

45. LEPTOSPIRA ORYZETI, AGENTE DI UNA NUOVA LEPTOSPIROSI ITALIANA.

L'autunno del 1937 il Prof. Mino ⁽¹⁾, primario all'Ospedale di Vercelli, comunicava di aver notato fra i lavoratori addetti alla campagna di monda e di taglio del riso, il manifestarsi di un discreto numero di casi di una malattia che nella forma più lieve decorreva con pochi giorni di febbre, cefalea e qualche mialgia, e nei casi gravi presentava ittero ed il quadro tipico del morbo di Weil.

In base alla sintomatologia osservata, e pur non avendo ottenuto risultati convincenti dai tentativi culturali e dall'inoculazione in cavia, Mino sospettò trattarsi di casi di spirochetosi ittero-emorragica.

Tale ipotesi parve suffragata dalle prove di agglutinazione eseguite a Roma da Reitano ⁽²⁾, su 20 sieri di convalescenti, inviatigli da Mino. In 14 casi il risultato fu positivo di fronte ad un ceppo di L.i.-e. Ulteriori 5 risultati positivi furono succesivamente ottenuti da Mino ⁽³⁾ ⁽⁴⁾ con altri sieri.

Nel novembre del 1937 fui inviato a Vercelli per studiare la malattia. Purtroppo arrivai tardi, sì che non mi fu possibile di osservare casi iniziali della malattia, ed i tentativi fatti per isolare l'eventuale spirocheta riuscirono negativi. Tuttavia, in base a quanto avevo potuto osservare, mi parve azzardata l'affermazione che tutti i casi anitterici fossero da attribuirsi al morbo di Weil, e in una relazione presentata il dicembre, scrivevo che, secondo il mio parere, nel Vercellese esistono 2 malattie provocate da due agenti diversi: l'uno di questi è la spirocheta ittero-emorragica, la cui presenza è stata segnalata ripetutamente nella Valle del Po. A questa dovevano attribuirsi tutti i casi con ittero, ed una parte soltanto di quelli senza ittero. La seconda malattia, che ritenevo comprendesse la maggior parte dei casi anitterici, era da ritenersi probabilmente essa pure dovuta ad una spirocheta, diversa però dalla classica L.i.-e. e avvicinabile piuttosto, per lo meno per la sua epidemiologia, a *Leptospira grippo-typhosa*, l'agente della « Schlammfieber » russa e tedesca.

Le prove serologiche da me eseguite con 14 ceppi di spirochete e 21 sieri d'individui che m'erano stati segnalati come aventi superato la forma in questione, rafforzavano in me tale opinione. Infatti dei 9 sieri saggiati, provenienti da individui itterici, 7 mi diedero risultato positivo con L.i.-e., mentre dei 12 anitterici, 2 soli agglutinavano tale spirocheta.

Le prove di protezione della cavia eseguite con 8 dei sieri positivi mi diedero 7 risultati positivi (in 5 casi con 0,1 cc.; in 2 con 1 cc.), mentre i 10 sieri anitterici studiati, mi diedero tutti risultato negativo.

Voglio notare che i sieri da me studiati solo in parte provengono dai pazienti studiati da Mino e da Reitano.

Durante l'estate e l'autunno del 1938 la malattia è ricomparsa, per lo più in forma lieve e con casi singoli, tanto nel Vercellese che nelle provincie contermini (Novara, Pavia, Cremona). Recatomi sul posto, ho ripreso le ricerche dirette ad individuare l'agente patogeno responsabile della malattia, e sono finalmente riuscito ad ottenere in cultura un primo ceppo di leptospira (ceppo Pavia I).

Questa leptospira, a cui in una mia nota di alcuni mesi fa ⁽⁵⁾, ho imposto il nome di *L. oryseti* (da oryzetum-risaia) è stata isolata da un paziente di Galliavola (Pavia), un cavallante di 26 anni, il quale da oltre un mese lavorava in risaia. L'ammalato era stato visto, in seconda giornata, dal Prof. Bianchi, direttore del Laboratorio Provinciale di Pavia, il quale sospettando di trovarsi di fronte ad un caso di spirochetosi, aveva salassato il paziente e inoculato alcuni cc. di sangue ad una cavia. Questa venne a morte dopo 9 giorni, senza presentar ittero, ma soltanto emorragie polmonari puntiformi (*).

Al paraboloide era possibile osservare negli organi dell'animale un discreto numero di spirochete. Seminati alcuni tubi di terreno di Reiter con sangue prelevato dal cuore dell'animale, in uno di questi ottenni in cultura pura la spirocheta. I primi passaggi mi diedero culture poco abbondanti e che si svilupparono con una certa difficoltà, successivamente invece il parassita si abituò ai terreni artificiali, sì che ora mi dà, dopo una settimana, culture rigogliose, sia in terreno di Reiter, sia in quello di Vervoort da me lievemente modificato (acqua fontis, bollita a lungo

(*) Alcune ricerche su questa leptospira furono da me eseguite nel Laboratorio Provinciale di Batteriologia di Pavia, diretto dal Prof. L. Bianchi, che ringrazio per la cortese ospitalità.

e filtrata cc. 500, peptone gr. 0,5, cloruro di sodio gr. 0,25, soluzione tampone secondo Sørensen a pH = 7,5: cc. 150. La soluzione viene autoclavata, e quindi vi si aggiunge il 5 % di sangue di coniglio fresco).

Morfologicamente *L. oryseti* non è differenziabile dalle altre specie di leptospire. Nel siero diluito si sviluppano in prevalenza forme corte, nel terreno di Vervoort anche forme molto lunghe. Di rado si formano grovigli di spirochete, simulanti un'avvenuta agglutinazione.

Nei primi passaggi *L. oryseti* mostrava una spiccata tendenza ad aderire al vetrino portaoggetti, e ciò anche quando non si faceva uso di vetrino coprioggetti. In tale caso si muove con caratteristici movimenti a scatto, serpentini, nel senso del suo asse.

La spirocheta in questione si colora facilmente col Fontana-Tribondeau o con la colorazione prolungata col Giemsa.

La patogenicità di *L. oryseti* per la cavia, sembra essere molto scarsa. Infatti di 20 cavie giovani che ho inoculato con quantità varie (da 1/2 a 3 cc. di cultura recente) 18 sono sopravvissute all'infezione. Una di queste, che è stata sacrificata 7 giorni dopo l'inoculazione, presentava soltanto qualche raro punto emorragico ai polmoni. Dal sangue di questo animale non sono riuscito a coltivare le spirochete.

