

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Laurete Murer

**DOENÇAS DE PSITTACIFORMES NA REGIÃO CENTRAL DO RIO
GRANDE DO SUL**

Santa Maria, RS
2017

Laurete Murer

**DOENÇAS DE PSITTACIFORMES NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO
SUL**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Maristela Lovato

Santa Maria, RS
2017

Laurete Murer

**DOENÇAS DE PSITTACIFORMES NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO
SUL**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Medicina Veterinária**.

Aprovada em 16 de outubro de 2017:

Maristela Lovato, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Gláucia Denise Kommers, Dr^a. (UFSM)

Isadora Mainieri de Oliveira, Dr^a. (UNICRUZ)

Kelly Cristina Tagliari de Brito, Dr^a. (FEPAGRO)

Luciana Pötter, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

à minha filha Letícia e ao meu filho Bruno, meus “pequenos grandes” companheiros desta jornada, razão maior da minha existência e

à minha mãe Terezinha que, com certeza, de onde está, olha, torce por mim e se orgulha com minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade desta vida, por ter colocado em meu caminho tantas pessoas que me ajudaram vencer os obstáculos, por ter me dado forças para lutar pelo meu sonho e conseguir torná-lo realidade.

À “família Murer e achegos” com quem sempre posso contar, por todo o apoio recebido nos momentos difíceis e também pelos tantos bons momentos compartilhados.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pública, gratuita e de qualidade e ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), conceito 7 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com muito orgulho, pela oportunidade de realizar este curso de doutorado e a CAPES pela concessão de bolsa.

À minha orientadora, professora Dr^a. Maristela Lovato, por ter me acolhido e me dado tantas oportunidades de aprendizado no Núcleo de Estudos e Pesquisas em Animais Silvestres/ Laboratório Central de Diagnóstico e Patologias Aviárias (NEPAS/LCDPA), desde 2010. Por todos os momentos alegres e principalmente por aqueles mais difíceis, sempre me apoiando de todas as maneiras. Mais que professora, uma “quase irmã”.

À professora Dr^a Glaucia Denise Kommers, pelo auxílio nos diagnósticos, pelas orientações e pela amizade.

À professora Dr^a Luciana Pötter, por todas as vezes que me socorreu com alegria nesta caminhada, e, além de esclarecimentos, me proporcionou amizade.

À equipe do NEPAS/LCDPA, em especial aos estagiários Marília Baialardi Ribeiro, Natalí Stürmer Saft e Moisés Westenhofen, parceiros dedicados nos cuidados aos animais silvestres e pelo auxílio na realização das necropsias.

E a todos os que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui:

Muito obrigada!

“A persistência é o caminho do
êxito.” (Charles Chaplin)

RESUMO

DOENÇAS DE PSITTACIFORMES NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL

AUTORA: Laurete Murer

ORIENTADORA: Maristela Lovato

Santa Maria, 16 de outubro de 2017.

Esta tese objetivou o estudo de doenças de Psittaciformes diagnosticadas no Núcleo de Estudos e Pesquisas em Animais Silvestres da Universidade Federal de Santa Maria (NEPAS/UFSM). Para a elaboração deste trabalho, foram examinadas as fichas das 495 necropsias de animais silvestres realizadas no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2016, além dos resultados da investigação da presença de *Salmonella* spp. realizada em atendimentos clínicos a dois criatórios de psitacídeos. As principais alterações macroscópicas verificadas nas necropsias foram agrupadas por sistemas, analisadas através de uma meta-análise descritiva, onde se verificou que o sistema digestório foi o que apresentou maior número de alterações (29,4%), seguido pelo respiratório (18,6%), cardiovascular (14,6%), musculoesquelético (12,6%) e presença de parasitos ou fungos (8,4%). Em um expressivo número de casos (16,5%) não foi possível identificar as lesões devido ao avançado estado de decomposição dos cadáveres, ou por serem alterações macroscópicas que não levariam o animal à morte. Durante o período de estudo, surgiram dois casos de maior relevância, para os quais a investigação da *causa mortis* teve sequência, com a realização de exames histopatológicos e moleculares que resultaram em dois relatos: primeiro registro, no Brasil, da presença de um avipoxvírus do clado C e outro, do primeiro registro, no Brasil, do herpesvírus dos Psitacídeos tipo 3, ambos em Psittaciformes de cativeiro. Desta forma, este estudo resultou em quatro trabalhos científicos: (1) Meta-análise descritiva das alterações patológicas de aves e mamíferos silvestres diagnosticadas na região central do Rio Grande do Sul: 495 casos; (2) Identification and phylogenetic analysis of clade C avipoxvirus in a fowlpox outbreak in exotic Psittaciformes in southern Brazil ; (3) Psittacid Herpesvirus 3 infection in rose-ringed parakeets (*Psittacula krameri*) in Southern Brazil e (4) Investigação de *Salmonella* spp. em Psittaciformes exóticos e nativos mantidos em cativeiro na região central do Rio Grande do Sul. Este trabalho deverá contribuir com médicos veterinários clínicos e patologistas no diagnóstico de doenças presentes na região central do Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: Avipoxvírus clado C. Herpesvírus de Psitacídeos 3. *Salmonella*.

ABSTRACT

DISEASES OF PSITTACIFORMES IN THE CENTRAL REGION OF RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: Laurete Murer
ADVISOR: Maristela Lovato
Santa Maria, October 16th, 2017.

This thesis aimed to study the diseases of Psittaciformes diagnosed at the Center for Studies and Research in Wild Animals of the Federal University of Santa Maria (NEPAS / UFSM). For the preparation of this paper, the records of the 495 necropsies of wild animals carried out from January 2013 to December 2016 were examined, in addition to the results of the investigation of the *Salmonella* spp. presence carried out in clinical care to two psittacids breeders. The main macroscopic alterations observed at necropsies were grouped by systems, analyzed through a descriptive meta-analysis, where it was verified that the digestive system presented the highest number of alterations (29.4%), followed by the respiratory system (18.6%), cardiovascular (14.6%), musculoskeletal (12.6%) and presence of parasites or fungi (8.4%). In an expressive number of cases (16.5%) it was not possible to identify the lesions due to the advanced stage of decomposition of the cadavers, or because they were macroscopic alterations that would not lead the animal to death. During the study period, two cases of greater relevance appeared, for which the investigation of the *causa mortis* was sequenced, with the accomplishment of histopathological and molecular tests that resulted in two reports: the first report in Brazil of the clade C avipoxvirus presence and another, the first report in Brazil of the herpesvirus of the Psittacidae type 3, both in captive Psittaciformes. Thus, this study resulted in four scientific studies: (1) Descriptive meta-analysis of the pathological alterations of wild birds and mammals diagnosed in the central region of Rio Grande do Sul: 495 cases; (2) Identification and phylogenetic analysis of clade C avipoxvirus in a fowlpox outbreak in exotic Psittaciformes in Southern Brazil; (3) Psittacid herpesvirus 3 infection in rose-ringed parakeets (*Psittacula krameri*) in Southern Brazil and (4) Investigation of *Salmonella* spp. in exotic and native Psittaciformes kept in captivity in the central region of Rio Grande do Sul. This work will contribute with clinical and pathologists veterinarians in the diagnosis of diseases present in the central region of Rio Grande do Sul.

Keywords: Clade C avipoxvirus. Psittacid herpesvirus 3. *Salmonella*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I:

- Figura 1 - Forest plot das alterações identificadas em necropsias de animais silvestres realizadas no NEPAS/UFSM (2013-2016).....26
- Figura 2 - Forest plot das alterações de sistemas cardiovascular e hemolinfopoiético em necropsias de animais silvestres realizadas no NEPAS/UFSM (2013-2016).....26
- Figura 3 - Forest plot das alterações de sistema digestório em necropsias de animais silvestres realizadas no NEPAS/UFSM (2013-2016).....27
- Figura 4 - Forest plot da presença de agentes parasitários/fúngicos/leveduriformes detectados em necropsias de animais silvestres realizadas no NEPAS/UFSM (2013-2016).....27
- Figura 5 - Forest plot das alterações de sistema respiratório em necropsias de animais silvestres realizadas no NEPAS/UFSM (2013-2016).....28

CAPÍTULO II:

- Figure 1 - Nodular lesions in the periocular region (A) and in the commissure of the beak (B) of Psittaciformes, suggestive of cutaneous form of fowlpox.....48
- Figure 2 - Caseous mass obstructing trachea, indicative of diphtheric form of fowlpox (A) and marked epithelial hyperplasia with the presence of Bollinger corpuscles (arrows) in Psittaciformes tongue. Hematoxylin and eosin stain; magnification, ×40 (B).....48
- Figure 3 - Electrophoresis in 1.2% agarose gel stained with ethidium bromide with the amplification products compatible with the 4b gene: amplicon of reaction 1 (578 bp); amplicon of reaction 2 (419 bp). MP = molecular weight marker (100 bp); 01 and 02 = Psittaciformes tracheal samples; 03 and 04 = Psittaciformes skin fragment samples; 05 and 06 = vaccines for fowlpox. The dashed arrow indicates a 500-bp fragment.....49
- Figure 4 - Maximum likelihood phylogeny generated from the cytochrome b sequences from GenBank. Avipoxvirus clades A to C, subclades, and clusters are labeled according to the nomenclature described previously^{9,10}. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The confidence was measured using the bootstrap method inferred from 1000 replicates, and it is displayed with a color gradient (1 = red; 0 = blue). Similar sequences were condensed in cluster A and cluster B.....50

CAPÍTULO III:

- Figure 1 - Rose-ringed parakeet (*Psittacula krameri*), male, adult. Lungs with light yellow multifocal lesions compatible with pneumonia (case 4).....61
- Figure 2 - Lung, rose-ringed parakeet, in A - Accentuated necrotising bronchopneumonia associated to syncytial cells containing eosinophilic intranuclear inclusion bodies (arrow), hematoxylin and eosin stain, obj. 40x and in B - viral structures in the nucleus of a syncytial cell measuring about 145 nm diameter and showing core, capsid and envelope..... 61

Figure 3 - Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of DNA polymerase gene of avian herpesviruses. The outgroup was composed by the respective gene of *Felid Herpesvirus* (AJ224971). The tree was constructed using the Neigbohr-Joining method with 1,000 bootstrap replicates based on p-distance model and implemented by MEGA 5.0. Values >60% are shown. The *Psittacid Herpesvirus 3* sequence of the present report is identified with a black diamond.....62

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II:

Table 1 - Sequence and reference of selected primers, size of amplicons, and thermocycler conditions for polymerase chain reaction reactions 1 and 2.....47

CAPÍTULO III:

Table 1 - Histopathological findings associated with PsHV-3 infection in rose-ringed parakeets.....60

CAPÍTULO IV:

Tabela 1 - Relação das espécies de psitacíformes e amostragem utilizada, onde n representa o número de recintos coletados..... 67

Tabela 2 - Resultados dos testes bioquímicos presuntivos para 26 amostras de fezes de Psitacíformes suspeitas de *Salmonella* spp. analisadas a partir dos meios de cultura Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Verde Brilhante (AVB).....69

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| ANEXO A – Comprovante de submissão do manuscrito “Identification and phylogenetic analysis of clade C avipoxvirus in a fowlpox outbreak in exotic Psittaciformes in southern Brazil” | 80 |
| ANEXO B – Comprovante de aceite do manuscrito “Investigação de <i>Salmonella</i> spp. em Psittaciformes exóticos e nativos mantidos em cativeiro na região central do Rio Grande do Sul” | 81 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 16 |
| | 2.1 Diagnóstico <i>post mortem</i>..... | 16 |
| | 2.2 Medicina de selvagens e os Psittaciformes..... | 17 |
| | 2.3 <i>Avipoxvirus</i>..... | 17 |
| | 2.4 Herpesvírus de Psitacídeos..... | 19 |
| | 2.5 Família Enterobacteriaceae..... | 20 |
| 3 | CAPÍTULO I – Meta-análise descritiva das alterações patológicas de aves e mamíferos silvestres diagnosticadas na região central do Rio Grande do Sul: 495 casos..... | 22 |
| | Resumo..... | 22 |
| | Abstract..... | 23 |
| | Introdução..... | 24 |
| | Material e Métodos..... | 24 |
| | Resultados..... | 25 |
| | Discussão..... | 28 |
| | Conclusões..... | 30 |
| | Referências..... | 31 |
| 4 | CAPÍTULO II – Identification and phylogenetic analysis of clade C <i>avipoxvirus</i> in a fowlpox outbreak in exotic Psittaciformes in southern Brazil..... | 34 |
| | Abstract..... | 35 |
| | References..... | 44 |
| 5 | CAPÍTULO III – Psittacid herpesvirus 3 infection in rose-ringed parakeets (<i>Psittacula krameri</i>) in southern Brazil..... | 51 |
| | Abstract..... | 52 |
| | References..... | 58 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 6 | CAPÍTULO IV – Investigação de <i>Salmonella</i> spp. em Psittaciformes exóticos e nativos mantidos em cativeiro na região central do Rio Grande do Sul..... | 63 |
| | Resumo..... | 63 |
| | Abstract..... | 64 |
| | Introdução..... | 64 |
| | Material e Métodos..... | 66 |
| | Resultados e Discussão..... | 68 |
| | Conclusões..... | 72 |
| | Referências..... | 72 |
| 7 | CONCLUSÕES..... | 76 |
| 8 | REFERÊNCIAS..... | 77 |

1. INTRODUÇÃO

Os animais selvagens, principalmente as aves, estão sendo cada vez mais escolhidos como animais de companhia, sendo que os membros da família dos psitacídeos são os mais comumente adotados como ave de estimação (JEPSON, 2010; SANTOS et al., 2008). Os papagaios chamam a atenção pelo companheirismo, temperamento e pela sua habilidade em imitar a voz humana (ALLGAYER & CZIULIK, 2007; HARCOURT-BROWN, 2010). A ordem Psittaciformes inclui a família Psittacidae (araras, papagaios, periquitos, maritacas e lóris) e Cacatuidae (cacatuas e calopsitas). Alguns autores classificam ainda uma terceira família: a Loridae (lóris e *lorikeets*). As principais características desta ordem são o bico superior arqueado e os pés zigodáctilos (com os dígitos I e IV direcionados caudalmente e os dígitos II e III direcionados cranialmente) (GRESPLAN & RASO, 2014; HARCOURT-BROWN, 2010).

De maneira geral, as aves não exibem sinais de doença até que o curso da mesma esteja bem avançado; outras vezes apresentam sinais clínicos inespecíficos, além de o exame físico fornecer informações limitadas (JEPSON, 2010; SCHMIDT, 2014). Os animais silvestres são acometidos por uma grande variedade de doenças de diferentes etiologias, as quais podem ter origem infecciosa, parasitária, nutricional ou metabólica, entre outras, podendo levá-los à morte (QUSE & FALZONI, 2008). Segundo RASO (2009), as enfermidades infecciosas representam 30 a 50% dos casos diagnosticados em aves no Brasil, sendo que as mais relevantes são as enfermidades fúngicas (candidíase, aspergilose, megabacteriose), bacterianas (micoplasmoses, tuberculose, clamidiose) e virais (infecção por poxvírus, doença do bico e das penas, síndrome da dilatação do pró-ventrículo).

Há poucos estudos sobre ocorrência de doenças infecciosas em aves no Brasil que correlacionem as lesões macroscópicas com o exame histopatológico e a identificação do agente presente nos órgãos lesionados (CASAGRANDE, 2013), assim como são escassos os trabalhos que relacionam as lesões *post mortem*, macroscópicas e microscópicas que ocorrem devido à ação destes agentes patogênicos (QUSE & FALZONI, 2008). No Rio Grande do Sul encontramos relatos isolados.

Embora seja um método diagnóstico dos mais importantes, a necropsia é uma prática frequentemente relegada ao plano de atividades de baixa prioridade, fazendo com que se percam muitas informações sobre as doenças que afetam animais selvagens (CATÃO-DIAS & MIRANDA, 2014). Os principais problemas na identificação da causa de morte são os cadáveres em avançado estado de decomposição (pela demora em enviar os mesmos para

necropsia) e o congelamento (que rompe a maioria das células do corpo) (CATÃO-DIAS & MIRANDA, 2014). A grande maioria dos indivíduos que vão a óbito não passa por necropsia para investigação da causa de morte, sendo muitas vezes enterrados, ou descartados em lixo comum, podendo contaminar o meio ambiente e os humanos.

Diante do exposto, esta tese apresenta, através de uma meta-análise descritiva, as principais ocorrências verificadas nas necropsias realizadas no Núcleo de Estudos e Pesquisas em Animais Silvestres (NEPAS) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2016. Relata, também, o primeiro registro, no Brasil, da presença de um avipoxvírus do clado C e do herpesvírus dos Psitacídeos tipo 3 em Psittaciformes. Além disso, apresenta o resultado da investigação de presença de *Salmonella* spp. em dois criatórios de Psitacídeos. O presente trabalho visa identificar as principais patologias presentes na região central do Rio Grande do Sul, na área de abrangência do NEPAS (UFSM), com o objetivo de auxiliar médicos veterinários clínicos e patologistas no diagnóstico de doenças prevalentes nesta região.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diagnóstico *post mortem*

De acordo com CATÃO-DIAS & MIRANDA (2014), "Necropsia é a inspeção e análise de um cadáver com o objetivo de determinar as alterações patológicas e a consequente causa da morte de um determinado animal." Os animais silvestres são afetados por enfermidades que podem ter origem infecciosa, parasitária, nutricional, metabólica, entre outras, e que muitas vezes levam à morte indivíduos ou populações (QUSE & FALZONI, 2008). Apesar de sua inegável importância para determinar a causa da morte, este método diagnóstico é negligenciado e relegado à atividade de baixa prioridade (CATÃO-DIAS & MIRANDA, 2014).

Para um diagnóstico *post mortem* correto é necessário que a necropsia seja realizada de maneira adequada, assim como a posterior coleta e processamento de amostras (QUSE & FALZONI, 2008). Deve ser realizada logo após a morte do animal. Caso não seja possível, deverá ser conservado sob refrigeração por, no máximo, 24h a fim de evitar autólise e putrefação. O congelamento deve ser evitado, pois produz danos celulares que dificultam estudos histopatológicos (MATUSHIMA, 2007; QUSE & FALZONI, 2008).

