

29. LA POSIZIONE SISTEMATICA DELLE LEPTOSPIRE DEL TIPO "MEZZANO",

Nel giugno del 1938 una forma infettiva a carattere epidemico si manifestava fra i lavoratori addetti alla monda del riso, nella fattoria « Mezzano », in Provincia di Pavia. Le ricerche compiute in tale occasione da L. Bianchi e da me portarono all'isolamento, dall'acqua di una risaia e dai reni di un ratto, di tre ceppi, tra loro serologicamente identici, di una leptospira che fu riconosciuta essere l'agente eziologico dell'infezione. Come comunicammo allora in un lavoro comparso nel volume III di questi Rendiconti (¹), i ceppi di Mezzano dimostravano una certa affinità per *L. ictero-haemorrhagiae*, ma per parecchi caratteri non si potevano identificare con questa. La loro posizione sistematica era per ciò lasciata in sospenso.

Qualche tempo dopo ricevetti dalla cortesia del Prof. Schüffner parecchi ceppi di leptospire che ancora non possedevo, e fra questi i tre tipi australiani. Confrontati anche questi ceppi con quelli « Mezzano », constatavi che una forte affinità esisteva fra questi ultimi e il ceppo « Pomona », isolato nel 1937 da Clayton e Derrick (²) nell'Australia del Sud. Tale osservazione è stata da me comunicata, nel maggio 1940, al Congresso Tedesco di Medicina Interna, tenuto a Wiesbaden (³).

I precisi rapporti intercorrenti fra i tre tipi di leptospire: *L. ictero-haemorrhagiae*, *L. tipo « Mezzano »* e *L. tipo « Pomona »* potevano essere però chiariti soltanto dalla prova di saturazione delle agglutinine, il che ho fatto non appena ho potuto disporre di una centrifuga adatta allo scopo. La tecnica da me adottata in tali prove è stata quella suggerita da Schüffner e Bohlander (⁴).

Prima di esporre i risultati di questa ricerca, riassumo qui brevemente i termini del problema e le ricerche collaterali eseguite.

I sieri, in numero di 66, raccolti dai convalescenti dell'epidemia di Mezzano, in un periodo che va da 40 giorni ad un anno dall'inizio della malattia, agglutinano i ceppi Mezzano responsabili dell'epidemia stessa

ad un titolo discretamente elevato, che per lo più supera l'1 a 10.000 e può raggiungere anche l'1 a 500.000. Tali sieri agglutinano anche il ceppo « Pomona » a titoli pressapoco uguali. Essi agglutinano e lisano pure ceppi di *L. ictero-haemorrhagiae* a titoli in genere più bassi, ma in qualche caso anche superiori a quelli per il tipo « Mezzano », e in ogni caso notevolmente elevati. Riporto qui ad esempio i risultati delle prove d'agglutinazione eseguite di fronte a questi tre tipi, con otto di tali sieri:

N.	T I P I					
	L. Mezzano		L. Pomona	L. ictero-haemorrhagiae		
	Ceppi		Ceppo Pomona	C e p p i		
	Mezzano I	Mezzano II		Zaan	Lister I	Verdun
1	1 : 10.000	1 : 20.000	1 : 10.000	1 : 1.000	1 : 500	—
2	1 : 20.000	1 : 10.000	1 : 20.000	1 : 100	1 : 1.000	1 : 100
3	1 : 10.000	1 : 10.000	1 : 10.000	1 : 100	1 : 1.000	1 : 2.000
4	1 : 50.000	1 : 20.000	1 : 50.000	1 : 100	1 : 2.000	1 : 1.000
5	1 : 500.000	1 : 100.000	1 : 200.000	1 : 2.000	1 : 1.000	—
6	1 : 100.000	1 : 50.000	1 : 100.000	1 : 2.000	1 : 1.000	1 : 5.000
7	1 : 10.000	1 : 10.000	1 : 10.000	1 : 5.000	1 : 1.000	—
8	1 : 2.000	1 : 5.000	1 : 5.000	1 : 500	1 : 10.000	1 : 2.000

Un osservatore frettoloso ne avrebbe dedotto che i ceppi « Mezzano » e quello « Pomona » non sono altro che stipiti lievemente atipici di *L. ictero-haemorrhagiae*. Una prima sorpresa era data però dalle prove di protezione sulla cavia, eseguite con 48 di questi sieri. Queste prove dimostrarono che 1 cc. di siero, pur contenendo agglutinine e lisine ad alto titolo per *L. ictero-haemorrhagiae*, è tuttavia incapace di proteggere la cavia dall'infezione di questo tipo, mentre sieri provenienti da convalescenti di infezione da *L. ictero-haemorrhagiae*, pur non avendo un titolo superiore di anticorpi e pur essendo usati in una quantità dieci volte minore, riescono a salvare la cavia. Questo risultato, sconcertante con quelli delle prove di agglutinazione-lisi, dimostrano che la prova di protezione non è sempre come qualcuno dice, un semplice « lusso diagnostico ».

