

## INDAGINI DIAGNOSTICHE IN EPISODI DI CORIZZA DEL FAGIANO RIPRODUTTORE

Di Castri A.<sup>1</sup>, Cornaggia M.<sup>1</sup>, Viel L.<sup>1</sup>, Losasso C.<sup>2</sup>, Orsini M.<sup>2</sup>, Peruzzo A.<sup>2</sup>, Catania S.<sup>3</sup>, Zanardello C.<sup>4</sup>, Gobbo F.<sup>5</sup>, Bano L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratorio di Diagnostica Clinica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Vicolo Giuseppe Mazzini, 4, 31020 Villorba (TV), Italia.*

<sup>2</sup> *Laboratorio di Ecologia Microbica e Genomica dei Microrganismi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (PD), Italia.*

<sup>3</sup> *Laboratorio di Medicina Aviare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via S. Giacomo, 5, 37135 Verona (VR), Italia.*

<sup>4</sup> *Laboratorio di Istopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (PD), Italia.*

<sup>5</sup> *Virologia Speciale e Sperimentazione, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (PD), Italia.*

### Summary

Sinusitis or “bulgy eyes” is one of the most common infectious disease of breeding pheasants. The condition is often associated with the presence of a complex of microorganisms including *Mycoplasma* spp., bacteria and viruses. In this report, we briefly describe the diagnostic remarks of breeding pheasants with sinusitis. In a 2 years period, five groups of birds of the same flock, were sent to the veterinary diagnostic laboratory for post-mortem examination. Some of them were at the onset of the clinical signs, others showed chronic lesions. As expected, we were able to detect a broad variety of different microorganisms including *Mycoplasma* spp. Among the bacteria, we isolated 2 new species that were recurrently present in the infraorbital sinuses of the diseased animals. The analysis of the genomes of the 2 isolates revealed that one belonged to the genus *Campylobacter*, species unknown, whereas the second one resulted completely unclassified at genus and species level. The pathogenic power of these new bacteria species needs to be further investigated in order to clarify their role in this multifactorial disease. Furthermore, the presence of a probably new *Campylobacter* species is worthy of note, especially if isolated from an unusual anatomic district of birds.

### INTRODUZIONE

La corizza infettiva è una malattia acuta respiratoria del pollame, causata da un coccobacillo Gram negativo denominato *Avibacterium paragallinarum*, un tempo noto come *Haemophilus paragallinarum* (Blackall and Soriano, 2008). Essa si presenta più frequentemente nel pollo, ma è stata descritta anche in altre specie come il tacchino, il fagiano, la faraona e la quaglia. (Blackall and Hinz, 2008)

Questa malattia colpisce primariamente le vie aeree superiori ed è caratterizzata da elevata morbilità e scarsa mortalità, ma poiché fortemente debilitante, causa gravi perdite in termini di incrementi ponderali giornalieri e di uova deposte (Blackall and Hinz, 2008).

Condizioni ambientali sfavorevoli e infezioni concomitanti, sostenute da altri bat-

teri (*Mycoplasma spp*, *Pasteurella spp* e *E. Coli*) e/o virus, predispongono a forme più severe e prolungate (Blackall and Hinz, 2008).

Secondo alcuni autori, solo il pollo (*Gallus gallus*) sarebbe sensibile all'infezione sostenuta da *A. paragallinarum*. Nelle specie sopra citate, un gran numero di batteri, di cui molti non ancora classificati e appartenenti alla famiglia *Pasteurellaceae* (Christensen *et al.*, 2009), sarebbe stato isolato da casi di malattia delle vie aeree superiori, ma nessuno di questi si identificherebbe con *A. paragallinarum* (Blackall and Chen, 2015).

Esiste poi un quadro ben noto come “corizza del tacchino”, sostenuto da un batterio completamente diverso, *Bordetella avium* (Jackwood and Saif, 2008). Pertanto, solo studi che si avvalgono di dettagliati approfondimenti di batteriologia o di biologia molecolare, possono realmente escludere o confermare il coinvolgimento di *A. paragallinarum* da specie che non ne costituiscono l'ospite naturale (Blackall and Soriano, 2008).

