

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Escola de Veterinária
Programa de pós graduação em Ciência Animal**

Érika Procópio Tostes Teixeira

ADENOVIRUS, *CHLAMYDIA PSITTACI* E *CIRCOVIRUS* EM *AMAZONA AESTIVA*: OCORRÊNCIA, LESÕES E ASPECTOS DO TRÁFICO E DE MANEJO NO CETAS DE BELO HORIZONTE

Belo Horizonte

2020

Érika Procópio Tostes Teixeira

ADENOVIRUS, *CHLAMYDIA PSITTACI* E *CIRCOVIRUS* EM *AMAZONA AESTIVA*: OCORRÊNCIA, LESÕES E ASPECTOS DO TRÁFICO E DE MANEJO NO CETAS DE BELO HORIZONTE

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

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientação: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte
2020

T266a Teixeira, Érika Procópio Tostes .1987-
Adenovírus, *Chlamydia psittaci* e *Circovirus* em *Amazona aestiva*: ocorrência, lesões e aspectos do tráfico e de manejo no CETAS de Belo Horizonte/ Érika Procópio Tostes Teixeira 2020.

81f:il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins
Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva
Inclui bibliografia f. 69 e 81.

- 1- Papagaio (Ave) - Teses - 2 - Doenças - Teses - 3 – Animais selvagens - Teses – I - Martins, Nelson Rodrigo da Silva – II – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III – Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

FOLHA DE APROVAÇÃO

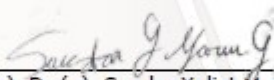
ÉRIKA PROCÓPIO TOSTES TEIXEIRA

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 27 de março de 2020, pela banca constituída pelos membros:



Prof(a). Dr.(a). Nelson Rodrigo da Silva Martins
Presidente - Orientador(a)



Prof(a). Dr.(a). Sandra Yuliet Marin Gomez



Prof(a). Dr.(a). Marcelo Pires Nogueira de Carvalho

Dedico este trabalho à minha família, fonte de amor e inspiração.

Aos animais silvestres, meu incentivo diário para fazer deste, um mundo melhor.

A todos aqueles que, assim como eu, contribuem da forma que podem para a conservação ambiental.

AGRADECIMENTOS

Sempre estive cercada por pessoas incríveis, que me incentivaram em todas as etapas da vida e com certeza me ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço inicialmente à minha mãe, Christina, que me ensinou a ser forte e perseverante. Ensinou, na prática, que por maiores que sejam as dificuldades, no final sempre dá tudo certo. E este passou a ser meu lema: sem desespere... Vai dar certo!

Ao meu pai, Leandro, anjo da guarda que me protege e rege todos os dias.

A Luiza, irmã querida, companheira de vida e risadas.

Ao Felipe pelo amor, companheirismo e paciência. Esse projeto não foi fácil, mas chegar em casa sempre foi aconchego e tranquilidade, ainda mais nos dias mais loucos de trabalho e nas horas extras no laboratório.

Aos colegas de trabalho que se tornaram grandes amigos ao longo desses anos. Equipe CETAS, vocês são incríveis! Por maiores que sejam as dificuldades em trabalhar com conservação em um órgão público, com vocês tudo fica mais fácil e até divertido! Um ambiente de trabalho como o nosso é raro e tenho a sorte grande de dividir a maior parte do meu dia com vocês. Daniel, Cecília, Júlia, Laer e Thiago, agradeço pelo incrível trabalho que fazem e por todo apoio que me deram durante esses dois anos. Obrigada por compreenderem e cobrirem minhas ausências, e pelos momentos de descontração, dentro e fora do horário de trabalho. Sem o suporte de vocês teria sido impossível.

Agradeço ao IBAMA e IEF, órgãos que me fizeram crescer e desenvolver como profissional, e que viabilizaram a execução desse projeto. Agradeço a Alice e Sônia que, como representantes do IEF, permitiram e incentivaram minha capacitação, mesmo em um período conturbado no âmbito governamental, em que não era consentido liberação e licença para estudos.

Aos orientadores Nelson, Sandra e Maurício, muito obrigada pela paciência, ensinamentos, conversas, conselhos e cafês! Prof. Nelson, muito obrigada por me receber de braços abertos, compreender meus aparecimentos e desaparecimentos do laboratório e, principalmente, pela disponibilidade em me ajudar e aconselhar. Sandrinha, muito obrigada pela paciência em ensinar cada passo da biologia molecular. Por estar sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas de PCR, eletroforese, sequenciamento, cálculo de primer, reagentes... Sem você minha caminhada teria sido árdua e cheia de obstáculos. Sua ajuda foi fundamental!

À Hannah, Clara, Camila e demais colegas do Laboratório de Doenças das Aves pela disponibilidade em ajudar, pelas conversas e companhia nas longas horas de bancada.

Aos futuros e atuais colegas de profissão, que como colaboradores e estagiários auxiliaram no manejo desses filhotes, nas necropsias e coleta de dados. Em especial para Mika, Grécia e Thamiris, sempre dispostas em ajudar.

Por fim, e, sem querer esquecer ninguém, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma durante esse período. Seja no trabalho do CETAS e incansáveis horas de papinhas para esses filhotes, ou simplesmente com palavras, sorrisos, risadas e energias positivas. Muito obrigada a todos! Como disse, estou cercada de pessoas incríveis!

“A seu tempo, tudo compreenderás”.
Dom João Bosco

RESUMO

O papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) é a espécie de psitacídeo mais capturada no mundo, sendo um dos principais alvos do comércio ilegal de animais silvestres. Estas aves traficadas são transportadas e mantidas em péssimas condições, submetidas a fatores estressantes que podem acarretar em imunodepressão e desenvolvimento de doenças causadas por patógenos presentes subclínicamente ou incubados. O objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de adenovírus, circovírus da doença do bico e das penas (BFDV - Beak and feather disease vírus) e *Chlamydia psittaci* em papagaios-verdadeiros filhotes provenientes do tráfico recebidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres de Belo Horizonte (CETAS/BH). Foram realizadas 114 necropsias de animais que vieram a óbito desde o recebimento até o sexto mês de triagem, e exame molecular em tecido hepático para detecção dos agentes. Deste total, 81 animais (71%) foram positivos para adenovírus, indicando que os animais podem ter sido apreendidos infectados e que o vírus circulou no CETAS durante a permanência desses animais no local. Não foram encontrados animais positivos para circovírus e clamídia, sugerindo que os animais deram entrada no local sem portar o agente, e não se infectaram durante o processo de triagem. Acreditamos que alterações realizadas no manejo de papagaios no CETAS, associado à antibioticoterapia profilática com doxiciclina, tenham colaborado para prevenção da disseminação de *C. psittaci* no local.

Palavras-chave: papagaio-verdadeiro, viroses aviárias, tráfico de animais, biologia molecular, necropsia, conservação

ABSTRACT

The blue-fronted amazon parrot (*Amazona aestiva*) is the most captured psittacine in the world, being one of the biggest focus in the illegal trade of wild animals. Trafficked birds are transported and kept in stressful conditions leading to immunodepression and primary or opportunistic infections. The objective of this study was investigate the occurrence of adenovirus, circovirus of beak and feather disease (BFDV) and *Chlamydia psittaci* in trafficked blue-fronted amazon parrot nestlings recently received at the Wild Animal Triage Center in Belo Horizonte (CETAS/BH). Psittacines (n=114) that died within 6 months of triage were necropsied, and livers were collected for molecular analysis. Results showed the 81/114 (71%) parrots were positive for adenovirus, indicating that they could have been apprehended already infected and that the virus circulated in CETAS during captivity. No positivity was detected for circovirus or Chlamydia, indicating that the animals entered and remained free during the triage process. Introduced management changes in the handling of rescued psittacines in CETAS/BH, including the prophylactic antibiotic therapy with doxycycline, were considered associated beneficial on the prevention of the previously reported present *C. psittaci* transmission.

Keywords: blue-fronted amazon parrot, avian viruses, illegal trade, molecular biology, necropsy, conservation

LISTA DE IMAGENS

Figura 1 - Taxonomia de vírus integrantes da família Adenoviridae. A família inclui três gêneros que infectam aves: <i>Atadenovirus</i> , <i>Aviadenovirus</i> e <i>Siadenovirus</i> . ICTV (2018) retirado de Martins e Gómez (2020).....	23
Figura 2 - Diagrama de adenovírus–(MFENYANA, 2007).	24
Figura 3- Apresentação esquemática do genoma BFDV. O esquema apresenta as 7 ORFs do genoma do BFDV, identificando ainda o ORF C1 e ORF V1 – KHALESI (2007).....	32
Figura 4 – Ciclo de desenvolvimento da <i>Chlamydia psittaci</i> nas células do hospedeiro. CE: corpúsculos elementares; CR: corpúsculos reticulados. (RASO, 2007).	41
Figura 5 – Filhotes de psitacídeos recebidos no dia 19/09/2018.	50
Figura 6 – Filhotes de papagaios-verdadeiros recebidos no dia 07/11/2018.	50
Figura 7 – Eletroforese dos produtos de PCR realizada para adenovírus. Da esquerda para direita, ladder (1), controle positivo (2), controle negativo (3), amostras negativas (4 e 5) e amostras positivas (6, 7 e 8) na altura de aproximadamente 500 pb.	56
Figura 8 – <i>Amazona aestiva</i> . Congestão pulmonar.....	58
Figura 9 – <i>Amazona aestiva</i> . Aerossaculite em saco aéreo abdominal direito, com presença de espessamento focal e material caseoso (seta branca).	58
Figura 10 – <i>Amazona aestiva</i> . Cavidade celomática e fígado aumentado de tamanho.....	58
Figura 11– <i>Amazona aestiva</i> . Órgãos do sistema digestivo. Setas brancas indicando o baço aumentado de tamanho.	58
Figura 12 – <i>Amazona aestiva</i> . Intestino delgado. Notar coloração marrom escuro.....	59
Figura 13 – <i>Amazona aestiva</i> . Conteúdo intestinal. Reatividade do ao peróxido de hidrogênio à presença de catalase, sugestiva da presença de sangue.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores usados neste estudo para detecção de parte do genoma de cada agente com finalidade de diagnóstico.	53
Tabela 2. Quantitativo total e provenientes do tráfico de <i>A. aestiva</i> recebidos. e que vieram a óbito no ano de 2018	54
Tabela 3. Alterações anatomopatológicas observadas na necropsia de acordo com resultado do teste de PCR para adenovírus	60
Tabela 4. Alterações anatomopatológicas correlacionadas com resultado positivo no teste de PCR para adenovírus.....	60

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1. PAPAGAIO-VERDADEIRO	16
3.2. TRÁFICO DE ANIMAIS SILVESTRES	18
3.3. SANIDADE EM AVES TRAFICADAS	20
3.4. ADENOVÍRUS EM PSITACÍDEOS	21
3.4.1. Histórico.....	21
3.4.2. Etiologia	22
3.4.3. Patogenia	24
3.4.4. Distribuição e ocorrência.....	25
3.4.5. Transmissão.....	26
3.4.6. Sinais clínicos.....	26
3.4.7. Alterações anatomopatológicas.....	27
3.4.8. Diagnóstico.....	27
3.4.9. Prevenção e controle	28
3.4.10. Saúde pública	30
3.5. DOENÇA DO BICO E DAS PENAS DOS PSITACÍDEOS (CIRCOVIRUS).....	30
3.5.1. Histórico	30
3.5.2. Etiologia	31
3.5.3. Patogenia	32
3.5.4. Distribuição e ocorrência.....	33
3.5.5. Transmissão.....	34
3.5.6. Sinais clínicos.....	34
3.5.7. Alterações anatomopatológicas.....	35
3.5.8. Diagnóstico.....	36
3.5.9. Prevenção e controle	37

3.5.10.	Conservação	38
3.6.	CLAMIDIOSE	38
3.6.1.	Histórico	38
3.6.2.	Etiologia	39
3.6.3.	Patogenia	40
3.6.4.	Distribuição e ocorrência.....	42
3.6.5.	Transmissão.....	43
3.6.6.	Sinais clínicos.....	43
3.6.7.	Alterações anatomopatológicas.....	44
3.6.8.	Diagnóstico.....	46
3.6.9.	Tratamento, prevenção e controle	47
3.6.10.	Saúde pública	48
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1.	LOCAL DE EXECUÇÃO	49
4.2.	ANIMAIS E NECROPSIAS.....	49
4.3.	EXTRAÇÃO DE DNA	51
4.4.	DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA CONCENTRAÇÃO DE DNA TOTAL.....	51
4.5.	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE – PCR.....	52
4.5.1.	Adenovírus	52
4.5.2.	Circovírus.....	52
4.5.3.	Clamídia	53
4.6.	ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR	54
4.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1.	Adenovírus	55
5.2.	Circovírus.....	62
5.3.	Clamídia	64
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Amazona aestiva*, popularmente chamada de papagaio-verdadeiro, é uma ave representante da família Psittacidae, ordem Psittaciformes (FORSHAW, 1977; SICK, 1997). Possui ampla distribuição, ocorrendo em todos os biomas brasileiros, com exceção dos pampas (ICMBIO, 2011). Dentre as espécies de psitacídeos brasileiros, destaca-se como a mais popular, por ser considerado um animal sociável, relativamente inteligente, capaz de imitar as palavras humanas (SICK, 1997; LEITE, 2007), e por apresentar uma exuberante plumagem (FORSHAW, 1977). É o psitacídeo mais capturado no mundo, sendo um dos principais alvos do comércio ilegal de animais silvestres (BEISSINGER e BUCHER, 1992; ICMBIO, 2011; RODRIGUES, 2013; MATOS, 2016), e, portanto, é uma das espécies de psitacídeos mais encontradas em cativeiro (FORSHAW, 1977; RODRIGUES, 2013; FERREIRA *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2015; MATOS, 2016). Na última avaliação seu *status* de conservação foi alterado para “Quase ameaçada” (*Near threatened*) (IUCN, 2020), sendo a espécie da família Psittacidae mais recebida no Centro de Triagem de Animais Silvestres de Belo Horizonte (CETAS/BH) (IBAMA, 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; FERREIRA *et al.*, 2015; MATOS, 2016).

A preocupação com a biodiversidade é crescente, tornando necessária a criação de programas de conservação (COCKREM, 2005; FUJIHARA, 2014) que monitorem e verifiquem os impactos sobre a saúde dos animais. As enfermidades exercem um importante desafio sobre a manutenção da biodiversidade (VILELA, 2012), e, o estresse, desencadeado por situações diversas, aumenta a susceptibilidade a doenças em diversos animais (DLUGOSZ, 2015). Além disso, os animais podem hospedar uma série de organismos, incluindo vírus, bactérias, protozoários, helmintos e artrópodes, que podem se tornar patogênicos em situações adversas, como por exemplo, sob condições de estresse ou subnutrição (WOODFORD, 2000; SANCHES, 2008). Doenças infecciosas, especialmente doenças virais, são os problemas clínicos mais comuns em aves da família Psittacidae em cativeiro, devido à ocorrência de morte aguda, inespecificidade de sintomas e dificuldades no tratamento e controle (KATOH *et al.*, 2010).

As infecções por adenovírus (AdV) são comuns em aves comerciais e as características dos sistemas de criação intensificada, em locais com múltiplas idades e procedências, com proximidade entre lotes, favorecem a disseminação (MARTINS; RESENDE, 2009). Os adenovírus possuem também potencial de afetar aves silvestres, inclusive àquelas integrantes de programas de reprodução de espécies ameaçadas em cativeiro (YANG *et al.*, 2019). Os AdVs são patógenos não envelopados (WELLEHAN *et al.*, 2009), bastante resistentes à inativação no ambiente e à maioria dos desinfetantes (RITCHIE; CARTER, 1995; MFENYANA, 2007), que podem ser encontrados em mamíferos, aves, répteis e peixes (WELLEHAN *et al.*, 2009). Sua patogenicidade é variada, sendo relatadas infecções subclínicas, suaves, doença severa e, em alguns casos, pode ser apenas um achado sem importância clínica em uma ave saudável (SCHACHNER *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2019; PHALEN *et al.*, 2019). A infecção pode ser persistente ao longo da vida das aves (SCHACHNER *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2019) e reativados em situações de imunodepressão (YANG *et al.*, 2019; PHALEN *et al.*, 2019). Agentes imunodepressores ambientais, virais e bacterianos, bem como situações de estresse crônico são determinantes no aparecimento de doença severa (SCHADE, *et al.*, 2013; MCFERRAN, 2000; WELLEHAN, 2005; MFENYANA, 2007; TO *et al.* 2014). Os sinais

clínicos podem variar desde perda de peso e letargia (WELLEHAN et al., 2009) a depressão, anorexia, sintomas respiratórios, diarreia, hemorragia cloacal e morte (TO et al., 2014). Os AdVs são mundialmente distribuídos e possuem grande variedade de aves hospedeiras, como galinhas, perus e psitacídeos (MFENYANA, 2007), e já foram descritos em muitas espécies de papagaios originários de todas as suas distribuições geográficas (YANG et al., 2019). Existem poucos estudos de AdV em psitacídeos silvestres no Brasil, sobretudo em animais oriundos de tráfico, sendo necessário um estudo mais profundo desse agente em aves traficadas. Entre os estudos prévios no Brasil, estes se concentram principalmente em aves domésticas (PERERIRA et al., 2014; DE LA TORRE et al., 2018), mas também foi descrito um surto de traqueíte hemorrágica fatal em mutum de Alagoas (*Pauxi mitu*) (MARQUES et al., 2019).

O Circovirus, agente etiológico da doença do bico e das penas (BFDV - *Beak and feather disease virus*), é um vírus não envelopado, causador da doença do bico e das penas dos psitacídeos (Pbfd). Pbfd é uma doença frequentemente fatal que afeta os papagaios. Seus sinais clínicos incluem anormalidade das penas, necrose dos folículos e, ocasionalmente, deformidade do bico e unhas (RITCHIE, 1995; RAUE et al., 2004; PIÇARRA et al., 2009; KATOH et al., 2010; PIASECKI; WIELICZKO, 2010; ARAÚJO et al., 2011; LEITE, 2013; AZEVEDO, 2017; MELO FILHO, 2019; DUARTE et al., 2019). O vírus replica-se em tecidos onde haja células em divisão incluindo o timo, bursa de fabricius e leucócitos, podendo causar uma imunodepressão nos animais acometidos (DE KLOET & DE KLOET, 2004; PHALEN, 2006; PIÇARRA, 2009; LEITE, 2013). Essa diminuição da imunidade aumenta a susceptibilidade para infecções secundárias, que na maioria das vezes é a causa do óbito desses animais (HULBERT et al., 2015; ORTIZ-CATEDRAL et al., 2010). A doença está mundialmente distribuída, havendo relatos inclusive de animais acometidos em vida livre (KATOH et al., 2010; JULIAN, 2012; LEITE, 2013; FOGELL; MARTIN; GROOMBRIDGE, 2016). Acredita-se que a disseminação do patógeno ocorreu devido ao comércio internacional de papagaios, e tornou-se uma preocupação mundial, podendo causar declínio populacional inclusive de espécies em risco de extinção (RAUE et al., 2004; PIÇARRA et al., 2009; ARAÚJO, 2011; JULIAN, 2012; FOGELL; MARTIN; GROOMBRIDGE, 2016; MELO FILHO, 2019). É extremamente estável e resistente a grande parte dos métodos utilizados para desinfecção (JULIAN, 2012). O controle deste agente inclui manejo higiênico sanitário das instalações (limpeza, desinfecção, vazão sanitário), quarentena e teste diagnóstico dos animais recém adquiridos, triagem regular do plantel e isolamento ou eutanásia dos animais positivos (PIÇARRA, 2009; PIASECKI; WIELICZKO, 2010; LEITE, 2013; MELO FILHO, 2019). O diagnóstico desta enfermidade já foi descrito no Brasil, tanto em espécies exóticas (WERTHER et al., 1998) quanto em nativas (ARAÚJO et al., 2015). Entretanto, a permanente investigação de sua ocorrência nos plantéis em cativeiro destinados a programas de conservação é fundamental para a viabilização de programas de reintrodução e revigoramento populacional.

A clamidiose é uma das principais doenças infecciosas em psitacídeos (RASO et al., 2006). Trata-se de uma zoonose (CDC, 2018) cujo agente etiológico é a bactéria Gram negativa, intracelular obrigatória, *Chlamydia psittaci* (STORZ AND PAGE, 1971). A *C. psittaci* ocorre em um grande número de animais domésticos e selvagens, sendo seus principais hospedeiros as aves, acometendo 467 espécies compreendidas em 30 ordens diferentes (KALETA e TADAY, 2003; LEAL, 2013). Geralmente a infecção nas aves é de caráter persistente e assintomático, ocorrendo eliminação intermitente da bactéria. Porém, quando submetidos a fatores de estresse, como alta densidade populacional, higienização inadequada, desnutrição, mudanças bruscas na dieta, manejo e ambiência (temperatura, umidade, etc.) inadequados, pode haver ou intensificar a manifestação clínica, bem como aumentar a taxa de eliminação bacteriana, potencializando o

risco de infecção de outras aves (GERLACH, 1994; FUDGE, 1996; HARKINEZHAD et al., 2009; VILELA, 2012; LEAL, 2013). A transmissão se dá pela inalação ou ingestão de material contaminado e seu ciclo de desenvolvimento possui duas fases morfológicas e metabolicamente distintas (VILELA, 2012). O ciclo se inicia pela adesão e internalização dos corpos elementares (CE), formas infectantes, na membrana da célula. Os CE se diferenciam em corpos reticulados (CR), formas vegetativas, e após replicação ou divisão binária são reorganizados morfológicamente, dando origem a novos CE ou aos corpos persistentes (CP) (VANROMPAY et al., 1995; VILELA, 2012). Os corpos persistentes são associados a infecções crônicas e, após eventos que causem imunodepressão, podem se diferenciar em CE ou CR (HOGAN et al., 2004; VILELA, 2012). Os sinais clínicos dependem da patogenicidade do sorotipo de *C. psittaci*, idade, espécie, imunidade da ave, fatores ambientais e presença de outras doenças concomitantes. Geralmente são inespecíficos e discretos na forma crônica, apresentando apatia, emagrecimento progressivo, conjuntivite e alterações respiratórias discretas. Na forma aguda podem se manifestar em hipertermia, anorexia, letargia, penas arrepiadas, diarreia, descarga nasal, espirros e respiração ofegante (devido à pneumonia e aerossaculite). Na forma inaparente os animais permanecem portadores, sem sintomas, podendo eliminar o agente por períodos longos (MOHAN, 1984; GERLACH, 1994; BILLINGTON, 2005; VILELA, 2012). Devido aos sinais inespecíficos o diagnóstico é difícil, sendo necessária realização de isolamento, detecção de antígenos ou de parte do material genético para diagnóstico definitivo (ANDERSEN, 1998; SACHSE, et al. 2009; VANROMPAY et al., 1995; VILELA, 2012; LEAL, 2013). A clamidiose possui importância na saúde pública por se tratar de uma zoonose, pelo convívio de seres humanos com aves de companhia, pelo risco ocupacional de trabalhadores que lidam com essas aves e pela exposição de pessoas a lugares com presença de seus excrementos (HARKINEZHAD et al., 2009; TEFLER et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2013). Um surto no CETAS/BH foi descrito envolvendo múltiplas espécies (*Amazona aestiva*, *Aratinga aurea* e *Pionus maximiliani*) e com alta mortalidade (ECCO et al., 2009).

Programas de conservação e/ou reprodução em cativeiro são cada vez mais empregados para aumentar a população de muitas espécies ameaçadas. Um risco para esses programas é a introdução de patógenos, que podem acometer populações selvagens e cativas, inclusive espécies nativas silvestres que frequentam instalações de reprodução ou outras aves mantidas como pet (LÜSCHOW et al., 2007). Se uma doença infecciosa é introduzida em uma população cativa de espécies ameaçadas, pode ser desafiador ou mesmo impossível erradicá-la (RAUE, 2005).

Existem poucos estudos envolvendo a sanidade de populações selvagens, ainda mais em se tratando de animais do Novo Mundo (FOGELL; MARTIN; GROOMBRIDGE, 2016). A disseminação global de patógenos representa uma ameaça crescente à biodiversidade (DASZAK et al. 2000) e, tem sido associada ao colapso da população selvagem e à extinção de várias espécies (CUNNINGHAM; DASZAK; WOOD, 2017; FOGELL et al., 2018). O controle de enfermidades em animais em vida livre envolve ações políticas e são, na grande maioria, subfinanciadas (DASZAK, 2000). Tendo em vista a saúde pública e bem-estar animal, o ser humano precisa trabalhar de forma a preservar a natureza e os serviços ecossistêmicos, incluindo o controle e entendimento de doenças que afetam a biodiversidade (CUNNINGHAM; DASZAK; WOOD, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de adenovírus, *Circovirus* e *Chlamydia psittaci* em papagaios da espécie *Amazona aestiva*, em óbito durante a triagem, provenientes do tráfico de animais silvestres, recebidos no CETAS de Belo Horizonte, MG, no ano de 2018.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar, por meio da técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a ocorrência de adenovírus em tecido hepático de *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro) recebidos em situação de tráfico de animais silvestres no CETAS de Belo Horizonte, Minas Gerais (CETAS/BH).

Detectar, por meio da técnica de PCR, a ocorrência de *Circovirus* em tecido hepático de *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro) recebidos em situação de tráfico de animais silvestres no CETAS de Belo Horizonte, Minas Gerais (CETAS/BH).

Detectar, por meio da técnica de PCR, a ocorrência de *Chlamydia psittaci* em tecido hepático de *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro) recebidos em situação de tráfico de animais silvestres no CETAS de Belo Horizonte, Minas Gerais (CETAS/BH).

Descrever as alterações macroscópicas evidenciadas e comparar com as alterações descritas na literatura para os agentes etiológicos evidenciados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. PAPAGAIO-VERDADEIRO

O papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) é uma ave neotropical representante da família Psittacidae, Ordem Psittaciformes. Apresentam porte médio, medindo até cerca de 37 cm de comprimento e pesando em média 400g. Sua coloração predominante é verde, com fronte e loro azuis, cabeça amarela, pés e bicos pretos. (FORSHAW, 1977; SICK, 1997). Possui ampla distribuição, ocorrendo em todos os biomas brasileiros, com exceção dos Pampas (ICMBIO, 2011). Vive em mata úmida ou seca, palmais e beira de rio (SICK, 1997), ocorre desde o leste da Bolívia e do Paraguai, até o norte da Argentina (FORSHAW, 1977; SICK, 1997). É a espécie de psitacídeo mais conhecida do gênero *Amazona*, sendo muito popular como ave de companhia em diversos países do mundo (FORSHAW, 1977). Sua popularidade se dá devido a seu comportamento sociável, relativamente inteligente, capaz de imitar as palavras humanas (SICK, 1997; LEITE, 2007), e, por apresentar uma exuberante plumagem (FORSHAW, 1977). Os casais se reproduzem uma vez por ano, sendo o período reprodutivo compreendido entre setembro a fevereiro. A fêmea põe de dois a quatro ovos, que são chocados durante 24 a 29 dias. Os filhotes dependem de cuidado parental por cerca de quatro a cinco meses até adquirem

aptidão para vôo e saída do ninho e se tornarem independentes (FORSHAW, 1977; SICK, 1997; LEITE, 2007).

Os papagaios têm sido caçados historicamente em grande número nos neotrópicos e em diversas partes do mundo para atender a demanda doméstica como animal de estimação (PIRES; SCHNEIDER; HERRERA, 2016). Aliado a isto, encontra-se no Brasil uma das maiores biodiversidades de psitacídeos do mundo (SICK, 1997), que torna o País um dos principais alvos dos traficantes (VILELA, 2012).

