

ANALISI MOLECOLARE DI CEPPI DEL *CIRCOVIRUS* DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI IN ITALIA. RISULTATI PRELIMINARI

Conzo G.¹, Dotto G.², Cassano D.², De Guz D.³, Piccirillo A.²

¹*Veterinario libero professionista, Verona*

²*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16 - 35020, Legnaro (Padova)*

³*Veterinario libero professionista, Trepuzzi (LE)*

Summary

Psittacine Beak and Feather Disease (PBFD) shows a broad host range within captive psittacine populations. Since clinical findings of PBFD in parrots often differ on the basis of the species and the age of infected psittacines, it has been speculated that a species-specificity of PBFDV strains may exist. The phylogenetic analysis of 9 BBFDV strains isolated in Italy from October 2010 to February 2011 showed some degree of genetic variability related to the infected species and clinical signs.

INTRODUZIONE

La Malattia del becco e delle penne degli psittacidi (PBFD) fu descritta per la prima volta negli anni '70 in Australia in diverse specie di *Cacatua* (Pass & Perry, 1984). In seguito la presenza di questa malattia è stata riportata in numerosi altri Paesi del mondo, compresa l'Italia (Conzo *et al.*, 1997, Bert *et al.*, 2005).

La PBFD è stata descritta in più di 40 specie di pappagalli e virtualmente tutte le specie di Psittaciformi sono ritenute sensibili all'infezione (Gerlach, 1994; Cross, 1996), sebbene quelle originarie del Sud America siano considerate più resistenti in quanto più raramente sviluppano la malattia (Kondiah *et al.*, 2005). Poiché la presentazione clinica della PBFD varia da specie a specie (Gerlach, 1994; Harrison, 2006), si è ipotizzato che vi possa essere una specie-specificità dei ceppi virali nei confronti delle diverse specie di pappagalli (Bassami *et al.*, 2001; Varsani *et al.*, 2011).

L'ultimo studio sulla diversità genetica del *Circovirus* della PBFD (Varsani *et al.*, 2011) ha proposto la classificazione dei ceppi virali in 14 *cluster*, identificati con lettere in ordine alfabetico dalla A alla N, cui si aggiungono 3 *cluster* nettamente separati dai precedenti ed isolati esclusivamente da Pappagallini ondulati (*Melopsittacus undulatus*), per i quali è stata proposta una riclassificazione tassonomica come nuova specie "*Budgerigar Circovirus*" (BCV). Mentre alcuni ceppi presentano una localizzazione geografica specifica, per altri si osserva una certa distribuzione apparentemente casuale, probabilmente correlata al commercio internazionale di uccelli ornamentali.

La nostra indagine, prima in Italia sull'analisi genetica di ceppi virali della PBFD, si è proposta di identificare, con metodi biomolecolari, la presenza di *Circovirus* della PBFD nelle diverse specie di psittacidi detenute in cattività nel territorio italiano e confrontare le sequenze nucleotidiche di porzioni del genoma di questi, tentando di mettere in risalto la possibile variabilità esistente tra i vari ceppi in rapporto alla distribuzione geografica, alla specie e alle manifestazioni cliniche.

MATERIALI E METODI

Campioni

In collaborazione con diversi veterinari liberi professionisti che operano nel territorio italiano, dall'ottobre 2010 al febbraio 2011 sono stati campionati 202 pappagalli, sia vivi (192 soggetti) che venuti a morte (10 soggetti), appartenenti a 38 specie diverse (Tabella 1), distribuiti in varie aree geografiche ed alloggiati presso allevamenti, attività commerciali e parchi faunistici o detenuti da privati come "pet". In totale sono stati prelevati 195 campioni di sangue intero e 24 campioni di tessuto (8 di fegato, 2 di milza, 4 di rene, 2 di intestino, 3 di polmone, 3 di cuore e 2 campioni di penne e relativi follicoli cutanei).

La maggior parte dei 192 soggetti in vita si presentava in buone condizioni generali di salute, ad eccezione di 16 pappagalli che presentavano alterazioni di vario grado del piumaggio. I 10 pappagalli venuti a morte presentavano differenti lesioni agli organi interni (Tabella 2).

I campioni ematici sono stati prelevati dalla vena giugulare o dalla vena brachiale e raccolti in provette sterili con anticoagulante EDTA.

