



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**LISTERIOSIS EN RUMIANTES EN URUGUAY:
CARACTERIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD Y CREACIÓN DE
UN BANCO DE CEPAS DE *Listeria* SPP.**

Carolina MATTO ROMERO, DCV, MS

TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2023**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**LISTERIOSIS EN RUMIANTES EN URUGUAY:
CARACTERIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD Y CREACIÓN DE
UN BANCO DE CEPAS DE *Listeria* SPP.**

Carolina MATTO ROMERO, DCV, MS

**Rodolfo Rivero, MS
Director de Tesis**

**Gustavo Varela, PhD
Co-director**

**Ruben E. Gianneechini, MS
Co-director**

2023

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Pablo Zunino; DMV, MS, PhD

Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable”

Ministerio de Educación y Cultura – Uruguay

Franklin Riet-Correa; DMV, MS, PhD

Universidad Federal de Bahía - Brasil

Rodrigo Puentes; DCV, MS, PhD

Facultad de Veterinaria

Universidad de la República - Uruguay

2023



Centro de Posgrados
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE DOCTORADO

ORIENTACIÓN: Salud animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 1/11/2023, Aula 102 Fvet

TRIBUNAL: Pablo Zunino, Rodrigo Puentes, Franklin Riet-Correa

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4299346-5	Matto, Carolina	S.S.S.	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

TRIBUNAL

FIRMA

Pablo Zunino

Franklin Riet-Correa

Rodrigo Puentes



Centro de Posgrados
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

Montevideo, 1 de noviembre de 2023

En el día de la fecha, este tribunal juzgó el trabajo de Tesis de Doctorado “Listeriosis en rumiantes en Uruguay: caracterización de la enfermedad y creación de un banco de cepas de *Listeria* spp.”, presentado y defendido por la estudiante Carolina Matto.

La Tesis presentada refleja un muy importante volumen de trabajo. Durante su desarrollo se aborda un tema de relevancia para la Salud a través de la integración de conocimientos y diversas aproximaciones experimentales.

El documento escrito incluyó una perspectiva general del trabajo, así como tres artículos publicados y otro por ser enviado.

La presentación oral fue muy clara y la estudiante respondió con solvencia las preguntas formuladas por el Tribunal.

En base a estas consideraciones, este Tribunal otorga la máxima calificación de 12 (SSS).

TRIBUNAL

FIRMA

Pablo Zunino

Franklin Riet-Correa

Rodrigo Puentes

La investigación que da origen a los resultados presentados en esta Tesis de Doctorado recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) en el llamado a Becas para Posgrados Nacionales identificado como POS_NAC_2019_1_157866

Este trabajo fue financiado parcialmente por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) en el Fondo Sectorial de Salud Animal identificado como FSSA_1_2019_1_160057

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a mis Tutores: Rodolfo, Gustavo y Edgardo por el tiempo brindado y acompañarme permanentemente a lo largo del trabajo, así como su apoyo académico y humano durante estos años.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el apoyo económico para la realización de mi Doctorado, a través de la beca para Posgrados Nacionales (POS-NAC-2019-1-157866).

Al programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria-Universidad de la Republica por permitirme la formación académica y científica, herramienta que espero pueda utilizar para poder aportar conocimiento y valor a la sociedad.

Al Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene-Facultad de Medicina-Universidad de la República por la confianza, así como el apoyo técnico y científico que he recibido en estos años de trabajo en conjunto y, muy especialmente a todos/as las personas que allí se desempeñan. Entre ellos, quiero destacar a Valeria Braga, Maria Inés Mota y Bruno D'Alessandro.

A la División Laboratorios Veterinarios (DILAVE) “Miguel C. Rubino” por brindarme formación académica y científica, aportar recursos e infraestructura para la realización de los diferentes trabajos que forman parte de esta Tesis. Particularmente, quiero agradecer a mis compañeros del Laboratorio Regional Noroeste por los aportes realizados a este trabajo, calidez humana y compañerismo: Víctor Rodríguez, Marcos Schanzembach, Yesica López, Lucía Grille, Pablo Parodi, Adriana Zabala, Emiliano Rivas, Rosina López, Ana Layera, Florencia Buroni, Marcelo Bottino y Pamela Freire.