Tre sole cavie sono venute a morte, e più precisamente quella inoculata nove giorni prima col sangue del paziente, e due cavie, di un giorno di età, inoculate con mezzo cc. di cultura recente, e venute a morte l'una dopo tre, l'altra dopo cinque giorni. Nessuna di queste cavie presentava ittero, ma soltanto emorragie polmonari, sotto forma di numerose chiazze piccole, diverse e meno nettamente delimitate che le grosse chiazze provocate da *L. ictero-haemorrhagiae*. Gravemente emorragici erano le surrenali, i reni e la loro capsula adiposa. Altre piccole emorragie erano disseminate nel sottocutaneo, nella muscolatura addominale, nelle pareti intestinale. Le linfoghiandole erano ingrossate ed emorragiche. Nel fegato e nei reni erano visibili, al paraboloide, numerose leptospire. Con la poltiglia del fegato della prima cavia sono state inoculate in peritoneo due altre cavie. Una di queste è ancora vivente, a 7 mesi dall'inoculazione, e dopo 4 mesi aveva nel sangue un tasso di agglutinine di appena 1:100; l'altra morì dopo 14 giorni, mostrando qualche rara chiazza emorragica ai polmoni, e senza che la ricerca al paraboloide e i tentativi culturali dessero alcun risultato.

Delle 3 cavie inoculate con poltiglia di fegato proveniente da quest'ultima, nessuna è venuta a morte con segni sospetti di spirochetosi.

Come pure sono ancora in vita, a 2 mesi di distanza, due cavie di 9 giorni d'età, inoculate con materiale proveniente da una delle cavie neonate morte per l'infezione.

Con cultura di *L. oryzei* ho inoculato in peritoneo anche 2 topini e 2 ratti albin, assicurandomi prima, con ripetuti esami delle urine, che essi fossero indenni da spirochete. Nel siero dei due ratti ho ricercato anche, con esito negativo, l'eventuale presenza di agglutinine di fronte al ceppo Pavia I e a 2 ceppi di L.i.-h. (Lister, Mino R. 3). Ripetuti esami delle urine, alcaline, di tali animali, eseguite dopo l'inoculazione, non m'hanno permesso di mettere in evidenza alcuna spirocheta. I 2 topini sono venuti a morte, per malattia intercorrente, dopo 58 e 59 giorni; i ratti sono stati sacrificati dopo 5 mesi. La ricerca delle spirochete negli organi di questi animali, sia con l'esame diretto al paraboloide, sia con tentativi culturali, è rimasta vana. Il siero dei due ratti agglutinava *L. oryzei*, nell'uno fino al titolo di 1:500, nell'altro fino a 1:2000.

Ricorderò inoltre che dai pochi ratti del Pavese esaminati da L. Bianchi e da me, non è stato possibile isolare alcuna spirocheta, mentre a Vercelli Mino ⁽³⁾ ⁽⁴⁾ è riuscito ad isolare solo ceppi di L.i.-h. classica.

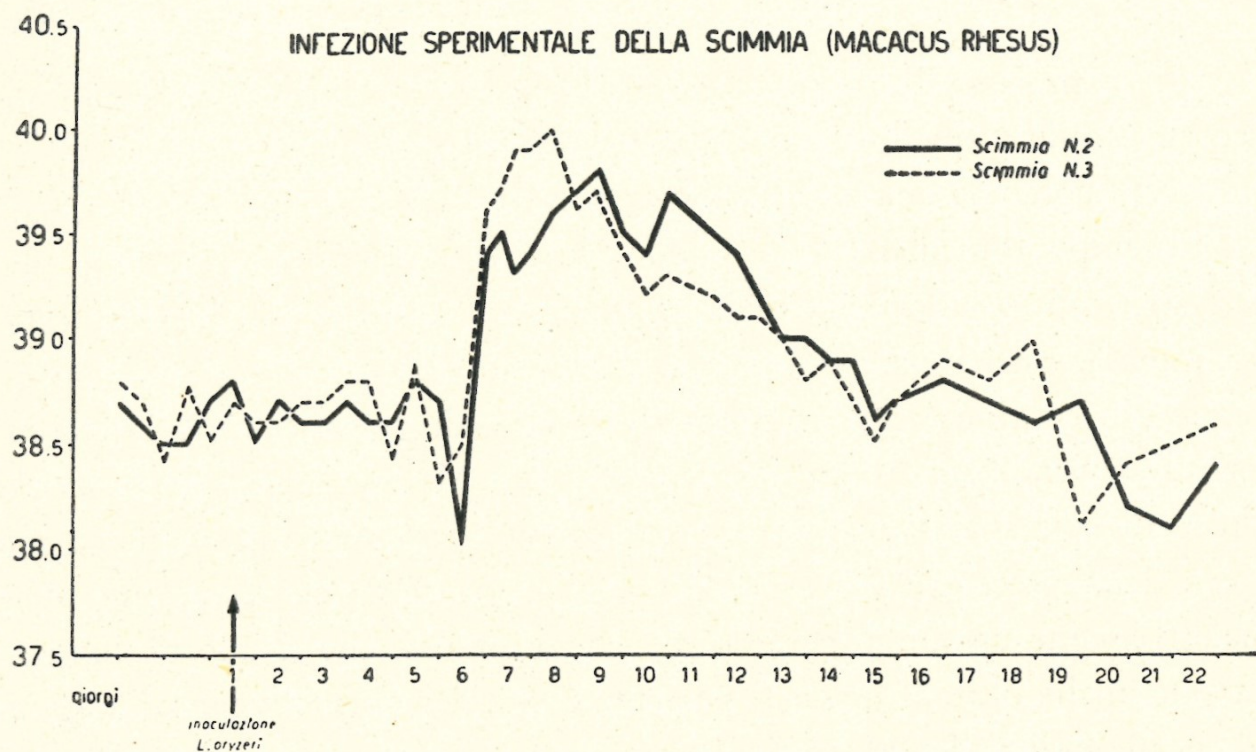
Due conigli furono inoculati, l'uno endovena e l'altro in peritoneo, con culture recenti di spirochete. Il primo è sopravvissuto senza mostrare apparenti disturbi, il secondo è venuto a morte, per malattia intercorrente, dopo 3 giorni. In esso non fu possibile mettere in evidenza spirochete.

Più interessanti sono stati i risultati ottenuti infettando sperimentalmente 3 scimmie (*Macacus rhesus*) con l'inoculazione sottocutanea di 2 cc. di cultura di 16 giorni. Nel siero delle scimmie era stata precedentemente ricercata l'eventuale presenza di agglutinine per *L. oryzei*, per un ceppo di L.i.-h. (Lister) e per un'altra specie itterogena per la cavia isolata nel corso di un episodio epidemico nel Pavese (ceppo « Mezzano I »). In due delle scimmie il risultato è stato negativo, in quella n. 3 invece il ceppo Lister è stato agglutinato fino al tasso di 1:500 (infezione pregressa?).

