

Rogério Venâncio Donatti

**AVALIAÇÃO SANITÁRIA DE PSITTACIFORMES EM CATIVEIRO NO ESTADO
DE MINAS GERAIS, NO PERÍODO DE 2010-2012.**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG

2012

Dedicatória

Dedico este trabalho às aves, em especial aos psitacídeos, animais majestosos que sempre admirei.

Agradecimentos

A vontade de iniciar um curso de mestrado veio com o tempo e com diversos acontecimentos em minha vida.

Após assumir a responsabilidade de coordenar os estágios na Fazenda Vale Verde, onde atuei por mais de quatro anos, e ter a experiência de passar conhecimento a mais de quarenta estagiários, de diversas formações, percebi o quanto era gratificante ensinar. Aliado a isso a vontade de crescer e especializar profissionalmente, de tornar-me um profissional mais completo e também de superar alguns limites ou quebrar paradigmas serviram de estímulo para ingressar nesta jornada. A oportunidade de execução deste projeto com pessoas de altíssimo nível, tanto intelectual quanto pessoal, e o incentivo de outras tantas que citarei abaixo também foram fundamentais para que eu tomasse essa decisão.

E assim foi, aquele graduando que nunca teve “tempo” e paciência para trabalhar dentro de um laboratório, se tornou um mestrando deslumbrado com tantas possibilidades na execução da pesquisa, finalmente achando um lugar para canalizar positivamente sua sistematicidade e organização.

Após um ano e meio de mestrado, já percebia que boa parte dos meus objetivos haviam sido cumpridos, e outra parte destes está sintetizada nesta dissertação.

Dentro deste contexto agradeço:

Aos meus pais Ignez e Orlando que, mesmo de longe, sempre me incentivaram e apoiaram ajudando a tornar meu sonho a minha profissão;

À minha noiva Ana Cristina pelo companheirismo e apoio;

Ao meu orientador Professor Doutor Nelson Rodrigo pelos ensinamentos, tanto acadêmicos quanto de vida e pela enorme paciência e compreensão;

Ao Professor Doutor Mauricio Resende que foi fundamental para execução deste projeto e acima de tudo um grande exemplo e um grande amigo;

Ao meu co-orientador Professor Doutor José Sergio Resende;

Ao Claudio pela ajuda e pela paciência em autoclavar minhas coisas por quatro vezes ou mais;

Aos meus amigos e sócios Marcus Vinícius e Plínio pela ajuda, incentivo, paciência e por tocarem a empresa em minha ausência;

Aos meus colegas de laboratório, Francisco Carlos, Daniel, Sandra, Alexis, Marcela, Isaac, Mariana sempre solistas quando necessário;

À Adriana Dias Gomes e ao professor Álvaro Cantini, pelos ensinamentos em biologia molecular e pela possibilidade de usufruir das suas instalações no ICB ;

Aos colegas do ICB e Ecovec que me receberam tão bem e sempre se demonstraram satisfação em ajudar, dividindo um laboratório tão pequeno, Lenice, Sávio, Bruno, Bruna, Luige, Igor, Adriana e outros tantos;

Ao laboratório de patologia veterinária, em especial à professora Roselene Ecco, que foi o elo de ligação com Shivaprasad;

Ao laboratório de patologia clínica do HV da UFMG em especial a Gaby Micoli e a professora Fabíola;

À todos que me auxiliaram nos dias de coleta;

Aos proprietários, gerentes e funcionários dos criatórios que abriram as portas para execução e coleta de materiais biológicos, em especial aos amigos Felipe Coutinho, Wilton Felipe, Edielene, Rafael Resende e Tiago Lima.

À Escola de Veterinária da UFMG.

À Fapemig pelo apoio financeiro.

Deixo aqui o meu mais sincero muito obrigado!

"Reparta o seu conhecimento. É uma forma de alcançar a imortalidade."

"Quando morremos, nada pode ser levado conosco, com a exceção das sementes lançadas por nosso trabalho e do nosso conhecimento."

"Para lidar com o sofrimento é preciso perceber que ele faz parte da nossa vida."

Dalai Lama

Resumo

Psitacídeos do gênero *Amazona*, com duas espécies ameaçadas de extinção (*A. rhodocorytha* e *A. vinacea*) e duas espécies de psitacídeos mais comuns (*A. aestiva* e *Ara ararauna*), todas originárias de cativeiro em Minas Gerais, foram examinados para etiologias previstas no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Foram também estudadas a síndrome da dilatação do proventrículo (PDD) (*Bornavírus* aviário, ABV), clamidiose (*Chlamydophila psittaci*), vírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos (BFDV), ecto e endoparasitoses. A amostragem totalizou duzentas e dezesseis (216) aves, sendo cento e quarenta e cinco (145) *A. aestiva* (67,2%), vinte e uma (21) *A. vinacea* (9,7%), dez *A. rhococorytha* (4,6%) e quarenta (40) *A. ararauna* (18,5%). O período de coleta das amostras biológicas foi iniciado no dia 24-05-2011 e encerrado em 23-08-2011. Durante o mesmo período, aves psitacídeas em óbito foram encaminhadas para avaliações necroscópicas no Setor de Doenças das Aves da UFMG e examinadas, incluindo dois exemplares de cuiu-cuiú (*Pionopsitta pileata*), quatro papagaios de peito roxo (*Amazona vinacea*), duas maracanãs (*Primolius maracana*), uma arara vermelha (*Ara macao*), uma ararajuba (*Guaruba guarouba*), um papagaio do espírito santo (*Amazona rhodocorytha*), uma maracanã-açu (*Ara severa*), uma maritaca verde (*Pionus maximiliani*), uma maritaca roxa (*Pionus fuscus*), duas maritacas de cabeça roxa (*Pionus mesntrus*), e um lóris arco-íris (*Trichoglossus haematodus*). Para PDD (ABV), tecidos de 17 psitacídeos com lesões macroscópicas características, foram submetidos à histopatologia, imuno-histoquímica (IHQ) e RT-PCR, confirmados dois em IHQ e quatro em RT-PCR. Para as doenças preconizadas pelo PNSA, embora reagentes em soro-aglutinação rápida em placa (SAR), 11,57% (25/216) para *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e 17,12% (37/216) para *Salmonella Pullorum* (SP)/*S. Gallinarum* (SG), todas foram não reagentes em soroaglutinação lenta (SAL) para SP/SG e inibição da hemaglutinação (IH) para MG e *Mycoplasma synoviae* (MS), indicando negatividade sorológica. Não foram também encontrados títulos de anticorpos para o vírus da doença de Newcastle (APMV-1) por IH. Nos exames coproparasitológicos de flutuação e de microscopia direta, observou-se uma ocorrência de endoparasitismo em 2,77% (6/216) do total das aves avaliadas. Ovos de *Ascaris* sp em um *A. vinacea*; ovos de Tricurídeos, provavelmente do gênero *Capillaria* sp. encontrados em duas *A. ararauna*; e oocistos de coccidia não esporulados em três *A. aestiva*. Para *C. psittaci*, foram testadas 216 amostras de *pools* de *swab* cloacal e fenda palatina, sendo destas 11 amostras (5,09%) positivas pela técnica de PCR. Entre as 11 amostras positivas, oito (3,70%) foram de *A. aestiva*, uma (0,46%) de *A. rhodocorytha*, uma (0,46%) de *A. vinacea*, e uma (0,46%) de *A. ararauna*. Para BFDV, foram testadas por PCR, 63 amostras de sangue de aves com falhas na

plumagem, obtendo-se duas amostras positivas (3,17%), um *A. aestiva* e uma *A. ararauna*. Com presente trabalho detectou-se a ocorrência da síndrome da dilatação de proventrículo, demonstrada pela identificação do genoma do ABV em tecidos dos psitacídeos com sinais e lesões sugestivas, sendo o primeiro caso comprovado no país. Foi comprovada a existência de *C. psittaci* e BFDV em plantéis hígidos em Minas Gerais, bem como algumas parasitoses. Não foram detectados anticorpos para as etiologias (APMV-1, MG, MS, SG, SP) preconizadas no PNSA.

Abstract

Parrots of genera *Amazona* and *Ara*, held in captivity in Minas Gerais, including two endangered species (*Amazona rhodocorytha* and *Amazona vinacea*) and the common species *Amazona aestiva* and *Ara ararauna*, were studied. The etiologies of diseases investigated were recommended by the National Poultry Health Program (PNSA), and the etiologies of other major diseases, such as *Chlamydophila psittaci*, psittacine beak and feather disease virus (BFDV), ecto endoparasitoses, and the proventricular dilatation disease (PDD) (avian *Bornavirus*, ABV) were investigated. Based on plate agglutination test (PAT), 11.6% (25/216) of birds were positive for *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and 17.1% (37/216) were positive for *Salmonella Pullorum* (SP) / *S. Gallinarum* (SG), although all shown negative by slow agglutination test (SAT) for SP / SG and negative by hemagglutination inhibition (HI) for MG and *Mycoplasma synoviae*. No antibody titers were found for Newcastle disease virus by IH. In fecal examinations by flotation and direct microscopy on wet preparation (saline), endoparasitism was detected in 2.8% (6/216). *Ascaris* sp. was detected in one *A. vinacea*, eggs of Trichuridae nematode, probably *Capillaria* sp., were found in two *Ara ararauna*. Non-sporulated oocysts of coccidia were found in three parrots (*A. aestiva*). For *C. psittaci* 11 (5.1%) samples were tested positive (11/216) in pools of cloacal and palate cleft swabs by PCR, including eight (3.7%) *A. aestiva*, one (0.46%) *A. rhodocorytha*, one (0.46%) *A. vinacea*, and one (0.46%) *Ara ararauna*. Considering BFDV, 63 blood samples from birds with feather loss were tested by PCR, resulting in one *A. aestiva* and one *Ara ararauna* positive for BFDV DNA (3.17%). PDD was evaluated in 17 parrots with typical lesions, by histopathology, immunohistochemistry (IHC) for ABV antigens and RT-PCR for ABV RNA, revealing two positive by IHC and four positive by RT-PCR, being for the first time confirmed in Brazil .

Sumário

1) Introdução-----	16
2) Revisão bibliográfica-----	17
2.1) Os psitacédeos-----	17
2.2) Espécies trabalhadas-----	18
2.2.1) <i>Amazona aestiva</i> -----	18
2.2.2) <i>Amazona rhodocorytha</i> -----	19
2.2.3) <i>Amazona vinacea</i> -----	19
2.2.4) <i>Ara ararauna</i> -----	20
2.2.5) <i>Ara macao</i> -----	20
2.2.6) <i>Ara severa</i> -----	21
2.2.7) <i>Guaruba guarouba</i> -----	21
2.2.8) <i>Pionopsitta pileata</i> -----	21
2.2.9) <i>Pionus fuscus</i> -----	22
2.2.10) <i>Pionus maximiliani</i> -----	22
2.2.11) <i>Pionus menstruus</i> -----	22
2.2.12) <i>Primolius maracana</i> -----	23
2.2.13) <i>Trichoglossus haematodus</i> -----	23
2.3) Doenças pesquisadas -----	25
2.3.1) Doenças consideradas importantes em Psittaciformes-----	25
2.3.1.1) Síndrome da Dilatação de Proventrículo- <i>Bornavírus</i> -----	25
2.3.1.2) Clamidiose-----	29
2.3.1.3) Doença do bico e das penas dos psitacédeos – PBFD- (Circovírus)-----	32
2.3.2) Doenças relacionadas ao Plano Nacional de Sanidade Avícola PNSA-----	33
2.3.2.1) Doença de Newcastle-----	33
2.3.2.2) Micoplasmoses-----	35
2.3.2.3) Salmonelose-----	37
2.3.3) Parasitoses-----	39
2.3.3.1) Ácaros e piolhos-----	39
2.3.3.2) Coccidioses-----	41
2.3.3.3) Helmintoses-----	41
3) Objetivos-----	43
3.1) Objetivo geral-----	43
3.2) Objetivos específicos-----	43
4) Material e métodos-----	43

4.1) Locais de execução do projeto e animais-----	43
4.2) Contenção das aves-----	45
4.3) Amostras de fezes, amostras de sangue e <i>swabs</i> .-----	45
4.4) Exame clínico, aferição do peso das aves e escore corporal-----	46
4.5) Armazenagem dos <i>swabs</i> no laboratório-----	48
4.6) Necropsia-----	48
4.7) Histopatologia para <i>Bornavírus</i> aviário-----	48
4.8) Imuno-histoquímica para <i>Bornavírus</i> aviário-----	48
4.9) Exames coproparasitológicos-----	49
4.10) Soroaglutinação Rápida em Placa-----	49
4.11) Técnica de Inibição da Hemaglutinação para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>Mycoplasma synoviae</i> -----	50
4.12) Soroaglutinação lenta em tubo (SAL) para <i>Salmonella Gallinarum</i> e <i>Salmonella</i> <i>Pullorum</i> -----	50
4.13) Teste de inibição da hemaglutinação para doença de Newcastle-----	50
4.14) Extração de DNA <i>swabs</i> cloacais e de fenda palatina-----	51
4.15) Extração de DNA – coágulos sanguíneos-----	52
4.16) Extração de RNA amostras de tecido-----	52
4.17) Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA e RNA-----	53
4.18) Reação em Cadeia pela Polimerase- PCR-----	53
4.18.1) PCR <i>Chlamydophila psittaci</i> -----	53
4.18.2) PCR para o vírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos (Pbfd) – Circovírus- -----	54
4.18.3) PCR <i>Bornavírus</i> -----	55
4.18.3.1) Transcrição reversa-----	55
4.18.3.2) Reação de PCR-----	56
4.19) Análise dos produtos de PCR-----	56
4.20) Sequenciamento para <i>Bornavírus</i> aviário-----	56
4.20.1) Purificação do DNA em gel de agarose com NaI e sílica-----	56
4.20.2) Sequenciamento do produto de <i>Bornavírus</i> aviário-----	57
5) Resultados e Discussão-----	58
5.1) Exame clínico, aferição do peso das aves e escore corporal-----	58
5.2) Achados de necrópsia-----	59
5.3) Histopatologia de tecidos das aves com síndrome da dilatação de proventrículo--	65

5.4) Imuno-histoquímica para <i>Bornavírus</i> aviário-----	66
5.5) Exames coproparasitológicos-----	70
5.6) Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR)-----	72
5.7) Técnica de Inibição da Hemaglutinação para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>Mycoplasma synoviae</i> -----	73
5.8) Soroaglutinação lenta em tubo (SAL) para <i>Salmonella Gallinarum</i> e <i>Salmonella Pullorum</i> -----	74
5.9) Teste de inibição da hemaglutinação para doença de Newcastle-----	74
5.10) Reação em Cadeia pela Polimerase- PCR para <i>Chlamydophila psittaci</i> -----	76
5.11) Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR para Circovírus dos psitacídeos-----	78
5.12) Reação em Cadeia pela Polimerase- PCR para <i>Bornavírus</i> aviário-----	83
6) Conclusões-----	92
7) Referências-----	94

Lista de tabelas

Tabela	Descrição	Pag.
Tabela 1	Numero amostral por criatório, local de origem e espécie de psitacídeo.	44
Tabela 2	Cronograma de coletas	45
Tabela 3	Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do DNA de <i>Chlamydophila psittaci</i>	54
Tabela 4	Oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do DNA de circovírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos.	55
Tabela 5	Peso dos psitacídeos cativos em Minas Gerais	58
Tabela 6	Escore corporal de psitacídeos cativos em Minas Gerais	59
Tabela 7	Oligonucleotídeos iniciadores para <i>Bornavírus</i> aviário (ABV).	85

Lista de quadros

Quadro	Descrição	Pag.
Quadro 1	Exames <i>post mortem</i> de psitacídeos cativos em Minas Gerais, e resultados de imuno-histoquímica e PCR para <i>Bornavírus</i> aviário.	60
Quadro 2	Amostras positivas <i>Chlamydophila psittaci</i>	77
Quadro 3	Pesquisa do DNA do vírus da doença do bico e das penas em coágulos sanguíneos de psitacídeos cativos em Minas Gerais.	79
Quadro 4	Oligonucleotídeos iniciadores de <i>Bornavírus</i> aviário (ABV)	84
Quadro 5	Amostras positivas, panorama geral.	90

Lista de figuras

Figura	Descrição	Pag.
Figura 1a	Exemplar de papagaio verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) avaliado neste estudo.	24
Figura 1b	Exemplar de papagaio do espírito santo (<i>Amazona rhodocorytha</i>) avaliado neste estudo.	24
Figura 1c	Exemplar de papagaio do peito roxo (<i>Amazona vinacea</i>) avaliado neste estudo.	24
Figura 1d	Exemplar de arara canindé (<i>Ara ararauna</i>) avaliado neste estudo.	24
Figura 2a	Representação de Bornavírus - Síndrome da dilatação do proventrículo (PDD). Vírus envelopado, esférico, com diâmetro de 70-130 nm. Localização de suas principais proteínas.	28
Figura 2b	Representação da cadeia RNA genômica de Bornavírus – Vírus RNA fita simples, negativa.	28
Figura 3	Papagaios (<i>Amazona aestiva</i>) em gaiolas individuais, com fundo plástico para a coleta de fezes, aguardando para procedimento anestésico.	46
Figura 4a	Papagaio verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) anestesiado com isoflurano em aparelho de anestesia portátil (Metalvet®), acondicionado sobre colchão térmico e toalha.	47
Figura 4b	Papagaio verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) submetido à coleta de <i>swab</i> cloacal.	47
Figura 4c	Papagaio verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>) submetido à punção da veia jugular com seringa de 3 ml e agulha (20 x 0.55 mm BD®).	47
Figura 4d	Papagaio do Espírito Santo (<i>Amazona rhodocorytha</i>) submetido à coleta de <i>swab</i> de fenda palatina com auxílio de abre bico (Ortovet®).	47
Figura 5a	Achados macroscópicos de PDD em um <i>Amazona rhodocorytha</i> identificado como PDD7.	62
Figura 5b	Ave com condição corporal ruim, redução da musculatura peitoral e gordura subcutânea.	62
Figura 5c	Cavidade celomática mostrando proventriculo ocupando toda lateral	62

	esquerda, aumentado de tamanho e volume, com presença de alimento, hepatomegalia e ausência de gordura peritoneal.	
Figura 5d	Detalhe do proventrículo distendido.	62
Figura 5e	Presença de grande quantidade de alimento não digerido no proventriculo.	62
Figura 5f	Detalhe dos “black spots” na serosa do proventrículo.	62
Figura 6a	Achados macroscópicos patológicos de PDD em um exemplar de <i>Primolius maracana</i> identificado como PDD6	63
Figura 6b	Condição corporal ruim e ausência de tecido adiposo subcutâneo.	63
Figura 6c	Visão da cavidade peritoneal evidenciando proventrículo moderadamente dilatado ocupando a lateral esquerda da cavidade celomática e ausência de tecido adiposo peritoneal.	63
Figura 6d	Proventriculo com paredes delgadas.	63
Figura 6e	Conteúdo alimentar escurecido e fétido; Fig. 6f – Detalhe de úlcera na serosa do proventriculo.	63
Figura 6f	Detalhe de úlcera na serosa do proventriculo.	63
Figura 7a	Achados patológicos macroscópicos em um exemplar de <i>Primolius maracana</i> (PDD3) – Cavidade celomática mostrando deslocamento de órgãos e proventriculo aumentado ocupando grande porção da lateral esquerda.	64
Figura 7b	<i>Primolius maracana</i> (PDD3) – Após a remoção do fígado podemos visualizar detalhe do proventrículo dilatado com paredes delgadas e grande quantidade de alimento no interior.	64
Figura 8a	Achados patológicos macroscópicos em um exemplar de <i>Ara macao</i> (PDD4) – Proventrículo removido após necropsia dilatado com paredes delgadas e grande quantidade de alimento no interior.	64
Figura 8b	<i>Ara macao</i> (PDD4) – Proventrículo dilatado ao corte mostrando grande quantidade de alimento não digerido.	64
Figura 9a	Achados histológicos em um exemplar de <i>Primolius maracana</i> (PDD6). Corte de adrenal corada com HE mostrando um infiltrado	67

	linfo plasmocitário moderado entre as células medulares.	
Figura 9b	Achados histológicos em um exemplar de <i>Primolius maracana</i> (PDD6). Corte da moela corada com HE mostrando-se infiltrado linfo plasmocitário moderado entre as fibras nervosas da serosa.	68
Figura 9c	Achados histológicos em um exemplar de <i>Amazona rhodocorytha</i> (PDD7). Corte do proventrículo corado por HE mostrando-se infiltrado linfo plasmocitário leve a moderado ao redor dos neurônios ganglionares. E em alguns locais (setas) os neurônios não podem mais serem observados (setas).	68
Figura 10a	Coloração imuno-histoquímica de um exemplar de <i>Amazona rhodocorytha</i> mostrando-se coloração intranuclear e citoplasmática do antígeno de ABV em corte de tecido da adrenal.	69
Figura 10b	Coloração imuno-histoquímica de um exemplar de <i>Amazona rhodocorytha</i> . Corte de tecido cerebral onde nota-se coloração intranuclear em neurônios e nas células da glia.	69
Figura 10c	Coloração imuno-histoquímica de um exemplar de <i>Amazona rhodocorytha</i> . Corte de cerebelo onde evidencia-se coloração nas células de Purkinje e nas células da camada granular.	69
Figura 10d	Coloração imuno-histoquímica de um exemplar de <i>Amazona rhodocorytha</i> . Corte de nervos periféricos onde nota-se coloração intranuclear nos neurônios.	69
Figura 10e	Coloração imuno-histoquímica de um exemplar de <i>Amazona rhodocorytha</i> . Corte de proventrículo onde se observa coloração intranuclear nos neurônios do ganglio.	69
Figura 11a	Oocistos não esporulados encontrados em fezes de <i>Amazona aestiva</i> .	71
Figura 11b	Oocistos não esporulados encontrados em fezes de <i>Amazona aestiva</i>	71
Figura 12a	Ovo de tricurídeos encontrado em fezes de <i>Ara ararauna</i> .	72
Figura 12b	Ovo de <i>Ascaris</i> sp. encontrado em fezes de <i>Amazona vinacea</i>	72
Figura 13	Soroaglutinação rápida em placa de <i>Amazona rhodocorytha</i> negativo para micoplasmose (MG) e reagente para salmonelose (SP).	73

Figura 14	Placa de inibição da hemaglutinação para AMPV-1 doença de Newcastle	75
Figura 15	Eletroforese de produtos de PCR de <i>Chlamydophila psittaci</i> de swab cloacal/fenda palatina de psitacédeos cativos em Minas gerais	78
Figura 16	Eletroforese de produto de PCR de vírus da doença do bico e das penas de amostras de coágulos sanguíneos de psitacédeos cativos em Minas Gerais.	80
Figura 17	<i>Amazona aestiva</i> (AAVV42) positivo, com falta de rêmiges primárias e secundárias e retrizes	82
Figura 18	<i>Ara ararauna</i> (AraVV09) positiva, aparentemente sem nenhuma sintomatologia.	82
Figura 19	Fig. 19 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR de <i>Bornavirus</i> aviário: Escolha de <i>primers</i> apropriados e determinação de volume de cópia molde.	84
Figura 20	Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR de <i>Bornavirus</i> aviário: Teste para a determinação da temperatura ótima de anelamento.	86
Figura 21	Fig. 21. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR de <i>Bornavirus</i> aviário para determinação da concentração de cloreto de magnésio.	87
Figura 22	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de <i>Bornavirus</i> aviário.	88
Figura 23	Eletroforese de produtos de PCR de <i>Bornavirus</i> aviário em gel de poliacrilamida corada por prata.	89

Lista de siglas

APMV-1	<i>Avian Paramyxovirus type 1</i> (Paramyxovírus aviário do sorotipo 1)
ABV	<i>Avian Bornavírus</i> (Bornavírus aviário)
BFDV	Beak and feather disease virus (Vírus da doença do bico e das penas)
Bp	Pares de base
<i>C. psittaci</i>	<i>Chlamydophia psittaci</i>
CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CITES	Convenção sobre o comércio internacional de espécies da flora e fauna selvagens em perigo de extinção
DN	Doença de Newcastle
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Trifosfato de deoxyribonucleotídeo
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético sódico
EV/UFMG	Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
G	Gramas
g/dl	Gramas por decilitros
HI	Inibição da hemaglutinação
HCl	Ácido clorídrico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICB/UFMG	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i> – União Internacional para Conservação da Natureza
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NaI	Iodeto de sódio
Ng	Nanogramas
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
pb	pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Tampão salina fosfato
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Transcriptase reversa - Reação em Cadeia da Polimerase
SAR	Soroaglutinação Rápida em placa
SG	<i>Salmonella Gallinarum</i>
SP	<i>Salmonella Pullorum</i>
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEN	Tris-EDTA-NaCl
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
µL	Microlitros
UV	Ultravioleta
VDN	Vírus da Doença de Newcastle

1) Introdução

Os psitacídeos são aves da ordem Psittaciformes, distribuídas pela zona tropical do globo, com ocorrência desde áreas tropicais, até áreas frias como a Patagônia. A ordem Psittaciformes atualmente está dividida por alguns autores em três famílias, a Cacatuidae, Psittacidae e Loriidae. As famílias Cacatuidae e Loriidae têm sua distribuição geográfica restrita à Austrália e ilhas vizinhas, já a família Psittacidae possui distribuição geográfica nos demais continentes (Américas, África e Ásia incluindo suas ilhas). O Brasil é considerado o país mais rico do mundo na família Psittacidae, cerca de 100 espécies que ocorrem na América do Sul, 72 estão no Brasil. São o grupo de aves com maior número de espécies listado na "Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção". A destruição dos habitat, endogamia e outros fatores relacionados ao tamanho populacional reduzido e o tráfico são os principais responsáveis por esta ameaça.

No Brasil há ainda poucos estudos sobre os potenciais patógenos que ocorrem em na avifauna tanto em cativeiro como em vida livre. Este tipo de estudo e conhecimento é de extrema importância para manutenção e principalmente reprodução de espécies ameaçadas em cativeiro, para o sucesso de projetos de reintrodução e para viabilizar a criação comercial *ex-situ* de espécies mais comuns

(de acordo com a legislação atual) para diminuição da pressão de tráfico, criando assim uma alternativa para as pessoas que desejam manter animais da fauna como animais de estimação. Além disso, o monitoramento dos plantéis de aves selvagens em reprodução deve atender às recomendações do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), para assegurar a adoção das medidas de biossegurança tanto à avicultura industrial quanto à conservação da avifauna. O conhecimento do perfil sanitário das aves criadas em cativeiro é importante para estabelecer medidas preventivas, tratamentos mais eficazes e para a elaboração de protocolos sanitários.

No presente trabalho foram realizados estudos em Psittaciformes que vieram a óbito em um mantenedor de fauna e foram encaminhados para diagnóstico da *causa mortis* no Setor de Doenças das aves da Escola de Veterinária da UFMG, os quais apresentaram semelhanças nos achados de necropsia e sinais clínicos (que serão descritos posteriormente) compatíveis com relatados na literatura com a síndrome da dilatação de proventrículo (PDD), pesquisando-se *Bornavirus* aviário (ABV) como potencial etiologia. Avaliou-se o perfil sanitário de psitacídeos do gênero *Amazona*, e gênero *Ara*, mantidos em cativeiro em Minas Gerais, incluindo duas espécies ameaçadas de extinção com ocorrência histórica em

Minas Gerais (*Amazona rhodocorytha* e *Amazona vinacea*) e as espécies mais comuns (*Amazona aestiva* e *Ara ararauna*), pela sua importância em criações comerciais e pela proximidade de criação destas espécies com as espécies ameaçadas citadas anteriormente. Neste grupo foram pesquisadas doenças importantes e comumente associada a esta

2) Revisão bibliográfica

2.1) Os psitacídeos

Os psitacídeos são aves da ordem Psittaciformes, ordem muito característica, podendo ser reconhecidas imediatamente, embora variem extremamente de tamanho e peso. As aves possuem bico alto e recurvado com uma cera na base, maxila bem móvel articulada ao crânio como uma dobradiça que possibilita movimentos extras que aumentam a potência do bico. A ranfoteca da maxila é pregueada internamente, a língua grossa, sensível e riquíssima em papilas gustativas, e o papo é grande para armazenagem de alimentos. A visão é apurada possuindo duas fóveas na retina para focalizar a imagem. O tarso muito curto, pés com o quarto dedo deslocado para trás junto ao primeiro, que facilita a apreensão de alimentos. Asas são compridas e fortes, plumagem, dura curta e rica em pó, possuindo diversas colorações, mas predominando a verde nas espécies brasileiras, e com regiões perioftálmicas nuas em extensão variada (Sick, 1997).

ordem de aves, como a clamidiose, a doença do bico e das penas dos psitacídeos (*Circovirus* aviário), as etiologias das doenças preconizadas pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) micoplasmose, salmonelose e doença de Newcastle (*Paramyxovirus* aviário tipo 1), e a ocorrência de ecto e endoparasitoses.

Geralmente, não há dimorfismo sexual aparente na maioria das espécies, e a identificação do sexo pode ser feita pela análise do ácido desoxirribonucléico (DNA) ou laparoscopia. Essas aves são bastante barulhentas, sendo os papagaios os que desenvolvem maior capacidade de vocalização, mas diversas espécies aprendem a pronunciar palavras e imitar sons com perfeição (Cubas, 2006).

A ordem Psittaciformes atualmente está dividida por grande parte dos autores em três famílias, *Cacatuidae*, *Loriidae*, ambas ocorrentes na Australasia (Oceania) e *Psittacidae*, de distribuição mundial. A família *Cacatuidae* é ainda dividida em duas subfamílias *Cacatuinae* e *Nymphicinae*. Inclui cerca de 21 espécies compreendendo como espécies típicas, as cacatuas (*Cacatua* spp.) e a calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) com distribuição geográfica restrita à Austrália, Nova Guiné e ilhas vizinhas, sua principal característica são plumagens de cor simples predominando o branco, cinza ou o preto e uma crista de penas móveis na cabeça. A

família *Loriidae* com cerca de 56 espécies, representados pelos lóries (*Trichoglossus* spp., *Eos* spp.; *Chalcopsitta* spp.), são aves também oriundas da Austrália, Nova Guiné e de outras ilhas vizinhas. Possuem aparência muito similar às outras famílias, porém são normalmente mais coloridos. Apresentam a ponta da língua comprida e áspera, que é utilizada para lamber pólen e néctar de que se alimentam, podendo também comer frutas e alguns insetos (Forshaw, 1977). A família *Psittacidae* é composta por quatro subfamílias *Nestorinae*, *Micropsittinae*, *Strigopinae* e a maior delas, *Psittacinae* que abrange as espécies brasileiras como as araras (*Ara* spp., *Anodorhynchus* spp.), papagaios (*Amazona* spp.), periquitos, jandaias e maritacas (*Brotogeris* spp., *Aratinga* spp., *Pionus* spp.).

De acordo com o "Censo Mundial de Psitaciformes Ameaçados de Extinção", realizado pela *Bird Life International*, 86 (26%) das 332 espécies de psitacídeos do mundo estão sob risco de extinção, estando 36 muito próximas desse fim. Isso se deve à peculiar vulnerabilidade dos papagaios, que sofrem com a contínua destruição de habitat, apanha de exemplares na natureza para o tráfico ilegal, introdução de outras espécies invasoras, endogamia e outros fatores relacionados ao tamanho populacional reduzido. Estão entre os grupos da fauna que mais sofrem com o tráfico de animais

silvestres, a "*Convention on International Trade in Engandered Species of Wild Fauna and Flora*" (CITIES), reportou o tráfico internacional de psitacídeos, com uma média de 539.700 aves por ano (Cubas *et al.*, 2006). Os psitacídeos são o grupo com maior número de espécies listado na "Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção". Devido à habilidade de imitar a voz humana, combinada com a inteligência, beleza e docilidade, são as aves mais populares e procuradas como animal de estimação no mundo, ficando atrás apenas dos cachorros e gatos. Isso as leva a serem também as mais comercializadas ilegalmente (Sick, 1997).

2.2) Espécies trabalhadas

2.2.1) *Amazona aestiva*

As espécies do gênero *Amazona* são os psitacídeos mais característicos do novo mundo. Possuem tamanho médio à grande, são aves fortes, possuem bicos pesados e curtos, e cauda ligeiramente arredondada. As asas são largas e arredondadas, predominando a coloração verde, e não há dimorfismo sexual.

