

66. Brenno BABUDIERI. — **Ricerche di microscopia elettronica.**
— III. Studio del genere *Leptospira*.

Riassunto. — L'A. studia al microscopio elettronico varie specie di leptospire e ne descrive la morfologia. La leptospira è costituita da un lungo e sottile cilindro protoplasmatico racchiuso da una sottilissima e delicata membrana e avvolto intorno ad un sottile assistile. Mancano normalmente cilia, flagelli o granuli.

L'A. studia i vari aspetti che le leptospire presentano a seconda dei metodi di fissazione usati e a seconda delle azioni fisiche o chimiche alle quali sono state sottoposte.

Résumé. — L'A. étudie sous le microscope électronique plusieurs espèces de leptospires et en décrit la morphologie. La leptospire est constituée par un cylindre protoplasmatique long et fin, renfermé dans une membrane très fine et délicate et enroulé autour d'un mince filament axial. Normalement il n'y a pas de cils, flagella ou granules.

L'A. étudie les divers aspects que les leptospires présentent suivant les méthodes de fixation employées et suivant les actions physiques ou chimiques auxquelles elles ont été soumises.

Summary. — The A. investigates with the electron microscope various species of leptospiras and describes their morphology. The leptospira is constituted by a long and thin protoplasmic cylinder enclosed by an extremely thin and delicate membrane, and wound round a thin axial filament. Normally, there are no cilia, flagella or granules.

The A. examines the various aspects which the leptospiras can present according to the methods of fixation used as well as to the physical or chemical actions to which they have been subjected.

Zusammenfassung. — Der Verfasser studiert mit dem Elektronenmikroskop verschiedene Gattungen der *Leptospira* und beschreibt ihre Morphologie. Die *Leptospira* ist von einem langen und dünnem Protoplasma-Zylinder gebildet, der von einer sehr dünnen und zarten Membrane eingeschlossen und um einen dünnen Axialfaden gewunden ist. Normalerweise sind keine Cilien, Geisselfäden und Körnchen vorhanden.

Der Verfasser studiert die verschiedenen Formen, die die Leptospirae je nach den verwendeten Fixierungsmethoden sowie auch nach den physikalischen und chemischen Einflüssen aufweisen, denen sie unterzogen worden sind.

La morfologia delle leptospire è stata ripetutamente oggetto di ricerche, ma le dimensioni oltremodo minute di questo microorganismo non hanno permesso di rivelarne con precisione la struttura, tanto che di questa abbiamo soltanto descrizioni imprecise e contraddittorie. Mi è sembrato perciò opportuno studiare la morfologia delle leptospire con l'ausilio del microscopio elettronico.

Al microscopio ottico la leptospira non colorata non è visibile neppure qualora si usino i più forti ingrandimenti di cui è possibile disporre, e neppure, come ho potuto constatare, con l'uso del microscopio a ritardo di fase. Questa invisibilità è per lo più giustificata con l'affermazione che «l'indice di rifrazione delle leptospire è così prossimo a quello dell'acqua, da rendere impossibile la loro differenziazione al microscopio». Tale affermazione è riportata anche in alcuni recenti e diffusi testi di microbiologia. Ciò è però inesatto e a smentirla basterebbero i risultati dell'osservazione in campo scuro, nel quale le leptospire spiccano brillantissime, dimostrando così che il loro indice di rifrazione è ben diverso da quello dell'acqua.

La ragione della invisibilità delle leptospire al microscopio è invece ben altra. Essa consiste nell'estrema sottigliezza di questi microorganismi. Il loro diametro, misurato al microscopio elettronico, è in media un po' inferiore a $0,1 \mu$; è cioè corrispondente alle dimensioni di alcuni virus filtrabili, ed inferiore alla lunghezza media dell'onda luminosa ($0,5 \mu$).

Si comprende così che il potere risolutivo del microscopio ottico non sia tale da poterle rendere visibili. Ciò è invece possibile usando determinati metodi di colorazione che consistono nell'impregnare il corpo spirochetico di particelle coloranti, accrescendone notevolmente il diametro e facendolo rientrare nei limiti del potere risolutivo del microscopio ottico.

Ringrazio la Prof. D. Bocciarelli e il Dr. C. Castagnoli, del Laboratorio di fisica per la loro preziosa assistenza nella osservazione al microscopio elettronico.

Date le sue dimensioni minime, è comprensibile che poco si sappia della morfologia della leptospira. Sono state descritte le sue spire molto ravvicinate, le estremità piegate ad uncino, ma non si è visto molto di più. Molto discussa è stata la presenza o meno di un assistile.

Questo è stato ammesso dalla Zuelzer ⁽¹⁻²⁾ e da Mesnil ⁽³⁾, e, con qualche riserva, da Noguchi ⁽⁴⁾ e da Hindle ⁽⁵⁾, negato da Vuillemin ⁽⁶⁾ e da Buchanan ⁽⁷⁾. Qualcuno [Uhlenhuth e Fromme ⁽⁸⁾], ammette la sua esistenza soltanto nella porzione centrale della leptospira. Altri AA. invece [Pettit ⁽⁹⁾] non hanno preso netta posizione al riguardo. La presenza di filamenti o cilia terminali è stata pure descritta in qualche caso [Fantham ⁽¹⁰⁾ Pettit, Martin ⁽¹¹⁾, Vaudremer ⁽¹²⁾], ma gli stessi AA. che li

(1) M. ZUELZER, Beitrage zur Kenntniss der Morphologie und der Entwicklung der Weil'schen Spirochaete, Arb. a. d. Kaiserl. Reichsgesundheitsamte, 51, 159 (1918).

(2) M. ZUELZER, Biologische und systematische Spirochaetenuntersuchungen, C. f. Bakt., I, 85, 154 (1921).

(3) F. MESNIL, Analyse et discussion du mémoire de H. Noguchi « Morphological characteristics and nomenclature of *L. icterohemorrhagiae* », Bull. Inst. Pasteur, 16, 501 (1918).

(4) H. NOGUCHI, Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira*, J. exper. Med., 27, 575 (1918).

(5) E. HINDLE, The Spirochaetes: in Medical Research Council: A System of Bacteriology London, 8, 101 (1931).

(6) P. VUILLEMIN, Spirochètes et spirochètoses, Rev. méd. de l'Est, 47, 358 (1919).

(7) R. E. BUCHANAN, Studies in the classification et nomenclature of the Bacteria. X. Subgroup et genera of the Myxobacteriales et Spirochaetes. J. of Bacter., 3, 541 (1918).

(8) P. UHLENHUTH, W. FROMME, Weilsche Krankheit. In W. Kolle, R. Kraus e P. Uhlenhuth, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen Jena, 7, II, 487 (1930).

(9) A. PETTIT, Contribution a l'étude des Spirochètides. Vanves (1928).

(10) H. B. FANTHAM, Spirochaetes and their granule phase. Br. Med. J. 1, 409 (1916).

(11) L. MARTIN, A. PETTIT, La Spirochètose ictérohémmorragique. Monogr. Inst. Pasteur, Paris (1919).

(12) L. MARTIN, A. PETTIT, A. VAUDREMER, Coloration du Spirochète de l'ictère hémmorragique par les méthodes de Loeffler et de van Ermengem. Présence de cils. C. R. Soc. Biol., 79, 1053, 1149 (1916).

hanno visti, si sono dichiarati dubbiosi sulla loro reale presenza e sul loro significato.

Ripetutamente sono stati descritti granuli e piccole sfere cocciformi, sia facenti corpo con la spirocheta stessa, sia collegati ad essa da esili filamenti, sia infine liberi nel terreno di cultura. Mentre alcuni AA. considerano tali granuli come un prodotto di degenerazione e disfacimento della leptospira, alcuni hanno voluto vedere in essi un particolare stadio vitale della spirocheta e magari anche una forma di resistenza.

In complesso però l'osservazione al microscopio ottico e al paraboloide hanno posto dei problemi piuttosto che risolverli.

Non è mancata in quest'ultimo tempo qualche osservazione di leptospira al supermicroscopio elettronico. Ricorderò a questo proposito una fotografia pubblicata da Ruska ⁽¹³⁾ con la leggenda «spirocheta dell'acqua» e non accompagnata da nessuna descrizione. La fotografia rappresenta con ogni probabilità una leptospira con la sua estremità piegata ad uncino e le sue spire ravvicinate. Il protoplasma appare piuttosto diafano e rivestito da una membrana.

Il primo vero studio morfologico delle leptospire (*L. canicola* e *L. icterohaemorrhagiae*), risale però a Morton e Anderson ⁽¹⁴⁾. Questo studio, piuttosto succinto e corredato di fotografie non molto dimostrative, non dà risultati granchè notevoli. Nelle leptospire, lavate in acqua distillata e non fissate, gli AA. non vedono alcuna struttura particolare. Essi ammettono soltanto, in forma dubitativa però, la presenza di una membrana di rivestimento. Negano la presenza di cilia, non parlano di assistile.

L'anno scorso Jakob ⁽¹⁵⁾ ha pubblicato i risultati di sue ricerche su *L. canicola* osservata al microscopio elettronico. Anche questo A. non fissa i suoi preparati e s'accontenta di lavare le leptospire mediante centri-

⁽¹³⁾ H. RUSKA, Versuch zu einer Ordnung der Virusarten. Arch. f. ges. Virusforsch, 2, 480 (1941).

⁽¹⁴⁾ H. E. MORTON, T. F. ANDERSON, The morphology of *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *L. canicola* as revealed by the electron microscope. J. of Bacter, 45, 143 (1943).

⁽¹⁵⁾ A. JAKOB, Ueber die Morphologie der *Leptospira canicola*. Mediz. Klinik, 42, 1 (1947).

fugazioni ripetute. Il lavoro di Jacob non dà alcun ragguaglio sulla morfologia delle leptospire e si sofferma invece nella descrizione di particolari formazioni che egli trova in un ceppo di *L. canicola*.

Tali formazioni consistono in particolari corpiccioli ovalari, o liberi, o più spesso situati all'estremità di lunghi filamenti rigidi, che l'A. considera quali corpi spirochetici privi di spire. Egli considera, pur con qualche riserva, tali formazioni, alle volte straordinariamente abbondanti, quali particolari stadi vitali delle leptospire, sviluppantesi in terreni di cultura inadatti.

Infine sul suo recente volume sulle leptospirosi, Van Thiel ⁽¹⁶⁾ pubblica alcune fotografie di leptospire trattate con la tecnica dell'«ombra-tura». Anche queste fotografie, non rivelano però nulla di particolare sulla fine struttura delle leptospire.

Tutti questi lavori hanno però un difetto fondamentale: sono stati eseguiti su microorganismi non fissati. Da parecchi anni ormai ho richiamato l'attenzione sull'importanza che nella microscopia elettronica ha la fissazione dei microorganismi in osservazione ed ho affermato che in queste ricerche è indispensabile adottare la tecnica dell'osservazione istologica e non quella dell'osservazione batteriologica. Appunto seguendo questo principio e grazie anche all'eccellenza dello strumento di ricerca che ho potuto adoperare, mi è riuscito di mettere in evidenza nelle leptospire particolarità di struttura che erano del tutto sfuggite agli osservatori che mi hanno preceduto.

Le leptospire da me osservate appartengono a numerosi ceppi delle seguenti specie:

<i>L. ictero-haemorrhagiae</i>	<i>L. Sejrö</i>
<i>L. canicola</i>	<i>L. australis</i> B
<i>L. pomonae</i>	<i>L. tipo Fledermaus</i> 90 C
<i>L. Bataviae</i>	<i>L. acquicole</i>

Dirò subito che dal punto di vista della morfologia non c'è alcuna differenza fra le diverse specie, e che anche le leptospire acquicole sono perfettamente uguali a quelle patogene.

(16) P. H. VAN THIEL, *The Leptospiroses*. The Hague (1948).

Si nota soltanto una differenza di lunghezza delle leptospire da ceppo a ceppo, differenza che però non riveste significato particolare, perchè è oltremodo variabile a seconda l'età della cultura, l'abbondanza dei microorganismi, il terreno di cultura, ecc., per quanto si noti che in alcuni ceppi, anche appartenenti alla medesima specie, tendano a prevalere individui di piccole dimensioni mentre in altri son frequenti le forme lunghe.

La tecnica seguita nelle presenti ricerche è stata la seguente: Le leptospire venivano per lo più coltivate in terreno di Korthof modificato, e tenute a 28°. Esse venivano fissate mediante l'aggiunta di 1-2 gocce di soluzione di acido osmico all'1% per 1-2 cm³ di cultura; poi, dopo alcuni istanti, sottoposte a centrifugazione per 45' a 2.500 giri. Il sedimento era quindi risospeso in acqua bidistillata sterile e la sospensione veniva nuovamente contrifugata a lungo. Tale lavaggio veniva ripetuto per 3 o 4 volte, fino ad ottenere una sospensione di leptospire il più pura possibile, pronta per l'osservazione al microscopio elettronico.

Ho già insistito sull'importanza che il metodo di fissazione ha per mantenere integra la delicata struttura delle leptospire. Forse per nessun altro microorganismo ciò risulta tanto evidente come per questo. Infatti nei preparati non fissati o fissati insufficientemente o con mezzi di fissazione non adatti, le spire si allentano e alle volte scompaiono, non è più visibile la membrana, sparisce l'assistile. Aggiungerò ancora che conviene fissare le leptospire prima di sottoporle alla centrifugazione e non dopo. Questa pratica violenta non è infatti del tutto senza conseguenze sul delicato corpo delle leptospire non fissate.

Nell'osservazione del parassita sono ricorso alle volte all'«ombratura» del preparato, per lo più mediante vapori di cromo. Questa tecnica che è stata di recente descritta da Trabacchi e Bocciarelli (¹⁷), non deve essere considerata come sostitutiva dell'osservazione di preparati semplicemente essiccati, ma invece complementare di questa: infatti mentre alcune particolarità di struttura risaltano molto meglio se «ombrate», altre sono più evidenti senza ombratura. Il merito maggiore della tecnica dell'«ombratura» è quella di dirci se là dove il microscopio elettronico ci rivela un'opacità, questa sia dovuta ad una maggiore densità locale della materia o ad una maggiore sua massa.

