

29. Z. DYMOWSKA e B. BABUDIERI. — Studi sulla cosiddetta "lisi immunitaria" delle leptospire.

Riassunto. — Gli AA. studiano il cosiddetto fenomeno della lisi immunitaria delle leptospire. Essi confermano con varie esperienze l'opinione di Lawrence, che le cosiddette « lysis balls » sono in realtà ammassi compatti di leptospire integre agglutinate e che la lisi manca in esse completamente, anche qualora alla miscela spirochete-siero immune si aggiunga il complemento.

Per la formazione delle « lysis balls » è indispensabile la motilità vivace degli uncini terminali delle leptospire. Se questa manca, come nel caso dei ceppi privi di uncini, si ha il quadro dell'agglutinazione a fascetti o a reticolo. Se infine le leptospire sono uccise e non possiedono più alcuna motilità, l'agglutinazione si manifesta soltanto con la formazione di ammassi poco compatti ed irregolari di leptospire.

Summary. — The AA. studied the phenomenon termed « immunity lysis » of leptospirae. They confirm with many experiences Lawrence's opinion that the so-called « lysis balls » are compact heaps of integral agglutinated leptospirae and that there is no lysis in them even when the complement is added to the mixture Spirochaeta-immune serum.

For the formation of lysis balls a quick motility of the distal hooks of leptospirae is necessary. If there is no motility, as in the case of strains without hooks there is a bundle or net agglutination. If the leptospirae are killed and have no more motility, the agglutination appears only through the formation of little compact and irregular heaps of leptospirae.

Per lungo tempo si è ritenuto che il siero immune specifico fosse in grado non solo di agglutinare, ma anche di lisare le leptospire. Anzi questo ultimo fenomeno veniva citato come l'unico esempio noto di una lisi specifica che avvenisse anche in assenza di complemento.

In realtà, quando si mette a contatto una cultura vivente di leptospire con diluizioni scalari di un siero immune omologo, si osserva nelle prime diluizioni un'evidente agglutinazione: le leptospire appaiono più grosse e a superficie più irregolare della norma (fenomeno di adesione o di Rieckenberg), si raggruppano a formare ammassi reticolari a maglie fitte ed irregolari. Nelle diluizioni successive, più elevate, il campo microscopico appare privo di leptospire libere ed in esso si vede soltanto

un gran numero di sfere granulose, brillanti, più o meno grandi. Si è ritenuto che queste sfere (« Lysis balls ») fossero costituite da frammenti di leptospire prima agglutinate e successivamente disgregate dalle lisine specifiche.

Nelle diluizioni ancora più elevate di siero un numero sempre maggiore di leptospire non viene agglutinato e alla periferia delle « lysis balls » di dimensioni minori, è visibile una sorta di raggiera di spirochete vivacemente mobili, che aderiscono alla massa soltanto con una delle loro estremità. Avvicinandosi al tasso-limite del siero, si osservano soltanto ammassi non molto numerosi di leptospire e le « lysis balls » scompaiono completamente.

In base a questi diversi aspetti, parecchi AA., specie dell'Europa Nordica, distinguono, per il siero immune, un tasso limite per le agglutinine ed un altro per le lisine.

Diverso è il quadro che si osserva qualora si mettano a contatto con il siero immune leptospire uccise con la formalina. In questo caso le « lysis balls » non si formano e si hanno soltanto ammassi più o meno compatti di leptospire non molto strettamente agglutinate.

Questa differenza d'aspetto sembrava costituire un ulteriore argomento in favore dell'esistenza di una lisi specifica la quale, ovviamente, si manifestava a carico di leptospire viventi, ma non più a carico di quelle uccise e fissate dalla formalina.

LAWRENCE ⁽¹⁾ è stato il primo, nel 1955, ad affermare che una lisi specifica delle leptospire non esiste e che le « lysis balls » consistono in realtà di ammassi molto compatti di leptospire integre, strettamente agglutinate tra loro. Egli è arrivato a questa conclusione in base alla seguente esperienza: Qualora si incorporino nella gelatina o nell'agar leptospire viventi, e le si metta successivamente a contatto con siero immune, in presenza o meno di complemento, l'agglutinazione non può ovviamente avvenire, ma non si osserva neppure una lisi.

