

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Aila Solimar Gonçalves Silva

**Diagnóstico e caracterização da doença da dilatação proventricular em psitacídeos
em Minas Gerais**

Belo Horizonte

2017

Aila Solimar Gonçalves Silva

Diagnóstico e caracterização da doença da dilatação proventricular em psitacídeos em Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Co - Orientador (a): Érica Azevedo Costa

Belo Horizonte

2017

S586d Silva, Aila Solimar Gonçalves,1987-
Diagnóstico e caracterização da doença da dilatação proventricular em psitacideos em Minas Gerais/ Aila Solimar Gonçalves Silva. – 2017.
80 f.:il

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins
Coorientadora: Erica Azevedo Costa
Dissertação (Mestrado) Apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
Inclui bibliografia.

1. Aves – Doenças - Diagnóstico – Teses - 2. psitacideo - Teses – 3. Proventriculo - Teses – I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva – II. Costa, Erica Azevedo – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636. 686 089 6

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais

FOLHA DE APROVAÇÃO

AILA SOLIMAR GONÇALVES SILVA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

Aprovada em 13 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Presidente - Orientador

Profª. Sandra Yuliet Marin Gomez
Escola de Veterinária - UFMG

Dr. Daniel Ambrózio da Rocha Vilela
Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA

Profª. Érica Azevedo Costa
Escola de Veterinária - UFMG

Dr. Francisco Carlos Ferreira Junior
Doutorado - UFMG



Dedico esse trabalho a todos os animais, principalmente às aves, razão de todo meu esforço.

À minha família e amigos queridos.

Ao meu querido amigo Jorge.

Aos meus orientadores, em especial a professora Érica, sempre solícita e incansável.

“Os poucos professores que me impressionaram, não foram os que sabiam mais, mas aqueles que deram o máximo de si, que me olharam de frente, tal como eu era, com um humanismo que despertou e atraiu meu espírito inseguro e me chamou a assumir minha existência com minhas próprias mãos.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Confesso que no começo o medo se fez presente, mas encarei o desafio de frente e com determinação!

Primeiramente agradeço a Deus, mentor de todas as minhas conquistas!

Agradeço a minha família por todo apoio. Aos meus irmãos pelo companheirismo, paciência e momentos de descontração, sem vocês nada faria sentido!

Ao meu querido pai, exemplo de caráter e honestidade lutou desde cedo para tornar todos os sonhos dos seus filhos possíveis, aquele que me ensinou o valor de cada pessoa no mundo, me ensinou a ver a vida com humildade e nunca me deixou desistir.

À minha mãezinha querida, exemplo de mulher guerreira e mãe presente. Obrigada por dedicar seus dias para minha educação e evolução de caráter. Obrigada por me ensinar a amar todos os seres em igualdade, não deixando que eu me esquecesse o real significado de amor ao próximo!

À vocês meus pais amados dedico todo meu esforço. Obrigada por me ensinarem a seguir sempre em frente com determinação e coragem!

Ao meu querido amigo Jorge que me mostrou como a vida pode ser diferente se aprendermos a olhar com carinho e respeito para nossos semelhantes. Sem ele eu nunca teria ingressado no mestrado!

Ao meu orientador, mentor e amigo Professor Doutor Nelson por seu carinho e ensinamentos. Ao senhor que foi muito mais que um mestre, mas sim uma figura de pai que sempre me amparou nas dificuldades e me recebeu de braços abertos ainda na graduação. Ao meu querido professor que tornou meus dias de trabalho mais leves meu sincero agradecimento e meu desejo de que o dia da despedida nunca chegue.

À minha querida co-orientadora Professora Doutora Érica pela paciência, companheirismo e dedicação! A pessoa que sempre acreditou no meu projeto, que torceu e vibrou com cada vitória. A você professora, que fez crescer ainda mais meu amor pela pesquisa, que nunca me permitiu desistir e foi uma amiga muito querida durante todo meu mestrado, meu sincero agradecimento.

Aos meus queridos amigos. Os de longe que nunca me abandonaram, Melissa (minha Mel), Fabiane, Lu, Anelise, Natani e Ana Helena. Os de pertinho que sempre me apoiaram: Carlos (minha fonte de incansáveis abraços), Bela, Amanda, Filipe, Camila, Barbara, Joice, Fabio e Ethiene.

Aos amigos do trabalho voluntario (Mario, Rose, Daniel, Zé, Dudu, Cleuber ...) obrigada pelo carinho e paciência!

À minha amiga e irmã Aninha, meu porto seguro, obrigada por tudo!

À minha amiga Maria pela dedicação e carinho!

Thais pela amizade e preciosos conselhos. Ao Gui pela paciência, boas conversas e parceria dos finais de semana. Carol Prezotto pela paciência, carinho e boas risadas.

A toda equipe da escola de veterinária, em especial Rita, Derci, Eduardo, Cassinha, Luiz, os motoristas, as faxineiras Meire, Roselene, Lucia, Patricia e tantos outros que fizeram parte dessa trajetória. Muito obrigada!

Aos meus professores da graduação, meus eternos mestres!

Aos professores do departamento de Medicina Veterinária Preventiva, em especial Professor Jenner, pelo carinho e receptividade.

A equipe do laboratório da Professora Zélia: Gra, Iza, Carol, obrigada pela paciência e ensinamentos!

Aos colegas que deixei na USP e que sempre me apoiaram! A Professora Tania Raso pela paciência e ensinamentos.

A equipe do Laboratório de Doenças das Aves (Nat, Lilian, Mayara, Aninha, Rui, Beth, André, Bruno, professor Mauricio e professor José Sergio) meus companheiros de trabalho e jornada, minha segunda família! Muito obrigada, por tudo!

A Sandrinha, pessoa que me iniciou no laboratório e razão de todo e qualquer sucesso, obrigada pelos ensinamentos e paciência.

A equipe do setor de Patologia Veterinária, professores e técnicos, em especial Leymar, Mari e Amandinha, pela paciência.

A veterinária e colega querida Marcela Ortiz que me ensinou que devemos tentar e trabalhar com amor e dedicação sempre!

A Alessandra pela ajuda incansável e paciência extrema, meu agradecimento mais sincero!

Aos criatórios que colaboraram e tornaram esse projeto e sonho possível!

Por fim e não menos importante, todas as aves desse projeto em especial ao papagaio Taynã, obrigada por serem a razão e motivo de todo meu esforço e dedicação. A pesquisa existe única e exclusivamente para benefício de todos esses animais!

A todos os meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A síndrome da dilatação do proventrículo (*proventricular dilatation disease - PDD*) é hoje uma doença emergente de ocorrência mundial e de caráter fatal. O Bornavírus aviário (ABV) foi identificado em 2008 como o agente etiológico de PDD, tendo sido comprovada a relação de causalidade entre a infecção por ABV e PDD em infecções experimentais. A doença e a infecção por ABV foram previamente descritas no Brasil, em 2010-2012, com a primeira detecção na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. No biênio de 2015-2016, 46 psitacídeos cativos de espécies nativas e exóticas provenientes de criatórios e mantenedouros de fauna da região metropolitana de Belo Horizonte, de instituições privadas, do Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) de Uberlândia e da casuística da rotina do Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária – UFMG, foram examinados para diagnóstico da *causa mortis*. Foi realizada detecção molecular de ABV por RT-PCR e descrição das lesões *post mortem* por necropsia e histopatologia. Essas aves também foram submetidas ao diagnóstico diferencial por RT-PCR para os gêneros *Alphavirus* e *Paramyxovirus*. Dezenove aves recebidas em óbito (19/46 – 41,3%) foram avaliadas em exame histopatológico por apresentarem boa conservação *post mortem*. Como resultados, em nove (n=9; 19,6%) aves puderam-se observar lesões histopatológicas típicas para PDD (PDD positiva). Entretanto, em treze aves (13/46; 28,2%) com lesões macroscópicas características de PDD não houve confirmação histopatológica, sendo considerados quadros sugestivos de PDD. Em vinte e quatro aves (24/46; 52,2%) não foram encontradas alterações clínico-patológicas de PDD (PDD negativa). Considerando os resultados da RT-PCR para ABV, vinte e nove aves (29/46; 63%) avaliadas foram positivas, sendo que a maior sensibilidade foi observada utilizando os oligonucleotídeos para o gene que codifica a proteína da matriz (M) em comparação com o gene que codifica a proteína N (20/29 - 89,7%; 3/29 - 10,3%). Entre as aves positivas para ABV por RT-PCR, onze aves (11/29; 38%) foram consideradas não doentes e portadoras do vírus. ABV foi associado à manifestação clínico-patológica de PDD em nove (9/46; 19,6%) aves avaliadas. No diagnóstico diferencial, duas aves (2/46; 4,3%) foram positivas na RT-PCR para gênero *Alphavirus* (EEV, vírus da encefalite equina), sendo detectado EEV em co-infecção com ABV em uma ave. Uma ave (1/46; 2,1%) foi positiva na RT-PCR para *Paramyxovirus*, embora a não conclusão do sequenciamento não permitiu o diagnóstico final. Os resultados apresentados no presente estudo confirmam a presença de ABV nos planteis de psitacídeos cativos da região metropolitana de Belo Horizonte, reforçam a associação de ABV e PDD, indicam a existência de aves portadoras saudáveis e de coinfeções.

Palavras chaves: Bornavírus aviário, Doença da dilatação do proventrículo, PDD, psitacídeos, Brasil, diagnóstico.

ABSTRACT

The proventricular dilatation disease (PDD) is considered an emerging and fatal disease worldwide. An avian *Bornavirus* (ABV) was identified in 2008 as the cause of PDD, being the relationship of causality of ABV infection and PDD demonstrated in experimental infections. PDD associated to ABV was previously described in Brazil in outbreaks of PDD occurring in 2010-2012 in Belo Horizonte (Minas Gerais). In the years 2015-2016, 46 captive psittacines of native and exotic species were examined, original from wildlife keepers of the metropolitan region of Belo Horizonte, in private institutions, of wildlife research facilities (Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres, LAPAS, Uberlândia), or arriving at the avian diseases laboratory of the Veterinary college of UFMG (Laboratório de Doenças das Aves, Escola de Veterinária, UFMG). The molecular detection of ABV was performed by RT-PCR and the description of lesions *post mortem* at necropsy and histopathology. These psittacines were also submitted to differential diagnosis (RT-PCR) for *Alphavirus* and *Paramyxovirus*. Nineteen birds received dead (19/46 – 41.3%) were evaluated by histopathology for the good conservation *post mortem*. Results revealed nine birds (n=9; 19.6%) with PDD typical histopathologic lesions (PDD positive). However, thirteen birds (13/46; 28.2%) with typical macroscopic lesions of PDD, no histopathologic lesions were found, being considered cases suggestive of PDD. For twenty-four birds (24/46; 52.2%) examined, no clinical-pathologic lesions of PDD (PDD negative) were found. Considering the RT-PCR results, twenty-nine birds (29/46; 63%) were positive for ABV, being more sensitive the oligonucleotides directed to the matrix protein (M) gene, as compared to the N protein gene (20/29 - 89,7%;3/29 - 10,3%). Among the ABV positive birds, eleven (11/29; 38%) were not clinically affected and did not show lesions, and were considered reservoirs of ABV. ABV was associated to the clinical-pathological manifestation of PDD in nine birds (9/46; 19,6%). Two birds (2/46; 4,3%) were positive for an *Alphavirus* (EEV, equine encephalitis vírus), being EEV detected in co-infection with ABV in one bird. One bird (1/46; 2,1%) was positive for *Paramyxovirus*, although the product was not sequenced and did allow further characterization. Results reinforced the association of PDD with infection by ABV, confirmed the occurrence of ABV in captive psittacines of the metropolitan region of Belo Horizonte, indicated the existence of healthy carriers of ABV and showed a low rate of co-infections with other RNA viruses involved with neuropathology.

Keywords: Avian Bornavirus, proventricular dilatation disease, psittacines, Brazil, diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação da Estrutura do <i>Bornavírus</i> (virion) – Vírus envelopado com tamanho de 70-130 nm e as principais proteínas sinalizadas.....	24
Figura 2 Representação do genoma RNA de Bornavírus de tamanho 8,9kb.	24
Figura 3- A Papagaio-de-cara-roxa (<i>Amazona brasiliensis</i>). B. Papagaio campeiro (<i>Amazona ochrocephala</i>)	36
Figura 4- A. Normal (sem Dilatação do proventrículo) <i>Amazona vinacea</i> amostra 20. B. Dilatação do proventrículo discreta/moderada <i>Amazona rhodocorytha</i> amostra 24. C. Dilatação do proventrículo severa/intensa <i>Primolius maracana</i> amostra 4.	41
Figura 5. Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>) (amostra 11) . A. Escore corporal reduzido (caquexia) e visualização do ventrículo (seta) antes da abertura da cavidade celomática. B. Dilatação do proventrículo intensa (++) ocupando grande parte da cavidade celomática (seta). C. Proventrículo dilatado, removido e individualizado em placa de petri apresentando parede fina. D. Proventrículo dilatado com grande quantidade de alimento não digerido (sementes).	47
Figura 6 – Maracanã verdadeira (<i>Primolius maracana</i>) (amostra 4). A. Escore corporal reduzido (caquexia). B. Cavidade celomática após retirada do fígado e coração, com dilatação do proventrículo intensa (++) (seta), com o órgão apresentando parede fina (transparência), grande quantidade de alimento e ocupando grande parte da cavidade celomática.	48
Figura 7 - Maitaca roxa (<i>Pionus fuscus</i>) (amostra 7). A. Dilatação do proventrículo (seta branca) e parasitismo intestinal intenso (seta preta). B. Proventrículo com alimento não digerido (sementes). C. Segmento intestinal aberto, demonstrando presença de grande contagem (mais de 100 indivíduos) de nematódeo <i>Ascaridia hermaphrodita</i> . D. Extremidade anterior (boca e esôfago) de <i>A. hermaphrodita</i> (microscópia óptica).	49
Figura 8 – Presença de infiltrado linfoplasmocitário (seta) na camada muscular do ventrículo amostra 10, <i>Amazona vinacea</i> (Coloração HE – Hematoxilina e eosina).....	51
Figura 9 – Resultado de RT-PCR para ABV usando oligonucleotídeos para ABVM (360pb). Amostra 5 (SNC) em duplicata (poço 1 e 2) em gel de agarose 1%.....	52
Figura 10 - Árvore filogenética gerada a partir de sequências nucleotídicas de parte do gene que codifica a proteína M (360bp) de ABV. As estirpes estão identificadas com o nome, espécie de psitacídeo encontrada. As amostras do criatório A são: UFMG 1, <i>Ara choropectera</i> , UFMG 5, <i>Psittacus erithacus</i> ; UFMG 9, <i>Pionus reichnowi</i> ; UFMG 21, <i>Pionites leucogaster</i> ; e UFMG 22, <i>Amazona ochrocephala</i> e do criatório B são: UFMG 3, <i>Amazona brasiliensis</i> UFMG 4, <i>Primolius maracana</i> ; UFMG 10, <i>Amazona rhodocorytha</i> ; UFMG 20, <i>Amazona vinacea</i> ; UFMG 38, <i>Eupsittula aurea</i> e UFMG 44, <i>Amazona brasiliensis</i> . As sequências foram analisadas utilizando-se o método de <i>neighbor-joining</i> (Saitou and Nei, 1987) e o modelo de distâncias evolutivas Kimura 2 (Kimura, 1980). Valores de <i>bootstrap</i> 1000 (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos (Felsenstein, 1985). Análises evolutivas foram realizadas em MEGA7 (Kumar et al., 2016), envolvendo 46 sequências de nucleotídeos sendo que as sequências da família <i>Bornaviridae</i> usadas como referência estão representadas na tabela 12. ABV 1 a 8 – Bornavírus aviário de Psitacíformes; ABVES-1; ABVC- 1 a 3- Bornavírus de Passeriformes; ABV-CG 1 – Bornavírus aviário de aves aquáticas; BDV-1 a 2- Bornavírus de mamífero (Bornavírus clássico).	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aves diagnosticadas com PDD no Brasil*	21
Tabela 2– Bornavírus aviários (ABV)	25
Tabela 3- Espécies de psitacídeos nativos da fauna brasileira amostradas no estudo com número amostral e classificação em relação ao estado de conservação.	37
Tabela 4 – Espécies de aves encaminhadas ao Laboratório de Doenças das Aves no período de 2013-2016 com respectiva data de chegada/coleta (necropsia) e origem/ Identificação das aves usadas no estudo com respectiva data de chegada/coleta (necropsia) e origem.	38
Tabela 5- Classificação dos critérios avaliados na necropsia (escore corporal e dilatação do proventrículo)	40
Tabela 6 – Primers utilizados na reação de RT-PCR para ABV.	42
Tabela 7– Oligonucleotídeos utilizados nas reações de semi nested RT-PCR para detecção dos vírus dos gêneros Paramyxovirus (PARF1, PARF2, PAR) e nested RT-PCR para os Alphavirus (ALPHA1F, ALPHA1R, ALPHA2F, ALPHA2R)	43
Tabela 8 - Frequência dos sinais clínicos compatíveis com PDD observados nas aves avaliadas.	45
Tabela 9 – Diagnóstico final para a doença da dilatação do proventrículo (PDD) considerando os resultados do exame histopatológico das aves avaliadas.	46
Tabela 11 – Presença ou ausência de infiltrado linfoplasmocitário nas amostras avaliadas.	50
Tabela 12 - Sequências referências de ABV (Bornavírus aviário de psitacídeos) analisadas para construção da árvore filogenética:	56
Tabela 13 - Resultado geral das análises de histórico clínico, necropsia, histopatologia e biologia molecular (RT-PCR) realizadas nesse estudo	57
Tabela 10 – Exames post mortem das aves avaliadas com escore corporal e demais descrições.	75

LISTA DE SIGLAS

ABV	<i>Avian Bornavirus</i> (Bornavírus aviário)
ABV-C	<i>Avian Bornavirus canary birds</i> (Bornavírus aviário de canários)
ABV-CG	<i>Avian Bornavirus aquatic birds</i> (Bornavírus aviário de aves aquáticas)
ABV-ES	<i>Avian Bornavirus estrildid</i> (Bornavírus aviário de <i>Estrildidae</i>)
ABV-UM	<i>Avian bornavirus munia</i> (Bornavírus aviário de <i>Munia - Lonchura striata</i>)
AMVP-1	Avian Paramyxovirus type 1 (Paramyxovirus aviário sorotipo 1)
BDV	<i>Borna disease virus</i> (Bornavírus clássico)
CEC32	<i>Avian fibroblast cell line</i> - Fibroblasto de codorna
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DEF	<i>Duck embryo fibroblasts</i> - fibroblastos embrião de pato
DEPEC	Diethylpyrocarbonate
DMVP	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dntp	Trifosfato de deoxyribonucleotídeo
EEEV	Encefalite Equina do Leste
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético sódico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IHQ	Imunohistoquímica
INF	Interferon
IUCN	International Union for Conservation of Nature – União Internacional para Conservação da Natureza
LAPAS	Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres
LDA/UFGM	Laboratório de Doenças das Aves – UFGM
LMH	Célula hepatoma de galinha
MDBK	<i>Madin-Darby Bovine Kidney Cells</i> (Células de rim de bovino Madin-Darby)
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MVA	Vírus vaccínia Ankara modificado
NDV	Vírus da doença de Newcastle
ORFS	<i>Open reading frame</i> - Sequências abertas de leitura
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PDD	Doença da Dilatação do Proventrículo
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcriptase reversa - Reação em Cadeia pela Polimerase
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
TBE	Tris-borato-EDTA
TGI	Trato Gastrointestinal
WEEV	Encefalite Equina do Oeste
UFGM	Universidade Federal de Minas Gerais
VERO	African green monkey (Macaco Verde Africano)
µL	Microlitros

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	16
REVISÃO BIBLIOGRAFICA CAPITULO 1 - SÍNDROME DA DILATAÇÃO DO PROVENTRÍCULO (PDD).....	17
1- Sinais Clínicos	17
2- Diagnóstico	18
3 Diagnóstico diferencial	20
4 PDD no Brasil	20
5 Etiologia de PDD	22
CAPITULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – BORNAVÍRUS AVIÁRIO (ABV).....	24
1 ABV	24
2- ABV e BDV	26
3-ABV e PDD	27
4 - Patogenia.....	28
5- Transmissão	28
6 - Epidemiologia.....	29
7- Diagnóstico	30
8- Tratamento.....	32
9- Prevenção.....	32
CAPITULO 3 – DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BORNAVÍRUS AVIÁRIO EM PSITACÍDEOS CATIVOS EM MINAS GERAIS, BRASIL.....	34
RESUMO	34
1- INTRODUÇÃO	34
2- MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 - Coleta de material	37
2.1.1- Aves utilizadas no estudo.....	37
2.2 - Necropsia	39
2.3 - Histopatologia.....	41
2.4 - Extração de RNA	41
2.5- RT-PCR para ABV	42
2.6 - Diagnóstico diferencial	43
2.6.1- RT-PCR para os gêneros <i>Alphavirus</i> e <i>Paramyxovirus</i>	43
2.7- Análise dos produtos da PCR	44
2.8- Sequenciamento e análise filogenética	44

3- RESULTADOS	44
3.1 - Resultados anatomopatológicos.....	46
3.2 – Histopatologia	49
3.3– RT-PCR para ABV:	51
3.4- Diagnóstico diferencial	52
3.5- Análise das sequências.....	53
4 - DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES.....	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

INTRODUÇÃO

A criação de aves silvestres, em especial psitacídeos, ampliou consideravelmente nos últimos anos. O crescente domínio dos habitats naturais dessas aves pelos seres humanos com consequente falta de destinação para aquelas apreendidas pelo tráfico assim como a procura e demanda na criação dessas aves como *pet*, fizeram crescer o número de mantenedouros e/ou criatórios de avifauna silvestre (Cubas, 2014).

As aves silvestres em geral chamam atenção por aspectos como canto e beleza, mas principalmente os psitacíformes, por sua inteligência. Algumas espécies de psitacídeos são conhecidos por sua capacidade de repetir sons e palavras com perfeição (Cubas, 2014).

A primeira identificação da doença da dilatação do proventrículo (PDD) foi em araras ficando a enfermidade associada inicialmente apenas a Ordem Psittacíformes. Entretanto, embora seja mais comumente vista em psitacídeos, a doença já foi identificada em mais de 80 espécies incluindo Passeriformes, Falconiformes e, recentemente, Galliformes, entre outras espécies aviárias (Gancz et al., 2010; Bourque et al., 2015). A doença que pode se apresentar na forma neurológica e/ou envolvendo alterações do trato gastrointestinal, possui rápida disseminação, caráter fatal (mortalidade de 100%) e atualmente, possui abrangência global (Gregory et al., 1994; Rubbenstroth et al., 2016).

O caráter emergente de PDD e crescente identificação de ABV, aumentam a necessidade de maiores estudos sobre o assunto. A primeira descrição de PDD no Brasil foi em 2009, porém somente em 2014 o RNA viral foi identificado em tecidos de 4 psitacídeos com lesões de PDD (Marietto et al., 2009; Donatti et al., 2014). Desde então outros estudos identificaram o vírus em psitacídeos nativos e exóticos cativos, inclusive aves de companhia, mais restrito à região sudeste do país, totalizando até o momento 62 aves infectadas (Donatti et al., 2014; Encinas-Nagel et al., 2014; Philadelpho et al., 2014)

Entre Bornavírus aviários identificados até o momento, os ABV de Psittacíformes são os mais conhecidos e consequentemente mais estudados (Rubbenstroth et al., 2016). Entretanto não se conhece a extensão do vírus nas aves de vida livre, sendo desenvolvidos nessa espécie, até então, estudos somente com aves em cativeiro. Acredita-se que a manifestação da doença PDD esteja relacionada com o cativeiro e assim, fatores como estresse podem ter envolvimento direto no curso clínico da doença consequentemente, na infecção por ABV (Lierz et al., 2009; Gancz et al., 2009; Gray et al., 2010).

A caracterização de ABV é relativamente recente e muitos aspectos sobre sua transmissão, patogenia, epidemiologia, diagnóstico e controle são desconhecidos. A origem de PDD foi sugerida como sendo da América do Sul devido ao primeiro caso em uma arara importada da Bolívia (Gregory et al., 1994; Payne et al., 2012) entretanto, essa origem não foi comprovada.

A identificação de Bornavírus aviário tem alcançado proporções mundiais crescendo assim a importância do seu estudo. A criação de aves silvestres, principalmente psitacídeos, é hoje uma realidade no Brasil, portanto, instituir uma prevenção quanto a entrada de ABV em um plantel irá contribuir para uma melhor manutenção da saúde desses animais.

O estabelecimento do diagnóstico para ABV permite o planejamento de medidas preventivas e de controle mais eficazes. Práticas sanitárias apropriadas, com o monitoramento através de diagnóstico e manejo sanitário de planteis em cativeiro, separação e política de biossegurança como desinfecção do ambiente e utensílios, cuidados adicionais na incubação, isolamento das aves suspeitas e clinicamente doentes são fundamentais (Gancz et al., 2010).

Portanto, estudos no Brasil que venham a desenvolver métodos diagnósticos de ABV criam significativos avanços para manutenção dos planteis de aves silvestre cativas assim como, em maior importância, irão estabelecer uma nova rotina para a triagem de aves destinadas à soltura

na natureza. Embora as informações sobre o comportamento de ABV, principalmente em psitacídeos, nas aves silvestres de vida livre sejam escassas como supracitado, a manutenção de métodos diagnósticos na triagem na soltura dessas aves apreendidas é de extrema importância em face justamente desse pouco conhecimento. Além disso, esses estudos irão contribuir para elucidar mais aspectos sobre ABV, que acarretará melhoria nos planteis dessas aves cativas e aumento de informações de um vírus que possui caracterização relativamente recente.

O presente estudo buscou elucidar os aspectos da epidemiologia de ABV em aves cativas de Minas Gerais através do diagnóstico de RT-PCR para ABV em aves encaminhadas ao Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da UFMG para diagnóstico.

Além disso, considerando que o emprego de diagnóstico para todas as suspeitas fundamentadas proporcionaria maior conhecimento sobre a epidemiologia do vírus, incluindo distribuição geográfica, espécies de ocorrência, transmissão e disseminação, foram feitos nesse estudo diagnóstico diferencial para os gêneros *Alphavirus* e *Paramyxovirus*, onde estão incluídos agentes virais que podem causar quadro clínico semelhante ao de PDD (Gerlach, 1994; Gregory et al., 1994; Schmidt, 2003).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Diagnosticar e caracterizar a infecção natural por ABV em espécies nativas e exóticas cativas em Minas Gerais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Diagnosticar e caracterizar aspectos das lesões de infecções naturais por Bornavírus aviário (ABV) em psitacídeos cativos de espécies exóticas e nativas à fauna brasileira, associados ou não a doença da dilatação do proventrículo (PDD).

