

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – CIÊNCIA ANIMAL

SARA ELIS SCHMITT

**BORNAVÍRUS EM PSITACÍDEOS MANTIDOS EM CATIVEIRO NO ESTADO DE
SANTA CATARINA: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA**

LAGES, SC

2021

SARA ELIS SCHMITT

**BORNAVÍRUS EM PSITACÍDEOS MANTIDOS EM CATIVEIRO NO ESTADO DE
SANTA CATARINA: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Renata Assis Casagrande

LAGES, SC

2021

Schmitt, Sara Elis

BORNAVÍRUS EM PSITACÍDEOS DE CATIVEIRO NO
ESTADO DE SANTA CATARINA: CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA / Sara Elis Schmitt. -- 2021.
66 p.

Orientadora: Renata Assis Casagrande
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2021.

1. Doença da dilatação proventricular. 2. Bornavirose. 3.
Doença emergente. 4. Vírus RNA. 5. Psittaciform orthobornavirus. .
I. Casagrande, Renata Assis. II. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

SARA ELIS SCHMITT

**BORNAVÍRUS EM PSITACÍDEOS MANTIDOS EM CATIVEIRO NO
ESTADO DE SANTA CATARINA: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
EPIDEMIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

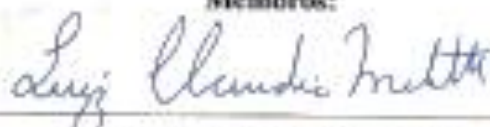


Prof.^a Dr.^a Renata Assis Casagrande

Orientadora

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Membros:



Prof. Dr. Luiz Cláudio Miletto

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)



Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias

Universidade de São Paulo (USP)

Lages, 26 de fevereiro de 2021.

Aos meus pais, por todo o apoio integral e
aos animais, por existirem.

AGRADECIMENTOS

A vida é feita de momentos que fazem parte de nós, pois deixamos um pouco de si e carregamos um pouco do momento conosco, por isto sou grata por esta experiência. Sempre acreditei que daria certo. Agradeço aos meus amados pais pela base tão forte que formamos, ao meu companheiro por estar presente mesmo longe, e por me ampararem dia e noite.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Renata Assis Casagrande pela oportunidade, aprendizados, por acreditar assim como eu que os animais selvagens merecem reconhecimento científico, e por me apresentar e incentivar também na área da Medicina Veterinária Legal com estes animais.

Agradeço ao professor Dr. Luiz Claudio Miletto do Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores (CAV-UDESC) pelo suporte e por permitir que este laboratório se tornasse minha segunda casa temporária, assim como por todos os colegas de lá que me receberam tão bem. Agradeço especialmente a Msc. Gabriella Bassi das Neves pelo auxílio na padronização da técnica de extração de RNA e RT-PCR, pelo companheirismo diário e pela grandiosa amizade. Agradeço ao Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa pela gentileza de sempre e por emprestar estruturas necessárias para o armazenamento das amostras no Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA- CAV/UDESC).

Agradeço aos meus especiais amigos, Jéssica Aline Withoeft, Leonardo da Costa Silva e Lucas Marian, por já termos um laço de afinidade anterior e podermos nos aproximar mais ainda nesse período, que dividiam comigo não somente uma sala, mas tudo, pelos dias de luta e glória, por sermos família! Aos demais colegas da pós-graduação Thierry Grima de Cristo, Giovana Biezu, Fábio Santiani e Aline da Rosa Maciel agradeço o aprendizado que cada um me proporcionou. Agradeço aos meus amigos externos, seja da faculdade, do esporte, de afinidade de área, pelos momentos de descontração e apoio.

Meus agradecimentos a todos profissionais e colegas que ajudaram no momento das coletas ou de alguma outra forma no projeto, assim como os estagiários do Grupo de Patologia Veterinária (GPVCAV/UDESC) pelo auxílio durante a rotina no laboratório, aos bolsistas, especialmente ao de iniciação do projeto João Vitor Bilicki pela parceria durante a execução. Também agradeço pela Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) pelo programa de pós-graduação em Ciência Animal e sua qualidade, assim como à Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa proporcionando dedicação exclusiva à pesquisa.

“Podemos julgar o coração de um homem pela
forma como ele trata os animais”

Immanuel Kant, filósofo

RESUMO

O Bornavírus aviário (BVA) é o causador da doença da dilatação proventricular (DDP), emergente e frequentemente fatal em psitacídeos. Possui distribuição mundial, mas no Brasil há poucos dados sobre sua abrangência. Objetiva-se determinar a prevalência e os fatores associados a infecção por BVA em psitacídeos mantidos em cativeiro no estado de Santa Catarina. Realizou-se um estudo transversal com 192 aves de dois criatórios (A e B), utilizando suabe da coana, do esôfago, da cloaca e coleta de pena totalizando 768 amostras submetidas a transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) utilizando como gene alvo a proteína matriz (M) com produto final de 350 pares de base (pb). Dados foram coletados, como espécie, gênero, idade, escore corporal, qualidade das penas e histórico, analisados por meio de estatística descritiva e por regressão logística. A prevalência total foi de 35,9% (69/192), no criatório A de 40,4% (42/104) e no criatório B de 30,7% (27/88). O suabe de coana apresentou positividade de 58,0% (40/69), cloaca 50,7% (35/69), esôfago 43,5% (30/69) e pena 21,7% (15/69) com aves positivas em mais de uma amostra. Foram amostrados 29 espécies de psitacídeos, sendo a maioria nativa, 49,0% (94/192) das espécies ameaçadas de extinção e 58,0% (40/69) destas estavam infectadas. As três espécies mais afetadas foram Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), Pagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) e Tiriba-da-testa-vermelha (*Pyrrhura frontalis*). Dos dados epidemiológicos analisados, nenhum apresentou relação com a infecção por BVA. Nos psitacídeos positivos, 88,4% (61/69) estavam saudáveis e 8,7 (6/69) apresentavam alterações clínico-comportamentais. Ocorreu 15,9% (11/69) de óbitos dentre os positivos e 2,9% (2/69) morreram com lesões sugestivas de DDP. A utilização de amostras conjuntas foi eficaz para o diagnóstico clínico de BVA e determinou uma prevalência elevada em psitacídeos mantidos em cativeiro no estado, com maior abrangência no criatório comercial, em espécies do gênero *Amazona*, assintomáticos e oriundos de translocação por doação.

Palavras-chave: Doença da dilatação proventricular. Bornavirose. Doença emergente. Vírus RNA. *Psittaciform orthobornavirus*.

ABSTRACT

Avian bornavirus (ABV) is the cause of the of proventricular dilatation disease (PDD), emerging and often fatal in psittacines. It has worldwide distribution, but in Brazil there is little data on its dissemination. The objective is to determine the prevalence and factors associated with ABV infection in captive psittacines in the state of Santa Catarina. A cross-sectional study was carried out with 192 birds from two captive psittacine breeding facility (A and B), using choana, esophagus and cloaca swab, and feather collection totaling 768 samples for reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) using as gene targeting the protein (M) with a final product of 350 base pairs. Data were collected, such as species, gender, age, body score, quality of feathers and history when available. The total prevalence was 35.9% (69/192), in captive A 40.4% (42/104) and in captive B 30.7% (27/88). The choana swab showed positivity of 58.0% (40/69), cloaca 50.7% (35/69), esophagus 43.5% (30/69) and feather 21.7% (15/69) with positive birds in more than one sample. Among the 29 species of psittacines sampled, the majority were native, with 49.0% (94/192) of endangered species and 58.0% (40/69) of these were infected. The three most affected species were Blue-fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*), Vinaceous-breasted Amazon parrot (*Amazona vinacea*) and Reddish-bellied conure (*Pyrrhura frontalis*). Of the epidemiological data analyzed, none was related to BVA infection. In the positive psittacines, 88.4% (61/69) were healthy and 8.7% (6/69) had clinical and behavioral diseases. There was 15.9% (11/69) of deaths among the positive and 2.9% (2/69) died with lesions suggestive of PDD. The use of sets samples was effective for the clinical diagnosis of ABV and determined a high prevalence in captive psittacines in the state, with greater scope in commercial captive, in species of the genus *Amazona*, asymptomatic and from translocation by donation.

Keywords: Proventricular dilation disease. Bornavirose. Emerging disease. Vírus RNA. *Psittaciform orthobornavirus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição de casos de Bornavírus Aviário (BVA) em psitacídeos no Brasil.	16
Figura 2 - Relação dos psitacídeos cativos positivos para Bornavírus aviário (BVA) por RT-PCR de acordo com o tipo de amostra.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise descritiva de psitacídeos mantidos em cativeiro com infecção por Bornavírus aviário (BVA), de acordo com cada variável.	38
Tabela 2 - Distribuição das frequências e características das espécies de psitacídeos mantidos em cativeiro do estudo de prevalência para Bornavírus aviário (BVA).	39
Tabela 3 - Origem dos psitacídeos positivos para Bornavírus aviário (BVA) nos criatórios A e B do estado de Santa Catarina.	40
Tabela 4 - Análise de regressão logística para fatores associados a positividade para Bornavírus aviário em psitacídeos mantidos em cativeiro no estado de Santa Catarina.	41
Tabela 5 - Resultado comparativo do RT-PCR entre as amostras positivas para Bornavírus aviário (BVA) em psitacídeos mantidos em cativeiro.	42
Tabela 6 - Correlação entre os resultados das amostras de suabe de cloaca com suabe de coana, esôfago e material de pena através do RT-PCR para Bornavírus aviário (BVA) em psitacídeos mantidos em cativeiro.	43
Tabela 7 - Resultado comparativo do RT-PCR de Bornavírus aviário (BVA) entre os tipos de amostras positivas nos psitacídeos coletados.	44
Tabela 8 - Psitacídeos positivos para Bornavírus aviário (BVA) com alterações clínico-comportamentais no momento da coleta.	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	OS PSITACÍDEOS.....	18
3.2	BORNAVÍRUS AVIÁRIO	19
3.2.1	Transmissão	20
3.2.2	Manifestação clínica do Bornavírus em psitacídeos	21
3.2.3	Patogenia, lesões macroscópicas e histológicas	22
3.2.4	Diagnóstico	24
3.2.4.1	<i>Métodos para detectar aves com BVA.....</i>	24
3.2.4.2	<i>Métodos para detectar aves doentes devido a infecção por BVA</i>	25
3.2.5	Tratamento e Controle	27
4	BORNAVÍRUS EM PSITACÍDEOS MANTIDOS EM CATIVEIRO NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA	29
4.1	INTRODUÇÃO.....	31
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.2.1	POPULAÇÃO DE PSITACÍDEOS UTILIZADOS NO ESTUDO.....	32
4.2.2	AUTORIZAÇÕES PARA O ESTUDO	33
4.2.3	COLHEITA DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	33
4.2.4	COLHEITA DAS AMOSTRAS	34
4.2.5	DETECÇÃO MOLECULAR DE BORNAVÍRUS.....	34
4.2.5.1	<i>EXTRAÇÃO DE RNA</i>	34
4.2.5.2	<i>RT-PCR DE BORNAVÍRUS AVIÁRIO</i>	36
4.2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4.3	RESULTADOS	38
4.4	DISCUSSÃO	46
4.5	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICE	64

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta 88 espécies de psitacídeos, que representam cerca de 22,3% dos psitacídeos da família Psittacidae do mundo e mais de 15% destas espécies nativas estão classificadas em ameaçadas de extinção de acordo com o livro vermelho da fauna brasileira do Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade (ICMBIO) (MMA, 2018) e a Lista de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (IUCN, 2019). A perda de habitat, a retirada de filhotes do seu meio natural e o tráfico ilegal estão entre as principais causas do declínio populacional. Além disso, a carência de informações sobre a biologia, a ecologia e os patógenos que as infectam também são ameaças importantes para a conservação destas aves (GUEDES, 2004; RASO, 2004). Muitas espécies de psitacídeos têm alta longevidade (YOUNG et al., 2012) e as aves criadas e mantidas em cativeiro desenvolvem um conjunto de doenças que podem diferir (RICKLEFS, 2000), ou não daquelas que ocorrem em seus habitats naturais. Nesse sentido, devido à alta biodiversidade do país e aos riscos que acometem fauna, a implementação e apoio para estudos que investiguem a ocorrência de patógenos e as consequentes enfermidades nos animais é de urgência (CATÃO-DIAS, 2003).

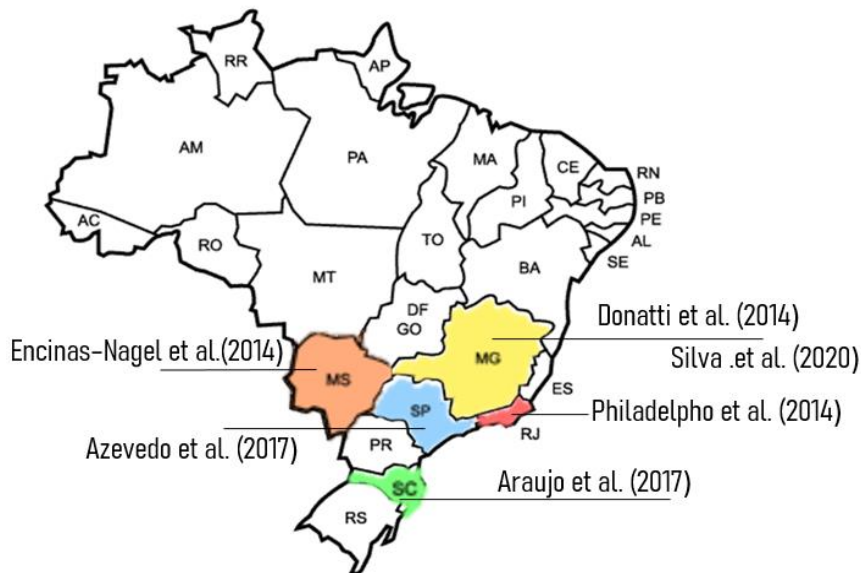
Entre as doenças infecciosas que afetam os psitacídeos, uma das mais emergentes é a Doença da Dilatação Proventricular (DDP) causada pelo Bornavírus aviário (BVA) pertencente as espécies *Psittaciform orthobornavirus* 1 e 2 (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008; AMARASINGHE et al., 2018). A caracterização de BVA é recente e diversos aspectos sobre sua transmissão, patogenia, epidemiologia, diagnóstico e controle são ainda escassos. A doença pode se manifestar de forma conjunta ou individual, com sinais neurológicos, alterações gastrointestinais (GREGORY et al., 1994; HOPPES et al., 2010; RUBBENSTROTH et al., 2016) e/ou com alterações no empenamento (FLUCK et al., 2019), além de também ser identificado o agente viral em aves clinicamente saudáveis (KLOET et al., 2009; LIERZ et al., 2009; HEFFELS-REDMANN et al., 2011). Acredita-se que a manifestação da doença esteja relacionada com o cativeiro e assim, fatores como estresse podem influenciar a infecção por BVA e a consequente manifestação de DDP (LIERZ et al., 2009; GANCZ et al., 2009; GRAY et al., 2010).

BVA tem distribuição mundial (LIERZ et al., 2009; RINDER et al., 2009; KISTLER et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2010; HEFFELS-REDMANN et al., 2011; SASSA et al., 2013; FLUCK et al., 2019; PINTO et al., 2019; SA-ARDTA et al., 2019;

ARAUJO et al., 2020; KESSLER et al., 2020) e no Brasil há relatos da doença nas regiões Centro-oeste, Sudeste e Sul (Figura 1) (DONATTI et al., 2014; ENCINAS-NAGEL et al., 2014; PHILADELPHO et al., 2014; ARAUJO et al., 2017a; AZEVEDO et al., 2017; SILVA et al., 2020). Na região Sul não há dados de prevalência, e no estado de Santa Catarina já houve um surto em ambiente cativo (ARAUJO et al., 2017a). A origem do BVA e sua forma de transmissão nas populações de psitacídeos em todo o mundo ainda é desconhecida (RUBBENSTROTH et al., 2016). Adjunto do caráter emergente do BVA aumenta-se a necessidade de maiores estudos sobre o assunto (SILVA et al., 2020).

Portanto, os objetivos deste estudo são determinar a prevalência da infecção por BVA em psitacídeos cativos do estado de Santa Catarina e identificar os fatores que estão associados. Esses resultados possibilitam a disseminação do conhecimento sobre as questões que envolvem o Bornavírus de psitacídeos mantidos em cativeiro, proporcionando avanços para manutenção destas populações.

