

VOLUME XXV

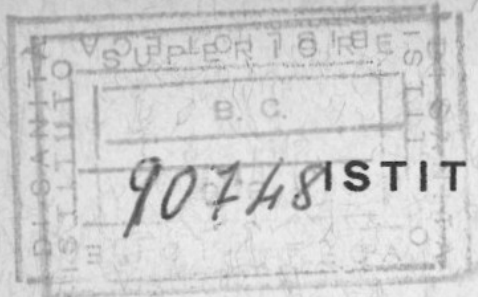
PARTI I - II

RENDICONTI

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ



ROMA: FONDAZIONE EMANUELE PATERNÒ
VIALE REGINA ELENA, 299 - ANNO 1962



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

DIRETTORE

GIORDANO GIACOMELLO

CAPI DEI LABORATORI E DEI SERVIZI

BIBLIOTECA: BRUNO MANZONE - **BIOLOGIA:** ANTONIO GALAMINI - **CHIMICA:**
— — . **CHIMICA BIOLOGICA:** G. B. MARINI-BETTOLO - **CHIMICA TERAPEUTICA:**
DANIELE BOVET - **ELETTRONICA:** MARCO FRANK (Inc.) - **FISICA:** MARIO AGENO
- **INGEGNERIA:** SALVATORE SALOMONE - **MICROBIOLOGIA:** GIUSEPPE PENSO -
PARASSITOLOGIA: EZIO MOSNA - **VETERINARIA:** VITTORIO MAZZARACCHIO -
SEGRETERIA DIDATTICA-MUSEO SPERIMENTALE: GIUSEPPE RUSSO - **SERVIZI**
AMMINISTRATIVI E DEL PERSONALE: ITALO DOMENICUCCI

CENTRO INTERNAZIONALE DI CHIMICA MICROBIOLOGICA: E. B. CHAIN (Inc.).

COMITATO SCIENTIFICO

GIORDANO GIACOMELLO - *Presidente*

GIUSEPPE AMANTEA - GUIDO BARGELLINI - GINO BERGAMI - GIOVAN BATTISTA
BONINO - GIUSEPPE CARONIA - GIULIO COTRONEI - PIERO DI MATTEI - BASILIO
FOCACCIA - GAETANO MARTINO - SILVIO RANZI

Rendiconti Istituto Superiore di Sanità

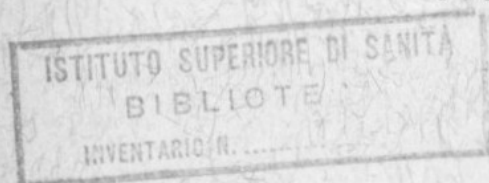
Dir. responsabile: DOMENICO MAROTTA

Redattore Capo: DANIELE BOVET

FOTOGRAFIE, TAVOLE, DIAGRAMMI, DISEGNI
ESEGUITI DAI FOTOGRAFI E DISEGNATORI DELL'ISTITUTO
A. PICCIRILLI - A. PACELLI

DISEGNO NEL FRONTESPIZIO:

FOCO A ROTA DI CARBONI ACCESI (1464)



INDICE

1. G. TIECCO — Ricerca degli estrogeni sintetici negli alimenti - Nota I.
Validità dei metodi biologici di controllo.
— Research on synthetic estrogens in foodstuffs. - I. Validity of the bio-
logical methods p. 5
2. G. TIECCO — Ricerca degli estrogeni sintetici negli alimenti. - Nota II.
Una nuova tecnica di controllo biologico.
— Research on synthetic estrogens in foodstuffs. - II. A new technique of
biological control 14

(Continua in terza pagina di copertina)

28. B. BABUDIERI, L. A. SCURO, A. MEDDA e G. SARACENI. — **Indagini epidemiologiche sulle leptospirosi nelle risaie della Sardegna.**

Riassunto. — Viene ricercata, mediante indagini serologiche, la presenza di leptospirosi nelle persone che lavorano nelle risaie sarde di Arborea e Oristano. Le percentuali di positività trovate sono piuttosto elevate, specie nelle risaie di Arborea, dove il pH del terreno e delle acque è più favorevole alla sopravvivenza delle leptospire. Nell'anamnesi dei soggetti seropositivi mancano di solito i segni sicuri di una pregressa infezione.