Amazona aestiva é a espécie mais comum medindo cerca de 35cm de comprimento, possui cabeça amarela com azul esverdeado na fronte, bochechas, narinas e bico escuros, ombros vermelhos, asas com parte vermelha e extremos azul-escuro, restante do corpo verde, mais claro entre o ventre e a cauda. É tida como a

espécie sul americana que possui maior habilidade para reproduzir sons, sendo por este fato muito capturada como animal de estimação.

Sua distribuição geográfica é ampla partindo do nordeste do Brasil até sul do Paraguai e norte da Argentina, sempre em regiões mais centrais não ocorrendo naturalmente em altitudes mais baixas próximo ao mar. Forma casais e bandos de dez ou mais aves. A situação desta espécie é avaliada como pouco preocupante pela *BirdLife International*, pois continua a ser comum em toda uma parte significativa da sua área de ocorrência e não há evidência de um declínio da população, apesar da espécie estar sendo fortemente negociada, desde 1981, quando foi cotada na "*Convention on International Trade in Engandered Species of Wild Fauna and Flora*" (CITIES) no Apêndice II, onde 413.505 indivíduos selvagens capturados foram registados no comércio internacional. (Sick, 1997; Forshaw, 1977; Renctas, 2002; IUCN, 2011).

2.2.2) *Amazona rhodocorytha*

É uma espécie que atinge cerca de 37 cm de comprimento, característica da Serra do Mar, abaixo de 200 metros de altitude, mas existem registros desta espécie em até 1000 metros de altitude. Possui cabeça intensamente vermelha assim como base da maxila, garganta

laranja espelho alar e nódoas ante apicais da cauda vermelha.

Sua distribuição hoje é restrita em alguns remanescentes florestais no Estado do Espírito Santo, onde existem projetos para sua preservação. Existem recentes relatos de sua existência no norte do Rio de Janeiro, sudeste de Bahia e Minas Gerais próximos a divisa destes estados. Historicamente ocorria de Alagoas ao Rio de Janeiro e mais ao interior no leste de Minas Gerais. Além do tráfico a destruição de seus habitat são os maiores entraves para sua preservação. Atualmente é declarada como "espécie em perigo" na Lista Vermelha da IUCN. (Sick, 1997; Forshaw, 1977; Renctas, 2002 IUCN, 2011).

2.2.3) *Amazona vinacea*

É uma espécie de dimensões um pouco menores que *A. aestiva*, que atinge no máximo 35 cm de comprimento. Possui um padrão escamoso arroxeadado-vináceo no peito bem característico, e uma gola de penas alongadas as quais frequentemente arrepia, lembrando o anacã (*Deroptyus accipitrinus*). A extremidade da asa é verde-azulada e as partes externas das penas secundárias são vermelhas. Seu dorso e cauda são verde-amarelados. O bico é avermelhado com a ponta acinzentada, a íris é vermelha e os pés são cinza.

Ocorre do Sul da Bahia ao Rio Grande do Sul, Paraguai e norte da Argentina, em matas secas interioranas, pinheirais, orla de capões de mata e entre campos. A espécie encontra-se ameaçada devido à caça predatória e à destruição ou fragmentação do seu habitat. Na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) é declarada como “espécie em perigo”. (Sick, 1997; Forshaw, 1977; Renctas, 2002; IUCN, 2011).

2.2.4) *Ara ararauna*

A característica mais marcante deste gênero *Ara* é a face glabra desprovida totalmente de penas em algumas espécies ou com algumas penas menores formando fileiras em outras. A *Ara ararauna* é a arara mais comum no nosso território com distribuição geográfica desde América Central até o Estado de São Paulo. Possui cerca de 80 cm de comprimento, coloração azul na parte superior e amarela na parte inferior, garganta e fileira de penas faciais negras.

Habita várzeas com buritizais, babaçuais, e copa de árvores ao longo de cursos d'água. Normalmente é vista em pares, ou em bandos de até 25 indivíduos e é comum se deslocar por grandes distâncias para se alimentar. Socializam-se com outros psitacídeos em bandos mistos. Graças à sua vasta distribuição e grande

população estimada, esta espécie de arara não está em condição de ameaça imediata, mas sua população vem declinando diante da destruição do ambiente e do comércio ilegal intenso sendo procurada em todo o mundo como animal de estimação por sua docilidade e grande beleza.

A atividade predatória do homem já fez com que em alguns locais fosse extinta, como em Trinidad e Tobago, Santa Catarina, Paraguai e Bolívia, ou na condição de quase extinta, em São Paulo. Atualmente o bioma mais ameaçado da América do Sul é o cerrado, onde a espécie era abundante, sendo entretanto considerada em perigo, pela ocupação com atividades humanas (Sick, 1997; Forshaw, 1977; Renctas, 2002; IUCN, 2011; Sigrist, 1966).

2.2.5) *Ara macao*

A arara-piranga (*Ara macao*) é considerado na Lista Vermelha da IUCN como espécie “pouco preocupante”. Mede cerca de 89 cm de comprimento e possui coloração vermelha escarlate, com asas tricolores (vermelho, amarelo na parte média e azul intenso nos extremos) e cauda azul. Face nua, creme e sem penas. Alimenta-se de frutos grandes, e habita a copa de florestas úmidas, florestas de galeria e margens de rios. Vive em grupos, podendo misturar-se a bandos mistos com outras espécies de araras.

Ocorre em uma grande área, abrangendo vários países como Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana; Honduras, do México; Nicarágua; Panamá, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago e Venezuela. No Brasil, sua distribuição é na Floresta Amazônica, com uma população estimada em 20.000 a 50.000 indivíduos (Sick, 1997; Forshaw, 1977; Renctas, 2002; IUCN, 2011).

2.2.6) *Ara severa*

A maracanã-açu (*Ara severa*) é considerado na Lista Vermelha da IUCN como espécie “pouco preocupante”. Mede de 43 a 48 cm de comprimento. Cor geral verde escura, com a frente marrom, pele nua e branca na face, coroa azulada, borda da parte média da asa vermelha, extremo da mesma e borda da cauda azul. Habita floresta úmida e semi-úmida baixa, até mesmo pântanos ou em ribeiras, e ambientes secundários, entre 300 e 2000 m de altitude.

Ocorre em duas grandes áreas. Uma desde o Panamá, norte da Colômbia, oeste da Venezuela, até o Equador e norte do Peru pela costa do Oceano Pacífico. E outra na Amazônia, desde as Guianas e sul do Orenoco, até o norte de Bolívia. No Brasil, sua distribuição ocorre da Amazônia à Bahia e ao Mato Grosso, em matas ciliares e buritizais (Sick, 1997;

Forshaw, 1977; Renctas, 2002; IUCN, 2011).

2.2.7) *Guaruba guarouba*

A ararajuba (*Guaruba guarouba*) é considerado na Lista Vermelha da IUCN como espécie “em perigo de extinção”. Trata-se de uma espécie amazônica que mede cerca de 34 cm de comprimento. Habita a copa de florestas úmidas altas. É bastante social, inclusive no período reprodutivo, vivendo em bandos de 4 a 10 indivíduos.

Encontrada exclusivamente no Brasil, do leste do Maranhão a sudeste do Amazonas, e principalmente no Pará, sempre ao sul do Rio Amazonas e leste do Rio Madeira. Ocorre na interface das terras baixas da calha do Rio Amazonas e a borda do Planalto Central (Sick, 1997; Forshaw, 1977; Renctas, 2002; IUCN, 2011).

2.2.8) *Pionopsitta pileata*

O cuiu-cuiú (*Pionopsitta pileata*) é considerado na Lista Vermelha da IUCN como espécie “pouco preocupante”, encontrados nas regiões sul e sudeste do Brasil, em cidades no Vale do Ribeira na Mata Atlântica, e também no Paraguai e em uma pequena área na Argentina.

Emite um som barulhento e semelhante ao da maitaca-verde (*Pionus maximiliani*). É uma das poucas espécies que possui dimorfismo sexual. Ambos

sexos apresentam plumagem verde uniforme, mas somente os machos tem a testa, o loro e a coroa vermelha. A fêmea apresenta a fronte com faixa levemente azulada. Ambos possuem a borda superior das asas, em azul escuro. Alimenta-se de grande variedade de frutas silvestres, são naturalmente pouco ariscos em relação à presença humana (Sick, 1997; Forshaw, 1977; Renctas, 2002; IUCN, 2011).

2.2.9) *Pionus fuscus*

A maitaca-roxa (*Pionus fuscus*) é considerado na Lista Vermelha da IUCN como espécie “pouco preocupante”. Mede de 24 a 26 cm de comprimento, possui coloração geral azul-violeta escuro, com manchas vermelhas ao redor da narina, e no lados do pescoço manchados de branco em diferentes proporções. Ventralmente contrasta o corpo pardo escuro com as asas azul-violeta e o vermelho na cauda. Possui uma dieta essencialmente frugívora.

Habita na floresta sub-andina nublada, floresta úmida e áreas desmatadas entre 1200 e 1800 m. É uma espécie pouco comum, voa solitária ou em pequenos grupos no dossel da floresta. Sua área de ocorrência abrange o noroeste da Colômbia, sudeste da Venezuela e Guianas até o nordeste do Brasil (Sick, 1997; Forshaw, 1977; Renctas, 2002; IUCN, 2011).

2.2.10) *Pionus maximiliani*

A maitaca-verde (*Pionus maximiliani*) é considerado na Lista Vermelha da IUCN como espécie “pouco preocupante”. O tamanho da população total não foi quantificado, mas é descrito como "bastante comum". Pesa cerca de 260g e mede 25 cm. Tem a cabeça cinza-azulada, abaixo do pescoço tem uma faixa roxa, bico amarelado, asas verdes e ponta do rabo vermelho. Alimenta-se de frutos e sementes.

Sua distribuição no Brasil inclui as regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul, em uma variedade de habitats que incluem florestas úmidas, de galeria, savanas e áreas cultivadas, até os 2.000 m. Geralmente gregário, voam em bando de seis a oito indivíduos. É um dos mais abundantes psitacídeos em sua área de ocorrência (Sick, 1997; Forshaw, 1977; Renctas, 2002; IUCN, 2011).

2.2.11) *Pionus menstruus*

A maitaca-de-cabeça-roxa (*Pionus menstruus*) é considerado na Lista Vermelha da IUCN como espécie “pouco preocupante”. Possui aproximadamente 27 cm de comprimento e pesa 245 g. Sua plumagem é principalmente verde, com a cabeça azul, incluindo o pescoço e parte do peito. A face inferior da cauda é vermelha, com penas vermelhas e rosas ao redor do bico. Não apresentam dimorfismo sexual aparente, mas as aves juvenis têm menor coloração azul na cabeça. Alimenta-se de

frutos, sementes, néctar, vagens, pétalas de flores e brotos. É comum na copa de florestas úmidas, capoeiras e clareiras com árvores isoladas, até 1.500 m de altitude. Vive solitária, aos pares ou em bandos grandes de até 100 indivíduos.

Ocorre ao leste do Andes, chegando ao Peru, parte do Brasil até o norte de Bolívia. No Brasil vive principalmente na bacia do rio Amazonas, incluindo o sudeste do rio Araguaia (Sick, 1997; Forshaw, 1977; Renctas, 2002; IUCN, 2011).

2.2.12) *Primolius maracana*

A maracanã-verdadeira (*Primolius maracana*) é classificada na Lista Vermelha da IUCN como "quase ameaçadas", isto porque a população é moderadamente pequena e está passando por um rápido declínio devido à perda extensa de habitat e captura para o comércio ilegal.

A espécie mede cerca de 41 cm de comprimento, e possui fronte, parte do dorso e barriga vermelhas, face superior da cauda ferrugínea, face nua amarelo-clara, anel perioftálmico branco e bico negro. Alimenta-se de frutos e sementes, habita beira de matas e buritizais.

Presente no Brasil em diversos Estados (Pernambuco, Piauí, Maranhão, Pará, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Santa

Catarina, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul) até o Paraguai e a Argentina (Sick, 1997; Forshaw, 1977; Renctas, 2002; IUCN, 2011).

2.2.13) *Trichoglossus haematodus*

O lóris arco-íris (*Trichoglossus haematodus*) é uma espécie exótica de psitacídeo, considerada na Lista Vermelha da IUCN como espécie "pouco preocupante". Trata-se de um Psittaciforme da família *Loridae*, com cerca de 26cm de comprimento. São verdes, com o peito vermelho estriado, cabeça azul roxeada, com um colar amarelo esverdeado. Existem cerca de 21 subespécies. O tamanho da população mundial não foi quantificado, mas a espécie é descrita como comum a abundante em boa parte de seu território de ocorrência, como na Nova Guiné e ilhas vizinhas, abundante no norte da Austrália, comum em Timor, Bali, e Sumbawa. Normalmente é observada aos pares, mas podem formar grandes grupos dependendo da disponibilidade de alimento. A dieta é composta de pólen, néctar, flores, frutas, insetos e suas larvas.

Trata-se de uma espécie criada intensivamente no Brasil e em outros países, sendo muito procurada como animal de estimação pela beleza de suas cores e docilidade (Del Hoyo *et al.*, 1997; Forshaw, 1977; IUCN, 2011).

Algumas das espécies avaliadas



Fig. 1-a - exemplar de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) avaliado neste estudo;

Fig.1-b - exemplar de papagaio do espírito santo (*Amazona rhodocorytha*) avaliado neste estudo;

Fig. 1-c - exemplar de papagaio do peito roxo (*Amazona vinacea*) avaliado neste estudo;

Fig. 1-d - exemplar de arara canindé (*Ara ararauna*) avaliado neste estudo.

2.3) Doenças pesquisadas:

2.3.1) Doenças consideradas importantes em Psittaciformes

2.3.1.1) Síndrome da Dilatação de Proventrículo- *Bornavírus*

A síndrome da dilatação proventricular (PDD), também conhecida como síndrome da caquexia e fadiga das araras, dilatação gástrica neuropática dos Psittaciformes, encefalomielite dos Psittaciformes, ganglioneurite mientérica, neuropatia esplânquica infiltrativa, é uma doença inflamatória fatal que infecta principalmente, mas não exclusivamente, psitacídeos (Berhane, *et al.*,2001).

A PDD tem chamado a atenção nos últimos anos pelo aumento considerável de sua ocorrência. A doença compromete basicamente a inervação autônoma do trato digestivo superior e médio, incluindo o esôfago, o inglúvio, o proventrículo, o ventrículo e o duodeno, e também o sistema nervoso central. A apresentação clínica são os sinais resultantes da disfunção gastrointestinal, tais como disfagia, regurgitação, perda de peso e presença de alimentos não digeridos nas fezes, além de ataxia, movimentos irregulares de cabeça e dificuldade de posicionamento (Berhane, *et al.*,2001; Mannl, *et al.*, 1987).

A doença já foi diagnosticada em mais de 50 espécies de psitacídeos, e também em diversas outras espécies como

gansos canadenses, canários, tucanos, colheireiros e traupídeos (Harrison *et al.*, 2006). Ela tem sido considerada por muitos como uma das maiores ameaças à avicultura de psitacídeos no mundo. Muitas, senão todas as grandes coleções já tiveram focos de PDD (Kistler, *et al.*, 2008).

Diversas etiologias já foram propostas para a PDD. Em 1986, pela primeira vez são descritos corpos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos e intranucleares, nas células nervosas do gânglio celíaco e do plexo mientérico, em psitacídeos com dilatação gástrica neuropática (Gancz, *et al.*,2009). Em 1996, foram identificadas partículas do tipo viral com aproximadamente 80 nm de diâmetro nas fezes de aves com esta doença, (Gought, *et al.*, 1996). Kistler e colaboradores, combinando investigação clínica veterinária com biologia genômica e molecular em dois estudos de caso/controle desenvolvidos em Israel e nos Estados Unidos, identificaram que novos perfis de Bornavirus estavam presentes em 62,5% das amostras de tecidos do trato gastrointestinal e cerebral de aves com PDD, e em nenhuma das amostras dos controles. No mesmo trabalho, a partir de amostras adicionais provenientes dos mesmos países, foram detectados estes Bornavirus em 71% dos casos com PDD e nenhum nos controles. Assim, com esta investigação foi

fortalecida a corrente da etiologia viral e relacionou-se o provável envolvimento do *Bornavirus* Aviário (ABV) nesta doença (Gancz, *et al.*, 2009).

Os Bornavirus são vírus de cadeia negativa de RNA não segmentado, envelopados e com formato esférico (Honkavouri, *et al.*, 2008) (Fig. 2a e 2b).

Antes dessa descoberta só se conhecia o vírus da doença de Borna clássico (VDB) associado a uma alteração neurológica progressiva principalmente em cavalos, ovinos e outros animais domésticos na Europa Central (Rott, *et al.*, 1995). A epidemiologia de VDB é especulativa, mas foi sugerido que os animais adquiriam o vírus de insetos infectados que contaminaram as pastagens (Hilbe, *et al.*, 2006). Assim como a epidemiologia, a patogenia do ABV é ainda obscura. Entretanto, com a implementação de técnicas moleculares e baseando-se em sequências de três partes distintas do genoma, encontraram-se sete genótipos distintos de ABV. As sequências de ABV e VDB têm 65% de identidade, mas esses dois vírus possuem a mesma organização genômica. Essa similaridade inclui o número e a ordem dos genes em um genoma vírico linear, a estrutura de transcrição, os sinais de iniciação e de terminação e o local de recorte, e de inserção (Kistler, *et al.*, 2008; Honkavouri, *et al.*, 2008; Weissenbock, *et al.*, 2009).

Nos Estados Unidos, na University of Wisconsin-Madison foi descrito um caso de uma arara piranga (*Ara macao*) encaminhada ao hospital veterinário com histórico de depressão e perda de apetite e emagrecimento por cerca de duas semanas. Diversos diagnósticos como análise de PCR para *Chlamydophila psittaci*, herpesvírus da Doença de Pacheco, dentre outros foram realizados, sendo todos negativos. Uma série de radiografias contrastadas do trato gastrointestinal foram realizadas, e nenhuma alteração no trânsito da ingesta foi encontrada. Uma terapia de suporte foi implementada e após uma semana a ave apresentou sinais neurológicos como incapacidade de permanecer empoleirada, movimentos erráticos com a cabeça, e pupilas de tamanhos diferentes. Tais sinais pioraram gradativamente durante cinco dias de internação, quando então a ave foi submetida à eutanásia. Posteriormente a necropsia a histopatologia revelou que no cérebro existia uma infiltração perivascular mononuclear multifocal, e finalmente através de PCR identificou-se que a encefalite foi causada por bornavírus aviário (Keller *et al.*, 2010). No Canadá em um estudo com 16 psitacídeos, nos quais cinco deles apresentavam histórico de sinais neurológicos foram encontrado infiltrados inflamatórios sugestivos de PDD nos exames histopatológicos de oito dessas aves, e na técnica de PCR foram

diagnosticados nove delas positivas (Raghav *et al.*, 2010). Na Espanha um estudo de 12 casos suspeitos atendidos em um hospital veterinário, apenas cinco casos foram confirmados por histopatologia, encontrando-se infiltrados linfoplasmocístico associadas aos plexos nervosos e nervos em diversos órgãos, sendo que oito destes casos pertenciam a um mesmo criatório (Ramada, 2009). Na Áustria também em 2009 foi comprovada a infecção de bornavírus aviário em um canário (*Serinus canaria*) por PCR, comprovando que a infecção também pode ocorrer em aves de outras ordens (Weissenböck *et al.*, 2009). Na Alemanha foi comprovado através de *swabs* cloacais e PCR a positividade de aves aparentemente saudáveis que tiveram contato com duas aves doentes de um mesmo criatório, num total de 59 psitacídeos, 19 (32,2%) foram positivos. Os mesmos testes foram feitos em outros dois criatórios da região que não tinham histórico desta doença, sendo todas as aves negativas. Assim comprovou-se pela primeira vez que o bornavírus estava presente em aves sem sinais clínicos (Lierz *et al.*, 2009). Kistler e colaboradores descreveram a ocorrência de um surto de PDD em um criadouro. O surto teve início em meados de junho de 2009 com a entrada de uma fêmea de papagaio do congo (*Psittacus erithacus*) que apresentou sementes não digeridas nas fezes e

posteriormente uma auto-mutilação dos pés. A ave foi retirada do aviário e levada a uma sala onde foi instituído tratamento de suas feridas. Nesta mesma sala eram mantidos filhotes de psitacídeos que eram alimentados artificialmente. No dia 15 de julho de 2009 a fêmea veio a óbito. Na necropsia foram encontradas lesões compatíveis com as de PDD. Todos os filhotes que permaneceram na mesma sala vieram a óbito dias depois com os mesmos achados de necropsia. Um total de 11 psitacídeos desenvolveram a sinais clínicos da doença e vieram à óbito ou foram submetidos à eutanásia. Neste contexto, foram colhidas amostras através de *swabs* cloacais de todas as aves do criatório (46) e foram diagnosticados por PCR mais 12 animais positivos (Kistler *et al.*, 2010). Kloet *et al.* (2009) identificaram através de análise de PCR de amostras de *swabs* cloacais e fezes positividade em duas araras militar (*Ara miliaris*) e uma arara canindé (*Ara ararauna*) sem sintomatologia clínica. Em 2011 foi diagnosticado o primeiro caso de PDD no Japão, em uma cacatua (*Cacatua sulphurea citrinocristata*) com características macroscópicas típicas à necropsia, e um infiltrado linfoplasmocítico em gânglios nervosos de vários órgãos e nervos periféricos na histopatologia, além de positividade na PCR, sendo a estirpe identificada como do genótipo tipo 2 (Ogawa *et al.*, 2011).

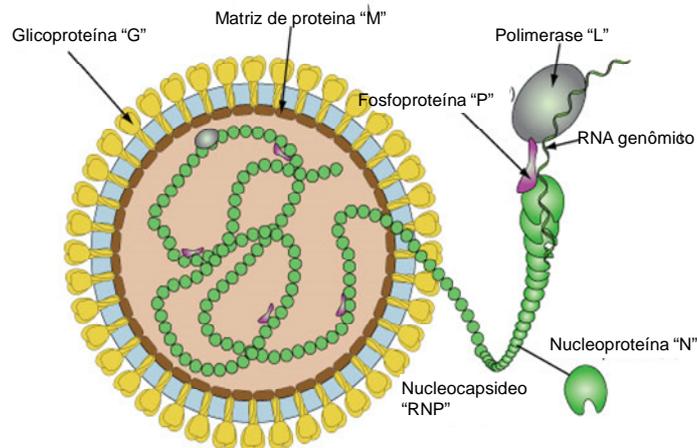


Fig. 2a – Representação de *Bornavírus* - Vírus envelopado, esférico, com diâmetro de 70-130 nm. Indica-se a localização de suas principais proteínas.

Fonte: Viralzone.expasy.org; Swiss Institute of Bioinformatics.

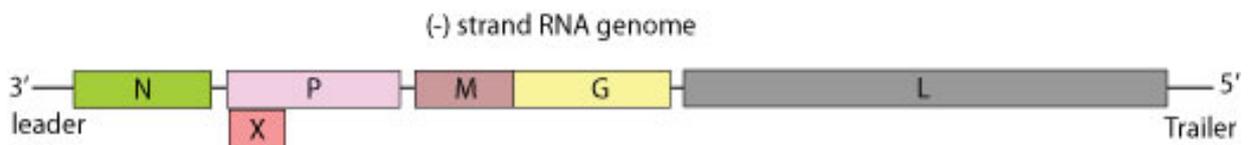


Fig. 2b – Representação da cadeia de RNA genômica de *Bornavírus* – Vírus RNA fita simples, negativa.

Fonte: Viralzone.expasy.org; Swiss Institute of Bioinformatics.

2.3.1.2) Clamidiose

Clamidiose é uma doença causada pela *Chlamydophila psittaci*, uma bactéria Gram-negativa, sendo um parasita intracelular obrigatório que acomete aves, mamíferos e répteis. É uma das principais zoonoses de origem aviária, apesar da incidência em humanos ser muito baixa quando comparada ao número estimado de aves portadoras. Aproximadamente 160 espécies de aves são reconhecidas como portadoras desse agente e os psitacídeos representam 25% deste total. A virulência e patogenicidade variam conforme a amostra infectante, grau de exposição e fatores relativos ao hospedeiro e ao ambiente (Andersen & Vanrompay, 2003).

Em humanos, a infecção é denominada psitacose e o primeiro caso que se tem relato foi descrito em 1879, quando Ritter descreveu uma epidemia de pneumonia grave que foi atribuída ao contato com psitacídeos em cativeiro. Observações parecidas foram descritas por diversos outros autores como Berne e Wagner em 1882 e Leipzig em 1886.

O maior surto desta doença iniciou-se em Paris em 1892 quando 49 casos foram reportados com 16 mortes. A infecção foi relacionada com a importação de psitacídeos vindos da América do Sul que tiveram um histórico de mortes e uma severa diarreia (Hutchison *et al.*, 1930). Uma pandemia com mais de 800 casos e aproximadamente 20% de óbito humanos

ocorreu entre os anos de 1929 e 1930. Em todos os casos as infecções estavam ligadas ao manuseio de psitacídeos (Beeckman *et al.*, 2009).

A apresentação em humanos foi relatada como uma febre alta seguida de uma pneumonia atípica (Hutchison *et al.*, 1930). E a sintomatologia nas aves foi descrita como perda de apetite, debilidade, sonolência, asas caídas, diarreia seguida de óbito em mais de 50% dos casos (Gulland, 1924).

Há anos a psitacose tem sido notificada em todo mundo, sempre associada com manejo de aves principalmente com psitacídeos e aves domésticas, em especial com perus e patos (Vanrompay *et al.*, 1995). Acredita-se que os casos notificados representam apenas uma pequena parcela dos casos, pois como se trata de uma bactéria intracelular obrigatória o diagnóstico se torna extremamente difícil, pela dificuldade de utilização de técnicas sensíveis e específicas. A doença é considerada rara, mas isto pode estar ligado ao fato de que provavelmente apenas os casos mais graves envolvendo pneumonia, com ou sem complicações cardíacas e neurológicas, serem notificados. Infecções menos graves, caracterizadas por sintoma de gripe e infecções assintomáticas são provavelmente pouco notadas pelos médicos e por consequência raramente notificadas.

Atualmente a pesquisa de diagnósticos progrediu enormemente, com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular com alto grau de especificidade e sensibilidade, como PCR-nested, PCR em tempo real e anticorpos recombinantes ELISA. Tais técnicas estão sendo usadas para identificação e o sequenciamento da *Chlamydomphila psittaci* principalmente em aves (Harkinezhad, 2008).

Em aves, os sinais clínicos variam largamente e a severidade depende da espécie aviária afetada, idade da ave, virulência e concentração da cepa envolvida. Em geral a clamidiose se apresenta com letargia, hipertermia, excreções anormais, descargas nasais e oculares e diminuição da produção de ovos. Em aves de companhia os sinais clínicos mais frequentes são conjuntivite, anorexia e perda de peso, diarreia, sinusite, biliverdinúria, descarga nasal, espirro, lacrimejamento e dificuldade respiratória (Andersen e Franson, 2007; Raso *et al.*, 2009; Hidasi, 2010).

A infecção ou transmissão de *C. psittaci* ocorre predominantemente através da inalação de aerossóis respiratórios contaminados, secreções dos olhos, urina ou fezes secas de um animal doente ou portador assintomático (Beekman *et al.*, 2009).

No ciclo de desenvolvimento da *C. psittaci* ocorrem duas fases morfológica e metabolicamente distintas. O ciclo de

replicação ocorre no citoplasma da célula hospedeira e se inicia pela adesão das formas infectantes inativas ou corpos elementares (CE), na membrana da célula, seguido pela internalização que dá origem a um vacúolo endossomal. Os CE se diferenciam, pela redução nas ligações entre as pontes dissulfeto das proteínas de membrana, nas formas vegetativas ou corpos reticulados (CR). Estes por sua vez se dividem através de replicações ou divisões binárias, quando são reorganizados morfológicamente dando origem a novos CE. À microscopia eletrônica, os CE apresentam citoplasma granular, refletindo a presença de ribossomos e um nucléolo excêntrico contendo DNA condensado. A liberação dos CE pode ocorrer por lise da célula hospedeira ou por fusão de inclusões clamidiais com a membrana celular (Vanrompay *et al.*, 1995). Durante este ciclo de desenvolvimento, por mecanismos ainda obscuros associados a condições pouco favoráveis de sobrevivência da *C. psittaci* na célula, os CR podem não se diferenciar em CE, originando os corpos persistentes (CP). Onde, apenas após eventos que causem imunossupressão do hospedeiro, os CP se transformam em CR e em seguida na forma infecciosa CE. As formas de persistência têm sido associadas às infecções crônicas (Hogan *et al.*, 2004).

No Brasil um trabalho de investigação epidemiológica de diagnóstico de *C. psittaci* foi conduzido, avaliando-se em três locais distintos a população aparentemente sadia de papagaios do gênero *Amazona* mantidos em cativeiro. Foram colhidas amostras de *swab* cloacal em duplicatas de 95 papagaios. Das amostras cloacais examinadas, a eliminação de corpos elementares de *C. psittaci* nas populações de papagaios foi de 16,7% em São Carlos, 22,2% em Belo Horizonte e 56,1% em Campo Grande. O elevado número de aves positivas sugere que a maioria das infecções ocorre sem o desenvolvimento da doença clínica, caracterizando o quadro de portador inaparente (Raso *et al.*, 2002). Foi reportado pela mesma autora, a ocorrência de um surto onde 96,5% dos filhotes de papagaios acometidos vieram a óbito, foi relatado também sintomatologia clínica de sinais de gripe com complicações de uma pneumonia atípica em pessoas que tiveram contato com estas aves. Caracterizando o potencial zoonótico da infecção (Raso *et al.*, 2004). Em um estudo sorológico na Bolívia, 54 psitacédeos, dentre estes 34 de vida livre, não foi encontrado nenhuma ave com sorologia positiva para *C. psittaci* (Deem *et al.*, 2005). Na Itália em 2005 foi relatado a presença de sinais clínicos da doença em 15 agapornis (*Agapornis fischeri*) em um *pet shop*, amostras de fezes foram colhidas

e todas estas aves foram positivas, decidiu-se então coletar amostras de fezes de outras aves presentes no *pet shop*, porém que não apresentavam sinais clínicos. De 14 aves testadas duas foram positivas. Neste mesmo trabalho é relatado a infecção humana de pessoas que manipularam estas aves (Grecco *et al.*, 2005). Em um estudo na Turquia, o diagnóstico de *C. psittaci* por PCR de 96 amostras testadas, 33 (34,4%) foram positivas (Celebi *et al.*, 2006). No Brasil, um surto de clamidiose foi descrito em um centro de triagem, envolvendo 15 psitacédeos. Os achados macroscópicos foram hepatomegalia com focos esbranquiçados variando de 1 à 100 mm de diâmetro, esplenomegalia e aerossaculite e os histológicos foram focos de necrose multifocais nos hepatócitos com infiltrado inflamatório de heterófilos e linfócitos, todos achados compatíveis com a infecção por *C. psittaci* e o diagnóstico foi confirmado por imuno-histoquímica utilizando-se anticorpos monoclonais para *C. psittaci* confirmando sua presença no citoplasma de macrófagos do fígado, baço e diversos outros órgãos (Ecco *et al.*, 2009). Em 2012 foi descrito em um estudo no mesmo centro de triagem, onde 212 animais foram necropsiados com 152 (72%) positivos para *C. psittaci* pelo teste da PCR, mostrando uma taxa extremamente elevada em relação a outros estudos (Vilela, 2012).

2. 3.1.3) Doença do bico e das penas dos psitacídeos - Pbfd- (Circovírus)

A doença do bico e das penas dos psitacídeos é causada por um circovírus, semelhante ao da anemia infecciosa das galinhas, e causa doença clínica em psitacídeos (Cubas, 2006).

A Pbfd tem sido notada em aves de vida livre a mais de 100 anos. Anormalidades nas penas já eram observadas em *Red-Rumped (Psephotus haematonotus)* desde 1887, muito antes de seu nome ser inventado, em relatos de uma síndrome caracterizada por anormalidades na plumagem e bico de várias espécies de cacatuas na Austrália (Perry, 1981). A doença é considerada hoje, como a mais comum em psitacídeos selvagens na Austrália (Raidal *et al.*, 1993). Já foi diagnosticada em mais de 40 espécies de psitacídeos. Sendo que, Psittaciformes da Ásia, África e Oceania são mais susceptíveis à doença, e os Psittaciformes das Américas Central e do Sul são mais resistentes (Bassami *et al.*, 2001).