Para a elaboração do laudo de necropsia, as alterações anatomopatológicas observadas devem ser descritas, assim como a determinação da *causa mortis*. Porém, muitas vezes não é possível definir alterações macroscópicas que sejam capazes de conduzir o indivíduo à morte. Outras vezes, alterações em vários órgãos vitais tornam difícil determinar qual foi a que levou ao óbito. Porém, o maior número de casos em que não é possível determinar a causa da morte está relacionado com o estado de autólise e putrefação dos cadáveres, tornando impossível identificar lesões macro ou microscópicas. Nestes casos, pode-se usar o termo causa indeterminada (MATUSHIMA, 2007).

Uma ficha com o histórico do animal, assim como uma conversa com os colaboradores dos criatórios, ou os proprietários (no caso de animais de companhia) podem fornecer informações importantes para a elucidação da causa da morte (CATÃO-DIAS & MIRANDA, 2014). O conhecimento das doenças é fundamental para o planejamento de conservação animal, proteção da saúde humana e na programação de ações profiláticas como vacinação e desinfecção.

2.2 Medicina de animais selvagens e os Psittaciformes

O mercado de animais de companhia tem crescido ao longo dos anos, exigindo a capacitação de médicos veterinários, não apenas pelo crescente número de aves silvestres e exóticas mantidas por proprietários e criadores, mas também pela necessidade de aumentar os conhecimentos nutricionais, zootécnicos e sanitários. Os Psittaciformes compreendem aves extremamente populares como aves de companhia por sua inteligência, facilidade de domesticação, capacidade de imitar sons e pela plumagem densa e colorida, sendo as aves de maior frequência mantidas como animais de estimação (GRESPLAN & RASO, 2014; HARCOURT-BROWN, 2010; JEPSON, 2010; SANTOS et al., 2008).

A ordem Psittaciformes é facilmente reconhecida pelo formato do bico superior que é arqueado e de base larga e os pés preênseis que são zigodáctilos, com os dedos II e III voltados para frente e os dedos I e IV para trás (HARCOURT-BROWN, 2010). Compreende as famílias Psittacidae (araras, papagaios, periquitos e maritacas) e Cacatuidae (cacatuas e calopsitas). Alguns autores classificam esta ordem em uma terceira família: a Loridae (lóris e *lorikeets*) (GRESPLAN & RASO, 2014).

Estas aves têm distribuição mundial, sendo o Brasil o país com a maior diversidade. Das 375 espécies reconhecidas, 85 são encontradas em nosso país. De acordo com a Lista de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) e o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção do Ministério do Meio Ambiente, 22 espécies de psitacídeos estão ameaçados de extinção no Brasil. Entre os fatores responsáveis pelo declínio das populações se destaca o comércio ilegal, além da fragmentação de *habitat*, o desmatamento, a ampliação do agronegócio, a coleta e o comércio de penas, ovos e filhotes, a introdução de espécies invasoras e a endogamia (GRESPLAN & RASO, 2014). Atualmente, a criação e comercialização de espécies silvestres nativas são normatizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), através das portarias 117 e 118 de 15 de outubro de 1997, que normatizam a criação de espécies silvestres nativas e comercialização de animais vivos, abatidos, partes e produtos da fauna nativa, e assim é possível adquirir animais de maneira legal (ALLGAYER & CZIULIK, 2007).

2.3 *Avipoxvirus*

As espécies virais do gênero *Avipoxvirus* (vírus da bouba aviária ou da varíola aviária) são espécie-específicas e geralmente recebem a denominação de acordo com a espécie hospedeira (ALLGAYER & PEREIRA, 2014; CANAL & DIEL, 2017; TRIPATHY &

REED, 2008). Pertencem à subfamília *Chordopoxvirinae*, família *Poxviridae* cujos membros infectam invertebrados e vertebrados (incluindo humanos). Os membros desta família foram os primeiros a serem estudados em laboratório e estão ligados à história da imunologia e da vacinologia. Em 1796, o vírus da varíola bovina foi utilizado para imunizar humanos contra a varíola humana (CANAL & DIEL, 2017).

O espectro de hospedeiros, assim como a severidade da infecção varia de acordo com os diferentes poxvírus e as espécies afetadas. Lesões na pele são características destas infecções, porém, sinais clínicos generalizados também podem aparecer. Em aves, predomina doença proliferativa, sendo que as lesões vesiculares e pustulares predominam nos mamíferos. O período de incubação é de 4 a 10 dias para galinhas, pombos e perus (CANAL & DIEL, 2017) podendo estender-se por até 30 dias (ALLGAYER & PEREIRA, 2014).

Os avipoxvírus são cosmopolitas, sendo que as infecções ocorrem especialmente nas épocas mais quentes do ano, devido à presença de vetores transmissores do agente (insetos sugadores) em maior número. A transmissão também pode ocorrer pelo contato direto ou indireto com alimentos, água, secreções e fômites contaminados. A doença pode se apresentar de duas formas: a cutânea e a diftérica. A forma cutânea (bouba aviária) é caracterizada pela presença de lesões que evoluem de pápulas para vesículas, pústulas e crostas, nas áreas desprovidas de penas, principalmente ao redor dos olhos, na comissura do bico, nas narinas e nos membros pélvicos. Essas lesões formam grandes massas que prejudicam a visão ou a deglutição. As taxas de mortalidade são baixas e ocorre recuperação espontânea em cerca de duas a três semanas. No entanto, podem ocorrer infecções secundárias, que retardam a melhora das lesões. Na forma diftérica da doença, ocorrem lesões (placas caseosas de coloração amarelada) nas mucosas do trato respiratório superior e do digestório, podendo resultar em dispneia, anorexia, descarga nasal e ocular, com alta mortalidade. Uma infecção sistêmica concomitante também pode ocorrer. No Brasil, são escassos os relatos de casos clínicos individuais, porém eventuais surtos podem afetar criações. O diagnóstico é realizado a partir das lesões, por exame histopatológico, onde são visualizados corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (Corpúsculos de Bollinger), por isolamento viral ou por técnicas moleculares (CANAL & DIEL, 2017; GRESPAN & RASO, 2014; RASO, 2009; TRIPATHY & REED, 2008).

O tratamento é sintomático, com a limpeza e desinfecção das áreas afetadas, administração de vitamina A e, em caso de infecções secundárias, uso de antibióticos e antifúngicos. As aves recuperadas podem se tornar portadoras, passando a eliminar o vírus de maneira intermitente através das penas, pele e trato digestório. Em galinhas e perus, o controle

é realizado através da vacinação dos pintos, porém, não há vacinas para aves silvestres disponíveis no mercado nacional. Desta forma, as medidas de biossegurança nas criações, incluindo o controle de vetores ainda é a medida mais importante para diminuir a disseminação do vírus, além de isolar aves infectadas e promover limpeza e desinfecção do ambiente (ALLGAYER & PEREIRA, 2014; CANAL & DIEL, 2017; GRESPAN & RASO, 2014; RASO, 2009).

2.4 Herpesvírus de Psitacídeos

A família *Herpesviridae* inclui vírus de mamíferos, aves e répteis, entre outros. Os herpesvírus possuem envelope, sendo que o diâmetro dos vírions varia de 120 a 300 nm, não possuindo forma bem definida, com tendência para a globular. Estão distribuídos na maioria das espécies animais, geralmente produzindo infecções inaparentes ou leves. Tem a propriedade de produzir infecções latentes em seus hospedeiros naturais, que em situações de imunossupressão são reativadas e novos vírions infecciosos são sintetizados, eliminados pelo hospedeiro e disseminado para indivíduos suscetíveis. Do ponto de vista epidemiológico, animais latentemente infectados atuam como disseminadores do vírus (ALLGAYER & PEREIRA, 2014; FRANCO et al., 2017).

Os herpesvírus do gênero *Iltovirus* estão entre os agentes causadores de doenças respiratórias em aves. Infecções em pulmões e trato respiratório inferior causadas por herpesvírus foram descritas em periquitos Bourke e Ringneck. O herpesvírus respiratório é distinto do herpesvírus de psitacídeos 1 (PsHV-1) (SHIVAPRASAD & PHALEN, 2012).

O herpesvírus de psitacídeos 1 (PsHV-1) causa a doença de Pacheco, uma hepatite fulminante, onde muitas aves afetadas morrem. Em aves bem nutridas, a morbidade parece ser bem menor, porém a mortalidade é a mesma. Esta patologia é caracterizada por quadros agudos, com morte súbita e sem sinais clínicos ou com sinais inespecíficos como apatia, sonolência, letargia, eriçamento das penas, anorexia, poliúria, polidipsia, regurgitação, diarreia aquosa esverdeada ou hemorrágica e uratos de cor amarela. Lesões macroscópicas são observadas em fígado (hepatomegalia com múltiplos focos amarelados e hemorrágicos), baço, rim e intestino. No exame histopatológico, lesões necróticas e hemorrágicas são observadas principalmente no fígado (ALLGAYER & PEREIRA, 2014; HARCOURT-BROWN, 2010).

O herpesvírus de psitacídeos 3 (PsHV-3) foi apontado como causa de severa doença respiratória em periquitos bourke (*Neopsephotus bourkii*) nos Estados Unidos. Os sinais clínicos incluem anorexia, penas arrepiadas, depressão, perda de peso e dificuldade respiratória. As lesões macroscópicas observadas na necropsia são edema e congestão

pulmonar moderada e leve exsudato fibrinoso nos sacos aéreos e no lúmen da traqueia. Este é o único herpesvírus caracterizado geneticamente como sendo o agente etiológico de doença respiratória em periquitos. Na Austrália, a presença deste vírus foi confirmada em dois papagaios ecletus (*Ecletus roratus*) através de técnicas moleculares, o que sugere que seja um patógeno importante para populações de psitacídeos (GABOR et al., 2013; SHIVAPRASAD & PHALEN, 2012).

2.5 Família Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae, formada por bacilos Gram negativos, contém mais de 28 gêneros e de 80 espécies. Os principais patógenos de animais são *Escherichia coli*, espécies de *Salmonella* e de *Yersinia*, que podem causar doenças entéricas e sistêmicas. Estes microorganismos possuem distribuição mundial, habitam o trato intestinal de animais e humanos e contaminam vegetação, solo e água. Outras espécies bacterianas como *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae* e o gênero *Proteus* são patógenos oportunistas (QUINN et al., 2005).

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*, a qual é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Com base na diversidade de lipopolissacarídeos (LPS), antígenos (O) e antígeno flagelar (H) as cepas são classificadas em sorovares. Atualmente, são reconhecidos mais de 2.600 sorovares ou sorotipos (GUIBOURDENCHE et al., 2010; OIE, 2010). O sorotipo isolado de Psittaciformes com maior frequência é *S. Typhimurium* (GODOY, 2007; HARCOURT-BROWN, 2010), porém já foram isolados *S. Lexington*, *S. Saintpaul* e *S. Newport* (LOPES et al., 2014).

As bactérias do gênero *Salmonella* são importantes patógenos para aves selvagens, além dos riscos para a saúde pública, uma vez que causam salmonelose, que é uma importante zoonose. Nas aves, a enfermidade cursa com apatia, anorexia, desidratação, enterocolite aguda com diarreia, podendo ocorrer bacteremia, meningite, enterite necrótica e morte súbita (LOPES et al., 2016; MARQUES, 2014).

E. coli faz parte da microbiota de humanos e animais, porém causa infecção em animais imunossuprimidos, geralmente associada a outras enterobactérias ou leveduras oportunistas, como *Candida* spp.. A colibacilose se manifesta principalmente como doença entérica (DEC), mas pode ocorrer também extraintestinal (ExPEC) (DE CARVALHO, 2014; GODOY, 2007). Entre os principais achados de necropsia estão atrofia da musculatura peitoral, penas descoloridas e sujas de fezes, hepatomegalia com pontos amarelos em todo o

parênquima, opacidade dos sacos aéreos, hiperemia da mucosa intestinal, esplenomegalia com palidez do baço (GODOY, 2007). A aerossaculite é a principal manifestação localizada da colibacilose aviária (APEC), podendo levar a infecções generalizadas como pericardite, peri-hepatite e peritonite (DE CARVALHO, 2014).

A enterobactéria *Citrobacter freundii* apresenta alta patogenicidade, podendo produzir rápida bacteremia com morte aguda, sem a presença de sinais clínicos, principalmente em aves jovens e imunossuprimidas; no entanto, as sobreviventes tornam-se portadoras. No exame necroscópico é observada septicemia, petéquias no coração, musculatura e parênquima dos órgãos, bem como enterite necrótica pseudomembranosa grave (GODOY, 2007). Sua versatilidade fenotípica dificulta a sua identificação, sendo frequentemente confundida com *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* (DELGADO et al., 2013).

As principais enterobactérias encontradas por CORRÊA (2013) em psitacídeos mantidos em criadouro conservacionista no sul do Brasil foram *E. coli* (40%), *Serratia odorífera* (26,9%), *Enterobacter aerogenes* (10%) e *Salmonella* spp (6,6%). ALLGAYER et al. (2008), utilizando suabes de cloaca de 280 psitacídeos de cativeiro, através de diagnóstico molecular, detectaram 37 casos positivos para *Salmonella* spp. (13,2%), porém nenhum caso foi positivo pela técnica microbiológica padrão. Em um estudo com Psittaciformes oriundos de tráfico de animais silvestres em Fortaleza (CE), de um total de 119 aves analisadas, foram isoladas 164 cepas de bactérias da família Enterobacteriaceae, sendo as mais prevalentes: *Escherichia coli* (46,5%), *Pantoea agglomerans* (13,2%) e *Enterobacter cloacae* (12%). Em apenas uma amostra foi detectada *Salmonella* Saintpaul (0,6%) (LOPES et al., 2015).

3. CAPÍTULO I

Meta-análise descritiva das alterações patológicas de aves e mamíferos silvestres diagnosticadas na região central do Rio Grande do Sul: 495 casos

Descriptive meta-analysis of the pathological alterations of wild birds and mammals diagnosed in the central region of Rio Grande do Sul: 495 cases

(Artigo a ser submetido ao Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

Laurete Murer^{1*}, Luciana Pötter², Maristela Lovato¹

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) - Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900. Telefone: (55) 3220-8072. E-mail: laumurer@hotmail.com *Autor para correspondência.

²Departamento de Zootecnia, CCR, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo das 495 fichas de necropsias realizadas no Núcleo de Estudos e Pesquisas em Animais Silvestres da Universidade Federal de Santa Maria (NEPAS/UFSM) no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2016, a fim de reunir informações a cerca de famílias, tipo de criação e alterações anatomopatológicas presentes em animais silvestres da região central do Rio Grande do Sul, para auxiliar médicos veterinários clínicos e patologistas na busca de diagnóstico. Cerca de 90% dos animais eram oriundos de criatórios (comerciais ou conservacionistas), sendo que a família Psittacidae foi a que teve maior número de casos de necropsia (51,92%). O sistema digestório foi o mais acometido por lesões patológicas (29,4%), seguido do respiratório (18,6%), cardiovascular (14,6%), músculo-esquelético (12,6%), infecções parasitárias ou fúngicas multissistêmicas (8,4%) e 16,5% das lesões foram denominadas indeterminadas. Estas lesões representam casos em que o cadáver se encontrava em elevado grau de putrefação ou autólise, ou quando as lesões macroscópicas encontradas não seriam suficientes para levar o indivíduo à morte. Entre as

alterações no aparelho digestório destacaram-se como importante causa de morte, as enterites (26,1%). Além disso, foi diagnosticada a presença de helmintos em 42,8% dos casos agrupados em alterações parasitárias e fúngicas. Estes dados chamam a atenção para a importância do manejo no que se refere à higiene de comedouros e bebedouros, assim como o preparo e conservação dos alimentos e a qualidade da água, uma vez que representam importantes fontes de transmissão de agentes infecciosos e parasitários, causadores de enterites.

Palavras-chave: Psittacidae, doenças de animais silvestres, necropsia

ABSTRACT

The aim of the present study was to conduct a study of 495 necropsy files from the Center for Studies and Research on Wild Animals of the Federal University of Santa Maria (NEPAS / UFSM) from January 2013 to December 2016 in order to gather information about families, breeding type and anatomopathological changes present in wild animals from the central region of Rio Grande do Sul that assist clinics and pathologists veterinaries in the diagnostics. About 90% of the animals were from commercial or conservationist farms, and the Psittacidae family had the highest number of necropsy cases (51.92%). The digestive system was the most affected by pathological lesions (29.4%), followed by respiratory (18.6%), cardiovascular (14.6%), musculoskeletal (12.6%), multisystemic parasitic or fungal infections (8.4%) and 16.5% of the lesions were denominated indeterminate. These lesions represent cases in which the cadaver was already in a high degree of putrefaction or autolysis, or when the macroscopic lesions found would not be sufficient to lead the individual to death. Among the alterations in the digestive system, the main cause of death was enteritis (26.1%). In addition, the presence of helminths was diagnosed in 42.8% of the cases grouped in parasitic and fungal alterations. These data point to the importance of management in terms of hygiene of feeders and drinkers, as well as food preparation and conservation and water quality, since they represent important sources of transmission of infectious and parasitic agents that cause enteritis.

Keywords: Psittacidae, wild animals diseases, necropsy

INTRODUÇÃO

A história entre o ser humano e o animal é muito antiga. À medida que o homem foi se tornando sedentário surgiu a domesticação, com fins como alimentação, transporte e companhia (Mergulhão e Trivelato, 2007). Nas últimas décadas, o aumento do mercado de animais de companhia tem levado à necessidade de capacitação do médico veterinário também com relação aos cuidados com os animais silvestres e exóticos, que estão sendo criados em cativeiro com essa finalidade. Entre as aves, os membros da família Psittacidae são os mais comuns, seja pela plumagem exuberante e colorida, pela facilidade de domesticação ou por imitar a voz humana (Grespan e Raso, 2014; Harcourt-Brown, 2010; Jepson, 2010).

