

Zakażenia wirusem choroby dzioba i piór papug w Polsce

TOMASZ PIASECKI, ALINA WIELICZKO, MACIEJ KUCZKOWSKI

Katedra Epizootologii i Administracji Weterynaryjnej z Kliniką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Piasecki T., Wieliczko A., Kuczkowski M.

Psittacine beak and feather disease virus infection in Poland

Summary

Psittacine beak and feather disease (PBFD) is the most common viral disease of captive and wild psittacine birds. The aim of the study was to investigate the presence of psittacine beak and feather disease virus (PBFDV) inside the population of captive psittacine birds in Poland. DNA was isolated from the feathers of 225 birds from 33 different species. The presence of PBFDV was analyzed by performing polymerase chain reaction assays. PBFDV was found in 47 (20.9%) birds. The previous high incidence of PBFDV infection in Poland was due to the lack of diagnostics means and insufficient control of imported birds.

Keywords: psittacine beak and feather disease, PBFD, psittacine birds

Ptaki egzotyczne, a zwłaszcza różne gatunki papug cieszą się w naszym kraju coraz większą popularnością. Dla wielu ludzi są one alternatywą posiadania psa czy kota, szczególnie „duże papugi” (różne gatunki amazonek, kakadu, ar oraz żako). Coraz częściej zwierzęta te pochodzą z krajowych hodowli, jednak w dalszym ciągu większość ich jest importowana z różnych stron świata. W wielu przypadkach import ten jest nielegalny, a co za tym idzie, brak jest nadzoru sanitarno-weterynaryjnego oraz przestrzegania zasad kwarantanny. Taki stan rzeczy sprzyja pojawianiu się w naszym kraju nowych chorób zakaźnych, specyficznych dla tej grupy ptaków. Przykładem jest opisany przez Piaseckiego i wsp. w 2004 r. syndrom rozszerzenia żołądka gruczołowego u papug (13).

Pierwsze przypadki choroby dzioba i piór papug zostały stwierdzone i udokumentowane na początku lat 70. ubiegłego wieku u różnych gatunków kakadu w Australii. W latach 80. XX wieku choroba ta została uznana za najbardziej znaczącą infekcję u papugowych i była stwierdzana już w wielu hodowlach na całym świecie (6, 7, 18). W Polsce dotychczas nie prowadzono badań nad występowaniem u papug zakażeń wywołanych przez wirus PBFD.

Choroba dzioba i piór papug wywoływana jest przez Psittacine Beak and Feather Disease Virus – PBFDV należący do rodzaju *Circovirus* i rodziny *Circoviridae*. Do rodziny tej należą również inne ptasie cirkowirusy, takie jak: cirkowirus gołębi (*Pigeon circovirus* – PiCV), cirkowirus gęsi (*Goose circovirus* – GCV), cirkowirus kanarków (*Canary circovirus* – CaCV)

oraz wirus zakaźnej anemii kurcząt (*Chicken Anaemia Virus* – CAV), z tym że ten ostatni należy do rodzaju *Gyrovirus* (1, 5, 7, 8, 10, 12, 19).

Genom wirusa PBFD zbudowany jest z pojedynczej, kolistej nici DNA, otoczony kulistym kapsydem o średnicy 14-21 nm. Zaliczany jest do najmniejszych patogennych wirusów. Zawiera on dwie główne, otwarte ramki odczytu ORF 1 i ORF 2, które kodują odpowiednio białko związane z replikacją (Rep) i białko kapsydu (CP) (1, 2, 6, 10). Są to najbardziej konserwatywne regiony w genomie PBFDV stwierdzane we wszystkich izolatach tego wirusa i wykorzystywane w diagnostyce molekularnej (2, 20).

Do zakażenia wirusem PBFD dochodzi przez kontakt bezpośredni i pośredni z odchodami, wydzieliną z wola oraz ze złuszczonego naskórkiem chorych ptaków. Najwięcej cząstek wirusa znajduje się w złuszczonego naskórku, który stanowi główny składnik pudru piór (15). Niewykluczona jest również transmisja drogą pionową (4, 14). Na zakażenie podatne są papugowe (*Psittaciformes*), przy czym najbardziej wrażliwe są osobniki młode, do 3. roku życia. Wirus wykazuje powinowactwo do komórek układu powłokowego oraz układu odpornościowego. W pierwszej kolejności atakowane są: torba Fabrycjusza i grasica, w których powstają ogniska martwicy, a narządy te ulegają atrofii. Rozwija się silna immunosupresja i dochodzi do wtórnych infekcji wirusowych, bakteryjnych i grzybiczych, które są najczęściej bezpośrednią przyczyną śmierci zakażonych papug. Klinicznie choroba objawia się osłabieniem, wychudzeniem, a przede wszyst-

