

Kliniczne przypadki choroby dzioba i piór u papużek falistych w Polsce

TOMASZ PIASECKI, MARCIN NOWAK*, ALINA WIELICZKO

Katedra Epizootologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

*Katedra Patologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP we Wrocławiu, ul. C. K. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Piasecki T., Nowak M., Wieliczko A.

Clinical cases of psittacine beak and feather disease virus in budgerigars in Poland

Summary

Psittacine beak and feather disease (PBFD) is the most common viral disease of captive and wild psittaciformes globally. To our knowledge, this is the first case of PBFD in budgerigars in Poland with complete histopathological and molecular diagnosis. In 2008-2009 three aviaries with 15-46 breeding pairs were investigated. It was observed that in 30.6-48.8% young chicks infected by PBFDV progressive feather malformation occurs, especially in remiges and rectrices. The developing feathers were shorter, with the calamus having a very characteristic „hour-glass” shape, with the rachis beyond this point being dried out and lifeless.

All seventy-four birds were divided into three groups; one group containing adult birds, the second one young budgerigar (28-35 days old) without changes in their feathers, and the last one containing young birds with feather malformation. The presence of the PBFDV and APV in the feathers were evaluated using PCR methods. In addition to this, malformed feathers were subjected to histopathological investigation.

The results of PCR assay have shown that 90.9% of adult birds and 100% young chicks were positive to PBFDV whereas none of them was positive to APV. Histopathological changes included, among others, the occurrence of typical, basophilic nuclear and cytoplasmic inclusions in the epithelium of feathers in 18 cases (75.0%).

Keywords: avian polyomavirus, psittacine beak and feather virus, budgerigar, PCR

Papużka falista (*Melopittacus undulatus*) to bez wątpienia najpopularniejszy gatunek spośród papugowych (*Psittaciformes*) hodowanych przez ludzi. Jej ojczyzną jest Australia, gdzie gatunek ten występuje głównie w południowo-wschodniej i południowo-zachodniej części kontynentu. Zamieszkuje równiny porośnięte trawą, żywi się nasionami i bytuje przeważnie w stadach, złożonych z 20-100 sztuk. W okresie migracji stada mogą liczyć nawet po kilka tysięcy osobników (7).

Pierwszą parę tych ptaków do Europy przywiózł z Australii znany ornitolog John Gould w latach 40. XIX wieku. Papużki faliste dobrze znosiły aklimatyzację i dość szybko zaczęto je rozmnażać w warunkach hodowlanych, wtedy też pojawiły się różne mutacje barwne, które dodatkowo zwiększyły atrakcyjność hodowli tych ptaków. Obecnie papużki faliste można spotkać praktycznie w każdym sklepie zoologicznym, a ludzie ciągle chętnie je kupują. To sprawia, że wiele osób zajmuje się hodowlą tych ptaków na wielką skalę w celu zaopatrywania sklepów zoologicznych.

Choroba dzioba i piór papug (Psittacine Beak and Feather Disease – PBFD) jest zakaźną i zaraźliwą chorobą papug wywoływaną 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, 4, 8, 9, 11, 19). Genom wirusa PBFD zbudowany jest z pojedynczej, kolistej nici DNA, otoczonej 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, 5, 9). Są to najbardziej konserwatywne regiony w genomie PBFDV stwierdzane we wszystkich izolatach tego wirusa i wykorzystywane w diagnostyce molekularnej (10, 20).

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 (2, 3, 5, 14, 16-18). W Polsce, jak wynika z badań przeprowadzonych w latach 2006-2009, w których łącznie zbadano 751 klinicznie zdrowych papug z 59 gatunków, wirusa PBFD stwierdzono u 25,3% (12, 13).

Niniejsze opracowanie dotyczy pierwszych w Polsce klinicznych przypadków choroby dzioba i piór papug u papużek falistych, które zostały w pełni zdiagnozowane i potwierdzone badaniami histopatologicznymi oraz molekularnymi.