Por último, pero no por ello menos importante, quiero agradecer a mi familia y amigos por el apoyo incondicional, los buenos deseos y el empuje para seguir adelante.

En particular quiero agradecer a mis padres Néstor y Mary por darme lo mejor de sí, acompañarme y estar presente en cada paso de mi vida. A Martín por el sostén, la paciencia y la buena onda y a nuestros hijos Gaspar y Manuela por su luz y alegría, motor para alcanzar este objetivo.

INDICE

RESUMEN GENERAL	10
GENERAL SUMMARY	12
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	13
CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS.....	18
ANEXOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	20
CONSIDERACIONES GENERALES:.....	20
I. DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO:	20
Histopatología (Publicaciones I, II, III y IV):	20
Inmunohistoquímica (Publicación I):	20
II. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO (Publicaciones I, II, III, IV):	21
III. DIAGNÓSTICO MOLECULAR (Publicaciones I, II, III, IV):	21
Presencia del gen que codifica Internalina A:	21
Determinación del perfil de serotipo en <i>L. monocytogenes</i> :	21
IV. SECUENCIACIÓN GENÓMICA (Publicación II):	22
V. MUESTREO DE UN RODEO DE BOVINOS Y DEL AMBIENTE (Publicación I):	23
VI. FORMACIÓN DEL BANCO DE CEPAS DE <i>Listeria</i> sp.	24
RESULTADOS GENERALES	25
DISCUSIÓN GENERAL	28
CONCLUSIONES GENERALES	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

RESUMEN GENERAL

Listeriosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por bacterias del género *Listeria* y dentro de este, principalmente por *Listeria monocytogenes*. Si bien ha sido reportada en varias especies animales, afecta fundamentalmente a los seres humanos y rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos). En seres humanos es sobre todo una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) asociada al consumo de productos de origen animal, de baja morbilidad en individuos sanos, pero alta letalidad en grupos de riesgo. En los rumiantes, la bibliografía menciona que los ovinos son la especie más susceptible, que la enfermedad se presenta en casos individuales o colectivos, está asociada al consumo de alimentos ensilados y la forma nerviosa (neurolisteriosis) es la manifestación clínica más frecuente. En Uruguay existen varios reportes de casos en rumiantes basados únicamente en el diagnóstico histopatológico. Solo un trabajo previo incluyó el cultivo microbiológico de *Listeria*, pero con escaso éxito en el aislamiento. Además, no hay ninguna investigación local que haya descrito la epidemiología de la enfermedad, con lo cual, la información acerca de esta patología es escasa. El objetivo de este trabajo de Tesis fue realizar un análisis descriptivo de una serie de casos de listeriosis en rumiantes en Uruguay, partiendo de un diagnóstico realizado mediante técnicas de patología, microbiología tradicional y métodos moleculares. Para ello, se utilizaron las muestras de bovinos y pequeños rumiantes con sospecha clínica de padecer listeriosis, remitidas al Laboratorio Regional Noroeste de la DILAVE “Miguel C. Rubino” entre los años 2014 y 2021 inclusive. Se diagnosticaron 20 casos de listeriosis, 11 ocurrieron en bovinos (10 correspondieron a la forma nerviosa de la enfermedad y uno a un aborto de tercer tercio de gestación) y nueve en pequeños rumiantes (todos correspondientes a la forma nerviosa). La enfermedad se presentó principalmente en primavera y en menor proporción en invierno (75% y 25% de los casos, respectivamente), afectando a animales adultos (mayores a dos años) sobre todo en casos individuales, tanto a nivel de sistemas ganaderos extensivos como lecheros y sistemas de producción ovina. Otro dato relevante fue que el 45% de los casos en bovinos y el 77,7% en pequeños rumiantes no tenían antecedentes de consumo de alimentos ensilados. El abordaje del diagnóstico utilizando la patología, bacteriología y técnicas moleculares fue congruente y aportó información nueva sobre la enfermedad. En primer lugar, en la histopatología en los casos de neurolisteriosis se observó meningoencefalitis supurativa con microabscesos en el tronco encefálico, y en el feto abortado hepatitis y nefritis necrosupurativa, lesiones características de la enfermedad en rumiantes. En segundo lugar, de los 20 casos estudiados en 18 hubo recuperación bacteriana (90%), donde *Listeria monocytogenes* se aisló en 15 casos y *Listeria innocua* en 3 casos, mientras que solo en dos no hubo recuperación de estos agentes. El hecho de haber aislado *L. innocua* en tres casos de neurolisteriosis es destacado, ya que existen solo dos reportes previos en la literatura científica. Otro resultado relevante fue la detección de vacas clínicamente sanas que excretaban *L. monocytogenes* y *L. innocua* en materia fecal, lo que constituye una fuente de mantenimiento y dispersión del agente en el ambiente de los predios agropecuarios. Los serotipos de *L. monocytogenes* 4b, 1/2b y 1/2a recuperados tanto de casos clínicos como de animales excretores, correspondieron a los más frecuentemente reportados en casos humanos y animales a nivel mundial. Todos los aislamientos de *L. monocytogenes* portaban el gen que codifica la internalina A, uno de los principales factores de virulencia de esta especie. Sin embargo, ninguno de los aislamientos de *L. innocua* lo poseía, incluyendo los recuperados de animales enfermos. En la secuenciación completa del genoma realizado a los dos primeros aislamientos de *L. innocua* recuperados de casos clínicos, se observó que ambos eran genéticamente muy próximos y que portaban genes de

