

GONÇALO ANDRÉ DE OLIVEIRA PORTELA

**DETEÇÃO MOLECULAR E PREVALÊNCIA DE
CIRCOVÍRUS DOS PSITACÍDEOS EM PAPAGAIOS-
CINZENTOS (*Psittacus erithacus*) EM PORTUGAL
CONTINENTAL**

ORIENTADOR: Professora Doutora Cátia Marques

**UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS
Faculdade de Medicina Veterinária**

LISBOA

2022

GONÇALO ANDRÉ DE OLIVEIRA PORTELA

**DETEÇÃO MOLECULAR E PREVALÊNCIA DE
CIRCOVÍRUS DOS PSITACÍDEOS EM PAPAGAIOS-
CINZENTOS (*Psittacus erithacus*) EM PORTUGAL
CONTINENTAL**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção de Grau de Mestre em Medicina Veterinária, no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 25 de julho de 2022, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n . 255/2022, de 11 de julho de 2022, com a seguinte composição:

Presidente: Prof . Doutora Sofia Van Harten, por delegação da Prof . Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Prof. Doutor David Ramilo

Orientadora: Prof . Doutora Cátia Marques

Co-Orientadora: Prof . Doutora Margarida Alves (membro não integrante do júri)

Orientador Externo: Mestre Mário Nóbrega (membro não integrante do júri)

UNIVERSIDADE LUSÓFONA DE HUMANIDADES E TECNOLOGIAS
Faculdade de Medicina Veterinária

LISBOA

2022

Dedicatória

Para a Teresa, o João, a Leónia, a Eugénia, o Augusto e o Adelino

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Cátia Marques pela sua sábia orientação, por ter estado sempre presente e disponível para me auxiliar e dar as suas sugestões, pela exigência e rigor com que me acompanhou e pela sua simpatia. Agradeço também pelas palavras de encorajamento, sempre certas, durante as fases menos boas e pelos conselhos para o futuro.

Agradeço à Professora Doutora Margarida Alves por me orientar, pelo apoio e ajuda durante o tempo que passei no laboratório, por nunca me deixar desanimar quando os resultados não eram o esperado, pela confiança que depositou em mim e pela transmissão de conhecimentos. Agradeço também pelo seu empenho para que o desenvolvimento deste estudo fosse possível. Obrigado pela dedicação com que me acompanhou durante todo este percurso.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, a todos os docentes e colaboradores, pelos seis anos que aqui passei, pelos ensinamentos, pela exigência e pela dedicação. Agradeço também pelo apoio financeiro à realização deste projeto, pelo suporte das despesas, sem o qual o mesmo não seria possível.

Agradeço ao Drº Mário Nóbrega, por me orientar, pelo conhecimento que partilhou comigo, pelo apoio que me demonstrou, pela exigência, pelas oportunidades, pela confiança e, sobretudo, pela amizade.

Agradeço à INOVE GENE, em especial à Doutora Ana Paula Terrasso por toda a ajuda no desenvolvimento deste projeto, pelo apoio que deu à realização do mesmo e pela incansável disponibilidade para qualquer questão.

Agradeço ao Instituto Ricardo Jorge na pessoa da Professora Doutora Alexandra Nunes pela colaboração neste projeto.

Agradeço à equipa da Exoticvets por me terem recebido de braços abertos. Em especial ao Enfermeiro Tiago, pelo companheirismo, partilha de conhecimentos e memórias. O meu muito obrigado também à Drª Susana e à Drª Catarina.

Ao Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e a toda a sua equipa. Agradeço também à Francisca por me ter acompanhado nestes meses.

Deixo também o meu agradecimento a todos os criadores que aceitaram colaborar com o estudo, que por motivos profissionais terão que permanecer no anonimato.

Agradeço ao Hospital Veterinário Escolar da FMV-ULHT, a todos os médicos, enfermeiros, auxiliares e bolseiros, pelos dois anos de bolsa que aí passei, pela oportunidade e pelo desafio. Agradeço especialmente à Daniela, ao Joel e à Cláudia.

Agradeço ao Professor Doutor João Ribeiro Lima por toda a ajuda na estruturação deste projeto.

Agradeço aos meus pais e irmão que foram imprescindíveis durante todo o meu percurso até aqui. Sem eles não teria sido possível. O meu obrigado por todos os valores que me passaram e por me oferecerem uma família feliz. Obrigado também por todos os sacrifícios e esforços que tiveram que fazer para que este dia chegasse e pela vossa paciência. Muito obrigado por me apoiarem incondicionalmente em tudo.

Agradeço aos meus avós, Leónia, Augusto, Eugénia e Adelino, por todos os ensinamentos, por todas as histórias, abraços e memórias, por me terem feito e continuarem a fazer de mim um jovem feliz e sortudo por vos ter.

A toda a minha família pelo apoio que me deram ao longo da minha vida. Em especial aos meus tios, à Joana, ao Tomás, à Elsa, ao Rui, ao Ricardo e ao David.

Agradeço ao Rui, à Daniela, à Carolina, à Catarina, ao Miguel, à Inês, à Sofia, ao Rafael, à Solange, ao Miguel, à Mariana e à Carolina, por serem a família que eu escolhi, pelo crescimento conjunto, pelo amor que estará sempre presente independentemente da distância, pela amizade incondicional, por estarem sempre por perto e por me apoiarem em todos os momentos.

Agradeço aos amigos que a faculdade me deu. Em especial à Catarina, ao João, à Marta, à Rita, à Adriana, ao Ruben, à Vanessa, ao Manel, à Rute, à Benedita e à Mónica. Obrigado pelo companheirismo, pelos momentos partilhados e por todo o apoio ao longo de todo o meu percurso académico.

Agradeço ao Jardim Zoológico de Lisboa que será sempre um local muito especial que me viu crescer e a todas as pessoas que por lá encontrei. Especialmente ao Pedro, à Tatiana, à Luísa, à Catarina e ao Diogo, obrigado pela vossa amizade.

Agradeço à Federação Académica de Medicina Veterinária e à International Veterinary Students Association por todos os ensinamentos, partilhas e memórias. Um agradecimento especial à Sara, à Soraia, ao Miguel, à Catarina, à Alícia, à Joana, à Alejandra, à Inês, à Ana, à Carolina, à Inês e à Lara.

Agradeço à família do Mário pela forma como sempre me receberam de braços abertos e por me fazerem sentir sempre bem-vindo.

Resumo

Circovírus dos psitacídeos (PsCV, do inglês *psittacine circovirus*) ou vírus da doença do bico e das penas (BFDV, do inglês *beak and feather disease virus*) é responsável pela Doença do Bico e das Penas dos Psitacídeos (PBFD, do inglês *Psittacine Beak and Feather Disease*), que afeta aves, apresentando particular relevância nos psitacídeos, incluindo o Papagaio-Cinzento (*Psittacus erithacus*). Esta é uma infecção que pode assumir uma forma hiperaguda, aguda, crônica ou subclínica, sendo responsável por elevados prejuízos económicos e de saúde animal (incluindo a morte) em aves mantidas em cativeiro. A presença do vírus encontra-se atualmente descrita em 40 países, com variações significativas na sua prevalência, de acordo com a região geográfica dos estudos realizados. Contudo, existe uma lacuna de conhecimento quanto à prevalência desta infecção no nosso País.

O presente trabalho teve, por isso, como principal objetivo estimar a prevalência de BFDV em *Psittacus erithacus* assintomáticos mantidos em coleções de diversos criadores em Portugal.

Um total de 100 colheitas sanguíneas foram realizadas a *Psittacus erithacus* assintomáticos mantidos em coleções privadas de aves em várias regiões de Portugal Continental. A presença de DNA viral foi avaliada através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) *nested*. O DNA de BFDV foi detetado em 8 amostras, obtendo-se uma prevalência de 8%.

Dada a importância clínica deste vírus e a escassez de informação sobre a distribuição do mesmo em Portugal, o presente trabalho representa um importante contributo epidemiológico e clínico para a fauna cativa de *Psittacus erithacus* neste País.

Palavras-chave: Circovírus dos psitacídeos, BFDV, *Psittacus erithacus*, Doença do Bico e das Penas dos Psitacídeos.

Abstract

Psittacine circovirus (PsCV) or beak and feather disease virus (BFDV) is responsible for Psittacine Beak and Feather Disease (PBFD), which affects birds, with particular relevance in psittaciformes, including the Grey Parrot (*Psittacus erithacus*). This is an infection that can take a hyperacute, acute, chronic or subclinical form, being responsible for high economic and animal health losses (including death) in birds kept in captivity. The presence of the virus is currently described in 40 countries, with significant variations in its prevalence, according to the geographical region of the studies that obtained it. However, there is a gap in knowledge about the prevalence of this infection in Portugal.

Therefore, the main objective of this study was to estimate the prevalence of BFDV in asymptomatic *Psittacus erithacus* kept in collections from several breeders in Portugal.

A total of 100 blood samples were taken from asymptomatic *Psittacus erithacus* kept in private bird collections in several regions of mainland Portugal. The presence of viral DNA was assessed by nested polymerase chain reaction (PCR). BFDV DNA was detected in 8 samples, with a prevalence of 8%.

Given the clinical importance of this virus and the scarcity of information on its distribution in Portugal, this work represents an important epidemiological and clinical contribution to the captive fauna of *Psittacus erithacus* in this country.

Keywords: Psittacine circovirus, BFDV, *Psittacus erithacus*, Psittacine Beak and Feather Disease.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

® - Marca registada

% - Percentagem

™ – Marca comercial, do inglês “Trademark”

3’ – Extremidade portadora do grupo hidroxilo da molécula de DNA, do inglês “Hydroxyl terminus of DNA molecule”

5’ – Extremidade portadora do grupo fosfato da molécula de DNA, do inglês “Phosphate terminus of DNA molecule”

12S *rDNA* – Gene que codifica a subunidade 12S do ácido desoxirribonucleico ribossómico, do inglês “12S ribosomal ribonucleic acid”

BLAST – Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local, do inglês “Basic Local Alignment Search Tool”

BFDV – Vírus da Doença do Bico e das Penas, do inglês “Beak and Feather Disease Vírus”

cm – Centímetro

CITES – Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Fauna e Flora Selvagem Ameaçada de Extinção, do inglês “Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora”

CP – Proteína da cápside, do inglês “Capsid protein”

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic Acid”

dNTP’s – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EUA – Estados Unidos da América

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês “Ethylenediaminetetraacetic acid”

et al. – E outros, da locução latina “*et alli*”

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

FMV-ULHT – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

g – Grama

g – Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)

G – Gauge

h – Hora

IM – Intramuscular

IV – Intravenoso

IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza, do inglês “International Union for Conservation of Nature”

Km – Quilômetro

MIMV – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

min. – Minuto

mL – Mililitro

NGS – Sequenciação de nova geração, do inglês “Next Generation Sequencing”

nm – Nanômetro

°C – Grau Celsius

ORF – Sequências genéticas em fase de leitura aberta, do inglês “opening reading frames”

pb – Pares de bases

PBFD – Doença do Bico e das Penas dos Psitacídeos, do inglês “Psittacine Beak and Feather Disease”

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”

pmol – Picomole

Rep – Proteína associada à replicação viral, do inglês “Replication-associated protein”

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês “Ribonucleic Acid”

rpm – Rotações por minuto

SID – Uma vez por dia, da locução latina “*semil in die*”

UI – Unidades Internacionais

ULHT – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

μL – Microlitro

μm - Micrómetro

W – Watts

V – Volts

VPLs – Partículas semelhantes a vírus, do inglês “virus-like particles”

TBE – Tris/Borato/EDTA

UV – Ultravioleta

Índice Geral

I.Descrição da casuística de estágio	16
II. Prevalência e diversidade genómica de Circovírus dos psitacídeos (BFDV) em Papagaios-Cinzentos (<i>Psittacus erithacus</i>) em Portugal	24
1. Introdução.....	24
1.1. A espécie <i>Psittacus erithacus</i>	24
1.1.1. Distribuição geográfica no estado selvagem.....	25
1.1.2. Habitat	26
1.1.3. Dieta	26
1.1.4. Reprodução	26
1.1.5. Ameaças e plano de conservação.....	27
1.2. Etiologia - Circovírus aviário	28
1.2.1. Doença do bico e das penas dos psitacídeos.....	31
1.2.2. Epidemiologia	31
1.2.3. Patogénese	33
1.2.4. Patologia	35
1.2.5. Sinais clínicos	36
1.2.5.1. Apresentação hiperaguda e aguda	36
1.2.5.2. Apresentação crónica	37
1.2.5.3. Apresentação subclínica.....	39
1.2.5.4. Sinais clínicos em Papagaios-Cinzentos (<i>Psittacus erithacus</i>).....	40
1.3. Diagnóstico	40
1.3.1. Diagnósticos diferenciais.....	44
1.4. Tratamento	44
1.5. Prognóstico.....	46
1.6. Prevenção e controlo	46
1.7. Objetivos	48
2. Material e métodos	49

2.1.	Descrição da população em estudo	49
2.2.	Recolha da amostra de sangue	50
2.3.	Extração de DNA e controlo de qualidade	51
2.3.1.	Extração de DNA genómico total	51
2.3.2.	Controlo de qualidade do DNA para deteção do 12S rDNA por PCR convencional.....	53
2.3.2.1.	Visualização dos produtos do PCR por eletroforese em gel de agarose	55
2.4.	Deteção de BFDV por PCR <i>nested</i>	55
3.	Resultados	60
3.1.	Caracterização da população de Papagaios-cinzentos (<i>Psittacus erithacus</i>) em estudo	60
3.2.	Deteção de BFDV	61
4.	Discussão	67
5.	Conclusão	73
6.	Bibliografia	74
7.	Apêndices	81

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição da casuística observada durante o estágio curricular	17
Gráfico 2 – Distribuição da casuística de procedimentos clínicos em aves ($n=687$).....	21
Gráfico 3 – Distribuição da casuística de procedimentos clínicos em mamíferos ($n=223$) ...	22
Gráfico 4 – Distribuição da casuística de procedimentos clínicos em répteis ($n=64$)	23
Gráfico 5 – Total de aves positivas por cada criador	64

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Identificação da casuística de aves e número de indivíduos examinados	18
Tabela 2 – Identificação da casuística de mamíferos e número de indivíduos examinados	20
Tabela 3 – Identificação da casuística de répteis e número de indivíduos examinados	20
Tabela 4 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>12S rDNA</i>	54
Tabela 5 – Condições da reação de PCR para a amplificação do <i>12S rDNA</i>	54
Tabela 6 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na amplificação da ORF V1 (Tomasek <i>et al.</i> , 2008)	55
Tabela 7 – Condições da primeira reação de PCR <i>nested</i> para a amplificação de DNA de circovírus	57
Tabela 8 – Condições da segunda reação de PCR <i>nested</i> para a amplificação de DNA de circovírus	57
Tabela 9 – Condições dos criadores onde se encontravam as aves envolvidas no estudo	60
Tabela 10 – Resultados da prevalência de BFDV nas aves envolvidas no estudo	63
Tabela 11 – Infecção por BFDV e características das aves envolvidas no estudo	65

Índice de Figuras

Figura 1 – Exemplar de Papagaio-Cinzento (<i>Psittacus erithacus</i>).....	24
Figura 2 – Distribuição geográfica da espécie <i>Psittacus erithacus</i> no habitat natural.	25
Figura 3 – Representação esquemática do genoma do BFDV constituído por cerca de 1993pb, ilustrando as duas principais ORFs.	30
Figura 4 – Representação gráfica da disseminação mundial do circovírus dos psitacídeos, obtido através da análise filogeográfica, através da utilização de bases de dados, da proteína associada à replicação do vírus (linhas contínuas) e de recombinações livres do BFDV (linhas tracejadas).	32
Figura 5 – Papagaio cinzento com alopecia e penas displásicas devido ao desenvolvimento da apresentação crónica resultante da infeção por BFDV.	38
Figura 6 – Presença de corpos de inclusão intracitoplasmáticos basofílicos (setas brancas) numa pena de rosela (<i>Platycercus eximius</i>).	41
Figura 7 – Localização geográfica aproximada das aves envolvidas no presente estudo.	49
Figura 8 – Colheita sanguínea a uma das aves que integrou o estudo para deteção de PBFD.	51
Figura 9 – Representação esquemática do genoma do BFDV.	56
Figura 10 – Resultados da amplificação do gene <i>12S rDNA</i> de <i>Psittacus erithacus</i> por eletroforese em gel de agarose a 2%.	62
Figura 11 – Resultados da amplificação de BFDV por eletroforese em gel de agarose a 2%.	63

I. Descrição da casuística de estágio

Neste relatório o autor relata sucintamente as atividades desenvolvidas pelo mesmo durante o período de estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV - ULHT).

O estágio foi realizado na Exoticvets, maioritariamente em regime de ambulatório, entre novembro de 2021 e março de 2022, sob orientação do Mestre Mário Nóbrega. Este estágio permitiu a consolidação de conhecimentos adquiridos ao longo dos vários anos curriculares que compõem o MIMV, assim como a interiorização de novos conhecimentos e a aplicação prática dos mesmos.

Durante este período várias áreas foram abrangidas, que serão de seguida apresentadas e divididas nas seguintes categorias: medicina interna, cirurgia e atividades laboratoriais.

No que concerne à medicina interna, foram realizadas atividades relacionadas com o internamento como cálculo de doses, preparação e administração de fármacos, o acompanhamento dos casos clínicos, desde a realização de um exame físico detalhado e direcionado à espécie a ser examinada até à realização de exames complementares de diagnóstico, tais como a imagiologia, e por fim, a monitorização dos pacientes.

Na área da clínica cirúrgica, foram realizados procedimentos como a avaliação pré-cirúrgica dos pacientes, a classificação do risco anestésico, o planeamento do protocolo anestésico, o planeamento da abordagem cirúrgica, a participação nas cirurgias como anestesista, ficando encarregue da monitorização dos pacientes sob efeitos anestésicos, a participação em cirurgias como cirurgião e o acompanhamento dos pacientes já no recobro.

No âmbito das atividades laboratoriais, foram realizados esfregaços sanguíneos, recorrendo-se à coloração Giemsa, quer para a pesquisa de hemoparasitas como para a elaboração de hemogramas e foram também realizadas análises coprológicas para avaliar a carga parasitária e também alterações a nível da flora intestinal. A utilização da coloração Gram para identificação de agentes infecciosos também foi uma técnica utilizada. Também se procedeu diversas vezes à técnica de necrópsia.

Relativamente à casuística, o estágio incidiu maioritariamente na medicina de animais exóticos, nomeadamente, aves, répteis e mamíferos. O grupo das aves foi aquele que se destacou mais a nível de indivíduos observados ($n= 1399$), contabilizando mais de 90% dos casos, seguido do grupo dos mamíferos ($n= 111$) e por fim o dos répteis ($n= 27$) (gráfico 1).

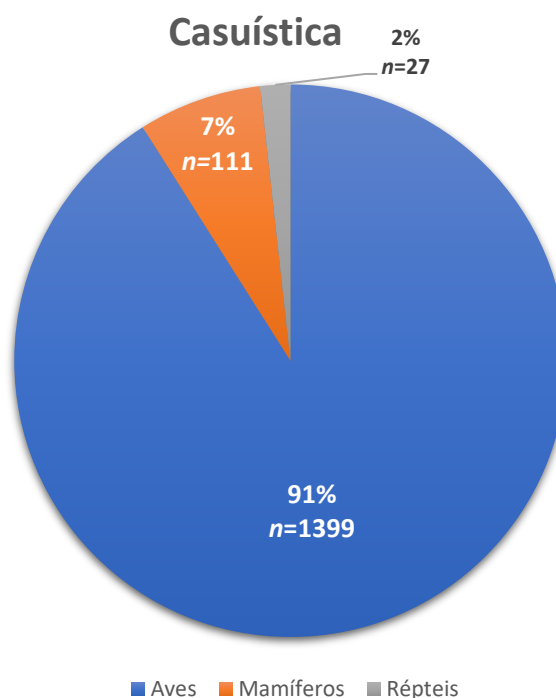


Gráfico 1 – Distribuição da casuística observada durante o estágio curricular, correspondendo a 1399 aves de 78 espécies distintas, 111 mamíferos de 15 espécies e 27 répteis de 14 espécies, num universo de 1537 animais observados.

Nas tabelas 1, 2 e 3 estão listadas as espécies observadas de aves ($n= 78$ espécies), mamíferos ($n= 15$ espécies) e répteis ($n= 14$ espécies), respetivamente, assim como o número de indivíduos examinados de cada espécie.

De entre os procedimentos efetuados nas aves, destacam-se os exames coprológicos e as endoscopias. Também os hemogramas e bioquímicas foram técnicas laboratoriais bastante utilizadas ao longo deste período, como se pode constatar no gráfico 2.

Quanto aos mamíferos, contam mais com uma abordagem de medicina preventiva do que o grupo anterior, ganhando especial relevância a vacinação e a desparasitação interna e externa. Associado à desparasitação, e também um procedimento de destaque, está a análise coprológica. Esta análise foi realizada, na sua grande maioria, sempre previamente à desparasitação interna, uma vez que animais saudáveis eram apenas desparasitados se

apresentassem carga parasitária que justificasse. No gráfico 3, estão descritos os procedimentos realizados neste grupo.

Os répteis apresentam-se como o grupo com menor casuística. Os exames complementares de diagnóstico, nomeadamente os hemogramas e as bioquímicas, foram aqueles que mais se destacaram, seguidos dos exames imagiológicos de radiografia.

Tabela 1 – Identificação da casuística de aves e número de indivíduos examinados.