Il quadro di sinusite o “occhio gonfio” (bulgy eyes) è la manifestazione clinica più importante di malattia delle vie aeree superiori del fagiano (*Phasianus colchicus*), nonché la principale causa infettiva di morte nell'allevamento di questa specie, secondo alcuni autori (Pennycott, 2000; Welchman, 2016), già descritta a partire dal 1958 in UK (Keymer, 1961).

Studi condotti negli anni successivi hanno portato a credere che la sinusite del fagiano sia il risultato di una infezione sostenuta primariamente da Micoplasm, nello specifico da *M. gallisepticum*, e che altri agenti causali infettivi e non, giocherebbero un ruolo importante sulla gravità del quadro clinico osservato (Welchman *et al.*, 2002).

Scopo del presente lavoro è stato quello di indagare gli agenti infettivi coinvolti in episodi ricorrenti di sinusite, osservati in un allevamento di fagiani allevati a scopo venatorio.

## **MATERIALI E METODI**

### *Anamnesi e campionamento*

Nell'allevamento oggetto di studio, da circa quaranta anni, vengono allevati all'aperto fagiani di razza *Mongolia* a scopo venatorio, per un totale di circa 40.000 soggetti distribuiti su 6 ettari di terreno. Parte dei giovani adulti viene utilizzata come rimonta interna per sostenere il numero di circa 4.000 riproduttori, comprendenti maschi e femmine in rapporto di 1 a 7. I soggetti risultano regolarmente vaccinati per malattia di Newcastle, Vaiolo ed infezioni sostenute da *Pasteurella multocida* e *M. gallisepticum* (6/85). Da qualche anno vengono riportati casi di sinusite nei soggetti giovani a partire da 120-150 giorni di età. Questi casi tendono progressivamente ad aggravarsi, soprattutto nel periodo autunnale, e a cronicizzare nel gruppo dei riproduttori, nonostante i trattamenti con antimicrobici. La sintomatologia è caratterizzata da depressione del sensorio, scolo nasale accompagnato da rari starnuti e difficoltà respiratoria, quando sottoposti a manipolazione.

Dal 2019 al 2020, presso la sezione territoriale di Treviso dell'IZS delle Venezie sono stati conferiti sei gruppi di soggetti dell'allevamento sopra descritto, di età compresa tra i dieci mesi e i due anni, per un totale di 33 fagiani sottoposti ad esame anatomopatologico.

### *Esame batteriologico e ricerca Micoplasmi*

L'esame batteriologico è stato condotto dai seni infraorbitali di 23 soggetti con sinusite di vario grado, e dal sacco aereo di 4 soggetti con aerosacculite fibrinosa. Il materiale patologico prelevato attraverso tampone cotonato, è stato seminato su terreni di coltura, incubati a 37 °C in condizioni di aerobiosi (agar sangue ed eosin methylene blue agar) e microaerofilia (columbia agar con balia, agar cioccolato, brain heart infusion broth con aggiunta di NAD). L'identificazione delle colonie isolate è stata eseguita con metodi standard ed in ultima analisi mediante spettrometria di massa con tecnologia MALDI TOF MS (Maldi Biotyper, Bruker Daltonics), che permette l'identificazione batterica comparando lo spettro ottenuto da proteine fingerprint del ceppo in esame con quelli di ceppi noti presenti nel database collegato allo strumento. Qualora l'identificazione attraverso spettrometria di massa risultasse non attendibile a causa di una incompleta sovrapposizione tra i due tracciati spettrofotometrici o per assenza dello spettro corrispondente nel database, il ceppo veniva sottoposto ad ulteriori approfondimenti biochimici e biomolecolari. Questi ultimi si sono basati sul sequenziamento dell'intero genoma e assemblaggio con approccio De Novo (Cole et al., 2014). Per l'identificazione di specie le singole sequenze sono state confrontate con la banca dati NCBI per il gene rDNA 16S.

