

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Lais Talita Souza Hanna

ENCEFALITES VIRAIS EM AVES SILVESTRES

Belo Horizonte

2023

Lais Talita Souza Hanna

ENCEFALITES VIRAIS EM AVES SILVESTRES

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

Orientador: Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva
Martins

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Erica Azevedo
Costa

Belo Horizonte

2023

Hanna, Lais Talita Souza ,1996-
H243e Encefalites virais em aves silvestres /Lais Talita Souza Hanna. – 2023.
 94f: il

 Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins
 Coorientadora: Erica Azevedo Costa
 Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da
UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.
 Bibliografias: f:80 a 93.

 1. Animais silvestres - Doença - Teses - 2. Virologia veterinária - Teses
I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva - II. Costa, Erica Azevedo -
III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária –
IV. Título.

CDD – 636.5

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

LAIS TALITA SOUZA HANNA

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.

Aprovado(a) em 13 de setembro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Nelson Rodrigo da Silva Martins (Orientador)

Dr.(a). Beatriz Senra Álvares da Silva Santos

Dr.(a). Daniel Ambrózio da Rocha Vilela

Dr.(a). Erica Azevedo Costa



Documento assinado eletronicamente por **Nelson Rodrigo da Silva Martins, Professor do Magistério Superior**, em 17/09/2023, às 12:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Ambrózio da Rocha Vilela, Usuário Externo**, em 20/09/2023, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Beatriz Senra Álvares da Silva Santos, Usuário Externo**, em 20/09/2023, às 11:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erica Azevedo Costa, Professora do Magistério Superior**, em 21/09/2023, às 08:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2626464** e o código CRC **EF26019B**.

AGRADECIMENTOS

Tenho diversas pessoas a quem agradecer, dentre elas, meu pai (*in memoriam*) e minha mãe que sempre me apoiaram e fizeram o possível e impossível para a minha formação acadêmica. Minhas irmãs, Laiane e Laiara, que sempre tiveram comigo compartilhando experiências e conhecimentos, mesmo que sendo de áreas diferentes.

Ao meu esposo Wesley que tive o prazer de conhecer, por ser uma pessoa bondosa, amável, carinhosa e que apoia em todas as decisões, te amo ao infinito e além, e também à segunda família que ele me deu Angela, Jen e Mark (*To my husband Wesley, whom I had the pleasure of meeting, for being a kind, loving, caring person who supports all of my decisions, I love you to infinity and beyond, and also to the second family he gave me, Angela, Jen and Mark*).

Aos meus padrinhos Maria Geralda e Luiz que também estiveram comigo durante toda minha formação, minha segunda mãe e meu segundo pai.

Aos meus amigos: Camila, Brisa, Furiati, Júlia, Keith, Leonardo, Luiza, Lísle, Maria, Paula e Roberta que me acompanharam neste processo e que compartilho muitos e muitos momentos de alegria e rizada.

Ao meu professor Nelson por ter me convidado para a realização deste projeto e à professora Erica, minha mãe científica, que muito me ensinou durante todo esse período, às professoras Maria Isabel e Zélia que me acolheram e me receberam com todo carinho no laboratório de virologia. Aos professores, Último, Lívio, Lobão e Rodrigo por terem me recebido e me orientado na clínica de ruminantes durante toda graduação, além de seus conselhos de vida que também me fizeram crescer como pessoa. Pessoas que guardo extrema admiração e carinho.

Aos amigos que fiz no LPVA: Beatriz, Brenda, Grazielle, Nágila, Sabryna que também compartilho momentos de alegria, que tenho gratidão por terem me ajudado durante meu mestrado.

“A medicina cura o homem, a medicina veterinária cura o mundo.”

Louis Pasteur

RESUMO

O Brasil é um país de extensa área territorial sendo composto por diferentes biomas, o que permite diversidade de habitats e de espécies de aves silvestres. A atividade humana em agricultura, produção animal, urbanização, mineração, resulta em impacto negativo à homeostasia ambiental, com circulação interespecífica de etiologias que podem ser zoonóticas, com potencial risco à saúde única, além de gerar perdas de exemplares silvestres. Dentre as enfermidades de relevância, é importante ressaltar as que envolvem o Sistema Nervoso Central (SNC), uma vez que são, geralmente, causas de morte em animais jovens, impactando a conservação da fauna. Métodos de diagnóstico são essenciais para determinar as etiologias destas doenças, permitindo a elaboração de estratégias de prevenção e controle. O objetivo geral deste estudo foi analisar a casuística da rotina do Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária – UFMG, de aves silvestres necropsiadas entre 2018 e 2022 oriundas da grande Belo Horizonte, além da investigação de etiologias virais de importância para o SNC em amostras coletadas em criatório conservacionista localizado em Ribeirão das Neves-MG. Foram selecionados 61 casos de aves, de diferentes ordens e famílias, com histórico de sinais clínicos neurológicos e/ou alterações neurológicas observadas à necropsia. Além disso, amostras de sangue total, suabe cloacal e traqueal de 18 aves de aspecto clínico normal, cativas em criatório conservacionista em Ribeirão das Neves, foram colhidas no ano de 2022. Os materiais biológicos e/ou fragmentos do SNC de cada animal foram analisados para as etiologias de encefalites equinas West Nile virus (WNV), encefalites equinas venezuelana (VEEV), leste (EEEV), oeste (WEEV), Influenza A, Bornavírus aviário (ABV), doença de Newcastle (NDV), doença de Pacheco (PDV), doença de Marek (MDV), Adenovírus aviário. Dentre os 61 animais, foi detectado influenza A, em técnica de RT-qPCR e RT-PCR, Bornavírus aviário, pan-herpesvírus além do vírus da doença de Marek e também para o vírus da doença de Pacheco (PsHV-1). Já entre os 18 animais observou-se positividade para o vírus da influenza A em suabe traqueal e para ABV em suabe cloacal. Por fim, foi analisado um papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) com sinais clínicos compatíveis com hidrocefalia, com as avaliações anatomopatológica e histopatológica indicativas de processo inflamatório e análises em técnicas moleculares de diagnóstico negativos para etiologias virais.

Palavras-chave: sanidade aviária; espécies aviárias selvagens; Minas Gerais; doenças neurológicas aviárias; biologia molecular aviária; zoonoses aviárias; patógenos aviários.

ABSTRACT

Brazil is a country with an extensive territorial area made up of different biomes, which allows for a diversity of habitats and wild avian species. Human activity in agriculture, animal production, urbanization, mining, results in a negative impact on environmental homeostasis, with interspecific circulation of etiologies that may be zoonotic, with potential risk to One Health, in addition, losses of wild specimens. Among the relevant diseases, it is important to highlight those involving the Central Nervous System (CNS), since they are generally causes of death in young animals, impacting the wildlife conservation. Diagnostic methods are essential to determine the etiologies of those diseases, allowing the elaboration of prevention and control strategies. The general objective of this study was to analyze the routine casuistry of the Laboratory of Avian Diseases of the Veterinary School – UFMG, of wild avian species necropsied between 2018 and 2022 from greater Belo Horizonte, in addition to investigating viral etiologies of importance for the CNS in samples collected at a conservationist breeding located in Ribeirão das Neves-MG. Were selected sixty-one cases of avian morbid cases, from different orders and families, with a history of clinical neurological signs and/or neurological alterations observed at necropsy. In addition, samples of whole blood, cloacal and tracheal swabs of 18 avian species of normal clinical appearance, captive in a conservationist breeding in Ribeirão das Neves, were collected in 2022. Biological materials and/or CNS fragments from each animal were analyzed for the etiologies of equine encephalitis West Nile virus (WNV), Venezuelan equine encephalitis (VEEV), eastern (EEEV), western (WEEV), Influenza A, avian bornavirus (ABV), Newcastle disease (NDV), Pacheco's disease (PDV), Marek's disease (MDV), avian adenovirus. Among the 61 animals, influenza A was detected using RT-qPCR and RT-PCR techniques, avian bornavirus, pan-herpesvirus in addition to Marek's disease virus and also Pacheco's disease virus (PsHV-1). Among the 18 animals, positivity for influenza A virus was observed in the tracheal swab and for ABV in the cloacal swab. Finally, a blue parrot (*Amazona aestiva*) with clinical signs compatible with hydrocephalus was analyzed, with anatomopathological and histopathological evaluations indicative of an inflammatory process and analyzes in molecular techniques of negative diagnosis for viral etiologies.

Keywords: avian health; wild avian species; Minas Gerais; avian neurological diseases; avian molecular biology; avian zoonosis; avian pathogens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Animais necropsiados. A- Animal 54, <i>Pionopsitta pileata</i> fêmea. B- Animal 60, <i>Guaruba guarouba</i> fêmea.	39
Figura 2. Necropsia do animal 52 <i>Amazona aestiva</i> , animal com queda de penas, macrocefalia.....	40
Figura 3. Árvore filogenética construída a partir da sequência parcial do gene M que codifica ABV4. As variantes são identificadas pelo número do Genbank e país. As sequências foram analisadas usando o método de Neighbor-Joining e o modelo de distância evolutiva Kimura 2. Valores de Bootstrap 1.000 são mostrados ao lado dos ramos. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X, envolvendo 13 sequências de acordo com Silva <i>et al.</i> (2020), incluindo um grupo externo (MH190827.1 Mammalian 1 <i>Orthobornavirus</i>).....	53
Figura 4. Mapa da localização do criatório marcado em azul. Fonte: Google maps (2023).	56
Figura 5. Criatório de Ribeirão das Neves. A. Contenção de <i>Guaruba guarouba</i> . B. <i>Primolitis maracana</i> em recinto. C. Gaiola de <i>Guaruba guarouba</i> em quarentenário, animais apresentando sinais neurológicos e difusa queda de penas.	58
Figura 6. Árvore filogenética construída a partir da sequência parcial do gene M que codifica ABV4. As variantes são identificadas pelo número do Genbank e país. As sequências foram analisadas usando o método de Neighbor- Joining e o modelo de distância evolutiva Kimura 2. Valores de Bootstrap 1.000 são mostrados ao lado dos ramos. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X, envolvendo 13 sequências de acordo com Silva <i>et al.</i> (2020), incluindo um grupo externo (MH190827.1 Mammalian 1 <i>Orthobornavirus</i>).....	64
Figura 7. <i>Amazona aestiva</i> (papagaio-verdadeiro) utilizado no estudo.....	68
Figura 8. Sinais clínicos apresentados pelo animal. A- Posicionamento incorreto do membro esquerdo, cabeça pendida para o lado esquerdo, macrocefalia. B- Excretas em região pericloacal. C- Falta de propriocepção em membro esquerdo.	71
Figura 9. A- Distensão e adelgaçamento da calota craniana. B- Microencefalia e presença de líquido cefalorraquidiano límpido. C- Espessamento de meninge.	72
Figura 10. A- Área hemorrágica de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro na musculatura peitoral (círculo vermelho). B- Intestino hiperêmico, com vasos bem definidos e ingurgitados (setas vermelhas). C- Ventrículo sem conteúdo alimentar (quadrado vermelho). D- Adrenal aumentada (círculo preto).....	73
Figura 11. Análise microscópica de conteúdo digestivo, aumento 1000X. Estruturas compatíveis com <i>Blastocystis</i> sp. (círculos vermelhos).	74

Figura 12. Análise microscópica de cérebro, coloração hematoxilina-eosina, malácia multifocal discreta. A- Alteração cérebro. B- Aumento de 200x da imagem no quadrado vermelho em imagem A. C- Aumento de 1000x de imagem no quadrado preto na imagem A.	74
Figura 13. Análise microscópica de cérebro, coloração hematoxilina-eosina, áreas multifocais contendo astrócitos tumefeitos (gemistócitos) e satelitose neuronal multifocal. A- Sateliose neuronal (seta preta). B- Gemistócito (seta vermelha).	75
Figura 14. Análise microscópica de cerebelo, coloração hematoxilina-eosina, vacuolização cortical multifocal (círculos pretos). B- Vacuolização de substância branca (setas pretas) em aumento de 200x.	75
Figura 15. Análise microscópica de meninge, coloração hematoxilina-eosina A- Acentuada atrofia cortical associada à vacuolização e desorganização cortical (setas pretas). B. Vacuolização e desorganização cortical (círculo preto). C- Deposição de conteúdo dourado a amarronzado no interior de neurônios (setas vermelhas).	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação das amostras utilizadas no estudo.	36
Tabela 2. Classificação do escore corporal de aves.....	40
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados.	41
Tabela 4. Resultados positivos de análises moleculares das amostras de SNC dos animais 1 a 61.	44
Tabela 5. Quantidade de animais positivos, frequência das doenças e correlação das técnicas das amostras de SNC dos animais 1 a 61.	45
Tabela 6. Relação dos órgãos analisados para testes moleculares de detecção e subtipagem de influenza A.	51
Tabela 7. Identificação das amostras coletadas no dia 04 de agosto de 2022.	57
Tabela 8. Classificação do escore corporal de aves.....	57
Tabela 9. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados.	59
Tabela 10. Agentes infecciosos avaliados nos testes de RT-PCR ou RT-qPCR. Positividade representada pela letra “x”.....	61
Tabela 11. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados.	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ABBV-1.	Aquatic Bird Bornavirus 1
ABV.	Bornavirus aviário
AIV.	Avian Influenza Virus
AOAv-1.	Orthoavulavirus aviário tipo 1
APMV-3.	Paramyxovirus tipo 3
AQUAVET.	Laboratório de Diagnóstico de Doenças dos Animais Aquáticos
BDV.	Bornavirus clássico
CBRO.	Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos
CETAS.	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CEUA.	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CnBV-2.	Canary Bornavirus 2
CT.	Cycle Threshold
DMPV.	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
DNA.	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F.	Fusão
Fiocruz Minas.	Fundação Oswaldo Cruz- Minas
FUNED-MG.	Fundação Ezequiel Dias
HA.	Hemaglutinina
HN.	Hemaglutinina-Neuraminidasae
HPAIV.	Highly Pathogenic Avian Influenza Virus
HVT.	Herpesvirus of Turkeys
IBAMA.	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDGA.	Imunodifusão em Ágar gel

IEF.	Instituto Estadual de Florestas
IMA.	Instituto Mineiro de Agropecuária
IPIV.	Índice de Patogenicidade Intravenoso
L.	Polimerase
LANAGRO.	Rede de Laboratórios Nacionais Agropecuários
LCR.	Líquido Cefalorraquidiano
LDA.	Laboratório de Doenças das Aves
LPAIV.	Low Pathogenic Avian Influenza Virus
M.	Matriz
MDCK.	Madin-Darby Canine Kidney Cells
N.	Nucleoproteína
NA.	Neuraminidase
NT.	Near Threatened
OMS.	Organização Mundial da Saúde
OMSA.	Organização Mundial de Saúde Animal
OPAS.	Organização Pan-Americana da Saúde
P.	Fosfoproteína
PaBV-4.	Parrot bornavirus 4
PaBV-8.	Parrot bornavirus 8
PBS.	Phosphate-Buffered Saline
PDD.	Proventricular Dilatation Disease
pH.	Potencial Hidrogeniônico
PNSA.	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PPMV-1.	<i>Pigeon</i> Paramyxovirus sorotipo 1
PshV.	Psittacid herpesvirus
RNA.	Ácido Ribonucleico

RNA-DNAse free.	Ribonucleases free water
SNC.	Sistema Nervoso Central
SPF.	Specific Pathogen Free
UFMG.	Universidade Federal de Minas Gerais
UV.	Ultra-Violeta
VDN.	Virus da Doença de Newcastle
VEEV.	Virus da Encefalite Equina Venezuelana
WEEV.	Virus da Encefalite Equina do Oeste
WNV.	West Nile virus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: ENCEFALITES AVIÁRIAS COM ENFOQUE NAS CAUSAS VIRAIS.....	18
3.1.Encefalites equinas.....	18
3.2.Influenza aviária.....	20
3.3.Bornavirus	23
3.4.Doença de Newcastle e outros Paramyxovirus	25
3.5.Doença de Marek	28
3.6.Doença de Pacheco	30
3.7.Adenovirus	32
4. CAPÍTULO 2 - DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS EM AVES SILVESTRES DA GRANDE BELO HORIZONTE.....	34
4.1.INTRODUÇÃO	34
4.2.MATERIAL E MÉTODOS	35
4.2.1. Coleta de material	35
4.2.2. Necropsia	39
4.2.3. Extração de DNA e RNA.....	40
4.2.4. PCR e RT-PCR	40
4.2.5. Sequenciamento e análise filogenética	42
4.2.6. Análise estatística.....	43
4.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.3.1. Ensaios de PCR e análise de animais positivos	43
4.3.2. Detecção de Influenza A em outros órgãos, das aves positivas no SNC	50
4.3.3. Resultados de Sequenciamento	52
5. CAPÍTULO 3 - DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS EM AVES SILVESTRES DE CRIATÓRIO CONSERVACIONISTA DE RIBEIRÃO DAS NEVES.....	55

5.1.INTRODUÇÃO	55
5.2.MATERIAL E MÉTODOS	55
5.2.1. Coleta de material	55
5.2.2. Extração de DNA e RNA.....	58
5.2.3. PCR e RT-PCR	58
5.2.4. Sequenciamento e análise filogenética	59
5.2.5. Análise estatística.....	60
5.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.3.1. Amostras de suabe endotraqueal, cloacal e sangue total em heparina.....	60
5.3.2. Resultados de Sequenciamento	64
6. CAPÍTULO 4 – CASO CLÍNICO: HIDROCEFALIA EM <i>AMAZONA AESTIVA</i>	
66	
6.1.INTRODUÇÃO	66
6.2.MATERIAL E MÉTODOS	68
6.2.1. Animal utilizado.....	68
6.2.2. Necropsia	69
6.2.3. Biologia molecular.....	69
6.3.RESULTADOS.....	71
6.3.1. Descrição clínica	71
6.3.2. Alterações macroscópicas	71
6.3.3. Exames laboratoriais	73
6.4.DISSCUSSÃO	76
7. CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de extensa área em que seu terreno é situado predominantemente em área tropical, contendo diferentes biomas como Pantanal, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica (FIGUEIREDO, 2000). A atividade humana explora diversos recursos naturais, para a agricultura e criação de animais para alimentação, sistemas de transporte, e mantém animais de companhia, com estreita relação entre animais e humanos (ZANELLA, 2016). A avifauna brasileira é a terceira maior do mundo e das 1.971 espécies de aves registradas no país, 216 estão envolvidas em algum tipo de migração, sendo um total de 18 sítios migratórios catalogados ou sítios de invernada (FEITOSA JUNIOR *et al.*, 2020; CEMAVE; ICMBio, 2022). Em 2019 foram registrados 523 empreendimentos comerciais de fauna silvestre em atividade, destes, 85 estabelecimentos comerciais e 438 criadouros comerciais, em que 92,66% são criadouros de aves (TRAJANO; CARNEIRO, 2019).

É notável que no último século emergiram e reemergiram diversas enfermidades, sendo conhecidas mais de 200 zoonoses. Estima-se que seis entre dez doenças infecciosas são zoonóticas de seres humanos para animais domésticos e silvestres e quatro de animais para humanos (WHO, 2020; CDC, 2021). O expressivo crescimento da população humana e as ações antrópicas têm contribuído para o aumento da transmissão de agentes infecciosos que antes se encontravam mantidos na natureza. A concentração de animais de origens diferentes permite a transmissão e amplificação da carga de patógenos, favorecendo o intercâmbio de zoonoses, que podem ser transmitidas de animais para humanos e vice-versa. A transmissão de zoonoses pode ocorrer por contato direto e indireto, vetores, alimentos e água contaminada. Os agentes envolvidos em zoonoses são diversos, incluindo, vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos e artrópodes (LIMA-CAMARA, 2016; ZANELLA, 2016; CDC, 2021; BARBOSA *et al.*, 2022; WOAAH, 2023).

Segundo a Instrução Normativa 50 de 24 de setembro de 2013, que determina as doenças de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial, as doenças como febre do Nilo Ocidental, influenza aviária, encefalomielite equina venezuelana e doença de Newcastle requerem notificação imediata de qualquer caso suspeito (BRASIL, 2013). O Instituto Mineiro de Agropecuária -IMA é o órgão responsável pela execução dos programas sanitários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA no Estado de Minas Gerais (COSTA *et al.*, 2015). Dentre estas diversas doenças que acometem aves, vale-se notar as causadoras de transtornos neurológicos uma vez que esses transtornos são importantes causas de morte em animais jovens, além de perdas econômicas em diversos setores de produção

como doença de Marek e doença de Pacheco (BENNETT, 1994; JONES; OROSZ, 1996; MARUSAK *et al.*, 2010; HEDLEY *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho foi determinar a ocorrência de encefalites, além de identificar lesões e material genético compatível com infecção por vírus em amostras de sistema nervoso central de espécies de aves nativas e exóticas.

2.2 Objetivos específicos

Analisar a presença dos seguintes agentes infecciosos virais que causam doença neurológica em aves. O agente foi detectado ou não por meio de biologia molecular, PCR convencional e/ou tempo real e sequenciamento, quando cabível. Os agentes pesquisados foram vírus de RNA e DNA, tendo-se West Nile virus (WNV), encefalites equinas por Flavivirus e Alphavirus, influenza A, Bornavírus aviário (ABV) e doença de Newcastle (NDV) como os agentes de RNA. Os vírus, que apresentam DNA como material genético, pesquisados foram, doença de Pacheco (PDV) e Adenovírus aviário, tendo como foco áreas conservada de aviadenovirus, especialmente Adenovírus de faisões.

3. CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: ENCEFALITES AVIÁRIAS COM ENFOQUE NAS CAUSAS VIRAIS

3.1. Encefalites equinas

Os arbovírus (*arthropod-borne virus*) são vírus transmitidos para humanos e outros vertebrados por meio da transmissão biológica, picada, de mosquitos hematófagos, principalmente os da família Culicidae, gênero *Culex* (SILVA *et al.*, 2014). Dentre os arbovírus causadores de encefalites têm-se os vírus do gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae e os *Alphavirus* da família Togaviridae. No gênero *Flavivirus* a enfermidade mais conhecida é West Nile Virus (WNV), já em *Alphavirus* têm-se o Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), Encefalite Equina do leste (EEEV) e Encefalite Equina do Oeste (WEEV). Arbovírus são vírions esféricos que apresentam RNA de fita simples em sentido positivo, com capsídeo proteico e esférico com projeções na superfície, medindo entre 40 e 70 nm de diâmetro e genoma de aproximadamente 11 kb (FIGUEIREDO, 2000; COLPITTS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014; GIL *et al.*, 2021; ICTV, 2023).

O Brasil é um amplo país de clima tropical, com diferentes ecossistemas, fauna e flora, e apresenta uma ampla diversidade de aves migratórias e de mosquitos *Culex* sp. e *Aedes* sp. (OMETTO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014). A associação de fatores como o clima, pluviosidade, diversidade de aves e vetores favorece a presença de arboviroses, sendo as infecções causadas por *Flavivirus* listada entre as doenças com maior taxa de incidência no mundo (BURGUEÑO *et al.*, 2013; OMETTO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014). Os arbovírus como VEEV, WEEV, EEEV e WNV são etiologias de importância para a saúde pública nas Américas e o último já foi reportado em algumas regiões do Brasil, sendo o primeiro relato em 2004 em um equino soropositivo para WNV. Nas outras encefalites foram detectados anticorpos e vírus, com isolamento viral (OMETTO *et al.*, 2013; GIL *et al.*, 2021; WEBER *et al.*, 2021). O WNV apresenta elevada importância para a saúde pública, sendo atualmente, dentre os vírus do gênero, o com maior capacidade de disseminação, uma vez que está em rápida expansão pelas Américas desde 1999 (DIAZ *et al.*, 2008; OMETTO *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2020).

Espécies de aves das ordens Passeriformes, Charadriiformes e Falconiformes atuam como hospedeiros amplificadores (OMETTO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2020; WEBER *et al.*, 2021). Sendo, portanto, importante fonte replicadora para a transmissão vetorizada de WNV, sendo altas cargas virais carregadas em fezes, secreções orais, podendo facilitar a transmissão por contato direto entre aves e humanos (SILVA *et al.*, 2014; COSTA

et al., 2020). Em aves, o vírus realiza o pico de viremia em 7 dias, desta forma, a transmissão de WNV ocorre entre aves nativas ou que migram por curtas distâncias e os sinais clínicos podem variar entre sinais nervosos e morte (COLPITTS *et al.*, 2012; OMETTO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2020). A transmissão fecal-oral ocorre em regiões da América do Norte em corvo-americano (*Corvus brachyrhynchos*) devido à aglomeração destes animais em locais de hibernação, facilitada pela auto-limpeza e limpeza de outras aves (*allopreen*), e à baixa atividade de vetores durante o inverno (HINTON *et al.*, 2015). Em contrapartida, mamíferos como humanos e cavalos não são transmissores, sendo considerados hospedeiros acidentais ou terminais, uma vez que a viremia nestas espécies não é suficiente para a infecção do mosquito no momento do repasto sanguíneo (COLPITTS *et al.*, 2012; OMETTO *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2020).

A infecção pode resultar em sinais clínicos diversos, que variam entre sinais nervosos e morte como febre, mialgia e morte em humanos, e sinais nervosos por encefalite em equinos (COLPITTS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014). Já em aves, a invasão viral no sistema nervoso central e/ou outros órgãos como fígado, baço, rim e coração, são determinantes para que ocorra a doença clínica em que são predominantes os sinais neurológicos. Desta forma, em aves infectadas nota-se ataxia, paralisia, movimentos de pedalagem, torcicolo, opistótono, incoordenação, convulsão, depressão, letargia, desidratação, penas arrepiadas, diarreia hemorrágica e elevada taxa de mortalidade e até mesmo ausência de sinais. Por serem vírus de elevado pantropismo, não há lesões macroscópicas patognomônicas, sendo observada emaciação, petéquias, congestão, esplenomegalia, hepatomegalia, atrofia cerebral e malácia. Dessa mesma forma, as lesões microscópicas estão presentes nos órgãos afetados, notando-se infiltrados inflamatórios, degeneração, necrose celular e hemorragias. As aves da família Corvidae, ordem Passeriformes, são mais suscetíveis à infecção (DEIN *et al.*, 1986; VEAZEY *et al.*, 1994; GAMINO; HÖFLE, 2013).

O diagnóstico da infecção é baseado nos sinais clínicos e testes indiretos como o teste de ELISA, inibição da hemaglutinação, e testes diretos como detecção do genoma viral por meio de RT-PCR e isolamento viral. O teste para a detecção de anticorpos por ensaio imunoenzimático (ELISA) pode apresentar reação cruzada com outros vírus do gênero como encefalite viral japonesa, encefalite de Saint Louis e Dengue (COLPITTS *et al.*, 2012). O diagnóstico diferencial inclui doenças com acometimento do sistema nervoso central como influenza e paramyxovirus. Não existe um tratamento específico para combater a infecção por WNV, como compostos antivirais, sendo somente realizada a terapia suporte (COLPITTS *et al.*, 2012; OMETTO *et al.*, 2013; BRASIL, 2023).

Em 2003 foi criado no Brasil o Sistema Nacional de Vigilância da Febre do Nilo Ocidental, que realiza a triagem sorológica dos vetores e sentinelas da doença, assim como recomendado pela Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS e Organização Mundial da Saúde - OMS (COSTA *et al.*, 2020). O foco da prevenção no país é centrado no controle de população de mosquitos como, uso de inseticidas e evitar água parada, uma vez que a importação de vacinas e utilização em animais não é autorizada pelo Ministério da Agricultura (COLPITTS *et al.*, 2012; OMETTO *et al.*, 2013; BRASIL, 2023).

3.2. Influenza aviária

A influenza aviária (*Avian Influenza Virus – AIV*) causada pelo vírus influenza A, do gênero *Alphainfluenzavirus*, família *Orthomyxoviridae* foi descrita pela primeira vez em 1878, sendo no século XX quatro pandemias em seres humanos (MORAES *et al.*, 2020; ICTV, 2023). Os integrantes de *Orthomyxoviridae* são vírus esféricos, envelopados, com RNA segmentado de fita simples em sentido negativo de 200 nm de diâmetro e genoma composto em 8 segmentos (SUAREZ, 2016; ICTV, 2023). O envelope viral, adquirido durante a saída da célula hospedeira, é derivado de setores da membrana citoplasmática do hospedeiro e contém as glicoproteínas, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) (CHEUNG; POON, 2007; ICTV, 2023).

