

RICERCA DI ANTICORPI ANTI-TOXOPLASMA GONDII IN CANI E GATTI: CONFRONTO DEI METODI DI IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA, AGGLUTINAZIONE DIRETTA ED ELISA INDIRETTA.

Scarpulla M.¹, Pourquier P.², Salvato L.¹, Macrì G.¹



¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana. 00178 Roma - Via Appia Nuova, 1411.

² ID VET Innovative Diagnostics – Montpellier, Frankreich.

Parole chiave: *Toxoplasma gondii*, ELISA, agglutinazione diretta, immunofluorescenza indiretta.

INTRODUZIONE

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) è un parassita endocellulare responsabile di una zoonosi a diffusione mondiale, capace di infettare le specie animali a sangue caldo. Il Manuale OIE definisce il Dye test (DT) test di riferimento per la ricerca di anticorpi anti-*T. gondii* ma, risultando di difficile applicabilità in campo veterinario l'immunofluorescenza indiretta (IFI) è utilizzata come *gold standard* nonostante tempi lunghi di esecuzione, costi elevati e risultati legati alla soggettività della lettura. Per ovviare a tali inconvenienti è bene scegliere tecniche dotate di facilità di esecuzione, economicità e oggettività di lettura. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di utilizzare le tecniche di AD ed ELISA per la ricerca di anticorpi anti-*T. gondii* in sieri di cani e gatti e confrontare i risultati ottenuti con l'IFI.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati i sieri di 85 cani e 110 gatti, di entrambi i sessi, di età e razze diverse, inviati presso il nostro Istituto per la ricerca di anticorpi anti-*T. gondii*. I campioni di sangue sono stati centrifugati, il siero distribuito in provette e conservato a +4°C se esaminato entro le 48 ore o congelato a -80°C se lavorato in un momento successivo.

IFI: sono stati utilizzati vetrini commerciali pronti all'uso (*Toxoplasma gondii*, Fuller-Laboratories) e anti-IgG specie-specifiche coniugate con isotiocianato di fluoresceina (SIGMA). I sieri sono stati testati alla diluizione screening di 1:20 in PBS e, se positivi, diluiti al raddoppio e titolati fino a 1:20480. In ogni seduta sono stati inseriti i sieri di controllo positivo e negativo ed il campione bianco. I risultati con titolo ≥ 20 sono considerati positivi e negativi quelli con titolo < 20 .

AD: è stato utilizzato un test di agglutinazione modificato basato sull'impiego di tachizoiti fissati in formalina (Toxo-Screen DA, BioMerieux). I sieri sono stati testati dalla diluizione di 1:20 alla diluizione di 1:20480. I risultati con titolo ≥ 20 sono considerati positivi e negativi quelli con titolo < 20 .

ELISA: i campioni sono stati analizzati mediante il kit commerciale "Toxoplasmosis Indirect" (ID.VET Innovative Diagnostics), che utilizza come antigene la proteina P30 di *T. gondii*, seguendo le indicazioni fornite dal produttore. Sono considerati positivi i sieri con valore S/P $\geq 50\%$, negativi quelli con valore S/P $\leq 40\%$ e dubbi quando $40\% < S/P < 50\%$.

RISULTATI

Tab. n°1

Confronto qualitativo dei risultati in AD e IFI in sieri di gatto.

	IFI +	IFI -	TOTALE
AD +	42	0	42
AD -	1	67	68
TOTALE	43	67	110

Legenda: (+): positivi, (-): negativi.

Tab. n° 2

Confronto qualitativo dei risultati in AD e IFI in sieri di cane.

	IFI +	IFI -	TOTALE
AD +	31	1	32
AD -	13	40	53
TOTALE	44	41	85

Legenda: (+): positivi, (-): negativi.

Tab. n°3

Confronto qualitativo dei risultati in ELISA e IFI in sieri di gatto.

	IFI +	IFI -	TOTALE
ELISA +	42	1	43
ELISA -	1	66	67
TOTALE	43	67	110

Legenda: (+): positivi, (-): negativi.

Tab. n° 4

Confronto qualitativo dei risultati in ELISA e IFI in sieri di cane.

	IFI +	IFI -	TOTALE
ELISA +	40	2	42
ELISA -	4	39	43
TOTALE	44	41	85

Legenda: (+): positivi, (-): negativi.

Per ciascuna tecnica e specie considerate sono stati calcolati sensibilità (Se), specificità (Sp) e kappa (K) di Cohen come stima dell'accordo tra due variabili (positivi e negativi), i valori sono riportati nelle tabelle 5 e 6.

Tab. n°5

Calcolo di Se, Sp e K di Cohen nei sieri di gatto.

	AD/IFI	ELISA/IFI	ACCORDO
Se	98%	98%	
Sp	100%	99%	
K	0,99	0,98	molto buono

Tab. n°6

Calcolo di Se, Sp e K di Cohen nei sieri di cane.

	AD/IFI	ELISA/IFI	ACCORDO
Se	70%	91%	
Sp	98%	95%	
K	0,84	0,93	molto buono

DISCUSSIONE

Tutti i valori di concordanza ottenuti, kappa (K) di Cohen, sono risultati "molto buoni" secondo la Scala di Holton. Nel gatto sia l'AD che l'ELISA hanno mostrato, confrontati con l'IFI, valori di sensibilità e specificità vicini o uguali al 100%. Nel cane la tecnica AD ha fornito un valore di sensibilità non elevato (70%) riportando 13 risultati falsi negativi su un totale di 44 sieri positivi in IFI. La specificità invece si attesta su valori alti. La tecnica ELISA ha mostrato invece valori di sensibilità e specificità pari al 91% e 95% rispettivamente. Dai nostri risultati ottenuti si evince come nel gatto, oltre al test standard di IFI, si possa utilizzare per la diagnosi sierologica di toxoplasmosi sia la tecnica AD che quella ELISA avendo esse fornito risultati equivalenti. Nel cane, la tecnica ELISA ha dato risultati molto buoni e quasi sovrapponibili a quelli dell'IFI, offrendo inoltre il vantaggio della maggiore rapidità di esecuzione e di lettura automatizzata. La tecnica AD se paragonata con l'IFI, pur mostrando una specificità molto elevata, ha invece difettato in sensibilità.