

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM PLACENTAS HUMANAS E  
TECIDO NERVOSO CÉNTRAL DE RUMINANTES

Autor: Jussara Pires Schwab

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências Veterinárias na área de Patobiologia ligada  
à Veterinária

Orientador: Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

Porto Alegre  
2003

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço pela inestimável colaboração para a realização deste trabalho:

- aos professores, às funcionárias e aos colegas do PPG em Ciências Veterinárias;
- à Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss, orientadora;
- à Dra. Dominguita Lühers Graça, Dra. Maria Celeste Osório Wender e Dra. Maria Lúcia Scroferneker, membros da banca;
- à Dra. Vera Beatriz Wald, colaboradora da parte estatística;
- à Sra. Flávia Giusti Grossmann, ao Sr. Jorge Alberto Lopes e à Sra. Neiva Copetti, técnicos do Laboratório de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
- à Sra. Ana Vera Finardi Rodrigues, bibliotecária da FAVET/UFRGS;
- aos professores, aos funcionários e aos colegas da Faculdade de Veterinária da UFRGS;
- aos professores e aos funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS;
- aos médicos, aos residentes e aos funcionários do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
- ao Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria;
- aos meus familiares;
- aos meus amigos.

Agradeço também ao apoio financeiro obtido através do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE), do Laboratório Edelweiss e dos recursos financeiros familiares.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>1.1 Características de L. m.</b> .....	7
<b>1.2 Listeriose nos Animais</b> .....	8
1.2.1 Epidemiologia .....	8
1.2.2 Patogenia .....	9
1.2.3 Aspectos anatomopatológicos.....	10
1.2.4 Diagnóstico .....	11
1.2.5 Tratamento .....	11
<b>1.3 Listeriose no Homem</b> .....	12
1.3.1 Transmissão .....	12
1.3.2 Patogenia .....	12
1.3.3 Epidemiologia .....	13
1.3.4 Surto e casos isolados de listeriose humana .....	13
1.3.5 Diagnóstico .....	18
1.3.6 Tratamento .....	18
<b>CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM PLACENTAS HUMANAS E ESPÉCIMES DE ABORTO PELA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA</b> .....	19
<b>CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i> PELA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA EM TECIDO NERVOSO CENTRAL DE RUMINANTES</b> .....	28
<b>CAPÍTULO 4 - IDENTIFICAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM PLACENTAS FIXADAS EM FORMOL E EMBEBIDAS EM PARAFINA</b> .....	42
<b>CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO GERAL E SUGESTÕES</b> .....	60
REFERÊNCIAS .....	63
ANEXO 1 - TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA.....	72
RESUMO .....	74
ABSTRACT .....	76
<i>CURRICULUM VITAE</i> .....	78

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A listeriose é uma doença infecciosa causada pela *Listeria monocytogenes* (*L.m.*), sendo mais significativa como uma enfermidade de ovinos, caprinos e bovinos (THOMSON, 1990).

A *L.m.* é um importante patógeno de origem alimentar. É uma bactéria gram-positiva associada às doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Diversos fatores são determinantes para a presença e/ou desenvolvimento deste microorganismo nos alimentos (LOGUERCIO *et al.*, 2001).

A *L. m.* foi isolada do solo, das fezes, das secreções genitais e do muco nasal de animais aparentemente saudáveis, da silagem, de produtos de origem animal e de vegetais (CARTER *et al.*, 1995; NASH *et al.*, 1995).

A listeriose ocorre em três distintas situações que, via de regra, não se apresentam juntas: encefalite, septicemia e aborto e pode causar infecção em humanos, bovinos, ovinos, caprinos, suínos, caninos, felinos e roedores. A *L. m.*, mais raramente, causa endocardite e lesões purulentas em outros órgãos e tecidos (JONES *et al.*, 1997). A primeira lesão do Sistema Nervoso Central (SNC), nos ruminantes, é a encefalite, enquanto nos humanos a lesão envolve as meninges (TIMONEY *et al.*, 1992).

A *L. m.* pode infectar os humanos penetrando na mucosa ocular e pela pele; já tem sido observada em acidentes laboratoriais e em profissionais veterinários, após a exposição direta ao patógeno. Também pode, por extensão de processo infeccioso endometrial, infectar a placenta, a cavidade amniótica e o feto, causando lesões inflamatórias típicas e micro-abscessos. Esta infecção pode ocorrer em qualquer fase da gestação e causar parto prematuro, provocando a morte ou o nascimento de uma criança infectada (ARMSTRONG, 1995).

O período de incubação, entre o consumo do alimento e o aparecimento da doença, varia consideravelmente de 1 a 90 dias (McLAUHLIN, 1997).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que o consumo de alimentos contaminados é a primeira rota de transmissão de listeriose humana (WHO, 1988). Os alimentos de origem animal e vegetal constituem a via mais significativa de transmissão de *L. m.* para o homem, destacando-se entre eles as carnes e seus subprodutos, os pescados, o leite e seus derivados e os vegetais, particularmente, quando ingeridos crus (SCHLECH *et al.*, 1983; FLEMING *et al.*, 1985; JAMES *et al.*, 1985; PINNER *et al.*, 1992; SCHUCHAT *et al.*, 1992; BEMRAH *et al.*, 1998; IIDA *et al.*, 1998; CDC, 2000).

As investigações epidemiológicas de vários surtos e casos esporádicos têm demonstrado que o consumo de alimentos contaminados é responsável pela alta proporção de casos de listeriose e *L. m.* tem sido reconhecida como um importante patógeno transmitido por alimentos nos últimos 15 anos (ROCOURT; BILLE, 1997).

Em trabalhos realizados no Brasil, *L. m.* foi isolada de 2% dos queijos coloniais artesanais analisados em Porto Alegre/RS (SCHWAB *et al.*, 1996) e de 12,62% dos queijos de várias marcas investigados no Rio de Janeiro/RJ (DA SILVA *et al.*, 1998).

Nos Estados Unidos da América, há a obrigatoriedade de notificação da listeriose para a investigação do alimento envolvido na transmissão, com a finalidade de detectar a fonte do microorganismo e eliminá-lo. Em 1989, o Departamento de Agricultura e o Food and Drug Administration (FDA) americanos estabeleceram o limite de "tolerância zero" para a presença de *L. m.* em produtos prontos para o consumo. Entre 1989 e 1993, um programa de vigilância foi criado pelo governo, diminuindo a incidência da doença em 40% em 9 estados americanos (SHALLOW *et al.*, 1998; SLUTSKER *et al.*, 1998; USDA, 2001; CDC, 2002).

A listeriose de origem alimentar pode ser evitada através de práticas preventivas que proporcionem um controle microbiológico rigoroso sobre a matéria-prima, o ambiente, os manipuladores e outros fatores ligados ao processamento de alimentos (CFSAN, 2002; FSIS, 2002).

Apesar de *L. m.* ser um patógeno potencialmente perigoso, não existe ainda, no Brasil, uma preocupação por parte das autoridades de saúde pública em relação a sua disseminação, por isso, não há a obrigatoriedade de sua notificação, nem há programas de conscientização da população quanto aos riscos do consumo de alimentos sem adequada industrialização e fiscalização (LOGUERCIO *et al.*, 2001).

É preciso, portanto, que ocorra um estímulo a pesquisas que possibilitem maior conhecimento sobre este microorganismo, assim como o desenvolvimento de métodos mais rápidos para sua detecção (LOGUERCIO *et al.*, 2001).

O diagnóstico através da cultura do material com suspeita de listeriose é demorado e, nem sempre, é possível diferenciar a *L. m.* de outros microorganismos gram-positivos presentes, o que levaria ao descarte do material como contaminado (DI MAIO, 2000).

O estudo histológico de órgãos obtidos de necropsias de animais ou de fetos e placentas com suspeita de listeriose fornece rico material para análise dos casos com êxito letal e com suspeita clínica da doença, porém a identificação do agente torna-se difícil pelos métodos comumente usados para identificação de bactérias como a técnica de Gram. Esses métodos, embora de baixo custo, não são específicos para o diagnóstico.

O exame sorológico permite também o diagnóstico, pela identificação de anticorpos circulantes *antilisteria*, bem como dos seus vários sorotipos.

O desenvolvimento de métodos imunoenzimáticos, com anticorpos policlonais e monoclonais *antilisteria monocytogenes* vem sendo desenvolvidos para auxiliar na identificação do patógeno em tecidos lesados de animais e pacientes humanos.

A coloração imunoistoquímica em tecido cerebral de animais é útil para o rápido resultado e para circunstâncias nas quais o isolamento da bactéria seja impraticável. Esta técnica tem como vantagem adicional o uso de todos os reagentes comerciais e a possibilidade de desenvolver estudos retrospectivos em tecidos fixados em formalina. (PETERS *et al.*, 1992; JOHNSON *et al.*, 1995; WEINSTOCK *et al.*, 1995).

O presente estudo teve como objetivo desenvolver a técnica de imunoistoquímica para identificar a *L. m.* em cérebro de ruminantes e em placentas humanas, após o aborto ou o parto prematuro.

## 1.1 Características de *L. m.*

A *L. m.* é uma bactéria gram-positiva com o formato de um bastonete de 1-2  $\mu\text{m}$ , na maioria das vezes, apresenta-se em forma de paliçada, de "V" ou "Y", não forma esporos e não é ácido resistente. A temperatura ótima de crescimento está entre 30°C e 37 °C, mas o crescimento pode ocorrer entre 3°C e 45°C, tolerando a refrigeração. O

microorganismo cresce facilmente em condições de aerobiose e microaerofilia e em valores de pH tão alto quanto 9.6, mas não em condições de total anaerobiose ou pH menor do que 5.6 (LOW, 2000).

## 1.2 Listeriose nos Animais

### 1.2.1 Epidemiologia

A *L. m.* é uma zoonose encontrada em vários países, porém é mais comum em regiões com clima de baixa temperatura, tais como Nova Zelândia, Austrália, América do Norte, Europa continental e Reino Unido. Em alguns desses países, a prevalência de listeriose tem aumentado, particularmente durante o inverno e início da primavera (SCHNEIDER, 1994). No Brasil, foi encontrada em vários estados, inclusive no Rio Grande do Sul (KRAHE, 1967; FERNANDES *et al.*, 1971; HOFER *et al.*, 1984; SCHWAB *et al.*, 1996; HOFER *et al.*, 1998).

A *L. m.* é largamente distribuída na natureza e foi isolada de uma grande variedade de mamíferos e aves, bem como do solo, água, adubo e silagem. Também foi encontrada em frutas e vegetais crus. Uma grande proporção de ovelhas e cabras carregam subclínicamente o microorganismo, excretando-o nas fezes e no leite. A bactéria pode sobreviver ao tratamento do leite com temperaturas inadequadas e ser encontrada nos seus derivados, constituindo um perigo à saúde humana (SCHNEIDER, 1994).

A listeriose nos animais é associada ao consumo de grandes quantidades de silagem de baixa qualidade, resultante do preparo e do estoque inadequado que favorecem o desenvolvimento da bactéria, principalmente no topo e nos lados da silagem. Em ovelhas, casos de meningoencefalite por listeriose ocorreram 30 dias após a introdução da silagem como alimento (SCHNEIDER, 1994).

A alta prevalência de meningoencefalite por listeriose, em certos grupos de ovelhas, foi relacionada com a troca de dentição no início da primavera. Suspeitou-se que a *L. m.* alcançou os finos terminais dentários do nervo trigêmeo, causando neurite e meningoencefalite ascendente. Dessa forma, a encefalite foi induzida experimentalmente pela inoculação de *L. m.* na polpa do dente e na mucosa labial de ovelhas e cabras; o período de incubação nesses casos foi de 14 a 28 dias (SCHNEIDER, 1994).



### 1.2.2 Patogenia

A *L. m.* é um patógeno intracelular capaz de se multiplicar dentro dos macrófagos e monócitos. Após a entrada na célula, é capaz de se multiplicar dentro do citoplasma e se espalhar entre as células. O fator de maior virulência é a secreção de uma hemolisina, a listeriolisina O (LLO), que impede a sua destruição pelos macrófagos e lisossomos. O movimento bacteriano dentro do citoplasma do hospedeiro permite o encapsulamento do microorganismo pelos filamentos de actina intracelulares (HOF *et al.*, 1997; LOW, 2000).

A *L. m.* tem a habilidade para penetrar nas células epiteliais (na conjuntiva, bexiga e intestino) onde se multiplica, destrói as células e é fagocitada. O transporte é feito pelos macrófagos e resulta na fase septicêmica em alguns casos. O movimento do microorganismo dentro dos ramos do nervo trigêmeo, eventualmente alcança a medula oblonga. A bactéria parece se mover ao longo das fibras, mas também dentro dos axônios, causando lesões destrutivas no sistema nervoso central (SNC) e ocasionando a morte do animal (JONES *et al.*, 1997).

A meningoencefalite é, talvez, a forma mais facilmente reconhecida de listeriose nos animais domésticos. O nome *circling disease* foi dado para a doença em ovelhas, em 1931, na Nova Zelândia. Os animais afetados apresentam movimentos circulares em uma direção, paralisia facial unilateral, espasmo ocular, nistagmo, febre e cegueira. A doença progride até a paralisia total do animal e a morte ocorre em 2 ou 3 dias (TIMONEY *et al.*, 1992).

A septicemia é a forma mais comum de listeriose encontrada nos fetos e neonatos de ruminantes e, às vezes, nos animais monogástricos. Nesses casos, muitos órgãos e tecidos são afetados (SCHNEIDER, 1994).

Em ovelhas infectadas experimentalmente, verificou-se que na metade final da gestação, o microorganismo penetrou na placenta, alcançou o fígado do feto, multiplicou-se e provocou a sua morte. A *L. m.* pode ocasionalmente ser excretada nas fezes dos animais na ausência de doença e contaminar o ambiente (JONES *et al.*, 1997).

A listeriose causa abortos esporádicos em bovinos, ovinos e caprinos. Em ovinos também ocorrem abortos em forma de surtos. Raramente, as formas reprodutiva e neurológica ocorrem juntas no mesmo rebanho (CARLTON; McGAVIN, 1998).

Os abortos relacionados à listeriose ocorrem no último terço da gestação, com ou sem doença materna febril, devido à septicemia ou à endometrite. A placenta pode

apresentar inflamação necrosante, supurativa grave e difusa, tanto dos cotilédones como das áreas intercotilédones. O fígado do feto pode estar aumentado de volume e conter numerosos focos amarelos de necrose (granulomas) de 1 mm de diâmetro espalhados por todo o órgão (CARLTON; McGAVIN, 1998).

### 1.2.3 Aspectos anatomopatológicos

Lesões macroscópicas não são usualmente detectadas no SNC, mas quando estão presentes há opacidade meníngea, necrose no tronco cerebral posterior, congestão cerebral e um aumento no líquido cefalorraquidiano (LCR), que pode estar turvo pelo aumento de células inflamatórias (THOMSON, 1990).

As lesões patológicas patognomônicas são predominantemente unilaterais e mais severas na medula oblonga e ponte. As lesões são menos frequentes no cerebelo, cordão espinhal cervical e diencéfalo (LOW, 2000).

A lesão característica da encefalite é um foco de células inflamatórias localizadas no manguito perivascular adjacente, consistindo de linfócitos com histiócitos, plasmócitos e neutrófilos ocasionais. Nos casos severos, as lesões podem afetar grandes áreas do tecido cerebral. A meningite está, muitas vezes, presente, mas o canal endodimário e os plexos coróides são raramente afetados (LOW, 2000).

