

NATALIA PHILADELPHO AZEVEDO

**Detecção de Bornavírus, Poliomavírus e Circovírus em
amostras biológicas, utilizando PCR e RT-PCR, de psitacídeos
com diferentes aspectos clínicos**



**São Paulo
2014**

NATALIA PHILADELPHO AZEVEDO

Deteccção de Bornavírus, Poliomavírus e Circovírus em amostras biológicas, utilizando PCR e RT-PCR, de psitacídeos com diferentes aspectos clínicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Pr. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2968
FMVZ

Azevedo, Natalia Philadelpho
Detecção de Bornavírus, Poliomavírus e Circovírus em amostras biológicas, utilizando
PCR e RT-PCR, de psitacídeos com diferentes aspectos clínicos / Natalia Philadelpho
Azevedo. -- 2014.
94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. APV. 2. BFDV. 3. ABV. 4. Vírus. 5. Papagaio. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção de Bornavírus, Poliomavírus e Circovírus em amostras biológicas, utilizando PCR e RT-PCR, de psitacídeos com diferentes aspectos clínicos", protocolado sob o nº 2684/2012, utilizando 100 (cem) psitacídeos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/9/2012.

We certify that the Research "Detection of Bornavirus, Polyomavirus and Circovirus in biological samples, using PCR and RT-PCR technique, from psittacine birds with different clinical manifestations", protocol number 2684/2012, utilizing 100 (one hundred) psittacine, under the responsibility Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/19/2012.

São Paulo, 29 de abril de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: AZEVEDO, Natalia Philadelpho

Título: Detecção de Bornavírus, Poliomavírus e Circovírus em amostras biológicas, utilizando PCR e RT-PCR, de psitacídeos com diferentes aspectos clínicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

AMIZADE

“Mais que uma mão estendida
mais que um belo sorriso
mais do que a alegria de dividir
mais do que sonhar os mesmos sonhos
ou doer as mesmas dores
muito mais do que o silêncio que fala
ou da voz que cala, para ouvir
é, a amizade, o alimento
que nos sacia a alma
e nos é ofertado por alguém
que crê em nós.”

Autor desconhecido

Primeiramente agradeço a meus pais, Maria de Jesus Garcia Philadelpho Azevedo e Philadelpho Azevedo Neto, e ao meu irmão Felipe Philadelpho Azevedo, por serem minha base e acreditarem em mim mesmo quando eu mesmo não acreditava. Sem vocês nada disso faria sentido.

A minha segunda família Luis Faria, Olga Penalva, Guilherme Penalva, Renata Penalva e Maria do Carmo. Por me acolherem, pelos conselhos, apoio, companhia para assistir seriados, pelas refeições deliciosas ... Não tenho palavras para minha gratidão.

A meus amigos de Viçosa que mesmos longe, estão sempre por perto: Mariana Herman, Simone Scarpin de Sá, Cecília Zarif, Cynthia Maximo, Aline Santana, Tássia Sell, Thiago Freitas, Guilherme Oliveira Silva, Monique Aline teles, Juliano Peixoto, Gabriel Thuler Costa, Raul Dornas, Angelina Freitas, Anna Carolina Frazão.

A meus amigos de longa data do Rio: Isabel Matos, Kati Pinto, Felipe Senra, Livia Torres e Mário Loureiro.

A minhas amigas Marta Brito Guimarães, Yamê Miniero Davies e Luciana Allegretti Frazão, pela amizade, almoços, projetos, discussões. Apoio fundamental durante esses anos.

Aos meus amigos Marcos P. V. Cunha, Gabriela Oliveira, Mirela Vilela, Dennis Zanatto, Claudia Carranza, Luis Nunes e Silvana Santander pelo companheirismo.

A Prof. Dr. Claudete S. A. Ferreira, por estar sempre presente no laboratório em prontidão para ajudar tanto nos projetos quanto nos problemas da vida.

A Elza Maria Rosa Bernardo Faquim, da Biblioteca da FMVZ-USP, pela paciência e agilidade.

A Prof. Dr. Terezinha Knobl pelo convívio e ajuda durante todo o mestrado

Aos membros da Banca Examinadora, por terem atendido ao convite e dispor de tempo e conhecimento para analisar este trabalho.

A todos que participaram direta ou indiretamente neste projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, por me orientar e me apoiar e pela sua disponibilidade.

A FMVZ USP e ao VPT por me darem essa oportunidade de enriquecer meu conhecimento.

A todas as aves, parte fundamental e objetivo maior deste projeto.

“Há pessoas que choram por saber que as rosas têm espinho. Há outras que sorriem por saber que os espinhos têm rosas!”

Machado de Assis

RESUMO

AZEVEDO, N. P. **Detecção de Bornavírus, Poliomavírus e Circovírus em amostras biológicas, utilizando PCR e RT-PCR, de psitacídeos com diferentes aspectos clínicos.** [Detection of Avian Bornavirus, Polyomavirus and Circovirus in biological samples, using PCR and RT-PCR technique, from psittacine bird with different clinical manifestation]. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Os vírus são patógenos importantes na saúde das aves, podendo levar a surtos que ameaçam de forma significativa a população destas. O Bornavírus aviário (ABV), o Circovírus (BFDV) e o Poliomavírus (APV) são os agentes virais mais comuns e que mais ameaçam os psitacídeos de cativeiro. O ABV é responsável pela doença da dilatação proventricular (PDD) em psitacídeos e outras aves, uma doença neurológica letal, que foi descoberta no início da década de oitenta na Europa e América do Norte. A primeira infecção por APV descrita em aves foi em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) jovens, sendo depois associada com elevada mortalidade e morbidade em outros psitacídeos. O BFDV é o agente causador da doença do bico e das penas de psitacídeos, que ocorre quase exclusivamente em psitacídeos, principalmente em criatórios, aves em quarentena e lojas de animais. Foram testadas 120 amostras de psitacídeos de cativeiro no Brasil, para BFDV e APV e 112 amostras para ABV, resultando em 21 (17,5%) aves positivas para APV, 41 (34,17%) para BFDV e 32 (28,57 %) para ABV. Entre os animais positivos, quatorze apresentaram infecção concomitante, sete foram positivos para BFDV e ABV, seis positivos para BFDV e APV e uma positiva para BFDV, APV e ABV. Dentre os animais positivos para BFDV, os sinais clínicos mais comuns encontrados foram apteria e apatia/anorexia, em relação às aves positivas para APV foram a apatia/anorexia, enquanto para ABV os sinais neurológicos foram os mais representados. A detecção de APV, BFDV e ABV demonstra a ocorrência destes vírus testados em psitacídeos de cativeiro no Brasil, tanto em espécies exóticas como em espécies nativas.

Palavras-chave: APV. BFDV. ABV. Vírus. Papagaio.

ABSTRACT

AZEVEDO, N. P. **Detection of Avian Bornavirus, Polyomavirus and Circovirus in biological samples, using PCR and RT-PCR technique, from psittacine bird with different clinical manifestation.** [Detecção de Bornavírus, Poliomavírus e Circovírus em amostras biológicas, utilizando PCR e RT-PCR, de psitacídeos com diferentes aspectos clínicos]. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Viruses are important pathogens in avian health and may lead to outbreaks that threaten significantly the population of birds. The Avian Bornavírus (ABV), Circovirus (BFDV) and Avian Polyomavirus (APV) are the most common viral agents that threaten parrots in captivity. The ABV is responsible for the proventricular dilation (PDD) in parrots and other birds, a lethal neurological disease, which was discovered in the early eighties in Europe and North America the disease. The first APV infection in birds has been described in young Australian budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), after being associated with high mortality and morbidity in other parrots. The BFDV is the causative agent of Beak and Feathers Disease, which occurs almost exclusively in psittacines, especially in aviary, quarantine birds and pet stores. A total of 120 captivity parrots were tested in Brazil for BFDV and APV and 112 samples for ABV, resulting in 21 (17.5%) positives for APV, 41 (34.17%) for BFDV and 32 (28.57%) for ABV. Among the positive animals, fourteen had concomitant infection, six were positive for both APV and BFDV, seven for BFDV and ABV, and one sample was positive for BFDV, APV and ABV. Among BFDV positive animals, most common clinical signs were apteria and apathy/anorexia, for APV positive birds were apathy/anorexia, while for ABV were neurological signs were the most represented. The detection of APV, BFDV and ABV demonstrate the occurrence of all tested viruses in captive parrots in Brazil, including exotic and native species.

Keywords: APV. BFDV. ABV. Virus. Parrot.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema ilustrado do genoma do ABV, demonstrando suas unidades de transcrição.....	19
Figura 2 -	Radiografia de uma calopsita (<i>Nymphicus hollandicus</i>) apresentando dilatação proventricular.....	23
Figura 3 -	Fezes com sementes não digeridas.....	29
Figura 4 -	Periquito australiano (<i>M. undulatus</i>) apresentando <i>head tilt</i>	29
Figura 5 -	Calopsita (<i>N. hollandicus</i>) apática.....	30
Figura 6 -	Radiografia contrastada de um exemplar de <i>G. guarouba</i> apresentando dilatação proventricular.....	30
Figura 7 -	Radiografia simples de um exemplar de <i>N. hollandicus</i> apresentando dilatação de proventrículo.....	30
Figura 8 -	Proventrículo dilatado observado no exame macroscópico de necropsia de um exemplar de <i>A. aestiva</i>	30
Figura 9 -	Movimentação do Circovírus de psitacídeos obtido através de análise filogenética.....	46
Figura 10 -	Esquema do genoma do BFDV.....	47
Figura 11 -	Esquema da replicação “rolling circle”.....	48
Figura 12 -	<i>Cacatua alba</i> filhote apresentando retenção das bainhas das penas.....	50
Figura 13 -	Periquitos australianos filhotes de um mesmo criador durante um surto de BFDV.....	52
Figura 14 -	Papagaio verdadeiro (A) e Jandaia (B) apresentando apteria.....	64

Figura 15 -	Árvore filogenética para APV, construída utilizando o método <i>neighbor-joining</i> com repetição de 1000 bootstrap (utilizando o programa MEGA), baseada na proteína VP1, codificada pelo gene VP1	65
Figura 16 -	Árvore filogenética para BFDV, construída utilizando o método <i>neighbor-joining</i> com repetição de 1000 bootstrap (utilizando o programa MEGA), baseada na proteína Rep, codificada pelo ORF V1.....	66
Figura 17 -	Radiografia simples latero-lateral de <i>Amazona aestiva</i>	86
Quadro 1 -	Manifestação clínica de inclusão no trabalho.	25
Quadro 2 -	<i>Primers</i> selecionados para a identificação viral.....	27
Quadro 3 -	Distribuição de infecções concomitantes entre as espécies e os sinais clínicos apresentados.....	28
Quadro 4 -	Sinais clínicos para a inclusão no trabalho	58
Quadro 5 -	<i>Primers</i> selecionados para a detecção viral.....	60
Quadro 6 -	Distribuição de espécies infectadas por cada agente etiológico.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de espécies testadas para ABV.....	29
Tabela 2 - Incidência de BFDV e APV por espécie.....	62
Tabela 3 - Distribuição de amostras positivas de APV e BFDV em relação ao tipo de amostra coletada.....	63
Tabela 4 - Matriz de similaridade do APV baseado na tradução da proteína VP1 do gene ORF 1 das sequências NP1 e NP 94 e sequências de proteínas obtidas no GenBank.....	67
Tabela 5 - Matriz de similaridade do BFDV baseado na tradução da proteína Rep da ORF V1 das sequências NP 89 e NP 96 e sequências de proteínas obtidas no GenBank.....	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2	DETECÇÃO DE BORNAVIRUS EM PSITACÍDEOS DE CATIVEIRO NO BRASIL.....	16
2.1	INTRODUÇÃO.....	16
2.2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.2.1	Bornavírus aviário.....	17
2.2.1.1	Morfologia.....	18
2.2.1.2	Sinais Clínicos.....	19
2.2.1.3	Animais Susceptíveis.....	20
2.2.1.4	Patogenia.....	22
2.2.1.5	Diagnóstico.....	22
2.2.1.6	Tratamento.....	23
2.2.1.7	Zoonose.....	24
2.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.3.1	Coleta de Amostras.....	25
2.3.2	Extração.....	26
2.3.3	RT-PCR.....	26
2.3.4	Outros agentes.....	27
2.4	RESULTADOS.....	27
2.5	DISCUSSÃO.....	30
2.6	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS.....	36
3	DETECÇÃO DE POLIOMAVÍRUS E CIRCOVÍRUS EM PSITACÍDEOS DE CATIVEIRO DO ESTADO DE SÃO PAULO.....	44
3.1	INTRODUÇÃO.....	44
3.2	REVISÃO DE LITERATURA.....	45
3.2.1	Circovírus – vírus da doença do bico e das penas (BFDV).....	45
3.2.1.1	Morfologia.....	46
3.2.1.2	Patogenia.....	48
3.2.1.3	Sinais clínicos.....	49
3.2.1.4	Diagnóstico.....	52

3.2.1.5	Tratamento.....	53
3.3.2	Poliomavírus	53
3.3.2.1	Morfologia.....	55
3.3.2.2	Patogenia.....	54
3.3.2.2	Sinais clínicos.....	55
3.3.2.4	Diagnóstico.....	57
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.4.1	Coleta de amostras	57
3.4.2	Extração	58
3.4.3	PCR	59
3.4.4	Purificação e Sequenciamento	60
3.4.5	Outros agentes virais	61
3.4.6	Resultados	61
3.4.7	Sequenciamento	64
3.5	DISCUSSÃO.....	70
3.6	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS	76
4	POLIOMAVÍRUS ASSOCIADO À ANEMIA SEVERA EM PAPAGAIO VERDADEIRO (<i>Amazona aestiva</i>): RELATO DE CASO	83
4.1	INTRODUÇÃO.....	83
4.2	REVISÃO DE LITERATURA.....	84
4.2.1	Poliomavírus em <i>Amazona sp.</i>	84
4.3	CASO CLÍNICO.....	85
4.4	DISCUSSÃO.....	87
4.5	CONCLUSÃO.....	90
	REFERÊNCIAS	91
5	CONSIDERAÇÕES GERAIS	94

1 INTRODUÇÃO GERAL

A interação entre humanos e aves é antiga. Nos tempos medievais, falcões eram considerados símbolo de *status*, utilizados para recreação e caça. No século XVIII, os primeiros grandes aviários foram criados e com o colonialismo, o comércio e movimentação de aves tornou-se mais importante. Atualmente, a relação homem-ave é mais ampla e complexa. Atividades relacionadas à observação, fotografia de aves de vida livre, caça, falcoaria, assim como avicultura e aves pet demonstram o desejo de interação do ser humano com esses animais. Dentre as diversas espécies de aves, os psitacídeos são os mais populares em cativeiro devido às cores atraentes, inteligência e capacidade de interação.

Nos dias atuais, doenças infecciosas - em especial as doenças virais - são consideradas de grande importância na sanidade de psitacídeos em cativeiro, por estarem associados a morte súbita, dificuldade no tratamento e no controle da doença. Infecções latentes, persistentes e assintomáticas complicam ainda mais o controle destas doenças e facilitam a disseminação das mesmas. A apresentação da doença clínica que se desenvolve em um hospedeiro é dependente da idade, condição corpórea, estado do sistema imunológico, além da presença de infecção concomitante com outros agentes e presença de doença subclínica, dificultando a identificação do agente. Com a ampliação da movimentação mundial de aves, a possibilidade de transferência de agentes etiológicos virais se torna cada vez mais importantes, tornando-se uma ameaça significativa para a população de aves.

O Bornavírus Aviário, Poliomavírus e Circovírus são considerados os agentes etiológicos virais mais importantes para psitacídeos de cativeiro, sendo descritos casos em todo o mundo em animais de cativeiro e de vida livre. Apesar do aumento do conhecimento sobre as doenças virais em aves, ainda há informações críticas que precisam ser estudadas, principalmente sobre a presença destes agentes e sua apresentação no Brasil, já que existem poucos estudos com este enfoque no país.

2 DETECÇÃO DE BORNAVIRUS EM PSITACÍDEOS DE CATIVEIRO NO BRASIL

2.1 INTRODUÇÃO

O Bornavirus aviário (ABV) é um vírus RNA de fita simples e polaridade negativa, envelopado, pertencente à família Bornaviridae (KISTLER et al., 2008). O ABV é responsável pela doença da dilatação proventricular (PDD) em psitacídeos e outras aves, uma doença neurológica fatal que foi descoberta no início dos anos 80 na Europa e na América do Norte (HONKAVUORI et al., 2008). No entanto, apenas em 2008, o ABV foi confirmado como agente etiológico da doença (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008). São conhecidos sete genótipos do ABV em psitacídeos, designados de ABV 1 a 7 (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008; WEISSENBOCK et al., 2009a; RUBBENSTROTH et al., 2012), e seis (6) genótipos adicionais foram detectados em passeriformes e aves aquáticas selvagens (WEISSENBOCK et al., 2009a; PAYNE et al., 2011a; RUBBENSTROTH et al., 2013). A variabilidade genética, bem como a presença potencial de genótipos até agora não identificados, é um grande desafio para o diagnóstico do vírus, que é baseada na transcriptase reversa da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008).

Nas aves, a infecção por ABV afeta os nervos autônomos, causando infiltrações linfoplasmocíticas, principalmente nos gânglios do sistema nervoso periférico e central (GREGORY et al., 1994). Desta forma, os sinais clínicos podem variar de gastrointestinais a neurológicos. Os sinais neurológicos mais comuns são depressão, convulsões, ataxia e incoordenação (BERHANE et al., 2010), e os gastrointestinais mais comuns são a dilatação de proventrículo, regurgitação, anorexia e presença de sementes não digeridas nas fezes (MURPHY et al., 1999; VILLANUEVA et al., 2010). Os sinais gastrointestinais e neurológicos podem ocorrer concomitantemente (STAEHEL; RINDER; KASPERS, 2010).

O objetivo deste estudo foi detectar, utilizando RT-PCR em amostras biológicas, o Bornavírus aviário em psitacídeos do Brasil.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2.1 **Bornavírus aviário**

No século XVIII foi descrita na Alemanha uma doença neurológica em equinos, cujos sinais clínicos incluíam ataxia, tremores musculares, paresia dos membros pélvicos e distúrbios na deglutição, levando a perda de muitos animais (MURPHY et al., 1999). Surto com sintomatologia semelhante foram descritos também em ovinos (LIPKIN; BRIESE; HORNIG, 2011), todos ocorreram nos arredores da cidade alemã de Borna, ficando então conhecida como doença de Borna (BD). Durante anos o agente etiológico permaneceu desconhecido, sendo descoberto apenas no final do século XIX por Murphy et al. (1999), que descreveram um vírus em mosaico de tabaco, denominado vírus da doença de Borna (BVD).

A doença de Borna, contudo, não ficou restrita apenas a mamíferos, sendo descrito em 1993, um surto em Israel, de uma doença neurológica em avestruz identificado como BD através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Berg et al. (2001) sugeriram que as aves migratórias poderiam ser a fonte de infecção entre mamíferos e aves. A hipótese, apesar de ainda não ter sido comprovada, se baseou em infecções experimentais em galinhas com material de mamíferos infectados com BD (LUDWIG; BECHT; GROH, 1973).

Em 2008, dois grupos distintos de pesquisadores descreveram um novo Bornavírus, denominado Bornavírus Aviário (ABV), sendo sugerido como o agente etiológico causador da Doença da Dilatação Proventricular (PDD) (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008). Infecções experimentais em várias espécies de psitacídeos confirmaram esta suposição (GANCZ et al., 2009; GRAY et al., 2010; HOPPES et al., 2010).

A PDD é considerada uma das maiores ameaças à criação de psitacídeos no mundo (KISTLER et al., 2008). A doença, descrita pela primeira vez nos Estados Unidos, na década de 70 em araras importadas da Bolívia, foi posteriormente documentada em mais de 50 espécies de psitacídeos (KISTLER et al., 2008; MIRHOSSEINI et al., 2011, 2012; PAYNE et al., 2011a; RUBBENSTROTH et al.,

2012; HOPPES; TIZARD; SHIVAPRASAD, 2013), incluindo aves em risco de extinção, como a ararinha azul (*Cyanopsitta spixii*) (DEB et al., 2008) e em pelo menos outras cinco ordens de aves (KISTLER et al., 2008; WEISSENBOCK et al., 2009a; PAYNE et al., 2011a). A doença já foi descrita na Ásia (HORIE et al., 2012), Oceania (SULLIVAN et al., 1997), Europa (STAEHELI; RINDER; KASPERS, 2010; RUBBENSTROTH et al., 2012, 2013;), África (LAST et al., 2012) e América (HOPPES et al., 2010; KISTLER et al., 2010; MONACO et al., 2012), entretanto, há apenas duas publicações no Brasil (MARIETTO-GONÇALVES et al., 2009; DONATTI et al., 2013).

2.2.1.1 Morfologia

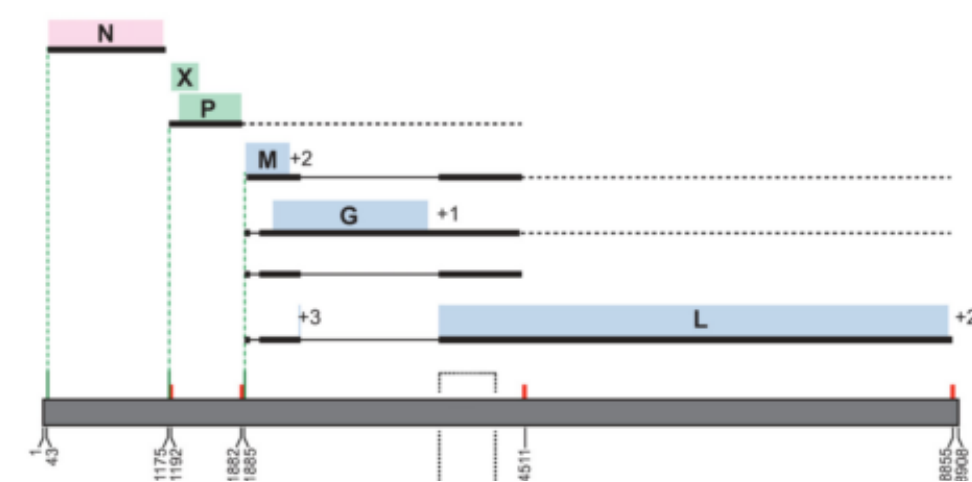
O ABV, pertence à família Bornaviridae, da ordem Mononegavirales. É um vírus RNA de fita simples, com polaridade negativa, envelopado, possuindo tamanho aproximado de 8.900 nucleotídeos (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008).

O genoma do ABV, assim como, do BVD, possui seis unidades de transcrição: nucleoproteína (N), proteína reguladora (X), cofator de polimerase (P), proteína da matriz (M), glicoproteína (G) e polimerase (L) (Figura 1). As proteínas X e P são sintetizadas por uma sobreposição de fases de leitura aberta de um único RNA mensageiro (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008; STAEHELI; RINDER; KASPERS, 2010). A nucleoproteína interage com o RNA viral e se acumula no núcleo durante o ciclo viral. Segundo Gray et al. (2010), a proteína N existe em duas formas isogênicas, de 40 e 38 KDa, sendo a primeira nuclear e a segunda citoplasmática, porém ambas as formas conseguem se ligar a proteína P. Por meio da técnica de obtenção de vírus recombinantes houve a confirmação de que as proteínas N, P e L são suficientes para a transcrição e replicação do genoma do BVD (LIPKIN; BRIESE; HORNIE, 2011).

