

4. B. BABUDIERI, e M. CASTELLI. — Ricerche sulla diversa agglutinabilità di differenti ceppi di leptospire.

Riassunto. — Gli AA. studiano statisticamente l'agglutinabilità di ceppi italiani e spagnoli di *L. ictero-haemorrhagiae* di fronte a sieri immuni umani di provenienza italiana, spagnola e danese.

Dai risultati ottenuti risulta che esistono alcuni ceppi che vengono generalmente agglutinati a titoli più elevati che altri. Tale maggiore agglutinabilità non è legata ad una comune origine dei ceppi e dei sieri saggiati: non esiste cioè una maggiore agglutinabilità dei ceppi d'origine locale.

Queste differenze d'agglutinabilità si manifestano anche per quanto riguarda il fenomeno dell'agglutinazione paraspecifica.

Esistono inoltre, sia pure raramente, determinati sieri che agglutinano singoli ceppi a valori molto più elevati che altri ceppi.

Dalle prove eseguite di adsorbimento degli anticorpi, non risulta che queste diversità di comportamento dei ceppi studiati siano legate a diversità di costituzione antigenica: la spiegazione del fenomeno resta perciò oscura.

Résumé. — Les auteurs étudient statistiquement l'agglutinabilité de souches italiennes et espagnoles de *L. ictero-hemorrhagiae* en présence de immune sérums humains de provenance italienne, espagnole et danoise.

Les résultats obtenus montrent qu'il existe des souches qui sont agglutinées généralement à des titres plus élevés que d'autres. Cette plus grande agglutinabilité n'est pas liée à une communauté d'origine. L'origine locale ne confère pas à des souches une plus grande agglutinabilité.

Ces différences dans l'agglutination se manifestent aussi pour ce qui regarde le phénomène de l'agglutination paraspécifique.

Il existe en outre, quoique rares, certains sérums qui agglutinent des souches de valeurs beaucoup plus élevées que d'autres souches.

Des expériences d'absorption d'anticorps il ne résulte pas que ces diversités de comportement des souches étudiées soient liées à des diversités constitutionnelles des antigènes: l'explication du phénomène demeure donc obscure.

Summary. — The authors made a statistical study of the agglutinability of Italian and Spanish strains of *L. ictero-haemorrhagiae* in the presence of immune human sera of Italian, Spanish, and Danish origin.

It appears from the results obtained that there are some strains which

are agglutinated in general at higher titres than others. Strains and sera of common origin did not give significantly higher agglutination values, i.e. there is no evidence for a greater agglutinability of local strains.

The same variation of agglutinability appeared in connexion with the phenomenon of paraspecific agglutination.

There is furthermore a small number of particular serums which agglutinate some strains to a much higher titer than other strains.

Antibody adsorption tests were carried out, but failed to show any difference of antigenic constitution in the strains studied which might account for their different behaviour. The phenomenon thus remains unexplained.

Zusammenfassung. — Es wird statistisch die Agglutinabilität italienischer und spanischer *L. ictero-haemorrhagiae* Stämme gegenüber immunen menschlichen Sera italienischer, spanischer und dänischer Herkunft untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass einige Stämme im Allgemeinen stärker agglutiniert werden als andere. Diese Tatsache ist nicht an einen gemeinsamen Ursprung der Stämme und der zu den Versuchen benutzten Sera gebunden; d.h. bei den Stämmen lokaler Herkunft besteht keine grössere Agglutinabilität.

Diese Agglutinabilitätsunterschiede werden auch bei der Erscheinung der paraspezifischen Agglutinierung deutlich.

Ausserdem gibt es bestimmte Sera, die einzelne Stämme stärker als andere agglutinieren, wenn solche Sera allerdings auch nur selten vorkommen.

Aus den Adsorptionsversuchen der Antikörpern geht nicht hervor, dass diese Verschiedenheiten des Verhaltens der untersuchten Stämme an Verschiedenheiten ihrer antigenischen Konstitution gebunden sind. Die Erklärung dieser Erscheinung ist somit bisher nicht möglich.