Nome Comum	Nome Científico	n
Inseparável-de-Fischer	<i>Agapornis fischeri</i>	6
Inseparável-de-Angola	<i>Agapornis roseicollis</i>	7
Papagaio-galego	<i>Alipiopsitta xanthops</i>	6
Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva aestiva</i>	14
Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva xanthopteryx</i>	2
Papagaio-de-testa-branca	<i>Amazona albifron</i>	2
Papagaio-do-mangue	<i>Amazona amazonica</i>	2
Papagaio-de-nuca-amarela	<i>Amazona auropalliata</i>	2
Papagaio-diadema	<i>Amazona autumnalis</i>	4
Papagaio-diadema	<i>Amazona autumnalis lilacina</i>	2
Papagaio-moleiro	<i>Amazona farinosa</i>	1
Papagaio-das-várzeas	<i>Amazona festiva</i>	2
Papagaio-das-várzeas	<i>Amazona festiva bodini</i>	1
Papagaio-de-finsch	<i>Amazona finschi</i>	2
Papagaio-de-cabeça-amarela-do-Panamá	<i>Amazona ochrocephala panamensis</i>	3
Papagaio-de-coroa-amarela	<i>Amazona ochrocephala xantholaema</i>	3
Papagaio-de-cabeça-amarela	<i>Amazona oratrix</i>	3
Papagaio-da-serra	<i>Amazona pretrei</i>	4
Chauá	<i>Amazona rhodocorytha</i>	4
Papagaio-de-peito-roxo	<i>Amazona vinacea</i>	2
Papagaio-de-coroa-vermelha	<i>Amazona viridigenalis</i>	2
Papagaio-de-olho-vermelho	<i>Amazona xantholora</i>	4
Papagaio-de-ombros-amarelos	<i>Amazonas barbadensis</i>	3
Arara-jacinta	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	7
Arara-azul-e-amarela	<i>Ara ararauna</i>	15
Arara-vermelha	<i>Ara chloropterus</i>	9
Arara-de-garganta-azul	<i>Ara glaucogularis</i>	3
Arara-arco-íris	<i>Ara macao</i>	7
Arara-militar	<i>Ara militaris</i>	6
Maracanã-nobre	<i>Diopsittaca nobilis</i>	1
Arara-de-fronte-vermelha	<i>Ara rubrogenys</i>	3
Jandaia-amarela	<i>Aratinga solstitialis</i>	4
Catatua-branca	<i>Cacatua alba</i>	4
Catatua-negra-de-cauda-vermelha	<i>Calyptorhynchus banksii</i>	2
Catatua-de-crista-amarela	<i>Cacatua galerita</i>	4

Catatua-de-crista-amarela	<i>Cacatua galerita eleonora</i>	2
Catatua-das-molucas	<i>Cacatua moluccensis</i>	5
Catatua-sufúrea	<i>Cacatua sulphurea</i>	2
Pombo-de-nicobar	<i>Caloenas nicobarica nicobarica</i>	1
Cisne-negro	<i>Cignus atratus</i>	1
Pombo-comum	<i>Columba livia</i>	784
Papagaio-cabeça-de-falcão	<i>Derophtus accipitrinus</i>	4
Papagaio-ecletus	<i>Eclectus roratus</i>	24
Catatua-galah	<i>Eolophus roseicapilla</i>	32
Diamante-de-cabeça-vermelha	<i>Erythrura pealii</i>	2
Diamante-bicolor	<i>Erythrura psittacea</i>	2
Galinha	<i>Gallus gallus</i>	1
Pombo-coroadado	<i>Goura victoria</i>	2
Guaruba	<i>Guaruba guarouba</i>	9
Bico-de-chumbo-de-cabeça-preta	<i>Lonchura malaccas</i>	2
Freirinha-de-dorso-vermelho	<i>Lonchura nigriceps</i>	2
Catatua-rosa	<i>Lophochroa leadbeateri</i>	9
Periquito-australiano	<i>Melopsittacus undulatus</i>	3
Turaco-violeta	<i>Musophaga violacea</i>	1
Papagaio-da-Nova-Zelândia	<i>Nestor notabilis</i>	2
Ganso-pigmeu-africano	<i>Nettapus auritus</i>	2
Caturra	<i>Nymphicus hollandicus</i>	13
Pavão-comum	<i>Pavus cristatus</i>	1
Marianinha-de-cabeça-amarela	<i>Pionites leucogaster</i>	4
Marianinha-de-cabeça-preta	<i>Pionites melanocephala pallida</i>	2
Papagaio-de-barriga-vermelha	<i>Poicephalus rufiventris</i>	4
Papagaio-do-Senegal	<i>Poicephalus senegalus</i>	4
Maracanã-de-cabeça-azul	<i>Primolius couloni</i>	6
Periquito-alexandrino	<i>Psittacula eupatria</i>	1
Periquito-de-colar	<i>Psittacula krameri</i>	21
Papagaio-cinzento	<i>Psittacus erithacus</i>	124
Araçari-verde	<i>Pteroglossus viridis</i>	2
Tiriba-grande	<i>Pyrrhura cruentata</i>	4
Tiriba-de-cauda-roxa	<i>Pyrrhura egregia</i>	7
Tiriba-Venezuelana	<i>Pyrrhura emma</i>	7
Tiriba-de-peito-cinza	<i>Pyrrhura griseipectus</i>	10
Tiriba-de-asa-amarelada	<i>Pyrrhura hoffmanni gaudens</i>	5
Tiriba-de-cara-suja	<i>Pyrrhura molinae</i>	8
Tiriba-do-paraná	<i>Pyrrhura pfrimeri</i>	6
Tiriba-de-testa-azul	<i>Pyrrhura picta picta</i>	4
Canário	<i>Serinus canaria</i>	126
Turaco-de-bochecha-branca	<i>Tauraco leucotis</i>	1

Legenda: n, número total de animais

Tabela 2 – Identificação da casuística de mamíferos e número de indivíduos examinados.

Nome Comum	Nome Científico	n
Camelo	<i>Camelus bactrianus</i>	1
Cão	<i>Canis lupus</i>	5
Cabra	<i>Capra aegagrus hircus</i>	2
Porquinho-da-Índia	<i>Cavia porcellus</i>	13
Chinchila-comum	<i>Chinchilla lanigera</i>	5
Hamster-comum	<i>Cricetus cricetus</i>	2
Burro	<i>Equus asinus</i>	1
Gato	<i>Felis catus</i>	4
Capivara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	1
Lama	<i>Lama glama</i>	2
Canguru-de-Bennett	<i>Macropus rufogriseus</i>	2
Furão	<i>Mustela putorius furo</i>	3
Coelho	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	62
Suricata	<i>Suricata suricatta</i>	6
Porco	<i>Sus scrofa domesticus</i>	2

Legenda: n, número total de animais

Tabela 3 – Identificação da casuística de répteis e número de indivíduos examinados.

Nome Comum	Nome Científico	n
Boa-de-Dumeril	<i>Acrantophis dumerili</i>	2
Pitão-de-Ramsay	<i>Aspidites ramsayi</i>	2
Tartaruga-de-esporas-africana	<i>Centrochelys sulcata</i>	1
Camaleão-do-Yémen	<i>Chamaeleo calyptratus</i>	5
Camaleão-pantera	<i>Furcifer pardalis</i>	1
Tartaruga-do-mapa-do-Mississippi	<i>Graptemys pseudogeographica kohnii</i>	1
Iguana-verde	<i>Iguana iguana</i>	1
Cobra-do-leite	<i>Lampropeltis triangulum</i>	2
Cobra-do-milho	<i>Pantherophis guttatus</i>	2
Dragão-de-água-chinês	<i>Physignathus cocincinus</i>	1
Dragão-barbudo	<i>Pogona vitticeps</i>	4
Pitão-real	<i>Python regius</i>	2
Tartaruga-grega	<i>Testudo graeca</i>	1
Tartaruga-de-orelhas-vermelhas	<i>Trachemys scripta</i>	2

Legenda: n, número total de animais

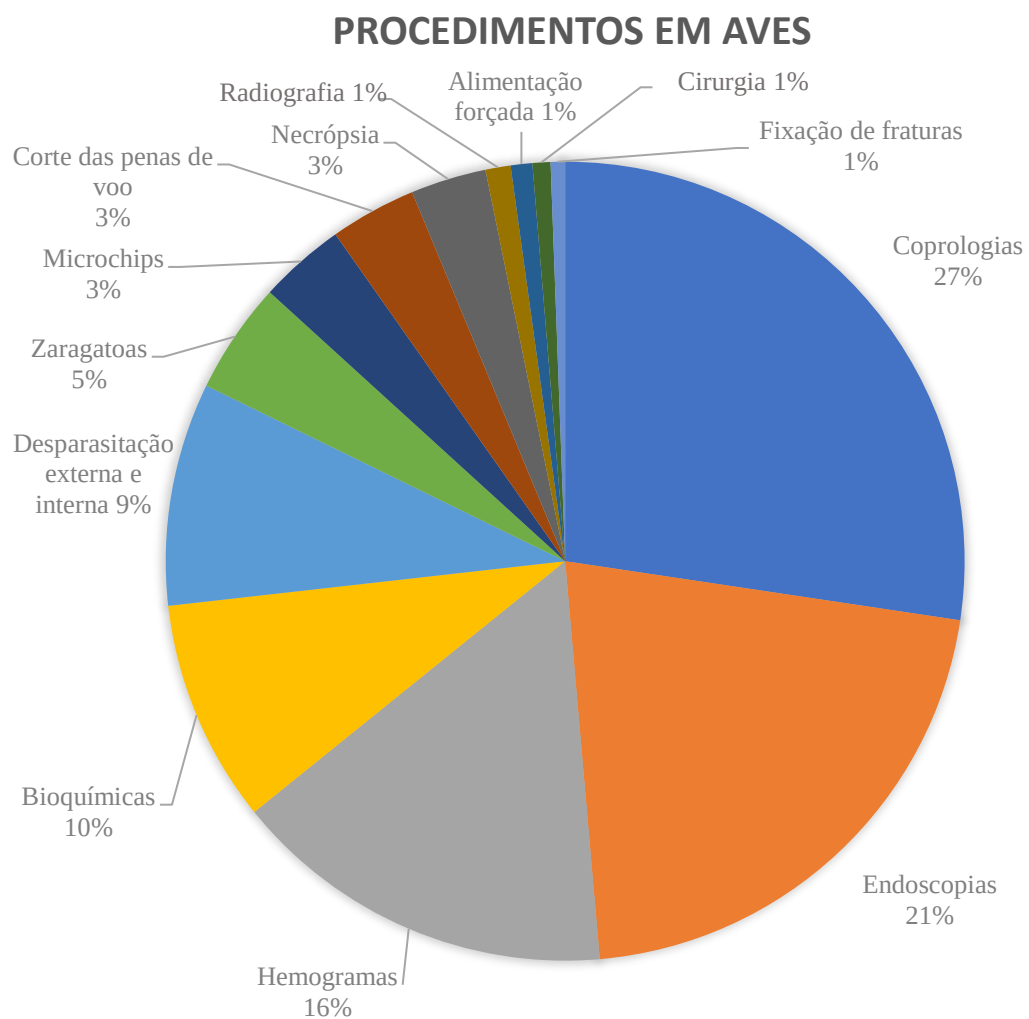


Gráfico 2 – Distribuição da casuística de procedimentos clínicos em aves ($n= 687$).

PROCEDIMENTOS EM MAMÍFEROS

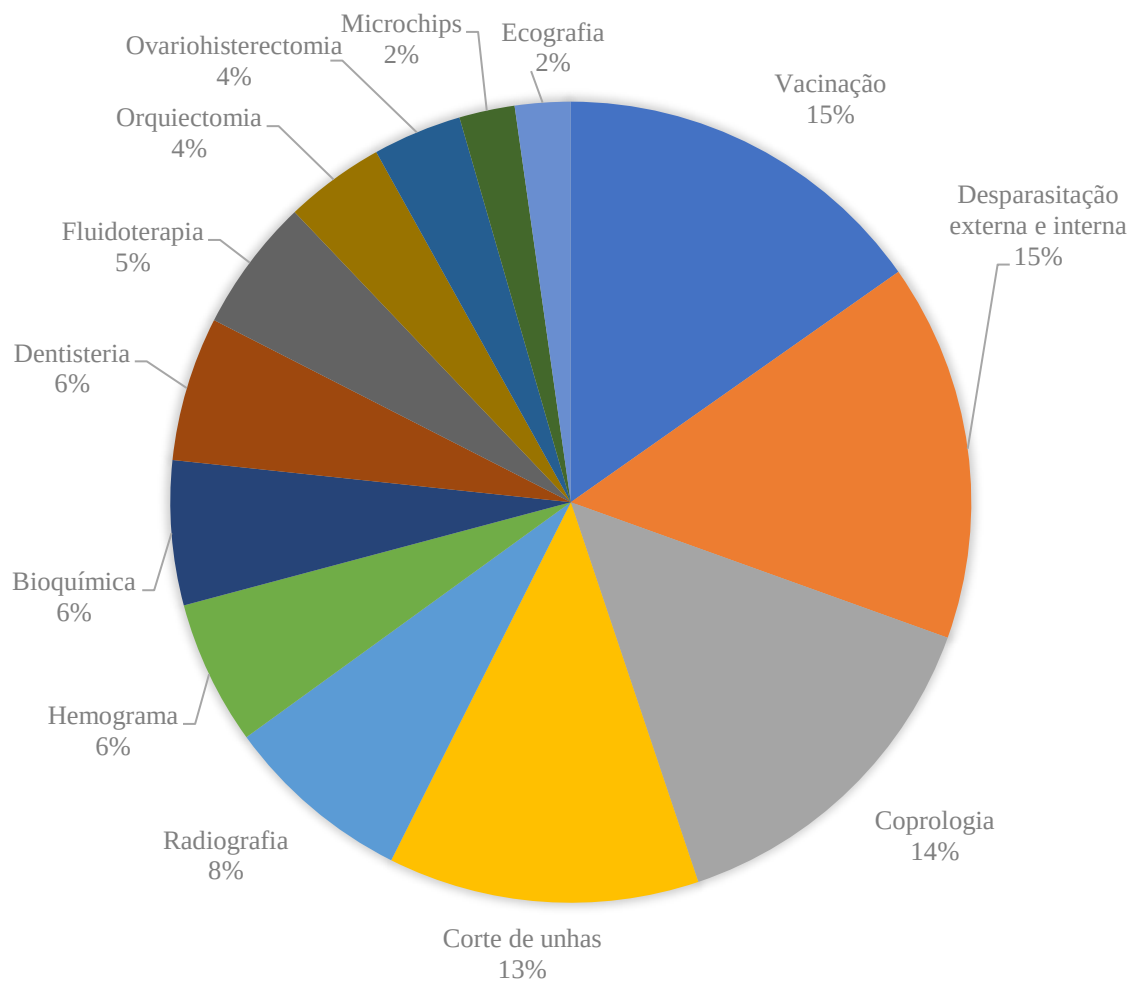


Gráfico 3 – Distribuição da casuística de procedimentos clínicos em mamíferos ($n= 223$).

PROCEDIMENTOS EM RÉPTEIS

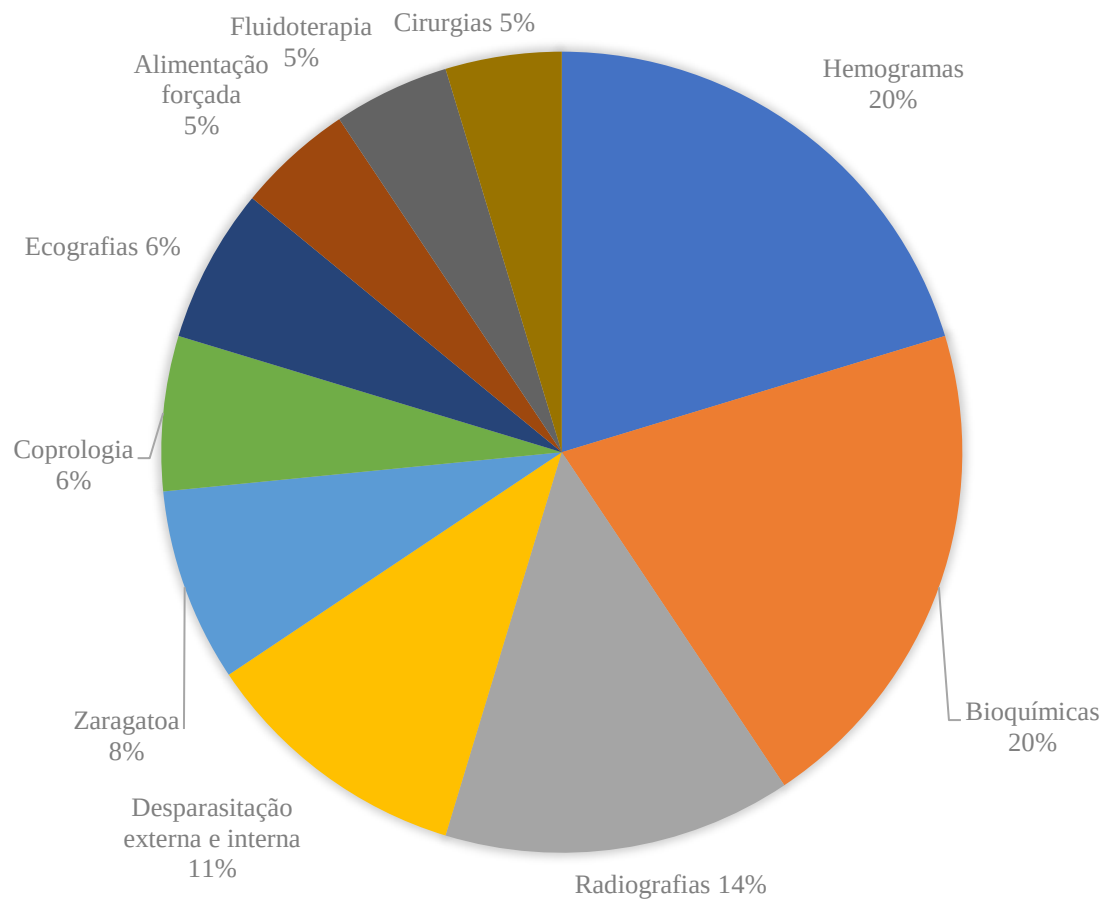


Gráfico 4 – Distribuição da casuística de procedimentos clínicos em répteis ($n= 64$).

II. Prevalência de Circovírus dos psitacídeos (BFDV) em Papagaios-Cinzentos (*Psittacus erithacus*) em Portugal

1. Introdução

1.1. A espécie *Psittacus erithacus*

O Papagaio-Cinzento (*Psittacus erithacus*) pertence à ordem dos Psittaciformes, família Psittacidae e género *Psittacus*. É considerado um papagaio de médio porte, pesando cerca de 400 a 500 gramas (g) e medindo cerca de 33 centímetros (cm) desde a cabeça até à extremidade da cauda. A envergadura das asas pode variar de 46 a 52 cm. A plumagem é maioritariamente cinzenta com algumas áreas mais brancas. As penas da cauda destacam-se pela sua cor encarnado vivo. O bico e as unhas são de cor preta e os olhos são amarelos (Holman, 2008; BirdLife International, 2018). Esta espécie não apresenta dimorfismo sexual, significando que não é possível a diferenciação entre machos e fêmeas sem ser por métodos de sexagem. Segundo Holman (2008), a média da longevidade desta espécie em habitat natural é cerca de 23 anos, em contraste com a longevidade de aves sob cuidados humanos que conta com uma média de 45 anos, podendo chegar a 60 anos.



Figura 1 – Exemplar de Papagaio-Cinzento (*Psittacus erithacus*). (Retirado a 27 de junho de 2022 de <https://www.zoo.pt/pt/conhecer/animais/aves/papagaio-cinzento/>).

Classificada em 2021 como “Em Perigo” pela IUCN (International Union of Conservation of Nature), esta espécie foi inscrita no Apêndice I da CITES (Convention on

International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) encontrando-se em declínio em países como o Burundi, Camarões, Ghana, Guiné, Guiné-Bissau, Libéria, Serra Leoa, Nigéria, Ruanda, São Tomé e Príncipe, Togo, Uganda, Congo e República Democrática do Congo (BirdLife International, 2018; McGowan, 2001; Martin *et al.*, 2014).

1.1.1. Distribuição geográfica no estado selvagem

A distribuição geográfica deste psitacídeo compreende o território entre o sudeste da Costa do Marfim até aos Camarões, assim como toda a área até ao Uganda, Kenya e Tanzânia. A sul, as populações de *P. erithacus* podem estender-se até ao norte de Angola, sendo delimitadas a norte pela República Centro Africana. Também nas ilhas de São Tomé e Príncipe como na Guiné Equatorial está descrita a ocorrência desta espécie (McGowan, 2001; Holman, 2008; BirdLife International, 2018; Martin *et al.*, 2014; Tamungang *et al.*, 2014). Segundo Tamungang *et al.* (2014), estima-se que a distribuição geográfica desta espécie possa alcançar os 3.000.000 km² (Figura 2).