virulencia de *L. monocytogenes* llamados “menores”. Los resultados de este trabajo de Tesis, plasmados en tres publicaciones científicas arbitradas y un manuscrito a publicar, han aportado información nueva sobre la enfermedad en rumiantes y el posible rol que estos tienen como fuente potencial de contaminación de productos alimenticios de origen animal. Con lo cual, estos resultados indican que sería conveniente realizar una vigilancia activa de los casos de listeriosis en rumiantes, para disponer de un número mayor de cepas y profundizar en su estudio molecular, a fin de avanzar en su caracterización, estableciendo su linaje, relacionamiento epidemiológico, y factores de virulencia, que permitan elaborar y evaluar medidas específicas de control.

GENERAL SUMMARY

Listeriosis is an infectious disease caused by bacteria of the genus *Listeria*, being *Listeria monocytogenes* the most important specie among them. Although the disease had been reported in many species, it affects mainly humans and ruminants (cattle, sheep and goats). In humans is a foodborne disease, associated frequently to the consume of animal-origin food, of low morbidity in healthy individuals but of high lethality in at-risk groups. In ruminants, the scientific literature mentions that sheep is the most susceptible specie, the disease can occur as single cases or outbreaks, it is associated to silage feeding and the nervous form (neurolisteriosis) is the most frequent clinical manifestation. In Uruguay there are many reports of the disease in ruminants in which the diagnose is based only in histopathology. There was only one previous report that included bacteriological culture of *Listeria*, but the success in the isolation was low. Furthermore, until now there is not any local investigation that described the epidemiology of the disease so, the information about this pathology is scarce. The aim of this Thesis was to make a descriptive analysis of a case series of listeriosis in ruminants in Uruguay, through a diagnose that included pathology, bacteriology and molecular methods. Samples of cattle and small ruminants with clinical suspects of listeriosis sent to the Laboratorio Regional Noroeste DILAVE “Miguel C. Rubino” between 2014 and 2021 were used. Twenty cases of listeriosis were diagnosed, 11 cases were in cattle (10 were the nervous form of the disease and one a late-term abortion) and nine cases in small ruminants (all of them neurolisteriosis). The disease occurred in spring and less frequently in winter (75% and 25% of cases, respectively), affecting adults (2 years-old or more) mainly isolated cases, in extensive beef cattle operations as well as dairy farms and sheep farms. Another relevant finding was that 45% of cattle and 77.7% of small ruminant cases had not previous history of silage feeding. The diagnose using pathology, bacteriology and molecular methods was congruent and added new information about the disease. First, at histopathology in neurolisteriosis cases there was a suppurative meningoencephalitis with microabscesses in the brainstem, and in the aborted fetus necrosuppurative nephritis and hepatitis, characteristic lesions of the disease in ruminants. Second, of the 20 cases studied in 18 there was bacterial recovering (90%), in which *Listeria monocytogenes* was isolated in 15 cases and *Listeria innocua* in three, only in two cases there was no bacterial growth. It is noteworthy the fact of diagnosed three cases of neurolisteriosis due to *L. innocua*, because there are only two previous reports in scientific literature. Another relevant finding was the detection of clinically healthy cows that shed *L. monocytogenes* and *L. innocua* in feces, being a source of maintenance and bacterial spread in the farm environment. Serotypes of *L. monocytogenes* 4b, 1/2b and 1/2a recovered from clinical cases as well as fecal shedders, belong to the most frequent human and animal cases worldwide. All *L. monocytogenes* isolates carried the gene that encodes internalin A, one of the main virulence factors of this specie. Although, none of the *L. innocua* isolates harbor it, including those recovered from diseased animals. In the whole genome sequencing made to the first two *L. innocua* isolates, it was found out that were closely related to each other and, both carried virulence genes of *L. monocytogenes* called “minor”. The results of this Thesis, published in three scientific peer-review papers and one manuscript, bring new information about the disease in ruminants and the role that they can poses as potential source of animal-origin food products. Therefore, this results highlight the requirement to make an active surveillance of clinical cases of listeriosis in ruminants to recover more isolates, making molecular studies to have a more extensive comprehension about linages, epidemiological relationships and virulence factors, to made and asses specific control measures.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Listeriosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias de morfología cocobacilar, Gram positivo, intracelulares facultativas del género *Listeria*, principalmente *Listeria monocytogenes* y menos frecuentemente por otras especies como *L. innocua* (sobre todo las variantes atípicas beta hemolíticas), *L. ivanovii*, *L. seeligeri* o *L. grayi* (Wilesmith & Gitter 1986, Walker et al. 1994, Moura et al. 2019, Bagatella et al. 2022). La enfermedad se ha reportado en diversas especies como camélidos sudamericanos, aves, cerdos, pequeños animales, equinos y también en animales salvajes. Sin embargo, los rumiantes domésticos y los seres humanos son los hospederos más frecuentemente afectados (Low & Donachie 1997, Vázquez-Boland et al. 2001).