Tutti i campioni venivano conservati tra +0°C e +5°C se essi erano processati lo stesso giorno della raccolta o il successivo, oppure conservati a -20°C se l'estrazione del DNA virale veniva eseguita a distanza di qualche giorno dal prelievo.

Estrazione del DNA virale

La procedura di estrazione del DNA virale dai campioni ematici e dai tessuti è stata eseguita utilizzando il kit commerciale "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche Diagnostics Corporation), mentre l'estrazione dai campioni di penne e follicoli annessi è stata eseguita utilizzando il kit commerciale "DNeasy Blood & Tissue Kit" (Qiagen), seguendo le istruzioni dei produttori.

Polymerase chain reaction

Tutti i campioni sono stati sottoposti a PCR per l'amplificazione del gene ORFV1 codificante per la proteina REP del *Circovirus* della Malattia del becco e delle penne degli psittacidi. La coppia di *primer* oligonucleotidici utilizzata in questo studio è quella suggerita da Ypelaar et al. (1999).

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite nel termociclatore automatico 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystem), in un volume di reazione finale di 30 µl ed utilizzando l'*Amplitaq Gold with GeneAmp* (Roche Diagnostics Corporation). Ad ogni reazione di amplificazione si aggiungeva un controllo negativo e un controllo positivo, gentilmente fornito dal Dr. C. Terregino dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, sezione di Padova. I prodotti della PCR venivano separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% e le bande visualizzate con il transilluminatore *Gel DocTM XR* (Bio-rad). Ad ogni corsa elettroforetica si aggiungeva pUC *marker* 8 (Fermentas Life Sciences) come marcatore di peso molecolare.

Sequenziamento ed analisi filogenetica

Prima di procedere con il sequenziamento nucleotidico, tutti i prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit commerciale "High Pure PCR Cleanup Micro Kit" (Roche Diagnostics Corporation) seguendo le istruzioni fornite del produttore. I prodotti delle reazioni di amplificazione sono stati sequenziati in entrambe le direzioni

utilizzando gli stessi *primer* di PCR. E' stato utilizzato il kit *Applied Biosystems - Prism-Perkin Elmer*, Foster City, CA che si basa sulla chimica dell'*ABI PRISM Big-Dye terminator v3.1*.

L'analisi e l'assemblaggio dei cromatogrammi sono stati eseguiti utilizzando rispettivamente i software *FinchTV* versione 1.4.0 (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) e *ChromasPro*, versione 1.42 (Technelysium Pty Ltd., Australia). E' stata poi eseguita una ricerca per similarità delle sequenze consenso con i dati disponibili in *Genbank* utilizzando il server BLAST del database NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Le sequenze consenso così ottenute sono state allineate tra loro e con quelle disponibili in *Genbank* mediante *ClustalW* del *Pôle Bioinformatique Lyonnais*, France, disponibile on-line al sito http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalwan.html, con l'obiettivo di confrontarle e di calcolare le percentuali d'identità. Le sequenze sono state poi sottoposte ad analisi filogenetica utilizzando l'algoritmo *neighbour-joining* col software MEGA4. La robustezza dell'albero ottenuto è stata verificata mediante 1000 repliche di *bootstrap* e sono stati considerati significativi solo quelli >70, che corrispondono ad un intervallo di confidenza >95%.

RISULTATI

Su un totale di 202 animali testati, 9 sono risultati positivi (positività: 4,45%) per *Circovirus*; in 6 casi (positività: 3,12%) si trattava di campioni ematici provenienti da animali vivi, mentre in 3 dei 10 soggetti venuti a morte (positività 30%) è stato rinvenuto il virus da campioni di tessuto epatico (Tabella 3).

Per l'analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche del gene ORFV1 dei ceppi di *Circovirus* identificati nella presente indagine, è stata utilizzata una sequenza di 643 bp a causa di alcune ambiguità presenti alle estremità 3' e 5' in prossimità dei *primer*, che ci ha indotti a ridurre la lunghezza di ciascuna sequenza di circa 60 bp. L'analisi eseguita con *ClustalW* ha permesso di rilevare un'identità di sequenza compresa tra il 92,5% e il 100% e una discreta variabilità intraspecifica tra i ceppi, con una percentuale di siti variabili intorno al 7,5% per un totale di 48 siti. I siti polimorfici erano frequenti soprattutto confrontando i ceppi E e LR di Ecletto (*Eclectus roratus*) e Cenerino (*Psittacus erithacus*) rispettivamente, con i restanti 7 ceppi. Infatti, l'analisi delle sequenze dei ceppi 32, 36 e 43 di Lorichetto arcobaleno (*Trichoglossus haematodus*) e il ceppo 37 di Lori testa nera (*Lorius lory*) ha evidenziato un'identità del 100%. Parimenti, il confronto tra i 4 ceppi appena citati e i ceppi 30 e 31 di Lorichetto arcobaleno (*Trichoglossus haematodus*) e 28 di Rosella comune (*Platycercus eximius*) ha mostrato una percentuale di identità superiore al 99%. Infatti, ciascuno di questi 3 ceppi differiva dagli altri, escludendo E ed LR, per una sola sostituzione nucleotidica.

