

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PEDRO HENRIQUE AYELLO LEITE

DOENÇA DO BICO E DAS PENAS DOS PSITACÍDEOS

BRASÍLIA

2013

Pedro Henrique Ayello Leite

Doença do Bico e das Penas dos Psitacídeos

Trabalho de Conclusão de Curso - Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília como requisito à obtenção do diploma do Curso de Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Rafael Veríssimo Monteiro.

Brasília

2013

PEDRO HENRIQUE AYELLO LEITE

Doença do Bico e das Penas dos Psitacídeos

Monografia apresentada no curso de graduação à Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, para conclusão do curso de Medicina Veterinária.

Área de concentração:

Data de defesa: 11 de dezembro de 2013.

Resultado: _____.

BANCA EXAMINADORA

Rafael Veríssimo Monteiro Prof. Dr. _____
Universidade de Brasília

Giane Regina Paludo Prof. Dra. _____
Universidade de Brasília

Francisco Ernesto M. Bernal Prof. Dr. _____
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Amauri Pereira Leite e Alaíde Pettinati Ayello Leite; irmãos, João Gabriel Ayello Leite, Ana Clara Ayello Leite, Maria Beatriz Ayello Leite e Matheus Felipe Ayello Leite, pelo apoio, carinho e dedicação.

Ao professor Rafael Veríssimo Monteiro pela orientação, amizade e oportunidade de realizar minha conclusão de curso na área de clínica e cirurgia de animais silvestres.

A professora Giane Regina Paludo e todos os integrantes do laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UnB, que participaram ativamente e com muita boa vontade em etapas importantes deste trabalho.

Ao professor Francisco Ernesto Moreno Bernal pela participação na banca avaliadora e na minha formação acadêmica.

Ao professor Sérgio Leme da Silva pelos ensinamentos e orientações que me fizeram refletir, cada vez mais, sobre a importância de se estudar o comportamento animal com a responsabilidade implícita de ter que melhorar o Bem-Estar dos animais.

A toda a equipe do Zoológico de Brasília, veterinárias, tratadores e demais funcionários pela amizade, aprendizado e oportunidade de conhecer e estudar diversas espécies animais.

A todas as residentes de clínica e cirurgia de animais silvestres da Universidade de Brasília pelo apoio e conselhos carinhosamente prestados durante este período letivo.

A minha namorada Jéssica Felício pelos conselhos e por estar sempre ao meu lado.

“Nós temos que tentar deixar o mundo um lugar melhor que quando nós entramos nele. Como indivíduos, nós podemos fazer a diferença.”

Michio Kaku.

RESUMO

Esta monografia aborda a Doença do Bico e das Penas dos Psitacídeos (PBFD) também conhecida como Infecção de Psitacídeos por Circovírus (Psittacine Circovirus Infection) e Doença de Psitacídeos por Circovírus (Psittacine Circovirus Disease). É a doença de etiologia viral mais comum em aves da ordem Psitaciforme na Austrália, pode ser encontrada em criadouros de psitacídeos no mundo inteiro e acomete também aves selvagens provocando danos à fauna e dificultando a preservação das espécies ameaçadas. A infecção gera distrofia e hiperplasia do folículo das penas, bico e unhas resultando no quadro característico de perda de penas, deformidade no crescimento do bico e das unhas. A PBFD pode cursar um quadro hiperagudo, agudo, crônico e algumas aves podem ser assintomáticas. Este trabalho traz uma revisão sobre o assunto e relata um caso da doença observado no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília.

Palavras chave: Circovírus, Diagnóstico, Doença do Bico e das Penas dos Psitacídeos, PBFD.

ABSTRACT

This monograph addresses the Psittacine Beak and Feather Disease (Pbfd) also known as Psittacine Circovirus Infection and Psittacine Circovirus Disease. It is the most common viral disease in the Psittaciforme bird order in Australia, it can be found in captive psittacines all over the world and also affects wild birds causing damage to the wildlife and impairing the preservation of endangered species. The infection causes dystrophy and hyperplasia of the feathers follicle, beak and nails resulting in the characteristic condition of feather loss and growth deformity of the beak and nails. The Pbfd can cause hyperacute, acute and chronic forms and some birds may be asymptomatic. This work brings a review on the subject and a case report of the disease observed in the Small Animal Veterinary Hospital of the University of Brasilia.

Keywords: Circovirus, Diagnostic, Psittacine Beak and Feather Disease, Pbfd.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de replicação do BFDV ilustrando os potenciais ORFs.....	13
Figura 2. Distribuição de psitacídeos de vida livre ao redor do planeta	17
Figura 3. Duas Cacatua galerita com sinais clínicos clássicos da doença crônica ..	21
Figura 4. Eolophus roseicapilla com infecção crônica da PBFD apresentando fratura de bico	21
Figura 5. Cacatua galerita com infecção crônica da doença.....	22
Figura 6. Eolophus roseicapilla em estado avançado da doença crônica	22
Figura 7. Aspecto histopatológico dos corpúsculos de inclusão viral na doença do bico e das penas	24
Figura 8. Eletroforese da sexagem.....	33
Figura 9. Eletroforese da PBFD.....	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Espécies susceptíveis ao BFDV.....	18
Quadro 2. Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APV – Avian polyomavirus
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
HA – Hemaglutinação
HE – Hematoxilina e Eosina
Hb – Concentração de hemoglobina
HI – Inibição da hemaglutinação
 μ l – Microlitro
nm – Nanómetro
ORF – Open reading frame
PBFD – Psittacine beak and feather disease
BFDV – Beak and feather disease virus
PBS – Phosphato Buffer Saline
PCR – Polymerase chain reaction

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. ETIOLOGIA	13
3. EPIDEMIOLOGIA	15
4. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	19
5. DIAGNÓSTICO	23
5.1 HISTOPATOLÓGICO	23
5.2 HEMAGLUTINAÇÃO E INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (HA e HI)	25
5.3 PCR	25
6. PREVENÇÃO, TRATAMENTO E CONTROLE	28
7. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA PBF D NO HOSPITAL VETERINÁRIO DE PEQUENOS ANIMAIS DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	30
7.1 RELATO DE CASO.....	30
7.2 RESULTADOS.....	33
8. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
APÊNDICE	40

1. INTRODUÇÃO

A doença do bico e das penas dos psitacídeos (Pbfd) é uma enfermidade cuja etiologia viral foi descoberta no século passado em cacatuas na Austrália. É causada pelo vírus da doença do bico e das penas (*Psittacine Beak and Feather Disease Virus - Pbfdv*), um vírus pequeno de morfologia icosaédrica, não envelopado cujo genoma é composto por um DNA fita-simples circular (ssDNA), classificado como membro da família *Circoviridae*. A doença acomete principalmente os psitacídeos australianos como a Cacatua-de-Crista-Amarela (*Cacatua galerita*), Periquito-Australiano (*Melopsittacus undulatus*), Red-Rumped Parrot (*Psephotus haematonotus*) e outros psitacídeos, causando sinais clínicos bem característicos, distrofia simétrica das penas, deformidade no crescimento do bico (JULIAN, 2012). A transmissão se dá de forma horizontal e vertical, aves infectadas com o vírus da doença do bico e das penas frequentemente morrem devido a infecções secundárias devido a imunossupressão gerada pelas lesões na Bursa de Fabricius e timo, bem como por lesões hepáticas. Atualmente o diagnóstico é feito principalmente pela reação em cadeia da polimerase (PCR), hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (HI) para detecção de anticorpos para BFDV.

Não existe uma cura conhecida para Pbfd, o controle da doença constitui um bom manejo higiênico sanitário das instalações, teste dos animais recém-chegados e quarentena antes da introdução no plantel. A vacina com vírus inativado feito a partir da proteína do capsídeo viral demonstrou resultados promissores e pode vir a ser comercializada no futuro. (BONNE, 2009). Devem ser incluídas no diagnóstico diferencial a muda francesa (*French moult*) causada pelo *Polyomavirus aviário* (APV), infecções bacterianas e fúngicas na pele, efeitos de fármacos, nutrição inadequada das aves, ectoparasitos, estresse ambiental e automutilação.