Per lungo tempo ha goduto favore, in microbiologia, l'opinione che fosse opportuno utilizzare a scopo diagnostico o per la preparazione di vaccini profilattici o curativi, ceppi batterici di isolamento locale, provvisti presumibilmente di un corredo antigenico piuttosto uniforme e parzialmente diverso da quello di ceppi isolati in località straniera.

Questo concetto, che ha tenuto a lungo il campo, specialmente per ciò che riguarda le Salmonelle, è successivamente venuto in buona parte a cadere quando lo studio accurato della costituzione antigenica dei germi ne ha permesso un'esatta classificazione e ci ha dato i criteri che ci per-

mettono una scelta razionale del ceppo più adatto agli scopi che ci si propone. Tuttavia qualche cosa di questi concetti sopravvive ancora, quale ad esempio l'impiego, a scopo terapeutico, degli autovaccini.

Nel campo della serodiagnosi delle leptospirosi, è generalmente noto che non tutti i ceppi appartenenti al medesimo tipo serologico vengono agglutinati allo stesso titolo da un determinato siero immune. Ci sono, da ceppo a ceppo, oscillazioni alle volte notevoli e tali, in qualche caso, da influire sensibilmente sulla valutazione, ai fini pratici, dei risultati ottenuti.

Non ci consta che qualcuno abbia studiato sperimentalmente questo fenomeno, per accertare se queste differenze di titolo siano dovute ad una diversa e maldefinibile « agglutinabilità » del ceppo, o a diversità nella costituzione del mosaico antigenico di diversi ceppi appartenenti ad un determinato serotipo. Ad ogni modo nei laboratori dove si pratica abitualmente la reazione di MARTIN e PETTIT, si preferisce generalmente utilizzare ceppi di isolamento locale.

Abbiamo ritenuto opportuno studiare questo problema, sia per il suo interesse teorico, sia per i riflessi d'ordine pratico che esso comporta.

Nel nostro laboratorio, per lunghi anni abbiamo utilizzato, tra gli altri, nella serodiagnosi delle leptospirosi, due ceppi di *L. ictero-haemorrhagiae*: uno era il ceppo « Zaan », di origine olandese, l'altro il ceppo « Bianchi 1 », isolato in Italia. Avevamo notato che questo secondo ceppo dava quasi costantemente con i sieri positivi un titolo maggiore che il primo ceppo. Spesso la differenza del titolo era di 10 volte o più, tanto che in alcuni, sia pur rari casi, un siero che agglutinava il ceppo « Bianchi 1 » al titolo di 1:1.000, dava un risultato praticamente negativo ($< 1:100$) con il ceppo « Zaan ». Questa differenza di comportamento non era attribuibile ad una delle note differenze antigeniche esistenti fra i due biotipi di *L. ictero-haemorrhagiae*, perchè mentre il ceppo « Zaan » ha la formula antigenica AB, quello « Bianchi 1 » ha quella A: quindi, se la differenza fosse dovuta alla diversità dei due biotipi, essa dovrebbe essere in favore del ceppo « Zaan » e non di quello « Bianchi 1 ». Si poteva però pensare che nel ceppo « Bianchi 1 » fosse anche contenuto un ancora non riconosciuto antigene, presente nei ceppi italiani di *L. ictero-haemorrhagiae* e assente in quelli olandesi.

Allo scopo di chiarire questa ipotesi, abbiamo saggiato 53 sieri umani positivi per *L. ictero-haemorrhagiae* di fronte a 4 diversi ceppi di tale leptospira. Dei sieri esaminati 25 provenivano da pazienti italiani (Tab. 1) 23 da pazienti spagnuoli (Tab. 2) e 5 da ammalati danesi (*) (Tab. 3).

(*) Ringraziamo il Dr. Borg Petersen dello Statens Serum Institute di Copenaghen, per il cortese invio di tali sieri.

