

## La diagnostica delle malattie infettive nel cavallo: PCR e test sierologici (1) - Patogeni enterici e respiratori

Dott.ssa Susanna Mereghetti

Negli ultimi anni si è verificato un aumento dell'incidenza di numerose malattie infettive, sia a causa delle modificazioni climatiche che hanno dilatato i tempi e le zone di sopravvivenza degli eventuali artropodi vettori, che per effetto dell'aumento della vita media dei nostri pazienti, e delle intense movimentazioni (anche internazionali) degli equini sportivi.

Fortunatamente anche la diagnostica si è molto affinata negli ultimi anni, rendendo più comodi, rapidi e veloci i test diagnostici per queste patologie: vediamo in dettaglio quali test per quali malattie.

### Test sierologici

Si basano sulla rilevazione di anticorpi nel siero di animali che hanno avuto un contatto con l'agente patogeno (virale, batterico o parassitario). Si tratta quindi di una metodica diagnostica indiretta, che comporta la scelta del momento idoneo per il prelievo (di solito alcuni giorni dopo l'insorgenza dei sintomi) e uno sforzo supplementare per l'interpretazione dei risultati: una sieropositività infatti definisce un contatto diretto attuale o pregresso con l'agente eziologico ricercato, ma anche, semplicemente, una vaccinazione. Sono disponibili differenti metodiche: i test più moderni utilizzano la tecnica ELISA che è caratterizzata da sensibilità e specificità

molto elevate e utilizza una reazione colorimetrica in presenza di anticorpi, mentre in assenza di anticorpi il campione non mostra alcun colore. Alcuni test utilizzati oltre alla classica ELISA (diretta/indiretta, reverse, competitive), sono l'immunofluorescenza indiretta (IFAT), l'inibizione dell'emoagglutinazione (HAH), l'agglutinazione (MAT), la fissazione del complemento (CFT), l'immunodiffusione in gel di agar (AGID), la sieroneutralizzazione virale (VN).

Per una diagnostica di certezza tramite test sierologici è necessario valutare la *sieroconversione*, ovverosia l'aumento significativo del titolo anticorpale per il dato patogeno in due prelievi distanziati di 15 / 45 gg uno dall'altro (vedi approfondimento "La diagnostica sierologica nella clinica equina: valutazione dei titoli anticorpali" - Aprile 2017), oppure considerare la presenza di IgM, che testimoniano un contatto recente (nei 20 gg precedenti) con l'agente eziologico cercato. In questo modo possiamo con ragionevole certezza ricondurre la sintomatologia corrente alla positività riscontrata.

Laboklin offre per molti test sierologici la rilevazione delle IgM, anche se la misurazione di questo tipo di anticorpi non è possibile per tutte le patologie.

## PCR

Questa metodica, perfezionata negli anni 80 del secolo scorso, permette di rilevare nei liquidi biologici, in vari tessuti, in tamponi a secco la presenza di parti di DNA dell'agente eziologico ricercato, con cicli ripetuti di amplificazione in vitro. Questa tecnica si è evoluta con molteplici varianti (Real time, Nested, etc....) permettendo la rilevazione dei microrganismi per via diretta, senza basarsi sulla reattività del sistema immunitario del paziente.

Queste amplificazioni comportano una sensibilità maggiore rispetto alla coltura, in quanto i diversi cicli ripetuti vanno ad esaltare la presenza anche di piccole parti di DNA del patogeno ricercato nella matrice fornita. Non è possibile quindi rilevare alcuna informazione sulla virulenza o vitalità del microrganismo isolato e non per tutte le metodiche è possibile la sua quantizzazione.

L'estrazione del genoma è possibile da molti materiali: sangue intero, siero, cute, croste e peli, tampone a secco (senza medium) proveniente da scoli, tessuti vari preferibilmente non fissati, feci, urina e sperma, liquidi cavitari, etc. in base alle caratteristiche peculiari della malattia (vedi approfondimento "La diagnostica PCR nella clinica equina"- maggio 2017).

Vediamo in dettaglio per le singole malattie quando è preferibile avvalersi del test sierologico e quando è invece indicato utilizzare una PCR per la diagnosi e su quale materiale.

## Patogeni enterici

### **Clostridiosi**

Per queste patologie abbiamo a disposizione delle PCR specifiche che utilizzano come matrice feci e contenuto gastrico, sia per la rilevazione dell'agente eziologico come *Clostridium difficile* / *perfringens* / *botulinum* che per le loro tossine: A, B, F e botulinica.

I test sierologici sono generalmente poco indicati per le clostridiosi enteriche, date le caratteristiche iperacute di questo gruppo di malattie, per le quali la presenza dell'agente patogeno nelle feci è sufficiente per la diagnosi ed è inoltre importante rilevare i soggetti diffusori asintomatici.

Per *Clostridium botulinum* disponiamo invece anche di un test sierologico per la ricerca della tossina e dell'agente patogeno in circolo, date le caratteristiche sistemiche della malattia.

### **Salmonella**

*Salmonella enterica* è ricercabile tramite PCR su feci ed è anche disponibile un test sierologico per *Salmonella abortus equi*, da proporre alle fattrici che hanno abortito.

Non è disponibile invece la PCR sugli invogli fetali specifica per questo tipo di agente.

### **Coronavirus equino**

Nell'equino l'infezione da *Coronavirus* si manifesta con una sintomatologia enterica e non prettamente respiratoria, quindi la diagnosi si effettua con una PCR su feci o su piccole biopsie intestinali di tessuto non

fissato in formalina (vedi approfondimento “Coronavirus equini” - Aprile 2021).

### **Parvovirus, Lawsonia intracellularis, Rotavirus A e Rhodococcus oagii nel puledro**

Si tratta di patogeni enterici caratterizzati da un decorso acuto di malattia con pesanti sintomi intestinali, per i quali Laboklin offre la PCR per la rilevazione dell’agente eziologico nelle feci o nel tessuto intestinale post-mortem. Possiamo rilevare anche *Rhodococcus oagii* nelle feci di puledri malati, sebbene la rodococcosi si presenti principalmente con sintomi respiratori ed ascessi polmonari: ne parleremo estesamente nel prossimo capitolo.

### **Patogeni respiratori**

#### **Streptococcus equi / zooepidemicus**

Per la diagnosi di adenite da *Streptococcus equi / zooepidemicus* è indicata la PCR su lavaggio delle tasche gutturali e, come alternativa, da tampone nasale o da linfonodo ascessuale. Questa metodica permette inoltre di identificare i portatori sani eliminatori, che rappresentano un problema epidemiologico importante e contribuiscono alla diffusione del batterio nell’ambiente. E’ possibile anche una coltura da tampone con medium, con tempistiche però maggiori rispetto all’esecuzione della PCR.

Il test sierologico non è indicato, sia per l’esistenza del vaccino (anche se non presente in Italia) che per il fatto che la sieropositività testimonia un contatto con l’agente eziologico che potrebbe essere avvenuto anche molto lontano nel tempo, e quindi non particolarmente utile ai fini diagnostici.

#### **Herpesvirus 1,4**

Le malattie erpetiche nel cavallo possono originare forme respiratorie, neurologiche, o abortive. Per la forma respiratoria da Herpesvirus 1,4 la PCR da tampone nasale è diagnostica nel caso di fase diffusiva, dato che il virus si localizza e viene escreto dalla mucosa nasale. Sappiamo però che i virus erpetici attraversano delle fasi variabili di quiescenza, pertanto la PCR su sangue - e potenzialmente anche da tampone nasale - è indicata in una fase acuta viremica e in presenza di febbre. Viceversa il test sierologico è maggiormente attendibile nelle forme croniche ricorrenti dato che la presenza di anticorpi (e un’eventuale sieroconversione) testimoniano che si è avuta viremia nel tempo intercorrente tra i due prelievi presi in esame.

Ricordiamo che l’interpretazione del test sierologico deve tener presente che sono disponibili in Italia dei vaccini somministrati principalmente per la prevenzione dell’aborto virale nelle fattrici gravide. Per le forme neurologiche e abortive è possibile l’esecuzione di PCR su liquor, umor acqueo e invogli fetali (le patologie causa di aborto verranno trattate nel prossimo approfondimento).

## Herpesvirus 2,5

L'infezione da Herpesvirus 2 causa prevalentemente forme respiratorie delle prime vie e oculari, mentre l'infezione da Herpesvirus 5 può causare patologie polmonari (EMPF, Fibrosi polmonare multinodulare equina). La diagnostica si avvale della PCR su tamponi nasali, oculo-congiuntivali, umor acqueo, fluidi da BAL / TW e parenchima polmonare per la polmonite nodulare. Anche in questo caso la diagnostica sierologica è maggiormente indicata nelle forme subacute / croniche ricorrenti. Una sieropositività al sierotipo 2 si riscontra frequentemente in soggetti affetti da altre patologie respiratorie e il suo significato patogeno non è ancora stato chiarito completamente.

## Influenza A

Per la diagnosi dell'Influenza A è indicata la PCR su tamponi a secco del tratto respiratorio o da fluido da BAL. La diagnostica sierologica è utile per la valutazione del titolo anticorpale dopo vaccinazione, ma non particolarmente per la diagnosi di patologia, in quanto l'infezione naturale stimola prevalentemente un'immunità di tipo umorale mucosale e cellulo-mediata, difficilmente valutabile in laboratorio (vedi approfondimento "Valutazione dello stato vaccinale nel cavallo" - Agosto 2025).

## Puledri: Rhodococcus oagii

Questo batterio intracellulare penetra nell'ospite dall'ambiente (dal terreno, tramite aerosol, dal pulviscolo e con le secrezioni di altri puledri malati) e si localizza principalmente nei macrofagi, distruggendoli. Di solito la rodococcosi si presenta nei puledri fino a 6 mesi di età con sintomi respiratori e ascessi polmonari, ma può avere occasionalmente diverse localizzazioni: intestinale (enterite o ascessi addominali), osteo-articolare (osteomielite, artrite settica o polisinovite immunomediata), oculare (hypopyon). Possiamo avere l'eliminazione intestinale del microrganismo non solo nelle forme enteriche, ma anche in quelle respiratorie, poiché viene ingerito con le secrezioni bronchiali o assunto dal terreno in ambienti fortemente contaminati.

La diagnostica in questi casi si effettua con una PCR su tampone nasale o da liquido da TW / BAL, feci, liquido articolare, umor acqueo, a seconda del distretto colpito.

Il test sierologico non è indicato perché si tratta di un patogeno con una scarsa reattività umorale, stimolando infatti prevalentemente un'immunità di tipo citotossico ne consegue che l'infezione attiva non sempre dà luogo ad una sieroconversione.