

6. ZUSAMMENFASSUNG

Beim kulturellen Nachweis von Listerien-Spezies aus zehn Wiederkäuergehirnen wurden die Selektivnährmedien L-PALCAMY-Differential-Enrichment-Broth, die Listeria-Anreicherungsbouillon der International Dairy-Federation sowie der Listeria-Selektivagar (Oxford form.) und der PALCAM-Listeria-Selektivagar vergleichend untersucht. Obwohl sich beide Flüssigmedien in Vorversuchen für Reinkulturen von zwei L.m.-Stämmen als gleich produktiv erwiesen, übertraf das L-PALCAMY-Medium die FDA-Anreicherungsbouillon bei den mischinfizierten Hirnstammproben sowohl in der Selektivität als auch in der Produktivität für Listerien-Spezies. Der Oxford- und PALCAM-Agar entsprachen sich in ihrer Produktivität für Listerien-Spezies, letzterer war jedoch selektiver als der Oxford-Agar. In den Hirnstammproben ließ sich L.m. in Keimgehalten von bis zu $1,2 \times 10^9$ kbE/g, *Listeria innocua* in Keimgehalten von bis zu $6,2 \times 10^4$ kbE/g nachweisen.

Unter Verwendung des L-PALCAMY-Mediums, Oxford- und PALCAM-Agars wurden 164 Gehirne von Wiederkäuern mit zentralnervösen Störungen bzw. mit pathologisch-anatomischen Auffälligkeiten am ZNS auf Listerien-Spezies untersucht. Aus 29 Gehirnen konnte L.m., aus fünf Gehirnen *Listeria innocua* isoliert werden. In einem Gehirn gelang der kulturelle Nachweis beider Listerien-Spezies. Von 27 L.m.-haltigen Gehirnen, die auch mittels Kälteanreicherung untersucht worden waren, ließ sich L.m. in 59,3 % der Proben mittels Direktkultur, in 81,5 % mittels selektiver Warmanreicherung und in 77,8 % mittels selektiver Kälteanreicherung isolieren. Jeweils fünf Fälle wurden ausschließlich über eine Warm- bzw. Kälteanreicherung erfaßt. Bei der nachträglichen Untersuchung von 69 tiefgefrorenen Wiederkäuergehirnen ließ sich durch eine dreimonatige selektive Kälteanreicherung die Zahl der als L.m.-haltig ermittelten Gehirne von sieben auf 13 steigern.

An formalinfixierten Paraffinschnitten von 58 Wiederkäuergehirnen, von denen 44 histopathologische Veränderungen wie bei Listeriose zeigten, wurde die ungekoppelte Peroxidase-Antiperoxidase-Technik mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Technik beim Listerien-Antigen-Nachweis verglichen.

Zweiundfünfzig der 58 Gehirne waren bakteriologisch untersucht und in 46 Gehirnen waren Listerien-Spezies nachgewiesen worden (43mal L.m. und dreimal *Listeria innocua*). Aus 14 Gehirnen waren Listerien-Spezies isoliert worden, ohne daß histopathologische Veränderungen wie bei Listeriose vorlagen. In sechs Fällen mit histopathologischen Veränderungen wurden Listerien-Spezies nicht nachgewiesen. Als Primärserum für die immunhistologischen Untersuchungen diente ein durch Immunisierung mit einem formalinabgetöteten L.m.-Stamm der Serovar 1/2a hergestelltes Kaninchenhyperimmunserum. Das Antiserum wurde an formalinfixierten Objektträgerausstrichen verschiedener Bakterienspezies hinsichtlich seiner Spezifität überprüft. In 40 der 44 Gehirne mit histopathologischen Veränderungen konnte unter Verwendung der ABC-Methode Listerien-Antigen dargestellt werden, während der Nachweis mittels PAP-Technik nur in 34 der 44 Gehirnen gelang. Trotz einer höheren Gebrauchsverdünnung des primären Antikörpers zeichnete sich die ABC-Methode gegenüber der PAP-Methode zudem durch eine höhere Färbeintensität des immunhistochemisch dargestellten Listerien-Antigens aus. Listerien-Antigen konnte in Gehirnen nachgewiesen werden, aus denen kulturell die L.m.-Serovare 1/2a, 1/2b, 4b und 4c isoliert worden waren.

Durch den Einsatz der oben genannten Selektivmedien und der Kälteanreicherung ließen sich histopathologische Verdachtsdiagnosen im Vergleich zu den bakteriologischen Untersuchungsergebnissen früherer Jahre häufiger ätiologisch absichern. Listerien wurden jedoch auch vermehrt aus Gehirnen isoliert, die keine auf Listeriose hinweisenden histopathologischen Veränderungen zeigten. Aus diesem Grunde ist die Diagnose der Gehirnlisteriose allein aufgrund der Isolierung von L.m. nicht möglich. Immunhistologisch ließ sich Listerien-Antigen stets nur in Gehirnen mit histopathologischem Bild wie bei Listeriose nachweisen. Die ABC-Methode stellt eine sensitive und vergleichsweise schnell durchzuführende Alternativmethode zur ätiologischen Absicherung der histologischen Verdachtsdiagnose dar.

SUMMARY

Peters, Martin:

Comparative Studies on the Diagnosis of Listeriosis in Ruminants using Cultural and Immunohistological Techniques.

The selective L-PALCAMY differential enrichment broth, the Listeria enrichment broth of the International Dairy Federation, Oxford Listeria selective agar, and PALCAM Listeria selective agar were comparatively examined in the cultural isolation of Listeria spp. from ten ruminant brains. Although both liquid media proved to be equally productive in preliminary experiments with pure cultures of two L.m. strains, the L-PALCAMY medium was superior to the FDA enrichment broth in both selectivity and productivity for Listeria spp. in the brain stem samples, which were also contaminated with other bacteria. The Oxford and PALCAM agars corresponded in their productivity for Listeria spp. The latter, however, was more selective than the Oxford agar. Bacterial counts of up to $1,2 \times 10^9$ CFU/g of brain stem sample were made from L.m., and of up to $6,2 \times 10^4$ CFU/g from Listeria innocua.

A total of 164 brains from ruminants showing CNS disturbances and/or with pathoanatomical symptoms in the CNS were examined using L-PALCAMY medium, and Oxford and PALCAM agar. L.m. could be isolated from 29 of the brains, and Listeria innocua from five. Cultural isolation of both Listeria spp. occurred in one brain. Of 27 brains containing L.m., which were also examined using cold enrichment, L.m. was isolated in 59.3 % of the cases with direct culture, in 81.5 % of the cases using selective warm enrichment, and in 77.8 % of the cases by means of selective cold enrichment. Five cases each were identified solely by cold or warm enrichment, respectively. In further investigations of 69 ruminant brains, which had been frozen, the number of brains shown to contain L.m. could be increased from seven to 13 by means of selective cold enrichment for three months.

The unlabeled peroxidase-antiperoxidase technique was compared with the avidin-biotin-peroxidase complex technique in the identification of *Listeria* antigen in 58 formalin-fixed paraffin sections of ruminant brains, 44 of which showed histopathological changes, as seen in listeriosis. 52 of the 58 brains were bacteriologically examined, and *Listeria* spp. were identified in 46 (43 with *L.m.* and three with *Listeria innocua*). *Listeria* spp. were isolated from 14 brains, which showed no histopathological changes typical for listeriosis. *Listeria* spp. could not be isolated in six cases showing histopathological changes. Rabbit hyperimmune serum, obtained by immunization of rabbits with a formalin-killed *L.m.* strain of serotype 1/2a, served as primary serum in the immunohistological investigations. The antiserum was tested for specificity using formalin-fixed smears of various bacterial species. *Listeria* antigen could be shown in 40 of the 44 brains with histopathological changes using the ABC method, whereas their identification with the PAP method only succeeded in 34 of the 44 brains. Despite the higher dilution during use of the primary antibody, the ABC method distinguished itself further, in comparison to the PAP method, through more intense immunohistochemical staining of *Listeria* antigen. *Listeria* antigen could be identified in brains, in which the *L.m.* serotypes 1/2a, 1/2b, 4b, and 4c were isolated.

Through the use of the above mentioned selective media and cold enrichment, the histopathological presumptive diagnoses could be etiologically verified more often in comparison to the results of bacteriological investigations of earlier years. *Listeria* were, however, also increasingly isolated from brains, which showed no histopathological changes indicative of listeriosis. For this reason, the diagnosis of listeriosis of the brain is not possible merely on the basis of isolation of *L.m.*

Listeria antigen could only be identified immunohistologically in brains showing the histopathological picture of listeriosis. The ABC method represents a sensitive and relatively quick alternative for the etiological verification of the histological presumptive diagnosis.