Apesar da relação sentimental dos humanos com os animais em cativeiro domiciliar, os papagaios são considerados como cachorrinhos, para não dizer brinquedos e objetos de exibição, tendo “proprietários” que não se interessam pelas condições naturais em que esses animais normalmente viveriam (SICK, 1997). As aves, de modo geral, são mantidas em recintos pequenos, isolados, com dieta inadequada, com raros cuidados veterinários e uma alta taxa de mortalidade. Esse tipo de cultura de papagaio em cativeiro que é observada em muitos países do mundo, principalmente nos latino-americanos é a força motriz para o comércio local de papagaios (WESTON; MEMON, 2009).

Como a maioria dos papagaios capturados é composta de filhotes, a taxa de recrutamento pode estar seriamente comprometida, sendo o número de filhotes que permanecem nas populações de origem insuficientes para repor os indivíduos que naturalmente são perdidos no grupo (LEITE, 2007). BERKUNSKY et al. (2017), ao avaliarem a dinâmica populacional de 192 populações de papagaios neotropicais constataram que 38% das populações apresentaram tendência decrescente no número de indivíduos, sendo as principais ameaças às populações de papagaios neotropicais na natureza relacionadas às atividades humanas, como agricultura, seguida de captura de indivíduos para a guarda doméstica ilegal, e, invasões humanas ao seu habitat causando distúrbios e perturbações ao ambiente natural.

Segundo PIRES (2012), das 330 espécies de papagaios existentes, 66 estão diretamente ameaçadas devido ao tráfico e posse ilegal. Além da sua remoção da natureza, a taxa de mortalidade de papagaios contrabandeados é extremamente alta.

O Amazona aestiva é o psitacídeo mais capturado no mundo, sendo um dos principais alvos do comércio ilegal de animais silvestres (BEISSINGER e BUCHER, 1992; ICMBIO, 2011; RODRIGUES, 2013; MATOS, 2016), e, portanto, é uma das espécies de psitacídeos mais encontradas em cativeiro (FORSHAW, 1977; RODRIGUES, 2013; FERREIRA et al., 2015; FREITAS et al., 2015; MATOS, 2016). Durante anos seu *status* de conservação foi considerado como “Pouco Preocupante” (*Least Concern*, IUCN, 2018), porém na última avaliação seu *status* foi alterado para “Quase ameaçada” (*Near threatened*, IUCN, 2020), sendo a espécie da família Psittacidae mais recebida no CETAS/BH (IBAMA, 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; FERREIRA et al., 2015; MATOS, 2016). Entre 2011 a 2018 apenas no CETAS de Belo Horizonte (Minas Gerais), foram recebidos 2.860 indivíduos desta espécie, sendo 609 recebidos apenas no ano de 2018 (IBAMA, 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018; MATOS, 2016).

Devido ao forte impacto que as populações de papagaios, em particular o *Amazona aestiva*, estão sofrendo pelas atividades humanas, principalmente no que tange ao tráfico e constante degradação do habitat, se medidas de conservação efetivas não forem adotadas em um curto

espaço de tempo, esta espécie poderá ser incluída nas listas oficiais de espécies ameaçadas (LEITE, 2007).

3.2. TRÁFICO DE ANIMAIS SILVESTRES

O tráfico de animais silvestres é um problema social amplo e complexo, que impacta na conservação da biodiversidade, bem-estar dos animais e envolvem preocupações judiciais (DAUT, 2015). Este comércio ilegal ocorre em todo o mundo e, o Brasil, devido a sua rica biodiversidade, é considerado um dos principais alvos dos traficantes (RECTAS 2002; VILELA, 2012).

Análises de documentos históricos indicam que os pássaros são mantidos pelos índios desde a antiguidade. A beleza, canto, companhia e criação de pássaros estão firmemente enraizados nas culturas e tradições (ALVES; LIMA; ARAUJO, 2013). O comércio da fauna silvestre é igualmente uma prática antiga. Os europeus no século XVI voltavam de suas viagens exploratórias com animais desconhecidos como forma de marcar suas ações e evidência de terem descoberto novos continentes (SICK, 1997). Os primeiros espécimes registrados da fauna silvestre brasileira enviados para a Europa datam de 1500, quando se iniciou a exploração comercial do mercado brasileiro (ALVES; LIMA; ARAUJO, 2013).

Segundo VALL-LLOSERA e CASSEY (2017) o comércio de animais selvagens redistribui anualmente milhões de animais vivos (de diversas espécies) em todo o mundo para abastecer o mercado de guarda doméstica, e, é conservadoramente estimado em muitos milhões de dólares. A crescente demanda por uma variedade maior de espécies de animais resulta em: retirada excessiva de espécies desejadas de seus habitats; aumento não registrado das populações cativas em todo o mundo; introdução de espécies exóticas invasoras e patógenos da vida selvagem nas regiões receptoras desses animais.

Dentre os animais traficados, as aves, por sua beleza e pelos seus cantos, aliado a ampla distribuição geográfica e alta diversidade, são o grupo de animais mais procurados (ROCHA, et al., 2006). Em estudos realizados em feiras de comércio ilegal e Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), observa-se que dentre as aves, as Ordens mais frequentes em números de recebimentos foram a dos Passeriformes, seguida pelos Psittaciformes (GOGLIATH et al., 2010; VILELA, 2012; ALVES; LIMA; ARAUJO, 2013; FREITAS et al., 2015; MELLO, 2016).

Fortes evidências sugerem que a maioria absoluta dos animais silvestres comercializados ilegalmente no Brasil são destinados ao mercado interno, para atender a demanda da sociedade em manter animais silvestres em residências, como animal de companhia, ou para ornamentação (VILELA, 2012). Em seu estudo, PIRES (2015) relata que, em relação aos papagaios, o tráfico interno está prosperando nos neotrópicos muito mais que o tráfico internacional. Sendo essa tendência podendo ser explicada pela corrupção desenfreada, pela falta de aplicação das leis, pelos recursos limitados para combater o tráfico e pela demanda pela posse doméstica permanecer alta. Outros fatores de oportunidade também corroboram com essa tendência, sendo as espécies que sofrem maior pressão de captura aquelas que estão mais próximas de mercados

ilícitos, que possuem maior distribuição geográfica, são mais abundantes e aninham-se em locais de fácil acesso (PIRES; MORETO, 2016).

Em estudo realizado por VILELA (2012) verificou-se que as espécies de aves são mais frequentemente apreendidas dentro de sua área de distribuição natural, contrapondo a alegação amplamente difundida de que os animais silvestres são retirados das regiões Norte e Nordeste para atender o comércio das regiões Sul e Sudeste. Essa evidência é reforçada pela existência de uma forte tradição de se manter pássaros em gaiolas como animais de estimação em todo o país (SANTOS, 1985; VILELA, 2012).

Apesar de existirem técnicas de manejo adequadas às diversas espécies silvestres, os animais traficados são transportados e mantidos em péssimas condições. Os animais são confinados em pequenos espaços, sem água e alimento, presos em caixas superlotadas, onde se estressam, brigam, se mutilam e se matam (RENCTAS, 2002). Devido a essas precárias condições de captura e transporte, o índice de mortalidade pode chegar a 90% (ROCHA 1995; RENCTAS, 2002; ROCHA, et al., 2006; PAGANO et al., 2009).

Em 1975, a Convenção sobre Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Selvagens (CITES) entrou em vigor para proteger as espécies silvestres e “garantir que o comércio internacional de espécimes de animais e plantas selvagens não ameace sua sobrevivência” (CITES 2014; DAUT, 2015). As espécies protegidas são organizadas na CITES em três apêndices. O Apêndice I inclui espécies ameaçadas de extinção, cujo comércio somente será permitido em circunstâncias excepcionais. O Apêndice II contém espécies que não são necessariamente ameaçadas de extinção, mas, requerem comércio controlado para impedir o declínio da população, como é o caso de grande parte dos psitacídeos brasileiros, incluindo a espécie *Amazona aestiva*. Já as espécies do Apêndice III, estão listadas devido à solicitação de pelo menos um país, para que outros países o ajudem a regular o comércio das mesmas (CITES, 2016).

As consequências do tráfico podem ter implicações sanitárias, econômicas, sociais e ecológicas (SANCHES, 2008). Apesar de a Legislação Ambiental Brasileira ser considerada inovadora e atualizada quanto à proteção ambiental, no combate ao tráfico de animais silvestres ainda deixa muito a desejar (HERNANDEZ, 2006). Atualmente não há distinção entre o traficante e o cidadão que mantém espécime da fauna nativa sob guarda doméstica ilegal (VILELA, 2012). A legislação vigente estipula punição de seis meses a um ano, porém por ser considerado um crime de menor potencial ofensivo, a prisão é raramente aplicada e os traficantes retornam rapidamente às suas atividades (ALVES; LIMA; ARAUJO, 2013).

Visando a redução do comércio ilegal, diminuição de animais retirados da natureza e conservação das populações naturais, faz-se necessário a implantação de legislações mais rígidas que possibilitem a prisão dos traficantes. Outro ponto importante seria a implantação de programas de educação ambiental que possibilitem uma mudança na maneira como os brasileiros enxergam os animais silvestres, pois a maioria das pessoas não entende o tráfico de animais silvestres como um problema ético e moral, e essa consciência deve ser introduzida na população (ALVES; LIMA; ARAUJO, 2013).

3.3. SANIDADE EM AVES TRAFICADAS

As enfermidades exercem um importante impacto na manutenção da biodiversidade e podem interferir tanto nas populações em vida livre, quanto em cativeiro (VILELA, 2012). Os animais podem portar uma série de organismos, incluindo, vírus, bactérias, protozoários, helmintos e artrópodes que podem se tornar patogênicos em situações adversas, como por exemplo, sob estresse crônico ou exagerado, afetando não somente o animal infectado, mas os outros que estão em contato próximo, incluindo o homem (WOODFORD, 2000; SANCHES, 2008).

Apesar das aves fornecerem o reservatório natural para inúmeras espécies de patógenos (CHAN et al., 2015), no Brasil pouco é conhecido sobre o estado de saúde desses animais em seu habitat (RASO et al., 2006; VAZ et al., 2017). É necessário compreender melhor a interação desses agentes com os conjuntos de organismos vivos no ecossistema natural (HOLSBACK et al., 2013). Entender melhor os processos que afetam esses animais em ambiente natural pode fornecer importantes contribuições para o cuidado dessas espécies em cativeiro e fornecer critérios adequados nos casos em que esses animais são devolvidos à natureza (GODOY; MATUSHIMA, 2010).

Conforme relatado por MATOS (2016) fatores estressantes, sejam ambientais, físicos ou sociais, disparam uma cascata de alterações endócrinas e metabólicas de forma que aumentam a disponibilidade de energia para o animal, e inibem processos fisiológicos que não são necessários para a sobrevivência imediata. Caso o estressor não seja eliminado e as cascatas endócrinas e metabólicas continuem a acontecer, consequências danosas como imunodepressão, atrofia muscular, desenvolvimento de estereotipias, entre outras podem ocorrer.

Fatores estressantes como desnutrição ou nutrição inadequada, superpopulação, condições sanitárias ruins e manejo inadequado, desempenham um importante papel no desenvolvimento de doenças infecciosas (SANCHES, 2008; SIQUEIRA et al., 2016). Nessas situações não é incomum encontrar infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitológicas concomitantes (SANCHES, 2008), e, microrganismos de baixa patogenicidade podem causar doenças clínicas severas (DE MELO et al., 2013). Tendo em vista que os animais provenientes do tráfico são submetidos a péssimas condições de transporte e manutenção (RENCTAS, 2002), todos esses fatores predisponentes são encontrados constantemente nestes animais (SANCHES, 2008).

As infecções podem progredir de forma assintomática permitindo que as aves se tornem portadoras subclínicas, podendo eliminar contínua ou intermitentemente o agente (DLUGOSZ et al., 2015), porém, uma vez comprometida a imunidade do hospedeiro, o patógeno multiplica-se e causa doenças clínicas (GODOY; MATUSHIMA, 2010). Conforme relatado por GODOY e MATUSHIMA (2010), a maioria das aves que chegam aos centros de triagem e reabilitação de animais silvestres estão muito debilitadas por causa do estresse a que são submetidas após serem capturadas da natureza, transportadas e mantidas em pequenos locais. Apesar de uma alta mortalidade durante esse processo, os animais que sobrevivem frequentemente desenvolvem doenças causadas por patógenos que estiveram presentes subclínicamente. Dessa maneira, as aves provenientes do tráfico podem ser carreadoras desses agentes patogênicos, que podem representar uma significativa ameaça, não só a saúde animal, como também a saúde humana, visto que diversos agentes podem ser zoonoses (DAUT, 2015; MACIEL et al., 2019).

As avaliações de saúde de animais selvagens comercializados ilegalmente são escassas (GÓMEZ; AGUIRRE, 2008), e é necessário adoção de práticas que visem à segurança sanitária,

como a realização de exames nos animais provenientes do tráfico (GAIO et al., 2019). Além de realização de procedimentos laboratoriais em amostras de animais vivos, os estudos das carcaças desses animais proporcionam uma oportunidade de se obter informações sobre as populações selvagens, incluindo informações anatômicas, fisiológicas, alimentares, reprodutivas e sanitárias (SANCHES, 2008; GODOY; MATUSHIMA, 2010).

GÓMEZ e AGUIRRE (2008) sugerem que os riscos potenciais à saúde silvestre e humana decorrente do comércio ilegal de animais silvestres exigem ação coletiva, como aumento de conscientização da população, maiores esforços na vigilância e notificação de surtos de doenças da vida selvagem, e aumento de pesquisas sobre: o estado de saúde de espécies silvestres autóctones, atributos epidemiológicos dos patógenos da fauna silvestre, alternativas para desencorajar o tráfico, e diminuição dos custos para diagnósticos confiáveis.

3.4. ADENOVÍRUS EM PSITACÍDEOS

3.4.1. Histórico

Os primeiros isolados de adenovírus aviários foram obtidos de forma acidental por estarem presentes em ovos embrionados utilizados na rotina de isolamento viral para diagnóstico, no final da década de 1940 (MARTINS; RESENDE, 2009). Infecções por esse agente foram descritas e caracterizadas em muitas espécies de papagaios originários de todas as suas distribuições geográficas. Eles têm sido associados a uma variedade de lesões, incluindo hepatite, esplenite, pancreatite, enterite, nefrite, conjuntivite e pneumonia (HULBERT, 2015).

Os adenovírus (AdVs) foram isolados de uma ampla gama de vertebrados, incluindo mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes. A classificação dos adenovírus foi revisada, e, os antigos representantes dos grupos I, II e III que acometiam aves foram reclassificados em três gêneros: *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* e *Siadenovirus*. A maioria dos adenovírus aviários que foram caracterizados é classificada no gênero *Aviadenovirus* (KATOH et al., 2010).

De acordo com KATOH et al. (2010) e WELLEHAN et al. (2009), lesões consistentes com doença adenoviral foram encontradas em muitas espécies de psitacídeos, incluindo periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) (MCFERRAN et al., 1976), calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) (SCOTT et al., 1986), periquitos agapornis (*Agapornis* spp.) (PASS, 1987; JACOBSON et al., 1989), periquitos ring-neck (*Psittacula krameri*) (DESMIDT et al., 1991), papagaios eclectus (*Eclectus roratus*) (RAMIS et al., 1992), papagaios (*Amazona* spp.) (GÓMEZ-VILLAMANDOS et al., 1992), papagaios do congo (*Psittacus erithacus*) (DROUAL et al., 1994), cacatuas (*Cacatua* spp.) (LATIMER et al., 1997), *Poicephalus* spp. (LATIMER et al., 1997; WELLEHAN et al., 2005), loris (*Trichoglossus* spp.) (MACKIE et al., 2003) e araras (*Ara* spp.). Em 2005, foi detectado por RAUE, um novo adenovírus em papagaios do Senegal (*Poicephalus senegalus*) causando sinais clínicos e patológicos. Este AdVs foi detectado por meio da técnica de PCR e, por sua sequência do gene hexon, foi identificado como um novo integrante de *Aviadenovirus*, designado, e aprovado pelo ICTV, como *Psittacine Aviadenovirus* (PsAdv) (RAUE, 2005; KATOH et al., 2010).

O *Psittacine adenovirus-2* (PsAdv-2) é o adenovírus mais estudado por infectar psitacíformes. Seu primeiro relato foi em um periquito cabeça de ameixa (*Psittacula cyanocephala*) e em uma cacatua alba (*Cacatua alba*) nos Estados Unidos (WELLEHAN et al., 2009). Posteriormente foi


detectado por BALLMANN e VIDOVSZKY (2013) em cinco papagaios de origem australiana na Hungria. ZADRAVEC et al. (2011) evidenciaram infecções subclínicas por este agente em swabs cloacais de 13 aves psitacíformes, aparentemente saudáveis, na Eslovênia. Recentemente, YANG et al. (2019) detectaram o PsAdv-2 na espécie *Neophema chrysogaster*, periquito de ventre laranja, espécie em risco de extinção na Austrália (PHALEN et al., 2019).

No Brasil, uma recente pesquisa relatou a ocorrência de estirpes de AdVs de diferentes gêneros (*Aviadenovirus* e *Atadenovirus*) em psitacídeos, no centro-oeste do Brasil (DUARTE et al., 2019).

3.4.2. Etiologia

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) os adenovírus são classificados em 5 gêneros: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* e *Ichtadenovirus* (ICTV, 2019). Os representantes de *Mastadenovirus* são encontrados em mamíferos, *Aviadenovirus* são encontrados em aves. *Atadenovirus* foram encontrados em aves e mamíferos, mas sua origem mais provável é em squamatas (répteis) (HARRACH, 2000; BENKO et al., 2002; FARKAS et al., 2002; WELLEHAN et al., 2004; WELLEHAN et al., 2009). *Siadenovirus* foram descritos em aves (PITCOVSKI et al., 1998; WELLEHAN et al., 2009), tartarugas (RIVERA et al., 2009; WELLEHAN et al., 2009) e anfíbios (DAVISON et al., 2000; WELLEHAN et al., 2009). Atualmente, o adenovírus de esturjão branco é o único membro conhecido do gênero *Ichtadenovirus*, sendo o único adenovírus descrito em peixes (BENKOË et al., 2005; ICTV; KING, 2012).

Em aves, as adenovirose são causadas por integrantes dos gêneros *Aviadenovirus* (denominado anteriormente Grupo I), *Atadenovirus* (anteriormente Grupo III) ou *Siadenovirus* (anteriormente Grupo II) (LÜSCHOW et al., 2007; DAS et al., 2017; SCHACHNER et al., 2018; PHALEN et al., 2019; MARTINS; RESENDE, 2009; CASSMANN et al., 2019). As espécies reconhecidas que afetam psitacídeos pertencem aos gêneros *Atadenovirus* e *Aviadenovirus* (DAS et al., 2017; LÜSCHOW et al., 2007; RAUE et al., 2005; CASSMANN et al., 2019) conforme apresentado na Figura 1. Recentemente foi descrito uma espécie nova de *Siadenovirus* infectando psitacídeos em cativeiro e vida livre na Austrália (YANG et al., 2019).



Virus Taxonomy: 2018b Release
 EC 50, Washington, DC, July 2018
 Email ratification February 2019 (MSL #34)

<ul style="list-style-type: none"> - Family: <i>Adenoviridae</i> - Genus: <i>Atadenovirus</i> Species: <i>Bovine atadenovirus D</i> Species: <i>Deer atadenovirus A</i> Species: <i>Duck atadenovirus A</i> Species: <i>Lizard atadenovirus A</i> ★ Species: <i>Ovine atadenovirus D</i> Species: <i>Possum atadenovirus A</i> Species: <i>Psittacine atadenovirus A</i> Species: <i>Snake atadenovirus A</i> + Genus: <i>Aviadenovirus</i> + Genus: <i>Ichtadenovirus</i> + Genus: <i>Mastadenovirus</i> + Genus: <i>Siadenovirus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Family: <i>Adenoviridae</i> + Genus: <i>Atadenovirus</i> - Genus: <i>Aviadenovirus</i> Species: <i>Duck aviadenovirus B</i> Species: <i>Falcon aviadenovirus A</i> Species: <i>Fowl aviadenovirus A</i> Species: <i>Fowl aviadenovirus B</i> Species: <i>Fowl aviadenovirus C</i> Species: <i>Fowl aviadenovirus D</i> Species: <i>Fowl aviadenovirus E</i> Species: <i>Goose aviadenovirus A</i> Species: <i>Pigeon aviadenovirus A</i> Species: <i>Pigeon aviadenovirus B</i> Species: <i>Psittacine aviadenovirus B</i> Species: <i>Turkey aviadenovirus B</i> Species: <i>Turkey aviadenovirus C</i> Species: <i>Turkey aviadenovirus D</i> + Genus: <i>Ichtadenovirus</i> + Genus: <i>Mastadenovirus</i> + Genus: <i>Siadenovirus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Family: <i>Adenoviridae</i> + Genus: <i>Atadenovirus</i> + Genus: <i>Aviadenovirus</i> + Genus: <i>Ichtadenovirus</i> + Genus: <i>Mastadenovirus</i> - Genus: <i>Siadenovirus</i> ★ Species: <i>Frog siadenovirus A</i> Species: <i>Great tit siadenovirus A</i> Species: <i>Penguin siadenovirus A</i> Species: <i>Raptor siadenovirus A</i> Species: <i>Skua siadenovirus A</i> Species: <i>Turkey siadenovirus A</i>
--	---	--

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/93/adenoviridae

Figura 1 - Taxonomia de vírus integrantes da família Adenoviridae. A família inclui três gêneros que infectam aves: *Atadenovirus*, *Aviadenovirus* e *Siadenovirus*. ICTV (2018) retirado de Martins e Gómez (2020)

Os AdV são caracterizados por virions não envelopados, com duas fitas de DNA, de tamanho médio variando de 26 a 45 kbp (WELLEHAN et al., 2009; DAS et al., 2017). O genoma codifica as proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais estão localizadas nos capsídeos, fibras e cerne, e as não estruturais estão apenas presentes na célula infectada (MARTINS; RESENDE, 2009). As partículas de AdVs são de simetria regular, formadas por um capsídeo em arranjo icosaédrico de 252 capsômeros hexagonais, compostos de 240 *hexons*, 64 *pentons* e 12 fibras (RAUE, 2005; MARTINS; RESENDE, 2009) (Figura 2). A proteína *hexon* é a principal proteína capsídica viral do adenovírus e, consiste em dois componentes funcionais: as regiões de pedestal conservadas P1 e P2, e as variáveis, os loops L1 a L4. L1, L2 e L4 estão localizadas na superfície da proteína hexon e, interagem com a resposta imune do hospedeiro (KATOH et al., 2009). A região L3 combina as regiões da superfície externa e as regiões conservadas do pedestal P1 e P2, formando a superfície interna (RAUE, 2005; KATOH et al., 2010).

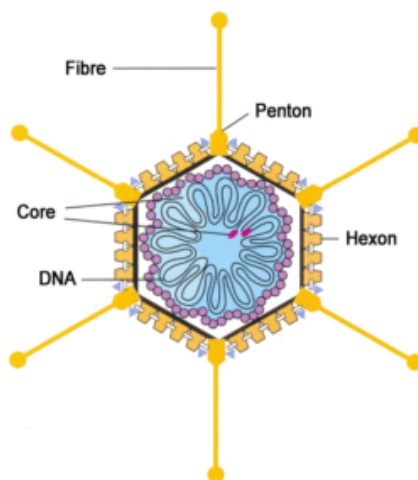


Figura 2 - Diagrama de adenovírus–(MFENYANA, 2007).

As propriedades antigênicas determinadas pelos *hexons*, *pentons* e fibras permitem a diferenciação de isolados, estirpes, espécies e gêneros de adenovírus aviários (MARTINS; RESENDE, 2009). Por ser conhecida, a proteína hexon possui determinantes específicos de família, gênero, espécie e tipo. Dessa forma o gene hexon tem sido utilizado para o estudo filogenético dos AdVs (KATOH et al., 2010).

Como muitos vírus de DNA, análises filogenéticas de adenovírus indicam que vários elementos nas estruturas de ramificação desses vírus são congruentes com os padrões de ramificação para seus hospedeiros. Isto sugere que esses vírus coevoluíram com as espécies que hospedam, embora trocas de hospedeiros certamente tenha ocorrido (WELLEHAN et al., 2009).

3.4.3. Patogenia

No geral, a epizootiologia dos AdVs que afetam psitacídeos é pouco compreendida, sendo seu comportamento comparado ao que ocorre em aves de produção (WELLEHAN, 2005). Alguns adenovírus são altamente patogênicos, resultando em considerável morbimortalidade (SCHACHNER et al., 2018; PHALEN et al., 2019), enquanto outros causam exclusivamente, ou predominantemente, infecção subclínica e podem circular de forma despercebida nos indivíduos infectados (SCHACHNER et al., 2018; YANG et al., 2019; PHALEN et al., 2019). A infecção pode ser persistente ao longo da vida das aves (SCHACHNER et al., 2018; YANG et al., 2019) e podem ter pouca ou nenhuma consequência para o animal, porém, podem ser reativados a qualquer supressão imunológica (YANG et al., 2019; PHALEN et al., 2019). Devido a essa característica de infecção latente, mesmo com a monitoria permanente dos plantéis saudáveis, pode-se obter resultados laboratoriais falso-negativos, por amostragem nos ciclos sem expressão viral. (MARTINS; RESENDE, 2009).

Presume-se que em papagaios a infecção seja mantida em indivíduos infectados de forma subclínica, porém pode causar infecção branda ou doença severa quando se desenvolve em conjunto com: outro agente viral ou bacteriano, agentes imunodepressores, em animais sob

estresse crônico ou intenso, ou em animais imunodeprimidos (HESS, 2013; SCHADE, et al, 2013; MCFERRAN, 2000; WELLEHAN, 2005; MFENYANA, 2007; TO et al 2014).

Representantes da família Adenoviridae foram isolados de bolsa cloacal (ZADRAVEC et al., 2011), fezes (YANG et al., 2019), traqueia (MARQUES et al., 2019), sangue periférico, conjuntiva, faringe, pulmões, rins, tonsilas cecais, baço e fígado de aves infectadas naturalmente, o que indica que o vírus pode estar amplamente distribuído no organismo do hospedeiro (PEREIRA, 2011). É relatado que alguns AdVs têm predileção por replicar em células hepáticas, porém em infecções experimentais em galinhas foi demonstrado que, pelo menos em infecção precoce, a replicação do vírus é maior nas tonsilas cecais, seguidas pelo fígado e bolsa cloacal (ROMANOVA et al., 2009). De acordo com PEREIRA (2011), com as evidências disponíveis, parece que todas as estirpes seguem o mesmo padrão de infecção. Após uma replicação inicial provavelmente ocorre uma viremia, resultando na dispersão do vírus para todos os órgãos.

Segundo relatado por PHALEN et al. (2019), os AdVs da maioria das espécies de vertebrados são relativamente específicos ao hospedeiro, no entanto, infecção entre espécies próximas podem ocorrer. Essa infecção cruzada pode ser facilitada em espécies em cativeiro criadas para o comércio de animais de estimação pela prática comum de criação mista. A consequência da infecção em um hospedeiro não específico para o agente não pode ser prevista, e em alguns casos foi relatado que um adenovírus benigno para seu hospedeiro adaptado causou doença em um hospedeiro não adaptado (DAS et al., 2017; PHALEN et al., 2019).

As infecções por AdVs são comuns em aves comerciais e as características dos sistemas de criação intensificada, em locais com múltiplas idades e procedências, e com proximidade entre lotes, favorecem a disseminação (MARTINS; RESENDE, 2009).

É sugerido por TO et al. (2014), que os adenovírus aviários podem levar à imunodepressão nas aves, causando doença imunossupressora, como a Síndrome do Hidropericárdio. É ainda especulado, neste estudo, que o adenovírus aviário descoberto tenha causado imunodepressão nos papagaios infectados, e, portanto, mais animais foram infectados com uma maior carga bacteriana de *C. psittaci*.