A doença pode se apresentar na forma hiperaguda, aguda ou crônica. A forma hiperaguda ocorre em neonatos e jovens e pode causar pneumonia, enterite, perda de peso e morte. A forma aguda acomete animais jovens que estão trocando as plumas de filhotes para penas de adultos. Pode causar depressão e alterações no desenvolvimento das penas, incluindo

necrose, quebra e sangramento. A forma crônica é caracterizada pelo aparecimento progressivo de penas anormais, principalmente após a muda. É possível notar o desenvolvimento de penas distróficas, sangramentos, fraturas de penas, muitos canhões, linhas de estresse e destruição dos folículos das penas. Ocorrem também alterações na cavidade oral, como um alongamento do bico, fraturas transversais e longitudinais, necrose de palato e ulceração da mucosa oral. Geralmente estas lesões de bico ocorrem após as lesões de penas estarem bem avançadas (Cubas, 2006; Harrison *et al.*, 2006).

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 doença causa uma imunossupressão a qual deixa o animal susceptível a infecções secundárias (bacterianas, fúngicas e virais), que normalmente acabam por provocar a morte do animal (Doneley, 2003). A resposta imunológica do hospedeiro depende de vários fatores individuais e ambientais. Aves naturalmente expostas podem permanecer clinicamente normais e terem uma resposta imune adequada, mas em casos em que isso não ocorre e há apenas uma resposta imunológica menos adequada, instala-se uma doença clínica

superaguda ou aguda (Richie, 1995). De acordo com alguns estudos a infecção latente assintomática pode ser bastante frequente em algumas espécies de psitacídeos como, por exemplo, na Oceania, onde estudos mostram que existem grandes diferenças na relação entre indivíduos doentes e indivíduos infectados (Piçarra, 2009). Em cativeiro, por existirem portadores assintomáticos e contato entre animais de diferentes espécies, origens e idades, a dispersão da doença é facilitada (Khalesi *et al.*, 2007). A recuperação de PBFD clínica foi documentada em araras (*Ara spp.*) e maritacas (*Pionus spp.*), bem como na família Loriinae (Kaleta, 2007).

No Brasil o primeiro diagnóstico relatado da doença foi realizado em 1997, em uma cacatua (*Cacatua alba*) com sintomatologia clínica (Werther *et al.*, 1998). Também foram realizados diagnósticos em papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) (Gussoni *et al.*, 2006), por Castro *et al.* (2009) em periquitos australianos (*Melopsittacus unguilatus*) e *ring-necks* (*Psittacula krameri*) em um criadouro em Minas Gerais.

O diagnóstico da PBFD é feito através do histórico médico da ave, a presença de sinais clínicos, além de exames de histopatologia e PCR. A histopatologia pode confirmar o diagnóstico. As células afetadas terão

corpúsculos de inclusão basófilos intranucleares em seus núcleos. O diagnóstico pode também ser confirmado por um teste de PCR em amostras de penas, fezes ou sangue, o PCR detecta a presença de parte do genoma do vírus (Khalesi *et al.*, 2005).

2.3.2) Doenças relacionadas ao Plano Nacional de Sanidade Avícola PNSA

2.3.2.1) Doença de Newcastle

A Doença de Newcastle (DN), causada pelo *Paramyxovirus* aviário tipo 1 (APMV-1), ocorre nas aves domésticas e em diversas espécies de aves selvagens e é listada como enfermidade infecciosa de notificação imediata da Organização Mundial de Saúde Animal - OIE, sendo seus focos de erradicação compulsória. É caracterizada por sinais respiratórios, digestivos e nervosos, podendo causar mortalidade elevada (Alexander, 2003).

Estirpes do vírus da Doença de Newcastle (VDN) têm sido agrupadas, para fins didáticos, em cinco patótipos com bases nos sinais clínicos observados nas aves infectadas. Os mais patogênicos são denominados como velogênico, um designado como velogênico viscerotrópico, frequentemente observando-se lesões intestinais e respiratórias hemorrágicas; e outro velogênico neurotrópico, observando-se sinais nervosos centrais e respiratórios, ambos causam altos índices de mortalidade de até 100% de aves

infectadas; o patotipo de patogenicidade intermediária é denominado mesogênico, apresentando-se com sinais respiratórios mais brandos, ocasionalmente sintomatologia nervosa central, e menor mortalidade que, entretanto, pode atingir 50% em aves sensíveis; o quarto patotipo denominado lentogênico ou vacinal apresenta-se com infecções respiratórias mais brandas e subclínicas; e finalmente a quinta denominada entérica assintomática, consistindo em uma infecção entérica subclínica (Alexander, 2003; Paulillo *et al.*, 2000).

Infecções pelo APMV-1 já foram descritas em, pelo menos, 241 espécies de aves, representando 27 das 50 ordens da classe Aves e, provavelmente, todas as aves são susceptíveis à infecção, sendo que as aves selvagens podem atuar como reservatórios do vírus, incluindo estirpes patogênicas. A severidade da doença pode variar de infecções inaparentes até a morte, dependendo da patogenicidade do vírus, condições ambientais e dos hospedeiros (Heckert, 1993).

Entre aves, a transmissão ocorre pela eliminação nas fezes, fluidos corporais e aerossóis respiratórios. O vírus pode resistir por longos períodos no ambiente, podendo assim, ser transmitido por fômites (Leighton *et al.*, 2007). A maioria das infecções em aves silvestres são inaparentes, ou causam sinais clínicos brandos, no entanto, esses animais tendem

a eliminar o vírus por um período de tempo relativamente longo (Macpherson, 1956 e Kuiken *et al.*, 1998, citados por Leighton *et al.*, 2007). Estas manifestações clínicas geralmente são neurológicas, causando incordenação, posicionamento incorreto da cabeça e paresia ou paralisia de membros superiores e inferiores.

No Brasil, o PNSA estabelece normas de biossegurança, vacinação e sacrifício sanitário de aves para APMV-1, para estirpes com índice de patogenicidade intracerebral maior que 0,7 ou com código genético para múltiplos aminoácidos básicos no sítio de clivagem da glicoproteína de fusão (Alexander, 2003; Brasil, 2002). O teste sorológico considerado padrão é a inibição da hemaglutinação. O isolamento em ovos embrionados de galinhas SPF e a RT-PCR, respectivamente, são realizados para a replicação do vírus ou detecção do seu genoma, sendo assim, os testes confirmatórios (Brasil, 2002).

Historicamente, é conhecida a participação das aves silvestres na difusão mundial da doença, em especial dos psitacídeos na segunda panzootia da DN, no final de 1960 no Oriente Médio, com uma rápida difusão atingindo todos os continentes e diversos países até o ano de 1973. Essa rápida difusão estava associada ao grande comércio de espécies de psitacídeos principalmente provenientes da América do Sul, América Central e

Sudoeste da Ásia, envolvendo transporte aéreo. Os psitacídeos podem desenvolver uma infecção crônica com potencial de eliminação de partículas virais por um longo período (Alexander, 1991, 2003; Paulillo *et al.*, 2000).

Na Suíça, 3049 *swabs* cloacais coletados de aves selvagens foram negativos para o APMV-1 utilizando a técnica de RT-PCR (Camenisch, *et al.*, 2008). Na Índia, quatro isolados de APMV-1 obtidos de pombo, lóris, papagaio e agapornis. Foram genotipados e identificados como amostras velogênicas (Senthuran *et al.*, 2005). Um surto de Doença de Newcastle com alta mortalidade foi descrito em faisões de coleira (*Phasianus colchicus*) no sudeste da Inglaterra (Aldous *et al.*, 2007). Paulillo e colaboradores, em 2005, constataram que perdizes (*Rhynchotus rufescens*) infectadas com estirpes de alta patogenicidade eliminam o vírus por até 15 dias, provocando 100% de mortalidade em galinhas alojadas com esses animais. Além disso, 30 dias pós-infecção as perdizes soronegativaram ao teste da HI (Paulillo *et al.*, 2005). Apesar de testes sorológicos não fornecerem informações sobre a estirpe do vírus da DN, pesquisas em populações selvagens são importantes para conhecer a circulação deste agente entre esses animais (Leighton *et al.*, 2007). Em um estudo em araras (*Ara sp.*) no Peru 30 indivíduos de diversas idades foram sorologicamente

negativos para o APMV-1 (Karesh *et al.*, 1997). Também no Peru psitacídeos de vida livre capturados, sendo nove periquitos-de-cabeça-suja (*Aratinga weddellii*) e oito periquito-testinha (*Brotogeris sanctithomae*) foram sorologicamente negativos para APMV-1 (Kirsten *et al.*, 1995). Em outro estudo com aves silvestres capturadas proximais a granjas no interior do Estado de São Paulo, das 74 aves capturadas e testadas, todas foram sorologicamente negativas, estando entre elas um exemplar de jandaia coquinho (*Aratinga aurea*) e cinco exemplares de maritaca (*Aratinga leucophthalmus*) (Sousa, 2007). Em um estudo com aves do Zoológico Municipal do Rio de Janeiro e de propriedades particulares nos municípios próximos foi realizada coleta de sangue para detecção de anticorpos para VDN. Um painel de 837 plasmas foi obtido, no período de agosto de 1998 a julho de 2001, e analisado pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI), dos quais 12 foram soropositivas (1,43%) para o VDN, indicando prévio contato das aves com o patógeno (Oliveira Jr. *et al.*, 2003).

2.3.2.2) Micoplasmoses

Micoplasmoses são infecções por *Mycoplasma* spp. integrantes do grupo de bactérias que não possuem paredes celulares, sendo as menores formas de vida auto-replicas. *Mycoplasma* é a definição

trivial para os microorganismos da divisão *Tenericutes* e da classe *Mollicutes* (*Mollis* = macio; *cutis* = pele), que são caracterizados pela ausência de parede celular, decorrente da falta de informação genética para sua síntese, fato este que mais os distingue das bactérias verdadeiras (Macari *et al.*, 2000).

As diversas espécies de micoplasmas são responsáveis por uma variedade de doenças em seres humanos, animais, insetos e plantas. Estas bactérias podem causar doenças agudas e crônicas nos hospedeiros, comumente associados a infecções por outros patógenos, especialmente em condições de imunodepressão do hospedeiro. Micoplasmas têm formato cocóide, cocobacilar ou pleomórfico, quanto às propriedades tintoriais são Gram negativas, mas se coram pelo método de Giemsa. Há cerca de 100 espécies de *Mycoplasma* descritas e 23 destas são relacionadas às aves, sendo as mais importantes: *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM) e *Mycoplasma iowae* (MI). Somente MG é espécie descrita como de importância para as aves selvagens (Friend e Frason, 1999; Yoder, 1998).

Os sinais clínicos da micoplasmosose por (MG) são tosse, espirros, descargas nasais e oculares, diminuição na ingestão alimentar e

produção de ovos, baixa eclodibilidade e aumento da mortalidade. Em perus o principal sinal é aumento de volume nos seios infraorbitais. A micoplasmosose por (MS) causa sinais semelhantes aos mencionados para (MG) em galinhas, perus e outras aves, porém de forma mais branda, podendo não haver sinais respiratórios. No entanto, este microrganismo causa claudicação com aumento de volume nos pés e articulações. Infecções crônicas podem provocar fezes esverdeadas.

As micoplasmososes possuem transmissão horizontal, através de aerossóis, água, alimento e fômites contaminados e pelo contato direto com animais infectados. A transmissão vertical também ocorre, através da contaminação do ovo no oviduto (Ley *et al.*, 2003; e Yoder, 1998).

O PNSA define as medidas de monitoramento de estabelecimentos avícolas de controles permanentes ou eventuais integrantes do comércio internacional de aves destinadas à reprodução e à produção de aves e de ovos férteis. Para a realização de comércio internacional, o estabelecimento avícola deverá estar certificado como livre de MG, MS e MM. O teste da soroaglutinação rápida em placas (SAR) é realizado para triagem e os soros reagentes devem ser submetidos ao teste de ELISA ou inibição da hemaglutinação (HI). Havendo casos de

positividade, *swabs* de traquéia devem ser coletados e enviados para laboratórios oficiais para a realização de PCR (Brasil, 2002).

Em experimento realizado no interior do Estado de São Paulo 50 aves silvestres que viviam próximas a granjas de galinhas foram capturadas e testadas sorologicamente para MG, dentre essas nove aves (11,25%) foram reagentes na SAR, porém negativas em testes confirmatórios de HI e PCR (Sousa, 2007). Allgayer e colaboradores, em um criadouro comercial de psitacídeos em Novo Hamburgo-RS realizou um levantamento através de provas sorológicas e isolamento de MG e MS em 52 araras (*Ara ararauna*) e oito papagaios (*Amazona aestiva*), todas aves saudáveis, no período de março à setembro de 2000. Nenhum dos resultados demonstrou positividade, tanto para os testes sorológicos quanto para o isolamento (Allgayer *et al.*, 2001). Uma correlação positiva entre infecções por micoplasma e a sintomatologia clássica foi descrita em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), papagaios-de-nuca-amarela (*Amazona auropalliata*) e em passeriformes (*Carpodacus mexicanus*) experimentalmente inoculados com MG de galinhas (Farmer *et al.*, 2005). Friend e Fransion relataram a ocorrência de MG em um papagaio campeiro (*Amazona ochocephala*) (Friend e Fransion, 1999). Horta *et al* (2008) e Gomes *et al.* (2010)

diagnosticaram, por meio de PCR, MG em psitacídeos provenientes do centro de triagem de animais silvestres (CETAS) na cidade de Belo Horizonte. Entre os anos de 2005 e 2006 Marieto-Gonçalves e colaboradores diagnosticaram dois casos de MG em psitacídeos atendidos no Laboratório de Ornitopatologia da UNESP-Botucatu (Marieto-Gonçalves *et al.*, 2008).

2.3.2.3) Salmonelose

A salmonelose é causada por uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, do gênero *Salmonella*, família *Enterobacteriaceae*, cujo habitat é o intestino grosso dos animais portadores. (Koneman *et al.*, 2001). Os psitacídeos entretanto possuem uma microbiota intestinal normalmente formada por bactérias Gram-positivos (Cubas, 2006).

O gênero *Salmonella* tem distribuição mundial e é uma das causas mais comuns de diarreia bacteriana em seres humanos e outros animais. No gênero estão incluídas cerca de 2.500 sorovarietades, que foram descritas em uma grande variedade de animais hospedeiros, incluindo répteis, aves e mamíferos. A maioria das sorovarietades apresenta baixa especificidade de hospedeiro.

Dependendo de fatores relacionados ao sorotipo bacteriano, espécie de hospedeiro e condições

ambientais, a exposição de um animal para salmonelas pode resultar uma infecção assintomática, uma enterite aguda ou septicemia, ou ainda uma infecção multifocal crônica. Em aves selvagens, a salmonelose é uma causa comum de mortalidade esporádica, especialmente entre aves jovens que permanecem em grandes colônias de reprodução, e em aves canoras que se reúnem para se alimentar no inverno. Com base nas diferentes manifestações de salmonelose conhecidas em aves domésticas, muito continua a ser aprendido sobre a epizootiologia desta doença em aves selvagens, incluindo a possível adaptação do hospedeiro ao agente, e a contribuição potencial de transmissão transovariana para a persistência de salmonela nas populações de aves selvagens (Thomas *et al.*, 2007).

A transmissão da salmonelose ocorre principalmente pela via fecal-oral, pelo contato direto com animais infectados ou pela ingestão de água e alimentos contaminados. Na avicultura industrial, a transmissão via ovo também é importante. Pode ocorrer pela infecção do ovo no ovário, durante o trânsito pelo oviduto, ou após a postura, por contaminação na cloaca e conseqüente penetração do microrganismo chegando às membranas da casca ou até ao embrião em desenvolvimento. O filhote pode ainda se

infectar durante a eclosão, através da casca contaminada (Macari *et al.*, 2000).

A manifestação clínica da salmonelose não é característica podendo ser confundida com qualquer septicemia causada por outra bactéria, os sinais são inespecíficos, como apatia, anorexia, desidratação, enterocolite aguda com diarreia, podendo ocorrer bacteremia, meningite com sinais nervosos, enterite necrótica e morte súbita. Os fatores que contribuem para a gravidade e para a ocorrência da doença são fatores estressantes, imunossupressão, dose infectante, via de transmissão, espécie e idade acometida, doenças concomitantes, sorotipo de *Salmonella* sp. envolvido, entre outros fatores (Friend e Franson, 1999).

Segundo o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), para proceder ao comércio nacional e internacional e à transferência, no âmbito nacional, de seus produtos, o núcleo ou estabelecimento avícola que possua reprodução de qualquer tipo de aves, deverá estar certificado como livre de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* e livre ou controlado para *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*. As provas que devem ser realizadas para o monitoramento dos plantéis são soro-aglutinação rápida em placas (SAR), que pode ser em placas de *Huddleson*, utilizando-se sangue total ou soro, aglutinação lenta em tubos (SAL) ou microaglutinação, e confirmação por

isolamento bacteriano. Para aves ornamentais ou silvestres de produção, serão adotados os mesmos critérios utilizados para matrizes. Todas as salmonelas isoladas deverão ser obrigatoriamente, enviadas ao laboratório oficial e de referência de salmonelas aviárias para serem investigadas sob os aspectos epidemiológicos/microbiológicos (Brasil, 2002).

No Brasil foi relatada a morte de araras azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*) por *Salmonella* Typhimurium (Menão *et al.*, 2000). No Zoológico do Rio de Janeiro foi descrita a ausência de isolamento de *Salmonella* sp. em uma amostragem de swabs cloacais de 78 aves selvagens de 21 espécies (Lemos *et al.*, 1999). *Salmonella* sp. não foi detectada em nenhuma das amostras, no estado de São Paulo, em uma amostragem de 200 aves selvagens por swabs cloacais e cultivo bacteriano. Kanahiro *et al.* (2002) relatou o isolamento de *Salmonella enterica enterica* de um psitacídeo (*Agapornis roseicollis*) pertencente a uma criação com mais de 2000 aves na cidade de Descalvado no Estado de São Paulo, com resistência a antibioticoterapia à enrofloxacina. Também no Estado de São Paulo, em um estudo com aves de vida livre capturadas próximas a granjas, em 80 amostras, apenas uma foi reagente para SAR e confirmada por isolamento (Sousa, 2007). Foram também isoladas *Salmonella*

Braenderup em cloaca de arara-azul do Pantanal (*Anodorhynchus hyacinthinus*), em seu ambiente natural. Considerando-se o alto potencial zoonótico, destaca-se a relevância do controle sanitário de psitacídeos em ambiente natural (Loiko *et al.*, 2009). Allgayer estudou a prevalência de *Salmonella* sp. em criadouros comerciais, mantenedouros e zoológicos no Rio grande de Sul, e relatou que aproximadamente 13,2% (num total de 280 aves) dos psitacídeos mantidos em cativeiro eram portadores assintomáticos ou eram transientemente infectados pelo gênero *Salmonella* (Allgayer, 2003).

2.3.3) Parasitoses

2.3.3.1) Ácaros e piolhos

Uma grande diversidade de ácaros causa infestação em psitacídeos de cativeiro. A sarna knemidocóptica causada pelo ácaro *Knemidocoptes spp.* É comum em periquitos australianos (*Melopsittacus unguatus*) e outras aves.

A sarna causa lesões de hiperqueratose características em áreas desprovidas de penas como o bico, cera, pálpebras e patas. Pode ocorrer deformação do bico, crescimento anormal das unhas e descamação da pele, tendo como consequência, dificuldade de locomoção, artrite e infecções bacterianas secundárias.

O diagnóstico clínico é feito pela observação das lesões típicas e por exame

microscópio de raspado das lesões, em lâmina e lamínula com solução de hidróxido de potássio a 10%, para visualização dos ácaros (Greiner and Ritchie, 1994).

Em um estudo avaliativo com 36 papagaios de San Vincent (*Amazona guildingii*) foram diagnosticados duas aves parasitadas com o ácaro *Knemidocoptes* sp. (Deem *et al.*, 2008).

Os ácaros vermelhos *Dermanyssus spp.* E *Ornithonyssus spp.* Causam anemia, prurido, debilidade e alta mortalidade de adultos e filhotes de aves em criatórios com grande infestação. O *Dermanyssus gallinae* é encontrado no aviário formando colônias nas frestas e em fendas, em acúmulo de sujeiras e em ninhos e poleiros. Permanecem nestes locais durante o dia e à noite procuram as aves para realizarem o repasto sanguíneo. O *Ornithonyssus bursa* realiza seu ciclo de vida na ave e não sobrevive muito tempo fora do hospedeiro, concentra-se ao redor da cloaca (Greiner and Ritchie, 1994).

Karesh *et al.* (1997) relataram em seu estudo a ocorrência de uma infestação leve de *Ornithonyssus bursa* em dois filhotes de *Ara macao* que estavam sendo criados pelos pais, e não foi relatado a presença deste parasita em nenhum dos filhotes criados artificialmente.

Os piolhos são insetos (Ordem Phthiraptera, Classe Insecta) não

hematófagos que parasitam as penas das aves, podendo acarretar injúrias em infestações muito grandes. O estudo dos malófagos de psitacídeos sugere a co-evolução da ave e do parasito.

Nos psitacídeos americanos ocorre historicamente um único gênero de malófagos (*Paragoniocolotes*), com quatro linhas evolutivas que acompanhariam a evolução dos próprios Psittacidae, quanto a sua ocorrência nos diversos gêneros, podemos ver que uma primeira linha aparece nos *Pionopsitta*, *Pionus* e *Amazona*, uma segunda só no gênero *Amazona* junto com a anterior, uma terceira nos *Ara*, *Aratinga*, *Pyrrhura*, *Forpus* e *Brotogeris* e a quarta nos *Aratinga*, *Forpus* e *Brotogeris*, junto com a anterior. (Sick, 1997).

No parque zoológico municipal Quinzinho de Barros, na cidade de Sorocaba e na fundação jardim zoológico do Rio de Janeiro. Valim *et al.* (2005) encontraram 28 espécies de malófagos que foram coletadas de aves silvestres no acervo do zoológico de São Paulo durante o ano de 2003. Sendo que em psitacídeos foram encontrados *Psittacobrosus* sp. em arara azul grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*), e *Psittacobrosus burmeisteri* em arara vermelha (*Ara chloroptera*). Karesh *et al.* (1997) relatou em seu estudo a ocorrência de uma espécie não identificada de malófago parasitando filhotes de arara (*Ara macao*) criados pelos

pais, e em nenhum filhote criado artificialmente.

2.3.3.2) Coccidioses

Em aves de cativeiro, as coccidioses representam uma constante ameaça às criações. Os gêneros *Eimeria spp.* e *Isospora spp.* são as principais espécies responsáveis pelas coccidioses em aves (Greiner e Ritchie, 1994).

Coccidioses são comuns em passeriformes, pombos, tucanos e lóries, e são raras em psitacídeos do gênero *Amazona*. Duas espécies de *Eimeria* (*E. dunsingi* e *E. haematodi*) e uma de *Isospora* (*I. psittaculæ*) foram descritas em psitacídeos (Hofstatter *et al.*, 2011).

Os oocistos esporulados de *Eimeria* são subdivididos em quatro esporocistos com dois esporozoítos cada, enquanto que *Isospora* o oocisto possui dois esporocistos com quatro esporozoítos. Aves infectadas podem ser assintomáticas ou desenvolver sinais clínicos como prostração, redução da massa muscular peitoral, penas pericloacais sujas de excretas e diarreia amarelada, com estrias de sangue ou escura (sangue digerido), e óbito. A coccidiose comumente está associada a outras doenças, relacionando-se como uma doença oportunista.

A transmissão pode ser direta ou através de alimentos ou água contaminada com os oocistos. O diagnóstico é realizado pela visualização de oocistos de coccidia

não esporulados e/ou esporulados nas excretas pelos métodos de exame direto das fezes em microscopia óptica e flutuação em solução saturada de NaCl (Harrison, 1994).

Em um estudo no Japão, foi descrito uma coccidiose em papagaios (*A. aestiva*) (Tsai *et al.*, 1992). Na Guatemala em um estudo durante a translocação de 350 aves, 75 amostras de fezes foram analisadas, sendo encontrada coccidia em apenas três amostras pertencentes a papagaios (*Amazona autumnalis*) (Ronney *et al.*, 2001). Estudos recentes têm demonstrado à infecção por *Eimeria* em psitacídeos, como na Costa Rica, onde foi descrita uma nova espécie de *Eimeria* (*Eimeria aratinga*) em *Aratinga canicularis* (Upton *et al.*, 1994). E no Brasil recentemente foram descritos três espécies de *Eimeria* (*Eimeria amazonae*; *Eimeria ochrocephalæ*; e *Eimeria aestivæ*) em papagaios do gênero *Amazona* (Hofstatter *et al.*, 2011).

2.3.3.3) Helmintoses

Entre os vários problemas sanitários que afetam as aves silvestres, as enfermidades parasitárias estão entre as mais frequentes, podendo causar desde infecções sub-clínicas até a morte (Freitas *et al.*, 2002), sendo as endoparasitoses muito comum principalmente em casos de alta densidade populacional (Barnes *et al.*, 1986).

As helmintoses são parasitoses causadas por nematóides, acantocéfalos, cestóides e trematóides. A maior parte dos helmintos parasita o trato gastrointestinal, determinando lesões e processos inflamatórios de diferentes graus, dependendo da espécie envolvida, quantidade de parasitos e imunidade das aves. As helmintoses podem ter curso agudo com morte, mas o mais comum é a forma crônica e debilitante.

Os sinais clínicos incluem prostração, plumagem descolorida e perda de peso (decorrentes da má absorção dos nutrientes), anorexia, penas arrepiadas, regurgitação, diarreia e anemia.

Os nematóides mais comumente observados são *Ascaridia spp.*, *Capillaria spp.*, *Heterakis spp.* e *Strongyloides spp.* E os cestóides *Davainea proglottina*, *Raillietina spp.* e *Amoebotaenia spp.* (Freitas *et al.*, 2002). Os nematóides parasitos de aves referidos para o Brasil pertencem a 17 superfamílias, 23 famílias, 75 gêneros com 257 espécies (Vicente *et al.*, 1995).

Em um estudo no Espírito Santo, das 36 aves examinadas, 14 (38,89%) apresentaram diagnóstico positivo nos exames coproparasitológicos (Carneiro *et al.*, 2011). Em outro estudo no interior de São Paulo, das 212 amostras examinadas, 76,6% foram de aves silvestres, tendo-se observado: ovos de *Ascaridia sp.*,

Capillaria sp. e *Heterakis sp.*; cistos de *Balantidium sp.*, *Blastocystis sp.* e *Entamoeba sp.*; e oocistos de coccídeos. Dentre estas aves estavam 17 Psittaciformes, onde dois foram positivos para infestação mista dos protozoários *Entamoeba sp.* *Balantidium sp.* e não foram positivos para nenhuma helmintose (Marieto-Gonçalves *et al.*, 2005). Em outro estudo em psitacídeos exóticos foram encontrados ovos de parasitas nas amostras de fezes. Nas calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) e nos papagaios do Senegal (*Poicephalus senegalus*) foram encontrados ovos de *Ascaridia platycerci*, e em roselas (*Platycercus eximius*) foram encontrados ovos de *Heterakis gallinarum* (Balicka-Ramisz *et al.*, 2007). No Peru, um estudo com araras (*Ara macao*, *Ara ararauna*), ovos de nematóides estavam presentes em sete de dez amostras, e foram identificados como *Ascardia galli* e *Heterakis sp.* (Karesh *et al.*, 1997). Em um estudo com papagaios de San Vincent (*Amazona guildingii*), os exames parasitológicos onde 21 amostras foram analisadas, apenas uma foi positiva e os ovos encontrados foram do parasita *Capillaria sp.* (Deem *et al.*, 2008).

3) Objetivos

3.1) Objetivo geral

Determinar o perfil sanitário de psitacídeos em cativeiro em Minas Gerais para doenças selecionadas.

3.2) Objetivos específicos

Avaliar a ocorrência da infecção por Bornavírus aviário (ABV), em psitacídeos afetados pela síndrome da dilatação de proventrículo (PDD), pela detecção do RNA de ABV e imunohistoquímica.

Determinar a ocorrência da infecção por *Chlamydophila psittaci* (CP) pela detecção do DNA de CP.

Examinar a ocorrência de infecção por circovírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos (PBFD) pela detecção do DNA do circovírus.

Avaliar a ocorrência de anticorpos para APMV-1 (vírus da doença de Newcastle).

Examinar soros para anticorpos específicos contra *Mycoplasma gallisepticum*.

Examinar soros para anticorpos específicos contra *Salmonella Pullorum* / *Salmonella Gallinarum*.

Determinar a ocorrência de ecto e endoparasitoses.

4) Material e métodos

4.1 Locais de execução do projeto e animais

Fizeram parte deste estudo todas as aves da ordem Psittaciformes que vieram ao óbito durante o período de execução deste trabalho, e foram encaminhados ao Setor de Doenças das Aves da UFMG, onde foram realizados exames necroscópicos e coletados materiais para diagnóstico da *causa mortis*.

Além disso, amostras de sangue, *swabs* cloacais, de fenda palatina e amostras fecais de psitacídeos do gênero *Ara* e *Amazona*, foram coletadas no criatório comercial Fazenda Vale Verde, mantenedor de fauna Bem Viver, mantenedor de fauna Recanto do Amor e na Estação Ecológica de PETI-CEMIG, todos empreendimentos de fauna cadastrados no IBAMA de Minas Gerais. A amostragem (Tab.1) totalizou 216 aves, sendo 145 *A. aestiva*, representando (67,2%) das aves testadas; 21 (9,7%) de *A. vinacea*; 10 (4,6%) de *A. rhococorytha*; e 40 (18,5%) de *A. ararauna*. O período de coleta das amostras biológicas foi iniciado no dia 24-05-2011 e encerrado no dia 23-08-2011.

Imediatamente após cada coleta as amostras foram processadas no Setor de Doenças das Aves, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Laboratório de Genética Animal da Escola de Veterinária da UFMG; no Laboratório de Genética

Celular e Molecular (LCGM) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG; no Laudo Laboratório Avícola de Uberlândia, Minas Gerais, Laboratório de patologia clínica do hospital veterinário da UFMG, ou também no Laboratory of Avian Pathology, University of California – Davis - USA.

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética e Experimentação Animal

(CETEA/UFMG) registrado no protocolo 10/2011 (anexo 1).

No Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade com o protocolo 26263-1 e código de autenticação 51142388 (anexo 2).

Tabela 1: Numero amostral por criatório, local de origem e espécie de psitacídeo.

CRIATÓRIOS	Local de origem	Localização geográfica	<i>Amazona aestiva</i>	<i>Amazona vinacea</i>	<i>Amazona rhodocorytha</i>	<i>Ara ararauna</i>
Vale Verde	Betim	19°58'04" S 44°11'52" O	100	0	3	26
Bem Viver	Betim		20	8	3	8
Peti	São Gonçalo Rio Abaixo	19°49'33" S 43°21'43" O	18	11	4	3
Recanto do Amor	Esmeraldas	19° 45' 46" S 44° 18' 50" O	7	2	0	3
Sub-total	Total = 216 aves		145	21	10	40

Tabela 2 – Cronograma de coletas

Criatório X datas	Vale Verde	Bem Viver	Recanto do Amor	Estação de PETI
24-05-2011	AAVV 01 à 20 ARVV 01 e 02			
06-06-2011	AAVV 21 à 44			
14-06-2011	AAVV 45 à 70			
21-06-2011	AAVV 71 à 98			
19-07-2011	AAVV 99 e 100 AraVV 01 à 09	AABV 01 à 10		
26-07-2011			AraRA 01 à 03 AVRA 01 e 02 AARA 01 à 07	
02-08-2011	AraVV 10 à 26 + recoletas			
10-08-2011		AABV 11 à 20 AVBV 01 à 08 AraBV 01 à 08 ARBV 01 à 03		
23-08-2011				AAC 01 à 18 AVC 01 à 11 ARC 01 à 04 AraC 01 à 03

Legenda: AA = Amazona aestiva; AV = Amazona vinacea; AR= Amazona rhodocorytha; Ara = Ara ararauna; VV= Vale Verde; BV = Bem Viver; RA = Recanto do Amor; C = Estação Ecológica de PETI-CEMIG.