O vírus da influenza é classificado em três tipos A, B e C, em que todos podem infectar humanos; porém o tipo A é o único com evidência de infectar aves, além de possuir potencial zoonótico e infectar mamíferos aquáticos e terrestres (CHEUNG; POON, 2007; MORAES *et al.*, 2020; ICTV, 2023). Além dessa classificação, tem-se a divisão do AIV em vírus de influenza aviária de alta patogenicidade – HPAIV (*Highly Pathogenic Avian Influenza Virus*) e Influenza aviária de baixa patogenicidade – LPAIV (*Low Pathogenic Avian Influenza Virus*). Para ser considerada uma HPAIV, é necessário que o vírus apresente Índice de Patogenicidade Intravenoso (IPIV) maior que 1,2 (entre 0,0 e 3,0) ou que seja letal para no mínimo 6 de 8 galinhas entre 4 a 6 semanas de idade. Mas, deve-se ter em mente que o valor mencionado é específico para galinhas, ou seja, este índice varia de valor conforme cada espécie (MORAES *et al.*, 2020; BRASIL, 2021; ICTV, 2023; WOAHA, 2023).

O vírus da influenza aviária apresenta complexa epidemiologia uma vez que pode infectar diferentes espécies de aves e mamíferos como cavalo, suínos, cães, morcegos e humanos (SUAREZ, 2016; MORAES *et al.*, 2020). Embora de distribuição mundial, é uma doença exótica para a avicultura industrial brasileira. Em contrapartida, as aves silvestres nativas são susceptíveis à infecção natural e algumas espécies podem atuar como sentinelas

para o vírus de alta patogenicidade (CHEUNG; POON, 2007; MORAES *et al.*, 2020; BRASIL, 2021; ICTV, 2023). Os vírus da gripe aviária já foram isolados de mais de 100 espécies de aves selvagens de 15 ordens, sendo as aves aquáticas migratórias, como gansos e patos, consideradas reservatórios do vírus, tipicamente LPAIV. Nos animais reservatórios ocorre a manutenção e surgimento de diferentes variantes além da eliminação viral via fezes devido à replicação em células gastrointestinais. Portanto, essas aves são uma fonte de infecção para animais domésticos e silvestres. Outro fator que aumenta a complexidade epidemiológica do vírus é o fato de se tratar de um vírus com alta capacidade mutagênica e rearranjo genético (*drift e shift* antigênico), facilitado pela troca entre segmentos de diferentes origens durante a co-infecção (CAUSEY; EDWARDS, 2008; KRAUSS; WEBSTER, 2010; MORAES *et al.*, 2020). Na América Latina, cerca de 50% dos casos de influenza aviária tiveram relação com a migração de aves da ordem Anseriformes, como gansos e patos, e Charadriiformes, como gaivotas e outras aves marinhas (KRAUSS; WEBSTER, 2010; MORAES *et al.*, 2020).

A transmissão ocorre de forma horizontal por contato direto, inalação ou ingestão de quaisquer secreções e água contaminadas; por fômites como roupas, veículos, pessoas, cama de aviários contaminada e a proximidade entre aves infectadas e susceptíveis. Os principais fatores que contribuem para a transmissão são presença de aves migratórias ou silvestres em criações de galinhas, globalização, comércio internacional especialmente as criações domésticas extensivas em regiões de rotas migratórias (MORAES *et al.*, 2020; BRASIL, 2021). A adsorção viral à célula do hospedeiro é possível uma vez que haja afinidade entre ambos, esta afinidade é determinada pelo receptor hemaglutinina do envelope viral. Assim, o vírus se liga aos receptores de ácido siálico com galactose polimerizada em ligações α -2,3 presentes no epitélio respiratório inferior de humanos, e intestinal de aves. As estirpes de alta patogenicidade (HPAIV) têm repetições de aminoácidos básicos (arginina e lisina) no sítio de clivagem da hemaglutinina (HA) em um número restrito de células, o que permite o reconhecimento e ativação por enzimas no complexo de Golgi, desta forma a infecção se torna local. Após a clivagem, a HA participa da penetração viral na célula hospedeira pela fusão do envelope às membranas celulares, sendo ativado em uma variedade de células, causando infecção sistêmica. Já as estirpes de baixa patogenicidade (LPAIV) não contém o sítio de aminoácidos básicos múltiplos e não sofrem a ativação intracelular, dependendo da ação de tripsinas para infecção (ROTT *et al.*, 1992; STIENEKE-GRÖBER *et al.*, 1992; VEY *et al.*, 1992; WOOD *et al.*, 1993; MORAES *et al.*, 2020).

A transmissão do vírus de influenza aviária para humanos já foi confirmada em diversas partes do mundo. Exemplos desses subtipos são H5N1 detectado inicialmente em 1996 na China e H7N9 que já foi relacionado à diversas mortes de pessoas na China (ZEITLIN; MASLOW, 2005; CAUSEY; EDWARDS, 2008; BUCHY *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2014; WOAAH, 2023). Outro subtipo de importância é o H1N1, causador de pandemia em humanos em 2009, inicialmente nos EUA, México, Canadá e depois no mundo, também observado em suínos no Brasil e detectado em aves. A maioria dos casos humanos resultou do direto contato com aves infectadas ou superfícies contaminadas (GIRARD *et al.*, 2010; SCHAEFER *et al.*, 2011; WOAAH, 2023). Esta infecção se torna possível, uma vez que muitas aves possuem receptores imunológicos semelhantes/ idênticos aos receptores de mamíferos, sendo, portanto, reservatórios zoonóticos de doenças (ZEITLIN; MASLOW, 2005; CAUSEY; EDWARDS, 2008). Até o momento, todos os 18 subtipos de HA e 11 de NA descritos foram identificados em aves (exceto H17 e 18, identificados em morcegos), alguns destes afetando também mamíferos (ZEITLIN; MASLOW, 2005; ALVAREZ *et al.*, 2010; MASSIN *et al.*, 2010; SULLIVAN *et al.*, 2010; TONG *et al.*, 2013; WOAAH, 2023).

Assim sendo, os sinais clínicos nas espécies acometidas dependem da estirpe viral envolvida e variam de leves a graves com taxa de mortalidade e morbidade variando entre 1 a 100%, sendo o período de incubação de poucas horas a dias. Outros fatores como virulência, idade do animal, espécie afetada, comorbidade, imunossupressão, fatores ambientais também interferem nos sinais clínicos. As estirpes AIV de baixa patogenicidade necessitam de maior carga viral para promover infecção no epitélio da traqueia, resultam em sinais respiratórios e digestivos inaparentes, embora as co-infecções possam aumentar a gravidade em sinais e lesões. Já o vírus de alta patogenicidade, por ativação prévia da glicoproteína de fusão, apresentam pantropismo e a infecção é possível com baixa quantidade viral. Animais infectados por variante de alta patogenicidade podem apresentar sinais nervosos, como tremores de cabeça, torcicolo e opistótono, além de edema de face e cabeça, cianose de barbelas, sinais respiratórios e queda na postura de ovos (MORAES *et al.*, 2020; ICTV, 2023; WOAAH, 2023; MARTINS, 2001). As lesões macroscópicas são variáveis, mas podem-se observar lesões como edema, focos fibrino-necróticos e hemorragia em mucosas e serosas em órgãos, edema de cabeça e pata, congestão pulmonar (MORAES *et al.*, 2020).

O diagnóstico oficial é feito no LANAGRO (Laboratório Nacional de Referência do MAPA) de casos clínicos suspeitos e depende de diagnóstico laboratorial, com isolamento e caracterização viral. Podem ser realizados, inoculação em ovos embrionados de galinhas SPF (*Specific Pathogen Free*), teste de imunodifusão em ágar gel (IDGA), inibição de

hemaglutinação, *real-time* RT-PCR para a detecção e análise do material genético, cultivo celular em células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney Cells*). O diagnóstico diferencial deve ser realizado entre paramyxovirus como a doença de Newcastle, coccidioses, coriza infecciosa, laringotraqueíte, pasteurelose (MORAES *et al.*, 2020; WOAAH, 2023).

Segundo o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), para o controle e prevenção da doença é necessário que medidas de biossegurança e biosseguridade sejam tomadas por meio do isolamento de aves positivas, limpeza e desinfecção do ambiente e isolamento de aves de granjas de aves silvestres. O vírus da influenza é pouco estável, sendo sensível a desinfetantes, solventes orgânicos e aniônicos, calor, pH extremo, ambientes extremamente secos. A vacinação de aves é proibida no Brasil, uma vez que o vírus não está presente em aves comerciais e o diagnóstico definitivo é somente possível após isolamento e identificação da estirpe envolvida no surto, não sendo também suficiente sem a aplicação das outras medidas de controle (MATHIEU *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2020; BRASIL, 2021; WOAAH, 2023). Por se tratar infecção com potencial zoonótico e de alto impacto econômico a notificação deve ser encaminhada à Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) e a imediata erradicação do foco após o diagnóstico laboratorial deve ser adotada para a conformidade internacional. Além de realizar vigilância ativa, com monitoramento contínuo dos plantéis comerciais e de regiões com população de aves migratórias para prevenir a introdução da doença (MORAES *et al.*, 2020; FEITOSA JUNIOR *et al.*, 2020; BRASIL, 2021; WOAAH, 2023).

3.3. Bornavírus

O *Bornavirus* é um vírus de RNA fita simples não segmentado de polaridade negativa pertencente à família Bornaviridae que possui 3 gêneros e 12 espécies. Se trata de um vírus de com cerca de 80 nm de diâmetro, envelopado, com genoma de aproximadamente 8,9 kb. Entre os integrantes da ordem Mononegavirales, é o único com replicação no núcleo da célula. O Bornavírus aviário possui heterogeneidade genética sendo atualmente conhecidos sete genótipos diferentes ABV-1 – ABV-7, destes ABV-2 e 4 são os mais comuns (WEISSENBOCK *et al.*, 2009; PAYNE *et al.*, 2012; ICTV, 2023). É um agente de encefalite, tendo cavalos e ovelhas como hospedeiros naturais (KISTLER *et al.*, 2008).

A família Bornaviridae compreende dois grupos, Bornavírus clássico (BDV) e o Bornavírus aviário (ABV). O BDV é causador de doença neurológica em equinos e ovinos, sendo mais restrito à Europa central, em contrapartida, o Bornavírus aviário é responsável pela síndrome da dilatação do proventrículo (*Proventricular Dilatation Disease* - PDD) em

aves e já foi descrita em países como Japão, Estados Unidos, Israel, Canadá, Austrália e Brasil (KISTLER *et al.*, 2008, SASSA *et al.*, 2013; DONATTI *et al.*, 2014; RASO, 2014). O Bornavírus clássico pode infectar diversos animais como roedores, galinhas e seres humanos, mas, em grande parte dos casos não ocorre o desenvolvimento da doença, uma vez que o vírus apresenta poucos efeitos no funcionamento da célula infectada. Porém, alguns animais infectados podem desenvolver sinais neurológicos progressivos que variam de acordo com a espécie infectada e idade do animal. Apesar do conhecimento a respeito da patologia, é um vírus de epidemiologia não bem definida, sendo detectado em diversos órgãos e presente em secreções orais, fezes e ovos (PAYNE *et al.*, 2012, GONÇALVES, 2020). Por sua vez, a síndrome da dilatação do proventrículo é uma doença neurológica fatal que afeta principalmente aves da ordem Psittaciformes, sendo também possível a infecção de espécies de outras ordens como canários, gansos, patos, rapinantes, tucanos e gaivotas (KISTLER *et al.*, 2008; WEISSENBOCK *et al.*, 2009; PAYNE *et al.*, 2012; HOPPES *et al.*, 2013).

A transmissão do Bornavírus aviário ocorre primariamente via fecal oral por meio da eliminação de partículas virais nas excretas como urina e fezes de animais infectados (RINDER *et al.*, 2009; MONACO *et al.*, 2012; RASO, 2014). A transmissão vertical foi demonstrada em estudo realizado em ovos de psitacídeos, encontrando-se a presença do vírus em alguns dos ovos testados e em tecido cerebral de dois embriões (MONACO *et al.*, 2012; RASO, 2014). A síndrome da dilatação do proventrículo tem relevância na conservação de psitacídeos em cativeiro e vida livre, sendo considerada uma ameaça para criação dessas aves em todo o mundo (KISTLER *et al.*, 2008; SASSA *et al.*, 2013; DONATTI *et al.*, 2014).

A infecção pelo Bornavírus aviário não se restringe ao sistema nervoso, desta forma a ave afetada pode apresentar sinais gastrointestinais e/ou neurológicos (RINDER *et al.*, 2009). Como sinais neurológicos podem ocorrer fraqueza, déficit proprioceptivo, cegueira, ataxia e convulsões. Porém, algumas aves não apresentam sinais clínicos, sendo importantes na transmissão para espécies mais suscetíveis. A síndrome da dilatação do proventrículo também afeta a inervação autônoma do sistema digestório, acometendo órgãos como esôfago, papo, proventrículo, ventrículo e duodeno. A dilatação ocorre pela não motilidade do órgão que resulta em compactação da ingesta, com conseqüente deficiência de digestão e absorção de nutrientes (KISTLER *et al.*, 2008; SASSA *et al.*, 2013; RASO, 2014). Outros sinais observados são emagrecimento progressivo, regurgitação, estase de papo, dilatação proventricular e intestinal, presença de alimento não digerido nas fezes, diarreia, evoluindo para o óbito. Macroscopicamente é possível notar dilatação de esôfago e proventrículo, atrofia de musculatura ventricular (PAYNE *et al.*, 2012; HOPPES *et al.*, 2013; RASO, 2014).

O diagnóstico presuntivo é feito de acordo com o histórico e sinais clínicos e o diagnóstico definitivo baseia-se nas lesões macroscópicas, histopatologia, isolamento viral, detecção molecular do genoma através do RT-PCR, imunohistoquímica, imunofluorescência indireta (IFI), *Western blot* ou ELISA. Na histopatologia, observa-se infiltração mononuclear nos gânglios nervosos, infiltrados linfoplasmatócitos em plexos nervosos do sistema nervoso central e gastrointestinal, encefalite e mielite. Porém, a distribuição variável das lesões pode dificultar o diagnóstico (OUYANG *et al.*, 2009; RASO, 2014; GONÇALVES, 2020). Para diagnóstico diferencial considera-se doença de Newcastle, megabacteriose, impactação gástrica, corpos estranhos, papilomatose intestinal, intoxicação por metal pesado e neoplasias (OUYANG *et al.*, 2009; RASO, 2014; GONÇALVES, 2020).

Estudos têm avaliado a possibilidade de tratamento com antivirais e anti-inflamatórios, buscando a sobrevivência da ave doente. O prognóstico para essa enfermidade é desfavorável e alguns protocolos de tratamento foram testados, porém, mais estudos são necessários para a avaliação das estratégias de tratamento (HOPPES *et al.*, 2013; RASO, 2014). 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, quarentena, cuidados adicionais na incubadora, principalmente de aves clinicamente doentes, são fundamentais (HOPPES *et al.*, 2010; MONACO *et al.*, 2012; RASO, 2014).

3.4. Doença de Newcastle e outros Paramyxovirus

O vírus da doença de Newcastle (VDN) é do gênero *Orthoavulavirus* e pertence à família Paramyxoviridae e subfamília Avulavirinae, sendo dividido em *Orthoavulavirus* aviário tipo 1 (avian *Orthoavulavirus* type 1 – *AOAv-1*) acometendo aves domésticas e silvestres e sua variante Paramyxovirus de pombos sorotipo 1 (PPMV-1) tendo Columbiformes como hospedeiros naturais, podendo acometer outras aves (MAPA, 2022; ICTV, 2023). É um vírus esférico, envelopado, de RNA de fita simples de sentido negativo, de aproximadamente 150 a 200 nm de diâmetro, com capacidade de hemaglutinação. O RNA tem 15000 nucleotídeos codificantes de seis genes sendo, nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), matriz (M), fusão (F), hemaglutinina-neuraminidase (HN) e polimerase (L). Destes genes, a fosfoproteína, a nucleoproteína e a polimerase fazem parte do complexo polimerase que é responsável pela replicação do genoma viral. Já a HN é responsável pela adsorção ao receptor celular do hospedeiro e a clivagem do mesmo receptor e a glicoproteína de fusão responsável pela fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira (ORSI; FERREIRA, 2020;

WOAH, 2023). A doença de Newcastle, uma das doenças virais mais importantes em aves, é uma infecção viral altamente contagiosa de distribuição mundial, sendo endêmica em diversos países desde a sua descrição em 1926, em Newcastle, Inglaterra. É responsável por grandes perdas econômicas no setor avícola mundial, tanto por perdas diretas na mortalidade dos animais, quanto em relação às barreiras sanitárias impostas na comercialização (FERNANDES *et al.*, 2009; SNOECK *et al.*, 2013; ORSI; FERREIRA, 2020; BRASIL, 2021). Tem-se aves selvagens como reservatório natural do vírus de baixa virulência e as aves domésticas como reservatórios de estirpes virulentas. Dessa forma, aves silvestres são as mais importantes quando se analisa a possível introdução do agente no território brasileiro, uma vez que o país detém grande população dessas aves e ausência de fronteiras para aves migratórias (SNOECK *et al.*, 2013; PRINZ *et al.*, 2020; BRASIL, 2021).

A principal forma de transmissão dos paramyxovirus é a horizontal por meio de aerossóis respiratórios de aves infectadas, ingestão de vírus em equipamentos ou ração contaminados com secreções ou contato com fezes de aves infectadas. Sendo a transmissão indireta por meio de contato com fômites também possível. As aves selvagens e domésticas são consideradas os hospedeiros naturais do vírus, detectado em mais de 250 espécies, sendo perus e pombos mais resistentes e frangos mais sensíveis à infecção pelo vírus (ORSI; FERREIRA, 2020; ONO *et al.*, 2021). As aves de rapina podem se infectar por meio de ingestão de carcaças contaminadas, já em avestruzes a transmissão é dependente do contato direto dos animais com secreções, não ocorrendo por via aerógena (FERNANDES *et al.*, 2009; ORSI; FERREIRA, 2020). O período de incubação é de 21 dias, podendo variar em relação à idade, saúde e espécie do hospedeiro (ORSI; FERREIRA, 2020; WOAHA, 2023).

O *Orthoavulavirus* aviário tipo 1 pode infectar mais da metade das ordens de aves sendo dividido em 5 patotipos de acordo com os sinais clínicos observados em galinhas infectadas, sendo viscerotrópico velogênico, neurotrópico velogênico, mesogênico, lentogênico e forma assintomática. O primeiro, é altamente patogênico, causando lesões intestinais hemorrágicas agudas e até 100% de mortalidade; já o neurotrópico velogênico, apresenta sinais respiratórios e neurológicos graves seguidos de mortalidade de 50% e 100% de morbidade. Os vírus mesogênicos causam sinais respiratórios e neurológicos e uma mortalidade de menos de 10%, sendo mais comum em aves jovens. Por fim, o vírus lentogênico ou respiratório assintomático causa infecção respiratória subclínica, e já foi isolado em aves aquáticas e outras ordens; e a forma assintomática apresenta infecção entérica sem sinais clínicos evidentes (ORSI; FERREIRA, 2020; ONO *et al.*, 2021; MAPA, 2022; WOAHA, 2023). Sendo variáveis e determinados pelo subtipo envolvido na infecção, os sinais

clínicos observados são edema de olhos e cabeça, incoordenação motora, opistótono, torcicolo, corrimento nasal, conjuntivite e até 100% de mortalidade nos animais acometidos. A variabilidade dos sinais é também dependente da estirpe e carga viral, além da espécie acometida (ORSI; FERREIRA, 2020; WOAAH, 2023). Macroscopicamente a doença causa hemorragia, aumento de volume e necrose em órgãos viscerais como faringe, traqueia, timo, baço, tonsilas cecais, proventrículo e olhos. Não sendo observadas lesões macroscópicas em sistema nervoso mesmo em aves com sinais neurológicos. Já microscopicamente é possível observar lesões multifocais de infiltrado mononuclear perivascular associado à hiperplasia ou hipertrofia do epitélio vascular, gliose moderada e necrose multifocal em células de Purkinje (ORSI; FERREIRA, 2020; WOAAH, 2023).

O Paramyxovirus tipo 3 (APMV-3), atualmente classificado como Paraavulavirus aviário 3 pelo ICTV (2023), se trata de outro paramyxovirus de importância, sendo também integrante da subfamília Avulavirinae e família Paramyxoviridae. O APMV-3 foi isolado pela primeira vez em 1968 em Wisconsin em perus, sendo posteriormente isolado no Brasil em aves migratórias, podendo também ser isolado em aves terrestres e aquáticas. (KUMAR *et al.*, 2010; GOGOI *et al.*, 2015). Tem-se o Cormorão-de-crista-dupla (*Phalacrocorax auritus*), pombos e patos selvagens como reservatórios de APMV na população de aves selvagens, mas, sabe-se muito pouco em relação às cepas isoladas nessas espécies (KUMAR *et al.*, 2010; GOGOI *et al.*, 2015). A doença está associada à encefalite e alta mortalidade em animais mantidos em cativeiro e à doença respiratória em perus. Já em aves da ordem Passeriformes e Psittaciformes está associado à pancreatite aguda e sintomas nervosos (KUMAR *et al.*, 2010). Além desses sinais, animais infectados pelo vírus também podem apresentar torcicolo, opistótono, ataxia e esteatorreia (CATROXO *et al.*, 2012).

Os paramyxovirus podem sobreviver indefinidamente em materiais congelados, mas, são sensíveis a altas temperaturas (ORSI; FERREIRA, 2020). Para todos os paramyxovirus o diagnóstico definitivo é apenas laboratorial, tendo o isolamento em ovos embrionados como o padrão ouro de diagnóstico. Outras técnicas como ELISA, RT-PCR convencional ou em tempo real, prova de hemaglutinação seguida de inibição de hemaglutinação também podem ser realizadas. O sequenciamento genético da região que codifica a glicoproteína de fusão deve ser realizado para determinar a virulência da estirpe viral. É importante realizar o diagnóstico diferencial entre os paramyxovirus aviários, influenza, encefalites equinas, adenovírus, laringotraqueíte infecciosa, entre outros (ORSI; FERREIRA, 2020; WOAAH, 2023).

Para o controle de paramyxovirus é necessário um conjunto de medidas, incluindo biosseguridade, vigilância epidemiológica, correto diagnóstico e vacinação, sendo este somente para a doença de Newcastle (ORSI; FERREIRA, 2020; MAPA, 2022; WOA, 2023). Dentre as cepas vacinais mais utilizadas durante os últimos 60 anos tem-se LaSota e B1, que são vírus de classe II, genótipo II. A vacinação protege contra morbidade e mortalidade em galinhas, mas não previne a infecção e replicação viral. Dessa forma, os vírus circulantes podem ser disseminados silenciosamente entre as aves de produção vacinadas e aves selvagens de vida livre, por meio de mutação a partir de cepas de baixa virulência. Exemplos são os relatos de vírus lentogênicos altamente semelhantes à estirpe LaSota em aves aquáticas selvagens em países como China, Índia, Malásia, Argentina e França (GARCIA *et al.*, 2013; MILLER *et al.*, 2013; SNOECK *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2022). Segundo WOA (2021), a notificação e erradicação de casos da doença são obrigatórias. Desta forma, o controle oficial no Brasil é realizado pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo exótica na avicultura industrial, com último caso relatado em 2006 (PRINZ *et al.*, 2020; BRASIL, 2021). No Brasil, o serviço veterinário oficial realiza coletas de amostras para pesquisa de influenza aviária e doença de Newcastle em populações domésticas de subsistência que vivem em um raio de 10 km de sítios de aves migratórias. Também ocorre a vigilância passiva, em que são realizadas coletas de amostras em aves silvestres/ migratórias, doentes ou recentemente mortas (BRASIL, 2002; MAPA, 2022).

3.5. Doença de Marek

O vírus da doença de Marek pertence ao gênero *Mardivirus*, da família Orthoherpesviridae e sub-família Alphaherpesvirinae. São vírions envelopados, pleomórficos, com DNA linear de dupla fita de aproximadamente 160 - 180 kpb, geralmente encontrado no núcleo da célula hospedeira (ICTV, 2023; WOA, 2023). O genoma é responsável pela codificação de mais de 200 genomas, sendo um deles o meq que está relacionado à patogenicidade viral. É um vírus com três sorotipos que possuem estruturas genômicas semelhantes, dois de galinhas, *Gallid herpesvirus 2* (sorotipo 1, patogênico), *Gallid herpesvirus 3* (sorotipo 2, não patogênico) e um vírus não patogênico de perus, *Meleagrid herpesvirus 1* ou Herpesvírus de perus (HVT) (sorotipo 3). Destes, o sorotipo 1, oncogênico, é o responsável pela doença de Marek, sendo a proteína oncogênica codificada pela fosfoproteína meq. A distinção das diferentes variantes deste vírus é realizada por meio da presença de maior número de repetições de 132 pares de bases em variantes virulentas. Desta

forma, cepas virulentas (virulenta, vMDV; altamente virulenta, vvMDV; altamente virulenta mais vv+MDV) possuem menor repetição desta sequência e o inverso ocorre em formas menos virulentas (mMDV - levemente virulenta) (TORRES *et al.*, 2019; BARBOSA; COLVERO, 2020; ICTV, 2023; WOAAH, 2023).

A doença de Marek, notificada pela primeira vez em 1907 por Jozsef Marek, é uma doença de distribuição mundial, sendo responsável por grandes perdas econômicas para o sistema produtivo avícola. É uma infecção neuropática e linfoproliferativa causada por um Herpesvírus aviário (BLUME *et al.*, 2016; BARBOSA; COLVERO, 2020; WOAAH, 2023). A galinha é o hospedeiro natural, mas também há descrição em faisões, perus, codornas, pavão-branco e aves aquáticas como gansos selvagens e patos. A transmissão para aves livres e aves migratórias pode ser considerada, apesar de ser mais prevalente em aves mantidas em cativeiro (MURATA *et al.*, 2007; BLUME *et al.*, 2016; BARBOSA; COLVERO, 2020; WOAAH, 2023). Não ocorrendo de forma vertical, a transmissão se dá por contato direto e indireto por meio da inalação de aerossóis originados de penas e fezes que podem infectar o ambiente por meses. Após a infiltração na célula hospedeira, o vírus é transferido entre células por meio de pontes intracelulares podendo passar pelas transformações produtiva, latente e/ou transformante, em todas essas formas, o genoma vírus pode ser encontrado junto ao cromossoma do hospedeiro. Por se tratar de um herpesvírus a forma latente (não produtiva) em que o animal não apresenta sinais clínicos, porém, transmite para outros animais, é comum. Nesta forma, a infecção dos reservatórios ocorre por tempo indefinido. O contrário é observado na forma produtiva, uma vez que há a replicação do DNA, com produção de antígenos e partículas virais com consequente produção de vírions infecciosos em células foliculares de pena e não infecciosos em células somáticas. Por fim, na forma transformante a integração do genoma em linfócitos T resulta em expressão do genoma viral e transformação não necessária à replicação viral. O período de incubação é dependente de virulência, dose, quantidade de anticorpos maternos, sexo e comorbidades. Sendo a paralisia de membros observada em aves entre 4 a 10 semanas de idade (BARBOSA; COLVERO, 2020; WOAAH, 2023).

Os sinais clínicos da enfermidade são inespecíficos e variam de ave para ave, uma vez que o vírus realiza infiltração tumoral e inflamação em células de diversos tecidos como nervos periféricos, gônadas, íris, órgãos linfóides, coração e pele. Os principais sinais observados são imunossupressão, palidez, paralisia progressiva e unilateral de pernas e asas, atrofia muscular, ataxia, torcicolo, incoordenação, depressão, cegueira podendo evoluir para morte. Na doença de Marek clássica observa-se o aumento de nervos periféricos, como o

nervo vago na região proventricular/ ventricular, que irão apresentar opacidade, perda de estrias e coloração acinzentada ou amarelada. Dentre as alterações macroscópicas tem-se esplenomegalia, tumores viscerais, não sendo notadas alterações macroscópicas no sistema nervoso central (TORRES *et al.*, 2019; BARBOSA; COLVERO, 2020; WOA, 2023).

O diagnóstico definitivo, principalmente para o sorotipo 1, é possível após 1 a 2 dias pós-infecção, sendo realizado por meio da técnica de PCR e imunohistoquímica para a detecção de DNA e antígenos do vírus na lesão. O isolamento em células de rim de galinha e fibroblastos de embrião de pato também pode ser utilizado, assim como ELISA de captura, ágar gel de imunoprecipitação e vírus-neutralização. O PCR é um importante método para a identificação da virulência e a estirpe viral envolvida e diferenciação entre infecção por leucose aviária e reticuloendoteliose (BARBOSA; COLVERO, 2020; WOA, 2023).