Considerando os genótipos deste vírus, até o momento são conhecidos sete genótipos ocorrendo em psitacídeos, ABV 1-5 (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008), ABV-6 (WEISSENBOCK et al., 2009a) e ABV-7 (DELNATTE et al., 2011). Dentre estes genótipos, o ABV 4 é o mais disseminado

(WEISSENBOÖCK et al., 2009a; GRAY et al., 2010; HOPPEs et al., 2010; PAYNE et al., 2011b). Foram identificados também um genótipo em ganso canadense (*Branta canadense*) ABV-CG (PAYNE et al., 2011a), sendo o primeiro ABV descoberto em aves silvestres, três genótipos em canários (*Serinus canaria*) ABV-C1, ABV-C2 e ABV-C3 (RUBBENSTROTH et al., 2012, 2013), um genótipo em manon (*Lonchura striata*) ABV-EF (RUBBENSTROTH et al., 2014) e um pertencente a família Estrildidae, denominado ABV-LS (WEISSENBOÖCK et al., 2009b).

Figura 1 - Esquema ilustrado do genoma do ABV, demonstrando suas unidades de transcrição



Fonte: Adaptado de Kistler et al. (2008).

2.2.1.2 Sinais Clínicos

O ABV afeta principalmente psitacídeos, sendo caracterizada por uma ganglioneurite não supurativa dos nervos do plexo presentes no ingluvío, ventrículo e duodeno; podendo estar acompanhada de encefalomielite não supurativa (WEISSENBOÖCK et al., 2009b). Ocorre infiltração linfoplasmática, principalmente no gânglio do sistema nervoso central. Essas infiltrações levam a anormalidades do sistema nervoso central, causando ataxia, andar anormal, propriocepção diminuída e disfunção no trato gastrointestinal como disfagia, regurgitação, dilatação proventricular e a presença de alimentos não digeridos para as fezes (MANNL; GERLACH; LEIPOLD, 1986; KISTLER et al., 2008; GANCZ et al., 2009). Outros sinais descritos são: convulsão, fraqueza, cegueira e perda de peso (PAYNE et al.,

2012). A dilatação proventricular, sinal clínico que identifica a doença, esta presente em 70% dos casos (GANCZ; CLUBB; SHIVAPRASAD, 2010), onde se observa acúmulo de sementes não digeridas e parede do proventrículo extremamente delgada, com possibilidade de rompimento (STAEHELI; RINDER; KASPERS, 2010). A automutilação foi observada por Gancz et al. (2009) e Horie et al. (2012).

As lesões microscópicas podem ser encontradas em diversos órgãos, incluindo trato gastrointestinal, sistema nervoso central, periférico ou autônomo, coração e glândula adrenal. Lesões em ventrículo e proventrículo são as mais comumente encontradas, seguidas de lesões na glândula adrenal, coração e cérebro (GANCZ; CLUBB; SHIVAPRASAD, 2010).

2.2.1.3 Animais Susceptíveis

Psitacídeos

Os psitacídeos são os principais hospedeiros da doença, inicialmente chamada de doença do emagrecimento das araras. Atualmente, mais de 50 espécies de psitacídeos foram diagnosticadas com a doença, incluindo espécies em risco de extinção, como a ararinha azul (DEB et al., 2008; KISTLER et al., 2008; PAYNE et al., 2011a; MIRHOSSEINI et al., 2011, 2012; RUBBENSTROTH et al., 2012). Animais assintomáticos são comumente encontrados, sendo estes importantes disseminadores da doença, pois podem eliminar o vírus de forma intermitente por anos (VILLANUEVA et al., 2010; PAYNE et al., 2012).

Passeriformes

Até o presente momento, dentre a ordem Passeriformes, apenas os canários (*Serinus canaria*) foram diagnosticados com PDD. Os sinais clínicos, são idênticos aos sintomas de PDD em psitacídeos, como sinais neurológicos, dilatação

de proventrículo e a presença de sementes não digeridas nas fezes (WEISSENBOCK et al., 2009b). Rubbenstroth et al. (2013) pesquisaram ABV em criatórios na Alemanha e encontraram 40% das aves positivas, demonstrando a prevalência da infecção em canários em cativeiro. Apesar de o vírus ainda não ter sido detectado em outros Passeriformes, a presença deste em canários com sintomatologia sugere que todas as aves possam ser susceptíveis a doença (PAYNE et al., 2012).

Anseriformes

Daoust et al. (1991) identificaram a presença de dilatação proventricular associada à encefalomielite não supurativa em gansos canadenses (*Branta canadenses*). No entanto, a confirmação ocorreu após o sequenciamento do genoma completo e a identificação de um novo genótipo (DAOUST et al., 1991; DELNATTE et al., 2011; PAYNE et al., 2011a). Em estudos subsequentes desenvolvidos por Delnatte et al. (2013) em duas espécies de cisnes (*Cygnus buccinator* e *Cygnus olor*) com sinais clínicos, utilizando imunohistoquímica e RT-PCR, detectaram a presença de animais positivos, demonstrando a susceptibilidade destas espécies a PDD.

Aves de rapina

Payne et al. (2012) identificaram a doença em um indivíduo de águia careca (*Haliaeetus leucocephalus*), cuja infecção possivelmente ocorreu devido ao tipo de alimentação, ou seja, pequenos mamíferos e aves. Desta forma, a transmissão do ABV para as aves de rapina se deve, provavelmente ao contato com aves portadoras ou infectadas (PAYNE et al., 2012).

2.2.1.4 Patogenia

A patogenia da doença não foi totalmente elucidada (PAYNE et al., 2011b). Acredita-se que seja por via oral, com a eliminação do vírus pelas fezes. Hoppes et al. (2010) descreveram que a via respiratória também pode ser uma via de infecção. Como o período de incubação é variável, muitas vezes torna-se difícil identificar o indivíduo contaminante (GANCZ; CLUBB; SHIVAPRASAD, 2010). A transmissão vertical já foi comprovada, identificando o agente em ovos, embriões e filhotes recém-nascidos (LIERZ et al., 2011; KERSKI et al., 2012; MONACO et al., 2012). A transmissão vertical pode causar uma tolerância imunológica e tornar os sobreviventes portadores assintomáticos (MONACO et al., 2012), favorecendo a disseminação do agente (HOPPE et al., 2010).

2.2.1.5 Diagnóstico

Um diagnóstico presuntivo pode ser obtido por meio de histórico e sinais clínicos, estudos de imagem e exames laboratoriais (biologia molecular, biópsia etc) (HONKAVUORI et al., 2008). Durante anos, o diagnóstico foi baseado em radiografias simples e contrastadas pela presença de dilatação proventricular (Figura 2) e biópsia de ingluvie (presença de infiltração linfocítica), porém existe uma elevada possibilidade de falso-positivo ou falso-negativo (GANCZ; CLUBB; SHIVAPRASAD, 2010; DORRESTEIN et al., 2010).

Com a identificação do agente etiológico, foram desenvolvidas novas técnicas para o diagnóstico da doença. O RT-PCR e RT-PCR em tempo real são as técnicas mais utilizadas atualmente. As amostras indicadas para estes procedimentos são fezes, suabe de cloaca, penas e fragmentos de órgãos (proventrículo, ventrículo, adrenal, cérebro e olhos) (GANCZ et al., 2009; OUYANG et al., 2009; KELLER et al., 2010; LIERZ et al., 2011; SASSA et al., 2013). Outras técnicas de diagnóstico como a imunohistoquímica, ELISA e *western blot* são amplamente empregadas em estudos científicos (WENSMAN et al., 2007;

DORRESTEIN et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2010; WÜNSCHMANN et al., 2011).

Figura 2 - Radiografia de uma calopsita (*Nymphicus hollandicus*) apresentando dilatação proventricular



Fonte: (AZEVEDO, N. P., 2012).

O período de incubação varia de 11 dias a anos, com um período médio de 30 dias (GANCZ; CLUBB; SHIVAPRASAD, 2010). Devido à eliminação intermitente do agente, resultados negativos não indicam indivíduos isentos do vírus. Essa característica se torna muito importante principalmente em criatórios onde há a presença de vários indivíduos ocupando um mesmo espaço e com elevada rotatividade de aves, facilitando a disseminação da doença.

2.2.1.6 Tratamento

Devido a natureza inflamatória do agente, quase todos os tratamentos preconizados até hoje se baseiam em substâncias antiinflamatórias não esteroidais (AINE). O meloxicam se mostrou ineficaz em um estudo realizado por Hoppes et al. (2013) onde os animais que vieram a óbito foram os tratados, e os controles positivos e negativos permaneceram saudáveis. O Celecoxibe, um potente inibidor seletivo da COX-2 pertencente à nova família dos AINE, foi considerado eficaz em

alguns casos tornando-se uma das melhores opções de tratamento da PDD (DAHLHAUSEN; ALDRED; COLAIZZI, 2002). Entretanto, o tratamento é demorado, variando de duas semanas a seis meses (POLLOCK; CARPENTER; ANTINOFF, 2010).

O sulfato de amantadina foi utilizado no tratamento de BVD, sendo indicado também no tratamento de PDD quando há presença de quadro neurológico (GANCZ; CLUBB; SHIVAPRASAD, 2010). A associação de amantadina e celecoxibe é indicada e raramente causa efeitos colaterais (GANCZ; CLUBB; SHIVAPRASAD, 2010). O interferon alfa também pode ser utilizado em aves (POLLOCK; CARPENTER; ANTINOFF, 2010). O tratamento sintomático com antibióticos terapia para a prevenção de infecções secundárias, metoclopramida para melhorar a motilidade do trato gastrointestinal, fluidoterapia e alimentação forçada, podem ser utilizados (GANCZ; CLUBB; SHIVAPRASAD, 2010).

2.2.1.7 Zoonose

Após a inoculação do BVD em ratos, foram observados sinais clínicos semelhantes a doenças psiquiátricas como a esquizofrenia (WALTRIP et al., 1995). Devido a grande variedade de hospedeiros infectados experimentalmente, incluindo primatas, levantou-se a hipótese de o ser humano também ser susceptível ao vírus (WALTRIP et al., 1995). Alguns estudos observaram o aumento da prevalência de anticorpos contra o BVD em pacientes psiquiátricos (LIPKIN; SCHNEEMANN; SOLBRIG, 1995), enquanto outros estudo relataram a ausência do agente (HORNIG et al., 2012). Com a descoberta do ABV infectando diferentes espécies aviárias, esta premissa reforçou a hipótese dos humanos serem susceptíveis ao agente (KINNUNEN et al., 2013).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Coleta de Amostras

Foram coletadas amostras de fezes, sangue, suabe cloacal e/ou penas de psitacídeos com sinais clínicos compatíveis com Bornavírus (Quadro 1). As amostras foram obtidas no Ambulatório de Aves da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, de criadouros de aves (Estado do Rio de Janeiro e São Paulo) e de clínicas veterinárias em São Paulo.

As fezes foram obtidas do fundo de gaiolas de aves, previamente forradas com papel alumínio. As amostras foram armazenadas em um tubo com meio de conservação contendo tampão fosfato salino 0,1M, pH 7,4 (PBS 0,1M, pH 7,4), antibiótico (16mg/mL) e antifúngico (2mg/mL), mantida a -80°C até o procedimento de extração de material genético.

Para a coleta de suabe cloacal, a ave foi contida de acordo com a semiologia da espécie. Foi utilizado um suabe umedecido em meio de conservação, sem que este tocasse na parte externa da cloaca. Foram armazenados em tubo estéril com meio de conservação, em freezer -80°C até o processamento das amostras.

O sangue foi coletado em papel filtro FTA (Whatman International Ltd., GE Healthcare, Reino Unido). A contenção foi executada de forma adequada às espécies em questão, armazenada em freezer -80°C até o processamento das amostras.

Quadro 1 - Manifestação clínica de inclusão no trabalho

Bornavírus	
Automutilação	Óbito súbito
Sinais Neurológicos	Apatia
Fezes com presença de alimento não digerido	Anorexia
Regurgitação	Dilatação Proventricular
Alteração em pena	

2.3.2 Extração

Inicialmente se realizou a suspensão das amostras seguida da extração de RNA. A suspensão ocorreu de seguinte forma: as amostras foram congeladas a -80°C por dez minutos, então descongeladas por um minuto em banho-Maria a 56°C , foram homogenizadas com o uso do *vortex* por 20 segundos. Esses procedimentos foram repetidos três vezes, para então serem centrifugadas a $12.000\times g$ durante 30 minutos. Seguiu-se então a extração de RNA.

O método GIT modificado foi utilizado para a extração de RNA. Em um microtubo foram adicionados 500 μL de GIT, 250 μL de suspensão da amostra, 500 μL de fenol (pH4), 50 μL de acetato de sódio 2M, pH4 e 4 μL de Beta-mercaptoetanol. A amostra foi agitada com o uso do *vortex* e mantidas em temperatura ambiente por cinco minutos. Após o repouso, 250 μL de clorofórmio foram adicionados. A amostra foram homogeneizada com o uso do *vortex*, mantidos a 4°C por 15 minutos e centrifugados a $12.000\times g$ por 20 minutos. Em novo microtubo, uma alíquota de 750 μL de isopropanolol e 700 μL do sobrenadante do microtubo anterior foi pipetado. Estes foram incubados a -20°C por 20 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada a $12.000\times g$ durante 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado com 1mL de etanol 75%. A amostra foi centrifugada $12.000\times g$ por 10 minutos, desprezando novamente o sobrenadante novamente desprezado e o *pellet* diluído com 20 microlitros de água DPEC. O microtubo foi colocado em placas a 56°C por 10 minutos. Após esse procedimento, a amostra com o material genético extraído foi armazenada a -20 graus Celsius até o processamento.

2.3.3 RT-PCR

Os *primers* utilizados se encontram no quadro 2, selecionados por amplificarem uma região conservada do RNA, reduzindo assim a chance de reação falso-negativo (KERSKI et al., 2012). Foi utilizado o *kit* OneStep (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante, com a temperatura de hibridização de 50°C .

Quadro 2 - *Primers* selecionados para a identificação viral

Região Codificada (nome do primer)	<i>Primer</i>	Tamanho do Fragmento	Referência
M (Mcom) F	5'CAAGGTAATYGTTCCTGGATGG3'	352 pb	KISTLER et al., 2008
M (Mcom) R	5'ACCAATGTTCCGAAGMCGAWAY3'	352 pb	KISTLER et al., 2008
N (Ncom) F	5'CATGAGGCTATWGATTGGATTA3'	352 pb	WEISSENBOCK et al., 2009a
N (Ncom) R	5'GGCAYCAYCKACTCTTRAYYGTRT CAGC3'	352 pb	WEISSENBOCK et al., 2009a

2.3.3 Outros agentes virais

Algumas amostras também foram testadas para Poliomavírus (APV) e Circovírus (BFDV), utilizando o método GT modificado foi utilizado para a extração de DNA. Para BFDV foram utilizados os primers descritos por Ypelaar et al. (1999) e para APV Bert et al. (2005), seguindo o protocolo de PCR descrito pelos mesmos autores.

2.4 RESULTADOS

Foram coletadas amostras de 112 psitacídeos, distribuídas em 23 espécies. No total, 32 (28,57%) aves foram positivas para ABV em pelo menos uma das amostras examinadas como fezes, penas e/ou sangue. A distribuição por espécie esta apresentada na tabela 1.

Todas as amostras foram examinadas quanto à presença de ABV utilizando RT-PCR para os dois genes: Ncom e Mcom (WEISSENBOCK et al., 2009a). De 32 amostras positivas para Ncom, 27 (84,38%) foram também positivas para Mcom. Nenhuma amostra foi positiva para Mcom e negativa para Ncom.

O gene Ncom resultou na detecção de ABV em todas as 32 (28,57%) aves positivas, enquanto o ensaio Mcom foi menos sensível com apenas 19 aves positivas (16,96%).

Os sinais clínicos observados foram sinais neurológicos (21/32, 65,63%), sementes não digeridas nas fezes (7/32, 21,88%), dilatação proventricular (4/32, 12,5%), apatia (6/32, 18,75%), êmese (4/32, 12,5%), alteração em pena (3/32, 9,375%) e morte súbita (3/32, 9,375%) (Figuras 3 a 8).

Dependendo da aprovação do proprietário, diferentes tipos de amostras foram coletadas de uma mesma ave, ou seja, entre elas amostras fecais (n=72), penas (n=45), suabe de cloaca (n=17), sangue (n=6) e amostras de órgãos (n=8). Dentre as amostras analisadas, foram obtidas 14 positivas (31,12%) em penas, 11 (15,28%) em fezes e nove (52,94%) em suabe de cloaca. Nenhuma amostra de sangue foi positiva.

Foram encontrados sete indivíduos com infecção concomitante com Circovírus e Bornavírus e um animal com infecção concomitante com Circovírus, Bornavírus e Poliomavírus (Quadro 3).

Quadro 3 - Distribuição de infecções concomitantes entre as espécies e os sinais clínicos apresentados

Circovirus e Bornavírus		Circovirus, Poliomavírus e Bornavírus	
Espécie	Sinal clínico	Espécie	Sinal clínico
<i>Amazona aestiva</i> (n=6)	Tremor (n=5) Incoordenação* (n=3)	<i>Psittacus erithacus</i> (n=1)	Lesão necrosante em pele (n=1)
<i>Nymphicus hollandicus</i> (n=1)	Emese (n=1)		
7 animais		1 animal	

*Duas aves apresentaram sinal concomitante de incoordenação e tremor

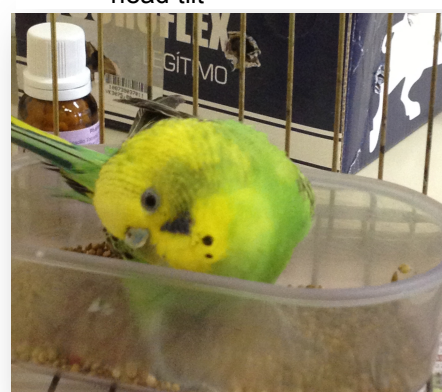
Tabela 1 - Distribuição de espécies testadas para ABV

Espécie	Número de animais testados	Positivos para ABV
<i>Amazona aestiva</i>	43	22
<i>Aratinga jandaya</i>	2	0
<i>Ara ararauna</i>	3	0
<i>Amazona aestiva</i>	43	22
<i>Aratinga jandaya</i>	2	0
<i>Ara ararauna</i>	3	0
<i>Triclaria malachitacea</i>	1	0
<i>Aprosmictus erythropterus</i>	1	0
<i>Platycercus icterotis</i>	4	0
<i>Psephotus haematonotus</i>	4	0
<i>Neophema bourkii</i>	1	0
<i>Barnardius zonarius</i>	2	1
<i>Forpus coelestis</i>	1	0
<i>Platycercus eximius</i>	2	0
<i>Alisterus scapularis</i>	1	0
<i>Neophema splendida</i>	2	0
<i>Nymphicus hollandicus</i>	15	3
<i>Psittacus erithacus</i>	3	1
<i>Amazona amazonica</i>	1	1
<i>Melopsittacus undulatus</i>	14	0
<i>Aratinga leucophthalmus</i>	1	0
<i>Eclectus roratus</i>	1	0
<i>Agapornis personatus</i>	3	0
<i>Guarouba guarouba</i>	4	2
<i>Pyrrhura frontalis</i>	1	0
<i>Cacatua alba</i>	2	2
Total (%)	112	32

Figura 3 - Fezes com sementes não digeridas



Fonte: (AZEVEDO, N. P., 2012).

Figura 4 - Periquito australiano (*M. undulatus*) apresentando head tilt

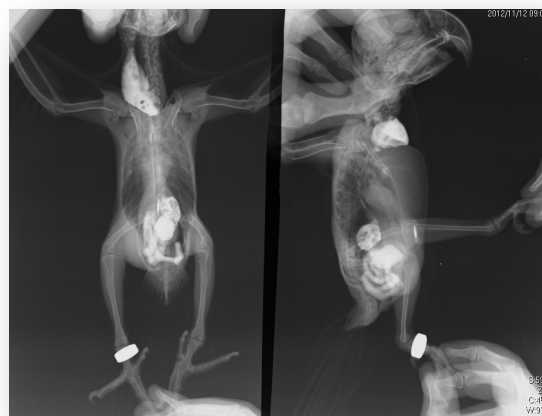
Fonte: (AZEVEDO, N. P., 2013).

Figura 5 - Calopsita (*N. hollandicus*) apática



Fonte: (AZEVEDO, N. P., 2012).

Figura 6 - Radiografia contrastada de um exemplar de *G. guarouba* apresentando dilatação proventricular



Fonte: (AZEVEDO, N. P., 2012).

Figura 7 Radiografia simples de um exemplar de *N. hollandicus* apresentando dilatação de proventrículo



Fonte: (AZEVEDO, N. P., 2013).

Figura 8 Proventrículo dilatado observado no exame macroscópico de necropsia de um exemplar de *A. aestiva*



Fonte: (AZEVEDO, N. P., 2012).

2.5 DISCUSSÃO

A PDD é reconhecida pela Sociedade Internacional de Avicultura (IAS) como uma doença extremamente perigosa, se não a mais ameaçadora para os psitacídeos (KISTLER et al., 2008; KISTLER et al., 2009). Esta pesquisa descreveu a ocorrência da doença no Brasil e as manifestações clínicas apresentadas.

De 112 aves examinadas, 32 (28,57%) foram positivas para ABV. Este resultado mostra que este vírus está presente de forma significativa entre as aves que se encontram em cativeiro e a importância das investigações científicas com este agente, principalmente devido a existência de apenas dois artigos descrevendo a presença de infecções de PDD e ABV no Brasil (MARIETTO-GONÇALVES et al., 2009; DONATTI et al., 2013). A possibilidade de aves saudáveis estarem disseminando o vírus é preocupante, uma vez que não há legislação sobre o controle deste patógeno no país, especialmente no que diz respeito às importações de aves. Kloet e Dorrestein (2009) elaboraram uma pesquisa em psitacídeos de cativeiro assintomáticos detectando aves positivas. De acordo com Heffels - Redmann et al. (2011), 19% dos psitacídeos aparentemente saudáveis na Europa foram positivos para ABV.

Considerando a eficácia dos ensaios de RT-PCR utilizados, o ensaio de RT-PCR com a sequência de *primers* Ncom, apresentou um resultado mais consistente em comparação com a sequência do gene M, *primers* Mcom. A sequência (Mcom) do gene M apresentou cinco resultados falso-negativos. Estes dados corroboram Weissenbock et al. (2009a), que encontraram uma positividade maior dos *primers* Ncom, do que com a sequência dos *primers* Mcom. Em contraste, Kloet, Kersi e Kloet (2011) descreveram o gene M como sendo mais confiável quando comparado ao gene Ncom, especialmente em amostras com excesso de material genético. Rubbenstroth et al. (2013) demonstraram que a sensibilidade dos diferentes ensaios de RT - PCR poderiam variar consideravelmente entre os diferentes genótipos de Bornavírus. Considerando os resultados divergentes, ensaios destinados a diferentes genes devem ser utilizados para as amostras de triagem, a fim de evitar resultados falsos negativos, especialmente considerando a existência de genótipos desconhecidos.

O ABV é eliminado por secreções, assim, fezes, urina e penas (que recebem lubrificante da glândula uropigial) são possíveis fontes de infecção, embora a eliminação viral seja intermitente. Com o objetivo de evitar resultados falso-negativos, amostras de fezes, suabe de cloaca, penas, sangue e/ou órgãos foram analisadas de acordo com a aprovação do proprietário. Fezes e penas foram as amostras mais aceitáveis pelos proprietários, devido ao pouco estresse e dor provocado durante a coleta. Todas as amostras de sangue foram negativas para

ABV, não sendo portanto adequada para o diagnóstico deste vírus, corroborando os resultados encontrados na literatura (GANCZ et al., 2009; DORRESTEIN et al., 2010; KLOET; KERSI; KLOET, 2011).

