

# Il Centro diagnostico per la rabbia dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie di Padova

## RIASSUNTO

Sono illustrate le metodologie di diagnosi adottate presso il centro Diagnostico per la Rabbia dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie di Padova (Italia). Vengono descritte le varie tecniche diagnostiche quali l'esame dell'immunofluorescenza, su vetrino colorato e le varie prove su topi.

## SUMMARY

The methods of diagnosis adopted at the Diagnostic Centre for rabies of the «Istituto Zooprofilattico delle Venezie», (Padua, Italy), are expounded. The various diagnostic techniques are described such as the examination of immunofluorescence on coloured glass and the various tests on mice.

La diagnosi della rabbia comporta varie fasi:

- 1) raccolta programmata dei campioni con dati di riconoscimento e anamnestici;
- 2) conservazione ed invio dei campioni;
- 3) registrazione dei dati;
- 4) test eseguiti in laboratorio;
- 5) risposta dell'esito degli esami;
- 6) valutazione dei dati e consigli di lotta e prevenzione.

La diagnosi di laboratorio per la rabbia non deve servire solamente a giudicare positivo o negativo il campione esaminato ma, assieme ai dati anamnestici e statistici, a configurare la presenza ed il movimento dell'infezione sul territorio e di conseguenza a programmare i piani di lotta e di prevenzione.

Pertanto la diagnosi per le zone infette e per una fascia di territorio antistante al fronte della rabbia per una profondità di circa 30 km dovrebbe essere fatta su tutti gli animali selvatici trovati morti e uccisi nel periodo di caccia e nella campagna di diradamento, sospetti e non sospetti e su-

gli animali domestici sospetti, uccisi o venuti a morte. Gli esiti degli esami di laboratorio vanno continuamente collegati con tutti i dati anamnestici e statistici scrupolosamente raccolti in registri, in grafici e mappe.

Dall'esperienza fatta fin dal 1977 risulta che per mantenere sotto controllo il movimento epidemiologico della rabbia la frequenza della diagnosi dovrebbe aggirarsi sui  $0,3/\text{km}^2/\text{anno}$ , se si considerano anche le montagne alte e  $0,6/\text{km}^2/\text{anno}$  nella sola zona di fondo valle e di collina; queste diagnosi debbono riguardare la sola volpe, unico propagatore della rabbia. Frequenze diagnostiche inferiori al valore denunciato non permettono una sicura valutazione epidemiologica dell'infezione, invalidando l'efficacia della lotta. Questa frequenza diagnostica ha dimostrato che la corrispondente frequenza di cattura porta all'arresto del fronte e spesso anche all'eradicazione della malattia.

Dunque al laboratorio va inviato più materiale possibile: selvaggina morta e ucci-

sa, animali domestici con sintomi sospetti, campioni di vaccini usati, sieri di sangue di persone e animali vaccinati. Si consiglia di accompagnare tutti i campioni con più dati possibili anamnestici, quali: località, date, persona che ha raccolto e che ha toccato il campione, comportamenti anormali della selvaggina, lesioni riscontrate ecc.

Il centro diagnostico deve tenere sotto controllo anche i vaccini usati per l'uomo e per gli animali mediante test biologici di laboratorio e dimostrarne l'efficacia immunizzante con test sierologici sui sieri di sangue dei soggetti vaccinati.

Gli esami che vengono eseguiti in laboratorio per la ricerca del virus nel cervello, nelle ghiandole salivari e nella cute sono i seguenti: la immunofluorescenza, la prova biologica su topini lattanti e adulti, la coltura su cellule.

Gli esami eseguiti per la titolazione degli anticorpi specifici antirabbia nel siero di soggetti vaccinati sono quelli della: sieroneutralizzazione su topino, sieroneutralizzazione di focolai fluorescenti su coltura di cellule con il metodo Elisa.

Per affiancare l'opera programmatica e direzionale del Centro operativo viene fatta la valutazione dei dati di esami positivi e negativi, per specie animale, per Comune, per mese e per anno, per Provincia e per chilometro quadrato.

Per mantenere aggiornata in tutti i suoi aspetti l'operazione di controllo dell'infezione occorre una continua consultazione della bibliografia, frequenti contatti con altri Centri specializzati e l'esercizio continuo della ricerca applicata.

La tecnica dei vari esami diagnostici è continuamente aggiornata alle ultime scritte e consigliata dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) sulla sua rivista mensile della rabbia.

