

Alessandra Vitelli de Araujo

**DOENÇA DO BICO E DAS PENAS: AVALIAÇÃO EM PSITACÍDEOS
NATIVOS APREENDIDOS EM MINAS GERAIS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2011**

Araujo, Alessandra Vitelli de, 1984-
A663d Doença do bico e das penas: avaliação em psitacídeos nativos apreendidos em Minas
Gerais / Alessandra Vitelli de Araujo. – 2011.

58 p. : il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária

Inclui bibliografia

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

CDD – 636.686 5

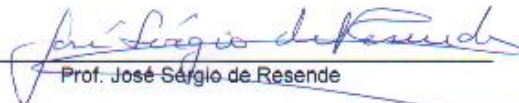
Dissertação defendida e aprovada em 11 de março de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Presidente



Profª. Tânia de Freitas Raso



Prof. José Sérgio de Resende

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre sonharam os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por permitir o convívio com uma família e pessoas maravilhosas.

Aos meus pais pelo apoio incondicional às minhas escolhas, pelo carinho e amor, por me entender e respeitar.

Ao meu avô Adair (*in memoriam*) e à minha avó Neusa, por serem mais que avós, meus segundos pais.

Aos tios e tias, primos e primas, especialmente à tia Lau, ao tio Zé e à tia Maria.

Aos amigos tão importantes em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Minas Gerais e à Escola de Veterinária, pela oportunidade para realização desse trabalho de mestrado e ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao meu orientador, Professor Nelson Rodrigo da Silva Martins, pelos ensinamentos, pela paciência, experiência e exemplo de profissional e pessoa.

Ao Professor José Sérgio de Resende pela presença sempre constante, pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos.

Às Professoras Bernadete Miranda dos Santos, Tania Raso, Roselene Ecco e ao Professor Maurício Resende pela ajuda nas interpretações dos resultados, materiais e reagentes cedidos e pelos ensinamentos.

Aos colegas do Setor de Doença das Aves, em especial à Danielle Andery pela cumplicidade, companhia, amizade e participação de momentos importantes durante esses dois anos, à Sandra Marin pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e amizade durante todo o período do mestrado, ao Daniel Vilela, por ter aberto as portas do IBAMA, pelos ensinamentos, participação nas análises laboratoriais e amizade, aos amigos Marcus Vinícius, Francisco Carlos (Chiquinho), Marcela Ortiz, Rogério Donatti, Flávio Resende, André Fernandes, Claiton Pereira, Renata Rios, Alexis Gomes, Carolina Galvão, Letícia, Carolina, Bárbara Tocantins e ao funcionário Cláudio Rocha Públio, pelos bons momentos vividos.

Ao Bruno Dos Santos Alves Figueiredo Brasil pelo sequeciamento dos materiais e ajuda nas interpretações e submissões ao *Genbank*.

“COMECE FAZENDO O QUE É NECESSÁRIO, DEPOIS O QUE É POSSÍVEL, E DE REPENTE VOCÊ ESTARÁ FAZENDO O IMPOSSÍVEL.”

São Francisco de Assis

Sumário

	RESUMO	10
	ABSTRACT	10
1	INTRODUÇÃO	11
1.1	PSITTACIFORMES.....	11
1.2	DOENÇA DO BICO E DAS PENAS (Pbfd).....	13
1.2.1	A DOENÇA.....	13
1.2.2	HISTÓRICO.....	14
1.2.3	ETIOLOGIA.....	14
1.2.4	EPIDEMIOLOGIA.....	18
1.2.5	PATOGENIA E TRANSMISSÃO.....	20
1.2.6	SINAIS CLÍNICOS.....	22
1.2.7	DIAGNÓSTICO.....	24
1.2.7.1	DIAGNÓSTICO SUGESTIVO E CONFIRMATÓRIO.....	24
1.2.7.2	HISTOPATOLOGIA.....	24
1.2.7.3	HEMAGLUTINAÇÃO E INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (HA E HI).....	25
1.2.7.4	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	25
1.2.7.5	HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	26
1.2.8	DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS.....	26
1.2.9	TRATAMENTO E PROFILAXIA.....	27
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	LOCAL DE EXECUÇÃO DO PROJETO.....	28
3.2	AVES.....	28
3.3	AMOSTRAGEM.....	29
3.4	CONTENÇÃO DAS AVES.....	29
3.5	EXTRAÇÃO DO DNA.....	29
3.6	DETERMINAÇÃO ESPECTOFOTOMÉTRICA DE CONCENTRAÇÃO DO DNA....	30
3.7	CONDIÇÕES DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DE PARTE DO GENOMA DO CIRCOVÍRUS DOS PSITACÍDEOS.....	30
3.8	ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS EM PCR.....	31
3.9	SEQUENCIAMENTO.....	32
3.9.1	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	32
3.9.2	MONTAGEM E EDIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTIDICAS.....	32
3.9.3	BUSCA DAS SEQUÊNCIAS SIMILARES EM BANCOS DE DADOS.....	32
3.9.4	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS.....	33
3.9.5	ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	33
3.10	HISTOPATOLOGIA.....	33
3.11	PREVALÊNCIA.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	PCR.....	34
4.2	SEQUENCIAMENTO.....	40
4.2.1	ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DEDUZIDA DE AMINOÁCIDOS.....	40
4.2.2	ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	41
4.3	HISTOPATOLOGIA.....	43
4.4	PREVALÊNCIA.....	47
5	CONCLUSÕES	49
6	BIBLIOGRAFIA	50
7	ANEXOS	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Locais de coleta, número e tipo de amostra e porcentagem de aves positivas para PBFD.....	35
Tabela 2 -	Número de amostras e porcentagem de positivos para PBFD por tipo de material coletado.....	35
Tabela 3 -	Avaliação clínica e detecção molecular do DNA de BFDV por PCR em psitacídeos com problemas de empenamento.....	36
Tabela 4 -	Similaridade de nucleotídeos do gene da proteína VP1 nos isolados brasileiros comparados com estipes descritas em outros países.....	43
Tabela 5 -	Similaridade entre aminoácidos dos genes da proteína VP1 nos isolados brasileiros comparados com outros encontrados no mundo.....	44
Tabela 6 -	Prevalência de BFDV por PCR, tendo em conta os grupos taxonômicos.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Papagaios brasileiros considerados ameaçados, de acordo com a IUCN <i>Red List</i>	13
Quadro 2 -	Espécies do gênero <i>Circovirus</i> que afetam aves.....	16
Quadro 3 -	Características físicas e químicas de CAV e BFDV.....	16
Quadro 4 -	Espécies de aves que podem ser infectadas pelo BFDV mundialmente.....	19
Quadro 5 -	Prevalências de PBFD em diferentes países (Piçarra, 2009 modificado).....	20
Quadro 6 -	Causas de perda de penas em psitacídeos (Piçarra, 2009).....	27
Quadro 7 -	Locais de coleta, número e tipo de amostras dos psitacídeos.....	29
Quadro 8 -	Iniciadores, sequências de bases e localização genômica dos primers utilizados no estudo.....	31
Quadro 9 -	Alterações macro e microscópicas em papagaios <i>Amazona aestiva</i> positivos por PCR para o vírus da doença do bico e das penas.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Micrografia eletrônica de partículas do vírus da PBFD negativamente coradas (Kondiah, 2004).....	15
Figura 2 -	Apresentação esquemática do genoma BFDV. ORFs são rotuladas de acordo com sua localização sobre o vírus (V) ou complementares (C). Apenas as duas principais ORFs codificando a proteína Rep (ORF V1) e da proteína capsidial (ORF C1) são mostradas. (Niagro <i>et al.</i> , 1998).....	17
Figura 3 -	Posição e orientação dos primers utilizados para a amplificação de ORF1 do genoma do BFDV.....	32
Figura 4 -	Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo mostrando o segmento esperado de 717 pb da ORF 1, de produtos amplificados de amostras de fígado de <i>Amazona aestiva</i> . Canaletas PM peso molecular (100 pb), C+ controle positivo, C- controle negativo, 1, 2, 3, 4 e 5 amostras de campo.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 5 -	Arara Canindé (<i>Ara ararauna</i>) do CETAS de Belo Horizonte positiva para PBFV segundo PCR.....	37
Figura 6 -	Arara Canindé (<i>Ara ararauna</i>) com penas disformes, quebradiças, ausência de penas na asa.....	37
Figura 7 -	Arara Canindé (<i>Ara ararauna</i>) com penas distróficas, ausência e quebra de penas, especialmente visíveis na cauda.....	38
Figura 8 -	<i>Psittacula krameri</i> (Ring Neck) positiva para BFDV por PCR e sequenciamento. Ave com ausência de penas na região toraco-abdominal com 1 ano de idade e infecção crônica.....	38
Figura 9 -	Dendograma construído pelo método de “neighbor-joining”, usando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura-2 parâmetro, implementado no programa Mega 5.0. Os números representam os valores de Bootstrap (1000 reamostragens) em que >70 são considerados confiáveis. Amostras deste identificadas com BH 632 e BH 215.....	41
Figura 10 -	Agrupamento entre amostras de PBFV do presente estudo e de outras partes do mundo depositadas no GenBank com base no segmento de 210 aminoácidos da região que codifica a proteína VP1. O dendograma foi construído pelo método de “neighbor-joining”, usando modelo de substituição de aminoácido do JTT implementados no programa MEGA 5.0. Os valores de reprodutibilidade das análises estão apresentados em porcentagens e são referentes a 1000 repetições (Bootstrap).....	41
Figura 11a	Fígado ave 412. Áreas com infiltrado linfoplasmocitário perivascular.	46
Figura 11b -	Fígado ave 412. Áreas com infiltrado linfoplasmocitário e hepatócitos com coloração amarelada sugestiva de hemossiderina.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APV	<i>Avian polyomavirus</i>
BFDV	<i>Beak and feather disease virus</i>
Bp	Pares de Base
CaCV	Circovírus de canário
CAV	<i>Chicken anemia vírus</i>
CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CITES	Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção
Cm	Centímetro
CyCV	Circovírus de Cisne
g/dl	Gramas por decilitros de volume
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Trifosfato Deoxyribonucleotídeo
DuCV	Circovírus de pato
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
EV	Escola de Veterinária
FiCV	Circovírus de tentilhão

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GoCV	Circovírus de ganso
GuCV	Circovírus de gaivota prateada
HA	Hemaglutinação
HAU	Unidades de hemaglutinação
Hb	Concentração de hemoglobina
HI	Inibição da hemaglutinação
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
ICB	Instituto de Ciências Biológicas (UFMG)
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IM	Intramuscular
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza
kb	Milhares de pares de bases de nucleotídeos
kDa	Kilodalton
KOH	Hidróxido de Potássio
Mg ²⁺	Íons de magnésio
Min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM -	Millimolar
M	Molar
N	Normalidade
nm	Nanômetro
n °	Número
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBFD	<i>Psittacine beak and feather disease</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PiCV	Circovírus de Pombo
RaCV	Circovírus de corvo australiano
RT-PCR	PCR em tempo real
Rpm	Rotações por minuto
S	Segundos
ss-DNA	DNA fita simples
StCV	Circovírus de estorninho
TE	Tris-EDTA
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta

RESUMO

Um estudo de ocorrência da doença do bico e das penas (PBFD) foi desenvolvido em psitacídeos mantidos em centro de triagem de animais silvestres (CETAS-IBAMA) pela detecção do genoma do vírus da PBFD (BFDV) por PCR em fígados (n=140), sangue (n=46) ou swab cloacal (n=144), sendo parte das aves estudada em mais de uma amostra. Foram avaliadas 190 aves, sendo 12 positivas para o genoma de BFDV. A prevalência de BFDV foi de 6,2% em *Amazona aestiva* e 33,3% em *Ara ararauna*. Não foi detectado o DNA de BFDV no fígado de *Aratinga leucophthalma*, *Pionus maximiliani*, *Guarouba guarouba*, *Amazona amazonica*, *Amazona vinacea*, *Amazona rhodochoryta* e *Anodorhynchus hyacinthinus*. Na grande maioria dos casos de alopecia não foi detectado BFDV. A histopatologia dos fígados foi inconclusiva. Houve similaridade de 98% entre as sequências das estirpes locais com sequências de isolados descritos na África do Sul, Áustria e Japão, podendo ser estirpes de ocorrência mundial, potencialmente chegadas ao Brasil com o comércio legal e ilegal de psitacídeos. As sequências das estirpes de BFDV brasileiras BH 215 e BH 732 foram depositadas no GenBank (JQ649409 e JQ649410). Não foi possível relacionar a infecção pelo BFDV com a origem geográfica das aves. Os índices de ocorrência, embora semelhantes aos encontrados por outros autores, apresentam tendência para mais elevados, condição, possivelmente, em parte relacionada ao estresse e concentração de aves em confinamento.

Palavras chave: psitacídeos, doença do bico e das penas, vírus.

ABSTRACT

A study of psittacine beak and feather disease (PBFD) occurrence was conducted in parrots captive at a rescue and triage center for wild animals (CETAS-IBAMA), using genomic detection of PBFD virus (BFDV) DNA by PCR in blood (n=46), cloacal swab (n=144) or liver (n=140), being part of birds evaluated by more than one sample. Out of 190 birds studied, results indicated 12 positive for BFDV DNA, with a prevalence of 6.2% in *Amazona aestiva* (n=160) and 33.3% in *Ara ararauna* (n=3). No BFDV DNA was detected in livers of *Aratinga leucophthalma*, *Pionus maximiliani*, *Guarouba guarouba*, *Amazona Amazonica*, *Amazona vinacea*, *Amazona rhodochoryta* and *Anodorhynchus hyacinthinus*. In most cases alopecia was not associated to BFDV in liver. The histopathology of the livers was inconclusive. There were 98% similarity between sequences of strains isolated sites with sequences described in South Africa, Austria and Japan, may be strains of worldwide occurrence, potentially coming to Brazil with the legal and illegal trade of parrots. The sequences of Brazilian strains of BFDV BH 215 and BH 732 were deposited in GenBank. It was not possible to relate the BFDV infection with the geographical origin of birds. The rates of detection, although similar to other studies, indicate for a tendency of elevation, possibly associated to the stress and bird concentration in captivity.

Keywords: psittacine, beak and feather disease, virus.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a doença do bico e das penas em psitacídeos (*psittacine beak and feather disease* - Pbfd) tem disseminação mundial. Foi relatada primeiramente no continente australiano onde também é a doença viral mais comum em psitacídeos selvagens (Bassami *et al.*, 2001) e disseminou-se em psitacídeos de companhia na Ásia, Europa, África, América do Norte e América do Sul, como resultado do comércio mundial de aves (Borthwick, 2005).

A infecção pelo vírus da Pbfd (BFDV) é enzoótica nas populações selvagens de cacatuas australianas (Borthwick, 2005). Embora a origem geográfica da doença esteja por se determinar, pode ser potencialmente originária do continente africano, nos gêneros *Poicephalus* e *Agapornis* (Heath *et al.*, 2004; Khalesi *et al.*, 2005). Inclusões virais semelhantes à Pbfd foram demonstradas em pombos da rocha (*Columba livia*) em 1986, antes da primeira descrição do vírus, podendo sugerir outra origem da infecção, assim como psitacídeos em ilhas do Pacífico Sul (Woods *et al.* 1994; Kaleta, 2007).

A doença foi também documentada em aves nativas da Europa e América. O comércio mundial de aves nativas australianas está proibido desde os anos 50, sendo as populações mundiais derivadas desta época (McOrist *et al.*, 1984; Piçarra, 2009) e foi há pouco tempo relatada no Brasil, em *Cacatua alba* com lesões compatíveis no estado de São Paulo. Há aparente alta disseminação de BFDV em psitacídeos exóticos em outros países, e talvez no Brasil, tendo em vista os relatos prévios e não publicados (Werther *et al.*, 1998).

Na Austrália foi estabelecido um programa governamental para conter a dispersão e prejuízo ambiental relacionado com o

BFDV, com as espécies *Agapornis* de Peito-Preto (*Agapornis nigrigenis*), Papagaio do Cabo (*Poicephalus robustus*) e Periquito-andorinha (*Lathamus discolor*) que correm risco de extinção pela Pbfd (Borthwick, 2005).

Foram descritas infecções por BFDV em cacatuas, papagaios ecletus (*Ecletus roratus*), periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e lorídeos na Australásia e ilhas do oceano pacífico, sendo os papagaios cinza-africano (*Psittacus erithacus*) e os agapornis (*Agapornis* spp.) as espécies africanas mais afetadas (Bassami *et al.*, 2001)..

No Brasil a doença adquire crescente importância para a conservação das espécies, reabilitação de aves e especialmente devido aos grandes contingentes apreendidos do tráfico (aves que são mantidas por um período de tempo em triagem). Alguns criatórios comerciais comumente mantêm em proximidade, as aves em reabilitação nativas e as aves comerciais exóticas, potencialmente portadoras. O risco de BFDV tem sido considerado como agravante em aves estressadas, com outras infecções e parasitas e com transtornos nutricionais.

O presente estudo teve por objetivo determinar a ocorrência de Pbfd em psitacídeos silvestres em reabilitação no Centro de Triagem (CETAS/ IBAMA) e da rotina do Laboratório de Doenças das Aves da UFMG no estado de Minas Gerais, utilizando uma técnica de PCR específica para a detecção do DNA de BFDV viral em aves naturalmente infectadas.