Neste trabalho foi realizado um diagnóstico molecular da doença por PCR e eletroforese em uma fêmea da espécie Periquito-do-dorso-vermelho (*Psephotus haematonotus*) residente do Biotério Central do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília.

2. ETIOLOGIA

O vírus da doença do bico e das penas foi isolado pela primeira vez ao final da década de 80, classificado como gênero *Circovirus* da família *Circoviridae*. Também na família *Circoviridae*, encontramos outros dois gêneros, *Gyrovirus* sp. causador da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e *Geminivirus* sp. que compreende diversas espécies e acometem plantas. O vírus da CAV possui semelhanças químicas e físicas com o vírus da PBFD, por ser o vírus mais conhecido da família *Circoviridae* é usado como modelo para estudos do BFDV (JULIAN, 2012). O agente possui um genoma pequeno com 1,7 a 2,3 kb, constituído de um DNA circular de fita simples, não é envelopado possuindo apenas o capsídeo de formato icosaédrico e de diâmetro de 14 a 21 nm, o genoma viral possui 7 ORFs (*Open Reading Frames*) ilustrados na figura 1. Sendo duas janelas de iniciação principais denominadas de 1 e 2. A ORF 1 (ORF V1 ou Rep) codifica uma proteína ligada a replicação do vírus e a ORF 2 (ORF C1 ou CP) codifica proteínas do capsídeo viral. Atualmente não são conhecidas as funções das demais ORFs (BASSAMI et al.,2001; KATOH et al.,2010)

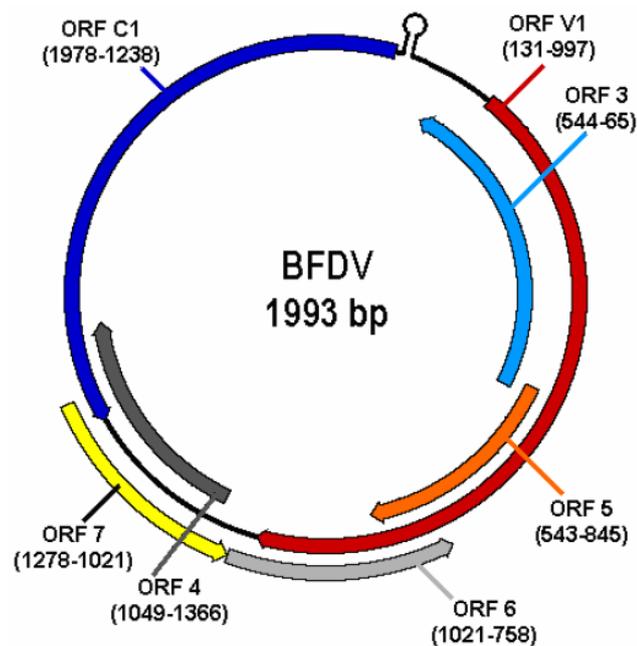


Figura 1. Esquema de replicação do BFDV ilustrando os potenciais ORFs. Fonte: (BONNE, 2009).

Várias estirpes foram definidas com base nas variações na cadeia de DNA, chegando a uma variação total de aproximadamente 20%. A ORF V1 é altamente conservada em todas as espécies de circovírus aviário. Enquanto as proteínas codificadas pela ORF V1 apresentam uma baixa diferença de identidade na sequência de bases nitrogenadas, as proteínas codificadas pelas ORFs do sentido complementar possuem uma maior variação entre as diferentes cepas (KHALESI, 2007). É bem aceito na literatura a existência de diferentes cepas parcialmente adaptadas para as famílias *Loriidae*, *Cacatuidae* e *Psittacidae* apesar de não ter sido identificado até o momento casos de especificidade entre uma cepa viral e um hospedeiro (RAIDAL et al., 2008).

3. EPIDEMIOLOGIA

Segundo Julian (2012), o primeiro registro da doença se trata de uma carta para o jornal australiano escrita em 1907, em que o autor faz um relato pessoal sobre uma ave da espécie *Psephodes haematonotus* (Periquito-do-dorso-vermelho) com incapacidade de voo devido a perda completa de suas penas, mais tarde a essa afecção seria dada o nome de Doença do Bico e das Penas dos Psitacídeos. A primeira investigação oficial quanto a etiologia e patogenicidade da doença foi realizada em 1984 na Austrália em aves das espécies *Cacatua galerita* (Cacatua de crista amarela), *Eolophus roseicapilla* (Cacatua de peito rosa), *Melopsittacus undulatus* (Periquito australiano) e *Agapornis* sp. (Os inseparáveis) todas elas apresentavam sinais clínicos compatíveis com a doença e sinais histopatológicos como corpúsculos de inclusão viral foram encontrados indicando que o agente infeccioso provavelmente se tratava de um vírus (JULIAN, 2012).

A doença possui distribuição mundial, foi encontrada em diversos países e compreende um problema sério para as aves de vida livre. A prevalência aferida nos últimos anos na Austrália, Alemanha, Itália, Taiwan, Estados Unidos e Japão são de 23%, 40,4%, 8%, 41,2%, 3,5-4% e 18,5%, respectivamente. Atualmente é a enzootia de etiologia viral mais importante em psitacídeos na Austrália e nos demais países, especialmente nas cacatuas. A Austrália é considerada o berço da doença, tendo sua origem nesse continente e posteriormente se espalhando para o resto do globo. (KATOH et al., 2010). Psitacídeos do Novo Mundo são menos acometidos, portanto considerados menos susceptíveis à doença do que as aves do Velho Mundo. Os primeiros relatos da PBFV nas Américas ocorreu em 1984 nas espécies *Amazona aestiva*, *Amazona autumnalis* e *Ara macao*. O diagnóstico foi feito por isolamento e purificação de partículas virais a partir de tecidos infectados. (JULIAN, 2012).

A exportação de aves australianas selvagens é proibida desde 1950, uma das razões é a presença do BFDV na região. A exportação de aves ornamentais do continente australiano para os demais países é tida como o principal fator de disseminação da doença ao redor do planeta, facilitada pela presença de animais portadores assintomáticos e contato entre aves de diferentes idades e origens. O gênero *Agapornis* sp, de acordo com Bonne (2009), apresenta uma maior frequência de quadros assintomáticos e uma prevalência bem elevada. A propagação do vírus

pelos criadouros de psitacídeos acarretam perdas para os produtores além de ser um risco eminente para as espécies selvagens, especialmente as ameaçadas de extinção. No quadro 1 estão listadas as espécies susceptíveis conhecidas atualmente ao vírus da PBFV (DE KLOET, E.; DE KLOET SR., 2004).

Na América do norte, após a extinção em 1918 do Periquito-da-carolina (*Conuropsis carolinensis*), não existem mais psitacídeos nativos de vida livre. Assim como em muitos outros países da Europa, várias aves exóticas foram e continuam sendo importadas, principalmente da América do sul, para o comércio de aves de estimação. Desta forma é possível encontrar em alguns locais, espécies invasoras de psitacídeos que foram soltas ou fugiram de seus criadouros vivendo em ambientes naturais onde a espécie não é endêmica.

No continente Africano a PBFV tem causado um grave dano às espécies ameaçadas como o *Poicephalus robustus* (Papagaio do cabo) e *Psittacula echo* (Periquito das Ilhas Maurício) diminuindo ainda mais suas populações naturais e é considerada como um dos principais empecilhos ao programa de preservação do periquito das Ilhas Maurício. Foram analisadas sequências completas de dez genomas isolados de aves na África do Sul e dez genomas isolados de aves australianas. Três cepas de origem africana eram muito similares às encontradas nos Estados Unidos enquanto as demais cepas isoladas dos continentes australiano e africano formaram grupos distintos, sugerindo que o BFDV encontra-se na África a bastante tempo (JULIAN, 2012).

