

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE
Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal



Dissertação

Comparação entre imunofluorescência e imuno-histoquímica para detecção de *Listeria monocytogenes* em tecidos fixados e parafinizados

Kelen Regina Ascoli Baldi

Concórdia, 2020

Kelen Regina Ascoli Baldi

**Comparação entre imunofluorescência e imuno-histoquímica para detecção de
Listeria monocytogenes em tecidos fixados e parafinizados**

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

Orientador: Teane Milagres Augusto Gomes

Coorientador: Ricardo Evandro Mendes

Concórdia, 2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

B177c Baldi, Kelen Regina Ascoli
Comparação entre imunofluorescência e imuno-
histoquímica para detecção de *Listeria monocytogenes* em
tecidos fixados e parafinizados / Kelen Regina Ascoli
Baldi; orientador Teane Milagres Augusto Gomes;
coorientador Ricardo Evandro Mendes. -- Concórdia,
2020.
36 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal
Catarinense, campus Concórdia, Programa de Pós-graduação
em Produção e Sanidade Animal, Concórdia, 2020.

Inclui referências.

1. Listeriose. 2. Técnicas imunológicas. 3.
Diagnóstico veterinário. I. Gomes, Teane Milagres
Augusto, II. Mendes, Ricardo Evandro . III. Instituto
Federal Catarinense. Programa de Pós-graduação em
Produção e Sanidade Animal. IV. Título.

KELEN REGINA ASCOLI BALDI

**COMPARAÇÃO ENTRE IMUNOFLORESCÊNCIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA
PARA DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM TECIDOS FIXADOS E
PARAFINIZADOS.**

Trabalho de Conclusão aprovado como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal, do Instituto Federal Catarinense.

Araquari/SC, 23 de outubro de 2020.

Autenticação eletrônica na Folha de Assinaturas

Prof. Dr.^a Teane Milagres Augusto da Silva
Orientadora – IFC *Campus* Concórdia

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr.^a Marcia Cristina da Silva

Prof. Dr. João Xavier de Oliveira Filho

Prof. Dr. Diogenes Dezen



Emitido em 23/10/2020

DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS - CAMPUS ARAQUARI Nº 24/2020 - DEPE/ARA (11.01.02.02.02)
(Nº do Documento: 8)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 23/11/2020 23:39)

TEANE MILAGRES AUGUSTO GOMES

PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO

BLPV/CON (11.01.04.01.03.02.12.06)

Matricula: 1081425

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sig.ifc.edu.br/documentos/> informando seu número: **8**,
ano: **2020**, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS - CAMPUS ARAQUARI**, data de emissão: **23/11/2020**
e o código de verificação: **06abe3f27d**

*Os grandes feitos são conseguidos não pela força, mas pela perseverança” (Samuel
Johnson)*

Agradecimentos

Nesse período de realização do mestrado, com muito estudo, empenho e dedicação, chega o momento de agradecer a todos que contribuíram e foram essenciais para a realização deste sonho. Muito obrigada:

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho para seguir em frente, e encarar esse desafio.

A minha família que sempre apoiou e incentivou todas as minhas escolhas. Agradeço ao meu esposo Rogério, pelo amor e incentivo. Ao meu filho Miguel, por ser minha inspiração e minha força, te amo infinitamente. A minha mãe, sempre me auxiliando e apoiando, em especial, pela ajuda para cuidar do meu filho nos horários de aula.

Agradeço imensamente a minha orientadora, professora Teane Gomes, por todas as orientações, ensino, paciência e colaboração, tenho certeza que sem a sua participação, não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada pelo apoio, acompanhamento na execução em todas as etapas do projeto, você é um exemplo de pessoa e profissional! Agradeço a parceria no curso de capacitação e pela amizade que construímos.

Ao meu coorientador, professor Ricardo Mendes, pelo incentivo e apoio, você foi um grande incentivador para a concretização do mestrado em nossa instituição. Agradeço o empréstimo dos reagentes para o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas da turma, pela parceria e momentos alegres. Em especial a colega Maiara, onde sempre trocamos mensagens sobre os conteúdos e pela amizade.

A toda equipe do Laboratório de Patologia “minha segunda casa”, aos estagiários, bolsistas, pelo apoio na realização do projeto. Sou muito grata e feliz por fazer parte desta equipe.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para esta pesquisa.

Ao Instituto Federal Catarinense, por permitir e incentivar a qualificação dos servidores e também pelo Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal. Da mesma forma, agradeço a todos os docentes, técnicos administrativos e coordenadores do IFC, engajados para a realização e consolidação do mestrado profissional.

A Embrapa Suínos e Aves, em especial a pesquisadora Mariana Marques e ao analista Marcos Mores, pelo empréstimo e auxílio no manuseio do microscópio de fluorescência para tirar as fotos para a publicação do artigo. A técnica da Patologia, Franciele Ianiski, pela colaboração e amizade.

As minhas colegas e amigas, Silvia Fontes e Fernanda Fernandes que sempre estiveram dispostas a me escutar e ajudar.

Meu agradecimento especial a minha colega e amiga Eliete Griebeler, pela contribuição em todas as etapas do projeto, principalmente pela amizade e companheirismo. Meus dias são muito mais felizes com você no trabalho!

Enfim, agradeço a todos que me auxiliaram, direta ou indiretamente, na concretização deste sonho.

Resumo

BALDI, Kelen Regina Ascoli. **Comparação entre imunofluorescência e imuno-histoquímica para detecção de *Listeria monocytogenes* em tecidos fixados e parafinizados.** 2020. 36f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2020.

Listeria monocytogenes é uma bactéria que infecta humanos e animais, podendo causar uma doença zoonótica caracterizada por encefalite, septicemia e abortos. Além disso, a listeriose resulta em perdas econômicas significativas pela morte ou sacrifício de animais. O objetivo deste trabalho foi comparar a técnica de imunofluorescência (IF) e imuno-histoquímica (IHQ) para detecção de *L. monocytogenes* em tecidos fixados e parafinizados. Foram selecionados 25 blocos de tecidos de animais com histórico e/ou lesões compatíveis com listeriose. Para a imuno-histoquímica, foi utilizado anticorpo primário policlonal anti-*L. monocytogenes* sorotipo 1 e 4 diluído, seguido de kit com anticorpo secundário acoplado a polímero. Para a imunofluorescência, foi utilizado o mesmo anticorpo primário, seguido de anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com fluoresceína. Cada amostra foi classificada quanto à presença e intensidade de imunomarcagem. Das 25 amostras, 10 foram positivas em pelo menos uma das técnicas, sendo oito amostras positivas em ambas IHQ e IF com a mesma intensidade. Houve forte imunomarcagem tanto em amostras de bovino experimentalmente infectado com *L. monocytogenes* ATCC 7644, como em amostras de tecido nervoso de ruminantes naturalmente infectados. O estudo demonstrou que as duas técnicas foram eficientes para detectar *L. monocytogenes* em tecidos fixados e parafinizados. O uso de materiais biológicos processados para IF, ao invés de tecidos frescos, é algo inovador, uma vez que existem poucos protocolos descritos. Porém, a IF não apresentou diferença na sensibilidade quando comparada com a IHQ, sendo esta última de menor custo e maior facilidade na interpretação dos resultados.