(¹⁷) D. BOCCIARELLI, C. TRABACCHI, Tecnica delle ombre nella microscopia elettronica, Rend. Ist. Sup. Sanità, 11, 127 (1948).

Dimensioni delle leptospire. — La lunghezza delle leptospire è estremamente variabile. Essa è stata del resto ripetutamente e facilmente determinata con il microscopio ottico, e quindi su di essa non è il caso di soffermarsi. Il diametro trasverso delle leptospire è stato invece per la prima volta esattamente determinato con il microscopio elettronico, e risulta notevolmente inferiore a quanto si riteneva in base alle osservazioni con il microscopio ottico ($0,25-0,3 \mu$). Il diametro deve determinarsi su leptospire non ombrate, perchè in quest'ultime l'apposizione delle particelle metalliche lo aumenta notevolmente.

Bisogna inoltre tener conto del fatto che al microscopio elettronico noi osserviamo microorganismi seccati, retratti ed appiattiti sul piano della membrana di collodio. Perciò le misure che noi possiamo prendere sono soltanto approssimative e non del tutto corrispondenti a quelle delle leptospire viventi.

Ad ogni modo possiamo dire che il diametro trasverso delle leptospire, pur non essendo costante, non presenta però notevoli variazioni da individuo ad individuo e da ceppo a ceppo. Esso s'aggira tra i $0,06$ e i $0,12 \mu$ circa, considerando il diametro del citoplasma entro la membrana: arriva invece ai $0,16 \mu$ se si considera anche lo spazio compreso tra membrana e citoplasma.

Minore appare il diametro delle leptospire se lo misuriamo in un tratto della spirocheta che attraversi un foro della membrana di collodio (fig. 1). E' comprensibile che ciò si debba al fatto che, non appoggiandosi ad un piano, la retrazione della leptospira durante l'essiccamento, sia maggiore.

In complesso si deve ritenere che la leptospira vivente abbia un diametro che superi in media di poco i $100 m\mu$.

Alle estremità le leptospire s'assottigliano, ma non eccessivamente. Esse terminano per lo più con un'estremità arrotondata (fig. 2); alle volte però, specie in culture giovani, l'estremità presenta un certo affilamento.

Assistile. — L'osservazione al microscopio elettronico rivela che nella totalità delle leptospire è presente un sottile assistile, esteso da una estremità all'altra delle leptospira e particolarmente ben visibile nei preparati « ombrati » (fig. 3, 4). Esso dà una certa impressione di relativa

rigidità e costituisce lo scheletro della leptospira. Esso protrude in maniera molto evidente sotto il protoplasma, sollevandolo in certi tratti. Questo reperto conferma singolarmente quanto osservato dalla Zuelzer, per quanto non sia vero che l'assistile oltrepassi alle due estremità il protoplasma, né che sia così grosso e rechi alle estremità due rigonfiamenti come essa raffigura.

Con particolari procedimenti (trattamento con pepsina, autolisi) è possibile provocare nelle leptospire notevoli alterazioni e distruggerne il protoplasma. In tali casi l'assistile, più resistente, si conserva, e allora esso si rende molto meglio evidente (figg. 5, 6).

In vecchie culture pressochè completamente autolizzate si osservano, accanto ad ammassi di detriti, alcuni sottili filamenti che presumibilmente corrispondono ad assistili divenuti liberi (fig. 7). L'immagine, osservata un'unica volta, di una leptospira che recava alla sua estremità una specie di lungo flagello, si può probabilmente spiegare con la distruzione parziale di un tratto protoplasmatico della spirocheta, con liberazione conseguente dell'assistile in forma di filamento (fig. 8).

Nei preparati « non ombrati » l'assistile compare come un sottile filamento meno opaco del protoplasma, che talvolta anzi deprime quest'ultimo solcandolo così con una linea di minore opacità che può anche simulare la presenza di una membrana ondulante (fig. 9).

Protoplasma. — Il corpo della leptospira è costituito da un cilindro di protoplasma avvolto in strette spire attorno all'assistile (fig. 10). Esso è perfettamente omogeneo, opaco ai raggi elettronici, ben rilevato nei preparati « ombrati », e non presenta normalmente nel suo interno, nè granuli, nè altra struttura. Eccezionalmente, in alcuni preparati si vedono leptospire meno opache, che lasciano scorgere nel loro interno una struttura irregolarmente reticolare con qualche addensamento per lo più periferico (fig. 11). A tali immagini corrispondono nei preparati « ombrati » spirochete che si direbbero come corrose e che fanno ritenere che, con ogni probabilità ci si trova di fronte ad aspetti degenerativi (fig. 12). Molto di rado in spirochete di vecchie culture è possibile vedere nel protoplasma alcuni piccoli granuli rotondi, opachi (fig. 13).

Anche l'idrolisi delle leptospire o altri trattamenti che alterino il protoplasma, non mettono in evidenza in esso particolari differenziazioni.

Membrana. — Il protoplasma delle leptospire è accompagnato lungo tutto il suo decorso da una sottile ombra ondulata, di scarsa opacità, che per lo più ha un aspetto di membrana ondulante, alternandosi da un lato e dall'altro delle spire protoplasmatiche, e che più raramente invece e alle volte solo per un determinato tratto, decorre pressochè parallelamente al protoplasma, da ambedue i lati di questo (fig. 10, 14, ecc). Alle estremità della leptospira la membrana incappuccia il protoplasma (fig. 15).

Questa membrana non è evidente nei preparati non fissati. Essa non mostra alcuna particolare struttura, non si sfibrilla in nessun caso, scompare qualora si trattino le leptospire con papaina, saponina, ecc., e ciò anche qualora il protoplasma della leptospira non mostri danni evidenti. Nei tratti in cui la leptospira attraversa un foro della pellicola, la membrana non è visibile (fig. 1). Nelle leptospire, trattate a lungo con acqua distillata, non si nota una migliore differenziazione di tale membrana.

Qual'è la sua natura? Si tratta di una membrana ondulante o di una membrana di rivestimento? Ambedue le ipotesi hanno argomenti in loro favore.

Per una membrana ondulante inserita su di una linea a spirale che segua il cilindro protoplasmatico, parlano oltre che considerazioni di analogia (presenza di una membrana ondulante nel genere *Spironema*), anche l'aspetto molto suggestivo che essa di solito presenta, come di onde che si alternano da una parte e dall'altra del proplasma.

In suo favore parla anche il fatto che essa è sempre visibile nei preparati bene fissati, mentre è noto che negli schizomiceti, di dimensioni ben maggiori, e in cui la retrazione del protoplasma per effetto dell'essiccamento è ben più notevole, soltanto in alcuni casi avviene il distacco della membrana dal protoplasma. Inoltre, mentre negli schizomiceti la membrana è la parte più resistente del corpo microbico, per cui non è raro trovare nelle vecchie culture membrane vuote di protoplasma, ed è facile con vari mezzi fisici e chimici provocare la distruzione del protoplasma lasciando integra o quasi la membrana, ciò non avviene per le leptospire.

Infatti nelle culture di queste ultime non s'incontrano mai membrane vuote, e trattando le leptospire con papaina, saponina o taurocolato di sodio, come abbiamo già detto, la membrana scompare prima ancora che

il protoplasma presenti alterazioni, e senza che perciò il diametro della leptospira risulti maggiore, come dovrebbe avvenire se in questi casi fosse mancata la retrazione del protoplasma.

Anche la circostanza che il cilindro protoplasmatico abbia un margine molto netto e regolare e mai presenti punte o protuberanze che s'attaccino alla membrana, contrasta con quanto siamo soliti ad osservare negli schizomiceti.

Inoltre si capisce male perchè nelle leptospire non fissate o fissate con sostanze che alterano il protoplasma più che l'acido osmico, una membrana di rivestimento non si debba vedere, mentre ciò non accade per gli schizomiceti. Si aggiunga che anche qui il diametro delle leptospire prive di membrana non risulta maggiore di quello del protoplasma spirochetico fissato con l'acido osmico.

Un altro dato che parla in favore della membrana ondulante è quello che, specie nei preparati « ombrati » la membrana presenta un orlo ingrossato, rilevato (fig. 16), che può giustificare l'ipotesi della presenza in esso di un grosso filamento elastico marginale, simile a quello presente nella membrana ondulante dei tripanosomi.

Non bisogna però nascondere che anche la membrana di rivestimento degli schizomiceti presenta alle volte simile aspetto rilevato.

Anche nel processo di divisione delle leptospire, contrariamente a quanto avviene per gli schizomiceti, non assistiamo, prima della divisione completa dei due nuovi microrganismi, ad uno stiramento della membrana, che si divide per ultima. Nel caso delle leptospire, noi vediamo che i due elementi prossimi a dividersi e uniti tra loro soltanto da un sottile istmo che si direbbe protoplasmatico, sono già contornati completamente dalla membrana (fig. 17).

Contro l'ipotesi della membrana ondulante sta però un rilievo fondamentale, quello che in certi casi la membrana accompagna da ambo i lati il protoplasma (fig. 18) e lo incappuccia alle estremità (fig. 15). Ciò è assolutamente inspiegabile con l'ipotesi della membrana ondulante.

La circostanza che di solito la membrana abbia un decorso ad onda, alternativamente dall'uno e dall'altro lato del protoplasma non parla contro l'ipotesi della membrana di rivestimento qualora si consideri l'avvol-

gimento delle spire. Ciò si può constatare anche con l'esame radiologico di modelli.

Una ipotesi ancora può esser fatta, e più precisamente quella che il corpo della leptospira possa essere accompagnato, dai due lati opposti da due sottili « cristae ». Questa ipotesi spiegherebbe bene i diversi aspetti della membrana ed il suo comportamento nelle varie condizioni. Difficilmente interpretabile sarebbe soltanto la presenza del cappuccetto alle estremità della spirocheta.

Questa ipotesi deve essere però affacciata con molte riserve, perchè, a parte che la presenza di due « cristae » in una spirocheta costituirebbe un fatto del tutto nuovo, non è facile comprendere come le due « cristae » possano inserirsi sul corpo avvolto intorno all'assistile.

Per risolvere per via indiretta il problema, ho studiato a lungo al paraboloide i movimenti delle leptospire proponendomi il quesito se questi possano essere spiegati dall'ipotesi di una leptospira priva di membrana ondulante, o se richiedano senz'altro l'ammissione di questa.

Com'è noto i movimenti delle leptospire, a prescindere da quelli flessori sul proprio asse, consistono essenzialmente in movimenti rotatori intorno all'asse e in movimenti di traslazione. Ho controllato che questi ultimi sono sempre accompagnati da movimenti di rotazione. Quindi la traslazione può essere spiegata anche considerando la leptospira come una semplice spirale sospesa nel liquido, senza bisogno di ammettere la presenza di una membrana ondulante o di una crista. Se queste formazioni fossero presenti, allora dovrebbe essere possibile alla leptospira di spostarsi in senso longitudinale anche senza rotare sul suo asse.

Naturalmente però se questa constatazione non rende necessario la ammissione di una membrana ondulante o di una « crista », non la esclude. Anzi essa spiegherebbe meglio certi rapidi movimenti di traslazione accompagnati da movimenti piuttosto lenti di rotazione.

Un importante elemento in favore della natura avvolgente della membrana è dato dalla formazione di bolle nelle soluzioni ipertoniche di cui dirò più avanti.

Considerato tutto quanto fin qui esposto, mi pare si possa con quasi assoluta certezza affermare che la leptospira è priva di una membrana

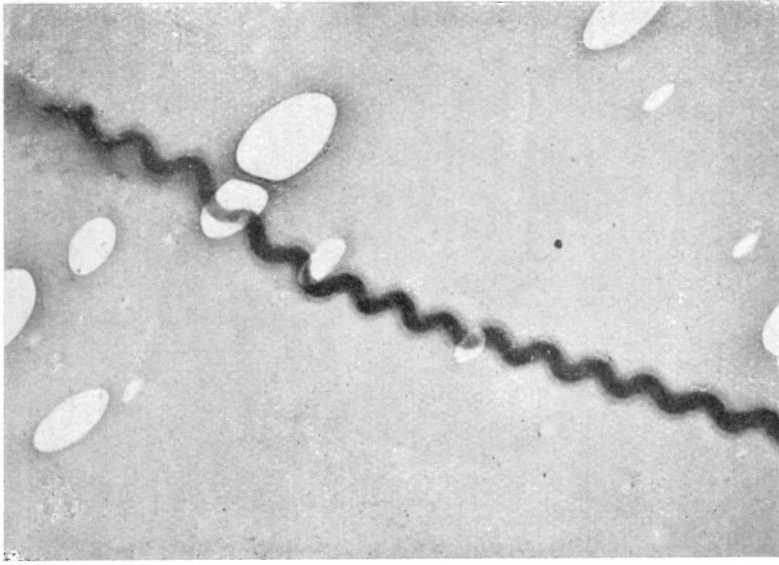


FIG. 1.

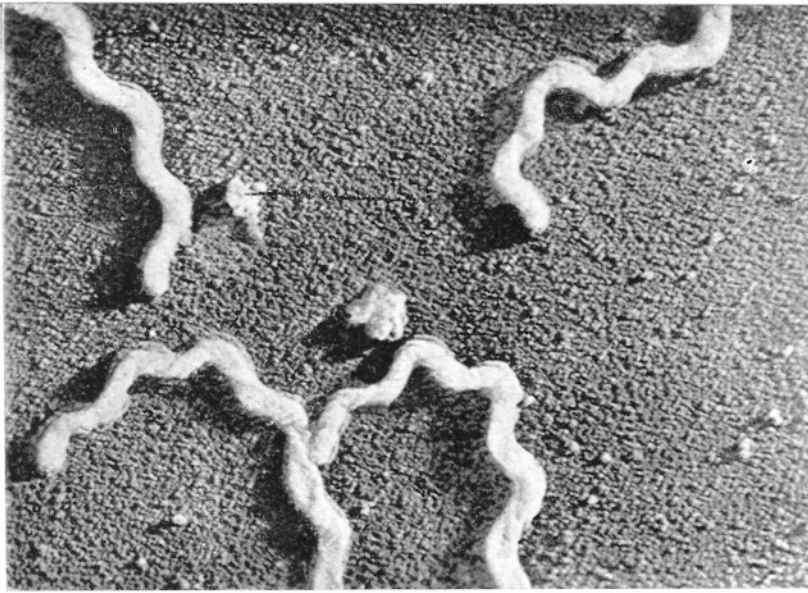


FIG. 2.