Os animais silvestres são afetados por doenças de diferentes origens, como as infecciosas, parasitárias, nutricionais ou metabólicas. Poucas publicações descrevem as lesões *post mortem*, macroscópicas e microscópicas, que ocorrem pela ação de agentes patogênicos que levam à morte dos animais (Quse e Falzoni, 2008). Há uma carência de estudos sobre as alterações patológicas encontradas em necropsias de animais silvestres em nossa região, bem como no Rio Grande do Sul.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma meta-análise descritiva das 495 fichas de necropsias realizadas no NEPAS/UFSM em animais silvestres da região central do Rio Grande do Sul, a fim de organizar informações a cerca de famílias, tipo de criação e alterações macroscópicas atribuídas como causa de morte, que possam ser úteis aos clínicos e patologistas veterinários.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados os 495 protocolos das necropsias realizadas em animais silvestres realizadas no Núcleo de estudos e pesquisas em animais silvestres da Universidade Federal de Santa Maria (NEPAS/UFSM), Rio Grande do Sul, correspondendo ao período de quatro anos (janeiro de 2013 a dezembro de 2016). As informações sobre tipo de criação, família, órgão e sistemas onde foram constatadas as alterações anatomopatológicas, bem como o tipo de alteração encontrada foram organizadas em tabelas. Alguns animais apresentaram alterações em mais de um sistema. Para os casos em que não foi possível avaliar os órgãos devido à autólise, considerou-se como caso indeterminado.

Para a meta-análise, as alterações foram agrupadas em sistemas (respiratório, digestório, musculoesquelético e cardiovascular), presença de endo e/ou ectoparasitos ou fungos e casos indeterminados. Também foram analisadas as alterações encontradas em cada

sistema. Os modelos de efeito fixo foram escolhidos a priori por se tratar da casuística de um laboratório. Nas análises, utilizou-se o comando “metaprop”, da função meta, do programa estatístico R, versão 3.2.2.

RESULTADOS

Entre janeiro de 2013 e dezembro de 2016 foram realizadas 495 necropsias de animais silvestres no NEPAS/UFSM. A maioria deles estava congelada, havendo poucos casos em que estavam mantidos em refrigeração. Deste total, foram 125 casos em 2013, 89 em 2014, 155 em 2015 e 126 em 2016. Estes animais eram oriundos de criatórios comerciais (49,29%), criadouros conservacionistas (40,20%), animais de vida livre (6,87%) e criação doméstica (3,64%).

Foram necropsiadas 460 aves e 35 mamíferos, os quais pertenciam a 49 famílias, sendo que exemplares da família Psittacidae foram os mais frequentes com 51,92% dos casos, seguida da Thraupidae (9,49%); Fringillidae (4,65%); Passeridae (3,64%); Columbidae (3,43%); Ramphastidae (2,83%); Cacatuidae (2,02%); Phasianidae (1,82%); Anatidae (1,41%); Atelidae, Chinchillidae e Rallidae (1,21%) e as famílias Accipitridae, Alcedinidae, Anhimidae, Bucconidae, Callitrichidae, Caprimulgidae, Cardinalidae, Cebidae, Cervidae, Ciconiidae, Corvidae, Cracidae, Cricetidae, Didelphidae, Emberizidae, Falconidae, Felidae, Furnariidae, Hirundinidae, Icteridae, Leporidae, Mustelidae, Nyctibiidae, Phoenicopteridae, Phyllostomidae, Picidae, Procellariidae, Scolopacidae, Strigidae, Threskiornithidae, Tinamidae, Trogonidae, Turdidae, Tyrannidae, Tytonidae com frequência igual ou menor que 1%.

O sistema onde foi encontrado maior número de alterações foi o digestório, com 454 achados (29,4%). No sistema respiratório foram encontradas 244 alterações (18,6%); sendo estes os dois sistemas mais frequentemente afetados. Os demais achados de necropsia, em ordem decrescente, afetaram os sistemas cardiovascular 183 (14,6%), musculoesquelético 155 (12,6%), além de 100 casos (8,4%) onde foi verificada a presença de ectoparasitos, endoparasitos, ou fungos e 211 (16,5%) de causas indeterminadas (Figura 1). A discriminação das alterações em cada grupo estão detalhadas nas figuras 2-5.

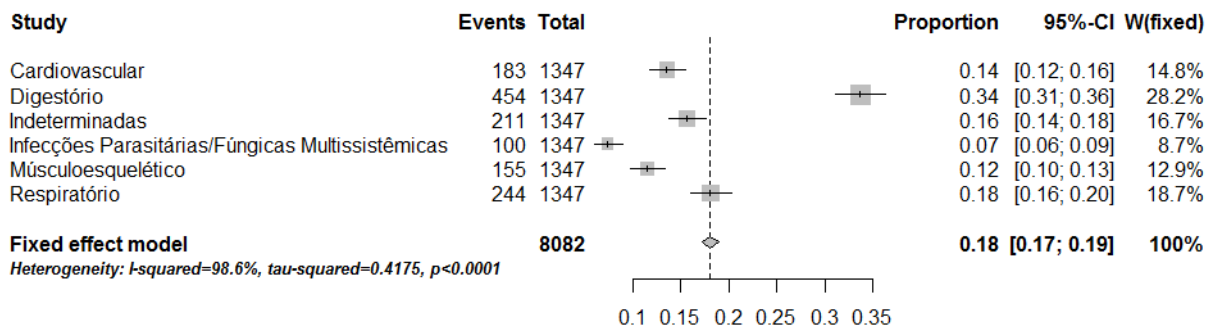


Figura 1. Forest plot das alterações identificadas em necropsias de animais silvestres realizadas no NEPAS/UFSM (2013-2016).

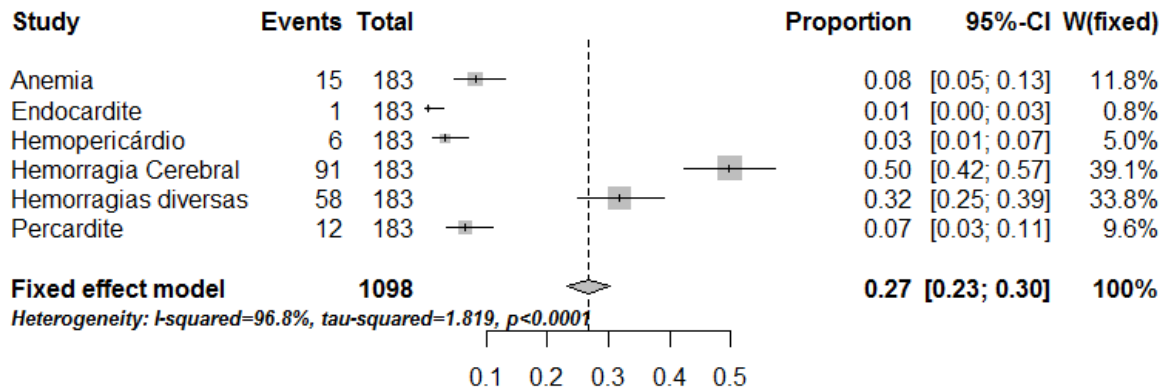


Figura 2. Forest plot das alterações de sistemas cardiovascular e hemolinfopoiético em necropsias de animais silvestres realizadas no NEPAS/UFSM (2013-2016).

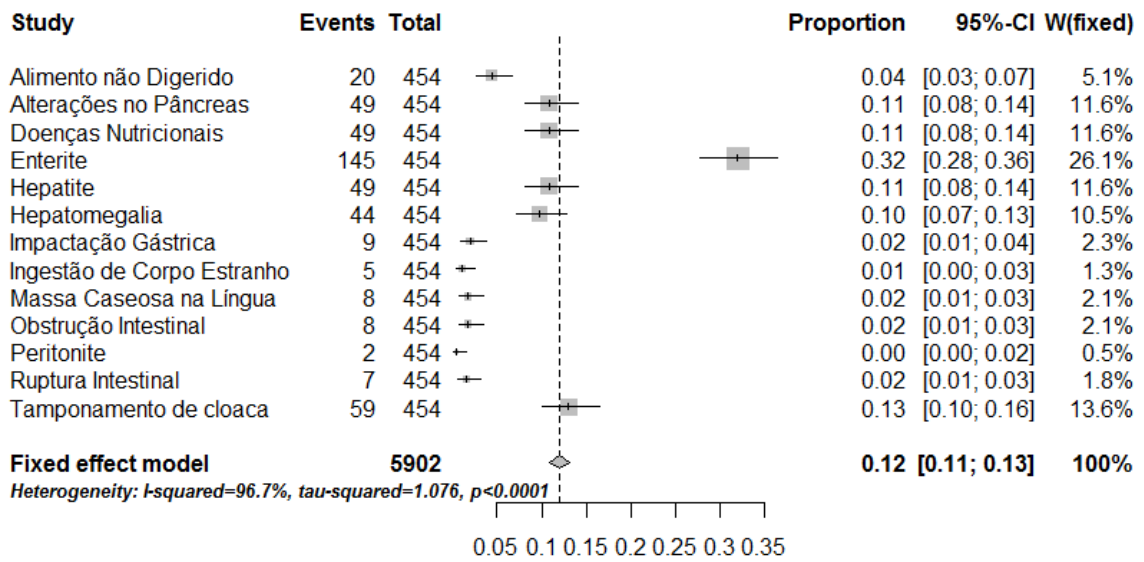


Figura 3. Forest plot das alterações de sistema digestório em necropsias de animais silvestres realizadas no NEPAS/UFSM (2013-2016).

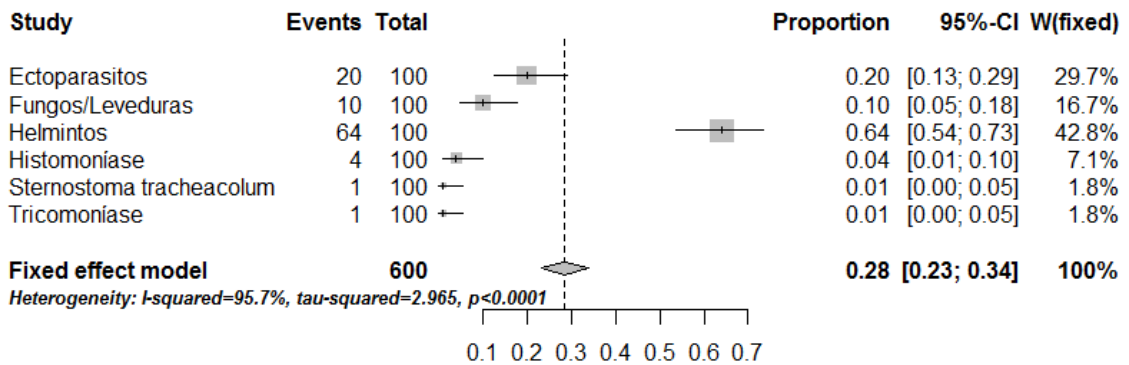


Figura 4. Forest plot da presença de agentes parasitários, fúngicos/leveduriformes detectados em necropsias de animais silvestres realizadas no NEPAS/UFSM (2013-2016).

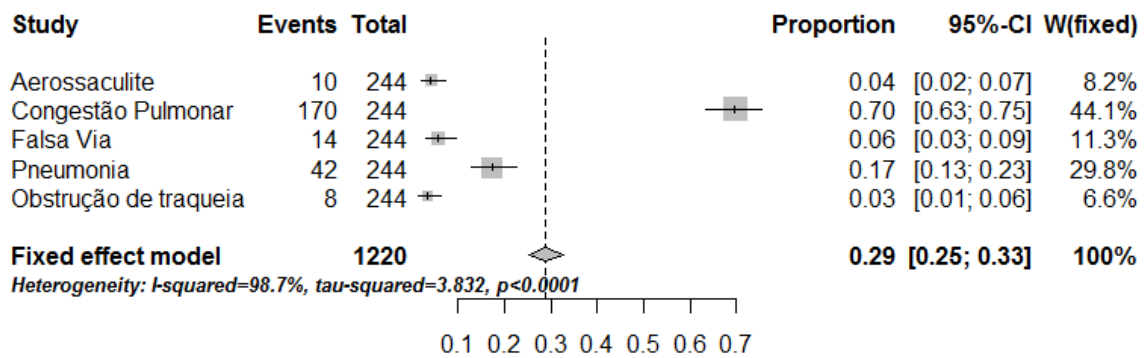


Figura 5. Forest plot das alterações de sistema respiratório em necropsias de animais silvestres realizadas no NEPAS/UFSM (2013-2016).

DISCUSSÃO

Quase 90% dos animais necropsiados pertenciam a criatórios comerciais ou conservacionistas. Essa característica pode ser explicada pela exigência de legislação que determina que os criatórios comprovem o destino dos animais mortos através de laudos de necropsia. Além disso, o diagnóstico permite atuar preventivamente no restante da população que poderá estar afetada pela mesma enfermidade (Quse e Falzoni, 2008). O baixo número de necropsias de animais classificados como de criação doméstica possivelmente seja devido ao fato de que, quando um animal de companhia morre, raramente o proprietário solicita necropsia, preferindo sepultar o cadáver. É o que se constata na rotina dos atendimentos clínicos do NEPAS.

A alta prevalência da família Psittacidae pode ser explicada por serem os membros desta família os mais comumente adotados como animais de companhia (Santos *et al.*, 2008). A facilidade para comercializar estas aves estimula tanto a criação destas espécies nos criatórios, quanto o tráfico de animais silvestres. As aves desta família, necropsiadas no NEPAS, com procedência de criadouros conservacionistas, eram oriundas de apreensões.

No sistema digestório, a enterite foi observada em maior número de casos. Essa alteração é a mais comumente encontrada no exame dos intestinos, sendo observada em várias doenças sistêmicas como salmoneloses, colibacilose, clamidiose e coccidiose (Bordin, 1978). O tamponamento de cloaca foi a segunda alteração mais frequente e pode estar relacionado com infecções por *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (Corrêa *et al.*, 2013), que são enterobactérias causadoras também de enterite. Estas infecções bacterianas, além dos prejuízos que causam à saúde das aves, tem importância em saúde pública, pois são zoonoses (Marvulo e Carvalho, 2014).

No sistema respiratório, congestão pulmonar foi a alteração mais prevalente (44,1%). Esta predominância ocorreu também no estudo de Carvalho (2004), onde foi constatada em 43,37% dos casos. Esta lesão, que representa acúmulo de sangue nos pulmões, é causada pela obstrução de pequenos ou grandes vasos (Carvalho, 2004). Comumente é encontrada em casos de cólera aviária, doença de Newcastle, psitacose (Bordin, 1978), síndrome ascítica, a qual pode levar à morte por hipóxia (Rosário *et al.*, 2004). Foram diagnosticados 42 casos de pneumonia, sendo quatro destes relacionados ao herpesvírus de psitacídeos 3, confirmados pela histopatologia, microscopia eletrônica de transmissão e por análises moleculares (Murer *et al.*, 2017). Além disso, neste sistema foram encontrados 14 casos de falsa via devidos a problemas de manejo, quando tratadores de criatórios alimentavam os filhotes de aves com papas, utilizando seringa (relato pessoal). Os casos de obstrução de traqueia estavam relacionados com um surto de boubá aviária em psitacídeos exóticos, ocorrido em um criatório da região central do Rio Grande do Sul. As aves foram necropsiadas e apresentavam tampão caseoso obstruindo a traqueia, característica da boubá na forma diftérica (Tripathy e Reed, 2008).

As hemorragias foram as alterações mais encontradas no sistema cardiovascular dos animais necropsiados. Muitas vezes foram associadas a traumas, porém algumas doenças podem causar essa desordem, como hipovitaminose K, poliomavírus e diátese hemorrágica (ligada à falta de alimento) (Jepson, 2010). Os casos de anemia foram atribuídos à parasitose por *Capillaria* sp. (Godoy, 2007). As aves apresentavam palidez generalizada, incluindo medula óssea, estado nutricional caquético e foram encontradas formas adultas e ovos do parasito nas fezes.

Devido a apreensões oriundas de tráfico de animais silvestres, traumatismos causados pelos vários tipos de caixas ou gaiolas de contenção eram alterações comuns, além das agressões entre os animais que são devidas ao estresse causado pela contenção, fome e sede. Além disso, a maioria dos casos de animais de vida livre era de vítimas de atropelamentos.

Foram registrados 100 casos de presença de parasitos ou fungos/leveduras. Formas adultas de helmintos foram coletadas e exames parasitológicos de fezes revelaram casos positivos, onde *Capillaria* sp. foi o parasito mais frequentemente encontrado. Estes helmintos podem infestar o trato gastrointestinal das aves, sendo muito comuns em psitacídeos. Diarreia, perda de peso, anorexia, penas arrepiadas, depressão, vômito e anemia são sinais clínicos de capilariose (Godoy, 2007). Foi verificada a presença do ácaro de traqueia e sacos aéreos *Sternostoma tracheacolum* na traqueia de um canário belga, embora seja mais frequente em calopsitas (Godoy, 2007). Ao exame externo, foram detectados 20 casos de ectoparasitos

(29,7%), sem importância clínica, pois são comuns em aves domésticas, pombos, aves de rapina e canários. No entanto, *Cnemidocoptes pilae* pode causar hiperqueratose de pele e descamação, além de queda de penas (Jones, 2010), alterações estas que não foram verificadas nos casos.

Dois casos de megabacteriose foram identificados. Esta doença é causada por um fungo (*Macrorhabdus ornithogaster*) que coloniza pró-ventrículo e ventrículo, sendo os psitacídeos bastante sensíveis à infecção. Na maioria dos casos, trata-se de uma infecção oportunista, que ocorre em casos de imunossupressão (Godoy, 2007). Acredita-se que não tenha sido a causa primária da morte dos casos deste estudo. A candidíase foi a outra doença fúngica encontrada. Causada por *Candida* spp., normalmente é uma infecção secundária, com lesões localizadas na cavidade orofaríngea e porção superior do esôfago, na maioria dos casos (Lovato e Santos, 2014). Em nosso estudo, foram encontrados nove casos, sempre associados com outras lesões importantes, como nos casos de infecção por herpesvírus de psitacídeos 3 e também avipoxvírus, demonstrando ser uma infecção secundária.

