

Presence of a peculiar type of heat-labile antigen with hapten-like property in some strains of the Icterohaemorrhagiae leptospira serogroup

BRENNO BABUDIERI

Department of Microbiology

WHO/FAO Leptospira Reference Laboratory

Summary. — In the Icterohaemorrhagiae leptospira serogroup we identified some strains that, according to cross-agglutination tests, might be attributed both to the «icterohaemorrhagiae» and to the «ictero n. 1» serotypes. According to the tests, another strain might belong both to the «copenhageni» and to the «ictero n. 1» serotypes.

The phenomenon could be explained by assuming the existence, in these strains, of the thermo-labile antigen peculiar to the «ictero n. 1» serotype: this antigen should have in these-strains hapten-like properties.

Other strains might also contain this antigen, but in small amount.

This hypothesis is discussed and the meaning of these antigens is evaluated for systematic purposes.

Riassunto (*Presenza di un tipo particolare di antigene termolabile con proprietà apteno-simili in ceppi di leptospire appartenenti al serogruppo Ictero-haemorrhagiae*). — Nel serogruppo di leptospire Ictero-haemorrhagiae abbiamo identificato alcuni ceppi che, secondo i tests di agglutinazione crociata, potrebbero essere egualmente attribuiti sia al serotipo «icterohaemorrhagiae» che al serotipo «ictero n. 1». Un altro ceppo, secondo i tests, potrebbe appartenere sia al serotipo «copenhageni» che a quello «ictero n. 1».

Questo fenomeno potrebbe essere spiegato con l'ipotesi che in tali ceppi esista l'antigene termolabile caratteristico del serotipo «ictero n. 1», ma con proprietà simili a quelle di un aptene.

Altri ceppi, seppure in piccole quantità, potrebbero avere questo antigene.

Si discute questa ipotesi e si valuta il significato di tali antigeni a fini sistematici.

In a recently published study, BABUDIERI & SMITH (1968) have identified a new serotype among the leptospires belonging to the Icterohaemorrhagiae serogroup. This serotype is represented by the strain «Ictero n. 1», which, most probably, corresponds to the first strain of pathogenic leptospires, isolated by INADA & IDO (1915). A name has not yet been officially attributed to this serotype and we shall give it here the provisional name of «Ictero n. 1». The new serotype is characterized by the presence of the antigenic pattern characteristic of the serotype ictero-haemorrhagiae, and also by the presence of a peculiar surface antigen, which is thermolabile and of scarce potency (BORG PETERSEN, 1971). So far this is the only thermolabile antigen described in the genus *Leptospira*.

Later on it became possible to attribute to this new serotype not only two other Japanese strains, «Kagoshima» and «Akasawa», isolated by Yamamoto in 1954 and by Numata in 1933 respectively, but also the strain «Victoria», which I isolated in Rome in 1941 from rat kidney. Thus, it has been proved that the new serotype is not only present in Japan, but also in Europe (BABUDIERI & SMITH, 1968).

We have now controlled our leptospira collection, and more particularly the strains classified in the ictero-haemorrhagiae and copenhageni serotypes, in order to ascertain whether some strains belonging to the new serotype might be contained in them.

WORKING PLAN AND METHODS

For our purposes the ictero-haemorrhagiae serotype requested the most careful control. In fact the assignment of a strain to this serotype is generally made on the basis of absorption tests apt to distinguish between the copenhageni and ictero-haemorrhagiae serotype. The antigenic pattern of the copenhageni serotype differs from that of the ictero-haemorrhagiae serotype for the presence of an additional antigenic factor. These tests, however, do not permit to discriminate between the strains belonging to «Ictero n. 1» and those belonging to the serotype ictero-haemorrhagiae.

The 30 strains of our collection are reported in Table 1.

They were included in the ictero-haemorrhagiae serotype after controlling that they were not agglutinated by an immune anti-«M 20» serum (copenhageni serotype) absorbed with the RGA strain (ictero-haemorrhagiae serotype). This test was repeated and the first results were confirmed for all the strains.

TABLE 1

Leptospira strains attributed to the icterohaemorrhagiae serotype

Strain	Isolated from	Locality	Year	Isolated by
RGA	man	Germany	1915	Uhlenhut & Fromme
Verdun . . .	man	France	1916	Martin & Petitt
Bianchi 1 . .	man	Italy (Pavia) . . .	1937	Bianchi
Konings . . .	man	Netherlands (Rotterdam)	1937	Wolff
Canova . . .	man	Italy (Modena) . . .	1949	Babudieri and coll.
Visentin . . .	man	Italy (Mortara) . . .	1939	Babudieri
Fiumicino 7 .	man	Italy (Fiumicino) . .	1939	Babudieri
Mino R 3 . .	man	Italy (Vercelli) . . .	1937	Mino
Raf	dog	Italy (Bologna) . . .	1941	Castagnoli
Ratto 58 . .	rat	Italy (Roma)	1941	Enrico
Ratto 59 . .	rat	Italy (Roma)	1941	Enrico
Ratto 60 . .	rat	Italy (Roma)	1941	Enrico
Ratto 63 . .	rat	Italy (Roma)	1941	Enrico
Ratto 64 . .	rat	Italy (Roma)	1941	Enrico
Ratto 65 . .	rat	Italy (Roma)	1941	Enrico
Ratto 66 . .	rat	Italy (Roma)	1941	Enrico
Gemo	man	Italy (Mortara) . . .	1939	Babudieri
Scollo	man	Italy (Mortara) . . .	1940	Babudieri
Roma 1	rat	Italy (Roma)	1935	Marchesi
Valeria . . .	<i>Rattus decum.</i>	Italy (Roma)	1941	Babudieri
Vinicia . . .	<i>Rattus decum.</i>	Italy (Roma)	1941	Babudieri
Laura	rat	Italy (Lazio)	1952	Addamiano
Barbieri R. .	man	Italy	1955	Bussinello and coll.
Rossetti O. .	man	Italy	1955	Bussinello and coll.
Borsari A. . .	man	Italy (Modena) . . .	1955	Bussinello and coll.
Uchida	man	Japan	1931	Inada and coll.
Wissmar . . .	man	Germany (Berlin) . .	1935	Schlossberger
RA - 79 . . .	dog	Italy (Sicily)	1965	Joli
Policlinico . .	man	Italy (Roma)	1963	Babudieri
Zavka	rat	Italy (Perugia) . . .	1963	Zavka

