

DAL PAPPAGALLO AL DIAMANTE DI GOULD: UN NUOVO OSPITE PER BFDV (BEAK AND FEATHER DISEASE VIRUS)

Circella E., Legretto M., Pugliese N., Bozzo G., Caroli A., Camarda A.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bari "Aldo Moro", S. P. per Casamassima km. 3, Valenzano (BA), Italia

Summary

Beak and Feather Disease Virus (BFDV) is a member of the genus *Circovirus* and causes the Psittacine Beak and Feather Disease (PBFD) in *Psittaciformes*. PBFD is a severe disease generally characterized by immunodeficiency and beak and feather disorders. Although *Circovirus* spp. have been detected in several non-psittacine specie, little is known about the symptoms and the disease associated to this infection in birds other than *Psittaciformes*. Nevertheless, PBFD has never been described in non-psittacine specie. In this study, we reported an outbreak of *Circovirus* infection in a flock of Gouldian finches where beak and feather disorders were observed. Sequence analyses on the *rep* gene of the virus highlighted a strong similarity at nucleotide and amino acid level with the corresponding regions of BFDV.

INTRODUZIONE

Circovirus appartiene alla famiglia *Circoviridae*, ed è un virus privo di envelope, a DNA circolare a singolo filamento (Niagro et al., 1998). Il suo genoma codifica per due proteine principali, replication associated protein (Rep) e coat protein (CP). È inoltre presente la regione ORF (open reading frame), la cui funzione non è stata ancora ben definita (Varsani et al., 2010).

Al genere *Circovirus* appartiene BFDV (Beak and Feather Disease Virus), che rappresenta l'agente di una delle più importanti e frequenti infezioni degli psittacidi, la Malattia del becco e delle penne (Psittacine Beak and Feather Disease - PBFD), così denominata in quanto caratterizzata da possibili anomalie a carico del piumaggio e del becco (Gerlach, 1994). L'infezione è però particolarmente temuta perché associata ad immunodepressione, dovuta a deplezione dei tessuti linfoidi colpiti, in particolare timo e borsa di Fabrizio, che predispone il soggetto colpito a frequenti infezioni secondarie di natura batterica e/o fungina (Kato et al., 2010; Todd, 2004). Attualmente, l'infezione da *circovirus* è stata identificata in più di 60 differenti specie di psittacidi e si ritiene abbia distribuzione pressochè mondiale (Todd, 2004; Cathedral-Ortiz et al. 2010). *Circovirus* è stato inoltre identificato anche in altre specie come i canarini (Todd et al., 2001; Rampin et al., 2006), i piccioni (Mankertz et al. 2000; Todd. et al. 2001; Duchatel et al., 2006; Todd et al. 2008), gli struzzi (Shivaprasad et al. 1993; Eisenberg et al. 2003), le oche (Todd. et al. 2001; Chen et al. 2003) le anatre (Smyth et al., 2005), il corvo australiano (Stewart et al. 2006) ed il diamante di Gould (Shivaprasad et al., 2004). Tuttavia in queste specie la PBFD non è stata riportata e le manifestazioni cliniche associate all'infezione non sono state ben descritte e definite. In questo lavoro, viene riportato un particolare caso di infezione da *circovirus* in un allevamento di diamanti di Gould in cui si sono manifestati segni clinici generalmente riconducibili a PBFD. Il virus è stato caratterizzato geneticamente.

MATERIALI E METODI

Caso clinico

Il gruppo di diamanti di Gould era costituito da 5 coppie di riproduttori e 6 giovani, allevati tutti insieme in un'unica voliera esterna durante la stagione favorevole e spostati, durante i mesi più rigidi, in una voliera interna. I riproduttori erano pienamente adattati alla vita in colonia, portavano a termine le cove ed allevavano i piccoli in autonomia. Non erano pertanto presenti altre specie di volatili quali i passeri del Giappone, generalmente adottati come balie per i diamanti di Gould. Tra la tarda primavera e l'estate 2011, i soggetti adulti svilupparono anomalie a carico del becco, rappresentate da allungamento e comparsa di rugosità ed escrescenze, che progredirono nell'arco di pochi mesi coinvolgendo in particolare il becco superiore (foto 1). Inoltre in 2 adulti, entrambi femmine, si osservava perdita di piume che portava ad alopecie localizzate prevalentemente alla regione della testa e del collo. Vennero inoltre riportate dall'allevatore infertilità e ridotta schiudibilità delle uova. Nei soggetti giovani il piumaggio ed il becco non apparivano alterati. Tuttavia, due giovani di circa tre mesi di età morivano nell'arco temporale di tre settimane, dopo aver mostrato leggero abbattimento, diarrea e arruffamento del piumaggio.

