

8. BRENNO BABUDIERI. — Studio sierologico dei ceppi europei di *Leptospira ballum*.

Riassunto. — L'A. studia sierologicamente tre ceppi di *Leptospira ballum* da lui isolati in Spagna (Castellon) e li confronta con ceppi di *L. ballum* provenienti dall'Italia, Danimarca, Olanda, Francia, Spagna (Tarragona) e Portogallo.

Le prove di adsorbimento delle agglutinine dimostrano che in *L. ballum* possono essere presenti due diversi antigeni: quello A e quello B. Alcuni ceppi sono provvisti del solo antigene A (biotipo A), altri tanto di quello A che di quello B (biotipo AB). Questo secondo antigene è contenuto in abbondanza in alcuni ceppi del biotipo AB; è invece molto scarso in altri.

La circostanza che il siero di un risaiolo della provincia di Valencia, convalescente di una leptospirosi, agglutini, ed a titolo elevato, il solo biotipo AB di *L. ballum*, fa ritenere all'A. che possano esistere in natura anche ceppi provvisti del solo antigene B. Tali ceppi sarebbero, dal punto di vista sierologico, completamente diversi dai primi ceppi di *L. ballum* che siano stati isolati, quelli danesi, che contengono il solo antigene A, e dovrebbero essere attribuiti ad un serotipo di leptospira completamente nuovo.

Résumé. — L'auteur étudie du point de vue sérologique trois souches de *Leptospira ballum* qu'il a isolées en Espagne (Castellon) et il les compare avec des souches de *L. ballum* provenant d'Italie, du Danemark, de la Hollande, de la France, de l'Espagne (Tarragona) et du Portugal.

Les essais d'adsorption des agglutinines démontrent que chez *L. ballum* deux différents antigènes peuvent être présents: l'antigène A et l'antigène B. Certaines souches sont pourvues seulement de l'antigène A (biotype A), d'autres d'autant d'antigène A que d'antigène B (biotype AB). Ce dernier antigène se trouve en abondance dans certaines souches du biotype AB; il est au contraire en quantité fort limitée dans d'autres.

La circonstance que le sérum d'un ouvrier du riz de la province de Valencia, convalescent d'une leptospirose, agglutine, et à un titre élevé, seulement le biotype AB de *L. ballum*, porte selon l'auteur à la conclusion qu'il pourrait exister dans la nature des souches munies du seul antigène B. De telles souches seraient du point de vue sérologique, complètement

différentes des premières souches de *L. ballum* qui aient été isolées, les souches danoises, qui contiennent seulement l'antigène A, et elles devraient être classifiées dans un sérotype de leptospira complètement nouveau.

Summary. — The writer studied serologically three strains of *Leptospira ballum* isolated by him in Spain (Castellon) and compares them with strains of *L. ballum* coming from Italy, Denmark, Holland, France, Spain (Tarragona) and Portugal.

Agglutinin adsorption tests show that two different antigens may be present in *L. bollum*: A and B. Some strains are equipped only with the A antigen (biotype A), others with both: A, and B antigens (biotype AB). The latter antigen is abundantly present in some strains of biotype AB; but is very rare in others.

The circumstance that the serum of a rice cultivator in the province of Valencia, convalescing from leptospirosis, agglutinated at a high titre the only AB biotype of *L. ballum*, makes the write suppose that other strains may exist in nature possessing the B antigen alone. From the serological point of view, these strains would be completely different from the first strains of *L. ballum* isolated (*viz.*, the Danish strains, which contain A antigen alone), and must be due to a completely new serotype of leptospira.

Zusammenfassung. — Der Verfasser untersucht serologisch drei Stämme der *Leptospira ballum*, die von ihm in Spanien isoliert wurden, und stellt einen Vergleich mit Stämmen der *L. ballum* italienischer, dänischer, holländischer, französischer, spanischer (Tarragona) und portugiesischer Herkunft an.

Die Adsorptionsproben der Agglutinine zeigen, dass bei der *L. ballum* zwei verschiedene Antigene, A und B, vorhanden sein können. Einige Stämme haben nur das Antigen A (Biotyp A), andere hingegen A und B (Biotyp AB). Das zweite Antigen ist reichlich bei einigen Stämmen des Biotyps AB vorhanden, bei anderen hingegen nur sehr schwach.