O controle e prevenção, uma vez que não existe tratamento para a doença, são realizados por meio de medidas de biossegurança e desinfecção do ambiente. A desinfecção do ambiente é possível com o uso de desinfetantes como amônia quaternária, cloro, iodo orgânico, uma vez que o vírus é inativado após 10 minutos nestas substâncias. Atualmente, a vacinação de aves de produção, obrigatória no Brasil, ocorre com dose multivalente ou polivalente de diferentes sorotipos e gera proteção de 90% do lote, diminuindo a taxa de mortalidade. Porém, a vacina, cruciais para prevenção de doença na produção animal, apresenta riscos à vida de aves selvagens. Uma característica vacinal importante para este aspecto é a atenuação e vetorização presentes na vacina de Marek, uma vez são facilitadores para a ocorrência de recombinação viral. Esta recombinação viral trás como consequências o aumento da virulência da cepa, maior replicação viral e maior transmissão (READ *et al.*, 2015; DEVLIN *et al.*, 2016; TORRES *et al.*, 2019; BARBOSA; COLVERO, 2020; WOA, 2023).

3.6. Doença de Pacheco

Assim como *Gallid herpesvirus 1*, o vírus da doença de Pacheco pertence ao gênero *Mardivirus*, da família *Orthoherpesviridae* e sub-família *Alphaherpesvirinae*, logo, ambos os vírus compartilham das características estruturais semelhantes. O vírus é denominado Herpesvírus de psitacídeos (PsHV - *Psittacid herpesvirus*) e apresenta três sorotipos PsHV1, PsHV2 e PsHV3, sendo PsHV1 o causador de enfermidade em psitacídeos. É uma doença de altamente transmissível de ocorrência mundial (BARBOSA *et al.*, 2022; ICTV, 2023).

Tem-se os Psittaciformes como hospedeiros da doença, dentre esses os papagaios (*Amazona spp.*), cacatuas (*Cacatua spp.*) e araras são altamente suscetíveis ao vírus. Não

somente estes animais, aves como tucanos, cardeais e canários que tiveram contato com psitacídeos também já foram diagnosticadas com a enfermidade (GERLACH, 1994; TOMASZEWSKI *et al.*, 2004). Em geral, a doença é caracterizada por ser hiperaguda, de alta morbidade e ocasionalmente fatal, com elevada taxa de mortalidade em animais com sinais clínicos. Nota-se sinais clínicos variáveis como letargia, depressão, eriçamento de penas, diarreia, sonolência, letargia e convulsões ou tremores no pescoço, asas e pernas. Em alguns casos os animais podem sobreviver e não apresentarem quaisquer sinais eliminando o vírus intermitentemente. Acredita-se que os fatores estressantes (mudança no ambiente, início da estação reprodutiva) induzam a recrudescência em portadores assintomáticos, resultando na excreção do vírus levando em surtos da doença. Macroscopicamente podem ser observados edema e necrose de baço e fígado, lipidose hepática, pancreatite, traqueíte e aerossaculite, além de leucopenia, papilomas cutâneos em infecções subclínicas. Microscopicamente é comum infiltração inflamatória ao redor de lesões e corpúsculos de inclusão intranuclear eosinofílicos em fígado, baço e intestinos, necrose hepática, não havendo lesões características (TSAI *et al.*, 1993; GERLACH, 1994; YOUNG, 1995; TOMASZEWSKI *et al.*, 2001; TOMASZEWSKI *et al.*, 2004; KATOH *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2022).

Diagnóstico é realizado por meio de histórico, sinais clínicos, achados de necropsia, técnicas histoquímicas e PCR que se trata de uma técnica altamente sensível para a detecção do agente em tecidos e fluidos. A técnica de PCR é utilizada com oligonucleotídeos que amplificam região de herpesvírus que deu origem aos Herpesvírus de mamíferos e aves UL16. O isolamento em fibroblastos de embriões de galinhas também pode ser realizado, mas, não é tão efetivo quanto o PCR. Outras técnicas também podem ser realizadas como, ELISA, imunofluorescência, imunohistoquímica e vírus-neutralização (GERLACH, 1994; TOMASZEWSKI *et al.*, 2001). Para o diagnóstico diferencial deve-se considerar enfermidades que causam alterações no sistema gastrointestinal e alterações neurológicas, como doença de Marek, influenza, *Orthoavulavirus* aviário tipo 1, adenovírus, salmoneloses, *Chlamydia psittaci*, *Escherichia coli* e endoparasitas (BARBOSA *et al.*, 2022).

Para realização de medidas de controle e prevenção é importante levar em conta que não existe vacina comercial, desta forma, torna-se importante realizar quarentena, aquisição de aves de criatórios livres da doença, desinfecção dos ambientes. A detecção precoce da doença para iniciar o tratamento de aves expostas e adotar medidas para diminuir as mortalidades durante o surto é extremamente importante. O tratamento é realizado com uso de aciclovir 80 mg/kg por via oral a cada 8 horas durante 10 dias, também pode-se realizar a administração por via intravenosa, mas, quando administrado por via intramuscular tende a

causar hemorragia e necrose (YOUNG, 1995; TOMASZEWSKI *et al.*, 2001; TOMASZEWSKI *et al.*, 2004; GREENACRE, 2005; BARBOSA *et al.*, 2022).

3.7. Adenovírus

Os adenovírus pertencem à família Adenoviridae que apresenta 6 gêneros *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus*, *Ichtadenovirus* e *Testadenovirus* (ICTV, 2023). Os adenovírus têm uma distribuição mundial, sendo encontrado em 31 espécies de aves, além de peixes, anfíbios, répteis e mamíferos (SCHRENZEL *et al.*, 2005; SURPHLIS *et al.*, 2022). Trata-se de um vírus icosaédrico, não envelopado, de DNA de fita dupla de 25 a 46 kb, com sequências redundantes terminais e conteúdo G + C e codifica proteínas estruturais e não estruturais. Todos adenovírus compartilham antígenos gênero- específicos presentes no hexon que representa aproximadamente 10% do genoma. A proteína hexon é conhecida por possuir determinantes específicos de família, gênero, espécie e tipo viral, sendo utilizada para o estudo filogenético do vírus. O *Aviadenovirus* já foi descrito em Anseriformes, Columbiformes, Galiformes, Psittaciformes, Passeriformes, Ciconiformes, Falconiformes (SHEPPARD *et al.*, 1995; CHIOCCA *et al.*, 1996; MEULEMANS *et al.*, 2004; KATOH *et al.*, 2010; LEBDAH *et al.*, 2022). O mais comum deste grupo é o Adenovírus de galinhas (FAdV-1), que infecta galinhas e outras aves e o Adenovírus de psitacídeos 2 (PsAdV-2) o mais estudado. Na literatura o FAdV-1 já foi relatado como causador de traqueíte necrótica acentuada em Mutum-de-lagoas (*Paux mitu*) no Brasil, hepatite por corpos de inclusão (IBH) em frangos de corte, calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e papagaio-cinzento (*Psittacus erithacus*), além de corpos de inclusão intranucleares no epitélio traqueal de codornas (*Coturnix japonica*) e perus (*Meleagris gallopavo domesticus*). Os adenovírus são transmitidos por vias horizontais, orofecal ou inalação, verticais como transovariana ou sêmen do macho infectado (SCHRENZEL *et al.*, 2005; CHOI *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2019; SURPHLIS *et al.*, 2022; MARÍN *et al.*, 2023).

Os sinais clínicos variam entre prostração, enterite, palidez, icterícia, morte súbita, depressão, anorexia, hemorragia cloacal e alta mortalidade. O *Aviadenovirus* é um patógeno oportunista e geralmente está envolvido em infecções concomitantes ou imunossupressão. As lesões mais notadas em infecções por Adenovírus aviário são hepatite por corpos de inclusão, síndrome de hepatite hidropicárdica, síndrome da queda de postura, enterite hemorrágica em perus e bronquite de codorna. Desta-forma, nota-se hepatite, enterite, pancreatite, encefalite, esplenite, hemorragia pulmonar, esplenomegalia, hidropicárdio, erosão em ventrículo e

conjuntivite. Microscopicamente há corpos de inclusão basofílicos intranucleares em hepatócitos, hemorragia hepática (GREENACRE, 2005; SCHRENZEL *et al.*, 2005; KATOH *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2012; LEBDAH *et al.*, 2022; MARÍN *et al.*, 2023). Apesar de não ter alterações neurológicas como sinais marcantes, Gerlach (1994) evidenciou ataxia, tremores, *head-pressing* e morte, além de corpos de inclusão intranuclear sugestivos de adenovírus em uma *Cacatua-das-molucas* (*Cacatua moluccensis*). Outro relato foi o de Yu *et al.* (2018) que observaram edema e hemorragia cerebral, macro e microscopicamente, em estudo com inoculação de FAdV-4 em patos domésticos (*Anas platyrhynchos domesticus*). Este mesmo estudo relata que a infecção foi fatal entre 5 a 20% dos casos, sendo o DNA viral detectado em todos os tecidos em estágio inicial da infecção, indicando que o vírus pode invadir e se replicar em muitos tecidos, incluindo o cérebro, porém, os patos infectados não apresentaram nenhum sinal clínico neurológico.

Em humanos, infecções por adenovírus podem causar sinais respiratórios, gástricos, urinários, cutâneos, oculares e neurológicos. Dentre os sinais neurológicos observados tem-se a meningite e a encefalite como os mais observados, sendo possível identificar o vírus ou DNA em amostras de tecidos cerebrais ou líquido cefalorraquidiano. Em exame histopatológico é possível notar edema difuso e hemorragia (OSAMURA *et al.*, 1993; HUANG *et al.*, 2013; KHANAL *et al.*, 2018).

O diagnóstico é realizado por PCR com oligonucleotídeos que amplificam os genes das proteínas do hexon ou polimerase, já o sequenciamento e a genotipificação permitem a diferenciação entre todas as espécies do gênero. A técnica de hemaglutinação pode ser utilizada para diferenciar os tipos de adenovírus. Outras técnicas que também podem ser empregadas são ELISA, imunodifusão, imunofluorescência, soro-neutralização, mas, são técnicas laboriosas (RAUE; HESS, 1998; MEULEMANS *et al.*, 2004). O controle e prevenção devem ser realizados considerando-se o fato dos adenovírus sobreviverem por longos períodos em superfícies e ser resistente a detergentes, solventes lipídicos, mas, sensível ao calor, formol e água sanitária. Assim sendo, a exposição à formalina, aldeídos ou iodóforos por mais de 1 hora é recomendada para inativar o vírus. A vacinação autógena é utilizada em diversas áreas do globo onde a doença ocorre (GREENACRE, 2005; KHANAL *et al.*, 2018; LEBDAH *et al.*, 2022).

4. CAPÍTULO 2 - DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS EM AVES SILVESTRES DA GRANDE BELO HORIZONTE

4.1. INTRODUÇÃO

O Brasil, país de extensa área territorial abriga 1.971 espécies de aves, esta elevada população de aves e a estreita relação homem-animal são importantes para transmissão e disseminação de agentes infecciosos, ameaçando a saúde pública. As doenças infecciosas representam um risco constante para a saúde e produção de aves, com graves consequências para o bem-estar destas e para a economia, além de ser um impedimento para conservação da vida selvagem. Assim, a saúde aviária é desafiada por enfermidades emergentes e reemergentes que são responsáveis por elevada perda de animais silvestres (HERNANDEZ-DIVERS *et al.*, 2006; WHO, 2020; CDC, 2021; PACHECO *et al.*, 2021; BAYMA *et al.*, 2022; FAGRE *et al.*, 2022; LIEBHART *et al.*, 2023).

Dentre estas doenças, que são causadas por vírus, bactérias, parasitas, fungos, tem-se as zoonoses em que ocorre a transmissão de um agente de um hospedeiro animal para um humano, e zooantroponose, onde ocorre o inverso. No último século, cerca de 14 zoonoses emergentes e reemergentes surgiram, tendo o *spillover* (adaptação de um patógeno de uma população hospedeira ou reservatório ambiental para outra população) como um evento participante deste processo. Outro processo de ocorrência importante e notado em estudos é o *spillback*, em que o agente adquire capacidade de infectar novos hospedeiros reservatórios ou hospedeiros finais (ZANELLA, 2016; OLIVAL *et al.*, 2017; ALEXANDER *et al.*, 2018; CDC, 2021; FAGRE *et al.*, 2022).

Assim sendo, o controle, a prevenção e a erradicação destas enfermidades, por meio de vigilância/notificação de casos, vacinação, medidas sanitárias, são extremamente importantes para a preservação da saúde única e a rápida detecção de doenças exóticas ou doenças emergentes. Porém, a erradicação é menos frequente quando se analisa a situação global, assim a saúde aviária é desafiada por enfermidades emergentes e reemergentes que são responsáveis por elevadas perdas de populações de animais silvestres (HERNANDEZ-DIVERS *et al.*, 2006; WHO, 2020; FAGRE *et al.*, 2022; LIEBHART *et al.*, 2023).

O diagnóstico de doenças infecciosas deve incluir análise de histórico, sinais clínicos, análise *post mortem*, coleta de amostras, que seleciona os possíveis diagnósticos presuntivos, por fim, são realizadas análises laboratoriais. Estas análises devem ser realizadas tendo como base os sinais apresentados pelos animais, de forma a identificar o agente e descartar outras

causas, e devem ser específicos para as espécies-alvo. Atualmente, as técnicas moleculares como o PCR podem ser aplicadas, uma vez que são técnicas mais rápidas e não necessitam do agente vivo para a detecção do mesmo (CDC, 2021; WOA, 2021; LIEBHART *et al.*, 2023).

O presente capítulo tem como objetivo analisar amostras de sistema nervoso central de aves silvestres nativas e exóticas da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, para agentes causadores de alterações neurológicas, além de estabelecer status sanitário em criatório de aves, em relação ao bornavírus e detectar a provável existência de zoonose reversa.

4.2.MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Coleta de material

Foram amostradas aves de diferentes ordens e famílias, como segue: Psittaciformes – família Psittacidae, Cacatuidae e Psittaculidae, Strigiformes – família Strigidae, Tinamiformes – família Tinamidae, Passeriformes – família Thraupidae, Columbiformes – família Columbidae, Falconiformes – família Falconidae, Accipitriformes - família Accipitridae, Galliformes - família Cracidae. Estas amostras foram provenientes de criatórios, mantenedouros, clínicas de animais silvestres, proprietários particulares, e órgãos governamentais como o CETAS - Centro de Triagem de Animais Silvestres, todos pertencentes à região metropolitana de Belo Horizonte. Todos os criatórios e/ou mantenedouros são devidamente cadastrados no IEF (Instituto Estadual de Florestas) e IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) de Minas Gerais. As amostras para análise, obtidas por meio de necropsia, são de 2014 a 2022, sendo todos pertencentes à casuística da rotina do Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, encaminhados para diagnóstico da *causa mortis*. O laboratório de Doenças das Aves (LDA) apresenta autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) de número 327/ 2017, para manipulação e coleta de material de aves silvestres.

Como material de estudo foram selecionadas amostras de cérebro, cerebelo, fígado, baço, pulmão, traqueia, proventrículo, ventrículo, de animais que apresentavam sinais clínicos neurológicos como ausência de propriocepção, opistótono, ataxia, morte súbita, e/ou alteração macroscópica no SNC (hemorragia, congestão de vasos sanguíneos ou do órgão, hematomas, edema, degeneração, isquemia) visualizada durante a necropsia. Desta forma, as amostras obtidas são de diferentes órgãos como SNC (Sistema Nervoso Central), fígado, baço, traqueia,

pulmão, rins, provenientes de necropsias realizadas no período de 2014 a 2021 (animais 1 a 50). Essas amostras ficaram armazenadas, inicialmente, a -20°C , sendo realocadas e armazenadas a -80°C , em 2022. As amostras coletadas em 2022 (cérebro, cerebelo, fígado, baço, pulmão traqueia, proventrículo, ventrículo) (animais 51 a 61) foram armazenadas diretamente a -80°C . A identificação das amostras foi anotada em caderno de registro do LDA. Desta forma, informações como espécie aviária, data de chegada, sexo, local de origem, sinais clínicos e/ou alterações à necropsia, com foco em alterações neurológicas, foram organizadas de acordo com a disponibilidade (Tab. 1).

Tabela 1. Identificação das amostras utilizadas no estudo.

Amostra	Espécie	Data de chegada	Sexo	Local de origem	Sinais clínicos e/ou macroscópicos
1	<i>Lorius lory</i>	28/03/2014	SI	Belo Horizonte	Morte súbita, cérebro congesto
2	<i>Crypturellus undulatus</i>	11/05/2015	SI	Ribeirão das Neves	Morte súbita
3	<i>Saltator similis</i>	23/06/2016	SI	Belo Horizonte	Hemorragia na calota craniana
4	<i>Megascops choliba</i>	24/06/2016	SI	Belo Horizonte	Morte súbita, vasos cerebrais congestos
5	<i>Eupsittula cactorum</i>	26/09/2016	M	Ribeirão das Neves	Morte súbita, hematoma no lado esquerdo do cérebro
6	<i>Glaucidium brasilianum</i>	16/11/2016	SI	Belo Horizonte	Sinais neurológicos, contorcendo o corpo, não ficava em estação, cérebro liquefeito e com coloração levemente avermelhada
7	<i>Pionus fuscus</i>	18/11/2016	SI	Ribeirão das Neves	Animal cego, hematoma pontual no crânio
8	<i>Ara ararauna</i>	04/05/2017	SI	Belo Horizonte	Hematoma em calota craniana, cérebro com coloração levemente avermelhada
9	<i>Amazona brasiliensis</i>	24/08/2017	SI	Ribeirão das Neves	Hemorragia cerebral e hematoma em calota craniana
10	<i>Amazona aestiva</i>	21/12/2017	M	Betim	Sinais nervosos, ataxia, paralisia temporal, dificuldade de ficar em estação. Congestão de vasos cerebrais e meninges
11	<i>Melopsittacus undulatus</i>	11/01/2018	SI	Belo Horizonte	Animal prostrado, hematoma na cabeça
12	<i>Guaruba guarouba</i>	29/01/2018	M	Ribeirão das Neves	Sistema Nervoso Central com vasos ingurgitados
13	<i>Pionites melanocephalus</i>	14/02/2018	SI	Ribeirão das Neves	Hematoma na região externa da calota craniana
14	<i>Triclaria malachitacea</i>	14/02/2018	SI	Ribeirão das Neves	SNC com vasos ingurgitados
15	<i>Amazona aestiva</i>	26/03/2018	M	Ribeirão das Neves	Congestão de vasos cerebrais
16	<i>Amazona aestiva</i>	10/04/2018	SI	Betim	Hemorragia cerebral e congestão cerebelar

17	<i>Pyrrhuras sp.</i>	10/04/2018	F	Betim	Hemorragia de meninges, congestão e edemaciação cerebral, hemorragia cerebelar
18	<i>Aratinga sp.</i>	10/04/2018	SI	Betim	Morte súbita
19	<i>Alipiopsitta xanthops</i>	10/04/2018	SI	Betim	Hemorragia cerebelar
20	<i>Amazona rhodocorytha</i>	04/05/2018	M	Ribeirão das Neves	Hematoma em calota craniana em região próxima ao cerebelo. Leve degeneração cerebelar, congestão dos vasos do SNC
21	<i>Amazona ochrocephala</i>	07/05/2018	M	Ribeirão das Neves	Alterações neurológicas, incoordenação motora. Hematomas calota craniana e congestão dos vasos do SNC
22	<i>Pionus maximiliani</i>	30/07/2018	SI	Ribeirão das Neves	Edema cerebral (vasos dilatados e congestos), megalencefalia
23	<i>Pyrrhura perlata</i>	26/09/2018	SI	Ribeirão das Neves	Hemorragias puntiformes no cérebro
24	<i>Pionites leucogaster</i>	16/10/2018	F	Ribeirão das Neves	Hematoma em caixa craniana
25	<i>Pionus maximiliani</i>	14/11/2018	SI	Ribeirão das Neves	Congestão e hemorragia cerebelar
26	<i>Amazona rhodocorytha</i>	06/05/2019	F	Ribeirão das Neves	Encéfalo congesto e hemorrágico
27	<i>Guaruba guarouba</i>	16/07/2019	F	Ribeirão das Neves	Hemorragia multifocal em região apical do crânio, congestão de vasos cerebrais
28	<i>Columba livia</i>	19/08/2019	SI	Belo Horizonte	Cegueira
29	<i>Amazona aestiva</i>	17/10/2019	SI	Belo Horizonte	Encéfalo apresentando hemorragia multifocal moderada
30	<i>Columba livia</i>	25/10/2019	M	Divinópolis	Torcicolo, tremores da cabeça, olho azulado, cegueira
31	<i>Columba livia</i>	25/10/2019	F	Divinópolis	Torcicolo, tremores da cabeça, olho azulado, cegueira
32	<i>Saltator similis</i>	30/10/2019	M	Santos Dumont	Morte súbita. Hemorragia na cabeça. Aparente edema do tendão na região posterior do crânio
33	<i>Falco sparverius</i>	11/11/2019	SI	Belo Horizonte	Congestão vascular nos vasos do crânio
34	<i>Columba livia</i>	18/11/2019	SI	Belo Horizonte	Morte súbita
35	<i>Nymphicus hollandicus</i>	30/12/2019	F	Belo Horizonte	Congestão circulatória e hemorragia unilateral esquerda, crânio com isquemia no lado direito
36	<i>Nymphicus hollandicus</i>	04/12/2019	F	Belo Horizonte	Diátese hemorrágica cerebelar
37	<i>Loris lorius</i>	10/01/2020	M	Belo Horizonte	Morte súbita. Hiperemia discreta multifocal.
38	<i>Psittacula krameri</i>	14/01/2020	SI	Belo Horizonte	Encéfalo hemorragia multifocal moderada
39	<i>Columba livia</i>	14/02/2020	SI	Belo Horizonte	Sinais nervosos, incoordenação motora
40	<i>Columba livia</i>	17/11/2020	SI	Belo Horizonte	Incoordenação motora, torcicolo, opistótono e caquexia, morte por inanição
41	<i>Columba livia</i>	17/11/2020	SI	Belo Horizonte	Incoordenação motora, torcicolo, opistótono e caquexia, morte por inanição

42	<i>Columba livia</i>	23/11/2020	SI	Belo Horizonte	Torcicolo, opistótono, SNC com discreta hiperemia
43	<i>Columba livia</i>	06/12/2020	M	Belo Horizonte	Alta mortalidade em lote. Incoordenação motora, torcicolo, opistótono, morte por inanição
44	<i>Sporophila maximiliani</i>	17/02/2021	F	Lagoa Santa	Região occipital do crânio com extensa área de lesão hemorrágica, concomitante com encéfalo intensamente e difusamente avermelhado
45	<i>Asio clamator</i>	18/02/2021	F	Belo Horizonte	Encéfalo difusamente avermelhado
46	<i>Nymphicus hollandicus</i>	27/04/2021	M	Belo Horizonte	Área hemorrágica extensa na região dorso caudal da calota craniana. Vasos cerebrais congestos e ingurgitados
47	<i>Nymphicus hollandicus</i>	27/04/2021	M	Belo Horizonte	Extensa hemorragia na calota craniana. Vasos cerebrais congestos e ingurgitados
48	<i>Amazona vinacea</i>	14/05/2021	M	Belo Horizonte	Extensa área de coloração avermelhada em hemisfério cerebral direito
49	<i>Nymphicus hollandicus</i>	20/05/2021	F	Curvelo	Morte súbita. Áreas multifocais de hiperemia do lado direito da calota craniana
50	<i>Nymphicus hollandicus</i>	20/05/2021	M	Curvelo	Morte súbita
51	<i>Amazona vinacea</i>	10/06/2021	SI	Belo Horizonte	Cérebro com coloração vermelho vivo
52	<i>Amazona aestiva</i>	24/05/2022	SI	Ribeirão das Neves	Macrocefalia, <i>head pressing</i> , incoordenação ao voo. Sem resposta no lado esquerdo: pupila não responsiva à luz, sem reflexo de aproximação e palpebral, membro inferior sem resposta ao toque e propriocepção. Cabeça pendida para o lado esquerdo. Hidrocefalia e espessamento de meninge
53	<i>Guaruba guarouba</i>	25/05/2022	F	Ribeirão das Neves	Apático, com desequilíbrio motor. Hemorragia lateral em lado esquerdo do encéfalo
54	<i>Pionopsitta pileata</i>	25/05/2022	F	Ribeirão das Neves	Pontos hemorrágicos na calota craniana e cérebro
55	<i>Penelope obscura</i>	30/05/2022	M	Belo Horizonte	Congestão cerebelar na metade anterior, vasos ingurgitados, edema cerebelar
56	<i>Guaruba guarouba</i>	31/05/2022	F	Ribeirão das Neves	Pontos hemorrágicos em calota craniana e ingurgitamento de vasos em encéfalo
57	<i>Harpia harpyja</i>	05/07/2022	F	Brumadinho	Focos de hemorragia no crânio, vasos cerebrais ingurgitados, petéquias no cerebelo
58	<i>Spizaetus ornatus</i>	05/07/2022	M	Brumadinho	Congestão disseminada em SNC, edema cerebral
59	<i>Guaruba guarouba</i>	01/09/2022	M	Ribeirão das Neves	Morte súbita
60	<i>Guaruba guarouba</i>	01/09/2022	F	Ribeirão das Neves	Morte súbita. Presença de vasos ingurgitados na porção cranial do cérebro e cerebelo
61	<i>Penelope obscura</i>	01/09/2022	M	Ribeirão das Neves	Hemorragia cerebral na porção cranial e na meninge próxima ao cerebelo

F: fêmea. M: macho. SI: sem informação.

4.2.2. Necropsia

As aves encaminhadas para as necropsias foram necropsiadas completamente no Setor de Doenças das Aves, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMPV) da Escola de Veterinária - UFMG, para o diagnóstico *post mortem*. Os procedimentos foram realizados com uso de instrumentais cirúrgicos autoclavados e embalados, sendo que as pinças e tesouras foram trocadas durante o procedimento, sempre que necessário. Todos os órgãos (cérebro, cerebelo, pulmão, traqueia, fígado, baço, proventrículo, ventrículo, rim, intestino delgado) foram coletados em duplicata em tubos de microcentrífuga *RNA-DNAse free* de 1,5 mL. As amostras foram imediatamente congeladas a -20°C , sendo posteriormente armazenadas a -80°C , para posterior extração de DNA e RNA. Fragmentos de órgãos também foram fixados em formalina 10% para análise histopatológica.

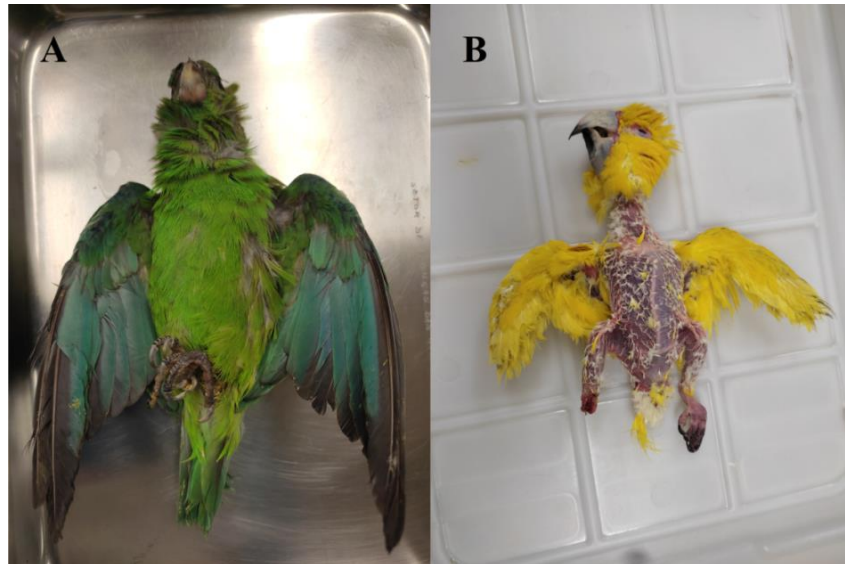


Figura 1. Animais necropsiados. A- Animal 54, *Pionopsitta pileata* fêmea. B- Animal 60, *Guaruba guarouba* fêmea.