CEPPI	7056	7103	7042	7052	7053	7101	7102	7123	7096	7041	7095	6953	6952	6907	6896	6895	6951	6908	6902	6900	6903	6883	8702	8703	8707	MEDIE
VALENCIA I:																										
Titolo	100	100	5000	5000	100	500	1000	5000	10000	50000	5000	1000	500	1000	100	1000	5000	10000	5000	1000	10000	10000	100	500	10000	
Titolo %	100	100	20	100	40	100	100	50	100	50	10	100	50	20	10	40	50	40	100	10	10	20	0	50	10	
X	48,2	48,2	31,2	48,2	11,2	48,2	48,2	1,2	48,2	1,2	41,2	48,2	1,2	31,2	41,2	11,2	1,2	11,2	48,2	41,2	41,2	31,2	51,2	1,2	41,2	51,2
BIANCHI I:																										
Titolo	100	100	25000	5000	250	500	1000	10000	10000	100000	50000	1000	1000	5000	1000	2500	10000	25000	5000	10000	100000	50000	50000	1000	100000	
Titolo %	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
LOLA:																										
Titolo	100	100	5000	5000	100	500	1000	5000	10000	100000	10000	1000	1000	1000	500	2500	10000	25000	5000	5000	50000	10000	100	1000	50000	
Titolo %	100	100	20	100	40	100	100	50	100	100	20	100	100	20	50	100	100	100	100	50	50	20	0	100	50	
X	29,2	29,2	50,8	29,2	30,8	29,2	29,2	20,8	29,2	29,2	50,8	29,2	29,2	50,8	20,8	29,8	29,8	29,8	29,8	20,8	20,8	50,8	70,8	29,2	20,8	70,8
RINALDI:																										
Titolo	100	100	5000	5000	100	500	500	1000	5000	50000	5000	1000	1000	1000	100	2500	10000	10000	5000	5000	50000	25000	100	1000	50000	
Titolo %	100	100	20	100	40	100	50	10	50	50	10	100	100	20	10	100	100	40	100	50	50	50	0	100	50	
X	38	38	42	38	22	38	12	52	12	12	52	38	38	42	52	38	38	22	38	12	12	12	62	38	12	62,0

X = distacco dalla media.

SIERI SPAGNOLI

TABELLA 2

CEPPI	38	34	35	37	40	53	42	44	43	47	59	56	28	49	50	53	54	55	91	92	105	111	39	MEDIE
VALENCIA I:																								
Titolo	500	5000	500	500	1000	1000	100	100	1000	100	1000	100	100	1000	1000	500	1000	500	10000	1000	1000	10000	10	
Titolo ‰	100	10	100	100	100	100	20	100	100	20	40	13	33	100	100	100	100	100	20	10	100	20	2	64,7
X	35,3	54,7	35,3	35,3	35,3	35,3	44,7	35,3	35,3	44,7	24,7	51,7	31,7	35,3	35,3	35,3	35,3	35,3	44,7	54,7	35,3	44,7	62,7	
BIANCHI I:																								
Titolo	500	50000	500	500	1000	1000	500	100	1000	500	2500	750	300	1000	1000	100	1000	500	50000	10000	1000	50000	500	
Titolo ‰	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	20	100	100	100	100	100	100	100	96,5
X	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	76,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	
LOLA:																								
Titolo	500	7500	500	500	1000	500	500	100	1000	500	1000	300	100	1000	1000	500	1000	500	50000	1000	1000	50000	100	
Titolo ‰	100	15	100	100	100	50	100	100	100	100	40	25	33	100	100	100	100	100	100	10	100	100	20	77,5
X	22,5	62,5	22,5	22,5	22,5	27,5	22,5	22,5	22,5	22,5	37,5	52,5	44,5	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5	67,5	22,5	22,5	57,5	
RINALDI:																								
Titolo	500	5000	500	500	1000	500	500	100	1000	500	2500	500	300	1000	1000	500	1000	500	10000	10000	1000	10000	100	
Titolo ‰	100	10	100	100	100	50	100	100	100	100	100	15	100	100	100	100	100	100	20	100	100	20	20	75,9
X	24,1	65,9	24,1	24,1	24,1	25,9	24,1	24,1	24,1	24,1	24,1	60,9	24,1	24,1	24,1	24,1	24,1	24,1	55,9	24,1	24,1	55,9	55,9	

X = distacco dalla media.