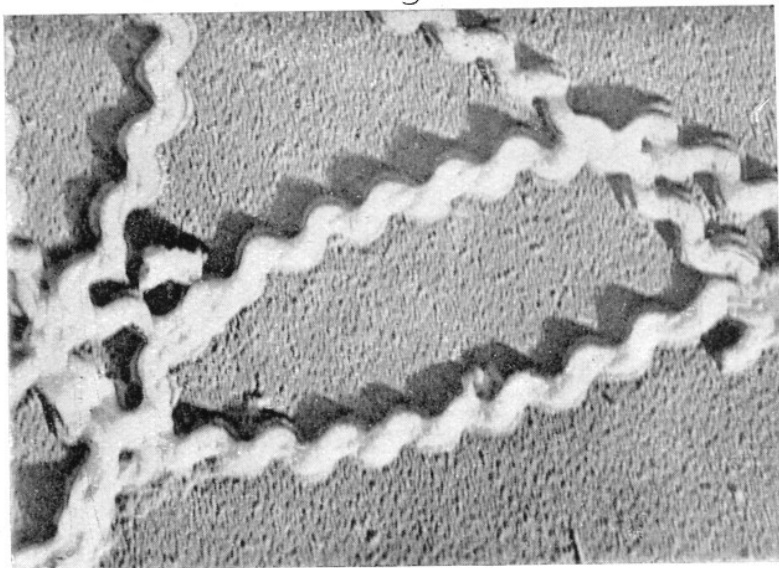


FIG. 3.

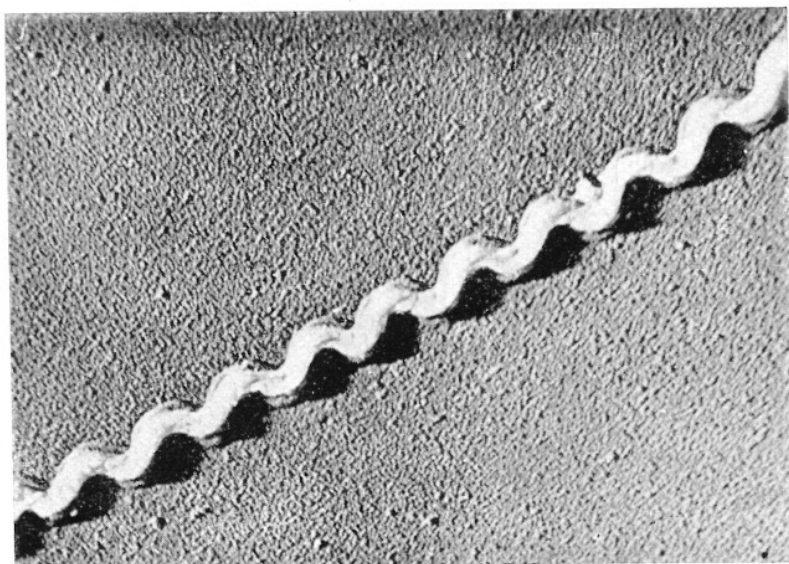


FIG. 4.

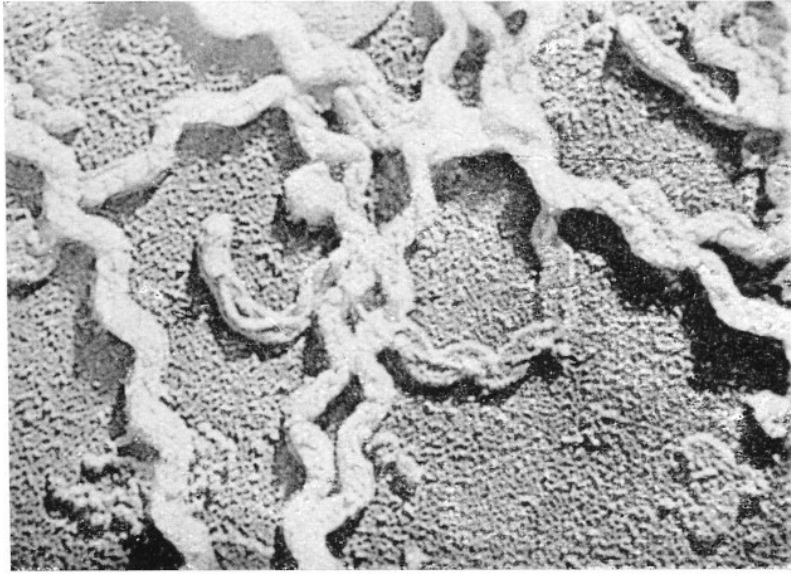


FIG. 5.



FIG. 6.

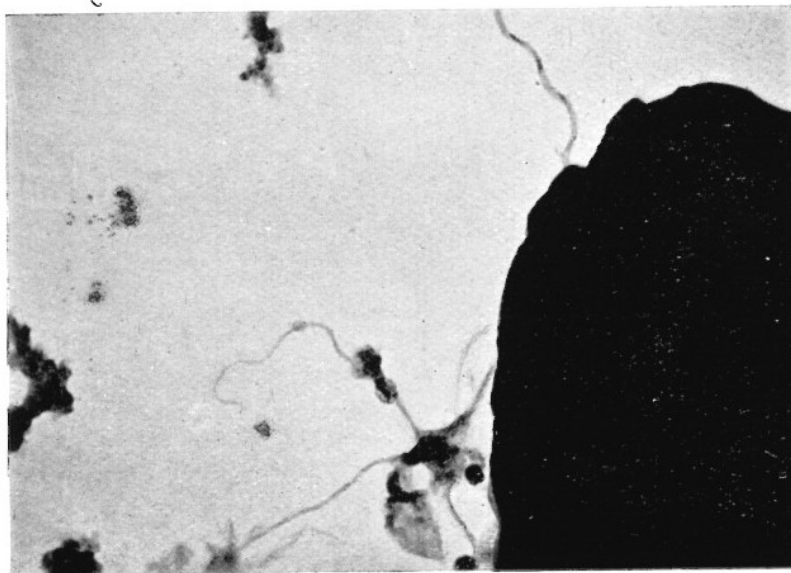


FIG. 7.

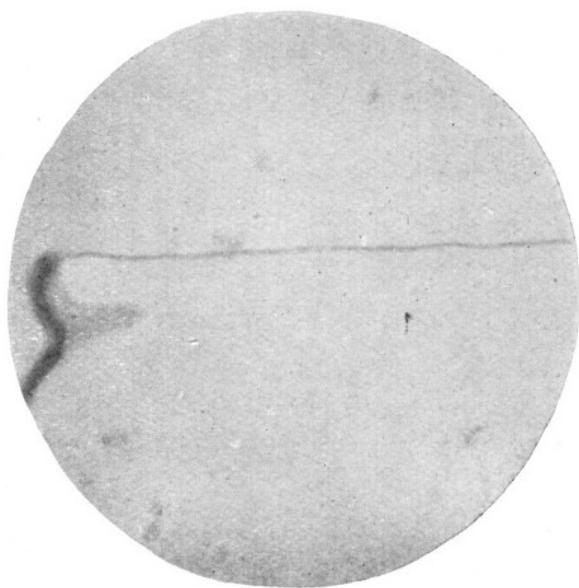


FIG. 8.

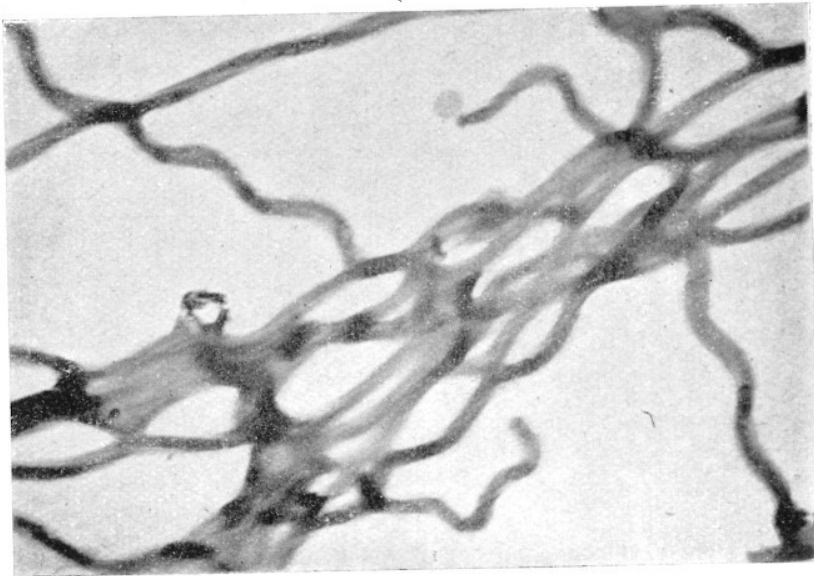


FIG. 9.

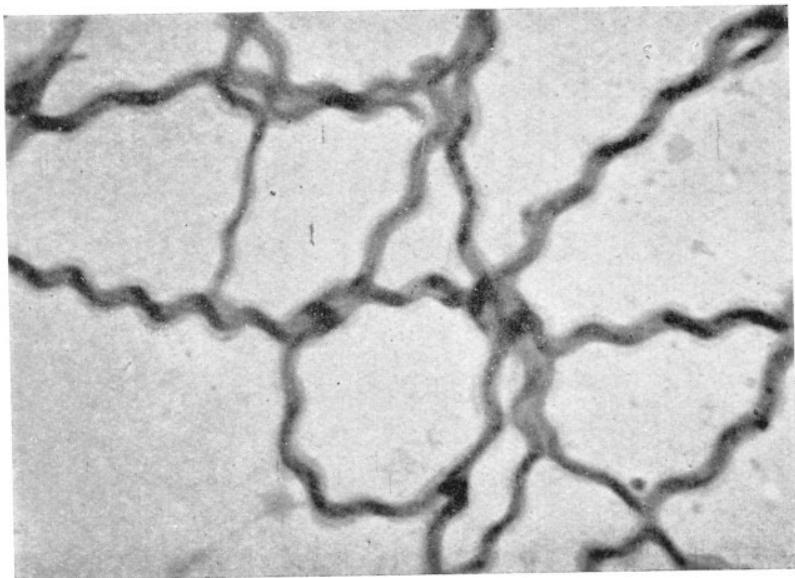


FIG. 10.

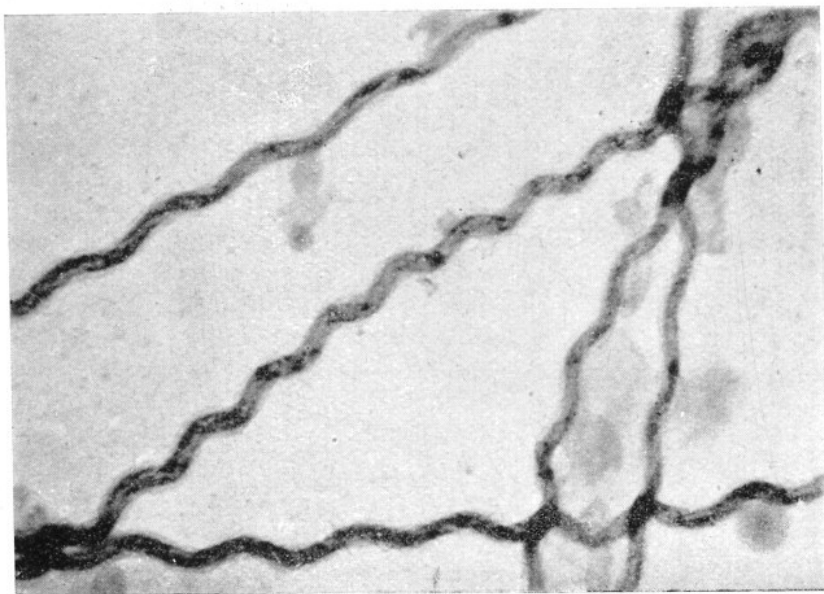


FIG. 11.

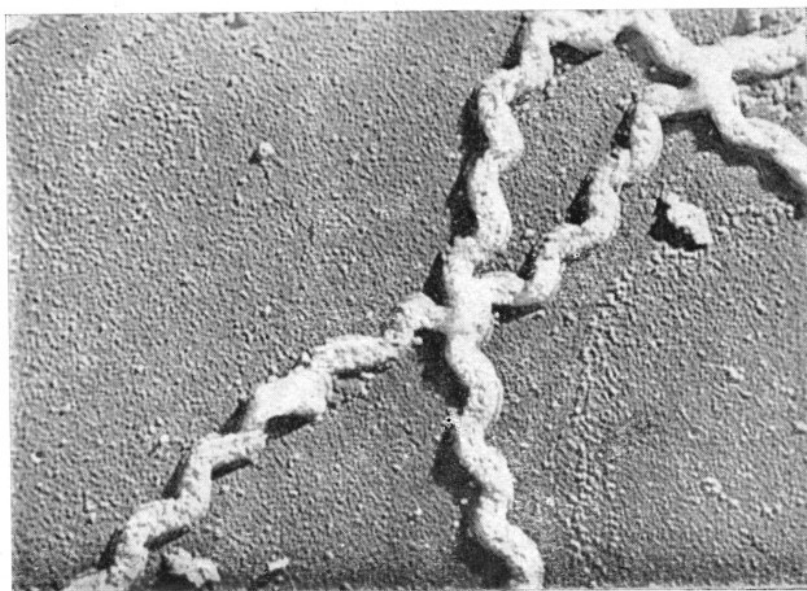


FIG. 12.