Algumas aves foram enviadas em período inferior a 6 horas após o óbito e resfriadas em 4°C , outras foram enviadas congeladas, com período indefinido após a morte, o que dificultou a análise macro e microscópica. O escore corporal dessas aves foi feito de acordo com classificação descrita na tabela 2. Quanto ao animal 52 *Amazona aestiva*, foi possível realizar a avaliação clínica, e considerada a sua condição clínica grave foi realizada a eutanásia no local de origem.

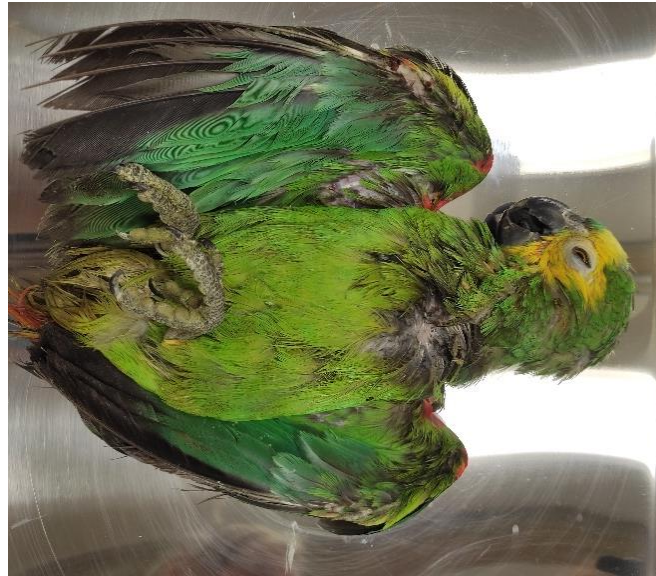


Figura 2. Necropsia do animal 52 *Amazona aestiva*, animal com queda de penas, macrocefalia.

Tabela 2. Classificação do escore corporal de aves.

Escore	Condição corporal	Descrição
0	Caquexia	Sem gordura e musculatura ao redor do esterno
T	Magro	Perda parcial de musculatura e resquício de gordura em torno do esterno
1	Moderada	Preenchimento de gordura da cavidade da fúrcula em 1/3
2	Boa	Quantidade ideal de gordura - quilha é sentida somente ao leve toque
3	Sobrepeso	Leve excesso de gordura na cavidade da fúrcula
4	Obesidade severa	Cavidade da fúrcula apresentando excesso de gordura (4/3)

Fonte: Adaptado de IBAMA (1994).

4.2.3. Extração de DNA e RNA

Para a extração do DNA e RNA total, fragmentos de SNC, traqueia, proventrículo, ventrículo, fígado, pulmão, baço, rim foram maceradas e homogeneizadas em PBS 1X estéril em diluição de 1:5 com auxílio de vórtex e centrifugadas a 5000g, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi aliqotado em tubos de microcentrífuga de 1,5 μ L *RNA-DNAse free*. A extração de RNA e DNA foi feita utilizando-se o kit QIAamp[®] MinElute[®] Virus Spin kit DNA/RNA (QIAGEN), conforme protocolo do fabricante.

4.2.4. PCR e RT-PCR

Todos os materiais genéticos extraídos foram testados por PCR convencional para os vírus de DNA, RT-PCR convencional para vírus de RNA e RT-qPCR para influenza A e subtipagem em H1N1pdm09, de acordo com os protocolos requeridos, com uso das sequências de primers abaixo citadas (Tab. 3).

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados.

Agente	Primers	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
WNV	WNVF	AACCKCCAGAAGGAGTSAAR	370	Silva <i>et al.</i> (2018)
	WNV R	AGCYTCRAACTCCAGRAAGC		
Flavivirus	NS5 (+)	TCAAGGAACTCCACACATGAG ATGTACT	256	Fulop <i>et al.</i> (1993)
	NS5 (-)	GTGTCCCATCCTGTGTGTCAT CAGCATAACA		
Alphavirus	M2W	YAGAGCDTTTTTCGCAWSTRGCH W	434	Pfeffer <i>et al.</i> (1997)
	cM3W	ACATRAANKGNGTNGTRTCRA ANCCDAYCC		
Influenza A	InfA FW	GACCAATCTTGTCACCTCTGAC	-	WHO (2009)
	InfA RV	AGGGCATTYTGGACAAAKCGT CTA		
	InfA Probe	[6FAM] TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCA CG [BHQ-1]		
H1N1pdm09	SW InfA FW	GCACGGTCAGCACTTATYCTRA G	-	WHO (2009)
	SW InfA RV	GTGRGCTGGGTTTTTCATTTGGT C		
	SW InfA Probe	[6-FAM] CYACTGCAAGCCCA”T”ACACA CAAGCAGGCA [BHQ-1]		
H3 - 1ª reação	FW1H3	ATATGTTCAAACGTCAGGGAG A	544	Fraiha <i>et al.</i> (2021)
	RV1H3	GTCGATTGCTGCTTGAGTGC		
H3N2 - 2ª reação	FW1H3	ATATGTTCAAACGTCAGGGAG A	279	
	RV2H3	TTCCCATTTGGAGTGACGCA		
Influenza A	M52C	CTTCTAACCGAGGTGAAACG	244	Fouchier <i>et al.</i> (2000)
	M253R	AGGGCATTTTGGACAAAGTCGT CTA		
Paramyxovirus	PAR-F1	GAAGGITATTGTCAIARNTNTG GAC	200 a 500	Tong <i>et al.</i> (2008)
	PAR-F2	GTTGCTTCAATGGTTCARGGNG AYAA		
	PAR-R	GCTGAAGTTACIGGITCICCDAT RTTNC		
NDV (Doença de Newcastle)	NDVF	CCTTGGTGAITCTATCCGIAG	254	Seal <i>et al.</i> (1995)
	NDVR	CTGCCACTGCTAGTTGIGATAA TCC		
Bornavirus aviário	ABV_MF	GGRCAAGGTAATYGTYCCTGG ATGGCC	360	Kistler <i>et al.</i> (2008)
	ABV_PR	CCAACACCAATGTTCCGAAGM CG		
Pan-	DFA	GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC	210 a 315	Vandevanter

herpesvirus	ILK	TCCTGGACAAGCAGCARNYSGC NMTNAA		<i>et al. (1996)</i>
	KG1	GTCTTGCTCACCAGNTCNACNC CYTT		
	TGV	TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYA CNGGNGT		
	IYG	CACAGAGTCCGTRTCNCCRTAD AT		
MDV (vírus da doença de Marek)	MR-S	TGTTTCGGGATCCTCGGTAAGA	583 a 763	Chang <i>et al.</i> (2002)
	MR-AS	AGTTGGCTTGTCATGAGCCAG		
PsHV-1 (vírus da doença de Pacheco)	PsHV UL16/17F	TGCGTGGGGTTAAACTCGGAAC	667	Tomaszewski <i>et al.</i> (2006)
	PsHV UL16/17R	CGACTACACGAGCCTAACATC		
	PsHV UL16/17 Internal	CGACTTCTCAACGACGTC		
Adenovirus	Hexon AF	CAARTTCAGRCAGACGGT	897	Meulemans <i>et al.</i> (2001)
	Hexon BR	TAGTGATGMCGSGACATCAT		

Os resultados das reações de PCR convencional foram visualizados em gel de agarose 1% com brometo de etídio, exceto para RT-PCR convencional de influenza (matriz) e flavivirus em que foi utilizado gel a 2%. No gel foram aplicados 10 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 (100 mM Tris-base pH 8,3, 25 mM EDTA e 50 mM ácido bórico), utilizando-se o padrão molecular de 100 pb DNA (*ladder*), Ludwig. Após a corrida, o resultado foi visualizado em luz ultra-violeta (UV).

Em relação aos animais que apresentaram positividade no SNC para Influenza A, pelos testes de RT-qPCR e/ou RT-PCR convencional (Universal-matriz), outros fragmentos de órgãos foram testados para Influenza A, de acordo com disponibilidade dos mesmos. Os RNAs positivos nos testes de triagem para Influenza A (Universal-matriz) foram subtipados para H1N1pdm09 e H3N2.

4.2.5. Sequenciamento e análise filogenética

Amplicons, bandas de gel e/ou material genético extraído das amostras positivas, foram encaminhados ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças dos Animais Aquáticos (AQUAVET) da EV-UFMG, Fundação Oswaldo Cruz - Minas (Fiocruz Minas) e para Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG) para sequenciamento, de acordo com protocolo estabelecido por cada laboratório. Os amplicons ou géis de agarose excisados foram purificados com o kit DNA Clean & Concentrator™-25-ZYMO RESEARCH. Os produtos

purificados foram sequenciados por três métodos diferentes de acordo com a disponibilidade de cada laboratório. Somente amostras que tiveram bom resultado em PCR foram analisadas, seja por melhor visualização no gel de agarose, quanto menor valor de CT (*Cycle Threshold*). Após verificação da qualidade dos nucleotídeos e análise dos eletroferogramas, somente as amostras oriundas de PCR específico para bornavírus estavam viáveis para análise. Uma sequência, oriunda de SNC do animal 53, de aproximadamente 360 pb foi gerada.

Os produtos de PCR foram sequenciados pelo método de Sanger (SANGER *et al.*, 1997), em sequenciador capilar automático (ABI 3730, Applied Biosystems1, EUA), utilizando Big Dye Terminator1 Mix (Applied Biosystems, EUA). O sequenciamento foi realizado em triplicata em ambas as direções. A qualidade das sequências foi determinada com o software Electropherogram Quality Analysis (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>), e os dados das sequências de nucleotídeos foram analisados e montados com o software SeqMan 7.1.0 (DNASTAR, Inc. Madison, WI, EUA). O alinhamento de múltiplas sequências (MSA) foi realizado com referências obtidas do banco de dados GenBank utilizando o programa MAFFT v7.471 e o método globalpair para ajustar a opção de direção. As sequências foram comparadas pelo BLAST1 ([//blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)) e alinhadas pelo ClustalW com sequências do gene da proteína da matriz disponíveis no GenBank. Uma árvore filogenética foi construída usando o método Neighbor-joining e o modelo de distância evolutiva Kimura 2 e bootstrap com 1.000 repetições usando o software MEGA X, incluindo um grupo externo (MH190827.1 Mammalian 1 *Orthobornavirus*).

4.2.6. Análise estatística

A comparação das técnicas foi realizada pelo cálculo da correlação obtendo-se o valor de *kappa* (κ) proposto por Jacob Cohen em 1960.

4.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Ensaio de PCR e análise de animais positivos

Dentre as 61 (sessenta e uma) amostras de Sistema Nervoso Central (SNC) de aves que morreram com sinais nervosos, foi observada positividade de 4/61 amostras (6,56%) para RT-qPCR Influenza A, 2/61 amostras (3,28%) em RT-PCR Influenza A, ambos para primer Universal-gene matriz, 5/61 amostras (8,2%) para bornavírus e 5/61 amostras (8,2%) para Pan-herpes (gene DNA polimerase), sendo 1/61 amostra (1,64%) para vírus da doença de Marek e 1/61 (1,64%) para vírus doença de Pacheco. Todas as amostras foram negativas para

os demais agentes testados, como Encefalites equinas, paramyxovirus e adenovirus. Dentre todas as amostras analisadas, teve-se um total de 10 animais que foram positivos para, ao menos um agente testado. Estes dados são representados na tabela abaixo, de forma que as amostras que foram positivas são determinadas pelo número 1, e 0 representativo de amostra negativa, quando necessário.

Tabela 4. Resultados positivos de análises moleculares das amostras de SNC dos animais 1 a 61.

Amostra	Influenza A RT-qPCR matriz	Influenza RT-PCR matriz	Bornavírus	Pan – Herpes	Doença de Pacheco	Doença de Marek
15	1	0	0	0	0	0
16	0	0	0	1	0	0
19	0	0	0	1	0	0
33	1	0	0	1	0	1
44	1	1	0	0	0	0
53	0	0	1	0	0	0
56	0	0	1	0	0	0
59	0	0	1	1	1	0
60	1	1	1	1	0	0
61	0	0	1	0	0	0
Total	4	2	5	5	1	1

Dentre as amostras de SNC que foram positivas para os agentes etiológicos testados é possível notar que houve co-infecção em 3 animais (3/61 - 6,56%). Dentre eles, os animais 33 (Influenza A + Marek), 59 (bornavírus + doença de Pacheco) e 60 (Influenza A + bornavírus + herpesvírus). Quando utilizamos o teste de PCR gênero-específico para herpesvírus, detectamos o DNA viral no SNC de 5 aves, sendo uma delas detectada como doença de Marek e outra doença de Pacheco nos testes de PCR espécie-específicos. Em 3/5 (60%) não foi possível chegar ao diagnóstico espécie-específico nos testes de PCR. Em aves selvagens é possível a ocorrência de infecções por múltiplos agentes ao mesmo tempo (co-infecção), sendo esta interação entre patógenos sinérgica ou antagônica, além disso, essas interações podem determinar a gravidade do quadro do animal. As co-infecções são facilitadas por fatores ambientais e a prévia presença de diferentes patógenos no organismo do hospedeiro. Em relação ao hospedeiro, as interações entre diferentes agentes infecciosos são dependentes do tempo de interação, resposta imune, produtos biológicos. Sendo assim, a infecção por um patógeno pode aumentar a suscetibilidade do hospedeiro a outros patógenos ou a graves doenças, estas co-infecções/interferências já foram relatadas em diversos países em que ambos agentes são endêmicos na região de ocorrência (OAKGROVE *et al.*, 2014; CLARK *et al.*, 2016; SAMY; NAGUIB, 2018). Aves silvestres são importantes disseminadoras de

doenças infecciosas, sendo hospedeiras de diferentes agentes, dentre estas, doenças zoonóticas ou não como herpesvírus, adenovírus e bornavírus aviários. Sendo assim, a junção de diferentes espécies de aves em um mesmo ambiente aumenta os riscos da circulação de diferentes vírus e infecções mistas envolvendo vírus, parasitas, bactérias, fungos (PINTO *et al.*, 2019; SUTHERLAND *et al.*, 2019; PARVIN *et al.*, 2020). Desta forma, a presença de co-infecções nestas aves é explicada pela aglomeração de animais, estresse, manipulação e infecções prévias.

Quando comparamos os testes de PCR os testes de PCR gênero-específicos e espécie-específicos como Paramyxovirus e New Castle; Pan-herpesvírus e Marek ou Pacheco, respectivamente, e comparamos as diferentes técnicas de PCR (tempo real e convencional) é possível obter o coeficiente *kappa* (k). Este coeficiente mostra a correlação entre estas comparações quando se trata do mesmo agente, de forma que é possível determinar se há concordância ou discordância entre as técnicas empregadas. Com esta análise foi possível obter um valor de *kappa* de 0,65 entre as técnicas para detecção de Influenza A, *kappa* de 1 entre RT-PCR de Paramyxovirus e New Castle, *kappa* de 0,31 entre PCR de Pan-herpes e Marek e 0,31 PCR de Pan-herpes e Pacheco. A tabela abaixo apresenta a quantidade de animais positivos em cada técnica, a frequência de positividade e a correlação das técnicas realizadas com Coeficiente *kappa* entre as técnicas quando aplicável.

Tabela 5. Quantidade de animais positivos, frequência das doenças e correlação das técnicas das amostras de SNC dos animais 1 a 61.

Método e doença	Quantidade de positivos	Frequência (%)	Coeficiente <i>kappa</i> (κ)
RT-PCR West Nile	0	0	-
RT-PCR Alphavirus	0	0	-
RT-PCR Flavivirus	0	0	-
RT-qPCR Influenza A matriz	4	6,56	0,65
RT-PCR Influenza A matriz	2	3,28	
RT-PCR Paramyxovirus	0	0	1
RT-PCR New Castle	0	0	P< 0,0001
RT-PCR Bornavirus	5	8,2	-
PCR Pan-herpesvirus	5	8,2	-
PCR Marek	1	1,64	0,31
PCR Pacheco	1	1,64	0,31
PCR Adenovirus	0	0	-

Em relação aos testes de Influenza A RT-PCR em tempo real e o RT-PCR de influenza A com o uso do primer de matriz, em amostras de SNC das 61 aves, apresentaram frequências diferentes, 6,56% e 3,28%, respectivamente. Além disso, a análise do teste de correlação entre os dois testes determinou um valor de coeficiente de concordância de *kappa*

de 0,65 o que mostra que os testes apresentam uma elevada concordância entre si. Estas diferenças são explicadas pelo fato do diagnóstico molecular ser uma técnica de alta sensibilidade, garantida pela síntese enzimática de bilhões de cópias de DNA, e especificidade. Sendo um método altamente indicado pela OIE quando se trata de diagnóstico de doenças de aves (JALALI *et al.*, 2016; IKUTA *et al.*, 2020). Em estudo comparativo entre qPCR e RT-PCR convencional, Agrawal *et al.* (2009) observaram que o RT-PCR apresentou falsos negativos em RT-PCR convencional e menor sensibilidade quando comparado ao qPCR pra detecção de influenza e vírus sincicial respiratório em amostras de suabe nasal de crianças. Ademais, o uso de PCR em tempo real realizado com sondas específicas internamente ao amplicon, detectou com maior especificidade os vírus. Apesar de serem amostras antigas, a positividade em mais de 3% das amostras está em concordância com ocorrência de anticorpos demonstrada por Castro Filho *et al.* (2018) que encontrou uma positividade de 1,13% para H1 em teste Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) para influenza A em 704 amostras da região metropolitana de Belo Horizonte/ Minas Gerais.

Com a positividade observada para herpesvírus, vírus da doença de Marek e vírus da doença de Pacheco nota-se uma frequência de ocorrências de 8,2%, 1,64% e 1,64%, respectivamente. Por se tratarem de herpesvírus é possível realizar o teste de concordância entre estas doenças e pan-herpes obtendo-se um valor de *kappa* de 0,31 entre as técnicas de pan-herpes e Marek e pan-herpes e doença de Pacheco. A diferença na frequência entre o protocolo de pan-herpes, Marek e doença de Pacheco, se dá pela existência de outros herpesvírus da família Orthoherpesviridae sub-família Alphaherpesvirinae envolvidos em infecção de aves como herpesvírus de anatídeos (anatid alphaherpesvirus 1), pombos (columbid alphaherpesvirus1), galinhas (gallid alphaherpesvirus 2 e 3), perus (meleagrid alphaherpesvirus 1) e pinguins (spheniscid alphaherpesvirus1) (ICTV, 2023; WOA, 2023). Os valores de *kappa* observados se dão pelas amostras que foram negativas nos testes correlacionados, uma vez que nem todas as amostras positivas para pan-herpes foram positivas para Marek ou doença de Pacheco. Além disso, nenhuma amostra foi positiva para os vírus de Marek ou doença de Pacheco sendo negativa para Pan-herpes.

Em contrapartida, as técnicas de RT-PCR para paramyxovirus universal e Newcastle apresentaram mesma frequência de amostras positivas e correlação de 100%, uma vez que ambos os testes foram negativos para todas as amostras, não havendo discordância entre ambos. Foi detectada a frequência 0% em West Nile virus, flavivirus, alphavirus e adenovírus. Os resultados negativos podem estar relacionados ao fato da maioria das amostras terem sido armazenadas em freezer -20°C que foi congelado e descongelado por algumas vezes ao longo

do tempo. Como observado por Islam *et al.* (2022) que observaram diferenças estatísticas significativas na detecção de SARS-CoV-2 em águas residuais, obtendo queda de material genético em amostras armazenadas em 4°C em comparação com amostras a -20°C e -80°C. Morley *et al.* (1983) também notaram queda de concentração de *Pseudomonas paucimobilis* em amostras congeladas e descongeladas por mais de uma vez. Cuypers *et al.* (1992) analisando o vírus da hepatite C em amostras de sangue total em EDTA, notaram que ocorre uma redução em 3 a 4 logs de cDNA em PCR de amostras após armazenamento em 4°C em comparação ao PCR em sangue fresco. Por fim, James *et al.* (1996) em estudos com detecção de *Toxoplasma gondii* determinou que a análise imediata por PCR das amostras é mais eficiente do que comparada em amostras mantidas a 4°C por 48h, congelamento e aquecimento, uma vez que nestas houve queda de sensibilidade da técnica. Nota-se, portanto, que o processo de congelamento e descongelamento compromete significativamente os resultados de PCR, uma vez que contribui para a degradação dos ácidos nucleicos e/ou queda populacional de agente infeccioso (MORLEY *et al.*, 1983; CUYPERS *et al.*, 1992; RÖDER *et al.*, 2010; ISLAM *et al.*, 2022).

Outra informação importante é em relação aos sinais clínicos apresentados pelos animais quando analisadas as informações contidas no caderno de registo do LDA dos animais positivos com os agentes infecciosos pesquisados. Desta forma, torna-se possível fazer as seguintes observações em relação à positividade para Influenza A (Universal-Matriz), as aves positivas foram oriundas de diferentes criatórios, exceto os animais 15 e 60 que vieram do mesmo criatório, em Ribeirão das Neves. Foram positivas, aves das famílias dos psitacídeos (2/4 - 50%), columbídeos (1/4 - 25%) e falconídeos (1/4 - 25%). Dos 4 animais positivos, 3/4 (75%) apresentaram congestão vascular dos vasos cerebrais, principalmente na porção cranial do cérebro e cerebelo (1 psitacídeo e 1 falconídeo) e 2/4 animais (50%) apresentaram morte súbita (1 columbídeo e 1 psitacídeo). Não há informações adicionais sobre sinais clínicos e alterações macroscópicas dos outros animais. Outras alterações notadas foram prostração, desequilíbrio, dificuldade de locomoção e voo, lesão na face, megacefalia, fezes aderidas na cloaca, queda e fraturas em canhão de penas e ausência de sinais. Estes sinais vão de encontro ao presente na literatura, uma vez que em infecções por Influenza A causam sinais clínicos leves a graves, com taxa variável (1 a 100%) de mortalidade e morbidade. É comum observar, em aves infectadas, sinais de tremores de cabeça, torcicolo e opistótono, edema de face e cabeça, cianose de barbela, sinais respiratórios e queda na postura de ovos (MORAES *et al.*, 2020; ICTV, 2023; WOAHA, 2023; MARTINS, 2001). Também foram observadas as alterações macroscópicas no SNC de congestão de vasos

cerebrais, hemorragia, encéfalo intensamente e difusamente avermelhado, estes corroboram o apresentado por Moraes *et al.* (2020) que cita lesões variáveis como, edema, focos fibrino-necróticos e hemorragia em mucosas e serosas em órgãos, edema de cabeça e pata, congestão pulmonar. Sabe-se que no Brasil, o vírus não circula entre aves comerciais, frangos de corte e postura, e o diagnóstico definitivo é somente possível após isolamento e identificação da estirpe envolvida no surto, não sendo também suficiente sem a aplicação das outras medidas de controle (MATHIEU *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2020; BRASIL, 2021; WOAAH, 2023).

Em relação ao Bornavírus estudado foi possível notar que as aves positivas vieram de um mesmo criatório, exceto o animal 61. Este criatório estava sob suspeita de circulação do vírus, uma vez que os animais apresentavam sinais compatíveis com dilatação do proventrículo (PDD). Todas as aves do criatório, acometidas pelo Bornavírus aviário foram da mesma espécie, Ararajuba (*Guaruba guarouba*), família dos psitacídeos. O animal 61, trata-se de um Jacu (*Penelope obscura*), galiforme, pertencente à outra propriedade. Em 4/5 (80%) dos animais foram relatados presença de pontos hemorrágicos na porção cranial do cérebro e cerebelo, inclusive no galiforme. Morte súbita foi relatada em 2/5 (40%) casos e desequilíbrio motor em 1/5 (20%) casos. Estes achados corroboram o que diz na literatura, uma vez que o Bornavírus aviário, causador de doença da dilatação de proventrículo, apresenta neurotropismo acentuado e ocorre em mais de 80 espécies de psitacídeos, já sendo também relatado em tucanos, drepanidídeos, tecelões, canários, aves aquáticas, aves de rapina. A doença está associada à perda de peso, estase de papo, dilatação proventricular e intestinal, regurgitação, queda de postura, perda de peso, inanição e morte. A morte por colapso circulatório ou aspiração de alimentos é comum, sendo esta caracterizada como súbita. Animais infectados pelo vírus também apresentam danos significativos no sistema nervoso central, causados por encefalite não supurativa, com sinais como tremores, incoordenação, ataxia, convulsões e cegueira. Tem-se a dilatação do proventrículo como a lesão macroscópica mais observada. Algumas aves infectadas também podem permanecer por anos sem apresentar sinais clínicos ou apresentar sinais clínicos mínimos. Sendo assim, este vírus já foi identificado em amostras de cérebro, proventrículo, adrenal, ovários, testículos, ovos, excretas e suabe cloacal de aves (OUYANG *et al.*, 2009; MONACO *et al.*, 2012; HOPPES *et al.*, 2013; HECKMANN *et al.*, 2017).

Os Herpesvírus, como pan-herpes, Marek e Pacheco também foram testados e encontrados em 5 animais. Dessas 1/5 (20%) foi positiva para doença de Marek e 1/5 (20%), para doença de Pacheco. Não foi possível detectar a espécie dos herpesvírus envolvidos nas infecções dos restantes das 3/5 (60%) aves infectadas. A ave positiva para doença de Marek

foi um Falcão-americano (*Falco sparverius*), que apresentava congestão vascular nos vasos do crânio. A ave positiva para doença de Pacheco foi uma Ararajuba (*Guaruba guarouba*), que apresentou morte súbita. Em geral, foram notados os sinais clínicos variáveis entre morte súbita presente em Marek (WOAH, 2023) e doença de Pacheco (TOMASZEWSKI *et al.*, 2001; TOMASZEWSKI *et al.*, 2004). Sinais macroscópicos à necropsia de hemorragia cerebral e congestão cerebelar, congestão vascular nos vasos do crânio, presença de vasos ingurgitados no cérebro e cerebelo, também foram notados. Porém, como cita WOA (2023), animais positivos para a doença de Marek, geralmente, não apresentam sinais macroscópicos no sistema nervoso central, e, em herpesvírus como Pacheco as alterações macroscópicas são variáveis, não havendo lesões características segundo Tomaszewski *et al.* (2001) e Tomaszewski *et al.* (2004). Herpesvírus diversos já foram identificados em diferentes animais silvestres, como águia-de-asa-redonda (*Buteo buteo*), águia-calçada (*Hieraaetus pennatus*), gavião-galinha (*Accipiter Cooperi*) e corujão-orelhudo (*Bubo virginianus*), sendo causadores de sinais clínicos diversos e até a ausência destes, como o Herpesvírus de pombos (CoHV-1) que pode causar sinais inespecíficos como depressão, diarreia e sinais neurológicos (WOŹNIAKOWSKI *et al.*, 2013). A presença de herpesvírus em falcões de diferentes espécies com necrose focal em baço e fígado foi relatada por Maré e Graham (1973), eles também relataram a semelhança antigênica de Herpesvírus de falcões (FHV) com herpesvírus de pombos (CoHV) e corujas (OHV). Outra detecção de herpesvírus foi realizada por Woźniakowski *et al.* (2013) que identificaram a presença de Herpesvírus de pombos (CoHV-1) em 18 amostras de SNC de aves da Polônia, por meio do PCR, dentre essas aves amostradas havia um falcão-peregrino fêmea (*Falco peregrinus*) que apresentava sinais de ceratite e torcicolo. Apesar de ter a galinha como hospedeiro natural, a doença de Marek já foi descrita em faisões, perus, codornas e pavão-branco (WOAH, 2023) e também já foi relatada em 3 patos domésticos adultos de raça mista com flamingos por Damir *et al.* (2023).

Sabe-se que, dos sinais notados, a perda de penas de aves pode advir de diferentes causas, sendo o circovírus uma dessas causas. O circovírus é um vírus de DNA, membro da família Circoviridae, gênero *Circovirus* e causa a doença do bico e das penas (BFDV - *beak and feather disease virus*). A síndrome ocorre predominantemente em psitacídeos jovens em cativeiro, mas também já foi relatada em pombos, corvos, corujas, águias, falcões. A condição, que é responsável por perda de penas de maneira variável e alteração em crescimento do bico e garras, dura de vários meses a um ano ou mais sendo irreversível. Em escala local pode ser uma causa importante do declínio populacional por causar considerável imunossupressão, o que facilita coinfeções e ser de fácil transmissão, uma vez que é

transmitida por contato próximo, aerossóis e fômites (PASS; PERRY, 1984; RAIDAL; PETERS, 2017; PHILADELPHO *et al.*, 2022). O vírus circula atualmente no Brasil, como relatado por Philadelpho *et al.* (2022) após análises de amostras de fezes, penas, suabes cloacais e/ou sangue de 120 Psittaciformes coletadas durante o período de 2012 a 2014 em clínicas veterinárias e criadouros de São Paulo e Rio de Janeiro. No total, 41 das 120 aves (34,17%) foram para BFDV. Apesar da circulação viral e ser uma causa importante de queda de penas, o agente não foi investigado no estudo, uma vez que não é uma causa de sinais neurológicos, não podendo-se negar a circulação do vírus no criatório.

