

VALUTAZIONE DI UN TEST IMMUNOENZIMATICO (ELISA) PER LA DIAGNOSI SIEROLOGICA DI INFEZIONE DA *RHODOCOCCUS EQUI*

EVALUATION OF AN ELISA TEST FOR THE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF *RHODOCOCCUS EQUI* INFECTION

Attili AR, Marenzoni ML¹, Or E³, Bastianini L², Valente C¹, Cuteri V Dip. Scienze Veterinarie, Camerino; ¹Dip. Patologia Diagnostica e Clinica Veterinaria, Perugia; ²Dip. di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Perugia; ³Internal Medicine Department, Istanbul

Parole chiave: ELISA, equino, *Rhodococcus equi*

Key words: ELISA, equine, *Rhodococcus equi*

SUMMARY - An E.L.I.S.A. test, using a reference *Rhodococcus equi* strain (ATCC 6939) as antigen, was evaluated for its usefulness in monitoring antibodies in infected horses. Because no commercial ELISA is available, a study was undertaken to adapt this diagnostic method for use in our laboratory to detect *Rhodococcus equi* infection in foals. Four hundred and sixty-four serum samples from horses, aged less of 18 months, reared in 12 herds of central Italy, were examined. The cut off optical density (OD/450nm) value was determined to be 0.664. The specificity and sensitivity was of 90.9% and 80% for all age groups, respectively. Prevalence of 12,1% support the data obtained from a previous study conducted in Italy and indicate that an ELISA, so optimised, may be a simple and valuable alternative to monitor *R. equi* infection in order to control and prevent the disease.

INTRODUZIONE - L'apparato respiratorio del cavallo può andare incontro, fin dai primi mesi di vita, a stati patologici di origine infettiva in grado di provocare una diminuzione delle performances. In questo contesto *Rhodococcus equi* si propone come un patogeno del puledro responsabile di elevata mortalità e perdite economiche a seguito degli esiti della broncopolmonite purulenta. L'insorgenza della malattia è subdola e nelle scuderie dove l'infezione raggiunge caratteri di endemicità, la diagnosi precoce e l'attività di monitoraggio risultano essere i soli mezzi che possano dare risposta all'esigenza di una tempestiva ed efficace terapia. L'isolamento del batterio dal soggetto malato, a partire dal lavaggio o aspirato tracheo-bronchiale, rappresenta il materiale e la metodica "gold standard"(1), più recentemente affiancata dalle tecniche di biologia molecolare che hanno permesso di caratterizzare 12 plasmidi responsabili della virulenza (85-kb type I-IV, 87-kb type I-III, 90-kb type I-V). Stipiti di *R. equi* a virulenza intermedia, positivi per la presenza della proteina *Vap B*, sono stati isolati dai linfonodi submascellari di suino, riconoscendo 16 distinti plasmidi di 79-100 kb (types 1-16) e da pazienti umani affetti dal *HIV*. Stipiti avirulenti vengono costantemente isolati dal suolo (2-3-4). Un utile ausilio alla diagnostica per evidenziare i casi di infezione, è dato dall'utilizzo di prove sierologiche quali l'immunodiffusione in gel di agar (AGID) e l'inibizione sinergica dell'emolisi (SHI) che, nonostante risulti più sensibile rispetto alla prima, non è in grado di svelare gli stati precoci di malattia. Negli ultimi anni è stata elaborata una varietà di test immunoenzimatici (ELISA), che utilizzavano antigeni poco purificati e scarsamente specifici. Successivamente *R. equi* è stato sottoposto a trattamenti tali per cui gli antigeni, estratti con detergenti quali Tween 20 o Triton X-114, conferivano una maggiore specificità e sensibilità alla prova. Poiché attualmente non esiste in commercio un test ELISA in grado di evidenziare anticorpi nei confronti di *R. equi*, è stata messa a punto ed ottimizzata una metodica immunoenzimatica facilmente riproducibile sulla base di quanto descritto da Takai et al. (5). Allo scopo è stata condotta un'indagine sierologica in 12 scuderie dell'Umbria e della Toscana al fine di verificare l'affidabilità e la riproducibilità del test.

MATERIALI E METODI - Nel corso dell'anno 2005 sono stati testati 464 sieri provenienti da puledri di età compresa tra i 3 e i 18 mesi, allevati in 12 scuderie del Centro Italia, tra le quali non c'erano relazioni né scambi di animali. 20 puledri, dai quali sono stati prelevati i campioni di sangue, presentavano una sintomatologia respiratoria caratterizzata da bronchite, tosse e ipersecrezione nasale e da tre di essi è stato isolato *R. equi*. La metodica ELISA è stata applicata utilizzando un antigene di referenza ATCC 6939 estratto mediante Tween 20 (1µg di proteina/1

ml di soluzione bicarbonato-carbonato tamponata a pH 9,6) (5). Il protocollo ha previsto l'adsorbimento dell'antigene diluito 1:50 (24h a 4°C in camera umida) in piastre microtiter (IWAKI, Giappone), successivamente sottoposte a 4 lavaggi in PBS contenente 0,05% di Tween 20 e 0,02% di NaN₃. I sieri in esame sono stati diluiti 1:50 in PBS-Tween 20, addizionato con 1% di Albumina Serica Bovina (BSA) ed incubati a 37°C per 90 min. Anti-IgG di cavallo, coniugate con perossidasi (Sigma-Aldrich), diluite 1:15.000 con PBS-Tween 20 e 4% di BSA, sono state incubate a 25°C per 60 min. Infine è stato aggiunto il substrato costituito da tampone citrato e perborato di sodio (pH 4,8), contenente 0,4 mg di o-fenilene-diamina diidrocloreto (Sigma-Aldrich). La lettura dei valori di assorbanza è stata effettuata mediante spettrofotometro (Labsystem Multiscan) a 450 nm. Cinque sieri positivi (media OD 0,947) e cinque sieri negativi (media OD 0,038), sono stati utilizzati come controlli. Il valore soglia di negatività/positività del test (cut off), calcolato aggiungendo 3 deviazioni standard alla media aritmetica delle assorbanze dei campioni risultati negativi, è risultato pari a 0,664. La specificità e la sensibilità del test sono state calcolate rispettivamente adottando le seguenti formule: 100 x (sieronegativi / cavalli clinicamente sani) e 100 x (sieropositivi / cavalli con sintomatologia respiratoria). L'analisi statistica dei risultati è stata condotta mediante il programma STATA versione 5 e la significatività delle differenze è stata valutata attraverso il test del χ^2 e il T test.

RISULTATI – La tecnica ELISA (sensibilità 80% e specificità 90,9%) ha permesso di evidenziare una sieroprevalenza del 12,1% (Confidential Interval_{95%} 9,1-15,0). Una percentuale maggiore di positività (20,9%, n=67) non statisticamente significativa ($P=0,016$), e un più elevato livello anticorpale medio (0,481; CI_{95%} 0,430-0,531), sono stati riscontrati tra i puledri di età inferiore ai 6 mesi. Statisticamente significativi sono risultati invece i valori di sieroprevalenza ($P<10^{-4}$) e di assorbanza ($t = -12,2854$; $P<10^{-4}$) tra soggetti clinicamente sani e quelli con sintomatologia respiratoria (Tab. 1), anche tra i diversi gruppi di età dei cavalli saggiati (Tab. 2).

Tabella 1 – Sieroprevalenza e titolo anticorpale in relazione allo stato di salute.

		Positivi	Negativi	Titolo anticorpale medio
Cavalli sani	(n=444)	9,0% (6,3-11,7)*	91,0%	0,420 (0,405-0,436)*
Cavalli ammalati	(n=20)	80,0% (60,8-99,2)	20,0%	0,906 (0,773-1,040)

* CI_{95%}

Tabella 2 – Sieroprevalenza e titolo anticorpale in relazione all'età dei soggetti.

	Cavalli clinicamente sani			Cavalli con sintomi respiratori		
	Età ≤ 6 mesi (n=59)	Età 6-12 mesi (n=222)	Età 12-18 mesi (n=163)	Età ≤ 6 mesi (n=8)	Età 6-12 mesi (n=10)	Età 12-18 mesi (n=2)
Prevalenza	11,9% (3,4-20,4) ¹	6,8% (3,4-10,1) ²	11,0% (6,2-15,9) ³	87,5% (57,9-117,1) ¹	70,0% (35,4-104,5) ²	100% (100-100) ³
OD _{450 nm} (media)	0,432 (0,389-0,475) ⁴	0,409 (0,387-0,431) ⁵	0,431 (0,406-0,457) ⁶	0,840 (0,734-0,946) ⁴	0,942 (0,663-1,219) ⁵	0,995 (0,053-2,044) ⁶

* CI_{95%} ¹($P<10^{-4}$); ²($P<10^{-4}$); ³($P=0,0001$); ⁴($t=-6,7438$; $P<10^{-4}$); ⁵($t=-9,12$; $P<10^{-4}$); ⁶($t=-4,754$; $P<10^{-4}$).

DISCUSSIONE – La metodica è di facile realizzazione e si è dimostrata affidabile nell'evidenziare anticorpi nei confronti di *R. equi* anche in sintonia con la positività batteriologica dei 20 puledri ammalati. La prevalenza del 12,1% è in accordo con quanto emerso da un analogo studio condotto sempre nel centro Italia in cui oltre il 12% dei puledri risultavano positivi (6). I valori di specificità e sensibilità ne fanno un test affidabile in una situazione in cui *R. equi* oltre ad interessare i puledri rappresenta anche l'agente di una importante zoonosi. Pertanto, al fine di ridurre l'azione di *R. equi*, il test ELISA diventa un mezzo prioritario per formulare una diagnosi precoce di infezione.

BIBLIOGRAFIA - 1) Giguère S, Prescott J (1997) Vet Microbiol, 56, 313-334. 2) Takai S et al (2003) J Vet Med Sci, 65 (12), 1313-1317. 3) Takai S et al (2003) J Clin Microbiol, 41 (9), 4468-4470. 4) Ribeiro MG et al (2005) Comp Immun Microbiol Infect Dis, 28, 53-61. 5) Takai S et al (1985) Am J Vet Res, 46, 2166-2170. 6) Cuteri et al (2003) Comp Immun Microbiol Infect Dis, 26, 17-23.