Figura 1- Distribuição de casos de Bornavírus Aviário (BVA) em psitacídeos no Brasil.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência do Bornavírus aviário (BVA) em psitacídeos mantidos em cativeiro no estado de Santa Catarina por reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) juntamente com avaliação epidemiológica da doença.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Investigar a ocorrência da infecção por BVA na população de psitacídeos de dois criatórios no estado de Santa Catarina.
- II. Realizar a caracterização epidemiológico da doença nas populações estudadas.
- III. Validar o uso de amostras de suabes da coana, esôfago, cloaca e coleta de penas para detectar BVA por RT-PCR.
- IV. Verificar a evolução clínica com a positividade do hospedeiro durante o período do projeto.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 OS PSITACÍDEOS

A família Psittacidae é composta por aves popularmente conhecidas como as araras, papagaios e periquitos, que pertence a ordem Psittaciformes, possuindo ainda mais duas famílias, Loridae e Cacatuidae (COLLAR, 1997; GALETTI et al., 2002). Essa ordem está distribuída em todos os continentes, incluindo Austrália, ilhas do Oceano Pacífico, Índia, Ásia, América e África, sendo que a maior parte das espécies se encontra na América do Sul e Austrália (COLLAR, 1997). Os representantes da família Psittacidae são distinguíveis por apresentar cabeça grande em relação ao corpo, pescoço pequeno, pés zigodáctilos, tarsometatarso geralmente curto e, principalmente, por possuírem bico grande, forte e recurvado (SICK, 1997). Em relação ao tamanho corpóreo, possuem grande heterogeneidade, variando desde representantes pequenos como tuins (*Forpus spp.*) de cerca de 15 cm e 25 g, até araras (*Ara spp.* e *Anodorhynchus spp.*) que são as maiores espécies da família, podendo chegar a 98 cm e 1,5 kg (COLLAR, 1997). Atualmente, 27% das 395 espécies de psitacídeos estão classificadas pela IUCN nas categorias vulnerável (VU), em risco (EN) ou criticamente em risco (CR) (IUCN, 2019). O Brasil contém aproximadamente um quarto (88/395) destas espécies sendo o país mais rico em biodiversidade da fauna Psittaciforme da América (MMA, 2018; IUCN, 2019). Psitacídeos são ecologicamente importantes pelo seu papel de consumo de frutos, sementes e flores (GALETTI et al., 1992; SILVA, 2005), sendo conseqüentemente dispersores de sementes (BLANCO et al., 2016; BAÑOS-VILLALBA et al., 2017), e assim afetando diretamente no equilíbrio do ambiente (SICK, 1997). O grande apreço dos humanos por estas aves favorece o aprisionamento em cativeiro e a biopirataria (ICMBIO, 2014).

Em um estudo realizado na América do Norte, os psitacídeos mantidos em cativeiro foram frequentemente diagnosticados com processos de doenças infecciosas (44,5%), sendo mais acometidos por vírus. Dessas, Bornavírus aviário foi a mais diagnosticada 56,37% (314/557) (GIBSON et al., 2019). Em aves cativas, o vírus tornou-se relevante para os psitacídeos, devido ao efeitos graves que pode causar para o seu bem-estar e para os níveis de biodiversidade. As análises epidemiológicas sugeriram que um comércio mundial de psitacídeos sem medidas de biossegurança (PINTO et al., 2018; PINTO et al., 2019; SILVA et al., 2020) e as aves silvestres migratórias (RUBBENSTROTH et al., 2016; PINTO et al., 2018), simultaneamente ou

individualmente podem ser uma fator de disseminação do BVA. A Ordem Psittaciformes é a mais acometida pela enfermidade, com relatos descritos em mais de 80 espécies de psitacídeos de diversos gêneros (HOPPES et al. 2013). Nos protocolos sanitários nacionais, apenas o Plano de Ação Nacional (PAN) da Ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*) e Arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*) consta a triagem para o BVA (ICMBIO, 2012a,b), porém a Instrução Normativa (IN) da Secretária da Receita Federal (SRF) N° 179 (IBAMA, 2008) que define diretrizes gerais e procedimentos para destinação dos animais da fauna silvestre nativa e exótica apreendidos, resgatados ou entregues às autoridades competentes, não solicita qualquer teste para BVA. Logo, adquirir dados sobre a prevalência, transmissão e/ou tratamento de doenças emergentes e virais, como o BVA, possui grande relevância para a medicina veterinária e a biodiversidade (BOATRIGT-HOROWITZ, 2020).

3.2 BORNAVÍRUS AVIÁRIO

O vírus Bornavírus pertence à ordem *Mononegavirales* e ao novo gênero *Orthobornavírus* que possui oito espécies, *Elapid 1 orthobornavirus*, *Mammalian 1 orthobornavirus*, *Mammalian 2 orthobornavirus* que afetam mamíferos e répteis, e *Passeriform 1 orthobornavirus*, *Passeriform 2 orthobornavirus*, *Psittaciform 1 orthobornavirus*, *Psittaciform 2 orthobornavirus* e *Watterbird 1 orthobornavirus* que afetam aves (AMARASINGHE et al., 2018). A família Bornaviridae possui o Bornavírus aviário (BVA) e o Bornavírus clássico (BDV). BVA está associado à Doença da Dilatação Proventricular, especialmente e de forma mais grave em psitacídeos (KISTLER et al., 2008; PAYNE et al., 2012 TIZARD et al., 2016). BDV é causador de doença neurológica em pequenos ruminantes e equinos, com maior incidência na Europa central (LUDWIG et al., 1988).

O Bornavírus é um vírus envelopado, com diâmetro de 80 a 100 nanômetros, com um genoma não segmentado por RNA cadeia simples, com cerca de 8.900 nucleotídeos (TIZARD et al., 2016). O genoma do BVA é semelhante ao BVD, possuindo seis unidades de transcrição: nucleoproteína (N), proteína reguladora (X), cofator de polimerase (P), proteína da matrix (M), glicoproteína (G) e polimerase (L) (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008; STAEHELI et al., 2010). Durante o ciclo de replicação viral, a proteína N é sintetizada como outras proteínas dentro do citoplasma e depois entra no núcleo, onde participa do processo de transcrição e replicação (SCHWEMMIE et al., 2004). Sua organização genômica geral é semelhante à

de outros vírus da ordem Mononegavirales, incluindo Paramixovírus e Rabdovírus. No entanto, o Bornavírus é o único vírus de RNA de polaridade negativa, não segmentado, a se replicar dentro dos núcleos das células infectadas e, portanto, foi colocado em sua própria família Bornaviridae, e estabelecem infecção persistente não citolítica no hospedeiro (SCHNEIDER et al., 2005). Durante a expressão gênica realizam o mecanismo de *splicing* e aparentemente também como estratégia de replicação a retirada de ao menos 50 nucleotídeos terminais para variação genética (SCHWEMMLE et al., 2004; PAYNE et al., 2012; TIZARD et al., 2016).

A Doença da dilatação proventricular (DDP) em psitacídeos teve o agente etiológico descoberto somente em 2008, sendo este o Bornavírus aviário (BVA) (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008). A DDP é conhecida como doença neurodegenerativa grave e muitas vezes fatal em populações de psitacídeos em cativeiro (GANCZ et al., 2009; STAEHELI et al., 2010), e pode afetar ambos os sexos, geralmente é encontrado em aves adultas, mas também foi descrito em psitacídeos juvenis naturalmente infectados (KISTLER et al., 2010). Há duas espécies do vírus que podem acometer os psitacídeos, *Psittaciform 1 orthobornavirus* e *Psittaciform 2 orthobornavirus*, contendo sete genótipos que são os *parrot bornavirus 1-5* e 7 (PaBV 1-5 e 7) (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008; WEISSENBOCK et al., 2009a; RUBBENSTROTH et al., 2012). Os genótipos mais comuns de PaBV relatados em casos de DDP em todo o mundo são o PaBV-2 e o PaBV-4 (RUBBENSTROTH et al., 2016).

3.2.1 Transmissão

A rota natural de infecção não é evidente até o momento, mas dados epidemiológicos apóiam a transmissão horizontal (RUBBENSTROTH et al., 2016) pela detecção em conteúdos fecais e oronasais (LIERZ et al., 2009; RINDER et al., 2009; KISTLER et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2010; HEATLEY et al., 2012; ENCINAS-NAGEL et al., 2014; RUBBENSTROTH et al., 2016). Outra forma para a transmissão do Bornavírus aviário a se considerar é pela via vertical, pois o RNA viral já foi detectado em ovos e embriões provenientes de aves infectadas (LIERZ et al., 2011; KERSKI et al., 2012; MONACO et al., 2012; RUBBENSTROTH et al., 2013; DELNATTE et al., 2014). Sabe-se que também pode ser detectado em cloaca, coana, penas, e até nos filtros dos ductos de ar de ambientes que abrigam aves infectadas (HOPPES et al., 2010; DE KLOET et al., 2011), possibilitando que o vírus também possa ser eliminado e detectado em outros

materiais conferindo um perfil de transmissão mais amplo (RINDER et al., 2009; HEATLEY et al., 2012).

O período de incubação experimental variou de 20 a 60 dias após a infecção (dpi) até 200 dpi o que corrobora com a observação em algumas exposições naturais (GANCZ et al., 2009; GRAY et al., 2010; KISTLER et al., 2010; PAYNE et al., 2011; PIEPENBRING et al., 2012; PIEPENBRING et al., 2016; ARAUJO et al., 2017b; ARAUJO et al., 2020). Além disso, mostraram que as vias nasais e orais não conseguiram reproduzir a doença experimentalmente em psitacídeos provavelmente por características dos hospedeiros (HECKMANN et al., 2017). No entanto, após a inoculação intramuscular, o BVA se espalhou para o sistema nervoso central (SNC) e em seguida para os gânglios periféricos, com uma propensão a afetar os gânglios do trato gastrointestinal, com ocorrência tardia também em células mesenquimais e epiteliais (ARAUJO et al., 2017b). O sucesso ao utilizar via intramuscular experimental em psitacídeos reiteram a importância de investigar a associação de lesões de tegumento e intramusculares como porta de entrada para BVA, mas que ainda não há dados suficientes para apoiar que seja uma via de infecção em casos naturais (ARAUJO et al., 2017b).

O BVA já foi identificado em psitacídeos na América do norte (KISTLER et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2010; ARAUJO et al., 2020), Europa (LIERZ et al., 2009; RINDER et al., 2009; HEFFELS-REDMANN et al., 2011; FLUCK et al., 2019; PINTO et al., 2019; KESSLER et al., 2020), na Ásia (SASSA et al., 2013; SA-ARDTA et al., 2019), Oceania (SUTHERLAND et al., 2021) e na América do Sul, incluindo o Brasil (DONATTI ET AL., 2014, ENCINAS-NAGEL et al., 2014; PHILADELPHO et al. 2014,; ARAUJO et al., 2017a; AZEVEDO et al., 2017; SILVA et al.; 2020). Além de psitacídeos, o vírus pode afetar outras ordem de aves como passeriformes (PERPINAN et al., 2007; RUBBENSTROTH et al., 2013; AZEVEDO et al., 2017), charadriiformes (RUBBENSTROTH et al., 2016), anseriformes (DELNATTE et al., 2013; GUO et al., 2013; RUBBENSTROTH et al., 2016), piciformes (PERPINAN et al., 2007) e falconiformes (SHIVAPRASAD, 2008).

3.2.2 Manifestação clínica do Bornavírus em psitacídeos

Os sinais clínicos da doença bornaviral nos psitacídeos pode ser diverso (GRAY et al., 2010; PAYNE et al., 2011; PIEPENBRING et al., 2012; PIEPENBRING et al., 2016), geralmente são gastrointestinais, como estase de inglúvio e proventrículo, regurgitação, hiporexia a anorexia, e sementes não digeridas nas fezes (GANCZ et al.

2009; VILLANUEVA et al., 2010; ARAUJO et al., 2017a; PHILADELPHO et al., 2017). Pode observar também sinais neurológicos, os mais comuns são depressão, convulsões, ataxia, cegueira e incoordenação (BERHANE et al., 2010; RUBBENSTROTH et al., 2016), e os que afetam as penas seria de autoarrancamento e automutilação (FLUCK et al., 2019), podendo ocorrer de forma conjunta ou não. Pode também gerar morte súbita, por estar associado a lesões cardíacas (ARAUJO et al., 2020). O curso da doença natural foi evidenciado como mais grave em aves jovens, com sinais neurológicos dentro de 48 horas após a recusa de alimento, e evolução até a morte em três dias (KISTLER et al., 2010). Mas em um estudo experimental comparativo entre calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) juvenis e adultas, a inflamação foi menos grave ou ausente no encéfalo dos jovens (GARTNER et al., 2020). Logo experimentalmente, há diferentes padrões de DDP, de acordo com as diferentes genótipos e características individuais do hospedeiro (PIEPENBRING et al., 2016). Sabe-se também que infecção por BVA pode ser detectada em aves clinicamente saudáveis (DE KLOET et al., 2009; LIERZ et al., 2009; HEFFELS-REDMANN et al., 2011; FLUCK et al., 2019). Até o momento sugere-se o *parrot bornavirus 4* (PaBV-4) como genótipo mais patogênico, sendo responsável por grande parte dos quadros mais severos (GRAY et al 2010; PAYNE et al, 2011).

3.2.3 Patogenia, lesões macroscópicas e histológicas

A patogênese da doença ainda não foi identificada por completo, sendo assim, a hipótese mais aceita afirma que o vírus acomete todo sistema nervoso e desencadeia diretamente as alterações inflamatórias e imunológicas (PIEPENBRING et al., 2012). As aves infectadas podem desenvolver lesões inflamatórias não purulentas no encéfalo, medula espinhal, nervos principais e gânglios autonômicos que se assemelham às lesões típicas do Bornavirus observadas em mamíferos (HOPPES et al., 2013).

Foi verificado que após a inoculação intramuscular de *parrot bornavirus 2* (PaBV-2) no músculo peitoral de calopsitas, detectou-se o vírus primeiramente em macrófagos e linfócitos no local da inoculação e nervos adjacentes, em seguida, atingiu o plexo braquial, disseminado centripetalmente para o segmento torácico da medula espinhal, e posteriormente invadiu outros segmentos espinhais e encéfalo. Após atingir o SNC, o PaBV-2 espalhou-se centrifugamente do SNC para os gânglios no sistema gastrointestinal, adrenal, coração e rins. Em momentos finais da infecção, o PaBV-2 não foi detectado apenas nos nervos e gânglios, mas disseminados no músculo liso e/ou

células epiteliais dispersas de tecidos tais como inglúvio, intestinos, proventrículo, rins, pele e vasos.

A principal lesão de infecção por BVA é a dilatação do proventrículo, no entanto o genótipo PaBV-2 atinge primeiro o SNC, antes de migrar para os tecidos periféricos (ARAUJO et al., 2017b). As lesões já foram encontradas em diferentes órgãos além do SNC, como inglúvio, proventrículo, duodeno, pâncreas, músculo cardíaco e esquelético, fígado, baço, pulmões e rins, sugerindo um processo sistêmico (LIERZ et al., 2009; RINDER et al., 2009). Nesse sentido, é concebível que a infecção precoce ou o status de portador é caracterizado em detecção restrita ao tecido nervoso e essa distribuição mais ampla ocorre em estágios mais avançados da DDP (LIERZ et al., 2009).

Macroscopicamente, a dilatação do proventrículo é a lesão mais marcante de DDP, que pode levar em casos extremos a ruptura proventricular de parede e celomite (ARAUJO et al. 2016). Embora a distensão do proventrículo e suas consequências clínicas sejam um fator característico na DDP, em alguns estudos, a quantidade de aves com sinais neurológicos foi superior (SASSA et al, 2013; PHILADELPHO et al, 2014; FLUCK et al., 2019; SILVA et al., 2020). Deve-se analisar o empenamento geral da ave também, pois o BVA pode induzir a ave a realizar autoarrancamento, de forma leve até severa, e até mesmo lesões na pele (FLUCK et al., 2019). Pode haver também retinite e cegueira devido a propagação viral através do nervo óptico (STEINMETZ et al., 2008) e cardiomegalia ou hidropericárdio (ARAUJO et al., 2020).

A DDP é caracterizada histopatologicamente por inflamação não supurativa nos sistemas nervosos central, periférico e autônomo. Infiltrados mononucleares principalmente de linfócitos e plasmócitos presentes nos gânglios nervoso especialmente no plexo mioentérico do trato gastrointestinal, atingindo o proventrículo e ventrículo, mas também esôfago, inglúvio e duodeno, bem como encefalite não purulenta, mielite e/ou ganglioradiculoneurite foram relatados (BERHANE et al., 2001; HOPPES et al., 2010; KELLER et al., 2010; KISTLER et al., 2010; OUYANG et al., 2009; PAYNE et al., 2011b; PIEPENBRING et al., 2012; RAGHAV et al., 2010; ARAUJO et al., 2017a). Além disso, é possível verificar uma a duas camadas de infiltrado linfoplasmocitário e até histiocíticos expandindo espaços de Virchow-Robin no cérebro, cerebelo, medula espinhal e as meninges assim como infiltrados leves em nervo óptico, plexo braquial e nervo ciático (ARAUJO et al., 2017a), e em estruturas cardíacas como gânglios do ventrículo e epicárdio, e cardiomiócitos (ARAUJO et al., 2017a; ARAUJO et al., 20120).

3.2.4 Diagnóstico

A ave infectada e suas características individuais, genótipo viral, vias de transmissão, período de incubação, material coletado, desenvolvimento ou não dos sinais clínicos parecem ser determinantes não apenas no curso clínico mas também na detecção do vírus (GANCZ et al., 2009; GRAY et al., 2010; KISTLER et al., 2010).