3.4.4. Distribuição e ocorrência

Os AdVs são mundialmente distribuídos e possuem grande variedade de hospedeiros, como galinhas, perus e psitacídeos (MFENYANA, 2007). As infecções por adenovírus foram descritas e caracterizadas de forma variável em muitas espécies de psitacídeos, originários de todas as suas distribuições geográficas (YANG et al., 2019). De acordo com PHALEN et al. (2019), a infecção por PsAdv-2 foi documentada em nove espécies de psitacíformes, cujas distribuições geográficas naturais incluem a Austrália, Nova Zelândia, Indonésia, e o subcontinente Indiano. Das espécies originárias da Austrália, foram descritas infecções em periquito do ventre laranja (*Neophema chrysogaster*), periquito-australiano (*Melopsittacus undulatus*), calopsita (*Nymphicus hollandicus*), rosela (*Platycercus eximius*), papagaio de burke (*Neopsephotus bourkii*) e papagaio de peito escarlate (*Neophema splendida*). Das espécies originárias da Nova Zelândia foi descrita em periquito-de-coroa-vermelha (*Cyanoramphus novaezelandiae*). Foi descrita em *Cacatua alba* originária da Indonésia, e periquito cabeça de

ameixa (*Psittacula cyanocephala*), do subcontinente Indiano (WELLEHAN et al., 2009; ZADRAVEC et al., 2011; BALLMANN; VIDOVSZKY, 2013; YANG et al., 2019; PHALEN et al., 2019).

Foram descritas infecções envolvendo psitacídeos em cativeiro na África do Sul (MFENYANA, 2007), na Europa (LÜSCHOW et al., 2007), Estado Unidos (WELLEHAN et al., 2009), Eslovênia (ZADRAVEC et al., 2011), Hungria (BALLMANN; VIDOVSZKY, 2013) e Austrália (PHALEN et al., 2019).

Em 2014 foi descrito um surto de psitacose humana, precedida de um surto de clamidiose em psitacídeos (*Amazona farinosa*) em Hong Kong. Foi sugerido que o adenovírus de psitacídeos (PsAdV) pode ter ocasionado imunodepressão em aves infectadas com *Chlamydia psittaci*, acarretando em uma maior carga bacteriana nas aves e consequente aumento do risco de infecção aos humanos envolvidos no manejo (TO et al. 2014).

No Brasil, a maioria das pesquisas com adenovírus foi realizada em aves domésticas de produção (METTIFOGO et al., 2014; PEREIRA et al., 2014; DE LA TORRE et al., 2018) e, entre as populações silvestres há publicações com columbiformes (CATROXO et al. 2011) e cracídeos (MARQUES et al. 2019). Uma recente pesquisa relatou a ocorrência de estirpes de adenovírus de diferentes gêneros (*Aviadenovirus* e *Atadenovirus*) em psitacídeos, no centro-oeste do Brasil (DUARTE et al., 2019).

3.4.5. Transmissão

A transmissão dos adenovírus aviários pode ser vertical ou horizontal (CRITTER et al., 2007; MARTINS; RESENDE, 2009; PEREIRA, 2011). O vírus é transmitido da matriz para a progênie, por via transovariana ou no sêmen do macho infectado (vias verticais), e da ave infectada para a ave susceptível (vias horizontais), principalmente por inalação de aerossóis respiratórios da ave infectada e via oro-fecal, com alimento, água ou equipamentos contaminados (MARTINS; RESENDE, 2009).

Na produção avícola a presença de adenovírus aviários em embriões ocorre devido à transmissão vertical de reprodutoras infectadas, e é fator determinante na produção. A transmissão horizontal, a partir da contaminação de fômites, pessoal e proximidade de galinhas portadoras, ocorre em falhas de biossegurança e coloca em risco os plantéis (MARTINS; RESENDE, 2009).

Pouco se conhece sobre a transmissão de adenovírus em aves silvestres e em ambiente natural, no entanto acredita-se que se dê da mesma forma que em aves de produção, inclusive com a possibilidade de transmissão vertical (YANG et al., 2019).

3.4.6. Sinais clínicos

Grande parte dos AdVs não apresentam relação direta entre infecção e doença, se comparados aos integrantes de *Atadenovirus* e *Siadenovirus*, que são diretamente associados à doença

específica (HESS, 2013; MAREK et al., 2014; MFENYANA, 2007). É relatado que geralmente os AdVs não são causadores de patologia evidente e sua presença no hospedeiro nem sempre é associada à doença com manifestações clínicas (MARTINS; RESENDE, 2009).

O vírus pode ser encontrado em aves aparentemente saudáveis (HULBERT et al., 2015), mas a infecção também pode desenvolver sinais clínicos. Os sinais clínicos variam, podendo ser: bastante inespecíficos, como perda de peso e letargia (WELLEHAN et al., 2009); associados aos sinais clínicos, como a depressão, anorexia, sinais respiratórios, diarreia e hemorragia cloacal (TO et al., 2014); mas também ocorrem casos que com progressão clínica semelhante à infecção pelo herpesvírus de psitacídeos tipo 1 (PsHV-1), na qual aves aparentemente normais são encontradas mortas em seus recintos (KATOH et al., 2010; SCARLATA et al., 1999; MFENYANA, 2007; TO et al. 2014).

Os quadros clínicos mais consistentes associados aos *Aviadenovirus* em aves de produção são hepatite por corpúsculo de inclusão e hepatite-hidropericárdio. A doença hemorrágica em aves jovens com envolvimento do fígado (hemorrágico e aumentado) é digna de suspeita. Episódios de adenovirose severa têm sido relatados em falcónídeos, com hepatite por corpúsculo de inclusão e alta mortalidade, causando grande impacto nas criações preservacionistas (MARTINS; RESENDE, 2009).

3.4.7. Alterações anatomopatológicas

Lesões inespecíficas associadas a infecções por AdVs têm sido observadas em várias aves, e incluem hepatomegalia, esplenomegalia, dilatação do duodeno e proventrículo, rins aumentados, bem como edema, congestão e hemorragia pulmonar (KATOH et al., 2010; TO et al. 2014). Lesões hepáticas são as alterações mais evidentes em aves infectadas. Fígados friáveis, aumentados, podem ser hemorrágicos, pálidos ou manchados. Corpos de inclusão basofílicos intranucleares nos hepatócitos são vistos rotineiramente e, ocorrem devido à concentração de DNA viral nos sítios de montagem, podendo ser associados com necrose no fígado e baço (KATOH et al., 2010; MARTINS; RESENDE, 2009).

Estes vírus têm sido associados a uma variedade de lesões, incluindo hepatite, esplenite, pancreatite, enterite, nefrite, conjuntivite e pneumonia (HULBERT, 2015). Em estudo realizado por DAS et al. (2017) foi demonstrado fígado com congestão grave generalizada e necrose hepatocelular multifocal, além de áreas multifocais de necrose nos intestinos e baço associados à núcleo aumentado e inclusões intranucleares basofílicas. DROUAL et al. (1995) em necropsias realizadas observou pequenas hemorragias no fígado e sangue vivo no lúmen intestinal. Em outro animal evidenciou fígado com manchas escuras e líquido avermelhado no intestino. Na histopatologia graves lesões de necrose coagulativa associadas a infiltrações heterofílicas foram reveladas. O intestino apresentava áreas de necrose grave com enterite hemorrágica. Havia também eritrócitos extravasados no lúmen e lâmina própria.

3.4.8. Diagnóstico

O quadro clínico de depressão imune, redução do crescimento e lesões hepáticas com hepatite por corpúsculo de inclusão intranuclear no hepatócito são indicativos para *Aviadenovirus* em frangos (MARTINS; RESENDE, 2009). Os métodos de diagnóstico podem incluir isolamento viral, microscopia eletrônica, hibridização *in situ*, imunohistoquímica, histopatologia, e amplificação e caracterização molecular das sequências de DNA (MARTINS; RESENDE, 2009; WELLEHAN et al., 2009; PEREIRA, 2011).

Adenovírus foram detectados em psitacídeos por microscopia eletrônica (RAUE, 2005), porém esse método além de caro não está amplamente disponível (PEREIRA, 2011).

O diagnóstico sorológico é de difícil interpretação devido à baixa correlação de títulos de anticorpos e doença, uma vez que os anticorpos ocorrem tanto em aves saudáveis, quanto nas afetadas clinicamente. Além disso, há relatos de aves comerciais frequentemente infectadas com diferentes sorotipos, motivos estes, pelos quais este método não tem sido mais utilizado, principalmente na avicultura comercial (MARTINS; RESENDE, 2009; PEREIRA 2011)

Em psitacídeos o diagnóstico utilizado, na maioria dos casos, baseia-se em investigações histológicas e na evidenciação de corpúsculos de inclusão intranucleares em hepatócitos (LÜSCHOW et al., 2007). Os hepatócitos, usualmente, contêm corpúsculo de inclusão intranuclear basofílico ou eosinofílico (ADAIR e FITZGERALD, 2008). Conforme relatado por PEREIRA (2011), embora os corpúsculos de inclusão intranuclear nos hepatócitos sejam sugestivos de infecção por AdVs, se presentes, podem variar em tamanho e propriedades tintoriais, de aumentado e basofílico, a pequeno e eosinofílico. Inclusões de adenovírus podem estar misturadas com inclusões por herpesvírus, circovírus ou poliomavírus, dependendo da espécie aviária em questão. As lesões histopatológicas, principalmente aquelas encontradas no fígado, não são patognômicas, e podem ser encontradas em outras diversas patologias.

Os materiais suspeitos obtidos podem também ser avaliados por reação em cadeia pela polimerase (PCR), para pesquisa de DNA, em que os iniciadores podem ser específicos para a estirpe, sorotipo ou espécie, seguida de caracterização dos produtos por enzimas de restrição ou sequenciamento. O diagnóstico baseado por amplificação e caracterização molecular de sequências do DNA é atualmente a ferramenta de melhor custo-benefício, sendo considerado o método laboratorial mais rápido e confiável (MARTINS; RESENDE, 2009). RAUE descreveu em 2005 um protocolo de PCR que foi desenvolvido amplificando o gene da região L1 presente no hexon, para identificação do DNA do PsAdv em amostras de fígado de aves psitacíformes que vieram a óbito. YANG (2019) realizou a técnica de PCR para detecção do DNA do agente em swab cloacal e excrementos cloacais de psitacídeos vivos infectados, e relatou que, comparando as amostras testadas, é sugestivo que o teste em fezes seja mais sensível que em swab cloacal. Devido à possibilidade de eliminação intermitente, os resultados laboratoriais em animais vivos podem ser falso-negativos (MARTINS; RESENDE, 2009).

A maioria dos métodos relatados para o diagnóstico da infecção não identifica o adenovírus além do nível da família (WELLEHAN et al., 2009), sendo necessária a caracterização dos produtos por enzimas de restrição ou sequenciamento do DNA viral para evidenciar a espécie de adenovírus causadora da patologia (MARTINS; RESENDE, 2009).

3.4.9. Prevenção e controle

Os adenovírus podem permanecer infectantes por longos períodos em lixo, comida, água ou fezes contaminadas, portanto são resistentes à inativação fora do hospedeiro. É relatado que os aviadenovírus são resistentes a solventes lipídicos como éter, clorofórmio, tripsina e álcool a 50%. Existem variações na susceptibilidade ao calor para diferentes espécies do vírus, sendo alguns isolados resistentes a 56°C por 20 minutos e outros podendo suportar essa temperatura por até 22 horas. Algumas cepas resistiram a 60°C e 70°C por 30 minutos. Também é encontrada ineficácia dos desinfetantes mais usados, sendo que a exposição à formalina, aldeídos e iodóforos deve ser por mais de uma hora para inativar o vírus (RITCHIE; CARTER, 1995; MFENYANA, 2007). A resistência ao intervalo de pH entre 3 e 9 também foi descrita (MFENYANA, 2007).

A terapia específica para a maioria das infecções por AdVs é inexistente, mas infecções secundárias podem ser evitadas através da administração de um antibiótico de amplo espectro às aves afetadas, o que pode reduzir a mortalidade (MFENYANA, 2007).

Para aves comerciais existem vacinas específicas para as espécies de vírus que acarretam em perdas econômicas e doenças na produção (MARTINS; RESENDE, 2009; PEREIRA, 2011; SCHACHNER et al., 2018), porém nenhuma vacina foi desenvolvida para o adenovírus de psitacídeos (MFENYANA, 2007).

As adenovirose estão adquirindo expressão clínica em espécies da fauna, principalmente em criatórios comerciais. Nesses locais há uma repetição de erros já cometidos pela avicultura industrial, que incluem a criação conjunta de aves de origem e idades diferentes, baixa biossegurança e contato próximo entre os lotes (MARTINS; RESENDE, 2009).

Criadores de aves em cativeiro, além de realizar compra e venda, costumam levar suas aves para torneios com baixa biossegurança. Seus pássaros costumam ser alojados com outras espécies, em recintos pequenos, práticas estas que criam condições ideais para disseminação do vírus (PHALEN et al., 2019). Além disso, o tráfico de aves silvestres para o criação em cativeiro irregular foi difundida no passado e continua hoje (VILELA, 2012; ALVES; LIMA; ARAUJO, 2013; PIRES, 2015; PIRES; MORETO, 2016). PHALEN et al. (2019) relatam não conhecerem nenhuma instituição onde é realizada a triagem rotineira para o adenovírus e, devido a natureza persistente de suas infecções, somente a quarentena como forma de prevenção não controla a sua disseminação.

As aves suscetíveis devem ser impedidas de entrar em contato com os animais de vida livre, principalmente com aves migratórias, pois estas podem se portar como fonte de infecção aos ambientes nos quais transitarem, como parques zoológicos e aviários (MFENYANA, 2007). Os resultados de YANG et al. (2019) demonstram que o PsAdv-2 é endêmica na população de papagaios de barriga laranja em cativeiro e que a população selvagem tem sido exposta. Além disso, a prevalência geral da infecção os leva a acreditar que é improvável que os esforços para controlar o PsAdv-2 nesta espécie de psitacídeo australiano sejam bem sucedidos.

Medidas de biossegurança, como limpeza e desinfecção das instalações, quarentena, vazios sanitário, separação de animais de idades e procedências diferentes, devem ser implantadas para minimizar o risco de infecção. Além disso, deve-se diminuir os fatores estressantes locais e o risco de infecções concomitantes, uma vez que estes podem causar imunodepressão nas aves e predispor a doença por adenovírus (MARTINS; RESENDE, 2009; CHAN et al., 2015; SCHADE, et al, 2013; MCFERRAN, 2000; WELLEHAN, 2005; MFENYANA, 2007; TO et al 2014).

3.4.10. Saúde pública

Até o momento nenhum dos adenovírus que ocorrem em aves tem importância em saúde pública (MARTINS; RESENDE, 2009), porém em 2014 foi descrito um surto de psitacose humana, precedida de um surto de clamidiose em psitacídeos em Hong Kong. Neste episódio, o adenovírus teve importante papel na disseminação de *C. psittaci*, acarretando maior carga bacteriana nas aves e, conseqüente infecção dos humanos envolvidos no manejo (TO et al., 2014).

Por seu caráter imunodepressor, e por haver ocorrência concomitante de adenovirose com outras patologias, deve-se dar bastante atenção a esta infecção para evitar a potencialização de agente zoonóticos na criação (CHAN et al., 2015).

3.5. DOENÇA DO BICO E DAS PENAS DOS PSITACÍDEOS (CIRCOVIRUS)

3.5.1. Histórico

Embora o primeiro relato oficial da doença do bico e das penas nos psitacídeos tenha ocorrido em 1972, e primeira descrição sobre a etiologia e patogenia tenha ocorrido em 1984, há um relato datado de 1888 em uma revista de ornitologia de uma doença grave que estaria afligindo psitacídeos na cidade de Adelaide (Austrália). Foi descrito que os animais estavam perdendo suas penas e o bico estava com formato diferente do normal, situação que impedia os animais de voarem e tornava-os mais susceptíveis a predadores e ao frio no inverno (JULIAN, 2012; MELO FILHO, 2019). Há outro relato, datado do início de 1900 em que descrevem uma cacatua em cativeiro em Sydney (Austrália) sem penas e com a parte superior do bico bastante alongado, sintomas clássicos da doença (JULIAN, 2012).

Devido às características de distrofia e perda de penas, e bico com deformidades, deu-se o nome de Psittacine Beak and Feather Disease Syndrome (PBFDS), doença do bico e das penas dos psitacídeos, para a afecção que havia sido observada em cacatuas australianas na década de 70, originando o primeiro relato oficial sobre a etiologia e patogenia da afecção em 1984 (PASS; PERRY, 1984; RITCHIE et al., 1989; KATOH et al., 2010; ARAÚJO, 2011; JULIAN, 2012; LEITE, 2013; MELO FILHO, 2019).

Foram realizados estudos subseqüentes que relatavam os achados clínicos da enfermidade e como ela atingia os psitacídeos, aprimorando a nomenclatura para Pbfd, por não se tratar de uma síndrome, e sim uma doença viral, causada pelo vírus da Pbfd (BFDV) (ARAÚJO, 2011; MELO FILHO, 2019).

Embora se acredite que o BFDV tenha se originado na Austrália, o vírus está globalmente distribuído, e é sugerido que tenha sido introduzido tanto nas populações de cativeiro, quanto vida livre provavelmente devido ao comércio internacional e tráfico de aves infectadas para o

mercado de aves de companhia (RAUE et al., 2004; PIÇARRA et al., 2009; ARAÚJO, 2011; JULIAN, 2012; MELO FILHO, 2019).

Inúmeros estudos evidenciaram que o agente possui distribuição mundial já tendo sido identificado em muitos países, incluindo Austrália, Alemanha, Itália, Nova Zelândia, África do Sul, Taiwan, Tailândia e EUA (KATOH et al., 2010). O BFDV foi isolado de mais de 60 espécies de psitacídeos em todo o mundo (HULBERT et al., 2015), sendo encontrado em animais de vida livre da Austrália, Indonésia e Filipinas (AZEVEDO, 2017).

Os primeiros casos de PBFV em espécies de psitacídeos no Novo Mundo foram descritos em papagaios do gênero *Amazona* e em uma arara (*Ara macao*), confirmando a suscetibilidade de espécies do Novo Mundo para infecção (JULIAN, 2012).

O agente já foi identificado em papagaios-verdadeiros (*A. aestiva*) entregues em Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) do Brasil (ARAÚJO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2015; MELO FILHO, 2019), tornando-se preocupante para a conservação desta espécie e dos demais psitacídeos em cativeiro e vida livre no país (ARAÚJO, 2011; ARAÚJO et al., 2015).

3.5.2. Etiologia

O vírus da doença do bico e das penas (BFDV - *Beak and feather disease virus*), agente causador do PBFV (doença do bico e das penas dos psitacídeos), pertence à família Circoviridae, gênero *Circovirus* (ICTV, 2019).

O BFDV é um vírus não envelopado pequeno, icosaédrico, medindo entre 14-18 nm de diâmetro, que possui uma fita simples circular de DNA (ssDNA). Seu genoma possui 1.993 nucleotídeos e sete ORFs (open reading frame) que codificam sete proteínas diferentes sendo em cadeia paralela as ORF's V1, V2 e V3, e na cadeia complementar as C1, C2, C3 e C4 (Figura 3). A ORF V1 possui 867 nucleotídeos e codifica uma proteína que está associada à replicação viral, denominada de proteína Rep. A ORF C1, localizada na fita complementar do DNA, codifica uma proteína de capsídeo. Não se sabe ao certo o papel das demais ORFs e, estas possuem menos conservação do genoma viral. Devido ao tamanho reduzido do genoma, a replicação viral é dependente das enzimas celulares das células hospedeiras, ocorrendo tipicamente no núcleo, onde produzem os corpúsculos de inclusão (RITCHIE, 1995; KATOH et al., 2010; AZEVEDO, 2017; MELO FILHO, 2019; RAUE et al., 2004; PIÇARRA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011; DUARTE et al., 2019; LEITE, 2013; PIASECKI; WIELICZKO, 2010).

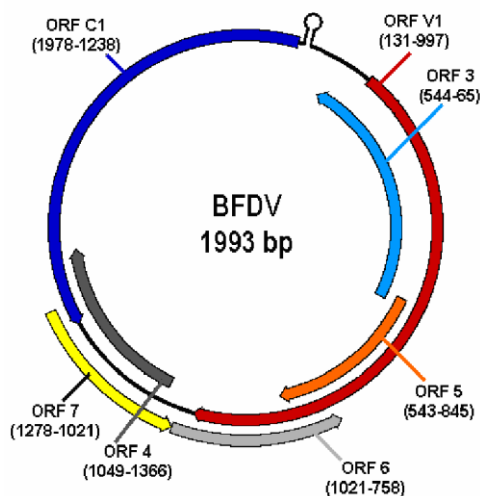


Figura 3- Apresentação esquemática do genoma BFDV. O esquema apresenta as 7 ORFs do genoma do BFDV, identificando ainda o ORF C1 e ORF V1 – KHALESI (2007).

As análises genômicas dos isolados de BFDV indicam a existência de diferentes estirpes do vírus. Originalmente as estirpes podem apresentar um grau de especificidade com o hospedeiro ou da região de ocorrência (JULIAN, 2012). Porém, devido às altas taxas de recombinação e de substituição de nucleotídeos, comuns entre os vírus ssDNA (ORTIZ-CATEDRAL et al., 2010), associado ao comércio internacional de psitacídeos e a prática de criação conjunta de espécies diferentes, ocorreu o surgimento de linhagens com patogenicidade alterada (VARSANI et al., 2011, JULIAN, 2012).

Diferentes genótipos e/ou estirpes têm sido definidos com base nas variações das sequências do DNA. Foram encontradas até cerca de 20% de variações (KHALESI et al., 2005; PHALEN, 2006; RAUE et al. 2004; PIÇARRA, 2009). ORF V1 é altamente conservada em todos os circovírus aviários, enquanto a ORF C1 possui maior variação entre as diferentes cepas. É relatado que existem genótipos ou estirpes mais ou menos adaptados às famílias Loriidae, Cacatuidae e Psittacidae, porém não é descrito casos de especificidade entre uma estirpe viral e determinado hospedeiro DE KLOET & DE KLOET, 2004; KHALESI et al., 2005; PHALEN 2006; LEITE, 2013; PIÇARRA, 2009).

3.5.3. Patogenia

O vírus é eliminado pelos animais infectados através de partículas de descamação das penas, fezes e secreções do papo (PHALEN, 2006; PIÇARRA, 2009). O quadro clínico é determinado pela idade, via de infecção, estado imunológico, quantidade de antígenos, genótipo viral e espécie afetada (RITCHIE, 1995; RAUE et al., 2004, PIÇARRA, 2009).

O período de incubação varia entre 2 e 4 semanas em filhotes e jovens, mas pode levar meses ou até anos em aves adultas (PHALEN, 2006; PIÇARRA, 2009). O vírus replica-se em tecidos

onde haja células em divisão, e já foi demonstrada a sua presença no timo, bolsa de Fabricius, baço, inglúvio, esôfago, intestino, fígado, pele, penas, cérebro e leucócitos circulantes (PHALEN, 2006; DE KLOET & DE KLOET, 2004; PIÇARRA, 2009).

A displasia das penas resulta da necrose e ruptura de estruturas da epiderme, bulbo das penas e tecidos adjacentes, causando lesões de trombose e hemorragia no interior dos folículos e consequente perda permanente do folículo. As lesões no bico e unhas ocorrem devido a este mesmo processo no seu epitélio germinativo. Este processo de necrose também ocorre nos órgãos linfóides e leucócitos circulantes, causando uma leucopenia grave e, resultando em um quadro de imunodepressão (PHALEN, 2006; PIÇARRA, 2009; LEITE, 2013). As aves afetadas tendem a desenvolver doenças secundárias como infecções bacterianas, virais ou fúngicas, das quais geralmente morrem (HULBERT et al., 2015; ORTIZ-CATEDRAL et al., 2010)

Uma ave portadora pode eliminar o vírus sem expressar sintomatologia, como ocorre com os *Agapornis* sp. e periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), que frequentemente apresentam infecção assintomática (PHALEN, 2006).

De acordo com PHALEN (2006), a infecção pode causar quadro agudo, crônico ou assintomático. A infecção aguda observa-se mais em animais jovens, com menos de um ano, por ainda não terem o completo desenvolvimento da bursa de fabricius, sendo a condição imunológica o fator determinante de susceptibilidade ao vírus e não as variações antigênicas (LEITE, 2013). É relatado também um quadro hiperagudo que acarreta em óbito de aves neonatas sem a presença de sinais clínicos (AZEVEDO, 2017). A doença crônica é caracterizada pelo crescimento progressivo de penas distróficas e deformidade no bico (PASS; PERRY, 1984; PIASECKI; WIELICZKO, 2010; RITCHIE et al., 1989).

Espécies de psitacídeos brasileiros aparentaram ser assintomáticas (ARAÚJO, 2011; ARAUJO et al. 2015; MELO FILHO, 2019), entretanto exceções, como espécies do gênero *Pyrrhura* foram diagnosticadas com grave perda de penas (Laboratório de Doenças das Aves, comunicação pessoal). Acredita-se que muitas espécies de psitacídeos americanos possuem maior resistência à infecção (PHALEN, 2006; PIÇARRA, 2009), porém podem transmitir o vírus entre si e para outras aves nativas e exóticas (MELO FILHO, 2019).

3.5.4. Distribuição e ocorrência

O BFDV possui distribuição mundial e já foi confirmado em 78 espécies de psitacídeos de cativeiro e vida livre (FOGELL; MARTIN; GROOMBRIDGE, 2016; KATOH et al., 2010; JULIAN, 2012, LEITE, 2013). O vírus foi relatado na Austrália, Alemanha, Itália, Nova Zelândia, África do Sul, Taiwan, Tailândia, EUA, Polônia, Costa Rica (KATOH et al., 2010; PIASECKI; WIELICZKO, 2010; DOLZ et al., 2013). No continente Africano a PBFV tem causado um grave dano às espécies ameaçadas, diminuindo ainda mais suas populações naturais. É considerada como um dos principais empecilhos ao programa de preservação do periquito das Ilhas Maurício (LEITE, 2013).

Hoje em dia, a infecção é generalizada na natureza, sendo encontrada em populações de cacatuas e roselas na Austrália e Indonésia (PIASECKI; WIELICZKO, 2010), em papagaios na

Nova Zelândia (ORTIZ-CATEDRAL et al., 2010), África do Sul e Austrália, e em periquitos nas Ilhas Maurício (FOGELL; MARTIN; GROOMBRIDGE, 2016).

Acredita-se que os psitacídeos do Novo Mundo são menos susceptíveis à doença do que as aves do Velho Mundo. Os primeiros relatos da PBFV nas Américas ocorreram em 1984, nas espécies *Amazona aestiva*, *Amazona autumnalis* e *Ara macao* (LEITE, 2013). No Brasil BFDV foi detectado em diversas espécies de psitacídeos, inclusive em *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro), entregues em Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) (ARAÚJO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2015; MELO FILHO, 2019)

Acredita-se que a razão da presença atual de BFDV em todos os continentes seja o comércio internacional de papagaios (PIASECKI; WIELICZKO, 2010; VARSANI et al., 2011; JULIAN, 2012; PIÇARRA et al., 2009; ARAÚJO, 2011; MELO FILHO, 2019).

3.5.5. Transmissão

O BFDV é altamente contagioso e os animais doentes eliminam o vírus através das penas e do pó das plumas, das secreções do Inglúvio, nas fezes e fômites infectados (JULIAN, 2012; LEITE, 2013; HULBERT et al., 2015) A transmissão de BFDV pode ocorrer de forma horizontal, a partir de aerossóis inalados, ingestão de partículas virais (LEITE, 2013; MELO FILHO, 2019) ou pelo ambiente, por se tratar de um vírus não envelopado que pode permanecer no ambiente por bastante tempo (MELO FILHO, 2019).

O vírus pode ser disseminado no ambiente através de células de descamação das penas das aves durante o voo, ou até mesmo paradas quando se limpam ou se mexem. Podem ainda ser eliminados pelas fezes ou secreções do papo, contaminando o ambiente (MELO FILHO, 2019).