4.3.2. Detecção de Influenza A em outros órgãos, das aves positivas no SNC

De acordo com a disponibilidade, outros fragmentos de órgãos como pulmão, traqueia, fígado, baço, proventrículo, ventrículo e intestino delgado foram testados para Influenza A pelo teste de RT-qPCR (Universal-gene Matriz), para avaliação da carga viral e escolha do melhor órgão para detecção viral, de forma a facilitar posteriores diagnósticos da doença em outros estudos. Testes de RT-PCR convencional e/ou RT-qPCR específicos também foram realizados para subtipagem de H3N2 e H1N1pdm09, conforme descrito na tabela 6. Dos fragmentos de órgãos, 4 fragmentos de fígados, 3 de traqueias, 3 de proventrículos, 2 de pulmões, 1 de intestino delgado, 1 de ventrículo e 1 de baço estavam disponíveis para teste, totalizando 15 amostras adicionais. Quando comparamos o valor de CT (*Cycle Threshold*) entre os órgãos analisados e SNC das aves, observamos que o valor de CT no SNC foi relativamente constante, apresentando-se na faixa de 35,463 e 37,753. Das 4 amostras de fígado analisadas (animais 15, 33, 44 e 60), o RNA viral foi detectado em 2 amostras (2/4-50%), com CTs de 21,406 (animal 60 para subtipagem H1N1pdm09) e 36,267 (animal 33 para Influenza A). O RNA viral foi detectado em 1 das 3 traqueias analisadas (33,3%) e em 1 dos 3 ventrículos analisados (33,3%) no ventrículo, não sendo detectado em nenhum outro órgão. Das 4 aves positivas para Influenza A, foi possível identificar o subtipo viral somente em um animal, sendo detectado o H1N1pdm09 no fígado, com valor de CT igual a 21,406 (Tab. 6). Sugere-se que o SNC e/ou fígado sejam órgãos de escolha para detecção do H1N1pdm09 em aves infectadas. Mas é necessário mais estudos para elucidar essa questão. O H1N1pdm09 já foi detectado em aves, podendo-se utilizar amostras de órgãos acometidos como pulmões, fígado e baço, e suabes cloacais e traqueais para diagnóstico (ZEITLIN; MASLOW, 2005; GIRARD *et al.*, 2010; SULLIVAN *et al.*, 2010; WOA, 2023). O animal positivo para H1N1pdm09 foi uma Ararajuba (*Guaruba guarouba*), que apresentou morte súbita, em 01 de setembro de 2022. Na necropsia, foi observada a presença de vasos

ingurgitados na porção cranial do cérebro e cerebelo. A ave é oriunda de um criatório de Ribeirão das Neves, que possui histórico de PDD (doença da dilatação do proventrículo), com detecção do bornavírus aviário desde 2015. Essa detecção foi realizada por Silva *et al.* (2020) com análises de amostras de psitacídeos que vieram a óbito entre julho de 2015 a setembro de 2016. Estes animais amostrados apresentavam sinais clínicos de emagrecimento progressivo, inapetência, regurgitação, irritabilidade, ataxia, déficits proprioceptivos ou motores, tremores, fraqueza, convulsões e morte súbita.

Tabela 6. Relação dos órgãos analisados para testes moleculares de detecção e subtipagem de influenza A.

Animal – Órgão	RT-qPCR Influenza A	RT-qPCR H1N1pdm09	RT-PCR H3N2
15 – SNC	37,106	Não detectado	Não detectado
15 – Fígado	Não detectado	-	-
15 – Pulmão	37,753	Não detectado	-
15 – Traqueia	35,219	Não detectado	-
15 – Baço	Não detectado	Não detectado	-
15 – Proventrículo	37,190	Não detectado	-
33 – SNC	37,120	Não detectado	Não detectado
33 – Fígado	36,267	Não detectado	-
44 – SNC	35,463	Não detectado	Não detectado
44 – Fígado	Não detectado	-	-
44 – Traqueia	Não detectado	-	-
44 – Proventrículo	Não detectado	-	-
44 - Intestino delgado	Não detectado	Não detectado	-
60 - SNC	Não detectado	Não detectado	Não detectado
60 – Fígado	Não detectado	21,406	-
60 – Traqueia	Não detectado	Não detectado	-
60 – Pulmão	Não detectado	Não detectado	-
60 – Proventrículo	Não detectado	Não detectado	-
60 – Ventrículo	Não detectado	Não detectado	-

-: Análise não realizada.

A subtipagem, com detecção de influenza H1N1pdm09 (Influenza A, H1N1 origem suína) em fígado do animal 60, foi realizada com a necessidade de identificar presença de zoonose reversa no criatório. Sabe-se já foram identificadas infecções em humanos por subtipos aviários, em pessoas com contato direto com aves. Além disso, tem-se na história diferentes relatos no mundo de epidemias influenza de origem aviária, como as causadas por H5N1 e H7N9, tendo as galinhas como a fonte imediata destas infecções zoonóticas. A infecção humana por estes vírus foi possível pelo fato de muitas aves possuírem receptores imunológicos semelhantes/idênticos aos receptores de mamíferos. O vírus também é conhecido por apresentar variações antigênicas que são um importante mecanismo de escape do sistema imune, favorecendo a infecção de novos hospedeiros suscetíveis (ZEITLIN;

MASLOW, 2005; CAUSEY; EDWARDS, 2008; LIU *et al.*, 2014; CANTARINO; MERCHAN-HAMANN, 2016). Outra infecção observada em humanos foi a causada pelo subtipo H5N1 de influenza, detectado em 1996, além deste também ter causado surtos aviários em 2001 e 2002 e o surto no Sudeste Asiático. Sendo possível inferir que este subtipo sofre mutações diversas em curto tempo, tendo propensão em adquirir genes de vírus que infectam diferentes espécies animais (ZEITLIN; MASLOW, 2005; BUCHY *et al.*, 2009). O H1N1pdm2009 originado de suínos, foi outro subtipo importante para pandemias em humanos e também já detectado em aves. Isto é explicado pelo fato de suínos serem o principal veículo para o rearranjo de vírus com componentes aviários e humanos. Outro fator que justifica a pesquisa de tais agentes é a identificação de todos os 18 subtipos de HA e 11 de NA em aves (ALVAREZ *et al.*, 2010; GIRARD *et al.*, 2010; SULLIVAN *et al.*, 2010; SCHAEFER *et al.*, 2011). Sendo assim, o frequente rearranjo do vírus da Influenza pode facilitar a ocorrência de zoonoses reversas. Além disso, a presença do vírus nas amostras do presente estudo pode ser justificada pela circulação desde 2009 em que foram confirmados os primeiros casos de Influenza-A H1N1 no país em 12.002 humanos na cidade de São Paulo e Campinas (RIBEIRO *et al.*, 2015). Outro estudo com evidência de circulação de influenza A no país foi o de De Araújo *et al.* (2014) em que foi detectado o subtipo H11N9 em amostras de 2006-2010 de suabes orotraqueais e cloacais de aves aquáticas da região de três locais na costa atlântica, mais especificamente de amostras de um vira-pedras (*Arenaria interpres*) coletadas em 2008.

4.3.3. Resultados de Sequenciamento

A sequência de nucleotídeos analisada codifica parte da proteína Matriz (M) do Bornavírus aviário (ABV)-*Parrot bornavirus*. A análise filogenética foi realizada comparando sequências de *Ortobornavirus* em psitacídeos previamente disponíveis no Genbank. A escolha das sequências foi baseada nas sequências virais de referência que caracterizam o Bornavírus aviário 1-7 (ABV 1-7), de acordo com o ICTV (SILVA *et al.*, 2020). Todas as sequências identificadas neste estudo foram classificadas como ABV-4 (*Parrot Bornavirus 4*). As 7 sequências obtidas tiveram identidade de 99 -100% entre elas e com a sequência de Minas Gerais (MG963919.1 *Amazona brasiliensis*) de Silva *et al.* 2020 (Fig. 3).

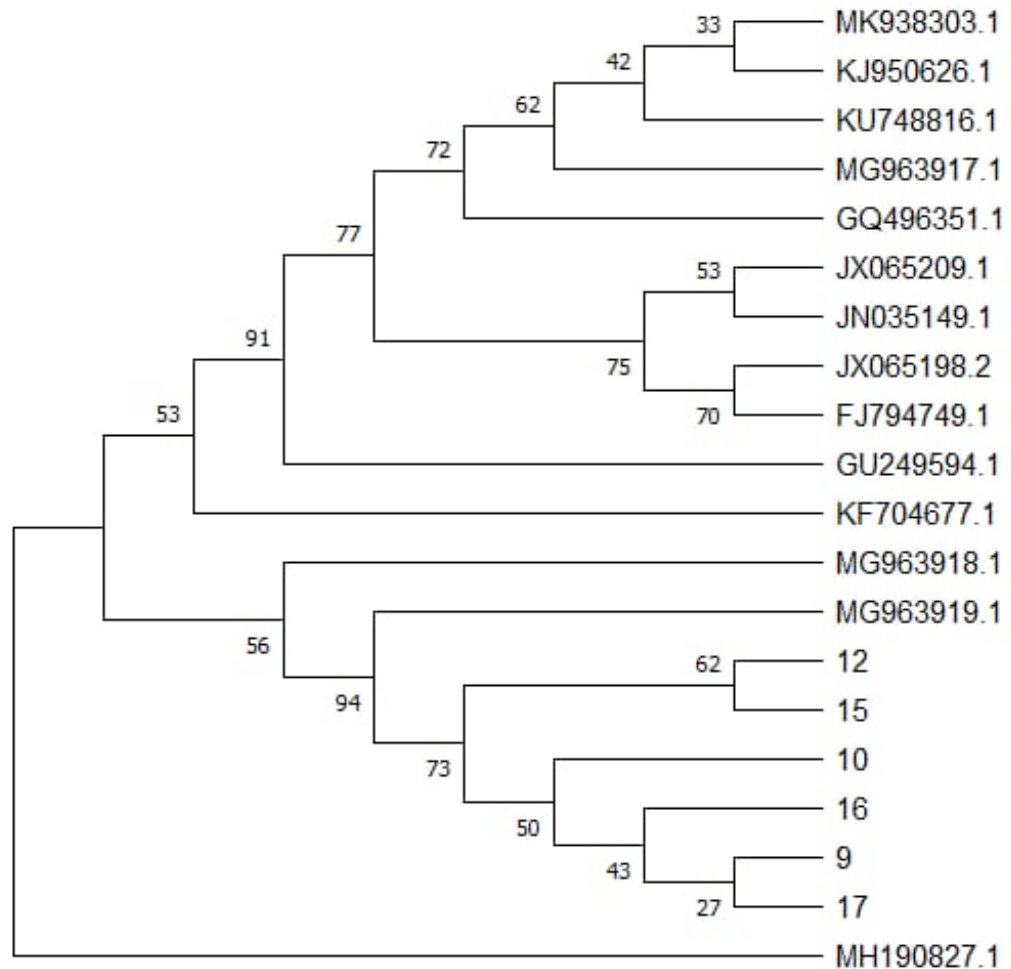


Figura 3. Árvore filogenética construída a partir da sequência parcial do gene M que codifica ABV4. As variantes são identificadas pelo número do Genbank e país. As sequências foram analisadas usando o método de Neighbor-Joining e o modelo de distância evolutiva Kimura 2. Valores de Bootstrap 1.000 são mostrados ao lado dos ramos. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X, envolvendo 13 sequências de acordo com Silva *et al.* (2020), incluindo um grupo externo (MH190827.1 Mammalian 1 *Orthobornavirus*).

Dentre as cinco amostras positivas para bornavírus, uma foi sequenciada para o agente, obtendo uma sequência de 99% de identidade com a sequência mineira (MG963919.1 *Amazona brasiliensis*) de Silva *et al.* (2020), amostra compatível com *Orthobornavirus* de Psittaciformes. Por se tratar de amostra de rotina do LDA, foi possível obter a origem da amostra em questão, sendo as amostras oriundas do mesmo criatório conservacionista. Este criatório estava sob suspeita de circulação de Bornavírus aviário, causador de doença da dilatação do proventrículo (PDD), em que os animais, em geral, apresentavam apatia, perda de peso, distensão de proventrículo, queda de postura, morte súbita. As amostras sequenciadas deste estudo foram oriundas de animais com sinais clínicos similares como apatia, ataxia, tremores da cabeça, dificuldade de se manter em estação, paralisia temporal, cegueira, morte

súbita e até mesmo a ausência de sinais clínicos relacionados à enfermidade corroborando o que foi citado por Gregory *et al.* (1994) e Steinmetz *et al.* (2008) que citam a presença de apatia, perda de peso, letargia, ataxia, movimentos anormais de cabeça, déficit proprioceptivo, dilatação gástrica neuropática, inflamação linfoplasmocitária em tecido nervoso, cegueira e miocardite em aves.

Tem-se o sequenciamento como uma melhor forma de determinar o patógeno envolvido na enfermidade, sendo, desde 1977 o método Sanger o mais utilizado para tal tarefa, uma vez que permite a diferenciação de variantes virais que, muitas vezes, não é possível pela técnica de PCR. Desta forma, a identificação de genomas inteiros permite a determinação de melhores métodos de diagnóstico, além de permitir melhor forma de erradicação e controle como vacinas (SANGER *et al.*, 1977; IKUTA *et al.*, 2020). Marton *et al.* (2015) analisaram uma arara-azul (*Ara ararauna*) morta da Alemanha e obtiveram a sequência de genoma completo de Bornavírus de arara (PaBV-5 - *Macaw Bornavirus*) revelando semelhança ao Bornavírus canário 2 (CnBV-2 - *Canary Bornavirus 2*) e Bornavírus de aves aquáticas 1 (ABBV-1 - *Aquatic Bird Bornavirus 1*). Philadelpho *et al.* (2014) detectaram Bornavírus de psitacídeos (PaBV-4 - *Parrot bornavirus 4*) em uma amostra além de terem identificado um novo vírus o Bornavírus de papagaio 8 (PaBV-8 - *Parrot bornavirus 8*) em análise de fezes de 112 psitacídeos. Até os dias atuais não foi sequenciado um genoma completo em amostras de aves no Brasil.

5. CAPÍTULO 3 - DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS EM AVES SILVESTRES DE CRIATÓRIO CONSERVACIONISTA DE RIBEIRÃO DAS NEVES

5.1. INTRODUÇÃO

Devido seu extenso território e presença de grande diversidade de aves silvestres e a estreita relação homem-animal, o Brasil é um país que detém uma elevada circulação de patógenos, sendo alguns destes zoonóticos. Estes agentes zoonóticos, por sua vez, acarretam riscos à saúde humana, animal e ambiental por meio de enfermidades emergentes e reemergentes (WHO, 2020; PACHECO *et al.*, 2021; WHO, 2020; CDC, 2021; FAGRE *et al.*, 2022; LIEBHART *et al.*, 2023). Uma maneira de mitigação destas enfermidades é a união de controle, prevenção e erradicação que também podem ser realizados com o objetivo de rápida detecção de doenças (HERNANDEZ-DIVERS *et al.*, 2006; WHO, 2020; FAGRE *et al.*, 2022; LIEBHART *et al.*, 2023).

Para que ocorra a rápida detecção de agentes procedimentos diagnósticos devem ser realizados. O diagnóstico pode ser feito por diversos métodos laboratoriais, mas, alguns fatores como histórico, sinais clínicos, análise *post mortem*, coleta de amostras, são extremamente importantes para se determinar qual o mais provável agente envolvido no surto. Dentre as técnicas laboratoriais disponíveis na atualidade tem-se técnicas como PCR, ELISA, imunofluorescência, isolamento do agente, histopatologia (CDC, 2021; WOA, 2021; LIEBHART *et al.*, 2023).

O presente capítulo tem como objetivo analisar amostras de suabe cloacal, traqueal e sangue total em aves silvestres nativas e exóticas da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, para análise de agentes causadores de alterações neurológicas, além de estabelecer status sanitário em criatório de aves, em relação ao bornavírus e detectar a provável existência de zoonose reversa. As aves em questão apresentavam sinais clínicos diversos, sendo então, as amostras testadas para diversos agentes sendo eles zoonóticos ou não.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Coleta de material

No dia 04 de agosto de 2022 foi solicitada, por criatório localizado em Ribeirão das Neves, a coleta de amostra dos animais para avaliação sanitária de plantel que continha um

total de 400 aves de variadas ordens e famílias. Foi realizada coleta de suabe orotraqueal, suabe cloacal e sangue total em heparina de 18 animais que pertenciam às ordens Psittaciforme e Passeriforme. O criatório em questão é devidamente cadastrado no IEF (Instituto Estadual de Florestas) e IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) de Minas Gerais.

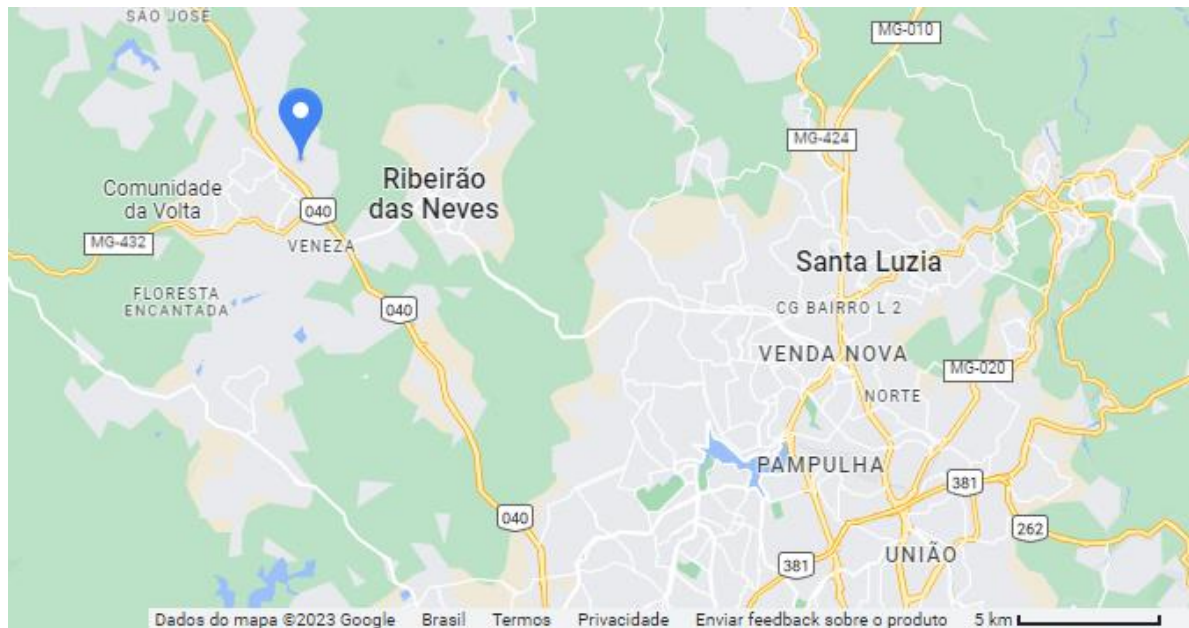


Figura 4. Mapa da localização do criatório marcado em azul. Fonte: Google maps (2023).

Todos os animais foram contidos com uso de luva de raspa de couro, em caso de animais grandes, e, uso de toalha em aves pequenas. Inicialmente foi realizada avaliação clínica geral e rápida de todas as aves de forma a não estressar os animais. Os animais apresentavam sinais clínicos como queda de postura de ovos, apatia, perda de peso, distensão de proventrículo, com alta mortalidade, sob a suspeita de infecção por Bornavírus aviário. Foram coletadas amostras de animais de diferentes recintos para obter uma análise sanitária geral do local. As informações referentes à espécie e sinais clínicos estão descritas (Tab. 7), sendo o escore corporal (Tab. 8) dessas aves obtido de acordo com classificação segundo IBAMA (1994).

A coleta de suabe endotraqueal e cloacal foi realizada utilizando-se suabe de rayon estéril com haste de plástico. Após a coleta, o suabe foi colocado em tubo tipo *Falcon* de 15 mL contendo 3 mL de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) a 1%. A coleta de sangue total da veia jugular foi realizada com seringa de 1mL, com a embebição da seringa/agulha em EDTA ou heparina, com excesso sendo retirado. A amostra de sangue foi vertida em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL *RNA-DNase free*. Todos os tubos foram previamente

identificados, a espécie e anilha dos animais anotadas e após a coleta, o material foi disposto em caixa de isopor contendo gelo em raspas e gelo reciclável para preservar a amostra até o armazenamento. Também foram observados os sinais clínicos das aves, além de escore corporal segundo a tabela 7. A figura 5 ilustra os aspectos dos recintos e o momento da contenção.

Tabela 7. Identificação das amostras coletadas no dia 04 de agosto de 2022.

Animal	Espécie	Sinais clínicos
1.0	<i>Pionites leucogaster</i>	Lesão na face, queda de penas, animal com dificuldade de voar e subir no viveiro, escore corporal 3, presença de ectoparasita (<i>Ornithonyssus</i> sp.)
2.0	<i>Pionites leucogaster</i>	Ausência de penas em diferentes partes do corpo, animal prostrado, bom escore corporal 2, presença de <i>Ornithonyssus</i> sp.
3.0	<i>Pionites melanocephalus</i>	Presença de ectoparasita (<i>Ornithonyssus</i> sp.), bom escore corporal 2, apático
4.0	<i>Pionites melanocephalus</i>	Megacefalia, sem sinal neurológico, múltipla fratura em canhão de penas, escore corporal 3
5.0	<i>Pionites leucogaster</i>	Penas amarelas sugestivo de degeneração hepática, escore corporal 3, hipercrecimento de bico
6.0	<i>Amazona tucumana</i>	Perda de todas as penas da cabeça, escore corporal alto 4
7.0	<i>Primolis maracana</i>	Escore corporal alto 4
8.0	<i>Guaruba guarouba</i>	Sem sinais clínicos, bom escore corporal 2
9.0	<i>Guaruba guarouba</i>	Sem sinais clínicos, bom escore corporal 2
10.0	<i>Guaruba guarouba</i>	Perda de penas ao logo do corpo, escore corporal alto 3
11.0	<i>Pionus fuscus</i>	Sentinela (mais sensível às infecções virais)
12.0	<i>Guaruba guarouba</i>	Sem sinais clínicos, bom escore corporal 2
13.0	<i>Passer sp.</i>	Estava na gaiola do animal 12.0, animal de vida livre
14.0	<i>Pyrrhura perlata</i>	Perda de penas, bom escore corporal 2
15.0	<i>Guaruba guarouba</i>	Cabeça aumentada, fezes na cloaca, sinal neurológico, desequilíbrio, bom escore corporal 2
16.0	<i>Guaruba guarouba</i>	Perda de penas, bom escore corporal 2
17.0	<i>Guaruba guarouba</i>	Perda de penas na região da cauda, bom escore corporal 2
18.0	<i>Guaruba guarouba</i>	Perda de penas em todo o corpo, bom escore corporal 2

Tabela 8. Classificação do escore corporal de aves.

Escore	Condição corporal	Descrição
0	Caquexia	Sem gordura e musculatura ao redor do esterno
T	Magro	Perda parcial de musculatura e resquício de gordura em torno do esterno
1	Moderada	Preenchimento de gordura da cavidade da fúrcula em 1/3
2	Boa	Quantidade ideal de gordura - quilha é sentida somente ao leve toque
3	Sobrepeso	Leve excesso de gordura na cavidade da fúrcula
4	Obesidade severa	Cavidade da fúrcula apresentando excesso de gordura (4/3)

Fonte: Adaptado de IBAMA (1994).

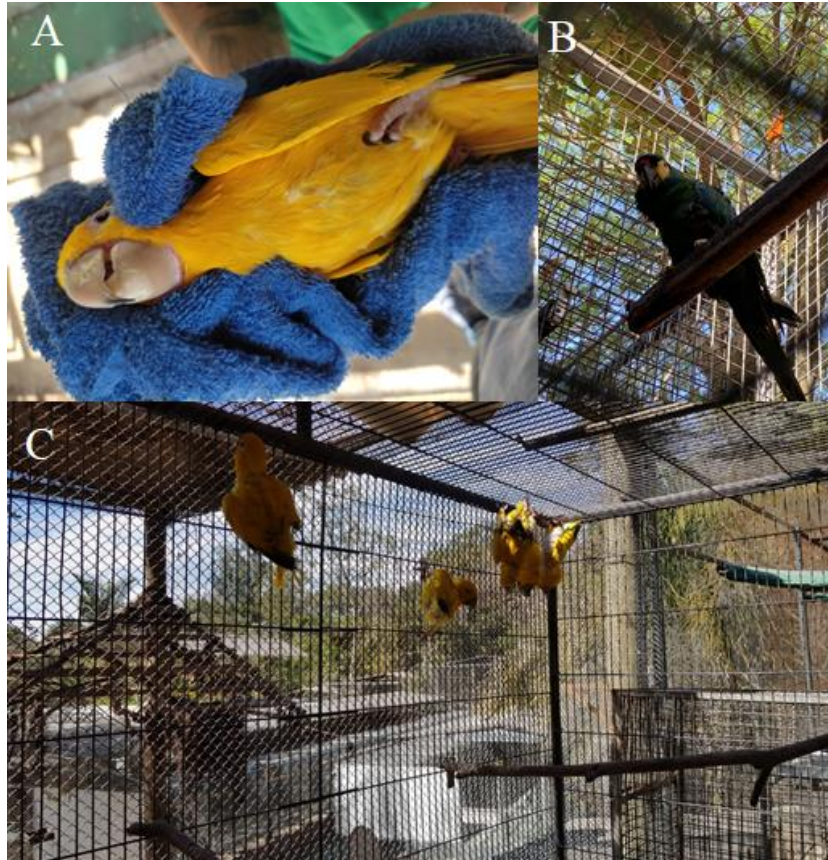


Figura 5. Criatório de Ribeirão das Neves. A. Contenção de *Guaruba guarouba*. B. *Primolis maracana* em recinto. C. Gaiola de *Guaruba guarouba* em quarentenário, animais apresentando sinais neurológicos e difusa queda de penas.

5.2.2. Extração de DNA e RNA

As amostras de suabe endotraqueal e cloacal foram homogeneizadas com auxílio de vórtex por aproximadamente 1 minuto. O sobrenadante foi aliqotado em tubo de microcentrífuga de 1,5 μ L *RNA-DNase free*. A extração de RNA destas amostras foi feita com o uso do kit QIAamp[®] Viral[®] RNA Mini Kit (QIAGEN), com o protocolo *Spin*, de acordo com orientações do fabricante. As amostras de sangue total foram diluídas em proporção de 1:3 em água *RNA-DNase free* e homogeneizadas com auxílio de vortex. o DNA e RNA foram extraídos com kit de extração mini spin vírus DNA/RNA (KASVI), seguindo as orientações do fabricante.

5.2.3. PCR e RT-PCR

Todos os materiais genéticos extraídos foram testados por PCR convencional, RT-PCR convencional e/ou RT-qPCR para diversos agentes de acordo com os protocolos requeridos, com uso das sequências de primers abaixo citadas (Tab. 9).

Tabela 9. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados.

Agente	Primers	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
Influenza A	InfA FW	GACCAATCTTGTCACCTCTGAC	-	WHO (2009)
	InfA RV	AGGGCATTYTTGGACAAAKCGTCTA		
	InfA Probe	[6FAM] TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG [BHQ-1]		
Influenza A	M52C	CTTCTAACCGAGGTTCGAAACG	244	Fouchier <i>et al.</i> (2000)
	M253R	AGGGCATTTTGGACAAAGTCGTCT A		
<i>Bornavirus</i> aviário	ABV_MF	GGRCAAGGTAATYGTYCCTGGATG GCC	360	Kistler <i>et al.</i> (2008)
	ABV_PR	CCAACACCAATGTTCCGAAGMCG		
Pan-herpesvirus	DFA	GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC	210 a 315	Vandevanter <i>et al.</i> (1996)
	ILK	TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNM TNAA		
	KG1	GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCY TT		
	TGV	TGTA ACTCGGTGTAYGGNTTYACN GGNGT		
	IYG	CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT		

Os resultados das reações de PCR convencional foram visualizados em gel de agarose 1% com brometo de etídio, exceto para RT-PCR de influenza (matriz) em que foi utilizado gel a 2%. No gel foram aplicados 10 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 (100 mM Tris-base pH 8,3, 25 mM EDTA e 50 mM ácido bórico), utilizando-se o padrão molecular de 100 pb DNA (*ladder*), Ludwig. Após a corrida, o resultado foi visualizado em luz ultra-violeta (UV).