4.2) Contenção das aves nos criatórios

As aves foram contidas fisicamente, com auxílio de puçás e luvas de couro, e posteriormente contidas quimicamente, utilizando isoflurano em um aparelho de anestesia inalatória portátil, a fim de, facilitar o acesso venoso das aves, bem como o bem estar e a segurança dos manipuladores e das próprias aves, reduzindo o estresse e as possíveis alterações fisiológicas causadas por esse estresse.

4.3) Amostras de fezes, amostras de sangue e swabs.

As aves foram retiradas de seus recintos habituais e acondicionados em gaiolas individuais, estas por sua vez eram

colocadas em cima de sacos plásticos limpos, esperava-se até que a primeira ave defecasse. As amostras de fezes foram coletadas em frascos limpos, identificadas e acondicionadas em um isopor com gelo, em seguida a ave foi contida fisicamente e encaminhada até a mesa de anestesia.

Uma vez anestesiada, amostras de sangue (2-5 ml, dependendo da espécie) foram colhidas após a limpeza (álcool 70°GL) do local de punção na veia jugular com seringas estéreis descartáveis e agulhas de 25 x 7 ou 20 x 5.5. A hemostasia era feita por compressão. A separação do soro ocorreu na seringa e o material coletado foi armazenado sob refrigeração e posteriormente congelado.

Foram colhidos um *swab* cloacal e um *swab* de fenda palatina de cada ave, os quais foram acondicionados em um tubo (microtubo tipo *Eppendorf*) de 1,5ml com 0,5ml de PBS.

4.4) Exame clínico, aferição do peso das aves e escore corporal

Após a coleta do último *swab* foi realizado um exame clínico nas aves. Neste momento observou-se a presença ou ausência de ectoparasitas, alterações anatômicas, condição da plumagem, das rêmiges primárias e secundárias e também das retrizes.

Também por observação visual estimou-se escore corporal das aves, realizado com análise da musculatura peitoral e gordura na região abdominal. Foi

definido um escore com variação de 1 à 5, onde 1 seria a ave caquética, 2 a ave magra, 3 a ave com condição ideal, 4 ave um pouco acima do desejado e 5 ave obesa.

Em seguida as aves foram retiradas da anestesia inalatória, e ainda, antes de saírem do padrão anestésico, eram pesadas. Os papagaios (*Amazona* sp.) foram colocados em um saco de pano e a aferição foi feita com auxílio de uma pesola. O peso das araras (*Ara ararauna*) era aferido com o auxílio de uma balança eletrônica.



Fig. 3 – Papagaios (*Amazona aestiva*) em gaiolas individuais, com fundo plástico para a coleta de fezes, aguardando para procedimento anestésico.

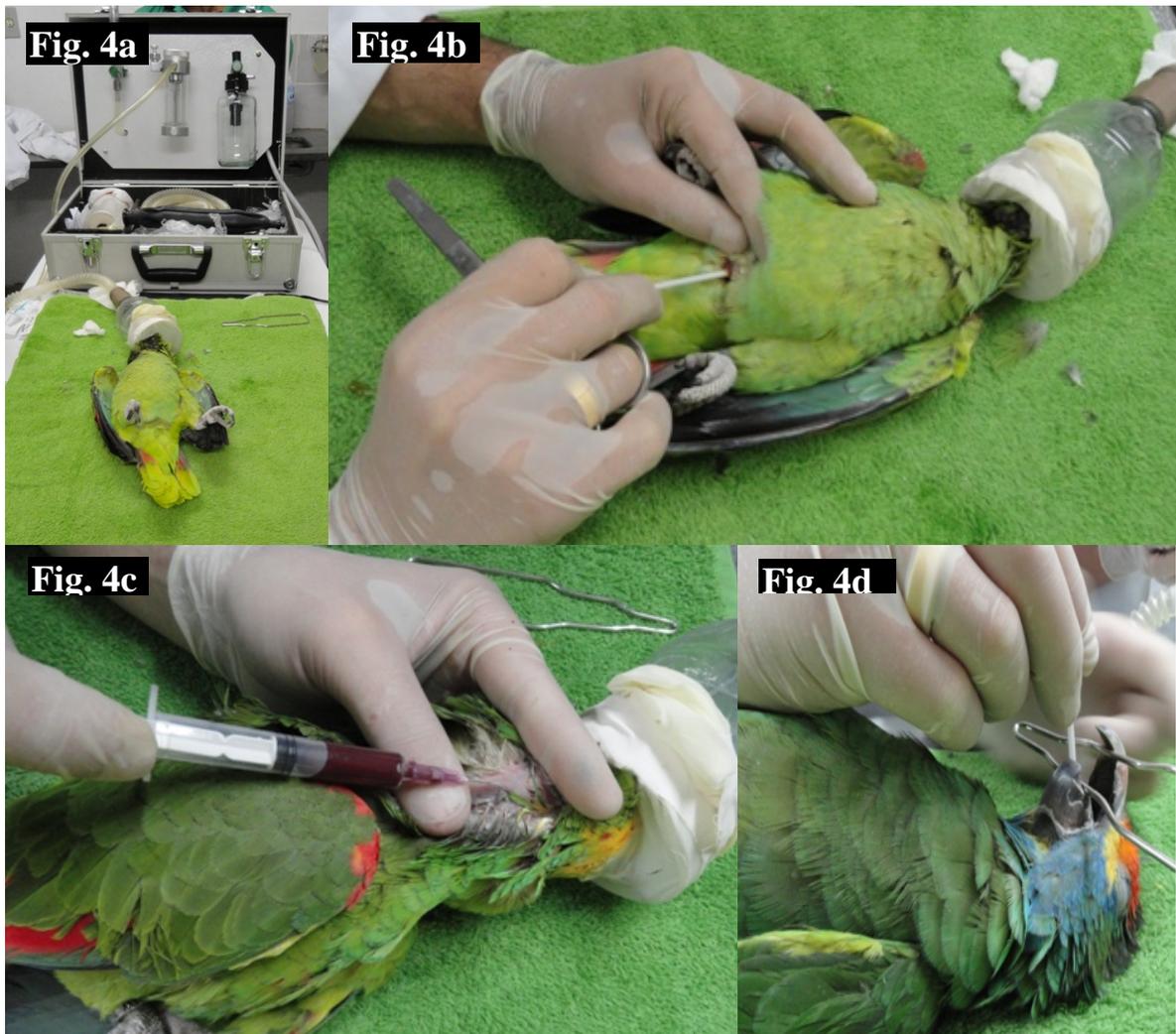


Fig. 4a – Papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) anestesiado com isoflurano em aparelho de anestesia portátil (Metalvet®), acondicionado sobre colchão térmico e toalha.

Fig. 4b – Papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) submetido à coleta de *swab* cloacal.

Fig.4c - Papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) submetido à punção da veia jugular com seringa de 3ml e agulha (20 x 5.5 BD®).

Fig. 4d – Papagaio do Espírito Santo (*Amazona rhodocorytha*) submetido à coleta de *swab* de fenda palatina com auxílio de abre bico (Ortovet®).

4.5) Armazenagem dos swabs no laboratório

No laboratório, o tubo contendo os *swabs* foram agitados em vortex intenso e os *swabs* retirados. As amostras foram estocadas a -20°C até a realização da extração de DNA pelo método de sílica e NaI (descrito por Boom *et al* 1990 e modificado por Caxito *et al* 2006).

4.6) Necropsia

Os psitacídeos que vieram ao óbito durante o período de trabalho foram submetidos a exames necroscópicos, conforme a técnica descrita por Cabana (2008).

Foram eles, dois exemplares de cuiu-cuiú (*Pionopsitta pileata*), quatro papagaios de peito roxo (*Amazona vinacea*), duas maracanãs (*Primolius maracana*), uma arara vermelha (*Ara macao*), uma ararajuba (*Guaruba guarouba*), um papagaio do espírito santo (*Amazona rhodocorytha*), uma maracanã-açu (*Ara severa*), uma maritaca verde (*Pionus maximiliani*), uma maritaca roxa (*Pionus fuscus*), duas maritacas de cabeça roxa (*Pionus mesntrus*), e um lóris arco-íris (*Trichoglossus haematodus*).

Coletaram-se diversos tecidos (ínglúvio, proventrículo, ventrículo, fígado, baço, intestinos, diversas partes do cérebro, cerebelo, gânglios nervosos, glândulas adrenais e rins) que foram acondicionados uma partida em solução de

formalina e posteriormente álcool 70 °GL e outra partida conservada congelada à -70 °C.

4.7) Histopatologia para *Bornavírus* aviário

As amostras coletadas na necropsia acondicionadas em álcool 70°GL foram enviadas ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Setor de Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais onde realizou-se a inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram encaminhados para exame no Avian Pathology Department, University of California onde foram processados cortes de 5mm de espessura, corados pelo método hematoxilina e eosina e posteriormente avaliados por microscopia óptica.

4.8) Imuno-histoquímica para *Bornavírus* aviário

Os tecidos escolhidos para esta análise foram, cérebro, proventrículo, nervos periféricos, glândula supra-renal, fígado, músculos esqueléticos e testículos, que foram cortados com 3mm de espessura, desparafinizados. O protocolo de imunohistoquímica (IHC) seguido foi o descrito por Weissenböck *et al.* (2009). As análises de IHC foram realizadas no Avian Pathology Department of Universty of California, sob coordenação do Prof. Dr. H. L. Shivaprasad.

4.9) Exames coproparasitológicos

Foram coletadas excretas de em frascos plásticos novos de todos os psitacídeos amostrados (n=216). As excretas foram armazenadas em refrigeração (4-8°C) até o momento da realização dos exames. Foram utilizados os métodos de microscopia direta a fresco em preparação úmida (solução fisiológica) de lâmina e lamínula (Hoffmann, 1987), e o método parasitológico de flutuação em solução saturada de cloreto de sódio (densidade 1,20) com formação de menisco no frasco e sobreposição de uma lâmina durante 15-20 minutos e posterior observação em microscopia óptica.

4.10) Soroaglutinação Rápida em Placa

Os soros dos psitacídeos foram testados individualmente com antígenos coloridos comerciais para *M. gallisepticum* (MYCO-GALLI TESTE – Laudo®), *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (PULOR TESTE – Laudo®) autorizados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

Os testes foram realizados de acordo com o PNSA (Brasil, 2001 e 2003). Os antígenos foram conservados entre 2°C e 8°C. Soros conhecidos não reagentes de aves SPF e reagentes de referência para *M. gallisepticum* e *S. Pullorum* foram utilizados para o controle do teste.

Utilizaram-se 50 microlitros (μL) de soro, os antígenos e os soros foram retirados do refrigerador e mantidos a 25°C por cerca de 10 minutos, antes do início da prova. Uma placa de vidro subdividida em quadrados (Huddleson) de 2,5 x 2,5 cm, com 50 quadrados foi utilizada para realizar o teste. O exame foi realizado em ambiente fechado, em local com o mínimo de poeira em suspensão para não prejudicar a visualização da reação. A temperatura para a realização da prova foi de 25 °C mantida com ar condicionado.

A mistura soro com antígeno foi feita em proporção aproximada de 1:1, ou seja, 30 μL de soro para 30 μL de antígeno. Os 30 μL de soro da ave foram colocados em um quadrado e após agitar o frasco do antígeno, de maneira cuidadosa e contínua, depositou-se uma gota no centro de cada quadrado da placa de vidro, mantendo o frasco conta-gota na posição vertical, sem tocar o soro da ave testada. Misturou-se com auxílio de uma ponteira de plástico o soro e o antígeno, com movimentos circulares. Entre um e dois minutos, após a homogeneização do soro e antígeno, iniciou-se a formação de grumos de coloração violeta escura, indicando a reatividade. Soros reagentes produziram granulação semelhante ao soro controle positivo. No caso da ave não ser reagente, a reação permaneceu uniforme, sem grumos, semelhante ao soro controle negativo. Não foi realizada a leitura após 2

minutos. Uma pequena proporção de reações de difícil leitura e/ou interpretação ocorreu. Todos os soros com ocorrência de granulação fina, foram diluídos em solução salina autoclavada, na proporção de 1:10. Foram considerados reagentes apenas os soros confirmados à diluição de 1:10.

Os soros reagentes no teste de SAR foram submetidos a outras provas, mais específicas, como a inibição da hemaglutinação para *M. gallisepticum* e *M. synoviae* e soroaglutinação lenta em tubo *S. Pullorum/S. Gallinarum*.

4.11) Técnica de inibição da hemaglutinação para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*

Todos os soros foram enviados ao laboratório Laudo em Uberlândia-MG, e reagente ou não, foram submetidos à prova de inibição da hemaglutinação (IH) para avaliação de anticorpos contra *M. gallisepticum* ou *M. synoviae*. Os testes foram realizados de acordo com o PNSA (Brasil, 2001).

O antígeno utilizado nessa prova foi produzido pelo laboratório Laudo em Uberlândia, Minas Gerais, a partir de isolados padrões de *M. gallisepticum* e *M. synoviae*.

O título de anticorpos foi considerado a recíproca da maior diluição capaz de inibir completamente a hemaglutinação. Em cada prova foram

utilizados soros controles positivos e negativos.

4.12) Soroaglutinação lenta em tubo (SAL) para *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum*

Todos os soros foram enviados ao laboratório Laudo em Uberlândia-MG, onde realizaram-se os testes de soroaglutinação lenta. Neste teste, o soro é diluído a 1:25 e o antígeno na concentração adequada. Os testes foram realizados de acordo com o PNSA (Brasil, 2003).

O volume da mistura foi de aproximadamente 1 mL e a reação foi feita dentro de tubo de ensaio a 37°C. A leitura foi realizada após 16-24 horas. A finalidade do teste é detectar a presença de aglutininas específicas contra *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* no soro sanguíneo das aves.

No caso de positividade, ocorreria aglutinação dos antígenos, formando aglomerados visíveis a olho nu. No caso de a amostra ser negativa a mistura permaneceu inalterada.

4.13) Teste de inibição da hemaglutinação para doença de Newcastle

O teste de IH foi realizado no Laboratório de Doença das Aves da EV-UFMG de acordo com o PNSA (Brasil,

2002). Para o teste de inibição da hemaglutinação (IH) a estirpe vacinal B1 Hitchner do APMV-1 (Biovet®) foi utilizada como antígeno após reconstituição em 30 mL de PBS estéril (tampão fosfato-salina autoclavado) e inativada com formol a 0,1%.

Foram utilizadas microplacas (fundo em “u”) de 96 orifícios e hemácias frescas de galinhas adultas sadias (SPF), coletadas com seringas estéreis e com anticoagulante citrato de sódio a 4,5% e lavadas três vezes em PBS (pH 7,2). A suspensão viral utilizada na técnica de IH foi titulada pelo teste da hemaglutinação (HA) imediatamente antes da execução da prova e calculada a diluição que continha 4 unidades hemaglutinantes (UHA).

Os soros testados foram diluídos previamente em PBS nas placas de 96 orifícios (50 µL/orifício) nas diluições de 1:2 a 1:1024. As amostras de soro foram testadas em duplicata.

Uma suspensão do vírus com 50 µL contendo 4 UHA foram adicionados a cada diluição do soro. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente (25°C), foram adicionados 50 µL de uma suspensão de hemácias a 0,5%. Em cada prova foram utilizados soros controles positivo e negativo e a retrotitulação do antígeno para a confirmação de 4 UHA. A placa foi incubada por uma hora à temperatura ambiente (25°C) e o título foi expresso como a recíproca da maior

diluição que inibiu completamente a hemaglutinação.

A ave foi considerada negativa onde não houve a formação de botão, e ocorreu a hemaglutinação. A ave foi considerada positiva onde houve a formação de botão, e não ocorreu a hemaglutinação.

4.14) Extração de DNA de swabs cloacais e de fenda palatina

Método de extração de DNA por sílica, método de Boom *et al.*, (1990) seguindo o protocolo de Caxito *et al.* (2006), com modificações para dióxido de silício ativado como adsorvente.

Os *swabs* coletados dos psitacídeos e acondicionados em tubos de eppendorf de 2.0 ml com 0,5ml de PBS foram estocados a -20°C. Foram retirados e deixados à temperatura ambiente por cerca de 30 minutos e depois vortezizados. Cerca de 200 µl da solução foram pipetadas para outro tubo devidamente identificado, adicionaram-se 600 µl de NaI a 6M, realizou-se vórtex e em seguida os tubos foram aquecidos à 55°C por 30 minutos em termobloco, realizando homogenização rápida (vórtex) a cada 10 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi pipetado com cuidado para que os detritos ficassem para trás e acondicionados em outro tubo. Adicionaram-se 50 µl de sílica, foi feito

um vórtex rápido e em seguida os tubos foram levados ao homogenizador durante 15 minutos. Após esta etapa os tubos foram centrifugados por 45 segundos a 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e adicionado 800 µl de NaI, foi feito vórtex e novamente levados à centrífuga por 45 segundos a 14.000 rpm. Esta etapa foi repetida por três vezes.

Após o último descarte do sobrenadante foi adicionado 1ml de etanol wash gelado (TRIS HCl pH 8 1M, EDTA pH 8 0,5M e álcool PA), em seguida foi realizado vórtex e depois os tubos foram levados à centrífuga por 45 segundos à 14.000 rpm. Esta etapa foi repetida por três vezes. Ao final dela após descartar o sobrenadante secou-se a beira dos tubos de eppendorf em um papel toalha limpo e acrescentou-se 1ml de acetona gelada, realizou-se em seguida vórtex e novamente centrifugação por 45 segundos à 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, as pontas dos tubos foram secadas em outro papel toalha limpo e os tubos levados ao termobloco a 50 °C mantidos abertos por 10 minutos, para completa evaporação da acetona. Adicionou-se então 60 µl de TE (Tris-EDTA) previamente aquecida, realizou-se um vortex intenso e novamente levou-se os tubos ao termobloco a 50 °C por 10 minutos, em seguida realizou-se uma centrifugação por 3 minutos à 14.000 rpm.

O sobrenadante foi então passado para um microtubo tipo *Eppendorf* de 500 µl, a centrifugação foi repetida e novamente o sobrenadante foi repassado para um microtubo de 500 µl previamente identificado e armazenado à -20°C.

4.15) Extração de DNA – coágulos sanguíneos

A extração dos coágulos de sangue foi feita como a extração para *swabs*, modificando a etapa inicial na qual se utilizaram aproximadamente 200 µl da amostra de coágulo de sangue macerado em microtubo e adicionado três volumes (600 µl) de iodeto de sódio (NaI) aquecido a 55°C por 30 min e vortexizado. A partir da adição de sílica o método foi executado como descrito previamente.

4.16) Extração de RNA amostras de tecido

As amostras biológicas coletadas nas necropsias e mantidas conservadas em -70 °C também foram utilizadas para extração de RNA. Optou-se pela extração em amostras de cérebro, mais indicada para o diagnóstico da suspeita clínica. O protocolo utilizado foi guanidina fenol-clorofórmio (Trizol®) desenvolvido da seguinte maneira.

As amostras foram aliqüotadas ainda congeladas e pesadas utilizando-se 0,200g destas. A seguir foram adicionados 500 µl de TEN aos poucos enquanto a

amostra foi mascerada com auxílio de um minipistilo. Ao completar-se 500 µl, a amostra foi pipetada cerca de 30 vezes, e depois vortexada intensamente. Centrifugadas a 11.000 rpm durante 10 minutos e 250 µl retirados do clarificado e colocados em um outro tubo, previamente identificado. O *pellet* e o restante do clarificado foram novamente armazenados a -70 °C. Foram adicionados 750 µl de Trizol® gelado, vortexados por 15 segundos e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após este período os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente e transferidos 650 µl do sobrenadante para um outro tubo previamente identificado, atendo-se ao cuidado para não pipetar a parte branca ou rósea. Em seguida foram adicionados 650 µl de isopropanol gelado e homogenizava-se vagarosamente por inversão cerca de 20 vezes. As amostras foram então incubadas à -70 °C por 40 minutos.

Depois deste período o material foi centrifugado a 11.500 rpm durante 25 minutos à temperatura de -4°C. As amostras foram lavadas 3 vezes com etanol absoluto gelado, centrifugando-se as amostras a cada lavagem durante 5 minutos à 13.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e na última lavagem o tubo foi seco com um papel toalha limpo. As amostras foram

então incubadas em um termobloco durante 10 minutos à 56°C. Após, foram adicionados 30 µl de TE e novamente incubadas a 56°C por 30 minutos. Misturados bem com auxílio de uma pipeta e feita a dosagem de RNA em espectrofotômetro, sendo em seguida armazenadas à -70 °C.

4.17) Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA e RNA

A quantidade e a pureza do DNA e RNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoVue® (GE, Healthcare). Este aparelho permite a análise estimando a quantidade de DNA ou RNA na amostra em ng/µL ou µg/µL e a qualidade do material pelo valor obtido na razão DO260nm/DO280nm. Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260nm e as proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280nm, sendo diferenciáveis pelas propriedades ópticas.

4.18) Reação em Cadeia pela Polimerase- PCR

4.18.1) PCR para *Chlamydomophila psittaci*

Para realização do PCR diagnóstico da *C. psittaci*, o DNA total extraído das amostras de *swab* cloacal e de fenda palatina de campo foi empregado como molde para a amplificação de parte

do genoma de *C. psittaci*. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores descritos por Sachse et al. (2009) para um produto de

418 pares de base (Tab. 3), preparados por Invitrogen Life Technologies® (São Paulo, Brasil).

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do DNA da *Chlamydophila psittaci*

Nome oligo	Sequência (5'>3')	Loc. Genoma*	Frag. (PB)	Autores
VD1-f	ACTACGGAGATTATGTTTTTCGATCGTGT	59195-59168	418	Sachse et al.
VD2-r	CGTGCACCYACGCTCCAAGA	58797-58778		(2009b)

*Localização descrita em base na sequência do genoma completo de *C. psittaci* isolado 08DC60 (Schofl et al., 2011). Acesso GenBank CP002807.

Uma alíquota de cada amostra de DNA total foi utilizada como molde na reação de amplificação, com volume final de 20µL contendo: 200ng de DNA, 2µL de tampão 10X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Invitrogen), 1µL de dNTP mix a 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP – Invitrogen), 1,0µL de MgCl₂ a 50mM (Invitrogen), 1µL de cada iniciador externo a 10pmol, 0,2µL de Taq Polimerase a 5U/µL (*Phonutria* Taq DNA Polymerase) e água ultra pura q.s.p.

A reação de PCR específica foi realizada em termociclador (Axygen – Maxygene®. EUA). As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 60 segundos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, além de uma extensão final a

72°C por 4 minutos. Para cada ensaio foi utilizado como controle positivo o DNA extraído da amostra de fígado de ave com diagnóstico para *C. psittaci* confirmado em outros laboratórios pela PCR.

Foi utilizado também um controle negativo contendo todos os reagentes sem a inclusão de amostra de DNA e com adição 3µL de água UP.

4.18.2) PCR para o vírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos (Pbfd)

Para realização do PCR diagnóstico da presença do vírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos (Pbfd), o DNA total extraído das amostras de coágulos sanguíneos de campo foi empregado como molde para a amplificação de parte do genoma do circovírus.

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores descritos por Ypelaar et al.

(1999) que amplificam um produto de 717 pares de base (Tab. 4).

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do DNA do circovírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos.

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

Ypelaar *et al.*, (1999).

Os oligonucleotídeos iniciadores foram confeccionados pela Invitrogen Life Technologies® (São Paulo, Brasil), e armazenados a -20°C em sua forma reconstituída em TE. O controle positivo utilizado foi amostra de sangue de um ring-neck (*Psittacula krameri*) conforme descrito por Araújo, (2010). Essa ave apresentou sintomatologia crônica da doença e foi confirmada como sendo positiva por PCR, sequenciamento da amostra e comparação no Gen- Bank, apresentando similaridade com amostras de PBF. A amostra utilizada como controle positivo foi denominada como BH 27.

As amplificações foram realizadas em termociclador programável (Axygen Maxygen-EUA), utilizando o seguinte protocolo: uma etapa de desnaturação inicial a 94° C por 4 min, seguida por 33 ciclos de 54°C durante 30s, 60° C por 30s, e 72° C por 50s, seguido por uma etapa de 72° C por 10 min., seguido de

resfriamento final a 4 ° C, segundo Ypelaar *et al.* (1999)

4.18.3) PCR Bornavírus

4.18.3.1) Transcrição reversa

Foram utilizados 2uL (894,4ng/dl) de RNA extraído de amostras de cérebro dos psitacídeos suspeitos para transcrição reversa.

Realizada da seguinte maneira: 2uL RNA acrescidos de 1uL H2O depec (total 3uL). Colocou-se no termociclador a 95°C durante 2 minutos, em seguida as amostras foram retiradas e colocadas em gelo, seguiu-se com acréscimo de 1,5uL de cada primer (10 pmol/cada), adicionando-se também 6,5uL de H2O DEPEC (total de 12,5ul), foi feito um *spin down* das amostras, que retornaram ao gelo, e depois foram colocadas novamente no termociclador à 70°C por 5 minutos. Novamente foram retiradas e colocadas em gelo, acrescentando 5uL de tampão (M-MLV buffer 5X [250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl2]), 1uL de DNTP

mix (20mM), 1,5uL de M-MLV(200U/ uL), realizou-se outro *spin down* e as amostras foram colocadas em gelo novamente e depois retornaram ao termociclador à 42°C por 5 min. Com isso produziu-se o c-DNA das amostras.

4.18.3.2) Reação PCR

Para a reação de PCR foram utilizados 8,55uL de H₂O DEPEC; 1,2uL de MgCl₂ (25mM) Promega; 2,0uL DNTP mix (20mM); 1,0uL oligo 1(10pmol); 1,0 uL de oligonucleotídeo 2 (10pmol) (reverso); 0,25uL GOTAC-FLEX® enzima Promega; 4uL Tampão 5X GREEN GOTAC FLEX®; 2,0uL de c-DNA.

O ciclo foi composto da seguinte maneira 95°C por 2 min; 30 repetições de 95°C 20 segundos; 57°C 30 segundos; 72°C por 1 minuto; e por fim extensão de 72°C por 5 minutos (Kistler *et al.*, 2009).

4.19) Análise dos produtos de PCR

A visualização dos produtos das PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose para clamidiose e circovirose, e em agarose e acrilamida para bornavirose.

Em cada 8 µL do produto amplificado foram adicionados 2µL do tampão de amostra 2X (60% de glicerol, 10% de TBE 10X e azul de bromofenol), e essa mistura foi aplicada ao gel de agarose a 1,5% com 1 uL de brometo de etídio para

cada 10 ml de agarose. A eletroforese ocorreu a 75V (bornavirus) à 100V (clamidophila e circovírus) em tampão TBE 0,5X (*Chlamydomphila* e circovírus) e 1,0X (bornavírus) (100mM Tris-base, pH8,3, 25 mM EDTA e 50 mM ácido bórico) durante 40 minutos (clamidophila e circovírus) a 60 minutos (bornavirus).

Foi utilizado o padrão de tamanho molecular de 100 pb DNA Ladder® (Promega). Posteriormente à corrida, o gel foi visualizado com o auxílio de um transiluminador UV.

O gel de poliacrilamida foi usado nas amostras suspeitas de bornavirose, todas as amostras foram visualizadas em agarose e em acrilamida.

4.20) Sequenciamento para Bornavírus aviário

4.20.1) Purificação do DNA em gel de agarose com NaI e sílica

O produto de três reações de PCR (60µl) da amostra de interesse contendo o segmento amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%. O DNA amplificado foi detectado com trasluminador UV. Como padrão molecular foi empregado o DNA Ladder 100pb (3 µl/canaleta – Promega® – EUA). Durante a observação dos produtos no gel de agarose as bandas com 360pb foram retiradas com auxílio de um bisturi e colocadas em um microtubo tipo *Eppendorf* de 1,5m.

O processo de purificação foi realizado iniciando-se com uma centrifugação da amostra por alguns segundos para compactar a banda no fundo do tubo e estimar o volume obtido. Foram adicionados três volumes da solução de NaI e o tubo incubado a 55°C por 30 minutos em termobloco, realizando homogeneização rápida (vórtex) a cada 10 minutos. Adicionaram-se 50 µl de sílica seguindo o protocolo de extração por NaI sílica (Boom et al., 1990 modificado por Caxito et al., 2006) descrito anteriormente.

4.20.2) Sequenciamento do produto de Bornavírus aviário

No protocolo de sequenciamento utilizou-se 1,0 µl do DNA purificado (122,5ng/dl), adicionando-se 5,5 µl de água miliQ autoclavada, 1,5 µl de tampão Big dye®, 1,0 µl de Big dye®, 1,0 µl de cada primer (10pmol). Totalizando 10 µl da amostra. Os tubos foram levados ao termociclador e o programa de sequenciamento utilizado foi 96 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60

°C por 4 minutos. Em seguida, acrescentaram-se 40 µl de isopropanol (Merck®) 65%, agitando-se no vórtex. O tubo foi deixado descansando por 30 minutos no escuro. Foi centrifugado por 45 min a 14.000 rpm, o sobrenadante descartado e o tubo colocado sobre papel toalha. Adicionaram-se 500 µl de etanol 60% (Merck®), e novamente o tubo foi centrifugado durante 10 minutos a 14.000 rpm. A seguir descartou-se o etanol e secou-se o tubo destampado a 95 °C por 5 minutos ou até o tubo ficar completamente seco. Acrescentaram-se 15 µl de formamida, realizou-se vortex e misturou-se cerca de 30 vezes com auxílio de uma pipeta. Transferiu-se para o tubo de sequenciamento com cuidado para não deixar bolhas, identificou-se e em seguida as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG, onde realizou-se o sequenciamento em sequenciador automático (Applied Biosystems®).

5) Resultados e Discussão

5.1) Exame clínico, aferição do peso das aves e escore corporal

Todo exame clínico foi realizado e anotado em fichas individuais (anexo 3). Dentre as 216 aves amostradas 63 delas possuíam alguma falha na plumagem. Tais aves foram testadas para PBF (Circovírus).

O peso e escore das aves foi aferido e está representado nas tabelas 5 e 6 abaixo.

Em um estudo na Bolívia a avaliação do peso de *Amazona aestiva* cativos teve uma média de (N=20) 422g com uma variação de 54,68 g (313-565g). Na avaliação de

aves de vida livre os valores encontrados foram (fêmeas N=8) média de 357 com uma variação de 29,40g (319-402g) e (machos N=24) média de 387 com uma variação de 44,59g (282-440) (Deem et al, 2005).

Os valores encontrados no presente estudo para esta espécie foram condizentes ao encontrado no trabalho de Deem et al. (2005) em papagaios cativos.

Tabela 5 - Peso dos psitacídeos cativos em Minas Gerais

Criatório	peso	<i>A. aestiva</i>	<i>A. vinacea</i>	<i>A. rhodocorytha</i>	<i>Ara ararauna</i>
Vale Verde	M:	473,2	N/P	466,38	1.088,00
	DP:	84,10	N/P	103,79	312,60
	CV:	0,18	N/P	0,22	0,29
Bem Viver	M:	367,50	326,25	503,34	N/A
	DP:	55,90	34,62	45,09	N/A
	CV:	0,15	0,11	0,09	N/A
Recanto Amor	M:	448,47	325,00	N/P	N/A
	DP:	63,09	35,36	N/P	N/A
	CV:	0,14	0,11	N/P	N/A
Peti	M:	399,73	337,28	421,25	1.108,34
	DP:	49,18	41,62	117,00	150,86
	CV:	0,12	0,12	0,28	0,14

Legenda: *A. aestiva*: *Amazona aestiva*; *A. vinacea*: *Amazona vinacea*; *A. rhodocorytha*: *Amazona rhodocorytha*; *A. ararauna*: *Ara ararauna*; M= média; DP= desvio padrão; CV= coeficiente de variação; N/P ave não presente; N/A aves não avaliadas.

Tabela 6 – Escore corporal de psitacédeos cativos em Minas Gerais

Criatório	peso	<i>A. aestiva</i>	<i>A. vinacea</i>	<i>A. rhodocorytha</i>	<i>Ara ararauna</i>
Vale Verde	M:	3	N/P	3	3
	DP:	5	N/P	5	5
	CV:	2	N/P	2	2
Bem Viver	M:	3	2,5	3	3
	DP:	4	3	3	3
	CV:	2	2	3	2
Recanto Amor	M:	3	3	N/P	3
	DP:	4	3	N/P	3
	CV:	3	3	N/P	2
Peti	M:	3	3	2,5	3
	DP:	4	5	4	4
	CV:	2	2	1	3

Legenda: *A. aestiva*: *Amazona aestiva*; *A. vinacea*: *Amazona vinacea*; *A. rhodocorytha*: *Amazona rhodocorytha*; *A. ararauna*: *Ara ararauna*; M= mediana; DP= desvio padrão; CV= coeficiente de variação; N/P = não presente.

