

Quando l'infezione era riferibile ad *E. maxima*, il tratto medio dell'intestino appariva aumentato di volume, con le pareti ispessite e nel lume era presente materiale schiumoso o essudato mucoso di colore arancione. Talvolta erano evidenti petecchie emorragiche sulla mucosa intestinale. Istologicamente in corso di coccidiosi la mucosa intestinale appare ispessita per la presenza nel citoplasma delle cellule epiteliali di coccidi nelle diverse fasi evolutive (Figura 2). La mucosa è interessata da lesioni infiammatorie che nei casi più gravi sono di tipo necrotico-emorragico.

Conclusioni

Nei casi osservati alla visita ispettiva *post mortem* la tiflite emorragica sostenuta da *E. tenella* ha determinato la presenza di una maggiore eterogeneità nei gruppi di broiler sia per quanto riguarda la pezzatura sia per la pigmentazione. Nel caso di *E. maxima* sono risultate più evidenti le alterazioni delle caratteristiche organolettiche ed in particolare la

presenza di soggetti con carni scure. Dall'indagine emerge la conferma che la coccidiosi rappresenta costantemente una minaccia per le produzioni del settore avicolo, sia per i danni diretti (mortalità), ma soprattutto per quelli indiretti rappresentati dal minor indice di conversione e dal ridotto incremento ponderale, nonché per i riflessi sulle caratteristiche merceologiche ed organolettiche delle carcasse.

Bibliografia

- 1) Goodwin M.A., Brown J., Bounous D.I. (1998) "Use of microscopic lesion scores, gross lesion scores and oocyst count scores to detect *Eimeria maxima* in chickens". Avian Pathol 27, 405-408.
- 2) McDougal L.R. (1997) "Coccidiosis" In: Calnek B.W., Barnes H.J., Berard C.W., McDougal L.R., Saif Y.M. (Eds.) Diseases of Poultry. 10th edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 865-883.
- 3) Yogaratnam V. (1995) "Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant". Vet Rec 137, 215-217.

Tabella 1: Distribuzione delle lesioni riferibili a coccidiosi nei 32 gruppi di broiler colpiti.

Table 1: Localisation of the lesions in the 32 coccidiosis-affected groups of broiler

	N. gruppi positivi	% di positività	N. capi esaminati	frequenza media %
Tiflite emorragica (<i>E. tenella</i>)	19	59	245.127	34,8
Duodenite (<i>E. acervulina</i>)	9	28	130.128	18,2
Enterite del tratto medio (<i>E. maxima</i>)	6	18	76.988	22,8
Enterite aspecifica del tratto medio	3	9	37.920	20,3

COMUNICAZIONE 2

INFEZIONE CONCOMITANTE DA VIRUS DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI (Pbfd) E POLIOMAVIRUS AVIARE IN PARROCCHETTI DAL COLLARE INDIANI (*Psittacula krameri manillensis*)

G. Conzo¹, A. Lavazza², D. Nieddu², D. Fulgione³, M. Milone³, A. Fioretti¹

¹Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Sezione di Patologia Aviaria, Università di Napoli "Federico II". ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia. ³Dipartimento di Zoologia, Università di Napoli "Federico II"

Parole chiave: poliomavirus, Pbfd, diagnosi, parrocchetto dal collare

A concurrent psittacine beak and feather disease (Pbfd) virus and avian polyomavirus infection in ring-necked parakeets (*Psittacula krameri manillensis*)

Key words: polyomavirus, Pbfd, diagnosis, ring-necked parakeet

Summary: A concurrent outbreak of Pbfd and Polyomavirus infection in a Ring-necked parakeets (colour mutations) facility is reported. Typical feathers' lesions, suggestive of Pbfd, involved 4 months old parakeets with high mortality reported in the following months. Necropsy revealed typical Polyomavirus lesions. An attempt to diagnose Pbfd by PCR from blood and liver of an infected parakeet was successful. Electron microscopy was useful to detect Polyomavirus particles from liver, spleen and ovary of two dead birds. Because no other psittacine species of the same facility were involved, a well parakeet-adapted Pbfd virus strain in this outbreak is hypothesized. Polyomavirus positive ovary seems confirm the possibility of the trans-ovarian transmission of this disease.

