

## La diagnostica sierologica nella clinica equina: valutazione dei titoli anticorpali

Per la diagnostica delle malattie infettive e parassitarie possiamo avvalerci di molteplici metodiche che utilizzano siero, plasma od altri materiali, differenti di volta in volta a seconda delle caratteristiche peculiari della malattia che costituisce il sospetto diagnostico. Un'importante differenziazione è quella tra la ricerca del titolo anticorpale / antigenico dopo contatto del sistema immunitario con l'agente infettivo (anticorpo, Ac - antigene, Ag) e la ricerca ed amplificazione genica dell'agente eziologico dopo prelievo del materiale idoneo tramite PCR (Polimerase chain reaction).

### Titolazione anticorpale (Ac)

Si effettua generalmente su siero o plasma. Permette di valutare la presenza di anticorpi (quindi una sieropositività) dopo che il sistema immunitario del paziente, non immunodepresso, ha preso contatto con l'agente eziologico oggetto di ricerca. Questo comporta la scelta del momento migliore per il prelievo ed uno sforzo supplementare per l'interpretazione dei risultati: una sieropositività infatti non indica necessariamente malattia, viceversa definisce un contatto diretto attuale o pregresso o ancora può indicare una vaccinazione avvenuta (gli anticorpi vaccinali sono raramente differenziabili). A questo proposito è molto importante chiarire il concetto di **siero-conversione**, che è un criterio di interpretazione basilare: effettuo un primo prelievo entro il 5°

giorno dall'inizio della sintomatologia e successivamente effettuo un secondo prelievo dopo 15-45 giorni dal primo. Confronto i titoli Ac rilevati: ho una **positività** se nel secondo esito l'aumento del titolo anticorpale è di almeno 4 diluizioni in base 2 (1:8 / 1:16 / 1: 32....) oppure, col solo siero/plasma prelevato dopo 15-45 giorni, se il titolo supera la soglia convenzionale fissata per quella data malattia che empiricamente indica un contatto con il patogeno / una profilassi vaccinale. Per alcune malattie gravi del cavallo la semplice positività è sufficiente a confermare la diagnosi anche in assenza di sintomatologia, attivando quindi le procedure di Polizia Veterinaria previste, con l'isolamento del soggetto: è il caso dell'*Anemia infettiva equina* e della *Morva*, mentre per l'*Arterite virale* ed il *Morbo coitale maligno* oltre alla positività viene valutata anche la presenza / eliminazione dell'agente eziologico con lo sperma o tramite le vie genitali prima di escludere il soggetto dall'attività riproduttiva.

### Metodiche di titolazione Ac

**ELISA indiretta:** si tratta della metodica più recente, standardizzata e veloce, utilizzabile per una titolazione anticorpale. Gli anticorpi del siero/plasma in esame (se presenti) si fissano su una fase solida con l'antigene (pozzetto), si aggiunge il marcatore con un enzima (perossidasi) e un substrato cromogeno. Se il cromogeno

incontra la perossidasi del marcatore che si è fissato alla fase solida in presenza degli anticorpi, abbiamo una reazione colorimetrica del pozzetto, altrimenti in assenza di anticorpi la reazione non avviene ed il campione non mostra alcun colore. Il pozzetto con la diluizione maggiore che mostra viraggio permette di quantificare la presenza degli Ac (maggiore è la diluizione che si colora, maggiore è la quantità di anticorpi presente).

Nella **Competitive ELISA** invece abbiamo un ulteriore passaggio: la colorazione viene valutata non direttamente ma tramite aggiunta di un secondo marcatore colorato che si fissa sul substrato in assenza di coniugazione con il primo marcatore: in questo caso si avrà colorazione in caso di assenza di anticorpi nel campione in esame ed il risultato espresso in % di colorazione va letto in senso inverso (maggiore è la colorazione, minore è il titolo anticorpale perché minore è la coniugazione con il primo marcatore). I valori ottici della colorazione espressa dalla reazione ELISA non sono correlabili con il titolo bensì con le caratteristiche del cromogeno, quindi l'interpretazione dei risultati non è operatore-dipendente.

**Immunofluorescenza indiretta:** la metodica indiretta prevede che gli anticorpi del siero/plasma da testare, se presenti, reagiscano legandosi ad un substrato di antigeni, utilizzando poi un secondo anticorpo coniugato con la sostanza fluorescente che si leghi al primo complesso Ag-Ac, quando presente, determinando

vari gradi di fluorescenza, valutabile come intensità da un operatore. Si tratta di una metodica di notevole amplificazione, molto sensibile, ma la fluorescenza deve essere interpretata e possono esserci casi dubbi sui valori soglia.

**Agglutinazione passiva diretta:** il principio utilizzato è la precipitazione dei globuli rossi (Gr) che si verifica se nel siero/plasma preso in esame vi è la presenza di anticorpi ad effetto agglutinante, utilizzando delle diluizioni seriali di materiale da esaminare e mettendole in contatto con dei Gr coniugati ad una quantità fissa di antigene. Risulta possibile valutare la sieropositività del campione espressa dalla formazione di un reticolo di eritrociti con precipitazione sul fondo del pozzetto e surnatante limpido. Viceversa, se il complesso Ag-Gr rimane in sospensione, senza che sia avvenuta quindi una agglutinazione, consideriamo il campione negativo. Molto sensibile e specifico, necessita di incubazione a temperatura controllata.

**Inibizione dell'emoagglutinazione:** viene utilizzata quando gli agenti eziologici sono emoagglutinanti, sia virus che batteri, mentre gli anticorpi ricercati non lo sono. Mettendo in contatto le varie diluizioni di siero/plasma da testare con una quota fissa di antigeni ed una quota di globuli rossi, se non si verificano degli immunocomplessi Ag-Ac si avrà emoagglutinazione con precipitazione verso il fondo del pozzetto delle emazie e quindi il campione testato risulterà negativo. Viceversa, una

soluzione in cui gli eritrociti rimangono in sospensione indica che nel materiale da testare sono presenti anticorpi che inibiscono la precipitazione e quindi considero il campione positivo con una titolazione corrispondente alla prima diluizione che non presenta agglutinazione.

**Fissazione del complemento:** permette di evidenziare una categoria di anticorpi che non danno alcuna azione visibile interagendo con l'antigene ma fissano il complemento che è composto da una serie di proteine presenti nella parte liquida del sangue che interagiscono con le membrane cellulari attivandone la lisi, coadiuvando e completando appunto l'azione del sistema immunitario. Si mette in contatto il siero/plasma da testare con l'Ag e si incuba a 56° C per 30 minuti per attivare il complemento. Se si verifica la reazione Ag+Ac, questo „fissa“ il complemento che quindi non è più disponibile per altre reazioni (in questo caso per la lisi delle emazie se si immettono successivamente degli eritrociti con Ac anti emazie abbinati) e possiamo considerare il nostro campione positivo. Se invece il materiale da testare è privo di anticorpi, il complemento rimarrà libero ed avremo l'emolisi nella seconda reazione che qualifica il nostro campione come negativo.

**Sieroneutralizzazione:** si utilizza per la diagnostica sierologica da virus citopatico, che provoca cioè dei danni visibili su tessuto-coltura. Il virus incubato nella tessuto-coltura, posto a contatto con l'emosiero di un soggetto con anticorpi,

perde il suo potere infettante perché gli Ac specifici ricoprono i virioni ed ne impediscono l'adsorbimento in condizioni di temperatura e tempistica adatti. Se il virus è rimasto libero, posso vedere sul tessuto un effetto citopatico con interruzione del monostrato cellulare, viceversa ciò non avviene. Il titolo sieroneutralizzante risulta essere la diluizione massima che neutralizza il virus. L'allestimento delle linee cellulari e delle diluizioni virali standardizzate non risulta molto pratico, quindi quando possibile si preferiscono metodiche più recenti ed immediate come ELISA e IF.

**Immunodiffusione in gel di Agar (AGID test):** si tratta di una metodica di precipitazione radiale, semi-quantitativa, ad interpretazione, che richiede tempistica di almeno 24 ore. Si utilizza una piastra di Petri con un pozzetto centrale contenente l'Ag, circondato da 3 pozzetti con reagente con Ac e 3 pozzetti dove posizionare il siero da testare. Se il siero è negativo, avremo delle linee di precipitazione Ag-Ac sul gel di Agar solamente tra il pozzetto centrale con l'Ag ed i 3 conosciuti positivi (gli altri 3 pozzetti non avranno alcuna linea), altrimenti avremo altre linee di precipitazione, una per ogni campione positivo dei 3 da esaminare. È la metodica ufficiale per la conferma di positività per l'Anemia infettiva, purtroppo la tempistica è di almeno 24 ore e l'allestimento delle piastre è piuttosto laborioso ma a differenza della metodica ELISA non sono possibili reazioni crociate.