I sierotipi predominanti sembrano essere *ballum*, *ictero-haemorrhagiae*, *saxkoebing*.

Summary. — The AA. have investigated, by means of serological examinations, the presence of leptospirosis in the workers in the Sardinian rice-fields of Arborea and Oristano. The percentages of positives found are rather high especially in the Arborea rice-fields where the soil and waters pH is more favourable to survival of leptospirae. In the anamnesis of serum positive subjects usually there are no certain signs of a precedent infection.

The predominant serotypes seem to be *ballum*, *ictero-haemorrhagiae*, *saxkoebing*.

1) PREMESSE.

In una precedente nota ⁽¹⁾ uno di noi, in collaborazione con Moscovici, riferì i risultati di alcune ricerche preliminari, condotte in Sardegna con lo scopo di accertare l'eventuale esistenza della leptospirosi nelle risaie sarde.

Si potè stabilire che in 17 di 44 sieri saggiati (38,6%) vi erano se-roagglutinine anti-leptospire; in 8 casi il titolo di queste agglutinine era maggiore di 1/100. Erano agglutinati i serotipi: *ictero-haemorrhagiae*, *ballum*, *bataviae*, *grippotyphosa*, *australis*. Fu possibile anche isolare un ceppo di *ballum* da *Apodemus sylvaticus dicrurus*.

In considerazione del fatto che le risaie sarde erano di recente impianto (da 7 a 12 anni), sembrò lecito avanzare l'ipotesi che negli anni successivi l'epidemiologia della leptospirosi, in particolare la frequenza relativa dei singoli serotipi, potesse mutare in seguito allo stabilirsi di un equilibrio definitivo nella fauna dei piccoli roditori presenti nelle zone coltivate a riso.

Ci è parso, pertanto, opportuno riprendere l'indagine a distanza di sette anni, con l'intento di stabilire l'odierna situazione epidemiologica della leptospirosi nelle risaie sarde.

2) UBICAZIONE ED ESTENSIONE DELLE RISAIE SARDE.

Le risaie sarde hanno attualmente una estensione di circa 1350 ettari contro i 460 del 1955. E' da rilevare, però, che vi è in questi ultimi anni



la tendenza a non estendere ulteriormente questo tipo di coltura, semmai a ridurlo per dare la preferenza ad altre coltivazioni più redditizie.

Le risaie sono situate in due zone: quella di Oristano, comprendente le risaie dei comuni di S. Giusta, Naruscineddu, Cabras, Massama, Zer-

faliu, Zeddiani, Simaxis, S. Vero Congiu, Sili, Ollastra Simaxis, Siama maggiore (estensione complessiva di ettari 900) e quella di Arborea, comprendente numerose risaie nel comprensorio di bonifica della stessa Arborea, note con il nome di Serra nuscedda, Cuccuru de su fenughu, Pesci arbiu, Su pirasteddu (estensione totale di ettari 400). Esiste, inoltre, un'altra piccola area, coltivata a riso, nel comune di Muravera, ove non si effettua la monda, poichè viene impiegato un sistema particolare di coltivazione mediante inondazione. In questa risaia, che ha una estensione di 50 ettari, lavorano soltanto tre operai.

Nei lavori di risaia sono ora impiegati pressochè esclusivamente soggetti di sesso maschile, a differenza di quanto si verificava negli anni precedenti al 1955, in cui la monda ed il raccolto erano espletati, per lo più, da giovani donne. Nessun lavoratore fa uso di gambali protettivi.

Per quanto attiene ai caratteri del terreno ed alla fauna presente nell'ambiente delle risaie, rimandiamo alla precedente nota di BABUDIERI e MOSCOVICI ⁽¹⁾.

3) METODO DI STUDIO E TECNICA DELLA RICERCA.

Le indagini, da noi condotte nelle risaie della Sardegna, sono state rivolte a:

- determinare il pH delle acque di risaia;
- individuare i roditori presenti nell'ambiente di risaia;
- tentare l'isolamento di leptospire;
- ricercare la presenza di agglutinine anti-leptospira nel siero dei risaioli.