Em 211 casos não foi possível chegar ao diagnóstico devido ao fato de que não havia alterações macroscópicas capazes de levar o indivíduo à morte ou o elevado grau de autólise dos cadáveres impossibilitava a identificação de quaisquer lesões. Esses casos foram denominados indeterminados. A fim de que se possa chegar a um diagnóstico seguro, é fundamental que os materiais para exame sejam conservados de maneira adequada, sob refrigeração, para que não entrem em estado de decomposição, devendo ser encaminhados o mais breve possível para o laboratório. A necropsia deve ser realizada no menor tempo possível desde a morte do animal. Além disso, informações sobre o histórico e sinais clínicos são importantíssimas para auxiliar no diagnóstico (Catão-Dias e Miranda, 2014; Koerich *et al.*, 2009; Quse e Falzoni, 2008). Nos casos estudados, com poucas exceções, essas informações não foram fornecidas.

CONCLUSÕES

A prevalência de casos de enterite, assim como a elevada presença de helmintos reforça a importância do manejo dos animais no que se refere à higiene de comedouros e bebedouros, assim como o preparo e conservação dos alimentos e a qualidade da água, uma vez que são importantes fontes de transmissão de agentes infecciosos e parasitários, causadores de enterites.

É extremamente importante que seja realizado um trabalho de conscientização sobre a importância da coleta imediata do animal nos casos de morte e manutenção em refrigeração, assim como anotar informações sobre o histórico para envio para necropsia, a fim de que se obtenham diagnósticos mais precisos, diminuindo os casos indeterminados.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado ao autor Laurete Murer.

REFERÊNCIAS

BORDIN, E.D. Diagnóstico post-mortem em avicultura. São Paulo: Nobel, 1978. 165p.

CARVALHO, P.P. *Alterações patológicas encontradas em Psitacídeos mortos em cativeiro de janeiro de 1994 a dezembro de 2002 no estado do Paraná*. 2004. 43f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CATÃO-DIAS, J.L.; MIRANDA F. Considerações para a realização e documentação de necropsias. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. cap. 82, p.1565-1576.

CORRÊA, I.M.; FLORES, F.; SCHNEIDERS, G.H. *et al.* Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, n.2, p.241-246, 2013.

GODOY, S.N. Psittaciformes (Arara. Papagaio, Periquito). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens-medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2007. p.222-251.

GRESPLAN, A.; RASO, T.F. Psittaciformes (Araras, Papagaios, Periquitos, Calopsitas e Cacatuas). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. cap. 28, p.550-589.

HARCOURT-BROWN, N.H. Aves psitaciformes. In: TULLY JR., T.N.; DORRESTEIN, G.M.; JONES, A.K. Clínica de Aves. 2. Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap.7, p.122-149.

JEPSON, L. Clínica de animais exóticos: referência rápida. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap.5, p.174.

JONES, A.K. O exame físico. In: TULLY JR., T.N.; DORRESTEIN, G.M.; JONES, A.K. Clínica de Aves. 2. Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.62-63.

KOERICH, P.K.V.; ZUFFO, J.P.; BACK, A. *et al.* Aves: guia de coleta e envio de materiais para o diagnóstico laboratorial. 2. Ed., Xanxerê : News Print Gráfica e Editora Ltda, 2009. 197p.

LOVATO, M.; DOS SANTOS, E.O. Rheiformes (Ema) e Struthioniformes (Avestruz, Ema e Casuar). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. cap.18, p.293.

MARVULO, M.F.V.; DE CARVALHO, V.M. Zoonoses. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. cap.116, p.2194-2206.

MERGULHÃO, M.C.; TRIVELATO, S.L.F. Interação homem-animal – um constante aprendizado para uma relação de respeito. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens-medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2007. cap.2, p.15-18.

MURER, L. *Doenças de Psittaciformes na região central do Rio Grande do Sul*. 2017. 79p. Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

QUSE, V.; FALZONI, E. Patología en fauna silvestre: Manual y atlas. 1. ed. Buenos Aires: Vazquez Mazzini, 2008. 192p.

ROSÁRIO, M.F.; DA SILVA, M.A.N.; COELHO, A.A.D. *et al.* Síndrome ascítica em frangos de corte: uma revisão sobre a fisiologia, avaliação e perspectivas. *Ciência Rural*, v.34, n.6, p.1987-1996, 2004.

SANTOS, G.G.C.; MATUELLA, G.A.; CORAIOLA, A.M. *et al.* Doenças de aves selvagens diagnosticadas na Universidade Federal do Paraná (2003-2007). *Pesq. Vet. Bras.*, v. 28(11), p. 565-570, 2008.

TRIPATHY, D.N.; REED, W.M. Pox. In: SAIF, Y.M. *Diseases of Poultry*. 12. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2008. p.291-307.

4. CAPÍTULO II

Identification and phylogenetic analysis of clade C avipoxvirus in a fowlpox outbreak in exotic Psittaciformes in southern Brazil

(Artigo submetido ao Journal of Veterinary Diagnostic Investigation)

Laurete Murer¹, Moisés Westenhofen, Glaucia D. Kommers, Thales Q. Furian, Karen A. Borges, Hiran C. Kunert-Filho, André F. Streck, Maristela Lovato

Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (Murer, Westenhofen, Lovato); Department of Pathology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (Kommers); Center for Diagnosis and Research in Avian Pathology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (Furian, Borges, Kunert-Filho); Diagnostic in Veterinary Medicine, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil (Streck).

¹Corresponding author: Laurete Murer, Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 44, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900, Brazil. laumurer@hotmail.com

Abstract

Fowlpox is one of the oldest diseases reported in birds. It is caused by a virus that affects approximately 232 domestic and wild species. The aim of this study was to describe historical, clinical, macroscopic, and histopathological lesions caused by a clade C poxvirus in exotic psittacines, as well as to conduct a phylogenetic analysis of this virus. Clinical signs included nodular yellowish lesions at the commissure of the beak and periocular skin, loss of appetite, and death. Fifty birds were necropsied, and fragments of the periocular skin, tongue and trachea were subjected to histopathological examination, which revealed hyperplasia of the epithelial cells associated with intracytoplasmic eosinophilic inclusions bodies. Tracheal fragments and periocular skin were subjected to Nested polymerase chain reaction and phylogenetic analyses. The sequenced strain showed 99.58% identification with the nucleotide sequences of *Avipoxvirus* strains AY53011, KC018069, AM050383, and AM05382 isolated from birds in Germany, United States, and United Kingdom; the strain was grouped under clade C, which represents isolates exclusively from Psittacidae species. This study represents the first report of avipoxvirus infection caused by a clade C strain in *Platycercus* species and *Psephotus haematonotus* in Brazil, and it demonstrates the circulation of this clade in exotic psittacines in southern Brazil.

Key words: avian diseases, psittacine birds, smallpox.

Fowlpox may present as cutaneous, septicemic, or diphtheric forms, depending on its virulence and the susceptibility of the host. The cutaneous form is most frequently observed in psittacines. It is characterized by the appearance of nodules in regions devoid of feathers that form large masses that may obstruct eye sight or the opening of the beak, interfering with the bird's ability to eat and drink. In the diphtheric form, yellowish lesions occur in the mucous membranes of the mouth, esophagus, or trachea, which also interfere with food and

water intake, and breathing. Fowlpox, one of the largest viruses capable of infecting animals, is a member of the *Poxviridae* family and represents one of the 10 recognized species of the genus *Avipoxvirus*¹⁸.

The exact number of existing species, strains, or variants is still undefined⁸. Some avipoxviruses (APVs) exhibit cross-reactive serogroups, and the genome sequences of only two isolates—from chicken and canary—are known^{3, 1}. In addition, new isolates continue to be described for a wide variety of avian species, such as hummingbirds (*Calypte anna*) and ferreirinhas (*Prunella modularis*)^{14,8}.

All poxviruses have a similar morphology, and mature structures are usually oval, large, and enveloped^{3,18}. Viral nucleic acid is formed by a linear double-stranded deoxyribonucleic acid (DNA) molecule ranging from 260 kb to 365 kb with a low content of guanine and cytosine^{1,20}. APV is resistant in the environment, surviving in dry crusts of infected birds for long periods. Susceptible birds could be infected through skin trauma or by inhaling the virus present in feathers and crusts¹⁸. Infections caused by APVs occur mainly during the hottest months of the year, due to the greater number of arthropod vectors, which are considered the main transmitters of the agent⁴.

The Psittaciformes order is one of the main groups affected by APVs³. Most wild birds infected with APVs are moderately affected and rarely die¹⁸. However, they usually exhibit high mortality rates when the mucous membranes of the oral and respiratory cavities are affected⁷. During outbreaks of the disease, 80% to 100% of the canaries in an infected flock can die¹⁸. Cases in wild birds are probably underestimated because of the difficulty in observing them⁷.

Regardless of host and strain diversity, the pathology associated with the virus is the same in domestic and wild birds, although clinical signs vary according to host susceptibility, agent virulence, and types of lesions^{18,20}. Most of the previous studies that evaluated the

pathogenicity of APVs in the last 20 years are based on single isolates from chickens, which makes it difficult to predict the behavior of different strains in various avian species²⁰.

The objective of this study was to describe the first fowlpox outbreak caused by a clade C poxvirus in exotic psittacines from an ornamental bird aviary in southern Brazil.

The outbreak occurred in an ornamental bird breeding program located in the central region of Rio Grande do Sul, southern Brazil. The Psittaciformes were kept in double breeder cages during the reproductive period. They were fed once a day with commercial feed suitable for the period, in addition to a seed mix containing millet (*Panicum miliaceum*) and birdseed (*Phalaris canariensis*). They also received water *ad libitum*.

From September 2016 to January 2017, high mortality of both male and female birds was observed; young animals—up to 90 days old—were primarily affected. With varying susceptibility, birds of all ages and of both genders can be infected by poxviruses¹⁸. The affected birds became lethargic, had bristly feathers, and were dyspneic. Moreover, they presented one or both eyes swollen with nodular lesions on the periocular skin and on the commissure of the beak; they became anorexic, and died at intervals of one to three days. The mortality initiated in the external area of the breeding complex, where there is grass, trees, and free wild birds. Later, birds from the inner area also began to show clinical signs. Australian species, such as *Platycercus* sp. and *Psephotus haematonotus* were the most affected. All cases occurred during the warmest months, when there is a higher mosquito proliferation; mosquitos are the main transmitters of the virus⁴.

Fifty refrigerated dead exotic Psittaciformes were sent to the Central Laboratory of Diagnosis of Avian Pathologies (LCDPA/UFSM) and to the Laboratory of Veterinary Pathology (LPV/UFSM) of the Federal University of Santa Maria in partnership with the Center for Diagnosis and Research in Avian Pathology of the Federal University of Rio Grande do Sul (CDPA/UFRGS). External examination revealed that the majority of birds

presented with yellowish and dry nodular masses located in the periocular region (Figure 1A), at the commissure of the beak (Figure 1B), and on the tongue. In the cutaneous form of fowlpox, nodular proliferative skin lesions that evolve from papules to vesicles, pustules, and crusts are typical and are usually observed in regions of the body without feathers^{4,6}.

The diphtheric form of fowlpox usually results in fibrinonecrotic proliferative lesions in the upper respiratory or digestive tract mucosa⁶. Protruding, yellowish-colored plaques may be observed in the mouth and mucous membranes of the upper respiratory tract, and result in dyspnea, inappetence, and nasal and/or ocular discharge⁴. The characteristics are in accordance with necropsy findings in the study, where the presence of a caseous mass obstructing the trachea was verified (Figure 2A). In addition, the crop, proventricle, and ventricle were empty.

Moreover, birds may show nonspecific systemic signs, such as depression, mild to moderate reduction in egg production, and in weight gain⁴, which would justify the poor nutritional status of necropsied animals.

The presence of macroscopic lesions is usually sufficient to consider APV infection¹⁸. However, other infections may present with similar skin lesions, such as papillomaviruses, mites, and mycotoxins^{18,20}. Similarly, candidiasis, trichomoniasis, and infections related to some strains of infectious laryngotracheitis virus may result in changes similar to the diphtheria-like lesions¹⁵. Thus, histopathological examination and polymerase chain reaction (PCR) were performed to confirm the diagnosis.

Tissue fragments, including the periocular skin, tongue, and trachea, were fixed in 10% formalin and processed routinely for histopathology. Histological sections of 5 µm were stained with hematoxylin and eosin for examination by optical microscopy. Histologically, diffuse and marked hyperplasia of the epithelium with vacuolar degeneration associated with large Bollinger corpuscles in the tongue was observed. Lymphoplasmacytic infiltrate in the

lamina propria around the vessels, characterizing diffuse proliferative and vacuolar glossitis associated with intralesional intracytoplasmic eosinophilic inclusion bodies, was also described (Figure 2B). Similar lesions were observed in nodules of the commissure of the beak and periocular skin, characterizing pronounced diffuse lymphoplasmocytic proliferative dermatitis associated with eosinophilic intracytoplasmic viral inclusion corpuscles.

The histopathological diagnosis of fowlpox in the cutaneous and diphtheric forms was based on the visualization of large, intracytoplasmic and eosinophilic inclusion bodies^{4,6}. In this study, inclusion bodies observed in periocular skin and tongue were typical of APV infections.

Tracheal tissue and skin from the periocular region were collected for molecular diagnosis through PCR. The DNA extraction was carried out using 25 mg of the skin and trachea from 10 individuals showing clinical signs, and the tissues were subjected to proteinase K digestion at 56 °C for 1 hour, according to Protocol 7¹⁶. After precipitation with sodium acetate and isopropanol, the pellet was suspended in 20 µl of ultrapure water. The extracted DNA was stored at -20 °C until PCR analysis. To increase the sensitivity and specificity of the diagnosis, two PCR reactions (nested PCR) were performed.

For detection of APV and subtype differentiation, a specific nested PCR (nPCR) was performed. The first reaction for amplification of a 578-bp fragment of the 4b gene was based on a previously reported method¹³, with adaptations. The second reaction was performed to allow specific type differentiation using the products of the first PCR as templates. The expected product for this second reaction was of 419 bp⁵. The reactions were standardized with 2.5 µl of Buffer 10X (Promega, Madison, WI, United States), 2.5 mM of each triphosphate deoxyribonucleotide (Ludwig Biotec, Alvorada, RS, Brazil), 20 pM of each primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States), 2 U GoTaqHot Start Polymerase[®]

(Promega), 2.5 mM MgCl₂ (Promega), and 2 µL DNA. The sequence of the primers and the thermocycler conditions are described in Table 1.

The amplification reactions were performed using a thermal cycler (Swift MaxPro Thermal Cycler[®], ESCO Technologies, Hatboro, Pennsylvania, USA), and electrophoresis of the amplified products was performed in 1.2% agarose gel stained with ethidium bromide. The amplified product was visualized with an ultraviolet light transilluminator (Pharmacia LKB MacroVue[®], Uppsala, Sweden). Two strains of commercial chickenpox virus vaccines and trachea fragments of Specific Pathogen-Free (SPF) chickens were used, respectively, as positive and negative controls for the reactions. A mixture of all constituents of the PCR mixture, without the addition of extracted DNA, was used as the PCR control. All trachea and skin fragment samples from the periocular region selected for nPCR were positive (Figure 3). Detection of nucleic acids increases the sensitivity and specificity of the diagnosis of viral pathogens, including the poxvirus, when compared with conventional cultures²⁰. The use of nPCR results in the detection of less than one infecting unit, and it increases the specificity of the technique through the use of internal primers⁵.

Positive samples in n-PCR were selected for sequencing by the Sanger Method for determination of the forward and reverse sequences of the amplicon. Each sample was sequenced in triplicate. Initially, the amplicons were purified using the commercial QUIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The DNA was then subjected to agarose gel electrophoresis on a 2% gel, stained with ethidium bromide, and quantified using the molecular weight marker Low DNA Mass TM Ladder as a standard (Invitrogen).

Subsequently, 50 ng of template DNA, 4.5 pmol of the specific oligonucleotide, and ultrapure water were added to a 0.5 mL microcentrifuge tube for a final volume of 6 µL. The samples were sequenced using an automated sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer[®]

(Applied Biosystems, Norwalk, CT, United States) assembled with 50-cm capillaries and the POP6 polymer (Applied Biosystems). The DNA templates (50 ng) were labeled using 2.5 pmol of the forward primer or 2.5 pmol of the primer reverse, and 3 μ L of BigDye Terminator reagent v. 3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems[®]), for a final volume of 10 μ L. The sequence quality was analyzed based on the electropherograms generated and the contigs built by the Seqman Pro program in the DNASTar Lasergene[®] package (available at <http://www.dnastar.com/t-seqmanpro.aspx>). Multiple alignments of the data were performed by the ClustalW method, with sequences from different strains available from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method. The model Tamura 3-parameter¹⁷ was selected for testing the different models for the dataset. The initial tree (s) for the heuristic search was obtained automatically by applying Neighbor-Join (NJ) and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the maximum composite likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with upper log likelihood value. A discrete gamma distribution was used to model differences in evolutionary rates among sites (5 categories [+ G, parameter = 0.4504]). The analysis involved 231 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st + 2nd + 3rd + noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 460 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in Molecular Evolutionary Genetics Analysis[®] (MEGA), version 7¹².

