



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Intraaxonal transport av *Listeria monocytogenes* till hjärnan vid encephalitformen av listerios.

Anna Farsäter

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2010: 76

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2010



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Intraaxonal transport av *Listeria monocytogenes* till hjärnan vid encephalitformen av listerios.

Intraaxonal transport of *Listeria monocytogenes* to the brain during listeriosis caused encephalitis.

Anna Farsäter

Handledare:

Ebba Nilsson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Désirée S. Jansson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: VM0068

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2010

Omslagsbild: -

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2010: 76
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Axonal transport, listerios, encephalit, hjärna, *Listeria monocytogenes*.

Key words: Axonal transport, listeriosis, encephalitis, brain, *Listeria monocytogenes*.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturöversikt.....	4
Diskussion	6
Litteraturförteckning	7

SAMMANFATTNING

Listerios är en sjukdom orsakad av infektion av bakterier ur gruppen listeria och framför allt av *Listeria monocytogenes*; en gram-positiv, fakultativt anaerob bakterie som är spridd i stort sett över hela världen. Bland våra husdjur ställer infektionen till med störst problem på idisslare samt att den även är humanpatogen och sprids till människor via matförgiftning. Vid infektion kan sjukdomen uttryckas i tre olika former; septikemi, abort och encephalit. Det finns olika teorier om hur bakterierna tar sig in i hjärnan, förbi blod-hjärnbarriären, vid encephalitformen varav en är via intraaxonal transport d.v.s. via nerver in i CNS. Denna litteraturstudie är gjord för att undersöka om den neurala vägen är trolig och vilka bevis det finns för teorin.

Det har gjorts några undersökningar där man histologiskt studerat hur det ser ut i hjärnan och i nerver på naturligt infekterade djur samt att det har gjorts en likartad undersökning på humanfall. Man fann att inflammatoriska infiltrat var lokaliserade till hjärnstammen och nerver samt dessa nervers nuclei. Vidare har även gjorts studier där man framkallat listerios hos flera olika djurslag genom olika metoder, bl.a. genom att inokulera djuren med suspensioner innehållande *Listeria monocytogenes* nära nervändslut eller i nerver, för att sedan undersöka resultaten histologiskt. Vid dessa undersökningar fanns överensstämmande resultat med de från de naturligt infekterade individerna nämligen infiltrat i hjärnstammen samt i nerver. Lokalisationen av infiltraten tyder på att teorin om neural väg är trolig. Bevis för teorin finns även då man i ett par undersökningar kunnat se bakterier inuti axon .

SUMMARY

Listeriosis is a disease caused by an infection of bacteria from the group listeria and above others by *Listeria monocytogenes*; a gram-positive, facultative anaerobic bacterium who is spread across the world. Among our domestic animals the infection causes most problems among ruminants but it is also a pathogen for humans and is spread by the means of food poisoning. During infection the disease can take three forms; septicemia, abortion and encephalitis. Different hypothesis exist on how the bacteria enters the brain, passing the blood-brainbarrier, during the listeriosiscaused encephalitis and one of them is that the bacteria uses intraaxonal transport to enter the CNS through the nerves. This review is written to investigate if the neural path is likely and what evidence exist to support the theory.

Some studies have been made to look histologically on how it looks in the brain and in the nerves of naturally infected animals and also a similar study on human cases. In these studies inflammatory infiltrates were found localized to the brain stem, nerves and the nerves nuclei. Further more studies have been made where listeriosis have been induced on several species through various methods, including inoculating the animals with suspensions containing *Listeria monocytoenes* near nerve terminals or in nerves, that later were studied histologically. The results from these studies are consistent with the results from the naturally infected individuals namely infiltrations in the brain stem and also in nerves. The localization of the inflammatory infiltrates suggests that the theory of a neural path is likely. Evidence that supports the theory has also been found since in some of the studies bacteria were found inside axons.

INLEDNING

Listerios är en viktig sjukdom hos våra husdjur, framförallt hos idisslare, men även viktig som matförgiftningspatogen på människa. I en studie på små idisslare som dött i Schweiz hittade man resultat som visade på att det finns många fler fall än man tidigare uppskattat (Oevermann et al., 2008). Listerios orsakas av en infektion med bakterier från gruppen listeria och oftast av *Listeria monocytogenes*. Bakterien som är en intracellulär patogen blir fagocyterad av celler men tar sig ur fagosomen genom att lysera dess membran vilket ger bakterien möjlighet att proliferera i cellens cytoplasma (Low & Donachie, 1997). Bakterien är gram-positiv, fakultativt anaerob och överlever mycket bra i miljön med möjlighet att växa mellan 3-45° C och tålighet för pH mellan 5,6 och 9,6. I miljön är den spridd i stort sett över hela världen med undantag för vissa mycket varma platser. Listerios uttrycks i tre olika former; en som oftast slutar i abort p.g.a. infektion i uterus under dräktigheten, en form som karakteriseras av septikemi och en form där man får encephalit. På djur ses encephalitformen oftast bara på vuxna idisslare där den kan ske sporadiskt eller i utbrott, utbrotten sammankopplas med utökad utfodring av ensilage eftersom bakterien växer till bra i dåligt ensilage (Jubb et al., 2007). Inkubationstid är cirka 2-6 veckor innan symptom som slöhet, nedhängande öron, överdriven salivering, paralyt och en tendens att gå runt i en cirkel börjar. Just att gå runt, runt i en cirkel har gjort att sjukdomen även kallas ”circling disease”. Efter symptomen börjat avlider oftast djuret inom 2-3 dagar om det är en get eller ett får men det är ett lite längre förlopp om det är ett nötkreatur (Low & Donachie, 1997). Man ser inga makroskopiska förändringar i hjärnan vid listerios utan det är histologiskt som man kan se lesioner och då i medulla oblongata och pons.

Det finns olika hypoteser om hur *Listeria monocytogenes* tar sig in i hjärnan förbi blod-hjärnbarriären, exempelvis; via blodet och då eventuellt i vita blodkroppar, direkt invasion i epitelceller eller via en neural väg (Drevets et al., 2004). Den neurala vägen föreslås i litteraturen vara via intra-axonal transport av *Listeria monocytogenes* i nerver till hjärnan. Jag har valt att göra en litteraturstudie på om detta är troligt och vilka eventuella bevis det finns.

MATERIAL OCH METODER

För att hitta material till denna litteraturstudie har jag till större delen använt mig av att söka efter artiklar i databaser. Den första sökningen jag gjorde var rätt bred då jag sökte på: (encephalitis) AND listeria AND (cow OR cows OR bovine OR bovines OR heifer OR calf OR calves) i databasen Pubmed. Redan i denna sökning hittade jag relevanta artiklar. Senare gjorde jag en ytterligare sökning i Pubmed som även den gav resultat: pathology AND listeria AND brain. Vidare sökte jag även på Web of Knowledge där jag i ”topic” fältet sökte på (encephalit*) AND (lister*) samt att jag förfinade sökningen genom att välja att få artiklar eller reviews på engelska inom ämnesområdena veterinärvetenskap eller patologi. Vissa av de äldre artiklar som jag har använt har jag hittat eftersom de dykt upp som referenser i många av de senare studier som jag använt. Jag har även läst igenom artiklar om encephalitformen av listerios och där funnit referensartiklar om just intraaxonal transport. De flesta artiklar jag använt finns tillgängliga via internet men fyra av de äldre artiklarna har letats fram i Ulltuna bibliotekets källare.

LITTERATURÖVERSIKT

Eftersom det finns många olika förslag på hur *Listeria monocytogenes* tar sig in i centrala nervsystemet för att utlösa encephalit gjordes i Japan en serie försök där teorin var att bakteriens väg in var via cerebrala nerver, och framför allt trigeminusnerven (Asahi et al., 1957). Andra teorier vid den tiden var att inträde skedde via cirkulationssystemet, att virus samarbetade med bakterien eller att den tog sig in via olfaktoriska nerver. Det sista alternativet ansåg Asahi et al. (1957) att inte var trolig p.g.a. att man inte såg lesioner i luktbulben. Asahi et al. (1957) utförde olika försök på möss, kaniner och getter där de bl.a. fick bakterien droppade i conjunctivan, inokulerad i läppen och blandad med mat. För att jämföra med hur det ser ut hos naturligt infekterade djur undersöktes även några får och getter, som haft encephalitformen av listerios, histologiskt. Resultat erhöles på en get som man droppat en suspension med *Listeria monocytogenes* i ögat på. Encephaliten den fick liknade den som vid naturlig infektion och man kunde se lesioner, från vilka *Listeria monocytogenes* isolerades, histologiskt i hjärnstammen i området dit trigeminusnerven löper samt att man hittade infiltrat i själva nerven, i den vänstra nerven vilket är viktigt eftersom man på just det djuret droppat suspensionen i det vänstra ögat. När man utförde samma försök på 4 kaniner kunde man se infiltrerade områden med gliaceller i trigeminalnerven samt i cerebrum omgivna av perivaskulära cellinfiltrat. Vidare gjorde man inokulationsförsök på alla tre djurslag. Möss inokulerades på olika ställen, tio möss per ställe, och några avled utan CNS-symptom inom fem dagar. De möss som blev sjuka senare uppvisade typiska listeriossymptom inklusive överdriven salivering, paralytisk och cirkelgång. Efter symptomen börjat överlevde de flesta djur bara en till två dagar. Några av djuren visade sig ha haft en blandad form av sjukdomen och där hittade man lesioner även i andra organ än i hjärnan men hos de som enbart hade lesioner i hjärnan så kunde man enbart hitta bakterien även där, nämligen i hjärnstammen. Vid försöken på kanin hittade man inga bakterier eller makroskopiska lesioner men hos fem av sex kunde man mikroskopiskt se infiltrat i trigeminusnerven och hjärnstammen. Även getter blev inokulerade i läppen och där utvecklade fyra av elva listerios med typiska symptom vilka ledde till koma och död inom 2 dagar. Hos 3 av djuren kunde man isolera *Listeria monocytogenes* men hos alla fyra sågs leukocyter i nerver, nu även i andra än trigeminusnerven, samt i förlängda märgen, medulla oblongata. Det tredje försöket man gjorde var genom att blanda bakterien med en sorts fisk som först kokts och sedan torkats. Denna mat är grov nog att göra minimala små sår i munnen medan de tuggas så bakterien kan ta sig in. *Listeria monocytogenes* isolerades i hjärnstammen hos 13 av 20 möss som matats med blandningen och dessa hade även utvecklat sjukdomen. Leukocyter fanns i hjärnstammen samt i eller mellan nervfibrerna i trigeminusnerven. När man utfodrade 8st getter med samma blandning fick två stycken feber följt av CNS störningar som i sin tur följdes av koma och död och även hos dessa fanns lesionerna lokaliserade i hjärnstam och trigeminusnerven. Som tidigare nämndes gjordes även histologiska undersökningar på getter och får som naturligt fått infektionen, totalt sju djur på vilka fyra man gjorde djupare studier. Det histologiska utseendet hos dessa djur stämde väl överens med det på dem som sjukdomen framkallats på och man kunde se gram positiva bakterier hos alla fyra. Cellreaktioner observerades vid roten till trigeminusnerven samt ett antal andra nerver. De inflammatoriska cellerna syntes i eller mellan nervfibrer. Från resultaten från alla dessa

undersökningar drog man slutsatsen att *Listeria monocytogenes* på något sett färdas längs nerver, och ofta längs trigeminusnerven, till medulla oblongata.

För att undersöka om en intraaxonal migrationsväg är möjlig gjordes i slutet av sjuttioalet två studier, en ljusmikroskopisk (Charlton & Garcia, 1977) och en elektronmikroskopisk (Charlton, 1977) på 17 får med encephalitformen av listerios. I den ljusmikroskopiska fann man bevis som stödde teorin om att smittoämnet, *Listeria monocytogenes*, migrerar till hjärnan via kranialnerver och ofta trigeminusnerven (Charlton & Gracia, 1977). Hos 16 av fåren kunde man histologiskt observera neurit i trigeminusnerven, antingen enbart i denna eller i kombination med neurit i en eller flera andra kranialnerver. Man tittade även efter bakterier och fann dessa i hjärnan hos alla 17 fåren samt hos nio av fåren i den proximala delen av en eller flera kranialnerver samt även ibland i intakta nervfibrer. Hos fyra av de nio får man hittade bakterier i den proximala delen av en eller flera kranialnerver så kunde man se bakterierna ligga i linjära grupper. Sådana grupper av bakterier kunde man även se hos fem av fåren i axon inuti hjärnan och de flesta av dessa axon var intakta. Att bakterierna ligger på just detta vis ser man som ett bevis på att de färdats längs fibrerna och man tror att detta kan vara ett bra sätt för *Listeria monocytogenes* att undkomma djurets immunförsvar. Ett annat bevis för att bakterierna tagit sig till hjärnan den vägen är att man inte påträffade några bakterier i blodkärl eller i perineurium. Vidare diskuterade dem om infektionen kunde spridit sig descenderande från hjärnan till nerverna istället men man tror mer på teorin att det är en ascenderande infektion p.g.a. att lokaliseringen av neuriten så ofta var just trigeminusnerven. Den elektronmikroskopiska studien stödde resultaten från den ljusmikroskopiska (Charlton, 1977). I denna undersökning kunde man se mikroorganismerna i flera neuron samt i ett axon liggandes ensamma eller i par.

1985 gjordes en studie på får för att undersöka om en möjlig smittväg är via tänderna till trigeminusnerven och vidare till CNS (Barlow & McGorum, 1985). Man misstänkte detta p.g.a. att listerios på får var vanligare under vintern och den tidiga våren samt i åldersgrupper då olika förändringar sker med fårens tänder. Man inokulerade 21 får i tandens pulpa med *Listeria monocytogenes* och de som utvecklade några CNS-symptom avlivades, de som inte utvecklade symptom avlivades inom olika intervall. 28,5 % av fåren utvecklade klinisk encephalit och 67 % av fåren hade histologisk encephalit vilket man såg som ett bevis på att infektionsvägen via tänderna till nerven och vidare till hjärnan är fullt möjlig.

Det finns även en norsk undersökning av 9 humana fall av listerios, varav sju från åren 1977 till 2000 och två fall efter år 2000 (Antal et al., 2005). Man hade identifierat *Listeria monocytogenes* i alla fallen och lokaliseringen av encephaliten var i hjärnstammen. Resultatet av undersökningen var att man hittade bakterier och inflammatoriska infiltrat i oropharynx innerverande kranialnerver, både motoriska och sensoriska, och deras nuclei. De anser att detta resultat stödjer tidigare hypoteser om att *Listeria monocytogenes* infiltrerar CNS och därmed hjärnstammen via kranialnerver från munhålan. De påpekar även att man inte än vet hur den intraaxonala transporten sker men föreslår att bakterierna kan transporteras via mikrotubuli eller att transporten är aktinberoende.

Antal var även involverad i en studie gjord på möss 2001 (Antal et al., 2001). Man gjorde olika försök på 50 st. honor, man inokulerade *Listeria monocytogenes* i nerv eller ansiktsmuskel samt att man även testade att inokulerade bakterien i bakbenets muskel eller sciatusnerven. På vissa djur klippte man nerven proximalt om inokulationsplatsen för att se om spridning skedde till hjärnan trots att det inte kunde ske längs nerven. Resultatet var att spridning inte skedde om så var fallet. Den neurogena formen av listerios utvecklades hos 28 av mössen och hos de av dem som fick hjärnstamsencephalit kunde man se inflammation just i nuclei tillhörande kranialnerverna VII och V, n. trigeminus.

Till sist mer inriktat på idisslare; en Schweizisk undersökning gjord på 220 idisslare under åren 1996 till 2008 (Oevermann et al., 2009). Som inklusionskriterier har man haft att djuren ska ha haft hjärnstamsencephalit i kombination med att man identifierat *Listeria monocytogenes* i hjärnvävnad. Man undersökte neuropatogenesisen på tre olika arter idisslare; getter, får och nötboskap. Även resultaten av denna undersökning stödjer hypotesen om axonal migration via nerver till CNS av bakterierna. I de flesta fallen, hos 85 % av djuren, kunde man se mikroabcesser mikroskopiskt hos en eller flera kranialnervers nuclei. Vanligast var att hitta abscesserna i nuclei tillhörande kranialnerverna XII, VII och V, n. trigeminus, men man anser att det finns belägg för att bakterierna kan ta sig in genom de flesta av kranialnerverna. Resultaten antyder att vägar in i CNS finns överallt i oropharyngeala hålan, troligen även i buken samt i ögat. *Listeria monocytogenes* hittades i linjära kedjor i axon, både i degenererade och intakta. Om man jämförde akut encephalit med subakut eller kronisk så var det vanligare att hitta bakterierna i axon i den akuta inflammationen. Vad gäller encephalitens lokalisering i CNS stöder inte deras resultat åsikterna om att encephaliten ska vara begränsad till medulla och pons utan man hittade lesioner även i högre centra i hjärnan och föreslår att spridning även dit skett via axon (intracerebrala).

DISKUSSION

Listerios är en allvarlig sjukdom som är orsakad av en infektion med bakterien *Listeria monocytogenes* och som drabbar både människor och djur. Eftersom den formen av listerios som ger encephalit ofta har dödlig utgång är det viktigt att försöka få en klar bild av hur bakterien tar sig förbi blod-hjärnbarriären. Redan i slutet av femtiotalet gjordes försök för att undersöka om en möjlig väg in för bakterien är via nerver till CNS (Asahi et al., 1957). Då framkallade man listerios hos flera djurslag genom olika metoder och kunde se inflammatoriska infiltrat i nerver och hjärnstam. Liknande försök har även gjorts senare med samma resultat (Barlow & McGorum, 1985; Antal et al., 2001). Resultaten tyder på att teorin är trolig p.g.a. lokaliseringen av inflammationen. I undersökningen från 1957 (Asahi et al., 1957) studerade man även hur listerios såg ut histologiskt på naturligt infekterade djur och fann att utseendet var överensstämmande med hur det såg ut hos de man framkallat sjukdomen på. Även i en nyare studie undersöktes var infiltrat kunde hittas vid encephalitformen av listerios på naturligt infekterade individer men i det fallet fokuserade man på humanfall (Antal et al., 2005). Därför borde man kunna använda djur där man framkallat sjukdomen som modeller för både naturligt infekterade djur och människor. Eftersom man även hittat själva bakterien, *Listeria monocytogenes*, vid histologiska

undersökningar i nerver samt även i axon (Charlton, 1977; Charlton & Garcia, 1977; Oevermann et al., 2009) kan det ses som starka bevis på att smittvägen är intraaxonal.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Antal, E., Løberg, E., Bracht, P., Melby, K. K., Mæhlen, J. (2001). Evidence for intraaxonal spread of *Listeria monocytogenes* from the periphery to the central nervous system. *Brain Pathology*, 11, 432-438.
- Antal, E., Løberg, E., Dietrichs, E., Mæhlen, J. (2005). Neuropathological findings in 9 cases of *Listeria monocytogenes* brain stem encephalitis. *Brain Pathology*, 15, 187-191.
- Asahi, O., Akiyama, Y., Hosoda, T. (1957). Studies on the mechanism of infection of the brain with *Listeria monocytogenes*. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 147-157.
- Barlow, R. M., McGorum, B. (1985). Ovine listerial encephalitis: analysis, hypothesis and synthesis. *The Veterinary Record*, 116, 233-236.
- Charlton, K. M. (1977). Spontaneous listeric encephalitis in sheep electron microscopic studies. *Veterinary Pathology*, 14, 429-434.
- Charlton, K. M., Garcia, M. M. (1977). Spontaneous listeric encephalitis and neuritis in sheep light microscopic studies. *Veterinary Pathology*, 14, 297-313.
- Drevets, D. A., Leenen, P. J. M., Greenfield, R. A. (2004). Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 17:2, 323-347.
- Jubb, Kennedy, Palmer. (2007). *Pathology of domestic animals*. 5. uppl. Elsevier Saunders.
- Low, J. C., Donachie, W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal*, 153, 9-29.
- Oevermann, A., Botteron, C., Seuberlich, T., Nicolier, A., Friess, M., Doherr, M. G., Heim, D., Hilbe, M., Zimmer, K., Zurbriggen, A., Vandervelde, M. (2008). Neuropathological survey of fallen stock: Active surveillance reveals high prevalence of encephalitic listeriosis in small ruminants. *Veterinary Microbiology*, 130, 320-329.
- Oevermann, A., Doherr, M. G., Vandervelde, M. (2009). Neuropathogenesis of naturally occurring encephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in ruminants. *Brain Pathology*, 20, 378-390.