Die Tatsache, dass das Serum eines Reisarbeiters aus der Provinz Valencia in der Rekonvaleszenz nach einer Leptospirosis in erheblichem Masse nur den Biotyp AB der *L. ballum* agglutiniert, lässt den Verfasser darauf schliessen, dass in der Natur auch Stämme vorhanden sein können, die nur über das Antigen B verfügen. Vom serologischen Standpunkt aus

wären diese Stämme völlig verschieden von den ersten Stämme völlig verschieden von den ersten Stämmen der *L. ballum*, die isoliert wurden, und zwar den dänischen, die nur Antigen A enthalten, und müssten einem völlig neuen serologischen Typ der *Leptospira* angehören.

Leptospira ballum è stata isolata per la prima volta in Olanda, nel 1941, da SCHÜFFNER e BOHLANDER ⁽¹⁾, che la coltivarono dall'urina e dal liquido peritoneale di un topolino bianco. Il ceppo, conservato in laboratorio, non è stato però, almeno in un primo tempo, studiato o identificato serologicamente.

Nel 1944 BORG PETERSEN C. ⁽²⁾ isolò da un esemplare di *Mus musculus spicilegus*, catturato nella Danimarca meridionale, un ceppo in leptospira che risultò diverso dalle altre specie note e mostrò una sua lontana affinità serologica con la *L. canicola*. BORG PETERSEN denominò questo serotipo « *Leptospira ballum* ».

Il ceppo di SCHÜFFNER e BOHLANDER, successivamente confrontato con quello di BORG PETERSEN, risultò essere del tutto identico ad esso ^(1, 2).

Più tardi WOLFF, BOHLANDER e RUYS ⁽¹⁾ trovarono il medesimo tipo di leptospira in numerosi topini bianchi di due allevamenti della città di Amsterdam. Un'infezione da laboratorio contratta dalla RUYS, ed un'altra subita da un bambino che aveva maneggiato topini bianchi (BORG PETERSEN ⁽³⁾), dimostrarono che il nuovo tipo di leptospira era patogeno per l'uomo.

Tuttavia *L. ballum* sembra infettare molto raramente l'uomo, per lo meno in Danimarca ed Olanda. Infatti dei numerosi sieri colà controllati da BORG PETERSEN e da WOLFF, nessuno ha mostrato un titolo significativo per questa specie. Invece, nella stessa Olanda, WOLFF J. W. e BOHLANDER H. ⁽⁴⁾ hanno trovato una positività del 0,9% per *L. ballum* in 481 sieri di bovini esaminati.

Nel 1951 *L. ballum* è stata segnalata nel Portogallo da FRAGA DE AZEVEDO J. ⁽⁵⁾. Quest'A. riuscì ad isolarne due ceppi, rispettivamente da un esemplare di *Apodemus sylvaticus* e da uno di *Epyomis norvegicus* catturati nelle risaie di Aguas de Moura.

Nel 1952 ZAHARIJA J. ⁽⁶⁾, nel corso di alcune ricerche epidemiologiche eseguite in Croazia, ha trovato, su 271 sieri equini esaminati, tre che agglutinavano *L. ballum* ad un titolo di almeno 1:100.

Nello stesso anno a Portorico JAGER e GOCHENOUR hanno segnalato 2 casi umani d'infezione da *L. ballum*. La sorgente dell'infezione non è stata in tali casi rintracciata, però questo tipo di leptospira è stato isola-

to negli Stati Uniti d'America da topini domestici, da topi albini e da non meglio identificati « ratti selvatici » (7). Nessun caso d'infezione umana è stato finora segnalato negli Stati Uniti.

Nel 1953 COVALEDA J., PUMAROLA A. e CANTARELL I. (8) hanno comunicato i risultati di una ricerca epidemiologica svolta l'anno precedente nelle risaie del delta dell'Ebro. Questi AA. sono riusciti ad isolare un ceppo di *L. ballum* (ceppo « Camarles ») da un esemplare di *Epymis norvegicus*. Inoltre essi hanno constatato che il siero di 6 lavoratori che avevano sofferto di una malattia clinicamente diagnosticata come leptospirosi, agglutinava a titolo elevato tale leptospira

Lo stesso anno KOLOCHINE ERBER (9) ha isolato due ceppi di *L. ballum* da risaioli infettatisi a La Camargue, nella Francia Meridionale. Inoltre due serodiagnosi su 16 colà praticate, sono state positive per *L. ballum*.