1.1. Psittaciformes

As aves psittaciformes são distinguidas das outras ordens de aves devido às suas características físicas e filogenéticas e, atualmente, incluem 332 espécies e 78

gêneros, tendo como representantes principais as araras, papagaios, cacatuas e maritacas. O Brasil é o país mais rico do mundo em espécies na família Psittacidae (84 espécies), possuindo desde o menor exemplar (tuim com 12 cm) até o maior representante (a arara-azul, com 1 m de comprimento) sendo que 16 (*Amazona brasiliensis* - Papagaio-da-cara-roxa; *Amazona pretrei* - Papagaio-charão; *Amazona rhodocorytha* - Chauá; *Amazona vinacea* - Papagaio-de-peito-roxo; *Anodorhynchus glaucus* - Arara-azul-pequena; *Anodorhynchus hyacinthinus* - Arara-azul-grande; *Anodorhynchus leari* - Arara-azul-de-lear; *Cyanopsitta spixii* - Ararinha-azul; *Guaruba guarouba* - Ararajuba; *Pyrrhura anaca* - Cara-suja; *Pyrrhura cruentata* - Fura-mato; *Pyrrhura lepida coerulescens* - Tiriba-pérola; *Pyrrhura lepida lepida* - Tiriba-pérola; *Pyrrhura leucotis* - Tiriba-de-orelha-branca; *Pyrrhura pfrimeri* - Tiriba-de-orelha-branca; *Touit melanonota* - Apuim-de-cauda-vermelha) espécies de psitacídeos estão vulneráveis ou ameaçadas de extinção (Brasil, 2003). Duas espécies estão em condição pior: a Arara-azul-pequena desaparecida da natureza nos últimos 50 anos e considerada extinta, e a Ararinha-azul, extinta na natureza. Em Minas Gerais, 5 espécies de ocorrência natural estão ameaçadas de extinção: *Amazona rhodocorytha* - Chauá; *Amazona vinacea* - Papagaio-de-peito-roxo; *Anodorhynchus hyacinthinus* - Arara-azul-grande; *Pyrrhura cruentata* - Fura-mato e *Pyrrhura leucotis* - Tiriba-de-orelha-branca (Brasil, 2003).

Dentre as espécies brasileiras destaca-se o gênero *Amazona*, que segundo Sick (1997) é composto por 28 espécies, muitas delas em processo de extinção. As principais características que as distinguem psitacídeos das outras famílias de aves são o fato de serem aves zigodáctilas (possuem nos membros pélvicos dois dedos orientados cranealmente e dois dedos orientados caudalmente), terem o bico

adunco e de grandes dimensões e possuírem uma região denominada cera, onde se abrem as narinas (Forshaw e Knight, 2006).

Algumas espécies consideradas silvestres vêm sendo criadas como domésticas aumentando a demanda de “novos pets” nas clínicas, destacando-se o papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) (Goulart, 2006). O papagaio-verdadeiro é a espécie mais popular deste gênero por ser uma ave sociável, relativamente inteligente e capaz de imitar palavras humanas (Sick, 1997; Piçarra, 2009). Atualmente está classificado no anexo II do CITES (Convenção Internacional para o Tratado contra o Tráfico de Animais Silvestres), não sendo, portanto, espécie considerada criticamente ameaçada.

O papagaio-verdadeiro sempre foi presença comum nos lares do Brasil, apesar da legislação de fauna vigente, que desde 1967 (lei nº 5.197 de 3 de janeiro de 1967) proíbe a captura de animais para comércio. Em 1997, o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis - IBAMA - criou as portarias 117 e 118- de 15 de outubro de 1997 que permitiram a criação de animais da fauna silvestre nacional para fins comerciais. Desde então, um número crescente de criadores vêm investindo na criação de aves silvestres (Goulart, 2006). Atualmente, a lista de aves que podem ser comercializadas está sendo reelaborada pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis - IBAMA - e deverá constar nelas as espécies de psitacídeos que poderão ser criadas em cativeiro para comercialização com mudanças na lista antiga.

A destruição de habitats e a captura em massa de aves silvestres levaram a ameaça da conservação ou mesmo à extinção de muitas espécies e muitos psitacíformes foram incluídos no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional

das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção (CITES, 2009). Por esta razão a sua captura está proibida, exceto em situações particulares que a justifiquem, e somente os animais acompanhados de certificados de origem podem ser comercializados e mantidos fora do habitat natural.

As regiões neotropicais se destacam com quase 4.130 espécies, 44% da avifauna mundial e um grande número de psitacídeos (148 espécies em 27 gêneros) (Snyder *et al.*, 2000).

No quadro 1 estão representados os papagaios brasileiros ameaçados de acordo com a IUCN *Red List*.

Quadro 1. Papagaios brasileiros considerados ameaçados, de acordo com a IUCN* *Red List*

Nome	Nome Científico	Distribuição	Categoria de risco
Papagaio-de-cara-roxa	<i>Amazona brasiliensis</i>	Brasil	Ameaçado
Papagaio Charão	<i>Amazona pretrei</i>	Brasil	Ameaçado
Papagaio Chauá	<i>Amazona rhodocorytha</i>	Brasil	Ameaçado
Papagaio-de-peito-roxo	<i>Amazona vinacea</i>	Brasil	Ameaçado
Papagaio Galego	<i>Amazona xanthops</i>	Cerrado do Brasil	Vulnerável
Hyacinth macaw	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Brasil e Bolívia	Vulnerável
Arara-azul-de-lear	<i>Anodorhynchus leari</i>	Brasil	Ameaçado
Maracanã	<i>Ara maracana</i>	Brasil, Paraguai e Argentina	Vulnerável
Jandaia	<i>Aratinga auricapilla</i>	Paraná, Brasil	Vulnerável
Ararinha Azul	<i>Cyanopsitta spixii</i>	Brasil	Criticamente ameaçado
Ararajuba	<i>Guarouba (Aratinga) guarouba</i>	Brasil	Ameaçado
Tiriba-grande	<i>Pyrrhura cruentata</i>	Brasil	Vulnerável
Apuim-de-cauda-vermelha	<i>Touit melanonota</i>	Brasil	Ameaçado
Apuim-de-cauda-amarela	<i>Touit surda</i>	Brasil	Ameaçado
Sabia-cica **	<i>Trichilaria malachitacea</i>	Brasil	Vulnerável

Fonte: IUCN red list

(http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/our_work/the_iucn_red_list/).

*International Union for Conservation of Nature; **Espécie proposta para inclusão na Red List.

1.2. Doença do Bico e das Penas (Pbfd)

1.2.1. A doença

A doença do bico e das penas dos psitacídeos, Pbfd sigla em inglês para *Psittacine Beak and Feather Disease*, mas também denominada *Psittacine Circovirus*

Infection (infecção de psitacídeos por circovírus), *Psittacine Circovirus Disease* (doença de psitacídeos por circovírus) é a doença viral mais comum em psitacídeos na Austrália (Pass e Perry, 1984; McOrist *et al.*, 1984; Raidal *et al.*, 1993), onde pelo menos uma espécie está em extinção devido à presença de BFDV e foi reconhecida em várias espécies de aves de vida livre australianas há mais de cem anos (Kaleta, 2007). É também um problema para a fauna

onde existam aves concentradas em cativeiro (Bassami *et al.*, 2000; Piçarra, 2009). O nome da doença foi cunhado por Perry em 1981 (Kaleta, 2007). A maioria das espécies da ordem Psittaciformes e algumas outras espécies de aves são susceptíveis ao vírus (Ritchie *et al.*, 2003).

Anormalidades nas penas, observadas em aves livres na natureza, como em periquitos Red-rumped (*Psephotus haematonotus*), já em 1887, foram possivelmente o primeiro relato da PBF, muito antes da doença receber este nome. Foi caracterizada por uma síndrome com anormalidades de plumagem e de bico em várias espécies de araras na Austrália (Kaleta, 2007). A doença foi diagnosticada em mais de 40 espécies de psitacídeos e embora todos os membros desta família pareçam susceptíveis, a doença é vista mais frequentemente nas cacatuas. (Bassami *et al.*, 2001). Os gêneros *Eclectus*, *Agapornis*, *Calopsitta*, *Melopsittacus* e outros Psittaciformes da Ásia, África e Oceania são mais susceptíveis à doença, enquanto os Psittaciformes das Américas Central e do Sul são mais resistentes (Bassami *et al.*, 2001).

1.3.2. Histórico

A doença do bico e das penas aparentemente originou-se no continente Oceania (Australasia), mas já foi identificada em psitacídeos de cativeiro na Ásia, Europa, África, América do Norte (Piçarra, 2009). A doença dos psitacídeos selvagens documentada na Austrália e Nova Zelândia (Raidal *et al.* 1993; Piçarra, 2009) já foi relatada em papagaios selvagens do cabo (*Poicephalus robustus*) e *Agapornis* (*Agapornis nigrigenis*) na África (Kock *et al.*, 1993; Heath *et al.*, 2004).

Os corpúsculos de inclusão característicos de circovírus foram demonstrados em cortes histológicos arquivados de pombos

da Rocha em 1986, quatro anos antes da primeira descrição do PiCV e sete anos antes do vírus ser identificado (Woods *et al.* 1994; Kaleta, 2007).

A descrição do circovírus reflete, portanto, uma maior sensibilização entre a comunidade científica e aperfeiçoamento das ferramentas de diagnóstico (Todd, 2000; Kaleta, 2007).

Acredita-se que a PBF ocorre enzoótica nas populações de psitacídeos livres na natureza do Velho Mundo e do Pacífico Sul, e que a doença foi introduzida a outras populações susceptíveis, tanto livres na natureza como de cativeiro, pelo comércio (e tráfico) mundial de aves para o mercado de aves de companhia (*pet*) (McOrist *et al.*, 1984).

Grande parte dos autores considera a doença enzoótica nas populações selvagens de cacatuas australianas e que, depois de instalada neste continente, a doença espalhou-se pelo resto do Mundo (Gerlach, 1999). Segundo outros autores, a origem geográfica da doença continua por ser determinada, sugerindo que possa mesmo ser no continente africano, pois há registro de infecção de psitacídeos selvagens neste continente em aves dos gêneros *Poicephalus* e *Agapornis* (Piçarra, 2009).

No Brasil, há relato de caso em *Cacatua alba* (Werther *et al.*, 1998), com descrição de ave com distrofia simétrica e perda de penas. A confirmação se deu por radiografia, patologia clínica, exame histopatológico e hibridização *in situ* de vários tecidos.

1.2.3. Etiologia

O vírus responsável pela doença é integrante do gênero *Circovirus* (Fig. 1) e família *Circoviridae*. Integrantes dessa família são caracterizados por partículas de

tamanho pequeno, sem envelope, capsídeo em formato icosaédrico, DNA fita simples circular de aproximadamente 1,7-2,3 kb e que podem infectar aves e mamíferos (Todd, 2000; Kaleta, 2007). As infecções por BFDV são normalmente por comprometimento imunológico causando anormalidades de penas e/ou infecções secundárias, mas também podem ser assintomáticas (Todd, 2000; Kaleta, 2007).

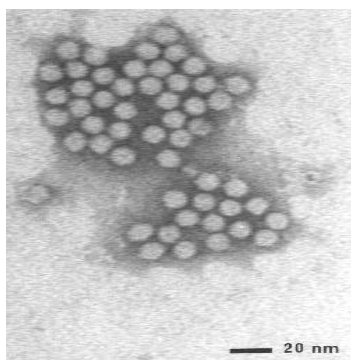


Figura 1. Micrografia eletrônica de partículas do vírus da PBFD (BFDV) coradas negativamente (Kondiah, 2004).

Uma característica comum dos genomas de DNA fita simples é uma estrutura potencial em forma de haste-laço (stem-loop) que contém uma cadeia conservada de nonanucleotídeos (TAGTATTAC) em seu ápice e é o provável ponto de início para a replicação (Ritchie *et al.*, 2003).

Os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos basofílicos podem ser vistos na bursa de Fabricius, em outros tecidos linfóides e/ou em folículos de pena em crescimento, mas nem sempre estão presentes (Kaleta, 2007).

O agente etiológico da doença foi definitivamente identificado no final dos anos 80 (Ritchie *et al.*, 1989) como vírus da doença do bico e das penas (BFDV) e incluído na família Circoviridae. Alguns circovírus aviários estão apresentados no Quadro 2.

As infecções por circovírus em pombos foram relatadas pela primeira vez em 1993 por Woods (Smyth *et al.*, 2001). Inclusões parecidas com circovírus foram reconhecidas na bursa de pombos antes de 1986 no Canadá e em 1989 na Austrália. Subsequentemente, infecções similares à circovírus em pombos foram reconhecidas e caracterizadas nos Estados Unidos em 1990. Desde então, casos de circovírus em pombos ocorreram esporadicamente na Califórnia e na Austrália (Woods *et al.*, 1994), na Irlanda do Norte e vários países europeus (Smyth *et al.*, 2001).

De acordo com estudos estruturais os circovírus de pombos formam matrizes paracrystalinas e semicírculos compostos de virions de 14-17 nm de diâmetro, similares ao vírus de PBFD. Essas matrizes foram reconhecidas pela microscopia de luz como inclusões citoplasmáticas basofílicas em macrófagos (Pass e Perry, 1984; Latimer *et al.*, 1991, Woods *et al.*, 1994).

Com base no tamanho das partículas do vírus, na associação de resultados patológicos e na demonstração de baixo nível de homologia do DNA com PBFD, o vírus foi incluído como membro da família circovírus e designado como circovírus de pombo (PiCV) (Todd, 2000, Smyth *et al.*, 2001). A coloração imunohistoquímica indica que o circovírus de pombo é antígenicamente diferente do vírus da PBFD (Woods *et al.*, 1994).

O circovírus infecta pombos jovens antes da involução da bursa de *Fabricius*, podendo ser este o primeiro sítio de replicação para o vírus. Inclusões de circovírus tem sido observadas em pombos de 4 semanas até 1 ano de idade (Woods *et al.*, 1994, Woods e Latmer, 2000). Nos pombos infectados a apresentação clínica é semelhante à de psitacídeos com PBFD (Woods e Latmer, 2000). A infecção viral é associada à alta morbidade e baixa mortalidade (Smyth *et al.*, 2001). Em alguns pombos infectados

observa-se a recuperação clínica espontânea. O diagnóstico da doença é dependente do reconhecimento de corpos de inclusão intracitoplasmáticos em cortes histológicos de tecido linfóides (Smyth *et al.*, 2001).

A Família Circoviridae possui ainda dois outros gêneros, *Gyrovirus* – sendo único intergante o vírus da anemia infecciosa da galinha (CAV), e *Geminivirus* – constituído por diversos vírus que afetam plantas. As características físicas e químicas de CAV e BFDV são apresentadas no Quadro 3.

O vírus da anemia infecciosa das galinhas é o circovírus mais bem estudado e pode ser

usado como modelo no estudo do circovírus de PBFD (Schat, 2003).

Os virions de CAV são típicos e têm 23-25 nm de diâmetro, são icosaédricos, não envelopados e possuem DNA circular fita simples (Natesan *et al.*, 2005). Inclusões nucleares em macrófagos são observadas frequentemente no fígado, intestino e brônquios associadas ao tecido linfóide e inclusões citoplasmáticas são observadas em células epiteliais (Schat, 2003).

Quadro 2. Espécies do gênero *Circovirus* que afetam aves.

Espécie de circovirus	Espécie(s) afetada(s)
CaCV	Canário (<i>Serinus canaria</i>)
RaCV	Corvo Australiano (<i>Corvus coronoides</i>)
GuCV	Gaiivota prateada (<i>Larus argentatus</i>)
GoCV	Ganso (<i>Anser spp.</i>)
DuCV	Pato (<i>Anas spp.</i>)
PiCV	Pombo (<i>Columba livia</i>)
BFDV	Psitacídeos
FiCV	Tentilhão (<i>Carpodacus mexicanus</i> , Fringillidae)
StCV	Estorninho (<i>Sturnus vulgaris</i>)
CyCV	Cisne (<i>Cygnus olor</i>)

<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>

Quadro 3. Características físicas e químicas de CAV e BFDV

	CAV	BFDV
Diâmetro da Partícula (nm)	19.1-26.5	14-20.7
Densidade (g.ml-1 em CsCl)	1.33-1.37	1.378
Coefficiente de Sedimentação	91S	-
Tamanho do Genoma (b)	2298/2319	1993-2018
Proteínas Virais (Massa)	50.000	26.300, 23.700, 15.900

Todd, 2000; Kondilah, 2004 modificada

O genoma de BFDV foi sequenciado por dois grupos de pesquisa independentes. Ambos publicaram resultados de que ele possui um DNA circular, de fita única (ssDNA) e molécula de 1993 nucleotídeos (Niagro *et al.*, 1998; Ypelaar *et al.*, 1999).

O BFDV possui genoma de 1,7 a 2,3 kb de cadeia simples de DNA circular (dos mais pequenos entre os vírus patogênicos conhecidos), envolvido por um capsídeo esférico ou icosaédrico e não possui invólucro (Heath *et al.*, 2004; Raue *et al.*, 2004). O genoma deste vírus possui 7 open reading frames (ORF) que podem codificar sete proteínas diferentes. Foram identificadas três ORF na cadeia do sentido paralelo (V1, V2 e V3) e quatro na cadeia do sentido complementar (C1, C2, C3 e C4) (Raue *et al.*, 2004). Em partículas virais purificadas, porém, três grandes proteínas virais, com massas moleculares aproximadas de 26,3, 23,7 e 15,9 kDa, têm sido relatadas (Khalesi, 2007). Baseado em comparações de seqüência entre circovírus de origem diferente as ORF V1 e C1 (as de maior dimensão) codificam as proteínas associadas à replicação (Rep) e a proteína do capsídeo, respectivamente (Kaleta, 2007).

Atualmente sabe-se que a ORF V1 (de maiores dimensões) codifica uma proteína associada à replicação viral semelhante à proteína replicase encontrada no circovírus suíno (proteína rep). A ORF C1 aparentemente codifica uma proteína do capsídeo e é também semelhante à encontrada no circovírus suíno (de Kloet e de Kloet, 2004). A proteína da replicação possui entre 26 e 33 kDa e a proteína do capsídeo possui entre 23 e 28,9 kDa (Bassami *et al.*, 1998; Khalesi, 2007).

O papel das ORFs restantes não está ainda bem definido no BFDV e na produção de proteínas e apresentam menor conservação no genoma viral (Raue *et al.*, 2004; de Kloet e de Kloet, 2004).