I tentativi di isolamento delle leptospire sono stati eseguiti mediante coltura, in terreno liquido di Korthof modificato, di pappa di rene appartenente a roditori catturati lungo gli argini dei canali e nei locali di raccolta del riso.

Gli anticorpi agglutinanti sono stati ricercati con la tecnica abituale dell'Istituto Superiore di Sanità.

Il saggio delle sieroagglutinine è stato condotto su 187 risaioli, dei quali 102 addetti alle risaie della zona di Arborea e 85 a quelle della zona di Oristano. Tutti i lavoratori erano di origine sarda ed in precedenza non avevano mai soggiornato nè svolto la loro attività in risaie dell'Italia continentale.

3) RISULTATI.

a) *Reazione delle acque di risaia.* Nella Tab. I sono riportati i dati relativi alle determinazioni da noi effettuate su acqua prelevata nei canali di irrigazione e su fango di risaia.

TABELLA I

Reazione delle acque di risaie sarde

	Canale di irrigazione	Risaia
<i>Zona di Arborea</i>	pH	pH
Canale Sassu	6	—
Serra Nuscedda	6	6,2
Cuccuru de su fenughu	6,2	6,5
Pisci arbiu	—	6
Su pirasteddu	—	6
<i>Zona di Oristano</i>		
Simaxis	5,5	5,7
S. Giusta	5,7	5,6
Zeddiani	5,6	5,2 (6,2 *)
Cabras	5,5	5,6

(*) pH rilevato in una zona molto limitata della risaia.

L'esame della Tabella permette di rilevare che il pH è costantemente acido; si è notata, però, una differenza tra il pH delle acque delle risaie situate nella zona di Arborea e quello delle risaie appartenenti alla zona di Oristano. Infatti, mentre nel comprensorio di Arborea il pH ha variato nei canali di irrigazione tra 6 e 6,2 e in risaia tra 6 e 6,5, nelle risaie della zona di Oristano il pH è risultato sempre più basso (tra 5,5 e 5,7 nelle acque dei canali e 5,2-5,7 in risaia).

Si può dire, pertanto, che attualmente l'acidità delle acque delle risaie sarde è maggiore rispetto a quella rilevata nella zona di Arborea nel 1955, che si aggirava intorno pH 6,9 per l'acqua dei canali di afflusso e intorno a pH 6,2-6,4 per quella dei canali di efflusso o per l'acqua stagnante in risaia.

b) *Roditori presenti in risaia.* L'unica differenza riscontrata, rispetto alle precedenti indagini del 1955, riguarda la comparsa nell'ambiente delle risaie sarde di *Micromys minutus sorcinus*. Si è potuta confermare, peraltro, la netta prevalenza di *Apodemus sylvaticus* e di *Epimys decumanus*, specialmente lungo gli argini dei canali di irrigazione.

c) *Tentativi di isolamento di leptospire patogene.* Sono stati tutti infruttuosi, sia nelle zone di Oristano che in quelle di Arborea. Sono state utilizzate a questo scopo pappe di rene dei seguenti roditori: *Apodemus sylvaticus dicrurus*, *Epimys decumanus*, *Micromys minutus sorcinus*.

d) *Ricerca di seroagglutinine antileptospire.* I dati relativi al saggio degli anticorpi serici agglutinanti sono riassunti nelle Tabelle II-

TABELLA II

Sero-agglutinine anti-leptospire in 187 lavoratori delle risaie presenti in Sardegna

Serotipo	Titolo delle sero-agglutinine			
	1/100	1/500	1/1.000	1/5.000.
icterohaemorrhagiae incompleta	5	2	—	—
icterohaemorrhagiae ictero-haemorrhagiae	—	1	1	—
canicola	7	3	—	—
pomona	—	—	—	—
bataviae	—	—	—	—
grippytyphosa	1	1	—	—
australis	3	—	—	—
zanoni	—	1	—	—
saxkoebing	16	4	1	—
sejroe	—	—	—	—
ballum	1	4	5	4
hyos	2	—	—	—
poi	2	—	—	—
mini	2	—	—	—
n	39	16	7	4

III-IV-V. Nella Tab. II sono riportate le positività per i singoli serotipi di leptospire osservate nei 187 risaioli. E' dato di rilevare che il maggior numero di positività significative (titolo $> 1/100$) riguarda i serotipi: *ballum* (13 positività), *saxkoebing* (5 positività), *canicola* (3 positività), *ictero-haemorrhagiae ictero-haemorrhagiae* e *ictero-haemorrhagiae incompleta* (2 positività per ciascuna) *grippo-typhosa* e *zanoni* (1 positività per ciascuna). Positività a titolo $1/100$ si sono avute anche per i serotipi *australis*, *hyos*, *poi*, *mini*.