The avian isolates from the clinical case skin fragments (sequence 1) and trachea (sequence 2) were clustered in clade C, as previously described (Figure 4). Vaccine samples (sequences 3 and 4) were clustered in clade A, as expected⁸. Results were as follows:

Cluster A: AB576861, AM050376, AM050377, AM050378, AM050379, AM050380, AM050385, AM050388, AM050392, AY530302, AY530303, AY530305, AY530306, DQ131892, DQ873808, DQ873809, DQ873811, EF016108, EF568397, EF568398, EU798994, FR852585, FR852586, GQ180201, GQ180204, GQ180207, GU108500, GU108501, GU108503, GU108504, GU108505, GU108506, GU108507, GU108509, HM481402, HM481404, HM481406, HM481407, HM481408, HM481409, HQ441566, JN615018, JQ665838, JQ665840, JX418296, JX464819, KC017960, KC017961, KC017963, KC017964, KC017965, KC017966, KC017967, KC017968, KC017970, KC017971, KC017972, KC017973, KC017974, KC017975, KC017976, KC017977, KC017978, KC017979, KC017980, KC017981, KC017982, KC017983, KC017984, KC017985, KC017986, KC017988, KC017989, KC017990, KC017991, KC017992, KC017993, KC017994, KC017996, KC017997, KC017998, KC017999, KC018002, KC018003, KC018004, KC018005, KC018006, KC018007, KC018008, KC018009, KC018010, KC018013, KC588962, KC693506, KF722858, KF722860, KF722862, KF722863, KF722864, KF722865, KF956000, KF956002, KF956003, KJ192189, KJ913659, KM396388, KM396389, KM396390, KM974727, KP987207, KP987208, KP987209, KP987210, KP987211, KP987212, KP987213, KP987214, KR733092, KT003288, KT003289, KT003290, KU212807, KU522209, KU522210, LN795891, sequence 3 and sequence 4; Cluster B: AM050389, AY530308, AY530309, AY530310, EF568378, EF568379, EF568381, EF568382, EF568383, EF568385, EF568390, EF568393, EF568395, EF568396, EF568401, EU798995, FJ863095, FJ863096, GQ180211, GQ487567, HM627228, HM627229, HM627231, HM627232, HQ875130, KC018014, KC018015, KC018016, KC018018, KC018019, KC018021, KC018023, KC018027, KC018029, KC018033, KC018034, KC018036, KC018037, KC018038, KC018039, KC018040, KC018041, KC018042, KC018043, KC018044, KC018045, KC018047, KC018048, KC018050, KC018051, KC018052, KC018053, KC018056, KC018058, KC018059, KC018060, KC018061, KC018062, KC588955, KC588956, KC588958, KC588959, KC588960, KF516679, KF673397, KF956001, KT003286, LC055558, LC055559, LC055560, LC055561, LC055562, LC055563, LN795885, LN795886, LN795888, LN795889

The PCR amplicon sequencing process allows for a rapid search for homologous sequences to identify the virus and to evaluate the phylogenetic relationships between host specificity and virulence of the isolate²⁰. However, the phylogenetic study of APVs is still limited^{20,8}. This lack of information is likely due to the difficulty in identifying genus markers or species-specific primers that can be used to amplify different genes²⁰. Only two complete genomes of chicken and canary strains have been sequenced¹, representing only 70% of sequence identity⁸.

The locus commonly selected for detection through PCR¹³ and for analysis of the genetic relationship of APV¹⁴ is the region of the genome that encodes the 4b virion core protein. Other genome core genes may also be combined to provide a more robust phylogenetic analysis for APV classification⁸.

Phylogenetic studies based on this locus indicate that most of the isolates analyzed to date are clustered closely with the previously sequenced strains of chicken in clade A or canary in clade B¹⁹. However, some isolates may be located in a third group of psittacids in

clade C^{9,8}. Phylogenetic characterization of APV from turkeys in Brazil was recently achieved¹¹. The isolates were classified in subclass 1 of clade A, which comprises strains of the Galliformes, with a wide geographic distribution. Clade C consists exclusively of isolates from Psittacidae species. It is still unclear whether this clade is considered a separate group or if it is remotely related to clade B⁸.

This study is the first report of an infection caused by a strain of clade C in these bird species in Brazil. Sequenced samples showed 99.58% identity with nucleotide sequences of strains AY53011, KC018069, AM050383 and AM05382, available in Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). These strains were respectively isolated from the genus *Agapornis* species in Germany, *Amazona ochrocephala* in the United States, and *Amazona* species and parrots in the United Kingdom^{9,8}. Small difference among the sequences recovered in this clinical case and those isolated in Europe and in the United States may be related to the high conservation of APV DNA¹¹. In addition, extensive adaptation to different species in distinct geographic regions highlights the potential result of anthropogenic action that allows unnatural contact between species, both in zoos and in the wild⁸.

In general, APV presents specificity according to the host family or order. However, ecological niches, habitat, and geographic distribution may modulate this pattern⁸. Among the approximately 9,000 bird species described, the natural poxvirus infection has been reported in 232 bird species belonging to 23 distinct orders³. Although the phylogenetic distribution of hosts demonstrates a clustering congruency according to the viral clade, strains of distinct clades can be isolated from strongly related hosts. Circulation among closely related hosts and breeders with different bird species, as described in this case, provide a natural interface for viral exchange and coinfection⁸. Thus, birds can be carriers of the virus among local populations and among migratory routes used by different species⁷. The increased number of

serious cases observed by our group in recent years, in addition to the involvement of a new bird species, suggests that fowlpox is an emerging viral disease in southern Brazil.

The macroscopic and histological features, combined with molecular characterization, allow diagnosis confirmation of fowlpox caused by a clade C avian poxvirus, not reported until now in these species in Brazil. Future studies with a greater number of samples, including from free-living birds from the same region, are necessary to confirm the circulation of this specific fowlpox virus strain and to evaluate the pathogenic potential among other species of birds of the region.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This work was supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) through a doctoral fellowship to the author Laurete Murer.

References

1. Afonso CL, et al. The genome of fowlpox virus. *J Virol* 2000;74:3815-3831.
2. Binns MM, et al. Analysis of the Fowlpox virus gene encoding the 4b core polypeptide and demonstration that it possesses efficient promoter sequences. *Virology* 1989;170:288-291.
3. Bolte AL, et al. Avian host spectrum of avipoxviruses. *Avian Pathol* 1999;48:415-432.

4. Canal CW, Diel DG. Poxviridae. In: Flores EF, ed. *Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas*. 3rd ed. Santa Maria, Brasil: Ed. da UFSM, 2017:585-620.
5. Fallavena LC, et al. Presence of avipoxvirus DNA in avian dermal squamous cell carcinoma. *Avian Pathol* 2002;31:241-246.
6. Fletcher OJ, Abdul-Aziz T. Integumentary System. In: Fletcher OJ, Abdul-Aziz T, eds. *Avian Histopathology*. 3rd ed. Jacksonville: American Association of Avian Pathologists, 2008:392-408.
7. Friend M, Franson JC. Avian Pox. In: Friend M, Franson JC, eds. *Field Manual of Wildlife Diseases*, ed. Cidade: Editora, 1999:163-170.
8. Gyuranecz M, et al. Worldwide phylogenetic relationship of avian poxviruses. *J Virol* 2013;87:4938-4951.
9. Jarmin S, et al. Avipoxvirus phylogenetics: identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. *J Gen Virol* 2006;87:2191-2201.
10. Jarvi SI, et al. Diversity, origins, and virulence of avipoxviruses in Hawaiian forest birds. *Conserv Gen* 2008;9:339-348.
11. Kunert-Filho HC, et al. First phylogenetic analysis of Avipoxvirus (APV) in Brazil. *Pesq Vet Bras* 2016;36:357-362.
12. Kumar S, et al. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870-1874.
13. Lee LH, Lee KH. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *J Virol Methods* 1997;63:113-119.
14. Manarolla G, et al. Molecular biological characterization of avian poxvirus strains isolated from different avian species. *Vet Microbiol* 2010;140:1-8.

15. Riper CV, Forrester DJ. Avian pox. In: Thomas NJ et al., eds. Infectious diseases of wild birds. Ames: Blackwell Publishing, 2007:131-176.
16. Sambrook JF, Russel DW. Rapid isolation of yeast DNA, Protocol 7. In: Sambrook JF, Russel DW, ed. Molecular Cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Vol. 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001:631-632.
17. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol Biol Evol* 1992;9:678-687.
18. Tripathy DN, Reed WM. Pox. In: Saif YM, ed. Diseases of Poultry. 12th ed. Ames: Blackwell Publishing, 2008:291-307.
19. Weli SC, et al. Analysis and comparison of the 4b core protein gene of avipoxviruses from wild birds: evidence for interspecies spatial phylogenetic variation. *Arch Virol* 2004;149:2035-2046.
20. Weli SC, Tryland M. Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors. *Virol J* 2011;8:1-15.

Table 1. Sequence and reference of selected primers, size of amplicons, and thermocycler conditions for polymerase chain reaction reactions 1 and 2.

| Reaction | Primer sequence (5' - 3') | Primer reference | Amplicon (pb) | Number of cycles | Thermocycler conditions |
|----------|---------------------------|-------------------------|---------------|------------------|-------------------------|
| 1 | CAGCAGGTGCTAAACAACAA | Binns et al. (1989) | 578 | 35 | 94 °C, 30 s |
| | CGGTAGCTTAACGCCGAATA | | | | 60 °C, 60 s |
| 2 | ACGACCTATGCGTCTTC | Fallavena et al. (2002) | 419 | 35 | 72 °C, 60 s |
| | ACGCTTGATATCTGGATG | | | | 94 °C, 30 s |

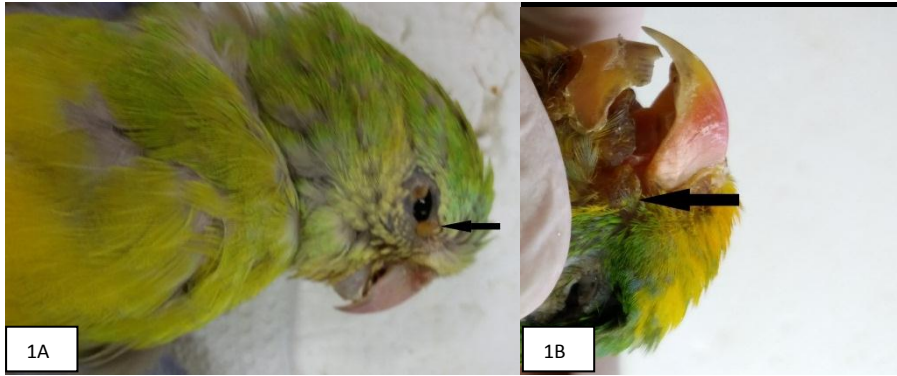


Figure 1. Nodular lesions in the periocular region (A) and in the commissure of the beak (B) of Psittaciformes, suggestive of cutaneous form of fowlpox.

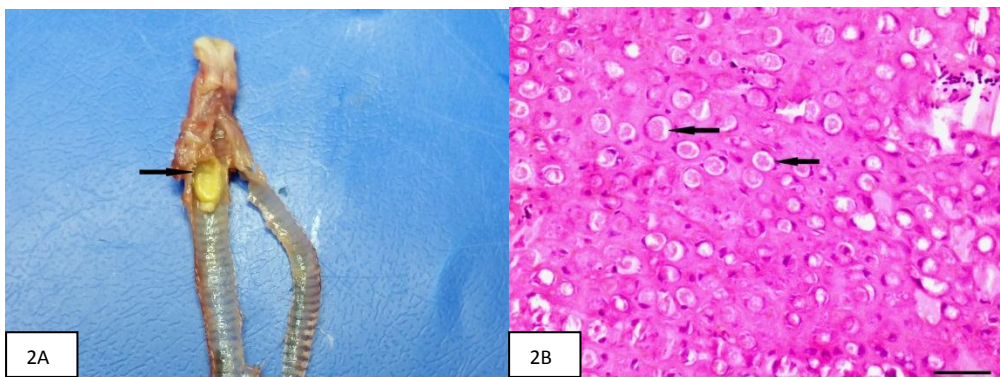


Figure 2. Caseous mass obstructing trachea, indicative of diphtheric form of fowlpox (A) and marked epithelial hyperplasia with the presence of Bollinger corpuscles (arrows) in Psittaciformes tongue. Hematoxylin and eosin stain; magnification, $\times 40$ (B).

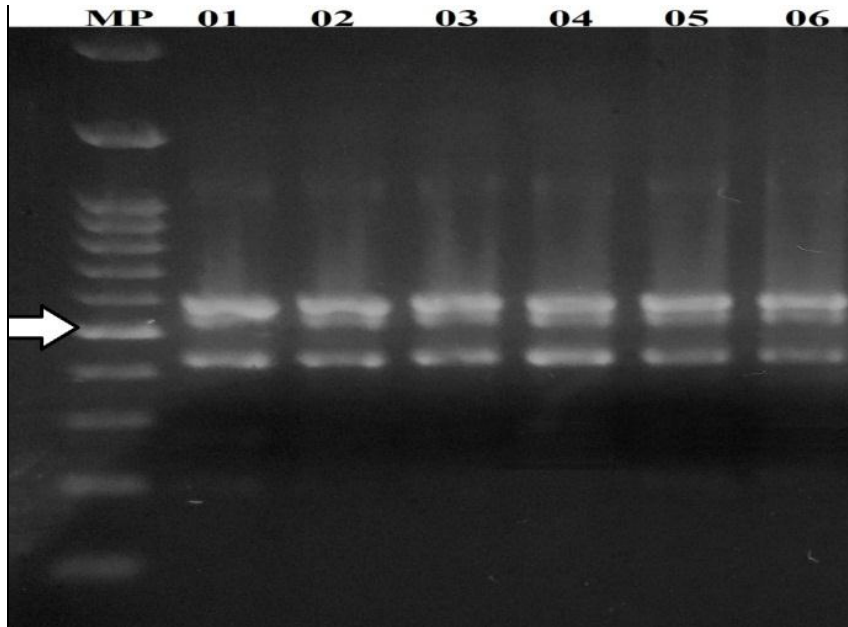


Figure 3. Electrophoresis in 1.2% agarose gel stained with ethidium bromide with the amplification products compatible with the 4b gene: amplicon of reaction 1 (578 bp); amplicon of reaction 2 (419 bp). MP = molecular weight marker (100 bp); 01 and 02 = Psittaciformes tracheal samples; 03 and 04 = Psittaciformes skin fragment samples; 05 and 06 = vaccines for fowlpox. The arrow indicates a 500-bp fragment.

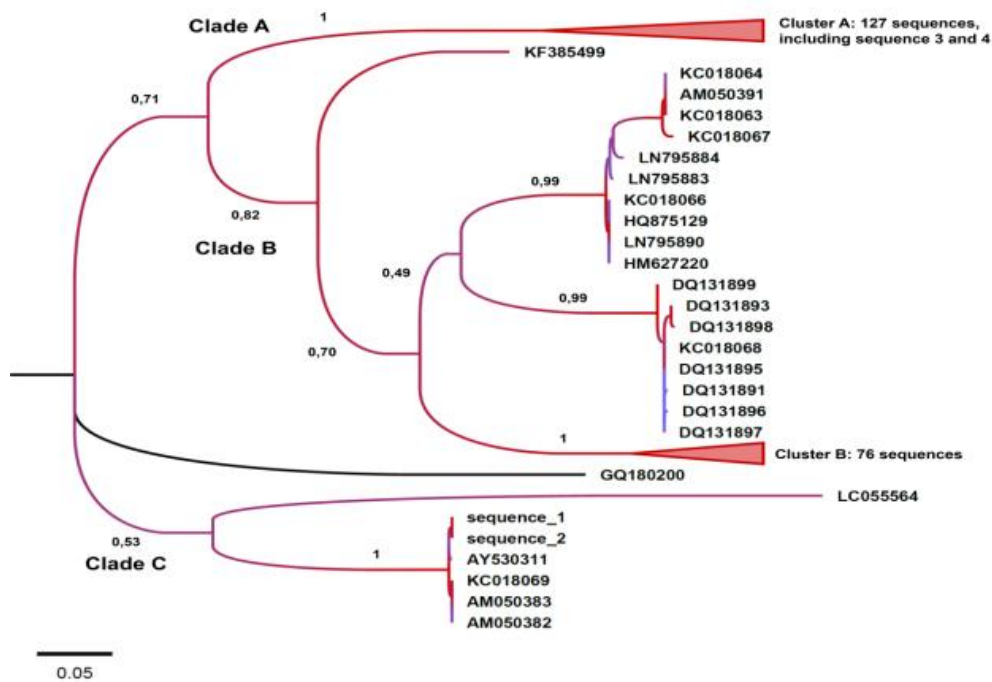


Figure 4. Maximum likelihood phylogeny generated from the cytochrome b sequences from GenBank. Avipoxvirus clades A to C, subclades, and clusters are labeled according to the nomenclature described previously^{9,10}. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The confidence was measured using the bootstrap method inferred from 1000 replicates, and it is displayed with a color gradient (1 = red; 0 = blue). Similar sequences were condensed in cluster A and cluster B.

5. CAPÍTULO III

Psittacid Herpesvirus 3 infection in rose-ringed parakeets (*Psittacula krameri*) in Southern Brazil

(Artigo a ser submetido ao Journal of Veterinary Diagnostic Investigation)

Laurete Murer¹, Marília Baialardi Ribeiro, Glaucia Denise Kommers, Mauro Pereira Soares, Juliana Felipetto Cargnelutti, Eduardo Furtado Flores, Maristela Lovato

Wild Animals Studies and Research Center (NEPAS), Department of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (Murer, Ribeiro, Lovato); Department of Pathology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (Kommers); Regional Diagnostic Laboratory, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil (Soares); Virology Section, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (Cargnelutti, Flores).

¹Corresponding author: Laurete Murer, Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 44, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900, Brazil. laumurer@hotmail.com

Abstract

The present article describes natural cases of infection by *Psittacid Herpesvirus 3* (PsHV-3), a novel psittacid pathogen, in rose-ringed parakeets (*Psittacula krameri*) from a breeder of ornamental birds in Southern Brazil. The disease affected several adult birds, from which four were submitted to necropsy. The clinical signs included apathy, tachypnea and respiratory wheezing. Tissue fragments were collected for histopathological examination and electron microscopy (EM). Total DNA extracted from paraffinized tissues was submitted to a PCR with pan-herpesvirus primers, followed by nucleotide sequencing of the amplicon. Pulmonary congestion, bronchopneumonia or multifocal necrotizing parabronchitis associated with syncytial cells and eosinophilic intranuclear inclusion bodies were observed in the lungs of the dead birds. Viral particles morphologically compatible with herpesviruses were observed by the EM in lung sections of affected animals. PCR with pan-herpesvirus primers performed in total DNA extracted from paraffinized tissue resulted in a 270 bp product. Nucleotide sequencing of the amplicon revealed a 93% nt identity with a PsHV-3 sequence available in Genbank. Phylogenetic analysis grouped the obtained sequence with the only PsHV-3 DNA polymerase gene sequence available (Genbank access: JX028240) and separated from the *Psittacid Herpesvirus* types 1 and 2. Thus, the clinical, pathological and molecular findings indicate the association of PsHV-3 with the disease reported in rose-ringed parakeets in Southern Brazil.