Nella prima scimmia, che presentava una temperatura superiore alla norma fin dai giorni precedenti all'inoculazione, la curva termica non fu molto dimostrativa. Si ebbe in essa una lieve elevazione termica il giorno

seguinte all'iniezione e una seconda, un po' più elevata, dopo 3 giorni. In seguito la temperatura scese lentamente alla norma. Emoculture praticate 7 e 26 giorni dopo l'inoculazione, diedero risultati negativi. Un mese dopo l'inoculazione il siero della scimmia agglutinava *L. oryzei* fino al titolo di 1:10.000, mentre non agglutinava neppure al titolo di 1:100, 4 ceppi di *L.i.h.*, uno di *L.canicola* e uno di *L. grippo-typhosa*.

Le altre due scimmie hanno dato invece una curva febbrile molto caratteristica, che riproduco nel grafico sottostante. Come si vede, 5 giorni



dopo l'inoculazione, la temperatura è scesa brevemente a valori inferiori alla norma, per risalire il giorno seguente bruscamente a valori di 39°,4-39°,6. L'acme fu raggiunto in un caso al secondo giorno di febbre (40°), nell'altro al terzo (39°,8). Subito dopo, la febbre ha incominciato a scendere per lisi, arrivando a valori normali 8-9 giorni dopo l'inizio dell'accesso febbrile. In seguito si è avuta una seconda breve elevazione termica (11-13 dì dall'inizio) a cui è seguita una caduta della temperatura a valori subnormali, per ritornare poi definitivamente alla norma dopo 15-16 dì dall'inizio.

Al terzo giorno di febbre le scimmie hanno mostrato un'iniezione congiuntivale non molto marcata, scomparsa dopo 2 giorni. Le condizioni generali delle scimmie non parvero molto compromesse durante la malattia.

L'emocultura praticata il giorno seguente all'inoculazione, risultò positiva con facilità in ambedue gli animali. Dopo 3 giorni essa fu positiva in uno e negativa nell'altro. Essa fu invece costantemente negativa dopo 5, 6, 8 giorni dall'inoculazione. L'esame ematologico, praticato la terza giornata di febbre, ha mostrato una lieve leucocitosi (12.600 e 15.800 leucociti). Le formule leucocitarie furono le seguenti:

	pol. neutr.	pol. eos.	pol. bas.	linf.	mon.	endoteli	cell. Türk.
N ₂	41,5	0,5	0	55,5	2,5	0	0
N ₃	23	1,5	0	74	0,5	0,5	0,5

In complesso l'infezione sperimentale della scimmia ha avuto un decorso simile a quello di un caso lieve nell'uomo.

Nell'uomo la malattia decorre in modo alquanto uniforme. Quale sia il tempo d'incubazione è molto difficile a dirsi. E' probabile che s'aggiri sui 6-10 giorni. La malattia inizia bruscamente con brivido, cefalea intensa, rachialgia, mialgie. La febbre supera spesso i 40° e persiste per lo più continua, per un numero variabile di giorni (1-9). Lo sfebbramento avviene per lo più per rapida lisi. Molto spesso, dopo alcuni giorni di apiressia, si ha una seconda punta termica, meno elevata e più breve della precedente, e alle volte anche una terza e una quarta. Alla malattia segue un lungo periodo di penosa astenia, che si può prolungare talvolta anche oltre al mese. Il paziente è pallido, notevolmente dimagrito ed incapace di dedicarsi ad un lavoro un po' faticoso.

Uno dei sintomi che più di frequente accade di osservare all'inizio della malattia, è la comparsa di una notevole iniezione dei vasi della congiuntiva bulbare, sintomo che era presente anche nelle scimmie infettate sperimentalmente. Abbastanza frequente è anche la comparsa dell'herpes labiale, per lo più alcuni giorni dopo l'inizio della febbre. Non ho mai osservato la presenza segnalata da Mino, di esantemi, fors'anche per la loro fugacità e per la difficoltà di poter esaminare pazienti all'inizio della malattia. In qualche caso ho notato un arrossamento del faringe, che non so se si possa mettere senza altro in rapporto con la infezione spirochetica. Costante, fin dall'inizio della malattia, è la comparsa di una modica albuminuria e cilindruria. Nel sedimento urinario sono presenti anche, in quantità non rilevante, emazie. Non ho mai notato un'evidente epatomegalia, talvolta invece la milza appariva modicamente ingrossata. Abbastanza frequenti sono all'inizio della malattia le manifestazioni

a carico dell'apparato digerente: nausea, vomito, stipsi o diarrea, dolori a tipo colico ai quadranti superiori dell'addome.

Nei pazienti da me esaminati e in quelli di cui ho avuto notizia, non è mai comparso ittero. Fa eccezione un unico caso, in cui si trattava però probabilmente di un'infezione doppia, perchè il siero del paziente agglutinava a titolo elevato, oltre che *L. oryzei*, anche *L. ictero-haemorrhagiae*. Mancano del pari manifestazioni emorragiche.

In complesso, dalla sintomatologia che il paziente presenta, non è facile differenziare il quadro di questa spirochetosi da banali forme influenzali, reumatiche e dalla dengue. Nella diagnosi differenziale bisogna tener presente principalmente la mancanza, nella spirochetosi, di fatti catarrali a carico dell'apparato respiratorio, e la presenza invece dell'albuminuria ed ematuria, la cefalea persistente, l'infezione congiuntivale, la frequente ripresa febbrile dopo alcuni giorni di apiressia.

La diagnosi sicura può essere però posta soltanto con il reperto diretto dell'agente patogeno, o indirettamente, attraverso alle prove serologiche.

Il trovare direttamente la spirocheta nel sangue del paziente, sia con l'esame al paraboloide, sia in strisci colorati, è impresa del tutto eccezionale. Più facile dovrebbe essere il reperto, almeno a giudicare da ciò che accade per le altre spirochetosi, nel sangue centrifugato a lungo per 3 volte (metodo di Blanchard e Lefrou). Però anche questa ricerca è aleatoria e priva d'importanza pratica.

Nei miei casi non sono mai riuscito a trovare la spirocheta nel sedimento urinario. Ad ogni modo tale ricerca è da riprendersi ed estendersi, anche in vista dall'importanza che essa potrebbe assumere nell'epidemiologia della malattia (ricorderò a questo proposito un paziente di Slot e Walle ⁽⁶⁾, che continuò per 5 mesi ad emettere con l'urina spirochete patogene per la cavia e uno di Johnson ⁽⁷⁾ in cui la leptospiruria continuò per 11 mesi).

L'inoculazione di sangue del paziente in cavia sembra dare in questi casi risultati poco brillanti, ciò per la scarsa patogenicità di *L. oryzei* per quest'animale, che quasi sempre sopravvive all'infezione. Tutt'al più la cavia potrebbe forse servire da terreno d'arricchimento, qualora 3-4 giorni dopo l'inoculazione del materiale infetto si allestissero delle emoculture o delle culture con la sierosità peritoneale. Alcuni tentativi da me compiuti in questo senso, hanno dato risultati negativi, ma non è detto che insistendo nelle prove, non si arrivi a risultati migliori.

