

YOHANE TRACY HOFMANN NASCIMENTO

**Pesquisa e caracterização molecular de poxvírus em psitacídeos
nativos e exóticos**

São Paulo

2024

YOHANE TRACY HOFMANN NASCIMENTO

Pesquisa e caracterização molecular de poxvírus em psitacídeos nativos e exóticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Tânia de Freitas Raso

São Paulo

2024

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo
Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Nascimento, Yohhane Tracy Hofmann
Pesquisa e caracterização molecular de poxvírus em psitacídeos
nativos e exóticos / Yohhane Tracy Hofmann Nascimento ; orientador
Tânia de Freitas Raso .-- São Paulo, 2024.
45 f. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada - Departamento de Patologia) - Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São
Paulo, 2024.

1. Aves silvestres. 2. Aves exóticas. 3. Avipoxvirus. 4. Bouba
aviária. 5. Poxvirose. I. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.



CERTIFIED

We certify that the Research "Molecular characterization of poxvirus in native and exotic psittacine birds", protocol number CEUAX 9188290120 (ID 001366), under the responsibility Tania De Freitas Raso, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day April 08, 2020.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Pesquisa e caracterização molecular de poxvirus em psitacídeos nativos e exóticos", protocolado sob o CEUAX nº 9188290120, sob a responsabilidade de Tania De Freitas Raso, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 08 de abril de 2020.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coodenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NASCIMENTO, Yohhane Tracy Hofmann

Título: **Pesquisa e caracterização molecular de poxvírus em psitacídeos nativos e exóticos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a todos os médicos veterinários e pesquisadores, que mesmo diante de todas as dificuldades e a falta de reconhecimento, não medem esforços para fazer desse mundo um lugar melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é o meu sustento e o meu respirar. Agradeço a minha família que sempre foi a minha base para tudo, principalmente minha mãe Odete, que sempre me colocou em primeiro lugar e permitiu que eu voasse. Agradeço aos meus cachorros e aos animais de forma geral, pois são o principal motivo da minha paixão pela medicina veterinária.

Agradeço aos meus tios Silvia e Levi, que me deram todo o suporte para realizar o tão sonhado mestrado, e não mediram esforços para que eu conquistasse tudo.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Tânia de Freitas Raso, pela dedicação a ciência e por ser um exemplo de profissional, sempre pronta a ajudar em tudo o que era necessário.

Agradeço aos professores Adriano de Oliveira Torres Carrasco e Meire Christina Seki, sem os quais, não teria chego tão longe. Mesmo à distância se fizeram sempre presente em toda a minha formação, acadêmica e profissional.

Agradeço à Catalina Ospina, colega de laboratório, pela amizade e por sempre compartilhar seu conhecimento e sempre disposta a ajudar em tudo o que era necessário, você foi essencial para que este projeto fosse concluído.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de mestrado (número do130554/2020-0).

“Porque onde está o teu tesouro, lá também está teu coração. O olho é a luz do corpo. Se teu olho é são, todo o teu corpo será iluminado.”

Mateus 6:21-22.

RESUMO

NASCIMENTO, Y. T. H. **Pesquisa e caracterização molecular de poxvírus em psitacídeos nativos e exóticos.** 2024. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

A poxvirose é causada por um vírus DNA de fita dupla, pertencente ao gênero *Avipoxvirus*, família *Poxviridae*. É considerada de ocorrência comum em aves comerciais, domésticas e silvestres, afetando aves de todas as idades, sexo e espécies. A doença é caracterizada pela formação de lesões proliferativas discretas nas áreas aptéricas da pele e/ou lesões proliferativas nas membranas mucosas dos tratos respiratório e digestório superiores. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar retrospectivamente (2015-2021) a prevalência e características epidemiológicas do poxvírus em Psittaciformes nativos e exóticos cativos no estado de São Paulo. Foram selecionadas amostras de *swabs* de orofaringe e/ou cloaca, fezes, sangue, tecidos e/ou *swab* de lesão palpebral provenientes do banco de amostras do Laboratório de Ecopatologia de Aves, FMVZ-USP. As amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) baseada na sequência do gene que codifica a proteína de núcleo P4b, seguidas por sequenciamento e análise filogenética. No total, foram analisadas 300 aves, representadas por 339 amostras, sendo 54,3% (163/300) psitacídeos nativos de 27 espécies e 45,7% (137/300) psitacídeos exóticos de 19 espécies. Quanto a origem, 68,7% (112/163) das aves nativas amostradas eram provenientes de criatórios, 19% (31/163) de centros de reabilitação e 12,3% (20/163) eram domiciliadas. Por outro lado, entre as aves exóticas, 81% (111/137) eram de criatórios, 9,5% (13/137) de centros de reabilitação e 9,5% (13/137) domiciliadas. Dos 163 psitacídeos nativos, um *Amazona aestiva* foi positivo (0,6%) para o poxvírus pela PCR. Entre os 137 psitacídeos exóticos, dois (1,5%) indivíduos foram positivos, um *Platycercus eximius* e um *Barnardius barnadis*. A análise filogenética das três sequências obtidas revelou que duas aves do mesmo criatório agruparam com sequências de *psittacinepox* (clado C) disponíveis no GenBank. O criatório de origem destas duas aves teve histórico de casos sugestivos de poxvirose. A sequência da outra ave exótica agrupou com sequências do clado A (*fowlpox*), clado este onde se agrupam principalmente os poxvírus de galinhas,

perus e pombos. Esta sequência apresentou 100% de identidade com sequências de pombos. Os resultados demonstram a circulação dos clados A e C de *Avipoxvirus* em Psittaciformes no Brasil, ressaltando a importância de uma vigilância epidemiológica nos criatórios e mantenedores de psitacídeos para avaliação da diversidade viral e risco da presença deste vírus para as populações *ex situ* e *in situ*.

Palavras-chave: Aves silvestres, Aves exóticas, *Avipoxvirus*, Buba aviária, Poxvirose.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Y. T. H. **Molecular characterization of poxviruses in native and exotic psittacine birds.** 2024. 45p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Poxvirus disease is caused by a double-stranded DNA virus, belonging to the *Avipoxvirus* genus, family *Poxviridae*. It is considered a common occurrence in commercial, domestic, and wild birds, affecting birds of all ages, sex, and species. The disease is characterized by the formation of discrete proliferative lesions in apteric areas of the skin and/or proliferative lesions in the mucous membranes of the upper respiratory and digestive tracts. Therefore, the objective of this study was to retrospectively evaluate (2015-2021) the prevalence and epidemiological characteristics of poxvirus in captive Psittaciformes, native and exotic, in the state of São Paulo. Cloacal and/or oropharyngeal swabs, feces, blood, tissues and/or an eyelid lesion swab samples were selected from the repository of the Laboratório de Ecopatologia de Aves, FMVZ-USP, Brazil. DNA samples were submitted to polymerase chain reaction (PCR) based on the sequence of the gene that encodes the P4b core protein, followed by sequencing and phylogenetic analysis. In total, 300 psittacine birds were analyzed, represented by 339 samples, 54.3% (163/300) were native birds from 27 species and 45.7% (137/300) were exotic birds from 19 species. Regarding origin, 68.7% (112/163) of the native birds sampled were from aviaries, 19% (31/163) from rehabilitation centers and 12.3% (20/163) were pet birds. On the other hand, among exotic birds, 81% (111/137) were from aviaries, 9.5% (13/137) from rehabilitation centers and 9.5% (13/137) were pet birds. Of the 163 native psittacine birds, one *Amazona aestiva* was positive (0.6%) for poxvirus by PCR. Among the 137 exotic psittacine, two (1.5%) individuals were positive, one *Platycercus eximius* and one *Barnardius barnadis*. Phylogenetic analysis of the three sequences obtained revealed that two birds from the same aviary were grouped with *psittacinepox* sequences (clade C) available on GenBank. The aviary where these two birds originated had a history of suggestive cases of poxvirus infection. The sequence from the other exotic bird was grouped with sequences in clade A (*fowlpox*), a clade where poxviruses from chickens, turkeys and pigeons are mainly grouped. This sequence showed 100% of identity with pigeon sequences. These

results demonstrate the circulation of clades A and C of *Avipoxvirus* in psittacine birds in Brazil, highlighting the importance of epidemiological surveillance in breeding aviaries and psittacine keepers to assess the viral diversity and the risk of the presence of this virus for ex situ and in situ populations.

Keywords: Wild birds, Exotic birds, *Avipoxvirus*, Fowlpox, Poxvirus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Demonstração dos percentuais de psitacídeos nativos e exóticos amostrados de acordo com o local de origem28

Figura 2 - Arvore filogenética da análise das sequências parciais do gene P4b de *Avipoxvirus* de aves silvestres e exóticas representando os clados A, B e C construída pelo método Neighbor- Joining (*bootstrap* com 1000 réplicas)32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de psitacídeos nativos avaliados para a presença do *Avipoxvirus* de acordo com nome científico, nome comum e a população de estudo.....29

Tabela 2 - Relação de psitacídeos exóticos avaliados para a presença de *Avipoxvirus* de acordo com o nome científico, nome comum e a população de estudo.....30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 AMOSTRAS DE ESTUDO.....	25
4.2 PESQUISA DE DNA DE AVIPOXVÍRUS.....	25
4.2.1 Extração de DNA.....	25
4.2.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	25
4.2.3 Eletroforese dos produtos amplificados.....	26
4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	27
5. RESULTADOS.....	28
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÕES.....	39
REFERENCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A poxvirose ou bouba aviária é uma enfermidade viral de distribuição mundial, com ampla ocorrência em aves comerciais, domésticas e silvestres. O agente infeccioso, poxvírus, é um grande vírion envelopado, DNA de fita dupla linear pertencente à família Poxviridae, gênero *Avipoxvirus* (TRIPATHY; REED, 2003).