Palavras-chave: listeriose; técnicas imunológicas; diagnóstico veterinário.

Abstract

BALDI, Kelen Regina Ascoli. **Comparison between immunofluorescence and immunohistochemistry for the detection of *Listeria monocytogenes* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues.** 2020. 36f. Dissertation (Master degree in Science) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2020.

Listeria monocytogenes is a bacterium that infect humans and animals and causes a zoonotic disease characterized by encephalitis, septicemia or abortion. Also, listeriosis leads to significant economic losses due to animal death or sacrifice. The aim of this work was to compare the technique of immunofluorescence (IF) and immunohistochemistry (IHC) for the detection of *L. monocytogenes* in formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissues. A total of 25 tissue blocks from animals with history and/or lesions compatible with listeriosis were selected. For immunohistochemistry, a diluted polyclonal anti-*L. monocytogenes* serotype 1 and 4 primary antibody was used, followed by a secondary antibody with polymer kit. For immunofluorescence, the same primary antibody was used, followed by fluorescein-labeled anti-rabbit IgG secondary antibody. Each sample was classified according to the immunostaining presence and intensity. From 25 samples, 10 were positive at least for one technique, whereas eight samples were positive for both IHC and IF with similar intensity. There was strong immunolabeling in samples from bovines experimentally infected with *L. monocytogenes* ATCC 7644, as well as in nervous tissues from naturally infected ruminants. This study demonstrated that both techniques are efficient to detect *L. monocytogenes* in FFPE tissues. Using processed biological materials for IF, instead of fresh samples, is a quite unique technique, since there are few protocols described. However, IF did not show any difference in sensitivity when compared to IHC, whereas the latter is less expensive and has an easier result interpretation.

Keywords: Listeriosis; immunological techniques; veterinary diagnostics.

Lista de Figuras

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Imuno-histoquímica e imunofluorescência específicas para <i>Listeria monocytogenes</i> em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina..... | 29 |
|----------|--|----|

Lista de Tabelas

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Comparação da imuno-histoquímica (IHQ) e imunofluorescência (IF) para <i>Listeria monocytogenes</i> em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina..... | 27 |
|----------|--|----|

SUMÁRIO

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE | 12 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 17 |
| 2.1 | Geral | 17 |
| 2.2 | Específicos | 17 |
| 3 | ARTIGO | 18 |
| 3.1 | Introdução | 18 |
| 3.2 | Material e Métodos..... | 21 |
| 3.3 | Resultados e Discussão | 25 |
| 3.4 | Conclusão | 31 |
| 3.5 | Agradecimento | 31 |
| 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 32 |
| 5 | REFERÊNCIAS..... | 32 |

1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

Listeriose é uma das principais doenças de origem alimentar que causa infecção sistêmica em várias espécies animais e no homem, resultando em elevada taxa de letalidade em pacientes infectados (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007). A doença é causada frequentemente por *Listeria monocytogenes* e apresenta três manifestações clínicas distintas: septicemia, com múltiplos abscessos no baço e fígado; reprodutiva, com aborto; e neurológica, caracterizada por nistagmo lateral, opistótono, paralisia flácida dos membros pélvicos ou dos quatro membros e salivação excessiva (Lopes, 2010; Oevermann et al., 2010).

L. monocytogenes pode infectar humanos e animais causando meningoencefalites e abortos (Buchrieser et al., 2011). É uma bactéria flagelada, Gram positiva, intracelular facultativa (Liu, 2013) e altamente adaptável, podendo existir tanto como patógeno no animal como livre no ambiente (Low e Donachie, 1997). A manifestação da doença depende da patogenicidade, dose ingerida e virulência do sorotipo de *L. monocytogenes*. Os sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b são frequentemente relacionados com a doença clínica (Vazquez-Boland et al., 2001).

Além de ser uma zoonose, em que a transmissão pode ocorrer por contato direto com animais contaminados (Vazquez-Boland et al., 2001), a listeriose também causa perdas pela morte de animais ou pela necessidade de seu sacrifício, além de gasto com medicamentos e diminuição da produção (Lopes, 2010).

Em humanos, a transmissão da doença ocorre através de alimentos e produtos de origem animal, sendo os derivados de leite e carnes os alimentos mais acometidos. Após a ingestão de alimentos contaminados, *L. monocytogenes* pode se proliferar no intestino e causar diarreia e gastroenterite autolimitante (Doganay, 2003). Além disso, essa bactéria tem a capacidade de atravessar a barreira intestinal, se disseminar pelos linfonodos mesentéricos, fígado e baço, causando bacteremia prolongada. Inclusive,

pode chegar até o sistema nervoso central e placenta, causando meningite e aborto em mulheres grávidas, respectivamente (Bonazzi et al., 2009).

Existem vários casos de listeriose humana no Brasil (Esper et al., 1978; Hofer et al., 2000; Schwab e Edelweiss, 2003) mas, como a doença não é de notificação compulsória, a Vigilância Sanitária não tem dados epidemiológicos consistentes da doença no país, apenas alguns casos isolados são relatados (Vallim et al., 2015).

Nos animais domésticos, a listeriose acomete principalmente os ovinos, caprinos e bovinos (Low e Donachie, 1997). Estudos em ruminantes mostram que o útero em gestação de vacas e ovelhas podem ser infectados por via intravenosa, podendo levar ao aborto (Low e Donachie, 1997). A infecção do feto ocorre por via hematogena, uma vez que tanto *L. monocytogenes* como *Listeria ivanovii* conseguem proliferar em células trofoblásticas (Rocha et al., 2017) e atravessar a barreira placentária (Vazquez-Boland et al., 2001).

A listeriose encefálica é a forma mais comum da doença em ruminantes, sendo caracterizada por encefalite, atingindo principalmente o tronco cerebral. Há indícios de que, além da via hematogena, o patógeno alcance o sistema nervoso central (SNC) através dos nervos facial e trigeminal, via lesão pré-existente na cavidade oral (Lopes, 2010; Low e Donachie, 1997). Porém, outras formas da doença, como aborto e septicemia, também são descritas nestes animais (Low e Donachie, 1997; Lopes, 2010; Oevermann et al., 2010). Os casos de encefalite são mais comuns no inverno, pois os animais ficam confinados e recebem alimentos estocados que podem estar contaminados pela bactéria (Lopes, 2010). A principal forma de contaminação de *L. monocytogenes* em ruminantes se dá através da silagem mal conservada (Ho et al., 2007).