No aborto, as lesões na placenta são pequenos pontos amarelos de focos necróticos, envolvendo as extremidades dos cotilédones com uma vilite focal ou difusa proliferativa cobertos com um exsudato vermelho amarronzado (LOW, 2000). Microscopicamente, observa-se na placenta dos animais uma infiltração inflamatória acentuada, que envolve o mesênquima das vilosidades e a parte superior do córion. O epitélio coriônico está repleto de microorganismos listéricos entre as vilosidades (CARLTON; McGAVIN, 1998).

As lesões inflamatórias agudas no feto dos ruminantes são multifocais e necrosantes no fígado, tendem a apresentar grande número de microorganismos e são semelhantes às que ocorrem em outros órgãos fetais (CARLTON; McGAVIN, 1998). Histologicamente, estes focos mostram necrose coagulativa e vários graus de infiltração por macrófagos e neutrófilos (LOW, 2000).

Na septicemia, a lesão mais consistente é a necrose focal hepática com pontos branco-acinzentados em todo o fígado. As lesões estão presentes no baço, mas raramente em outros tecidos (LOW, 2000).

#### 1.2.4 Diagnóstico

O microorganismo é dificilmente encontrado no LCR dos ruminantes com encefalite, possivelmente por estar confinado nas lesões dentro do parênquima cerebral (TIMONEY *et al.*, 1992).

A identificação de *L. m.* através da técnica de imunoistoquímica em cérebros de ruminantes mostrou que pode auxiliar no diagnóstico de listeriose, evitando que a doença cause prejuízos aos rebanhos e que os alimentos produzidos a partir da matéria-prima proveniente desses animais sejam veículo de transmissão do patógeno para o homem (PETERS *et al.*, 1992; JOHNSON *et al.*, 1995; WEINSTOCK *et al.*, 1995).

A listeriose pode ser diagnosticada em laboratório pela cultura do microorganismo, detecção de uma resposta imune específica ou, na forma encefálica da doença, pelas lesões histológicas patognomônicas. Várias técnicas de soro diagnóstico estão disponíveis, porém nenhuma para a doença encefálica. O exame do LCR pode ser indicativo de listeriose, porém nem sempre é possível se fazer o diagnóstico *ante-mortem* (LOW, 2000).

#### 1.2.5 Tratamento

Praticamente todos os antibióticos, exceto a cefalosporina, são ativos contra a *L. m. in vitro*. Experimentalmente, as penicilinas semi-sintéticas são mais ativas; a tetraciclina e o cloranfenicol não são agentes de escolha. A resposta ao tratamento com antibióticos nos casos de encefalite é geralmente pequena, provavelmente por ser este microorganismo intracelular. A ampicilina ou amoxicilina com aminoglicosídeos é recomendada em altas doses e longo período de tratamento (LOW, 2000).

As vacinas com o organismo morto mostraram-se ineficientes, pois o patógeno é um parasita intracelular. Uma vacina atenuada foi desenvolvida na Bulgária e está disponível em alguns países da Europa. Esta vacina parece ser efetiva em ovelhas, porém os resultados dos ensaios no campo não são conclusivos e não há modelos experimentais disponíveis para testar sua eficácia. No presente momento, não há vacinas disponíveis no Reino Unido e sua utilização não é muito divulgada no restante do mundo (LOW, 2000).

### 1.3 Listeriose no Homem

#### 1.3.1 Transmissão

O passo inicial da listeriose é a presença frequente do patógeno nos alimentos. Nos indivíduos normais, a exposição contínua ao antígeno de *L. m.*, provavelmente, contribui para a manutenção da memória das células-T contra a *Listeria*. Nos indivíduos debilitados e pacientes imunossuprimidos, a proliferação de *L. m.* no fígado pode resultar num prolongado nível de bacterímia, permitindo a invasão de outros órgãos como o cérebro e o útero gravídico, evidenciando a doença clínica (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

#### 1.3.2 Patogenia

Uma ampla variedade de problemas clínicos ocasionados pela *L. m.* têm sido relatados, mas a maior parte das infecções humanas são: septicemia e meningite em recém-nascidos e em pacientes imunodeprimidos; septicemia e doença gripal inespecífica em mulheres sadias durante a gestação, que podem contaminar o feto (LENNETTE *et al.*, 1985; GELLIN; BROOME, 1989; LOVETT, 1989; SCHUCHAT *et al.*, 1991; VARNAM, 1991; BORTOLUSSI; SCHLECH, 1995).

A listeriose nos recém-nascidos tem duas formas clínicas: a precoce e a tardia. A forma mais severa é a precoce, que ocorre logo após o nascimento, está associada com prematuridade e pneumonia nas crianças. No momento do nascimento, pode-se observar mecônio no líquido amniótico em qualquer idade gestacional, e, no feto, cianose, apnéia, dificuldade respiratória e pneumonia. A infecção tardia está associada com meningite, que ocorre entre 3 e 8 (1 e 8) semanas de vida em 95% dos casos; a febre e a irritabilidade da criança são os sinais clínicos predominantes. Na infecção severa, foram descritas lesões granulomatosas na pele; pápulas pálidas e elevadas medindo 1 a 2 mm de diâmetro com base eritematosa brilhante. Tais áreas, quando biopsiadas e examinadas ao microscópio, apresentam infiltração de leucócitos onde a bactéria é encontrada. Exceto por isso, as características clínicas são similares às causadas pela infecção por outros microorganismos, tais como, as do *Streptococcus* do grupo B (BORTOLUSSI; SCHLECH, 1995).

As alterações inflamatórias provocadas pela *L. m.* na placenta (corioamnionite, vilite e/ou deciduíte) indicam uma infecção intra-uterina, cujas consequências incluem

aborto, nascimento prematuro, morte fetal, malformação fetal, infecção após o nascimento e seqüelas neurológicas (KRAUSE *et al.*, 1982; TOPALOVSKI *et al.*, 1993; SILVER, 1998; GERSELL; KRAUS, 2002).

### 1.3.3 Epidemiologia

A listeriose é a quinta causa mais comum de meningite bacteriana neonatal nos Estados Unidos. Entre 1978 e 1981, foram relatados 265 casos de meningite provocados por esta bactéria, em 27 estados que participaram do *National Bacterial Meningitis Surveillance Study*. Em algumas regiões, ela foi a segunda causa mais comum de meningite neonatal e a segunda causa mais comum de meningite bacteriana em pessoas com mais de 60 anos (BORTOLUSSI *et al.*, 1985).

A incidência de listeriose relacionada com a gestação foi registrada como sendo 4,7 a 30 casos por 100000 nascimentos, porém a taxa de mortalidade variou entre 20% e 30% (ROCOURT, 1996). No caso de listeriose precoce, a taxa de mortalidade é alta (50%), enquanto nos casos tardios é 20% (BORTOLUSSI, 1990).

A infecção por *L. m.* ocorre em 75% dos casos em mulheres grávidas ou no recém-nascido, sendo responsável por 3,5% dos abortamentos espontâneos (REZENDE, 1998).

O Programa de Infecções Emergentes do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), chamado *FoodNet*, em 1997, constatou que de 8576 casos de doenças transmitidas por alimentos, confirmados em laboratórios, 77 eram causadas pela *L. m.*, sendo que 88% necessitaram hospitalização. Das 36 mortes que ocorreram neste período, 15 foram ocasionadas pela *L.m.* (SHALLOW *et al.*, 1998).

A incidência de listeriose é de 2 a 7 casos por milhão de pessoas (ROCOURT, 1996). De acordo com o CDC, menos do que 2000 pessoas por ano nos Estados Unidos apresentaram doença grave por *L.m.*, porém 25% daquelas morreram (FSIS, 1999).

### 1.3.4 Surtos e casos isolados de listeriose humana

Vários surtos e casos isolados de listeriose foram registrados ao longo de 50 anos, causando meningite, hidrocefalia, parto prematuro, aborto e morte (LAMONT; POSTLETHWAITE, 1986; LALLEMONT *et al.*, 1992; GOULET *et al.* 1998; MORA *et al.*, 1998; TRIDENTE *et al.*, 1998; MYLONAKIS *et al.*, 1998; BANERJ; NOYA, 1999; BEINDER *et al.*, 1999; MEAD *et al.*, 1999; NOLLA-SALAS *et al.*, 2002).

Os primeiros surtos registrados de listeriose ocorridos em Halle, na Alemanha Oriental, entre 1949 e 1957, foram associados ao consumo de leite e derivados e atingiram 100 mulheres grávidas que apresentaram aborto ou parto prematuro (GRAY; KILLINGER, 1966).

Um dos primeiros casos de listeriose foi de uma paciente com 36 anos cujo primeiro filho nasceu com deficiência neurológica, o segundo normal, o terceiro abortou espontaneamente no 1º trimestre e na 4ª gestação, na 28ª semana, nasceu uma menina pequena, apresentando pústulas no corpo, com apnéia severa e que morreu 4 horas após. A necropsia e o exame histológico sugeriram um quadro de listeriose, que foi confirmado com a cultura dos tecidos estocados após congelamento (DRISCOLL *et al.*, 1962).

Um surto com 13 casos de listeriose em recém-nascidos foi registrado durante três meses no *National Women's Hospital Auckland* (Nova Zelândia). Onze deles apresentaram baixo peso ao nascer, dificuldade respiratória em 24 horas de vida e pneumonia por aspiração do líquido amniótico infectado. Nove crianças apresentaram septicemia e 2 desenvolveram meningite na primeira semana de vida (BECROFT *et al.*, 1971).

No Centro Médico de Sacramento (EUA), num período de 13 meses, foram descritos 5 casos de listeriose neonatal. Uma das crianças apresentou a forma granulomatosa e não sobreviveu, as demais foram medicadas com antibióticos e se recuperaram (AHLFORS *et al.*, 1977).

No *Columbus Children's Hospital* (EUA), o primeiro caso ocorreu em 13 de agosto de 1972 numa criança de 10 dias. A *L. m* foi isolada da cultura do sangue e o tratamento, realizado com antibióticos, permitiu a recuperação da criança (a mãe havia apresentado aborto espontâneo no 3º mês da gestação anterior). O segundo caso ocorreu em 12 de dezembro de 1974 em uma criança de 12 dias, cuja mãe apresentou infecção urinária na 27ª semana de gestação e foi tratada com antibióticos. A criança nasceu de parto normal, porém retornou ao hospital apresentando sintomas de listeriose, foi tratada intravenosamente com ampicilina e gentamicina se recuperou do quadro infeccioso (AZIMI; GRAMBLETT, 1977).

Um pequeno surto com 7 casos de listeriose neonatal ocorreu entre 10 de março e 29 de outubro de 1975 no *Greenville Hospital*, Carolina do Sul (EUA), no qual as crianças que apresentaram meningite, foram medicadas com antibióticos e se recuperaram (FILICE *et al.*, 1978).

No *Grady Memorial Hospital e no Henrietta Egleston Hospital*, Atlanta (EUA) foram analisados 167 casos de meningite bacteriana em bebês com menos de 31 dias de idade, entre primeiro de janeiro de 1962 e 30 de junho de 1976. A listeriose foi diagnosticada em 22 crianças: 14 casos na segunda semana de vida, 6 na terceira semana e 2 na quarta semana, sendo que um desses veio a óbito (VISINTINE *et al.*, 1979).

Entre abril e agosto de 1981, 15 casos de listeriose neonatal foram registrados no *Grace Maternity Hospital*, Halifax (Canadá). Houve 12 casos de parto prematuro, todas as crianças apresentaram sinais clínicos de depressão perinatal, dificuldade respiratória, febre, alterações hematológicas e pústulas, sendo que 7 morreram (EVANS *et al.*, 1985).

Em Dresden, durante maio de 1981 e abril 1986, na Clínica de Pediatria do *Medical Academy "Carl Gustav Carus"*, foram registrados 18 casos de listeriose: 3 apresentaram granulomatose infantisséptica, 3 septicemia, 8 meningite e 4 manifestações clínicas em diversos órgãos (SCHWARZE *et al.*, 1989).

Em 1985, ocorreu em Los Angeles (EUA) um surto com 145 casos de listeriose, envolvendo 65,5% de gestantes, que foi atribuído a um queijo tipo Mexicano, produzido a partir de leite sem pasteurização (LINNAN *et al.*, 1988).

O CDC conduziu uma pesquisa, entre 1986-1987, em seis regiões dos Estados Unidos e a listeriose foi registrada em 154 pacientes, com 1/3 dos casos perinatais e 2/3 em pessoas idosas e imunossuprimidas, apresentando uma taxa de mortalidade de 28% (SCHWARTZ *et al.*, 1988).

No *Simpson Memorial Maternity Pavillion*, Edinburgh, em 3 meses, ocorreram 4 casos de listeriose que resultaram em parto prematuro na 21<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup> e 32<sup>a</sup> semana e nascimento a termo de uma criança infectada (CAIRD, 1989).

Das informações coletadas sobre 722 casos de listeriose humana ocorridos na Inglaterra, entre 1967 e 1985, observou-se que 248 (34%) estavam associados com a gestação (listeriose materna, fetal ou neonatal) (McLAUHLIN, 1990).

No *Hadassah University Hospital* (Israel), uma paciente de 32 anos apresentou fadiga, mialgias, dor de garganta e febre na 13<sup>a</sup> semana de gestação. Nas gestações anteriores, teve 2 partos normais e 2 abortos espontâneos na 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana. A cultura do sangue foi positiva para *L. m.* e o tratamento intravenoso com ampicilina e gentamicina foi instituído. A criança nasceu, através de cesariana, na 36<sup>a</sup> semana e, aos

18 meses, apresentava desenvolvimento psicomotor apropriado para a idade (FUCHS *et al.*, 1994).

Um estudo realizado pelo *Centre National de Référence des Listeria, Institut Pasteur* (Paris), entre março e dezembro de 1992, identificou 257 casos de listeriose humana, sendo que 92 foram relacionados com gravidez (JACQUET *et al.*, 1995).

Em pesquisas realizadas na Itália, em recém-nascidos (BERTOTTO *et al.*, 1995; TRIDENTE *et al.*, 1998) e na Nova Zelândia em 2 casos (BRETT *et al.*, 1998), a *L. m* foi isolada do sangue ou LCR das crianças.

O relato de 24 casos de listeriose no *Royal Women's Hospital* em Melbourne, (Austrália) mostrou que 3 desses casos foram diagnosticados antes do nascimento e com o tratamento intensivo administrado nas mães, as crianças nasceram sem problemas. Das 21 que não tiveram o diagnóstico precoce, ocorreram 5 mortes durante o período perinatal e 1 morte na 18ª semana de gestação (CRAIG *et al.*, 1996).

No caso de listeriose ocorrido em gêmeos no *King Edward Memorial Hospital* (Austrália), houve a recuperação das crianças após ser instituído o tratamento com antibióticos (QUINLIVAN *et al.*, 1998).

No *Montreal Children's Hospital* (Canadá), foi registrado o caso de um menino de 32 dias com abscesso no cérebro, que após a septicemia por *L. m*. evoluiu para hidrocefalia (BANERJ; NOYA, 1999).

Um surto de listeriose, entre agosto de 1998 e janeiro de 1999 nos Estados Unidos, provocou 50 casos com 6 mortes em adultos e 2 abortos espontâneos (CDC, 1999).

Na França, o primeiro surto de listeriose ligado a alimento foi relacionado ao queijo produzido com leite cru, registrou 20 casos, sendo 11 em gestantes, resultando em 2 abortos, 4 partos prematuros e 2 mortes fetais (DFST, 1999).