A infecção em aves é caracterizada pela formação de discretas lesões nodulares proliferativas na pele, em áreas desprovidas de penas (forma cutânea) ou lesões proliferativas fibrino-necróticas nas membranas mucosas dos sistemas respiratório e digestório superiores (forma diftérica) (TRIPATHY; REED, 2003; BERNARDINO, 2009). Em geral causa baixa mortalidade, no entanto, em condições de confinamento, com alta densidade populacional e má qualidade de manejo, podem ocorrer surtos com elevada mortalidade (MURER et al., 2018; LO et al., 2017; ESTEVES et al., 2017).

A transmissão do poxvírus pode ocorrer por contato direto com aves infectadas, por meio de lesões abrasivas na pele, nas membranas conjuntivas, mucosas ou indiretamente por vetores mecânicos como artrópodes hematófagos (RITCHIE, 1995; TRIPATHY; REED, 2003). Sendo assim, a enfermidade tem maior ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais e, no período das chuvas, pois nesta época a população de vetores aumenta (LO et al., 2017).

Mais de 232 espécies de aves de 23 ordens têm sido reportadas por terem adquirido infecção natural por poxvírus (BOLTE et al., 1999; TRIPATHY; REED, 2020). No Brasil, apesar de impacto da doença na avicultura comercial, o vírus é controlado de modo eficiente. No entanto, em relação às aves selvagens cativas, bem como em aves de vida livre, existem poucos dados sobre a prevalência, caracterização e o impacto do vírus nas populações no país.

Tendo em vista a importância do gênero *Avipoxvirus* em aves silvestres, particularmente em Psittaciformes e, devido à carência de estudos epidemiológicos e moleculares sobre o agente, o presente trabalho teve por finalidade pesquisar e realizar a caracterização molecular do *Avipoxvirus* em espécies nativas e exóticas mantidas em cativeiro no estado de São Paulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A poxvirose, também conhecida como boubá aviária, é uma doença viral que acomete aves, com importância econômica para aves de produção. O poxvírus pode atingir aves de todas as idades, independente de sexo ou raça, sendo de distribuição mundial (TRIPATHY; REED, 2003).

A doença é causada por um *Avipoxvirus*, pertencente à subfamília *Chordopoxvirinae*, família *Poxviridae*, trata-se de um vírus de fita dupla de DNA linear (dsDNA), o qual se replica no citoplasma das células infectadas. O vírus tem amplo potencial de infecção, tendo sido registrado em mais de 232 espécies de aves (SARKER et al., 2017; MURER et al., 2018; SHARMA et al., 2019). É um vírus com alta resistência ambiental, podendo sobreviver por anos em matéria orgânica, como crostas e penas de aves infectadas, tendo como vetores mecânicos mosquitos e artrópodes hematófagos (TRIPATHY; REED, 2003).

Em aves, até o momento foram descritas doze espécies pertencentes ao gênero *Avipoxvirus*, dentre elas estão: *Canarypox*, *Flamingopox*, *Fowlpox*, *Juncopox*, *Mynahpox*, *Penguinpox*, *Pigeonpox*, *Psittacinepox*, *Quailpox*, *Sparrowpox*, *Starlingpox* e *Turkeypox* (ICTV, 2019; SARKER; ATHUKORALA; RAIDAL, 2021).

As espécies *Fowlpox* e *Turkeypox* são de grande importância em aves comerciais, como galinhas e perus e são as mais estudadas, sendo utilizadas como vetores de vacinas (TRIPATHY; REED, 2019; RAJASEKARAN et al., 2019). Entre as aves silvestres, as espécies *Canarypox* e *Psittacinepox* são de importância econômica para os criadores, visto que causam muitas perdas em curto período, sobretudo quando em plantéis de grandes criatórios devido às condições do ambiente, como por exemplo, superlotação (TRIPATHY; REED, 2019)

As espécies de *Avipoxvirus* são classificadas em três grandes grupos genéticos, sendo eles os clados A, B e C. O clado A está dividido em subgrupos, A1 (*fowlpox*), A2 (*turkeypox*), A3 (*flamingopox*), A4 e, o clado B, está subdividido em B1 (*canarypox*) e B2 (*starlingpox*) (JARMIN et al., 2006; RIBEIRO et al., 2020). Sendo que o clado A compreende as estirpes de poxvírus de galinhas (*Fowlpox*) e os seus subgrupos as estirpes de Galliformes (*Turkeypox*) e Columbiformes (*Pigeonpox*). O clado B compreende o poxvírus de canários (*Canarypox*) e seus subgrupos

compreendem as estirpes de Passeriformes (*Mynahpox*, *Starlinpox* e *Sparrowpox*). Por sua vez, o clado C compreende os poxvírus de psitacídeos (*Psittacinepox*), sendo este grupo o mais distinto entre eles (JARMIN et al., 2006; RIBEIRO et al., 2020).

Foi proposta a existência de um clado D, isolado de codornas japonesas (Itália) e um clado E isolado em perus (Hungria) e galinhas (Moçambique e Brasil), os quais podem se apresentar como potenciais causadores de surtos em aves comerciais no Brasil, ressaltando a importância de mais estudos epidemiológicos a respeito do poxvírus no país (MANAROLLA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2020).

Os *Avipoxvirus* são antígenicamente e imunologicamente diferentes entre si, no entanto, existem vários graus de reações cruzadas, tornando as espécies de aves suscetíveis à uma ou mais cepas do vírus. A espécie característica do gênero é a *Fowlpox* devido a sua importância na avicultura comercial, dessa forma, a maior parte dos estudos foi realizada com foco nesta espécie em comparação aos outros tipos de poxvírus aviários (VAN RIPER; FORRESTER, 2007; TRIPATHY; REED, 2019).

O tropismo do *Fowlpox* é determinado por três fatores, sendo eles, a entrada do vírus nas células, a sua capacidade de se replicar nessas células e a capacidade de causar a doença no hospedeiro. Partindo desse princípio, os hospedeiros são classificados de duas formas, os hospedeiros permissivos e hospedeiros semipermissivos ou abortivos (RAJASEKARAN et al., 2019).

Como hospedeiro permissivo, temos as espécies aviárias, nas quais a entrada do *Fowlpox* é bem-sucedida e a sua replicação é completa, com o início da doença em que a ave apresenta sinais clínicos. O hospedeiro semi-permissivo ou abortivo engloba as espécies de mamíferos, nas quais a entrada do *Fowlpox* é irrestrita, mas a replicação é abortiva e, portanto, o animal não apresenta a patogênese (SOMOGYI; FRAZIER; SKINNER, 1993; BROWN et al., 1999; RAJASEKARAN et al., 2019).

A replicação viral no epitélio pode se apresentar em duas fases distintas, sendo uma caracterizada por hiperplasia folicular logo nas primeiras 72 horas de infecção e, outra forma na qual ocorre a síntese de vírus infeccioso entre 72 e 96 horas pós-infecção (CHEEVERS; RANDALL, 1968; TRIPATHY; REED, 2003).

Após essa fase de replicação há uma fase latente relativamente longa com corpos de inclusão dentro do citoplasma das células tornando-se vírions incompletos que migram para vacúolos de corpos de inclusão das células infectadas, formando estruturas clássicas chamadas de corpos de Bollinger, os quais são achados patognomônicos para infecções por poxvírus, sendo estas lesões visualizadas em microscopia óptica avaliação histopatológica (VAN RIPER; FORRESTER, 2007; KUNERT-FILHO et al., 2016).

O período de incubação do vírus varia de acordo com a espécie aviária e a cepa viral envolvida, podendo ser de cerca de dez dias para galinhas, perus e pombos e até um mês para aves de vida livre (VAN RIPER; FORRESTER, 2007; TRIPATHY; REED, 2019).

Algumas infecções por poxvírus são limitadas às células adjacentes ao local de entrada viral e outras são caracterizadas por viremia com danos graves nos órgãos. As infecções generalizadas são caracterizadas pela replicação do vírus no local inicial de sua entrada, liberação de novas partículas virais na corrente sanguínea (viremia primária) e transporte do vírus para o fígado e medula óssea, onde o vírus se replica novamente. À medida que o vírus se replica nesses órgãos-alvo, uma nova geração de partículas virais é liberada no sangue (viremia secundária), causando lesões mais substanciais em todo o corpo (RITCHIE, 1995; VAN RIPER; FORRESTER, 2007; TRIPATHY; REED, 2019).

A transmissão do vírus por meio de mosquitos e ácaros como o *Dermanyssus gallinae*, aerossóis de aves infectadas e poeira produzida pelo ambiente, contato direto ou fômites (poleiro, água e alimentos contaminados), tem se mostrado uma importante forma de propagação do vírus entre as aves (VARGAS et al., 2011; TRIPATHY; REED, 2019).

A ocorrência da doença tende a aumentar durante o período mais quente do ano, no qual o número de vetores aumenta, sendo estes, importantes transmissores do vírus, visto que têm predileção por áreas desprovidas de penas, onde fazem o repasto sanguíneo picando uma ave infectada e transmitindo o agente para as aves saudáveis (VARGAS et al., 2011; PEREIRA et al., 2014; BWALA; FASINA; DUNCAN, 2015; MURER et al., 2018).

