

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

# ANNALI

DELLA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA DI  
PISA

Volume L - 1997



ISSN 0365-4729

FELICI  
1998

## EPISODIO DI TIFLO-COLITE NECROTICA ASSOCIATA A SPIROCHETE IN GALLI FORCELLI (*LYRURUS TETRIX*) DI ALLEVAMENTO.

### CASES OF SPIROCHETE-ASSOCIATED NECROTIZING TYPHLITIS IN CAPTIVE BLACK GROUSES (*LYRURUS TETRIX*).

PAOLO MANI<sup>(1)</sup>, GIACOMO ROSSI<sup>(1)</sup>, MARCO FOLLIERO<sup>(2)</sup>, MARCO BAGLIACCA<sup>(3)</sup>.

#### RIASSUNTO

La tiflocolite necrotica associata ad infezione da spirochete è una patologia più volte segnalata in avifauna di allevamento e selvatica. Tale patologia è stata riprodotta sperimentalmente anche se il ruolo patogeno primario o secondario delle spirochete non è ancora stato ben definito.

L'episodio descritto è stato da noi osservato in galli forcelli (*Lyrurus tetrix*) di allevamento di circa 80 giorni di età. Negli animali morti l'esame necroscopico ha evidenziato gravi quadri anatomo-patologici riportabili ad una tiflocolite necrotico-emorragica caratterizzata dalla costante e significativa presenza di spirochete nelle gravi lesioni enteriche.

Parole chiave: spirochete, tiflocolite necrotica, gallo forcello (*Lyrurus tetrix*).

#### SUMMARY

Necrotic typhlocolitis related to spirochete infection is a pathological condition commonly found in birds in the wild or bred in captivity. Though this pathology has been reproduced experimentally, the role of the spirochete, whether primary or secondary in these episodes, has not yet been established. On gross examination of many black grouses (*Lyrurus tetrix*) (young subjects 80 days of age), revealed severe anatomopathological signs suggestive of necrotic hemorrhagic typhlocolitis.

The negativity of parasitological tests conducted on contents of the intestine and of scrapings from the enteric mucosa, exclude protozoal infection and have lead to further histo-pathological tests carried out using particular histochemical techniques. The observation of a massive presence of spirochetes in all of the samples examined would suggest definite role of this microorganism, along with other factor, in the genesis of severe intestinal lesions and of the incidence of mortality.

Key words: spirochete, necrotizing typhlocolitis, black grouses (*Lyrurus tetrix*).

(1) Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti. (Direttore, Prof. Salvo Rindi).

(2) Collaboratore esterno

(3) Dipartimento di Produzioni Animali. (Direttore Prof. Bindiano Colombani).

## INTRODUZIONE

Le conoscenze circa la flora microbica presente nell'apparato gastroenterico di avifauna selvatica sono scarse; la notevole variabilità delle esigenze nutritive-tipo di alimentazione che nel caso del gallo forcello, allo stato libero o in cattività, è caratterizzata ad esempio da alimenti indispensabili del tutto particolari quali frutti di bosco ed aghi di pino mugo rappresentano un fattore condizionante la flora batterica stessa. Poco si conosce pertanto del ruolo di certi batteri nella genesi di alcune patologie intestinali o di quanto in cattività l'alimentazione, sia pure con mangimi appositamente formulati ed integrati, possa essere correlata a squilibrio della flora microbica ed a patologia enterica. Tra gli agenti comunemente riscontrati da controlli su feci o contenuto intestinale di avifauna si annoverano protozoi, funghi, metazoi, virus e batteri; recentemente sono stati descritti poi casi sporadici di tifi di tipo necrotico correlate ad infezione massiva da spirochete, tanto in specie aviari d'allevamento (Barnes, 1991), quanto in specie selvatiche (Buckles, 1997), associate a fenomeni diarroici, ritardo di accrescimento e diminuzione dell'ovodeposizione. Le nostre osservazioni si riferiscono ad un episodio di tifi necrotico-emorragica riscontrata nell'estate del 1997 nell'allevamento di Bieri (LU) in galli forcelli maschi e femmine di 70-90 giorni di età venuti a morte improvvisamente o dopo 2-3 giorni dall'insorgenza di una sintomatologia caratterizzata da anoressia e sporadici fenomeni diarroici. L'episodio non ha interessato i riproduttori, mantenutisi in apparente buono stato di salute e di nutrizione.