Outro surto, também ocorrido na França, envolveu 26 pessoas, 7 das quais vieram a óbito. A investigação realizada pelo *National Institute of Hygiene Surveillance* constatou que a maioria dos doentes consumiu um derivado de carne suína produzido por uma indústria próxima a Paris (DOROZYNSKI, 2000).

No Hospital Policlínico Regional, San Luis (Argentina), houve 1 caso de listeriose precoce com sinais de meningite, acompanhado de septicemia e agravado com hidrocefalia grave (LACIAR *et al.*, 2000).

A investigação epidemiológica do surto de listeriose ocorrido na Carolina do Norte (EUA), identificou 12 casos em hispânicos que consumiram queijo caseiro tipo



mexicano. Todos confirmados laboratorialmente, sendo um por imunistoquímica. Em 10 dos casos, as mulheres estavam grávidas, resultando em 5 natimortos, 3 partos prematuros e 2 recém-nascidos infectados. A 11ª mulher retornou ao hospital 5 meses após o parto com meningite por *L. m.* (OUTBREAK, 2001).

No Brasil, no Instituto Oswaldo Cruz foram analisadas 71 amostras de *L. m.* isoladas de processos infecciosos e de portadores humanos no período de 1969 a 1983. Uma dessas amostras era da placenta e 11 eram do LCR de crianças de 0 a 1 mês de vida (HOFER *et al.*, 1984).

Em Brasília, foram confirmados através de culturas 3 casos de meningite por *L.m.*, sendo que 1 ocorreu em um recém-nascido com 10 dias, que foi tratado e após 29 dias teve alta hospitalar. Outro caso foi em uma paciente de 35 anos que veio a óbito. (HOFER *et al.*, 1998).

A *L. m.* foi isolada do LCR de 5 recém-nascidos, que apresentaram meningite, no Centro Obstétrico de um hospital da Grande São Paulo em um período de 14 horas; 2 dessas crianças vieram a óbito. (LANDGRAF *et al.*, 1999).

Um estudo desenvolvido em Porto Alegre mostrou que a interrupção da gestação ocorrida em 5 pacientes foi causada por *L. m.*, concluindo que o microorganismo estava presente na cidade (KRAHE, 1967).

Uma paciente internada no Hospital Universitário da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, apresentou trabalho de parto prematuro, ocorrendo o óbito fetal. A investigação sorológica e bacteriológica levou ao diagnóstico de listeriose (KRAHE *et al.*, 1982).

Outro caso relatado em Porto Alegre foi o de um menino nascido no Hospital de Clínicas (HCPA), com 1600 gramas, de uma gestante que tinha apresentado um quadro gripal febril prolongado de 17 dias de duração. A criança nasceu gravemente deprimida, sem respiração espontânea e o líquido amniótico era tinto de mecônio. Com 16 horas de vida fez parada cardiorespiratória e veio a óbito. A punção lombar revelou líquido hemorrágico e a hemocultura foi positiva para *L. m.* (MIURA *et al.*, (1983).

Em Porto Alegre, ocorreu o caso de listeriose em um menino que nasceu de parto normal com 36 semanas de gestação, pesando 2.560 g e acompanhamento pré-natal sem intercorrências. Aos 16 dias de vida, retornou com apnéia, crises de cianose, mau estado geral, com quadro séptico, fontanela abaulada, evoluindo até parada respiratória. Após o tratamento de reanimação e ventilação mecânica, foi instituída a

terapia com ampicilina e a evolução clínica foi considerada satisfatória (PIVA *et al.*, 1987).

### 1.3.5 Diagnóstico

As lesões inflamatórias na placenta com listeriose são inespecíficas e podem ser confundidas com as que ocorrem em outras patologias infecciosas. O material proveniente de abortos nem sempre é enviado para cultura e identificação do microorganismo, impossibilitando o diagnóstico diferencial (LANDGRAF *et al.*, 1999).

A identificação de *L. m.* através da técnica de imunoistoquímica em placentas de mulher possibilita um rápido diagnóstico, permitindo tratar a gestante e o recém-nascido evitando complicações posteriores na mãe e no concepto (PARKASH *et al.*, 1998).

### 1.3.6 Tratamento

A ampicilina e a penicilina parecem ser as melhores drogas para o tratamento da infecção por *L. m.*, porém não há estudos controlados para estabelecer uma droga de escolha (AMRSTRONG, 1995).

A duração do tratamento também permanece sem estudos conclusivos. Em alguns casos, 2 semanas têm sido suficientes; em outros, ocorre recorrência, portanto um período de 3 a 6 semanas pode ser mais prudente (AMRSTRONG, 1995).

**CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM PLACENTAS  
HUMANAS E ESPÉCIMES DE ABORTO PELA TÉCNICA DE  
IMUNOISTOQUÍMICA**

Artigo publicado no Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, Abr/Maio/Jun. 2003.

IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM PLACENTAS HUMANAS E ESPÉCIMES DE ABORTO PELA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

IDENTIFICATION OF *Listeria monocytogenes* IN HUMAN PLACENTAS AND ABORTION SPECIES THROUGH IMMUNOHISTOCHEMICAL TECHNIC

JUSSARA PIRES SCHWAB, professor adjunto, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cursando Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090. Bairro Agronomia. Campus do Vale, CEP 91540-000. Porto Alegre/RS

DRA. MARIA ISABEL ALBANO EDELWEISS, professor adjunto, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2492. Bairro Santana, Campus da Saúde, CEP 90035-003. Porto Alegre/RS.

Trabalho realizado no Departamento de Patologia, no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2492. Bairro Santana, Campus da Saúde, CEP 90035-003. Porto Alegre/RS.

Autor responsável: Jussara Pires Schwab.

Trabalho apresentado no I Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária, realizado em Curitiba, no período de 15 a 17 de maio de 2002.

## RESUMO

A listeriose é causada por um microrganismo que se encontra amplamente disseminado na natureza e tem sido isolado do solo, de fezes humanas e de animais e pode, eventualmente, contaminar os alimentos. A *Listeria monocytogenes* é patogênica para o homem e tornou-se o principal patógeno nas doenças transmitidas pelos alimentos. Tendo-se em vista que a incidência de listeriose humana não é bem conhecida e as placentites possuem aspecto morfológico inespecífico e não são, muitas vezes, investigadas para este fator etiológico, surgiu a motivação para desenvolver a técnica de imunoistoquímica para o diagnóstico de *Listeria monocytogenes* em placentas ou produtos de aborto, utilizando um anticorpo policlonal anti-listeria (Biodesign®). Um projeto-piloto foi realizado a partir do material encontrado em dez placentas provenientes de abortos ou partos prematuros ocorridos no ano de 2000 no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). As lâminas foram analisadas através do exame microscópico convencional (HE) e de imunoistoquímica (IHQ). Os resultados deste projeto revelaram a presença de *Listeria monocytogenes* em cinco das dez (50%) casos estudados. Todos os casos apresentaram alterações sugestivas de processo inflamatório agudo supurativo. Frente a estes achados torna-se importante considerar a infecção por *Listeria monocytogenes* detectável por IHQ como um elemento no diagnóstico da patogenia do aborto ou das infecções perinatais, podendo este achado contribuir para o tratamento dos recém-nascidos ou das parturientes. As características microscópicas de listeriose na placenta, embora não-patognomônicas, permitem ao patologista um diagnóstico presuntivo, e a confirmação pode ser realizada pelo método de imunoistoquímica.

**Palavras-chave: Aborto, Listeria, Placentite, Patologia**

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes*, a food-borne, human-infecting pathogen, is widespread in nature and has been isolated from soil, human and animal feces. Since the incidence of human listeriosis is not well-known and placentitis has a nonspecific morphological aspect, usually uninvestigated for this etiologic factor, we decided to implement immunohistochemistry (IHC) to diagnose listeriosis in placentas or abortion specimens by using an anti-*Listeria* polyclonal antibody (Biodesign®). A pilot study was conducted with the material obtained from ten placentas from abortions or preterm deliveries at Hospital de Clínicas de Porto Alegre in the year 2000. The slides were analyzed by conventional HE staining and IHC. The results revealed listeriosis in five (50%) of the ten studied cases. All cases showed alterations suggestive of acute suppurative inflammatory process. These findings show that it is important to consider IHC-detected listeriosis as a tool for the diagnosis of abortion pathogenesis or perinatal infections, as this can contribute towards the treatment of newborns or pregnant women. The microscopic characteristics of listeriosis in the placenta, albeit nonpathognomonic, allow for a presumptive diagnosis, which is then confirmed by IHC.

**Key words: Abortion, Listeria infections, Placentitis, Pathology**

## Introdução

A *Listeria spp.* é um microrganismo que se encontra amplamente disseminado na natureza e tem sido isolado do solo, de fezes humanas e de animais. Todas as espécies de *Listeria* são encontradas na natureza e podem, eventualmente, contaminar os alimentos, porém somente a *Listeria monocytogenes* é patogênica para o homem (4), tornando-se o principal patógeno nas doenças transmitidas pelos alimentos (12).

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva, com motilidade, que é um freqüente patógeno veterinário, causando aborto e meningoencefalite em vacas e ovelhas, porém há relatos em várias espécies animais. A infecção no homem não é comum, mas ocorre mais freqüentemente no período neonatal, durante a gravidez, nos idosos ou pacientes imunodeprimidos (3).

A transmissão de *Listeria monocytogenes* através dos alimentos pode causar doença em surtos ou casos isolados (9).

A gravidade da doença depende das condições imunológicas do hospedeiro e do tipo de infecção (11). Desta forma, a listeriose torna-se importante entre as gestantes e parturientes, que se enquadram nas chamadas situações de risco. Segundo a organização americana Food and Drug Administration (FDA), um terço das infecções ocorre durante a gestação e pode provocar o aborto ou doenças sérias no recém-nascido (5).

As mulheres grávidas infectadas podem apresentar sintomas de um resfriado e transmitir a doença ao feto através da placenta causando aborto, parto prematuro ou meningite após o nascimento (11).

O feto pode infectar-se no útero através da via hematogênica ou da via ascendente a partir do trato genital materno (6), apresentando sinais de pneumonia e apnéia; pústulas na face e no corpo; granulomas no fígado, baço, e cérebro (3).

Tendo-se em vista que a incidência de listeriose humana não é bem conhecida e as placentites não são, muitas vezes, investigadas para este fator etiológico, surgiu a motivação para a realização desta pesquisa.

## Material e método

O método de imunistoquímica para diagnóstico de listeriose foi desenvolvido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) utilizando um anticorpo policlonal *antilisteria monocytogenes* (Biodesign<sup>®</sup>) na diluição 1:1000. Um projeto-piloto foi realizado na Unidade de Pesquisa Experimental do HCPA, a partir do material de dez blocos de placentas provenientes de abortos ou partos prematuros ocorridos no ano de 2000 naquele hospital.

As lâminas foram processadas no Serviço de Patologia do HCPA para a técnica de hematoxilina e eosina (HE) e o método de Imunistoquímica (IHQ) foi adaptado a partir da técnica descrita por Alves *et al.* (1) e Mills (7), de acordo com as seguintes etapas:

- identificação dos blocos de parafina: com tecido normal, com listeriose (controles) e com as amostras das placentas;
- preparação dos cortes histológicos: os blocos foram cortados com 2mm a 3 mm de espessura;
- preparação das lâminas: as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE);
- procedimentos imunistoquímicos (IHQ):
  - a) preparação dos cortes histológicos;
  - b) desparafinização e hidratação;
  - c) recuperação antigênica: irradiação em forno de microondas;
  - d) bloqueio da peroxidase endógena: as lâminas foram colocadas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 5% e água destilada e, após, em uma solução a 5 % de leite desnatado e tampão fosfato (PBS), durante 40min em câmara úmida e escura; foram lavadas com água corrente, água destilada e colocadas no PBS durante 5min.;
  - e) incubação com anticorpo primário *antilisteria monocytogenes*;
  - f) reação complexo avidina-biotina-estreptavidina + Kit Peroxidase (Dako<sup>®</sup>): anticorpo secundário e marcador;
  - g) revelação;
  - h) contracoloração;
- observação das lâminas.

## Resultados e discussão

A *Listeria monocytogenes*, na sua forma baciliforme e apresentação característica em “V” (10), corou-se de marrom pelo método de imunoistoquímica.

No presente estudo, cinco das dez placentas analisadas pelo método de IHQ foram positivas para *Listeria monocytogenes* (Tabela). Ressalta-se que, no estudo de Parkash *et al.* (10), foram identificadas alterações características de listeriose nas sete placentas examinadas.

Tabela Resultados do projeto-piloto em dez placentas testadas com anticorpo policlonal anti-*Listeria monocytogenes*

Caso IHQ	Pesquisa	Patologia	Idade materna	Trimestre	Número De gestações (G)
1	Positivo	com inflamação	28	2º	G5
2	Positivo	com inflamação	40	3º	G1
3	Positivo	com inflamação	40	3º	G6
4	Positivo	com inflamação	21	3º	G1
5	Positivo	com inflamação	18	3º	G1
6	Negativo	sem inflamação	19	2º	G3
7	Negativo	com inflamação	29	3º	G2
8	Negativo	sem inflamação	38	3º	G7
9	Negativo	com inflamação	24	2º	G2
10	Negativo	com inflamação	não informado	3º	não informado

No estudo-piloto, analisamos lâminas de placentas com características histológicas sugestivas de infecção com placentite, corioamnionite e vilite, e outras com discreta infiltração inflamatória aguda.

As alterações histológicas na placenta com listeriose são microabscessos, vilite focal, corioamnionite e funiculite (2, 6, 9). As alterações identificadas no HE das placentas deste estudo foram corioamnionite (quatro casos) e vilite necrótica (três casos).

As principais alterações histológicas encontradas por Parkash *et al.* (10) foram corioamnionite (seis em sete casos) e vilite (todos os sete casos). O trabalho



desenvolvido por Fox (6) encontrou vilite necrótica em três dos cinco casos examinados.

A dificuldade encontrada no desenvolvimento da técnica foi a presença de uma reação de fundo inespecífica em células deciduais e endometriais. Superamos esta dificuldade melhorando a diluição do anticorpo, os métodos de bloqueio da peroxidase e analisando os casos predominantemente nas áreas inflamatórias. Esta dificuldade não está referida na literatura com o uso deste anticorpo, porém estes achados podem estar relacionados com o uso da biotina, pois a mesma serve como coenzima para várias enzimas envolvidas na transferência de  $\text{CO}_2$ . A interação entre biotina e avidina forma a base para a identificação dos antígenos celulares. A biotina endógena presente no citoplasma ou núcleo pode ser fonte de falso positivo na coloração IHQ quando se utiliza o complexo avidina-biotina-peroxidase (8).

## **Conclusão**

A realização deste projeto-piloto permitiu identificar a presença de *Listeria monocytogenes* em placentas e espécimes de abortos examinados no Serviço de Patologia do HCPA.

As características histológicas de infecção por listeriose na placenta, embora não-patognomônicas, permitem ao patologista um diagnóstico presuntivo e, a confirmação pode ser realizada pelo método de IHQ.

Mais estudos devem ser realizados em placentas com alterações sugestivas de listeriose através de confirmação da presença do agente pela técnica de IHQ.