Successivamente ALEXANDER ⁽²⁾ e BABUDIERI ⁽³⁾ hanno riferito di avere confermato le conclusioni alle quali era arrivato Lawrence, anche in base allo studio, con il microscopio elettronico, delle « lysis balls ».

Poichè non tutti hanno ritenuto sufficientemente convincenti questi risultati e poichè ancor ora qualcuno continua a parlare di « reazione di agglutinazione e lisi », abbiamo ritenuto opportuno riconsiderare il fenomeno e ricercare, anche per altre vie, se la lisi sia davvero soltanto un'apparenza.

In primo luogo abbiamo ripetuto le esperienze di Lawrence, incorporando leptospire viventi in agar contenente siero immune omologo. Frammenti di tale agar, osservati in campo oscuro, ad intervalli scalari di tempo, hanno dimostrato che le leptospire si mantengono perfetta-

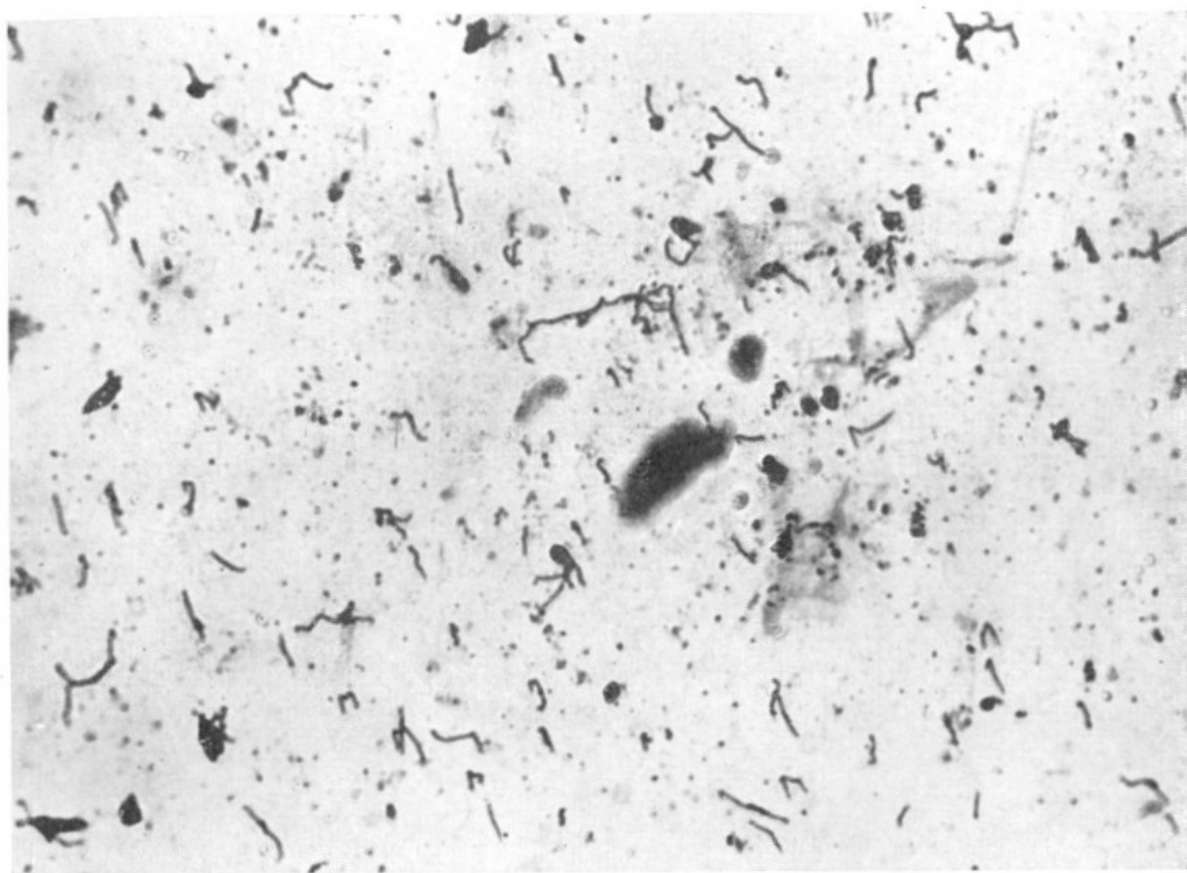


Fig. 1. - Leptospire normali, da cultura. Microscopia ottica.

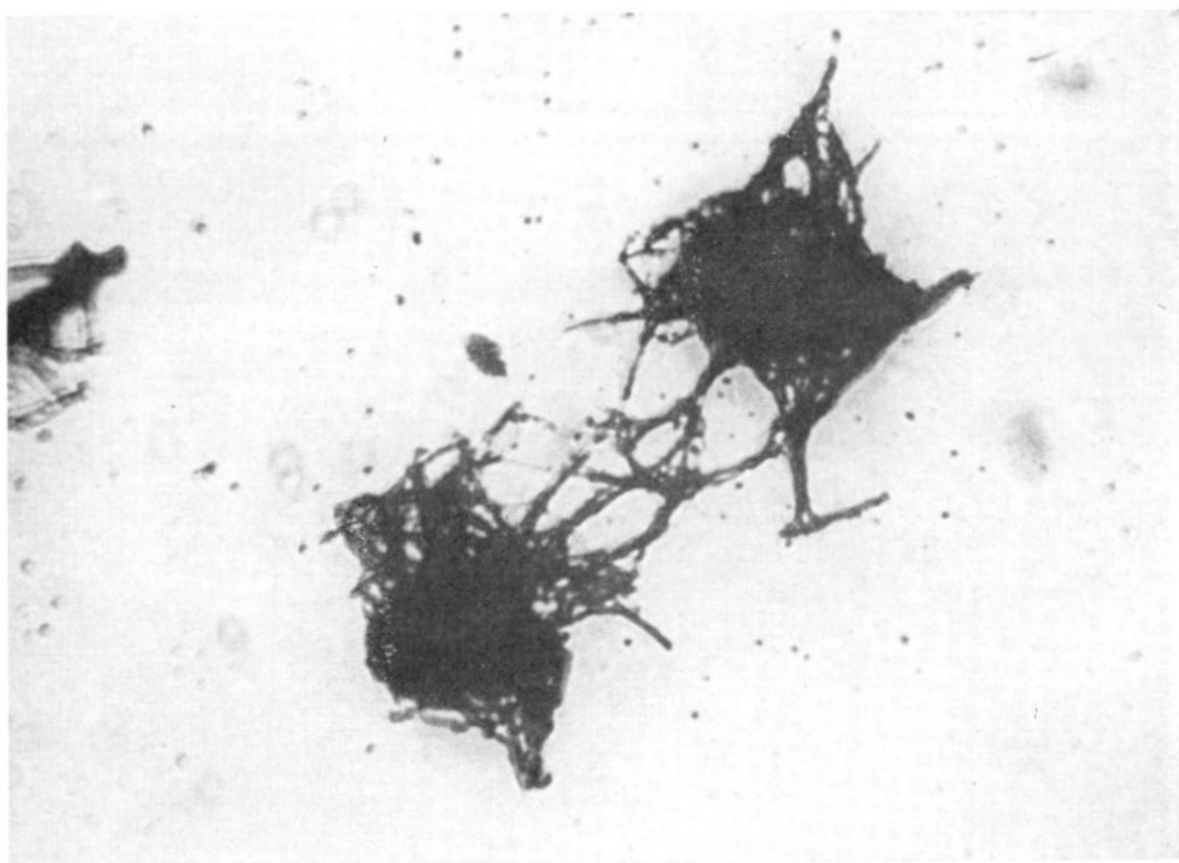


Fig. 2. - Agglutinazione del tipo « a sfere ». Microscopia ottica.

