

57. L. RAVAIOLI, A. D'AMORE. — Ricerche sulla possibilità d'infezione da leptospira nei bovini dell'Agro Romano.

Riassunto. — Dopo un breve cenno bibliografico gli Autori prendono in considerazione l'eventualità che anche in Italia possano esistere infezioni da spirochete nei bovini.

A tale scopo hanno saggiato con l'agglutinazione 120 sieri bovini presi a caso. Essi hanno così potuto dimostrare come tale possibilità, benchè in piccola percentuale, esista.

Résumé. — Dans les derniers 15 ans plusieurs AA. de l'étranger, en Russie, en Palestine, dans l'Amérique du Nord et en Australie, ont décrit divers cas de leptospirose bovine.

En Italie on n'a signalé jusqu'ici aucun cas de cette infection. Dans l'éventualité, toutefois, que cette maladie ait pu se produire sans aucune manifestation de symptômes, ou qu'elle ait pu être confondue, par erreur, avec d'autres maladies, les AA. ont essayé par la méthode de l'agglutination 120 sérums de bovidés pris au hasard, afin de déceler l'éventuelle présence d'anticorps spécifiques agglutinant les leptospires. Tous les sérums appartenaient à des bovidés âgés de plus de quatre ans, d'une race de la Maremme, provenant de la Campagne Romaine. La technique utilisée pour la réaction sérologique est celle adoptée par l'Istituto Superiore di Sanità.

D'après les résultats de ces essais, on a pu constater qu'à peu près 5% des bovidés examinés ont eu sûrement un contact avec des leptospires pathogènes.

La plupart des cas positifs doivent être attribués à infection par *Leptospira ictero-hemorrhagiae*, mais aussi la *Leptospira Pomonae* a démontré cette possibilité. Il paraît sûr, toutefois, que l'évolution de ces infections a été sans aucune manifestation symptomatique.

Summary. — In the last 15 years various foreign AA., in Russia, Palestine, North America and Australia, have described several cases of bovine leptospirosis.

Up to the present, in Italy, no case has been reported of this infection. It being, however, possible that this disease may have manifested itself asymptotically or have been confused with other diseases, the AA. have tested by the method of agglutination 120 sera of bovines taken at random with a view to detecting a possible presence of specific antibodies agglutinating the leptospiras. All of the sera were taken from bovines more than four years old, of a race of La Maremma, coming from that large tract of land in Italy which is known under the name of « Cam-

pagna di Roma». The technique used for the serological reaction is that adopted by the «Istituto Superiore di Sanità».

From the results of the above tests it was possible to establish that 5% of the bovines in question had had surely contacts with pathogenic leptospiras.

Most of the positive cases are to be attributed to infection by *Leptospira ictero-hemorrhagiae*, but also *Leptospira Pomonae* has shown this possibility. It must be assumed, however, that the development of such infections had been an asymptomatic one.

Zusammenfassung. — In den letzten 15 Jahren wurden von mehreren fremden Verfassern in Russland, Palästina, Nordamerika und Australien verschiedene Fälle von Rinderleptospirose beschrieben.

Bis heute sind in Italien noch keine derartigen Infektionsfälle bekannt geworden. Für den Fall aber, dass diese Krankheit asymptomatisch aufgetreten, oder mit anderen Krankheiten verwechselt worden sein könnte, haben die VV. 120 Rindersera, ohne Auswahl, durch Agglutination versucht, um die eventuelle Anwesenheit von spezifischen, die Leptospire agglutinierenden Antikörpern hervorzuheben. Die Sera waren alle von über 4 Jahre alten Rindern der Maremma - Rasse aus dem Agro Romano. Die für die serologische Reaktion angewendete Technik ist die im Istituto Superiore di Sanità gebräuchliche.

Aus den Ergebnissen der Proben konnte man feststellen, dass ca. 5% der Rinder sicher mit pathogenen Leptospiren in Kontakt gewesen sind.

Die grösste Anzahl der positiven Fälle ist Infektionen von *Leptospira icterohemorrhagiae* zuzuschreiben, aber auch *Leptospira pomonae* hat diese Möglichkeit erwiesen. Es ist aber anzunehmen, dass diese Infektionen einen asymptomatischen Verlauf gehabt haben.