Apesar da ocorrência de dilatação proventricular ser considerada o sinal clínico mais importante da PDD (STAEHELI; RINDER; KASPERS, 2010), estes foram encontrados em apenas 12,5% (4/32) de animais positivos. Curiosamente, sinais neurológicos foram os mais comuns, perfazendo um total de 65,63% (21/32). Esses dados corroboram com Sassa et al. (2013), que encontraram sinais neurológicos mais frequentes em relação à dilatação de proventrículo, em um estudo realizado no Japão. De acordo com Kistler et al. (2010), animais jovens podem ser mais susceptíveis a ocorrência de sinais neurológicos. Devido a impossibilidade dos proprietários de informar a idade de seus animais, não foi possível comparar esta informação. A ausência de sinais clínicos clássicos dificulta o diagnóstico da doença no Brasil, e possivelmente esta seja a causa dos escassos relatos na literatura. E também devido ao custo elevado dos exames para se diagnosticar a doença.

Foram obtidos 9,38% (3/32) de aves com alteração em pena, sinal observado em uma infecção experimental por Gancz et al. (2009). Horie et al. (2012) encontraram amostras positivas em um *Electus roratus* apresentando automutilação. Um dos animais deste estudo que apresentava alteração em pena foi positivo também para Circovírus e Poliomavírus, logo os sinais clínicos encontrados provavelmente não estão relacionados exclusivamente a infecção pelo ABV. Entretanto, nos outros dois animais, ambos *Amazona aestiva*, as amostras foram positivas para ABV. Não é possível comprovar se as alterações em penas foram causadas pelo ABV, pois deve-se levar em consideração a possibilidade de falso negativo para os outros vírus testados (que comumente causam alteração em penas, porém são eliminados de forma intermitente), assim como os diversos fatores que podem levar a apteria e automutilação, como por exemplo uma deficiência nutricional, além da probabilidade de ambas as aves serem portadoras assintomáticas de ABV. Entretanto, se deve considerar a possibilidade de o ABV ser o causador destas alterações dessa forma, o clínico ao encontrar este sinal clínico deve incluir o ABV como um provável agente causador desta manifestação, além do APV e Circovírus,

Outro aspecto interessante encontrado neste estudo foi a infecção concomitante com Circovírus. Foram observados seis *Amazona aestiva* apresentando sinais neurológicos, como tremores e incoordenação motora e um *Nymphicus hollandicus* com sinais de regurgitação. Todas as aves foram positivas para Circovírus e Bornavírus. Como não existem relatos de Circovírus causando sinais neurológicos (LATIMER et al., 1996), estes sinais clínicos provavelmente são consequência da infecção por ABV. No caso do *N. hollandicus*, o sinal clínico – regurgitação – é inespecífico e compatível tanto para o diagnóstico de Circovírus quanto de Bornavírus, não sendo possível diferenciar qual é o agente causador deste sinais clínicos. É provável que os animais tenham sido contaminados com Circovírus, que causa imunossupressão facilitando a infecção com outros agentes virais. Não foi encontrada nenhuma ave com a associação de Poliomavírus e Bornavírus, sem a presença do Circovírus. Isto sugere que o Circovírus possa ser um agente primário importante para a infecção por outros patógenos. A imunossupressão ocasionada por Circovírus poderia também facilitar a multiplicação do ABV no sistema nervoso, levando a apresentação, ou a intensificação de sinais neurológicos. Esse é o primeiro relato de animais apresentando infecção concomitante com Bornavírus e outros vírus, como Circovírus e Poliomavírus.

Apenas um indivíduo foi positivo para Bornavírus, Circovírus e Poliomavírus. Um *Psittacus erithacus* fêmea de oito meses foi encaminhado ao Ambulatório de Aves apresentando dermatite gangrenosa embaixo das asas, apteria e apatia. A ave veio a óbito, no momento da necropsia foram obtidas amostras para a realização de PCR para os três agentes estudados (fígado, rim, baço, proventrículo e intestino). Os resultados foram positivos para os três vírus nos órgãos examinados. Ainda não se conhece qual das espécies de psitacídeos seja a mais susceptível ou a de menor suscetibilidade ao Bornavírus, entretanto, sabe-se que os papagaios do congo são frequentemente positivos para Circovírus (LATIMER et al., 1990, 1993; SCHOEMAKER et al., 2000; LEVINE; PRACTICE, 2003) porém a presença de Poliomavírus é rara nesta espécie (PHALEN, 1998, 2005). A relação entre esta infecção com três agentes virais pode estar relacionada a imunossupressão causada pelo Circovírus, já que além destes agentes, a ave apresentava também contaminação por *Clostridium* sp.. O agente etiológico associado aos sinais clínicos de apatia e anorexia não pôde ser determinado devido

a variedade de agentes infecciosos detectados, mas existe a possibilidade de o animal ser portador assintomático de Bornavírus e Poliomavírus.

Embora não seja possível saber como ocorreu a infecção das aves positivas identificadas neste estudo, algumas hipóteses podem ser estabelecidas com os dados obtidos. Acredita-se que a transmissão do ABV ocorra através das vias oral-fecal e respiratória, o que dificulta o seu controle em instalações com alta densidade populacional (HOPPES et al., 2010). Outro fator facilitador da transmissão é a presença de animais assintomáticos infectados com ABV, uma vez que podem excretar o vírus no ambiente sem serem detectados (KLOET; DORRESTEIN, 2009; LIERZ et al., 2009). Considerando-se que a maioria das amostras vieram de animais que foram capturados pelo comércio ilegal, uma possibilidade seria a de infecção destes animais em vida livre. Esta teoria é apoiada pelo fato de que a primeira descrição da doença ocorreu em aves exportadas da Bolívia, indicando a presença deste patógeno na América Latina, sendo recentemente confirmada em aves de cativeiro no Brasil (DONATTI et al., 2013). Outro fator que reforça esta teoria é a inexistência de legislação sobre o controle deste vírus no tráfego de aves, logo, um animal infectado pode facilmente entrar no país. Exemplo disso é a *Cacatua alba* positiva encontrada no presente trabalho. O animal foi importado da América do Norte, viajou entre os países pelo menos duas vezes e detectado o vírus três meses após a última viagem, havendo a possibilidade de a mesma estar disseminando o vírus durante este trajeto. Donatti et al. (2013) sugeriram o contato com animais exóticos infectados como possível causa do surto relatado no Brasil, indicando também a importância da realização de exames para este e outros vírus durante a quarentena de importação de aves.

2.6 CONCLUSÃO

O ABV está presente em aves de cativeiro, não sendo diagnosticado adequadamente possivelmente porque é relacionado com casos onde ocorre apenas o sinal clínico clássico de dilatação de proventrículo em contraste com casos de sinais neurológicos e inespecíficos.

Foram observadas aves com alteração em penas positivas para o vírus, indicando a possibilidade de uma conexão entre automutilação e ABV.

Aves com infecção concomitante por ABV e Circovírus e ABV, Circovírus e Poliomavírus foram encontradas.

REFERÊNCIAS

- BERT, E.; TOMASSONE, L.; PECCATI, C.; NAVARRETE, M. G.; SOLA, S. C. Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, n. 2, p. 64–8, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15752264>>. Acesso em: 22 jun. 2013.
- BERHANE, Y.; SMITH, D. A.; NEWMAN, S.; TAYLOR, M.; NAGY, E.; BINNINGTON, B.; HUNTER, B. Peripheral neuritis in psittacine birds with proventricular dilatation disease. **Avian Pathology**, v. 30, n. 5, p. 37–41, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079450120078770>>. Acesso em: 8 maio 2013.
- DAHLHAUSEN, B.; ALDRED, S.; COLAIZZI, E. Resolution of clinical proventricular dilatation disease by cyclooxygenase 2 inhibition. In: ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIAN. 2002, Estados Unidos. **Anais...** p.9–12.
- DAOUST, P. Y.; JULIAN, R. J.; YASON, V.; ARTSOB, H. Proventricular impaction associated with nonsuppurative encephalomyelitis and ganglioneuritis in two Canada geese. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 27, n. 3, p. 513–517, 1991.
- DEB, A.; BORJAL, R. J.; BURKLE, R.; WATSON, R.; HAMMER, S. Evaluation of avian paramyxovirus, serology and crop biopsy for the diagnosis of proventricular dilatation disease in captive spix's macaws (*Cyanopsitta spixii*). In: EUROPEAN ASSOCIATION OF ZOO AND WILDLIFE VETERINARIANS. 1008, Leipzig. **Anais...** p.239–242.
- DE LA TORRE, J.; CARBONE, K.; LIPKIN, W. Molecular characterization of borna disease agent. **Virology**, v. 179, n. 2, p. 853–856, 1990.
- DELNATTE, P.; BERKVEN, C.; KUMMROW, M.; SMITH, D. A.; CAMPBELL, D.; CRAWSHAW, G. New genotype of avian bornavirus in wild geese and trumpeter swans in Canada. **The Veterinary Record**, v. 169, n. 4, p. 108, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21784813>>. Acesso em: 8 nov. 2013.
- DELNATTE, P.; OJKIC, D.; DELAY, J.; CAMPBELL, D.; CRAWSHAW, G.; SMITH, D. A. Pathology and diagnosis of avian bornavirus infection in wild Canada geese (*Branta canadensis*), trumpeter swans (*Cygnus buccinator*) and mute swans (*Cygnus olor*) in Canada: a retrospective study. **Avian Pathology**: journal of the W.V.P.A., v. 42, n. 2, p. 114–28, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23581438>>. Acesso em: 29 jan. 2014.
- DONATTI, R.; RESENDE, M.; JUNIOR, F.; MARQUES, M. V. R.; ECCO, R.; SHIVAPRASAD, H. L.; RESENDE, J. S.; MARTINS, N. R. S. Fatal proventricular dilatation disease in captive native psittacines in Brazil. **Avian Diseases**, v. 58, n.1, p. 187–93, 2013.

DORRESTEIN, G.; HONKAVUORI, K.; BRIESE, T.; TIZARD, I.; VERSCHUREN, M. C. M.; LIPKIN, W. I.; DE KLOET, S. R. Overview of the role and diagnosis of avian bornavirus related to PDD in psittacines. In: VII CONGRES INTERNATIONAL SUR LES ANIMAUX SAUVAGES ET EXOTIQUES / VII INTERNATIONAL CONGRESS ON WILD AND EXOTIC ANIMALS. 2010, Paris. **Anais...**

GANCZ, A. Y.; CLUBB, S.; SHIVAPRASAD, H. L. Advanced diagnostic approaches and current management of proventricular dilatation disease. **The Veterinary Clinics of North America**, v. 13, n. 3, p. 471–94, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20682431>>. Acesso em: 18 mar. 2012.

GANCZ, A. Y.; KISTLER, A. L.; GRENINGER, A. L.; FARNOUSHI, Y.; MECHANI, S.; PERL, S.; BERKOWITZ, A.; PEREZ, N.; CLUBB, S.; DERISI, J.; GANEM, D.; LUBLIN, A. Experimental induction of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) inoculated with brain homogenates containing avian bornavirus 4. **Virology Journal**, v. 6, p. 100, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2717941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

GRAY, P.; HOPPE, S.; SUCHODOLSKI, P.; MIRHOSSEINI, N.; PAYNE, S.; VILLANUEVA, I.; SHIVAPRASAD, H. L.; HONKAVUORI, K. S.; BRIESE, T.; REDDY, S.; TIZARD, I. Use of avian bornavirus isolates to induce proventricular dilatation disease in conures. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 473–9, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3322028&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

GREGORY, C.; LATIMER, K.; NIAGRO, F.; RITCHIE, B. W.; CAMPAGNOLI, R. P.; NORTON, T. M.; GREENACRE, C. B. A review of proventricular dilatation syndrome. **Journal of Avian Veterinarian Association**, v. 8, p. 69–75, 1994.

HEFFELS-REDMANN, U.; ENDERLEIN, D.; HERZOG, S.; HERDEN, C.; PIEPENBRING, A.; NEUMANN, D.; MULLER, H.; CAPELL, S.; OBERHAUSER, K.; GERLACH, H.; KALETA, E. F.; LIERZ, M. Occurrence of avian bornavirus infection in captive psittacines in various European countries and its association with proventricular dilatation disease. **Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.**, v. 40, n. 4, p. 419–26, 2011.

HONKAVUORI, K. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; WILLIAMS, B. L.; QUAN, P.; HORNIG, M.; STREET, C.; PALACIOS, G.; HUTCHISON, S. K.; FRANCA, M.; EGHOLM, M.; BRIESE, T.; LIPKIN, W. I. Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1883–1886, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/eid/content/14/12/1883.htm>>. Acesso em: 2 abr. 2012.

HOPPE, S.; GRAY, P. L.; PAYNE, S.; SHIVAPRASAD, H. L.; TIZARD, I. The isolation, pathogenesis, diagnosis, transmission, and control of avian bornavirus and proventricular dilatation disease. **The Veterinary Clinics of North America**, v. 13, n. 3, p. 495–508, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20682432>>. Acesso em: 18 mar. 2012.

HOPPE, S.; HEATLEY, J. J.; GUO, J.; TURNER, D.; SHIVAPRASAD, H. L.; TIZARD, I. Meloxicam treatment in cockatiels (*nymphicus hollandicus*) infected with avian bornavirus. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 22, n. 3, p. 275–279, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1557506313001158>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

HOPPE, S. M.; TIZARD, I.; SHIVAPRASAD, H. L. Avian bornavirus and proventricular dilatation disease: diagnostics, pathology, prevalence, and control. **The Veterinary Clinics of North America**, v. 16, n. 2, p. 339–55, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23642866>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

HORIE, M.; UEDA, K.; UEDA, A.; HONDA, T.; TOMONAGA, K. Detection of avian bornavirus 5 RNA in *Eclectus roratus* with feather picking disorder. **Microbiology and immunology**, v. 56, n. 5, p. 346–9, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22309239>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

HORNIG, M.; BRIESE, T.; LICINIO, J.; KHABBAZ, R. F.; ALTSHULER, L. L.; POTKIN, S. G.; SCHWEMMLE, M.; SIEMETZKI, U.; MINTZ, J.; HONKAVUORI, K.; KRAEMER, H. C.; EGAN, M. F.; WHYBROW, P. C.; BUNNEY, W. E.; LIPKIN, W. I. Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 5, p. 486–93, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3622588&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

KELLER, D. L.; HONKAVUORI, K. S.; BRIESE, T.; LIPKIN, W. I.; MUTHUSWAMY, A.; STEINBERG, H.; SLADKY, K. K. Proventricular dilatation disease associated with avian bornavirus in a scarlet macaw (*Ara Macao*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 6, p. 961–965, 2010. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063871002200619>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

KERSKI, A.; KLOET, A. H. de; KLOET, S. R. de; A. S. R. D. K. Vertical Transmission of avian bornavirus in psittaciformes: avian bornavirus rna and anti-avian bornavirus antibodies in eggs , embryos , and hatchlings obtained from infected sun conures (*Aratinga solstitialis*). **Avian Diseases**, v. 56, n. 3, p. 471–478, 2012.

KINNUNEN, P. M.; PALVA, A.; VAHERI, A.; VAPALAHTI, O. Epidemiology and host spectrum of Bornavirus infections. **The Journal of General Virology**, v. 94, n. 2, p. 247–62, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23223618>>. Acesso em: 30 jan. 2014.

KISTLER, A. L.; GANCZ, A.; CLUBB, S.; SKEWES-COX, P.; FISCHER, K.; SORBER, K.; CHIU, C. Y.; LUBLIN, A.; MECHANI, S.; FARNOUSHI, Y.; GRENINGER, A.; WEN, C. C.; KARLENE, S. B.; GANEM, D.; DERISI, J. L. Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. **Virology Journal**, v. 5, p. 88, 2008. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2546392&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

KISTLER, A. L.; SMITH, J. M.; GRENINGER, A. L.; DERISI, J. L.; GANEM, D. Analysis of naturally occurring avian bornavirus infection and transmission during an outbreak of proventricular dilatation disease among captive psittacine birds. **Journal of Virology**, v. 84, n. 4, p. 2176–9, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2812378&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 abr. 2012.

KLOET, A. H.; KERSI, A.; KLOET, S. R. Diagnosis of Avian bornavirus infection in psittaciformes by serum antibody detection and reverse transcription polymerase chain reaction assay using feather calami **Journal of Veterinary Diagnostic**, v. 23, n. 3, p. 421-429, 2011.

KLOET, S. R.; DORRESTEIN, G. M. Presence of avian bornavirus rna and anti-avian bornavirus antibodies in apparently healthy macaws presence of avian bornavirus rna and anti-avian bornavirus antibodies in apparently healthy macaws, v. 53, n. 4, p. 568–573, 2009.

LAST, R. D.; WEISSENBOCK, H.; NEDOROST, N.; SHIVAPRASAD, H. L. Avian bornavirus genotype 4 recovered from naturally infected psittacine birds with proventricular dilatation disease in South Africa Case history. **Journal of South African Veterinary Association**, v. 83, n. 1, p. 938–942, 2012.

LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. D.; CAMPAGNOLI, R. P.; RITCHIE, R. P.; PESTI, D. A.; STEFFENS, W. L. Diagnosis of concurrent avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus infections using DNA probes. **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, v. 7, n. 3, p. 141–146, 1993.

LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. D.; STEFFENS, W. L.; RITCHIE, B. W.; CAMPAGNOLI, R. P. Polyomavirus encephalopathy in a ducorps cockatoo (*cacatua ducorpsii*) with psittacine beak and feather disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n.3, p. 291–295, 1996.

LATIMER, K. S.; RAKICH, P. M.; KIRCHER, I. M.; RITCHIE, B. W.; NIAGRO, F. D.; STEFFENS, W. L.; LUKERT, P. D. Extracutaneous viral inclusions in psittacine beak and feather disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, n. 3, p. 204–207, 1990. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879000200309>>. Acesso em: 3 fev. 2014.

LEVINE, B. S.; PRACTICE, C. A. Common disorders of Amazons, Australian Parakeets, and African grey parrots. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 12, n. 3, p. 125–130, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055937X03800178>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

LIERZ, M.; HAFEZ, H. M.; HONKAVUORI, K. S.; GRUBER, A. D.; OLIAS, P.; ABDELWHAB, E. M.; KOHLS, A.; LIPKIN, W. I.; BRIESE, T.; HAUCK, R.

Anatomical distribution of avian bornavirus in parrots, its occurrence in clinically healthy birds and ABV-antibody detection. **Avian Pathology**: journal of the W.V.P.A, v. 38, n. 6, p. 491–6, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19937538>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

LIERZ, M.; PIEPENBRING, A.; HERDEN, C.; OBERHAUSER, K.; HEFFELS-REDMANN, U.; EDERLEIN, D. Vertical transmission of avian bornavirus in psittacines. **Emerging Infectious Disease**, v. 17, n. 12, p. 2390–2391, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2884495&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 abr. 2012.

LIPKIN, W. I.; BRIESE, T.; HORNIG, M. Borna disease virus - fact and fantasy. **Virus Research**, v. 162, n. 1-2, p. 162–72, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21968299>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

LIPKIN, W. I.; SCHNEEMANN, A.; SOLBRIG, M. V. Borna disease virus: implications for human neuropsychiatric illness. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 64–9, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7728387>>. Acesso em: 8 jul. 2012.

LUDWIG, H.; BECHT, H.; GROH, L. Borna disease (BD), a slow virus infection biological properties of the virus. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 158, n. 4, p. 275–289, 1973.

MANNL, A.; GERLACH, H.; LEIPOLD, R. Neuropathic gastric dilatation in psittaciformes. **Pet Bird Medicine**: case report, v. 31, n. 1, p. 214–221, 1986.

MARIETTO-GONÇALVES, G. A.; TRONCARELLI, M. Z.; SEQUEIRA, J. L.; FILHO, R. L. A. F. Proventricular dilatation disease (PDD) and megaesophagus in a blue-fronted amazon parrot (*Amazona aestiva*) - Case report. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 69–73, 2009.

MIRHOSSEINI, N.; GRAY, P. L.; HOPPES, S.; TIZARD, I.; SHIVAPRASAD, H. L.; PAYNE, S. Proventricular dilatation disease in cockatiels (*nymphicus hollandicus*) after infection with a genotype 2 avian bornavirus proventricular dilatation disease in cockatiels (*nymphicus hollandicus*) after infection with a genotype 2 avian bornavirus. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 25, n. 3, p. 199–204, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1647/2010-030.1> URL:>. Acesso em: 2 ago. 2012.

MIRHOSSEINI, N.; GRAY, P. L.; TIZARD, I.; PAYNE, S. Complete genome sequence of avian bornavirus genotype 1 from a Macaw with proventricular dilatation disease. **Journal of Virology**, v. 86, n. 12, p. 7023, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3393589&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

MONACO, E.; HOPPES, S.; GUO, J.; TIZARD, I. The detection of avian bornavirus within psittacine eggs. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 26, n. 3, p.

144–8, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23156976>>. Acesso em: 23 jul. 2013.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary virology**. Londres: Academic Press, 1999.

OUYANG, N.; STORTS, R.; TIAN, Y.; WIGLE, W.; VILLANUEVA, I.; MIRHOSSEINI, N.; PAYNE, S.; GRAY, P.; TIZARD, I. Histopathology and the detection of avian bornavirus in the nervous system of birds diagnosed with proventricular dilatation disease. **Avian Pathology**: journal of the W.V.P.A, v. 38, n. 5, p. 393–401, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19937526>>. Acesso em: 29/1/2014.

PAYNE, S.; COVALEDA, L.; JIANHUA, G.; SWAFFORD, S.; BAROCH, J.; FERRO, PAMELA J.; LUPIANI, B.; HEATLEY, J.; TIZARD, I. Detection and characterization of a distinct bornavirus lineage from healthy Canada geese (*Branta canadensis*). **Journal of Virology**, v. 85, n. 22, p. 12053–6, 2011a. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3209299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 abr. 2012.

PAYNE, S. L.; DELNATTE, P.; GUO, J.; HEATLEY, J. J.; TIZARD, I.; SMITH, D. A. Birds and bornaviruses. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, n. 2, p. 145–56, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23253163>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

PAYNE, S.; SHIVAPRASAD, H. L.; MIRHOSSEINI, N.; GRAY, P.; HOPPE, S.; WEISSENBOCK, H.; TIZARD, I. Unusual and severe lesions of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) acting as healthy carriers of avian bornavirus (ABV) and subsequently infected with a virulent strain of ABV. **Avian Pathology**: journal of the W.V.P.A, v. 40, n. 1, p. 15–22, 2011b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21331944>>. Acesso em: 11 fev. 2014.

PHALEN, D. N. Avian Polyomavirus: my thoughts. **American Federation of Aviculture Watchbird**, v. 25, p. 28–39, 1998.

PHALEN, D. N. Implications of Viruses in Clinical Disorders. In: HARRISON, G. J.; LIHJTFOOT, T. L. **Clinical avian medicine**. Florida: Spix Publishing, 2005. p. 721–746.

POLLOCK, C.; CARPENTER, J.; ANTINOFF, N. Aves. In: CARPENTER, J. W. **Formulário de Animais Exóticos**. 3. ed: China: Elsevier, 2010. p. 177–187.