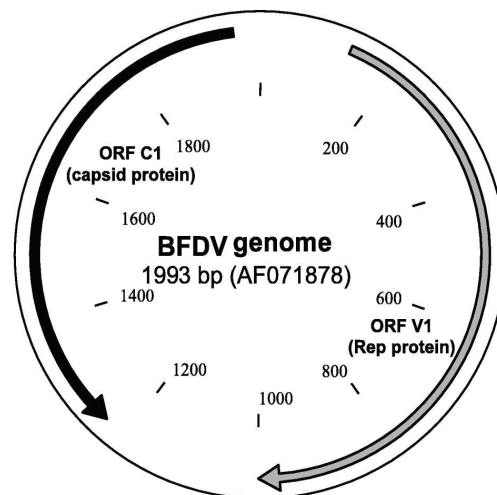


Figura 2. Apresentação esquemática do genoma BFDV. As ORFs são nomeadas de acordo com sua localização no genoma viral o vírus (V) ou complementares (C). Apenas as duas principais ORFs codificando a proteína Rep (ORF V1) e da proteína capsidial (ORF C1) são mostradas (Niagro *et al.*, 1998).

Diferentes genótipos e/ou estirpes foram definidos com base nas variações da seqüência de DNA. Foram encontradas variações totais até cerca de 20% (Raue *et al.*, 2004, Khalesi *et al.*, 2005). Um estudo feito por Raue *et al.*, (2004) indica a possibilidade da existência de genótipos do vírus da doença do bico e das penas, pois sequencias obtidas de aves de um surto agudo de doença do bico e das penas em lorídeos foram agrupadas em ramos diferentes da árvore genética. O sequenciamento de estirpes de Papagaio Africano Cinza com desordens de empenamento foi agrupado no mesmo ramo enquanto algumas espécies com imunossupressão foram agrupadas em outros ramos.

A ORF V1 mostrou ser altamente conservada entre todos os circovírus

aviários. A sequência de nucleotídeos incluída na ORF V1 é extremamente semelhante nos circovírus isolados por de Kloet e de Kloet (2004), embora tenham sido detectadas algumas variações. A proteína da replicação codificada pela ORF V1 apresenta entre 86,9% e 98,3% de identidade na sequência de amino-ácidos. Por sua vez, a proteína do capsídeo apresenta apenas entre 76,3% e 83,3% de conservação da sequência de amino-ácidos. Estas variações são encontradas comparando proteínas isoladas de genótipos distintos (Raue *et al.*, 2004).

Segundo experimento feito por Bassami *et al.* (2001) as ORF 1, ORF 2 e ORF 5 foram as únicas comuns a todos eles. A ORF 1 codifica a proteína Rep. ORF2 ou ORF 5 codificam a proteína do capsídeo. Baseado nas sequências deduzidas de aminoácidos de ORF 2 em BFDV e de ORF 2 em PCV (Bassami *et al.*, 1998; Bassami *et al.*, 2001), concluiu-se que a ORF 2 de BFDV codifica a proteína do capsídeo (Niagro *et al.*, 1998).

Atualmente, é reconhecida a existência de diferentes genótipos ou estirpes mais ou menos adaptadas às famílias Loriidae, Cacatuidae e Psittacidae. Apesar desta tendência para a relação entre genótipo e ave, não foram encontrados casos de especificidade na interação entre uma estirpe viral e determinado hospedeiro (Heath *et al.*, 2004, de Kloet e de Kloet, 2004; Khalesi *et al.*, 2005) com algumas exceções de aves na Austrália. Baseado nos dados de sequenciamento obtidos da ORF V1 codificando a proteína rep, há evidências de especificidade das cepas de BFDV de algumas espécies (Ritchie *et al.*, 2003, Raue *et al.*, 2004).

As diferenças nas manifestações clínicas e patológicas de PBFD em espécies de

psitacídeos susceptíveis à infecção com o vírus da doença do bico e penas (BFDV) podem ser devidas a fatores ligados ao hospedeiro ao invés de variação antigênica ou genética na BFDV, no entanto, isso não foi comprovado cientificamente ainda (Ritchie *et al.*, 1990; Bassami *et al.*, 2000; Piçarra, 2009).

Inicialmente, sugeriu-se que assim como o Poliomavírus (APV), apenas sequências de diversidade limitadas existiam entre as diversas estirpes de BFDV (Piçarra, 2009). Entretanto recentemente foi demonstrado que a diversidade genética de BFDV na Austrália é maior do que o esperado (Bassami *et al.*, 2001, Raue *et al.*, 2004).

1.2.4. Epidemiologia

A epidemiologia dos circovírus em aves de cativeiro e de vida livre continua a ser desconhecida. A infecção por circovírus é frequentemente subclínica ou latente e muitas vezes o animal tem a infecção viral, mas não é suspeito (Woods *et al.*, 1994; Kaleta, 2007).

A PBFD é uma doença que afeta menos as aves do Novo Mundo (Hemisfério Ocidental - Continente Americano) do que aquelas originárias do Hemisfério Oriental (aves do Velho Mundo – África, Australásia e Pacífico) (Gerlach, 1999). Supõe-se que estes têm maior resistência à infecção (Greenacre, 2005; Piçarra, 2009).

Por existirem portadores assintomáticos e contato entre animais de diferentes espécies, origens e idades, a dispersão da doença fica facilitada (Khalesi, 2007; Piçarra, 2009). No Quadro 4 apresentam-se as espécies documentadas susceptíveis de infecção por BFDV.

Quadro 4. Espécies de aves que podem ser infectadas pelo BFDV mundialmente

Psittacidae		Cacatuidae
Arara azul e amarela (<i>Ara ararauna</i>)	Periquito cornudo (<i>Eunymphicus cornutus</i>)	Cacatua branca (<i>Cacatua alba</i>)
Arara escarlate (<i>Ara macao</i>)	Periquito de asas douradas (<i>Psephotus chrysopterygius</i>)	Cacatua das Molucas (<i>Cacatua moluccensis</i>)
Arara militar (<i>Ara militaris</i>)	Periquito de Bourke (<i>Neopsephotus bourkii</i>)	Cacatua das palmeiras (<i>Probosciger aterrimus</i>)
Arara vermelha (<i>Ara chloroptera</i>)	Periquito de colar (<i>Psittacula krameri</i>)	Cacatua de bico comprido (<i>Cacatua tenuirostris</i>)
Jandaia de testa vermelha (<i>Aratinga auricapilla</i>)	Periquito de colar de Manila (<i>Psittacula manillensis</i>)	Cacatua de crista amarela (<i>Cacatua galerita</i>)
Jandaia-Sol ou amarela (<i>Aratinga solstitialis</i>)	Periquito de dorso vermelho (<i>Psephotus haematonotus</i>)	Cacatua de crista citrina (<i>Cacatua citrinocristata</i>)
Maitaca-verde (<i>Pionus maximiliani</i>)	Periquito do príncipe de Gales (<i>Polytelis alexandrae</i>)	Cacatua de Galah ou de peito rosa (<i>Eolophus roseicapillus</i>)
Papagaio cinzento (<i>Psittacus erithacus</i>)	Periquito de Bluebonnet (<i>Psephotus haematogaster</i>)	Cacatua de Goffin (<i>Cacatua goffini</i>)
Papagaio de barriga-laranja (<i>Neophema chysogaster</i>)	Periquito encapuzado (<i>Psephotus dissimilis</i>)	Cacatua de Mitchell ou de leadbeater (<i>Cacatua leadbeateri</i>)
Papagaio de frentevermelha (<i>Amazona autumnalis</i>)	Periquito Port Lincoln (<i>Barnardius zonarius</i>)	Cacatua filipina (<i>Cacatua haematuropygia</i>)
Papagaio de frente azul (<i>Amazona aestiva</i>)	Periquito rei (<i>Alisterus scapularis</i>)	Cacatua gang-gang (<i>Callocephalon fimbriatum</i>)
Papagaio de frente branca (<i>Amazona albifrons</i>)	Rosela azul ou pálida (<i>Platycercus adscitus</i>)	Cacatua sanguínea ou pequena (<i>Cacatua sanguinea</i>)
Papagaio de cabeça castanha (<i>Poicephalus cryptoxanthus</i>)	Rosela do Leste (<i>Platycercus icterotis</i>)	Cacatua triton (<i>Cacatua triton</i>)
Papagaio de ventre vermelho (<i>Poicephalus rufiventris</i>)	Rosela do Norte (<i>Platycercus venustus</i>)	Caturra (<i>Nymphicus hollandicus</i>)
Papagaio do Cabo (<i>Poicephalus robustus</i>)	Rosela elegante (<i>Platycercus elegans</i>)	Loridae
Papagaio do Senegal (<i>Poicephalus senegalus</i>)	Rosela multicolorida (<i>Platycercus eximius</i>)	Lóris arco-íris (<i>Trichoglossus haematodus</i>)
Papagaio Meyer (<i>Poicephalus meyeri</i>)	Inseparável de Angola (<i>Agapornis roseicollis</i>)	Lóris chlorocercus (<i>Lorius chlorocercus</i>)
Papagaio preto (<i>Coracopsis nigra</i>)	Inseparável de Madagáscar (<i>Agapornis cana</i>)	Lóris de Mitchell (<i>Trichoglossus haematodus mitchellii</i>)
Papagaio vasa (<i>Coracopsis vasa</i>)	Inseparável de faces negras (<i>Agapornis nigrigenis</i>)	Lóris reticulado ou de crista-azul (<i>Eos reticulata</i>)
Papagaio-eclétus (<i>Eclectus roratus</i>)	Inseparável de Fisher (<i>Agapornis fischeri</i>)	Lóris de Goldie (<i>Psitteuteles goldiei</i>)
Periquito-andorinha (<i>Lathamus discolor</i>)	Inseparável de Nyassa (<i>Agapornis lilianae</i>)	Outras
Periquito australiano (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	Inseparável mascarado ou da Tanzânia (<i>Agapornis personatus</i>)	Rola do Senegal (<i>Streptopelia senegalensis</i>)
Periquito Barnardi (<i>Barnardius barnardi</i>)		

(Heath *et al.*, 2004; Ritchie, 1995; de Kloet e de Kloet, 2004; Rahaus *et al.*, 2008; Piçarra, 2009).

A prevalência de PBFDF em países europeus foi estudada por Rahaus e Wolff (2003) e por Bert *et al.* (2005). Rahaus e Wolff (2003) determinaram uma prevalência da infecção de 39,2% através do teste por PCR da ORF V1 de penas em psitacídeos na Alemanha numa amostra de 142 animais.

No quadro abaixo (Quadro 5) estão compilados alguns dados publicados sobre a prevalência de PBFDF, inclusive dos estudos citados acima. Esses dados são variáveis e os motivos para tal podem ser a região geográfica, a(s) espécie(s) estudada(s) e a técnica de análise aplicada (Piçarra, 2009).

Quadro 5. Prevalências de PBFDF em diferentes países (Piçarra, 2009 modificado)

País	Prevalência	Método	Espécie(s)	Fonte
Austrália	41-94%	IH	Cacatuas selvagens	Raidal <i>et al.</i> , 1993
EUA	5%	PCR Sangue	Várias	Dahlhausen e Radabaugh, 1997
Alemanha	39,2%	PCR penas	Várias	Rahaus e Wolff, 2003
Itália	8,05%	PCR sangue e penas	Várias	Bert <i>et al.</i> , 2005
Austrália	23%	PCR penas	Várias com suspeita de infecção	Khalesi <i>et al.</i> , 2005
Taiwan	41,2%	PCR	Várias	Hsu <i>et al.</i> , 2006
Austrália	18,85%	PCR penas	Várias com suspeitas de Infecção.	Khalesi, 2007
Nova Zelândia	3%	PCR penas e sangue	Várias espécies autóctones	Ha <i>et al.</i> , 2009
Barcelona	2,6%	PCR sangue e tecidos	Várias espécies	Piçarra, 2009
(*) – N/A = não apresentado				

1.2.5. Patogenia e transmissão

O vírus é eliminado pelas aves infectadas através das penas e pó das plumas de descamação (naturalmente abundantes em algumas espécies), das fezes e das secreções do papo (Gerlach, 1999). A

transmissão pode ocorrer por inalação ou ingestão de partículas virais ou devido à infecção do epitélio folicular da bolsa de Fabricius (Phalen, 2006; Piçarra, 2009). A transmissão vertical foi demonstrada em *Cacatua sanguinea*, em filhotes de uma ave positiva para PBFDF que teve os ovos

incubados e criados de forma independente da mãe (Latimer *et al.*, 1991) e também foi recentemente demonstrada em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e papagaios - de - cabeça - castanha (*Poicephalus cryptoxanthus cryptoxanthus*) nos quais 20% (n=15) dos ovos embrionados descendentes de adultos infectados demonstraram a presença no seu interior do BFDV por PCR (Rahaus *et al.*, 2008).

Nos locais onde aves infectadas permaneceram o pó ambiental pode ser uma importante fonte de contágio (a concentração de virions pode ser elevada) (Gerlach, 1999). O BFDV pode permanecer viável em fômites por períodos relativamente prolongados (Doneley, 2003).

O quadro clínico é determinado conforme a espécie, idade, via de infecção, estado imunológico da ave, título de anticorpos e antígenos e o genótipo do vírus (Raue *et al.*, 2004). O período de incubação pode variar entre 2 a 4 semanas (quando infectados filhotes) até meses ou anos. O vírus é replicado em tecidos onde existam células em divisão e foi demonstrada a sua presença no timo, bursa de Fabricius, baço, papo, esôfago, intestino, fígado, pele, penas, cérebro e leucócitos circulantes (Gerlach, 1999; de Kloet e de Kloet, 2004).

Ocorre a distrofia e hiperplasia do folículo das penas, bico e unhas resultando nas anormalidades clínicas observadas em PBFD. Há necrose e hiperplasia das células da bainha e das camadas exteriores do bico e unha (Pass e Perry, 1984; Kondiah, 2004). A necrose dos órgãos linfóides e dos leucócitos circulantes pode levar a infecções secundárias e ao óbito (Phalen *et al.*, 2003; Phalen, 2006).

O BFDV pode ser eliminado por uma ave portadora, sem a demonstração de sinais da doença, em quadro silencioso (assintomático) da doença (Phalen, 2006). Nas aves infectadas subclínicas, acredita-se

que o vírus persista nas penas e células epiteliais, afetando assim em menor grau outros órgãos vitais da ave (Greenacre, 2005).

O BFDV apresenta epiteliotropismo e linfotropismo (Latimer *et al.*, 1991). A infecção em uma ave susceptível resulta em disseminação hematogênica do vírus que se inicia no epitélio folicular das penas com anomalias de empenamento, na bursa de Fabricius e no timo (Latimer *et al.*, 1991).

A recuperação de PBFD clínica foi documentada em araras (*Ara spp.*) e pionus (*Pionus spp.*), bem como na família Loriidae (Kaleta, 2007).

É provável que os vírus atinjam as células precursoras T e provoquem diminuição das populações das células auxiliares (CD4) e as células citotóxicas (CD8) T (Adair, 2000; Ritchie, 2003) e a mortalidade é geralmente o resultado de uma infecção secundária como citado acima.

Ao final de casos prolongados podem ser vistos necrose do bico e das unhas, mas raramente ocorrem esses sinais sem a presença anormalidades no empenamento. Na forma superaguda da doença, achados de necropsia podem ser mais consistentes com septicemia aguda (Kaleta, 2007).

Nas aves com patologia no bico, necrose e inflamação do epitélio da língua, da cavidade do bico e cloaca também já foram reportadas (Gerlach, 1999). À necropsia em aves adultas o baço é freqüentemente pequeno e tem poucos linfócitos, e ocasionalmente pode observar-se necrose das células reticulares. Inclusões extracutâneas do vírus de PBFD são encontradas principalmente em macrófagos no bico, do palato, esôfago, cloaca, nariz, língua, glândula paratireóide, medula óssea, células estreladas de Kupffer do fígado, baço e glândula tireóide (Kaleta, 2007).

Corpúsculos de inclusão intranucleares e intracitoplasmáticos foram demonstrados por coloração por hematoxilina e eosina nos tecidos de penas, bico, timo e bursa coletados de aves com sinais clínicos de PBF (McOrist *et al.*, 1984; Latimer *et al.*, 1991; Gerlach, 1999).

Os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos têm sido mais relatados, mas em casos especiais em que a infecção está no início, os relatos são de corpúsculos de inclusão intranucleares (McOrist *et al.*, 1984; Gerlach, 1999).

Além de estarem localizados no epitélio do folículo das penas e dos tecidos linfáticos, os corpúsculos de inclusão viral de PBF também foram demonstrados por anticorpos específicos virais no palato, língua, glândula paratireoide, cloaca, esôfago, baço, intestino, medula óssea, fígado e glândulas tireoide e supra-renais (Latimer *et al.*, 1990). As inclusões intracitoplasmáticas originam-se nas células epidérmicas e atingem seu maior tamanho dentro dos macrófagos, que fagocitam essas células infectadas (Latimer *et al.*, 1991). Sugere-se que o vírus da PBF é replicado no núcleo das células epidérmicas infectadas e as inclusões são então liberadas quando as células necróticas são fagocitadas por células como macrófagos na polpa e epiderme (Gerlach, 1999).

1.2.5. Sinais clínicos

A PBF pode manifestar-se sintomaticamente segundo dois quadros clínicos distintos – o quadro agudo e crônico. Existe também o quadro assintomático (Phalen, 2006; Piçarra, 2009) que é comum em aves do novo mundo. Outros autores consideram três tipos de infecção – hiperaguda, aguda e crônica (Gerlach, 1999; Kondiah, 2004).

O tipo de doença clínica (hiperaguda, aguda ou crônica) varia na sintomatologia e de acordo com a idade da ave, mas pode também ser influenciado pela via de infecção viral, pelo título do vírus infectante e condição da ave quando é exposto ao vírus (Kondiah, 2004).

Ambos os sexos podem ser afetados. O curso agudo é progressivo ao longo de vários meses ou anos e é irreversível (Kondiah, 2004).

De acordo com alguns estudos a infecção latente assintomática pode ser bastante frequente em algumas espécies de psitacídeos da Oceania e Pacífico, onde existem grandes diferenças na relação entre indivíduos doentes e indivíduos infectados (Ritchie *et al.*, 2003).