Tra le leptospirosi animali, quelle del bovino sono a tutt'oggi le meno conosciute specie in Italia.

Non è nostra intenzione discutere qui l'eziologia della febbre catarrale maligna, e i lavori, che del resto devono ancora essere confermati, del Goetze (1).

In questi ultimi quindici anni alcuni Autori hanno visto e descritto casi di leptospirosi nei bovini, specie in Russia, in Palestina, nel Nord America e nell'Australia.

Nel sud della Russia, Nicolski, Desjatow, Martschenko ed altri citati dal P. H. Van Thiel (2) hanno descritto nel 1935 una infezione del bo-

(1) R. GOETZE, La presenza di Lept. nella febbre catarrale maligna del bovino, Duetsche Tier. Woch, pag. 517 (1940).

(2) P. H. Van THIEL, The leptospiroses, pag. 194 (1948).

vino caratterizzata da ittero ed emoglobinuria. Da bovini morti con tale sintomatologia Minchin isolò una leptospira. La cultura pura di tale spirocheta fu ottenuta nel 1939 da Terskich ⁽³⁾.

L'agente eziologico fu chiamato da Semskow ⁽⁴⁾ «leptospira ictero-haemoglobulinaria». Tuttavia dato che il Schuffer nel 1918 aveva chiamato una leptospira isolata a Sumatra «icterohaemoglobinuria» (black water fever) Van Thiel ⁽²⁾, per evitare confusione nella nomenclatura propone l'aggiunta di «bovis». Queste leptospire però non sembra che, almeno sierologicamente, si assomiglino. Gli esami sierologici eseguiti da Terskich e Schutow avvicinano maggiormente la «ictero-haemoglobulinuria bovis» alla grippo-typhosa. Nei sieri di bovini che avevano subito l'infezione Terskich e Schutow rilevarono la presenza di agglutinine per tale leptospira.

Nel 1941 Awrorow ⁽⁵⁾ più di una volta riuscì a dimostrare la presenza di leptospire nel lume di tubuli contorti di reni di vitelli morti, e Romanesko ⁽⁴⁾ isolò la leptospira dalle urine di un vitello colpito dall'infezione.

In genere gli Autori sono concordi col ritenere fonti di infezioni i cibi e le acque contaminate, specie le acque stagnanti. La percentuale di mortalità riportata è molto varia, quella d'infettività può andare dal 2 al 55% in una mandria infetta.

E' probabile che il topo possa essere nella leptospirosi bovina, come in quella umana, uno tra i principali vettori dell'infezione ed a tale proposito Semskow trovò agglutinine specifiche in sei topi su venti, ma non riuscì ad isolare la leptospira.

Lo stesso Autore osservò la malattia in pecore, capre e cavalli e sperimentalmente giudicò il parassita poco patogeno per la cavia ed il coniglio.

Secondo quanto scrive Van Der Hoeden ⁽⁶⁾ nel suo libro, Friend, Trainin e Malkin hanno osservato in Palestina nel 1941 una infezione itterica nei bovini molto simile alla leptospirosi descritta dagli Autori A. Russi. La leptospira che venne isolata da Bernkopf ⁽⁷⁾ fu chiamata dall'Autore «Leptospira bovis». Detta leptospira fu considerata sierologicamente diversa dalle altre leptospire conosciute. Successivamente però (Olitzki) essa fu identificata con la *L. grippotyphosa*. Tale leptospira risultò pa-

⁽³⁾ TERSKICH, Zschr. Ges. Hyg., 49, 107 (1942); Ref. Munch. Med. Wschr., 117 (1940).

⁽⁴⁾ M. W. SEMSHOW, Die Aetiologie, Klinische Formen und die Epizootologie des Icterus infectiosus der Rinder. Zscher. Vetkund, 5, 7 (1941).

⁽⁵⁾ A. A. AWROROW, Einige Ergebnisse der Erforschung der pathogenese des Icturus infectiosus der Rinder, Zschr. f. Vetkunde, 32 (1941).

⁽⁶⁾ J. Van der HOEDEN, De Zoonosen, Leiden (1946).

⁽⁷⁾ H. BERNKOPF, Report on bovine leptospirosis in Palestine (1948).

togena anche per gli uomini che avevano stretti contatti col bestiame ammalato e per coloro che ne manipolavano le carogne. Tale possibilità ha fatto considerare la malattia in questione tra quelle professionali.