3.2.4.1 Métodos para detectar aves com BVA

A detecção de anticorpos contra o BVA por ensaio imunoenzimático (ELISA) apresentou resultados diferentes para cada uma das proteínas virais, para a nucleoproteína (N) do vírus foram detectados na maioria das aves positivas por RT-PCR (DE KLOET et al., 2011). No diagnóstico sorológico de infecção viral por BVA utilizaram em estudos principalmente a nucleoproteína P40 como antígeno (DE KLOET et al., 2009; OUYANG et al., 2009; DE KLOET et al., 2011). E os anticorpos para proteína matriz (M) e fosfoproteína (P) tiveram resultados mais variáveis (DE KLOET et al., 2011). O *western blotting* pode representar um método para detecção de anticorpos para BVA, mas esse método não deve ser utilizado isolado, pois evidenciaram aves doentes soronegativas assim com saudáveis sem DDP mas soropositivas (VILLANUEVA et al., 2010). Estudos sugerem que aves que apresentam o RNA viral e altos títulos de anticorpos têm maior risco de desenvolver o quadro clínico da enfermidade (HEFFELS-REDMANN et al., 2012).

Amostras de órgãos, sangue e suabe de cloaca e faringe, podem ser utilizado para o cultivo celular e em seguida a identificação molecular do vírus (RUBBENSTROTH et al., 2012). No entanto, a detecção parece ser menos sensível a partir de amostras de sangue em comparação com os suabes (DE KLOET et al., 2009; GANCZ et al., 2009; LIERZ et al., 2009; DE KLOET et al., 2011). O isolamento de vírus é um método trabalhoso e demorado, sendo pouco usado no diagnóstico de rotina, mas deve ser considerado uma ferramenta útil de diagnóstico e triagem, particularmente para a detecção de novos genótipos (RUBBENSTROTH et al., 2012).

Atualmente é possível a detecção deste vírus por RT-PCR (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008; RUBBENSTROTH et al., 2013), podendo utilizar amostras de sangue e suabes de cloaca, de coana, de traqueia, além de urina e penas (GANCZ et al., 2009; LIERZ et al., 2009; RINDER et al., 2009; RAGHAV et al., 2010; DE KLOET et al., 2011; HEATHEY et al., 2012; SASSA et al., 2013; ENCINAS-NAGEL et al., 2014; PHILADELPHO et al., 2014; ARAUJO et al., 2017b). As amostras

de sangue não são confiáveis para a detecção devido as fases de viremia (GANCZ et al., 2009; DE KLOET et al., 2011; TIZARD et al., 2013), assim como para suabe cloacal e/ou fezes, sendo sugerido diversas coletas efetuadas em diferentes momentos devido a eliminação intermitante, que poderia assim reduzir resultados falsos negativos (LIERZ et al., 2009; RAGHAV et al., 2010; PAYNE et al., 2011). Esses ensaios de RT-PCR foram desenvolvidos para a detecção do RNA do Bornavírus aviário, e possuem alta especificidade e sensibilidade (HONKAVUORI et al., 2008; DELNATTE et al., 2014; GUO et al., 2014), sendo atualmente o método mais sensível para diagnóstico (HONKAVUORI et al., 2008; RAGHAV et al., 2010). Há também o método de amplificação isotérmica mediada por *loop* com transcriptase reversa (RT-LAMP), que detecta somente o RNA do *parrot bornavirus 4* (PaBV 4), porém de vários tipos de amostra, como células de cultura, fezes e tecidos, sendo importante para o monitoramento deste genótipo (KOMORIZONO, 2019). A infecção por BVA, provalmente precede a manifestação clínica da doença, o que explicaria inclusive a detecção do vírus em aves sem sinais clínicos (KISTLER et al., 2010).

3.2.4.2 Métodos para detectar aves doentes devido a infecção por BVA

Durante muitos anos a biópsia foi utilizada como método definitivo para diagnóstico de DDP em aves vivas, afim de visualizar as lesões características de infiltração linfoplasmocitária nos nervos do sistema nervoso autônomo e gânglios nervosos em diferentes locais do trato digestório (BERHANE et al. 2001). Entretanto, este procedimento é invasivo, potencialmente fatal e, de difícil realização. A biópsia do proventrículo não é recomendada devido à espessura da parede gástrica e a presença de ácido clorídrico. A biópsia do ventrículo é possível, mas exige celiotomia com maior risco de dano à motilidade intestinal. Por outro lado, a biópsia de ingluvío representa menor risco para a ave, no entanto, apresenta baixa sensibilidade, pois a ave pode não apresentar lesões na amostra coletada e desenvolver quadros clínicos de DDP (GREGORY et al., 1996; LIERZ et al., 2009; BERHANE et al., 2011; SCHMIDT 2015).

Radiografia comum, de contraste e fluoroscopia podem ser usados como técnicas complementares. O proventrículo quando acometido, é frequentemente e severamente dilatado, preenchendo o lado esquerdo da cavidade celômica, assim como o ventrículo e os intestinos também podem estar dilatados (HOPPES et al., 2020). Os parâmetros laboratoriais são frequentemente normais, embora possa haver uma elevação da creatina fosfoquinase, anemia leve e hiperproteinemia (HOPPES et al., 2020).

O diagnóstico de DDP é geralmente *post mortem* e realizado por identificação histológica da inflamação linfoplasmocitária no SNC e nos gânglios e nervos do trato gastrointestinal em conjunto com a detecção imuno-histoquímica (IHQ) e/ou molecular do BVA (GRAY et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2010; DONATTI et al., 2014; ENCINAS-NAGEL et al., 2014; ARAUJO et al., 2016; ARAUJO et al., 2017a; SILVA et al., 2020). A imuno-histoquímica pode ser realizada usando um anticorpo policlonal que visa uma região específica da proteína N do vírus. Em aves com suspeita de DDP, órgãos como ingluvívio, proventrículo, ventrículo, coração, intestinos e glândulas adrenais, além do SNC e nervos devem ser coletados para exame histopatológico (OUYANG et al., 2009; GRAY et al., 2010; ARAUJO et al., 2016; ARAUJO et al., 2017a). A detecção do RNA por RT-PCR em órgãos coletados também é possível (DELNATTE et al., 2013; DONATTI et al., 2014; ENCINAS-NAGEL et al., 2014; SILVA et al., 2020), sendo identificado em um estudo maior frequência de detecção em proventrículo (100%), rim (71%), cólon (50%), cérebro e cerebelo (43%) (DELNATTE et al., 2013). Raghav e colaboradores (2010) estudaram a associação de exame histopatológico, IHQ e RT-PCR para diagnóstico de DDP, resultando em um alto nível de concordância entre esses métodos.

A DDP deve ser sempre considerada em casos de dilatação proventricular em psitacídeos, no entanto, impactação gástrica, micobacteriose gástrica, megabacteriose, corpos estranhos, proventriculite fúngica ou bacteriana e toxicose por chumbo podem também causar esta dilatação e deve ser considerado como diagnóstico diferencial (RINDER et al., 2009; SCHMIDT et al., 2015; HOPES et al., 2020). O BVA também pode causar uma doença neurológica primária e BVA deve ser considerado como um importante diagnóstico, com ou sem sinais gastrointestinais (SASSA et al., 2013; PHILADELPHO et al., 2014; ARAUJO et al., 2017a; FLUCK et al., 2019; SILVA et al., 2020).

O mau empenamento e/ou autoarrancamento deve também ser uma diagnóstico diferencial para BVA, pois foi demonstrado uma possível correlação com o comportamento de danificar as penas e a presença de anticorpos anti-BVA, além da possibilidade da detecção do vírus na pena (DE KLOET et al., 2011; FLUCK et al., 2019). O BVA pode também estar envolvido no desenvolvimento de doenças cardíacas nos psitacídeos. A DDP deve ser descrita como diagnóstico diferencial em casos de morte súbita com infiltração linfoplasmocitária cardíaca na histopatologia (BEHARNE et al., 2001; PAYNE et al., 2011; ARAUJO et al., 2020).

3.2.5 Tratamento e Controle

O prognóstico para uma ave afetada clinicamente com esta enfermidade é desfavorável e não há tratamento específico efetivo. Deste modo, utiliza-se uma terapia de suporte com alimentação assistida, incluindo remoção da ingesta estagnada, alimentação com alta digestibilidade, líquida ou pastosa, suplementação vitamínica, controle e tratamento de infecções oportunistas, aumentando assim a sobrevivência da ave (RITCHIE, 2004). Alguns protocolos sem comprovação científica têm sido aplicados com a utilização de tratamentos antivirais associados com anti-inflamatórios e imunomediadores além dos cuidados de suporte básicos (STEINMETZ et al., 2008; HOPPES et al., 2013).

A falha nos tratamentos atuais, a severidade e emergência da doença, resultaram na sugestão de uma possível imunização das aves silvestres cativas, principalmente psitacídeos, contra BVA. Como medida para evitar a infecção pelo vírus, o uso de vacinas com vetor viral vivo (RUNGE et al., 2017) e com recombinantes sobre as vacinas dos Vírus da doença de Newcastle (DNC) e da Vaccinia Ankara Modificado (MVA) (OLBERT et al., 2016) ambos expressando as nucleoproteínas (N) e fosfoproteínas (P) para o genótipo *parrot bornavirus 4* (PaBV-4) do BVA foi testada. Através da estratégia de reforço após a vacinação inicial evidenciaram que as aves vacinadas tiveram redução na carga viral e na eliminação, e também com progressão da doença mais demorada, no entanto, ainda desenvolveram sinais clínicos de DDP (OLBERT et al., 2016; RUNGE et al., 2017). Semelhantes resultados sugeriram também que a vacinação pode não exacerbar a infecção, mas não reduz a persistência viral (HAMEED et al., 2018). Os resultados refletem a complexa patogênese da DDP (HOPPES et al., 2020). Em estudo experimental, as aves apresentaram resposta mais exacerbada com lesões histopatológicas mais graves, após a inoculação com estirpe diferente de mesmo genótipo, sugerindo que pode ocorrer resposta autoimune decorrente de uma exposição prévia (PAYNE et al., 2011).

Na falta de tratamentos e vacinas eficazes, o controle deve ser feito ambientalmente e no diagnóstico precoce. O BVA é frágil devido a sua natureza genética, e por isto pode ser facilmente destruído com produtos com propriedades detergentes ou alvejante diluído, além de inativado por luz ultravioleta (KRANZ et al., 2015). Algumas recomendações para controle do BVA entre as aves em cativeiros são: boa higiene e alojamento das aves ao ar livre quando for possível termicamente; evitar a superlotação e isolamento de todas as aves recém-chegadas; doentes ou positivas com separação das

demais; aves novas ao adentrarem em uma população devem ser testadas com métodos conjuntos, como sorologia e molecular, devendo haver pelo menos três testes negativos em intervalos de quatro a seis semanas; filhotes de aves infectadas devem ser mantidos separados de outras aves e monitorados para o desenvolvimento da doença; aves saudáveis com teste positivo, seja por RT-PCR ou sorologia não devem ser sacrificado pois não significa que irá ficar clinicamente doente com DDP (HOPPES et al., 2020). Além disso, em populações de aves não reprodutoras, a separação de aves infectadas já poderá ser suficiente para a prevenção de nova transmissão do vírus entre as aves, mas não exclui a sugestão de não realizar a reprodução de aves infectadas (HEFFELS-REDMANN et al., 2012).

4 **Bornavírus em psitacídeos mantidos em cativeiro no estado de Santa Catarina, Brasil: caracterização molecular e epidemiológica**

Bornaviruses in captivity psittacines in the state of Santa Catarina, Brazil: molecular and epidemiological characterization.

RESUMO

O Bornavírus aviário (BVA) é o causador da doença da dilatação proventricular (DDP), emergente e frequentemente fatal em psitacídeos. Possui distribuição mundial, mas no Brasil há poucos dados sobre sua abrangência. Objetiva-se determinar a prevalência e os fatores associados a infecção por BVA em psitacídeos mantidos em cativeiro no estado de Santa Catarina. Realizou-se um estudo transversal com 192 aves de dois criatórios (A e B), utilizando suabe da coana, do esôfago, da cloaca e coleta de pena totalizando 768 amostras submetidas a transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) utilizando como gene alvo a proteína matriz (M) com produto final de 350 pares de base (pb). Dados foram coletados, como espécie, gênero, idade, escore corporal, qualidade das penas e histórico, analisados através de estatística descritiva e por regressão logística. A prevalência total foi de 35,9% (69/192), no criatório A de 40,4% (42/104) e no criatório B de 30,7% (27/88). O suabe de coana apresentou positividade de 58,0% (40/69), cloaca 50,7% (35/69), esôfago 43,5% (30/69) e pena 21,7% (15/69) com aves positivas em mais de uma amostra. Foram amostrados 29 espécies de psitacídeos, sendo a maioria nativa, 49,0% (94/192) das espécies ameaçadas de extinção e 58,0% (40/69) destas estavam infectadas. As três espécies mais afetadas foram Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), Pagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) e Tiriba-da-testa-vermelha (*Pyrrhura frontalis*). Dos dados epidemiológicos analisados, nenhum apresentou relação com a infecção por BVA. Nos psitacídeos positivos, 88,4% (61/69) estavam saudáveis e 8,7% (6/69) apresentavam alterações clínico-comportamentais. Ocorreu 15,9% (11/69) de óbitos dentre os positivos e 2,9% (2/69) morreram com lesões sugestivas de DDP. A utilização de amostras conjuntas foi eficaz para o diagnóstico clínico de BVA e determinou uma prevalência elevada em psitacídeos mantidos em cativeiro no estado, com maior abrangência no criatório comercial, em espécies do gênero *Amazona*, assintomáticos e oriundos de translocação por doação.

Palavras-chave: Doença da dilatação proventricular. Bornavirose. Doença emergente. Vírus RNA. *Psittaciform orthobornavirus*.

ABSTRACT

Avian bornavirus (ABV) is the cause of the of proventricular dilatation disease (PDD), emerging and often fatal in psittacines. It has worldwide distribution, but in Brazil there is little data on its dissemination. The objective is to determine the prevalence and factors associated with ABV infection in captive psittacines in the state of Santa Catarina. A cross-sectional study was carried out with 192 birds from two captive psittacine breeding facility (A and B), using choana, esophagus and cloaca swab, and feather collection totaling 768 samples for reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) using as gene targeting the protein (M) with a final product of 350 base pairs. Data were collected, such as species, gender, age, body score, quality of feathers and history when available. The total prevalence was 35.9% (69/192), in captive A 40.4% (42/104) and in captive B 30.7% (27/88). The choana swab showed positivity of 58.0% (40/69), cloaca 50.7% (35/69), esophagus 43.5% (30/69) and feather 21.7% (15/69) with positive birds in more than one sample. Among the 29 species of psittacines sampled, the majority were native, with 49.0% (94/192) of endangered species and 58.0% (40/69) of these were infected. The three most affected species were Blue-fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*), Vinaceous-breasted Amazon parrot (*Amazona vinacea*) and Reddish-bellied conure (*Pyrrhura frontalis*). Of the epidemiological data analyzed, none was related to BVA infection. In the positive psittacines, 88.4% (61/69) were healthy and 8.7% (6/69) had clinical and behavioral diseases. There was 15.9% (11/69) of deaths among the positive and 2.9% (2/69) died with lesions suggestive of PDD. The use of sets samples was effective for the clinical diagnosis of ABV and determined a high prevalence in captive psittacines in the state, with greater scope in commercial captive, in species of the genus *Amazona*, asymptomatic and from translocation by donation.

Keywords: Proventricular dilation disease. Bornavirose. Emerging disease. Vírus RNA. *Psittaciform orthobornavirus*.

4.1 INTRODUÇÃO

A doença da dilatação proventricular (DDP) que acomete psitacídeos é causada pelo Bornavírus aviário (BVA), sendo esta etiologia descoberta somente em 2008 por dois grupos de pesquisa provenientes da América do Norte e da Ásia (KISTLER et al., 2008; HONKAVUORI et al., 2008). Na taxonomia atual, existem 15 BVAs geneticamente diversos compreendendo seis espécies virais distintas. As duas espécies conhecidas por causar DDP em psitacídeos, são *Psittaciform orthobornavirus* (PaBV) 1 e 2 que incluem os genótipos de 1 a 5 e 7 (AMARASINGHE et al., 2018).

DDP é uma doença neurológica e gastrointestinal progressiva, geralmente fatal (HOPPES et al., 2010; BERHANE et al., 2010; PIEPENBRING et al., 2012; RUBBENSTROTH et al., 2016). O desenvolvimento da doença também é variável, podendo gerar morte aguda à progressão lenta da doença clínica, e nem todas as aves infectadas desenvolvem doença clínica (HEFFELS-REDMANN et al., 2011; HEFFELS-REDMANN et al., 2012; PIEPENBRING et al., 2016). Logo, aves clinicamente saudáveis também podem albergar o vírus (DE KLOET, et al., 2009; LIERZ et al., 2009; RAGHAV et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2010; HEFFELS-REDMANN et al., 2011; FLUCK et al., 2019).