A doença ocorre principalmente em duas formas clássicas, a forma cutânea e a diftérica. A forma cutânea causa lesões nodulares e crostosas nas partes desprovidas de penas das aves, na face, ao redor dos olhos, pálpebras, comissura do bico, narinas e dígitos. Estas lesões podem progredir de tamanho, de forma a impedir que o animal consiga abrir os olhos, apresentar dificuldades em se alimentar devido a nódulos na comissura do bico e dificuldade em respirar pela obstrução das narinas. Na forma diftérica, a ave apresenta lesões proliferativas nas mucosas do trato respiratório, boca e esôfago, apresentando sinais respiratórios que podem ser leves a muito graves, levando a ave ao óbito (RITCHIE, 1995; TRIPATHY; REED, 2019; SARKER et al., 2017).

Não há tratamento específico para as infecções por poxvírus, dentre as opções disponíveis pode ser feito o uso de iodo glicerinado para a limpeza e auxílio na cicatrização das lesões em pele, uso de antibióticos para o controle de infecções bacterianas secundárias e vitamina A para ajudar na cicatrização das feridas (WELL; TRYLAND, 2011). Portanto, se faz necessário medidas de prevenção e controle eficazes para evitar a disseminação do vírus, principalmente melhorando as condições de manejo, quarentena e controle de vetores.

Os vetores são muito importantes para a disseminação da doença, entre os ectoparasitas de psitacídeos, destaca-se o ácaro *Knemidocoptes pilae*, por sua predileção por hospedeiros como papagaios e periquitos, causando lesões nas partes glabras do hospedeiro. Outro vetor de importância para essas aves, apesar de ser conhecido como piolho de galinhas, é o ácaro *Dermanyssus gallinae* que também pode atuar como vetor mecânico na transmissão do vírus em psitacídeos (LO et al., 2017).

Alguns relatos sugerem que algumas aves que se recuperam de infecções por poxvírus podem desenvolver infecções persistentes e excretar vírions de forma intermitentemente pelo trato gastrointestinal, pele ou penas e, também, acredita-se que os fatores de estresse estejam associados à ativação de infecções latentes (RITCHIE, 1995).

Infecções persistentes que podem durar até 13 meses foram relatadas em galinhas. A queda de imunidade parece ser um fator importante para a manifestação da doença, como relatado também em cisnes e periquitos. Acredita-se que galinhas

infectadas de forma latente podem transmitir o vírus para a prole através do ovo. Em perus sugere-se que o vírus pode ser transmitido através da inseminação artificial (RITCHIE, 1995).

O surgimento de lesões recorrentes por poxvírus foi relatado posteriormente à eventos estressantes em algumas aves de rapina que se recuperaram das lesões iniciais. Esta observação sugere que algumas aves de rapina que se recuperam da doença induzida por poxvírus podem permanecer latentemente infectadas ou desenvolver uma imunidade transitória que não protege a ave de infecções subsequentes (RITCHIE, 1995).

A distribuição das lesões cutâneas provavelmente pode estar ligada a transmissão mecânica do vírus pelas picadas dos insetos, estas lesões raramente levam a ave ao óbito, mas podem reduzir seu ganho de peso, geram dificuldade da ave em se alimentar e de fugir de predadores (GIOTIS; SKINNER, 2019).

Embora a poxvirose seja uma enfermidade de ocorrência comum, ela nem sempre é diagnosticada de forma adequada, pois em alguns casos os sinais clínicos desaparecem em poucos dias, porém, os surtos da doença podem levar à alta mortalidade. Os surtos geralmente são raros em regiões de clima temperado, no entanto, tem significativa prevalência em locais de clima tropical e subtropical (GIOTIS; SKINNER, 2019), como o Brasil, visto que o controle de vetores mecânicos é difícil.

O avipoxvírus tem se mostrado um potencial risco para aves silvestres de vida livre. Um exemplo clássico deste risco ocorreu no Havaí onde o avipoxvírus foi responsável pela diminuição de espécies selvagens devido à introdução de aves infectadas e dos vetores disseminadores da doença, sendo que foram isolados dois *fowlpoxvirus* distintos das aves (TRIPATHY et al., 2000). Faz-se necessária uma investigação de fatores imunológicos, ambientais e biológicos, para elucidar melhor as reações cruzadas, que causam doença entre espécies diferentes de aves, como em casos semelhantes a estes citados anteriormente (SMITS et al., 2005; TRIPATHY et al., 2000; PARKER et al., 2011; SARKER et al., 2017).

Em 1982, Boosinger et al., isolaram o vírus de um surto, no qual estavam envolvidos 250 papagaios recém-importados, sendo que 20 aves da espécie *A. ochrocephala* e 50 de *A. finshi* foram a óbito e os demais animais apresentaram

sinais clínicos da doença, sendo eles, anorexia, apatia e edema de pálpebra. À época desse trabalho, os estudos eram ainda mais escassos em aves de vida livre.

González-Hein et al. (2008) relataram um surto de em uma colônia de aves no Chile, no qual, 50 dos 188 psitacídeos foram acometidos por sinais clínicos, somando sete espécies diferentes, sendo eles lesões cutâneas nas partes glabras das aves, a doença ocorreu de forma autolimitante, no entanto, 11 aves foram a óbito. As espécies acometidas foram a *A. personatus*, *A. fisheri*, *N. bourkii*, *P. eximius*, *A. roseicollis*, *P. swainsonii* e *P. alexandrae*. Em microscopia foram observados corpúsculos de Bollinger nas lesões.

Os psitacídeos estão entre as aves mais populares pela sua beleza e capacidade de imitar sons, o que leva a sua grande distribuição pelo mundo, sendo o Brasil o país com maior diversidade de espécies. Apesar dos poucos relatos no país, o poxvírus aviário já foi detectado em algumas espécies de psitacídeos no Brasil (ESTEVEES et al., 2015; MURER et al., 2018).

A ocorrência da doença na rotina clínica é relativamente baixa, porém, quando ocorrem os surtos, levam a perdas que afetam os plantéis (GRESPLAN; RASO, 2014). Em junho de 2015, Esteves e colaboradores relataram um surto em Minas Gérias, que durou cerca de três meses. O surto atingiu 10 espécies de psitacídeos, gerando lesões cutâneas nodulares típicas na doença, perda de peso e apatia, levando três aves a óbito.

A primeira análise filogenética do poxvírus aviário no Brasil foi realizada em perus (*Meleagris gallopavo*) comerciais no Rio Grande do Sul. Os animais apresentaram lesões características de infecções por poxvírus aviário, como lesões cutâneas tipo tumorais causadas pela hiperplasia de células epiteliais, formando nódulos proliferativos em áreas sem penas, como em pálpebra, bico e pescoço. Na avaliação histopatológica das lesões cutâneas dos animais necropsiados foram visualizados corpos de Bollingere areação em cadeia da polimerase (PCR) de tecido de traqueia e pulmão confirmou a presença de *Avipoxvirus* com 100% de compatibilidade com os *Avipoxvirus* do clado A1 (*fowlpox*) (KUNERT-FILHO et al., 2016).

A maioria dos estudos com poxvírus de aves são realizados em galinhas, gerando assim uma dificuldade em prever o comportamento das diferentes

linhagens em outras espécies de aves. Os casos de poxvirose em aves de vida livre se tornam subestimados devido às dificuldades inerentes em observá-las. Um estudo recente revela que a maioria dos poxvirus que infectam aves de vida livre permanecem descaracterizados (SARKER; ATHUKORALA; RAIDAL, 2021).

Adicionalmente, com relação às aves silvestres criadas em cativeiro existem poucos relatos disponíveis no Brasil. Deste modo, há a necessidade de maior conhecimento sobre a importância e prevalência do *Avipoxvirus* neste grupo, particularmente em aves da Ordem Psittaciformes, visto que estão entre as espécies mais comumente mantidas em cativeiro, sejam em criatórios, zoos, domicílios ou Centros de reabilitação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar retrospectivamente a prevalência e características epidemiológicas do *Avipoxvirus* em Psittaciformes nativos e exóticos mantidos em cativeiro no estado de São Paulo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença do genoma do *Avipoxvirus* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*) a partir de amostras de swabs de cloaca e orofaringe, fezes, fragmentos de tecidos e/ou sangue de Psittaciformes nativos e exóticos cativos no estado de São Paulo;
- Comparar a presença do *Avipoxvirus* entre as diferentes espécies de Psittaciformes, nativas e exóticas e os diferentes tipos de cativeiro;
- Comparar a detecção do *Avipoxvirus* em diferentes tipos de amostras biológicas;
- Caracterizar por meio de sequenciamento genético os *Avipoxvirus* detectados e comparar geneticamente as sequências de aves nativas e exóticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE ESTUDO

Para detecção do *Avipoxvirus* foram selecionadas 300 amostras biológicas pertencentes ao acervo do Laboratório de Ecopatologia de Aves da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

As amostras foram coletadas a partir da contenção física dos Psittaciformes sendo obtidos *swabs* da orofaringe, *swabs* da cloaca, *swab* de lesão palpebral, fezes, fragmentos de tecidos ou sangue. Os Psittaciformes eram cativos, de espécies nativas e exóticas, provenientes de clínicas, criatórios e Centros de reabilitação (CETAS) do Estado de São Paulo.