Our surveys were extended, however, also to 23 of the strains grouped in the copenhageni serotype according to the above-mentioned test (Table 2) in order to ascertain whether any of them might contain the thermo-labile antigen peculiar to the strain «Ictero n. 1».

TABLE 2

Leptospira strains attributed to the copenhageni serotype

Strain	Isolated from	Locality	Year	Isolated by
M 20	man	Denmark	1938	Borg Petersen
Wijnberg . .	man	Netherlands	1925	Gispén & Schueffner
Zaan	<i>Mus musculus</i>	Netherlands	1943	Schueffner
Fiumicino 6 .	rat	Italy (Fiumicino) . .	1939	Babudieri
Dellatte . . .	man	Italy (Roma)	1940	Babudieri
Ratto 52 . . .	rat	Italy (Roma)	1941	Enrico
Ratto 67 . . .	rat	Italy (Roma)	1941	Enrico
Dell'Unto . .	man	Italy (Roma)	1939	Babudieri
I. h. Camarles	rat	Spain	1952	Covaleda & Pumarola
Bonariensis S.R.	man	Argentina (B. Aires)	1944	Savino & Rennella
I. h. Valencia	rat	Spain (Valencia) . .	1953	Altava
Maccaresse R7	man	Italy (Lazio)	1951	Babudieri
Barros Luco .	man	Cile (Santiago) . . .	1957	Castelli
Cane Farina .	dog	Italy (Pisa)	1955	Farina
Cane 475 . . .	dog	Italy (Pisa)	1955	Farina
Lola	rat	Spain (Castellón)	1953	Babudieri
CF 1	dog	Puertorico	1950	Alexander
Belousov . . .	man	URSS (Krasnodar) .	1949	Kovalskii & Ribnikwa
Bisagno	man	Italy (Pavia)	1954	Bianchi
Messina R4 . .	rat	Italy (Sicily)	1962	Joli
Messina R5 . .	rat	Italy (Sicily)	1962	Joli
Castoro 4 . . .	<i>Myocastor coypus</i>	Italy	1964	Farina
Monica	rat	Italy (Roma)	1967	Babudieri

The following serological tests were utilized :

1) absorption of an immune anti-«Ictero n. 1» serum prepared with live antigen by the strain under study and determination of the titer of the residual homologous antibodies.

Expected results :

	agglutination
(if) ictero-baemorrhagiae	+ (titer 30-50%)
(if) copenhageni	+ (titer 30-50%)
(if) ictero n. 1	— (*)

(*) — means: below the 10% of the preabsorption titer.

2) absorption of the immune sera of the various strains under study by the strain « Ictero n. 1 » and determination of the residual homologous antibodies.

Expected results:

	agglutination
(if) ictero-haemorrhagiae	— (*)
(if) copenhageni	+ (titer 25-30%)
(if) ictero n. 1	— (*)

Obviously, this test is valid only for the strains belonging to the « copenhageni » serotype.

3) absorption of the immune sera of the strain under study by the strain « RGA » (with « M20 » for the strains attributed to the « copenhageni » serotype) and determination of the homologous residual antibodies.

Expected results:

	agglutination
(if) ictero-haemorrhagiae	— (*)
(if) copenhageni	— (*)
(if) ictero n. 1	+ (titer > 10%)

4) an immune anti- « Ictero n. 1 » serum prepared with live antigen was absorbed by the strain « RGA ». After the absorption the serum was tested, for residual antibodies, with all the strains under study.

Expected results:

	agglutination
(if) ictero-haemorrhagiae	— (*)
(if) copenhageni	— (*)
(if) ictero n. 1	+ (titer 30-33%)

5) an immune anti- « Ictero n. 1 » serum prepared with live antigen was absorbed by the strain « M20 ». After absorption, the serum was tested for residual antibodies, with the strain under study attributed to the « copenhageni » serotype.

Expected results:

	agglutination
(if) ictero-haemorrhagiae	+ (titer < 10%, not significant)
(if) copenhageni	— (*)
(if) ictero n. 1	+ (titer 50%)

(*) — means: below the 10% of the preabsorption titer.

Absorption tests of the anti-RGA serum by the individual strains under study were not performed, because the antibodies are completely absorbed by the «icterohaemorrhagiae» serotype and by the «ictero n. 1» serotype as well.

More absorption tests have been occasionally performed with other immune sera and strains belonging to the «Icterohaemorrhagiae» serogroup in order to exclude that the strains under study belong to other serotypes of this group and also to clarify other points, on which we shall report later.