Bert *et al.* (2005), ao estudarem a presença de PBF em aves de cativeiro na Itália, também encontraram uma grande prevalência de psitacíformes infectados de forma latente.

Pensava-se que as diferenças nas manifestações clínicas e patológicas de PBF nas espécies de aves silvestres susceptíveis à doença eram devidas a fatores ligados ao hospedeiro e não a fatores antigênicos ou genéticos (Bassami, 2001).

A forma superaguda da doença pode ocorrer em aves neonatais encontradas em óbito, sem sinais premonitórios. Esta forma é subnotificada em aves silvestres (Kaleta, 2007). As lesões histológicas podem ser limitadas à necrose grave da bursa de Fabricius ou timo com a presença de corpos de inclusão viral induzidos. A patologia da pena nestes casos pode não ocorrer, ou pode ser limitada a um edema no epitélio folicular (McOrist *et al.*, 1984; Latimer *et al.*, 1991).

O quadro agudo é observado nas aves mais jovens, nas quais a bursa de Fabricius ainda

não envolveu (Piçarra, 2009). Os animais com menos de um ano são particularmente susceptíveis a este quadro, que é especialmente comum em papagaios cinzentos incubados e criados à mão (Doneley, 2003). As aves criadas pelos seus progenitores desenvolvem o sistema imune de forma mais competente. O contato com a flora do material do ninho, dos excrementos e com as secreções digestivas das aves adultas estimulam o melhor desenvolvimento do sistema imunológico (Crosta, 2008 *Apud* Piçarra, 2009). A susceptibilidade da ocorrência do quadro clínico agudo nos animais jovens está mais relacionada a fatores inerentes às aves do que referentes a propriedades antigênicas ou genotípicas virais (Ritchie *et al.*, 2003).

Em alguns casos agudos de PBF, aves com sintomatologia mínima nas penas podem estar deprimidas, desenvolver constipação ou diarreia e ir a óbito em uma semana (Gerlach, 1999).

De acordo com a espécie da ave infectada, a forma aguda pode ser rapidamente fatal. Este tipo de infecção ocorre em papagaios cinzentos africanos (*Psittacus erithacus*), cacatua-de-crista-amarela (*Cacatua galerita*) e cacatua-branca (*Cacatua alba*) (Phalen, 2006; Piçarra, 2009).

A imunossupressão deixa o animal susceptível a infecções secundárias (bacterianas, fúngicas e virais), que normalmente acabam por provocar a morte (Doneley, 2003). A aspergilose é, para alguns autores, a infecção secundária mais frequente resultante da imunossupressão (Niagro, 1990; Piçarra, 2009). Segundo Doneley (2003), a hepatite por adenovírus é uma infecção secundária comum que ocorre devido à imunossupressão causada pelo quadro agudo da infecção por circovírus aviário.

A hematologia e a bioquímica sérica são geralmente de pouco valor na tentativa de estabelecer um diagnóstico de PBF

(Kaleta, 2007), embora um estudo realizado por Schormaker *et al.*, (2000) em papagaios Africanos Cinza com menos de sete meses de idade com PBF revelou grave anemia, leucopenia ou pancitopenia.

Os filhotes de cacatuídeos infectados normalmente recusam ser tocados e manejados, pois a dor nos folículos das penas é intensa. As lesões mais severas são observadas nas aves infectadas antes da plumagem definitiva ter começado a substituir a de neonato (Gerlach, 1999). O tratamento sintomático revela-se praticamente infrutífero e a septicemia por bactérias e fungos oportunistas é frequentemente apontada como causa de morte (Doneley, 2003).

A infecção crônica está descrita na literatura há mais tempo e manifesta-se por sinais clínicos que resultaram no nome da doença do bico e penas. O quadro é progressivo e os primeiros sintomas normalmente aparecem entre os 6 meses e os 3 anos de idade, tendo as aves em sua maioria mais de 8-10 meses (Phalen, 2006; Piçarra, 2009).

Os sintomas da doença crônica são desenvolvimento anormal, simétrico e progressivo das penas durante mudas sucessivas, retenção da bainha das penas, hemorragia dentro da cavidade da poupa, fraturas no eixo das penas e plumas anormais. Os folículos de penas tornam-se inativos e a ave que sobrevive torna-se careca (Kondiah, 2004).

As anormalidades na plumagem e alopecia não são específicas de PBF e podem ter muitas outras causas. A abordagem clínica de uma ave que apresente sintomatologia condizente é complexa e exige conhecimento e experiência por parte do clínico (Molina *et al.*, 2002 *Apud* Piçarra, 2009).

As aves silvestres podem apresentar coloração castanha da pele, provavelmente

por excessiva exposição solar da mesma. Nos casos mais antigos pode-se observar aplasia folicular mais ou menos dispersa (Gerlach, 1999; Doneley, 2003).

Nos papagaios cinzentos pode-se observar o aparecimento de penas avermelhadas (“penas de conure”) intercaladas com as penas cinzentas, o que não é, no entanto, específico de PBFDF (Gerlach, 1999). A patologia no bico nem sempre é presente em pássaros com PBFDF e parece dependente das espécies envolvidas (Ritchie *et al.*, 1989 *Apud* Kondiah, 2004). Mudanças semelhantes ocorrem nas unhas que eventualmente podem vir a cair, embora essa apresentação seja mais rara (Kondiah, 2004).

As lesões no bico são vistas mais frequentemente em aves do gênero *Cacatua* sp. e em cacatuas de Galah (*Eolophus roseicapillus*) (Olsen, 2003 *Apud* Piçarra, 2009). Tal como a afecção da plumagem, as alterações do bico costumam ser simétricas (Gerlach, 1999). O desgaste irregular e infecções bacterianas contribuem para a diminuição da capacidade de comer e podem levar a maior debilidade e perda de peso (Jergens *et al.*, 1988 *Apud* Kondiah, 2004).

As aves afetadas com frequência estão imunossuprimidas, devido à infecção da bursa de Fabricius, baço, timo e medula óssea e na maioria das vezes morrem devido a infecções bacterianas, parasitárias, fúngicas ou virais secundárias, no período de um ano após o início das alterações na plumagem (Greenacre, 2005; Piçarra, 2009).

A expectativa de vida dos animais infectados pode, no entanto, prolongar-se acima dos 10-15 anos em quadros menos malignos e com assistência e manejo adequado (Greenacre, 2005; Piçarra, 2009).

As aves brasileiras aparentemente são assintomáticas, não apresentando

sintomatologia clínica na maioria dos casos. São aves que podem transmitir o vírus entre si e para aves exóticas.

1.2.7. Diagnóstico

1.2.7.1. Diagnóstico sugestivo e confirmatório

Na presença de um quadro clínico compatível, o diagnóstico laboratorial é fundamental. Os métodos de diagnóstico podem também servir para diagnosticar quadros silenciosos e precoces ou monitorar grupos de psitacídeos. Atualmente, a PBFDF é diagnosticada através de PCR, hibridização *in situ*, HA e HI (Bert *et al.*, 2005; Phalen, 2006; Piçarra, 2009). A histopatologia é utilizada como diagnóstico sugestivo. Os corpúsculos de inclusão não são patognomônicos da doença. No caso da utilização da microscopia eletrônica com a visualização do vírus o diagnóstico é confirmatório. O método de PCR é atualmente o mais frequentemente utilizado no diagnóstico *in vivo* nos países europeus, norte-americanos e na Oceania (Bert *et al.*, 2005; Phalen, 2006; Piçarra, 2009) sendo juntamente com os testes de hibridização *in situ*, HA e HI diagnóstico confirmatórios da doença.

1.2.7.2. Histopatologia

A histopatologia é o método de diagnóstico mais antigo de PBFDF e pode ser aplicada a microscopia óptica e eletrônica. Esse método tem como vantagem a possibilidade de se observar diretamente o vírus na forma de corpos de inclusão intracitoplasmáticos de 15-20 nm nas células epiteliais e leucócitos da medula óssea, baço, timo, bursa de Fabricius e dos folículos da pena.

(McOrist *et al.*, 1984; Greenacre, 2005; Piçarra, 2009).

Algumas lesões histopatológicas são também típicas de PBFD, principalmente dos órgãos linfóides: depleção linfocitária, edema, infiltração leucocitária, assim como os já referidos corpos de inclusão intracitoplasmáticos virais (Doneley, 2003). A desvantagem das técnicas histopatológicas é devido ao fato de serem necessárias amostras cuja retirada é obrigatoriamente invasiva ou apenas praticável no exame *post mortem*. Este fato torna-a pouco prática no diagnóstico de animais vivos, sendo, no entanto, extremamente útil na investigação de animais que vieram a óbito (Gerlach, 1999).

1.2.7.3. Hemaglutinação e inibição da hemaglutinação (HA e HI)

Uma das propriedades do circovírus aviário é a capacidade de aglutinar os eritrócitos de determinadas espécies animais. (Phalen, 2006; Piçarra, 2009). O diagnóstico do BFDV por hemaglutinação pode ser feito com eritrócitos de *Cacatua-Goffin*, *Cacatua-Galah* ou de cobaio (*Cavia porcellus*), embora também tenha sido demonstrado com sangue de outros psitacídeos (Kondiah *et al.*, 2005).

Comparativamente aos outros métodos, tem como vantagem o fato de ser o mais econômico e obter resultados de HA e HI quantitativos, o que pode permitir ao clínico avaliar melhor o estado da infecção (Khalesi *et al.*, 2005).

A HI é o método de eleição para detecção de anticorpos e estudos seroepidemiológicos (Khalesi *et al.*, 2005).

1.2.7.4. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A reação em cadeia pela polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) é uma das mais importantes ferramentas de diagnóstico desenvolvida nos últimos 20 anos para identificar e caracterizar patógenos (Olsen & Speer, 2009).

Atualmente, este método é o mais utilizado para a detecção do DNA de BFDV e consiste na amplificação de um segmento de DNA viral que permitirá confirmar a presença do agente patogênico. As amostras a serem submetidas à PCR podem ser de qualquer tecido animal ou mesmo de zangãos ambientais (Phalen, 2006; Piçarra, 2009). A análise de PCR é efetuada sobre o gene ORF V1, localizado na cadeia de DNA no sentido paralelo. Este gene codifica uma proteína associada à replicação do vírus (Ypelaar *et al.*, 1999). O PCR com primers deste gene originou resultados mais consistentes que para ORF C1 (gene codificante de uma proteína do capsídeo). Variações no gene ORF V1 foram observadas, mas estas são suficientemente pequenas para não provocarem falsos negativos (Ritchie *et al.*, 2003; Hess *et al.*, 2004). A análise de PCR demonstrou ser mais sensível e específica que a HÁ/HI na detecção de antígeno (Khalesi *et al.*, 2005).

A análise para o genoma de BFDV pode ser realizada em qualquer tecido da ave, não havendo, entretanto, ainda dados conclusivos quanto ao(s) tecido(s) de eleição. Como exemplo, num estudo com agapornis (*Agapornis sp.*), nenhuma ave resultou positiva no PCR de penas sem que o vírus ocorresse no sangue (Khalesi *et al.*, 2005). Nos periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), pelo contrário, o PCR de penas e de hastes de algodão cloacais mostrou-se mais sensível que o de sangue (Hess *et al.*, 2004; Piçarra, 2009).

A análise sanguínea por PCR pode dar origem a falsos negativos nas situações de amostras em tubos heparinizados, devido ao excesso de material biológico que pode gerar interferência (neste caso a amostra pode ser purificada por filtração), erros de procedimento na colheita e no processamento, degradação das amostras no transporte ou mesmo devido ao número de leucócitos ser tão reduzido que não se detectem células portadoras de DNA viral (Khalesi, 2007; Olsen & Speer, 2009).

Os falsos positivos podem surgir devido à presença de material genético viral em aves que tenham eliminado a infecção anteriormente – os virions inativados podem persistir até 3 meses no corpo da ave. Assim, numa ave positiva, a análise deverá ser repetida pelo menos três meses após a remissão dos sintomas. Podem também ocorrer falsos positivos por contaminação cruzada no momento da colheita ou no laboratório (Khalesi *et al.*, 2005).

A ausência de kits de diagnóstico com certificação oficial pode limitar a confiança depositada nos vários métodos laboratoriais e obriga o laboratório que processa a análise a assumir a responsabilidade do método utilizado (Olsen e Speer, 2009).

A combinação de várias provas laboratoriais é recomendada como melhor forma de diagnóstico, podendo a HA e a HI ser úteis para monitorar um animal doente (Khalesi *et al.*, 2005).

1.2.7.5. Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* (ISH) foi descrita pela primeira vez em 1969 (Gall, 1969 *Apud* Silva-Valenzuela *et al.*, 2006) mas teve mais atenção da comunidade científica na década de 80 e foi usada com sucesso para a identificação de circovírus em pombos em um estudo (Woods *et al.*, 1994).

A grande vantagem da utilização do ISH é a possibilidade de localizar com precisão no tecido parafinado ou congelado, um gene específico ou seus transcritos (Silva-Valenzuela *et al.*, 2006).

Em psitacídeos com PBFD testes de hibridização *in situ* de ácido nucléico demonstraram circovírus em seções de baço, fígado e bursa (Woods, 2000).

1.2.8. Diagnósticos Diferenciais

No Quadro 6, de acordo com Piçarra (2009), estão listadas algumas alterações que são causa de arrancamento e perda de penas em psitacídeos e podem ser utilizadas no diagnóstico diferencial para PBFD.

Quadro 6. Causas de perda de penas em psitacídeos.

Causas Orgânicas	Causas Ambientais	Causas Comportamentais
<ul style="list-style-type: none"> - Processo de muda normal - Polyomavirus (APV) - Hipotireoidismo - Carências nutricionais (Vitamina A e aminoácidos essenciais) - Doença hepática (metabólica ou infecciosa) - Foliculite (Fúngica, bacteriana, por clamídeas ou viral) - Parasitas (internos e externos) - Processos alérgicos (atopia, alergia alimentar) - Neoplasias cutâneas - Aspergilose sistêmica - Clamidiose - Aerossaculite bacteriana - Doença que produza dor (artrites, outras) - Apresentação clínica de Pbfd 	<ul style="list-style-type: none"> - Umidade relativa baixa - Irritantes ambientais - Falta de banhos - Má higiene das instalações - Alterações do fotoperíodo 	<ul style="list-style-type: none"> - Demasiado estresse (presença de humanos e de outros animais, acúmulo de estresse) - Excesso de tempo livre - Sexual - frustração ou estimulação hormonal em excesso - Comportamento de postura

(Piçarra, 2009)

1.2.9. Tratamento e profilaxia

Não existe tratamento específico e com eficácia inquestionável para a Pbfd (Dahlhausen e Radabaugh, 1997; Bert *et al.*, 2005). O tratamento sintomático e de suporte são as únicas formas de controlar a doença (Kondiah, 2004). A profilaxia envolve o controle analítico e a quarentena dos animais recém-adquiridos, o isolamento e/ou a eutanásia dos animais positivos, assim como a limpeza, desinfecção e vazio sanitário prolongado das instalações onde permaneceram indivíduos infectados (Dahlhausen e Radabaugh, 1997; Bert *et al.*, 2005).

O monitoramento preventivo de aves tem sido utilizado como forma de prevenir a disseminação da doença e de reduzir a prevalência da infecção (Dahlhausen e Radabaugh, 1997; Bert *et al.*, 2005).

Foi demonstrado em estudo alguma eficácia na utilização de interferon omega felino tipo 1 (Virbagen omega®, Virbac Animal Health, França) em conjunto com nebulizações ambientais com um desinfetante viricida à base de amônia quaternária (F10 SC®, Health and Hygiene td, África do Sul) (Piçarra, 2009) e também em outro trabalho foram obtidos bons resultados com a utilização de beta-(1,3/1,6)-D-glucano na eliminação da infecção por BFDV em periquitos do

gênero *Eunymphicus sp.* e cacatuas de Mitchell (*Cacatua leadbeteri*) (Tomasek e Tukac, 2007).

Os circovírus são muito estáveis no ambiente e resistentes a muitos tratamentos físicos e químicos. O PCV 1 e CAV mostraram ser resistentes a formol e éter 15 minutos à temperatura de 70°C e pH 3. O tratamento com iodo ou lixívia a altas concentrações foi capaz de inativar o BFDV num estudo (Khalesi, 2007). Segundo Greenacre (2005) o agente pode ser inativado com a aplicação de iodo a 1%, hipoclorito de sódio, B-propionolactona a 0,4%, glutaraldeído a 1% e com calor (80° C durante 1 hora). Iodo, hipoclorito de sódio a 10%, 0,4% beta propriolactona, glutaraldeído 1%, e aquecimento a 80 ° C por uma hora inativam CAV e podem ser considerados como opções para a desinfecção (Ritchie, 1995).

Bonne *et al.*, (2009) publicaram resultados satisfatórios na produção de uma vacina recombinante a partir da proteína do capsídeo do BFDV (recBFDVcap), que poderá vir a ser desenvolvida comercialmente no futuro.

2. Objetivos

Determinar a ocorrência da doença do bico e das penas (PBFD) em psitacídeos nativos silvestres de Centros de Triagem no estado de Minas Gerais e da rotina do laboratório do setor de Doença das Aves da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG; utilizando a PCR para a detecção do DNA de BFDV e o diagnóstico histopatológico complementar em aves naturalmente infectadas.

2.1. Objetivo geral

Determinar a ocorrência da doença do bico e das penas (PBFD) em psitacídeos em triagem e cativeiro em Belo Horizonte e Uberaba, Minas Gerais.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a ocorrência do vírus da PBFD (BFDV) em espécies de psitacídeos em triagem.

Empregar técnica de PCR para a detecção do DNA de BFDV.

Examinar amostras de sangue, fígado e swabs cloacais de psitacídeos.

3. Material e métodos

3.1. Local de execução do Projeto

Foram coletadas amostras de aves do CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres) de Belo Horizonte e de Uberaba e amostras recebidas na rotina do laboratório de criatórios comerciais. As amostras foram processadas no Setor de Doenças das Aves, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da UFMG (EV-UFMG), com extrações de DNA iniciais no Setor de Virologia Comparada do ICB/UFMG e sequenciamentos no Setor de Genética, Departamento de Zootecnia, EV-UFMG.

