

6. Keyburn AL, Sheedy SA, Ford ME, Williamson M M, Award M M, Rood JI, Moore RJ (2006). Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect. Immun.* 74(11): 6496-6500
7. Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannma TL, Ford ME, Parker D, Di Rubbo A, Rood JI, Moore RJ. (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4:0001-0011
8. Coursodon CF, Glock RD, Moore KL, Cooper KK, Songer JG. (2012). TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaer.* 18:117-121
9. Kwatra YK, Lee YJ, Mo IP. (2004). A presumptive diagnosis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*) from Assam (India). *Avian Dis.* 20:401-406
10. Barnes HJ, Wages DP, Opengart K. (2008). Clostridial disease. In: Saif JM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK (Eds.), *Diseases of Poultry*, 12th Edn., Blackwell Publishing, London, pp. 865-879.
11. Berkhoff GA, Campbell SG. (1973). Etiology and pathogenesis of ulcerative enteritis (quail disease). The experimental disease. *Avian Dis.* 18(2):205-2012
12. Davis RB. (1973). Ulcerative enteritis in chickens: coccidiosis and stress as predisposing factors. *Poult Sci.* 52:1283-1287
13. Baltzely TA, Dunham SM, Lago F, Rehberger TG, Siragusa GR. (2008). Molecular pathogenesis markers of focal duodenal necrosis in layer hens. Proceedings of the 80th Northeastern conference on Avian diseases.
14. Yoo HS, Lee SU, Park YH. (1997). Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin Microbiol.* 35:228-232
15. Baums CG, Schotte U, Amtberg G, Goethe R. (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet Microbiol.* 100:11-16
16. Bano L, Drigo I, Macklin KS, Martin RS, Miller RS, Norton RA, Oyarzabal OA, Bilgili SF. (2008). Development of a polymerase chain reaction assay for specific identification of *Clostridium colinum*. *Avian Pathol.* 37:179-181
17. Beltran-Alcrudo D, Cardona C, McLellan L, Reimers N, Charlton B. (2008). A persistent outbreak of ulcerative enteritis in bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Avian Dis.* 52:531-536
18. Bano L, Bacchin C, Marcon B, Fracas V, Giovanardi D, Drigo I, Agnoletti F. (2013) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* field strains isolated from commercial turkeys, broilers and layer hens. XIIIth WVPA (world veterinary pathology association) Congress. Nantes, FR, 19-23 settembre. p 672

FILOGENESI DI *CIRCOVIRUS* SULLA BASE DELLE SEQUENZE DEL GENOMA COMPLETO IDENTIFICATI IN SPECIE DIVERSE DI PAPPAGALLI

Caroli A., Pugliese N., Camarda A., Legretto M., Marino M., Circella E.

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", S. P. per Casamassima km. 3, 70010, Valenzano, Bari.

ABSTRACT

BFDV, *Beak and Feather Disease Virus*, appartiene alla famiglia *Circoviridae* e al genere *Circovirus* (Bassami et al, 1998). A tale genere appartengono virus identificati in numerose altre specie come il suino, *Porcine Circovirus* (PCV-1, PCV-2) (Hamel et al, 1998), e virus identificati nei volatili, nel piccione *Pigeon Circovirus* (PiCV) (Mankertz et al, 2000), nell'oca *Goose Circovirus* (GoCV) (Todd et al, 2001b), nel canarino *Canary Circovirus* (CaCV) (Todd et al, 2001), nell'anatra *Duck Circovirus* (DuCV) (Todd et al, 2005), nel gabbiano *Gull Circovirus* (GuCV) (Twentyman et al, 1999), nel Diamante di Gould *Finch Circovirus* (FiCV) (Shivaprasad et al, 2004), nel corvo australiano *Australian raven Circovirus* (RaCV) (Stewart et al, 2006), nello storno *Starling Circovirus* (StCV) (Dayaram et al, 2013), e nel cigno *Swan Circovirus* (SwCV) (Halami et al, 2008).