Materiał i metody

W 2008 r. zgłosiło się do Ambulatorium dla Zwierząt przy Katedrze Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP we Wrocławiu 3 hodowców papużek falistych, którzy obserwowali u młodych ptaków różnie nasilone zmiany w upierzeniu. Zmiany dotyczyły przede wszystkim piór długich, lotek i sterówek. Wyrastające pióra były krótsze, dudka posiadała charakterystyczne przewężenie w kształcie klepsydry, a stosina znajdująca się powyżej tego przewężenia ulegała wyschnięciu i obumarciu. W mieszkaniu pióra pozostawała tylko niekształcona dudka. Papugi takie bardzo słabo fruwały bądź w ogóle nie miały zdolności do lotu. W każdym lęgu od poszczególnych par znajdowały się zarówno osobniki z uszkodzonymi piórami, jak również w pełni opierzone, jednak z biegiem czasu procentowy udział chorych papużek wzrastał. Objawy kliniczne charakteryzujące się ubytkami w upierzeniu nasuwały podejrzenie choroby francuskiego pierzenia papużek falistych wywołwanego przez polyomawirus (Avian polyomavirus – APV).

Badania przeprowadzono w latach 2008-2009, objęto nimi 3 obiekty hodowlane (hodowla nr 1, 2, 3), w których utrzymywano od 15 do 46 par lęgowych papużek falistych (tab. 1). Poszczególne hodowle mieściły się w pomieszczeniach zamkniętych, w których klatki z pojedynczymi parami ptaków umieszczone były na regałach. Warunki zoohigieniczne pomieszczeń były zróżnicowane, wszystkie posiadały wentylację grawitacyjną, oświetlenie naturalne i dodatkowo oświetlenie sztuczne. Papugi karmione były mieszankami przeznaczonymi dla małych papug z dodatkami owoców i warzyw, a podczas lęgów dodatkowo dostawały pokarm jajeczny.

Papużki faliste w monitorowanych hodowlach przystępowały do lęgów w ciągu całego roku, każda para wyprowadzała w roku od 4 do 6 lęgów. Określano liczbę odchowanych piskląt w wieku 28-35 dni oraz odsetek papużek klinicznie zdrowych i z zaburzeniami w upierzeniu (częściowy lub zupełny brak lotek i sterówek).

Do badań laboratoryjnych pobrano materiał od 74 papug, które podzielono na trzy grupy: ptaki dorosłe (pary lęgowe), papugi młode (28-35 dni) kompletnie opierzone i papugi młode z zaburzeniami w rozwoju piór. Od papug dorosłych i młodych, klinicznie zdrowych pobierano pióra (8-10 szt.) z okolicy mostka i podbrzusza, od młodych z zaburzeniami w pierzeniu pobierano pióra uszkodzone i nierozwinięte (lotki i sterówki). Z wszystkich piór izolowano DNA, przy czym z piór uszkodzonych dodatkowo wykonywano preparaty histopatologiczne.

Izolację DNA wykonywano przy użyciu kolumniłek Genomic DNA Prep Plus® (A&A Biotechnology, Gdynia) zgodnie z technologią podaną przez producenta. Uzyskane DNA wykorzystano jako matrycę w reakcji PCR.

Badanie PCR w kierunku PBFDV. Do reakcji użyto pary starterów: P₂ – 5'-AAC CCT ACA GAC GGC GAG-3' (182-199) oraz P₄ – 5'-GTC ACA GTC CTC CTT GTA CC-3' (879-898) zaprojektowanych dla sekwencji ORF 1 wirusa PBFD (20). Reakcję PCR prowadzono w MJ Mini Personal Thermal Cycler BioRad w objętości 25 µl. Mieszanina reakcyjna zawierała: 100 ng matrycowego DNA (z piór), 2,5 µl buforu do PCR (10x REDTaq PCR Reaction Buffer, Sigma), 1 U polimerazy REDTaq DNA (Sigma), 200 µM mieszaniny dNTP (Sigma) oraz po 25 pmol każdego z primerów. 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.