Na ocasião, estas amostras foram avaliadas para outras enfermidades e a licença para captura e coleta de material biológico com finalidade científica das aves foi expedida e autorizada pelo SISBIO/ICMBio (licença número 37364) e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-USP (números 2870/2012 e 9188290120).

4.2 PESQUISA DE DNA DE AVIPOXVIRUS

4.2.1 Extração do DNA

As amostras biológicas obtidas das aves, armazenadas em microtubos, foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit de extração QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante conforme o tipo de amostra, sendo armazenadas a -80°C até as análises.

4.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), as amostras de DNA foram testadas de acordo com o protocolo proposto por Lee et al. (1997), utilizando os *primers* P1f (5'-CAGCAGGTGCTAAACAACAA-3') e P2r (5'-CGGTAGCTTAACGCC

GAATA-3') que codificam o fragmento de 578pb do gene P4b do capsídio viral. Na reação foram utilizados: 1x DreamTaq Green PCR Master Mix[®] (Thermo Fisher Scientific, USA) que inclui DreamTaq DNA Polymerase, DreamTaq Green buffer, dNTPs e MgCl₂; 0,5µL de cada primer (*forward* e *reverse*) a 5,0x10⁵ pmol/µL; 3 µL de DNA e água ultrapura livre de nucleases, totalizando um volume final de 25 µL. Como controle positivo foi utilizada a vacina Vaxxon[®] Pox P (amostra pombo) (Vaxxinova, São Paulo, Brasil) e como controle negativo água ultrapura livre de DNA/RNAses.

As amostras foram submetidas à amplificação a partir de uma desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida por 32 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 50°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, e, uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Para amplificação das reações foi utilizado o termociclador Axygen[®] Maxygene (Axygen, Union City, Califórnia, EUA).

4.2.3 Eletroforese dos produtos amplificados

Para a fase de eletroforese, foi utilizado gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA) corado na concentração de 0,5 µg/mL usando GelRed[®] (Biotium, Fremont, Califórnia, EUA) e submetido a uma corrida eletroforética de 90 minutos a 120V. A cada corrida foram incluídos 10 µL de cada produto da PCR, o controle positivo, o controle negativo e o marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder[®] (Sinapse Biotecnologia Ltda, Brasil).

Após a separação dos fragmentos no gel, este foi analisado por meio do sistema de fotodocumentação *Multi Doc-It Digital Imaging System UVP[®]*, sendo todas as reações fotodocumentadas e as amostras determinadas como positivas ou negativas de acordo com os padrões para o *Avipoxvirus* aviário.

4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

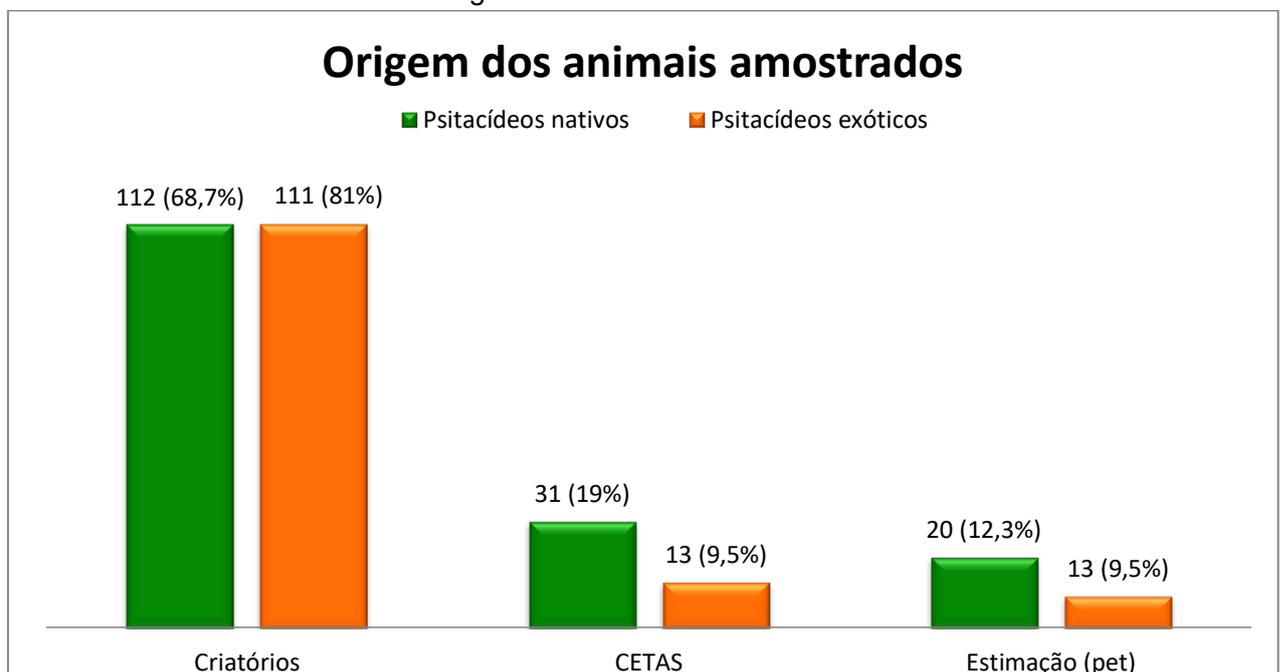
Os produtos de PCR amplificados foram purificados a partir do recorte do fragmento no gel utilizando o kit comercial *NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up*[®] (Macherey Nagel, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante e sequenciados em sentido *forward* e *reverse* por Sequenciamento Sanger (Centro de Pesquisa em Genoma Humano e Células-Tronco, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil). Os cromatogramas foram analisados e os *primers* foram removidos usando o software Bioedit. As sequências foram comparadas com sequências de referência de *Avipoxvirus* disponíveis no GenBank[®] utilizando a ferramenta básica de busca de alinhamento local (BLAST). O alinhamento das sequências foi realizado no software MEGA X. O método utilizado para construir a árvore filogenética foi o de Neighbor-Joining, testada por *bootstrap* com 1000 réplicas.

5 RESULTADOS

Foram analisadas um total de 339 amostras referentes a 300 animais. Este número de amostras decorreu do fato que em um criatório havia histórico de mortalidade de aves e suspeita de casos de poxvírus, sendo coletado material de 21 aves nativas e 18 aves exóticas. Deste modo, foram obtidas duas amostras de cada animal (*swab* de orofaringe/cloaca e sangue). Adicionalmente, foi colhida uma amostra extra de *swab* de lesão palpebral de um exemplar exótico, resultando em um aumento de 39 amostras. Assim, no total do estudo foram amostrados 163 (54,3%) psitacídeos nativos e 137 (45,7%) psitacídeos exóticos, representados respectivamente por 183 amostras e 156 amostras.

Dentre os 163 psitacídeos nativos, 112 (68,7%) eram provenientes de criatórios, 31 (19,0%) de CETAS e 20 (12,3%) eram aves de estimação (pets) atendidas em clínicas privadas, conforme representado na Figura 1. Entre os tipos de amostras, a maioria analisada foi *swab* cloacal (53; 29,0%), *swabs* cloacal e orofaríngeo (53; 29,0%), fezes (51; 27,8%), seguido por sangue (20; 22,0%) e, por fim, fragmentos de tecidos (fígado/baço/rim) (6; 3,2%).

Figura 1 - Demonstração dos percentuais de psitacídeos nativos e exóticos amostrados de acordo com o local de origem.



Fonte: Nascimento (2024).

Ainda em relação à fauna nativa, foram amostradas 27 espécies, sendo predominantes as espécies *Amazona aestiva* (78/163; 47,8%), seguidas por *Amazona rhodocorytha* e *Ara ararauna* (12/163; 7,4% cada) e *Amazona amazonica* (10/163; 6,1%), conforme discriminado na Tabela 1. Apenas um indivíduo (*Amazona aestiva*, #952b) foi positivo (0,6%; 1/163) para o poxvírus pela PCR.

Tabela 1 - Relação de psitacídeos nativos avaliados para a presença do *Avipoxvirus* de acordo com nome científico, nome comum e a população de estudo.

Nome científico	Nome comum	nº de positivos/ nº total de indivíduos
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	1/78
<i>Amazona rhodocorytha</i>	Papagaio-chauá	0/12
<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	0/12
<i>Amazona amazonica</i>	Papagaio-do-mangue	0/10
<i>Amazona brasiliensis</i>	Papagaio-de-cara-roxa	0/6
<i>Amazona vinacea</i>	Papagaio-de-peito-roxo	0/4
<i>Aratinga nenday</i>	Periquito-de-cabeça-preta	0/4
<i>Pionus fuscus</i>	Maitaca-roxa	0/4
<i>Amazona festiva</i>	Papagaio-da-várzea	0/3
<i>Ara chloropterus</i>	Arara-vermelha	0/3
<i>Brotogeris chiriri</i>	Periquito-de-encontro-amarelo	0/3
<i>Pionites leucogaster</i>	Marianinha-de-cabeça-amarela	0/3
<i>Amazona ochrocephala</i>	Papagaio-campeiro	0/2
<i>Ara severus</i>	Maracanã-guaçu	0/2
<i>Aratinga jandaya</i>	Jandaia-verdadeira	0/2
<i>Aratinga leucophthalmus</i>	Periquitão-maracanã	0/2
<i>Derophtyus accipitrinus</i>	Anacã	0/2
<i>Guaruba guarouba</i>	Guaruba	0/2
<i>Amazona leucocephala</i>	Papagaio-cubano	0/1
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Arara-azul-grande	0/1
<i>Ara macao</i>	Araracanga	0/1
<i>Aratinga acuticaudata</i>	Aratinga-de-testa-azul	0/1
<i>Aratinga aurea</i>	Jandaia-coquinho	0/1
<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã-nobre	0/1
<i>Primolius auricollis</i>	Maracanã-de-colar	0/1
<i>Pyrrhura frontalis</i>	Triba-de-testa-vermelha	0/1
<i>Pyrrhura perlata</i>	Triba-de-barriga-vermelha	0/1
Total		1/163 (0,6%)

Fonte: Nascimento (2024).