5.2) Achados de necropsia

Durante o período de trabalho foram necropsiadas todas as aves da ordem Psittaciformes que vieram a óbito e foram encaminhadas ao setor de doenças das aves da UFMG.

Em 17 aves necropsiadas durante este período verificou-se evidente a similaridade dos achados macroscópicos. Apresentando-se caquexia, indicado por perda de massa muscular peitoral, distensão de inglúvio com presença de alimento em seu conteúdo, hepatomegalia, esplenomegalia, proventrículo distendido com pontos enegrecidos na serosa e mucosa e grande quantidade de alimento não digerido, congestão e edema pulmonar, congestão intestinal e congestão cerebral.

No histórico clínico destas aves foram descritos os sinais de prostração, emagrecimento progressivo, penas

arrepiadas, papo com tempo de esvaziamento aumentado, regurgitação do alimento, diarreia, algumas apresentaram sinais nervosos como incoordenação, movimentos circulares de cabeça, paralisia evoluindo todos os casos para morte.

Dentre as necropsias foram escolhidas dez aves em melhor conservação e com lesões mais características de síndrome da dilatação do proventrículo (PDD – *proventricular dilatation disease*) para diagnóstico laboratorial (Quadro 1). Foram coletadas amostras de inglúvio, proventrículo, ventrículo, fígado, baço, intestinos, diversas partes do cérebro, cerebelo, gânglios nervosos, glândulas adrenais e rins que foram acondicionados uma partida em solução de formalina e posteriormente álcool 70% e outra partida conservada congelada à -70°C.

Quadro 1- Exames *post mortem* de psitacídeos cativos em Minas Gerais dos casos mais característicos, e resultados de imuno-histoquímica e PCR para *Bornavírus* aviário.

Ave e data	Necropsia	IHC	PCR
PDD1 <i>Pionopsitta pileata</i> 05/02/2010	Caquexia (redução da massa muscular peitoral); distensão do inglúvio (papo); hepatomegalia; esplenomegalia; distensão do proventrículo; pulmões congestos e edemaciados; intestinos congestos; congestão cerebral.	-	-
PDD 2 <i>Amazona vinacea</i> 05/02/2010	Caquexia (redução da massa muscular peitoral); distensão do inglúvio (papo); hepatomegalia; esplenomegalia; distensão do proventrículo; pulmões congestos e edemaciados; intestinos congestos; congestão cerebral.	-	-
PDD 3 <i>Primolius maracana</i> 09/03/2010 Fig. 24 e 25	Caquexia (redução da massa muscular peitoral); papo com alimento em seu interior; hepatomegalia; esplenomegalia; proventrículo aumentado de volume (distensão) com pontos escuros na serosa e grande quantidade de alimento não digerido no interior; pulmões congestos e edemaciados; intestinos congestos; congestão cerebral; vísceras comprimidas pelo aumento de volume do proventrículo.	-	-
PDD4 <i>Ara macao</i> 16/04/2010 Fig. 26 e 27	Caquexia (redução da massa muscular peitoral); traquéia com coloração amarelada e presença de muco de coloração amarelada em seu interior; hepatomegalia com foco amarelado, com aproximadamente 1 cm de diâmetro; esplenomegalia; proventrículo aumentado de volume com pontos enegrecidos na serosa e mucosa, presença de grande quantidade de alimento não digerido no interior do proventrículo; pulmões congestos e edemaciados; intestinos congestos, com ovos de <i>Capillaria</i> no conteúdo em visualização a microscopia óptica; congestão cerebral; rins congestos e aumentados de volume; adrenais aumentadas de volume.	-	-
PDD 5 <i>Amazona vinacea</i> 26/11/2010	Ave com condição corporal ruim; opacidade dos sacos aéreos; hepatomegalia; proventrículo aumentado de volume; grande quantidade de conteúdo mucoíde no proventrículo; intestinos congestos; supra renais aumentadas de volume; congestão na região encefálica.	-	-
PDD 6 <i>Primolius maracana</i> 30/12/2010 Fig. 18 à 23	Ave com condição corporal ruim; traquéia amarelada; conteúdo de coloração castanho escuro em todo trato gastrointestinal; proventrículo congesto e aumentado de volume com pontos enegrecidos na serosa, presença de uma úlcera; pulmões edemaciados e congestos e com conteúdo de coloração amarelada; hepatomegalia; supra renais aumentadas de volume.	+	+
PDD 7 <i>Amazona rhodocorytha</i> 10/01/2011 Fig. 12 à 17	Ave com condição corporal ruim; papo aumentado de volume com grande quantidade de alimento em seu interior; traquéia amarelada; opacidade de sacos aéreos; coração aumentado de volume e congesto; proventrículo aumentado de volume (distensão) com presença de grande quantidade de alimento não digerido no seu interior. Pulmões edemaciados e congestos; hepatomegalia; intestinos congestos; supra renais aumentadas de volume; encéfalo congesto.	+	+
PDD 8 <i>Ara severa</i> 03/02/2011 Anilha: RST 09 1011 Viv 8 (colônia)	Ave com condição corporal ruim; fígado aumentado de volume; pulmões edemaciados e congestos; proventrículo aumentado de volume (distensão), com presença de grande quantidade de alimento não digerido no seu interior; Intestinos congestos; Encéfalo congesto	-	-
PDD 9 <i>Amazona vinacea</i> 04/05/2011 Anilha: JCG 31 705 Viv G9	Ave com condição corporal ruim; traquéia com presença de conteúdo amarelado e fragmentos de coloração verde; pulmões congestos e edemaciados; hepatomegalia; esplenomegalia; proventrículo congesto, aumentado de volume com presença de grande quantidade de alimento (distensão) não digerido no seu interior; úlcera na moela; Intestinos congestos; conteúdo hemorrágico nos intestinos; presença de oocistos de coccidia no conteúdo intestinal.	-	-
PDD 10 <i>Pionus maximiliani</i> 04/05/2011 Anilha: JCG 31 922 Viv 2	.Ave com condição corporal ruim; papo com conteúdo de coloração escura e odor fétido; opacidade de sacos aéreos; proventrículo aumentado de volume (distensão) com presença de grande quantidade de alimento não digerido no seu interior; Pulmões congestos e edemaciados; hepatomegalia; esplenomegalia; intestinos congestos; conteúdo hemorrágico nos intestinos.	-	-

Os achados condizem com a suspeita clínica de PDD. Berhane *et al.* (2001) descreve que 50% das aves suspeitas de PDD com que trabalhou demonstraram na necropsia atrofia da musculatura peitoral, ingluvío dilatado, proventrículo dilatado ocupando quase metade da cavidade celomática das aves, com grande quantidade de alimento e paredes delgadas e ventrículo flácido também com paredes delgadas. Em um experimento, calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) saudáveis foram infectadas com material de cérebro de um papagaio do congo (*Psittacus erithacus*) que tinha histórico de PDD, após a infecção as calopsitas desenvolveram a doença clínica, e os achados de necropsia foram atrofia da musculatura peitoral, proventrículo dilatado com presença de alimento não digerido no interior e paredes afinadas, e presença de sementes não digeridas também nos intestinos (Gancz *et al.*, 2009). Nos EUA duas jandaias da patagônia (*Cyanoliseus patagonus*) sadias

foram experimentalmente infectadas com material de aves com PDD desenvolvido em células embrionárias de pato. Após 62 dias da infecção sinais clínicos de PDD foram notados, uma das aves veio a óbito com 66 dias de infecção e a outra foi submetida à eutanásia (Gray *et al.*, 2010). Na necropsia observou-se achados semelhantes aos descritos nas necropsias de Berhane e nas necropsias conduzidas neste experimento. Kloet *et al.* (2009) descreveram um surto de PDD com os mesmos sinais e achados de necropsia que dizimou 100% do plantel de *Aratinga* sp. e *Phyrrhura* sp. em um criatório na Holanda. Achados de necropsia semelhantes foram encontrados em uma arara piranga (*Ara macao*) nos EUA (Keller *et al.*, 2010) e em uma cacatua (*Cacatua sulphurea citrinocristata*) no Japão (Ogawa *et al.*, 2011). Tais características macroscópicas são descritas como sugestivas de PDD por diversos autores, e testes laboratoriais foram conduzidos para a confirmação do diagnóstico.

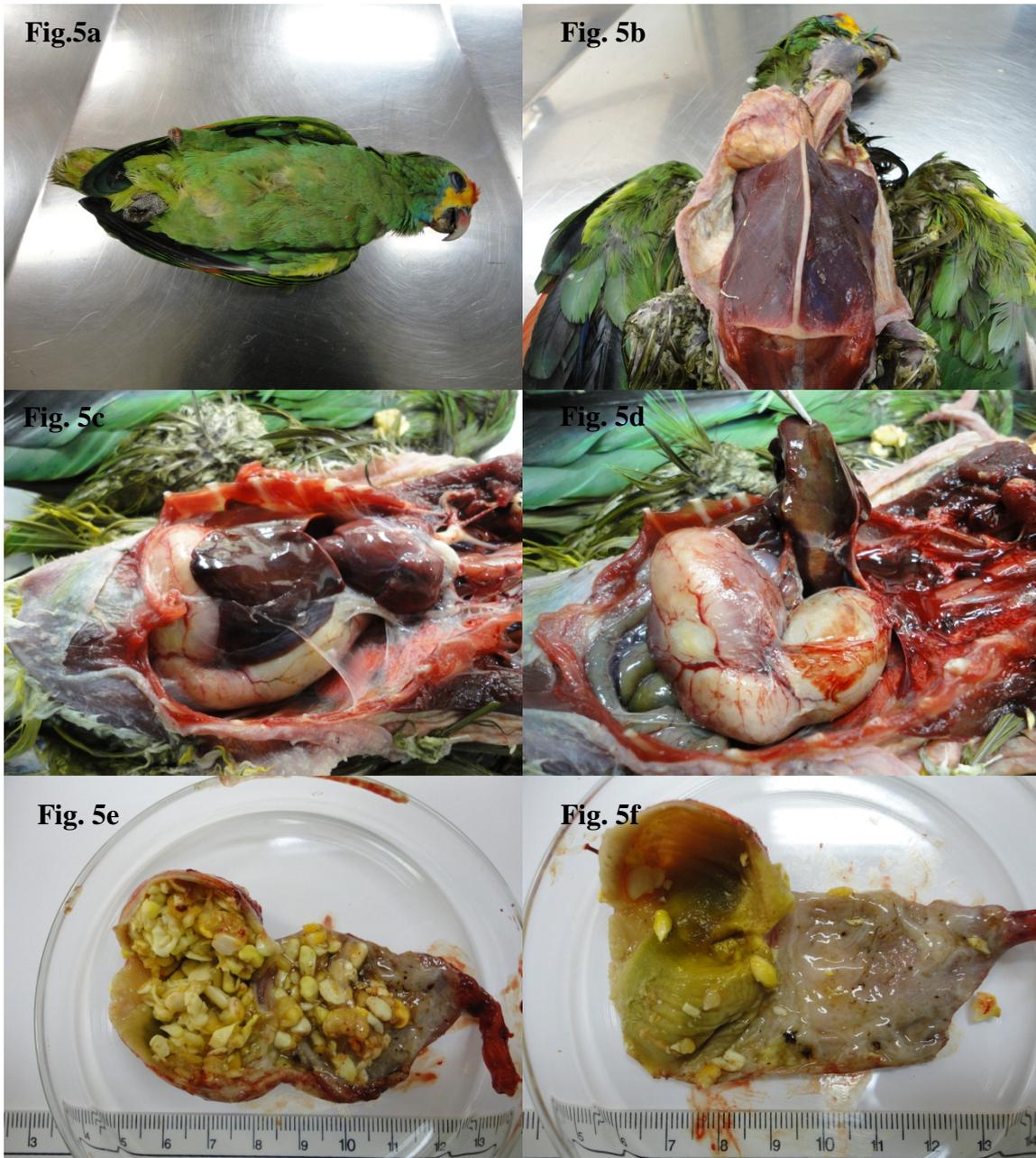


Fig. 5a – Achados macroscópicos de PDD em um *Amazona rhodocorytha* identificado como PDD7; Fig. 5b- Ave com condição corporal ruim, redução da musculatura peitoral e gordura subcutânea; Fig.5c - Cavidade celomática mostrando proventriculo ocupando toda lateral esquerda, aumentado de tamanho e volume, com presença de alimento, hepatomegalia e ausência de gordura peritoneal; Fig.5d - Detalhe do proventriculo distendido; Fig. 5e – Ao corte, presença de grande quantidade de alimento não digerido no proventriculo; Fig. 5f – Detalhe dos “black spots” na serosa do proventriculo.



Fig. 6a – Achados macroscópicos patológicos de PDD em um exemplar de *Primolius maracana* identificado como PDD6; Fig. 6b – Condição corporal ruim e ausência de tecido adiposo subcutâneo; Fig. 6c – Visão da cavidade peritoneal evidenciando proventriculo moderadamente dilatado ocupando a lateral esquerda da cavidade celomática e ausência de tecido adiposo peritoneal; Fig. 6d – Proventriculo com paredes delgadas; Fig. 6e - Conteúdo alimentar escurecido e fétido; Fig. 6f – Detalhe de úlcera na serosa do proventriculo.

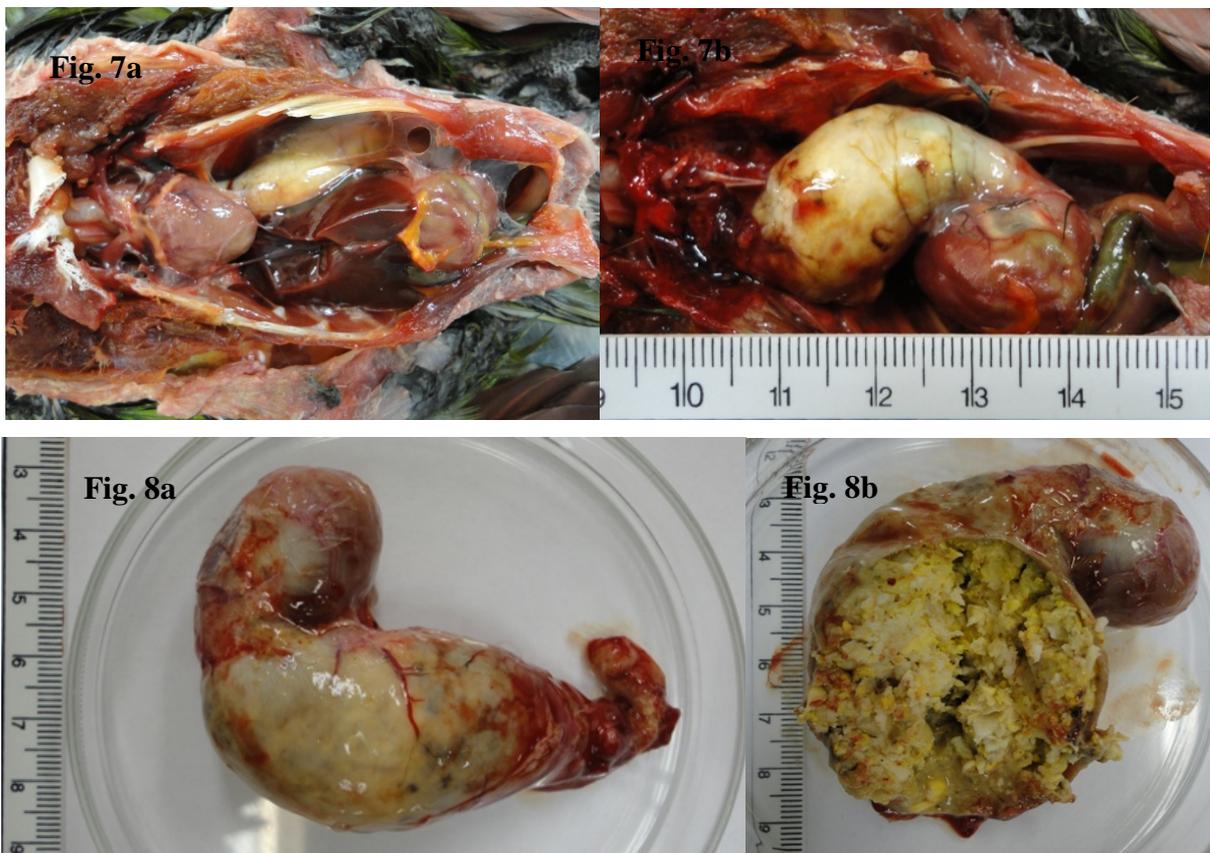


Fig. 7a – Achados patológicos macroscópicos em um exemplar de *Primolius maracana* identificado como (PDD3) – Cavidade celomática mostrando deslocamento de órgãos e proventriculo aumentado ocupando grande porção da lateral esquerda.

Fig. 7b – *Primolius maracana* (PDD3) – Após a remoção do fígado podemos visualizar detalhe do proventrículo dilatado com paredes delgadas e grande quantidade de alimento no interior.

Fig. 8a – Achados patológicos macroscópicos em um exemplar de *Ara macao* identificado como (PDD4) – Proventrículo removido após necropsia dilatado com paredes delgadas e grande quantidade de alimento no interior.

Fig. 8b – *Ara macao* (PDD4) – Proventrículo dilatado ao corte mostrando grande quantidade de alimento não digerido.

5.3) Histopatologia de tecidos das aves com síndrome da dilatação de proventrículo

Avaliadas por histopatologia, todas as aves apresentaram infiltrado leve ou moderada de linfócitos e plasmócitos em diferentes órgãos. Três psitacídeos (PDD3, PDD4 e PDD7) apresentaram a serosa da moela espessada devido à moderada e coalescente infiltrado de linfócitos e plasmócitos multifocais nos nervos e gânglios sendo em duas aves (PDD5, PDD6) a inflamação leve, com perda de neurônios e axônios.

Infiltrados de linfócitos e plasmócitos foram também observadas na camada muscular e submucosa da moela, associadas aos nervos e espaço perivascular (Fig. 29). Lesões semelhantes associadas aos nervos e gânglios foram observadas no papo e proventrículo de todos os psitacídeos (Fig. 30), sendo que na ave quatro, o esôfago também estava envolvido. Nas aves números quatro, cinco e seis, lesões multifocais semelhantes foram observadas na moela. Erosões focais ou multifocais e ulcerações foram observadas ocasionalmente nas mucosas do papo, esôfago e proventrículo.

Na glândula adrenal, foi observado infiltrado linfocitário multifocal coalescente leve a intensa (fig.28). Uma diferenciação intensa de linfócitos para

plasmócitos foi observado no baço. Em uma ave (PDD5), notou-se infiltrado de linfócitos e plasmócitos no nervo braquial. Vários cistos alongadas sugestivos de *Sarcocystis* foram observados nos músculos estriados esqueléticos.

Gancz *et al.*, (2009) encontraram à necropsia de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) experimentalmente infectadas com bornavírus aviário, infiltrados linfoplasmocíticos nos gânglios mesentéricos no trato gastro-intestinal superior e médio. Sendo o ventrículo (moela) o órgão mais afetado, em dois animais os infiltrados linfoplasmocíticos não se limitaram aos nervos ventriculares, estavam também na túnica muscular. Os infiltrados foram também encontrados em gânglios no epicardio, gânglios adrenais, e a matéria cinzenta cerebral destas aves evidenciaram múltiplos focos de gliose circundados por pequenas partículas de material amorfo eosinofílico.

Em outro estudo com infecção experimental por PDD de jandaias da patagônia (*Cyanoliseus patagonus*) saudáveis, encontrou-se ganglioneurites com infiltrados inflamatórios linfoplasmocíticos no ingluvío, proventrículo, ventrículo e intestinos. Em outra ave da mesma espécie não inoculada com o infiltrado contendo PDD nenhuma destas

alterações foram encontradas (Gray *et al.*, 2010).

Em um estudo no Canadá, a presença de característicos infiltrados linfoplasmocitários nos gânglios do papo, proventrículo, ou ventrículo, e nos gânglios adjacente à glândula adrenal e do coração foram utilizados como o principal critério para o diagnóstico de uma ave positiva para PDD. Outras lesões sugestivas de PDD, incluindo infiltrados perivasculares dos vasos sanguíneos no cérebro e coluna vertebral, adrenalite linfoplasmocitária, e neurite periférica foram notados e utilizados como critérios secundários para auxiliar no diagnóstico histopatológico (Raghav *et al.*, 2010).

Nos EUA a histopatologia de uma arara piranga (*Ara macao*) submetida à eutanásia com quadro clínico neurológico revelou leucoencefalite com moderado infiltrado linfo-plasmocítico no cérebro e em gânglios neurais de diversos órgãos (Keller *et al.*, 2010). Os mesmos achados histopatológicos também foram encontrados em uma cacatua (*Cacatua sulphurea citrinocristata*) no Japão (Ogawa *et al.*, 2011).

As lesões macroscópicas e histológicas descritos acima são condizentes com a literatura encontrada sobre casos confirmados de PDD.

5.4) Imuno-histoquímica para *Bornavírus aviário*

A imuno-histoquímica revelou coloração positiva para antígeno viral de bornavírus aviário nas amostras PDD6 (*Primolius maracana*) e PDD7 (*Amazona rhodocorytha*) (Fig.31 à 35), a coloração estava presente não só no núcleo, mas também no citoplasma de neurônios e células gliais em todo o cérebro, gânglio mientérico, nas células gliais do proventrículo, nas cordas medulares da glândula supra-renal e nos cilindros do eixo dos nervos periféricos. Fígado, músculo esquelético, testículos e alguns nervos periféricos foram negativos.

Gancz *et al.*, (2009) em seu estudo experimental demonstraram que todas as aves inoculadas com PDD foram positivas na imuno-histoquímica, visualizando coloração generalizada em todo o cérebro próximas aos núcleos dos neurônios e células gliais. Sendo essas as mesmas características encontradas na imuno-histoquímica das aves amostradas neste estudo. Em um estudo no Texas-EUA 24 amostras que estavam estocadas foram processadas e analisadas por imuno-histoquímica. Dessas amostras 13 pertenciam a aves em que a *causa mortis* estabelecida havia sido PDD e 11 amostras as quais os diagnósticos eram outros. A

imuno-histoquímica revelou positividade nos tecidos de cérebro, cerebelo e medula espinhal das 13 amostras de PDD e de uma das 11 amostras restantes (Ouyang *et al.*, 2009). No Canadá foi detectada coloração para o antígeno ABVN em vários tecidos de oito aves que também tiveram lesões características na necropsia (Raghav *et al.*, 2010). Em outro estudo na Áustria, proteínas do bornavírus aviário foram demonstradas por imunohistoquímica do sistema nervoso central de aves com PDD,

nos núcleos e citoplasma dos dendritos e células de Purkinje (Weissenböck *et al.*, 2009).

Neste estudo, apenas duas confirmações por imuno-histoquímica foram obtidas de aves com patologia altamente sugestiva de PDD. As diferenças podem estar relacionadas às alterações durante a fixação prolongada em formol ou *post-mortem* pela degradação do RNA de *Bornavirus*, resultando em falsos-negativos.

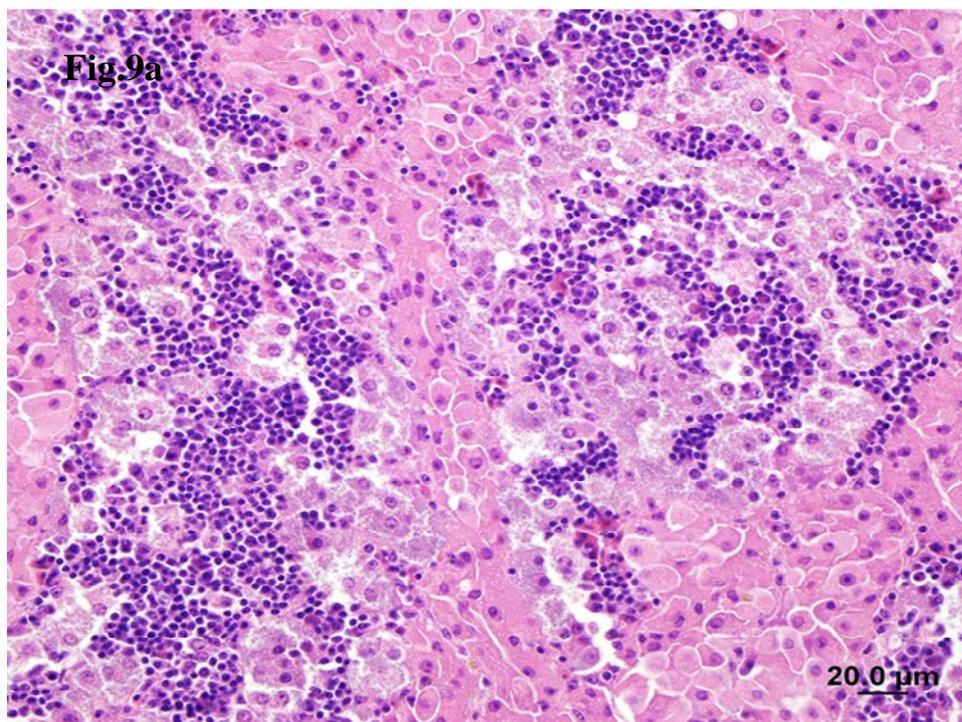


Fig. 9a: Achados histológicos em um exemplar de *Primolius maracana* identificado por (PDD6). Corte de adrenal corada com HE mostrando um infiltrado linfoplasmocitário moderado entre as células medulares.

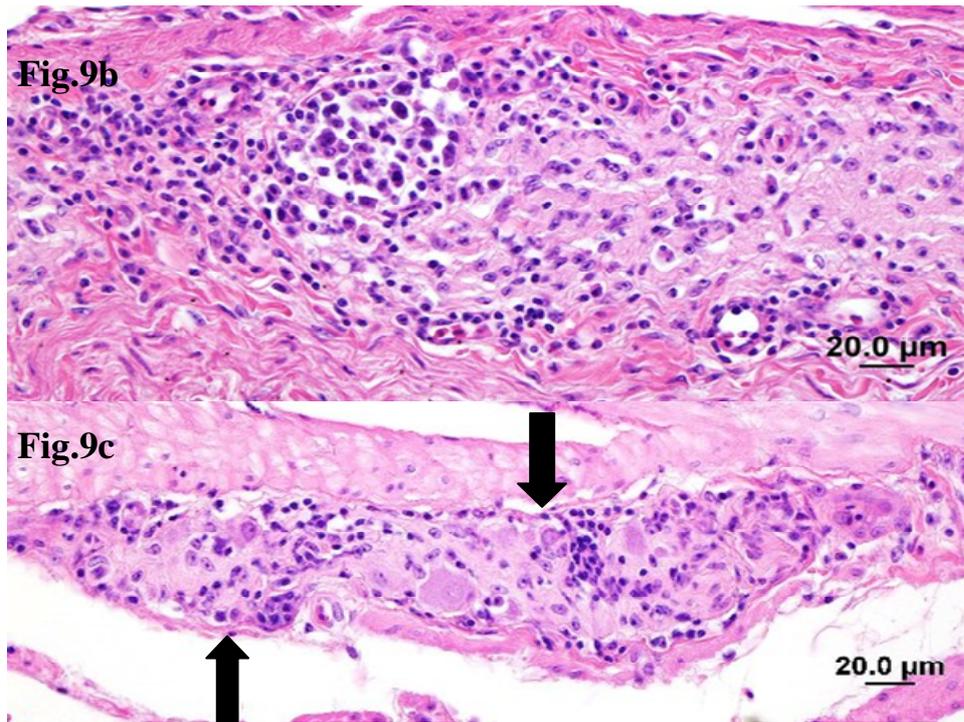


Fig. 9b: Achados histológicos em um exemplar de *Primolius maracana* identificado por (PDD6). Corte da moela corada com HE mostrando-se infiltrado linfo plasmocitário moderado entre as fibras nervosas da serosa.

Fig. 9c: Achados histológicos em um exemplar de *Amazona rhodocorytha* identificado por (PDD7). Corte do proventrículo corado por HE mostrando-se infiltrado linfo plasmocitário leve a moderado ao redor dos neurônios ganglionares. E em alguns locais (setas) os neurônios não podem mais serem observados (setas).

Imuno-histoquímica

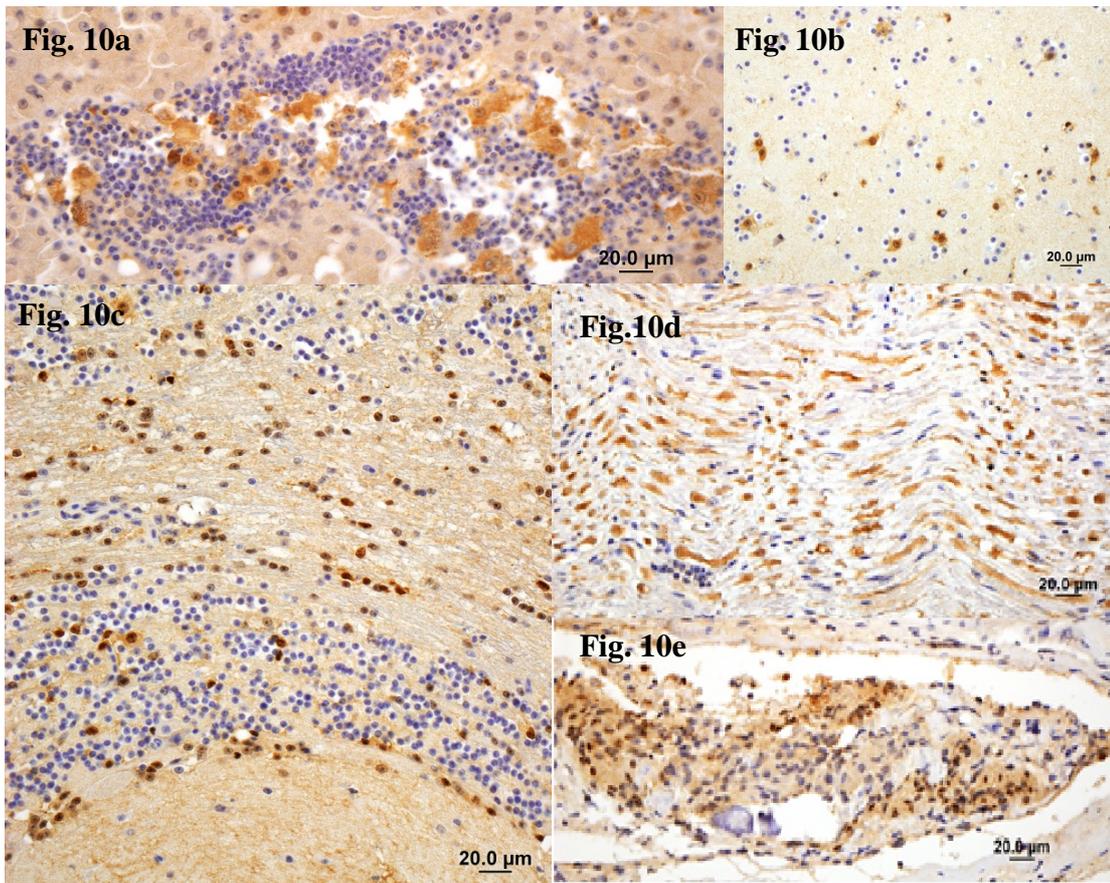


Fig. 10a- *Amazona rhodocorytha* mostrando-se coloração intranuclear e citoplasmática de antígeno de ABV em corte de tecido da adrenal.

Fig. 10b- *Amazona rhodocorytha*. Corte de tecido cerebral, onde se nota coloração intranuclear em neurônios e nas células da glia.

Fig. 10c - *Amazona rhodocorytha*. Corte de cerebelo, onde se evidencia coloração nas células de Purkinje e nas células da camada granular.

Fig. 10d- *Amazona rhodocorytha*. Corte de nervos periféricos, onde se nota coloração intranuclear nos neurônios.

Fig. 10e- *Amazona rhodocorytha*. Corte de proventrículo, onde se observa coloração intranuclear nos neurônios do gânglio.