All tests were performed at least twice: they were often repeated three or even more times especially when a quantitative discordance between two results was present or when the residual agglutinating titer was very near to the conventional limit of significance of 10%.

The subsequent dilutions of the sera examined were made by doubling in all the cases in which the limit titer was close to the value of 10%.

The absorption technique usually employed in our *Leptospira* Laboratory was utilized. The absorption was performed using leptospiras killed with 0.05% formal. With some strains the serum, after absorption, agglutinated around the limit of 10%. In these cases the test was repeated with live leptospiras. However, we did not notice any significant quantitative or qualitative difference between the results obtained with formalized and with live antigens. All the cultures were developed in a modified Korthof's medium (BABUDIERI, 1961).

RESULTS

After checking by the tests mentioned above, a strain of our collection classified in the «icterohaemorrhagiae» serotype showed an antigenic pattern perfectly corresponding to the serotype represented by the strain «Ictero n. 1». The strain is «Mino R2», isolated by MINO in 1941 from a rat captured in the rice-fields of the region of Vercelli (Italy).

Other strains, instead, gave unexpected results, that are difficult to interpret. They could be grouped into three different groups, marked with the letters *A*, *B* and *C* respectively according to the results of the cross-agglutination and absorption tests, reported in Table 3.

The following three strains belong to the group *A*: «Policlinico», «Canova» and «Zavka».

Only one strain belongs to the group *B*. This is the well known strain «Verdun», the first isolated in France by Martin and Petitt, in 1916, from the blood of a patient.

Three other strains belong to the group *C*: «Bianchi 1», «Valeria» and «Konings».

The other strains examined proved to have the antigenic characteristics typical of the «icterohaemorrhagiae» serotype. However, some of them

were agglutinated, though at a not significant titer (5% or less) by the absorbed serum of the test 4. One of them, the strain « Ratto 66 », absorbed from the immune sera anti-« Ictero n. 1 » (test 1) not less than 90% of the homologous antibodies, thus reaching the limit of significance.

TABLE 3

**Serological tests performed with strains attributed to the
icterohaemorrhagiae serotype**

TESTS					
1) Serum anti-« Ictero n. 1 » absorbed with the strains under examination		3) Serum anti-strain under examination, absorbed with « RGA » strain		4) Serum anti-« Ictero n. 1 » absorbed with « RGA » strain	
Behaviour corresponding to that of the strain :					
« RGA » « Ictero n. 1 »		« RGA » « Ictero n. 1 »		« RGA » « Ictero n. 1 »	
A	— +	+	—	—	+
B	— +	+	— (*)	+	—
C	+ —	+	—	—	+

(*) In this list the immune serum against strain « Verdun » (group B), absorbed by strain « RGA », is able to agglutinate strain « Ictero n. 1 », but at not significant titer (below 10% of the preabsorption titer for « Ictero n. 1 »). In very few instances (3 rabbits of 10 used for the preparation of the immune sera) the border of 10% was attained.

TABLE 4

Serological tests performed with strain « Ratto 67 »

TESTS					
1) Serum anti-« Ictero n. 1 » absorbed with strain « R 67 »		2) Serum anti-« R 67 » absorbed with strain « Ictero n. 1 »		3) Serum anti- « R67 » absorbed with strain « M20 »	
Behaviour corresponding to that of the strain :					
« M 20 » « Ictero n. 1 »		« M 20 » « Ictero n. 1 »		« M 20 » « Ictero n. 1 »	
	— +	—	+	+	—
4) Serum anti-« Ictero n. 1 » absorbed with strain « RGA »		5) Serum anti-« Ictero n. 1 » absorbed with strain « M 20 »		6) Serum anti- « M 20 » absorbed with strain « R 67 »	
Behaviour corresponding to that of the strain :					
« M 20 » « Ictero n. 1 »		« M 20 » « Ictero n. 1 »		« M 20 » « Ictero n. 1 »	
	— +	—	+	+	—

It must be pointed out that this strain, as well as the strains marked *A* and *B*, are agglutinated by the anti-«RGA» serum at a lower titer than the other strains of the «icterohaemorrhagiae» serotype. This titer is similar to that at which the strain of the «ictero n. 1» serotype are agglutinated.

Of the strains attributed to the «copenhageni» serotype, only one, the «Ratto 67» showed an atypical behaviour.

This strain, marked *D*, gave the results reported in Table 4. In direct serological tests this strain appear to have the same antigenic structure as «M 20» (test 3: residual titer 5%; test 6: residual titer < 1%).

But the same thing happens if we compare directly the strain «R 67» with «Ictero n. 1» (test 1: residual titer < 1%; test 2: residual titer 5%).

In indirect tests the strain «R 67» behaves like strain «Ictero n. 1» (test 4: residual titer 15%; test 5: residual titer 10%).

It is also necessary to add that the immune anti-«Ictero n. 1» serum absorbed with the reference strains of the «icterohaemorrhagiae», «mankarso» and «budapest» serotypes respectively does no longer agglutinate the «copenhageni» serotype, but still agglutinates both the strain «Ictero n. 1» and the strain «Ratto 67».

In conclusion, the strain «R 67» shows, in absorption tests, the peculiar characteristic of exhibiting antigenic identity both with strain «M 20» and with «Ictero n. 1»; however, the latter strains differ antigenically one from the other, at least in part.

On the other hand, the results of the indirect serological tests clearly indicate a similarity to strain «Ictero n. 1».