Da 14 dei 23 soggetti sottoposti ad esame batteriologico, è stata eseguita la ricerca in PCR di *M. gallisepticum* e *M. synoviae* su tampone prelevato da seno infraorbitale. Da altri 5 degli stessi 23 soggetti, appartenenti tutti all'ultimo gruppo di conferimento, la ricerca in PCR è stata invece eseguita su tampone endotracheale. Tale indagine è stata condotta in pool di tamponi per ciascun gruppo di conferimento. Inoltre, da alcuni soggetti di ciascun gruppo è stato condotto l'esame colturale specifico per *Mycoplasma* spp. a partire da essudato patologico prelevato sterilmente dai seni infraorbitali (Catania et al., 2019).

### *Ulteriori accertamenti diagnostici*

In tre dei sei gruppi è stata eseguita la ricerca di Metapneumovirus aviare (APV) attraverso RT-Real time PCR su pool di tamponi tracheali in due gruppi, e su pool di tamponi prelevati dai seni infraorbitali nel terzo (Guionie et al., 2007). Sono stati prelevati 3 pool di polmoni, da tre dei sei gruppi conferiti, da sottoporre a RT-Real time PCR per ricerca del Virus della Bronchite infettiva aviare (IBV) (Callison et al., 2006).

Una porzione di tessuto della parete del seno infraorbitale con annesso essudato caseoso infiammatorio è stata sottoposta ad esame istologico e ad esame virologico ad ampio spettro condotto tramite microscopia elettronica (Robards et al., 1998).

Negli ultimi due gruppi conferiti sono stati prelevati campioni di emosiero da sottoporre alla ricerca di anticorpi nei confronti di *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, mediante tecnica ELISA (IDEX test kit), impiegando kit commerciali non validati su siero di fagiano. Nell'ultimo gruppo inoltre i campioni di emosiero sono stati anche sottoposti alla ricerca di anticorpi per IBV (IDEX test kit).

In tutti i soggetti è stato eseguito un esame parassitologico a fresco attraverso osservazione microscopica di contenuto intestinale prelevato dal tratto prossimale dell'intestino e dal cieco. Eventuali ectoparassiti rilevati sulla cute dei soggetti, sono stati sottoposti ad identificazione tassonomica eseguita su base morfologica.

## RISULTATI

All'esame anatomopatologico si osservava congiuntivite sierosa e sinusite accompagnata da severa tumefazione mono o bilaterale dei seni infraorbitali, conseguente ad accumulo di abbondante essudato d'aspetto variabile da mucoso a caseoso, a seconda del grado di cronicità della malattia. Infatti l'essudato, tendeva a perdere la componente liquida divenendo sempre più compatto con il progredire della malattia. Alcuni di questi soggetti presentavano anche lesioni a carico dei sacchi aerei, da lievi (opacizzazione dei sacchi aerei) a gravi (aerosacculite fibrinosa). Risultava inoltre costante il rinvenimento di un'importante infestazione da parassiti sia interni che esterni.

