

RUOLO DELL'IMMUNOISTOCHEMICA NELLA DIAGNOSI DELL'ENCEFALITE DA *LISTERIA MONOCYTOGENES* NEGLI OVI-CAPRINI

Bozzetta E, Ligios C*, Casalone C, Cottone E, Liciardi M*, Lollai S*, Caramelli M
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Centro di
Referenza Nazionale per le Encefalopatie animali e Neuropatologie comparate*
**Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna*

Introduzione

L'attività di sorveglianza sulle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) animali in Italia, ribadita ed ampliata dal D.M. 29/1/97 (G.U. n.ro 99 del 30/4/97), prevede tra l'altro la creazione di un registro nazionale delle neuropatologie animali, nell'ambito del quale emerge come *Listeria monocytogenes* rappresenti uno degli agenti eziologici più frequentemente coinvolti nelle sindromi neurologiche ². Lo stesso dato epidemiologico risulta peraltro dalle indagini svolte in altri paesi europei, quali Inghilterra e Svizzera^{9,5}, ove si sottolinea l'importanza dell'ausilio di tecniche di laboratorio rapide e standardizzate per formulare una diagnosi eziologica di Listeriosi.

In molti casi, infatti, l'esame batteriologico non conferma il quadro istopatologico attribuibile a *Listeria monocytogenes* ³; inoltre i dati anamnestici dell'animale giungono spesso al patologo incompleti, quando non addirittura assenti, non suggerendo quindi necessariamente la ricerca del germe; infine, non è da trascurare la possibilità che un eventuale trattamento terapeutico con antibiotici cui l'animale è stato sottoposto possa compromettere l'isolamento in coltura di *Listeria spp.*⁴

Nel nostro Paese le problematiche relative alla diagnostica differenziale delle EST negli ovi-caprini hanno reso il problema particolarmente rilevante, visti i recenti preoccupanti dati di incidenza della Scrapie in allevamenti del Centro-Sud e della Sardegna (Ru G., comunicazione personale). Peraltro, le caratteristiche dell'allevamento ovino (brado o semibrado) in Italia e a volte la reticenza dei pastori nel collaborare alle indagini sul campo, spesso non rendono disponibili eventuali dati clinici indicativi di *Listeria spp.*, quali decorso acuto, rialzo termico, atteggiamento di opistotono e di maneggio, che potrebbero far escludere un sospetto di encefalopatia spongiforme.

Accanto all'esame batteriologico, l'esame istopatologico ha da sempre rappresentato la metodica di laboratorio di ausilio nella diagnosi di encefalite da *L. monocytogenes*, poichè si riscontra un quadro istolesivo caratteristico ed indicativo della malattia⁸. Tuttavia la diagnosi definitiva richiede l'identificazione dell'agente eziologico.

A questo fine, nel presente studio, è stata valutata l'utilità della diagnosi immunoistochimica su encefali di ovini e caprini con lesioni istologiche riferibili a *L. monocytogenes*, correlandole, ove disponibile, con l'esame batteriologico; è inoltre stata valutata l'efficacia di alcuni trattamenti di smascheramento antigenico, già risultati efficaci nell'aumentare la sensibilità della tecnica quando applicati nella identificazione di altri antigeni localizzati a livello encefalico¹.

Materiali e metodi

Nel periodo 1992-1998, nei nostri Istituti sono stati sottoposti ad esame anatomicopatologico 8 ovini e 7 caprini di età compresa tra i 15 giorni ed i 2 anni; gli ovini erano di razza biellese, sarda o meticciasa, mentre le capre erano di razza alpina o meticciasa. Clinicamente, essi avevano presentato sintomatologia nervosa a decorso acuto, con emi-paralisi dei muscoli facciali, movimenti di maneggio e rialzo termico; tale quadro aveva permesso di porre il sospetto di Listeriosi.

Esame batteriologico. Sui 15 soggetti dei quali era disponibile tessuto nervoso fresco, è stata prelevata in condizioni di sterilità una porzione di parenchima dall'ultimo tratto del midollo allungato, la quale è stata messa ad incubare in un brodo di arricchimento (*Listeria Enrichment Broth - BBL*) a 37°C per 24 ore, dopo di che si è eseguito un trapianto in agar selettivo (*Listeria Selective Agar - Oxford Formulation - Oxoid*), a sua volta incubato a 37°C per altre 24 ore.

Le colonie sospette sono state identificate come *Listeria monocytogenes*, mediante colorazione di Gram e prove biochimiche con metodo di identificazione rapida API *Listeria* (Bio-Mérieux).

I ceppi di *L. monocytogenes* isolati presso l'Istituto Zooprofilattico della Sardegna, relativi a 5 ovini e 2 caprini, sono inoltre stati sierotipizzati mediante prova di agglutinazione su vetrino con sieri specifici (DIFCO) anti-sierotipo 1 e anti-sierotipo 4, riconosciuti come i più diffusi sia in medicina veterinaria che in umana⁸.

Esame istologico. Le sezioni di encefalo incluse in paraffina, a carico delle quali si apprezzavano lesioni riferibili a Listeriosi, sono state sottoposte a esame immunostochimico utilizzando come anticorpo primario un siero policlonale anti-*L. monocytogenes* (Listeria O antisera types 1,4 and poly, DIFCO) diluito 1:250. Per la rivelazione è stato utilizzato il kit LSAB-perossidasi (DAKO) e come cromogeni il 3-amino-9-etilcarbazolo (AEC) oppure la 3-3'-diaminobenzidina (DAB). E' stato utilizzato quale controllo positivo un campione di encefalo di capra già risultato positivo agli esami istologico, batteriologico ed immunostochimico; quali controlli negativi sono stati utilizzati 4 encefali (2 di ovino e 2 di caprino) clinicamente sani.

Un siero non immune di coniglio è stato inoltre impiegato in luogo dell'anticorpo primario su sezioni di ciascun campione, al fine di valutare le eventuali colorazioni aspecifiche.

Sui campioni positivi all'esame batteriologico, è stato eseguito l'esame immunostochimico sia senza smascheramento antigenico, sia con l'adozione di due diverse tecniche di ripristino dell'antigenicità: la prima prevede il trattamento in autoclave (121°C per 10 minuti) e l'altra in forno a microonde (2 cicli da 5 minuti ognuno, alla potenza di 850 W); in entrambi i casi le sezioni istologiche venivano immerse in tampone citrato 10 mM, pH 6.

Su 2 encefali di ovino e 1 di caprino pervenuti già fissati al laboratorio, su cui non era possibile effettuare la ricerca batteriologica colturale, sono stati eseguiti gli esami istologico ed immunostochimico.

Risultati

All'esame batteriologico sono risultati positivi per *Listeria monocytogenes* 6 ovini e 5 caprini, mentre 2 caprini e 2 ovini risultavano negativi. I ceppi isolati nei 7 casi verificatisi in Sardegna sono risultati appartenere al sierotipo 1.

Istologicamente, in tutti i campioni le aree encefaliche interessate erano localizzate lungo tutto il tronco encefalico caudale, in particolare nel midollo allungato, ma in qualche caso le lesioni erano evidenti anche nel mesencefalo, nel cervelletto e nel midollo spinale a livello della fuoriuscita del primo nervo cervicale; le lesioni consistevano in manicotti perivascolari mononucleari, formazioni microascessuali, aree malaciche, noduli gliali e neuronofagia; nella maggior parte dei

casi questi aspetti istolesivi avevano una distribuzione monolaterale. Era inoltre possibile osservare leptomeningite non purulenta di tipo linfocitario.

All'esame immunoistochimico la visualizzazione di *L. monocytogenes* è stata possibile in tutti i campioni di encefalo risultati positivi all'esame batteriologico; in 1 caso, tuttavia, la positività è stata rilevata solo grazie all'adozione dei trattamenti di ripristino dell'antigenicità. I 4 campioni negativi all'esame colturale sono risultati positivi. Degli encefali di cui era disponibile solo il tessuto in paraffina, solo 1 ovino risultava negativo.

In 9 campioni, l'immunolocalizzazione appariva diffusa a tutto il tronco encefalico, mentre nei rimanenti era localizzata ora a livello del midollo spinale, ora del midollo allungato. Positività è stata rilevata anche a livello del mesencefalo ma non nel cervelletto, in un caso che presentava lesioni in questa sede.

In genere l'immunopositività era direttamente proporzionale all'estensione delle alterazioni necrotiche ed era evidenziabile all'interno del citoplasma di macrofagi e polimorfonucleati neutrofili, in forma di masserelle intensamente colorate. Inoltre, nei casi di più intensa positività e gravità del quadro istolesivo, non era raro il riscontro, a livello del neuropilo, sia di caratteristiche colonie batteriche, sia di elementi batterici singoli o duplici disposti a V, spiccatamente positivi.

Raro era il riscontro di positività antigenica in posizione intra-neuronale e perivasale, presente comunque solo nei casi in cui le lesioni istologiche risultavano molto gravi e l'immunopositività evidente nelle altre sedi.

Per quanto riguarda le tecniche di ripristino dell'antigenicità cui sono stati sottoposti i campioni, i metodi utilizzati hanno mostrato una analoga sensibilità. Inoltre, se il trattamento in autoclave sembra determinare un aumento di intensità del segnale, l'uso del forno a microonde risulta più pratico e standardizzabile.

Discussione

Dall'analisi dei nostri risultati emerge che l'esame immunoistochimico eseguito con l'utilizzo di una tecnica di ripristino dell'antigenicità ha permesso di confermare la positività batteriologica in tutti i casi, risultando più affidabile dal punto di vista diagnostico rispetto a quanto rilevato da Gayle e coll.³, il quale tuttavia non ricorreva all'utilizzo di tecniche di smascheramento antigenico. E' inoltre importante sottolineare che nei nostri casi si è riscontrata positività immunoistochimica in tutti gli

encefali che presentavano lesioni istologiche indicative di Listeriosi, mentre l'esame batteriologico è risultato positivo solo in 11 dei 15 casi in cui è stato allestito. A questo riguardo riteniamo che, in almeno 2 dei casi considerati, il ricorso a tentativi terapeutici a base di antibiotici sugli animali in vita, come risulta dalla scheda anamnestica, abbia inficiato il tentativo d'isolamento del germe.

Per quanto riguarda le tecniche di ripristino dell'antigenicità, l'impiego del forno a microonde o dell'autoclave risulta preferibile rispetto ad altre tecniche sia per la semplicità d'uso, che per l'economicità dei reattivi e degli strumenti impiegati, nonché per la possibilità di standardizzare i protocolli^{6,7}. I trattamenti da noi applicati hanno permesso sia di aumentare la sensibilità della tecnica immunoistochimica (100% rispetto al 90,9%), sia di individuare positività a carico di corpi batterici non altrimenti rivelati nella stessa area, permettendo così un accertamento più sicuro della presenza di *L. monocytogenes*. Ricordiamo in proposito che tecniche di colorazione quali la Gram, già adottata da altri Autori³, rendono più difficile l'identificazione dei singoli batteri; inoltre, solo la colorazione immunoistochimica permette di rilevare le positività antigeniche intracellulari.

Infine, nei campioni di archivio di casi istologici e di encefali pervenuti già fissati in formalina, solo mediante l'esame immunoistochimico è stata possibile la conferma del sospetto istologico (nel nostro caso in 2 dei campioni testati).

L'applicazione di anticorpi anti-*Listeria monocytogenes* su sezioni istologiche può risultare quindi di grande utilità per la conferma eziologica di quadri istolesivi indicativi di Listeriosi e deve essere presa in considerazione quale tecnica da adottare nella prassi diagnostica di laboratorio.

L'apporto tecnico del presente lavoro è da attribuire alla Sig.na Sara Baracco e al Sig. Carlo Arru, Operatori Professionali di I categoria, Tecnici di laboratorio.

Bibliografia

- 1) Bankfalvi A, Navabi H, Bier B, Böcker W, Jasani B & Schmid KW: Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *J Pathol*, **174**: 223-228, 1994.
- 2) Bozzetta E, Casalone C, Meineri V, Di Guardo G, Eleni C, Ligios C, Ru G, Capucchio MT, Guarda F, Agrimi U, Caramelli M: Neuropathological findings in sheep and goat

during a 2 years survey on Scrapie in Italy. Abstract 15th meeting of ESVP., Sassari-Alghero, 16-19 september, 24, 1997.

- 3) Gayle GC, Fales WH, Maddox CW, Ramos-Vara JA: Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. *J. Vet Diagn Invest* **7**:223-228, 1995.
- 4) Gualandi G: *Listeria*. In: Trattato di malattie infettive degli animali, eds. Farina R, Scatozza F, pp 319-326. UTET, Torino, 1995.
- 5) Heim D, Fatzer A, Hörnlimann B & Vandevelde M: Frequency of neurological diseases in cattle. *Schweiz Arch Tierheilk*, **139**: 354-362, 1997.
- 6) Shi SR, Key ME, Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* **39**: 741-48, 1991.
- 7) Shin RW, Iwaki T, Kitamoto T, Tateishi J: Hydrated autoclave pretreatment enhances TAU immunoreactivity in formalin-fixed normal Alzheimer's disease brain tissue. *Lab Inv* **64**: 693-702, 1994.
- 8) Weinstock D, Horton SB, Rowland PH: Rapid diagnosis of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissue. *Vet Pathol*, **32**: 193-195, 1995.
- 9) Wells GAH, Sayers AR, Wilesmith JW: Clinical and epidemiological correlates of the neurohistology of cases of histologically unconfirmed, clinically suspected bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* **4**: 211-215, 1994.