



MODELO EXPERIMENTAL DE LISTERIOSE EM BOVINOS

Autores: Leandro Anderson RHODEN¹; Manoela Marchesan PIVA²; Fabio SANTIANI²; Anderson GRIS²; Renan CECHIN²; Denilso José GOMES²; Marcella TRONCARELLI²; Ricardo Evandro MENDES²; Teane Milagres Augusto da SILVA³.

Identificação autores: ¹Bolsista PIBITI 023/2017; ² IFC-Campus Concórdia; ³Orientadora IFC-Campus Concórdia.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi a formulação de um modelo experimental de infecção neurológica por *Listeria monocytogenes* em bovinos. Utilizou-se 10 bovinos da raça Holandesa, divididos em dois grupos. Realizou-se a escarificação da mucosa oral, seguida de aplicação do inóculo. Os bovinos foram eutanasiados 14 dias após inoculação e submetidos à necropsia. Os órgãos foram coletados para microbiologia e histopatologia. As lesões encontradas na histopatologia indicam provável infecção intestinal por *L. monocytogenes* seguida por infecção sistêmica. Contudo, a doença neurológica não foi observada neste modelo, sendo consideradas as seguintes variáveis: curto período de experimento, a ineficácia no transporte axonal, ou baixa imunossupressão.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A listeriose é uma zoonose de origem alimentar, que apresenta alta letalidade em animais acometidos (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007). A doença é causada por ~~em~~ a *Listeria monocytogenes*, uma bactéria flagelada, Gram positiva, intracelular facultativa. Em animais, a doença pode se apresentar em três formas clínicas distintas: (i) septicemia; (ii) aborto e; (iii) neurológica, caracterizada por nistagmo lateral, opistótono, paralisia flácida dos membros pélvicos ou dos quatro membros e salivação excessiva (Summers et al., 1995).

Segundo Summers et al. (1995), a sua ocorrência é favorecida pela má conservação de alimentos, como silagens e feno, sendo essa a principal fonte de contaminação para ruminantes.

Segundo Cruz et al.(2008), *L. monocytogenes* é considerado um patógeno oportunista, dependendo principalmente das condições imunológicas dos indivíduos afetados.

Na forma neurológica, acredita-se que *L. monocytogenes* infecta o organismo através de uma ferida ou área com comprometimento do epitélio da mucosa oral e por via ascendente, através do nervo trigêmeo, atinge o tronco cerebral (Barlow e McGorum, 1985).





Não há relatos de modelo experimental de listeriose neurológica em bovinos, tornando este experimento inovador na comunidade científica, auxiliando no estudo desta patologia e sua forma de controle.

O objetivo geral do presente estudo foi formular um modelo experimental de infecção neurológica por *L. monocytogenes* em bovinos,. Os objetivos específicos incluem avaliar os sinais clínicos durante a infecção e, posteriormente, descrever lesões anatomopatológicas observadas no modelo experimental e confirmar a infecção local com auxílio da microbiologia.

METODOLOGIA

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto Federal Catarinense Campus Concórdia (CEUA 11/2016).

Foram incluídos no estudo 10 bovinos machos, da raça Holandesa, enumerados e divididos em dois grupos: grupo infectado (GI) de 1 a 5; e grupo controle (GC) de 6 a 10.

No dia anterior à inoculação, injetou-se 0,4mg/kg de dexametasona por via intramuscular, em todos os animais de ambos grupos. Os animais foram mantidos por 24 horas em jejum. Ambos os procedimentos foram realizados com o intuito de causar imunossupressão nos animais.

Utilizou-se a cepa patogênica de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Para preparo do inóculo, cultivou-se a bactéria em placa de agar sangue em estufa a 37°C por 24 h, e transferiu-se para 100 mL de meio líquido de *Brain Heart Infusion* (BHI) para crescimento por 16 h a 37°C em homogeneizador. A concentração bacteriana foi estimada por espectrofotômetro considerando $1 \text{ OD}_{600} = 1 \times 10^9 \text{ UFC}$ (unidade formadora de colônia)/mL. Centrifugou-se a amostra a 1000xg por 5 min e o *pellet* foi ressuspensionado em solução tampão fosfato estéril (PBS). A esterilidade e concentração final do inóculo foram confirmadas por diluição seriada e plaqueamento do inóculo em ágar sangue incubado a 37°C *overnight*.

A inoculação ocorreu realizando-se escarificação da mucosa gengival, na região rostral da mandíbula, com bisturi utilizando-se sobre a lesão e na submucosa 1 mL do inóculo bacteriano, sendo a concentração final de $1,32 \times 10^{10}$ UFC por animal. No grupo controle utilizou-se 1 mL de solução estéril de PBS para simular a inoculação.





Os animais do grupo controle foram abatidos em abatedouro com sistema de inspeção municipal (SIM) O abate foi acompanhado, sendo coletados fragmentos de intestino e baço na área suja, e de fígado e a cabeça inteira após a inspeção na área limpa.

As peças recolhidas foram levadas ao Laboratório de Patologia Veterinária do IFC - Campus Concórdia, onde fragmentos de tecidos do sistema nervoso central, fígado, baço e intestinos foram coletados para microbiologia, PCR, análise de estresse oxidativo e histopatologia.