Entre os 137 psitacídeos exóticos, 111 (81,0%) eram provenientes de criatórios, 13 (9,5%) de CETAS e 13 (9,5%) eram aves de estimação (pets) atendidas em clínicas privadas, conforme representado na Figura 1. Entre os tipos de amostras, a maioria analisada foi de *swabs* de cloaca/orofaringe (133; 85,2%), seguidos por amostras de sangue (18; 11,5%), fragmentos de tecidos (fígado/baço/rim) (4; 2,7%) e uma amostra extra de *swab* de lesão palpebral (1; 0,6%). Os 18 animais com amostra de sangue também foram testados com amostra de *swab* de cloaca/orofaringe e um indivíduo com amostras do *swab* de lesão palpebral.

Foram amostradas 19 espécies exóticas, sendo as predominantes *Psittacula krameri* (37; 27,0%), *Psephotus haemotonotus* (21; 15,3%), *Psittacus erithacus* (19; 13,9%) e *Platycercus eximius* (15; 11,0%) (Tabela 2). Destas aves exóticas, dois indivíduos (1,5%) foram positivos na PCR, sendo um *Platycercus eximius* (#921b) e um *Barnardius barnadis* (#778b).

Tabela 2 - Relação de psitacídeos exóticos avaliados para a presença do *Avipoxvirus* de acordo com o nome científico, nome comum e a população de estudo.

Nome científico	Nome comum	nº de positivos/nº total de indivíduos
<i>Psittacula krameri</i>	Periquito-de-colar	0/37
<i>Psephotus haemotonotus</i>	Periquito-dorso-vermelho	0/21
<i>Psittacus erithacus</i>	Papagaio-cinzento	0/19
<i>Platycercus eximius</i>	Rosela-multicolorida	1/15
<i>Cacatua alba</i>	Cacatua-branca	0/8
<i>Ecolophus roseicapilla</i>	Cacatua-galah	0/6
<i>Platycercus elegans</i>	Rosela-vermelha	0/5
<i>Eclectus roratus</i>	Papagaio-ecletus	0/4
<i>Neophema elegans</i>	Periquito-elegante	0/4
<i>Cacatua galerita</i>	Cacatua-de-crista-amarela	0/3
<i>Neopsephotus bourkii</i>	Periquito-de-bourke	0/3
<i>Cacatua sulphurea</i>	Cacatua-sufurea	0/2
<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>	Periquito-de-coroa-vermelha	0/2
<i>Poicephalus senegalus</i>	Papagaio do Senegal	0/2
<i>Trichoglossus haematodus</i>	Lóris-arco-íris	0/2
<i>Barnardius barnardi</i>	Periquito-de-barnard	1/1
<i>Cacatua moluccensis</i>	Cacatua-das-molucas	0/1
<i>Psittacula cyanocephala</i>	Periquito-cabeça-de-ameixa	0/1
<i>Psittacula eupatria</i>	Papagaio-alexandrino	0/1

Total	2/137 (1,5%)
--------------	---------------------

Fonte: Nascimento (2024).

Dentre os animais testados com mais de uma amostra (sangue e *swab* cloaca/orofaringe) e que apresentaram resultado positivo na PCR, está o exemplar nativo de *Amazona aestiva* que apresentou resultado negativo na amostra de sangue, mas em contrapartida, apresentou resultado positivo na amostra de *swab* de cloaca/orofaringe.

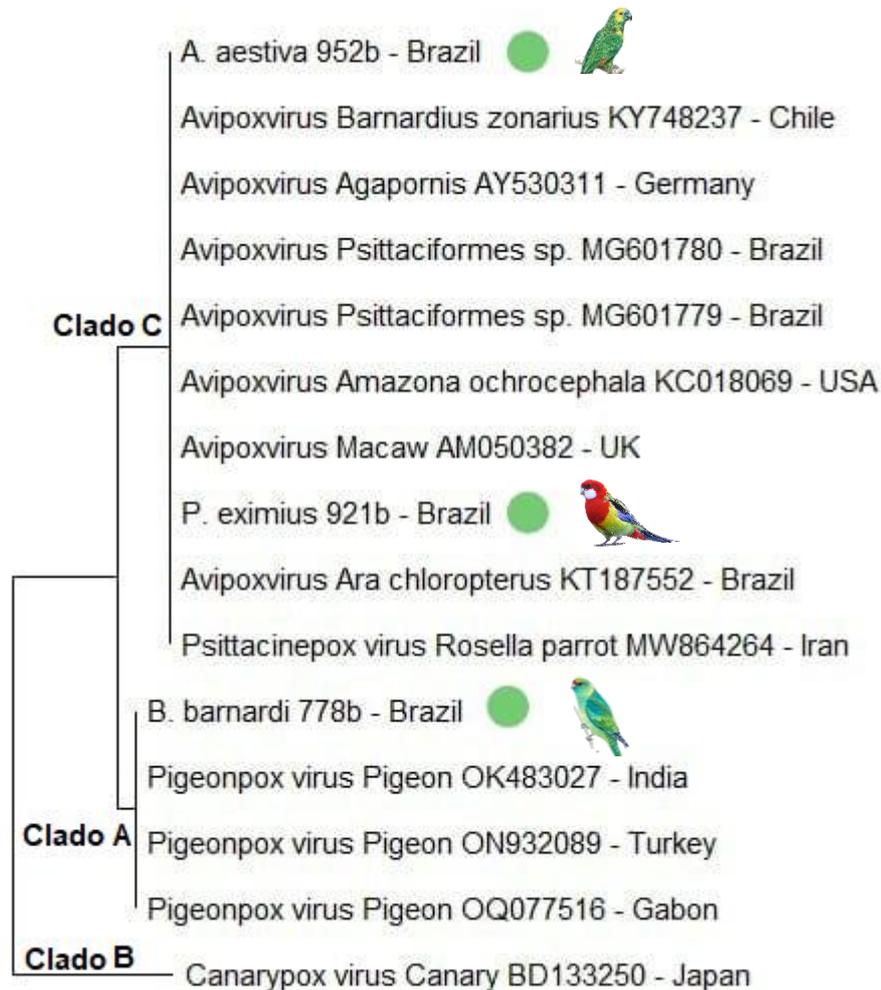
Entre as espécies exóticas, o *Platycercus eximius* teve resultado positivo na PCR da amostra de *swab* de lesão palpebral, porém, negativo nas amostras de sangue e de *swab* de cloaca/orofaringe. Este indivíduo pertencia ao mesmo criatório do *Amazona aestiva* positivo, local com histórico de suspeita de infecção por poxvírus. Por sua vez, o *Barnardius barnardis* foi positivo na amostra de *swab* de cloaca/orofaringe e pertencia a outro criatório do estado de SP, porém esse indivíduo não tinha histórico clínico.

O sequenciamento dos produtos do gene P4b foi realizado nas três amostras positivas do presente estudo, sendo todas sequências obtidas de boa qualidade. A análise filogenética destas sequências revelou que as amostras correspondiam a dois cladogramas distintos do gênero *Avipoxvirus*, sendo eles o Clado A (*fowlpox*) e o Clado C (*psittacinepox*).

A análise das sequências também demonstrou que as amostras #952b (*Amazona aestiva*) e #921b (*Platycercus eximius*) tinham uma identidade de sequência de 99,78% a 100% com sequências referentes à psitacídeos brasileiros (GenBank número de acesso: MG601780; MG601779) de poxvírus do Clado C de psitacídeos (*psittacinepox*).

A amostra #778b (*Barnardius barnardis*) demonstrou uma alta porcentagem de identidade (100%), com outras sequências de poxvírus do Clado A (*fowlpox*), incluindo dois genomas completos de Columbiformes (GenBank número de acesso: ON375849.1 e NC_024447.1) e outras sequências do gene P4b de pombos de diferentes países, como mostrado na árvore filogenética da Figura 2.

Figura 2 - Arvore filogenética da análise das sequências parciais do gene P4b de *Avipoxvirus* de aves silvestres e exóticas representando os cladoss A, B e C construída pelo método Neighbor- Joining (*bootstrap* com 1000 réplicas).



Fonte: Nascimento (2024).

Legenda: Números de acesso do GenBank estão incluídos. Amostras do presente estudo estão sinalizadas pelo círculo verde.

As amostras #952b (*A. aestiva*) e #921b (*P. eximius*) são de animais provenientes do mesmo criatório, o qual teve histórico de casos clínicos sugestivos de poxvirose. Entre as 20 aves nativas amostradas, três apresentavam lesão ocular no momento da coleta de material, no entanto, foram negativas na PCR de *swab* de cloaca/orofaringe e sangue. O indivíduo #952b não apresentava sinal clínico no momento da coleta.

