

DIAGNOSTICA CLINICA E MOLECOLARE DELLE INFEZIONI DA *CIRCOVIRUS* NEI VOLATILI D'AFFEZIONE

Circella E.¹, Pugliese N.¹, Todisco G.², Camarda A.¹

¹*Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bari "Aldo Moro", Italia*

²*Dipartimento di Scienze Biomediche comparate, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Teramo, Italia*

Summary

In this study, we report our clinical and laboratory experiences about circovirus infection in pet birds. In the most cases, typical changes in feathers have not been observed. Lesions of the beak were never present. The affected birds were often weak and depressed without specific symptoms and were more susceptible to bacterial and parasitic secondary infection probably due to immunodeficiency. In the diagnosis, feathers resulted useful and efficient samples even in the several cases with the lack of feather changes.

INTRODUZIONE

Circovirus è l'agente eziologico della Malattia del Becco e delle Penne (Beak and Feather Disease), patologia immunodepressiva (Todd, 2004) caratterizzata dalla comparsa di anomalie del piumaggio e del becco. L'infezione è stata evidenziata in più di 60 specie appartenenti all'Ordine Psittaciformes (Ortiz-Cathedral et al. 2010) ed è stata segnalata in diverse parti del mondo. Inizialmente segnalata in Australia (Pass and Perry, 1984), è stata successivamente riscontrata in USA (Dahlhausen et Radabaugh, 1997), Nuova Zelanda (Ha et al. 2007; Ha et al. 2009), Africa (Heath et al. 2004; Varsani et al. 2010), Giappone (Katoh et al. 2010). Attualmente, si ritiene che l'infezione sia presente in tutti i continenti. In Europa, studi epidemiologici indicano in Germania un'incidenza del 39,2% (Rahaus and Wolff, 2003) mentre in Italia pari all'8%. (Bert et al. 2005). Probabilmente, tali dati potrebbero rappresentare sottostime visto che l'infezione non sempre si manifesta con sintomi specifici e pertanto potrebbe sfuggire anche durante eventuali *iter* diagnostici. In questo lavoro vengono discussi, alla luce delle esperienze cliniche, i risultati delle ricerche di laboratorio condotte su volatili sintomatici presso il Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari.

MATERIALI E METODI

Casi clinici

Nel corso dell'attività clinica svolta su volatili d'affezione presso il Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, n. 28 volatili sono stati sottoposti a test diagnostici per BFDV (BFD Virus) per sospetta infezione (tabella 1). I soggetti di età compresa tra pochi mesi e 2 anni di vita (solo un soggetto aveva 5 anni), appartenevano a proprietari diversi, erano stati allevati in abitazioni diverse e non avevano avuto contatti tra loro. Tra questi, 20 volatili erano giunti presso il Dipartimento per esser sottoposti a visita clinica, mentre 8 erano soggetti deceduti inviati per indagini autoptiche. Negli esemplari esaminati, l'infezione da *Circovirus* veniva considerata o per la comparsa di anomalie

del piumaggio compatibili con l'infezione o per sospetta immunodepressione in quanto, pur in assenza di lesioni al piumaggio, presentavano un'anamnesi di patologie o stati di malessere ricorrenti (tabella 2). In nessun caso venivano osservate anomalie a carico del becco.

Tra i soggetti sottoposti ad autopsie, i 5 cenerini appartenevano a distinti proprietari, avevano un'età inferiore a 6 mesi di vita e presentavano tutti la stessa anamnesi: acquistati a qualche mese di vita in fase di svezzamento, erano stati allevati *allo stecco*, ciascuno dal suo nuovo proprietario, e dopo un periodo di malessere erano deceduti.

I canarini, di età compresa tra 1 e 1,5 anni, provenivano invece da un allevamento in cui era stata osservata la comparsa di mortalità senza la presenza di una sintomatologia ben precisa, ma solo dopo osservazione di sintomi aspecifici e pertanto comuni a numerose patologie (arruffamento delle penne, sonnolenza, minore assunzione di mangime, feci di consistenza ridotta).