## Referências

1. Alves, V. A. F *et al.* Manual de imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.
2. Benirschke, K. & Kaufmann, P. Pathology of the human placenta. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 1995. p.560-64.
3. Bortolussi, R. & Schlech III, W.F. Listeriosis. In: Remington J. S. & Klein, J. O. (eds). *Infectious diseases of the fetus newborn infant*. 4.ed. Philadelphia: Saunders, 1995. cap. 27, p. 1055-73.
4. Carter, G. R. *et al.* Listeria. In: *Essentials of veterinary microbiology*. 5.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1995. p.127-30.
5. FDA. Food And Drug Administration. [online].Disponível na Internet via URL: [http// www. fda.gov/ cdrh/yr2000/cfr/866.html](http://www.fda.gov/cdrh/yr2000/cfr/866.html). Arquivo capturado em 04/09/99.
6. Fox, H. *Pathology of the placenta*. Londres: Saunders, 1978. p.286-325.
7. Mills, B. Immunohistochemistry. In: Prophet, E.D.; Mills, B.; Arrington, J.B.; Sobin, L.H.. (eds.) *Laboratory methods in histotechnology*. Washington : Armed Forces Institute of Pathology, 1992. p. 247-55.
8. Mount, S. L. & Cooper, K. *Current diagnostic pathology*, 7(3): 161-67, 2001.
9. Nolla-Salas, J. *et al.* Perinatal listeriosis: a population-based multicenter study in Barcelona, Spain (1990-1996). *Am. J. Perinatol.*, 15(8):461-67, 1998.
10. Parkash, V. *et al.* Immunohistochemical detection of Listeria antigens in the placenta in perinatal listeriosis. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 17(4): 343-50, 1998.
11. Rocourt, J. Risk factors for listeriosis. *Food Control*, 7(4-5):195-202, 1996.
12. Taege, A. J. Listeriosis: recognizing it, treating it; preventing it. *Cleve. Clin. J. Med.*, 66 (6):375-80, 1999.

Endereço para correspondência:

Rua Coronel Bordini, 1.180 aptº. 31

Bairro Moinhos de Vento

CEP 90440-003 - Porto Alegre-RS

Tel: (51) 3333-2507 ; (51) 9901-0722

**CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* PELA TÉCNICA  
DE IMUNOISTOQUÍMICA EM TECIDO NERVOSO CENTRAL DE  
RUMINANTES**

Trabalho enviado para publicação na Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias,  
Lisboa, Portugal, em 24/06/2003.

Identificação de *Listeria monocytogenes* pela técnica de imunoistoquímica em tecido nervoso central de ruminantes

Immunohistochemical identification of *Listeria monocytogenes* in the brain tissue of ruminants

J.P.Schwab\*<sup>1</sup>, M.I.A. Edelweiss<sup>2</sup>, D.L. Graça<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090. Bairro Agronomia. Campus do Vale, CEP 91540-000. Porto Alegre/RS. Brasil. Fone (51) 3333.2507. E-mail: jpschwab@adufrgs.ufrgs.br

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: edelw@pro.via-rs.com.br

<sup>3</sup>Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria. E-mail: dlgraca@lince.hcv.ufsm.br

## Resumo

Listeriose é uma infecção bacteriana causada pela *Listeria monocytogenes* que está disseminada pela natureza e afeta várias espécies de aves e mamíferos, incluindo o homem. A encefalite é a forma mais freqüente nos ruminantes que consomem silagem contaminada. A *Listeria monocytogenes* penetra através da mucosa oral, atinge o nervo trigêmeo e o sistema nervoso central. O diagnóstico se baseia na sintomatologia nervosa e nas lesões histopatológicas. O exame imunistoquímico, identifica o antígeno da *Listeria monocytogenes* nas lesões típicas, como microabscesso, infiltrado inflamatório perivascular e encefalite. O propósito deste estudo foi padronizar a técnica de imunistoquímica em cérebro de ruminantes com o anticorpo policlonal *antiListeria* Biodesign<sup>®</sup>. O material do cérebro de 5 animais (2 bovinos, 2 ovinos e 1 caprino), com diagnóstico clínico de listeriose realizado no Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria, foi analisado pelo exame histológico convencional e pelo exame imunistoquímico no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A *Listeria monocytogenes* foi identificada em todos os casos, indicando que o exame de imunistoquímica deve ser considerado para confirmar o diagnóstico de listeriose em cérebro de ruminantes.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, listeriose, encefalite, imunistoquímica.

## Summary

Listeriosis is a sporadic bacterial infection caused by *Listeria monocytogenes* that is ubiquitous in the environment and affects several poultry and mammalian species, including man. Encephalitis is the most readily recognized form in animals that fed spoiled silage. *Listeria monocytogenes* penetrates through the oral mucosa, gaining entry to the trigeminal nerve and to the central nervous system. The diagnosis is based on neurological symptoms and histopathological lesions. The immunohistochemical assay identifies the antigen of *Listeria monocytogenes* in typical lesions, such as microabscess, perivascular inflammatory infiltrate, and encephalitis. The aim of this study was to develop an immunohistochemical assay to detect listeriosis in the brain of ruminants with the use of an antilisteria polyclonal antibody (Biodesign®). The material was collected from the brain of five animals (2 cows, 2 sheep and 1 goat) with clinical diagnosis of listeriosis. The investigation was carried out at the Division of Veterinary Pathology, Universidade Federal de Santa Maria, the samples were analyzed by conventional histology and immunohistochemistry at the Center for Experimental Research of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Listeria monocytogenes* was detected in all cases, indicating that immunohistochemistry should be considered to confirm the diagnosis of listeriosis in the brain of ruminants.

Key words: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, encephalitis, immunohistochemistry

## Introdução

Listeriose é uma doença infecciosa causada pela *Listeria monocytogenes*, bactéria Gram-positiva largamente distribuída na natureza, que foi isolada do solo, das fezes, secreções genitais e muco nasal de animais aparentemente saudáveis, da silagem, de produtos de origem animal e de vegetais (Carter *et al.*, 1995).

Murray *et al.* (1926) descreveram pela primeira vez a *Listeria monocytogenes*, após verificar os sinais clínicos e as alterações anatomopatológicas do encéfalo de coelhos infectados por via oral. Os resultados dos exames *post-mortem* coincidiram com os achados patológicos observados em coelhos naturalmente infectados.

A listeriose ocorre em três síndromes distintas que normalmente não se apresentam juntas: encefalite, septicemia e aborto, e pode causar infecção em bovinos, ovinos, caprinos, suínos, caninos, felinos, roedores e humanos. A *Listeria monocytogenes*, mais raramente, causa endocardite e lesões purulentas em outros órgãos e tecidos (Jones *et al.*, 1997).

A forma neurológica da doença envolve o sistema nervoso central (SNC), é a mais comum em ruminantes, principalmente em bovinos e ovinos de qualquer idade, ocorre particularmente no inverno e início da primavera, e está associada ao consumo de silagem de baixa qualidade (pH maior de 5,5) (Schild, 2001). A enfermidade manifesta-se pela postura anormal da cabeça e pescoço, ataxia unilateral, meningite, caminhar em círculos (*circling disease*), nistagmo, cegueira e paralisias (Jones *et al.*, 1997).

A queratoconjuntivite e a oftalmite também são descritas nos animais (Carter *et al.*, 1995).

O modo de infecção das formas neural e visceral é diferente. Na forma neural, a infecção ocorre através dos ramos do nervo trigêmeo após lesão nas mucosas oral, nasal



e ocular. Na forma visceral, a infecção ocorre pela via hematogena após a ingestão de alimento contaminado (Carter *et al.*, 1995; Schild, 2001).

As lesões microscópicas na encefalite se caracterizam por microabscessos compostos predominantemente por neutrófilos envolvendo o tronco encefálico e meninges (Cooper e Walker, 1998).

As lesões no SNC são reconhecidas pelo exame microscópico convencional, coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) (Jones *et al.*, 1997) e pelo exame de imunohistoquímica (IHQ) pode-se detectar o antígeno específico nesses cortes histológicos, possibilitando um rápido diagnóstico de *Listeria monocytogenes*. (Petters *et al.*, 1992).

Petters *et al.* (1992) demonstraram o antígeno de *Listeria* no material fixado em formalina de 40 cérebros de ruminantes, que apresentavam alterações histopatológicas como aquelas que ocorrem na listeriose.

Weinstock *et al.* (1995) confirmaram através de imunohistoquímica a *Listeria monocytogenes* no material fixado em formalina de 14 cérebros de ruminantes, que tinham as alterações histológicas e a cultura positiva, e em 3 casos com lesões histológicas sugestivas de listeriose, mas com a cultura negativa.

O presente trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de IHQ para a confirmação do diagnóstico de listeriose em tecido nervoso central de ruminantes com suspeita clínica da doença, tendo em vista que na revisão da literatura não foram encontradas referências de artigos sobre este assunto no Brasil. Além disso, os anticorpos usados não estavam disponíveis em nível comercial, excetuando-se os anticorpos para realização de testes sorológicos imunoenzimáticos. Dessa forma, utilizando-se anticorpos policlonais comercialmente disponíveis para a realização de

testes de ELISA procuramos implementar o estudo imunistoquímico para detectar a presença deste antígeno nos tecidos.

### **Material e métodos**

O material utilizado neste trabalho foi cedido pelo Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria. Os casos estudados tinham suspeitas clínicas diversas e as necropsias dos animais evidenciaram aspectos sugestivos de listeriose.

O estudo foi retrospectivo feito a partir dos exames anatomopatológicos (AP) de cérebros de 5 animais das espécies bovino (2), ovino (2) e caprino (1), analisados pelo exame histológico convencional HE e visando atender aos objetivos desse estudo pela técnica de IHQ no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O critério de leitura das lâminas, coradas com hematoxilina e eosina (HE), levou em consideração os achados histológicos, evidenciados pelo esparsos infiltrado inflamatório no tecido nervoso central em nódulos gliais, com presença de infiltrado linfocitário perivascular (manguito perivascular), leptomeninges e em áreas de necrose do encéfalo e cerebelo. As lâminas foram analisadas ao microscópio nos aumentos de 10x, 40x e 100x.

O método de imunistoquímica para diagnóstico de listeriose foi padronizado no Laboratório de patologia experimental do HCPA a partir da técnica de Mills (1992) e Santos *et al.* (1999) de acordo com as seguintes etapas: preparação dos cortes histológicos; desparafinização e hidratação; recuperação antigênica com irradiação em forno de microondas; bloqueio da peroxidase endógena: as lâminas foram colocadas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 5% e água destilada e, após, em uma solução a

5 % de leite desnatado e tampão fosfato (PBS - Dako<sup>®</sup>), durante 40min em câmara úmida; foram lavadas com água corrente, água destilada e colocadas no PBS durante 5min.; incubação com anticorpo primário policlonal Rabbit A "*Listeria monocytogenes*" B65420R (Biodesign<sup>®</sup>) na diluição 1:1000; reação complexo avidina-biotina-estreptavidina + Kit Peroxidase: anticorpo secundário e marcador (Kit LSAB - Dako<sup>®</sup>); revelação (Kit Dab - Dako<sup>®</sup>); contracoloração com hematoxilina de Harris e montagem com Bálsamo do Canadá.

O critério para a leitura das lâminas, coradas pela imunoistoquímica, foi a presença de *Listeria monocytogenes* no tecido nervoso, identificada pela forma baciliforme, apresentação característica em forma da letra "v" com coloração marrom contrastando com as estruturas azuladas adjacentes. A observação das lâminas ao microscópio foi realizada com aumentos de 10x, 40x e 100x.

O controle negativo foi realizado pela substituição do anticorpo primário pelo diluente sem anticorpo. O controle positivo foi realizado com a aplicação dos reagentes em material de cultura do líquido céfallo-raquidiano positiva para *Listeria monocytogenes*. As bactérias nessa situação eram intensamente coradas em marrom.

## **Resultados**

Os resultados deste estudo demonstraram que a técnica de IHQ identificou com nitidez a presença de *Listeria monocytogenes* nas lesões características em todos os casos examinados, confirmando o diagnóstico anatomopatológico anteriormente formulado quando comparados com os controles positivos e negativos. Os resultados podem ser vistos na tabela 1 e nas figuras 1 e 2.

Tabela 1. Espécie animal, resultado do estudo histológico do encéfalo e sinais clínicos apresentados pelos ruminantes com resultados positivos para *Listeria monocytogenes* pelo exame imunoistoquímico (n= 5)

CASO	ESPÉCIE	ESTUDO HISTOLÓGICO DO CÉREBRO	SINAIS CLÍNICOS
1	Ovino	Encefalite supurativa multifocal microabsessos Manguitos perivasculares	Ataxia unilateral
2	Bovino	Encefalite supurativa multifocal, Meningo-encefalite não supurativa	Midríase, opistótono, andar em círculos, cegueira
3	Ovino	Microabscessos, Manguitos mononucleares perivasculares.	Incoordenação motora, torneio, paralisia flácida dos membros torácicos e pélvicos
4	Caprino	Encefalite supurativa multifocal, microabsessos, Manguitos perivasculares	Cabeça pendida para o lado, andar cambaleante
5	Bovino	Encefalite supurativa multifocal, Manguitos perivasculares	Paralisia da língua e músculo da face, tremores musculares incoordenação motora no trem posterior, andar cambaleante, olhar fixo

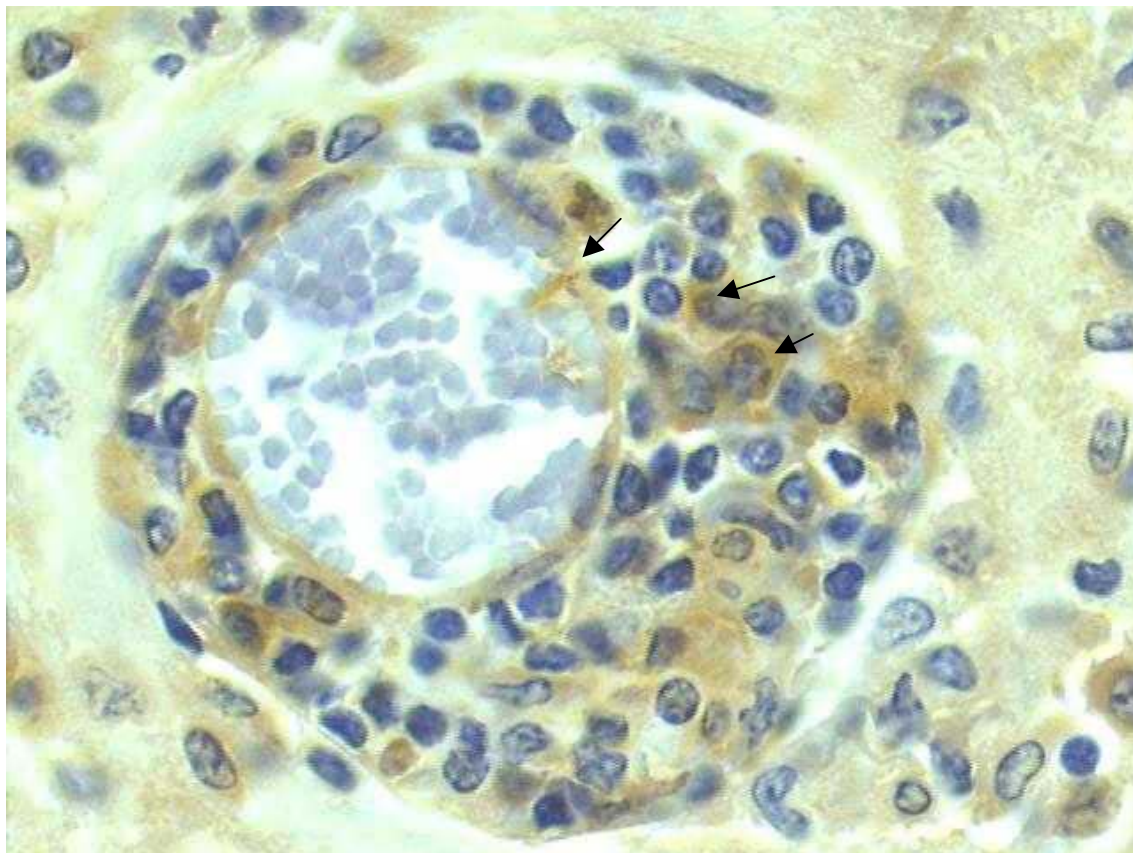


Figura 1- Microfotografia de lesão encefálica da *Listeria monocytogenes* revelando a presença da bactéria em mangitos perivascularares. A bactéria em forma de V é vista com a coloração amarronzado, diferenciando-a das estruturas adjacentes ( IHQ- anticorpo anti-listeria- 1000x)