L'analisi filogenetica è stata eseguita con l'obiettivo di stimare le distanze sia tra i ceppi di *Circovirus* identificati in questo studio, sia tra questi e altri ceppi analizzati nel resto del mondo. Per uniformità, l'analisi è stata eseguita confrontando una porzione del gene ORFV1 presente in tutte le sequenze selezionate pari a 547 bp. L'albero filogenetico (Figura 1) ha permesso di distinguere diversi gruppi filogenetici. La maggior parte dei ceppi analizzati in questo studio appartiene a un unico gruppo (*cluster C*) supportato da un elevato valore di *bootstrap* (99). In

questo gruppo si inseriscono anche 2 ceppi di *Amazona auropalliata* (DQ304744) ed *Eos reticolata* (DQ304739) isolati a Taiwan. I ceppi che si inseriscono nel *cluster* C sono: 28 (28-Platycercus-eximius-IT), 30 (30-Trichoglossus-haematodus-IT), 31 (31-Trichoglossus-haematodus-IT), 32 (32-Trichoglossus-haematodus-IT), 36 (36-Trichoglossus-haematodus-IT), 37 (37-Lorius-lory-IT) e 43 (43-Trichoglossus-haematodus-IT) e formano un sottogruppo supportato da un buon valore di *bootstrap* (87). I ceppi LR ed E, invece, differiscono notevolmente dagli altri ceppi. Infatti, il ceppo LR (LR-Psittacus-erithacus-IT) di un Cenerino (*Psittacus erithacus*) di Macerata si inserisce nel gruppo indicato come *cluster* B, insieme a due ceppi rispettivamente di un *Psephotus haematonotus* (DQ304746) e di un *Forpus coelestis* (DQ304748) isolati a Taiwan. Parimenti, il ceppo E (E-Eclectus-roratus-IT) di un Ecletto (*Eclectus roratus*) di Perarolo (PD), fa parte di un terzo gruppo (*cluster* A), filogeneticamente distante dai *cluster* B e C, in cui sono inseriti gli altri ceppi oggetto di studio.

DISCUSSIONE

Nel presente studio sono state analizzate le sequenze nucleotidiche di 9 ceppi di *Circovirus* della Malattia del Becco e delle Penne degli Psittacidi (PBF) isolati da varie specie di pappagalli presenti nel territorio italiano. In particolare, l'analisi è stata eseguita su una porzione del gene ORFV1 che codifica la proteina REP (*Replication Associated Protein*) coinvolta nel ciclo replicativo virale.