RUBBENSTROTH, D.; RINDER, M.; KASPERS, B.; STAEHELI, P. Efficient isolation of avian bornaviruses (ABV) from naturally infected psittacine birds and identification of a new ABV genotype from a salmon-crested cockatoo (*Cacatua moluccensis*). **Veterinary Microbiology**, v. 161, n. 1–2, p. 36–42, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22824256>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

RUBBENSTROTH, D.; RINDER, M.; STEIN, M.; HÖPER, D.; KASPERS, B.; BROSINSKI, K.; HORIE, M.; SCHMIDT, V.; LEGLER, M.; KORBEL, R.; STAEHELI,

P. Avian bornaviruses are widely distributed in canary birds (*Serinus canaria* f. domestica). **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3-4, p. 287–95, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23631925>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

RUBBENSTROTH, D.; SCHMIDT, V.; RINDER, M.; LEGLER, M.; CORMAN, V. M.; STAEHELI, P. Discovery of a new avian bornavirus genotype in estrildid finches (*Estrildidae*) in Germany. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 2-4, p. 318–23, 2014.

SASSA, Y.; HORIE, M.; FUJINO, K.; NISHIURA, N.; OKAZAKI, S.; FURUYA, T.; NAGAI, M.; OMATSU, T.; KOJIMA, A.; MIZUGAMI, M.; UEDA, K.; IKI, H.; EBISAWA, K.; TOMONAGA, K.; MIZUTANI, T. Molecular epidemiology of avian bornavirus from pet birds in Japan. **Virus Genes**, v. 47, n. 1, p. 173–7, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23609929>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

SCHOEMAKER, N. J.; DORRESTEIN, G. M.; LATIMER, K. S.; LUMEIJ, J. T.; VAN DER HAGE, M. H.; CAMPAGNOLI, R. P. Case report-- severe leukopenia and liver necrosis in young African grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) infected with psittacine circovirus. **Avian Diseases**, v. 44, n. 2, p. 470–478, 2000. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1592565>>. Acesso em 6 nov. 2013.

STAEHELI, P.; RINDER, M.; KASPERS, B. Avian bornavirus associated with fatal disease in psittacine birds. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6269–75, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2903261&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 abr. 2012.

SULLIVAN, N. D.; MACKIE, J. T.; MILLER, R. I.; AGILES, A. First case of psittacine proventricular dilatation syndrome (macaw wasting disease) in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 9, p. 674, 1997.

VILLANUEVA, I.; GRAY, P.; MIRHOSSEINI, N.; PAYNE, S.; HOPPE, S.; HONKAVUORI, K. S.; BRIESE, T.; TURNER, D.; TIZARD, I. The diagnosis of proventricular dilatation disease: use of a Western blot assay to detect antibodies against avian Borna virus. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 2-4, p. 196–201, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036080>>. Acesso em: 2 abr. 2012.

WALTRIP, R. W.; BUCHANAN, R. W.; SUMMERFELT, A.; BREIER, A.; CARPENTER, W. T.; BRYANT, N. L.; RUBIN, S. A.; CARBONE, K. M. Borna disease virus and schizophrenia. **Psychiatry Research**, v. 56, p. 33–44, 1995.

WEISSENBOCK, H.; BAKONYI, T.; SEKULIN, K.; SHIVAPRASAD, H. L. Avian bornaviruses in psittacine birds from europe and australia with proventricular dilatation disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1453–1459, 2009a. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2819881&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 jun. 2012.

WEISSENBOCK, H.; SEKULIN, K.; BAKONYI, T.; HÖGLER, S.; NOWOTNY, N. Novel avian bornavirus in a nonpsittacine species (Canary; *Serinus canaria*) with enteric ganglioneuritis and encephalitis. **Journal of Virology**, v. 83, n. 21, p. 11367–71, 2009b. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2772780&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

WENSMAN, J. J.; THORÉN, P.; HAKHVERDYAN, M.; BELÁK, S.; BERG, M. Development of a real-time RT-PCR assay for improved detection of Borna disease virus. **Journal of virological Methods**, v. 143, n. 1, p. 1–10, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376545>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

WÜNSCHMANN, A.; HONKAVUORI, K.; BRIESE, T.; LIPKIN, W. I.; SHIVERS, J.; ARMIEN, A. G. Antigen tissue distribution of Avian bornavirus (ABV) in psittacine birds with natural spontaneous proventricular dilatation disease and ABV genotype 1 infection. **Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation**: official publication of the american association of veterinary laboratory diagnosticians, v. 23, n. 4, p. 716–26, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908314>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

3 DETECÇÃO DE POLIOMAVÍRUS E CIRCOVÍRUS EM PSITACÍDEOS DE CATIVEIRO DO ESTADO DE SÃO PAULO

3.1 INTRODUÇÃO

A ordem Psitaciforme, que engloba espécies exóticas, ou seja, calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e espécies silvestres como o papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) e o periquito rico (*Brotoogeris tirica*) são considerados os mais populares entre as aves de companhia em todo o mundo. Além da beleza demonstrada através de cores vibrantes, sua capacidade de imitar sons e se relacionar com seres humanos os tornam os mais desejados. Devido as atraentes características destas espécies, o número de aves em cativeiro e o comércio mundial destes animais vêm aumentando gradativamente, tornando um facilitador na disseminação de agentes causadores de doenças.

O impacto de patógenos exóticos nas espécies nativas é um problema reconhecido; dentre as diversas doenças preocupantes em aves de cativeiro, a Circovirose e a Poliomavirose estão entre as mais importantes (HA et al., 2009; SZWEDA et al., 2011). Por serem doenças virais persistentes, com elevada mortalidade e morbidade, são extremamente perigosas tanto para psitacídeos de cativeiro como para os de vida livre. Estudos sobre a ocorrência destes agentes em aves de cativeiro e vida livre foram realizados em várias partes do mundo (RAHAUS; WOLFF, 2003; BERT et al., 2005; RAHAUS et al., 2008; HA et al., 2009), entretanto, pouco se sabe sobre estes vírus na América do Sul (WERTHER et al., 1999).

O Circovírus de psitacídeo é o agente causador da doença do bico e das penas de psitacídeos (BFV), primeiramente relatada na Austrália (PASS; PERRY, 1984) mas, atualmente, disseminado pelo mundo (LATIMER et al., 1990; WERTHER et al., 1999; ALBERTYN; TAJBHAI; BRAGG, 2004; HARKINS et al., 2014). É caracterizado pela distrofia simétrica das penas e pela imunossupressão, afetando diversas espécies de psitacídeos.

O Poliomavírus (APV) causa uma doença semelhante à BFD, com alteração em penas, entretanto, outros sinais clínicos como a hemorragia subcutânea são comumente encontrados nesta patologia (BOZEMAN et al., 1981; BERNIER; MORIN; MARSOLAIS, 1984; PHALEN, 1998). Ambos os patógenos podem ocorrer no mesmo hospedeiro (PHALEN, 1998). Apesar de afetarem psitacídeos, poucos estudos sobre estes agentes foram realizados no Brasil, país que abriga uma avifauna de mais de 1.000 espécies. O objetivo deste estudo foi detectar através da técnica de PCR, o Circovírus e o Poliomavírus em amostras biológicas de psitacídeos de cativeiro no Brasil.

3.2 REVISÃO DE LITERATURA

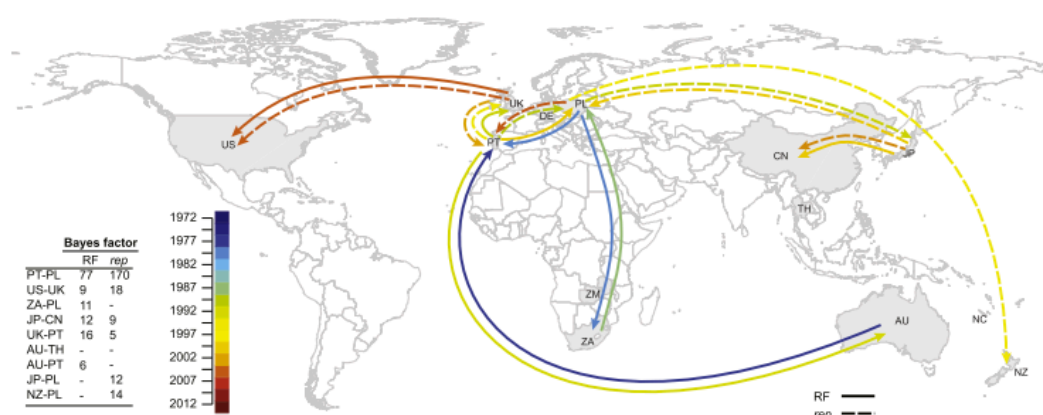
3.2.1 Circovírus – Vírus da Doença do Bico e das Penas (BFDV)

A doença do bico e das penas de psitacídeos foi descrita pela primeira vez em 1975, em cacatuas na Austrália (LATIMER et al., 1990; ALBERTYN; TAJBHAI; BRAGG, 2004). Durante os anos 70 e 80, a hipótese de que a etiologia da doença seria uma anormalidade endócrina foi proposta, no entanto, esta foi desconsiderada na mesma época. Diversos agentes etiológicos foram cogitados e desconsiderados ao longo dos anos, entre eles estão *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, vírus de Newcastle, Reovírus, Adenovírus, *Salmonella Pullorum* e Poliomavírus (RITCHIE, 1995). Finalmente, em 1987 foi identificado o vírus causador da doença do bico e das penas de psitacídeos (BFDV) (WYLIE; PASS, 1987).

A doença afeta mais de 40 espécies de psitacídeos, sendo encontrada em animais de vida livre da Austrália, Indonésia e Filipinas (RITCHIE, 1995). Devido à grande movimentação de aves pelo mundo, o Circovírus está presente em quase todos os continentes, e foi relatado em aves de cativeiro da Europa (BERT et al., 2005), América do Norte (KLOET; KLOET, 2004), Ásia (OGAWA et al., 2010), Oceania (MASSARO et al., 2012), América do Sul (WERTHER et al., 1999) e África (HEATH et al., 2004). Ao analisar sequências do genoma do BFDV de diferentes continentes, Harkins et al. (2014) observaram que o ancestral do vírus veio

provavelmente da Austrália, e que países da América do Norte e Europa, que importam muitas aves, agem como disseminadores do agente. Os mesmos autores demonstraram em um mapa a possível distribuição do vírus no mundo (Figura 9), que não inclui a América do Sul devido à falta de documentação da doença nestes países. O único trabalho relatando a doença no Brasil foi publicado em 1999 em uma *Cacatua alba*, de um criador de aves exóticas (WERTHER et al., 1999).

Figura 9 - Movimentação do Circovírus de psitacídeos obtido através de análise filogenética



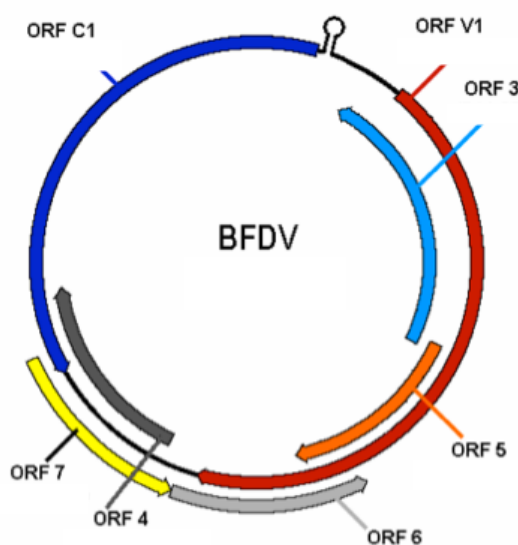
Fonte: Adaptado de Harkins et al. (2014).

3.2.1.1 Morfologia

O BFDV é um vírus isométrico, pequeno (14-18 nm de diâmetro), não envelopado, que possui uma fita simples circular de DNA, pertencente à família Circoviridae. Esta família engloba o vírus da anemia das galinhas (CAV), o Circovírus suíno (PCV), o BFDV e o Circovírus de outras espécies de aves (pombos, canários, gansos e outros) (RITCHIE, 1995; PHALEN, 2005). O genoma do BFDV possui 1.993 nucleotídeos, com sete ORFs (*open reading frame*) (FRANCIOSINI et al., 2005; PHALEN, 2005). A ORF V1 codifica a proteína associada à replicação viral, enquanto a ORF C1 codifica a proteína do capsídeo

(Figura 10) (RAIDAL; CROSS, 1994). O DNA pode variar em até 11% entre as estirpes virais (PHALEN, 2005). Kloet e Kloet (2004) observaram a ocorrência de subtipos com uma complexa especificidade de hospedeiros, também relacionados com a ocorrência geográfica.

Figura 10 - Esquema do genoma do BFDV

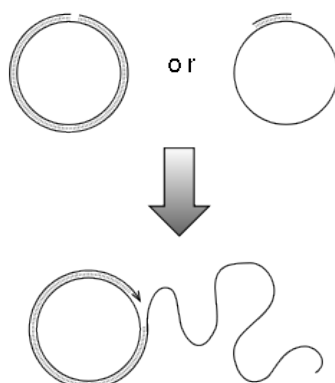


Fonte: Adaptado de Bassami et al. (1998).

A ORF V1 possui 867 nucleotídeos e codifica uma proteína de 33,3 KDa. Esta proteína está associada à replicação viral, denominada de proteína Rep (LATIMER et al., 1993; BASSAMI et al., 1998). A ORF C1, com 741 nucleotídeos, localizada na fita de DNA complementar, codifica uma proteína de capsídeo de 28,9 KDa. Não se sabe ao certo a função das outras ORFs (BASSAMI et al., 1998).

Devido ao tamanho reduzido do genoma, a replicação viral é extremamente dependente das enzimas celulares, ocorrendo tipicamente no núcleo, onde produzem os corpúsculos de inclusão. A replicação ocorre via “rolling cycle” (WOODS; LATIMER, 2008), apresentada na figura 11. A persistência viral ocorre nas células intestinais e órgãos adjacentes (LATIMER et al., 1990).

Figura 11 - Esquema da replicação "rolling circle"



Fonte: (adaptado de http://en.wikipedia.org/wiki/Rolling_circle_replication)

Legenda: A fita produzida ao final da replicação é clivada, formando diversos vírions.

3.2.1.2 Patogenia

Devido à relação entre a infecção e os órgãos linfoides de produção como timo e a bursa de Fabricius, o BFDV é conhecido por causar imunodeficiência (LATIMER et al., 1990).

O período de incubação varia de 3 semanas a 1 ano. O vírus é eliminado através do pó da pena, fezes e epitélio do ingluvírio, com a transmissão ocorrendo pela inalação ou ingestão do vírus (PHALEN, 2005), podendo ocorrer também transmissão vertical (RAHAUS et al., 2008).

Devido à ocorrência em psitacídeos do novo (BERT et al., 2005; PIASOMASZ; WIELICZKO, 2010) e velho mundo (SCHOEMAKER et al., 2000; FRANCIOSINI et al., 2005; KATOH et al., 2010), todas as espécies de psitacídeos apresentam potencial de desenvolver a doença, porém animais mais jovens e espécies do velho mundo são considerados mais susceptíveis (BERT et al., 2005; PHALEN, 2005), com mortalidade de até 100% (SCHOEMAKER et al., 2000).

3.2.1.3 Sinais clínicos

A doença manifesta-se de três formas: hiperaguda, aguda e crônica. A forma hiperaguda ocorre mais comumente em neonatos, a aguda ocorre em filhotes, quando as penas estão em fase de formação, levando o animal a óbito em 1-2 semanas. Na forma crônica, os animais mais comumente atingidos estão na faixa etária de 6-12 meses, passando pela primeira muda de penas, mas pode ocorrer também em animais mais velhos. A morte geralmente ocorre entre 6 meses a 2 anos do início da manifestação dos sinais clínicos, devido a natureza imunossupressora da doença. Na maioria das espécies, a doença é crônica, caracterizada pelo crescimento progressivo de penas distróficas e deformidade no bico (PASS; PERRY, 1984).

CACATUA

A doença crônica geralmente ocorre em animais de 8-10 meses. Os primeiros sinais clínicos são sutis, como a diminuição de pó de pena no bico e muda de penas prolongadas. Em uma observação mais detalhada, é comum encontrar algumas penas distróficas desde o início da doença. As penas afetadas sofrem hiperqueratose, que leva ao engrossamento da bainha da pena e retenção da mesma (Figura 12). Este engrossamento gera a permanência dos canhões de pena, devido a dificuldade de ruptura dos mesmos (PHALEN, 2005).

A lesão no bico é mais comum em *Cacatua* sp., sendo raro nas outras espécies. Essas alterações se devem a hiperqueratose, que levam ao alongamento e um maior crescimento do bico, com necrose no estágio final da doença. Devido a dor causada por estas lesões, as aves apresentam anorexia, logo, animais que não apresentam lesão no bico possuem maior sobrevida. Uma grande porcentagem de animais morrem entre 6-12 meses após o início dos sinais clínicos.

Figura 12 - *Cacatua alba* filhote apresentando retenção das bainhas das penas



Fonte: (AZEVEDO, N. P., 2010).

A doença aguda é mais comum em filhotes e é geralmente fatal. Os sinais clínicos são: depressão, regurgitação e crescimento de penas com estrangulamento na base (PHALEN, 2005).

Devido a imunossupressão causada pelo Circovírus, infecções concomitantes com o Poliomavírus são comuns (PHALEN et al., 2000).

PAPAGAIO AFRICANO

Em infecções experimentais os sinais sistêmicos inespecíficos (regurgitação, estase de papo e fraqueza) precedem as lesões nas penas. As alterações encontradas, entretanto, são idênticas as de cacatuas, com exceção da alteração nas penas primariamente cinzas que passam a apresentar coloração vermelha (PHALEN, 2005).

Na apresentação hiperaguda, que pode ocorrer em animais com até 7 meses de idade, os sinais clínicos são diferentes da apresentação clássica da BFPD. Em um estudo com 14 animais jovens, Schoemaker et al. (2000) encontraram anorexia, vômito e fraqueza como sinais clínicos mais comuns, com apenas três indivíduos apresentando alteração em penas.

AGAPORNIS

A doença é muito comum nas aves deste gênero, chegando à incidência de 60% dos criatórios destas espécies nos Estados Unidos, mas sua manifestação geralmente é subclínica (PHALEN, 2005).

PERIQUITO AUSTRALIANO

Nesta espécie, os mais susceptíveis são os filhotes (Figura 13). A doença se apresenta de forma diferente das demais espécies, com a ausência do crescimento das penas primárias e secundárias das asas. A mesma apresentação ocorre com a infecção por Poliomavírus, sendo esta um diagnóstico diferencial importante (PHALEN, 2005).

ECLECTUS

A qualidade das penas é bastante afetada, sendo comum a infecção concomitante com o Poliomavírus (PHALEN, 1998, 2005).

OUTRAS ORDENS

Em pombos, a doença está associada à elevada morbidade e baixa mortalidade, entretanto a mortalidade descrita varia de 1 a 100% (WOODS et al., 1993, 1994; SOIKE et al., 2001; WOODS; LATIMER, 2008). A idade das aves afetadas varia de seis semanas a doze meses. Os sinais clínicos são: letargia, anorexia, diarreia e emagrecimento (RITCHIE, 1995).

Em canários, a doença é associada a “black spot”, cujos sinais clínicos incluem distensão abdominal e congestão da vesícula biliar (TODD, 2001). A mortalidade varia de 90 a 100% dos casos, afetando principalmente filhotes (WOODS et al., 2000).

Figura 13 - Periquitos australianos filhotes de um mesmo criador durante um surto de BFDV



Fonte: (AZEVEDO, N. P., 2010).

Legenda: As aves apresentam apteria por todo o corpo (setas).

3.2.1.4 Diagnóstico

No exame histológico, é possível observar corpo de inclusão intranuclear basofílico principalmente no trato gastrointestinal e folículos das penas, mas este também pode ser encontrado no bico, língua, trato gastrointestinal, bursa de Fabricius, timo, órgãos genitais, entre outros (LATIMER et al., 1990). Entretanto, o Poliomavírus, Herpesvírus e Adenovírus podem causar inclusões nucleares basofílicas em psitacídeos, dificultando o diagnóstico da doença pelo exame histopatológico (LATIMER et al., 1993).

Por ser um vírus que causa hemaglutinação, o Circovírus permitiu o desenvolvimento de reação de hemaglutinação (HA) e inibição de hemaglutinação (RAIDAL; CROSS, 1994). Entretanto, com a padronização da reação em cadeia

pela polimerase (PCR) para a BFPV, este se tornou o principal meio de diagnóstico da doença (LATIMER et al., 1993). Penas, fezes, suabes orais e cloacais além de órgão podem ser testados. O vírus pode ser detectado no sangue antes do início dos sinais clínicos (PHALEN, 2005).

3.2.1.5 Tratamento

Não existe cura para a doença, sendo preconizado o tratamento suporte do animal. As lesões em pena são toleradas, entretanto lesões em bico e unhas são extremamente dolorosas, principalmente quando há infecção secundária, sendo indicada a eutanásia (GERLACH, 1994).

3.3.2 Poliomavírus

O Poliomavírus das aves (APV) foi descoberto em 1981, após um surto ocorrido no Texas em um aviário de periquitos australiano (*Melopsittacus undulatus*) (BOZEMAN et al., 1981). É causador de perdas econômicas anuais substanciais para a avicultura, casa de venda de animais (PHALEN, 1998).

O vírus está distribuído mundialmente (ENDERS et al., 1997; PHALEN et al., 2000; RAHAUS; BERT et al., 2005; WOLFF, 2005; DEB et al., 2010; ZHUANG et al., 2012; ALLEY et al., 2013; BENNETT; GILLET, 2014), entretanto os sinais clínicos podem variar de acordo com a cepa, ocorrendo a forma crônica na Europa e aguda na América (GERLACH, 1994; RITCHIE, 1995).

3.3.2.1 Morfologia

O APV é um vírus icosaédrico, não envelopado, de 40-50 nm de diâmetro, com um DNA duplo circular de 4,8 a 5,5 Kb, pertencente à família Papovaviridae

(ROTT et al., 1988; RAMIS et al., 1998). Seu genoma possui duas ORFs principais (ROTT et al., 1988). Existe apenas um genótipo de APV (KOU et al., 2008).

O vírus é termoestável, sobrevivendo ao congelamento e ao aquecimento a 56°C por 2 horas. O APV também é resistente a solventes orgânicos. A remoção de matéria orgânica seguida de desinfecção é a única forma segura de remoção deste agente (SZWEDA et al., 2011).

3.3.2.2 Patogenia

O APV pode permanecer em estado latente, causando a doença apenas após um período de estresse excessivo (BOZEMA et al., 1981). O período de incubação em infecções naturais varia de 10–14 dias, com a exceção nos periquitos australianos, em que esse período diminui para sete dias (PHALEN, 1998, 2000), enquanto em infecções experimentais com a aplicação do vírus por via intramuscular (IM) ou intravenosa (IV), o período de incubação diminui para 2 dias. A viremia, que pode durar de 17 a 67 dias, precede a liberação do vírus, sendo possível detectar o vírus no sangue antes de se detectá-lo nas fezes e/ou suabes da cloaca (PHALEN et al., 2000). Devido à característica de elevada mortalidade em filhotes, esta doença é percebida pelos criadores durante a época de reprodução, quando ocorre menor taxa de fertilização de ovos e maior mortalidade de filhotes (PHALEN, 1998).

Potti et al. (2007) relataram a transmissão do APV através de insetos, sendo o primeiro grupo a demonstrar uma rota de infecção primária. Esse resultado corrobora com Bert et al. (2005), que encontraram filhotes de papagaios positivos cujos pais apresentavam resultado negativo para o vírus, indicando a possibilidade de uma contaminação pelo ambiente. Outro fator importante relatado pelos mesmos autores foi à elevada prevalência de aves positivas e assintomáticas, que podem disseminar o vírus para o ambiente.