kim zaburzeniami w rozwoju upierzenia. Pióra wykazują różny stopień uszkodzenia, często występuje hiperkeratoza pochwy pióra, która prowadzi do jej pogrubienia, zamknięcia i powstania torbieli. Rosnące pióra są krótkie, czasem skrócone i często łamią się przy skórze. Stosina odrastających piór posiada charakterystyczne przewężenie (kształt klepsydry) tuż nad skórą. Dochodzi do nadmiernej utraty piór, która pogłębia się z każdym pierzeniem. Histologicznie w przebiegu PBFD obserwuje się występowanie bazofilnych wewnątrzjądrowych i wewnątrzcytoplazmatycznych ciałek wtretowych w obrębie nabłonka zakażonych piór i makrofagach (7, 14, 18).

W diagnostyce PBFD najczęściej wykorzystywane były badania histopatologiczne oraz serologiczne (7, 14, 17), które obecnie coraz częściej są uzupełniane bądź zastępowane doskonalszymi technikami, w tym reakcją PCR (3, 11, 16, 20).

Celem podjętych badań było określenie częstotliwości występowania zakażeń wirusem choroby dzioba i piór papug hodowanych w Polsce z zastosowaniem w diagnostyce metod biologii molekularnej.

Materiał i metody

Badaniami objęto 225 papug z 33 gatunków pochodzących od prywatnych hodowców z terenu Polski. Badane ptaki podzielono na grupy, stosując dwa kryteria podziału: stan kliniczny oraz wielkość hodowli. Na podstawie stanu klinicznego badanych papug podzielono je na 3 grupy: grupę 1. stanowiły osobniki klinicznie zdrowe, grupa 2. to ptaki, u których obserwowano zaburzenia w pierzeniu oraz uszkodzenia piór i grupa 3. to ptaki padłe dostarczone do badania sekcijnego. Biorąc pod uwagę wielkość hodowli, z której pochodziły papugi, również podzielono je na 3 grupy: grupa 1. to ptaki pochodzące z amatorskich hodowli liczących od 1 do 3 osobników, grupa 2. to hodowle liczące 4-10 osobników i grupa 3. to profesjonalne hodowle liczące więcej niż 10 ptaków.

Do badań pobierano od papug pióra (6-8 szt.) z okolicy mostka i podbrzusza, z których izolowano DNA. Izolację wykonywano przy użyciu kolumnienek Genomic DNA Prep Plus® (A&A Biotechnology, Gdynia) zgodnie z technologią podaną przez producenta. Uzyskane DNA wykorzystano jako matrycę w reakcji PCR, do której użyto pary starterów: P₂ – 5'-AAC CCT ACA GAC GGC GAG-3' (182-199) oraz P₈ – 5'-ACA GGA GGA GTA GCC GTA TT-3' (879-898) zaprojektowanych dla sekwencji ORF 1 wirusa PBFD (20).

Reakcje PCR prowadzono w termocyklerze Biometra Uno-Thermoblock w objętości 50 µl. Mieszanina reakcyjna zawierała: 1 µl matrycowego DNA (z piór), 5 µl buforu do PCR (10 × buffer for DyNAzyme DNA Polymerase, Polygen), 1 µl 10 mM mieszaniny nukleotydów dNTP (dATP, dCTP, dGTP i dTTP – Polygen), po 1 µl każdego ze starterów, 40 µl wody bidestylowanej oraz 2 U polimerazy Taq (Polygen). Amplifikację prowadzono w następujących warunkach: denaturacja wstępna 96°C przez 5 min., następnie 32 cykle (96°C 30 s., 60°C 30 s., 72°C 90 s.), elongacja końcowa w 72°C przez 5 min. Produkty amplifikacji

Tab. 1. Występowanie zakażeń PBFDV u papug w Polsce z uwzględnieniem badanych gatunków (polskie nazwy ptaków wg Mielczarek P., Cichocki W. (9))