Badanie PCR w kierunku APV. Do reakcji użyto pary starterów: 5'-CAA GCA TAT GTC CCT TTA TCC C-3' (4303-4324) oraz 5'-CTG TTT AAG GCC TTC CAA GAT G-3' (4,612-4,591) opracowanej przez Johna i Müllera (6). Reakcję PCR prowadzono w MJ Mini Personal Thermal Cycler BioRad w objętości 25 µl. Mieszanina reakcyjna zawierała: 100 ng matrycowego DNA (z piór), 2,5 µl buforu do PCR (10x REDTaq PCR Reaction Buffer, Sigma), 1 U polimerazy REDTaq DNA (Sigma), 200 µM mieszaniny dNTP (Sigma) i po 25 pmol każdego z primerów. Amplifikację prowadzono w następujących warunkach: denaturacja wstępna 95°C przez 5 min., następnie 35 cykli (94°C 30 s., 60°C 30 s., 72°C 30 s.), elongacja końcowa w 72°C przez 10 min.

Produkty amplifikacji 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).

Pióra do badań histopatologicznych utrwalono w 10% zbuforowanej formalinie, zatopiono w parafinowe bloczki, krojono na skrawki o grubości 5 µm i barwiono standardowo hematoksyliną i eozyną.

Wyniki i omówienie

Ptaki dorosłe z par rodzicielskich posiadały prawidłowe w pełni rozwinięte pióra, jak również nie wykazywały żadnych klinicznych objawów chorobowych. Młode osobniki opuszczające budki lęgowe były żywotne, zachowywały się normalnie, przy czym u 30,6% do 48,8% występowały zaburzenia w rozwoju lotek i sterówek (tab. 1). Papugi z uszkodzonymi piórami w większości przypadków były niezdolne do lotu. W monitorowanych hodowlach nie obserwowano podwyższonej śmiertelności wśród piskląt. Przeprowadzone badania molekularne nie wykazały obecności DNA ptasiego polyomawirusa (Avian polyomavirus – APV) wywołującego francuskie pierzenie papużek falistych

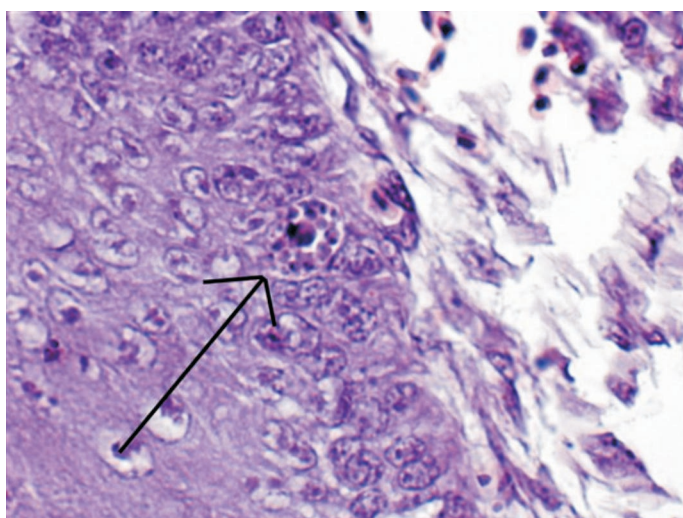
Tab. 1. Liczba par lęgowych oraz młodych papużek falistych w poszczególnych hodowlach i występowanie zaburzeń w rozwoju piór

Hodowla	Sezon lęgowy	Liczba par lęgowych	Liczba uzyskanych młodych w wieku 28-35 dni	Liczba (%) ptaków z zaburzeniami w upierzeniu
1	2008	15	307	94 (30,6)
2	2008	22	454	142 (31,3)
3	2008	46	934	456 (48,8)

Tab. 2. Występowanie APV, PBFVDV oraz zmian histopatologicznych w poszczególnych grupach badanych papużek falistych

Grupa	Liczba badanych ptaków	Liczba (%) wyników dodatnich		
		APV	PBFVDV	Badanie histopatologiczne
Ptaki dorosłe	22	0	20 (90,9)	nb*
Młode, klinicznie zdrowe	28	0	28 (100,0)	nb*
Młode, zaburzenia w upierzeniu	24	0	24 (100,0)	18 (75,0)

Objaśnienie: nb* – nie badano



Ryc. 1. Bazofilne wewnątrzcytoplazmatyczne ciało wtrętowe w obrębie nabłonka zmienionej dudki pióra papużki falistej

w żadnej z badanych prób. Potwierdzono natomiast obecność wirusa PBFVDV u 20 spośród 22 badanych dorosłych papug, co stanowi 90,9% oraz u 100% młodych osobników. W badaniach histopatologicznych stwierdzono u 18 spośród 24 badanych ptaków typowe bazofilne wewnątrzjądrowe i wewnątrzcytoplazmatyczne ciała wtrętowe w obrębie nabłonka zmienionych piór (tab. 2, ryc. 1).