## MATERIALI E METODI

I galli forcelli rinvenuti morti dal personale dell'allevamento del Corpo Forestale dello Stato di Lucca sono stati in parte conservati congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  in parte refrigerati fino al momento degli esami autoptici effettuati presso il Dipartimento di Patologia Animale della Facoltà (Fig. 1). Gli organi, appena prelevati, sono stati utilizzati per esami parassitologici e per indagini istopatologiche dopo riduzione, fissazione in formalina tamponata ed inclusione in paraffina. Sezioni di  $3\mu\text{m}$  di spessore sono state adese su vetrini pretrattati con polylysina (DAKO Laboratoires) e successivamente utilizzate per effettuare colorazioni istochimiche

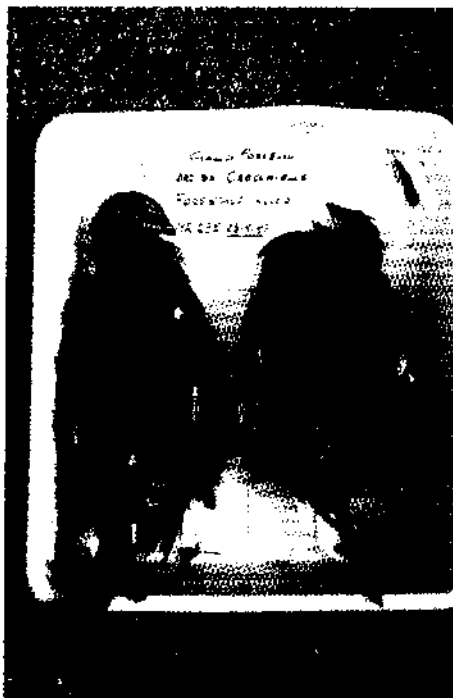


Fig. 1 - Due giovani galli forcelli (*Lyrurus tetrix*) in allevamento, deceduti in fase di muta parziale.

particolari quali la colorazione tricromica di Goldner, per l'evidenziazione del tessuto connettivo, la colorazione all' Alcian-pas per le mucosostanze, il metodo Goodpasture per l'evidenziazione di batteri e funghi ed i metodi con impregnazione argentea di Levaditi e Warthin-Starry, specifici per l'evidenziazione delle spirochete. Gli esami parassitologici sono stati effettuati tramite esame diretto al microscopio stereoscopico della mucosa intestinale e flottazione del contenuto intestinale in soluzione sovrasatura di NaCl.

## RISULTATI

Gli esami parassitologici sono risultati negativi per: *Eimeria sp.*, *Trichomonas sp.* o *Histomonas sp.*, in un primo momento sospettati di essere i più probabili agenti eziologici dati: il tipo di lesione, l'età degli

animali colpiti, la situazione epidemiologico-ambientale e la similarità dei quadri lesivi macroscopici con alcune tiftiti del pollo, del tacchino ma soprattutto di altre specie selvatiche quali fagiano, starna e pernice presenti in voliere o parchetti vicini a quelle dei galli forcelli.



Fig. 2 - Aspetto macroscopico dei visceri. E' evidente il quadro di tiftite caratterizzato da materiale semiliquido all'interno dei ciechi la parete dei quali risulta interessata da fenomeni necrotici, visibili anche in trasparenza.

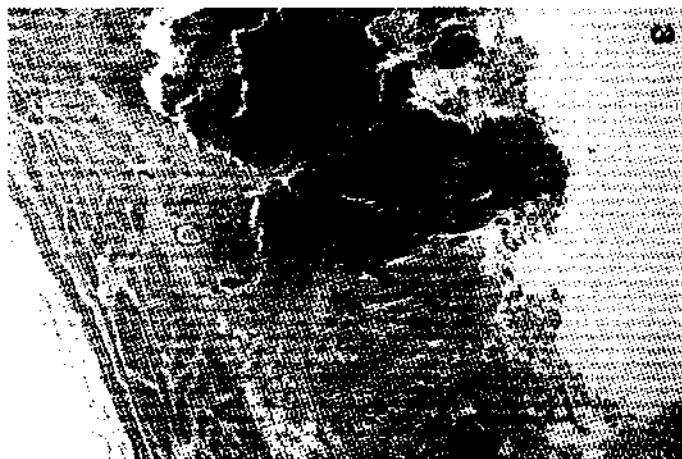


Fig. 3 - Sezione istologica di cieco; grave quadro di tiftite con aree di necrosi coinvolgente lo strato mucoso e parte della sottomucosa (freccia). (Col. E&E; 10X).