I soggetti deceduti sono stati analizzati presso la Sezione di Patologia aviaria del Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia dell'Università di Bari. Inoltre, dai riproduttori sono stati raccolti campioni di penne e feci da sottoporre a test diagnostici.

Esami batteriologici e parassitologici

Gli esami batteriologici sono stati eseguiti, dai volatili deceduti, a partire da campioni di fegato, milza e sangue del cuore su terreni selettivi (MacConkey Agar, Oxoid, Milano) e arricchiti (Agar sangue, Oxoid, Milano), in condizioni di aerobiosi ed anaerobiosi a 37 °C per 24 ore.

Gli esami parassitologici sono stati eseguiti dai campioni di feci dei riproduttori e dal contenuto intestinale dei soggetti giovani deceduti, mediante flottazione in soluzione sovrasatura di cloruro di sodio con aggiunta di glucosio (650 g/L).

Esami istologici

Campioni di fegato sono stati prelevati dai due giovani soggetti deceduti e posti in formalina al 10% per gli esami istologici. Dopo inclusione in paraffina, sono state effettuate sezioni di 4 µm, colorate con ematossilina-eosina.

Ricerca virologica

Circovirus e *polyomavirus* (APV) sono stati ricercati mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) nei campioni di fegato, milza, contenuto intestinale e penne prelevati dai giovani diamanti deceduti e nei campioni di penne e feci prelevati dai riproduttori. L'estrazione del DNA è stata ottenuta mediante il kit commerciale EuroGold Tissue Mini Kit (EuroClone, Milan, Italy) secondo le indicazioni del produttore. La miscela di reazione di PCR era così costituita: 1 U di Platinum *Taq* polymerase (Invitrogen, Milano, Italia), 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM di ogni dNTP e 25 pmol di ogni *primer*. Alla miscela di reazione sono stati aggiunti fino a 400 ng di DNA. Per la ricerca di *circovirus* sono stati utilizzati i primers DCiVf/DCiVr (Todd et al., 2001) con qualche modifica al protocollo termico, viste le differenti temperature

di melting dei primers. Per la ricerca di APV sono stati adottati primers e programma termico proposti da Manarolla et al. (2007). I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio colorato con etidio bromuro (0.5 mg/mL).

Clonaggio e sequenziamento

Due prodotti di PCR positivi per *circovirus*, provenienti rispettivamente dal fegato di un giovane e dalle penne di un riproduttore, sono stati purificati mediante EuroGold Cycle-Pure Kit (EuroClone) e clonati pGEM[®]-T Easy cloning vector (Promega, Milan, Italy), secondo le indicazioni dell'azienda produttrice. Tre-quattro cloni positivi sono stati scelti per ogni campione e il loro inserto sequenziato mediante Big Dye Terminator v3.1. Le sequenze ottenute sono state assemblate mediante SeqManII (DNASTar, Madison, US) ed identificate in GenBank mediante BLAST. Essendo tra loro identiche, solo uno dei due cloni (denominato EC32/ITA/2011) è stato selezionato ed allineato con il frammento corrispondente del gene *rep* di un pannello rappresentativo di *circovirus* di suino (PCV), di diamante di Gould (FiCV), di canarino (CaCV), di piccione (CoCV), e di pappagallo (BFDV). Gli stipiti di BFDV sono stati selezionati in base alla specie di pappagallo in cui sono stati identificati, in maniera da considerare ciascuna famiglia appartenente all'ordine *Psittaciformes*. Tutte le sequenze utilizzate per l'analisi filogenetica sono riportate nella tabella 1.