3.3.2.3 Sinais clínicos

Uma hemorragia generalizada é um sinal comum em aves positivas para APV, provavelmente devido a uma trombocitopenia (PHALEN et al., 2000). Alguns animais que sobrevivem à doença podem apresentar a síndrome do edema e ascite, causado pela lesão em glomérulos renais e no parênquima hepático (PHALEN, 2005).

PERIQUITO AUSTRALIANO

A detecção da doença ocorre normalmente quando há a percepção de maior mortalidade de filhotes e menor taxa de ovos incubados (PHALEN, 1998). Na doença aguda, a demora no esvaziamento do inglúvio, distensão abdominal, ascite, hemorragia subcutânea, alteração em penas e morte súbita são sinais comuns (BOZEMAN et al., 1981; BERNIER; MORIN; MARSOLAIS, 1984; PHALEN, 1998). A mortalidade é elevada, chegando a 100%, e aves que sobrevivem aos primeiros 15 dias de infecção apresentam demora no crescimento das penas primárias das asas e nas penas da cauda. Estes sinais clínicos semelhantes ao PBFD, devem ser considerados em um diagnóstico diferencial (BERNIER; MORIN; MARSOLAIS, 1981, 1984). Existem ainda casos de sinais neurológicos como ataxia e tremores de cabeça, que ocorrem devido à presença do vírus no cerebelo das aves infectadas (RITCHIE, 1995; PHALEN, 1998).

AGAPORNIS

Agapornis sp. com APV apresentam doença distinta, comum em animais mais velhos (até 1 ano). O vírus é comumente associado com PBFD, fator que poderia explicar a susceptibilidade de animais mais velhos a doença, uma vez que

o Circovírus é considerado um vírus imunossupressor da resposta imunológica (PHALEN, 1998, 2005).

CACATUA

Filhotes de cacatua apresentam sinais clínicos únicos se comparados com as outras espécies. Quando infectados na idade entre 4-8 semanas, apresentam sinais de dificuldade respiratória e atraso no desenvolvimento corporal. A necropsia revela secreção em pulmões, acompanhado de pneumonia intersticial severa. Aves adultas apresentam sinais clássicos de alteração em penas e hemorragia, entretanto já foram relatados casos de encefalopatia por APV em dois indivíduos (PHALEN, 2005). Foram descritos encefalopatia em três cacatuas adultas (LATIMER et al., 1996; PHALEN, 2005).

OUTROS PSITACÍDEOS

Em *Aratinga sp.* infectadas, ocorre óbito em até seis semanas de idade, enquanto Araras e Eclectus doentes morrem em até 14 semanas de idade. Filhotes infectados podem morrer sem demonstrar sinais clínicos, mas quando estes estão presentes, são sutis como a demora no esvaziamento do papo e fraqueza (PHALEN, 1998).

A doença é rara em papagaios amazonas adultos, geralmente associada a PBFD (PHALEN, 2005). Amazonas infectados podem vir a óbito sem demonstrar sinais clínicos ou apresentarem depressão, anorexia, perda de peso, demora no esvaziamento do papo, diarreia, regurgitação, ataxia e paresia (SZWEDA et al., 2011).

3.3.2.4 Diagnóstico

A técnica de PCR é a mais utilizada e muito sensível para a detecção deste agente. O diagnóstico deve ser feito após duas semanas da exposição da ave ao vírus, período no qual ainda não há viremia ou eliminação do vírus, evitando assim falso negativos (PHALEN et al., 2000). O período de quarentena recomendado é de pelo menos 135 dias, podendo chegar a seis meses em periquitos australianos (PHALEN; WILSON; GRAHAM, 1997; PHALEN et al., 2000).

No exame necroscópico pode ser observado hidropericárdio, palidez generalizada, hepatomegalia e/ou esplenomegalia (BOZEMAN et al., 1981; PHALEN, 1998; PHALEN et al., 2000). Em papagaios da Amazônia, os achados mais comuns são: Inglúvio repleto, hidropericárdio, aumento dos rins, hepatomegalia com lesões focais, esplenomegalia, edema pulmonar e/ou palidez generalizada (SZWEDA et al., 2011).

No exame histopatológico observa-se a presença de corpúsculo de inclusão no baço, nas células epiteliais dos túbulos renais e/ou fígado (BOZEMAN et al., 1981; PHALEN, 1998).

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de fezes, sangue, suabe cloacal e/ou penas de psitacídeos com sintomatologia clínica compatível com Poliomavírus e/ou Circovírus (Quadro 4). As amostras biológicas foram obtidas no Ambulatório de Aves da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, criadouros de aves e clínicas veterinárias em São Paulo e Rio de Janeiro.

As fezes foram obtidas do fundo da gaiola das aves, previamente forradas com papel alumínio. Para a coleta de suabe cloacal, a ave foi contida, as penas foram afastadas para a visualização da cloaca sendo utilizado um suabe umedecido

com meio de conservação sem tocar na parte externa da cloaca. As fezes foram armazenadas em um microtubo com meio de conservação, ou seja, tampão fosfato salino 0,1M, pH 7,4 (PBS 0,1M, pH 7,4) contendo antibiótico (16mg/mL) e antifúngico (2mg/mL), congeladas a -80°C até o procedimento de extração de material genético.

O sangue foi coletado com papel filtro FTA (Whatman International Ltd., GE Healthcare, Reino Unido).

Quadro 4 - Sinais clínicos para a inclusão no trabalho

Poliovírus	Circovírus
Apteria	Apteria
Sinais Neurológicos	-
Regurgitação	Regurgitação
Óbito súbito	Óbito súbito
Penas distróficas	Penas distróficas
Mortalidade em filhotes	Mortalidade em filhotes
-	Automutilação
Anorexia	Anorexia
Hemorragia	-
Apatia	Apatia

3.4.2 Extração

Antes do procedimento de extração do DNA a amostra recebeu choque térmico. As amostras foram congeladas no freezer -80 graus Celsius por dez minutos e então descongeladas por um minuto em banho Maria e foram homogeneizadas no *vortex* por 20 segundos. Esse procedimento foi repetido três vezes, para então centrifuga-las a 12.000xg durante 20 minutos para a obtenção do DNA.

O método GT modificado foi utilizado para a extração de DNA. O método GT foi realizado da seguinte forma: O volume de 600 μL de GT (60g Isoticionato de Guanidina, 5mL de Tris-HCl 1 M pH7,5, 10mL de EDTA 0,25M pH 8, adicionar água ultra pura para o volume de 100 mL) foi adicionado a 200 μL de amostra. A amostra foi homogeneizada no *vortex* por 20 segundos e mantida em temperatura ambiente

por cinco minutos. Após este período de incubação se adicionou 100µL de clorofórmio. A amostra foi homogeneizada por 20 segundo no *vortex*, mantida em repouso em temperatura ambiente por dez minutos e centrifugada a 12.000xg a 4°C por cinco minutos. O volume de 600µL de isopropanolol foi colocado em novo microtubo, e adicionado de 500µL do sobrenadante da amostra. Esta reação foi incubada a -20°C por duas horas. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000xg a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi lavado com 500µL de etanol 70% e centrifugado por 10 minutos a 12.000xg a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o *pellet* dissolvido com 30µL de TE. A amostra foi mantida em placa a 56°C por 15 minutos e armazenada a -20°C até o momento da realização do PCR.

3.4.3 PCR

Os *primers* selecionados estão descritos no quadro 5. O *mix* utilizado foi o mesmo para Circovírus e Poliomavírus, que apresentava 5µL de solução tampão 5X, 2µL de MgCl₂, 0,75µL de dNTP (1,25mM), 2µL de cada *primer* (10mM) e 0,2µL de Taq Polymerase (5U), 1µL de DNA e água para o volume de 25µL.

Para BFDV, o ciclo utilizado foi: 96°C por 5 minutos, 32 ciclos de 96°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, sendo a extensão realizada a 72°C durante 10 minutos. Para o APV, o ciclo utilizado foi o mesmo, mudando apenas a temperatura de hibridização para 58°C e a quantidade de ciclos para 40.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo o corante *Sybr Safe* (Invitrogen). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pb. O resultado foi analisado por meio de um transluminador e foto documentado por *Alpha Imager Mini Análises System* (Alpha Innotech).

Quadro 5 - *Primers* selecionados para a detecção viral

Agente Viral	Região Codificada	Primer	Tamanho do Fragmento	Referência
BFDV	ORF V1 F	5'AACCCTACAGACGGCGAG 3'	717 bp	YPELAAR et al., 1999
BFDV	ORF V1 R	5'GTCACAGTCTCCTTGTACC 3'	717 bp	YPELAAR et al., 1999
APV	ORF1 F	5'CTTATGTGGGAGGCTGCAGTGT T3'	550 bp	BERT et al., 2005
APV	ORF1 R	5' TACTGAAATAGCGTGGTAGGCCTC 3'	550 bp	BERT et al., 2005

3.4.4 Purificação e Sequenciamento

Algumas amostras foram selecionadas para o sequenciamento e posterior análise filogenética. Utilizou-se para a purificação 100µL de amostras positivas. O *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* foi utilizado, seguindo as indicações do produto. Em seguida, foi realizada uma eletroforese das amostras purificadas para que o produto purificado fosse quantificado visualmente com *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen™).

Após se verificar a qualidade do produto purificado, as amostras foram enviadas para o sequenciamento de material genético no Centro de Pesquisas sobre Genoma Humano e Células-Tronco no Instituto de Biociências da USP, seguindo as instruções do mesmo.

As sequências recebidas foram analisadas utilizando o programa CLC Main Workbench 6.8.3 e alinhadas no programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999). As árvores filogenéticas foram confeccionadas baseadas na proteína *VP1* para APV e *Rep* para BFDV, e foram construídas através do programa MEGA 5, utilizando um *bootstrap* de 1000 replicações.

2.4.5 Outros agentes virais

Algumas amostras também foram testadas para Poliomavírus (APV) e Circovírus (BFDV), utilizando o método GT modificado foi utilizado para a extração de DNA. Para BFDV foram utilizados os primers descritos por Ypelaar et al. (1999) e para APV Bert et al. (2005), seguindo o protocolo de PCR descrito pelos mesmos autores.

3.4.6 Resultados

Foram examinados 120 animais, pertencentes a 23 espécies distintas, com sintomatologia compatível com APV e/ou BFDV. Foram encontradas 57 (47,5%) aves positivas, sendo que em 21 (17,5%) foi detectado o APV e em 41 (34,17%) o BFDV, distribuídos em 18 espécies de psitacídeos. Entre os animais positivos, cinco (8,62%) apresentaram infecção concomitante. A tabela 2 e o quadro 6 apresentam estes resultados. A distribuição das amostras positivas dos vírus em relação aos tipos de amostras coletadas está demonstrado na tabela 3.

Dentre as 17 espécies positivas, apenas cinco representam espécies nativas, sendo elas: *Amazona aestiva*, *Amazona amazonica*, *Ara ararauna*, *Triclaria malachitacea* e *Aratinga jandaya*, que representam 19 (32,75%) indivíduos positivos de um total de 58 aves do novo mundo analisadas. Em contraste, 38 das 62 amostras que pertenciam a espécies exóticas foram positivas, representando 61,20%. Das espécies Brasileiras, apenas *Ara ararauna* apresentou infecção concomitante, representando 5,26% no total de aves nativas positivas e 1,72% no total geral de aves positivas.

Os sinais clínicos observados nos animais positivos para Circovírus foram apteria (n=19), automutilação (n=2), regurgitação (n=1), sinais neurológicos (n=11), apatia/anorexia (n=15) e óbito súbito (n=2). Dentre os 11 animais que apresentavam sinais neurológicos, uma ave foi positiva também para Poliomavírus enquanto seis animais foram positivos para outro vírus de psitacídeo, o Bornavírus. Nas aves positivas para Poliomavírus, quatro apresentavam apteria, três

automutilação, dois regurgitação, um sinal neurológico, vinte apatia/anorexia e um óbito súbito sem ocorrência de sinais clínicos (Figura 14). Os animais com infecção concomitante de Circovírus e Poliomavírus apresentavam: automutilação (n=2), apteria (n=3), apatia/anorexia severa (n=2) e sinais neurológicos (n=1).

Tabela 2 - Incidência de BFDV e APV por espécie

Espécie	Número de animais examinados	Positivos para Poliomavírus	Positivo para Circovírus	Infecção concomitante
<i>Amazona aestiva</i>	40	1	12	0
<i>Aratinga jandaya</i>	1	1	0	0
<i>Ara ararauna</i>	4	2	2	1
<i>Triclaria malachitacea</i>	1	0	1	0
<i>Aprosmictus erythropterus</i>	1	1	0	0
<i>Platycercus icterotis</i>	7	5	1	0
<i>Psephotus haematonotus</i>	6	0	2	0
<i>Neophema bourkii</i>	1	0	1	0
<i>Turquoise opaline</i>	3	1	1	0
<i>Forpus coelestis</i>	1	0	0	0
<i>Platycercus eximius</i>	7	5	0	0
<i>Alisterus scapularis</i>	3	1	0	0
<i>Neophema splendida</i>	2	0	1	0
<i>Nymphicus hollandicus</i>	15	0	2	0
<i>Psittacus erithacus</i>	3	2	2	2
<i>Amazona amazonica</i>	1	0	1	0
<i>Melopsittacus undulatus</i>	15	1	11	1
<i>Aratinga leucophthalmus</i>	1	0	0	0
<i>Eclactus roratus</i>	1	1	1	1
<i>Agapornis personatus</i>	4	0	3	0
<i>Guarouba guarouba</i>	1	0	0	0
<i>Pyrrhura frontalis</i>	1	0	0	0
<i>Cacatua alba</i>	1	0	0	0
Total (%)	120	21 (17,5%)	41 (34,17%)	5 (8,62%)

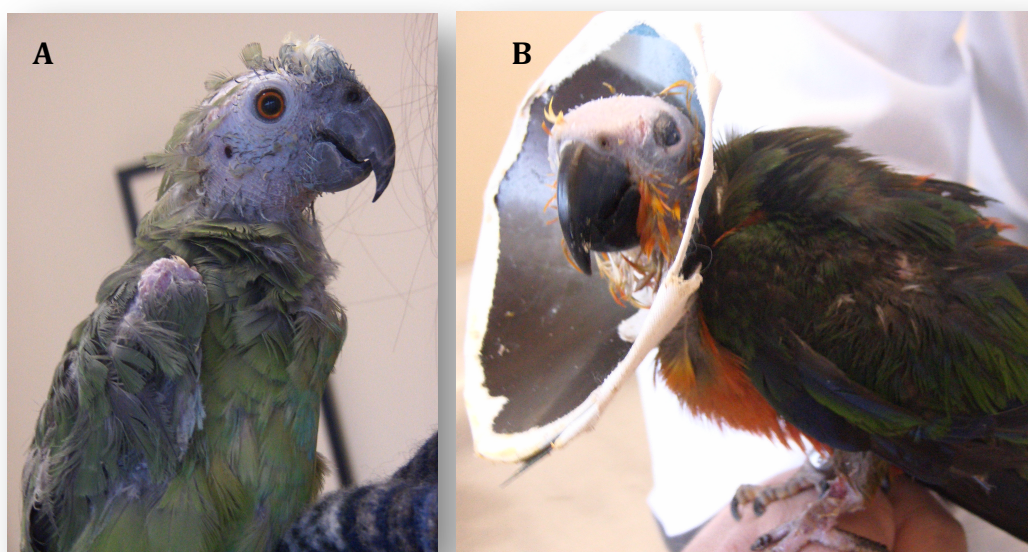
Quadro 6 Distribuição de espécies infectadas por cada agente etiológico

Poliomavírus	Circovírus	Poliomavírus e Circovírus
<i>Aratinga jandaya</i>	<i>Psittacus erithacus</i>	<i>Psittacus erithacus</i>
<i>Ara ararauna</i>	<i>Amazona aestiva</i>	<i>Melopsittacus undulatus</i>
<i>Aprosmictus erythropterus</i>	<i>Triclaria malachitacea</i>	<i>Eclectus roratus</i>
<i>Turquoise opaline</i>	<i>Neophema bourkii</i>	<i>Ara ararauna</i>
<i>Platycercus eximius</i>	<i>Platycercus icterotis</i>	
<i>Psittacus erithacus</i>	<i>Turquoise opaline</i>	
<i>Platycercus icterotis</i>	<i>Psephotiis haematonotus</i>	
<i>Eclectus roratus</i>	<i>Neophema splendida</i>	
<i>Melopsittacus undulatus</i>	<i>Ara ararauna</i>	
<i>Alisterus scapularis</i>	<i>Amazona amazonica</i>	
<i>Amazona aestiva</i>	<i>Eclectus roratus</i>	
	<i>Melopsittacus undulatus</i>	
	<i>Agapornis personatus</i>	
	<i>Nymphicus hollandicus</i>	

Tabela 3 Distribuição de amostras positivas de APV e BFDV em relação ao tipo de amostra coletada

	Fezes	Penas	Suabe cloaca	Fígado	Rim	Sangue
Positivos APV (%)	10 (12,65%)	2 (7,14%)	0 (0%)	9 (56,25%)	9 (69,23%)	1 (12,5%)
Positivos BFDV (%)	14 (17,72%)	14 (50%)	1 (8,33%)	2 (12,5%)	2 (15,38%)	1 (12,5%)
Total de positivos/ Total testado (%)	24/79 (30,38%)	16/28 (57,15%)	1/12 (8,34%)	11/16 (68,75%)	11/13 (84,61%)	2/8 (25%)

Figura 14 - Papagaio verdadeiro (A) e Jandaia (B) apresentando apteria



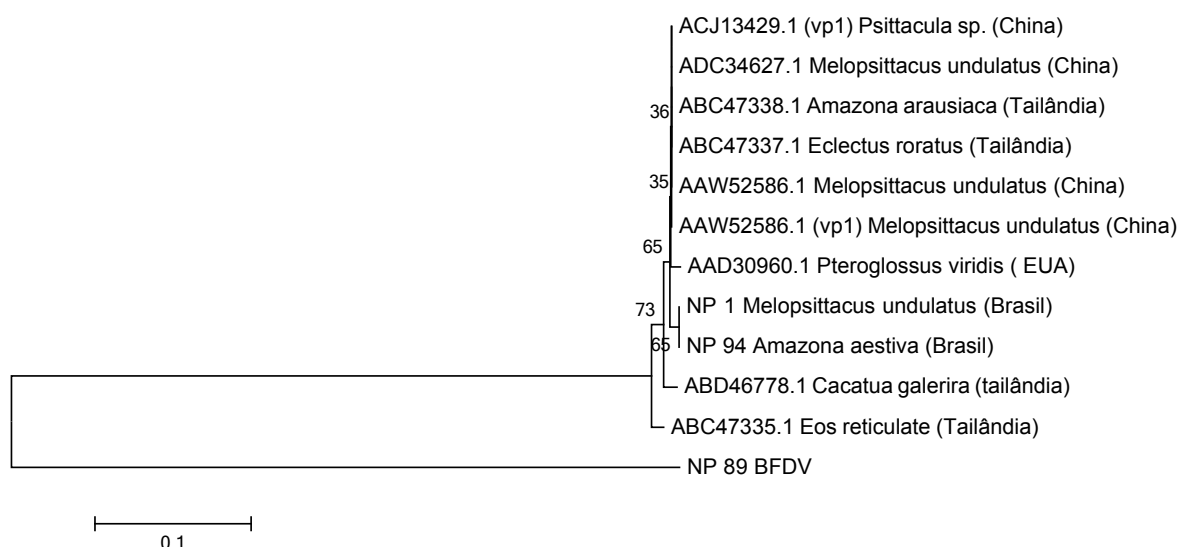
Fonte: (AZEVEDO, N. P., 2012).

3.4.6 Sequenciamento

O sequenciamento parcial do gene ORF1 para Poliomavírus de duas amostras positivas, NP 1 (*M. undulatus*) e NP 94 (*A. aestiva*) foi comparado com sequências presentes no GenBank. Baseada no BLAST (NCBI), a similaridade do gene ORF 1 entre as amostras NP 1 e NP 94 e as amostras do sistema foi de 99%, a mesma similaridade encontrada da proteína deduzida deste gene.

A árvore filogenética construída está demonstrada na figura 15, enquanto a matriz de similaridade esta apresentada na tabela 4. Não pode ser observado agrupamento de amostras em relação a origem das mesmas nem das espécies hospedeiras, sendo todas as amostras de APV pertencentes ao mesmo genótipo.

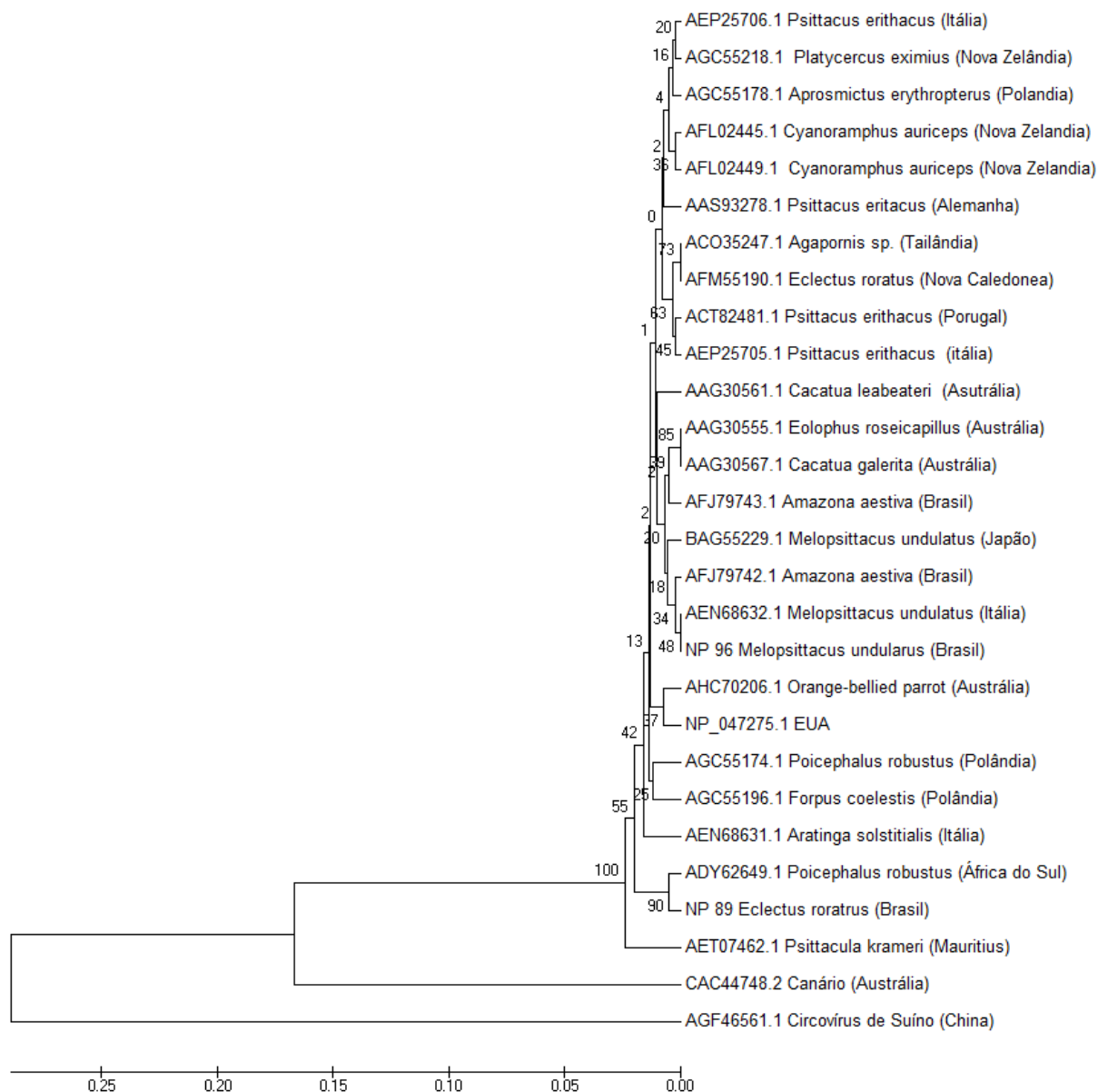
Figura 15 - Árvore filogenética para APV, construída utilizando o método *neighbor-joining* com repetição de 1000 *bootstrap* (utilizando o programa MEGA-5), baseada na proteína VP1, codificada pelo gene VP1



Fonte: AZEVEDO, N. P.