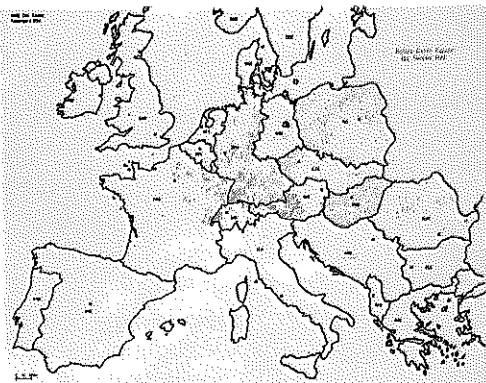
*L'esame dell'immunofluorescenza* su sistema nervoso centrale e midollare, su ghiandole salivari e sulla cute, per la diagnosi della rabbia viene eseguito nel tempo di un'ora con una attendibilità del 100% se positivo, e del 99% se negativo. Durante l'azione di diradamento delle volpi può succedere che una di esse si trovi nella positività iniziale per rabbia nel cervello e perciò con una fluorescenza minima; in tal caso l'esito

potrebbe risultare negativo e la prova biologica sarebbe positiva. Dunque in questo caso la prova biologica è più sensibile dell'immunofluorescenza. A sua volta però la prova biologica non riesce a dimostrare gli animali positivi già in via di putrefazione, che possono benissimo essere diagnosticati con la prova della immunofluorescenza. Talora corpuscoli aspecifici fluorescenti possono trarre in inganno il laboratorista ancora inesperto. La lettura del vetrino al microscopio va prolungata scrupolosamente quando c'è di mezzo una morsicatura e in zona sospetta di rabbia.

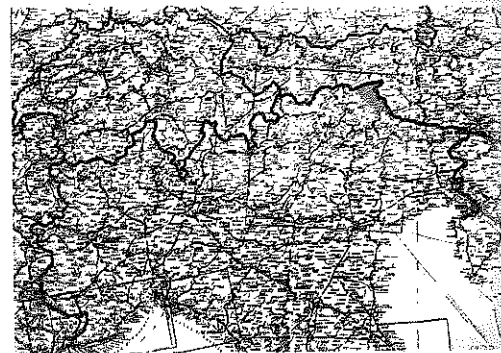
*L'esame per rabbia su vetrino colorato* (Sellers, Mann, Hartmann ecc.) oggi è completamente abbandonato; questo metodo svela circa il 50% dei casi positivi.

*La prova biologica su topino*, del peso di 10-15 gr e di età di 25-30 gg. e nel topino lattante di 4 gg. è sempre una prova molto sensibile; tale prova deve essere usata su tutti i campioni negativi all'immunofluorescenza ma sospetti di un contagio all'uomo, pertanto su tutti gli animali domestici sospetti e su animali selvatici che hanno morsicato o con i quali c'è stato un contatto pericoloso. La positività della prova biologica si appalesa di solito già dopo 7-8 giorni dall'inoculazione nel topino. Quando nel cervello c'è pochissimo virus, appena o non dimostrabile con la immunofluorescenza, la prova biologica diviene positiva a circa 15 gg. dall'inoculazione. L'osservazione di routine dura 3-4 settimane.

*La sieroneutralizzazione su topino* per la determinazione degli anticorpi protettivi viene oggi sostituita da quella su colture di cellule con l'osservazione dei fochi fluorescenti; metodo questo che dura 2 giorni solamente, al posto delle 3 settimane della prova su topini. La prova su cellule ha lo stesso valore di quella su topini. Oltre che su siero di sangue questa prova può essere fatta anche su estratto di organi e sul liquor cerebrospinale. La sieroneutralizzazione può essere fatta oggi anche con il metodo Elisa che viene oggi usato per il controllo dell'efficacia della vaccinazione delle volpi, poiché molto sensibile ed evidenza anticorpi anche in estratti di organi e coaguli di animali morti.

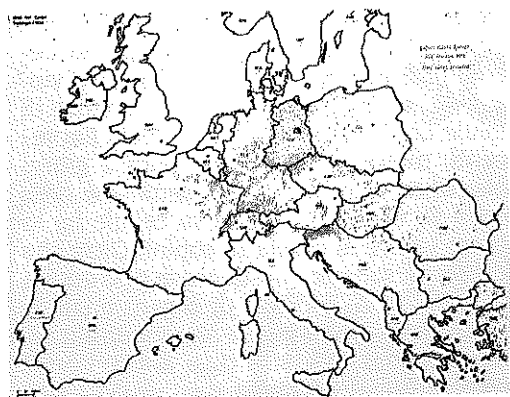


Diffusione della rabbia silvestre in Europa nel 1977.