Una prova indiretta potrebbe essere costituita dalla ricerca delle agglutinine nel siero delle cavia inoculate con il materiale sospetto. Questa ricerca può essere però eseguita soltanto tardivamente, e, se negativa, non è probativa.

La ricerca culturale diretta della spirocheta dal sangue dei pazienti, sembra dare risultati favorevoli qualora sia praticata precocemente, all'inizio della malattia. E' infatti con questo procedimento che Mino ha isolato i suoi ceppi.

In genere però tutti questi metodi intesi a mettere in evidenza direttamente l'agente patogeno, hanno importanza soltanto se danno risultato positivo, e debbono essere effettuati precocemente, all'inizio della malattia, quando non è molto facile che gli ammalati cadano sotto la nostra osservazione. Dalle prove fatte sulle scimmie risulta anzi che le emoculture, facili ad ottenersi prima dell'inizio della febbre, diventano negative già il giorno precedente a questo.

Più sicure sono le prove serologiche, però queste hanno l'inconveniente di dare risultati probativi soltanto 7-10 giorni dopo l'inizio della malattia, servono cioè piuttosto per una diagnosi retrospettiva che per una attuale. Del resto neppure le prove serologiche danno sempre risultati sicuri nelle spirochetosi. Ricorderò a questo proposito un caso della Zuelzer ⁽⁸⁾ ⁽⁹⁾, che in un siero proveniente da un paziente di Sumatra, il cui sangue aveva provocato nella cavia una spirochetosi mortale, non trovò agglutinine, pur avendolo saggiato di fronte a 46 ceppi diversi, e il caso ancor più sorprendente, riferito da Slot e Walle ⁽⁶⁾, di un paziente il cui siero non agglutinava per nulla la spirocheta isolata dal suo sangue.

Oltre alla ricerca di agglutinine e di lisine nel siero, nel morbo di Weil ha importanza la ricerca di un eventuale potere protettivo del siero, qualora esso venga mescolato con una sospensione di spirochete virulente, che vengano poi inoculate nella cavia. Tale prova non può essere applicata nel nostro caso, data la scarsa patogenicità di *L. oryzei* per la cavia. Tutt'al più essa può essere impiegata, usando un ceppo di L.i.-h. virulento, per distinguere un'infezione da *L. oryzei* da una da *L. ictero-haemorrhagiae*.

Nella tabella qui allegata espongo i risultati delle prove di agglutinazione e lisi eseguite sui sieri di pazienti che m'hanno dato risultato positivo. I sieri NN 21 a, 22 mi sono stati inviati dal Prof. Mino, che mi ha inoltre segnalato i casi NN 3, 4, 8, 10; quelli NN 12-15 mi sono stati

	L. ory- zeti	L. bata- viae	L. ictero-haemorrhagiae						L. "Mezzano,"		L. py- rogenes	L. autum- nalis		L. hebdomadis		L. canicola		L. grippo- typhosa		L. bititexa
			Lister	Verdun	Wijnberg	Aut. Punt	Zaan	Kenin gs	Mino R 2	Icterioides	Mezzano 1	Mezzano 2	Ruch- mat	Pasteur A	Pasteur B	Utrecht	Alarik	Moskau 8	Straubing	
1	Frazitella .	10.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	De Domici .	10.000	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Fonsato .	10.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
4	Creola .	50.000	1.000	1.000	1.000	1.000	500	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Franzini .	5.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Teatini .	5.000	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	Boca .	5.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Lulli .	2.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	Pretta .	10.000	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
10	Friolotto .	5.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	Bersano .	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	Marsi .	10.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0	0	0	0	0	0	0	0
13	Gasio .	1.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	Garioni .	10.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	Bellotti .	50.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	Soldani .	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	Bortolozzo .	5.000	100	100	100	100	500	100	100	100	100	100	0	0	0	0	100	0	0	0
18	Cremona 68 .	1.000	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	Cremona 85 .	2.000	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
20	Zanetti .	1.000	0	5.000	100	0	100	100	500	1.000	0	0	0	0	0	0	0	500	100	0
21a	Raso .	5.000	10.000	5.000	5.000	5.000	20.000	5.000	5.000	1.000	0	0	1.000	0	0	0	1.000	0	0	0
21b	Raso .	1.000	2.000	5.000	5.000	5.000	5.000	5.000	5.000	100	0	0	0	0	0	0	500	0	0	0
22	Lisi .	2.000	10.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	5.000	0	0	2.000	0	0	0	0	0	0	0
23a	Tambussi .	500	100	500	500	500	100	100	100	100	2.000	1.000	100	100	100	100	0	0	0	0
23b	Tambussi .	1.000	2.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	Chiesa C. .	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	Novara 13 .	500	1.000	500	500	500	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	Cremona 80 .	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	Basini .	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	Michelini .	500	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0

Buona parte dei ceppi usati in queste prove, mi sono stati gentilmente inviati dai Proff. Schlossberger e Schüffner, e dai D.ri Sardjito ed Erber, che ringrazio vivamente per la loro cortesia.

inviati dal Prof. Bianchi, che m'ha segnalato anche il caso N 17. Ringrazio sentitamente i due Studiosi per la loro cortesia.

Come risulta dalla tabella, i sieri dal N 1 al N 19, hanno agglutinato, per lo più esclusivamente, oltre al ceppo Swart, quello Pavia I, mentre le prove d'agglutinazione eseguite con numerosi altri ceppi, hanno dato risultati negativi. In qualche caso soltanto s'è avuta l'agglutinazione anche di qualche altro ceppo, a titolo però molto più basso che per *L. oryzei*. Tali agglutinazioni, frequenti ad aversi anche nelle altre leptospirosi, sono da considerarsi paraspecifiche.

In tre casi (N 20-22) sono stati agglutinati ad alto titolo, oltre a *L. oryzei*, anche ceppi di *L. ictero-haemorrhagiae*. Nel primo caso s'è avuto l'ittero; nel secondo la prova di protezione per la cavia, usando un ceppo di L.i.-h., ha dato risultato positivo. Si deve ritenere cioè che in questi tre casi si sia trattato di un'infezione mista, o per lo meno di un'infezione da L.i.-h. in individui che avevano già superato un'infezione da *L. oryzei*.

Nel caso del N 23, si trattava di una donna infettata da una leptospira appartenente al gruppo « Mezzano ». Il siero prelevato subito all'inizio della malattia, agglutinava *L. oryzei* e *L. ictero-haemorrhagiae* e non ancora i ceppi responsabili della malattia in atto; quello prelevato dopo 50 giorni, agglutinava questi ultimi ceppi e numerosi altri, appartenenti a varie specie. Anche qui si può pensare che si sia trattato di un individuo che avesse già superato in precedenza una spirochetosi, oppure che si trattasse di una particolare condizione del siero, per cui la sua proprietà di dare agglutinazioni paraspecifiche fosse particolarmente accentuata.