Immunizzai allora dei conigli con i vari ceppi in studio e preparai così sieri monovalenti. Costatai così che i sieri di coniglio si comportano ben diversamente da quelli umani. Con essi si riesce a differenziare bene i ceppi di *L. ictero-haemorrhagiae* da quelli « Mezzano » e da quello « Pomona », mentre questi due ultimi tipi confermano la loro stretta parentela.

Nella tabella sottostante riproduco una di tali prove serologiche, eseguite con uno dei ceppi di *L. ictero-haemorrhagiae*, quello « icteroides Noguchi », che mostravano maggiore affinità per il gruppo « Mezzano-Pomona ».

C e p p i	S i e r i		
	Anti-Mezzano	Anti-Pomona	Anti-Icteroides
Mezzano I	1 : 100.000	1 : 2.000.000	1 : 500
Pomona	1 : 30.000	1 : 1.000.000	1 : 50
Icteroides N.	1 : 50	1 : 200	1 : 10.000

Eseguii quindi un'altra serie di prove: quelle di inibizione crociata della crescita secondo la tecnica di Uhlenhuth, allestendo tubi di terreno culturale preparato con siero immune. Vidi così che i sieri anti-Mezzano e anti-Pomona inibiscono ugualmente la crescita di questi due tipi, mentre permettono uno sviluppo rigoglioso dei ceppi di *L. ictero-haemorrhagiae*. All'incontro il siero *anti-icterohaemorrhagiae* non inibisce la crescita dei tipi « Mezzano » e « Pomona ».

Eseguii anche qualche prova di immunità crociata sulla cavia, per quanto sapessi che tale prova ha nel campo delle leptospire una scarsa importanza. Infatti, come risulta dalle ricerche di Inada (5), Fletcher (6), Clayton e Derrick (2) e altri, anche tra i tipi di leptospire serologicamente del tutto diverse, esiste un discreto grado di immunità crociata.

Nelle mie prove inoculai 8 cavie con i ceppi « Mezzano » e « Pomona » e dopo 45 giorni iniettai loro un ceppo virulento di *L. ictero-haemorrhagiae*. Di tali cavie una morì per cause accidentali, delle altre, tre sopravvissero e quattro morirono col quadro classico del morbo di Weil. Altre prove d'immunità crociata non mi fu possibile di fare per la scarsa patogenicità verso la cavia dei ceppi « Mezzano » e « Pomona ».

Altri caratteri, all'infuori di quelli serologici, i quali accostano i ceppi « Mezzano » a quello « Pomona » e li differenziano da quelli ictero-haemorrhagiae, sono la mancanza di ittero e l'assenza di rilevanti lesioni renali in tutti i casi di malattia determinati dai tipi « Mezzano » e « Pomona », e la loro scarsa virulenza per la cavia, virulenza che non si riesce ad accrescere neppure eseguendo ripetuti passaggi successivi.

Anche i caratteri epidemiologici e clinici della malattia australiana, qual'è descritta da Clayton e Derrick (2), coincidono con quanto noi abbiamo osservato a Mezzano. Come da noi, in Australia la malattia ha un decorso lieve, dà per lo più febbre elevata ma di breve durata, nausea, vomito, cefalea, iniezione congiuntivale, astenia nella convalescenza. L'ittero è sempre mancato, tanto da noi che in Australia. Come i ceppi « Mezzano », anche quello « Pomona » è solo debolmente patogeno per la cavia, ma nei rari casi in cui ne determina la morte, la uccide con ittero. Aggiungo ancora che la regione di Pomona, come la Lombardia, è molto ricca d'acqua.

Però il criterio decisivo doveva esser dato dalla prova di Castellani. Questa prova è stata introdotta nello studio delle leptospire da ben poco tempo, da Borg Petersen (7) della scuola di Madsen; Schüffner e Bohlander ne hanno fissata la tecnica (4).