Essa enfermidade é diagnosticada comumente após a morte por identificação do infiltrado linfoplasmocitário em encéfalo, gânglios e nervos do sistema digestório, cardíaco e endócrino, associado a imunomarcagem por imuno-histoquímica (IHQ) e/ou detecção molecular por RT-PCR (GRAY et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2010; DONATTI et al., 2014; ENCINAS-NAGEL et al., 2014; ARAUJO et al., 2016; ARAUJO et al., 2017a; SILVA et al., 2020). A transmissão do BVA não é totalmente compreendida, mas sabe-se que a infecção por BVA precede o desenvolvimento de DDP (KISTLER et al., 2010), e que o vírus pode ser encontrado nas fezes e urina de aves (LIERZ et al., 2009; RINDER et al., 2009; VILLANUEVA et al., 2010; HEATLEY et al., 2012; ENCINAS-NAGEL et al., 2014). A DDP tem distribuição mundial, sendo identificado em psitacídeos na América do Norte (KISTLER et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2010; ARAUJO et al., 2020), Europa (LIERZ et al., 2009; RINDER et al., 2009; HEFFELS-REDMANN et al., 2011; FLUCK et al., 2019; PINTO et al., 2019; KESSLER et al., 2020), na Ásia (SASSA et al., 2013; SA-ARDTA et al., 2019) e América do Sul (VILLANUEVA et al., 2009). No Brasil há relatos em Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Santa Catarina (DONATTI et al., 2014; ENCINAS-NAGEL et al., 2014; PHILADELPHO et al., 2014; ARAUJO et al., 2017a; SILVA et al., 2020). O único relato de DDP em Santa Catarina

ocorreu em 2016, com óbito de três araras-canindé (*Ara ararauna*) cativas com diagnóstico *post mortem* com confirmação pelo exame de IHQ (ARAÚJO et al., 2017a).

O BVA é considerado uma ameaça importante para psitacídeos mantidos em cativeiro e possivelmente para aves de vida livre (ZIMMERMANN et al., 2014). Medidas de biossegurança e testes regulares de triagem para patógenos de psitacídeos são recomendados para cativeiros, afim de evitar disseminação de patógenos entre aves cativas e de vida livre (KESSLER et al., 2020). Bornavírus aviário já foi detectado em alguns estados no Brasil, no entanto dados sobre sua distribuição e prevalências em psitacídeos mantidos em cativeiro são escassos em todo país. Portanto, este estudo tem como objetivo determinar a prevalência e qual via coletada possuirá maior positividade, assim como os fatores associados a infecção por Bornavírus aviário em psitacídeos cativos no estado de Santa Catarina.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 POPULAÇÃO DE PSITACÍDEOS UTILIZADOS NO ESTUDO

O tamanho amostral foi estipulado utilizando Software R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (Package EpiCalc) (THRUSFIELD, 2004), através da fórmula $n = Z \times Z [P(1-P)] / D^2$, de amostragem aleatória simples para populações infinitas, aonde Z se refere ao multiplicador (1,645) obtido por meio do intervalo de confiança desejado (99%), com base na distribuição normal, sendo P a prevalência esperada de 50% e D o erro máximo aceitável na estimativa (0,10). Através da forma randômica e sistemática, foi definido que o número mínimo de animais amostrados seria de 166.

Para este estudo transversal foram realizadas coletas de 192 aves de dois criatórios (A e B) que continham psitacídeos em cativeiro no estado de Santa Catarina. O criatório A é Comercial e o B é um Jardim Zoológico, ambos de acordo com a Instrução Normativa nº 07/2015 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Foram coletadas amostras de psitacídeos sem distinção de espécie, gênero, porte, idade ou histórico.

4.2.2 AUTORIZAÇÕES PARA O ESTUDO

Este trabalho obteve aprovação para realização de atividades com finalidade científica de número 69012-1 através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO), pertencente ao Ministério do Meio Ambiente (MMA) e também pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição protocolado sob o número 7336060819. Além disso, o termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado responsável de cada criatório (APÊNDICE 2).

4.2.3 COLHEITA DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os dados das aves foram obtidos por um questionário contendo informações sobre cativoiro, espécie, gênero, faixa etária, escore corporal, empenamento e histórico clínico quando houvesse (APÊNDICE 1). A classificação do gênero foi fêmea, macho e indefinido além da respectiva espécie por meio da identificação fornecida pelo responsável. Para a idade utilizou-se as classificações de faixas etárias em filhote, com o tempo de vida contido no período até empenamento total, juvenil até a primeira troca de penas e adultos com mais de uma troca de penas, sendo também informado pelo responsável da população de psitacídeos. A classificação da qualidade de penas foi realizada pela avaliação visual da quantidade, qualidade e uniformidade estipulando assim em estado ruim, regular e bom. O escore corporal foi definido pela palpação da região peitoral da ave obtendo a classificação de 0 a 3, utilizando o sistema de graduação segundo Gregory e Robins et al. (1998) sendo o escore 0 corresponde ao osso da quilha saliente e contorno deprimido dos músculos peitorais, escore 1 corresponde ao osso proeminente da quilha com músculos peitorais mal desenvolvidos, escore 2 corresponde ao osso da quilha menos proeminente e com músculos peitorais moderados e escore 3 com músculos peitorais exacerbados que proporcionam contorno suave na quilha. Foi realizado a junção entre este escore corporal com a condição clínica da ave, sendo estipulado que o escore 0 – Caquético, escore 1 – Magro, escore 2 – Regular e escore 3 – Gordo. Além disso, as aves coletadas positivas, foram abordados questionamentos ao responsáveis pela população sobre a evolução da enfermidade ou não, e para as que morreram quais as principais alterações macroscópicas descritas pelo médico veterinário da população de psitacídeos, se tinham relação ou não com o desenvolvimento da DDP.

4.2.4 COLHEITA DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas no segundo semestre de 2019 com obtenção de amostras clínicas por meio de suabe da coana, esôfago e cloaca juntamente com coleta de penas, sendo quatro coletas por ave, totalizando 768 amostras. No criatório A, foram coletadas 104 aves (104/192) no mês de setembro e no criatório B foram coletadas 88 aves (88/192) no mês de agosto. Para o momento da coleta, as aves eram capturadas manualmente com auxílio de toalhas e luvas de raspo em aves de pequeno e médio porte, e com puçás e luva de raspo em aves de grande porte, manejadas tanto em gaiolas como em recintos, afim de serem contidas fisicamente. As coletas de penas foram realizadas na região peitoral pela retirada manual e para as coletas da cavidade oral utilizou-se um abridor de bico de aço inoxidável que permitiu a abertura de forma segura. Para a coleta das secreções orais e urofecais utilizou-se suabe, sendo o diâmetro do suabe proporcional ao tamanho de cada ave. O suabe para as aves de porte médio e grande foi o de haste de plástico de 150mm com 15mm de diâmetro, e para aves de porte pequeno foi o de haste de alumínio de 147mm com 0,70mm diâmetro, ambos estéreis. No momento de uso do suabe, ele era inserido suavemente na região estipulada, realizando movimentos rotatórios em contato com a mucosa e coletados de forma individual. Os suabes e as penas coletados eram imersos em 0,7 ml de tampão-fosfato salino (PBS) estéril refrigerados contidos em tubos de 2 mL por até 12 horas e após armazenados em freezer a -80°C.

4.2.5 DETECÇÃO MOLECULAR DE BORNAVÍRUS

4.2.5.1 EXTRAÇÃO DE RNA

Os protocolos moleculares foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores da UDESC-CAV em Lages – Santa Catarina. A extração do RNA do Bornavírus foi realizado de acordo com Silva (2017), utilizando o protocolo com ácido-guanidínio-fenol (Trizol®, Invitrogen, CA), com modificações. Os materiais utilizados foram o cálcio da pena, além de secreções e excreções urofecal, coanal e de esôfago contidas no suabe, sendo que todas foram processadas de forma individual. Antes de iniciar a extração, as amostras eram retiradas do freezer -80°C e descongeladas naturalmente em gelo, e mantidas no gelo durante todo processamento molecular, e os tubos utilizados eram previamente tratados com dicarbonato de dietila (DEPC) e autoclavados, além do uso de ponteiras com filtro, objetivando materiais livres de RNAses. Para as penas, o cálcio era separado com bisturi nº11 esterilizado, depois

cortado em partes menores e colocado em tubos contendo 100 μ L de Trizol® gelado realizando a homogeneização mecânica. As amostras de coana, esôfago e cloaca, o suabe era removido após descongelamento e inserido em tubos contendo 100 μ L de Trizol® gelado com homogeneização em vortex para liberar o vírus em suspensão dos materiais coletados que ficaram aderidos ao suabe seguido da remoção do mesmo. Após, em todas as amostras, realizou-se a incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, depois acrescentado 20 μ L de clorofórmio gelado, homogeneizado em vortex por 15 segundos e centrifugado a 12.000g durante 15 minutos a 4°C.

Transferia-se então a camada aquosa formada para um novo tubo de 1,5 mL com adição de 1 μ l de glicogênio (10mg/ml), para facilitar a visualização do *pellet* devido a ser co-precipitado com RNA mas não interferir na aplicação subsequente de 50 μ L de isopropanol gelado. A amostra foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g durante 10 minutos a 4°C. Após, o sobrenadante foi descartado e com o *pellet* formado ao fundo realizava-se lavagem com 100 μ L de etanol 70% gelado, homogeneizado em vortex seguido de centrifugação a 7.500g por 5 minutos a 4°C, realizando esta etapa por três vezes consecutivas. Descartado o sobrenadante, o *pellet* foi seco durante 15 minutos a vácuo em temperatura ambiente.

Pra solubilização do RNA extraído, foram acrescentados 5 μ L de água ultra pura tratada com DEPEC autoclavada e aquecida, incubado por 15 minutos em banho seco a 55°C. Afim de purificar a amostra, realizou-se tratamento com DNase I (Thermo Scientific™, EUA) acrescidos 0,5 μ L do próprio tampão 10X e 0,1 μ L de DNase incubados por 60 minutos em 37°C, seguido da adição de 50mM EDTA 0,5 μ l com incubação por 10 minutos em 65°C para inativação enzimática. Para finalizar, foi determinado a concentração e pureza do RNA extraído de cada amostra através do NanoDrop™ (Thermo Scientific™, EUA) por espectrofotometria. O RNA de algumas amostras inicialmente analisadas apresentaram uma boa integridade conforme demonstrado pela corrida em gel de agarose dos produtos extraídos, definindo uma padronização do protocolo para prosseguir com as seguintes etapas.

4.2.5.2 RT-PCR DE BORNAVÍRUS AVIÁRIO

Para a detecção molecular foi utilizado como alvo o gene que codifica a proteína matriz (M), sendo denominados como ABVMF (5'-GGTAATTGTTCTGGATGG-3') e ABVMR (5'-ACACCAATGTTCCGAAGACG-3') com produto final de 350 pares de base (pb) de acordo com GUO et al. (2014) com modificações. Estes oligonucleotídeos específicos para Bornavírus aviário foram utilizados em todo o processo de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

O RNA extraído foi transcrito reversamente com a enzima transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de moloney (M-MLV-RT) (Promega, EUA) com utilização de 0,5-1µg de cada amostra conforme protocolo com modificações. Foi adicionado 0,1µg de cada oligonucleotídeo específico (ABVMF e ABVMR) e água ultra pura tratada com DEPEC autoclavada para reação final de 2µL. Homogeneizados delicadamente e depois foram incubados por 5 minutos a 70°C seguido de choque térmico imediato em gelo durante 5 minutos. Foram acrescentados os demais componentes da reação, sendo 0,65µL de tampão 5X Promega, 0,15 µL de DNTP 10mM, 0,125 µL de M-MLV e 0,7 µL de água ultra pura DEPEC autoclava e incubado por 60 minutos a 42°C, sendo armazenadas ao final em -20°C.

Na reação seguida de PCR, utilizou-se 2µL de cDNA como padrão com 1µL de tampão de reação verde 5X, 0,4 µL de MgCl₂ 100mM, 0,2 µL de DNTP mix 10mM, 0,5µL de cada primer ABVMF e ABVMR, 0,05 µL de Taq (GoTaq[®] - Promega, EUA), 4,95µL de água ultra pura DEPEC autoclavada. Em amostras de penas, adicionava-se 15µg de albumina sérica bovina (10mg/ml) na reação. As condições do termociclador utilizadas foram 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, 57°C por 20 segundos e 72°C por 2 minutos, com uma temperatura de extensão final de 72°C por 5 minutos. Em todas as reações foi utilizado o controle positivo, adquirido do tecido encefálico de uma ave psitacéida decorrente de um surto (ARAUJO et al., 2017a) e o controle negativo, água DEPEC autoclava. A eletroforese ocorreu em gel de agarose 1%, a 90V por 50 minutos em tampão TAE 1X (tampão Tris-Acetato-EDTA).

4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados obtidos e compilados foi realizada pela estatística descritiva e inferencial utilizando o Software *Excel*® (2019). Determinou-se a quantidade de aves positivas de acordo com o tipo de cativo, de amostra, espécie e porte da ave, gênero, idade, escore corporal e empenamento considerando o número total de amostras testadas e expressos em porcentagem. A eficiência dos tipos de amostras utilizados (suabe de coana, esôfago e cloaca, e pena) para o diagnóstico molecular foi avaliada pelo método de Kappa Cohen, que determina o índice de concordância entre as quatro diferentes amostras, sendo determinado que a amostra de cloaca seria o padrão ouro para comparativo devido ao seu pioneirismo como amostra de diagnóstico por suabe (RINDER et al., 2009). A concordância é classificada em: <0 = nenhuma concordância; valores entre 0 – 0,19 = baixa concordância; valores entre 0,20 – 0,39 = regular concordância; valores entre 0,40 – 0,59 = moderada concordância; valores entre 0,60 – 0,79 = substancial concordância; valores entre 0,80 – 1,00 = alta concordância.

Foi construído um modelo estatístico para testar a hipótese de associação entre a infecção por Bornavírus aviário e informações específicas do hospedeiro. Foram analisadas como variáveis univariadas o hábitat, a idade, qualidade das penas, a origem das aves e estado corporal. Todos os fatores foram testados para a colinearidade e nenhuma correlação foi encontrada. As variáveis independentes foram submetidas ao teste de qui-quadrado, $p < 0,05$ foram considerados com associação estatística significativa. As variáveis com grandes quantidades de dados em falta (>10%) e variabilidade limitada (< 20%) não foram incluídas na análise. Além disso a variável espécie não foi avaliada devido ao tamanho amostral muito heterogêneo dentro de cada grupo de espécie. O software estatístico utilizado foi o IBM® SPSS® Statistics, versão 25.

4.3 RESULTADOS

A prevalência total para Bornavírus aviário em psitacídeos mantidos em cativeiro foi de 35,9% (69/192). No Criadouro comercial (criatório A) a ocorrência foi de 40,4% (42/104) com aves amostradas habitando gaiolas, comumente com mais de uma ave, e no Jardim Zoológico (criatório B) de 30,7% (27/88) habitavam em recintos compartilhados com diferentes espécies de aves. A distribuição de aves positivas dentro de cada variável pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise descritiva de psitacídeos mantidos em cativeiro com infecção por Bornavírus aviário (BVA), de acordo com cada variável.

Variáveis	Grupos	Número de aves por grupo (%) <i>n=192</i>	Prevalência de BVA (%) <i>n=192</i>	Número de aves positivas (%) <i>n=69</i>
Tipo de cativeiro	Jardim Zoológico	88 (45,8)	27 (14,1)	27 (39,1)
	Criadouro comercial	104 (54,)	42 (21,9)	42 (60,9)
Porte da ave	Pequeno	50 (26,0)	17 (8,8)	17 (24,6)
	Médio	104 (54,2)	43 (22,4)	43 (62,3)
	Grande	38 (19,8)	9 (4,7)	9 (13)
Gênero	Fêmea	19 (9,9)	7 (3,6)	7 (10,1)
	Macho	12 (6,2)	4 (2,1)	4 (5,8)
	Indefinido	161 (83,8)	58 (30,2)	58 (84)
Idade	Filhote	14 (7,3)	7 (3,6)	7 (10,1)
	Juvenil	9 (4,69)	5 (2,6)	5 (7,2)
	Adulto	169 (88)	57 (29,7)	57 (82,6)
Escore corporal	0	1 (0,5)	1 (0,5)	1 (1,4)
	1	44 (22,9)	16 (8,3)	16 (23,2)
	2	130 (67,7)	49 (25,5)	49 (71)
	3	17 (8,8)	3 (1,6)	3 (4,3)
Empenamento	Ruim	30 (15,6)	13 (6,8)	13 (18,8)
	Regular	53 (27,6)	18 (9,4)	18 (26,1)
	Bom	109 (56,8)	38 (19,8)	38 (55,1)

Escore corporal: 0 – Caquético, 1 – Magro, 2 – Regular e 3 – Gordo. Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Quanto a origem 24 espécies eram nativas do Brasil (82,75%) e cinco eram exóticas (17,24%). Na tabela 2 verifica-se as espécies amostradas e as que foram acometidas por BVA e na Tabela 3 a origem dos psitacídeos positivos.

Tabela 2 - Distribuição das frequências e características das espécies de psitacídeos mantidos em cativeiro do estudo de prevalência para Bornavírus aviário (BVA).