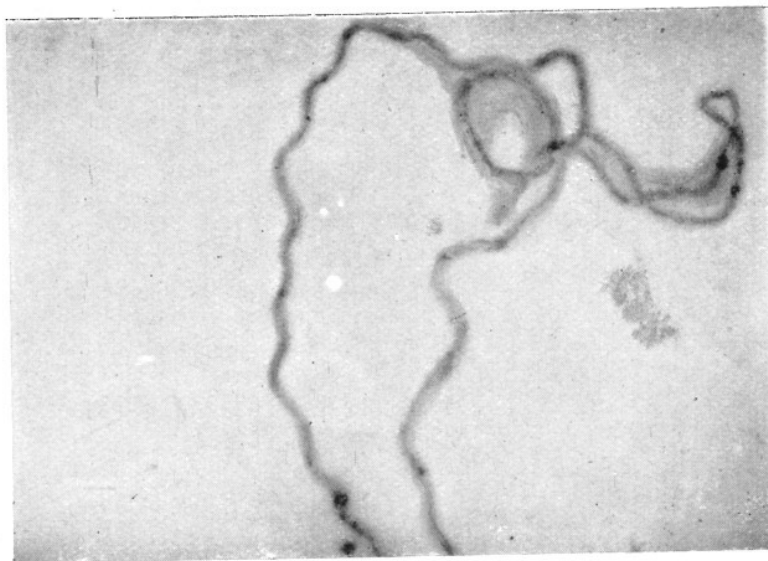


FIG. 13.

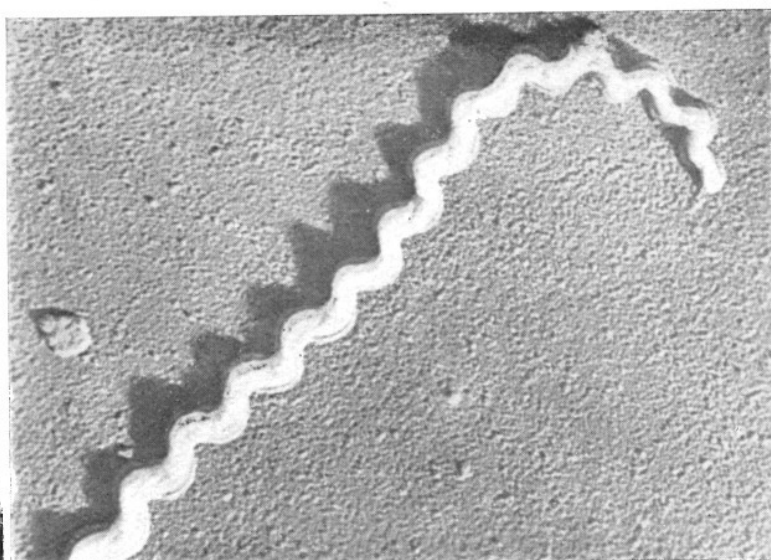


FIG. 14.

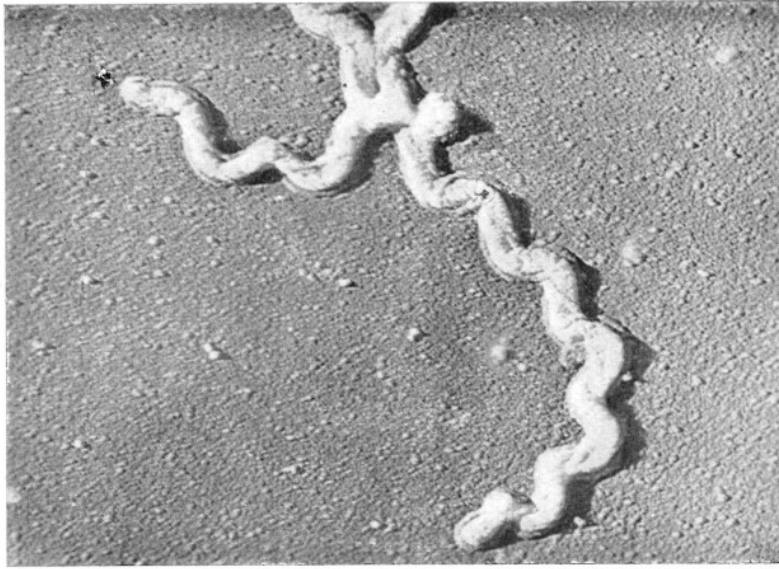


FIG. 15.

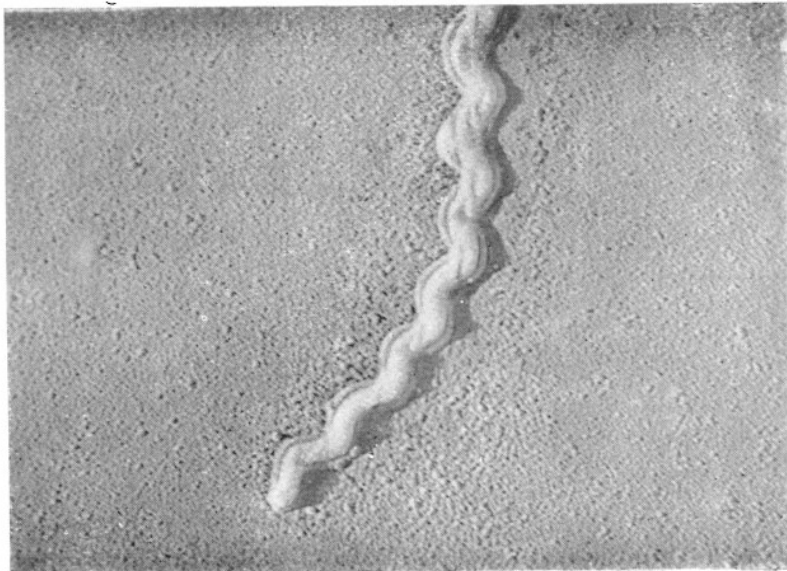


FIG. 16.

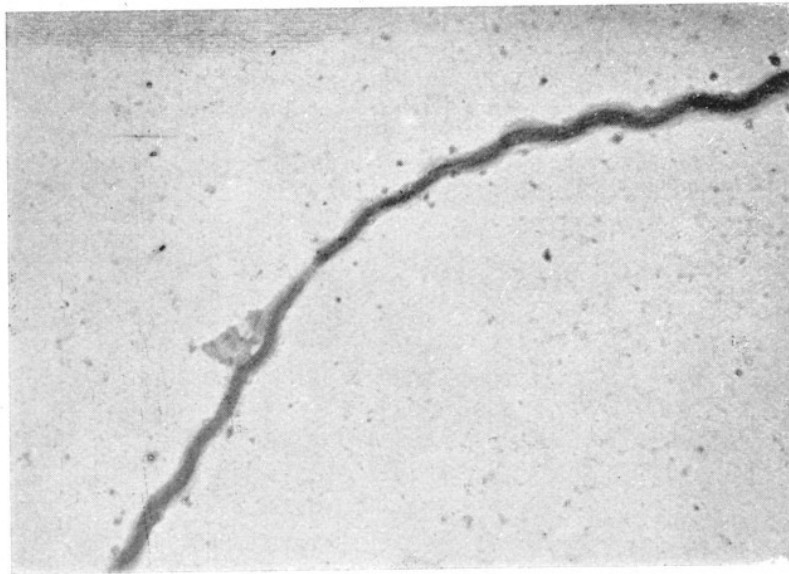


FIG. 17.

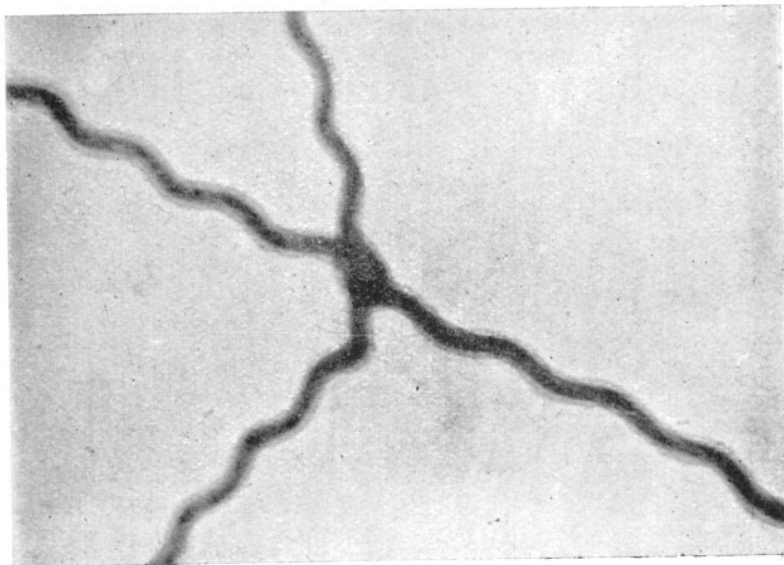


FIG. 18.

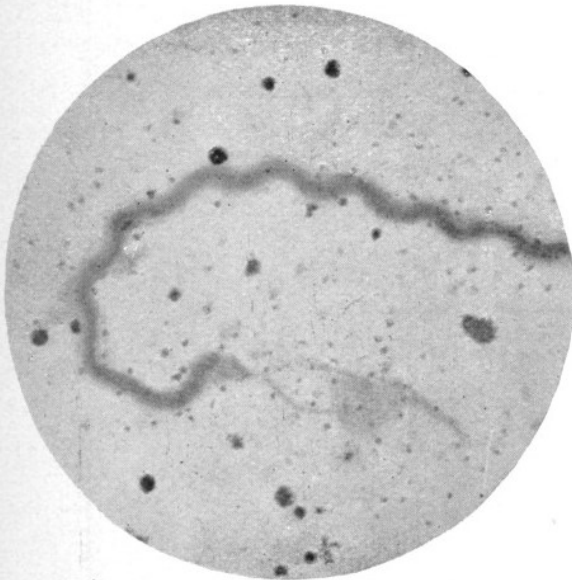


FIG. 19.

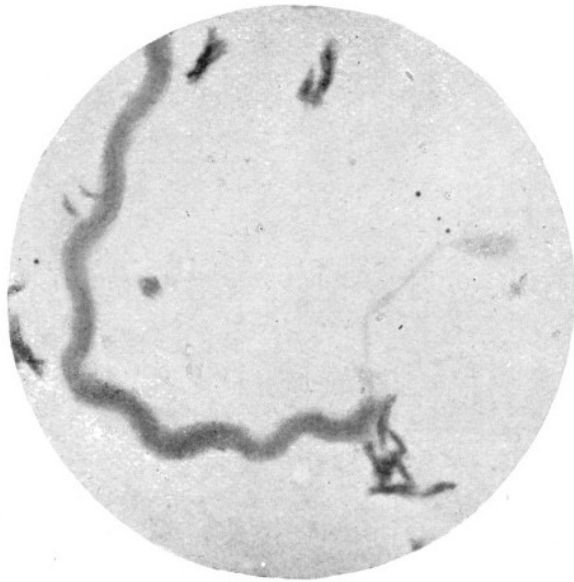


FIG. 20.

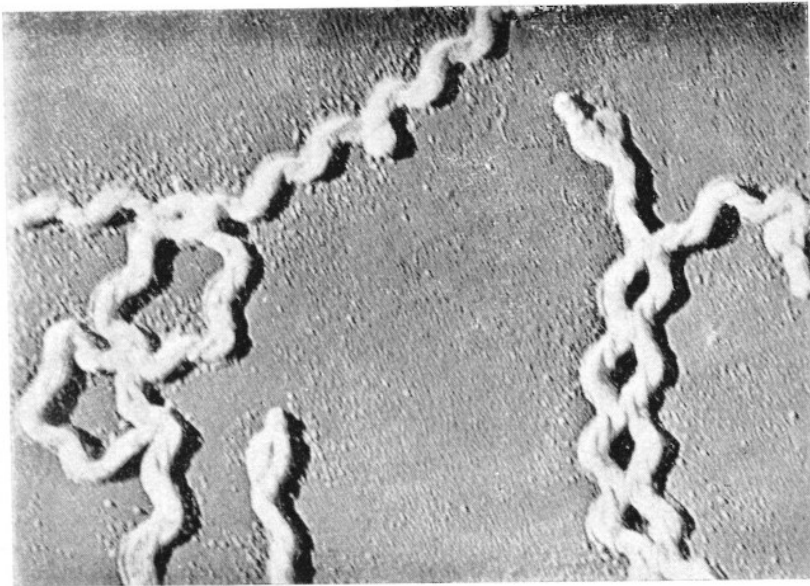


FIG. 21.

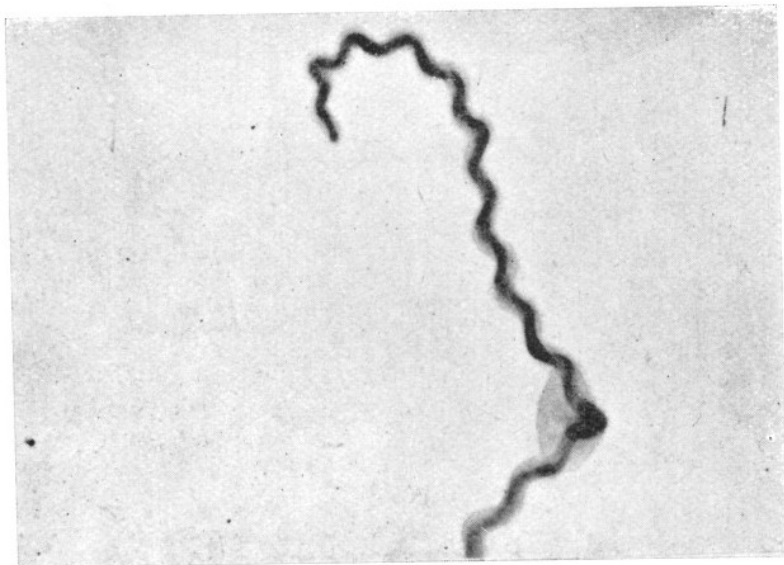


FIG. 22.