Nos países da Ásia, vários relatos da doença do bico e das penas foram feitos nas últimas décadas, tendo seu primeiro registro na Tailândia em Cacatuas-de-crista-amarela (*Cacatua galerita*) importadas da Indonésia. Durante o ano de 2005 e 2006, várias amostras de pena e sangue foram colhidas de psitacídeos de diversas espécies e testados para PBFV. Dezesete amostras colhidas de sete gêneros distintos obtiveram diagnóstico positivo para a doença. As análises genômicas das cepas demonstraram uma estreita relação com as sequências de DNA australianas, indicando a chegada recente do vírus, provavelmente oriunda da Austrália, no ambiente (VARSANI et al., 2011).

Assim como nos Estados Unidos, na Europa encontram-se atualmente populações de psitacídeos invasores que foram acidentalmente ou propositalmente soltos em ambientes selvagens das regiões mais temperadas da Europa, onde

naturalmente não havia psitacídeos. O comércio dessas aves sempre foi muito prolífico entre os europeus e em 2007 foi proibida a importação de psitacídeos exóticos, porém criadouros já estabelecidos seguem com suas atividades de venda destas espécies como aves de estimação, não estando à exportação restrita apenas aos países europeus. O BFDV provavelmente foi importado várias vezes, trazido junto com os animais e permanecem não só nas aves de vida livre como dentro de criadouros. A falta de controle e testagem preventiva dos animais favorece a disseminação da doença e ameaça as aves dos países para os quais essas aves estão sendo exportadas (JULIAN, 2012, VARSANI et al., 2011).

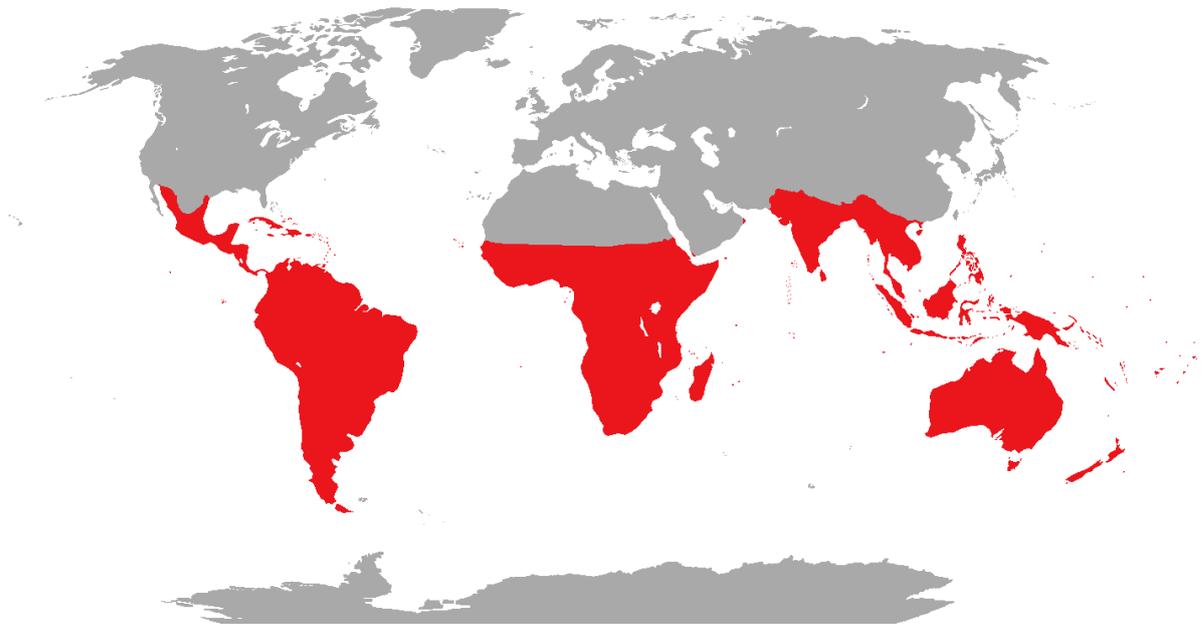


Figura 2. Distribuição de psitacídeos de vida livre ao redor do planeta. Fonte: (PEACHEY, 2013).

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

Quadro 1. Espécies suscetíveis ao BFDV. Adaptado de (DE KLOET, E.; DE KLOET SR., 2004).

4. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

Os animais doentes eliminam o vírus através das penas e do pó das plumas, das secreções do Inglúvio e nas fezes. A transmissão da PBFV pode ocorrer de forma horizontal, a partir de aerossóis inalados e ingestão de partículas virais, ou vertical, demonstrada em periquitos (*Melopsittacus undulatus*) por meio da PCR de ovos férteis postos por aves doentes, 20% deles apresentaram positividade para o BFDV (KHALESI, 2007; RAHAUS et al., 2008). O vírus gera displasia dos folículos das penas causando necrose e rompimento dos tecidos adjacentes acarretando na perda permanente do folículo. As lesões no bico e nas unhas ocorrem de maneira semelhante no tecido germinativo, dando origem às más formações destes tecidos. As lesões necróticas nos órgãos linfoides causam uma leucopenia severa, essa imunossupressão predispõe quadros a de infecções secundárias que são responsáveis pela morte do indivíduo (SHEARER, 2008; RITCHIE et al., 1989).

O vírus é bastante resistente e permanece viável no ambiente por alguns meses e as aves jovens com menos de três anos são as mais sensíveis à doença, Aves mais velhas que apresentam os sinais característicos da PBFV podem ter sido infectadas quando jovens e permaneceram em estado de latência (RAIDAL et al., 2008).

O curso da doença do bico e das penas pode estabelecer três quadros clínicos diferentes, agudo, crônico e o silencioso, presente nos portadores assintomáticos (BASSAMI et al., 2001). Outros autores consideram a presença de um quadro clínico hiperagudo, dividindo o quadro agudo em duas formas relacionadas à idade do animal e a velocidade da ocorrência dos sintomas, podendo ocorrer morte súbita em ambos os casos (KATOH et al., 2010). O quadro clínico vai depender da espécie afetada, seu estado imunológico, idade e estirpe viral. O período de incubação é de aproximadamente duas a quatro semanas. O vírus infecta preferencialmente o tecido epitelial (Pele e penas) e órgãos linfoides (Timo, Bursa de Fabricius e baço), podendo ser encontrado também no cérebro, leucócitos, intestino e esôfago (RITCHIE et al., 1989). Na infecção aguda os animais jovens com menos de um ano são os mais acometidos, pois ainda não tiveram o completo desenvolvimento da Bursa de Fabricius, essa condição do sistema imunológico é o fator determinante de susceptibilidade ao vírus e não as variações antigênicas

(RAIDAL et al., 2008). As lesões da plumagem podem ou não ocorrer nas infecções agudas Papagaios cinzentos geralmente não apresentam essas lesões, já nos cacatuídeos a distrofia e necrose dos folículos das penas desenvolvem-se rapidamente (Figura 3), de maneira semelhante ao que ocorre na forma crônica da doença. As aves infectadas tendem a recusar o manuseio devido à dor muito intensa nos locais das lesões, nas infectadas antes da muda para plumagem de adulto essas lesões frequentemente são mais severas (KHALESI, 2007).

Usualmente a infecção crônica ocorre em aves com idade entre seis meses e três anos, com a perda progressiva das penas e deformidade do bico (Figura 4). As lesões na pele e plumagem ocorrem gradativamente conforme as mudas e por isso pode não ser evidente nos primeiros meses. Normalmente a perda é simétrica e se inicia nas penas da cauda. As penas lesionadas apresentam diferentes graus de displasia, hiperqueratose, constrição da haste da pena, linhas de estresse e alterações no tamanho, podendo causar hemorragia devido ao rompimento da vascularização presente no interior do cálamo (Figura 5). Unhas e bico tornam-se quebradiços com uma camada necrótica próxima a superfície, podendo ocorrer fraturas longitudinais, transversais e de laminação, quadro comum em cacatuídeos. Necrose da mucosa oral e osteomielite podem ser observadas em casos severos, levando a queda do bico. Nos membros a pele pode ter uma aparência espessada e ressecada devido à hiperqueratose. A falta de penas pode levar a um aumento de pigmentação causado pelos raios solares, podendo progredir para úlceras de pele. A expectativa de vida das aves em quadros mais brandos da doença associados a um bom manejo é de aproximadamente 13 anos (GREENACRE, 2005; BONNE, 2009).