Le distanze filogenetiche sono state calcolate secondo il modello Tamura-Nei +Gamma (TN+G). Gli alberi filogenetici sono stati costruiti con il metodo Maximum Likelihood utilizzando il software PHYML con bootstrap calcolato su 1000 repliche non parametriche. La sequenza della porzione del gene *rep* analizzata è stata inserita in GenBank con il numero di accesso JX131620.

RISULTATI

Indagini diagnostiche

I volatili esaminati in sede autoptica apparivano disidratati e sottopeso. All'apertura della cavità toraco-addominale, non venivano riscontrate lesioni macroscopiche di rilievo a parte una leggera ipoplasia della milza ed una lieve degenerazione del fegato. Istologicamente, venivano evidenziati negli epatociti corpi inclusi intranucleari di tipo Cowdry B ed ampie aree di necrosi nel parenchima epatico. Gli esami di laboratorio non hanno evidenziato la presenza di patogeni batterici o parassitari in alcun campione esaminato. Le indagini molecolari per polyomavirus risultavano costantemente negative. Al contrario, dai campioni di fegato e da tutti gli altri campioni esaminati, veniva ottenuto un amplicone di ampiezza corrispondente a quella attesa per *circovirus* (550 bp).

Caratterizzazione genetica di circovirus

I due prodotti di PCR scelti tra quelli ottenuti e provenienti rispettivamente da un riproduttore e dal fegato di un giovane Gould deceduto presentavano sequenze identiche tra loro. Inoltre le analisi di sequenza mediante BLAST hanno permesso di confermare il virus identificato (denominato EC32/ITA/2011) come *circovirus*. Infatti, la sequenza mostrava una correlazione al 97% con quella corrispondente di uno stipite di BFDV (accession number EU810207) identificato in un pappagallo cenerino. Tra le sequenze di *circovirus* presenti in banca dati e considerate per la costruzione dell'albero filogenetico, EC32/ITA/2011 risultava particolarmente correlato a stipiti di BFDV mentre la sequenza

risultava decisamente più distante dalle corrispondenti regioni di FiCV (diamante di Gould) e CaCV (canarino) con un elevato valore di bootstrap. La distanza filogenetica tra EC32/ITA/2011 e FiCV e CaCV risultava rispettivamente pari a 0.535 e 0.564. Al contrario, la distanza media tra le sequenze di EC32/ITA/2011 e quelle provenienti dal gruppo di BFDV era solo di 0.065, con identità nucleotidica variabile tra il 91% (stipite di BFDV identificato in *T. haematodus*) e il 95% (BFDV identificato in *P. erithacus*) (tabella 1).

DISCUSSIONE

Nel gruppo di diamanti di Gould esaminato è stata diagnosticata un'infezione da *circovirus*. A questa andrebbe attribuita la mortalità osservata tra i giovani, considerate le gravi lesioni necrotiche riscontrate istologicamente a carico del fegato, tipiche in corso di quest'infezione (Todd, 2004).

Le infezioni da *circovirus* sono ben note negli psittacidi ed associate alla PBFD (Gerlach, 1994; Todd et al. 2000). Al contrario, per quanto segnalate in specie di volatili differenti non sono in esse ben descritte. Analogamente i quadri clinici e patologici ad esse associati non sono ben noti e definiti. Nel Diamante di Gould, l'infezione da *circovirus* è stata già segnalata (Shivaprasad et al. 2004) ed il virus riscontrato è stato successivamente classificato come nuovo *circovirus* aviare in base all'analisi del gene *rep* (Todd et al. 2007). Il soggetto risultato positivo al virus proveniva da un allevamento di Gould in cui era stata osservata una sindrome respiratoria, caratterizzata da letargia, scolo nasale, grave dispnea e mortalità in percentuali ridotte. Precedentemente, nel diamante mandarino, la presenza di particelle *circovirus*-like era stata associata a necrosi epatica e qualche perdita di penne (Mysore et al. 1995).