Tenendo distinti i dati per zona di provenienza, si nota (Tab. III) che le positività per *ballum* e per *ictero-haemorrhagiae* riguardano esclusivamente la zona di Arborea, mentre le positività a titolo $> 1/100$ per *saxkoebing* sono presenti solo nei sieri dei risaioli della zona di Oristano.

TABELLA III

Sero-agglutinine anti-leptospire in 102 lavoratori addetti alle risaie della zona di Arborea ed in 85 addetti a quelle della zona di Oristano (CA)

Serotipo	Zona di Arborea				Zona di Oristano			
	Titolo delle agglutinine				Titolo delle agglutinine			
	1/100	1/500	1/1.000	1/5.000	1/100	1/500	1/1.000	1/5.000
icterohaemorrhagiae in-completa	5	2	—	—	—	—	—	—
icterohaemorrhagiae ictero-haemorrhagiae	—	1	1	—	—	—	—	—
canicola	3	2	—	—	4	1	—	—
pomona	—	—	—	—	—	—	—	—
bataviae	—	—	—	—	—	—	—	—
grippotyphosa	1	1	—	—	—	—	—	—
australis	—	—	—	—	3	—	—	—
zanoni	—	1	—	—	—	—	—	—
saxkoebing	7	—	—	—	9	4	1	—
sejroe	—	—	—	—	—	—	—	—
ballum	1	4	5	4	—	—	—	—
hyos	—	—	—	—	2	—	—	—
poi	1	—	—	—	1	—	—	—
mini	—	—	—	—	2	—	—	—
	18	11	6	4	21	5	1	—

Le percentuali di positività delle seroagglutinine antileptospire sono riportate nella Tab. IV. Si osserva che la percentuale di positività glo-

TABELLA IV

Percentuale di sieri positivi per agglutinine anti-leptospire in 187 lavoratori delle risaie sarde

	Positività globale			Positività > 1/100	
	N.	N. (*)		N. (*)	
Sieri esaminati	187	45	24 %	21	11.2%
Sieri zona Arborea	102	24	23.5%	15	14.7%
Sieri zona Oristano	85	21	24.7%	6	7 %

(*) Alcuni sieri contenevano agglutinine per più leptospire.

bale è del 24% sui 187 sieri esaminati. Nel 1955 su 44 sieri si ebbe, invece, una positività globale del 38,6%.

Le positività a titolo > 1/100 sono state 21 su 187 campioni, pari all'11,2% (nel 1955 furono 8 su 44, pari al 18,2%). Tenendo distinti i

sieri della zona di Arborea da quelli della zona di Oristano, si vede che le percentuali di positività globali non si discostano di molto, essendo rispettivamente pari a 23,5% e 24,5%.

Una differenza chiaramente significativa esiste, invece, tra le percentuali di positività a titolo $> 1/100$, riscontrate nelle due zone: in quella di Arborea essa è stata del 14,7%, in quella di Oristano del 7%.

Infine, nelle Tab. V e VI, i dati delle seroagglutinzioni sono raffrontati al numero di anni trascorsi in risaia dai soggetti presi in esame.