O diagnóstico de listeriose, em sua maioria, é baseado na descrição histopatológica associada aos sinais clínicos, sendo importante a confirmação através da técnica de imuno-histoquímica (IHQ), coloração de Gram e/ou cultivo bacteriológico (Johnson et al., 1995; Loeb, 2004). Técnicas moleculares como a Reação da Polimerase

em Cadeia (PCR) também são utilizadas para o diagnóstico definitivo (Barkallah et al., 2016). Atualmente, há escassos trabalhos que descrevem a realização de imunofluorescência (IF) para *Listeria* spp. em tecidos previamente fixados e processados (Henke et al., 2015).

A técnica de IHQ foi descrita pela primeira vez por Coons et al. (1941). Desde então, esta tem sido utilizada para identificar *L. monocytogenes* em animais (Johnson et al., 1995; Rissi et al., 2010; Rocha et al., 2017; Prado et al., 2019) e no homem (Schwab e Edelweiss, 2003), sendo estabelecida como uma metodologia sólida e confiável para atividades rotineiras de diagnóstico e pesquisa em medicina veterinária (Ramos-Vara e Miller, 2014). Nos animais, os protocolos de IHQ frequentemente descritos para *L. monocytogenes* utilizam kits de biotina-avidina/estreptavidina com peroxidase (Johnson et al., 1995; Rissi et al., 2006; Rocha et al., 2017; Prado et al., 2019) ou de biotina/estreptavidina com fosfatase alcalina (Kirinus et al., 2010; Rissi et al., 2010).

As reações imunológicas que envolvem ligação antígeno-anticorpo podem ser visualizadas por meio de enzimas, como utilizado na IHQ, ou de fluorocromos, como utilizados na imunofluorescência. Os fluorocromos são corantes que absorvem radiação (luz), são por ela excitados e emitem luz visível. Para que funcionem como marcadores, precisam ter grupos químicos capazes de formar ligações covalentes com moléculas proteicas, emitindo alta fluorescência no espectro visível com coloração distinta da emitida pelos tecidos. Um dos fluorocromos mais utilizados é o isotiocianato de fluoresceína, que emite cor verde (Aoki et al., 2010).

Para *L. monocytogenes*, a IF tem sido rotineiramente aplicada em *imprint* de tecidos frescos quando há suspeita clínica da doença (McLauchlin et al., 1988; Barbuddhe et al., 2009). Contudo, esta técnica tem demonstrado resultados muito variáveis na rotina diagnóstica da veterinária.

A otimização e utilização de técnicas imunológicas, como IHQ e IF, em tecidos fixados em formol e conservados em parafina possibilitam o diagnóstico de doenças

infecciosas sem a necessidade de infraestrutura laboratorial onerosa de biossegurança para o isolamento bacteriano e extração de DNA de tecidos frescos. Estas técnicas também oportunizam estudos retrospectivos utilizando materiais de necropsias realizadas, o que se torna inviável para avaliação microbiológica.

Para amostras frescas, o diagnóstico definitivo de listeriose baseado no isolamento do agente é relativamente demorado, fastigioso (Johnson et al., 1995). Além disso, a colheita adequada de amostras para isolamento bacteriano nem sempre condiz com a realidade no campo. Frequentemente, a forma pouco asséptica e refrigeração inadequada das amostras até a chegada ao laboratório, ou quando o veterinário não suspeita do agente, dificultam o isolamento bacteriano e, inclusive, a realização de técnicas moleculares mais sensíveis para diagnóstico de *Listeria* sp., como a PCR.

Na medicina veterinária, a técnica de PCR já foi amplamente descrita para a detecção de *L. monocytogenes* em casos de aborto em fetos bovinos (Silva et al., 2009), em chinchilas (Kirinus et al., 2010) e em ruminantes (Barkallah et al., 2016). Também já foi descrita como um método rápido e sensível para detectar esse patógeno em alimentos (Aznar e Alarcon, 2003; Peres et al., 2010; Palma et al., 2016). Vale ressaltar que, apesar da PCR ser um método sensível, não é possível associar a localização *in situ* do agente na lesão como é possível visualizar nas técnicas imunológicas de IHQ e IF, o que torna essas últimas mais eficazes para associar a lesão com o agente pesquisado. O diagnóstico de listeriose na medicina veterinária tem grande relevância, não só pelas perdas econômicas com a morbidade e mortalidades de animais, mas também em relação à segurança alimentar e saúde pública, oferecendo uma possível ligação de contaminação do ambiente e a infecção humana (Overmann et al., 2010). O desenvolvimento de novas alternativas de diagnóstico acessível, rápido e confiável é primordial para o controle efetivo da doença. Por isso, a implantação e otimização de técnicas que auxiliem no diagnóstico definitivo da

listeriose se fazem necessárias, para que sejam aplicadas em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina de animais submetidos à necropsia.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar as técnicas de imunofluorescência e imuno-histoquímica para detecção de *L. monocytogenes* em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina.

2.2 Específicos

- I. Otimizar a técnica de IHQ, utilizando anticorpo secundário em polímero marcado com enzima peroxidase.
- II. Otimizar a técnica de IF para tecidos fixados e parafinizados.
- III. Realizar diagnóstico definitivo da listeriose por IHQ e/ou IF, em tecidos de animais que possuem lesões histopatológicas compatíveis com a doença, já processadas e arquivadas no laboratório de Patologia Veterinária do IFC Campus Concórdia.
- IV. Comparar a sensibilidade entre as duas técnicas de IF e IHQ, quanto à presença e intensidade de imunomarcção de *L. monocytogenes* nos tecidos fixados em formol e embebidos em parafina.

3 ARTIGO

Comparação entre imunofluorescência e imuno-histoquímica para detecção de *Listeria monocytogenes* em tecidos fixados e parafinizados

Artigo a ser submetido na Revista Ciência Rural

<https://www.scielo.br/revistas/cr/iinstruc.htm>

Kelen Regina Ascoli Baldi ⁽¹⁾, Jéssica Line Farias de Lima ⁽²⁾, Isabela Gimenes da Silva ⁽¹⁾, Fernanda Felicetti Perosa ⁽¹⁾, Ricardo Evandro Mendes ⁽¹⁾ e Teane Milagres Augusto Gomes ^(1*)

¹ Instituto Federal Catarinense Campus Concórdia. Departamento de Patologia Veterinária. Rodovia SC 283 km 17, CEP 89703-720. Concórdia SC, Brasil.