BFDV è responsabile nei pappagalli di una patologia denominata "Malattia del becco e delle penne" (Psittacine Beak and Feather Disease – PBFD), in virtù della localizzazione tipica delle lesioni riscontrate a livello del becco e delle penne (Gerlach, 1994). La patologia se pur descritta inizialmente in popolazioni di pappagalli selvatici in Australia (Paré et Robert, 2007), attualmente l'infezione è segnalata in tutto il mondo nei pappagalli allevati in cattività a seguito del commercio globale di volatili esotici, ed è stata identificata in più di 60 specie di psittacidi (Varsani et al, 2011). Non sempre l'infezione evolve con sintomi specifici evidenti (Circella et al. 2012), ma classicamente la PBFD può manifestarsi in tre diverse forme cliniche, iperacuta, acuta e cronica, in base all'età dei volatili colpiti (Gerlach, 1994). Le lesioni a carico del becco e delle penne appaiono più frequentemente nelle evoluzioni croniche (Todd et Gortazar, 2012). L'infezione è associata ad immunosoppressione che espone i pappagalli all'insorgenza di infezioni secondarie (Todd, 2000).

Le diverse forme con cui la malattia si manifesta sono legate inoltre a numerosi e complessi fattori tra cui la specie colpita, il livello di anticorpi materni, i diversi stipiti coinvolti nell'infezione, la dose infettante e la co-presenza di altri agenti patogeni (de Kloet et de Kloet, 2004).

In questo lavoro sono stati analizzati geneticamente stipiti di *circovirus* identificati in pappagalli infetti appartenenti a specie diverse, provenienti da differenti località del centro e sud Italia (tabella 1) ed è stata valutata un'eventuale correlazione tra stipite virale e forma clinica osservata nel soggetto infetto.

Per l'amplificazione della regione *rep* sono state allestite due diverse reazioni di PCR, con due differenti coppie di primer, *BFDV2/4* (Ypelaar et al., 1999) e *DCiVf/r* (Todd et al., 2001), che amplificano due diverse regioni del gene che in parte si sovrappongono. L'intero genoma dei ceppi oggetto di studio è stato amplificato mediante la tecnica del circolo-rotante (Dean et al., 2001), o mediante primer

disegnati sulla base delle regioni conservate del genoma. Per il completamento di tutte le sequenze genomiche secondo la tecnica del chromosome walking, sono stati disegnati e sintetizzati diversi oligonucleotidi.

Le sequenze genomiche ottenute sono state allineate tra loro e con un pannello rappresentativo di genomi di *BFDV* presenti in GenBank. Il genoma di riferimento di *Circovirus* del canarino (Todd et al. 2001) è stato utilizzato come radice per le successive analisi filogenetiche. La dimensione del genoma di tutti i virus identificati, amplificati e sequenziati era compresa tra 1.994 pb (IT03) e 2.010 pb (IT213). In tutte le sequenze sono state evidenziate le due ORF, *rep* e CP. Dall'analisi delle sequenze è emerso che, su tutte, è presente la sequenza altamente conservata TAGTATTAC, considerata il sito di potenziale origine di replicazione del genoma virale (Varsani et al., 2011), e che alcuni stipiti condividevano altre sequenze ripetute ed invertite soprattutto a monte e a valle dei due geni *rep* e CP. La struttura di tali regioni ripetute invertite ha i requisiti per originare delle strutture secondarie, pertanto è altamente probabile che si formi una struttura *Steam and loop* in queste regioni. I ceppi di *BFDV* nel complesso mostravano una distanza media, in percentuale di posizioni nucleotiche, del 5,9%. Nel particolare è possibile identificare una sostanziale identità tra i virus identificati nei cenerini, ad eccezione di mIT60 che mostrava un'identità più elevata con IT24 identificato nel cacatua. Tale dato risulta molto interessante considerato che i due virus, strettamente correlati filogeneticamente, venivano identificati in due volatili appartenenti a due famiglie differenti, *Cacatuidae* e *Psittacidae*. Infine i ceppi IT05 e IT06 mostravano un'identità del 100% derivando da due inseparabili che condividevano la stessa gabbia. In base alle percentuali di divergenza nucleotica (Varsani et al., 2011), è possibile individuare tre diversi ceppi: **a** (IT05 ed IT06, **b** comprendente tre varianti: **b1** (IT02 ed IT213), **b2** (IT24 ed IT60) e **b3** (IT30, IT32, IT47 ed IT54), e **c** (IT03).