3.2. Aves

Foram estudadas nove espécies de psitacídeos num total de 190 indivíduos, sendo 160 indivíduos da espécie *Amazona aestiva*, 3 da espécie *Ara ararauna*, 2 da espécie *Aratinga leucophthalma*, 1 da espécie *Pionus maximiliani*, 1 da espécie *Guarouba guarouba*, 11 da espécie *Amazona amazonica*, 5 da espécie *Amazona*

vinacea, 4 da espécie *Amazona rhodochoryta* e 3 da espécie *Anodorhynchus hyacinthinus*.

3.3. Amostragem

A amostragem está apresentada no Quadro 7. Foram coletados swabs cloacais de 80 aves do CETAS de Belo Horizonte ao acaso e sangue e swab cloacal de 30 aves ao acaso, sangue e swab cloacal de 16 amostras de aves selecionadas por apresentarem sintomatologia, no CETAS de Belo Horizonte, 18 amostras de swab cloacal de aves do CETAS de Uberaba e 140 amostras de fígado de aves que vieram a óbito e foram necropsiadas no Setor de Doença das Aves da UFMG, incluindo animais do CETAS de Belo Horizonte e de criatórios comerciais, totalizando 330

amostras. As amostras foram coletadas durante o período do mês 01 de 2009 a mês 10 de 2010.

As amostras cloacais foram coletadas com hastes flexíveis estéreis e colocadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,15M) PBS (*phosphate buffered saline*) (NaCl 8,77 gL⁻¹, Na₂HPO₄ 3,58 gL⁻¹, KH₂PO₄ 1,36 gL⁻¹) e mantidas a -20°C. O sangue foi coletado por punção da veia braquial e foram retirados mais ou menos 0,5 ml, em tubos com ou sem EDTA e mantidos à -20° C. As aves que vieram a óbito foram necropsiadas e amostras de fígado foram coletadas e mantidas à -20°C. Com poucas exceções, as aves foram anilhadas e pesadas. As aves foram escolhidas aleatoriamente e examinadas logo à chegada ao CETAS, antes de ter contato com qualquer outro animal do local.

Quadro 7. Locais de coleta, número e tipo de amostras dos psitacídeos

Local da coleta	Número de amostras	Tipo de amostra
CETAS BH	80	Swab cloacal
CETAS BH	140	Fígado
CETAS BH	30	Swab cloacal
CETAS BH	30	Sangue
CETAS Uberaba	18	Swab cloacal
CETAS aves com problemas de empenamento	16	Swab cloacal
CETAS aves com problemas de empenamento	16	Sangue
Total de amostras	330	

3.4. Contenção das aves

As aves foram contidas fisicamente pelo médico veterinário responsável, sem o uso

de contenção química, visando reduzir o estresse e o risco de eventuais efeitos colaterais indesejáveis da sedação química.

3.5. Extração do DNA

A extração do DNA dos tecidos (fígado) foi feita pelo método de sílica seguindo o protocolo de Boom *et al.* (1990) modificado por Caxito *et al.* (2007). A extração foi realizada através da reação de mais ou menos 1 cm cúbico de material bruto (fígado) previamente macerado com três volumes (600µl) de iodeto de sódio (NaI) sob aquecimento a 55°C e agitação por 15 min. O material obtido foi então submetido à centrifugação por 15 minutos a 4000g e o sobrenadante coletado com o auxílio de uma pipeta. Foram adicionados à mistura 50µl de suspensão de sílica e a nova mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vortex. A mistura foi incubada em agitador por 10 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 30 segundos a 14000g, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo.

O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de NaI e rapidamente homogeneizado com o auxílio de um vortex. A mistura foi centrifugada por 30 segundos a 14000g e o sobrenadante descartado.

O sedimento foi lavado duas vezes com 1 ml de tampão de lavagem (Etanol 50%, 50mM Tris-HCl pH8,0, 10mM EDTA pH 8,0). Após centrifugação por 30 segundos a 14000g todo o tampão de lavagem foi removido com o auxílio de uma pipeta.

Foi adicionado 1 ml de acetona e após homogeneização no vortex, e centrifugação por 30 segundos a 14000g, o sobrenadante foi descartado e o resíduo de acetona evaporado do sedimento em tubo com tampa aberta, mantido a 55°C por 10 minutos.

O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 50µl de TE (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA pH 8,0), incubado a 55°C por 10 minutos e o tubo foi centrifugado por 30 segundos a 14000g para solidificar o sedimento. O

sobrenadante (DNA molde) foi removido com o auxílio de uma pipeta e estocado em freezer a -20°C até a hora de uso.

A extração do DNA dos swabs cloacais foi feita da mesma maneira como citado acima, modificando somente as etapas iniciais nas quais foram adicionados três volumes (600µl) de iodeto de sódio (NaI) sob aquecimento a 55°C e vortezização por 15 min como citado. O material obtido foi submetido à centrifugação durante 4 min. em agitação e então os swabs foram retirados com o auxílio de uma pinça. A partir dessa etapa adicionou-se a sílica o método utilizado foi o mesmo.

A extração do sangue foi feita também com similaridade ao método de extração do fígado, modificando a etapa inicial na qual se utilizou 50 µl da amostra de sangue adicionando-se três volumes (600 µl) de iodeto de sódio (NaI) sob aquecimento a 55°C e agitação por 15min. A partir dessa etapa adicionou-se a sílica e o método utilizado também foi o mesmo.

3.6. Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA

As amostras de DNA total extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Este aparelho permite a análise e quantificação de amostras de ácido nucléicos utilizando 1µl da amostra de interesse. É ligado a um computador que analisa os dados enviados pelo aparelho e estima a quantidade de DNA na amostra em ng/µl e a qualidade do material pelo valor obtido na razão DO_{260nm}/DO_{280nm} .

3.7. Condições da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação de parte do genoma do circovírus dos psitacídeos

O DNA total das amostras foi empregado como molde para a amplificação de parte do genoma do circovírus dos psitacídeos pelo PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (Quadro 8) de acordo com Ypelaar *et al.* (1999).

Os oligonucleotídeos iniciadores foram confeccionados pela INVITROGEN Life Technologies (São Paulo, Brasil), e armazenados a -20°C em sua formareconstituída em TE. O controle positivo utilizado foi amostra de sangue de *Psittacula krameri* (Ring neck). A ave apresentou sintomatologia crônica da

doença e foi confirmada como sendo positiva por PCR, sequenciamento da amostra e comparação no GenBank, apresentando similaridade com amostras anteriormente sequenciadas. A amostra utilizada como controle positivo foi denominada como BH 27.

Os primers foram desenvolvidos de acordo com o posicionamento em ORF 1 (Fig. 5) e têm como produto uma sequência de 717 pb (Ypelaar *et al.*, 1999).

Quadro 8. Iniciadores, sequências de bases e localização genômica dos primers utilizados no estudo

Primer	Sequencia (5' → 3')	Posição BP
1	5-AACCCTACAGACGGCGAG-3	182±199
2	5-GTCACAGTCCTCCTTGTACC-3	879±898

Ypelaar *et al.*, (1999).

Os primers citados acima amplificam regiões dentro da cadeia aberta de ORF 1 produzindo produtos consistentes. Oligonucleotídeos baseados em regiões fora da ORF1 não produziram produtos consistentes do PCR, sugerindo haver variações genéticas fora da ORF 1 (Ypelaar *et al.*, 1999).

3.8. Análise dos produtos amplificados em PCR

Após o ciclo de amplificação, a cada 8µL do produto amplificado foram adicionados 2µL de tampão corante de amostra (60% de glicerol, 10% de TBE 10X e azul de bromofenol) na concentração de 5X), e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão de corrida TBE 0,5 X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico).

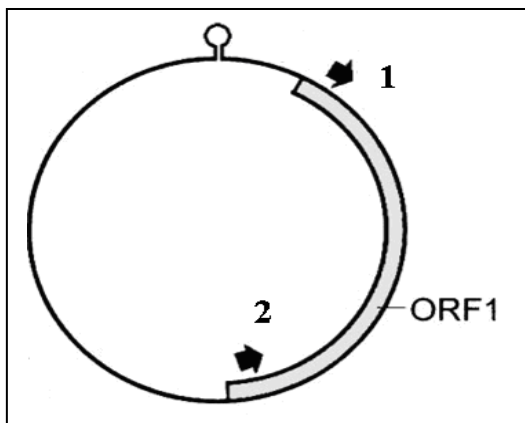


Fig. 3. Posição e orientação dos primers utilizados para a amplificação de ORF1 do genoma do BFDV.

A corrida foi realizada em temperatura ambiente, com tempo médio de 20 minutos, em voltagem constante (100 V). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (10mg/ml), por 20 minutos, em ambiente desprovido de luz, para a visualização dos fragmentos.

Para visualização dos fragmentos amplificados, utilizou-se transiluminador ultravioleta (254nm – Pharmacia LKB MacroVue TM , Amersham, EUA).

3.9. Sequenciamento

3.9.1. Reação de sequenciamento

O sequenciamento foi feito no laboratório de Genética e no Setor de Doença das Aves da UFMG. Os produtos amplificados foram submetidos a um processo de sequenciamento pelo método de dideoxinucleotídeos, descrito por Sanger *et al.* (1997), em um sequenciador automático capilar (ABI 310, Applied Biosystems, Estados Unidos), utilizando o *kit Big Dye Terminator Mix* (Applied Biosystems,

Estados Unidos), de acordo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Aproximadamente 1µl do produto de PCR purificado foi utilizado em cada reação de sequenciamento, adicionando 1 µl de cada iniciador na concentração de 10 µmol, 2 µl de *Big Dye*, 1,5 µl de tampão *Save Money* (Applied Biosystems, Estados Unidos) e água milliQ quantidade suficiente para 10 µl. A reação de sequenciamento foi feita em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., Estados Unidos), utilizando o seguinte ciclo: desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento do iniciador a 50°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos, sendo esse ciclo repetido por 30 vezes. Em seguida, o produto da reação de sequenciamento foi purificado por precipitação utilizando isopropanol e etanol e homogeneizado em formamida, sendo então feita a desnaturação rápida a 95 °C por 2 minutos e colocado no gelo imediatamente. O sequenciamento foi feito pelo programa Sequencing Analyses versão 5.2 da Applied Biosystems.

3.9.2. Montagem e edição das seqüências nucleotídicas

Para análise da qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento das fitas senso e anti-senso, foi utilizado o programa Bioedit (Hall, 1999).

3.9.3. Busca das seqüências similares em bancos de dados

Para início das análises, todas as seqüências finais geradas foram comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os algoritmos dos programas BLAST 2.0 (*Basic Local Alignment Search Tool*),

BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), desenvolvidos pelo NCBI, foram utilizados para a busca de similaridade entre os nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente (Altschul *et al.*, 1997).

3.9.4. Alinhamento das sequências

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e sequências inferidas de aminoácidos foram feitos com o auxílio dos programas Clustal W versão 1.6 implementado no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 5.0/ www.megasoftware.net) versão 5.0 para Windows. Todos os alinhamentos foram revisados e editados manualmente quando necessário.

3.9.5. Análises filogenéticas

Para análise da qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento das fitas senso e anti-senso, foi utilizado o programa BioEdit (Hall, 1999). Todas as sequências finais geradas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram alinhadas com as sequências de PBFd depositadas no GenBank com o auxílio do programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), implementado no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* MEGA versão 5.0 e no programa BioEdit para Windows (Tamura *et al.*, 2011).

A análise filogenética dos nucleotídeos e dos aminoácidos do gene VP1 foi feita usando o método *neighbor-joining*, com o programa MEGA 5.0. Neste mesmo programa, os dados foram submetidos ao teste de confiança em topologia (Bootstrap)

com 1000 reamostragens, para testar o grau de confiabilidade dos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas. Com o método de substituição de nucleotídeos Kimura 2-parâmetro (Kimura, 1980) e o método de substituição de aminoácidos JTT (Jones *et al.*, 1992).

3.10. Histopatologia

Alguns animais que vieram a óbito durante o período do experimento foram necropsiados. Foram coletadas amostras de fígado, rins, baço, coração e mantidos no formol a 10%. Dos animais positivos no PCR dos quais havia o material preservado em formol foram feitos procedimentos de rotina e a coloração utilizada foi hematoxilina-eosina.

3.11. Prevalência

A prevalência para a doença foi calculada de acordo com a seguinte fórmula, de acordo com Smith, (1994).

$$\text{Taxa de Prevalência} = \frac{\text{Número de casos}}{\text{Número de Indivíduos Estudados}}$$

4. Resultados e discussão

4.1. PCR

Os resultados estão apresentados à Tab. 1. Um produto de 717 pares de bases foi obtido (Fig. 4), compatível com a descrição da literatura (Ypelaar *et al.*, 1999). Entre as amostras coletadas de swabs cloacais (n=110) de aves do CETAS de Belo Horizonte 0% foram positivas. Entretanto, das amostras de fígado (n=140), 7,85% (11/140) foram positivas para PBFV. Das aves que tiveram swabs cloacais analisados, 19 vieram a óbito e amostras de fígado também foram analisadas, sendo 21% (4/19) positivas na análise das amostras de fígado e 0% positivas (0/19) para PBFV na análise das amostras de swab cloacal. Das amostras de sangue 0% (0/30) foram positivas para PBFV.

Entre as amostras de swab cloacal das aves do CETAS de Uberaba, 100% (0/18) foram negativas (swab cloacal).

Das amostras de coletadas nas aves selecionadas com problema de empenamento, 6,25% (1/16) foram positivas em sangue e 0% (0/16) foram positivas para amostras de swab cloacal.

As espécies *Amazona aestiva* e *Ara ararauna* foram positivas. Existem poucos relatos no Brasil nessas espécies e pode haver algum fator associado de maior susceptibilidade. Sugere-se atenção para o risco da mistura de aves de origens e espécies diferentes. As aves da espécie *Amazona aestiva* positivas apresentaram-se assintomáticas, já a arara canindé (*Ara ararauna*) positiva apresentou sintomatologia clínica que será descrita posteriormente (Fig. 5, 6 e 7).

Foram negativas as espécies *Aratinga leucophthalma*, *Pionus maximiliani*, *Guarouba guarouba*, *Amazona amazonica*,

Amazona vinacea, *Amazona rhodochoryta* e *Anodorhynchus hyacinthinus*.

Os resultados detalhados estão descritos nas tabelas 1, 2 e 3.

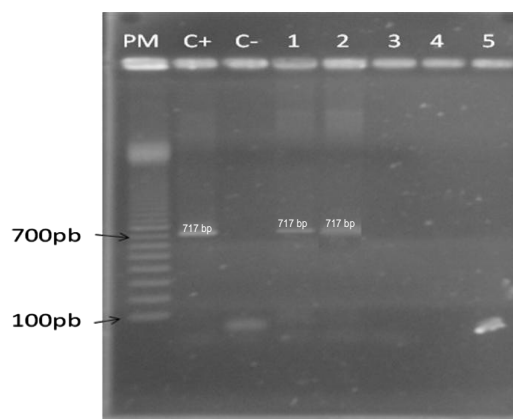


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo mostrando o segmento esperado de 717 pb da ORF 1, de produtos amplificados de amostras de fígado de *Amazona aestiva*. Canaletas PM peso molecular (100 pb), C+ controle positivo, C- controle negativo, 1, 2, 3, 4 e 5 amostras de campo.

Do total de 330 amostras 3,63% foram positivas para PBFV e do total de animais testados 6,31% (12/190) foram positivos para PBFV. Segundo Dahlhausen e Radabaugh (1993) nas aves do novo mundo, as taxas chegam apenas a cerca de 4% (gêneros *Ara* e *Amazona*). Poder-se-ia justificar a maior ocorrência em nosso estudo, tendo em vista que as condições em triagem poderiam favorecer a disseminação de BFDV. A avaliação clínica e de outros

parâmetros das aves testadas com sintomatologia clínica condizente com PBFID estão citadas na Tabela 3. Algumas aves podem desenvolver uma resposta imune protetora com ausência de sinais clínicos e eliminação viral com re-agudização da infecção em condições adversas (Dahlhausen e Radabaugh, 1993). Um estudo semelhante foi realizado por Khalesi *et. al.* (2005).

Tabela 1. Locais de coleta, número e tipo de amostra e porcentagem de amostras positivas

Local da coleta	Número de amostras	Tipo de amostra	Porcentagem de positivos
	80 (61+19)	Swab cloacal	0%
CETAS BH	140 (121 + 19)	Fígado	7,8%
	19 + 19	Fígado + Swab cloacal do mesmo animal	21% e 0%
	30	Sangue	0%
CETAS Uberaba	18	Swab cloacal	0%
CETAS aves com problemas de empenamento	16	Swab cloacal	0%
	16	Sangue	0%
Total de amostras	330	Sangue + swab cloacal + fígado	3,63%

Tabela 2. Número de amostras e porcentagem de positivos por tipo de material coletado

	Número de amostras coletadas por tipo de material	Porcentagem de amostras positivas
Swab cloacal	144	0%
Fígado	140	7,8%
Sangue	46	2,1%
Total de amostras	330	3,63%

A infecção de aves saudáveis devido ao contato com portadores assintomáticos já foi descrita e sabe-se da capacidade de algumas espécies de manterem infecções latentes (Phalen, 2006; Piçarra, 2009). A partir da realização de testes de diagnóstico preventivos, a detecção dos animais portadores do BFDV permite isolá-los e impedir o contágio da PBFV.

Os dados das aves com alterações de empenamento (Tab. 3) do CETAS de Belo Horizonte foram obtidos de acordo com o preenchimento da ficha clínica (Anexo II), baseada em Rupley (1999).

A partir de estudos recentes, sabe-se que a infecção por BFDV pode resultar em sinais clínicos em psitacídeos do Novo Mundo (Phalen, 2006; Piçarra, 2009) embora alguns autores acreditem que tal efeito não deveria ocorrer (Gerlach, 1999). A infecção das aves nativas do Neotrópico pode ser muito importante, pois pode afetar a sua saúde e viabilidade, com riscos à recuperação das espécies ameaçadas.

