



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie - Dipartimento di Scienze Animali

TESI DI LAUREA IN MEDICINA VETERINARIA

La Leptospira negli allevamenti equini della
Regione Veneto.

Relatore: Dott.ssa Maria Elena Falomo

Correlatori: Dott.ssa Daniela Pasotto

Prof. Roberto Mantovani

Laureanda: Eva Armellin

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

*Cos'è la vita?
Lo sfavillare di una lucciola nella notte,
il respiro sbuffante di un bisonte nell'inverno,
la breve ombra che scorre sopra l'erba
e si perde dentro il sole.*

Piede di Corvo

INDICE

INTRODUZIONE	6
1. OBIETTIVI	6
2. BIOLOGIA	7
3. PATOGENESI	8
4. SINTOMATOLOGIA	9
5. ASPETTI RIPRODUTTIVI DELLA LEPTOSPIROSI	9
6. DIAGNOSI	12
7. FATTORI DI RISCHIO	15
8. PREVENZIONE	17
9. CONFRONTO CON LE ALTRE SPECIE ANIMALI	19
MATERIALI E METODI	20
1. AZIENDE	20
2. FATTRICI	20
3. CAMPIONAMENTO	21
4. ESAMI EFFETTUATI	21
5. ANALISI DEI DATI	22
RISULTATI E DISCUSSIONI	25
CONCLUSIONI	37
BIBLIOGRAFIA	40
RINGRAZIAMENTI	45

INTRODUZIONE

1. OBIETTIVI

La leptospirosi è un'importante zoonosi diffusa a livello mondiale, che colpisce l'uomo, gli animali domestici e selvatici (Bernard, 1993). Diversi serovars colpiscono gli equini (Donahue *et al*, 2000), ma nella maggior parte dei casi si ha un'infezione subclinica, che rende difficile stimare la reale diffusione di questa patologia (Szeredi *et al*, 2006). Nelle fattrici può essere sporadicamente causa di aborto o mortalità perinatale (Donahue *et al*, 2000) ed è, quindi, fonte di perdite economiche per gli allevatori. Mentre nei cavalli può generare patologie renali o più specificatamente l'uveite ricorrente equina (Verma *et al*, 2005).

Nel 2005 la titolazione anticorpale per *Leptospira* è stata inserita all'interno di uno studio sulla diffusione di potenziali agenti abortigeni nelle cavalle TPR (Tiro Pesante Rapido) della Regione Veneto.

Il lavoro è stato condotto grazie ai finanziamenti dalla Regione Veneto in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, l'Associazione Regionale Allevatori del Veneto e la Dottoressa Falomo Maria Elena.

Lo scopo finale era quello di comprendere l'entità del pericolo derivante dalla presenza di *Leptospira* negli allevamenti valutati e di considerare quali potessero essere le necessarie misure di controllo ambientali o l'eventualità di introdurre la vaccinazione, come avviene già in molti paesi europei.

Innanzitutto l'ANAV ha stilato un elenco degli allevatori interessati ad aderire alla ricerca. C'è stata, quindi, una visita alle aziende e un prelievo preventivo alle fattrici, seguito da un ulteriore campionamento al fine di valutare eventuali problemi riproduttivi durante la stagione 2005.

2. BIOLOGIA

La *Leptospira* (dal greco *leptòs* sottile, *spéira* spirale) è classificata come una spirocheta gram negativa, asporigena, ha un corpo esile e filamentoso, la forma a spirale, con parete cellulare (Donahue *et al*, 2000). Il battere è dotato di flagelli periplasmatici altamente mobili, che gli permettono movimenti di rotazione attorno all'asse centrale, di flessione, traslazione e ondulazione (Poli *et al*, 2002). È un parassita obbligato e per la sua sopravvivenza richiede ossigeno, acqua stagnante o ambienti umidi, al riparo dalla luce diretta. Inoltre necessita di calcio, fosforo e potassio e di una temperatura tra i 20 e i 30°C. Le leptospire patogene possono sopravvivere da 15 giorni fino oltre i 3 mesi in ambienti con clima umido e caldo e in suoli a pH neutro, mentre sono sensibili all'essiccamento (Poli *et al*, 2002).

Questo patogeno può essere diviso in due complessi: *L. Biflexia*, che è saprofita, e *L. Interrogans*, che include tutti gli organismi patogeni (Bernard, 1993).

I sierotipi appartenenti al complesso *L. Interrogans* possono essere non ospite-specifico, in questo caso il battere non è adattato alla specie che infetta, e l'infezione è di tipo accidentale (Bernard, 1993). Tale condizione comporta una sintomatologia più grave (Williams *et al*, 1994), ma, quando è eliminata la fonte di infezione, si ha la guarigione dell'animale (Donahue *et al*, 2000).

Il complesso delle leptospire patogene include anche ospiti-specifici, che causano una sintomatologia lieve (Williams *et al*, 1994), ma, essendo adattati alla specie animale che colonizzano, permettono la permanenza del battere nell'organismo e la sua eliminazione nell'ambiente per tutta la vita (Bernard, 1993).

Dagli studi epidemiologici effettuati sulla leptospirosi equina, si può concludere che le sieroprevalenze variano tra le diverse regioni (Williams *et al*, 1994).

Le elevate prevalenze, il frequente isolamento e l'identificazione degli anticorpi contro il sierotipo *Bratislava* hanno fatto pensare a questo sierotipo come quello ospite-specifico per gli equini (Donahue *et al*, 2000). Mentre il sierotipo *Pomona* è quello più coinvolto nell'aborto equino (Williams *et al*, 1994).

Altri serovars non ospite specifico sono stati isolati con prevalenze diverse in base alle aree geografiche esaminate. Per esempio *L. Pomona*, *L. Grippotyphosa* e *L. Icterohaemorrhagica* sono largamente diffusi negli Stati Uniti (Williams *et al*, 1994), in Brasile (Hashimoto *et al*, 2007) e in Europa (Szeredi *et al*, 2006, Baverud *et al*, 2009).

3. PATOGENESI

La trasmissione si ha soprattutto mediante contatto con le urine infette o con fieno e acqua contaminati dalle urine di animali infetti. Nel nostro caso è importante rilevare la possibilità della trasmissione transplacentare, che può comportare aborti o nascita di puledri già infetti (Barwick *et al*, 1997). Durante la fase acuta tutti i secreti dell'organismo possono contenere il battere. Quindi si devono considerare anche il latte, le lacrime e il sangue. Per questo motivo si deve porre attenzione anche alle fattrici che stanno allattando (Poli *et al*, 2002).

L'ingresso del battere nell'organismo può avvenire tramite le mucose del primo tratto gastroenterico o attraverso lesioni cutanee (Poli *et al*, 2002). Grazie alla sua motilità raggiunge velocemente il sangue e si diffonde in tutto l'organismo, continuando a moltiplicarsi. La batteriemia si ha circa dopo 4-10 giorni dall'infezione, segue una diffusione a livello sistemico, con produzione di endotossine e possibilità di eventi febbrili. Dopo aver causato lesioni endoteliali e vascolari, le leptospire scompaiono dal sangue e si localizzano negli organi bersaglio: fegato, rene e meningi. Quando giungono al rene, si ha l'escrezione dei batteri tramite le urine, la quale può persistere per tutta la vita dell'animale, soprattutto se si tratta di un sierotipo ospite-specifico (Bernard, 1993).

La virulenza e la sintomatologia della leptospirosi dipendono molto dalla quantità di microrganismi, che si trovano nell'organismo, e dal tipo di serovar infettante, quindi dalla sua patogenicità e dalla sua capacità di adattarsi all'ospite. Molto importanti sono la risposta e la competenza del sistema immunitario dell'animale infettato. Infatti, l'opsonizzazione inattiva le leptospire e impedisce la batteriemia. Se la risposta immunitaria non è adeguata, si ha una diffusione del battere agli organi e, quindi, conseguenze più gravi (Bernard, 1993).

4. SINTOMATOLOGIA

La sintomatologia, che si evidenzia negli equini, provoca febbre, anoressia, ittero, emoglobinuria, problemi renali ed epatici, uveite ricorrente, con problemi di fotofobia, miosite e lacrimazione, fino alla cecità (Szeredi *et al*, 2006). Si possono, inoltre, riscontrare problemi nella fertilità, con aborto asintomatico dopo il sesto mese di gestazione, mortalità perinatale, oppure nascita di puledri già malati o nati prematuri (Bernard, 1993).

L'isolamento di questo battere avviene solo occasionalmente, poiché la maggior parte delle infezioni decorre in forma subclinica e le prove diagnostiche nei riguardi di *Leptospira* non sono sempre effettuate (Bernard, 1993).

L. Pomona in Nord America e *L. Grippotyphosa* in Europa sembrano essere le cause principali dell'uveite ricorrente equina (Verma *et al*, 2005), che si manifesta dopo i 12-24 mesi dall'infezione (Bernard, 1993).

Cavalli infettati con questo sierotipo possono produrre anticorpi, i quali aggrediscono la cornea, provocando una cross-reazione degli stessi anticorpi contro i tessuti dell'occhio, creando, quindi, un'autoimmunità con uveite ricorrente di gravità sempre maggiore e sempre più estesa, fino ad avere come ultimo risultato la cecità (Verma *et al*, 2005). Le lesioni oculari, se esaminate al microscopio, presentano neutrofili e fibrina aggregata (Poli *et al*, 2002).

5. ASPETTI RIPRODUTTIVI DELLA LEPTOSPIROSI

L'aborto e la morte perinatale sono tra le maggiori cause di perdita economica nell'allevamento equino (Donahue *et al*, 2000). Tra i diversi patogeni coinvolti compaiono l'arterite virale equina, EHV-1, miceti, *Streptococchi spp*, *Staphylococcus aureus*,.. Mentre il riconoscimento di *Leptospira interrogans*, come causa di questa sintomatologia, è molto complesso, soprattutto per l'insufficiente identificazione e studio, dovuti alla difficoltà d'isolamento e di coltura del patogeno (Bernard, 1993).

Il sierogruppo *Pomona* (serovar *Kennewick*) è maggiormente coinvolto in caso di aborto (Szeredi *et al*, 2006) (Bernard, 1993) (Donahue *et al*, 2000): la *Leptospira* passa dal circolo ematico a quello placentare, causando placentite e

infiammazione del cordone ombelicale, i quali impediscono un'adeguata nutrizione del feto (Sebastian *et al*, 2005).

L'aborto può avvenire tra il sesto mese e il termine della gravidanza ed è asintomatico. Quest'evento ne rende ancora più difficile il riconoscimento (Donahue *et al*, 2000). Inoltre, da uno studio effettuato da Pilgrim *et al* (1999), è risultato che la presenza di leptospire nell'organismo materno non è univocamente correlata all'aborto. Infatti, non tutte le fattrici sieropositive hanno in seguito problemi di perdita del prodotto del concepimento o di nascita di puledri malati, perché la sintomatologia dipende anche dalla quantità di batteri, che infettano l'animale e dal sierotipo infettante, oltre che dalla risposta del sistema immunitario materno. Inoltre, sembrano avere un ruolo importante anche le condizioni meteorologiche durante la gravidanza. Infatti, un clima umido con alluvioni sembra incrementare i casi di aborto dovuto alle leptospire (Szeredi *et al*, 2006).

Gli annessi embrionali si presentano edematosi, con vasculite e trombosi generalizzate (Donahue *et al*, 2000). Con l'impregnazione argentea (Warthin-Starry) si rileva la presenza delle spirochete nella gelatina di Warton, nello stroma, nei villi della placenta (Donahue *et al*, 2000) e nello stroma dell'allantocorion (Szeredi *et al*, 2006). Il corion è necrotico e ha un aspetto itterico, mentre nello stroma sottostante l'epitelio corionico presenta segni di infiammazione: aree perivascolari necrotiche, con linfociti, plasmacellule e neutrofili diffusi (Sebastian *et al*, 2005).

Sulla faccia allantoidea dell'allantocorion si possono trovare delle microcisti nodulari, mentre su quella dell'allantoamnios si rilevano frequentemente zone di necrosi con cellule linfocitarie e neutrofiliche (Sebastian *et al*, 2005).

L'amnios può essere ispessito e opaco, con un colorito brunastro, mentre il cordone ombelicale è ingrossato con un essudato denso, ricco di neutrofili non degenerati e fibrina, presenti anche nella gelatina di Warton (Sebastian *et al*, 2005).

Nel feto abortito le lesioni riscontrabili sono molteplici e la loro presenza è variabile (Whitwell *et al*, 2009), ma le caratteristiche che accomunano tutti i feti sono la presenza di edema generalizzato, ittero, petecchie e trombi (Donahue *et al*, 2000).

Con il metodo Warthin-Starry le spirochete sono evidenziabili nel citoplasma di cellule endoteliali, epiteliali dei tubuli, muscolari del cuore, epiteliali del surrene, nei neuroni, nei macrofagi e negli epatociti, oltre che nel lume dei tubuli renali, degli alveoli polmonari, dei sinusoidi epatici e splenici e nei vasi di molteplici organi fetali (Szeredi *et al*, 2006). La presenza di antigeni di *Leptospira* in fegato, rene e polmoni si dimostra con l'utilizzo dell'immunoistochimica (Szeredi *et al*, 2006).

Il fegato del feto aumenta di volume, con aspetto itterico, marmorizzato e friabile (Szeredi *et al*, 2006). Con un'analisi microscopica, si può evidenziare degenerazione epatocitaria e delle cellule dei dotti biliari, osservando dilatazione dei sinusoidi, infiltrazione portale di leucociti e presenza di cellule giganti nel parenchima (Whitwell *et al*, 2009).

I reni fetali si presentano edematosi con striature bianche corticomidollari (Donahue *et al*, 2000). I tubuli renali sono dilatati, con fibrosi e tubulonefrosi, ma la caratteristica principale è la presenza di microascessi renali, che sembrano essere specifici di infezione da *Leptospira* (Donahue *et al*, 2000).

Gli altri organi, che possono essere colpiti, sono il polmone con polmonite, trombi ed emorragie (Szeredi *et al*, 2006). La milza può essere moderatamente aumentata di volume, con vasculite e perivasculite; mentre la midollare del surrene è congesta e la corticale presenta infiltrazione di cellule mononucleate (Whitwell *et al*, 2009).

Nel caso di nascita di un puledro vivo ma infetto, esso presenta ittero, stress respiratorio con ipoventilazione, piressia (Bernard, 1993) o ipotermia, perdita del riflesso della suzione (Leon *et al*, 2006), depressione, anossia e coma (Leon *et al*, 2006). Ad un esame batteriologico delle urine, si possono trovare le leptospire (Bernard, 1993).

Il puledro, se trattato tempestivamente, può guarire (Donahue *et al*, 2000), altrimenti all'anatomopatologia si evidenziano ittero generalizzato, edema interstiziale e congestione. I reni possono presentare glomerulonefrite, necrosi tubulare e nefrite interstiziale (Bernard, 1993), mentre a livello polmonare si può notare emorragia, atelettasia con consolidamento dei lobi cranioventrali. L'epicardio può presentare petecchie multifocali (Vemulapalli *et al*, 2005).

6. DIAGNOSI

Le metodiche diagnostiche per la leptospirosi sono molte, anche se non tutte sono così precise e specifiche (Szederi *et al*, 2006).

La determinazione del sierotipo coinvolto nell'infezione è necessaria sia a livello epidemiologico, sia per il possibile sviluppo di un vaccino contro la leptospirosi da utilizzarsi nella regione esaminata (Donahue *et al*, 2000).

La raccolta e la conservazione dei campioni devono essere accurate, poiché le leptospire sono molto labili al di fuori dell'organismo (Donahue *et al*, 2000). Per la raccolta dei campioni si deve considerare che il trattamento con antimicrobici può alterare i risultati diagnostici, mentre i diuretici possono rimuovere i batteri dal rene, pertanto il prelievo deve essere effettuato prima di qualsiasi terapia (Bernard, 1993). È necessario, poi, tenere presente che l'emissione di leptospire con l'urina è intermittente. Quindi potrebbero essere necessari più prelievi per ottenere la positività (Bernard, 1993).

Inizialmente abbiamo la coltura (a temperature di 28-30°C con siero di coniglio), metodo molto accurato e sicuro, ma che richiede troppo tempo. Infatti, si possono dover aspettare i risultati da 15 giorni, fino a sei mesi, a causa del lungo tempo di replicazione cellulare, fino a 20 ore (Donahue *et al*, 2000). Esiste, poi, la necessità di specifici terreni di trasporto e di coltura: i campioni devono essere analizzati nel più breve tempo possibile dopo il prelievo, senza poter essere congelati, ma solo refrigerati (Donahue *et al*, 2000).

I campioni prelevabili per questo esame sono sangue e urina per la diagnosi in vita, fegato e rene per quella post-mortem (Tegliabue, 2008). I batteri devono essere immediatamente posti a 4°C con albumina serica bovina (BSA) e con una diluizione di 1:10, unita a una parte di siero o urina e nove parti di BSA (Bernard, 1993).

L'indagine con il campo oscuro è effettuata in fluidi o tessuti omogeneizzati ed è usata come controllo del risultato della coltura (Williams *et al*, 1994). Essa richiede un campione fresco, con una grande quantità di organismi presenti nel vetrino, in caso contrario è difficile distinguerli dagli artefatti, soprattutto se l'operatore non ha una grande esperienza. Lo stesso dicasi per l'impregnazione argentea (Warthin-Starry), dove è frequente interpretare un artefatto come una *Leptospira* (Szederi *et al*, 2006).

Un valido metodo diagnostico è la PCR (Polymerase Chain Reaction), con la quale è identificato il DNA delle leptospire. I tessuti prelevati (rene, fegato, polmone, ecc.) sono omogeneizzati e, successivamente, è estratto il DNA (Vemulapalli *et al*, 2005), riuscendo in questo modo ad identificare rapidamente la specie di *Leptospira* presente. Il materiale può essere refrigerato e il test si può eseguire in un secondo momento, poiché non è necessario che il battere sia integro per questo tipo di esame (Tagliabue, 2008).

L'utilizzo della PCR permette l'identificazione precoce delle infezioni da leptospire, prima ancora della comparsa degli anticorpi in circolo (Tagliabue, 2008).

L'Imunoistochimica (IHC) evidenzia la distribuzione e la localizzazione degli antigeni nei tessuti. Inoltre, con la conservazione dei tessuti, in formalina e paraffina, sono possibili studi retrospettivi sui campioni (Szederi *et al*, 2006).

La sierologia è un importante ausilio nella diagnosi, ma è maggiormente utilizzata in caso di forme croniche o lente, in quanto la comparsa degli anticorpi in circolo avviene solo 7-8 giorni post-infezione. È, quindi, meglio procedere con una terapia nell'attesa del risultato del sierologico. Durante i test si ricercano gli anticorpi contro i serovars di cui si sospetta maggiormente la presenza nel territorio di origine del campione (Donahue *et al*, 2000). In particolare, si considera l'agglutinazione microscopica (MAT), che è la tecnica per eccellenza per sensibilità e specificità nell'identificazione delle leptospire, anche se richiede ceppi vivi (Tagliabue, 2008).

La MAT è il metodo che permette l'identificazione del sierotipo, il quale infetta l'organismo, tramite l'individuazione degli anticorpi presenti nel siero dell'animale in esame. Essa fornisce la possibilità di differenziare tra un contatto recente o in corso e uno vecchio o vaccinale. Ma per fare questo una sola MAT non è sufficiente. Infatti, è necessario poter fare più prelievi e ripetere più volte l'esame per avere maggiori sicurezze (Tagliabue, 2008).

Per questo test è utilizzato il siero dell'animale preso in esame, è fatta una diluizione e successivamente è introdotto l'antigene. Ogni siero deve essere diluito più volte e ogni diluizione deve essere mescolata con la stessa quantità di antigene. Il titolo del campione sarà dato dall'ultima diluizione, che provoca agglutinazione. La lettura del risultato deve essere fatta con luce diretta sul campione (Tagliabue, 2008).

Nell'interpretazione dei risultati è decretato positivo ogni campione di siero che ha un titolo maggiore o uguale a 100. Si può affermare che c'è stata sicuramente infezione attiva, se si hanno titoli anticorpali maggiori di 800 con sintomatologia clinica evidente (Tagliabue, 2008). In ogni caso l'animale deve essere testato nuovamente dopo sette giorni (www.italiaonline.it). Si deve, però, ricordare che una terapia antibiotica in atto può alterare i risultati dell'esame, causando un minore incremento del titolo anticorpale (www.veterinariassociati.it).

Il problema principale della MAT è la cross-reattività, dovuta alla contemporanea presenza di diversi sierotipi all'interno dell'ospite o alla somiglianza antigenica tra questi. È importante tenere presente che nel caso di positività a diversi sierotipi, si prende come infettante il serovar con titolo più elevato (Tagliabue, 2008).

La FAT (Fluorescent Antibody Test) è un sistema accurato per dimostrare la presenza di leptospire, anche in materiale lisato. Per questo tipo di analisi, si prelevano campioni di siero, urine, latte, vari tessuti e placenta, che possono essere congelati (Vemulapalli *et al*, 2005).

Il metodo ELISA è molto specifico e ha una maggiore sensibilità della MAT (Bernard, 1993).

Per la diagnosi è comunque indicato l'utilizzo di più tecniche. Si possono associare, per esempio l'IHC con la PCR (Hajikolaie *et al*, 2005), la MAT con la coltura (Williams *et al*, 1994) o l'IHC con l'impregnazione argentea (Szederi *et al*, 2006).

Quando l'animale resta portatore dell'infezione, i livelli anticorpali si presentano bassi. Perciò servono dei metodi estremamente specifici per l'identificazione degli anticorpi, come ELISA e MAT (Hajikolaie *et al*, 2005).

Il materiale da prelevare per il laboratorio varia dal sangue alle urine, al siero in caso di prelievo in vita, altrimenti si inviano organi, come fegato, reni, cervello, polmone. In caso di aborto è indicata anche la conservazione della placenta e, secondo recenti studi, anche del cordone ombelicale (Sebastian *et al*, 2005).

7. FATTORI DI RISCHIO

Il segnalamento della fattrice fornisce importanti informazioni, che ci possono indirizzare verso il sospetto di contagio con *Leptospira*. Si deve considerare l'età della cavalla. Infatti, un animale più anziano ha maggiori probabilità di essersi infettato con l'antigene (Pilgrim *et al*, 1999). La movimentazione è importante, perché, se una cavalla è portata a mostre, competizioni o nei centri di monta, ha maggiore possibilità di contrarre la malattia, a causa del continuo contatto con animali provenienti da altre stalle (Barwick *et al*, 1998). Inoltre i cavalli, che sono lasciati liberi per molte ore in prati o paddock esterni, hanno, una maggiore probabilità di contrarre l'infezione, rispetto a quelli che passano la maggior parte della loro vita all'interno della stalla (Barwick *et al*, 1997). Questo perché nell'ambiente esterno le leptospire trovano facilmente la possibilità di sopravvivere (Baverud, 2009).

Esaminando l'anamnesi riproduttiva della cavalla, si possono evidenziare aborti precedenti o mortalità perinatale, che sono riconducibili anche a Leptosirosi (Williams *et al*, 1994).

La regione climatica in cui è posto l'allevamento può incidere sulla sopravvivenza e sulla diffusione di queste spirochete. Infatti, luoghi umidi con temperature elevate e ad alta piovosità, sono per il battere il posto ideale dove vivere (Szederi *et al*, 2006). Anche la presenza di corsi d'acqua o stagni nelle immediate vicinanze dell'allevamento o dei pascoli, sono elementi da considerare, perché creano un ambiente adatto alla sopravvivenza delle leptospire (Barwick *et al*, 1998).

Il management dell'allevamento è un aspetto importante da valutare. Infatti, la coabitazione con altre specie animali, può incrementare il rischio di contagio con le leptospire, attraverso cibo o acqua inquinati (Williams *et al*, 1994), mentre un'elevata densità di animali in allevamento permette un più facile contatto tra infetti e sani (Barwick *et al*, 1998). Inoltre, è buona norma effettuare frequentemente disinfezioni, derattizzazioni e pulizie della lettiera per eliminare le leptospire presenti nell'ambiente (Hascimoto *et al*, 2007).

Ratti, cani e gatti sono importanti eliminatori di batteri. Quindi è bene tenerli lontani dall'allevamento (Barwick *et al*, 1997).

Tra tutti questi fattori sembra esserci una relazione che li lega e ognuno incide in modo diverso sulla diffusione della malattia e sulla presenza dei diversi serovars (Barwick *et al*, 1998).

Per esempio, cani e maiali sono eliminatori di *L. Bratislava*. Quindi è possibile che in allevamenti equini, dove sono presenti anche queste specie animali, ci sia una maggior possibilità di trovare questo serovar. Oppure in cavalli allevati vicino a bovini è facile trovare *L. Hardjo* (Williams *et al*, 1994).

Da uno studio effettuato (Barwick *et al*, 1998) è emerso che il numero di ore passate al pascolo è correlato all'infezione da *L. Grippotyphosa*, mentre il tipo di pascolo e la presenza di stagni incidono sull'esposizione a *L. Icterohaemorrhagiae*.

La tabella è un esempio: raggruppa i diversi fattori che influenzano la possibilità del contatto con il battere.

FATTORI	INDICI
Altezza	Suolo e acqua
Ecologia della regione	Roditori, Suolo e acqua, Natura
Prossimità a foreste	Natura
Prossimità a fiumi/torrenti	Suolo e acqua
Larghezza di fiumi/torrenti	Suolo e acqua
Prossimità a laghi/stagni	Suolo e acqua
Diametro di laghi/stagni	Suolo e acqua
Ore al pascolo	Roditori, Natura
Tipo di pascolo	Suolo e acqua
Ore in stalla	Roditori
Condizioni di stalla	Roditori
Frequenza di pulizia della stalla	Roditori
Composizione dei muri della stalla	Roditori
Uso di disinfettanti in stalla	Roditori
Uso di insetticidi in stalla	Roditori
Ore nel paddock	Natura
Tipo di paddock	Suolo e acqua
Frequenza disinfestazione	Pratiche manageriali
Uso di insetticidi sui cavalli	Pratiche manageriali
Applicazione di insetticidi	Pratiche manageriali
Uso dei cavalli	Pratiche manageriali
Accesso dei cani alla stalla	Roditori, Natura
Accesso dei gatti alla stalla	Roditori, Natura
Presenza di bovini nella stalla	Roditori, Natura
Igiene di stalla	Roditori

Tabella 1: Fattori associabili alla sieropositività a *Leptospira* e relativi indici (Barwick *et al*, 1998).

8. PREVENZIONE

La ricerca dei fattori immunogenetici protettivi è molto complicata, poiché alcune componenti sono espresse solo durante l'infezione (Palaniappan *et al*, 2002).

Il vaccino sembra non essere una buona soluzione per la profilassi di questa patologia, in quanto ha una bassa efficacia e concede solo un breve periodo di immunità. Inoltre la necessità di inserire in esso l'antigene del serovar presente nel territorio, comporta uno studio epidemiologico accurato e soprattutto la composizione di vaccini diversi per una stessa regione (Palaniappan *et al*, 2002).

Sono stati pensati e testati diversi tipi di vaccini, anche se nessuno sembra dare sempre cross-protezione (Simposio, 2005).

Il vaccino inattivato polivalente stimola soprattutto la risposta umorale, ma da studi svolti per valutarne l'efficacia si sono ottenuti risultati contrastanti. Infatti, Yan *et al* (2003) hanno dimostrato che non si sviluppano titoli anticorpali adeguati contro tutti i sierotipi inseriti nel vaccino. Mentre i vaccini polivalenti, utilizzati negli Stati Uniti, contengono antigeni contro *L. Grippotyphosa*, *L. Pomona*, *L. Canicola* e *L. Icterohaemorrhagica*, inducono alti titoli anche contro *L. Autumnalis* (Symposium, 2005). Studi, effettuati sui cani, indicano che la protezione fornita dal vaccino inattivato polivalente è inferiore ai sei mesi, quindi le somministrazioni devono essere frequenti. Ma questo fattore causa soppressione immunitaria nei cuccioli. Quindi si consiglia la vaccinazione dopo le 9-10 settimane di età. Nei cavalli i richiami con questo vaccino danno come effetto collaterale gonfiore locale nel sito di iniezione a 3-4 giorni dalla ri-vaccinazione (Symposium, 2005).

I vaccini vivi attenuati danno una protezione di maggiore durata, con buoni titoli anticorpali e cross-reattività. Ma la necessità di conservarli e trasportarli a temperature idonee e la possibilità di ritornare virulenti all'interno dell'ospite, non ne consentono largo utilizzo (Srivastava, 2006).

I lipopolisaccaridi (LPS) sono carboidrati endotossici, derivanti dalla parete esterna del battere. Essi riflettono le diversità tra i serovar e attivano la risposta immunitaria specifica per il sierogruppo da cui derivano. Grazie a recettori specifici presenti sulla membrana dei linfociti B, i LPS attivano in modo policlonale a specifico queste cellule e i macrofagi (Srivastava, 2006).

Studi eseguiti con criceti e bovini, però, hanno dimostrato che i lipopolisaccaridi non riescono a dare una buona protezione (Srivastava, 2006).

La ricerca del vaccino contro la leptospirosi ha interessato anche le proteine della membrana esterna del battere, che sembrano conferire una buona immunità. Inoltre, parti del battere hanno minori effetti collaterali e potrebbero dare cross-protezione verso diversi sierotipi (Symposium, 2005).

Da recenti studi è emerso che l'immunità cellulo-mediata potrebbe essere coinvolta nella cross-protezione dall'infezione di queste spirochete. Infatti, cellule mononucleate del sangue periferico di bovini vaccinati contro il sierotipo *Hardjo*, reagiscono a preparati con antigene del serovar *Grippotyphosa*, mentre la risposta delle stesse cellule provenienti da animali non vaccinati è minore (Symposium, 2005).

Nel caso di questa patologia è molto importante che la sorveglianza epidemiologica di ogni territorio sia effettuata con regolarità, per permettere la conoscenza dei serovars presenti. Inoltre, è necessario differenziare gli animali con anticorpi dovuti alla vaccinazione da quelli infetti. Si deve, poi, valutare attentamente la vera necessità del vaccino, in quanto il tempo impiegato per lo sviluppo di un vaccino è molto lungo, soprattutto nel nostro caso, dove il battere ha una replicazione molto lenta (Srivastava, 2006).

Studi specifici sulla terapia da usare nel cavallo in corso di Leptospirosi non sono stati effettuati (Bernard, 1993).

Più autori (Bernard, 1993, Donahue *et al* 2000) consigliano l'utilizzo di penicillina G procaina combinata con diidrostreptomina per prevenire la dispersione del battere con le urine. Inoltre, può essere utile una fluidoterapia per supportare la patologia renale acuta (Robinson *et al*, 2008).

In caso di puledri nati prematuri o già malati sono trattati con antibiotico, FANS, ossigeno e fluidi endovenosi (Vemulapalli *et al*, 2005).

La miglior prevenzione è la disinfezione delle stalle occupate da animali infetti, l'isolamento degli infetti, il controllo dei roditori e di altri portatori di questa malattia (Bernard, 1993). Inoltre è importante l'eliminazione di tutti i tessuti abortiti, della lettiera della cavalla infetta e l'isolamento di questa dalle altre gestanti (Donahue *et al*, 2000).

Fattori di rischio per il contagio sono gli eliminatori asintomatici, che devono essere individuati ed allontanati dagli altri animali (Bernard, 1993).

9. CONFRONTO CON LE ALTRE SPECIE ANIMALI

Cerri *et al* hanno elaborato uno studio sulla situazione epidemiologica del Centro Nord Italiano, evidenziando i serovars maggiormente presenti nel territorio. Il cavallo è colpito soprattutto da *L. Bratislava*, ma anche da *L. Icterohaemorrhagiae*, a differenza del suino e cinghiale, che sono infettati quasi esclusivamente da *L. Bratislava*. Questo sierotipo si sta diffondendo molto anche nel cane, a discapito di *L. Canicola* e *L. Icterohaemorrhagiae*.

Bovini e pecore sono risultati ospiti di mantenimento di *L. Hardjo*, anche se la sieropositività è stata evidenziata nei confronti dei due serovars precedentemente nominati.

Nel bovino se il primo contatto con l'antigene si ha in gravidanza, ci possono essere problemi di aborto dopo qualche settimana dall'infezione, senza che la vacca manifesti alcun sintomo premonitore. E' importante ricordare che in questa specie *Leptospira* persiste nel tratto genitale per circa dodici mesi (Grooms, 2006).

Anche gli ovini colpiti dall'infezione possono abortire (Saglam *et al*, 2008), mentre nella scrofa si possono evidenziare diminuzione delle performance riproduttive, incremento di problemi all'apparato riproduttore, della mortalità perinatale e del numero di suinetti mummificati (Ramos *et al*, 2006).

Confrontando gli asini con i cavalli, si è notato che i due animali non sono colpiti allo stesso modo da *Leptospira*. Gli asini hanno una maggior prevalenza di anticorpi contro le spirochete rispetto ai cavalli, probabilmente perché passano buona parte della loro vita al pascolo e a contatto con altri animali, che gli forniscono maggiori possibilità di entrare in contatto con l'antigene (Hajikolaie *et al*, 2005).

MATERIALI E METODI

1. AZIENDE

Le 51 aziende considerate erano poste in diverse province venete, (come riportato nella **Tabella 1**) ed avevano una consistenza media di 2,8 fattrici gravide, da un minimo di uno ad un massimo di sette.

Provincia	Aziende (n)	Aziende (%)	Fattrici (n)	Fattrici (%)
Padova	22	42%	43	30%
Verona	9	18%	37	26%
Vicenza	9	18%	27	19%
Venezia	7	14%	22	16%
Rovigo	2	4%	6	4%
Treviso	2	4%	6	4%
<i>Totale</i>	<i>51</i>		<i>141</i>	

Tabella 2: Distribuzione delle aziende e delle fattrici campionate nelle diverse province venete.

Come evidenziato dalla **Tabella 2**, la distribuzione delle aziende tra le sei province venete esaminate non è omogenea, sia a causa della diversa dislocazione degli allevamenti nella Regione, sia per la differente disponibilità dimostrata dagli allevatori.

2. FATTRICI

Le fattrici inserite nel programma erano 141, appartenevano tutte alla razza TPR, con età che variava da 1 a 22 anni, con una media di 7,1 anni e una prevalenza di cavalle di età inferiore alla media. La maggior parte delle cavalle (134) erano gravide, grazie alla fecondazione effettuata nella stagione

riproduttiva del 2004, tre avevano già partorito nel 2005, una non era rimasta gravida e tre non erano state coperte perché avevano partorito troppo tardi la stagione precedente.

I dati contenuti nella scheda anamnestica compilata durante il campionamento, riguardavano informazioni generali della fattrice come età, nome, tipo di stabulazione, movimento degli animali, BCS, condizioni generali, sverminazione, vaccinazioni ed eventuali altri trattamenti. C'era inoltre una sezione che riferiva l'anamnesi riproduttiva dell'animale con indicazioni riguardo a tipo e numero di inseminazione nella stagione in corso e data dell'ultimo salto, eventuali problemi sanitari, numero e tipologia degli eventuali parti precedenti e data dell'ultimo parto, aborti, riassorbimenti e natimortalità, differenziando tra puledri nati morti e morti entro 48 ore dal parto.

3. CAMPIONAMENTO

Come prima cosa è stato effettuato un campionamento sierologico di base sulle fattrici, che si è svolto nel corso dei mesi di gennaio e febbraio 2006. Durante l'intervento, per ogni soggetto, è stata compilata la scheda anamnestica che indicava anche un codice che rappresentava l'unica indicazione riportata sui campioni, questo per garantire l'anonimato alle aziende coinvolte nella ricerca.

Questo codice indicava due lettere AE (Aborto Equino), seguite da un numero che identificava l'azienda e una lettera per risalire al soggetto.

Sono stati eseguiti successivi campionamenti in caso di aborto e di mortalità perinatale, che prevedevano un prelievo di sangue della madre, raccolta della placenta e del feto o puledro morto. I campioni erano registrati con il codice inizialmente assegnato alla madre.

4. ESAMI EFFETTUATI

I campioni del siero delle fattrici sono stati esaminati presso l'IZSVE, che ha ricercato gli anticorpi verso 8 serovar di *Leptospira interrogans*:

- ✓ *Bratislava* (sierogruppo *Australis*);

- ✓ *Canicola* (sierogruppo *Canicola*);
- ✓ *Grippotyphosa* (sierogruppo *Grippotyphosa*);
- ✓ *Copenhageni* (sierogruppo *Icterohaemorrhagie*);
- ✓ *Icterohaemorrhagie* (sierogruppo *Icterohaemorrhagie*);
- ✓ *Pomona* (sierogruppo *Pomona*);
- ✓ *Hardjo* (sierogruppo *Sejroe*);
- ✓ *Tarassovi* (sierogruppo *Tarassovi*).

Il metodo diagnostico utilizzato è l'agglutinazione microscopica o MAT.

La MAT è un test sierologico che indaga la presenza nel siero di anticorpi contro antigeni specifici.

Questa metodologia diagnostica prevede la diluizione del siero in base 2 e successiva combinazione dei campioni ottenuti con lo stesso volume di antigene. Le piastre sono incubate a 30°C per circa due ore, passate le quali si esaminano al microscopio in campo oscuro, comparandole con una sospensione di antigene al 25%. La titolazione è il reciproco della più alta diluizione che agglutina il 50% o più di leptospire.

I campioni sono considerati positivi quando il titolo è maggiore o uguale a 100. Con la MAT sono stati testati anche i campioni di siero provenienti dal secondo prelievo.

Sul feto o puledro è stato eseguito l'esame autoptico, istologico e batteriologico degli organi, come cervello, polmoni, reni, fegato, cuore, stomaco, intestino e milza.

5. ANALISI DEI DATI

Innanzitutto sono state indicate 11 aree in cui suddividere le aziende. In ogni area è stato individuato un comune centrale alla zona, che è servito per impostare le cartine presentate successivamente.

Area	Nome Area	Comune Centro Area	Fattrici presenti
A	Sinistra Po	Taglio di Po	6
B	Destra Brenta	San Pietro in Gu'	13
C	Sinistra Brenta	Camposampiero	8
D	Padovana	Padova	14
E	Bassa Padovana	Bagnoli di Sopra	10
F	Bassanese	Valstagna	16
G	Vicentina	Torri di Quartesolo	11
H	Veneziana	Mirano	20
I	Vittorio Veneto	San Fior	6
L	Veronese	Verona	14
M	Fiume Tione	Mozzecane	23

Tabella 3: Denominazione delle aree, con indicazione dei comuni considerati come centro area, e numero delle fattrici presenti in ogni area.

Grazie al programma GIS sono state create due cartine che riassumono la distribuzione di *Leptospira* nella Regione Veneto.

Le variabili che si potevano estrapolare dalla scheda anamnestica erano troppo numerose per eseguire un'analisi accurata, quindi si è preferito eliminare quelle che non avevano nessuna relazione con lo studio in esame e, quando possibile, conglobare le altre in un'unica variabile.

Le variabili considerate sono:

- ✓ Area di riferimento (vedi **Tabella 2**).
- ✓ Età: queste sono state suddivise in quattro gruppi:
 - ≤ 3anni,
 - da 4 a 7 anni,
 - da 8 a 11 anni,
 - ≥ 12 anni.
- ✓ Numero di parti: gli 8 gruppi individuati sono
 - Gruppo 0: fattrici con zero parti,
 - Gruppo 1: fattrici con un parto,
 - Gruppo 2: fattrici con due parti,
 - Gruppo 3: fattrici con tre parti,
 - Gruppo 4: fattrici con quattro parti,
 - Gruppo 5: fattrici con cinque parti,
 - Gruppo 6: fattrici con sei parti,
 - Gruppo 7: fattrici con sette parti,
 - Gruppo 8: fattrici con otto o più parti.

- ✓ Tipo di stabulazione: in gruppo o singola.
- ✓ Uscita dall'allevamento: animali che escono e quelli che non escono.
- ✓ Introduzione di nuovi animali: allevamenti che introducono animali o no.

Inizialmente nella variabile “tipo di stabulazione”, si era pensato di includere anche il gruppo “stabulazione mista”, ma dall’analisi dei dati è risultato che questo gruppo incideva poco sui risultati e quindi si è preferito integrarlo in “stabulazione multipla”.

L’uscita degli animali dall’allevamento comprende la partecipazione a fiere, l'alpeggio e il raggiungimento delle stazioni di monta.

Con l’ausilio del programma statistico SAS sono stati elaborati i dati ottenuti dallo studio e grazie, alla procedura GENMOD è stata effettuata la regressione logistica.

Grazie a questo programma si sono individuate le variabili indipendenti associate alla variabile dipendente, oggetto di interesse. Nel nostro caso specifico, il SAS ha permesso di identificare quali variabili hanno un ruolo nella diffusione delle leptospire e dei diversi serovar; quali invece non incidono sulla sieropositività. Il calcolo del χ^2 è utile per testare l’ipotesi che possa esistere una certa discrepanza tra dati attesi e dati osservati, dovuta al caso o al fatto che il campionamento è stato eseguito su una popolazione diversa da quella da cui derivano i dati attesi. Quando il valore di χ^2 è maggiore del valore critico di $P < 0.05$, si riconosce che la variabilità sia dovuta al campionamento e non al caso.

Infine si è stimato il rischio di sieropositività in base alle variabili considerate.

RISULTATI E DISCUSSIONI

Tra le 141 fattrici testate, 41 (29%) sono risultate sieropositive. Di queste, 11 hanno titoli ≥ 100 per due o più sierotipi; in questi casi la fattrice è considerata positiva al serovar con titolo maggiore. Queste cavalle, in realtà, dovrebbero essere sieropositive ad un solo serovar, ma gli anticorpi potrebbero avere subito una cross-reazione con gli altri antigeni presenti nel test, dando un risultato falsato. L'incidenza della sieropositività a più sierotipi non è un risultato diagnostico, ma rappresenta un limite del MAT test.

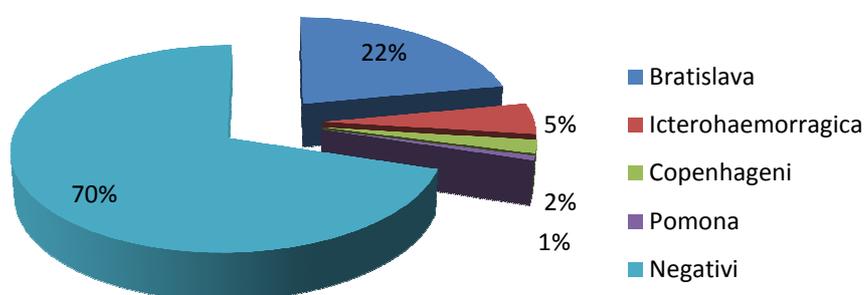


Grafico 1: Distribuzione percentuale della positività per *Leptospira*.

La percentuale di sieropositività è in disaccordo con ciò che è emerso dallo studio di Cerri *et al* (2003), in cui l'11.4% era sieropositivo a *Leptospira*. Nella lettura dei risultati bisogna tenere presente che i dati dell'anno 2005 relativi a umidità e precipitazioni confermano le caratteristiche di elevate umidità e piovosità del Veneto. Inoltre dalle **Cartina 1 e 2** si può evidenziare la ricchezza di corsi d'acqua della Regione. Entrambi questi fattori sono importanti per la sopravvivenza delle leptospire nell'ambiente, perciò possono incidere sulla diffusione della patologia.

Il 74% delle fattrici sieropositive risulta esserlo a *L. Bratislava*, il 17 % a *L. Icterohaemorrhagica* e il 2% a *L. Pomona*. Questi dati confermano le ricerche precedenti, in cui si è trovata una sieropositività per *L. Bratislava* tra il 70 e l'80%, mentre per *L. Icterohaemorrhagica* attorno al 18% e per *L. Pomona* circa 1%. I dati relativi allo studio nello stato di New York, invece, identificano una

percentuale di sieropositività a *L. Bratislava* del 42% e di *L. Pomona* del 10%, mentre non è presente *L. Icterohaemorrhagica*, ma compare *L. Autumnalis* (30%). Quindi i diversi sierotipi hanno incidenze diverse nei vari territori. In ogni studio, però, si ha il maggiore numero di casi sieropositivi al sierotipo *Bratislava*, questo conferma l'individuazione di questo come il serovar ospite specifico per il cavallo.

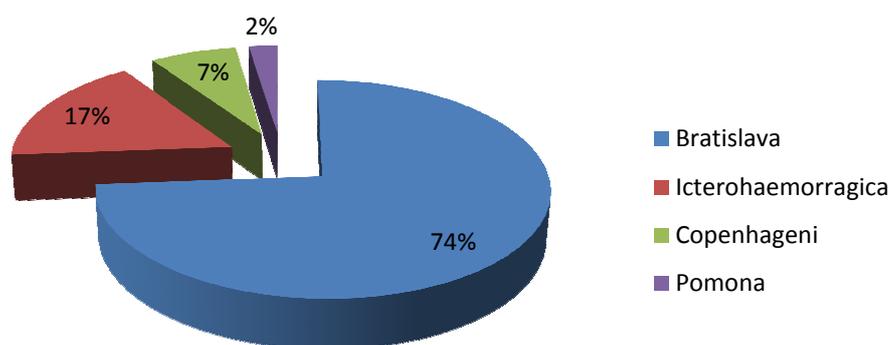


Grafico 2: Incidenza dei diversi serovar, sul totale di sieropositivi.

Il sierotipo maggiormente presente è *L. Bratislava*, con 31 sieropositivi (21,99%), di cui 18 (59%) con titolazione 100, 8 (25%) con titolazione 200, 4 (13%) con titolazione 400 e uno (3%) con titolazione 800.

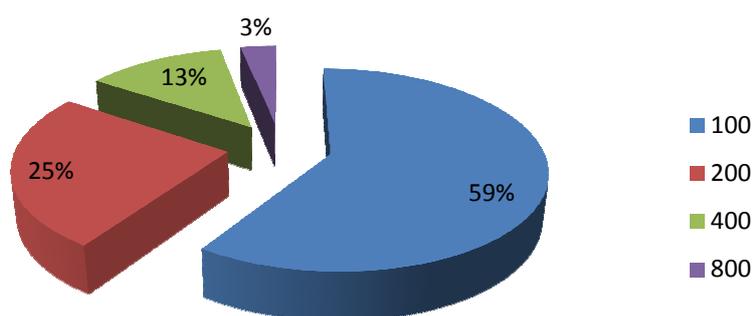


Grafico 3: Distribuzione percentuale dei titoli per il sierotipo Bratislava.

Le fattrici sieropositive ad *L. Icterohaemorrhagica* sono 7 (5%), di cui 3 (43%) hanno evidenziato titolazione 1:100, 3 (43%) titolazione 1:200 e una (14%) titolazione 1:800.

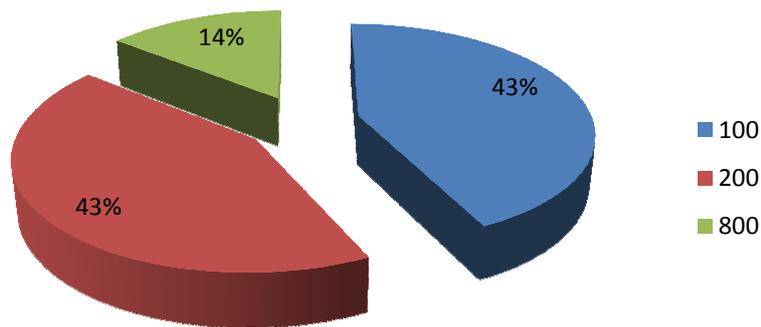


Grafico 4: Distribuzione percentuale dei titoli per il sierotipo *Icterohaemorrhagica*.

Solo tre cavalle (2%) sono risultate sieropositive al serovar *Copenhageni* (2 ad un titolo di 1:100 e una 1:200). Un'unica cavalla presenta sieropositività a *L. Pomona*, con titolazione 800, ma senza sintomi clinici evidenziati. Vi è poi un caso sieropositivo a *L. Tarassovi*, ma la titolazione non è conosciuta.

Canicola presenta due sieropositività, ma questi soggetti sono positivi anche per altri sierotipi con titolazioni maggiori. *L. Grippotyphosa* e *L. Hardjo* non risultano presenti negli allevamenti analizzati.

Al fine dell'elaborazione dei dati con il programma SAS, si è preferito considerare la sola sieropositività a *Leptospira*, per dare un'idea complessiva sulla diffusione del battere e sui fattori ad essa correlati.

I comuni con una media di animali colpiti maggiore del 50% sono

- ✓ Agna,
- ✓ Carmignano di Brenta,
- ✓ Gazzo,
- ✓ Grumolo,
- ✓ Marano,
- ✓ Selvazzano,
- ✓ Trebaseleghe.

Tra questi, solo Gazzo e Grumolo hanno un numero di fattrici superiore a sette, quindi sono più rappresentativi, rispetto a comuni con solo 1-3 fattrici che non permettono una significativa variabilità dei dati.

I comuni come Bagnoli, Romano d'Ezzelino, Santa Maria di Sala, San Pietro in Gù e Travenzuolo risultano sieronegativi a *Leptospira*.

La **Cartina 1** permette di osservare in modo diretto la distribuzione dei comuni sieropositivi a *Leptospira* e di apprezzare in quale percentuale lo siano. Inoltre si può evidenziare che la provincia di Belluno non è stata considerata, mentre per quella di Rovigo e Treviso gli allevamenti analizzati sono solamente due, per un totale di dodici fattrici, con una sieropositività per provincia, quindi questi dati non possono essere considerati rappresentativi del territorio.

La **Cartina 2** mostra la distribuzione delle fattrici sieropositive nelle diverse aree. Si può notare come l'area B (53,8%) sia quella maggiormente colpita da *Leptospira*, seguita dalle aree L (50,0%) e G (45,4%). Questi dati non sono completamente riconducibili a ciò che risulta dalle medie dei minimi quadrati fatte con il SAS, che permette di eliminare le differenze di numerosità tra i vari gruppi esaminati. Dall'analisi si evidenzia che le aree A, B, G, L, M hanno la maggiore percentuale di positivi, ma è importante considerare che l'area A ha solo sei fattrici, quindi non è confrontabile con le altre che hanno almeno undici cavalle ognuna.

Per quanto riguarda la presenza di corsi d'acqua o laghi nelle zone con maggiore diffusione delle leptospire, si può fare una valutazione grafica, tramite le cartine, anche se non è del tutto precisa. Infatti, nelle **Cartine 1 e 2** non sono presenti tutti i corsi d'acqua della regione, soprattutto vengono a mancare i canali e i fiumi di minore rilevanza. L'elevata presenza di sieropositivi nelle aree B e G può essere correlata con l'abbondanza di corsi d'acqua; considerazione che non si può estendere alle aree M ed L, in cui le fonti d'acqua non sono numerose.

Anche nel caso dei comuni si può dire che la sieropositività non sempre corrisponde all'essere situati nelle vicinanze di fonti d'acqua. Se si prende come esempio il comune di Santa Maria di Sala, si può notare che, nonostante sia situato nei pressi della laguna di Venezia e in una zona densa di fiumi, le sette fattrici presenti sono tutte sieronegative.

Quindi si può concludere che, in questo studio, la sieropositività delle fattrici non è legata alla presenza di acqua vicino agli allevamenti considerati, ma che non avendo dati a disposizione riguardanti la derattizzazione e l'igiene, non si è a conoscenza dell'importanza che questi fattori possano avere avuto sulla diffusione del battere.

Esaminando le medie aritmetiche risultanti dall'analisi dei dati con il SAS, si può osservare che la classe di età con una maggiore incidenza di sieropositivi è quella con individui ≥ 12 anni, mentre la meno colpita è la classe tra i 4 e i 7 anni. Questo risultato concorda con gli esiti dello studio di Pilgrim *et al* del 1999, da cui si otteneva che le fattrici con età maggiore sono più colpite dal battere, anche perché spesso le cavalle più anziane sono lasciate sempre in box, dove la presenza di ratti è sicuramente più elevata, che all'esterno.

CLASSE ETÀ	MEDIA ARITMETICA	MEDIA QUADRATICA
≤ 3 anni	0.28	0.36
4-7 anni	0.24	0.33
8-11 anni	0.3	0.36
≥ 12 anni	0.5	0.54

Tabella 4: Media aritmetica e media quadratica relative alle diverse classi di età delle fattrici.

Anche per quanto riguarda le classi di parto i dati confermano i risultati delle ricerche precedenti. Infatti, la classe maggiormente colpita è quella con il numero di parti più elevato, mentre il gruppo con minore incidenza è quello con un solo parto.

CLASSE PARTO	MEDIA ARITMETICA	MEDIA QUADRATICA
0	0.27	0.46
1	0.12	0.26
2	0.27	0.41
3	0.4	0.51
4	0.5	0.66
5	0.23	0.27
6	0.28	0.44
7	0	0.14
8	0.55	0.44

Tabella 5: Media aritmetica e media quadratica relative alle diverse classi di parto delle fattrici.

L'introduzione di nuovi animali in allevamento favorisce la diffusione del battere, quest'affermazione è supportata dal fatto che le stalle con una rimonta propria hanno un'incidenza minore di sieropositivi.

INTRODUZIONE ANIMALI	MEDIA ARITMETICA	MEDIA QUADRATICA
0	0.23	0.31
1	0.38	0.049

Tabella 6: Media aritmetica e media quadratica relative all'introduzione (1) o no (0) di animali in allevamento.

Barwick *et al* (1997) hanno rilevato che l'uscita degli animali dall'allevamento incrementa la diffusione del battere. Le medie ottenute dallo studio veneto, invece, affermano che l'uscita diminuisce di pochi punti percentuali la probabilità di infettarsi con le leptospire, probabilmente perché in questi casi entrano in gioco altri fattori che non sono stati oggetto di analisi nella scheda anamnestica.

USCITA	MEDIA ARITMETICA	MEDIA QUADRATICA
0	0.37	0.4
1	0.28	0.4

Tabella 7: Media aritmetica e media quadratica relative all'uscita (1) o no (0) degli animali dall'allevamento.

La stabulazione in box o paddock multipli dovrebbe favorire il contatto tra le fattrici e quindi incrementare la diffusione della patologia. I dati dello studio in esame sembrano invece avallare l'ipotesi contraria, in quanto le medie di sieropositività dei box e paddock singoli sono maggiori rispetto ai multipli. La sieropositività potrebbe essere dovuta alle fattrici stabulate singolarmente, le quali, di solito, non hanno a disposizione paddock e trascorrono l'intera giornata all'interno di stalle con lettiera semipermanente, dove le condizioni strutturali ed igieniche favoriscono la convivenza con i ratti.

STABULAZIONE	MEDIA ARITMETICA	MEDIA QUADRATICA
1	0.37	0.43
2	0.3	0.37

Tabella 8: Media aritmetica e media quadratica relative alla stabulazione in box o paddock singoli (1) o multipli (2) .

Nonostante nessuno dei dati ottenuti con l'analisi della varianza sia risultato significativo, in quanto hanno tutti $P > 0.05$, si può osservare che nel caso delle classi di età (**Grafico 5**), dell'introduzione di animali e della stabulazione i risultati sono gli stessi delle medie matematiche. Mentre l'uscita delle fattrici dall'allevamento non incide sulla diffusione delle leptospire. Per quanto riguarda

le classi di parto, le cavalle con quattro parti risultano essere le più colpite, come si può evidenziare dal **Grafico 6**.

Osservando questi risultati si può affermare che i dati sono contraddittori e non sempre confermano ciò che è stato dimostrato negli studi precedenti. Questo potrebbe essere dovuto alla particolarità del campionamento che vede una disomogenea distribuzione e numerosità degli allevamenti del territorio veneto.

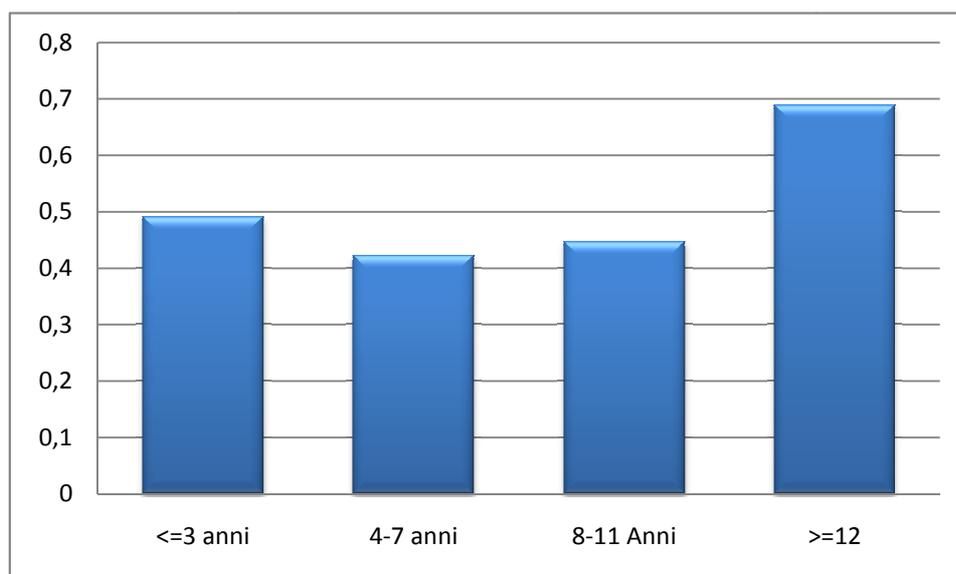


Grafico 5: Incidenza di sieropositività a *Leptospira* nelle diverse classi di età delle fattrici.

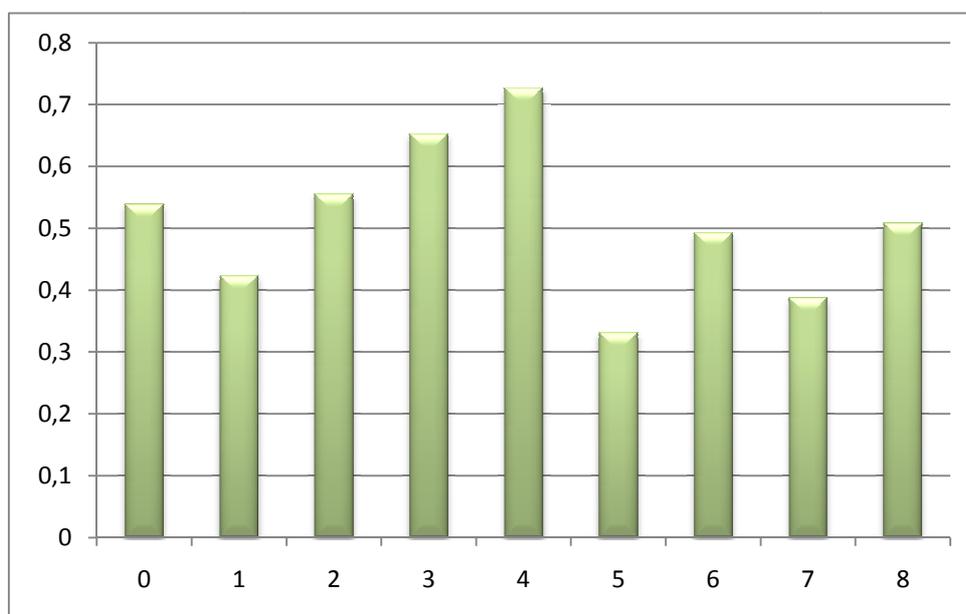


Grafico 6: Incidenza di sieropositività a *Leptospira* spp nelle diverse classi di parto delle fattrici.

La **Tabella 9** evidenzia come le fonti di variazione influenzino in modo diverso la positività ai diversi sierotipi o la sieropositività, in generale, a *Leptospira*. Dalla tabella è possibile estrapolare che i dati significativi per la sieropositività a *Leptospira* sono quelli riguardanti l'area di studio, la stabulazione e l'introduzione di animali. La fonte di variazione più importante è quest'ultima ed incide pesantemente sulla diffusione del battere, ecco perché è stata inserita nell'analisi del rischio, di cui si tratterà successivamente.

Mentre per il sierotipo *Copenhageni* solo l'uscita delle fattrici dall'allevamento ha $P < 0.05$. Negli altri casi, nonostante ci possano essere dei fattori che incidano sulla diffusione del battere, la loro P è superiore a 0.05, quindi sono considerati non significativi.

Fonti di variazione	Gradi libertà	Bratislava	Copenhageni	Icterohaemorrhagica	Leptospira
Area di studio	10	0.21	0.09	0.06	0.41 *
Classe età	3	0.17	0.02	0.05	0.13
Classe parto	8	0.15	0.07	0.06	0.13
Stabulazione	2	0.21	0.06	0.03	0.66*
Uscite	1	0.07	0.31 *	0.1	0.03
Introduz. Animali	1	0.56	0.08	0.04	1.31 *
Varianza residua	88	0.17	0.08	0.06	0.18

* $P < 0.05$

Tabella 9: Media quadratica relativa a ogni sierotipo, in relazione alla fonte di variazione considerata.

Dovendo effettuare la regressione lineare si è preferito analizzare l'effetto età e quello relativo all'introduzione degli animali.

Con la regressione (**Grafico 7**) risulta che la classe 4-7 anni ha un rischio minore di contrarre la patologia del 70% rispetto a quelle di età maggiore di 12 anni, anche se i limiti di confidenza sono ampi e il dato non è del tutto significativo, in quanto ha $P = 0.057$. Le classi sotto i 3 anni e tra gli 8 e gli 11 anni hanno limiti di confidenza e significatività non adeguati. Questi dati confermano i risultati dello studio di Pilgrim *et al* del 1999, secondo cui la maggiore probabilità di contrarre la *Leptospira* aumenta con l'aumentare dell'età.

Nel caso dell'introduzione di animali, la regressione dice che introdurre animali comporta un rischio maggiore del 54%, rispetto non introdurli, con $P = 0.047$, quindi significativo. Anche questo dato è in accordo con gli studi americani

precedentemente effettuati, da cui risultava che la possibilità di introdurre le leptospire nell'allevamento è correlata con l'entrata di nuovi animali.

Classi	Stima puntuale	95% limite di confidenza
<=3anni	0.284	0.059-1.36
4-7anni	0.3*	0.087-1.036
8-11anni	0.496	0.137-1.196
no introd anim	0.443*	0.198-0.990

*P<0,05

Tabella 10: Rischio relativo delle varie classi di età e di introduzione degli animali, con relativi limiti di confidenza.

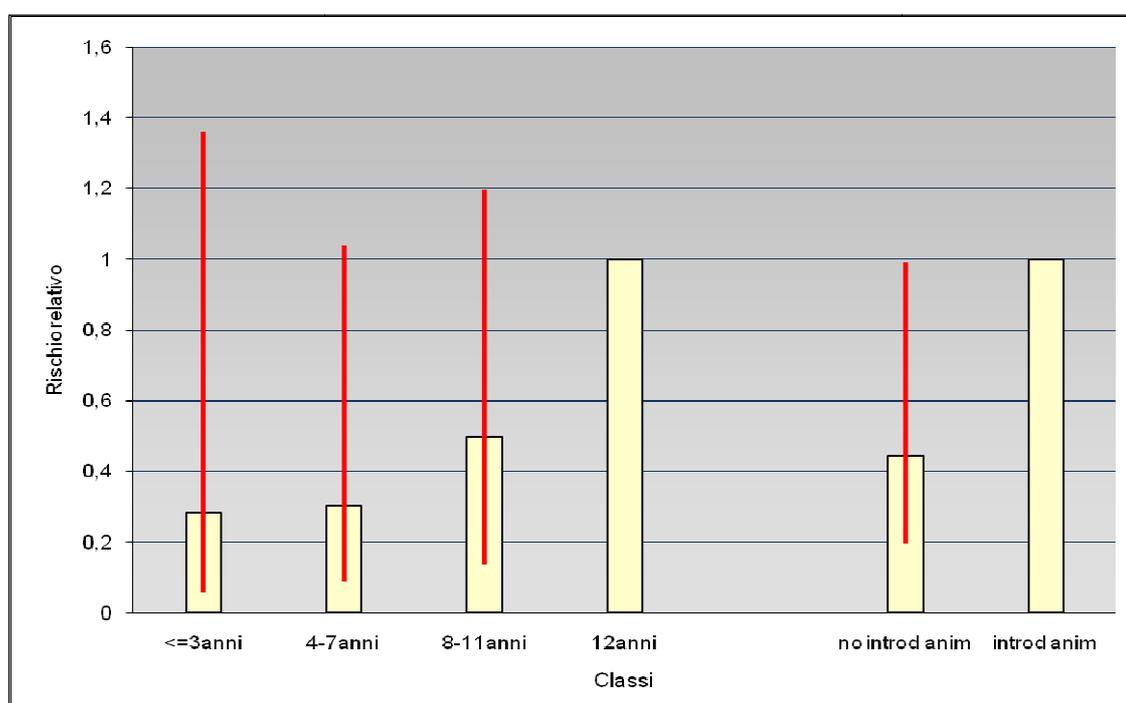


Grafico 7: Rischio relativo delle varie classi di età e di introduzione delle fattrici, con relativi limiti di confidenza.

Nonostante quanto risulti dagli studi effettuati precedentemente, la sieropositività a *Leptospira* non è relazionabile con l'anamnesi riproduttiva della fattrice, in quanto le cavalle sieropositive non presentano un'incidenza di aborto o natimortalità maggiore, rispetto alle negative.

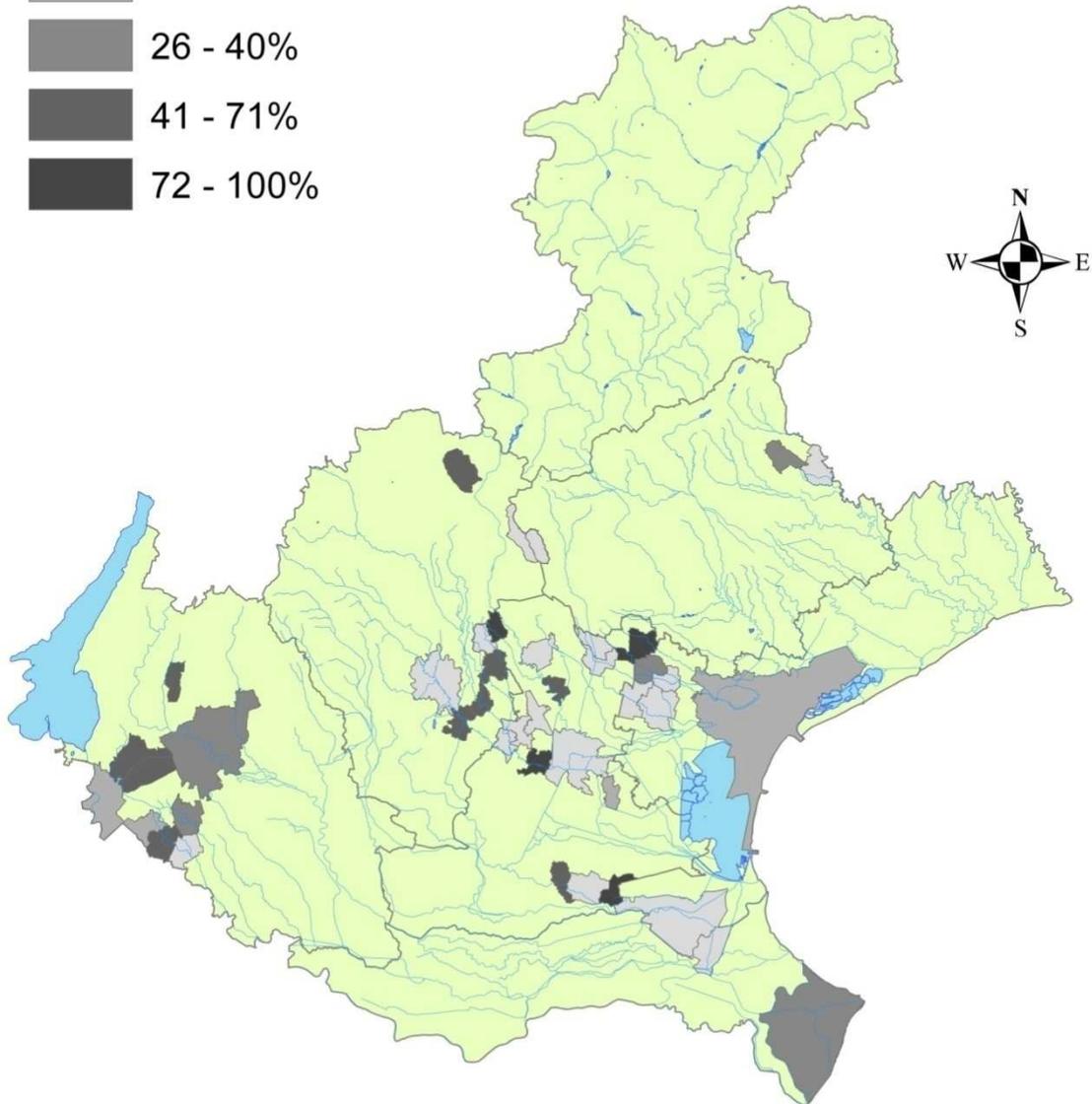
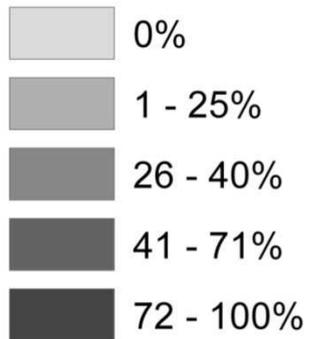
Durante la stagione riproduttiva in esame nove fattrici hanno abortito. Due di queste hanno perso il prodotto del concepimento nella fase finale della gravidanza (10°-11° mese), un puledro è nato morto al termine della gestazione, sei invece sono nati da parto normale e morti entro le 72 ore successive.

I feti raccolti sono soltanto sette e nessuno di essi è stato trovato sieropositivo a *Leptospira*, inoltre dal materiale prelevato durante l'esame autoptico, non è stato possibile isolare le leptospire.

Solo due fattrici sono sieropositive alla MAT sia prima che dopo l'aborto. La cavalla AE22B è stata trovata sieropositiva in entrambi i test sia a *L. Bratislava* che a *L. Icterohaemorrhagica*, con una titolazione maggiore nei confronti del secondo serovar. La cavalla AE28A è risultata sieropositiva al primo test per *L. Canicola*, *L. Copenhageni* e *L. Icterohaemorrhagica*, con titolo più elevato nei confronti dell'ultimo serovar; mentre nel secondo test i serovar individuati sono stati *Copenhageni* e *Icterohaemorrhagica*, con titolazioni equivalenti. Comunque in nessun caso le cavalle presentano sintomi correlabili a *Leptospira*.

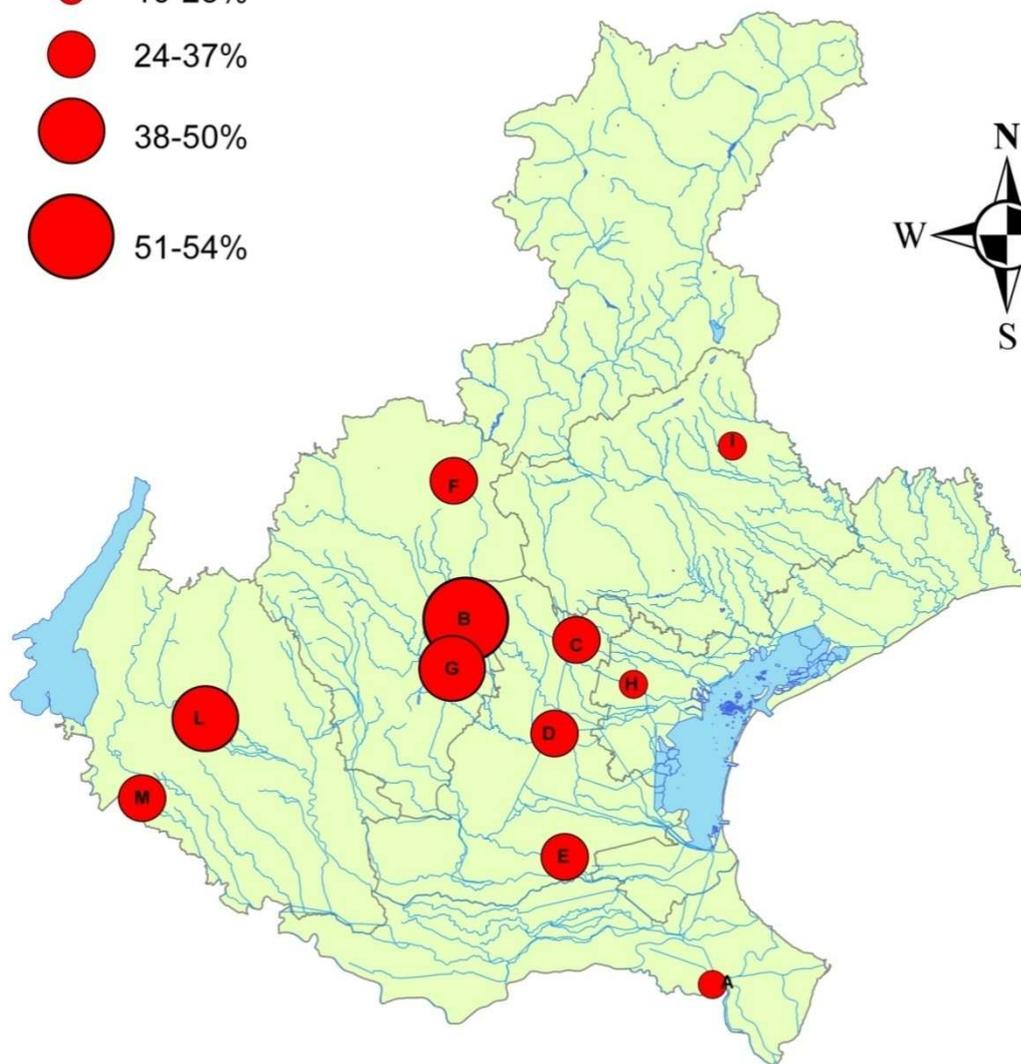
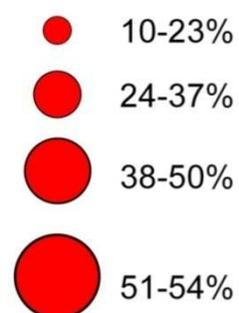
Questi risultati possono essere relazionati al fatto che, secondo Szeredi *et al* (2006), il sierotipo che maggiormente causa l'aborto è *Pomona*, che in queste fattrici non è presente, come non lo è in nessuna delle cavalle campionate, tranne una che comunque non ha presentato problemi di aborto o natimortalità.

Legenda



Cartina 1: Mappa del Veneto con individuazione dei comuni analizzati e distinzione tra le varie percentuali di sieropositività tramite colori.

Legenda



Cartina 2: Mappa del Veneto con identificazione dei comuni di centro area (vedi Tabella 3) e individuazione delle percentuali di sieropositivi.

CONCLUSIONI

Il 29% delle fattrici di razza TPR, testate nel Veneto, sono risultate sieropositive a *Leptospira*.

Questo risultato è significativo, in quanto è il primo dato relativo alla diffusione delle leptospire tra le fattrici allevate nella Regione Veneto. L'incidenza di sieropositività per *Leptospira* è elevata rispetto a quella riportata in letteratura ma fortunatamente non sembra correlata a sintomatologia conclamata, come uveite ricorrente, problemi riproduttivi o altra sintomatologia.

Tra le nove fattrici che hanno abortito durante la stagione riproduttiva del 2005, nessuna presentava segni o sintomi riconducibili alla *Leptospira*. Importante sottolineare che una sola fattrice, tra le 141 testate, presentava sieropositività per *L. Pomona*, che è il sierotipo identificato come maggiore causa di aborto.

I risultati di questo studio inducono ad alcune riflessioni sul management dell'allevamento di TPR in Veneto.

In questo tipo di allevamento le norme igieniche di base (come disinfezione e pulizia), non sono spesso rispettate e la derattizzazione è effettuata solo saltuariamente e mai in modo razionale. I box sono spesso creati con materiale di recupero che favorisce l'annidamento dei ratti e le lettiere, di tipo semipermanente, creano un ambiente umido, con urine stagnanti, ideale per la sopravvivenza delle leptospire. Gli alimenti sono somministrati a terra, dove ratti e animali selvatici li possono raggiungere con facilità. Questa situazione può motivare la maggiore incidenza dei sierotipi *Bratislava* e *Icterohaemorrhagica*, i quali sono maggiormente veicolati dai ratti.

Nella maggior parte degli allevamenti convivono diverse specie animali (cani, bovini, suini) permettendo al battere di diffondersi, anche tra ospiti non specifici. Tutti questi aspetti del management aziendale possono spiegare le discrepanze tra i risultati ottenuti da questo studio e i dati ricavati dalla bibliografia internazionale. Alla luce di questi dati, uno studio futuro sulla diffusione di *Leptospira*, dovrà disporre di una scheda anamnestica più mirata, che consenta una più precisa identificazione ed analisi dei punti critici.