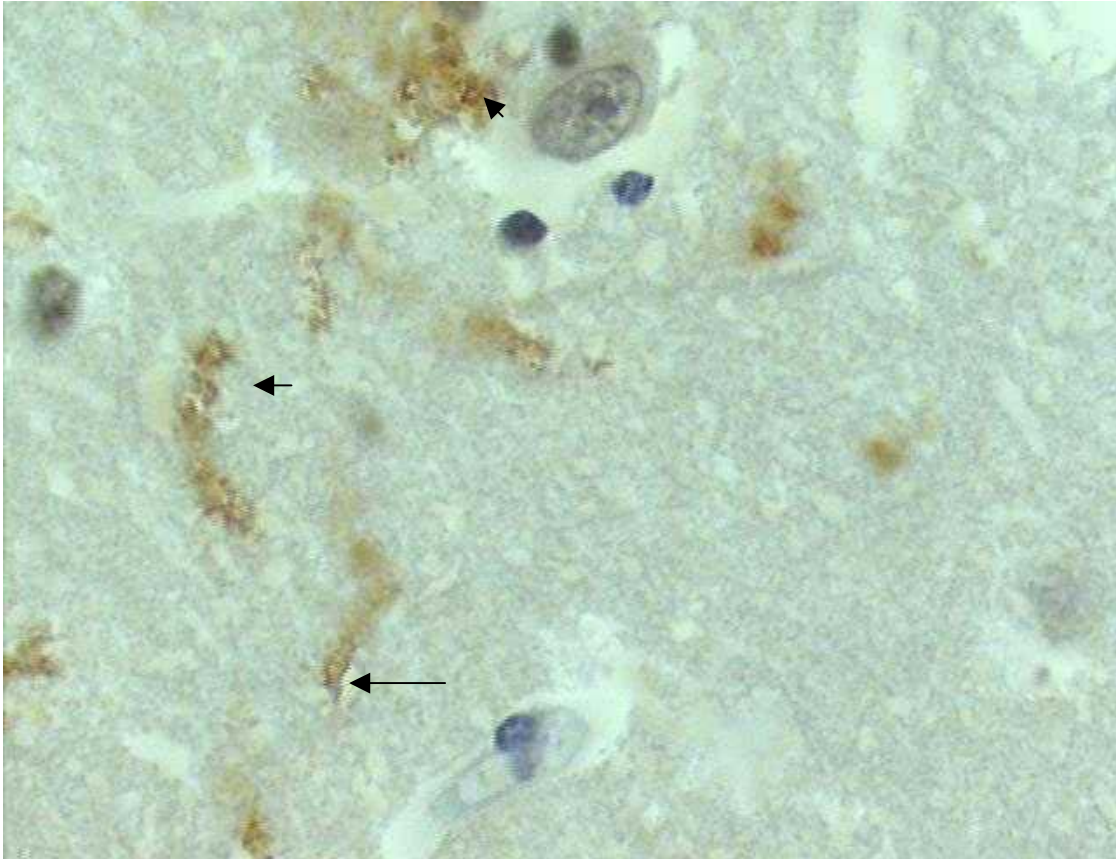


Figura 2 - Microfotografia de lesão encefálica da *Listeria monocytogenes* revelando a presença da bactéria isoladamente no interstício. A bactéria em forma de V é vista com a coloração amarronzado, diferenciando-a das estruturas adjacentes ( IHQ- anticorpo anti-listeria- 1000x)

## Discussão

As lesões microscópicas típicas de listeriose encefalítica são: 1) microabscessos, inflamação purulenta difusa, ou nódulo glial; 2) acúmulo perivascular de linfócitos; 3) leptomeningite linfocítica (Jones *et al.*, 1997). A pesquisa realizada mostrou que os animais apresentavam encefalite, microabscessos e infiltrados inflamatórios mononucleares perivasculares (tabela 1).

Os sinais clínicos de listeriose que envolvem o SNC, como ataxia, cegueira, paralisias, andar em círculos descritos por Carter (1995) e Jones *et al.* (1997), estavam presentes nos casos examinados neste estudo (tabela 1).

O estudo de Peters *et al.* (1992) identificou o antígeno de *Listeria monocytogenes* em 90 % dos encéfalos que apresentaram lesões histológicas típicas de listeriose, utilizando antisoro policlonal de coelho, obtido por imunização com *Listeria monocytogenes* sorotipo 1/2a, como anticorpo primário na técnica de IHQ. A técnica aplicada neste trabalho, utilizou o anticorpo policlonal *antiListeria* comercialmente disponível (Biodesign<sup>®</sup>) na diluição 1:1000 e detectou o antígeno de *Listeria monocytogenes* em todos os casos, revelando que a técnica utilizada é bastante específica para *Listeria monocytogenes*.

O trabalho desenvolvido por Johnson *et al.* (1995) confirmou a presença de *Listeria monocytogenes* pela IHQ em 82% dos casos com diagnóstico patológico de listeriose encefalítica em ruminantes, usando um antisoro de coelho (policlonal) *antiListeria* diluído a 1:2000. As diluições usadas neste estudo mostraram que diminuindo-se o tempo de incubação, o antisoro utilizado pode ser mais concentrado e revelar-se de forma igualmente aceitável para o uso na rotina de um laboratório. Nossa experiência com a diluição de 1:2000 não revelou positividade nas mesmas amostras, mesmo com maior tempo de incubação.

Os dados deste trabalho indicam que o exame imunohistoquímico é importante para confirmar o diagnóstico de *Listeria monocytogenes* em tecido nervoso central de ruminantes no estudo histológico após o óbito, uma vez que o exame histológico convencional e a observação dos sinais clínicos apresentados pelo animal apenas sugerem a possibilidade e compatibilidade com a doença. Pelo exame de IHQ podemos comprovar a presença de um agente etiológico de forma eficaz e que pode incrementar a acuidade diagnóstica em neuropatologia animal. Esses achados tornam-se ainda mais relevantes quando analisamos o potencial zoonótico da doença.

### **Bibliografia**

- Carter, G. R., Chengappa, M. M., Roberts, A. W. (1995). *Listeria*. In: *Essentials of Veterinary Microbiology*, 5ª edição. Editores: Williams & Wilkins (Baltimore), 127-130.
- Cooper, J. e Walker, R. D. (1998). Listeriosis. *The Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*, 14, 113-125.
- Johnson, G. C., Fales, W. H., Maddox, C. W., Ramos-Vara, J. A. (1995). Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7, 223-228.
- Jones, T. C., Hunt, R. D., King, N. W. (1997). *Veterinary Pathology*, 6ª edição. Editores: Williams & Wilkins (Baltimore), 461-463.
- Mills, B. (1992). Immunohistochemistry. In: *Laboratory Methods in Histotechnology*. Editores: American Registry of Pathology (Washington), 247-255.
- Murray, E. G. D., Webb, R. A., Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 29, 407-439.



- Peters, M., Hewickertrautwein, M., Amtsberg, G. (1992). Studies of the diagnosis of listeric encephalitis in ruminants using cultural and immunohistological techniques. 2. Immunohistological investigations on formalin-fixed paraffin sections. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B-infectious diseases and Veterinary Public Health*, 39, 473-484.
- Santos, R.T.M., Wakamatsu, A., Kanamura, C.T., Nonogaki, S., Pinto, G.A. (1999). Procedimentos laboratoriais em imuno-histoquímica e hibridização "in situ". In: *Manual de Imuno-Histoquímica*. Editores: Alves, V.A.F., Bacchi, C.E., Vassalo, J. (São Paulo), 237-259.
- Schild, A. L. (2001). Listeriose. In: *Doenças de ruminantes e equinos*, 2ª edição. Editores: Riet-Correa, F.; Schild, A. L.; Méndez, M.C.; Lemos, R.A.A. (São Paulo), 288-292.
- Weinstock, D.; Horton, S. B.; Rowland, P. H. (1995). Rapid diagnosis of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissue. *Veterinary Pathology*, 32, 193-194.

**CAPÍTULO 4 - IDENTIFICAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE *Listeria monocytogenes* EM PLACENTAS FIXADAS EM FORMOL E EMBEBIDAS EM PARAFINA**

Artigo protocolado sob nº 2098 e aceito para publicação no volume 52 da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, Ribeirão Preto/SP.

Identificação imunohistoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina<sup>1</sup>

Immunohistochemical identification of *Listeria monocytogenes* in formalin-fixed and paraffin-embedded placentas

Jussara Pires Schwab, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS

Maria Isabel Albano Edelweiss, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre/RS.

Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Endereço para correspondência:

Jussara Pires Schwab, Rua Cel. Bordini, 1180, apto. 31, bairro Moinhos de Vento, Porto Alegre/RS, CEP 90440-003. Fone (51) 3333.2507. Fax (051) 3332.7246

e-mail [jpschwab@orion.ufrgs.br](mailto:jpschwab@orion.ufrgs.br)

---

<sup>1</sup> Apoio financeiro parcial do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

## Resumo

Objetivos: identificar *Listeria monocytogenes* (*Lm*) em placentas humanas através da técnica de imunohistoquímica e relacionar sua presença com as alterações histológicas encontradas no exame convencional, com o trimestre gestacional, a idade das gestantes, casos de aborto e parto prematuro e a ocorrência de aborto habitual. Material e métodos: um estudo retrospectivo foi realizado no setor de patologia de um hospital escola de Porto Alegre no ano 2000. O material dos blocos de parafina de 254 placentas (AP), provenientes de aborto, de parto prematuro e de nascimento a termo, foi analisado pela técnica histológica convencional com a coloração de hematoxilina e eosina (HE). A técnica de imunohistoquímica (IHQ) foi realizada no material de 148 AP, que apresentaram alterações inflamatórias, hemorragia, necrose e trombose, utilizando anticorpo policlonal Rabbit A "*Listeria monocytogenes*" B65420R (Biodesign®) na diluição 1:1000 e complexo avidina-biotina-estreptavidina. O teste qui-quadrado foi aplicado para a análise estatística. Resultados: a presença de *Lm* foi identificada em 33,78% das placentas analisadas pela técnica IHQ. Corioamnionite e vilite foram as alterações inflamatórias que mostraram diferença estatística significativa nas placentas positivas. *Lm* estava presente nas placentas de 1º, 2º e 3º trimestres gestacionais. A idade das gestantes, casos de aborto e/ou parto prematuro não mostraram diferença estatística significativa com a presença ou ausência de *Lm* nas placentas. Abortos habituais ocorreram em pacientes com ou sem *Lm* no tecido placentário. Conclusão: a técnica de imunohistoquímica pode ser utilizada para confirmar o diagnóstico histopatológico de listeriose em todos os trimestres gestacionais.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. Imunohistoquímica. Aborto habitual. Corioamnionite. Vilite.

### Abstract

**Objectives:** The aim of this study is to identify *Listeria monocytogenes* (*Lm*) in human placentas by immunohistochemistry and relate its presence to the histological alterations found on conventional examination, to the pregnancy trimester, age of pregnant women, cases of abortion and premature delivery, and to the occurrence of habitual abortion.

**Material and methods:** A retrospective study was carried out at the pathology service of a teaching hospital in the city of Porto Alegre in 2000. The paraffin blocks of 254 placentas, obtained from abortion, premature delivery and full-term birth, were analyzed by conventional histology using hematoxylin and eosin (HE) staining. The immunohistochemical assay (IHC) consisted of a rabbit anti-listeria polyclonal antibody B65420R (Biodesign<sup>®</sup>) diluted 1:1000, in addition to the avidin-biotin-streptavidin complex; 148 placentas revealed inflammatory disorders, hemorrhage, necrosis and thrombosis. The chi-squared test was used for statistical analysis.

**Results:** *Listeria monocytogenes* was detected in 33.78% of the placentas analyzed by IHC. Chorioamnionitis and villitis showed significant statistical difference in the positive placentas. *Lm* occurred in the 1st, 2nd and 3rd trimesters of pregnancy. The age of pregnant women, the cases of abortion and/or premature births were not statistically different as to the presence or absence of *Lm* in the placentas. Habitual abortions occurred in patients with or without *Lm* in the placental tissue.

**Conclusion:** Immunohistochemistry may be used to confirm the histopathological diagnosis of listeriosis in all trimesters of pregnancy.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*. Immunohistochemistry. Habitual abortion. Chorioamnionitis. Villitis.

Identificação imunohistoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina

Immunohistochemical identification of *Listeria monocytogenes* in formalin-fixed and paraffin-embedded placentas

### Introdução

A listeriose é uma zoonose causada pelo microorganismo *Listeria monocytogenes* (*Lm*) e pode ser transmitida ao homem pelos alimentos de origem animal, como o leite sem pasteurização, carne e os derivados de ambos<sup>1</sup>. Os indivíduos com sistema imunológico debilitado, gestantes e recém-nascidos fazem parte do grupo de risco e devem consumir esses alimentos com a necessária cautela<sup>2,3</sup>.

Ao longo do tempo, vários surtos de listeriose humana ocorreram, atingindo principalmente mulheres grávidas e seus conceitos, ocasionando aborto ou parto prematuro com alta incidência de mortes fetais e neonatais. Casos isolados de listeriose também provocaram aborto ou o nascimento de crianças com meningite e outras lesões neurológicas<sup>4,5,6,7</sup>.

A incidência de listeriose é subestimada, pois há vários fatores que dificultam a identificação do microorganismo através da cultura do sangue e do líquido cefalorraquidiano; entre os quais citamos as características morfológicas da *Lm* que podem confundir com as de outro microorganismo, *Streptococcus* do grupo B<sup>8</sup>.

A listeriose não é, na maioria das vezes, diagnosticada na gravidez pela dificuldade das técnicas microbiológicas em encontrar o microorganismo ou pelas

alterações histológicas nas placentas que a confunde com outras patologias, o que provavelmente impede de avaliar a importância de *Lm* na saúde humana<sup>9</sup>.

No entanto, é importante diagnosticá-la, através do exame da placenta, para prevenir processos inflamatórios maternos recidivantes e tratar os casos neonatais, que podem causar meningite com seqüelas como hidrocefalia, retardo mental, convulsões e sinais neurológicos focais<sup>10</sup>.

A ocorrência de aborto habitual ou de repetição (3 ou mais abortos consecutivos) relacionada com a presença de *Lm* é discutida por vários autores e não é investigada na maioria desses casos<sup>11</sup>.

A identificação de *Lm*, através do exame imunohistoquímico, foi evidenciada em estudos de placentas que apresentaram as lesões inflamatórias características, o que demonstra ser um método capaz de confirmar o diagnóstico desta enfermidade<sup>11, 12</sup>.

Os objetivos deste trabalho foram identificar *Lm* em placentas humanas através da técnica de imunohistoquímica e relacionar sua presença com as alterações histológicas encontradas no exame convencional (HE), o trimestre gestacional, a idade das gestantes, os casos de aborto e parto prematuro e a ocorrência de aborto habitual.