Con respecto a los seres humanos, la enfermedad se transmite a través del consumo de alimentos contaminados (ETA) o, verticalmente al feto/recién nacido en el caso de mujeres embarazadas/puérperas por infección transplacentaria ó contaminación durante el pasaje por el canal del parto, provocando enfermedad neonatal tardía (Vázquez-Boland et al. 2001). La enfermedad tiene una presentación clínica variable, desde una gastroenteritis febril, leve y autolimitada a cuadros invasivos severos, potencialmente mortales, como bacteriemia y meningitis en los grupos de riesgo reconocidos (adultos mayores, inmunodeprimidos, neonatos y embarazadas) (Vázquez-Boland et al. 2001; Cartwright et al. 2013). Las embarazadas al ser infectadas con *L. monocytogenes* cursan un síndrome gripal o una infección asintomática, que puede resultar en abortos, partos prematuros, infección neonatal o muerte fetal (Cartwright et al. 2013).

Como ya se mencionó, los rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos) son particularmente susceptibles a la infección (Low & Donachie 1997). La forma nerviosa (o neurolisteriosis) es la presentación clínica más común, caracterizada por depresión, anorexia, hipoalgesia de la cara, dificultades masticatorias, parálisis facial unilateral, nistagmo y marcha en círculos, entre otros signos de afectación de pares craneanos (Low & Donachie 1997, Oevermann et al. 2010a, Rissi et al. 2010a). Esta sintomatología se relaciona a que la lesión principal en el sistema nervioso central (SNC) se localiza en el tronco encefálico, provocando una meningoencefalitis supurativa con microabscesos (Oevermann et al. 2010a). El período de incubación de la forma nerviosa varía de una a siete semanas (Brugère-Picoux 2008, Oevermann et al. 2010b). Con respecto a la patogenia, esta no ha sido completamente dilucidada aún. Diversos autores proponen que *Listeria* accede a las terminales nerviosas por lesiones en las barreras mucocutáneas (principalmente ocular, oral o de tracto digestivo) y a través de los nervios mediante migración intraaxonal centripeta llega al tronco encefálico (Barlow & McGorum 1985, Oevermann et al. 2010a, Bagatella et al. 2022).