Entre as 18 aves exóticas deste mesmo criatório, cinco apresentavam lesão ocular e uma (#921b) apresentava lesão característica na pálpebra, sendo esta amostra positiva na PCR, embora negativa nas amostras de *swab* de cloaca/orofaringe e sangue.

A amostra #778b (*B. barnardis*) foi proveniente de um criatório de outra região e essa ave não tinha histórico clínico conhecido, apesar de ter sido importada recentemente.

6 DISCUSSÃO

Psitacídeos são susceptíveis à infecção por poxvírus, incluindo os papagaios do gênero *Amazona*, *Pionus* sp., *Ara* sp., *Pionites* sp., entre outros (GRAHAM, 1978; McDONALD et al., 1981; BOOSINGER et al., 1982; GERLACH, 1994; ESTEVES et al., 2017). Entre as espécies exóticas, a poxvirose já foi relatada em diversas espécies dos gêneros *Agarpornis* sp., *Neopsittacus* sp., *Neophema* sp., *Northiella* sp., *Polytelis* sp., *Platycercus* sp. e *Psephotus* sp. (KRAFT & TEUFEL, 1971; TSAI et al., 1997; GERLACH et al., 1998; TERREGINO et al., 1999; GARTRELL et al., 2003; GONZÁLEZ-HEIN et al., 2008; SLOCOMBE et al., 2013; MURER et al., 2018). Devido aos poucos relatos disponíveis, alguns autores acreditam que cacatuas, calopsitas e periquitos-australiano parecem ser mais resistentes a este tipo de infecção (McDONALD et al., 1981; RITCHIE, 1995; GONZÁLEZ-HEIN et al., 2008).

Uma revisão recente indica seis ordens que possuem o maior número de espécies onde o *Avipoxvirus* foi detectado, estando a ordem Psittaciformes entre elas (WILLIAMS et al., 2021). No presente estudo, a sequência parcial do *Avipoxvirus* foi detectada em apenas três das 46 espécies pesquisadas, sendo uma nativa (*A. aestiva*) conforme já relatado por McDonald et al. (1981) durante um surto em uma estação de quarentena nos EUA e; por Esteves e colaboradores (2017) durante um surto em um criatório de Minas Gerais.

Em relação às espécies exóticas analisadas neste estudo, o *Avipovirus* foi detectado em *Platycercus eximius*, conforme também relatado em surto no Chile (GONZÁLEZ-HEIN et al., 2008) e no Rio Grande do Sul (MURER et al., 2018), ambos surtos em criatórios. Quanto ao *B. barnardi* detectado positivo neste estudo, não foram encontrados registros positivos para a espécie na literatura.

No que concerne aos locais, não foram detectadas amostras positivas oriundas de centros de reabilitação ou animais domiciliados atendidos em clínicas. Contudo, deve ser ressaltado que aves de criatórios foram mais frequentemente amostradas neste estudo, representando 68,7% das aves nativas e 81% das aves exóticas.

As sequências parciais do gene P4b de *Avipoxvirus* aqui obtidas agruparam com sequências do clado A (*fowlpox*) e clado C (*psittacinepox*). As duas amostras positivas referentes a uma ave nativa (#952b) e uma exótica (#921b) do mesmo criatório agruparam no clado C, no qual comumente agrupam-se amostras de Psittaciformes. Nestes casos, havia histórico de doença clínica com alta mortalidade de espécimes exóticas alguns meses antes da coleta das amostras biológicas das aves. Embora algumas aves (n=4) apresentassem lesão ocular, nenhuma ave nativa tinha lesões características de poxvirose.

No entanto, a ave exótica positiva (#921b) apresentava lesão palpebral no momento da coleta de amostras. A relação entre a presença ou não de lesões cutâneas evidentes e PCR positivo também foi notada por Esteves et al. (2017) em um estudo com psitacídeos nativos de cativeiro em Minas Gerais, revelando 24,4% de aves com lesões cutâneas e resultado positivo na PCR, embora outros 4,2% de aves com lesões cutâneas tiveram PCR negativo. Ainda, 4,2% de aves sem lesões aparentes apresentaram resultado positivo na PCR. Como o período de incubação do vírus pode variar de quatro dias a mais de um mês, certas amostras podem apresentar um resultado falso negativo (RITCHIE, 1995).

O criatório com aves positivas deste estudo, teve amostras de *swabs* de cloaca/orofaringe e sangue coletadas. E, a ave que apresentava lesões palpebrais características da doença teve resultado PCR positivo. Contudo, deve ser considerado que neste e, talvez em outros casos, o médico veterinário só foi acionado durante a remissão dos sinais clínicos e, provavelmente, após o tempo de viremia do poxvírus. Tais fatores podem ter resultado em amostras de sangue negativas. Com exceção do criatório onde havia histórico de quadro clínico sugestivo de infecção por poxvírus, as outras aves amostradas neste estudo não apresentavam lesões macroscópicas típicas.

Ainda da análise filogenética, foi confirmado o agrupamento da sequência da amostra do *B. barnardis* (#778b) no clado A (*fowlpox*), demonstrando 100% de identidade com sequências de genomas completos de poxvírus de Columbiformes. Porém, não detectamos na literatura consultada amostras provenientes de psitacídeos neste clado para a devida comparação.

Os *Avipoxvirus* possuem diferentes níveis de especificidade, gerando grande número de infecções cruzadas entre espécies, tornando as aves suscetíveis a uma ou mais cepas do vírus, independente do clado ao qual pertencem (VAN RIPER; FORRESTER, 2007). Isto sinaliza que esta ave exótica positiva (#778b) pode ter tido contato direto com pombos, com um ambiente contaminado ou ainda, com artrópodes com o *fowlpox*. Há indícios de que transmissões do vírus de aves selvagens para aves domésticas e o vice-versa não são incomuns (TERASAKI; KANEKO; MASE, 2010).

A poxvirose é uma doença que não possui um tratamento específico, portanto, se faz necessário medidas de prevenção e controle a fim de evitar a disseminação viral. Assim, condições inadequadas de ambiente e manejo, superlotação, comércio ilegal e presença de vetores, são alguns destes eventos geram estresse nos animais, podendo levar a uma queda de imunidade que pode predispor as aves a certas doenças, como a agudização de uma infecção latente pelo poxvírus (RITCHIE, 1995), por exemplo.

A incidência de casos de poxvirose em Psittaciformes atendidos na rotina clínica é relativamente baixa (GRESPLAN & RASO, 2014). Há uma carência de estudos sobre a prevalência da infecção por *Avipoxvirus* em aves silvestres no Brasil. Em muitos casos, a infecção apresenta um quadro clínico cutâneo discreto e auto-limitante (RITCHIE, 1995), talvez por isso a doença tem sua importância subestimada.

No entanto, eventuais surtos de poxvirose podem causar quadros clínicos evidentes e resultar em grandes perdas de plantéis, principalmente em situações de quarentena e criatórios (McDONALD et al., 1981; BOOSINGER et al., 1982; TSAI et al., 1997; GONZÁLEZ-HEIN et al., 2008; GONZÁLEZ-HEIN et al., 2022). No Japão, em um surto em um local de revenda de aves, papagaios (*Amazona aestiva*), agapornis (*Agapornis personata*) e calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) apresentaram lesões sugestivas de poxvírus. As aves apresentaram sinais característicos como blefarite, conjuntivite e lesões perioculares, sendo realizado o isolamento viral em todas as aves que foram para atendimento veterinário (IWATA et al., 1986).

Também em um surto relatado no Chile, 50 de 188 psitacídeos apresentaram sinais clínicos de poxvirose como blefarite, conjuntivite serosa, lesões cutâneas em pernas, pálpebra e região periocular. As aves mais jovens foram as mais afetadas, incluindo as espécies *Agapornis* sp., *Polytelis* sp., *Neophema* sp. e *Platycercus* sp. (espécies também presentes neste estudo). Onze das aves que apresentaram sinais clínicos vieram a óbito, sendo que o diagnóstico foi baseado no histórico, lesões, histopatológico e isolamento viral (GONZÁLES-HEIN et al., 2008).

Em Taiwan, uma epizootia afetou agapornis (*Agapornis roseicollis*) de 12 semanas de idade, causando 60% de morbidade e 5% de mortalidade entre um plantel de 200 indivíduos. As aves desenvolveram as formas cutânea e a forma diftérica da doença, apresentando lesões crostosas em pernas, pálpebras, ao redor do bico e lesões diftéricas em trato digestório e respiratório. Neste caso foram realizados avaliação histopatológica, microscopia eletrônica e PCR como prova diagnóstica (LO et al., 2017).

Recentemente, um estudo realizado no Chile, demonstrou que psitacídeos de dois aviários distintos apresentaram lesões sugestivas de poxvírus, sendo eles letargia, blefarite, espessamento das pálpebras e dispneia. Amostras de tecidos de *Psephotus haematonotus* e *Barnardius zonarius* que foram a óbito foram submetidas à PCR, eletroforese e sequenciamento genético, tanto para o *Avipoxvirus* como para outras doenças comuns em aves. A maioria das aves era assintomática, no entanto, as aves da espécie *P. haemotonotus* apresentaram a forma cutânea e diftérica da doença (GONZÁLES-HEIN et al., 2022). O resultado do sequenciamento foi positivo para o *Avipoxvirus* com 99,6% a 100% de semelhança com os poxvírus do clado C de psitacídeos.