Indagini di laboratorio - Ricerca di circovirus mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'estrazione di DNA virale è stata effettuata, nei soggetti sottoposti a visita clinica, a partire dalle penne prelevate direttamente dall'animale al momento della visita. In alcuni casi, contemporaneamente alle penne sono stati raccolti e analizzati campioni di feci. Dai soggetti sottoposti a necropsia, sono stati prelevati campioni di milza, fegato, contenuto intestinale. Per le reazioni di PCR sono state utilizzate due diverse coppie di *primers* secondo protocolli descritti in bibliografia (Ypelaar et al. 1999; Todd et al. 2001) in maniera da amplificare una porzione più ampia del genoma virale per ulteriori approfondimenti di ricerca, tuttora in corso, basati sull'analisi di sequenza degli amplificati ottenuti.

RISULTATI

Tra gli esemplari sottoposti a visita clinica ed analizzati per BFDV è stata evidenziata la presenza del virus in 11 volatili su 20 (55 %) (tabella n. 2).

Tuttavia, tra i soggetti analizzati per anomalie del piumaggio compatibili con la malattia del becco e delle penne soltanto un soggetto è risultato positivo. Al contrario, nei pappagalli privi di lesioni alle penne ma con sospetta immunodepressione per il manifestarsi nel tempo di problemi e patologie ricorrenti di varia eziologia, il virus veniva riscontrato in ben 10 soggetti su 13 analizzati.

Tutti i campioni d'organo prelevati dai cenerini sottoposti a necropsia sono risultati fortemente positivi. In tali soggetti venivano inoltre evidenziate lesioni legate a contemporanee patologie frequentemente condizionate da stati immunodepressivi: in un caso, infatti, erano presenti gravi lesioni da *Aspergillus fumigatus* a livello dei sacchi aerei; in un altro esemplare veniva riscontrata una grave enterite, a tratti emorragica, indotta da una massiva infestazione di coccidi; in un altro veniva diagnosticata, mediante biologia molecolare, una concomitante infezione da *polyomavirus*; in un altro ancora venivano evidenziate lesioni extraintestinali multiple indotte da *Escherichia coli*.

La PCR eseguita sui campioni prelevati dai canarini deceduti ha confermato la presenza del virus.

DISCUSSIONE

Tra i pappagalli analizzati per anomalie del piumaggio compatibili con la malattia del becco e delle penne soltanto un soggetto è risultato positivo. Tale dato evidenzia

l'importanza di un'attenta diagnosi differenziale tra la malattia del becco e delle penne ed altre patologie, di natura infettiva e non, che possono creare disordini del piumaggio simili o sovrapponibili, quali squilibri nutrizionali, disordini epatici o patologie comportamentali con autotraumatismo del piumaggio. In molti dei casi clinici con assenza di infezione da BFDV, infatti, la correzione di alcuni tra questi fattori ha comportato successivamente la risoluzione dei problemi di piumaggio osservati.

Al contrario, nei pappagalli privi di lesioni alle penne ma che avevano manifestato nel tempo problemi clinici e patologie ricorrenti, il virus veniva riscontrato nel 76.9% dei casi analizzati, evidenziando che BFDV era alla base dello stato di immunodepressione che comprometteva lo stato di salute degli animali esponendoli a stati patologici frequenti. Pertanto l'infezione, più spesso di quanto ritenuto, si manifesta in maniera subdola senza la comparsa di manifestazioni esteriori che inducano a sospettarla.

La tipologia di campione da utilizzare per una corretta diagnosi è di estrema importanza. Dalle esperienze cliniche e di laboratorio riportate, la penna risulterebbe un campione idoneo ed estremamente utile ai fini diagnostici, permettendo facilmente la diagnosi *in vivo* senza la necessità di ricorrere a prelievi ematici sicuramente più stressanti per il volatile. Inoltre l'analisi delle penne è risultata attendibile ed idonea anche nei diversi casi in cui mancavano anomalie del piumaggio, confermando che la localizzazione del virus a livello dei follicoli delle penne è massiva anche in assenza di alterazioni esteriori.