## Material e Métodos

Estudo retrospectivo feito a partir dos exames anatomopatológicos (AP) de placentas provenientes de aborto, parto prematuro e nascimento a termo. O levantamento efetuado nos registros do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) revelou 714 AP desse tipo de material examinados no ano 2000. Uma amostra casual de 254 AP foi utilizada para análise através do exame microscópico convencional.

O critério de leitura das lâminas, coradas com hematoxilina e eosina (HE), levou em consideração os achados histológicos, evidenciados pelo infiltrado inflamatório, hemorragia, necrose e trombose observados ao microscópio nas objetivas 10x, 40x e 100x.

A técnica de imunohistoquímica foi realizada no material dos blocos de parafina de 148 lâminas examinadas pelo HE que apresentaram infiltrado inflamatório, hemorragia, necrose e trombose entre os 254 AP da amostra.

O método de imunohistoquímica para diagnóstico de listeriose foi padronizado no laboratório de patologia experimental do HCPA<sup>12</sup> a partir da técnica de Santos *et al.*<sup>13</sup>, utilizando anticorpo primário policlonal Rabbit A "*Listeria monocytogenes*" B65420R (Biodesign<sup>®</sup>) na diluição 1:1000 e complexo avidina-biotina-estreptavidina.

O critério para a leitura das lâminas, coradas pela imunohistoquímica, foi a presença de *Lm* na placenta, identificada pela forma baciliforme, apresentação característica em forma da letra "v" e coloração marrom em contraste com as estruturas azuladas adjacentes. A observação das lâminas ao microscópio foi realizada com ampliações de 10x, 40x e 100x.

A consulta aos prontuários permitiu pesquisar o trimestre gestacional, a idade da paciente, o número de abortos e os exames solicitados; porém quando a paciente foi



atendida na emergência, os dados em geral eram incompletos. Em apenas um dos casos, encontramos referência sobre o resultado da cultura laboratorial da placenta com isolamento de *Lm*, que foi confirmado pela imunohistoquímica.

Para a análise estatística, aplicamos o teste do qui-quadrado ( $X^2$ ) para as variáveis alterações histológicas, trimestre gestacional, idade das gestantes, casos de aborto e/ou parto prematuro e a ocorrência de aborto habitual.

As lâminas utilizadas no presente estudo foram identificadas por números, resguardando a identidade das pacientes e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob número 00379.

## Resultados

A *Lm* foi identificada em 50(33,78%) das 148 lâminas analisadas pelo método de imunohistoquímica como pode ser visualizado na microfotografia que mostra a lesão provocada pela *Lm* na placenta (Figura 1).

Na tabela 1, são mostradas as alterações histológicas, observadas no HE, e a frequência com que ocorreram nos casos positivos e negativos. A corioamnionite ( $p=0,035$ ) e a vilite ( $p=0,003$ ) mostraram ter significado estatístico com relação à presença de *Lm* na placenta.

A presença de *Lm* foi constatada em placentas de 1º (37,5%), 2º (27,5%) e 3º (35%) trimestres gestacionais sem diferença estatística significativa ( $p=0,987$ ).

A idade das gestantes variou entre 17 e 48 anos sem diferença estatística significativa.

Na tabela 2, são mostrados os casos de aborto e parto prematuro e a frequência com que ocorreram, relacionando-os com a presença ou ausência de *Lm* na placenta. Não houve diferença significativa entre a ocorrência de aborto e parto prematuro ( $p=0,445$ ) nas duas circunstâncias (presença ou ausência de *Lm*). Porém, quando *Lm* estava presente nas placentas ocorreram 66,67% de abortos e 33,33% de partos prematuros nos casos em que se obteve esta informação ( $n=36$ ).

Os casos de aborto habitual ou de repetição ocorreram com a presença de *Lm* (20,83%) ou ausência de *Lm* (16,6%), sem diferença significativa ( $p=0,665$ ), como mostrado na tabela 3. Porém, *Lm* estava presente em 38,46% do total de aborto habitual.

## Discussão

O presente estudo identificou *Lm* em 33,78% das placentas analisadas pela IHQ; somente uma das placentas tinha a cultura e o isolamento de *Lm* confirmado, pois este exame não é realizado como rotina no HCPA. Todas as sete placentas examinadas no estudo desenvolvido por Parkash<sup>11</sup> apresentaram resultado positivo pela IHQ, confirmando o diagnóstico anterior realizado através da cultura e isolamento de *Lm*.

Os resultados deste trabalho mostram que a corioamnionite e a vilite estão presentes na placenta com *Lm* concordando com os resultados encontrados por Parkash<sup>11</sup>. Concordam também com Gersell & Kraus<sup>14</sup> que afirmam que a *Lm* é a bactéria que mais comumente causa vilite, na qual, predominam os neutrófilos que se localizam entre o trofoblasto e o estroma dos vilos. A corioamnionite é usualmente grave e muitas vezes se estende até o estroma placentário e o âmnion contém um grande número de microorganismos.

A maioria dos autores refere que a listeriose predomina no terceiro trimestre gestacional, ocorre raramente no segundo e excepcionalmente no primeiro<sup>11, 15</sup>. Em trabalhos similares, analisando placentites por *Lm* em período perinatal com detecção por IHQ ou através da cultura e isolamento do microorganismo, pode-se observar que a infecção por *Lm* ocorreu mais no final da gestação. Efetivamente quando a cultura é realizada para diagnóstico clínico presuntivo, pode-se encontrar este agente. Porém culturas não são rotineiramente realizadas em abortos espontâneos e a ausência de um estudo retrospectivo como o desta pesquisa pode ter contribuído para a observação da diferença dos resultados encontrados por esses autores. Esta pesquisa examinou o material proveniente dos três trimestres gestacionais e foi possível detectar *Lm* em todos.

Esse fato não parece ser um fator importante na listeriose, conforme observado neste estudo, ressaltando que o uso de IHQ evidenciou que esta infecção pode estar presente no 1º trimestre. Ocorre que este diagnóstico não é investigado, na maioria das vezes, pela situação clínica da paciente que busca atendimento no setor de emergências dos hospitais e nem sempre está realizando acompanhamento pré-natal ou pesquisa de infertilidade.

No estudo realizado por Parkash<sup>11</sup>, a idade das pacientes variou entre 21 e 41 anos. Corroborando com os achados deste trabalho, a idade materna parece estar relacionada com o período de maior fertilidade da mulher e não ter relação com a patogenicidade da *Lm*.

Salazar *et al.*<sup>17</sup> afirmam que não há evidências de que *Lm* cause aborto habitual, porém os resultados deste trabalho mostram que o microorganismo estava presente na placenta em 5 (38,46%) dos 13 casos de aborto habitual analisados (tabela 3).

A realização deste estudo permitiu identificar facilmente a presença de *Lm* em placentas que apresentavam vilite e corioamnionite, indicando que a IHQ pode ser utilizada para confirmar o diagnóstico de listeriose quando o exame de rotina da placenta evidenciar este tipo de alteração.

A alta frequência dessa positividade (33,78%) em tecido placentário com alterações inflamatórias nos estimula a incentivar a busca deste agente através da IHQ, a fim de confirmar a presença do patógeno, notadamente em casos de aborto habitual.

Mais pesquisas utilizando a técnica de imunohistoquímica poderão esclarecer a frequência de *Lm* como uma das causas de septicemia neonatal, de aborto e parto prematuro<sup>16</sup> e as evidências de que cause aborto habitual<sup>17</sup>.

### Agradecimentos

Aos técnicos Flavia Giusti, Jorge Alberto Lopes e Neiva Copetti do Laboratório de Patologia Experimental do HCPA.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA pelo apoio financeiro.

## Referências

1. Iida T, Kanzaki M, Nakama A, Kokubo Y, Maruyama T, Kaneuchi, C. Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods. *J Vet Med Sci* 1998; 60: 1341-3.
2. Limaye AP, Perkins JD, Kowdley KV. *Listeria* infection after liver transplantation: report of a case and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:1942-4.
3. Slutsker L, Altekruuse SF, Swerdlow DL. Foodborne diseases – emerging pathogen and trends. *Infect Dis Clin North Am* 1998; 12: 199-219.
4. Hofer E, Nascimento RS, Oliveira MA. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31: 173-7.
5. Nolla-Salas J, Bosch J, Gasser I *et al.* Spontaneous *Listeria monocytogenes* peritonitis: a population-based study of 13 cases collected in Spain. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:1507-11.
6. Laciari AL, Hasuoka RP, Correa SM, Miranda AM, Centorbi NP. Symptomatic hydrocephalus in a newborn infected with *Listeria monocytogenes*. *Braz J Microbiol* 2000; 31:9-11.
7. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-Style cheese –North Carolina, October 2000-January 2001. *JAMA* 2001; 286:664-5.
8. Berzioli M, Brisotto P, Breseghello S, Faion N, Boccato S. Perinatal Listeriosis. A propos of two cases. *Pediatr Med Chir* 1999; 21:39-41.
9. Loguercio AP, Silva WP, Aleixo JA, Costa MM, Vargas AC. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. *Higiene Alimentar* 2001; 15: 39-48.
10. Di Maio H. *Listeria* infection in women. Primary Care Update for OB/GYNS 2000;

- 7: 40-5.
11. Parkash V, Morotti RA, Joshi V, Cartun R, Rauch CA, West AB. Immunohistochemical detection of *Listeria* antigens in the placenta in perinatal listeriosis. *Int J Gynecol Pathol* 1998; 17: 343-50.
  12. Schwab JP, Edelweiss MIA. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunohistoquímica. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003; 39:111-14.
  13. Santos RTM, Wakamatsu A, Kanamura CT, Nonogaki S, Pinto GA. Procedimentos laboratoriais em imuno-histoquímica e hibridização "in situ". In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J, editores. *Manual de Imuno-Histoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p. 237-59.
  14. Gersell DJ, Kraus FT. Diseases of the placenta. In: Kurman RJ, editor. *Blaustein's pathology of the female genital tract*. 5. ed. New York: Springer; 2002. p. 1119-31.
  15. Smith JL. Foodborne infections during pregnancy. *J Food Prot* 1999; 62: 818-29.
  16. Cunningham FG, Macdonald PC, Gant NF *et al.* *Williams Obstetrics*. 20. ed. Stamford: Appleton and Lange; 1997. p.585; 1307-8.
  17. Salazar CC, Cunha Filho JSL, Schlatter D *et al.* Abortamento de repetição. *Femina* 2001; 29: 667-72.



Figura 1 – Microfotografia mostrando a lesão causada pela *Listeria monocytogenes* na placenta, com a bactéria dentro da célula de Hofbauer e no estroma do vilão. A forma em "V" da bactéria aparece corada de marrom em contraste às estruturas adjacentes. (IHQ-anticorpo anti-listeria - X1000)



Tabela 1 - Frequência de alterações histológicas nas placentas relacionadas com a presença ou ausência de *Lm* identificada pela IHQ

Alterações Histológicas*	Presença de <i>Lm</i> (n=50)		Ausência de <i>Lm</i> (n=98)	
	Nº	Porcentagem	Nº	Porcentagem
Corioamnionite	13	26	12	12,24
Vilite	13	26	8	8,16
Deciduite	7	14	14	14,29
Hemorragia	40	80	80	81,63
Necrose	12	24	28	28,57
Trombose	7	14	10	10,20

\*Em algumas placentas, visualizou-se mais de um elemento histológico.

Tabela 2 - Frequência de aborto, parto prematuro e nascimento a termo relacionados com a presença ou ausência de *Lm* identificada na placenta pela IHQ

Casos	Presença de <i>Lm</i> (n=50)		Ausência de <i>Lm</i> (n=98)	
	Número	Porcentagem	Número	Porcentagem
Aborto	24	33,33	48	66,67
Parto prematuro	12	41,38	17	52,62
Nascimento a termo	0	0	2	100
Não informado	14	31,11	31	68,89

Tabela 3 - Ocorrência de aborto habitual relacionada com a presença ou ausência de *Lm* identificada na placenta pela IHQ

Aborto habitual	Presença de <i>Lm</i>		Ausência de <i>Lm</i>		Total
	Nº	Percentagem	Nº	Percentagem	
Sim	5	20,83	8	16,66	13
Não	19	79,17	40	83,34	59
Total	24	100,0	48	100	72

## CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO GERAL E SUGESTÕES

A listeriose vem ocorrendo, ao longo dos anos, nos animais, principalmente nos ruminantes, causando meningoencefalite e morte e, em animais prenhes, parto prematuro ou aborto.

A transmissão da doença para o homem ocorre através dos alimentos, como o leite, a carne e seus derivados, particularmente, quando ingeridos crus ou produzidos sem as condições higiênicas adequadas.

Vários surtos e casos isolados de listeriose foram descritos, tanto nos ruminantes quanto nos humanos, nestes atingindo mulheres grávidas e seus conceptos, provocando, muitas vezes, hidrocefalia e a morte das crianças.

Nos Estados Unidos, a incidência da doença vem diminuindo, pois há a conscientização das autoridades sanitárias, que implementaram programas visando esclarecer a população e as indústrias de alimentos quanto ao risco da listeriose.

No Brasil, não há até o momento a preocupação em relação à listeriose, pois não há o conhecimento da incidência de *L. m.* Talvez seja pela dificuldade em se identificar o microorganismo através da cultura de sangue, do LCR ou de material proveniente de parto prematuro ou de aborto. As características morfológicas e culturais deste patógeno se confundem com as de outros microorganismos, dificultando o diagnóstico da doença.

As lesões do SNC nos ruminantes são patognomônicas e, geralmente, possibilitam o diagnóstico *post-mortem*. Porém as alterações histológicas encontradas na placenta, como corioamnionite e vilite, estão presentes em diversas patologias, impossibilitando o diagnóstico diferencial.

A técnica de IHQ, através de reação com anticorpos no tecido, possibilita identificar a *L. m.* tanto, no cérebro de ruminantes, quanto na placenta de mulher, confirmando o diagnóstico presuntivo.

A técnica de IHQ apresentou dificuldades em relação à reação de fundo (*background*), também encontradas por Mount e Cooper (2001), que foram superadas

no Laboratório de Patologia Experimental do HCPA durante a realização do projeto piloto (experimento 1), implementado para a identificação de *L. m.* em espécimes de aborto e placentas humanas.

O experimento 2, com material do cérebro de ruminantes, utilizando o anticorpo policlonal *antilisteria monocytogenes* (Biodesign®) na diluição 1:1000, possibilitou identificar *L. m.* em 100% dos casos. O estudo realizado por Peters *et al.* (1992) identificou *L. m.* em 90% dos encéfalos que apresentaram lesões histológicas típicas de listeriose, utilizando antisoro policlonal de coelho, obtido por imunização com *Listeria monocytogenes* sorotipo 1/2a, como anticorpo primário na técnica de IHQ. O trabalho desenvolvido por Johnson *et al.* (1995) confirmou a presença de *Listeria monocytogenes* pela IHQ em 82% dos casos com diagnóstico patológico de listeriose encefalítica em ruminantes, usando um antisoro de coelho *antilisteria* diluído a 1:2000. A pesquisa desenvolvida por Weinstock *et al.* (1995) confirmou a presença de *L.m* pelo IHQ em todos os quatorze casos com cultura positiva e em três casos de oito suspeitos de listeriose, utilizando como anticorpo primário o anticorpo policlonal *Listeria O*, sorotipo 1 e 4 (Difco®).