5.2.4. Sequenciamento e análise filogenética

Amplicons, bandas de gel e/ou material genético extraído das amostras positivas, foram encaminhados ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças dos Animais Aquáticos (AQUAVET) da EV-UFMG, Fundação Oswaldo Cruz - Minas (Fiocruz Minas) e para Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG) para sequenciamento, de acordo com protocolo estabelecido por cada laboratório. Os amplicons ou géis de agarose excisados foram purificados com o kit DNA Clean & Concentrator™-25-ZYMO RESEARCH. Os produtos purificados foram sequenciados por três métodos diferentes de acordo com a disponibilidade de cada laboratório. Somente amostras que tiveram bom resultado em PCR foram analisadas,

seja por melhor visualização no gel de agarose, quanto menor valor de CT (*Cycle Threshold*). Após verificação da qualidade dos nucleotídeos e análise dos eletroferogramas, somente as amostras oriundas de PCR específico para bornavírus estavam viáveis para análise. Seis sequências de aproximadamente 360 pb foram geradas, sendo elas, oriundas de suabe cloacal dos animais 10.0, 11.0, 12.0, 15.0, 16.0, 17.

Os produtos de PCR foram sequenciados pelo método de Sanger (SANGER *et al.*, 1997), em sequenciador capilar automático (ABI 3730, Applied Biosystems¹, EUA), utilizando Big Dye Terminator¹ Mix (Applied Biosystems, EUA). O sequenciamento foi realizado em triplicata em ambas as direções. A qualidade das sequências foi determinada com o software Electropherogram Quality Analysis (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>), e os dados das sequências de nucleotídeos foram analisados e montados com o software SeqMan 7.1.0 (DNASTAR, Inc. Madison, WI, EUA). O alinhamento de múltiplas sequências (MSA) foi realizado com referências obtidas do banco de dados GenBank utilizando o programa MAFFT v7.471 e o método globalpair para ajustar a opção de direção. As sequências foram comparadas pelo BLAST1 ([//blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)) e alinhadas pelo ClustalW com sequências do gene da proteína da matriz disponíveis no GenBank. Uma árvore filogenética foi construída usando o método Neighbor-joining e o modelo de distância evolutiva Kimura 2 e bootstrap com 1.000 repetições usando o software MEGA X, incluindo um grupo externo (MH190827.1 Mammalian 1 *Orthobornavirus*).

5.2.5. Análise estatística

A comparação das técnicas foi realizada pelo cálculo da correlação obtendo-se o valor de *kappa* (κ) proposto por Jacob Cohen em 1060.

5.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Amostras de suabe orotraqueal, cloacal e sangue total em heparina

Na solicitação de avaliação sanitária de plantel, foram incluídos testes de RT-PCR e RT-qPCR para detecção do vírus Influenza A, devido à anterior detecção e subtipagem do H1N1pdm09 na propriedade. Os testes foram feitos com prévia permissão dos proprietários.

Dentre as amostras coletadas a campo de 18 aves, foi possível observar em amostras de suabe endotraqueal, 2/18 amostras positivas (11,11%) para RT-qPCR Influenza A e RT-PCR Influenza A, ambos os testes para primer Universal-matriz. Em amostras de suabe cloacal, sendo coletadas 17 amostras, 6/17 amostras (35,29%) foram positivas para

bornavírus, e 12/17 (70,59%) foram positivas para Influenza A, sendo 3/17 amostras (17,65%) e 9/17 amostras (52,94%) positivas para RT-qPCR Influenza A e RT-PCR Influenza A, respectivamente. Foi observada co-infecção de Influenza A e Bornavírus aviário em 3/17 (17,65%) amostras de suabe cloacal (Tab. 10). Herpesvírus foi detectado em somente 1 animal, sendo esse também co-infectado com Bornavírus aviário e Influenza A. Não foi possível detectar a espécie do herpesvírus por testes de PCR espécie-específicos para doença de Marek e Pacheco. Abaixo se encontra a tabela 10 que representa amostras dos animais que foram positivas para um ou mais agentes etiológicos testados, sendo a positividade representada pela letra x.

Tabela 10. Agentes infecciosos avaliados nos testes de RT-PCR ou RT-qPCR. Positividade representada pela letra “x”.

Animal	Influenza A qPCR/PCR	Influenza A RT-qPCR/PCR	Bornavírus	Pan- Herpes
	Suabe orotraqueal	Suabe cloacal		Sangue total
1.0		x		
2.0	x	x		
3.0		x		
4.0		x		
5.0	x	x		
6.0		x		
7.0		x		
8.0		x		
9.0		x	x	
10.0			x	
11.0		x	x	
14.0		x		
15.0		x	x	x
16.0			x	
17.0			x	
Total	2	12	6	1

Em relação aos testes de Influenza A, a diferença entre a positividade em suabe endotraqueal (11,11%) e cloacal (70,59%) é explicada pela eliminação viral que em reservatórios ocorre via fezes devido à replicação em células gastrointestinais, uma vez que os receptores α -2,3 presentes no epitélio intestinal de aves serem o sítio de clivagem essencial para a ativação do vírus. Desta forma, a detecção de influenza em amostras de fezes se torna mais viável, mas, a detecção em amostras de suabe endotraqueal também é possível, uma vez que os animais em questão também apresentam sinais respiratórios, ocorrendo certa eliminação viral em secreções nasais e orais (ROTT *et al.*, 1992; STIENEKE-GRÖBER *et al.*,

1992; VEY *et al.*, 1992; WOOD *et al.*, 1993; MORAES *et al.*, 2020). Esta diferença na detecção de influenza em suabe cloacal e endotraqueal ocorre uma vez que a eliminação viral em aves é preferencialmente via fecal (ROTT *et al.*, 1992; MORAES *et al.*, 2020). Como encontrado por Causey e Edwards (2008) que identificaram a eliminação de vírions viáveis em fezes por aves no Ártico, além da viabilidade destes vírions após longos períodos em água fria, gelo ou solo congelado.

Dentre todas as amostras positivas para Influenza notaram-se diversos sinais como prostração, desequilíbrio, dificuldade de locomoção e voo, lesão na face, megacefalia, fezes aderidas à cloaca, queda e fraturas em canhão de penas e ausência de sinais. Estes sinais vão de encontro ao presente na literatura, uma vez que em infecções por Influenza A causam sinais clínicos leves a graves, com taxa variável (1 a 100%) de mortalidade e morbidade. É comum observar, em aves infectadas, sinais de tremores de cabeça, torcicolo e opistótono, edema de face e cabeça, cianose de barbela, sinais respiratórios e queda na postura de ovos (MORAES *et al.*, 2020; ICTV, 2023; WOA, 2023; MARTINS, 2001). Também foram observadas as alterações macroscópicas no SNC de congestão de vasos cerebrais, hemorragia, encéfalo intensamente e difusamente avermelhado, estes corroboram o apresentado por Moraes *et al.* (2020) que cita lesões variáveis como, edema, focos fibrino-necróticos e hemorragia em mucosas e serosas em órgãos, edema de cabeça e pata, congestão pulmonar. Sabe-se que no Brasil, o vírus não circula entre aves comerciais, frangos de corte e postura, e o diagnóstico definitivo é somente possível após isolamento e identificação da estirpe envolvida no surto, não sendo também suficiente sem a aplicação das outras medidas de controle (MATHIEU *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2020; BRASIL, 2021; WOA, 2023).

O Herpesvírus testado e encontrado em amostra de sangue total do animal 15 que apresentava cabeça aumentada, fezes na cloaca, sinal neurológico, desequilíbrio, bom escore corporal 2 é justificado pela literatura. Herpesvírus diversos já foram identificados em diferentes animais silvestres, como águia-de-asa-redonda (*Buteo buteo*), águia-calçada (*Hieraaetus pennatus*) e gavião-galinha (*Accipiter Cooperi*), corujão-orelhudo (*Bubo virginianus*), sendo causadores de sinais clínicos diversos e até a ausência destes, como o Herpesvírus de pombos (CoHV-1) que pode causar sinais inespecíficos como depressão, diarreia e sinais neurológicos (WOŹNIAKOWSKI *et al.*, 2013). A presença de herpesvírus em falcões de diferentes espécies com necrose focal em baço e fígado foi relatada por Maré e Graham (1973), eles também relataram a semelhança antigênica de Herpesvírus de falcões (FHV) com Herpesvírus de pombos (CoHV) e corujas (OHV), mas, a diferença entre o vírus da laringotraqueíte infecciosa (ILT), o vírus da doença de Marek (MDV) e o vírus da enterite

dos patos (HAV). Outra detecção de herpesvírus foi realizada por Woźniakowski *et al.* (2013) que identificaram a presença de Herpesvírus de pombos (CoHV-1) em 18 amostras de SNC de aves da Polônia, por meio do PCR, dentre essas aves amostradas havia um falcão-peregrino fêmea (*Falco peregrinus*) que apresentava sinais de ceratite e torcicolo. Desta forma, existem diversos herpesvírus já detectados em diferentes espécies e por se tratar de um teste para a detecção de quaisquer herpesvírus, o teste realizado não permite a especificação da espécie envolvida. Sendo assim o vírus detectado na amostra positiva pode se tratar de qualquer espécie do gênero.

Os animais positivos para bornavírus em sua maioria se tratavam de Ararajubas (*Guaruba guarouba*), com exceção do animal 11.0 que se tratava de uma Maitaca-roxa (*Pionus fuscus*), sendo todas as aves Psittaciformes. Os animais 10.0, 16.0 e 17.0 apresentavam perda de penas em regiões do corpo e o animal 15.0 Ararajuba (*Guaruba guarouba*) apresentava sinais neurológicos de perda de equilíbrio e megacefalia. Já os animais 9.0 e 11.0 não apresentavam sinais clínicos. Também foram notados perda de penas em todo o corpo, até ausência de sinais clínicos e bom escore corporal 2. O Bornavírus aviário, causador de doença da dilatação de proventrículo, apresenta neurotropismo acentuado e ocorre em mais de 80 espécies de psitacídeos, já sendo também relatado em tucanos, drepanidídeos, tecelões, canários, aves aquáticas, aves de rapina. A doença está associada a sinais clínicos como perda de peso, estase de papo, dilatação proventricular e intestinal, regurgitação, queda de postura, perda de peso, inanição e morte. A morte por colapso circulatório ou aspiração de alimentos é comum, sendo esta morte caracterizada como súbita. Animais infectados pelo vírus também apresentam danos significativos no sistema nervoso central, causados por encefalite não supurativa, com sinais como tremores, incoordenação, ataxia, convulsões e cegueira. Tem-se a dilatação do proventrículo como a lesão macroscópica mais observada. Algumas aves infectadas também podem permanecer anos sem apresentar sinais clínicos ou apresentar sinais clínicos mínimos. Sendo assim, este vírus já foi identificado em amostras de cérebro, proventrículo, adrenal, ovários, testículos, ovos, excretas e suabe cloacal de aves (OUYANG *et al.*, 2009; MONACO *et al.*, 2012; HOPPES; *et al.*, 2013; HECKMANN *et al.*, 2017).

O animal 15.0 Ararajuba (*Guaruba guarouba*), positivo para herpesvírus, Bornavírus aviário e Influenza A apresentava megacefalia, fezes na cloaca, sinal neurológico, desequilíbrio, escore corporal 2 (bom). Além do animal 15.0, o animal 9, *Guaruba guarouba*, também apresentou positividade para mais de um agente sendo, Influenza A e bornavírus. As aves silvestres são suscetíveis à co-infecções o que pode ser exacerbado por fatores ambientais, aglomeração de animais, estresse, manipulação, infecções prévias, como citado no

capítulo 2 (OAKGROVE *et al.*, 2014; CLARK *et al.*, 2016, SAMY; NAGUIB, 2018; PINTO *et al.*, 2019; SUTHERLAND *et al.*, 2019; PARVIN *et al.*, 2020).

5.3.2. Resultados de Sequenciamento

Dentre as amostras de suabe cloacal dos animais 10.0, 11.0, 12.0, 15.0, 16.0, 17.0, todas as 6 sequências de nucleotídeos analisadas codificam parte da proteína Matriz (M) do Bornavírus aviário (ABV)- *Parrot bornavirus*. A análise filogenética foi realizada comparando sequências de *Orthobornavirus* em psitacídeos previamente disponíveis no Genbank. A escolha das sequências foi baseada nas sequências virais de referência que caracterizam o Bornavírus aviário 1-7 (ABV 1-7), de acordo com o ICTV (SILVA *et al.*, 2020). Todas as sequências identificadas neste estudo foram classificadas como ABV-4 (*Parrot bornavirus 4*). As 7 sequências obtidas tiveram identidade de 99 -100% entre elas e com a sequência de Minas Gerais (MG963919.1 *Amazona brasiliensis*) de Silva *et al.* 2020 (Fig. 6).

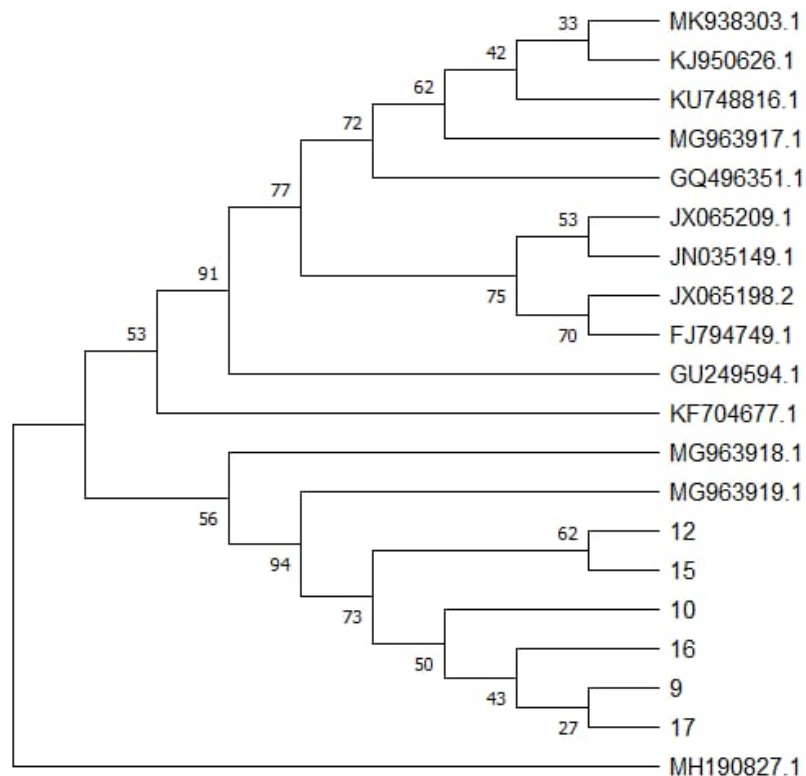


Figura 6. Árvore filogenética construída a partir da sequência parcial do gene M que codifica ABV4. As variantes são identificadas pelo número do Genbank e país. As sequências foram analisadas usando o método de Neighbor- Joining e o modelo de distância evolutiva Kimura 2. Valores de Bootstrap 1.000 são mostrados ao lado dos ramos. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X, envolvendo 13 sequências de acordo com Silva *et al.* (2020), incluindo um grupo externo (MH190827.1 Mammalian 1 *Orthobornavirus*).

Todas as 6 amostras positivas para bornavírus foram sequenciadas para o agente, obtendo uma sequência de 99% de identidade com a sequência mineira (MG963919.1 *Amazona brasiliensis*) de Silva *et al.* (2020), amostra compatível com *Ortobornavírus* de Psittaciformes. As amostras eram oriundas do mesmo criatório conservacionista que estava sob suspeita de circulação de Bornavírus aviário, assim como as amostras do capítulo 2 deste trabalho. As amostras sequenciadas foram oriundas de animais apresentando sinal neurológico, desequilíbrio, perda de penas ao longo do corpo, cabeça aumentada, fezes na cloaca, e até mesmo a ausência de sinais clínicos relacionados à enfermidade corroborando o que foi citado por Gregory *et al.* (1994) e Steinmetz *et al.* (2008) que citam a presença de apatia, perda de peso, letargia, ataxia, movimentos anormais de cabeça, déficit proprioceptivo, dilatação gástrica neuropática, inflamação linfoplasmocitária em tecido nervoso, cegueira e miocardite em aves.

6. CAPÍTULO 4 – CASO CLÍNICO: HIDROCEFALIA EM *AMAZONA AESTIVA*

6.1. INTRODUÇÃO

Sendo um país de território extenso, o Brasil apresenta uma grande diversidade de aves, sendo o primeiro registro da avifauna brasileira realizado em 1500, em que foi observado um exemplar de arara-vermelha (*Ara chloropterus*) (FIGUEIREDO, 2000; PIACENTINI *et al.*, 2015). A ordem Psittaciformes é composta por quatro famílias - Cacatuidae, Psittacidae, Psittaculidae e Strigopidae. Na avifauna brasileira, dentre os diferentes táxons, somente são encontrados os da família Psittacidae, com 87 espécies, divididas em 26 gêneros (ANTONIO *et al.*, 2021). A *Amazona aestiva*, também conhecida popularmente como papagaio-verdadeiro, de acordo com o *International Union for Conservation of Nature - IUCN* (2019) está presente em florestas, savanas e matagais, no Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia, sendo em 2019 colocado na lista vermelha de animais próximos à ameaça de extinção (NT- *Near Threatened*).

As aves estão sujeitas às doenças emergentes e reemergentes, algumas de caráter zoonótico (WHO, 2020; CDC, 2021). Dentre estas doenças, tem-se as doenças causadoras de transtornos neurológicos que podem ser responsáveis por declínio de populações. As semelhanças clínico-patológicas, entretanto, tornam o diagnóstico *ante mortem* um desafio e exigem o diagnóstico laboratorial mais detalhado e definitivo. Diversas são as possíveis causas de alterações neurológicas em aves, dentre elas têm-se, infecções por Bornavírus aviário, encefalomielite aviária, doença de Marek, *Cryptococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia psittaci*, *Salmonella* Typhimurium, intoxicações por organofosforados e metais pesados, doenças metabólicas como hipocalcemia, doenças carenciais por deficiência de vitamina E e tiamina (B1), trauma (BENNETT, 1994; JONES; OROSZ, 1996; HERNANDEZ-DIVERS *et al.*, 2006; MARUSAK *et al.*, 2010; HEDLEY *et al.*, 2015).

As alterações congênitas associadas à malformação do sistema nervoso central são raramente relatadas em aves. A hidrocefalia, caracterizada por acúmulo exagerado de líquido cefalorraquidiano no sistema ventricular do cérebro, entretanto, já foi relatada em cacatuas (*Cacatua* sp.), papagaio-do-congo (*Psittacus erithacus*), perus e galinhas. Dentre as causas de hidrocefalia têm-se a malformação precoce e bifurcação do tubo neural durante o desenvolvimento embrionário, intoxicação por ciclofosfamida, destilados de petróleo e em animais de laboratório a deficiência de vitamina A, cianocobalamina (B12), piridoxina (B6) e zinco ou excesso de vitamina A. Os sinais clínicos observados em animais com hidrocefalia

incluem tremores, incoordenação motora, ataxia, letargia, pressão de cabeça contra objetos (*head pressing*) e cegueira. Ocasionalmente, pode haver hipoplasia cerebelar, aumento de crânio, expansão dos ventrículos, compressão e atrofia do parênquima e hipomielinização (BENNETT, 1994; JONES; OROSZ, 1996; ECCO *et al.*, 2016; SCHMIDT; ONDREKA, 2019).

Entre as doenças infecciosas que podem levar à quadros neurológicos estão a febre do Nilo Ocidental, encefalomielite equina Venezuelana, influenza aviária e doença de Newcastle, que requerem notificação imediata de qualquer caso suspeito (BRASIL, 2013; COSTA *et al.*, 2015; HEDLEY *et al.*, 2015). São também importantes as infecções por Bornavírus aviário (KISTLER *et al.*, 2008), os herpesvírus da doença de Marek e doença de Pacheco (VANDEVANTER *et al.*, 1996, CHANG *et al.*, 2002, TOMASZEWSKI *et al.*, 2006), Adenovírus aviários (MEULEMANS *et al.*, 2001). Os sinais nervosos geralmente incluem tremores de cabeça, torcicolo, opistótono e incoordenação motora e os sinais não-nervosos, edema de face e cabeça, incoordenação motora, ataxia, culminando em morte. Macroscopicamente, há hemorragia cerebral, edema, e microscopicamente é possível notar infiltração inflamatória (BENNETT, 1994; CATROXO *et al.*, 2012; BARBOSA; COLVERO, 2020; COSTA *et al.*, 2020; WOAAH, 2023).

Para o diagnóstico destas enfermidades é necessária a realização de exame clínico neurológico, avaliação do histórico animal, amparados, sempre que possível, por hemograma completo e perfil químico sérico. Técnicas de imagem como radiografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética também podem ser realizadas em suspeita de trauma espinhal ou intoxicação por metais pesados. A necropsia é essencial para a descrição das lesões macroscópicas e viabilizar os encaminhamentos para a histopatologia, sendo também possível realizar exames laboratoriais como PCR, RT-PCR e os exames bacteriológicos destas amostras (BENNETT, 1994; SCHMIDT; ONDREKA, 2019; COSTA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021; WOAAH, 2023).

O presente capítulo teve como objetivo relatar um caso clínico de hidrocefalia em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) com 1,5 anos, oriundo da cidade de Ribeirão das Neves em Minas Gerais.

6.2.MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Animal utilizado

No dia 24 de maio de 2022 foi recebido pelo LDA da Escola de Veterinária da UFMG um papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), com 1 ano e 7 meses de idade (jovem), peso de 330g, com origem em Ribeirão das Neves, Minas Gerais, Brasil. O criatório apresentava diversos animais com queda de postura de ovos, apáticos e alta mortalidade, com a suspeita de infecção por Bornavírus aviário, doença que causa problemas neurológicos.

A ave do estudo não se alimentava sozinha, somente por sonda ou seringa, sendo mantida em um viveiro com outros animais. Não foi tratada com antiviral, uma vez que, em exames anteriores não foi constada a presença de vírus, e em 2021 foi realizado teste de bornavírus (RT-PCR) que constou negativo. Vários protocolos foram testados como anticonvulsivante e canabidiol por mais de 3 dias, mas não foi obtida resposta, tendo, portanto, prognóstico desfavorável.



Figura 7. *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro) utilizado no estudo.

Foi realizada eutanásia no dia 24 de maio de 2022 com autorização e à pedido do tutor, pelo protocolo com quetamina, morfina e midazolam calculados em dose 3 vezes maior que a terapêutica para um animal de 0,5kg administrada por via intramuscular, após sedação profunda do animal, o mesmo foi colocado em câmara de CO₂. O laboratório apresenta

autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) de número 327/2017, autorizando a manipulação e coleta de material de aves silvestres.

6.2.2. Necropsia

A necropsia completa foi realizada no Setor de Doenças das Aves, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMPV) da Escola de Veterinária - UFMG, para o diagnóstico *post mortem*. O procedimento foi realizado com uso de instrumentais cirúrgicos autoclavados sendo que as pinças e tesouras foram trocadas durante o procedimento, sempre que necessário. As amostras de tecido coletadas foram acondicionadas em frascos de coleta novos autoclavados.

Foram coletadas alíquotas em duplicata de cérebro, cerebelo, meninge, lobo óptico, pulmão, traqueia, fígado, baço, ventrículo, adrenal, tireoide, adrenal, duodeno, jejuno, íleo. Uma alíquota de aproximadamente 300 μ L de cada tecido foi congelada a -80°C em microtubo *RNAse free* de 1,5 mL, para posterior extração de DNA e RNA. Outra fração tecidual foi armazenada em formalina 10% para fixação e futura análise histopatológica. Também foram coletadas as amostras de sangue em EDTA, soro sanguíneo e conteúdo do inglúvio, proventrículo e duodeno. Para análise histopatológica, foram coletados cérebro, cerebelo, meninge, lobo óptico, pulmão, traqueia, fígado, baço, ventrículo, adrenal, tireoide, adrenal, duodeno, jejuno, íleo.

6.2.3. Biologia molecular

Para a extração do DNA e RNA total, fragmentos de SNC foram macerados e homogeneizados em PBS 1X estéril em diluição de 1:5 com auxílio de vórtex e centrifugados a 5000xg, a 4°C , por 10 minutos. O sobrenadante foi alíquotado em tubos de microcentrífuga de 1,5 μ L *RNA-DNAse free*. A extração de RNA e DNA foi feita utilizando-se o kit QIAamp[®] MinElute[®] Virus Spin kit DNA/RNA (QIAGEN), conforme protocolo do fabricante.

Todas as amostras obtidas foram testadas por técnicas de PCR diferentes, sendo convencional e/ou tempo real para diversos agentes de acordo com os protocolos definidos por cada autor e com uso das sequências de primers abaixo citadas.

Tabela 11. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados.

Agente	Primers	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
WNV	WNVF	AACCKCCAGAAGGAGTSAAR	370	Silva <i>et al.</i> (2018)
	WNR	AGCYTCRAACTCCAGRAAGC		
Flavivirus	NS5 (+)	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGT ACT	256	Fulop <i>et al.</i> (1993)
	NS5 (-)	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGC ATACA		
Alphavirus	M2W	YAGAGCDTTTTCGCAWSTRGCHW	434	Pfeffer <i>et al.</i> (1997)
	cM3W	ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCC DAYCC		
Influenza A	InfA FW	GACCAATCTTGTACCTCTGAC	-	WHO (2009)
	InfA RV	AGGGCATTYTGACAAAKCGTCTA [6FAM]		
	InfA Probe	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG [BHQ-1]		
H1N1pdm09	SW InfA FW	GCACGGTCAGCACTTATYCTRAG	-	WHO (2009)
	SW InfA RV	GTGRGCTGGGTTTTCATTTGGTC [6-FAM]		
	SW InfA Probe	CYACTGCAAGCCCA”T”ACACACAAG CAGGCA [BHQ-1]		
H3 - 1ª reação	FW1H3	ATATGTTCAAACGTCAGGGAGA	544	Fraiha <i>et al.</i> (2021)
	RV1H3	GTCGATTGCTGCTTGAGTGC		
H3N2 - 2ª reação	FW1H3	ATATGTTCAAACGTCAGGGAGA	279	
	RV2H3	TCCCCATTTGGAGTGACGCA		
Influenza A	M52C	CTTCTAACCGAGGTCGAAACG	244	Fouchier <i>et al.</i> (2000)
	M253R	AGGGCATTYTGACAAAGTCGTCTA		
Paramyxovirus	PAR-F1	GAAGGITATTGTCAIAARNTNTGGAC	200 a 500	Tong <i>et al.</i> (2008)
	PAR-F2	GTTGCTTCAATGGTTCARGGNGAYA A		
	PAR-R	GCTGAAGTTACIGGITCICCDATRTTN C		
NDV (Doença de Newcastle)	NDVF	CCTTGGTGAITCTATCCGIAG	254	Seal <i>et al.</i> (1995)
	NDVR	CTGCCACTGCTAGTTGIGATAATCC		
Bornavirus aviário	ABV_MF	GGRCAAGGTAATYGTYCCTGGATGG CC	360	Kistler <i>et al.</i> (2008)
	ABV_PR	CCAACACCAATGTCCGAAGMCG		
Pan-herpesvirus	DFA	GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC	210 a 315	Vandevanter <i>et al.</i> (1996)
	ILK	TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMT NAA		
	KG1	GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT		
	TGV	TGTAACTCGGTGTAYGGNTTYACNG GNGT		
	IYG	CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT		
MDV (vírus da doença de Marek)	MR-S	TGTTCCGGGATCCTCGGTAAGA	583 a 763	Chang <i>et al.</i> (2002)
	MR-AS	AGTTGGCTTGTGATGAGCCAG		

PsHV-1 (virus da doença de Pacheco)	PsHV UL16/17F	TGCGTGGGGTTAAACTCGGAAC	667	Tomaszewski <i>et al.</i> (2006)
	PsHV UL16/17R	CGACTACACGAGCCTAACATC		
	PsHV UL16/17 Internal	CGACTTCTCAACGACGTC	418	
Adenovirus	Hexon AF	CAARTTCAGRCAGACGGT	897	Meulemans <i>et al.</i> (2001)
	Hexon BR	TAGTGATGMCGSGACATCAT		

6.3.RESULTADOS

6.3.1. Descrição clínica

Ave com escore corporal regular (3/5), macrocefalia, sensibilidade à palpação abdominal, presença de fezes aderidas à cloaca, *head pressing*, cabeça pendida para o lado esquerdo, incoordenação ao voo. Sem resposta no lado esquerdo: pupila não responsiva à luz, sem reflexo pupilar de aproximação e palpebral, membro inferior sem resposta ao toque e propriocepção.