La sintomatologia che essa determina è nell'uomo assai simile a quella dovuta al morbo di Weil (Btes). Clinicamente vi sono molti punti di contatto nel decorso della malattia tra l'uomo e il bovino. Nè nell'uomo nè nel bovino è stata descritta emoglobinuria. Tuttavia è possibile rintracciare le leptospire nell'urine di entrambi dalla settimana alla decima giornata dell'infezione (Padersky).

L'ittero non è sempre presente, e nel bestiame le nefriti interstiziali sono state descritte come caratteristiche. Il vitello anche quando ha superato l'infezione può eliminare, per un periodo assai lungo, le leptospire dall'urina. Questi animali rappresentano forse i più gravi diffusori e serbatoi di leptospirosi bovina. Oltre i bovini, anche le pecore e le capre sono suscettibili alla malattia (Bernkopf) mentre gli animali da laboratorio, quali il ratto e il cane sembrano refrattari.

Nel 1944 Jungherr E. ⁽⁸⁾ descrisse, negli Stati Uniti di America tre casi sporadici di leptospirosi in bovini e riuscì a mettere in evidenza le leptospire nel fegato e nei reni col metodo di colorazione di Levaditi.

Nel 1945 sempre nell'America del Nord, il Marsh ⁽⁹⁾ comunicò reperti simili, mentre lo Johnson ⁽¹⁰⁾ nel '43 descrisse casi di leptospirosi bovina in Australia.

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DEL LAVORO

Data la presenza nell'Agro romano di piroplasmosi bovina quindi di una forma morbosa a sintomatologia che potrebbe riferirsi anche a leptospirosi, abbiamo voluto controllare se nel siero di bovini, macellati a Roma al pubblico macello, esistessero o no anticorpi agglutinanti specifici per le leptospire, a che titoli, in che percentuale e per quali specie.

I bovini, ai quali è stato prelevato il sangue al momento della iugulazione, erano tutti ad anamnesi completamente ignota.

Tutti gli animali provenivano dall'Agro romano, ed erano di razza maremmana o da essa direttamente derivata. In genere si trattava di animali in buone condizioni generali, e di età aggirantesi tra i quattro e i dieci anni.

⁽⁸⁾ H. JUNGHERR, Bovine leptospirosis, J.A.V.M.A., 105, 276-281 (1944).

⁽⁹⁾ MARSH HADLEIGH, Leptospira in bovine ictero-haemoglobinuria, J.A.V.M.A., 119-121 (1945).

⁽¹⁰⁾ P. W. JOHNSON, Epidemiology of Weil's disease, Brit. Med. Jor., 2, 659.

Dato il carattere più che altro informativo generale delle nostre ricerche, non abbiamo creduto opportuno raccogliere dati anamnestici precisi sugli animali, cosa del resto non facilmente attuabile per ovvie ragioni pratiche, non ultima il carattere sospetto dei proprietari di bestiame.

TECNICA

Assai numerosi sono stati i metodi che i diversi Autori hanno usato per mettere in evidenza gli anticorpi specifici nei sieri dei malati. Ma fra tutti, quello che maggiormente ha risposto allo scopo e si è affermato nella pratica, è la reazione di Martin e Petit o dell'agglutinazione e della lisi.

Per le nostre ricerche abbiamo eseguito l'agglutinazione con la stessa tecnica usata dal Prof. Babudieri all'Istituto Superiore di Sanità.

L'antigene è dato da culture recenti di leptospire (quattro-venti giorni) in terreno di Reiter-Ramne modificato da Babudieri ⁽¹¹⁾.

La cultura prima dell'uso viene controllata al paraboloide per poterne valutare: la ricchezza, e quindi se necessario opportunamente diluirla, o la presenza di ammassi di leptospire che possono simulare una agglutinazione.

I sieri conservati in ghiacciaia a +4° non subiscono alcun trattamento preliminare.

Il siero viene diluito 1:10 in soluzione cloruro sodica al 0,85%. Di questa diluizione se ne pongono cm³ 0,05 in una serie di provettine d'agglutinazione, tante quante sono i ceppi di leptospire in esame.