I ceppi di *L. icterohaemorrhagiae* utilizzati sono stati due di isolamento italiano e due di provenienza spagnuola, e più precisamente il ceppo « Bianchi 1 », isolato nel 1936 da BIANCHI a Pavia, quello « Rinaldi », isolato nel 1933 da BUSSINELLO nella pianura padana, il ceppo « Valencia 1 » isolato da DURICH e Coll. a Valencia (1935) e quello « Lola », isolato da uno di noi nel 1953 a Castellón de la Plana. I due ceppi italiani erano d'origine umana: quelli spagnuoli erano stati isolati dai reni di ratti.

I risultati ottenuti sono esposti nelle tabelle 1, 2, 3.

SIERI DANESI

TABELLA 3

CEPPI	2845	1041	624	1025	63	MEDIE
VALENCIA 1:						
Titolo	100000	50000	10000	100000	50000	
Titolo %	100	100	20	100	50	74
X	26	26	54	26	24	
BIANCHI 1:						
Titolo	100000	5000	50000	100000	100000	
Titolo %	100	10	100	100	100	82
X	18	72	18	18	18	
LOLA:						
Titolo	100000	50000	50000	100000	100000	
Titolo %	100	100	100	100	100	100
X	0	0	0	0	0	
RINALDI:						
Titolo	100000	10000	50000	100000	50000	
Titolo %	100	20	100	100	50	74
X	26	54	26	26	24	

X = distacco dalla media.

Allo scopo di valutare statisticamente i dati ottenuti, abbiamo proceduto come segue. Abbiamo attribuito il valore di 100 (Titolo %) al titolo più elevato raggiunto da ciascun siero. Abbiamo poi assegnato ai titoli minori, che il siero aveva ottenuto con gli altri tre ceppi, il valore proporzionalmente corrispondente. Abbiamo in seguito calcolato la media

aritmetica dei valori ottenuti da ciascun ceppo di fronte a ciascun gruppo di sieri, e determinato i limiti dell'errore probabile. A questo scopo

abbiamo impiegato la seguente formula: $m = \frac{\mu}{\sqrt{n}}$, dove $\mu = \sqrt{\frac{\sum (x^2)}{n-1}}$

dove m = errore medio del risultato, μ = errore medio delle osservazioni, n = numero delle osservazioni, x = distacco delle singole osservazioni dalla media aritmetica.

I risultati così determinati sono esposti nella tabella 4.

TABELLA 4

Ceppi	S I E R I		
	Italiani	Spagnoli	Danesi
Valencia 1	51 2 $\pm$ 7,4	64 7 $\pm$ 8 8	74 $\pm$ 16,6
Bianchi 1	100 $\pm$ 0	96,5 $\pm$ 3 5	82 $\pm$ 18.2
Lola	70,8 $\pm$ 7.1	77 5 $\pm$ 7.2	100 $\pm$ 0
Rinaldi	62 0 $\pm$ 7 3	75 9 $\pm$ 7,4	74 $\pm$ 18,5

Questa tabella ci dice che non esiste una supremazia dei ceppi locali su quelli di provenienze lontane, ma che invece esistono ceppi più, e altri meno facilmente agglutinabili, e ciò indifferentemente dalla località di provenienza dei sieri immuni. Al primo posto sta il ceppo italiano « Bianchi 1 », che raggiunge in tutti e tre i gruppi, tenendo conto dell'errore probabile, il titolo di 100. Segue il ceppo spagnolo « Lola », che anzi nel gruppo dei sieri danesi raggiunge e supera il « Bianchi 1 ». Al terzo posto sta il ceppo « Rinaldi » e al quarto e ultimo il ceppo « Valencia 1 ». E' da notarsi ad ogni modo che se la superiorità del ceppo « Bianchi 1 » sugli altri è statisticamente provata, altrettanto non si può dire per la gerarchia dei ceppi rimanenti, eccezion fatta per quello « Valencia 1 » che, nel gruppo dei sieri italiani è certamente inferiore al ceppo « Lola ».