In 4 soggetti sottoposti a visita clinica e risultati positivi a BFDV a livello delle penne, in cui contemporaneamente a queste sono state testate anche le feci, queste ultime sono risultate positive solo in due casi. Nonostante il virus si localizzi e replichi anche a livello intestinale, la sua eliminazione attraverso le feci è probabilmente incostante e meno cospicua, rendendo questo campione meno attendibile a fini diagnostici. Le feci, inoltre, rappresentano una tipologia di campione che più facilmente, rispetto alla penna, consente la formazione di aspecifici che rendono meno agevole la diagnosi mediante PCR.

La positività al virus dei campioni d'organo prelevati dai cenerini deceduti sottoposti a necropsia era alla base dello stato di immunodepressione sofferto dai soggetti, giustificando la presenza di quadri anatomopatologici, confermati dalle specifiche indagini di laboratorio, tipici di patologie frequentemente condizionate da stati immunodepressivi (infestazioni da coccidi, infezioni da *polyomavirus* e da *Escherichia coli*), non sempre frequentemente evidenziabili in soggetti così giovani (infestazioni da *Aspergillus fumigatus*).

La diversa età dei pappagalli deceduti (pochi mesi di vita) rispetto all'età media dei soggetti giunti presso il Dipartimento per la visita clinica (qualche anno) confermerebbe la gravità delle infezioni da *circovirus* in volatili molto giovani. In tali soggetti, infatti, organi quali la Borsa di Fabrizio e il timo, di fondamentale importanza per la risposta immunitaria, sono in pieno sviluppo mentre vanno incontro ad atrofia e regressione con la crescita dell'animale. Pertanto nelle infezioni precoci il virus, che ha uno spiccato tropismo per i tessuti linfoidei, trova la possibilità di replicare massivamente compromettendo in maniera più pesante la risposta immunitaria dell'organismo ed inducendo stati patologici con un più elevato tasso di mortalità. Nelle infezioni più tardive il soggetto colpito, sia pur compromesso ed esposto ad infezioni di diversa natura rispetto a soggetti sani, spesso riesce a sopravvivere per un periodo di tempo anche molto più lungo.

I risultati ed il numero di canarini analizzati non sono sufficienti a poter attribuire la mortalità registrata nell'allevamento di canarini a *circovirus*. Per quanto più rara, l'infezione da *circovirus* è stata, negli ultimi anni, riscontrata in questa specie (Todd et al.

2001; Rampin et al. 2006). Tuttavia, l'evoluzione clinica e le ripercussioni patologiche non sono ancora ben note e definite in questa specie.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti confermano la presenza e la circolazione di circovirus, nel nostro territorio, non solo tra pappagalli ma anche tra altri volatili d'affezione. La capacità dei soggetti infetti di eliminare il virus massivamente attraverso la desquamazione cutanea e l'elevata resistenza del virus nell'ambiente rendono questa infezione, dalle così gravi ripercussioni, di facile diffusione. La mancata disponibilità di un vaccino commerciale ne aggrava le difficoltà di controllo. Attualmente, la prevenzione è basata principalmente sulle norme di profilassi igienico-sanitaria e sul controllo e la quarantena dei soggetti di nuova introduzione. Non essendo ancora, ad oggi, disponibili dati relativi ai virus circolanti sul territorio italiano, approfondimenti di ricerca basati sulla caratterizzazione genetica dei virus riscontrati potranno fornire informazioni utili per chiarire meglio l'epidemiologia di questa temibile infezione e migliorarne il controllo.