A transmissão pode ocorrer também de forma vertical, como foi evidenciado em estudos que demonstraram a presença do DNA viral em 20% dos ovos de animais acometidos (PIÇARRA et al., 2009; MELO FILHO, 2019)

Os circovírus são muito estáveis no ambiente e resistentes a muitos tratamentos físicos e químicos (JULIAN, 2012; PIÇARRA, 2009; ARAÚJO, 2011). São resistentes a alta temperatura, baixo pH e diversos desinfetantes comerciais, motivo este pelo qual a contaminação ambiental é uma importante via de transmissão (JULIAN, 2012).

3.5.6. Sinais clínicos

O PBFV pode se apresentar de forma hiperaguda, aguda e crônica. A morte súbita ocorre nas formas hiperaguda e aguda. A forma crônica é caracterizada por distrofia e perda progressiva da simetria das penas e por deformidades nos bicos, porém esses sinais nem sempre estão presentes e parecem ter relação com a espécie afetada ou outros fatores (KATOH et al., 2010; (HULBERT et al., 2015). A forma hiperaguda ocorre em neonatos, levando-os a óbito sem a presença de sinais clínicos. A forma aguda é mais comum em filhotes, quando as penas estão em fase de formação, levando o animal a óbito em 1 a 2 semanas. Na forma crônica, as aves

afetadas possuem faixa etária de 6 a 12 meses, passando pela primeira muda de penas, entretanto, esta fase pode ocorrer também em animais mais velhos. A morte geralmente ocorre entre 6 meses a 2 anos do início da manifestação dos sinais clínicos, devido à natureza imunodepressora da doença (AZEVEDO, 2017). De acordo com RITCHIE et al. (1989) em filhotes e aves jovens pode-se observar letargia, depressão, diarreia e morte. Na forma aguda as lesões nas penas podem ser muito sutis, com apenas algumas ou nenhuma pena apresentando alterações distróficas. Ainda segundo RITCHIE et al. (1989), se a ave sobreviver à infecção inicial, pode desenvolver as alterações clássicas nas penas, sendo a forma crônica da doença.

Normalmente o primeiro sinal de PBFDF é a substituição de penas normais por penas de contorno distrófico, com necrose e inviáveis que param de crescer após emergirem do folículo. A doença progride nas mudas subsequentes e atingem as penas da cauda e as responsáveis pelo voo (RITCHIE et al., 1989).

É relatado também a forma silenciosa ou assintomática da doença, em que o animal não apresenta nenhuma manifestação externa, mas possui grande importância como disseminador do vírus no plantel e instalações (MELO FILHO, 2019)

O PBFDF pode ocasionar imunodepressão devido às lesões na bursa de fabricius, timo, bem como por lesões hepáticas (LEITE, 2013), favorecendo infecções secundárias que são as principais causas de óbito nas aves acometidas (MELO FILHO, 2019; DOLZ et al., 2013). A maioria das aves infectadas sobrevive menos de um ano após o aparecimento dos sinais clínicos, embora tenham sido relatadas aves portadoras assintomáticas, sobrevivendo por 10 anos (DOLZ et al., 2013).

O tipo de doença clínica é influenciado pela via de exposição viral, título do vírus infectante, virulência da cepa viral, idade e condição imunológica da ave afetada (RITCHIE et al., 1989). Algumas espécies, como as cacatuas, apresentam sinais clínicos específicos. Neste gênero, além do acometimento das penas, ocorrem sinais evidentes de lesão no bico, o que raramente é observado em outras espécies. Ocorre uma hiperqueratose do bico levando ao crescimento excessivo e alongamento, com necrose no estágio final da afecção (AZEVEDO, 2017).

3.5.7. Alterações anatomopatológicas

Microscopicamente, são observados corpúsculos de inclusão basofílicos intranuclear e intracitoplasmática dentro de células epiteliais ou macrófagos de penas infectadas (KATOH et al., 2010). Foi demonstrado que esses corpos de inclusão contêm antígeno viral do BFDV. Foi observado necrose nas células epiteliais das penas e, ocasionalmente da cavidade pulpar, juntamente com a necrose da epiderme basal do bico. Os corpúsculos de inclusão ou o ácido nucleico viral também foram relatados no timo, na bursa de fabricius e em outros órgãos e tecidos, frequentemente associados ao trato alimentar. A bursa de fabricius também mostra atrofia acentuada e tecido necrótico, causando imunodepressão em aves afetadas (JULIAN, 2012).

De acordo com RITCHIE et al. (1989), a lesão primária nas penas é caracterizada por inflamação não supurativa, incluindo acúmulo de células plasmáticas e linfócitos na região perivascular. Em aves afetadas cronicamente, observa-se edema com acúmulo de heterófilos e

macrófagos na polpa das penas. Geralmente, há uma necrose difusa das células epiteliais no colar intradérmico, câmara basal e intermediária das penas em desenvolvimento. Corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos basofílicos têm sido evidenciados nas penas, bico, timo e bursa de fabricius em aves com sinais clínicos. Esses corpúsculos de inclusão são de tamanho variável podendo estar ligados à membrana ou livre no citoplasma, e são encontrados comumente em macrófagos nas camadas basal e intermediária da epiderme e polpa das penas.

Em um relato de PBF em *A. aestiva* (papagaio-verdadeiro) recebido no CETAS de Brasília, foi observado infiltrado inflamatório difuso moderado, contendo macrófagos e acentuada congestão de vasos e capilares na região do intestino. Sendo essas alterações características da doença devido ao tropismo pelo sistema gastrointestinal. Neste caso não foram encontradas alterações no sistema imunológico e epiderme da ave (MELO FILHO, 2019).

3.5.8. Diagnóstico

A PBF não pode ser diagnosticada sem testes laboratoriais. Em situações de quadro clínico compatível os testes de diagnóstico são imprescindíveis para detectar o agente (LEITE, 2013). Já foram descritos diagnósticos por hibridação *in situ*, hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (HI), microscopia eletrônica, histopatologia, PCR e PCR em tempo real. Entre eles, a PCR é uma ferramenta muito sensível, específica e rápida para detecção do vírus (KATOH et al., 2010; PIÇARRA, 2009).

A histopatologia é o teste mais antigo para o diagnóstico da PBF, e visualiza-se o vírus na forma de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos, medindo cerca de 15 a 20 nm. As limitações dessa técnica decorrem da coleta invasiva de material biológico, sendo possível apenas nas coletas *post mortem* (LEITE, 2013; PIÇARRA, 2009). Outro fator limitante desta técnica é que o poliomavírus, herpesvírus e adenovírus podem causar inclusões nucleares basofílicas similares em psitacídeos, dificultando o diagnóstico de PBF pelo exame histopatológico (AZEVEDO, 2017).

O circovírus aviário tem a capacidade de aglutinar os eritrócitos de determinadas espécies animais quando colocado em contato (PHALEN, 2006; PIÇARRA, 2009). O diagnóstico por hemaglutinação (HA) já foi demonstrado com eritrócitos de diversos psitacídeos (PIÇARRA, 2009). As técnicas de HA são bastante sensíveis, mas podem ser pouco específicas devido à presença de hemaglutininas ou inibidores de hemaglutinação no soro das aves (PHALEN, 2006; PIÇARRA, 2009).

A inibição da hemaglutinação (HI) permite a determinação de títulos de anticorpos em aves que tiveram contato prévio com o vírus. O título de anticorpos do soro, devido à inibição do vírus e ausência da hemaglutinação, é determinado pela mais alta diluição capaz de inibir a hemaglutinação. (PHALEN, 2006; KHALESI, 2007; PIÇARRA, 2009). Esse teste é vantajoso devido ao baixo custo, e por dar resultados quantitativos, permitindo a avaliação do estado imune das aves (PIÇARRA, 2009; LEITE, 2013). A HI é o método de eleição para detecção de anticorpos em estudos soroepidemiológicos (PIÇARRA, 2009).

A PCR, ou Reação em Cadeia pela Polimerase (Polymerase Chain Reaction), é uma técnica de diagnóstico que vem sendo utilizada cada vez mais devido à alta sensibilidade (LEITE, 2013), e

é mais precisa e específica que a HA e HI (KHALESI, 2007; LEITE, 2013). Consiste na amplificação de um segmento do DNA viral, permitindo detectar a presença do patógeno. Podem ser coletadas amostras de qualquer tecido do animal, inclusive swabs cloacais e amostras ambientais (PHALEN, 2006; PIÇARRA, 2009; AZEVEDO, 2017). O PCR normalmente é realizado sobre a sequência nucleotídica do gene ORF V1, localizado na cadeia de DNA no sentido paralelo. Esse gene mostrou-se mais preservado que o gene ORF C1, ainda que não universalmente. As pequenas variações no gene ORF V1 não são suficientes para provocar falsos negativos (PIÇARRA, 2009). A detecção do DNA viral no sangue e penas tem sido utilizada como teste de triagem, inclusive para detectar portadores subclínicos (DOLZ et al., 2013).

Novas técnicas baseadas no PCR têm sido desenvolvidas. O Real Time PCR (PCR em tempo real) permite quantificar os antígenos virais, sendo possível caracterizar melhor a infecção e avaliar o tratamento (PIÇARRA, 2009; KATOH et al., 2010; LEITE, 2013).

Devem ser considerados como diagnóstico diferencial: a muda alterada causada pelo Polyomavirus aviário (APV), infecções bacterianas e fúngicas na pele, efeitos de fármacos, doença carencial por nutrição inadequada das aves, ectoparasitos, estresse ambiental e automutilação (LEITE, 2013).

3.5.9. Prevenção e controle

Não existe uma cura conhecida para PBFV e o controle da doença constitui em um bom manejo higiênico sanitário das instalações, teste dos animais recém-chegados e quarentena antes da introdução no plantel (LEITE, 2013).

Os membros da família Circoviridae são ambientalmente estáveis e bastante resistentes a muitos dos métodos comumente utilizados para desinfecção, como altas temperaturas, pH baixo, solventes orgânicos e grande quantidade de desinfetantes comerciais (JULIAN, 2012). O agente pode ser inativado com aplicação de iodo 1%, hipoclorito de sódio, B-propionolactona a 0,4%, glutaraldeído 1% e com calor (80°C durante 1 hora) (PIÇARRA, 2009).

O controle do BFDV na natureza é praticamente impossível, devido à natureza estável do vírus, porém, em cativeiro é possível prevenir a transmissão (JULIAN, 2012). Para isso é imprescindível que sejam adotadas medidas de profilaxia como: quarentena dos animais recém-adquiridos, isolamento ou eutanásia dos animais positivos, limpeza, desinfecção, vazios sanitário, diagnóstico de triagem regular no plantel (PIÇARRA, 2009; PIASECKI; WIELICZKO, 2010).

Não existe cura para a doença, sendo preconizado o tratamento suporte que consiste, basicamente, em terapia visando a prevenção de infecções secundárias devido a imunodepressão (LEITE et al., 2013; AZEVEDO, 2017; MELO FILHO, 2019), porém a probabilidade de sucesso é pequena, principalmente em infecções agudas (LEITE, 2013). É relatado tentativas de tratamento com interferon ômega felino tipo 1 e beta-(1,3/1,6)-Dglucano, porém esse tratamento é bastante dispendioso e apresenta uma taxa de sucesso relativamente reduzida (LEITE, 2013; PIÇARRA, 2009).

Tem-se trabalhado em tentativa de desenvolvimento de vacina com o vírus inativado, porém essa estratégia aparenta ser inviável pela dificuldade de cultivo do vírus *in vitro* em cultura celular e necessidade de manutenção de um plantel infectado como fonte de antígeno, o que torna o procedimento perigoso do ponto de vista epidemiológico, oneroso e antiético (LEITE, 2013; JULIAN, 2012; FOGELL; MARTIN; GROOMBRIDGE, 2016; PIÇARRA, 2009).

Em instalações que não possuem plantel estável e estão sujeitas a rotineira entrada de indivíduos, como os CETAS, é recomendada quarentena, exames de triagem e isolamento ou, preferencialmente, eutanásia dos animais positivos para prevenir a transmissão para animais saudáveis, destinados à soltura, evitando a disseminação para o ambiente natural (MELO FILHO, 2019).

3.5.10. Conservação

PBFD é uma preocupação mundial para a conservação de espécies psitacíformes, devido ao seu potencial de rápida evolução que pode levar a morte de espécies vulneráveis (FOGELL; MARTIN; GROOMBRIDGE, 2016), incluindo as espécies em risco de extinção, diminuindo as taxas de sobrevivência de indivíduos entre as populações em cativeiro ou selvagens (ORTIZ-CATEDRAL et al., 2010). Foi observado que, mesmo não sendo todas consideradas ameaçadas de extinção, 60% das espécies de psitacídeos afetadas por PBFD estão em declínio populacional (FOGELL; MARTIN; GROOMBRIDGE, 2016).

No Brasil, por conter a maior diversidade de fauna psitacíforme, a presença do vírus é bastante preocupante, tendo em vista que este se disseminou em espécies que nunca haviam entrado em contato com essa doença. Há uma constante preocupação com disseminação deste agente em animais de vida livre, considerando que o vírus já foi identificado em diversas espécies de psitacídeos nativos em CETAS do país, inclusive em *A. aestiva* (papagaio-verdadeiro) (ARAUJO, 2011; ARAUJO et al., 2015; MELO FILHO, 2019).

É extremamente importante estabelecer programas de rastreamento que monitorem a incidência, documentem os genótipos e virulência de BFDV em aves selvagens e populações em cativeiro, principalmente para espécies endêmicas e ameaçadas. Essas ações permitiriam a identificação e implementação de programas de gestão destinados a conter a disseminação do BFDV, protegendo essas espécies (ORTIZ-CATEDRAL et al., 2010). Além disso, o comércio ilegal de psitacídeos silvestres aumenta o risco de disseminação do vírus, mesmo com a aplicação de medidas de controle rigorosas. Dessa forma, qualquer programa de conservação precisa ter além de rotina de realização de exames, um plano de gerenciamento de risco para lidar com infecção, minimizando a disseminação e prevenindo surtos fatais (JULIAN, 2012).

3.6. CLAMIDIOSE

3.6.1. Histórico

O primeiro artigo científico sobre infecção por clamídia aviária data de 1879, quando ocorreu um surto em humanos. Neste relato a doença humana foi associada a um surto em curso em

papagaios de estimação (SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015; KNITTLER; SACHSE, 2015). Em 1893 foi relatada a transmissão de um agente infeccioso de papagaios para humanos causando sintomas semelhantes aos de gripe, em Paris. Essa doença recebeu o nome de psitacose em referência às aves que transmitiam o agente (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995).

A investigação das clamídias começou de fato em 1907, quando pesquisadores encontraram microrganismos intracitoplasmáticos característicos, dentro de vacúolos em células de raspagem conjuntival de pacientes humanos com tracoma (doença infecciosa crônica de conjuntiva e córnea) (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995). Durante o inverno de 1929-1930 ocorreu, na Europa e Estados Unidos, uma pandemia de psitacose em humanos, com mais de 800 vítimas humanas e mortalidade acima de 20%, o que estimulou estudos para entender melhor esta enfermidade (VILELA, 2012). O agente causador foi isolado em humanos e aves e o surto foi atribuído à importação de papagaios infectados provenientes da América do Sul (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995; SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015; KNITTLER; SACHSE, 2015). Por volta de 1930, conseguiu-se reproduzir a transmissão em laboratório a partir de infiltrados de tecidos de papagaios infectados, que vieram a óbito, para papagaios sadios (KALETA; TADAY, 2003). Foi considerado que o agente descoberto possuía propriedades semelhantes a um vírus, devido ao fato de não ter crescido em culturas laboratoriais, ter passado em filtros à prova de bactérias, mas replicar-se em animais e embriões de galinhas. Dessa forma, o agente etiológico da “febre dos papagaios” foi classificado como sendo um agente viral (KALETA; TADAY, 2003).

À medida que as pesquisas evoluíam, foi sendo identificado o agente em diversas espécies de aves, inclusive em não psitacíformes, alterando o nome da afecção para ornitose (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995). Em 1965, foi obtida uma cultura de tecidos que possibilitou o isolamento de agentes causadores de tracoma. Essa técnica possibilitou descobrimentos relacionados à microbiologia, epizootiologia, sorologia, patogenia, terapia e controle, ficando claro que o agente era uma bactéria e não vírus (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995).

Durante os últimos anos houve reclassificações do gênero. Em 1999, foi proposta uma subdivisão do gênero *Chlamydia*: *Chlamydia* e *Chlamydophila*. Estudos posteriores evidenciaram, através de análises comparativas do genoma e de conjuntos de proteínas, que esses gêneros são biologicamente e ecologicamente semelhantes, retornando a classificação a um único gênero de *Chlamydia* (SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015).

3.6.2. Etiologia

A clamidiose é uma zoonose causada pela bactéria Gram-negativa e intracelular obrigatória denominada *Chlamydia psittaci*. Até meados da década de 60, as clamídias eram classificadas como vírus, porém, elas têm um ciclo de desenvolvimento único que difere da replicação viral (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995).

Antes do desenvolvimento das metodologias moleculares, utilizaram-se anticorpos monoclonais específicos em reações de imunofluorescência para classificar as cepas de *C. psittaci* em sorotipos, com base nas variações na proteína principal da sua membrana externa (MOMP) (LEAL, 2013; SACHSE et al., 2009). As estirpes foram classificadas em sorovares de A-F, cada um tendo algum grau de especificidade com o hospedeiro (SACHSE et al., 2009). Posteriormente, foi demonstrado que esses sorotipos equivaliam aos genótipos do gene ompA, codificador desta principal proteína de membrana externa (MOMP). Essa descoberta substituiu a classificação de sorotipagem pela genotipagem, no final da década de 90 (KNITTLER; SACHSE, 2015; SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015; SACHSE et al., 2009, VILELA, 2012).

Inicialmente, foram descritos nove genótipos: A, B, C, D, E, F, E/B, M56 e WC. Posteriormente, oito novos genótipos foram propostos: 1V, 6N, Mat116, R54, YP84, CPX0308, I e J. Presume-se que cada genótipo possui forte preferência pelo hospedeiro, porém todos possuem potencial zoonótico (ORIGLIA et al., 2019). Os genótipos clássicos A - F são conhecidos por infectarem aves: A em psitacídeos, B em columbiformes, C em anseriformes e galiformes, D em galiformes, F em psitacídeos e galiformes (ORIGLIA et al., 2019). O genótipo E/B infectam patos, perus e pombos (SACHSE et al., 2009). O genótipo WC afeta bovinos, enquanto o M16, roedores. Os outros oito genótipos recentemente propostos (1V, 6N, Mat116, R54, YP84, CPX0308, I e J) são encontrados em psitacídeos selvagens (KNITTLER; SACHSE, 2015; SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015; ORIGLIA et al., 2019). O genótipo A, além de ser o mais frequente nos estudos em aves (VILELA, 2012), é considerado o mais virulento para espécies de psitacídeos e, também para os seres humanos (CARLOS; LUYO, 2018).

Acreditava-se que a *C. psittaci* era o único agente causador da doença, porém foram descobertas duas novas espécies de clamídia, a *C. avium* e *C. gallinacea* (SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015; VASCONCELOS et al., 2016). Essas cepas atípicas foram identificadas em aves, pombos, íbis e psitacídeos. É provável que *C. avium* e *C. gallinacea* não sejam as últimas espécies de clamídia a serem descobertas em aves e, sugere-se a revisão da epidemiologia e etiopatogenia da doença (SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015).

3.6.3. Patogenia

A *C. psittaci* é uma bactéria intracelular obrigatória que possui ciclo de desenvolvimento bifásico (LEAL, 2013). O ciclo tem início quando o Corpo Elementar (CE) se adere à superfície da célula hospedeira e a penetra por endocitose. O CE é inativo metabolicamente e é a forma extracelular infectante da bactéria. Após 9 a 12 horas o CE diferencia-se em Corpo Reticulado (CR), forma intracelular metabolicamente ativa e não infeccioso. O CR divide-se dentro da célula do hospedeiro por fissão binária dando origem às típicas inclusões citoplasmáticas. Estes corpúsculos de inclusão são mitocôndrias contendo de 100 a 500 microrganismos por célula. De 30 a 84 horas pós-infecção, dependendo da espécie, os CRs diferenciam-se em CEs, sendo eliminados do interior desta célula por sua destruição ou exocitose para iniciar um novo ciclo (LEAL, 2013; HOGAN et al., 2004; SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015). O CE é pequeno e denso, é esférico e tem aproximadamente 0,2 a 0,3 µm de diâmetro. O CR também é esférico, porém é maior, medindo

cerca de 0,6 a 0,8 μm de diâmetro (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995; LEAL, 2013).

Durante o ciclo de desenvolvimento e, associado a condições desfavoráveis de sobrevivência fora da célula, os CRs não se diferenciam em CEs e dão origem aos Corpos Persistentes (CP). Essas formas são associadas às infecções crônicas e, após algum evento que desencadeie uma queda de imunidade do hospedeiro, as CPs podem se transformar em CRs, reiniciando o ciclo (VILELA, 2012).

Embora o mecanismo que permite entrar e sair desta fase persistente não seja inteiramente compreendido, essa característica permite que a doença seja recorrente e que os tratamentos nem sempre sejam eficazes (HOGAN et al., 2004).

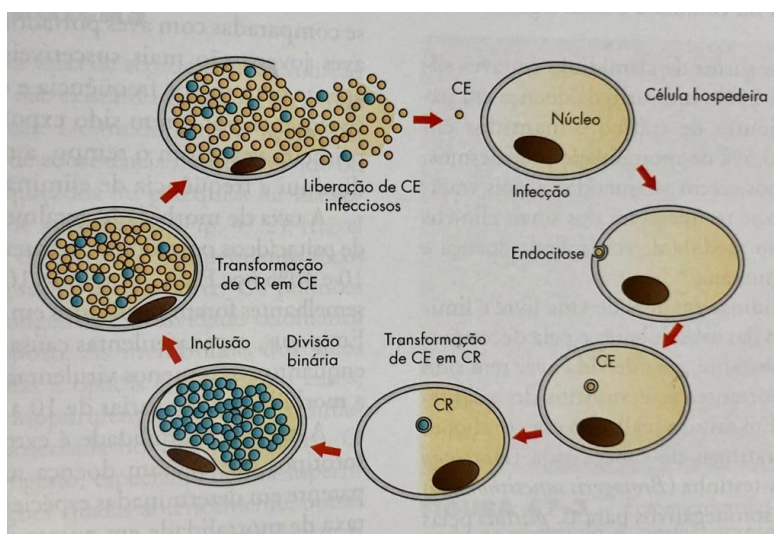


Figura 4 – Ciclo de desenvolvimento da *Chlamydia psittaci* nas células do hospedeiro. CE: corpúsculos elementares; CR: corpúsculos reticulados. (RASO, 2007).

A capacidade de *C. psittaci* causar infecção sistêmica é relacionada à sua característica de entrar em praticamente qualquer tipo de célula, como células epiteliais, fibroblastos, macrófagos e células dendríticas (SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015; KNITTLER; SACHSE, 2015). As inclusões intracitoplasmáticas de clamídia são comumente encontradas no epitélio faríngeo, respiratório e cloacal e, em células epiteliais serosas, do fígado e do baço (KALETA; TADAY, 2003). Conforme relatado por BILLINGTON (2005), as clamídias são capazes de permanecer nos macrófagos infectados por um longo período, podendo chegar a 10 anos (BILLINGTON, 2005). Em um estudo com inoculação em perus, foi evidenciado que as clamídias estavam presentes nos pulmões, sacos aéreos e saco pericárdico, 4 horas após a inoculação. Dentro de 48 horas, as clamídias estavam presentes no sangue, baço, fígado e rim. Às 72 horas, também foram encontradas na medula óssea, testículos, ovários e tecido muscular. Além disso, foram encontradas em grande número nas portas de saída, como cornetos nasais e cloaca (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995).

Períodos de estresse favorecem a replicação bacteriana, a sua eliminação de forma intermitente nas secreções orofaríngeas e cloacais (LEAL, 2015) e o desenvolvimento de sinais clínicos

(LEAL, 2013). O estresse está constantemente associado a erros no manejo, superlotação, movimentação de animais, manipulação, nutrição, reprodução ou alguma outra doença concomitante (BILLINGTON, 2005).

Pouco se sabe sobre a imunidade protetora contra a infecção por clamídia em aves (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995). Geralmente a resposta humoral é fraca (SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015) e não é gerada resposta imune duradoura (KALETA; TADAY, 2003), permitindo reinfecções recorrentes pelo mesmo genótipo ou genótipo diferente (LEAL, 2013).

3.6.4. Distribuição e ocorrência

A clamidiose é diagnosticada em animais e humanos em todo mundo (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995), sendo considerada endêmica na maioria dos países onde foi estudada (VILELA, 2012). O primeiro relato da afecção é de 1879, em um surto em humanos (SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015; KNITTLER; SACHSE, 2015). O agente já foi relatado em diversos países, como Estados Unidos, Holanda, Alemanha, Bélgica, Austrália, Turquia, Peru, Filipinas, Colômbia e Brasil (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995; CARLOS; LUYO, 2018; LEAL, 2013).

É relatada a ocorrência de *C. psittaci* em um grande número de animais domésticos e silvestres, porém seus principais hospedeiros são aves silvestres e domésticas (LEAL, 2013). KALETA e TADAY (2003) listam 469 espécies de aves silvestres e domésticas que são acometidas pela bactéria, sendo a ordem dos Psittaciformes a que contém a maior parte das espécies positivas (45%).

No Brasil há relatos de ocorrência de *C. psittaci* em psitacídeos silvestres de cativeiro, provenientes de criadouros e de tráfico, bem como em vida livre (RASO et al., 2002; RASO et al., 2004; RASO et al., 2006; LEAL, 2013; ECCO et al., 2009; VILELA, 2012; VASCONCELOS et al., 2016). Diversos estudos e relatos de caso demonstram a presença da bactéria em CETAS no país (RASO et al., 2004; ECCO et al., 2009; VILELA, 2012; VASCONCELOS et al., 2016). RASO et al. (2004) relataram um surto, em um Centro de Reabilitação de São Paulo, em filhotes de papagaios provenientes de tráfico com 96,5% de mortalidade. No CETAS de Belo Horizonte, foi evidenciado em 2009 um surto de clamidiose em papagaios com 64% de mortalidade, sendo a afecção diagnosticada após a necropsia dos animais (ECCO et al., 2009). VILELA (2012) evidenciou também no CETAS de Belo Horizonte, 152 *A. aestiva* (papagaio-verdadeiro) positivos para *C. psittaci* em 212 necropsias realizadas, o que corresponde a 72% de prevalência, sendo as estirpes caracterizadas filogeneticamente em genótipo A (VILELA et al., 2019). VASCONCELOS et al. (2016) evidenciaram 50% de positividade em swab de cloaca em *Ara ararauna* mantidos no CETAS de Juiz de Fora. Além desses trabalhos, a bactéria foi descrita em filhotes de papagaios (*A. aestiva*) e araras (*Anodorhynchus hyacinthinus*) de vida livre no Pantanal (MS/Brasil). A avaliação sanitária de Cathartiformes (n=14), Falconiformes (n=82) e Strigiformes (n=84) de vida livre resgatados e entregues no CETAS revelou ausência de infecção por *C. psittaci* em aves raptoras em Belo Horizonte (ANDERY et al., 2013).

3.6.5. Transmissão

A infecção por *C. psittaci* ocorre principalmente por via aerógena, mas também pode ocorrer por ingestão ou contato com a conjuntiva de material contaminado. Os corpos elementares infecciosos são eliminados nas fezes, urina, pó de penas, descargas nasais, excreções orais e salivares na forma de aerossóis (CARLOS; LUYO, 2018; LEAL, 2013; BILLINGTON, 2005; VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995; SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015). É relatada a transmissão de *C. psittaci* por ectoparasitas sugadores de sangue (piolhos, ácaros, moscas, etc.), porém esses agentes parecem agir como um vetor mecânico e não como um vetor biológico (LEAL, 2013; VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995).