Gatunek	Liczba badanych	Liczba zakażonych
<i>Agapornis sp.</i> Nierozłęczki	5	4
<i>Alisterus scapularis</i> Szkarałtka królewska	2	2
<i>Amazona aestiva</i> Amazonka niebieskoczelna	31	2
<i>Amazona amazonica</i> Amazonka modrobrwa	8	0
<i>Amazona farinosa</i> Amazonka skromna	3	0
<i>Amazona festiva</i> Amazonka czerwonooczelna	5	0
<i>Amazona leucocephala</i> Amazonka kubańska	3	0
<i>Amazona ochrocephala</i> Amazonka żółtogłowa	2	1
<i>Aprosmictus erythropterus</i> Krasnopiórka czerwonoskrzydła	4	4
<i>Ara ararauna</i> Ara ararauna	20	1
<i>Ara chloropterus</i> Ara zielonoskrzydła	6	0
<i>Cacatua alba</i> Kakadu biała	2	0
<i>Cacatua goffini</i> Kakadu białoocza	1	0
<i>Cacatua moluccensis</i> Kakadu molucka	1	0
<i>Eclectus roratus</i> Barwnica	5	0
<i>Melopsittacus undulatus</i> Papuzka falista	5	1
<i>Myiopsitta luchi</i> Mnicha górską	1	0
<i>Nymphicus hollandicus</i> Nimfa	2	0
<i>Orthopsittaca manilata</i> Ara żółtolica	2	0
<i>Pionites melanocephala</i> Barwinka czarnogłowa	2	0
<i>Platycercus elegans</i> Rozella królewska	2	2
<i>Platycercus eximius</i> Rozella białolica	3	1
<i>Poicephalus robustus</i> Atrykanka zielonorytna	3	1
<i>Poicephalus senegalus</i> Atrykanka ognistobrzucha	6	0
<i>Prohosciger aterrimus</i> Żałobnica palmowa	1	1
<i>Psephenus sp.</i> Świergotki	1	1
<i>Psittacula alexandri</i> Aleksandretta różana	2	2
<i>Psittacula cyanocephala</i> Aleksandretta śliwogłowa	2	2
<i>Psittacula debrina</i> Aleksandretta chińska	1	0
<i>Psittacula eupatria</i> Aleksandretta większa	1	0
<i>Psittacula krameri</i> Aleksandretta obrożna	15	8
<i>Psittacus erithacus</i> Żako	71	12
<i>Trichoglossus haematodus</i> Lorysa górską	7	1
Ogółem	225	47

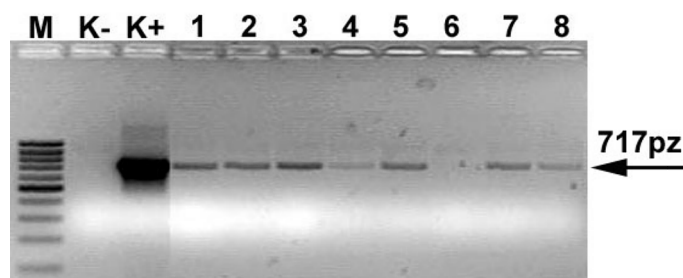
rozdzielone zostały metodą elektroforezy w 2% żelu agarozowym. Żel barwiono roztworem bromku etydyny. Do określenia wielkości produktu amplifikacji użyto dwóch markerów firmy Sigma (Step Ladder 50 bp, PCR 100 bp Low Ladder Buffered aqueous solution). Kontrolę pozytywną stanowiło DNA cirkowirusa papug (PBFDV) otrzymane od profesora G. M. Dorresteina z Uniwersytetu w Utrechcie, Holandia.

Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania wykazały obecność DNA wirusa PBFD u 47 spośród 225 badanych papug, co stanowi 20,9% (tab. 1, ryc. 1). U ptaków klinicznie zdrowych odsetek ten wynosił 21,9%, podobnie u osobników z uszkodzonymi piórami i zaburzeniami w pierzeniu 20,8%, natomiast u papug padłych dostarczanych do badania sekcijnego był znacznie niższy i wynosił 8,7% (tab. 2). Analizując występowanie zakażeń PBFDV u papug w zależności od wielkości hodowli, z jakiej pochodziły, uzyskano następujące wyniki. W hodowlach amatorskich odsetek zakażonych papug wynosił 13,2% i był znacznie niższy w stosunku do hodowli średnich i dużych, gdzie zakażonych osobników było odpowiednio 20,7% i 24,2%. W odniesieniu do samych hodowli stwierdzono 13,2% zakażonych małych hodowli, 40,0% średnich i 71,0% dużych (tab. 3).

Przeanalizowano również częstotliwość występowania zakażeń PBFDV w zależności od geograficznego pochodzenia papug. U papug Nowego Świata (Ameryka Północna, Środkowa i Południowa) odsetek zakażonych ptaków wynosił 4,8%, a u gatunków wywodzących się ze Starego Świata (Afryka, Azja, Europa) wynosił 27,4%. Najwięcej, bo aż 38,9%, było zakażonych papug australijskich (tab. 4). Obserwacja ta potwierdza wcześniejsze publikacje różnych autorów wskazujące na zdecydowanie mniejszą podatność papug Nowego Świata na zakażenie wirusem PBFD (3, 14).