Tra le altre specie non psittacidi, *circovirus* è stato associato in passato nei canarini alla "black spot disease", condizione patologica caratterizzata da mortalità neonatale in presenza di distensione addominale e dilatazione della cistifellea (Goldsmith, 1995). Più recentemente, *circovirus* è stato identificato in canarini che manifestavano mortalità accompagnata da sintomi aspecifici quali letargia, anoressia e perdita di peso (Todd et al., 2001). Il virus responsabile è stato poi classificato come nuovo *circovirus* aviare in base alla distanza filogenetica con BFDV ed altri *circovirus* (Phenix et al. 2001). Sembrerebbe pertanto che, analogamente a quanto osservato in altre specie di volatili non psittacidi (Duchatel et al., 2006; Chen et al. 2003; Todd et al. 2001; Smyth et al., 2005; Stewart et al. 2006), il canarino ed il diamante di Gould non vengano infettati da stipiti di BFDV ma da altri *circovirus* geneticamente ben distinti. Nei non psittacidi inoltre forme cliniche analoghe alla PBFD non sono mai state descritte. Le manifestazioni patologiche osservate nel gruppo di diamanti di Gould esaminati sembrerebbero invece molto simili alla PBFD. Infatti, nel gruppo colpito sono state osservate lesioni sia a carico del becco che delle penne. In particolare, la maggior parte delle alterazioni erano evidenziabili a carico del becco, che risultava gravemente colpito in particolare nella sua porzione superiore. Tali lesioni sono tipiche della PBFD dei pappagalli (Todd, 2004) e relativamente comuni in alcune specie come i cacatua (McOrist et al. 1984; Jacobson et al. 1986). Anche la mancanza di anomalie del becco nei giovani Gould esaminati sembrerebbe un'analogia con quanto accade in corso di infezione da BFDV negli psittacidi. Infatti, generalmente nei pappagalli le infezioni da BFDV sono più gravi quando colpiscono precocemente i soggetti giovani i quali hanno gli organi linfoidi ancora in pieno sviluppo, rendendo così più rapida l'evoluzione della malattia con un tasso di mortalità più elevato in età giovanile

spesso senza la comparsa di lesioni al becco che insorgono più frequentemente nelle evoluzioni croniche (Gerlach, 1994). Analogamente pertanto, i giovani Gould potrebbero esser deceduti prima di manifestare segni clinici esteriori. Le analisi filogenetiche hanno evidenziato una elevata affinità tra le sequenze di EC32/ITA/2011 e di stipti di BFDV, mentre il virus appariva invece molto distante da *circovirus* del canarino (CaCV) e del diamante di Gould (FiCV). Tali riscontri porterebbero a ritenere che l'infezione non sia stata indotta dal *circovirus* specifico del diamante di Gould ma che sia stata determinata dalla diffusione interspecifica di un BFDV di pappagallo ai diamanti stessi, con conseguente sviluppo delle manifestazioni cliniche proprie della PBFD.

CONCLUSIONI

In questo lavoro viene descritta, in un gruppo di Diamanti di Gould, un'infezione da *circovirus* associata a manifestazioni cliniche tipiche della Malattia del becco e delle penne dei pappagalli. Le lesioni osservate vengono supportate dalle analisi filogenetiche che evidenziano una elevata divergenza tra il virus riscontrato e *circovirus* del diamante di Gould (FiCV) e del canarino (CaCV). Al contrario, il virus risulta particolarmente affine a stipti di BFDV identificati in specie diverse di pappagalli. Si ritiene pertanto che l'infezione osservata sia attribuibile alla trasmissione interspecifica di un ceppo di BFDV dal pappagallo al gruppo di diamanti di Gould. Resta da chiarire come l'infezione possa essersi trasmessa da una specie all'altra.

Tabella 1. Correlazione in base al gene *rep* della sequenza di EC32/ITA/2011 con i frammenti corrispondenti di *Circovirus* provenienti da specie differenti. Nella prima colonna, per ogni sequenza, è riportato l'accession number in GenBank.