² Universidade Federal de Pelotas. Departamento de Patologia Animal. Av. Eliseu Maciel/Prédio 1. Campus Capão do Leão. CEP 96010-900. Pelotas RS, Brasil.

*Autor para correspondência: teane.gomes@ifc.edu.br.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a bacterium that infect humans and animals and causes a zoonotic disease characterized by encephalitis, septicemia or abortion. Also, listeriosis leads to significant economic losses due to animal death or sacrifice. The aim of this work was to compare the technique of immunofluorescence (IF) and immunohistochemistry (IHC) for the detection of *L. monocytogenes* in formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissues. A total of 25 tissue blocks from animals with history and/or lesions compatible with listeriosis were selected. For immunohistochemistry, a diluted polyclonal anti-*L. monocytogenes* serotype 1 and 4 primary antibody was used, followed by a secondary antibody with polymer kit. For immunofluorescence, the same primary antibody was used, followed by fluorescein-labeled anti-rabbit IgG secondary antibody. Each sample was classified according to the immunostaining presence and intensity. From 25 samples, 10 were positive at least for one technique, whereas eight samples were positive for both IHC and IF with similar intensity. There was strong immunolabeling in samples from bovines experimentally infected with *L. monocytogenes* ATCC 7644, as well as in nervous tissues from naturally infected ruminants. This study demonstrated that both techniques are efficient to detect *L. monocytogenes* in FFPE tissues. Using processed biological materials for IF,

instead of fresh samples, is a quite unique technique, since there are few protocols described. However, IF did not show any difference in sensitivity when compared to IHC, whereas the latter is less expensive and has an easier result interpretation.

Keywords: Listeriosis; immunological techniques; veterinary diagnostics.

RESUMO

Listeria monocytogenes é uma bactéria que infecta humanos e animais, podendo causar uma doença zoonótica caracterizada por encefalite, septicemia e abortos. Além disso, a listeriose resulta em perdas econômicas significativas pela morte ou sacrifício de animais. O objetivo deste trabalho foi comparar a técnica de imunofluorescência (IF) e imuno-histoquímica (IHQ) para detecção de *L. monocytogenes* em tecidos fixados e parafinizados. Foram selecionados 25 blocos de tecidos de animais com histórico e/ou lesões compatíveis com listeriose. Para a imuno-histoquímica, foi utilizado anticorpo primário policlonal anti-*L. monocytogenes* sorotipo 1 e 4 diluído, seguido de kit com anticorpo secundário acoplado a polímero. Para a imunofluorescência, foi utilizado o mesmo anticorpo primário, seguido de anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com fluoresceína. Cada amostra foi classificada quanto à presença e intensidade de imunomarcção. Das 25 amostras, 10 foram positivas em pelo menos uma das técnicas, sendo oito amostras positivas em ambas IHQ e IF com a mesma intensidade. Houve forte imunomarcção tanto em amostras de bovino experimentalmente infectado com *L. monocytogenes* ATCC 7644, como em amostras de tecido nervoso de ruminantes naturalmente infectados. O estudo demonstrou que as duas técnicas foram eficientes para detectar *L. monocytogenes* em tecidos fixados e parafinizados. O uso de materiais biológicos processados para IF, ao invés de tecidos frescos, é algo inovador, uma vez que existem poucos protocolos descritos. Porém, a IF não apresentou diferença na sensibilidade quando comparada com a IHQ, sendo esta última de menor custo e maior facilidade na interpretação dos resultados.

Palavras-chave: listeriose, técnicas imunológicas, diagnóstico veterinário.

3.1 INTRODUÇÃO

Listeriose é uma das principais doenças de origem alimentar que causa infecção sistêmica em várias espécies animais e no homem, resultando em elevada taxa de letalidade em pacientes infectados (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007). A doença é causada frequentemente por *Listeria monocytogenes*, uma bactéria flagelada, Gram positiva e intracelular facultativa (Liu, 2013), a doença apresenta três manifestações clínicas distintas: septicêmica, com múltiplos abscessos no baço e fígado; reprodutiva,

com aborto; e neurológica, caracterizada por romboencefalite e microabscessos (Lopes, 2010; Oevermann et al., 2010).

Nos animais domésticos, a listeriose acomete principalmente os ovinos, caprinos e bovinos. A encefalite é a forma mais comum de listeriose em ruminantes, porém, as demais formas da doença também acometem esses animais (Low e Donachie, 1997). O diagnóstico de listeriose na medicina veterinária, em sua maioria, é baseado na descrição histopatológica associada aos sinais clínicos, sendo importante a confirmação através da técnica de imuno-histoquímica (IHQ), coloração de Gram e/ou cultivo bacteriológico (Johnson et al., 1995; Loeb, 2004). Técnicas moleculares como a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) também são utilizadas para o diagnóstico definitivo (Kirinus et al., 2010; Barkallah et al., 2016). Atualmente, há escassos trabalhos que descrevem a realização de imunofluorescência (IF) para *Listeria* spp. em tecidos previamente fixados e processados (Henke et al., 2015), contudo, não se sabe a sua aplicabilidade quando utilizada para a detecção do patógeno na rotina laboratorial. Isto evidencia a importância da disponibilização de técnicas confiáveis para a confirmação *in situ* de listeriose em amostras de campo.

A otimização e utilização de técnicas imunológicas, como a IHQ (Johnson et al., 1995; Rocha et al., 2017) e IF (Henke et al., 2015) em tecidos fixados em formol e conservados em parafina possibilitam o diagnóstico desta doença infecciosa sem a necessidade de infraestrutura laboratorial onerosa de biossegurança para o isolamento bacteriano e extração de DNA de tecidos frescos. Além disso, estas técnicas também oportunizam estudos retrospectivos utilizando materiais arquivados.

Para amostras frescas, o diagnóstico definitivo baseado no isolamento do agente é relativamente demorado e fastigioso (Johnson et al., 1995). Assim, a verificação de novas alternativas de diagnóstico acessível, rápido e confiável é primordial para o controle efetivo da doença. Portanto, o presente trabalho tem o objetivo de comparar entre as técnicas de IF e IHQ como métodos alternativos para detecção confirmatória de *L. monocytogenes* em tecidos animal fixados em formol e embebidos em parafina.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção de amostras

Foram selecionados 25 tecidos, previamente fixados em formol e embebidos em parafina, de animais com histórico e/ou lesões histopatológicas sugestivas de listeriose, tanto neurológica como sistêmica. Estes animais foram submetidos à necropsia ou avaliação microscópica no laboratório de Patologia Veterinária do Instituto Federal Catarinense, *Campus* Concórdia, SC, no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2019. Oito amostras foram oriundas de ruminantes com suspeita de infecção espontânea por *Listeria* sp., incluindo ovinos (5/8 casos), bovinos (2/8 casos) e um caprino. Estes animais apresentaram lesões histopatológicas em pelo menos um dos fragmentos do sistema nervoso central (tronco cerebral, cerebelo, cérebro e/ou medula), caracterizadas por múltiplos microabscessos ricos em neutrófilos associados a manguito perivascular não supurado, por vezes, com malácia e células de Gitter. O grau de lesão microscópica foi classificada para cada amostra quanto à intensidade inflamação, sendo: 0- ausência de lesão; 1- leve inflamação; 2- moderada inflamação; 3- acentuada inflamação com malácia.