No Brasil, apenas dois surtos foram relatados até o momento, envolvendo psitacídeos nativos (ESTEVES et al., 2017) e exóticos (MURER et al., 2018) de criatórios, causando altas taxas de mortalidade. Em 2017, um surto ocorrido em um centro de conservação em Minas Gerais, envolvendo 10 espécies de psitacídeos nativos, entre papagaios, periquitos e araras perdurou por 3 meses. Amostras de swabs de conjuntiva e cloaca de 94 animais do local foram submetidas a PCR, sendo que destes animais testados, 27 apresentavam sinais clínicos e 67 estavam aparentemente saudáveis. Os animais doentes apresentaram lesões cutâneas nodulares típicas, perda de peso e apatia, três animais vieram a óbito, duas

maritacas-roxa (*Pionus fuscus*) e uma guaruba (*Guaruba guarouba*). As aves que sobreviveram apresentaram remissão das lesões em torno de três semanas (ESTEVEES et al., 2017).

No Rio Grande do Sul, outro surto de poxvirose foi descrito, sendo, porém, em psitacídeos exóticos, ocorrendo altas taxas de mortalidade, principalmente em aves jovens. As aves apresentaram letargia, penas eriçadas, dispneia, edema ocular, lesões nodulares em região periocular e em comissura de bico, anorexia e morriam em torno de 1 a 3 dias. Durante o primeiro surto as aves estavam em um ambiente externo, expostas ao ar, grama e aves de vida livre/migratórias, logo após, as aves do ambiente interno começaram a apresentar sinais clínicos. Todos os casos ocorreram nos meses mais quentes do ano, coincidindo com o aumento na população de vetores. As aves mais afetadas foram as roselas (*Platycercus* sp.), assim como neste estudo, e os periquitos-dorso-vermelho (*Psephotus haemotonotus*) (MURER et al., 2018).

Deste surto no Rio Grande do Sul, 50 aves que vieram a óbito foram submetidas à necropsia, sendo observado externamente massas nodulares secas e amarelas em região periocular, na comissura do bico e em língua, também inchaço em pálpebra, lesões nodulares e alterações em penas; além de massas caseosas obstruindo a traqueia e lesões diftéricas nas mucosas. O diagnóstico foi concluído através de exame histopatológico e PCR com posterior análise filogenética a qual apresentou 99,58% de identidade com *Avipoxvirus* do clado C (*psittacinepox*) (MURER et al., 2018).

Estes dois estudos relatados no Brasil indicaram alta porcentagem de identidade com espécies de poxvirus de psitacídeos (*psittacinepox*) pertencentes ao clado C. Em associação aos nossos resultados, indicam que há possibilidade de ampla circulação deste clado em regiões diversas do país.

Visto que o vírus pode permanecer latente no hospedeiro (RITCHIE, 1995), além de realizar a colheita do material quando o animal apresenta lesões e em seu pico de viremia, é importante realizar a triagem clínica e o exame físico dos animais independente de apresentarem ou não sinais clínicos. De acordo com as diretrizes da Instrução Normativa nº 5 de 13 de maio de 2021, do Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2021), animais dos centros

de triagem destinados à soltura devem ser submetidos à exames para detecção de diversos agentes patogênicos, entre eles, o *Avipoxvirus*, a fim de evitar a disseminação do vírus entre as outras espécies da fauna brasileira e introdução nas populações de vida livre.

Alguns estudos indicam que os *Avipoxvirus* podem circular amplamente entre as diferentes ordens de aves de vida livre (WILLIAMS et al., 2021; BERTELLONI et al., 2022). Deste modo, estes autores sugerem que mais estudos sejam realizados, a fim de identificar espécies, clados e subclados dos vírus envolvidos para entender melhor o papel das aves assintomáticas como possíveis fontes de infecção para outras aves silvestres.

Até o presente momento, existem poucos estudos e sequências genéticas disponíveis sobre os *Avipoxvirus* em aves silvestres, particularmente psitacídeos. Tal fato torna difícil avaliar qual a real distribuição, prevalência e impacto do vírus para as espécies cativas e de vida livre. Os dados aqui apresentados demonstram um baixo percentual de aves positivas, contudo, a ampliação na quantidade de estudos clínicos, patológicos, epidemiológicos e moleculares será útil para o maior conhecimento da diversidade genética dos poxvírus em aves silvestres no Brasil.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- ✓ *Avipoxvirus* estão presentes em plantéis de Psittaciformes nativos e exóticos em cativeiro no estado de São Paulo.
- ✓ A detecção de poxvírus foi similar entre espécies nativas (0,6%) e exóticas (1,5%).
- ✓ Entre as amostras biológicas analisadas, os *swabs* de cloaca/orofaringe e *swab* de lesão palpebral foram as amostras onde o vírus foi detectado, não sendo observado nenhum quadro de viremia.
- ✓ *Avipoxvirus* agrupados no Clado C (*psittacinepox*) estão presentes em criatórios mistos de Psittaciformes, afetando clinicamente tanto espécies nativas quanto exóticas.
- ✓ *Avipoxvirus* pertencente ao Clado A (*fowlpox*), detectado em espécie exótica com 100% de identidade com sequência de Columbiformes, indica que psitacídeos são suscetíveis a cepas virais de outros clados do vírus. Apesar desta ave não ter histórico clínico, não se sabe a virulência de outras estirpes virais para os psitacídeos.
- ✓ A diversidade de estirpes e o escasso conhecimento epidemiológico sobre *Avipoxvirus* em espécies de aves silvestres ressalta a necessidade de mais estudos sobre a prevalência e caracterização viral, visando a segurança sanitária dos plantéis e populações *in situ*.

REFERÊNCIAS

BERNARDINO, A. Boubá aviária. *In*: Júnior et al. **Doenças das Aves**, 2 ed. FACTA, 2009. p. 723-729.

BERTELLONI, F.; CECCHERELLI, R.; MARZONI, M.; POLI, A.; EBANI, V. V. Molecular detection of *Avipoxvirus* in wild birds in central Italy. **Animals**, v. 12, n. 3, p. 338, 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12030338>

BOLTE, A.L.; MEURER, J.; KALETA, E.F. Avian host spectrum of avipoxviruses. **Avian Pathology**, v. 28, n. 5, p. 415–432, 1999. <https://doi.org/10.1080/03079459994434>

BOOSINGER, T.R.; WINTERFIELD, R.W.; FELDMAN, D.S.; DHILLON, A.S. Psittacine pox virus: virus isolation and identification, transmission, and cross-challenge studies in parrots and chickens. **Avian Diseases**. v. 26, p. 437–44, 1982. <http://dx.doi.org/10.2307/1590119>

BROWN, M.; DAVIES, D. H.; SKINNER, M. A.; BOWEN, G.; HOLLINGSWORTH, S. J.; MUFTI, G. J.; ARRAND, J.R.; STACEY, S. N. Antigen gene transfer to cultured human dendritic cells using recombinant avipoxvirus vectors. **Cancer Gene Therapy**, v. 6, n. 3, p. 238-245, 1999. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700014>

BWALA, D. G.; FASINA, F. O.; DUNCAN, N. M. Avian poxvirus in a free-range juvenile speckled (rock) pigeon (*Columba guinea*). **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 86, n. 1, p. 1-4, 2015. <https://doi.org/10.4102/jsava.v86i1.1259>

CHEEVERS, W. P.; RANDALL, C. C. Viral and cellular growth, and sequential increase of protein and DNA during *fowlpox* infection *in vivo*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 127, n.2, p.401-405, 1968.

ESTEVEZ, F. C. B.; MARÍN, S. Y.; RESENDE, M.; SILVA, A. S. G.; COELHO, H. L. G.; BARBOSA, M. B.; D'APARECIDA, N. S.; RESENDE, J. S.; TORRES, A. C. D.; MARTINS, N. R. S. Avianpox in native captive psittacines, Brazil, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 154-156, 2017. <https://doi.org/10.3201/eid2301.161133>

GARTRELL, B.; STONE, M.; KING, C.; WANG, J. An outbreak of disease caused by *psittacinepox virus* in rosellas. **Surveillance**, v. 30, p. 11-13, 2003.

GERLACH, H. 1994. Viruses. *In*: Ritchie, B. W., G. J. Harrison, and L. R. Harrison (eds). *Avian Medicine: Principles and Application*. Wingers Publish. Inc., Lake Worth, Florida, USA. Pp. 863-948.

GERLACH, H.; RAMIS, A. J.; ENDERS, F.; CASARES, M.; TRUYEN, U. Avian pox in lorries (*Neopsittacus* sp): a case report. *In*: International virtual conferences in veterinary medicine: diseases of psittacine birds, p. 1-5, 1998. (<http://www.vet.uga.edu/IVCVM/gerlach2/gerlach2.html>)

GIOTIS, E. S.; SKINNER, M. A. Spotlight on avian pathology: fowlpox virus. **Avian Pathology**, v. 48, n. 2, p. 87-90, 2019. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1554893>

GONZÁLEZ-HEIN, G; GONZÁLES, C.; HIDALGO, H. Case report: an avian pox outbreak in captive psittacine birds in Chile. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 17, n. 3, p. 210-215, 2008. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2008.05.008>

GONZÁLEZ-HEIN, G; GONZÁLES, C.; AGUIRRE, I.; HUARACÁN, B. *Psittacinepox* Virus in *Psephotus haematonotus* (red-rumped parrot) in Chile. **Biomedical Journal Scientific & Technical Research**, v. 45, n. 2, 2022.