L'analisi filogenetica ha evidenziato che la maggior parte dei ceppi esaminati nel presente studio (28-Platycercus-eximius-IT, 30-Trichoglossus-haematodus-IT, 31-Trichoglossus-haematodus-IT, 32-Trichoglossus-haematodus-IT, 36-Trichoglossus-haematodus-IT, 37-Lorius-lory-IT e 43-Trichoglossus-haematodus-IT) si inserisce in un *cluster* comune (*cluster* C) insieme a 2 ceppi (DQ304744 e DQ304739) originari di Taiwan. Questa elevata similarità non deve sorprendere poiché proprio questo Paese, antecedentemente al blocco delle importazioni di uccelli da Paesi extra-UE (Dicembre 2006), era tra i principali esportatori di Psittacidi verso l'Europa. E' verosimile, quindi, che questi ceppi del virus della PBF siano stati introdotti nel nostro Paese proprio con le importazioni di pappagalli da Taiwan. Cinque dei ceppi inseriti nel *cluster* C (30, 31, 32, 36 e 37) provenivano da pappagalli, di età compresa tra 1 e 2 anni ed in apparente buono stato di salute, ospitati in un *pet shop* della provincia di Verona. Un sesto ceppo (43) è stato isolato da un Lorichetto di 6 mesi d'età, proveniente dalla stessa zona geografica e venuto a morte in seguito ad una grave forma di epatite. Questi dati confermerebbero una certa variabilità nello sviluppare la malattia in funzione dell'età del soggetto infettato (Gerlach, 1994). Il settimo ceppo (28) ascrivibile al medesimo *cluster* è stato, invece, isolato dal fegato di una Rosella comune di 2 anni d'età della provincia di Bergamo, venuta a morte con buone probabilità proprio per una forma acuta di PBF, come testimoniano i segni di epatite necrotizzante rinvenuti alla necropsia. Tali reperti sono frequenti nella forma acuta di PBF che colpisce i soggetti giovani, ma decisamente rari in un soggetto adulto (Schoemaker et al., 2000; Harrison, 2006). Possiamo supporre, quindi, che ceppi che prediligono come ospiti particolari specie, in questo caso appartenenti alla famiglia dei Loridi, e in grado di determinare forme cliniche fatali nei soggetti giovani, possano infettare anche altre specie e dare in queste particolari forme cliniche, diverse da quella tipica.

Per quanto riguarda, invece, gli altri due ceppi virali (LR-Psittacus-erithacus-IT e E-Eclectus-roratus-IT), essi sono da ricondurre a eventi filogenetici indipendenti dagli altri ceppi, in quanto inseriti in *cluster* filogeneticamente lontani (*cluster* B e A, rispettivamente). Ciò è molto probabilmente da correlare alla diversa provenienza geografica. Il ceppo LR isolato da un Cenerino proveniente da un allevamento di Macerata si inserisce nel *cluster* B, insieme a due ceppi isolati rispettivamente da un *Psephotus haematonotus* (DQ304746) e da un *Forpus coelestis* (DQ304748) a Taiwan. Anche la vicinanza genetica di questo ceppo con i due taiwanesi potrebbe trovare la medesima spiegazione data in precedenza per i ceppi del *cluster* C. Nel nostro caso si trattava di un Cenerino di 5 mesi d'età, venuto a morte con la forma acuta di PBF, rapidamente fatale, descritta tipicamente in questa specie in soggetti di età compresa tra le 7 settimane ed i 9 mesi, caratterizzata da una diffusa necrosi epatica (Harrison, 2006). Il ceppo E isolato da un Ecletto della zona di Perarolo (PD), fa parte di un terzo gruppo filogenetico (*cluster* A) distante dai *cluster* B e C, in cui si sono inseriti gli altri ceppi oggetto dello studio. Il pappagallo, dell'età di 4 anni, presentava sintomi perfettamente compatibili con la PBF in forma cronica con le tipiche lesioni distrofiche del piumaggio, ampiamente descritte in letteratura (Gerlach, 1994; Harrison, 2006).

Ad eccezione di quest'ultimo soggetto, tutti i pappagalli che presentavano alterazioni del piumaggio sono risultati negativi alla ricerca del *Circovirus* della PBF. Questo dato potrebbe trovare spiegazione nell'assenza di viremia al momento del prelievo ematico o con fenomeni di deplumazione attribuibili a cause differenti dalla PBF.

CONCLUSIONE

I nostri risultati, seppur preliminari, sembrano avvalorare l'ipotesi di una specificità di ceppi virali verso particolari specie ospiti o una regionalità geografica. Il raggruppamento dei 5 ceppi isolati da Lorichetto arcobaleno (*Trichoglossus haematodus*) nel *cluster* C, assieme al ceppo isolato dal Lori testa nera (*Lorius lory*), della stessa famiglia tassonomica dei Lorichetti, può far sospettare che possa esistere una certa specie-specificità. Questa ipotesi sembra essere supportata dall'albero filogenetico costruito in questo studio. Infatti, nella parte terminale dello stesso si può osservare un grande *cluster* (valore di *bootstrap* 100), in cui sono raggruppati un cospicuo numero di ceppi isolati da diverse specie appartenenti alla famiglia *Loridae*, nonché provenienti anche dalla stessa area geografica (Nuova Zelanda ed Australia). All'estremità opposta dell'albero, invece, si può identificare un *cluster* in cui sono raggruppati ceppi isolati da Cacatuidi, sempre dall'areale australiano. Ancora, ceppi isolati dai Pappagallini ondulati si ritrovano vicini filogeneticamente, nonostante la provenienza sia varia, così come sono vicini ceppi isolati da Cenerini. Da queste specie, comunque, sono state isolate anche varianti virali che compaiono a diversi livelli dello stesso albero filogenetico.

