

36. Brenno BABUDIERI - Leonida RAVAIOLI. — L'intradermoreazione nella diagnosi della febbre Q, nella cavia.

Riassunto. — Gli AA. confrontano nella cavia i risultati ottenuti nella diagnosi della febbre Q, dalle reazioni di deviazione del complemento e dalla intradermoreazione praticata sia con l'antigene Lederle (estratto con etere), sia con quello Babudieri (non estratto con etere).

Dalle prove è risultato che l'intradermoreazione non dà negli animali indenni alcuna reazione locale, o soltanto una di assai scarsa entità. Negli animali nettamente seropositivi l'intradermoreazione è nella massima parte dei casi, ma non sempre, positiva. Negli animali solo debolmente seropositivi, l'intradermoreazione è alle volte positiva alle volte negativa.

Mentre la seroreazione diviene positiva di solito già sette giorni dopo l'infezione, l'intradermoreazione lo diviene dopo oltre 16 giorni, e non può di conseguenza essere impiegata per una diagnosi precoce.

Fra i due antigeni usati, quello Lederle sembra essere più spesso, ma non sempre, maggiormente sensibile, quello Babudieri invece più specifico.

Résumé. — Les AA. comparent les résultats obtenus dans le diagnostic de la fièvre Q chez le cobaye avec les réactions de déviation du complément et l'intradermoréaction faite soit avec l'antigène Lederle (extrait avec éther) soit avec celui de Babudieri (non-extrait avec éther).

Les expériences ont démontré que l'intradermoréaction ne provoque chez les animaux sains aucune réaction locale ou ne provoque qu'une réaction très réduite. Par contre, chez les animaux nettement séro-positifs l'intradermoréaction est dans la plupart des cas, mais pas toujours, positive. Chez les animaux qui ne sont que faiblement séro-positifs l'intradermoréaction est parfois positive, parfois négative.

Tandis que la séro-réaction devient positive d'habitude déjà sept jours après l'infection, l'intradermoréaction le devient après plus de 16 jours et ne peut pas, par conséquent, être utilisée pour un diagnostic précoce.

En ce qui concerne les deux antigènes employés, celui de Lederle semble être plus souvent, mais pas toujours, plus sensible, tandis que celui de Babudieri, par contre, est plus spécifique.

Summary. — The authors compare, in guinea pigs, the results of diagnosis based upon complement-deviation and cutireaction, obtained by means of (ether-extracted) Lederle antigen and (not ether extracted) Babudieri antigen.

The experiments showed, that the cutireaction does not yield any local reaction, or only a very slight one, in healthy animals.

In clærly seropositive animals, the reaction appears mostly, although not constantly, positive. In weakly seropositive animals the cutireaction is sometimes positive, sometimes negative.

While the seroreaction generally turns positive already after 7 days, the cutireaction takes 16 days after infection to show positive results; it is therefore not suited for early diagnosis.

As to the two antigens, the Lederle-one seems to be often, but not always more sensitive, while the Babudieri-one appears more specific.

Zusammenfassung. — Die Verfasser vergleichen am Meerschweinchen die Ergebnisse der Q-Fieber Diagnostik, das heisst der Komplementbindungsreaktion und der Intrakutanreaktion mit dem (etherextrahierten) Antigen Lederle und dem (nicht etherextrahierten) Antigen Babudieri.

Die Versuche zeigten, dass die Intrakutanreaktion bei gesunden Tieren kein oder nur ein schwaches Ergebnis zeigt. Bei seropositiven Tieren ist die Intrakutanreaktion im grössten Teil der Fälle, aber nicht in allen, positiv. In den nur schwach seropositiven Tieren ist die Intrakutanreaktion gelegentlich positiv, in anderen Fällen aber negativ.

Während die Seroreaktion gewöhnlich schon am 7. Tage der Infektion positiv wird, wird es die Intradermalreaktion erst nach dem 16. Tag.. Sie kann aus diesem Grunde nicht zur Frühdiagnose herangezogen werden.

Von den beiden verwendeten Antigenen scheint das von Lederle häufig, aber nicht immer empfindlicher, das von Babudieri dagegen spezifischer zu sein.

Nel corso di alcune ricerche sulla neutralizzazione di *Rickettsia mooseri* per azione di siero immune, GIROUD notava, nel 1939, che il coniglio immune, reinoculato intraderma, con *Rickettsie* viventi, risponde con una reazione locale molto più intensa che i conigli di controllo, vergini (1). GIROUD ne dedusse che nelle infezioni da *Rickettsie* esista una dissociazione tra immunità generale ed immunità locale, per cui negli animali che hanno superato l'infezione si stabilisce una ipersensibilità cutanea. Queste osservazioni furono successivamente confermate da BLANC e da NOURY (2).