Correspondence: Gino Conzo, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Sezione di Patologia Aviaria, Università di Napoli "Federico II", via F. Delpino 1, 80137 Napoli. E-mail: ginoconzo@tin.it

Introduzione

Il virus della Malattia del Becco e delle Penne degli Psittacidi (Pbfd) determina, nella sua forma subacuto-cronica, gravi lesioni distrofiche delle penne ed immunodepressione in varie specie di Pappagalli, in particolare di origine australiana, africana ed asiatica, di età inferiore ai 3 anni. Le alterazioni del

becco, non sempre presenti, occorrono successivamente. Il Polioma virus aviario è in grado di determinare una malattia ad evoluzione iperacuta o acuta in giovani Psittacidi di qualsiasi specie e d'età inferiore ai 150 giorni, caratterizzata da morte improvvisa, talora preceduta da stasi del gozzo, rigurgito ed emorragie cutanee. Singolarmente la

malattia interessa quasi esclusivamente soggetti allevati artificialmente, mentre è praticamente assente nei piccoli allevati dai genitori. I due virus sono, al momento, i più temuti patogeni per gli allevamenti amatoriali di Pappagalli. Descriviamo un episodio di malattia sostenuta da entrambi i virus in un allevamento di Parrocchetti dal collare.

Materiali e metodi

Pappagalli. L'allevamento ospita circa cento coppie di Parrocchetti di numerose mutazioni di colore, oltre ad altre specie di Psittacidi (Cacatua, Inseparabili, Parrocchetti australiani). Nel 1996 l'allevatore nota, senza darvi grande importanza, la comparsa di piume distrofiche in alcuni novelli di 4 mesi d'età. Poiché nei due anni successivi i casi aumentano in modo esponenziale, si sospetta che l'epidemia sia dovuta alla BPDF, diagnosi confermata attraverso la tecnica della PCR eseguita in Inghilterra (presso la *University Diagnostic Ltd, Teddington, UK*) su campioni ematici provenienti dai soggetti con le tipiche lesioni. Dopo ogni stagione riproduttiva ben pochi sono stati i soggetti con piume distrofiche in grado di superare l'inverno successivo per cui, nel 1999, l'allevatore decide (anche nell'intento di eradicare la malattia) di sopprimere tutti i novelli presentanti i segni di PBF. 5 soggetti vengono, tuttavia, risparmiati ed ospitati, in assoluto isolamento, presso il Centro Sperimentale Avicunicolo di Varcaturò.

Diagnosi di laboratorio. Con l'intento di confermare, mediante PCR, la diagnosi di PBF nei Parrocchetti in nostro possesso viene prelevato un campione di sangue da un soggetto con eclatanti lesioni distrofiche delle penne. Dallo stesso soggetto, venuto a morte alcune settimane dopo, viene prelevato anche un frammento di fegato per la medesima ricerca. Il controllo negativo è rappresentato da un campione ematico di Parrocchetto dal collare selvatico ed in buona salute. L'estrazione del DNA è stata effettuata con la classica procedura fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (25:24:1); gli acidi nucleici sono stati successivamente purificati mediante etanolo e poi ripresi in 100 µl di TE *buffer* (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0). Sono stati preparati due coppie di *primers* per l'amplificazione (1):

A' – TGGTACAAGGAGGACTGTGAC
A'' – CCAGCACTTAATAAACACTCAG
B' – GTCTTTATTAAGTGCTGGGA
B'' – GTCACAGTCTGGTTGTACC

La prima coppia produce un frammento di 368 bp e la seconda un frammento relativo alla rimanente porzione del genoma circolare del virus, circa 1664 bp. Il protocollo di PCR ha previsto l'utilizzo di un programma di amplificazione strutturato in 35 cicli: 95°C per 1 min (denaturazione), 58°C per 1 min (ibridazione), 72°C per 2 min (estensione). I tre prodotti di amplificazione sono stati elettroforizzati in gel di agarosio 1,5% in presenza di un marcatore molecolare per la determinazione della lunghezza dei frammenti.

Nel giro di 4 mesi i 5 Parrocchetti sono venuti a morte e l'esame autoptico ha evidenziato lesioni molto simili a quelle prodotte dal Poliomavirus (emorragie cutanee, epatosplenomegalia, pallore di muscoli, miocardio e rene). Campioni di cervello, cute, fegato, milza ed ovaio prelevati da 2 soggetti sono stati sottoposti alla ricerca di particelle virali attraverso la microscopia elettronica (ME). I campioni sono stati

sminuzzati ed omogenizzati in presenza di PBS (pH 7,4) in rapporto 1/5 (p/v). La sospensione è stata sottoposta a due cicli di congelamento, scongelamento rapidi, quindi a centrifugazione a 4000 g per 20' ed a 9300 g per 10'. 85 µl del secondo supernatante sono stati processati secondo la metodica di colorazione negativa previa ultracentrifugazione con "Airfuge Beckman", in uso presso il laboratorio di M.E. dell' I.Z.S. di Brescia (3). Le griglie ottenute sono state colorate negativamente con NaPT al 2% (pH 6,8) ed osservate con un TEM Philips CM10.