Nel caso 24 l'agglutinazione raggiunge un così basso titolo che non può essere ritenuta come assolutamente dimostrativa per l'infezione.

Nei casi infine NN 25-28, sono agglutinate, a basso titolo, spirochete appartenenti a diverse specie. In tale caso è difficile dire quale sia l'agglutinazione specifica e quali le paraspecifiche. A questo proposito ricorderò che anche Korthof ^(1°) aveva notato che all'inizio della « Schlammfieber » le agglutinazioni paraspecifiche hanno valori pressochè uguali a quella specifica, e che appena più tardi è possibile, in base alla diversa altezza del loro titolo, differenziare questa da quelle.

Si tratta ora di discutere se in base alle ricerche compiute e qui esposte si possa essere autorizzati a ritenere *L. oryzei* una specie autonoma.

E' noto che a proposito dell'unicità e della pluralità delle specie di leptospire, la discussione è ancora apertissima. I più noti sostenitori della prima tesi sono Baermann e la Zuelzer, la seconda è sostenuta dalla maggior parte degli altri AA.

Non voglio entrare in merito a tale complessa questione e pur guardandomi bene dall'affermare che tutte le specie finora descritte abbiano ragione di essere considerate autonome, tuttavia mi pare che possediamo, per differenziare le varie specie di spirochete, criteri non di molto inferiori a quelli che i batteriologi hanno ritenuto sufficienti per differenziare, ad esempio, le Salmonelle tra di loro. In quanto alla possibilità che una specie possa trasformarsi in un'altra, questo è un ben più complesso problema d'ordine generale, che interessa tutta la biologia, e che non è qui il caso di discutere. Ciò che deve essere considerato si è se per *L. oryzei* sussistano sufficienti criteri differenziali che ci permettano di staccare questa dalle altre specie note, così come si è fatto, per esempio, per *L. grippo-typhosa* di fronte a *L. ictero-haemorrhagiae*.

Gli elementi che per questo scopo si prendono in esame, sono in primo luogo i risultati delle prove serologiche (agglutinazione, lisi, prove di protezione, prova di Rieckenberg), quindi la patogenicità per l'uomo e per gli animali, con particolare riguardo alla presenza o assenza della proprietà itterogena, infine i dati epidemiologici e altri eventuali criteri di secondaria importanza.

Dai dati esposti nella tabella di pag. 763 risulta già la specificità serologica di *L. oryzei*. Infatti i sieri dei pazienti che la agglutinano anche a titolo molto alto, non agglutinano o agglutinano soltanto a titolo molto basso i ceppi di spirochete appartenenti ad altre specie. Ho già detto come si debbano interpretare le rare eccezioni costituite da alcuni pochi sieri.

Come controprova ho ricercato la presenza di agglutinine per *L. oryzei* in 21 sieri di pazienti lombardi, piemontesi, bolognesi e romani che agglutinavano ad alto titolo (fino a 1:1.000.000) ceppi di L.i.-h. I risultati furono del tutto negativi. Infatti in un solo caso *L. oryzei* fu agglutinata, ma appena al titolo di 1:100.

Così pure ho saggiato i sieri di 56 individui che avevano contratto in provincia di Pavia un'infezione spirochetica da una Leptospira vicina a quella i.-h. Tali sieri, tutti positivi ad alto titolo per la spirocheta responsabile della malattia, non agglutinavano invece *L. oryzei*. Ne fanno ecce-

zione 13 soli sieri che la agglutinavano appena al titolo di 1:100 e 2 fino al titolo di 1:500.

Con 10 sieri (NN 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 21-a) ho eseguito la prova del potere protettivo nella cavia. A questo scopo ho preparato una sospensione in soluzione tamponata di Sørensen, di pappa di fegato di una cavia morta per infezione da *L. ictero-haemorrhagiae*. Quindi, dopo averla filtrata per cotone, l'ho tenuta per un'ora a contatto con il siero in esame, ed ho quindi inoculato la miscela in peritoneo ad una cavia di 250-300 gr. Tutte le cavie così inoculate vennero a morte in un periodo di 4-8 giorni col tipico quadro della spirochetosi ittero-emorragica. L'unica cavia sopravvissuta fu quella inoculata col siero N 21-a, siero che, come già dissi, proveniva con ogni probabilità da un individuo che aveva subito un'infezione doppia. Del pari sopravvisse una cavia di controllo inoculata con 1/10 di cc. di un siero proveniente da un convalescente di morbo di Weil.

Tali risultati hanno cioè confermato in pieno quelli ottenuti con le prove di agglutinazione e lisi.

Per evitare però le possibilità d'errore derivanti dalla comparsa di reazioni paraspecifiche, conveniva ricorrere a prove fatte usando sieri immuni monovalenti, ad alto titolo, ottenuti dal coniglio. E' noto che con tali sieri le reazioni paraspecifiche sono ridotte al minimo. Con un paziente lavoro di immunizzazione, sono riuscito ad ottenere una notevole serie di tali sieri.

Ho così visto che il siero anti-oryzeti, dal titolo di 1:110.000 non agglutina neppure al titolo di 1:100, i seguenti ceppi:

L. ictero-haemorrhagiae: Konings, Zaan, Bianchi 1, Roma II, Polen, Wijnberg, Mino R₃, Mino R₄, Lister, Verdun, Aut. Punt., icteroides Noguchi, Zini, Gemo, Ratto 52, Fiumicino 2, 3, 4, 5, 6.

L. ?: Mezzano I, Mezzano II, Feldrat 173 (Semarang).

L. canicola: Alarik, Utrecht.

L. pyrogenes: Bindjei, Rachmat, Salinem, Bangkinang I, Bangkinang II, Jow Yit.

L. grippo-typhosa: Straubing, Moskau V, Eggenfelden.

L. autumnalis: A Pasteur, B Pasteur, A (Reitano).

L. hebdomadis: Lister, H.

L. acquicole: biflexa Lister, Vinzent.

D'altra parte i sieri immuni, dal titolo 1:50.000-1:300.000, ottenuti con i seguenti ceppi:

L. ictero-haemorrhagiae: Lister, Polen, Konings, Verdun, Wjinberg, Mino R₃, Bianchi I, Roma II, Zaan, Aut. Punt.

L. ?: Mezzano I, Mezzano II, Feldrat 173 (Semarang).

L. canicola: Alarik, Utrecht.

L. pyrogenes: Bindjei, Rachmat.

L. grippo-typhosa: Mallersdorf, Straubing.

L. autumnalis: A Pasteur, B Pasteur.

L. hebdomadis: Lister.

L. acquicole: biflexa Lister, Vinzent.

non agglutinano neppure al titolo di 1:100 *L. oryzeti*.

