

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**ESTUDO CASO-CONTROLO - INFEÇÃO POR *BEAK AND
FEATHER DISEASE VIRUS* EM PSITACIFORMES**

João Diogo Correia Soares

Orientadora:
Alexandra Müller

Co-orientador:
Joel Tsou Ferraz

Porto 2020

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**ESTUDO CASO-CONTROLO - INFEÇÃO POR *BEAK AND
FEATHER DISEASE VIRUS* EM PSITACIFORMES**

João Diogo Correia Soares

Orientadora:
Alexandra Müller

Co-orientador:
Joel Tsou Ferraz

Porto 2020

Resumo

A doença do bico e das penas dos psitacíformes, causada pelo *Beak and Feather Disease Virus*, é tipicamente debilitante nestas aves e de difícil controlo. A infeção pode originar vários quadros clínicos de severidades diferentes nas aves que afeta. A ação direta do vírus, bem como a sua forte capacidade imunossupressora, reduzem significativamente o bem-estar e a longevidade das aves.

Nesta dissertação propõe-se compreender a importância da PBFD no Norte de Portugal, bem como a relação de diferentes fatores de risco com a infeção, usando a metodologia caso-controlo. Foram recolhidos e analisados dados provenientes do Centro Veterinário de Exóticos do Porto relativos a aves com diagnóstico sugestivo ou definitivo de infeção por BFDV. Foram incluídos dados registados entre janeiro de 2010 e fevereiro de 2020. Foram recolhidas informações relativas à espécie, idade, sexo, testagem por PCR para BFDV e APV, hematologia e sintomatologia manifestada.

Os resultados demonstram que a infeção por BFDV é frequente em psitacíformes do Norte de Portugal, visto que 29,2% das aves testadas por PCR obtiveram resultado positivo. Todas as testagens para APV obtiveram resultado negativo, sugerindo que este agente tem menor importância como diagnóstico diferencial no contexto nacional.

A análise dos dados demonstrou que as aves com menos de um ano de idade aparentam estar mais predispostas ao desenvolvimento de infeção por BFDV. Os papagaios cinzentos africanos apresentam uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento de doença clínica após o estabelecimento da infeção.

As aves infetadas por BFDV apresentam maior predisposição ao desenvolvimento de anorexia e apatia, e de uma apresentação clínica geral compatível com PBFD aguda. O surgimento de sintomatologia aguda é mais comum em papagaios cinzentos africanos.

As aves infetadas apresentam predisposição ao desenvolvimento de leucopénia e heteropénia, apontando que a análise hematológica é uma boa ferramenta diagnóstica complementar à testagem por PCR para BFDV.

Agradecimentos

O meu percurso académico foi marcado por uma exposição constante às várias vertentes da Medicina Veterinária e foi no seu decorrer que me apaixonei profundamente por esta maravilhosa área. Estou profundamente grato ao Centro Veterinário de Exóticos do Porto pela oportunidade de contactar com uma medicina diferente, em tantas espécies variadas, na companhia de excelentes profissionais. Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me permitiram chegar aqui, particularmente:

À minha orientadora, professora Alexandra Müller, pela disponibilidade e apoio prestados na organização do meu estágio e dissertação, pela partilha do entusiasmo pela área da Infecçiology e por tão prontamente se ter debruçado comigo em novas realidades na medicina de animais exóticos.

Ao meu co-orientador, doutor Joel Ferraz, pelos ensinamentos cruciais, por tão calorosamente me ter acolhido no Centro Veterinário de Exóticos do Porto, pela confiança que depositou em mim e sobretudo pelas discussões que partilhámos ao longo destes meses.

Às doutoras Joana, Inês e Rute e aos enfermeiros Diogo, Helena, Vanessa e Ana por me ensinarem e confiarem em mim na realização de procedimentos em animais tão sensíveis, pela paciência, pelas piadas trocadas, pelos bolos de arroz e pelo profissionalismo.

À Maria, à Laura e em especial ao Eduardo, pelos cafés e jantares, pelos debates e ideias, pelas consultas hilariantes e por me terem feito gostar ainda mais da medicina de animais exóticos. Foi um prazer ter partilhado convosco este estágio e espero que colaborem de novo em breve.

À minha mãe, ao meu irmão, à minha madrinha e à minha avó por terem tornado tudo isto possível. Obrigado por nunca terem duvidado das minhas capacidades e por me impulsionarem a querer saber mais, na veterinária e fora dela.

À Rafaela e à Júlia, por sermos os melhores mosqueteiros. Tenho muito orgulho e uma profunda admiração por vocês.

Ao piso: a Rafaela, a Daniela, o Eduardo, a Leonor, a Gabriela, a Matilde, o Sandes, o Pedro e a Magda por tantas paisagens, fotografias, momentos e histórias. Quero partilhar toda a vida convosco, porque convosco tudo faz mais sentido. À Rita, à Rafaela F., ao Miguel, ao Nuno, ao Diogo, ao Bruno, à Inês e à Chiara. Obrigado por todos os momentos que partilhámos e pela enorme motivação que me dão.

Índice

1. Introdução.....	1
2. Doença do Bico e das Penas dos Psitacíformes.....	2
2.1 Caracterização do agente etiológico.....	2
2.2 Epidemiologia.....	2
2.3 Patogénese.....	2
2.4 Apresentações clínicas.....	3
2.5 Diagnóstico.....	5
2.6 Tratamento.....	7
2.7 Controlo e profilaxia.....	8
3. Materiais e Métodos.....	8
3.1 Seleção dos animais.....	8
3.2 Definição das variáveis.....	9
3.3 Metodologia laboratorial.....	11
3.4 Metodologia estatística.....	12
4. Resultados.....	13
4.1 Variáveis categorizadas.....	13
4.2 Análise estatística das variáveis.....	15
4.3 Análise estatística entre a sintomatologia aguda e as variáveis.....	15
4.4 Análise estatística da hematologia.....	17
5. Discussão.....	17
5.1 Generalidades.....	17
5.1.1 Interpretação geral dos resultados obtidos.....	17
5.1.2 Amostras utilizadas nos PCR para BFDV.....	18
5.1.3 Casos excluídos.....	18
5.2 Variáveis.....	19
5.2.1 Espécie.....	19
5.2.2 Sexo.....	19
5.2.3 Idade.....	19
5.3 Apresentações clínicas.....	20
5.3.1 Categorias clínicas.....	20
5.3.2 Alterações da plumagem, bico e unhas.....	21
5.3.3 Relação entre as alterações da plumagem, bico e unhas com a idade.....	21
5.3.4 Sintomatologia compatível com PBFD aguda.....	22
5.4 Resultados da análise hematológica.....	23
5.4.1 Comparação entre casos e controlos.....	23
5.4.2 Comparação do grupo NTHS com os casos e os controlos.....	23
5.5 Análise dos resultados de PCR para APV.....	24
5.6 Recomendações clínicas.....	25
5.7 Limitações do estudo.....	25
5.8 Futuros trabalhos.....	26
6. Conclusão.....	27
7. Bibliografia.....	28
8. Anexos.....	31
Anexo I – Lista de espécies observadas durante o estágio no CVEP.....	31
Anexo II – Casuística acompanhada durante o estágio no CVEP.....	32
Anexo III – Fotografias ilustrativas de alguns casos acompanhados durante o estágio no CVEP.....	34
Anexo IV – Tabelas com os dados recolhidos da plataforma informática, organizados para as análises estatísticas.....	36

Lista de Abreviaturas

® - Marca Registrada

µL – Microlitro

% - Percentagem

χ^2 – Qui-quadrado

α - Significância

APV – *Avian Polyomavirus*

BFDV – *Beak and Feather Disease Virus*

CVEP – Centro Veterinário de Exóticos do Porto

DOM – Doenças Ósseas Metabólicas

dsDNA – *Double-stranded DNA*

HA - Hemaglutinação

IC – Intervalo de Confiança

HI – Inibição da Hemaglutinação

L - Litro

MDA – Maloclusão Dentária Adquirida

NTHS – Grupo Não-Testado por PCR mas com Hematologia Sugestiva de PBFD

OI – Origem indeterminada

OR – *Odds Ratio*

ORF – *Open Reading Frame*

PBFD – *Psittacine Beak and Feather Disease*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RT-PCR – *Real-time Polymerase Chain Reaction*

SCr - Sobrecrecimento

spp. – Espécies

ssDNA – *Single-stranded DNA*

Lista de Tabelas

Tabela 1: Interpretação dos resultados laboratoriais do teste de PCR para BFDV de acordo com a sintomatologia da ave.

Tabela 2: Valores de referência utilizados para a interpretação da análise hematológica dos casos recolhidos, adaptados de Hawkins *et. al* (2018).

Tabela 3: Dados das aves não-testadas por PCR para BFDV, mas com hematologia compatível com PBFD (grupo NTHS).

Tabela 4: Valores de OR, IC a 95%, χ^2 e p da associação dos casos e controlos de BFDV com as variáveis biológicas e sinais clínicos.

Tabela 5: Valores de OR, IC a 95%, χ^2 e p da associação entre casos com sintomatologia compatível com PBFD aguda e casos sem essa sintomatologia, relativamente à espécie, idade e sexo.

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Número de aves de acordo com a espécie e com o PCR para BFDV.

Gráfico 2: Número de aves de acordo com o sexo e com o PCR para BFDV.

Gráfico 3: Número de aves de acordo com a idade e com o PCR para BFDV.

Gráfico 4: Percentagem de aves com os diferentes sinais clínicos de acordo com o PCR para BFDV.

Gráfico 5: Número de aves de acordo com a hematologia e com o PCR para BFDV.

1. Introdução

A totalidade do meu estágio de 16 semanas foi realizada no Centro Veterinário de Exóticos do Porto (CVEP) (<http://www.cve.pt>). Durante este estágio, tive a oportunidade de acompanhar vários casos clínicos, percorrendo a metodologia médica na sua sequência típica: desde a anamnese e exame físico aos exames complementares, à emissão de um diagnóstico e à instituição de uma terapêutica adequada. Foram acompanhados casos clínicos nas espécies indicadas no Anexo I. A casuística dividida pelas diferentes classes de animais está listada no Anexo II.

Durante o estágio, contactei com diferentes modalidades de diagnóstico, nomeadamente as análises hematológica, bioquímica, microbiológica e histopatológica, a citologia, a radiografia, a ecografia, a endoscopia, o exame oral sob sedação e a necrópsia. Participei em diferentes procedimentos cirúrgicos e terapêuticos. Algumas fotografias ilustrativas de casos acompanhados no CVEP podem ser encontradas no Anexo III.

A popularidade dos novos animais de companhia encontra-se em crescimento e, em paralelo, também a exigência dos tutores dos animais na qualidade dos serviços médico-veterinários prestados. A maior acessibilidade a métodos complementares de diagnóstico, bem como a quantidade crescente de nova informação na área, permitem um estudo mais detalhado dos casos que surgem na prática clínica. Esta dissertação foca-se na doença do bico e das penas dos psitacíformes, de grande relevância nestas aves por ser debilitante e de difícil controlo.

Esta dissertação tem como objetivo entender melhor a infeção por BFDV em psitacíformes do Norte de Portugal e esclarecer a relação de possíveis fatores de risco com a doença. Foram estudados casos reais, cuja informação foi recolhida da plataforma informática do CVEP. Foram realizadas várias análises estatísticas através da metodologia caso-controlo, enumeradas abaixo:

- 1) Verificar a influência de possíveis fatores de risco (espécie, sexo e idade) na obtenção de um resultado positivo no PCR para BFDV;
- 2) Relacionar os diferentes sinais clínicos, bem como a apresentação clínica geral, dos casos e controlos com a sua idade e com o resultado de PCR para BFDV;
- 3) Avaliar a relação entre os resultados da análise hematológica e a testagem por PCR para BFDV;
- 4) Comparar animais com hematologia sugestiva de PBFD, mas sem testagem por PCR para BFDV, com os animais testados;
- 5) Analisar os resultados de PCR para APV realizados, visto que a infeção por este agente é o principal diagnóstico diferencial para a PBFD.

2. Doença do Bico e das Penas dos Psitaciformes

2.1 Caracterização do agente etiológico

O agente etiológico da Doença do Bico e das Penas dos Psitaciformes (PBFD) é o *Beak and Feather Disease Virus* (BFDV), pertencente à família *Circoviridae* e ao género *Circovirus*.^[4] O BFDV possui ssDNA circular com duas ORFs principais, não possui um envelope lipídico e efetua replicação por círculo rolante.^[1,4,21,34] É capaz de promover hemaglutinação.^[29]

O BFDV é suscetível a processos de mutação, embora ainda não haja classificação formal dos genótipos.^[15,21] Os diferentes BFDV isolados são bem conservados antigenicamente.^[32]

2.2 Epidemiologia

O BFDV surgiu em psitaciformes selvagens da Australásia.^[28] O comércio massivo de aves permitiu a sua disseminação global e a exposição de populações de outros continentes ao vírus. Por esta razão, a PBFD é classificada como uma doença infecciosa emergente.^[9,17,21,28]

O BFDV é excretado pelo pó das penas, fezes e secreções do papo de aves infetadas^[26], sendo transmitido horizontalmente por ingestão ou contacto cloacal com o vírus.^[24,28] O vírus foi detetado em ovos embrionados vindos de mães infetadas e incubados artificialmente, colocando-se a possibilidade de ser transmitido verticalmente.^[27] O vírus é resistente às condições ambientais e persiste no ambiente durante anos, o que revela a importância dos fómites na sua transmissão.^[24]

A doença pode surgir em qualquer idade. As aves mais suscetíveis à doença são as mais jovens, sobretudo até um ano de idade.^[10,24] O BFDV origina doença clínica mais frequentemente em aves do Velho Mundo que em aves americanas.^[13] Estas últimas aparentam ser resistentes ao surgimento e intensificação de sinais clínicos. Algumas aves africanas, nomeadamente do género *Agapornis* spp., e aves australianas, nomeadamente a caturra (*Nymphicus hollandicus*), o periquito-australiano (*Melopsittacus undulatus*) e os lóris do género *Trichoglossus* spp. também parecem possuir alguma resistência ao desenvolvimento de doença.^[13,24,28] O papagaio cinzento africano (*Psittacus erithacus*), o papagaio de Timneh (*Psittacus timneh*) e as catatuas (subfamílias *Calyptorhynchinae* e *Cacatuinae*) são mais suscetíveis e desenvolvem quadros clínicos mais graves.^[13,24,28]

2.3 Patogénese

O BFDV infeta preferencialmente células em divisão ativa.^[24] A replicação primária ocorre na bolsa de Fabricius e no tecido linfóide do intestino. A replicação secundária

ocorre no timo, fígado, esófago, papo, bolsa de Fabricius, intestino, epiderme e epitélio basal dos folículos das penas, bico e unhas.^[36]