También se han reportado, otras formas clínicas severas de presentación menos frecuente, como abortos de último tercio (Brugère-Picoux 2008, Margineda et al. 2012) septicemia neonatal (Bagatella et al. 2022) y más raramente, mastitis (Fedio et al. 1990, Winter et al. 2004), o cuadros más leves como gastroenteritis (Fairley et al. 2012, García et al. 2016), dermatitis (Bagatella et al. 2022) y queratoconjuntivitis/uveítis (Low & Donachie 1997, Evans et al. 2004). En los abortos, la septicemia y la mastitis la patogenia es distinta. La bacteria ingresa al tracto gastrointestinal a través de alimentos contaminados y allí puede ocasionar un cuadro de enteritis, aunque, no está totalmente probado en modelos murinos, que la colonización de los enterocitos provoque una reacción inflamatoria (Vázquez-Boland et al. 2001, Bagatella et al.

2022). En intestino delgado, atraviesa la barrera gastrointestinal utilizando enterocitos, células M o caliciformes alcanzando la lámina propia, infectando macrófagos y células dendríticas y luego, se disemina por vía hematológica y linfática a los órganos primarios (hígado y bazo). Si la infección no es controlada por estos órganos, la bacteria se disemina por vía sanguínea a los órganos blanco secundarios: sistema nervioso central, útero gestante y mama, provocando meningitis o meningoencefalitis, infección fetoplacentaria y mastitis respectivamente (Vázquez-Boland et al. 2001, Bagatella et al. 2022).

Las lesiones oculares y de piel descritas, son de presentación esporádica y se relacionan a implantación directa de la bacteria (Evans et al 2004, Bagatella et al. 2022). Cabe destacar que, si bien no se conoce la razón, las diferentes formas clínicas de la enfermedad no se superponen en un individuo. Además, dentro de los rodeos o majadas tiende a predominar una forma clínica (Low & Donachie 1997). Actualmente se postula que no existe una predisposición por edad para la presentación de la enfermedad (Bagatella et al. 2022), ya que se han reportado casos en animales de todas las edades (Barlow & McGorum 1985, Wilesmith & Gitter 1986, Oevermann et al. 2010a).

Por otra parte, muchos trabajos han demostrado que los rumiantes sanos son portadores asintomáticos de bacterias del género *Listeria* incluyendo *L. monocytogenes*, excretándolas por materia fecal y leche (Brugère-Picoux 2008, Nightingale et al. 2004, Esteban et al. 2009). Dentro de los rumiantes, la especie bovina es la que tiene mayor prevalencia de animales portadores (Nightingale et al. 2004, Esteban et al. 2009). Este hecho se relacionaría a una mayor prevalencia de *L. monocytogenes* en el ambiente de los predios que crían y mantienen bovinos (Nightingale et al. 2005). Diferentes modelos matemáticos postulan que la prevalencia de bovinos excretores varía diariamente, alcanzando hasta el 90% de los animales en un rodeo. Además, la dinámica de la excreción estaría altamente asociada al consumo de alimentos contaminados y factores estresantes de los animales (Ivanek et al. 2007).

Este género bacteriano es capaz de tolerar un amplio margen de pH (4,5 a 9,0) y temperatura (1°C a 45°C) (Vázquez-Boland et al. 2001), por lo cual es capaz de sobrevivir en el ambiente y contaminar tanto el alimento como el agua de bebida de los animales. En ese sentido, se han recuperado especies de *Listeria* en heces de aves (Hellström et al. 2008) y animales salvajes (Lyautey et al. 2007b), diferentes recursos fluviales como lagos, arroyos o ríos (Lyautey et al. 2007, den Bakker et al. 2014, Linke et al. 2014), efluentes (principalmente saneamiento) y suelo (Linke et al. 2014). En estudios epidemiológicos realizados en tambos, la bacteria se ha recuperado a partir de alimentos y agua de bebida de los animales, cama, suelo, insectos, comederos, máquinas de ordeño, tanques de frío y filtros, efluentes y heces de aves (Borucki et al. 2004, Nightingale et al. 2004, Latorre et al. 2009, Mohammed et al. 2009, Castro et al. 2018). Estos resultados confirman la amplia difusión ambiental que tienen estas bacterias. Además, se ha reportado que en los rodeos de bovinos lecheros se observa mayor prevalencia de animales portadores asintomáticos (46,3%) que en bovinos de carne (30,6%) (Esteban et al. 2009), y que dentro de los bovinos lecheros, las vacas tienen una mayor prevalencia de portadores que los terneros (18,2% y 8,4% respectivamente) (Bandelj et al. 2018). Algunos autores mencionan también que raramente vacas, ovejas o cabras en ordeño pueden excretar *Listeria* spp. por leche, provocando en algunos casos mastitis subclínica (Fedio et al. 1990, Winter et al. 2004, Pintado et al. 2009). Este hecho es relevante ya que demuestra que la leche podría ser una fuente potencial de infección para los humanos, así como también una vía de entrada del agente a las industrias lácteas.