Un altro genere di prove serologiche è stato eseguito preparando una serie di tubi di terreno Reiter, in cui tutto il siero necessario (diluito 1/6) era stato ottenuto da conigli immunizzati di fronte al ceppo Pavia I. Con ciascuno dei ceppi di spirochete di cui sono in possesso, ho seminato due tubi di tale terreno ed un altro tubo di terreno preparato con siero non immune (controllo).

Ho così visto che il siero immune anti-oryzeti non impedisce per nulla la rigogliosa crescita dei seguenti ceppi:

L.i.h.: Konings, Zaan, Bianchi I, Roma II, Polen, Wjinberg, Mino R₃, Mino R₄, Lister, Verdun, Aut. Punt., icteroides Noguchi.

L. ?: Mezzano I, Mezzano II, Feldrat 173 (Semarang).

L. canicola: Alarik, Utrecht.

L. pyrogenes: Bindjei, Rachmat.

L. grippo-typhosa: Straubing.

L. autumnalis: A Pasteur, B Pasteur, A (Reitano).

L. hebdomadis: Lister, H.

L. acquicole: biflexa Lister, Vinzent,

mentre è del tutto impedita la crescita del ceppo Pavia I e di quello Swart.

All'incontro *L. oryzeti* s'è sviluppata con facilità su terreni Reiter preparati con sieri immuni anti-ictero-haemorrhagiae e anti-grippo-typhosa.

Tali prove, ben più nette di quelle che, per esempio Schüffner ⁽¹¹⁾ ritiene sufficienti per poter affermare l'autonomia specifica di *L. canicola*, mi sembrano convincenti e tali da permettere di distinguere senz'altro *L. oryzeti* dalle altre specie da me studiate.

A queste va aggiunta la scarsa patogenicità di *L. oryzeti* per la cavia, patogenicità che, contrariamente a quanto avviene per *L. icterohaemorrhagiae*, non si esalta nei passaggi successivi, e la sua scarsa o nulla ten-

denza itterogena. Infatti sembra che uno solo dei pazienti infetti da tale spirocheta abbia presentato ittero, e del pari senza ittero è decorsa la malattia nelle scimmie e nelle tre cavie venute a morte per essa.

Per quanto questi dati possano sembrare sufficienti per considerare *L. oryzei* una buona specie, pure ulteriori ricerche m'hanno portato a prendere in esame la possibilità che tale specie non debba essere considerata del tutto nuova. Infatti, come risulta dalla tabella (pag. 763) c'è stato un ceppo, quello « Swart », inviatomi da Giava, dal Dott. Sardjito, con indicazione che si tratta di un ceppo appartenente alla specie *L. pyrogenes*, il quale s'è comportato in complesso esattamente come il ceppo Pavia I.

Il ceppo Swart è stato agglutinato dal siero anti-oryzei (titolo 1: 110.000) fino al suo titolo massimo, non s'è sviluppato nel terreno culturale preparato con tale siero, e, inoculato al coniglio, ha dato un siero del titolo di 1: 50.000, il quale mi ha agglutinato fino a 1: 42.000 il ceppo Pavia I. Da queste prove risulta che il ceppo Swart, serologicamente diverso dagli altri ceppi tipici (tipo Rachmat) di *L. pyrogenes* da me studiati, deve invece secondo ogni probabilità essere attribuito alla specie a cui appartiene anche il ceppo Pavia I.

Di recente m'è stato inviato dal Prof. Schüffner un altro ceppo isolato da Dinger ⁽¹²⁾ nelle Indie Olandesi: il ceppo « (Swart) v. Tienen », serologicamente identico al ceppo Swart inviatomi da Sardjito. Le prove serologiche finora eseguite, dimostrano che anche tale ceppo corrisponde perfettamente a *L. oryzei*. Infatti è agglutinato dal siero dei convalescenti che agglutinano *L. oryzei*, e il siero puro anti-oryzei lo agglutina al titolo limite (1: 110.000).

In una sua recente lettera il Prof. Schlossberger a cui avevo inviato il mio ceppo « Pavia I », mi comunica cortesemente di aver egli pure constatato l'identità di tale ceppo con quello « Swart » della sua collezione, e anche con un altro ceppo, denominato « Ratte Hospital », esso pure proveniente dalle Indie Olandesi.

Anche il Prof. Schüffner mi conferma gentilmente di aver constatato, anche impiegando la prova di saturazione del Castellani, l'identità serologica esistente tra *L. oryzei* ed il ceppo « (Swart) v. Tienen ».

Il ceppo « (Swart) v. Tienen » appartiene alla specie *L. bataviae*, specie a cui si devono ricondurre anche i ceppi « Swart » e « Ratte Ospital ». Essa è stata creata da Esseveld e Collier ⁽¹³⁾ per un gruppo di

leptospire (tipo Batavia), di cui il primo ceppo (ceppo Swart) è stato isolato a Batavia nel 1926 da Walch (¹⁴), e serologicamente differenziato da *L.i.-h.* e da *L. pyrogenes*, l'anno seguente dallo stesso Walch e da Soesilo (¹⁴).

La pubblicazione di Esseveld e Collier (¹³) porta la data del 10 agosto 1938, la mia prima nota (⁵) su *L. oryzei* è del 26 settembre, quindi, se l'identità delle due spirochete fosse senz'altro dimostrata, il nome di *L. bataviae* dovrebbe avere la precedenza, sia pure per una priorità di poco più d'un mese.

Vi sono però alcuni fatti che fanno per ora tenere in sospeso la questione: *L. bataviae* è stata isolata da un paziente morto con ittero ed emorragie, ed essa uccide con frequenza la cavia col quadro tipico del morbo di Weil.

Invece *L. oryzei* non ha dato mai ittero nell'uomo, tranne che in un solo caso descritto da Mino (¹⁶). Essa è scarsamente patogena per la cavia, e quando la riesce ad uccidere (cavie di 1 o 2 giorni di età) non dà in esse ittero. Inoltre per *L. bataviae* Sardjito e Postmus hanno dimostrato che riserva di virus è *R. norvegicus*; invece, a quanto mi consta, *L. oryzei* non è stata ancora mai trovata nei ratti delle zone infette (*). Quindi, pur propendendo a credere in base agli importantissimi risultati delle prove di agglutinazione, che *L. bataviae* ed *L. oryzei* siano un'unica specie, ritengo tuttavia prudente lasciare ancora in sospeso un giudizio definitivo, nell'attesa che ulteriori studi mi portino altri e più sicuri elementi di giudizio. Può sembrare strano che in due paesi così lontani e diversi per tanti caratteri, quali la Lombardia e le Indie Olandesi, possa trovarsi la medesima specie di leptospira. Però questo non sarebbe il primo caso del genere: infatti già Rimpau, Schlossberger e Kathe (¹⁷) hanno dimostrato che un ceppo isolato a Sumatra (ceppo 70) è serologicamente identico alla tedesca e russa *L. grippo-typhosa*, e non bisogna dimenticare che a Sumatra come in Lombardia esiste un ambiente comune a cui la leptospira sembra essere strettamente legata: la risaia.