Key words: viruses, PsHV-3, avian diseases, respiratory disease, ringneck

The rose-ringed parakeet (*Psittacula krameri*), also known as ringneck, belongs to the *Psittacidae* family. The ringneck parakeet is vulnerable to several infectious diseases, including those associated with herpesviruses, which are important pathogens of domestic

birds². To date, three herpesviruses have been identified among birds of the *Psittacidae*: psittacid herpesvirus types 1, 2 and 3 (PsHV-1, 2 e 3)^{6,9} from which only PsHV-1 has been officially recognized as a viral species. These viruses belong to the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae* and genus *Iltovirus*⁴. PsHV-3 was first detected in an outbreak of respiratory disease in Bourke's parrots (*Neopsephotus bourkii*) in the United States⁶ and, subsequently, detected only in one occasion, in eclectus parrots (*Eclectus roratus*) in Australia².

The present report describes the clinical signs and pathological findings of an outbreak of respiratory disease in rose-ringed parakeets in Rio Grande do Sul (RS), Brazil, from which herpesvirus particles were visualized by EM and DNA sequences highly indicative of PsHV-3 were detected in tissues of affected animals.

In an exotic ornamental birds' breeding facility, located in Rio Grande do Sul, Southern Brazil, nearly 40 birds of the *Psittacidae* family lived in a group enclosure of approximately 25m³. In this facility, several *Psittacula krameri* (the rose-ringed parakeet) deaths were observed during four weeks. The exact number was not provided by the owner.

Between August and September 2013, an adult female (case 1), a young male (case 2) and two adult males (cases 3 and 4) were found dead. The owner had noticed that a few days before the deaths, the female was walking on the ground, being chased by the other birds. One of the adult males showed depressed behavior, tachypnea and respiratory wheezing. The four deceased birds were sent to necropsy, in which was observed poor (cases 1 and 2) to regular (cases 3 and 4) nutritional status, brittle feathers, dirty tails, and feces around the cloaca of all birds. Macroscopically, pulmonary congestion was observed in cases 1, 2 and 3, in addition to lesions compatible with pneumonia, such as yellow and firm nodules (case 2) or little grey nodules (case 3), or light yellow multifocal lesions spread over the pulmonary parenchyma (case 4) (Fig. 1). The liver presented with dark aspect with light areas and rounded edges.

The spleen, pancreas, proventriculus and ventriculus were pale. The crop's wall of the fourth bird was very thick and whitish. The intestines of all birds had congested vessels and hemorrhagic content.

Fragments of lungs and liver of all birds, and the crop and spleen of one animal (case 4) were fixed in 10% formalin for histopathological examination. In the lungs of all four birds, eosinophilic intranuclear inclusion bodies were observed in respiratory epithelial cells (Fig. 2A), usually occupying the nucleus or surrounded by a light halo. Some inclusion bodies were slightly basophilic. The microscopic changes associated with the presence of viral inclusions in the lungs and other organs are summarized in Table 1.

In the lung of case 3, there were extensive areas of severe necrosis, some with degenerate heterophils clustered in the center or randomly spread. Mainly in these areas, there were numerous basophilic fungal hyphae measuring about 3 μm diameter, with walls mostly parallel, septated and dichotomically branched (in acute angles), morphologically compatible with *Aspergillus* sp. A lung fragment was submitted to the Mycological Research Laboratory/UFSM, where samples were cultured in a Sabouraud agar at 30°C for 5 days, confirming the growth of *Aspergillus fumigatus*.

Gram stain in impression smears made from the crop of case 4 were performed, and yeast structures compatible with *Candida* sp. were identified. In the histopathological examination of the crop, it was possible to observe epithelial hyperplasia with accentuated hyperkeratosis, in the midst of which there were several fungal yeast organisms (about 1 to 3 μm) or basophilic pseudohyphae, morphologically compatible with *Candida* sp.

Lung samples were submitted to EM examination revealing the presence of viral particles measuring about 145 nm of diameter in inclusion bodies in the nuclei of syncytial cells (Fig. 2B), morphologically compatible with herpesvirus particles. Thus, the

identification of herpesvirus-like virions in the lungs of affected animals suggested the association of a herpesvirus with the development of the lesions.

Subsequently, for the identification of the viral agent associated with the lesions, total DNA extracted from paraffinized lungs was submitted to a pan-herpesvirus PCR. Total DNA extraction was performed using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen®, Hilden, Germany). Next, the DNA was submitted to PCR using pan-herpesvirus degenerate oligonucleotide primers (viral polymerase DNA gene) and specific for PsHV-3, according to the method described previously^{7,12}. The amplicon was submitted to nucleotide sequencing by the Sanger method, using BigDye dye, and the consensus sequence was obtained from de Staden program⁸. The identity of the consensus sequence with the samples deposited in Genbank was verified by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

The sample V973-13 was positive in PCR using pan-herpesvirus oligonucleotide primers, resulting in a 270bp amplicon. Nucleotide sequencing revealed an identity of 93% with a PsHV-3 strain sequence deposited in Genbank (access: JX028240). The identity was significantly lower comparing with other herpesvirus (74% identity with *Passerid herpesvirus 1*, AF520812). Unfortunately, considering the lack of PsHV-3 sequences in Genbank, molecular analysis and nucleotide identity analysis were possible in only 20% of the sequence of the obtained product.

The obtained sequence was aligned with sequences of the DNA polymerase gene from several avian herpesvirus available in Genbank. The alignment was used to build a phylogenetic tree in MEGA 5.0 software¹⁰, using the Neighbor-Joining method with 1000 bootstrap replicates (Fig. 3).

For decades, an atypical herpesvirus was reported infecting mainly the trachea of psittacids in the United States and Europe. The first isolation and identification of PsHV-3 by

PCR was reported in specimens collected from Bourke's parrots (*Neopsephotus bourkii*) in the United States⁶.

The geographic distribution of PsHV-3 infection is probably broader than what it has been described to date. A number of reports of psittacids showing macroscopic and microscopic lesions compatible with this infection has been published, yet most were published before of the PsHV-3 gene segment sequencing^{2,6}. Thus, these cases might have been incorrectly diagnosed. The occurrence of a "respiratory herpesvirus" - until so far unknown - was reported in ringnecks through macroscopic and microscopic evidence in birds imported from Australia to the United States⁵, and in 14 ringnecks in Japan, brought from India¹¹. Lung lesions similar to those observed in these cases have been described and associated with a "parakeet respiratory herpesvirus"⁵.

The clinical signs of the infection include anorexia, depression, weight loss, ruffled feathers and breathing difficulties. The macroscopic lesions observed in necropsy are moderate congestion and edema in the lungs and slightly fibrinous exudate in air sacs and in tracheal lumen. Histologically, necrosis of the respiratory epithelium, bronchopneumonia in several severity levels and air sacs inflammation with syncytial cells containing eosinophilic viral inclusion bodies were observed⁶. These alterations were similar to those found in birds analyzed in this work.

The bronchopneumonia and necrotizing peribronchitis observed in the birds of this study were associated with the presence of syncytial cells, most containing intranuclear eosinophilic viral inclusion bodies, which are characteristic of many herpesvirus infections². The herpesvirus virions contain envelope and capsid; their diameter can vary between 120 and 300 nm¹. In this study, lung samples of the birds submitted to necropsy examined by EM presented viral particles of morphology and size compatible with herpesviruses.

The 270 bp product obtained in the pan herpesvirus PCR was submitted to nucleotide sequencing and resulted in a consensus sequence that showed high homology with a sequence of PsHV-3 deposited in Genbank. Unfortunately, only 20% of the obtained sequence was analyzed by BLAST. The complete coverage of this sequence was not possible due to the low number of PsHV-3 sequences deposited in Genbank. In addition, there is no available sequences of PsHV-3 including the region amplified by our PCR. Negative amplification in some samples may be related to the degradation of genetic material due to long time fixation and /or paraffinization.

Phylogenetic analysis performed with the alignment of different herpesvirus sequences revealed that the sequence obtained from sample grouped with the only sequence of PsHV-3 DNA polymerase gene available at Genbank (JX028240), and remained in different branches of the other psittacid herpesvirus, suggesting that the amplified sample belong to this new species of herpesvirus.

Other infectious agents were also investigated in the birds of the breeding. The virus that causes the beak and feather disease (PsCV) was diagnosed in some healthy psittacids living in the same enclosure that the examined birds. Unfortunately, the presence of PsCV was not investigated in clinical specimens of deceased birds. In addition, secondary fungal infection (aspergillosis and candidiasis) have also been described in birds with respiratory disease caused by herpesviruses².

The clinical and pathological findings, associated with EM and molecular diagnosis indicate the involvement of a herpesvirus, likely PsHV-3, in the described outbreak. To our knowledge, this is the first report of this agent in Brazil. These findings reinforce the importance of adequate sanitary control before the introduction of new birds in a breeding facility, as to avoid the spreading of pathogenic agents. Our findings also call attention for the circulation of this agent among Brazilian birds.

Declaration of Conflicting Interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This work was supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) through a doctoral fellowship to the author Laurete Murer.

References

1. Franco AC, et al. Herpesviridae. In: Flores EF (Org) Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas. 3rd ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2017: 517-533.
2. Gabor M, et al. Psittacid Herpesvirus 3 Infection in the Eclectus Parrot (*Eclectus roratus*) in Australia. Veterinary Pathology Online 2013. Available at: <http://vet.sagepub.com/content/early/2013/05/22/0300985813490753>. Accessed in 23 feb 2016.
3. Harcourt-Brown NH. Aves psitaciformes. In: Tully Jr. TN, et al. Clínica de Aves. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2010:122-149.
4. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2016. Available at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Accessed in 17 oct 2017.
5. Lazic T, et al. Respiratory herpesvirus infection in two Indian Ringneck parakeets. J. Vet. Diagn. Invest. 2008;20:235-238.
6. Shivaprasad HL, Phalen DN. A novel herpesvirus associated with respiratory disease in Bourke's parrots (*Neopsephotus bourkii*). Avian Pathology. 2012; 41:531–539.

7. Shivaprasad HL et al. Identification of a novel herpesvirus from Bourke's parrots (*Neopsephotus bourkii*). Avian Pathology In Press, 2012.
8. Staden, R. The Staden sequence analysis package. Molecular Biotechnology. 1996;5:233–241.
9. Styles DK et al. A novel psittacid herpesvirus found in African grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*). Avian Pathology. 2005;34:150–154.
10. Tamura K et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetic Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution. 2011;28:2731-2739.
11. Tsai SS et al. Herpesvirus infections in psittacine birds in Japan. Avian Pathology. 1993;22:141–156.
12. Vandevanter DR et al. Detection and analysis of diverse herpes-viral species by consensus primer PCR. Journal of Clinical Microbiology. 1996;34:1666-1671.

Table 1 - Histopathological findings associated with PsHV-3 infection in rose-ringed parakeets (*Psittacula krameri*).

| Bird number | Lungs | Other organs |
|--------------------|--|---|
| 1 | Mild necrosis of the parabronchi epithelium with inclusion bodies in individual epithelial cells and/or in multinucleated syncytial cells. Inclusion bodies in epithelial cells in the alveolar capillaries where there were also few heterophils. | Liver - hepatocytes nuclei with marginalized chromatin and containing eosinophilic inclusion bodies surrounded by a light halo. |
| 2 | Necrosis of the covering epithelium of secondary bronchi and parabronchi (sometimes more accentuated). There were inclusion bodies in the epithelial cells of secondary bronchi and parabronchi walls, which were observed in a great number of multinucleated syncytial cells in the walls of bronchi, parabronchi and alveolar capillaries. | No alterations. |
| 3 | Inclusion bodies in multinucleated syncytial cells of secondary bronchi and parabronchi (some with epithelium necrosis). | Air sacs - inclusion bodies in epithelial segments of air sacs next to the lung. |
| 4 | Multifocal accentuated necrosis of the covering epithelium of parabronchi. Epithelial cells of parabronchi walls with numerous inclusion bodies, mainly in multinucleated syncytial cells in the walls of bronchi, parabronchi and in alveolar capillaries (also in individual epithelial cells). Fibrin in the parabronchi, accentuated congestion and multifocal hemorrhage in the lung parenchyma, and inflammatory cell infiltrate (mainly perivascular lymphocytic infiltrate). | Spleen - mild necrotic areas with fibrin deposition. Cells with eosinophilic inclusion bodies were adjacent to these areas. |



Figure 1. Rose-ringed parakeet (*Psittacula krameri*), male, adult. Lungs with light yellow multifocal lesions compatible with pneumonia (case 4).

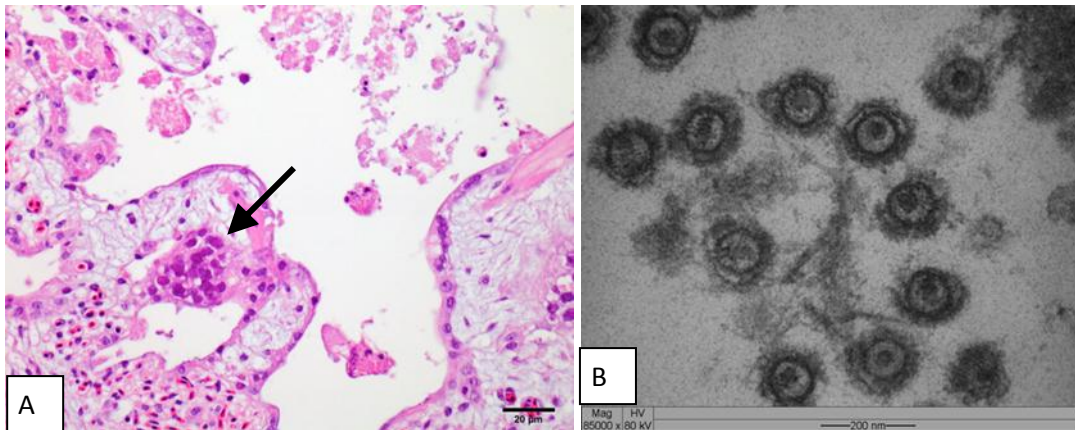


Figure 2. Lung, rose-ringed parakeet, in A - Accentuated necrotising bronchopneumonia associated to syncytial cells containing eosinophilic intranuclear inclusion bodies (arrow), hematoxylin and eosin stain, obj. 40x and in B - viral structures in the nucleus of a syncytial cell measuring about 145 nm diameter and showing core, capsid and envelope.

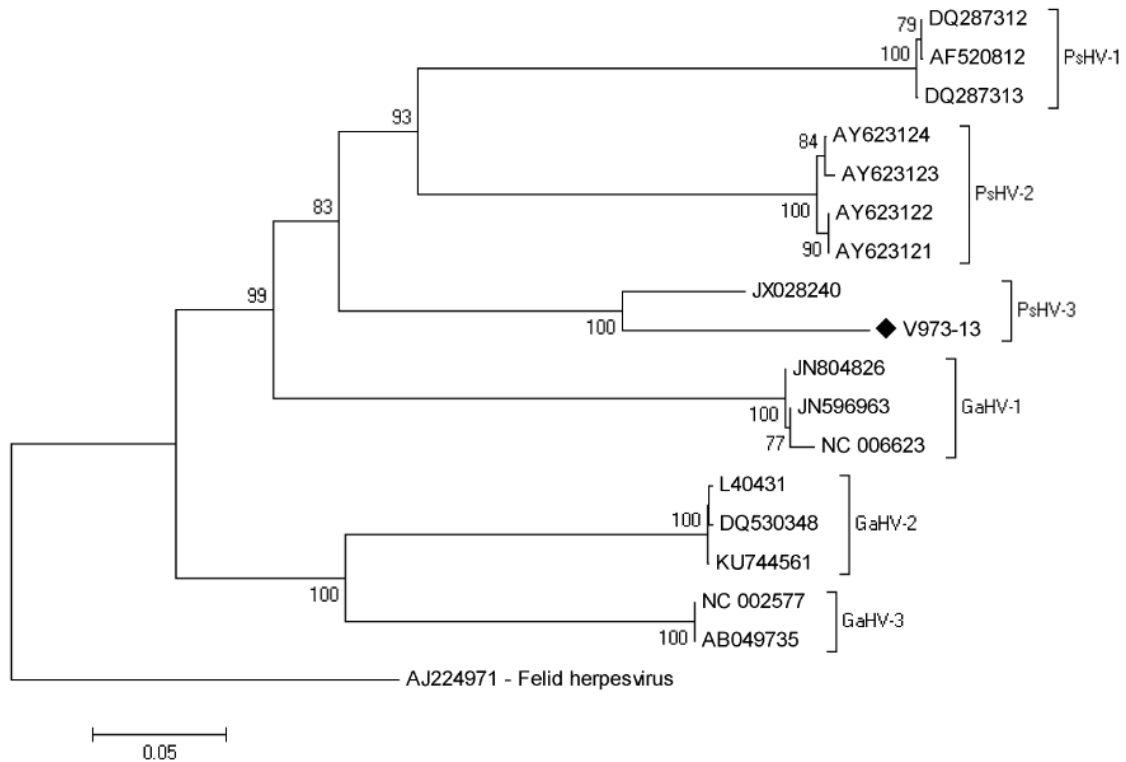


Figure 3. Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of DNA polymerase gene of avian herpesviruses. The outgroup was composed by the respective gene of *Felid Herpesvirus* (AJ224971). The tree was constructed using the Neighbour-Joining method with 1,000 bootstrap replicates based on p-distance model and implemented by MEGA 5.0. Values >60% are shown. The *Psittacid Herpesvirus 3* sequence of the present report is identified with a black diamond.

6. CAPÍTULO IV

Investigação de *Salmonella* spp. em Psittaciformes exóticos e nativos mantidos em cativeiro na região central do Rio Grande do Sul

Investigation of *Salmonella* spp. in exotic and native Psittaciformes kept in captivity in the central region of Rio Grande do Sul

(Artigo aceito para publicação no Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia em 22 de junho de 2017)

Laurete Murer^{1*}, Simone Rosa Didoné¹, Ana Beatriz Benevides de Freitas¹, Maristela Lovato¹
¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900. Telefone: (55) 3220-8072. E-mail: laumurer@hotmail.com *Autor para correspondência.

