

mostravano segni di enterite ed infine in 33 gruppi è stato possibile rilevare ipertrofia renale. Altre lesioni considerate caratteristiche dell'infezione da MI, come il *wry neck*, sono state rilevate, anche se in un numero esiguo di animali e solamente in un gruppo.

Dall'analisi statistica effettuata, i dati che mostrano significatività statistica tra infezione da MI e le evidenze di laboratorio, risultano essere le anomalie ossee a carico degli arti inferiori e la presenza di coccidi. Mentre per quanto riguarda gli altri parametri rilevati non è stata evidenziata significatività statistica. In particolare è risultato che la probabilità di diagnosticare un soggetto positivo al *Mycoplasma iowae* è quattro volte superiore per i soggetti che presentano anomalie agli arti inferiori (OR=4.5, IC 95%: 1.71 – 12.16), ed inoltre che la probabilità di registrare un esito positivo al *Mycoplasma iowae* risulta tre volte superiore qualora si registri un esito positivo per *Eimeria* (OR=3.4, IC 95%: 1.36 – 8.53).

CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti si evince che la presenza del *Mycoplasma iowae* nel settore tacchino da carne sembra avere un impatto sulle *performance* produttive. Inoltre le lesioni riscontrate a carico degli arti inferiori così come la presenza di coccidi sembra avere un valore prognostico piuttosto importante nell'avanzare un sospetto di infezione da MI.

La presenza di una correlazione statistica tra MI e coccidi a livello intestinale, può essere interpretata con una alterazione dell'ambiente intestinale che favorisce la colonizzazione dei coccidi. Infine è possibile ipotizzare che la presenza dell'infezione intestinale da MI possa alterare anche le funzioni di questo delicato organo, determinando le alterazioni di sviluppo osseo che si possono manifestarsi con le tipiche deformazioni degli arti inferiori.

BIBLIOGRAFIA

1. Battanoli G., Brustolin M., Bilato D., Gobbo F., Qualtieri K., McAuliffe and Catania S. Utilizzo della DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) per l'identificazione delle specie di micoplasmi in campo avicolo. XII Congresso Nazionale SIDILV. Genova 27-29 Ottobre 2010. pag 63-64.
2. Catania S, Gobbo F, Bilato D, Fincato A, Battanoli G, Iob L. Isolation of *Mycoplasma iowae* in commercial turkey flocks. *Vet Rec.* 2012 Jan;170(4):107-8.
3. Ley D.H., Marusak R.A., Vivas E.J., Barnes H.J., Fletcher O.J. (2010). *Mycoplasma iowae* associated with chondrodystrophy in commercial turkeys. *Avian Pathol.* Apr; 39 (2): 87-93. Erratum in: *Avian Pathol.* 2010 Aug; 39 (4): 307.
4. Trampel DW, Goll F Jr. Outbreak of *Mycoplasma iowae* infection in commercial turkey poults. *Avian Dis.* 1994 Oct-Dec;38(4):905-9.

Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/10 "Le micoplasmosi nel settore avicolo industriale: studio e messa a punto di nuove metodiche e protocolli diagnostici al fine di valutare e studiare il differente ruolo dei ceppi circolanti tra le differenti tipologie di produzioni avicole."

INFEZIONE DA *CIRCOVIRUS* NELLA GRU CORONATA (*BALEARICA REGULORUM*). CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DEL VIRUS IDENTIFICATO

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

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

ABSTRACT

Circovirus, famiglia *Circoviridae*, 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).

Nei pappagalli, questo virus è ben noto e viene definito BFDV (Beak and Feather Disease Virus), in quanto causa una patologia denominata Malattia del becco e delle penne (Psittacine Beak and Feather Disease - PBFD), in quanto caratterizzata da anomalie a carico del piumaggio e del becco (Gerlach, 1994). La rilevanza di questa patologia è legata alla immunodepressione che si osserva nei soggetti colpiti, dovuta a deplezione dei tessuti linfoidi, in particolare timo e borsa di Fabrizio, che li predispone a frequenti infezioni secondarie di natura batterica e/o fungina (Katoh et al., 2010; Todd, 2004). Nei pappagalli, 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). Tra le altre specie di volatili, *Circovirus* è stato identificato nei canarini (Todd et al., 2001; Rampin et al., 2006), nei piccioni (Mankertz et al. 2000; Todd et al. 2001; Duchatel et al., 2006; Todd et al. 2008), negli struzzi (Shivaprasad et al. 1993; Eisenberg et al. 2003), nelle oche (Todd et al. 2001; Chen et al. 2003) nelle anatre (Smyth et al., 2005), nel corvo australiano (Stewart et al. 2006) e nel diamante di Gould (Shivaprasad et al., 2004; Circella et al. 2014). In queste specie, gli effetti dell'infezione non sono ancora ben chiari. Analogamente, le manifestazioni cliniche descritte possono variare da caso a caso, anche a seconda della specie colpita. In questo lavoro, viene riportato il riscontro di *circovirus* in una gru coronata (*Balearica regulorum*).