Voglio ancora accennare che in una breve nota preventiva pubblicata poco fa, Mino (¹⁶) comunica di aver isolato da vari pazienti anitterici

(*) Mentre questa nota era in corso di stampa, è uscito un lavoro di MINO (Policlinico, sez. medica, p. 410, 1939) in cui quest'A. afferma di aver isolato *L. oryzei* dal rene di alcuni ratti.

ben 10 ceppi di una spirocheta, identificabile con *L. oryzei*, e di aver ottenuto con questa risultati positivi nelle prove di agglutinazione eseguite con 35 sieri di convalescenti.

Mino, mutando la sua primitiva opinione sostenuta fino a pochi mesi or sono, ritiene ora che tale spirocheta costituisca una specie nuova, che egli denomina *L. mitis*. Pure essendo lieto che Mino si sia accostato a quanto vado sostenendo da oltre un anno, non posso non rilevare che il nome di *L. oryzei* è di alcuni mesi antecedente a quello di *L. mitis*, e che quindi a prescindere dalla possibilità che *L. oryzei* si debba identificare con *L. bataviae*, in ogni modo il nome di *L. mitis* cade in sinonimia e non ha ragione d'essere mantenuto.

Resta a dire qualche cosa della diffusione della malattia e della sua epidemiologia.

I casi di spirochetosi da *L. oryzei* si sono presentati finora isolatamente, in vari comuni delle provincie di Vercelli, Novara, Pavia. Tutt'al più si sono avuti 3-4 casi per località. In complesso i casi finora diagnosticati sono scarsi, ma qualora si pensi alla difficoltà della diagnosi, al fatto che in molti casi sospetti si trattava di mondariso o tagliariso forestieri, che ritornavano subito a casa loro, rendendo così impossibile un controllo serologico del caso, bisogna ritenere che il numero totale degli ammalati sia stato di molto maggiore di quello riconosciuto.

Non bisogna dimenticare inoltre che *L. oryzei* non è l'unica specie responsabile della leptospirosi delle risaie. Alcuni casi, e principalmente quelli con ittero, vengono sostenuti da *L. ictero-haemorrhagiae* che, com'è noto, può dare una discreta percentuale di casi senza ittero (il 60 % secondo Schüffner) ⁽¹⁸⁾. Altri casi infine vengono sostenuti da un altro tipo di leptospira, vicina a quella i.-h., ma che pure se ne differenzia per alcuni caratteri serologici e biologici. Tale spirocheta, che sto attualmente studiando in collaborazione col Prof. Bianchi di Pavia, è risultata quest'anno responsabile di almeno 56 casi di spirochetosi, tutti decorsi senza ittero.

In ogni caso tutti gli ammalati da *L. oryzei* avevano avuto rapporto diretto o indiretto con l'ambiente risaia, ed è perciò la risaia che noi dobbiamo studiare quando vogliamo renderci conto dell'epidemiologia della malattia.

Ricorderò che le acque delle risaie piemontesi e lombarde, acque scarsamente correnti e quindi tiepide l'estate, ricche di fango e di sostanze

organiche, di reazione alcalina (pH 7,2-7,6), costituiscono un terreno ottimo per la sopravvivenza per lo meno, se non per la moltiplicazione delle leptospire patogene. Da queste acque ho con grande facilità coltivato, sul terreno di Zuelzer, *L. biflexa*. Non sono invece riuscito ad ottenere quella *oryzeti*, neppure mettendo a bagno nell'acqua sospetta delle cavia, secondo la tecnica di Appelman e van Thiel (¹⁹), e salassandole alcuni giorni dopo, dal cuore. Non è perciò ancora possibile dire se la spirocheta si contragga direttamente dall'acqua in cui essa vive, o se, come per *L. ictero-haemorrhagiae* e per altre specie, esista un animale serbatoio di virus, che con la maggiore verosimiglianza potrebbe essere il ratto.

Mi propongo, durante la prossima campagna di monda e di taglio, di indirizzare in questo senso le mie ricerche, sì da arrivare a risolvere questo problema, senza la cui esatta conoscenza è vano intraprendere efficaci tentativi di prevenzione e profilassi.

La malattia, come tutte le spirochetosi, lascia quasi certamente un'immunità. Quanto questa possa durare, è difficile dire. Il fatto che anche individui anziani che da molto tempo lavorano in risaia ne sono colpiti, e l'osservazione da me fatta in una paziente, in cui ad un anno di distanza il tasso d'agglutinine era sceso da 1:10.000 a 1:200 fanno pensare che l'immunità non debba avere una eccessiva durata.

L'aver superato un'infezione di *L. oryzeti* può proteggere dall'infezione da altre leptospire?

Quattro cavia che avevo immunizzato contro *L. oryzeti*, sono state inoculate, una dopo 20 giorni, una dopo mesi 2 ½ e due dopo 2 mesi con un ceppo virulento di L.i.-e. Tre di tali cavia sono sopravvissute, una delle due ultime è invece morta con ittero ed emorragie.

I tre risultati negativi sono strani perchè nel siero delle cavia immunizzate rispetto a *L. oryzeti* non sono dimostrabili anticorpi anti-icterohaem.

Nell'uomo però tale protezione non sembra avvenire. Infatti in un caso di infezione da spirochete tipo « Mezzano » la paziente presentava nel siero fin dai primissimi giorni di malattia, agglutinine per *L. oryzeti*, segno questo di una progressa infezione da questa specie e di un'immunità ancora in atto.

La malattia in questione ha un decorso benigno, per lo meno per quanto si è finora osservato. Non per questo però dobbiamo misconoscere l'importanza.

Per il notevole numero di lavoratori che potrebbe colpire, per la lunga astenia che la segue, essa può recare un danno economico notevolissimo. Non è poi detto che essa non possa, sotto l'influenza di particolari circostanze favorevoli, assumere una diffusione molto maggiore di quella attuale ed una maggiore gravità, sì da compromettere la nostra risicoltura. Ricorderò a questo riguardo l'esempio della Germania in cui la spirochetosi detta « Schlammfieber », epidemiologicamente molto simile a quella delle nostre risaie, spirochetosi che di solito decorre in forma benigna e che colpisce un numero relativamente scarso d'individui, nel 1926, in seguito ad inondazione, diede una epidemia molto estesa, che provocò 25 decessi.