Em seguida, realizou-se a necropsia dos animais infectados, colhendo os mesmos tecidos que no grupo controle e, quando necessário, colhendo para histopatologia os demais órgãos que apresentassem alterações macroscópicas. O cultivo bacteriano foi realizado em àgar sangue e para histopatologia realizou-se desidratacao em alcool crescente, diafinizacao, embebicao em parafina, seguido de corte histologico e coloracao em Hematoxilina e Eosina.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nenhum dos animais apresentou quadros de sintomatologia nervosa sugestivas de listeriose.

Ao exame de necropsia, 60% dos animais do grupo infectado (3/5) apresentaram linfonodos mesentéricos com moderado a acentuado aumento de tamanho, brilhantes (edemaciados) e associado à linfangiectasia moderada. Dois animais (40%) apresentaram espessamento leve a moderado da parede de intestino delgado, principalmente jejuno e íleo, com evidenciação de placas de Peyer.

Na microbiologia dos órgãos, não foi isolada *Listeria* spp. Amostras do tecido nervoso, em ambos os grupos, tiveram resultado negativo.

Na avaliação por histopatologia, as alterações observadas nos animais do grupo infectado foram: no baço esplenite supurativa variando de discreta a moderada, com infiltrado inflamatório neutrofílico adjacente aos nódulos linfóides (4/5), hiperplasia linfoide discreta a moderada, com evidenciação de centro germinativos (2/5) e discreta hemossiderose (2/5).. Nos linfonodos mesentéricos, observou-se hiperplasia linfoide moderada com evidenciação de centros germinativos, hemossiderose focal (1/5) e edema difuso na medular (2/5). No intestino delgado, observou-se dilatação moderada a intensa de vasos linfáticos na submucosa





(2/5), edema de submucosa e hemossiderose (1/5). Dois animais apresentaram enterite linfocítica moderada, com evidenciação de placas de Peyer com hiperplasia moderada. Um dos animais apresentou dilatação da cripta com acúmulo de debris celulares no lúmen e outro com fragmentação da muscular da mucosa.

Nos animais do grupo controle, evidenciou-se hiperplasia linfoide discreta com evidenciação de centro germinativo no baço somente em um animal, descartando a importância desta lesão no grupo inoculado.

A falta de sintomatologia nervosa, associada à ausência de lesão no tecido neural, principalmente no tronco encefálico, indicam que não houve quadro de listeriose neurológica.

As lesões macroscópicas e microscópicas evidenciadas no intestino delgado indicam agressão inflamatória local provavelmente contra *L. monocytogenes*. Apesar de a inoculação ter sido na mucosa e intragengival, há possibilidade de que, no momento da inoculação, parte do inóculo tenha sido deglutido pelos animais, estabelecendo uma infecção intestinal. Há evidências de que, em pequenos ruminantes, ocorre excreção fecal de *L. monocytogenes* em portadores assintomáticos, após estabelecer a infecção no trato gastrointestinal por via oral (Zundel e Bernard, 2006). Contudo, não há relatos de quais alterações histopatológicas são observadas no local durante a infecção intestinal. .

A infecção sistêmica pode ter sido debelada com ativação do sistema imune, ocorrendo lise celular e eliminação bacteriana sistêmica assim como descrito por Zundel e Bernard (2006). Para a confirmação da infecção, será necessário realização de testes complementares mais sensíveis, tais como imunohistoquímica ou PCR convencional dos tecidos.

Como não houve indícios de infecção no sistema nervoso por *L. monocytogenes*, infere-se que o período de incubação seja maior que 14 dias, como relatado por Riet-Correa et al. (2001), ou ainda que a via de infecção em bovinos seja por via intestinal com absorção, bacteremia e posterior infecção neurológica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do modelo experimental de listeriose neurológica em bovinos pela





inoculação de *L. monocytogenes* em mucosa oral de bovinos não foi eficaz, uma vez que não houve lesões macroscópicas ou histopatológicas no sistema nervoso. A inoculação resultou em lesões intestinais e lesões microscópicas no baço compatíveis com quadro sistêmico após deglutição acidental do inóculo.

Mais estudos devem ser realizados a fim de instituir um modelo experimental, que determine a doença neurológica em bovinos, sendo consideradas modificações na metodologia, tais como alteração do local de inoculação, o aumento no período de imunossupressão ou até mesmo aumento no período entre inoculação e eutanásia.

REFERÊNCIAS

BARLOW, R. M. & MCGORUM, B. (1985). Ovine listerial encephalitis: analysis, hypothesis and syntheses. *Vet. Rec.*, 116:233–236.

CRUZ, C.D.; MARTINEZ, M.B.; DESTRO, M.T. (2008). *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Alim. Nutr. Araraquara* v.19, n.2, p.195-206.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS R.A.A. (2001). *Doenças De Ruminantes E Equinos*. Segunda Edição - Volume 1. Editora Varela 288-292.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; LAHUNTA, A. (1995). *Veterinary Neuropathology*. St. Louis: Mosby. 527p.

SWAMINATHAN B. & GERNER-SMIDT P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* 9: 1236–1243.

ZUNDEL, E. E BERNARD, S. (2006). *Listeria monocytogenes* translocates throughout the digestive tract in asymptomatic sheep. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1717–1723.

APOIO CNPQ