Para o BFDV, foram comparadas o sequenciamento parcial da ORF V1 das amostras NP 89 (*E. roratus*) e NP 96 (*M. undulatus*) com as amostras do BLAST (NCBI), obtendo-se uma similaridade de 99% para os nucleotídeos e para proteína (*Rep*). A árvore filogenética construída está demonstrada na figura 16, enquanto a matriz de similaridade esta apresentada na tabela 5. Não pode ser observado agrupamento de amostras em relação a origem das mesmas nem das espécies hospedeiras. A variação da similaridade entre as sequencias obtidas neste trabalho e das sequencias do GenBank provenientes do Brasil variaram entre 96 e 99%, sendo a NP 89 com maior variabilidade do que a NP 96 quando comparadas com as outras duas sequencias do país. Quando comparada com as mesmas espécies, a amostra NP 96 (*M. unduatus*) variou entre 99 e 100%, enquanto a amostra NP 89 (*E. roratus*) mostrou similaridade de 96%.

Figura 16 - Árvore filogenética para BFDV, construída utilizando o método *neighbor-joining* com repetição de 1000 *bootstrap* (utilizando o programa MEG5), baseada na proteína *Rep*, codificada pelo ORF V1



Fonte: AZEVEDO, N. P.

Tabela 4 - Matriz de similaridade do APV baseado na tradução da proteína VP1 do gene ORF 1 das sequências NP1 e NP 94 e sequências de proteínas obtidas no GenBank

Sequência	AAD309 60.1	AAW525 86.1	AAW525 86.1	ABC473 35.1	ABC473 37.1	ABC473 38.1	ABD4677 8.1	ACJ134 29.1	ADC34 627.1	NP 1	NP 94	NP 89 BFDV
AAD30960.1	ID	0,993	0,993	0,975	0,993	0,993	0,975	0,993	0,993	0,981	0,981	0,137
AAW52586.1	0,993	ID	1	0,981	1	1	0,981	1	1	0,987	0,987	0,137
AAW52586.1	0,993	1	ID	0,981	1	1	0,981	1	1	0,987	0,987	0,137
ABC47335.1	0,975	0,981	0,981	ID	0,981	0,981	0,969	0,981	0,981	0,969	0,969	0,143
ABC47337.1	0,993	1	1	0,981	ID	1	0,981	1	1	0,987	0,987	0,137
ABC47338.1	0,993	1	1	0,981	1	ID	0,981	1	1	0,987	0,987	0,137
ABD46778.1	0,975	0,981	0,981	0,969	0,981	0,981	ID	0,981	0,981	0,975	0,975	0,137
ACJ13429.1	0,993	1	1	0,981	1	1	0,981	ID	1	0,987	0,987	0,137
ADC34627.1	0,993	1	1	0,981	1	1	0,981	1	ID	0,987	0,987	0,137
NP 1	0,981	0,987	0,987	0,969	0,987	0,987	0,975	0,987	0,987	ID	1	0,137
NP 94	0,981	0,987	0,987	0,969	0,987	0,987	0,975	0,987	0,987	1	ID	0,137
NP 89 BFDV	0,137	0,137	0,137	0,143	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	ID

LEGENDA: A similaridade das amostras obtidas no presente trabalho com as demais sequências do GenBank estão grifadas em rosa.

Tabela 5 - Matriz de similaridade do BFDV baseado na tradução da proteína *rep* da ORF V1 das sequências NP 89 e NP 96 e sequências de proteínas obtidas no GenBank

(Continua)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	NP 89	NP 96	Z
A	ID	0,9 76	1	0,9 72	0,9 72	0,9 72	0,9 48	0,9 58	0,9 9	0,9 67	0,9 76	0,9 53	0,9 86	0,9 9	0,9 76	0,9 81	0,9 72	0,9 72	0,9 76	0,9 76	0,9 81	0,2 92	0,9 72	0,9 81	0,6 65	0,9 58	0,9 9	0,9 67
B	0,9 76	ID	0,9 76	0,9 76	0,9 76	0,9 76	0,9 53	0,9 62	0,9 86	0,9 72	0,9 81	0,9 48	0,9 81	0,9 76	0,9 81	0,9 86	0,9 76	0,9 76	0,9 81	0,9 62	0,9 86	0,2 92	0,9 76	0,9 76	0,6 65	0,9 62	0,9 86	0,9 72
C	1 76	0,9 76	ID	0,9 72	0,9 72	0,9 72	0,9 48	0,9 58	0,9 9	0,9 67	0,9 76	0,9 53	0,9 86	0,9 9	0,9 76	0,9 81	0,9 72	0,9 72	0,9 76	0,9 76	0,9 81	0,2 92	0,9 72	0,9 81	0,6 65	0,9 58	0,9 9	0,9 67
D	0,9 72	0,9 76	0,9 72	ID	0,9 81	0,9 81	0,9 53	0,9 67	0,9 81	0,9 76	0,9 86	0,9 53	0,9 76	0,9 72	0,9 86	0,9 81	0,9 81	0,9 72	0,9 86	0,9 67	0,9 9	0,2 87	0,9 72	0,9 81	0,6 69	0,9 62	0,9 81	0,9 67
E	0,9 72	0,9 76	0,9 72	0,9 81	ID	0,9 95	0,9 58	0,9 81	0,9 81	0,9 9	0,9 86	0,9 53	0,9 76	0,9 72	0,9 86	0,9 81	1 72	0,9 86	0,9 67	0,9 9	0,9 92	0,2 92	0,9 72	0,9 72	0,6 65	0,9 67	0,9 81	0,9 67
F	0,9 72	0,9 76	0,9 72	0,9 81	0,9 95	ID	0,9 58	0,9 81	0,9 81	0,9 95	0,9 86	0,9 53	0,9 76	0,9 72	0,9 86	0,9 81	0,9 95	0,9 72	0,9 86	0,9 67	0,9 9	0,2 92	0,9 72	0,9 72	0,6 6	0,9 67	0,9 81	0,9 67
G	0,9 48	0,9 53	0,9 48	0,9 53	0,9 58	0,9 58	ID	0,9 53	0,9 58	0,9 53	0,9 53	0,9 48	0,9 62	0,9 53	0,9 62	0,9 67	0,9 58	0,9 58	0,9 53	0,9 44	0,9 58	0,2 92	0,9 58	0,9 48	0,6 65	0,9 9	0,9 58	0,9 62
H	0,9 58	0,9 62	0,9 58	0,9 67	0,9 81	0,9 81	0,9 53	ID	0,9 67	0,9 76	0,9 72	0,9 53	0,9 62	0,9 58	0,9 81	0,9 76	0,9 81	0,9 58	0,9 72	0,9 53	0,9 76	0,2 92	0,9 67	0,9 58	0,6 65	0,9 62	0,9 67	0,9 62
I	0,9 9	0,9 86	0,9 9	0,9 81	0,9 81	0,9 81	0,9 58	0,9 67	ID	0,9 76	0,9 86	0,9 53	0,9 95	0,9 9	0,9 86	0,9 9	0,9 81	0,9 81	0,9 86	0,9 76	0,9 9	0,2 96	0,9 81	0,9 9	0,6 65	0,9 67	1	0,9 76
J	0,9 67	0,9 72	0,9 67	0,9 76	0,9 9	0,9 95	0,9 53	0,9 76	0,9 76	ID	0,9 81	0,9 48	0,9 72	0,9 67	0,9 81	0,9 76	0,9 9	0,9 67	0,9 81	0,9 62	0,9 86	0,2 96	0,9 67	0,9 67	0,6 65	0,9 62	0,9 76	0,9 62
K	0,9 76	0,9 81	0,9 76	0,9 86	0,9 86	0,9 86	0,9 53	0,9 72	0,9 86	0,9 81	ID	0,9 48	0,9 81	0,9 76	0,9 9	0,9 86	0,9 86	0,9 76	0,9 9	0,9 72	0,9 95	0,2 92	0,9 76	0,9 76	0,6 6	0,9 62	0,9 86	0,9 72
	0,9 53	0,9 48	0,9 53	0,9 53	0,9 53	0,9 53	0,9 48	0,9 53	0,9 53	0,9 48	0,9 48	ID	0,9 48	0,9 62	0,9 58	0,9 62	0,9 53	0,9 48	0,9 48	0,9 44	0,9 53	0,2 92	0,9 53	0,9 44	0,6 65	0,9 58	0,9 53	0,9 53

LEGENDA: A similaridade das amostras obtidas no presente trabalho com as demais sequências do GenBank estão grifadas em rosa. Cada letra do cabeçalho indica uma sequência do GenBank: A (AAG30555.1), B (AAG30561.1), C (AAG30567.1), D (AAS93278.1), E (ACO35247.1), F (ACT82481.1), G (ADY62649.1), H (AEN68631.1), I (AEN68632.1), J (AEP25705.1), K (AEP25706.1), L (AET07462.1), M (AFJ79742.1), N (AFJ79743.1), O (AFL02445.1), P (AFL02449.1), Q (AFM55190.1), R (AGC55174.1), S (AGC55178.1), T (AGC55196.1), U (AGC55218.1), V (AGF46561.1), W (AHC70206.1), X (BAG55229.1), Y (CAC44748.2) e Z (NP_047275.1).

(Conclusão)

Se q	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	X	W	Y	NP 89	NP 96	Z
M	0,9 86	0,9 81	0,9 86	0,9 76	0,9 76	0,9 76	0,9 62	0,9 62	0,9 95	0,9 72	0,9 81	0,9 48	ID	0,9 86	0,9 81	0,9 86	0,9 76	0,9 76	0,9 81	0,9 72	0,9 86	0,2 96	0,9 76	0,9 86	0,6 69	0,9 62	0,9 95	0,9 72
N	0,9 9	0,9 76	0,9 9	0,9 72	0,9 72	0,9 72	0,9 53	0,9 58	0,9 9	0,9 67	0,9 76	0,9 62	0,9 86	ID	0,9 76	0,9 81	0,9 72	0,9 76	0,9 76	0,9 81	0,9 81	0,2 96	0,9 72	0,9 81	0,6 74	0,9 62	0,9 9	0,9 72
O	0,9 76	0,9 81	0,9 76	0,9 86	0,9 86	0,9 86	0,9 62	0,9 81	0,9 86	0,9 81	0,9 9	0,9 58	0,9 81	0,9 76	ID	0,9 95	0,9 86	0,9 76	0,9 9	0,9 72	0,9 95	0,2 92	0,9 86	0,9 76	0,6 65	0,9 72	0,9 86	0,9 81
P	0,9 81	0,9 86	0,9 81	0,9 81	0,9 81	0,9 81	0,9 67	0,9 76	0,9 9	0,9 76	0,9 86	0,9 62	0,9 86	0,9 81	0,9 95	ID	0,9 81	0,9 81	0,9 86	0,9 67	0,9 9	0,2 92	0,9 9	0,9 81	0,6 69	0,9 76	0,9 9	0,9 86
Q	0,9 72	0,9 76	0,9 72	0,9 81	1	0,9 95	0,9 58	0,9 81	0,9 81	0,9 9	0,9 86	0,9 53	0,9 76	0,9 72	0,9 86	0,9 81	ID	0,9 72	0,9 86	0,9 67	0,9 9	0,2 92	0,9 72	0,9 72	0,6 65	0,9 67	0,9 81	0,9 67
R	0,9 72	0,9 76	0,9 72	0,9 72	0,9 72	0,9 72	0,9 58	0,9 58	0,9 81	0,9 67	0,9 76	0,9 48	0,9 76	0,9 76	0,9 76	0,9 81	0,9 72	ID	0,9 76	0,9 76	0,9 81	0,2 92	0,9 72	0,9 72	0,6 69	0,9 67	0,9 81	0,9 76
S	0,9 76	0,9 81	0,9 76	0,9 86	0,9 86	0,9 86	0,9 53	0,9 72	0,9 86	0,9 81	0,9 9	0,9 48	0,9 81	0,9 76	0,9 9	0,9 86	0,9 86	0,9 76	ID	0,9 72	0,9 95	0,2 87	0,9 76	0,9 76	0,6 69	0,9 62	0,9 86	0,9 72
T	0,9 76	0,9 62	0,9 76	0,9 67	0,9 67	0,9 67	0,9 44	0,9 53	0,9 76	0,9 62	0,9 72	0,9 44	0,9 72	0,9 81	0,9 72	0,9 67	0,9 67	0,9 76	0,9 72	ID	0,9 76	0,2 96	0,9 62	0,9 67	0,6 69	0,9 53	0,9 76	0,9 62
U	0,9 81	0,9 86	0,9 81	0,9 9	0,9 9	0,9 9	0,9 58	0,9 76	0,9 9	0,9 86	0,9 95	0,9 53	0,9 86	0,9 81	0,9 95	0,9 9	0,9 9	0,9 81	0,9 95	0,9 76	ID	0,2 92	0,9 81	0,9 81	0,6 65	0,9 67	0,9 9	0,9 76
V	0,2 92	0,2 92	0,2 92	0,2 87	0,2 92	0,2 92	0,2 92	0,2 92	0,2 96	0,2 96	0,2 92	0,2 92	0,2 96	0,2 96	0,2 92	0,2 92	0,2 92	0,2 92	0,2 87	0,2 96	0,2 92	ID	0,2 96	0,2 87	0,2 83	0,2 92	0,2 96	0,2 92
W	0,9 72	0,9 76	0,9 72	0,9 72	0,9 72	0,9 72	0,9 58	0,9 67	0,9 81	0,9 67	0,9 76	0,9 53	0,9 76	0,9 72	0,9 86	0,9 9	0,9 72	0,9 72	0,9 76	0,9 62	0,9 81	0,2 96	ID	0,9 72	0,6 65	0,9 67	0,9 81	0,9 86
X	0,9 81	0,9 76	0,9 81	0,9 81	0,9 72	0,9 72	0,9 48	0,9 58	0,9 9	0,9 67	0,9 76	0,9 44	0,9 86	0,9 81	0,9 76	0,9 81	0,9 72	0,9 72	0,9 76	0,9 67	0,9 81	0,2 87	0,9 72	ID	0,6 65	0,9 58	0,9 9	0,9 67
Y	0,6 65	0,6 65	0,6 65	0,6 69	0,6 65	0,6 6	0,6 65	0,6 65	0,6 65	0,6 65	0,6 6	0,6 65	0,6 69	0,6 74	0,6 65	0,6 69	0,6 65	0,6 69	0,6 69	0,6 69	0,6 65	0,2 83	0,6 65	0,6 65	ID	0,6 65	0,6 65	0,6 6
N 89	0,9 58	0,9 62	0,9 58	0,9 62	0,9 67	0,9 67	0,9 9	0,9 62	0,9 67	0,9 62	0,9 62	0,9 58	0,9 62	0,9 62	0,9 72	0,9 76	0,9 67	0,9 67	0,9 62	0,9 53	0,9 67	0,2 92	0,9 67	0,9 58	0,6 65	ID	0,9 67	0,9 72
N 96	0,9 9	0,9 86	0,9 9	0,9 81	0,9 81	0,9 81	0,9 58	0,9 67	1	0,9 76	0,9 86	0,9 53	0,9 95	0,9 9	0,9 86	0,9 9	0,9 81	0,9 81	0,9 86	0,9 76	0,9 9	0,2 96	0,9 81	0,9 9	0,6 65	0,9 67	ID	0,9 76
Z	0,9 67	0,9 72	0,9 67	0,9 67	0,9 67	0,9 67	0,9 62	0,9 62	0,9 76	0,9 62	0,9 72	0,9 53	0,9 72	0,9 72	0,9 81	0,9 86	0,9 67	0,9 76	0,9 72	0,9 62	0,9 76	0,2 92	0,9 86	0,9 67	0,6 6	0,9 72	0,9 76	ID

3.5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram encontrados 57 (47,5%) psitacídeos positivos para pelo menos um dos vírus estudados, sendo 21 (17,5%) para Poliomavírus e 41 (34,17%) para Circovírus. Esses dados diferem com uma pesquisa realizada em criadouros na Polônia, utilizando psitacídeos aparentemente saudáveis, que detectaram entre 22,12% a 25,99% de aves positivas para BFDV e para 21,85% a 23,25% de animais positivos para APV (PIASECKI; WIELICZKO, 2010). Outro estudo, realizado em Taiwan com aves aparentemente sadias, descreveu uma ocorrência de 15,2% de aves positivas para APV e 41,2% para BFDV. Curiosamente, ao compararem a porcentagem de aves positivas entre um grupo de animais aparentemente sadios e um grupo de aves apresentando sinais clínicos, não houve diferença estatística (HSU et al., 2006). Apesar de Julian et al. (2012) encontrarem 42,5% de positividade para BFDV em aves com sinais clínicos, um número mais elevado do que os encontrados neste trabalho, o número de aves pesquisado foi reduzido, apenas 17 indivíduos, enquanto todos os autores citados acima utilizaram pelo menos uma centena de aves. Além disso, incluíram apenas aves com alteração em penas primárias, não abrangendo sinais clínicos inespecíficos como regurgitação e anorexia. Embora os resultados encontrados não sejam compatíveis com alguns encontrados na literatura (HSU et al., 2006; PIASECKI; WIELICZKO, 2010), o número de positivos é alarmante, principalmente se considerarmos o baixo número de relatos destas doenças no país. A falta de identificação da doença pelo veterinário pode ter um efeito devastador para a população de aves no país, que abriga uma das mais diversas avifaunas do mundo.

Além de possuírem sinais clínicos similares (ZHUANG et al., 2012), a ocorrência de infecção concomitante de APV e BFDV não é rara (RAMIS et al., 1998; HSU et al., 2006; PIASECKI; WIELICZKO, 2010). Neste estudo foram encontrados cinco indivíduos positivos para ambos os vírus, o que equivale a 8,62% das aves estudadas. Este resultado é compatível com a literatura que revela a detecção concomitante de APV e BFDV variando entre 5,99% (PIASECKI; WIELICZKO, 2010) e 10,3% (HSU et al., 2006). A infecção com BFDV pode causar imunossupressão e permitir a infecção por APV. A infecção concomitante torna o animal persistentemente infectado, eliminando os vírus de forma intermitente, desta

forma, aves que possuem ambos os vírus e sobrevivem a doença se tornam importantes disseminadores do agente (PHALEN, 1998).

Dentre as amostras coletadas, as fezes foram as mais bem aceitas pelos proprietários, seguidas da coleta de penas. Amostras de sangue só foram permitidas quando um hemograma ou exame bioquímico eram solicitados pelo clínico veterinário. Em alguns casos, mais de uma amostra foi coletada por animal, sendo este o melhor método para garantir um resultado fidedigno, uma vez que os vírus estudados são eliminados de forma intermitente, e apenas uma amostra poderia levar a um falso negativo. Devido à heterogeneidade da coleta de amostras, não foi possível comparar a eficácia de cada uma delas, porém, sabe-se que para APV e BFDV, as fezes são preconizadas para a obtenção de bons resultados, mas a coleta de fezes e penas aumenta a possibilidade de detecção destes agentes (HSU et al., 2006).

Harkins et al. (2014) descreveram o comércio mundial de aves silvestres como a principal forma de disseminação do BFDV. No mesmo estudo, um mapa com a possível movimentação do vírus foi descrito, no entanto, este não incluiu os países da América do Sul. O presente estudo demonstrou uma elevada ocorrência de BFDV e APV nas aves analisadas, estes resultados são relevantes uma vez que existe escassez de informações sobre estes agentes etiológicos no país. Considerando que 39 das 57 aves positivas pertenciam a espécies exóticas e a falta de legislação que estabeleça o controle destes agentes virais no Brasil, torna-se evidente a necessidade de se estabelecer uma legislação para estes e outros agentes infecciosos que acometem os psitacídeos, a fim de proteger a fauna silvestre nativa. Além do comércio de aves, a fuga de aves exóticas e silvestres de cativeiro são fatores importantes na disseminação de patógenos, que põe em risco toda a fauna silvestre (KARESH et al., 1997; JULIAN et al., 2013). O reconhecimento do impacto de agentes patógenos exóticos nas espécies nativas é está conhecida. BFDV é considerado a maior ameaça para psitacídeos de vida livre (ALLEY, 2002), e a prevenção da disseminação deste vírus é crucial para a proteção da fauna Brasileira.

A maior susceptibilidade de aves do velho mundo ao BFDV e ao APV em relação a aves do novo mundo já foi descrita (RITCHIE, 1995; BERT et al., 2005; HSU et al., 2006). Apesar de menos comum, há relatos da doença em espécies do novo mundo como *Amazona* sp e *Ara* sp. (PHALEN, 1998; BERT et al., 2005; HSU

et al., 2006; SZWEDA et al., 2011). Neste estudo, a porcentagem de aves positivas do novo e velho mundo equivalem, respectivamente, a 31,57% e 68,42%, para pelo menos um dos vírus estudados, respectivamente. Corroborando com a literatura, que descreve espécies do novo mundo como resistentes a ambos os vírus (PIASECKI; WIELECZKO, 2010). Os mesmos autores relataram que entre as espécies do novo mundo, *Amazona* sp. seriam os mais resistentes. Encontramos um maior número de aves desta família positivo para os vírus, entretanto, devido ao elevado número de *Amazona* sp. analisados e poucos indivíduos das outras espécies do novo mundo testados, esta hipótese não pode ser confirmada. Contudo, se as amostras positivas forem separadas por agente viral estudado, teremos para APV 8,17% (4/49) de aves do novo mundo e 22,53% (16/71) para aves do velho mundo. Enquanto para BFDV, 32,65% (16/49) para aves do novo mundo e 35,21% (25/71) para aves do velho mundo. Como esperado, o APV foi mais comumente encontrado em aves do velho mundo, porém, a distribuição do BFDV foi equivalente entre os dois grupos. Dentre as 25 aves do novo mundo positivas para BFDV, 12 eram *Amazona aestiva*, espécie popular no Brasil e no mundo. Sabe-se que os cuidados destinados a papagaios em cativeiro no país ainda é incipiente, sendo a nutrição baseada em sementes de girassol e pão com café. A má-nutrição é um fator agravante, que predispõe a ave a infecção (RITCHIE, 1995), devendo ser levada em consideração na alta casuísta da infecção por BFDV.

Considerando a origem das aves silvestres, quatro eram provenientes de criadouros, enquanto 12 vieram do tráfico de animais silvestres. Sabe-se que durante a captura e até o destino final, nove em cada dez aves capturadas veem a óbito. Desta forma, os animais que sobrevivem à captura provavelmente, devido ao estresse pode ocorrer diminuição da resposta imunológica, sendo mais susceptíveis a doenças. Não se sabe a origem destes animais, nem aos agentes etiológicos a que foram expostos. Entretanto, a possibilidade de contaminação das aves neste trajeto não pode ser descartada, principalmente pela falta de estudos destes agentes virais em aves de vida livre na América do Sul.