L'antigene, rappresentato dalla cultura di leptospire in toto (se è troppo ricca si diluisce in soluzione fisiologica), viene aggiunto nella quantità di cm³ 0,45 per provetta. Ogni provettina viene così a contenere cm³ 0,50 di sospensione, e la diluizione finale del siero è a 1:100. Per ogni ceppo di leptospira si pone un controllo consistente in cm³ 0,50 di sola cultura.

Le provette vengono quindi agitate e poste in termostato a 37° C per due ore, e l'agglutinazione viene letta al paraboloide prelevando con un ansa una goccia da ogni provetta.

In caso di agglutinazione negativa le leptospire si vedono libere e mobili come nel controllo, se invece è positiva, le leptospire libere sono pochissime, mentre invece appaiono i caratteristici ammassi delle leptospire agglutinate e più o meno lisate. Alle volte alla periferia di queste sfere o matasse, rimane attaccate qualche leptospira che presenta movimenti molto vivaci.

(11) B. BABUDIERI, Ricerche di laboratorio per la diagnosi di leptospirosi, Rend. Ist. Sup. di Sanità, vol. V, 1012-1043

Alla prima prova, in caso di positività, ne segue una seconda partendo da siero diluito 1:100 (che con l'aggiunta dell'antigene porta la diluizione 1:1000), quindi una terza con siero diluito 1:1000, una quarta con siero diluito 1:10.000 ecc. fino al titolo massimo.

I due fenomeni, quello dell'agglutinazione e della lisi, non sempre concordano o procedono di pari passo. In genere l'agglutinazione è più evidente e avviene a titoli superiori che la lisi (II).

Anche qui, come nelle reazioni d'agglutinazione con batteri possono verificarsi fenomeni di « zona muta o negativa ».

L'agglutinazione cioè manca a bassi titoli mentre compare a più forti diluizioni. Secondo Babudieri ⁽¹¹⁾ però in questi casi pur mancando una vera agglutinazione le leptospire si presentano anormali, rifrangenti a contorni poco netti; granulose con movimenti esagerati o legati; tutti fenomeni questi che non sfuggono ad un occhio esercitato. Inoltre sieri positivi per un ceppo di leptospira pur presentando il fenomeno della zona negativa hanno spesso coagglutinine a basso titolo per altri ceppi. Per cui se la reazione viene allestita saggiando un certo numero di ceppi diversi, il fenomeno della zona negativa potrà comparire in alcuni di essi, ma non in tutti. In casi d'infezione umana ad esempio la *Lep. pomonae* determina la comparsa di coagglutinine ad alto titolo per la *Lep. ictero-haemorrhagiae*. Sembra però che questo non avvenga negli animali da esperimento ⁽¹²⁾. Nulla invece si sa per i grossi animali domestici.

I sieri da noi saggiati con la tecnica sopra descritta sono stati 120. Come è riportato dallo specchio accluso e i ceppi usati sono stati:

due di *Lep. ictero-haemorrhagiae* (Zaan e Wynberg), uno di *Lep. grippotyphosa* (Eggenfelden), uno di *grippo-typhosa bovis* (Olitzki), uno di *Sejroe* (M 84), uno di *canicola* (Alarik), uno di *bataviae* (Pavia I) uno di *Australis B* (Zanoni), uno di *pomonae* (Mezzano I).

Data la scarsità di lavori sull'argomento in medicina veterinaria specie per i bovini, non è possibile stabilire con esattezza a priori il titolo minimo di agglutinazione cui attribuire un significato specifico, e in base a questo, dichiarare con certezza positiva o negativa una reazione.

La diluizione minima da cui siamo partiti è stata di 1/100.

Non abbiamo creduto opportuno iniziare da diluizioni minori tenendo presente come, sia in umana, sia in precedenti lavori sulle leptospirosi del cane [Babudieri e Castagnoli ⁽¹³⁾, e del bovino (Bernkopf ⁽⁷⁾)] i sieri

⁽¹²⁾ B. BABUDIERI, La posizione sistematica delle leptospire del tipo « Mezzano », Rend. Ist. Sup. di Sanità, 4, 460-468 (1941).