Diagnosticar e caracterizar as estirpes locais através do sequenciamento genético de segmentos das regiões que codificam as proteínas M e/ou N e analisar filogeneticamente para as comparações entre as sequências das estirpes locais e sequências disponíveis no GenBank.

REVISÃO BIBLIOGRAFICA CAPITULO 1 - SÍNDROME DA DILATAÇÃO DO PROVENTRÍCULO (PDD)

A Síndrome da dilatação do proventrículo (PDD), também conhecida como síndrome neuropática das araras, dilatação gástrica dos psitacídeos, ganglioneurite miontérica ou doença debilitante das araras, foi inicialmente identificada na década de 1970 nos Estados Unidos, em araras importadas da América do Sul (Gregory et al., 1994; Payne et al., 2012). A doença é mais comumente encontrada em psitacídeos (ordem Psittaciformes) porém, já foi descrita em várias outras ordens de aves como Passeriformes, Falconiformes, Anseriformes, entre outras (Gancz et al., 2010). Não há relato de alterações compatíveis com PDD em aves domésticas (*Gallus gallus*). Entretanto, recentemente, essa doença foi descrita na espécie *Lophophorus impejanus*, sendo o primeiro relato de PDD na ordem Galliformes (Bourque et al., 2015).

Em psitacídeos, mais de 80 espécies já foram diagnosticadas com PDD. Entre elas estão aves ameaçadas de extinção como o papagaio do peito roxo (*Amazona vinacea*) e ararinha azul (*Cyanopsitta spixii*), esta última, atualmente, encontrada somente em cativeiro (Deb et al., 2008; Gancz et al., 2010; Donatti et al., 2014; IUCN, 2016).

A doença está disseminada em todo mundo e já foi descrita em vários países como Japão, Estados Unidos, Israel, Canadá, Austrália, Brasil, entre outros (Doneley et al., 2007; Kistler et al., 2008; Marietto et al., 2009; Weissenböck et al., 2009a; Sassa et al., 2013). Como já descrito, o intenso trânsito de aves devido venda e tráfico contribui para essa disseminação. Aves, em especial psitacídeos, são o principal alvo do tráfico e também da venda comercial de animais silvestres.

1- Sinais Clínicos

A ave pode manifestar sinais gastrointestinais e/ou neurológicos. Os sinais clínicos relacionados à disfunção gastrointestinal são devido aos danos ocasionados ao sistema nervoso entérico, resultando em alterações que refletem a má digestão e má absorção. Podem ocorrer presença de sementes não digeridas nas fezes, regurgitação, perda de peso, fraqueza, depressão, inapetência e estase do papo (Gregory et al., 1994; Berhane et al., 2001; Gancz et al., 2009; Gray et al., 2010).

A dilatação do proventrículo decorrente da paralisia, causa impactação da ingesta favorecendo o crescimento da microbiota e/ou a ruptura desse órgão, resultando em um quadro de septicemia na ave. Outra possível consequência é a morte por aspiração de alimento devido a estase do papo e regurgitação (Gregory et al., 1994; Kistler et al., 2010).

As alterações neurológicas podem incluir ataxia, desequilíbrio, dificuldade de se manter em estação ou de realizar o voo, déficits proprioceptivos ou motor, apreensão, postura e posição da cabeça anormais, fraqueza, tremores, convulsões e morte súbita (Gregory et al., 1994; Berhane et al., 2001). Existe um relato de caso isolado de cegueira com

degeneração bilateral da retina, em um papagaio do congo (*Psittacus erithratus*) diagnosticado com PDD (Steinmetz et al, 2008).

A manifestação do quadro clínico é notavelmente variável entre as espécies, assim como entre os indivíduos. Aves exóticas, em particular a espécie *Psittacus erithratus*, parecem ser mais susceptíveis às alterações neurológicas (Gregory et al 1994; Steinmetz et al, 2008; Sassa et al, 2013; Phidelpho et al, 2014).

Embora a distensão do proventrículo e suas consequências clínicas sejam um fator característico na PDD, em alguns estudos, o número de aves com sinais neurológicos foi superior em relação ao total dos casos encontrados (Sassa et al, 2013; Phidelpho et al, 2014). A idade também parece ser um fator determinante no curso da doença: aves mais jovens em geral apresentam quadros mais severos vindo a óbito mais rapidamente (Kistler et al, 2010).

Além do quadro clínico característico, já foram relatadas outras alterações como miocardites como possíveis sequelas do quadro de PDD (Gregory et al., 1994).

2- Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo é baseado nos sinais clínicos, exames de raio X/ultrassonográficos e histórico. Porém, o diagnóstico definitivo de PDD baseia-se nos achados histopatológicos caracterizados por ganglioneurite linfoplasmocitária (Gregory et al, 1994).

Métodos diagnósticos auxiliares, como ultrassonografia e raio X, contribuem no diagnóstico de PDD. Através desses exames muitas vezes é possível identificar a distensão do proventrículo e impação da ingesta. Além disso, o uso do contraste no exame de raio X permite avaliar o tempo de trânsito gastrointestinal, que é mais demorado nas aves com PDD (Gregory et al 1994; Steinmetz et al, 2008).

A biopsia de papo constitui um outro exame auxiliar para diagnóstico *ante mortem* de PDD. Gregory e colaboradores (1996) avaliaram a eficácia da biópsia de papo como teste diagnóstico. Aves com sinais clínicos e alterações histopatológicas compatíveis com PDD foram avaliadas quanto a presença de infiltrado linfoplasmocitário *ante-mortem* (biópsia de papo) e na análise histopatológica do ventrículo e proventrículo *post-mortem*. Como resultado, o percentual de falsos negativos foi de 24%, não apresentando eficácia válida. Além disso, o tecido do papo foi dividido em quadrantes que foram avaliados individualmente e apresentaram resultados diferentes entre eles em alguns casos, ou seja, a escolha do trecho tecidual que será usado, influencia na exatidão do diagnóstico (Gregory et al, 1996).

Outros trabalhos publicados também demonstraram um percentual considerável de falha desse método, onde aves com infiltração linfoplasmocitária nos tecidos colhidos na necropsia tiveram resultados negativos na biópsia de papo antes do óbito (Lierz et al, 2009; Villanueva et al, 2010). Embora a biópsia de papo por muitos anos foi utilizada como método de escolha para diagnóstico de PDD, não deve ser utilizado isoladamente,

além de ser um exame invasivo representando riscos para à ave, pode resultar no aumento da mortalidade daquelas que estiveram debilitadas.

Os exames de patologia clínica não apresentam achados patognomônicos. Os resultados podem ser variáveis, uma vez que já foram descritos quadros como anemia, hipoproteinemia e alteração da fosfatase alcalina (Gregory et al 1994; Lublin et al, 2006).

Apesar das possíveis técnicas disponíveis para diagnóstico clínico de PDD, a confirmação da doença na ave viva ainda encontra dificuldades permanecendo, portanto, o exame histopatológico como padrão ouro para detecção da doença (Gregory et al., 1994).

Na necropsia os achados característicos são emagrecimento, perda de massa muscular com atrofia da musculatura peitoral devido à má absorção, distensão do papo, proventrículo, ventrículo e pequeno intestino, proventrículo com alimento não digerido e parede fina. Alterações como presença de ulcera na parede do proventrículo, peritonite, alterações hepáticas como esteatose, hepatomegalia decorrentes da disfunção gastrointestinal e consequente má absorção, alterações cardíacas, aumento da glândula adrenal, entre outras, já foram descritas nas aves com PDD (Gregory et al., 1994; Berhane et al., 2001; Kistler et al., 2010)

Na histopatologia, observa-se a presença de infiltrado com predomínio de células mononucleares: linfócitos, células plasmáticas e ocasionalmente, macrófagos e heterofilos, nos gânglios nervosos principalmente no plexo mioentérico do trato gastrointestinal. Entretanto, as lesões também já foram descritas em órgãos como pulmão, rim, fígado, adrenais e coração. Além dos plexos nervosos, a infiltração pode se estender para tecidos adjacentes como tecido conjuntivo entre os feixes musculares ou tecido condutor cardíaco (fibras de Purkinje) (Berhane et al, 2001; Gregory et al., 1994; Lierz et al., 2009; Ouyang et al., 2009).

As alterações no sistema nervoso central podem ser encefalite não supurativa associada com infiltração linfoplasmocitária perivascular, presença de gliose, falha e degeneração na camada de células de purkinje, mielite com possível degeneração axonal e de mielina. A presença de infiltração de células mononucleares também é encontrada nos nervos periféricos como nervo braquial, ciático e vago (Berhane et al, 2001; Ouyang et al, 2009).

Disfunções neurológicas como ataxia, descoordenação e dificuldade de pouso podem ser justificadas devido a lesão cerebelar descrita na histopatologia (Ouyang et al, 2009). Além disso, as lesões de destruição identificadas no sistema nervoso central dessas aves se assemelham ao que ocorre na síndrome Guillian Barré, uma doença auto imune que ocorre em seres humanos, o que sugere então que PDD possui, portanto, um caráter de doença auto imune (Rossi et al., 2008; Gray et al, 2010).

Embora o exame histopatológico seja o método padrão ouro para diagnóstico de PDD, a distribuição variável das lesões assim como o trecho tecidual utilizado nas biopsias podem gerar resultados falsos negativos, como foi demonstrado em diversos trabalhos (Berhane et al., 2001; Ouyang et al., 2009, Raghav et al 2010).

3 Diagnóstico diferencial

Considerando que as alterações físicas, macroscópicas e de exames auxiliares como raio x não são patognômicas para a síndrome da dilatação proventricular, outras causas que resultem em quadro semelhante devem ser investigadas. Alterações similares podem ocorrer devido a traumas, infecções parasitárias, infecções por agentes virais, neoplasias, obstrução gastrointestinal por ingestão de corpo estranho, distúrbios de absorção e má digestão, entre outras patologias (Gregory et al, 1994).

4 PDD no Brasil

O primeiro relato de caso de PDD no Brasil foi em um *Amazona aestiva*, em 2009. Essa ave apresentava as lesões compatíveis com PDD associadas a um quadro de megaesôfago (Marietto et al., 2009).

Posteriormente, em 2014, outras espécies nativas como *Amazona rhodocorytha*, *Amazona vinacea*, *Ara severa*, *Ara macao*, entre outras, foram diagnosticadas com distensão proventricular (Donatti et al, 2014). Aves exóticas, como calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e papagaio do congo (*Psittacus erithacus*), também foram diagnosticadas com a doença em território nacional (Philadelpho et al., 2014).

No Brasil, pouco se conhece sobre essa enfermidade e a maioria dos relatos existentes são da região sudeste, conseqüentemente, essa doença pode estar subnotificada desconhecendo-se sua real importância (Donatti et al, 2014; Philadelpho et al., 2014).

Muitos dos sinais clínicos de PDD são desconhecidos por grande parte dos médicos veterinários, proprietários de aves de companhia e de criatórios com aves silvestres. Em alguns casos exames auxiliares como raio X e ultrassom, ao serem realizados, acusam a distensão do proventrículo e/ou trânsito gastrointestinal mais lento, embora em uma grande parte dessas aves não é obtido o diagnóstico definitivo, por falta de envio de material para necropsia e/ou histopatologia.

Atualmente, PDD é uma doença emergente, com diagnóstico clínico não publicado, em todo o território nacional e representa perdas significativas de planteis de aves, inclusive comerciais resultando em prejuízo econômico considerável. Além disso, a identificação de uma doença com mortalidade de 100% em psitacídeos nativos ameaçados ou já em via progressiva de extinção, alerta para o problema da disseminação da doença no Brasil (Donatti et al., 2014; Silva et al, 2017 não publicado).

São apresentadas na Tabela 1 as aves diagnosticadas com PDD no Brasil com sua respectiva classificação na Lista de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) para as espécies nativas da fauna brasileira.

Tabela 1: Aves diagnosticadas com PDD no Brasil*

Espécie	Nome popular	Nativa/exótica	Referências	Classificação IUCN
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio verdadeiro	Nativa	Marietto et al., 2009	Pouco preocupante
<i>Psittacara leucophthalma</i>	Periquitão-maracanã	Nativa	Encinas-Nagel et al., 2014	Pouco preocupante
<i>Brotogeris tirica</i>	Periquito-verde	Nativa	Encinas-Nagel et al., 2014	Pouco preocupante
<i>Ara ararauna</i>	Arara Canindé	Nativa	Encinas-Nagel et al., 2014	Pouco preocupante
<i>Aratinga jandaya</i>	Jandaia verdadeira	Nativa	Philadelpho et al., 2014	Pouco preocupante
<i>Tricharia Malachitacea</i>	Sabia cica	Nativa	Philadelpho et al., 2014	Quase ameaçada
<i>Aprosmitus erythropterus</i>	Periquito de asa vermelha	Exótica	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Platycercus icterotis</i>	Rosela	Exótica	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Psephotus haematonotus</i>	Periquito-dorso-vermelho	Exótica	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Neophema Bourkii</i>	Periquito-de-bourke	Exótica	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Barnardius zonarius</i>	Ringneck australiano	Exótica	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Forpus coelestis</i>	Tuim	Exótico	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Platycercus eximius</i>	Rosela	Exótico	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Alisterus scapularis</i>	Periquito-rei-australiano	Exótico	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Neophema splendida</i>	Periquito-esplêndido	Exótico	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Nymphicus hollandicus</i>	Calopsita	Exótico	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Psittacus erithacus</i>	Papagaio do congo	Exótico	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Amazona amazonica</i>	Papagaio-do-mangue	Nativa	Philadelpho et al., 2014	Pouco preocupante
<i>Melopsittacus undulatus</i>	Periquito-australiano	Exótico	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Eclectus roratus</i>	Papagaio ecleto	Exótico	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Agapornis personatus</i>	Agapornis	Exótico	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Guaruba guarouba</i>	Ararajuba	Nativa	Philadelpho et al., 2014	Em perigo

<i>Pyrrhura frontalis</i>	Tiriba-de-testa-vermelha	Nativa	Philadelpho et al., 2014	Pouco preocupante
<i>Cacatua alba</i>	Cacatua	Exótica	Philadelpho et al., 2014	SC
<i>Primolius maracana</i>	Maracanã verdadeiro	Nativa	Donatti et al., 2014	Quase ameaçada
<i>Amazona rhodocorytha</i>	Chauá	Nativa	Donatti et al., 2014	Em perigo
<i>Amazona vinacea</i>	Papagaio-de-peito-roxo	Nativa	Donatti et al., 2014	Em perigo
<i>Ara macao</i>	Araracanga	Nativa	Donatti et al., 2014	Pouco preocupante
<i>Ara severa</i>	Maracanã-guaçu	Nativa	Donatti et al., 2014	Pouco preocupante
<i>Pionopsitta pileata</i>	Cuiú-cuiú	Nativa	Donatti et al., 2014	Pouco preocupante
<i>Pionus maximiliani</i>	Maitaca-verde	Nativa	Donatti et al., 2014	Pouco preocupante
<i>Amazona brasiliensis</i>	Papagaio-de-cara-roxa	Nativa	(Esse trabalho)	Vulnerável
<i>Pionus fuscus</i>	Maitaca-roxa	Nativa	(Esse trabalho)	Pouco preocupante
<i>Pionus reichenowi</i>	Maitaca-de-barriga-azul	Nativa	(Esse trabalho)	Pouco preocupante
<i>Pionites leucogaster</i>	Marianinha	Nativa	(Esse trabalho)	Pouco preocupante
<i>Amazona ochrocephala</i>	Papagaio campeiro	Nativa	(Esse trabalho)	Pouco preocupante
<i>Psittacula krameri</i>	Periquito-de-colar	Exótico	(Esse trabalho)	SC
<i>Amazona festiva</i>	Papa-cacau	Nativa	(Esse trabalho)	Pouco preocupante
<i>Pionus menstruus</i>	Maritaca-de-cabeça-azul	Nativa	(Esse trabalho)	Pouco preocupante
<i>Eupsittula aurea</i>	Jandaia coquinho	Nativa	(Esse trabalho)	Pouco preocupante
<i>Aratinga weddellii</i>	Periquito de cara suja	Nativa	(Esse trabalho)	Pouco preocupante
<i>Amazona pretrei</i>	Papagaio-charão	Nativa	(Esse trabalho)	Vulnerável
<i>Psittacara mitrata</i>	Aratinga mitrata	Exótico	(Esse trabalho)	SC
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Arara azul grande	Nativa	(Esse trabalho)	Em perigo

*Diagnóstico através de sinais clínicos, achados de necropsia e/ou histopatologia compatíveis com PDD/ SC: aves exóticas sem classificação IUCN.

5 Etiologia de PDD

Desde os primeiros relatos, a suspeita etiológica de PDD foi de envolvimento de algum agente viral. As lesões inflamatórias e, em alguns casos, presença de inclusões intranucleares encontrados nos exames histopatológicos de aves com PDD, além das lesões no SNC

semelhantes ao que ocorre em pacientes humanos com sarampo, são achados sugestivos de uma reação a uma infecção por vírus (Gregory et al, 1994; Berhane et al, 2001).

Diversos vírus foram então sugeridos como possíveis causadores dessa enfermidade porém, nenhum deles foi consistentemente associado a doença, incluindo o vírus da encefalite equina, adenovirus, herpesvírus, coronavírus e paramyxovirus (Gregory et al., 1997; Gough et al, 2006; Lublin et al, 2006; Deb et al., 2008; Gancz et al., 2010).

Somente em 2008, estudos utilizando ferramentas moleculares como microarranjos de DNA e RT-PCR em tempo real, identificaram um vírus da ordem *Mononegavirales*, família *Bornaviridae* como agente etiológico de PDD (Honkavuori et al, 2008; Kistler et al, 2008).

Os trabalhos pioneiros de detecção de ABV identificaram o vírus apenas nas aves doentes. Em seu trabalho Honkavuori e colaboradores (2008) detectaram ABV no cérebro, proventrículo e glândula adrenal em todas as aves doentes e em nenhuma das aves saudáveis. Resultados similares foram observados no estudo realizado por Kistler e colaboradores (2008), publicado no mesmo ano, onde mais de 60% das aves doentes provenientes dos Estados Unidos e mais de 70% das doentes provenientes de Israel foram ABV positivo e todas as aves saudáveis foram negativas (Honkavuori et al, 2008; Kistler et al, 2008).

CAPITULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – BORNAVÍRUS AVIÁRIO (ABV)

1 ABV

Bornavírus aviário (*Avian Bornavirus*, ABV) e bornavírus clássico (*Borna disease virus*, BDV) são integrantes do gênero *Bornavírus*, família *Bornaviridae*. BDV é causador de doença neurológica em ovinos e equinos e mais restrito à Europa central e o ABV associado à doença da dilatação do proventrículo, especialmente em psitacídeos, em vários continentes (Kistler et al., 2008; Payne et al., 2012; Tizard et al., 2016).

Os bornavírus apresentam vírions envelopados com RNA de fita simples, não segmentado e de polaridade negativa. O genoma de 8,9 kb possui 6 ORFs (*open reading frame*) que codificam as proteínas matrix (M), a glicoproteína (G), a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), a polimerase L e a proteína acessória X (Horie et al., 2010; Tizard et al., 2016). As figuras 1 e 2 representam a estrutura do vírion e genoma do Bornavírus, respectivamente.

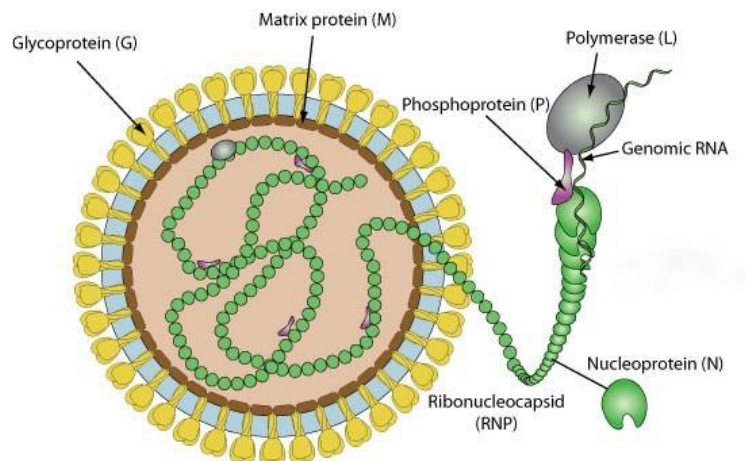


Figura 1 Representação da Estrutura do *Bornavírus* (virion) – Vírus envelopado com tamanho de 70-130 nm e as principais proteínas sinalizadas.

Fonte: Viralzone.expasy.org

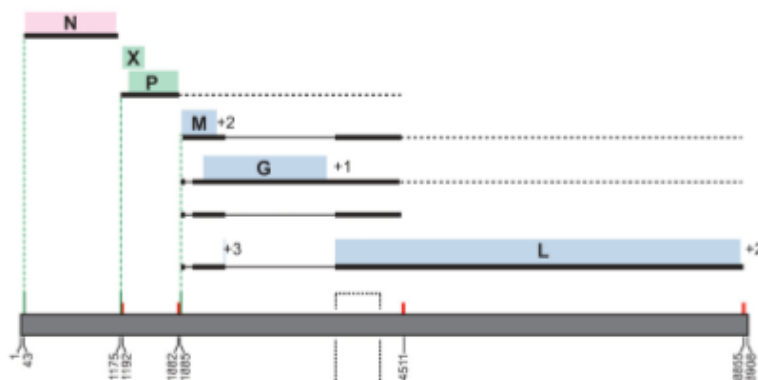


Figura 2 Representação do genoma RNA de *Bornavírus* de tamanho 8,9kb.

Fonte: Adaptado de Kistler et al., 2008

Assim como os vírus da família *Orthomyxoviridae*, os integrantes de *Bornaviridae* fazem replicação intranuclear porém, os bornavírus são os únicos vírus RNA não segmentado e de polaridade negativa a estabelecerem infecção persistente não citolítica no hospedeiro. Utilizam-se de “splicing” para expressão dos genes e além disso, apresentam aparentemente também como estratégia de replicação a retirada de 50 nucleotídeos terminais (Schwemmler e Lipkin, 2004; Payne et al, 2012; Tizard et al, 2016).

Os receptores utilizados por ABV e BDV para adsorção à membrana celular ainda são pouco conhecidos, embora a replicação nuclear confirma-se, por exemplo, pela detecção de antígenos virais por imunohistoquímica (Horie et al., 2010; Tizard et al., 2016).

Outra peculiaridade do gênero *Bornavírus* é a detecção de elementos genéticos correspondentes à nucleoproteína N de BDV integrado ao genoma de algumas espécies de vertebrados. Essas sequências encontradas foram denominadas de nucleoproteína endógena *Borna-like* (EBLN) ou “Bornavírus endógenos” (Horie et al., 2013).

Existem identificados atualmente 20 tipos de *Bornavírus* sendo a maioria deles de ocorrência em aves. Os genótipos de ABV conhecidos são os de psitacídeos (ABV-1 a 8), passeriformes (ABV-C 1 a 3, ABV-ES-1 e ABV-MU-1) e de aves aquáticas (ABV-CG 1 a 3), representado na tabela 2 (Kunh et. al, 2015).

Tabela 2– Bornavírus aviários (ABV)

ESPECIE	BORNAVÍRUS	HOSPEDEIRO
Psitacídeos	ABV1	Psittacíformes
	ABV2	Psittacíformes
	ABV3	Psittacíformes
	ABV4	Psittacíformes
	ABV5	Psittacíformes
	ABV6	Psittacíformes
	ABV7	Psittacíformes
	ABV8	Psittacíformes
Passeriformes	ABV-C 1	Passeriformes (Canários)
	ABV-C 2	Passeriformes (Canários)
	ABC-C 3	Passeriformes (Canários)
	ABV-ES-1	Passeriformes (<i>Estrildidae</i>)
	ABV-MU-1	Passeriformes (Munia*)
Aves aquáticas	ABVCG 1	Anseriformes (Ganso canadense)
	ABVCG 2	Anseriformes (Ganso canadense)
	ABVCG 3	Anseriformes (Ganso canadense)

*Pássaro Manon (*Lonchura striata*)

Entre todos os ABV identificados, as estirpes de psitacídeos têm sido as mais descritas e também com maior número de sequências conhecidas (Kunh et al., 2015). Entretanto, o conhecimento da patogenicidade de cada genótipo ainda é incipiente (Rubbenstroth et al., 2016).

Atualmente, o genótipo de ocorrência mais comum em todo mundo é o ABV4 de psitacídeos (Lierz et al., 2009; Rinder et al., 2009; Gancz et al., 2009; Donatti et al., 2014). Alguns estudos relataram infecções mista de dois genótipos de ABV em psitacídeos (Weissenböck et al., 2009 a; Nedorost et al., 2012).

Embora haja variabilidade entre os genótipos de ABV, há entre 68 e 85% de identidade genética (Kistler et al., 2008; Kuhn et al., 2015). Apesar do alto grau de identidade, que pode ser maior que 90% em algumas sequências genômicas, há diferenças quanto à virulência e indução de resposta imunológica do hospedeiro. Payne e colaboradores desafiaram aves sabidamente positivas para ABV4 utilizando uma estirpe geneticamente distinta, resultando em resposta autoimune exacerbada, com quadro mais severo de lesão histopatológica e formação de grandes granulomas (Payne et al., 2011).

2- ABV e BDV

ABV e BDV possuem genoma muito conservado, com organização semelhante e mesma ordem de códons de iniciação e terminação da transcrição e possuem 65% de similaridade (Kistler et al., 2008). Entretanto, diferem na região que codifica os genes que regulam a síntese das proteínas X e N, sendo que esse fragmento é mais curto em ABV que parece ter 22 nucleotídeos a menos (Rinder et al, 2009). Essas diferenças encontradas resultaram então na classificação do Bornavírus aviário (ABV- *Avian Bornavirus*) como uma espécie a parte na família *Bornaviridae* (Kistler et al., 2008).

Ambos são vírus neurotrópicos porém, ao contrário de BDV que se restringe ao tecido nervoso, ABV possui distribuição tecidual mais ampla e variável, apresentando replicação também em células não neuronais, sendo identificado em órgãos como fígado, rim, pulmão e coração (Rinder et al, 2009).