Tale stipite è stato identificato in un esemplare di gru coronata adulto, asintomatico, che si trovava in un giardino zoologico del Sud Italia. Nella stessa struttura, sia pure in voliere differenti, erano presenti pappagalli appartenenti a specie diverse. Il virus è stato identificato mediante PCR utilizzando due protocolli diversi, con due differenti coppie di primers, *BFDV2/4* (Ypelaar et al., 1999) e *DCiVf/r* (Todd et al., 2001). Le PCR hanno permesso di amplificare due frammenti, del peso molecolare atteso rispettivamente di 700 bp e 550 bp. L'analisi delle sequenze corrispondenti ai frammenti ottenuti hanno confermato l'identificazione di *circovirus*, che è stato denominato IT82. Il genoma completo del virus è stato poi amplificato e sequenziato per l'analisi filogenetica del virus identificato.

La sequenza ottenuta è stata comparata inizialmente con quelle corrispondenti ai genomi completi di *circovirus* identificati presso il Dipartimento di

Medicina Veterinaria in pappagalli appartenenti a specie differenti (tabella 1), e successivamente con le sequenze corrispondenti presenti in GenBank.

Dalla prima analisi sul genoma completo, IT82 identificato nell'esemplare di gru coronata ha mostrato un'identità nucleotidica del 96% con IT24, individuato nel cacatua e del 95,6% con IT60, riscontrato in un cenerino (tabella 2).

Rispetto a tutti i virus considerati, la sua distanza in termini di differenza percentuale della sequenza nucleotidica, è risultata compresa tra 4 % e 8,6 %.

Strettamente correlato in base alla sequenza nucleotidica ad IT24 ed IT60 (figura 1), IT82 presentava una sequenza ripetuta vicino all'ipotetica origine di replicazione più corta rispetto agli altri stipiti. Inoltre, IT82 condivideva con questi la sequenza ripetuta nella regione compresa tra i nucleotidi 1128 e 1164, ma presentava altre due sequenze ripetute nelle posizioni 1756-1767 e 1808-1795. Dalla comparazione tra la sequenza di IT82 e le sequenze, presenti in GenBank, corrispondenti a *circovirus* identificati in diversi Stati ed in pappagalli di specie diverse, è emerso che IT82 (gru coronata), così come IT24 del cacatua ed IT60 del cenerino, cui risultava strettamente correlato, rientravano in uno stesso *cluster* che comprendeva *circovirus* identificati in psittacidi, tra cui cenerini, parrocchetti dal collare (*P. krameri*), e due diverse varietà di rosella (*Platyercus*) in Polonia ed in Portogallo tra il 2008 ed il 2011 (Julian et al., 2013; Henriques et al., 2010).

In base ai criteri stabiliti da Fauquet et al. (2008) e Varsani et al. (2011), IT82 deve pertanto essere classificato come BFDV. Tale risultato è particolarmente significativo se si considera che la specie in cui è stato identificato, è molto distante filogeneticamente dall'ordine *Psittaciformes* (Hackett et al., 2008). L'infezione non ha avuto alcuna ripercussione sulla gru risultata infetta. Tuttavia essa assume rilevanza per la possibile trasmissione interspecifica dell'infezione. Infatti, la gru coronata infetta si trovava in un giardino zoologico dove erano presenti psittacidi, sia pure separati in quanto allevati in voliere diverse, ed è ipotizzabile, anche in base ai risultati delle analisi filogenetiche, che l'infezione riscontrata nella gru derivi dai pappagalli. Si ritiene infatti improbabile che il virus identificato nelle penne fosse una semplice contaminazione, in quanto l'estrazione di DNA è stata condotta dalla parte cellularizzata del calamo, separata accuratamente dal resto. Essendo *circovirus* stabile nell'ambiente (Todd, D. *Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review*. Avian Pathology, 29, 373-394. 2000), è possibile che il virus sia passato dai pappagalli alla gru facilmente per via indiretta. I pappagalli presenti, che comunque non è stato possibile analizzare, non manifestavano alcuna sintomatologia. Questo è un fenomeno comunemente noto proprio negli psittacidi, in cui l'infezione può decorrere anche asintomaticamente in animali adulti, mentre induce lesioni e mortalità nei giovani. La gru, oltre ad essere un soggetto adulto, rappresenterebbe un ospite non preferenziale per il virus, che vi ha attecchito, ma non ha indotto manifestazioni cliniche riconducibili alla malattia del becco e delle penne.

In ogni caso, la gru potrebbe potenzialmente fungere a sua volta da serbatoio dell'infezione per i pappagalli. Questa possibilità assume particolare rilievo se si considera che la gru è, allo stato libero, un animale migratore che pertanto può veicolare il virus da un'area geografica all'altra, favorendo tra l'altro fenomeni di ricombinazione genetica tra virus insistenti in territori diversi.