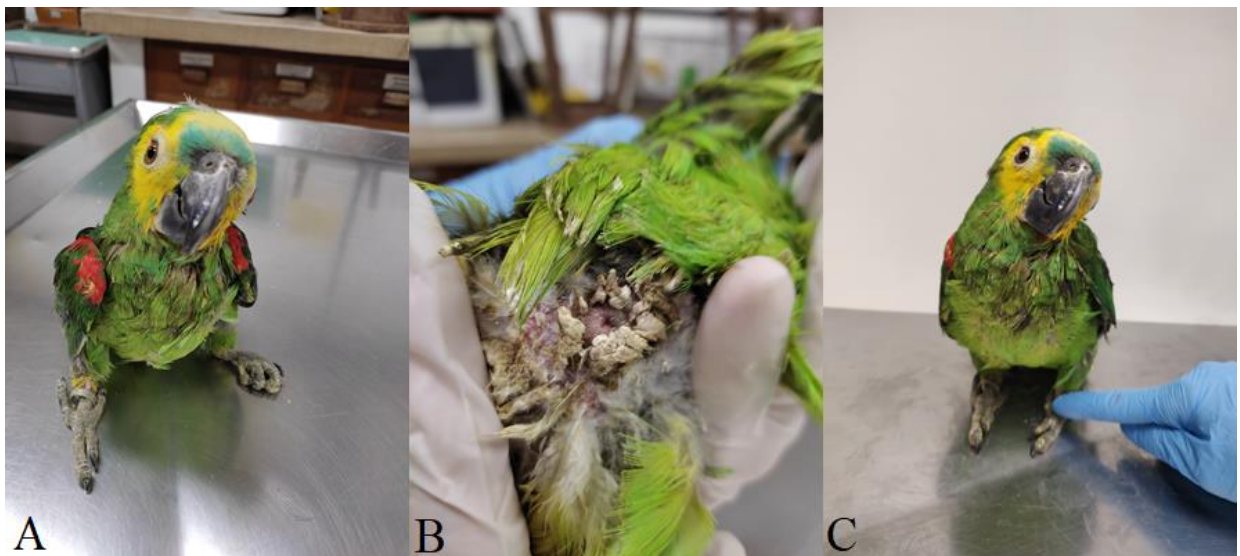


Figura 8. Sinais clínicos apresentados pelo animal. A- Posicionamento incorreto do membro esquerdo, cabeça pendida para o lado esquerdo, macrocefalia. B- Excretas em região pericloacal. C- Falta de propriocepção em membro esquerdo.

6.3.2. Alterações macroscópicas

Durante o exame *post mortem* foram observadas alterações na região da cabeça, com distensão e adelgaçamento da calota craniana (Fig. 9A), microcefalia e presença de aproximadamente 10 mL de líquido cefalorraquidiano límpido (Fig. 9B) e espessamento das meninges (Fig. 9C). Área hemorrágica de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro foi observada

na musculatura peitoral (Fig. 10A), associada à região de aplicação de anestesia para a eutanásia. Intestino hiperêmico na região do duodeno (Fig. 10B), com vasos bem definidos e ingurgitados, inglúvio, proventrículo; ventrículo sem conteúdo alimentar (Fig. 10C), embora sem alterações aparentes e aumento de adrenal aproximadamente 6 mm (Fig. 10D).

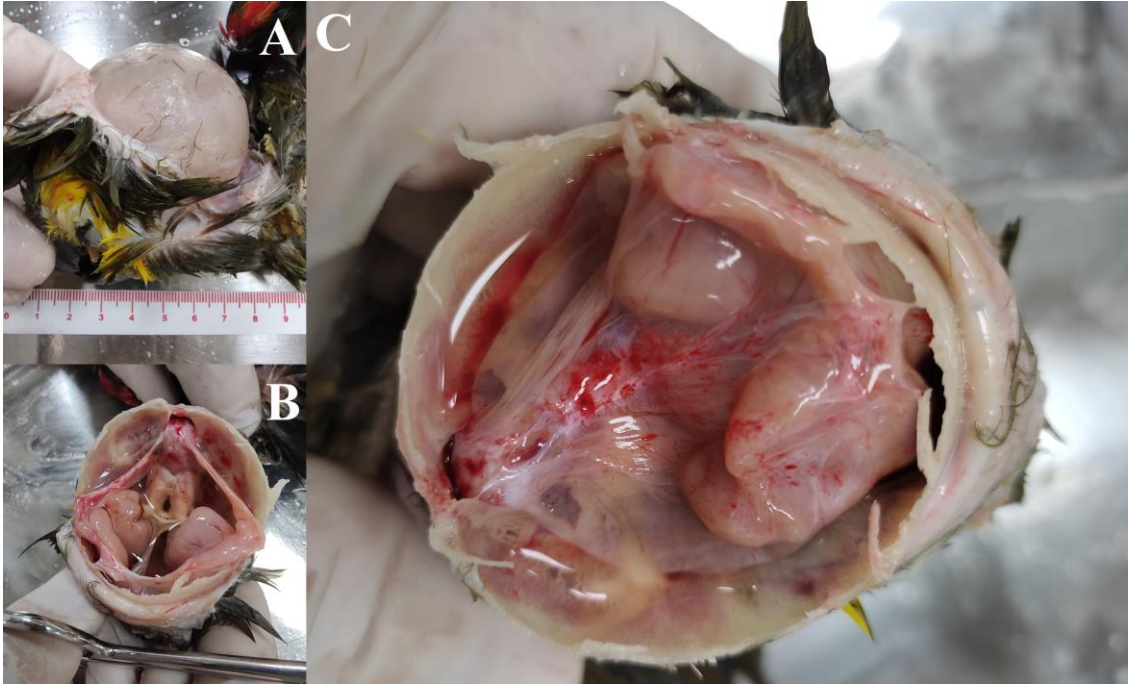


Figura 9. A- Distensão e adelgaçamento da calota craniana. B- Microencefalia e presença de líquido cefalorraquidiano límpido. C- Espessamento de meninge.



Figura 10. A- Área hemorrágica de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro na musculatura peitoral (círculo vermelho). B- Intestino hiperêmico, com vasos bem definidos e ingurgitados (setas vermelhas). C- Ventrículo sem conteúdo alimentar (quadrado vermelho). D- Adrenal aumentada (círculo preto).

6.3.3. Exames laboratoriais

A microscopia direta de conteúdo do inglúvio não revelou estruturas de parasitas e leveduras. A avaliação da mucosa e conteúdo do proventrículo não revelou a presença de

Macrorhabdus ornithogaster (megabactéria). O exame da mucosa e conteúdo do duodeno não indicou a presença de parasitos. Entretanto, foram visualizadas estruturas compatíveis com *Blastocystis* sp. em amostras de conteúdo digestivo de proventrículo, ventrículo e duodeno (Fig. 11).

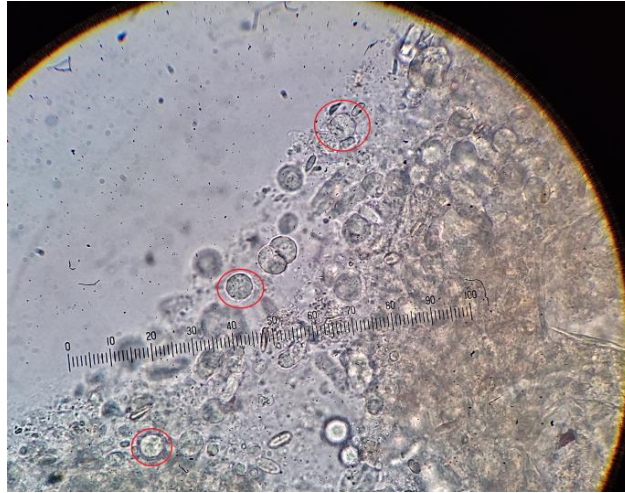


Figura 11. Análise microscópica de conteúdo digestivo, aumento 1000X. Estruturas compatíveis com *Blastocystis* sp. (círculos vermelhos).

A histopatologia do sistema nervoso central revelou as seguintes alterações descritas adiante.

- Cérebro (Fig. 12 A-C): fragmento de cérebro apresentando áreas multifocais discretas de malácia na substância branca e cinzenta, com vacuolização do parênquima associada a macrófagos espumosos preenchidos por conteúdo amarronzado. Há áreas multifocais contendo astrócitos tumefeitos (gemistócitos) e satelitose neuronal multifocal (Fig. 13). A interpretação das lesões permitiu o diagnóstico de malácia multifocal discreta associada à gliose e satelitose neuronal.

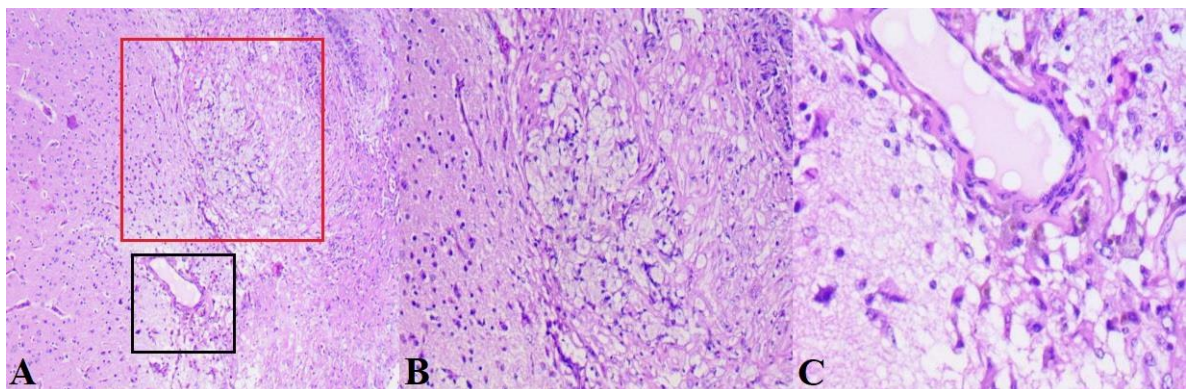


Figura 12. Análise microscópica de cérebro, coloração hematoxilina-eosina, malácia multifocal discreta. A- Alteração cérebro. B- Aumento de 200x da imagem no quadrado vermelho em imagem A. C- Aumento de 1000x de imagem no quadrado preto na imagem A.

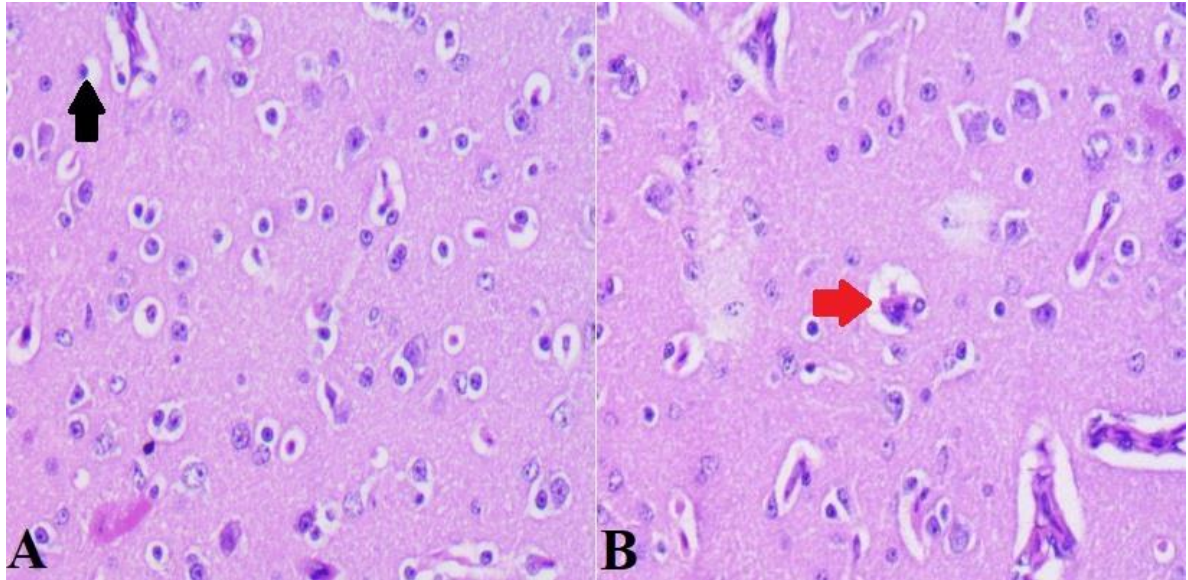


Figura 13. Análise microscópica de cérebro, coloração hematoxilina-eosina, áreas de malácia multifocal contendo astrócitos tumefeitos (gemistócitos) e satelirose neuronal multifocal. A- Sateirose neuronal (seta preta). B- Gemistócito (seta vermelha).

- Cerebelo: fragmento de cerebelo apresentando áreas multifocais de vacuolização (Fig. 14) da substância branca no cerebelo e tronco encefálico.

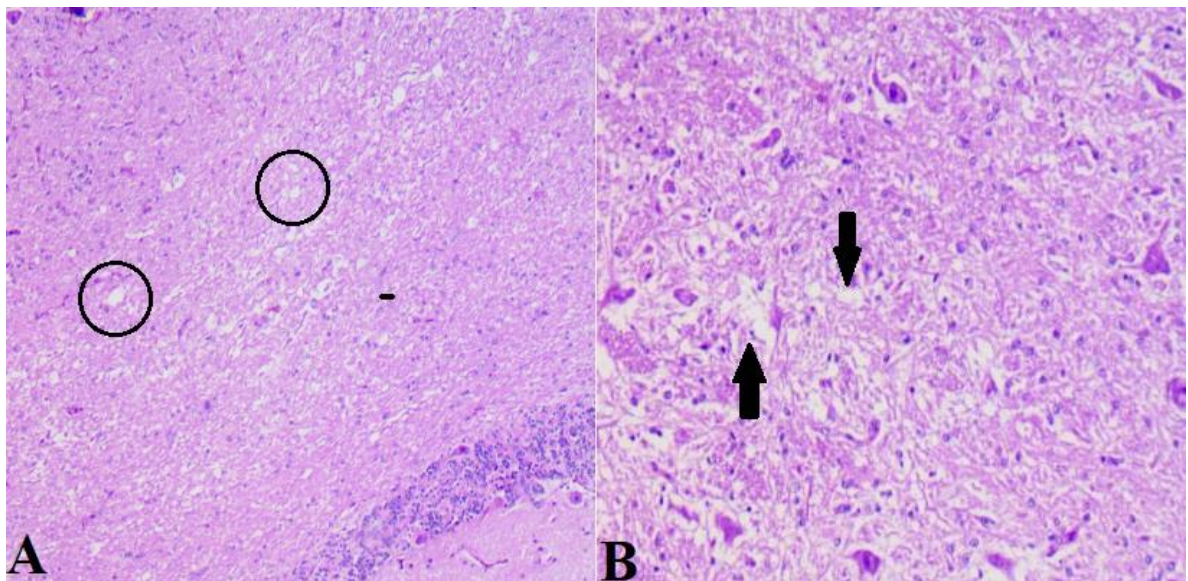


Figura 14. Análise microscópica de cerebelo, coloração hematoxilina-eosina, vacuolização cortical multifocal (círculos pretos). B- Vacuolização de substância branca (setas pretas) em aumento de 200x.

- Meninges: fragmento de cérebro e meninges (Fig. 15A-C) apresentando acentuada atrofia das substâncias branca e cinzenta, formando apenas uma camada delgada sem distinção entre as duas porções e contendo neurônios e poucos astrócitos, oligodendrócitos e células gitter, todos distribuídos de forma desordenada, desorganização cortical. Há moderada deposição de conteúdo dourado a amarronzado

no interior de neurônios, compatível com lipofuscina, e vacuolização multifocal moderada.

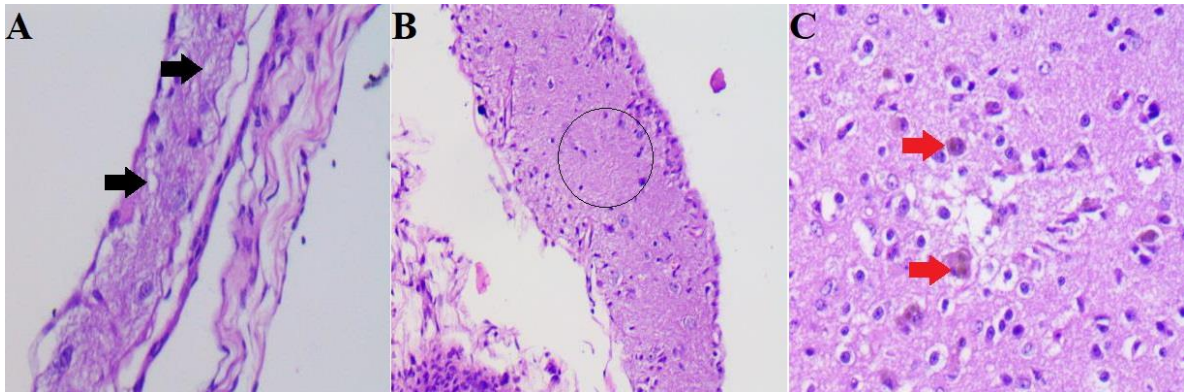


Figura 15. Análise microscópica de meninge, coloração hematoxilina-eosina A- Acentuada atrofia cortical associada à vacuolização e desorganização cortical (setas pretas). B. Vacuolização e desorganização cortical (círculo preto). C- Deposição de conteúdo dourado a amarronzado no interior de neurônios (setas vermelhas).

6.4.DISCUSSÃO

A hidrocefalia pode ter diversas origens, congênita ou adquirida, sendo em processos crônicos, determinar a causa inicial nem sempre é possível (MARUSAK *et al.*, 2010; KELLER *et al.*, 2011; SCHMIDT; ONDREKA, 2019). Os resultados histopatológicos de acentuada atrofia cortical e malácia discreta, associadas à lipofuscinosose e gliose são compatíveis com lesão secundária à compressão cortical devida a hidrocefalia. Não foi possível determinar o local exato do bloqueio no fluxo do líquido que originou a hidrocefalia, entretanto, considerando os resultados negativos para as diversas etiologias testadas, sugere-se causa congênita. A circulação e a absorção de líquido cefalorraquidiano (LCR) em aves são similares às de mamíferos, mas, alguns processos patológicos por muitas vezes são mais estudados e entendidos em mamíferos, o diagnóstico e investigação de alterações em aves se torna um desafio (FLEMING *et al.*, 2003; KELLER *et al.*, 2011; SCHMIDT; ONDREKA, 2019).

Assim como no caso relatado, há na literatura relatos de hidrocefalia em psitacídeos como o de Keller *et al.* (2011) que relataram o primeiro caso de hidrocefalia ex-vácuo, em papagaio-de-cabeça-amarela (*Amazona ochrocephala oratrix*) com atrofia do sistema nervoso central. Além de Thurber *et al.* (2015) que realizaram o diagnóstico de hidrocefalia *ante mortem* por tomografia computadorizada em papagaio-do-congo (*Psittacus erithacus erithacus*), além da descrição de Fleming *et al.* (2003) que realizaram diagnóstico de hidrocefalia também em papagaio-do-congo por meio de ressonância magnética, por fim,

Johnston *et al.* (2006) que relataram hidrocefalia comunicante em uma Cacatua-de-Goffin (*Cacatua goffini*). Apesar de não ter sido feita por meio de exame de imagem, foi possível, assim como nos casos relatados, diagnosticar a hidrocefalia no psitacídeo em questão.

Os sinais clínicos principais observados no animal foram déficits visuais com falta de reflexo pupilar à luz, ausência de resposta à ameaça, perda de propriocepção, ambos os sinais mais presentes no lado esquerdo, como observado por SCHMIDT e ONDREKA (2019) em lesões oriundas de hidrocefalia. A hipoplasia de sistema nervoso central, a expansão dos ventrículos e a atrofia do SNC observadas no caso relatado também estão em concordância com descrições prévias de Johnston *et al.* (2006). Os aspectos clínicos, os achados *post mortem* e histopatológicos com ausência de alterações inflamatórias no sistema nervoso central foram consistentes com o diagnóstico de hidrocefalia de causa(s) congênita(s).

Dentre as observações dignas de nota nos exames laboratoriais, foi possível observar a presença de estrutura compatível com *Blastocystis hominis* em amostras de conteúdo digestivo. O *B. hominis* é um protozoário comum de trato digestivo humano, sendo encontrado em pessoas saudáveis ou não. O parasita do gênero *Blastocystis* sp. também já foi encontrado em suínos, bovinos, aves, anfíbios, primatas não humanos, muitas vezes sendo relacionado a infecção zoonótica. Na maioria destes casos, somente é possível definir, por meio de visualização por microscopia, a infecção pelo gênero, não podendo ser distinguível a espécie (ABE; WU; YOSHIKAWA, 2003). Este parasita já foi descrito em perus, patos domésticos, gansos, galinhas domésticas, codornas, avestruzes. Em humanos, a infecção geralmente envolve sinais de diarreia, desconforto abdominal, anorexia. Normalmente, este parasita é comensal, podendo ser patogênico em casos de imunossupressão, má nutrição e infecção por outros agentes, sendo, na maioria das vezes, um agente oportunista (BOREHAM; STENZEL, 1993; STENZEL; CASSIDY; BOREHAM, 1994). Como o animal em questão apresentava quadro de inanição, a presença do parasita pode ser justificada pelo seu oportunismo.

7. CONCLUSÕES

Neste texto pretendeu-se oferecer uma contribuição acerca de problemas neurológicos em aves e suas principais causas com foco nos agentes infecciosos virais.

Pode-se concluir que são diversos os agentes virais causadores de encefalites em aves de diferentes ordens. Outro fator importante é o fato de em enfermidades neurológicas advindas de agentes virais não haverem sinais clínicos específicos (patognomônicos), que, em certas enfermidades, são extremamente importantes para a determinação de causa. Exames laboratoriais são essenciais para se chegar a um diagnóstico definitivo, tendo os sinais clínicos e outras avaliações importantes para o auxílio no diagnóstico. A determinação assertiva do agente envolvido é também importante uma vez que a maioria das enfermidades que levam à sinais neurológicos em aves silvestres, são importantes zoonoses.

Os resultados de investigação direta das etiologias no SNC indicaram agentes de alta relevância que, embora previamente descritos na literatura, são parcialmente negligenciados como causa de morbidade ou óbito, possivelmente devido às dificuldades de diagnóstico etiológico definitivo.

As investigações cloacais e traqueais de *Bornavirus* e AIV em aves vivas indicaram a presença viral em órgãos que sugerem a transmissão horizontal, presença ambiental e a potencial perpetuação nos cativeiros.

Torna-se importante destacar que um gargalo à pesquisa retrospectiva é o armazenamento dos tecidos (SNC, cérebro e/ou cerebelo) em condição de potencial degradação de material genético, com potencial subavaliação, por redução de detecção. As condições ideais para o diagnóstico das encefalites devem contar com envio e análise imediatos.

Caracterizou-se caso de hidrocefalia em *Amazona aestiva* por descrição macro e microscópica das lesões. Diversas etiologias infecto-parasitárias de relevância para o sistema nervoso central de aves foram pesquisadas, com resultados negativos, sugerindo causa congênita.

Importante notar que médicos veterinários ao realizar diagnóstico em aves apresentando sinais clínicos compatíveis com lesões em sistema nervoso central devem direcionar atenção para questões como: histórico do animal e, se possível, seus pais, sinais clínicos presentes, localização da propriedade/ habitat, presença de contato com outros animais e/ ou humano.

Torna-se importante melhorar o sistema de manejo, diagnóstico, prevenção, tratamento, controle, de forma a mitigar as enfermidades. O uso de desinfetantes, como cloro e detergentes, para a limpeza do ambiente, uso de quarentena (separação de animais com sinais clínicos aparentes) de forma a evitar contato entre doentes e sadios e diagnóstico de enfermidades, evitar aglomeração de animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, N.; WU, Z.; YOSHIKAWA, H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from birds by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. **Parasitology Research**, v. 89, n. 5, p. 393-396, mar. 2003.
- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2023**. Disponível em: <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>>. Acesso em: 29 jun. 2023.
- AGRAWAL, A. S. *et al.* Prevalence of respiratory syncytial virus group B genotype BA-IV strains among children with acute respiratory tract infection in Kolkata, Eastern India. **Journal of Clinical Virology**, v. 45, n. 4, p. 358-361, ago. 2009.
- ALEXANDER, K. A. *et al.* The Ecology of Pathogen Spillover and Disease Emergence at the Human-Wildlife-Environment Interface. In: HURST, C. J. **The Connections Between Ecology and Infectious Disease: advances in environmental microbiology**. Ohio, USA: Springer Cham, 2018. Cap. 3. p. 267-298. ISSN 2366-3324.
- ALVAREZ, P. *et al.* First isolation of an H1N1 avian influenza virus from wild terrestrial non-migratory birds in Argentina. **Virology**, v. 396, n. 1, p. 76-84, jan. 2010.
- ANTONIO, E. S.; FRAGA, R. E.; TOMAZI, L. Sexagem molecular em araras vermelhas e Centros de Triagem de Animais Silvestres: revisão. **Pubvet**, v. 15, n. 11, p. 1-10, 3 nov. 2021.
- BARBOSA, C. M. *et al.* Pacheco's Disease Outbreak with High Mortality in Brazilian Captive Psittacine Birds. **Hosts and Viruses**, v. 9, p. 32-37, 26 dez. 2022.
- BARBOSA, T. M. C.; COLVERO, L. P. Enfermidade de Marek, complexo leucótico aviário e reticuloendoteliase. In: FILHO, R. L. A. *et al.* **Doenças das aves**. 3. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2020. p. 673 - 692. ISBN 978-65-991079-0-0.
- BAYMA, A. P. *et al.* Biodiversidade. In: IBAMA. **Relatório de Qualidade do Meio Ambiente (RQMA)**. Brasília, DF: Brasil, 2020, 2022. Cap. 4. p. 232-301. Disponível em: https://www.gov.br/ibama/pt-br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2022/2022-06-03_RQMA_Brasil_2020.pdf. Acesso em: 28 jan. 2023.
- BENNETT, R. A. Neurology. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine: Principles and Application**. Lake Worth, Flórida: Wingers Publishing, Inc., 1994. cap. 28, p. 723-747.
- BLUME, G. R. *et al.* Visceral Marek's disease in white-peafowl (*Pavo cristatus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, p. 1602-1608, dez. 2016.
- BOREHAM, P. F.L.; STENZEL, D. J. *Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology, and Epizootiology. **Advances in Parasitology**, v. 32, p. 1-70, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Influenza Aviária (IA)**. 2021. Programa Nacional de Saúde Avícola - PNSA. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/influenza-aviaria-ia>>. Acesso em: 11 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 32**, de 13 de maio de 2002. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/imagens/IN32.pdf>>. Acesso em: 9 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 50**, de 24 de setembro de 2013. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/31061237/do1-2013-09-25-instrucao-normativa-n-50-de-24-de-setembro-de-2013-31061233>. Acesso em: 2 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **PLANO DE CONTINGÊNCIA PARA INFLUENZA AVIÁRIA E DOENÇA DE NEWCASTLE**: versão 1.4. VERSÃO 1.4., abr. 2013. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/influenza-aviaria/plano-de-contingencia/Plano-de-Contingencia-Versao-1_4.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre do Nilo Ocidental**. 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-do-nilo-ocidental>>. Acesso em: 11 maio 2023.

BUCHY, P. *et al.* Molecular Epidemiology of Clade 1 Influenza A Viruses (H5N1), Southern Indochina Peninsula, 2004–2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 10, p. 1641-1644, out. 2009.

BURGUEÑO, A. *et al.* Seroprevalence of St. Louis Encephalitis Virus and West Nile Virus (Flavivirus, Flaviviridae) in Horses, Uruguay. **Biomed Research International**, epub, v. 2013, p. 1-5, 29 dez. 2013.