L'isolamento o la dimostrazione serologica della presenza di *L. ballum* nelle risaie dell'Europa meridionale, ci porta ad aggiungere anche questo tipo serologico ai numerosi altri che sono stati riconosciuti responsabili della leptospirosi delle risaie.

Nelle ricerche epidemiologiche e serologiche eseguite nelle risaie della Pianura padana, non m'è mai avvenuto di riscontrare direttamente o indirettamente la presenza di *L. ballum*, e ciò benchè in esse non manchino sia *Epymis norvegicus* che *Apodemus sylvaticus*, portatori di tale tipo serologico.

Nel corso di un'indagine epidemiologica svolta per conto dell'O.M.S. nelle regioni risicole della Spagna Orientale, ho isolato, nella zona di Castellon de la Plana, su 39 esemplari di *Apodemus sylvaticus dicrurus* esaminati, tre ceppi di *L. ballum*, che ho denominato rispettivamente « Castellon 1, 2 e 3 ». Le culture sono state ottenute seminando direttamente nel terreno di Korthof da me modificato, piccoli frammenti del rene di tali animali, non appena uccisi.

Nel corso delle ricerche serologiche eseguite sui lavoratori che avevano contratto nelle risaie spagnuole un'infezione da leptospire, ho trovato tre sieri che agglutinavano esclusivamente o a titolo nettamente superiore (1:1.000 - 1:50.000) *L. ballum*. Altri 9 sieri agglutinavano *L. ballum* a titoli di 1:100 - 1:1000, però *L. ictero-haemorrhagiae* veniva da essi agglutinata a titoli più elevati. In due dei casi, in cui *L. ballum* era agglutinata ad 1:1.000 la prova dell'adsorbimento delle agglutinine (siero in esame più sospensione di un ceppo di *L. ictero-haemorrhagiae*) ha dimostrato che l'agglutinazione per *L. ballum* era da considerarsi come paraspecifica. Altri cinque sieri hanno agglutinato a titolo poco elevato (1:100) tanto *L. ballum* che altri diversi tipi serologici.

Un quarto ceppo di *L. ballum* (ceppo « Arborea ») è stato isolato da

Moscovici e da me (¹⁰), da un esemplare di *Apodemus sylvaticus dicrurus* catturato nelle risaie di Arborea, in Sardegna.

In Sardegna, contrariamente a quanto avevo osservato in Spagna, nessuno dei sieri di risaioli esaminati, ha agglutinato a titolo significativo questa specie di leptospira.

Poichè nelle ricerche serologiche eseguite in Spagna, avevo usato, come rappresentante della specie *L. ballum*, il ceppo « Mus 127 », di provenienza danese, cortesemente inviatomi da BORG PETERSEN, ho voluto saggiare i sieri risultati positivi per tale ceppo, anche di fronte ai ceppi locali.

I titoli così ottenuti hanno corrisposto più o meno a quelli raggiunti con il ceppo « Mus 127 ». Però nel saggiare con i ceppi spagnuoli i sieri di alcuni convalescenti che avevano sofferto di una malattia che aveva avuto tutte le apparenze cliniche di una leptospirosi, ma che tuttavia non avevano agglutinato alcuno dei tipi di leptospire da me adoperati, ne trovai uno, e più precisamente il siero del paziente n. 27, che aveva lavorato nelle risaie di Sollana (Valencia), il quale agglutinò al titolo di 1:1.000 sia il ceppo « Castellon 2 » che il « Castellon 3 », ed a 1:100 il ceppo « Castellon 1 ». Ripetuta una prova con tale siero, diluito a valori inferiori a quello abituale dell'1:100, e con il ceppo « Mus 127 », l'agglutinazione si ottenne soltanto al titolo di 1:10.

Questo risultato faceva ritenere che alcuni dei ceppi spagnuoli di *L. ballum* avessero una costituzione antigenica, almeno parzialmente diversa da quella del ceppo danese in mio possesso. Ritenni perciò di un certo interesse studiare la costituzione antigenica dei ceppi di *L. ballum* finora isolati in Europa.