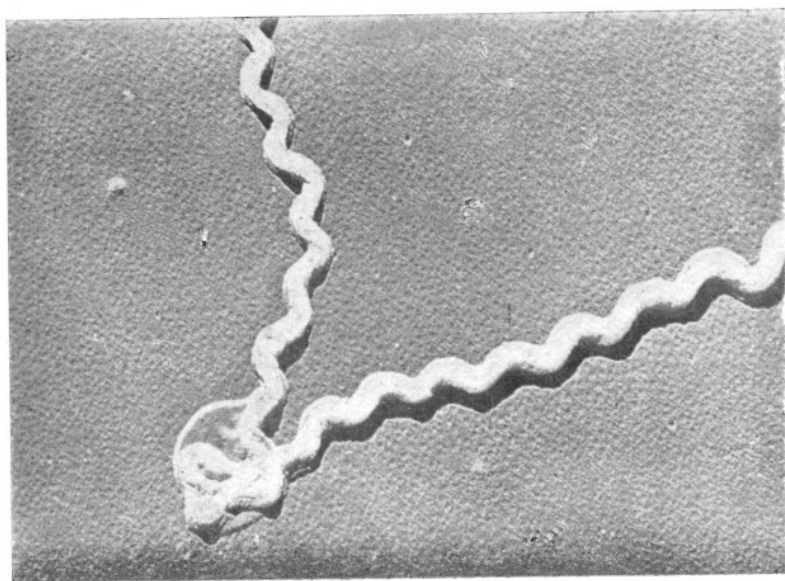


FIG. 23.

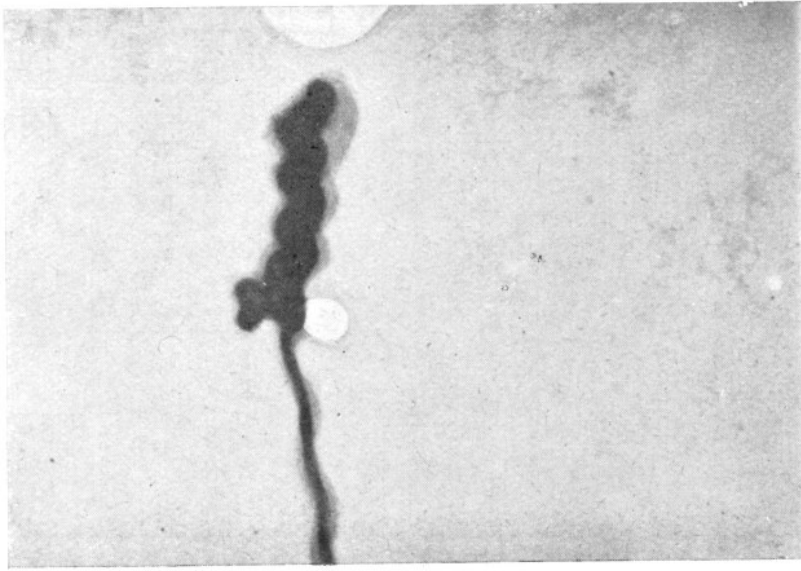


FIG. 24.

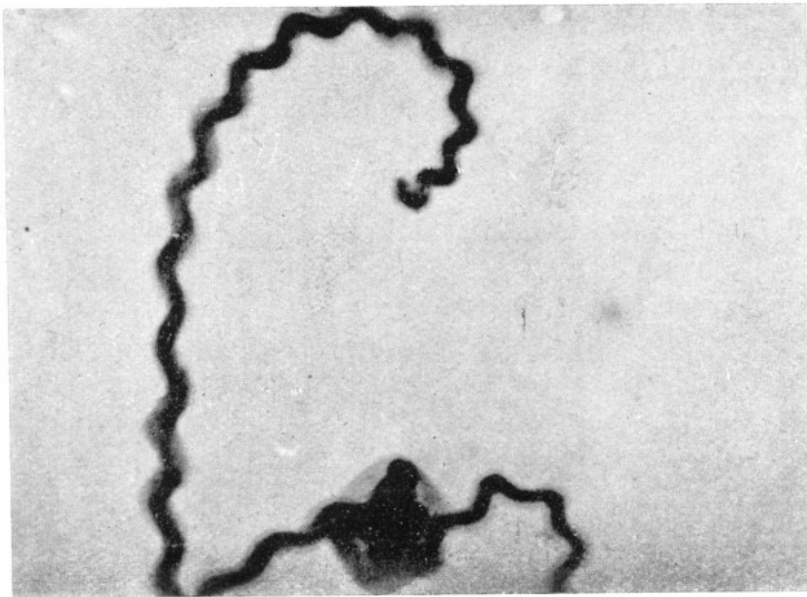


FIG. 25.

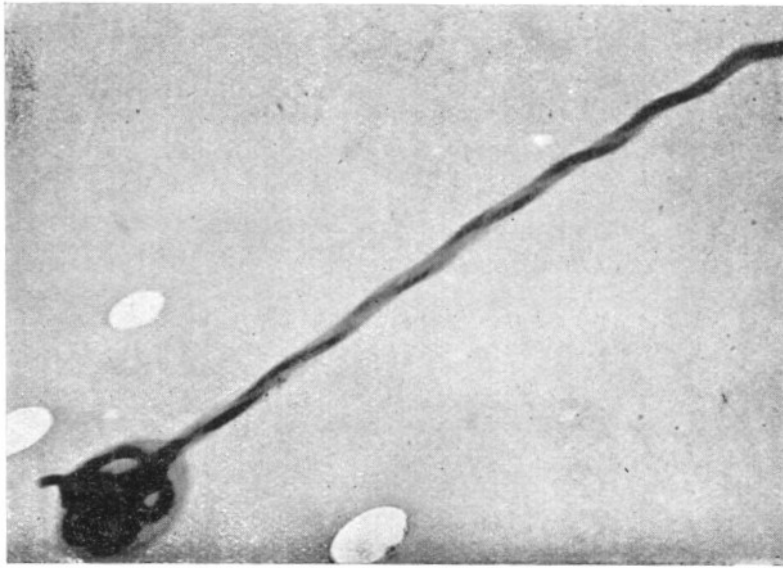


FIG. 26.

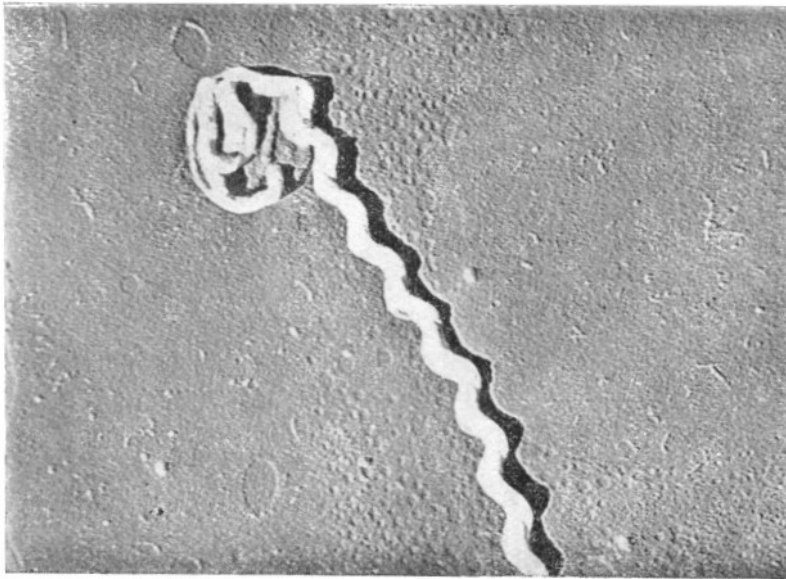


FIG. 27.

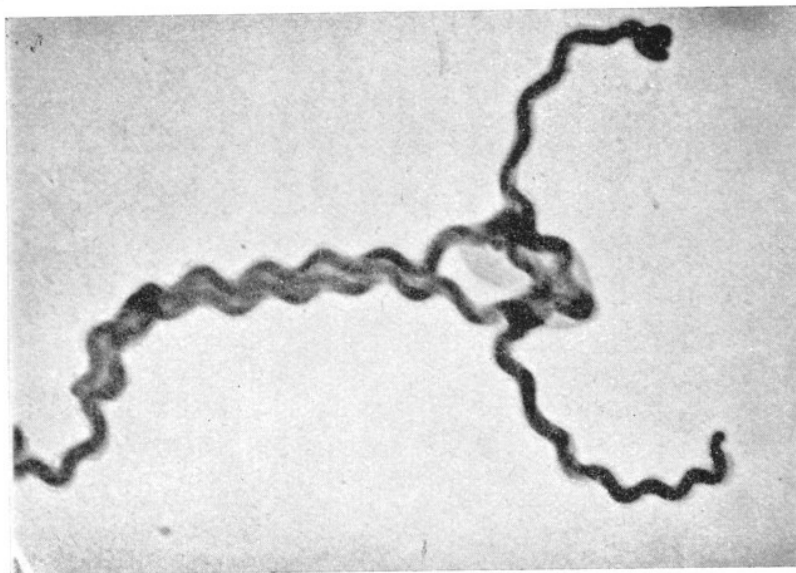


FIG. 28.

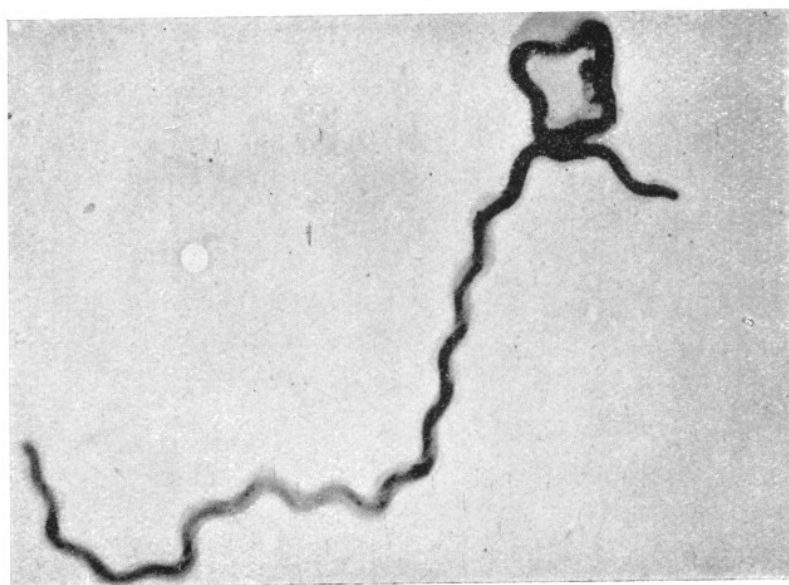


FIG. 29.

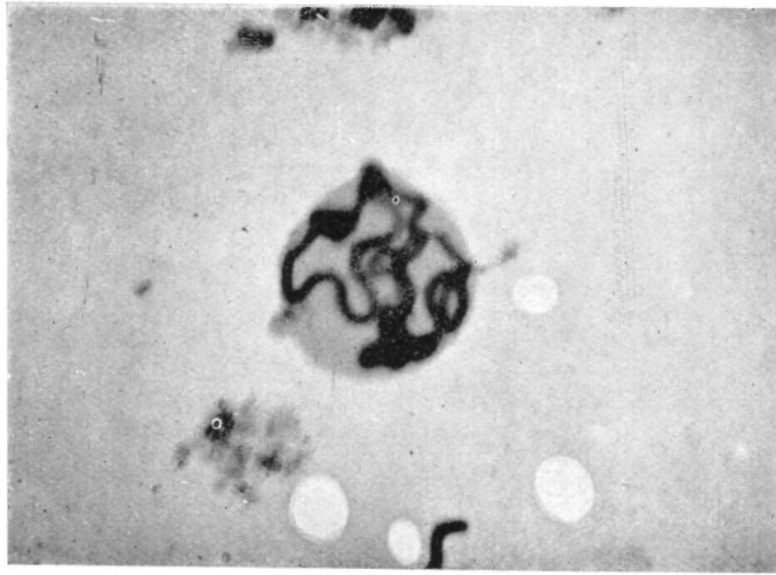


FIG. 30.

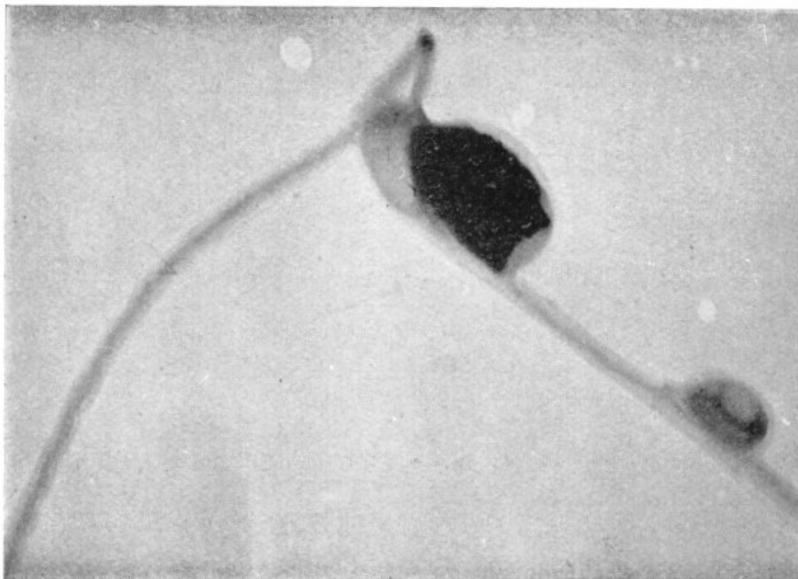


FIG. 31.

