

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*,

Cacatua alba, *Cacatua oftalmica*, *Myiopsitta monachus*, *Poicephalus senegalus*, *Psittacula krameri*, *Psittacus erithacus*) provenienti sia da allevamenti che da privati.

Campioni. Ad ogni soggetto è stato prelevato il sangue dalla vena giugulare e conservato in litio eparina per max 3 giorni a 4° gradi, prima di estrarre il DNA. Ai soggetti sintomatici sono state asportate penne distrofiche, conservate anche queste a 4° in provetta sterile, al fine di estrarre il DNA. Su altre penne raccolte verranno eseguite in un secondo tempo esami istopatologici e di microscopia elettronica. Estrazione del DNA virale e amplificazione. Si è eseguita l'estrazione del DNA virale sia dal sangue intero che dalle penne. Per l'estrazione è stato usato il Wizard genomic DNA purification kit® (Promega). La metodica di amplificazione si è basata su quella sperimentata da Ypelaar (1999) con opportune modificazioni. Viene amplificata una porzione della regione conservata nell'open reading frame (ORF1) del PBFDV. Sono stati utilizzati i primers indicati da Ypelaar come n°2 e n°4; il prodotto di amplificazione è di 717 basi. L'amplificazione avveniva con la temperatura di denaturazione di 94° per 1 min, di 55° per l'annealing per 1 min, e di 72° per l'estensione per 1.5 min, per 35 cicli, usando il Thermal Cycler Cetus Perkin Elmer.

Risultati

Sul totale di 36 animali, 29 non presentavano sintomi, 3 soggetti (2 *Cacatua oftalmica* e 1 *Psittacus erithacus*) presentavano sintomatologia suggestiva di PBFV con distrofia e perdita delle penne delle remiganti e della coda. Un soggetto presentava anche lesioni gravi al becco con frattura trasversale e necrosi del palato. Altri 4 psittacidi (*Amazona aestiva*, *Cacatua alba*, *Agapornis personata*, *Myiopsitta monachus*) avevano sintomi clinici riferibili anche ad altre patologie.

L'8,2% degli animali è risultato positivo alla PBFV, con la PCR; si trattava dei tre soggetti che manifestavano sintomi clinici riferibili alla malattia in esame. E' stato possibile evidenziare la presenza del PBFV virus sia da campioni di sangue intero che da campioni di penne raccolte sui soggetti sintomatici.

Discussione

Il test PCR si è confermato un metodo pratico e preciso per la diagnosi di PBFV. Un aspetto interessante è rappresentato dal fatto che il materiale

diagnostico può essere costituito dalla polpa delle penne, il che permette di evitare agli uccelli lo stress del prelievo di sangue. Il limite dei dati per ora ottenuti sta nel fatto che solo i soggetti clinicamente ammalati sono risultati positivi al test, il che ci permette di ipotizzare che gli animali apparentemente sani non siano comunque infetti. Questa situazione non ci ha permesso quindi di ricavare dati relativi alla possibilità di individuare mediante la PCR infezioni molto precoci in animali asintomatici o soggetti portatori, secondo quanto peraltro già affermato da altri ricercatori (8).

Bibliografia

1. Latimer KS, Rakich W, Steffens WL, Kircher IM, Ritchie BW, Niagro FD, Lukert PD (1991) "A Novel DNA virus associated with feather inclusions in psittacine beak and feather disease." *Vet Pathol* 28:300-304
2. Latimer KS, Niagro FD, Rakich W, Campagnoli RP, Ritchie BW, Steffens WL, Pesti D, Lukert PD (1992) "Comparison of DNA Dot-blot hybridization, immunoperoxidase staining and routine histopathology in the diagnosis of psittacine beak and feather disease in paraffin-embedded cutaneous tissues." *J. Assoc Avian Vet* 6 (3):165-168
3. McOrist S, Black DG, Pass DA, Scott PC, Marshall J (1984) "Beak and feather dystrophy in wild sulfur-crested cockatoos (*Cacatua galerita*)." *J. Wild Dis* 20: 120-124
4. Niagro FD, Ritchie BW, Latimer SK (1990) "Polymerase chain reaction detection PBFV virus and BFD virus in suspect birds." *Proc. Annu Conf Avian Vet* : 25-37
5. Perry RA (1983) "Some feather characteristics of acute French moult in fledgling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*)." *Aust Vet Pract* 13:128
6. Raidal SS, Sabine M, Cross GM (1993) "Laboratory diagnosis of psittacine beak and feather disease by haemagglutination and haemagglutination inhibition." *Aust Vet J* 70:133-137
7. Ramis A, Latimer KS, Niagro FD, Campagnoli RP, Ritchie BW, Pesti D (1994) "Diagnosis of psittacine beak and feather disease (PBFV) viral infection, avian polyomavirus infection, adenovirus infection and herpesvirus infection in psittacine tissues using DNA *in situ* hybridization." *Avian Path* 23:643-657
8. Ritchie BW, Carter K (1995) "Psittacine beak and feather disease" in "Avian viruses: function and control." Wingers publishing inc, Florida, USA, 223-251
9. Todd D, Niagro FD, Ritchie BW (1991) "Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA." *Archiv Virol* 117:129-135
10. Ypelaar I, Bassami MR, Wilcox GE, Raidal SR (1999) "A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus." *Vet Micro*, 68:141-148.