Abbiamo voluto quindi controllare se la maggiore agglutinabilità di alcuni ceppi rispetto ad altri, si esplicasse anche a proposito dei fenomeni di agglutinazione paraspecifica, dell'agglutinazione cioè che certi sieri danno con serotipi di leptospire diversi da quelli che sono stati responsabili della produzione dello stato immunitario.

A questo scopo abbiamo scelto 5 sieri umani, dei quali 4 agglutina-

vano *L. pomonae* (rispettivamente a 1:100.000, 1:10.000, 1:1.000, 1:1.000) e uno *L. bataviae* (a 1:100.000). Questi sieri, saggiati con i nostri 4 ceppi di *L. ictero-haemorrhagiae*, hanno dato i risultati esposti nella tabella 5.

TABELLA 5

Ceppi	S I E R I				
	1	2	3	4	5
Valencia 1	100	0	100	0	0
Bianchi 1	1000	1000	1000	1000	1000
Lola	100	0	100	0	0
Rinaldi	100	100	100	0	100

Traendo da questi risultati le medie aritmetiche e calcolando l'errore probabile, si ottengono i seguenti valori:

Valencia 1: $4 \pm 2,5$

Bianchi 1: 100 ± 0

Lola: $4 \pm 2,5$

Rinaldi: 8 ± 2

Da essi risulta statisticamente provata la maggiore agglutinabilità del ceppo « Bianchi 1 » rispetto agli altri, anche per ciò che riguarda il fenomeno dell'agglutinazione paraspecifica.

Sempre allo scopo di sottoporre i risultati ottenuti ad un ulteriore controllo, abbiamo preparato dal coniglio i sieri immuni rispetto ai 4 ceppi di leptospire studiati. Saggiati tali sieri con i diversi ceppi, abbiamo ottenuto i seguenti titoli (Tab. 6).

TABELLA 6

Ceppi	S I E R I			
	Valencia 1	Bianchi 1	Lola	Rinaldi
Valencia 1	1 : 25.000	1 : 25.000	1 : 10.000	1 : 10.000
Bianchi 1	1 : 50.000	1 : 100.000	1 : 50.000	1 : 25.000
Lola	1 : 25.000	1 : 25.000	1 : 25.000	1 : 10.000
Rinaldi	1 : 25.000	1 : 25.000	1 : 25.000	1 : 25.000

Qui i divari fra i titoli sono minori: ad ogni modo si può anche qui notare un'agglutinabilità lievemente più spiccata per il ceppo « Bianchi 1 » e meno evidente per il ceppo « Rinaldi ».

Nel considerare i risultati ottenuti con i sieri umani, si rileva che se il divario dei titoli ottenuti con i differenti ceppi è stato alle volte abbastanza considerevole, altre volte invece di scarsa entità, esso ha raggiunto valori molto elevati con il siero n. 8702. Questo siero ha agglutinato il ceppo « Bianchi 1 » al titolo di 1:50.000, mentre con gli altri ceppi ha raggiunto appena il titolo di 1:100. L'abbiamo allora voluto saggiare con altri ceppi di *L. ictero-haemorrhagiae* della nostra collezione, ed abbiamo ottenuto i seguenti titoli:

Ceppi italiani: Canova	1:10.000
Dellatte	1:50.000
Ceppi spagnuoli: Camarles 3	1:100
Camarles 4	1:100
Camarles 8	1:500
Ceppi olandesi: Zaan	1:10.000
Ceppi argentini: Buenos Aires	>1:5.000

Rispetto al siero n. 8702 i ceppi di *L. ictero-haemorrhagiae* si possono cioè dividere in due categorie: una costituita da ceppi che vengono agglutinati ad alto titolo, e una costituita da ceppi solo debolmente agglutinati. E' interessante rilevare che tutti i ceppi spagnoli saggiati appartengono a questo secondo gruppo. Questa differenza di comportamento non è assolutamente legata alla condizione di biotipo A e AB; rappresentanti dei due biotipi si trovano in ambedue i gruppi.