La prova viene eseguita così: Un'abbondante quantità di una ricca cultura di leptospire viene trattata col 0,5 per cento di formolo, e quindi centrifugata a 10.000 giri, per 20 minuti. Il sedimento viene messo in contatto con un volume 10 volte minore del siero in esame previamente diluito fino a portarlo al titolo di 1:3.000. Dopo circa 12 ore la miscela viene centrifugata ed il siero, saturato, ne è separato.

Per prima cosa occorre determinare i rapporti intercorrenti fra il tipo « Pomona » e quello « Mezzano. ».

Come risulta dalla sottostante tabella, le prove di saturazione dimostrarono che i due tipi sono perfettamente identici.

S I E R I .

C e p p i	Anti-Mezzano		Anti-Pomona	
	non saturato	saturato con " Pomona,,	non saturato	saturato con " Mezzano,,
Mezzano I	1 : 3.000	0	1 : 1.500	0
Pomona	1 : 1.000	0	1 : 3.000	0

Quindi non si trattava di semplici fatti di agglutinazione di gruppo, bensì era dimostrato che i ceppi « Mezzano » e quello « Pomona » sono serologicamente identici.

Più complesso si presentava lo studio dei rapporti fra il gruppo « Mezzano-Pomona » e *L. ictero-haemorrhagiae*. Qui parecchie ipotesi si potevano affacciare, ed una prima di tutto si doveva considerare, ipotesi di valore sia pure soltanto teorico, ma che avrebbe spiegato la diversità di comportamento dei sieri anti-Mezzano umani e di coniglio, rispetto ad *L. ictero-haemorrhagiae*, come pure la mancata agglutinazione dei ceppi « Mezzano » da parte di convalescenti dall'infezione di *L. ictero-haemorrhagiae*.

Si poteva cioè pensare che a Mezzano si fosse avuta un'infezione doppia: dal tipo « Mezzano » e dal tipo « Ictero-haemorrhagiae ».

Per saggiare quest'ipotesi, saturai il siero di un paziente il quale agglutinava i ceppi « Mezzano » a 1:10.000, quello « Pomona » a 1:5.000 e un ceppo di *L. ictero-haemorrhagiae* (Zaan) a 1:5000, col ceppo « Mezzano ». Il siero non agglutinò più, neppure a 1:5, nè il ceppo « Pomona », nè il ceppo « Zaan ». Con ciò era dimostrato che non si trattava d'infezione doppia.

Una seconda prova fu fatta saturando il siero del convalescente col ceppo di *L. ictero-haemorrhagiae*. Il siero così trattato, incapace di agglutinare più il ceppo « Zaan », agglutinava però quello « Mezzano » e quello « Pomona » al medesimo titolo del siero non saturato. Era dimostrato così che si trattava, per *L. ictero-haemorrhagiae*, di agglutinazione di gruppo, e che il tipo « Mezzano-Pomona » è serologicamente del tutto diverso da *L. ictero-haemorrhagiae*. Un'ipotesi si poteva però ancora fare, ed era quella che la leptospira « Mezzano » fosse costituita da un mosaico antigenico, e che accanto all'antigene specifico ne avesse uno in comune con *L. ictero-haemorrhagiae*. Si comprende che in tale ipotesi le prove di adsorbimento avrebbero dato gli stessi risultati ottenuti ammettendo che le agglutinine per *L. ictero-haemorrhagiae* fossero coagglutinine. Ma che ciò non sia è dimostrato dal fatto che nel coniglio la leptospira di Mezzano non riesce a provocare la comparsa se non di minime quantità di anticorpi per *L. ictero-haemorrhagiae*.

In base a tutto questo complesso di ricerche, e specialmente in base alle prove di adsorbimento delle agglutinine, si può affermare che i ceppi « Mezzano » sono identici a quello « Pomona », e che costituiscono una specie diversa e ben distinguibile da *L. ictero-haemorrhagiae*. Con ciò

resta dimostrato che le leptospirosi europee sono sostenute da ben 6 tipi diversi di leptospire:

- 1) la classica *L. ictero-haemorrhagiae*, descritta per la prima volta da Inada, Ido e Collab.;
- 2) *L. canicola* identificata da Schüffner;
- 3) *L. grippo-typhosa* descritta da Tarassof;
- 4) la varietà « oryzeti » di *L. bataviae*, trovata da me;
- 5) *L. sejro* di Borg Petersen;
- 6) il tipo « Pomona-Mezzano » descritto da Clayton e Derrick in Australia e da me e Bianchi in Lombardia (*).