Tali ceppi sono i seguenti: « Castellon 1 », « Castellon 2 » e « Castellon 3 », isolati da me in Spagna: « Arborea », isolato da Moscovici e da me in Sardegna: « Mus 29 » e « Mus 127 » isolati da BORG PETERSEN in Danimarca: « Camarles », isolato da COVALEDA e coll. in Spagna: « Rato 81 » e « Rato 112 » isolati da FRAGA DE AZEVEDO in Portogallo: « Ai A 52 » e « Ba A 52 » isolati da KOLOCHINE ERBER in Francia.

Una prima prova è stata eseguita ricercando l'agglutinabilità di tali ceppi di fronte al siero del paziente n. 27, a partire dal titolo di 1:50, perchè titoli minori non possono essere ritenuti significativi. Il siero n. 27 ha agglutinato, a 1:1.000, i ceppi « Castellon 2 » e « Castellon 3 », « Arborea », « Ai A 52 »; a 1:100 il ceppo « Castellon 1 », e a 1:50 il ceppo « Camarles ». Gli altri ceppi non sono stati agglutinati.

Prima di procedere a prove di adsorbimento delle agglutinine, ho voluto ricercare se i ceppi con i quali avevo ottenuto un risultato positivo, più che possedere un corredo antigenico particolare, possedessero una

particolare maggiore agglutinabilità rispetto agli altri ceppi, e per questo ho preso in particolare considerazione i ceppi spagnuoli e quello « Mus 127 ». Ho immunizzato con tali ceppi alcuni conigli ed ho ottenuto sieri immuni che mi hanno dato i seguenti risultati:

SIERI

Ceppi:	Castellon 1	Castellon 2	Castellon 3	Mus 127
Castellon 1 . .	1 : 50.000	1 : 10.000	1 : 100.000	1 : 1.000
Castellon 2 . .	1 : 50.000	1 : 10.000	1 : 100.000	1 : 1.000
Castellon 3 . .	1 : 50.000	1 : 10.000	1 : 100.000	1 : 5.000
Mus 127	1 : 1.000	1 : 1.000	1 : 10.000	1 : 5.000

Dalla tabella risulta che per quanto effettivamente i ceppi spagnuoli posseggano una maggiore agglutinabilità, tuttavia essa non è di grado tale da poter spiegare i differenti risultati ottenuti con il siero n. 27, soltanto sulla base di una differenza quantitativa di agglutinabilità dei ceppi saggiati.

Per studiare le probabili differenze qualitative, sono allora passato alle prove di adsorbimento delle agglutinine. A questo scopo ho immunizzato un coniglio con il ceppo « Castellon 3 » ed ho ottenuto un siero che aveva il titolo di 1:10.000. Tale siero è stato adsorbito, diluendolo nella proporzione di 1:9 e adottando la tecnica di SCHUEFFNER e BOHLANDER, con una cultura centrifugata del ceppo « Mus 127 ».

Il siero così adsorbito, ha agglutinato ancora, al suo titolo, il ceppo « Castellon 3 ». I ceppi « Arborea », « Castellon 1 » e « Castellon 2 » sono stati invece agglutinati a metà titolo; i ceppi « Ai A 52 », « Ba A 52 » e « Camarles », solo ad 1/10 del titolo; gli altri ceppi non sono stati agglutinati. D'altra parte un siero immune anti-Mus 127, adsorbito con il ceppo « Castellon 3 » non ha agglutinato più alcun ceppo di *L. ballum*.

Queste ricerche dimostrano che anche in *L. ballum*, come è già noto di altre specie di leptospire patogene, è possibile distinguere due biotipi, dei quali l'uno possiede un solo antigene (A) e l'altro ne possiede due (AB). L'antigene B non è però presente in eguale misura in tutti i ceppi che lo possiedono. Alcuni, come quello « Castellon 3 », ne sono provvisti in abbondanza, altri invece in scarsa misura. E' possibile che una minima quantità di tale antigene sia presente anche in altri ceppi che praticamente si debbono assegnare al biotipo A, come lo dimostrerebbe la circostanza che il siero del paziente n. 27 ha agglutinato, sia pure a titolo minimo, alcuni di tali ceppi (Mus 127).