5.5) Exames coproparasitológicos

Nos exames coproparasitológicos de flutuação e de microscopia direta em preparação úmida (solução fisiológica) de lâmina e lamínula observou-se uma ocorrência de endoparasitismo de 2,77% (6/216) no total das aves avaliadas.

Foram elas ovos de *Ascaris* sp em um papagaio-do-peito-roxo (*Amazona vinacea*) (Fig.12b) ; ovos de Tricurideo, provavelmente do gênero *Capillaria* sp. encontrados em duas araras-canindé (*Ara ararauna*) (Fig.12a), sendo as duas de criatórios diferentes; oocistos de coccidia não esporulados em três papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*) de um mesmo criatório (Fig. 11a e 11b).

A baixa infestação por parasitas encontradas neste estudo pode ser devida ao fato de em todos os criatórios amostrados manterem-se vermifugações periódicas. Um baixo número de infecções por endoparasitos também foi relatado no Parque Zoológico de Houston (Texas - EUA), os endoparasitos encontrados neste trabalho foram ascarídeos, *Capillaria* spp., *Strongylus* spp., *Strongyloides* spp., *Dispharynx* spp., *Heterakis* spp. e coccídeos. A autora relata que as infestações por endoparasitos respondem bem aos anti-helmínticos (Tocidlowski, 2007). Deem *et al.* (2005), descreve que em sete papagaios cativos (N=20) e oito de

vida livre (N=24) foram encontrados ovos de ascaridia e em um papagaio cativo e em um de vida livre ovos de *Capillaria* sp. Em outro estudo com papagaios de San Vincent (*Amazona guildingii*) os exames parasitológicos onde 21 amostras foram analisadas, apenas uma foi positiva e os ovos encontrados foram do parasita *Capillaria* sp. (Deem *et al.*, 2008). Em filhotes de vida livre de arara azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) no Pantanal, foram realizados exames parasitológicos em duas estações reprodutivas, sendo o resultado negativo para presença de ovos de helmintos e oocistos de protozoários em 100% dos casos (Allgayer *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2000). No Peru, em um estudo que avaliou 38 jandaia (*Aratinga weddellii*) e 13 periquitos (*Brotogeris sanctithomae*), nenhum ovo de parasita foi encontrado (Kirsten *et al.*, 1995).

Não foi observada em nenhuma das aves a presença de ectoparasitas. Podendo este fato estar ligado às práticas de vermifugação periódica com bases medicamentosas como ivermectina, que seriam eficientes também no combate de ectoparasitas. Além disso, há relatos da utilização de fipronil nas aves como medida preventiva para o controle de ectoparasitas. Todos os criatórios possuem boas práticas de manejo, o que

diminuí a probabilidade da ocorrência e permanência de um ambiente favorável aos parasitas. A literatura relata que todos os principais grupos de aves possuem ácaros plumícolas, sendo que cada ordem apresenta uma fauna específica de ácaros, e que dentro das ordens a especificidade destes ácaros pode ser relacionada às famílias, gêneros ou até mesmo às espécies de aves (Gaud e Atyeo, 1976). No trabalho de Deem *et al.* (2005) também não foram encontrados ectoparasitas nas aves amostradas.

As amostras de com oocistos de coccidia foram tratadas com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), entretanto não foi possível obter esporulação que permitisse a identificação da espécie de coccídeo envolvido. Na literatura é descrito por Tsai *et al.* (1992) um estudo que envolveu 534 psitacídeos de diversas espécies. Encontraram coccidioses em 10 casos, sendo destes, dois em papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*). Novos

trabalhos no Brasil descrevem em uma espécie de papagaio campeiro (*Amazona ochrocephala*) comumente mantido em cativeiro numa relação extremamente próxima com papagaios verdadeiros (*A. aestiva*), duas novas espécies, *Eimeria amazonae* e *Eimeria ochrocephalae* (Hofstatter *et al.*, 2011a). Em outro estudo, este mesmo autor descreve uma nova espécie de Eimeria (*Eimeria aestivae*) em *Amazona aestiva*. Nesta espécie os oocistos são maiores do que as das duas espécies descritas anteriormente, mas todas elas parecem estar estreitamente relacionadas devido a algumas semelhanças (Hofstatter *et al.*, 2011b).

Apesar de não ter sido possível neste estudo a caracterização da espécie de coccidia envolvida, sugere-se que provavelmente seja uma destas espécies descritas na literatura, pois sabe-se da existencia de relação espécie-específica entre parasita e hospedeiro.

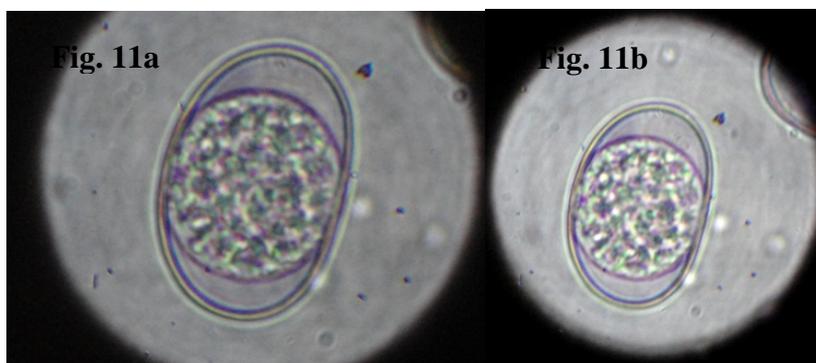


Fig. 11a e 11b – Oocistos não esporulados encontrados em fezes de *Amazona aestiva*.

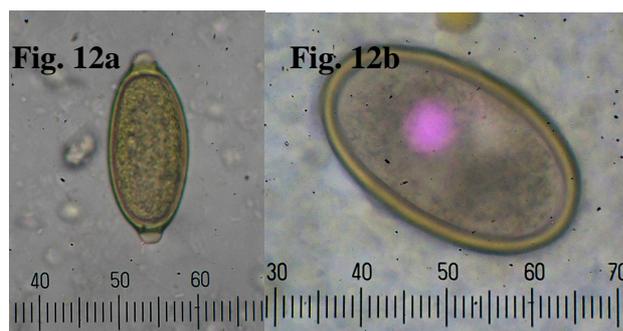


Fig. 12a – Ovo de tricurídeo encontrado em fezes de *Ara ararauna*.

Fig. 12b – Ovo de *Ascaris* sp. encontrado em fezes de *Amazona vinacea*.

5.6) Soroaglutinação rápida em placa (SAR)

Considerando todas as espécies avaliadas à prova de SAR, 11,57% (25/216) das aves foram reagentes para *M. gallisepticum*, e 17,12% (37/216) foram reagentes para *S. Pullorum/S. Gallinarum*.

Destas, 8,96% dos papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*) foram reagentes para *M. gallisepticum*, e 17,93% foram reagentes para *S. Pullorum/S. Gallinarum*. Entre os papagaios-do-peito-roxo (*Amazona vinacea*) 23,8% foram reagentes para *M. gallisepticum*, e 9,52% foram reagentes para *S. Pullorum/S. Gallinarum*. Já nos papagaios-do-espírito-santo (*Amazona rhodocorytha*) 10% foram reagentes para *M. gallisepticum*, e 40% foram reagentes para *S. Pullorum/S.*

Gallinarum. Entre as araras-canindé (*Ara ararauna*) 15% foram reagentes para *M. gallisepticum*, e 12,50% foram reagentes para *S. Pullorum/S. Gallinarum*.

Como provas confirmatórias para a demonstração de contato prévio ou infecção por *M. gallisepticum*, *S. Pullorum/S. Gallinarum* em testes de triagem, foram realizadas a IH para *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, a avaliação em soroaglutinação lenta em tubos (SAL) para pulorose/tifo aviário.

Carrasco *et al.* (2010) em um trabalho com 133 pombos domésticos capturados na cidade de Ribeirão Preto, não encontrou nenhum animal soro-reagente em SAR para *Mycoplasma gallisepticum*, e apenas um reagente para *Salmonella* sp.

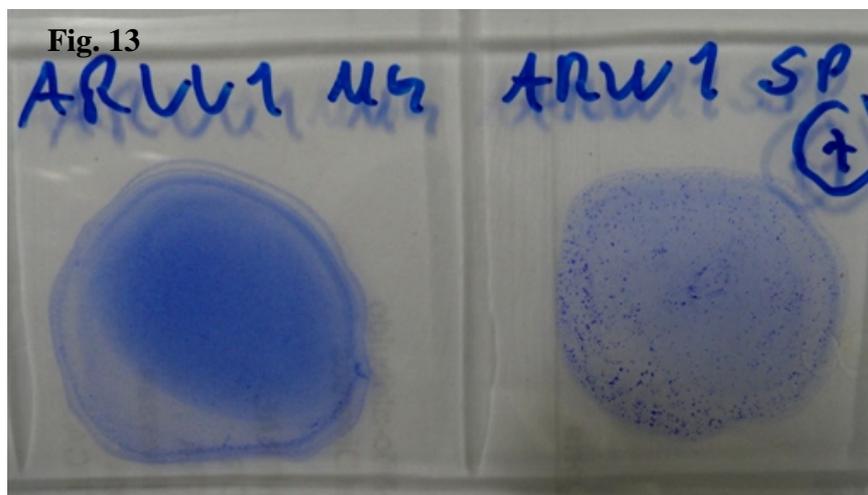


Fig. 13 – Soroaglutinação rápida em placa de *Amazona rhodocorytha* (ARV1) negativo para *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e reagente para *Salmonella Pullorum* (SP) onde são observadas granulações.

5.7) Técnica de inibição da hemaglutinação para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*

Todos os 216 soros coletados foram submetidos ao teste de IH para *M. gallisepticum* (MG) e *M. synoviae* (MS). Nenhum soro apresentou títulos de anticorpos contra MG e MS na prova de IH. Tendo em vista a maior especificidade do IH, as aves foram consideradas negativas.

Os resultados encontrados no presente trabalho foram similares aos encontrados por Hoffman *et al.* (1997), que avaliou 119 soros de perus selvagens e 31

galinhas de fundo de quintal, que conviviam em um rancho no Colorado (EUA). Os soros foram testados para *M. gallisepticum* e *M. synoviae* na prova de SAR, onde encontram 43% de aves reagentes, entretanto nos testes de IH foram todos negativos para *M. gallisepticum* e *M. synoviae*.

Outros autores também encontraram valores muito baixos de reatividade sorológica ao *M. gallisepticum* e *M. synoviae* na IH. Fritz *et al.* (1992) na prova de SAR para *M. gallisepticum* obtiveram 27,6% (200/724) de perus selvagens reagentes, entretanto apenas 3% (20/664) das aves foram positivas para *M.*

gallisepticum e 2,2% (9/403) para *M. synoviae* no teste de IH.

No Brasil em um trabalho com aves de rapina em 66 amostras testadas, apenas uma foi reagente no teste de SAR para MG, porem esta amostra foi negativa no teste de HI (Andery, 2010). Em um trabalho com cracídeos e tinamídeos, de um total de 130 amostras de cracídeos, 42 (32,3%) foram reagentes na SAR para MG, e dos tinamídeos avaliados num total de 95, quatro (4,2%) foram reagentes na SAR para MG. Nenhum soro apresentou títulos de anticorpos contra *M. gallisepticum* e *M. synoviae* na prova de IH. Tendo em vista a maior especificidade do IH, as aves foram consideradas negativas (Marques, 2010).

O resultado falso positivo para SAR pode ser devido à ocorrência de reação cruzada entre *M. gallisepticum* e outros micoplasmas, ou ainda, outros microorganismos, como *Staphylococcus aureus*, cuja indução de reações falso positivas já foi descrita anteriormente (Ley, 2003).

5.8) Soroaglutinação lenta em tubo (SAL) para *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum*

Todos os 216 soros coletados foram submetidos ao teste de soroaglutinação lenta em tubos (SAL) para

pulorose/tifo-aviário. Nenhum soro apresentou reatividade confirmada por SAL, com a precipitação do complexo antígeno-anticorpo e transparência da suspensão. Tendo em vista a maior especificidade do SAL, as aves foram consideradas negativas.

Deem *et al.* (2005), descreve que dos 20 *A. aestiva* cativos e dos 24 de vida livre todos foram negativos para salmonelose pelo teste de microaglutinação. Karesh *et al.* (1997) no seu estudo no Peru descreve positividade em testes sorológicos de microaglutinação em oito araras (seis *Ara macao*, e três *Ara chloroptera*).

No Brasil um estudo com galinhas de fundo de quintal em criações próximas a granjas no interior de São Paulo detectou 16,5% (67/406) de amostras reagentes confirmadas no teste de SAL (Buchala *et al.*, 2006). Em outro estudo com cracídeos das 130 amostras analisadas 35 (26,9%) foram reagentes na SAR para *S. Gallinarum/S. Pullorum* e dos 95 tinamídeos analisados 27 (28,4%) foram reagentes. Todavia, apenas um mutum do sudeste (*C. blumenbachii*) apresentou reatividade confirmada por SAL (Marques, 2010).

5.9) Teste de inibição da hemaglutinação para doença de Newcastle

Todos os 216 soros coletados foram submetidos ao teste de IH para anticorpos específicos para o APMV-1 da doença de Newcastle. Nenhum soro apresentou títulos de anticorpos contra APMV-1 na prova de IH, sendo as aves consideradas negativas.

Tais resultados estão condizentes com encontrado por outros autores. Deem *et al.* (2005), realizou este teste em 44 *A. aestiva* sendo que 20 destes eram cativos e 24 de vida livre. Todos foram negativos na sorologia. Herrera *et al.* (2001) realizou inibição da hemaglutinação em 129 araras vermelhas (*Ara macao*), sendo também todas negativas. Em outro estudo com 36 papagaios de San Vincent (*Amazona guildingii*) os exames de IH para Paramixovírus- 1, 2 e 3 também foram negativos. (Deem *et al.*, 2008). Carrasco *et al.* (2010) em um trabalho com 133 pombos domésticos capturados na cidade

de Ribeirão Preto, não encontraram nenhum animal positivo na IH para APMV-1.

Em Minas Gerais em um trabalho com aves de rapina das 69 aves testadas, duas (2,9%) apresentaram títulos de anticorpos anti APMV-1, cujos títulos foram de 1:32 e 1:16. As duas aves eram exemplares de uma mesma espécie de falconiforme, carcará (*Caracara plancus*), considerando-se o número e diversidade de espécies examinadas, o resultado indicou baixa ocorrência da infecção por APMV-1 nas aves rapinantes da região (Andery , 2010). Também em Minas Gerais, uma pesquisa com soros de cracídeos e tinamídeos (n=20) 8,8% apresentaram títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (IH) para o APMV-1 (Marques, 2010).

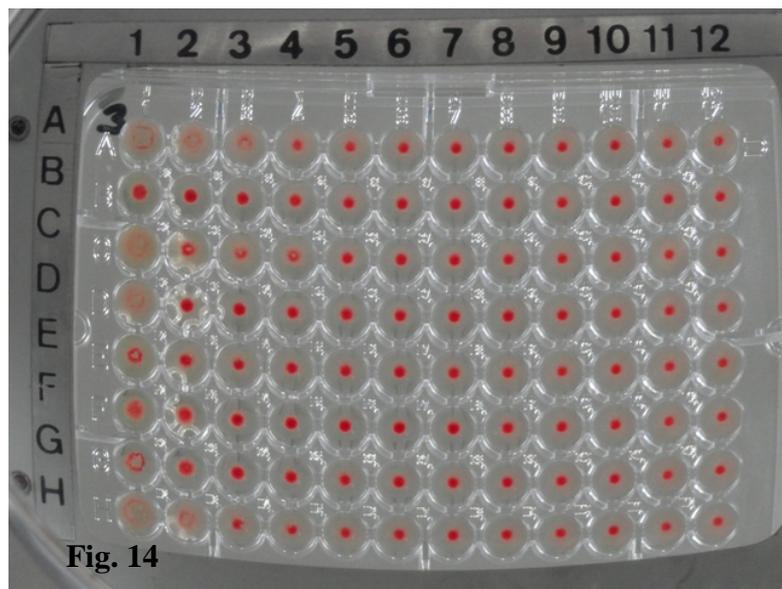


Fig. 14

Fig. 14 – Inibição da hemaglutinação para anticorpos específicos do vírus AMPV-1 da doença de Newcastle

5.10) Reação em cadeia pela polimerase-PCR para *Chlamydophila psittaci*

Foram testadas todas as 216 amostras de *pools* de *swab* cloacal e fenda palatina, sendo destas 11 amostras (5,09%) positivas, visualizando-se um produto com uma banda de 418 pb, demonstrado no Quadro 2. Entre as 11 amostras positivas, oito (3,70%) foram de papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*), uma (0,46%) de papagaio-do-espírito-santo (*Amazona rhodocorytha*), uma (0,46%) de papagaio-do-peito-roxo (*Amazona vinacea*), e uma (0,46%) de arara canindé (*Ara ararauna*).

Tais resultados são compatíveis com encontrados previamente por Hidasi, que obteve obtiveram 11 (3,66%) amostras positivas em 300 aves coletadas

provenientes de um centro de triagem em Goiás (Hidasi, 2010). Entretanto Hidasi relatou quadro clínico respiratório em duas destas aves. No presente trabalho nenhuma ave apresentava-se com sintomatologia clínica sugestiva de infecção por *Chlamydophila psittaci*.

Em um estudo no CETAS de Belo Horizonte de 212 animais necropsiados 152 (72%) foram positivos para *Chlamydophila psittaci* pelo teste da PCR (Vilela, 2012). Outros estudos realizados em São Paulo diagnosticaram a *Chlamydophila psittaci* como responsável pela mortalidade de 96,5% de 58 filhotes de *Amazona aestiva* apreendidos do tráfico (Raso *et al.*, 2004). As enormes diferenças na porcentagem de positividade das amostras estão relacionadas com diversos fatores, como a diferença na eleição do

material utilizado para diagnóstico, como amostras de fígado (Vilela, 2012), sendo assim, uma infecção subclínica teria uma maior probabilidade de ser diagnosticada, e já no caso das amostras de *swabs* seria necessário que os animais estivessem na fase de eliminação do ciclo dos corpos elementares (CE) da *Chlamydophila psittaci*.

O fato de as aves testadas neste estudo estarem alojadas em criadouros há algum tempo, ambientadas, muitas vezes pareadas com uma alimentação balanceada influenciou positivamente para um bom *status* sanitário, resultando em uma menor porcentagem de diagnóstico da doença, visto que sabemos que dentre outros fatores, condições estressantes como no tráfico são determinantes para desencadear surtos desta doença. (Ecco *et al.*, 2009; Raso *et al.*, 2004). A idade das aves também influenciou para a ocorrência desta menor porcentagem, pois todas as aves testadas neste estudo eram adultas, e sabe-se que filhotes, como os testados por Raso *et al.* (2004), possuem um sistema imunológico menos eficiente e portanto são mais predispostos à infecção.

Em um estudo sorológico na Bolívia foram testadas 34 *Amazona aestiva*, sendo 20 aves cativas e 24 de vida livre. Os resultados sorológicos negativos obtidos demonstram que as aves não

tiveram contato prévio com o microrganismo e por isso não desenvolveram resposta imune (Deem *et al.*, 2005). Herrera *et al.* (2001) encontrou sorologia positiva em 2 aves em um total de 129 araras testadas (*Ara macao*). Em um estudo o qual comparou métodos de diagnóstico na Turquia de 96 amostras testadas, 33 (34%) foram positivas na PCR e 29 (30,2%) foram positivos em testes com anticorpos conjugados monocloais, demonstrando a proximidade dos resultados entre diferentes métodos de diagnóstico (Celebi *et al.*, 2006). Em um estudo no Pantanal matogrossense dos 32 filhotes de *Amazona aestiva* testados, apenas 2 (6,3%) foram positivos na PCR para *C. psittaci* e todos negativos para o teste de fixação do complemento (FC). Nos 45 filhotes de araras (*Anodorhynchus hyacinthinus*) testados, 12 (26,7%) foram positivos no PCR e 4,8% no teste FC (Raso *et al.*, 2006). Na Itália em um surto ocorrido em uma loja de animais, das 15 aves que desenvolveram sintomatologia de *C. psittaci*, todas (100%) foram positivas pela técnica de PCR e das 14 aves assintomáticas, 2 (14,2%) foram positivas (Grecco *et al.*, 2005). Verificou-se com isso que a porcentagem de positivos em aves aparentemente saudáveis neste trabalho também foi menor, estando de acordo com nossos resultados. Vamropey *et al.*, (2007),

em um estudo que verificou a potencialidade de transmissão da *C. psittaci* de aves mantidas como animais de estimação para humanos, encontrou 59

(19,2%) de aves positivas, em 308 Psittaciformes testados pela técnica de PCR-nested.

Quadro 2 – Amostras positivas *Chlamydophila psittaci*.

Amostra 1- AABV12	Amostra 7 - AAC3
Amostra 2- ARBV03	Amostra 8 - AVC1
Amostra 3 - AraRA 03	Amostra 9 - AAVV27
Amostra 4 - AARA05	Amostra 10 - AAVV35
Amostra 5 - AARA06	Amostra 11 - AAVV96
Amostra 6 - AAC1	

Legenda: AA = *Amazona aestiva*; AR = *Amazona rhodocorytha*; AV= *Amazona vinacea*; Ara = *Ara ararauna*; BV= criatório Bem Viver; RA= criatório Recanto do Amor; C= Estação Ecológica PETI-CEMIG; VV= criatório Vale Verde.

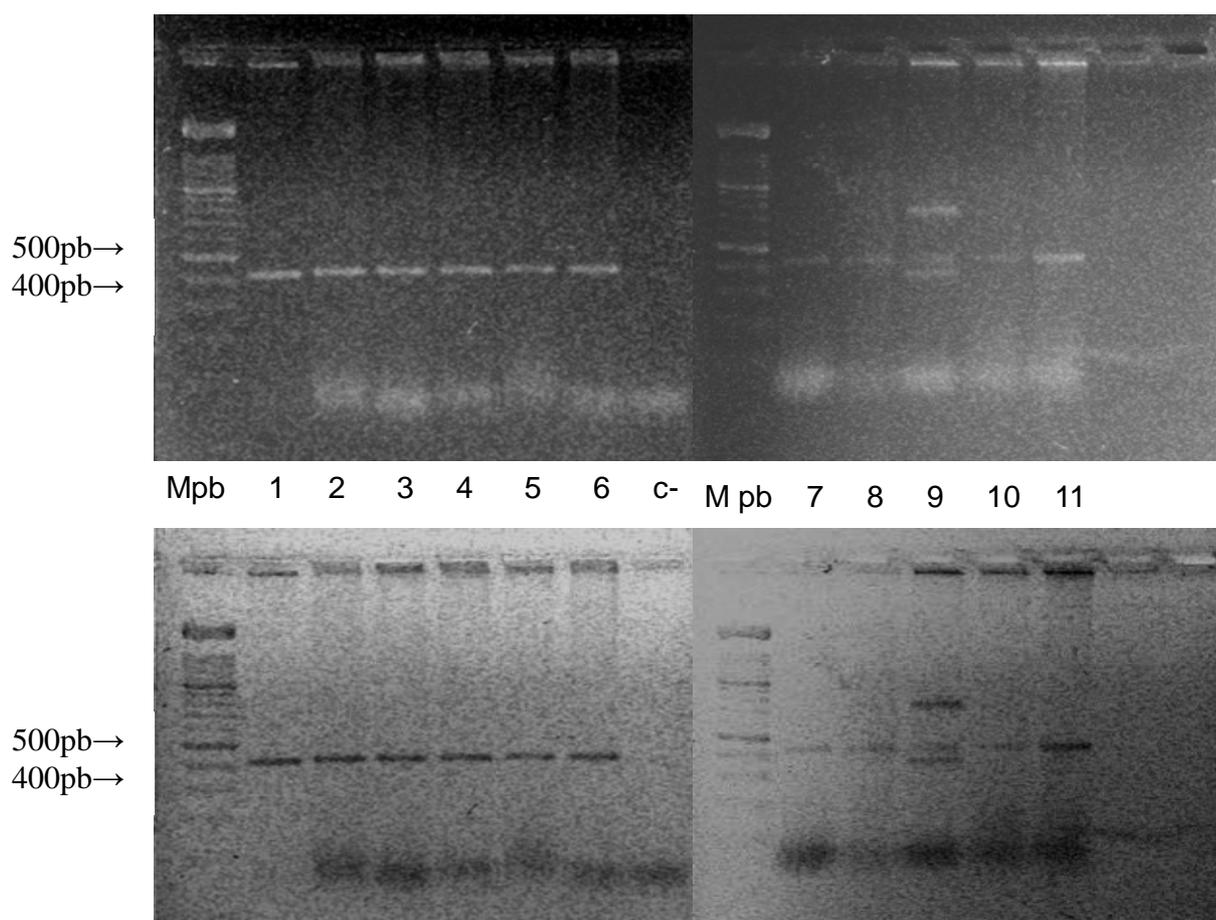


Fig. 15 – Eletroforese de produtos de PCR de *Chlamydophila psittaci* de swab cloacal/fenda palatina de psitacídeos cativos em Minas gerais.

Foram também testadas para o diagnóstico de *Chlamydothlypsittaci*, amostras das aves suspeitas de PDD (Síndrome da Dilatação de Proventrículo-*Bornavírus* aviário), do presente estudo. Sendo elas: *Primolius maracana* 09-03-10 (PDD3); *Ara macao* 16-04-2010 (PDD4); *Amazona vinacea* 26-11-10 (PDD5); *Primolius maracanã* 30-12-10 (PDD6); *Amazona rhodocorytha* 10-01-11 (PDD7); *Ara severa* 03-02-11 (PDD8); *Amazona vinacea* 04-05-11 (PDD9), *Pionus maximilianus* 04-05-11 (PDD10) e *Guaruba guarouba* 17-11-10. Todas foram negativas.

5.11) PCR para o vírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos

Foram testadas 63 amostras, sendo estas todas as aves que tinham alguma falha na plumagem, desde a falta de algumas remiges primárias, secundárias ou retrizes, até falhas consideráveis nas penas coberteiras.

Um produto de 717 pares de base (Fig.4), compatível com a descrição da literatura (Ypelaar *et al.*, 1999) foi obtido em duas amostras (representando 3,17% do total das amostras testadas) AAVV42 e AraVV09. Um papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) e uma arara canindé (*Ara ararauna*) respectivamente. Os resultados estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3. Pesquisa do DNA do vírus da doença do bico e das penas em coágulos sanguíneos de psitacídeos cativos em Minas Gerais.

Nº	Ave	Resultado	Nº	Ave	Resultado	Nº	Ave	Resultado	Nº	Ave	Resultado
1	AAVV05	Negativa	17	AAVV63	Negativa	33	AraBV01	Negativa	49	AAC03	Negativa
2	AAVV06	Negativa	18	AAVV65	Negativa	34	AraBV04	Negativa	50	AAC04	Negativa
3	AAVV08	Negativa	19	AAVV68	Negativa	35	AraBV07	Negativa	51	AAC06	Negativa
4	AAVV12	Negativa	20	AAVV75	Negativa	36	AraBV08	Negativa	52	AAC07	Negativa
5	AAVV19	Negativa	21	AAVV78	Negativa	37	AABV02	Negativa	53	AAC11	Negativa
6	AAVV21	Negativa	22	AAVV86	Negativa	38	AABV06	Negativa	54	AAC13	Negativa
7	AAVV23	Negativa	23	AAVV95	Negativa	39	AABV08	Negativa	55	AAC15	Negativa
8	AVBV26	Negativa	24	AAVV96	Negativa	40	AABV09	Negativa	56	AAC16	Negativa
9	AAVV29	Negativa	25	AAVV99	Negativa	41	AABV10	Negativa	57	AAC18	Negativa
10	AVBV33	Negativa	26	AraVV09	Positiva	42	ARBV01	Negativa	58	AVC2	Negativa
11	AAVV39	Negativa	27	AraVV18	Negativa	43	ARBV03	Negativa	59	AVC08	Negativa
12	AAVV41	Negativa	28	AraVV24	Negativa	44	AVBV02	Negativa	60	AVC10	Negativa
13	AAVV42	Positiva	29	AraVV25	Negativa	45	AVBV03	Negativa	61	AVC11	Negativa
14	AAVV43	Negativa	30	AVRA01	Negativa	46	AVBV04	Negativa	62	ARC3	Negativa
15	AAVV52	Negativa	31	AVRA02	Negativa	47	AVBV05	Negativa	63	ARC4	Negativa
16	AAVV56	Negativa	32	AraRA03	Negativa	48	AVBV06	Negativa			

Legenda: AA = *Amazona aestiva*; AR = *Amazona rhodocorytha*; AV = *Amazona vinacea*; Ara = *Ara ararauna*; BV = criatório Bem Viver; RA = criatório Recanto do Amor; C = Estação Ecológica PETI-CEMIG; VV = criatório Vale Verde.

PBFD – Circovírus – 717pb

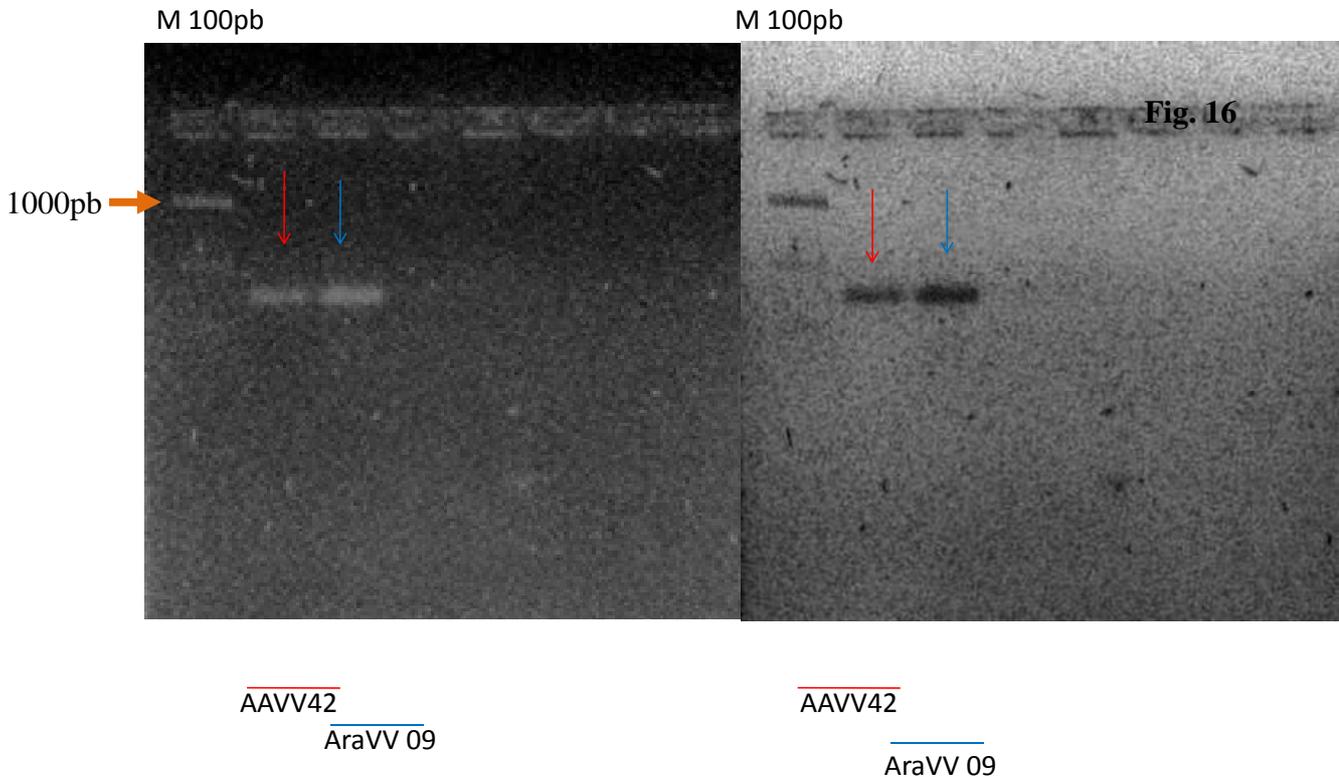


Fig. 16 - Eletroforese de produto de PCR de vírus da doença do bico e das penas de amostras de coágulos sanguíneos de psitacídeos cativos em Minas Gerais.

As duas aves positivas eram pertencentes ao mesmo criadouro. O papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) estava no plantel já há alguns anos, pareado e acondicionado com seu par em um viveiro suspenso de reprodução. Entretanto não há nos arquivos do criatório relato de reprodução desta ave, sendo ela inclusive, antes mesmo deste resultado retirada da reprodução.