Nome popular	Nome científico	Local	Porte da ave	Classificação IUCN	Nº. de aves	Nº. de positivos (%)
Arara-azul-grande	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	B	Grande	VU	4	0 (0/4)
Araracanga	<i>Ara macao</i>	B	Grande	LC	3	33,3 (1/3)
Arara-canindé	<i>Ara ararauna</i>	B	Grande	LC	7	14,2 (1/7)
Arara-vermelha	<i>Ara chloropterus</i>	B	Grande	LC	3	0 (0/3)
Ararajuba	<i>Guaruba guarouba</i>	B	Médio	VU	4	100 (4/4)
Aratinga mitrata	<i>Psittacara mitratus</i>	B	Médio	LC	3	0 (0/3)
Cuiú-cuiú	<i>Pionopsitta pileata</i>	B	Pequeno	LC	6	16,6 (1/6)
Eclectus	<i>Eclectus polychloros</i>	B	Médio	LC	3	0 (0/3)
Jandaia-verdadeira	<i>Aratinga jandaya</i>	B	Médio	LC	1	0 (0/1)
Lóris arco-íris	<i>Trichoglossus haematodus</i>	B	Pequeno	LC	2	50 (1/2)
Lóris bailarino	<i>Lorius lory</i>	B	Médio	LC	2	50 (1/2)
Maitaca-de-cabeça-azul	<i>Pionus menstruus</i>	B	Pequeno	LC	6	16,6 (1/6)
Maitaca-verde	<i>Pionus maximiliani</i>	A e B	Pequeno	LC	9	33,3 (3/9)
Maracanã-de-colar	<i>Primolius auricollis</i>	B	Grande	LC	1	0 (0/1)
Maracanã-verdadeira	<i>Primolius maracana</i>	A e B	Grande	NT	14	42,8 (6/14)
Marianinha-da-cabeça-preta	<i>Pionites melanocephalus</i>	B	Pequeno	LC	1	0 (0/1)
Papa-cacau	<i>Amazona festiva</i>	B	Médio	NT	1	100 (1/1)
Papagaio-charão	<i>Amazona pretrei</i>	B	Médio	VU	1	0 (0/1)
Papagaio-chauá	<i>Amazona rhodocorytha</i>	B	Médio	VU	2	100 (2/2)
Papagaio-de-peito-roxo	<i>Amazona vinacea</i>	A e B	Médio	EN	21	42,8 (9/21)
Papagaio-do-mangue	<i>Amazona amazonica</i>	A	Médio	LC	10	10 (1/10)
Papagaio-moleiro	<i>Amazona farinosa</i>	A	Médio	NT	2	100 (2/2)
Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	A e B	Médio	NT	44	36,36 (16/44)
Periquitão-maracanã	<i>Psittacara leucophthalmus</i>	A e B	Médio	LC	9	77 (7/9)
Periquito-verde	<i>Brotogeris tirica</i>	A e B	Pequeno	LC	9	44,4 (4/9)
Periquito-rei	<i>Eupsittula aurea</i>	B	Pequeno	LC	4	25 (1/4)
Ring neck	<i>Psittacula krameri</i>	B	Grande	LC	4	25 (1/4)
Tiriba-da-testa-vermelha	<i>Pyrrhura frontalis</i>	A e B	Pequeno	LC	12	58,3 (7/12)
Tiriba-de-barriga-vermelha	<i>Pyrrhura perlata</i>	B	Pequeno	VU	1	0 (0/1)

A= Criatório comercial; B= Jardim zoológico; LC= Pouco preocupante; NT= Quase ameaçada; VU= Vulnerável; EN= Em perigo – Classificação pela IUCN (2016, 2017, 2018 e 2019). Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Tabela 3 - Origem dos psitacídeos positivos para Bornavírus aviário (BVA) nos criatórios A e B do estado de Santa Catarina.

Origem	Criatório A	Criatório B	Total
	N.º de aves (%) <i>n=42</i>	N.º de aves (%) <i>n=27</i>	Aves positivas (%) <i>n=69</i>
Obtidos por doação			
<i>CETAS</i>	22 (52,4)	-	22 (31,9)
<i>PMA/SC e IBAMA</i>	1 (2,4)	20 (74,1)	21 (30,4)
Obtidos por compra/troca			
<i>De outro município</i>	3 (7,2)	-	3 (4,3)
<i>De outro estado</i>	2 (4,8)	2 (7,4)	4 (5,8)
Nascimento no criatório	8 (19,0)	5 (18,5)	13 (18,8)
Sem informação	6 (14,3)	-	6 (8,7)

CETAS: Centro de Triagem de Animais Silvestres; PMA: Polícia Militar Ambiental; IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Os resultados da análise univariada para os fatores associados a positividade para BVA podem ser observados na Tabela 4, não demonstrando associação significativa para a infecção.

Tabela 4 - Análise de regressão logística para fatores associados a positividade para Bornavírus aviário em psitacídeos mantidos em cativeiro no estado de Santa Catarina.

Fator associado	Grupos	Univariada	
		Valor de <i>p</i>	OR (95%IC)
Local	Jardim Zoológico	0,21	0,65 (0,36 - 1,19)
	Criadouro comercial	-	-
Idade	Filhote	1,00	0,70 (0,13-3,68)
	Juvenil	0,33	2,43 (0,63 – 9,42)
	Adulto	-	-
Empenamento	Ruim	0,58	1,44 (0,57 - 3,63)
	Regular	0,87	1,00 (0,50 - 2,01)
	Bom	0,50	1,45 (0,64-3,30)
Escore corporal	0	-	-
	1	0,98	0,94 (0,46 - 1,92)
	2	0,17	2,82 (0,77 - 10,32)
	3	0,23	2,83 (0,71 – 11,32)

Escore corporal: 0 – Caquético, 1 - Magro, 2 – Regular e 3 – Gordo. OR: Odds ratio ou razão de chance; IC: intervalo de confiança. Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

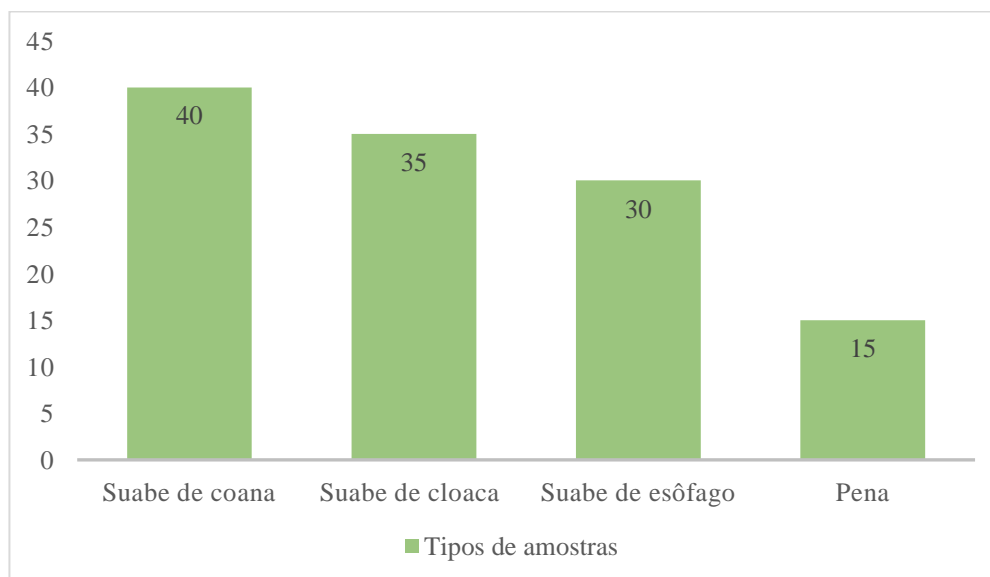
Na Tabela 5 é possível verificar a frequência de positivities das 69 aves acometidas nos diferentes tipos de amostras coletadas. O tipo de amostra e sua respectiva positividade para BVA é demonstrado na Figura 2.

Tabela 5 - Resultado comparativo do RT-PCR entre as amostras positivas para Bornavírus aviário (BVA) em psitacídeos mantidos em cativeiro.

Nº ave	Suabe de coana	Suabe de esôfago	Suabe de cloaca	Pena	Local	Nº ave	Suabe de coana	Suabe de esôfago	Suabe de cloaca	Pena	Local
1	-	+	-	+	B	104	+	-	-	-	A
2	+	-	-	-	B	106	+	-	-	-	A
5	-	-	+	-	B	107	+	+	-	-	A
7	-	-	+	-	B	108	-	+	-	-	A
10	-	-	+	-	B	118	-	+	-	-	A
11	+	-	-	-	B	131	-	-	-	+	A
24	-	-	+	-	B	135	+	-	-	-	A
32	-	+	-	-	B	144	+	-	+	-	A
37	+	-	-	-	B	151	+	-	+	-	A
38	+	+	-	-	B	157	-	+	-	-	A
39	+	+	+	-	B	158	-	-	+	-	A
40	+	-	-	-	B	159	-	-	+	-	A
41	+	+	+	-	B	160	-	-	-	+	A
42	+	+	-	-	B	162	+	-	+	-	A
57	+	-	+	-	B	164	+	-	-	-	A
58	+	+	-	-	B	165	-	-	+	-	A
62	+	-	-	-	B	167	+	-	-	-	A
64	-	-	+	-	B	173	-	+	-	-	A
65	+	+	+	-	B	175	-	-	+	-	A
66	+	+	+	+	B	177	-	-	+	+	A
67	+	+	+	+	B	178	-	-	+	-	A
68	+	-	-	-	B	179	+	+	+	+	A
70	+	+	+	-	B	180	-	+	-	-	A
71	-	+	-	+	B	182	+	+	-	+	A
72	+	+	-	-	B	183	+	+	+	+	A
73	+	+	-	-	B	184	+	-	+	-	A
86	+	-	-	-	B	185	-	-	+	-	A
92	-	-	+	-	A	186	+	+	-	-	A
96	-	-	+	-	A	187	+	+	+	+	A
98	-	+	-	-	A	188	+	+	+	+	A
99	+	-	-	-	A	189	+	+	+	+	A
100	-	-	+	-	A	190	-	+	+	-	A
101	-	-	+	-	A	191	+	-	+	+	A
102	-	+	-	-	A	192	+	-	+	+	A
103	+	-	-	-	A	TOTAL	40	30	35	15	A

+ =Resultado positivo; - =Resultado negativo; A= Criatório comercial; B= Jardim zoológico. Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Figura 2 - Relação dos psitacídeos cativos positivos para Bornavírus aviário (BVA) por RT-PCR de acordo com o tipo de amostra.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A análise de concordância realizada pelo teste de Kappa Cohen comparando a positividade da amostra de cloaca com as demais encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Correlação entre os resultados das amostras de suabe de cloaca com suabe de coana, esôfago e material de pena através do RT-PCR para Bornavírus aviário (BVA) em psitacídeos mantidos em cativeiro.

	Suabe de cloaca		Suabe de coana		Suabe de esôfago		Pena	
	+	-	+	-	+	-	+	-
+	18	17	12	23	9	26		
-	22	135	18	139	6	151		
Total	40	152	30	162	15	177		
Coefficiente Kappa	0,35		0,24		0,28			

+ =Resultado positivo; - =Resultado negativo. Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Para a amostra de coana a espécie mais acometida foi Papagaio-verdaderio (*Amazona aestiva*), para esôfago em quantidades iguais foram o Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e Periquitão-maracanã (*Psittacara leucophthalmus*), para a cloaca o Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) e Tiriba-da-testa-vermelha (*Pyrrhura frontalis*), e pena em Periquitão-Maracã (*Psittacara leucophthalmus*) e Periquito-verde

(*Brotogeris tirica*). Na Tabela 7 é possível evidenciar a quantidade de aves positividades por tipo de amostra coletada.

Tabela 7 - Resultado comparativo do RT-PCR de Bornavírus aviário (BVA) entre os tipos de amostras positivas nos psitacídeos coletados.

	Região coleta	Quantidade de aves positivas <i>n=69</i>
Um local de coleta	Coana	16
	Esôfago	13
	Cloaca	8
	Pena	2
Dois locais de coleta	Coana+Esôfago	7
	Coana+Cloaca	5
	Coana+Pena	1
	Esôfago+Pena	2
	Esôfago+Cloaca	1
Três locais de coleta	Coana+Esôfago+Cloaca	4
	Coana+Esôfago+Pena	1
	Coana+Cloaca+Pena	2
	Esôfago+Cloaca+Pena	0
Quatro locais de coleta	Coana+Esôfago+Cloaca+Pena	7

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Das aves positivas para BVA, 8,69% (6/69) apresentarem alterações comportamentais, de empenamento e de escore corporal no momento da coleta conforme pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 - Psitacídeos positivos para Bornavírus aviário (BVA) com alterações clínico-comportamentais no momento da coleta.

Nº da ave	Descrição	Deteção	Evolução
nº1 – Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	Agredido por outra ave, estado corporal 1 (magro) e empenamento ruim	Pena e suabe de esôfago	Adoeceu e está vivo
nº 2 – Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	Má adaptação à qualquer recinto, agredido constantemente por outras aves, estado corporal 1 (magro) e empenamento ruim	Suabe de coana	Adoeceu e morreu com lesões sugestivas de DDP
nº5 – Cuiú-cuiú (<i>Pionopsitta pileata</i>)	Autoarrancamento de penas, apteria generalizada, empenamento ruim	Suabe de cloaca	Não adoeceu
nº98- Papagaio-de-peito-roxo (<i>Amazona vinacea</i>)	Autoarrancamento de penas, apteria em asas, empenamento ruim	Suabe de coana	Não adoeceu
nº11 – Papagaio verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	Escore corporal 0 (caquético)	Suabe de esôfago	Não adoeceu
nº 175 – Maitaca-verde (<i>Pionus maximiliani</i>)	Emaciação crônica, escore corporal 1 (magro)	Suabe de cloaca	Não adoeceu

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Entre as aves positivas, no criatório A não houve óbitos e no criatório B 40,74% (11/27) dos psitacídeos positivos morreram. Destes óbitos 18,18% (2/11) haviam adoecido e tiveram lesões sugestivas de DDP e 81,81% (9/11) morreram sem alterações prévias. O histórico dessas aves e a descrição de necropsia estão apresentadas no APÊNDICE 3. Além disso, um protocolo de orientação o BVA para psitacídeos mantidos em cativeiro foi elaborado para fornecimento para as instituições parceiras deste trabalho (APÊNDICE 4).

4.4 DISCUSSÃO

Este estudo identificou uma alta prevalência para BVA por RT-PCR em psitacídeos mantidos em cativeiro em duas instituições no estado de Santa Catarina. Assim, enfatiza-se que o BVA está circulando no Brasil, conforme relatado em outros estudos (DONATTI et al., 2014; ENCINAS-NAGEL et al., 2014; PHILADELPHO et al., 2014; AZEVEDO et al., 2017; ARAUJO et al., 2017a; SILVA et al., 2020), sendo presente em psitacídeos cativos também na região Sul do Brasil. Em ambos os cativeiros havia histórico de casos de BVA e também DDP, e portanto confirma-se a permanência do vírus. O criatório A (Comercial), local que identificou-se o primeiro surto de DDP no estado (ARAUJO et al., 2017a), apresentou prevalência superior ao criatório B (Jardim zoológico), e assim como em outro estudo o criatório comercial excedeu a positividade, porém em relação a um criatório conservacionista (SILVA et al., 2020). Em relação aos riscos potenciais de introdução e infecção por BVA em psitacídeos em cativeiro, há preocupação já relatada por Donatti et al. (2014) sobre a manutenção de aves nativas e exóticas nas mesmas instalações, evidenciadas também neste estudo em ambos os criatórios.

No criatório A, as aves permaneciam em gaiolas coletivas em um mesmo ambiente, favorecendo maior aproximação entre as aves do que no criatório B onde habitavam em recintos. Apesar disso, em ambos criatórios foi possível evidenciar psitacídeos negativos para BVA convivendo junto ou próximo de outros infectados, sugerindo que pode haver variação na suscetibilidade à infecção por este vírus entre diferentes espécies de psitacídeos (RAGHAV et al., 2010; KLOET et al., 2011; MURRAY et al., 2017). Por fim, em um mesmo ambiente com aves positivas, estas poderão ou não desenvolver a doença (LIERZ et al., 2009), no qual verificou-se que apenas uma minoria apresentou sinais sugestivos de DDP.

Assim como no trabalho de SILVA et al. (2020), inúmeros fatores podem ter contribuído para a manutenção e surgimento de novos casos de BVA em ambos locais de cativeiro, como a falta de exigência para relatar casos de BVA pelos profissionais de medicina veterinária, assim como ausência de padronização de diagnóstico e controle da doença, falha na implantação e verificação de regras de biossegurança em população de psitacídeos mantidos em cativeiro, são alguns dos fatores que influenciam e foram observados. Verificou-se também que a maior quantidade de aves positivas foi obtida por doação consentida, do CETAS no criatório A, e da PMA/SC e/ou IBAMA no

criatório B. Em outros estudos de outras regiões do país também verificou-se a presença de aves positivas oriundas de centros de triagem e/ou reabilitação de animais (DONATTI et al., 2014; ENCINAS-NAGEL et al., 2014; AZEVEDO et al., 2017; SILVA et al., 2020). Não foi informado na maioria destes casos do estudo, se estas aves possuíam histórico relacionado com BVA ou se houve medidas de controle sanitário quando adquiridas, sendo estes dados de aves que são translocadas e/ou comercializadas relevantes para a epidemiologia do BVA (PINTO et al., 2018; PINTO et al., 2019; RUBBENSTROTH et al., 2016; SILVA et al., 2020). Em um estudo de psitacídeos que estavam em CETAS no estado de São Paulo, após um período acomodados em recintos, foram encaminhados em ordem decrescente para áreas de solturas, criatório comercial e conservacionista, seguindo as normas da Instrução Normativa n° 179/2008 (IBAMA 2008), portanto, não realizando testagem para detecção de BVA nestas aves, contribuindo para sua disseminação (MENDONÇA et al., 2020).