RESUMO

As doenças infecciosas são reconhecidamente causadoras de declínios populacionais de animais silvestres e algumas delas podem representar ameaça à saúde pública. O presente estudo objetivou investigar a ocorrência de *Salmonella* spp. em Psittaciformes exóticos e nativos mantidos em cativeiro na região central do Rio Grande do Sul, além de comparar os resultados obtidos através do método bacteriológico convencional e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando material fecal do ambiente, evitando o stress da contenção. Durante os meses de agosto/2016 e setembro/2016 foram coletadas amostras de fezes frescas de 90 gaiolas em dois criatórios, representando 180 aves. Com as duas técnicas empregadas nas análises, as amostras foram negativas para *Salmonella* spp., contudo foram detectadas bactérias da família *Enterobacteriaceae*: *Escherichia coli*, *Cedecea* sp. e *Citrobacter freundii*. Considera-se importante a continuidade do monitoramento dos criatórios já que o patógeno investigado pode estar em aves portadoras e se manifestar em situações de stress, representando riscos enquanto zoonose e prejuízos à saúde das aves.

Palavras-chave: Psitacídeos, aves silvestres, patógenos intestinais, *Enterobacteriaceae*, zoonoses

ABSTRACT

Infectious diseases are known to cause decline in wildlife population and some of them may represent a threat to public health. This study aimed to investigate the occurrence of *Salmonella* spp. in exotic and native Psittaciformes kept in captivity in the central region of Rio Grande do Sul, Brazil, and to comparing the results obtained through the conventional bacteriological method and the Polymerase Chain Reaction (PCR), using fecal matter collected from the environment, avoiding the containment stress. From August to September, 2016, samples of fresh feces were collected from 90 cages in two breeding grounds, representing 180 birds. According to both analysis techniques the samples were negative for *Salmonella* spp., however, bacteria from the *Enterobacteriaceae* family: *Escherichia coli*, *Cedecea* sp. and *Citrobacter freundii* were detected. It is important the continue monitoring the breeding grounds since the pathogen investigated can be found in carrier birds and manifest itself in stressful situations presenting risks such as zoonosis and affecting the birds' health.

Keywords: Psittacine birds, wild birds, intestinal pathogens, *Enterobacteriaceae*, zoonosis

INTRODUÇÃO

Os psitacídeos são aves da ordem Psittaciformes que se caracterizam por apresentarem bico superior curvo e bem desenvolvido e pés preênseis, zigodáctilos, possuindo os dígitos I e IV direcionados caudalmente e os dígitos II e III, cranialmente. Têm ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde áreas tropicais até regiões frias. O Brasil é considerado o país mais rico em variedade de psitacídeos, com 80 espécies descritas, do total de 100 na América do Sul. Das 332 espécies relatadas, 148 ocorrem no Novo Mundo e 184 no Velho Mundo. A perda e alteração de *habitat*, bem como o tráfico de fauna silvestre colocaram muitas destas aves em risco de extinção. A beleza de suas cores, sua inteligência, o potencial para serem treinados e a capacidade de imitar a voz humana faz com que sejam muito procurados como animais de estimação (Godoy, 2007; Harcourt-Brown, 2010). Através de portarias específicas, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) normatizou a criação e comercialização de espécies silvestres nativas e assim é possível adquirir animais da nossa fauna de maneira lícita (Allgayer e Cziulik, 2007).

Os papagaios são psitacídeos robustos, de cauda curta e bico grande, enquanto as araras variam de tamanho entre 30 cm da maracanã-pequena (*Ara nobilis*) até arara-azul (*A. hyacinthinus*) com 100 cm, possuindo bico grande e cauda longa (Harcourt-Brown, 2010). O papagaio charão, *Amazona pretrei*, vive nas matas de araucária do Rio Grande do Sul (Sigrist, 2009), ameaçado pela captura de filhotes e perda de habitat, consta nas Listas das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção–2014 na categoria vulnerável (VU) (ICMBio, 2014). O Papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) habita áreas semi-abertas no Brasil Central, no Nordeste e em parte do Sudeste e a Arara Canindé (*Ara ararauna*) é encontrada em florestas e matas desde a Amazônia até o Brasil centro-meridional (Sigrist, 2009). O termo “periquito” é usado para pequenos papagaios de cauda longa e graduada, distribuídos em sua maioria pelo Pacífico e Ásia (Harcourt-Brown, 2010).

As enterites bacterianas, comuns em psitacídeos, são atribuídas a alterações do microambiente intestinal e diminuição da resposta imune (Lopes *et al.*, 2016). Entre as bactérias que causam doenças nos psitacídeos, as Gram negativas são as mais patogênicas (Godoy, 2007) e entre elas está a família *Enterobacteriaceae*, formada por bacilos com mais de 28 gêneros e de 80 espécies (Quinn *et al.*, 2005). Os principais patógenos pertencentes a esta família, relatados em aves, são *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Yersinia* sp. os quais podem causar doenças entéricas e sistêmicas. Em menor número são encontrados trabalhos científicos relacionados a outros micro-organismos desta família, tais como *Shigella* spp., *Edwardsiella tarda*, *Proteus* spp., *Hafnia alvei*, *Serratia* spp., *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae* (Allgayer *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2016). Embora pouco relatado, segundo Godoy (2007), *Citrobacter freundii* apresenta alta patogenicidade, podendo desencadear bacteremia aguda seguida de morte, principalmente em aves jovens e imunossuprimidas. Estes agentes têm distribuição mundial, habitam o trato intestinal de animais e humanos e contaminam vegetação, solo e água. (Quinn *et al.*, 2005; Corrêa *et al.*, 2013).

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a primeira dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. As cepas são classificadas em sorovares baseados na diversidade de lipopolissacarídeos (LPS), antígenos (O) e antígeno flagelar (H). Atualmente, mais de 2.600 sorovares são reconhecidos (Guibourdenche *et al.*, 2010; OIE, 2010). O sorotipo isolado de Psittaciformes com maior frequência é *S. Typhimurium* (Godoy, 2007; Harcourt-Brown, 2010), porém em seu estudo Lopes *et al.* (2014), utilizando o método microbiológico convencional, isolaram *S. Lexington*, *S. Saintpaul* e *S. Newport*.

Água e alimentos contaminados são as principais fontes de infecção, mas animais cronicamente infectados, aves de vida livre, roedores e insetos também podem carrear o patógeno (Godoy, 2007). As aves afetadas podem ter morte súbita ou apresentar sinais inespecíficos como diarreia aquosa profusa, polidipsia/poliúria, dispneia/pneumonia, depressão, anorexia, e ocasionalmente, sinais neurológicos. As aves tratadas podem recuperar-se, porém permanecendo portadoras, com eliminação intermitente do patógeno (Godoy, 2007; Harcourt-Brown, 2010). Outro fator importante é a disseminação pelo ambiente, como a relatada por Kanashiro *et al.* (2002) que verificaram um caso de contaminação disseminada em um criadouro comercial de aves silvestres onde, através de método microbiológico, foi identificada *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo 4, 5, 12: i: - em *Agapornis* (*Agapornis roseicollis*), Diamante Gold (*Chloebia gouldiae*) e Bivate (*Stagonopleura guttata*) mantidos em viveiros distintos.

Com vista a aumentar o conhecimento sobre os psitacídeos e seus agentes infecciosos em animais de cativeiro, objetivou-se investigar a ocorrência de *Salmonella* spp. em psitacídeos na região central do Rio Grande do Sul, através do método bacteriológico convencional e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando amostras fecais do ambiente, evitando o stress da contenção. Este trabalho reveste-se de especial importância, visto que as salmoneloses, além dos prejuízos que podem causar aos criadores colocando em risco a saúde do plantel, sendo zoonoses, representam perigo também para as pessoas que mantêm contato com as aves, seja por motivo de trabalho ou como animais de companhia.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em dois criatórios de aves ornamentais da região central do Rio Grande do Sul, um onde são criadas diversas espécies de Psittaciformes da fauna silvestre exótica e outro, licenciado pelo IBAMA para criação de psitacídeos da fauna silvestre nativa. As aves estavam alojadas em casais, recebendo ração comercial e mistura de sementes e água “ad libitum” e apresentavam-se clinicamente saudáveis.

No período de agosto a setembro de 2016 foram realizadas coletas de fezes de 60 gaiolas de aves exóticas, com um casal em cada uma, e uma coleta de 30 amostras de fezes de aves nativas, mantidas em viveiros, em casais, totalizando 90 recintos, que representam 180 aves (Tab. 1).

Tabela 1. Relação das espécies de psitacíformes e amostragem utilizada, onde n representa o número de recintos coletados.

| Espécie | Nome comum | n | % |
|---------------------------------|-----------------------------|----------|----------|
| <i>Amazona aestiva</i> | Papagaio verdadeiro | 11 | 12,2 |
| <i>Amazona pretrei</i> | Papagaio charão | 17 | 18,9 |
| <i>Ara ararauna</i> | Arara canindé | 02 | 2,2 |
| <i>Barnardius barnardi</i> | Periquito Cloncurry | 01 | 1,1 |
| <i>Barnardius zonarius</i> | Periquito-port-lincoln | 01 | 1,1 |
| <i>Bolborhynchus lineola</i> | Periquito Catarina | 03 | 3,3 |
| <i>Forpus sp.</i> | Forpus | 01 | 1,1 |
| <i>Lathamus discolor</i> | Swift parrot | 02 | 2,2 |
| <i>Neopsephotus bourkii</i> | Periquito-de-bourke | 08 | 8,9 |
| <i>Platycercus sp.</i> | Rosela | 10 | 11,1 |
| <i>Poicephalus senegalus</i> | Papagaio-do-senegal | 01 | 1,1 |
| <i>Polytelis alexandrae</i> | Periquito-príncipe-de-gales | 02 | 2,2 |
| <i>Polytelis anthopeplus</i> | Periquito Regente | 01 | 1,1 |
| <i>Polytelis swainsonii</i> | Periquito Barraband | 01 | 1,1 |
| <i>Psephotus haematonotus</i> | Red rumped | 21 | 23,3 |
| <i>Psittacula alexandri</i> | Moustache | 01 | 1,1 |
| <i>Psittacula columboides</i> | Periquito-de-malabar | 01 | 1,1 |
| <i>Psittacula cyanocephala</i> | Cabeça-de-ameixa | 02 | 2,2 |
| <i>Psittacula krameri</i> | Ring necked | 03 | 3,3 |
| <i>Purpureicephalus spurius</i> | Periquito-red-capped | 01 | 1,1 |
| Total | | 90 | 100 |

Para a coleta das amostras, as gaiolas (ou viveiros) foram forradas com papel alumínio. Logo após a defecação, as fezes foram coletadas com suabe estéril, passadas para kit de coleta com papel filtro fornecido pelo laboratório e então o suabe foi colocado em tubo de ensaio contendo 10mL de água peptonada a 1%.

O material para exame bacteriológico foi conservado em caixa de isopor com gelo até chegar ao Núcleo de Estudos e Pesquisas em Animais Silvestres (NEPAS), do Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) para análise. Os kits de coleta para pesquisa pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram mantidos à sombra por cerca de uma hora para secagem completa e remetidos a laboratório especializado, de acordo com as instruções do mesmo, em

temperatura ambiente. A metodologia utilizada no diagnóstico pela PCR seguiu o protocolo de Freitas (2008).

No LCDPA, foram realizadas análises microbiológicas qualitativas das amostras segundo a metodologia para *Salmonella* spp. utilizada na rotina do laboratório, adaptada de Brasil (2003) e Brasil (2011). As amostras que estavam em caldo de pré-enriquecimento não seletivo (Água peptonada a 1%) foram incubadas em estufa a 37°C/20h. Após esse período, uma alíquota de 1mL do caldo foi transferido a tubos de ensaio contendo 10mL de caldo Tetracionato (TT) acrescido de solução verde brilhante a 0,1% e iodo-iodeto e outra alíquota, de 100µL, foi adicionada aos tubos contendo 10mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), sendo incubados novamente em estufa a 37°C/24h e 42°C/24h, respectivamente. Após este período, com auxílio de alças estéreis descartáveis, os caldos de enriquecimento seletivo foram estriados em placas com meio Ágar Verde Brilhante (AVB) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e levados à estufa a 37°C/24h. Após o exame das placas, colônias morfologicamente compatíveis com *Salmonella* spp. foram selecionadas para a realização de triagem bioquímica, composta dos seguintes meios: “Triple Sugar Iron” (TSI), “Lysine Iron Agar” (LIA), meio Sulfeto Indol Motilidade (SIM), Caldo Ureia e Ágar Citrato de Simmons. Após incubação a 37°C/24 h foi realizada a leitura e interpretação das provas bioquímicas de acordo com Macfaddin (1999). Para efeito de comparação de resultados, todo o protocolo foi desenvolvido também com uma cepa de campo, controle positivo de *Salmonella* Gallinarum, previamente tipificada, pertencente à bacterioteca do LCDPA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os meios seletivos/indicadores AVB e XLD foram utilizados para diferenciar salmonelas de outros enteropatógenos. No ágar XLD as colônias da maioria dos sorotipos de salmonelas são vermelhas com centros pretos e uma zona rosa-avermelhada pode ser vista no meio que envolve as colônias (Quinn *et al.*, 2005; WHO, 2010). A partir destas informações, analisando as 90 placas contendo XLD observou-se que, na maioria delas, o meio desenvolveu coloração amarelo intenso e em apenas 15 o meio estava rosa ou vermelho. Embora em algumas destas placas as colônias não apresentassem centro preto, tendo em vista que alguns sorovares de *Salmonella* spp. não manifestam esta característica, para evitar um falso negativo, optou-se por testar as 15 placas com a série bioquímica. Da mesma forma, foram selecionadas 11 placas com AVB em que o meio apresentou coloração em tons de rosa, já que de acordo Quinn *et al.* (2005) e WHO (2010), neste meio as colônias de salmonelas e o

meio adjacente desenvolvem coloração rosa ou vermelha e outras enterobactérias aparecem em verde ou amarelo.

Das 26 amostras selecionadas (14,4%), oito placas eram do criatório de aves nativas, sendo que nas sete placas com XLD isolou-se *Escherichia coli* e na placa com AVB, foi isolada *Cedecea* sp.. Do criatório de exóticas foram 18 placas, sendo que nas placas com XLD verificou-se a presença de *Citrobacter freundii* em 5 placas e *Cedecea* sp. em três delas. No meio AVB foram duas placas com *Citrobacter freundii* e oito com *Cedecea* sp. (Tab. 2).

Tabela 2. Resultados dos testes bioquímicos presuntivos para 26 amostras de fezes de Psittaciformes suspeitas de *Salmonella* spp. analisadas a partir dos meios de cultura Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Verde Brilhante (AVB).

| Enterobactéria | NATIVAS | | | EXÓTICAS | | | Total | Total (%) |
|-----------------------------|---------|-----------|------------|-----------|------------|------|-----------|------------|
| | XLD | AVB | % | XLD | AVB | % | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 07 | 00 | 87,5 | 00 | 00 | 00 | 07 | 26,9 |
| <i>Cedecea</i> sp. | 00 | 01 | 12,5 | 03 | 08 | 61,1 | 12 | 46,2 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 00 | 00 | 00 | 05 | 02 | 38,9 | 07 | 26,9 |
| Total | | 08 | 100 | 18 | 100 | | 26 | 100 |

Nesta investigação, *Salmonella* spp. não foi isolada de nenhuma amostra submetida a análise microbiológica convencional e da mesma forma esta bactéria não foi detectada na PCR em nenhuma das 90 amostras. Este resultado está de acordo com estudo realizado por Sareyyüpoğlu *et al.* (2008) que analisando 185 amostras de sete criatórios de periquitos australianos, canários e outras espécies de aves observaram a presença de *Salmonella* spp. nas espécies *Serinus canaria*, *Fringilla montifringilla* e *Taeniopygia guttata*, sendo que nenhuma das 27 amostras de fezes de psitacídeos (periquitos australianos) foi positiva para *Salmonella* spp.. Porém, Tunca *et al.* (2012) avaliando periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) provenientes de três criatórios comerciais na Turquia, detectaram a presença de *S. Gallinarum* com taxa de mortalidade mais alta nestas aves comparada com outras espécies, mostrando que estes psitacídeos são altamente susceptíveis ao patógeno. Em nosso estudo, utilizando este sorovar como controle positivo foi observado que nenhuma amostra foi fenotipicamente semelhante na avaliação microbiológica.

Bezerra *et al.* (2013) analisaram 264 amostras de suabe de arrasto e suabes cloacais de periquitos australianos provenientes de *pet shops* e criadouros e, utilizando o método microbiológico, constataram ausência de *Salmonella* spp.. A justificativa dada para a ausência

do patógeno foi relacionada com medidas sanitárias utilizadas pelos criadores, tais como limpeza diária dos bebedouros, comedouros, gaiolas e instalações, assim como o uso de água de torneira e de ração mantida em recipientes fechados. Em outro estudo, Keen *et al.* (2007) analisando amostras de fezes de 22 aves (entre elas, 3 papagaios) de zoológicos dos Estados Unidos obtiveram resultado negativo para *Salmonella* spp., atribuindo a baixa prevalência às excelentes condições das instalações e de manejo. Da mesma forma, nos criatórios testados neste estudo, boas práticas de manejo e ótimas condições das instalações poderiam ser apontadas como responsáveis por não favorecer a presença do agente nos criatórios.

A baixa expressividade de resultados positivos para *Salmonella* spp. em amostras de aves silvestres é identificada desde muitos anos, como demonstrado em trabalho feito por Dorrestein *et al.* (1985), onde foram avaliadas 80 amostras fecais e 466 necropsias de Cacatuinae, Trichoglossinae e Psittacinae, sendo positivas para *Salmonella* spp. apenas uma amostra fecal e oito materiais oriundos de necropsias. A microbiota predominante na amostragem era composta principalmente por *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus*. Corrêa *et al.* (2013) analisando 44 amostras provenientes de psitacídeos da fauna nativa de cativeiro (15 fragmentos de órgãos de aves necropsiadas e 29 suabes de cloaca e ingluvívio) não encontraram nenhuma amostra positiva para *Salmonella* spp., porém 28 amostras (63,6%) foram positivas no exame microbiológico para *Escherichia coli*.