Tabela 3. Avaliação clínica e detecção molecular do DNA de BFDV por PCR em psitacídeos com problemas de empenamento

Ficha	Espécie	PCR	C.C.	Ht%	Pplas	Problemas Observados
01	<i>Amazona aestiva</i>	-	Boa	61	6,2	Blefarite no olho direito, ausência de penas na cabeça, ao redor dos olhos, asas e na região dorsal. Coloração anormal (amarelada com pontos vermelhos na face). Canhão das penas expostos na asa direita.
02	<i>Aratinga leucophthalma</i>	-	Boa	58	4,1	Ausência de penas no dorso do corpo, descamação da pele, canhões de penas expostos.
03	<i>Amazona aestiva</i>	-	Boa	50	4,7	Penas amorfas nascendo no peito, nas asas e no dorso e no dorso das asas penas quebradiças, soltando fácil e amorfas.
04	<i>Ara ararauna</i>	+	Boa	50	3,6	Penas escassas na região da cauda, amorfas e canhão das penas exposto nas asas. Ausência de penas nas asas (primárias e secundárias).
05	<i>Amazona aestiva</i>	-	Boa	50	4,7	Ausência de penas na região do dorso, peito e asas, penas friáveis ao remover, amorfas e de coloração anormal.
06	<i>Amazona aestiva</i>	-	Regular	41	4,8	Ausência de penas na cauda, nas asas, crescimento anormal e canhões expostos na cauda. Penas amorfas.
07	<i>Amazona amazonica</i>	-	Boa	53	6,7	Penas amorfas de coloração escura, ausência de penas no peito, penas amorfas na cauda.
08	<i>Pionus maximiliani</i>	-	Regular	47	5,8	Ausência de penas na cabeça, na cauda, penas amorfas.
09	<i>Amazona aestiva</i>	-	Boa	54	4,6	Ruptura de saco aéreo na região do dorso da cabeça, ausência de penas no dorso da cabeça.
10	<i>Amazona aestiva</i>	-	Regular	51	5	Penas amorfas, sinusite, ausência de penas no dorso das duas asas.
11	<i>Amazona aestiva</i>	-	Regular	62	6,8	Ruptura de saco aéreo na região torácica (peitoral), penas amorfas em pequena quantidade no dorso. Penas amorfas na cauda.
12	<i>Amazona aestiva</i>	-	Ruim	48	4,0	Penas da face amorfas, conjuntivite, escamação do bico, sinusite.
13	<i>Aratinga leucophthalma</i>	-	Regular	46	3,4	Ausência de penas na cabeça, rabo e asas.
14	<i>Amazona aestiva</i>	-	Ruim	58	5,4	Ausência de penas na cabeça, penas amorfas na quilha do esterno. Penas com coloração anormal.
15	<i>Amazona aestiva</i>	-	Regular			Sinusite, dificuldade respiratória, penas amorfas.
16	<i>Amazona aestiva</i>	-	Regular	54	7,0	Penas amorfas nas asas e na cabeça. Laceração na cabeça (dorso).

Notas: C.C. - condição corpórea; Ht- hematócrito; Ppla – proteína plasmática %.

A maioria dos sinais observados nas aves estudadas com alterações de empenamento foi, provavelmente, devido a causas externas à PBF, já que, das 16 aves avaliadas clinicamente com quadro de alopecia, apenas uma foi positiva para BFDV. Entretanto, pode ocorrer também que as aves infectadas pelo BFDV não estavam em fase de viremia, não sendo BFDV detectável pela PCR em um único teste.



Figura 5. Arara Canindé (*Ara ararauna*) do CETAS de Belo Horizonte positiva para PBF (PCR).

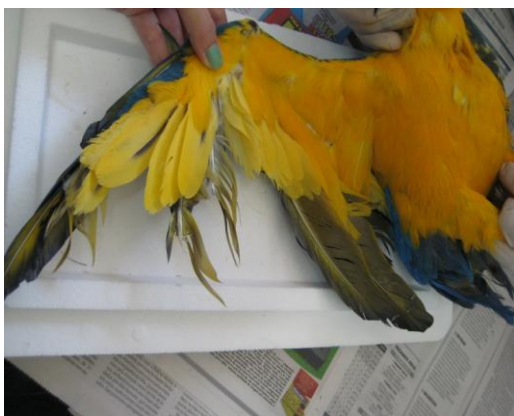


Figura 6. Arara Canindé (*Ara ararauna*) com penas disformes, quebradiças, ausência de penas na asa.

Os swabs cloacais das aves amostradas em todo o estudo foram quantificados e resultaram em sua maioria, em menos de 200 ng de DNA por μL e pureza muito abaixo de 2 (média entre 0,4 e 0,5) indicando que para o método de extração utilizado, o swab cloacal não seria o mais recomendado. A negatividade do swab cloacal de indivíduos positivos no fígado poderia ser explicada pela presença de inibidores de DNA, potencialmente de origem fecal. Outra possibilidade seria um estado de latência, no qual haveria a integração do genoma de BFDV em poucas células do hospedeiro, sem eliminação fecal.



Figura 7. Arara Canindé (*Ara ararauna*) com penas distróficas, ausência e quebra de penas, especialmente visíveis na cauda.

De forma a aumentar a sensibilidade do teste efetuado, o controle laboratorial sistemático deverá consistir na retirada de amostras de swab cloacal, juntamente com a amostra de sangue, e se o animal vier a óbito, o recolhimento de amostras de tecido do fígado, visto que a análise conjunta das amostras biológicas pode ser mais sensível (Khalesi *et al.*, 2005).

O PCR de amostras de sangue pode não ser a melhor análise para exames de monitoramento e rotina, pois podem surgir falsos negativos e também pode ocorrer a não detecção de aves portadoras

assintomáticas que não estão em fase virêmica. Nestes casos, poderá ser mais indicado realizar análise genética de amostras conjuntas dos vários tecidos (sangue, penas e swab cloacal) (Piçarra, 2009).

Como já descrito anteriormente, anormalidades nas penas podem ser devido a vários fatores e uma investigação minuciosa do médico veterinário é necessária para um diagnóstico preciso.

O principal foco do atual estudo foram os psitacídeos da fauna brasileira, principalmente o papagaio verdadeiro, e os resultados foram positivos, indicando que também são susceptíveis à doença e, portanto devem também considerados como importantes objetos de estudo.

Apesar de não apresentarem sintomatologia na maioria das vezes, são portadores e transmissores da doença. Observou-se que os psitacídeos estudados apresentaram na grande maioria dos casos, infecção assintomática, condizente com estudos já publicados e torna-se importante, pois sabemos tratar-se de possíveis fontes de contágio e dispersão do vírus (Dahlhausen e Radabaugh, 1997).

As aves positivas foram recebidas na rotina dos Cetas sem apresentar alterações relacionadas ao empenamento, comprovando que um levantamento da doença nos plantéis é de grande importância. Os sinais clássicos observados (Fig. 8) em aves da fauna exótica não foram observados nos animais da fauna brasileira.

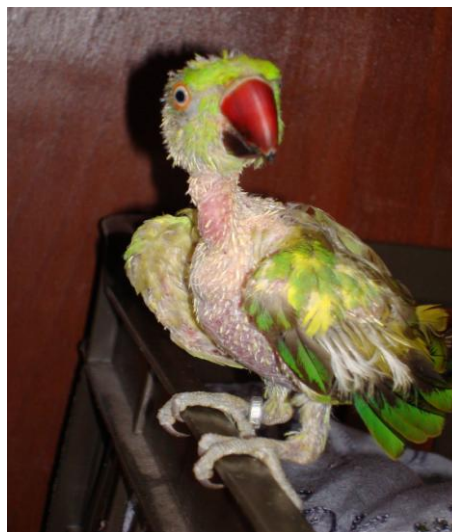


Figura 8. *Psittacula krameri* (Ring Neck) positiva para BFDV por PCR e sequenciamento. Aves com ausência de penas na região toraco-abdominal com 1 ano de idade e infecção crônica.

Atualmente os criatórios, principalmente comerciais, têm grande variedade de psitacídeos silvestres e exóticos sendo criados conjuntamente facilitando a dispersão da doença. Observou-se na rotina do laboratório de doença das aves da UFMG que surtos estão ocorrendo em criatórios comerciais de psitacídeos exóticos. O atual estudo demonstra que uma relação entre a contaminação entre aves exóticas e aves silvestres pode estar ocorrendo. Matrizes positivas para BFDV devem ser retiradas da reprodução, tendo em vista o risco de transmissão vertical. A venda de aves positivas não deve ocorrer pois é risco potencial de transmissão e disseminação da doença entre criatórios. O controle desse comércio é muito difícil, porque na maioria das vezes os donos dos criatórios estão interessados no lucro que obterão com a venda das aves, desconsiderando os riscos e o impacto que poderão causar à fauna revendendo animais positivos para PBFV. Recomenda-se para aves positivas a eutanásia. Não existe tratamento comprovado para a doença em questão. Deve-se levar em conta a espécie,

a idade e a origem da ave em questão no diagnóstico da doença (Phalen, 2006; Piçarra, 2009; Ritchie, 1995).

Neste estudo, aves ameaçadas, como a ararajuba e arara azul que vieram a óbito e foram encaminhadas para o laboratório, foram negativas para PBFV.

Tal como referido por Bert *et al.* (2005) a aplicação de métodos de diagnóstico de forma sistemática, especialmente nos centros de triagem, criação e dos circuitos comerciais é uma forma de combater e reduzir a prevalência da PBFV. O isolamento e/ou eliminação dos animais positivos, junto com as medidas de quarentena mínimas, permitiu diminuição da prevalência nos EUA (Bert *et al.*, 2005) e poderia obter resultados semelhantes na região geográfica estudada. Os animais recém-adquiridos devem sempre ser colocados em quarentena pela possibilidade de ocorrência de falsos negativos laboratoriais e de quadros silenciosos em animais não testados (Olsen e Speer, 2009).

A vacinação individual dos psitacídeos poderá ser a ferramenta de eleição num futuro mais ou menos próximo, no controle da BFDV. A vacina poderá ser produzida através da proteína recombinante recBFDVcap (Bonne *et al.*, 2009), embora sejam necessários estudos que permitam confirmar a eficácia e segurança da vacina.

4.2. Sequenciamento

Foram analisadas sequências de BFDV encontrados em duas amostras de fígado (BH 215 e BH 732) de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) que foram comparadas a amostra BH 27 de Ring-Neck (*Psittacula krameri*) (controle positivo). A estirpe BH 27 foi considerada positiva após resultado positivo por PCR e sequenciamento. Demonstrou-se alta qualidade do eletroferograma das estirpes positivas por

PCR que foram sequenciadas. Atribui-se esses resultados à utilização de pares de iniciadores altamente específicos (Ypelaar *et al.*, 1999). Confirmou-se a similaridade das sequências obtidas em comparação com sequências disponibilizadas no GenBank, com identidade unicamente com estirpes de BFDV. As três amostras foram depositadas no *GenBank* (JQ649409 a JQ649411).

4.2.1. Análise da sequência de nucleotídeos e análise da sequência deduzida de aminoácidos

Foram analisadas as sequências de BFDV de duas estirpes, BH 215 e BH 732, obtidas do fígado de *Amazona aestiva*, em comparação com sequências disponibilizadas no *GenBank*, resultando em identidade apenas com estirpes de BFDV.

Para estirpe BH 215 o alinhamento das sequências de nucleotídeos com as sequências de estirpes publicadas, revelou 19 substituições de nucleotídeos. Baseado nas comparações de porcentagem de homologia, obteve-se identidade de 97,2% com a estirpe AF311302.1 de *Cacatua galerita*, com escore foi 1181 bits (639) nucleotídeos. Não houve inserção nem deleção de bases.

Para a estirpe BH 732, a análise da sequência dos 659 nucleotídeos entre as posições 203 a 861, em alinhamento com alguns isolados publicados, revelou 18 substituições de nucleotídeos. Com base nas comparações de porcentagem de homologia foi encontrada identidade de 97,2% com GQ165758.1 do isolado BK53ZA_86 de periquito (*Melopsittacus undulatus*), com escore de 1118 bits (605) nucleotídeos, demonstrando alta confiabilidade e e-value baixo indicativo de bom alinhamento. Não houve inserção nem deleção de bases.

As análises das sequências de aminoácidos deduzidos revelaram, para a estirpe BH 215, que não houve substituição de aminoácidos, com 99% de similaridade com a sequência (ACY78221.1) do isolado BKS3ZA_86, ocorrendo substituição dos aminoácidos treonina por alanina. Essa substituição pode significar troca natural (mutação) e potencial alteração da função da proteína, podendo, entretanto, ser devida a erro durante a polimerização. Entretanto, a análise da sequência de 232 aminoácidos entre as posições 180 e 696, revelou 100% de identidade. Outros sequenciamentos da mesma estirpe serão necessários para esclarecer se a troca é real.

O alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas para a estirpe BH 732 não revelou substituição de aminoácido, com 98% de similaridade com a sequência ACY78221.1 (África do Sul), com indicação de substituição positiva de ácido aspártico por ácido glutâmico,

embora com 100% de similaridade no segmento de 219 aminoácidos entre as posições 25 e 243. A substituição observada entre aminoácidos de caráter semelhante (ácidos) parece não acarretar alterações na função protéica.

4.2.2. Análise filogenética

Para a construção da árvore filogenética por substituição de nucleotídeos foram escolhidas sequências depositadas no *GenBank* de estirpes de BFDV originárias de regiões distintas, geograficamente distantes em diferentes continentes e também a amostra controle BH 27 também depositada no Genbank (JQ649411), na tentativa de estabelecer alguma relação geográfica entre as sequências obtidas nesse estudo e aquelas depositadas (Fig. 9).

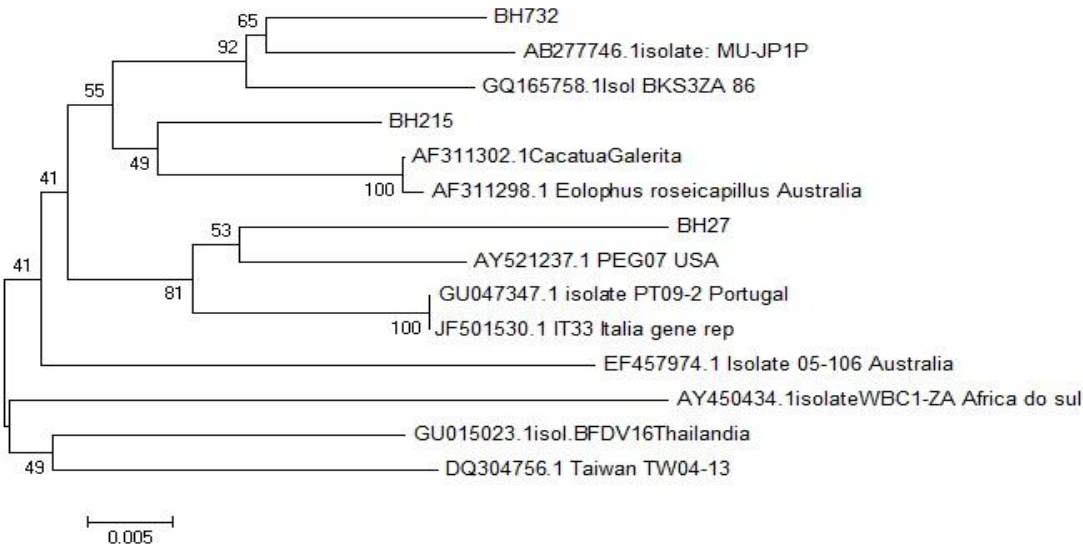


Figura 9. Dendrograma construído pelo método de “neighbor-joining”, usando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura-2 parâmetro, implementado no programa Mega 5.0. Os números representam os valores de Bootstrap (1000 reamostragens) em que >70 são considerados confiáveis. Amostras deste identificadas com BH 632 e BH 215.

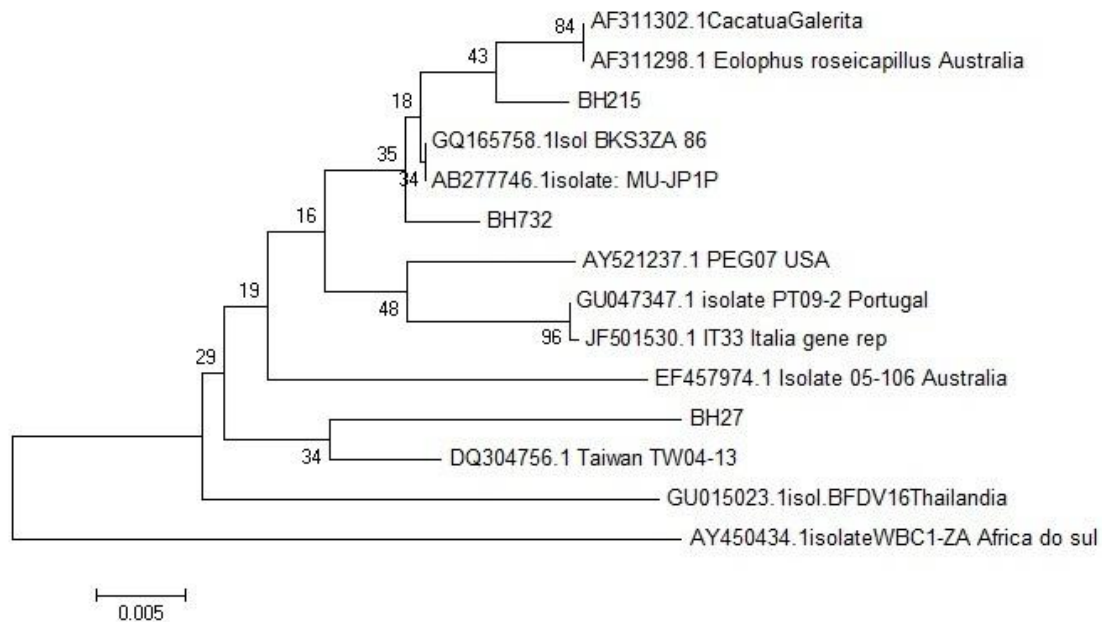


Figura 10. Agrupamento entre amostras de PBFD do presente estudo e de outras partes do mundo depositadas no GenBank com base no segmento de 210 aminoácidos da região que codifica a proteína VP1. O dendograma foi construído pelo método de “neighbor-joining”, usando modelo de substituição de aminoácido do JTT implementados no programa MEGA 5.0. Os valores de reprodutibilidade das análises estão apresentados em porcentagens e são referentes a 1000 repetições (Bootstrap).