O vírus provoca degenerescência balonizante e apoptose das várias camadas do folículo da pena, bico e unhas, bem como das células epiteliais do colar epidérmico da pena, formando corpos de inclusão intracitoplasmáticos e intranucleares basófilos.^[25,36,41] As lesões do colar epidérmico e da ráquis em crescimento provocam constrição do cálam. No colar epidérmico ocorre hiperplasia e hiperqueratose do epitélio promovendo o espessamento da bainha da pena, o que impede a exteriorização da pena e altera a sua forma.^[25] A polpa distal degenera, levando a hemorragia dentro do eixo da pena. Ocorre infiltração por heterófilos e macrófagos, contendo estes últimos corpos de inclusão intracitoplasmáticos basófilos.^[10,25,36] No bico, a degenerescência e hiperqueratose levam ao sobrecrecimento do bico e à criação de fissuras.^[25]

O vírus infeta as células de Kupffer provocando necrose multifocal e congestão hepática.^[28] Na bolsa de Fabricius, timo e baço o vírus provoca atrofia linfóide.^[28] Infeta também os leucócitos circulantes, resultando em virémia, e células de suporte da medula óssea, levando a leucopénia, heteropénia e possivelmente anemia.^[6,26,28,35] As aves sofrem imunossupressão severa, potenciando o surgimento de infeções secundárias por agentes oportunistas.^[26,28] A imunossupressão ocorre sobretudo em aves juvenis antes da regressão da bolsa de Fabricius.^[28]

O período de incubação da doença é variável, sendo maior quanto mais velha for a ave. Pode durar duas a quatro semanas em crias ou meses a anos em adultos.^[24]

2.4 Apresentações clínicas

O BFDV pode resultar em quadros clínicos muito díspares entre as várias aves, dependendo de vários fatores.^[23] Nesta dissertação, adotar-se-á a categorização referida por Lierz, M. (2005), contendo as apresentações hiperaguda, aguda, crónica e assintomática.^[13,24]

A forma hiperaguda ocorre em psitacíformes neonatos, sobretudo papagaios cinzentos africanos e catatuas. Algumas aves morrem sem evidenciar quaisquer sinais clínicos, havendo apenas um aumento da taxa de mortalidade neonatal. Outras apresentam perda de peso, depressão, esforço respiratório e diarreia devido às infeções secundárias causadas pela imunossupressão severa.^[10,13,24]

A forma aguda ocorre sobretudo em aves juvenis antes da involução da bolsa de Fabricius e que estão a substituir a penugem neonatal por penas de contorno.^[39] Surge tipicamente entre os 28 dias até a um ano de idade.^[13,24] É a forma mais comum e caracteriza-se por sinais clínicos inespecíficos, como depressão, diarreia esverdeada,

biliverdinúria, anorexia, estase do papo, regurgitação e intolerância à manipulação.^[24,28] As penas apresentam lesões geralmente mais subtis do que as observadas na forma crónica da doença. As lesões nas penas dependem da fase de desenvolvimento em que as penas se encontravam aquando da infeção, sendo menos graves se as penas já estiverem bem desenvolvidas.^[10] Há perda do pó das penas por lesão das pulviplumas. As penas podem estar todas afetadas simultaneamente ou pode haver afeção das penas primárias com progressão bilateral simétrica das lesões. Podem apresentar constrição anular do cálamo com fratura da pena, hemorragia da polpa ou maior facilidade na depena.^[28] Pode haver também retenção da bainha da pena e a coloração das penas pode estar alterada.^[11,24,26] Poderá haver manifestação simultânea de sinais de infeções secundárias facilitadas pela imunossupressão severa.

No caso particular do papagaio cinzento africano juvenil, a forma aguda é muito característica, manifestando-se sobretudo entre um a seis meses de idade. Surge depressão, anorexia, fraqueza, mucosas pálidas, regurgitação e uratos amarelos a verdes.^[8] Não apresentam lesões nas penas, ou a única alteração destas é a mudança da cor cinzenta para vermelha das penas de contorno recém-formadas.^[8,36] A imunossupressão é tipicamente muito severa e a morte ocorre 2 a 3 semanas após o início dos sinais clínicos.^[8,28,37]

A forma crónica surge principalmente em aves entre os 6 meses e os 3 anos de idade, após a involução da bolsa de Fabricius e do timo, e é de desenvolvimento insidioso. É caracterizada pelo surgimento de penas distróficas que substituem penas saudáveis a cada muda.^[24,28] As lesões das penas da forma crónica são normalmente mais graves que as da forma aguda. A forma crónica pode ter início com lesão das pulviplumas, com lesão nas penas de contorno ou com lesão de ambos os tipos de penas. A progressão da doença nos tratamentos ptéricos depende da fase de muda, embora seja geralmente bilateral.^[24] A ave perde pó das penas na plumagem e no bico e a plumagem apresenta linhas de *stress* nos véxilos, enclausuramento da pena dentro da bainha espessada e penas curtas, em bastão, arqueadas ou encaracoladas. As rémiges primárias são comumente o último tipo de penas a ser afetado.^[10,25,26,33] A atrofia das penas leva a aptéria progressiva com pigmentação da pele exposta. Pode haver hiperqueratose das extremidades, bem como ulceração das pontas das asas e dos cotovelos.^[28] Estas alterações ocorrem de forma menos severa em psitacíformes do género *Psephotus* spp. e *Neophema* spp., ou em periquitos-australianos.^[24,28] As lesões do bico e das unhas são mais comuns em catatuas e o seu desenvolvimento surge normalmente após as alterações das penas. O bico sofre sobrecrecimento, fraturas, necrose da superfície oral e desalinhamento da rinoteca com a gnatoteca.^[25,33] Estas

lesões podem levar a anorexia e predisõem a infecções secundárias do bico.^[26] Por fim, a atrofia linfóide e da medula óssea causa imunossupressão. Aves infetadas cronicamente continuam a excretar intermitentemente o vírus.^[24] A ave pode sobreviver durante meses a anos, embora seja comum o desenvolvimento de infecções secundárias que levam à morte, sendo que os psitacíformes maiores geralmente pioram a sua condição seis a doze meses após o início dos sinais clínicos.^[44] Estão descritos casos de recuperação clínica.^[28]

A forma assintomática ocorre sobretudo em aves velhas imunocompetentes, ou em algumas espécies particularmente resistentes. Esta forma ocorre mais frequentemente em aves do género *Agapornis* spp., caturras, periquitos-australianos, aves da subfamília *Loriinae* e psitacíformes americanos.^[2,24,38,44]

Aves que sobrevivem à forma aguda da patologia poderão desenvolver a forma crónica mais tarde.^[33] Algumas aves imunocompetentes poderão recuperar totalmente da infeção.^[28] Estas aves não padecerão de novo da patologia e não excretarão o vírus.^[28,31]

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico de PBFD é simples quando a ave demonstra lesões clássicas nas penas e no bico, embora seja prudente considerar alguns diagnósticos diferenciais. A presença de penas distróficas é sugestiva, embora também ocorra na infeção pelo poliomavírus aviário (APV) ou por hipotiroidismo.^[19,28] A aptéria pode ter várias causas, como distúrbios nutricionais, ectoparasitismo, foliculite, hepatopatia, *stress* ou mau manejo ambiental.^[42] A alteração da cor das penas e as anomalias do bico também ocorrem em aves com distúrbios nutricionais, hipotiroidismo, hepatopatia ou neoplasia.^[42] Alguns psitacíformes de criação possuem alteração da cor das penas sem possuírem qualquer tipo de doença. O diagnóstico clínico em aves com sintomatologia inespecífica é mais desafiante. O diagnóstico definitivo de PBFD exige a realização de exames complementares que confirmem a suspeita clínica.

A análise hematológica poderá revelar alterações em psitacíformes juvenis afetados sobretudo pela forma aguda, em particular em papagaios cinzentos africanos. Leucopénia severa (com menos de 2×10^9 células/L) com heteropénia são sugestivos de infeção por BFDV.^[8,20] A presença de anemia numa ave infetada é controversa. Existem autores que não admitem relação entre a doença e anemia, enquanto outros propõem que anemia não-regenerativa com hematócrito entre 10 a 25% é sugestiva.^[8,18,20,24,28] A maioria das aves não demonstra alterações sugestivas das enzimas hepáticas, embora aves afetadas cronicamente possam demonstrar hipoproteinémia com diminuição dos valores de pré-albumina e gamaglobulinas.^[8,18]

A necrópsia e a análise histopatológica podem revelar lesões compatíveis com PBFD. Aves afetadas pelas formas hiperaguda e aguda apresentam necrose hepática, esplenomegália, atrofia do timo e da bolsa de Fabricius, pneumonia e enterite, bem como lesões provocadas por agentes patogénicos secundários.^[24,28]

O diagnóstico laboratorial da infeção é feito por métodos diretos ou indiretos. Os métodos diretos detetam a presença do vírus, enquanto os métodos indirectos detetam a existência de anticorpos contra o vírus.

Os métodos diretos de deteção de BFDV incluem o teste de hemaglutinação e o PCR. O teste de hemaglutinação baseia-se na capacidade hemaglutinante do vírus e é feito com material recolhido das penas. Permite avaliar a excreção de BFDV pelas penas. O PCR é o teste que possui maior sensibilidade e especificidade.^[22] A metodologia descrita por Ypelaar *et. al* (1999) tem como alvo dois *primers* contidos na ORF1, uma zona genómica conservada do vírus^[43], o que amplia o espectro de detecção do teste. Algumas estirpes desviantes poderão não ser detetadas pelo teste.^[28] O teste pode ser realizado com amostras de sangue, penas ou zaragoas da cloaca. A análise da amostra de sangue é a que se correlaciona melhor com sinais clínicos de PBFD, embora possa originar resultados negativos caso a virémia seja curta ou a leucopénia seja muito severa.^[16] A análise das penas coloca vários obstáculos à interpretação dos resultados. Nem todas as penas de uma ave infetada contêm o vírus, sobretudo se a ave não manifestar sintomatologia.^[24] Para além disso, possui um maior risco de originar resultados falsos positivos por contaminação ambiental das penas por vírus excretado por outras aves infetadas.^[28]

O método indireto de eleição é o teste de inibição da hemaglutinação (HI) usando uma amostra de sangue. O título de anticorpos quantifica a resposta imune do organismo contra a infeção, visto que a presença de anticorpos contra o vírus no sangue tem elevado valor preditivo negativo para a infeção clínica. Este exame exige cautela na interpretação dos seus resultados. Algumas aves podem ter títulos de anticorpos baixos e oscilantes por persistência do vírus nas células imunes ou pela imunossupressão severa, podendo levar a falsos negativos.^[22]

O uso combinado de testes de HA, HI e PCR permite um diagnóstico mais preciso das aves testadas, tal como se resume na Tabela 1. Por exemplo, uma situação na qual uma ave sem sinais clínicos suspeitos é positiva no teste de PCR pode ocorrer aquando de contaminação da amostra, de uma infeção no seu início ou de uma infeção transitória com aquisição de resposta imunitária. Nesta situação recomenda-se uma nova realização de PCR 90 dias após o primeiro teste ou a realização de um teste de HI. Se a ave possuir anticorpos contra o agente ou o segundo teste de PCR for negativo, o clínico pode

deduzir que a ave está a combater a infeção, devendo considerar-se sempre a possibilidade de o segundo resultado ser falso negativo ou de o primeiro ter sido falso positivo.^[44]

Utilizando a amostra recolhida para deteção de BFDV, é comum realizar-se simultaneamente sexagem genética e testagem para a presença de DNA de APV por PCR. A infeção por APV, um vírus de dsDNA sem envelope, pode resultar em quadros clínicos semelhantes aos que o BFDV origina, sendo o principal diagnóstico diferencial.^[35] A infeção por APV é menos frequente mas a infeção conjunta pelos dois vírus pode ocorrer.^[24]

Tabela 1 – Interpretação dos resultados laboratoriais do teste de PCR para BFDV de acordo com a sintomatologia da ave.

Sintomatologia	PCR	Interpretação
Sugestiva	+	- Provável infeção ativa
Sugestiva	-	- PCR falso-negativo: • erro na colheita da amostra • erro na técnica laboratorial (heparina, operadores) • estirpe não detetada pelo teste - considerar realizar HA, biópsia de foliculo da pena ou outro protocolo de PCR • leucopénia severa ou carga viral demasiado elevada (amostras de sangue) - Considerar outro diagnóstico diferencial
Pouco sugestiva	+	- Infeção inicial - Infeção subclínica transitória – realizar HI para verificar presença de resposta imune ou repetir PCR 90 dias depois do primeiro - PCR falso-positivo: • contaminação da amostra na recolha • contaminação da amostra no processamento
Pouco sugestiva	-	- Ave <i>naïve</i> - Ave que combateu a infeção com resposta imune

2.6 Tratamento

As opções terapêuticas para a PBFD são limitadas, visto que a doença é na maioria das vezes fatal, pelo que se elege a terapia de suporte e manutenção da qualidade de vida da ave, sobretudo se afetada pela forma crónica.^[26] Estas aves necessitarão de viver em locais mais quentes, de aparagens corretivas do bico frequentes, de administração de imunoestimuladores como probióticos e vitamina A e de monitorização eficaz de infeções secundárias.^[24,35] Aves afetadas pela forma crónica cuja qualidade de vida esteja comprometida devem ser eutanasiadas.^[24] Foi testada a eficácia terapêutica de interferão felino $\alpha 1$, β -(1,3/1,6)-D-glucano e interferão γ aviário. Embora a eficácia dos dois primeiros protocolos não tenha sido satisfatória.^[39,40], a utilização de interferão aviário com nebulizações com compostos quaternários de amónia é promissora.^[39]

2.7 Controlo e profilaxia

Em contexto de criação de aves ou de colecionismo, os detentores das aves devem ser aconselhados a testar todas através de PCR e isolar todos os casos positivos confirmados. Manter estas aves, mesmo em isolamento, acrescenta um risco para as restantes pela possível transferência do vírus por fómites. Caso o objetivo seja tornar todo o bando negativo, estas aves devem ser removidas do bando, com a reserva de que algumas destas poderão recuperar da doença e testar negativamente num teste de PCR posterior. Caso sejam mantidas, é necessária cautela e um rigoroso plano de biossegurança para a manutenção destas aves visto que podem continuar a excretar o vírus pelo pó das penas até à muda seguinte. Todas as aves introduzidas devem ser testadas no momento da introdução e, idealmente, passados 30 a 90 dias dessa testagem.^[24,26] Caso se opte pelo intervalo de 90 dias, sugere-se que as aves passem por um período de quarentena de seis meses.^[7] Detentores de aves suscetíveis que também mantêm aves resistentes devem ser desaconselhados de manter estas últimas pelas cargas virais que podem excretar.^[28]

Os circovírus são muito estáveis no ambiente, resistindo a variações térmicas e à aplicação de vários desinfetantes.^[30] Embora ainda não se conheça qual o desinfetante ideal para os inativar, aconselha-se a que após a remoção das aves infetadas sejam desinfetados todos os equipamentos, locais de alojamento e vestuário com glutaraldeído a 1% ou compostos de peróxido a 1%.^[24,28] A eficácia da limpeza pode ser verificada através de PCR para BFDV usando zaragatoas ambientais.^[26]

Embora ainda não exista uma vacina comercial disponível, já foi demonstrada a eficácia da utilização de uma vacina inativada e de uma vacina recombinante com proteína da cápside de BFDV.^[3,30] Estas vacinas não impedem a infeção, apenas atrasam a progressão da transmissão no bando.