Figura 2 – Distribuição geográfica da espécie *P. erithacus* no seu habitat natural. A laranja está representada a área onde esta espécie é endémica e a vermelho onde é considerada como extinta. (Adaptado de IUCN Red List of Threatened Species – *Psittacus erithacus*. Retirado a 30 de maio de 2022 de <https://www.iucnredlist.org/species/22724813/129879439>)

1.1.2. Habitat

Sendo uma espécie sem hábitos migratórios, o habitat de *P. erithacus* varia entre florestas tropicais ou subtropicais densas, orlas florestais, savanas, campos de cultivo, jardins e mangais, sendo as de maior importância as florestas tropicais e subtropicais (McGowan, 2001; BirdLife International, 2018; Tamungang *et al.*, 2014). Pode ser encontrada até uma altitude de 2.200 metros (Holman, 2008). Apesar de não ser uma espécie de hábitos migratórios, estão descritas movimentações pontuais de zonas áridas para zonas onde seja mais fácil a obtenção de água e alimento durante a estação seca (BirdLife International, 2018).

1.1.3. Dieta

Tratando-se de animais herbívoros, a sua dieta consiste principalmente numa variedade de frutos e sementes, onde a fruta da árvore de onde é proveniente o óleo de palma (*Elaeis guinensis*) adquire um papel importante (Tamungang *et al.*, 2014). No entanto, também folhas, insetos e flores fazem parte da sua alimentação natural (Holman, 2008).

Uma vez que grande parte da sua alimentação é obtida do solo, é normal ver aves concentradas numa árvore enquanto parte do grupo se alimenta no solo (Holman, 2008).

1.1.4. Reprodução

O ninho é preparado numa cavidade do tronco de uma árvore a cerca de 10 a 30 metros de altura. São aves bastante sociais e a reprodução ocorre em colónias de diferentes tamanhos em que cada casal nidifica numa árvore (Holman, 2008; BirdLife International, 2018). Estas aves atingem a maturidade sexual por volta dos 3 a 5 anos de idade e são monogâmicas (Holman, 2008). A época de reprodução no habitat natural tem início em janeiro e fevereiro terminando entre junho e julho. A postura é composta por 3 a 5 ovos de cor branca com 39.5mm por 31.0mm. A fêmea ocupa-se da incubação dos ovos que demora 30 dias enquanto o macho a alimenta no ninho. As crias são altriciais e por esse motivo são inteiramente dependentes dos seus progenitores para garantirem a sua sobrevivência. A saída do ninho ocorre por volta das 12 semanas de idade (Holman, 2008).

1.1.5. Ameaças e plano de conservação

Os principais motivos para o delicado estatuto de conservação da espécie *P. erithacus* prendem-se com a captura ilegal de aves para o comércio ilegal, aliado à elevada percentagem de perda do seu habitat natural, que poderão conduzir a um rápido declínio da população mundial num curto espaço de tempo (BirdLife International, 2018; Martin *et al.*, 2014).

Segundo a IUCN, entre 1982 e 2014, cerca de 1,3 milhões de indivíduos foram capturados para o tráfico de animais selvagens e, anualmente, estima-se que cerca de 21% da população selvagem seja capturada (Martin *et al.*, 2014). Uma das razões apresentadas para esta elevada taxa de captura prende-se com o facto de esta ser uma das espécies mais populares na avicultura em todo o mundo, principalmente devido à sua longevidade e à inigualável capacidade de mimicar sons (McGowan, 2001).

A IUCN alerta ainda para a progressiva perda de habitat, entre os anos de 1990 e 2000, em que a desflorestação atingiu níveis de 31% na Costa de Marfim e 26% na Nigéria (Martin *et al.*, 2014). A perda de árvores de grande porte com cavidades com ninhos apresenta-se como outro desafio à reprodução das aves (Martin *et al.*, 2014). As condições florestais são diretamente proporcionais ao estado populacional da espécie, sendo que, em áreas onde a desflorestação é mais acentuada, verifica-se também um declínio das populações de *P. erithacus* presentes nesse mesmo local (Martin *et al.*, 2014).

Também a captura das aves para *bushmeat* (espécies selvagens caçadas para consumo humano) e o uso de órgãos ou partes do corpo para processamento de medicamentos e magia negra, contribui para o impacto negativo na população (McGowan, 2001; BirdLife International, 2018; Martin *et al.*, 2014).

No que concerne a medidas tomadas para travar o declínio populacional que esta espécie enfrenta, não se encontra a decorrer nenhum plano de recuperação *in situ* de momento (BirdLife International, 2018). No entanto, devido a este decréscimo populacional e tendo em conta a tendência de crescimento da espécie, foram tomadas ações de conservação dos *P. erithacus* (BirdLife International, 2018). Em 2016, a espécie passou a integrar o apêndice I da CITES, onde estão todas as espécies ameaçadas de extinção ou que podem ser afetadas pelo comércio, estando sujeitas a uma regulamentação especial (BirdLife International, 2018). Foram também definidas áreas protegidas em que a espécie ocorre e se reproduz, assim como foram criados programas de reprodução e conservação *ex situ* e ainda o controlo do tráfico internacional (BirdLife International, 2018). Algumas medidas sugeridas são também a monitorização das

populações selvagens de forma a vigiar as tendências de crescimento ou declínio das populações, assim como a reprodução desta espécie sob cuidados humanos de forma a fazer face à procura pelo mercado internacional, não fazendo assim pressão sobre a população selvagem (Mulliken, 1995; McGowan, 2001). Em paralelo, esta reprodução *ex situ* pode ser também utilizada para servir de base à criação de programas de reintrodução desta espécie (Collar & Butchart, 2014; BirdLife International, 2018).

Relativamente a predadores naturais, esta espécie é predada pelo Abutre das Palmeiras (*Gypohierax angolensis*), por várias espécies de falcões e, uma vez que se alimentam no solo, são também suscetíveis à captura por parte de predadores terrestres (Holman, 2008).

1.2. Etiologia - Circovírus aviário

O Circovírus Aviário, pertencente à família *Circoviridae*, é um vírus que afeta diversas espécies de aves, pertencentes a vários géneros (Raidal *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2016; Harkins *et al.*, 2014; Peters *et al.*, 2014; Henriques, 2010). A família *Circoviridae* inclui dois géneros, *Circovirus* e *Cyclovirus* (Haddadmarandi *et al.*, 2018). No género *Circovirus*, estão identificados 22 vírus, 11 deles que afetam espécies de aves das mais variadas ordens (Haddadmarandi *et al.*, 2018).

O circovírus dos psitacídeos (BFDV, do inglês Beak and Feather Disease Virus) é o agente causal da doença do bico e das penas no *P. erithacus* (PBFD, do inglês Psittacine Beak and Feather Disease), a espécie em estudo neste trabalho. Apesar desta doença ter sido descrita nos anos 70 do século XX, foi apenas na década seguinte que o seu agente etiológico foi definitivamente identificado (Bert *et al.*, 2005; Fogell *et al.*, 2016). O comércio internacional de aves fez com que a disseminação do vírus chegasse a todos os continentes, afetando quer aves sob cuidados humanos, quer aves selvagens, sendo uma doença atualmente descrita em 40 países, tornando-se assim uma problemática a nível mundial (Bert *et al.*, 2005; Fogell *et al.*, 2016). Esta doença já foi reportada no mínimo em 60 espécies de psitacídeos quer em cativeiro quer selvagens (Huang *et al.*, 2016). É especialmente delicada a situação de espécies de aves em perigo de extinção, uma vez que o vírus representa uma ameaça para a sua sobrevivência (Das *et al.*, 2020; Raidal *et al.*, 2018). Estudos demonstram também que aves não pertencentes à família dos psitacídeos como o Abelharuco-arco-íris (*Merops ornatus*), o diamantes de Gould (*Erythrura gouldiae*) e corujas da espécie *Ninox strenua*, podem ser infetadas pelo BFDV (Huang *et al.*, 2016).

O genoma deste vírus é constituído por uma cadeia circular de DNA (ácido desoxirribonucleico) de 1993 a 1996 nucleótidos, tendo de diâmetro apenas 7 a 22 nm (Peters *et al.*, 2014; Regnard *et al.*, 2017; Bert *et al.*, 2005; Phalen *et al.*, 2006; Sarker *et al.*, 2014; Das *et al.*, 2014; Haddadmarandi *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2019). Este vírus sem invólucro lipídico (Raidal *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2016; Julian *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2010), possui uma cápside esférica ou icosaédrica (Fogell *et al.*, 2016; Julian *et al.*, 2013; Henriques *et al.*, 2010) e é constituído por duas ORFs (*opening reading frames*) principais que codificam dois genes, a ORF C1, localizada na cadeia de sentido complementar, que codifica uma proteína da cápside (CP) e a ORF V1, localizada na cadeia de sentido paralelo, que codifica outra proteína associada à replicação viral (Rep) (Haddadmarandi *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2019; Peters *et al.*, 2014; Julian *et al.*, 2013) (Figura 3). Todos os vírus pertencentes ao género *Circovirus* possuem assim a capacidade de utilizar uma estratégia de transcrição em ambos os sentidos, ou seja, alguns genes são codificados na cadeia de sentido paralelo e outros na cadeia de sentido complementar (MacLachlan & Dubovi, 2017).

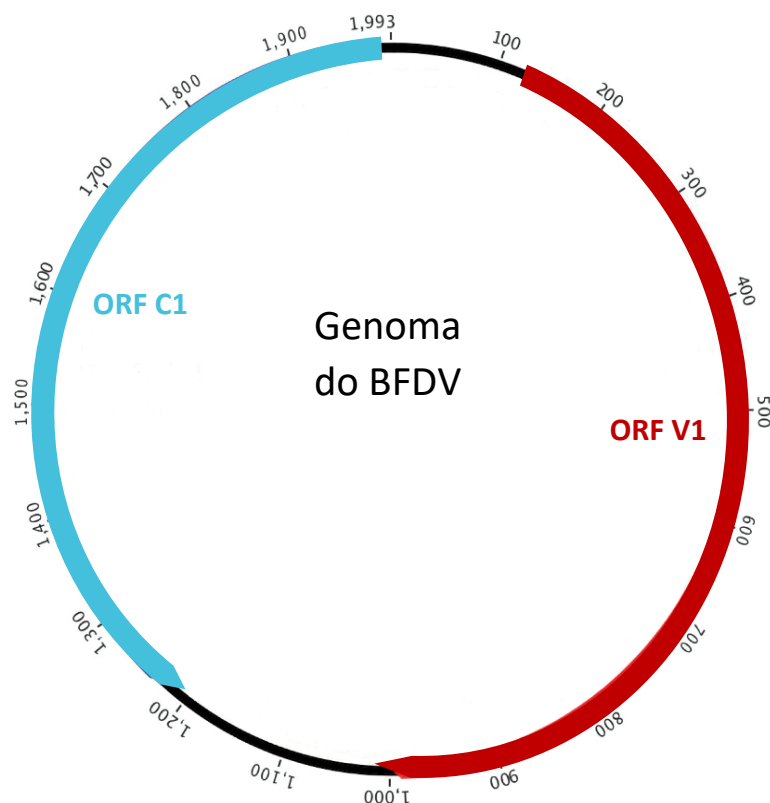


Figura 3 - Representação esquemática do genoma de BFDV constituído por cerca de 1993pb, ilustrando as duas principais ORFs. A azul a ORF C1 localizada na cadeia de sentido complementar, que codifica uma proteína da cápside (CP) e a vermelho a ORF V1, localizada na cadeia de sentido paralelo, que codifica uma proteína associada à replicação viral (Rep) (Adaptado de Peters *et al.*, 2014).

As ORF são sequências genéticas em fase de leitura aberta, delimitadas por dois codões, um de início e outro de terminação, e que não são interrompidas por codões stop, ou seja, que pode ser traduzida e originar uma proteína (Sieber *et al.*, 2018). Outras ORFs foram identificadas, nomeadamente, V2 e V3 na cadeia de sentido paralelo, e C2, C3 e C4 na cadeia de sentido complementar (Raue *et al.*, 2004; Phalen *et al.*, 2006). Contudo, o seu papel na produção de proteínas ainda não foi definido (Araújo, 2011; Haddadmarandi *et al.*, 2018).

Através de estudos de sequenciação do genoma, foram identificadas, até à data, no mínimo, 11 estirpes do circovírus aviário (Phalen *et al.*, 2006). Nestas variantes, a sequência de DNA difere em 11% comparando com a variante originalmente sequenciada (Phalen *et al.*, 2006). Estas estirpes são definidas com base na variação da sequência de nucleótidos no genoma (Phalen *et al.*, 2006). As variações de sequência ocorrem maioritariamente na ORF C1, uma vez que a proteína da cápside demonstra uma conservação da sequência de nucleótidos de 76,5% a 83,3%, em comparação com a proteína da replicação com origem na ORF V1 que alcança valores de conservação da sequência de aminoácidos de 86,9% a 98,3% (Raue *et al.*, 2004).

A recombinação de genoma de BFDV é comum e tem carácter evolutivo (Raidal *et al.*, 2018; Fogell *et al.*, 2016; Haddadmarandi *et al.*, 2018; Jackson *et al.*, 2014a). A recombinação dos genomas pode levar a uma acentuação da virulência do vírus, o que pode conduzir a um aumento da mortalidade das aves infetadas pelas novas estirpes (Jackson *et al.*, 2014a). Esta variação genética pode ser relacionada com a distribuição geográfica das espécies hospedeiras ou com o local de criação sob cuidados humanos (Fogell *et al.*, 2016; Haddadmarandi *et al.*, 2018). Os centros de reprodução de várias espécies de aves apresentam-se como um risco para o desenvolvimento destas recombinações, uma vez que promovem o contacto próximo entre diferentes espécies de aves e, por isso mesmo, diferentes estirpes de BFDV (Jackson *et al.*, 2014a).

A existência de diferentes genótipos do vírus pode interferir no desenvolvimento de testes de diagnóstico *standard* e na criação de vacinas eficazes (Fogell *et al.*, 2016; Haddadmarandi *et al.*, 2018). Por este motivo, de modo a detetar todas as variantes de BFDV, os *primers* utilizados quando se recorre à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction) devem ser desenhados de forma a detetar uma região em que a sequência de nucleótidos seja conservada (Phalen *et al.*, 2006).

1.2.1. Doença do bico e das penas dos psitacídeos

Como referido anteriormente, a doença do bico e das penas dos psitacídeos tem origem viral, é altamente infecciosa e ocorre em várias espécies pertencentes à ordem dos Psitaciformes (Kessler *et al.*, 2020). Atualmente, é uma das doenças de origem viral que mais relevância clínica tem, principalmente nesta ordem (Kessler *et al.*, 2020). Devido à sua elevada prevalência e gravidade nos psitacídeos, a doença assume o nome desta ordem, nomeadamente *Psittacine Beak and Feather Disease* (PBFD) (Araújo, 2011; Haddadmarandi *et al.*, 2018; Raidal *et al.*, 2018).

A doença causada pelo BFDV pode ter três apresentações clínicas ou fenótipos, classificadas como apresentação hiperaguda, apresentação aguda e apresentação crónica (Greenacre *et al.*, 2005; Regnard *et al.*, 2017; Gerlach, 1994; Haddadmarandi *et al.*, 2018). No entanto, há também autores que consideram uma apresentação adicional, a subclínica (Gerlach, 1994; Araújo, 2011; Haddadmarandi *et al.*, 2018). O fator que se considera mais preponderante no tipo de apresentação desenvolvido é a idade da ave quando infetada (Gerlach, 1994). Também a espécie da ave é um fator importante para o desenvolvimento ou não de sinais clínicos (Jackson *et al.*, 2014a). A apresentação hiperaguda e aguda da doença ocorre geralmente em animais jovens e a sua morte ocorre sem sinais clínicos prévios (Ma *et al.*, 2019). Já as formas crónica e subclínica, afetam maioritariamente aves adultas provocando sinais clínicos como a perda crónica de penas, deformações do bico e das garras, predispondo a ave ao desenvolvimento de infeções secundárias (Ma *et al.*, 2019). Estes sinais clínicos reduzem drasticamente a mobilidade e capacidade de voo das aves. Devido à sua natureza imunossupressora, a morte ocorre 6 a 24 meses após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (Ma *et al.*, 2019; Pyne *et al.*, 2005).

1.2.2. Epidemiologia

A PBFD foi descrita pela primeira vez em catatuas, na Austrália, na década de 1970 (Fogell *et al.*, 2016). No entanto, estima-se que o BFDV esteja presente há pelo menos 10 milhões de anos (Raidal *et al.*, 2018).

Hoje em dia, devido à elevada taxa de disseminação deste vírus, a PBFD está descrita em mais de 70 espécies de psitacídeos, quer sob cuidados humanos, quer animais provenientes de populações selvagens (Fogell *et al.*, 2016). De entre estas espécies, 50 estão classificadas pela IUCN como “Pouco Preocupante”, 7 como “Quase Ameaçadas” e cerca de 20 estão

categorizadas como “Ameaçadas”, incluindo o *P. erithacus* (Fogell *et al.*, 2016). Esta disseminação tem como principal causa o comércio internacional de aves, estando por isso proibida a exportação de exemplares selvagens provenientes da Austrália. No entanto, alguns autores sugerem também que as rotas migratórias possam ter alguma influência na dispersão da doença. Aves portadoras assintomáticas do vírus, representam um grande perigo, uma vez que não demonstram sinais precoces de serem portadores, facilitando a propagação do vírus (Phalen *et al.*, 2006; Khalesi *et al.*, 2007).

Na figura 3, é possível observar o modo como ocorreu a disseminação de BFDV, desde o local onde este vírus é endêmico, na Austrália, para o resto do globo, ao longo dos anos, desde a sua descoberta na década de 1970 até 2012 (Harkins *et al.*, 2014). A entrada de BFDV no continente europeu ocorreu por Portugal ainda na década de 1970, disseminando-se posteriormente por outros países tanto europeus como asiáticos, norte-americanos e africanos (Harkins *et al.*, 2014).

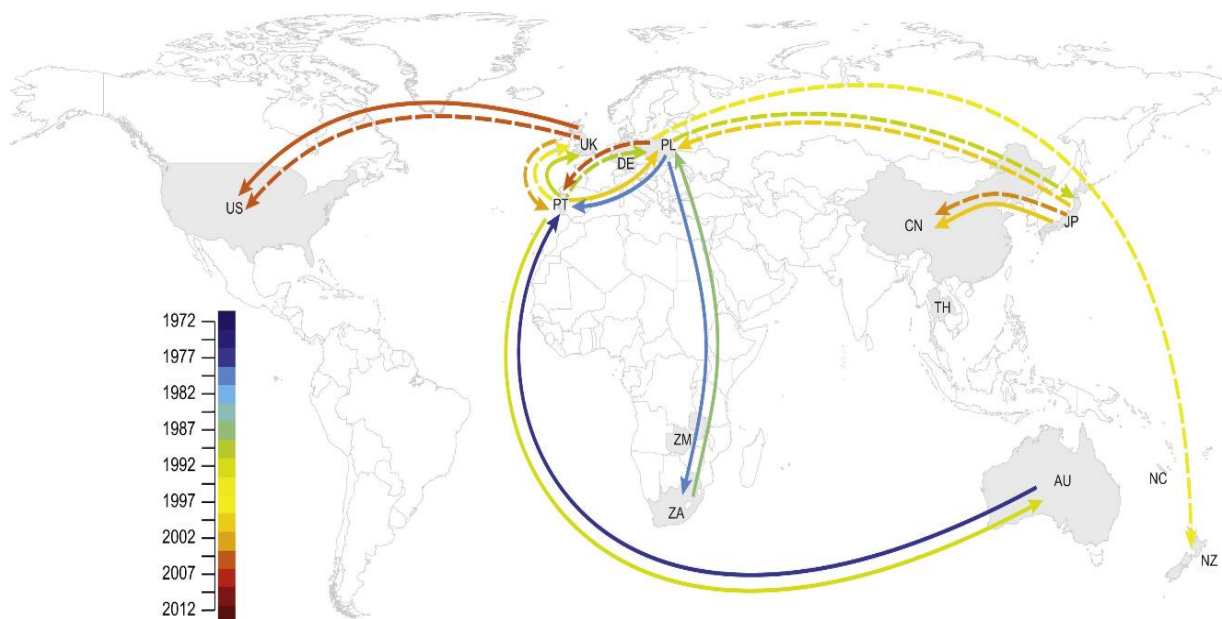


Figura 4 - Representação gráfica da disseminação mundial do circovírus dos psitacídeos, obtido pela análise filogeográfica, através da utilização de bases de dados, da proteína associada à replicação do vírus (linhas contínuas) e de recombinações livres do BFDV (linhas tracejadas). AU – Austrália, CN – China, DE – Alemanha, JP – Japão, NC – Nova Caledónia, NZ – Nova Zelândia, PL – Polónia, PT – Portugal, TH - Tailândia, US – Estados Unidos da América, ZA – África do Sul, ZM – Zâmbia. (Adaptado de Harkins *et al.*, 2014).

No que concerne à transmissão do BFDV, já foi demonstrado que pode ocorrer tanto por via horizontal como por via vertical, o que dificulta a erradicação do vírus das coleções de aves infetadas (Regnard *et al.*, 2015; Regnard *et al.*, 2017; Harkins *et al.*, 2014). A via horizontal é considerada a forma mais comum de disseminação do BFDV a qual ocorre através

da inalação ou ingestão dos produtos por onde se dá a eliminação das partículas virais (Regnard *et al.*, 2017; Regnard *et al.*, 2015; Bert *et al.*, 2005; Phalen *et al.*, 2006; Gerlach, 1994). Esta eliminação do vírus pode ocorrer através das penas, do pó proveniente da descamação das plumas, das fezes e das secreções provenientes do papo (Regnard *et al.*, 2015; Phalen *et al.*, 2006; Araújo, 2011). Quanto à transmissão vertical, Rahaus *et al.* (2008) demonstrou a sua ocorrência ao detetar uma taxa de infeção em ovos embrionados de 20% considerando duas espécies de psitacídeos, nomeadamente periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) e papagaios de cabeça castanha (*Poicephalus cryptoxanthus cryptoxanthus*). Também Gerlach (1994), afirma que crias provenientes de incubação artificial desenvolveram a doença, corroborando assim a hipótese de transmissão vertical do agente. No entanto, segundo Bert *et al.* (2005), a maioria das infeções por circovírus de aves jovens ocorre por via horizontal, nomeadamente pela contaminação ambiental. Estudos recentes reportam também a presença do vírus em fezes de ácaros do género *Knemidocoptes*, que podem agir como vetores do BFDV (Raidal *et al.*, 2018).