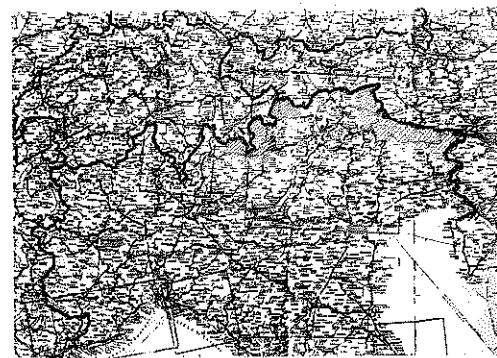


Diffusione della rabbia nella volpe nell'anno 1977 in Italia.

Diffusione della rabbia silvestre in Europa nel 1982.



Zone invase dalla rabbia silvestre fino al 1982 in Italia.



Tab. I - HIPD (Hunting Index Population Density) volpi nelle province infette di rabbia.

Provincia	Km <sup>2</sup>	1977	pos.	1978	pos.	1979	pos.	1980	pos.	1981	pos.	1982	pos.	1983	pos.
Bolzano	7400	0,36	82	0,36	167	0,28	5	0,28	3	0,21	91	0,13	76	0,12	14
Belluno	3678			0,47	23	0,29	8	0,25	0	0,19	11	0,15	11	0,18	2
Udine	7500			0,01	14	0,02	47	0,04	7	0,12	71	0,07	62	0,05	29
Gorizia	466							0,20	0	0,34	0	0,30	19	0,15	6
Trieste	212							0,04	0	0,36	1	0,49	16	0,13	3
Trento	6213							0,007	0	0,13	0	0,13	0	0,19	24
Sondrio	3212							0,08	1	0,20	118	0,14	84	0,18	272
Brescia	4761							0,01	0	0,07	26	0,08	22	0,08	19
Bergamo	2759							0,005	0	0,01	0	0,05	0	0,08	11
Como	2067							0,001	0	0,05	0	0,05	0	0,18	23
Val Venosta		0,35	0	0,29	0	0,31	0	0,34	3	0,32	76	0,21	13	0,10	0
Alto Isarco		0,26	0	0,16	1	0,15	1	0,15							
Val Pusteria		0,21	82	0,26	167	0,08	4	0,11							
Carnia		0,023		0,039		0,061		0,03							

Per titolare i virus dei vaccini si usano sia le cellule che i topini.

I virus vaccinali possono oggi essere distinti da quelli di strada sia mediante la immunofluorescenza che mediante la sieroneutralizzazione, usando sieri monoclonali. Quest'anno dal cervello di un bovino del Trentino morto per rabbia si è potuto determinare con sieri fluorescenti monoclonali la presenza, non del virus «rabbia da strada», ma del virus vaccinale, cioè del virus ERA: un animale vaccinato con virus vivo su circa 10.000 può ammalarsi di rabbia e anche morire, ma molto raramente il virus viene ritrovato nel cervello e nelle ghiandole salivari; la nostra continua ricerca in questo senso è stata coronata da successo solo 2 volte: nel 1977 su bovini della Val Aurina ed ora, nel 1984, su bovini della

Val di Sole. Una conferma della positività da virus vaccinale viene anche data dal titolo anticorpale che in questi animali aumenta di 100 volte quello normale da vaccinazione.

Infine va anche detto che l'anamnesi che accompagna il campione al laboratorio segnala il sospetto di malattia in circa il 50% degli animali positivi; l'anamnesi indica anche per le volpi che circa 50% delle positive sono state uccise con il fucile, 25% sono state trovate morte, 15% sono state uccise con un bastone ed il rimanente per incidenti stradali e altro.

I dati statistici per rabbia di tutti i Paesi europei vengono inviati mensilmente al Centro di referenza dell'OMS di Tübingen e pertanto ogni Stato può tenersi aggiornato sulla diffusione della rabbia e provvedere in tempo ad un eventuale impegno di prevenzione e di lotta. Oggi sarebbe utile che tutti i dati statistici ed i metodi di lotta e prevenzione che ne derivano continuamente aggiornati dall'impegno contro la rabbia nella zona con la malattia in atto, giungessero mensilmente alle singole U.S.L. (Unità Sanitaria Locale), almeno a quelle che nel prossimo futuro dovranno prepararsi ed impegnarsi ugualmente nell'azione di lotta alla rabbia silvestre.



dr. Angelo Irsara

Aiuto presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Padova