Un carattere singolare dei biotipi di *L. ballum* è però quello che, mentre per le altre specie di leptospire che possiedono i due biotipi, non è mai stato trovato un ceppo che possieda il solo antigene B, tutto fa ritenere che in *L. ballum* tale biotipo possa esistere. Infatti il singolare comportamento del siero del paziente N° 27 è spiegabile soltanto ammettendo l'ipotesi che questi sia stato infettato da un ceppo che possedeva il solo antigene B.

Così mentre nella comune pratica serologica è indifferente usare, per *L. ictero-haemorrhagiae* o per altre specie, il biotipo A o quello AB, lo stesso non vale per la *L. ballum*, dove, usando il solo biotipo A, sfuggirebbero alla serodiagnosi i sieri dei pazienti infettati da ceppi provvisti del solo antigene B.

Questo stato di cose è diverso anche da quello che MOCHTAR A. ha rilevato in *L. bataviae* ⁽¹¹⁾. In questa specie esistono due biotipi (α e β), dei quali l'uno possiede gli antigeni C e D e l'altro quelli D e E. Se in questo caso ciascuno dei due biotipi contiene un antigene che l'altro biotipo non possiede, esiste però un antigene comune, quello D, che è sufficiente per caratterizzare la specie.

Nel caso dei tre probabili biotipi di *L. ballum*, tale antigene comune non esiste e se anche l'ipotetico biotipo provvisto del solo antigene B non è stato ancora isolato, la sua esistenza appare quanto mai probabile.

Queste constatazioni pongono ancora una volta alla ribalta il difficile e complesso problema della sistematica delle leptospire. Infatti, qualora si ammetta che esistano i tre biotipi A, AB, e B, non è possibile assegnarli tutti e tre ad un'unica specie, perchè tra il biotipo A e quello B non esiste alcuna comunanza antigenica. Bisognerebbe allora attribuire il nome di *L. ballum* soltanto al biotipo A, a cui appartiene il ceppo « Mus 127 » che è il primo ceppo a cui sia stato attribuito tale nome. Il biotipo B costituirebbe una specie o un sierotipo nuovo, a sè stante, e il biotipo AB sarebbe da considerarsi quasi come un ibrido di due specie diverse.

Questi rilievi ci portano a ritenere che nell'argomento ancora molto controverso della sistematica delle leptospire, occorra dare particolare valore al corredo antigenico di cui ciascun ceppo è dotato. Sono gli antigeni gli elementi basilari di una futura sistematica razionale del gruppo, e se la presenza in misura predominante di un antigene specifico può caratterizzare una determinata specie, non mancano singoli ceppi provvisti in misura più o meno equivalente, di due o più antigeni, sì che la loro assegnazione ad una specie piuttosto che ad un'altra è al-

quanto problematica, ed essi non possono essere praticamente contrassegnati se non da una formula che ci dia ragione della loro costituzione antigenica.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) WOLFF J. W., BOHLANDER H., RUYS A. Ch. . Researches on Leptospirosis ballum. - *Antonie van Leeuwenhoek* 15: 1 (1949).
 - (²) BORG PETERSEN C. - *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 21: 594 (1944).
 - (³) BORG PETERSEN C.: comunicaz. personale.
 - (⁴) WOLFF J. M., BOHLANDER H. - *Documenta de Med. geogr. et trop.*, 4: 257 (1952).
 - (⁵) FRAGA DE AZEVEDO J., SALVADO J. L., GUEIROR J. J. - *Ann. do Inat. Med. Trop.*, 8: 621 (1951).
 - (⁶) ZAHARIJA J. - *Veterinarski Arhiv.* 22: 172 e 252 (1952).
 - (⁷) YAGER R. H., GOCHENOUR J. - *Am. J. Trop. Med. a Hyg.*, 1: 457 (1952).
 - (⁸) VOVALEDA J., PUMAROLA A., CANTARELL I. - *Rev. Ibérica de Parasit.*, 13: 289 (1953).
 - (⁹) KOLOCHINE ERBER - IV Congr. Internaz. Ig. e Med. Mediterra., Barcellona (1953).
Simposio di Ig., 35.
 - (¹⁰) BABUDIERI B., MOSCOVICI C. - *Rend. Ist. Sup. Sanità* (in corso di stampa).
 - (¹¹) MOCHTAR A. - *Gen. Tschr. Ned. Ind.*, 81: 2670 (1941).
-