As espécies *Psittacus erithacus* (Papagaio cinzento africano), *Cacatua galerita* (Cacatua-de-Crista-Amarela) e *Cacatua alba* (Cacatua-Branca) costumam cursar a infecção aguda da doença, enquanto as espécies *Eolophus roseicapilla* (Cacatua-Galah) e *Agapornis* sp. (Os inseparáveis) o quadro clínico crônico é mais frequente (Figura 6). Neste último geralmente ocorre pouca perda de penas e grandes lesões de pele com formação de crostas que devem ser diferenciadas de lesões causadas por ectoparasitos e infecções por poxvírus (SHEARER, 2008). Existe uma grande discrepância entre o número de indivíduos doentes e o número de infectados, sugerindo um grande número de casos de infecções latentes (GREENACRE, 2005).



Figura 3. Duas Cacatua galerita com sinais clínicos clássicos da doença crônica. Fonte: (BONNE, 2009).



Figura 4. *Eolophus roseicapilla* com infecção crônica da PBFD apresentando fratura de bico. Fonte: (BONNE, 2009).

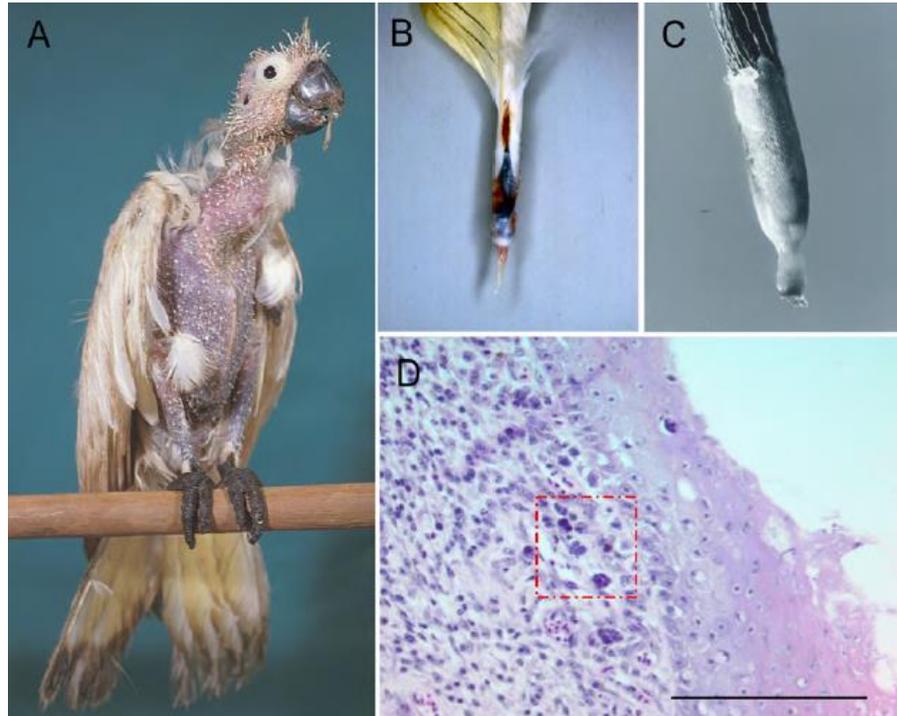


Figura 5. *Cacatua galerita* com infecção crônica da doença. B: Pena afetada pelo BFDV demonstrando hemorragia dentro do cálam. C: Pena afetada pelo BFDV demonstrando a bainha da pena retida e deformada. D: Corte histológico da pele inclusões basofílicas dentro de macrófagos. Fonte: (SHEARER, 2008).



Figura 6. *Eolophus roseicapilla* em estado avançado da doença crônica. Fonte: (PEACHEY, 2013).

5. DIAGNÓSTICO

A doença do bico e das penas não pode ser diagnosticada sem testes laboratoriais, portanto, tendo um quadro compatível com a PBFD os testes descritos a seguir irão confirmar o diagnóstico. É relevante o fato de que animais portadores assintomáticos não apresentam sinais clínicos e uma testagem periódica preventiva dos animais é preconizada (KHALESI, 2007; SHEARER, 2008).

5.1 HISTOPATOLÓGICO

A observação direta no microscópio (Figura 7) é o teste mais antigo para diagnóstico da PBFD. Nestas técnicas que utilizam microscópios óticos e eletrônicos, a vantagem é a possibilidade de visualizar o vírus na forma de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos, que medem cerca de 15 a 20 nm e estão presentes em leucócitos do baço, Bursa de Fabricius, folículos das penas, medula óssea e timo. Nos cortes histológicos destes órgãos é possível observar edema e diminuição de leucócitos circulantes. As limitações da histopatologia estão na pouca praticidade do recolhimento do material necessário para análise. A colheita é muito invasiva e a maioria delas só é possível com um animal morto (LATIMER et al., 1990).