L'esame batteriologico condotto a partire dal seno infraorbitale dei 23 soggetti ha portato all'isolamento di molteplici specie batteriche, di seguito elencate in ordine di frequenza decrescente (tra parentesi è riportato il numero dei soggetti da cui sono state isolate): *E. coli* (14), *P. multocida* (9), *Pasteurella/Haemophilus spp* (8), *O. rhinotracheale* (7), *Campylobacter spp.* (4), *Trueperella pyogenes* (1) (tabella 1). Solo un seno infraorbitale, appartenente ad un soggetto dell'ultimo gruppo è risultato negativo all'esame batteriologico. Dai sacchi aerei di due soggetti dello stesso gruppo è stato invece isolato *Gallibacterium anatis* mentre gli altri 2 sono risultati negativi. Le colonie cui ci si riferisce come *Pasteurella/Haemophilus spp.* e *Campylobacter spp.* sono state sottoposte ad una identificazione che si è avvalsa in prima istanza di metodi di batteriologia classica. Il primo isolato era un cocco-bacillo, Gram-negativo, microaerofilo, NAD-indipendente, catalasi positivo, con ossidasi dubbia, indolo negativo, ureasi negativo, non cresciuto su terreno selettivo per enterobatteriaceae (McConkey). L'appartenenza al genere *Avibacterium spp.* di tale specie microbica è stata esclusa sulla base dei risultati di fermentazione di un panel di zuccheri (positività a 24 ore per saccarosio, a 48 ore per lattosio e maltosio, negatività per glucosio, mannitolo, sorbitolo, arabinosio, trealosio, ramnosio, amilosio, melibiosio e inositolo). La colonia è inoltre risultata positiva a 48 ore all'esculina e negativa ai seguenti test biochimici: produzione di H<sub>2</sub>S, liquefazione della gelatina (GEL), produzione di β-galattosidasi batterica (ONPG), produzione di arginina deidrolasi (ADH), produzione di lisina decarbossilasi (LDC), produzione di ornitina decarbossilasi (ODC), produzione di triptofano deaminasi (TDA), utilizzo del citrato come unica fonte di carbonio (CIT), test di Voges-Proskauer per evidenziare la produzione di acetoina durante la fermentazione, riduzione di nitrati in nitriti (NO<sub>3</sub>), produzione di β-glucuronidasi (PNPG).

Il secondo ceppo era un bacillo Gram negativo, ricurvo (a virgola), emolitico e catalasi positivo. Essendo una specie batterica a lenta crescita (48 – 72 ore) e particolarmente esigente (necessita di strette condizioni di microaerofilia e di terreni ricchi), si è deciso di non testarne le caratteristiche biochimiche e di sottoporlo a identificazione genetica.

Il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) delle 2 specie batteriche, ha permesso di giungere ad una classificazione attendibile a livello di famiglia parziale nel primo caso, e certa di genere per il secondo isolato (*Campylobacter spp.*).

La ricerca di *M. gallisepticum* e *M. synoviae* da seno infraorbitale attraverso PCR ha sempre dato esito negativo. Solo nell'ultimo gruppo di conferimento si riscontra una positività per *M. gallisepticum* da pool di trachee. L'esame colturale per *Mycoplasma spp.* ha portato all'isolamento di varie specie, indicate di seguito in ordine

decescente di frequenza (tra parentesi il numero di soggetti): *M. verecundum* (4), *M. iowae* (3), *M. gallinaceum* (3), *M. iners* (2), *M. pullorum* (1) e *M. glycyphilum* (1) (tabella 1). Per l'ultimo gruppo di conferimento l'esame colturale risulta ancora in corso.

La ricerca di agenti virali, IBV e APV, attraverso RT-Real time PCR da pool di polmoni e da tamponi prelevati da seni infraorbitali/trachee, rispettivamente, ha portato, a sua volta, ad esito negativo. Anche la microscopia elettronica, per la ricerca di particelle virali, su una porzione di tessuto patologico è risultata negativa.

L'istologia della medesima porzione di tessuto ha rivelato un gravissimo ed esteso processo di infiammazione fibrino-necrotico-eterofilo batterica con edema e congestione.

La ricerca sierologica sul penultimo gruppo di fagiani ha svelato una omogenea negatività per *M. synoviae* e positività per *M. gallisepticum* nel 50% dei soggetti. L'ultimo gruppo è invece risultato omogeneamente negativo per *M. synoviae* e *M. gallisepticum*, ma in 4 soggetti su 5 si è riscontrata positività agli anticorpi per IBV. In 14 soggetti è stato possibile osservare la presenza di uova di ascaridi tra cui *Capillaria spp.* ed *Heterakis spp.*, spesso compresenti, e in due di questi soggetti anche di oocisti di coccidi. Gli ectoparassiti, rinvenuti su tutti i soggetti esaminati, sono stati invece classificati in parte come *Lipeurus caponis* e in parte come appartenenti alla famiglia *Analgidae*.