Após a infeção, o período de incubação do vírus é no mínimo de 21 dias, podendo variar conforme a influência de determinados fatores como a carga viral, a via de infeção, a idade da ave, a etapa do crescimento, a etapa da muda das penas e o estado imunitário da ave infetada (Das *et al.*, 2020). Segundo Phalen *et al.* (2006), quando as aves infetadas são jovens o período de incubação é de 15 a 30 dias, ao contrário do que acontece quando em aves adultas nas quais o período de incubação viral pode ir de meses a anos.

A especificidade das diferentes estirpes de BFDV conhecidos e os seus hospedeiros parece variar (Haddadmarandi *et al.*, 2018). Segundo Haddadmarandi *et al.* (2018), foi encontrada uma relação de grande especificidade entre certas estirpes e hospedeiros, como é o caso da estirpe denominada BFDV-“N”, inicialmente descrita na África do Sul, e que apenas foi detetada em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*). Por outro lado, outras estirpes foram isoladas em várias espécies de psitacídeos apresentando por isso uma baixa especificidade de espécie, como no caso da estirpe BFDV-“I”, também presente em Portugal (Haddadmarandi *et al.*, 2018). A análise da distribuição geográfica de várias estirpes deste vírus, permitiu também verificar que parece haver estirpes restritas a certas regiões, enquanto outras, como no caso da estirpe BFDV-“I”, se encontram mais disseminadas (Haddadmarandi *et al.*, 2018).

1.2.3. Patogénese

Para que o vírus se possa replicar, é necessário que este infete células hospedeiras em divisão ativa, de modo que o seu genoma possa ser replicado (MacLachlan & Dubovi, 2017). É devido às elevadas taxas de divisão celular que ocorrem nas aves jovens, por estarem em processo de crescimento, que ocorre um aumento significativo de partículas virais num curto espaço de tempo (MacLachlan & Dubovi, 2017). A replicação primária do BFDV ocorre no epitélio do bico e das unhas, na bursa de Fabrícus e no tecido linfóide do trato gastrointestinal (Phalen *et al.*, 2006; Raidal *et al.*, 2015; MacLachlan & Dubovi, 2017). Secundariamente, a replicação pode ocorrer no fígado, timo, medula óssea e outros tecidos, levando a defeitos nas penas e a imunossupressão (Phalen *et al.*, 2006; Raidal *et al.*, 2015; MacLachlan & Dubovi, 2017).

Mesmo antes da replicação, as células do hospedeiro em contacto com o BFDV, iniciam uma resposta imune que poderá levar ao comprometimento dos tecidos saudáveis e, desta forma, conduzir ao desenvolvimento da doença (MacLachlan & Dubovi, 2017).

A imunossupressão característica desta doença ocorre devido à invasão dos tecidos linfóides pelo vírus, com a consequente necrose dos órgãos linfóides (Phalen *et al.*, 2006; Pyne *et al.*, 2005). A necrose do timo e da bursa de Fabrícus, bem como a ocorrência de uma leucopénia secundária, origina um quadro variável de imunossupressão e cria uma porta de entrada para agentes patogénicos oportunistas, facilitando o aparecimento de infeções secundárias e podendo assim conduzir a quadros clínicos de septicémia (Phalen *et al.*, 2006; Pyne *et al.*, 2005).

Os fatores que podem determinar se ocorre uma resposta imunitária eficaz ou se o desenvolvimento da doença terá um desfecho fatal podem estar correlacionados com a idade da ave aquando da infeção pelo vírus, a via de transmissão e a presença ou ausência de anticorpos maternos (Gerlach, 1994). Segundo Pyne *et al.* (2005), geralmente, quanto mais nova é a ave mais severa é a imunossupressão que apresenta. Esta gravidade está associada ao facto de as aves desenvolverem os seus anticorpos na bursa de Fabrícus nas primeiras 3 a 4 semanas de vida (Pyne *et al.*, 2005). Aves infetadas antes do desenvolvimento destas capacidades do seu sistema imunitário resulta numa incapacidade de resposta imune adequada (Pyne *et al.*, 2005). Devido a esta quebra de imunidade as aves desenvolvem infeções secundárias (Pyne *et al.*, 2005). Também Gerlach (1994), afirma que periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) infetados antes do 7º dia de vida desenvolvem doença severa, enquanto que as aves infetadas entre o 10º e o 14º dias demonstram menos sinais clínicos, sendo algumas mesmo assintomáticas. No entanto, crias que tenham progenitores fêmeas com a doença subclínica e,

portanto, com uma resposta imune à infecção eficiente, podem transmitir parcialmente esta imunidade (Raidal *et al.*, 2018). A imunidade transferida através de anticorpos presentes na gema do ovo, apesar de diminuir nas primeiras semanas de vida, fornece uma proteção aos neonatos durante este período crítico (Raidal *et al.*, 2018).

Está descrita a recuperação parcial ou total da forma aguda da doença em periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*), *Agapornis* spp., em neonatos de algumas espécies do género *Ara*, entre outros, devido à seroconversão (Khalesi, 2005). Também Phalen *et al.* (2006), refere que aves com sinais clínicos podem recuperar, testando negativo para a presença do vírus, não sendo, no entanto, uma situação comum.

1.2.4. Patologia

As principais características histopatológicas da infecção por BFDV são hiperplasia, hiperqueratose e necrose da epiderme das penas, do bico e das unhas (Robino *et al.*, 2014). No interior da pena é possível encontrar-se infiltrados celulares compostos por heterófilos, células plasmáticas, macrófagos, linfócitos e ocasionalmente hemorragias na área distal (Robino *et al.*, 2014). O vírus induz ainda a necrose e rutura do colar epidérmico, da epiderme basal intermédia, do cálamio das penas e lesões sugestivas de trombose e hemorragia no interior do folículo (Phalen *et al.*, 2006). É também possível observar-se inclusões basófilas intranucleares e intracitoplasmáticas em vários órgãos e tecidos como bico, bursa de Fabrício, timo, trato gastrointestinal, língua, tiroide, paratiroide, fígado, baço e medula óssea, corroborando a atividade multissistémica do vírus (Robino *et al.*, 2014).

A imunossupressão induzida por este vírus em resultado da infecção e atrofia dos órgãos linfoides resulta na ocorrência frequente de lesões compatíveis com infeções secundárias, muitas vezes responsáveis pela morte das aves (Raidal *et al.*, 2018; Allgayer & Pereira, 2014; Gerlach, 1994; Pendl *et al.*, 2016; Harkins *et al.*, 2014). A infecção secundária por *Chlamydia psittaci* é bastante comum em aves infectadas por circovírus (Raidal *et al.*, 2018). Ao exame *post-mortem* e histopatológico, os animais infetados apresentam uma atrofia do tecido linfoide com focos de necrose e inclusões basófilas intracitoplasmáticas (Pendl *et al.*, 2016).

Particularmente nos papagaios-cinzentos, a ação do BFDV na medula óssea pode conduzir ao aparecimento de anemia severa, leucopénia e à atrofia da medula e posterior substituição da mesma por tecido adiposo (Pendl *et al.*, 2016).

1.2.5. Sinais clínicos

Apesar da PBFD, como o nome indica, ser caracterizada por lesões no bico e nas penas, os sinais clínicos variam de acordo com a gravidade e apresentação da mesma - hiperaguda, aguda ou crônica (Haddadmarandi *et al.*, 2018; Allgayer & Pereira, 2014; Harkins *et al.*, 2014). As lesões apresentadas não podem ser consideradas patognomônicas uma vez que há uma grande variação de espécie para espécie (Fogell *et al.*, 2016) e o desenvolvimento das mesmas está diretamente relacionado com fatores como a idade, o genótipo do vírus e doenças concomitantes (Raidal *et al.*, 2018; Haddadmarandi *et al.*, 2018; Allgayer & Pereira, 2014).

As lesões ao nível das penas e do bico ocorrem devido à presença do vírus no epitélio germinativo dos mesmos (Phalen *et al.*, 2006). As alterações encontradas nas penas podem também variar de acordo com a etapa da muda da pena em que a ave se encontra, uma vez que o BFDV ataca principalmente as penas em fase de crescimento (Pyne *et al.*, 2005; Gerlach, 1994). Aves que sejam infetadas com o vírus ainda no ninho poderão apresentar uma distrofia das penas de 100% enquanto que, em aves adultas, as alterações são graduais à medida que a muda ocorre (Pyne *et al.*, 2005; Gerlach, 1994). No caso do bico, as lesões podem aparecer e progredir mesmo sem a ave estar no período da muda da pena, uma vez que o epitélio germinativo do bico, necessário à replicação viral, não é influenciado pela muda da pena (Gerlach, 1994).

As lesões mais comuns associadas à infecção por BFDV são a perda de penas, alterações na coloração da plumagem, deformações na forma das penas, perda da força de adesão das penas ao folículo e alterações a nível do cálamio (Pyne *et al.*, 2005; Fogell *et al.*, 2016).

As aves mais afetadas são aquelas provenientes do Velho Mundo, ou seja, aves endêmicas do continente Africano, e também as aves endêmicas do continente Australiano, como *Agapornis* spp., *P. erithacus*, *Cacatua* spp., entre outras (Greenacre *et al.*, 2005). Com menos frequência, o vírus pode também infetar psitacídeos do Novo Mundo, nomeadamente aves americanas, como *Amazonas* spp. e *Ara* spp. (Greenacre *et al.*, 2005).

1.2.5.1. Apresentação hiperaguda e aguda

Alguns autores dividem a apresentação aguda em hiperaguda e aguda, tendo por base a idade da ave, a evolução e a gravidade da doença (Phalen *et al.*, 2006).

Muitos dos sinais clínicos observados em aves ainda no ninho são inespecíficos tais como depressão e regurgitação (Phalen *et al.*, 2006). As lesões nas penas desenvolvem-se

rapidamente e são bastante extensas, levando a que estas quebrem com facilidade, podendo causar hemorragias (Phalen *et al.*, 2006).

A apresentação hiperaguda ocorre geralmente em aves neonatais e inclui sinais clínicos compatíveis com um quadro clínico de septicemia associado a pneumonia, enterite, perda de peso rápida e mesmo a morte (Allgayer & Pereira, 2014; Greenacre *et al.*, 2005; Gerlach, 1994). Segundo o mesmo autor, esta apresentação de doença é particularmente comum em papagaios-cinzentos (Gerlach, 1994).

A apresentação aguda de PBFD, vulgarmente denominada de muda francesa devido às anomalias no desenvolvimento das penas, é acompanhada de sinais clínicos como depressão, necrose e fratura de penas e folículos, hemorragias, muda prematura das penas afetadas, estase do papo e diarreia (Allgayer & Pereira, 2014; Gerlach, 1994). Esta apresentação é muito comum em aves jovens durante a primeira formação das penas e torna-se rapidamente fatal em cerca de 1 a 2 semanas (Gerlach, 1994).

Neste tipo de apresentação de PBFD, não são geralmente visíveis lesões indicativas de cronicidade por ser rapidamente fatal (Phalen *et al.*, 2006).

1.2.5.2. Apresentação crónica

Geralmente, a forma crónica de PBFD ocorre em aves com idade superior a 10 meses. Na sua maioria, estas aves vão desenvolver algum tipo de lesão até aos 3 anos de idade.

Esta apresentação é caracterizada principalmente pelo progressivo aparecimento de anormalidades nas penas das aves ao longo das sucessivas mudas efetuadas (Regnard *et al.*, 2015; Gerlach, 1994) (Figura 5).



Figura 5 – Papagaio cinzento com alopecia e penas displásicas, devido ao desenvolvimento da apresentação crónica resultante da infeção por BFDV. Todas as penas de revestimento estão afetadas, à exceção das penas da cabeça, assim como algumas das penas de voo. Fotografia original gentilmente cedida pelo Mestre Mário Nóbrega.

Alguns dos primeiros sinais clínicos que se podem observar são a aquisição de um aspeto baço do bico e atrasos na muda da pena (Phalen *et al.*, 2006). Inicialmente, pode ser verificado um padrão das penas afetadas de acordo com a muda das mesmas (Phalen *et al.*, 2006). As anomalias iniciais que podem ser observadas nas penas são a retenção do canudo que envolve as mesmas, hemorragias no cálamo, fraturas das penas e a apresentação de deformações como penas curtas, enroladas, deformadas, com anéis de constrição ou o aparecimento de linhas de stress (Allgayer & Pereira, 2014; Gerlach, 1994). Com o avançar da doença é possível verificar a perda de penas com um padrão simétrico (Phalen *et al.*, 2006).

Dependendo do grau de displasia das penas poderá estar associada hiperqueratose da área de inserção da pena na pele, resultando na retenção das penas (Phalen *et al.*, 2006). Geralmente, a doença começa por manifestar-se nas penas de revestimento e por último nas penas primárias (Allgayer & Pereira, 2014; Gerlach, 1994). Em casos severos e prolongados, pode não ser possível qualquer distinção das várias estruturas das penas, apresentando-se apenas como uma massa de queratina (Allgayer & Pereira, 2014). As alterações na coloração das penas também podem ser um sinal clínico presente como, por exemplo, a mudança da cor das penas do Papagaio-Cinzento de cinzento para vermelho (Gerlach, 1994).

As mudanças no bico acontecem geralmente na parte superior do bico, denominada rinoteca, e são resultado da hiperqueratose da camada superficial do epitélio, que pode provocar o sobrecrecimento do mesmo (Phalen *et al.*, 2006; Portas *et al.*, 2017; Pyne *et al.*, 2005). Este sobrecrecimento do bico pode provocar limitações na ingestão de alimentos o que conduz à debilidade progressiva da ave. Com o crescimento exagerado do bico aparecem também fissuras longitudinais ou transversais (Pyne *et al.*, 2005; Gerlach, 1994). Numa fase terminal da doença, a extremidade distal do bico poderá fraturar e a necrose da mucosa do palato faz com que a mesma se separe do bico (Gerlach, 1994). Este espaço vai ser posteriormente preenchido por material caseoso e as infeções secundárias são bastante comum (Phalen *et al.*, 2006). Uma vez que estes tipos de lesões provocam dor, a ave pode desenvolver anorexia (Phalen *et al.*, 2006). Aves infetadas pelo BFDV que desenvolvam este tipo de lesões morrem em cerca de 6 a 12 meses, quer pela lesão primária, quer por infeções secundárias (Phalen *et al.*, 2006). Alguns dos microrganismos oportunistas mais comumente associados a estas lesões são bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, leveduras, cryptosporidia e poliomavírus (Phalen *et al.*, 2006).

O sobrecrecimento das unhas ocorre de maneira similar ao crescimento do bico, no entanto, não é a manifestação mais comum de PBFD (Phalen *et al.*, 2006).

1.2.5.3. Apresentação subclínica

No caso da apresentação subclínica, como o próprio nome sugere, os animais são portadores assintomáticos de BFDV. Esta apresentação ocorre em aves que foram infetadas pelo vírus nalguma fase da sua vida sem nunca desenvolver sinais clínicos, e que portanto desenvolveram uma resposta imunológica eficaz (Gerlach, 1994). A grande problemática relacionada com as aves portadoras, prende-se com o facto de poderem excretar o vírus, contribuindo assim para a sua disseminação, sem nunca demonstrar sinais clínicos sugestivos de doença (Regnard *et al.*, 2017; Regnard *et al.*, 2015; Phalen *et al.*, 2006). Nos portadores assintomáticos, o vírus encontra-se principalmente nas penas e no epitélio das unhas e bico, não afetando gravemente órgãos linfoides (Greenacre *et al.*, 2005). Por essa razão não vai ocorrer uma imunossupressão induzida, contribuindo para a ausência de sinais clínicos (Greenacre *et al.*, 2005). Segundo Phalen *et al.* (2006), aves do género *Agapornis* spp., endémicas de África, periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), e muitas espécies nativas da América, são frequentemente portadores assintomáticos de BFDV.

1.2.5.4. Sinais clínicos em Papagaios-Cinzentos (*Psittacus erithacus*)

Em exemplares jovens de *P. erithacus*, a apresentação aguda é a principal forma que esta doença adquire (Phalen *et al.*, 2006). Alguns dos sinais clínicos que podem ser observados são a presença de penas distróficas, folículos de crescimento da pena que normalmente são de cor cinzenta podem, por vezes, ser vermelhos, presença de penas vermelhas noutras zonas do corpo que não a cauda (Phalen *et al.*, 2006; Gerlach, 1994). No entanto, esta alteração no padrão de coloração das penas das aves, não é patognomónico de PBFD uma vez que poderá ter outras etiologias (Phalen *et al.*, 2006).

Segundo Gerlach (1994), crias infetadas entre o 3º e 8º dia de vida apresentam sinais de letargia aos 30 dias, desenvolvendo também uma distrofia progressiva das penas entre o 33º e o 44º dia.

Para além da forma aguda, está também descrita a apresentação hiperaguda, na qual aves com idades compreendidas entre as 7 semanas e os 9 meses desenvolvem doença fatal fulminante (Phalen *et al.*, 2006). Normalmente, ocorre a estase do papo, regurgitação e fraqueza generalizada (Phalen *et al.*, 2006). Esta forma, como referido anteriormente, parece ser particularmente comum em Papagaios-cinzentos (Gerlach, 1994).

Relativamente a achados laboratoriais, em papagaios-cinzentos, está descrita uma anemia não regenerativa com corpos de inclusão típicos na medula óssea (Gerlach, 1994). As aves podem também apresentar uma leucopénia severa (<1000 leucócitos/ μL) e necrose aguda do fígado (Allgayer & Pereira, 2014; Phalen *et al.*, 2006).

A maioria das aves morre ou é eutanasiada duas semanas após o aparecimento de sinais clínicos (Phalen *et al.*, 2006).

1.3. Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo de PBFD pode ser alcançado através da observação dos sinais clínicos típicos que suportam fortemente a hipótese de infeção por BFDV (Phalen *et al.*, 2006). Assim, a infeção pelo BFDV deve ser considerada e fazer parte da lista de diagnósticos diferenciais sempre que a ave demonstrar sinais clínicos compatíveis, tal como a perda progressiva de penas envolvendo a má formação das mesmas (Gerlach, 1994). No entanto,

apenas os sinais clínicos não são suficientes para estabelecer um diagnóstico definitivo uma vez que os mesmos não são patognomônicos (Phalen *et al.*, 2006).

Para confirmar a suspeita de infecção por BFDV, pode recorrer-se a métodos de diagnóstico como a histopatologia, hemaglutinação e inibição de hemaglutinação e PCR (Pyne *et al.*, 2005).

O vírus pode ser detetado no sangue mesmo que o animal não apresente sinais clínicos (Phalen *et al.*, 2006). De acordo com Phalen *et al.* (2006), numa ave experimentalmente infectada, foi possível detetar o vírus 2 dias após a infecção.

No diagnóstico por histopatologia será possível observar-se lesões inflamatórias celulares no cálamo da pena e na bursa de Fabrício (Pyne *et al.*, 2005). Este vírus produz corpos de inclusão intracitoplasmáticos ou intranucleares basofílicos no cálamo da pena, no folículo onde se insere a pena ou na bursa de Fabrício, no bico, no timo e outros tecidos (Pyne *et al.*, 2005; Khalesi *et al.*, 2005) (Figura 6).

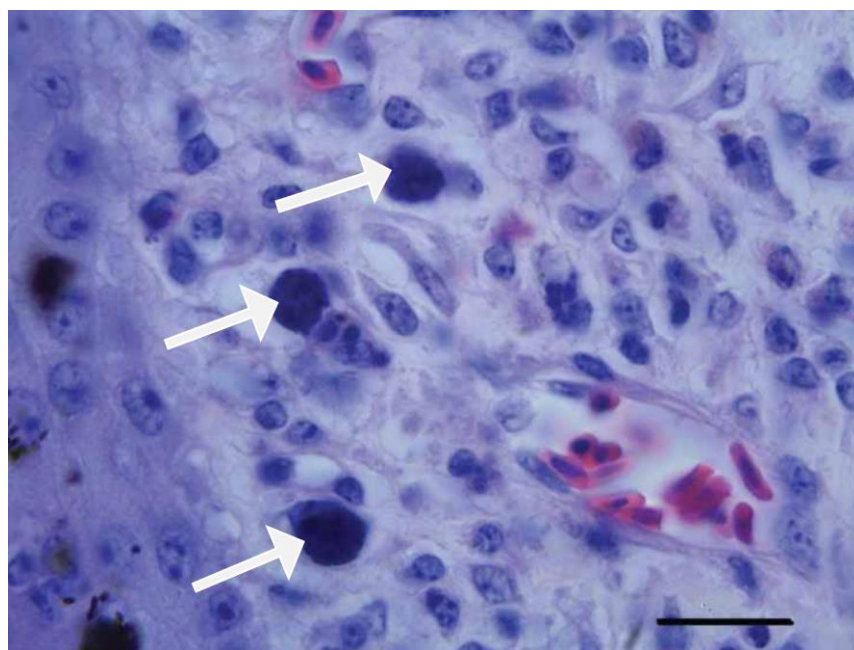


Figura 6 – Presença de corpos de inclusão intracitoplasmáticos basofílicos (setas brancas) numa pena de rosela (*Platycercus eximius*). (Coloração Hematoxilina-Eosina, bar=20 μ m) (Adaptado de Jackson *et al.*, 2014).