Di questi 6 tipi, 5 sembrano esistere in Italia; la sola *L. grippo-typhosa* non vi è stata finora segnalata, nè direttamente, nè indirettamente (**).

Dalle ricerche che ho fin qui esposte si possono trarre varie considerazioni, alcune riguardanti il più ristretto campo delle leptospire, altre invece che abbracciano più ampi problemi di serologia e patologia generale.

Tra le prime ricorderò che non siamo più autorizzati a far diagnosi di infezione da *L. ictero-haemorrhagiae*, in base ad un semplice risultato positivo della prova di agglutinazione e lisi verso tale leptospira. Tale diagnosi potrà essere fatta soltanto se contemporaneamente fosse risultata negativa la prova per il tipo « Pomona-Mezzano ». Questo dato di fatto deve essere tenuto presente specie in Lombardia, dove il tipo « Pomona-Mezzano » sicuramente esiste.

Si poteva veramente obiettare che la diffusione del tipo « Pomona-Mezzano » è molto ristretta. A questo proposito vorrei osservare che forse la distribuzione di questo tipo è molto più ampia di quanto si creda. Ri-

(*) È possibile che il tipo « Pomona-Mezzano » si trovi anche nelle Indie Olandesi. Infatti in un recente lavoro Walch-Sorgdrager (8) comunica che il siero di un paziente di colà gli ha agglutinato, ad alto titolo, il ceppo Pomona.

(**) In un recente lavoro comparso [Münch. Med. Woch., 88, 96-99 (1941)] mentre la presente nota era in corso di stampa, Mino comunica di aver isolato nel Vercellese, 3 ceppi di *L. grippo-typhosa*. Quindi in Italia sarebbero presenti tutti e sei i tipi europei di leptospire.

orderò ad esempio che a Roma ho trovato nel siero di un cane un alto contenuto di agglutinine per il tipo « Mezzano » (9).

La distinzione fra i due tipi non ha soltanto un valore teorico, ma anche uno pratico, perchè la prognosi delle infezioni dal tipo « Pomona-Mezzano » è molto più favorevole che in quelle da *L. ictero-haemorrhagiae*. Inoltre il siero curativo *anti-ictero-haemorrhagiae* è del tutto inefficace nei casi d'infezione dal tipo « Pomona-Mezzano ».

Un'altra osservazione: Nel campo delle leptospire si parla molto spesso di stipiti a distribuzione cosmopolita: *L. ictero-haemorrhagiae*, e di stipiti locali. Bisognerà considerare se questo termine di « locale » non sia da rivedere. Infatti abbiamo già visto che *L. bataviae*, tipico esempio di stipite cosiddetto « locale » si trova in Italia e nelle Indie Olandesi (11). Ora poi si vede che un altro tipo: quello « Pomona-Mezzano » si trova tanto in Italia che in Australia. Ricerche più accurate potranno forse dimostrare che anche i ceppi cosiddetti locali hanno in realtà una distribuzione altrettanto vasta che *L. ictero-haemorrhagiae*.

Un'altro problema, di più vasta portata, toccato dalle mie ricerche è quello del parallelismo o meno nella produzione dei vari anticorpi. In genere si tende ad ammettere che sotto l'azione di un antigene gli anticorpi vengano prodotti in quantità tra loro proporzionali, sì che il reperto di uno di questi in un siero costituisce, per lo meno grosso modo, un indice dello stato immunitario, per lo meno di quello umorale, dell'organismo. Così il controllo dell'attività di un vaccino si esegue per lo più determinandone il potere agglutinogeno; quello di un siero alle volte determinandone il potere agglutinante o quello litico. È noto però, e su ciò ha richiamato l'attenzione anche Lustig (10), che ciò non è sempre esatto, specialmente per ciò che riguarda gli anticorpi agglutinanti. Invece quelli litici sarebbero più spesso un indice esatto dell'attività immunizzante o dello stato immunitario. Il nostro caso dimostra che neppur questo è vero. Abbiamo visto infatti, nei sieri umani, che c'è un'evidente discordanza fra la presenza, da una parte di anticorpi agglutinanti e litici per *L. ictero-haemorrhagiae*, e l'assenza dall'altra parte, di proprietà immunizzanti (immunisine?) e di proprietà inibenti la crescita dei germi.