Le sequenze genomiche dei virus identificati sono state comparate con un pannello scelto tra quelle presenti in GenBank. È interessante osservare che i virus riscontrati nei cenerini della variante B3 mostravano un'identità superiore al 98%, con una serie di virus identificati in Portogallo in cenerini e altri psittaciformi, che ugualmente avevano manifestato un'evoluzione acuta della malattia (Henriques et al., 2010). Dall'analisi dell'albero filogenetico emerge una parziale specificità d'ospite di *BFDV*, dato che alcune varianti sembrano prediligere specie ben precise, anche se le stesse varianti sono state poi identificate in ospiti di specie piuttosto distanti tra loro. Ad esempio sequenze corrispondenti ad IT03 (identificato nella cocorita) sono state riscontrate prevalentemente nelle cocorite, ma sono state riportate anche in un cacatua se pur in condizioni di forte promiscuità di specie. Complessivamente l'analisi filogenetica condotta su un pannello più ampio di virus chiarisce alcuni aspetti critici, come le relazioni clonali tra i ceppi, ma sembra indicare una scarsa specie-specificità d'ospite, in quanto virus identificati da specie di pappagalli distanti tra loro entrano a far parte degli stessi *clade*.

Tuttavia, va considerato che i valori di *bootstrap* sono piuttosto bassi e quindi le relazioni filogenetiche tra i virus possono variare notevolmente a seconda della regione genomica di riferimento. Sono state condotte analisi aggiuntive, per chiarire alcuni aspetti delle relazioni filogenetiche tra gli stipiti oggetto di studio, considerando singolarmente le sequenze dei geni *rep* e CP e valutando i possibili eventi ricombinativi. Da queste analisi emerge che i ceppi A e B1 abbiano avuto origine da un ancestore comune e che

successivamente un evento di ricombinazione che ha coinvolto il gene *rep*, li abbia separati. Pertanto, la variante **b1** può essere riclassificata come variante A2 del ceppo A. Alla luce di tutte le analisi condotte, i virus analizzati si possono riclassificare come: ceppo A, variante A1 (IT05 ed IT06); ceppo A, variante A2 (IT02 ed IT213); ceppo B, variante B1 (IT24, IT60 e IT82); ceppo B, variante B2 (IT30, IT32, IT47 e IT54) e ceppo C (IT03).

In conclusione, dalle analisi filogenetiche si può evincere che sicuramente esiste una certa predisposizione d'ospite di *BFDV*, ma non è esclusa la possibilità di un passaggio dello stesso stipite ad altre specie, soprattutto in condizioni di forte promiscuità e di contatto ravvicinato. Tali condizioni renderebbero possibile sia l'adattamento di un ceppo a più ospiti, sia la possibilità di coinfezioni nello stesso animale da parte di stipiti diversi, condizione favorevole per l'instaurarsi di eventi di ricombinazione che hanno un ruolo di fondamentale importanza nell'evoluzione di *BFDV*.

Pertanto per il controllo dell'infezione diventa fondamentale non solo applicare piani di controllo igienico-sanitario, ma anche evitare la stretta promiscuità di specie differenti.

BIBLIOGRAFIA

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 circoviruses and chicken anaemia virus*. *Virology*. 249: 453-459.

Circella C., Caroli A., Pugliese N., Legretto M., Todisco G., Di Paola G. Camarda A. (2012). *Infezione da Circovirus nei volatili d'affezione: approccio diagnostico clinico e molecolare*. *Veterinaria*, Anno 26, n.6: 15-22.

Dayaram A., Goldstien S., Zawar-Reza P., Gomez C., Harding J.S., Varsani A. (2013). *Identification of Starling Circovirus in an Estuarine Mollusc (Amphibola crenata) in New Zealand Using Metagenomic Approaches*. *Genome Announcements*. Vol.1(3): e00278-13.

de Kloet E., de Kloet S.R. (2004). *Analysis of the beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specificity*. *Archives of Virology*. 149: 2393-2412.

Dean F.B., Nelson J.R., Giesler T.L., and Lasken R.S. (2001). *Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification*. *Genome Research*. 1095-1099.