As demais 17 amostras analisadas por IHQ e IF foram oriundas de bovinos (n=15) e gerbilos (n=2) experimentalmente infectados com *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Jaguezeski et al., 2018; Jaguezeski et al., 2020). Fragmentos de fígado, intestino, mucosa oral e sistema nervoso central, foram previamente analisados através de PCR específica para *L. monocytogenes* (Jaguezeski et al., 2018; Jaguezeski et al., 2020), sendo selecionadas somente as amostras positivas. O grau de lesão microscópica foi classificada para cada amostra quanto à intensidade de inflamação, sendo: 0- ausência de lesão; 1- inflamação leve e/ou formação de microabscessos; 2- inflamação moderada; 3- inflamação acentuada com necrose tecidual. Para garantir a confiabilidade do teste, tecidos de animais negativos (grupo controle) também foram utilizados.

Imuno-histoquímica para L. monocytogenes

Para a detecção intralésional de *L. monocytogenes*, a IHQ foi realizada como previamente descrita por Rocha et al. (2017), com modificações. As variáveis testadas foram: recuperação de antígeno com enzima Proteinase K e sem método de recuperação; bloqueio de reações inespecíficas com leite em pó; anticorpo primário nas diluições (1:100 e 1:200) com incubação de 45 e 90 minutos em estufa a 37°C; anticorpo secundário com polímero marcado e com kit de estreptavidina-peroxidase (DAKO, EUA); lavagens entre as incubações com PBS 0,05% de Tween 20, por 5 e 15 minutos; revelação com 3-Amino-9-etilcarbazol (AEC) e diaminobenzidina (DAB), (DAKO, EUA). Foi selecionado o protocolo que apresentou melhor imunomarcção dos controles positivos com menor marcação inespecífica e menor tempo de execução, conforme descrito a seguir.

As lâminas de carga contendo tecidos histológicos com 3 µm de espessura foram aquecidas em estufa a 56°C, diafinizadas em xilol para a remoção completa da parafina, seguida de hidratação em série decrescente de álcool (100, 96, 80 e 70%) e lavagem em solução de PBS com 0,05% de Tween 20 (Dinâmica, Brasil) por 5 minutos cada. As amostras foram incubadas com solução de peróxido de hidrogênio a 4% em água destilada por 45 minutos para bloqueio da peroxidase endógena, lavadas e incubadas com leite em pó (diluição 1:10) em PBS por 45 minutos 37°C em câmara úmida, para bloqueio de reações inespecíficas. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário policlonal anti-*L. monocytogenes* (*Listeria O Antiserum Poly Serotypes 1 e 4*, Difco, EUA) por 90 minutos em câmara úmida a 37°C, lavadas com PBS-Tween e incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário acoplado a polímero (Kit Polímero EnVision+Dual Link System-HRP, DAKO, EUA). A imunomarcção foi revelada com 3-Amino-9-etilcarbazol (AEC, DAKO, EUA) e as lâminas contra coradas com Hematoxilina de Harris, para melhor visualização do tecido, seguida de montagem com lamínula e meio de montagem de gelatina-Glicerol P.A. (Isofar, Brasil), na concentração (1:1) para melhor conservação e visualização do tecido. A leitura foi feita em microscópio óptico (Opton), sendo cada amostra avaliada quanto à presença/ausência e intensidade de imunomarcção nos tecidos (neg = ausente, + = leve, ++ = moderada, +++ = intensa). Como controles negativos, foram utilizadas amostras de tecidos de animais não infectados incubados com anticorpo primário. Tecidos positivos foram incubados com PBS-Tween ao invés de anticorpo primário, como controle de reações inespecíficas.

Imunofluorescência para L. monocytogenes

Tecidos fixados e embebidos em parafina, com lesões histopatológicas sugestivas de listeriose ou previamente positivos pela técnica de IHQ, foram selecionados para IF. A técnica descrita por Henke et al., (2015) foi realizada com modificações. As variáveis testadas foram: recuperação de antígeno com enzima Proteinase K e sem método de recuperação; bloqueio de reações inespecíficas com soro de equino a 2,5 % e 10%; anticorpo primário na diluição (1:200) com incubação de 90 minutos em estufa a 37°C; anticorpo secundário (FITC) (Abcam, EUA) nas diluições 1:100 e 1:500, com incubações de 60, 75 e 105 minutos em temperatura ambiente e 60 minutos em estufa a 37°C; lavagens entre as incubações com PBS 0,05% e 0,1% de Tween 20. Foi selecionado o protocolo que apresentou melhor imunomarcção dos controles positivos, com menor marcação inespecífica e menor tempo de execução, conforme descrito a seguir.

As lâminas de carga contendo tecidos histológicos com 3 µm de espessura foram aquecidas em estufa a 56°C, mergulhadas em xilol para a remoção completa da parafina, e hidratadas em série decrescente de álcool (100 a 70%) e PBS com 0,05% de Tween 20 (Dinâmica, Brasil) por 5 minutos cada. Para bloqueio de reações inespecíficas, foi utilizado soro equino (Vector, EUA) a 2,5% em estufa a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Após lavagem em PBS-Tween por 5 minutos, os tecidos foram incubados com anticorpo primário policlonal anti *L. monocytogenes* (*Listeria O Antiserum Poly Serotypes 1 e 4*, Difco, EUA) na diluição 1:200 por 90 minutos em estufa a 37°C. Em seguida, as amostras foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com fluoresceína (FITC) (ab6717, Abcam,

EUA) na diluição 1:100, por 105 minutos em câmara úmida escura à temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram lavadas em PBS-Tween (Dinâmica, Brasil) e água destilada, montadas com glicerol P.A. (Isofar, Brasil) e examinadas em até 48 hs em microscópio de fluorescência Oxion[®] (Euromex, Holanda) com filtro de excitação 475 nm/ AF40 e emissão 535 nm/AF45. Para captura de imagens, foi utilizado microscópio confocal Zeiss (Observer.Z1, Germany) com objetiva de 100X em imersão.