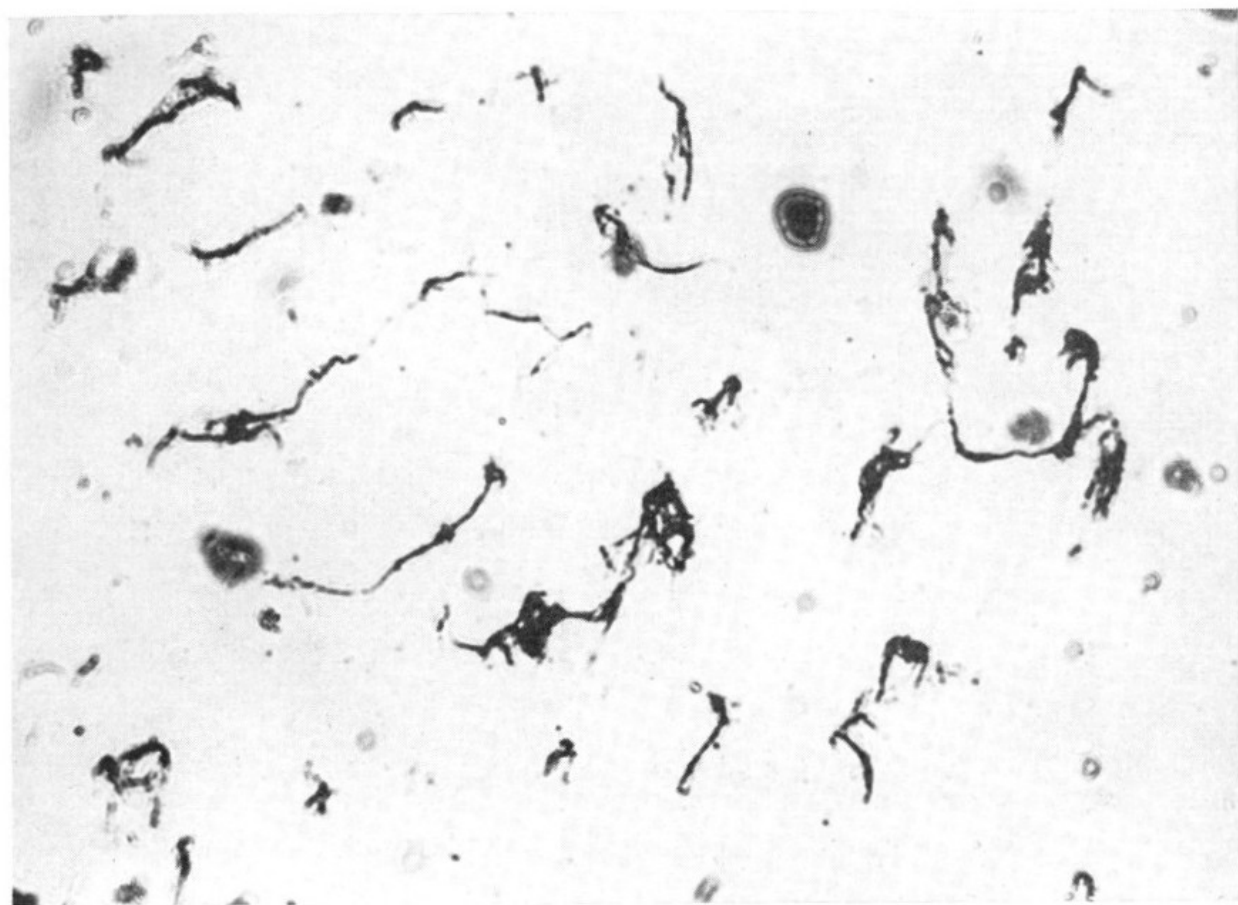


Fig. 3. - Agglutinazione del tipo « a fascetti ». Microscopia ottica.