DISCUSSION

The assignement of the strains belonging to the group *A* and *B*, and of strain «Ratto 67» to old or new serotypes, according to the rules actually valid for the classification of leptospiras, presents remarkable difficulties.

In fact, according to these rules, they might indifferently be classified in the «Ictero n. 1», in the «icterohaemorrhagiae» (groups *A* and *B*) or in the «copenhageni» serotype (strain «Ratto 67»).

The difficulties of the systematics of group *C* are relatively smaller, as we deal with strains more akin to the «icterohaemorrhagiae» serotype. Their antigenic pattern could easily be defined when it should be possible to solve the immunological problem of the strains of the group *A* and *B*.

In order to attempt an explanation of these results we took into consideration some hypotheses, such as that of the presence, in some of these leptospira strains: 1) of antigens of the so-called «blocking» type; 2) of antigens that are at times superficial and at times deepset; 3) of antigenic

complexes containing only some factors common to several strains; 4) of antibodies of the so-called «incomplete» type (in the immune sera employed).

However, none of these hypotheses can explain the phenomena observed. The only hypothesis which might explain all the results of the serological tests performed is the following: an antigenic complex corresponding to the thermolabile antigen peculiar of serotype «Ictero n. 1», with the characteristics of the haptens, might be present in the strains of groups *A* and *B*. However, this complex should have the characteristics of a complete antigen in the strain «Ictero n. 1». This hypothesis involves the assumption of the existence of a new phenomenon never observed, so far, in microorganisms. In the case of group *C*, the hypothetic antigen with hapten-like activity should be also present, but in a smaller amount, not sufficient to give residual significant titers in the absorption tests.

On the other hand, still smaller amounts of this hapten should be present also in other strains of the «icterohaemorrhagiae» serotype, that are agglutinated by the immune serum against the «ictero n. 1» serotype absorbed with the strain «RGA». Although the agglutination titer could not be considered significant (5% or less), it was indicative of the presence of a «minor» hapten-like factor.

The hypothesis that the antigen we are talking about may behave like an hapten leaves some perplexity, because it is well known that haptens show the properties of a complete antigen when inoculated in association with a protein. Consequently, the haptens present in microorganisms cause an antibody response if the microorganism itself penetrates into an organism by parenteral way.

However, we must remember the observation of DOERR & HALLAUER (1926). According to these AA., the addition of some types of saprophytic schizomycetes to a pure hapten does not enable it to give an antibody response. We must also remember that serotype «ictero n. 1» has a peculiar antigen characterized by thermolability and scarce immunogenic power. The latter property suggests that this antigen might be very similar to haptens. On the other hand, strains belonging to the groups *A* and *B* are able to rise in rabbits the production of some antibodies against the heat-labile antigen of serotype «ictero n. 1» although at a very low and not significant level.

We also tried to disaggregate leptospiras with the freezing-defrosting method and to immunize rabbits with the material obtained associated to swine serum, according to the technique usually employed to induce an antibody response to pure haptens. The immune sera obtained in this way, however, showed the same antibody pattern of those obtained with the customary technique of immunization, and the addition of swine serum

was ineffective in causing formation of antibodies against the hypothetical haptenic determinant.

According to the hypothesis proposed here, the antigenic characteristics of the «icterohaemorrhagiae», «copenhageni» and «ictero n. 1» serotypes can be represented as follows:

icterohaemorrhagiae α

copenhageni α, β

ictero n. 1 α, γ

where the greek letters indicate «antigenic complexes».

These «complexes» might include one or more of the so-called Kmetz's «antigenic factors».

According to our hypothesis, the following formula should be attributed to groups *A* and *B* of the strains studied α (γ); the strain «Ratto 67» should have the formula $\alpha \beta$ (γ), where the letter (γ) in brackets represent the hypothetical antigen with an haptenic-like action.

The results presented here bring up to date a problem of systematics. More precisely, it is necessary to establish the importance that must be given to the presence, in some strains, of particular incomplete antigens with aptenic-like action.

This problem has not yet been discussed at the Leptospira Subcommittee of Bacterial Nomenclature, and it is not necessary, therefore, to take up a definite position about the matter. However, it must be pointed out that the active part of a molecule with antigenic activity is the part of the «determinants». Since determinants are equally found in complete and in incomplete antigens, the latter should be given the same dignity of «markers» in the study of the antigenic pattern of a microorganism. If this idea is accepted, «incomplete antigens» should be attributed the same value as «complete» antigens.

If, at this point, we consider the above scheme of «antigenic complexes» the strains of groups *A* and *B* should be included in the «ictero n. 1» serotype. The strain «Ratto 67» instead, has an antigenic pattern different from both the «copenhageni» and the «ictero n. 1» serotypes, and should, therefore, be considered a representative of a new serotype.

Anyhow, the presence of the antigen peculiar to the «ictero n. 1» serotype in a hypothetical form of haptenic in leptospiras belonging to other serotypes of the «icterohaemorrhagiae» group stimulates a deeper study of the scarcely known immunology of leptospiras.

A better and deeper knowledge of the characteristics and properties of the heat-labile antigen of leptospiras might give us an easier explanation of the results reported above.

Received February 18, 1972.

Accepted April 24, 1972.

REFERENCES

- BABUDIERI, B., 1961. *Bull. World Health Organ.*, **24**, 45.
- BABUDIERI, B. & D. J. W. SMITH, 1968. *Geograph. Trop. Med.*, **20**, 319.
- BORG PETERSEN, C., 1971. *Geograph. Trop. Med.*, **23**, 282.
- DOERR, R. & C. HALLAUER, 1926. *Z. Immunitaetsforsch.*, **47**, 291.
- INADA, R. & Y. IDO, 1915. *Tokyo Ljisch*, 1301.
- MINO, P., 1941. *Münch. Med. Wochschr.*, **88**, 96.