	Distanza (TN + G) EC32/ITA/2011	Identità nucleotidica EC32/ITA/2011
CaCV AJ301633	0.564	63.13 %
FiCV DQ845075	0.535	64.53 %
PCV1 U49186	1.056	48.50 %
PCV2 AF055392	1.056	50.30 %
CoCV AF252610	0.532	64.53 %
BFDV1 AF311299 Tha	0.102	90.78 %
BFDV2 FJ685979 Csu	0.049	95.39 %
BFDV3 EF457975 Nho	0.073	93.19 %
BFDV4 AY521238 Per	0.048	95.39 %
BFDV AY521235 Aro	0.053	94.99 %

Legenda: CaCV: Canary Circovirus; FiCV: Finch Circovirus; PCV: Porcine Circovirus; CoCv: Columbidae Circovirus; BFDV: Beak and Feather Disease Virus; Tha: *Trichoglossus haematodus*; Csu: *Cacatua sulphurea*; Nho: *Nymphicus hollandicus*; Per: *Psittacus erithacus*; Aro: *Agapornis roseicollis*.

Figura 1. Lesioni macroscopiche riscontrate in corso di infezione: 1a, 1b: alopecia nella regione della testa ed anomalie del becco; 1c, 1d, 1e: lesioni a carico del becco (N.B. l'aspetto del piumaggio è legato al processo di muta in corso)



Figura 2. Sezione istologica di fegato (Ematossilina-eosina; ingrandimento 1000x): 2a: Corpi inclusi intranucleari di tipo Cowdry B (In) ed area di necrosi (N). 2b: marginalizzazione della cromatina (CM).

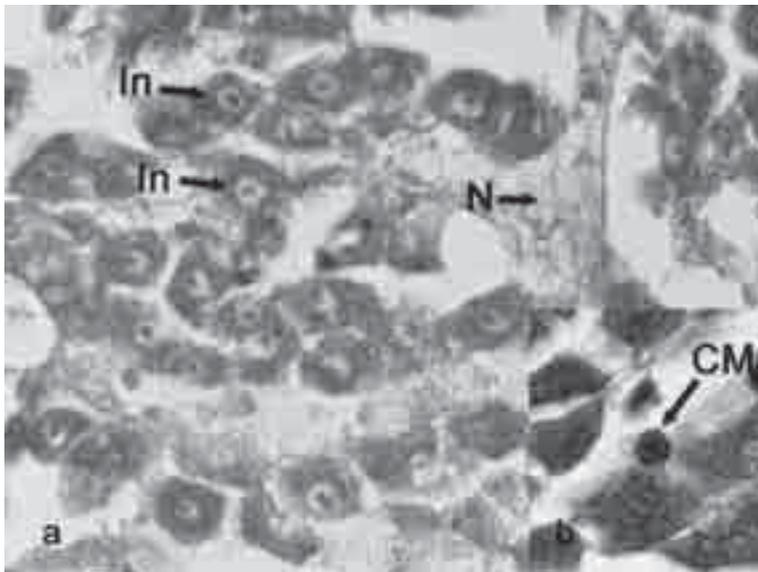
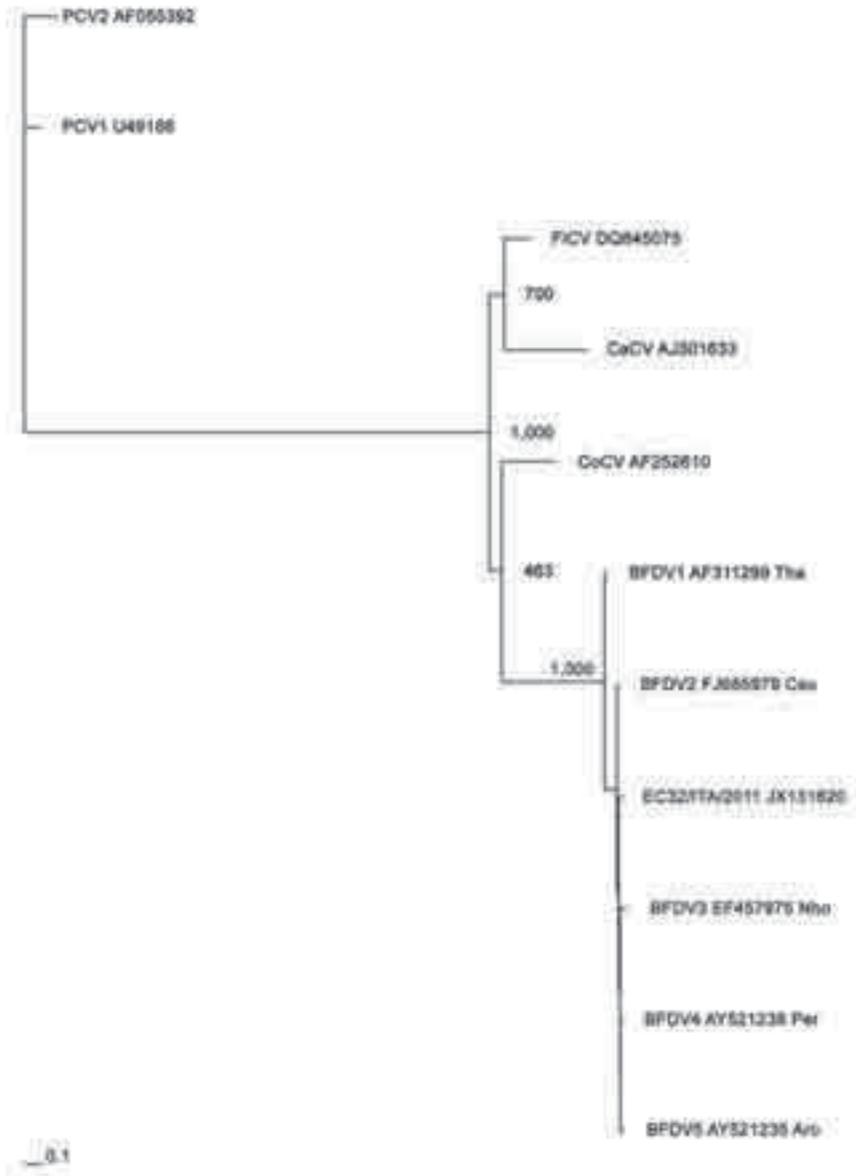