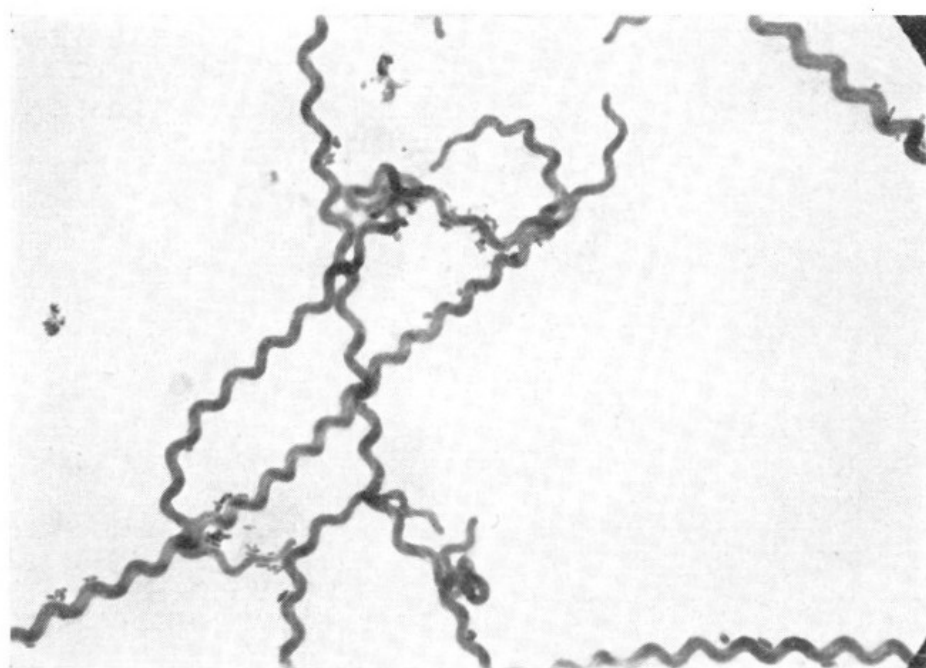


Fig. 4. - Leptospire normali. Microscopia elettronica 8000 x.

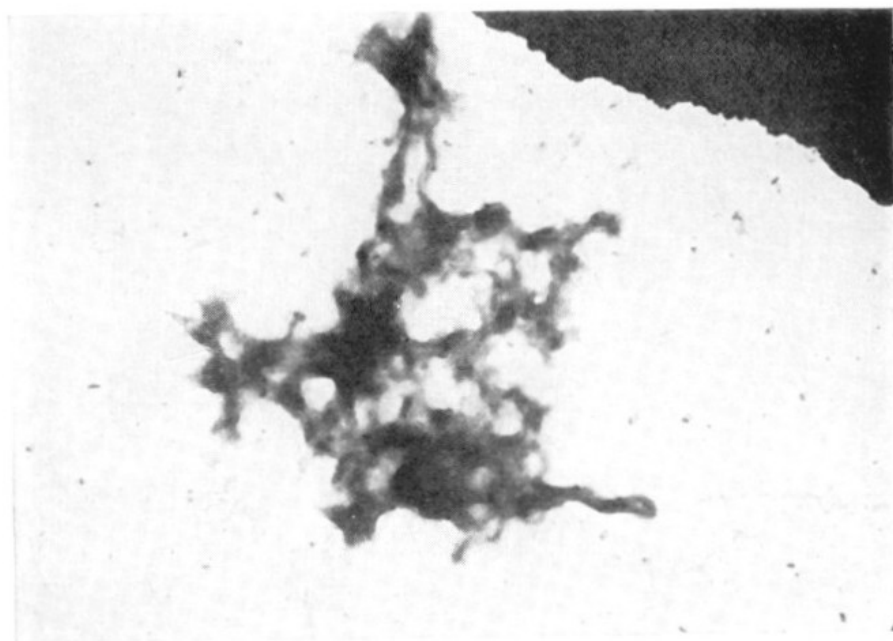


Fig. 5. - Leptospire agglutinate da siero immune ad alta concentrazione. Fenomeno di « adesione ». Microscopia elettronica 8000 x.