Além disso, para o criatório A foi verificado que aves nascidas no local tiveram 80% (8/10) de positividade, sendo apenas uma ave adulta e as demais filhotes, e no criatório B entre as positivas havia 18,51% (5/27), sendo todas adultas com 60% (3/5) de óbitos sem alterações prévias. Isto sugere possíveis maneiras de transmissão, de forma indireta por meio da alimentação artificial de suporte ou objetivando a domesticação para venda como aves de companhia como ocorre no criatório A, podendo haver alguma falha na biossegurança por fômites (SILVA et al., 2020), direta por via horizontal pelo contato fecal-oral quando compartilham o ambiente (LIERZ et al., 2009; RINDER et al., 2009; VILLANUEVA et al., 2010; RAGHAV et al., 2010; HEATLEY et al., 2012; MONACO et al., 2012; ENCINAS-NAGEL et al., 2014), inclusive pela alimentação regurgitada se estiverem com as aves geradoras (KIERSKI et al., 2012), e por via vertical pois são aves que nasceram no cativeiro, porém ainda há poucos detalhes sobre a transmissão viral durante o desenvolvimento do ovo, sobre os embriões infectados e as taxas de mortalidade de filhotes positivos (LIERZ et al., 2011; MONACO et al., 2012; BOATRIGT-HOROWITZ, 2020; HOPPES et al., 2020).

Não houve correlação entre a positividade para BVA e os dados epidemiológicos obtidos, provavelmente pela população estudada ser muito heterogênea entre cada variável ou porque de fato não possuem influência na positividade para o vírus. A falta de correlação pode indicar que aves sem qualquer alteração podem ser positivas, sendo um fator importante para o entendimento da transmissão, proporcionado um estado de portador assintomático. Neste trabalho, a maioria das aves portadoras não desenvolveram

sinais sugestivos de DDP, o que também pode ser visto em mamíferos afetados pelo Bornavírus clássico, que apesar da infecção poder ser fatal, a maioria dos portadores é persistentemente infectada sem apresentar alterações clínicas (LUDWIG et al., 2000), podendo ser também uma realidade para o BVA (KLOET et al., 2009; LIERZ et al., 2009; KISTLER et al., 2010; HEFFELS-REDMANN et al., 2011).

Foi possível evidenciar que a maioria das aves infectadas por BVA foram adultos, assim como em outro estudo (ENCINAS-NAGEL et al., 2014). Porém entre as classificações da faixa etária, os juvenis como também relatado por Gibson et al. (2019) e filhotes foram mais afetados dentro do seu número amostral do que os adultos, apesar de não se obter correlação estatística entre a faixa etária e a infecção do BVA. Psitacídeos infectados verticalmente ou em estágio inicial de vida, podem se tornar aves portadoras saudáveis do ponto de vista clínico e desempenham um papel importante na epidemiologia das infecções por BVA (MONACO et al., 2012; GARTNER et al., 2020), logo a positividade maior que 50% nas aves classificadas como filhotes e juvenis, é um dado relevante para acompanhamento.

Nesse estudo houve variação de alterações clínicas, assim como em estudos também de infecção natural de BVA em psitacídeos cativos (KISTLER et al., 2010; HEFFELS-REDMANN et al., 2012; SILVA et al., 2020). As alterações clínico-comportamentais foram baixas, com diferenças entre os criatórios A e B. No momento da coleta, no criatório A havia 1,92% (2/104) de aves com alterações, no criatório B 4,54% (4/88), além de mais dois psitacídeos positivos que adoecerem após a coleta neste criatório, totalizando 13,04% (9/69). Houve alteração comportamental e agressão por outras aves, sendo ambos eventos associados a multifatores e ainda não relacionado com a infecção de BVA, mas podem tornar o ambiente estressante, e este fato pode desencadear os sinais clínicos (BOATRIGT-HOROWITZ, 2020; SILVA et al., 2020). Sobre as alterações de escore corporal, a caquexia já foi detectada em aves positivas para BVA (DONATTI et al., 2014), o qual foi notado em uma única ave com escore corporal 0 (caquética). Além disso, foram detectados 36,36% (16/44) positivos entre os psitacídeos com escore corporal 1 (magro), sendo possível indicativo para ocorrência de disfunções do sistema digestório, pois há alta relação entre o escore corporal com ao desenvolvimento da DDP na avaliação *pos mortem* de aves infectadas pelo BVA (SILVA et al., 2020).

As espécies de psitacídeos que apresentaram positividade para BVA nesse estudo, a maioria já foi diagnosticada em estudos prévios (DONATTI et al., 2014; ENCINAS-

NAGEL et al., 2014; PHILADELHO et al., 2014; SILVA et al., 2020), demonstrado que espécies positivas em outros estados, também foram detectadas em Santa Catarina. No entanto, houve detecção de BVA em dois Papagaios-moleiro (*Amazona farinosa*), espécie nativa e constitui um relato inédito no Brasil, e preocupante por ser uma espécie nativa classificada como “Quase ameaçada” (NT) (IUCN, 2016), e espécies exóticas como um Lóris bailarino (*Lorius lory*) e um Lóris arco-íris (*Trichoglossus haematodus*) ambos classificados como “Pouco preocupante” (LC) (IUCN 2018). O maior acometimento de aves de porte médio, pode estar associado a possuírem a maior quantidade amostral, coabitação de ambientes, além da grande quantidade pertencentes ao gênero *Amazona* que é nativo do Brasil, diferente de outro estudo na América do Norte em que o gênero mais acometido por BVA foi *Psittacus* nativo da África (GIBSON et al., 2019). Este gênero *Amazona* possui maior densidade populacional em CETAS de todo o país, pois é atingido drasticamente pelo comércio ilegal, devido sua popularidade como animal de estimação (ICMBIO, 2011; FREITAS et al., 2015), e assim é destinado em grandes quantidades a outros lugares, como verificado no criatório A que houve a entrega de aves do gênero *Amazona* pelo CETAS estadual.

Este vírus pode ser encontrado nas fezes e urina de aves sugerindo a transmissão pela rota fecal-oral (LIERZ et al., 2009; RINDER et al., 2009; VILLANUEVA et al., 2010; RAGHAV et al., 2010; HEATLEY et al., 2012; ENCINAS-NAGEL et al., 2014), sendo reforçada neste estudo pela presença do vírus decorrente de infecção natural de BVA em coletas de esôfago, coana e cloaca. Esta detecção em amostras de regiões extraneurais, contribui para a confirmação de ampla distribuição tecidual que o BVA possui, se diferenciando do Bornavírus que afetam mamíferos, e estando de acordo com Weissenbok et al. (2009), Rinder et al. (2009) e Araujo et al. (2017b), abrangendo não psitacídeos e psitacídeos.

Em relação ao diagnóstico de BVA neste estudo, evidenciou-se que se fosse utilizado apenas amostras individualizadas poderia indicar uma falsa positividade baixa, devido a alta heterogeneidade de positividade entre as quatro amostras coletadas, por características próprias de cada tipo de amostra que podem interferir no processo molecular e da infecção de cada hospedeiro. Alguns dos componentes de ocorrência natural identificados como PCR inibidores incluem sais biliares e polissacarídeos complexos em amostras fecais (LANTZ et al., 1997; MONTEIRO et al., 1997), ureia na urina (KHAN et al., 1991), sendo que essa também pode estar presente na cloaca e nas fezes, pois nas aves as excreções fecais e urinárias são juntas, componentes sanguíneos

como heme e imunoglobulina (ABU AL-SOUND et al., 2001) presentes em alguns suabes coletados, por ser utilizado em regiões que possuem mucosa suscetíveis ao sangramento por atrito no momento da coleta, e melanina e/ou mioglobina presente em diversos tecidos (ECKHART et al., 2000) como neste caso em melanina na pena.

Há procedimentos laboratoriais que podem auxiliar na remoção destes inibidores, mas que não promovem eficácia completa de algumas amostras como as de origem cloacal (KLOET et al., 2011). De acordo com Das et al. (2009) é difícil identificar os inibidores naturais que ocorrem nas amostras fecais, pois pode variar devido à complexidade da composição fecal que depende do habitat, dieta e manejo da ave. Nesse sentido, é importante testar também a eficácia da DNA polimerase pois estas enzimas possuem diferentes níveis de sensibilidade com os inibidores das amostras (RADSTROM et al., 2004), sendo a causa mais comum de falha no PCR e resultados falso-negativos (DAS et al., 2009). Portanto, uma abordagem para reduzir esta inibição, é otimizar as enzimas e as condições que melhor se adaptam ao tipo de cada amostra (DAS et al., 2009), conforme realizou-se neste estudo e com o uso de uma DNA polimerase com alta sensibilidade. Além disso, o tampão de guanidina, presente no reagente utilizado para extração do material genético das amostras, proporciona uma eficaz amplificação de vírus RNA em amostras de aves (EVERS et al., 2007).

O suabe cloacal é a amostra pioneira para o diagnóstico clínico de BVA, e por este motivo foi utilizado como padrão neste estudo para comparativo estatístico, mesmo que possa apresentar resultados falsos negativos (LIERZ et al., 2009; RAGHAV et al., 2009). Isto pode ocorrer pela presença de inibidores moleculares em amostras que contenham fezes (EVERS et al., 2007; DAS et al., 2009; KLOET et al., 2011), além da eliminação intermitente já evidenciada (KLOET et al., 2009; HOPPES et al., 2010; RAGHAV et al., 2010; PAYNE et al., 2011), fatos que justificam os diferentes resultados encontrados para esse tipo de amostra. Verificou-se que uma ave em que já havia antigo resultado negativo para BVA através de suabe de cloaca, apresentou desta vez positividade para amostra de coana. Além disso, o suabe de cloaca não foi a amostra mais sensível para detecção do BVA por RT-PCR (KLOET et al., 2011; PHILADELPHO et al., 2014), e não houve praticamente concordância estatística entre a cloaca e as outras três amostras, determinando que não há um tipo de amostra ideal para o diagnóstico clínico de BVA por RT-PCR, pois a amostragem em conjunto forneceu uma maior positividade do que os resultados individualizados.

A maior quantidade de positividade pela amostra de coana pode ter sido influenciado pela possibilidade da coana ser a região coletada com menor quantidade de inibidores moleculares como os presentes nas excreções cloacais, restos alimentares contaminantes e substâncias sanguíneas contidas nas amostras de esôfago e da melanina presente nas penas, e/ou sugere-se a possibilidade de que nesta região tenha maior quantidade de vírus. Com este resultado, reforça-se o potencial desta amostra para métodos de diagnóstico *antemortem* de BVA (RAGHAV et al., 2010; ARAUJO et al., 2017b). Em estudos de infecção experimental, foi possível detectar molecularmente em amostra de suabe de coana após 85 dias da infecção (GANCZ et al., 2009) e em outro após 60 dias sendo a coana uma região indicada para detectar aves cronicamente infectadas por *parrot bornavirus 2* (ARAUJO et al., 2017b).

O uso de suabe de esôfago também obteve sucesso na detecção de BVA neste trabalho, sendo este tipo de amostra ainda não evidenciada na literatura para detecção deste vírus. A detecção nesta região é de certa forma esperada, pois o diagnóstico utilizando biópsia de ingluvío já foi relatado (GREGORY et al., 1996; BERHANE et al., 2011; GANCZ et al., 2009; LIERZ et al., 2009; SCHMIDT 2015), além de que amostras teciduais do esôfago já foram detectáveis para BVA em estudo experimentais (ARAUJO et al., 2017b) e naturais em psitacídeos (PAYNE et al., 2011; DONATTI et al., 2014) e em não psitacídeos (DELNATTE et al., 2013; RUBBENSTROTH et al., 2013).

Foi extraído material genético também de penas, utilizando três unidades pois há dados de que uma única pena pode gerar resultados inconstantes, talvez pela quantidade de material genético viral ou até idade da pena selecionada (DE KLOET et al., 2011). Este é um tipo de amostra que pode ser mais sensível porque é menos provável que seja afetado por contaminantes, por substâncias sanguíneas ou matéria urofecal (BOATRIGT-HOROWITZ, 2020). A presença de inibidores conhecidos de PCR como a melanina (DAS et al., 2009), um elemento comum na coloração das penas de aves (ZHANG et al., 2010), foi controlado utilizando a albumina sérica bovina, porém, a presença de outros inibidores nas penas não poderá ser totalmente excluída (DE KLOET et al., 2011). As aves positivas para BVA que apresentaram autoarrancamento de penas, já foram observadas anteriormente em outros estudos (GANCZ et al., 2009; HORIE et al., 2012; PHILADELPHO et al., 2014; FLUCK et al., 2019). Dentre as classificações realizadas para qualidade do empenamento, a maior positividade estava dentro da classificação ruim, apesar de não haver correlação estatística. Mamíferos infectados com o Bornavírus clássico, podem desenvolver um comportamento anormal de prurido na

fase inicial da infecção (LUDWIG et al., 2000), logo, de acordo com Fluck et al. (2019) o autoarrancamento de penas também pode ser um comportamento anormal causado pelo BVA devido há uma possível correlação com a presença de anticorpos anti-BVA.

A detecção de BVA nas penas, sugere que também poderiam desempenhar um papel na transmissão do vírus (DE KLOET et al., 2011), assim como foi relatado como forma de transmissão do Circovírus que causa a anemia das galinhas, comprovado por lesões histológicas compatíveis com a doença nas penas, e ao serem homogeneizadas e utilizadas para infectar pintos de um dia de idade pelas vias ocular, nasal e orofaringe, foi identificado a infecção pela sorologia, virologia e patologia, demonstrando que as penas carreavam o vírus e que contribuíam para a disseminação horizontal (DAVIDSON et al., 2009). Além disso, as penas podem ser usadas na detecção individual ou de recinto (DAVIDSON et al., 2009) e possuem alta resistência na integridade do material genético, pois já houve detecção do BVA até um mês após a coleta mesmo mantidas em temperatura ambiente (DE KLOET et al., 2011).

Portanto, as vantagens da realização do teste molecular *antemortem* ocorre pela possibilidade de ser uma ferramenta de triagem acessível (GANCZ et al., 2009), coleta rápida, pouco invasiva e de diagnóstico eficiente. Este estudo colabora para a conservação *ex-situ* de psitacídeos, reforça a necessidade de um planejamento com medidas de prevenção e controle desta doença emergente (DONATTI et al., 2014), e a necessidade de desenvolver regulamentação sanitária sobre psitacídeos que são comercializados e mantidos em cativeiro no Brasil (SILVA et al., 2020).

4.5 CONCLUSÃO

A prevalência de Bornavírus aviário por RT-PCR em psitacídeos em dois cativeiros do estado de Santa Catarina foi alta. A infecção ocorreu nos dois criatórios coletados, com maior positividade no comercial. Identificou-se a maior predominância do vírus por meio do suabe de coana, em espécies pertencentes ao gênero *Amazona*, em aves assintomáticas e oriundas por doação de órgãos públicos.

A associação da coleta de suabe de coana, de esôfago e de cloaca além da pena para o diagnóstico molecular de BVA foi validada, sendo este método conjunto de amostras mais eficaz para o diagnóstico *antemortem* do que uso individual de suabe de cloaca. Durante o período do projeto, uma pequena quantidade das aves positivas tiveram evolução clínica sugestivas de DDP e/ou óbito.

REFERÊNCIAS

ABU AL-SOUD, W.; RADSTROM, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 485–493, 2001.

AMARASINGHE, G. K.; BÀO, Y.; BASLER, C. F.; BAVARI, S.; BEER, M.; BEJERMAN, N. & CALISHER, C. Taxonomy of the order Mononegavirales: update. **Archives of Virology**, v. 163, p. 2283–2294, 2018.

ARAUJO, J. L. et al. Proventricular Rupture Associated with Psittaciforme 1 Bornavirus (PaBV) Infection in a Major Mitchell Cockatoo (*Lophochroa leadbeateri*). **Veterinary Pathology**, v. 9, p. 83-87, 2016.

ARAUJO J. L., et al. Surto de doença da dilatação proventricular em araras-canindé (*Arara ararauna*) no estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p.1331-1335, 2017a.

ARAUJO, J. L.; RECH, R.R.; HEATLEY, J.J.; GUO, J.; GIARETTA, P.R.; TIZARD, I.; et al. From nerves to brain to gastrointestinal tract: A timebased study of parrot bornavirus 2 (PaBV-2) pathogenesis in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 2017b.