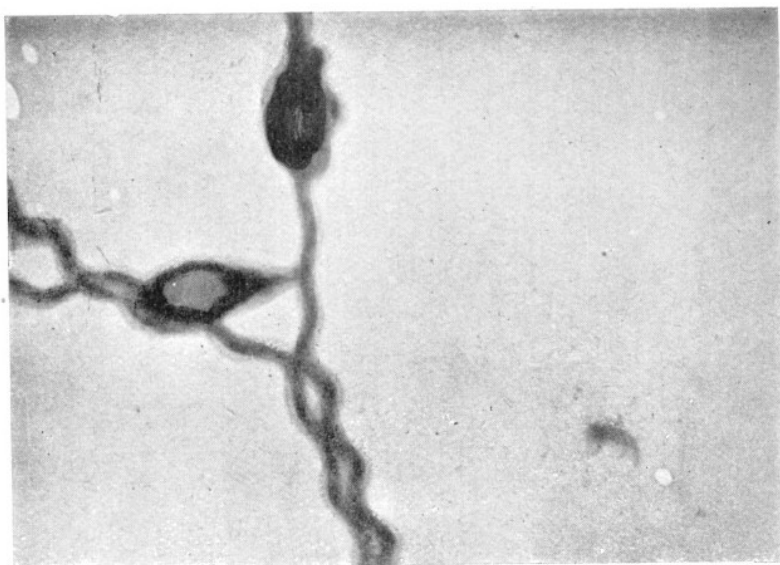


FIG. 32.

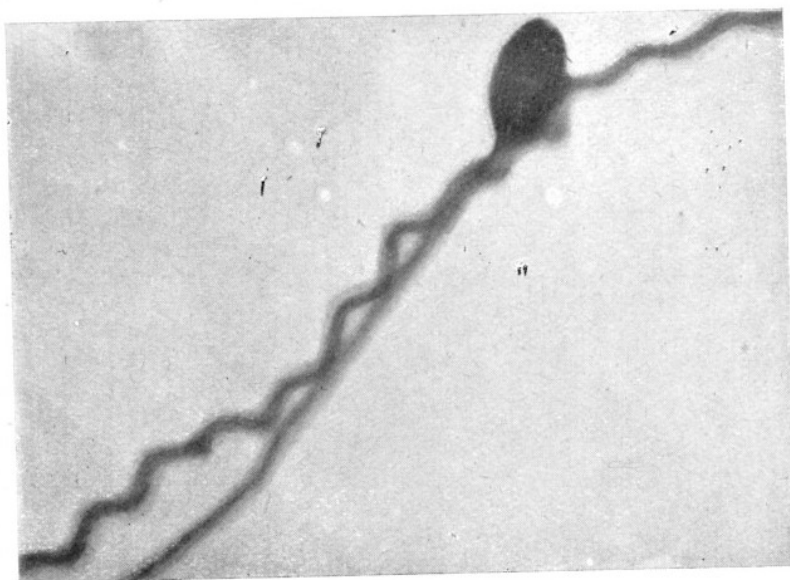


FIG. 33

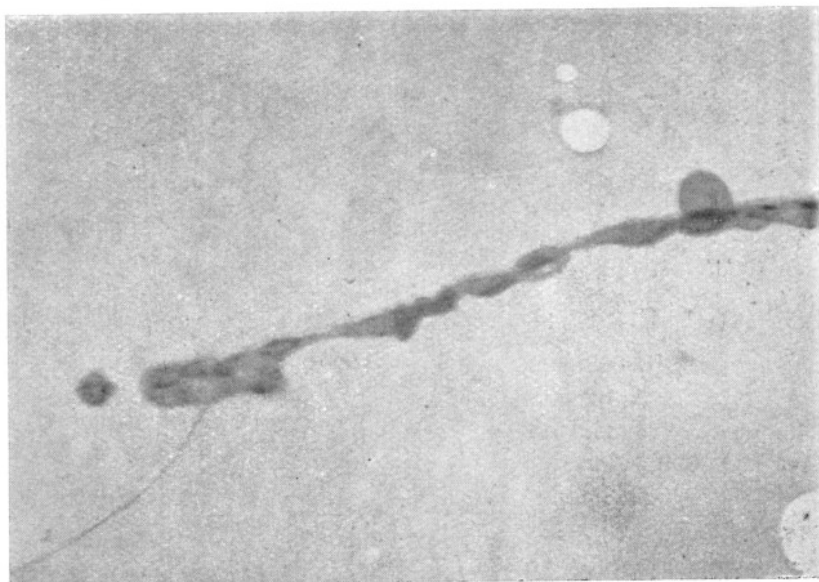


FIG. 34.

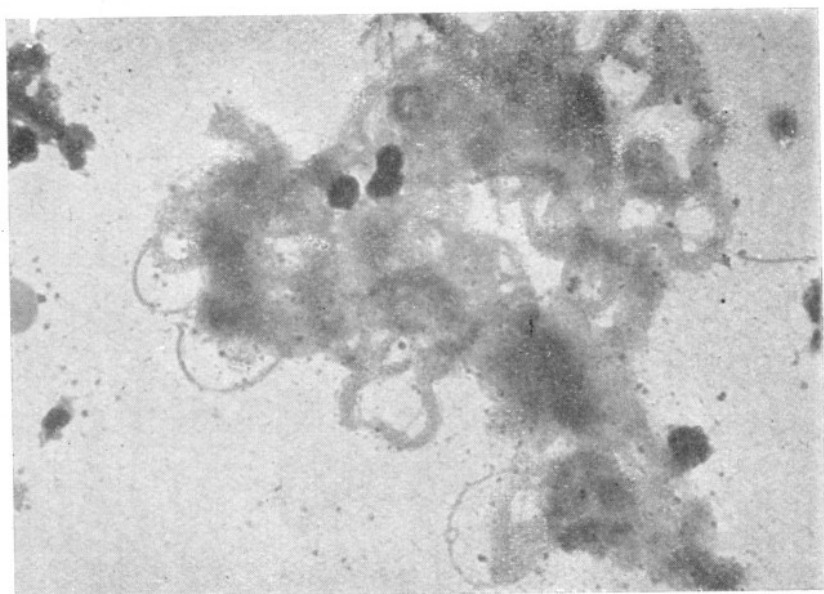


FIG. 35.

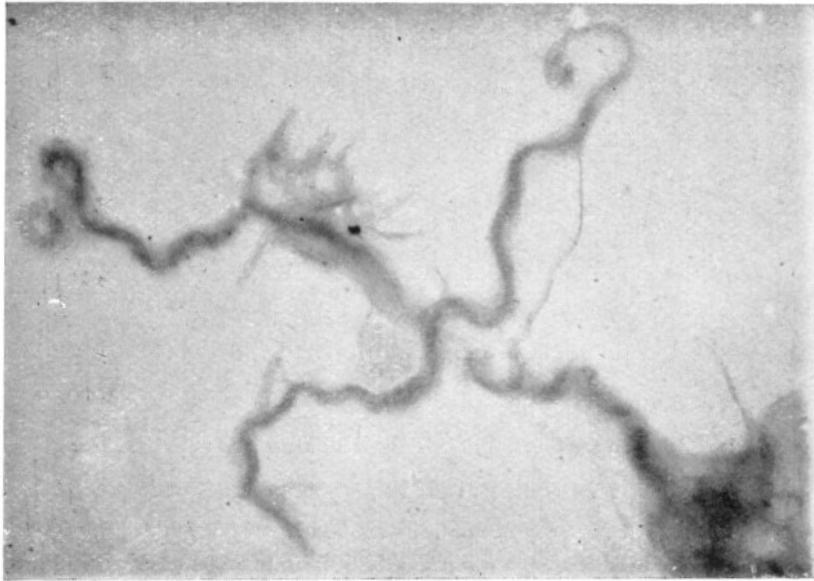


FIG. 36.

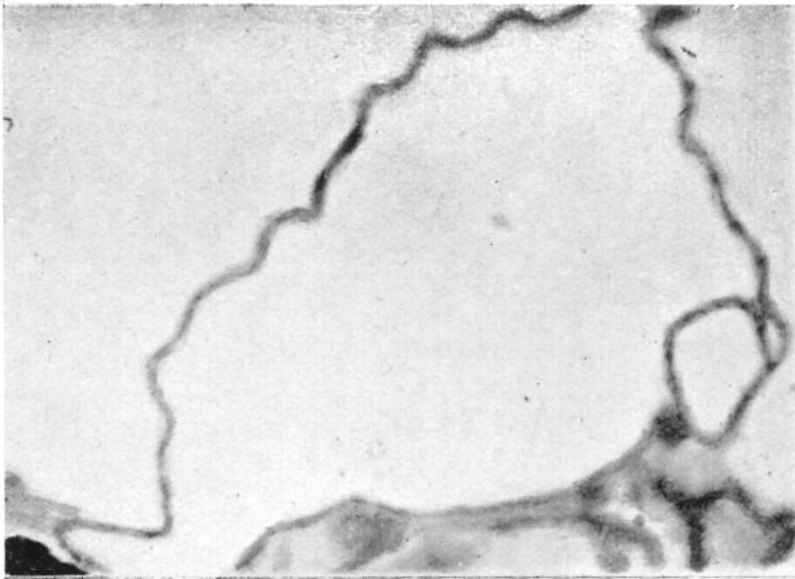


FIG. 37.

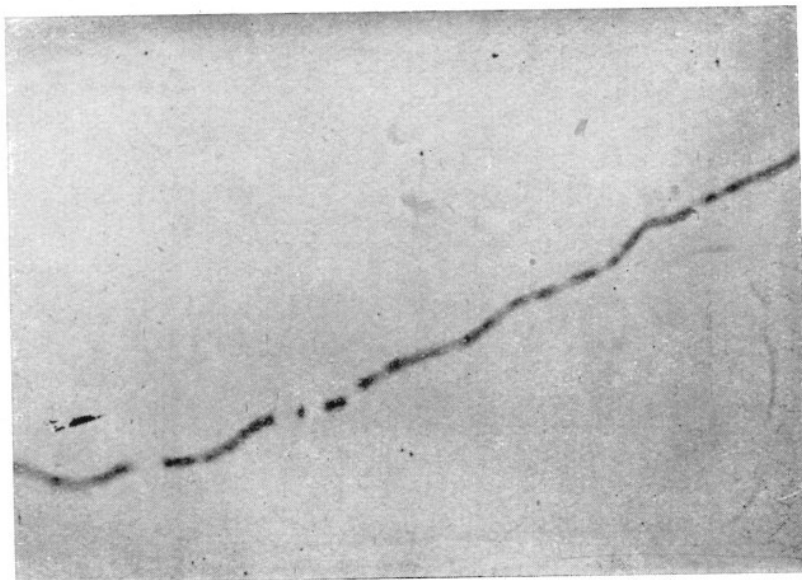


FIG. 38.

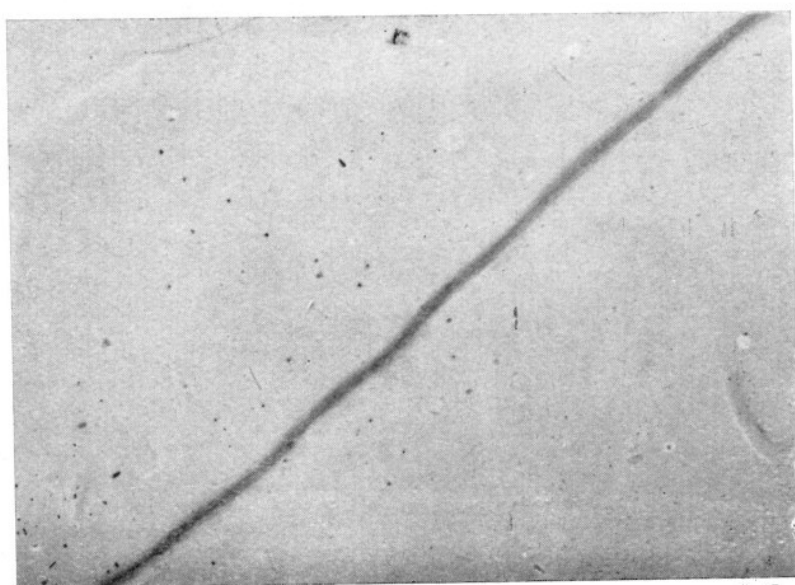


FIG. 39.

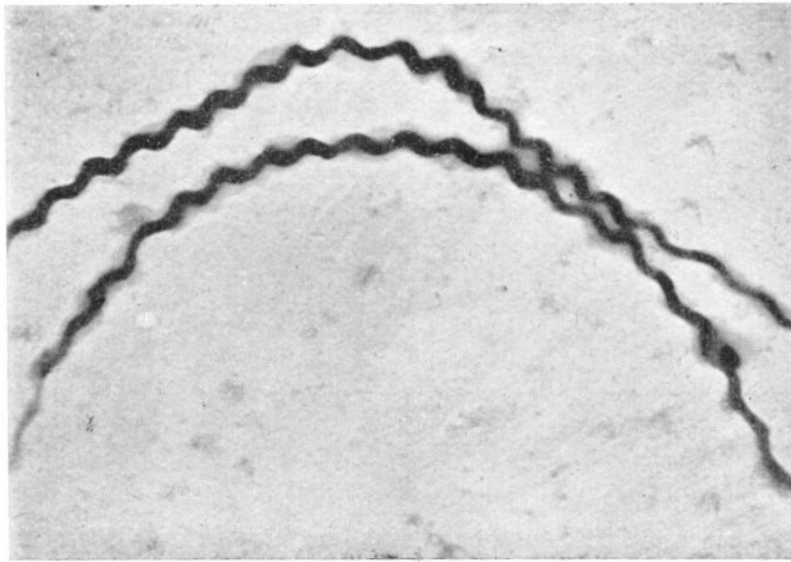


FIG. 40.