A histopatologia é o método de diagnóstico mais simples, no entanto, podem ocorrer resultados falsos negativos com esta técnica, uma vez que a ausência de corpos de inclusão não descarta a infecção por BFDV (Pyne *et al.*, 2005; Gerlach, 1994; Khalesi *et al.*, 2005). Vários

vírus podem causar a presença de corpos de inclusão, por esse motivo, é necessário a utilização de anticorpos específicos para BFDV para o diagnóstico, sendo por esse motivo um método de diagnóstico sugestivo (Gerlach, 1994). A presença de BFDV nos tecidos pode ser detetada através da microscopia eletrônica, onde podem ser observados estes corpos de inclusão intranucleares ou intracitoplasmáticas em macrófagos e células epiteliais (Khalesi *et al.*, 2005). Estes corpos de inclusão são pequenas partículas esféricas e não encapsuladas de 14 a 20 nm de diâmetro (Khalesi *et al.*, 2005). A histopatologia e microscopia eletrônica também apresentam como desvantagem o facto de requererem equipamento e pessoal especializado (Haddadmarandi *et al.*, 2018).

Os resultados combinados da hemaglutinação e da inibição de hemaglutinação permitem, para além do diagnóstico, aferir o prognóstico da doença (Pyne *et al.*, 2005). A hemaglutinação é utilizada para determinar a carga viral sanguínea presente na ave. Por sua vez, a inibição de hemaglutinação permite aferir a resposta imunitária da ave face à infeção viral (Pyne *et al.*, 2005). A presença do vírus provoca a aglutinação dos eritrócitos de vários animais, nomeadamente em espécies de psitacídeos (Araújo, 2011). O prognóstico é alcançado uma vez que uma ave com uma carga viral elevada com uma resposta imunitária baixa ou nula é provável que não sobreviva, enquanto que uma ave com uma carga viral baixa e boa resposta imunitária pode sobreviver durante mais tempo excretando o vírus (Pyne *et al.*, 2005). Este método permite a avaliação quantitativa dos resultados, permitindo assim a aferição do estado da infeção (Khalesi *et al.*, 2005).

O método de PCR é o mais sensível, detetando cargas virais baixas (Pyne *et al.*, 2005). Atualmente é o método de eleição para o diagnóstico de BFDV (Araújo, 2011). Esta técnica permite a deteção de aves positivas quer estas demonstrem sinais clínicos ou não (Phalen *et al.*, 2006). Este método consiste na amplificação de um segmento de um gene que codifica a proteína associada à replicação viral, localizado na ORF V1 do vírus (Ypelaar *et al.*, 1999). Apesar das variações do genoma poderem ocorrer, a ORF V1 é mais estável e mesmo que ocorram alterações, as mesmas são pouco frequentes, sendo menos provável que resultem em resultados falso negativos (Araújo, 2011; Raue *et al.*, 2004). Como vantagem, este método de diagnóstico é rápido e pode ser aplicado a qualquer tipo de tecido animal e ainda a zaragatoas ambientais (Araújo, 2011). Segundo Hess *et al.* (2004), a sensibilidade do PCR para detetar este vírus, é maior usando amostras de penas do que amostras sanguíneas. No entanto, Khalesi *et al.* (2005) refere resultados opostos, tendo obtido melhor resultados com amostras sanguíneas do que com penas. Aves sem sinais clínicos que tenham testado positivo para BFDV pelo

método de PCR devem ser testadas novamente num prazo de 3 meses para confirmar a infeção, uma vez que um resultado positivo pode tratar-se de uma infeção subclínica transitória ou da deteção de DNA não replicante, uma vez que este pode demorar até 3 meses para deixar de ser detetado no sangue (Khalesi *et al.*, 2005; Phalen *et al.*, 2006). A utilização de PCR em tempo real, pode aumentar a sensibilidade de deteção por esta técnica, sendo considerada mais sensível e específica do que a hemaglutinação e a inibição de hemaglutinação (Khalesi *et al.*, 2005). A ocorrência de falsos negativos pode ocorrer em situações de baixa carga viral na amostra escolhida, bem como quando há presença de inibidores do PCR (Tomasek *et al.*, 2008).

A técnica de sequenciação de nova geração (NGS, do inglês Next Generation Sequencing), permite realizar a sequenciação de um genoma em poucas horas, em contraste com tecnologias utilizadas anteriormente (Behjati & Tarpey, 2013). No entanto, apesar de ter ultrapassado tecnologias antigas, a NGS ainda não é utilizada como rotina na prática clínica veterinária em virtude da necessidade de pessoal e equipamento especializado (Behjati & Tarpey, 2013). Em bacteriologia, a sequenciação do genoma total permite a obtenção de informação sobre mecanismos de resistência a vários fármacos, bem como a realização de estudos filogenéticos para a identificação de cadeias de transmissão (Behjati & Tarpey, 2013). Até á data, em Portugal, apenas foram sequenciados sete genomas completos de BFDV em *P. erithacus* utilizando técnicas de PCR (Henriques *et al.*, 2010). Esta sequenciação permitiu obter informações relativas à variabilidade do vírus, determinar a sua filogenia e aferir a sua origem (Henriques *et al.*, 2010).

Relativamente ao método de replicação viral, uma vez que não é possível a replicação de BFVD em culturas celulares em crescimento, não há conhecimento científico sobre método (Gerlach, 1994). Várias tentativas foram realizadas de modo a obter culturas de BFDV mas sem sucesso (Fogell *et al.*, 2016). Assim, a utilização de aves infetadas é a única forma de obter o vírus para estudos imunológicos e genéticos (Khalesi *et al.*, 2005). Devido à impossibilidade do cultivo do vírus *in vitro*, a técnica de PCR é muito usada para a deteção da infeção BFVD devido à sua rapidez, simplicidade e acessibilidade.

O tipo de amostra recomendada para o diagnóstico desta doença, quer em animais sintomáticos quer em animais assintomáticos, é o sangue total (Gerlach, 1994). Em aves com penas deformadas podem ser realizadas biópsias das mesmas para a sua avaliação (Gerlach, 1994). Contudo, e como já referido, a sensibilidade do PCR em amostras de sangue e penas parece variar de acordo com o estudo considerado (Hess *et al.*, 2004; Khalesi *et al.* 2005).

1.3.1. Diagnósticos diferenciais

Os sinais clínicos de casos de PBFD não são patognomónicos e, por essa mesma razão, várias outras doenças podem ter uma apresentação clínica semelhante à que é provocada pelo BFDV (Pyne *et al.*, 2005).

No manejo destes animais deve ter-se sempre em conta, como fator de aparecimento da sinais clínicos, causas do foro ambiental como o stress, temperatura ou higiene; problemas a nível nutricional e agentes infecciosos (Allgayer & Pereira, 2014). Uma correta recolha do historial clínico associado a um bom exame clínico são essenciais para direcionar o diagnóstico corretamente. No entanto, é através dos métodos de diagnóstico acima descritos que se poderá chegar à confirmação do diagnóstico definitivo de infeção por BFDV (Pyne *et al.*, 2005).

A par de causas ambientais, o diagnóstico diferencial de PBFD poderá incluir as seguintes causas:

- O poliomavírus aviário pode causar sinais clínicos semelhantes àqueles provocados pelo BFDV, como a perda de penas com um padrão similar e uma alta mortalidade das crias ainda no ninho (Pyne *et al.*, 2005).

- Doenças hepáticas podem também traduzir-se em alterações a nível das penas como o aparecimento de penas mais estreitas e alterações nas cores das mesmas (Pyne *et al.*, 2005).

- Uma dieta pobre e desequilibrada pode também estar na origem de alterações semelhantes àquelas descritas em aves infetados pelo BFDV, como alterações na forma e cor das penas (Pyne *et al.*, 2005). Problemas derivados de uma má nutrição, como a hipovitaminose A, podem levar também a anomalias na plumagem das aves (Allgayer & Pereira, 2014).

- O picacismo também pode ser confundido com PBFD uma vez que resulta no arranque das penas pela ave. Por outro lado, aves infetadas com BFDV podem também desenvolver formas de picacismo devido às alterações nas penas (Pyne *et al.*, 2005).

1.4. Tratamento

Não existe atualmente tratamento efetivo para esta doença (Tomasek *et al.*, 2008). As aves mantidas sob cuidados humanos e que tenham desenvolvido a forma crónica da doença poderão ter qualidade de vida desde que sejam garantidas condições de manejo excelentes para

evitar agravamentos do quadro clínico e aparecimento de infeções secundárias (Pyne *et al.*, 2005). No caso de ocorrer uma perda acentuada das penas da ave, o controlo da temperatura ambiente pode ser necessário de modo a garantir a capacidade de termorregulação da ave (Jacobson *et al.*, 1986). Quaisquer infeções secundárias que sejam diagnosticadas devem ser tratadas de forma agressiva tendo em conta a fragilidade imunitária das aves (Pyne *et al.*, 2005; Gerlach, 1994).

Enquanto que em casos de anomalias das penas podem ser fornecidas condições ambientais que melhorem a qualidade de vida da ave, no caso de lesões no bico e nas unhas estas podem ser bastante dolorosos, principalmente se houver infeções secundárias concomitantes. Neste caso deve ser ponderada a realização de eutanásia (Gerlach, 1994).

Estudos recentes indicam que poderá haver vantagens no tratamento de aves com a apresentação crónica da doença com interferões que reforçam o sistema imunitário (Pyne *et al.*, 2005). O tratamento com recurso a interferão gama na dose de 1.000.000 UI, intramuscular (IM), SID, por um período de 90 dias, obteve bons resultados em *P. erithacus* (Allgayer & Pereira, 2014).

Para além de estudos com imunomodeladores, estão também a decorrer tentativas de desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o BFDV, uma vez que seria particularmente importante para fazer face aos perigos de biossegurança que as aves com a doença subclínica representam (Regnard *et al.*, 2017). As tentativas iniciais de desenvolvimento de uma vacina consistiam num vírus inativado isolado das penas ou outros órgãos das aves. Para além das questões éticas relacionadas com o isolamento do vírus através de animais infetados, associou-se o facto de não se ter conseguido obter a inativação completa do vírus (Regnard *et al.*, 2017). Uma vez que, até à data, a replicação viral do BFDV em culturas celulares ainda não foi possível, a utilização de tecnologias de recombinação de DNA é tida como uma possível alternativa para o isolamento do vírus (Regnard *et al.*, 2017). Também as vacinas contendo *virus-like particles* (VLPs) são uma alternativa uma vez que não possuem ácidos nucleicos virais e por isso não possuem capacidade infecciosa (Regnard *et al.*, 2017). As VLPs produzem uma boa resposta imunitária estimulando não só a resposta humoral como também a celular (Regnard *et al.*, 2017).

Num estudo levado a cabo por Bonne *et al.* (2009), foram administradas vacinas contendo proteínas recombinantes da cápside de BFDV a aves da espécie *Cacatua tenuirostris* (grupo teste). Em paralelo, num grupo controlo, foram incluídas aves não vacinadas. Após 16

dias, todas as aves foram infetadas experimentalmente com o BFDV por via oral, tendo as do grupo teste recebido um reforço de vacinação. Os resultados foram promissores, uma vez que as aves vacinadas não desenvolveram qualquer sinal clínico e foi apenas possível observar, por PCR, uma virémia transitória. Após 270 dias as aves vacinadas foram novamente testadas através de técnicas como PCR, histopatologia e imunohistoquímica, não sendo obtidos resultados compatíveis com a presença de infecção persistente. As aves não vacinadas desenvolveram lesões nas penas transitórias e resultados positivos nas técnicas de PCR, hemaglutinação e inibição de hemaglutinação (Bonne *et al.*, 2009).

1.5. Prognóstico

A maioria das aves infetadas sobrevive entre 6 meses a 1 ano após o aparecimento de sinais clínicos (Gerlach, 1994). No entanto, segundo o mesmo autor, há relatos de aves com sinais clínicos que sobreviveram durante 10 anos. Tendo em conta a natureza imunodepressora deste agente, a morte das aves ocorre geralmente devido ao aparecimento de infeções concomitantes do foro bacteriano, fúngico ou mesmo viral, ou pela necessidade de ser realizada a eutanásia da ave (Gerlach, 1994). Geralmente, na forma aguda o desfecho é a morte em cerca de 1 a 2 semanas, enquanto que na forma crónica as aves podem viver durante 6 a 12 meses após o aparecimento de sinais clínicos (Khalesi *et al.*, 2005). Como referido anteriormente, a morte ocorre principalmente devido a lesões primárias ou por infeções secundárias, tendo em conta a natureza imunodepressiva do BFDV (Khalesi *et al.*, 2005).

1.6. Prevenção e controlo

Este vírus é muito estável, podendo permanecer viável durante anos independentemente das condições ambientais, e resistente a desinfetantes sendo por isso muito difícil de eliminar (Jackson *et al.*, 2014a). Gerlach (1994), afirma que foi demonstrada a presença do vírus numa sala onde foram mantidas aves infetadas, indicando que o pó contaminado é um veículo importante para a transmissão e persistência deste vírus no meio ambiente.

O método de prevenção mais eficaz consiste na implementação de medidas que limitem ou impeçam a entrada do BFDV na coleção de aves. Todas as aves suscetíveis para a doença devem ser testadas para verificar a existência de portadores assintomáticos (Gerlach, 1994). Esta testagem deve ser realizada principalmente em criadores e lojas de animais, uma vez que as aves têm contacto com outras aves, muitas vezes de outras origens (Gerlach, 1994). Aves

novas a introduzir numa coleção devem ser testadas no momento da aquisição e passado um mês de modo a garantir a ausência de infeção (Allgayer & Pereira, 2014). Apesar dos testes de diagnóstico representarem um custo adicional para os criadores, a realização dos mesmos, previne que no futuro ocorram perdas económicas e de animais decorrentes da introdução deste vírus na coleção (Allgayer & Pereira, 2014).

Num estudo levado a cabo por Bert *et al.* (2005), em aves mantidas sob cuidados humanos, o autor refere que a maioria dos psitacídeos que testaram positivo não mostravam sinais clínicos sugestiva da infeção. Animais portadores do vírus com infeção latente (apresentação subclínica) contribuem acentuadamente para a contaminação ambiental e disseminação do BFDV (Bert *et al.*, 2005). É imprescindível a monitorização dos casais reprodutores, a testagem dos mesmos, o isolamento das aves positivas e ainda a implementação de medidas de biossegurança que protejam as crias, uma vez que a maioria das infeções ocorre por contaminação ambiental (Bert *et al.*, 2005).

Aves de valor financeiro elevado são geralmente testadas, no entanto, a maioria dos criadores possui também outras espécies de aves com menor valor económico que geralmente não são testadas, constituindo assim uma porta de entrada do vírus para a coleção (Allgayer & Pereira, 2014). Aves comuns como *Agapornis* spp., *Melopsittacus undulatus* e *Nymphicus hollandicus* estão muitas vezes na origem da entrada deste vírus nas coleções (Allgayer & Pereira, 2014). Qualquer ave que seja positiva para BFDV deve ser isolada e retirada da coleção o mais rápido possível, uma vez que o potencial infeccioso do vírus é bastante elevado (Pyne *et al.*, 2005). Após qualquer manuseio de aves suspeitas de estarem infetadas, deve-se trocar de roupa e tomar banho antes de contactar com outras aves (Pyne *et al.*, 2005).

Locais de contacto entre as aves e criadores, como feiras de exposição ou de venda, devem ser consideradas como locais de risco de transmissão e as aves que participarem devem ser sujeitas a quarentena e testagem após 30 dias do evento (Allgayer & Pereira, 2014).

Também o comércio legal e ilegal de espécies de psitacídeos, pode potenciar a disseminação do BFDV e o aparecimento de novas variantes do vírus, comprometendo assim as populações de psitacídeos (Haddadmarandi *et al.*, 2018). Segundo o mesmo autor, também as migrações sazonais naturais das espécies contribuem para a disseminação do vírus. O controlo do comércio de aves provenientes do Velho Mundo, nomeadamente do continente africano, é necessário uma vez que está descrita a existência de estirpes do vírus nas populações selvagens (Bert *et al.*, 2005). No que concerne ao Novo Mundo, Bert *et al.* (2005) não verificou

a presença do vírus em aves selvagens provenientes da América do sul e central, corroborando a hipótese da ausência do vírus nestas populações.

A erradicação da PBFD é portanto pouco provável devido principalmente à prevalência do vírus e à resistência do mesmo no meio ambiente (Regnard *et al.*, 2017). Contudo, a implementação de medidas de prevenção e controlo em aves sob cuidados humanos mostra-se essencial na minimização de perdas animais e económicas.

1.7. Objetivos

Os principais objetivos a ser atingidos neste estudo são determinar, através de métodos moleculares, a prevalência da infeção por BFDV em aves assintomáticas da espécie *P. erithacus* mantidas em cativeiro em Portugal Continental e caracterizar as condições de manejo, permitindo identificar medidas de prevenção da disseminação deste vírus. Dada a importância clínica do vírus e a escassez de informação sobre a distribuição do mesmo em Portugal, o presente trabalho representa um importante contributo epidemiológico e clínico para a fauna cativa de *P. erithacus* e outros psitacídeos no nosso País.

2. Material e métodos

2.1. Descrição da população em estudo

Neste estudo foi realizada a pesquisa de BFDV em aves saudáveis da espécie *P. erithacus* mantidas em coleções de aves em 9 concelhos de Portugal Continental (Arraiolos, Azambuja, Caldas da Rainha, Coimbra, Montijo, Tondela e Valpaços) (Figura 7). Para tal, foram colhidas amostras de sangue de 10 aves sem sinais clínicos, provenientes de 10 criadores distintos, perfazendo um total de 100 animais. Estas amostras foram colhidas entre novembro de 2021 e março de 2022.

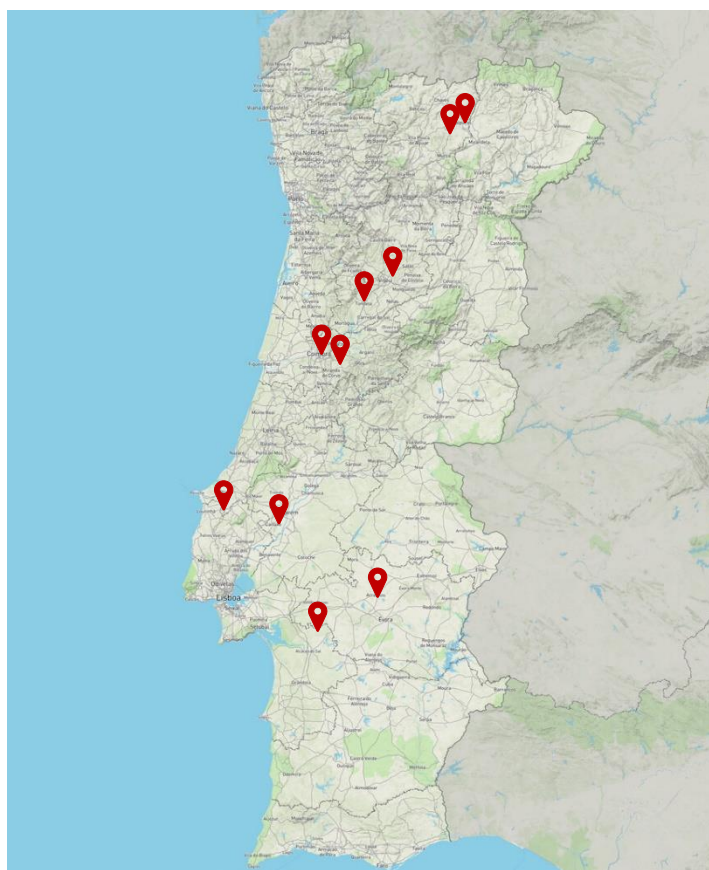


Figura 7 – Localização geográfica aproximada da origem das aves envolvidas no presente estudo. Original do autor.

Como critérios de inclusão no estudo foram aceites aves adultas, de ambos os sexos e provenientes de criadores que possuíssem, no mínimo, 10 aves da espécie *P. erithacus*. Não foram consideradas restrições quanto ao tamanho ou composição de cada coleção.

Todas as recolhas de amostras foram realizadas no âmbito da avaliação clínica de rotina e rastreio de infeção por BFDV nestas aves.

Previamente à inclusão no estudo, foi fornecido um consentimento informado aos criadores que o assinaram. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da FMV-ULHT (parecer 4-2022).

No momento da colheita, foi realizado um questionário epidemiológico sobre cada criador (Apêndice A) e cada ave (Apêndice B) por forma a caracterizar os animais em estudo. Todas as aves foram identificadas através da recolha do respetivo número de microchip/anilha.

2.2. Recolha de amostra de sangue

A recolha de sangue em aves pode ser um processo muito stressante, podendo agravar o seu estado clínico ou provocar alterações em parâmetros utilizados para avaliação do seu estado de saúde. Por esta razão, a captura e imobilização dos animais deve ser realizada por um enfermeiro ou médico veterinário experiente, visando a segurança do animal e dos manipuladores, assim como a colheita rápida e segura das amostras necessárias (Campbell, 2015). As aves devem ser imobilizadas vertical ou horizontalmente, mas nunca suspensas de cabeça para baixo. Estes princípios foram seguidos no presente estudo por forma a garantir o bem-estar das aves.