3. Materiais e Métodos

3.1 Seleção dos animais

A informação recolhida sobre os casos utilizados nesta dissertação foi obtida através de pesquisa no sistema informático do CVEP (<http://cve.sincelo.pt>), utilizando as palavras-chave “circovírus” e “circo”. Desta forma, foi adquirida informação relativa a 116 aves. Este número agrupa aves que se apresentaram no centro para rastreio de BFDV, que possuíam PBFD como diagnóstico diferencial para o seu quadro clínico, ou com PBFD confirmada. Foram considerados “casos” as aves que obedeceram a todos os seguintes critérios de inclusão:

- a) aves com resultados do teste PCR para BFDV positivo;

b) aves cujo registo consta entre o período temporal de janeiro de 2010 até fevereiro de 2020;

c) aves pertencentes exclusivamente à ordem taxonómica *Psittaciformes*.

Destas aves, foram excluídos 2 animais com 2 testagens sucessivas por PCR para BFDV por apresentarem resultados diferentes entre os testes realizados. Uma breve descrição clínica destas duas aves é apresentada na discussão. Foram considerados “controles” as aves com resultado negativo no teste PCR para BFDV e que obedeciam às alíneas **b)** e **c)** supracitadas.

Com base nestes critérios foram selecionados 19 casos e 46 controles para os estudos. A informação relativa às 51 aves que não foram selecionadas para os estudos será discutida e consta nos dados apresentados, na categoria “Não-testada” das várias tabelas e gráficos. Nas tabelas A, B, C, D e E do Anexo IV os dados não usados nos estudos estão a cinzento.

3.2 Definição das variáveis

Foi obtida informação relativa à espécie, idade, sexo, sintomatologia, análise hematológica e testagem para BFDV e APV por PCR. Foram criadas três categorias principais de acordo com os resultados dos testes PCR para BFDV: “Caso”, “Controlo” e “Não-testada”. Estas categorias foram aplicadas na apresentação da restante informação recolhida nas tabelas que constam do Anexo IV. As espécies dos casos recolhidos, agrupadas consoante o resultado de PCR para BFDV, encontram-se na Tabela A do Anexo IV. Nesta tabela, as espécies diferentes do género *Agapornis* spp., bem como de *Amazona* spp., foram agrupadas em categorias desses géneros. As espécies foram posteriormente agrupadas em duas categorias – “*Psittacus erithacus*”, na qual apenas se incluíram aves dessa espécie, e “Outras espécies”, na qual se incluíram as restantes espécies listadas na tabela.

O sexo das aves foi determinado com recurso a um teste PCR, embora quando possível outras características externas tenham sido usadas como auxílio à determinação, nomeadamente a coloração de plumagem, a cor da íris, a cor da cera, o peso e história de postura de ovos. A determinação do sexo não foi possível em 56 aves, sendo classificado de “indefinido” (IND).

As idades das aves foram agrupadas em duas principais categorias: “Até a 1 ano de idade” e “Mais de 1 ano de idade”. Estas categorias foram escolhidas porque a forma aguda de PBFD ocorre sobretudo em aves até um ano de idade.^[8,24,37] Qualquer idade não registada na plataforma informática foi classificada de “Indefinida”.

Os achados ao exame geral e os dados de anamnese registados na plataforma informática foram analisados e agrupados em várias categorias. As aves sem estas informações na plataforma foram agrupadas na categoria “Não-avaliado”. A categoria “Penas” inclui alteração da cor das penas, penas distróficas, *blood feathers*, diminuição ou ausência de pó das penas, facilidade na depena e aptéria. A categoria “Bico/unhas” inclui maloclusão do bico, sobrecrecimento do bico e das unhas e ausência de unhas. A categoria “Digestivo” inclui diarreia, regurgitação, vômito e atraso no esvaziamento do papo. A categoria “Respiratório” inclui espirros, corrimento nasal, tumefação do seio infraorbitário, *tail-bobbing*, dispneia e ruído respiratório. A categoria “Neurológico” inclui convulsões, *head-tilt*, tremores de intenção e ataxia. A categoria “Dermatológico” inclui eritema, escoriações, lacerações e úlceras cutâneas, dermatite, hiperqueratose e prurido. A anorexia, a apatia e o picacismo foram considerados categorias separadas, que representam esses sinais isoladamente. Outros sinais clínicos pouco específicos e menos frequentemente apresentados, nomeadamente dilatação celômica, poliúria, polidipsia, polifagia, fraqueza e alteração da cor dos uratos, foram agrupados na categoria “Outros”.

Numa segunda fase de análise das apresentações clínicas, foi avaliada a presença de sintomatologia compatível com a forma aguda de PBFD, com base na literatura.^[24,28] Foi criada a categoria “sintomatologia compatível com PBFD aguda” com base nos seguintes sinais clínicos: apatia, anorexia, diarreia, biliverdinúria, estase do papo, regurgitação e vômitos. As aves incluídas nesta categoria apresentaram pelo menos um dos sinais clínicos e foram classificadas com “compatível”. As aves que não manifestaram estes sinais foram classificadas com “pouco compatível”. Criou-se também uma categoria que inclui sinais respiratórios, neurológicos, dermatológicos, picacismo e outros sinais de acordo com as categorias previamente criadas, designada de “Outros sinais clínicos”.

Os resultados da análise hematológica recolhidos foram divididos em duas categorias: “Hematologia compatível com PBFD” e “Hematologia pouco compatível com PBFD”. Foi interpretado o número total de leucócitos por microlitro de sangue, a percentagem de heterófilos no leucograma diferencial e o valor do microhematócrito. A interpretação foi feita tendo em conta o efeito do BFDV na medula óssea e nas células sanguíneas circulantes, sendo que aves infetadas podem manifestar leucopénia e/ou heteropénia. Para a interpretação dos valores foram usados os valores de referência tabelados por Hawkins *et. al* (2018), expostos na Tabela 2.^[14] As aves sem análise hematológica realizada foram classificadas com “Não-avaliado”. Considerou-se que uma ave apresentou heteropénia quando o valor relativo dos heterófilos era menor que o tabelado e a ave possuía um número total de leucócitos normal ou diminuído. As aves

foram categorizadas em “hematologia compatível com PBFD” quando apresentaram leucopénia e/ou heteropénia. O valor do microhematócrito não foi incluído na categorização das aves, visto que a sua relação com a infeção é inconsistente na literatura.^[8,18,24,28]

Tabela 2 - Valores de referência utilizados para a interpretação da análise hematológica dos casos recolhidos, adaptados de Hawkins *et. al* (2018).

Espécie	Leucopénia (células/ μ L)	Heteropénia relativa (%)
<i>Agapornis</i> spp.	$<7 \times 10^3$	<40
<i>Amazona</i> spp.	$<6 \times 10^3$	<31
<i>Cacatuidae</i>	$<5 \times 10^3$	<45
<i>Ecletus roratus</i>	$<9 \times 10^3$	<46
<i>Melopsittacus undulatus</i>	$<3 \times 10^3$	<40
<i>Nymphicus hollandicus</i>	$<5 \times 10^3$	<46
<i>Pionites melanocephalus</i>	$<8 \times 10^3$	<39
<i>Poicephalus senegalus</i>	$<6 \times 10^3$	<44
<i>Psittacus erithacus</i>	$<6 \times 10^3$	<45

Em relação à testagem para APV por PCR, as aves foram agrupadas nas mesmas categorias usadas para BFDV.

3.3 Metodologia laboratorial

A análise hematológica e a testagem por PCR de BFDV e APV foram realizadas em contexto clínico com o objetivo de confirmar a suspeita de PBFD e descartar o APV como diagnóstico diferencial. Os resultados obtidos foram introduzidos na plataforma informática da clínica, sendo estes dados o alvo de exploração nesta dissertação. A recolha de amostras sanguíneas foi feita através de punção das veias jugular direita ou braquial. O sangue recolhido foi colocado em lâminas para realização de esfregaços sanguíneos e em tubos capilares de microhematócrito. Estes foram usados para a análise hematológica *in-house*. O sangue restante foi colocado em tubos EDTA ou em papel de solitação diagnóstica, posteriormente enviados para laboratórios para a realização de testes PCR para BFDV e APV. A maioria dos testes PCR usados para BFDV adotaram a metodologia descrita por Ypelaar *et. al* (1999)^[43]. A metodologia de PCR para APV não é especificada pelo laboratório. As testagens mais recentes para ambos os vírus utilizaram protocolos RT-PCR, embora a metodologia usada também não seja especificada.

Foram enviadas amostras de penas para PCR para BFDV em 3 aves. Foram retiradas 3 a 5 penas em crescimento da zona envolvente à cloaca e foram coladas com fita adesiva num papel de solitação diagnóstica disponibilizado pelo laboratório. O teste PCR usado adotou a metodologia descrita por Ypelaar *et. al* (1999).^[43]

Em 18 aves a amostra de sangue recolhida foi utilizada simultaneamente para a sexagem da ave utilizando um teste PCR de acordo com a espécie.

A análise hematológica foi realizada *in-house* manualmente. Devido à morfologia das células sanguíneas aviárias, nomeadamente a presença de trombócitos e de eritrócitos nucleados de grandes dimensões relativamente aos leucócitos, os métodos automáticos aplicados em mamíferos poderão não ser adequados.^[5] O número de leucócitos foi determinado a partir da zona de monocamada dos esfregaços sanguíneos. Este método consiste em contar o número de leucócitos em 10 campos com ampliação 40x e calcular a média, que é multiplicada posteriormente por 2000.^[5] O resultado é expresso em células/ μ L.

Nem todos os métodos complementares de diagnóstico supracitados foram realizados em todas as aves, por decisão do veterinário para o estabelecimento de um diagnóstico clínico, ou por limitações financeiras dos tutores.

3.4 Metodologia estatística

A informação recolhida foi compilada utilizando o *software Microsoft Excel 2010®* e analisada no *software IBM SPSS Statistics 26®*. A significância (α) utilizada nos testes estatísticos foi de 0,05.

Foi realizado um estudo caso-controlo, utilizando os casos e controlos seleccionados. Pretendeu-se verificar o efeito de diferentes variáveis nos resultados da testagem por PCR, de acordo com as categorias criadas. As variáveis analisadas foram a espécie, o sexo e a idade. Pretendeu-se verificar qual o efeito do resultado positivo de PCR para BFDV nas apresentações clínicas, na presença de sintomatologia compatível com PBFD aguda e na presença de hematologia compatível com PBFD. Calcularam-se os valores de *Odds Ratio* (OR), intervalo de confiança a 95%, χ^2 e p para as diferentes análises.

Foram feitas análises adicionais para algumas variáveis:

- a)** Avaliou-se a relação entre casos com lesões nas penas e casos sem essas lesões com a faixa etária das aves, usando o teste χ^2 ;
- b)** Avaliou-se a relação entre casos com sintomatologia compatível com PBFD aguda e casos sem essa sintomatologia com algumas variáveis (espécie, sexo e idade), utilizando os testes OR (com IC a 95%) e χ^2 ;
- c)** Averiguou-se se o grupo não-testado por PCR mas com hematologia sugestiva de PBFD (grupo NTHS) é comparável com os casos. Foram comparadas as variáveis (espécie, idade, sexo e sintomatologia compatível com PBFD aguda) entre os grupos NTHS, casos e controlos através do teste χ^2 .

4. Resultados

4.1 Variáveis categorizadas

Os gráficos representam os resultados obtidos para as diferentes variáveis. As tabelas referentes a estas informações (Tabelas B, C, D e E) encontram-se no Anexo IV.

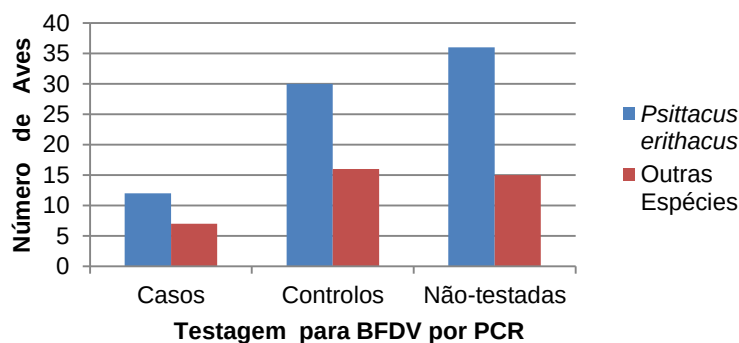


Gráfico 1 – Número de aves de acordo com a espécie e com o PCR para BFDV.

A maioria dos 116 animais pertencia à espécie *Psittacus erithacus* (78, 67%). Foram testadas por PCR para BFDV 65 aves (56%), sendo que 19 (29%) constituíram casos e 46 (71%) constituíram controlos (Gráfico 1). Dos casos, 12 (63%) eram da espécie *Psittacus erithacus* e 7 (37%) de outras espécies, enquanto que dos controlos 30 (65%) eram da espécie *Psittacus erithacus* e 16 (35%) de outras espécies.

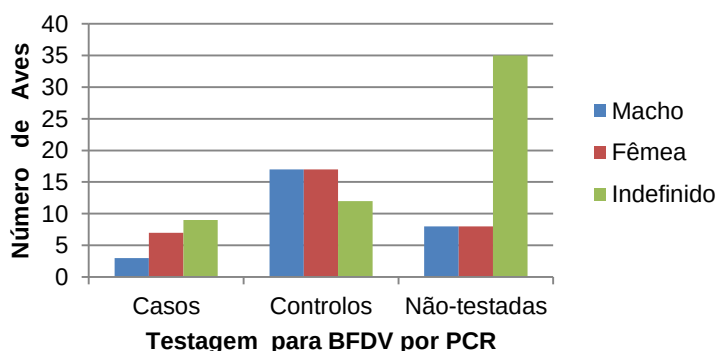


Gráfico 2 – Número de aves de acordo com o sexo e com o PCR para BFDV.