TABELLA V

Raffronto tra positività della reazione di sero-agglutinazione antileptospire e anzianità di occupazione in risaia dei 187 lavoratori esaminati

Zona di Arborea					Zona di Oristano			
Anni di lavoro	Sieri esam.	Sieri neg.	Sieri positivi		Sieri esam.	Sieri neg.	Sieri positivi	
			$\leq 1/100$	$> 1/100$			$\leq 1/100$	$> 1/100$
1	20	18	—	2	25	19	6	—
2	17	16	1	—	13	10	2	1
3	13	13	—	—	8	6	—	2
4	5	4	1	—	5	5	—	—
5	9	7	1	1	7	5	2	—
6	5	—	2	3	9	6	1	2
7	12	8	1	3	3	2	—	1
8	4	3	—	1	4	2	2	—
9	4	3	1	—	2	2	—	—
10	4	1	1	2	9	7	2	—
11	1	1	—	—	—	—	—	—
12	3	1	—	2	—	—	—	—
13	—	—	—	—	—	—	—	—
14	3	1	1	1	—	—	—	—
15	1	1	—	—	—	—	—	—
Impr.	1	1	—	—	—	—	—	—
	102	78	9	15	85	64	15	6
Sintesi								
1-5	64	58	3	3	58	45	10	3
6-10	29	15	5	9	27	19	5	3
11-15	8	4	1	3	—	—	—	—

Si rileva che esiste un chiaro rapporto tra percentuali di sieropositività e anzianità di lavoro in risaia, nel senso che più elevato è il numero di positività a titolo $> 1/100$ nei risaioli più anziani.

4) COMMENTO.

Nel loro complesso, i dati delle indagini ora condotte, confermano quelli ottenuti nel 1955 da BABUDIERI e MOSCOVICI (¹). Ci sembra, però, che possano farsi alcuni rilievi degni di interesse.

Anzitutto, va segnalato che il pH delle acque di risaia si è spostato ancor più verso l'acidità. Ciò può darci ragione delle difficoltà di isolamento di leptospire patogene dal fango, poichè esse trovano un ambiente ancor meno favorevole alla loro vita ed al loro sviluppo. E' da ricordare, tuttavia, che nel 1955 fu possibile a Babudieri e Moscovici isolare in coltura pura, ad Arborea, da *Apodemus sylvaticus dicrurus*, un ceppo di *ballum*. Questo isolamento riveste notevole importanza, poichè viene a confortare i risultati dell'indagine serologica, che hanno appunto dimostrato la presenza di agglutinine per *ballum* a titolo variabile da 1/100 a 1/5.000, con netta predominanza di titoli $> 1/100$, nel siero dei risaioli della zona di Arborea.

Per quanto attiene alla fauna dei roditori esistenti nelle risaie sarde, è da segnalare il rilievo della comparsa del *Micromys minutus sorcinus*. E' da presumere, pertanto, che nel prossimo futuro questo roditore possa diffondere anche nelle risaie sarde il serotipo *bataviae*, di cui è il principale portatore.

I risultati più significativi delle nostre ricerche sono quelli di ordine serologico. Essi fanno presumere che, nonostante le sfavorevoli condizioni di vita (acidità delle acque) numerose leptospire patogene siano presenti nelle risaie sarde: infatti, in numerosi risaioli si è potuta documentare l'esistenza di un movimento anticorpale specifico nei confronti di diversi serotipi di leptospire patogene.

Rispetto al 1955 non si sono notate differenze significative per quanto concerne i tipi serologici agglutinati dai sieri prelevati nella zona di Arborea. Comunque, ci sembra degno di rilievo il fatto che nella zona suddetta si siano avute numerose positività per *ballum*, serotipo che, in risaia, è presente particolarmente in Spagna, tra i Paesi dell'Europa continentale [BABUDIERI (²)]. Ciò fa ritenere che esistano alcune correlazioni tra la penisola iberica e la Sardegna, anche per quanto attiene alla ecologia della suddetta leptospira patogena [FIASCHI e SCURO (³)].

Nella zona di Oristano prevale, invece, il serotipo *saxkoebing*; inoltre, in questa zona si sono avute positività a titolo $> 1/100$ in percentuale nettamente inferiore di quella relativa alla zona di Arborea. Quest'ultimo dato è verosimilmente da mettere in rapporto con il diverso pH delle acque di risaia, notevolmente più acido nelle risaie intorno ad Oristano.