BIBLIOGRAFIA

1. Ha HJ., Anderson IL., Alley MR., Springett BP., Gartrell BD. (2007). The prevalence of beak and feather disease virus infection in wild populations of parrots and cockatoos in New Zealand. *N Z Vet J*. Dec; 55(6): 361.
2. Ha HJ., Alley MR., Cahill JI., Howe L., Gartrell BD. (2009). The prevalence of psittacine beak and feather disease virus infection in native parrots in New Zealand. *N Z Vet J*. Feb; 57(1): 50-2.
3. Bert E., Tomassone L., Peccati C., Navarrete MG., Sola S.C. 2005. Detection of Beak and Feather Disease Virus (BFDV) and Avian Polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. *J Vet Med B* 52, 64-68.
4. Katoh H., Ohya K., Ise K., Fukushi H. 2010. Genetic analysis of beak and feather disease virus derived from a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) in Japan. *J Vet Med Sci*. 72(5): 631-634.
5. Heath L., Martin DP., Warburton L., Perrin M., Horsfield W., Kingsley C., Rybicki E.P., Williamson A.L. 2004. Evidence of unique genotypes of beak and feather disease virus in Southern Africa. *J Virol* 78, 9277-9284.
6. Pass D.A., Perry R.A. 1984. The pathology of beak and feather disease. *Aust Vet J*, 61, 69-74.
7. Ortiz-Catedral L., Kurenbach B., Massaro M., McInnes K., Brunton D.H., Hauber M.E., Martin D.P., Varsani A. 2010. A new isolate of beak and feather disease virus from endemic wild red-fronted parakeets (*Cyanoramphus novaezelandiae*) in New Zealand *Arch Virol* 155: 613-620
8. Dahlhausen M.S., Radabaugh M.S. 1997. Update on Psittacine beak and feather disease and avian polyomavirus. *Proc. MASA AV Conference* 51-57.
9. Varsani A., de Villiers G.K., Regnard G.L., Bragg R.R., Kondiah K., Hitzeroth I.I., Rybicki E.O. 2010. A unique isolate of beak and feather disease virus isolated from budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in South Africa. *Arch Virol* 155: 435-439.
10. Ypelaar I., Bassami M.R., Wilcox G.E., Raidal S.R. 1999. A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Vet Microb* 68, 141-148.

11. Rampin T., Manarolla G., Pisoni G., Recordati C., Sironi G. 2006. Circovirus inclusion bodies in intestinal muscle cells of a canary. *Avian Pathology*, 35(4), 277-279
12. Todd D., Weston J., Ball N.W., Borghmans B.J., Smyth J.A, Gelmini L., Lavazza A. 2001. Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries. *Avian Pathology* 30, 321-325.
13. Todd D. 2004. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMVVS. *Vet Microbiol*, Feb 4; 98(2):169-174.

Tabella 1. Volatili esaminati per sospetta infezione da *circovirus*.

		Specie	Esemplari analizzati
VISITE CLINICHE	Pappagalli	Conuro del sole (<i>Aratinga solstitialis</i>)	1
		Pappagallino ondulato (<i>Melopsiccatu s ondulatu s</i>)	1
		Inseparabile a collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)	3
		Rosella comune (<i>Platycercus eximius</i>)	2
		Amazzone Fronte Azzurra (<i>Amazona aestiva</i>)	2
		Parrocchetto monaco (<i>Myiopsitta monachus</i>)	2
		Ara spalle rosse (<i>Ara nobilis</i>)	1
		Ara ali verdi (<i>Ara Chloroptera</i>)	1
		Cacatua bianco (<i>Cacatua alba</i>)	2
		Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	3
		Ecletto (<i>Eclectus roratus</i>)	1
		Pionus	1
AUTOPSIE	Pappagalli	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	5
	Altri volatili	Canarino (<i>Serinus canaria</i>)	3
Totale			28

Tabella 2. Riscontro di *circovirus* in soggetti con sintomatologia differente.

		Motivo alla base della visita clinica	
		Anomalie del piumaggio	Sospetta immuno- depressione
Specie		N° positivi (N° analizzati)	N° positivi (N° analizzati)
Pappagalli	Conuro del sole (<i>Aratinga solstitialis</i>)	-	1 (1)
	Pappagallino ondulato (<i>Melopsiccatu s ondulatu s</i>)	-	1 (1)
	Inseparabile a collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)	-	3 (3)
	Rosella comune (<i>Platycercus eximius</i>)	-	1 (2)
	Amazzone Fronte Azzurra (<i>Amazona aestiva</i>)	1 (2)	-
	Parrocchetto monaco (<i>Myiopsitta monachus</i>)	0 (2)	-
	Ara spalle rosse (<i>Ara nobilis</i>)	-	0 (1)
	Ara ali verdi (<i>Ara Chloroptera</i>)	0 (1)	-
	Cacatua bianco (<i>Cacatua alba</i>)	-	1 (2)
	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	-	3 (3)
	Ecletto (<i>Eclectu s roratu s</i>)	0 (1)	-
	Pappagallo corona bianca (<i>Pionu s senili s</i>)	0 (1)	-
Totale		1 (7)	10 (13)