Più tardi GIROUD pensò di applicare queste sue osservazioni all'elaborazione di un testo che potesse rivelare lo stato immunitario di un individuo (3). A questo scopo egli procedette alla inoculazione intradermica, all'avambraccio del soggetto in esame, di 0,1 cm³ di una sospensione di

Rickettsie uccise. In tutti gli individui così trattati, compare poco dopo l'iniezione, una piccola papula che scompare dopo 1/2-1 ora. Cinque ore più tardi si stabilisce localmente un infiltrato che, nei soggetti non immuni è di scarsa entità, e misura un diametro non superiore ai 4-5 mm, mentre nei soggetti immuni si rende sempre più evidente e raggiunge dopo 28-52 ore, un diametro di 40-50 mm. Questa reazione, che è specifica, dà risultato positivo anche a due e persino a 25 anni di distanza dall'infezione.

Nello studio della febbre Q, MIRRI ha di recente proposto l'uso, nei bovini e negli ovini, di una intrapalpebroreazione, che avrebbe dato a questo A. buoni risultati, in complesso concordanti con quelli ottenuti con la deviazione del complemento (4).

La tecnica usata da MIRRI è la seguente: Egli impiega come antigene quello della Ditta Lederle, usato generalmente per la reazione della deviazione del complemento. Si tratta di una densa sospensione di *C. burneti* (ceppo « Nine Mile ») preparata a partire da culture in embrione, successivamente concentrate e depurate con centrifugazioni ripetute e con estrazioni eteree. MIRRI inocula sottocute, nella palpebra inferiore, 2/10 di cm³ negli ovini, 3/8 di cm³ nei bovini. La reazione positiva si manifesta con una tumefazione ben visibile della palpebra, che compare in III-IV giornata e che persiste piuttosto a lungo.

PATRIGNANI (5) ad Ancona e LOPES (6) a Lipari, hanno tentato di impiegare anche nell'uomo la intradermoreazione alla diagnosi della febbre Q, confrontandone i risultati con quelli dati dalla reazione di deviazione del complemento. Non pare però che i risultati finora ottenuti siano stati molto soddisfacenti, nel senso che abbastanza spesso intradermoreazioni positive si sono avute in individui seronegativi.

Noi abbiamo voluto studiare più da vicino la possibilità d'impiego dell'intradermoreazione, proponendoci due scopi: primo quello di accertare se esista o meno una concordanza fra questa reazione e quella di deviazione del complemento; secondo, quello di determinare a quale distanza dall'infezione la reazione divenga positiva, e soprattutto se questa positività preceda o meno la positività della deviazione del complemento, e se sia suscettibile o no di essere impiegata per una diagnosi precoce.

Nelle nostre ricerche abbiamo impiegato tanto l'antigene dei Laboratori Lederle (ceppo Henzerling) diluito 1:2, quanto un antigene preparato da uno di noi a partire da culture in embrione di pollo del ceppo « Nine Mile ». Per la sua preparazione il sacco vitellino infetto veniva triturato, sospeso in soluzione fisiologica formolata, e quindi si procedeva a centrifugazioni ripetute in modo da eliminare dalla sospensione di Rickettsie, per quanto possibile, i globuli del tuorlo e gli altri componenti aspeci-

fici. Non si è ricorso ad estrazioni eterree. Il nostro antigene, conservato in ghiacciaia da oltre un anno, è, rispetto a quello Lederle, notevolmente più povero di Rickettsie e contiene in più di questo i componenti etero-solubili. Esso è stato usato non diluito.

L'inoculazione è stata eseguita intraderma, nella pelle dell'addome rasato, con la dose di 0,1 cm³.

I risultati sono stati sempre comparati e controllati con quelli della reazione di deviazione del complemento, eseguita con la tecnica abituale, usando l'antigene Lederle (ceppo Henzerling).

In queste nostre ricerche non ci siamo proposti di ricercare direttamente la specificità dell'intradermoreazione, ma lo abbiamo fatto solo indirettamente, nel senso che abbiamo voluto controllare se essa dia risultati concordanti con quelli ottenuti dalla reazione di deviazione del complemento, lasciando impregiudicata, almeno per ora, la questione se quest'ultima reazione sia sempre e strettamente specifica, e quella del significato che si deve attribuire alle seroreazioni positive ad un titolo molto basso.

In una prima prova abbiamo praticato, con i due antigeni, l'intradermoreazione a 53 cavie indenni, seronegative. Esse sono state tenute sotto osservazione per 14 giorni. Durante tale periodo gli animali non hanno presentato alcuna evidente reazione locale, salvo, in alcuni casi, una scarsa zona d'infiltrazione che è scomparsa completamente dopo 3-4 giorni.

Altre 4 cavie, del pari inoculate con materiale sospetto, ci avevano dato una deviazione del complemento a titolo molto basso, non tale da poter essere considerato con sicurezza, indice di un'avvenuta infezione. Alla intradermoreazione il risultato è stato quello qui sotto esposto:

Cavie	Inoculate da giorni	Deviazione del complemento	Intradermoreazione con antigene	
			Lederle	Babudieri
1	37	1 : 4 + 1 : 8 ±	+ +	—
2	37	1 : 8 + 1 : 16 ±	—	—
3	37	1 : 4 ±	+	—
4	21	1 : 4 + 1 : 8 ±	+ +	±

Come si vede, in questi casi l'antigene Babudieri ha dato un risultato che può considerarsi costantemente negativo, perchè anche l'unica cavia che ha manifestato una certa reazione, l'ha avuta di assai lieve entità. Con l'antigene Lederle invece, in 3 casi la reazione è stata positiva, e due volte in maniera molto netta.

Ai fini di una valutazione dei risultati ottenuti, sarebbe interessante conoscere il significato che dev'essere attribuito a queste seroreazioni così debolmente positive. Ciò non è però molto facile. Ricorderemo ad ogni modo che delle tre prime cavie, a due erano state instillate nel sacco congiuntivale, e ad una in bocca, alcune gocce di una sospensione molto scarsa di una *Rickettsia* attenuata. L'infezione probabilmente non era avvenuta, ma non si può escludere che lo scarso antigene pervenuto in circolo non sia stato sufficiente a determinare la comparsa di una scarsa quantità di anticorpi, e che di conseguenza le seroreazioni, pur così deboli, non abbiano in realtà un significato specifico, d'interesse per lo meno teorico se non pratico. La cavia N. 4 era stata invece inoculata sottocute con materiale quasi certamente sterile. Infatti la sua compagna, inoculata contemporaneamente con lo stesso materiale, aveva dato una seroreazione del tutto negativa. Non si può neppure pensare che la scarsa intensità della seroreazione fosse dovuta al troppo breve periodo intercorso fra l'inoculazione ed il salasso, perchè una seconda deviazione del complemento, praticata dopo altri 20 giorni ci diede esattamente il medesimo risultato della prima.

Infine abbiamo praticato la intradermoreazione ad un gruppo di 13 cavie che erano state infettate da 173 a 26 giorni prima, e che presentavano tutte una seroreazione nettamente positiva ($>1:16$). I risultati ottenuti sono qui esposti:

Cavie	Infettate da giorni	Ceppo di <i>C. burneti</i> usato	Intradermoreazione con antigene	
			Lederle	Babudieri
1	173	G. A.	±	++
2	120	»	+++	++
3	120	»	+++	++
4	45	Cap.	+	±
5	45	»	+	+
6	37	N. M.	±	++
7	37	»	++	+
8	30	G. A.	+	++
9	30	»	±	++
10	30	»	—	—
11	26	»	++	++
12	26	»	++	++
13	26	»	++	++

G. A. - Grottazzolina. — Cap. - Capodistria. — N. M. - Nine Mile.

Come risulta dalla tabella, c'è in genere una discreta corrispondenza tra il risultato della seroreazione e quello della intradermoreazione. In un unico caso quest'ultima è risultata del tutto negativa con ambedue gli antigeni. Per le altre, con l'antigene Lederle si sono avute nove reazioni nettamente positive e tre debolmente; con quello Babudieri, undici nette e una debole. E' da notarsi che la cavia n. 10, che ha dato ambedue le intradermoreazioni negative, era, assieme a quella n. 9, che ha pure reagito debolmente con l'antigene Lederle, l'unica cavia infettata per via transcongiuntivale; tutti gli altri animali erano stati infettati, o per via sottocutanea o per via orale. Non si può escludere che la via d'introduzione del germe patogeno possa influire sui risultati dell'intradermoreazione.

Se si confrontano i risultati ottenuti dall'impiego dei due antigeni, si vede che mentre in parecchi casi le reazioni date dai due antigeni sono state press'a poco equivalenti, in altri invece la corrispondenza è mancata, nel senso che talvolta la reazione più intensa è stata dovuta all'uno, talvolta all'altro dei due antigeni. Se confrontiamo i casi discordanti con i risultati delle seroreazioni, comprese fra queste anche quelle debolmente positive, constatiamo che l'antigene Lederle sembra di solito, ma non sempre, esser dotato di una maggiore sensibilità, ma in compenso quello Babudieri è notevolmente più specifico.

Se poi consideriamo il giorno dall'inoculazione in cui l'intradermoreazione ha raggiunto il suo massimo d'intensità vediamo che con l'antigene Lederle ciò accade tra il VI ed il X, con quello Babudieri tra il V ed il XV. Anche per quanto riguarda la prima comparsa della reazione, vediamo che con quello Lederle ciò avviene in genere dopo 5 giorni, con quello Babudieri in genere dopo 7.

In conclusione possiamo dire che l'intradermoreazione concorda bene con la seroreazione quando questa è negativa. Quando invece questa è positiva, ne discorda non di rado; essa può quindi in tale caso essere usata come un buon criterio orientativo, ma non si può dare ad essa un valore assoluto. Un notevole significato essa ha soltanto se risulta molto intensamente positiva. Soltanto ulteriori ricerche potrebbero rivelare quale delle due reazioni abbia maggior valore di specificità nei casi in cui esse non concordano. Fra i due antigeni da noi usati, sembra essere preferibile, anche se più tardivo, quello Babudieri.

Secondo scopo dei nostri studi era quello di ricercare se l'intradermoreazione avesse i requisiti per poter essere usata ai fini della diagnosi precoce dell'infezione.

A questo scopo abbiamo infettato per via sottocutanea, con il ceppo Crottazzolina un gruppo di cavie. A distanze scalari a tali animali sono

state praticate tanto la deviazione del complemento che l'intradermoreazione con i due antigeni. I risultati sono riferiti nella tabella seguente:

Cavie	Distanza in giorni dall'infezione	Deviazione del complemento	Intradermoreazione con antigene	
			Lederle	Babudieri
1	3	1 : 4 —	—	—
2	3	1 : 4 —	—	—
3	3	1 : 4 ± 1 : 8 —	—	—
4	5	1 : 4 —	—	—
5	5	1 : 4 ± 1 : 8 —	—	—
6	7	1 : 64 + 1 : 128 —	?	? (+)
7	7	1 : 4 —	—	—
8	7	1 : 256 + 1 : 512 —	?	? (+)
9	7	1 : 512 + 1 : 1024 —	±	—
10	9	1 : 32 + 1 : 64 ±	?	? (+)
11	9	1 : 32 + 1 : 64 ±	—	±
12	10	1 : 128 + 1 : 256 —	—	—
13	10	1 : 64 + 1 : 128 —	—	—
14	11	1 : 256 + 1 : 512 —	±	—
15	11	1 : 2048 + 1 : 4096 ±	?	? (+)
16	16	1 : 1024 + 1 : 2048 ±	—	—
17	16	1 : 512 + 1 : 1024 ±	±	—
18	26	1 : 512 + 1 : 1024 ±	+++	++
19	26	1 : 512 + 1 : 1024 ±	+++	++
20	26	1 : 512 + 1 : 1024 ±	+++	++
21	30	> 1 : 16	++	+

(+) La cavia è venuta a morte nei 5 giorni successivi all'intradermoreazione.

Dalla tabella risulta evidente che l'intradermoreazione diventa positiva più tardivamente che la seroreazione. Se, come nel nostro caso, la dose infettante è piuttosto elevata, la deviazione del complemento dà, nella maggior parte dei casi, un risultato probativo già in settima giornata, mentre l'intradermoreazione si fa positiva molto più tardi, appena tra la sedicesima e la ventiseiesima giornata. Di conseguenza riteniamo che, anche a prescindere dalla sua maggiore o minore concordanza con la reazione

di deviazione del complemento, l'intradermoreazione non possa essere impiegata per una diagnosi precoce.

Riassumendo, dalle nostre ricerche risulta che, per lo meno nella cavia, l'intradermoreazione merita di essere applicata per la diagnosi dell'avvenuta infezione da *C. burneti*, a patto però che non si voglia attribuire ad essa un valore assoluto, specie se risulti negativa. Essa non può però servire per una diagnosi precoce. Le nostre conclusioni si riferiscono naturalmente soltanto alla cavia; è noto che la sensibilità delle varie specie animali all'introduzione intradermica di una sostanza estranea all'organismo stesso, può variare notevolmente, ed è molto probabile che la specie umana presenti una frequente e notevole recettività al fattore aspecifico che è certamente contenuto negli antigeni da noi usati: con ciò si spiegherebbero i poco convincenti risultati che altri ricercatori hanno ottenuto nell'uomo. Del pari le nostre ricerche non ci permettono di esprimere un parere positivo o negativo sulla reazione proposta ed applicata da MIRRI nei bovini e negli ovini.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia, 4 novembre 1950.

BIBLIOGRAFIA

- (1) GIROUD P., C. R. Soc. Biol. (1939), 130, 230
 - (2) BLANC G., NOURY M., C. R. Soc. Biol. (1939), 130, 234.
 - (3) GIROUD P., C. R. Soc. Biol. (1941), 135, 1296.
 - (4) MIRRI A., Ann. Sanità Pubbl. (1950), 11
 - (5) PATRIGNANI, comunicaz. verbale.
 - (6) LOPES A., comunicaz. verbale.
-