Con respecto a los bovinos de carne, en la bibliografía existen escasos trabajos que estudien la prevalencia de animales portadores. Esteban et al. (2009) en un muestreo en el País Vasco, España, reportaron una prevalencia de 30,6%. Mientras que Mohammed et al. (2010) en un trabajo realizado en el estado de California, Estados Unidos, mencionan una prevalencia promedio de portadores asintomáticos de 3,4% en vacas de cría y 2,5% en terneros, mientras que en feedlots fue de 0,3%. Estos autores realizaron además muestreos del ambiente de los establecimientos, encontrando que la prevalencia de *L. monocytogenes* fue significativamente mayor en predios dedicados a la cría, y dentro de estos, en las fuentes de agua (bebederos, tajamares) pasturas y/o suelo (Mohammed et al. 2010).

En el caso de los ovinos, se postula que son más sensibles a la infección por *Listeria* y por ende, enferman más frecuentemente que los bovinos (Low & Donachie 1997, Nightingale et al. 2004, Brugère-Picoux 2008). La prevalencia de ovinos portadores reportada por Esteban et al. (2009) fue de 14,2%. En predios con antecedentes de la enfermedad, estudios han detectado una presencia significativamente mayor de *L. monocytogenes* en el ambiente (alimentos, suelo y agua de bebida) que en predios sin casos de listeriosis (Nightingale et al. 2004).

En cuanto a la fuente de infección para los animales, tradicionalmente esta enfermedad se asoció al consumo de alimentos ensilados en mal estado de conservación (Wilesmith & Gitter 1986, Low & Donachie 1997, Gudmundsdottir et al. 2004, Ribeiro et al. 2006, Brugère-Picoux 2008, Margineda et al. 2012, García et al. 2016, Ribeiro et al. 2022). Sin embargo, una revisión realizada por Walland et al. (2015) estimó que hasta un tercio de los casos de listeriosis en rumiantes no tiene relación con el consumo de ensilados. En ese sentido, en países donde los rumiantes tienen su alimentación con base en pasturas como Nueva Zelanda, Argentina, Brasil y Uruguay, se han descrito casos asociados a condiciones de pastoreo (Campero et al. 2002, Guedes et al. 2007, Rissi et al. 2010c, Fairley et al. 2012, Costa et al. 2018, Dutra 2020).

Listeria monocytogenes

Se reportan 13 serotipos de *L. monocytogenes* en base a los antígenos somáticos “O” y flagelares “H” (Low & Donachie 1997). Sin embargo, más del 95% de los casos que ocurren en humanos y animales se deben a los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b (Low & Donachie 1997, Oevermann et al. 2010b, Cartwright et al. 2013). Por lo cual, para realizar estudios epidemiológicos la serotipificación no es la herramienta adecuada, sobre todo cuando las cepas pertenecen al mismo serotipo. Durante 20 años la técnica de subtipificación estándar para realizar estudios epidemiológicos fue la electroforesis de campo pulsado ó Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Datta & Burall 2018). No obstante, el desarrollo de las técnicas de secuenciación completa del genoma (WGS), aportó mejoras en la detección de brotes y en la vigilancia epidemiológica debido a su mayor poder discriminatorio (Moura et al. 2016, Datta & Burall 2018).

L. monocytogenes posee una variedad de factores de virulencia que permiten la invasión, multiplicación y dispersión intercelular a nivel de las células del sistema inmune, células no fagocíticas como hepatocitos, enterocitos o células endoteliales (Vázquez-Boland et al. 2001). Los principales factores de virulencia se organizan en el genoma en clusters llamados islas de patogenicidad (LIPI en inglés) conocidos como LIPI-1, LIPI-3 y LIPI-4 o, en loci internalina A (*inlA*). La presencia de LIPI-1 e *inlA* tienen un rol muy importante en la patogenicidad de *L. monocytogenes*. LIPI-1 está constituida por seis factores de virulencia codificados por los genes *prfA*, *plcA*,

hly, *actA*, *mpl*, *plcB*, con distintas funcionalidades que intervienen desde el escape de vacuola dentro de la célula huésped a la motilidad intracelular de la bacteria. Mientras que internalina A (InlA) es una proteína que promueve la entrada de la bacteria en las células del hospedador y media el traspaso de las barreras intestinal y placentaria, así como también la invasión del SNC (Vázquez-Boland et al. 2001).