Os filhotes podem ser infectados ainda no ninho, seja por regurgitação dos pais, contato com fezes e aerossóis ou pelos ectoparasitas. Os filhotes que sobreviverem poderão se tornar portadores, podendo eliminar o agente ao longo de sua vida (LEAL, 2013; BILLINGTON, 2005; SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015).

A transmissão vertical também deve ser considerada e, já foi demonstrada em perus, galinhas, patos, gansos, periquitos e gaivotas (LEAL, 2013; BILLINGTON, 2005; SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015).

O período de excreção da bactéria pode variar conforme o genótipo e virulência, carga infectante e estado imune do hospedeiro (LEAL, 2013). Em um estudo de infecção experimental evidenciou-se o agente, nas portas de saída (cloaca e cornetos nasais), 72 horas após a infecção (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995). A eliminação, geralmente, é de caráter intermitente e se correlaciona as situações de estresse às quais o animal está submetido (LEAL, 2013).

C. psittaci pode permanecer viável e infecciosa por até um mês, principalmente se estiver protegida por matéria fecal, podendo ser transmitida por fômites, alimentos ou água contaminados. Porém, uma vez removida a matéria orgânica, a bactéria é facilmente morta por agentes desinfetantes (BILLINGTON, 2005; LEAL, 2013).

Os humanos, geralmente, são infectados por meio da inalação de poeira contaminada, penas ou secreções e excreções, em forma de aerossóis. O contato direto com aves infectadas, incluindo contato boca-a-bico e bicadas, também pode transmitir a bactéria (LEAL, 2013; SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015). Além disso, atividades como jardinagem e corte de grama já foram associados a casos de psitacose humana. Acreditava-se que a transmissão entre humanos seria improvável de acontecer, porém um caso foi descrito na Suécia, evidenciando que apesar de rara, pode ocorrer (SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015).

A possibilidade de infecção de seres humanos deve-se principalmente à posse de psitacídeos como animais de estimação ou contato por atividades ocupacionais, sendo a psitacose mais comumente relatada em proprietários, criadores, veterinários, trabalhadores de pet shops e de zoológicos (TELFER et al., 2005; CARLOS; LUYO, 2018; KALETA; TADAY, 2003).

3.6.6. Sinais clínicos

O curso e gravidade da doença dependem das propriedades de virulência da bactéria, estado imunológico da ave, via de transmissão, dose infectante, grau de estresse e fatores ambientais (SACHSE et al., 2009; RASO et al., 2006). O genótipo A é considerado o mais virulento de *C. psittaci* tanto para aves, quanto para humanos (LEAL, 2013; CARLOS; LUYO, 2018).

A clamidiose pode seguir cursos diferentes nas aves infectadas. Pode se apresentar grave na fase aguda, subclínica ou inaparente, e crônica (SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015). Geralmente, a infecção é persistente e assintomática, porém, quando submetidos a fatores estressantes, a manifestação dos sinais clínicos pode se intensificar (LEAL, 2013).

Os sinais clínicos geralmente são inespecíficos e incluem sintomatologia respiratória (rinite, sinusite, tosse e dispneia), conjuntivite, blefarite, coriza, secreção mucopurulenta nasal e ocular, fezes esverdeadas a acinzentadas. Sintomas como apatia, cansaço, morte súbita, nanismo, anorexia e caquexia também ocorrem e, indicam uma infecção crônica (LEAL, 2013; SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015; SACHSE et al., 2009).

Os sinais típicos de uma infecção clinicamente aparente por *C. psittaci* virulenta são: pneumonia com sinais respiratórios, secreção nasal mucopurulenta, diarreia, poliúria. As fezes podem estar amareladas sugerindo alta concentração de pigmentos biliares, o animal pode apresentar conjuntivite uni ou bilateral, ceratoconjuntivite e, em quadros completos pode-se observar distúrbios do sistema nervoso central (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995).

A forma inaparente é bastante comum em pombos, que atuam como dispersores da bactéria pelas fezes, secreções respiratórias e conjuntivais. Nesses animais os sinais clínicos ocorrem em infecções simultâneas com outros patógenos, sendo mais comum sintomatologia referente ao trato gastrointestinal e sistema respiratório (VILELA, 2012).

A infecção latente é mais frequente que casos agudos e surtos e, esses animais representam importante reservatório. (SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015).

As taxas de morbidade e mortalidade podem ser muito altas, especialmente em filhotes e aves jovens, durante o início da maturidade sexual, estação reprodutiva e durante a criação de filhotes, devido aos fatores estressantes presentes naturalmente nessas situações (SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015; KALETA; TADAY, 2003). Situações de estresse, ligadas ao manejo como deficiências nutricionais, transporte prolongado, superlotação, ambiente abafado, manuseio e alto fluxo de entrada e saída de indivíduos também desempenham papel fundamental no curso da doença (LEAL, 2013; VASCONCELOS et al., 2016, VILELA, 2012).

3.6.7. Alterações anatomopatológicas

Os achados de necropsia e histológicos não são característicos o suficiente para diferenciar as infecções por *C. psittaci* de outras doenças sistêmicas. A gravidade das lesões depende de vários fatores como patogenicidade do genótipo, susceptibilidade do hospedeiro, via de exposição, dose infectante e presença de doenças concomitantes (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995; VILELA, 2012).

As lesões macroscópicas podem variar bastante. Aerossaculite fibrinosa, hepatomegalia, pericardite, broncopneumonia, nefrose, enterite são alterações comumente observadas (BILLINGTON, 2005). Baço aumentado, com consistência macia, é geralmente um achado comum, podendo conter focos necróticos ou hemorragias petequiais em sua superfície. O fígado pode apresentar-se friável, com aumento de volume e bordas arredondadas (hepatomegalia), de coloração amarelada ou esverdeada, e pequenos focos necróticos podem estar presentes na superfície capsular, aprofundando-se ao corte (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995; VILELA, 2012; LEAL, 2013). Há inflamação com predomínio de linfócitos tanto nas superfícies respiratórias, como nos espaços intersticiais, ocasionando edema, espessamento, necrose e algumas vezes hemorragia (LEAL, 2013). As membranas dos sacos aéreos podem estar espessadas, turvas e, às vezes, cobertas com conteúdo fibrinopurulento espesso (exsudato). Os pulmões geralmente estão congestionados, o coração pode estar aumentado, o pericárdico pode apresentar reação inflamatória intensa, podendo estar coberto por conteúdo purulento, seroso ou fibroso. Nos intestinos pode-se observar espessamento da parede e hiperemia das serosas. Os rins podem estar congestionados e aumentados de tamanho (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995; VILELA, 2012; LEAL, 2013). Apesar dos vários órgãos que podem estar acometidos, na maioria dos casos, as lesões nos psitacideos estão mais confinadas ao fígado, baço e sacos aéreos (VILELA, 2012).

As evidências histopatológicas também são inespecíficas, porém a visualização dos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos característicos é um achado patognomônico da infecção (VILELA, 2012; LELA, 2013). O baço pode apresentar estrutura alterada associada à hiperplasia das células retículo-endoteliais. Hiperplasia linfoide, plasmocitose e áreas de necrose podem estar presentes. No fígado é comumente observado infiltrado de linfócitos, heterófilos e macrófagos. Infecções agudas, geralmente, apresentam necrose multifocal e coagulativa, e infecções crônicas mostram hiperplasia do ducto biliar e infiltrado de linfócitos (VILELA, 2012; VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995). Esse infiltrado pode levar a compressão e necrose dos ductos biliares, causando impregnação hepática pela bile (VILELA, 2012). As lesões nos sacos aéreos são resultantes de infiltração de células mononucleares, especialmente de macrófagos, e de heterófilos. Os intestinos geralmente apresentam uma enterite linfocítica e plasmocítica, associada clinicamente à presença dos glóbulos brancos nas fezes. Necrose e inflamação com infiltrados mistos podem estar presentes nos rins, podendo também estar presente na adrenal e gônadas. Lesões cerebrais são raras (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995). As inclusões intracitoplasmáticas basofílicas (CE e CR) podem estar presentes principalmente nos macrófagos e hepatócitos na periferia dos focos de necrose, podendo também ser detectados no intestino e pâncreas sem alterações associadas (VILELA, 2012).

Em trabalho realizado em 2009 por ECCO et al., as alterações mais frequentes foram hepatomegalia com focos necróticos nos hepatócitos, esplenomegalia e aerossaculite fibrinopurulenta (ECCO et al., 2009; LEAL, 2013).

VILELA (2012) evidenciou em seu estudo que a lesão mais frequente foi espessamento dos sacos aéreos com deposição de exsudato fibrinoso (aerossaculite), seguido por hepatomegalia associada a focos de necrose distribuídos pelo parênquima, esplenomegalia associada à consistência flácida do órgão.

3.6.8. Diagnóstico

O diagnóstico clínico de clamidiose aviária é bastante difícil devido à inespecificidade dos sinais clínicos (VILELA, 2012). O método considerado como padrão ouro para o diagnóstico de *C. psittaci* em aves infectadas é aquele que identifica a presença do agente nos órgãos, amostras fecais ou swabs (LEAL, 2013; VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995; BILLINGTON, 2005). Como as clamídias são eliminadas de forma intermitente nas fezes, um único resultado negativo não é confiável (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995).

Os principais métodos de diagnóstico são: identificação direta do agente em amostras submetidas a colorações específicas, isolamento da bactéria, testes sorológicos, e detecção de parte do material genético da bactéria (VILELA, 2012).

A detecção do agente pode ocorrer em esfregaços de fezes, material cloacal e de orofaringe, e secreções oculares e nasais. Também podem ser identificados em impressões em lâminas ou corte histológico de tecidos infectados como fígado, baço, rim, pulmão e pericárdio corados com corantes hematoxilina-eosina, Ziehl-Neelsen, Gimenez modificado, Machiavello e Stamp (VILELA, 2012; LEAL, 2013; VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995). Apesar destas técnicas apresentarem custo reduzido, serem rápidas e fáceis de serem realizadas, necessitam de pessoa treinada para sua confiabilidade (VILELA, 2012).

O isolamento é o exame clássico para diagnóstico de clamidiose e, requer inoculação em ovos embrionados e ou cultura de células. Após crescimento bacteriano, a identificação de *C. psittaci* pode ser realizada por imunofluorescência direta ou indireta, outras colorações histoquímicas, imuno-histoquímicas ou técnicas moleculares (VILELA, 2012; LEAL, 2013). O método preferido para demonstrar inclusões do agente é a imunofluorescência direta, no qual um anti-soro conjugado com fluoresceína para Chlamydiaceae é aplicado às células infectadas, corando as inclusões com fluorescência de cor verde (LEAL, 2013). O isolamento encontra-se em desuso devido ao custo elevado, baixa reprodutibilidade, sensibilidade dependente da estirpe bacteriana cultivada (VILELA, 2012).

Para o diagnóstico sorológico podem ser empregadas as técnicas de imunofluorescência indireta, ensaios imunoenzimáticos (ELISA), aglutinação em látex, aglutinação de corpos elementares e reação de fixação do complemento (LEAL, 2013; VILELA, 2012). É sabido que os anticorpos podem persistir por semana ou meses e, que os resultados sorológicos não indicam necessariamente uma infecção ativa, portanto a detecção de anticorpos deve ser utilizada em conjunto com outra técnica para detecção do antígeno (VILELA, 2012; LEAL, 2013; BILLINGTON, 2005; VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995). A detecção de anticorpos anti-clamídia é mais adequado para estudos epidemiológicos do que para o diagnóstico da afecção (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995; VILELA, 2012).

As técnicas baseadas na reação em cadeia pela polimerase (PCR) e suas variações substituíram o isolamento (VILELA, 2012). A técnica, que consiste na amplificação de um fragmento de DNA de determinado microrganismo, apresenta alta sensibilidade e especificidade, é rápida e reduz o risco de infecção para a equipe laboratorial (LEAL, 2013; VILELA, 2012). A sensibilidade e a especificidade da PCR variam de acordo com a preparação da amostra e com a padronização do seu protocolo. Apesar de serem utilizadas sequências do RNA ribossômico e

do gene *ompA* como iniciadores, o gene *ompA* possibilita menos reações cruzadas, sendo mais específico (VILELA, 2012). A PCR possui ainda a vantagem de não ser invasiva, podendo ser utilizadas fezes e swabs como amostras. Neste ponto, deve-se atentar para a eliminação intermitente do agente, sendo sugeridas coletas seriadas (VILELA, 2012; BILLINGTON, 2005).

3.6.9. Tratamento, prevenção e controle

A clamidiose possui características que dificultam a eficácia das medidas de prevenção e controle. A grande variedade de hospedeiros, as infecções persistentes, os portadores inaparentes, ocorrência cosmopolita e sobrevivência por longos períodos em locais com matéria orgânica, são alguns desses fatores dificultadores (LEAL, 2013). As medidas de prevenção e controle baseiam-se em manejo adequado e práticas de biossegurança, visando à diminuição da entrada de animais infectados no plantel e a redução da disseminação do agente. As medidas incluem manejo nutricional e sanitário adequados, quarentena, realização de exames em animais recém-chegados, densidade populacional adequada, exames laboratoriais de rotina, destino correto de carcaças e resíduos contaminados, limpeza e desinfecção do ambiente, além de realização de vazio sanitário. Além dessas medidas, é imprescindível que as pessoas que trabalham ou convivam com as espécies potencialmente acometidas sejam informadas sobre o risco e utilizem equipamentos de proteção individual (LEAL, 2013; RASO et al., 2014; VILELA, 2012).

Existem estudos experimentais com objetivo de desenvolvimento de vacina, porém, foi demonstrado que, apesar de ter ocorrido uma redução dos sinais clínicos, a vacina testada não foi eficiente em diminuir a replicação e excreção do agente (LEAL, 2013; VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995; SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015)

As clamídias são sensíveis a vários antibióticos. As tetraciclina são grupo de escolha para o tratamento (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995; VILELA, 2012; LEAL, 2013; BILLINGTON, 2005; SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015), porém também são descritos tratamentos com enrofloxacin e azitromicina (LEAL, 2013). Esses antibióticos atuam inibindo as enzimas necessárias para a replicação bacteriana, portanto só agem quando a bactéria está na forma metabolicamente ativa (CR). É necessário que o sistema imunológico da ave atue sobre a forma metabolicamente inativa (CE), implicando em antibioticoterapia continuada e terapia de suporte, para que o sistema imune do animal tenha condições e tempo para atuar. (LEAL, 2013; BILLINGTON, 2005).

Para os psitacídeos, a doxiciclina (tetraciclina de escolha), pode ser administrada no alimento (300mg/kg de ração), por via oral direta (25-50mg/kg a cada 24 horas), na água (400mg/litro) e por via intramuscular (75 a 100mg/kg a cada 5-7 dias) durante 45 dias (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995; VILELA, 2012; LEAL, 2013). Apesar de relatada, administração em água não é recomendável, pois as aves podem evitar seu consumo, não ingerindo a quantidade necessária do medicamento (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995).

Durante o tratamento é imprescindível que seja realizada limpeza e desinfecção do ambiente, para impedir a reinfecção. Produtos desinfetantes com quaternário de amônio são suficientes

para eliminar o agente, desde que este não esteja protegido por matéria orgânica (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995; LEAL, 2013).

Apesar da susceptibilidade a antibióticos, existem evidências que algumas espécies e indivíduos não podem ser curados, mantendo-se persistentes mesmo após a terapia (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995). De fato, a alta incidência da clamídia e a imunidade transitória observada após infecção, faz com que haja dificuldade em diferenciar uma infecção persistente de uma reinfecção (HOGAN et al., 2004).

3.6.10. Saúde pública

C. psittaci tem potencial zoonótico e pode produzir doença crítica em humanos se não for diagnosticada a tempo (CARLOS; LUYO, 2018). O primeiro relato de psitacose é de 1879 e após isso vários casos em humanos foram descritos, inclusive em forma de surtos (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995; KALETA; TADAY, 2003; SACHSE; LAROUCAU; VANROMPAY, 2015; KNITTLER; SACHSE, 2015). A psitacose representa uma das principais zoonoses de origem aviária e está associada ao risco ocupacional de pessoas envolvidas em abate, criação, comércio, zoológicos, com o processo de tráfico de animais e sua apreensão. Além disso, são um risco para pessoas que praticam o hábito de manter psitacídeos em ambiente doméstico (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995; LEAL, 2013; CARLOS; LUYO, 2018; VILELA, 2012).

A infecção em humanos pode variar de inaparente a sistêmica e, em alguns casos pode apresentar quadro clínico severo, com pneumonia intersticial (LEAL, 2013; HARKINEZHAD et al., 2009). A doença é raramente fatal quando tratada adequadamente (HARKINEZHAD et al., 2009), mas quando não tratada, pode progredir para sintomatologia severa e óbito (KNITTLER; SACHSE, 2015).

Os sintomas comuns incluem febre abrupta, calafrios, dor de cabeça, mal-estar, mialgia, tosse improdutiva e dispneia (KNITTLER; SACHSE, 2015). O envolvimento pulmonar é comum (HARKINEZHAD et al., 2009) e, pode haver diarreia no início do curso da doença, com náusea e vômito (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995). Em quadros mais graves ocorrem complicações como: pericardite, endocardite ou miocardite, hepatomegalia, esplenomegalia (KNITTLER; SACHSE, 2015) e, ocasionalmente, acometimento cerebral (KALETA; TADAY, 2003).

A incidência da psitacose é provavelmente subestimada. Suspeita-se que muitas vezes a afecção pode estar sendo confundida com uma virose sazonal, pela semelhança dos sintomas, ou por se apresentarem de forma assintomáticas (HARKINEZHAD et al., 2009; LEAL, 2013). Sua notificação é obrigatória na Austrália, Estados Unidos, e em grande parte dos países da Europa (HARKINEZHAD et al., 2009; LEAL, 2013; VILELA, 2012). Vários países adotam medidas de controle para ingresso de aves importadas, como quarentena por pelo menos 45 dias no país de origem, seguidos de 30 dias de quarentena no país importador (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995).

Estudos evidenciam a presença de anticorpos anti-*C. psittaci* com prevalência significativa em trabalhadores e visitantes de zoológicos (RASO, ET AL. 2010; MONSALVE; MIRANDA;

MATTAR, 2011; MATSUI et al. 2008; LEAL, 2013) , e em pessoas que tiveram contato não ocupacional com animais infectados (CADARIO et al., 2017; RASO et al., 2014; HARKINEZHAD et al., 2009).

Apesar da importância de *C. psittaci* como agente zoonótico, poucas pessoas tem conhecimento da doença, inclusive profissionais da área médica humana (observação pessoal), sendo necessário maior disseminação de informação para pessoas que possuem essas aves em cativeiro, profissionais com contato ocupacional com aves, e para os profissionais ligados a saúde humana (LEAL, 2013; HARKINEZHAD et al., 2009; BILLINGTON, 2005).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. LOCAL DE EXECUÇÃO

As necropsias foram realizadas no CETAS/BH - IBAMA e Laboratório de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – EV/UFMG.

No laboratório de biologia molecular pertencente ao CETAS/BH foi realizado a extração de DNA de 84 das 114 amostras. A extração do restante das amostras (total de 30 amostras) e as demais análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - EV/UFMG.

4.2. ANIMAIS E NECROPSIAS

Todos os animais foram recebidos pelo CETAS/BH e são provenientes de duas grandes apreensões de filhotes de psitacídeos em condições de tráfico de animais silvestres.

O primeiro recebimento, ocorrido no dia 19 de setembro de 2018, foi referente a uma apreensão em Espinosa/MG, na qual 187 animais estavam sendo transportados dentro do porta-malas de um veículo. Desses animais, 100 foram encaminhados ao CETAS/BH, sendo 98 indivíduos da espécie *A. aestiva*. O segundo recebimento, ocorrido no dia 11 de novembro de 2018, foi referente a uma apreensão em Belo Horizonte/MG na qual 524 animais estavam em uma residência, sendo 232 indivíduos da espécie *A. aestiva*. Em ambas situações as aves eram filhotes, estavam em condições precárias de bem estar, nutricional e em desidratação. A idade estimada dos animais recebidos variou de 04 a 40 dias de vida.



Figura 5 – Filhotes de psitacídeos recebidos no dia 19/09/2018.
Foto: (Acervo CETAS BH, 2018).



Figura 6 – Filhotes de papagaios-verdadeiros recebidos no dia 07/11/2018.
Foto: (Acervo CETAS BH, 2019).

Ao longo do processo de triagem, alguns desses filhotes vieram a óbito, sem sintomatologia específica. A sintomatologia apresentada incluía prostração, estase de papo, dificuldade respiratória em alguns casos ou morte súbita.

As carcaças dos animais em óbito foram acondicionadas em freezer a -20°C até a realização da necropsia.

As necropsias foram realizadas entre 25 de setembro de 2018 e 25 de junho de 2019, sendo que foram priorizados os animais que vieram a óbito no mês subsequente a sua chegada. Após este primeiro mês, os animais foram selecionados de forma aleatória, em relação a sua data de óbito, sendo a última necropsia de um animal com óbito registrado na data de 30 de abril de 2019.

As necropsias foram realizadas conforme descrito por VILELA (2012) e CABANA (2008). Nos filhotes que já possuíam penas, os indivíduos foram molhados em solução contendo detergente neutro e água, para facilitar a retirada das penas e reduzir sua dispersão, bem como a dispersão de pó de penas e patógenos. Com a superfície corporal exposta, foi realizada a determinação da condição corporal de cada ave através da avaliação de sua musculatura corporal.

Foi realizada uma incisão e divulsão da pele ao longo do esterno, para permitir a visualização e avaliação da musculatura peitoral. Foi realizada uma incisão na cavidade celomática, a partir do esterno até a região inguinal e, procedeu-se um corte longitudinal nas costelas, bilateralmente, para permitir a retirada do osso esternal, possibilitando o acesso à cavidade celomática. Todos os tecidos foram avaliados em relação à posição anatômica, tamanho e coloração previamente à manipulação. Foi retirado, com instrumentos esterilizados, aproximadamente 1 cm³ do fígado para realização de técnicas moleculares (PCR). Este material foi acondicionado em microtubo estéril e conservado sob congelamento a -20°C .

Foram retirados da cavidade celomática, de forma unificada, o proventrículo, o ventrículo, os intestinos, o pâncreas, o baço, o fígado e o coração, para permitir a visualização dos pulmões, rins e gônadas. Os pulmões foram retirados da carcaça e, seguiu-se com a avaliação individual de cada órgão. Foram avaliados tamanho, forma, consistência, coloração e textura, sendo todas as alterações registradas. Os órgãos ociosos foram abertos e seu interior, bem como conteúdo, foram avaliados. Foram coletadas amostras do fígado, baço, pulmões e intestinos de cada animal necropsiado e, acondicionado em formol 10% para confecção de lâminas histopatológicas.

4.3. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA total do tecido hepático foi realizada pelo método de extração por sílica seguindo protocolos descritos previamente (BOOM et al., 1990; VOGESTEIN e GILLESPIE, 1979), modificados por CAXITO et al. (2006) e adaptado por VILELA (2012).

O volume de aproximadamente 200 μL de amostra de fígado foi macerado com aproximadamente 600 μL (1:3) de iodeto de sódio (NaI) a 6M, sob aquecimento a 55° C e forte homogeneização em vórtex a cada 5 minutos, durante 15 minutos. Posteriormente, esse material foi submetido à centrifugação por 2,15 minutos a 3500 rpm e, a parte líquida foi coletada com pipeta ajustável calibrada e colocada em um novo tubo. Foram acrescentados 40 μL de suspensão de sílica ao material, seguida de homogeneização com o auxílio de um vórtex. A mistura foi incubada em agitador por 15 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se com homogeneização e centrifugação por 1,15 minutos a 13500rpm, sendo o sobrenadante descartado por inversão do tubo. O sedimento (DNA total ligado à sílica) foi lavado duas vezes com 1000 μL de tampão de lavagem (Etanol 60%, 50mM Tris-HCl pH8,0, 10mM EDTA pH 8,0) e centrifugado a 13500 rpm por 45 segundos. Todo o tampão de lavagem foi descartado, adicionou-se 1000 μL de acetona seguindo de homogeneização (vórtex) e centrifugação a 13500 rpm por 1,15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o resíduo de acetona evaporado do sedimento em tubo com tampa aberta, mantido a 55°C por 10 a 30 minutos. O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 80 μL de TE (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA pH 8,0), levemente homogeneizado e incubado a 55°C por 15 minutos. Procedeu-se a centrifugação a 13500 rpm por 2,15 minutos e o sobrenadante foi removido cuidadosamente com pipeta, tendo-se o cuidado de não misturar a sílica novamente. O material contendo o DNA total foi acondicionado em microtubos e estocado em freezer a -20°C.

4.4. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA CONCENTRAÇÃO DE DNA TOTAL

O DNA foi quantificado por densidade óptica em espectrofotômetro NanoVue® (GE Healthcare, USA). Este aparelho estima a quantidade de DNA na amostra em ng/ μL ou $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e, determina a qualidade do material correlacionando à quantidade de DNA e proteínas presentes na amostra. Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm, enquanto as proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. A relação entre a leitura do comprimento de onda da proteína e ácido nucleico (DO260nm/DO280nm) fornece um

parâmetro para avaliação da pureza dos ácidos nucleicos da amostra, indicando se a extração foi bem sucedida.

A quantidade de DNA ideal, considerando que foi realizada uma extração de tecido, é entre 100 ng e 200 ng, sendo toleráveis pequenas variações. Para quantificação foram utilizados 2µL da amostra extraída e, as amostras que apresentaram quantidade de DNA inferior a 80ng/ml foram extraídas novamente.

4.5. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE – PCR

4.5.1. Adenovírus

Após a extração do DNA das amostras de fígado, procedeu-se a amplificação do DNA, seguindo o protocolo descrito por RAUE, et al. (2005), com modificações. Uma alíquota de 1µl, com aproximadamente 200ng/µl de DNA total de cada amostra, foi utilizada como molde em uma reação de amplificação contendo: 1µl de cada iniciador (primer frente e primer reverso a 10 pmol/µl), 0,2 mM de dNTPs phoneutria[®], 1U de Taq polimerase phoneutria[®] (polimerase de *Thermus aquaticus*), tampão 1X (GoTaq[®] com MgCl₂), 2 mM de MgCl₂ e água milliQ qsp, completando o volume final para 25 µl.

Os primers foram desenvolvidos a partir da sequência da região que codifica L1 da proteína hexon. O sentido do primer Hex L1-s (5-ATGGGAGCSACCTAYTTCGACAT-3) é localizado na região nt 301 ao nt 323 do hexon de FAdV-1 (*Aviadenovirus*). O primer reverso - Hex L1-as (5-AAATTGTCCKRAANCCGATGTA-3) corresponde a região que abrange o nt 890 ao nt 868. Os oligonucleotídeos iniciadores tem como produto uma sequência de 590 pb (RAUE, 2005) (Tabela1).

Para amplificação ocorreu um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, além de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de amostra de fígado de outro psitacédeo com diagnóstico para adenovírus confirmado pela técnica de PCR. Foi utilizado como controle negativo um controle branco contendo todos os reagentes, sem a inclusão de amostra de DNA e, com adição de 1µl de água.

4.5.2. Circovírus

Uma alíquota de 1µl, com aproximadamente 200ng/µl de DNA total de cada amostra, foi utilizada como molde em uma reação de amplificação contendo: 1µl de cada iniciador (primer frente e primer reverso a 10 pmol/µl), 0,2 mM de dNTPs phoneutria[®], 1U de Taq polimerase phoneutria[®] (polimerase de *Thermus aquaticus*), tampão 1X (GoTaq[®] com MgCl₂), 2 mM de MgCl₂ e água milliQ qsp, completando o volume final para 25 µl.

Os primers utilizados foram desenvolvidos de acordo com o posicionamento em open reading frame 1 (ORF-1) e tem como produto uma sequência de 717 pb. O primer 1 (5-AACCCTACAGACGGCGAG-3) corresponde a região que abrange a posição bp 182 a 199 e o primer 2 (5-GTCACAGTCCTCCTTGACC-3) a posição bp 879 a 898 (YPELAAR et al., 1999) (Tabela 1).