Não havia registo do sexo em 56 (48%) aves (Gráfico 2). Dos 19 casos, 3 (16%) eram machos, 7 (37%) fêmeas e 9 (47%) não tinham o sexo registado. Dos 46 controlos, 17 (37%) eram machos, 17 (37%) eram fêmeas e 12 (26%) não tinham o sexo registado.

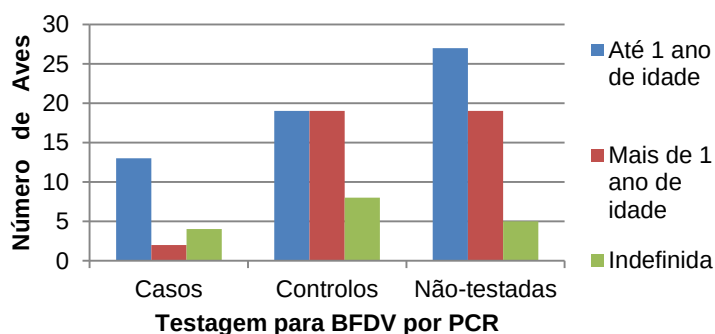


Gráfico 3 – Número de aves de acordo com a idade e com o PCR para BFDV.

Não havia registo da idade em 17 (15%) aves (Gráfico 3). Dos 19 casos, 13 (68%) tinham até um ano de idade, 2 (12%) tinham mais de um ano de idade e 4 (21%) não tinham a idade registada. Dos 46 controlos, 19 (41%) tinham até um ano de idade, 19 (41%) tinham mais de um ano de idade e 8 (17%) não tinham a idade registada.

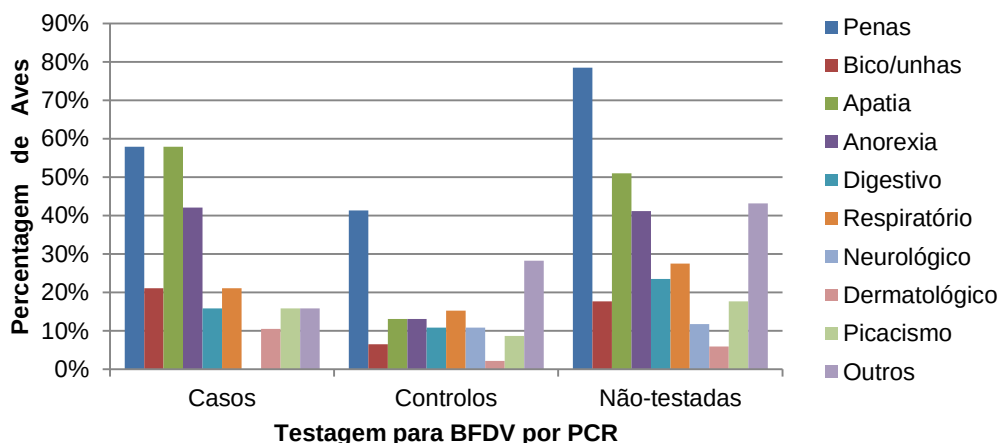


Gráfico 4 – Percentagem de aves com os diferentes sinais clínicos de acordo com o PCR para BFDV. As proporções foram calculadas com base no número de aves de cada grupo de testagem por PCR.

Não havia registo dos sinais clínicos em 8 (6,9%) das 116 aves. Dos casos, as três apresentações clínicas mais frequentes foram as lesões nas penas (58%), a apatia (58%) e a anorexia (42%). Nos controlos, foram as lesões nas penas (41%), outros sinais clínicos conforme categorizado (28%) e sinais respiratórios (15%) (Gráfico 4).

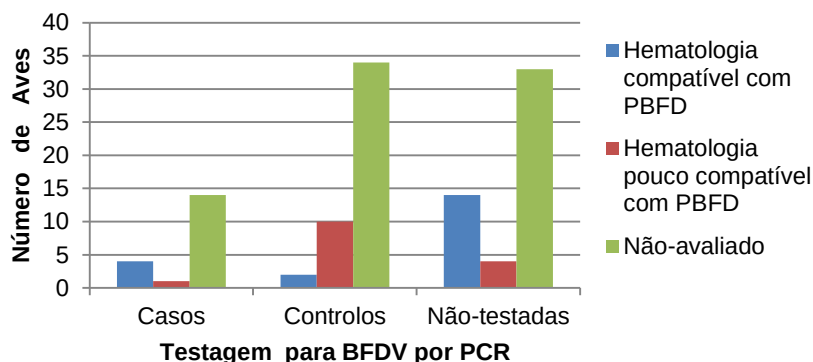


Gráfico 5 – Número de aves de acordo com a hematologia e com o PCR para BFDV.

Dos 19 casos, 5 (26%) aves foram submetidas a análise hematológica e destas 4 (80%) apresentaram resultado compatível com PBFD (Gráfico 5). Dos 46 controlos, foi analisado o sangue de 12 (26%) aves e 2 (17%) destas apresentaram resultados compatíveis com PBFD. Das 51 aves não-testadas por PCR, 18 (35%) foram submetidas a análise hematológica. Destas, 14 (78%) evidenciaram alterações hematológicas sugestivas de PBFD. Estas 14 aves constituem o grupo Não-Testado com Hematologia Sugestiva de PBFD (grupo NTHS). A Tabela 3 representa as informações do grupo NTHS relativas às outras variáveis.

Tabela 3 – Dados das aves não-testadas por PCR para BFDV, mas com hematologia compatível com PBFD (grupo NTHS).

Dados	Valores
Espécie	<i>Psittacus erithacus</i> – 12 Outras espécies - 2
Sexo	Macho - 4 Fêmea - 1 Indefinido - 9
Idade	Até 1 ano de idade – 12 Mais de 1 ano de idade – 1 Indefinido - 1
Sintomatologia	Sintomatologia compatível com PBFD aguda - 12 Sintomatologia pouco compatível com PBFD aguda - 2

Foram testadas 17 (15%) das 116 aves por PCR para detecção de APV. Foram testados 3 (16%) dos casos e 14 (30%) dos controlos. Todos os testes obtiveram resultado negativo.

4.2 Análise estatística das variáveis

A Tabela 4 expõe associações estatísticas entre as diferentes variáveis e os casos e controlos de BFDV, obtidos entre janeiro de 2010 a fevereiro de 2020, de acordo com a seguinte organização:

- variáveis biológicas – espécie, sexo e idade;
- categorias de sinais clínicos de maior interesse;
- sintomatologia compatível com PBFD aguda e outros sinais.

Tabela 4 – Valores de OR, IC a 95%, χ^2 e p da associação dos casos e controlos de BFDV com as variáveis biológicas e sinais clínicos.

	Análises	Odds Ratio	Intervalo de Confiança de 95%		χ^2	p
			Limite inferior	Limite superior		
a)	Espécie	0,914	0,301	2,780	0,025	0,875
	Sexo	0,429	0,095	1,941	1,247	0,264
	Idade	6,500	1,288	32,806	6,044	0,014
b)	Penas	2,123	0,660	6,832	1,623	0,203
	Bico/unhas	3,897	0,768	19,773	2,976	0,084
	Apatia	10,694	2,860	39,989	14,542	0,000
	Anorexia	5,185	1,431	18,785	6,900	0,009
c)	Sintomatologia compatível com PBFD aguda	3,536	1,080	11,574	4,576	0,032
	Outros sinais	1,714	0,556	5,283	0,890	0,346

Em **a)**, apenas a idade revelou associação estatística ($p < 0,05$). Os casos apresentaram *odds* 6,5 vezes superiores de terem menos de um ano de idade em relação aos controlos.

Em **b)**, apenas as categorias “apatia” e “anorexia” apresentaram resultados estatisticamente significativos que demonstram existir diferença entre os casos e os controlos. Os valores de OR indicam que os casos apresentaram *odds* 10,7 e 5,2 vezes maiores de manifestarem apatia e anorexia, respetivamente, que os controlos. A presença de lesões nas penas, no bico e nas unhas não foi significativamente diferente entre os casos e os controlos com a dimensão da amostra avaliada, embora os valores de OR sugiram *odds* maiores de casos apresentarem lesões que os controlos. Os resultados das categorias “digestivo”, “respiratório”, “neurológico”, “dermatológico”, “picacismo” e “outros” não foram estatisticamente significativos e encontram-se na Tabela F do Anexo IV. Contudo, os resultados sugerem que os casos apresentaram *odds* 1,1 vezes maiores de apresentarem sinais neurológicos que os controlos, visto que o IC para este valor inclui valores maiores que o valor unitário.

Em **c)**, revela-se que existe diferença estatisticamente significativa entre os casos e os controlos em relação à apresentação de sintomatologia compatível com PBFDA aguda. Os casos apresentaram *odds* 3,5 vezes maiores de exibirem este quadro clínico que os controlos. Os resultados indicam não existir relação significativa para a apresentação de outros sinais clínicos entre os casos e os controlos.

4.3 Análise estatística entre a sintomatologia aguda e as variáveis

A Tabela 5 expõe a associação, para os casos, entre a sintomatologia compatível com PBFDA aguda e a sua espécie, idade e sexo.

Tabela 5 - Valores de OR, IC a 95%, χ^2 e p da associação entre casos com sintomatologia compatível com PBFDA aguda e casos sem essa sintomatologia, relativamente à espécie, idade e sexo.

Análises	Odds Ratio	Intervalo de Confiança de 95%		χ^2	p
		Limite inferior	Limite superior		
Espécie	20,000	1,391	287,600	6,199	0,013
Sexo	0,800	0,044	14,643	0,023	0,880
Idade	12,000	0,773	186,362	3,764	0,052

Nestas análises pretendeu-se comparar casos com sintomatologia aguda com casos sem sintomatologia aguda, em relação à espécie, sexo e idade das aves. Verificou-se que existe diferença significativa entre a apresentação ou não de sintomatologia aguda e a espécie da ave. Casos com sintomatologia aguda apresentaram *odds* 20 vezes maiores de serem da espécie *Psittacus erithacus* que os casos sem sintomatologia aguda. Relativamente ao sexo e à idade, os valores não foram significativos, embora o valor de p para a idade esteja próximo da significância estatística. Tal sugere que casos

com sintomatologia aguda apresentaram *odds* 12 vezes maiores de terem menos de um ano de idade que os casos sem sintomatologia aguda.

Posteriormente, foram comparados casos com lesões nas penas, bico e unhas com casos sem estas lesões, no que diz respeito à idade das aves. Os resultados não foram estatisticamente significativos, sugerindo não existir relação entre a idade e manifestação das lesões (Penas: $\chi^2 = 1,296$; $p = 0,255$; Bico/unhas: $\chi^2 = 0,525$; $p = 0,469$; $n = 17$).

4.4 Análise estatística da hematologia

Os valores obtidos revelaram existir diferença significativa entre os casos e os controlos em obter resultados hematológicos compatíveis com PBFD ($\chi^2 = 6,199$; $p = 0,013$; $n = 17$). Os casos apresentaram *odds* 20 vezes maiores de apresentarem resultados hematológicos compatíveis que os controlos (IC a 95%: 1,391-287,600).

A comparação das variáveis (espécie, sexo, idade e sintomatologia compatível com PBFD aguda) entre o grupo NTHS e os casos não revelou diferenças significativas na expressão de nenhuma das variáveis, como exposto na Tabela G do Anexo IV. A comparação dessas variáveis entre o grupo NTHS e os controlos revelou diferenças significativas na idade das aves e na expressão de sintomatologia compatível com PBFD aguda (Idade: $\chi^2 = 7,274$; $p < 0,05$; Sintomatologia: $\chi^2 = 11,134$; $p < 0,05$; $n = 60$).

5. Discussão

5.1 Generalidades

5.1.1 Interpretação geral dos resultados obtidos

Os dados compilados foram obtidos de registos entre janeiro de 2010 e fevereiro de 2020 do CVEP. Neste período, de 65 aves testadas por PCR, 19 (29,2%) obtiveram resultado positivo. Visto que este centro veterinário se especializa no atendimento de espécies exóticas, os dados obtidos são uma boa aproximação da realidade dos psitacíformes no Norte de Portugal e revelam a importância de BFDV nestes animais. Adicionalmente, a existência de aves com resultados de PCR positivos com sinais clínicos discretos e com bom estado geral revela a importância da testagem por PCR como rastreio para a deteção do vírus. A natureza imunossupressora do vírus, bem como a ação patogénica direta deste, levam a que a PBFD possa debilitar significativamente as aves infetadas, comprometendo a sua longevidade e bem-estar. É importante testar as aves em coleções e as aves recém-adquiridas por tutores, para que seja despistada a presença do vírus. Caso o vírus ocorra, devem ser adotadas medidas de controlo da circulação viral entre as aves. Salienta-se a importância da espécie, idade, sintomatologia

e estado hematológico da ave como informações úteis para o estabelecimento do diagnóstico e prognóstico, como referido nas próximas secções.

5.1.2 Amostras utilizadas nos PCR para BFDV

Em todas as aves testadas por PCR para BFDV foram utilizadas amostras de sangue. Em três das aves analisadas foi feita a recolha de penas emparelhada com a colheita sanguínea para envio conjunto das amostras para testes PCR para BFDV. Cada ave fez dois testes PCR usando cada uma uma amostra diferente. Os resultados foram concordantes entre si nas três aves, sendo que apenas uma obteve resultados positivos. Estes resultados estavam em concordância com o quadro clínico que a ave apresentava, reforçando a confiança no resultado do teste. De acordo com a bibliografia, privilegia-se o envio de amostras de sangue, visto que os resultados com este tipo de amostra são os que apresentam maior correlação com a presença da doença.^[16] Para além disso, nem todas as penas de uma ave infetada excretam o vírus num determinado momento e as penas apresentam maior risco de contaminação por partículas virais ambientais, originando mais resultados falsos positivos.^[16,24,28] Contudo, a amostra de sangue pode resultar em falsos negativos em determinadas situações, nomeadamente quando a leucopénia é muito severa.^[24] Por esta razão, o envio simultâneo de sangue e penas para testagem, conforme ocorreu nestas 3 aves, poderá ser considerado para uma melhor interpretação dos resultados.

