

DICROCELIOSI OVINA: INSORGENZA E DECORSO DELLA  
INFEZIONE DA *DICROCOELIUM DENDRITICUM* STUDIATI CON  
METODI PARASSITOLOGICI E SIEROLOGICI (ELISA) IN  
QUATTRO GRUPPI DI OVINI DI TRACCIA \*

M. AMBROSI B. BALDELLI D. PIERGILI FIORETTI G. A. POLIDORI  
V. GRELLONI A. MORETTI M. PRINCIPATO

Ovine dicrocoeliosis: onset and course of *D. dendriticum* infection studied by parasitological and serological (ELISA) methods in four groups of ovines.

The onset and course of *D. dendriticum* infection were studied on four groups of ovines (2-3 months and 6-7 months old lambs) born and bred in sheepfolds and exposed, in different moments, to natural infection in notoriously contaminated pastures belonging to districts of Gubbio (2 groups of 15 animals each) and Assisi (2 groups of 15 animals each). The animals were examined regularly for periods varying from 4 to 10 months. Blood samples (for ELISA test to detect serum antibody) and faecal samples (for parasitological research) were taken every 15 day from each animal. After a «pre-patent» period varying from 6 to 12 weeks, all experimental animals eliminated *D. dendriticum* eggs. Serologically ELISA showed its full validity evidencing high titres of antibodies to *D. dendriticum* which appeared prematurely (4-8 weeks before) compared with «patency» of the parasite. It is concluded that the first antigenic stimulus is caused in animals by the «adolescaries» during the invasive phase of the host.

Le ricerche di cui riferiamo nella presente comunicazione traggono origine dalle indagini (Ambrosi e Polidori, 1978) che ci avevano permesso di accertare la notevole diffusione della dicrocoeliosi ovina in Umbria dove colpisce il 91,5-100% dei greggi e il 75-88,66% dei capi con gravi ripercussioni sullo stato di salute e sul rendimento zoo-economico degli animali.

Tali ricerche hanno avuto lo scopo di studiare, dal lato parassitologico e sierologico, l'insorgenza e il decorso della infezione da *D. dendriticum* in quattro gruppi di ovini di traccia (agnelli di 2-3 mesi e di 6-7 mesi) nati ed allevati al chiuso ed esposti al contagio naturale in pascoli contaminati.

Con le suddette finalità sono stati posti sotto controllo sperimentale: — 2

\* Ricerche eseguite nell'Istituto di Parassitologia dell'Università di Perugia nell'ambito del Piano finalizzato «Incremento delle disponibilità alimentari di origine animale» del C.N.R.

Comunicazione presentata al X Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia (Alghero 20-23 Maggio 1980).

gruppi di ovini (allevate Valmarcola e, rispettivamente, agnelli Carestello) nel comune di Gubbio; — 2 gruppi di ovini (allevate Subasio e, rispettivamente, agnelli Subasio) nel comune di Assisi.

A far inizio dal mese di marzo, gli animali dei gruppi di cui sopra sono stati seguiti e controllati regolarmente due volte al mese per 4-10 mesi con prelievi di un campione di feci e di sangue da ogni singolo animale. Per quanto riguarda le feci, i singoli campioni sono stati sottoposti subito agli esami parassitologici quali e quantitativi per la ricerca delle uova di *D. dendriticum*; per i campioni di sangue, i relativi sieri sono stati separati, catalogati e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento delle prove sierologiche.

Per quanto riguarda le prove sierologiche, esse sono state effettuate con il metodo ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) con la tecnica ed i materiali di cui abbiamo riferito nelle precedenti comunicazioni (Piergili Fioretti e coll., 1980; Baldelli e coll., 1980) esaminando alla diluizione 1/40, nella stessa seduta, tutti i diversi campioni di sangue dello stesso soggetto raccolti quindicinalmente dall'inizio alla fine dell'esperimento in modo da controllare scrupolosamente la cinetica anticorpale; come controlli, sono stati usati sempre n. 5 campioni di siero di animali sicuramente indenni. Alla fine delle prove sierologiche, per ognuno dei quattro gruppi di ovini di traccia è stata fatta la media geometrica dei valori O.D. accertati nei campioni di siero prelevati nella stessa giornata e sono stati ritenuti positivi tutti gli *Extinction value* superiori alla media dei valori ottenuti nei 5 sieri di controllo + 3 volte la deviazione standard (99% di limite di confidenza).

## RISULTATI

**ALLEVE VALMARCOLA** (in comune di Gubbio): 15 ovini dell'età di circa 6 mesi (nati nel settembre-ottobre 1978), allevati al chiuso: usciti al pascolo il 12.4.1979: controllati 2 settimane prima dell'uscita al pascolo e ogni due settimane fino alla 20a settimana.

I risultati delle indagini sierologiche e parassitologiche sono riferiti sinteticamente nella fig. 1.

Come si desume dalla figura, gli animali siero-negativi nei saggi effettuati prima dell'uscita al pascolo hanno presentato successivamente anticorpi verso *D. dendriticum* che hanno raggiunto titoli significativi dopo 6 settimane dall'uscita al pascolo e 4 settimane prima dell'inizio della «patenza» per uova di *D. dendriticum* per aumentare progressivamente toccando i valori più elevati in 20a settimana.

Dal lato parassitologico va rilevato che tutti gli animali del gruppo hanno contratto la discroceliosi, che è stata accertata coprologicamente dopo un periodo di «pre-patenza» di 10-12 settimane dall'inizio del pascolo; va anche aggiunto che la eliminazione di uova di *D. dendriticum* è stata accertata, in tutti i soggetti, anche nelle settimane successive (14a, 16a, 18a e 20a), cioè fino al termine dell'esperimento.

*AGNELLI CARESTELLO* (in comune di Gubbio): 15 agnelli dell'età di circa 3 mesi (nati nel Febbraio 1979) allevati al chiuso: usciti al pascolo il 30.4.1979: controllati 2 settimane prima dell'inizio del pascolo e ogni due settimane fino alla 20a settimana.

I risultati delle indagini sierologiche e parassitologiche sono riferiti sinteticamente nella fig. 2.

Come si rileva dalla figura, anticorpi verso *D. dendriticum* sono stati rilevati a livello modesto nel primo prelievo di sangue, quando gli animali avevano l'età di mesi 2-2½ e si tratta verosimilmente — anche per le osservazioni fatte in altri agnelli (vedasi la comunicazione Baldelli e coll.) — di anticorpi passivi trasmessi dalla madre con il colostro il che trova conferma nella negatività dei reperti sui campioni dei due prelievi successivi. A distanza di 4 settimane dall'inizio del pascolo la curva anticorpale presenta un innalzamento significativo per raggiungere livelli sempre più elevati, prima e dopo il periodo di «patenza» per uova di *D. dendriticum*.

Dal lato parassitologico, va rilevato che tutti gli animali del gruppo hanno contratto la dicroceliosi, che è stata accertata coprologicamente dopo un periodo di «pre-patenza» di 12-14 settimane dall'inizio del pascolo; va anche aggiunto che la eliminazione di uova del trematode è stata accertata, in tutti i soggetti anche nelle settimane successive (18a e 20<sup>a</sup> settimana), cioè fino al termine dell'esperimento.

*ALLEVE SUBASIO* (in comune di Assisi): 15 ovini dell'età di circa 6 mesi (nati nel settembre-ottobre 1978), allevati al chiuso, condotti al pascolo il 20.3.1979 in una zona di pianura in comune di Foligno e successivamente (nei primi giorni di maggio) sulle pendici del monte Subasio: controllati 2 settimane prima dell'uscita al pascolo e successivamente ogni due settimane fino alla 16a settimana.

I risultati delle indagini sierologiche e parassitologiche sono riferiti sinteticamente nella fig. 3.

Come si deduce dalla figura, gli animali sono risultati sierologicamente negativi per anticorpi verso *D. dendriticum* fino alla 6-8a settimana dall'inizio del pascolo (fino all'8° mese di vita); dalla 10a settimana dopo l'inizio del pascolo ha avuto inizio un deciso movimento anticorpale che è andato progressivamente aumentando fino a raggiungere l'acme in 16a settimana; la comparsa degli anticorpi si è verificata 6 settimane prima della «patenza» per uova di *D. dendriticum*.

Dal lato parassitologico, va rilevato che tutti gli animali del gruppo hanno contratto la dicroceliosi e che il periodo di «pre-patenza» è risultato piuttosto lungo (16 settimane): ciò trova giustificazione — secondo il nostro modesto avviso — nel fatto che gli animali sono stati condotti al pascolo nel mese di marzo (quando non erano presenti le formiche portatrici di metacercarie) e, almeno in un primo tempo, in una zona di pianura del folignate di cui ci mancano elementi circa la diffusione del parassita e degli ospiti intermedi.

*AGNELLI SUBASIO* (in comune di Assisi): 15 soggetti dell'età di circa 2 mesi

(nati nella seconda quindicina di febbraio 1979), allevati al chiuso, condotti al pascolo l'1.5.1979: controllati due settimane prima dell'uscita al pascolo e successivamente ogni due settimane fino alla 10a settimana.

I risultati delle indagini sierologiche e parassitologiche sono riferiti sinteticamente nella fig. 4.

Come si deduce dalla figura, gli animali sono risultati sierologicamente sempre positivi per anticorpi verso *D. dendriticum*, ma tenuto conto della giovane età dei soggetti e delle osservazioni fatte in altri agnelli seguiti dalla nascita (vedasi la comunicazione Baldelli e coll.), è da ritenere che gli anticorpi rilevati nei primi mesi siano di origine colostrale e che successivamente — si noti l'impennata del titolo in 8a settimana! — la positività sierologica debbasi attribuire ad anticorpi elaborati direttamente dagli agnelli in rapporto con l'avvenuta contaminazione parassitaria che è documentata dalla «patenza» per uova di *D. dendriticum*.

Dal lato parassitologico, va rilevato che tutti gli animali del gruppo hanno contratto la dicroceliosi e che il periodo di «pre-patenza» per uova di *D. dendriticum* (calcolato dal momento dell'inizio del pascolo) è stato piuttosto breve (8-10 settimane) e ciò trova giustificazione nel fatto che l'uscita al pascolo è avvenuta nei primi giorni di maggio, quando le possibilità di contaminazione con le formiche portatrici di «metacercarie» erano notevoli.

#### CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati delle nostre indagini ci sembra lecito concludere che:

1) tutti gli animali dei quattro gruppi di ovini in esperimento hanno contratto spontaneamente la Dicroceliosi, il che conferma la già riconosciuta alta contaminazione delle zone di Gubbio e di Assisi prescelte appositamente per queste indagini;

2) il periodo di «pre-patenza», valutato a partire dall'inizio del pascolo è stato di 8 settimane per gli «agnelli Subasio», di 10 settimane per le «allevi Valmarcola», di 12 settimane per gli «agnelli Carestello» e di 14 settimane per le «allevi Subasio»; per i primi tre gruppi di ovini è stato quindi accertato un periodo di pre-patenza compatibile con le valutazioni di Euzeby mentre per il gruppo «allevi Subasio» esso è stato più lungo ma ciò trova giustificazione nel fatto che l'uscita al pascolo è avvenuta nel mese di marzo (quando era meno probabile la contaminazione con formiche portatrici di «metacercarie») in terreno di pianura (in comune di Foligno) in località di cui ci sfuggiva e ci sfugge la situazione relativa alla contaminazione dell'ambiente;

3) attraverso il metodo ELISA, da noi proposto ed applicato per la ricerca degli anticorpi verso *D. dendriticum* negli ovini, ci è stato possibile seguire il comportamento immunologico degli animali in esperimento accertando: a) che la comparsa degli anticorpi è precoce (4-8 settimane o anche più) rispetto alla «patenza» del parassita, sì da ritenere che il primo stimolo antigenico

venga esercitato negli animali dalle «adolescarie» durante il periodo invasivo dell'ospite; b) che, tali anticorpi, come si deduce dai risultati ottenuti nel gruppo «agnelli Subasio», debbono essere riguardati come *testimoni* della parassitosi e non come anticorpi *protettivi*;

4) in accordo con le conclusioni di Calamel (1977), che ha impiegato la tecnica di Immunofluorescenza indiretta, la ricerca di anticorpi serici verso *D. dendriticum* negli ovini fornisce utili elementi per lo studio epidemiologico della dicroceliosi e a tale fine il metodo ELISA si presenta come uno strumento che offre tutte le garanzie di sensibilità e di validità.

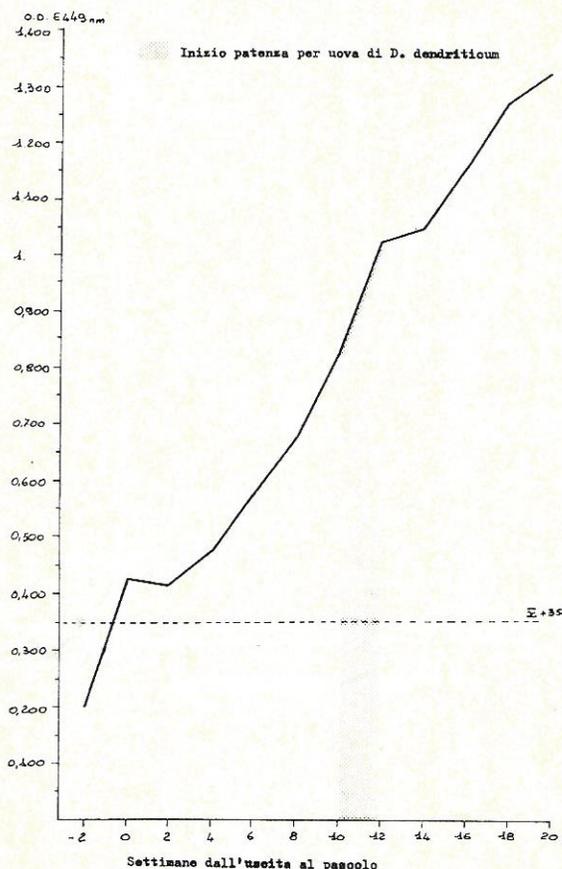


Fig. 1 Alleva Valmarcola  
15 soggetti dell'età di circa 6 mesi (nati nel settembre-ottobre  
1978) usciti al pascolo il 12.4.1979

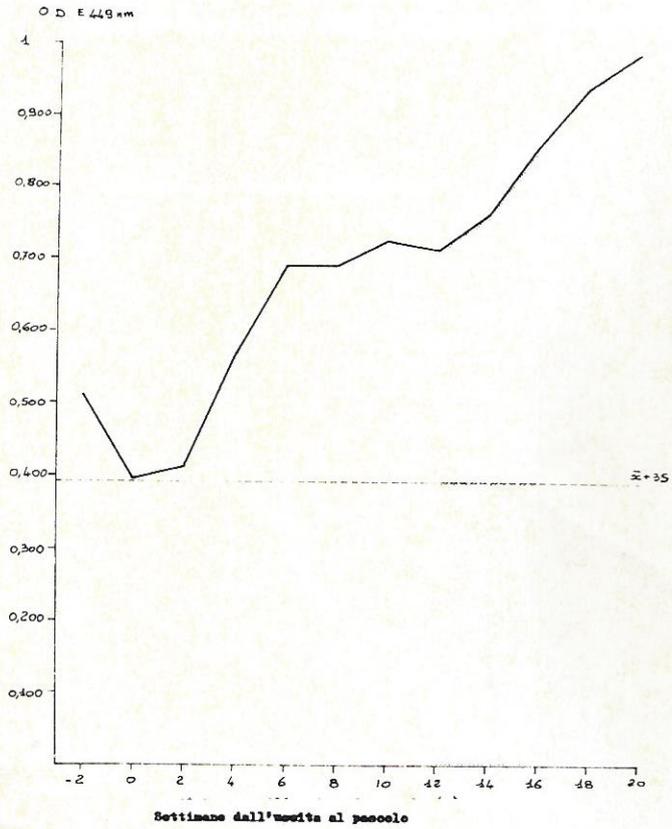


Fig. 2 Agnelli Carestello  
15 soggetti dell'età di circa 3 mesi (nati nel febbraio 1979)  
usciti al pascolo il 30.4.1979

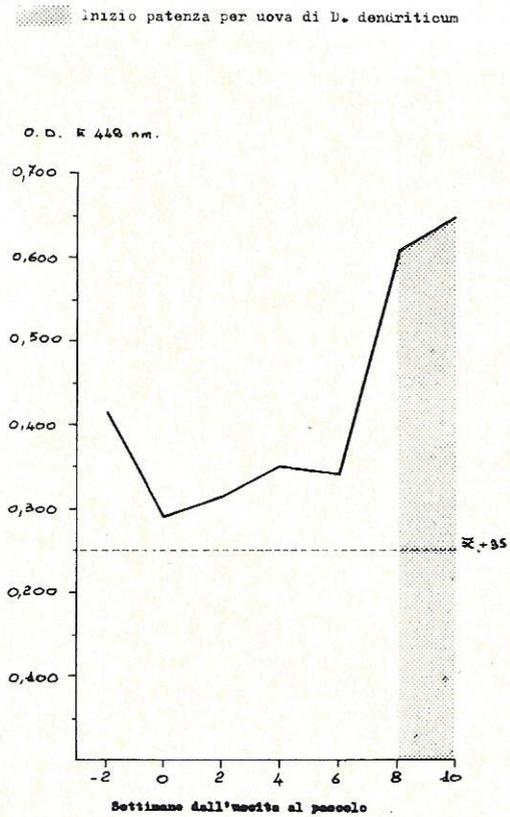


Fig. 3 Allevi Subasio  
 15 soggetti di circa 6 mesi (nati nel settembre-ottobre 1978)  
 usciti al pascolo il 20.3.1979 in zona di pianura e ricondotti  
 sulle pendici del Subasio nella prima decade di maggio.

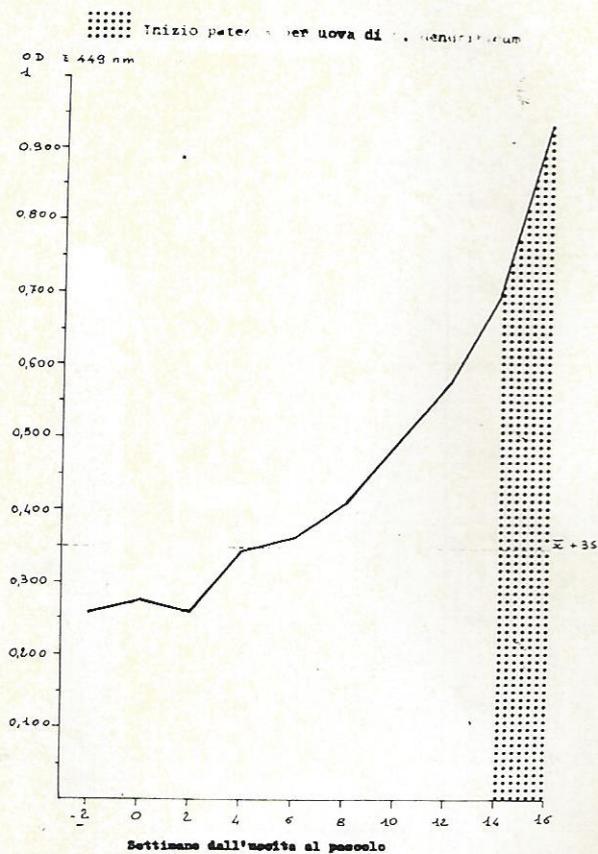


Fig. 4 Agnelli Subasio  
 15 soggetti dell'età circa di 2 mesi (nati nel febbraio 1979)  
 usciti al pascolo l'1.5.1979.

## BIBLIOGRAFIA

- AMBROSI, M., POLIDORI, G. A. (1978) — Osservazioni sulla diffusione della dicroceliosi ovina. *Atti Soc. It. Sci. Vet.*, 32, 365.
- PIERGILI FIORETTI, D., BALDELLI, B., AMBROSI, M., POLIDORI, G. A. & MORETTI, A. (1980) — Il metodo ELISA per la ricerca di anticorpi in ovini parassitati da *Dicrocoelium dendriticum*. *Rivista di Parassitologia*, 41, 289.
- BALDELLI, B., PIERGILI FIORETTI, D. & POLIDORI, G. A. (1980) — Studio immunologico di animali da esperimento trattati con antigeni parassitari di *Dicrocoelium dendriticum* e di *Fasciola hepatica* controllati con ELISA. *Rivista di Parassitologia*, 51, 293.
- CALAMEL, M. (1977) — Application de la technique d'Immunofluorescence indirecte e l'étude épidémiologique de la Dicrocoeliose. *Rec. Méd. Vét.*, 153, 343-348.