All'esame necroscopico è apparsa evidente la costante lesione ai ciechi ( Fig.2 ), peraltro particolarmente sviluppati nel gallo forcello data la dieta ricca di fibra. All'istologia le lesioni apparivano caratterizzate da focolai di necrosi con materiale caseoso adeso in alcuni punti della mucosa cecale e colica. I due ciechi, soprattutto a livello delle valvole ileo-cecocoliche, apparivano con parete fortemente inspessita e, a tratti, iperemica. Il materiale caseoso endoluminale risultava in alcuni punti tenacemente adeso alla mucosa sottostante tanto che, all'asportazione, si potevano creare soluzioni di continuo della stessa esponendo la sottomucosa. Il materiale fecale di tutti i soggetti appariva inoltre di consistenza pastosa e di colore grigio-verdastro. Istologicamente si osservava una necrosi estesa interessante vaste aree della mucosa, queste ultime caratterizzate da parziale o totale perdita della morfologia per presenza di fenomeni autolitici associati alla necrosi stessa. Era inoltre evidente l'accumulo di materiale fortemente eosinofilo che in certi casi rendeva difficile l'interpretazione dei preparati istologici (Fig. 3 ). In altri casi, soprattutto in prossimità dell'apice dei ciechi e delle valvole ileo-cecocoliche, era chiaramente visibile una severa tiffocolite linfo-plasmocitaria, caratterizzata da espansione follicolare del tessuto linfoide associato alla mucosa enterica (GALT) e da fenomeni compressivi a carico delle strutture ghiandolari della mucosa e della sottomucosa . In queste aree fortemente alterate, dove i fenomeni necrotico-autolitici erano quasi assenti, era possibile osservare una enorme quantità di microorganismi spiraliformi, colorati in rosso dalla fucsina con metodo Goldner (Fig. 4) ed in marrone scuro con le specifiche colorazioni ad impregnazione argentea (W.S. e Levaditi) (Fig. 7), morfologicamente riportabili al genere *Treponema*. Le spirochete erano particolarmente numerose e fortemente stipate all'interno delle cripte ( Fig.5 ) e/o libere nel lume cecale; in prossimità di tali aree mucosali fortemente invase dai microorganismi (Fig.6), si osservava una intensa reazione linfoplasmocitaria juxta ghiandolare, accompagnata, in alcuni campi, da presenza di numerosi granulociti eterofili frammisti all'infiltrato mononucleato. Tramite colorazione con Alcian-pas era inoltre possibile osservare, a carico dell'epitelio ghiandolare di aree fortemente invase, fenomeni iperplastici delle cellule mucipare (globet cells), che risultavano molto dilatate e fortemente alcianofile.

## DISCUSSIONE

Il ruolo delle spirochete nella patologia gastroenterica degli uccelli è ancora poco chiaro sia in specie avicole da reddito che in specie ornamentali e avifauna di allevamento.

Le prime segnalazioni di entero-tiflo-coliti con presenza di spirochete all'interno dei ciechi di galline ovaiole, in associazione o meno ad infezione con batteri *campylobacter*-like, inducente fenomeni diarroici più o meno evidenti con alterazione dell'ovodeposizione e ritardo nei processi di accrescimento risalgono alla seconda metà degli anni '80 (Davelaar, 1986; Griffiths, 1987). Sperimentalmente è stata riprodotta una forma attenuata della malattia con comparsa di diarrea, calo ponderale e presenza di muco-sangue nelle feci, inoculando alcuni polli SPF con spirochete prelevate da raschiati mucosali di animali con patologia (Davelaar, 1986). Osservazioni analoghe sono state inoltre effettuate nel suino dove due spirochete, *Serpulina (treponema) innocens* (specie apatogena) e *Serpulina (treponema) hyodysenteriae* (responsabile dell'insorgenza di gravi tiflo-coliti con ulcerazioni; Barker, 1985) vengono isolate abbastanza frequentemente e riproducono lesioni anche in pulcini di un giorno inoculati sperimentalmente (Sueyoshi, 1990).

Degli stessi anni è la segnalazione che anche altri agenti batterici possono indurre quadri analoghi di tiflo-colite necrotico-emorragica in specie aviari: *Borrelia anserina*, spirocheta trasmessa da insetti vettori per via ematogena nelle anatre (Barnes, 1991); *Clostridium perfringens* e *C. difficile* (Cowen, 1987; Griffith, 1987); varie salmonelle come *S. oranienburg*, *S. newport* e *S. typhimurium* (Adachi, 1985; McDougald, 1991).

Più recentemente la presenza di microorganismi anaerobi riferibili al genere *Treponema* è stata associata a gravi fenomeni di necrosi a carico della mucosa intestinale con percentuali di mortalità molto elevate, in special modo in uccelli con apparato gastroenterico caratterizzato da un notevole sviluppo delle strutture cecali in relazione ad una alimentazione particolarmente ricca di fibre (Bukles, 1997). In ogni caso gli episodi di patologia più gravi sono stati riscontrati sempre in animali giovani, di circa 2-3 mesi di età, e l'alta morbilità/mortalità è risultata essere ad andamento stagionale.