## DISCUSSIONE

La sinusite è una delle più comuni malattie che si riscontrano nell'allevamento del fagiano riproduttore (Forrester *et al.*, 2011; Pennycott, 2011). Gli animali presentano congiuntivite e lacrimazione, perdita del piumaggio nella regione periorbitale, grave edema bilaterale dei seni infraorbitali con contenuto catarrale o eosinofilo che si diffonde attraverso la fessura palatina all'interno del cavo orale (Pennycott, 2000; Forrester *et al.*, 2011). Può anche esserci, più raramente, un coinvolgimento delle vie aeree inferiori con tracheite, lesioni polmonari, aerosacculite e dispnea (Pennycott, 2000; Bradbury *et al.*, 2001). Gli animali manifestano inoltre depressione del sensorio, ridotta assunzione di alimento e acqua di bevanda, calo dell'ovo-deposizione e ridotto accrescimento corporeo (Blackall and Soriano, 2008). La terapia con antimicrobici spesso risulta inutile e la morte sopraggiunge per inanizione.

Il primo a individuare un possibile agente infettivo causale fu Keymer, i cui studi, già cominciati nel 1958, portarono all'isolamento di batteri del genere *Mycoplasma spp.* dalle lesioni (Keymer, 1961).

Supportati da riscontri in diversi paesi tra cui Australia (Reece *et al.*, 1986), Regno Unito (Lister 1989; Bradbury *et al.*, 2001) e Stati Uniti (Cookson and Shivaprasad, 1994), molti autori indicarono *M. gallisepticum* come agente eziologico primario di questa forma clinica del fagiano.

Nel caso oggetto di questo studio, contrariamente a quanto più diffusamente risulta riportato in bibliografia, le ricerche volte a dimostrare la presenza di *M. gallisepticum* all'interno delle lesioni, seppur da un numero significativo di soggetti, non ha portato ad esito favorevole. Sia la PCR sia l'isolamento a partire da materiale prelevato dai seni infraorbitali di soggetti a vari stadi della malattia, hanno dato riscontro negativo. Bradbury *et al.* (2001) ricordano come *M. gallisepticum* non risulti facilmente isolabile in coltura, anche da animali positivi in PCR, in quanto spesso

coperto da altri Micoplasmata a crescita veloce che svolgono molto probabilmente solo un ruolo di commensali. L'uso di un terreno di trasporto e il mantenimento della catena del freddo risulterebbero quindi essenziali. D'altro canto alcuni autori riferiscono come si possa avere più successo eseguendo la PCR per *M. gallisepticum* a partire da tampone endotracheale, aumentando considerevolmente la possibilità di trovare il patogeno (Welchman et al., 2002). L'ultimo gruppo, in cui si evidenziavano lesioni in fase acuta di malattia e non recentemente vaccinati, è risultato positivo alla ricerca di *M. gallisepticum* tramite PCR da tampone endotracheale eseguito in pool e solo l'esito del colturale, ancora in corso, ci permetterà di escludere o confermare la presenza di questo microorganismo all'interno dei seni infraorbitali e di correlarlo specificatamente alla patogenesi della malattia, tenendo comunque conto delle difficoltà definite sopra.

Bradbury et al. (2001) hanno riportato una vasta gamma di altri Micoplasmata (*M. glycyphilum*, *M. pullorum*, *M. gallinaceum*, *M. iners*) da casi di sinusite del fagiano e della pernice, mettendo in dubbio il loro ruolo patogeno. Non è inusuale isolare anche 3 o 4 diverse specie di Micoplasmata da un singolo sito di prelievo (occhio, seno infra-orbitale, trachea) di un medesimo soggetto. Tutte queste specie, con l'aggiunta di *M. verecundum* e *M. iowae* sono state isolate nel caso qui discusso. Il ruolo patogeno di tutti questi Micoplasmata sarebbe stato tuttavia messo in discussione nella selvaggina (Bradbury et al., 2001), fatta eccezione che per *M. iowae* (Catania et al., 2014), in questo caso isolato da 3 soggetti, tutti appartenenti allo stesso gruppo. In nessun caso è stato possibile invece isolare *M. synoviae*, in linea con quanto riportato in bibliografia (Bradbury et al., 2011)