Estudando a prevalência de enterobactérias isoladas de Psittaciformes oriundos do tráfico de nossa fauna silvestre, Lopes *et al.* (2015) analisaram 167 suabes cloacais e isolaram enterobactérias em 119 indivíduos (71,3%), sendo *Escherichia coli* a mais prevalente (46,5%) e entre as menos prevalentes, *Salmonella* Saintpaul foi isolada de uma ave (0,6%). Hidasi *et al.* (2013) avaliando amostras fecais de 300 papagaios capturados ilegalmente no Brasil, através de exame bacteriológico convencional obtiveram um total de 508 isolados, sendo 172 *Escherichia coli* (33,9% dos isolados; 57,3% dos indivíduos); 153 *Enterobacter* spp. (30,1% dos isolados; 51,0% dos indivíduos); 89 *Klebsiella* spp. (17,5% dos isolados; 29,7% dos indivíduos); 59 *Citrobacter* spp. (11,6% dos isolados; 19,7% dos indivíduos), 21 *Proteus vulgaris* (4,2% dos isolados; 7,0% dos indivíduos), 5 *Providencia alcalifaciens* (0,98% dos isolados; 1,67% dos indivíduos), 5 *Serratia* sp. (0,98% dos isolados; 1,67% dos indivíduos), 3 *Hafnia aivei* (0,59% dos isolados; 1,00% dos indivíduos), e 1 *Salmonella* sp. (0,20% dos isolados; 0,33% dos indivíduos). Em nosso estudo obteve-se uma alta prevalência de *Escherichia coli* (87,5%) no criatório de aves nativas, o que está de acordo com os trabalhos citados anteriormente para esta enterobactéria.

Lopes *et al.* (2014), utilizando métodos microbiológicos convencionais, avaliaram suabes cloacais de 182 psitacídeos e obtiveram três (1,65%) resultados positivos: *Amazona aestiva* (*Salmonella* Lexington), *Ara chloroptera* (*Salmonella* Saintpaul) e *Melopsittacus undulatus* (*Salmonella* Newport), e consideraram baixa prevalência de *Salmonella* sp. em Psittaciformes mantidos em criatórios comerciais e conservacionistas da Região Metropolitana de Fortaleza. Marietto-Gonçalves *et al.* (2010) avaliaram 103 psitacídeos oriundos do tráfico de animais e que estavam em processo de reabilitação para soltura, detectando a presença de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis em três (2,9%) *Amazona aestiva*, espécie de psitacídeo habitualmente traficada e encontrada em residências. Nemeth *et al.* (2016) realizaram estudo retrospectivo de 827 amostras aviárias (112 Psittaciformes, 22 Passeriformes, 18 Galliformes, 10 Anseriformes e 6 Columbiformes) recebidas na University of Georgia, Pathology Department and Athens Veterinary Diagnostic Laboratory entre 2006 e 2011 e apenas 5 foram positivas para *Salmonella* spp., o que confirma a baixa prevalência desta bactéria nos diagnósticos laboratoriais destas ordens taxonômicas.

As enterobactérias isoladas em nosso estudo como suspeitas de *Salmonella* e não confirmadas pelas provas bioquímicas são citadas na literatura como possuidoras de características fenotípicas semelhantes a esta bactéria, o que reforça a necessidade da caracterização bioquímica, sorológica e molecular dos isolados. Segundo Delgado *et al.* (2013), *C. freundii* apresenta grande versatilidade na morfologia de suas colônias, assim como no seu comportamento bioquímico, antigênico e patológico, o que dificulta a identificação e faz com que seja frequentemente confundida com *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*. Uma hipótese para os resultados negativos obtidos na investigação de *Salmonella* spp. através dos métodos microbiológicos convencionais e PCR é a apresentada por WHO (2010) onde consta que o isolamento de *Salmonella* em fezes de animais pode ser dificultado quando há infecção subclínica, com eliminação de pequeno número deste agente nas fezes. Em nosso estudo, as aves apresentavam-se clinicamente saudáveis. Além disso, a população de salmonelas é muito menor do que de outras bactérias da microbiota entérica (WHO, 2010). Outro fator a ser considerado é a possibilidade da excreção intermitente do agente, o qual poderia estar ausente no momento da coleta das fezes, impossibilitando seu isolamento e identificação naquelas amostras (Allgayer *et al.*, 2008; Harcourt-Brown, 2010; Lopes *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2016).

CONCLUSÕES

Nesta investigação não foi isolada *Salmonella* spp., mas foram detectadas três outras enterobactérias, sendo pelo menos duas delas potencialmente patogênicas (*Escherichia coli* e *Citrobacter freundii*).

O método microbiológico convencional e a PCR indicaram o mesmo resultado negativo para as amostras analisadas, demonstrando equidade de 100%.

Considera-se importante a continuidade do monitoramento dos criatórios uma vez que o resultado negativo para as amostras não significa a ausência de *Salmonella* spp., podendo estar em aves portadoras e se manifestar em situações de estresse representando riscos enquanto zoonose e prejuízos à saúde das aves.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado ao autor Laurete Murer.

REFERÊNCIAS

ALLGAYER, M.C.; CZIULIK, M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, n.3, p.344-350, 2007.

ALLGAYER, M.C.; LIMA-ROSA, C.A.V.; WEIMER, T.A. *et al.* Molecular diagnosis of *Salmonella* species in captive psittacine birds. *Vet. Rec.*, v.162, n.21, p.816-819, 2008.

BEZERRA, W.G.A.; CARDOSO, W.M.; TEIXEIRA, R.S.C. *et al.* Survey of *Salmonella* sp. in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in Fortaleza, Brazil. *Acta Sci. Vet.*, v.41, n.1157, p.1-7, 2013.

BRASIL. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Instrução Normativa N.62, de 26 de agosto de 2003/ MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (D.O.U. 18/09/2003). Brasília.

BRASIL. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*/Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. p.16-39.

CORRÊA, I.M.; FLORES, F.; SCHNEIDERS, G.H. *et al.* Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, n.2, p.241-246, 2013.

DELGADO, G.; SOUZA, V.; MORALES, R. *et al.* Genetic Characterization of Atypical *Citrobacter freundii*. *PLoS ONE*, v.8, n.9, p.e74120, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0074120

DORRESTEIN, G.M.; BUTELAAR, M.N.; VAN DER HAGE, M.H.; ZWART, P. Evaluation of a bacteriological and mycological examination of psittacine birds. *Avian Dis.*, v.29, n.4, p.951-962, 1985.

FREITAS, C.G. *Adaptação da técnica de PCR múltipla para a identificação de Salmonella sp. e dos sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium por em carcaças e miúdos de aves comercializadas no distrito Federal.* 2008. 65f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, Universidade de Brasília, Brasília.

GODOY, S.N. Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. *Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária.* São Paulo: Roca, 2007. p.222-251.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M. *et al.* Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.*, v.161, p.26-29. 2010.

HARCOURT-BROWN, N.H. Aves psitaciformes. In: TULLY JR., T. N.; DORRESTEIN, G.M.; JONES, A.K. *Clínica de Aves.* 2. Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.122-123.

HIDASI, H.W.; HIDASI NETO, J.; MORAES, D.M.C. *et al.* Enterobacterial detection and *Escherichia Coli* antimicrobial resistance in parrots seized from the illegal wildlife trade. *J. Zoo Wildlife Med.*, v.44, n.1, p.1-7, 2013. DOI: 10.1638/1042-7260-44.1.1

ICMBio. Espécies Ameaçadas – 2014. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies>>. Acessado em: 13 jan. 2017.

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

KEEN, J.E.; DURSO, L.M.; MEEHAN, T.P. Isolation of *Salmonella enterica* and shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157 from feces of animals in public contact areas of United States zoological parks. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.73, n.1, p.362-365, 2007.

LOPES, E.S.; CARDOSO, W.M.; ALBUQUERQUE, Á.H. *et al.* Isolation of *Salmonella* spp. in captive Psittaciformes from zoos and a commercial establishment of Fortaleza, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.3, p.965-968, 2014.

LOPES, E.S.; MACIEL, W.C.; ALBUQUERQUE, Á.H. *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance profile of enterobacteria isolated from psittaciformes of illegal wildlife trade. *Acta Sci. Vet.*, v.43, n.1313, p.1-9, 2015.

LOPES, E.S.; MACIEL, W.C.; TEIXEIRA, R.S.C. *et al.* Isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* de psittaciformes: relevância em saúde pública. *Arq. Inst. Biol.*, v.83, p.1-10, e0602014, 2016. DOI: 10.1590/1808-1657000602014

MACFADDIN, J. F. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 1999. p.732-802.

MARIETTO-GONÇALVES, G.A; ALMEIDA, S.M.; LIMA, E.T. *et al.* Isolation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Blue-Fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*). *Avian Dis.*, v.54, n.1, p.151-155, 2010.

NEMETH, N.M.; GONZALEZ-ASTUDILLO, V.; OESTERLE, P.T.; HOWERTH, E.W. A 5-Year Retrospective Review of Avian Diseases Diagnosed at the Department of Pathology, University of Georgia. *J. Comp. Path.*, p.1-16, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.05.006>

OIE Terrestrial Manual, 2010. Disponível em: https://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.09.09_SALMONELLOSIS.pdf.

Acessado em: 03 fev. 2017.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CATER, M. E. *et al.* (Eds.). Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.115-130.

SAREYYÜPOĞLU, B.; ÇELİK, O.K.; CANTEKIN, Z. *et al.* Polymerase chain reaction detection of *Salmonella* spp. in fecal samples of pet birds. *Avian Dis.*, v.52, n.1, p.163-167, 2008. DOI: 10.1637/8052-070507-Reg

SIGRIST, T. Guia de Campo Avis Brasilis – Avifauna Brasileira. São Paulo: Avis Brasilis, 2009. 600p.

TUNCA, R.; TOPLU, N.; KIRKAN, S. *et al.* Pathomorphological, immunohistochemical and bacteriological findings in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) naturally infected with *S. Gallinarum*. *Avian Pathol.*, v.41, n.2, p.203-209, 2012. DOI: 10.1080/03079457.2012.663076

WHO Global Foodborne Infections Network. Laboratory Protocol “Isolation of *Salmonella* spp. From Food and Animal Faeces ”, 2010. Disponível em: http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/protocols/isolation_of_salm_220610.pdf. Acessado em: 03 fev. 2017.

7. CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados, concluiu-se que as aves da família Psittacidae foram as mais prevalentes nas necropsias realizadas no NEPAS. Dentre as alterações patológicas macroscópicas verificou-se que as lesões no sistema digestório ocorreram em maior número.

Foram confirmadas as presenças de dois vírus até então não relatados no Brasil: o Avipoxvírus clado C e o Herpesvírus de Psitacídeos tipo 3.

Nos dois criatórios de Psitacídeos onde foi investigada a presença de *Salmonella* spp., tanto na pesquisa microbiológica padrão, quanto por técnicas moleculares, esta bactéria não foi diagnosticada, porém foram identificadas outras duas enterobactérias: *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii*.

Considerando que salmonelose é uma zoonose e que *Salmonella* spp. pode permanecer em aves portadoras e ser eliminada de forma intermitente, sobretudo em casos de estresse, o monitoramento dos criatórios assume grande importância para saúde pública, além da proteção aos animais.

8. REFERÊNCIAS

- ALLGAYER, M.C.; CZIULIK, M., Reprodução de psitacídeos em cativeiro. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 31, n. 3, p. 344-350, 2007.
- ALLGAYER, M.C. et al., Molecular diagnosis of Salmonella species in captive psittacine birds. **Vet Rec**, v. 162, n. 21, p. 816-819, 2008.
- ALLGAYER, M.C.; PEREIRA, R.A., Doenças virais em Psittaciformes. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L., **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, cap. 64, p. 1337-1352, 2014.
- CANAL, C.W.; DIEL, D.G., Poxviridae. In: FLORES, E.F. (org.), **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 3. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, cap. 19, p. 585-620, 2017.
- CASAGRANDE, R.A. **Caracterização anatomopatológica, imuno-histoquímica e molecular de doenças infecciosas em aves de produção e ornamentais**. 2013. 86p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- CATÃO-DIAS, J. L.; MIRANDA, F., Considerações para realização e documentação de necropsias. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L., **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, cap. 82, p. 1565-1576, 2014.
- CORRÊA, I.M. et al., Detecção de fatores de virulência de Escherichia coli e análise de Salmonella spp. em psitacídeos. **Pesq Vet Bras**, v. 33, n. 2, p. 241-246, 2013.
- DE CARVALHO, V.M., Colibacilose e salmonelose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L., **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, cap. 69, p. 1389-1398, 2014.
- DELGADO, G. et al., Genetic Characterization of Atypical Citrobacter freundii. **PLoS ONE**, v.8, n.9, p.e74120, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0074120
- FRANCO, A.C. et al., Herpesviridae. In: FLORES, E.F. (org.), **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 3. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, cap. 18, p. 517-584, 2017.
- GABOR, M. et al., Psittacid Herpesvirus 3 Infection in the Eclectus Parrot (*Eclectus roratus*) in Australia. **Vet Pathol Online** 2013. Available at: <<http://vet.sagepub.com/content/early/2013/05/22/0300985813490753>>. Acesso em: 23 fev. 2016.
- GODOY, S.N. Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p.222-251.
- GRESPLAN, A.; RASO, T. F., Psittaciformes (Araras, Papagaios, Periquitos, Calopsitas e Cacatuas). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L., **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, cap. 28, p. 550-589, 2014.

GUIBOURDENCHE, M. et al., Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res Microbiol**, v.161, p.26-29, 2010.

HARCOURT-BROWN, N.H., Aves psitaciformes. In: TULLY JR., T. N.; DORRESTEIN, G.M.; JONES, A.K., **Clínica de Aves**. 2. Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 7, p.122-149, 2010.

JEPSON, L., **Clínica de animais exóticos: referência rápida**. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 5, p.174, 2010.

LOPES, E.S. et al., Isolation of *Salmonella* spp. in captive Psittaciformes from zoos and a commercial establishment of Fortaleza, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.66, n.3, p.965-968, 2014.

LOPES, E.S. et al., Prevalence and antimicrobial resistance profile of enterobacteria isolated from psittaciformes of illegal wildlife trade. **Acta Sci Vet**, v.43, n.1313, p.1-9, 2015.

LOPES, E.S. et al., Isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* de psittaciformes: relevância em saúde pública. **Arq Inst Biol**, v.83, p.1-10, e0602014, 2016. DOI: 10.1590/1808-1657000602014

MARQUES, M.V.R., Galliformes (Aracuaã, Jacu, Jacutinga, Mutum e Uru). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L., **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, cap. 21, p. 371, 2014.

MATUSHIMA, E. R., Técnicas Necroscópicas. In: Cubas, Z.S.; Silva, J.C.R.; Catão-Dias, J.L., **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, p.980-990, 2007.

OIE **Terrestrial Manual**, 2010. Disponível em: <https://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.09.09_SALMONELLOSIS.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2017.

QUINN, P. J. et al., **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, p. 512, 2005.

QUSE, V.; FALZONI, E. **Patología en fauna silvestre: Manual y atlas**. 1. ed. Buenos Aires: Vazquez Mazzini, 192p, 2008.

RASO, T. F., Doenças infecciosas em aves selvagens. In: VILANI, R. G. D.; SCHMIDT, E. M. S. (org), **Avanços na medicina de animais selvagens: medicina de aves**. Curitiba: Associação Paranaense de Medicina de Animais Selvagens – Grupo Fowler, p. 307-336, 2009.

SANTOS, G. G. C. et al., Doenças de aves selvagens diagnosticadas na Universidade Federal do Paraná (2003-2007). **Pesq Vet Bras**, v. 28, n. 11, p. 565-570, 2008.

SCHMIDT, E. M. S., Patologia clínica em aves. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L., **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, cap. 83, p. 1577, 2014.

SHIVAPRASAD, H.L.; PHALEN, D.N., A novel herpesvirus associated with respiratory disease in Bourke's parrots (*Neopsephotus bourkii*). **Avian Pathol**, v. 41, n. 6, p. 531-539, 2012.

TRIPATHY, D.N.; REED, W.M., Pox. In: Saif YM, ed., **Diseases of Poultry**. 12th ed. Ames: Blackwell Publishing, cap. 10, p. 291-307, 2008.

ANEXO A – Comprovante de submissão de manuscrito

JVDI ms 17-0350



Journal of Veterinary Diagnostic Investigation <onbehalfof+editorial+jvdi.org@manuscriptcentral.com>

sex 15/09, 23:34

Você; laumurer@hotmail.com; glaukommers@yahoo.com; thales.furian@ufrgs.br; mais 5 ✕



Responder | ▾

15-Sep-2017

Dear Ms. Murer:

Your manuscript entitled "Identification and phylogenetic analysis of clade C avipoxvirus in a fowlpox outbreak in exotic Psittaciformes in southern Brazil" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Veterinary Diagnostic Investigation in chronological order.

Your manuscript number is 17-0350.

Please mention the above manuscript number in all future correspondence or when contacting the Editorial Office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/jvdi> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jvdi>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.

Sincerely,

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Editorial Office

JVDI

ANEXO B – Comprovante de aceite de manuscrito

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Decision Letter (ABMVZ-2017-9794.R1)

From: ampinho.editor@gmail.com

To: laumurer@hotmail.com, vetmurer@gmail.com

CC:

Subject: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia - Decision on Manuscript ID ABMVZ-2017-9794.R1

Body: 22-Jun-2017

Dear Mrs. Murer:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Investigação de <i>Salmonella</i> spp. em Psittaciformes exóticos e nativos mantidos em cativeiro na região central do Rio Grande do Sul" in its current form for publication in the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Antonio de Pinho Marques Jr
Editor-in-Chief, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
ampinho.editor@gmail.com

Associate Editor
Comments to the Author:
(There are no comments.)

Entire Scoresheet: