



UNIVERSITA' DI PISA

FACOLTA' DI SCIENZE VETERINARIE

Scuola di Specializzazione in

Sanità Animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche

TESI DI SPECIALIZZAZIONE

Indagine sieroepidemiologica sulla diffusione di *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* su arieti dell'Italia centrale

Candidato: **Dott. Marco Perroni**

Relatori: **Prof. Domenico Cerri**

Dott. Fabrizio Bertelloni

Anno Accademico 2013-2014

Riassunto

Parole chiave: Leptosiroosi, Arieti, serovar Hardjo

La leptosiroosi è una delle più importanti zoonosi a livello mondiale. Una fra le sierovarianti più frequentemente riscontrate negli ovini, soprattutto in Italia, è la sierovariante Hardjo. A differenza di quanto si verifica nei bovini, nonostante che *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* non possiede la capacità di colonizzare e di persistere nell'apparato genitale di arieti e pecore, non è da escludere l'evenienza che residui di urina presenti nell'ultimo tratto dell'apparato genitale possano essere sufficienti alla trasmissione del microrganismo nelle greggi.

Scopo del lavoro è stato quello di valutare la sieropositività per *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in arieti (*Ovis aries*) provenienti da 75 diversi allevamenti ovini della Toscana, dell'Alto Lazio e dell'Umbria. Centoventotto sieri di montone sono stati sottoposti a controllo sierologico tramite microagglutinazione (MAT). Sette sieri (5,47%) sono risultati positivi, testimoniando la circolazione in tale area geografica di questo patogeno.

Abstract

Keywords: Leptospirosis, rams, serovar hardjo

Leptospirosis is one of the most important worldwide zoonoses. One of the most frequently serovars found in sheep, especially in Italy, is the serovar *hardjo*. Unlike what occurs in cattle, *Leptospira interrogans* serovar Hardjo does not have the ability to colonize and persist in the genital apparatus of rams and sheep, but it can not exclude the possibility that

residual urine present in the last section of genital tract may be sufficient to transmit the microorganism in flocks.

The purpose of this study was to evaluate the seropositivity for *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in rams (*Ovis aries*) from 75 different sheep farms in Tuscany, Umbria and Lazio. One hundred and twenty eight sera from sheep were subjected to serological testing by microagglutination (MAT). Seven sera (5.47%) were positive, demonstrating the circulation of this pathogen in this geographical area.

Introduzione

La leptospirosi è una malattia infettiva sistemica a carattere zoonosico, a decorso acuto, causata da batteri spiraliformi che appartengono alla specie *Leptospira* (combinazione della parola greca $\lambda\epsilon\gamma\tau\omicron\varsigma$, *leptos*, "sottile", e della parola latina *spira*, con lo stesso significato dell'italiano "spira").

La leptospirosi è conosciuta con moltissimi sinonimi, e tra i più noti si ricordano: febbre autunnale (*akiyami*, nella lingua nipponica), febbre dei sette giorni (*nanukayami*, in giapponese), febbre dei porcai, swamp fever, mud fever, sugar cane fever, bushy creek fever, cane-cutter fever, pea-picker's disease, Weil's disease, Weil's syndrome, febbre

itteroemorragica. Talvolta, la leptospirosi viene impropriamente definita *febbre gialla*, per evidenziare la variante itterica della malattia.

Si narra che verso la fine del Settecento un noto chirurgo dell'epoca descrisse per primo un complesso quadro sintomatologico di leptospirosi, diagnosticandola erroneamente come peste. Per avere una diagnosi corretta di leptospirosi si dovette attendere sino al 1870, mentre il 1917 fu l'anno dell'identificazione del batterio responsabile della malattia.

Le leptospirosi sono malattie diffuse in tutto il mondo, ma soprattutto frequenti nei paesi tropicali e subtropicali in cui si hanno climi umidi per le abbondanti piogge e ricca fauna di roditori. Questi animali infatti, insieme con certi animali domestici (cani, maiali, ecc.) costituiscono la maggior fonte di infezione: essi albergano le leptospire nel proprio organismo, a livello dei tubuli renali, senza manifestare alcun segno di malattia, e le eliminano in grandi quantità con le urine infettando così il terreno e le acque stagnanti.

Non resistono all'essiccamento e non sono in grado di sopravvivere a lungo nell'ambiente esterno. Sono anche facilmente eliminate dai comuni disinfettanti chimici (per esempio cloro) e dal calore. L'ambiente caldo, umido, alcalino, favorisce la sopravvivenza delle leptospire che infettano l'uomo penetrando in genere nell'organismo attraverso la cute e le mucose. È soprattutto la cute la via più seguita, specialmente in quei soggetti che per ragioni professionali vengono a contatto con ambienti infetti, e che siano esposti a traumi o ferite agli arti superiori e inferiori. Le specie di leptospire patogene per l'uomo sono numerose; le forme di infezione più conosciute sono la Leptospirosi itteroemorragica o morbo di Weil, dovuta a *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*, la febbre delle risaie, dovuta a *Leptospira* serovar *Bataviae*, la febbre dei campi, osservata specialmente in Germania e in Russia, provocata da diverse sirovarianti di *Leptospira interrogans*, la meningite dei porcai provocata invece da *Leptospira interrogans* serovar *Pomona*e e *Mitis*.

A livello globale, la leptospirosi s'inserisce tra le sindromi infettive a maggior prevalenza e viene considerata uno dei maggiori problemi di sanità pubblica nei paesi in via di sviluppo del Sud-Est Asiatico e del Sud America.

La leptospirosi viene considerata una zoonosi cosmopolita, anche se nella maggior parte dei casi la malattia viene osservata nelle zone tropicali e sub-tropicali con clima umido. La leptospirosi solo di rado si manifesta con piccole epidemie.

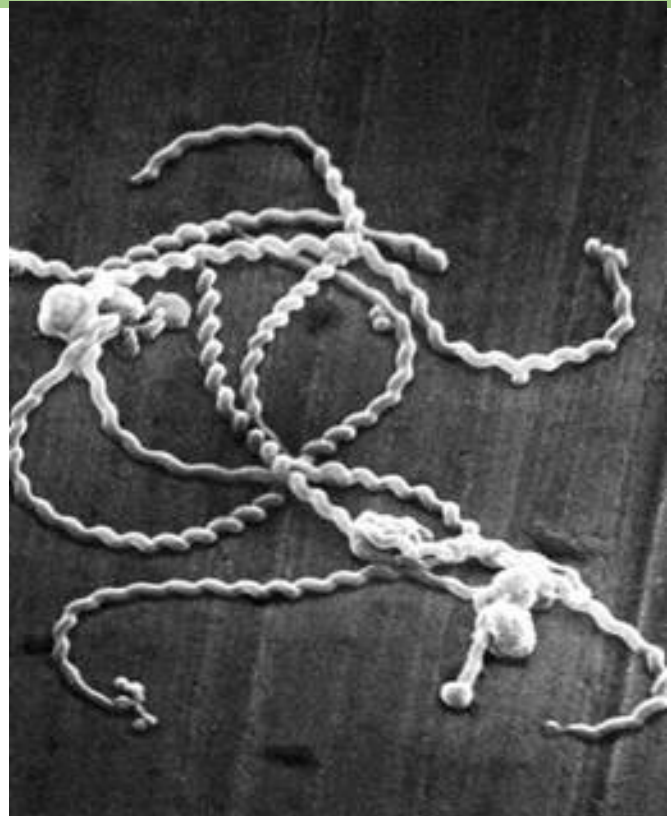
Le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) indicano che ogni anno si verificano oltre 500.000 casi di leptospirosi grave, con un tasso di mortalità del 10%. Tuttavia, l'incidenza in Europa è molto inferiore, con meno di 500 casi diagnosticati ogni anno. Nel Nostro Paese, la leptospirosi colpisce, in media, 100 persone all'anno, soprattutto in Veneto.

Le statistiche mediche hanno rilevato una maggior incidenza della leptospirosi tra i maschi, soprattutto durante i mesi caldi e l'inizio autunno. Attualmente, la malattia è in netta diminuzione, grazie agli interventi vaccinali a cui vengono sottoposti gli animali.

Gli animali ospiti (in genere i roditori) eliminano le leptospire con l'urina. La contaminazione umana avviene per contatto cutaneo o mucoso con acqua dolce infetta. Il periodo di incubazione dura circa 10 giorni. I segni iniziali dell'infezione comprendono la febbre, associata a tremore e a dolori (mialgia, cefalee e dolori addominali). La malattia progredisce per diversi giorni con una gravità che varia dai sintomi simili a quelli influenzali all'insufficienza multisistemica a evoluzione rapida, che mette a rischio la vita del paziente; il segno più caratteristico è l'epatonefrite. Possono essere anche presenti ittero intenso, insufficienza renale, sintomi neurologici, interessamento respiratorio, miocardite, epatomegalia dolorosa associata a splenomegalia e emorragie. Gli esami di laboratorio rivelano iperleucocitosi dei granulociti polimorfonucleati, colestasi che in alcuni casi è grave e isolata (con o senza citolisi limitata) e, occasionalmente, rabdomiolisi e trombocitopenia. La diagnosi si basa sulle analisi delle colture di sangue, l'isolamento dei ceppi nelle urine può essere effettuato solo sui campioni freschi. Le analisi mediante PCR dei campioni di sangue e di urina possono essere utili per identificare il DNA delle leptospire e consentono di ottenere una diagnosi precoce nella prima settimana successiva all'esordio della malattia. Tuttavia, la diagnosi della leptospirosi è spesso tardiva, a causa della variabilità della sintomatologia, che può comprendere una sindrome simil-influenzale fino all'insufficienza

renale. I sintomi sono simili a quelli presenti in molte altre malattie, compresa la febbre dengue e la malaria. Le leptospire rispondono alla penicillina G e pertanto il trattamento si basa sulla somministrazione di antibiotici. La terapia antibiotica offre alcuni benefici, ma deve essere somministrata durante il primo stadio della malattia. La prevenzione della malattia prevede la derattizzazione e l'uso di precauzioni adeguate. In alcuni paesi, come la Francia, è disponibile la vaccinazione, limitatamente ai lavoratori a rischio, come ad esempio gli addetti alla gestione della rete fognaria.

Leptospira interrogans in microscopia elettronica



Storia

La leptospirosi era certamente conosciuta in Cina fin dai tempi antichi come malattia professionale dei coltivatori di riso. Si pensa che la leptospirosi sia stata introdotta in Europa occidentale nel XVIII secolo con l'invasione dei ratti dall'Asia.

Nel 1798 si ebbe la prima descrizione di un caso di “febbre gialla” (“fièvre jaune”), cioè della forma itterica della leptospirosi, da parte del barone Dominique Jean Larrey, chirurgo dell'esercito napoleonico durante l'assedio del Cairo, che la scambiò per peste.

Durante il XIX secolo la leptospirosi fu nota in Europa come “tifo biliare”.

Nel 1870 a Heidelberg, Adolf Weil, professore di medicina interna descrisse il quadro clinico della forma itterica, che si presentava improvvisamente con febbre, splenomegalia e ittero. La forma itterica della leptospirosi prese il nome di “sindrome di Weil” o “di Larrey-Weil”

Nel 1915 l'agente eziologico fu isolato per la prima volta contemporaneamente ed indipendentemente da studiosi giapponesi e tedeschi. Ryukichi Inada e Yutaka Ido in

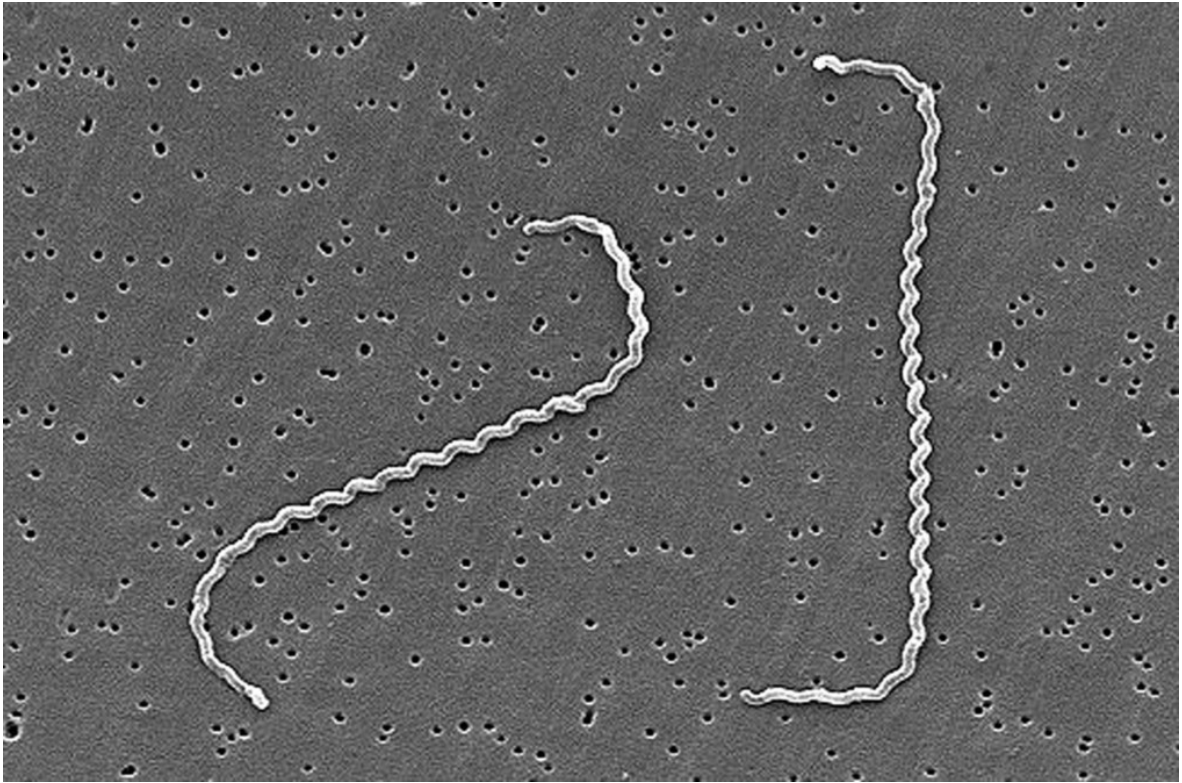
Giappone isolarono le leptospire dal tessuto renale di un minatore morto per la cosiddetta "febbre dei sette giorni" (nanukayami) o "febbre autunnale" (akiyami), nomi giapponesi della leptospirosi.

I tedeschi Uhlenhuth e Fromme, e Hubener e Reiter trovarono le spirochete nel sangue di porcellini d'India nel quale era stato inoculato sangue infetto di soldati del fronte francese della prima guerra mondiale.

Nel 1917 gli studiosi giapponesi identificarono la fonte dell'infezione e determinarono le modalità della trasmissione (il ruolo del ratto), la patogenesi, il quadro clinico, le metodiche di diagnosi e il trattamento della malattia. L'agente eziologico fu chiamato *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*.

Nel 1918 Noguchi propose il nome "Leptospira", per la sua forma a sottile spirale.

A causa delle controversie sulla priorità della scoperta e sulla nomenclatura, passò inosservato il fatto che già Stimson nel 1907 avesse dimostrato, con la colorazione con argento, la presenza di gruppi di spirochete nei tubuli renali di un paziente morto per febbre gialla. Stimson le chiamò *Spirochaeta interrogans*, perché erano a forma di punto di domanda.



Leptospira interrogans al microscopio elettronico.

Eziologia

La leptospirosi è causata da varietà sierologiche di piccoli batteri (spirochete) appartenenti all'ordine delle *Spirochaetales*, nell'ambito del quale sono oggi classificate due famiglie: quella delle *Leptospiraceae*, con il genere *Leptospira*, e quella delle *Spirochetaceae* con i generi *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Serpulina*, *Treponema* e *Borrelia*. Le leptospire sono estremamente sottili, gram-negativi che presentano un corpo filamentoso, ondulato, una forma tipicamente spiraliforme (da qui, il nome “spirochete”) con una od entrambe le estremità ripiegate ad uncino. Sono lunghe 4-5 μm con diametro trasverso di 60-120 nm; nelle colture più vecchie raggiungono lunghezze fino a 30-40 μm .

Le Leptospire sono microrganismi vivacemente mobili; presentano tre tipi di movimento, rotatorio (ben apprezzabile nelle colture liquide), di traslazione (in avanti e indietro) e di flessione. Questi movimenti non sono dovuti ad esoflagelli, bensì alla contrazione di un endoflagello o filamento assiale, costituito da una o più fibrille, che avvolge tutto il protoplasma. Questi filamenti possono essere osservati solo dopo digestione enzimatica. Il

filamento assiale si trova tra la membrana cellulare e la parete batterica. Non è una struttura continua, ma è costituito da due gruppi di fibrille che sono ancorate alle due estremità della cellula e si sovrappongono. Morfologicamente, sono simili agli spirilli flagellati a un polo con la differenza che nelle spirochete le fibrille si trovano internamente alla parete cellulare, negli spirilli le fibrille attraversano la parete cellulare.

Si colorano con il metodo Giemsa dell'impregnazione argentea (metodo Fontana-Tribondeau, Levaditi, Wartin-Starry). Poiché sono così sottili, esemplari di *Leptospira* viventi sono osservati meglio mediante microscopio con condensatore oscuro detto paraboloidale: la luce viene deviata lateralmente, per cui si crea un campo oscuro sul quale risaltano le leptospire.

Tassonomia

In base alla classificazione classica, su base fenotipica-antigenica, al genere *Leptospira* appartengono due specie: *interrogans* e *biflexa*. Alla specie *biflexa*, che comprende 60 sierotipi raggruppati in 28 sierogruppi, appartengono le leptospire saprofiti, non patogene, che vivono libere nelle acque, per questo dette anche acquicole. Nella specie *interrogans* sono raggruppati più di 250 diversi sierotipi o sierovarianti ("serovar") suddivisi in 24 sierogruppi considerati tutti patogeni. Di tali sierovarianti sono presenti in Italia: Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Canicola, Pomona, Bratislava, Jalna, Lora, Sejroe, Saxkoebing, Hardjo, Tarassovi, Ballum, Bataviae, Mini e Poi.

N	Sierogruppo	Serovar (S)
1	Australis	Australis, Bratislava, Jalna Lora
2	Autumnalis	Autumnalis, Bankinang, Bulgarica, Carlos, Mooris, Weerasinghe
3	Ballum	Ballum, Arboreae, Castellonis
4	Bataviae	Bataviae, Losbanos, Paidjan
5	Canicola	Benjamin, Broomi, Canicola
6	Celledoni	Celledoni
7	Cynopteri	Cynopteri
8	Djasiman	Djasiman, Gurungi, Sentot
9	Grippotyphosa	Grippotyphosa, Muellerei, Valbuzzi
10	Hebdomadis	Hebdomadis, Kremastos
11	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni, Gem, Icterohaemorrhagiae, Lai
12	Javanica	Javanica
13	Louisiana	Louisiana, Lanka
14	Lyme	Lyme
15	Manhao	Manhao
16	Mini	Mini, Georgia
17	Panama	Cristobali, Mangus, Panama
18	Pomona	Pomona
19	Pyrogenes	Pyrogenes, Robinsoni
20	Ranarum	Ranarum
21	Sarmin	Sarmin
22	Sejroe	Haemolytica, Hardjo, Saxkoebing, Wolffi
23	Shermani	Shermani

24	Tarassovi	Tarassovi
----	-----------	-----------

E' di recente introduzione una nuova classificazione, su base genomica, che divide il genere *Leptospira* in 19 specie (13 patogene e 6 saprofite):

N	Genere	Specie
1	<i>Leptospira</i>	<i>alexanderi</i>
2	<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>
3	<i>Leptospira</i>	<i>borgpetersenii</i>
4	<i>Leptospira</i>	<i>inadai</i>
5	<i>Leptospira</i>	<i>noguchii</i>
6	<i>Leptospira</i>	<i>santarosai</i>
7	<i>Leptospira</i>	<i>weillii</i>
8	<i>Leptospira</i>	<i>kirshneri</i>
9	<i>Leptospira</i>	<i>licerasiae</i>
10	<i>Leptospira</i>	<i>fainei</i>
11	<i>Leptospira</i>	<i>wolffii</i>
12	<i>Leptospira</i>	alstonii (genomospecie 1)
13	<i>Leptospira</i>	<i>biflexa</i>
14	<i>Leptospira</i>	<i>meyeri</i>
15	<i>Leptospira</i>	<i>kmetyi</i>
16	<i>Leptospira</i>	wolbachii
17	<i>Leptospira</i>	vanthielii (genomospecie 3)

1 8	<i>Leptospira</i> <i>a</i>	terpstrae (genomospecie 4)
1 9	<i>Leptospira</i> <i>a</i>	yanagawae (genomospecie 5)

Entrambi i sistemi di classificazione sono in uso in quanto la tradizionale e collaudata classificazione in *serovar* e sierogruppi non sempre coincide con il nuovo raggruppamento delle genomospecie, pertanto per evitare confusione soprattutto nella nomenclatura, la classificazione in serovar viene conservata nella pratica comune.

Struttura cellulare

Leptospira possiede un rivestimento simile alla parete cellulare dei Gram-negativi, formato da una membrana citoplasmica, uno strato di peptidoglicano e una membrana esterna. Tuttavia, lo strato di peptidoglicano è associato con la membrana citoplasmica piuttosto che con quella esterna, un arrangemento che è esclusivo delle spirochete. I due flagelli di *Leptospira*, emergenti dalle estremità del batterio, si estendono all'interno dello spazio periplasmico, e sono indispensabili per la motilità della *Leptospira*.

La membrana esterna della *Leptospira*, analogamente a quella dei batteri Gram-negativi, contiene lipopolisaccaridi (LPS). Differenze nella struttura altamente immunogenica degli LPS spiegano la presenza di numerosi sierotipi di *Leptospira*. Di conseguenza, l'immunità è sierotipo specifica; i vaccini attuali per la leptospirosi, che consistono di uno o più sierotipi di *Leptospira* endemici nella popolazione, proteggono solo contro i sierotipi contenuti nella preparazione. Il lipopolisaccaride (LPS) leptospirale ha mostrato una bassa attività come endotossina.

Le leptospire sono microrganismi molto esigenti da un punto di vista nutritivo, in quanto per permetterne la crescita si impiegano terreni ricchi, per lo più liquidi o semisolidi con solo l'1% di Agar. Le sostanze di cui necessitano sono le vitamine B1 e B12 e albumina bovina e/o siero di coniglio, oltre a vari aminoacidi (asparagina, arginina, prolina, ecc.).

Leptospira viene coltivata a temperature di 30 °C sul terreno di Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), che può essere arricchito con siero di coniglio allo 0,2-1% per aumentare la crescita di ceppi esigenti. La crescita di leptospire patogene in un terreno artificiale come l'EMJH si evidenzia in 4-7 giorni, mentre la crescita di ceppi saprofitici avviene in 2-3 giorni. Per le specie patogene, la temperatura minima di crescita è di 13-15 °C. Poiché la temperatura minima di crescita delle specie saprofitiche di *Leptospira* da quelle patogene. Il pH ottimale di crescita di *Leptospira* è 7.2-7.6.

Alcune leptospire producono una tossina denominata emolisina, attiva verso i globuli rossi dei soli ruminanti (bovino, bufalo, pecora e capra): ciò spiega perché nei ruminanti uno dei sintomi più significativi della leptospirosi sia rappresentato dall'emoglobinuria.

Le leptospire sono organismi microaerofili nei quali la principale sorgente di carbonio ed energia durante la crescita *in vitro* è rappresentata da acidi grassi a catena lunga, che sono metabolizzati mediante beta-ossidazione. Gli acidi grassi sono presenti nel terreno EMJH sotto forma di Tween. Nel suddetto terreno gli acidi grassi sono legati dall'albumina e rilasciati lentamente nel mezzo per prevenire il loro accumulo tossico.

Come la maggior parte dei batteri, *Leptospira* richiede ferro per la crescita. *L. interrogans* e *L. biflexa* hanno la capacità di acquisire il ferro in differenti forme. *L. biflexa* possiede un recettore TonB-dipendente richiesto per l'utilizzazione della forma ferrosa del ferro, ed un gene ortologo del recettore è stato identificato anche nel genoma di *L. interrogans*. *L. interrogans* può anche ricavare il ferro dall'eme, che è legato alla maggior parte del ferro presente nel corpo umano. Sulla superficie di *L. interrogans* è stata identificata la proteina HbpA emina-legante, che può essere coinvolta nella cattura dell'emina. Sebbene non secernino siderofori, *L. biflexa* and *L. interrogans* sono capaci di ricavare il ferro dai siderofori secreti da altri microrganismi.

Epidemiologia

La leptospirosi è una zoonosi cosmopolita, benché sia molto più diffusa nelle regioni tropicali (con tassi di sieropositività nelle popolazioni fino all'80%, segno di avvenuta infezione).

Le leptospirosi rappresentano un tipico esempio di infezioni i cui agenti causali, dotati di scarsissima resistenza nell'ambiente esterno ed incapaci di moltiplicarvisi, affidano ogni possibilità di sopravvivenza ad animali vertebrati, domestici e selvatici, che ne divengono più o meno durevoli serbatoi e come tali provvedono alla conservazione della specie ed alla perpetuazione del contagio.

I selvatici occupano una posizione di assoluta preminenza quali indispensabili anelli della lunga catena epidemiologica dell'infezione. I roditori, soprattutto i muridi, rimangono i portatori più diffusi e pericolosi. E' tuttavia dimostrato che accanto a questi animali, molti altri possono assolvere la medesima funzione.

Il fenomeno coinvolge naturalmente anche gli animali domestici i quali, per la recettività più o meno spiccata che mostrano nei confronti della maggior parte delle leptospire patogene e per la frequenza con la quale soggiacciono all'infezione, contribuiscono per la loro parte a diffondere il contagio mediante disseminazione di quote più o meno cospicue di microrganismi nell'ambiente in cui vivono e per periodi di tempo variabili.

Le leptospire patogene sono dunque parassiti obbligati e la sopravvivenza di una sierovariante in un determinato ecosistema è legata alla presenza di una popolazione animale che funga da ospite di mantenimento. In questa popolazione l'infezione, qualunque sia l'ospite o la sierovariante in causa, assume carattere endemico ed è caratterizzata da alta recettività dell'ospite (dose minima infettante molto bassa), scarsa patogenicità della sierovariante nei riguardi dell'ospite, prolungata leptospiruria e quindi efficiente trasmissione dell'infezione alle generazioni successive.

L'infezione non rimane tuttavia confinata all'ospite di mantenimento, ma in genere individui di altre specie, gli ospiti accidentali, possono contagiarsi quando si inseriscono nell'*habitat* dell'ospite di mantenimento oppure quando quest'ultimo viene a trovarsi nell'*habitat* di un'altra specie. La trasmissione dell'infezione ad ospiti accidentali non è necessaria per la sopravvivenza della sierovariante nell'ambiente; tale infezione assume andamento "sporadico" ed è caratterizzata da scarsa suscettibilità dell'ospite, da leptospiruria di breve durata e pertanto da inefficiente trasmissione intraspecifica.

Sia negli animali domestici che nei selvatici lo stato di portatore è conseguenza di una localizzazione renale delle leptospire e, più esattamente, a livello delle strutture tubulari. Diverse indagini sono state dedicate allo studio del meccanismo patogenetico della leptospirosi negli ospiti di mantenimento. E' certa l'esistenza di una fase di leptospiremia, sia pure transitoria, anche in assenza di sintomi obiettivamente rilevabili. Già durante questa prima fase le leptospire, oltreché in altri organi, sono reperibili in ambito renale e più precisamente nel connettivo intertubulare. Dopo aver determinato piccole emorragie per rottura dei capillari, esse si liberano negli spazi interstiziali dove trovano condizioni molto favorevoli alla loro replicazione. Con lo stabilirsi dei processi immunitari che si verificano verso il 7°-10° giorno dall'infezione, abbandonano questa sede per raggiungere la loro sede definitiva: le strutture tubulari del nefrone inferiore. E' presumibile che guadagnino il lume tubulare per penetrazione diretta oppure in seguito alla disintegrazione e il distacco di frammenti di cellule epiteliali; giunte in questa sede si riproducono molto rapidamente e intensamente. La loro escrezione con le urine, anche se rappresenta un evento pressoché costante, non avviene tuttavia in ogni caso con uguale persistenza, continuità ed intensità. Per dare un'idea dell'entità del fenomeno e della sua rilevanza in termini epidemiologici, è sufficiente ricordare che nell'urina di certi portatori, soprattutto muridi, sono costantemente reperibili fino a 10^6 - 10^7 leptospire/ml e che nell'urina di bovino e di suino possono essere presenti sino a 2×10^8 leptospire/ml (sierovariante Pomona).

Di norma negli ospiti di mantenimento la leptospiruria non dura per l'intero corso della loro vita; in taluni casi e per determinate sierovarianti essa può tuttavia protrarsi, sia pure con intensità variabile, per tempi lunghi (6-12 mesi) e lunghissimi (circa due anni). Questa persistente colonizzazione delle spirochete in sede tubulare non è però priva di effetti patologici; essa infatti finisce generalmente per provocare un danno parenchimale più o meno sensibile, non di rado a carattere progressivo, sfociante in lesioni anatomiche di tipo interstiziale, alla lunga anche mortali.

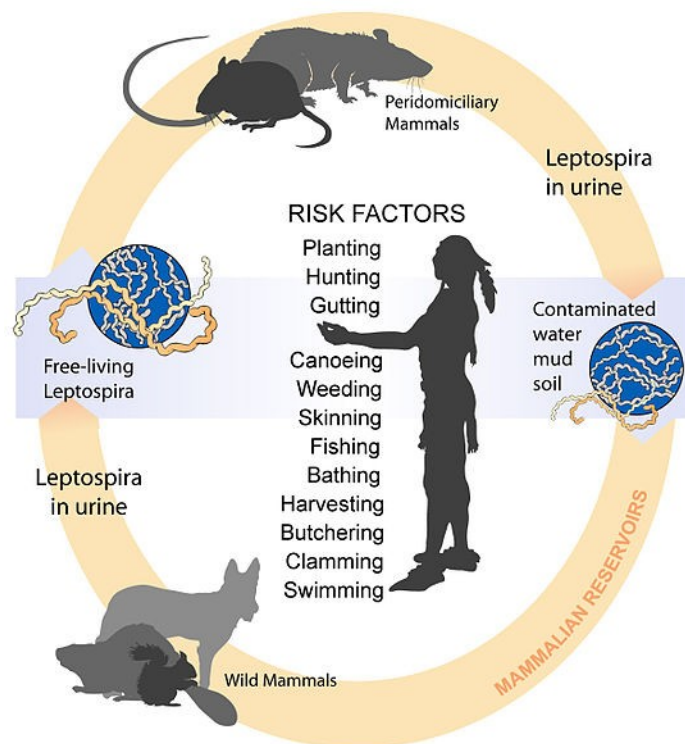
L'abbondante e persistente eliminazione di *L. interrogans* con le urine da parte dei serbatoi naturali rappresenta quindi il caposaldo epidemiologico delle leptospirosi in generale.

Per quanto riguarda gli animali domestici vi è peraltro l'importante e, sotto certi aspetti, sorprendente scoperta di una localizzazione delle leptospire patogene nell'apparato genitale maschile e femminile: testicolo, epididimo, vescicole seminali, prostata, ghiandole bulbouretrali di tori e verri; utero, salpingi e vagina di bovine e scrofe, anche impuberi, spontaneamente infette o sperimentalmente infettate. Poiché la presenza delle leptospire nell'apparato genitale femminile può protrarsi a lungo (da 83 a 147 giorni), ben si comprende quanto questo evento possa agevolare la trasmissione venerea del contagio e costituire ulteriore motivo di rischio per l'uomo.

Sulla base di ricerche sperimentali e di osservazioni in campo pratico, si deve ammettere la possibilità di trasmissione dell'infezione a mezzo di artropodi ematofagi tra i quali, in particolare, le zecche. E' stato infatti possibile isolare la sierovariante Gryppotyphosa da ixodidi del genere *Dermacentor* parassitanti bovini con manifestazioni di malattia ed è stato anche accertato che forme ninfali e adulte di *Ornithodoros*, fatte infettare su hamster ed uova embrionate in precedenza inoculati con serovar Pomona, sono in grado di trasmetterla alle cavie. Dopo l'assunzione con il sangue, le leptospire passerebbero nell'emocele della zecca attraverso la parete intestinale; dopo essersi qui intensamente moltiplicate andrebbero a infettare le ghiandole salivari, il liquido coxale e gli organi genitali. Le zecche possono rimanere portatrici fino a 518 giorni e infettanti fino a 232.

Nelle leptosirosi il contagio può essere diretto o indiretto. La trasmissione diretta da animale infetto a sano si realizza comunque assai meno frequentemente della trasmissione indiretta per contatto con le leptospire vive e virulente nell'ambiente esterno, dove le acque e il terreno inquinati con urine di portatori costituiscono i principali mediatori dell'infezione.

Diverse sono le vie attraverso le quali i microrganismi riescono a penetrare nell'ospite recettivo. Prima fra tutte è quella delle mucose. La maggior parte dei casi di leptosirosi è imputabile all'ingestione di acqua o di alimenti contaminati. La porta d'ingresso più comune è in ogni modo rappresentata dal primo tratto dell'apparato digerente, limitatamente quindi al cavo orofaringeo, anche se non si deve escludere la possibilità, specie nei poligastrici, che la penetrazione avvenga a livello delle vie digerenti più profonde, in particolare nei prestomaci. Una evenienza del genere è invece da ritenersi più rara nei monogastrici, costituendo l'acidità del succo gastrico una barriera difficilmente superabile dalle spirochete. In determinate circostanze è da presumere però che ciò possa accadere: in occasione, ad esempio, di abbondanti bevute d'acqua le quali comportano un passaggio rapido del liquido dallo stomaco all'intestino ed una sensibile modificazione del pH del mezzo. Una certa importanza si deve riconoscere anche al contagio attraverso le mucose nasale, oculocongiuntivale e soprattutto genitale. Il contagio può inoltre avvenire in corrispondenza di soluzioni di continuo della cute, particolarmente quando queste si producono in prossimità delle labbra, delle narici e delle parti distali degli arti e di tutte le regioni che, come quest'ultime, hanno un contatto frequente e/o prolungato con le acque ambientali. E' da ritenere assai difficile, anche se non impossibile, l'infezione attraverso la cute integra.



Anche l'uomo come gli altri animali si infetta attraverso il contatto con le urine dei mammiferi portatori, principalmente ratti, ma non solo: la *Serovar canicola* può essere eliminata dai cani, la *Serovar hardjo* dai bovini domestici, la *Serovar pomona* dai suini, anche se ciò può non rappresentare la regola.

Patogenesi

Qualunque sia la porta di ingresso nell'organismo, le leptospire raggiungono ben presto il torrente circolatorio. Ciò avviene con grande rapidità, probabilmente grazie all'estrema sottigliezza del loro corpo ed in parte anche per i vivaci movimenti di cui sono dotate. Inoculate nella cavia si ritrovano nel sangue già dopo 10 minuti. Una volta giunte in circolo, iniziano una intensa replicazione la quale porta in un periodo più o meno lungo da 3-5 a 10-15 giorni, alla comparsa delle prime manifestazioni, che costituiscono la fase iniziale del processo morboso o fase setticemica o di leptospiremia. Nei casi in cui l'infezione sfocia in malattia conclamata già in questa fase di esordio si rilevano, oltre a febbre elevata, sintomi evidenti quali: anoressia, profondo abbattimento, iperemia congiuntivale, bradicardia. Il periodo setticemico dura in genere da 5 a 8-10 giorni e rappresenta una premessa indispensabile alla propagazione e distribuzione dei microrganismi nei vari organi e tessuti. Non si conosce la ragione della progressiva diminuzione e della totale scomparsa delle leptospire del sangue ma appare probabile che il fenomeno sia da ascrivere alle reazioni immunitarie umorali, che cominciano appunto ad evidenziarsi verso il sesto giorno dopo l'infezione.

Con la fine della leptospiremia inizia la seconda fase o fase di stato o delle localizzazioni. Il quadro clinico oltremodo complesso e vario, è in tale periodo nettamente dominato dal grave e costante interessamento renale e/o epatico. A carico di tutti gli organi e parenchimi, con particolare riguardo a fegato e rene, si hanno, accanto a lesioni di diversa entità, alterazioni degenerative molto pronunciate. Le espressioni più caratteristiche del danno e della conseguente insufficienza epato-renale sono l'ittero e l'uremia da ritenzione. L'ittero leptospirotico ha un aspetto particolare; alla esplorazione delle mucose esso assume infatti, per la contemporanea congestione dei capillari sottoepiteliali, colorito giallo-arancio ed è quindi abbastanza ben differenziabile da altri itteri, infettivi e non, di norma giallo citrina. La sua origine è duplice: e cioè prettamente epatogeno (parenchimoso e colestatico) nel cane,

nel suino e nel cavallo, per la degenerazione torbida degli epatociti e per le alterazioni infiammatorie delle vie biliari intraepatiche; è invece prevalentemente ematogeno nei ruminanti, in conseguenza della particolare labilità dei globuli rossi di questi animali all'azione della emolisina; il che vale a spiegare i fenomeni di eritrolisi massiva e a giustificare l'emoglobinuria e l'intensa anemia, generalmente osservabili nel corso di malattia nei bovini, negli ovini e nei caprini. Nei quadri acuti è evidente anche la compromissione del sistema circolatorio, che si estrinseca comunemente con un abbassamento brusco della pressione arteriosa e, per le lesioni degenerative cui vanno incontro gli endoteli vasali, con fatti emorragici. Con lo stabilirsi delle localizzazioni si ha la normalizzazione della curva termica la quale, nell'ulteriore decorso della infezione, tende anzi attestarsi su valori subnormali.

Quando l'infezione decorre in forma paucisintomatica o subclinica (eventualità molto frequenti), alla fase di leptospiremia segue una persistente localizzazione renale e con essa, a più o meno lungo termine, nefrite interstiziale cronica. E' noto come l'interruzione della gravidanza e l'aborto costituiscano un evento molto frequente nel corso di leptospirosi suina e bovina ed è altresì noto come tale fenomeno rappresenti spesso l'unica manifestazione della infezione. Sembra ormai chiarito che le leptospire, durante la fase di setticemia materna passano attraverso il filtro placentare, invadono e infettano successivamente i feti, di cui determinano la morte in tempi variabili in rapporto al potere patogeno della siero variante in causa. Si tratterebbe in altre parole di una invasione spirochetica transplacentare e pertanto di una infezione attiva di notevole gravità, favorita nella sua fatale evoluzione dalla completa assenza di anticorpi di origine materna nei feti durante l'intero periodo della loro vita intrauterina.

Leptospirosi negli ovini

Fino a pochi anni fa gli ovini erano ritenuti scarsamente recettivi all'infezione, giudizio formulato sulla base della scarsa frequenza con cui si rilevavano manifestazioni cliniche. Infatti in questi animali la leptospirosi decorre generalmente in forma silente o semisilente.

Casi isolati o piccoli focolai di malattia, generalmente sostenuti dalle sierovarianti *Icterohaemorrhagiae* o *Pomona*, interessano di preferenza gli agnelli e sono caratterizzati da quadri itteroemorragici o itteroemoglobinurici. E' dimostrato che in animali adulti la sierovariante *pomona*, dotata di potere patogeno in genere più elevato della *Hardjo* (elabora, fra l'altro, emolisina) può dar luogo ad una nefrite interstiziale cronica a focolaio e quindi a leptospiruria della durata di circa tre mesi e aborto entro 2-4 settimane se l'infezione viene contratta nella prima metà della gravidanza. Infezioni ad eziologia diversa o sono piuttosto rare (*L. interrogans* serovars *Canicola*, *Tarassovi*) o tendono ad estinguersi spontaneamente per la brevità della fase di leptospiruria da cui sono contraddistinte (*L. serovar Icterohaemorrhagiae*). Nel nostro Paese non è segnalata la presenza di *L. serovar Grippotyphosa*, non di rado causa di episodi morbosi in Europa centro-orientale.

In questi ultimi anni è venuto emergendo, anche per gli ovini, il problema delle infezioni da *Hardjo*.

Tale problema deriva dalla frequente costatazione di sierologia positiva, sia in Italia che in Paesi diversi, su pecore con turbe della funzione riproduttiva (aborto, parto prematuro e mortalità perinatale) ad eziologia indefinibile. Dalle indagini sperimentali è scaturito che l'infezione da *Hardjo* nella pecora è realmente assai diffusa, come dimostrano i ripetuti isolamenti dalle urine e dai reni di portatori, registrati anche in Italia, nonché la comparsa di turbe della gravidanza, aborto e mastite atipica.

La sierovariante *Hardjo*, isolata per la prima volta a Sumatra nel 1938 da un giovane malese, a nome *Hardjoprajitno*, affetto da una forma di Leptospirosi benigno-anitterica, si distingue

da altre leptospire patogene per alcune caratteristiche ed in particolare per le esigenze colturali.

Mediante l'impiego di endonucleasi di restrizione è stata riconosciuta l'esistenza di due genotipi di Hardjo: Hardjobovis, meno patogeno, cui appartiene la gran parte (oltre il 90%) dei ceppi isolati dai reni e dalle urine di animali portatori e Hardjoprajitno, più patogeno, al quale appartiene circa l'80% degli stipiti isolati da materiale patologico (feti abortiti, secrezione mammaria di bovine affette da mastite atipica). Tutti gli stipiti isolati in Nord America, Nuova Zelanda e Australia appartengono al genotipo Hardjobovis, la maggioranza di quelli isolati in Europa (Inghilterra, Irlanda del Nord) al genotipo Hardjoprajitno. Tra i ceppi isolati in Italia, quelli sottoposti a questo tipo di indagine sono stati tutti identificati come Hardjobovis.

Nonostante le differenze di virulenza, il potere patogeno intrinseco di hardjo è in genere modesto. Non producendo emolisina, la sua inoculazione a ovini recettivi non provoca quadri clinici di particolare rilievo; esercita attività patogena sul feto in utero, ma tra infezione e aborto corrono tempi alquanto lunghi; inoltre, l'infezione contratta nell'ultima fase della gestazione è spesso compatibile con la nascita di agnelli a termine o prematuri in buono stato di salute ma leptospirurici per infezione renale congenita.

La localizzazione nei tubuli contorti di secondo ordine è in ogni caso fenomeno di lunghissima durata. Un dato di notevole rilevanza epidemiologica, di recente acquisizione, è quello relativo alla possibilità che hanno ovini infetti di eliminare Hardjo con le urine per periodi molto lunghi, fino ad 11 mesi. Conseguenza di questo stato è l'instaurarsi di una nefrite interstiziale cronica a lenta evoluzione. Tale persistente leptosipuria autorizza ad attribuire alla pecora il ruolo di secondo ospite di mantenimento, dopo il bovino, della sierovariante Hardjo e spiega la facilità con cui l'infezione ha modo di propagare in natura e il carattere di endemicità che essa vuole assumere nell'ambito degli allevamenti. Osservazioni fatte in epoca recente, sia su soggetti naturalmente infetti che su soggetti sottoposti ad infezione sperimentale fanno ritenere che, a differenza di quanto si verifica nei

bovini, *L. ser. Hardjo* non possiede la capacità di colonizzare e di persistere nell'apparato genitale di arieti e pecore.

Questa sierovariante è dotata di un potere patogeno intrinseco molto modesto per cui non dà luogo a manifestazioni morbose come quelle sostenute dalla sierovariante *pomona*. In ogni caso interferisce con lo stato di gravidanza ed ha la capacità di provocare l'insorgenza di una mastite atipica.

La malattia può colpire indifferentemente animali di qualunque razza, età, sesso e attitudine, pur notandosi di solito una più spiccata recettività nelle razze da latte e nei giovani animali.

Sul piano clinico l'infezione si manifesta con sintomi diversi e di diversa intensità in rapporto anche alla sierovariante, lo stato fisiologico e immunitario del soggetto, e alla virulenza dello stipo in causa. Sotto questo aspetto le infezioni da *L. serovar Pomona* si differenziano abbastanza nettamente dalle infezioni da *Hardjo*.

Infezione da pomona. – Il periodo di incubazione oscilla in media su 8-10 giorni, con minimi di 4 e massimi di 15-20. La malattia evolve in forma acuta, subacuta e cronica.

La forma acuta si riscontra in giovani soggetti fino a 3 mesi di età. La fase setticemica è caratterizzata da soliti sintomi di ordine generale; febbre, a volte elevata (41,5-42°C), anoressia, profondo abbattimento, stipsi o diarrea, congestione della mucosa congiuntivale. Nel periodo delle localizzazioni col ritorno della temperatura corporea a valori pressoché normali si evidenzia anemia, ittero ben apprezzabile sulla congiuntiva, sulla mucosa buccale, vulvare, vaginale, sulla sclera e anche sulla cute con tonalità variabile dal bianco-giallastro al giallo-arancio intenso, nonché emoglobinuria. A seconda dell'entità dei fenomeni eritrolitici, le urine assumono colore rossastro o rosso molto scuro, nerastro, paragonabile a quello del caffè.

Tra gli altri sintomi si segnalano fatti di congiuntivite mucopurulenta, edemi e successivamente lesioni ulcerativo-necrotiche circoscritte a carico di labbra, orecchie, collo, dorso, mammella e, più raramente, processi infiammatori uveali o meningei.

Nei casi gravi si assiste ad un graduale peggioramento delle condizioni generali; il polso si fa sempre più celere e impercettibile, la respirazione dispnoica, la temperatura corporea raggiunge valori nettamente subnormali finché, preceduta da un breve stato di coma, sopravviene la morte. Il decorso è rapido e tumultuoso (3-5 giorni) e spesso non influenzabile da alcuna terapia per quanto tempestiva e razionale. La mortalità raggiunge il 50-60%.

La forma subacuta predilige i soggetti adulti e si conclama con un complesso di sintomi sostanzialmente analoghi a quelli della forma acuta, anche se di minore intensità e di maggiore durata (10-20 giorni) e con più modesta percentuale di esiti letali.

La forma cronica consegue per lo più alla subacuta ed è espressione di una nefrite interstiziale cronica, la quale si traduce in un progressivo scadimento delle condizioni generali accompagnato da stranguria, cifosi, dolorabilità lombare, atassia locomotoria, albuminuria, iperazoturia.

Piuttosto comuni in natura sono le forme paucisintomatiche, a carattere costantemente benigno, nelle quali mancano di norma sia l'ittero che l'emoglobinuria e gli unici sintomi sono rappresentati da febbre modica di breve durata, abbattimento, disoressia, stipsi.

Frequentissime, come s'è già avuto modo di accennare, debbono considerarsi le forme del tutto asintomatiche o inapparenti.

Nell'allevamento da carne, l'aborto rappresenta l'evento più frequente e temuto. Si osserva soprattutto nelle primipare, presenta carattere endemico e costituisce assai spesso l'unica manifestazione morbosa. Quando l'infezione coincide con l'ultimo periodo di gravidanza, possono aversi parti prematuri, casi di mortinatalità o di mortalità perinatale.

Infezione da Hardjo.- In assenza di forme acute sistemiche, tra gli effetti più significativi della localizzazione viscerale delle leptospire sono da considerare l'aborto, la mortinatalità, la nascita di soggetti prematuri e disvitali, la mastite atipica, l'ipofertilità. Colonizzando nell'utero gravido, la sierovariante *hardjo* induce necrosi nei villi dei cotiledoni, edema del

tessuto intercotiledonare con infiltrazione di linfociti e polimorfonucleati. L'aborto, tardivo, si manifesta in genere, come si è già detto, da un mese e mezzo a tre mesi dopo il contagio e il feto, che viene con ogni probabilità a morte in seguito a setticemia, all'esame necroscopico presenta tubulonefrosi e nefrite interstiziale, emorragie sparse e necrosi epatica centrolobulare.

Negli animali in lattazione l'infezione può avere più o meno profonde ripercussioni sulla mammella. In tal caso si rende evidente una marcata diminuzione della secrezione latte con interessamento della mammella in toto, che appare soffice e flaccida con latte denso, giallo, d'aspetto similcolostrale. L'agalassia persiste da 2 a 10 giorni, dopodiché la produzione ritorna spesso a valori normali. Alla guarigione clinica, non residuano conseguenze anatomiche o funzionali a carico del parenchima mammario. Questa forma di mastite, nota anche come mastite atipica, può costituire la forma dominante di infezione da *hardjo* e comparire pertanto in assenza di altri fenomeni morbosi generali. *L. hardjo* sembra anche capace di indurre ipofertilità, con ingenti danni economici alle aziende.

Lesioni anatomo-patologiche

I quadri anatomopatologici più significativi si osservano nelle forme acuto-subacute da *pomona*, in cui predominano in assoluto alterazioni epatorenali e fenomeni itteroemorragici. Il fegato è normalmente megalico di color argilla od ocraceo, friabile, a volte sede di focolai di necrosi. Istologicamente, accanto alle note proprie di un processo infiammatorio-degenerativo, si rileva intensa eritrofagia ed emosiderosi nelle cellule di Kupffer. Le modificazioni macro e microscopiche renali variano col variare dello stadio evolutivo della malattia (nefrite interstiziale acute o cronica, a focolai o diffusa), per cui il viscere può conservare la sua normale grandezza oppure presentare aumento di volume, come nelle forme acute; lo stesso si dica per l'aspetto esteriore, l'entità e la natura dei fatti infiltrativi connettivali e degenerativi tubulari. Si può inoltre rilevare: vescica notevolmente distesa e

ripiena di urina rosso-bruna scura, spesso con emorragie multiple a carico della mucosa, edema polmonare con emorragie parenchimali, subpleuriche, peri ed epicardiche; miocardio pallido e degenerato; abomaso e intestino sede di una flogosi catarrale, con tratti di mucosa iperemici o con emorragie puntiformi.

Leptospirosi nell'uomo

Date le possibili modalità di contagio, è palese che le categorie più a rischio comprendano tutte quelle persone che, per svariati motivi (es. lavorativi), sono costrette a rimanere frequentemente in contatto con le acque o con i terreni umidi. I cacciatori, i veterinari, gli sportivi (soprattutto chi pratica sport acquatici), i minatori, gli agricoltori, gli allevatori, i pescatori e le mondine rappresentano sicuramente le categorie più esposte al rischio di leptospirosi.

Sintomi e forme cliniche

Il quadro sintomatologico della leptospirosi risulta spesso problematico, soprattutto per delineare una diagnosi completa ed esaustiva. Abbiamo visto che in natura esistono moltissime varietà di leptospire, dunque anche il quadro clinico-sintomatologico che ne consegue è spesso complesso ed eterogeneo. Inoltre, la gravità della malattia è proporzionale alla carica infettante.

Nella maggior parte dei casi nei primi stadi l'infezione decorre in maniera del tutto asintomatica.

La complessità della malattia è tale da rendere necessaria una distinzione in tre forme cliniche (Leptospirosi sub-clinica, Leptospirosi anitterica e Sindrome di Weil o Leptospirosi itterica).

Tutte le tre forme cliniche possono presentare un decorso bifasico, in cui si alternano due fasi ben distinte, la fase setticemica e la fase immune, palesemente indistinguibili quando la malattia si presenta in maniera asintomatica.

Di seguito sono riportate le caratteristiche generali tipiche di ogni fase della leptospirosi, nonostante ognuna delle tre forme si distingua per segni e sintomi leggermente differenti:

1. Fase setticemica: o fase leptospirotica o fase acuta

Generalmente, la prima fase della leptospirosi presenta una durata variabile dai 4 agli 8 giorni: esordisce con un inatteso e brusco aumento della temperatura basale (39-40°C),

accompagnato da forte mal di testa, brividi, malessere generale, nausea, vomito ed anoressia. Talvolta, la fase acuta della leptospirosi viene associata anche a faringodinia ed esantema morbilliforme; più raramente, la fase acuta grave si caratterizza anche da ittero, solitamente verso lo stadio finale della fase setticemica.

La gravità di questa prima fase della leptospirosi varia in base alla specie batterica e allo stato di salute del paziente.

2. Fase immune della leptospirosi: o leptospirulica

Più breve della prima, la fase immune dura in genere 5 giorni, durante i quali si formano gli anticorpi specifici contro il batterio, le leptospire nel sangue tendono a scomparire e compaiono lesioni istologiche a carico di rene, meningi e fegato. Nel rene si registrano spesso marcate lesioni a livello del nefrone distale, accompagnato da edema interstiziale, infiltrazione dei linfociti e distruzione dell'epitelio della membrana basale. A livello delle meningi, si osserva spesso un'infiltrazione linfocitaria e nel fegato si registra sovente una necrosi delle cellule epatiche e coleresi.

Leptospirosi sub clinica: La forma subclinica della leptospirosi esordisce il più delle volte con febbre, dolori a livello del basso ventre, mal di testa, vomito, spesso accompagnato dai tipici sintomi influenzali. L'esame del sangue evidenzia una marcata presenza di leptospire circolanti. Successivamente (fase immune), il paziente si sfebbra, non si riscontrano leptospire nel sangue e compaiono gli anticorpi specifici: in simili frangenti, sono possibili altre manifestazioni quali uveite, eruzioni cutanee, lesioni renali e/o epatiche.

Leptospirosi anitterica: Rappresenta la forma intermedia delle leptospirosi e ne costituisce il 90% delle forme sintomatiche: i sintomi sono più gravi rispetto alla forma subclinica, ma meno severi della sindrome di Weil. Il paziente, nella prima fase della malattia, lamenta malessere generale sempre accompagnato da una marcata alterazione della temperatura basale (febbre elevata di tipo settico); frequenti anche cefalee, brividi, vomito, dolore nel basso ventre e diminuzione della pressione arteriosa. Talvolta, possono associarsi anche disturbi polmonari respiratori.

Il mal di testa persevera anche nella seconda fase della leptospirosi, mentre i valori della temperatura basale tendono alla normalità; in alcuni pazienti, si osserva una lieve febbre. Talvolta, viene diagnosticata anche una meningite asettica che perdura alcuni giorni, senza effetti gravi. La forma anitterica della leptospirosi è spesso accompagnata anche da disturbi oculari, quali dolore agli occhi, iperemia congiuntivale e fotofobia. Nella fase immune, i patogeni non sono osservabili nel liquor, che si presenta normoteso, generalmente con iperproteinorachia (notevole aumento delle proteine) e valori normali di glicorrachia (tasso di glucosio all'interno del liquido cefalorachidiano, chiamato anche liquor o liquido cerebrospinale: 50-60mg/ml).

Sindrome di Weil (Leptospirosi itterica): Rappresenta sicuramente la forma clinica più allarmante e pericolosa tra le leptospirosi; recenti studi hanno dimostrato che *L. interrogans* è il patogeno responsabile della malattia. Il danno epatico e renale, accompagnato spesso ad emorragie, è il sintomo più grave che caratterizza la sindrome: le lesioni sono tali perché la malattia è principalmente dovuta ad un danno vasculico di tipo sistemico. La sindrome di Weil esordisce con febbre alta (analogia con la forma anitterica della leptospirosi), accompagnata sempre da ittero evidente (da qui, il nome leptospirosi "itterica"), talvolta da interessamento renale di varia entità (oliguria, cilindruria, proteinuria). Possibili casi di miocardite. A seguito della fase setticemica, quella immune si caratterizza per il peggioramento delle condizioni epatiche e renali, associato ad iperazotemia ed ipercreatininemia. Rara, seppur possibile, la necrosi tubulare. Quando non curata o trascurata, la leptospirosi itterica è mortale nel 10% dei pazienti: il rischio di prognosi infausta aumenta con l'avanzare dell'età e con il grado di severità dell'ittero.

Leptospirosi: diagnosi e terapie

La diagnosi di leptospirosi, risulta particolarmente artificiosa e complessa, soprattutto a causa del marcato polimorfismo clinico. A rigor di ciò, anche le terapie volte alla guarigione

dalla leptospirosi rappresentano spesso un limite, poiché i test diagnostici attualmente disponibili non sono sempre limpidi ed inconfutabili.

Leptospirosi: diagnosi: Chiaramente, essendo una malattia infettiva, la diagnosi della leptospirosi si basa in particolare su due elementi fondamentali:

- Isolamento del batterio (agente patogeno)
- Analisi sierologica anticorpale specifica

A partire da queste considerazioni, è chiaro che la diagnosi si fonda sia sull'analisi sintomatologica - clinica, sia sul racconto anamnestico che, purtroppo, rimane spesso un'incognita. Per quanto concerne lo studio dei sintomi, nella maggior parte dei casi si punta l'attenzione sulla presenza di febbre, mialgia, emorragie, ittero ed iperemia congiuntivale; per quanto riguarda l'anamnesi, invece, si indaga sull'attività lavorativa del paziente, sui viaggi effettuati negli ultimi periodi, sulle condizioni igienico-sanitarie e, da ultimo, sul contatto con animali potenzialmente infetti.

L'isolamento dei batteri, per le leptospire, viene condotto su terreni specifici a partire da liquidi biologici, sangue e, soprattutto, urine e/o tessuti lesionati dalla leptospirosi (fegato o rene). È doveroso puntualizzare che non sempre gli esami diagnostici colturali su terreni artificiali sono efficaci ed attendibili, poiché le leptospire tendono a svilupparsi in maniera molto lenta. Le indagini diagnostiche sierologiche (di tipo anticorpale specifico) risultano senza dubbio più vantaggiose e sicure.

Gli esami sierologici sono in genere effettuati durante i sintomi iniziali della leptospirosi (quando sintomatica); per questa indagine, ci si avvale dei sierotipi maggiormente diffusi sul territorio. I test sierologici dovrebbero essere ripetuti più volte, al fine di confermare la diagnosi.

Tra i test di accertamento diagnostico, si ricordano:

- Microscopic Agglutination test (MAT): test molto specifico ma particolarmente complesso e laborioso. La conferma o meno della leptospirosi si ottiene in tempi relativamente lunghi.

- ELISA: esame diagnostico di tipo immuno-enzimatico, più semplice rispetto al precedente.
- Colturale
- PCR

Terapie: Esistono due possibilità terapeutiche per la leptospirosi, malgrado siano per certi aspetti controverse.

La prima terapia si basa sulla somministrazione per os di antibiotici, particolarmente indicata in tutte le fasi della malattia; le forme di leptospirosi richiedenti l'ospedalizzazione del paziente sono curate con penicillina, ampicillina, macrolidi o clindamicina. Efficaci anche i chinoloni e le cefalosporine di terza generazione.

Indispensabile è il mantenimento dell'equilibrio elettrolitico del paziente leptospirotico.

In caso di severità è assolutamente indispensabile una terapia di supporto.

La tempestività di terapie specifiche, a seguito di accertamenti diagnostici, risulta indispensabile sia per evitare complicanze ed aggravamenti della malattia sia per accorciare il decorso naturale della leptospirosi.

Scopo del lavoro

Negli ultimi anni il quadro epidemiologico della Leptospirosi in Italia è cambiato notevolmente

in quanto in molte specie animali si praticano piani di profilassi vaccinale. Ciò ha contribuito a ridurre notevolmente la diffusione di questi microrganismi, contribuendo anche al verificarsi di un rimaneggiamento delle sierovarianti che vengono sempre più spesso isolate da specie animali non proprie. Si assiste a quello che viene definito “salto di specie” e quindi un adattamento dei sierotipi ad altre specie animali in quanto viene a mancare l'ospite di mantenimento.

Negli ovini un ruolo importante è rivestito dalla *Leptospira interrogans* serovar Hardjo, sia per il fatto che la pecora può rappresentare, anche se in maniera minore del bovino, un ospite di mantenimento e quindi una fonte di diffusione e infezione per altri animali e per l'uomo, sia per il fatto che in questa specie animale spesso si registrano turbe riproduttive, e quindi perdite economiche, dovute in particolare a tale sierovariante.

Scopo del presente lavoro è stato quindi quello di valutare la diffusione della *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in allevamenti ovini delle province dell'alto Lazio, dell'Umbria e della Toscana, nello specifico le province di Viterbo, Terni, Grosseto, Siena, Livorno e Pisa. L'indagine ha previsto il controllo sierologico dei montoni dei vari allevamenti inclusi nello studio in virtù del fatto che nella pecora la serovar Hardjo può essere trasmessa anche per via venerea e quindi i maschi riproduttori possono frequentemente risultare infetti e quindi,

assumendo un ruolo epidemiologico importante, evidenziare la circolazione del patogeno nell'allevamento.

Materiali e metodi

Campioni

Da Gennaio a Maggio 2014 sono stati collezionati 129 campioni di siero ovino, proveniente da animali di 75 diversi allevamenti ovisini dell'alto Lazio, dell'Umbria e della Toscana.

I campioni sono stati prelevati direttamente negli allevamenti o nelle stalle di sosta di due mattatoi della provincia di Viterbo prima che gli animali venissero macellati.

Sono stati eseguiti prelievi di sangue tramite vacutainer, poi fatti sierare a temperatura ambiente per circa 6 ore. I sieri sono stati poi raccolti e passati in provette eppendorf per poi essere congelati a -20°C o centrifugati e poi congelati a -20°C fino al momento delle prove sierologiche. I campioni inclusi nell'indagine sono stati tutti prelevati da soggetti maschi, di razza sarda, di età superiore all'anno di vita.

Nessuno degli animali al momento del prelievo presentava sintomi clinici riconducibili a leptospirosi ma si presentavano in ottimo stato di nutrizione.

Analisi sierologiche

Per la ricerca di anticorpi anti-*Leptospira* è stato impiegato il test di microagglutinazione di Martin and Pettit (MAT) (Ebani et al 2012). Per l'esecuzione del test sono state impiegate colture vive di *Leptospira* serovar Hardjo (ceppo Hardjoprajitno) di 4-14 giorni, contenenti circa $1-2 \times 10^8$ leptospire/ml, coltivate in *Leptospira* Medium Base Ellinghausen-MacCullough-Johnson-Harris (EMJH – Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) a 30°C e controllate prima della prova per la purezza, la motilità e l'assenza di autoagglutinazione. I sieri sono stati inizialmente testati alla diluizione soglia di 1:100 secondo la procedura di seguito descritta:

- Allestire diluizioni 1:25 dei sieri in fisiologica;

- Trasferire 25µ l dalla diluizione precedentemente preparata in un pozzetto di una piastra da micro titolazione da 96 pozzetti a U contenete 25µ l di fisiologica;
- Aggiungere a ogni pozzetto 50µ l di brodo coltura di *Leptospira*;
- Agitare la piastra e incubarla a 30°C per 2 ore;
- Esaminare un'ansata da ciascuna sospensione al microscopio in campo oscuro.

Ogni siero che presentava almeno il 50% delle leptospire agglutinate è stato considerato positivo alla diluizione soglia e sottoposto nuovamente a MAT dopo aver allestito diluizioni scalari in base due. La diluizione più alta a cui il 50% o più delle leptospire risultavano agglutinate è stata considerata come titolo anticorpale.

Risultati

La tabella seguente riporta i risultati delle indagini sierologiche svolte sui 128 animali dei 75 allevamenti inclusi nell'indagine. Dei sieri esaminati 7/128 (5,47%) sono risultati positivi almeno alla diluizione soglia di 1:100. La successiva titolazione ha evidenziato come 5/128 (3,9%) sieri esaminati erano positivi solo alla diluizione 1:100, mentre 2/128 (1,56%) sieri hanno mostrato un titolo di 1:400.

Dei 75 allevamenti controllati 5 (6,6%) sono risultati positivi.

Quattro allevamenti erano situati nella provincia di Viterbo, in tutti questi allevamenti il 100% degli animali testati sono risultati positivi. Da due di questi allevamenti, per i quali sono stati controllati 2 animali, provenivano gli animali che hanno mostrato titoli di 1:400, in entrambi i casi l'altro capo sottoposto a test sierologico ha mostrato un titolo di 1:100.

L'altro allevamento positivo è invece situato nella provincia di Livorno, in questo caso solo 1 su due animali testati è risultato positivo, con un titolo di 1:100.

Data	Allevamento	Provincia di Provenienza	Numero sieri testati	N° sieri positivi per <i>Leptospira</i> serovar <i>Hardjo</i> :				
				1:100	1:200	1:400	TOT	%
18/03/2014	1	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
18/03/2014	2	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
18/03/2014	3	Grosseto	1	0	0	0	0	0,00
18/03/2014	4	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
18/03/2014	5	Grosseto	1	0	0	0	0	0,00
18/03/2014	6	Grosseto	2	0	0	0	0	0,00
18/03/2014	7	Grosseto	1	0	0	0	0	0,00
18/03/2014	8	Terni	1	0	0	0	0	0,00
18/03/2014	9	Viterbo	2	0	0	0	0	0,00
18/03/2014	10	Siena	1	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	11	Viterbo	2	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	12	Viterbo	2	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	13	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	14	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	15	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	16	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	17	Siena	4	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	18	Siena	1	0	0	0	0	0,00

03/04/2014	19	Siena	2	0	0	0	0	0,00
07/04/2014	20	Pisa	2	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	21	Grosseto	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	22	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	23	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	24	Terni	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	25	Grosseto	2	1	0	1	2	100,00
09/04/2014	26	Grosseto	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	27	Grosseto	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	28	Grosseto	1	1	0	0	1	100,00
09/04/2014	29	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	30	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	31	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	32	Siena	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	33	Grosseto	2	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	34	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	35	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	36	Grosseto	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	37	Siena	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	38	Viterbo	2	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	39	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	40	Siena	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	41	Grosseto	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	42	Viterbo	3	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	43	Grosseto	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	44	Grosseto	2	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	45	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	46	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	47	Siena	3	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	48	Viterbo	2	1	0	1	2	100,00
09/04/2014	49	Grosseto	1	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	50	Viterbo	1	1	0	0	1	100,00
09/04/2014	51	Viterbo	2	0	0	0	0	0,00
09/04/2014	52	Viterbo	2	0	0	0	0	0,00
10/04/2014	53	Volterra	2	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	54	Viterbo	2	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	55	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	56	Grosseto	5	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	57	Grosseto	1	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	58	Viterbo	2	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	59	Livorno	1	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	60	Livorno	2	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	61	Grosseto	1	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	62	Grosseto	3	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	63	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	64	Viterbo	2	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	65	Grosseto	6	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	66	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
03/04/2014	67	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00