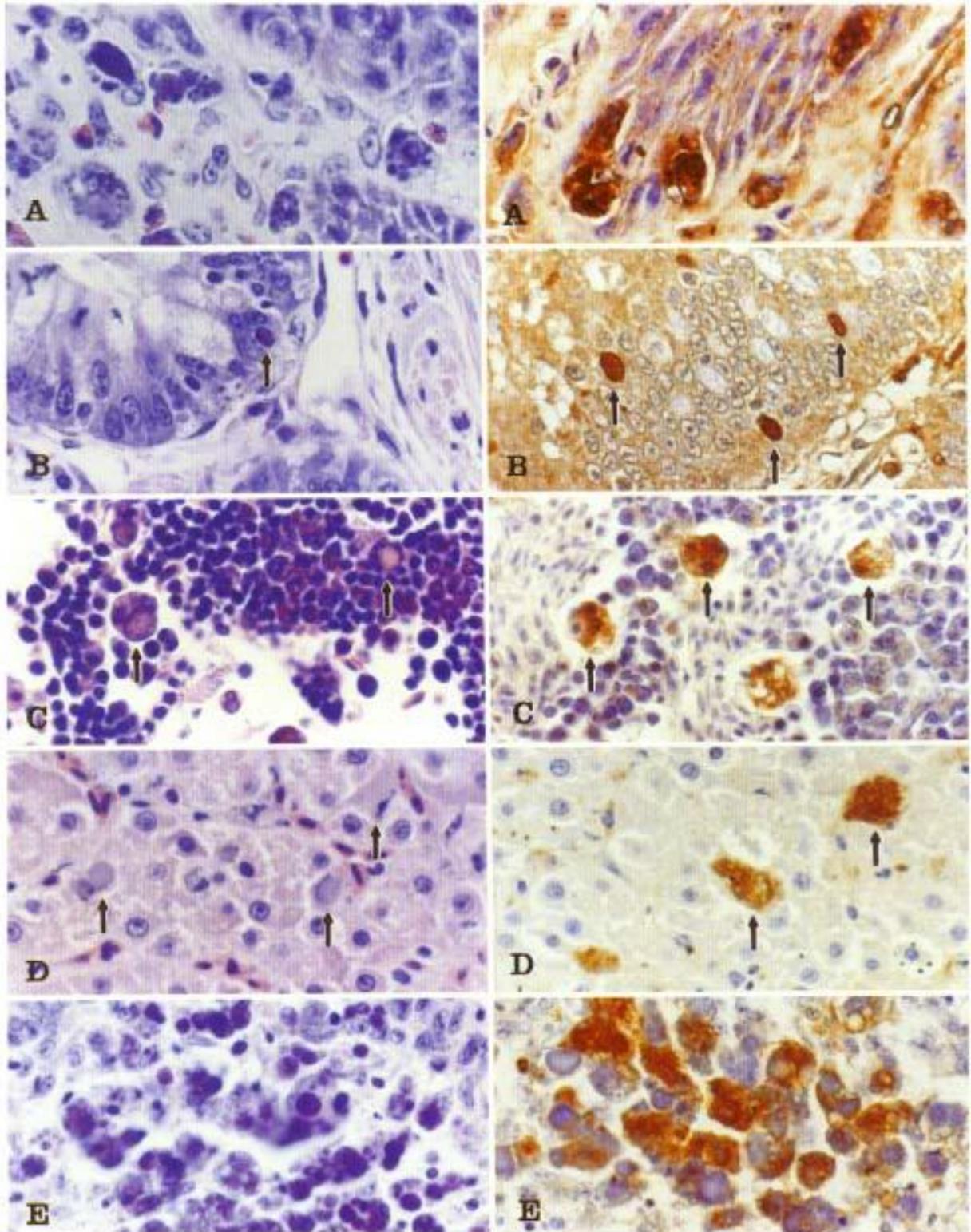


Figura 7. Aspecto histopatológico dos corpúsculos de inclusão viral na doença do bico e das penas. Com as colorações de HE (Hematoxilina e Eosina) à esquerda e imunoperoxidase à direita. A. Inglúvio. B. Intestino delgado, inclusões intranucleares nos enterócitos (setas). C. Medula óssea (setas). D. Células de Kupffer (setas) do fígado. E. Bursa de Fabricius. Fonte: LATIMER et al., 1990.

5.2 HEMAGLUTINAÇÃO E INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (HA e HI)

Assim como a Influenza Aviária e os paramixovírus, os circovírus também tem a capacidade de aglutinar eritrócitos quando em contato com os mesmos (KHALESI, 2007). De acordo com Shearer (2008), o diagnóstico por hemaglutinação pode ser feito com eritrócitos de Cacatua de Goffin (*Cacatua goffini*) e Cacatua Galah (*Eolophus roseicapilla*). O soro das aves possuem inibidores da hemaglutinação de modo que essa técnica se torna pouco específica (RAIDAL et al., 2008).

A inibição da hemaglutinação é feita a partir de soro diluído adicionado ao antígeno viral. Quando em contato com as hemácias, obtém-se uma titulação de anticorpos presentes no soro devido à neutralização do vírus e ausência da hemaglutinação. É possível aferir com esta técnica se o resultado foi devido a um falso positivo ou a presença do vírus (BONNE, 2009; RAIDAL et al., 2008).

As principais vantagens dos testes de HA e HI são o custo e a possibilidade de avaliar o estado da infecção no paciente, fornecendo valores quantitativos a respeito da viremia. A relação da hemaglutinação nas penas e inibição da hemaglutinação no sangue é inversamente proporcional. Aves negativas para testes antigênicos podem apresentar resultado positivo para HI sugerindo uma relação com a imunidade do animal, portanto, a inibição da hemaglutinação serve também como um indicador do estado da doença no paciente. Essa proporção inversa deve-se provavelmente ao comprometimento do sistema imune pela PBF, nestes casos o curso da doença provavelmente será mais grave (RAIDAL et al., 2008).

5.3 PCR

A PCR, ou Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*), é uma técnica de diagnóstico que vem sendo utilizada cada vez mais devido a sua alta sensibilidade. Todas as etapas do processo devem ser cuidadosas e seguir um fluxograma a fim de evitar contaminações que comprometeriam o resultado. É o método mais utilizado para diagnóstico de PBF. Com a PCR podemos amplificar fragmento de DNA desejado presente em bilhões de cópias sintéticas que serão vistas posteriormente na eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. A técnica da reação em cadeia da polimerase é mais precisa e específica em comparação com a HA e HI (KHALESI, 2007).

O primeiro passo é a extração do material biológico (Sangue, penas ou swab cloacal) do paciente seguido da extração do DNA. A elaboração do mix, que consiste em uma mistura de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), magnésio, a DNA polimerase, primeiros oligonucleotídeos previamente escolhidos, uma solução tampão e água apenas para completar o volume de 23µl. O DNA extraído da amostra é então adicionado ao mix.

Os ciclos são divididos basicamente em três etapas, temperatura de desnaturação, de anelamento e de extensão. Durante a desnaturação inicial, a temperatura é elevada até cerca de 95 °C por 5 minutos. Nesta fase, as pontes de hidrogênio são quebradas e as dupla-fitas de DNA se separam. Em seguida dá-se o início dos ciclos, variando entre 30 e 40 ciclos. Na etapa de anelamento, a temperatura é determinada de acordo com os oligonucleotídeos escolhidos, um cálculo é feito de acordo com a quantidade de adenina e timina, citosina e guanina presente nos oligonucleotídeos, varia de aproximadamente 50 °C a 60 °C, durante o anelamento os oligonucleotídeos vão se anelar nas fitas de DNA. A última fase de cada ciclo é a extensão, a temperatura é quase sempre a mesma, 72 °C, durante esta fase a enzima DNA polimerase funciona na sua temperatura ótima sintetizando novas moléculas (RAIDAL et al., 2008). Cada ciclo produz sempre o dobro de fragmentos do ciclo anterior de modo que a reação ocorre numa taxa exponencial, amplificando em bilhões de vezes o fragmento desejado (RAIDAL et al., 2008). Para diagnóstico da PBFD, geralmente usa-se os oligonucleotídeos que replicam a região da ORF V1, responsável pela replicação viral, existem algumas variações no gene ORF V1, porém não são extensas o suficiente para acusar um falso negativo. Oligonucleotídeos que amplificam genes da cadeia complementar não produzem resultados tão consistentes. Khalesi (2007), descreve que a ocorrência de falsos negativos pode se dar a partir de amostras heparinizadas devido ao excesso de material biológico que pode interferir no resultado. Um procedimento de colheita de material mal realizado, transporte inadequado ou devido a uma leucopenia severa, neste caso não há uma quantidade suficiente de células portadoras do DNA viral necessários para detecção. Alguns animais podem debelar a infecção e acusar um falso positivo por cerca de três meses devido a persistência de viriões que permaneceram inativados neste período. O teste deve ser refeito três a quatro meses após o término dos sintomas para confirmar que a ave não continua

infectada, com isso minimizamos também o risco de contaminação cruzada da amostra.

Atualmente, existe uma grande discrepância nos laudos emitidos por diversos laboratórios, Olsen e Speer (2009), avaliaram os valores de especificidade e sensibilidade de cinco laboratórios e obtiveram os valores de 82% e 98% respectivamente, os autores afirmam que a frequência de erros é muito alta em alguns deles apesar da maioria ter obtido uma avaliação satisfatória. A PCR tem sido amplamente estudada para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico. Katoh et al. (2010) cita a praticidade do RT-PCR (*Real Time PCR*), que possui sensibilidade equiparável a PCR convencional, esta técnica possibilita uma quantificação dos vírions presentes, fornecendo uma melhor compreensão do grau de infecção do paciente.