Cada amostra foi avaliada quanto à presença/ausência e intensidade de imunomarcacão nos tecidos (neg = ausente, + = leve, ++ = moderada, +++ = intensa) e comparada ao resultado da IHQ. Para padronização da leitura, amostras de tecidos de animais não infectados foram utilizados como controle negativo. Tecidos positivos foram incubados com PBS-Tween ao invés de anticorpo primário, como controle de reações inespecíficas.

Análise estatística

A sensibilidade dos testes de IHQ e IF foram calculados separadamente para amostras de infecção experimental e de infecção natural. O teste ouro utilizado foi qPCR para *L. monocytogenes* em órgãos congelados de animais experimentalmente infectados (Jaguezeski et al., 2018; Jaguezeski et al., 2020), e lesão histopatológica de listeriose nervosa para tecidos de animais com infecção natural.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 25 tecidos de animais selecionados, 10 amostras (40%; 10/25) foram positivas em pelo menos uma das técnicas e destas, oito amostras (80%; 8/10) foram

positivas em ambas IHQ e IF. Das 25 amostras testadas, somente duas amostras (8%) apresentaram resultado diferente entre as técnicas, sendo uma positiva para IHQ com leve imunomarcção e negativa para IF e outra com leve imunomarcção na IF e negativa na IHQ.

Houve forte marcação imunológica por IHQ (Figura 1A) e por IF (Figura 1B) tanto em tecidos de bovino experimentalmente infectados com *L. monocytogenes* ATCC 7644, como em tecido nervoso de ruminantes com infecção espontânea (Figura 1C e 1D). Também houve leve imunomarcção de fígado de gerbilos experimentalmente infectados, com 12 dias após a inoculação, além de leve imunomarcção em intestino e fígado de bovino experimentalmente infectados, com 14 dias pós infecção. Houve variação na intensidade de marcação entre os tecidos avaliados, porém, em todos os tecidos positivos, foram observados escores similares entre as duas técnicas. Além disso, não houve diferença na sensibilidade entre IHQ e IF. A sensibilidade de ambas as técnicas para a detecção de *Listeria* sp. foi de 29,4% e 50,0% em tecidos de infecção experimental e em tecidos de infecção natural, respectivamente. A comparação dos resultados entre IHQ e IF estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação da imuno-histoquímica (IHQ) e imunofluorescência (IF) para *Listeria monocytogenes* em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina.

| Amostras (espécie, idade, órgão) | Grau de lesão microscópica | IHQ | IF |
|---|---------------------------------------|------------|-----------|
| Infecção natural | | | |
| Ovino, 1 ano, encéfalo e cerebelo | 3 | Negativo | Negativo |
| Ovino, 1 ano, encéfalo | 2 | Negativo | Negativo |
| Ovino, 1 ano, medula espinhal | 2 | +++ | +++ |
| Ovino, NI, cerebelo | 2 | +++ | +++ |
| Ovino, 3 anos, tronco | 2 | +++ | +++ |
| Bovino, 20 meses, tronco | 2 | Negativo | Negativo |
| Bovino, feto abortado (NI), cérebro | 3 | Negativo | Negativo |
| Caprino, NI, medula, tronco | 3 | + | + |
| Infecção experimental* | | | |
| Bovino, 6 meses, mucosa oral | 3 | +++ | +++ |
| Bovino, 6 meses, mucosa oral | 2. | ++ | ++ |
| Bovino, 26 meses, ponte e cérebro | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 13 meses, ponte e cérebro | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 12 meses, ponte e cérebro | 0 | Negativo | Negativo |

| | | | |
|----------------------------------|---|----------|----------|
| Bovino, 6 meses, ponte e cérebro | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 6 meses, ponte e cérebro | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 26 meses, fígado | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 13 meses, fígado | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 12 meses, fígado | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 6 meses, fígado | 0 | + | Negativo |
| Bovino, 6 meses, fígado | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 12 meses, jejuno | 1 | Negativo | + |
| Bovino, 6 meses, jejuno | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 6 meses, jejuno | 1 | Negativo | Negativo |
| Gerbil, 8 semanas, fígado | 1 | + | + |
| Gerbil, 8 semanas, fígado | 1 | + | + |
| Grupo controle negativo | | | |
| Bovino, 22 meses, fígado | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 16 meses, fígado | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 16 meses, fígado | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 15 meses, fígado | 0 | Negativo | Negativo |
| Bovino, 15 meses, fígado | 0 | Negativo | Negativo |

*Órgãos colhidos 14 dias pós infecção (dpi) em bovinos e 12 dpi em gerbilos. NI: não informado

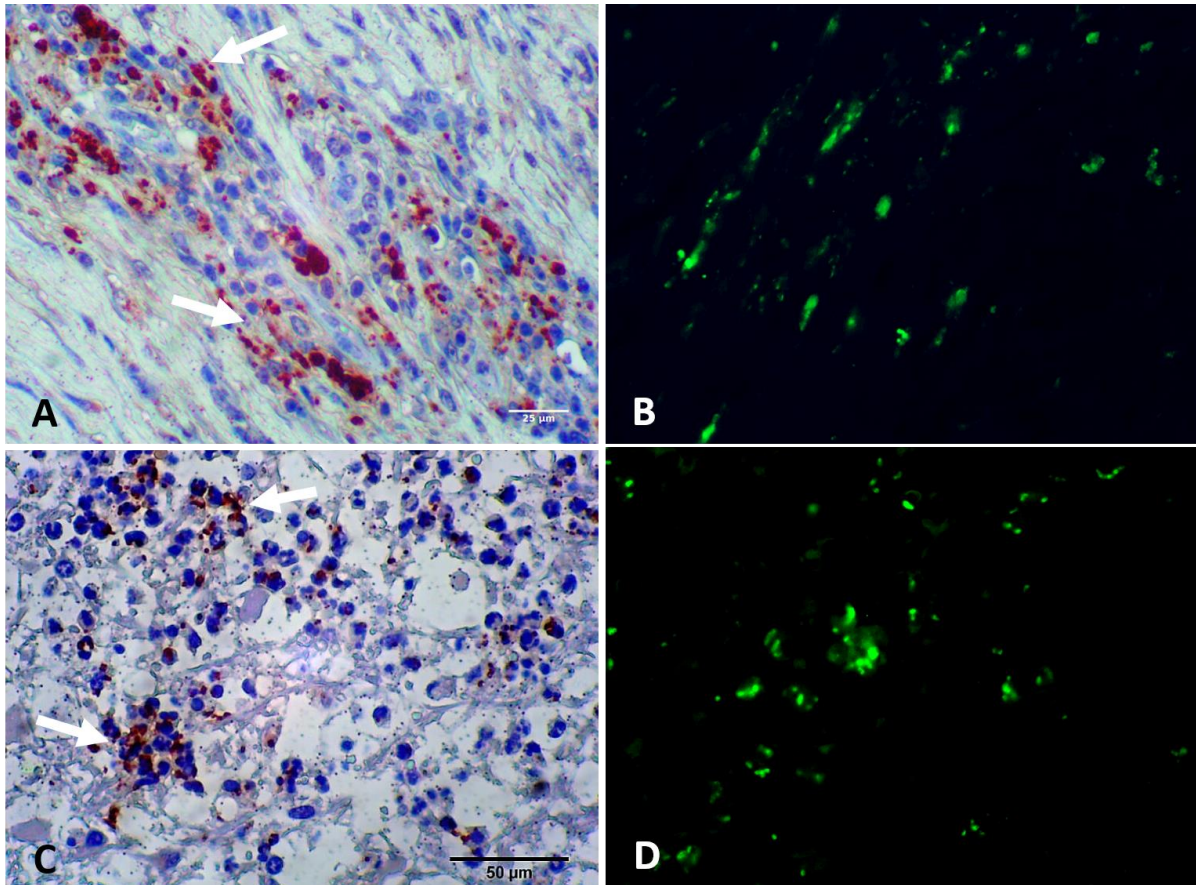


Figura 1. Imuno-histoquímica e imunofluorescência específicas para *Listeria monocytogenes* em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina. Forte imunomarcagem intralesional em mucosa de bovino experimentalmente infectado (A, B) e em cerebelo de ovino naturalmente infectado (C, D). Imuno-histoquímica (A, C) com anticorpo secundário de polímero e revelação com AEC (setas), 400X. Imunofluorescência (B, D) com anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com FITC (verde), 1000X.

A otimização da IHQ em nosso estudo com o método do polímero marcado apresentou maior rapidez e menos marcação inespecífica nos tecidos, quando comparado ao uso de kit de biotina-avidina ou estreptavidina-peroxidase (Johnson et al., 1995; Rissi et al., 2006; Rocha et al., 2017; Prado et al., 2019). A importância desta técnica imunológica em comparação a outros métodos diagnósticos direto se dá através da possibilidade de localização de um antígeno e associar às lesões teciduais, o que

permite melhorar a impressão diagnóstica e a compreensão da patogênese (Ramos-Vara e Miller, 2014).

Assim como em nosso trabalho, outros autores descrevem a eficiência da imunohistoquímica para detectar *L. monocytogenes* nos tecidos de animais. Em ovinos, a listeriose neurológica foi confirmada através do exame de IHQ no Rio Grande do Sul e Paraná, no qual o patógeno foi encontrado no citoplasma de neutrófilos e macrófagos (Rissi et al., 2010). O mesmo foi observado em nosso trabalho, que evidenciou a forte imunomarcagem de *L. monocytogenes* no citoplasma de neutrófilos em microabscessos presentes no cerebelo de ovino (Figura 1 C). Em caprinos, na região central do Rio Grande do Sul, Rissi et al., (2006) confirmaram listeriose encefálica pelo método de IHQ. A técnica também foi utilizada para detectar *L. monocytogenes* em tecido nervoso de búfalos no estado do Pará (Prado et al., 2019) e para confirmação de listeriose encefálica em ruminantes (Johnson et al., 1995).

A realização de IF em tecidos fixados em formol e emblocados em parafina, ao invés de tecido fresco, tem sido algo inovador, uma vez que existem poucos relatos utilizando essa técnica em materiais biológicos processados. Henke et al., (2015), testaram IF em 11 amostras de tecidos cerebrais de ovinos e caprinos e obtiveram resultado positivo, sendo que a grande maioria das bactérias foram encontradas em áreas de microabscessos cerebrais.

Com o protocolo de IF utilizado neste trabalho, não houve comprometimento da imunomarcagem com a remoção da etapa de recuperação antigênica. Além disso, o menor tempo de incubação com um novo anticorpo primário otimizou a técnica para obter um resultado mais rápido, quando comparado com a metodologia previamente

descrita (Henke et al., 2015).

Somente duas amostras apresentaram resultados distintos na imunomarcação entre as técnicas de IHQ e IF. Isto pode ter ocorrido devido aos cortes sequenciais do tecido, resultando na varia o da quantidade de antígeno entre os fragmentos de tecidos analisados.

Cabe salientar que este estudo demonstrou que as duas técnicas imunológicas foram igualmente eficientes para detectar o patógeno em tecidos parafinizados, com marca es imunológicas nos mesmos locais do tecido. Porém, a IF não apresentou diferença de sensibilidade ao comparar com a IHQ, sendo esta última uma técnica de menor custo e maior facilidade na interpreta o dos resultados.

3.4 CONCLUSÃO

Ambas as técnicas imunológicas de IHQ e IF são eficientes para detectar *L. monocytogenes* em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina. Contudo, não houve diferença de sensibilidade entre as técnicas avaliadas, apesar da maior complexidade na interpreta o e maior custo para realiza o de IF, quando comparada com a IHQ.

3.5 AGRADECIMENTO

Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq (Universal processo n. 431214/2016-16) e do laboratório de Patologia Veterinária do Instituto Federal Catarinense, *Campus* Concórdia.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo, foi possível verificar a presença de *L. monocytogenes* em ruminantes e pequenos ruminantes na região oeste de Santa Catarina, alertando para o risco de transmissão deste microrganismo para seres humanos. Apesar da ocorrência de poucos casos, os resultados obtidos apresentam especial importância, considerando que o patógeno é uma zoonose e, portanto, relevante para a saúde pública.

As duas técnicas imunológicas foram igualmente eficientes para detectar o patógeno em tecidos fixados e parafinizados, não sendo necessária confirmação por isolamento microbiológico. A IF não apresentou diferença de sensibilidade ao comparar com a IHQ, sendo esta última uma técnica de menor custo e maior facilidade na interpretação dos resultados.

Ressalta-se a importância em utilizar técnicas imunológicas para confirmação do diagnóstico de *L. monocytogenes* e, desta forma, disponibilizá-las para a aplicação em animais de produção.

5 REFERENCIAS

AOKI, V., SOUZA JR, J. X., FUKUMORI, L. M., PERIGO, A. M., FREITAS, E. L., & OLIVEIRA, Z. N. Imunofluorescência direta e indireta. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 490, 2010.

AZNAR, R.; ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p. 958-966, 2003.

BARBUDDHE, S.; HAIN, T.; CHAKRABORTY T. The Genus *Listeria*. In: GOLDMAN, E.; GREEN, L. **Practical Handbook of Microbiology**. Boca Raton: CRC Press, cap. 34, p. 533-562, 2009.

BARKALLAH, M., GHARBI, Y., HMANI, M., MALLEK, Z., GAUTIER, M., GDOURA, R., & FENDRI, I. Locked nucleic acid probe-based real-time PCR for the diagnosis of *Listeria monocytogenes* in ruminants. **Molecular and Cellular Probes**, v. 30, n. 3, p. 138-145, 2016.

BONAZZI, M., LECUIT, M., COSSART, P. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from bench to bedside. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 4, p. a003087, 2009.

BUCHRIESER, C., RUSNIOK, C., GARRIDO, P., HAIN, T., SCORTTI, M., LAMPIDIS, R., ... & VAZQUEZ-BOLAND, J. A. Complete genome sequence of the animal pathogen *Listeria ivanovii*, which provides insights into host specificities and evolution of the genus *Listeria*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 23, p. 6787-6788, 2011.

COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 47, n. 2, p. 200-202, 1941.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinical presentation. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 173-175, 2003.

ESPER, M. R. N. R., PESSOA, G. V. A., HOFER, E., LEE, I. M. L., MELLES, C. E. A., SAKATA, E. E., & CALZADA, C. T. Meningite por *Listeria monocytogenes* em São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 38, p. 37-41, 1978.

HENKE, D., RUPP, S., GASCHEN, V., STOFFEL, M. H., FREY, J., VANDEVELDE, M., & OEVERMANN, A. *Listeria monocytogenes* spreads within the brain by actin-based intra-axonal migration. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 6, p. 2409-2419, 2015.

HO, A. J., IVANEK, R., GROHN, Y. T., NIGHTINGALE, K. K., & WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *Listeria monocytogenes* subtypes. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 80, n. 4, p. 287-305, 2007.

HOFER, E., RIBEIRO, R., & FEITOSA, D. P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 615-620, 2000.

JAGUEZESKI A. M., BALDISSERA M. D., RHODEN L. A., GOMES T. M., MENDES R. E., BOTTARI N. B., MORSCH V.M, SCHETINGER M.R.C, STEFAN L.M, GIONGO J.L, VAUCHER R. A., SILVA A.S.Da. *Listeria monocytogenes* impairs enzymes of the phosphotransfer network and alters antioxidant/oxidant status in cattle brain structures. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 284-290, 2018.

JAGUEZESKI A. M., SOUZA C. F., PERIN G., GERBERT R. R., BALDI K. R. A., GOMES T. M. A., BALDISSERA M. D., ANDRADE C. M., STEFANI L. M., DA SILVA A. S. Changes in cardiac and hepatic energetic metabolism in gerbils infected by *Listeria monocytogenes*. **Microbial Pathogenesis**, v.138, p.103786, 2020.

JOHNSON G.C., FALES W.H., MADDOX C.W. & RAMOS-VARA J.A. Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 2, p. 223-228, 1995.

KIRINUS, J. K., KREVER, C., ZENI, D., MONEGO, F., SILVA, M. C. D., KOMMERS, G. D., & VARGAS, A. C. D. Surto de listeriose sistêmica em chinchilas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 686-689, 2010.

LIU, D. Molecular approaches to the identification of pathogenic and nonpathogenic listeriae. **Microbiology Insights**, v. 6, p. MBI. S10880, 2013.

LOEB, E. Encephalitic listeriosis in ruminants: Immunohistochemistry as a diagnostic tool. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 51, n. 9-10, p. 453-455, 2004.

LOPES, L. B. Listeriose: encefalites nos animais domésticos. **PUBVET**, v. 4, p. 752-758, 2010.

LOW, J. C.; DONACHIE, William. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. **The Veterinary Journal**, v. 153, n. 1, p. 9-29, 1997.

MCLAUCHLIN J, BLACK A, GREEN HT, NASH JQ, TAYLOR AG. Monoclonal antibodies show *Listeria monocytogenes* in necropsy tissue samples. **Journal Clin. Pathol.**, v. 41, n. 9, p. 983-988, 1988.

OEVERMANN, A., ZURBRIGGEN, A., & VANDEVELDE, M. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise? **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2010, 2010.

PALMA, J. M., LISBOA, R. C., RODRIGUES, D. P., SANTOS, A. F., HOFER, E., & SANTANA, A. P. Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 957-964, 2016.

PERES, N. D., LANGE, C. C., BRITO, M. A. V. P., BRITO, J. R. F., ARCURI, E. F., & CERQUEIRA, M. M. O. P. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.62, n.4, pp.973-979, 2010.

PRADO, R. G. S., DOMICIANO, T. A. O., PAREDES, L. J. A., BEZERRA JUNIOR, P. S., PEREIRA, W. L. A., CERQUEIRA, V. D., DRIEMEIER, D., & RIET-CORREA,

G. Nervous form of listeriosis in buffaloes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 299-303, 2019.

RAMOS-VARA, J. A., & MILLER, M. A. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry—the red, brown, and blue technique. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 1, p. 42-87, 2014.

RISSI, D. R., RECH, R. R., BARROS, R. R., KOMMERS, G. D., LANGOHR, I. M., PIEREZAN F., & BARROS, C. S. Forma nervosa de listeriose em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 14-20, 2006.

RISSI, D. R., KOMMERS, G. D., MARCOLONGO-PEREIRA, C., SCHILD, A. L., & BARROS, C. S. Meningoencefalite por *Listeria monocytogenes* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 51-56, 2010.

ROCHA, C. E., MOL, J. P., GARCIA, L. N., COSTA, L. F., SANTOS, R. L., & PAIXAO, T. A. Comparative experimental infection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in bovine trophoblasts. **PloS One**, v. 12, n. 5, 2017.

SCHWAB, J. P., EDELWEISS, M. I. A. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 7, p. 501-505, 2003.

SILVA, T. M. A. D.; OLIVEIRA, R. G. D.; MOL, J. P. D. S.; XAVIER, M. N.; PAIXAO, T. A.; , CORTEZ, A.; ... & SANTOS, R. D. L. Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2563-2570, 2009.

SWAMINATHAN B., GERNER-SMIDT P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes Infect**, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.

VALLIM, D. C., BARROSO, H. C., LISBOA, R. D. C., VICTOR B. A., ALVES, R., L., REIS, C. M. F. D., & HOFER, E. Twenty years of *Listeria* in Brazil: Occurrence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serovars in food samples in Brazil between 1990 and 2012. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A., KUHN, M., BERCHE, P., CHAKRABORTY, T., DOMINGUEZ-BERNAL, G., GOEBEL, W., ... & KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.