A escolha da veia a puncionar pode variar de acordo com a preferência do manipulador, da espécie alvo, tamanho da ave, estado clínico da ave e, ainda, volume de sangue a colher. No presente estudo foi utilizada a veia jugular direita para proceder à flebotomia, uma vez que o seu calibre favorece uma colheita rápida, assim como um volume adequado de sangue (Campbell, 2015) (Figura 7). No caso dos papagaios, nomeadamente o *P. erithacus*, foram utilizadas agulhas com 1,5 polegadas e 25 G acopladas a seringas de 1mL. O volume a ser colhido nas aves deve, no máximo, corresponder a 1% do seu peso total, uma vez que o volume total de sangue representa cerca de 10% do peso da ave (Campbell, 2015). Pesando esta espécie cerca de 500 g, o volume máximo a retirar é de 5 mL; no entanto, para o presente estudo foi colhido, no máximo, 1 mL a ser utilizado para extração de DNA. Após a colheita foi aplicada uma técnica hemostática, por pressão do local onde a veia foi puncionada, para prevenir o aparecimento de hematomas (Campbell, 2015).



Figura 8 – Colheita sanguínea a uma das aves que integrou o estudo para deteção de PBFD. Fotografia original, gentilmente cedida pelo Mestre Mário Nóbrega.

As amostras de sangue foram colhidas para tubos com EDTA, identificadas, mantidas em refrigeração e transportadas até ao laboratório do Hospital Veterinário Escolar da FMV-ULHT, num prazo máximo de 24 horas, onde foram conservadas a -80°C até à extração do DNA.

2.3. Extração de DNA e controlo de qualidade

2.3.1. Extração de DNA genómico total

Foi realizada a extração de DNA de todas as amostras de sangue total através do uso do kit comercial “Invisorb[®] Spin Universal Kit” (Invitex Molecular GmbH, Berlim, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante a seguir descritas:

- 1- Pipetaram-se 100 μL de sangue total, 10 μL de Proteinase K, 100 μL de *Elution Buffer M*, 200 μL de tampão de lise HLT para um microtubo de 2 mL devidamente identificado.
- 2- Procedeu-se à homogeneização no vórtex, durante 10 segundos. De seguida, incubou-se a amostra a 56°C em banho-maria (VWR[®]-Avantor, Radnor, PA, EUA),

durante 15 minutos. Terminada a incubação, efetuou-se um *short-spin*, durante 30 segundos, a $3.000 \times g$, numa centrífuga (Galaxy,14D, VWR® Radnor, PA, EUA), de forma a minimizar a produção de aerossóis.

- 3- Adicionaram-se 260 μL de *Binding Solution* à mistura inicial, homogeneizou-se no vórtex e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos. Efetuou-se um *short-spin*, durante 30 segundos, a $3.000 \times g$.
- 4- Transferiu-se o volume total da amostra para um Tubo RTA *receiver* já com o RTA *Spin Filter* acoplado, devidamente identificados. Centrifugou-se durante um minuto a $11.000 \times g$. Após este processo descartou-se o Tubo RTA *receiver* com o conteúdo filtrado. Colocou-se o RTA *Spin Filter* num Tubo RTA *receiver* limpo.
- 5- Adicionaram-se 600 μL de *Wash Buffer* HLT. Centrifugou-se durante um minuto a $11.000 \times g$. Descartou-se o Tubo RTA *receiver* com o conteúdo filtrado. Colocou-se o RTA *Spin Filter* num Tubo RTA *receiver* limpo.
- 6- Adicionaram-se 700 μL de *Wash Buffer*. Centrifugou-se durante um minuto a $11.000 \times g$. Descartou-se o conteúdo do Tubo RTA *receiver* e reutilizou-se o mesmo.
- 7- Repetiu-se o ponto 6 uma única vez.
- 8- Centrifugaram-se os tubos durante 5 minutos a $11.000 \times g$, de modo a promover a remoção do etanol. Descartou-se o Tubo RTA *receiver*.
- 9- Colocou-se o RTA *Spin Filter* num microtubo de 1,5 mL estéril e adicionaram-se 100 μL de H_2O desionizada, pré-aquecida a 56°C , diretamente sobre a superfície do filtro. Incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugou-se durante 1 minuto a $11.000 \times g$. Descartou-se o RTA *Spin Filter*. Identificou-se o microtubo com o DNA e armazenou-se a -20°C até à realização da PCR.

Após a extração, foi avaliada a presença de DNA genómico por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v), segundo o seguinte procedimento:

- 1- Para a preparação de um gel com um volume de 100 mL, pesaram-se 0,8 g de agarose (SeaKem® LE Agarose, Lonza®, Basileia, Suíça) para um Erlenmeyer, numa balança técnica (EK-600H, AND®, Tóquio, Japão).
- 2- Adicionaram-se ao Erlenmeyer 100 mL de tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 1 $\times$.
- 3- A suspensão foi levada ao micro-ondas a 700 watts (W), durante o tempo necessário para garantir a fusão total da agarose, observada como um líquido homogéneo e translúcido sem qualquer precipitado.

- 4- De seguida, montou-se o molde do gel de agarose e inseriram-se os pentes para criar os poços onde será colocada a amostra.
- 5- Antes de transferir o gel para o molde, arrefeceu-se o mesmo debaixo de água corrente, agitando o Erlenmeyer.
- 6- Foram adicionados ao gel 0,42 µL de GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Landing Park, Fremont, CA, EUA).
- 7- Colocou-se o gel no molde e aguardou-se a sua polimerização. Após a polimerização, o molde contendo o gel de agarose foi transferido para uma tina de eletroforese.
- 8- Adicionou-se tampão TBE 1× à tina de eletroforese até cobrir completamente os poços do gel.
- 9- Foram preparadas as amostras a aplicar em cada poço do gel, contendo 10 µL de DNA extraído e 2 µL de DNA *loading buffer* (Bioline®, Londres, Reino Unido).
- 10- Foi, também, aplicado num poço o marcador de pesos moleculares HyperLadder 100 pb (Bioline®, Londres, Reino Unido).
- 11- Após a aplicação de todas as amostras nos respetivos poços, ligou-se a fonte de alimentação (Biometra PS 300TP, Göttingen, Alemanha) e realizou-se a eletroforese a 90 volts (V), durante 60 minutos.
- 12- Depois de concluído o processo de eletroforese, observou-se o resultado final num transiluminador UV (AlfaGene®, Carcavelos, Portugal), por emissão de fluorescência do GelRed presente no DNA.

2.3.2. Controlo de qualidade do DNA pela deteção do 12S rDNA por PCR convencional

Para aferir e garantir a qualidade e integridade do DNA extraído, foram utilizados *primers* específicos para um gene *housekeeping* das aves, 12S rDNA, que delimitam um fragmento de 436 pb (Bert *et al.*, 2005) (Tabela 4). A amplificação foi realizada por PCR convencional, como descrito de seguida.

De forma a evitar a contaminação das amostras com DNA exógeno, realizou-se a higienização das superfícies de trabalho e materiais com lixívia a 10%, nomeadamente pipetas automáticas, suportes, caixa de pontas de pipetas, centrífuga e suportes de microtubos. Após esta higienização os materiais foram ainda expostos a luz UV (ultravioleta), durante 15 minutos, numa câmara de fluxo laminar. A preparação da mistura reacional foi realizada dentro de uma

câmara de uso exclusivo para PCR, portanto, sem material genómico. Foram utilizadas pipetas automáticas e pontas de pipetas com filtro estéreis, de uso exclusivo no interior da câmara. A adição de DNA à mistura reacional foi realizada noutra bancada de trabalho, com recurso a pontas de pipeta com filtro.

Por cada amostra em teste foi preparada uma mistura reacional com um volume total de 25 µL, composta por 1 × de MyTaq Reaction Buffer (Bioline®, Londres, Reino Unido), 7 pmol de *primer 12S rDNA L*, 7 pmol de *primer 12S rDNA H*, 1 U de MyTaq DNA polimerase (Bioline®, Londres, Reino Unido), entre 5 µL a 10 µL de DNA genómico e água desionizada estéril, até perfazer o volume final. Para cada reação feita foram incluídos um controlo negativo (com adição de água desionizada estéril) e um controlo positivo (com adição de DNA de uma amostra positiva conhecida), por forma a validar os resultados positivos e negativos de cada reação.

Tabela 4 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação do *12S rDNA*.

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento amplificado	Referência
<i>12S rDNA L</i>	GGA TTA GAT ACC CCA CTA TGC	436 pb	(Bert <i>et al.</i> , 2005)
<i>12S rDNA H</i>	AGG GTG ACG GGC GGT ATG TAC G		

A reação de PCR realizou-se num termociclador (BIO-RAD T100™ Thermal Cycler, Hercules, CA, EUA), de acordo com as condições presentes na tabela 5.

Tabela 5 – Condições da reação de PCR para a amplificação do *12S rDNA*.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	4 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	35
Hibridação dos <i>primers</i>	55°C	30 segundos	
Extensão	72°C	45 segundos	
Extensão final	72°C	7 minutos	1

2.3.2.1. Visualização dos produtos do PCR por eletroforese em gel de agarose

A visualização dos produtos de PCR foi feita submetendo 10 µL dos mesmos a eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v), de acordo com o descrito em 2.3.1. (página 53).

2.4. Detecção de BFDV por PCR *nested*

A pesquisa BFDV foi apenas realizada em amostras cuja detecção do gene *housekeeping* foi possível. De modo a garantir uma especificidade e sensibilidade elevadas, procedeu-se a uma reação de PCR *nested* utilizando *primers* previamente publicados (Tomasek *et al.*, 2008). A primeira reação de PCR foi realizada utilizando os *primers* PBFD 2 e PBFD 4 (Tabela 6), que amplificaram um fragmento da ORF V1 de 718pb, entre as posições dos nucleótidos números 182 e 899 do genoma de BFDV (Tomasek *et al.*, 2008) (Figura 8).

Tabela 6 – Sequência de *primers* utilizados na amplificação da ORF V1 (Tomasek *et al.*, 2008).

<i>Primers</i>	Sequência (5' →3')	Tamanho do fragmento amplificado	Referência
PBFD 2	AAC CCT ACA GAC GGC GAG	718 bp	(Tomasek <i>et al.</i> , 2008)
PBFD 4	GGT CAC AGT CCT CCT TGT ACC		
PBFD 251	ACT TAC CCT GGG CAT TGT GGC G	359 bp	
PBFD 609	GGC GGA GCA TCT CGC AAT AAG G		

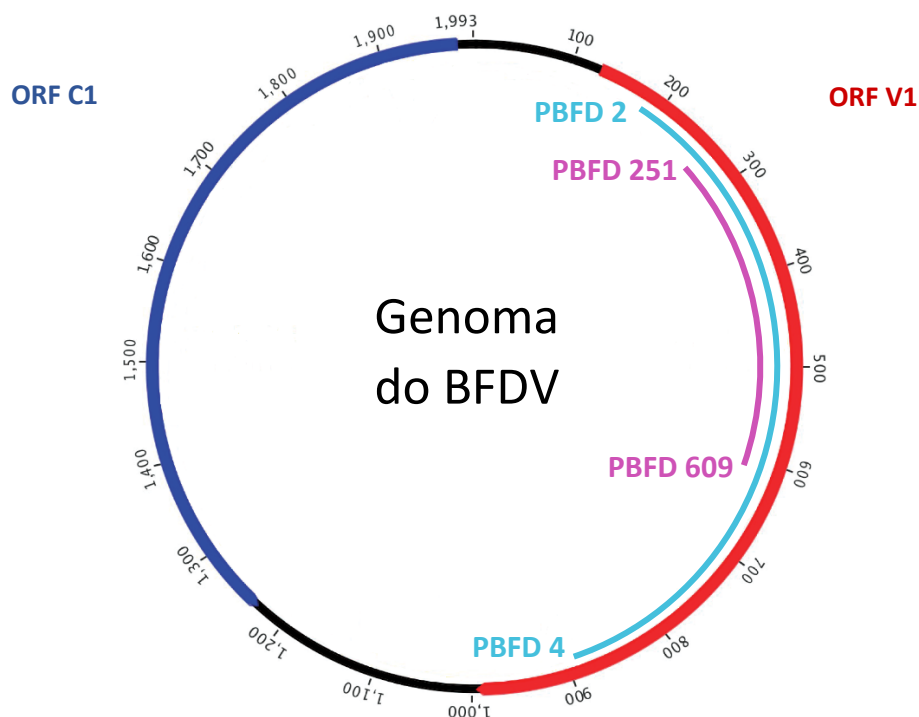


Figura 9 – Representação esquemática do genoma do BFDV. ORF V1 a vermelho e ORF C1 a azul-escuro. Representação dos *primers*: a azul os *primers* PBFD 2 e PBFD 4, utilizadas na 1ª reação de amplificação; a magenta os *primers* PBFD 251 e PBFD 609, utilizadas na 2ª reação de amplificação (Adaptado de Peters *et al.*, 2014).

Para esta reação de PCR foi preparada uma mistura reacional com um volume total de 25 μL , composta por 12,5 μL de NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYTech®, Lisboa, Portugal), 7 pmol de *primer* PBFD 2 e 7 pmol de *primer* PBFD 4, 2 μL de DNA e água desionizada estéril até perfazer o volume final. Para cada reação feita foram incluídos um controlo negativo (com adição de água desionizada estéril) e um controlo positivo (com adição de DNA de uma amostra positiva conhecida), por forma a validar os resultados positivos e negativos de cada reação.

A primeira reação de PCR foi efetuada num termociclador (BIO-RAD T100™ Thermal Cycler, Hercules, CA, EUA), de acordo com as condições apresentadas na tabela 7.

Tabela 7 – Condições da primeira reação de PCR *nested* para amplificação de DNA de circovírus.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	4 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	35
Hibridação dos <i>primers</i>	58°C	30 segundos	
Extensão	72°C	45 segundos	
Extensão final	72°C	7 minutos	1

Para a segunda reação do PCR *nested* foram utilizados os *primers* PBFD 251 e o *primer* PBFD 609, amplificando um fragmento de 359 pb, entre a posição 251 e 609 do genoma de BFDV (Tomasek *et al.*, 2008) (Figura 8).

Para a segunda reação do PCR *nested* foi preparada uma mistura reacional com um volume total de 25 µL, composta por 12,5 µL de NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYTech®, Lisboa, Portugal), 7 pmol de *primer* PBFD 251 e 7 pmol de *primer* PBFD 609, 2 µL do produto resultante da primeira reação de PCR *nested* e água desionizada até perfazer o volume final.

A segunda reação de PCR *nested* foi efetuada no mesmo termociclador, de acordo com as condições apresentadas na tabela 8.

Tabela 8 – Condições da reação de amplificação utilizadas na segunda reação da PCR *nested*.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	4 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	32
Hibridação dos <i>primers</i>	67°C	20 segundos	
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	7 minutos	1

Após a reação, a visualização dos produtos de PCR foi feita submetendo 10 µL dos mesmos a eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v), de acordo com o procedimento anteriormente apresentado em 2.3.1. (Página 53).

2.5. Purificação e Sequenciação dos produtos de PCR

A sequenciação dos produtos de PCR permite determinar a sequência de nucleótidos dos produtos amplificados (Clark & Pazdernik, 2009).

Para se proceder à sequenciação dos produtos de PCR é necessário que estes sejam purificados, por forma a remover os componentes da reação de PCR que podem interferir com o processo de sequenciação (*primers*, DNA polimerase, sais e desoxirribonucleotídeos fosfatados). O kit utilizado para o efeito no presente trabalho foi o “Jetquick – PCR Product Purification Spin Kit/50” (Genomed GmbH, Bad Oeynhausen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, a seguir descritas.

- 1- Pipetaram-se, para um microtubo de 1,5 mL, 15 µL do produto de PCR a sequenciar.
- 2- Adicionaram-se 60 µL do *Binding Buffer* H1 e procedeu-se à sua homogeneização.
- 3- Num tubo coletor inseriu-se uma “Jetquick Spin Column” e pipetou-se a mistura para o interior da mesma.
- 4- Centrifugou-se durante um minuto a $12.000 \times g$.
- 5- Descartou-se o filtrado e recolocou-se a “Jetquick Spin Column” no tubo coletor.
- 6- Adicionaram-se 500 µL de *Wash Buffer* H2.
- 7- Centrifugou-se durante um minuto a $12.000 \times g$.
- 8- Descartou-se o filtrado e recolocou-se a “Jetquick Spin Column” no tubo coletor.
- 9- Centrifugou-se durante um minuto a $12.000 \times g$.
- 10- Descartou-se o filtrado, juntamente com o tubo coletor, e colocou-se a “Jetquick Spin Column” num novo microtubo de 1,5 mL.
- 11- Adicionaram-se 50 µL de água desionizada estéril à membrana da “Jetquick Spin Column”.
- 12- Centrifugou-se durante dois minutos a $12.000 \times g$.
- 13- Descartou-se a “Jetquick Spin Column” e guardou-se o microtubo com o produto de PCR purificado a 4°C.

No presente trabalho foram selecionadas três amostras positivas para BFDV cujos produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciação pelo método de sanger na empresa STABVida®. Os resultados recebidos, representados por cromatogramas, foram visualizados com recurso ao programa FinchTV (Geospiza®). As sequências obtidas foram

submetidas a uma análise de pesquisa de similaridade, com recurso ao algoritmo “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST).

3. Resultados

3.1. Caracterização da população de Papagaios-Cinzentos (*Psittacus erithacus*) em estudo

No que concerne às condições ambientais e de manejo das coleções, não foi possível aferir o número de aves existentes, nem as diferentes espécies que as compõem. Esta informação revelou-se de difícil acesso devido à frequente saída e entrada de aves das coleções.

Relativamente às restantes informações recolhidas sobre as coleções (Apêndice A), faz-se notar que todas as aves pertencentes à mesma coleção se encontravam sob as mesmas condições (Tabela 9).

Tabela 9 – Condições dos criadores onde se encontravam as aves que participaram no estudo.

Criador	Contacto com o solo ou fezes		Tipo de ambiente		Tipo de alojamento		Contacto direto com outras espécies	
	Sim	Não	Interior	Exterior	Casal	Comunitário	Sim	Não
1	x			x	x			x
2		x		x	x			x
3		x		x	x			x
4		x	x		x			x
5		x	x		x			x
6		x		x	x			x
7		x		x	x			x
8		x		x	x			x
9	x			x		x	x	
10		x		x	x			x

De um modo geral, a maioria dos criadores mantinham as aves nas mesmas condições (60%, 6/10) (Tabela 9). Observou-se que, em 80% (8/10) destes, as aves não tinham contacto direto com o solo e fezes. Relativamente ao tipo de ambiente, apenas dois criadores (criador-4 e criador-5) mantinha as aves em ambiente interior, sem ventilação, enquanto os restantes 80% (8/10) mantinham as aves em recintos exteriores (Tabela 9).

Todos os criadores possuíam outras espécies de aves, no entanto, apenas 10% (1/10) dos criadores permitiam que as aves incluídas no estudo tivessem contacto direto com outras espécies (criador-9), sendo que os restantes 90% (9/10) permitiam o seu contacto indireto (Tabela 9). Entende-se por contacto indireto aves que estejam em gaiolas ou viveiros adjacentes e que possam partilhar utensílios como as taças utilizadas para o seu manejo nutricional.

No caso do criador-9, as aves habitavam num viveiro comunitário com outras espécies de psitacídeos, nomeadamente do género *Ara*. Os restantes criadores (90%, 9/10), mantinham as aves em gaiolas individuais de criação onde apenas estão presentes duas aves, em virtude de manterem os casais juntos durante todo o ano (Tabela 9).

Quanto aos dados individuais das aves incluídas no presente estudo ($n=100$), foi possível confirmar que nenhuma demonstrava qualquer tipo de sinais clínicos sugestiva de PBFD e que nenhuma das aves tinha sido anteriormente testada para a presença de BFDV.

Das aves incluídas neste estudo, 50% (50/100) eram fêmeas e 50% (50/100) machos, sendo esta distribuição mantida em todos os criadores. A informação sobre outros fatores de carácter individual (Apêndice B) como a idade, origem da ave e patologias anteriores, não foi fornecida por parte dos criadores em virtude de os registos serem de difícil acesso. No entanto, todas as aves incluídas eram adultas.

3.2. Detecção de BFDV

A amplificação do gene *12S rDNA* foi possível em todas as amostras incluídas no estudo (Figura 10), refletindo a boa qualidade e integridade do DNA utilizado bem como a ausência de inibidores da DNA polimerase que pudessem conduzir a resultados falsos negativos.