Analogamente a quanto riportato da altri autori (Ritchie et al, 2003; de Kloet & de Kloet, 2004; Khalesi et al., 2005; Shearer et al., 2008; Versani et al. 2011) possiamo quindi concludere che i rapporti tra ceppi di *Circovirus* della Malattia del becco e delle penne e le specie di psittacidi ospiti sono molto complesse ed è probabile che esistano ceppi adattatisi a determinate specie in grado di svolgere un differente ruolo patogeno in altre specie.

In conclusione, rileviamo l'importanza di eseguire ulteriori studi ed analisi al fine

di stabilire con maggior sicurezza quali siano le dinamiche che legano la specie-specificità dei ceppi virali, l'area geografica di cui fanno parte i ceppi virali o le modalità di evoluzione di questi, nonché il rapporto esistente tra varianti antigeniche virali, manifestazione clinica della malattia e caratteristiche immunologiche delle specie ospiti.

RINGRAZIAMENTI

Un particolare ringraziamento per il prezioso aiuto fornito va ai colleghi: Gianmaria Antonazzo, Tommaso Collarile e Massimo Mariani.

BIBLIOGRAFIA

1. Bassami, M. R., Ypelaar, I., Berryman, D., Wilcox, G. E. and Raidal, S. R. (2001). Genetic diversity of beak and feather disease virus detected in psittacine species in Australia. *Virology*, 279:392-400.
2. Bert, E., Tomassone, L., Peccati, C., Navarrete, M. G. and 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.
3. Conzo, G., Lavazza, A., Sironi, G., Magnino, S., Fabbi, M., Mella, L.F., Fioretti, A., Papparella, V. (1997). Malattia del Becco e delle Penne degli Psittacidi (PBFD): descrizione di un caso in un *Cacatua (Cacatua galerita)* d'importazione. Atti 35° Convegno SIPA. La Selezione Veterinaria, Agosto/Settembre 1997 (8-9), pp. 711-719.
4. Cross, G. M. (1996). Avian viral disease. In: *Disease of cage and aviary birds*, 3rd Ed. (W. J. Roskopf and R. W. Woerpel, Eds). William and Wilkins, Baltimore, pp. 548-567.
5. de Kloet, E. and de Kloet, S. R. (2004). Analysis of beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specificity. *Arch. Virol.*, 149:2393-2412.
6. Gerlach, H. (1994). Circoviridae - Psittacine beak and feather disease virus. In: B. W. Ritchie, G. T. Harrison, L. R. Harrison (Eds). *Avian Medicine: Principles and Practice*, Lake Worth, FL: Wingers Publishing Corporation, pp. 894-903.
7. Harrison, G. J. (2006). Implication of viruses in clinical disorders - DNA Viruses - Circovirus: Psittacine beak and feather disease virus (PBFDV). In: G. J. Harrison, T. L. Lightfoot (Eds). *Clinical Avian Medicine*, Spix Publishing Inc., Palm Beach, FL, USA, pp. 723-727.
8. Khalesi, B., Bonne, N., Stewart, M., Sharp, M. and Raidal, S. R. (2005). A comparison of haemoagglutination, haemoagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease virus infection and a comparison of isolates obtained from lorriids. *J. Gen. Virol.*, 86:3039-3046.
9. Kondiah, K., Albertyn, J. and Bragg, R. R. (2005). Beak and feather disease virus haemoagglutinating activity using erythrocytes from African Grey parrots and Brown-headed parrots. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 72:263-265.
10. Pass, D. A. and Perry, R. A. (1984). The pathology of psittacine beak and feather disease. *Aust. Vet. J.*, 61:69-74.
11. Ritchie, P. A., Anderson, I. L. and Lambert, D. M. (2003). Evidence for specificity of psittacine beak and feather disease virus among avian hosts. *Virology*, 306:109-115.