O criadouro tem um histórico de um grave surto de PBFD no ano de 2009, quando diversos filhotes de papagaio

ecletus (*Ecletus roratus*) um psitacídeo da Oceania, desenvolveram a forma aguda da doença, sendo então realizada a eutanásia de todos os filhotes com sintomatologia clínica e/ou positivos em PCR. Todos os adultos foram isolados testados pela técnica de PCR, sendo os positivos (em pelo menos três exames seriados) submetidos à eutanásia. Foi realizado ainda desinfecção das instalações e as matrizes restantes foram isoladas.

É provável que a infecção por circovírus tenha a mesma origem deste

surto, pois neste criatório espécies silvestres muitas vezes estão lado a lado com espécies exóticas.

Entretanto não foi realizado sequenciamento genético em 2009 no surto da doença, nem tampouco nas aves positivas neste estudo, para que pudéssemos comprovar esta suspeita. Baseado na literatura, um surto de PBFD em um criadouro é difícil de ser contido, pois o vírus é resistente a muitas medidas de controle, além disso normalmente a forma aguda da doença é encontrada em animais jovens entre zero e três anos devido a sua susceptibilidade (Richie *et al.*, 1990).

No dia da coleta o *Amazona aestiva* identificado como AAVV42 foi descrito em sua ficha clínica como falta de remiges primárias, secundárias e retrizes, penas mal formadas e canhões com sinal de arrancamento. O seu par também possuía defeitos semelhantes na emplumagem, porém em menor escala. Após o resultado positivo a ave foi novamente contida, mantendo o mesmo padrão descrito anteriormente, e seu par havia morrido.

A arara canindé (*Ara ararauna*) estava em um viveiro coletivo, ainda não se encontrava pareada e havia chegado ao criadouro a pouco tempo, sua origem era desconhecida. No dia da coleta identificada

como AraVV09 em sua ficha clínica estava descrita com falta de rêmiges primárias na asa esquerda. Após o resultado positivo a ave foi novamente contida e nenhuma sintomatologia aparente foi encontrada, estando sua plumagem em perfeito estado. Tal achado está de acordo com a literatura, que reporta que algumas aves podem desenvolver uma resposta imune protetora com ausência ou recuperação de sinais clínicos (Khalesi *et al.*, 2005). E que Psittaciformes das Américas Central e do Sul são mais resistentes e comumente não desenvolvem os sinais clínicos clássicos da doença (Bassami *et al.*, 2001). Em um estudo na Alemanha, 146 psitacídeos de 19 gêneros diferentes sem sintomatologia clínica foram testados e foi encontrado 58 (39,2%) de amostras positivas (Rhaus *et al.*, 2003).

O PCR de amostras de sangue pode não ser a melhor análise para exames de monitorização e rotina, pois existe a possibilidade de gerar resultados falsos negativos e também pode ocorrer a não detecção de aves portadoras assintomáticas que não estiverem em fase virêmica. Nestes casos, poderá ser mais indicado realizar análise genética de amostras conjuntas dos vários tipos de amostras, como sangue, penas e *swab* cloacal (Piçarra, 2009).

Entretanto em outro estudo, alguns agapornis (*Agapornis sp.*), foram testados e todas as amostras de penas que

foram positivas tiveram também positividade nas amostras de sangue pela técnica de PCR (Khalesi *et al.*, 2005). Já em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) o PCR de penas e de *swab* cloacal mostrou-se mais sensível que o de sangue (Piçarra, 2009).

A combinação de várias provas laboratoriais é recomendada como melhor forma de diagnóstico (Khalesi *et al.*, 2005).

É provável a existência de resultados falso negativos no presente

trabalho, e também acredita-se que teria-se mais resultados positivos se todas as 216 amostras fossem testadas, ou seja, incluindo na pesquisa aves sem sintomatologia clínica. A pesquisa com o uso do DNA obtido através das amostras de *swabs* também poderia aumentar o número de aves positivas, principalmente no criadouro que possuía histórico da doença clínica.



Fig. 17 – Exemplar de *Amazona aestiva* identificado como (AAVV42) positivo, apresentando falta de rêmiges primárias, secundárias e retrizes

Fig. 18 – Exemplar de *Ara ararauna* identificada como (AraVV09) positiva, apresentando-se aparentemente sem nenhum sinal clínico.

5.12) Reação em Cadeia pela Polimerase-PCR para *Bornavírus* aviário

Diversos cortes de tecidos montados em parafina da amostra (PDD7), papagaio-do-espírito-santo (*Amazona rhodocorytha*), foram encaminhados ao Avian Pathology Department of University of California e submetidos à extração de RNA sendo realizado em seguida um RT-PCR e sequenciamento da região putativa do gene M de acordo com protocolo previamente publicado por Weissenböck *et al* (2009). O par de *primer* amplificou uma sequência de bases de 352 pb (Fig.5), o que correspondeu as posições de 1908-2259 do genoma completo da estirpe de bornavírus aviário (*GeneBank* EU781967). Posteriormente, a pesquisa em BLASTn contra sequências do *GenBank* revelou ser compatível com o genótipo 4, com 99% a 100% identidade às sequências derivadas de diferentes espécies de psitacídeos de Israel e Canadá (números de acesso do *GenBank* FJ002341 e GQ496351 e FJ0023331 e FJ002330, FJ002340 e FJ002342).

Tal amostra foi utilizada como controle positivo para o restante dos testes realizados no LCGM-ICB (Laboratório de Genética Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG).

Os trabalhos iniciaram-se com o objetivo de confirmar através da técnica de RT-PCR a suspeita de ocorrência do bornavírus aviário nas demais amostras.

Foram escolhidos através de trabalhos de referência previamente publicados seis pares de *primers* para o início dos testes (Quadro 4). Realizou-se então extração de RNA das amostras de cérebros mantidos a -70°C através da técnica de isotiocinato fenol-clorofórmio (Trizol®) descrita anteriormente.

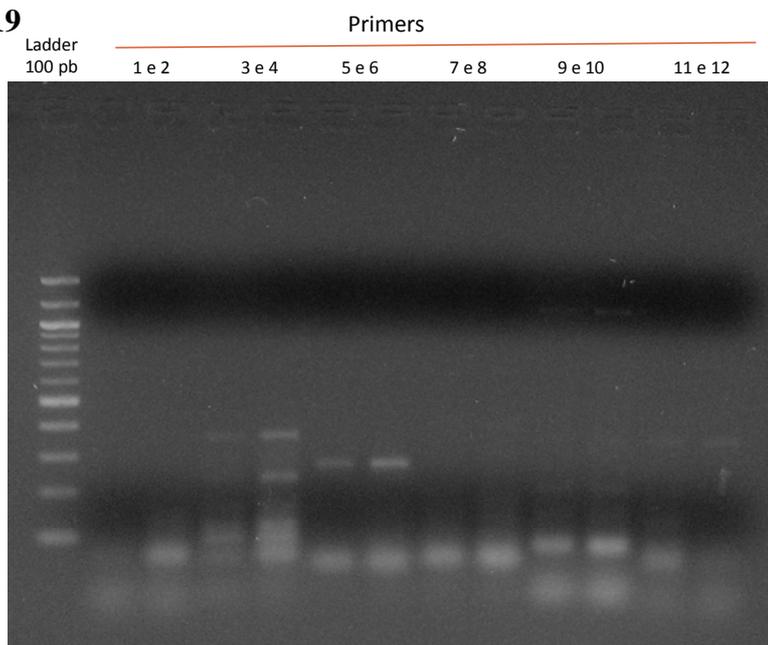
Para os testes iniciais, como todas as amostras disponíveis nesta época eram provenientes de um mesmo mantenedouro de fauna, optou-se por utilizar a amostra cinco (*Amazona rhodocorytha* PDD7), já testada anteriormente e sabidamente positiva. Realizou-se a transcrição reversa desta amostra para todos os *primers* disponíveis com 1uL (894,4ng/dl) da amostra (tubos 1 à 6) e com 2 uL da amostras (tubos 7 à 12). Em seguida realizou-se a RT-PCR e leitura por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Onde verificou-se PCR positivo, com fragmentos de tamanhos esperados a partir dos *primers* 3 e 4 (360 pb), 9 e 10 (1125 pb) e 11 e 12 (352). Constatou-se que as bandas foram mais evidentes nas amostras com 2uL para transcrição reversa (canaletas 4, 10, 12), (Fig.21).

Com tais resultados optou-se para utilização de 2uL da amostra para a realização da transcrição reversa. trabalhar os primers 3 e 4; e 11 e 12. E a

Quadro 4. Oligonucleotídeos iniciadores de Bornavírus aviário (ABV) testados.

Primer	Sequencia de nucleotídeos Bornavírus aviário	Referência
1: ABVNF	CCHCATGAGGCTATWGATTGGATTACG	Kistler et al., 2008
2: ABVNR	GCMCGGTAGCCNGCCATTGTDGG	
3: ABVPF	GGRCAAGGTAATYGTYCCTGGATGGCC	Kistler et al., 2008
4: ABVPR	CCAACACCAATGTTCCGAAGMGC	
5: ABVF	AAGGGAGCAGTTATCGAATG	
6: ABVR	GACATCTCACAATCAATCA	
7: NPWeissF	CATGAGGCTATWGATTGGATTA	Weissenböck et al., 2009
8: NPWeissR	GCMCGGTAGCCNGCCATTGT	
9: BVMFS1	CACGATCTATGCCACCCAAAAGGCAAAGAAGTC	Weissenböck et al., 2009
10: BVMRS2	CACGTGGACTCATTAGTTTGCAAATCCACTTCA	
11: MWeissF	CAAGGTAATYGTYCCTGGATGG	Weissenböck et al., 2009
12: MWeissR	ACCAATGTTCCGAAGMCGAWAY	

Fig. 19



Canaletas: 2, 4, 6, 8, 10 e 12 = 2uL cDNA 1; 3, 5, 7, 9, 11 e 13 = 1uL cDNA

Fig. 19 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR de *Bornavirus* aviário: Escolha de *primers* apropriados e determinação de volume de cópia molde.

Legenda: Nota-se PCR positivo, com fragmentos de tamanhos esperados a partir dos primers 3 e 4 (GGRCAAGGTAATYGTYCCTGGATGGCC e CCAACACCAATGTTCCGAAGMGC de 360 pb); 9 e 10 (CACGATCTATGCCACCCAAAAGGCAAAGAAGTC e CACGTGGACTCATTAGTTTGCAAATCCACTTCA de 1125 pb); e 11 e 12 (CAAGGTAATYGTYCCTGGATGG e ACCAATGTTCCGAAGMCGAWAY de 352pb).

Constatou-se que as bandas foram mais evidentes nas amostras com 2uL para transcrição reversa (canaletas 4, 10, 12).

Tabela 7 . Oligonucleotídeos iniciadores para *Bornavírus* aviário (ABV) que produziram bandas de tamanho esperado.

Primer	Sequencia	Região	Tamanho
3: ABVMF*	GGRCAAGGTAATYGTYCCTGGATGGCC	1904-1930	360 pb
4: ABVPR*	CCAACACCAATGTTCCGAAGMGC	2284-2263	
9: BVMFS1**	CACGATCTATGCCACCCAAAAGGCAAAGAAGTC	1-25	1125 pb
10: BVMRS2**	CACGTGGACTCATTAGTTTGCAAATCCACTTCA	1125-1107	
11: MWeissF** Membrane protein	CAAGGTAATYGTYCCTGGATGG	1853-1874	352 pb
12: MWeissR**	ACCAATGTTCCGAAGMCGAWAY	2204-2186	

(*Kistler *et al.*, 2009; **Weissenböck *et al.*, 2009).

O próximo passo foi verificar qual seria a melhor quantidade de c-DNA e temperatura de anelamento. Optou-se primeiramente em alterar a quantidade de c-DNA a ser testada de 1uL para 2 uL. Com a utilização de 2uL as bandas mostraram-se mais evidentes, portanto definimos a utilização de 2uL de c-DNA.

Nos testes da temperatura de anelamento (pareamento) foram realizados dois testes, o primeiro com temperaturas de 53°C, 55°C. Verificando uma melhor visualização da banda esperada à 55°C. E no segundo teste utilizou-se as

temperaturas de 55°C, 57°C, e 60°C. Como resultado verificou-se que tanto com a temperatura de 55°C e a temperatura de 57°C visualizou-se a banda esperada, sem nenhuma diferença significativa aparente, entretanto à 60°C os primers 11 e 12 não produziram a banda esperada. Optou-se então pela utilização da temperatura de anelamento de 57°C (Fig.49) e utilização dos primers 3 e 4 para diagnóstico das outras amostras.

Fig. 20

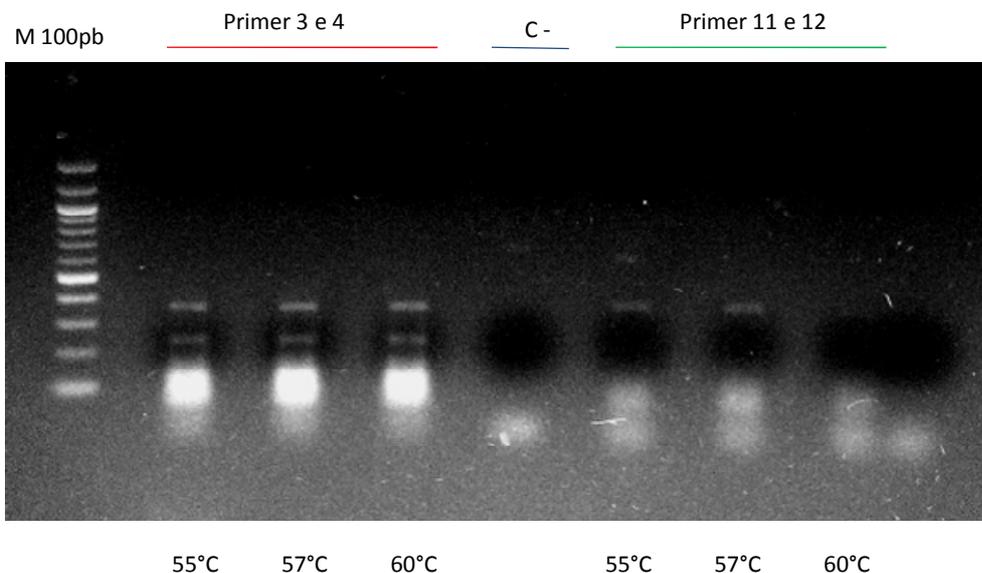


Fig. 20 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR de *Bornavirus* aviário: Teste para a determinação da temperatura ótima de anelamento.

Legenda: Canaleta 1 Ladder 100pb. Canaletas 2 e 6 temperatura de 55°C, canaletas 3 e 7 temperatura de 57°C, canaleta 4 e 8 temperatura 60°C, e canaleta 5 e 9 mix. Como resultado verificou-se que tanto a temperatura de 55°C como a temperatura de 57°C foi visualizada a banda esperada, sem nenhuma diferença significativa aparente. Entretanto na temperatura de 60°C os primers 11 e 12 não produziram a banda esperada.

Realizou-se ainda mais um teste, sobre a quantidade de cloreto de magnésio a ser utilizada na reação. Foram testadas quantidades de 1,5mM (1,2 ul); 2,0mM (1,6 ul); e 2,5mM (2,0 ul). Novamente utilizou-se c-DNA da amostra cinco

(*Amazona rhodocorytha* - PDD7) e os primers 3 e 4 de produto 360pb. Como resultado a banda esperada foi mais evidente em relação as outras bandas inespecíficas com a utilização de 1,5mM (1,2ul) de magnésio. Definiu-se então esta quantidade como padrão (Fig.21).

Fig. 21

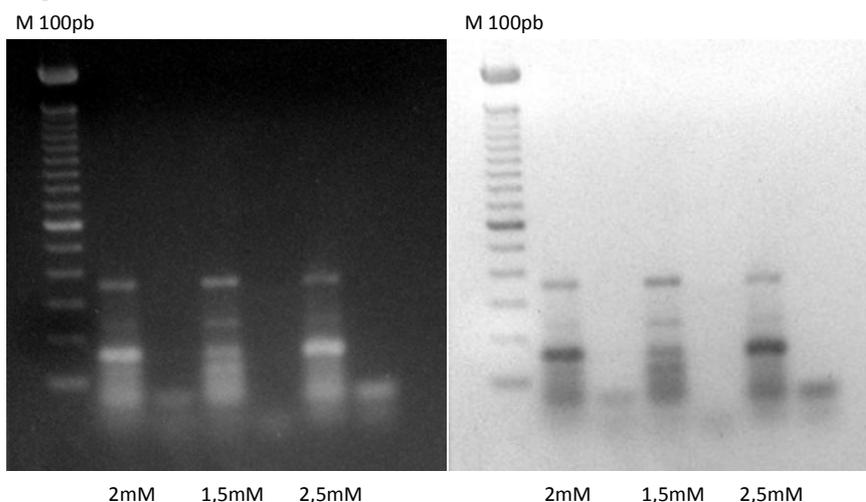


Fig. 21. Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR de *Bornavirus* aviário para determinação da concentração de cloreto de magnésio.

Legenda: Teste da quantidade magnésio, com 1,5mM (1,2 ul); 2,0mM (1,6 ul); e 2,5mM (2,0 ul). Utilizando-se c-DNA da amostra 5 (*Amazona rhodocorytha*-PDD7) e os primers 3 e 4 para a produção de um produto de 360pb.

Após estas definições dos melhores parâmetros, para a reação de RT-PCR foram iniciados os testes com 13 amostras suspeitas. Utilizando-se os pares de primers 3 e 4 para obtenção de um produto de 360 pb.

Foi encontrada a banda desejada na visualização em gel de agarose a 1,5% com as amostras 2, 5 e 13. A amostra 5 (*Amazona rhodocorytha*-PDD7) foi a mesma utilizada para a padronização dos parâmetros da PCR, portanto ela pode ser

considerada o controle positivo. A amostra 2 trata-se de uma arara piranga (*Ara macao*) PDD4, e a amostra 13 trata-se de uma maracanã verdadeira (*Primolius maracana*) PDD6.

Todas as amostras foram também aplicadas em gel de poliacrilamida. Neste, por ser mais sensível pode-se visualizar a banda esperada nas amostras 2, 5, 11 e 13 (Fig. 23). A amostra 11 trata-se de uma maracanã-açu (*Ara severa*) identificada como PDD8.

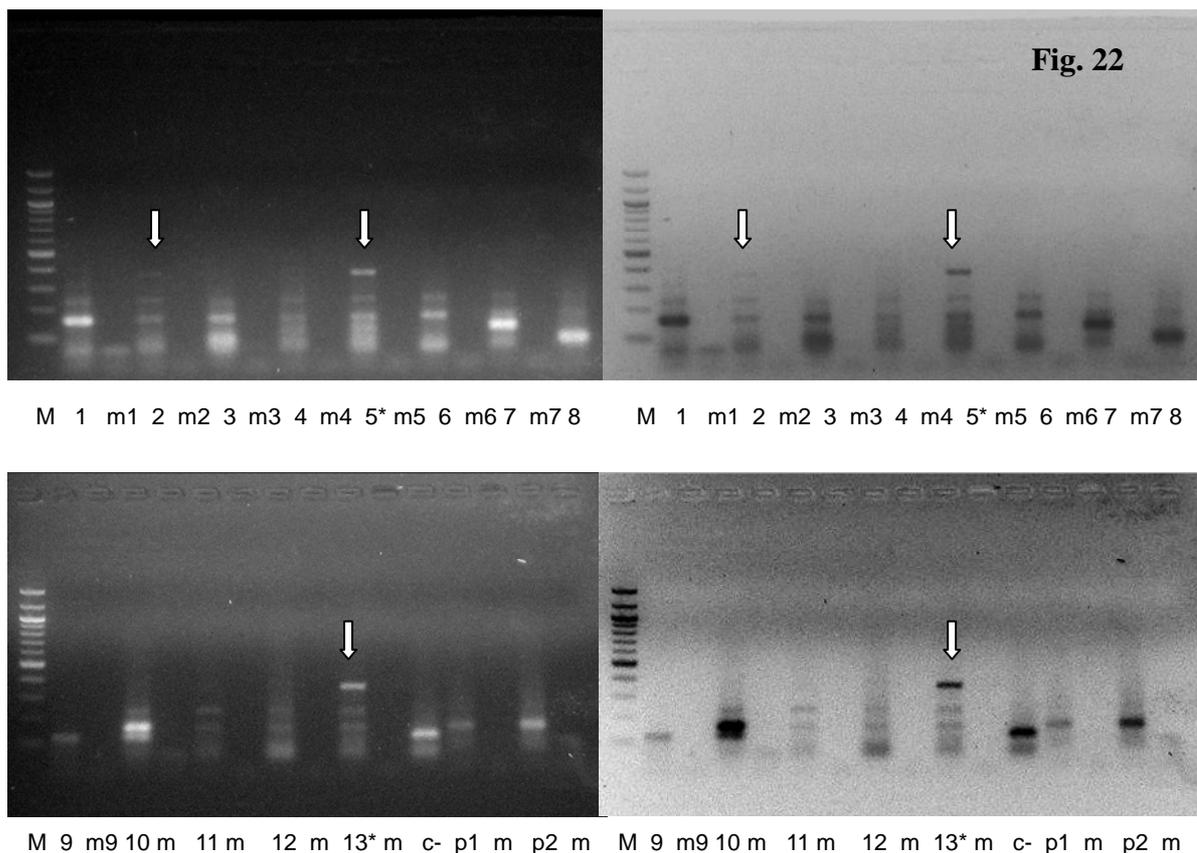


Fig. 22 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de *Bornavirus* aviário.

Legenda: Os oligonucleotídeos iniciadores 3 e 4 (Kistler et al., 2009) foram utilizados , com produto de 360 pb As amostras positivas estão indicadas (setas).

Canaleta 1 de cada gel = marcador de tamanho molecular ladder 100pb; amostra 1 = *Guaruba guarouba* necropsiada em 17-10-2010; amostra 2 = *Ara macao* necropsiada em 16-04-2010 identificada como PDD4; amostra 3= *Primolius maracana* 09-03-10 (PDD3); amostra 4 = *Pionus maximiliani* 04-05-2011 (PDD10); amostra5 = *Amazona rhodocorytha* 10-01-2011 (PDD7); amostra 6 = *Pionus fuscus* 07-10-2011; amostra 7 = *Amazona vinacea* 31-05-2011; amostra 8 = *Trichoglossus haematodus* 03-05-2011; amostra 9 = *Amazona vinacea* 04-05-2011 (PDD9); amostra 10 = *Amazona vinacea* 26-11-2010 (PDD5); amostra 11 = *Ara severa* 03-02-2011 (PDD8); amostra 12 = *Pionopsitta pileata* 18-07-2011; amostra 13 = *Primoluis maracana* 30-12-2010 (PDD6); amostra p1 = *Pionus menstrus* 04-11-2011; amostra p2 = *Pionus menstrus* 04-11-2011; m = respectivos mix; M = marcador Ladder 100pb.

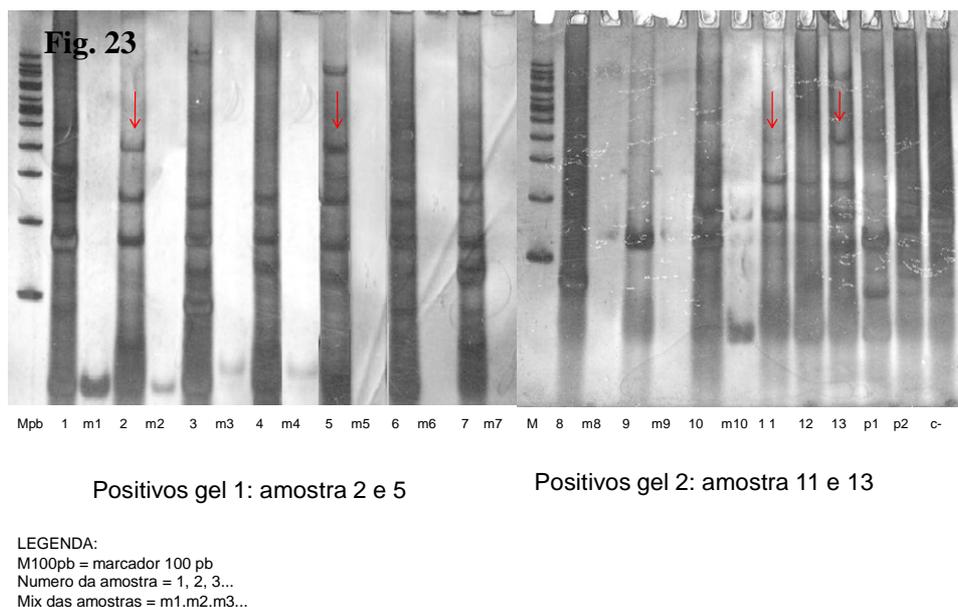


Fig. 23 – Eletroforese de produtos de PCR de *Bornavirus* aviário em gel de poliacrilamida corada por prata.

Legenda: Gel poliacrilamida corado por prata. Os oligonucleotídeos iniciadores 3 e 4 (Kistler et al., 2009) foram utilizados , com produto de 360 pb As amostras positivas estão indicadas (setas). Amostras 2, 5, 11 e 13.

amostra 1 = *Guaruba guarouba* necropsiada em 17-10-2010; amostra 2 = *Ara macao* necropsiada em 16-04-2010 identificada como PDD4; amostra 3= *Primolius maracana* 09-03-10 (PDD3); amostra 4 = *Pionus maximiliani* 04-05-2011 (PDD10); amostra5 = *Amazona rhodocorytha* 10-01-2011 (PDD7); amostra 6 = *Pionus fuscus* 07-10-2011; amostra 7 = *Amazona vinacea* 31-05-2011; amostra 8 = *Trichoglossus haematodus* 03-05-2011; amostra 9 = *Amazona vinacea* 04-05-2011 (PDD9); amostra 10 = *Amazona vinacea* 26-11-2010 (PDD5); amostra 11 = *Ara severa* 03-02-2011 (PDD8); amostra 12 = *Pionopsitta pileata* 18-07-2011; amostra 13 = *Primoluis maracana* 30-12-2010 (PDD6); amostra p1 = *Pionus menstrus* 04-11-2011; amostra p2 = *Pionus menstrus* 04-11-2011; m = respectivos mix; M = marcador Ladder 100pb.

A amostra 13 foi sequenciada e em análise no *GeneBank* demonstrou similaridade de 84% à 89% utilizando a sequência do fragmento obtido, com as amostras (FJ794746.1), (FJ794749.1), de bornavírus clássico BVD, e (JN014948.1), (JN035148.1), (GU249594.1) de bornavírus aviário BAV. Utilizando-se somente a melhor parte da sequência encontrada (representada na cor azul no programa *Applied Biosystem Sequence Scanner software*®), verificou-se uma similaridade de 97% com as amostras (JN014948.1), (JN035148.1), (GU249594.1) de bornavírus aviário BAV.

Novos sequenciamentos devem ser realizados para se chegar a uma sequência mais confiável. A qualidade da Taq utilizada para a reação de sequenciamento pode ter influenciado estes resultados. Não havia a disponibilidade da Taq Platinum apenas Gotac-Flex Promega.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as amostras 2, 5, 11 e 13 são positivas para bornavírus aviário.

Quadro 5 – Amostras positivas, panorama geral.

Nº Amostra no gel	Identificação Geral	Achados macroscópicos	Histo- patologia	Imuno- histoquímica	PCR EUA	PCR BR
2	PDD 4	+	+	-	-	+
5	PDD 7	+	+	+	+	+
11	PDD 8	+	-	-	-	+
13	PDD 6	+	+	+	-	+

Lierz *et al.* (2009) confirmou a presença de bornavírus aviário por RT-PCR em diversos órgãos de duas aves com sinais clínicos, incluindo amostras de tecido cerebral, tal como neste estudo. O autor confirmou ainda que aves aparentemente saudáveis, mas que tiveram contato com as aves doentes também

tiveram positividade comprovada à partir de amostras de *swab* cloacal.

No presente estudo não obteve-se autorização do proprietário do criadouro afetado, para coletas das aves vivas, com ou sem sinais clínicos que tiveram contato com as aves que desenvolveram PDD e vieram a óbito. Entretanto provavelmente

devem existir aves assintomáticas no criadouro, pois conforme já descrito os óbitos ocorreram de forma intermitente.

Kistley *et al.* (2008) reconfirmaram a presença de bornavírus aviário em amostras de psitacídeos com PDD, estudo que descreveu os pares de *primers* utilizados, com a obtenção de 62.5% de positividade (5/8) e 0% (0/8) nos controles negativos das amostras provenientes dos EUA e 71% (N=7) das amostras provenientes de Israel também com 0% (N=14) dos controles negativos. Os resultados sugeriram que a causa da PDD pode ser multifatorial embora dependa da presença do *Bornavírus*. Nas aves testadas por RT-PCR neste estudo 23,52% (N=17) foram positivas. É provável que tenhamos resultados falso-negativos decorrente possivelmente de degradação do RNA durante o processamento das amostras, pois as semelhanças encontradas à necropsia e na histopatologia de todos os casos deste mesmo criador são evidentes. Problemas com armazenagem de material, acção de RNAses podem ter ocorrido.

Kloet *et al.* (2009) também utilizaram os mesmos pares de *primers* para RT-PCR e comprovaram a presença de bornavírus aviário em araras aparentemente saudáveis através de amostras de *swabs* cloacais. Gancz *et al.*

(2009), conseguiram reproduzir a doença em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) saudáveis inoculando-as por diversas vias com um preparado de cérebro de aves com PDD, utilizando o mesmo par de *primers* do estudo de Kistley. A comprovação se deu através de histopatologia, imunohistoquímica e RT-PCR utilizando amostras de tecidos inclusive cérebro. Em outro estudo experimental em que jandaias da patagônia (*Cyanoliseus patagonis*) foram inoculadas, após o desenvolvimento da doença clínica e a realização da eutanásia, o PDD foi confirmado pela necropsia e pela histopatologia. A RT-PCR comprovou a presença de bornavírus aviário no cérebro das duas aves infectadas experimentalmente e comprovou sua ausência no cérebro da ave inoculada com salina utilizada como controle negativo (Gray *et al.*, 2010).

Em outro estudo para identificação do agente causador da PDD em três aves testadas a carga viral foi maior no cérebro do que nos demais tecidos (Honkavouri *et al.*, 2008). Na Áustria cérebro e proventrículo de várias aves foram testados simultaneamente na RT-PCR, em geral as amostras de cérebro tiveram resultados mais intensos (Weissenböck *et al.*, 2009). No Japão também utilizaram-se amostras de cérebro para diagnóstico por RT-PCR (Ogawa *et*

al., 2011). Kistley *et al.*, (2010) descreveram um surto natural de PDD em um criatório. O surto teve início com a introdução de ave sem quarentena. Em um primeiro momento o autor descreve que filhotes que tiveram contato desenvolveram sintomatologia clínica e vieram à óbito rapidamente. Depois 11 aves adultas desenvolveram sintomatologia e vieram à óbito, num total de 64 aves restantes 12 foram positivas para análise de RT-PCR sem desenvolver a sintomatologia.

No nosso estudo a forma de como a doença surgiu no criatório não foi esclarecida, porém dentre as aves que desenvolveram a doença e vieram a óbito a maracanã-açu (*Ara severa*) identificada na necropsia como PDD8 e na RT-PCR como amostra numero 11 (positiva) havia sido adquirida à pouco tempo de um criatório comercial para acasalar com uma da mesma espécie no plantel, entretanto a aproximação das aves não foi eficaz e esta ave foi colocada em um viveiro coletivo com maracanãs verdadeiras (*Primolius maracana*). Historicamente não se tinha nenhuma ave com a sintomatologia clínica ou achados de necropsia compatíveis por PDD neste criadouro, a *Ara severa* adquirida por se tratar de um filhote e ainda requerer tratamento especial (alimentação com papa de filhote) não

permaneceu na quarentena, sendo colocada diretamente na maternidade do criatório. Concluímos que existe a possibilidade desta ter sido a porta de entrada para a doença no criadouro.

6) Conclusões

O presente estudo não demonstrou incidência das doenças preconizadas pelo PNSA (micoplasmoses, salmoneloses e doença de Newcatle) nos psitacídeos nos criatórios pesquisados. O que não exclui a necessidade de manter-se uma vigilância em tais plantéis dado a importância econômica destes potenciais problemas frente à avicultura industrial. Além é claro, de com essa vigilância se cumprir as determinações da legislação brasileira.