Para amplificação ocorreu um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de amostra de fígado de outro psitacídeo com diagnóstico para *Circovirus* confirmado. Foi utilizado como controle negativo um controle branco contendo todos os reagentes sem a inclusão de amostra de DNA e, com adição de 1ml de água.

4.5.3. Clamídia

Uma alíquota de 1 µl do DNA total de cada amostra foi utilizada como molde em uma reação de amplificação, contendo 1µl de cada iniciador (primer frente e primer reverso), 0,5 mM de dNTPs, 1U de Taq polimerase phoneutria® (polimerase de *Thermus aquaticus*), tampão 1X (200mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 2,5 mM de MgCl₂ e água milliQ qsp, completando o volume final para 20 µl.

Para amplificação do DNA foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (primers) para o gene *ompA* de *C. psittaci*, tendo como produto uma sequência de 418 pb. O primer 1 (5-ACTACGGAGATTATGTTTTTCGATCGTG-3) corresponde a região que abrange a posição pb 59195 a 59168 e o primer 2 (5-CGTGCACCTACGCTCCAAGA-3) a posição pb 58797 a 58778 (SACHSE et al., 2009) (Tabela 1).

Para amplificação ocorreu um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 45 minutos, além de uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de amostra de fígado de outro psitacídeo com diagnóstico para clamídia confirmado. Foi utilizado como controle negativo um controle branco contendo todos os reagentes sem a inclusão de amostra de DNA e, com adição de 1ml de água.

Tabela 1. Iniciadores usados neste estudo para detecção de parte do genoma de cada agente com finalidade de diagnóstico.

Agente	Gene amplificado	Sequência (5'>3')	Localização no genoma	Segmento	Autores
Adenovirus	Hex L1	ATGGGAGCSACCTAYTTCGACAT AAATTGTCCCKRAANCCGATGTA	301-323 890-868	590	RAUE et al., 2005
<i>Circovirus</i>	ORF-1	AACCCTACAGACGGCGAG GTCACAGTCCTCCTTGACC	182-199 879-898	717	YPELAAR et al., 1999
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>ompA</i>	ACTACGGAGATTATGTTTTTCGATCGTG CGTGCACCTACGCTCCAAGA	59195-59168 58797-58778	418	SACHSE et al., 2009

4.6. ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR

Para visualização dos produtos da PCR foi realizado eletroforese em gel de agarose. Foram utilizados 8µl do DNA amplificado, adicionado a 3 µl de tampão de amostra com azul de bromofenol e corante fluorescente de ácidos nucleicos (Gelred, Biotium, USA), e aplicado em gel de agarose a 1,5%. A eletroforese ocorreu a 120V em tampão TBE (Tris-borato-edta) 1X, por 25 minutos. O Ladder foi utilizado como marcador de tamanho molecular, tendo como padrão segmentos em intervalos de 100 pb. Os resultados foram visualizados com auxílio de transiluminador UV.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a correlação entre as alterações anatomopatológicas e o resultado positivo para adenovírus, no teste de PCR, foi realizado o teste Exato de Fisher. Este teste foi aplicado na análise das tabelas de contingência confeccionadas a partir do resultado do teste de PCR para adenovírus e das alterações macroscópicas observadas. Foi considerado nível de significância de 5%, havendo correlação estatística quando $p < 0,05$.

Para comparação dos resultados obtidos no teste de PCR para *Chlamydia psittaci* com resultados obtidos no trabalho de VILELA (2012), foi realizado o teste de proporção. Esse teste é um teste estatístico não paramétrico que permite a comparação de duas porcentagens diferentes. Nesta análise, um valor $P < 0,001$ é indicativo que há diferença significativa entre as proporções dos grupos avaliados. Se o valor de $P > 0,001$ é indicativo que não houve diferença significativa entre as amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ano de 2018 o CETAS/BH recebeu 609 indivíduos da espécie *A. aestiva* (IBAMA, 2018). Desses, 330 foram apreendidos em situação de tráfico (Tabela 2), 76 apreendidos em guarda doméstica ilegal, 21 recolhidos em situação de risco em área urbana ou rural e 182 entregues voluntariamente. Os animais recebidos em situação de tráfico foram provenientes de duas apreensões em 2018, sendo encaminhados ao CETAS 98 papagaios-verdadeiros na primeira apreensão, ocorrida em setembro, e 232 na segunda operação, deflagrada em novembro. Nestas operações, foram também apreendidas as espécies *Ara ararauna*, *Eupsittula aurea* e *Alipiopsitta xanthops*.

Tabela 2. Quantitativo total e provenientes do tráfico de *A. aestiva* recebidos, e que vieram a óbito no ano de 2018

Recebimento <i>A. aestiva</i> em 2018		Óbitos <i>A. aestiva</i> em 2018	
Total recebido	609	Total de óbitos	214
Provenientes do tráfico	330	Provenientes do tráfico	116

No ano de 2018, 214 papagaios-verdadeiros vieram a óbito no CETAS/BH, desses, 116 foram filhotes traficados. Considerando-se somente os papagaios destas duas apreensões, outros 66 indivíduos vieram a óbito no ano de 2019, totalizando 182 óbitos. 44% (80/182) dos indivíduos vieram a óbito antes de 30 dias após o recebimento; 18,1% (33/182) vieram a óbito no segundo mês após o recebimento; 9,3 % (17/182) vieram a óbito no terceiro mês após o recebimento e 28,6% (52/182) dos animais vieram a óbito a partir do quarto mês até um ano após o recebimento.

Foram realizadas 114 necropsias dos 182 papagaios-verdadeiros (*A. aestiva*) provenientes destes dois recebimentos. Dos animais necropsiados, 53 (46,5%) vieram a óbito no primeiro mês após sua chegada ao CETAS, sendo que 20 deles (17,5%) morreram durante a primeira semana. Outros 44 animais (38,6%) vieram a óbito no segundo mês após o recebimento. Os demais animais estudados (14,9%) vieram a óbito a partir do terceiro mês até o sétimo mês após o recebimento.

5.1. Adenovírus

Dos 114 animais avaliados, em 81 (71%) foram detectados o DNA do gene que codifica parcialmente o hexon L1 do adenovírus, pela técnica de PCR, utilizando tecido hepático (Figura 7). Foram encontrados resultados positivos tanto para os animais que vieram a óbito em menos de uma semana do recebimento, incluindo um animal que veio a óbito no dia seguinte a entrega, quanto para animais que vieram a óbito nos meses subsequentes. Esse resultado é um indicativo que os animais já podem ter sido apreendidos infectados e que o vírus circulou no CETAS durante a permanência desses animais no local.

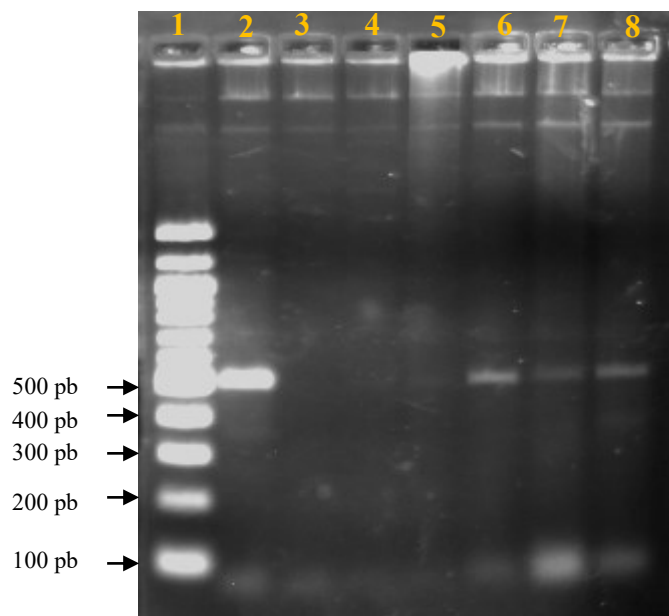


Figura 7 – Eletroforese dos produtos de PCR realizada para adenovírus. Da esquerda para direita, ladder (1), controle positivo (2), controle negativo (3), amostras negativas (4 e 5) e amostras positivas (6, 7 e 8) na altura de aproximadamente 500 pb.
Foto: (TEIXEIRA, E. P. T. 2019).

Por possuir transmissão vertical e horizontal (CRITTER et al., 2007; MARTINS; RESENDE, 2009; PEREIRA, 2011), é possível que alguns desses filhotes tenham sido infectados por via transovariana ou seminal, sendo portadores do vírus ao nascer. Conforme relatado por MARTINS e RESENDE (2009), as características dos sistemas de criação intensificada, locais com múltiplas idades, diferentes procedências e proximidades entre lotes favorecem a disseminação. Situações desse tipo, e ainda mais extremas, são observadas na cadeia do tráfico de animais. Os papagaios são retirados muito novos dos ninhos, perdem os cuidados parentais, ficam confinados em pequenos espaços com alta densidade e são privados de alimento e água (RENCTAS, 2002). Essas características favorecem a replicação viral, eliminação e transmissão horizontal, podendo acarretar na infecção de todos os animais em contato próximo.

Em um estudo realizado por YANG et al. (2019), foram coletadas fezes e swabs cloacais de psitacídeos de cinco cativéis australianos. A prevalência de eliminação de PsAdV-2 em papagaios de barriga laranja variou de 29,7% a 76,5%. No mesmo trabalho foram investigados eventos de mortalidade em duas instituições. No zoológico de Adelaide foi evidenciado PsAdV-2 pelo teste de PCR em tecido hepático das duas aves que vieram a óbito, no centro de criação de Taroom, oito das quinze aves avaliadas (53%) foram positivas para PsAdV-2 no teste de PCR em tecidos de fígado ou rins. Na Eslovênia, dezenove amostras de um total de 128 (15%) swabs cloacais foram positivos para adenovírus em diferentes espécies de psitacídeos. Das amostras positivas, treze foram compatíveis com PsAdV-2 (*Siadenovirus*), um novo *Siadenovirus* evidenciado em duas amostras, uma espécie de *Atadenovirus* em ring neck (*Psittacula krameri*) e, em três amostras suspeitou-se de mais de um tipo de adenovírus envolvido (ZADRAVEC et al., 2011). BRETZ (2019), ao avaliar 58 amostras de psitacídeos para AdVs, evidenciou 24 animais positivos em PCR, sendo 12 amostras provenientes de animais recebidos pelo CETAS/BH. Desses animais positivos, 11 eram da espécie *A. aestiva*, selecionados de forma aleatória, sem análise prévia sobre a origem dos animais.

Por se tratar de uma afecção com prevalência variável, a frequência de 71% de animais infectados, evidenciada em nosso estudo, é compatível com os relatos existentes na literatura em que até 100% dos animais em óbito avaliados foram positivos em teste de PCR para adenovírus. O resultado também corrobora com o relato de BRETZ (2019) de psitacídeos positivos para AdVs no CETAS de Belo Horizonte.

Além dos quadros de morte súbita, quando os animais demonstravam algum sinal clínico *ante mortem*, os sinais eram bastante inespecíficos, como prostração, perda de apetite, estase de papo e, eventualmente, dificuldade respiratória. A inespecificidade dos sintomas e morte antes de se iniciar um tratamento alopático, impossibilitou o registro clínico individualizado dos animais doentes. O significado clínico das adenovirose em psitacídeos ainda não é bem definido. Os sinais variam de subclínicos e inespecíficos a doença grave. Os sinais observados por WELLEHAN et al. (2009) foram de perda de peso e letargia, enquanto TO et al. (2014) evidenciou o vírus apenas em animais doentes coinfectados por *C. psittaci*. Sinais clínicos respiratórios, diarreia e hemorragia cloacal também podem ser observados na infecção (KATOH et al., 2010; TO et al., 2014). Os animais do nosso estudo apresentaram sinais clínicos bastante inespecíficos, porém, devido à falta de informação clínica de cada animal antes do óbito, não é possível correlacionar a sintomatologia de cada indivíduo aos achados de necropsia e aos resultados dos testes de PCR.

Dentre as alterações anatomopatológicas observadas durante a necropsia as mais frequentes foram acúmulo de líquido nos pulmões (49/114; 43%), presença de conteúdo escuro no lúmen intestinal reativo ao peróxido de hidrogênio (sugestivo de presença de sangue) (49/114; 43%), esplenomegalia (41/114; 36%), aerossaculite (37/114; 32,5%), congestão pulmonar fluído sangue ao corte (30/114; 26,3%), hepatomegalia (29/114; 25,4%), dilatação de proventrículo (24/114; 21%), ventrículo friável (19/114; 16,7%) e rins aumentados (19/114; 16,7%).

Do total de animais avaliados, 91 animais (79,8%) apresentaram algum tipo de alteração pulmonar, sendo as mais comuns: acúmulo de líquido nos pulmões (49/114; 43%), aerossaculite (37/114; 32,5%) (Figura 9), congestão pulmonar com sangue fluído ao corte (30/114; 26,3%) (Figura 8). 7 animais possuíam conteúdo alimentar na traqueia indicando morte por aspiração do alimento. 46 animais (40,35%) possuíam alterações hepáticas, dentre hepatomegalia (29/114; 25,4%) (Figura 10), fígado hipocorado (15/114; 13%), fígado friável (8/114; 7%) e congestão (2/114; 1,7%). 90 animais possuíam alterações no trato gastrointestinal, com presença de conteúdo escuro reativo ao peróxido de hidrogênio (49/114; 43%) (Figura 12 e 13), dilatação de proventrículo (24/114; 21%), ventrículo friável (19/114; 16%). 50 animais apresentaram alterações esplênicas como aumento do órgão (41/114; 36%) (Figura 11), congestão (9/114; 7,9%), coloração esbranquiçada (6/114; 5,2%) ou amarelada (1/114; 0,9%), e 14/114 (12,3%) congestão cerebral (Tabela 3).

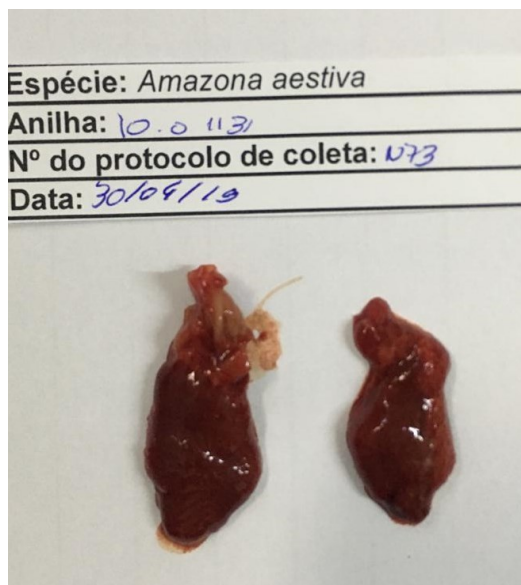


Figura 8 – *Amazona aestiva*. Congestão pulmonar.
Foto: (TEIXEIRA, E. P. T, 2019).

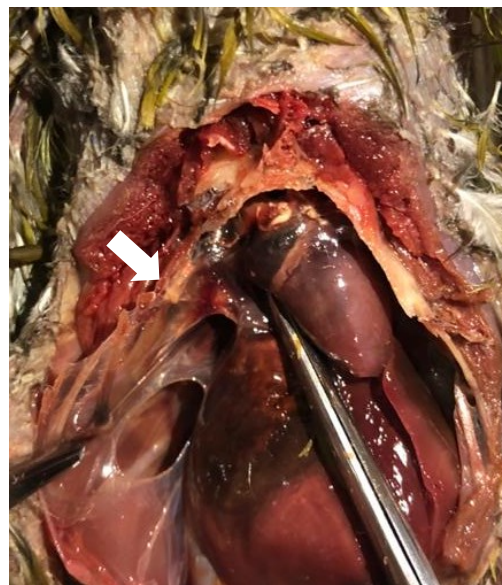


Figura 9 – *Amazona aestiva*. Aerossaculite em saco aéreo abdominal direito, com presença de espessamento focal e material caseoso (seta branca).
Foto: (TEIXEIRA, E. P. T, 2019).



Figura 10 – *Amazona aestiva*. Cavidade celômática e fígado aumentado de tamanho.
Foto: (TEIXEIRA, E. P. T, 2019).



Figura 11 – *Amazona aestiva*. Órgãos do sistema digestivo. Seta branca indicando o baço aumentado de tamanho.
Foto: (TEIXEIRA, E. P. T, 2019).



Figura 12 – *Amazona aestiva*. Intestino delgado.
Notar coloração marrom escuro.
Foto: (TEIXEIRA, E. P. T, 2019).



Figura 13 – *Amazona aestiva*. Conteúdo intestinal.
Reatividade do ao peróxido de hidrogênio à presença
de catalase, sugestiva da presença de sangue.
Foto: (TEIXEIRA, E. P. T, 2019).

As lesões macroscópicas associadas ao adenovírus incluem hepatomegalia, esplenomegalia, dilatação de duodeno e proventrículo, rins aumentados, edema, congestão e hemorragia pulmonar. As lesões hepáticas são as mais consistentes em aves infectadas e, o fígado pode estar hemorrágico, pálido ou manchado. É também relatado hemorragias no trato gastrointestinal, conjuntivite e pneumonia intersticial (TO et al., 2014; HULBERT et al., 2015). Apesar das alterações macroscópicas relatadas na literatura serem condizentes com as encontradas nas necropsias realizadas, não é possível inferir que o adenovírus seja a causa primária. As alterações relatadas foram encontradas tanto em animais positivos para adenovírus, quanto para animais considerados negativos pelo teste de PCR (Tabela 3).

A tabela 4 apresenta as alterações anatomopatológicas observadas em função do resultado positivo, no teste de PCR, para adenovírus. Os resultados estão expressos em número de animais em que foram observadas as alterações/número de animais positivos para adenovírus (n), porcentagem (%) e significância estatística (p) determinada pelo teste Exato de Fisher. As correlações não foram estatisticamente significativas entre as alterações macroscópicas encontradas e o resultado para o teste de PCR para adenovírus.

É provável, dada às condições de tráfico a que esses animais foram submetidos e à característica de fluxo de animais no CETAS, que existam outros agentes envolvidos na patologia e que os adenovírus façam parte de uma doença multifatorial. Além disto, também é possível que nem todas as amostras de fígado possuam o DNA para adenovírus, uma vez que em estudo realizado por YANG et al. (2019), foi localizado corpúsculo de inclusão basofílico intranuclear em

células renais, mas o teste de PCR em tecido hepático foi negativo, sendo sugerido por estes autores que o rim seja o órgão de escolha para PsAdV-2 em animais em óbito.

Tabela 3. Alterações anatomopatológicas observadas na necropsia de acordo com resultado do teste de PCR para adenovírus

Alteração anatomopatológica	Total de animais acometidos	Número de indivíduos positivos para adenovírus	Número de indivíduos negativos para adenovírus
Presença de líquido nos pulmões	49	34	15
Aerossaculite	37	24	13
Áreas de consolidação pulmonar	9	6	3
Áreas de hepatização pulmonar	12	10	2
Congestão pulmonar	30	21	9
Presença de conteúdo alimentar na traquéia	7	5	2
Pulmão friável	9	7	2
Congestão hepática	2	2	0
Fígado amarelado	2	1	1
Fígado esbranquiçado	15	12	3
Fígado friável	8	6	2
Hepatomegalia	29	22	7
Conteúdo escuro no lúmen intestinal reativo ao peróxido de hidrogênio	49	38	11
Dilatação de proventrículo	24	17	7
Ventrículo friável	19	13	6
Baço com coloração esbranquiçada	6	5	1
Baço com coloração amarelada	1	1	0
Congestão esplênica	9	4	5
Esplenomegalia	41	31	10
Rins aumentados	19	13	6
Rins congestionados fluindo sangue ao corte	2	2	0
Rins friáveis	4	3	1
Congestão cerebral	14	12	2

Tabela 4. Alterações anatomopatológicas correlacionadas com resultado positivo no teste de PCR para adenovírus

Alteração anatomopatológica	n (%)	p
Presença de líquido nos pulmões	34/81 (27,5%)	0.8353
Aerossaculite	24/81 (19,4%)	0.3789
Áreas de consolidação pulmonar	6/81 (4,9%)	0.7167
Áreas de hepatização pulmonar	10/81 (8,1%)	0.5040
Congestão pulmonar	21/81 (17%)	1,000
Presença de conteúdo alimentar na traquéia	5/81 (4,1%)	1,000
Pulmão friável	7/81 (5,7%)	1,000
Congestão hepática	2/81 (1,6%)	1,000
Fígado amarelado	1/81 (0,8%)	0.497
Fígado esbranquiçado	12/81 (9,7%)	0.5481
Fígado friável	6/81 (4,9%)	1,000
Hepatomegalia	22/81 (17,8%)	0.6373
Conteúdo escuro no lúmen intestinal reativo ao	38/81 (30,8%)	0.2147

peróxido de hidrogênio		
Dilatação de proventrículo	17/81 (13,8%)	1,000
Ventrículo friável	13/81 (10,5%)	0.7862
Baço com coloração esbranquiçada	5/81 (4,1 %)	0.6706
Baço com coloração amarelada	1/81 (0,8%)	1,000
Congestão esplênica	4/81 (3,2%)	0.1181
Esplenomegalia	31/81 (25,1%)	0.5202
Rins aumentados	13/81 (10,5%)	0.7862
Rins congestos fluindo sangue ao corte	2/81 (1,6%)	1,000
Rins friáveis	3/81 (2,4%)	1,000
Congestão cerebral	12/81 (9,7%)	0.3445

n= número de animais com a alteração anatomopatológica dentre os animais positivos para adenovírus pelo teste de PCR

p= significância estatística

A inespecificidade dos sinais clínicos dificulta o diagnóstico clínico da afecção. Em muitos trabalhos, somente é possível verificar a patogenicidade do agente após exame histopatológico dos tecidos envolvidos. DROUAL et al. (1995) identificou corpúsculos de inclusão basofílicos intranucleares, associados a severa necrose coagulativa e infiltrado heterofílico no fígado. Neste mesmo relato, foi também observada uma severa enterite hemorrágica necrosante com presença de corpúsculos de inclusão basofílicos intranucleares nos macrófagos presentes na lâmina própria. No exame por microscopia eletrônica foram evidenciadas partículas virais com morfologia compatível com adenovírus. Em periquitos australianos foram evidenciados corpúsculos de inclusão basofílicos intranucleares nas células epiteliais dos túbulos renais associados a acúmulo de células inflamatórias no fígado e rins e, congestão severa em diversos tecidos, sendo confirmada a presença de DNA adenoviral após a realização de PCR. Também foram identificados os corpúsculos de inclusão e DNA adenoviral, ou partículas virais, em: enterite necrosante em Lóris (MACKIE; BLACK; PRIOR, 2003); traqueíte necrosante fatal em mutuns de Alagoas (*Pauxi mitu*) (MARQUES et al., 2019); cacatua com doença hepática crônica (CASSMANN et al., 2019); necrose hepática e linfoide fatal em papagaio de Meyer (*Poicephalus meyeri*) (WELLEHAN et al., 2005); necrose hepatocelular leve em aves do zoológico de Adelaide e septicemia por *Pseudomonas aeruginosa* em um centro de criação em Tarooona (YANG et al., 2019). YANG et al. (2019) relatam ainda que no evento de morte no criatório de Tarooona foram encontradas poucas alterações histopatológicas condizentes com AdVs, incluindo uma ave positiva no teste de PCR que não possuía os corpúsculos característicos, sendo a causa do óbito outras afecções concomitantes.

As infecções por AdVs, em psitacídeos, foram identificadas com base em estudos microscópicos e, não pelo diagnóstico clínico (KATOH et al., 2010). Esses trabalhos demonstram a importância da histopatologia para identificação da patogenicidade, sendo possíveis casos em que o adenovírus seja o patógeno primário, causando doença e óbito e, em outras situações, seja um agente concomitante potencializando outras afecções. No CETAS/BH os animais que vem a óbito durante o processo de triagem são acondicionados sob congelamento até o descarte adequado ou encaminhamento para exames post-mortem. O processo de congelamento, a que foram submetidos os animais objeto deste estudo, acarretou em perda da arquitetura normal do tecido hepático por artefatos, inviabilizando a análise da morfologia celular e lesões teciduais.

As infecções por AdVs em aves podem ser causadas por três gêneros: *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* e *Siadenovirus*. A proteína hexon é a principal proteína do capsídeo viral do adenovírus e possui determinantes específicos de família, gênero, espécie e tipo (KATOH et al., 2010). A maioria dos métodos de diagnóstico da infecção por AdVs em psitacídeos não

identificava além do nível de família (WELLEHAN et al., 2009). O gene hexon tem sido utilizado para o estudo filogenético dos adenovírus (KATOH et al., 2010) e, para determinação da espécie causadora da patologia, é necessário caracterizar os produtos obtidos no teste de PCR por enzimas de restrição ou pelo sequenciamento do DNA viral (MARTINS; RESENDE, 2009).

Para identificar o sorotipo, foram realizadas tentativas de sequenciamento de 8 amostras, encaminhadas para dois laboratórios, porém não foi possível obter sequencia válida, seja por quantidade insuficiente de DNA após purificação, por degradação do produto ou perda da amostra durante a purificação. Sem o resultado do sequenciamento não é possível determinar a espécie do adenovírus presente nos animais estudados, sendo necessário realizar novas tentativas de sequenciamento. Os AdVs têm potencial para afetar programas de reprodução em cativeiro de espécies em extinção (YANG et al., 2019) e, não é conhecido nenhum local em que a triagem para adenovírus seja realizada de forma rotineira (PHALEN et al., 2019). A característica persistente e subclínica da afecção, sua capacidade de reativação em quadros de imunodepressão ou em infecções concomitantes, podem ser um grande desafio na triagem e reabilitação desses animais em instituições com a finalidade de conservação, como o CETAS. Além disso, considerando a possibilidade de transmissão vertical, os AdVs podem prejudicar os programas de revigoramento populacional que visam não somente recuperar espécies ameaçadas de extinção, como também restabelecer populações impactadas pelo tráfico de animais silvestres.

Para um maior controle da infecção e disseminação do agente, principalmente em locais como o CETAS, que recebem um grande número de animais provenientes de diferentes origens e, sem histórico conhecido, faz-se necessária a realização de quarentena para todos os animais que dão entrada na instituição, bem como a realização de exames periódicos, não somente para o adenovírus, mas também para outros agentes de importância clínica e causadores de imunodepressão, além da adoção de medidas de manejo que diminuam o estresse.

5.2. Circovírus

Foi realizado o teste de PCR para detecção BFDV em tecido hepático dos 114 papagaios-verdadeiros necropsiados. Nenhuma das amostras estudadas foi positiva para o *Circovirus*.

Dos testes diagnósticos disponíveis para detecção do BFDV, o PCR é o mais específico e sensível (KHALESI et al., 2005; JULIAN, 2012) e, já foi evidenciada a presença do vírus no fígado de psitacídeos em diversos estudos (KALETA, 2007; LATIMER et al., 1990; WOODS, 2000; GERLACH, 1994; PHALEN, 2006; DE KLOET & DE KLOET, 2004; PIÇARRA, 2009, ARAUJO, 2011), demonstrando ser uma amostra confiável para o diagnóstico *post mortem*. O método diagnóstico e amostras utilizadas dão confiabilidade ao resultado encontrado. PBFV é uma preocupação mundial para a conservação de espécies psitacíformes. A capacidade de BFDV infectar um grande número de espécies, sua distribuição mundial e seu potencial de rápida evolução apresentam uma séria ameaça ao futuro de algumas espécies de psitacídeos (JULIAN, 2012; VARSANI et al., 2011; FOGELL; MARTIN; GROOMBRIDGE, 2016). Os sintomas nem sempre são visíveis e uma ave infectada pode ocasionar a infecção de todo plantel (JULIAN, 2012). A falta de sinais clínicos e a não realização de testes diagnósticos de forma

rotineira, acarretam em subnotificação dos casos de PBFD no Brasil e no mundo (MELO FILHO, 2019).