La differenza di acidità tra le acque delle risaie di Oristano e quelle

delle risaie di Arborea può essere considerata significativa per quanto riguarda la maggiore o minore durata di sopravvivenza, per lo meno di alcuni serotipi di leptospire. Infatti in un recente lavoro GORDON SMITH e TURNER ⁽⁴⁾ hanno dimostrato che mentre per alcuni tipi di leptospire (*ictero-haemorrhagiae*, *hyos*, *australis*) differenze di pH tra 5,7 e 6,8-6,5 non modificano in misura significativa la durata della loro sopravvivenza, per altri invece (*javanica*) si va dai 17 giorni a pH=5,7-5,9 ai 35 per un pH=6,2 e a 75 per uno =6,5.

Queste differenze di sensibilità dei vari tipi di leptospire al pH del mezzo potrebbe spiegare non soltanto la percentuale molto più elevata di positività significative fra i lavoratori della zona di Arborea, meno acida, ma anche la presenza, in tale zona, di seropositività per i tipi (*ballum*, *ictero-haemorrhagiae*) che sembrano mancare nella zona di Oristano.

Un'indagine anamnestica, condotta tra i 187 risaioli sottoposti al saggio delle sieroagglutinine antileptospire, ha permesso di rilevare che soltanto pochi di essi, esattamente 15, avevano presentato, durante i periodi di lavoro in risaia, manifestazioni cliniche, le quali potevano far sospettare una malattia leptospirosica. D'altro canto, non è sembrato sussistere uno stretto rapporto tra presenza di sieroagglutinine antileptospire e rilievo anamnestico di sospetta leptospirosi. Si deve ammettere, tuttavia, che molti lavoratori hanno subito una infezione da leptospire patogene, la quale è stata quasi sempre asintomatica. Questo fatto va forse attribuito alla esiguità della carica infettante, dipendente, a sua volta, dall'esistenza di condizioni ambientali poco favorevoli alla vita delle leptospire (acidità delle acque di risaia).

Un ultimo dato, su cui riteniamo necessario di soffermarci, è quello relativo al raffronto tra positività serologiche e numero di anni di lavoro in risaia. Questo raffronto ci consente di rilevare che esiste una evidente correlazione tra la durata di esposizione al contagio e la presenza di movimento immunitario umorale. A questo riguardo si è avuta una più chiara conferma di quanto già si era intravisto nelle ricerche del 1955.

5) CONCLUSIONI.

Non v'è dubbio che la leptospirosi esiste nelle risaie della Sardegna. Tuttavia, le caratteristiche ambientali di queste risaie, in particolare quelle relative alla reazione acida delle acque di irrigazione e del fango, sono poco favorevoli alla vita delle leptospire. E' verosimile che a questo fatto debba imputarsi la difficoltà di isolare leptospire, soprattutto dal fango di risaia.

La frequenza dei serotipi presenti in Sardegna è diversa rispetto a quella rilevata nelle risaie della valle padana; nell'isola prevalgono, nell'ordine, i serotipi *ballum*, *saxkoebing*, e *ictero-haemorrhagiae*, mentre, come è noto, nelle risaie della pianura padana i serotipi di gran lunga più frequenti sono il *bataviae* e l'*ictero-haemorrhagiae*.

Nel loro insieme, i risultati delle nostre indagini confermano dunque la presenza della leptospirosi nelle risaie sarde, ma consentono anche di affermare che, almeno sino ad oggi, questa infezione non rappresenta per i lavoratori dell'isola quel grave pericolo che essa continua a costituire per i risaioli dell'Italia settentrionale.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

Cagliari — Istituto di Patologia medica e metodologia clinica dell'Università.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) BABUDIERI B. e MOSCOVICI C. - Leptospirosi nelle risaie del Lazio e della Sardegna. Rend. Ist. sup. Sanità, 48: 70 (1955).
 - (²) BABUDIERI B. - Le leptospirosi. Atti III Congr. Intern. Igiene e Medic. Mediterr. Palermo, 1951.
 - (³) FIASCHI E. e SCURO L. A. - Aspetti ecologici delle leptospirosi. Giorn. Mal. Inf. Parass., 1962, in stampa.
 - (⁴) GORDON SMITH C. E. e TURNER L. H. - The effect of pH on the survival of Leptospirae in water., Bull. W.H.O., 24: 35 (1961).
-