O experimento 1 (projeto piloto) identificou *L. m.* em 50% das placentas analisadas pelo IHQ e o experimento 3 identificou *L. m.* em 33,78% das placentas humanas com alterações inflamatórias sugestivas de listeriose (corioamnionite e vilite). No estudo realizado por Parkash *et al.* (1998), todas as placentas estavam positivas pelo IHQ, utilizando o anticorpo policlonal *Listeria O*, sorotipo 1 e 4 (Difco®) na diluição 1:25000, como anticorpo primário.

O resultado desta pesquisa mostra a importância da realização da técnica de IHQ para confirmar o diagnóstico da doença e, em estudos posteriores, poder-se-á estimar a incidência de listeriose e chamar a atenção das autoridades da área da saúde para a presença deste patógeno na cidade, estado ou país. Então, promover campanhas de esclarecimento da população, quanto aos cuidados sobre o consumo de produtos de origem animal e de conscientização das indústrias, quanto ao preparo e conservação desses alimentos.

Os resultados deste estudo permitem sugerir e recomendar:

- 1) analisar pela técnica de IHQ as placentas provenientes de aborto ou parto prematuro que apresentarem alterações inflamatórias no HE;

- 2) analisar pela técnica de IHQ as placentas provenientes de abortos de repetição;
- 3) pesquisar a incidência de listeriose no HCPA;
- 4) orientar as gestantes, durante o pré-natal, quanto ao risco da doença e quanto às medidas de prevenção:
  - a) em relação ao consumo de alimentos crus e pré-cozidos:
    - cozinhar completamente os alimentos de origem animal (ex. carne de bovinos, suínos e aves);
    - lavar bem os vegetais antes de cozinhar;
    - guardar carnes não cozidas separadas de vegetais, de alimentos cozidos e de alimentos pré-cozidos;
    - evitar o consumo de leite sem pasteurização ou de alimentos produzidos com leite sem pasteurização;
    - lavar as mãos, facas e tábuas de cortar alimentos após o manuseio de alimento não cozido.
  - b) em relação às gestantes:
    - evitar o consumo de queijo ou de alimentos produzidos com leite sem pasteurização: queijo colonial artesanal, Brie, Feta, Camembert, queijos azuis e tipo mexicano;
    - aquecer as sobras de alimento ou os alimentos pré-cozidos até temperatura de cozimento;
    - evitar o consumo de alimentos mantidos em balcões de lancherias ou aquecê-los completamente antes do consumo.
- 5) às autoridades da área da saúde que realizem campanhas de conscientização da população quanto ao risco do consumo de produtos de origem animal sem fiscalização, conservados em temperatura inadequada ou preparados sem o aquecimento necessário para o controle deste patógeno.

## REFERÊNCIAS

AHLFORS, C. E. et al. Neonatal listeriosis. **American Journal of Diseases of Children** (1960), v. 131, p. 405, Apr. 1977.

ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. 270p.

AMRSTRONG, D. *Listeria monocytogenes*. In: MANDELL, G. L. ; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. (Eds.). **Principles and practice of infectious diseases**. 4. ed. New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 1880-1885.

AZIMI, P. H.; GRAMBLETT, H. G. *Listeria monocytogenes* infection in newborn siblings. **American Journal of Diseases of Children**, v. 131, p. 398-399, Apr. 1977.

BANERJI, A; NOYA, F. J. D. Brain abscess associated with neonatal listeriosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 18, n. 3, p. 305-307, Mar. 1999.

BECROFT, D. M. O. et al. Epidemic listeriosis in the newborn. **British Medical Journal**, v. 3, p. 747-751, Sept. 1971.

BEINDER, E. et al. [Discrepant outcome of intrauterine listeria infection in dichorionic twins]. **Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie**, v. 203, suppl. 2, p. 12-15, Dec. 1999.

BEMRAH, N. et al. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1-4, p.129-145, Dec. 1998.

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P. **Pathology of the human placenta**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 1995. p. 560-564.

BERTOTTO, A. et al. Peripheral blood gamma delta T cells in human listeriosis. **Acta Paediatrica**, v. 84, n. 12, p. 1434-1435, Dec. 1995.

BERZIOLI, M. et al. Perinatal listeriosis. Apropos of two cases. **La Pediatrica Medica e Chirurgica: Medical and Surgical Pediatrics**, v. 21, n. 1, p. 39-41, Jan-Feb. 1999.

BORTOLUSSI, R.; SCHLECH III, W.F.; ALBRITTON, W.L. *Listeria*. In: LENNETT, E. H.; SPAUDING, L. H.; TRUANT, J.P. (Eds.). **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985. cap. 19, p. 205-208.

BORTOLUSSI, R. Neonatal listeriosis. **Seminars in Perinatology**, v. 14, n. 4, p. 44-48, Aug. 1990.

BORTOLUSSI, R.; SCHLECH III, W.F.; Listeriosis. In: REMINGTON J. S.; KLEIN, J. O **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 4.ed. Philadelphia: Saunders, 1995. cap. 27, p. 1055-1073.

BRETT, M. S. Y.; SHORT, P.; McLAUCHLIN, J. A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 223-229, Sept. 1998.

CAIRD, L. Listeriosis in pregnancy. **Lancet**, v. 11, p. 322, Feb. 1989.

CARLTON, W. W.; McGAVIN, D. M. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 557.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M.; ROBERTS, A. W. *Listeria*. In: **Essentials of veterinary microbiology**. 5.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. cap. 12. p.127-130.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Listeriosis**. [online]. Disponível em: <[http:// www.cdc.gov/od/oc/media/fact/lister.htm](http://www.cdc.gov/od/oc/media/fact/lister.htm)>. Acesso em: 23 set.1999.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Listeriosis**. [online]. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis\\_t.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_t.htm)>. Acesso em: 12 abr.2000.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses—selected sites, United States, 2000**. [online].Disponível<<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5013a1.htm> . Acesso em: 12 jul. 2002.

CFSAN. Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. food and Drug Administration. **How to safely handle refrigerated ready-to-eat- foods and avoid listeriosis**. [online]. Disponível em: <<http://www.Cfsan.fda.gov/~dms/>>. Acesso em: 11 ago. 2002.

COOPER, J.; WALKER, R. D. Listeriosis. **The Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 113-125, Mar. 1998.

CRAIG, S. et al. Perinatal infection with *Listeria monocytogenes* . **The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 36, n. 3, p. 286-290, Aug. 1996.



CUNNINGHAM, F. G. et al. **Williams obstetrics**. 20. ed. Stamford: Appleton and Lange. p. 585; 1307-1308. 1997

DFST. Food Science Australian Information Services. **Food safety and hygiene**. [online]. Disponível em: <<http://www.dfst.csiro.au/fshbull/fshbull3.htm>>. Acesso em: 20 out. 1999.

DI MAIO, H. *Listeria* infection in women. **Primary Care Update for OB/GYNS** 2000, v. 7, n. 1, p. 40-45, Jan-Feb. 2000.

DOROZYNSKI, A. Seven die in French listeria outbreak. **British Medical Journal**, Londres, v. 320, p. 601, Mar. 2000. Disponível em: <<http://www.bmj.com/cgi/content/full/310/7235/601/a>>. Acesso em: 24 set. 2000.

DRISCOLL, S. G.; GORBACH, A.; FELDMAN, D. Congenital listeriosis: diagnosis from placental studies. **Obstetrics and Gynecology**, v. 20, n. 2, p. 216-220, 1962.

EVANS, J. R. et al. Perinatal listeriosis: report of an outbreak. **Pediatric Infectious Disease**, v. 4, p. 237. 1985.

FDA. Food And Drug Administration. [online]. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cdrh/yr2000/cfr/866.html>>. Acesso em 04 set. 1999.

FERNANDES, J. C. T.; BOLLWANN, W.; SIQUEIRA, C. S. Listeriose em ovinos no Rio Grande do Sul: descrição de um caso. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 2, p. 131-137, 1971.

FILICE, G. A. et al. *Listeria monocytogenes* infection in neonates: investigation of an epidemic. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 138, n. 1, p. 17-23, July 1978.

FLEMING, D. W. et al. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 404-407, 1985.

FOX, H. **Pathology of the placenta**. Londres: Saunders, 1978. p. 286-325.

FSIS. Food Safety and Inspection Service. **Listeria monocytogenes and Listeriosis**. [online]. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/OA/pubs/listeria.htm>>. Acesso em: 04 set. 1999.

FSIS. Food Safety and Inspection Service. **Listeriosis and pregnancy: what is your risk?** [online]. Disponível em: <[http://www.fsis.usda.gov/OA/pubs/lm\\_tearsheet.htm](http://www.fsis.usda.gov/OA/pubs/lm_tearsheet.htm)>. Acesso em: 11 ago. 2002.

FUCHS, S.; HOCHNER-CELNIKIER, D.; SHALEV, O. First trimester listeriosis with normal fetal outcome. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 656-658, 1994.

GELLIN, B. G.; BROOME, C. V. Listeriosis. **The Journal of the American Medical Association**, v. 261, n. 9, p. 1313-1320, 1989.

GELLIN, B. G. et al. The epidemiology of listeriosis in the United States- 1986. **American Journal of Epidemiology**, v. 133, p. 392, 1991.

GERSELL, D. J.; KRAUS, F. T. Diseases of the placenta. In: KURMAN, R. J. (Ed). **Blaustein's pathology of the female genital tract**. 5. ed. New York: Springer, 2002. p. 1119-1131.

GOULET, V. et al. Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. **The Journal of Infectious Disease**, v. 177, n. 1, p. 155-160, Jan. 1998.

GRAY, M. L.; KILLINGER, A. H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 30, n. 2, p. 309-371, 1966.

HOF, H.; NICHTERLEIN, T.; KRETSCHMAR, M. Management of listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p. 345-357, Apr. 1997.

HOFER, E.; PESSOA, G. V. A.; MELLES, C. E. A. Listeriose humana. Prevalência dos sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados no Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 44, n. 2, p. 125-131, 1984.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R. S.; OLIVEIRA, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, Mar. 1998.

IIDA, T. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods. **Journal the Veterinary Medicine Science/ the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 60, n. 12, p. 1341-1343, Dec. 1998.

JACQUET, C. et al. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 2242-2246, June 1995.

JAMES, S. M. et al. Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese California. **The Journal of the American Medical Association**, v. 54, p. 474, 1985.

JOHNSON, G. C. et al. Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 223-228, 1995.

JONES, T. C. ; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Veterinary pathology**. 6.ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1997. p. 461-463.

KESSLER, S. L.; DAJANI, A. S. *Listeria meningitis* in infants and children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 9, p. 61, 1990.

KRAHE, C. **Listeriose na gestação**. 1967. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade Católica de Medicina de Porto Alegre, Porto Alegre.

KRAHE, C. et al. Listeriose como causa de morte fetal: relato de um caso. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 26, n. 3, p. 223-225, 1982.

KRAUSE, V. W. et al. Congenital listeriosis causing early neonatal death. **Canadian Medical Association Journal**, v. 127, p. 36, July-Sept. 1982.

LACIAR, A. L. et al. Symptomatic hydrocephalus in a newborn infected with *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 1, Jan-Mar. 2000.

LALLEMONT, A. V. et al. Fetal listeriosis during the second trimester of gestation. **Pediatric Pathology/ affiliated with the International Paediatric Pathology Association**, v. 12, p. 665-671, 1992.

LAMONT, R. J.; POSTLETHWAITE, R. Carriage of *Listeria monocytogenes* and related species in pregnant and non-pregnant women in Aberdeen, Scotland. **Journal of Infection**, v. 13, n. 2, p. 187-193, Sept. 1986.

LANDGRAF, I. M. et al. An outbreak of *Listeria monocytogenes* meningitis in neonates. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 63-67, 1999.

LENNETTE, E. H.; SPAUDING, L. H.; TRUANT, J. P. **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985. cap. 19, p. 205-208.

LIMAYE, A P.; PERKINS, J. D; KOWDLEY, K. V. Listeria infection after liver transplantation: report of a case and review of the literature. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 93, n. 10, p. 1942-1944, Oct. 1998.

LINNAN, M. J. et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 823-828, 1988.

LOGUERCIO, A. P. et al. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 80-81, p. 39-48, 2001.

LOVETT, J. *Listeria monocytogenes*. In: **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. cap. 7, p. 284-306.

LOW, J. C. Listeriosis. In: MARTIN, W.B.; AITKEN, I. D. (Eds.). **Diseases of sheep**. 3.ed. Edinburgh: Blackwell Science, 2000. cap. 34, p. 224-227.

McLAUCHLIN, J. Human listeriosis in Britain, 1967-1985, a summary of 722 cases. 1. Listeriosis during pregnancy and the newborn. **Epidemiology and Infectious**, v. 104, p. 181, 1990.

McLAUHLIN, J. Animal and human listeriosis.: a shared problem ? **The Veterinary Journal**, v. 153, p. 3-5, 1997.

MEAD, P. S. et al. Food-Related Illness and Death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, Sept-Oct, 1999. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol5no5/mead.htm>>. Acesso em: 14 out. 1999.

MILLS, B. Immunohistochemistry. In: PROPHET, E.D. et al. (Eds.) **Laboratory methods in histotechnology**. Washington : Armed Forces Institute of Pathology, 1992. p. 247-255.

MIURA, E.; ALVES, M. O.; ALENCASTRO, R. Listeriose neonatal: forma septicêmica precoce. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 3, n. 2, p. 125-127, 1983.

MORA, J.; WHITE, M.; DUNKEL, I. J. Listeriosis in pediatric oncology patients. **Cancer**, v. 83, n. 4, p. 817-820, Aug. 1998.

MOUNT, S. L.; COOPER, K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. **Current Diagnostic Pathology**, v. 7, n. 3, p. 161-167, Sept. 2001.

MURRAY, E. G. D.; WEBB, R. A.; SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 52, p. 407-439, 1926.

MYLONARKIS, E.; HOHMANN, E. L.; CALDERWOOD, S. B. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. **Medicine**, Baltimore, v. 77, n. 5, p. 313-336, Sept. 1998.

NASH, M. L. et al. Epidemiology and economics of clinical listeriosis in a sheep flock. **Preventive Veterinary Medicine**, v.24, n. 3, p. 147-156, Sept. 1995.

NOLLA-SALAS, J. et al. Perinatal listeriosis: a population-based multicenter study in Barcelona, Spain (1990-1996). **American Journal of Perinatology**, v. 15, n. 8, p. 461-467, Aug. 1998.

NOLLA-SALAS, J. et al. Spontaneous *Listeria monocytogenes* peritonitis: a population-based study of 13 cases collected in Spain. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 97, n. 6, p.1507-1511, 2002.

OUTBREAK of listeriosis associated with homemade Mexican-Style cheese –North Carolina, October 2000-January 2001. (MMWR, 50:560-562, 2001). JAMA, 286 (6): 664-665, 2001. [online]. Disponível em: <<http://www.gateway2.ovid.com/ovidweb.cgi>>. Acesso em: 15 set. 2002.

PARKASH, V. et al. Immunohistochemical detection of *Listeria* antigens in the placenta in perinatal listeriosis. **International Journal of Gynecological**

**Pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists**, v. 17, n. 4, p. 343-350, Oct. 1998.

PETERS, M.; HEWICKERTRAUTWEIN, M.; AMTSBERG, G. Studies of the diagnosis of listeric encephalitis in ruminants using cultural and immunohistological techniques.2. Immunohistological investigations on formalin-fixed paraffin sections. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe B-infectious diseases and Veterinary Public Health**, v. 39, n. 7, p. 473-484, 1992.

PINNER, R.W. et al. Role of foods in sporadic listeriosis – II microbiology and epidemiologic investigation. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 267, p. 2046-2050, 1992.