BFDV foi confirmado em 78 espécies de psitacídeos tanto de cativo quanto de vida livre (FOGELL; MARTIN; GROOMBRIDGE, 2016; KATOH et al., 2010; JULIAN, 2012, LEITE, 2013). Em estudos de prevalência, foram evidenciados 39,2% de animais positivos para o vírus em cativos da Alemanha, 41,2% de positividade em posse doméstica em Taiwan, 31,3% em aves importadas por criatórios no Japão e 19,7% da população cativa na Costa Rica. Em trabalhos com animais em vida livre, a ocorrência varia de acordo com a espécie e região estudada. Na Nova Zelândia 4-7% de todas as espécies nativas são positivas para BFDV, mas para a espécie *Cyanoramphus novaeseelandiae* a prevalência chega a 28%. Na Austrália, a espécie *Platycercus elegans* possui entre 45 a 50 % de prevalência, a *Platycercus elegans adelaidae* possui cerca de 95 a 100 % de prevalência e, a *Platycercus elegans flaveolus* possui de 18 a 22 % de prevalência. Nas Ilhas Maurício, a espécie *Psittacula echo* apresentou 38% de animais positivos em levantamento realizado em 2004/2005 e, 17% em trabalho realizado em 2008/2009 (FOGELL; MARTIN; GROOMBRIDGE, 2016).

ARAUJO et al. (2015) evidenciaram 6,8% (11/160) de positividade para BFDV em amostras de fígados de *A. aestiva* que vieram a óbito no CETAS/BH. MELO FILHO (2019) relata um caso de papagaio-verdadeiro positivo para BFDV, pelo teste de PCR, sem nenhuma sintomatologia associada. Devido ao risco de disseminação e como medida de controle, foi decidido pela eutanásia do animal.

Comparando três espécies frequentemente infectadas, o BFDV foi evidenciado em 24,2% de papagaios cinzentos (*Psittacus erithacus*), espécie de origem africana; 25,69% em Araras (*Aratinga canicularis*), espécie de origem americana e, apenas em 11,03% em papagaios (*Amazona sp.*), indicando que os papagaios parecem ser menos suscetíveis ao BFDV que outras espécies (PIASECKI; WIELICZKO, 2010).

No nosso estudo, os resultados negativos encontrados são bastante importantes do ponto de vista epidemiológico. Não foram encontrados animais positivos que vieram a óbito logo após a chegada e nem nos meses subsequentes, sugerindo que os animais chegaram ao CETAS sem o vírus e, tampouco se infectaram durante o processo de triagem. Levando em consideração que os CETAS recebem um alto número de psitacídeos, provenientes de origens diferentes e sem histórico, existe a constante preocupação da disseminação do vírus no local. Apesar disso, muitos destes locais recebem um número de animais superior ao seu planejamento estrutural e, muitas vezes, os recursos disponibilizados pelo órgão gestor são insuficientes para a adoção de todas as medidas de controle e biossegurança necessárias, o que torna o controle do PBFD bastante desafiador.

Apesar da confiabilidade do teste e do patógeno já ter sido evidenciado em amostras de fígado em estudos anteriores (KALETA, 2007; LATIMER et al., 1990; WOODS, 2000; GERLACH, 1994; PHALEN, 2006; DE KLOET & DE KLOET, 2004; PIÇARRA, 2009, ARAUJO, 2011), não podemos descartar a hipótese de resultados falsos-negativos, uma vez que é relatado que o vírus pode ser encontrado em qualquer tecido do animal devido a replicação em células em divisão (PHALEN, 2006; DE KLOET & DE KLOET, 2004; PIÇARRA, 2009, AZEVEDO, 2017). Para confirmação do resultado negativo pode-se repetir o teste em outros tecidos alvos do agente, como células epiteliais ou células do sistema imunológico (HULBERT et al., 2015).

A disseminação mundial do vírus é atribuída ao comércio internacional de psitacídeos e caturúdeos (VARSANI et al., 2011, JULIAN, 2012) e, uma vez disseminada em ambiente

natural, seu controle é praticamente impossível. A prevenção no ambiente cativo é possível e, faz-se necessária a implementação de regulamentações rígidas para o comércio legal, quarentena apropriada, realização de testes em novos animais adquiridos e acompanhamento sistemático das aves existentes no plantel (JULIAN, 2012). Apesar disso, o comércio ilegal representa um grande desafio no controle deste agente, facilitando o risco de disseminação (FOGELL et al., 2018).

A intervenção humana, embora necessária para recuperação de espécies ameaçadas ou em declínio, podem contribuir com a disseminação do vírus para o ambiente natural. Estruturas que trabalham com animais de origem desconhecida e provenientes de comércio ilegal devem possuir, além de medidas profiláticas, um plano de gerenciamento de riscos. Deve-se ter uma rotina de testes diagnósticos, realização de quarentena adequada após a chegada, limpeza e desinfecção de instalações e fômites, realização de vazio sanitário e isolamento e/ou eutanásia de animais positivos (PIÇARRA, 2009; JULIAN, 2012). A adesão a rigorosos protocolos de triagem pode minimizar a disseminação do BFDV e reduzir a introdução de diferentes cepas, evitando a recombinação viral (JULIAN, 2012). Para tanto, é necessário que haja uma política pública voltada para a conservação de espécies, que invista nos insumos necessários, estruturas adequadas e equipe capacitada para a triagem desses animais.

5.3. Clamídia

As 114 amostras de tecido hepático dos papagaios (*A. aestiva*) foram negativas, pelo teste de PCR, para *Chlamydia psittaci*. O teste diagnóstico de PCR possui maior sensibilidade e especificidade que os demais diagnósticos disponíveis para a afecção, pois detectam pequenas quantidades do agente na amostra e utilizam primers específicos (LEAL, 2013), dando confiabilidade ao resultado encontrado.

A clamidiose é uma doença de grande importância para os psitacíformes em cativeiro e, considerando as condições de manejo a que os animais encaminhados para o CETAS são submetidos, o risco de ocorrência de surtos é alto (VILELA, 2012). A *C. psittaci* já foi descrita em cativeiros (RASO et al., 2002; LEAL, 2013), em animais provenientes do tráfico (RASO et al., 2004) e em psitacídeos em vida livre no Brasil (RASO et al., 2006). Existem também relatos de ocorrência em CETAS do país (RASO et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2016), inclusive na estrutura de Belo Horizonte (ECCO et al., 2009; VILELA, 2012).

Em 2009 foi descrito um surto de clamidiose em psitacídeos no CETAS de Belo Horizonte, em que todos os animais necropsiados possuíam alterações macroscópicas e histopatológicas sugestivas de infecção, sendo ainda, visualizadas inclusões intracitoplasmáticas características da afecção no interior de macrófagos (ECCO et al., 2009). VILELA (2012), em seu estudo, realizou 212 necropsias em papagaios-verdadeiros (*A. aestiva*) que vieram a óbito no CETAS de Belo Horizonte, no período de julho de 2009 a julho de 2011e, evidenciou 152 (72%) animais positivos para *C. psittaci* pelo teste da PCR e histopatologia.

Não foram evidenciados animais positivos dentre os que vieram a óbito poucos dias após o recebimento e tampouco dos que vieram a óbito nos meses subsequentes, com cativeiro prolongado, indicando que os animais, provavelmente, entraram sem infecção e, não se infectaram durante a permanência no CETAS. Esse resultado difere significativamente dos

estudos publicados em outros centros de triagem, em que foram observados altíssimos índices de infecção, incluindo 96,5% de mortalidade em um surto ocorrido em São Paulo (RASO et al., 2004), 64% de mortalidade em Belo Horizonte (ECCO et al., 2009), e 50% de frequência de infecção detectada em swabs cloacais em araras em Juiz de Fora, MG. Em comparação com o trabalho realizado por VILELA (2012), este estudo foi realizado na mesma instituição, sem alterações estruturais da unidade e com padrão semelhante de recebimento. Diariamente, são recebidos animais provenientes de apreensão, recolhimento e entrega voluntária de localidades diversas e sem histórico de origem. Os trabalhos diferem, entretanto, em relação ao número de animais, época e objeto do estudo, uma vez que, VILELA (2012) utilizou o total de papagaios recebidos no período de 2 anos, sem distinção de faixa etária e tipo de recebimento. Nosso trabalho focou apenas em ninhegos que vieram a óbito após duas grandes apreensões de animais, sabidamente recém capturados da natureza e provenientes do tráfico de animais silvestres. As diferenças de ocorrências são diametralmente opostas e significativas, ao se compararem os resultados de 0/114 animais positivos em nosso estudo com a frequência de animais positivos 152/212 (72%) em VILELA (2012). O teste de proporção é um teste estatístico não paramétrico que permite a comparação de duas populações e avaliações diferentes, com porcentagens diferentes, com a probabilidade de $P < 0,001$, indicando que há diferença estatística significativa entre as proporções dos dois grupos.

Sugere-se que a diferença entre os resultados obtidos nos dois trabalhos seja devida às mudanças de manejo adotadas no CETAS de Belo Horizonte nos últimos anos. A partir dos resultados encontrados por VILELA (2012), a equipe de veterinários e biólogos do CETAS, elaborou estratégia para a redução do impacto de *C. psittaci* durante a triagem e reabilitação. As alterações incluíram melhorias ambientais, com redução no número de aves por recinto, reduzindo potenciais fatores estressantes relacionados à acomodação.

Outros fatores estressantes, como a alteração de dieta, aproximação com outros indivíduos não socialmente relacionados, entrada e saída de animais no grupo, exposição a barulhos desconhecidos, incluindo sons de outras espécies presentes na instituição e trânsito de pessoas, podem causar grandes transtornos aos animais, acarretando em queda da imunidade, aumento da eliminação de patógenos latentes e, conseqüentemente, uma maior taxa de infecção. Para minimizar esses fatores estressantes, foram realizadas as seguintes alterações no manejo durante a recepção e triagem no CETAS:

a) Alteração da dieta para um alimento mais palatável.

Os psitacídeos em cativeiro, na grande maioria, possuem dieta altamente energética, composta por sementes, principalmente de girassol. Há relatos de animais se alimentando com pão, café, macarrão, angu, arroz, etc, no cativeiro irregular (observação pessoal). Ao darem entrada no CETAS, a dieta ofertada era baseada em ração extrusada, frutas, legumes e uma pequena quantidade diária de girassol. Devido ao desconhecimento dos alimentos e paladar seletivo, apesar do balanceamento da dieta, muitos desses animais não se alimentavam bem nos primeiros dias no CETAS. Para aumentar a ingestão, a dieta foi alterada para uma mistura triturada, preparada diariamente na instituição, contendo cenoura, beterraba, farelo de milho, ração extrusada, polivitamínicos e minerais. Essa alternativa mostrou-se altamente palatável e, a grande maioria dos psitacídeos não diminui o consumo de alimentos após a chegada ao CETAS. Além disso, diariamente são oferecidos no mínimo três opções de frutas e legumes e, uma pequena quantidade de semente de girassol.

b) Aproximação branda a outros indivíduos da mesma espécie e maior tempo de adaptação antes da transferência para um viveiro mais amplo.

Anteriormente, após a avaliação inicial, os animais eram encaminhados para um viveiro no CETAS e permaneciam neste local até o encaminhamento para os recintos de reabilitação, existentes no CRAS (Centro de Reabilitação de Animais Silvestres). Esse manejo foi alterado e, antes de serem encaminhados para o viveiro, os papagaios são alocados em gaiolões, tipo canil, compostos de três módulos com aproximadamente 0,60m x 1,20m x 0,60m. Neste local é feita a aproximação dos indivíduos, sendo colocados em torno de 8 animais por módulo. Os animais permanecem neste pequeno grupo por 3 a 8 dias. Neste período é avaliado o comportamento individual, comportamento social, adaptação à nova dieta e se houve alguma alteração clínica. Ao fim deste período de aproximação, é realizada uma reavaliação e os animais aptos, são encaminhados para o viveiro maior, onde permanecerão até a composição do grupo de reabilitação, com aproximadamente 60 indivíduos. Essa aproximação e observação dos animais, durante a adaptação ao CETAS, diminui o estresse provocado ao chegar a um novo ambiente, permite o reconhecimento de outros indivíduos da espécie, possibilita uma adaptação à dieta, com menos animais competindo pelo alimento e, facilita a visualização de alterações clínicas e comportamentais, tornando a intervenção, caso necessária, mais rápida.

c) Manutenção dos indivíduos no mesmo grupo evitando a quebra de hierarquia social.

A unidade básica da organização social dos papagaios-verdadeiros são as díades, porém é verificado que os animais não interagem exclusivamente com seus pares, havendo interações frequentes com outros membros do grupo, sugerindo a possibilidade de associações secundárias entre vários pares. As relações sociais estáveis são fundamentais para a manutenção do bem-estar, do estado de saúde, do valor adaptativo e do sucesso reprodutivo dos indivíduos ao longo de sua vida e, o remanejamento de animais, sem critérios, pode ter como consequência efeitos deletérios para os indivíduos envolvidos (MATOS, 2016). Diante disso, procuramos manter os indivíduos no grupo inicialmente formado pelo maior tempo possível. Após a aproximação dos animais no pequeno grupo, com aproximadamente 8 indivíduos, as aves são reavaliadas e, se estiverem aptas, são encaminhados para um viveiro maior. Neste viveiro serão inseridos novos pequenos grupos até que se atinja aproximadamente 60 indivíduos. Os animais são novamente avaliados e encaminhados para o CRAS, onde permanecem juntos até serem transferidos para o viveiro de voo. É possível que nem todos os papagaios estejam aptos a serem encaminhados ao CRAS e, posteriormente, ao viveiro de voo. Neste momento, alguns animais podem ser retirados do grupo, porém, tenta-se sempre manter o grupo coeso, sem fluxo de entrada e saída constante de indivíduos, para não haver quebra de hierarquia e da organização social.

Após VILELA (2012) evidenciar que 72% dos papagaios que vieram a óbito, no período de julho de 2009 a julho de 2011, estavam infectados por *C. psittaci*, realizamos reuniões internas com objetivo de diminuir a transmissão do agente no CETAS. É bastante provável que parte dos animais à época tenham sido recebidos infectados e, que durante o processo de triagem passaram a eliminar o agente infectando outros animais presentes no local. O principal manejo preconizado na recepção de animais em Centros de Triagem deve ser a realização de quarentena por período adequado, realização de exames de entrada e, também, realização de exames periódicos dos animais alojados na estrutura. Porém, a estrutura atual do CETAS/BH não permite a realização de quarentena individualizada e não há recurso para a realização de todos os exames necessários na recepção dos animais, sendo preconizada a realização de exames

direcionados para a sintomatologia observada. Para contornar a situação e sabendo que a alteração de ambiente, a que os animais são submetidos ao serem entregues no CETAS, podem causar efeitos deletérios na sua imunidade, a equipe do CETAS decidiu realizar o tratamento preventivo de todos os psitacídeos que dão entrada no local. O tratamento é realizado com doxiciclina em pó, misturado ao triturado preparado na instituição, na dosagem de 80 mg a 100 mg por kg de alimento ofertado. Durante o período que os animais são mantidos no CETAS/BH, realiza-se o uso profilático da doxiciclina, devido ao constante recebimento de animais potencialmente infectados por *C. psittaci*, e possibilidade de introdução do patógeno no local. Após serem encaminhados para o CRAS, mantém-se o antibiótico por certo período, para evitar a eliminação de agentes infecciosos latentes devido ao estresse de transferência e, posteriormente, faz-se a utilização do antimicrobiano de forma metafilática, ou seja, se algum animal passa a demonstrar sintomatologia, realiza-se o protocolo de tratamento nos grupos residentes.

O uso de antimicrobianos em medicina veterinária se dá por finalidades mais amplas do que aquelas empregadas em medicina humana (DIAS, 2019). Na avicultura comercial os antimicrobianos são amplamente utilizados na avicultura de postura como agentes profiláticos (BORSOI, 2015). Além do uso terapêutico e profilático, para galinhas de postura, os antimicrobianos podem ser administrados na metafilaxia. O uso terapêutico do antimicrobiano ocorre no aparecimento de doenças infecciosas do plantel e, na profilaxia o seu uso é preventivo, com o intuito de garantir proteção contra possíveis infecções. O uso metafilático é também chamado de tratamento de animais em risco ou tratamento de animais em contato, podendo ser administrado na ração ou água. No entanto, a utilização desses medicamentos em produção animal tem sido questionada, pois, apesar de melhorar a produtividade, podem ocasionar aparecimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos (DIAS, 2019). A aplicação de drogas na produção de aves promove a eliminação de bactérias sensíveis e seleciona as resistentes. Dessa maneira, os isolados remanescentes tornam-se predominantes e transferem seus genes de resistência, tanto aos descendentes quanto a outras espécies bacterianas. O surgimento de bactérias multirresistentes tem sido uma preocupação global à saúde pública e, tem gerado um grande debate sobre o real impacto do uso de drogas antimicrobianas em animais de produção e o aparecimento de infecções multirresistentes em humanos nos últimos anos (OLIVEIRA; FREITAS; GEBREYES, 2018). Além disso, não podemos descartar que a utilização da doxiciclina esteja propiciando o surgimento de outras afecções, uma vez que foram avaliados neste trabalho somente três patógenos, um bacteriano e dois virais, sendo necessário a realização de um estudo mais amplo para essa investigação. Para evitar o uso profilático de antimicrobianos no processo de triagem de animais silvestres deve-se considerar a construção de estruturas que permitam a adequada quarentena dos animais e uma maior disponibilização de recursos para realização de exames.

Os diagnósticos negativos obtidos nos exames para *C. psittaci* são um importante resultado, ainda mais, se considerarmos que a bactéria pode permanecer latente ou inaparente por um longo período, ocasionando surtos inesperados com alta taxa de morbidade e mortalidade em situações de estresse ou em animais imunodeprimidos. É importante ressaltar que, por se tratar de uma zoonose, este resultado é benéfico também aos trabalhadores envolvidos na triagem dos animais, tornando o ambiente de trabalho mais seguro e com menor possibilidade de transmissão aos humanos.

Apesar do resultado obtido, e de sugerirmos que as medidas de manejo adotadas tenham sido favoráveis ao controle da clamidiose no CETAS/BH, a vigilância contra infecções e medidas de biossegurança devem ser permanentes na instituição.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi evidenciada a infecção por adenovírus em ninhegos de papagaios-verdadeiros, provenientes do tráfico, que vieram a óbito no CETAS/BH. Não foi possível determinar a espécie de adenovírus e sua filogenia, sendo necessário o sequenciamento genético do produto de PCR (parte do gene hexon) e mais estudos sobre a afecção no Centro de Triagem.

Não foi evidenciada infecção por BFDV nos papagaios-verdadeiros (*A. aestiva*), provenientes de tráfico, recebidos pelo CETAS/BH.

Nestes mesmos ninhegos, não foi evidenciada infecção por *C. psittaci*. Considerou-se que as alterações realizadas no manejo dos animais, bem como tratamento profilático, têm sido eficientes na prevenção da disseminação de *C. psittaci* no CETAS/BH. Propõe-se a realização de estudos em outros patógenos, para verificar se há semelhante benefício das medidas profiláticas adotadas.

Os resultados sugerem que a ausência de evidências de infecção por BFDV e *C. psittaci* pode significar ausência das mesmas no ambiente natural, tendo em vista as aves serem recém-eclodidas, mas não é descartado a possibilidade de resultados falso-negativos.

As principais lesões macroscópicas descritas nos filhotes foram no sistema respiratório, nos pulmões e sacos aéreos, e podem ser devidas a patógeno(s) não avaliado(s) neste estudo, sendo necessários estudos complementares para confirmação.

Aviadenovirus encontrados em papagaios jovens que vieram a óbito em processo de triagem e reabilitação no CETAS/BH podem ter papel no processo de doença e óbito. As alterações hepáticas foram relevantes, mas não houve correlação estatística entre as alterações anatomopatológicas e o resultado do teste de PCR.

Para maior controle de enfermidades e para prevenir a disseminação de patógenos em centros de triagem de animais silvestres, é recomendável a implementação de medidas profiláticas, de biossegurança, rotina de testes diagnósticos e de limpeza e desinfecção diárias. Para o bom funcionamento dos CETAS é necessária política pública voltada para conservação, com investimentos em estruturas adequadas, equipe capacitada, insumos e procedimentos necessários para o cumprimento das leis ambientais e de conservação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAIR, B.; M., FITZGERALD, S. D. Adenovirus infections. In.: SAIF, Y.M. *Diseases of Poultry*. 12. ed. Ames: Iowa State, 2008. p.251-296.

ALVES, R. R. N.; LIMA, J. R. D. F.; ARAUJO, H. F. P. The live bird trade in Brazil and its conservation implications: an overview. *Bird Conservation International*, v. 23, n. 1, p. 53–65, mar. 2013.

ANDERSEN, A.A. Chlamydiosis. In: SWAYNE, D. E. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. 4.ed. Iowa:Kendall/Hunt Publishing, 1998. p. 34-40.

ANDERY DD, FERREIRA JUNIOR FC, DE ARAÚJO AV, VILELA DD, MARQUES MV, MARIN SY, HORTA RS, ORTIZ MC, DE RESENDE JS, MARTINS NRS. Health assessment of raptors in triage in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2013 Sep;15(3):247-56.

ARAUJO, A.V.; ANDERY, D. A.; FERREIRA, J. R. F.C.; ORTIZ, M. C.; MARQUES, M. V. R.; MARIN, S. Y.; VILELA, D. A. R.; RESENDE, J. S.; RESENDE, M.; DONATTI, R. V.; MARTINS, N. R. S.; Molecular diagnosis of beak and feather disease in native Brazilian psittacines. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.17, n. 4, p. 451-458, 2015.

ARAÚJO. A. V. *Doença do Bico e das Penas: avaliação em psitacídeos nativos apreendidos em minas gerais*. 2011. p.58. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

AZEVEDO. N.P. *Caracterização molecular de bornavírus, poliomavírus e circovírus em aves de cativeiro, vida livre e criação comercial*. 2017. p 106. Tese (Doutorado em patologia experimental e comparada). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BALLMANN, M. Z., VIDOVSZKY, M. Z. Detection of broad-host-range psittacine adenovirus (PsAdV-2) in representatives of different parrot species. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 135, 78–84. 2013.

BEISSINGER, S.R. e BUCHER, E.H. Sustainable harvesting of parrots for conservation. In: Beissinger, S.R. and Snyder, N.E.R. *New World Parrots in Crisis: Solutions from Conservation Biology*. Smithsonian Institution Press: Washington, USA. 1992. p.73-115.

BENKÓ, M., ELO, P., URSU, K., AHNE, W., LAPATRA, S.E., THOMSON, D., et al. First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *Journal of Virology*, 76 (19), p. 10056 -10059, 2002.

BENKÓ, M., HARRACH, B., BOTH, G.W., RUSSELL, W.C., ADAIR, B.M., ADAM, E., et al. (2005). Family Adenoviridae. In C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L.A. Ball (Eds.), *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, CA: Academic Press. p. 213-228. 2005.

- BERKUNSKY, I. et al. Current threats faced by Neotropical parrot populations. *Biological Conservation*, v. 214, p. 278–287, out. 2017.
- BILLINGTON, S. Clinical and zoonotic aspects of psittacosis. *In Pract.*, v. 27, p. 256–263, 2005.
- BOOM, R., SOL, C. J. A., SALIMANS, M. M. M., JANSEN, C. L., et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Chn. Microbial.* 28, 495-503. 1990.
- BORSOI, A.; PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos na postura comercial. Problema de saúde aviária ou de saúde pública? In: *XIII Congresso APA produção e comercialização de ovos*. Anais. Ribeirão Preto, 2015.
- BRETZ, B. A. M; Detecção molecular de PsHv-1, Aviadenovirus e Chlamydia psittaci em Psittaciformes cativos em Belo Horizonte e região. 2019. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.
- CABANA, E. M. Veterinary necropsy procedures. Science City of Muñoz: *CLSU Alumni Association*, 2008. 47p.
- CADARIO, M. E. et al. Epidemiological and molecular characteristics of Chlamydia psittaci from 8 human cases of psittacosis and 4 related birds in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 49, n. 4, p. 323–327, out. 2017.
- CARLOS, N.; LUYO, E. P. Seroprevalence of Chlamydia psittaci in captive macaws (*Ara spp.*) in the department of Lima, Peru. *Ciência Animal Brasileira*, v. 19, n. 0, 4 out. 2018.
- CASSMANN, E. et al. Novel siadenovirus infection in a cockatiel with chronic liver disease. *Virus Research*, v. 263, p. 164–168, abr. 2019.
- CATROXO, M. H. B. et al. Research of Viral Agent in Free-living Pigeon Feces (*Columba livia*) in the City of São Paulo, SP, Brazil, for Transmission Electron Microscopy. *Int. J. Morphol.*, v. 29, n. 2, p. 628-635, jun. 2011.
- CAXITO, F. A.; COELHO, F. M.; OLIVEIRA, M. E.; RESENDE, M. Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. *Vet. Res. Commun.*, v. 30, n. 8, p. 953-956, 2006.
- CHAN, J. F.-W. et al. Cross-species transmission and emergence of novel viruses from birds. *Current Opinion in Virology*, v. 10, p. 63–69, fev. 2015.
- CITES. What is CITES? Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. 2014.
- CITES. The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. p. 16, 2016.
- COCKREM, J.F. Conservation and behavioral neuroendocrinology. *Horm Behav.* 48(4):492-501, nov. 2005.

- CRITTER, R. B. O.; KUIBIDA, K. V.; UHERARA, T. I.; PARRA, P. N. S.; CARVALHO, A. T. Adenoviroses, reoviroses e rotaviroses. In: FILHO ANDREATTI, R. L. *Saúde Aviária e Doenças*. São Paulo: Editora Roca LTDA, 2007. p. 208-215.
- CUNNINGHAM, A. A.; DASZAK, P.; WOOD, J. L. N. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 372, n. 1725, p. 20160167, 19 jul. 2017.
- DAS, S. et al. A novel pathogenic aviadenovirus from red-bellied parrots (*Poicephalus rufiventris*) unveils deep recombination events among avian host lineages. *Virology*, v. 502, p. 188–197, fev. 2017.
- DASZAK, P. Emerging Infectious Diseases of Wildlife-Threats to Biodiversity and Human Health. *Science*, v. 287, n. 5452, p. 443–449, 21 jan. 2000.
- DAUT, E. F. *Conservation Implications of Illegal Bird Trade and Disease Risk in Peru*. 2015. Doctoral dissertation, Texas A & M University.
- DAVISON, A.J., WRIGHT, K.M. & HARRACH, B. DNA sequence of frog adenovirus. *Journal of General Virology*, 81, p.2431-2439, 2000.
- DE KLOET, E.; DE KLOET, S. R. Analysis of the beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specificity. *Archives of Virology*, v. 149, n. 12, p. 2393–2412, dez. 2004.
- DE LA TORRE, D., NUÑEZ, L.F.N., SANTANDER PARRA, S.H. et al. Molecular characterization of fowl adenovirus group I in commercial broiler chickens in Brazil. *VirusDis*. 29, p. 83–88, 2018.
- DE MELO, C. M. F. et al. Parasites of Psittaciformes and Accipitriformes in Paraíba state, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 2, p. 314–317, jun. 2013.
- DESMIDT, M., DUCATELLE R., UYTTEBROEK E., et al. Respiratory adenovirus-like infection in a rose-ringed parakeet (*Psittacula krameri*). *Avian Dis*.35:1001– 1006, 1991.
- DIAS, R. G. *Efeitos da enrofloxacina, da sulfaquinoxalina e da nicarbazina na dieta de galinhas de postura sobre a qualidade da casca do ovo*. 2019. 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais.
- DLUGOSZ, A.P. Prevalência de salmonella sp. em calopsitas (*nymphicus hollandicus*) mantidas em cativeiro comercial. *Archives of Veterinary Science*, v.20, n.2, p.155-160, 2015.
- DOLZ, G. et al. Prevalence of Psittacine Beak and Feather Disease Virus and Avian Polyomavirus in Captivity Psittacines from Costa Rica. *Open Journal of Veterinary Medicine*, v. 03, n. 04, p. 240–245, 2013.
- DROUAL, R. et al. Inclusion Body Hepatitis and Hemorrhagic Enteritis in Two African Grey Parrots (*Psittacus erithacus*) Associated with Adenovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 7, n. 1, p. 150–154, jan. 1995.

- DROUAL, R., WOOLCOCK, P. R., NORDHAUSEN, R.W., FITZGERALD, S. D. Inclusion body hepatitis and hemorrhagic enteritis in two African grey parrots (*Psittacus erithacus*) associated with adenovirus. *J Vet Diagn Invest.* 7:150–154, 1994.
- DUARTE, M. A. et al. Faecal Virome Analysis of Wild Animals from Brazil. *Viruses*, v. 11, n. 9, p. 803, 30 ago. 2019.
- ECCO, R. et al. An outbreak of chlamydiosis in captive psittacines. *Braz J Vet Pathol*, 2(2), p. 85 - 90, 2009.
- FARKAS, S. L., BENKÓ, M., ELO, P., URSU, K., DÁN, Á., AHNE, W., et al. Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus solated from a corn snake (*Elaphe guttata*) imply common origin with the members of the proposed new genus *Atadenovirus*. *Journal of General Virology*, 83, p.2403-2410. 2002.
- FERREIRA, J.C.P. et al. Non-Invasive Measurement of Adrenocortical Activity in Blue-Fronted Parrots (*A. aestiva*, Linnaeus, 1758). *PLoS ONE* 10 (12): e0145909. DOI: 10.1371/journal.pone.0145909. 2015.
- FOGELL, D. J. et al. Trade and conservation implications of new beak and feather disease virus detection in native and introduced parrots: BFDV in Native and Introduced Parrots. *Conservation Biology*, v. 32, n. 6, p. 1325–1335, dez. 2018.
- FOGELL, D. J.; MARTIN, R. O.; GROOMBRIDGE, J. J. Beak and feather disease virus in wild and captive parrots: an analysis of geographic and taxonomic distribution and methodological trends. *Archives of Virology*, v. 161, n. 8, p. 2059–2074, ago. 2016.
- FORSHAW, J.M. *Parrots of the World*. T.F.H. Publications: Melbourne, 1977. 584 p.
- FREITAS, A.C.P.; OVIEDO-PASTRANA, M.E.; VILELA, D.A.R. et al. Diagnóstico de animais ilegais recebidos no centro de triagem de animais silvestres de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, no ano de 2011. *Cienc. Rural*, v.45, p.163-170, 2015.
- FUDGE, A. M. Avian chlamydioses. In: ROSSKOPF, W. J.; WOERPEL, R. W. *Diseases of cage and aviary birds*. 3. ed. Malvem: Willians and Wilkins, 1996. p. 572- 585.
- FUJIHARA, et al. *Dosagem de metabólitos de glicocorticoides e progesterona em fezes de papagaio-verdadeiro (A. aestiva)*. *Ciência Animal Brasileira*, 15 (3): 277-288. 2014.
- GAIO, F. C. et al. Bactérias zoonóticas isoladas de Passeriformes silvestres recuperados do tráfico de animais no estado do Ceará/Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 71, n. 5, p. 1488–1496, out. 2019.
- GERLACH, H. Chlamydia. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. *Avian medicine: principles and applications*. Florida: Wingers Publishing, 1994. p. 984-996.
- GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R. A Survey of Diseases in Passeriform Birds Obtained from Illegal Wildlife Trade in São Paulo City, Brazil. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 24, n. 3, p. 199–209, set. 2010.

GOGLIATH, M. et al. Avifauna apreendida e entregue voluntariamente no Centro de Triagem de Animais Silvestres (Cetas) do Ibama de Juiz de Fora, Minas Gerais. *Atualidades ornitológicas On-line*, núm. 154, p. 55-59, 2010.

GÓMEZ, A.; AGUIRRE, A. A. Infectious Diseases and the Illegal Wildlife Trade. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1149, n. 1, p. 16–19, dez. 2008.

GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C., MOZOS, E., SIERRA, M. A., et al. Inclusion bodies containing adenovirus-like particles in the intestine of a psittacine bird affected by inclusion body hepatitis. *J Wildl Dis.* 28:319–322, 1992.

HARKINEZHAD, T.; VERMINNEN, K.; DE BUYZERE, M. et al. Prevalence of Chlamydia psittaci infections in a human population in contact with domestic and companion birds. *J. Med. Microbiol.*, v. 58, n. 9, p. 1207-1212, 2009.

HARRACH, B. Reptile adenoviruses in cattle? *Acta Veterinaria Hungarica*, 48 (4), p.485-490, 2000.

HERNANDEZ, E. F. T.; CARVALHO, M. S. DE. O tráfico de animais silvestres no Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Human and Social Sciences*, v. 28, n. 2, p. 257–266, 1 dez. 2006.

HESS, M. Aviadenovirus Infections. IN: SWAYNE, D. E., GLISSON, J.R., MCDUGALD, L.R., NOLAN, L. K., SUAREZ, D. L., NAIR, V. L. *Diseases of Poultry*. 13th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. 2013. p. 289–332.

HOGAN, R. J.; MATHEWS, S. A.; MUKHOPADHYAY, S. et al. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect. Immun.*, v. 72, n. 4, p. 1843-1855, 2004.

HOLSBACK, L. et al. Natural infection by endoparasites among free-living wild animals. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 2, p. 302–306, 17 jun. 2013.

HULBERT, C. et al. Survey of captive parrot populations around Port Phillip Bay, Victoria, Australia, for psittacine beak and feather disease virus, avian polyomavirus and psittacine adenovirus. *Australian Veterinary Journal*, v. 93, n. 8, p. 287–292, ago. 2015.

IBAMA 2011. *Relatório Anual do Centro de Triagem de Animais Silvestres –CETAS/MG*. Superintendência do IBAMA em Minas Gerais. Belo Horizonte.

IBAMA 2012. *Relatório Anual do Centro de Triagem de Animais Silvestres –CETAS/MG*. Superintendência do IBAMA em Minas Gerais. Belo Horizonte.

IBAMA 2013. *Relatório Anual do Centro de Triagem de Animais Silvestres –CETAS/MG*. Superintendência do IBAMA em Minas Gerais. Belo Horizonte.

IBAMA 2014. *Relatório Anual do Centro de Triagem de Animais Silvestres –CETAS/MG*. Superintendência do IBAMA em Minas Gerais. Belo Horizonte.

IBAMA 2015. *Relatório Anual do Centro de Triagem de Animais Silvestres –CETAS/MG*. Superintendência do IBAMA em Minas Gerais. Belo Horizonte.

IBAMA 2016. *Relatório Anual do Centro de Triagem de Animais Silvestres –CETAS/MG*. Superintendência do IBAMA em Minas Gerais. Belo Horizonte.

- IBAMA 2017. *Relatório Anual do Centro de Triagem de Animais Silvestres –CETAS/MG*. Superintendência do IBAMA em Minas Gerais. Belo Horizonte.
- IBAMA 2018. *Relatório Anual do Centro de Triagem de Animais Silvestres –CETAS/MG*. Superintendência do IBAMA em Minas Gerais. Belo Horizonte.
- ICMBIO 2011. *Plano de ação nacional para a conservação dos papagaios da Mata Atlântica*. ICMBIO, Instituto Chico Mendes, MMA. Brasília.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomy. *Virus taxonomy*:2018b Release. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
- JACOBSON, E. R., GARDINER C., CLUBB S. Adenovirus-like infection in white-masked lovebirds (*Agapornis personata*). *J Assoc Avian Vet.* 1:32–34, 1989.
- JULIAN, L. *Analysis of Genetic Diversity and Evolution through Recombination of Beak and Feather Disease Virus*. 2012. p. 91. Master of Science in Microbiology. University of Canterbury. New Zealand.
- KALETA, E.F.; TADAY, E.M. Avian host range of *Chlamydophila* spp. Based on isolation, antigen detection e serology. *Avian Pathology*. V. 32, p. 435 – 461, 2003.
- KATOH, H. et al. A novel budgerigar-adenovirus belonging to group II avian adenovirus of Siadenovirus. *Virus Research*, v. 144, n. 1–2, p. 294–297, set. 2009.
- KATOH, H. et al. A Review of DNA Viral Infections in Psittacine Birds. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(9), p. 1099-1106., 16 abr. 2010.
- KHALESI, B. *Studies of beak and feather disease virus infection*. 2007. p. 124. Thesis (Doctor of philosophy). Murdoch University, Austrália.
- KHALESI, B., N. BONNE, M. STEWART, M. SHARP E S. RAIDAL. A comparison of haemagglutination, haemagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease virus infection and a comparison of isolates obtained from loriids. *Journal of General Virology*, 86, 3039-3046. 2005.
- KING, A. M. Q. (Eds.). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London; Waltham, MA: Academic Press, 2012.
- KNITTLER, M. R.; SACHSE, K. *Chlamydia psittaci*: update on an underestimated zoonotic agent. *Pathogens and Disease*, v. 73, n. 1, p. 1–15, 1 fev. 2015.
- LATIMER, K. S., NIAGRO, F. D., WILLIAMS, O. C., et al. Diagnosis of avian adenovirus infections using DNA in situ hybridization. *Avian Dis.* 41:773–782, 1997.
- LEAL, D. C. et al. Ocorrência de *Chlamydophila psittaci* em pombos (*Columba livia*) na cidade de Salvador, Bahia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 67, n. 3, p. 771–776, jun. 2015.

- LEAL, D.C. *Epidemiologia da infecção por Chamydophila psittaci em psitacíformes e columbíformes no Estado da Bahia*. 2013. p. 122. Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos) – Universidade Federal da Bahia.
- LEITE, K.C.E. *Análise da estrutura genética e biologia reprodutiva do papagaio-verdadeiro (Amazona aestiva)*. 2007.63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília.
- LEITE, P. H. A. *Doença do Bico e das Penas dos Psitacídeos*. 2013. p. 40. Trabalho de conclusão de curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de Brasília, Brasília.
- LÜSCHOW, D. et al. Adenovirus of psittacine birds: investigations on isolation and development of a real-time polymerase chain reaction for specific detection. *Avian Pathology*, v. 36, n. 6, p. 487–494, dez. 2007.
- MACIEL, W. C. et al. Isolamento e avaliação do potencial patogênico das cepas de Escherichia coli de psitacídeos provenientes do tráfico ilegal no Ceará. *Ciência Animal*, v.29, n.2, p.36-44, 2019.
- MACKIE, J. T., BLACK, D., PRIOR, H. Enteritis associated with adenovirus-like particles in captive lorikeets. *Aust Vet J*.81:293–295, 2003.
- MAREK, A., BALLMANN, M. Z., KOSIOL, C., HARRACH, B., SCHLÖTTERER, C., HESS, M. Whole-genome sequences of two turkey adenovirus types reveal the existence of two unknown lineages that merit the establishment of novel species within the genus Aviadenovirus. *Journal of General Virology*, 95, 156–170. 2014.
- MARTINS, N. R. S.; RESENDE, J. S. *Enfermidades Virais – Adenovirus, reovirose, rotavírus e vírus intestinais*. In: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D. *Doenças das aves*. 2ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 677-712.
- MARTINS, N. R. S.; GÓMEZ, S. Y. M. *Adenovírus, reovírus, rotavírus e outras viroses intestinais*. In: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D. *Doenças das aves*. 3ed. Campinas: FACTA, 2020. p. 799-843
- MATOS, L.S.S. *Hierarquia e estresse social em papagaio-verdadeiro (Amazona aestiva - Linnaeus, 1758) fora da estação reprodutiva*. 2016. 113 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
- MATSUI, T., NAKASHIMA, K., OHYAMA, T., KOBAYASHI, J., ARIMA, Y., KISHIMOTO, T., OGAWA, M., CAI, Y., SHIGA, S., ANDO, S., KURANE, I., TABARA, K., ITAGAKI, A., NITTA, N., FUKUSHI, H., MATSUMOTO, A., OKABE, N. An outbreak of psittacosis in a bird park in Japan. *Epidemiology & Infection*.v. 136, p. 492-495, 2008.
- MCFERRAN, J. B., CONNOR T.J., MCCRACKEN R.M. Isolation of adenoviruses and reoviruses from avian species other than domestic fowl. *Avian Dis.*; 20:519– 524, 1976.
- MCFERRAN, J.B.; SMYTH, J.A. Avian adenoviruses. *Revue Scientifique Et Technique. International Office of Epizootics*, v.19, n., p. 589–601, 2000.

MELLO, E. R. D. *Aves recebidas no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) de Seropédica, Rio de Janeiro, 2008 a 2014: diagnóstico e análise*. 2016. p. 97. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Universidade Rural do Rio de Janeiro.

MELO FILHO, A. A. *Doença do bico e das penas em papagaio verdadeiro: relato de caso*. 2019. P. 26. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Medicina Veterinária) - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos,

METTIFOGO, E. et al. Fowl adenovirus Group I as a causal agent of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome (IBH/HPS) outbreak in brazilian broiler flocks. *Pesq. Vet. Bras.* vol.34, n.8, p.733-737. 2014.

MFENYANA, N. *The Isolation and characterisation of a Psittacine Adenovirus from infected parrots in South Africa*. 2007. p. 91. Magister Scientiae (Faculty of Natural and Agricultural Sciences) University of the Free State Bloemfontein, South Africa.

MOHAN, R. Epidemiologic and laboratory observations of Chlamydia psittaci in pet birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 184, n. 11, p. 1372- 1374, 1984.

MONSALVE S.; MIRANDA J.; MATTAR S. Primera evidencia de circulación de Chlamydia psittaci en Colombia: posible riesgo de salud pública. *Revista de salud pública*.v. 13, n. 2, p 314-326, 2011.

ORIGLIA, J. A. et al. Detection and molecular characterization of Chlamydia psittaci and Chlamydia abortus in psittacine pet birds in Buenos Aires province, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 51, n. 2, p. 130–135, abr. 2019.

ORTIZ-CATEDRAL, L. et al. A new isolate of beak and feather disease virus from endemic wild red-fronted parakeets (*Cyanoramphus novaezelandiae*) in New Zealand. *Archives of Virology*, v. 155, n. 4, p. 613–620, abr. 2010.

PAGANO, I. S. DE A. et al. Aves depositadas no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA na Paraíba: uma amostra do tráfico de aves silvestres no estado. *Ornithologia*3 (2):132-144, dez. 2009.

PASS D. A. Inclusion bodies and hepatopathies in psittacines. *Avian Pathol.* 16:581–597, 1987.

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

PEREIRA, C. G. *Aviadenovirus na avicultura industrial, familiar e vacinas comerciais em minas gerais: detecção por reação em cadeia pela polimerase e avaliação histopatológica*.2011.40 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais.

PEREIRA, C.G.; MARIN, S.Y.; SANTOS, B.M.; RESENDE, J.S.; RESENDE, M.; GOMES, A.M.; MARTINS, N.R.S. Occurrence of Aviadenovirus in chickens from the poultry industry of Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.66, p.801 - 808, 2014

PHALEN, D. N. et al. A survey of a mixed species aviary provides new insights into the pathogenicity, diversity, evolution, host range, and distribution of psittacine and passerine adenoviruses. *Avian Pathology*, v. 48, n. 5, p. 437–443, 3 set. 2019.

- PHALEN, D. N. Implications of viruses in clinical disorders. In HARRISON G. J., LIGHTFOOT, T. L. *Clinical Avian Medicine*, Palm Beach: Spix Publishing. 2006. p. 721-746.
- PIASECKI, T.; WIELICZKO, A. Detection of beak and feather disease virus and avian polyomavirus dna in psittacine birds in poland. *Bull Vet Inst Pulawy*, 54, 141-146, 2010
- PIÇARRA, J. P. S. C. et al. *Estudo sobre a detecção do circovirus aviário em psitacídeos domésticos na região de Barcelona – Espanha*. 2009. p. 42. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- PIRES, S. F. A CRAVED Analysis of Multiple Illicit Parrot Markets in Peru and Bolivia. *European Journal on Criminal Policy and Research*, v. 21, n. 3, p. 321–336, set. 2015.
- PIRES, S. F. The illegal parrot trade: a literature review. *Global Crime*, v. 13, n. 3, p. 176–190, ago. 2012.
- PIRES, S. F.; MORETO, W. D. The Illegal Wildlife Trade. *Oxford University Press*, v.1, 2016.
- PIRES, S. F.; SCHNEIDER, J. L.; HERRERA, M. Organized crime or crime that is organized? The parrot trade in the neotropics. *Trends in Organized Crime*, v. 19, n. 1, p. 4–20, mar. 2016.
- PITCOVSKI, J., MUALEM, M., REI-KOREN, Z., KRISPEL, S., SHMUELI, E., PERETZ, Y., et al. The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus. *Virology*, 249, p.307-315, 1998.
- RAMIS, A., MARLASCA M. J., MAJO N., FERRER L. Inclusion body hepatitis (IBH) in a group of eclectus parrots (*Eclectus roratus*). *Avian Pathol.*21:165–169, 1992.
- RASO, T. DE F. et al. An Outbreak of Chlamydiosis in Captive Blue-Fronted Amazon Parrots (*Amazona aestiva*) in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 35, n. 1, p. 94–96, 2004.
- RASO, T. F. Clamidiose. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*. 1ed. São Paulo: ROCA, 2007 p. 760-767.
- RASO, T. F. et al. Psittacosis domiciliary outbreak associated with monk parakeets (*Myiopsitta monachus*) in Brazil: need for surveillance and control. *JMM Case Reports*, v. 1, n. 3, 1 set. 2014.
- RASO, T. F.; BERCHIERI JR., A.; PINTO, A. A. Evidence of Chlamydomphila psittaciinfection in captive amazon parrots in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. v.33, p.118-121, 2002.
- RASO, T. F.; CARRASCO, A. O. T.; SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; PINTO, A. A. Seroprevalence of Antibodies to Chlamydomphila psittaci in zoo Workers in Brazil. *Zoonoses and Public Health*. v.57, p.411-416, 2010.
- RASO, T. F.; SEIXAS, G. H. F.; GUEDES, N. M. R. et al. Chlamydomphila psittaci in freelifving Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet. Microbiol.*, v. 117, p. 235-241, 2006.

RAUE, R.; GERLACH, H.; MÜLLER, H. Phylogenetic analysis of the hexon loop 1 region of an adenovirus from psittacine birds supports the existence of a new psittacine adenovirus (PsAdV). *Archives of Virology*, v. 150, n. 10, p. 1933–1943, 3 out. 2005.

RAUE, R.; JOHNE, R.; CROSTA, L. et al. Nucleotide sequence analysis of a C1 gene fragment of psittacine beak and feather disease virus amplified by real-time polymerase chain reaction indicates a possible existence of genotypes. *Avian Path.*, v.33, p.41-50, 2004.

RENTAS (Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres). 1º relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre. Brasília: Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres (Rentas). 108p. 2002.

RITCHIE, B. W. Circoviridae. In: RITCHIE, B. W. *Avian Viruses, Function and Control*. Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida, 1995. p. 223-252.

RITCHIE, B. W.; NIAGRO, F. D.; LUKERT, P. D. et al. Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology*, v.171, n., p.83–88, 1989.

RITCHIE, B.W., CARTER, K. Adenoviridae. In: RITCHIE, B. W. *Avian Viruses, Function and Control*. Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida, 1995. p. 303-330.

RIVERA, S., WELLEHAN, J.F.X., MCMANAMON, R., INNIS, C.J., GARNER, M.M., RAPHAEL, B.L., et al. An epizootic in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forstenii*) caused by a novel Siadenovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21, p.415-426, 2009.

ROCHA, F. M. Tráfico de animais silvestres no Brasil – Fundo Mundial para a Natureza (WWF). Documento para discussão. 1995.

ROCHA, M. DA S. P. et al. Aspectos da comercialização ilegal de aves nas feiras livres de Campina Grande, Paraíba, Brasil. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, vol. 6, núm. 2, p. 204-221, 2006.

RODRIGUES, L.S.F. *Treinamento antipredação de papagaios verdadeiros - A. aestiva (Linnaeus, 1758)*. 2013. 48p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Biomas Tropicais do Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

ROMANOVA, N.; CORREDOR, J. C.; NAGY, E. Detection and quantitation of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. *J. Virol. Methods*, v. 159, n. 1, p. 58– 63, 2009.

SACHSE K, LAROUCAU K, VORIMORE F. DNA microarray genotyping of Chlamydophila psittaci strains from culture and clinical samples. *Vet. Microbiol.*, v. 135, p. 22-30, 2009.

SACHSE K, LAROUCAU K, VANROMPAY D. Avian chlamydiosis. *Curr Clin Microbiol Rep*; 2:10-21, 2015.

SACHSE, K.; LAROUCAU, K.; VORIMORE, F. et al. DNA microarray genotyping of Chlamydophila psittaci strains from culture and clinical samples. *Vet. Microbiol.*, v. 135, p. 22-30, 2009.

SANCHES, T.S. *Causa de morte em Passeriformes: comparação entre aves de vida livre residentes na região metropolitana de São Paulo e aves oriundas do tráfico*. 2008.186 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental Comparada) USP – São Paulo.

SANTOS, E. *Pássaros do Brasil: Vida e Costumes. Coleção Zoológica Brasileira (5ed)*. Belo Horizonte: Itatiaia Limitada, 312 p. 1985.

SCARLATA, E., SALGUERO, J. J., HERVÁS, J., CHACON, F., DE LARA, M., JAHN, J., GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C. Filamentous intranuclear inclusion bodies in psittacine birds. A structural and ultrastructural study. *J. Vet. Med.*, Vol. 46, 375-380, 1999.

SCHACHNER, A. et al. Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control – a review on the current global situation. *Avian Pathology*, v. 47, n. 2, p. 111–126, mar. 2018.

SCHADE, B., SCHMITT, F., BÖHM, B., ALEX, M., FUX, R., CATTOLI, G., TERREGINO, C., MONNE, I., CURRIE, R. J. W., OLIAS, P. Adenoviral gizzard erosion in broiler chickens in Germany. *Avian Diseases*, 57: 159–163. 2013.

SCOTT, P. C., CONDRON R. J., REECE R.L. Inclusion body hepatitis associated with adenovirus-like particles in a cockatiel (*Psittaciformes*; *Nymphicus hollandicus*). *Aust Vet J.* ,63:337–338, 1986.

SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. 4 ed. Editora Nova Fronteira: Rio de Janeiro, 1997. p. 912.

SIQUEIRA, R. A. S.; DE LUCENA, R. B.; ALMEIDA, T. et al. Aspectos clinico-patológicos em papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*, L., 1758) oriundos de apreensões do tráfico no estado da Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(4):439444, 2016.

STORZ, J., and PAGE, L. Taxonomy of the Chlamydiae: Reasons for Classifying Organisms of the Genus Chlamydia, Family Chlamydiaceae, in a Separate Order, Chlamydiales ord. *International Journal of Systematic Bacteriology*.p. 332-334, 1971.

TELFER, B.L. et. Al. Probable Psittacosis Outbreak Linked to Wild Birds. *Emerg. Infect. Dis.*, v.11, n. 3, p.391-397, 2005.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-1. <www.iucnredlist.org>. Acesso em 03.09.2018.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-3. <www.iucnredlist.org>. Acesso em 15.02.2020.

TO, K. K. W. et al. A Novel Psittacine Adenovirus Identified During an Outbreak of Avian Chlamydiosis and Human Psittacosis: Zoonosis Associated with Virus-Bacterium Coinfection in Birds. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 12, p. e3318, 4 dez. 2014.

VALL-LLOSERÀ, M.; CASSEY, P. ‘Do you come from a land down under?’ Characteristics of the international trade in Australian endemic parrots. *Biological Conservation*, v. 207, p. 38–46, mar. 2017.

- VANROMPAY, D.; DUCATELLE R.; HAESEBROUCK, F. Chlamydia psittaci infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet. Microbiol.*, v. 45, p. 93-119, 1995.
- VARSANI, A.; REGNARD, G. L.; BRAGG, R.; HITZEROTH, I. I.; RYBICKI, E. P. et al. Global genetic diversity and geographical and host-species distribution of beak and feather disease virus isolates. *Journal of General Virology*. Christchurch. p.752-767, 2011.
- VASCONCELOS, T. C. B. DE et al. Chlamydia psittaci in captive blue-and-gold macaws (*Ara ararauna*) in a triage center of wild animals in Brazil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 23, n. 1-2, p. 37-41, 2016.
- VASCONCELOS, T. C. B.; NOGUEIRA, D. M.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, E. R., BRUNO, S. F. Chlamydia Psittaci Em Aves Silvestres E Exóticas: Uma Revisão Com Ênfase Em Saúde Pública. *Enciclopédia Biosfera*. Goiânia, v.9, p.2463 - 2477, 2013.
- VAZ, F. F. et al. Survey of pathogens in threatened wild red-tailed Amazon parrot (*Amazona brasiliensis*) nestlings in Rasa Island, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 4, p. 747-753, out. 2017.
- VILELA, D. A. R. *Diagnóstico de situação dos animais silvestres recebidos nos CETAS brasileiros e Chlamydia psittaci em papagaios (Amazona aestiva) no CETAS de Belo Horizonte, MG*. 2012. 108 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.
- VILELA, D. A., MARÍN, S. Y., RESENDE, M., COELHO, H. L., RESENDE, J. S., FERREIRA-JÚNIOR, F. C., ORTIZ, M. C., ARAÚJO, A. V., RASO, T. F., MARTINS, N. R. Phylogenetic analyses of Chlamydia psittaci ompA gene sequences from captive Amazona aestiva (Aves: Psittaciformes) with hepatic disease. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2019;38(3):2.
- VOGELSTEIN, B., GILLESPIE, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76. 615-619. 1979.
- WELLEHAN, J. F. X. et al. Identification and Initial Characterization of an Adenovirus Associated with Fatal Hepatic and Lymphoid Necrosis in a Meyer's Parrot (*Poicephalus meyeri*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 19, n. 3, p. 191-197, set. 2005.
- WELLEHAN, J. F. X. et al. Siadenovirus infection in two psittacine bird species. *Avian Pathology*, v. 38, n. 5, p. 413-417, out. 2009.
- WELLEHAN, J. F. X., JOHNSON, A. J., HARRACH, B., BENKÓ, M., PESSIER, A. P., JOHNSON, C. M., et al. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *Journal of Virology*, 78, p.13366-13369, 2004.
- WERTHER, K., RASO, T.F., DURIGON, E. L., LATIMER, K. S., CAMPAGNOLI, R. P. Description of the first case of psittacine beak and feather disease in Brazil. *Proceedings of the International Virtual Conferences in Veterinary Medicine: Diseases of Psittacine Birds*; 1998.
- WESTON, M. K.; MEMON, M. A. The Illegal Parrot Trade in Latin America and its Consequences to Parrot Nutrition, Health and Conservation. *Bird Populations* 9:76-83, 2009.

WOODFORD, M. H. Quarantine and health screening protocol for wildlife prior to translocation and release into the wild. *Wildlife Disease and Zoonotics*. DigitalCommons@University of Nebraska - Lincoln. 2000.

YANG, N. et al. Psittacid Adenovirus-2 infection in the critically endangered orange-bellied parrot (*Neophema chrysogaster*): A key threatening process or an example of a host-adapted virus? *PLOS ONE*, v. 14, n. 2, p. e0208674, 27 fev. 2019.

YPELAAR, I.; BASSAMI M. R., WILCOX, G. E. A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Vet. Microbiol.*, v.68, p.141-148, 1999.

ZADRAVEC, M., RAČNIK, J., SLAVEC, B., BALLMANN, M., MARHOLD, C., HARRACH, B., ROJS, O. Z. Detection of new adenoviroses in psittacine birds in Slovenia. *IX Simpozij Peradarski dani*. Sibenik, Croatia. p. 131–134. 2011.