ARAUJO L. J.; HAMEED S. S.; TIZARD I.; ESCANDON P.; GIARETTA P. R.; HEATLEY J. J.; HOPPE S.; RECH R.R.; Cardiac Lesions of Natural and Experimental Infection by Parrot Bornaviruses. Infectious Disease. **Journal of Comparative Pathology**, v.174, p. 104-112, 2020.

AZEVEDO, N.P. Detecção de Bornavírus, Poliomavírus e Circovírus em amostras biológicas, utilizando PCR e RT-PCR, de psitacídeos com diferentes aspectos clínico. **Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, p. 23-35, 2017.

BAÑOS-VILLALBA, A.; BLANCO, G.; DÍAZ-LUQUE, J. A.; DÉNES, F. V.; HIRALDO, F.; TELLA, J. L. Seed dispersal by macaws shapes the landscape of an Amazonian ecosystem. **Scientific Reports**, London, v. 7, 2017.

BLANCO, G.; BRAVO, C.; PACIFICO, E. C.; CHAMORRO, D.; SPEZIALE, K. L.; LAMBERTUCCI, S. A.; HIRALDO, F.; TELLA, J. L. Internal seed dispersal by parrots: an overview of a neglected mutualism. **PeerJ**, v. 4, n. 688, 2016.

BERHANE, Y.S.D.; NEWMAN, S.; TAYLOR, M.; NAGY, E.; BINNINGTON, B.; HUNTER, B. Peripheral neuritis in psittacine birds with proventricular dilatation disease. **Avian Pathology**, v. 30, p. 563-570, 2001.

BERHANE, Y., SMITH, D.A., NEWMAN, S., TAYLOR, M., NAGY, E., BINNINGTON, B., HUNTER, B. Peripheral neuritis in psittacine birds with proventricular dilatation disease Peripheral neuritis in psittacine birds with proventricular dilatation disease. **Avian Pathology**, v. 30, p; 37–41, 2010.

BOATRIGT-HOROWITZ, S. L. Avian Bornaviral Ganglioneuritis: Current Debates and Unanswered Questions. **Psychology Department, University of Rhode Island, Kingstown**, 2020.

CATÃO-DIAS, J. L. Doenças e seus impactos sobre a biodiversidade. **Biodiversidade/Artigos, Ciência e Cultura**, p.32-34, 2003.

COLLAR, N. J. Family psittacidae (parrots). In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. **Handbook of the birds of the world**, p. 280-479, 1997.

DAVIDSON, I.; ARTZI, N.; SHKODA, I., et al. The contribution of feathers in the spread of chicken anemia virus. **Virus Research**, v. 132, p. 152–159, 2009.

DAS A., SPACKMAN E., PANTIN-JACKWOOD J., SUAREZ DL. Removal of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) inhibitors associated with cloacal swab samples and tissues for improved diagnosis of avian influenza virus by RT-PCR. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 771–778, 2009.

DE KLOET, S.R.; DORRESTEIN, G.M. Presence of avian bornavirus RNA and anti-avian bornavirus antibodies in apparently healthy macaws. **Avian Diseases**, v. 53, p. 568–573, 2009.

DE KLOET, A. H.; KERSKI, A.; DE KLOET, S. R. Diagnosis of avian bornavirus infection in psittaciformes by serum antibody detection and reverse transcription polymerase chain reaction assay using feather calami. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 421-429, 2011.

DELNATTE, P.; OJKIC, D.; DELAY, J.; CAMPBELL, D.; CRAWSHAW. G.; SMITH, D.A. Pathology and diagnosis of avian bornavirus infection in wild Canada geese (*Branta canadensis*), trumpeter swans (*Cygnus buccinator*) and mute swans (*Cygnus olor*) in Canada: a retrospective study. **Avian Pathology**, v.42, n.2, p. 114-28, 2013.

DELNATTE, P.; NAGY, E.; OJKIE, D., et al. Avian bornavirus in free-ranging waterfowl: prevalence of antibodies and cloacal shedding of viral RNA. **Wild Diseases**, v. 50, p. 512-523, 2014.

DONATTI, R. V. et al. Fatal proventricular dilatation disease in captive native psittacines in Brazil. **Avian Diseases**, v. 58, n. 1, p. 187-93, 2014.

ECKHART, L.; BACH, J.; BAN, J.; et al. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 271, p. 726–730, 2000.

ENCINAS-NAGEL, N. et al. Avian Bornavirus in Free-Ranging Psittacine Birds, Brazil. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 20, p. 2103-2106, 2014.

EVERS, D.I.; SLEMONS, R.D.; TAUBENBERGER, J.K., Effect of preservative on recoverable RT-PCR amplicon length from influenza virus RNA in bird feces. **Avian Diseases**, v. 51, p. 965–968, 2007.

FLUCK, A. et al. Correlation of avian bornavirus-specific antibodies and viral ribonucleic acid shedding with neurological signs and feather-damaging behaviour in psittacine birds. **Veterinary Record**, v. 184, p.476, 2019.

FREITAS, A. C. P., et al. Diagnóstico de animais ilegais recebidos no centro de triagem de animais silvestres de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, no ano de 2011. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 163-170, 2015.

GALETTI, M.; RODRIGUES, M. Comparative seed predation on pods by parrots in Brazil. **Biotropica, Malden**, v. 24, n. 2, p. 222-224, 1992.

GALETTI, M.; GUIMARÃES JR, P.; MARSDEN, S. Padrões de riqueza, risco de extinção nos psitacídeos. Im: GALETTI, M.; PIZO, M. A. Ecologia e conservação de Psitacídeos no Brasil. 1. Ed. Belo Horizonte: **Melopsittacus Publicações científicas**, p.17-26, 2002.

GANCZ, A.Y., KISTLER, A.L., GRENINGER, A.L., FARNOUSHI, Y., MECHANI, S., PERL, S., BERKOWITZ, A., PEREZ, N., CLUBB, S., DERISI, J.L., GANEM, D., LUBLIN, A. Experimental induction of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) inoculated with brain homogenates containing avian bornavirus 4. **Virology Journal**, v. 6, p. 100, 2009.

GARTNER, A.M.; LINK, J.; BÜCKING, B.; ENDERLEIN, D.; HERZOG, S.; PETZOLD, J.; MALBERG, S.; HERDEN, C.; LIERZ, M. Age-dependent development and clinical characteristics of an experimental parrot bornavirus-4 (PaBV-4) infection in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **Avian Pathology**, v.20, 2020.

GIBSON, D.J.; NEMETH, N.M.; BEAUFRÈRE, H.; VARGA, C.; EAGALLE, T.; SUSTA, L. Captive Psittacine Birds in Ontario, Canada: a 19-year retrospective study of the causes of morbidity and mortality. **Journal of Comparative Pathology**, v. 171, p. 38-52, 2019.

GRAY, P. et al. Use of avian bornavirus isolates to induce proventricular dilatation disease in conures. **Emerging Infectious Diseases journal**, v.16, p. 472-479, 2010.

GREGORY, C. R., K. S. LATIMER, F. D. NIAGRO, B. W. RITCHIE, R. P. CAMPAGNOLI, T. M. NORTON, AND C. B. Greenacre. A review of proventricular dilatation syndrome. **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, v. 8, p. 69–75, 1994.

GREGORY C.R.; LATIMER K.S.; CAMPAGNOLI R.P.; RITCHIE B.W. Histologic evaluation of the crop for diagnosis of proventricular dilatation syndrome in psittacine birds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 76-80, 1996.

GREGORY, N. G.; ROBINS, J. K. A body condition scoring system for layer hens, **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 41, p. 55-559, 1998.

GUEDES, N. M. R. Araras azuis: 15 anos de estudos no pantanal. **IV simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do pantanal** - Corumbá-MS, 2004.

GUO, J.; BAROCH, J.; RANDALL, A.; TIZARD, I. Complete Genome Sequence of an Avian Bornavirus Isolated from a Healthy Canadian Goose (*Branta canadensis*). **Genome Announcements**, v. 24, n. 5, 2013.

GUO, J.; PAYNE, S.; ZHANG, S.; TURNER, D.; TIZARD, I.; SUCHODOLSKI, P. Avian bornaviruses: diagnosis, isolation, and genotyping. **Current Protocols in Microbiology**, v.1, n.34, p. 1-33. 2014.

HAMEED, S.; GUO, J.; TIZARD, I.; et al. Studies on immunity and immunopathogenesis of parrot bornaviral disease in cockatiels. **Virology**, v. 515, p. 81–91, 2018.

HECKMANN, J.; et al. Investigation of different infection routes of parrot bornavirus in cockatiels. **Avian Diseases**, v. 61, p. 90-95, 2017.

HEFFELS-REDMANN U., et al. Occurrence of avian bornavirus infection in captive psittacines in various European countries and its association with proventricular dilatation disease. **Avian Pathology**, v. 40, n. 4, p. 419-26, 2011.

HEFFELS-REDMANN, U.; ENDERLEIN, D.; HERZOG, S.; PIEPENBRING, A.; BURKLE, M.; NEUMANN, D.; et al. Follow-up investigations on different courses of natural avian bornavirus infections in psittacines. **Avian Diseases**. 56(1):153–9, 2012.

HONKAVUORI, K.S., SHIVAPRASAD, H.L., WILLIAMS, B.L., QUAN, P.L., HORNIG, M., STREET, C., PALACIOS, G., HUTCHISON, S.K., FRANCA, M., EGHOLM, M., BRIESE, T., LIPKIN, W.I. Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. **Emerging Infectious Disease**, v. 14, p.1883-1886, 2008.

HOPPE, S.; GRAY, P. L.; PAYNE, S.; SHIVAPRASAD, H. L.; TIZARD, I. The isolation, pathogenesis, diagnosis, transmission, and control of avian bornavirus and proventricular dilatation disease. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v.13, p.495–508, 2010.

HOPPE, S. M.; I. TIZARD & H.L. SHIVAPRASAD. Avian bornavirus and proventricular dilatation disease: diagnostic, pathology, prevalence and control. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 16, p. 339-355, 2013.

HOPPE, S.M.; SHIVAPRASAD, H.L. Update on Avian Bornavirus and Proventricular Dilatation Disease: Diagnostics, Pathology, Prevalence, and Control. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 23, n.2, p.337-351, 2020.

HORIE, M.; UEDA, K.; UEDA, A.; HONDA, T.; TOMONAGA, K. Detection of avian bornavirus 5 RNA in *Eclectus roratus* with feather picking disorder. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 56, p. 346–349, 2012.

IBAMA. (**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**). Instrução Normativa Nº 179, de 25 de junho de 2008.

ICMBIO. Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica. Brasília: **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, 2011.

ICMBIO. Plano de ação nacional para conservação da arara-azul-de-lear. **Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade**, 2 ed. 144p. 2012a.

ICMBIO. Plano de ação nacional para conservação da ararinha-azul. **Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade**, 1 ed. 140p. 2012b.

ICMBIO. **Centro Nacional de Pesquisa e Conservação das Aves Silvestres. Avaliação do estado de conservação das aves brasileiras**, 2014.

IUCN. Red List of Threatened Species. **International Union for Conservation of Nature**, 2016.

IUCN. Red List of Threatened Species. **International Union for Conservation of Nature**, 2017.

IUCN. Red List of Threatened Species. **International Union for Conservation of Nature**, 2018.

IUCN. Red List of Threatened Species. **International Union for Conservation of Nature**, 2019.

KERSKI, A.; DE KLOET, A. H.; DE KLOET S. R. Vertical Transmission of avian bornavirus in psittaciformes: avian bornavirus rna and anti-avian bornavirus antibodies in eggs, embryos, and hatchlings obtained from infected sun conures (*Aratinga solstitialis*). **Avian Diseases**, v. 56, n. 3, p.471-478, 2012.

KESSLER, S.; HEENEMANN, K.; KRAUSE, T.; TWIETMEYER, S.; FUCHS, J.; LIERZ, M.; CORMAN, V.M.; VAHLENKAMP, T.M.; RUBBENSTROTH, D. Monitoring of free-ranging and captive Psittacula populations in Western Europe for avian bornaviruses, circoviruses and polyomaviruses. **Avian Pathology**, v. 49, n. 2, p.119-130, 2020.

KHAN, G.; KANGRO, H. O.; COATES, P.J.; et al. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p. 360–365, 1991.

KISTLER, A. L. et al. Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. **Virology Journal**, 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. **Journal Virology**, v.5, p. 88, 2010.

KRANZ, J.B.; ESCANDON, P.; MUSSER, J.M.B. Environmental stability of avian Bornavirus: pH and drying. **Procedure Exotics Congresses**. San Antonio (TX), August 29–September, v.2, p. 89, 2015.

KRAUS, R. H. S. The role of Mallard (*Anas platyrhynchos*) in the spread of avian influenza: genomics, population genetics, and flyways [Thesis]. **Wageningen, NL: Wageningen University**, p.6-96, 2011.

KOMORIZONO, R.; TOMONAGA, K.; MAKINO, A. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of parrot bornavirus 4. **Journal of Virological Methods**, v. 275, p. 113-749, 2019.

LANTZ, P.G.; MATSSON, M.; WADSTROM, T.; et al. Removal of PCR inhibitors from human fecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 28, p. 159–167, 1997.

LIERZ, M., HAFEZ, H.M., HONKAVUORI, 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 Pathology**, v. 38, p. 491–496, 2009.

LIERZ, M.; PIEPENBRING, A.; HERDEN, C.; et al. Vertical transmission of avian bornavirus in psittacines. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 17, p. 2390–2391, 2011.

LIERZ, M.; PIEPENBRING, A.; HEFFELS-REDMANN, U.; HERZOG, S.; HERDEN, C.; ENDERLEIN, D. Experimental infection of cockatiels with different avian bornavirus genotypes. **Proceedings of the Association of Avian Veterinarians**, Louisville, 2012.

LUDWIG, H.; BODE, L.; GOSZTONYI, G. Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. **Progress in Medical Virology Home**, v. 35, p. 107–151, 1988.

LUDWIG, H.; BODE, L. Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology, **Scientific and Technical Review**, v. 19, p. 259–88, 2000.

MA, Y.; FENG, Y.; LIU, D., ET AL. Avian influenza virus, Streptococcus suis serotype 2, severe acute respiratory syndrome-coronavirus and beyond: molecular epidemiology, ecology and the situation in China. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, p. 2735-2737, 2009.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**, v1. ed.-Brasília, DF, ICMBio, Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/livro_vermelho_2018_vol1.pdf>, 2018.

MENDONÇA, R.; AMARAL, A. A.N.; VOLTOLINI, J. C. Recepção, triagem e soltura de psitacídeos no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) IBAMA Lorena, SP. **Revista Biociências**, Universidade de Taubaté, v.26, n1, p. 70-79, 2020.

MONACO, E.; HOPPE, S.; GUO, J.; TIARD, I. The detection of avian bornavirus within psittacine eggs. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 26., n. 3, p. 144-148, 2012.

MONTEIRO, L.; BONNEMAISON, D.; VEKRIS, A.; et al. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 995–998, 1997.

MURRAY, O.; TURNER, D.; STREETER, K.; GUO, J.; SHIVAPRASAD, H.L.; PAYNE, S.; TIZARD, I. Apparent resolution of parrot bornavirus infection in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **Veterinary Medicine**, v. 6, n.8, p. 31-36, 2017.

OLBERT, M.; ROMER-OBERDORFE, A.; HERDEN, C.; et al. Viral vector vaccines expressing nucleoprotein and phosphoprotein genes of avian bornaviruses ameliorate homologous challenge infections in cockatiels and common canaries. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

OUYANG, N., STORTS, R., TIAN, Y., WIGLE, W., VILLANUEVA, I., MIRHOSSEINI, N., PAYNE, S., GRAY, P., TIZARD, I. Histopathology and the detection of avian bornavirus in the nervous system of birds diagnosed with proventricular dilatation disease. **Avian Pathology**, v.38, p. 393–401, 2009.

PAYNE, S.; SHIVAPRASAD, H. L.; MIRHOSSEINI, N.; GRAY, P.; HOPPE, S.; WEISSENBOCK, H.; TIZARD, I. Unusual and severe lesions of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) acting as healthy carriers of avian bornavirus (ABV) and subsequently infected with a virulent strain of ABV. **Avian Pathology**, v. 40, p.15–22, 2011.

PAYNE, S. L.; DELNATTE, P.; GUO, J.; HEATLEY, J. J.; TIZARD, I.; SMITH, D. A. Birds and Bornaviruses. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, p.145–156, 2012.

PERPINAN, D.; FERNANDEZ-BELLON, H.; LOPEZ, C.; RAMIS, A. Lymphoplasmacytic myenteric, subepicardial, and pulmonary ganglioneuritis in four nonsittacine birds. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 21, p. 210–214, 2007.

PHILADELPHO, N. A., et al. Survey of bornaviruses in pet psittacines in Brazil reveals a novel parrot bornavirus. **Veterinary Microbiology**, v. 174, p.584-590, 2014.

PIEPENBRING, A.K., et al. Pathogenesis of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 18, p. 264-241, 2012.

PIEPENBRING, A.K.; ENDERLEIN, D.; HERZOG,S.; ALBADI, B.; HEFFELSREDMANN, U.; HECKMANN, J.; LANGE-ERBST, H.; HERDEN, C.; LIERZ, M..ParrotBornavirus(PaBV)-isolate causes diferente disease patterns in cockatiels than PaBV-4.**Avian Pathology**, v. 45, p.156–168, 2016.