CANTARINO, L.; MERCHAN-HAMANN, E. Influenza in Brazil: surveillance pathways. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 01, p. 13-23, 31 jan. 2016.

CASTRO FILHO, R. P. L. *et al.* Serological Diagnosis of Influenza A Subtype H1 on Family Poultry of Belo Horizonte, Minas Gerais and Santa Maria, Rio Grande Do Sul, in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 20, n. 4, p. 811-816, dez. 2018.

CATROXO, M. H. B. *et al.* Avian Paramyxoviruses: detection by transmission electron microscopy techniques. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 30, n. 2, p. 723-730, jun. 2012.

CAUSEY, D.; EDWARDS, S. V. Ecology of Avian Influenza Virus in Birds. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 1, p. s29-s33, 15 fev. 2008.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Zoonotic diseases**, jul. 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/onehealth/basics/zoonotic-diseases.html>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

CEMAVE (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres); ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). **Relatório de Áreas de Concentração de Aves Migratórias no Brasil:** (inclui aves ameaçadas e morcegos). 4. ed. Cabedelo, 2022. ISSN: 2446-9750 (versão on-line). Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cemave/images/stories/Publica%C3%A7%C3%B5es_cient%C3%ADficas/RELATORIO_MIGRATORIAS_2022_opt.pdf. Acesso em: 28 abr. 2023.

CHANG, K. S. *et al.* The Detection of the meq Gene in Chicken Infected with Marek's Disease Virus Serotype 1. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 5, p. 413-417, maio 2002.

CHEUNG, T. K. W.; POON, L. L. M. Biology of Influenza A Virus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1102, n. 1, p. 1-25, abr. 2007.

CHIOCCA, S. *et al.* The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO. **Journal of Virology**, v. 70, n. 5, p. 2939-2949, maio 1996.

CHOI, K. S. *et al.* Epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus infection in commercial chickens in Korea. **Poultry Science**, v. 91, n. 10, p. 2502-2506, 1 out. 2012.

CLARK, N. J. *et al.* Co-infections and environmental conditions drive the distributions of blood parasites in wild birds. **Journal of Animal Ecology**, v. 85, n. 6, p. 1461-1470, 26 ago. 2016.

COHEN, J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, n. 1, p. 37-46, abr. 1960.

COLPITTS, T. M. *et al.* West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 635-648, out. 2012.

COSTA, E. A. *et al.* Diagnóstico etiológico de enfermidades do sistema nervoso central de equinos no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 391-399, abr. 2015.

COSTA, E. A. *et al.* Epidemiological surveillance of West Nile virus in the world and Brazil: relevance of equine surveillance in the context of "One Health". **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 4, p. 1-11, mar. 2020.

CUYPERS, H. T. *et al.* Storage conditions of blood samples and primer selection affect the yield of cDNA polymerase chain reaction products of hepatitis C virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3220-3224, dez. 1992.

DAMIR, H. A. *et al.* Investigation of a herpesvirus outbreak in mixed breeds of adult domestic ducks using next generation sequencing. **Plos One**, v. 18, n. 1, p. e0280923, 27 jan. 2023.

DE ARAUJO, J. *et al.* Avian Influenza Virus (H11N9) in Migratory Shorebirds Wintering in the Amazon Region, Brazil. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 110141-110143, 16 out. 2014.

DEIN, F. J. *et al.* Mortality of captive whooping cranes caused by eastern equine encephalitis virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 9, p. 1006-1010, 1 nov. 1986.

- DEVLIN, J. M. *et al.* Impacts of poultry vaccination on viruses of wild bird. **Current Opinion In Virology**, v. 19, p. 23-29, ago. 2016.
- DIAZ, L. A. *et al.* West Nile Virus in Birds, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 689-691, 4 abr. 2008.
- DONATTI, R. V. *et al.* Fatal Proventricular Dilatation Disease in Captive Native Psittacines in Brazil. **Avian Diseases**, v. 58, n. 1, p. 187-193, mar. 2014.
- ECCO, R. *et al.* Sistema Nervoso. In: SANTOS, R. L; ALESSI, A. C. **Patologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. cap. 8, p. 783-933.
- ESTEVAM, G.; JOB, J. R. P. P. Animais exóticos domesticados com potencial zoonótico - Revisão da literatura. **Revista Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, p. 114-120, 12 ago. 2016.
- FAGRE, A. C. *et al.* Assessing the risk of human-to-wildlife pathogen transmission for conservation and public health. **Ecology Letters**, v. 25, n. 6, p. 1534-1549, 22 mar. 2022.
- FEITOSA JUNIOR, A. B. *et al.* Influenza aviária: vigilância ativa em criações avícolas de subsistência no entorno do sítio de aves migratórias de Panaquatira, Maranhão, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 4, p. 17773-17782, 6 abr. 2020.
- FERNANDES, L. M. B. *et al.* Soroepidemiologia da doença de Newcastle em plantéis de avestruzes dos Estados da Bahia e de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 135-140, 18 dez. 2009.
- FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1643-1649, nov. 2000.
- FLEMING, G. J. *et al.* High field strength (4.7t) magnetic resonance imaging of hydrocephalus in an african grey parrot (*Psittacus erithacus*). **Veterinary Radiology**, v. 44, n. 5, p. 542-545, set. 2003.
- FOUCHIER, R. A. M. *et al.* Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4096-4101, nov. 2000.
- FRAIHA, A. L. S. *et al.* Swine influenza A virus subtypes circulating in Brazilian commercial pig herds from 2012 to 2019. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2421-2430, 28 ago. 2021.
- FULOP, L. *et al.* Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. **Journal of Virological Methods**, v. 44, n. 2-3, p. 179-188, out. 1993.
- GAMINO, V.; HÖFLE, U. Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 39-54, 3 jun. 2013.
- GARCIA, S. C. *et al.* Molecular Epidemiology of Newcastle Disease in Mexico and the Potential Spillover of Viruses from Poultry into Wild Bird Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 4985-4992, 15 ago. 2013.

GERLACH, H. Viruses. *In*: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine: Principles and Application**. Lake Worth, Flórida: Wingers Publishing, Inc., 1994. cap. 28, p. 862–948.

GIL, L. H. V. G. *et al.* Active Circulation of Madariaga Virus, a Member of the Eastern Equine Encephalitis Virus Complex, in Northeast Brazil. **Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 1-13, 3 ago. 2021.

GIRARD, M. P. *et al.* The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: a review. **Vaccine**, v. 28, n. 31, p. 4895-4902, jul. 2010.

GOGOI, P.; GANAR, K.; KUMAR, S. Avian Paramyxovirus: a brief review. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 64, n. 1, p. 53-67, 28 abr. 2015.

GONÇALVES, G. A. M. Principais enfermidades de aves selvagens e de companhia. *In*: FILHO, R. L. A. *et al.* **Doenças das aves**. 3. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2020. p. 1299-1321. ISBN 978-65-991079-0-0.

GREENACRE, C. B. Viral diseases of companion birds. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 8, n. 1, p. 85-105, jan. 2005.

GREGORY, C. R. *et al.* A Review of Proventricular Dilatation Syndrome. **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, v. 8, n. 2, p. 69-75, 1994.

HECKMANN, J. *et al.* Investigation of Different Infection Routes of Parrot Bornavirus in Cockatiels. **Avian Diseases**, v. 61, n. 1, p. 90-95, mar. 2017.

HEDLEY, J. *et al.* Neurologic Diseases of Birds and Reptiles. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 24, ed. 1, p. 6-20, jan. 2015.

HERNANDEZ-DIVERS, S. M. *et al.* A Survey of Selected Avian Pathogens of Backyard Poultry in Northwestern Ecuador. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 20, n. 3, p. 147-158, set. 2006.

HINTON, M. G. *et al.* West Nile Virus Activity in a Winter Roost of American Crows (*Corvus brachyrhynchos*): is bird-to-bird transmission important in persistence and amplification?. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 4, p. 683-692, 24 abr. 2015.

HOPPE, S. *et al.* The Isolation, Pathogenesis, Diagnosis, Transmission, and Control of Avian Bornavirus and Proventricular Dilatation Disease. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 13, n. 3, p. 495-508, set. 2010.

HOPPE, S. M.; TIZARD, I.; SHIVAPRASAD, H.L. Avian Bornavirus and Proventricular Dilatation Disease: Diagnostics, Pathology, Prevalence, and Control. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 16, n. 2, p. 339-355, maio 2013.

HU, Z. *et al.* Current situation and future direction of Newcastle disease vaccines. **Veterinary Research**, v. 53, n. 1, 26 nov. 2022.

HUANG, YHU-CHERING *et al.* Adenovirus infection associated with central nervous system dysfunction in children. **Journal of Clinical Virology**, v. 57, n. 4, p. 300-304, ago. 2013.

IBAMA. **Manual de Anilhamento de Aves Silvestres**. 2. ed. Brasília: Ibama, 1994. 146 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **Efetivo dos rebanhos por tipo (cabecas), 2020**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>. Acesso em: 29 nov. 2021.

ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). **Relatório anual de rotas e áreas de concentração de aves migratórias no Brasil**. Cabedelo, jan. 2016. ISSN: 2359-1749 (versão impressa).

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. **Current ICTV Taxonomy Release. Taxonomy Browser, 2023**. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>. Acesso em: 21 jun. 2023.

IKUTA, N.; FONSECA, A. S. K.; LUNGE, V. R. Diagnóstico molecular. In: FILHO, R. L. A. *et al.* **Doenças das aves**. 3. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2020. p. 177 - 192. ISBN 978-65-991079-0-0.

ISLAM, G. *et al.* Pasteurization, storage conditions and viral concentration methods influence RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 821, p. 1-9, maio 2022.

IUCN. *Amazona aestiva*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2019**: e.t22686332a154573813. e.T22686332A154573813. 2019. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T22686332A154573813.en>. Acesso em: 13 jun. 2023.

JALALI, M. *et al.* The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In: JALALI, M.; SALDANHA, F.; JALALI, M. **Basic Science Methods for Clinical Researchers**. Academic Press, 2016. Cap. 1. p. 1-18. (ISBN 978-0-12-803077-6). Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1>. Acesso em: 04 maio 2022.

JAMES, G. S. *et al.* Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 1572-1575, jun. 1996.

JOHNSTON, H. A.; LINDSTROM, J. G.; OGLESBEE, M. Communicating Hydrocephalus in a Mature Goffin's Cockatoo (*Cacatua goffini*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 20, n. 3, p. 180-184, 1 set. 2006.

JONES, M. P.; OROSZ, S. E. Overview of avian neurology and neurological diseases. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 5, n. 3, p. 150-164, jul. 1996.

KATOH, H. *et al.* A Review of DNA Viral Infections in Psittacine Birds. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 9, p. 1099-1106, 16 out. 2010.

KELLER, K. A. *et al.* Hydrocephalus in a Yellow-headed Amazon Parrot (*Amazona ochrocephala oratrix*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 25, n. 3, p. 216-224, set. 2011.

KHANAL, S.; GHIMIRE, P.; DHAMOON, A. The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: the innocuous to the deadly. **Biomedicines**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 7 mar. 2018.

- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16 p.111-120, 1980.
- KISTLER, A. L. *et al.* Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. **Virology Journal**, v. 5, 31 jul. 2008.
- KRAUSS, S.; WEBSTER, R. G. Avian Influenza Virus Surveillance and Wild Birds: past and present. **Avian Diseases**, v. 54, n. s1, p. 394-398, 1 mar. 2010.
- KUMAR, S. *et al.* Complete genome sequence of avian paramyxovirus-3 strain Wisconsin: evidence for the existence of subgroups within the serotype. **Virus Research**, v. 149, n. 1, p. 78-85, abr. 2010.
- LEBDAH, M. *et al.* Molecular characterization of aviadenovirus serotypes and pathogenicity of the identified adenovirus in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 101, n. 12, p.1-13, dec. 2022.
- LIEBHART, D. *et al.* Diagnosing Infectious Diseases in Poultry Requires a Holistic Approach: a review. **Poultry**, v. 2, n. 2, p. 252-280, 25 abr. 2023.
- LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 36, p. 1-7, 2016.
- LIU, W. *et al.* Occurrence and Reassortment of Avian Influenza A (H7N9) Viruses Derived from Coinfected Birds in China. **Journal of Virology**, v. 88, n. 22, p. 13344-13351, 15 nov. 2014.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano de vigilância de Influenza Aviária e Doença de Newcastle**. Brasil: Mapa, 2022. 65 p.
- MARÉ, C. J.; GRAHAM, D. L. Falcon Herpesvirus, the Etiologic Agent of Inclusion Body Disease of Falcons. **Infection and Immunity**, v. 8, n. 1, p. 118-126, jul. 1973.
- MARÍN, S. Y. *et al.* Fowl Aviadenovirus E associated with hepatitis-hydropericardium syndrome in broiler breeders. **Ciência Rural**, v. 53, n. 3, p. 1-10, 2023.
- MARQUES, M. V. R. *et al.* Fatal necrotic tracheitis by *Aviadenovirus* in captive Alagoas curassows (*Pauxi mitu*) extinct from the wild. **Avian Pathology**, v. 48, n. 3, p. 278-283, 12 mar. 2019.
- MARTINS, N. R. S. Influenza Aviária: Uma Revisão dos Últimos Dez Anos. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 2, p. 97-140, maio 2001.
- MARTON, S. *et al.* Coding-complete sequencing classifies parrot bornavirus 5 into a novel virus species. **Archives of Virology**, v. 160, n. 11, p. 2763-2768, 19 ago. 2015.
- MARUSAK, R. A. *et al.* Parvovirus-Associated Cerebellar Hypoplasia and Hydrocephalus in Day Old Broiler Chickens. **Avian Diseases**, v. 54, n. 1, p. 156-160, mar. 2010.

- MASSIN, P. *et al.* Temperature sensitivity on growth and/or replication of H1N1, H1N2 and H3N2 influenza A viruses isolated from pigs and birds in mammalian cells. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3-4, p. 232-241, maio 2010.
- MATHIEU, C. *et al.* Avian Influenza in wild birds from Chile, 2007–2009. **Virus Research**, v. 199, p. 42-45, 2 mar. 2015.
- MEULEMANS, G. *et al.* Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses. **Avian Pathology**, v. 33, n. 2, p. 164-170, abr. 2004.
- MEULEMANS, G. *et al.* Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. **Avian Pathology**, v. 30, n. 6, p. 655-660, dez. 2001.
- MILLER, P. J. *et al.* Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 41, n. 4, p. 505-513, dez. 2013.
- MONACO, E. *et al.* The Detection of Avian Bornavirus Within Psittacine Eggs. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 26, n. 3, p. 144-148, set. 2012.
- MORAES, H. L. S. *et al.* Influenza aviária. In: FILHO, R. L. A. *et al.* **Doenças das aves**. 3. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2020. p. 713 - 750. ISBN 978-65-991079-0-0.
- MORLEY, C. R. *et al.* Effects of freeze-thaw stress on bacterial populations in soil microcosms. **Microbial Ecology**, v. 9, n. 4, p. 329-340, dez. 1983.
- MURATA, S. *et al.* Detection of the virulent Marek's disease virus genome from feather tips of wild geese in Japan and the Far East region of Russia. **Archives of Virology**, v. 152, n. 8, p. 1523-1526, 14 maio 2007.
- OAKGROVE, K. S. *et al.* Distribution, diversity and drivers of blood-borne parasite co-infections in Alaskan bird populations. **International Journal For Parasitology**, v. 44, n. 10, p. 717-727, set. 2014.
- OLIVAL, K. J. *et al.* Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. **Nature**, v. 546, n. 7660, p. 646-650, 21 jun. 2017.
- OMETTO, T. *et al.* West Nile virus surveillance, Brazil, 2008–2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 11, p. 723-730, 4 set. 2013.
- ONO, J. M.; LIMA, C. B.; RIBEIRO, L. F. Doença de Newcastle. **Getec - Gestão Tecnologia e Ciências**, v. 10, n. 25, p. 9-13, 2021.
- ORSI, M. Â.; FERREIRA, H. L. Doença de Newcastle. In: FILHO, R. L. A. *et al.* **Doenças das aves**. 3. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2020. p. 693 - 712. ISBN 978-65-991079-0-0.
- OSAMURA, T. *et al.* Isolation of adenovirus type 11 from the brain of a neonate with pneumonia and encephalitis. **European Journal of Pediatrics**, v. 152, n. 6, p. 496-499, jun. 1993.

- OUYANG, N. *et al.* Histopathology and the detection of avian bornavirus in the nervous system of birds diagnosed with proventricular dilatation disease. **Avian Pathology**, v. 38, n. 5, p. 393-401, 18 set. 2009.
- PACHECO, J. F. *et al.* Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee-second edition. **Ornithology Research**, v. 29, n. 2, p. 94-105, jun. 2021.
- PARVIN, R. *et al.* Active virological surveillance in backyard ducks in Bangladesh: detection of avian influenza and gammacoronaviruses. **Avian Pathology**, v. 49, n. 4, p. 361-368, 18 maio 2020.
- PASS, D. A.; PERRY, R. A. The pathology of psittacine beak and feather disease. **Australian Veterinary Journal**, v. 61, n. 3, p. 69-74, mar. 1984.
- PAYNE, S. L. *et al.* Birds and bornaviruses. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, n. 2, p. 145-156, dez. 2012.
- PFEFFER, M. *et al.* Genus-Specific Detection of Alphaviruses by a Semi-Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 6, p. 709-718, 1 dez. 1997.
- PHILADELPHO, N. A. *et al.* Detection of aves polyomavirus 1 (APyV) and beak and feather disease virus (BFDV) in exotic and native Brazilian Psittaciformes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1665-1673, 29 jun. 2022.
- PHILADELPHO, N. A. *et al.* Survey of bornaviruses in pet psittacines in Brazil reveals a novel parrot bornavirus. **Veterinary Microbiology**, v. 174, n. 3-4, p. 584-590, dez. 2014.
- PIACENTINI, V. Q. *et al.* Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee/ Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 23, ed. 2, p. 91-298, jun. 2015.
- PINTO, M. C. *et al.* Bornaviruses in naturally infected *Psittacus erithacus* in Portugal: insights of molecular epidemiology and ecology. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 9, n. 1, 1 jan. 2019.
- PRINZ, M. S. *et al.* Monitoring of Newcastle disease in poultry at migratory birds landing sites: Mangue Seco and Cacha Pregos between 2013 and 2014. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 87, n. 87, p. 1-8, 2020.
- RAIDAL, S. R.; PETERS, A. Psittacine beak and feather disease: ecology and implications for conservation. **Emu - Austral Ornithology**, v. 118, n. 1, p. 80-93, 23 out. 2017.
- 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, set. 2014.
- RAUE, R.; HESS M. Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus. **Journal of Virological Methods**, v. 73, n. 2, p. 211-217, ago. 1998.

- READ, A. F. *et al.* Imperfect Vaccination Can Enhance the Transmission of Highly Virulent Pathogens. **Plos Biology**, v. 13, n. 7, p. e1002198, 27 jul. 2015.
- RIBEIRO, A. F. *et al.* Risk Factors for Death from Influenza A(H1N1)pdm09, State of São Paulo, Brazil, 2009. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0118772, 16 mar. 2015.
- RINDER, M. *et al.* Broad Tissue and Cell Tropism of Avian Bornavirus in Parrots with Proventricular Dilatation Disease. **Journal of Virology**, v. 83, n. 11, p. 5401-5407, jun. 2009.
- RÖDER, B. *et al.* Impact of Long-Term Storage on Stability of Standard DNA for Nucleic Acid-Based Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4260-4262, nov. 2010.
- ROTT, R. The pathogenic determinant of influenza virus. **Veterinary Microbiology**, v. 33, n. 1-4, p. 303-310, nov. 1992.
- SAMY, A.; NAGUIB, M. Avian Respiratory Coinfection and Impact on Avian Influenza Pathogenicity in Domestic Poultry: field and experimental findings. **Veterinary Sciences**, v. 23, n. 5, p. 1-12, 24 fev. 2018.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, dez. 1977.
- SASSA, Y. *et al.* Molecular epidemiology of avian bornavirus from pet birds in Japan. **Virus Genes**, v. 47, n. 1, p. 173-177, ago. 2013.
- SCHAEFER, R. *et al.* Isolamento e caracterização do vírus da influenza pandêmico H1N1 em suínos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 9, p. 761-767, set. 2011.
- SCHMIDT, M.; ONDREKA, N. Hydrocephalus in Animals. **Pediatric Hydrocephalus**, p. 53-95, 24 abr. 2019.
- SCHRENZEL, M. *et al.* Characterization of a New Species of Adenovirus in Falcons. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3402-3413, jul. 2005.
- SEAL, B. S.; KING, D. J.; BENNETT, J. D. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2624-2630, out. 1995.
- SHEPPARD, M; MCCOY, R. J; WERNER, W. Genomic mapping and sequence analysis of the fowl adenovirus serotype 10 hexon gene. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 10, p. 2595-2600, 10 out. 1995.
- SILVA, A. S. G. *et al.* Parrot bornavirus in naturally infected Brazilian captive parrots: challenges in viral spread control. **Plos One**, v. 15, n. 6, p. 1-12, 24 jun. 2020.
- SILVA, A. S. G. *et al.* West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 1, p. 445-453, 2 nov. 2018.

- SILVA, B. R. *et al.* Molecular diagnosis of avian viruses in grassland passerines and captive yellow cardinals *Gubernatrix cristata* in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, p. 1-8, mar. 2021.
- SILVA, J. R. *et al.* A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 414-417, ago. 2014.
- SIMON-LORIERE, E.; HOLMES, E. C. Why do RNA viruses recombine?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 617-626, 4 jul. 2011.
- SNOECK, C. J. *et al.* Characterization of Newcastle Disease Viruses in Wild and Domestic Birds in Luxembourg from 2006 to 2008. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 639-645, 15 jan. 2013.
- STEINMETZ, A. *et al.* Blindness as a sign of proventricular dilatation disease in a grey parrot (*Psittacus erithacus erithacus*). **Journal of Small Animal Practice**, v. 49, n. 12, p. 660-662, dez. 2008.
- STENZEL, D. J.; CASSIDY, M. F.; BOREHAM, P. F. L. Morphology of *Blastocystis* sp. from domestic birds. **Parasitology Research**, v. 80, n. 2, p. 131-137, fev. 1994.
- STIENEKE-GRÖBER, A. *et al.* Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. **The Embo Journal**, v. 11, n. 7, p. 2407-2414, jul. 1992.
- SUAREZ, D. L. Common aspects of animal influenza: influenza a virus. In: SWAYNE, D E. **Animal Influenza**. 2. ed. Athens: Wiley Blackwell, 2016. Cap. 1.1. p. 2-30. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118924341.ch1>. Acesso em: 11 nov. 2021.
- SULLIVAN, S. J. *et al.* 2009 H1N1 Influenza. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 85, n. 1, p. 64-76, jan. 2010.
- SURPHLIS, A. C. *et al.* Genomic characterization of psittacine adenovirus 2, a siadenovirus identified in a moribund African grey parrot (*Psittacus erithacus*). **Archives of Virology**, v. 167, n. 3, p. 911-916, 1 fev. 2022.
- SUTHERLAND, M. *et al.* Disease surveillance in wild Victorian cacatuids reveals co-infection with multiple agents and detection of novel avian viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 235, p. 257-264, ago. 2019.
- THURBER, M. I. *et al.* Antemortem diagnosis of hydrocephalus in two Congo African grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) by means of computed tomography. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 246, n. 7, p. 770-776, 1 abr. 2015.
- TOMASZEWSKI, E. K. *et al.* Detection and heterogeneity of herpesviruses causing Pacheco's disease in parrots. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 2, p. 533-538, fev. 2001.
- TOMASZEWSKI, E. K. *et al.* Genetic Characterization of a Herpesvirus Isolate from a Superb Starling (*Lamprotornis superbus*) as a Psittacid Herpesvirus Genotype 1. **Avian Diseases**, v. 48, n. 1, p. 212-214, jan. 2004.

TOMASZEWSKI E. K.; WIGLE W.; PHALEN D. N. Tissue Distribution of Psittacid Herpesviruses in Latently Infected Parrots, Repeated Sampling of Latently Infected Parrots and Prevalence of Latency in Parrots Submitted for Necropsy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 6, p. 536-544, nov. 2006.

TONG, S. *et al.* New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 1-12, 10 out. 2013.

TONG, S. *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, ago. 2008.

TORRES, A. C. D. *et al.* An Overview on Marek's Disease Virus Evolution and Evidence for Increased Virulence in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 9 maio 2019.

TRAJANO, M. C.; CARNEIRO, L. P. **Diagnóstico da Criação Comercial de Animais Silvestres no Brasil**. Brasília: IBAMA, 2019. 56 p. (ISBN: 978-85-7300-393-2). Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/phocadownload/fauna/faunasilvestre/2019-ibama-diagnostico-criacao-animais-silvestres-brasil.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2021.

TSAI, S. S. *et al.* Herpesvirus infections in psittacine birds in Japan. **Avian Pathology**, v. 22, n. 1, p. 141-156, mar. 1993.

VANDEVANTER, D. R. *et al.* Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1666-1671, jul. 1996.

VEAZEY, R. S. *et al.* Pathology of Eastern Equine Encephalitis in Emus (*Dromaius novaehollandiae*). **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 1, p. 109-111, jan. 1994.

VEY, M. *et al.* Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. **Virology**, v. 188, n. 1, p. 408-413, maio 1992.

WEBER, M N. *et al.* Correction to: serologic evidence of West Nile virus and Saint Louis encephalitis virus in horses from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 1055-1055, 28 abr. 2021.

WEISSENBOCK, H. *et al.* Novel Avian Bornavirus in a Nonsittacine Species (*Canary; Serinus canaria*) with Enteric Ganglioneuritis and Encephalitis. **Journal of Virology**, v. 83, n. 21, p. 11367-11371, nov. 2009.

WHO - World Health Organization. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1). **Swine Influenza**, Geneva, Switzerland, p. 1-8, 30 abr. 2009. Disponível em: http://cidbimena.desastres.hn/docum/AH1N1/CDCrealtimerTPCRprotocol_20090428.pdf. Acesso em: 1 maio 2021.

WHO – World Health Organization. **Zoonoses**. 29 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical Journal of Australia**, Australia, v. 2, n. 18, p. 375-376, out. 1921.

WOAH. Animal health surveillance (version adopted in May 2021). *In*: WOA World Organisation For Animal Health World Organisation For Animal Health (Founded as OIE). **Terrestrial Animal Health Code**: volume I. 20. ed. Paris: Oie, 2023. Cap. 1.4. p. 1-10. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_surveillance_general.pdf. Acesso em: 23 abr. 2023.

WOAH. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses) (version adopted in May 2021). *In*: WOA World Organisation For Animal Health World Organisation For Animal Health (Founded as OIE). **Terrestrial Manual Online Access**: manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 20. ed. Paris: OIE, 2023. Cap. 3.3.4. p. 1-26. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf. Acesso em: 23 abr. 2023.

WOAH. Marek's disease (version adopted in May 2023). *In*: WOA World Organisation For Animal Health World Organisation For Animal Health (Founded as OIE). **Terrestrial Manual Online Access**: manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 20. ed. Paris: OIE, 2023. Cap. 3.3.13. p. 1-15. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.13_MAREK_DIS.pdf. Acesso em: 23 abr. 2023.

WOAH. Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus) (version adopted in May 2021). *In*: WOA World Organisation For Animal Health World Organisation For Animal Health (Founded as OIE). **Terrestrial Manual Online Access**: manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 20. ed. Paris: Oie, 2023. Cap. 3.3.14. p. 1-22. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf. Acesso em: 23 abr. 2023.

WOOD, G. W. *et al.* Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. **Archives of Virology**, v. 130, n. 1-2, p. 209-217, mar. 1993.

WOŹNIAKOWSKI, G. J. *et al.* Phylogenetic analysis of Columbid herpesvirus-1 in rock pigeons, birds of prey and non-raptorial birds in Poland. **Bmc Veterinary Research**, v. 9, n. 1, 21 mar. 2013.

YOUNG, P. Selected herpesviral diseases of birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 4, n. 2, p. 62-71, abr. 1995.

YU, G. *et al.* Pathogenic, Phylogenetic, and Serological Analysis of Group I Fowl Adenovirus Serotype 4 SDSX Isolated From Shandong, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-12, 19 nov. 2018.

ZANELLA, J. R. C. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 510-519, maio 2016.

ZEITLIN, G. A.; MASLOW, M. J. Avian Influenza. **Current Infectious Disease Reports**, v. 7, n. 3, p. 193-199, jun. 2005.