Studio sistematico di 20 ceppi di leptospire acquicole

MARIA GRAZIA NARDELLI (*) e BRENNO BABUDIEMI

Laboratori di Microbiologia

WHO/FAO Leptospira Reference Laboratory

Riassunto. — Nel presente lavoro sono riportati i risultati dello studio sistematico di 20 ceppi di leptospire acquicole pervenuti al nostro Laboratorio di referenza da differenti località ed in epoche diverse.

I ceppi sono stati confrontati fra di loro e con tutti i serotipi fino ad ora descritti nel «complesso biflexa», mediante test di agglutinazione crociata e di adsorbimento delle agglutinine. Tali prove ci hanno permesso di identificare fra essi i seguenti 7 nuovi serogruppi: LAZIO, CODICE, PARAPATAN, BESSEMANS, NOMENTANO, ANCONA, DINDIO, e 9 nuovi serotipi: lazio, fons, isola sacra, c.d.c., parapatan, bessemans, nomentano, ancona, dindio.

Summary (*Systematic study of 20 strains of water leptospirae*). — The results of systematic study of 20 strains of water leptospirae are here reported. These strains have reached our Reference Laboratory from different localities and in various times.

The strains have been compared among themselves and with all the serotypes which have been described up to date in the «biflexa complex». The analysis has been made by using cross agglutination and agglutinins adsorption test.

The results of such analysis have permitted to identify among these strains the following new serogroups: LAZIO, CODICE, PARAPATAN, BESSEMANS, NOMENTANO, ANCONA, DINDIO, and the following new serotypes: lazio, fons, isola sacra, c.d.c., parapatan, bessemans, nomentano, ancona, dindio.

(*) Borsista dei Laboratori di Microbiologia.

Con il presente lavoro ci siamo proposti di dare un ordinamento sistematico a 20 ceppi di leptospire acquicole di diversa provenienza, conservati nella collezione di questo Laboratorio di referenza, e fino ad ora solo sommariamente studiati.

I 20 ceppi, la loro provenienza e la data d'isolamento sono elencati nella Tab. 1.

Ad alcuni di questi ceppi, già nel 1947, BABUDIERI & ARCHETTI avevano dato un orientativo ordinamento sistematico, facendo ricorso alle sole tecniche di agglutinazione crociata. I risultati così ottenuti non possono oggi ritenersi validi. Infatti attualmente, per gli studi sistematici delle leptospire, l'OMS, oltre alle prove di agglutinazione crociata, prescrive, come indispensabile, il ricorso alla tecnica dell'adsorbimento delle agglutinine. Nel nostro lavoro sono state pertanto seguite tali tecniche.

Preliminarmente abbiamo voluto accertarci se i ceppi in questione appartenessero veramente al «complesso biflexa», il quale raggruppa i ceppi di leptospire saprofiti, generalmente isolate dall'acqua. A questo scopo abbiamo fatto ricorso alle seguenti prove colturali: comportamento dei ceppi in esame su terreni addizionati con 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di 8-azoguanina, e su terreno al bicarbonato secondo MAZZONELLI & CASTELLANI PASTORIS (1968). In tutti questi terreni le leptospire in esame sono cresciute e si sono di conseguenza comportate come tipiche leptospire acquicole.

Successivamente, con tutti i ceppi allo studio, sono stati preparati, mediante ripetute iniezioni endovenose nel coniglio, i relativi sieri immuni.

In prima analisi, al fine di determinare il serogruppo di appartenenza, i ceppi sono stati confrontati, mediante test di agglutinazione crociata, fra loro e con tutti i serotipi di riferimento del «complesso biflexa» fino ad ora descritti e più precisamente con: semaranga, patoc, são Paulo, monte Valerio, andamana, bovedo, cau, doberdò, rupino, aurisina, farneti, percedol, basovizza, sangiusto, botanica, monfiascone, khoshamian, acquamarica, tevere, holland, roma, tredici, valderio, orvenco, udine, thracia, pulpudeva, maritza (Tab. 2).

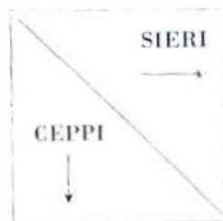
Non esistendo norme precise in materia, abbiamo considerato come appartenenti ad un nuovo serogruppo, quei ceppi che non raggiungono per lo meno il valore del 10% del titolo agglutinante per il ceppo omologo.

Dai dati ottenuti risulta che i ceppi AM 8, AM 12, AM 21, isolati dalla acqua potabile di Roma, costituiscono un nuovo serogruppo per il quale proponiamo il nome di LAZIO essendo stati isolati in tale regione, e che i ceppi Biflexa C.D.C., Parapatan, Bessemans, Nomentano, Dindio ed Ancona Porto costituiscono ciascuno un nuovo serogruppo, per il quale proponiamo il nome stesso del ceppo, tranne che per il Biflexa C.D.C. e l'Ancona Porto per i quali indichiamo rispettivamente il nome di CODICE ed ANCONA. Invece i ceppi Peschiera 1, Peschiera 2, Peschiera 3, isolati dalle sorgenti