5.1.3 Casos excluídos

Foram excluídos dois papagaios cinzentos africanos juvenis da análise, por cada um ter realizado dois testes PCR com resultados discordantes. Uma das aves obteve um resultado negativo no primeiro teste, estando assintomática aquando da sua realização. Três meses depois, a ave manifestou anorexia e apatia. Foi testada novamente e apresentou resultado positivo. Visto que os resultados de PCR estão de acordo com a sintomatologia exibida aquando da sua realização, pode ser deduzido que a ave foi infetada por BFDV e desenvolveu PBFD entre as duas análises. A outra ave excluída não exibia sintomatologia e obteve resultado positivo no primeiro teste PCR realizado, obtendo também um resultado sugestivo de PBFD na análise hematológica. Após um ano, a ave apresentava várias *blood feathers* e foi testada novamente por PCR, obtendo resultado negativo e hematologia sem anomalias. É possível que esta ave tenha combatido a infeção, sem resolução completa das alterações nas penas provocadas pelo vírus aquando do segundo teste. Este tipo de progressão clínica não é frequente nesta espécie, sendo mais comum a morte do animal num curto período de tempo. Outra interpretação possível poderá ser a obtenção de um resultado falso positivo na primeira testagem, ou

de um falso negativo na segunda testagem, embora seja pouco provável visto que os resultados hematológicos corroboram os de PCR. Para uma melhor interpretação clínica, podia ter sido feito um teste HI.

5.2 Variáveis

5.2.1 Espécie

A elevada representação de papagaios cinzentos africanos nos dados recolhidos justifica-se pela sua popularidade como ave de companhia em Portugal e está relacionada com a sua menção frequente na bibliografia acerca de PBFD. Quando o veterinário se depara com um papagaio cinzento africano com sintomatologia inespecífica ou com alteração da cor das penas, a PBFD é um dos primeiros diagnósticos diferenciais a ser considerado. Visto que é uma espécie do Velho Mundo, mais suscetível ao desenvolvimento de PBFD em relação a outros psitacíformes e que desenvolve uma forma aguda característica, poderá haver um maior esforço clínico na deteção de BFDV nesta espécie.^[13,24]

Os resultados obtidos sugerem que os papagaios cinzentos africanos não apresentam maior suscetibilidade em adquirir a infeção por BFDV e obter resultado positivo no teste PCR em relação aos outros psitacíformes considerados.

5.2.2 Sexo

As análises de sexo e faixa etária não incluíram os dados de aves cuja determinação não foi possível ou não estava disponível na plataforma. As particularidades biológicas das aves complicam a determinação externa destas características, exigindo o uso de registos e de provas laboratoriais para a sua determinação. Os resultados sugerem que não existe relação entre o sexo da ave e o desenvolvimento de infeção por BFDV. Este resultado está de acordo com o número semelhante entre machos e fêmeas nos casos e nos controlos e com a bibliografia, que reporta não existir predisposição sexual para a infeção por BFDV.^[12]

5.2.3 Idade

De acordo com a amostra obtida e com o contexto da clínica em questão, os casos apresentaram *odds* 6,5 vezes maiores de terem até um ano de idade que os controlos. O intervalo de confiança de OR foi moderadamente amplo, podendo dever-se ao número reduzido de indivíduos disponíveis para análise, nomeadamente de casos de aves com mais de um ano de idade. Os resultados estão de acordo com a descrição na bibliografia de que aves jovens são mais suscetíveis à infeção pelo vírus.^[24,26] As aves juvenis ainda estão a maturar o seu sistema imunitário, em particular a bolsa de Fabricius, pelo que a infeção pelo vírus nesta faixa etária poderá comprometer precocemente o

desenvolvimento de um sistema imune competente, potenciando o surgimento de doença clínica e de infeções secundárias debilitantes.^[28] As aves mais velhas com competência imunológica são frequentemente capazes de montar uma resposta imune que elimina eficazmente o vírus antes que este estabeleça infeção e doença clínica.^[24]

5.3 Apresentações clínicas

A existência de aves com sinais clínicos ligeiros e positivas na testagem por PCR revela a importância da deteção precoce do vírus. Estas aves, em conjunto com as aves com sintomatologia sugestiva mas com resultado negativo na testagem realçam a importância da integração do quadro clínico da ave com o resultado obtido laboratorialmente, como exposto na Tabela 1. Esta integração permite entender melhor a situação do paciente e oferecer um prognóstico mais preciso aos tutores e criadores.

5.3.1 Categorias clínicas

Das categorias criadas, apenas as categorias “apatia” e “anorexia” apresentaram resultados estatisticamente significativos que demonstram existir diferença entre os casos e os controlos. Os resultados de OR sugerem que os casos apresentaram *odds* 10,7 e 5,2 vezes maiores de manifestarem apatia e anorexia, respetivamente, que os controlos. Estes resultados são compatíveis com a ação debilitante do vírus e com a natureza inespecífica destes sinais clínicos, que podem surgir em múltiplas situações de doença orgânica. Embora o surgimento destes sinais não seja um indicador preditivo sensível para a infeção por BFDV, o clínico deve incluir a PBFD na lista de diagnósticos diferenciais após o exame clínico de uma ave que apresenta esses sinais. A suspeita clínica de PBFD deve ser maior numa ave juvenil e pertencente às espécies de psitacíformes do Velho Mundo.

A ocorrência das restantes apresentações clínicas categorizadas não foi significativamente diferente entre os casos e os controlos. Contudo, a maioria dos valores de OR, sobretudo o valor calculado para a sintomatologia neurológica, poderão sugerir que uma ave infetada está mais predisposta ao seu surgimento. Está descrita a infeção por adenovírus em aves imunossuprimidas por BFDV.^[8] Esta infeção pode resultar em encefalite com manifestação de sinais neurológicos.^[13] Outros diagnósticos diferenciais podem ser listados e estes resultados devem ser interpretados cuidadosamente. Os resultados obtidos para a categoria “outros sinais” não foram significativamente diferentes entre os casos e os controlos. O surgimento destes sinais diferentes nos casos poderá estar relacionado com infeções secundárias promovidas pela imunossupressão que o vírus provoca, e não necessariamente pela ação direta do vírus. Da mesma forma, o seu surgimento nos casos e nos controlos pode ocorrer por doenças que não a PBFD. Como

tal, a manifestação destes sinais é inconsistente entre as várias aves e a sua interpretação clínica deve ser cautelosa.

5.3.2 Alterações da plumagem, bico e unhas

A presença de alterações da plumagem não foi significativamente diferente entre os casos e os controlos. O valor de OR sugere que os casos apresentaram *odds* 2,1 vezes maiores de terem lesões nas penas que os controlos. O IC contém o valor unitário, indicando a necessidade de uma amostra maior para aumentar a precisão do teste estatístico e esclarecer esta possível relação. De acordo com estes resultados, a infeção por BFDV e a presença de lesões das penas não estão necessariamente relacionadas. Contudo, segundo a literatura, a ação do vírus nas células responsáveis pelo desenvolvimento das penas leva a alterações patológicas na sua estrutura. O surgimento destas lesões pode ser discreto ou exuberante e ocorre nas penas em crescimento.^[24,28]

A presença de lesões nas penas não é específica de PBFD e pode surgir por outras causas. A PBFD é um dos principais diagnósticos diferenciais a serem considerados numa ave com lesões das penas, mas o clínico deve considerar outras doenças, incluindo doenças sistémicas com manifestação secundária nas penas. Estes resultados poderão também indicar que as aves infetadas por BFDV não manifestam necessariamente lesões nas penas no momento do diagnóstico. A bibliografia indica que as lesões nas penas ocorrem menos frequentemente em papagaios cinzentos africanos afetados pela forma aguda que em outras espécies, e quando surgem a ave já apresenta outros sinais como anorexia, depressão e diarreia.^[8] Visto que a maioria dos casos corresponde a aves juvenis desta espécie, esta interpretação poderá estar em concordância com os resultados.

A presença de alterações do bico e unhas não foi significativamente diferente entre os casos e os controlos. O valor de OR sugere que os casos apresentaram *odds* 3,9 vezes maiores de apresentarem lesões no bico e unhas, embora o IC contenha o valor unitário. Poderão ser feitas propostas semelhantes às feitas para os resultados das lesões das penas. Deve também ser considerado que a representação de aves velhas nos casos é reduzida e que o surgimento de lesões no bico e unhas é mais frequente na forma crónica da doença, que surge sobretudo em aves mais velhas. O aumento da precisão destes resultados deve incluir um maior número de aves de ambas as faixas etárias.

5.3.3 Relação entre as alterações da plumagem, bico e unhas com a idade

Como referido, não foi estabelecida uma relação entre as lesões das penas, bico e unhas com os casos e controlos neste estudo. Pretendeu-se relacionar a presença destas lesões com a idade dos casos, visto que as lesões surgem mais frequentemente em aves

velhas afetadas pela forma crônica. Contudo, a presença destas lesões não foi diferente entre aves juvenis e aves velhas. Salienta-se que o número de aves cuja informação estava disponível para análise era reduzido (n=14).

5.3.4 Sintomatologia compatível com PBFD aguda

Segundo o valor de OR, os casos apresentaram *odds* 3,5 vezes maiores de apresentarem sintomatologia sugestiva de PBFD aguda que os controlos. Esta relação revela a importância do vírus como agente debilitante da saúde geral das aves e não apenas como um perturbador da aparência da plumagem e do bico. Este é um dos principais motivos pelo qual os veterinários e os tutores devem estar sensibilizados para a ocorrência e ação do BFDV em aves. Contudo, estes resultados devem ser interpretados com cautela, visto que estes sinais clínicos não são específicos da doença e podem surgir aquando de infeção por outros agentes ou por outro tipo de doenças.

Os casos com sintomatologia compatível com PBFD aguda apresentaram *odds* 20 vezes maiores de pertencerem à espécie *Psittacus erithacus* que às outras espécies dos casos (*Psittacus timneh*, *Agapornis* spp., *Melopsittacus undulatus*). Embora os papagaios cinzentos africanos não aparentem estar mais predispostos ao desenvolvimento de infeção pelo BFDV, estes resultados apoiam que esta espécie é particularmente suscetível ao desenvolvimento de doença aguda quando a infeção já está estabelecida. A maior predisposição ao surgimento da forma aguda de PBFD em papagaios cinzentos africanos foi documentada por Schoemaker (2000) e por Doneley (2003).^[8,37]

Os resultados da comparação da manifestação de sintomatologia aguda entre as duas faixas etárias dos casos estão próximos da significância estatística, sugerindo uma relação entre as variáveis. Casos com sintomatologia aguda apresentaram *odds* 12 vezes maiores de terem menos de um ano de idade que os controlos. O surgimento principalmente da forma aguda da doença em aves juvenis está de acordo com a descrição bibliográfica.^[24] Para que haja significância estatística e o intervalo de confiança seja menos amplo, deverá ser utilizado um maior número de aves com todas as informações disponíveis para análise.

Estes resultados estão associados às maiores *odds* que os casos têm de serem aves juvenis. Isto significa que as aves juvenis têm maior predisposição à infeção e, posteriormente, ao desenvolvimento da forma aguda de PBFD. As aves mais jovens, sobretudo antes da regressão da bolsa de Fabricius e do timo, ainda não possuem um sistema imune completamente desenvolvido. Deste modo, a infeção e a doença clínica estabelecem-se mais facilmente nas aves juvenis que nas mais velhas, visto que estas últimas montam uma resposta humoral capaz de combater o vírus.^[24,28,39]

A presença de sintomatologia compatível com a forma aguda de PBFD nos casos e o seu sexo não parecem estar relacionados.

O veterinário deve suspeitar de PBFD aguda na presença de um ou mais dos sinais compatíveis, conforme agrupados neste estudo. Quando se depara com uma ave que apenas apresenta apatia e/ou anorexia, a pesquisa das restantes manifestações clínicas agrupadas nesta categoria poderá fortalecer a PBFD como diagnóstico diferencial. A presença destes sinais não deve ser avaliada isoladamente como fator preditivo fidedigno da doença, pela sua reduzida especificidade. O clínico deve conjugar esta informação com a espécie e a idade da ave para justificar a suspeita clínica. Caso a ave reúna fatores de risco, nomeadamente ser da espécie *Psittacus erithacus* e/ou ser jovem, o clínico deve alertar os tutores em relação à importância da testagem e ao prognóstico.

5.4 Resultados da análise hematológica

5.4.1 Comparação entre casos e controlos

Os resultados sugerem existir diferença estatisticamente significativa da análise hematológica entre os casos e os controlos. Os casos apresentaram *odds* 20 vezes maiores de obterem resultados sugestivos de PBFD na análise hematológica que os controlos. Isto revela a importância da realização de um hemograma no diagnóstico precoce de PBFD. Os casos apresentaram desvios significativos no número total e relativo dos leucócitos e heterófilos circulantes, exibindo leucopénia severa e heteropénia. Estes desvios refletem a ação do vírus nas células da medula óssea e do sistema imune. O vírus provoca destruição dos órgãos linfóides e atrofia das células granulopoiéticas da medula óssea por destruição das células de suporte.^[28] Estes resultados hematológicos, em aves com sintomatologia aguda inespecífica, estão de acordo com a análise exposta por Schoemaker (2000).^[37]

Alterações sugestivas de PBFD no hemograma podem servir como um forte indicador da infeção e da ação patogénica do vírus antes da testagem por PCR. Para além disso, podem tornar mais evidente um estado de imunossupressão que a ave esteja a experienciar. A análise hematológica permite ao veterinário interpretar mais facilmente os sinais clínicos da ave infetada, quer sejam compatíveis com PBFD como outros que sejam causados por infeções secundárias promovidas pela imunossupressão.

5.4.2 Comparação do grupo NTHS com os casos e os controlos

O grupo NTHS e o grupo dos casos não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes variáveis avaliadas. Em contrapartida, a comparação entre o grupo NTHS e os controlos obteve diferenças significativas na idade e na presença de

sintomatologia compatível com PBFD aguda. Estes últimos resultados indicam relações semelhantes às obtidas comparando os casos e os controlos, visto que se verificaram diferenças na idade e na sintomatologia apresentada entre os dois grupos.

Com base nestas relações, o grupo de aves não testadas por PCR com hematologia compatível com PBFD é semelhante ao grupo dos casos de BFDV. Visto que os grupos são semelhantes, e que ambos os grupos apresentaram análises hematológicas compatíveis com PBFD, sugere-se que as alterações hematológicas no grupo NTHS tenham sido causadas por BFDV.

Estes resultados indicam que a hematologia pode servir como uma ferramenta diagnóstica útil para a PBFD e permite fortalecer a suspeita clínica juntamente com a testagem por PCR. Os achados hematológicos não permitem a identificação direta do vírus, mas apenas a sua ação no organismo infetado, pelo que devem ser considerados vários diagnósticos diferenciais. Contudo, sempre que se obtenha um resultado sugestivo no hemograma de uma ave deve ser feita a testagem por PCR para BFDV, mesmo que a ave tenha sido testada por rastreio previamente e tenha obtido resultado negativo. A hematologia poderá ser útil na interpretação de casos duvidosos após a testagem por PCR, por revelar a ação patogénica do vírus e permitir a deteção clínica de falsos positivos e falsos negativos.