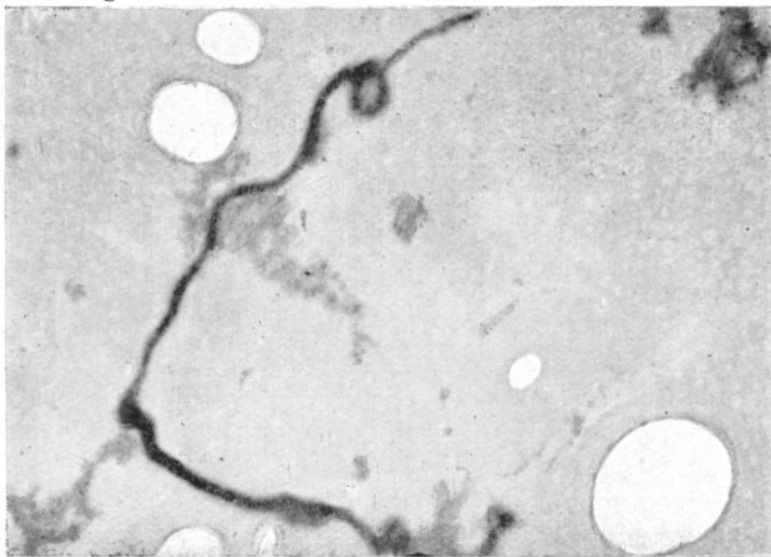


FIG. 41

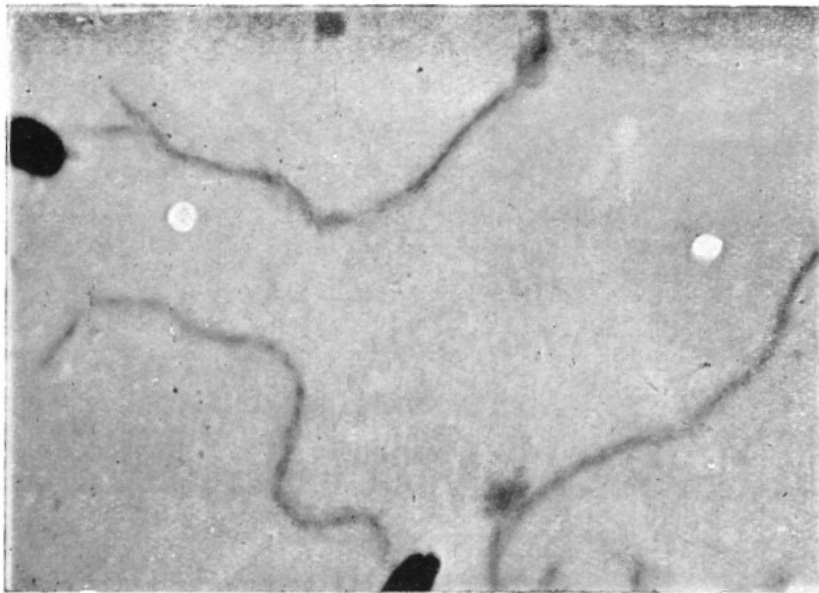


FIG. 42.

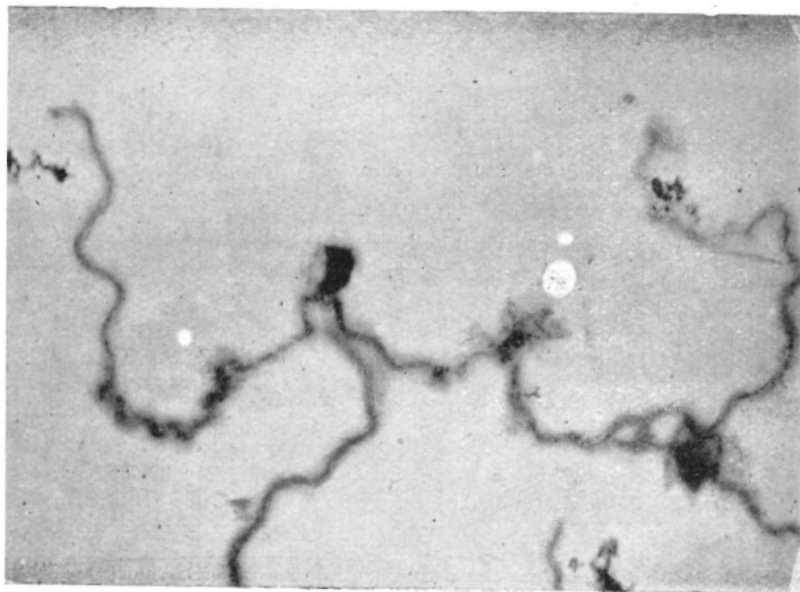


FIG 43.

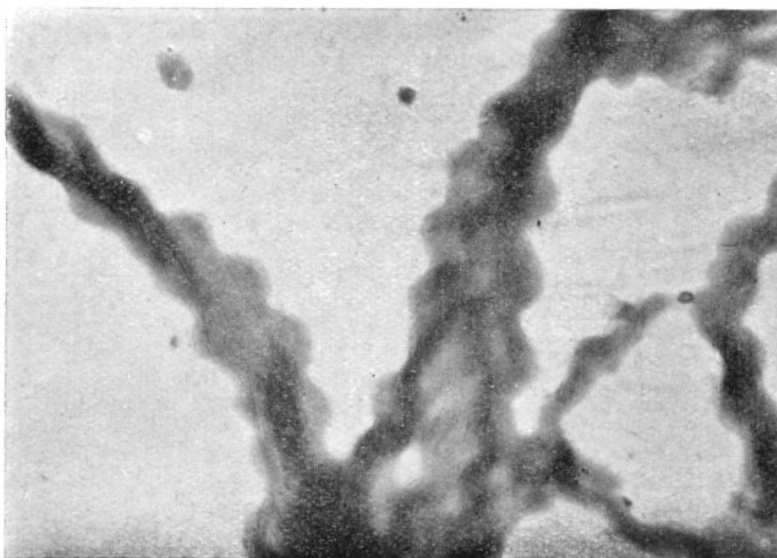


FIG. 44.

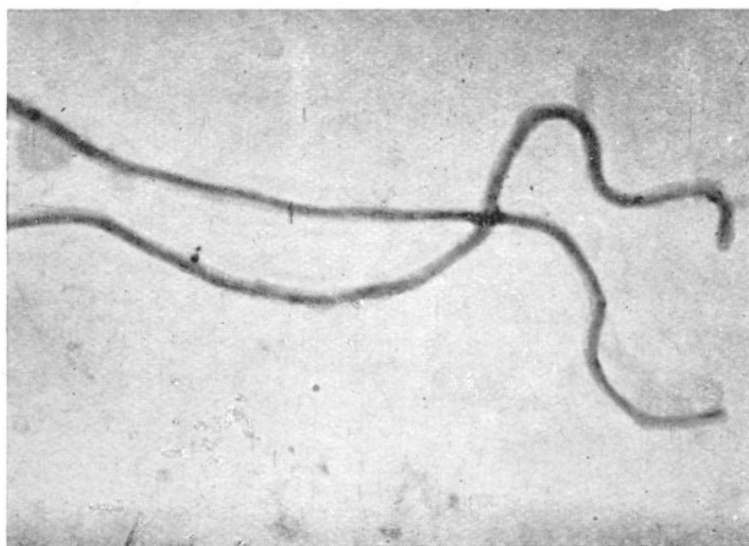


FIG. 45.

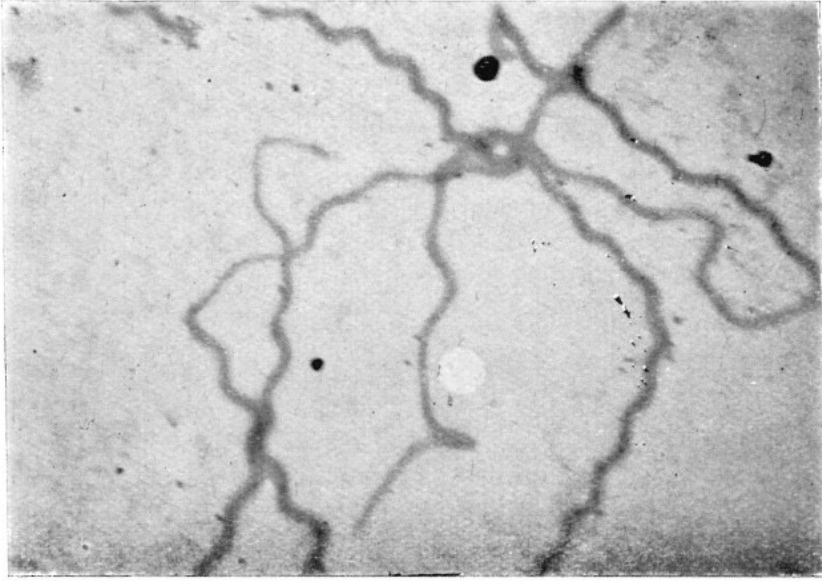


FIG. 46.



FIG. 47.

ondulante, e che essa è rivestita da una membrana avvolgente molto sottile ed estremamente delicata.

Flagelli - Cilia - Sferule. — Parecchi AA. hanno descritto nelle leptospire trattate con soluzioni argentiche, sottili cilia o filamenti terminali alle volte collegati con piccole sferule. (Fantham, Pettit, Martin, Vaudremer, ecc.). Queste formazioni non sono però mai state viste in leptospire viventi, osservate al paraboloide, e quindi ci sono giustificati dubbi sulla loro reale esistenza.

Nelle leptospire fissate con acido osmico non ho mai osservato formazioni del genere; invece ne ho notati in leptospire fissate con formolo. Si tratta di esili filamenti terminali che molto spesso portano ad una certa distanza dalla loro estremità, una sferula regolarmente rotonda e molto diafana (fig. 19, 20). Essi corrispondono certamente a quanto si osserva in alcuni preparati impregnati con sali argenticci.

E' difficile pronunziarsi sul loro significato. La sferula, per la mancanza di una struttura interna, per la sua scarsissima densità, non può essere considerata una spora o comunque una forma vitale proveniente dalle leptospire. Per la sua rarità, per la sua mancanza in leptospire fissate con l'acido osmico, si deve pensare che non si tratti di un costituente normale della leptospira, ma che sia piuttosto un reperto eccezionale, collegato forse a fenomeni degenerativi.

Diversa è invece la natura del filamento notevolmente più opaco, che ho osservato una volta in una leptospira trattata con siero specifico (fig. 8). E' logico supporre che qui si tratti dell'assistile divenuto libero in seguito alla distruzione di parte del protoplasma spirochetico.

Granuli. — Nelle spirochete non alterate, osservate in condizioni normali, non ho mai visto formazioni che possano riferirsi ai granuli descritti da vari AA. e considerati talvolta come possibili forme di sviluppo.

Ho visto invece ripetutamente formazioni riferibili a queste osservazioni in leptospire sospese, prima di essere fissate, in soluzioni sature di cloruro sodico, o comunque in soluzioni ipertoniche.

Descrivo qui l'aspetto e la evoluzione del fenomeno seguito con prelevamenti successivi di materiale da una sospensione di spirochete così trattate.

Dopo neanche 30'' molte leptospire presentano già, per lo più nell'immediata prossimità di una estremità, più raramente a distanza da questa, un piccolo rigonfiamento (fig. 21). Questo è quasi sempre unico; più di rado se ne formano due nella medesima leptospira. Il rigonfiamento appare costituito dalla sola membrana e in sua corrispondenza il protoplasma non presenta alterazioni.

Successivamente il rigonfiamento aumenta sempre più e in sua corrispondenza il corpo spirochetico manifesta una brusca flessione ad angolo acuto (fig. 22, 23). In seguito si direbbe che il protoplasma venga come assorbito nella bolla così formatasi, e s'arrotola su sé stesso, formando un groviglio, senza apparire però nè più ristretto, nè più ingrossato (fig. 24, 25).

Qualora il rigonfiamento si sia manifestato in prossimità di un'estremità, questa viene rapidamente inglobata in esso (figg. 26, 27).

La bolla aumenta ancora fino a raggiungere un diametro di 0,9-1 μ e anche più (figg. 28, 29). Nei casi estremi essa si trasforma in una grande sfera che contiene in sé ripiegato e aggrovigliato, l'intero corpo spirochetico (fig. 30).

Le pareti della bolla sembrano essere costituite dalla membrana di rivestimento della spirocheta, che dovrebbe perciò essere straordinariamente elastica. Essa non mostra alcuna alterazione, nè soluzione di continuo. Alle volte veramente si possono seguire sopra la bolla i contorni della membrana che accompagna la spirocheta, tanto che si potrebbe pensare che la bolla fosse una formazione estranea a questa (fig. 25). Bisogna invece ritenere che con ogni probabilità questi aspetti siano dovuti alla circostanza che alle volte il corpo spirochetico, circondato dalla sua membrana, riposa sopra o sotto la bolla, prima di penetrare in essa.

Che la bolla sia costituita veramente dalla membrana rigonfiata risulta in maniera molto chiara dalla osservazione di alcune fotografie, dove la continuità tra membrana della bolla e membrana avvolgente è evidentissima (fig. 23).

Il meccanismo di formazione di queste bolle, che compaiono in molte, ma non in tutte le leptospire della cultura così trattata, è molto difficilmente spiegabile. Sarebbe più facile darne una spiegazione se si verifi-

casce in soluzioni ipotoniche e non in ipertoniche. L'unica cosa che si può dire è che si tratta certamente di un processo degenerativo, che si manifesta in spirochete ormai uccise.

Può darsi che alterazioni di questo genere si manifestino anche in condizioni diverse da quella dell'azione di una soluzione ipertonica, e diano luogo agli aspetti granulari e globosi descritti da alcuni AA.

In un primo tempo avevo pensato che a fenomeni di questo genere si dovessero riportare le immagini descritte da Jakob, ma quando questo ultimo A. m'ha cortesemente inviato la cultura che era servita alle sue osservazioni, ha visto che si trattava di tutt'altra cosa. Le formazioni ovalari o a seme di limone, libere o alla estremità di un lungo filamento libero, non hanno evidentemente nulla a che fare con le leptospire. Si tratta di formazioni spesso omogenee e intensamente opache e di filamenti di opacità diversa da quella delle leptospire, in cui è possibile vedere una zona centrale più scura, contornata da una zona più chiara, d'aspetto però ben diverso da quanto s'osserva nelle leptospire. Mancano spire e assistile figg. 31, 32, 33). La diversità risulta ben evidente là dove nella stessa fotografia s'incontra una leptospira accanto ad una di tali formazioni.