Risultati

PCR: dal gel è stato possibile osservare la presenza di un prodotto di amplificazione esclusivamente nei campioni di sangue e fegato, ritenuti quindi positivi al virus della PBF.

M.E.: L'esame ultramicroscopico ha permesso di osservare numerose particelle virali, nei campioni epatici, splenici ed ovarici, morfologicamente riferibili a Poliomavirus. Dal fegato di un solo soggetto (lo stesso testato anche con la PCR) è stato possibile osservare anche particelle virali Circo-like ed Entero-like, queste ultime rinvenute anche nella milza del secondo Pappagallo esaminato.

Discussione

Nel caso illustrato l'effetto immunosoppressivo del virus della PBF (6) ha, con ogni probabilità, aperto la strada all'azione patogena del *Poliomavirus* che, come detto, non viene generalmente evidenziata in piccoli allevati dai genitori. Molto probabilmente, quindi, il *Poliomavirus* presente nell'allevamento non si sarebbe mai manifestato in assenza del virus della PBF, anche perché l'allevatore non usa allevare artificialmente i neonati. L'azione combinata dei due virus, già descritta in precedenza soprattutto in Inseparabili ed Ondulati (2,5), spiega l'evoluzione particolarmente grave della malattia e l'elevata mortalità osservata. Pappagalli affetti da PBF in forma cronica possono, infatti, sopravvivere, completamente deplumati, anche per alcuni anni (6). E' singolare notare come nessun'altra specie di Psittacidi sia stata coinvolta in questo focolaio, sebbene tutti gli altri Pappagalli ospitati in allevamento (ed a stretto contatto con i Parrocchetti) siano considerati altamente sensibili ad entrambe le malattie. Ciò farebbe supporre che questo focolaio sia dovuto ad un virus particolarmente adattato alle mutazioni di colore del Parrocchetto dal collare; i soggetti mutati di varie specie di Psittacidi risultano, infatti, maggiormente sensibili a varie infezioni (ed hanno una durata media della vita inferiore) rispetto ai loro simili ancestrali. L'agente virale che causa la PBF contiene un genoma composto da un *single strand* DNA di circa 2kb (1,7). L'amplificazione mediante PCR di materiale genetico, estratto da animali infetti, con primers specifici del DNA virale rappresenta un efficace strumento diagnostico della malattia (4), come dimostrato anche da questi nostri risultati preliminari. A differenza del campione ematico, quello epatico ha presentato soltanto la frazione leggera amplificata con A'A''. Questo potrebbe essere imputabile a variabili proprie della procedura di amplificazione per cui risulta sempre consigliabile utilizzare entrambe le coppie di *primers* per una valutazione più accreditabile. La M.E. ha permesso di confermare il sospetto del coinvolgimento del

Poliomavirus in questo focolaio; la presenza di questo virus nell'ovaio, inoltre, confermerebbe l'ipotesi della trasmissione verticale della malattia. Il ruolo del virus *Enterolike* (e la sua eventuale azione patogena) in questo caso non è ben chiaro.

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 Circovirus and Chicken Anemia virus. *Virology*, 249, 453-459.
- 2) Latimer K.S., Niagro F.D., Campagnoli R., Ritchie B.W., Pesti D.A., Steffens W.L. (1993) Diagnosis of concurrent Avian Polyomavirus and Psittacine Beak and Feather Disease infections using DNA probes. *Journal of Association of Avian Veterinarians*, 7, 141-146.
- 3) Lavazza A., Pascucci S., Gelmetti D. (1990) Rod shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. *Vet. Rec.*, 125, 581.
- 4) Niagro F.D., Ritchie B.W., Latimer K.S. (1990) Use of polimerase chain reaction for detection of PBFD and BFD in suspect birds. *Proc. Annual Conf. Ass. Avian Vet. Phoenix, Arizona, Sept. 10-15, 1990.* 25-37.
- 5) Ramis A, Latimer K.S., Gibert X., Campagnoli R. (1997). A concurrent outbreak of Avian Polyomavirus and Psittacine Beak and Feather Disease infection in a Budgerigar collection. *Proceedings of the 4th Conference of the European Committee of the Association of Avian Veterinarians.* London, England, May 19th-24th, 1997. Pp. 132-135.
- 6) Ritchie B.W. & Carter K. (1995) *Avian viruses: function and control.* Wingers Publ.
- 7) Ritchie B.W., Niagro F.D., Lukert P.D., Steffens W.L., Latimer K.S. (1989). Characterization of a new virus from Cockatoos with Psittacine Beak and Feather Disease. *Virology*, 171, 83-88.