Os vírus da família *Bornaviridae* não apresentam efeito citopático no cultivo celular sendo detectados por técnicas como a imunofluorescência indireta e/ou RT-PCR. BDV apresenta replicação em células de linhagem de mamíferos enquanto que ABV se multiplica em cultivos de células de linhagem aviária (Zimmerman et al., 2014). O curso clínico da doença é semelhante entre ABV e BDV, com envolvimento imunopatológico (Tizard et al., 2016). Outra semelhança observada são as lesões encontradas em histopatologia: na região do cerebelo ocorre destruição das células de Purkinje com interrupção dessa camada e sinais de degeneração (Ouyang et al, 2009).

O uso de anticorpos anti-BDV para imunohistoquímica de ABV sugere que ambos possuem determinantes antigênicos (epítomos) semelhantes (Weissenböck 2009-1) Além disso, possuem a mesma estratégia de escape do sistema imune do hospedeiro, através da modificação do genoma na região terminal 5', retirando resíduos trifosforilados para reduzir a indução de resposta por interferon (INF) (Reuter et al, 2010).

A epidemiologia de BDV ainda não está clara. Acredita-se que animais de pequeno porte, que se alimentam de insetos, podem ser veículos e transmissores do vírus nas fazendas (Hilbe et al, 2006). Uma espécie de esquilo de coleira foi identificada como reservatório natural de BDV, apresentando o vírus em vários tecidos e também nas excreções corporais (Hilbe et al, 2006; Nobach et al., 2015; Tizard et al., 2016). Entretanto, a identificação de sequências similares de ABV em espécies de aves de continentes distintos sugerem que ABV, ao contrário de BDV, parece não possuir uma espécie reservatório (Rinder et al., 2009; Rubbestroth et al., 2016).

As aves também são sugeridas como possíveis reservatórios de BDV. No início dos anos 1990, avestruzes em fazendas de Israel apresentaram quadros de alterações neurológicas com paresia dos membros, atingindo principalmente as aves mais jovens (até 3 meses de idade). Essa “síndrome de paresia” foi a principal causa de mortalidade nos plantéis e apresentou como agente etiológico o Bornavírus clássico (BDV), detectado através de sorologia (Ashash et al., 1996). Anos depois, Berg e colaboradores identificaram BDV através de RT-PCR em fezes de

aves selvagens, o pato real (*Anas platyrhynchos*) e uma espécie de gralha (*Corvus monedula*), em uma região da Suécia. Considerando que aves podem ser reservatórios de muitos vírus, esses resultados trouxeram à discussão a possibilidade das aves selvagens como possíveis fontes transmissoras de BDV (Berg et al., 2001).

BDV foi inoculado experimentalmente em diversas espécies de animais como galinhas, ratos, coelhos e mussaranhos. Nos experimentos realizados nas aves domésticas, os animais mais jovens apresentaram melhor resultado, com sinais clínicos característico da doença de Borna (Ludwig et al., 1973; Ludwig and Bode, 2000). Ludwig e colaboradores inocularam suspensão cerebral infectada com BDV via intracerebral em treze pintos de um dia de idade resultando em um quadro de incoordenação e paralisia de pernas e asas após 5 a 8 semanas (Ludwig et al., 1973).

Embora as inoculações experimentais com o vírus nas aves domésticas tenham apresentado resultados, o envolvimento de BDV em aves ainda não está claro (Ludwig and Bode, 2000).

Nos anos 1980, BDV foi sugerido como agente envolvido em desordens psiquiátricas humanas, como esquizofrenia e, portanto, um vírus com potencial zoonótico (Rott et al., 1985). Entretanto, essa hipótese ainda não foi confirmada e os resultados até o momento são inconclusivos (Ludwig and Bode, 2000; Horie et al., 2010; Payne et al., 2012; Tizard et al., 2016).

3-ABV e PDD

Desde a identificação do ABV como agente etiológico de PDD em 2008, muitos estudos epidemiológicos e experimentais foram desenvolvidos. Os resultados apresentados confirmaram a associação de ABV e PDD porém, inúmeros questionamentos surgiram. O mecanismo pelo qual Bornavírus aviário leva ao quadro de PDD não está totalmente esclarecido e vários fatores parecem interferir na manifestação e curso clínico da doença (Gancz et al., 2009; Lierz et al., 2009; Gray et al., 2010).

Fatores intrínsecos relacionados à ave infectada como idade e estado imunológico são importantes na determinação do curso da infecção por ABV. Além disso, o genótipo do vírus e/ou estirpe viral, vias de inoculação ou entrada, período de incubação variável, material coletado para diagnóstico, desenvolvimento ou não dos sinais clínicos parecem ser determinantes não apenas no curso clínico mas também na detecção do vírus (Gancz et al., 2009; Gray et al., 2010; Kistler et al., 2010).

Além dos fatores que influenciam a manifestação clínica de PDD já mencionados, o genótipo de ABV também parece influenciar na manifestação e curso clínico da doença. Os achados até o momento sugerem ABV4 como genótipo mais patogênico, sendo responsável por grande parte dos quadros mais severos (Gray et al 2010; Payne et al, 2011). Gancz e colaboradores em estudo com infecção experimental inoculando ABV4 em calopsitas, sugerem que a estirpe de ABV está relacionada à manifestação clínica assim como, às lesões encontradas em histopatologia (Gancz et al., 2009).

As alterações patológicas encontradas em muitos órgãos além do sistema digestório, como por exemplo, miocardites e disfunções renal, vistas nas aves com PDD, podem ser atribuídas à ampla distribuição tecidual do vírus (Weissenböck 2009b).

O quadro da doença, resultante tanto de infecção por ABV como BDV, está relacionado à resposta imune do animal. Entretanto, a imunidade humoral parece não ser eficiente na defesa

contra o vírus. Psitacídeos com altos títulos de anticorpos para ABV desenvolveram quadro de PDD com gravidade semelhante a outros com titulação baixa ou mesmo com sorologia negativa (Heffels-Redmann et al., 2012). Além disso, aves positivas para um determinado genótipo de ABV, aparentemente, não são imunes para uma nova infecção por outra estirpe desse mesmo genótipo (Payne et al., 2011).

Embora nos primeiros trabalhos sobre ABV este não foi detectado em aves saudáveis, no ano seguinte foram publicados estudos que detectaram o vírus em aves de aparência saudável, sugerindo a possível existência de portadoras de ABV (Lierz et al, 2009; Rinder et al, 2009).

O estado de portador foi abordado em diversos estudos que identificaram a eliminação do vírus em aves sem sinais clínicos de PDD (De Kloet et al., 2009). Lierz e colaboradores detectaram ABV por RT-PCR em Tempo-Real, em *swab* cloacal associado com resultado sorológico positivo (*Western blot*) em aves saudáveis que tiveram contato com aves com PDD e diagnosticadas positivas para o ABV em tecidos coletados na necropsia (Lierz et al., 2009).

Em outro estudo, calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) desafiadas experimentalmente com ABV4 foram eutanasiadas após período de infecção de 95 dias, sem sinais de dilatação proventricular e demais alterações compatíveis com PDD entretanto, as alterações microscópicas foram compatíveis com a doença. Como resultado, considerando o período de incubação variável de PDD, foi sugerido que essas aves desenvolveriam a doença futuramente e assim, não poderiam ser consideradas realmente como apenas aves portadoras. O estado de portador e possível fonte de vírus deve ser melhor investigado sendo necessários maiores estudos avaliando aves sintomáticas e assintomáticas (Gancz et al., 2009).

4 - Patogenia

Durante a infecção por ABV são encontradas inúmeras lesões em diferentes órgãos, incluindo o sistema nervoso, fígado, baço, pulmões e rins, sugestivas de um processo sistêmico (Lierz et al., 2009).

Acredita-se que, assim como BDV, ABV dissemina-se no hospedeiro através das redes de neurônios (Gancz et al., 2009; Payne et al, 2012; Tizard et al, 2016). No entanto, em estudo realizado por Payne e colaboradores, células inflamatórias mononucleares encontradas nos locais com lesão foram positivas para o antígeno ABV, sugerindo que essas células de defesa podem participar da disseminação viral pelo corpo da ave (Payne et al., 2011).

O padrão das lesões microscópicas encontradas no sistema nervoso central, com presença de anticorpos antigliais, além de outros fatores já mencionados, indicam que um processo imunomediado está envolvido na patogenia da doença (Gancz et al., 2009; Ouyang et al., 2009; Villanueva et al., 2010). Entretanto, o mecanismo pelo qual ABV leva ao quadro clínico patológico de PDD ainda não está completamente elucidado.

5- Transmissão

A detecção do vírus nas fezes e células intestinais de aves com PDD confirmou a rota fecal oral como via de transmissão de ABV (Rinder et al., 2009). Entretanto, a ampla distribuição de ABV em diversos tecidos faz com que o vírus também possa ser eliminado em outras secreções (Rinder et al., 2009; Heatley et al., 2012). A detecção de ABV nas penas sugere que estas podem também desempenhar um papel na transmissão do vírus (Kloet et al., 2011).

Nos primeiros trabalhos sobre ABV, a transmissão horizontal foi confirmada. Estudos detectaram ABV em aves de mesmo recinto e também casos de rápida disseminação viral em psitacídeos expostos a aves positivas por sete dias apresentando os sinais clínicos compatíveis com PDD pouco tempo depois (Kistler et al., 2010). Porém, em outros estudos de indução experimental e, em alguns casos, infecção natural, aves de um mesmo recinto tiveram diagnósticos diferentes na RT-PCR para ABV no *swab* cloacal (Lierz et al., 2009).

Rubbenstroth e colaboradores, em estudo publicado recentemente, indicaram a transmissão horizontal do vírus, inclusive interespecies, através de estudo filogenético analisando sequências de estirpes obtidas de aves Psittaciformes, Passeriformes e Anseriformes. Sequências estreitamente semelhantes foram encontradas em diferentes ordens filogenéticas aviárias, indicando essa via de transmissão (Rubbenstroth et al., 2016).

Em relação a transmissão vertical, embora comprovada a ocorrência, estudos são necessários para a sua caracterização. Monaco e colaboradores obtiveram resultados positivos em 17% dos ovos de psitacídeos avaliados, detectando ABV na albumina, gema e tecido embrionário e no cérebro de dois embriões nascidos de alguns ovos incubados e alimentados à mão após nascimento (Monaco et al., 2012).

Embora esses resultados sugere uma possível transmissão vertical de ABV, as informações sobre essa via de transmissão ainda são escassas. Fatores como diferenças reprodutivas entre as espécies e período de incubação variável do vírus, podem interferir na avaliação e assim, dificultar o estudo da transmissão vertical nos planteis (Monaco et al., 2012; Rubbenstroth et al., 2016).

6 - Epidemiologia

Atualmente, ABV possui distribuição mundial, atingindo muitas espécies de aves silvestres embora mais descrito em psitacídeos (ordem Psittaciformes) (Weissenböck et al., 2009a; Heffels-Redmann et al., 2011; Rubbenstroth et al., 2016).

Especula-se que PDD tenha sua origem na América do Sul (Gregory et al., 1994; Payne et al., 2012). A possível entrada da doença na Austrália, por exemplo, foi atribuída à uma arara vermelha (*Ara chloroptera*) importada em 1993. A ave apresentou os sinais clínicos característicos de PDD três semanas após início da quarentena (Sullivan et al., 1993).

Lierz e colaboradores avaliaram aves de coleções diferentes de uma mesma região geográfica da Alemanha, constatando um grupo controle sem histórico de PDD nos últimos 6 anos e negativo nos exames de RT-PCR para ABV. A localização geográfica parece ser um fator relevante considerando a distribuição mundial de PDD e conseqüentemente, de ABV (Lierz et al., 2009).

A disseminação de ABV nas aves de vida livre ainda é desconhecida. Estudos com Anseriformes selvagens (de vida livre) da Alemanha e América do Norte demonstraram a presença do vírus nessas aves. Entretanto, a ocorrência na população de Passeriformes e Psittaciformes de vida livre não foi estudada (Payne et al., 2011b; Delnatte et al., 2013; Rubbenstroth et al., 2016).

Villanueva e colaboradores tiveram acesso a amostras de sangue de psitacídeos capturados em estudo de radiotelemetria a campo realizado em região do Peru (Villanueva et al., 2010). Entretanto, a amostragem foi baixa, não sendo representativa para aves de vida livre da região, embora com resultados negativos, além de haver escassa informação epidemiológica dessas aves.

No Brasil a primeira identificação de ABV (genótipo 4) foi realizada no Laboratório de Doenças das Aves na Universidade Federal de Minas Gerais, com amostras de psitacídeos nativos cativos que apresentavam PDD, através de RT-PCR (Donatti et al., 2014). Os autores sugerem então a necessidade da preparação de um plano estratégico para a redução do impacto na conservação de espécies nativas.

Philadelpho e colaboradores também detectaram ABV em psitacídeos exóticos e nativos cativos, identificando o genótipo oito (Philadelpho et al, 2014). Assim como estudos realizados em outros países, os genótipos mais comuns encontrados no Brasil foram o ABV-2 e 4. Entretanto, a origem das amostras foi restrita à região sudeste do país e conseqüentemente, não houve um estudo epidemiológico filogeográfico mais abrangente (Donatti et al, 2014; Encinas-Nagel, 2014; Philadelpho et al, 2014).

Sequências similares de ABV foram encontradas em diferentes países, até mesmo diferentes continentes (Rinder et al., 2009; Weissenböck et al., 2009a; Rubbenstroth et al., 2016). Acredita-se que a disseminação mundial do vírus esteja relacionada ao tráfico e/ou comercialização dessas aves, principalmente psitacídeos (Raso 2014).

7- Diagnóstico

O diagnóstico *ante mortem* de ABV tem sido indicado para viabilizar a adoção de medidas de biosseguridade e redução na ocorrência surtos (Raso 2014). A descrição da sintomatologia clínica de PDD, associada ao diagnóstico laboratorial de ABV, tem sido o procedimento mais preconizado. A infecção por ABV, ao que tudo indica, precede a manifestação clínica da doença, o que explicaria inclusive a detecção do vírus em aves sem sinais clínicos (Kistler et al., 2010).

Considerando a rota fecal-oral como via de transmissão de ABV, a detecção do vírus através de *swab* cloacal e/ou fezes constitui uma opção não invasiva para o diagnóstico, estabelecendo a vigilância epidemiológica. Entretanto, o diagnóstico baseado na detecção de ABV por esse método pode resultar em resultado falso-negativo, uma vez que a liberação do vírus nas fezes é intermitente. Como alternativa, várias coletas efetuadas em diferentes horas do dia, durante um determinado período, poderia reduzir resultados falsos negativos (Lierz et al., 2009; Raghav et al., 2010; Payne et al., 2011).

Em muitos estudos, a detecção do vírus foi maior em *swab* cloacal e/ou fezes em contraste à detecção no sangue, que depende de viremia. A detecção de ABV no sangue se mostrou aparentemente mais difícil se comparada à detecção nas fezes, apesar da eliminação viral intermitente (Gancz et al., 2009).

Muitos estudos comprovaram a ampla distribuição tecidual de ABV, através de técnicas como RT-PCR e imunohistoquímica (IHQ), o que remete à possibilidade da excreção do vírus por diversas vias. Conseqüentemente, outros materiais biológicos foram usados para diagnóstico de ABV, incluindo *swabs* cloacais e de traqueia, urina e também em penas (Gancz et al., 2009; Rinder et al., 2009; Raghav et al., 2010; Kloet et al., 2011; Heathy et al., 2012; Sassa et al., 2013).

Exames sorológicos podem ser importantes em estudos epidemiológicos, ao possibilitar a detecção da exposição previa a ABV (De Kloet et al., 2009). A maioria dos estudos desenvolvidos utilizaram a proteína P40, a nucleoproteína, como antígeno no diagnóstico sorológico de infecção viral por ABV (De Kloet et al., 2009; Ouyang et al., 2009; Kloet et al., 2011;). A pesquisa de anticorpos contra ABV por ensaio imunoenzimático (ELISA) apresentou

resultados diferentes para cada uma das proteínas virais. Anticorpos contra nucleoproteína (N) do vírus foram detectados na maioria das aves positivas por RT-PCR. Entretanto, os anticorpos para proteína matriz (M) e fosfoproteína (P) tiveram resultados mais variáveis não sendo, portanto, primeira escolha para diagnóstico sorológico de ABV (Kloet et al., 2011).

O *western blotting* pode representar outro método de escolha para detecção de anticorpos para ABV na ave viva. Entretanto, também não deve ser utilizado como método isolado. Villanueva e colaboradores (2010) encontraram aves doentes soronegativas assim como saudáveis, sem PDD, soropositivas. Além disso, houve detecção do vírus nas fezes de aves soronegativas.

A detecção de anticorpos de ABV em infecção experimental ocorreu antes da eliminação do vírus nas fezes. Entretanto, estudos avaliando aves saudáveis e com PDD, identificaram aves assintomáticas soronegativas, porém com PCR positivo nas fezes. Há a possibilidade de a soroconversão ocorrer em etapas diferentes da infecção experimental, em comparação à infecção natural, nesta última a detecção de anticorpos pode ocorrer próxima à manifestação clínica da doença (Gray et al., 2010; Villanueva et al., 2010)

Em testes de IHQ utilizando anticorpos para as proteínas N e P podem ser observados pontos de marcação principalmente no núcleo, confirmando a presença destes antígenos de ABV intranucleares. Essas duas proteínas formam complexos dentro do núcleo das células (Ouyang et al., 2009). Entretanto, Ouyang e colaboradores (2009) observaram que nos exames de IHQ não houve um padrão de detecção no cérebro, tanto as células gliais como neurônios foram positivos. Entretanto, houve uma aparente predileção pelas células da camada de Purkinje no cerebelo.

Raghav e colaboradores estudaram a associação de exame histopatológico, IHQ e RT-PCR para Diagnóstico de PDD, resultando em um alto nível de concordância entre esses métodos (resultados estatísticos próximos de 100%) e assim, comprovando novamente a relação de PDD e ABV, este último como seu agente etiológico (Raghav et al 2010).

A detecção de ABV através de RT-PCR é atualmente o método mais sensível para diagnóstico (Honkavuori et al., 2008; Raghav et al., 2010). Devido à ampla distribuição de ABV, o vírus já foi detectado em diversos órgãos. Em alguns casos o cérebro, tecido nervoso central, apresentou melhores resultados em comparação com os demais órgãos como proventrículo, por exemplo, comprovando o caráter neurotrópico da infecção (Weissenböck et al., 2009a).

ABV pode ser replicado em células de linhagem aviária *in vitro*. Rinder e colaboradores usaram linhagens de células de codorna e frango, fibroblasto de codorna (CEC32) e hepatoma de galinha (LMH), respectivamente, e linhagens de células de mamíferos como VERO e MDBK. Resultados positivos, com a replicação viral detectada por imunofluorescência indireta, foram obtidos na linhagem de origem aviária enquanto que não houve sucesso nas linhagens de mamíferos. Os melhores resultados descritos até o momento foram com cultivos de fibroblastos embrião de pato (*duck embryo fibroblasts*, DEF) (Gray et al, 2010). Entretanto, seu isolamento é muito difícil sendo obtido sucesso após sucessivas tentativas em células aqui já especificadas (Rinder et al., 2009; Gray et al., 2010). Os resultados comprovaram assim, também demonstrado em diversos outros estudos, a preferência de ABV por células de aves (Rinder et al., 2009; Gray et al., 2010; Reuter et al., 2010).

O diagnóstico de ABV deve envolver além do histórico clínico, a associação de diferentes métodos. De Kloet e colaboradores sugeriram que a RT-PCR deve ser acompanhada de exame sorológico, quando o resultado do primeiro é negativo ou inconclusivo (De Kloet et al., 2009).

Além da instabilidade do genoma viral RNA e ser facilmente degradado por enzimas RNAses, os Bornavírus em comparação com os demais vírus, possuem replicação e geração de progênie

viral em pequenos níveis (Flores, 2015). Conseqüentemente, esses fatores contribuem para dificultar a detecção do RNA de ABV.

Entretanto, Kloet e colaboradores conseguiram detectar ABV em penas de psitacídeos mesmo após este material ter sido armazenado à temperatura ambiente por aproximadamente um mês (Kloet et al., 2011). A demonstração de ABV nas penas é uma estratégia não invasiva e pode ser uma alternativa quando há dificuldade de armazenamento das amostras biológicas.

8- Tratamento

PDD não possui tratamento, sendo a mortalidade de 100% (Gregory et al, 1994). Muitos protocolos já foram testados e, devido ao caráter inflamatório da doença, os tratamentos antivirais foram associados com anti-inflamatórios, além dos cuidados de suporte básicos (Hoppe et al., 2013; Steinmetz et al., 2008;).

Muitos relatos de terapêutica veterinária iniciaram as tentativas de tratamento com anti-inflamatórios não esteroidais como celecoxib. Heffels-Redmann e colaboradores testaram em uma das aves (*Ara ararauna*) do grupo de psitacídeos avaliados, que apresentava regurgitação e perda de peso, a associação de celecoxib, anfotericina B e enrofloxacin combinado com a mudança da alimentação para forma peletizada. A ave recuperou-se e permaneceu sem sinais clínicos durante 3 meses até sua morte súbita. Entretanto, esse mesmo protocolo foi testado na sua parceira de recinto (*Ara macao*), que começou a apresentar sinais de apatia e perda progressiva de peso, mas não houve resposta (Heffels-Redmann et al., 2012). Um estudo de 2015 com o antiviral ribavirina obteve sucesso *in vitro* contra uma estirpe de ABV4 (Musser et al., 2015).

O insucesso até então do tratamento *in vivo* e a severidade da doença, assim como seu caráter emergente, resultaram na sugestão de uma possível imunização das aves silvestres cativas, principalmente psitacídeos, contra ABV. Em estudo experimental, as aves apresentaram resposta mais exacerbada com lesões histopatológicas mais graves, após a inoculação com estirpe diferente de mesmo genótipo, sugerindo que pode ocorrer resposta autoimune decorrente de uma exposição previa (Payne et al., 2011).

9- Prevenção

O avanço das metodologias de estudo de ABV, especialmente o diagnóstico realizado na ave viva, permite o desenvolvimento de medidas preventivas e de controle mais eficazes.

O controle da enfermidade depende de práticas de manejo apropriadas. Medidas de higiene e uso de desinfetantes como fenóis ou hipocloritos na limpeza do ambiente e utensílios, isolamento das aves suspeitas, uso de quarentena, cuidados adicionais na incubadora, principalmente de aves clinicamente doentes, são fundamentais (Hoppe et al., 2010; Raso, 2014).

Falhas nas medidas de biossegurança, envolvendo medidas de higiene e sanitárias, podem resultar na introdução do vírus no criatório e assim gerar conseqüências que podem ser desastrosas. Em estudo prévio, onde foram avaliados aspectos como a transmissão e epidemiologia de ABV, um surto teve início após introdução de uma ave ABV-positiva, sem os devidos cuidados de prevenção, como quarentena com exames laboratoriais. As conseqüências

foram ainda maiores, pois a ave foi levada para tratamento de sinais clínicos, no mesmo local onde eram destinados os filhotes (Kistler et al., 2010).

Considerando a eliminação intermitente do vírus nas fezes assim como a variação na detecção de anticorpos, durante a quarentena é necessário que sejam realizados repetidos testes para detecção do RNA de ABV e/ou anticorpos para o vírus, como medida confiável de prevenção à introdução do mesmo no plantel (Heffels-Redmann et al., 2012).

Para que um plantel seja livre de ABV é recomendado a remoção e exclusão das aves infectadas (Heffels-Redmann et al., 2012).

Olbert e colaboradores publicaram recentemente um estudo testando uma estratégia de vacinação contra ABV utilizando como vetores o vírus da doença de Newcastle (NDV) e vírus vaccínia Ankara modificado (MVA). Uma infecção autolimitante foi estabelecida nas espécies *Nymphicus hollandicus* e *Serinus canaria* forma doméstica contra ABV4, além da diminuição da liberação do vírus, sugerindo modificação no curso da infecção por ABV. Entretanto, a infecção não foi eliminada, ocorrendo persistência viral com sinais clínicos de PDD na calopsita (Olbert et al., 2016).

CAPITULO 3 – DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BORNAVÍRUS AVIÁRIO EM PSITACÍDEOS CATIVOS EM MINAS GERAIS, BRASIL.

RESUMO

A síndrome da dilatação do proventrículo (*proventricular dilatation disease - PDD*) é hoje uma doença emergente de ocorrência mundial e de caráter fatal. O Bornavírus aviário (ABV) foi identificado em 2008 como o agente etiológico dessa enfermidade, sendo realizados inúmeros estudos desde então, comprovando a relação casuística de PDD e ABV. A doença e a infecção por ABV foram previamente descritas no Brasil, em 2010-2012, com primeira detecção na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. No presente estudo, 46 psitacídeos de espécies nativas e exóticas cativos provenientes de criatórios e mantenedouros da região metropolitana de Belo Horizonte, de proprietários particulares, do Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) de Uberlândia e casuística da rotina do laboratório foram encaminhados ao Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária – UFMG no período de 2015-2016 para identificação da *causa mortis*. Essas aves foram submetidas a exame necroscópico, RT-PCR para ABV e diagnóstico diferencial (RT-PCR gênero *Alphavirus* e *Paramyxovirus*). Algumas das aves amostradas (19 – 41,3%) também foram avaliadas em exame histopatológico. Como resultados, 9 (19,6%) aves com confirmação histopatológica foram consideradas positivas para a doença (PDD positiva), 13 (28,2%) com lesão característica de PDD na necropsia, porém sem confirmação histopatológica, foram consideradas como um quadro “sugestivo de PDD” e 24 (52,2%) sem a doença (PDD negativa). Nos resultados da RT-PCR para ABV, 29 (63%) aves avaliadas foram positivas sendo que a maior detecção dos casos foi utilizando o oligonucleotídeo para proteína matriz (M). Entre as aves positivas para ABV na RT-PCR, 18 (62%) aves foram sugeridas como não doentes e assim possíveis portadoras do vírus. No diagnóstico diferencial, 2 (4,3%) aves foram positivas na RT-PCR para gênero *Alphavirus* (Encefalite Equina), sendo detectado em uma delas co-infecção com ABV e apenas uma amostra (2,1%) positiva na RT-PCR para *Paramyxovirus*. Os resultados apresentados no presente estudo confirmam a presença de ABV nos planteis de psitacídeos cativos da região metropolitana de Belo Horizonte.