Era perciò logico prospettarsi l'ipotesi che i ceppi fortemente agglutinabili potessero contenere un antigene particolare, finora non identificato, assente invece, o estremamente scarso nei ceppi che vengono solo debolmente agglutinati. Allo scopo di controllare sperimentalmente questa ipotesi, abbiamo saturato un siero di coniglio anti-Bianchi 1 (ceppo fortemente agglutinabile) con sospensioni di leptospire appartenenti a ceppi debolmente agglutinabili.

Se l'ipotesi sopra prospettata avesse corrisposto alla realtà, il siero così assorbito avrebbe dovuto continuare ad agglutinare il ceppo « Bianchi 1 » e gli altri ceppi fortemente agglutinabili a valori immutati o solo di poco diminuiti.

I risultati invece non hanno corrisposto all'aspettativa. Diamo come

esempio il caso del siero anti-Bianchi 1 (titolo 1:1.000) adsorbito con il ceppo « Valencia 1 »:

Valencia 1	1:1
Bianchi 1	1:10
Lola:	1:10
Rinaldi:	1:10
Dellatte:	1:10
Canova:	1:10
Zaan:	1:10

Risultati pressochè corrispondenti sono stati ottenuti saturando il siero anti-Bianchi 1 con leptospire appartenenti ad altri ceppi scarsamente agglutinabili. Non si può di conseguenza sostenere che il ceppo « Bianchi 1 » contenga un antigene particolare, assente invece nei ceppi scarsamente agglutinabili.

Queste differenze di agglutinabilità sono evidentemente dovute a cause differenti da quella di una diversa costituzione del mosaico antigenico dei singoli ceppi di leptospire. Quali siano queste cause è ben difficile dire. Si potrebbe forse pensare che, nei ceppi più facilmente agglutinabili bastino meno molecole di anticorpi per legare tra di loro i singoli corpi delle spirochete, oppure che il potenziale V della carica elettrica responsabile della dispersione della sospensione di spirochete, abbia valori più prossimi al limite critico. Sono però queste soltanto semplici ipotesi che attendono conferma.

Occorre ad ogni modo rilevare che le cause che rendono alcuni ceppi più facilmente agglutinabili ed altri meno, sono presumibilmente diverse da quelle che condizionano lo strano comportamento del siero n. 8702. Infatti mentre, ad esempio, il ceppo « Lola » si stacca relativamente poco, come agglutinabilità, da quello « Bianchi 1 », esso viene invece agglutinato dal siero n. 8702 ad un titolo bassissimo e per nulla superiore a quello raggiunto da altri ceppi che dai sieri rimanenti erano stati più debolmente agglutinati.

Non si deve dimenticare che la serologia delle leptospire presenta caratteristiche peculiari e che si stacca in parte dagli schemi classici derivati dallo studio della serologia degli schizomiceti. Soltanto una più profonda conoscenza dei fenomeni immunitari che si manifestano in questo gruppo di microorganismi, potrà darci ragione dei fenomeni da noi osservati.

Ad ogni modo, per quanto allo stato attuale noi non si sia in grado di spiegare il perchè dei fenomeni osservati, possiamo affermare che nel campo delle leptospire esistono ceppi che vengono agglutinati

più facilmente che altri dai sieri immuni. La maggiore agglutinabilità di alcuni ceppi non è legata alla presenza dell'antigene A o di quelli AB, e comunque non sembra dovuta alla presenza di un particolare antigene, assente invece nei ceppi scarsamente agglutinabili.

Nella pratica della serodiagnosi non c'è ragione di preferire ad altri i ceppi di isolamento locale. E' invece preferibile usare ceppi facilmente agglutinabili.

A prescindere dalle differenze di agglutinabilità qui sopra esposte, s'incontrano alle volte, sia pure raramente, sieri immuni che agglutinano determinati ceppi di leptospire a titoli molto più elevati che altri ceppi. Questo strano comportamento, che può rivestire un notevole interesse pratico ai fini serodiagnostics, è difficilmente spiegabile e comunque non sembra essere legato ad una particolare costituzione antigenica dei ceppi agglutinati a titolo elevato.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.