Z powyższych badań wynika, że w większości przypadków dorosłe papużki faliste w badanych hodowlach były nosicielami i siewcami wirusa PBFVDV. Potomstwo takich ptaków ulegało w 100% zakażeniu. Jednak postać kliniczna choroby rozwinęła się maksymalnie u 48,8% ptaków. Przebieg obserwowanego PBFVDV u papużek był łagodny i charakteryzował się jedynie zaburzeniami w rozwoju lotek i sterówek. Ptaki, u których rozwinęła się bezobjawowa postać PBFVDV, stanowią realne zagrożenie dla nowych właścicieli, którzy wprowadzają je do swoich hodowli. Działanie immunosupresyjne wirusa PBFVDV może doprowadzić do wtórnych infekcji wirusowych, bakteryjnych i grzybiczych. Ramis i wsp. (15) opisali jednocześnie zakażenie papużek falistych wirusem PBFVDV i APV, które charakteryzowało się wysoką śmiertelnością. W badaniach tych ptaki dorosłe, podobnie jak w badaniach własnych, były bezobjawowymi nosicielami, a osobniki młode ulegały

w 100% zakażeniu. Jednak jednocześnie wystąpienie wirusa PBFVDV i APV spowodowało śmierć 85% piskląt do 2. tygodnia życia. U pozostałych występowała biegunka i zaburzenia w rozwoju piór (lotek i sterówek) i w dalszym ciągu występowała podwyższona śmiertelność, która doprowadziła pomiędzy 5. a 10. tygodniem życia do 30% upadków (15).

Reasumując, PBFVDV u papużek falistych objawia się przede wszystkim zaburzeniami w rozwoju lotek i sterówek. Kolejnym działaniem wirusa PBFVDV jest uszkodzenie układu immunologicznego, co może doprowadzić do wtórnych infekcji, a te z kolei mogą powodować bardzo wysoką śmiertelność.

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. 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.
3. Dahlhausen M. S., Radabaugh M. S.: Update on Psittacine beak and feather disease and avian polyomavirus – epidemiology and diagnostics. *Proc. MASAAC Conference* 1997, s. 51-57.
4. Hattermann K., Soike D., Grund C., Mankertz A.: A method to diagnose Pigeon circovirus infection in vivo. *J. Virol. Meth.* 2002, 104, 55-58.
5. 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.
6. Johne R., Müller H.: Avian polyomavirus in wild birds: genome analysis of isolates from Falconiformes and Psittaciformes. *Arch. Virol.* 1998, 143, 1501-1512.
7. Juniper T., Parr M.: Parrots. A guide to parrots of the world. Yale University Press, New Haven and London 2003.
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. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Piasecki T., Wieliczko A.: Detection of Beak and Feather Disease Virus (BFDV) and Avian Polyomavirus (APV) DNA in Psittacine Birds in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2010, 54, 141-146.
13. Piasecki T., Wieliczko A., Kuczkowski M.: Zakażenia wirusem choroby dzioba i piór papug w Polsce. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 1220-1223.
14. 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.
15. Ramis A., Latimer K. S., Gibert X., Campagnoli R.: A concurrent outbreak of psittacine beak and feather disease virus, and avian polyomavirus infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Avian Pathol.* 1998, 27, 43-50.
16. Ritchie B. W., Carter K.: Avian Viruses: Function and Control. Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida 1995, s. 223-252.
17. 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.
18. Sanada Y., Sanada N., Kubo M.: Electron microscopical observations of psittacine beak and feather disease in an umbrella cockatoo (*Coccyzus 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: tomasz.piasecki@up.wroc.pl