5.5 Análise dos resultados de PCR para APV

Todos os 17 testes de PCR para APV realizados obtiveram resultado negativo. Este vírus é o principal diagnóstico diferencial a ser excluído para a sintomatologia de PBFD, nomeadamente as alterações das penas e alguns dos sinais inespecíficos como a anorexia, a estase do papo e a regurgitação. Visto que todos os resultados dos testes foram negativos, sugere-se que a circulação deste vírus é reduzida no Norte de Portugal. Assim, a PBFD deve ser considerada como diagnóstico diferencial antes da infeção por APV para os sinais clínicos referidos. Esta afirmação deve ter em conta que a maioria das infeções por APV ocorre em aves muito jovens, sendo que estas representam uma menor porção da casuística do CVEP. Para além disso, a elevada taxa de mortalidade que o APV provoca nas aves jovens pode levar a que as aves examinadas na clínica sejam maioritariamente as que nunca contactaram com o vírus, obtendo resultado negativo por PCR. Por fim, todos os testes PCR utilizaram amostras de sangue, que poderão obter resultado negativo para APV visto que a virémia tem uma duração menor que a excreção viral, pelo que a utilização de outras amostras deveria ser considerada. Uma análise mais detalhada com diversas faixas etárias deverá ser realizada para que a verdadeira prevalência da infeção seja determinada nos psitacíformes do Norte de Portugal.

5.6 Recomendações clínicas

O diagnóstico de PBFD deve ter em conta diferentes variáveis que a ave possa apresentar:

- 1) O clínico deve suspeitar de PBFD em todas as aves que apresentem apatia, anorexia, estase do papo, regurgitação, vômitos, diarreia e biliverdinúria;
- 2) Deve considerar a suscetibilidade inerente da espécie à infecção e ao desenvolvimento da doença. Deve ter em atenção sobretudo espécies do Velho Mundo e em particular papagaios cinzentos africanos, pela gravidade da forma aguda da doença que podem desenvolver;
- 3) Deve considerar a idade da ave. Aves juvenis manifestam sobretudo a forma aguda, enquanto que as mais velhas manifestam a forma crónica. Caso a suspeita ocorra numa ave juvenil o diagnóstico deve ser feito com especial celeridade devido à progressão rápida da forma aguda;
- 4) Se houver lesões nas penas e no bico, estas poderão auxiliar no estabelecimento do diagnóstico caso a ave manifeste a sintomatologia sugestiva e seja uma ave juvenil de uma espécie suscetível, mas não devem ser consideradas patognomónicas da doença. Em aves sem sintomatologia inespecífica devem ser excluídos outros diagnósticos diferenciais para a sua ocorrência;
- 5) Todos os psitacíformes com PBFD suspeita devem ser submetidos a análise hematológica e a testagem por PCR para BFDV. A utilização das duas técnicas permite enquadrar a infecção com a sua possível manifestação no organismo. Aves com resultado positivo por PCR e com leucopénia severa, acompanhada normalmente por heteropénia, têm PBFD;
- 6) Caso seja confirmada a infecção numa ave juvenil de uma espécie suscetível, o veterinário deve emitir um prognóstico reservado.

Todos os psitacíformes que obtiverem resultados sugestivos na hematologia, quer apresentem sinais clínicos ou não, devem ser testados por PCR para BFDV para confirmar a presença da infecção.

5.7 Limitações do estudo

As aves com sintomatologia e resultado de PCR para BFDV discordantes devem idealmente ser submetidas a um novo teste de PCR após 90 dias do primeiro, ou a outro método diagnóstico, para confirmar o seu estado relativamente ao vírus. Cada uma das aves cuja informação foi analisada na dissertação foi apenas submetida a um teste de PCR para BFDV. São os tutores que sustentam os custos dos testes, o que condiciona a

realização de múltiplas testagens. Nas aves cujo quadro clínico é discordante do resultado de PCR obtido, este resultado poderá revelar um contexto clínico específico, ser falso positivo ou ser falso negativo, como exposto na Tabela 1. Este teste possui elevada sensibilidade e especificidade para a deteção do vírus^[22], embora para aumentar a confiança no estatuto infeccioso de cada ave devesse ter sido feita uma nova testagem por PCR após o intervalo de tempo recomendado entre testagens, ou devesse ter sido realizado outro método diagnóstico passado esse intervalo.

Nas várias análises estatísticas realizadas não foram incluídas as aves cujo sexo, idade e dados do exame físico não estavam registados na plataforma. Estas lacunas poderão interferir nos resultados obtidos e levar a algum viés de seleção nas análises. Para além disso, nem todas as aves realizaram testagem por PCR para BFDV e APV ou análise hematológica. Para aumentar o número de aves nas comparações, todas as características biológicas e achados do exame físico deviam ter sido registados e todas as aves deveriam ter sido submetidas aos mesmos testes diagnósticos, resultando numa análise mais frutífera dos vários parâmetros. Contudo, estas lacunas refletem a realidade e complexidade do meio clínico e da disponibilidade económica dos tutores.

As amplitudes dos intervalos de confiança a 95% para os valores de OR obtidos foram amplas na maioria dos resultados, o que significa que a precisão foi baixa. Tal justifica-se pelo reduzido número de casos, sobretudo quando filtrados pelas variáveis a comparar. O escasso número de aves com mais de um ano de idade incluído nos casos também impediu uma comparação eficaz da idade com outros dados. A inclusão de mais aves desta faixa etária no estudo teria permitido obter resultados mais informativos.

5.8 Futuros trabalhos

Sugere-se que este tipo de análises e comparações seja realizado com um maior número de casos, para aumentar a precisão dos resultados. Visto que o número de instituições veterinárias que examinam espécies aviárias é reduzido em Portugal, incita-se à realização de um estudo caso-controlo semelhante ao efetuado nesta dissertação, que reúna os dados de várias clínicas portuguesas para compreender melhor a realidade nacional.

Adicionalmente, propõe-se a realização de um estudo longitudinal com aves juvenis infetadas por BFDV, para verificar as diferentes infeções secundárias que as aves desenvolvem e determinar quais os agentes que as provocam.

Por fim, seria relevante a realização de um estudo transversal que averigue a prevalência e seroprevalência de BFDV nas unidades de criação de aves de companhia em Portugal, visto que a testagem é voluntária e apenas efetuada por alguns criadores ou

em situações particulares. Este tipo de estudo seria do interesse dos criadores, visto que poderia auxiliar no estabelecimento de planos para erradicar a infeção nestes recintos e permitir a venda de aves livres de BFDV. O mesmo tipo de estudo poderá ser útil para averiguar a importância de APV a nível nacional.

6. Conclusão

Esta dissertação investigou a infeção por BFDV em aves psitacíformes do Norte de Portugal, representadas pela casuística do CVEP. Das aves testadas por PCR para BFDV, 29,2% obtiveram resultado positivo, o que revela a importância do vírus no contexto nacional.

A análise dos dados esclareceu a importância da PBFD em papagaios cinzentos africanos. Aves desta espécie infetadas por BFDV apresentaram maior predisposição para o desenvolvimento de sintomatologia sugestiva de PBFD aguda.

Também a idade aparentou ser um fator de risco, sendo que aves com resultado positivo no PCR para BFDV apresentaram *odds* maiores de terem até 1 ano de idade.

Aves com resultado positivo no PCR para BFDV apresentaram *odds* maiores de manifestarem sintomatologia compatível com PBFD aguda. Por oposição, os resultados não esclarecem uma relação entre a presença de lesões nas penas, no bico e nas unhas com o resultado de PCR para BFDV ou com a idade das aves. No estabelecimento de uma suspeita clínica, a verificação de sinais clínicos sugestivos da forma aguda poderá ser mais relevante que a observação de lesões nas penas, bico e unhas.

O registo de leucopénia severa e heteropénia no hemograma estava relacionado com a infeção. Os grupos de aves com resultado positivo por PCR e aves com hemograma sugestivo foram comparáveis entre si, pelo que a hematologia será uma ferramenta importante no diagnóstico de PBFD. A realização simultânea de PCR para BFDV e de análises hematológicas permitirá esclarecer dúvidas relativas ao estado infeccioso da ave e da ação do vírus no organismo.

Todos os testes PCR para APV realizados obtiveram resultado negativo, o que diminui a relevância deste vírus como diagnóstico diferencial para os quadros clínicos sugestivos de PBFD no Norte de Portugal. Contudo, mais estudos deverão ser realizados para averiguar a prevalência da infeção em psitacíformes de Portugal.

Os resultados obtidos nesta dissertação esclarecem a relação entre a infeção, o desenvolvimento de doença e a ação do vírus em psitacíformes. O veterinário deve salientar a importância da testagem e da análise hematológica, bem como oferecer um prognóstico. O prognóstico deve ter como base os fatores de risco e sinais clínicos que a ave infetada reúne.

7. Bibliografia

1. Bassami, M. R., Berryman, D., Wilcox, G. E. & Raidal, S. R. (1998) "Psittacine Beak and Feather Disease Virus nucleotide sequence analysis and its relationship to Porcine Circovirus, plant circoviruses, and Chicken Anaemia Virus" **Virology**, 249(2), 453–459.
2. Bert, E., Tomassone, L., Peccati, C., Navarrete, M. G. & Sola, S. C. (2005) "Detection of Beak and Feather Disease Virus (BFDV) and Avian Polyomavirus (APV) DNA in Psittacine Birds in Italy" **Journal of Veterinary Medicine B**, 52, 64–68.
3. Bonne, N., Shearer, P., Sharp, M., Clark, P., Raidal, S. (2009) "Assessment of recombinant Beak and Feather Disease Virus capsid protein as a vaccine for psittacine beak and feather disease" **Journal of General Virology**, 90, 640-647.
4. Breitbart, M., Delwart, E., Rosario, K., Segalés, J., Varsani, A. & ICTV Report Consortium. (2017) "ICTV Virus Taxonomy Profile: *Circoviridae*" **Journal of General Virology**, 98, 1997–1998.
5. Capitelli, R. & Crosta, L. (2013) "Overview of Psittacine Blood Analysis and Comparative Retrospective Study of Clinical Diagnosis, Hematology and Blood Chemistry in Selected Psittacine Species" **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, 16(1), 71–120.
6. de Kloet, E. & de Kloet, S. R. (2004) "Analysis of the beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specificity" **Archives of Virology**, 149, 2393–2412.
7. Department of the Environment and Heritage (2005) "Threat Abatement Plan - Psittacine Beak and Feather Disease Affecting Endangered Psittacine Species" **Commonwealth of Australia**, 1–32.
8. Doneley, R. (2003) "Acute Beak and Feather Disease in juvenile African Grey parrots – an uncommon presentation of a common disease" **Australian Veterinary Journal**, 81(4), 206–207.
9. Fogell, D. J., Martin, R. O. & Groombridge, J. J. (2016) "Beak and feather disease virus in wild and captive parrots: an analysis of geographic and taxonomic distribution and methodological trends" **Archives of Virology**, 161(8), 2059–2074.
10. Gerlach, H. "Viruses" in Ritchie, B. W., Harrison, G. J., & Harrison, L. R. (1994). **Avian Medicine - Principles and Application**, Wingers Publishing, 1^a Ed., 862-948.
11. Gill, J. H. (2001). "Avian Skin Diseases" **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, 4(2), 463–492.
12. Graham, J. E. (2016). **Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult - Avian**, 1^a Ed., John Wiley & Sons, Inc., 61-62.
13. Greenacre, C. B. (2005) "Viral diseases of companion birds" **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, 8(1), 85–105.
14. Hawkins, M. G., Guzman, D. S.-M., Beaufrère, H., Lennox, A. M., & Carpenter, J. W. "Birds" in Carpenter, J. M. (2018) **Exotic Animal Formulary**, 5^a edição, Elsevier, 167-375.
15. Heath, L., Martin, D. P., Warburton, L., Perrin, M., Horsfield, W., Kingsley, C., Rybicki, E. P. & Williamson, A.-L. (2004) "Evidence of unique genotypes of Beak and Feather Disease Virus in southern Africa" **Journal of Virology**, 78(17), 9277–9284.
16. Hess, M., Scope, A. & Heincz, U. (2004) "Comparitive sensitivity of polymerase chain

- reaction diagnosis of psittacine beak and feather disease on feather samples, cloacal swabs and blood from budgerigars (*Melopsittacus undulates*, Shaw 18005)" **Avian Pathology**, 33(5), 477–481.
17. Jackson, B., Varsani, A., Holyoake, C., Jakob-Hoff, R., Robertson, I., McInnes, K., Empson, R., Gray, R., Nakagawa, K. & Warren, K. (2015) "Emerging infectious disease or evidence of endemicity? A multi-season study of beak and feather disease virus in wild red-crowned parakeets (*Cyanoramphus novaezelandiae*)" **Archives of Virology**, 160(9), 2283–2292.
 18. Jacobson, E. R., Clubb, S., Simpson, C., Walsh, M., Lothrop Jr., C. D., Gaskin, J., Bauer, J., Hines, S., Kollias, G. V., Poulos, P. & Harrison, G. (1986) "Feather and beak dystrophy and necrosis in cockatoos: clinicopathologic evaluations" **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 189(9), 999–1005.
 19. Johnson-Delaney, C. A. (1996). **Exotic Companion Medicine Handbook for Veterinarians**, Wingers Publishing, 1^a Ed., "Psittacines" 1-26.
 20. Jones, M. P. (2015) "Avian Hematology" **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, 18(1), 51–61.
 21. Julian, L., Piasecki, T., Chrzastek, K., Walters, M., Muhire, B., Harkins, G. W., Martin, D. P. & Varsani, A. (2013) "Extensive recombination detected among beak and feather disease virus isolates from breeding facilities in Poland" **Journal of General Virology**, 94, 1086–1095.
 22. Khalesi, B., Bonne, N., Stewart, M., Sharp, M. & Raidal, S. (2005) "A comparison of haemagglutination, haemagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease virus infection and a comparison of isolates obtained from lorriids" **Journal of General Virology**, 86, 3039–3046.
 23. Latimer, K. S., Rakich, P. M., Niagro, F. D., Ritchie, B. W., Steffens III, W. L., Campagnoli, R. P., Pesti, D. A. & Lukert, P. D. (1999) "An Updated Review of Psittacine Beak and Feather Disease" **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, 5(4), 211–220.
 24. Lierz, M. "Systemic infectious disease" in Harcourt-Brown, N. & Chitty, J. (2005) **BSAVA Manual of Psittacine Birds**, BSAVA, 2^a Ed., 155-169.
 25. Pass, D. A., & Perry, R. A. (1984). "The pathology of psittacine beak and feather disease" **Australian Veterinary Journal**, 61(3), 69–74.
 26. Phalen, D. (2006) "Implications of Viruses in Clinical Disorders" in Harrison, G. J. & Lightfoot, T. **Clinical Avian Medicine**, Spix Publishing, 1^a Ed., 1-26.
 27. Rahaus, M., Desloges, N., Probst, S., Loebbert, B., Lantermann, W. & Wolff, M. H. (2008) "Detection of beak and feather disease virus DNA in embryonated eggs of psittacine birds" **Veterinárni Medicina**, 53(1), 53–58.
 28. Raidal, S. "Psittacine Beak and Feather Disease", Pendl H. & Tizard, I. "Immunology" in Speer, B. L. (2016). **Current Therapy in Avian Medicine**, Elsevier, 1^a Ed., 28-46, 51-59, 400-432.
 29. Raidal, S. R. & Cross, G. M. (2007) "The haemagglutination spectrum of psittacine beak and feather disease virus" **Avian Pathology**, 23(4), 621–630.
 30. Raidal, S. R., Firth, G. A. & Cross, G. M. (1993) "Vaccination and challenge studies with psittacine beak and feather disease virus" **Australian Veterinary Journal**, 70(12), 437–441.