1- INTRODUÇÃO

A doença da dilatação do proventrículo (PDD) foi identificada inicialmente na década de 70, em araras (Gregory et al., 1994). A doença também conhecida como síndrome de emagrecimento das araras, síndrome da dilatação gástrica neuropática, entre outros sinônimos, possui caráter fatal com 100% de mortalidade sendo, atualmente, uma doença emergente com distribuição mundial (Gregory et al., 1994; Weissenböck et al, 2009a; Heffels-Redmann et al, 2011; Rubbenstroth et al, 2016).

Clinicamente, a doença pode se manifestar com alterações neurológicas e/ou gastrointestinais. No primeiro caso, podem ocorrer fraqueza, déficit proprioceptivos, cegueira, ataxia, convulsões, entre outros. Como manifestação clínica relacionada ao TGI, pode ocorrer progressiva perda de peso, estase da motilidade do papo, dilatação proventricular e do intestino, presença de alimento não digerido nas fezes, regurgitação evoluindo para o óbito (Gregory et al., 1994).

Espécies ameaçadas de extinção, como a ararinha azul (*Cyanopsitta spixii*) já tiveram diagnóstico positivo para PDD, alertando para a importância da sua prevenção e controle (Deb et al., 2008)

Entretanto, somente em 2008, a etiologia de PDD foi identificada através da caracterização do Bornavírus aviário (ABV) (Honkavuori et al., 2008; Kistler et al., 2008). Esse vírus de caráter neurotrópico, integra a família *Bornaviridae* juntamente com Bornavírus clássico (BDV) causador de doença neurológica principalmente em ovinos e equinos e mais restrito a Europa central (Kistler et al., 2008; Payne et al., 2012; Tizard et al., 2016).

Atualmente, o Bornavírus aviário possui distribuição mundial abrangendo muitas espécies de aves silvestres, entretanto, é mais descrito em psitacídeos (Weissenböck et al., 2009a; Heffels-Redmann et al., 2011; Rubbenstroth et al., 2016).

Os psitacídeos são aves pertencentes à Ordem Psittaciforme e que possuem como característica principal o formato do bico, com parte superior curto, arqueado, de base larga que se encaixa com a parte inferior. O bico dessas aves possui grande mobilidade e força devido a uma articulação especial entre a maxila e a calota craniana o que possibilita, em ação conjunta com a mandíbula, movimentos complexos (Cubas, 2014).

Na Ordem Psittaciforme estão incluídas as famílias *Psittacidae* formada pelas araras, papagaios, periquitos e maritacas, família *Cacatuidae* formada pelas cacatuas e calopsitas e pela família *Loridae*, onde estão incluídos os loris e *lorikeets* (Cubas, 2014).

Existe uma grande diversidade de formas, cores e tamanhos. Sua exuberância e inteligência faz com que sejam as aves mais procuradas no mundo para animais de estimação sendo uma das espécies preferidas do tráfico de animais silvestres (Relatório RENCTAS, 2002). São aves que vivem em bandos e na reprodução possuem comportamento monogâmico formando parceiros que podem permanecer por toda vida. Além disso, são popularmente conhecidas por sua inteligência e capacidade de vocalização, sendo que algumas espécies conseguem repetir com perfeição sons e até mesmo palavras (Cubas, 2014).

O Brasil é um dos países do mundo que abriga o maior número de espécies de psitacídeos (Sick, 1997). Atualmente, muitas espécies exóticas têm integrado o plantel de criatórios comerciais e, principalmente, o mercado pet.

No presente estudo, foram incluídas espécies de psitacídeos exóticas e nativas à fauna brasileira, algumas delas em risco eminente de extinção (IUCN, 2016). Do total de 46 aves amostradas, 21 espécies são nativas e 4 exóticas.

Das espécies exóticas, estão dois espécimes de *Psittacus Erithacus* conhecido popularmente como papagaio do Congo ou papagaio cinzento, duas calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), um periquito-de-colar (*Psittacula krameri*) e uma Aratinga mitrata (*Psittacara mitrata*).

As espécies nativas amostradas incluem os gêneros *Amazona* (figura 3), *Ara*, *Aratinga*, *Guaruba*, *Eupsittula*, *Pionus*, *Pionites* e *Triclaria*. Muitas espécies de alguns desses gêneros encontram-se na Lista de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (IUCN, 2016).



Figura 3- A Papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*). B. Papagaio campeiro (*Amazona ochrocephala*)

A primeira detecção de ABV no Brasil foi em estudo desenvolvido no Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária – UFMG, com psitacídeos cativos. Nesse trabalho, quatro das aves amostradas foram positivas para PDD e o RNA viral de ABV foi identificado no tecido cerebral dessas aves através de RT-PCR (Donatti et al., 2014).

Desde então, a investigação e detecção de casos relacionados com a doença e com infecção viral tem crescido em território nacional, totalizando 62 aves ABV positivas até o momento (Donatti et al., 2014; Encinas-Nagel et al., 2014; Philadelpho et al., 2014). Entretanto, a caracterização de casos de ABV no Brasil é mais restrita à região sudeste, o que indica a necessidade de um estudo mais abrangente (Donatti et al., 2014; Encinas-Nagel et al., 2014; Philadelpho et al., 2014).

A caracterização de ABV é relativamente recente e muitos aspectos como sua epidemiologia, patogenia, transmissão, entre outros, ainda são pouco conhecidos (Honkavuori et al., 2008; Kistler et al., 2008).

Desde a identificação de ABV como agente etiológico de PDD, inúmeros estudos experimentais e de infecção natural foram desenvolvidos comprovando a associação casuística de ambos (Gancz et al., 2009; Lierz et al., 2009; Rinder et al., 2009; Gray et al., 2010; Payne et al., 2011). Entretanto, o mecanismo pelo qual o vírus ocasiona a doença ainda é desconhecido.

Embora a associação de ABV e PDD já esteja comprovada, resultados sugerem que a infecção viral pode preceder a manifestação da doença e assim aves portadoras atuariam como fontes potenciais de ABV em um plantel (Gancz et al., 2009; Lierz et al., 2009)

No presente estudo buscou-se elucidar os aspectos da epidemiologia de ABV em psitacídeos cativos de Minas Gerais através de sua detecção por RT-PCR associado ou não com a doença PDD, em aves encaminhadas ao Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da UFMG para diagnóstico da *causa mortis*. Portanto, foram incluídas aves com apresentação clínica, macroscópica e/ou histopatológicas compatíveis ou não com PDD, objetivando estudar a importância do vírus nos plantéis de psitacídeos nativos e exóticos cativos, principalmente de Belo Horizonte e região metropolitana.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Coleta de material

2.1.1- Aves utilizadas no estudo

No período de 2013-2016, um total de 46 espécies de psitacídeos foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, para diagnóstico da causa mortis. Essas aves foram provenientes de criatórios e mantenedores da região metropolitana de Belo Horizonte, de proprietários particulares, do Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) de Uberlândia e casuística da rotina do Laboratório de Doenças das Aves. Entre os psitacídeos analisados tiveram espécies nativas da fauna brasileira, sendo o número amostral e classificação em relação ao estado de conservação, descritos na tabela 3. As aves foram devidamente identificadas com data de chegada, necropsia e origem, sendo o material coletado e armazenado a -80 °C, para posterior análise (Tabela 4).

Tabela 3- Espécies de psitacídeos nativos da fauna brasileira amostradas no estudo com número amostral e classificação em relação ao estado de conservação.

Espécie	Número amostral	Classificação IUCN
<i>Amazona aestiva</i>	2	Pouco preocupante
<i>Amazona festiva</i>	1	Pouco preocupante
<i>Amazona brasiliensis</i>	2	Vulnerável
<i>Amazona ochrocephala</i>	1	Pouco preocupante
<i>Amazona pretrei</i>	1	Vulnerável
<i>Amazona rhodocorytha</i>	4	Em perigo
<i>Amazona vinacea</i>	3	Em perigo
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	1	Em perigo
<i>Ara ararauna</i>	1	Pouco preocupante
<i>Ara chloropterus</i>	2	Pouco preocupante
<i>Aratinga jandaya</i>	1	Pouco preocupante
<i>Aratinga weddelli</i>	1	Pouco preocupante
<i>Eupsittula aurea</i>	2	Pouco preocupante
<i>Guaruba guarouba</i>	4	Em perigo
<i>Pionites leucogaster</i>	3	Pouco preocupante
<i>Primolius maracaná</i>	2	Quase ameaçada
<i>Pionus fuscus</i>	2	Pouco preocupante
<i>Pionus maximiliani</i>	2	Pouco preocupante
<i>Pionus menstruus</i>	1	Pouco preocupante
<i>Pionus reichnowi</i>	1	Pouco preocupante
<i>Triclaria malachitacea</i>	2	Quase ameaçada

Na avaliação das aves amostradas no presente estudo foram considerados como sinais clínicos compatíveis com PDD:

Sinais neurológicos: alteração de comportamento como aumento de agressividade, medo e/ou irritabilidade, postura anormal da cabeça e/ou membros, desequilíbrio postural com dificuldade de se manter em estação, dificuldade de voo, déficits proprioceptivos ou motor, tremores, fraqueza, depressão, convulsões (Gregory et al., 1994; Steinmetz et al, 2008).

Sinais Gastrointestinais: aumento e/ou diminuição do apetite, perda progressiva de peso, estase de papo, regurgitação e/ou sementes não digeridas nas fezes (Berhane et al, 2001; Gregory et al., 1994).

Todos os criatórios são devidamente cadastrados no IEF/IBAMA de Minas Gerais e este estudo tem autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) de número 218/2016 assim como SISBIO número 54185-1, autorizando a manipulação e coleta de material de aves silvestres.

Tabela 4 – Espécies de aves encaminhadas ao Laboratório de Doenças das Aves no período de 2013-2016 com respectiva data de chegada/coleta (necropsia) e origem

Amostra	Espécie/ Identificação	Data chegada/coleta	Criatório	Localização	Material
1	<i>Ara ararauna</i>	08/04/2013	A	Região metropolitana	Envio de tecidos
2	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	30/06/2015	A	Região metropolitana	Envio de tecidos
3	<i>Amazona brasiliensis</i>	27/07/2015	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
4	<i>Primolius maracanã</i>	09/08/2015	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
5	<i>Psittacus erithacus</i>	19/08/2015	A	Região metropolitana	Ave para necropsia
6	<i>Amazona vinacea</i>	31/08/2015	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
7	<i>Pionus fuscus</i>	09/09/2015	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
8	<i>Nymphicus hollandicus</i>	21/09/2015	Proprietário	Belo Horizonte	Ave para necropsia
9	<i>Pionus reichnowi</i>	05/11/2015	A	Região metropolitana	Ave para necropsia
10	<i>Amazona rhodocorytha</i>	28/11/2015	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
11	<i>Guaruba guarouba</i>	28/12/2015	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
12	<i>Amazona vinacea</i>	04/01/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
13	<i>Pionus maximiliani</i>	08/01/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
14	<i>Triclaria malachitacea</i>	14/01/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
15	<i>Guaruba guarouba</i>	21/01/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
16	<i>Primolius maracanã</i>	25/01/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
17	<i>Ara choropectera</i>	13/03/2015	LAPAS	Uberlândia	Envio de tecidos
18	<i>Triclaria malachitacea</i>	15/02/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
19	<i>Guaruba guarouba</i>	15/02/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
20	<i>Amazona vinacea</i>	14/03/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
21	<i>Pionites leucogaster</i>	29/05/2016	A	Região metropolitana	Ave para necropsia
22	<i>Amazona</i>	01/09/2016	A	Região	Ave para

	<i>ochrocephala</i>			metropolitana	necropsia
23	<i>Amazona rhodocorytha</i>	12/04/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
24	<i>Amazona rhodocorytha</i>	12/04/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
25	<i>Amazona rhodocorytha</i>	12/04/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
26	<i>Amazona aestiva</i>	13/04/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
27	<i>Pionites leucogaster</i>	18/04/2016	A	Região metropolitana	Ave para necropsia
28	<i>Pionites leucogaster</i>	18/04/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
29	<i>Pionus fuscus</i>	29/04/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
30	<i>Pionus maximiliani</i>	02/05/16	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
31	<i>Amazona pretrei</i>	11/05/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
32	<i>Aratinga weddelli</i>	13/05/2016	A	Região metropolitana	Ave para necropsia
33	<i>Amazona festiva</i>	14/05/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
34	<i>Psittacula krameri</i>	20/05/2016	A	Região metropolitana	Ave para necropsia
35	<i>Guaruba guarouba</i>	28/05/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
36	<i>Pionus menstruus</i>	15/06/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
37	<i>Eupsittula aurea</i>	27/06/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
38	<i>Eupsittula aurea</i>	28/06/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
39	<i>Amazona aestiva</i>	29/06/2016	Proprietário	Belo Horizonte	Ave para necropsia
40	<i>Ara chloroptera</i>	30/06/2016	Rotina LDA/UFMG	Região metropolitana	Ave para necropsia
41	<i>Nymphicus hollandicus</i>	06/07/2016	Proprietário	Belo Horizonte	Ave para necropsia
42	<i>Amazona rhodocorytha</i>	11/07/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
43	<i>Psittacus erithacus</i>	27/07/2016	A	Região metropolitana	Ave para necropsia
44	<i>Amazona brasiliensis</i>	13/09/2016	B	Região metropolitana	Ave para necropsia
45	<i>Psittacara mitrata</i>	13/09/2016	A	Região metropolitana	Ave para necropsia
46	<i>Aratinga jandaya</i>	13/09/2016	A	Região metropolitana	Ave para necropsia

LAPAS- Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres Uberlândia/MG; LDA/UFMG-
Laboratório de Doenças das Aves/ UFMG

2.2 - Necropsia

As necropsias das aves encaminhadas para diagnóstico *post mortem* foram realizadas no Setor de Doenças das Aves, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMPV) da Escola de

Veterinária – UFMG. Foram utilizados instrumentais cirúrgicos e frascos de coleta novos ou autoclavados. As pinças e tesouras foram trocadas durante o procedimento, sempre que necessário, e placas de petri foram utilizadas para a individualização dos órgãos destinados à coleta, evitando qualquer contaminação.

Para a viabilização da análise macro e microscópica dos órgãos e tecidos, os criatórios, e proprietários foram orientados a não congelarem as aves e, quando possível, levarem imediatamente ao setor ou manter apenas refrigerada a 4°C, encaminhando a ave dentro de no máximo 6 horas após o óbito. Entretanto, algumas aves foram avaliadas após o descongelamento dificultando a avaliação completa de alguns órgãos e envio para avaliação histopatológica.

Fragmentos de tecidos de cérebro, nervos periféricos, pulmão, traqueia, coração, fígado, baço, adrenais, rins, inglúvio, proventrículo, ventrículo, pâncreas, gônadas, intestinos e cloaca foram coletados. Uma alíquota de aproximadamente 300 µL foi congelada a -80 °C em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL para posterior extração de RNA e outra, armazenada em formalina 10% para análise histopatológica.

Durante o exame necroscópico, raspados de mucosa de papo, proventrículo, ventrículo e intestinos foram coletados em lâminas para posterior avaliação microscópica e possível detecção de parasitas.

Foram determinados escores corporais, que variaram entre 1 e 3, com base na constituição da musculatura peitoral, e presença de dilatação do proventrículo, classificada como discreta a moderada e intensa, conforme apresentado na tabela 5 e figuras 4 e 5.

Tabela 5- Classificação dos critérios avaliados na necropsia (escore corporal e dilatação do proventrículo)

Critério avaliado	Classificação
Escore corporal	1-Muito magro (caquexia) 2 – Médio 3 - Bom
Dilatação do proventrículo	- Normal +discreta/moderada ++intensa

Na figura 4, estão exemplificados os graus de dilatação do proventrículo avaliados no trabalho.

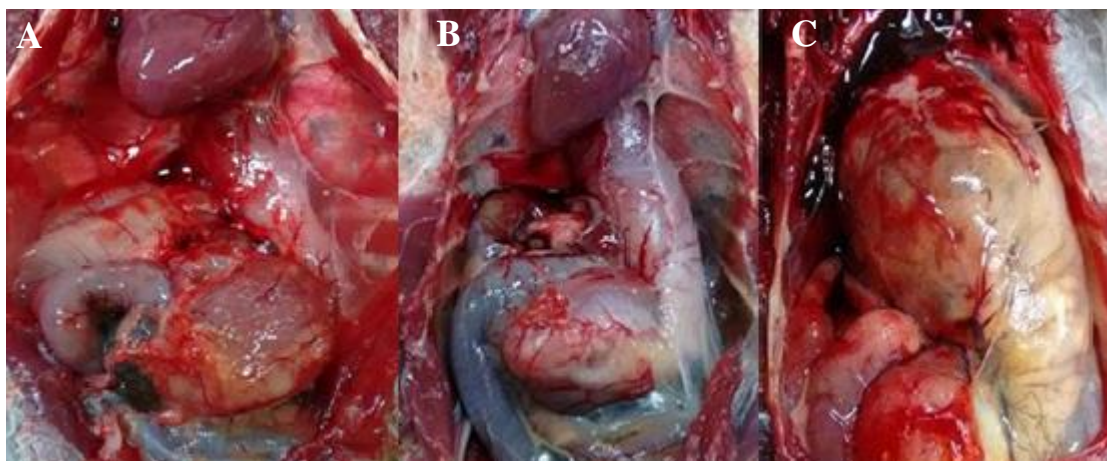


Figura 4- A. Normal (sem Dilatação do proventrículo) *Amazona vinacea* amostra 20. B. Dilatação do proventrículo discreta/moderada *Amazona rhodocorytha* amostra 24. C. Dilatação do proventrículo severa/intensa *Primolius maracana* amostra 4.

2.3 - Histopatologia

Para a análise histológica, os fragmentos de tecidos foram fixados em formalina neutra e tamponada a 10%, processadas pela técnica de rotina de inclusão em parafina. Depois de fixadas, as amostras foram desidratadas em banhos sucessivos de álcool 70%, 80%, 90% e 2 banhos em álcool 100%, diafinizadas em 2 banhos de xilol e impregnados por banho em parafina líquida a 65°C por 1 hora. As amostras foram incluídas em parafina e os cortes histológicos, com cerca de 5 micrômetros, submetidos a coloração pela técnica da hematoxilina e eosina e avaliados em microscópio óptico (Leica DMLS, Alemanha), (Luna, 1968).

Os tecidos foram processados no Laboratório de Patologia, da Escola de Veterinária da UFMG e a análise final foi realizada com a colaboração da professora Roselene Ecco.

2.4 - Extração de RNA

O tecido de escolha para diagnóstico de ABV foi o cérebro devido ao caráter neurotrópico do vírus, menor risco de contaminação, permitir uma coleta mais asséptica e com melhores resultados descritos na literatura (Gancz et al., 2009; Weissenböck et al., 2009a). A extração de RNA foi feita utilizando protocolo com tiocianato de guanidina e fenol clorofórmio (Trizol®), com modificações.

Alíquotas de 300 µL das amostras ainda congeladas foram maceradas com o auxílio de um pistilo e acrescentado 600 µL de Trizol® gelado. Em seguida foram homogeneizadas em vortex e centrifugadas a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C. Após incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, foram acrescentados 300 µL de clorofórmio gelado, homogeneizados em vortex por 15 segundos e centrifugados a 12.000 xg durante 15 minutos a 4°C.

A camada aquosa formada após centrifugação foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Em seguida foram acrescentados 500 µL de isopropanol gelado e a amostra foi incubada a -20°C *overnight*. Após uma nova centrifugação a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi então lavado com 1 ml de

etanol 75% gelado e centrifugado a 7.500 xg durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco durante 20 minutos à temperatura ambiente. Como etapa final da extração, foram acrescentados 50 µL de água ultra pura tratada com DEPEC e armazenadas a 4°C até a determinação da concentração e pureza do RNA extraído de cada amostra através do aparelho NanoVue® (GE, Healthcare) por densidade óptica. Como determinação do protocolo de Transcrição Reversa foram utilizados o equivalente a 2.000ng por µL de cada amostra.

2.5- RT-PCR para ABV

Todas as aves necropsiadas foram testadas por RT-PCR para ABV. Para transcrição reversa do RNA das amostras extraídas foi utilizada a enzima MMLV (Promega) seguindo-se recomendações do fabricante e utilizando-se os oligonucleotídeos específicos do ABV.

Foram utilizados oligonucleotídeos que amplificam parte das regiões que codificam a proteína matriz (M) (ABVMF e ABVMR) e nucleoproteína (N) (ABVNF1 e ABVNR1/ABVNF2 e ABVNR2) (Tabela 6) (Kistler et al., 2008; Weissenböck et al., 2009a).

Tabela 6 – Primers utilizados na reação de RT-PCR para ABV.

Oligonucleotídeos	Sequencia (5' – 3')	Tamanho pb
ABVMF*	GGRCAAGGTAATYGYCCTGGATGGCC	360pb
ABVMR*	CCAACACCAATGTTCCGAAGMGC	360pb
ABVNF1**	CATGAGGCTATWGATTGGATTA	389pb
ABVNR1**	TAGCCNGCCMKTGTWGGRTTYT	389pb
ABVNF2(nested)	TGAAAGCCCTGGCAAAGAGT	231pb
ABVNR2(nested)	ATCGCGTCCGAATGACGAAT	231pb

*Kistler et al., 2008. **Weissenböck et al., 2009

Os primers para as reações *nested* ABVNF2 e ABVNR2 (Tabela 5) foram desenhados utilizando-se o programa Primer-Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome), a partir da sequência de nucleotídeos da posição 632 a 1020 da amostra “bil” (GenBank EU781967), primeiro isolado de ABV, conforme Weissenböck et al. (2009).

Para a transcrição reversa, foram utilizados 2.000 ng/µL de RNA adicionados a 5 µM de cada oligonucleotídeo específico (ABVMF e ABVMR ou ABVNF1 e ABVNR1) e água ultra pura tratada com DEPEC para reação final de 15 µL. Em seguida foram aquecidos a 70°C por 5 minutos seguido de choque térmico imediato em gelo durante 1 minuto.

Foram acrescentados 5 µL de tampão 5X Promega, (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1,25 µL de DNTP 10mM, 1,25 µL de RNAsin Promega, 1 µL de M-MLV e 1,5 µL de água ultra pura DEPEC e incubadas a 42°C por 60 minutos, sendo armazenadas a -20°C.

Na reação de PCR que amplifica parte da proteína M, 10 µM dos oligonucleotídeos ABVMF e ABVMR foram utilizados, juntamente com 2,5 µL de Tampão 10 X (Phoneutria), 0,75 µL de MgCl₂ 50mM, 1 µL de DNTP mix 10mM Phoneutria, 1 µL de cada oligonucleotídeo (10pmol), 0,3 µL de taq phoneutria, 16,5 µL de água ultra pura DEPEC e 2 µL de cDNA.

As temperaturas da ciclagem foram 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma temperatura de extensão final de 72°C por 7 minutos.

Na reação de *nested* PCR que amplifica parte da proteína N, foram utilizados os oligonucleotídeos ABVNF1 e ABVNR1 na 1ª reação e os oligonucleotídeos ABVNF2 e ABVNR2 na 2ª reação. A concentração dos reagentes utilizados foi idêntica ao PCR que amplifica parte da proteína M, exceto a concentração de MgCl₂, que aumentou para 3 mM na 1ª reação. Na 2ª reação foram utilizados 2 µL de amplicon.

As temperaturas da ciclagem foram 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, seguidos de 72°C por 7 minutos.

Como controle positivo foi utilizado tecido da ave amostra 5 e como controle negativo apenas o pré-mix com todos os reagentes da reação de RT-PCR.

2.6 - Diagnóstico diferencial

2.6.1- RT-PCR para os gêneros *Alphavirus* e *Paramyxovirus*

Foram utilizados 5 µL de RNA extraído de cada amostra para a síntese do cDNA utilizando-se o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem)* com oligonucleotídeos randômicos de acordo com protocolo descrito pelo fabricante. Em seguida, foram feitas duas reações de PCR *nested* utilizando oligonucleotídeos degenerados gênero-específicos para detecção de vírus dos gêneros *Alphavirus* (Sanchez-Secco et al., 2001) e *Paramyxovirus* (Tong et al., 2008).

As reações de PCR e suas ciclagens seguiram os protocolos previamente estabelecido nos artigos de referência, sendo utilizados para a padronização das técnicas de *nested* PCR gênero-específicas para Alphavírus, a vacina Tri-Equi® (Hertape) que contém os vírus Encefalite Equina do Leste e Oeste e a amostra vacinal (New-Vacin La Sota, Biovet) para padronização da *nested* RT-PCR gênero específica para Paramyxovirus. Os oligonucleotídeos utilizados, suas seqüências e tamanhos amplificados estão descritos na tabela 7.

Tabela 7– Oligonucleotídeos utilizados nas reações de semi *nested* RT-PCR para detecção dos vírus dos gêneros Paramyxovirus (PARF1, PARF2, PAR) e *nested* RT-PCR para os Alphavirus (ALPHA1F, ALPHA1R, ALPHA2F, ALPHA2R)

Oligonucleotídeos	Seqüência (5' – 3')	Tamanho pb
PARF1*	GAAGGITATTGTCAIAARNTNTGGAC	200-500pb
PARF2*	GTTGCTTCAATGGTTCARGGNGAYAA	
PAR*	GCTGAAGTTACIGGITCICCDATRTTNC	
ALPHA1F**	GAYGCITAYYTIGAYATGGTIGAIGG	481pb
ALPHA1R**	KYTCYTCIGTRTGYTTIGTICIGG	195pb
ALPHA2F**	GIAAYTGYYAAYGTIACICARATG	
ALPHA2R**	GCRAAIARIGCIGCIGCYTYIGGICC	

*Tong et al., 2008 ** Sanchez-Secco et al., 2001

Para as reações de *semi nested* PCR (*Paramyxovirus*) e *nested* PCR (*Alphavirus*) foram utilizados 2,5 µL de Tampão 10 X (Phoneutria), 1,5 µL de MgCl₂ 50mM, 1 µL de DNTP mix 10mM Phoneutria, 10 µM de cada oligonucleotídeo, 0,3 µL de taq Phoneutria, 14,7 µL de água ultra pura DEPEC. Nas 1^{as} reações das PCRs foram utilizados 3 µL de cDNA e nas 2^{as} reações, 2 µL dos amplicons.

As temperaturas das ciclagens de todas as reações foram 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 48°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, além de uma temperatura de extensão de 72°C por 7 minutos.

2.7- Análise dos produtos da PCR

Os resultados das reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% com brometo de etídio. No gel foram aplicados 15 µL do amplicon adicionado a 2 µL de tampão de amostra 10X (Phoneutria) e a eletroforese ocorreu a 120V por 40 minutos, em tampão TBE 1X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico), utilizando-se o padrão molecular de 100 pb DNA (*ladder*), KASVI. Após a corrida, o resultado foi visualizado em luz UV.

2.8- Sequenciamento e análise filogenética

Os amplicons positivos para ABV foram encaminhados ao Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG e Myleus Biotecnologia para sequenciamento de acordo com protocolo estabelecido pelas respectivas empresas. O sequenciamento foi feito por eletroforese capilar utilizando-se BigDye® v.3.1. através do método da terminação em cadeia por dideoxynucleotídeos (Sanger et al., 1997) em ambas as direções da dupla fita.

Para análise filogenética foram utilizadas sequências dos genes que codificam a proteína Matrix (M). A qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento de ambas as fitas 5'-3' e 3'-5' foi avaliada com o programa Electropherogram quality analysis (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). As sequências geradas (total de onze sequências) foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com o auxílio do BLAST. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos foram alinhadas com as sequências depositadas no GenBank usando o programa Clustal W, integrado ao programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA versão 7.0.

A análise filogenética dos nucleotídeos foi feita pelo método de *neighbor-joining* (MEGA 7.0). Neste programa, os dados foram submetidos ao teste de confiança em topologia (*Bootstrap*) com 1.000 repetições, para testar a validade e confiabilidade dos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas e com o método de substituição de nucleotídeos Kimura 2 (Kimura, 1980).

3- RESULTADOS

Do total de aves avaliadas, 11 (23,9%) apresentaram sinais neurológicos, 8 (17,4%) com sinais relacionados à disfunção do trato gastrointestinal, 2 (4,3%) aves com sinais neurológicos e gastrointestinais, 4 (8,7%) aves sem sinais clínicos compatíveis com PDD e 21 (45,7%) aves sem histórico clínico (sem observação). Dentro das aves com sinais clínicos 4 (19%)

apresentaram, além do quadro compatível com PDD, alterações como dificuldade respiratória e hemorragia.

A tabela 8 apresenta o histórico clínico das aves avaliadas no presente estudo quanto aos sinais clínicos como sendo neurológicos, relacionados a disfunção do trato gastrointestinal (TGI), ambos, ausência e não observados (sem histórico clínico).

Tabela 8 - Frequência dos sinais clínicos compatíveis com PDD observados nas aves avaliadas.

SINAIS CLINICOS	% (aves avaliadas)
Neurológicos	11 (23,9%)
TGI	8 (17,4%)
Neurológicos e TGI	2 (4,3%)
Ausência	4 (8,7%)
Não observados (sem histórico)	21 (45,7%)
TOTAL	46 (100%)

(TGI – Trato Gastrointestinal)

Muitas aves, principalmente do criatório B, foram encaminhadas sem histórico clínico devido ao menor número de tratadores no local, não sendo possível a observação de todas as aves.

No resultado final da avaliação necroscópica, 25/46 (54,3%) aves apresentaram quadro compatível com PDD seguindo como critério principal presença de dilatação do proventrículo com alimento não digerido e parede fina, escore corporal reduzido com atrofia da musculatura peitoral sugestivo de caquexia, conforme descrito previamente (Gregory et al., 1994).

Grande parte das aves não tiveram tecidos avaliados em exame histopatológico devido ao estado avançado de autólise impossibilitando a análise do material. Das 19 aves que tiveram tecidos avaliados microscopicamente, 9 apresentaram lesões características de PDD no plexo miotérico e/ou sistema nervoso central ou periférico. Foram encontradas também lesões típicas da doença em outros órgãos como fígado e coração, assim como outras lesões como hemossiderose no fígado, entre outras.

Um conjunto de fatores foi avaliado para determinação da ave como positiva ou não para PDD: sinais clínicos, achados macroscópicos e/ou microscópicos (histopatológicos) compatíveis com a doença. Conforme descrito previamente na literatura o método diagnóstico considerado padrão ouro para PDD é o exame histopatológico, estabelecendo o diagnóstico definitivo da doença (Gregory et al., 1994; Gregory et al., 1996; Berhane et al., 2001). Sendo assim, o critério para diagnóstico confirmatório da doença neste estudo foi a presença de lesão característica de PDD na avaliação microscópica. Entretanto, como a maioria das aves devido ao estado de autólise do material, não foram avaliadas histopatologicamente, as amostras com sinais clínicos e/ou lesão característica de PDD na necropsia, porém sem confirmação histopatológica, foram consideradas como um quadro “sugestivo de PDD” (Tabela 9).

Tabela 9 – Diagnóstico final para a doença da dilatação do proventrículo (PDD) considerando os resultados do exame histopatológico das aves avaliadas.

PDD		Número de aves/%
Positivas (aves doentes)		9 (19,6%)
Negativas (sem PDD)		10 (21,7%)
Não avaliadas	Quadro sugestivo	13 (28,3%)
	Negativas	14 (30,4%)
TOTAL		46 (100%)

Não avaliadas: aves sem exame histopatológico

3.1 - Resultados anatomopatológicos

A maioria das aves avaliadas que apresentaram lesões características do quadro de PDD, também tiveram alterações cardíacas, hepáticas, renais e/ou do trato respiratório, entre outras. A presença da dilatação do órgão proventrículo não confirma a doença sendo usada apenas como critério separado das demais alterações para facilitar a apresentação dos resultados no exame necroscópico, além de ser uma alteração principal típica de PDD na necropsia (Gregory et al., 1994).

A tabela 10 (Anexo I) apresenta os resultados da avaliação do exame de necropsia das aves avaliadas com medida do escore corporal, dilatação do proventrículo e demais descrições.

Alguns casos com dilatação do proventrículo na necropsia estão representados nas figuras 1 a 8.

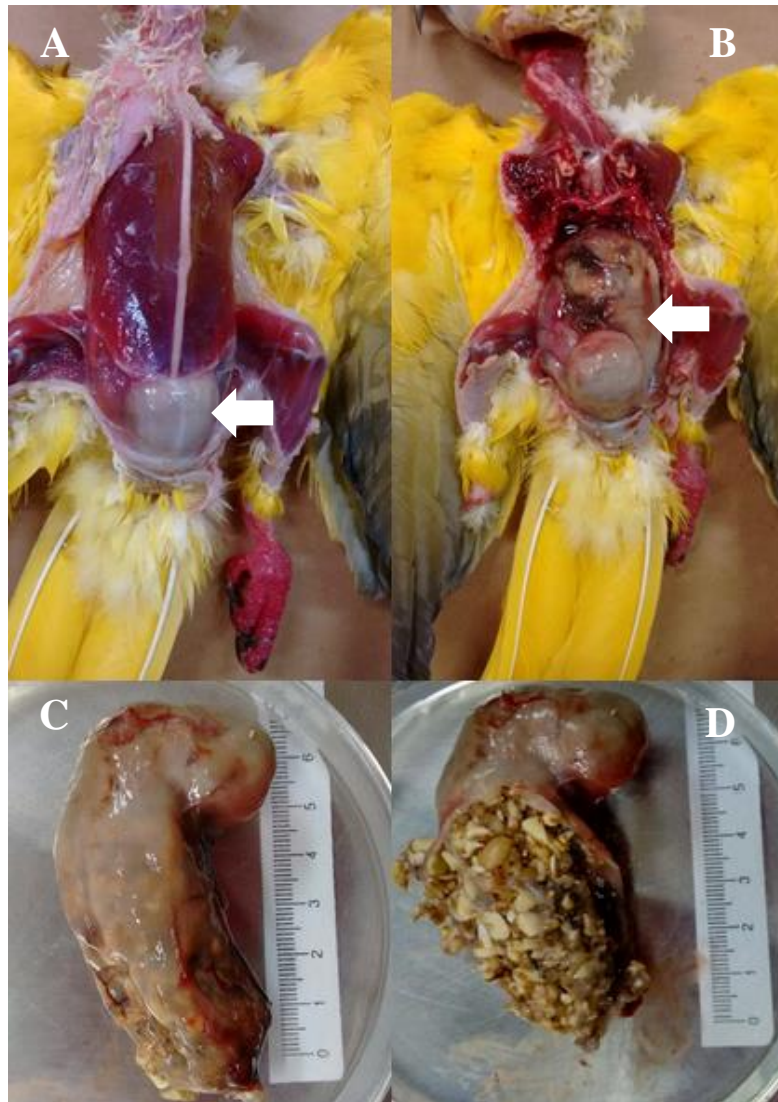


Figura 5. Ararajuba (*Guaruba guarouba*) (amostra 11). A. Escore corporal reduzido (caquexia) e visualização do ventrículo (seta) antes da abertura da cavidade celômica. B. Dilatação do proventrículo intensa (++) ocupando grande parte da cavidade celômica (seta). C. Proventrículo dilatado, removido e individualizado em placa de petri apresentando parede fina. D. Proventrículo dilatado com grande quantidade de alimento não digerido (sementes).



Figura 6 – Maracanã verdadeiro (*Primolius maracana*) (amostra 4). A. Escore corporal reduzido (caquexia). B. Cavidade celomática após retirada do fígado e coração, com dilatação do proventrículo intensa (++) (seta), com o órgão apresentando parede fina (transparência), grande quantidade de alimento e ocupando grande parte da cavidade celomática.

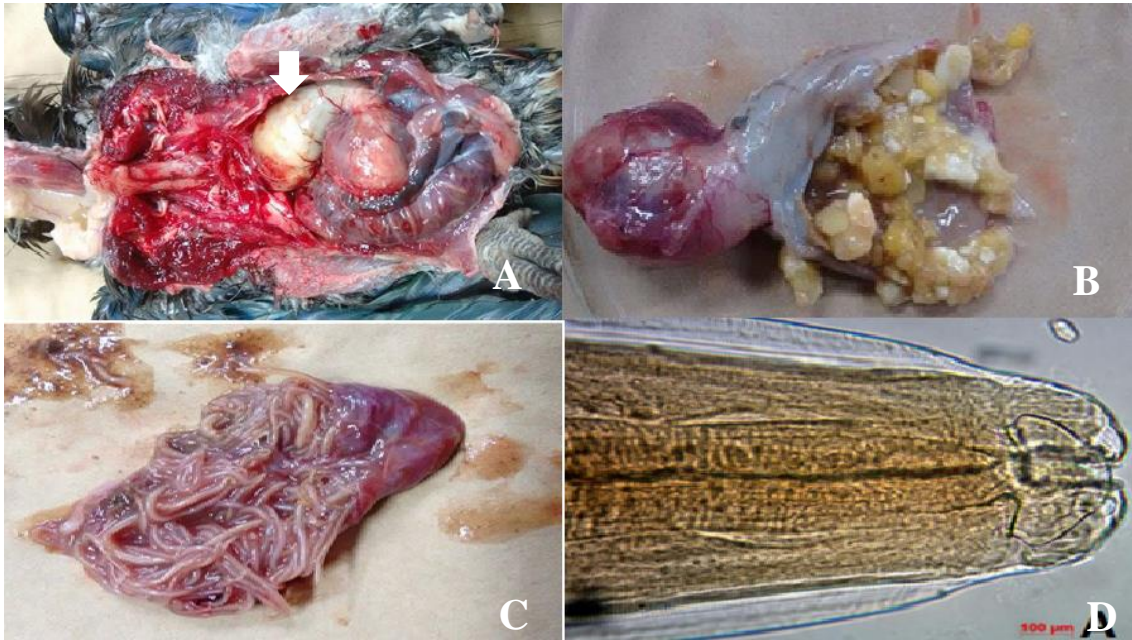


Figura 7 - Maitaca roxa (*Pionus fuscus*) (amostra 7). A. Dilatação do proventrículo (seta branca) e parasitismo intestinal intenso (seta preta). B. Proventrículo com alimento não digerido (sementes). C. Segmento intestinal aberto, demonstrando presença de grande contagem (mais de 100 indivíduos) de nematódeo *Ascaridia hermaphrodita*. D. Extremidade anterior (boca e esôfago) de *A. hermaphrodita* (microscópio óptico).

3.2 – Histopatologia:

O critério usado para diagnóstico confirmatório de PDD no exame histopatológico foi a presença de infiltração linfoplasmocitária nos órgãos do TGI.

Nos órgãos do TGI, ventrículo e proventrículo foram visualizados presença de infiltrado linfoplasmocitário, linfo-histoplasmocitário discreto, moderado e/ou intenso, também com áreas multifocais de degeneração de axônios e neurônios. A lesão no ventrículo além dos nervos e gânglios da serosa, subserosa e muscular, se estendeu para a túnica muscular havendo casos de espessamento e substituição desse tecido por infiltrado linfo-histoplasmocitário intenso (amostra 27).

Além do TGI, lesões nos nervos com presença de infiltrado linfoplasmocitário e vacuolização axonal com tumefação (amostra 32), infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos no fígado (amostras 13 e 15), infiltrado e lesão granulomatosa no rim (amostra 12) e infiltrado linfoplasmocitário e/ou heterofílico nos sacos aéreos (amostras 21 e 4).

Outras lesões foram vistas em órgãos como o fígado, principalmente, que apresentou degeneração gordurosa multifocal moderada (amostra 4), hemocromatose multifocal moderada e difusa acentuada (amostras 2 e 46) e/ou dilatação dos canais sinusóides com presença de hemácias (congestão) (amostras 4 e 21).

Somente uma ave apresentou infiltrado em todo TGI: papo, proventrículo, ventrículo e intestinos (amostra 4).

Na avaliação histopatológica da Arara azul, amostra 2, foi encontrado também inúmeros cistos de *Sarcocystis sp.* entre as fibras do músculo esquelético, que foi coletado em especial no caso dessa ave.

Na amostra 43, um Papagaio do Congo, foram encontradas colônias bacterianas basofílicas nos pulmões, baço, coração, fígado, papo, proventrículo e ventrículo, achados histológicos compatíveis com quadro de sepse.

Os resultados obtidos da avaliação histopatológica estão descritos na tabela 11.

Tabela 10 – Presença ou ausência de infiltrado linfoplasmocitário nas amostras avaliadas.

AMOSTRAS																			
TECIDOS	2	4	6	7	10	12	13	14	15	16	18	21	23	24	27	31	32	33	43
Traqueia	NA	-	-	-	NA	-	-	-	-	NA	NA	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-
Pulmões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacos aéreos		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Coração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Fígado	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rins	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baço	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	NA	NA	-	-	-	NA	-	-	-
Papo	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Provent.	+	+	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ventrículo	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Intestinos	-	+	+	-	-	NA	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	NA	-	-	-
Gônadas sex.	NA	NA	NA	-	NA	NA	NA	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	NA	NA	NA	NA	NA
Cérebro	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cerebelo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nervos periféricos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

(NA: Não avaliado; +/-: presença e ausência de infiltrado linfoplasmocitário)

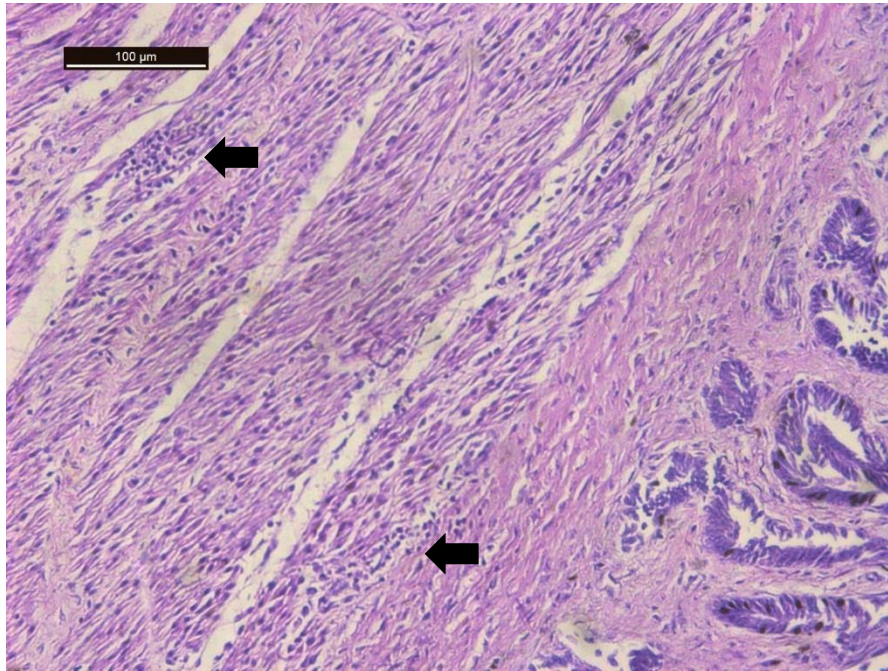


Figura 8 – Presença de infiltrado linfoplasmocitário (seta) na camada muscular do ventrículo amostra 10, *Amazona vinacea* (Coloração HE – Hematoxilina e eosina)

3.3– RT-PCR para ABV:

Para padronização da reação de RT-PCR para Bornavírus aviário utilizando-se os oligonucleotídeos que amplificam parte do gene M (ABVM), que foi utilizado como principal do estudo, optou-se como controle positivo, a amostra 5 que apresentou sinais clínicos e de necropsia (macroscópicos) compatíveis com o quadro de PDD.

Para primeira reação foi utilizado $MgCl_2$ na concentração de 1,5 mM e temperatura de anelamento inicial de 55°C, porém o resultado no gel de agarose apareceram inúmeras bandas inespecíficas. Em nova tentativa, ampliou-se essa temperatura para 57°C obtendo-se então banda do tamanho esperado (360 pb) (Figura 10)

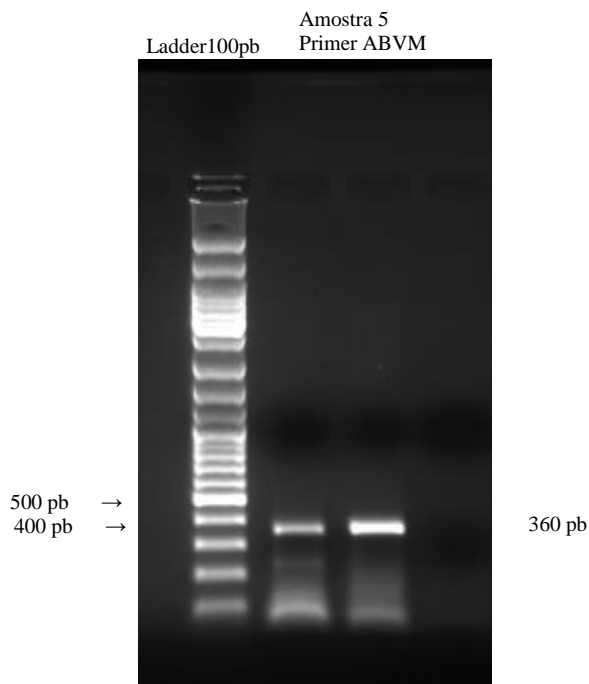


Figura 9 – Resultado de RT-PCR para ABV usando oligonucleotídeos para ABVM (360pb). Amostra 5 (SNC) em duplicata (poço 1 e 2) em gel de agarose 1%.

Para padronização da reação de PCR para Bornavírus aviário que amplificam parte da região que codifica a proteína N (ABVN), foram testadas 4 temperaturas de anelamento diferentes (48°C, 50°C, 52°C e 55°C), utilizando as mesmas concentrações de reagentes usados na reação de PCR para a ABVM, exceto a concentração de $MgCl_2$, com 3 mM. A temperatura de anelamento ideal foi de 50°C. O controle negativo utilizado foi o pré mix de reagentes da reação de RT-PCR, sem RNA ou cDNA

De todas as aves analisadas, 26/29 (89,7%) foram positivas para ABVM. Para aumentar a sensibilidade do teste, todas as amostras negativas para a proteína M foram avaliadas para a proteína N viral. Dessas, somente 3/29 (10,3%) amostras foram positivas utilizando-se os oligonucleotídeos ABVN (reação *nested* RT-PCR). No controle negativo (pré mix de reagentes da reação de RT-PCR) não houve a visibilização de amplicon.

3.4- Diagnóstico diferencial

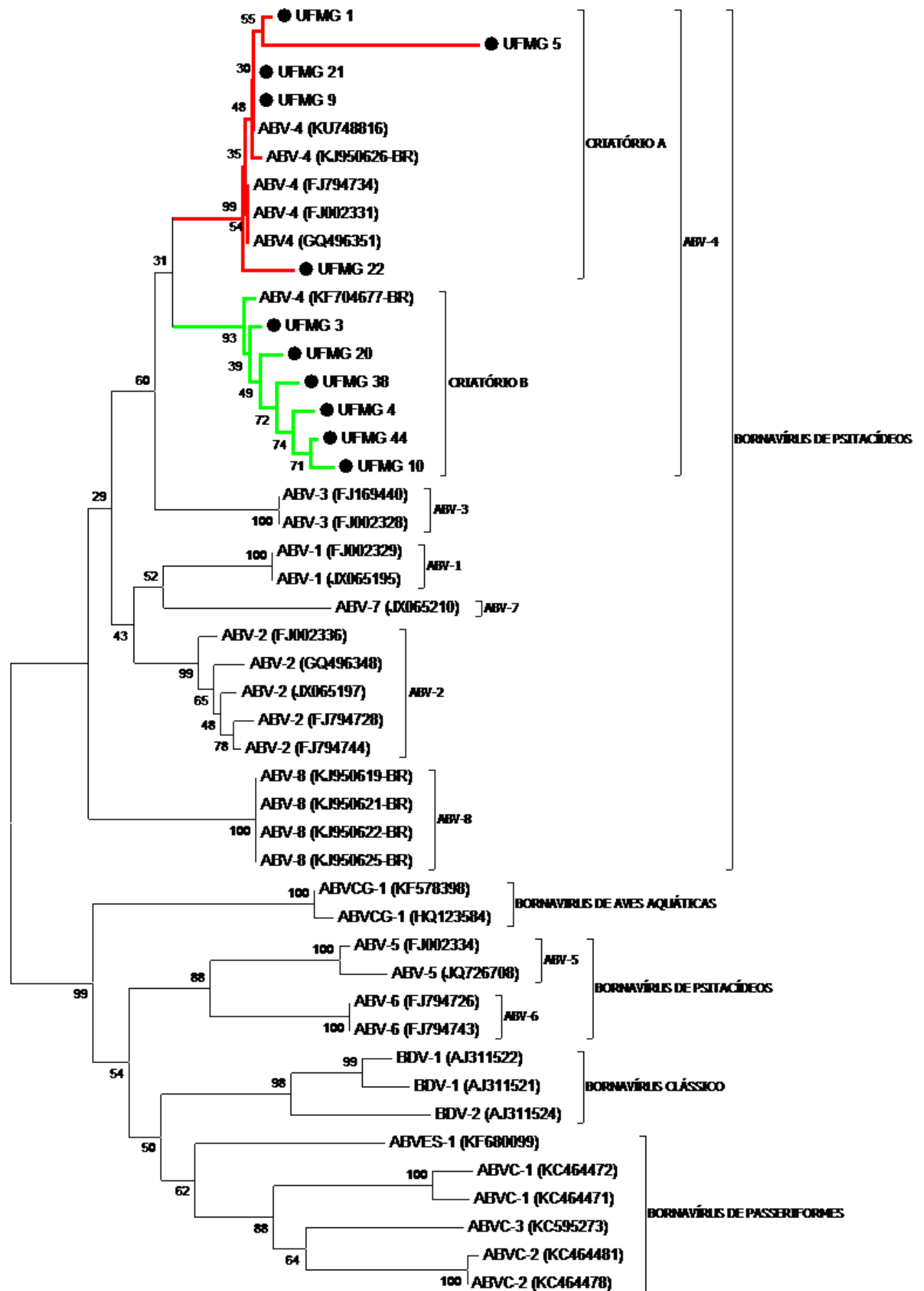
Todas as 46 amostras também foram analisadas por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos degenerados gênero específicos para *Alphavirus* e *Paramyxovirus*. As amostras 11 e 19 foram positivas para o gênero *Alphavirus* e apenas a amostra 17 foi positiva para *Paramyxovirus*. Observou-se uma co-infecção entre ABV e *Alphavirus* na amostra 11, porém a amostra 19 foi negativa para ABV. Em ambos os casos, não constava o histórico clínico. A ave 11 apresentava lesão característica de PDD na necropsia, entretanto, não teve avaliação histopatológica devido ao estado avançado de autólise. A amostra 17 foi negativa para ABV, entretanto apresentou sinais clínicos gastrointestinais e alterações macroscópicas compatíveis com PDD.

3.5- Análise das sequências

Onze amostras positivas para ABV na RT-PCR, representativas dos criatórios A e B, foram selecionadas e enviadas para sequenciamento. Quando comparadas com sequências previamente depositadas no Genbank, o genótipo encontrado foi o ABV4, em todas as amostras.

As sequências do criatório A (amostras 1, 5, 9, 21 e 22) apresentaram um maior grau de identidade de 98%, 92%, 99%, 99% e 97% respectivamente, com o isolado TiHO-47-48 (GenBank KU748816) obtido a partir de um *Pionus menstruus* com histórico de importação do Brasil em 2012 (Rubbenstroth et al., 2016) e 97%, 91%, 99%, 99% e 97% respectivamente, com o isolado Bird 16 (GenBank GQ496351) de um *Psittacus erithacus*, oriundo do Canadá que desenvolveu sinais neurológicos compatíveis com PDD (Raghav et al., 2010).

Enquanto que as amostras sequenciadas do criatório B (amostras 3, 4, 10, 20, 38 e 44) apresentaram maior grau de identidade de 98%, 94%, 93%, 98%, 95% e 93% respectivamente, com o isolado BH1 (Genbank KF704677) identificada em estudo prévio de uma ave proveniente desse mesmo criatório, coletada em 2011 (Donatti et al., 2014). Foi feito uma árvore filogenética com as amostras sequenciadas como descrito na figura 11.



0.05

Figura 10 - Árvore filogenética gerada a partir de sequências nucleotídicas de parte do gene que codifica a proteína M (360bp) de ABV. As estirpes estão identificadas com o nome, espécie de psitacídeo encontrada. As amostras do criatório A são: UFMG 1, *Ara choropectera*, UFMG 5, *Psittacus erithacus*; UFMG 9, *Pionus reichnowi*; UFMG 21, *Pionites leucogaster*; e UFMG 22, *Amazona ochrocephala* e do criatório B são: UFMG 3, *Amazona brasiliensis* UFMG 4, *Primolius maracana*; UFMG 10, *Amazona rhodocorytha*; UFMG 20, *Amazona vinacea*; UFMG 38, *Eupsittula aurea* e UFMG 44, *Amazona brasiliensis*. As sequências foram analisadas utilizando-se o método de *neighbor-joining* (Saitou and Nei, 1987) e o modelo de distâncias evolutivas Kimura 2 (Kimura, 1980). Valores de *bootstrap* 1000 (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos (Felsenstein, 1985). Análises evolutivas foram realizadas em MEGA7 (Kumar et al., 2016), envolvendo 46 sequências de nucleotídeos sendo que as sequências da família *Bornaviridae* usadas como referência estão representadas na tabela 12. ABV 1 a 8 – Bornavírus aviário de Psitaciformes; ABVES-1; ABVC- 1 a 3- Bornavírus de Passeriformes; ABV-CG 1 – Bornavírus aviário de aves aquáticas; BDV-1 a 2- Bornavírus de mamífero (Bornavírus clássico).

Como referência um maior número de sequências de ABV2 e ABV4 foram utilizadas pois possuem maior descrição de casos mundialmente, portanto maior número de sequências depositadas no Genbank (Rubbestroth et al., 2016). O critério para escolha das sequências de Bornavírus aviário de psitacídeos utilizados no presente estudo foi baseado nas espécies de aves exóticas e nativas amostradas (*Psittacus erithacus*, *Amazona aestiva*, *Nymphicus hollandicus*, *Pionus fuscus*, *Pionus menstruus*, *Ara ararauna*), sequências similares às encontradas no estudo e por fim, sequências de ABV identificadas no Brasil (Donatti et al., 2014; Philadelpho et al., 2014).

Embora o genótipo encontrado em todas as amostras foi o mesmo (ABV4), as sequências das amostras encontradas dentro de um mesmo criatório foram geneticamente relacionadas entre si, portanto, foram geneticamente distantes entre os criatórios. Diferenças vistas nos casos clínicos entre os criatórios, com manifestação neurológica mais severa em grande parte das aves no criatório A, sugerem que a patogenicidade da doença e consequente infecção por ABV de cada local esteja relacionada com as estirpes circulantes em cada local.

Quando comparadas com sequências brasileiras previamente depositadas no GenBank, o criatório A apresentou maior grau de identidade (amostra 1- 98%, amostra 5- 91%, amostra 9- 99%, amostra 21- 99% e amostra 22- 96%) com as sequências descritas em estudo prévio no Estado de São Paulo (GenBank KJ950626) onde a maioria dos casos apresentaram como sinais clínicos alterações neurológicas compatíveis com PDD (Philadelpho et al., 2014). As sequências do criatório B apresentaram maior grau de identidade como citado anteriormente, com um isolado identificado em estudo prévio de uma ave proveniente desse mesmo criatório, coletada em 2011 (Genbank KF704677) (Donatti et al., 2014).

O resultado geral da avaliação de histórico clínico, necropsia, histopatologia e biologia molecular (RT-PCR) realizadas nesse estudo, estão representados na tabela 13. Os critérios sinais clínicos, necropsia e histopatologia foram avaliados conforme alterações compatíveis com PDD.

As informações das sequências da família *Bornaviridae* usadas como referência estão representadas na tabela 12.

Tabela 11 - Sequências referências de ABV (Bornavírus aviário de psitacídeos) analisadas para construção da árvore filogenética:

Tipo de ABV	Genbank	Origem	Referência
Bornavírus de psitacídeos			
ABV1	FJ002329	Israel	Kistler et al., 2008
ABV1	JX065195	Alemanha	Rubbestroth et al., 2012
ABV2	FJ794728	Áustria	Weissenböck et al., 2009 a
ABV2	FJ794744	Suíça	Weissenböck et al., 2009 a
ABV2	GQ496348	Canadá	Raghav et al., 2010
ABV2	JX065197	Alemanha	Rubbestroth et al., 2012
ABV2	FJ002336	Estados Unidos	Kistler et al., 2008
ABV3	FJ169440	Estados Unidos	Honkavuori et al., 2008
ABV3	FJ002328	Estados Unidos	Honkavuori et al., 2008
ABV4	KJ950626	Brasil	Philadelpho et al., 2014
ABV4	KF704677	Brasil	Donatti et al., 2014
ABV4	KU748816	Alemanha	Rubbestroth et al., 2016
ABV4	FJ794734	Áustria	Weissenböck et al., 2009 a
ABV4	FJ002331	Israel	Kistler et al., 2008
ABV4	GQ496351	Canadá	Raghav et al., 2010
ABV5	FJ002334	Estados Unidos	Kistler et al., 2008
ABV5	JQ726708	China	Kunh et al., 2015
ABV6	FJ794726	Áustria	Weissenböck et al., 2009 a
ABV6	FJ794743	Suíça	Weissenböck et al., 2009 a
ABV7	JX065210	Alemanha	Rubbestroth et al., 2012
ABV8	KJ950621	Brasil	Philadelpho et al., 2014
ABV8	KJ950622	Brasil	Philadelpho et al., 2014
ABV8	KJ950625	Brasil	Philadelpho et al., 2014
Bornavírus de passeriformes			
ABVC-1	KC464472	Alemanha	Rubbestroth et al., 2013
ABVC-1	KC464471	Alemanha	Rubbestroth et al., 2013
ABVC-2	KC464481	Alemanha	Rubbestroth et al., 2013
ABVC-2	KC464478	Alemanha	Rubbestroth et al., 2013
ABVC-3	KC595273	Alemanha	Rubbestroth et al., 2013
ABVES-1	KF680099	Alemanha	Rubbestroth et al., 2014
Bornavírus de aves aquáticas			
ABVCG-1	KF578398	Estados Unidos	Guo et al., 2013
ABVCG-1	HQ123584	Estados Unidos	Payne et al., 2011
Bornavírus de mamífero (Bornavírus clássico)			
BDV-1	AJ311522	Alemanha	Pleschka et al., 2001
BDV-1	AJ311521	Alemanha	Pleschka et al., 2001
BDV-2	AJ311524	Áustria	Pleschka et al., 2001

Tabela 12 - Resultado geral das análises de histórico clínico, necropsia, histopatologia e biologia molecular (RT-PCR) realizadas nesse estudo

AMOSTRA	SINAIS CLINICOS	NECROPSIA	HIST.	PDD	RT-PCR ABV	RT-PCR Alpha	RT-PCR Param
1	+	+	NA	SG	+*	-	-
2	+	+	+	+	+	-	-
3	+	+	NA	SG	+*	-	-
4	NO	+	+	+	+	-	-
5	+	+	NA	SG	+*	-	-
6	+	-	+	+	+	-	-
7	NO	+	-	-	+*	-	-
8	+	+	NA	SG	-	-	-
9	+	+	NA	SG	+*	-	-
10	-	-	+	+	+	-	-
11	NO	+	NA	SG	+*	+	-
12	NO	+	+	+	+	-	-
13	NO	+	+	+	+	-	-
14	+	+	-	-	+*	-	-
15	-	-	-	-	+*	-	-
16	NO	+	-	-	+*	-	-
17	+	+	NA	SG	-	-	+
18	+	-	-	-	+*	-	-
19	-	-	NA	-	-	+	-
20	+	-	NA	-	+*	-	-
21	+	+	+	+	+	-	-
22	+	+	NA	SG	+*	-	-
23	NO	-	-	-	+*	-	-
24	NO	-	-	-	-	-	-
25	NO	-	NA	-	-	-	-
26	NO	-	NA	-	-	-	-
27	NO	+	+	+	+	-	-
28	NO	-	NA	-	-	-	-
29	NO	-	NA	-	+*	-	-
30	NO	-	NA	-	-	-	-
31	+	-	-	-	-	-	-
32	+	+	-	-	+*	-	-
33	NO	+	+	+	+	-	-
34	NO	-	NA	-	+*	-	-
35	-	+	NA	SG	-	-	-
36	NO	-	NA	-	+*	-	-
37	+	+	NA	SG	+*	-	-
38	NO	+	NA	SG	+*	-	-
39	+	-	NA	-	-	-	-
40	+	-	NA	-	-	-	-
41	+	+	NA	-	-	-	-
42	NO	-	NA	-	-	-	-
43	+	+	-	-	-	-	-
44	+	+	NA	SG	+*	-	-
45	NO	+	NA	SG	-	-	-
46	NO	-	NA	-	-	-	-

(Presença/resultado positivo: +; Ausência/resultado negativo: -; NO – Não observado; NA – Não avaliado; SG: aves com quadro “sugestivo de PDD”; +*: Aves possíveis portadoras de ABV; HIST.: Histopatologia; Alpha: Gênero *Alphavirus*; Param.: *Paramyxovirus*)

O criatório A encaminhou para diagnóstico um total de 12 aves e dentre elas, 9 (75%) foram positivas para ABV na RT-PCR e 3 (25%) foram negativas. Dentre as aves com detecção do RNA viral, 3/9 (33,3%) tiveram diagnóstico de PDD comprovados na histopatologia sendo consideradas aves doentes. Duas das aves avaliadas desse plantel 2/12 (16,6%) não apresentaram lesões características PDD entretanto foram positivas na detecção de ABV sugerindo assim a presença de aves “saúáveis” apenas portadoras para o vírus nesse local.

Embora o criatório B tenha encaminhado um maior número de aves (total de 29) para diagnóstico, ABV foi detectado em 20/29 (69%) ou seja, um percentual mais baixo em comparação com o criatório A. Das aves avaliadas apenas 6/29 (20,6%) tiveram Diagnóstico PDD positivo confirmado na histopatologia e assim consideradas aves doentes.

A ave (Arara canindé- amostra 17) enviada para diagnóstico como rotina do laboratório proveniente do LAPAS/Uberlândia foi negativa para ABV. Ela apresentava o quadro clínico e macroscópico compatível com a doença, porém o estado avançado de autólise do material inviabilizou a avaliação histopatológica do mesmo.

As aves de companhia exóticas de proprietários, duas calopsitas *Nymphicus hollandicus* (amostras 8 e 41), apresentaram quadro clínico e lesões macroscópicas típicas de PDD, entretanto ambas foram negativas na RT-PCR para ABVM e ABVN. Essas aves tiveram alterações semelhantes, descritas na mesma espécie em estudo de infecção experimental com ABV4 (Gancz et al., 2009).

Em uma ave *Amazona aestiva* (amostra 39), os achados macroscópicos sugerem que o quadro de dilatação proventricular estava possivelmente associado com um episódio de briga com lesão do sistema nervoso periférico do TGI. As amostras 7, 31, 43, e 40, foram encontradas lesões sugestivas de PDD na necropsia entretanto, foram decorrentes de outras etiologias como casos de infecções parasitárias (*Ascaridia hermafrodita*), fúngicas (*Cândida spp*), bacterianas (quadro de septicemia sem identificação da bactéria) e também encarceramento das alças intestinais com obstrução do TGI, respectivamente. Portanto, 5/46 (10,8%) aves tiveram quadro clínico e/ou macroscópico de PDD atribuídos a outras etiologias.

Algumas amostras positivas para ABV (14, 16, 18 e 32) embora tenham apresentado lesão macroscópica de PDD, não foram encontradas lesões histopatológicas características da doença sendo diagnosticadas, portanto, como aves sem PDD. O contrário também ocorreu sendo detectada lesões apenas na histopatologia nas amostras 6 e 10, consideradas portanto, positivas para a doença (PDD positivas).

ABV foi comprovadamente associado à doença PDD em 9/46 (19,6%) amostras do total de aves avaliadas. Porém, esse percentual poderia ser maior, se todas as aves tivessem sido avaliadas histopatologicamente, para confirmação da doença (Gregory et al., 1994; Gregory et al., 1996; Ouyang et al., 2009).

Das aves positivas para ABV, 9/29 (31,0%) foram diagnosticadas com quadro sugestivo de PDD devido à falta de exame histopatológico, e 11/29 (37,9%) foram diagnosticadas como não doentes e assim, consideradas possíveis portadoras do vírus. Dezesete aves (37%) foram negativas na detecção de ABV.

4 - DISCUSSÃO

No criatório A historicamente, os casos de PDD tiveram início no ano de 2013 em um grupo de araras. Na época algumas aves foram encaminhadas para necropsia na rotina do Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária UFMG entre elas, uma arara Canindé (*Ara ararauna*) com lesões macroscópicas típicas de PDD no exame necroscópico. O material coletado na necropsia permaneceu armazenado a -80°C até posterior exame de RT-PCR para ABV. Essa ave foi positiva para ABVM (amostra 1) confirmando a circulação do vírus e sua associação com os casos de PDD nesse criatório.

Nesse surto inicial foram relatadas inúmeras mortes principalmente de filhotes do plantel assim como nos casos subsequentes avaliados no período de 2015-2016 onde os óbitos, assim como uma manifestação clínica mais acentuada, foram em sua maioria de aves jovens. A idade já havia sido relacionada com manifestação de sinais clínicos mais graves em estudo prévio de infecção natural por ABV em psitacídeos cativos (Kistler et al., 2010).

Entre as aves amostradas nesse criatório, a detecção de ABV em uma arara azul gigante *Anodorhynchus hyacinthinus* (amostra 2) constitui um relato inédito no Brasil. Essa espécie encontra-se como “em perigo” na classificação da Lista de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (IUCN, 2016), sendo, portanto um achado significativo considerando a severidade da doença da dilatação do proventrículo.

ABV foi identificado pela primeira vez no criatório B em estudo prévio feito no período de 2010 a 2012 (Donatti, 2012). Entre as aves positivas nesse estudo, uma maracanã-çu (*Ara severa*) com alterações características de PDD na necropsia foi sugerida como possível porta de entrada do vírus no criatório devido não ter sido submetida à quarentena antes de sua introdução no plantel (Donatti, 2012). Falhas nas medidas de higiene e biosseguridade podem levar a introdução do vírus com consequências desastrosas para o plantel (Kistler et al., 2010).

Após a identificação dos primeiros casos, o criatório apresentou novamente um número considerável de mortes com quadro de PDD em aproximadamente 6 meses. As aves foram então encaminhadas para necropsia e demais exames laboratoriais novamente no ano de 2015, sendo identificado o primeiro caso com alterações clínicas e macroscópicas compatíveis com PDD no mês de julho desse ano.

Fatores intrínsecos relacionados à ave infectada como idade e estado imunológico são importantes na determinação do curso da infecção por ABV (Gancz et al., 2009; Gray et al., 2010; Kistler et al., 2010). Heffels-Redmann e colaboradores avaliando curso de infecção natural por ABV em psitacídeos cativos relataram um caso onde a ave apresentava-se saudável e negativo para ABV em teste de RT-PCR no *swab* cloacal porém, após separação de seu parceiro que estava doente com quadro de PDD e estresse gerado pelo contato com novas aves, a mesma iniciou um quadro de apatia e perda de peso vindo a óbito 7 meses depois (Heffels-Redmann et al., 2012). O *Primolius maracana* (amostra 4) com lesões macroscópicas e microscópicas típicas de PDD, se assemelha ao caso citado pois foi transferida de seu recinto para outro de acasalamento vindo a óbito dois meses depois. O estresse gerado é sugerido então como fator importante para alteração do *status* imunológico da ave e assim um contribuinte para a manifestação da doença.

A sazonalidade da doença da dilatação do proventrículo foi sugerida logo nos primeiros casos identificados (Gregory et al., 1994). Fatores como mudança de temperatura parecem ter influenciado a manifestação de alguns casos mais severos nesse criatório. Ao final do mês de dezembro/2015 e princípio do mês de janeiro/2016 houve mortalidade de psitacídeos (amostras 11, 12, 13, 14 e 16) com quadro característico de PDD na necropsia coincidindo com a queda

brusca de temperatura devido às tempestades na região. Todas essas aves apresentaram alterações características de PDD na necropsia e foram positivas na RT-PCR para ABV.

Deve-se considerar que psitacídeos são aves que habitam continentes tropicais e subtropicais portanto, mudança de temperatura é vista como um fator determinante na estabilidade do plantel na criação dessas aves cativas (Cubas, 2014).

A rota fecal oral foi confirmada como via de transmissão de ABV com a detecção do mesmo nas células intestinais, fezes e *swab* cloacal (Rinder et al., 2009). A transmissão nesse plantel parece ter sido favorecida nas aves que tiveram passagem nos recintos viveiros, ambientes telados onde tinham acesso ao chão e assim, contato com as excretas. A detecção de ABV nessas aves foi maior quando comparado com as demais do plantel. Entretanto, o constante manejo das aves com troca de recintos dificultou a identificação e entendimento do padrão da distribuição e assim transmissão de ABV nesse criatório.

Em trabalho desenvolvido por Lierz e colaboradores (2009) os resultados encontrados não se relacionaram com a idade, localização e sexo das aves no criatório, sendo detectado ave negativa em um mesmo recinto de aves positivas. Entretanto em outro trabalho publicado no mesmo ano, foram encontrados resultados positivos para ABV em aves que partilhavam um mesmo recinto e onde também foram constatados vírus relacionados geneticamente (Rinder et al., 2009). Assim, sugere-se que a informação sobre a movimentação e localização das aves seria importante mas não fator determinante para estabelecer a epidemiologia do vírus no local.

Assim como no criatório A, o comportamento de PDD no plantel de psitacídeos parece ter se modificado. No criatório B, os casos apareceram mais isolados e não ocorrendo mortes em massa (surto) e em alguns casos, mortes envolvendo mais de dois indivíduos ocorreram em períodos de alguma mudança brusca no ambiente, como alteração no clima. Entretanto, devido a não observação constante e detalhada do plantel, especula-se que a manifestação clínica de PDD no mesmo ocorre nas mesmas épocas que os anos anteriores, porém são conhecidas apenas a data do óbito quando elas são então encaminhadas para necropsia. Outra hipótese, é a estabilização do grupo, conseqüentemente a não entrada de novas estirpes virais consolidando a circulação de apenas um tipo de ABV. Entretanto, todos esses aspectos devem ser avaliados com cuidado.

Ainda sobre o criatório B, foram identificadas aves parasitadas com *Capillaria* e *Ascaridia*. Historicamente, as Maritacas roxa (*Pionus fuscus*) desse plantel se mostraram mais susceptíveis a infecção por *Ascaridia*, sendo identificado por microscopia óptica a espécie *Ascaridia hermaphrodita*, com suporte técnico do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG) (aluna Olivia Cruz, comunicação pessoal), em uma ave amostrada nesse estudo (amostra 7). Essa ave apresentou a dilatação severa do proventrículo porém, esse quadro foi possivelmente causado pela infestação intensa de *Ascaridea* no intestino prejudicando a passagem normal da ingesta e assim o transito gastrointestinal. O bom score corporal, ausência de observação de sinais clínicos e alterações histopatológicas características de PDD corrobora com essa hipótese.

Existem relatos na literatura de infecção por *Ascaridia hermaphrodita* nessa espécie (Kajerova et al., 2004; Santos et al., 2015) porém, a identificação de parasitismo intenso do mesmo, cursando com detecção de ABV em um espécime de *Pionus fuscus* não havia sido relatado no Brasil até o momento.

Embora as aves avaliadas provenientes da rotina e proprietários particulares não tiveram confirmação histopatológica da doença e foram negativas na detecção de ABV, muitos casos sugestivos de PDD têm sido relatados na rotina de clínicas veterinárias na cidade de Belo Horizonte e região metropolitana. Aves de companhia são constantemente conduzidas para

exame clínico apresentando alterações neurológicas e/ou gastrointestinais compatíveis com a doença (Dra. Marcela Carvalho Ortiz, comunicação pessoal).

A manifestação clínica característica de PDD envolve principalmente sinais clínicos relacionados a disfunções do trato gastrointestinal como regurgitação, emagrecimento progressivo e estase do papo (Gregory et al., 1994). Das aves amostradas nesse estudo com histórico clínico conhecido, a diferença entre o número de indivíduos com manifestação de sinais neurológicos para os com alterações envolvendo trato gastrointestinal não foi significativa.

Alguns estudos encontraram um maior número de aves avaliadas com sinais neurológicos enquanto que em outros, as aves apresentavam na sua maioria sinais gastrointestinais não havendo, portanto, um padrão de manifestação clínica nos trabalhos desenvolvidos desde a identificação de PDD (Berhane et al., 2001; Gancz et al., 2009; Lierz et al., 2009; Sassa et al., 2013; Philadelpho et al., 2014).

Os sinais clínicos de PDD não são patognomônicos sendo muito deles identificados em diversas outras enfermidades (Gregory et al., 1994). A exemplo disso, algumas das aves desse estudo apresentaram sinais, clínicos e macroscópicos, compatíveis com PDD, entretanto, foram encontrados outros achados indicando que o quadro apresentado por elas foi consequência de outras enfermidades que geram manifestação clínica semelhante ao de PDD.

Houve variação de infecção e também de curso clínico de PDD entre as aves avaliadas, assim como foi visto em trabalhos onde avaliou-se infecção natural de ABV em psitacídeos cativos (Kistler et al., 2010; Heffels-Redmann et al., 2012). Essa diferença foi observada entre os criatórios A e B onde no primeiro, os casos neurológicos foram mais frequentes e mais severos, sendo observadas alterações como desequilíbrio com postura anormal e dificuldade de locomoção, mudanças no comportamento como apatia, nervosismo e resposta exacerbada ao medo e convulsões.

Antes da identificação do agente etiológico de PDD, Gerlach sugeriu um possível período de incubação de 4 a 24 meses (Gerlach, 1994). Em estudos mais atuais, esse período variou consideravelmente (; Lierz et al., 2009; Rinder et al., 2009; Kistler et al., 2010; Philadelpho et al., 2014). Kistler e colaboradores (2010) avaliando plantel de psitacídeos cativos, constataram manifestação dos sinais clínicos de PDD duas semanas após serem expostas a aves de outro criatório com histórico da doença e positivos para ABV. Em outro estudo, Gancz e colaboradores observaram que após 95 dias, calopsitas que haviam sido inoculadas com ABV4 não tinham desenvolvido sinais clínicos e em outros estudos do mesmo grupo de pesquisa, a doença manifestou com 30 dias após inoculação, demonstrando assim, o período de incubação do vírus continua uma incógnita (Gancz et al., 2009).

Os resultados dos exames necroscópicos bem como na avaliação histopatológica, variaram consideravelmente entre as aves desse estudo assim como em trabalho publicado previamente (Lierz et al., 2009).

A dilatação do proventrículo ocorreu em diferentes graus nas necropsias das aves amostradas. Em alguns casos a distensão era muito discreta quase imperceptível, porém foi considerada devido a comparação com órgão de tamanho normal. Em contrapartida houve também distensões severas cujo órgão ocupou grande parte da cavidade celomática.

A presença de alterações necroscópicas típicas de PDD como atrofia do músculo peitoral, dilatação do papo e proventrículo com alimento não digerido entre outras, não implica necessariamente em um caso de PDD visto que não são sinais exclusivos dessa doença. Lesões dessa natureza podem ser causadas por anomalias como presença de corpos estranhos,

neoplasias, proventriculite fúngica e/ou bacteriana, traumas entre outras series de patologias que ocasionam quadro semelhante (Gregory et al., 1994). Além disso, Gerlach baseando-se em seus estudos coloca que cerca de 10% das aves que veem a óbito com sinais característicos de PDD não apresentam realmente esta doença. (Gerlach, 1994).

Muitas das aves desse estudo mostraram, além dos sinais clínicos, lesões macroscópicas características de PDD porém, após exames complementares e avaliação minuciosa, constatou-se tratar de lesões por outros agentes etiológicos. As amostras 7, 31, 43 e 40 apresentaram a dilatação do proventrículo na necropsia causada por infecção parasitaria, fúngica, bacteriana e um caso de encarceramento das alças intestinais com obstrução do TGI, respectivamente. Os achados macroscópicos e/ou histopatológicos corroboram com esses diagnósticos.

A procura do agente etiológico no local é essencial para um diagnóstico conclusivo (Schmidt, 2003). Em todas as necropsias material de raspado de mucosa e conteúdo de papo, assim como de proventrículo e ventrículo, foram coletados e avaliados ao microscópio óptico.

Megabacteriose (*Macrorhabdus ornithogaster*), por exemplo, constitui outra causa de disfunção do trato gastrointestinal devendo, portanto, ser também diagnóstico diferencial pois leva a um quadro semelhante ao de PDD. Entretanto muitas das aves possuem esse organismo cronicamente não manifestando alterações clinicas e a identificação desse parasita na necropsia sem alterações macroscópicas e/ou histopatológicas não necessariamente implica que tenha sido fator contribuinte ou determinante para a morte da ave (Schmidt, 2003). Megabacteria não foi encontrada nas aves amostradas nesse estudo.

Além do caso característico de PDD muitas aves apresentaram outras lesões como alterações cardíacas, hepática, renal, trato respiratório e nas adrenais. As alterações patológicas encontradas em muitos órgãos além do sistema digestório, vistas nas aves com PDD, podem ser atribuídas à ampla distribuição tecidual de ABV (Weissenböck et al., 2009b)

Muitos estudos relataram casos de miocardites cursando com casos de PDD (Gregory et al., 1994; Beharne et al., 2001; Payne et al., 2011). Casos de lesões renais como nefrite intersticial por exemplo, possivelmente em consequência da presença de ABV, também foram identificados em aves com PDD (Raghav et al., 2010).

Algumas lesões podem ser secundarias a alterações gastrointestinais da doença que resultem em má digestão e má absorção consequentemente, alterando o funcionamento de outros sistemas orgânicos (Gregory et al., 1994; Berhane et al., 2001; Gancz et al., 2009; Gray et al., 2010). As alterações hepáticas vistas na necropsia de um *Amazona aestiva* com PDD foram atribuídas ao tempo prolongado de anorexia da ave (Marietto et al., 2009). Além disso, o déficit energético gerado pelo estado de caquexia do animal pode levar a falência de sistemas como o cardiovascular (Gerlach, 1994).

Apesar da ampla distribuição tecidual de ABV como já citado, não se pode nesse estudo associar as lesões propriamente ao vírus pois os demais tecidos além do SNC não foram testados por RT-PCR na procura do RNA viral. Além disso, outras causas como fator nutricional, falhas no manejo entre outras supracitadas, podem estar relacionadas com as alterações.

Embora o diagnóstico definitivo de PDD é feito através de análise histopatológica, a maioria das amostras não foram avaliadas microscopicamente, portanto, o critério de classificação como positiva para a doença foi baseado no conjunto de técnicas diagnosticas: sinais clínicos, achados macroscópicos e/ou microscópicos (histopatológicos) compatíveis com a doença.

O exame histopatológico foi considerado durante muito tempo o método padrão ouro para diagnóstico da doença da dilatação do proventrículo (Gregory et al., 1994). No entanto, a

distribuição variável das lesões encontradas pode gerar resultados falsos negativos como ocorreu em diversos estudos anteriores (Berhane et al., 2001; Ouyang et al., 2009, Raghav et al 2010).

Com base na descrição de lesões histopatológicas em artigos publicados sobre PDD, os critérios considerados foram a presença de infiltração linfoplasmocitária característica da doença nos gânglios mionéricos do TGI (Gregory et al., 1996; Berhane et al., 2001; Ouyang et al., 2009; Raghav et al., 2010).

Na maioria das aves avaliadas com lesões macroscópicas não foi encontrado quadro compatível com PDD no exame histopatológico e comparativamente, não houve variação significativa nos resultados histopatológicos entre as aves dos criatórios A e B.

Entre as aves com lesões microscópicas, algumas apresentaram o infiltrado linfoplasmocitário no ventrículo associado ou não com proventrículo. Em estudo desenvolvido com psitacídeos cativos, o órgão mais afetado foi o ventrículo e a lesão não foi restrita ao plexo nervoso espalhando-se também na camada muscular assim como no presente estudo (Gancz et al., 2009).

Embora a lesão histopatológica típica de PDD seja mais comumente encontrada nos plexos mionéricos, nervos periféricos podem apresentar infiltração linfoplasmocitária e vacuolização axonal como foi visto na ave amostra 32, uma *Aratinga weddelli*. Essa mesma lesão foi descrita em aves com PDD em estudo prévio desenvolvido por Beharne e colaboradores (Berhane et al., 2001), entretanto, para ser considerada como uma ave positiva para PDD a infiltração linfoplasmocitária estaria também nos órgãos do TGI, como é característico da doença.

As lesões histopatológicas com infiltrados linfoplasmocitários, linfo-histioplasmocitário e/ou heterofilico vistas no fígado, rins, sacos aéreos e coração, estão em concordância com os estudos anteriores e possivelmente são consequência da ampla distribuição de ABV nos tecidos, como supracitado (Weissenböck et al., 2009 a).

Das aves amostradas nesse estudo positivas para ABV no tecido cerebral e com avaliação histopatológica somente uma ave (amostra 10) teve infiltração linfoplasmocitária característica nesse tecido. Em estudos prévios, nem todos os tecidos com detecção do RNA viral apresentaram as lesões típicas da doença confirmando que os resultados entre os exames podem variar (Lierz et al, 2009; Rinder et al., 2009).

Entretanto, deve-se considerar que grande parte das aves encaminhadas para necropsia já se encontravam em estado avançado de autólise. O cérebro e cerebelo são os principais órgãos onde essa condição dificultava a coleta de material para histopatologia.

Diversos fatores devem ser considerados quanto aos resultados negativos na avaliação histopatológica. Algumas aves com lesões macroscópicas características de PDD e/ou positivas para detecção do RNA viral de ABV foram negativas para histopatologia da doença. Entretanto, em vários outros estudos, casos similares foram relatados (Gacz et al., 2009; Lierz et al., 2009; Rinder et al., 2009; Raghav et al., 2010). Esses resultados também podem ser atribuídos a falhas na técnica e corte do material. Berhane e colaboradores obtiveram maior exatidão do diagnóstico após múltiplas secções dos órgãos, o que sugere essa necessidade (Berhane et al., 2001).

Embora somente as amostras com lesão histopatológica da doença foram consideradas PDD positivas, muitas aves com “quadro sugestivo” de PDD foram também consideradas como possíveis aves doentes devido ao quadro clínico e macroscópico compatível com a doença determinando assim, que as aves avaliadas podem em sua maioria estar associadas à doença.

Na detecção de ABV por RT-PCR, os resultados encontrados se assemelham com o estudo desenvolvido por Weissenböck e colaboradores (2009a) que obtiveram melhor resultado com o oligonucleotídeos correspondentes para a proteína M, amplificando todas as amostras (100%) e a codificação pelo primer de N conseguiu detectar 75% das positivas para ABV (Weissenböck et al., 2009 a). Em contrapartida, estudo desenvolvido no Brasil a detecção de ABV utilizando oligonucleotídeos para região correspondente a proteína N obteve melhores resultados (Philadelpho et al., 2014). No entanto, deve-se considerar que os oligonucleotídeos para proteína N utilizado nesse estudo foi usado apenas nas amostras negativas para ABVM objetivando aumentar a sensibilidade do teste, diminuindo resultados falso-negativos.

A baixa detecção de aves comprovadamente doentes (PDD positivas) e ABV positiva pode ser atribuído ao grande número de amostras sem avaliação histopatológica e assim sem diagnóstico definitivo para a doença. Considerando as amostras com quadro sugestivo da doença e positivas para ABV, esse número aumentaria para aproximadamente 39% (19 aves do total de 46) entretanto, sem a histopatologia essa afirmação não é possível.

Aves sem sinais característicos da doença na necropsia, foram testadas quanto a presença de ABV devido à proximidade do óbito com aves com PDD. A detecção de ABV em algumas dessas aves permitiu avaliar a presença do vírus no plantel sugerindo a existência de possíveis aves portadoras.

Estudos desenvolvidos com psitacídeos cativos detectaram ABV em aves saudáveis, sem sinais clínicos de PDD (De Kloet, et al., 2009; Lierz et al., 2009; Raghav et al., 2010; Villanueva et al., 2010). Villanueva e colaboradores encontraram ABV nas fezes de aves saudáveis e soronegativas sugerindo a existência do estado de carreador/portador do vírus. Como observação, o autor ainda sugere que a soroconversão pode ocorrer muito tempo depois, talvez meses, após a detecção do vírus nas excretas (Villanueva et al., 2010). Em contrapartida, no outro estudo, aves clinicamente saudáveis eliminavam ABV nas fezes, porém foram soropositivas (Lierz et a., 2009). As aves dos criatórios desse estudo não foram testadas sorologicamente para ABV, no entanto, seria interessante futuramente a realização destes para uma possível confirmação da associação da detecção de anticorpos com a manifestação dos sinais clínicos.

Ainda sobre os casos aqui apresentados, como de aves carreadoras e assim fontes transmissoras do vírus, embora os demais tecidos não tenham sido testados quanto a presença de ABV, esses resultados se assemelham aos encontrados em estudo prévio. Lierz e colaboradores sugeriram que em uma infecção inicial ou mesmo em uma ave portadora do vírus, o ABV está a princípio confinado no tecido nervoso, corroborando com os resultados encontrados (Lierz et al., 2009). Entretanto, para confirmação dessa hipótese nos casos do presente estudo, os outros tecidos coletados devem ser investigados quanto a presença do vírus.

A identificação de lesões histopatológicas sem manifestação de sinais clínicos e alterações necroscópicas características de PDD com RNA viral detectado por RT-PCR encontrados na ave 10, são indicativos que essa ave poderia estar no princípio da infecção e que, possivelmente, se não tivesse vindo a óbito, desenvolveria os sinais clínicos da doença futuramente. Quadro semelhante foi encontrado em estudo de avaliação de grupos de psitacídeos cativos onde lesões de PDD foram vistas no exame histopatológico em ave positiva para ABV, porém, sem apresentação clínica da doença (Heffels-Redmann et al., 2012). Além disso, esse resultado corrobora com o proposto por Kistler e colaboradores onde a infecção pelo vírus precede a manifestação clínica de PDD (Kistler et al., 2010).

Embora muitas aves positivas na RT-PCR não tenham apresentado confirmação da doença PDD, não se pode afirmar que são aves portadoras devido à falta de diagnóstico confirmatório com exame histopatológico. Além disso, como o período de incubação do vírus é variável e, portanto, não foi ainda estabelecido, uma ave considerada “portadora saudável” pode vir a ser uma ave doente em um período não determinado que pode ser então de semanas, meses ou mesmo anos devendo-se ter cautela na consideração desse diagnóstico.

Algumas das aves amostradas com alterações clínicas e/ou macroscópicas características de PDD, foram negativas na RT-PCR para ABV. Em estudos anteriores ABV também não foi detectado em todas as aves doentes (Kistler et al., 2008; Rinder et al., 2009).

Os resultados negativos para ABV de aves com PDD podem ser justificados por fatores como degradação do material genético (RNA viral), quantidades não detectáveis do vírus, variabilidade genética existente nos genótipos de ABV, interpretação clínica e/ou patológica equivocadas ou o envolvimento de outros agentes virais (Lierz et al., 2009; Rinder et al., 2009; Weissenböck et al., 2009 a).

A não detecção de ABV em algumas amostras pode também ser atribuído ao teste unicamente do sistema nervoso central à procura do RNA viral. Entretanto, ABV é um vírus de caráter neurotrópico e estudo anterior comparando a detecção deste nos tecidos cerebral e proventrículo obteve melhores resultados no primeiro contrariando, assim, essa hipótese (Weissenbok et al., 2009 a).

Entre os genótipos de ABV existe 68 e 85% de identidade genética (Kistler et al., 2008; Kuhn et al., 2015). Portanto, resultados falso-positivos podem ter ocorrido, mesmo com a amplificação das 2 regiões codificadoras utilizadas, M e N. Entretanto, a caracterização de ABV é recente e muito ainda precisa ser estudado. Além disso, infecções mistas com mais de um genótipo já foram relatadas em estudos com psitacídeos positivos para ABV (Nedorost et al., 2012). Sendo assim, existe a possibilidade de algum genótipo no presente estudo não ter sido detectado.

Deve-se ainda considerar que outros agentes virais podem estar envolvidos e para isso, todas as amostras desse estudo foram testadas por RT-PCR para vírus do gênero *Alphavirus* e *Paramyxovirus*, utilizando-se oligonucleotídeos gênero-específicos.

Estudos iniciais associaram vírus causadores de Encefalites Equina (*Alphavirus*) à PDD assim como *Paramyxovirus*, sendo que esse último foi sugerido como agente etiológico da doença durante anos até pouco tempo antes da identificação e caracterização de ABV (Gregory et al., 1997; Deb et al., 2008; Gough et al, 2006; Lublin et al, 2006; Gancz et al., 2010).

Entre os vírus do gênero *Alphavirus*, os vírus das Encefalites Equinas do Oeste (WEEV) e Encefalite Equina do Leste (EEEV) tem como hospedeiros naturais aves silvestres que participam então do seu ciclo de replicação e assim de sua transmissão (Gerlach, 1994; Flores, 2015). Ambos estão associados com casos de lesões de encefalite não supurativa na avaliação histopatológica em aves silvestres e assim, provocando possíveis quadros de alterações neurológicas, semelhantes a algumas das aves aqui avaliadas e com histórico clínico. Além disso, EEEV também está associada como etiologia da serosite aviária em psitacídeos, doença cuja alterações histopatológicas são semelhantes com as lesões vistas nas aves com PDD (Gerlach, 1994; Gregory et al., 1997).

Entretanto, Gregory e colaboradores (1997), investigaram a associação de EEEV com aves apresentando dilatação do proventrículo. Como resultado, esse estudo comprovou que esse vírus não está associado ao quadro de PDD (Gregory et al., 1997).

Em estudo prévio realizado no Brasil, foi encontrado uma prevalência de 14,7% para o gênero *Alphavirus* em aves silvestres avaliadas de diferentes estados confirmando a circulação desses vírus no país (Araújo, 2011).

Como observação final do diagnóstico envolvendo o gênero *Alphavirus*, o criatório B, que possui as aves positivas para o gênero *Alphavirus* no presente estudo, possui cavalos mantidos como estimação pelo proprietário. Portanto, é sugestivo que um estudo mais amplo com sequenciamento dessas amostras para comprovação da infecção e uma avaliação epidemiológica local deve ser feito.

A doença de Newcastle, infecção causada pelo Paramyxovirus aviário sorotipo 1 (APMV-1) está incluída no Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) e portanto, constitui uma doença de notificação obrigatória (http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/PNSA/Plano%20de%20Conting%C3%Aancia%20-%20Vers%C3%A3o%2014.pdf). A amostra 17, embora tenha sido positiva na RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados gênero-específicos para *Paramyxovirus*, não houve sequenciamento para confirmação e determinação do sorotipo viral e, portanto, não consideramos como diagnóstico definitivo e assim de notificação obrigatória.

O genótipo ABV4 encontrado no sequenciamento de amostras representativas dos criatórios A e B é o de ocorrência mais comum em todo mundo, sendo identificado em ampla gama de continentes (Lierz et al., 2009; Rinder et al., 2009; Weissenböck et al., 2009a; Last et al., 2012; Donatti et al., 2014; Rubbenstroth et al., 2016). Além disso, AVB4 foi também sugerido como o mais patogênico em trabalho prévio (Payne et al., 2011).

As diferenças entre as sequências, embora de mesmo genótipo ABV4, vistas nos resultados do criatório A e B pode ser responsável por diferenças no comportamento da infecção por ABV. Payne e colaboradores em estudo prévio concluíram que existem diferenças entre estirpes de um mesmo genótipo, resultando em diferenças na resposta imune apresentada pelo hospedeiro assim como em relação a virulência (Payne et al., 2011).

Como supracitado, o criatório A apresentou comportamento clínico de PDD diferente do criatório B com maior número de casos neurológicos. Embora o criatório B tenha um maior número de aves sem histórico clínico, poucos casos com manifestação neurológica foram observados e, mesmo assim, com quadros menos acentuados. Sendo assim, e como citado em estudo anterior, a estirpe viral parece estar estritamente relacionada com a manifestação clínica da doença assim como nas lesões encontradas (Gancz et al., 2009).

A identidade encontrada entre as sequências do criatório A e uma ave (*Pionus menstruus*) descrita na Alemanha com histórico de importação do Brasil (isolado TiHO-47-48 - GenBank KU748816), remete a importância da livre circulação e comércio dessas aves em todo mundo. Embora o histórico clínico desse *Pionus* não tenha sido esclarecido, essa identidade claramente o associa com as aves brasileiras do criatório A avaliadas nesse estudo, constatando assim que possivelmente a infecção teve origem ainda em território brasileiro.

A rápida disseminação de ABV pode, portanto, ser atribuída ao livre comércio de psitacídeos em todo mundo. Considerando que a caracterização desse vírus é relativamente recente e assim existem poucas informações sobre alguns de seus aspectos como epidemiologia e patogenia, é plausível considerar que seja necessário um controle mais rigoroso quanto a venda e aquisição dessas aves, instituindo também um diagnóstico de ABV obrigatório antes de sua entrada no plantel.

Embora sugerido nos primeiros estudos de identificação da doença, que PDD tenha sua origem na América do Sul, nenhum estudo até o momento comprovou essa hipótese (Gregory et al.,

1994; Payne et al., 2012). Com isso, um estudo mais apurado e abrangente com amostras de todo Brasil seria de importante contribuição para elucidar alguns desses aspectos.

CONCLUSÕES

A associação casuística de ABV como agente etiológico de PDD foi reafirmado no presente estudo, uma vez que todas as aves doentes PDD positivas foram também RT-PCR positivas para ABV.

Resultados de amostras com quadro sugestivo de PDD decorrente de outras etiologias sugerem a importância do diagnóstico diferencial. Portanto, um conjunto de técnicas constitui a melhor opção para diagnóstico definitivo de PDD.

Os achados de aves sem PDD positivas para ABV sugere a existência da condição de ave portadora. Aves assintomáticas portadoras de ABV podem desempenhar função importante na transmissão e disseminação do vírus, sendo necessário um estudo mais detalhado avaliando todas as aves do plantel. Sugere-se um estudo de prevalência em cada criatório avaliando detecção de ABV tanto em aves sintomáticas como em aves assintomáticas.

Os resultados encontrados contribuíram para elucidar aspectos quanto a situação atual da doença PDD e infecção por ABV em psitacídeos cativos de Minas Gerais bem como, foi pioneiro na detecção de aves portadoras do ABV nos planteis de psitacídeos cativos de Belo Horizonte e região metropolitana.

Embora tenha sido encontrado aves positivas na RT-PCR para os gêneros *Alphavirus* e *Paramyxovirus*, o diagnóstico não foi conclusivo devido ao não sequenciamento das amostras. É necessário além do sequenciamento, um estudo epidemiológico quanto a presença desses vírus nos planteis de psitacídeos cativos de Minas Gerais.

A crescente detecção de PDD e consequentemente ABV no Brasil é indicativo da importância da implementação do diagnóstico de ABV nos programas sanitários dos criatórios e também das aves destinadas para soltura. Dentro disso, sugere-se que devido a infecções subclínicas e liberação intermitente de ABV nas fezes, que sejam realizados repetidos testes nas aves durante quarentena para aumentar a sensibilidade da detecção do vírus antes de estas serem introduzidas no plantel ou retornar à natureza.

Por fim, embora esse estudo apresentou contribuição significativa para o avanço do conhecimento do Bornavírus aviário no Brasil, maiores estudos são necessários para elucidar aspectos da epidemiologia de ABV em território nacional, auxiliando no desenvolvimento de medidas sanitárias adequadas para prevenção e controle da síndrome da dilatação do proventrículo (PDD).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, F. A. A. Inquéritos sorológicos em equídeos e aves silvestres para detecção de anticorpos antiarbovírus de importância em saúde pública no Brasil. 2009.158f. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.
- ASHASH, E.; MALKINSON, M.; MEIR, R. et al. Causes of Losses Including a Borna Disease Paralytic Syndrome Affecting Young Ostriches of One Breeding Organization over a Five-Year Period (1989-1993). *Avian Dis.*, v. 40, n. 1, p. 240-245, 1996.
- BERG, M., JOHANSSON, M., MONTELL, H. et al. Wild birds as a possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiol Infect.* v. 127, p.173–178, 2001.
- BERHANE, Y.; SMITH, D. A.; NEWMAN, S. et al. Peripheral neuritis in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Avian Pathol*, v.30, n.5, p.563-570, 2001.
- BOURQUE, L.; LANIESSE, D.; BEAUFRÈRE, H. et al. Identification of avian Bornavírus in a Himalayan monal (*Lophophorus impejanus*) with neurological disease, *Avian Pathol*, v. 44, n.4, p. 323-327, 2015.
- CUBAS, Z.S; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens- Medicina veterinária. São Paulo: Rocca, 2014. p. 614-654.
- DEB, A.; BORJALI, R.J.; BARKLE, M. et al. Evaluation of avian paramyxovirus.i 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, Germany. Anais... p. 239-242, 2008.
- DE KLOET, S. R.; DORRESTEIN, G. M. Presence of avian Bornavírus RNA and anti-avian Bornavírus antibodies in apparently healthy macaws. *Avian Dis.* v. 53, p. 568–573, 2009.
- DELNATTE, P.; OJKIC, D.; DELAY, J. et al. Pathology and diagnosis of avian Bornavírus infection in wild Canada geese (*Branta canadensis*), trumpeter swans (*Cygnus buccinator*) and mute swans (*Cygnus olor*) in Canada: a retrospective study, *Av. Pathol*, v.42, n.2, p. 114-128, 2013.
- DONATTI, 2012. Avaliação sanitária de Psittaciformes em cativeiro no estado de Minas Gerais, no período de 2010-2012. 2012. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- DONATTI, R. V.; RESENDE, M.; FERREIRA JUNIOR, F. C. et al. Fatal Proventricular Dilatation Disease in Captive Native Psittacines in Brazil. *Avian Dis.*, v. 58, n.1, p. 87-193, 2014.
- DONELEY, R. J. T.; MILLER, R. I.; FANNING, T. E. Proventricular dilatation disease: an emerging exotic disease of parrots in Australia. *Aust Vet J.*, v. 85, n. 3, 2007.
- ENCINAS-NAGEL, N.; ENDERLEIN, D.; PIEPENBRING, A. et al. Avian Bornavírus in free-ranging psittacine birds, Brazil. *Emerg Infect Dis.*, v.20, n. 12, p. 2103-2106, 2014.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* v. 39, p. 783-791, 1985.
- FLORES, E. F. *Virologia veterinária*. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2015.
- GANCZ, A.Y.; KISTLER, A.; GRENINGER, A. et al. Experimental induction of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) inoculated with brain homogenates containing avian Bornavírus. *Vir. J.*, v.6, n.1, p.100, 2009.

- GANCZ, A.Y.; CLUBB, S.; SHIVAPRASAD, H.L. Advanced diagnostic approaches and current management of proventricular dilatation disease. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2010;13:471–494.
- GERLACH, H. Viruses, p. 862–948. In B. W. Ritchie, G. J. Harrison, and L. R. Harrison (ed.), *Avian medicine: principles and application*. Wingers Publishing, Lake Worth, FL, 1994, p. 862-948.
- GOUGH, R. E., DRURY, S. E.; CULVER, F. et al. Isolation of a coronavirus from a green-cheeked Amazon parrot (*Amazona viridigenalis* Cassin). *Avian Pathol.* v.35, p.122–126, 2006.
- GRAY, P, HOPPE, S.; SUCHODOLSKI, P. et al. Use of avian Bornavirus isolates to induce proventricular dilatation disease in conures. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 16, n. 3, p. 473–479, 2010.
- GREGORY, C. R.; LATIMER K. S.; NIAGRO F. D. et al. A review of proventricular dilatation syndrome. *J. Assoc. Avian. Vet.*, v. 8, p. 69-75, 1994.
- GREGORY, C. R.; LATIMER, K. S.; CAMPAGNOLI, R. P. et al. Histologic evaluation of the crop for diagnosis of proventricular dilatation syndrome in psittacine birds. *J. Vet. Diagn. Invest.*v.8, p.76–78, 1996.
- GREGORY, C.R., LATIMER, K.S., NIAGRO, F.D. et al, Investigation of eastern equine encephalomyelitis virus as the causative agent of psittacine proventricular dilatation syndrome. *J. Avian Med Surg*, v.11, p. 187–193, 1997.
- GUO, J.; BAROCH, J.; RANDALL, A. et al. Complete genome sequence of an avian Bornavirus isolated from a healthy Canadian goose (*Branta canadensis*). *Genome Announc*, v.1, n.5, p. 1-2, 2013.
- HEATLEY, J. J.; VILLALOBOS, A. R. Avian Bornavirus in the urine of infected birds. *Veterinary Medicine: Research and Reports* v. 3, p.19–23, 2012.
- HEFFELS-REDMANN, U.; ENDERLEIN, D.; S. HERZOG, S. et al. Occurrence of avian Bornavirus infection in captive psittacines in various European countries and its association to proventricular dilatation disease. *Avian Pathol.*, v. 40, p. 419–426, 2011.
- HEFFELS-REDMANN, U.; ENDERLEIN, D.; S. HERZOG, S. et al. Follow-Up Investigations on Different Courses of Natural Avian Bornavirus Infections in Psittacines. *Avian Dis.* v. 56, n.1, p. 153-159, 2012.
- HILBE, M.; HERRSCHE, R.; KOLODZIEJEK, J. et al. Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerg Infect Dis.* v. 12, p. 675–677, 2006.
- HONKAVUOURI, K.S.; SHIVAPRASAD, H.L.; WILLIAMS, B. L. et al. Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis.*, v.14, n.12, p.1883-1886, 2008.
- HOPPE, S.; GRAY, P.; PAYNE, S. et al. The isolation, pathogenesis, diagnosis, transmission and control of Avian Bornavirus and Proventricular Dilatation Disease. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* . v.13: p. 495-508, 2010.
- HOPPE, S.; HEATLEY, J. J.; GUO, J. et al. Meloxicam treatment in cocktiels (*Nymphicus hollandicus*) infect with Avian Bornavirus . *J. Exot. Pet Med.*, v.22, p. 275–279, 2013.
- HORIE, M.; HONDA, T.; SUZUKI, Y. et al. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature*, v. 463, p.84–87, 2010.
- HORIE, M.; HONDA, T.; SUZUKI, Y. et al. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* v. 463, p.84–87, 2010.

HORIE, M.; KOBAYASHI, Y.; SUZUKI, Y. et al. Comprehensive analysis of endogenous Bornavirus-like elements in eukaryote genomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368:20120499, p. 1-11, 2013.

IUCN, 2016. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-3. <www.iucnredlist.org>. Acesso em 25 de dezembro de 2016.

KAJEROVA, V.; BARUS, V.; LITERAK, I. Nematodes from the genus *Ascaridia* parasitizing psittaciform birds: a review and determination key. *Review Article Vet. Med. – Czech*, v. 49, n. 6, p. 217–223, 2004.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. of Mol. Evol.*, v. 16, p. 111-120, 1980.

KISTLER, A.L.; SMITH, J.M.; GRENINGER, A.L. et al. Recovery of divergent avian Bornavirus es from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *J. Virol.*, v.5, n.4, p. 2176-2179, 2008.

KISTLER, A. L., SMITH, J. M.; A. L. GRENINGER, A. L. et al. Analysis of naturally occurring avian Bornavirus infection and transmission during an outbreak of proventricular dilatation disease among captive psittacine birds. *J. Virol.*, v.84, p. 2176–2179, 2010.

KLOET, A. H.; KERSKI, A.; DE KLOET, S. R. Diagnosis of Avian Bornavirus infection in psittaciformes by serum antibody detection and reverse transcription polymerase chain reaction assay using feather calami. *J Vet Diagn Invest.*, v. 23, n. 3, p. 421-429, 2011.

KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* v. 33, p. 1870-1874, 2016.

KUHN J, DÜRRWALD, R.; BÀO, Y. et al. Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Arch. Virol.*, v.160, p. 621–632, 2015.

LAST, R.D.; WEISSENBÖCK, H.; NEDOROST, N. et al. Avian Bornavirus genotype 4 recovered from naturally infected psittacine birds with proventricular dilatation disease in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v. 83, n. 1, p. 1-4, 2012.

LIERZ, M.; HAFEZ, M.; HONKAVUOURI, K.S. et al. Anatomical distribution of avian Bornavirus in parrots, its occurrence in clinically healthy birds and ABV-antibody detection. *Avian Pathol.*, v.38, n.6, p.491-496, 2009.

LUBLIN, A., MECHANI, S., FARNOUSHI, I. et al, An outbreak of proventricular dilation disease in psittacine breeding farm in Israel. *Isr J Vet Med.*, v.61, p.16–19, 2006.

LUDWIG T. H.; BECHT, H.; GROH, L. Borna disease (BD), a slow virus infection. Biological properties of the virus. *Med Microbiol Immunol* v.158, p.275–289, 1973.

LUDWIG, H.; BODE, L. Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Rev sci tech OIE* v.19, p. 259–288, 2000.

LUNA, L. G. *Manual of Histologic Staining Methods*; of the Armed Forces Institute of Pathology. Ed. New York : Blakiston Division, McGraw-Hill, 1968.