Degno di nota è il fatto che i convalescenti di Mezzano coagglutinano, spesso ad un titolo rilevante, *L. ictero-haemorrhagiae*, mentre i convalescenti da infezione da *L. ictero-haemorrhagiae* non coagglutinano mai,

o solo a titolo minimo, i ceppi « Mezzano ». Non è un fatto nuovo questo in immunologia: lo stesso accade nelle Salmonelle per i tipi Flexner e Shiga. Infatti il siero di un ammalato da dissenterico tipo Shiga, agglutina tanto il Shiga che il Flexner, mentre il siero di un ammalato da tipo Flexner agglutina solo il Flexner e non il Shiga. Ciò non accade invece usando sieri immuni di coniglio.

Altre analogie esistono ancora fra le reazioni immunitarie delle Salmonelle e quelle delle leptospire. Così accade anche nelle Salmonelle che talvolta il titolo delle coagglutinine superi quello delle agglutinine specifiche.

Un'altra osservazione è ancora da farsi; l'uomo ed il coniglio si comportano ben diversamente di fronte al medesimo antigene. Nel primo caso si ha la comparsa di coagglutinine ad un titolo che può paradossalmente superare quello delle stesse vere agglutinine; nel siero di coniglio invece tali coagglutinine non compaiono o compaiono solo in minima quantità.

Tutto ciò richiama ancora una volta l'attenzione sull'importanza che in serologia ha non soltanto la costituzione dell'antigene ma anche la capacità reattiva dell'organismo, sì che lo stesso antigene in due organismi diversi può dare una reazione immunitaria ben diversa, non solo quantitativamente, ma anche qualitativamente.

Si tratta per questi, a cui ho appena accennato, di complessi problemi di patologia generale, spesso di difficile interpretazione e che meritano un'attenzione maggiore di quella che generalmente è loro prestata, specie poi quando si parli di costituzione antigenica di un microrganismo, o, com'è ora di moda, di mosaico antigenico.

RIASSUNTO

L'A. in base a ricerche serologiche, e specialmente adottando il metodo dell'adsorbimento delle agglutinine, dimostra che i ceppi di *leptospira* « Mezzano », isolati da lui e Bianchi in Lombardia, sono identici al ceppo australiano « Pomona », e costituiscono una specie di leptospira nuova per l'Europa e ben diversa da *L. ictero-haemorrhagiae*.

Delle ricerche eseguite risultano dati di fatto e vengono posti problemi di notevole interesse non solo per lo studio delle leptospire, ma anche per l'immunologia in genere.

SUMMARIUM

Serologicis pervestigationibus fretus, in quibus methodo usus est adsorbendarum agglutinarum, Auctor ostendit cippos, a se atque a Bianchi in Longobardia secretos, leptospirae quam « Mezzano » dicimus nihil aliud esse quam cippum australianum nomine « Pomona » ideoque novam quandam esse leptospirae speciem Europae ignotam et longe a *L. icterohaemorrhagiae diversam*.

Earundem pervestigationum opera et facta proferuntur et quaestiones proponuntur non minimi momenti cum ad leptospirarum cognitionem tum ad immunitatis, quam dicimus, generalem doctrinam.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Laboratorio di Batteriologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BABUDIERI B. e BIANCHI L., Rend. Ist. San. Pubbl., 3, 11-44 (1940).
- (2) CLAYTON G. E. e DERRICK E. H., Med. Jour. of Australia, 24, I, 647-654 (1937).
- (3) BABUDIERI B., Verhandl. D. Gesellsch. f. inn. Med., LII Kongr., 126-128 (1940).
- (4) SCHUEFFNER W. e BOHLANDER H., C. f. Bakt. Orig., 114, 434-439 (1939).
- (5) INADA R., Trans. of the Sixth. Congr. of the Far Eastern Assoc. of Trop. Med. Tokio, 2, 113 (1925).
- (6) FLETCHER W., Trans. Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg., 21, 265-282 (1927).
- (7) BORG PETERSEN C., Atti III Congr. Mal. Trop., Amsterdam, 396-406 (1938).
- (8) WALCH SORGDRAGER B., Geneesk Tijd. v. Ned. Indie, 79, 3077-3090 (1939).
- (9) BABUDIERI B. e CASTAGNOLI B., Rend. Ist. San. Pubbl., 3, 45-64 (1940).
- (10) LUSTIG A., Giorn. Med. Milit., 881-887 (1916).
- (11) BABUDIERI B., Boll. Soc. Ital. Sper., 14, 294-295 (1939).