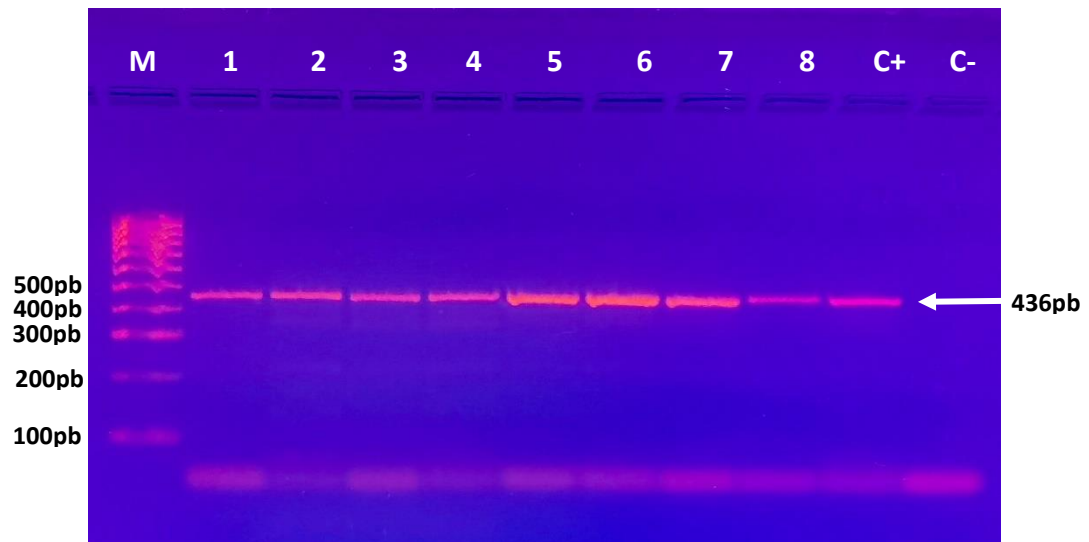


Figura 10 – Resultados da amplificação do *12S rDNA* observados em eletroforese em gel de agarose a 2%. M: Marcador de pesos moleculares Hyperladder 100 bp (Bioline). 1 a 8: Produto de PCR de oito amostras em estudo. C+: Controlo positivo. C-: Controlo negativo. Fotografia original do autor.

A detecção de infecção por BFDV por PCR *nested* foi confirmada pela presença de um produto de PCR com cerca de 359 pb (Figura 11). Considerando a totalidade de aves incluídas no estudo, foi detetada uma prevalência de infecção por BFDV de 8% (8/100) na espécie *P. erithacus* (Tabela 10).

Após a pesquisa de similaridade das sequências obtidas por sequenciação de sanger, com recurso ao algoritmo BLAST, foram encontradas para os três produtos de PCR percentagens de identidade entre 98,03% e 100% com vários isolados de BFDV.

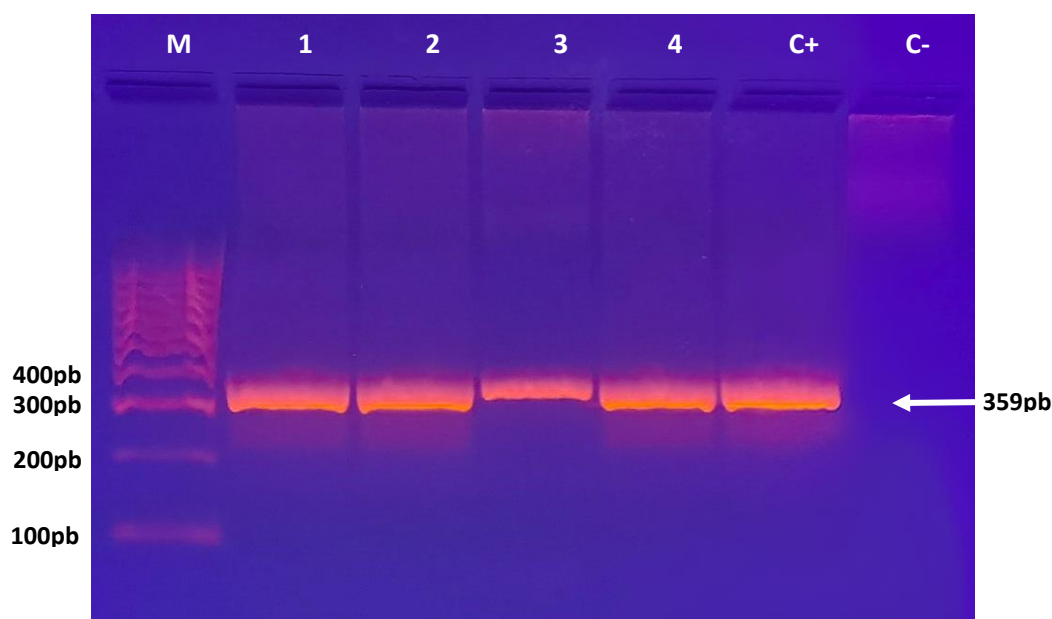


Figura 11 – Resultados da amplificação de BFDV observados após eletroforese em gel de agarose a 2%. M: Marcador de pesos moleculares Hypperladder 100 bp (Bioline). 1 a 4: Produto de PCR de quatro amostras positivas para BFDV. C+: Controlo positivo. C-: Controlo negativo. Fotografia original do autor.

Tabela 10 – Resultados da prevalência de BFDV nas aves envolvidas no estudo.

	Aves positivas para BFDV	Tamanho da Amostra (n)	Frequência Relativa (%)
<i>Psittacus erithacus</i>	8	100	8%

As aves infetadas por BFVD pertenciam a um total de seis criadores (criador-1, criador-4, criador-6, criador-7, criador-8 e criador-9), correspondendo a 60% das coleções estudadas (Gráfico 5). As coleções com pelo menos uma ave infetada distribuíram-se pelos Concelhos de Arraiolos, Coimbra, Montijo, Tondela e Valpaços.

Dois criadores (criador-1 e criador-4), apresentaram uma prevalência de 20% (2/10) de aves infetadas em relação à amostra analisada (Gráfico 5). Quanto às condições de manejo, as aves do criador-1 tinham contacto com o solo e fezes, encontravam-se alojadas no exterior e tinham apenas contacto indireto com outras espécies (Tabela 9). O criador-4, mantinha as aves sem contacto com o solo e fezes, alojadas em ambiente interior e também com contacto indireto com outras espécies (Tabela 9).



Gráfico 5 – Total de aves positivas por cada criador.

Quatro criadores (criador-6, criador-7, criador-8 e criador-9) obtiveram uma prevalência de infeção por BFDV de 10%, correspondendo a uma ave positiva de entre as 10 testadas em cada local. Os criador-6, criador-7 e criador-8 mantinham as aves sem contacto com o solo e fezes, alojadas em ambiente exterior e com contacto indireto com outras espécies (Tabela 9). No criador-9 as aves tinham acesso ao solo e fezes, estavam alojadas no exterior e tinham contacto direto com outras espécies por terem alojamento comunitário (Tabela 9).

Nos restantes criadores (criador-2, criador-3, criador-5 e criador-10) não foi detetada a presença de BFDV nas aves testadas, sendo que tinham condições de manejo idênticas às dos criador-6, criador-7 e criador-8 (Tabela 9).

Considerando as aves individualmente, foram testadas 90 aves alojadas por casal ($n=45$ casais) e 10 aves a viver em alojamento comunitário (Tabela 11). De entre os 45 casais testados, sete continham uma ave positiva, correspondendo a 15,6% (7/45) dos casais infetados. Um achado interessante neste estudo foi o facto de os parceiros de alojamento destas 7 aves terem sido todos negativos para a pesquisa de BFVD por PCR (Tabela 11).

De entre as 8 aves positivas para BFVD, 37,5% (3/8) tinham contacto com o solo e fezes, 25% (2/8) estavam alojadas no interior e 12,5% (1/8) tinham contacto com outras espécies. Finalmente, considerando as 92 aves negativas para BFVD, 18,5% (17/92) tinham contacto com o solo e fezes, 19,6% (18/92) estavam alojadas no interior e 9,8% (9/92) tinham contacto com outras espécies.

Tabela 11 – Infecção por BFDV e características das aves envolvidas no estudo.

Criador	Casal	ID ave	Resultado de PCR	Contacto com o solo e fezes	Alojamento	Contacto com outras espécies
1	1	PE0101	Negativo	Sim	Exterior	Não
		PE0102	Positivo			
	2	PE0103	Positivo			
		PE0104	Negativo			
	3	PE0105	Negativo			
		PE0106	Negativo			
	4	PE0107	Negativo			
		PE0108	Negativo			
	5	PE0109	Negativo			
		PE0110	Negativo			
2	6	PE0201	Negativo	Não	Exterior	Não
		PE0202	Negativo			
	7	PE0203	Negativo			
		PE0204	Negativo			
	8	PE0205	Negativo			
		PE0206	Negativo			
	9	PE0207	Negativo			
		PE0208	Negativo			
	10	PE0209	Negativo			
		PE0210	Negativo			
3	11	PE0301	Negativo	Não	Exterior	Não
		PE0302	Negativo			
	12	PE0303	Negativo			
		PE0304	Negativo			
	13	PE0305	Negativo			
		PE0306	Negativo			
	14	PE0307	Negativo			
		PE0308	Negativo			
	15	PE0309	Negativo			
		PE0310	Negativo			
4	16	PE0401	Negativo	Não	Interior	Não
		PE0402	Negativo			
	17	PE0403	Negativo			
		PE0404	Negativo			
	18	PE0405	Positivo			
		PE0406	Negativo			
	19	PE0407	Negativo			
		PE0408	Positivo			
	20	PE0409	Negativo			
		PE0410	Negativo			
5	21	PE0501	Negativo	Não	Interior	Não
		PE0502	Negativo			
	22	PE0503	Negativo			
		PE0504	Negativo			
	23	PE0505	Negativo			
		PE0506	Negativo			
	24	PE0507	Negativo			
		PE0508	Negativo			
	25	PE0509	Negativo			
		PE0510	Negativo			
6	26	PE0601	Negativo	Não	Exterior	Não

		PE0602	Negativo			
	27	PE0603	Negativo			
		PE0604	Negativo			
	28	PE0605	Negativo			
		PE0606	Negativo			
	29	PE0607	Negativo			
		PE0608	Negativo			
	30	PE0609	Negativo			
		PE0610	Positivo			
7	31	PE0701	Negativo			
		PE0702	Negativo			
	32	PE0703	Negativo			
		PE0704	Negativo			
	33	PE0705	Negativo	Não	Exterior	Não
		PE0706	Negativo			
	34	PE0707	Positivo			
		PE0708	Negativo			
	35	PE0709	Negativo			
		PE0710	Negativo			
8	36	PE0801	Negativo			
		PE0802	Negativo			
	37	PE0803	Negativo			
		PE0804	Negativo			
	38	PE0805	Negativo	Não	Exterior	Não
		PE0806	Negativo			
	39	PE0807	Negativo			
		PE0808	Negativo			
9	40	PE0809	Negativo			
		PE0810	Positivo			
		PE0901	Negativo			
		PE0902	Negativo			
		PE0903	Negativo			
	*	PE0904	Negativo			
		PE0905	Negativo	Sim	Exterior	Sim
		PE0906	Negativo			
		PE0907	Negativo			
		PE0908	Positivo			
10		PE0909	Negativo			
		PE0910	Negativo			
	41	PE1001	Negativo			
		PE1002	Negativo			
	42	PE1003	Negativo			
		PE1004	Negativo			
	43	PE1005	Negativo	Não	Exterior	Não
		PE1006	Negativo			
	44	PE1007	Negativo			
		PE1008	Negativo			
	45	PE1009	Negativo			
		PE1010	Negativo			

Legenda: *Aves mantidas em alojamento comunitário.

4. Discussão

A Doença do Bico e das Penas dos Psitacídeos é causada pelo circovírus dos psitacídeos, o qual se encontra disseminado mundialmente (Harkins *et al.*, 2014). Dada a sua importância na saúde e preservação de várias espécies de psitacídeos (Bert *et al.*, 2005; Fogell *et al.*, 2016), bem como a escassez de dados relativos a Portugal, este estudo pretendeu avaliar a prevalência da infeção por BFDV numa população de aves assintomáticas da espécie *P. erithacus*, vulgarmente conhecida por Papagaios-Cinzentos.

As 100 aves testadas foram provenientes de 10 criadores localizados em Portugal Continental. Como método de deteção de BFDV foi escolhido o PCR *nested*, realizado a partir de amostras de sangue total. Apesar da existência de dados discordantes quanto ao tipo de amostra preferencial a utilizar, optou-se pela recolha de amostras sanguíneas por se pretender a identificação de infeção em aves assintomáticas (apresentação subclínica), sendo que vários estudos indicam melhores resultados com amostras desta natureza (Fogell *et al.*, 2016; Khalesi *et al.*, 2005). Adicionalmente, a utilização de amostras sanguíneas pode potencialmente minimizar a ocorrência de possíveis contaminações ambientais, em virtude de o método de colheita ser mais asséptico. O PCR foi o método de diagnóstico escolhido, por ser considerado atualmente um dos métodos de eleição (Araújo, 2011) mas, também, pela sua boa sensibilidade, especificidade, simplicidade e rapidez. A realização do PCR *nested* promove uma maior sensibilidade da técnica, melhorando assim a deteção de cargas virais mais reduzidas, como será expectável encontrar em animais com infeção assintomática.

O PCR *nested* utilizado neste estudo permite a amplificação inicial de um fragmento localizado na ORF V1 (nucleótidos número 182 a 899), seguida de uma segunda amplificação de um fragmento com 359 pb (nucleótidos número 251 a 609) do mesmo gene (Tomasek *et al.*, 2008) (Figura 8). A escolha da ORF V1, prendeu-se com o facto de ser uma região conservada, minimizando, por isso, a possibilidade de falsos negativos decorrentes da acumulação de mutações genéticas (Araújo, 2011; Raue *et al.*, 2004).

Considerando todas as aves incluídas no presente estudo, foi calculada uma prevalência de infeção assintomática por BFDV em *P. erithacus* de 8% (Tabela 10). Esta prevalência encontrada em Portugal, é semelhante ao descrito noutros países europeus, nomeadamente, em Itália (Bert *et al.*, 2005). Mais precisamente, Bert *et al.* (2005) identificaram uma prevalência de 8,05% de positivos numa amostra de 1516 psitacídeos mantidos em cativeiro. No tocante a aves do género *Psittacus*, os mesmos autores avaliaram 371 indivíduos dos quais 28 foram identificados como positivos, refletindo-se numa prevalência de 7,55%.

A nível mundial, a prevalência de infeção por BFDV varia de acordo com o estudo considerado, podendo ser superior ou inferior ao encontrado no presente estudo. As diferenças entre estudos podem estar relacionadas com vários fatores, como a população estudada (sintomáticos vs assintomáticos; selvagem vs cativo; tipo de manejo das aves), com variações geográficas e temporais, com a utilização de diferentes métodos de deteção, entre outros.

No estudo de Haddadmarandi *et al.* (2017), no Irão, foi descrita uma prevalência de infeção por BFDV de 18,2% em várias espécies de psitacídeos. No entanto, para a espécie *P. erithacus*, o autor refere que obteve dois resultados positivos em 19 amostras, indicando uma prevalência de 10,52%. De ressaltar a pequena amostra de *P. erithacus* estudada, bem como o facto de terem sido incluídas as aves que apresentavam sinais clínicos (Haddadmarandi *et al.*, 2017). Importante também referir que a sequenciação total do genoma de alguns dos isolados obtidos por estes autores, foram relacionadas com estirpes identificadas em Portugal.

Também Massaro *et al.* (2012), recolheram, na Nova Zelândia, amostras sanguíneas de duas espécies endémicas de psitacídeos, na sua maioria aves selvagens, nomeadamente Rosela multicolorida (*Platycercus eximius*) e Periquito de coroa amarela (*Cyanoramphus auriceps*), tendo detetado prevalências de infeção de 22,9% (7/32) e 26,7% (8/30), respetivamente. A elevada prevalência de BFDV em espécies listadas na lista vermelha da IUCN representa uma importante preocupação uma vez que pode levar à diminuição da diversidade genética e extinção de espécies.

Num estudo levado a cabo por Hakimuddin *et al.* (2015), nos Emiratos Árabes Unidos, foram incluídas amostras de sangue e penas de 421 psitacídeos, dos quais 45,13% revelaram ser positivos para BFDV. Particularmente em *P. erithacus*, foi descrita uma prevalência de 58,33% num total de 216 animais testados. Esta elevada prevalência pode estar relacionada com o facto de ter sido utilizado o método de PCR em tempo real, uma vez que é bastante sensível e permite detetar cargas virais bastante reduzidas. Hakimuddin *et al.* (2015) referem, também, a importação de aves como um problema, uma vez que as aves não são testadas antes da entrada no país.

Huang *et al.* (2016), encontraram, também, uma elevada prevalência de infeção por BFDV (41,1%) em 51 aves amostradas em Taiwan. Neste caso, os autores justificam esta prevalência pelo facto de a maioria das aves apresentarem sinais clínicos compatíveis com PBFD (Huang *et al.*, 2016).

Na Europa, também alguns estudos descreveram uma prevalência da infecção superior aos 8% obtidos neste estudo. Segundo Julian *et al.* (2013), a prevalência de infecção por BFDV na Polónia é de 20,57%, num total de 209 aves provenientes de 50 criadores. Em 52 *P. erithacus*, Julian *et al.* (2013) estimaram uma prevalência de infecção de 17,3% (9/52). Contudo os autores não referem o estado de saúde das aves (sintomático vs assintomáticos). Neste estudo foram utilizadas amostras de origem sanguínea e/ou de penas, sendo que o número de cada tipo de amostra bem como as variações de resultados entre as diferentes naturezas das amostras, não é conhecido (Julian *et al.*, 2013). Na Alemanha, Rahaus e Wolff (2003) observaram uma prevalência de infecção por BFDV de 39,2% numa amostra de 146 aves assintomáticas de 32 criadores. Destas, 18 pertenciam ao género *Psittacus*; no entanto, o autor não revelou a percentagem correspondente à prevalência da infecção neste género. Outros estudos conduzidos em países europeus referem prevalências inferiores às acima descritas, bem como à detetada neste estudo. Piçarra *et al.* (2009), relata uma prevalência de 2,89% (16/554) em *P. erithacus* na Península Ibérica, embora a amostra tenha sido obtida apenas de Barcelona. Estes autores referem como justificação para a baixa prevalência encontrada a possibilidade da ocorrência de falsos negativos por erros na colheita, transporte e processamento de amostras.

Um estudo desenvolvido na Arábia Saudita, revelou também uma prevalência reduzida deste vírus, nomeadamente de 3,42% numa amostra de 175 aves (Hakami *et al.*, 2017). Neste estudo, todas as aves com resultado positivo demonstravam sinais clínicos compatíveis com PBFD, seis das quais pertenciam à espécie *P. erithacus*. No entanto, o autor não revelou dados relativamente ao número total de indivíduos testados desta espécie (Hakami *et al.*, 2017). Este foi o primeiro estudo que identificou a presença do BFDV na Arábia Saudita, sendo algumas justificações apresentadas pelos autores para a justificar a prevalência obtida, o facto de a criação de psitacídeos ser uma atividade recente no país, a importação de aves ser provenientes de países do novo mundo, por isso menos afetados, e a utilização de um PCR convencional (Hakami *et al.*, 2017).

Na maioria dos estudos, o comércio internacional e o tráfico de aves apresenta-se como uma preocupação uma vez que estas ações podem, não só facilitar a disseminação e transmissão do BFDV, como também promover o aparecimento de novas variantes do vírus (Sarker *et al.*, 2013; Haddadmarandi *et al.*, 2017). A existência de criadores de aves, nomeadamente de psitacídeos, diminui a pressão sobre as populações selvagens, conservando assim as espécies que são reproduzidas nestes locais. No entanto, estes criadores podem funcionar, também, como um foco de disseminação, manutenção e aparecimento de novas estirpes do vírus. A existência

de múltiplas espécies de psitacídeos em cada criador, como observado em todos os criadores portugueses incluídos neste estudo, pode potenciar, também, a natureza recombinante do vírus, pela existência de várias estirpes, contribuindo assim para a sua evolução (Jackson *et al.*, 2014a).

A falta de informação e conhecimento dos criadores sobre a forma como se dissemina o vírus, dificulta a implementação de medidas preventivas que impeçam a entrada ou a propagação de BFDV dentro das coleções. O facto de as aves não serem testadas de uma forma rotineira e a ausência de quarentenas adequadas, aquando da chegada a uma nova coleção, aumenta o risco da infeção por BFDV.

Alguns criadores mantêm condições favoráveis à manutenção do vírus nas próprias coleções, uma vez que o contacto entre aves, mesmo que indireto, apresenta-se como um fator de risco para a contaminação ambiental. O contacto direto com o solo e as fezes, que acontece em alguns dos criadores que participaram no estudo, é também uma das vias mais comum de disseminação do vírus, tendo em conta que o BFDV é excretado nas fezes, penas e pó proveniente da descamação das mesmas. O rastreio da infeção é visto como um custo acrescido pela maioria dos criadores, optando os mesmos pela realização de testes, apenas, quando as aves demonstram sinais clínicos. Também o facto de não haver nenhum tratamento eficaz descrito leva a que os criadores prefiram não testar as aves, colocando em risco as próprias coleções. Tal ação pode gerar consequências, quer a nível económico, quer a nível da saúde das aves. Apesar da sensibilização dos criadores para a deteção da infeção em aves assintomáticas ser difícil, em virtude dos custos envolvidos (quer na deteção, quer no posterior manejo de aves positivas), da gravidade da doença e da falta de conhecimento sobre que medidas preventivas podem ser tomadas, é necessário fazê-lo de modo a que se possa controlar a transmissão desta doença.

Relativamente à prevalência detetada neste estudo, é importante referir que vários fatores a podem ter influenciado. Dentro destes, e como já referido anteriormente, as condições de manejo apresentam-se como um fator de risco considerável, tendo em conta que a maioria das aves desenvolve a infeção por contaminação ambiental. A presença de cargas virais baixas, também pode ser um fator que influencie os resultados obtidos. No entanto, a utilização da técnica de PCR *nested*, serviu precisamente para minimizar esta influência.