Figura 3. Albero filogenetico sulla base del gene *rep*. Accanto all'acronimo di ogni sequenza è riportato l'accession number e, per gli stipiti, di BFDV, la specie ospite di pappagallo I valori di bootstrap sono indicati agli snodi principali. PCV: Porcine Circovirus; FiCV: Finch Circovirus; CaCV: Canary Circovirus; CoCV: Columbidae Circovirus; BFDV: Beak and Feather Disease Virus; Tha: *Trichoglossus haematodus*; Csu: *Cacatua sulphurea*; Nho: *Nymphicus hollandicus*; Per: *Psittacus erithacus*; Aro: *Agapornis roseicollis*.



BIBLIOGRAFIA

1. Cathedral-Ortiz 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 novaeseelandiae*) in New Zealand. *Arch Virol.* 155: 613-620.
2. Chen C.L., Chang P.C., Lee M.S., Shein J.H., Ou S.J., Shieh H.K. Nucleotide sequences of goose circovirus isolated in Taiwan. (2003). *Avian Path.* 32: 165-171.
3. Duchatel J. P., Todd D., Smyth J. A., Bustin J. C., Vindevogel H. Observations on detection, excretion and transmission of pigeon circovirus in adult, young and embryonic pigeons. (2006). *Avian Path.* 35(1): 30-34.
4. Eisenberg S.W.F., van Asten A.J.A.M., van Ederen A.M., Dorrestein G.M. Detection of circovirus with a polymerase chain reaction in the ostrich (*Struthio camelus*) on farm in the Netherlands. (2003). *Vet Microbiol.* 95: 27-38.
5. Gerlach, H., (1994). Circoviridae - Psittacine Beak and Feather Disease Virus, in: Ritchie, B.W., Harrison, J., Harrison, L.R. (Eds.), *Avian medicine: principles and application*. Wingers Publishing, Lake Worth, pp. 894-902.
6. Goldsmith T. L. (1995). Documentation of passerine circoviral infection (abstract). In *Proceedings of the Annual Conference of the American Association of Avian Veterinarians* pp. 349-350. Philadelphia, PA, USA.
7. Katoh, H., Ogawa, H., Ohya, K., Fukushi, H., (2010). A review of DNA viral infections in psittacine birds. *J. Vet. Med. Sci.* 72: 1099-1106.
8. Jacobson ER, Clubb S., Simpson C., Walsh M., Lothrop CD Jr, Gaskin J., Bauer J., Hines S., Kollias GV., Poulos P, et al. (1986). Feather and beak dystrophy and necrosis in cockatoos: clinicopathologic evaluations. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* nov 1, 189(9):999-1005.
9. Manarolla G., Liandris E., Pisoni G., Moroni P., Piccinini R., Rampin T. (2007). Mycobacterium genavense and avian polyomavirus co-infection in a European Goldfinch (*Carduelis carduelis*). *Avian Path.* 36(5): 423-426.
10. Mankertz A., Hattermann K., Ehlers B., Soike D. Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. (2000). *Arch. Virol.* 145, 2469-2479.
11. McOrist S., Black DG., Pass DA, Scott PC, Marshall J. (1984). Beak and feather dystrophy in wild sulphur-crested cockatoos (*Cacatua galerita*). *J Wildlife Dis.* apr. 20(2):120-124.
12. Mysore J., Read D., Duft B., Kinde H., Leger J. S. (1995). Feather loss associated with circovirus-like particles in finches (abstract). In *Proceeding of the Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticatians. Histopathology Section (2)* Reno, NV, USA.
13. Niagro, F.D., Forsthoefel, A.N., Lawther, R.P., Kamalanathan, L., Ritchie, B.W., Latimer, K.S., Lukert, P.D. (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Virol.* 143: 1723-1744.
14. Phenix K.V., Weston J.H., Ypelaar I., Lavazza A., Smyth J.A., Todd D., Wilcox G.E., Radial S.R. (2001). Nucleotide sequence analysis of a novel

- circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *J Gen Virol.* 82: 2805-2809.
15. Rampin T., Manarolla G., Pisoni G., Recordati C. and Sironi G. (2006). Circovirus inclusion bodies in intestinal muscle cells of a canary. *Avian Path* 35(4): 277-279.
 16. Shivaprasad H. L., Woolcock P.W., Castro A.E., Chin R.P., Nordhausen R.W., Meteyer C.U., Jeffrey J.S., Barr B.C., Droual R. (1993). Identification of viruses from the intestine of ostriches. In Proceedings of the 36th Annual Meeting, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (p. 107). Las Vegas, NV, USA.
 17. Shivaprasad H.L., Daphne H., Todd D., Smyth J.A. (2004). Circovirus infection in a Gouldian finch (*Chloebia gouldiae*). *Avian Path.* 33(5): 525-529.
 18. Smyth J., Soike D., Moffett D., Weston J.H., Todd D. (2005). Circovirus-infected geese studies by *in situ* hybridation. *Avian Path.* 34(3), 227-232.
 19. Stewart M. E., Perry R., Raidal S. R. (2006). Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian Path.* 35(2): 86-92.
 20. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
 21. Todd D. (2000). Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Path.* 29: 373-394.
 22. Todd. D., Weston J.H., Soike D., Smyth J.A. (2001). Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology.* 286: 354-362.
 23. Todd, D., (2004). Avian circovirus diseases: lesson for the study of PMWS. *Vet. Microbiol.* 98: 169-174.
 24. 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 Pathol.* 30: 321-325.
 25. Todd D., Scott N.J., Fringuelli H.L., Shivaprasad D., Gavier-Widen., Smyth J.A. (2007). Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. *Avian Pathol.* 36(1): 75-81.
 26. Todd D., Fringuelli E., Scott A. N., Borghmans B. J., Duchatel J. P., Shivaprasad H.L., Raidal S. R., Abadie J. X., Franciosi M. P., Smyth J. A. (2008). Sequence comparison of pigeon circoviruses. *Res Vet Sci.* 84(2): 311- 319.
 27. Varsani, A., de Villiers, G.K., Regnard, G.L., Bragg, R.R., Kondiah, K., Hitzeroth, I.I., Rybicki, E.P., (2010). A unique isolate of beak and feather disease virus isolated from budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in South Africa. *Arch. Virol.* 155: 435-439.