MARIETTO-GONCALVES, G.A.; TRONCARELLI, M.Z.; SEQUEIRA, J.L. et al, Proventricular dilatation disease (PDD) and megaesophagus in a blue-fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*) - case report. *Vet e Zootec.*, v.16, n.1, p. 69–73, 2009.

MONACO, E., HOPPE, S., GUO, J. et al. The Detection of Avian Bornavirus with in Psittacine Eggs. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 26, n. 3, p.144–148, 2012.

- MUSSER, J.M.B., HEATLEY, J.J., KOINIS, A.V. et al. Ribavirin Inhibits Parrot Bornavírus 4 Replication in Cell Culture. PLoS ONE v.10, n.7, 2015.
- NOBACH, D.; BOURG, M.; HERZOG, S. et al. Shedding of Infectious Borna Disease Virus-1 in Living Bicolored White – Tooth ed Shrews .PLoS ONE, v.10, n. 8, p. 1-14, 2015.
- OLBERT, M.; RÖMER-OBERDÖRFER, A.; HERDEN, C. et al. Viral vector vaccines expressing nucleoprotein and phosphoprotein genes of avian Bornavírus es ameliorate homologous challenge infections in cockatiels and common canaries. Sci. Rep., p. 1-6, 2016.
- OUYANG, N.; STORTS, R.; TIAN, Y. et al. Histopathology and the detection of avian Bornavírus in the nervous system of birds diagnosed with proventricular dilatation disease. Avian Pathol, v.38, n.5, p. 393-401, 2009.
- PAYNE, S.; SHIVAPRASAD, H. L.; MIRHOSSEINI, N. et al. Unusual and severe lesions of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) acting as healthy carriers of avian Bornavírus (ABV) and subsequently infected with a virulent strain of ABV, Avian Pathol.,v. 40, n.1, p. 15-22, 2011.
- PAYNE, S.; COVALEDA, L.; JIANHUA, G. et al. Detection and Characterization of a Distinct Bornavírus Lineage from Healthy Canada Geese (*Branta canadensis*) J. of. Vir, v.85, n.22, p. 12053–12056, 2011.
- PAYNE, S.; DELNATTE, P.; GUO, J. et al. Birds and Bornavírus es. Anim Health Res Ver., v.13 n.2, p. 145–156, 2012.
- PHILADELPHO, N. A.; RUBBENSTROTH, D.; GUIMARAES, M. B. et al. Survey of Bornavírus es in pet psittacines in Brazil reveals a novel parrot Bornavírus . Vet Microbiol., v. 174, n. 3-4, p. 584 – 590, 2014.
- PNSA (PLANO NACIONAL DE SANIDADE AVICOLA) Disponível em http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/PNSA/Plano%20de%20Conting%C3%Aancia%20-%20Vers%C3%A3o%201_4.pdf Acesso em 23 de janeiro de 2017.
- PLESCHKA, S.; STAEHELI, P.; KOLODZIEJEK, J. et al. Conservation of coding potential and terminal sequences in four different isolates of Borna disease vírus. J. Gen. Virol., v. 82, n.11, p. 2681-2690, 2001.
- RAGHAV, R.; TAYLOR, M.; DELAY, J. et al. Avian Bornavírus is present in many tissues of psittacine birds with histopathologic evidence of proventricular dilatation disease. J Vet Diagn Invest., v.22, p. 4495-508, 2010.
- RASO, T. F. Síndrome da Dilatação do Proventrículo: uma doença emergente com potencial impacto à conservação in situ e ex situ de psitacídeos. Ornithologia, v.6 n. 2, p. 148-152, 2014.
- RELATÓRIO NACIONAL SOBRE O TRÁFICO DE FAUNA SILVESTRE, 1. (2002). Brasília: Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres (Renctas), 2002. 108p.
- REUTER, A.; ACKERMANN, A.; KOTHLOW, S. et al. Avian Bornavírus es Escape Recognition by the Innate Immune System. Viruses v.2, p. 927-938, 2010.
- RINDER, M.; ACKERMANN, A.; KEMPF, H. et al. Broad tissue and cell tropism of avian Bornavírus in parrots with proventricular dilatation disease. J. of Vir., v.83, n.11, p.5401-5407, 2009.
- ROSSI, G.; CROSTA, L.; PESARO, S. Parrot proventricular dilatation disease: a possible model of Guillain-Barré syndrome? Vet. Rec. v.163, p. 310, 2008.
- ROTT, R.; HERZOG, S.; FLEISCHER, B. et al. Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. Science, v.228, p. 755–756, 1985.

- RUBBENSTROTH D, RINDER, M.; KASPERS, B. et al. Efficient isolation of avian Bornavírus es (ABV) from naturally infected psittacine birds and identification of a new ABV genotype from a salmon-crested cockatoo (*Cacatua moluccensis*). *Vet Microbiol* v. 161, p. 36–42, 2012.
- RUBBENSTROTH, D.; RINDER, M.; STEIN, M. et al. Avian Bornavírus es are widely distributed in canary birds (*Serinus canaria f. domestica*). *Vet Microbiol.*, v.165, p. 287–295, 2013.
- RUBBENSTROTH, D.; SCHMIDT, V.; RINDER, M. et al. Discovery of a new avian Bornavírus genotype in estrildid finches (*Estrildidae*) in Germany. *Vet Microbiol.*, v. 168, p.318–323, 2014.
- RUBBENSTROTH, D.; SCHMIDT, V.; RINDER M. et al. Phylogenetic Analysis Supports Horizontal Transmission as a Driving Force of the Spread of Avian Bornavírus es. *PLoS ONE*, v. 11, n. 8, p.1-18, 2016.
- SAITOU N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* v.4, p.406-425, 1987.
- SASSA, Y.; MASAYUKI, H.; FUJINO, K. et al. Molecular epidemiology of avian Bornavírus from pet birds in Japan. *Virus Genes*, v. 47, p. 173 – 177, 2013.
- SANCHEZ-SECO, M. P. ; ROSARIO, D. ; QUIROZ, E. et al. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J. Virol. Methods.*, v.95, p. 153–161, 2001.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *proceedings of the national academy of sciences, USA*, v.74, p. 5463-5467, 1997.
- SANTOS, P. M. S.; SILVA, S. G. N.; FONSECA, C.F. et al. Parasitos de aves e mamíferos em cativeiro no estado de Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 9, p. 788-794, 2015.
- SCHMIDT, R. E., D. R. REAVILL, D. R.; PHALEN, D. N. *Pathology of pet and aviary birds*. Iowa State Press, Ames, IA 2003, p. 41-65; 165-168.
- SCHWEMMLE, M.; LIPKIN, I. W. Models and mechanisms of Bornavírus pathogenesis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms | Infectious diseases*, v.1, n.2, p. 211–216, 2004.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira, 1997 p. 125 – 140.
- STEINMETZ, M.; PEES, V.; SCHMIDT, M. et al. Case report Blindness as a sign of proventricular dilatation disease in a grey parrot (*Psittacus erithacus erithacus*). *J Small Anim Pract.*, v. 49, p. 660–662, 2008.
- SULLIVAN, N. D.; MACKIE, J. T.; MILLER, R. I., GILES, A. First case of psittacine proventricular dilatation syndrome (macaw wasting disease) in Australia. *Aust Vet J.*, v.75, n.9, p.674, 1997.
- TIZARD, I.; BALL, J.; STOICA, G.; PAYNE, S. Review The pathogenesis of bornaviral diseases in mammals. *Animal Health Research*, p. 1-18, 2016.
- TONG, S.; CHERN, S. W. W.; LI, Y. et al. Sensitive and Broadly Reactive Reverse Transcription-PCR Assays To Detect Novel Paramyxoviruses. *Journal of clinical Microbiology*, v. 46, n. 8, p. 2652–2658, 2008.

VILLANUEVA, I.; GRAY, P.; MIRHOSSEINI, N. et al. The diagnosis of proventricular dilatation disease: use of a Western blot assay to detect antibodies against avian Bornavírus. *Vet. Microbiol.* v.143, p. 196- 201, 2010.

WEISSENBOCK, H., BAKONYI, T., SEKULIN, K., et al. Avian Bornavíruses in Psittacine Birds from Europe and Australia with Proventricular Dilatation Disease. *Emerg Infect Dis.*, v. 15, p. 1453 – 1459, 2009a.

WEISSENBOCK, H.; SEKULIN, K.; BAKONYI, T. et al. Novel avian Bornavírus in a nonsittacine species (Canary; *Serinus canaria*) with enteric ganglioneuritis and encephalitis. *J. Virol.* v.83, p.11367–11371, 2009b.

ZIMMERMANN, V.; RINDER, M.; KASPERS, B. et al. Impact of antigenic diversity on laboratory diagnosis of Avian Bornavírus infections in birds. *J Vet Diagn Invest.*, v.26, n. 6, p. 769-777, 2014.

ANEXO I

Tabela 13 – Exames post mortem das aves avaliadas com escore corporal e demais descrições.

AMOSTRA	Escore corporal/Dilatação do proventrículo	Necropsia (descrição)
1	Escore 1 ++	Presença alimento não digerido em grande quantidade no lúmen do proventrículo Intestinos delgado e grosso com serosa e vasos hiperêmicos
2	Escore 1 +	Parede do proventrículo com edema focal Petéquias difusas e sangue digerido no ventrículo e intestinos delgado e grosso.
3	Escore 1 +	Penas ao redor da cloaca sujas de fezes (sugestivo de diarreia); baço diminuído de tamanho
4	Escore 1 ++	Papo com distensão acentuada com grande quantidade de alimento não digerido no lúmen Proventrículo com parede adelgada com alimento não digerido em grande quantidade Hepatomegalia discreta
5	Escore 1 ++	(Estágio avançado de autólise) Proventrículo com parede fina; Papo, proventrículo e ventrículo com grande quantidade de alimento não digerido (sementes)
6	Escore 2 -	Mucosa do proventrículo com edema focal discreto Coagulo cruórico grande (0,5cm) no coração (átrio direito) Congestão hepática difusa acentuada Presença de hematoma difuso acentuado na superfície externa do crânio; Congestão cerebral difusa acentuada
7	Escore 3 ++	Proventrículo com grande quantidade de alimento não digerido, parede adelgada e com congestão moderada Falha de penas (alopecia) na região da cabeça (sugestivo de briga) Parasitismo intestinal intenso (<i>Ascaridia hermaphrodita</i>)
8	Escore 1 ++	Trato gastrointestinal difusamente distendido com presença de sementes não digeridas em grande quantidade Intestinos com paredes acentuadamente adelgadas
9	Escore 1 +	Proventrículo com dilatação discreta a moderada com paredes adelgadas, com intensa hiperemia e alimento não digerido (sementes) em pequena quantidade. (Ave já em estado de autólise avançado)

10	Escore 3 -	Presença de líquido amarelo translúcido em discreta quantidade no saco pericárdico Petéquias multifocais difusas na superfície do fígado, com órgão discretamente friável.
11	Escore 1 ++	Presença de alimento não digerido (sementes) em grande quantidade no papo, proventrículo e ventrículo. Ventrículo com distensão acentuada; Região de necrose área de 1 cm x 1 cm deprimida, friável e que aprofunda ao corte do parênquima no lobo esquerdo do fígado
12	Escore 1 +	Escoriação no dorso da ave com pequena falha de penas Proventrículo com dilatação discreta a moderada com alimento não digerido em pequena quantidade; Saco pericárdico de aspecto friável contendo líquido amarelo translúcido acentuada quantidade (aprox. 0,5-0,7ml); Coágulo cruórico (0,5cm) no átrio esquerdo; Hepatomegalia discreta Vasos da serosa do TGI muito congestionados; SNC com congestão acentuada
13	Escore 3 ++	Esôfago: parede do órgão apresentando áreas multifocais de coloração negra na parede do esôfago sugestivo de pseudomelanose, também no papo e ventrículo; Papo distendido com alimento (não digerido e digerido) e gás em grande quantidade; proventrículo com paredes adelgadas com alimento não digerido (sementes) em grande quantidade; Coágulo cruórico (0,5cm) átrio direito (aspecto “tigrado”); Fígado com regiões difusas amareladas em sua superfície, bordas abauladas e hepatomegalia (sugestivo de esteatose).
14	Escore 1 ++	Intensa dilatação do papo com grande quantidade de alimento digerido e não digerido (sementes) e parede adelgada; superfície do fígado com áreas multifocais pálidas difusa na superfície; Proventrículo com alimento não digerido em quantidade moderada, parede edemaciada, petéquias difusas e necrose multifocal discreta; Intestinos distendidos com grande quantidade de conteúdo fecal líquido e gás. Presença de <i>Candida sp</i> no proventrículo (microscopia óptica).
15	Escore 2 -	Ave com sinais de arrancamento de penas (penas primárias) Ventrículo com aumento de volume discreto Intestinos distendidos com grande quantidade de gás, paredes hiperemias e conteúdo hemorrágico no terço médio (intestino delgado)
16	Escore 2 +	Proventrículo com pequena quantidade de alimento não digerido, parede com petéquias difusas e pontos hemorrágicos mais extensos na região do istmo. Presença de muco transparente em grande quantidade no esôfago; Fígado com regiões amareladas multifocais difusas em sua superfície, bordas abauladas e aumento de tamanho (hepatomegalia); Congestão generalizada intensa principalmente, o SNC muito congestionado e com vasos hiperêmicos.
17	Escore 1 ++	Envio de tecidos (Envio de relatório onde constava dilatação proventricular moderada a severa com presença de alimento não digerido em grande quantidade e congestão hepática moderada)
18	Escore 2 -	Intensa dilatação do papo com grande quantidade de alimento não digerido (sementes) e no esôfago em menor quantidade Necrose multifocal no fígado lobo esquerdo e direito (Ave em estado de autólise)

19	Escore 1 -	Ave sem a metade do bico, com cavidade interna exposta; Descamação nas falanges; Papo: distendido com grande quantidade de alimento digerido e não digerido, presença de ulcera na parede (3 a 4 cm), com placa brancacenta de mesmo tamanho aderida. Ácaros (<i>Ornithonyssus</i>) em grande quantidade nas penas Lamina de papo (microscopia óptica): <i>Candida sp.</i>
20	Escore 3 -	Fígado em petéquias difusas na sua superfície e com aumento de volume (Hepatomegalia); Vasos do proventrículo e ventrículo congestos; Adrenais aumentadas de tamanho; Hematoma difuso na calota craniana (externo)
21	Escore 1 +	Sacos aéreos com opacidade branca (aerossaculite); Hepatomegalia severa; Congestão generalizada
22	Escore 3 ++	Proventrículo com grande quantidade de alimento não digerido (impactação) e vasos com hiperemia acentuada; Alimento não digerido em quantidade moderada no papo com dilatação; intestinos congestos com presença de petéquias difusas na parede do duodeno; coagulo de tamanho aproximado 0,1 cm na região posterior do hemisfério direito do cérebro, próximo ao cerebelo (sugestivo de ser na meninge – leptomeninge).
23	Escore 3 +	Proventrículo com dilatação muito discreta, porém sem presença de impactação (alimento) sendo considerada como alteração <i>post mortem</i> ; Coagulo cruórico (< 0,5cm) no ventrículo direito; Intestinos distendidos com conteúdo intestinal líquido e gás; parede do duodeno hemorrágica e com conteúdo vermelho (hemorrágico); Rins de aspecto friável. Lâmina de intestinos (microscopia óptica): <i>Capillaria spp.</i> em grande quantidade
24	Escore 1 +	Proventrículo com dilatação discreta a moderada, porém sem impactação (alimento não digerido) sugestivo de alteração <i>post mortem</i> . Presença de ponto escuro (0,2cm) na mucosa do papo, sugestivo de pseudomelanose; Congestão pulmonar Vasos do TGI hiperêmicos
25	Escore 1 +	Ave com descamação epitelial; parte externa do bico com conteúdo alimentar semelhante “papinha” fornecida para aves doentes e filhotes, esôfago e papo com esse mesmo conteúdo em grande quantidade; proventrículo distendido com presença de conteúdo líquido (alimento papinha) em grande quantidade sugestivo de alteração <i>post mortem</i> ; intestinos distendidos com conteúdo fecal líquido e gás em grande quantidade; Congestão do saco pericárdico; Regiões pálidas na superfície hepática.
26	Escore 1 +	Ave com espessamento de sacos aéreos (aerossaculite); papo com dilatação severa, paredes adelgadas e presença de alimento não digerido (sementes) em grande quantidade; proventrículo com dilatação discreta a moderada porém sem impactação (alimento) sugestivo de alteração <i>post mortem</i> ; Presença de líquido amarelo translúcido em grande quantidade (aprox. 0,5ml) no saco pericárdico; Intestinos distendidos, com petéquias difusas na parede do duodeno.
27	Escore 1 ++	Sem alterações além da distensão acentuada do proventrículo com presença de alimento não digerido em quantidade moderada.

28	Escore 1 -	Proventrículo com parede edemaciada e sem impactação (presença de alimento) Adrenais com aumento de tamanho (0,1-0,2mm); Rins com coloração pálida discreta
29	Escore 2 -	Petéquias difusas na parede do proventrículo; Fígado de consistência firme com forte aderência ao peritônio; SNC congesto com vasos hiperemicos; Parasitismo intestinal em pequena quantidade (<i>Ascaridia sp</i>) Ave já em estado de autólise
30	Escore 2 -	Dilatação muito discreta do proventrículo apenas na região do istmo sem impactação (presença de alimento); Ventrículo com distensão moderada a severa; Saco pericárdico espesso e de aspecto friável; Fígado com aspecto friável; Discreta deposição de conteúdo branco (pontos brancos multifocais) de aspecto friável na superfície hepática, renal e do saco pericárdico; hepatomegalia; Alças duodenais distendidas
31	Escore 3 +	Ave com conteúdo catarral na cavidade oral e traqueia em quantidade moderada; Esôfago e papo com conteúdo alimentar (sementes não digeridas) em quantidade moderada e muco branco amarelado espesso em grande quantidade; Congestão cardíaca; Parede da aorta hemorrágica; petéquias na parede do proventrículo, este com dilatação muito discreta porém sem alimento não digerido (impactação); adrenais aumentadas de tamanho; congestão renal; hematoma no crânio e vasos cerebrais congestos. Lâmina raspado mucosa e conteúdo do papo: estruturas sugestivas de <i>Candida spp</i>
32	Escore 1 +	Papo distendido com grande quantidade de conteúdo alimentar semelhante a “papinha” e parede fina; proventrículo com dilatação discreta a moderada, parede com petéquias difusas em grande quantidade e com quantidade moderada do mesmo conteúdo do papo; Fígado com congestão acentuada e aumentados (hepatomegalia); Congestão pulmonar; petéquias na parede do proventrículo e órgão com quantidade moderada de alimento; rins congestos e friáveis; Hematoma no crânio principalmente na região do occipital; coágulo na região do occipital próximo ao cerebelo; vasos cérebro e cerebelo congestos.
33	Escore 1 +	Ave com falha de penas na cabeça e pontas das asas; Peritônio espesso e fortemente aderido à superfície dos órgãos da cavidade celomática; Sacos aéreos espessos e com opacidade moderada; saco pericárdico com líquido amarelo translucido em pequena quantidade (0,2-0,3ml); papo distendido com sementes inteiras em grande quantidade; parede do proventrículo com uma região mais espessa formada por uma placa de coloração mais pálida (0.1-0,2mm), sem alimento não digerido (impactação); parede do duodeno congesta e com petéquias difusas; intestinos com conteúdo escuro; rins de aspecto friável; cerebelo com aumento de tamanho discreto.
34	Escore 1 +	Dilatação intensa do papo com presença de grande quantidade de gás, alimento e conteúdo espumoso em grande quantidade com áreas de congestão na parede; proventrículo com dilatação discreta, sem presença de alimento não digerido (impactação); muco em quantidade moderada na traqueia; sacos aéreos com opacidade branda; Fígado congesto, de aspecto friável e aumentado de tamanho (Hepatomegalia). Exame bacteriologia conteúdo do papo: isoladas colônias de bastonetes curto Gram+

35	Escore 1 +	Ave com lesões externas: falha de penas nas asas, escoriações na região interna das asas, peitoral e coxa direita com dilacerações na pele e musculo (sinais de briga); Cardiomegalia; fígado de aspecto friável com pontos brancos multifocais na superfície, bordas abauladas e hepatomegalia; Ventrículo dilatado; papo, proventrículo e ventrículo com sementes inteiras em quantidade moderada; alças intestinais distendidas com conteúdo de coloração amarronzado-amarelado e gás.
36	Escore 1 -	Ave com cardiomegalia; Papo com distensão moderada, parede fina com pontos escuros difusos sugestivos de pseudomelanose e com quantidade moderada de alimento não digerido e digerido. Fígado com áreas amareladas difusas na superfície e bordas abauladas (discreto).
37	Escore 1 +	Penas ao redor da cloaca sujas de fezes (sugestivo de diarreia); pequena deformação (“serrilhado”) no osso quilha do esterno; congestão hepática e hepatomegalia; Duodeno distendido e com parede congesta; parede do proventrículo congesta e edemaciada, alimento não digerido em quantidade discreta; Ventrículo com dilatação moderada a intensa.
38	Escore 1 +	Papo com distensão discreta a moderada, parede fina e com sementes inteiras em grande quantidade; Dilatação do proventrículo discreta a moderada, principalmente na região do istmo (transição proventrículo – ventrículo) com presença de alimento não digerido (sementes) em quantidade moderada; sacos aéreos com espessamento discreto (aerrosaculite); congestão pulmonar acentuada; fígado com pontos pálidos difusos na superfície e hepatomegalia; Congestão cerebral intensa
39	Escore 1 ++	Região de alopecia no pescoço da ave com hematoma pontual (sugestivo de briga); papo com dilatação intensa; presença de alimento não digerido (sementes) no papo, proventrículo e ventrículo em grande quantidade Congestão generalizada
40	Escore 1 ++	Ave com presença de conteúdo alimentar líquido de cor amarelada no bico (externamente) sugestivo de regurgitação, na cavidade oral, papo e proventrículo em quantidade moderada; aumento de volume semelhante a uma massa firme e fortemente aderida na região intestinal e após abertura da cavidade, encarceramento da porção inicial do intestino dentro dessa massa com porção do duodeno invaginada no terço proximal do intestino.
41	Escore 1 +	Penas ao redor da cloaca sujas de fezes; Presença de conteúdo alimentar nas narinas (sugestivo de aspiração devido regurgitação); hemorragia pulmonar bilateral, lesões arredondadas (1-2mm) sem elevação de consistência um pouco firme, de coloração esbranquiçada nos sacos aéreos torácico caudal e abdominal; fígado: Hepatomegalia e regiões de coloração pálida difusas em toda superfície do órgão; crânio hiperêmico; SNC hemorrágico e edemaciado; congestão generalizada
42	Escore 3 -	Presença de gordura na superfície dos órgãos na cavidade celomática em pequena quantidade; Fígado: Regiões de coloração amarelada distribuída em toda superfície do órgão, bordas abauladas e presença de petéquias multifocais difusas em quantidade moderada; Coração: petéquias focais discretas na região da base do órgão; líquido amarelo translúcido no saco pericárdico em pequena quantidade (0,1-0,2ml); Rins, pâncreas e duodeno com coloração pálida difusa; Adrenais aumentadas de tamanho (0,1-0,2 cm); Alças intestinais distendidas com coágulos de sangue difusos distribuídos no lúmen intestinal; bolsa cloacal com líquido de coloração avermelhada e gás em grande quantidade.

43	Escore 3 ++	Proventrículo com dilatação moderada a severa, parede edemaciada com conteúdo alimentar digerido em grande quantidade. Fígado: com pontos brancos milimétricos multifocais acentuado difuso na superfície do órgão e hepatomegalia; Baço aumentado de tamanho (esplenomegalia), com pontos brancos milimétricos multifocais acentuados difusos na superfície do órgão; Intestinos com conteúdo de cor brancacenta em grande quantidade; Hemorragia ocular direita; hemorragia difusa acentuada nas meninges; cérebro e cerebelo edemaciados
44	Escore 1 +	Ave com presença de conteúdo alimentar em pequena quantidade na superfície externa do bico e cavidade oral (sugestivo de regurgitação); penas ao redor da cloaca sujas de fezes (sugestivo de diarreia); proventrículo: parede edemaciada e com petéquias difusas discretas, com alimento líquido (que estava sendo fornecido antes do óbito) em quantidade moderada; Intestinos: alças intestinais distendidas com conteúdo escuro de aspecto arenoso em grande quantidade (sugestivo de melena); duodeno com petéquias difusas em grande quantidade na parede e conteúdo com aspecto hemorrágico; Saco pericárdico espesso; adrenais com aumento de tamanho discreto; rins congestos; nervos ciáticos com aumento de tamanho discreto e vasos adjacentes ingurgitados; Meninges espessas; SNC congesto com vasos hiperêmicos; hemorragia pontual pequena localizada no crânio próximo ao occipital.
45	Escore 1 ++	Acúmulo de material de aspecto catarral em pequena quantidade no terço final da traqueia; Musculatura peitoral de coloração vermelho escuro (congestão); Espessamento da parede do peritônio com aderência dos órgãos presentes na cavidade celomática (fígado, proventrículo e ventrículo); espessamento do saco pericárdico; sacos aéreos com opacidade branda (aerossaculite); fígado: região de coloração amarelada focal localizada no lobo esquerdo, ponto amarelo (0,1 -0,2cm) focal localizado no lobo direito, região caudal, órgão com consistência friável intensa e congestão acentuada; nervo braquial direito com aumento de tamanho discreto; adrenais com aumento de tamanho discreto (menor que 0,4cm); proventrículo: sementes inteiras em grande quantidade, parede muito fina com uma região pontual de coloração mais escura e edemaciada localizada próximo a junção proventrículo e ventrículo (istmo). Ventrículo menor com discreta atrofia da musculatura; intestinos: com conteúdo fecal escuro; duodeno com conteúdo avermelhado e com petéquias multifocais na parede em pequena quantidade; hematoma no crânio próximo a região do occipital; hemorragia discreta na região do cerebelo. Ave em estado avançado de autólise.
46	Escore 2 +	Escoriações e falha de penas (alopecia) na região da cabeça, próximo ao bico; hematoma pontual na região do pescoço proximal; papo com distensão intensa, paredes adelgadas e com conteúdo alimentar não digerido em grande quantidade; proventrículo com dilatação discreta, parede severamente edemaciadas com petéquias multifocais em pequena quantidade, sem alimento (impactação); dilatação moderada do ventrículo; fígado com regiões pálidas difusas discretas na superfície; congestão intensa dos vasos da região do cerebelo.