03/04/2014	68	Viterbo	1	0	0	0	0	0,00
18/04/2014	69	Livorno	2	1	0	0	1	50,00
18/04/2014	70	Pisa	5	0	0	0	0	0,00
18/04/2014	71	Pisa	1	0	0	0	0	0,00
18/04/2014	72	Pisa	2	0	0	0	0	0,00
18/04/2014	73	Pisa	5	0	0	0	0	0,00
30/04/2014	74	Pisa	1	0	0	0	0	0,00
07/05/2014	75	Grosseto	9	0	0	0	0	0,00
Totale			128	5	0	2	7	5,47

Discussione e conclusioni

Negli ultimi anni la leptospirosi umana, in Italia così come in Europa, è notevolmente diminuita, probabilmente ciò è dovuto da un lato a un cambiamento nello stile di vita che ha ridotto il rischio di contatto e quindi di contagio da parte dell'uomo, dall'altro da corrette pratiche di profilassi e controllo negli animali di allevamento che hanno condotto ad una minore presenza e diffusione di tale microrganismo sul territorio. La malattia non è tuttavia scomparsa ed episodi di infezione nell'uomo e negli animali continuano a verificarsi. C'è infatti da considerare che difficilmente è possibile agire e eliminare completamente gli ospiti di mantenimento naturali di questi batteri (topi, ratti, ricci, ecc.), inoltre la movimentazione di animali di allevamento e non, l'importazione, lecita e illecita di specie esotiche, nonché i cambiamenti dei vari ecosistemi possono talvolta favorire la ricomparsa di questa, come di altre malattie, nonché, parlando di leptospira l'introduzione di nuove sierovarianti o la conquista da parte di quelle classiche di nuove nicchie ecologiche. La leptospirosi non va tuttavia considerata solo come un problema di sanità pubblica, ma anche un possibile problema di sanità animale. Gli animali infatti non sono solo ospiti di mantenimento e diffusione, ma possono a loro volta sviluppare malattia in forma clinica o talvolta in forma subclinica, forma quest'ultima particolarmente problematica in alcuni animali di allevamento (suini, bovini, ovini) in quanto spesso accompagnata da turbe riproduttive, aborti, ipofertilità, nascita di soggetti disvitali, che incidono notevolmente sugli allevamenti colpiti anche e soprattutto sotto il profilo economico.

In quest'ottica, cioè quella del duplice rischio associato a questa malattia, si inserisce il nostro lavoro. L'area geografica da noi presa in considerazione, cioè quella della Toscana dell'alto Lazio e dell'Umbria, sono zone dove l'allevamento ovino, finalizzato alla produzione della carne, ma soprattutto del formaggio, riveste un'importanza notevole sotto il profilo economico e del valore zootecnico. Come abbiamo visto la *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* riconosce nelle pecore un ospite di mantenimento, ma riveste al contempo in

questo animale, come altre sierovarianti, ma probabilmente in misura maggiore, un patogeno che può dare manifestazioni o comunque problemi da non sottovalutare. La nostra attenzione si è quindi concentrata proprio su tale sierovariante. La percentuale di animali riscontrati positivi non è risultata altissima, tuttavia questi dati sembrano in accordo con quanto riportato precedentemente da altri autori nel corso di indagini analoghe condotte in Italia su ovini provenienti sia dalla medesima area geografica che da altre regioni (Ciuchini et al., 1980; Ciceroni et al., 2000; Cerri et al., 2003). Il fatto che sieri provenienti da più allevamenti, dislocati in alcuni casi in zone relativamente distanti geograficamente, siano risultati positivi testimonia la circolazione di questo patogeno nell'area geografica da noi presa in considerazione. In particolare diversi allevamenti della provincia di Viterbo sono risultati positivi individuando questa come un'area potenzialmente a rischio e a discreta circolazione di questo patogeno. I titoli anticorpali da noi riscontrati sono risultati generalmente bassi, pari al valore soglia nella maggior parte dei casi, indice probabilmente di infezioni pregresse o comunque non in fase acuta. Due animali mostravano un titolo di 1:400. Sebbene la letteratura (Andreani et al., 1974) ci suggerisce che in corso di infezione da Hardjo nella pecora i titoli anticorpali sono molto alti (1:500/1:200000), un titolo di 1:400 potrebbe suggerire o un'infezione in atto, magari in fase iniziale, o comunque recente testimoniando la circolazione di *Leptospira* serovar Hardjo in tempi recenti, evidenza supportata anche dall'età degli animali testati.

La scelta di campionare solo soggetti adulti di sesso maschile è stata dettata dal fatto di poter essere più rappresentativa possibile sullo stato epidemiologico e sulla circolazione della malattia nei greggi testati. Gli arieti infatti attraverso i molteplici accoppiamenti ed entrando a contatto con gran parte dei soggetti presenti in allevamento fungono da "sentinelle epidemiologiche" giocando un ruolo importantissimo nella trasmissione dell'infezione. Questo ci ha permesso di testare un discreto numero di allevamenti, ottenere maggiori informazioni sulla diffusione di *Leptospira* serovar Hardjo in questa area geografica e individuare gli allevamenti positivi.

Questo lavoro è infatti da intendersi come un punto di partenza per un'indagine più ampia e accurata che in futuro dovrebbe prevedere di estendere il campionamento a tutti i capi presenti negli allevamenti nei quali si sono riscontrate positività, per valutare la prevalenza e l'incidenza dell'infezione nelle singole aziende, e testare anche animali di aziende limitrofe a quelle risultate positive.

Bibliografia

- Adler B., De La Pen ? a Moctezuma A., *Leptospira* and Leptospirosis, *Veterinary Microbiology* 140: 287-296, 2010
- Andreani, E., E. Santarelli, and R. Diligenti: Leptosirosi degli ovini, infezione naturale da sierotipo *hardjo*. *Annali della Facolta` di Medicina Veterinaria. Universita` di Pisa* 27, 33–40, 1974
- Andreani E., Tolari F., Farina R., Experimental infection in sheep with *Leptospira interrogans* serotype *hardjo*, *Brit. Vet. J.*, 28: 171,1980.
- Amaddeo D., Autorino G.L., Korver H., *Leptospira Hardjo*, sottotipo *hardjo bovis* isolata dalla specie ovina, *Att. Soc. It. Sci. Vet.*, 44: 883-886, 1990
- Autorino G.L., Salvati F., Amaddeo D., Aleandri M., Eliminazione durevole di *Leptospira hardjo* con le urine in ovini con infezione naturale, *Atti SIPAOC, IX Congr. Naz.*, Grado, 2-12, 1990
- Barbante P., Shimabukuro F. H, Langoni H., Richini-Pereira V. B, Lucheis S. B., *Leptospira spp.* infection in sheep herds in southeast Brazil, Barbante et al. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 20:20, 2014
- Bottarelli E., Ostanello F., *Epidemiologia. Teoria ed esempi di medicina veterinaria Edagricole*, Milano, 2011.
- Cerri D., Ebani V., Fratini F., Pinzauti P., Andreani E. Epidemiology of leptospirosis: observations on serological data obtained by a "diagnostic laboratory for leptospirosis" from 1995 to 2001. *New Microbiol.*;26(4):383-9, 2003 Oct

- Ciceroni L., Lombardo D., Pinto A., Ciarrocchi S., Simeoni J., Prevalence of Antibodies to *Leptospira* Serovars in Sheep and Goats in Alto Adige–South Tyrol. *J.Vet. Med. B* 47, 217-223, 2000
- Ciuchini, F., G. Piccininno, E. Lillini, and C. Pistoia: Indagine sierologica sulla leptospirosi ovina nella Provincia di Roma. *Arch. Veterinario Italiano* 31, 37–40, 1980
- Cook G., *Manson's P. Tropical Diseases*. 12th ed. Saunders, 1998
- Ebani V, Bertelloni F, Pinzauti P, Cerri D. Seroprevalence of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Italian horses. *Ann Agric Environ Med*. 19(2):237-40, 2012
- Ebani V, Fratini F, Cerri D, Andreani E. La leptospirosi degli ovini, una patologia poco nota. *SUMMA* anno 19, n. 6/2002, supplemento Luglio/Agosto, 19-20.
- Evangelista K. V., Coburn J., *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses, *Future Microbiol.*; 5(9): 1413–1425, 2010 September
- Farina R, Cerri D, Andreani E et al., *Leptospira interrogans* in the genital tract of sheep. Research on ewes and rams experimentally infected with serovar hardjo (*hardjobovis*), *Microbiologica*, 19: 235-242, 1996.
- Farina R., Andreani E., Buonaccorsi A., Leptospirosi bovina: prove di infezione sperimentale da sierotipo hardjo, *Arch. Vet. It.*, 28: 3-22, 1972
- Farina R., Babudieri B., Andreani E., Osservazioni su un focolaio di leptospirosi bovina da sierotipi pomona e hardjo. Isolamento degli agenti causali, *Ann. Fac. Med. Vet. Univ. Pisa*, 21: 281-299, 1968

- Farina R., Scatozza F. Trattato di Malattie infettive degli animali, 360-385, 1998
- Levett P. N., Leptospirosis, *Clinical Microbiology Reviews*. 296-326, 2001 Apr.
- Mandell G., Bennett J., Dolin R., ed. *Principles and practice of infectious diseases*. 6th ed. Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
- Picardeau M., Diagnosis and epidemiology of leptospirosis, *Médecine et maladies infectieuses* 43, 1-9, 2013
- VIJAYACHARI P., SUGUNAN A. P., SHRIRAM A. N., Leptospirosis: an emerging global public health problem, *J. Biosci.* 33(4), Indian Academy of Sciences, 557–569, 2008 November