Infezioni miste sono molto frequenti nella selvaggina e spesso coinvolgono *M. gallisepticum* e agenti virali come *Metapneumovirus aviare* (APV) e *Virus della Bronchite infettiva* (IBV) che possono agire in sinergia ed esacerbare il quadro clinico, come avviene nel pollo. Forme ancora più severe possono sopraggiungere conseguentemente ad infezioni batteriche secondarie sostenute in particolare da *E. coli*, *P. multocida* e *O. rhinotracheale* (Welchman et al., 2013). Per quanto non ci sia stato possibile individuare la presenza di agenti virali, la nostra ricerca non si è avvalsa dell'opportunità di cercare gli anticorpi nel siero dei soggetti nei confronti di APV, cosa che gli autori incoraggiano vivamente: la positività anticorpale sarebbe infatti più frequentemente associata alla sinusite rispetto alla presenza del virus, proprio in virtù del ruolo di questo virus come precursore di malattia. Lo stesso discorso si potrebbe fare per IBV, ma attualmente non sembrano esserci test ELISA validati per questa specie (Welchman et al., 2002). La positività agli anticorpi per IBV riscontrata nell'ultimo gruppo di soggetti andrebbe pertanto interpretata con cautela.

Da tutti i soggetti esaminati è stata isolata una grande varietà di batteri, spesso anche due o tre specie batteriche diverse dallo stesso sito (seno infraorbitale) del medesimo soggetto. La specie più frequentemente isolata è stata *E. coli*, più spesso associata a *P. multocida*, in 6 soggetti, seguita da *ORT*, in 5 soggetti e da *Pasteurella/Haemophilus spp.* in 4 soggetti. Due soggetti vedevano la compresenza di *E. coli*, *ORT* e *P. multocida* o *Pasteurella/Haemophilus spp.* In altri due soggetti è stata invece riscontrata l'associazione di *Pasteurella/Haemophilus spp.* e *Campylobacter spp.*

Una serie di test biochimici ci ha permesso di escludere che il batterio indicato come *Pasteurella/Haemophilus spp.* appartenesse alla famiglia *Avibacterium*.

La sua caratterizzazione, così come quella dell'isolato appartenente alla famiglia

*Campylobacter*; non è ancora completa e necessita ulteriori approfondimenti, ma ci sarebbero buone probabilità che possa trattarsi di due specie batteriche nuove vista la mancata relazione di identità con il profilo genetico e biochimico di altri batteri noti. Non si può escludere che possano avere avuto un ruolo chiave nella patogenesi della malattia, soprattutto perché isolate da soggetti, in assenza di altri patogeni ritenuti primari. Per quanto meno frequente, sono infatti stati riportati in letteratura casi di sinusite nel fagiano sostenuti primariamente da batteri, in assenza di *M. gallisepticum* e agenti virali (Chin and Goshgarian, 2001).

L'isolamento di specie nuove appartenenti alla famiglia *Pasteurellaceae* da forme respiratorie non è infrequente nel pollame in generale, e nel fagiano in particolare (Christensen *et al.*, 2003). In molti uccelli le specie microbiche appartenenti al genere *Campylobacter* sono considerate commensali intestinali (es. *C. lari*, *C. jejuni*, *C. coli*), anche se nel pollo alcuni ceppi si sono dimostrati in grado di localizzarsi a livello extra-intestinale (*C. jejuni*, *C. coli*), mentre altre sono state associate a patologie specifiche di questa specie animale, quali la spotty liver disease (*C. hepaticus*) (Markey *et al.*, 2013; Crawshaw *et al.*, 2015; Van *et al.*, 2016). Localizzazioni di *Campylobacter ssp.* a livello di seni infraorbitali non sono mai state segnalate prima della presente comunicazione e il loro possibile ruolo nelle forme di sinusite del fagiano dovrà essere approfondito con studi di patogenesi. Ulteriori approfondimenti saranno condotti per giungere innanzitutto ad una identificazione della specie isolata, e non è escluso che possa trattarsi di una specie di *Campylobacter* non ancora segnalata.

In ultima analisi bisogna prendere in considerazione come il quadro respiratorio sostenuto da più agenti infettivi possa essere ulteriormente complicato dalla presenza di parassiti interni ed esterni, come in questo caso specifico, e come pertanto il trattamento di queste infezioni/infestazioni miste possa essere davvero problematico, soprattutto al sopraggiungere delle basse temperature autunnali e invernali, in un sistema d'allevamento all'aperto (Pennycott, 2001).

L'assenza di presidi immunizzanti specifici e di comprovata efficacia in questa specie, l'assenza di misure terapeutiche che possano eliminare le infezioni dall'allevamento (Pennycott, 2001; Welchman, 2016) e la pleora di patogeni coinvolti contemporaneamente fanno riflettere su come si possa agire, ponendo l'accento sulla necessità di attuare altre strategie: ridurre le fonti di stress garantendo spazi adeguati e riducendo al minimo le manipolazioni degli animali; migliorare le condizioni igienico – sanitarie, riducendo la carica microbica ambientale e attuando programmi “tutto pieno/tutto vuoto”; controllare le infestazioni da endo- ed ecto-parassiti e agendo a monte del problema, migliorando i livelli di biosicurezza dell'allevamento (Pennycott, 2001).

## CONCLUSIONI

Il presente studio conferma la complessità eziologica della sinusite del fagiano ed evidenzia il coinvolgimento di specie batteriche non note, confermate sia da studi biochimici che di genotipizzazione accurata quali il WGS. Una volta identificate chiaramente, il ruolo di queste nuove specie batteriche dovrà essere approfondito con studi di patogenesi. Allo stesso modo, si provvederà ad eseguire più approfondite indagini volte ad valutare il coinvolgimento pregresso di *M. gallisepticum*, APV e IBV.

**Tabella 1.** Numero di soggetti positivi alla singola specie/ famiglia batterica, divisi per organo e per gruppo di conferimento.

Specie/Famiglia batterica	Organo	Gruppo						Tot
		I (4 soggetti)	II (4 soggetti)	III (3 soggetti)	IV (3 soggetti)	V (4 soggetti)	VI (5 soggetti)	
	Seno infraorbitale	N° di soggetti positivi						
<i>E. coli</i>		4	4	2	3		1	14
<i>P. multocida</i>		2	4	1			2	9
<i>Pasteurella/ Haemophilus spp.</i>					3	4	1	8
<i>O. rhinotracheale</i>		3		1	1		2	7
<i>Campylobacter spp.</i>					1	2	1	4
<i>T. pyogenes</i>				1				1
<i>M. verecundum</i>			1	3				4
<i>M. iowae</i>					3			3
<i>M. gallinaceum</i>				3				3
<i>M. iners</i>			1			1		2
<i>M. pullorum</i>						1		1
<i>M. glycyphylum</i>						1		1
	Sacco aereo							
<i>G. anatis</i>						2		2

## BIBLIOGRAFIA

1. Blackall PJ, Hinz KH. (2008). Infectious Coryza and related diseases. Poultry Diseases, 6<sup>th</sup> edition, Chapter 11, pp. 155- 159.
2. Blackall PJ, Soriano EV. (2008). Infectious Coryza and related bacterial infections. Diseases of poultry, 12<sup>th</sup> edition, Chapter 20, pp.789-803.
3. Blackall PJ, Chen X. (2015). Infectious Coryza and related diseases. Manual of poultry diseases, Chapter 47, pp. 327-331.
4. Bradbury JM, Yavari CA, Dare CM. (2001). Mycoplasmas and respiratory disease in pheasants and partridges. Avian Pathology, Volume 30, Issue 4.
5. Callison S A, Hilt D A, Boyton T O, Sample B F, Robison R, Swayne D E, Jackwood M W (2006). Development and evaluation of a real time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens Journal of Virological Methods.138, 60-65.
6. Catania S, Gobbo F, Rodio S, Fincato A, Qualtieri K, Santone C, Nicholas RAJ. (2014). First Isolation of Mycoplasma iowae in Grey Partridge Flocks. Avian Diseases 58(2):323-325.
7. Catania S, Bottinelli M, Fincato A, Gastaldelli M, Barberio A, Gobbo F, Vicenzoni G. Evaluation of Minimum Inhibitory Concentrations for 154 Mycoplasma synoviae isolates from Italy collected during 2012-2017. PLoS One. 2019 Nov 7; 14 (11):e0224903.



8. Chin RP, Goshgarian M. (2001). Infraorbital sinusitis associated with *Pasteurella multocida* in pen-raised ring-necked pheasants. *Avian Diseases* 45:540-543.
9. Christensen H, Blackall PJ, Bisgaard M. (2009). Phylogenetic relationships of unclassified, satellitic Pasteurellaceae obtained from different species of birds as demonstrated by 16S rRNA gene sequence comparison. *Research in Microbiology*, Volume 160, Issue 5, June 2009, pp. 315-321.
10. Cole JR, Wang Q, Fish JA, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014;42 (Database issue): D633-D642.
11. Cookson KC and Shivaprasad HL. (1994). *Mycoplasma gallisepticum* infection in chukar partridges, pheasants and peafowl. *Avian Diseases* 39, 914-931.
12. Crawshaw T & Young S. (2003). Increased mortality on a free-range layer site. In *The Veterinary record* (Vol. 153, Issue 21, p. 664).
13. Forrester CA, Bradbury JM, Dare MC, Domangue RJ, Windsor H, Tasker JB, Mockett APA. (2011). *Mycoplasma gallisepticum* in pheasants and the efficacy of tylvalosin to treat the disease. *Avian Pathology*, Volume 40, Issue 6.
14. Guionie O, Toquin D, Sellal E, Bouley S, Zwingelstein F, Allée C, Bougeard S, Lemièrre S, Etteradossi N (2007). Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus. *J. Virol. Methods.* 139:150-158.
15. Jackwood MW, Saif YM. (2008). *Bordetellosis (Turkey Coryza)*. *Diseases of poultry*, 12th edition, Chapter 19, pp. 774-788.
16. Keymer IF. (1961). Infectious sinusitis of pheasants and partridges. *Veterinary Record* 73, pp. 1034-1038.
17. Lister SA. (1989). Diseases of gamebirds. In *Practice* 11, 170-174.
18. Markey B, Finola L, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. (2013). *Campylobacter, Arcobacter and Helicobacter species*. *Clinical Veterinary Microbiology*, 2th edition, Chapter 24, pp. 335- 343.
19. Pennycott TW. (2000). Causes of mortality and culling in adult pheasants. *The Veterinary record* 146 (10):273-8
20. Pennycott TW. (2001). Disease control in adult pheasants. In *Practice*, 2001; 23:132-140.
21. Reece RL, Ireland L, Barr DA. (1986). Infectious sinusitis associated with *Mycoplasma gallisepticum* in gamebirds (quail, partridge, pheasant). *Australian Veterinary Journal* 63, 163-168.
22. Robards A W, Wilson A J. (1998). *Procedures in Electron Microscopy*. Centre for Cell & Tissue Research, University of York, UK Wiley.
23. Van T T H, Elshagmani, E, Gor M C, Scott P C, & Moore R J (2016). *Campylobacter hepaticus* sp. nov., isolated from chickens with spotty liver disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4518–4524.
24. Welchman DdeB, Bradbury JM., Cavanagh D, Aebischer NJ. (2002). Infectious agents associated with respiratory disease in pheasants. *The Veterinary record* 150, 658-66.
25. Welchman DdeB. (2016). Diseases in gamebirds: an update. 38 , 189-192.