

CAPORALE, V.P., Donatella NANNINI, Giovanna SEMPRONI: PROVE COMPARATIVE TRA DEVIAZIONE DEL COMPLEMENTO IN PROVETTA, DEVIAZIONE DEL COMPLEMENTO MINIATURIZZATA ED IMMUNOELETTRO-OSMOFORESI NELLA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI MORBO COITALE MALIGNO

Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise-64100 Teramo)

Scopo della presente ricerca è stato quello di comparare la tecnica di deviazione del complemento miniaturizzata (DDC-mi) e la immunoelettro-osmoforesi (IEO) con la reazione di deviazione del complemento in provetta (DDC), considerata il test sierologico di scelta per la diagnosi del Morbo Coitale Maligno (MCM) (Watson, 1920; Domanski, 1948)

MATERIALI E METODI

Antigeni MCM: Antigene Te (Ag-Te): estratto acquoso di *Trypanosoma*, preparato con *Trypanosoma equiperdum* adattato al ratto, secondo la tecnica descritta da Mueller (1949).

Antigene standard (Ag-SA): gentilmente fornito dal Veterinary Research Institute, D. of A. Ondestepoort (RSA).

Siero standard: siero di cavallo con sintomi clinici di MCM, liofilizzato e standardizzato con Ag-SA, cui è stato dato, arbitrariamente, un titolo di 1000 unità devianti il complemento (U.Te/ml).

Sieri in esame: sono stati utilizzati, come sieri positivi, sieri di cavalli provenienti da una zona in cui il MCM era presente allo stato epidemico e, come negativi sieri provenienti da cavalli di allevamenti di zona sicuramente indenne, conservati a -25°C . I sieri sono stati prediluiti 1:3 in PBS addizionata di MgCl_2 e CaCl_2 a pH 7,2, ed inattivati a 56°C per 50 minuti.

Prova di deviazione del complemento in provetta (DDC): è stata utilizzata la tecnica utilizzata presso il Bundesanstalt fuer Tierseuchenbekämpfung di Moedlind (Austria) (comunicazione personale)

Prova di deviazione del complemento miniaturizzata (DDC-mi): è stata utilizzata la tecnica descritta da Baldelli e coll. (1975) con le seguenti modificazioni: 1) nelle prove preliminari e nella prova principale sono stati usati tempi di incubazione di 12 min. a 37°C ; 2) la sospensione di globuli rossi di montone era pari al 3% (v/v); 3) nella prova principale sono state utilizzate 1 unità di antigene, 2 unità di emolisina, e due unità di complemento/volume; 4) la lettura delle prove, effettuata immediatamente dopo l'incubazione e dopo centrifugazione a 600xg per 15 min. veniva fatta considerando come titolo del siero la più alta diluizione del siero che dava il 100% di fissazione del complemento. I risultati sono stati trasformati in U.Te/ml.

Elettroimmuno-osmoforesi (IEO): è stata utilizzata la tecnica descritta da Aguilar-Torres e coll. (1976) così modificata: su piastre di vetro (mm. 83x93x15) sono stati stratificati 16 ml. di agarosio all'1% in tampone TRIS-citrato pH 8,6. Sul agarosio sono state effettuate due doppie file di fori di 5 e 3 mm. di diametro distanziati di 4 mm. I sieri (nei pozzetti di diametro maggiore) e l'antigene, alla diluizione d'uso, posti rispettivamente accanto all'anodo ed al catodo sono stati fatti migrare per 60 min. a 500 V/25mA. La lettura dei risultati è stata effettuata sia subito dopo la corsa elettroforetica che dopo lavaggio in PBS pH 7,0 e colorazione con Coomassie Brilliant Bleu. I risultati registrati sono quelli osservati dopo colorazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati riportati nella Tabella 1 sembrano dimostrare che nelle prove di DDC non vi è alcuna differenza di sensibilità e di specificità tra l'Ag-SA e l'Ag-Te, mentre i risultati della Tabella 2 indicano che la prova di DDC-mi può sostituire, senza alcuna difficoltà la prova di DDC non essendovi, tra le due tecniche, nessuna differenza di sensibilità o specificità.

TABELLA 1. PROVA COMPARATIVA TRA ANTIGENE-TE E ANTIGENE-SA: RISULTATI DELLE PROVE DI DEVIAZIONE DEL COMPLEMENTO

U.Te/ml	Ag-SA no.sieri	Ag-Te no.sieri	Concordanza (%)
0	5	5	100.0
62.5	3	3	100.0
125.0	7	7	100.0
250.0	9	9	100.0
<i>Totale</i>	<i>24</i>	<i>24</i>	

TABELLA 2. PROVA COMPARATIVA CON Ag-Te TRA DEVIAZIONE DEL COMPLEMENTO IN PROVETTA E MINIATURIZZATA PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI MORBO COITALE

U.Te/ml	MALIGNO Prova sierologica		Concordanza (%)
	DDC no.sieri	DDC-mi no.sieri	
0	17	17	100.0
62.5	6	6	100.0
125.0	20	20	100.0
250.0	6	6	100.0
350.0	19	19	100.0
<i>Totale</i>	<i>68</i>	<i>68</i>	

Per saggiare la ripetibilità della DDC-mi, utilizzando la tecnica del doppio cieco, 5 sieri negativi e 20 sieri positivi sono stati divisi in 5 aliquote ciascuno e titolati. I risultati hanno concordato, perfettamente, all'89,7%; per il restante 10,3% le discordanze non sono mai state superiori a + una diluizione.

L'analisi statistica (chi-quadrato) dei risultati cumulativi riportati nella Tabella 3 non ha dimostrato alcuna differenza significativa tra DDC e IEO nella messa in evidenza di anticorpi anti Trypanosoma.

TABELLA 3. RISULTATI CUMULATIVI DELLE PROVE COMPARATIVE TRA DEVIAZIONE DEL COMPLEMENTO (DDC) E IMMUNOELETTRO-OSMOFORESI (IEO) PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI MORBO COITALE MALIGNO

Risultato prova	Prova		<i>Totale</i>
	DDC	IEO	
Positivi	33	37	70
Negativi	41	35	76
Dubbi		2	2
<i>Totale</i>	<i>74</i>	<i>74</i>	<i>148</i>

I risultati analitici riportati nella Tabella 4, però indicano che una parte (21,2%) dei sieri positivi alla DDC è negativa alla IEO e viceversa (il 28,2%). I sieri positivi alla IEO e negativi alla DDC erano risultati positivi a quest'ultima prova al momento del prelievo, ma erano stati conservati in modo non idoneo. La colorazione non ha aumentato la sensibilità dell'IEO e dopo colorazione, rispetto alla lettura fatta subito dopo la corsa

elettroforetica, alcuni sieri sono passati da negativi a positivi mentre altri da positivi sono diventati negativi.

TABELLA 4. RISULTATI ANALITICI DELLE PROVE COMPARATIVE TRA DEVIAZIONE DEL COMPLEMENTO (DDC) E IMMUNOELETTRO-OSMOFORESI (IEO) PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI MORBO COITALE MALIGNO

Risultato prova		no.sieri
+vi. DDC	+vi. IEO	26
+vi. DDC	-vi. IEO	7
-vi. DDC	-vi. IEO	28
-vi. DDC	+vi. IEO	11
-vi. DDC	+vi. IEO	2
TOTALE		74

I risultati analitici comparativi tra DDC e IEO se da un lato mostrano una leggera inferiore sensibilità della seconda, rispetto alla prima, dall'altro mostrano come sieri non perfettamente conservati possono divenire DDC negativi pur restando IEO positivi. Ottime appaiono la specificità, la rapidità e la semplicità dell'IEO la cui sensibilità potrebbe, probabilmente, essere aumentata, migliorando la qualità dell'antigene utilizzato. In ogni caso la IEO potrebbe già essere considerata una prova alternativa per sieri mal conservati o comunque inadatti per la DDC.

Sono in corso prove sia per ricercare un antigene più sensibile che per stabilire se la popolazione anticorpale reagente alla DDC sia la stessa che reagisce alla IEO.

BIBLIOGRAFIA: Aguilar-Torres, F.G., e coll. (1976), *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 25:667-670; Baldelli, R., e coll. (1975) *N. Ann. Igi. Micro.*, 26:179-190; Domanski, J. (1948), *Bull. Off. Int. Epiz.*, 29: 7-11; Mueller, J. (1949), *Nord. Vet.*, 1:895-904; Watson, E.A. (1920), *Ottawa: Canad. Dep. Agric., Hlth. of Anim. Branch*

SUMMARY: The possibility of using the microtiter technique for the diagnosis of dourine is reported. The microtiter technique has demonstrated satisfactory specificity and sensitivity and repeatability compared to the tube DDC. The good correlation found between IEO and DDC and the lack of positive reaction in negative sera suggest that IEO is a good diagnostic method for the detection of Trypanosoma equiperdum antibodies in horse serum.