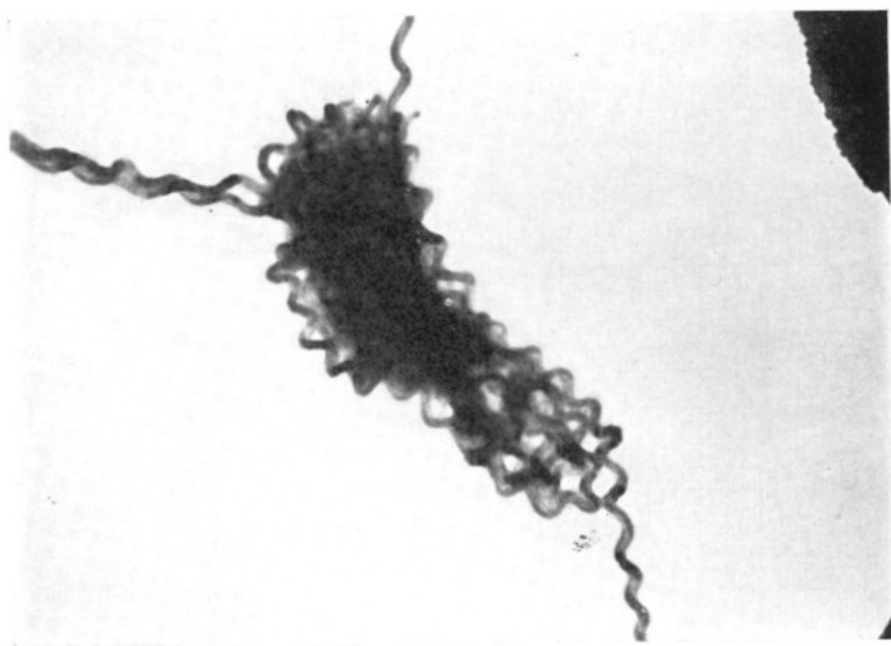


Fig. 6. - Leptospire agglutinate da siero immune ad alta concentrazione: « Lysis ball ». Microscopia elettronica 8000 x.

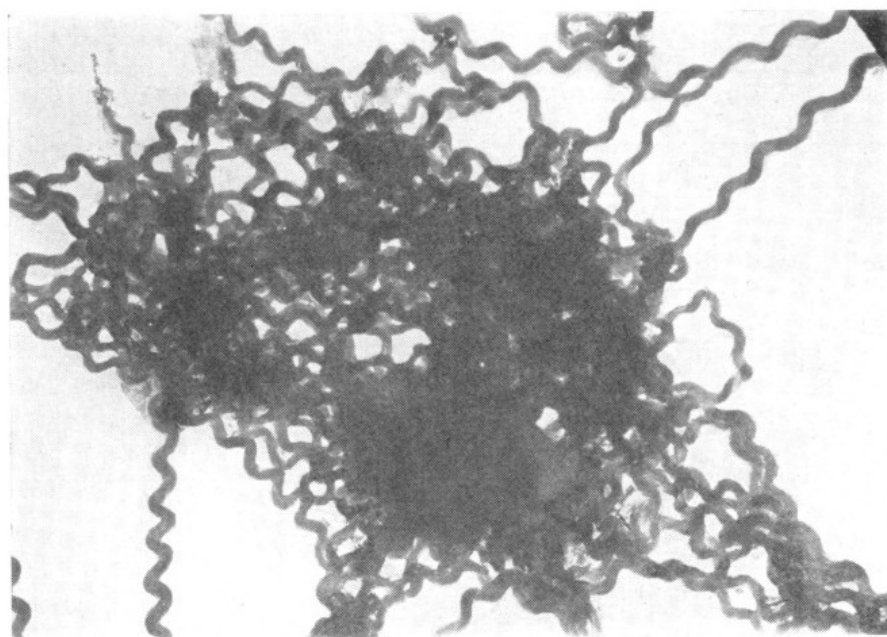


Fig. 7. - Leptospire agglutinate da siero immune a bassa concentrazione: « Lysis ball ». Microscopia elettronica 8000 x.

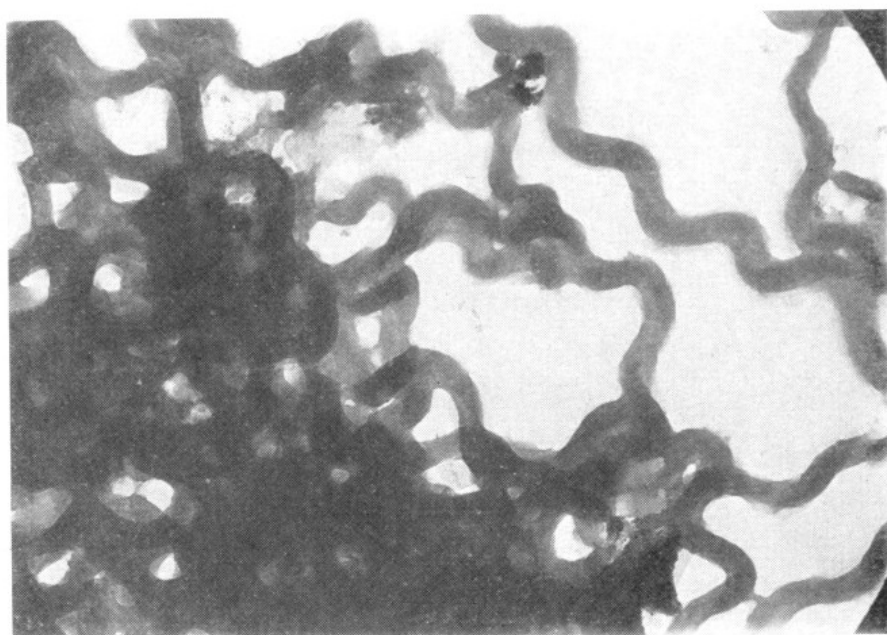


Fig. 8. - Porzione di « lysis ball ». I corpi delle leptospire sono integri, ma i loro contorni non sono netti. Microscopia elettronica 30.000 x.

mente integre. Lo stesso risultato si è ottenuto aggiungendo all'agar-siero anche il complemento.

Un'altra prova è consistita nell'osservazione al microscopio elettronico, della porzione periferica di alcune piccole « lysis balls ». Le leptospire così osservate sono risultate perfettamente integre. A questo reperto poteva essere mosso l'appunto che la lisi iniziasse al centro della sfera e che si estendesse solo successivamente alle leptospire che via via aderivano alla periferia. Per controllare questa possibilità abbiamo preparato, con la tecnica abituale dell'Istituto Superiore di Sanità, sezioni ultrasottili di « lysis balls », incluse in metacrilato. Queste sezioni ci hanno dimostrato che anche al centro delle grosse « lysis balls » le leptospire si mantengono perfettamente integre.

Una terza prova, decisiva, è stata eseguita nel modo seguente: Un'abbondante cultura di leptospire è stata tenuta a contatto, per due ore, a 37°, con un siero immune omologo, portato alla diluizione capace di dare il massimo di « lysis balls ». Queste ultime sono state ripetutamente lavate mediante centrifugazione e risospensione del sedimento in soluzione fisiologica. Infine il sedimento lavato è stato risospeso in un volume di soluzione fisiologica pari a quello di partenza. La provetta è stata tenuta a temperatura ambiente e controllata a vari intervalli di tempo. Già dopo un'ora erano ricomparse nella provetta alcune leptospire libere e mobili. Dopo 6 ore la provetta conteneva soltanto leptospire libere ed aveva lo stesso aspetto della cultura prima di essere stata messa a contatto con il siero immune. Le « lysis balls » erano completamente scomparse.