Dentre as doenças importantes para a ordem Psittaciformes, foi comprovada a existência de infecções sub-clínicas por *Chlamydophila psittaci* através da análise de swabs cloacais e de fenda palatina, extraídas pelo método de NaI e sílica. E de infecções sub-clínicas pelo *Circovírus* da doença do bico e das penas dos psitacídeos através da análise de coágulos sanguíneos extraídos pela técnica de NaI e sílica.

Em relação à infecção por *Chlamydophila psittaci*, sua importância se deve ao fato desta doença ser uma importante zoonose. A existência de animais assintomáticos deve fortalecer a

necessidade de boas práticas de manejo e biosseguridade, principalmente em relação às pessoas envolvidas diretamente com seu manejo, sejam elas seus tratadores e veterinários, ou mesmo proprietários. Todas as pessoas que pretenderem obter tais aves como animais de estimação em criadouros comerciais devem ser conscientizadas da necessidade e cuidado em relação à higiene ou contato direto íntimo com estes animais, e uma atenção especial deve ser dada a pessoas com algum tipo de imunossupressão, crianças e idosos.

Uma atenção especial deve ser dada em relação à PBFd com a proximidade de criação de animais da fauna silvestre que normalmente não apresentam sinais clínicos, com animais da fauna exótica. Deveria existir uma separação maior entre as espécies nas

criações, para diminuir a chance desta e de outras doenças consideradas exóticas se tornarem adaptadas aos nossos animais, correndo risco inclusive de ocorrerem nas populações selvagens, como já ocorre por exemplo na Austrália.

A baixa incidência das parasitoses observada não deve ser interpretada como uma falta de importância destas infestações nos psitacídeos, e sim como um correto manejo preventivo realizado nos criatórios pesquisados.

Foi comprovada a existência da síndrome da dilatação do proventrículo pelo *Bornavírus* aviário em pelo menos um criadouro conservacionista em Minas Gerais, demonstrando que a técnica utilizada foi eficiente e sugerindo que infecções subclínicas possam existir na população estudada.

7) Referências bibliográficas

ALDOUS, E. W.; MANVELL, R. J.; COX, W. J. *et al.* Outbreak of newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*) in south-east England in July 2005. *Vet. Rec.*, v.160, n.14, p.482-484, 2007.

ALEXANDER, D.J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W. *et al.* (Eds.). *Diseases of poultry*. 9.ed. Iowa State University Press, 1991. pp.496-519.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: SAIF, Y. M. (Ed.). *Diseases of poultry*. 11.ed. Ames: Iowa State University, 2003. p. 63 - 92.

ALLGAYER, M.C. *Detecção de salmonella sp. em psitacídeos de cativeiro através da reação em cadeia polimerase PCR*. 2003. 54f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Avícola)-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

ALLGAYER, M.C.; MORAES, H.L.S.; ANDELIERI, S. L.; *et al.* *Verificação de infecção natural de Mycoplasma gallisepticum e Mycoplasma synoviae em psitacídeos do Criadouro Asas do Brasil - avaliação micoplasmológica e sorológica*. In: Encontro INTERNACIONAL DE ZOOLOGICOS, 6. E CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL, 25. 2001, Brasília. *Anais...* Brasília, 2001.

ALLGAYER, M.C.; CHIMINAZZO, C.; GABRIELLI, E. *et al.* Parasitológico de fezes em filhotes de arara azul grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) no Pantanal. In: Congresso de zoológicos do Brasil. 28. 2004. Rio de Janeiro. *Anais...*2004.

AMAZONA RHODOCORYTHA (2008). In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acessado em: 13 dezembro de 2011.

AMAZONA VINACEA (2009). In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acessado em: 13 dezembro de 2011.

ANDERY, D.A. *Avaliação sanitária de aves de rapina em triagem em Belo Horizonte-MG*. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

ARA MACAO (2009). In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acessado em: 13 dezembro de 2011.

ANDERSEN, A.A.; FRANSON, J. *Avian Chlamydiosis*. In: Nancy J.; Thomas, D.; Bruce Hunter, Carter, T. Aikinson. *Infection Disease of Wild Birds*. Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional, 2007. p. 303-316.

ANDERSEN, A. A. AND VANROMPAY, D. *Avian chlamydiosis*. In: Saif, Y. M. (ed). Diseases of Poultry, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, p.863-879. 2003.

ARAÚJO, C.P.; WERNECK, M.R.; GÓRSKY, A. *et al.* Pesquisa de parasitos em fezes de filhote de arara azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). In: Encontro de biólogos do CRB. 1. 2000. São Pedro. Anais.... 2000. p.88.

ARAÚJO, A.V. *Doença do bico e das penas: avaliação em psitacídeos nativos apreendidos em Minas Gerais*. 2010. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

BACIENSE, C.R. *Determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos de arara canindé (Ara ararauna), no Estado do Rio de Janeiro*. Dissertação, 2010. 42f. (Mestrado em Ciências Clínicas). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.

BALICKA-RAMISZ, A.; TOMZA-MARCINIAK, A.; PILARCZYK, B.; *et al.* Intestinal parasites of parrots. *Wil. Parazytol.* v.53, n.2, p.129-132, 2007.

BARNES, H.J. Parasites. in. HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. *Clinical Avian Medicine and Surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986. p 472-485.

BASSAMI, M.R., I. YPELAAR, D. BERRYMAN, G.E. WILCOX, AND S.R. RAIDAL. Genetic diversity of beak and feather disease virus detected in psittacine species in *Aust. Virol.* v.279.p.392-400, 2001.

BEECKMAN, D. S. A.; VANROMPAY, D. C. G. Zoonotic Chlamydoiphila psittaci infections from a clinical perspective. *Clin Micro.Infect.* v.15n.1,p.11-17, 2009.

BERHANE, Y.; JOHANSSON, M.; MONTELL, H. *et al.* Peripheral neuritis in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Avian Pathol.*,v.30, n.5., p.563-570, 2001.

BOOM, R.; SOL, C.; BELD, M. *et al.* Improved silica – Guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha – casein to silica particles. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.1, p.615-619, 1990.

BRASIL. Ministério da Arricultura Pecuária e Amastecimento. Instrução Normativa SDA nº. 44, de 23 de agosto de 2001. Anexo normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a micoplasmose aviária (*Mycoplasma gallisepticum* , *M. synoviae* e *M. melleagridis*). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p. 68, 24 ago. 2001. Seção 1. 10 p.

BRASIL. Ministério da Arricultura Pecuária e Amastecimento. Instrução Normativa nº03, de 09 de janeiro de 2002. Anexo normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* e livres ou controlados para *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*. *Diário Oficial da União*. Brasília/DF, 16 de janeiro de 2002. Seção 1, 9p. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1932>>. Acessado em: 12/06/2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Amastecimento- Instrução Normativa SDA nº. 32, de 13 de maio de 2002. Anexo normas técnicas de vigilância para doença de newcastle e influenza aviária, e de controle e erradicação para a doença de newcastle. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, p. 28, 14 mai. 2002.Seção 1. 14p.

BUCHALA, F.G.; ISHIZUKA, M.M.; MATHIAS, L.A.; *et al.* Ocorrência de reação sorológica contra *Salmonella Pullorum* em aves de “fundo de quintal” no Estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.* v.73, n.1, p.1-5, 2006.

CABANA, E. M. *Veterinary necropsy procedures*. Science City of Muñoz: CLSU Alumni Association, 2008. 47p.

CARNEIRO, M.B.; CALAIS, A.; MARTINS, I.V.F. Avaliação coproparasitológica e clínica de aves silvestres e exóticas mantidas em criatórios particulares no município de Alegre- ES. *Ci. Anim. Bras.* v.12, n.3, p.525-529, 2011.

CAXITO, F. A.; COELHO, F. M.; OLIVEIRA, M. E.; RESENDE, M. Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. *Vet. Res. Commun.*, v. 30, n. 8, p. 953-956, 2006.

CAMENISCH, G.; BANDLI, R.; HOOP, R. Monitoring of wild birds for newcastle disease virus in Switzerland using real time RT-PCR. *J.Wildl. Dis.*, v.44, n.3, p.772-776, 2008.

CASTRO A.G., HORTA R.S., MARQUES M.V.R., FERREIRA JÚNIOR, F.C., COSTA M.P., MARIN S.Y., VILELA D.A.R., DONATTI, R.V., ANDERY D.A., ARAÚJO A.V., RESENDE J.S., MARTINS N.R.S. 2009. Ocorrência da Doença do Bico e das Penas dos Psitacídeos em Periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e ring-necks (*Psittacula krameri*). Anais do XII Congresso ABRAVAS, Águas de Lindóia, SP, p.104.

CARRASCO, A.O.T.; ISSAKOWICZ, J.C.; MORAIS, M.T.G.F.; *et al.* Levantamento Sorológico de *Mycoplasma spp*, *Salmonella sp* e Doença de Newcastle em Pombos Domésticos (*Columba livia*) de Vida Livre. *Cient Ciênc Biol Saúde*. v.13, n.1, p.23-27, 2010.

CELEBI, B.S.; AK, S.A. A comparative study of detecting *Chlamydophila psittaci* in pet birds using isolation in embrionated egg and polymerase chain reaction. *Avian Disease*. v.11, p.489-493, 2006.

CUBAS, Z.S; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS,J.L. *Tratado de animais selvagens- medicina veterinária*. São Paulo: Rocca, 2006. p. 222-251.

DEEM, S.L.; NOSS, A.J.; CUELLAR, R.L.; KARESH, W.B.; Health Evaluation of free-ranging and captive blue-fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*) in the Gran Chaco, Bolívia. *J. Wildl. Med.* v.36,n.4,p.598-605, 2005.

DEEM, S.L.; LADWING, E.; CRAY, C.; *et al.* Health Assessment of the exi-situ population of st. Vincent parrots (*Amazona guildingii*) in St Vincent and the Grenadines. *J. Avi. Med. Sur.* v.22, n.2, p.114-122, 2008.

DEL ROYO, J.; ELLIOTT, A.; CHISTHIE, D.A.; Handbook of the birds of the world. Barcelona: Lynx editions, 2003.

DONELEY, R. J. T. Acute beak and feather disease in juvenile African grey parrots – an uncommon presentation of a common disease. *Aust. Vet. J.* v.81, p.206-207, 2003.

ECCO, R.; PREIS, I. S.; MARTINS, N. R. S. et al. An outbreak of chlamydiosis in captive psittacines. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v. 2, n. 2, p. 85-90, 2009.

FARMER, K.L.; HILL, G.E.; ROBERTS, S.R. Susceptibility of wild songbirds to the house finch strain of *Mycoplasma gallisepticum*. *J. Wild. Dis.* v.41, n.1, p.317-325, 2005.

FORSHAW, J.M.; COOPER, W.T. *Parrots of the world*. Melbourne: T.F.H. Publications, 1977. 584p.

FREITAS, M.F.L., OLIVEIRA, J.B., VOLCANTI, M.D.B.; et al. Parasitos gastrointestinales de aves silvestres en cautiverio en el estado de Pernambuco, Brasil. *Parasitol. Latinoam.*, v. 57, n. 1-2, 2002, p. 50-54.

FRIEND, M.; FRASON, J.C. *Field manual of wildlife diseases: general field procedures and diseases of birds*. Madison: USGS, 1999. 426 p.

FRITZ, B. A.; THOMAS, C. B.; YUILL, T. M.. Serological and microbial survey of *Mycoplasma gallisepticum* in wild turkeys (*Meleagris gallopavo*) from six western states. *J. Wildl. Dis.*, v.28, n.1, p.10-20, 1992.

GANCZ, A.Y.; KISTLER, A.; GRENINGER, A. et al. Experimental induction of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) inoculated with brain homogenates containing avian bornavirus 4. *Vir. J.*, v.6, n.1, p.100, 2009.

GAUD, J.; ATYEO, W.T. Discordances entre les aires de répartition géographique des parasites et celles de leurs hôtes. *Acarologia* v.18 n.1, p.329-344, 1976.

GAUD, J.; ATYEO, W.T. Feather mites of the world (*Acarina, Astigmata*): the supraspecific taxa. (Part. I). *Ann. Mus. R. Afr. Cent. Sci. Zool.* v.277, n.1, p.1-187, 1996.

GERLACH H. Viruses. In: Avian Medicine: Principles and Application In: Ritchie B. W., Harrison G.J. & Harrison L. R., Florida: HBD International, 1999. p.894-903.

GOMES, A.M.; COSTA, L.L.; VILELA, D.A.R. et al. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in dead captive psittacines in Belo Horizonte, Brazil. *Braz. J. Poul. Sci.*, v.12, n.2, 75-78, 2010.

GOUGH, R.E.; DRURY, S.E.; HARCOURT-BROWN, N.A.; HIGGING, R.J. Virus like particles associated with macaw wasting disease. *Vet. Rec.*, v.139, n.1, p.24, 1996.

GRECCO, G.; CORRENTE, M.; MARTELLA, V. Detection of *Chlamydia psittaci* in Asymptomatic Animals. *J. Clin. Microb.* v.43, n.10, p.5410-5411, 2005.

GREINER, E.C.; RITCHIE, B.W. Parasites. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R (Eds.). *Avian medicine: principles and application*. Lake Worth, FL: Wingers Publishing, 1994. p.1007-1029.

GUSSONI, F. R. A.; DURIGON, E. L.; OLIVEIRA, D.B.L. Co-infection by psittacine beak and feather disease virus and Pacheco Parrot Disease virus in *Amazona aestiva*. In: XVII Encontro Nacional de Virologia, 2006, Campos do Jordão. Anais do XVII Encontro Nacional de Virologia. Campos do Jordão : Sociedade Brasileira de Virologia, 2006. v. 11. p. 98-99.

GULLAND, G.L. A note on psittacosis: with reports of two related cases. *Brit. Med. J.* v. 23, n._, p.308-309, 1924.

HARKINEZHAD, T. *Molecular epidemiology of Chlamydophila psittaci in psittacine birds and humans and prevention by DNA vaccination*. 2008.169f. PhD thesis, Ghent University, Ghent, Belgium.

HARRISON, G.J.; LIGHTFOOT, B.S. *Clinical avian medicine*. Palm Beach, Flórida: Spix Publishing, 2006. 1008p.

HECKERT, R.A. Newcastle disease in cosmorants. *Can. Vet. J.*, v. 34, n.3, p. 184, 1993.

HERRERA, M.D.; KHAN, S. R.; KALETA, E. F.; MUÈ LLER, H.; DOLZ, G.; NEUMANN, U. Serological Status for *Chlamydophila psittaci*, Newcastle Disease Virus, Avian Polyoma Virus, and Pacheco Disease Virus in Scarlet Macaws (*Ara macao*) Kept in Captivity in Costa Rica. *J. Vet. Med.*v.48,p.721-726, 2001.

HIDASI, H. W. *Detecção de enterobacteriaceae e Chlamydophila sp. em psitacídeos provenientes do centro de triagem de animais silvestres de Goiás*. 2010. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

HILBE,M.; HERRSCHE, R.; KOLODZIEJEK, J. *et al.* Shrews as reseroir hosts of borna disease virus. *Emerg. Infect. Dis.* v.12, n.1, p.675-677, 2006.

HOFFMAN, R. W.; LUTTRELL, M. P.; DAVIDSON W. R., et al. Mycoplasmas in wild turkeys living in association with domestic fowl. *J. Wildl. Dis.*, v. 33, n. 3, p. 526 - 535, 1997.

HOFSTATTER. P.G.; KAWAZOE, U.; Two New Eimeria Species (Apicomplexa: Eimeriidae) From the Yellow-Crowned Amazon *Amazona ochrocephala* (Aves: Psittacidae) in Brazil. *J. Parasitol.* v.85, n.1, p.769–770, 2011a.

HOFSTATTER. P.G.; GUARALDO, A.M.A. A New Eimerian Species (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Blue-Fronted Amazon Parrot *Amazona aestiva* L. (Aves: Psittacidae) In Brazil. *J. Parasitol.* v.97, n.6, p.1140-1141, 2011b.

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

HONKAVUOURI, K.S.; SHIVAPRASAD, H.L.; WILLIAMS, B. L. *et al.* Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg. Infec. Dis.*, v.14, n.12, p.1883-1886, 2008.

HORTA, R.S.; COSTA, M.P.; MARQUES, M.V.R. *et al.* *Mycoplasma gallisepticum* em *Amazona aestiva* no centro de triagem de animais silvestres -IBAMA (CETAS) de Belo Horizonte, Minas Gerais. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17; 2008, Belo Horizonte. *Trabalhos apresentados...* Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2008.

KALETA E. F. Section 1: Viral diseases, avian herpesviruses. In: Thomas N. J.; Hunter B. D. & Atkinson C. T.(Eds.), *Inf. Dis. Wil. Bir.*, 3rd Ed. Ames. Iowa. p. 63-86, 2007.

KANASHIRO, A.M.I.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P.; *et al.* Persistência de *Salmonella sp.* após antibioticoterapia em psitacídeos pertencentes a um criadouro comercial. *Arq. Inst. Biol.*, v.69, n.2, p.99-101, 2002.

KARESH, W.B.; CAMPO, A.B.S.; BRASEKTON, W.E.; PUNCHE, H.; COOK, R.A. Helth evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara spp.*) in Peru. *J. Wild. Med.* v.4, n.28, p.368-377, 1997.

KELLER, D.L.; HONKAVUORI, K.S.; BRIESE, T.; LIPKIN, W.I.; MUTHUSWAMY, A.; STEINBERG, H.; SLADKY, K. Proventricular dilatation disease associated with Avian bornavirus in a scarlet macaw (*Ara macao*). *J. Vet. Diagn. Invest.* v.22, n.1, p.961-965, 2010.

KHALESI, B., BONNE, N., STEWART, M., SHARP, M., RAIDAL, S.R. 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 loriids. *J. Gen. Virol.* v.86, n.1, p. 3039-3046, 2005.

KIRSTEN, V.K.G.; LOWENSTINE, L.J.; GILARDI, J.D.; MUNN, C.A. A survey for selected viral, Chlamydial, and parasitic disease in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and tui parakeets (*Brotogeris sanctithomae*) in Peru. *J. Wild. Dis.* v.4, n.31, p.523-528, 1995.

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

KISTLER, A.L.; SMITH, J.M.; GRENINGER, A.L.; DERISI, J.L.; GANEM, D. Analysis of naturally occurring avian bornavirus infection and transmission during an outbreak of proventricular dilatation disease among captive psittacine birds. *J. Virol.*, n.4, v.28, p.2176-2179, 2010.

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

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. *et al.* *Diagnóstico microbiológico*. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.

LEIGHTON, F. A.; HECKERT R.A. Newcastle disease and related avian paramyxoviruses. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. *Infectious diseases in wild birds*. Iowa: Blackwell, 2007. p.3–16.

LEMOS, M.; DA SILVA, G. M.; FEDULLO, L. P. L. *Salmonella* in wild birds in the Rio de Janeiro Zoological Garden, Brazil. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v.6, n.1, p40-43, 1999.

LEY D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Saif, Y.; Barnes, H. J.; Glisson, J. R.; Fadly, A. M.; McDougald, L. R.; Swayne, D. E. *Diseases of Poultry*. Iowa State Press, Ames: Iowa, 2003. p. 722-744.

LIERZ, M.; SCHIMIDT, R.; BRUNNBERG, L. *et al.* Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from free-ranging birds of prey in Germany. *J. Vet. Med.*, v.37, n.5, p.63-67, 2000.

LIERZ, M.; HAGEN, N.; LUESCHOW, D. *et al.* Use of polymerase chain reactions to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma imitans*, *Mycoplasma iowae*, *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma synoviae* in birds of prey. *Avian Pathol.*, v.37, n.5, p.471-476, 2008.

LIERZ, M.; HAGEN, N.; HERNADEZ-DIVERS, S.J. *et al.* Occurrence of mycoplasmas in free-ranging birds of prey in german. *J. Wildl. Dis.*, v.44, n.4, p.845-850, 2008a.

LIERZ, M.; HAFEZ, M.; HONKAVUOURI, K.S.; GRUBER, A.D.; OLIAS, P.; ABDELWHAB, E.M.; KOHLS, A.; LIPKIN, W.I.; BRIESE, T.; HAUCK, R. Anatomical distribution of avian bornavirus in parrots, its occurrence in clinically healthy birds and ABV-antibody detection. *Avian Pathol.*,v.38, n.6, p.491-496, 2009.

LISTA das aves do Brasil. 8.ed. CBRO, 2009. Disponível em: <<http://www.cbro.org.br>>, Acessado em: 21/06/2010.

LOIKO, M. R.; ABILLEIRA, F.; MOTTIN, V. D. *et al.* Isolamento de salmonella braenderup em arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *Ciênc. Rur.*, v.39, n.8, p.2542-2545, 2009.

LUMEIJI, J. T.; OVERDUIN, L.M. Plasma chemistry references values in Psittaciformes. *Av. Pathol.* v.19, n.1, p. 235-244, 1990.

MACARI, M.; BERCHIERI JUNIOR. A. *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. 490p.

MANNL, A.; GERLACH, H.; and LEIPOLD, R.; Neuropathic gastric dilatation in psittacines. *Avian Dis.*, v.31, n.1, p.214-221, 1987.

MARIETTO-GONÇALVES, G.A.; MARTINS, T.F.; ALMEIDA, S.M.; PEREIRA, R. E.P.; LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L. Presença de cistos de *Balantidium* sp. em amostras fecais aviárias. *in: Mostra Científica da FMVZ*, 9. 2005, Botucatu-SP, 2005.

MARIETTO-GONÇALVES, G. A.; LIMA, E. T.; ANDREATTI FILHO, R. Doenças respiratórias em aves atendidas no laboratório de ornitopatologia da FMVZ-

UNESP/Botucatu-SP, BRASIL, nos anos de 2005 a 2006. *Arc. Vet. Sc.*, v. 13, n.1, p. 40-45, 2008.

MARQUES, M.V.R. *Avaliação sanitária de cracídeos e tinamídeos de cativeiro no Estado de Minas Gerais*. 2010. 82f. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

MENÃO, M. C.; BOTTINO, J. A.; BIASIA, I. *et al.* Infecção por *Salmonella Typhimurium* em Arara Azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *Arq. Inst. Biol.*, v.67, n.1, p.40-43, 1999.

NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, M. G. F. *et al.* Avian mycoplasmosis Update. *Braz. J. Pout. Sci.*, v.7, n.1, p1-9. 2005.

OGAWA, H.; SANADA, Y.; SANADA, N.; KUDO, M.; TUCHIYA, K.; KODAMA, T.; UETSUKA, K. Proventricular dilatation disease associated with avian bornavirus infection in a Citron-crested cockatoo that was born and hand-reared in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, v.1 n.1 p.100-103. 2011.

OLIVEIRA Jr. J.G.; PORTZ, C.; LOUREIRO, B.O.; SCHIAVO, B.A.; FEDULLO, L.P.L.; MANZUR, C.; ANDRADE, C.M. Vírus da doença de Newcastle em aves não vacinadas no Estado. *Cie. Rur.*, v. 33, n. 2, 2003.

PAULILLO, A.C.; DA SILVA, G.S.; DORETTO JUNIOR, L. Doença de Newcastle. In: *Doença das Aves*. Cap.5,2. 266-281. Campinas: FACTA, 2000.

PAULILLO, A.C.; SILVA, G.S.; DORETTO JUNIOR, L. *et al.* F. Importancia das perdzizes (*Rhynchotus rufescens*) como fonte potencial de vírus patogênico da doença de Newcastle para aves domésticas. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.3, p.313-317, 2005.

PERRY, R.A. A psittacine combined beak and feather syndrome. In *Proceedings 55 of Courses for Veterinarians, Cage and Aviary Birds*, T. G. Hungerford (ed.). Sidney, Australia. *Com. Vet. Sc.* v.55 n.73, p.81-108, 1981.

PIÇARRA, J.P.S.C. *Estudo sobre a detecção do circovírus aviário em psitacídeos domésticos na região de Barcelona – Espanha*. 2009.42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

PIONOPSITTA PILEATA (2009). In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acessado em: 13 dezembro de 2011.

PIONUS MAXIMILIANI (2009). In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acessado em: 13 dezembro de 2011.

PRIMOLIUS MARACANA (2008). In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acessado em: 13 dezembro de 2011.

RAGHAV, R.; TAYLOR, M.; DELAY, J.; OJKIC, D.; PEARL, D.L.; KISTLER, A.L.; DERISI, J.L.; GANEM, D.; SMITH, D.A. Avian bornavirus is present in many tissues of psittacine birds with histopathologic evidence of proventricular dilatation disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* v. 22, n.1, p.495-508, 2010.

- RAHAUS, M.; WOLFF, M.H. Psittacine beak and feather disease: a first survey of the distribution of beak and feather disease virus inside the population of captive psittacine birds in Germany. *J. Vet. Med.* v.50, p.368–371, 2003.
- RAIDAL, S. R., C. L. MCELNEA, AND G. M. CROSS. Seroprevalence of psittacine beak and feather disease in wild psittacine birds in New South Wales. *Aust. Vet. J.* v.70, n.1, p.137–139, 1993.
- RAMADA, M.R.F.L. *Doença da dilatação de proventriculo: uma bornavirose*. 2009. 62f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- RASO, T. F.; BERCHIERI JUNIOR, A.; PINTO, A. A. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive amazon parrot in Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 33, n.1, p. 118–121, 2002.
- RASO, T. F.; GODOY, S. N.; MILANELO, L. *et al.* An outbreak of Chlamydiosis in captive blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) in Brazil. *J. Zoo and Wildl. Med.*, v. 35, n. 1, p. 94-96, 2004.
- RASO, T. F.; SEIXAS, G. H. F.; GUEDES, N. M. R. *et al.* *Chlamydophila psittaci* in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso de Sul, Brazil. *Vet. Microbiol.*, v. 117, n.1, p. 235-241, 2006.
- RASO, T.F. *Clamidiose aviária* in: **Patologia aviária** Barueri: Manole, p.367-374. 2009.
- RELATÓRIO NACIONAL SOBRE O TRÁFICO DE FAUNA SILVESTRE, 1. (2002). Brasília: Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres (Renctas), 2002. 108p.
- RINDER, M.; ACKERMANN, A.; KEMPF, H. *et al.* Broad tissue and cell tropism of avian bornavirus in parrots with proventricular dilatation disease. *J. Virol.*, v.83, n.11, p.5401-5407, 2009.
- RITCHIE, B.W. *Circoviridae*. In *Avian Viruses, Function and Control*, B.W. Ritchie (Eds.). Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida, 1995. p. 223–252.
- RITCHIE, B.W., NIAGRO, F.D., LATIMER, K.A., LUKERT, P.D., STEFFENS, W.L., RAKICH, P.M., PRITCHARD, N. Ultrastructure, protein composition, and antigenic comparison of psittacine beak and feather disease virus purified from four genera of psittacine birds. *J. Wild. Dis.* v.26, n.2, p.196–203, 1990.
- ROONEY, M. B.; BURKHARD, M.J.; GREINER, E.; *et al.* Intestinal and blood parasites in Amazon parrots destined for relocation in Guatemala. *J. Zoo Wildl. Med.* v.32, n.1, p. 71–73, 2001.
- ROTT, R.; BEEHT, H.: Natural and experimental borna disease in animals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v.190, n.1, p.17-30, 1995.

- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2007. 264p.
- SCHMIDT, E. M. S.; LOCATELLI -DITTRICH, R.; SANTIN, E.; *et al.* Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão. *Arch. Vet. Sci.*, v 12, n.3. p.09-20, 2007
- SENTHURAN, S.; VIJAYARANI, K.; KUMANAN, K. *et al.* Pathotyping of newcastle disease virus isolates from pet birds. *Acta Virol.*, v.49, n.3, p.177-182, 2005.
- SICK, H. *Ornitologia brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 912p.
- SIGRIST, T. *Aves do Brasil: uma visão artística*. São Paulo: Ediatora Avis Brasilis, 1996. 672p.
- SILVA, S.O.; OLIVEIRA, H.H.; FRICCIOLO, R.H.; SERRA-FREIRE, N.M. Malófagos parasitas de aves campestres cativas do Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, Sorocaba, Estado de São Paulo, Brasil. *Entomol. Vect.* v.11, n.2, p.333-339, 2004.
- SILVA, S.O.; OLIVEIRA, H.H.; TEIXEIRA, R.H.F.; AMORIM, M. Malófagos (*Phthiraptera, Amblycera, Ischnocera*) em aves cativas no sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Entom.* v.53, n.3, p.495–497, 2009.
- SNYDER, N., MCGOWAN, P., GILARDI, J. *et al.* *Parrots: status survey and conservation action plan 2000–2004*. Gland: IUCN, [200-]. 180p.
- SOUSA, E. *Pesquisa de agentes etiológicos patogênicos para galinhas de produção, em aves selvagens próximas as instalações avícolas*. 2007. 73f. Dissertação - apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, SP.
- THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B.; ATKINSON, C.T. *Diseases of wild birds*. Iwoa: Blackwell Publishing, 2007. 484p.
- THRALL, M.A.; BAKER, D. C.; DENICOLA, D.; *et al.* *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, 518 p.
- TOCIDLOWSKI, M. E. Medical Management of Curassows. In: FOWLER M. E; MILLER R. E. (Eds.). *Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*. 6.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 186 - 190.
- TSAI, S. S.; HIRAI, K.; ITAKURA, C. Histopathological survey of protozoa, helminths and acarids of imported and local psittacine and passerine birds in Japan. *Jap. J. Vet. Res.* v.40, n.1, p.161–174, 1992.
- UPTON, S. J.; WRIGHT, T.F. A new species of *Eimeria*(Apicomplexa) from the orange-fronted conure, *Aratinga canicularis*(Psittaciformes), in Costa Rica. *A. Protozoo.* v.33, n.1, p.117–119, 1994.

VALLE, S.F.; ALLGAYER, M.C.; PEREIRA, R.A.; *et al.* Parâmetros de bioquímica sérica de machos, fêmeas e filhotes de Araras Canindé (*Ara ararauna*) saudáveis mantidas em cativeiro comercial. *Cie. Rur.*, v.38, n.3, p.711-716, 2008

VALIM, M.P.; TEIXEIRA, R.H.F.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N.M. Malófagos (Phthiraptera) recolhidos de aves silvestres no Zoológico de São Paulo, SP, Brasil. *Rev. Bras. Entom.* v.49, n.4, p.584-587, 2005.

VANROMPAY, D.; DUCATELLE R.; HAESEBROUCK, F. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet. Microbiol.*, v. 45, p. 93-119, 1995.

VANROMPAY, D. HARKINEZHAD, T.; WALLE, M.; BEECKMAN, D.; DROOGENBROECK, C.; VERMINNEN, K.; LETEN, R.; MARTEL, A.; CAUWERTS, K. *Chlamydia psittaci* Transmission from Pet Birds to Humans. *Emer. Infect. Dis.* v.13, n.7, p.1108-1110, 2007.

VICENTE, J.J.; RODRIGUES, H.O.; GOMES, D.C.; *et al.* Nematóides do Brasil. Parte IV: nematóides de aves. *Revta. bras. Zoo.* v.12, n.1, p.1 – 27, 1995.

VILELA, D.A. *Diagnóstico da avifauna encaminhada para os centros de triagem de animais silvestres (CETAS) do Brasil e ocorrência de clamidiose aviária no CETAS de Belo Horizonte, MG.* 2012. 154f. Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Belo Horizonte-MG.

WEISSENBOCK, H.; BAKONYI, T.; SEKULIN, K.: Avian bornaviruses in psittacine birds from Europe and Australia with proventricular dilatation disease. *Emerg. Infect. Dis.* v.15, n.1, p.1453-1459, 2009.

WEISSENBOCK, H.; SEKULIN, K.; BAKONYI, T. Novel avian bornavirus in a non psittacine species (Canary: *Serinus canaria*) with enteric ganglioneuritis and encephalitis. *J. Virol.*, v.83, n.1, p.11367-11371, 2009.

YODER JUNIOR, H. W. *Avian mycoplasmosis* In: HOFSTADT, M. S. (Ed.). *Diseases of poultry.* 8.ed. Iowa: Mosby- Wolfe, 1998. p. 187-200.

YPELAAR, I.; BASSAMI M.R.; WILCOX G.E.; RAIDAL S.R. A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Vet. Microbiol.* v.68, n.1, 141-148, 1999.