Os resultados obtidos com agrupamento de nucleotídeos (Fig. 9) permitiram estabelecer relação geográfica entre as seqüências avaliadas, sendo a estirpe BH 732 bastante similar às estirpes MU-JP1P (Japão) e GQ165758. O bom alinhamento das seqüências, obtido nos testes de similaridade, reforça a boa qualidade das seqüências e indica que não houve resultado falso-positivo. A estirpe BH 215 se mostrou similar à AF 311302.1 *Cacatua galerita* e AF 311298.1 *Eolophus roseicapillus* Austrália. Já a estirpe BH 27 é bastante similar à Ay 521237.1 PEG 07 USA. Não houve inserção nem deleção de bases nas seqüências estudadas.

Os resultados obtidos com agrupamento de aminoácidos (Fig. 10) permitiram estabelecer relação geográfica entre as seqüências avaliadas, sendo a estirpe BH 732 bastante similar às estirpes MU-JP1P (Japão) e GQ165758. O bom alinhamento das seqüências, obtido nos testes de similaridade, reforça a boa qualidade das seqüências e indica que não houve resultado falso-positivo. A estirpe BH 215 se mostrou similar à AF 311302.1 *Cacatua galerita* e AF 311298.1 *Eolophus roseicapillus* Austrália. Já a estirpe BH 27 é bastante similar à DQ 304756.1 Taiwan TW04-13. Não houve inserção nem deleção de bases nas seqüências estudadas.

Menor similaridade foi encontrada de ambos isolados BH 215 e BH 732 com os

isolados WBC1-ZA (África do Sul), TW04-13 (Taiwan) e BFDV16 (Tailândia).

Nenhum isolado deste estudo apresentou 100% de homologia de nucleotídeos. A estirpe BH 215 apresentou maior similaridade com as estirpes GQ165758.1 Isol_BKS3ZA_86 (97,2%) e AB277746.1 isolate:_MU-JP1P (97,2%). A estirpe BH 732 apresentou maior similaridade com AF311302.1 *Cacatua galerita* (97,2%) e AF311298.1 (*Eolophus roseicapillus*, Austrália) (97,1%). As estirpes BH 215 e BH 732 (de *Amazona aestiva*) apresentaram similaridade com o controle positivo BH 27 (de *Psittacula krameri*) de 94,1% e 93,8%, respectivamente (Tab.4).

Nenhum isolado deste estudo teve 100% de homologia dos aminoácidos. A estirpe BH 215 apresentou maior similaridade com as estirpes GQ165758.1 isolado BKS3ZA_86, AB277746.1 isolado MU-JP1P, AF311298.1 de *Eolophus roseicapillus* Austrália e AF311302.1 de *Cacatua galerita*, de 99,1 %. A estirpe BH 732 apresentou maior similaridade com GQ165758.1 isolado BKS3ZA_86 e AB277746.1 isolado MU-JP1P, de 99,5% (Tab.5).

4.3 Histopatologia

Os resultados das estirpes de 8 aves positivas pela técnica PCR que vieram a óbito e foram necropsiadas no Laboratório de Doença das Aves da UFMG estão descritos no Quadro 9.

Observou-se que das oito aves, duas eram machos, cinco eram fêmeas e uma não teve o sexo determinado. O acesso ao resultado da necropsia do animal 15 não foi possível. Não há relação dos achados histopatológicos com circovírus neste animal. Os achados remetem à condição

neoplásica que pode estar associada a retrovírus. Sugere-se que no animal 412 havia algum agente que estava em replicação no fígado (Fig. 10a e 10b). Pode ter ocorrido imunodepressão por circovírus (lesão sugere infecção viral). No animal 732 a perda de hepatócitos pode indicar provável replicação de agente, sugerindo que possa ser, por exemplo, uma infecção por herpesvírus. A quantidade de linfócitos diminuída indicou depressão da imunidade, que pode ser gerada pela infecção por circovírus. Na ave 865 partir dos resultados as lesões sugeriram um quadro de hemocromatose. O aumento na quantidade de plasmócitos e diferenciação leucocitária indicaram que a ave estava em processo inflamatório, decorrente possivelmente de resposta a alguma infecção. Na ave 885 havia presença de megacariócitos possivelmente pelo fato da medula óssea não estar repondo células levando à ocorrência de hematopoiese extramedular, sugerindo anemia e hematócrito baixo. O infiltrado leve é sugestivo de infecção viral.

Tabela 4. Similaridade de nucleotídeos do gene da proteína VP1 nos isolados brasileiros comparados com estipes descritas em outros países.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 BH732 (<i>Amazona aestiva</i>)													
2 BH215 (<i>Amazona aestiva</i>)	96,2												
3 BH27 (<i>Psittacula krameri</i>)	94,1	93,8											
4 GQ165758.1 isolado BKS3ZA_86	97,2	96,6	93,6										
5 AB277746.1 isolado MU-JP1P	97,2	96,3	93,5	97,1									
6 AF311302.1 <i>Cacatua galerita</i>	95,6	97,2	94,5	96,0	95,5								
7 GU015023.1 isolado BFDV16 Tailândia	94,1	96,0	93,3	94,4	94,1	94,9							
8 AY450434.1 isolado WBC1-ZA_África_do_sul	93,5	94,0	92,5	93,7	93,0	93,8	94,0						
9 AF311298.1 <i>Eolophus roseicapillus</i> _Australia	95,5	97,1	94,3	95,8	95,4	99,9	94,8	93,7					
10 GU047347.1 isolado_PT09-2_Portugal	95,1	95,8	96,1	95,5	95,1	96,5	95,1	93,3	96,3				
11 DQ304756.1_Taiwan_TW04-13	94,2	94,9	94,6	94,0	94,4	94,8	95,6	93,3	94,8	95,1			
12 AY521237.1_PEG07_USA	95,9	95,4	96,1	95,4	95,4	95,9	94,6	93,2	95,7	96,6	94,7		
13 EF457974.1 isolado_05-106_Australia	94,1	94,4	92,8	94,3	94,0	94,5	94,0	92,4	94,6	94,1	94,4	94,8	
14 JF501530.1_IT33_Itália_gene_rep	95,1	95,9	96,0	95,6	95,1	96,5	95,1	93,3	96,4	100,0	95,1	96,8	94,1

Tabela 5. Similaridade entre aminoácidos dos genes da proteína VP1 nos isolados brasileiros comparados com outros encontrados no mundo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	BH732 (<i>Amazona aestiva</i>)												
2	98,5												
3	95,6	95,6											
4	99,5	99,1	96,1										
5	99,5	99,1	96,1	100,0									
6	98,5	99,1	95,1	99,1	99,1								
7	95,1	96,8	94,1	95,9	95,9	95,9							
8	94,1	94,0	93,1	94,0	94,0	93,1	92,6						
9	98,5	99,1	95,1	99,1	99,1	100,0	95,9	93,1					
10	97,6	97,2	97,1	98,2	98,2	97,2	94,9	92,1	97,2				
11	97,9	96,8	97,4	97,4	97,4	96,3	96,3	93,6	96,3	97,4			
12	97,6	97,3	96,1	98,2	98,2	97,3	94,9	92,1	97,3	98,2	96,3	!	
13	97,1	96,3	94,6	96,8	96,8	95,9	94,9	92,1	95,9	96,3	97,4	96,3	
14	97,6	97,2	96,6	98,1	98,1	97,2	94,8	91,8	97,2	100,0	97,4	98,1	96,2

Quadro 9. Alterações macro e microscópicas em papagaios *Amazona aestiva* positivos por PCR para o vírus da doença do bico e das penas.

N	Espécie	Sexo	Condição corporal	Necropsias	Histopatologia
15	<i>Amazona aestiva</i>				Fígado: áreas multifocais coalescentes com perda de hepatócitos. Linfócito neoplásico. Presença de células em mitose de origem hematocitária.
324	<i>Amazona aestiva</i>	Fêmea	Regular	Hepatomegalia, autólise avançada, líquido no pericárdio.	
325	<i>Amazona aestiva</i>	Fêmea	Regular	Autólise.	
350	<i>Amazona aestiva</i>	Fêmea	Ruim	Hepatomegalia, esplenomegalia, candidíase, autólise avançada.	
412	<i>Amazona aestiva</i>	Macho	Caquexia	Hepatomegalia, aerossaculite, esplenomegalia.	Fígado: aumento na quantidade de plasmócitos, presença de hemossiderina no interior dos macrófagos, aumento moderado na quantidade de macrófagos, autólise, focos de infiltrado multifocal linfoplasmocitário associado ao espaço periportal. Foco de necrose sugestivo de herpesvírus. Baço: áreas eosinofílicas, depleção linfóide. Não há presença de chlamydofila ou corpúsculos de inclusão.
721	<i>Amazona aestiva</i>		Caquexia	Proventrículo dilatado, trato gastrointestinal hiperêmico, petéquias no coração, nódulos caseosos raros no fígado, placas esbranquiçadas no baço, proventrículo hemorrágico, jejuno hemorrágico.	
732	<i>Amazona aestiva</i>	Fêmea	Caquexia	Aerossaculite, hepatomegalia, esplenomegalia, gastroenterite hemorrágica, pulmão esbranquiçado.	Fígado: congestão (grande quantidade de hemácias), infiltrado linfoplasmocitário predominantemente na região periportal, mas também no parênquima. Não visualizou-se hepatócitos. Hepatite multifocal linfoplasmocitária associada a necrose focal. Baço: hemossiderose moderada, com aumento dos plasmócitos.
865	<i>Amazona aestiva</i>	Macho	Regular	Aerossaculite e hepatomegalia.	Fígado: Presença de células inflamatórias, com proliferação de ducto biliar sugerindo lesão crônica. Grande quantidade de hemossiderina nos hepatócitos. Perda de hepatócitos. Necrose multifocal. Infiltrado plasmocitário periportal e no parênquima. Leve proliferação de ducto biliar. Hepatite plasmocitária periportal. Infiltrado neutrofilico. Hemossiderina associada à proliferação de ductos biliares associada à necrose de hepatócitos. Baço: hemossiderose. Aumento na quantidade de plasmócitos e na diferenciação linfocitária. Não há presença de chlamydofila ou corpúsculos de inclusão.
885	<i>Amazona aestiva</i>	Fêmea	Ruim	Gastroenterite hemorrágica, esplenomegalia	Fígado: infiltrado linfoplasmocitário periportal de baixa intensidade, autólise, sem foco de necrose. Hepatite linfoplasmocitária leve. Baço: quantidade moderada de macrófagos com hemossiderina. Presença de megacariócitos. Depleção linfóide moderada. Ativação moderada de plasmócitos.

Não foram encontrados corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos.

Segundo Donoley (2003), algumas lesões histopatológicas podem ser típicas de PBF, nomeadamente ao nível dos órgãos linfóides onde se observa depleção linfocitária e infiltração leucocitária o que foi observado em quatro estirpes. Os resultados do exame histopatológico das aves 412, 885, 865 e 732 sugerem que esses animais podem ter sofrido ação de algum agente viral, possivelmente o BFDV, conforme indicado pela PCR positiva, assim como poderia ter ocorrido a co-infecção por algum outro vírus, que se instalou na ave imunodeprimida pela infecção por BFDV, como o herpesvírus, por exemplo.

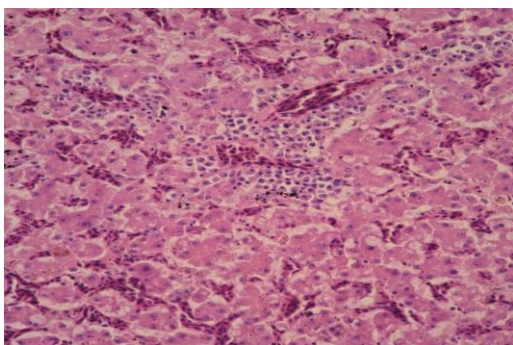


Figura 11a. Fígado ave 412. Áreas com infiltrado linfoplasmocitário perivascular.

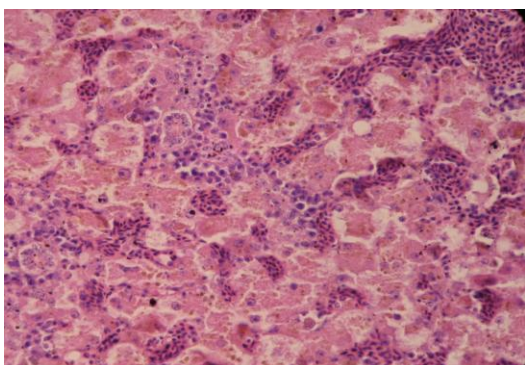


Figura 11b. Fígado ave 412. Áreas com infiltrado linfoplasmocitário e hepatócitos com coloração amarelada sugestiva de hemossiderina.

Após o diagnóstico histopatológico, podem ser aplicadas técnicas de PCR para a detecção genômica nas amostras teciduais fixadas, para confirmar o diagnóstico (Gerlach, 1999).

4.4. Prevalência

Foram estudadas 190 aves sendo que destas 12 foram positivas para PBF. A prevalência da PBF no estudo é de 6,3% (12/190). Em *Amazona aestiva* (6,25%) e *Ara ararauna* (33,33%) foi detectado o genoma de BFDV. Entretanto, a amostragem foi representativa apenas para *A. aestiva* e não suficiente para as outras espécies. A relação entre alterações da qualidade das penas e a infecção por BFDV não pode ser confirmada, apenas associável em um caso em *Ara ararauna*.

Os resultados de prevalência por espécie e total são apresentados na Tab. 6.

A prevalência em países europeus foi estudada por Rahaus e Wolff (2003) e por Bert *et al.* (2005). Rahaus e Wolff (2003) determinaram uma prevalência da infecção de 39,2% utilizando a técnica PCR da ORF 1 de penas em psitacídeos na Alemanha numa amostragem de 142 animais. Em 2005, Bert *et al.*, determinaram um valor mais reduzido para a prevalência de PBF na Itália – 8,05%, numa estirpe de 1516 animais. Estes autores realizaram análises de PCR da ORF V1 de sangue de animais vivos e, ocasionalmente, de penas do ninho onde permaneceram filhotes que vieram a óbito com suspeita de PBF. A discrepância entre estes dois resultados deve-se principalmente à natureza do material biológico que foi testado (penas) e à diferença no tamanho das amostras. De fato, essas diferenças não permitem sequer que se comparem os resultados obtidos nas duas publicações (Bert *et al.*, 2005).

A diferença entre as astirpes do estudo de Rahaus e Wolff (2003) e as do atual estudo poderia ser devida ao fato de os psitacídeos do novo mundo serem mais resistentes à PBFV e não apresentarem sintomatologia, sendo portadores da doença. Diversos autores têm descrito a menor predisposição das espécies americanas para um quadro sintomático (Gerlach, 1999). Essa diferença poderia ser também devida à natureza do material biológico testado, visto que na Itália foram feitos PCRs de sangue e pena.

As prevalências encontradas no estudo feito na Itália (Bert et al., 2005) e encontradas no presente estudo foram similares, embora não diretamente comparáveis, devido às diferenças das espécies de aves estudadas, número de amostras e natureza do material biológico testado.

Ambos estudos realizados na Europa apresentaram prevalências elevadas e bastante preocupantes, devido ao fato de muitos filhotes poderem vir a óbito com o

quadro agudo da doença sem se chegar a um diagnóstico que possa entrar no cálculo da prevalência (Bert et al., 2005). Esses resultados podem indicar que a propagação do vírus no continente europeu pode estar descontrolada e a PBFV pode ser responsável pela perda de grande quantidade de psitacídeos, sendo prejuízo tanto para o comércio quanto para os amantes dessas aves (Bert et al., 2005).

O quadro clínico mais identificado foi o assintomático (n=11), 91,6% do total de positivos (animais de rotina do CETAS). Este fato é relevante em termos de patogenia do vírus e reforça a importância do teste rotineiro das aves, mesmo que aparentemente saudáveis. Os animais positivos assintomáticos apresentam quadros latentes e são potenciais transmissores ou mesmo podem vir a desenvolver sintomas posteriormente (Piçarra, 2009).

Tabela 6. Prevalência de BFDV por PCR, tendo em conta os grupos taxonômicos

Grupo taxonômico	Total	Total de positivos (n)	Prevalência (%)
<i>Amazona aestiva</i>	160	11	6,25%
<i>Amazona amazonica</i>	11	0	0%
<i>Aratinga leucophthalma</i>	2	0	0%
<i>Pionus maximiliani</i>	1	0	0%
<i>Ara ararauna</i>	3	1	33,33%
<i>Amazona vinacea</i>	5	0	0%
<i>Amazona rhodochoryta</i>	4	0	0%
<i>Guarouba guarouba</i>	1	0	0%
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	3	0	0%
Total	190	12	6,31%

O estudo feito por Piçarra, (2009) indicou que as amostras *post-mortem* de outros tecidos que não sangue foram sempre positivas (n=3), o que pode revelar maior sensibilidade da análise de PCR para o tecido de órgãos linfóides e hepático. No atual estudo a maioria dos testes positivos

foram de tecidos hepáticos. Como já foi referido anteriormente, o BFDV infecta células linfóides em multiplicação e estes tendem a concentrar-se nos órgãos com funções imunitárias da ave.

No estudo feito por Bert (2005), foram estudados 253 aves do gênero *Amazona*, com porcentagem de positivos de 2,42% (6/253). No estudo atual foram avaliados 180 psitacídeos do gênero *Amazona* sendo a porcentagem de positivos de 5,5%.