Anche nel nostro caso, gli animali colpiti da tiflocolite necrotica erano soggetti giovani, di 70-90 giorni di età, mantenuti in buone



Fig. 4 - Aspetto istologico delle cripte ghiandolari cecali fortemente colonizzate da spirochete (freccie). (Col. Goldner; 40X).



Fig. 5 - Microrganismi spiralfornici presenti nei lumi ghiandolari cecali (freccie). (Col. F&E.; 100X).



Fig. 6 - Spirochete libere nello strato di muco sovrastante aree di mucosa danneggiata. (Col. Warthin & Starry; 100X).



Fig. 7 - Agglomerati di spirochete, colorate in bruno scuro tramite impregnazione argentea, localizzati nelle pliche della mucosa enterica (freccia). (Col. Warthin & Starry; 100X).



condizioni igienico-sanitarie, in voliere attigue ai parchetti dei riproduttori, nei quali non si è manifestata alcuna patologia . Il rinvenimento nei ciechi e nel colon di notevoli quantità di spirochete ci induce a sospettare che nella patogenesi delle gravi lesioni mucosali , osservate sia macro che microscopicamente, notevole importanza vada attribuita a tali agenti eziologici. Del resto lesioni similari, associate a colonizzazione della mucosa enterica da parte di spirochete beta-emolitiche, sono state riscontrate in *Rhea americana* (ratiti molto simili *Struthio camelus*) rinvenuti morti e necroscopizzati prima dei nove mesi d'età (Buckles, 1997). Di notevole interesse il fatto che anche nei galli forcelli, al pari dei ratiti e di alcuni anseriformi, vi sia un notevole sviluppo delle strutture cecali e che queste ultime rappresentino in generale un ambiente molto favorevole per condizioni microbiologiche (*anaerobiosi-fermentazioni-sostanze di nutrimento*) alla moltiplicazione e colonizzazione delle spirochete.

Rimane non del tutto chiaro quindi il ruolo svolto dalle spirochete nella genesi della patologia da noi osservata nel gallo forcello anche se la negatività degli esami parassitologici (che fa escludere una enteropatia protozoaria) e la fortissima concentrazione di questi microorganismi spiraliformi in prossimità di arce di mucosa fortemente danneggiate o notevolmente infiltrate di elementi mono e polimorfonucleati depone a favore di un loro ruolo patogeno ben definito anche se fortemente condizionato da stress ambientali e climatici.

#### BIBLIOGRAFIA

- Adachi, Y., M. Sueyoshi, E. Miyagawa, H. Minato, and S. Shoya. Experimental infection of young broiler chicks with *T. hyodysenteriae*. *Microbiology and Immunology* 29: 683-688. 1985.
- Barcker, I.K., and A. A. Van Dreumel. The alimentary system. In: *Pathology of domestic animal*, 3rd ed.. K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy, and N. Palmer, eds. Academic Press, Orlando, Fla. pp. 2-239. 1985.
- Barnes, H.J.. Spirochetosis. In: *Disease of Poultry*, 9th ed. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid, and H.W. Yorder, jr., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp.304-310. 1991.
- Buckles, E. L., K. A. Eaton, and D. E. Swayne. Cases of Spirochete-associated necrotizing typhlitis in captive Common Rheas (*Rhea americana*). *Avian Diseases* 41: 144-148. 1997.

- Cowen, B. S., L. D. Schwartz, R. A. Wilson, and S. I. Ambrus. Experimentally induced necrotic enteritis in chicken. *Avian Diseases* 31: 904-906. 1987.
- Davelaar, F.G., H. F. Smit, K. Hovind-Hougen, R. M. Dwars, and P.C. van der Valk. Infectious typhlitis in chickens caused by spirochetes. *Avian Pathology* 15:247-258. 1986.
- Griffiths, I.B., B.W. Hunt, S.A. Lister, and M.H. Lamont. Retarded growth rate and delayed onset of egg production associated with spirochaete infection in pullets. *Veterinary Record* 121: 35-37. 1987.
- McDougald, L. R. Other protozoan diseases of the intestinal tract. In: *Diseases of Poultry*, 9th ed. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid, and H.W. Yorder, jr., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 804-826. 1991.
- Sueyoshi, M., and Y. Adachi. Diarrhea induced by *Treponema hyodisenteriae*: a young chick cecal model of swine dysentery. *Infection and Immunity* 58: 3348-3362. 1990.