PIVA, J.P. et al. Listeriose neonatal a propósito de um caso. **Jornal de Pediatria**, v. 62, n. 4, p. 128-130, 1987.

QUINLIVAN, J. A. ; NEWNHAM, J. P.; DICKINSON, J. E. Ultrasound features of congenital listeriosis – a case report. **Prenatal Diagnosis**, v. 18, n.10, p. 1075-1078, Oct. 1998.

REZENDE, J. **Obstetrícia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. p. 565.

RITCHIE, A. C. **Boyd's textbook of pathology**. 9.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. v. 2, p. 1388-1395.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**, v. 7, n. 4-5, p.195-202, Aug-Oct. 1996.

ROCOURT, J.; BILLE, J. Foodborne listeriosis. **World health statistics quarterly. Rapport trimestrial de statistiques sanitaires mondiales**, v. 50, n. 1-2, p. 67-73, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/search?>>. Acesso em: 19 set. 2001.

SALAZAR, C. C. et al. Abortamento de repetição. **Femina**, v. 29, n. 10, p. 667-672, Nov-Dez. 2001.

SANTOS R. T. M. et al. Procedimentos laboratoriais em imuno-histoquímica e hibridização "in situ". In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J, editores. **Manual de Imuno-Histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p. 237-59.

SCHILD, A. L. Listeriose. In: RIET-CORREA, F. et al. (Eds.). **Doenças de ruminantes e equinos**. 2 ed. São Paulo: Varela, 2001. v. 1, p. 288-292.

SCHLECH, W. F. et al. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. **The New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 203-206, 1983.

SCHNEIDER, D. J. Listeriosis. In: COETZER, J.A.W.; THOMPSON, G. R.; TUSTIN, R. C. (Eds). **Infectious diseases of livestock**. Nova York: Oxford University, 1994. v. 2. cap. 164, p. 1374-77.

SCHUCHAT, A; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 2, p. 169-183, Apr. 1991.

SCHUCHAT, A. et al. Role of foods in sporadic listeriosis – I case control study of dietary risk factor. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 267, p. 2041-2045, 1992.

SCHWAB, J. P.; BECHTEL, M. A. B.; SCHUCH, D. M. T. *Listeria monocytogenes* em queijo colonial artesanal comercializado em Porto Alegre. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 24, n. 1, p. 95-106, 1996.

SCHWAB, J. P.; EDELWEISS, M. I. A. Identificação de *L. m.* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de Imunohistoquímica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPECIALIDADES EM MEDICINA VETERINÁRIA, 2002, Curitiba. **Resumos**. Curitiba: Sociedade Paranaense de Medicina Veterinária, 2002. p. 152.

SCHWAB, J. P.; EDELWEISS, M.I.A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunohistoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 111-114, 2003.

SCHWARTZ, B. et al. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. **Lancet**, v. 2, p. 779-782, 1988.

SCHWARZE, R. et al. Perinatal listeriosis in Dresden 1981-1986: Clinical and microbiological findings in 18 cases. **Infection**, v. 17, n. 3, p. 131-138, May-June 1989.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. Listeria. In: HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1988. p. 1235-1245.

SHALLOW, S.; DAILY, P. ROTHROCK, G. Incidence of foodborne illness-foodnet, 1997. **The Journal of the American Medical Association**, v. 280, n. 19, p.1651, Nov. 1998.

SILVA, M. G. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brasil. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.

SILVER, H. M. Listeriosis during pregnancy. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 53, n. 12, p. 737- 740, Dec. 1998.

SLUTSKER, L.; ALTEKRUSE, S.F.; SWERDLOW, D. L. Foodborne diseases – emerging pathogen and trends. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 12, n. 1, p. 199-219, Mar. 1998.

SMITH, J. L. Foodborne infections during pregnancy. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 7, p. 818-829, July 1999.

TAEGER, A. J. Listeriosis: recognizing it, treating it; preventing it. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 66, n. 6, p. 375-380, June 1999.

THOMSON, R. G. **Patologia veterinária especial**. Charlottetown: Manole, 1990. p. 627-628.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. London: Butterworths, 1986. 280 p.

TIMONEY, J. F. et al. The Genus *Listeria*. In: **Hagens and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. 8.ed. New York: Cornell University Press, 1992. cap. 23, p. 241-246.

TOPALOVSKI, M.; YANG, S. S.; BOONPASAT, Y. Listeriosis of the placenta: clinicopathologic study of seven cases. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 169, p. 616-620, 1993.

TRIDENTE, V. et al. A case of maternal and neonatal infection due to *Listeria monocytogenes*. **La Clinica Terapeutica**, v. 149, n. 4, p. 307-311, July-Aug. 1998.

USDA. United State Department of Agriculture. **HHS and USDA release Listeria risk assessment and Listeria action plan**. [online]. Disponível em: <<http://www.usda.gov/news/releases/2001/01/0020.htm>>. Acesso em: 24 jun. 2001.

VARNAM, A. H. **Foodborne pathogens**. Aylesbury: Wolfe, 1991. p. 327-352.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584, July 2001.

VISINTINE, A. M.; OLESKE, J. M.; NAHMIAS, A.J. *Listeria monocytogenes* infection in infants and children. **American Journal of Diseases of Children (1960)**, v. 131, p. 393, 1979.

WEINSTOCK, D.; HORTON, S. B.; ROWLAND, P. H. Rapid diagnosis of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissue. **Veterinary Pathology**, v. 32, n. 2, p. 193-194, 1995.

WHO. World Health Organization. Working Group. Foodborne listeriosis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 66, p. 421-428, 1988.

## ANEXO 1 - TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

- a) Preparação das lâminas: Lavagem (água e detergente); sinalização (acetona e silano (ATPS));
- b) Obtenção dos cortes histológicos: 2 a 3 mm de espessura, colocados por 24 horas em estufa a 56 ° C;
- c) Procedimentos imunoistoquímicos (IHQ):
  - Desparafinização e hidratação: colocar as lâminas no xilol 10 min, xilol 5 min (2x); mergulhar no álcool (2x); deixar 5 min no álcool (2x); lavar na água corrente; lavar na água destilada; colocar PBS durante 5min.
  - Recuperação antigênica - irradiação em forno de microondas: incubar as lâminas em tampão citrato pH 6,0 no microondas na potência 9, por 3 vezes de 5 min; com períodos de descanso de 2 min. Descansar 20 min (dentro do microondas desligado) e 15 min (em temperatura ambiente). Lavar com água destilada (2x) e deixar no PBS 5 min.
  - Bloqueio da peroxidase endógena: colocar as lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 5% em água destilada, durante 20 min (2x) em câmara escura; lavar com água destilada (2x) e colocar em PBS durante 5 min..
  - Modificação da técnica: colocar as lâminas em uma solução a 5 % de leite em pó desnatado em PBS, durante 40 min em câmara escura; lavar com água destilada (3x) e colocar em PBS durante 5 min (para evitar reações inespecíficas).
  - Incubação com o anticorpo primário: escorrer as lâminas e circundar os cortes com caneta Dako Pen; colocar o anticorpo primário *antiListeria monocytogenes*, cobrindo todo o corte, deixar durante 1 hora na câmara úmida e escura; lavar lâmina por lâmina com água destilada e colocá-las em PBS durante 5 min (3x);
  - Reação Complexo Avidina-biotina-estreptavidina + kit peroxidase (StreptABComplex): colocar o anticorpo secundário (Kit Dako/Lsab<sup>1</sup>) por 30



min; colocar em PBS durante 5 min (3x); gotejar o complexo Streptavidin (Kit Dako/Lsab<sup>2</sup>) e deixar por 30 min em câmara escura e úmida; colocar em PBS por 5 min (3x).

- Revelação: colocar 1 gota da solução de cromogeno (Kit Dab) e lavar com água destilada.
- Contracoloração: Hematoxilina de Harris por 20 segundos; lavar em água destilada, em água amoniacal a 2% e em água destilada; mergulhar as lâminas em álcool (3x); mergulhar em xilol (3x).
- Montar com 1 gota de Entellan (Merck) cada lâmina e lamínula.

#### REAGENTES:

Anticorpo primário policlonal : Rabbit A "*Listeria monocytogenes*"  
(Biodesign International®) diluição 1:1000

DAB = Solução de cromogeno (Dako®)

Entellan (Merck®)

LSAB = Labelled streptavidin biotin method + kit peroxidase (Dako®)  
Universal mouse/rabbit/goat

LSAB<sup>1</sup> = Dako Lsab + System (Link)

LSAB<sup>2</sup> = Dako Lsab + HRP (Streptavidin + HRP)

PBS = Phosphate buffered saline (fosfato de sódio e cloreto de sódio)

## RESUMO

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com a aprovação da Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e com apoio financeiro parcial do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE). O experimento 1, chamado de projeto piloto, teve como objetivo implementar a técnica de IHQ para identificar a *Listeria monocytogenes* (*L.m.*), utilizando anticorpo policlonal *antilisteria monocytogenes* (Biodesig<sup>®</sup>). Vários testes foram realizados para acertar a diluição (1:1000) que foi diferente da preconizada pelo fabricante. Os blocos de parafina, de dez placentas provenientes de parto prematuro ou aborto foram utilizados para os cortes histológicos e a preparação das lâminas para a coloração Hematoxilina e Eosina (HE) e imunoistoquímica (IHQ). As lâminas foram identificadas por números para resguardar a identidade das pacientes. O resultado do HE mostrou alterações inflamatórias em oito placentas e *L. m.* foi identificada pelo IHQ em cinco dessas placentas. O objetivo do 2º experimento foi identificar a *L. m.* em tecido nervoso cerebral de ruminantes, utilizando a técnica implementada no projeto piloto. O material utilizado neste trabalho foi cedido pelo Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria. Os casos estudados (2 ovinos, 1 caprino e 2 bovinos) tinham suspeitas clínicas diversas e as necropsias dos animais evidenciaram aspectos sugestivos da doença. Os cinco casos foram confirmados pelo IHQ, comprovando a importância da utilização desta técnica para o diagnóstico da listeriose no SNC de ruminantes. O 3º experimento objetivou identificar a *L. m.* em placentas encaminhadas ao Serviço de Patologia do HCPA no ano 2000. Da mesma forma que no experimento 1, as lâminas foram identificadas por números. Após o levantamento realizado nos registros dos exames anatomopatológicos (AP) deste setor, observou-se que 714 AP eram de placentas provenientes de aborto, parto prematuro e nascimento a termo examinados naquele período. Foram sorteados 254 AP para análise através de HE, revelando que 148 desses AP apresentavam

alterações inflamatórias (corioamnionite, vilite e deciduíte). Os blocos destas placentas foram utilizados para fazer as lâminas e realizar IHQ. A consulta aos prontuários dos casos com alterações inflamatórias permitiu observar que um deles tinha a confirmação bacteriológica de *L. m.* na placenta, tornando-se este o controle positivo. O controle negativo foi selecionado entre aqueles sorteados que não apresentavam alterações inflamatórias. A presença de *L. m.* foi identificada em 33,78% das placentas analisadas pela técnica IHQ. Corioamnionite e vilite foram as alterações inflamatórias que mostraram diferença estatística significativa nas placentas positivas. *L. m.* estava presente nas placentas de 1º, 2º e 3º trimestres gestacionais. A idade das gestantes, casos de aborto e/ou parto prematuro não mostraram diferença estatística significativa com a presença ou ausência de *L. m.* nas placentas. Abortos habituais ocorreram em pacientes com ou sem *L. m.* no tecido placentário. Conclusão: a técnica de imunohistoquímica pode ser utilizada para confirmar o diagnóstico histopatológico de listeriose em placentas e tecido nervoso central de ruminantes.

Palavras-chaves: *Listeria monocytogenes*. Imunohistoquímica. Aborto. Encefalite.  
Ruminantes.

## ABSTRACT

This project was developed at the Pathology Experimental Laboratory of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), after approval by the local Research Ethics Committee, and received partial financial support from the Research Incentive Fund (FIPE) of HCPA. The first experiment (or pilot scheme) aimed at implementing the immunohistochemistry (IHC) technique for the identification of *Listeria monocytogenes* (*L.m.*), by way of anti-listeria polyclonal antibody (Biodesign<sup>®</sup>). Several tests were performed in order to find the correct dilution (1:1000), which was different from that which had been recommended by the manufacturer. Paraffin-embedded blocks of placentas obtained from premature birth or abortion were used for the histological sections, and the slides were prepared for hematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemistry. The slides were labeled with numbers in order to preserve patient anonymity. The result of HE staining revealed inflammatory disorders in eight placentas and *L.m.* was identified by IHC in five of them. The aim of the second experiment was to identify *L.m.* in the brain tissue of ruminants by employing the technique implemented in the pilot scheme. The material used in this study was provided by the Division of Veterinary Pathology of the Department of Pathology of Universidade Federal de Santa Maria. The animals studied (2 sheep, 1 goat and 2 cows) exhibited several clinical suspicions and the necropsy results were suggestive of the disease. The five cases were confirmed by IHC, highlighting the importance of this technique to the diagnosis of listeriosis in the CNS of ruminants. The aim of the third experiment was to identify *L.m.* in placentas and abortion specimens that had been referred to the Division of Pathology of HCPA in year 2000. As with the first experiment, the slides were numbered. After surveying the registries of pathoanatomical exams (PAs), we noted that 714 PAs corresponded to placentas, obtained from abortion, premature delivery and full-term birth, examined during that period. Two hundred fifty-

four PAs were randomly selected (drawn out) for HE staining, and 148 of these PAs showed evidence of inflammatory disorders (chorioamnionitis, villitis and deciduitis). The blocks of these placentas were used for preparing the slides and carrying out IHC. The analysis of medical records in the cases with inflammatory disorders allowed us to observe that one of the records contained bacteriological confirmation of *L.m.* in the placenta (positive control). The negative control was chosen among the drawn-out PAs that did not present inflammatory disorders. *L. m.* was detected in 33.78% of the placentas analyzed by IHC. Chorioamnionitis and villitis showed significant statistical difference in the positive placentas. *L. m.* occurred in the 1st, 2nd and 3rd trimesters of pregnancy. The age of pregnant women, the cases of abortion and/or premature births were not statistically different as to the presence or absence of *L. m.* in the placentas. Habitual abortions occurred in patients with or without *L. m.* in the placental tissue. Conclusion: Immunohistochemistry may be used to confirm the histopathological diagnosis of listeriosis in placentas and brain tissue of ruminants.

Key words: *Listeria monocytogenes*. Immunohistochemistry. Abortion. Encephalitis.  
Ruminants.

## **CURRICULUM VITAE**

### **JUSSARA PIRES SCHWAB**

Médica Veterinária

CRMV - 1 - 1503

Rua Cel. Bordini, 1180/31, Bairro Moinhos de Vento

CEP 90440-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Fone (51) 3333.2507 e 9907.0122

E-mail: [jpschwab@orion.ufrgs.br](mailto:jpschwab@orion.ufrgs.br)

### **GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 1976

### **ESPECIALIZAÇÃO EM METODOLOGIA DO ENSINO SUPERIOR**

Faculdade de Educação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 1978

### **MESTRADO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 1994

### **DOCTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Área de Patobiologia ligada à Veterinária

Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 2003.

## **EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL**

### **Clínica Veterinária Zona Sul**

Atendimento clínico e cirúrgico a pequenos animais de 1978 a 1990. Porto Alegre/ RS.

### **Professora na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Disciplina de Inspeção e Tecnologia de Leite, Derivados, Ovos e Mel

A partir de 1976.