

B. BALDELLI, G. A. POLIDORI, V. GRELLONI, M. PRINCIPATO, A. MORETTI e
D. PIERGILI FIORETTI - Il metodo ELISA per la ricerca di anticorpi
in bovini affetti da ipodermosi: risultati preliminari. (*Istituto di Parasitologia, Università di Perugia*) *.

L'ipodermosi bovina, parassitosi di notevole importanza dal punto di vista zoo-economico, ricorre con inusitata frequenza anche negli allevamenti della regione umbra, soprattutto negli animali importati o allevati allo stato brado. Nei bovini parassitati sono state proposte reazioni sierologiche (fissazione del complemento, agglutinazione condizionata, *tests* di precipitazione) al fine di studiare il comportamento immunologico degli animali, ma i *tests* sierologici più moderni e più attendibili (doppia diffusione in gel, emoagglutinazione indiretta, immunoelettroforesi, immunofluorescenza) sono stati usati in campo umano dopo l'ipodermosi è affezione poco conosciuta ma non del tutto eccezionale.

Nel caso dei bovini, abbiamo studiato la possibilità di adottare, per il rilievo degli anticorpi circolanti, il metodo ELISA, di cui riferiamo sinteticamente i risultati preliminari anche perché la tecnica anzidetta non è stata mai utilizzata nell'ipodermosi sia bovina che umana.

Antigeni: sono stati preparati a partire da esemplari di larve di *H. bovis* di III stadio utilizzando il materiale in toto delle larve (*antigene n. 1*) o il contenuto interno delle larve stesche private della cuticola (*antigene n. 2*).

I materiali suddetti triturati in mortaio con aggiunta di tampone sodio carbonato (0,1 M., pH 9,6) contenente lo 0,02 % di NaN₃, congelati e scongelati ripetutamente, sono stati trattati per 3 volte per 2' con gli di bovini indenni di controllo, i due antigeni sono stati titolati, messi a

* Ricerche eseguite nell'ambito del Progetto Finalizzato « Incremento delle disponibilità degli alimenti di origine animale » del C.N.R.

confronto ed è stato prescelto per le prove ulteriori l'*antigene interno* (antigene n. 2) alla diluizione di 1/1.000 a contenuto proteico pari a gamma 28/ml.

Sieri: Sono stati usati n. 10 campioni di siero di bovini affetti da Ipodermosi, raccolti al momento della espulsione delle larve di III stadio di *H. bovis* e n. 9 campioni di siero di animali indenni di controllo, diluiti per raddoppio da 1/10 a 1/320 in tampone di fosfati (0,1 M., pH 7,2) (PBS) ultrasuoni, centrifugati a 3000 r.p.m. per 15' e successivamente a 10.000 r.p.m. per 1h.: il surnatante è stato raccolto, controllato per il suo contenuto proteico con il metodo di Lowry ed utilizzato come antigene.

Dopo alcuni saggi preliminari con « pool » di sieri di bovini parassitati e contenente lo 0,5 % di Albumina bovina (BSA) e lo 0,05 % di Tween 20.

Coniugato: sono state utilizzate anti-globuline bovine IgG (H + L) marcate alla perossidasi della *Nordic Immunology* diluite 1/500 in PBS contenente il 4 % di BSA e lo 0,05 % di Tween 20.

Liquido di lavaggio: è stato usato PBS contenente lo 0,05 % di Tween 20.

Substrato: era rappresentato da 9 p. di 5AS (acido 5-amino salicilico) a pH 6 e da 1 p. di H₂O₂ allo 0,05 %.

Tecnica: è stata eseguita la metodica ELISA in uso nell'Istituto (B. Baldelli e coll., 1978, Parassitologia, XX) secondo la tecnica in tubi di polistirene e con lettura delle reazioni allo spettrofotometro a 449 nm.

RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati sono riferiti sinteticamente nella tabella n. 1. Dall'esame di essa si evince che i valori OD più elevati sono stati ottenuti nei 10 campioni di siero di bovini affetti da ipodermosi, mentre nei soggetti indenni dalla parassitosi tali valori sono relativamente bassi.

Ai fini di una valutazione esatta dei titoli anticorpali si è tenuto conto della media dei valori ottenuti, nella diluizione minore, nei 9 sieri di controllo + 3 volte la deviazione standard e sono stati ritenuti positivi tutti gli *Extinction values* superiori a questo livello.

Applicando questo criterio e determinato che nei campioni di controllo alla diluizione dei sieri 1/10 il valore $\bar{x} \pm 3s$ era uguale a 0,025, è stato possibile accertare che i sieri degli animali affetti da ipodermosi erano positivi al *test* ELISA ai titoli di 1/10 (siero n. 9), di 1/80 (sieri nn. 1, 2, 4, 5, 6), di 1/160 (sieri nn. 3, 7, 10) e di 1/320 (siero n. 8).

Senza voler trarre delle conclusioni definitive, le ricerche da noi condotte

TABELLA I

RISULTATI DELL'APPLICAZIONE DEL METODO ELISA PER LA RICERCA DI ANTICORPI IN BOVINI AF-FETTI DA IPODERMOSI

Siero n.	Malattia	ELISA (Extinction value)					
		1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
1	Ipodermosi	0,080	0,060	0,060	0,080	0,020	0,010
2	»	0,080	0,060	0,040	0,040	0,010	0
3	»	0,040	0,040	0,020	0,040	0,040	0
4	»	0,200	0,120	0,080	0,040	0,020	0
5	»	0,160	0,120	0,080	0,040	0,020	0
6	»	0,080	0,080	0,060	0,060	0,020	0
7	»	0,200	0,160	0,120	0,080	0,060	0,020
8	»	0,500	0,440	0,320	0,180	0,100	0,060
9	»	0,040	0	0	0	0	0
10	»	0,160	0,120	0,080	0,060	0,040	0,020
11	Controllo	0,020	0,040	0,010	0	0	0
12	»	0,020	0,020	0,020	0,020	0	0
13	»	0,020	0	0,020	0	0	0
14	»	0,040	0,020	0,010	0	0	0
15	»	0,040	0,040	0,020	0	0	0
16	»	0	0	0	0	0	0
17	»	0	0	0	0	0	0
18	»	0,040	0,020	0,020	0	0	0
19	»	0	0	0	0	0	0

Sieri di controllo 1/10 : $\bar{x} \pm 3s = 0,025$

ci autorizzano a ritenere che il metodo ELISA, da noi proposto, sembra offrire sufficienti garanzie per la ricerca e per lo studio degli anticorpi circolanti nei bovini parassitati da larve di *H. bovis*, come pure — verosimilmente — per la diagnosi dell'ipodermosi umana.

I risultati ottenuti ci incoraggiano anche a proseguire le ricerche allo scopo di:

a) studiare e perfezionare la tecnica di preparazione dell'antigene tenendo presente che il parassita ha un'evoluzione biologica nell'organismo bovino durante la quale si hanno successivamente le larve di I, II e III stadio che possono avere una differente costituzione antigene (C. Boulard *et al.*, 1979, *Med. et Maladies Infect.*, 9, 393), J. M. Doby, 1970, *Bull. Soc. Path. Exot.*, 63, 716), e considerando il fatto da noi accertato che l'antigene più efficiente è quello cosiddetto interno, allestito cioè dal contenuto delle larve private della cuticola;

b) indagare sul comportamento immunologico degli animali durante tutto il decorso (circa un anno) della parassitosi e cioè dalla contaminazione fino alle manifestazioni cliniche ed alla espulsione del parassita.