Ma poichè un'efficace profilassi si può esercitare soltanto di fronte a quelle malattie di cui ben si conosca il meccanismo di diffusione e d'infezione, ne risulta la necessità di approfondire gli studi su questa spirochetosi, per meglio conoscerne l'epidemiologia.

Le proposte fatte, di rendere l'ambiente — risaia — inadatto alla vita della spirocheta con l'acidificazione delle sue acque o con la loro disinfezione per mezzo di particolari prodotti chimici quali il solfato di rame o la calciocianamide, appaiono del tutto inattuabili qualora si consideri il volume d'acqua che si dovrebbe trattare e le difficoltà d'ordine tecnico ed economico a cui s'andrebbe incontro.

La calciocianamide potrebbe anzi essere forse più dannosa che utile, per le lesioni cutanee che essa produce a chi la maneggia, lesioni che possono costituire delle comode porte d'ingresso per le spirochete.

Del pari, valore soltanto teorico possono avere le proposte di fornire a tutti i risaioli stivaloni e guanti di gomma, indumenti costosi, che costituirebbero un impaccio e che non sarebbero sopportati a lungo dalla massa dei lavoratori.

Anche la proposta di spalmare le gambe e le braccia dei lavoratori con particolari pomate protettive, non mi sembra pratica. Infatti i continui sfregamenti contro le erbe e le piante della risaia toglierebbero ben presto alla pelle questa protezione.

La vaccinazione che in altri paesi (Giappone), ma in località limitate e di fronte ad epidemie ad andamento grave ha dato buoni risultati, mi sembra di discutibile convenienza in risaia, dove si dovrebbero vaccinare decine di migliaia di persone, e contro una malattia prevalentemente lieve.

In conclusione, a mio parere, quando ci troviamo di fronte ad una malattia come questa, praticamente importante non già per la sua gravità, ma bensì per il danno economico che essa domani potrebbe recare allontanando dal lavoro un discreto numero d'individui proprio nel tempo in cui la loro opera è più necessaria, noi dobbiamo prendere in essenziale considerazione appunto questo fattore economico, e piuttosto che escogitare provvedimenti magari teoricamente perfetti, ma praticamente onerosissimi e inattuabili, converrebbe provvederci di mezzi di difesa praticamente sufficienti per permetterci di dominare eventuali episodi più gravi, e che non vengano con il loro costo sproporzionato ad incidere sul reddito di una cultura così importante per il nostro Paese, qual'è quella risicola.

Ritengo così che, per lo meno finchè l'epidemiologia della leptospirosi delle risaie non sia meglio conosciuta e finchè non si abbiano più precisi dati sulla reale diffusione della malattia, sarebbe utile apprestare una certa scorta di siero curativo e di vaccino, il primo per trattare gli eventuali casi gravi che si presentassero, il secondo per utilizzarlo soltanto qualora domani in una località la malattia dovesse assumere una diffusione o una gravità inconsuete.

RIASSUNTO

L'A. riferisce le ricerche che lo hanno condotto ad isolare dall'uomo una leptospira, *L. oryseti*, che dev'essere ritenuta responsabile di una parte dei casi di « leptospirosi delle risaie » manifestatisi nella pianura Padana, ed espone le caratteristiche serologiche e biologiche del parassita, da cui risulta che si tratta di una specie diversa da quelle finora note in Europa, specie affine e forse anche identificabile con *L. bataviae*.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Laboratorio di Batteriologia.

BIBLIOGRAFIA

(¹) MINO P., « La spirochetosi dei lavoratori delle risaie », Giorn. R. Accad. Med. Torino, 100, 203-221 (1937).

(²) REITANO U., « Sulla diagnosi serologica della spirochetosi ittero-emorragica », Giorn. Med. Milit., 86, 179-186 (1938).

(³) MINO P., « Accertamento serologico della spirochetosi in Provincia di Vercelli », Giorn. R. Accad. Med. Torino, 101, 99-106 (1938).

(⁴) MINO P., « La spirochetosi ittero-emorragica dei lavoratori delle risaie », *Minerva Med.*, 29, 481-486 (1938).

(⁵) BABUDIERI B., « Ricerche sulla leptospirosi del Vercellese », *Policlinico (sez. prat.)*, 45, 1774-1781 (1938).

(⁶) SLOT G. A., VAN DER WALLE N., « Leptospirosen in Bangkinang en omgeving », *Gen. Tijd. v. Nederl. Indie*, 72, 1579-1597 (1932).

(⁷) JOHNSON D. J., BROWN H. E., DERRICK E. H., « Weil's Disease in Brisbane », *Med. Jl. of Austr.*, 811 (1937).

(⁸) ZUELZER M., « Biologie und epidemiologie der Weil'schen Krankheit mit besonderer Berücksichtigung von Dänemark », *Acta Pathol. Microb. Scandinav.*, 12, 511-535 (1935).

(⁹) ZUELZER M., « Zur Biologie und Epidemiologie der Weil'schen Krankheit, mit besonderer Berücksichtigung von Dänemark. II », *C. f. Bakt.*, 137, 189-205 (1936).

(¹⁰) KORTHOFF G., « Experimentelles Schlammfieber beim Menschen », *C. f. Bakt.*, 125, 429-434 (1932).

(¹¹) WALCH B., SORGDRAGER-SCHUEFFNER W., « Die Selbständigkeit der *L. canicola* », *C. f. Bakt.*, 141, 97-109 (1938).

(¹²) DINGER, *Gen. Tijd. v. Ned.-Indie*, 73, 402 (1933).

(¹³) ESSEVELD H., COLLIER W., « Leptospirosen bei Kätzen auf Java », *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 93, 512-528 (1938).

(¹⁴) WALCH E. W., « Demonstratie van een Leptospira, geïsoleerd bij een patient, die klinisch het beeld eener Weilsche ziekte had vertoond », *Gen. Tijd. v. Ned.-Indie*, 66, 115-116 (1926).

(¹⁵) WALCH E. W., SOESILO R., « Vergelijkend serologisch onderzoek van te Batavia geïsoleerde en eenige andere Leptospira-stammen », *Gen. Tijd. v. Ned.-Indie*, 67, 84-97 (1927).

(¹⁶) MINO P., « Sulla eziologia della leptospirosi nel Vercellese », *Il Policlin. (sez. pratica)*, 46, 189 (1939).

(¹⁷) RIMPAU W., SCHLOSSBERGER H., KATHE J., « Ueber Leptospirosen in Deutschland », *C. f. Bakt.*, 141, 318-334 (1938).

(¹⁸) SCHUEFFNER W., « Recent work on Leptospirosis », *Trans. of the Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 28, 7-30 (1935).

(¹⁹) APPELMAN J. M., VAN THIEL P. H., « Das Isolieren von *Leptospira ictero-haemorrhagiae* aus Wasser », *C. f. Bakt.*, 133, 224-242 (1935).