31. Ritchie, B. W., Gregory, C. R., Latimer, K. S., Pesti, D., Campagnoli, R. & Lukert, P. D. (2000) "A review of the most common viruses affecting Psittaciformes" **International Zoo Yearbook**, 37, 257–273.
32. Ritchie, B. W., Niagro, F. D., Latimer, K. S., Lukert, P. D., Steffens III, W. L., Rakich, P. M. & Pritchard, N. (1990) "Ultrastructural, protein composition, and antigenic comparison of Psittacine Beak and Feather Disease Virus purified from four genera of psittacine birds" **Journal of Wildlife Diseases**, 26(2), 196, 203.
33. Ritchie, B. W., Niagro, F. D., Lukert, P. D., Latimer, K. S., Steffens III, W. L. & Pritchard, N. (1989) "A Review of Psittacine Beak and Feather Disease - Characteristics of the PBFD Virus" **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, 3(3), 143–149.
34. Rosario, K., Breitbart, M., Harrach, B., Segalés, J., Delwart, E., Biagini, P. & Varsani, A. (2017) "Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus" **Archives of Virology**, 162(5), 1447–1463.
35. Samanta, I., & Bandyopadhyay, S. (2017) **Pet Bird Diseases and Care**, Springer Nature, 1^a Ed., 77-90, 94-96.
36. Schmidt, R. E., Reavill, D. R. & Phalen, D. N. (2003). **Pathology of Pet and Aviary Birds**, 134, 185-187.
37. Schoemaker, N. J., Dorrestein, G. M., Latimer, K. S., Lumeij, J. T., Kik, M. J. L., van der Hage, M. H. & Campagnoli, R. P. (2000) "Case Report - Severe Leukopenia and Liver Necrosis in Young African Grey Parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) Infected with Psittacine Circovirus" **Avian Diseases**, 44(2), 470–478.
38. Shearer, P. L., Bonne, N., Clark, P., Sharp, M. & Raidal, S. R. (2008) "Beak and feather disease virus infection in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*)" **Avian Pathology**, 37(1), 75–81.
39. Stanford, M. (2004) "Interferon treatment of circovirus infection in grey parrots (*Psittacus erithacus*)" **Veterinary Record**, 154, 435–436.
40. Tomasek, O. & Tukac, V. (2007) "Psittacine Circovirus Infection in Parakeets of the Genus *Eunymphicus* and Treatment with β -(1,3/1,6)-D-Glucan" **Avian Diseases**, 51(4), 989–991.
41. Trinkaus, K., Wenisch, S., Leiser, R., Gravendyck, M. & Kaleta, E. F. (1998) "Psittacine beak and feather disease infected cells show a pattern of apoptosis in psittacine skin" **Avian Pathology**, 27(6), 555–561.
42. van Zeeland, Y. R. A. & Schoemaker, N. J. (2014) "Plumage disorders in psittacine birds - part 1: feather abnormalities" **European Journal of Companion Animal Practice**, 24(1), 34–47.
43. Ypelaar, I., Bassami, M. R., Wilcox, G. E. & Raidal, S. R. (1999) "A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus" **Veterinary Microbiology**, 68, 141–148.
44. Zsivanovits, P. "Infectious Diseases" in Chitty, J. & Monks, D. (2018) **BSAVA Manual of Avian Practice**, 1^a Ed., BSAVA, 286-298.

8. Anexos

Anexo I – Lista de espécies observadas durante o estágio no CVEP, com o número de animais diferentes observados de cada espécie.

AVES	RÉPTEIS	MAMÍFEROS	PEIXES
<i>Agapornis fischeri</i> (10)	<i>Agrionemys horsfieldii</i> (1)	<i>Acomys cahirinus</i> (1)	<i>Carassius auratus</i> (1)
<i>Agapornis lilianae</i> (1)	<i>Chamaeleo calytratus</i> (3)	<i>Atelerix albiventris</i> (1)	
<i>Agapornis nigrigenis</i> (2)	<i>Emys orbicularis</i> (2)	<i>Cavia porcellus</i> (100)	
<i>Agapornis personatus</i> (11)	<i>Eublepharis macularius</i> (5)	<i>Chinchilla lanigera</i> (20)	
<i>Agapornis roseicollis</i> (70)	<i>Furcifer pardalis</i> (1)	<i>Cynomys ludovicianus</i> (1)	
<i>Amazona aestiva</i> (18)	<i>Graptemys pseudogeographica</i> (5)	<i>Erinaceus europaeus</i> (1)	
<i>Amazona amazonica</i> (2)	<i>Hemitheconyx caudicinctus</i> (1)	<i>Eutamias sibiricus</i> (1)	
<i>Amazona autumnalis</i> (2)	<i>Iguana iguana</i> (5)	<i>Meriones unguiculatus</i> (2)	
<i>Amazona festiva</i> (1)	<i>Mauremys leprosa</i> (3)	<i>Mesocricetus auratus</i> (5)	
<i>Amazona farinosa</i> (1)	<i>Mauremys reevesii</i> (9)	<i>Mus musculus</i> (2)	
<i>Amazona ochrocephala</i> (4)	<i>Mauremys sinensis</i> (5)	<i>Mustela putorius furo</i> (46)	
<i>Anas platyrhynchos domesticus</i> (1)	<i>Pantherophis guttatus</i> (4)	<i>Octodon degus</i> (2)	
<i>Anser anser</i> (2)	<i>Pelomedusa subrufa</i> (1)	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (247)	
<i>Aprosmictus erythropterus</i> (1)	<i>Pogona vitticeps</i> (18)	<i>Petaurus breviceps</i> (4)	
<i>Apus apus</i> (1)	<i>Pseudemys nelsoni</i> (15)	<i>Phodopus roborovskii</i> (3)	
<i>Ara ararauna</i> (2)	<i>Pseudemys rubiventris</i> (1)	<i>Phodopus sungorus</i> (18)	
<i>Aratinga jandaya</i> (1)	<i>Python regius</i> (6)	<i>Rattus norvegicus</i> (11)	
<i>Aratinga solstitialis</i> (2)	<i>Testudo graeca</i> (1)	<i>Spermophilus richardsonii</i> (1)	
<i>Bolborhynchus lineola</i> (1)	<i>Testudo hermanni</i> (1)		
<i>Cacatua alba</i> (1)	<i>Trachemys scripta elegans</i> (9)		
<i>Columba livia</i> (14)	<i>Trachemys scripta scripta</i> (2)		
<i>Corvus corax</i> (1)	<i>Varanus exanthematicus</i> (1)		
<i>Ecletus roratus</i> (1)			
<i>Erythrura gouldiae</i> (4)			
<i>Gallus domesticus</i> (3)			
<i>Larus michahellis</i> (1)			
<i>Melopsittacus undulatus</i> (38)			
<i>Myiopsitta monachus</i> (1)			
<i>Nymphicus hollandicus</i> (31)			
<i>Pavo cristatus</i> (2)			
<i>Phasianus colchicus</i> (1)			
<i>Pionites melanocephalus</i> (1)			
<i>Platycercus elegans</i> (2)			
<i>Poicephalus senegalus</i> (4)			
<i>Polytelis anthopeplus</i> (1)			
<i>Psittacula krameri</i> (2)			
<i>Psittacus erithacus</i> (55)			
<i>Psittacus timneh</i> (3)			
<i>Serinus canaria forma domestica</i> (51)			
<i>Streptopelia decaocto</i> (5)			
<i>Streptopelia turtur</i> (1)			
<i>Taeniopygia guttata</i> (1)			
<i>Thectocercus acuticaudatus</i> (1)			
<i>Trichoglossus haematodus</i> (3)			
<i>Turdus merula</i> (2)			

Anexo II – Casuística acompanhada durante o estágio no CVEP. Cada diagnóstico está acompanhado do número de vezes relatadas durante este período.

MAMÍFEROS				RÉPTEIS	
MDA (53)	Enterite bacteriana (6)	Queilite (3)	Quisto sebáceo (2)	Dermatite (20)	Ingestão de corpo estranho (2)
Hipomotilidade gastrointestinal (37)	Fratura dos incisivos (6)	Reação adversa vacinal (3)	Ascite OI (1)	Infeção respiratória (12)	Necrose da cauda (2)
Neoplasia (37)	Otite (6)	SCr fúngico intestinal (3)	<i>Cat scratch disease</i> (1)	Sintomatologia inespecífica (9)	Queimadura (2)
Abcesso (30)	Urolitíase (6)	Sopro cardíaco (3)	Clostridiose (1)	Ataque por outro animal (6)	Choque séptico (1)
Infeção respiratória (27)	Conjuntivite (5)	Uveíte facoclastica (3)	Colangite (1)	Fratura da carapaça (6)	Deformação lombar (1)
Encefalitozoonose suspeita e confirmada (18)	Espondilose deformante (5)	Adenoma da hipófise (2)	Criptorquidismo (1)	Disecdisse (5)	Estase ovulatória (1)
Síndrome vestibular OI (17)	Mixomatose (5)	Artrose (2)	Cristalúria (1)	Hipocalcémia (5)	Fecaloma (1)
Obesidade (15)	Rinite alérgica (5)	Catarata (2)	Doença ovárica quística (1)	Infestação por nemátodes (5)	Hemoparasitose (1)
Infeção do trato urinário (14)	Úlcera da córnea/Queratite (5)	Celulite (2)	Doença vírica hemorrágica suspeita (1)	Abcesso (5)	Hemorragia da cloaca (1)
Dermatite (13)	Escorbuto (4)	Coagulopatia (2)	Efusão pleural (1)	DOM (4)	Herpesvirose (1)
SCr dos incisivos (13)	Pulicose (4)	Colelitíase (2)	Epistáxis OI (1)	Conjuntivite (3)	Hibernação (1)
Obstrução do ducto nasolacrimal (12)	Ataque por outro animal (3)	Cromodacriorreia (2)	Formação de osso heterotópica na superfície ocular (1)	Estomatite (3)	Hipovitaminose A (1)
Parésia OI (12)	<i>Barbering</i> (3)	Exoftalmia por abcesso retrobulbar (2)	Hérnia escrotal (1)	Impactação do hemipénis (3)	Luxação (1)
Dermatofitose (11)	Cheiletielose (3)	Infestação por protozoários flagelados (2)	Insulinoma (1)	Neoplasia (3)	Malnutrição (1)
Sarna por <i>Trixacarus caviae</i> (11)	Diagnóstico de gestação (3)	Giardíase (2)	Intoxicação por fumo (1)	Obesidade (3)	Necrose digital (1)
Comportamento sexual (10)	Esplenomegália (3)	Hiperadrenocorticismismo (2)	Intoxicação por organofosforados (1)	Prognatismo (3)	Osteomielite (1)
Dacriocistite (10)	Estomatite (3)	Hiperplasia uterina (2)	Linfadenopatia intestinal (1)	Blefarite (2)	Pododermatite (1)
Enterite OI (10)	<i>Floppy rabbit syndrome</i> (3)	Ingestão de corpo estranho (2)	Meningite suspeita (1)	Brumação (2)	Prolapso de hemipénis (1)
Fratura (10)	Hiperestrogenismo (3)	Luxação (2)	Osteoartrite do cotovelo (1)	Coccidiose intestinal (2)	Queilite (1)
Pododermatite (10)	Impactação cecal (3)	Maloclusão congénita dos incisivos (2)	Píometra (1)	Fratura (2)	Queratite (1)
Obstrução gastrointestinal (9)	Impactação das bolsas gulares (3)	Meteorismo (2)	Pólipo anogenital (1)	Giardíase (2)	Rinolitíase (1)
Choque séptico (7)	Insuficiência cardíaca (3)	Não-ingestão de cecotrofos (2)	Trauma medular (1)	Infestação por protozoários flagelados (2)	Scr do bico (1)
Otite (7)	Lipidose hepática (3)	Parasitismo por nemátodes (2)	Treponematose suspeita (1)		
Coccidiose intestinal (6)	Malnutrição (3)	Pediculose (2)	Volvo intestinal (1)		
Crise hipoglicémica (6)	Pneumonia por aspiração (3)	Pseudogestação (2)	Verruga (1)		

AVES			PEIXES
Infeção respiratória (41)	<i>Blood feathers</i> (5)	Hemoparasitose (1)	Infestação por protozoários flagelados (1)
Picacismo (32)	Choque séptico (5)	Hifema traumático (1)	Ictioftiríase (1)
Fratura (19)	Conjuntivite (5)	Ingestão de corpo estranho (1)	
Constricção anular da pata (14)	Hipovitaminose A (5)	Insuficiência renal (1)	
Quisto folicular (14)	Infestação por <i>Dermanyssus gallinae</i> (5)	Intoxicação por organofosforados (1)	
Distócia (13)	Trauma muscular (5)	Intoxicação por sal (1)	
Macrorrabdose (13)	Ataque por outro animal (4)	Laceração dos músculos peitorais (1)	
Distensão celômica OI (12)	Doença de Newcastle (4)	Míase (1)	
SCr do bico (12)	Queimadura do papo com fistulação (4)	Micobacteriose (1)	
Enterite bacteriana (10)	Trauma medular (4)	<i>Oiled bird</i> (1)	
Ingluvite bacteriana (10)	Artrite/artrose (3)	Osteomielite (1)	
Candidíase (10)	Aspergilose (3)	Otite externa (1)	
Neoplasia (8)	Coccidiose intestinal (3)	Pneumonia por aspiração (1)	
Parésia OI (8)	Dermatite (3)	Prolapso da cloaca (1)	
Pododermatite (8)	Encefalopatia hepática (3)	Prolapso da membrana nictitante (1)	
Enterite OI (7)	Estomatite (3)	Prolapso fálico (1)	
Necrose digital (7)	Intoxicação por metais pesados (3)	Psitacose (1)	
PBFD (6)	Maloclusão do bico (3)	Sinusite (1)	
Hipocalcémia (6)	Obesidade (3)	Avulsão do bico superior (1)	
Lipidose hepática (6)	Hepatopatia OI (3)	Tricomoniase (1)	
Muda da pena (6)	Estase do papo OI (1)		
Postura crónica de ovos (6)	Hemocromatose suspeita (1)		

Anexo III – Fotografias ilustrativas de alguns casos acompanhados durante o estágio no CVEP.