TABELLA 1

Elenco e provenienza dei ceppi di leptospire acquicole studiati

CEPPI	ISOLATO DA	LOCALITÀ	ANNO	ISOLATO DA	INVIATO DA	ANNO
AM 8	acqua di rubinetto	Roma (I)	1942	Babudieri	Babudieri	1942
AM 12	acqua di rubinetto	Roma (I)	1942	Babudieri	Babudieri	1942
AM 21	acqua di rubinetto	Roma (I)	1942	Babudieri	Babudieri	1942
PESCHIERA 1	acqua di sorgente	Peschiera (I)	1942	Babudieri	Babudieri	1942
PESCHIERA 2	acqua di sorgente	Peschiera (I)	1942	Babudieri	Babudieri	1942
PESCHIERA 3	acqua di sorgente	Peschiera (I)	1942	Babudieri	Babudieri	1942
FONS	acqua	Roma (I)	1942	Archetti	Archetti	1942
VALENCIA AGUA	acqua	Valencia (E)	1953	Babudieri	Babudieri	1953
TIBURTINO 2	acqua	Roma (I)	1942	Archetti	Archetti	1942
SEVILLA AGUA	acqua	Siviglia (E)	1953	Babudieri	Babudieri	1953
CASTELLÓN AGUA	acqua	Castellón (E)	1953	Babudieri	Babudieri	1953
ZAAAN A	acqua	Roma (I)	1942	Archetti	Archetti	1942
W.A. GENT	acqua	Gent (B)	1928	Bessemans e Théry	Wolff	1946
ISOLA SACRA	acqua	Roma (I)	1942	Archetti	Archetti	1942
BIFLEXA C. D. C.	acqua	—	—	—	Starnes	1958
PARAPATAN	acqua	Java (USA)	—	—	Ist. R. Korch	1940
M. BESSEMANS	acqua	Gand (B)	—	Bessemans	Bessemans	1917
NOMENTANO	acqua	Roma (I)	1942	Archetti	Archetti	1942
ANCONA PORTO	acqua di mare	Ancona (I)	1942	Babudieri	Babudieri	1942
DINDIO	acqua	Roma (I)	1942	Babudieri	Babudieri	1942



	AM 8	AM 12	AM 21	Botanica	Montefiascone 2	Khoshamian	AM 20	AM 6	AM 13	WaZ Holland	AR 18	Valderio	Orvenco	Udine	Bulgaria 4	Bulgaria 6	Bulgaria 16
AM 8	T 100	10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AM 12	50	T 10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AM 21	100	34	T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Peschiera 1	0	0		10	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Peschiera 2	0	0		10	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Peschiera 3	0	0		10	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Fons	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	12,5	0
Valencia agua	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	25	0

Montefiascone 2	0	0
Khoshamian.	0	0
AM 20	0	0
AM 6	0	0
AM 13	0	0
WaZ Holland	0	0
AR 18	0	0
Valderio.	0	0
Orvenco	0	0
Udine.	0	0
Bulgaria 4	0	0
Bulgaria 6	0	0
Bulgaria 16	0	0

dell'acquedotto di Roma, appartengono al serogruppo BOTANICA; i ceppi Fons, Tiburtino 2, Valencia agua, al serogruppo PULPUDEVA; Sevilla agua e Castellón agua al serogruppo BASOVIZZA; Zaan A. e Wa. Gent al serogruppo AURISINA; Isola Sacra al serogruppo DOBERDÒ.

Una volta evidenziato il serogruppo di appartenenza, i ceppi che presentavano fra loro evidenti affinità antigeniche sono stati confrontati mediante test di adsorbimento crociato delle agglutinine per avere una loro più precisa specificazione e per determinarne il serotipo. Tali prove, rese necessarie in tutti quei casi in cui, nel precedente saggio, si erano ottenuti, nei due sensi, titoli agglutinanti superiori al 10%, hanno dato i risultati riportati nella Tab. 3. In essa i valori sono espressi in percentuali considerando uguale a 100 il titolo del siero non adsorbito rispetto al ceppo omologo. Ricordiamo che si considerano come appartenenti a serotipi diversi quei ceppi che, confrontati fra di loro con la tecnica dell'adsorbimento crociato delle agglutinine, dimostrano di mantenere, dopo l'adsorbimento stesso, e almeno in una direzione, un titolo residuo per il ceppo omologo, pari o superiore al 10% del titolo preadsorbimento per il ceppo stesso.

Dagli adsorbimenti crociati n. 1 e n. 2, possiamo dedurre che i ceppi AM 8, AM 12, AM 21 appartengono ad uno stesso nuovo serotipo che denominiamo «lazio»: AM 8 ed AM 12 sono tra di loro identici, mentre AM 21 differisce lievemente da questi.

Per il gruppo di ceppi Peschiera 1, Peschiera 2, Peschiera 3 osserviamo che i ceppi Peschiera 2 e Peschiera 3 sono tra loro uguali (a.c. n. 4) ed appartengono al serotipo «monfiascone» (a.c. n. 9). Il Peschiera 1 possiede invece caratteristiche antigeniche parzialmente diverse: infatti il relativo siero immune, adsorbito sia con il ceppo Peschiera 2 che con quello Peschiera 3, mantiene per il ceppo omologo un titolo di agglutinine pari al 10% di quello pre-adsorbimento (a.c. n. 3 e n. 5). Tuttavia queste diversità antigeniche non devono ritenersi significative ai fini sistematici; infatti dalle prove di adsorbimento crociato fra i ceppi Peschiera 1 e Monte Fiascone 2 (a.c. n. 7) risulta evidente l'appartenenza dei due ceppi ad un medesimo serotipo: quello «monfiascone».