Gerlach H. (1994). *Circoviridae - Psittacine Beak and Feather Disease Virus*. In: Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R. (Eds.) *Avian medicine: principles and application*. Wingers Publishing, Lake Worth pp. 894-902.

Halami M.Y., Nieper H., Muller H., Johne R. (2008). *Detection of novel circovirus in mute swans (Cygnus olor) by using nested broad-spectrum PCR*. *Virus Research*. 132(1-2):208-12.

Hamel A.L., Lin L.L., Nayar G.P. (1998). *Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs*. *Journal of Virology*. 72: 5262-5267.

Henriques A.M., Fagulha T., Duarte M., Ramos F., Barros S., Luis T., Bernardino R., Fevereiro M. (2010). *Phylogenetic analysis of six isolates of beak and feather disease virus from African Grey Parrots in Portugal*. Avian Diseases. 54: 1066-1071.

Mankerts A., Hattermann K., Ehlers B., Soike D. (2000). *Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons*. Archives of Virology. 145: 2469-2479.

Paré J.A., Robert N. (2007). *Infectious diseases of wild birds*. In: Thomas N.J., Hunter D.B., Atkinson C.T. (Eds) Blackwell, Oxford, UK. pp. 194-205.

Shivaprasad H.L., Hill D., Todd D., Smyth J.A. (2004). *Circovirus infection in a Gouldian gouldiae*. Avian Pathology. 33: 525-529.

Stewart M.E., Perry R., Raidal S.R. (2006). *Identification of a novel circovirus in Australian ravens (Corvus coronoides) with feather disease*. Avian Pathology. 35: 86-92.

Todd D. (2000). *Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review*. Avian Pathology. 29: 373-394.

Todd D., Bendinelli M., Biagini P., Hino S., Mankertz A., Mishiro S., Niel C., Okamoto H., Raidal S., Ritchie B.W., Teo G.C. (2005). *Circoviridae*. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., L.A. Ball (Eds) *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier/Academic Press, pp. 327-334.

Todd D., Gortazar C. (2012). *Circovirus infection*. In: Infection Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe. Edited by: Gavier-Widen D., Duff J.P., Meredith A. Wiley-Blackwell Publishing. Cap. 4: 67-72.

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.

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.

Todd D., Weston J.H., Soike D., Smyth J.A. (2001 b). *Genome sequence determination and analyses of novel circovirus from goose and pigeons*. Virology 286: 354-362.

Twentyman C.M., Alley M.R., Meers J., Cooke M.M., Duignan P.J. (1999). *Circovirus-like infection in a southern black-backed gull (Larus dominicanus)*. Avian Pathology. 28: 513-516.

Varsani A., Regnard G.L., Bragg R., Hitzeroth I.I., Rybicki E.P. (2011). *Global genetic diversity and geographical and host-species distribution of beak and feather disease virus isolates*. Journal of General Virology. 92:752-767.

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*. Veterinary Microbiology. 68(1-2): 141-148.

Tabella 1: Circovirus oggetto di studio identificati in pappagalli

Denominazione Circovirus	Specie	Età	Sintomatologia manifestata	Provincia (anno di identificazione del virus)
IT02	Conuro del sole (<i>Aratinga solstitialis</i>)	~3 anni	Patologie secondarie ricorrenti	Bari (2008)
IT03	Pappagallino ondulato (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	1 anno	Anoressia, letargia, morte	Bari (2008)
IT05	Inseparabile collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)	1 anno	Patologie secondarie ricorrenti	Teramo (2008)
IT06	Inseparabile collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)	1 anno	Patologie secondarie ricorrenti	Teramo (2008)
IT24	Cacatua bianco (<i>Cacatua alba</i>)	6 mesi	Patologie secondarie ricorrenti	Brindisi (2010)
IT30	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	3,5 mesi	Anoressia, letargia, morte	Taranto (2010)
IT32	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	2,5 mesi	Anoressia, letargia, morte	Taranto (2010)
IT47	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	3 mesi	Anoressia, letargia, morte	Brindisi (2010)
IT54	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	6 mesi	Anoressia, letargia, morte	Bari (2011)
IT60	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)	7 mesi	Anoressia, letargia, morte	Bari (2011)
IT213	Inseparabile collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)	~1 anno	Alterazioni del piumaggio	Foggia (2013)