Evidentemente i legami che gli anticorpi effettuano fra i corpi spirochetici viventi compresi nelle « lysis balls » sono piuttosto labili, e se dal medium circostante vengono allontanati tutti gli anticorpi ancora disponibili, essi non sono capaci di opporsi ai movimenti vivacissimi delle leptospire che riescono infine a liberarsi dalla massa ed a ritornare libere nel mezzo ambiente. Il numero delle leptospire così liberate corrisponde a quello rilevato nella cultura all'inizio dell'esperimento.

Quest'ultima esperienza ci sembra decisiva e tale da dimostrare in modo inconfutabile che la supposta lisi immunitaria delle leptospire non esiste. Il termine di « reazione di agglutinazione e lisi » dev'essere definitivamente sostituito da quello di « reazione di agglutinazione ».

Altre indagini sono state rivolte a studiare le ragioni per cui alle volte, con determinati ceppi, l'agglutinazione non dà luogo alla formazione delle « lysis balls », bensì ad ammassi allungati di leptospire agglutinate che alle volte costituiscono un vero reticolo a larghe maglie, che occupa l'intero campo microscopico. E' la cosiddetta « agglutinazione a fascetti », che tutti i leptospirologhi hanno qualche volta osservato.

Abbiamo potuto rilevare che questo tipo di agglutinazione si svolge solo alle diluizioni seriche che abitualmente danno il fenomeno delle « lysis balls » e soltanto con quei ceppi di leptospire che hanno la caratteristica di essere costituiti da elementi o completamente privi dell'uncino terminale, o che contengono solo un numero molto limitato di leptospire provviste di un uncino appena accennato [BABUDIERI e CASTELLI ⁽⁴⁾]. Ceppi che presentano tali caratteristiche sono nella nostra collezione, quello « Celledoni » (serotipo celledoni) e quello « M 84 » (serotipo sejroe). Questo particolare comportamento di alcuni ceppi mette in evidenza l'importanza che hanno, nella formazione delle cosiddette « lysis balls » i movimenti attivi delle leptospire e la presenza di uncini terminali bene accentuati che favoriscono l'agganciamento ed il successivo aggrovigliamento dei corpi spirochetici.

Infatti, se si tiene conto dei movimenti delle leptospire, di rotazione intorno al loro asse longitudinale, ma particolarmente vivaci in corrispondenza delle loro estremità, dove gli uncini terminali tracciano un arco di ampio diametro, è facilmente comprensibile come, quando una leptospira, per effetto delle agglutinine, aderisce ad un'altra, essa s'aggancia a questa. Il movimento del resto del corpo s'accentua e le due leptospire finiscono con l'aggrovigliarsi e con il costituire un centro d'attrazione che darà origine ad una « lysis ball » ovviamente sferica. E' questo il fenomeno che si osserva abitualmente a carico delle leptospire ancora parzialmente libere, che aderiscono alla periferia della « lysis ball ».

Se invece le leptospire sono prive di uncini terminali, entra in giuoco soltanto il movimento di rotazione dell'intero corpo, che dà luogo, per avvitaimento, alla formazione di fascetti allungati di leptospire, i quali possono anche saldarsi fra loro sì da formare una sorta di reticolo.

Se infine le leptospire sono uccise e quindi non più mobili attivamente (culture formolate) manca la possibilità sia della formazione delle « lysis balls », sia dei fascetti e l'agglutinazione si manifesta soltanto con la formazione di ammassi più o meno irregolari e poco compatti, di leptospire.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) LAWRENCE J. J. - Austral. J. exp. Biol. med. Sci., 33: 91 (1955)
- (²) ALEXANDER A. D. - Joint WHO/FAO expert Committee on Zoonoses, W.H.O., Geneva 1959.
- (³) BADUDIERI B. - Joint WHO/FAO expert Committee on Zoonoses, W.H.O., Geneva 1959.
- (⁴) BABUDIERI B. e CASTELLI M. - Rend. Ist. sup. Sanità, 24: 698 (1958).