A prevalência em aves em triagem observada no presente estudo é menor que a relatada na maioria dos estudos anteriores, particularmente daqueles realizados em países europeus os quais estudaram aves tanto do novo como do velho mundo (Raidal *et al.*, 1993; Rahaus & Wolff, 2003; Bert *et al.*, 2005; Khalesi *et al.*, 2005; Phalen, 2006; Hsu *et al.*, 2006; Piçarra, 2009). Também as aves estudadas nos outros países, muitas das vezes chegavam à rotina dos laboratórios de várias origens, indicando também que esses resultados não podem ser comparados com o atual estudo, pois este teve foco em animais de centro de triagem.

Até ao momento não foram designadas espécies reservatório do vírus. A existência de vários genótipos que não estão totalmente caracterizados quanto à patogenicidade e especificidade ao hospedeiro, vem dificultar o controle da PBF. No entanto, a prevalência e sintomatologia em diferentes espécies hospedeiras poderiam estar relacionadas a algumas características genéticas próprias. Entretanto, o contato e a proximidade entre animais de espécies e origens distintas, deverão ser sempre evitados. Enquanto a imunização vacinal não estiver disponível comercialmente, a realização de testes de diagnóstico preventivos parece ser a melhor forma de controle com estratégias de biossegurança entre plantéis.

A separação entre espécies nativas e selvagens, em criatórios conservacionistas, pode ser uma estratégia para a viabilização da recuperação das espécies ameaçadas, com vistas à redução de PBF. A reprodução, o isolamento e/ou eliminação

dos animais positivos em conjunto com as medidas de quarentena mínimas, são medidas a serem observadas para reduzir a disseminação do vírus. A aplicação de métodos rápidos e específicos de diagnóstico para PBF, especialmente nos centros de triagem, unidades de conservação e criatórios comerciais poderá permitir melhor conhecimento sobre a prevalência da PBF no Estado e no Brasil, e o delineamento de estratégias ideais de controle.

5. Conclusões

- Demonstra-se a ocorrência do circovírus BFDV nos psitacídeos em triagem no CETAS em Belo Horizonte.
- Na grande maioria dos casos de alopecia não houve detecção de BFDV, sugerindo outras etiologias para problemas de empenamento.
- Detectou-se a ocorrência do genoma de BFDV em maior porcentagem em *Amazona aestiva* e, em apenas um indivíduo de *Ara ararauna*.
- Foram negativas para o genoma de BFDV as espécies *Aratinga leucophthalma*, *Pionus maximiliani*, *Guarouba guarouba*, *Amazona amazonica*, *Amazona vinacea*, *Amazona rhodochoryta* e *Anodorhynchus hyacinthinus*.
- Com a exceção de *Ara ararauna*, com alterações de empenamento, todos os demais quadros positivos para BFDV foram assintomáticos.
- A predominância de infecções subclínicas sugere atenção para o risco da mistura de aves de origens e espécies diferentes.
- Os materiais de eleição para PCR com a extração de DNA por sílica, foram amostras de fígado e sangue. Com este método de extração o swab cloacal não foi satisfatório.

- A detecção, significativa no fígado sugere o órgão como a melhor escolha para diagnóstico e triagem de lotes para PBFD.
- A detecção em *Amazona aestiva* e *Ara ararauna*, espécies em que há poucos relatos no Brasil, poderia haver algum fator associado de maior susceptibilidade.
- Houve similaridade de 98% entre as sequências das estirpes locais com sequências de isolados descritos na África do Sul, Áustria e Japão, podendo ser estirpes de ocorrência mundial, potencialmente chegadas ao Brasil com o comércio legal e ilegal de psitacídeos.
- As sequências das estirpes de BFDV brasileiras BH 215 e BH 732 foram depositadas no *GenBank* (JQ649409 e JQ649410).
- A sequência da estirpe BH 27 de *Psittacula krameri* foi depositada no *GenBank* (JQ649411).
- A histopatologia, considerada como método diagnóstico complementar, não permitiu a visualização de corpúsculos de inclusão nos hepatócitos, característicos da PBFD nas aves positivas, embora com indícios de infecção viral.
- Não foi possível relacionar a infecção pelo BFDV com a origem geográfica dos animais.

6. Bibliografia

ADAIR, B.M. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Dev. Comp. Immunol.*, v.24, p.247-255, 2000.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; HAFFER, A. A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v.48, p. 984-987, 1997.

APPENDICES I, II and III. Cites, 2009. Acessado em Jul. 11, 2009, disponível em <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>.

BASSAMI, M. R., BERRYMAN, D., WILCOX, G. E., RAIDAL, S. R. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses and chicken anaemia virus. *Virology*, v.249, p. 453-459, 1998.

BASSAMI, M. R. *Genetic studies of beak and feather disease virus*. 2000 Thesis (Ph.D) - Murdoch University. Murdoch, Australia, 2000.

BASSAMI, M. R.; YPELAAR, I.; BERRYMAN, D. *et al.* Genetic diversity of beak and feather disease virus detected in psittacine species in Australia. *Virology* v.279, p.392-400, 2001.

BERT, E.; TOMASSONE L., PECCATI, C. *et al.* Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. *J. of Vet. Med.. B*, v.52, p.64-68, 2005.

BONNE, N.; SHEARER, P.; SHARP M. *et al.* Assessment of recombinant beak and feather disease virus capsid protein as a vaccine for psittacine beak and feather

disease. *J. Gen.Virol.*, v. 90, pt 3, p. 640-647, 2009.

BOOM R.; SOL C.J.A.; SALIMANS M. M. M. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, p.495-503,1990.

BORTHWICK, D. Threat abatement plan for psittacine beak and feather disease affecting endangered psittacine species in Department of the Environment and Heritage website. Department of the Environment and Heritage, Commonwealth of Australia, 2005. <<http://www.environment.gov.au/biodiversity/threatened/publications/tap/pubs/beak-feather-tap.pdf>>. Acessado em 02/fev./2011

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Lista nacional de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção. Instrução Normativa nº 3, de 26 de maio de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília, 28 de maio de 2003, seção 1, p.88-97, 2003.

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, nº 8, p. 953-956, 2006.

DAHLHAUSEN B.; RADABAUGH C.S. Update on psittacine beak and feather disease and avian polyomavirus testing. *Proc. Assoc. Av. Vet.*, v.14, p.5-7, 1993.

DAHLHAUSEN, R.D.; RADABAUGH C.S. Update on Psittacine beak and feather disease and avian polyomavirus – epidemiology and diagnostics. In: PROCEEDINGS OF MID-ATLANTIC STATES ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS CONFERENCE,18, 197 Virginia. *Annual Avian Medicine and Surgery Conference*1997, p. 51–57.

- 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 specific. *Arch. Virol.*, v.12, p.2393-2412, 2004.
- DONELEY, R. J. T. Acute beak and feather disease in juvenile African grey parrots – an uncommon presentation of a common disease. *Austr. Vet. J.*, v.81, p.206-207, 2003.
- FORSYTH, J. M., KNIGHT F. *Parrots of the world: an identification guide*. New Jersey: Princeton University Press, 2006.
- GERLACH, H. Viruses. RITCHIE, B. W.; HARRISON G.J.; HARRISON L. R. *Avian Medicine: principles and application*. Florida: HBD International, 1999. p.894-903.
- GOULART, C.E.S. *Valores hematológicos de referência para papagaios-verdadeiros (Amazona aestiva – Psittacidae) mantidos em cativeiro*. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- GREENACRE, C. B. Viral diseases of companion birds. *Vet. Clin. Exotic Anim. Pract.*, v.8, p.85-105, 2005.
- HA, H. J.; ALLEY, M. R.; CAHILL, J. I. *et al.* The prevalence of psittacine beak and feather disease virus infection in native parrots in New Zealand. *N. Z. Vet. J.*, v. 57, p. 50-52, 2009.
- HALL T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, v.41, p. 95-98, 1999.
- HEATH, L.; MARTIN D. P.; WARBURTON, L. *et al.* Evidence of unique genotypes of beak and feather disease virus in southern Africa. *J. Virol.*, v.78, p. 9277-9284, 2004.
- HESS, M.; SCOPE, A.; HEINCZ, U. Comparative sensitivity of polymerase chain reaction diagnosis of psittacine beak and feather disease on feather samples, cloacal swabs and blood from budgerigars (*Melopsittacus undulatus*, Shaw 1805). *Avian Pathology*, v.33, p.477-481, 2004.
- HESS, M.; SCOPE, A.; HEINCZ, U. Feather and faecal samples are the most useful material to detect viral DNA of the budgerigar psittacine beak and feather disease (PBFD) virus, não publicado.
- HSU, C. M.; KO C. Y.; TSAIA H. J. Detection and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from psittacine birds in Taiwan. *Avian Diseases*, v.50, p.348-353, 2006.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>> Acesso em: 09/02/2011
- IUCN red list of threatened species. Versão 2009.1. International Council for Bird Preservation. Disponível online em <<http://www.iucnredlist.org>>. Acessado em: 15 de agosto de 2009.
- JONES, D.T.; TAYLOR, W.R.; THORNTON, J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Appl. Biosc.*, v.8, p. 275-282, 1992.
- KALETA E. F. Viral diseases, avian herpesviruses. In: THOMAS, N. J., HUNTER, B. D., ATKINSON C. T. (Eds). *Infectious diseases of wild birds*, 3rd Ed. Ames, Iowa: Editora, 2007. Section 1. p. 63-86.

- KHALESİ, B.; BONNE, N.; STEWART, M.; et al. A comparison of XII haemagglutination, haemagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease virus infection and a comparison of isolates obtained from lorriids. *J. Gen.Virol.*, n.86, p. 3039-3046, 2005.
- KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, v.16, p.111-120, 1980.
- KOCK, N. D.; HANGARTNER, P. U.; LUCKE, V. Variation in clinical disease and species susceptibility to psittacine beak and feather disease in Zimbabwean lovebirds. *Onderstepoort J Vet Res*, v.60, p.159-61, 1993.
- KONDIAH K. *Establishment of serological and molecular techniques to investigate diversity of psittacine beak and feather disease virus in different psittacine birds in south Africa*. 2004. 119f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of the Free State, Africa do Sul.
- KONDIAH, K.; ALBERTYN J.; BRAGG, R. R. Beak and feather disease virus haemagglutination activity using erythrocytes from African Grey parrots and Brown-headed parrots. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.72, p. 263-265, 2005.
- LATIMER, K.S.; RAKICH, P.M.; KIRCHER I.M. et al. Extracutaneous viral inclusions in psittacine beak and feather disease. *J Vet Diagn Invest.*, v.2, p.204-207, 1990.
- LATIMER, K.S.; RAKISH, P.M.; NIAGRO, F.D. et al. Na updated review of psittacine beak and feather disease. *J. Assoc. Avian Vet.*,v.5, p.211-220, 1991.
- MCORIST, S.; BLACK, D. G.; PASS, D. A. Psittacine beak and feather dystrophy in wild sulphurcrested cockatoos (*Cacatua galerita*). *J. Wild. Dis.*, v.20, p.120-124, 1984.
- NATESAN, S.; KATARIA J.M.; DHAMA K. et al. Biological and molecular characterization of chicken anaemia virusisolates of Indian origin. *Virus Res.*, v.118, p.78-86, 2006.
- NIAGRO, F.D.; FORSTHOEFEL, A.N.; LAWYER R.P. et al. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol*, v.143, p.1723-1744, 1998.
- OLSEN, G.; SPEER, B. Laboratory reporting accuracy of polymerase chain reaction testing for psittacine beak and feather disease virus. *J. Avian Med. Surg.*, v.23, p.194-198, 2009.
- PASS, D. A.; PERRY, R. A. The pathology of psittacine beak and feather disease. *Aust. Vet. J.*, v.61, p.69-74, 1984.
- PHALEN, D. N. Implications of viruses in clinical disorders. In: Harrison, G. J.; Lightfoot T. L. (Eds.). *Clinical avian medicine*. Palm Beach: Spix Publishing, 2006. p.721-46.
- PIÇARRA, J. P. S. C. *Estudo sobre a detecção do circovirus aviário em psitacídeos domésticos na região de Barcelona – Espanha*. 2009.42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- RAIDAL, S. R.; MCELNEA, C. L.; CROSS, G. M. Seroprevalence of psittacine beak and feather disease in wild psittacine birds in New South Wales in Australian. *Vet. J.*, v.70, p.121-122, 1993.

- RAHAUS, M.; WOLFF, M.H. Psittacine beak and feather disease: a first survey of the distribution of beak and feather disease virus in side the population of captive psittacine birds in Germany. *J. Vet. Med. B* v.50, p.368 – 371, 2003.
- RAHAUS, M.; DESLOGES, N.; PROBST, S. ET al . Detection of beak and feather disease virus DNA in embryonated eggs of psittacine birds. *Vet. Med.*, v.53, p.53-58, 2008.
- RAUE, R.; JOHNE, R.; COSTA, 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.
- 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. Circoviridae. In: *Avian Viruses, Function and Control*. B.W. Ritchie (Ed.), Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida, pp. 223-252, 1995.
- RITCHIE, B. W., NIAGRO, F. D., LATIMER, K. S, et al. Ultrastructural, protein composition, and antigen comparison of psittacine beak and feather disease virus purified from four genera of psittacine birds. *J. Wild. Dis.*, v.26, p.196-203, 1990.
- RITCHIE, P. A.; ANDERSON, I. L.; LAMBERT, D. M. Evidence for specificity of psittacine beak and feather disease viruses. *Virology*, v.306, p.109-115, 2003.
- RUPLEY, A.E. *Manual de clínica aviária*. São Paulo: Roca, 1999. p.257-265.
- SMITH R. D. *Veterinary clinical epidemiology: a problem oriented approach*. Boca Raton, Florida, 1994.p.58.
- SANGER, F.; NICKELE, S.; COULSON, A. R.DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings at. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467, 1997.
- SCHAT, K.A. Infectious anemia, p.182-202. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; FADLY, A.M. et al. (Eds.) *Diseases of Poultry*. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p.182-202.
- SCHOEMAKER, N. J.; DORRESTEIN, G. M.; LATIMER, K. S. et al. Severe leukopenia and liver necrosis in young african grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) infected with psittacine circovirus. *Avian diseases*, v.44, p.470-478, 2000.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro, Editora Nova Fronteira, 1997.
- SILVA-VALENZUELA, M. G.; ALMEIDA F. C. S.; MATIZONKAS-ANTONIO L. F. et al. Hibridização *in situ* com sonda não-radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v.42, n.3, p. 207-213, 2006.
- SMYTH, J. A.; WESTON, J.; MOFFETT, D. A. et al. Detection of circovirus infection in pigeons by *in situ* hybridization using cloned DNA probes. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.13, n., p.475–482 (2001).
- SNYDER, N.; MCGOWAN, P.; GILARDI, J. et al (Eds.) *Parrots: status survey and conservation action plan 2000–2004*. Gland: IUCN, 2000.180 p.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. et al. (2011) MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* (submitted).

TODD, D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathol.*, v.29, p.373-394, 2000.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK F. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, n.24, p.4876-4882, 1997.

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. In: International Virtual Conferences in Veterinary Medicine: Dis. of Psittacine Birds, 1998. <http://www.vet.uga.edu/ivcvm/werther/werther>, 1998.

WOODS, L. W.; LATIMER, K. S.; NIAGRO F. D. et al. A retrospective study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986-1993). *J Vet. Diagn Invest.*, v. 6, p.156-164, 1994.

WOODS, L.W.; LATMER, K.S. Circovirus infection of nonpsittacine birds. *J. Avian Med. Surg.*, v.14, n.3, p.154-163, 2000.

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.

Anexo I

CITES

Apêndices I, II, III para PSITTACIFORMES em 14/10/2010

Anexo I	Anexo II	Anexo III
<p>Cacatuas (Cacatuidae)</p> <p><i>Cacatua goffiniana</i>, <i>Cacatua haematuropygia</i>, <i>Cacatua moluccensis</i>, <i>Cacatua sulphurea</i>, <i>Probosciger aterrimus</i></p> <p>Lorídeos (Loriidae)</p> <p><i>Eos histrio</i>, <i>Vini ultramarina</i></p> <p>Papagaios, periquitos, araras (Psittacidae)</p> <p><i>Amazona arausiaca</i>, <i>Amazona auropalliata</i>, <i>Amazona barbadensis</i>, <i>Amazona brasiliensis</i>, <i>Amazona finschi</i>, <i>Amazona guildingii</i>, <i>Amazona imperialis</i>, <i>Amazona leucocephala</i>, <i>Amazona oratrix</i>, <i>Amazona pretrei</i>, <i>Amazona rhodocorytha</i>, <i>Amazona tucumana</i>, <i>Amazona versicolor</i>, <i>Amazona vinacea</i>, <i>Amazona viridigenalis</i></p>	<p>PSITTACIFORMES spp.</p> <p>(Exceto as espécies incluídas no Apêndice I e <i>Agapornis roseicollis</i>, <i>Melopsittacus undulatus</i>, <i>Nymphicus hollandicus</i> e <i>Psittacula krameri</i>, que não estão incluídos no Apêndices)</p>	

Anexo II

Ficha clínica n.º:	Data:	
Animal:	Espécie:	Anilha:

Condição corporal: Ruim Regular Boa

Histórico e anamnese:

Exame clínico:
Temp: F.C.: F.R.: Mucosas:

Exame específico:
Falta de penas? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Se sim, qual região:
Alimentação: está se alimentando? Ingerindo água?
Ao remover as penas: <input type="checkbox"/> friáveis <input type="checkbox"/> feias <input type="checkbox"/> arrancando fácil
Cicatriz:
Mancha reprodutora:
Lesões knemidocópticas:
Marcas de estresse:
Pena hemorrágica:

Coloração anormal de penas:
Retenção de bainha das penas (umidade):
Penas de formas anormais: Malnutrição: Traumatismo: Administração de parasitcida: Obesidade, muda de pena:
Recinto:
Autobicamento: Dieta: Problema comportamental:
Ectoparasitos macroscopia:
Penas para microscopia :
Observações: