Encefalitozoonosi del coniglio: approccio diagnostico e correlazione tra grading macro-microscopicoscopico, colorazione immunoistochimica e sierologia

Gibelli L., Lavazza A., Tittarelli C., Rota Nodari S., Nassuato C., Gelmetti D.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B.Ubertini", Brescia, Italy

Corresponding Author: Lucia Gibelli, Laboratorio di Istologia, IZSLER, via Celoria 12, Milano, Italy - Tel. +39 02/70600153 - Fax: +39 02/70635837 - Email: luciarita.gibelli@izsler.it

ABSTRACT: Rabbit Encephalitozoonosis: diagnostic approach and correlation among grading, immunohistochemistry and serology. Encephalitozoonosis is an infection caused by a microsporidium, largely diffused in rabbit farms. This study is focused on the relationship among antibody titers, macro-microscopic kidney lesions and its immunolocalization using a pool of MAbs on 98 kidney samples. Immunohistchemistry may be considered the gold standard for *post mortem* diagnosis whereas macroscopic scoring is only a screening. The serological test has a lower diagnostic efficacy but is a good screening *in vitam.* However, it has no prognostic value since serological titres are not directly related to the severity of lesions.

Key words: Rabbit, CIA test, Kidney, Immunohistochemistry.

INTRODUZIONE – *Encephalitozoon (E.) cuniculi* è un microsporidio intracellulare obbligato che infetta roditori, lagomorfi, carnivori, primati e l'uomo (Künzel e Joachim, 2010). Le spore colonizzano l'epitelio intestinale, infettano i monociti ed entrano in circolo raggiungendo diversi organi, in particolare rene e cervello. Qui possono rimanere latenti, o riattivarsi, causando una patologia subclinica rivelabile solo con la siero conversione. Uno studio comparativo tra sierologia e lesioni macro-microscopiche ha dimostrato che: 1) in assenza di lesioni macroscopiche l'88% dei conigli era sieronegativo; 2) in presenza di nefrite l'85% degli animali era sieropositivo; 3) i grading delle lesioni macro-microscopiche concordavano (Tittarelli *et al.*, 2009). La correlazione tra nefrite e presenza di anticorpi suggeriva un'infezione da *E. cuniculi*, tuttavia i microsporidi non sono stati osservati nelle sezioni istologiche. Lo scopo del lavoro è correlare e valutare statisticamente il dato sierologico, le lesioni macro-microscopiche e la presenza del microsporidio nel rene con colorazione immuno-istochimica (IHC).

MATERIALI E METODI – La metodica sierologica (CIA Test), istologica e la gradazione delle lesioni (score), sono descritti nel lavoro di Tittarelli *et al.* (2009). Da 98 campioni: 23 di classe 0; 17 di classe 1; 20 di classe 2; 19 di classe 3; 19 di classe 4, sono state ottenute sezioni seriate di 4μm, incubate con un pool di 4 MAbs (EC8C12, EC10G4, EC11C5 e EC7D5) specifici verso *E. cuniculi* alla diluizione 1:100 (Mo e Drancourt., 2004). Le sezioni sono state analizzate in un sistema automatico Bond (Menarini) con il kit *Bond intense R detection* (3,3diaminobenzidina). Controlli positivi e negativi erano presenti. Per l'analisi statistica sono state riportate le distribuzioni percentili per il CIA test rispetto allo score macro-microscopico ed alla classificazione

immunoistochimica. Il confronto tra il valore di CIA tra gruppi con diverso score è stato effettuato mediante analisi della varianza non parametrica. Sono state calcolate le stime dei valori di sensibilità e specificità diagnostiche con i relativi intervalli di confidenza al 95% del test CIA rispetto alla presenza/assenza di lesioni macroscopiche istologiche e rispetto a presenza/assenza di lesioni macroscopiche istologiche e/o positività immunoistochimica.

RISULTATI E CONCLUSIONI – Nei 54 campioni di rene positivi in IHC, aggregati rotondeggianti, di colore marrone intenso, erano osservabili nel citoplasma di: cellule epiteliali dei tubuli prossimali e distali, macrofagi, cellule del connettivo lasso della pelvi renale, e liberi nel lume tubulare (Figura 1). Nella maggior parte dei campioni la positività era localizzata nella pelvi renale e in 20 di questi anche le cellule tubulari erano positive. Il confronto tra 37 soggetti con lesioni acute-subacute (score 1 e 2) e 38 con lesioni croniche (score 3 e 4) non ha evidenziato differenze significative nella distribuzione della positività IHC (rene e pelvi) anche se la positività era più frequente nelle cellule del connettivo della pelvi (Tabella 1). La correlazione tra gravità delle lesioni macro-microscopiche e titoli anticorpali è riportata in tabella 2 e figura 2. L'analisi dei dati mediante rank sum test di Kruskal-Wallis evidenzia una differenza significativa nel valore di CIA che è limitata al gruppo senza lesioni nei confronti di quello con lesioni (P<0,05). Non vi è invece differenza significativa nel valore di CIA tra i gruppi con score crescente (Figura 3). Prendendo come standard di riferimento l'assenza/presenza di lesioni macro-microscopiche, la sierologia mostra sensibilità 90,7 (IC95%: 81,7-96,1), specificità 86,9 (IC95%: 66,4-97,2).

Figura 1 – Rene, IHC: aggregato di *E. cuniculi* nel lume tubulare. 400x

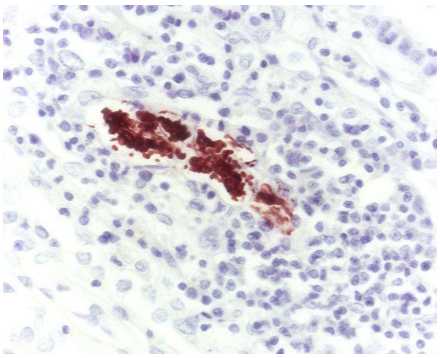


Tabella 1 – IHC in rapporto a quadro e sede delle lesioni.

IHC	q. acuto	q. cronico
totale negativa	17	17
totale positiva	20	21
rene negativa	28	28
rene positiva	9	10
pelvi negativa	18	20
pelvi positiva	19	18
Totale	**37**	**38**

La sieropositività è indicativa di presenza ma non di gravità delle lesioni; nello stesso tempo l'assenza di lesioni macro-micro-scopiche non esclude lo stato d'infezione e necessita quindi di diagnosi con IHC. La relazione tra titoli sierologici e IHC (Tabella 3), la sierologia non pare avere capacità discriminatoria rispetto all'assenza/presenza di *E. cuniculi* ovvero vi sono positività sierologiche in assenza di riscontri di positività in IHC e viceversa (Figura 4). Prendendo come standard di riferimento l'assenza/presenza di lesioni macro-microscopiche e/o il riscontro in IHC le performances dell'esame sierologico appaiono decisamente inferiori: sensibilità 78,4 (IC95%: 68,3-86,5), specificità 80,0 (IC95%: 44,4-97,5). Aumenta,

Tabella 2 – Score delle lesioni e sieropositività

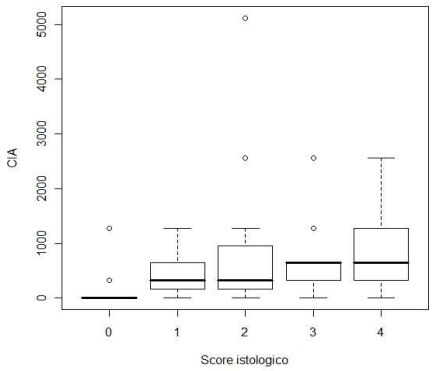
CIA	Neg	Pos	min	1°quartile	mediana	3°quartile	max	media
Score 0	20	3	neg	neg	neg	neg	1280	126.1
Score 1	1	16	neg	160	320	640	1280	541.2
Score 2	3	17	neg	160	320	800	5120	868.1
Score 3	1	18	neg	320	640	640	2560	707.4
Score 4	2	17	neg	320	640	1280	2560	1032.0
Score>0	*7*	*68*	*neg*	*320*	*640*	*1280*	*5120*	*794.8*

infatti, sia la quota di soggetti infetti non rilevati come tali (falsi negativi) sia la quota di soggetti non infetti identificati come infetti (falsi positivi). Comparando i titoli anticorpali tra i soggetti positivi in IHC nel bacinetto renale rispetto ai negativi si evidenzia che i soggetti positivi hanno titoli mediamente più bassi rispetto ai negativi (566,9 *vs.* 724,8). Questi dati indirizzano verso l'ipotesi che *E. cuniculi* possa rimanere latente nelle cellule del connettivo lasso della pelvi renale.

Tabella 3 – Positività IHC e sieropositività.

CIA	min	1°quartile	mediana	3°quartile	max	media
IHC rene neg	neg	neg	320	640	5120	643.5
IHC rene pos	neg	neg	640	1280	2560	621.1
IHC pelvi neg	neg	neg	320	1280	5120	703.1
IHC pelvi pos	neg	neg	320	640	2560	572.5
IHC totale neg	neg	neg	320	1280	5120	724.8
IHC totale pos	neg	neg	320	640	2560	566.9

Figura 2



In conclusione, l'IHC potrebbe diventare la metodica gold standard nella diagnosi *post mortem* di *E. cuniculi*, per la capacità di svelare i microsporidi anche in assenza di lesioni macroscopiche (classe 0). A tal fine la valutazione della pelvi renale non è da trascurare. Lo scoring macroscopico, ben correlato alle lesioni microscopiche, può fornire indicazioni diagnostiche ed ha valore di screening. Analogamente il test sierologico CIA può essere usato come screening *in vitam*, pur con numerosi limiti e minore efficienza diagnostica, ma non può avere valore prognostico, poiché la sieropositività è indicativa di presenza di *E. cuniculi* ma non di gravità delle lesioni.

Figura 3 – Sierologia *vs.* lesioni.

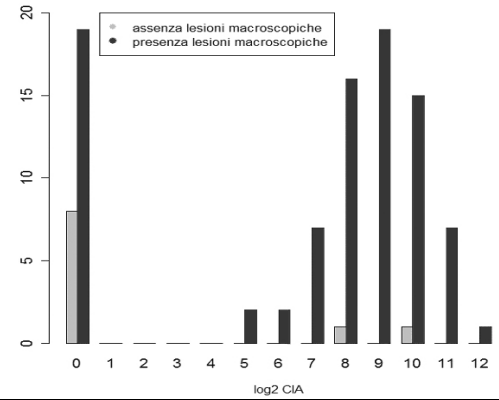
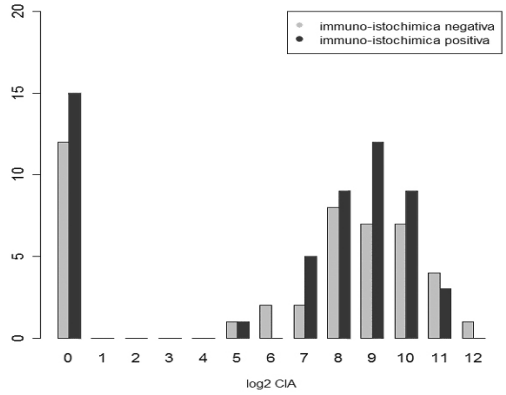


Figura 4 – Sierologia *vs.* IHC.



BIBLIOGRAFIA – **Künzel**, F., Joachim, A., 2010. Encephalitozoonosis in rabbits Parasitol. Res. 106:299-309. **Saviotti**, M., Tamba, M., Gallazzi, D., Lavazza, A., 2000. Further data on the diffusion of *Encephalitozoon cuniculi* in Italian rabbitries. In: Proc. 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain, pp. 355-362. **Santaniello**, A., Dipinto, L., Rinaldi, L., Menna, L.F., Cingoli, G., Fioretti, A., 2009. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. Res. Vet. Sci. 87:67-69. **Tittarelli**, C., Gelmetti, D., Rota Nodali, S., Gibelli, L., Lavazza, A., 2009. Encephalitozoonosi del coniglio. Correlazione tra lesioni renali macro-microscopiche e titolo anticorpale in conigli al macello. Atti delle Giornate di coniglicoltura ASIC 2009, Forlì, pp. 81-84.