I ceppi Valencia agua e Tiburtino 2 risultano essere ceppi diversi del medesimo serotipo (a.c. n. 10): «pulpudeva» (a.c. n. 11), mentre il ceppo Fons non rientra nel pulpudeva, ma costituisce un nuovo serotipo che denomineremo «fons» (a.c. n. 12).

I ceppi Sevilla agua e Castellón agua appartengono a diversi serotipi (a.c. n. 13) del medesimo serogruppo: Sevilla agua al serotipo «basovizza» (a.c. n. 14), Castellón agua al serotipo «san Giusto» (a.c. n. 16).

I ceppi Zaan A. e Wa. Gent risultano essere ceppi identici del medesimo serotipo (a.c. n. 17): «aurisina» (a.c. n. 18).

TABELLA 3

Prove di adsorbimento crociato delle agglutinine

Adsorbimento crociato n. 1	Provato con A M 12	Provato con A M II	Adsorbimento crociato n. 2	Provato con A M 21	Provato con A M 12
Antisiero <i>AM 8</i> adsorbito con <i>AM 12</i>	0	0	Antisiero <i>AM 12</i> adsorbito con <i>AM 21</i>	0	0
Antisiero <i>AM 12</i> adsorbito con <i>AM II</i>	0	0	Antisiero <i>AM 21</i> adsorbito con <i>AM 12</i>	0,3	0
Adsorbimento crociato n. 3	Provato con Peschiera 2	Provato con Peschiera 1	Adsorbimento crociato n. 4	Provato con Peschiera 3	Provato con Peschiera 2
Antisiero <i>Peschiera 1</i> adsorbito con <i>Peschiera 2</i>	0	10	Antisiero <i>Peschiera 2</i> adsorbito con <i>Peschiera 3</i>	0	0
Antisiero <i>Peschiera 2</i> adsorbito con <i>Peschiera 1</i>	0,64	0	Antisiero <i>Peschiera 3</i> adsorbito con <i>Peschiera 2</i>	0	0
Adsorbimento crociato n. 5	Provato con Peschiera 1	Provato con Peschiera 3	Adsorbimento crociato n. 6	Provato con Botanica	Provato con Peschiera 1
Antisiero <i>Peschiera 3</i> adsorbito con <i>Peschiera 1</i>	0	5	Antisiero <i>Peschiera 1</i> adsorbito con <i>Botanica</i>	0	80
Antisiero <i>Peschiera 1</i> adsorbito con <i>Peschiera 3</i>	10	5	Antisiero <i>Botanica</i> adsorbito con <i>Peschiera 1</i>	20	0
Adsorbimento crociato n. 7	Provato con M. Fiascone	Provato con Peschiera 1	Adsorbimento crociato n. 8	Provato con Botanica	Provato con Peschiera 3
Antisiero <i>Peschiera 1</i> adsorbito con <i>M. Fiasc. 2</i>	0	0	Antisiero <i>Peschiera 3</i> adsorbito con <i>Botanica</i>	0	40
Antisiero <i>M. Fiascone 2</i> adsorbito con <i>Peschiera 1</i>	0	0	Antisiero <i>Botanica</i> adsorbito con <i>Peschiera 3</i>	80	0
Adsorbimento crociato n. 9	Provato con M. Fiasc. 2	Provato con Peschiera 1	Adsorbimento crociato n. 10	Provato con Tiburtino 2	Provato con Valencia agua
Antisiero <i>Peschiera 3</i> adsorbito con <i>M. Fiasc. 2</i>	0	5	Antisiero <i>Valencia agua</i> adsorbito con <i>Tiburtino 2</i>	0	5
Antisiero <i>M. Fiascone 2</i> adsorbito con <i>Peschiera 3</i>	1,25	0	Antisiero <i>Tiburtino 2</i> adsorbito con <i>Valenc. agua</i>	0	0

Segue TABELLA 3

Adsorbimento crociato n. 11	Provato con Valencia acqua	Provato con Bulgaria 6	Adsorbimento crociato n. 12	Provato con Bulgaria 6	Provato con Fons
Antisiero Bulgaria 6 . . } adsorbito con Valencia acqua	0	0	Antisiero Fons . . . } adsorbito con Bulgaria 6	0	10
Antisiero Valencia acqua } adsorbito con Bulgaria 6	2,5	1,3	Antisiero Bulgaria 6 . . } adsorbito con Fons . .	15	0
Adsorbimento crociato n. 13	Provato con Castellón	Provato con Sevilla	Adsorbimento crociato n. 14	Provato con Basovizza	Provato con Sevilla
Antisiero Sevilla acqua . } adsorbito con Castellón a.	0	40	Antisiero Sevilla acqua . } adsorbito con Basovizza	0	0
Antisiero Castellón acqua } adsorbito con Sevilla a.	10	0	Antisiero Basovizza . . } adsorbito con Sevilla a.	0	0
Adsorbimento crociato n. 15	Provato con Basovizza	Provato con Castellón	Adsorbimento crociato n. 16	Provato con S. Giusto	Provato con Castellón
Antisiero Castellón acqua } adsorbito con Basovizza	0	40	Antisiero Castellón acqua } adsorbito con San Giusto	0	0
Antisiero Basovizza . . } adsorbito con Castellón a.	40	0	Antisiero San Giusto . . } adsorbito con Castellón a.	0	0
Adsorbimento crociato n. 17	Provato con Wa. Gent	Provato con Zaan A	Adsorbimento crociato n. 18	Provato con Aurisina	Provato con Wa. Gent
Antisiero Zaan A . . . } adsorbito con Wa. Gent.	0	0	Antisiero Wa. Gent . . . } adsorbito con Aurisina .	0	0
Antisiero Wa. Gent . . . } adsorbito con Zaan A . .	0	0	Antisiero Aurisina . . . } adsorbito con Wa. Gent .	2,5	0
Adsorbimento crociato n. 19	Provato con R.P.E	Provato con Isola Sacra	Adsorbimento crociato n. 20	Provato con Doberdò 1	Provato con Isola Sacra
Antisiero Isola Sacra . . } adsorbito con R.P.E . .	0	10	Antisiero Isola Sacra . . } adsorbito con Doberdò 1	0	20
Antisiero R.P.E } adsorbito con Isola Sacra	0	20	Antisiero Doberdò 1 . . } adsorbito con Isola Sacra	20	1,2