⁽¹³⁾ B. BABUDIERI e B. CASTAGNOLI, Ricerche sulla frequenza delle infezioni nei cani di Roma, Ann. d'igiene [50], 4, 145-162 (1940).

[illegible]

siano considerati positivi solo quando determinano agglutinazione a diluizioni molto più forti.

A tale proposito il Bernkopf in un recente lavoro sulla leptospirosi in Palestina (7) scrive che bisogna tener presente la possibilità che nel siero bovino esistano anticorpi naturali. In base a ricerche sierologiche eseguite in mandrie tenute sotto severo controllo veterinario e in cui non si erano mai verificati casi di leptospirosi Egli ha potuto stabilire come il titolo agglutinante, da potersi considerare sicuramente positivo sia di 1:200.

Volendo tuttavia considerare non totalmente prive di valore anche le agglutinazioni a titolo 1:100 risulta che su 120 sieri solo 22 hanno dimostrato di possedere agglutinine specifiche. Se invece, consideriamo positivi solo i sieri che hanno superato tale titolo, cosa questa che riteniamo più rispondente al vero, da 22 scendiamo a 6, cioè solo al 5% del totale.

Nessuno dei sieri saggiati è risultato positivo per tutte le specie di leptospire. La percentuale maggiore, sia come numero totale che come titolo d'agglutinazione la troviamo per il ceppo Zaan e Wynberg, entrambi appartenenti alle specie ictero-haemorrhagiae.

Il ceppo Eggenfeld (specie gruppo-typhosa) è stato agglutinato una unica volta dal siero n. 15 a titolo però basso.

Anche il ceppo Olitzki isolato di recente in Palestina da bovini e non ancora classificato con assoluta sicurezza (grippe-tophosa bovis?) ha agglutinato tre sieri, il 22, 79, 82 a titoli però assai bassi. Vi è tuttavia da tener presente che questi sieri, non hanno presentato agglutinazione per nessuna altra specie di leptospira, per cui non è possibile invocare in questo caso, nessun fenomeno di coagglutinazione. La Sejroe ha dato una sola agglutinazione a titolo non probativo.

Colla leptospira canicola (ceppo Alarik) dei tre sieri che hanno dato agglutinazione positiva, due sono a titolo di 1:100, e il siero 11 che è giunto fino al titolo di 1:1000, ha presentato agglutinazione positiva fino a 1:10.000 per entrambi i ceppi della ictero-haemorrhagiae, per il ceppo della pomonae, e di 1:1000 per l'australis B. In tali casi quindi l'agglutinazione per la Lep. canicola è da considerarsi senz'altro come paraspecifica. Lo stesso dicasi per la leptospira australis B dato che l'unico siero che l'abbia agglutinata a titolo superiore a 1:100 è lo stesso siero 11.

Con la leptospira pomonae, oltre il siero 11 che ne ha determinato agglutinazione fino a 1:10.000 si è avuta reazione sicuramente positiva solo con il siero 48.

In Italia sono note le infezioni da leptospira pomonae nel maiale, ed è noto come detta infezione possa venire trasmessa dall'animale all'uomo. Non è da escludersi quindi che anche il bovino possa venire infettato da questa leptospira.

CONCLUSIONE

Dal risultato delle prove eseguite si può concludere:

1) Il numero dei bovini che sicuramente hanno avuto contatto con leptospire patogene non è forte (circa il 5%) tuttavia tale possibilità esiste;

2) con ogni probabilità tale infezione è decorsa in maniera asintomatica od è totalmente sfuggita come entità nosologica a sè. Al momento della macellazione nessuno dei bovini presentava sintomi riferibili anche lontanamente ad essa;

3) il maggior numero di casi positivi è da riferirsi a un'infezione da leptospira ictero-haemorrhagiae;

4) per i casi riferibili alla grippo-typhosa (bovis) è difficile e prematuro il pronunciarsi dato il tasso assai basso d'agglutinazione e dato che la leptospira-grippo-typhosa si trova molto raramente in Italia;

5) le agglutinazioni per la canicola, l'australis B, sono da ritenersi quasi sicuramente paraspecifiche;

6) la possibilità che la leptospira pomonae dia una infezione dei bovini è sicuramente dimostrata dal risultato ottenuto col siero n. 48 e, con grande probabilità anche da quello n. 11.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia.
28 giugno 1949.