Pomimo że choroba dzioba i piór papug znana jest już od ponad 35 lat, to w krajach europejskich nie prowadzono badań dotyczących częstotliwości jej występowania u hodowanych papug. Pierwsze takie badania zostały wykonane dopiero w latach 2000-2004 we Włoszech i Niemczech (3, 16). Badania prowadzone w Niemczech przez Rahaus i Wolffa (16) na 146 klinicznie zdrowych papugach wykazały obecność cirkowirusa u 39,2%. Jest to blisko dwukrotnie wyższy odsetek ptaków zakażonych w porównaniu do wyników własnych. We Włoszech odsetek zakażonych papug okazał się zdecydowanie niższy i wyniósł tylko 8,05% przy przebadanej liczbie 1516 papug (3). Rozbieżność przedstawionych wyników związana jest najprawdopodobniej z wykorzystaniem różnego materiału pobieranego do badań. Badacze niemieccy, podobnie jak w niniejszych badaniach, od papug pobierali pióra,



Ryc. 1. Wyniki amplifikacji próbek DNA izolowanego z piór papug

Objaśnienia: M – marker PCR 100bp Low Ladder Buffered aqueous solution; K(-) – kontrola ujemna; K(+)- kontrola dodatnia; 1, 2, 3... – badane próbki

Tab. 2. Występowanie zakażeń PBFDV u papug w zależności od stanu klinicznego, w jakim znajdowały się ptaki podczas pobierania próbek do badania

Stan kliniczny papug	Liczba ptaków badanych	Liczba (%) ptaków zakażonych
Klinicznie zdrowe	178	39 (21,9)
Uszkodzenia piór, zaburzenia w pierzeniu	24	5 (20,8)
Osobniki martwe	23	2 (8,7)
Ogółem	225	47 (20,9)

Tab. 3. Występowanie zakażeń PBFDV u papug w zależności od wielkości hodowli, z której badane ptaki pochodziły

Wielkość hodowli	Liczba hodowli badanych	Liczba (%) hodowli zakażonych	Liczba ptaków badanych	Liczba (%) ptaków zakażonych
Hodowle amatorskie (1-3 osobniki)	68	9 (13,2)	68	9 (13,2)
Hodowle małe (4-10 osobników)	10	4 (40,0)	29	6 (20,7)
Hodowle profesjonalne (powyżej 10 osobników)	7	5 (71,0)	128	31 (24,2)
Ogółem	85	18 (21,2)	225	47 (20,9)

Tab. 4. Występowanie zakażeń PBFDV u papug w zależności od ich geograficznego pochodzenia

Pochodzenie	Liczba gatunków	Liczba ptaków badanych	Liczba (%) ptaków zakażonych
Papugi Nowego Świata	11	83	4 (4,8)
Papugi Starego Świata	9	106	29 (27,4)
Papugi Australii i Oceanii	13	36	14 (38,9)
Ogółem	33	225	47 (20,9)

z których izolowali DNA do dalszych analiz. Natomiast materiałem, z którego izolowano DNA we Włoszech, była krew papug. W związku z różnicami w metodyce badań wyniki te nie są porównywalne. Z kolei w badaniach amerykańskich, wykonanych w latach dziewięćdziesiątych XX wieku, do których używano DNA izolowanego z krwi papug, częstotli-

wość zakażeń wirusem PBFD wynosiła 5% i została uznana za bardzo wysoką. To skłoniło autorów do prowadzenia monitoringu zakażeń PBFDV, który wykazał w kolejnych latach spadek liczby zakażonych papug. Po 5 latach od pierwszych badań odsetek papug zakażonych cirkowirusem wynosił 3,5% (4).

W ostatnich latach choroba dzioba i piór papug stanowi coraz większy problem w Afryce. Jak podaje Heath i wsp. (6), w hodowlach papug w Południowej Afryce każdego roku z powodu PBFD ginie 10-20% piskląt. Choroba ta w tej części Afryki występuje endemicznie i spotykana jest coraz częściej u wolno żyjących gatunków papug, zwłaszcza u *Poicephalus robustus* i *Agapornis nigrigenis*. Papugi z tych hodowli, jak również odławiane ze środowiska naturalnego, w dużej części trafiają na rynek europejski i mogą stanowić istotne ogniwo w łańcuchu epizootycznym tej jednostki chorobowej.