BIBLIOGRAFIA

Cathedral-Ortiz, L., B. Kurenbach, M. Massaro, K. McInnes, D.H. Brunton, M.E. Hauber, D.P. Martin, and A. Varsani. (2010). A new isolate of beak and feather disease virus from endemic wild red-fronted parakeets (*Cyanoramphus novaezelandiae*) in New Zealand. Archives of Virology, 155, 613-620.

Chen, C.L., P.C. Chang, M.S. Lee, J.H. Shein, S.J. Ou, and H.K. Shieh. (2003). Nucleotide sequences of goose circovirus isolated in Taiwan. Avian Pathology, 32, 165-171.

Duchatel, J. P., D. Todd, J. A. Smyth, J.C. Bustin, and H. Vindevogel. (2006). Observations on detection, excretion and transmission of pigeon circovirus in adult, young and embryonic pigeons. Avian Pathology, 35, 30-34.

Eisenberg, S.W.F., A.J.A.M. van Asten, A.M. van Ederen, and G.M. Dorrestein. (2003). Detection of circovirus with a polymerase chain reaction in the ostrich (*Struthio camelus*) on farm in the Netherlands. Veterinary Microbiology, 95, 27-38.

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.

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

Katoh, H., H. Ogawa, K. Ohya, and H. Fukushi. (2010). A review of DNA viral infections in psittacine birds. Journal of Veterinary Medical Science, 72, 1099-1106.

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

Niagro, F.D., A.N. Forsthoefel, R.P. Lawther, L. Kamalanathan, B.W. Ritchie, K.S. Latimer, and P.D. Lukert. (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. Archives of Virology, 143, 1723-1744.

Rampin, T., G. Manarolla, G. Pisoni, C. Recordati, and G. Sironi. (2006). Circovirus inclusion bodies in intestinal muscle cells of a canary. Avian Pathology, 35, 277-279.

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

Shivaprasad, H.L., P.W. Woolcock, A.E. Castro, R.P. Chin, R.W. Nordhausen, C.U. Meteyer, J.S. Jeffrey, B.C. Barr, and R. Droual. (1993). Identification of viruses from the intestine of ostriches. Proceedings of the 36th Annual Meeting,

American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Las Vegas, NV, USA. p. 107.

Smyth, J., D. Soike, D. Moffett, J.H. Weston, and D. Todd. (2005). Circovirus-infected geese studies by in situ hybridation. *Avian Pathology*, 34, 227-232.

Todd, D. (2004). Avian circovirus diseases: lesson for the study of PMWS. *Veterinary Microbiology*, 98, 169-174.

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

Todd, D., E. Fringuelli, A.N. Scott, B.J. Borghmans, J.P. Duchatel, H.L. Shivaprasad S.R. Raidal, J.X. Abadie, M.P. Franciosini, and J.A. Smyth. (2008). Sequence comparison of pigeon circoviruses. *Research in Veterinary Science*, 84, 311- 319.

Todd, D., J. Weston, N.W. Ball, B.J. Borghmans, J.A. Smyth, L. Gelmini, and A. Lavazza. (2001). Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries. *Avian Pathology*, 30, 321-325.

Varsani, A., G.K. de Villiers, G.L. Regnard, R.R. Bragg, K. Kondiah, I.I. Hitzeroth, and E.P. Rybicki. (2010). A unique isolate of beak and feather disease virus isolated from budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in South Africa. *Archives of Virology*, 155, 435-439.

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: Distanze percentuali tra i virus analizzati

Virus	Specie
IT02	Conuro del sole (<i>Aratinga solstitialis</i>)
IT03	Pappagallino ondulato (<i>Melopsittacus undulatus</i>)
IT05	Inseparabile collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)
IT06	Inseparabile collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)
IT24	Cacatua bianco (<i>Cacatua alba</i>)
IT30	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)
IT32	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)
IT47	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)
IT54	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)
IT60	Cenerino (<i>Psittacus erithacus</i>)
IT213	Inseparabile collo rosa (<i>Agapornis roseicollis</i>)

Tabella 2: Distanze percentuali tra i virus analizzati

	IT02	IT03	IT05	IT06	IT213	IT24	IT30	IT32	IT47	IT54	IT60
IT03	8,5										
IT05	6,4	10,3									
IT06	6,4	10,3	0								
IT213	1,9	8,8	6,6	6,6							
IT24	7,9	8,2	9,3	9,3	8,0						
IT30	5,1	8,0	7,3	7,3	5,2	4,4					
IT32	5,0	7,9	7,1	7,1	5,1	4,5	0,3				
IT47	5,2	8,4	7,4	7,4	5,4	5,2	1,1	1,2			
IT54	5,5	8,6	7,5	7,5	5,6	5,3	1,3	1,4	0,3		
IT60	7,9	8,0	9,1	9,1	8,0	2,5	4,6	4,7	5,1	5,3	
IT82	7,6	8,4	8,6	8,6	7,8	4,0	4,6	4,7	5,2	5,4	4,4

Figura 1: Albero filogenetico dei virus oggetto di questo studio.