No que respeita ao presente estudo, e tendo em conta a alta taxa de transmissão do vírus, seria de esperar que aves que têm contacto direto, como as que são mantidas em casal, fossem

ambas positivas para a infeção. Tal facto não se verificou no presente estudo podendo dever-se à existência de uma resposta imunitária eficaz por parte da ave não infetada, não sendo possível a deteção da virémia. Tendo em conta a apresentação assintomática destas aves, é possível que as mesmas tenham sido recentemente infetadas ou que se encontrem num processo de infeção transitório (Khalesi *et al.*, 2005; Phalen *et al.*, 2006). Para esclarecer este aspeto, e tal como recomendado, seria importante voltar a testar todas estas aves passados três meses de forma a confirmar a persistência da infeção nas aves positivas e a ocorrência de novas infeções nas aves negativas (Khalesi *et al.*, 2005; Phalen *et al.*, 2006). Em virtude dos resultados contraditórios de vários estudos quanto ao melhor tipo de amostra a escolher (Hess *et al.*, 2004; Khalesi *et al.*, 2005), seria interessante a recolha de penas destas mesmas aves para o diagnóstico em paralelo com as amostras sanguíneas.

Este trabalho permitiu estimar a prevalência da infeção por BFDV em Portugal Continental em aves da espécie *P. erithacus* assintomáticas mantidas em cativeiro. No entanto, esta prevalência pode não ser representativa da população nacional de psitacídeos, uma vez que o BFVD infeta não só a espécie *P. erithacus* mas a família *Psittacidae* no seu todo (Araújo, 2011; Huang *et al.*, 2016; Kessler *et al.*, 2020; Haddadmarandi *et al.*, 2018; Raidal *et al.*, 2018). Adicionalmente, a prevalência detetada, e como já referido, pode ter sido influenciada pelas condições de manejo consideradas, não refletindo necessariamente a realidade de todos os criadores em Portugal, nem a situação em populações selvagens.

As limitações inerentes à técnica de deteção utilizada, nomeadamente quanto à ocorrência de resultados falso positivos ou falso negativos (Khalesi *et al.*, 2005), foi minimizada pela utilização de boas práticas de biologia molecular. Estas incluíram a aferição da qualidade do DNA utilizado, pela amplificação do gene *12S rDNA* da espécie de ave em estudo, a minimização de contaminações cruzadas, através de boas práticas de desinfeção de material, a utilização de controlos positivos e negativos em todas as reações, entre outros. Por fim, apesar da utilização de um PCR *nested* permitir a deteção de cargas virais mais baixas, considerando a possível ocorrência de baixas cargas virais em aves assintomáticas, seria possível argumentar que a utilização de um PCR em tempo real poderia ter permitido a deteção de uma prevalência mais elevada. Contudo, na ausência de estudos comparativos entre as técnicas não é possível fazer esta afirmação com certeza.

O conhecimento da prevalência e das estirpes de BFDV circulantes em cada região do mundo é de extrema importância para o conhecimento da epidemiologia deste vírus e eventual desenvolvimento de estratégias de controlo a nível global. Considerando o papel fundamental

que Portugal parece ter tido como ponto chave na disseminação deste vírus (Harkins *et al.*, 2014) (Figura 4), o seu estudo neste país é fundamental. As aves assintomáticas constituem um fator silencioso de disseminação do vírus, podendo colocar causa coleções inteiras de aves, muitas delas que incluem espécies em perigo de extinção. A comercialização e circulação de aves de cativeiro representa, também, um problema, sobretudo em aves assintomáticas. Algumas espécies frequentemente assintomáticas, como as pertencentes ao género *Agapornis* spp. (Piçarra *et al.*, 2009), são muitas vezes mantidas nos mesmos espaços que outras aves mais suscetíveis, atuando como reservatórios de infeção para outras aves de valor económico e genético superior. Apesar da problemática da infeção de psitacídeos selvagens ainda não ser uma realidade confirmada em Portugal, a exportação de aves infetadas para países com psitacídeos endémicos e suscetíveis à doença, aumenta o risco de extinção de aves ameaçadas.

Segundo Fogell *et al.* (2016), existe uma conexão intrínseca entre o aparecimento de novas variantes de BFDV em aves de cativeiro e a disseminação das mesmas para aves selvagens. Neste contexto, é importante referir que, apesar de em Portugal não ocorrerem aves da família *Psittacidae* de forma endémica, tal como acontece no resto da europa (Julian *et al.*, 2013), o aumento do número de espécies invasoras de psitacídeos no nosso país, poderá, eventualmente, contribuir para uma maior disseminação deste vírus. Em conjunto, todos os estes fatores reforçam a importância do rastreio das aves mantidas em cativeiro, de modo a minimizar a disseminação do BFDV.

5. Conclusão

Os objetivos determinados para a presente dissertação foram atingidos com sucesso, na medida em que foi possível identificar a presença de BFDV em 8,0% da população estudada. A relevância deste estudo prende-se com a natureza patogénica e ubiquitária do vírus, a sua distribuição mundial, com prevalências elevadas descritas em vários países, bem como o seu papel prejudicial na conservação de espécies em vias de extinção.

A prevalência da infeção por BFDV em psitacídeos, nomeadamente *P. erithacus*, obtida no presente estudo, é semelhante ou inferior à relatada na maioria dos estudos efetuados na Europa, encontrando-se abaixo dos valores obtidos na maioria dos estudos realizados noutros países não europeus. A ocorrência da infeção em psitacídeos assintomáticos corrobora dados já publicados e o seu diagnóstico é importante pelo papel que estas aves têm na disseminação de BFDV.

Desta forma, o trabalho experimental desenvolvido permitiu aumentar o conhecimento sobre a situação nacional, tanto quanto à prevalência de infeção por BFDV em Papagaios-cinzentos assintomáticos mantidos em cativeiro, assim como às condições de manejo existentes nos criadores estudados e que são favoráveis à manutenção e disseminação do vírus nas coleções. Assim, o presente estudo demonstra a necessidade de desenvolver estratégias de comunicação que permitam a sensibilização dos criadores destas aves para a importância de rastrear a presença de BFDV nas aves adquiridas, mesmo quando estas não demonstram sinais clínicos. Este rastreio poderá contribuir para uma menor disseminação do vírus, bem como reduzir eventuais perdas animais e económicas.

Como perspetivas futuras, seria importante avaliar qual o tipo de amostra (sangue vs penas) mais favorável à deteção precoce de aves assintomáticas através da recolha de amostras sanguíneas e de penas provenientes das mesmas aves. A padronização dos métodos de biologia molecular seria, também, um contributo importante de forma a estabelecer qual a metodologia mais sensível de modo a compreender melhor a epidemiologia do BFDV, quer numa perspetiva de diagnóstico clínico, quer de investigação. Por fim, o estudo da diversidade genómica das estirpes de BFDV que circulam atualmente em Portugal, bem como a inclusão de aves selvagens, reveste-se de grande importância. Sobretudo porque Portugal regista nos últimos anos um aumento de espécies de psitacídeos consideradas invasoras cuja contribuição para a epidemiologia do BFDV é desconhecida. A sequenciação completa dos genomas das amostras positivas obtidas neste estudo será um passo importante que permitirá conhecer algumas das variantes de BFDV que se encontram em circulação em Portugal.

6. Bibliografia

- Allgayer, M. C., & Pereira, R. A. (2014). Doenças Virais em Psittaciformes. In: Silva, J. C. R. (2007). *Tratado de animais selvagens-medicina veterinária* (2ªEd., pp.1339-1341). Editora Roca.
- Araújo, A. V. (2011). Doença do bico e das penas: avaliação em psitacídeos nativos apreendidos em Minas Gerais.
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing?. *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, 98(6), 236-238.
- Bert, E., Tomassone, L., Peccati, C., Navarrete, M. G., & Sola, S. C. (2005). Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 52(2), 64-68.
- Bonne, N., Shearer P., Sharp, M., Clark, P. & Raidal, S.R. (2009). Assessment of recombinant beak and feather disease virus (BFDV) capsid protein as a vaccine for psittacine beak and feather disease (PBFD). *Journal of General Virology*, 90, 640–647.
- BirdLife International. (2018). *Psittacus erithacus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T22724813A129879439. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T22724813A129879439.en>.
- Campbell, T. W. (2015). Evaluation of the blood film. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 18(1), 117-135.
- Clark, D.P., Pazdernik, N.J. (2009). In: Clark, D.P., Pazdernik, N.J. (Eds.), *Biotechnology: Applying the Genetic Revolution* (pp. 59-123). Amsterdam: Academic Press.
- Collar, N. J., & Butchart, S. H. M. (2014). Conservation breeding and avian diversity: chances and challenges. *International Zoo Yearbook*, 48(1), 7-28.
- Das, S., Sarker, S., Forwood, J. K., Ghorashi, S. A., & Raidal, S. R. (2014). Characterization of the whole-genome sequence of a beak and feather disease virus isolate from a Mallee Ringneck parrot (*Barnardius zonarius barnardi*). *Genome Announcements*, 2(4), e00708-14.
- Das, S., Smith, K., Sarker, S., Peters, A., Adriaanse, K., Eden, P., ... & Raidal, S. R. (2020). Repeat spillover of beak and feather disease virus into an endangered parrot highlights the

risk associated with endemic pathogen loss in endangered species. *Journal of Wildlife Diseases*, 56(4), 896-906.

Fogell, D. J., Martin, R. O., & Groombridge, J. J. (2016). Beak and feather disease virus in wild and captive parrots: an analysis of geographic and taxonomic distribution and methodological trends. *Archives of virology*, 161(8), 2059-2074.

Gerlach, H. (1994). Viruses. In B. W. Ritchie, G. J. Harrison e L. R. Harrison (Eds.), *Avian Medicine: Principles and Application*, (pp. 862-948). Lake Worth: Wingers Publishing.

Greenacre, C. B. (2005). Viral diseases of companion birds. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 8(1), 85-105.

Haddadmarandi, M. R., Madani, S. A., Nili, H., & Ghorbani, A. (2018). Molecular detection and characterization of beak and feather disease virus in psittacine birds in Tehran, Iran. *Iranian journal of veterinary research*, 19(1), 22–26.

Hakami, A., Al-Ankari, A., Zaki, M., & Yousif, A. (2017). Isolation and characterization of psittacine beak and feather disease virus in Saudi Arabia using molecular technique. *Int J Avian Wildlife Biol*, 2, 22-26.

Hakimuddin, F., Abidi, F., Jafer, O., Li, C., Wernery, U., Hebel, C., & Khazanehdari, K. (2016). Incidence and detection of beak and feather disease virus in psittacine birds in the UAE. *Biomolecular detection and quantification*, 6, 27-32.

Harkins, G. W., Martin, D. P., Christoffels, A., & Varsani, A. (2014). Towards inferring the global movement of beak and feather disease virus. *Virology*, 450, 24-33.

Henriques, A.M., Fagulha, T., Duarte, M., Ramos, F., Barros, S., Luís, T., Bernardino, R., Fevereiro, M. (2010). Phylogenetic analysis of six isolates of beak and feather disease virus from African grey parrots in Portugal. *Avian Diseases*. 54(3):1066-71.

Hess, M., Scope, A. & Heincz, U. (2004). Comparative sensitivity of polymerase chain reaction diagnosis of psittacine beak and feather disease on feather samples, cloacal swabs and blood from budgerigars (*Melopsittacus undulates*, Shaw 18005). *Avian Pathology*, 33(5), 477-481.

Holman, R. 2008. "Psittacus erithacus" (On-line), Animal Diversity Web. Accessed March 24, 2022 at https://animaldiversity.org/accounts/Psittacus_erithacus/.

- Huang, S. W., Chiang, Y. C., Chin, C. Y., Tang, P. C., Liu, P. C., & Wang, C. Y. (2016). The phylogenetic and recombinational analysis of beak and feather disease virus Taiwan isolates. *Archives of virology*, 161(11), 2969-2988.
- Jackson, B., Harvey, C., Galbraith, J., Robertson, M., Warren, K., Holyoake, C., ... & Varsani, A. (2014). Clinical beak and feather disease virus infection in wild juvenile eastern rosellas of New Zealand; biosecurity implications for wildlife care facilities. *New Zealand Veterinary Journal*, 62(5), 297-301.
- Jacobson, E. R., Clubb, S., Simpson, C., Walsh, M., Lothrop Jr, C. D., Gaskin, J., ... & Harrison, G. (1986). Feather and beak dystrophy and necrosis in cockatoos: clinicopathologic evaluations. *J Am Vet Med Assoc*, 189(999-1005), 10.
- Julian, L., Piasecki, T., Chrzastek, K., Walters, M., Muhire, B., Harkins, G. W., Martin, D. P. & Varsani, A. (2013). Extensive recombination detected amongst Beak and feather disease virus isolates from breeding facilities in Poland. *Journal of General Virology* 94, 1086–1095.
- Kessler, S., Heenemann, K., Krause, T., Twietmeyer, S., Fuchs, J., Lierz, M., ... & Rubbenstroth, D. (2020). Monitoring of free-ranging and captive Psittacula populations in Western Europe for avian bornaviruses, circoviruses and polyomaviruses. *Avian Pathology*, 49(2), 119-130.
- Khalesi, B. (2007). Studies of beak and feather disease virus infection. Ph.D. Thesis. Murdoch University, Austrália.
- Ma, J., Tian, Y., Zhang, M., Wang, W., Li, Y., Tian, F., ... & Sun, J. (2019). Identification and characterization of novel genotypes of psittacine beak and feather disease virus from budgerigar in China. *Transboundary and emerging diseases*, 66(5), 1827-1833.
- Ma, Y., Chen, X., Chen, K., Zeng, X., Yang, S., Chang, W., ... & Chen, J. L. (2020). Identification and characterization of a distinct strain of beak and feather disease virus in Southeast China. *Virologica Sinica*, 35(1), 43-51.
- MacLachlan, N. J. & Dubovi, E. J. (2017). Chapter 13 – Circoviridae and Anelloviridae. In *Fenner's Veterinary Virology*. 5th Ed., 259-268.

- Martin, R. O., Perrin, M. R., Boyes, R. S., Abebe, Y. D., Annorbah, N. D., Asamoah, A., ... & Wondafrash, M. (2014). Research and conservation of the larger parrots of Africa and Madagascar: a review of knowledge gaps and opportunities. *Ostrich*, 85(3), 205-233.
- Massaro, M., Ortiz-Catedral, L., Julian, L., Galbraith, J.A., Kurenbach, B., Kearvell, J., Kemp, J., van Hal, J., Elkington, S., Taylor, G., Greene, T., & other authors (2012). Molecular characterisation of beak and feather disease virus (BFDV) in New Zealand and its implications for managing an infectious disease. *Archives of Virology* 157, 1651–1663.
- McGowan, P. J. (2001). Status, management and conservation of the African Grey Parrot *Psittacus erithacus* in Nigeria.
- Mulliken, T. (1995). *South Africa's trade in African grey parrots*. TRAFFIC East/Southern Africa, South African National Office.
- Pendl, H. & Tizard, I. (2016). Immunology. In: Speer, B.L. (Ed.). *Current Therapy In Avian Medicine And Surgery*, 1st Ed., 400-432. Elsevier Saunders Inc, St. Louis, Missouri, USA.
- Peters, A., Patterson, E. I., Baker, B. G., Holdsworth, M., Sarker, S., Ghorashi, S. A., & Raidal, S. R. (2014). Evidence of psittacine beak and feather disease virus spillover into wild critically endangered orange-bellied parrots (*Neophema chrysogaster*). *Journal of Wildlife Diseases*, 50(2), 288-296.
- Piçarra, J. P. D. S. C. (2010). *Estudo sobre a detecção do circovirus aviário psitacídeos domésticos na região de Barcelona–Espanha* (Bachelor's thesis, Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária).
- Phalen, D. N. (2006). Implications of viruses in clinical disorders. In G. J. Harrison e T. L. Lightfoot (Eds.), *Clinical Avian Medicine*, (pp. 721-46). Palm Beach: Spix Publishing.
- Portas, T., Jackson, B., Das, S., Shamsi, S., & Raidal, S.R. (2017). Beak and feather disease virus carriage by *Knemidocoptes pilae* in a sulphur crested cockatoo (*Cacatua galerita*) with mange, concurrent cestodiasis and deep mycotic encephalitis. *Australian Veterinary Journal*, 95, 486-489.
- Pyne, M., Sanctuary, C. W., & Currumbin, G. C. (2005). Psittacine beak and feather disease. In *Proceedings of the National Wildlife Rehabilitation Conference*.

- Rahaus, M., & Wolff, M. H. (2003). Psittacine beak and feather disease: a first survey of the distribution of beak and feather disease virus inside the population of captive psittacine birds in Germany. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(8), 368-371.
- Rahaus, M., Desloges, N., Probst, S., Loebbert, B., Lantermann, W. & Wolff, M. H. (2008). Detection of beak and feather disease virus DNA in embryonated eggs of psittacine birds. *Veterinari Medicina* 53, 53-58.
- Raidal, S. R., Sarker, S., & Peters, A. (2015). Review of psittacine beak and feather disease and its effect on Australian endangered species. *Australian Veterinary Journal*, 93(12), 466-470.
- Raidal, S.R., & Peters, A. (2018). Psittacine beak and feather disease: Ecology and implications for conservation. *Emu – Austral Ornithology* 118, 80–93.
- Raue, R., Johne, R., Crosta, L., Burkle, M., Gerlach, H. & Muller, H. (2004). Nucleotide sequence analysis of a C1 gene fragment of psittacine beak and feather disease virus amplified by real-time polymerase chain reaction indicates a possible existence of genotypes. *Avian Pathology* 33, 41-50.
- Regnard, G.L, Boyes, R.S., Martin, R.O., Hitzeroth, I.I. & Rybicki, E.P. (2015). Beak and feather disease virus: correlation between viral load and clinical signs in wild Cape parrots (*Poicephalus robustus*) in South Africa. *Archives of Virology* 160, 339-344.
- Regnard, G. L., Rybicki, E. P., & Hitzeroth, I. I. (2017). Recombinant expression of beak and feather disease virus capsid protein and assembly of virus-like particles in *Nicotiana benthamiana*. *Virology journal*, 14(1), 1-12.
- Sarker, S., Das, S., Ghorashi, S. A., Forwood, J. K., & Raidal, S. R. (2014). Molecular characterization of genome sequences of beak and feather disease virus from the Australian twenty-eight parrot (*Barnardius zonarius semitorquatus*). *Genome announcements*, 2(6), e01255-14.
- Sieber, P., Platzer, M., & Schuster, S. (2018). The definition of open reading frame revisited. *Trends in Genetics*, 34(3), 167-170.
- Tamungang, S. A.; Cheke, R. A.; Mofor, G. Z.; Tamungang, R. N.; Oben, F. T. (2014). Conservation concern for the deteriorating geographical range of the Grey Parrot in Cameroon. *Int. J. Ecol.* 2014: Article ID 753294.

Tomasek, O., Kubicek, O., & Tukac, V. (2008). Comparison of three template preparation methods for routine detection of beak and feather disease virus and avian polyomavirus with single and nested polymerase chain reaction in clinical specimens. *Avian Pathology*, 37(2), 145-149.

Ypelaar, I., Bassami, M. R., Wilcox, G. E., & Raidal, S. R. (1999). A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Veterinary Microbiology*, 68(1-2), 141-148.

7. Apêndices

APÊNDICE A

Inquérito Geral relativo ao estudo “Prevalência e diversidade genómica de Circovírus dos psitacídeos (BFDV) em Papagaios-Cinzentos (*Psittacus erithacus*) em Portugal”

O presente inquérito foi desenvolvido no âmbito do projeto “Prevalência e diversidade genómica de Circovírus dos psitacídeos (BFDV) em Papagaios-Cinzentos (*Psittacus erithacus*) em Portugal” e visa a recolha de informação sobre as características ambientais e de manejo das coleções que fazem parte do estudo. Todos os dados recolhidos serão confidenciais e usados apenas para investigação científica.

1. Localidade da exploração/coleção _____
2. Tipo de alojamento:
 - a) Viveiro comunitário ☐
 - b) Gaiola de reprodução ☐
 - c) Outro. Qual? _____
3. Quantos aves tem a exploração? _____
4. As aves têm contacto direto com outras espécies?
 - a) Sim ☐
 - b) Não ☐
5. Existem outras espécies na exploração? Quantas? _____
6. As aves têm contacto com o solo/ fezes? _____
7. Tipo de ambiente onde se encontram as aves?
 - a) Interior ☐
 - b) Exterior ☐

Orientadores: Professora Doutora Cátia Marques; Professora Doutora Margarida Alves; Doutor Mário Nóbrega
Discente: Gonçalo Portela

APÊNDICE B

Inquérito Individual relativo ao estudo “Prevalência e diversidade genómica de Circovírus dos psitacídeos (BFDV) em Papagaios-Cinzentos (*Psittacus erithacus*) em Portugal”

O presente inquérito foi desenvolvido no âmbito do projeto “Prevalência e diversidade genómica de Circovírus dos psitacídeos (BFDV) em Papagaios-Cinzentos (*Psittacus erithacus*) em Portugal” e visa a recolha de informação individual relativa às aves das coleções que fazem parte do estudo. Todos os dados recolhidos serão confidenciais e usados apenas para investigação científica.

1. Exploração/Coleção

2. Número da anilha e/ou microchip

3. Origem da ave

4. Idade

5. Sexo

a) Fêmea ☐

b) Macho ☐

6. Patologias anteriores/ Estado de saúde

7. Local de recolha da amostra

a) Veia jugular ☐

b) Veia braquial ☐

c) Veia metatársica medial ☐

d) Outro. Qual?

Orientadores: Professora Doutora Cátia Marques; Professora Doutora Margarida Alves; Doutor Mário Nóbrega
Discente: Gonçalo Portela