12. Schoemaker, N. J., Dorrestein, G. M., Latimer, K. S., Lumeij, J. T., Kik, M. J. L., van der Hage, M. H. and Campagnoli, R. P. (2000). Severe leukopenia and liver necrosis in young African Grey Parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) infected with psittacine circovirus. *Avian Dis.*, 44:470-478.
13. Shearer, P. L., Bonne, N., Clark, P., Sharp, M. and Raidal, S. R. (2008). Beak and feather disease virus infection in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *Avian Pathol.*, 37(1):75-81.
14. Varsani, A., Regnard, G. L., Bragg, R., Hitzeroth, I. I. and Rybicki, E. P. (2011). Global genetic diversity and geographical and host species distribution of beak and feather disease virus isolates. *J. Gen. Virol.*, DOI: 10.1099/vir.0.028126-0.
15. Ypelaar, I., Bassami, M. R., Wilcox, G. E. and Raidal, S. R. (1999). A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Vet. Microbiol.*, 68: 141-148.

Tabella 1. Pappagalli oggetto dello studio.

Specie (Nome latino)	N° soggetti
Amazzone a redini rosse (<i>Amazona autumnalis</i>)	2
Amazzone dell'Amazonia (<i>Amazona amazonica</i>)	2
Amazzone farinosa (<i>Amazona farinosa</i>)	3
Amazzone e festiva (<i>Amazona festiva bodini</i>)	4
Amazzone fronte azzurra (<i>Amazona aestiva</i>)	12
Amazzone fronte gialla (<i>Amazona ochrocephala</i>)	15
Ara ali verdi (<i>Ara chloroptera</i>)	1
Ara di Illiger (<i>Ara maracana</i>)	4
Ara gialla e blu (<i>Ara ararauna</i>)	5
Ara ibrido	2
Ara macao (<i>Ara macao</i>)	3
Ara militare (<i>Ara militaris</i>)	4
Cacatua bianco (<i>Cacatua alba</i>)	9
Cacatua ciuffo giallo maggiore (<i>Cacatua galerita</i>)	15
Cacatua ciuffo giallo minore (<i>Cacatua sulphurea</i>)	2
Cacatua delle Molucche (<i>Cacatua moluccensis</i>)	2
Cacatua di Ducorps (<i>Cacatua ducorpsi</i>)	2
Cacatua di Goffin (<i>Cacatua goffini</i>)	2
Cacatua di Leadbeater (<i>Cacatua leadbeateri</i>)	2
Cacatua rosato (<i>Eolophus roseicapillus</i>)	1
Caicco testa nera (<i>Pionites melanocephala</i>)	1
Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	15
Conuro del sole (<i>Aratinga solstitialis</i>)	4
Conuro jandaya (<i>Aratinga jandaya</i>)	1
Ecletto (<i>Eclectus roratus</i>)	13
Inseparabile a collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)	7
Lori reticolato (<i>Eos reticolata</i>)	2
Lori testa nera (<i>Lorius lory</i>)	1
Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	14
Monaco (<i>Myopsitta monachus</i>)	3
Pappagallo accipitrino (<i>Deropterus accipitrinus</i>)	1
Pappagallo del Senegal (<i>Poicephalus senegalus</i>)	3
Parrocchetto a capo rosso (<i>Purpureicephalus spurius</i>)	1
Parrocchetto alessandrino (<i>Psittacula eupatria</i>)	9
Parrocchetto dai mustacchi (<i>Psittacula alexandri</i>)	4
Parrocchetto dal collare (<i>Psittacula krameri</i>)	30
Rosella comune (<i>Platycercus eximius</i>)	1
Totale	202