COMUNICAZIONE 3

DIAGNOSI DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI MEDIANTE LA POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Bert¹ E., Appino² S., Cerruti Sola¹ S.

¹Dipartimento di Produzioni animali, Epidemiologia ed Ecologia

²Dipartimento di Patologia animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino

Parole chiave: malattia del becco e delle penne (PBFD), pappagalli, PCR

Diagnosis of psittacine beak and feather disease using polymerase chain reaction (PCR) assay

Key Words: psittacine beak and feather disease, psittacine birds, PCR

Summary: In order to detect PBFD viruses in psittacine birds we designed a PCR assay based on ORF1 PBFD virus genome. Heparinised blood or samples of feather were collected from 36 psittacine birds both with feather lesions and without. DNA was extracted using *Wizard Genomic DNA purification*® kit (Promega, USA) and PCR amplification was carried out using the method described by Ypelaar (1999). The 8.3% of birds tested were found positive to PBFD PCR assay, both using blood sample and dystrophic feathers. All of these birds showed clinical signs, as variable degree of dystrophy and feather loss; only one bird had severe beak lesions. On the basis of our results we can confirm that the PCR assay represent a reliable tool for the diagnosis of PBFD in psittacine birds.

Correspondence: Bert E.- Dipartimento di Produzioni animali, Epidemiologia ed Ecologia, Sezione di Malattie infettive- Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino, Via Leonardo da Vinci n°44, 10095 Grugliasco (Torino) – E-mail: elenabert@yahoo.com

Introduzione

La malattia del becco e delle penne degli psittacidi (*Psittacine Beak and Feather Disease*) è stata descritta per la prima volta nella metà degli anni settanta nei pappagalli del Sud del Pacifico (5). La patologia ha un andamento cronico ed è caratterizzata da distrofia e perdita delle penne, accrescimento anormale del becco con fratture e necrosi del palato. L'esito della malattia è quasi sempre infausto (8). L'eziologia virale della PBFD è stata dimostrata tramite la trasmissione naturale e sperimentale della patologia (3). Nei preparati istologici delle penne e dell'epitelio dei follicoli delle penne si osservano corpi inclusi intracitoplasmatici e intranucleari basofili che al microscopio elettronico si presentano come strutture paracrystalline costituite da particelle virali (3,8). Il virus appartiene alla famiglia Circoviridae, ha un diametro che va dai 14 ai 17 nm, icosaedrico, senza envelope. Il DNA virale è di 1,7 – 2,0 kb, a catena singola e circolare (1,9). La diagnosi della PBFD non può essere eseguita basandosi sui segni clinici, poiché numerosi altri agenti eziologici possono determinare lesioni simili. Indagini istopatologiche possono essere effettuate per individuare la presenza

di corpi inclusi prodotti da PBFD nell'epitelio dei follicoli delle penne, ottenuto da biopsia. Benchè il reperto di corpi inclusi sia considerato diagnostico, alcuni autori hanno verificato che corpi inclusi simili a quelli causati da PBFD si rinvengono anche in caso di infezioni da adenovirus e polyomavirus (7). Altre tecniche diagnostiche sono state sperimentate da diversi autori, quali indagini in microscopia elettronica a trasmissione, metodiche di immunoistochimica, di ibridazione *in situ*, e ancora tecniche sierologiche quali l'emoagglutinazione e l'inibizione dell'emoagglutinazione (2,6,8). Secondo Ritchie (1995), il metodo che offre maggior sensibilità e specificità per la diagnosi della PBFD è rappresentato dalla ricerca del DNA virale tramite sonde o la PCR (polymerase chain reaction).

Il test di PCR è stato sperimentato sia in USA (4) che in Australia (9). L'obiettivo di questo lavoro è mettere a punto, nel nostro laboratorio, un test di PCR che permetta di individuare gli animali colpiti da PBFD.

Materiali e metodi

Uccelli. Sono stati prelevati campioni da 36 pappagalli di differenti specie (*Agapornis personata*, *Amazona aestiva*, *Amazona farinosa*, *Amazona ochrocephala*,