Figuras 1 e 2 – À esquerda: Camaleão-pantera (*Furcifer pardalis*). À direita: amputação da cauda numa iguana-verde (*Iguana iguana*).



Figuras 3 e 4 – À esquerda: laceração profunda da pele, tecido subcutâneo e músculos peitorais num pombo-doméstico (*Columba livia*). À direita: preparação cirúrgica para nodulectomia numa ratazana (*Rattus norvegicus*).



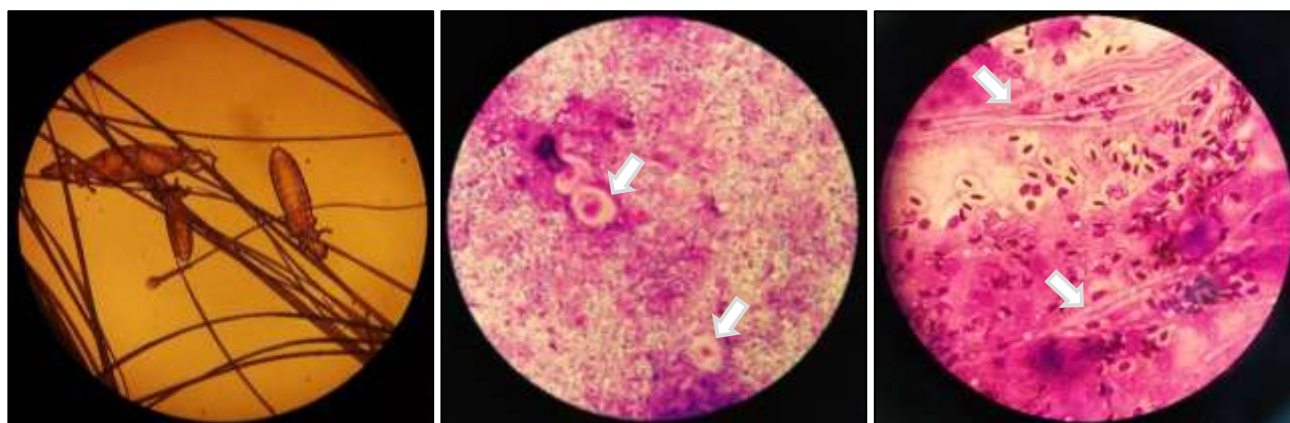
Figuras 5 e 6 – Extração de sonda alimentar deglutida acidentalmente, ficando alojada no papo, numa catatua-branca (*Cacatua alba*) juvenil.



Figuras 7 e 8 – À esquerda: sobrecrecimento do bico numa rosela-elegante (*Platycercus elegans*). Esta ave foi submetida a aparagem corretiva do bico. À direita: preparação cirúrgica para orquiectomia num petauro-do-açúcar (*Petaurus breviceps*).



Figuras 9 e 10 – À esquerda: corvo-comum (*Corvus corax*) com ligadura em oito para estabilização de fratura do rádio complicada por osteomielite fúngica. Esta ave foi posteriormente submetida a amputação do membro. À direita: dermatite e celulite purulenta extensa, desde o mento até à região umbilical, num coelho-anão (*Oryctolagus cuniculus*).



Figuras 11, 12 e 13 – À esquerda: *Gliricola porcelli*, um piolho maléfico que afeta porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*). No centro: oocistos de *Giardia* spp. (seta) e sobrecrecimento bacteriano nas fezes de um hamster Roborovski (*Phodopus roborovskii*). À direita: hifas fúngicas de *Aspergillus fumigatus* (seta) recolhidas de uma massa traqueal numa caturra (*Nymphicus hollandicus*).

Anexo IV – Tabelas com os dados recolhidos da plataforma informática, organizados para as análises estatísticas. Os valores sombreados não foram utilizados nas análises. Os valores percentuais indicados remetem para o total das aves agrupadas na tabela.

Tabela A – Distribuição das espécies das aves cuja informação foi recolhida, de acordo com a testagem para BFDV.

Espécie	Casos	Controlos	Não-testada	Total
<i>Psittacus erithacus</i>	12 (10,3%)	30 (25,9%)	36 (31,0%)	78 (67,2%)
<i>Agapornis</i> spp.	4 (3,4%)	1 (0,9%)	4 (3,4%)	9 (7,8%)
<i>Melopsittacus undulatus</i>	2 (1,7%)	2 (1,7%)	4 (3,4%)	8 (6,9%)
<i>Psittacus timneh</i>	1 (0,9%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,9%)
<i>Amazona</i> spp.	0 (0,0%)	6 (5,2%)	3 (2,6%)	9 (7,8%)
<i>Eolophus roseicapilla</i>	0 (0,0%)	2 (1,7%)	1 (0,9%)	3 (2,6%)
<i>Nymphicus hollandicus</i>	0 (0,0%)	2 (1,7%)	1 (0,9%)	3 (2,6%)
<i>Poicephalus senegalus</i>	0 (0,0%)	1 (0,9%)	1 (0,9%)	2 (1,7%)
<i>Cacatua galerita</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,9%)	1 (0,9%)
<i>Ecletus roratus</i>	0 (0,0%)	1 (0,9%)	0 (0,0%)	1 (0,9%)
<i>Pionites melanocephalus</i>	0 (0,0%)	1 (0,9%)	0 (0,0%)	1 (0,9%)
Total	19 (16,4%)	46 (39,7%)	51 (44,0%)	116 (100,0%)

Tabela B – Número de aves de acordo com as categorias criadas e com os casos e controlos. As alíneas a), b), c), d), e) e f) referem-se às categorias de espécie, sexo, idade, sintomatologia compatível com PBFD aguda, outros sinais e hematologia compatível com PBFD, respectivamente.

Variável	Casos	Controlos	Não-testada	Total
a) <i>Psittacus erithacus</i>	12 (10,3%)	30 (25,9%)	36 (31,0%)	78 (67,2%)
Outras espécies	7 (6,0%)	16 (13,8%)	15 (12,9%)	38 (32,8%)
b) Fêmea	7 (6,0%)	17 (14,7%)	8 (6,9%)	32 (27,6%)
Macho	3 (2,6%)	17 (14,7%)	8 (6,9%)	28 (24,1%)
Indefinido	9 (7,8%)	12 (10,3%)	35 (30,2%)	56 (48,3%)
c) Até 1 ano de idade	13 (11,2%)	19 (16,4%)	27 (23,3%)	59 (50,8%)
Mais de 1 ano de idade	2 (1,7%)	19 (16,4%)	19 (16,4%)	40 (34,5%)
Indefinida	4 (3,4%)	8 (6,9%)	5 (4,3%)	17 (14,7%)
d) Sintomatologia compatível	11 (9,5%)	14 (12,1%)	31 (26,7%)	56 (48,3%)
Sintomatologia pouco compatível	6 (5,2%)	27 (23,3%)	19 (16,4%)	52 (44,8%)
Não-avaliado	2 (1,7%)	5 (4,3%)	1 (0,9%)	8 (6,9%)
e) Com outros sinais	8 (6,9%)	14 (12,1%)	21 (18,1%)	43 (37,1%)
Sem outros sinais	10 (8,6%)	30 (25,9%)	30 (25,9%)	70 (60,3%)
Não-avaliado	1 (0,9%)	2 (1,7%)	0 (0,0%)	3 (2,6%)
e) Hematologia compatível com PBFD	4 (3,4%)	2 (1,7%)	14 (12,1%)	20 (17,2%)
Hematologia pouco compatível com PBFD	1 (0,9%)	10 (8,6%)	4 (3,4%)	15 (12,9%)
Não-avaliado	14 (12,1%)	34 (29,3%)	33 (28,4%)	81 (69,8%)
Total	19 (16,3%)	46 (39,7%)	51 (44,0%)	116 (100,0%)

Tabela C – Número de aves de acordo com as categorias criadas para os quadros clínicos e os casos e controlos.

Sinais Clínicos		Casos	Controlos	Não-testada	Total
Penas	Sim	11 (9,5%)	19 (16,4%)	40 (34,5%)	70 (60,3%)
	Não	6 (5,2%)	22 (19,0%)	10 (8,6%)	38 (32,8%)
Bico/unhas	Sim	4 (3,4%)	3 (2,6%)	9 (7,8%)	16 (13,8%)
	Não	13 (11,2%)	38 (32,8%)	41 (35,3%)	92 (79,3%)
Apatia	Sim	11 (9,5%)	6 (5,2%)	26 (22,4%)	43 (37,1%)
	Não	6 (5,2%)	35 (30,2%)	24 (20,7%)	65 (56,0%)
Anorexia	Sim	8 (6,9%)	6 (5,2%)	21 (18,1%)	35 (30,2%)
	Não	9 (7,8%)	35 (30,2%)	29 (25,0%)	73 (62,9%)
Digestivo	Sim	3 (2,6%)	5 (4,3%)	12 (10,3%)	20 (17,2%)
	Não	14 (12,1%)	36 (31,0%)	38 (32,8%)	88 (75,9%)
Respiratório	Sim	4 (3,4%)	7 (6,0%)	14 (12,1%)	25 (21,6%)
	Não	13 (11,2%)	34 (29,3%)	36 (31,0%)	83 (71,6%)
Neurológico	Sim	0 (0,0%)	5 (4,3%)	6 (5,2%)	11 (9,5%)
	Não	17 (14,7%)	36 (31,0%)	44 (37,9%)	97 (83,6%)
Dermatológico	Sim	2 (1,7%)	1 (0,9%)	3 (2,6%)	6 (5,2%)
	Não	15 (12,9%)	40 (34,5%)	47 (40,5%)	102 (87,9%)
Picacismo	Sim	3 (2,6%)	4 (3,4%)	9 (7,8%)	16 (13,8%)
	Não	14 (12,1%)	37 (31,9%)	41 (35,3%)	92 (79,3%)
Outros	Sim	3 (2,6%)	13 (11,2%)	22 (19,0%)	38 (32,8%)
	Não	14 (12,1%)	28 (24,1%)	28 (24,1%)	70 (60,3%)
Não-avaliados		2 (1,7%)	5 (4,3%)	1 (0,9%)	8 (6,9%)
Total		19 (16,4%)	46 (39,7%)	51 (44,0%)	116 (100,0%)

Tabela D – Número de casos de acordo com a presença de lesões nas penas, bico e unhas e com as faixas etárias criadas.

Idade	Lesões nas Penas			Total	Lesões no Bico/unhas			Total
	Sim	Não	Não-avaliado		Sim	Não	Não-avaliado	
Até 1 ano de idade	7 (36,8%)	2 (10,5%)	2 (10,5%)	11 (57,9%)	3 (15,8%)	1 (5,3%)	0 (0,0%)	4 (21,1%)
Mais de 1 ano de idade	5 (26,3%)	0 (0,0%)	1 (5,3%)	6 (31,6%)	9 (47,4%)	1 (5,3%)	3 (15,8%)	13 (68,4%)
Indefinida	1 (5,3%)	0 (0,0%)	1 (5,3%)	2 (10,5%)	1 (5,3%)	0 (0,0%)	1 (5,3%)	2 (10,5%)
Total	13 (68,4%)	2 (10,5%)	4 (21,1%)	19 (100,0%)	13 (68,4%)	2 (10,5%)	4 (21,1%)	19 (100,0%)

Tabela E – Número de casos de acordo com a presença de sintomatologia compatível com PBFD e a espécie, sexo e idade (a), b) e c) respetivamente).

Variável		Com sintomatologia	Sem sintomatologia	Não-avaliado	Total
a)	<i>Psittacus erithacus</i>	10 (52,6%)	1 (5,3%)	1 (5,3%)	12 (63,2%)
	Outras espécies	2 (10,5%)	4 (21,1%)	1 (5,3%)	7 (36,8%)
b)	Fêmea	5 (26,3%)	2 (10,5%)	0 (0,0%)	7 (36,8%)
	Macho	2 (10,5%)	1 (5,3%)	0 (0,0%)	3 (15,8%)
	Indefinido	5 (26,3%)	2 (10,5%)	2 (10,5%)	9 (47,4%)
c)	Até 1 ano de idade	8 (42,1%)	4 (21,1%)	1 (5,3%)	13 (68,4%)
	Mais de 1 ano de idade	1 (5,3%)	1 (5,3%)	0 (0,0%)	2 (10,5%)
	Indefinida	3 (15,8%)	0 (0,0%)	1 (5,3%)	4 (21,1%)
Total		12 (63,2%)	5 (26,3%)	2 (10,5%)	19 (100,0%)

Tabela F – Valores de OR, IC a 95%, χ^2 e p das categorias clínicas para casos e controlos de BFDV, de janeiro de 2010 a fevereiro de 2020.

Análise	Odds Ratio	Intervalo de Confiança de 95%		χ^2	p
		Limite inferior	Limite superior		
Digestivo	1,543	0,325	7,333	0,300	0,584
Respiratório	1,495	0,374	5,969	0,326	0,568
Neurológico	1,139	1,016	1,277	2,269	0,132
Dermatológico	5,333	0,450	63,225	2,131	0,144
Picacismo	1,982	0,393	9,999	0,705	0,401
Outros	0,462	0,113	1,890	1,189	0,275

Tabela G – Valores χ^2 e p obtidos para a comparação do grupo NTHS com os casos e com os controlos.

Análise	χ^2 (Casos)	p (Casos)	χ^2 (Controlos)	p (Controlos)
Espécie	2,068	0,150	2,147	0,143
Sexo	1,086	0,581	1,579	0,209
Idade	1,449	0,485	7,274	0,007
Sintomatologia compatível com PBFD aguda	1,770	0,183	11,134	0,001