PINTO, M.C.; RONDAHL, V.; BERG, M, et al. Detection and phylogenetic analysis of parrot bornavirus 4 identified from a Swedish Blue-winged macaw (*Primolius maracana*) with unusual nonsuppurative myositis. **Infection Ecology and Epidemiology**, v.9, 2018.

PINTO, M.C.; CRAVEIRO, H.; JOHANSSON, WENSMAN. J.; CARVALHEIRA, J.; BERG, M.; THOMPSON, G. Bornaviruses in naturally infected *Psittacus erithacus* in Portugal: insights of molecular epidemiology and ecology. **Infection Ecology Epidemiology**, v. 6, n.9, 2019.

RADSTROM, P.; KNUTSSON, R.; WOLFFS, P.; et al. Pre-PCR processing. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 133–146, 2004.

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. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 495–508, 2010.

RASO, T.F. *Chlamydophila psittaci* em psitacídeos de vida livre e cativo e suas implicações à saúde pública. **Tese (Doutorado)**. Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho". Jaboticabal, São Paulo, 79f, 2004.

RICKLEFIS, R. E. Intrinsic aging-related mortality in birds. **Journal of Avian Biology**, v. 21, p.103-11, 2000.

RINDER, M., et al. Broad tissue and cell tropism of avian bornavirus in parrots with proventricular dilatation disease. **Journal Virology**, v. 83, p. 5401-5407, 2009.

RITCHIE, B.W. Management of avian infectious diseases. In: **European Association of Avian Veterinarians Conference**, p.417-438, 2004.

RUBBENSTROTH, D. et al. Efficient isolation of avian bornaviruses (ABV) from naturally infected psittacine birds and identification of a new ABV genotype from a salmon-crested cockatoo (*Cacatua moluccensis*). **Veterinary Microbiology**, v. 161, p.36-42, 2012.

RUBBENSTROTH, D., et al. Avian bornaviruses are widely distributed in canary birds (*serinus canaria f. domestica*). **Veterinary Microbiology**, v. 165, p.287-295, 2013.

RUBBENSTROTH, D., et al. Phylogenetic analysis supports horizontal transmission as a driving force of the spread of avian bornaviruses. **PLoS One**, v. 11, 2016.

RUNGE, S.; OLBERT, M.; HERDEN, C.; et al. Viral vector vaccines protect cockatiels from inflammatory lesions after heterologous parrot bornavirus 2 challenge infection. **Vaccine**, v. 35, n. 4, p.557–563, 2017.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, p. 5463–5467, 1997.

SA-ARDTA, P.; RINDER, M.; SANYATHITISEREE, P.; WEERAKHUN, S.; LERTWATCHARASARAKUL, P.; LORSUNYALUCK, B.; SCHMITZ, A.; KORBEL, R. First detection and characterization of Psittaciform bornaviruses in naturally infected and diseased birds in Thailand. **Veterinary Microbiology**, v.230, p. 62-71, 2019.

SASSA, Y.; HORIE, M.; FUJINO, K.; NISHIURA, N.; OKAZAKI, S.; FURUYA, T.; NAGAI, M.; OMATSU, T.; KOJIMA, A.; MUZIGAMI, M.; UEDA, K.; IKI, H.; EBISAWA, K.; TOMONAGA, K.; MIZUTANI, T. Molecular epidemiology of avian bornavirus from pet birds in Japan. **Virus Genes**, v.47, n. 1, p. 173-177, 2013.

SCHLOTTAU K, et al. Fatal encephalitic Borna disease virus 1 in solid-organ transplant recipients. **The New England Journal of Medicine**, v. 379, p. 1377-1379, 2018.

SCHMIDT R.E.; REAVILL D.R.; PHALEN D.N. Gastrointestinal system and pancreas, In: Schmidt R.E., Reavill D.R. & Phalen D.N. (Eds), **Pathology of Pet and Aviary Birds**, p.55-94, 2015.

SCHNEIDER, U.; SCHWEMMLE, M.; STAEHELI, P. Genome trimming: a unique strategy for replication control employed by Borna disease virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)**, v. 102, p.3441–3446, 2005.

SCHWEMMIE, M.; LIPKIN, W.I. Models and mechanisms of Bornavirus pathogenesis. **Drug Discovery Today**, v.1, p.211-216, 2004.

SHIVAPRASAD, H. Proventricular dilatation disease in a peregrine falcon (*Falco peregrinus*), **Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians**. Association of Avian Veterinarians, Bedford, p. 107-108, 2008.

SICK, H. Ornitologia Brasileira. **Rio de Janeiro: Nova Fronteira**, 3ed., p. 113-360, 1997.

SILVA, P. A Predação de sementes pelo maracanã-nobre (*Diopsittaca nobilis*, Psittacidae) em uma planta exótica (*Melia azedarach*, Meliaceae) no oeste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 13, n. 2, p. 183-185, 2005.

SILVA, A.S.G.; RASO, T.F.; COSTA, E.A.; GOMEZ, S.Y.M.; MARTINS, N.R. Parrot bornavirus in naturally infected Brazilian captive parrots: Challenges in viral spread control. **PLoS ONE**, v. 15, v.6, 2020.

STAEHELI, P., RINDER, M., KASPERS, B., Avian bornavirus associated with fatal disease in psittacine birds. **Journal Virology**, v. 84, p. 6269–6275, 2010.

STEINMETZ, A.; PEES, M.; SCHMIDT, V.; WEBER, M.; KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.E.; OECHTERING, G. Blindness as a sign of proventricular dilatation disease in a grey parrot (*Psittacus erithacus erithacus*). **Journal of Small Animal Practice**, v.49, p. 660–662, 2008.

SUTHERLAND, M.; PHALEN, D. N.; HERZOG, S.; MAIER-SAM, K.; LIERZ, M. Detection of Immunoreactivity to Psittaciform Bornavirus in the Serum of a Wild Cacatuid in Victoria, Australia. **Journal Wildlife Diseases**, 2021.

TAPPE, D.; FRANK, C.; HOMEIER-BACHMANN, T., et al. Analysis of exotic squirrel trade and detection of human infections with variegated squirrel bornavirus 1, Germany, 2005 to 2018. **Euro Surveill**, v. 24, p.1800-18483, 2019.

THRUSFIELD, M. Inqueritos. **Epidemiologia veterinária**, São Paulo: Rocca,. p. 229-230, 2004.

TIZARD, I.; SHIVAPRASAD, H. L.; GUO, J, et al. The pathogenesis of proventricular dilatation disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 17, p.110–126, 2016.

VILLANUEVA, I.; GRAY, P.; MIRHOSSEINI, N.; PAYNE, S.; HOPPE, S.; HONKAVUORI, K. S.; BRIESE, T.; TURNER, D.; TIZARD, I. The diagnosis of

proventricular dilatation disease: use of a Western blot assay to detect antibodies against avian Borna virus. **Veterinary Microbiology**, v. 143, p.196–201, 2010.

WEISSENBOCK, H.; BAKONYI, T.; SEKULIN, K.; EHRENSPERGER, F.; DONELEY, R. J. T.; DURWAL, R.; HOOP, R.; ERDELYI, K.; GAL, J.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Avian bornaviruses in psittacine birds from Europe and Australia with proventricular dilatation disease. **Emerging Infectious Disease**, v.15, n.9, p.1453-1459, 2009a.

WEISSENBOCK, H., SEKULIN, K., BAKONYI, T., HOGLER, S., NOWOTNY, N. Novel avian bornavirus in a nonpsittacine species (Canary; *Serinus canaria*) with enteric ganglioneuritis and encephalitis. **Journal Virology**, v. 83, p. 11367–11371, 2009b.

YOUNG, A. M.; HOBSON, E. A.; LACKEY, L.B.; WRIGHT, T.F. Survival on the ark: life-history trends in captive parrots. **Animal Conservation**, v. 15, p. 28-43, 2012.

ZHANG, F.; KEARNS, S.L.; ORR, P.J, et al. Fossilized melanosomes and the colour of retaceous dinosaurs and birds. **Nature**, v.463, p. 1075–1078, 2010.

ZIMMERMANN, V., et al. Impact of antigenic diversity on laboratory diagnosis of Avian bornavirus infections in birds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, p.769-777, 2014.

APÊNDICE

Apêndice 1- Questionário para coleta de dados epidemiológicos dos psitacídeos amostrados.

QUESTIONÁRIO								
Nº AVE	RECINTO	ESPECIE	IDENTIFICAÇÃO	GÊNERO	FAIXA ETÁRIA	ESTADO CORPORAL	PENAS	COLETA
								<input type="checkbox"/> CO <input type="checkbox"/> E
								<input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> PI
								<input type="checkbox"/> CO <input type="checkbox"/> E
								<input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> CL
								<input type="checkbox"/> CO <input type="checkbox"/> E
								<input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> CL
								<input type="checkbox"/> CO <input type="checkbox"/> E
								<input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> CL
								<input type="checkbox"/> CO <input type="checkbox"/> E
								<input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> CL
								<input type="checkbox"/> CO <input type="checkbox"/> E
								<input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> CL
								<input type="checkbox"/> CO <input type="checkbox"/> E
								<input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> CL
								<input type="checkbox"/> CO <input type="checkbox"/> E
								<input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> CL
								<input type="checkbox"/> CO <input type="checkbox"/> E
								<input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> CL
								<input type="checkbox"/> CO <input type="checkbox"/> E
								<input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> CL
								<input type="checkbox"/> CO <input type="checkbox"/> E
								<input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> CL
								<input type="checkbox"/> CO <input type="checkbox"/> E
								<input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> CL

D-Ínguena
M-Média
G-Grande

A-Antebra
C-Chip
O-Outro

Q-Florido
L-Macho
I-Indefinido

F-Fêmea
J-Jovem
A-Adulto

0-Caquético
1-Magro
2-Regular
3-Gordo

RD-Ruím
RD-Regular
BD-Bom

CO-Coeca
PI-Perna
E-Esôfago
CL-Cloaca

Apêndice 2- Termo de consentimento para participação do projeto.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Eu, _____ declaro que concordo em participar como colaborador no fornecimento de animais para as atividades previstas no projeto “Bornavírus em psitacídeos mantidos em cativeiro no estado de Santa Catarina: caracterização molecular e epidemiológica”. Afirmo que fui informado (a) de maneira clara e detalhada sobre os objetivos e metodologia do projeto proposto e esclareci minhas dúvidas, estando ciente que a qualquer momento, poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão sobre esta colaboração, se assim o desejar. Neste termo, fica acordado que: todos os dados deste projeto serão tornados de meu conhecimento: minha participação não acarretará em custos além do fornecimento de animais na condição supracitada, e que não receberei nenhuma compensação financeira em caso de haver óbito, invalidez temporária ou permanente do (s) animal (ais) em estudo, seja por parte da professora responsável, do grupo de pesquisa a que pertence ou da própria Universidade de Estado de Santa Catarina. Também estou ciente que será necessário suabe de coana, esôfago, cloaca e coleta de penas. Assim sendo, declaro que concordo em participar desse projeto permitindo que meus animais sejam utilizados, conforme quantidade e características descritas a seguir:

Espécie: Ordem Psittaciformes

Finalidade: Conservação ex situ

Idade: entre 1 mês até 40 anos.

Quantidade: _____

Local:

Data:

Nome: _____

Assinatura do Participante: _____

Nome: Renata Assis Casagrande

Assinatura do Pesquisador: _____

Apêndice 3- Avaliação necroscópica de psitacídeos positivos para Bornavírus aviário no criatório B.

(continua)

Nºave	Dados obtidos na coleta	Histórico	Descrição macroscópica	Diagnóstico	Amostra positiva e data de óbito
nº 24 – Araracanga (<i>Ara macao</i>)	Adulto, escore corporal 2 e empenamento regular) ruim.	Agredido por outras, óbito no dia seguinte.	Magra, empenamento quebradiço, escoriações na face e no dorso, Proventrículo severamente dilatado. Hepatoesplenomegalia.	Sugestivo de DDP	Suabe de cloaca. Óbito 15 meses após a coleta
nº 64 – Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>)	Adulto, escore corporal 1 e empenamento bom.	Encontrado morto no recinto.	Estado avançado de autólise	Inconclusivo	Suabe de cloaca. Óbito três meses após a coleta
nº86 – Lóris arco-íris (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Adulto, escore corporal 1 e empenamento regular	Animal encontrado morto no recinto.	Magra. Intestinos com mucosa hiperêmica, dilatado e com estrutura caseosa de aproximadamente 1cm aderida. Esplenomegalia e rinomegalia.	Compatível com enterite caseosa	Suabe de coana. Óbito dois meses após a coleta
nº72 – Lóris bailarino (<i>Lorius lory</i>)	Adulto, escore corporal 2 e empenamento bom.	Animal encontrado morto no recinto	Pescoço, cabeça e parte da musculatura peitoral devorados. Cavidade celomática com sangue livre.	Politraumatismo	Suabe de coana e esôfago. Óbito 11 meses após a coleta
nº40 – Maracanã-verdadeira (<i>Primolius maracana</i>)	Adulto, escore corporal 2 e empenamento bom.	Animal agredido por arara-canindé, com óbito imediato.	Cabeça com laceração cutânea, extenso hematoma e fratura de calota craniana.	Politraumatismo	Suabe de coana. Óbito oito meses após a coleta
nº68 - Papagaio-chauá (<i>Amazona rhodocorytha</i>)	Adulto, escore corporal 2 e empenamento bom.	Animal encontrado morto no recinto.	Esplenomegalia e hepatomegalia acentuada.	Sugestivo de clamidiose	Suabe de coana e pena. Óbito 12 meses após a coleta

aviário no criatório B.

(conclusão)

nº71 - Papagaio- chauá (<i>Amazona rhodocorytha</i>)	Adulto, escore corporal 3 (gordo) e empenamento bom.	Animal encontrado no recinto	Pulmões congestos, com vasos ingurgitados, áreas esbranquiçadas e dilatação acentuada das câmaras cardíacas. Hepatomegalia.	Coração Inconclusivo	Suabe de esôfago e pena. Óbito dois meses após a coleta
nº58- Papagaio-de- peito-roxo (<i>Amazona vinacea</i>)	Adulto, escore corporal 2 (regular) e empenamento bom.	Animal encontrado no recinto	Pulmões congestos, hepatomegalia discreta.	Inconclusivo	Suabe de coana e esôfago. Óbito 12 meses após a coleta
nº57- Papagaio-de- peito-roxo (<i>Amazona vinacea</i>)	Adulto, escore corporal 2 (regular) e empenamento bom.	Animal encontrado no recinto. Companheiro morreu na última semana.	Ausência de alterações.	Inconclusivo	Suabe de coana e cloaca. Óbito 12 meses após a coleta
nº2 – Papagaio- verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	Adulto, escore corporal 1 (magro) e empenamento ruim. Não se adapta em nenhum recinto, vive em gaiola.	Animal internado com quadro de incoordenação e diarreia, com alimentos mal digeridos nas fezes.	Magra, empenamento de aspecto opaco. Presença de fezes aderidas ao empenamento pericloacal. Quantidade ínfima de conteúdo alimentar no trato gastrointestinal. Proventrículo com evidente dilatação e adelgaçamento de suas paredes. Intestinos com vasos severamente congestos e com conteúdo líquido e fétido. Esplenomegalia.	Sugestivo de DDP	Suabe de coana. Óbito 10 meses após a coleta
Nº70 – Tiriva-comum (<i>Pyrrhura frontalis</i>)	Adulto, escore corporal 2 (regular) e empenamento bom.	Animal encontrado no recinto.	Pescoço com extenso hematoma e escoriações na face e dorso. Úmero esquerdo e metatarso direito fratura completa.. Sangue livre na cavidade celomática.	Politrauma- tismo	Suabe de coana, esôfago e cloaca. Óbito três meses após a coleta

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Apêndice 4- Protocolo de orientação e controle para Bornavírus aviário (BVA) em psitacídeos mantidos em cativeiro.

- Controle ambiental:

Limpeza do ambiente e utensílios com detergente, alvejante diluído ou luz ultravioleta;

Vassoura de fogo quando possível em ambiente externo;

Alojamento das aves ao ar livre quando for possível termicamente;

Sugere-se não misturar aves de espécies e/ou origens diferentes;

Evitar superlotação.

- Controle na população de psitacídeos:

Realizar quarentena e isolamento de todas as aves recém-chegadas;

Aves novas devem ser testadas com métodos conjuntos como sorologia e PCR;

Não há amostra tecidual ideal ou mais sensível;

Amostras sugeridas: Suabe de coana, suabe de esôfago, suabe de cloaca e pena;

Quando não for possível utilizar as quatro, ao menos três tipos de amostras diferentes;

Positivas sem sinais clínicos ou doentes devem ser separadas das demais aves;

Filhotes de aves infectadas devem ser mantidos separados de outras aves e monitorados para o desenvolvimento da doença;

Sugere-se não realizar a reprodução de aves positivas.

Coleta:

1. Suabe novo e estéril utilizar na região a ser coletada;
2. Evitar sangue, alimentos e fezes em excesso;
3. Solicitar orientações ao laboratório de como armazenar a amostra.