In conclusione, si può affermare che le perdite economiche dovute alla presenza del battere, riscontrate dagli studi americani, non sono fortunatamente evidenziabili tra gli allevatori veneti. Infatti, nessuno dei casi di aborto o natimortalità rilevati da questo studio, sono stati correlati alla presenza di leptospire nella fattrice e nessuno degli animali è mai stato sottoposto a terapia medica per leptospirosi.

In molti Paesi si sta considerando l'opportunità di introdurre il vaccino contro la *Leptospira*, ma nel caso degli allevamenti di TPR veneti non sembra essere al momento una necessità, considerando che in questo tipo di aziende l'equilibrio tra costi e ricavati è sempre precario.

La prevenzione resta comunque un dovere: effettuando disinfezioni e derattizzazioni, evitando che altre specie animali vivano a contatto con le fattrici e cercando di individuare le cavalle portatrici del battere, al fine di eliminarle. Inoltre, è molto importante che i box e i paddock siano disinfettati e trattati con prodotti che consentano una migliore igiene e una vita più salubre per la fattrice. Un altro aspetto da migliorare è la conservazione degli alimenti: il mangime dovrebbe essere posto in bidoni chiusi e il fieno dovrebbe essere conservato in bancali, che non permettano il contatto con il pavimento.

Potrebbe invece essere utile prendere in considerazione il proseguimento d'indagini sierologiche periodiche, per controllare l'andamento del numero dei sieropositivi, nonché un'indagine per l'individuazione dei soggetti eliminatori, per il monitoraggio della diffusione del patogeno nel territorio, soprattutto perché non va mai dimenticato il carattere zoonosico della leptospirosi. Solitamente solo cani e ratti sono considerati serbatoi di leptospire per l'uomo, ma, da questo studio, si rileva che è importante includere anche gli equini. Gli allevatori, costantemente a contatto con le lettiere, devono essere adeguatamente informati ed istruiti a tutela, non solo del loro allevamento, ma soprattutto della salute comune.

BIBLIOGRAFIA

- Baird J. D., Williams T., Claxton P. D. (1972). A premature birth associated with *Leptospira Pomona* infection in a mare. Australian Veterinary Journal 48(9):524-6.
- Barwick R. S., Mohammed H. O., McDonough P. L., White M. E. (1998). Epidemiologic features of equine *Leptospira interrogans* of human significance. Preventive Veterinary Medicine 36(2):153-165.
- Barwick R. S., Mohammed H. O., McDonough P. L., White M. E. (1997). Risk factors associated with the likelihood of leptospiral seropositivity in the horses in the state of New York. American Journal of Veterinary Research 58:1097-1103.
- Baverud V., Gunnarsson A., Engvall E. O., Franzén P., Egenvall A. (2009). *Leptospira* seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. Acta Veterinaria Scandinavica 51:15.
- Bernard W. V., DVM (1993). Leptospirosis. Veterinary Clinics of North America, Equine practice 9:435-444.
- Bernard W. V., Bolin C., Riddle T., Durando M., Smith B. J., Tramontin R. R. (1993). Leptospiral abortion and leptospiruria in horses from the same farm. Journal of American Veterinary Medical Association 15;202(8):1285-6.
- Bernard W. V., Williams D., Tuttle P. A., Pierce S. (1993). Hematuria and leptospiruria in a foal. Journal of American Veterinary Medical Association 15;203(2):276-8.
- Cerri D., Ebani V. V., Fratini F., Pinzanuti P., Andreani F. (2003). Epidemiology of Leptospirosis: observation on serological data obtained by "diagnostic laboratories for Leptospirosis" from 1995 to 2001. Microbiologica 26: 383-389.
- Divers T. J. (2009). *Leptospirosis* in horses: a growing problem.
- Divers T. J., Irby N. L., Mohammed H. O., Schwark W. S. (2008). Ocular penetration of intravenously administered enrofloxacin in the horse. Equine Veterinary Journal Mar;40(2):167-70.

- Donahue J. M., Williams N. M. (2000). Emergent causes of placentitis and abortion. *Veterinary Clinics of North American: Equine practice*. 16,3: 443-449.
- Escamilla H. P., Martinez M. J. J., Medina C. M., Morales S. E. (2007). Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 71(4) 314-317.
- Giles R. S. M., Roberts J., Poonacha K., Harrison L., Donahue J., Benirschke K. (2005). Funisitis association with leptospiral abortion in an equine placenta. *Veterinary Pathology* 42:659-662.
- Gilger B. C., Salmon J. H., Yi N. Y., Barden C. A., Chandler H. L., Wendt J. A., Colitz C. M. (2008). Role of bacteria in the pathogenesis of recurrent uveitis in horses from the southeastern United States. *American Journal of Veterinary Research* 69(10):1329-35.
- Grooms D. L. (2006). Reproductive losses caused by bovine Viral Diarrhea Virus and Leptospirosis. *Theriogenology* 66: 624-628.
- Haji Hajikolaie M. R., Gorbanpour M. G., Haidari M., Abdollahpour G. (2005). Comparison of Leptospiral infection in the horses and donkey. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 49: 175-178.
- Hashimoto V. Y., Goncalves D. D., Silva F. G., Oliveira R. C., Alves L. A., Reichmann P., Muller E. E., Freitas J. C. (2007). Occurrence of antibodies against *Leptospira spp.* In horses of the urban area of Londrina, Paraná, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, 49(5):327-330.
- Jung B. Y., Lee K. W., Ha T. Y. (2010). Seroprevalence of *Leptospira spp.* in clinically healthy racing horses in Korea. *The journal of Veterinary Medical Science* 72(2) 197-201.
- Koizumi N., Watanabe H. (2005). Leptospirosis vaccines: Past, present, and future. *Journal of Postgraduate Medicine* 51:210-4.
- Lèon A., Pronost S., Tapprest J., Foucher N., Blanchard B., Andrè-Fontaine G., Laugier C., Fortier G., Leclercq R. (2006). Identification of pathogenic *Leptospira*

strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 18:218-221.

- Linhares G. F. C., Girio R. J. S., Linhares D. C. L., Mondeiro L. C., De Oliveira A. P. A. (2005). *Leptospira interrogans* serovars and their prevalences in horses from the microregion of Goiania, State of Goias, Brazil. *Ciencia Animal Brasileira* 6(4).
- Morrel E. L., Moore D. P., Odeon A. C., Poso M. A., Odriozola E., Canton G., Paolicchi F., Malena R., Leunda M. R., Morsella C., Campero C. M. (2008). Retrospective study of bovine neonatal mortality: cases reported from INTA Balcarce, Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia* 40: 151-157.
- Palaniappan R. U. M., Chang Y., Jusuf S. S. D., Artiushin S., Timoney J. F., McDonough S. P., Barr S. C., Divers T. J., Simpson K. W., McDonough P. L., Mohammed H. O. (2002). Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity* 70(11) 5924-5930.
- Pilgrim S., Threlfall W. R. (1999). A serologic study of Leptospirosis in mares. *Equine Practice* 21(8):20-23.
- Poli G., Cocilovo A. (2002). *Microbiologia e immunologia veterinaria*. UTET 214,215,819,823.
- Ramos A. C. F., Souza G. N., Lilenbaum W. (2006). Influence of Leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. *Theriogenology* 66: 1021-1025.
- Robinson N. E., Sprayberry K. A. (2008). *Current therapy in equine medicine*. Elsevier Health Sciences Edizione 6: 145-147.
- Saglam Y. S., Yener Z., Temur A., Yalcin E. (2008). Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. *Small Ruminant Research* 74 : 119-122.
- Sellon D. C. , Long M. T. (2007). *Equine infectious disease*. Elsevier health sciences: 305-308.

- Smits H. L., Ananyina Y. V., Chereshsky A., Dancel L., Lai-A-Fat R. F., Chee H. D. *et al* . (1999). International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira* -specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 37:2904-9.
- Srivastava S. K. (2006). Prospects of developing leptospiral vaccines for animals. *Indian Journal of Medical Microbiology* 24:331-6.
- Szeredi L., Haake D. A. (2006). Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by Leptospiral infection. *Veterinary Pathology* 43:755-761.
- Van Den Ingh T. S., Hartman E. G., Bercovich Z. (1989). Clinical *Leptospira interrogans* serogroup Australis serovar Iora infection in a stud farm in the Netherlands. *Veterinary Questions* 11(3):175-82.
- Vemulapalli R., Langohr I. M., Sanchez A., Kiupel M., Bolin C. A., Wu C., Lin T. (2005). Molecular detection of *Leptospira kirschneri* in tissues of a prematurely born foal. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17:67-71.
- Verma A., Artiushin S., Matsunaga J., Haake D. A., Timoney J. F (2005). LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenetic *Leptospira interrogans* associated with equine recurrent uveitis. *Infection and Immunity* 73(11): 7259-7266.
- Weiwei Y., Faisal S. M., McDonough S. P., Chang C., Pan M., Akey B., Chang Y. (2008). Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. *Vaccine* 26(16): 1942-1954.
- Whitwell K. E., Blundered A. S., Miller J., Errington J. (2009). Two cases of equine pregnancy loss associated with *Leptospira* infection in England. *Veterinary Record* 165: 377-378.
- Williams D. M. , Smith B. J., Donahue J. M., Poonacha K. B. (1994). Serological and microbiological findings on 3 farms with equine leptospiral abortions. *Equine Veterinary Journal*, 26(2):105-108.

- Yan W., Faisal S. M., Divers T., McDonough S. P., Akey B., Chang Y. F. (2010). Experimental *Leptospira interrogans* Serovar Kennewicki Infection of Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* April 6.
- Yan Y., Chen Y., Liou W., Ding J., Chen J., Zhang J. *et al* (2003). An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to leptospira. *Journal of the Chinese Medical Association* 66:224-30.

Siti Internet

- www.italiaonline.it
- www.izsvenezie.it
- www.veterinariassociati.it

RINGRAZIAMENTI

Ci sono così tante persone che dovrei ringraziare e ho paura di dimenticare qualcuno.

Alla dott.ssa **Maria Elena Falomo** un grazie di cuore per l'aiuto, la costanza e le innumerevoli correzioni.

Al prof. **Roberto Mantovani** per avermi aperto le porte di un mondo a me sconosciuto: la statistica.

Alla dott.ssa **Daniela Pasotto** per la correzione del testo.

Alla dott.ssa **Elisa Marchiori** per la pazienza, la sopportazione e il tempo dedicatomi.

Ai **miei genitori** per avermi permesso di arrivare fino a qui. Senza il vostro aiuto, la vostra pazienza e il vostro sostegno non ce l'avrei mai fatta!

A **Dino e Ida** per avermi sempre sostenuto, per avermi dato il coraggio di andare fino in fondo, per le lavate di testa nei periodi bui e per esserci sempre stati.

Alle **nonne, Gianna, Marce e Chiara** perché con il sostegno della famiglia tutto è più semplice.

A **Gianni e i nonni** che non ci potranno essere, ma che sono nel mio cuore.

A **Silvana e Sante** per la pazienza e il conforto.

Ai **miei amici di sempre** (e non sto qui a elencarli, loro sanno chi sono) per essermi sempre stati vicini.

Alle **compagne di appartamento** (vecchie e nuove) per le innumerevoli parole di incoraggiamento.

A **Cristina** per avermi insegnato che il sorriso aiuta a superare i momenti difficili e la forza di volontà aiuta ad andare avanti, sempre.