A detecção de BFDV em um Sabiá-cica (*Triclaria malachitacea*), espécie nativa do Brasil, é inédita. Os sinais clínicos apresentados -incoordenação motora e tremores musculares- não são compatíveis com o vírus. Latimer et al. (1996) descreveram sinais neurológicos progressivos em uma cacatua com APV e BFDV.

Como esta veio a óbito, foram realizados exames histopatológicos observando-se a presença de corpúsculo de APV em astrócitos e neurônios, sendo atribuído a este os sinais clínicos presente na ave. Como o Sabiá-cica não veio a óbito, outros estudos não puderam ser realizados, porém a detecção do vírus no sangue da ave indica a viremia, que pode preceder aos sinais clínicos, principalmente pelo fato de as fezes serem negativas para o vírus. Desta forma, há a possibilidade de outro agente estar associado aos sinais clínicos, independentemente da infecção por BFDV. A imunossupressão causada pelo BFDV pode ter sido um fator predisponente a entrada de outros agentes que poderiam estar causando os sinais neurológicos. Outra possibilidade é de uma infecção concomitante com o APV, já que sua eliminação é intermitente, podendo resultar em falso negativo.

Dentre os animais positivos para Circovírus, os sinais clínicos mais comuns encontrados foram apteria e apatia/anorexia. Apesar de serem sinais clínicos amplamente descritos na literatura, o elevado número de animais que apresentaram apenas apatia e/ou anorexia foi de oito aves (19,51%), número expressivo, que poderia passar despercebido na rotina clínica, sendo assim subdiagnosticado. O número de animais apresentando sinais neurológicos foi inesperado, considerando que não é um sinal descrito na literatura para este agente viral. Das onze aves com sinais neurológicos, seis foram positivas para Bornavírus e um para Poliomavírus, podendo ser considerado os prováveis agentes causadores desta sintomatologia. Entretanto, quatro aves foram positivas apenas para Circovírus. Pode-se considerar a possibilidade de outro agente não identificado ter sido o causador destes sinais clínicos, porém, a possibilidade do Circovírus levar a alterações neurológicas não deve ser desconsiderada. O Circovírus é associado a diferentes sintomatologias em diversas espécies, além de diferentes manifestações entre a forma aguda e a crônica. Cogita-se a possibilidade de existir manifestação neurológica pelo Circovírus na forma aguda em *A. aestiva*. Outros estudos devem ser realizados para se conhecer a epidemiologia do agente associado a problemas neurológicos associados ao Circovírus.

Em relação ao Poliomavírus, os sinais mais comuns foram apatia/anorexia em 95,23%, (n=20) sendo 66,67% (n=14) apresentando apenas estes sinais clínicos. O elevado número de aves apresentando sinais inespecíficos é relevante, sendo a possível causa dos escassos relatos na literatura encontrados no país. A hemorragia subcutânea, alteração sugestiva da doença, não foi observada. A

manifestação inespecífica deste agente dificulta sua detecção, permitindo que aves positivas disseminem a doença. Um sinal clínico único encontrado neste trabalho foi a presença de anemia em um *A. aestiva* positivo para APV em fezes e sangue. Além da anemia a ave apresentava vômito e prostração. Apesar de ser o primeiro relato deste sinal clínico, sabe-se que o APV causa hemorragia subcutânea e generalizada, entretanto, como os animais morrem, exames como hematócrito não são realizados. A anemia não regenerativa já foi relatada em um papagaio do congo com BFDV, mas não se sabe se este foi o agente etiológico causador da anemia ou se havia um outro patógeno que poderia estar causando este sinal clínico (RITCHIE, 1995). O APV é raro nesta espécie, que são consideradas resistentes a doença, possível razão pela qual a ave sobreviveu a doença e apresentou os sinais clínicos descritos. A anemia severa deve ser considerada como sinal clínico de APV em *Amazona* sp..

Entre as aves com infecção concomitante entre APV e Circovírus, os sinais observados foram: automutilação, apteria, anorexia e sinais neurológicos. Desta forma, 60% (n=3/5) demonstraram alteração em empenamento (apteria e/ou automutilação), sinais clássicos da doença, enquanto 20% (n=1/5) apresentaram sinais neurológicos e 20% (n=1/5) apatia e anorexia. Foi observado que os animais com infecção concomitante tiveram uma apresentação clínica mais característica das doenças, facilitando o diagnóstico. O único animal positivo para APV que apresentou sinais neurológicos foi positivo também para Circovírus. Esse achado corrobora com Latimer et al. (1996), que descreveram a encefalopatia viral de APV como sendo rara. Esta geralmente é encontrada quando há infecção associada a Circovírus, que provoca imunossupressão facilitando a disseminação do APV para o cérebro.

A árvore filogenética apresentada para o APV não indicou relação entre espécies e locais de origem das amostras, entretanto, a pequena quantidade de amostras disponíveis no GenBank pode dificultar a observação da relação entre as amostras (ZHUANG et al., 2012). A similaridade entre as amostras variou entre 96 a 98%, sendo 100% igual entre as amostras coletadas neste trabalho, demonstrando que todas as amostras pertencem ao mesmo genótipo.

Ao comparar as amostras obtidas no GenBank com as sequências deste trabalho, não foram observados agrupamentos em relação a origem das amostras, porém algumas espécies foram agrupadas juntas sugerindo uma possível relação

entre espécies e corroborando com Kloet e Kloet (2004), que observaram especificidade do vírus com algumas famílias ou subfamílias. A porcentagem de similaridades das sequências variou de 95 a 100%, sendo a similaridade entre as sequências NP 89 e NP 96 foi de 96%. Quando comparada com as mesmas espécies, a amostra NP 96 (*M. unduatus*) variou entre 99 e 100%, enquanto a amostra NP 89 (*E. roratus*) mostrou similaridade de 96%.

3.6 CONCLUSÃO

A detecção de APV e BFDV determina a ocorrência de ambos os vírus em psitacídeos de cativeiro no Brasil, tanto em espécies exóticas como em espécies nativas.

O BFDV foi descrito pela primeira vez em *Triclaria malachitacea*, uma espécie nativa do Brasil.

Os sinais clínicos mais comuns observados nas aves positivas para APV foram anorexia e/ou apatia, demonstrando a inespecificidade das manifestações clínicas nesta doença, sendo uma provável causa deste vírus não ser estudado no Brasil. Assim como, a dificuldade no diagnóstico desta doença quando outro agente não está associado. A presença de anemia em uma ave da espécie *Amazona aestiva* indica um possível sinal clínico de APV a ser considerado.

REFERÊNCIAS

ALBERTYN, J.; TAJBHAI, K. M.; BRAGG, R. R. Psittacine beak and feather disease virus in budgerigars and ring-neck parakeets in South Africa. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 1, p. 29–34, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15185572>>. Acesso em: 22 jun. 2012.

ALLEY, M. R. Avian wildlife diseases in New Zealand: current issues and achievements. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 50, n. 3, p. 118–120, 2002. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00480169.2002.36287>>. Acesso em: 25 Feb. 2014.

ALLEY, M. R.; RASIAH, I.; LEE, E. A.; HOWE, L.; GARTRELL, B. D. Avian polyomavirus identified in a nestling Gouldian finch (*Erythrura gouldiae*) in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, n. 6, p. 359–61, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23445119>>. Acesso em: 8 Nov. 2013.

BASSAMI, M. R.; BERRYMAN, D.; WILCOX, G. E.; RAIDAL, S. R. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine Circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. **Virology**, v. 249, n. 2, p. 453–9, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9791035>>. Acesso em: 23 maio 2013.

BENNETT, M. D.; GILLET, A. Butcherbird Polyomavirus isolated from a grey butcherbird (*Cracticus torquatus*) in Queensland, Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 2–4, p. 302–11, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24355535>>. Acesso em: 31 Jan. 2014.

BERNIER, G.; MORIN, M.; MARSOLAIS, G. A generalized inclusion body disease in budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) caused by papovavirus-like agent. **Avian Diseases**, v. 25, p. 1083–1092, 1981.

BERNIER, G.; MORIN, M.; MARSOLAIS, G. Papovavirus induced feather abnormalities and skin lesions in the budgerigar: clinical and pathological findings. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 25, n. 8, p. 307–10, 1984. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1790627&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 jun. 2013.

BERT, E.; TOMASSONE, L.; PECCATI, C.; NAVARRETE, M. G.; SOLA, S. C. Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, n. 2, p. 64–8, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15752264>>. Acesso em: 22 jun. 2013.

BOZEMAN, L. H.; DAVIS, R. B.; GAUDRY, D.; LUKERT, P. D.; FLETCHER, O. J.; DYKSTRA, M. J. Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars '. **Avian Diseases**, v. 25, n. 4, p. 972–980, 1981. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1590072>>. Acesso em: 22 jun. 2013.

DEB, A.; FOLDENAUER, U.; BORJAL, R. J.; STREICH, W. J.; LUKEN, C.; JOHNE, R.; MULLER, H.; HAMMER, S. A longitudinal study on avian polyomavirus-specific antibodies in captive spix's a longitudinal study on avian polyomavirus-specific antibodies in captive spix's macaws (*Cyanopsitta spixii*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 24, n. 3, p. 192–198, 2010. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1647/2009-004.1>>. Acesso em: 27 fev. 2014.

ENDERS, F.; GRAVENDYCK, A. M.; GERLACH, B. H.; KALETAB, E. F. Case report- fatal avian Polyomavirus infection during quarantine in adult wild-caught red-faced lovebirds (*Agapornis pullaria*). **Avian Diseases**, v. 41, n. 2, p. 496–498, 1997. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1592213>>. Acesso em: 22 maio 2012.

FRANCIOSINI, M. P.; FRINGUELLI, E.; TARHUNI, O.; GUELF, G.; TODD, D.; PROIETTI, P. C.; ASDRUBALI, G.; FRANCIOSINI, M. P.; FRINGUELLI, A. E.; TARHUNI, A. O.; GUELF, A. G.; TODD, A. D.; PROIETTI, B. P. C. Development of a polymerase chain reaction-based in vivo method in the diagnosis of subclinical pigeon Circovirus infection development of a polymerase chain reaction-based in vivo method in the diagnosis of subclinical pigeon circovirus infection. **Avian Diseases**, v. 49, n. 3, p. 340–343, 2005. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1637/7334-012705R.1>>. Acesso em: 23 maio 2012.

GERLACH, H. Viruses. In: RITCHIE, BW; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. (Org.). **Avian Medicine: principles and application**. Florida: Wingers Publishing, 1994. p. 888–902.

HA, H. J.; ALLEY, M. R.; CAHILL, J. I.; HOWE, L.; GARTRELL, B. D. The prevalence of psittacine beak and feather disease virus infection in native parrots in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, n. 1, p. 50–2, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19252543>>. Acesso em: 4 Feb. 2014.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium series**, n. 41, p. 95–98, 1999.

HARKINS, G. W.; MARTIN, D. P.; CHRISTOFFELS, A.; VARSANI, A. Towards inferring the global movement of beak and feather disease virus. **Virology**, v. 450–451, p. 24–33, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682213006557>>. Acesso em: 4 Feb. 2014.

HEATH, L.; MARTIN, D. P.; WARBURTON, L.; PERRIN, M.; HORSFIELD, W.; KINGSLEY, C.; RYBICKI, E. P.; WILLIAMSON, A.L. Evidence of unique genotypes

of beak and feather disease virus in southern Africa. **Journal of Virology**, v. 78, n. 17, p. 9277-9284, 2004.

HSU, CHIH-MING; KO, CHING-YI; TSAI, HSIANG-JUNG. Detection and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from psittacine birds in taiwan detection and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 50, n. 3, p. 348–353, 2006. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1637/7485-121105R.1>>. Acesso em: 23 jul. 2012.

JULIAN, L.; LORENZO, A.; CHENUET, J.; BONZON, M.; MARCHAL, C.; VIGNON, L.; COLLINGS, D. A.; WALTERS, M.; JACKSON, B.; VARSANI, A. Evidence of multiple introductions of beak and feather disease virus into the Pacific islands of Nouvelle-Calédonie (New Caledonia). **The Journal of General Virology**, v. 93, n. 11, p. 2466–72, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22855782>>. Acesso em: 8 Nov. 2013.

JULIAN, L.; PIASECKI, T.; CHRZASTEK, K.; WALTERS, M.; MUHIRE, B.; HARKINS, G. W.; MARTIN, D. P.; VARSANI, A. Extensive recombination detected among beak and feather disease virus isolates from breeding facilities in Poland. **The Journal of General Virology**, v. 94, n. 5, p. 1086–95, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23324468>>. Acesso em: 4 Feb. 2014.

KARESH, W. B.; CAMPO, A.; BRASELTON, W. E.; PUCHE, H.; COOK, R. A. Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara* spp.) in Peru. **Journal Of Zoo And Wildlife Medicine**, v. 28, n. 4, p. 368–377, 1997. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/20095677>>. Acesso em: 1 jan. 2013.

KATOH, H.; OHYA, K.; ISE, K.; FUKUSHI, H. Genetic analysis of beak and feather disease virus derived from a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 5, p. 631–4, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20035119>>. Acesso em: 5 fev. 2013.

KLOET, E.; KLOET, S. R. Analysis of the beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specificity. **Archives of Virology**, v. 149, n. 12, p. 2393–412, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15290360>>. Acesso em: 26 Feb. 2014.

KOU, ZHENG; ZHANG, ZHONG; CHEN, SHENGLIANG; FAN, ZHAOJUN TANG, SHUANG; ZHAO, LIN; ZHANG, A. B. ZHONG; CHEN, B. SHENGLIANG; FAN, B. ZHAOJUN; TANG, B. SHUANG; ZHAO, B. LIN; BC, TIANXIAN LI. Molecular characterizations of avian Polyomavirus isolated from budgerigar in china. **Avian Diseases**, v. 52, n. 3, p. 451–454, 2008. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1637/8223-012408-Reg.1>>. Acesso em: 5 fev. 2013.

LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. D.; CAMPAGNOLI, R. P.; RITCHIE, B. W.; PESTI, D. A.; III, W. L. S. Diagnosis of concurrent avian Polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus infections using DNA probes. **Journal of the Association of**

Avian Veterinarians, v. 7, n. 3, p. 141–146, 1993. Disponível em:
<<http://www.jstor.org/stable/30135045>>. Acesso em: 6 mar. 2013.

LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. D.; STEFFENS, W. L.; RITCHIE, B. W.; CAMPAGNOLI, R. P. Polyomavirus encephalopathy in a ducorps cockatoo (*Cacatua ducorpsii*) with psittacine beak and feather disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 3, p. 291–295, 1996. Disponível em:
<<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879600800303>>. Acesso em: 8 Nov. 2013.

LATIMER, K. S.; RAKICH, P. M.; KIRCHER, I. M.; RITCHIE, B. W.; NIAGRO, F. D.; STEFFENS, W. L.; LUKERY, D. Extracutaneous viral inclusions in psittacine beak and feather disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, n. 3, p. 204–207, 1990. Disponível em:
<<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879000200309>>. Acesso em: 3 Feb. 2014.

MASSARO, M.; ORTIZ-CATEDRAL, L.; JULIAN, L.; GALBRAITH, J. A.; KURENBACH, B.; KEARVELL, J.; KEMP, J.; VAN HAL, J.; ELKINGTON, S.; TAYLOR, G.; GREENE, T.; VAN DE WETERING, J.; VAN DE WETERING, M.; PRYDE, M.; DILKS, P.; HEBER, S.; STEEVES, T. E.; WALTERS, M.; SHAW, S.; POTTER, J.; FARRANT, M.; BRUNTON, D. H.; HAUBER, M.; JACKSON, B.; BELL, P.; MOORHOUSE, R.; MCINNES, K.; VARSANI, A. Molecular characterisation of beak and feather disease virus (BFDV) in New Zealand and its implications for managing an infectious disease. **Archives of Virology**, v. 157, n. 9, p. 1651-63, 2012.

OGAWA, H.; KATOH, H.; SANADA, N.; SANADA, Y.; OHYA, K.; YAMAGUCHI, T.; FUKUSHI, H. A novel genotype of beak and feather disease virus in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **Virus Genes**, v. 41, n. 2, p. 231-5, 2010.

PASS, D. A.; PERRY, R. A. The pathology of psittacine beak and feather disease. **Australian Veterinary Journal**, v. 61, n. 3, p. 69–74, 1984.

PHALEN, D. N. Avian polyomavirus: my thoughts. **American Federation Of Aviculture Watchbird**, v. 25, p. 28–39, 1998.

PHALEN, D. N. Implications of viruses in clinical disorders. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. L. **Clinical avian medicine**. [s.l.: s.n.], Florida:Spix Publishing, 2005. p. 721-746.

PHALEN, D. N.; RADABAUGH, C. S.; DAHLHAUSEN, R. D.; STYLES, D. K. Viremia, virus shedding, and antibody response during natural avian Polyomavirus infection in parrots. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 1, p. 32–6, 2000. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10909443>>. Acesso em 25 ago. 2013.

PHALEN, D. N.; WILSON, V. G.; GRAHAM, D. L. Prevalence of neutralizing antibody and virus shedding in avian Polyomavirus infected parrots. **Journal of Avian Medicine And Surgery**, v. 11, n. 2, p. 98–104, 1997.

PIASECKI, T.; WIELICZKO, A. Detection of beak and feather disease virus and avian polyomavirus dna in psittacine birds in Poland. **Bulletin Of The World Health Organization Veterinary Institute In Pulawy**, v. 54, p. 141–146, 2010.

POTTI, J.; BLANCO, G.; LEMUS, J. Á.; CANAL, D. Infectious offspring: how birds acquire and transmit an avian Polyomavirus in the wild. **PLoS ONE**, v. 2, n. 12, p. 5, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2093992&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 ago. 2013.

RAHAUS, M.; DESLOGES, N.; PROBST, S.; LOEBBERT, B.; LANTERMANN, W.; WOLFF, M. H. Detection of beak and feather disease virus DNA in embryonated eggs of psittacine birds. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n. 1, p. 53–58, 2008.

RAHAUS, M.; WOLFF, M. H. A survey to detect subclinical polyomavirus infections of captive psittacine birds in Germany. **Veterinary Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 73–6, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607086>>. Acesso em: 14 Jun. 2012.

RAHAUS, M.; WOLFF, M. H. Psittacine beak and feather disease: a first survey of the distribution of beak and feather disease virus inside the population of captive psittacine birds in Germany. **Journal Of Veterinary Medicine**, v. 50, n. 8, p. 368–71, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633205>>. Acesso em: 14 jun. 2013.

RAIDAL, S. R.; CROSS, G. M. The haemagglutination spectrum of psittacine beak and feather disease virus. **Avian Pathology: journal of the W.V.P.A.**, v. 23, n. 4, p. 621–30, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18671129>>. Acesso em: 3 fev. 2014.

RAMIS, A.; LATIMER, K. S.; GIBERT, X.; CAMPAGNOLI, R. A concurrent outbreak of psittacine beak and feather disease virus, and avian polyomavirus infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **Avian pathology: journal of the W.V.P.A.**, v. 27, n. 1, p. 43–50, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483964>>. Acesso em: 3 fev. 2013.

RITCHIE, B. W. **Avian viruses: function and control**. Florida: Wingers Publishing, 1995.

ROTT, O.; KRÖGER, M.; MÜLLER, H.; HOBOM, G. The genome of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus. **Virology**, v. 165, n. 1, p. 74–86, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2838972>>. Acesso em: 23 jul. 2012.

SCHOEMAKER, N. J.; DORRESTEIN, G. M.; LATIMER, K. S.; LUMEIJ, J. T.; KIK, M. J. L.; VAN DER HAGE, M. H.; CAMPAGNOLI, R. P. Severe leukopenia and liver necrosis in young african grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) Infected with Psittacine Circovirus. **Avian Diseases**, v. 44, n. 2, p. 470–478, 2000. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1592565>>. Acesso em: 23 jul. 2013.

SOIKE, D.; HATTERMANN, K.; ALBRECHT, K.; SEGALES, J.; DOMINGO, M.; SCHMITT, C.; MANKERTZ, A. A diagnostic study on columbid circovirus infection. **Avian Pathology**: journal of the W.V.P.A, v. 30, n. 6, p. 605–11, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19184954>>. Acesso em: 23 jul. 2013.

SZWEDA, M.; ODZIEJSKA, A. K. O.; SZAREK, J.; BABIŃSKA, I. Avian polyomavirus infections in Amazon parrots. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 67, n. 3, p. 147–150, 2011.

TODD, D.; WESTON, J.; BALL, N. W.; BORGHMANS, B. J.; SMYTH, J. A.; GELMINI, L.; LAVAZZA, A. Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries. **Avian Pathology**, v. 30, p. 321–325, 2001.

WERTHER, K.; RASO, T. F.; DURIGON, E. L.; LATIMER, K. S.; CAMPAGNOLI, R. P. Psittacine beak and feather disease in Brazil: case report. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 1, n. 1, p. 85–88, 1999.

WOODS, L.; LATIMER, K. S. Circovirus infection of pigeons and other avian species. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Disease of poultry**. 12. ed. Singapura: Blackwell, 2008. p. 236–249.

WOODS, L. W.; LATIMER, K. S.; BARR, B. C.; NIAGRO, F. D.; CAMPAGNOLI, R. P.; NORDHAUSEN, R. W.; CASTRO, A. E. Circovirus-like infection in a Pigeon. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 4, p. 609–612, 1993. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879300500417>>. Acesso em: 1 fev. 2014.

WOODS, L. W.; LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. D.; RIDDELL, C.; CROWLEY, A. M.; ANDERSON, M. L.; DAFT, B. M.; MOORE, J. D.; CAMPAGNOLI, R. P.; NORDHAUSEN, R. W. A Retrospective study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986–1993). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 2, p. 156–164, 1994. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879400600205>>. Acesso em: 14 Jun. 2012.

WOODS, L. W.; LATIMER, K. S. Circovirus infection of nonpsittacine birds. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 14, n. 3, p. 154–163, 2000.

WYLIE, S. L.; PASS, D. A. Experimental reproduction of psittacine beak and feather disease/French Molt. **Avian Pathology**: journal of the W.V.P.A, v. 16, n. 2, p. 269–81, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18766613>>. Acesso em: 26 Fev. 2014.

YPELAAR, I.; BASSAMI, M. R.; WILCOX, G. E.; RAIDAL, S. R. A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. **Veterinary Microbiology**, v. 68, n. 1–2, p. 141–8, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501171>>. Acesso em: 25 fev. 2012.

ZHUANG, QINGYE; CHEN, JIMING; MUSHTAQ, MUHAMMAD HASSAN; CHEN, JIE; LIU, SHUO; HOU, GUANGYU; LI, JINPING; HUANG, BAOXU; JIANG, WENMING. Prevalence and genetic characterization of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus isolated from budgerigars in Mainland China. **Archives of Virology**, v. 157, n. 1, p. 53–61, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22002652>>. Acesso em: 8 Nov. 2013.

4 POLIOMAVÍRUS ASSOCIADO A ANEMIA SEVERA EM PAPAGAIO VERDADEIRO (*Amazona aestiva*): RELATO DE CASO

4.1 INTRODUÇÃO

O Poliomavírus Aviário (APV) é um vírus icosaédrico, não envelopado, com diâmetro de 42-49 nm, possuindo uma fita dupla circular de DNA, pertencente à família Papovaviridae (BOZEMAN et al., 1981). São resistentes a diversos fatores ambientais, a solventes, detergentes lipídicos, baixo pH e a altas temperaturas. A replicação ocorre dentro do núcleo das células e seu material genético pode ser considerado oncogênico (MURPHY et al., 1999). A primeira infecção descrita deste vírus ocorreu em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) jovens, sendo depois associada com elevada mortalidade e morbidade em outros psitacídeos. A doença já foi descrita também no Japão, Alemanha, Canadá, Itália, África do Sul, Estados Unidos e Austrália (LATIMER et al., 1993).

Em papagaios da Amazônia (*Amazona* sp.) a doença é incomum, entretanto, já foram descritos casos em animais jovens e adultos, comumente associada a imunossupressão. Os sinais clínicos são emese, sinais neurológicos, anorexia, apatia e morte súbita (SZWEDA et al., 2011). A doença subclínica é a mais comum nestas espécies, devido a resistência a doença. Na Polônia, 18% dos *Amazona* sp. testado foram positivos para APV, todos assintomáticos (PIASECKI; WIELICZKO, 2010).

No Brasil, devido a falta de estudos sobre o vírus, pouco se sabe sobre a ocorrência da doença em aves doentes e híginas. Este é o primeiro relato de caso de um *A. aestiva* com a doença no país, além da descrição de um sinal clínico não comumente associado à infecção por APV.

4.2 REVISÃO DE LITERATURA

4.2.1 POLIOMAVÍRUS EM *Amazona* sp.

O APV é causador de perda econômica anual substancial para criação de aves silvestres e casa de venda de animais (PHALEN, 1998). O vírus afeta todas as espécies de psitacídeos, sendo distribuído mundialmente (ENDERS et al., 1997; PHALEN et al., 2000; BERT et al., 2005; RAHAUS; WOLFF, 2005; DEB et al., 2010; ZHUANG et al., 2012; ALLEY et al., 2013; BENNETT; GILLET, 2014), entretanto os sinais clínicos podem variar de acordo com o agente, apresentando a forma crônica na Europa e aguda na América (GERLACH, 1994; RITCHIE, 1995).

Os periquitos australianos são comumente afetados. Os sinais encontrados variam de acordo com a idade do animal, por exemplo, em neonatos, ocorre o desenvolvimento normal até dez a quinze dias seguido de morte súbita. Alguns indivíduos apresentam sinais clínicos como distensão abdominal, hemorragia subcutânea e sinais neurológicos (ataxia e tremores). As aves que sobrevivem a primeira quinzena podem apresentar penas distróficas e áreas aptéricas. Ocorre também diminuição da natalidade durante o período reprodutivo, com aumento de morte embrionária (PHALEN, 1998, 2005; LAFFERTY et al., 2012).

Outros psitacídeos também são susceptíveis, ocorrendo a morte súbita dos filhotes ou óbito pouco após ocorrerem os sinais clínicos não específicos, como depressão, perda de peso, estase de papo, anorexia, diarreia e dispneia. *Eclectus* sp. são mais susceptíveis, ocorrendo estase de papo e diminuição do esvaziamento gastrointestinal, podendo ser confundido com a infecção por Bornavírus, sendo a hematúria um indicativo de APV. A doença crônica aparece com uma perda de peso progressiva, anorexia intermitente, poliúria, penas mal formadas e depressão. A doença em aves adultas é rara, e geralmente está associada a infecção concomitante com a Doença do Bico e das Penas de Psitacídeos (Circovírus), que leva a uma imunossupressão (LATIMER et al., 1993, 1996; PHALEN, 1998; 2005)

A doença é rara em *Amazona* sp. adultos, estando geralmente associada ao Circovírus (PHALEN, 2005). *Amazona* sp. infectados podem vir a óbito sem demonstrar sinais clínicos ou apresentarem depressão, anorexia, perda de peso,

demora no esvaziamento do papo, diarreia, regurgitação, ataxia e paresia (SZWEDA et al., 2011). A necrose hepática também foi relatada nestas aves (GARCIA et al, 1994).

A doença subclínica é mais comum em papagaios da Amazônia. Phalen et al. (2000) encontraram papagaios da Amazônia positivos em um aviário onde ocorreu um surto, entretanto, diferente das demais espécies, estes não apresentaram sinais clínicos aparentes. Alguns autores já relataram a doença nestas espécies (KENNETH et al., 1993; JULIAN et al., 2013; ROY et al., 2004), porém poucos detalhes foram apresentados sobre os sinais clínicos e a infecção. Na Polônia a prevalência de APV em *Amazona* sp. assintomáticos foi de 18%, enquanto em Taiwan foi de 12,5% (HSU et al., 2006; PIASECKI; WIELICZKO, 2010). Entretanto, na Itália nenhum dos 238 papagaios da Amazônia testados foram positivos (BERT et al., 2005).

4.3 CASO CLÍNICO

Um papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) de 2 anos e 4 meses de idade foi atendido no Ambulatório de Aves da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ -USP), apresentando anorexia apatia há três dias e vômitos há um dia. A ave foi alojado em uma gaiola e alimentado com ração comercial peletizada, sementes de girassol, frutas, legumes e água “ad libitum”. Ao exame clínico, foi observado boa conformação de musculatura peitoral, sinais sugestivos de desidratação leve e mucosas pálidas. Melena e poliúria também foram observados. Prescreveu-se enrofloxacin (IM 15 mg / Kg Baytril 5 % , Bayer ®) , ferro (20 mg / Kg Ferrodex , Tortuga ®), vitamina B (3 mg / Kg Vitamina B1 , Labovet ®) e fluido (solução cristalóide - 20 ml / Kg Equiplex ®).

No dia 3 de tratamento, a ave retornou a clínica, não apresentando melhora do quadro clínico. Na inspeção macroscópica das fezes, observou-se sementes não digeridas, enquanto no exame microscópico havia presença de gordura nas fezes, no entanto, não havia presença de sangue. Como o animal estava desidratado e com mucosas hipocoradas, nenhum exame de sangue foi realizado. Ao exame radiográfico foram observados aumento da silhueta renal e papo ligeiramente

dilatado (Figura 17). No mesmo dia , as amostras de fezes foram coletadas para reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de Bornavírus, Circovírus e Poliomavírus. Foi administrado pancreatina por via oral (2 g / Kg, composto de droga) e nistatina (300,000 UI / Kg , Micostatin , Bristol ®).

Figura 17 - Radiografia simples latero-lateral do *Amazona aestiva*



Fonte: AZEVEDO, N. P. (2013).

Legenda: Observar aumento do papo (repleto de conteúdo radiopacidade água) e aumento da silhueta renal.

No dia 7, o animal retornou sem melhora clínica, o mesmo apresentava desidratado, dispneico, com mucosas hipocoradas, emese, retardo no esvaziamento do papo e sementes não digeridas nas fezes. Durante os dias 8 e 9, a ave não permaneceu fundo da gaiola, sem conseguir se empoleirar. As fezes ainda apresentavam gordura. Foi realizado hematócrito, cujo resultado foi de 33%. Desta forma, foi aplicado a metoclopramida IM (0,5 mg / Kg , Noprosil , Isofarma ®) e fluido hipertônico (solução cristalóide - 20 ml / Kg , Equiplex ® - e solução coloidal - 10 ml / Kg , Voluven ®).

No dia 10 o animal continuou apresentando emese, sendo encaminhado à clínica. A ave recebeu enrofloxacina , nistatina e papa para psitacídeos através de sonda de ingluvío, durante 3 dias. No retorno (dia 14) o animal demonstrou-se ligeiramente mais ativo, sendo então coletado sangue para um hemograma completo, sendo uma gota de sangue enviada para testes viral (Bornavírus,

Circovírus e Poliomavírus). No dia seguinte (dia 15) a ave ainda apresentava emese e sementes não digeridas nas fezes. O tratamento preconizado foi: fluidoterapia com solução coloidal, sucralfato SID (25 mg/kg, Sucrafilm, Sigma Pharma ®), imunoestimulante e multivitaminaco oral.

Uma anemia normocítica normocrômica não regenerativa, com hematócrito de 14% com anisocitose discreta, policromasia e leucopenia grave, sem alterações nas células brancas do sangue foi observada no hemograma. Esta anemia indica diminuição da eritropoiese . Os resultados da PCR apresentaram como positivo para Poliomavírus no sangue e fezes, e negativo para Circovírus e Bornavírus, confirmando uma infecção de Poliomavírus ativa.

A ave voltou a se alimentar no dia 20, apresentando-se mais ativo e sem episódios de emese. A enrofloxacina e nistatina foram suspensas, entretanto metoclopramida, sucralfato, imunoestimulante e vitaminas foram mantidos . No dia 27, o animal regressou a clínica com apetite melhor e mais ativo. O tratamento de nistatina, vitamina e imunoestimulante foram mantidos por mais 10 dias.

Um mês após a apresentação inicial dos sinais clínicos, a ave voltou a vocalizar e apresentar apetite normal. Um novo hematócrito foi realizado, resultando em 51%, demonstrando a normalização de doenças hematológicas. Todos os medicamentos foram suspensos e o animal recebeu alta.

4.4 DISCUSSÃO

Há poucos relatos da doença em *Amazona* sp. e não há descrição de APV nesta espécie no Brasil. A detecção de Poliomavírus pelo veterinário é geralmente negligenciada devido a ausência de sinais clínicos específicos para a doença. Por outro lado, há uma carência no diagnóstico laboratorial diferencial da enfermidade em relação às demais infecções causadas por vírus em psitacídeos. Assim, a prevalência desta doença no Brasil é desconhecida.

Os sinais clínicos relacionados ao APV são variáveis, dependendo da espécie e da idade. O óbito súbito sem quaisquer sinais clínico de doença é relatada em filhotes de várias espécies (RAHAUS; WOLFF, 2005), entretanto, pena distrófica, descoloração da pele e distensão abdominal são as apresentações

clínicas mais comuns (PHALEN, 1998; RAMIS et al., 1998). Outros sinais clínicos incluem apatia, poliúria, diarreia, dispnéia, emagrecimento, hemorragia e regurgitação (PHALEN et al., 1998; PHALEN et al., 2000; SZWEDA et al., 2011; LAFFERTY et al., 2012).

Em papagaios da Amazônia, a maioria das infecções são assintomáticas, e os poucos relatos da doença são geralmente concomitante com Circovírus. Alguns sinais clínicos descritos são morte súbita, depressão, anorexia, perda de peso, atraso no esvaziamento do papo, regurgitação, diarreia, desidratação, hemorragias subcutâneas, ataxia e paralisia (RAHAUS; WOLFF, 2005). As infecções crônicas de psitacídeos com APV indicam a existência de uma subpopulação positiva para o vírus dentro da população de psitacídeos em cativeiro. Estas infecções subclínicas podem servir como um reservatório (RAHAUS; WOLFF, 2005).

Todos os sinais clínicos apresentados neste trabalho são compatíveis com a APV, no entanto, a anemia grave durante a fase de viremia é um sinal clínico considerado atípico e não há relatos na literatura. O hematócrito encontrado foi de 14%, com anisocitose e policromasia, levando a uma anemia normocrômica, indicando uma diminuição da eritropoiese. A anemia pode ser causada por uma lesão renal aguda ou crônica, devido à menor produção de eritropoietina, um hormônio que regula a produção de células do sangue (THRALL et al., 2004).

Neste relato, o animal apresentava poliúria, sinal claro de doença renal, podendo ter sido causada por APV, comumente encontrado no parênquima renal. Infecções virais podem provocar anemia através de um processo hemolítico devido à resposta imunológica do organismo da ave, portanto, pode-se considerar a possibilidade de anemia devido à nefropatia, causada ou agravada pela infecção viral. Em psitacídeos com aumento renal, glomerulopatia com reação de PAS (ácido periódico de Schiff) positiva pode sugerir infecção por APV (GERLACH et al., 1998). A progressão da doença no presente caso foi de um mês, corroborando com a literatura (PHALEN et al., 2000; SZWEDA et al., 2011). Com a melhoria dos sinais clínicos e com terapia suporte, houve uma evolução da anemia para hematócrito normal em um mês após o início do tratamento.

Phalen et al. (2000) relataram a trombocitopenia aparente em esfregaços de sangue aves de um criatório com surto de APV. Os mesmos indicaram a possibilidade desta ser a causa da hemorragia causada pela doença. A causa da trombocitopenia não foi detectada, porém, os mesmos autores sugeriram a

possibilidade de uma trombólise viral ou de uma indução de uma coagulação intravascular disseminada (CID). Neste relato entretanto, não houve alteração em trombócitos, porém o hemograma só foi realizado 14 dias após o início da apresentação viral, havendo possibilidade de uma normalização do quadro, já que a ave apresentava início de melhora clínica.

Embora a anemia não seja um achado comum, deve-se levar em consideração que a maioria das aves morrem sem apresentar sinais clínicos, portanto, não é possível realizar testes adicionais, como o hemograma. Considerando os sinais comumente encontrados, como hematúria e petéquias subcutânea (PHALEN et al., 2000), a possibilidade de que a anemia também ocorra em outras aves devem ser consideradas. É sabido que em passeriformes pode ocorrer uma hemorragia generalizada (LAFFERTY et al., 2012), que poderia levar a anemia.

Além da anemia, outra alteração hematológica foi observada, a leucopenia grave, sem alterações nas outras células brancas, comuns em infecções virais agudas. O hemograma não demonstrou sinais evidentes de uma infecção bacteriana associada ao APV.

Infecções agudas de APV em *Amazona* sp. adultos têm sido descritas, sendo frequentemente causadas por imunossupressão, geralmente associada com a infecção concomitante com Circovírus (SZWEDA et al., 2011). Entretanto, a ave deste estudo foi negativa para Circovírus e Bornavírus, através de testes moleculares. É possível que tenha ocorrido imunossupressão devido a fatores ambientais como o estresse associado a mudanças de clima, a alimentação e período reprodutivo. Apesar de não ser uma ave filhote, a idade de maturidade destas espécies é de aproximadamente 5 anos, logo a ave deste relato, com 2 anos e 4 meses deve ser considerada jovem, e desta forma, sendo ainda susceptível ao vírus.

A transmissão do agente pode ocorrer de diversas formas, inclusive através do contato com ectoparasitas contaminados (POTTI et al., 2007). A dificuldade de diagnóstico ocorre devido aos sinais inespecíficos e de transmissão por animais assintomáticos. O vírus é eliminado através das fezes, descamação da pele e fômites (RITCHIE, 1995). Sugere-se que a viremia preceda excreção viral cloacal, apesar de a viremia persistir após o início da eliminação do vírus nas fezes. Em uma infecção clássica, o período entre o início da viremia e o início da disseminação do

vírus pela cloaca é de apenas alguns dias (PHALEN et al., 2000). As aves importadas desempenham papel importante na disseminação deste e outros agentes (PIASECKI & WIELICZKO, 2010) agravada pela ausência de legislação que controle esses agentes no Brasil.

4.5 CONCLUSÃO

Este artigo descreve um caso de *A. aestiva* de dois anos e quatro meses de idade, diagnosticado com APV através do PCR de fezes e sangue, apresentando emese, sementes não digeridas nas fezes e anemia. Considerando os resultados do diagnóstico molecular por PCR e os sinais clínicos manifestados, há fortes evidências de que o sinais clínicos foram relacionados a infecção por APV. A anemia deve ser considerada como um sinal clínico adicional importante nos casos de infecção por APV em *Amazona* sp.. Esta foi a primeira descrição de infecção por APV associada à anemia em *A. aestiva* no país

REFERÊNCIAS

ALLEY, M.; RASIAH, I.; LEE, E.; HOWE, L.; GARTRELL, B. Avian polyomavirus identified in a nestling Gouldian finch (*Erythrura gouldiae*) in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, n. 6, p. 359–61, 2013

BENNETT, M. D.; GILLET, A. Butcherbird polyomavirus isolated from a grey butcherbird (*Cracticus torquatus*) in Queensland, Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 2-4, p. 302–11, 2014.

BERT, E.; TOMASSONE, L.; PECCATI, C.; NAVARRETE, M. G.; SOLA, S. C. Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, n. 2, p. 64–8, 2005.

BOZEMAN, A. L. H.; DAVIS, R. B.; GAUDRY, D.; LUKERT, P. D.; FLETCHER, O. J. Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars **Avian Diseases**, n. 25, n. 4, p. 972–980, 1981. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1590072>> Acesso em: 23 jun. 2012.

DEB, A.; FOLDENAUER, U.; BORJAL, R. J.; STREICH, W. J.; LUKEN, C.; JOHNE, R.; MULLER, H.; HAMMER, S. A longitudinal study on avian polyomavirus-specific antibodies in captive spix's a longitudinal study on avian polyomavirus-specific antibodies in captive spix's macaws (*Cyanopsitta spixii*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 24, n. 3, p. 192–198, 2010. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1647/2009-004.1>>. Acesso em: 27 fev. 2014.

ENDERS, F.; GRAVENDYCK, A. M.; GERLACH, B. H.; KALETAB, E. F. Case report- fatal avian Polyomavirus infection during quarantine in adult wild-caught red-faced lovebirds (*Agapornis pullaria*). **Avian Diseases**, v. 41, n. 2, p. 496–498, 1997. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1592213>>. Acesso em: 22 maio 2012.

GARCIA, A.; LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. D.; RITCHIE, B. W.; CAMPAGNOLI, R. P. Diagnosis of polyomavirus-induced hepatic necrosis in psittacine birds using DNA probes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 3, p. 308–314, 1994.

GERLACH, H. Viruses. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. (Org.). **Avian medicine: principles and application**. 1 ed. Florida: Wingers Publishing, 1994, p. 888–902.

GERLACH, H.; ENDERS, F.; CASARES, M.; MÜLLER, H.; JOHNE, R. Membranous Glomerulopathy as an Indicator of Avian Polyomavirus Infection in Psittaciformes. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 12, n. 4, p. 248–254, 1998. Disponível em <<http://www.jstor.org/stable/30135180>>. Acesso em: 12 jun. 2013.

HSU, CHIH-MING; KO, CHING-YI; TSAI, HSIANG-JUNG. Detection and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from psittacine birds in taiwan detection and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 50, n. 3, p. 348–353, 2006. Disponível em:

<<http://www.bioone.org/doi/full/10.1637/7485-121105R.1>>. Acesso em: 23 jul. 2012.

JULIAN, L.; PIASECKI, T.; CHRZASTEK, K.; WALTERS, M.; MUHIRE, B.; HARKINS, G. W.; MARTIN, D. P.; VARSANI, A. Extensive recombination detected among beak and feather disease virus isolates from breeding facilities in Poland.

The Journal of General Virology, v. 94, n. 5, p. 1086–95, 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23324468>>. Acesso em: 4 Feb. 2014

LAFFERTY, S. L.; FUDGE, A M.; SCHMIDT, R. E.; WILSON, V. G.; PHALEN, D. N. Avian polyomavirus infection and disease in a green aracaris (*Pteroglossus viridis*).

Avian Diseases, v.43, n. 3, p. 577–85, 2012. Disponível em

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10494430>> Acesso em: 1 jan. 2013

LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. D.; CAMPAGNOLI, R. P.; RITCHIE, B. W.; PESTI, D. A.; III, W. L. S. Diagnosis of concurrent avian Polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus infections using DNA probes. **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, v. 7, n. 3, p. 141–146, 1993. Disponível em:

<<http://www.jstor.org/stable/30135045>>. Acesso em: Acesso em: 6 mar. 2013.

LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. D.; STEFFENS, W. L.; RITCHIE, B. W.; CAMPAGNOLI, R. P. Polyomavirus encephalopathy in a ducorps cockatoo (*Cacatua ducorpsii*) with psittacine beak and feather disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 3, p. 291–295, 1996. Disponível em:

<<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879600800303>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary virology**. Londres: Academic Press, 1999.

PHALEN, D. N. Avian polyomavirus : my thoughts. **American Federation Of Aviculture Watchbird**, v. 25, p. 28–39, 1998.

PHALEN, D. N. Implications of Viruses in Clinical Disorders. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. L. **Clinical Avian Medicine**. [s.l.: s.n.], Florida:Spix Publishing, 2005. p. 721-746.

PHALEN, D. N.; RADABAUGH, C. S.; DAHLHAUSEN, R. D.; STYLES, D. K. Viremia, virus shedding, and antibody response during natural avian Polyomavirus infection in parrots. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 1, p. 32–6, 2000. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10909443>>. Acesso em 25 ago. 2013.

PIASECKI, T.; WIELICZKO, A. Detection of beak and feather disease virus and avian polyomavirus dna in psittacine birds in Poland. **Bulletin Of The World Health Organization Veterinary Institute In Pulawy**, v. 54, p. 141–146, 2010.

POTTI, J.; BLANCO, G.; LEMUS, J. Á.; CANAL, D. Infectious offspring: how birds acquire and transmit an avian Polyomavirus in the wild. **PLoS ONE**, v. 2, n. 12, p. 5, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2093992&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 ago. 2013.

RAHAUS, M.; WOLFF, M. H. A survey to detect subclinical polyomavirus infections of captive psittacine birds in Germany. **Veterinary Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 73–6, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607086>>. Acesso em: 14 Jun. 2012.

RAMIS, A.; LATIMER, K. S.; GIBERT, X.; CAMPAGNOLI, R. A concurrent outbreak of psittacine beak and feather disease virus, and avian polyomavirus infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **Avian Pathology: journal of the W.V.P.A.**, v. 27, n. 1, p. 43–50, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483964>>. Acesso em: 3 fev. 2013.

RITCHIE, B. W. **Avian viruses: function and control**. Florida: Wingers Publishing, 1995.

ROY, P.; DHILLON, A. S.; LAUERMAN, L.; SHIVAPRASAD, H. L.; DHILLON, A. A. S.; LAUERMAN, A. C. L.; SHIVAPRASAD, H. L. B. Detection of Avian Polyomavirus Infection by Polymerase Chain Reaction Using Formalin-Fixed , Paraffin-Embedded. **Avian Diseases**, v. 48, n. 2, p. 400–404, 2004.

SZWEDA, M.; ODZIEJSKA, A. K. O.; SZAREK, J.; BABIŃSKA, I. Avian polyomavirus infections in Amazon parrots. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 67, n. 3, p. 147–150, 2011.

THRALL, M.; BARKER, D.; CAMPBELL, T.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.; LASSEN, E.; REBAR, A.; WEISER, G. **Veterinary hematological and clinical chemistry**. Victoria: Lippincott William and Wilkins, 2004.

ZHUANG, QINGYE; CHEN, JIMING; MUSHTAQ, MUHAMMAD HASSAN; CHEN, JIE; LIU, SHUO; HOU, GUANGYU; LI, JINPING; HUANG, BAOXU; JIANG, WENMING. Prevalence and genetic characterization of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus isolated from budgerigars in Mainland China. **Archives of Virology**, v. 157, n. 1, p. 53–61, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22002652>>. Acesso em: 8 nov. 2013.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo principal deste trabalho foi a detecção dos agentes virais (BFDV, APV e ABV) em psitacídeos de cativeiro do Brasil. O resultado encontrado conclui a presença de todos os agentes em psitacídeos de cativeiro nativos e exóticos no Brasil. Para ABV, foi observado sinais clínicos inespecíficos e neurológicos como os mais comuns, enquanto para APV e BFDV, sinais inespecíficos foram mais representativos.

A infecção concomitante com ABV e BFDV, ABV, BFDV e APV e APV e BFDV foram observadas.

O BFDV foi descrito pela primeira vez em *Triclaria malachitacea*, uma espécie nativa do Brasil.

Um novo sinal clínico, a anemia, foi encontrado em casos de infecção por APV em papagaios da Amazônia, sendo indicado sua inclusão no diagnóstico diferencial da doença.