6. PREVENÇÃO, TRATAMENTO E CONTROLE

A vacina contra a Pbfd feita a partir de vírus inativado purificado das penas de cacatuas com uma infecção crônica da doença foi produzida e os resultados obtidos foram satisfatórios e promissores. Porém essa seria uma estratégia inviável visto que seria necessário um plantel de aves infectadas como fonte de antígeno para produção de vacinas, o que além de muito perigoso do ponto de vista epidemiológico, seria uma produção muito onerosa além de eticamente incorreto manter esses animais infectados propositalmente apenas para produzir vacinas (BONNE, 2009). Este autor também discute os novos métodos alternativos para a produção de vacinas que vem sendo estudados, pois as técnicas convencionais de cultivo celular para amplificação do vírus da Doença do Bico e das Penas não obtiveram os resultados esperados. Com o uso de baculovírus recombinante na produção de proteína do capsídeo viral do BFDV foi demonstrado que a proteína sintetizada possui propriedades similares às do vírus original, incluindo morfologia, atividade de hemaglutinação e habilidade de reagir com os anticorpos que combatem o vírus da Pbfd. Em seu experimento, foram vacinadas cacatuas da espécie *Cacatua tenuirostris*, o objetivo foi avaliar se as proteínas do capsídeo viral feitas a partir de baculovírus recombinante poderiam ser soroconvertidas e prevenir a replicação e excreção do BFDV. Todas as aves desenvolveram títulos de anticorpos após a vacinação demonstrados através do teste de HI e não desenvolveram sintomatologia clínica da doença após a inoculação do agente. O controle negativo não recebeu a vacina e após a exposição ao vírus desenvolveram pequenas lesões nas penas, diminuição do pó presente nas penas e lesões no penacho de penas presente no topo da cabeça desses animais, todos sinais compatíveis com a Pbfd. A eficácia das vacinas produzidas é mais bem avaliada quando utilizados animais SPF (Specific-pathogen-free), que são animais livre de patógenos específicos. Porém, existe uma grande dificuldade para obter espécies selvagens SPF, especialmente as que estão ameaçadas de extinção.

O tratamento da Pbfd consiste basicamente em uma terapia de suporte, limpeza e desinfecção do ambiente para evitar infecções secundárias. A probabilidade de sucesso é pequena principalmente em infecções agudas. A quarentena de aves recém-chegadas é fundamental antes de introduzi-las no

plantel, bem como a limpeza, vazios sanitários, desinfecção de instalações antes de utiliza-las novamente com outros animais e a triagem dos recém-chegados para evitar a disseminação. É fundamental em qualquer tratamento a prevenção contra infecções secundárias que podem vir a atingir o paciente no decorrer da doença devido à imunossupressão. A aspergilose é considerada a principal preocupação para as aves imunossuprimidas, por se tratar de um agente encontrado normalmente em qualquer ambiente, seu tratamento é demorado e difícil.

Khalesi (2007), relata os estudos e pesquisas que já foram realizados para o tratamento com interferon ômega felino tipo 1 e outro utilizando beta-(1,3/1,6)-Dglucano. Neste segundo, os resultados foram encorajadores. Esta substância é extraída de algumas espécies de cogumelos, tem como função a estimulação do sistema imune das aves, auxiliando na eliminação do vírus.

Para as infecções secundárias agudas, antibioticoterapia utilizando drogas de amplo-espectro deve ser feita em conjunto com fluidoterapia, alimentação forçada, propiciar uma boa condição de ambiente para a ave, mantendo-as dentro da zona de conforto térmico, humidade relativa do ar e livre de estresse (KHALESI, 2007). A higiene do ambiente é fundamental para o controle de enfermidades, no caso da PBFV é na maioria dos casos a única forma de combater o agente. Devido às suas características morfológicas o BFDV é facilmente inativado pela maioria dos detergentes e desinfetantes comerciais (Department of the Environment and Heritage, 2006).

7. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA Pbfd NO HOSPITAL VETERINÁRIO DE PEQUENOS ANIMAIS DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

7.1 RELATO DE CASO

Dois periquitos da espécie *Psephotus haematonotus* (Periquito-do-dorso-vermelho) foram atendidos no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da apresentando queda das penas há aproximadamente três meses, as aves estavam apáticas e agressivas, com dificuldade respiratória e espirros intermitentes. Inicialmente a suspeita foi de uma pneumonia bacteriana, circovirose e sarna. Foram colhidas amostras de penas para cultivo microbiológico e feito um raspado de pele. O protocolo terapêutico estabelecido inicialmente foi enrofloxacino 2,5% via intramuscular duas vezes ao dia por sete dias, suplementação vitamínica adicionada à água de bebida e ivermectina via oral feita em duas doses com intervalo de sete dias entre cada uma. Um dos animais morreu em poucos dias. Na necropsia a carcaça apresentava escore corporal 2 (Escala de 1 a 5), com mínima autólise. Acentuada diminuição do número de penas difusamente distribuídas por todo o corpo (Asas, membros, tórax e cabeça), moderada descamação da pele de ambos os pés, o bico apresentava a extremidade moderadamente descamativa e esbranquiçada. Nos órgãos internos não foram encontradas alterações dignas de nota. Na histopatologia foi observada proliferação focalmente extensa da epiderme (Acantose), discreta proliferação da camada córnea (Hiperqueratose ortoqueratótica), moderado infiltrado multifocal de linfócitos e raros heterofilos na derme superficial, discreta vacuolização da substância branca multifocal (Status Spongiosus). Na cultura, isolamento e antibiograma realizada nas penas, foram isolados *Bacillus* sp., *Pasteurella* sp. e *Staphylococcus* sp. Apesar de não ter sido encontrado corpúsculos de inclusão viral na histopatologia, os animais continuaram suspeitos de infecção viral pelo BFDV (*Beak and Feather Disease Virus*) pois estas alterações nem sempre são encontradas. Oligonucleotídeos específicos para reconhecimento de um fragmento do genoma do BFDV foram sintetizados (Invitrogen) para tentativa de diagnóstico molecular da Pbfd (Quadro 2). Para a reação de PCR foi colhido 3mL de sangue do animal remanescente em tubo estéril com EDTA. A extração do DNA foi feita segundo a recomendação de kits comerciais utilizando 10 µL de sangue e o volume

final (200 μL) completado com solução PBS (GE Healthcare). As amostras de DNA extraído foram mantidas acondicionadas a -20°C até o momento da realização da PCR.

Visto que os psitacídeos, com raras exceções, são animais monomórficos, foi necessária a realização de PCR da ave para determinação do sexo (Quadro 2). Este procedimento foi útil também para excluir a presença de possíveis inibidores da reação durante o processo de extração de DNA; uma sexagem bem sucedida confirma a extração. Para a reação da PCR as concentrações dos reagentes da mistura foram: 2,0 μL de DNA, 1X tampão de PCR, 2 mM MgCl_2 , 1,2 mM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 U de *Taq* DNA Polimerase. E água miliQ para um volume final de 25 μL . Na etapa inicial, as amostras foram incubadas a 95°C por 5 minutos para ocorrer a desnaturação. Em seguida, as amostras passaram por 35 ciclos de: 95°C por 30 segundos para desnaturação da fita de DNA, 54°C por 45 segundos para a hibridização dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para extensão das fitas. Ao término, foi realizada a extensão final a 72°C por 5 minutos. Essa PCR pode gerar dois produtos finais com diferença de aproximadamente 200 pares de base, logo, quando foram observadas os dois tamanhos de pares de base o periquito foi considerado fêmea (ZW), caso houvesse a visualização de apenas um produto a ave seria macho (ZZ).

Com a confirmação de uma extração adequada de DNA, foi feita a PCR para Pbfd no dia 08/11/2013. Foram utilizados os oligonucleotídeos F1 e R1 e a seguinte mistura de reagentes: 2,0 μL de DNA, 1X de tampão, 2mM de MgCl_2 , 0,4 mM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo; 1U de *Taq* DNA Polimerase e água miliQ para um volume final de 25 μL . Para amplificação a mistura foi submetida às seguintes condições: Uma fase de desnaturação a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de: 94°C por 1 minuto para desnaturação da fita de DNA, um gradiente de temperatura de anelamento (51°C , 52°C , 53°C , $54,2^{\circ}\text{C}$, $55,2^{\circ}\text{C}$ e 56°C) para hibridização dos oligonucleotídeos e tentativa de estabelecer um protocolo de específico para esta PCR, 72°C por 1 minuto para a extensão das fitas e finalizando com extensão a 72°C por 5 minutos.