GRAHAM, C. L. G. Poxvirus infection in a spectacled Amazon parrot (*Amazona albifrons*). **Avian Diseases**, v.22, p.340-343, 1978.

GRESPLAN, A.; RASO, T. F. Psittaciformes (araras, papagaios, periquitos, calopsitas e cacatuas). *In*: **Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária**. CUBAS, Z.S. et al. (Org.). 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca, vol.1, p.550-589, 2014.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ministério do Meio Ambiente. **Instrução normativa nº5, de 13 de maio de 2021**, 2021.

ICTV. International Committee on taxonomy of viruses. Avipoxvirus, 2019. Disponível em: https://ictv.global/report_9th/dsDNA/poxviridae. Acesso em: 28 de dezembro de 2023.

IWATA, Y.; FUKUCHI, H.; SUZUKI, Y.; HIRAI, K. Poxvirus infection in psittacine birds. **Research Bulletin of the Faculty of Agriculture, GifuUniversity**, n. 51, p. 201-205, 1986.

JARMIN, S.; MANVELL, R.; GOUGH, R. E.; LAIDLAW, S. M.; SKINNER, M. A. Avipoxvirus phylogenetics: identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 8, p. 2191-2201, 2006. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81738-0>

KRAFT, V.; TEUFEL, P. A pox-like disease in lovebirds (*Agapornis personata* and *Agapornis roseicollis*). **Berliner Und Umchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 84, p. 83-87, 1971.

KUNERT-FILHO, H.C.; CIBULSKI, S.P.; FINKLER, F.; GRASSOTTI, T.T.; JAENISCH, F.R.F.; BRITO, K.C.T.; CARVALHO, D.; LOVATO, M.; BRITO, B. G. First phylogenetic analysis of *Avipoxvirus* (APV) in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 357-362, 2016. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000500001>

LEE, L. H.; LEE, K. H. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. **Journal of Virological Methods**, v. 63, n. 1-2, p. 113-119, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(96\)02119-2](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(96)02119-2)

LO, D. Y.; YEH, J. C.; CHI, C.; CHEN, C. L.; CHANG, M. H.; YU, P. H.; KUO, H. C. Case report: psittacine pox virus infection in *Agapornis roseicollis*. **Taiwan Veterinary Journal**, v. 43, n. 2, p. 85-88, 2017. <https://doi.org/10.1142/S168264851672001X>

MANAROLLA, G.; PISONI, G.; SIRONI, G.; RAMPIN, T. Molecular biological characterization of avian poxvirus strains isolated from different avian species. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 1-2, p. 1-8, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.004>

McDONALD, S.E.; LOWENSTINE, L.J.; ARDANS, A.A. Avian pox in blue-fronted Amazon parrots. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 179, n. 11, p. 1218-1222, 1981.

MURER, L.; WESTENHOFEN, M.; KOMMERS, G. D.; FURIAN, T. Q.; BORGES, K. A.; KUNERT-FILHO, H. C.; STRECK, A. F.; LOVATO, M. Identification and phylogenetic analysis of clade C *Avipoxvirus* in a fowlpox outbreak in exotic psittacines in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 6, p. 946-950, 2018. <https://doi.org/10.1177/1040638718775146>

PARKER, P. G.; BUCKLES, E. L.; FARRINGTON, H.; PETREN, K.; WHITEMAN, N. K.; RICKLEFS, R. E.; BOLLMER, J. L.; JIMÉNEZ- UZCÁTEGUI, G. 110 Years of *Avipoxvirus* in the Galapagos Islands. **PlosOne**, v. 13, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015989>

PEREIRA, W. L. A.; GABRIEL, A. L. M.; MONGER, S. G. B.; MORAES, L. A.; QUEIROZ, D. K. S.; SOUZA, A. J. S. Lesões cutâneas tipo tumorais associadas à infecção por *avipoxvirus* em uma marreca-cabocla (*Dendrocygna autumnalis*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 2, p. 234-238, 2014. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v15i217202>

RAJASEKARAN, R.; KIRUBAHARAN, J. J.; YADAV, V.; VIDHYA, M.; RAJALAKSHMI, S. Na introduction to Fowlpoxvirus and its potential as a suitable vaccine vector candidate. **Technical Report**, Feb, 2019. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12667.98089>

RIBEIRO, L. C.; MONTEIRO, F. L.; CHAGAS, D. B.; VARGAS, G. D.; LIMA, M.; FISCHER, G.; HUBNER, S. O. Identification of Clade E Avipoxvirus in Brazil. **Avian Diseases**, v. 64, n.2, p. 223-227, 2020. <https://doi.org/10.1637/0005-2086-64.2.223>

RITCHIE BW. Poxviridae. *In: Avian Viruses - Function and Control*. Lake Worth: Wingers Publishing, 1995. p. 285-299.

SARKER, S.; ATHUKORALA, A.; RAIDAL, S. R. Molecular characterization of a novel pathogenic avipoxvirus from an Australian passerine bird, mudlark (*Grallina cyanoleuca*). **Virology**, v. 554, p. 66-74, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.12.011>

SARKER, S.; DAS, S.; LAVERS, J. L.; HUTTON, I.; HELBIG, K.; IMBERY, J.; UPTON, C.; RAIDAL, S. R. Genomic characterization of two novel pathogenic avipoxviruses isolated from pacific shearwaters (*Ardenna* spp.). **BMC Genomics**, v. 18, n. 298, p. 1-26, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3680-z>

SHARMA, B.; NASHIRUDDULLAH, N.; AHMED, J. A.; SHARMA, S.; AHAMAD, D. B. Pathology of avipoxvirus isolates in chicken embryonated eggs. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 8, n. 9, p. 422-430, 2019. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.510.051>

SLOCOMBE, R. F.; MCCOWAN, C.; WANG, J.; HOLZ, P. Avian pox in crimson rosellas (*Platycercus elegans*) in southern Australia. **Avian Pathology**, v. 42, n. 2, p. 147-150, 2013. <https://doi.org/10.1080/03079457.2013.773581>

SMITS, J. E.; TELLA, J. L.; CARRETE, M.; SERRANO, D.; LÓPEZ, G. An epizootic of avian pox in endemic short-toed larks (*Calandrella rufescens*) and Berthelot's Pipits (*Anthus berthelotti*) in the Canary Islands, Spain. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 1, p. 59-65, 2005. <https://doi.org/10.1354/vp.42-1-59>

SOMOGYI, P.; FRAZIER, J.; SKINNER, M. A. Fowlpox virus host range restriction: gene expression, DNA replication, and morphogenesis in nonpermissive mammalian cells. **Virology**, v. 197, n. 1, p. 439-444, 1993. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1608>

TERASAKI, T.; KANEKO, M.; MASE, M. Avian poxvirus infection in flamingos (*Phoenicopterus roseus*) in a Zoo in Japan. **Avian Diseases**, v. 54, n. 2, p. 955-957, 2010. <http://dx.doi.org/10.1637/9040-082609-Case.1>

TERREGINO, C.; CATELLI, E.; DELOGU, M.; CAPUA, I.; TONELLI, A. Poxvirus infection in a blue bonnet parrot. **The Veterinary Record**, v. 145, p. 264, 1999.

TSAI, S.S.; CHANG, T.C.; YANG, S.F.; CHI, Y.C.; CHER, R.S. et al. Unusual lesions associated with avian poxvirus infection in rosy-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). **Avian Pathology**, v.26, p. 75-82, 1997.

TRIPATHY, D. N.; REED, W. M. Pox. *In*: BOULIANNE, M.; LOGUE, C. M.; MCDUGALD, L. R.; NAIR, V.; SUAREZ, D. L. **Diseases of Poultry**. 14th ed. Wiley-Blackwell. 2019. p. 364-381.

TRIPATHY, D. N.; REED, W.M. Pox. *In*: **Diseases of Poultry**, 14th Edition. Swayne, D. E. (Ed). 2020. John Wiley & Sons, Inc. p. 364-381.

TRIPATHY, D. N.; REED, W. M. Pox. *In*: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 11th ed. Iowa States University Press: Ames, 2003. p. 253-269.

TRIPATHY, D. N.; SCHNITZLEIN, W. M.; MORRIS, P. J.; JANSSEN, D. L.; ZUBA, J. K.; MASSEY, G.; ATKINSON, C. T. Characterization of poxviruses from forest birds in Hawaii. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 2, p. 225-230, 2000. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-36.2.225>

VAN RIPER, C. III; FORRESTER, D. *In*: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. **Infectious Diseases of Wild Birds**. ed. Blackwell Publishing. 2007. p. 131-176.

VARGAS, G. D.; ALBANO, A. P.; FISCHER, G.; HUBNER, S.; SALLIS, S. E.; NUNES, C. F.; RAFFI, M. B.; SOARES, M. P. Avian pox virus infection in a common barn owl (*Tyto alba*) in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 620-622, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000700012>

WELI, S. C.; TRYLAND, M. Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors. **Virology Journal**, v. 8, n. 49, p. 1-15. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-49>

WILLIAMS, R.A.J.; TRUCHADO, D.A.; BENITEZ, L. A Review on the Prevalence of Poxvirus Disease in Free-Living and Captive Wild Birds. **Microbiology Research**, v. 12, p. 403–418, 2021. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12020028>