E' difficile dire quale sia la natura di questo microorganismo; è però probabile che si tratti di un micete.

ASPETTI MORFOLOGICI COLLEGATI AL CICLO VITALE DELLE LEPTOSPIRE

A parte la maggiore lunghezza, nessuna evidente differenza morfologica è dimostrabile fra leptospire provenienti da culture recenti o da culture vecchie, ma ancora abbondanti, e in genere nelle leptospire non è possibile rilevare modificazioni morfologiche che si possano riferire a successivi stadi vitali del parassita. Quando però nelle vecchie culture le leptospire incominciano ad andare incontro a fenomeni di autolisi, possiamo notare alcuni aspetti particolari. In primo luogo alle volte il protoplasma si fa più diafano ed assume un aspetto quasi reticolare (fig. 11), che nei preparati « ombrati » dà una impressione quasi di corrosione del corpo spirochetico (fig. 12). In rare spirochete si osservano anche alcuni granuli opachi, distribuiti con una certa regolarità lungo il protoplasma

(fig. 13). Più avanti la leptospira va incontro a fenomeni di lisi alle volte molto spinti (fig. 34). In questi casi si possono osservare con l'« ombra-tura » aspetti molto interessanti: in qualche tratto si conserva solo la membrana spirochetica, che mostra nel suo interno un sottile filamento serpeggiante: l'assistile (fig. 5 e 6).

In vecchie culture quasi completamente lisate, troviamo accanto ad informi masse in disfacimento, qualche spirocheta brevissima o gomitoli di spirochete alterate, svuotate e molto sottili. Frammisti a questi si osservano sottili e lunghi filamenti ondulati, che molto probabilmente non sono altro che assistili fattisi liberi (fig. 35).

Non si vedono mai nelle vecchie culture, granuli od altre formazioni che possano far pensare a forme di resistenza di spirochete.

MORFOLOGIA DELLE LEPTOSPIRE SOTTOPOSTE A VARIE AZIONI FISICHE E CHIMICHE

Ho sottoposto le leptospire a varie azioni fisiche e chimiche per studiare le alterazioni che queste producono nella loro morfologia. Di queste ho in parte già detto precedentemente. Qui riassumo e completo i risultati.

Azione di soluzioni ipertoniche. — Di questo e della formazione di globi ho già ampiamente detto più sopra.

Azione di soluzioni ipotoniche. — Il mantenimento di leptospire, anche per 24 ore, in acqua distillata, non provoca alterazioni visibili della loro morfologia. Se però l'azione dell'acqua distillata si prolunga per molti giorni, le spirochete vanno incontro a profonde alterazioni ed in fine ad un disfacimento completo (fig. 36).

Azione del calore. — Le leptospire portate per alcuni minuti a 65°, perdono la loro vitalità e mostrano contemporaneamente profonde alterazioni della loro struttura. Non sono più visibili nè membrana, nè assistile, le spire sono rilassate e irregolari, il protoplasma appare irregolarmente opaco, ristretto in alcuni tratti, rigonfiato in altri: in preda comunque ad evidenti fatti di plasmolisi (fig. 37).

Azione del freddo. — Contrariamente a molti altri germi, le leptospire non sono molto resistenti alle basse temperature. Se si tengono queste

spirochete per 24 ore a 0° in acqua distillata, senza però arrivare al congelamento della sospensione, si osservano nella maggior parte di esse profonde alterazioni, consistenti nella perdita delle spire, nella diafanizzazione e frammentazione del protoplasma che in certi tratti appare costituito da una serie di granuli o di blocchetti plasmatici, apparentemente privi di un comune legame (fig. 38). La membrana non è più visibile. Nell'interno del protoplasma è invece talvolta visibile un esilissimo filamento leggermente più opaco, che evidentemente corrisponde all'assistile (fig. 39).

Azione di soluzioni alcaline. — Gli alcali forti (potassa caustica al 20%) distruggono rapidamente le leptospire, trasformandole in ammassi di detriti informi.

Azione di soluzioni acide. — L'aggiunta al terreno di cultura di una dose letale di acido acetico, determina nelle leptospire la comparsa di una certa rigidità.

Le spire sono conservate, se pure di solito ridotte nella loro ampiezza. L'intera spirocheta tende però ad assumere una posizione rettilinea o lievemente incurvata (fig. 40); soltanto le estremità hanno una certa tendenza ad arrotolarsi su se stesse. Il protoplasma è intensamente opaco e il suo diametro trasverso è spesso ridotto. Non sono visibili nè membrana nè assistile.

Azione della pepsina. — La digestione peptica porta ad una rapida distruzione della spirocheta. Il suo protoplasma si assottiglia, alle volte in maniera irregolare e si diafanizza (fig. 41), finchè le leptospire arrivano ad una plasmolisi completa (fig. 42). Nel sedimento di culture così trattate si trovano alle volte esili e lunghi filamenti ondulati, che forse corrispondono ad assistili non intaccati dai fermenti. E' noto infatti che la digestione triptica rispetta gli assistili di *Spirochaeta plicatilis*.

Azione della papaina. — La papaina esercita sulle leptospire una azione simile a quella esercitata dalla pepsina. Anche qui arriviamo alla loro lisi totale, sia pure con un certo ritardo rispetto al tempo impiegato dalla pepsina.

Azione del taurocolato di sodio. — Una soluzione di taurocolato di sodio al 10% porta pure a distruzione le leptospire, attraverso a successive

fasi di scomparsa della membrana, di perdita delle spire, assottigliamento e diafanizzazione del protoplasma.

Azione della saponina. — Si ritiene generalmente che la saponina in diluizione al 10% non alteri minimamente la morfologia delle leptospire. Se ciò è vero per l'osservazione al microscopio ottico, non lo è altrettanto per quella al microscopio elettronico. Prolungando il contatto con la soluzione si osservano accanto a parecchie spirochete con morfologia pressochè normale, altre profondamente alterate. Le alterazioni consistono essenzialmente nella perdita più o meno completa delle spire, nell'assottigliamento del protoplasma e nel dissolvimento di questo. Alle volte nella stessa spirocheta ad un tratto profondamente degenerato fa seguito uno ancora discretamente integro (fig. 43). In tutte le leptospire così alterate non è visibile la membrana, mentre l'assistile sembra persistere.

Azione della penicillina. — La penicillina in dose battericida (circa 0,1 U. O. per cm³) porta ad una dissoluzione rapida e pressochè completa della leptospira. Leptospire trattate con dosi subinibenti di antibiotico, non danno luogo a forme giganti o a forme mostruose.

Azione del siero antileptospira. — Leptospire messe a contatto per breve tempo col siero antileptospira specifico, mostrano tendenza ad agglutinare. L'agglutinazione avviene per giustapposizione longitudinale dei corpi spirochetici che tendono a formare fasci più o meno grossi (fig. 44). I corpi spirochetici appaiono notevolmente ingrossati, come per imbibizione di liquido. La membrana resta bene evidente. Prolungando l'azione del siero, si va incontro alla lisi e alla distruzione completa delle spirochete.

EFFETTO DEI VARI METODI DI FISSAZIONE SULLA MORFOLOGIA DELLE LEPTOSPIRE

La descrizione che ho fin qui dato della morfologia delle leptospire si basa sui preparati fissati con l'acido osmico. Ho già accennato, al principio di questo lavoro, alla grande importanza che ha l'accurata fissazione delle leptospire per mantenere integra la loro fine struttura. Alcuni AA. che hanno studiato spirochete al microscopio elettronico hanno trascurato

tale precauzione, ed hanno di conseguenza ottenuto risultati assai poco precisi.

Già una insufficiente fissazione con una diluizione troppo spinta di acido osmico, porta ad alcune alterazioni della morfologia spirochetica, come risulta con molta evidenza dalla fig. 9. In primo luogo le spire si fanno più lente e più rare, il corpo spirochetico tende a distendersi. Inoltre la membrana si rende meno evidente e l'assistile simula alle volte in maniera suggestiva, la presenza di una « crista ».

Se la fissazione è mancata del tutto e le leptospire sono state essicate, traendole direttamente dall'acqua distillata, allora la morfologia risulta più profondamente interessata. Le leptospire appaiono come organismi stretti e lunghi, nastriformi, ondulati, senza membrana visibile, nè assistile. Soltanto le estremità conservano la loro caratteristica forma ad uncino (fig. 45).

Fissate con alcool assoluto, le leptospire appaiono pure notevolmente deformate. Le spire sono più lente, la membrana non è visibile e soprattutto il corpo appare fortemente assottigliato e diafanizzato (fig. 46). Minori sono le alterazioni date dal formolo, che lascia integro lo spessore e l'opacità del protoplasma. Però anche qui le spire si allentano notevolmente e la membrana non è più visibile o lo è solo molto indistintamente (fig. 8, 13, 19). Alle volte si nota una certa tendenza all'arrotolamento nelle estremità spirochetiche (fig. 47).

Fissate con Bouin le leptospire hanno un aspetto simile a quelle fissate con l'alcool, per quanto il protoplasma appaia in genere meno assottigliato. Anche la sua opacità è maggiore. Questo mezzo di fissazione ha inoltre l'inconveniente di provocare la comparsa di precipitati che è molto difficile allontanare dalle spirochete.

Gli stessi inconvenienti e gli stessi aspetti si hanno nelle spirochete fissate con il liquido di Zenker.

In conclusione si può affermare che l'acido osmico dà risultati senza paragone superiori a quelli dati dagli altri comuni liquidi di fissazione, e deve perciò essere considerato come il fissatore di scelta in queste delicate osservazioni.

CONCLUSIONI

Lo studio morfologico del genere *Leptospira* al microscopio elettronico permette di constatare la presenza di particolarità strutturali, quali la membrana e l'assistile, altrimenti assolutamente invisibili, e dà con ciò gli elementi necessari ad una esatta sistematica del genere. E' indispensabile però che l'osservazione al microscopio elettronico s'estenda ad altre specie di spirochete e ne determini esattamente le caratteristiche morfologiche, prima che una nuova sistematica di questo gruppo travagliato possa essere elaborata.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.
20 luglio 1948.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

1. *L. canicola*, fissazione con acido osmico.
2. *L. acquicola*, fissazione con acido osmico, ombratura.
3. *L. ictero-haemorrh.* fissazione con acido osmico, ombratura.
4. *L. pomonae*, fissazione con acido osmico, ombratura.
5. *L. acquicola*, fissazione con acido osmico, ombratura, autolisi parziale del protoplasma.
6. *L. acquicola*, fissazione con acido osmico, ombratura, autolisi parziale del protoplasma.
7. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico, vecchia cultura. Assistili (?) liberi.
8. *L. pomonae*, fissazione con formalina, da vecchia cultura. Pseudoflagello: assistile libero (?).
9. *L. acquicola*, fissazione con acido osmico. Assistili che simulano una membrana ondulante.
10. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico.
11. *L. acquicola*, fissazione con acido osmico. Protoplasma alterato.
12. *L. acquicola*, fissazione con acido osmico, ombratura. Protoplasma alterato.
13. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con formalina, da cultura di 120 giorni.
14. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico, ombratura.
15. *L. acquicola*, fissazione con acido osmico, ombratura.
16. *L. Fledermaus* 90 C, fissazione con acido osmico, ombratura.
17. *L. Fledermaus* 90 C, fissazione con acido osmico, ombratura. Forma in divisione.

18. *L. acquicola*, fissazione con acido osmico.
19. *L. bataviae*, fissazione con formalina, da vecchia cultura. Pseudocilio e sferula.
20. *L. bataviae*, fissazione con formalina, da vecchia cultura. Pseudocilio e sferula.
21. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico, ombratura, in soluzione di NaCl 1% per 1'.
22. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico, in soluzione di NaCl 1% per 30''.
23. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico, ombratura, in soluzione di NaCl 10% per 1'.
24. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico, in soluzione di NaCl 1% per un'ora.
25. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico, in soluzione di NaCl 1% per 10'.
26. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico, in soluzione di NaCl 10% per un'ora.
27. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico, ombratura, in soluzione di NaCl 10% per 10'.
28. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico, in soluzione di NaCl al 10% per 30''.
29. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico, in soluzione di NaCl al 10% per 1'.
30. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico, in soluzione di NaCl al 10% per 6 ore.
31. Miceti (?) in cultura di *L. canicola*, fissazione con acido osmico.
32. Miceti (?) accanto a *L. canicola*, fissazione con acido osmico.
33. Miceti (?) accanto a *L. canicola*, fissazione con acido osmico.
34. *L. acquicola*, fissazione con acido osmico. Vecchia cultura. Autolisi.
35. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico. Spirochete degenerate: assistili (?) liberi.
36. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico. Spirochete tenute per una settimana in acqua distillata. Plasmolisi.
37. *L. acquicola*, non fissata. Spirochete riscaldate a 65°.
38. *L. acquicola*, non fissata. Spirochete tenute per 24 ore in acqua distillata a 0°.
39. *L. acquicola*, non fissata. Spirochete tenute per 24 ore in acqua distillata a 0°.
40. *L. pomonae*, fissazione con acido osmico. Spirochete trattate con HCl diluito.
41. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico. Spirochete trattate con pepsina.
42. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico. Spirochete trattate con pepsina: Digestione completa.

43. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con acido osmico. Spirochete trattate con saponina.
44. *L. pomonae*, fissazione con acido osmico. Spirochete trattate per breve tempo con siero antileptospira.
45. *L. acquicola*, non fissata.
46. *L. ictero-haemorrh.*, fissazione con alcool etilico.
47. *L. acquicola*, fissazione con formalina.

Ingrandimento 18.000 $\times$ circa.