	Oligonucleotídeos	Nome	Gene / Tamanho do produto
Sexagem	GTTACTGATTCGTCTACGAGA	2550F	CHD1-W 450pb
	ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	2718R	CHD1-Z 650pb
PBFD	AACCCTACAGACGGCGAG	PB F1	717pb
	GTCACAGTCCTCCTTGTACC	PB R1	

Quadro 2. Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs.

7.2 RESULTADOS

O periquito foi sexado como fêmea, na figura 8 é possível observar as bandas correspondentes aos cromossomos Z e W, com a distância de 200pb entre eles (Figura 8).

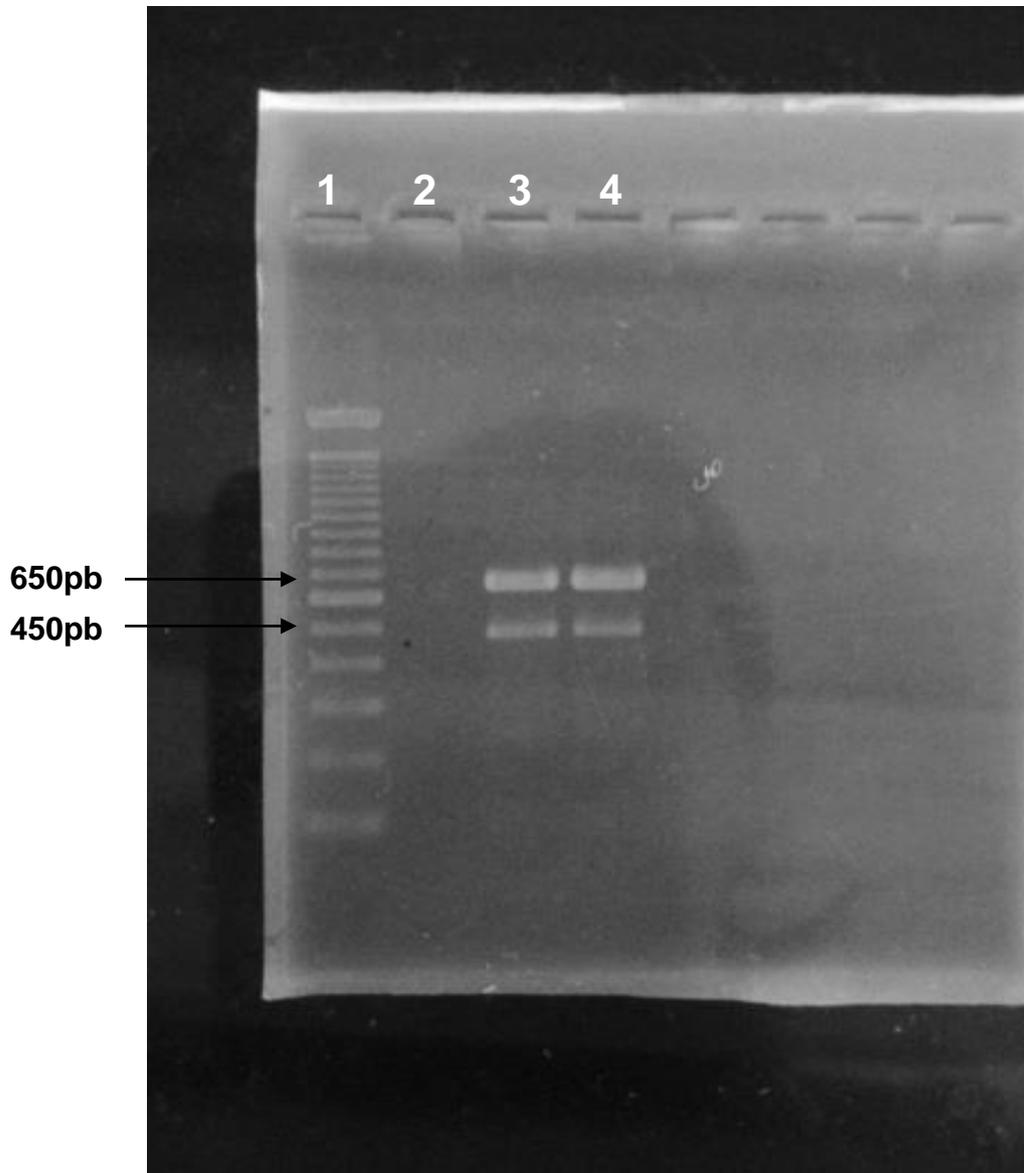


Figura 8. Eletroforese da sexagem. 1: Marcador padrão (100pb); 2: Controle negativo; 3 e 4: Amplificação das bandas correspondentes aos cromossomos Z (650pb) e Z (450pb).

Foi realizada a eletroforese em gel de agarose, concluindo o diagnóstico como positivo para o vírus da doença do bico e das penas. Na figura 9 observamos na eletroforese as bandas correspondentes a 717pb, nas temperaturas de 51°C, 52°C, 53°C, 54,2°C, 55,2°C e 56°C (Da esquerda para a direita) ao lado de cada banda o controle negativo (Figura 9).