NOTA: I valori vengono espressi quali percentuali del titolo pre-adsorbimento del siero immune per il ceppo omologo, titolo considerato = 100. 0 = < 1%.

Il ceppo Isola Sacra appartiene ad un nuovo serotipo del serogruppo Doberdò, che denominiamo «isola sacra» (a.c. n. 19 e n. 20).

I ceppi Biflexa C.D.C., Parapatan, Bessemans, Nomentano, Ancona Porto, e Dindio, non presentando affinità con nessuno dei serotipi esaminati, costituiscono ciascuno un nuovo serotipo che denominiamo rispettivamente: c.d.c., parapatan, bessemans, nomentano, ancona, dindio.

Inoltre il ceppo Ancona Porto, isolato dall'acqua marina, è stato confrontato, mediante agglutinazione crociata, anche con gli altri ceppi marini 8M, 11M, 5M, e Muggia, isolati nel golfo di Trieste, ma non si è riscontrata con essi alcuna affinità.

Concludendo, proponiamo per i ceppi da noi studiati, la seguente classificazione.

SEROGRUPPO	SEROTIPO	CEPPO
* LAZIO	* lazio	AM 8 - AM 12 - AM 21
AURISINA	aurisina	Zaan A. - Wa. Gent
BOTANICA	monfiascone	Peschiera 1-Peschiera 2-Peschiera 3
BASOVIZZA	basovizza	Sevilla agua
BASOVIZZA	san Giusto	Castellón agua
PULPUDEVA	pulpupeva	Valencia agua - Tiburtino 2
PULPUDEVA	* fon-	Fons
DOBERDÒ	* isola sacra	Isola Sacra
* CODICE	* c. d. c.	Biflexa C. D. C.
* PARAPATAN	* parapatan	Parapatan
* BESSEMANS	* bessemans	Bessemans
* NOMENTANO	* nomentano	Nomentano
* ANCONA	* ancona	Ancona Porto
* DINDIO	* dindio	Dindio

I serotipi ed i serogruppi contrassegnati con * sono nuovi.

A parte il nostro obiettivo principale, che è stato quello della sistematica dei ceppi allo studio, le nostre ricerche hanno messo in evidenza alcuni dati di fatto sui quali riteniamo opportuno richiamare l'attenzione:

1) confermiamo che il medesimo serotipo di leptospire acquicole può essere presente in località tra di loro distanti migliaia di chilometri (aurisina: Italia, Olanda, Belgio; basovizza e san Giusto: Italia e Spagna; pulpudeva: Bulgaria, Spagna e Italia), senza che sia immaginabile una migrazione attiva o passiva del microorganismo dall'una all'altra di tali località.

2) le leptospire isolate dall'acqua di mare non hanno necessariamente tra di loro una comunanza antigenica.

3) ceppi isolati da campioni d'acqua che presumibilmente hanno una origine comune (ceppi AM, isolati da vari rubinetti della rete idrica di Roma; ceppi Peschiera, isolati dalle sorgenti del Peschiera prima che l'acqua venisse

convogliata nei tubi dell'acquedotto) mostrano spesso, tra di loro, identità antigenica. Esistono però in tali ambienti, ceppi che differiscono dagli altri per alcune poco rilevanti diversità antigeniche (AM 21, Peschiera 1), il che fa ritenere che non sia rara, in tali ambienti, la comparsa e la sopravvivenza, accanto ai ceppi originari, di mutanti antigeniche. Questa sopravvivenza è evidentemente possibile in un ambiente ampio, dove le leptospire vengono fortemente diluite, mentre non è possibile, come è noto, in un ambiente ristretto, contenente un'abbondante popolazione di microorganismi, quale è quello di una provetta di terreno culturale (MAGLIOCCHETTI-LOMBI & BABUDIERI, 1968).

Ricevuto il 6 maggio 1972.

Accettato il 30 maggio 1972.

BIBLIOGRAFIA

- BABUDIERI, B. & I. ARCHETTI, 1947. Le leptospire acquicole e la loro costituzione antigenica. *Rend. Ist. Super. Sanità*, **10**, 962.
- MAGLIOCCHETTI-LOMBI, P. & B. BABUDIERI, 1968. Ricerche su colture associate di leptospire. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **4**, 291.
- MAZZONELLI, J. M. R. & M. CASTELLANI PASTORIS, 1968. Efecto del bicarbonato de sodio en la diferenciacion de leptospiras saprofitas y patogenas. *Veterinaria*, tomo I, n. 4.