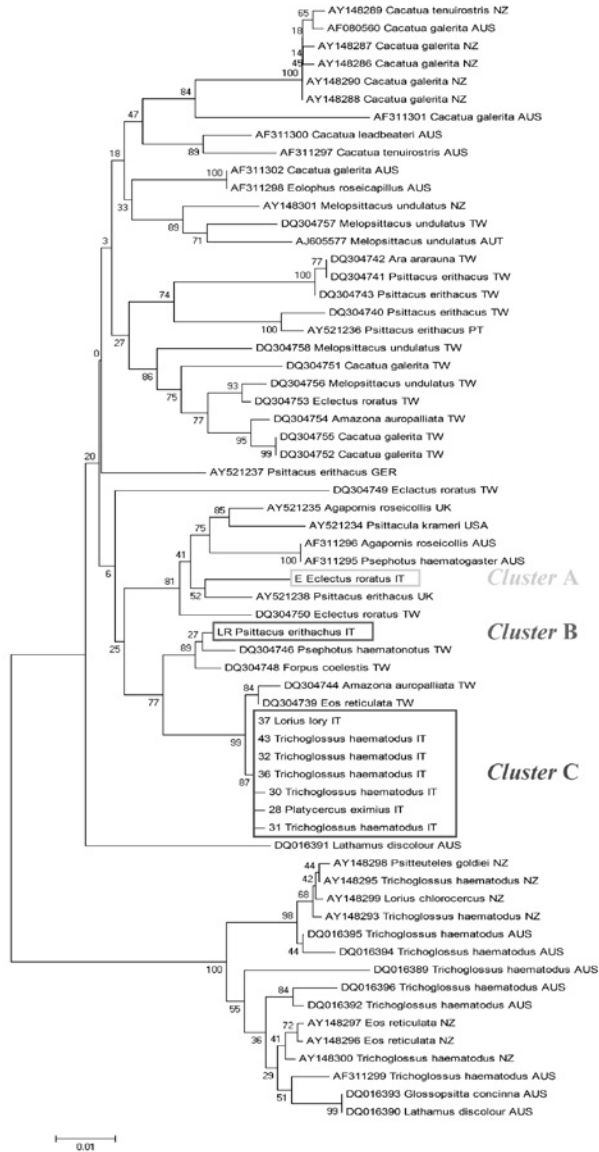
Tabella 2. Psittacidi deceduti compresi nello studio, dai quali la ricerca del *Circovirus* è stata effettuata a partire da organi e tessuti.

ID	Specie	Provenienza	Organo prelevato	Reperti necroscopici
FC	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (privato)	Fegato	Epatite, emorragie muscoli, pallore del miocardio
28	Rosella comune (<i>Platycercus eximius</i>)	Bergamo (privato)	Fegato Milza	Epatomegalia e splenomegalia
41	Lori reticolato (<i>Eos reticolata</i>)	Verona (pet shop)	Fegato	Epatite necrotizzante
42	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	Verona (pet shop)	Fegato Rene	Epatite necrotizzante
43	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (pet shop)	Fegato	Epatite necrotizzante
VR	Caicco testa nera (<i>Pionites melanocephala</i>)	Verona (privato)	Fegato Intestino	Enterite emorragica
CEN	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	Roma (privato)	Sangue	Non disponibili
PF	Parrocchetto capo rosso (<i>Purpureicephalus spurius</i>)	Ostuni (allevamento)	Fegato Cuore Penne Milza Reni Polmone Sangue	Ascaridi intestinali
LR	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	Macerata (allevamento)	Cuore Reni Digerente Polmoni	Epatite necrotizzante
DAR	Inseparabile a collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)	Pordenone (privato)	Fegato Cuore Penne Reni Polmoni	Sospetta proventricolite micotica

Tabella 3. Campioni positivi per *Circovirus*.

ID	Specie	Provenienza	Sesso	Età	Note
28	Rosella comune (<i>Platycercus eximius</i>)	Bergamo (privato)	F	2 anni	Epatomegalia e splenomegalia
30	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (pet shop)	N.D.	2 anni	
31	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (pet shop)	N.D.	1 anno	
32	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (pet shop)	N.D.	2 anni	
36	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (pet shop)	N.D.	2 anni	
37	Lori testa nera (<i>Lorius lory</i>)	Verona (pet shop)	N.D.	1 anno	
43	Lorichetto arcobaleno (<i>Trichoglossus haematodus</i>)	Verona (privato)	M	6 mesi	Epatite necrotizzante
LR	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	Macerata (allevamento)	N.D.	5 mesi	Epatite necrotizzante
E	Ecletto (<i>Eclectus roratus</i>)	Perarolo (PD) (privato)	F	4 anni	Deplumazione avanzata

Figura 1. Albero filogenetico di 9 ceppi di BFDV isolati nel presente studio e 54 ceppi isolati a livello mondiale. L'albero è basato sulla sequenza nucleotidica del gene ORFV1, utilizzando MEGA4. Le lunghezze dei rami sono proporzionali alla differenza genetica stimata. La barra rappresenta il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito.



* I ceppi analizzati nello studio sono identificati con la sigla IT e incorniciati. Il colore diverso e le lettere (A, B e C) identificano i tre *cluster* in cui sono contenuti i suddetti ceppi. Le sequenze scaricate da *Genbank* portano l'indicazione del numero di accesso, specie da cui sono state isolate e la sigla del Paese d'origine.