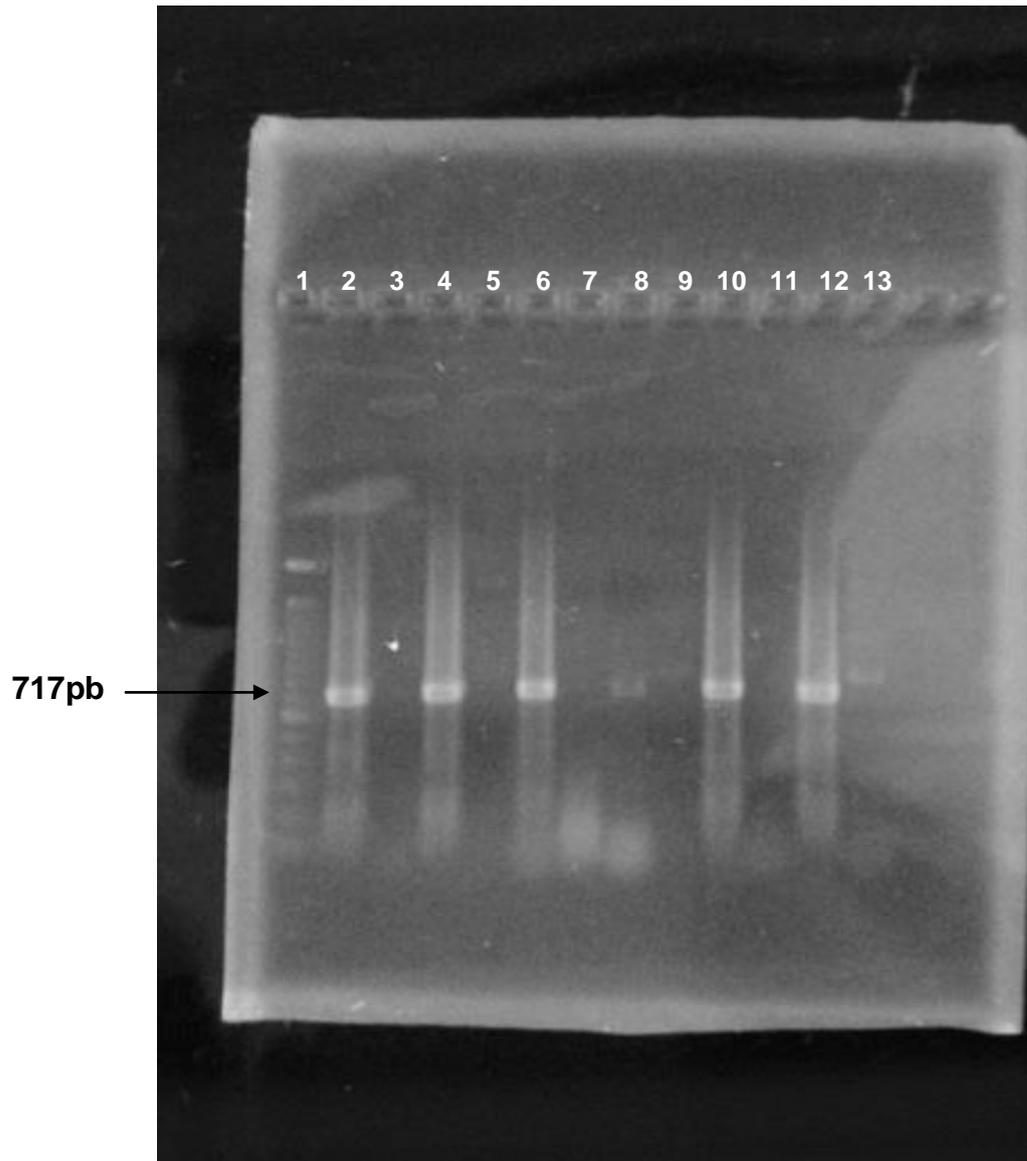


Figura 9. Eletroforese da PBF. 1: Marcador padrão (100pb); 2, 4, 6, 8, 10 e 12: Amplificação da banda correspondente a 717pb; 3, 5, 7, 9, 11 e 13: Controle negativo das amostras 2, 4, 6, 8, 10, 12 respectivamente.

8. CONCLUSÃO

O Brasil é o país com a maior quantidade e a maior variedade de espécies de psitacídeos do planeta, muitas destas espécies estão ameaçadas de extinção. Fica claro o risco da PBFD na preservação das espécies brasileiras e a importância de se estudar a doença e o quadro epidemiológico atual em nosso país bem como o desenvolvimento de novas pesquisas visando a produção de vacinas e planos de erradicação da doença em nosso território.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTYN, J.; TAJBHAI, K. M.; BRAGG, R. R. **Psittacine beak and feather disease virus in budgerigars and ring-neck parakeet in South Africa.** Journal of Veterinary Research. Bloemfontein, 2004, p.29-34.

AUSTRALIA. Department of the Environment and Heritage. **Hygiene Protocols for the Prevention and Control of Diseases (Particulary Beak and Feather Disease) in Australian Birds:** The Effectiveness of Disinfectants Used on Viruses Closely Related to BFDV. Austrália, 2006. 11p. Disponível em: <<http://www.deh.gov.au/about/publications/index.html>>. Acesso em: 30 nov. 2013.

BASSAMI, M. R.; BERRYMAN, D.; WILCOX, G. E.; RAIDAL, S. R. **Psittacine Beak and Feather Disease Virus Nucleotide Sequence Analysis and Its Relationship to Porcine Circovirus, Plant Circoviruses, and Chicken Anemia Virus.** Virology 249. Perth, 1998, p.453-459.

BASSAMI, M.; R.; YPELAAR, I.; DERRYMAN, D.; WILCOX, G. E.; RAIDAL, S. R. **Genetic Diversity of Beak and Feather Disease Virus Detected in Psittacine Species in Australia.** Virology 279. Perth, 2001, p.392-400.

BONNE, N.; SHEARER, P.; SHARP, M.; CLARK, P.; RAIDAL, S. **Assessment of recombinant beack and feather disease virus capsid protein as a vaccine for psittacine beack and feather disease.** Journal of General Virology, Perth, maio 2009, p.640-647.

BONNE, N. J. **PSITTACINE BEAK AND FEATHER DISEASE: VACCINATION, HAEMATOLOGICAL RESPONSE AND PCR METHODOLOGY.** Perth, 2009. 226p. Tese (Doutorado). Murdoch University, Perth 2009.

DE KLOET, E.; DE KLOET SR. **Analysis of the beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specificity.** *Arch. Virol.* Florida, dezembro 2004, p.2393-2412.

DOLZ, G.; SHELEBY-ELÍAS, J.; ROMERO-ZUÑIGA, J. J.; VARGAS-LEITÓN, B. GUTIÉRREZ-ESPELETA, G.; MADRIZ-ORDEÑANA, K. **Prevalence of Psittacine Beak and Feather Disease Virus and Avian Polyomavirus in Captivity Psittacines from Costa Rica.** *Open Journal of Veterinary Medicine.* Heredia, agosto 2013, p.240-245.

GREENARE, CB. **Viral diseases of companion birds.** *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* Knoxville, janeiro 2005, p.85-105.

JULIAN, L. **Analysis of Genetic Diversity and Evolution through Recombination of Beak and Feather Disease Virus.** Canterbury, 2012. 91p. Tese (Mestrado). University of Canterbury. Christchurch 2012.

KATOH, H.; OGAWA, H.; OHYA, K.; FUKUSHI, H. **A review of DNA Viral Infections in Psittacine Birds.** *J. Vet. Med. Sci., Gifu,* abril 2010, p.1099-1106.

KHALESI, B. **Studies of beack and feather disease virus infection.** Perth, 2007. 160p. Tese (Doutorado). Murdoch University. Perth 2007.

LATIMER, K. S.; RAKICH, P. M. KIRCHER, I. M.; RITCHIE, B. W.; NIAGRO, W. L.; STEFFENS III, W. L.; LUKERT P. D. **Extracutaneous viral inclusions in psittacine beak and feather disease.** *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* Athens, julho 1990, p.204-207.

OLSEN, G.; SPEER, B. **Laboratory reporting accuracy of polymerase chain reaction testing for psittacine beak and feather disease virus.** *J. Avian Med Surg.* Oakley, setembro 2009, p23-194.

PEACHEY, M. PSITTACINE BEACK AND FEATHER VIRAL DISEASE IN PARROTS IN THE ACT². In: RUSSEL-FRENCH, A. **Canberra Birds Notes**. Canberra: Canberra Ornithologists Group, 2013. P.106-118.

RAHAUS, M.; DESLOGES, N.; PROBST, S.; LOEBBERT, B.; LANTERMANN, W.; WOLFF, M.H. **Detection of beak and feather disease virus DNA in embryonated eggs of psittacine birds**. Veterinarni Medicina. Cidade, Witten 2008, p.53-58.

RAIDAL, S. R.; BONNE, N. J.; STEWART, M.; SHEARER, P. **STANDARDISED DIAGNOSTIC TESTS FOR BEAK AND FEATHER DISEASE VIRUS (BFDV)**. A report for the Australian Government Department of the Environment. Perth, agosto 2008.

RITCHIE, P. A.; ANDERSON, I. L.; LAMBERT, D. M.; **Evidence for specificity os psittacine beak and feather disease viruses among avian hosts**. Virology 306. Palmeston North, 2003, p109-115.

RITCHIE, B. W.; NIAGRO, F. D.; LATIMER, K. S.; STEFFENS, W. L.; PESTI, D.; ARON, L.; LUKERT, P. D. **Production and characterization of monoclonal antibodies to psittacine beack and feather disease virus**. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Athens, janeiro 1992, p.13-18.

RITCHIE, B. W.; NIAGRO, F. D.; LUKERT, P. D.; LATIMER, K. S.; STEFFENS, W. L.; PRITCHARD, N. **A REVIEW OF PSITTACINE BEACK AND FEATHER DISEASE: CHARACTERISTICS OF THE Pbfd VIRUS**. Journal of the Association of Avian Veterinarians. Athens, 1989, p.143-150.

SHEARER, P. **Development of Novel Diagnostic and Vaccine Option for Beak and Feather Disease Virus (BFDV)**. Perth, 2008. 273p. Tese (Doutorado). Murdoch University. Perth 2008.

VARSANI, A.; REGNARD, G. L.; BRAGG, R.; HITZEROTH, I. I.; RYBICKI, E. P. **Global genetic diversity and geographical and host-species distribution of**

beak and feather disease virus isolates. Journal of General Virology. Christchurch, 2011, p.752-767.

APÊNDICE

Animal
haematonotus).

experimental,

periquito-do-dorso-vermelho

(*Psephotus*