Reasumując, zastosowana technika PCR pozwoliła na wykrycie obecności DNA cirkowirusa w krajowej populacji papug. Na tak wysoki odsetek zakażonych wirusem PBFD papug w naszym kraju składa się wiele czynników. Za najważniejszy należy uznać brak dotychczasowych możliwości diagnostycznych, co uniemożliwiało wykonywanie badań profilaktycznych, a tym samym eliminowanie ptaków zakażonych z hodowli. Kolejnym czynnikiem odgrywającym istotną rolę w rozprzestrzenianiu się chorób zakaźnych papug jest słaba kontrola lub jej brak podczas importu tych ptaków.

Piśmiennictwo

1. Bassami M. R., Berryman D., Wilcox G. E., Raidal S. R.: Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses and chicken anaemia virus. *Virology* 1998, 249, 453-459.
2. Bassami M. R., Ypelaar I., Berryman D., Wilcox G. E., Raidal S. R.: Genetic diversity of beak and feather disease virus detected in psittacine species in Australia. *Virology* 2001, 279, 392-400.
3. Bert E., Tomassone L., Peccati C., Navarrete M. G., Sola S. C.: Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. *J. Vet. Med. B* 2005, 52, 64-68.
4. Dahlhausen M. S., Radabaugh M. S.: Update on Psittacine beak and feather disease and avian polyomavirus – epidemiology and diagnostics. *Proc. MASAAV Conference* 1997, s. 51-57.
5. Hattermann K., Soike D., Grund C., Mankertz A.: A method to diagnose Pigeon circovirus infection in vivo. *J. Virol. Meth.* 2002, 104, 55-58.
6. Heath L., Martin D. P., Warburton L., Perrin M., Horsfield W., Kingsley Ch., Rybicki E. P., Williamson A. L.: Evidence of unique genotypes of beak and feather disease virus in South Africa. *J. Virol.* 2004, 78, 9277-9284.
7. Kiatipattanasakul-Banlunara W., Tantileartcharoen R., Katayama K., Suzuki K., Lekdumrogsak T., Nakayama H., Doi K.: Psittacine beak and feather disease in three captive sulphur-crested cockatoos (*Cacatua galerita*) in Thailand. *J. Vet. Med. Sci.* 2002, 64, 527-529.
8. Mankertz A., Hattermann K., Ehlers B., Soike D.: Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. *Arch. Virol.* 2000, 145, 2469-2479.
9. Mielczarek P., Cichocki W.: Polskie nazewnictwo ptaków świata. *Not. Orn.*, zeszyt specjalny 1999, 40.
10. Niagro F. D., Forsthoefel A. N., Lawther R. P., Kamalanathan L., Ritchie B. W., Latimer K. S., Lukert P. D.: Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Virol.* 1998, 143, 1723-1744.
11. Ogawa H., Yamaguchi T., Fukushi H.: Duplex shuttle PCR for differential diagnosis of budgerigar fledgling disease and psittacine beak and feather disease. *Microbiol. Immunol.* 2005, 49, 227-237.
12. Phenix K. V., Weston J. H., Ypelaar I., Lavazza A., Smyth J. A., Todd D., Wilcox G. E., Raidal S. R.: Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *J. Gen. Virol.* 2001, 82, 2805-2809.
13. Piasecki T., Dzimir S., Wieliczko A.: Syndrom rozszerzenia żołądka gruczołowego u papug. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 622-625.
14. Ritchie B. W., Carter K.: Avian viruses: function and control. *Wingers Publishing, Inc.*, Lake Worth, Florida 1995, 223-252.
15. Ritchie P. A., Anderson I. L., Lambert D. M.: Evidence of specificity of psittacine beak and feather disease viruses among avian hosts. *Virology* 2003, 306, 109-115.
16. Rahaus M., Wolff M.: Psittacine beak and feather disease: a first survey of the distribution of beak and feather disease virus inside the population of captive psittacine birds in Germany. *J. Vet. Med. B* 2003, 50, 368-371.
17. Sanada N., Sanada Y.: The sensitivities of various erythrocytes in a haemagglutination assay for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *J. Vet. Med. B* 2000, 47, 441-443.
18. Sanada Y., Sanada N., Kubo M.: Electron mikroskopical observations of psittacine beak and feather disease in an umbrella cockatoo (*Cacatua alba*). *J. Vet. Med. Sci.* 1999, 61, 1063-1065.
19. Shivaprasad H. L., Hill D., Todd D., Smyth J. A.: Circovirus infection in a Gouldian finch (*Chloebia gouldiae*). *Avian Pathol.* 2004, 33, 525-529.
20. Ypelaar I., Bassami M. R., Wilcox G. E., Raidal S. R.: A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Vet. Microbiol.* 1999, 68, 141-148.

Adres autora: dr Tomasz Piasecki, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław;
e-mail: piamot@op.pl