Listeriosis en rumiantes en Uruguay

En Uruguay el primer brote de listeriosis en rumiantes se reportó en el año 1960, donde se afectaron 54 ovinos que presentaron la forma nerviosa de la enfermedad (Leaniz et al. 1960). Hasta la actualidad, se han descrito algunos casos individuales o colectivos en ovinos (Dutra 2011, 2012, 2015, Preliasco et al. 2013, Costa et al. 2018) y en bovinos (Dutra 2019, 2020). Sin embargo, estos reportes basaron su diagnóstico en las lesiones observadas en el estudio histopatológico y en algunos casos, ensayos de inmunohistoquímica, pero en ninguno se realizó cultivo y aislamiento bacteriológico para confirmar la etiología. Por otra parte, en un estudio retrospectivo entre 1999 y 2011 en la sección Patología del Laboratorio Central “Miguel C. Rubino” se notificaron 12 casos de listeriosis en bovinos. Los mismos se presentaron de forma esporádica a lo largo del periodo estudiado y, se reportó que la mayoría ocurrió en los meses de invierno y primavera (Easton et al. 2012).

Posteriormente, en el marco de la tesis de Maestría en Salud Animal, Matto et al. (2017) reportaron un caso de listeriosis por *L. monocytogenes* en un bovino de un predio lechero mediante el diagnóstico patológico y el aislamiento del agente en SNC. En ese trabajo, se realizó un estudio ambiental del predio y del rodeo, donde el principal resultado obtenido fue que la pastura donde se encontraba el animal enfermo fue la potencial fuente de infección. Por otra parte, además, se registró la presencia de vacas secas y vacas en ordeño clínicamente sanas que excretaban *Listeria innocua* en sus heces (Matto et al. 2017). En el segundo trabajo que forma parte de la tesis de Maestría, se realizó un estudio ambiental y del rodeo de bovinos en ordeño en diez tambos del Departamento de Paysandú (Uruguay) (Matto et al. 2018). Se detectó la presencia de *Listeria* spp. en materia fecal de vacas en ordeño, en distintos alimentos consumidos por los animales (ensilados, pasturas, heno) y en el suelo de la periferia de las salas de ordeño y particularmente, *L. monocytogenes* en materia fecal de vacas y en una pastura implantada (Matto et al. 2018).

CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

En la región que abarca Brasil, Argentina y Uruguay la listeriosis es una de las enfermedades neurológicas más importantes de los rumiantes (Sanches et al. 2000, Rissi et al. 2010a,b,c, Easton et al. 2012, Späth, & Becker 2012). Existen en la bibliografía muchos reportes de la enfermedad en bovinos (Campero et al. 2002, Galiza et al. 2010, Easton et al. 2012, Margineda et al. 2012, Dutra 2019, 2020), ovinos (Campero et al. 2002, Ribeiro et al. 2006, Rissi et al. 2010b,c, Dutra 2012, 2015, Konradt et al. 2017, Canton et al. 2018, Costa et al. 2018, Ribeiro et al. 2022) así como también en caprinos (Rissi et al. 2006, Guedes et al. 2007, Headley et al. 2013, Konradt et al. 2017). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos basan el diagnóstico en las lesiones histopatológicas y algunos de ellos incluyen inmunohistoquímica.

De todos los reportes mencionados en el párrafo anterior, solo unos pocos han realizado el cultivo y aislamiento de *Listeria*. En todos estos trabajos la cantidad de materiales cultivados que recuperaron colonias de *Listeria* fue bajo: Easton et al. (2012) reportaron dos cultivos positivos en 12 casos (17%); Konradt et al. (2017) nueve cultivos positivos en 19 muestras (47%); Margineda et al. (2012) tres cultivos positivos en siete muestras (43%), y Campero et al. (2002) 10 cultivos positivos en 17 muestras (59%). Otros trabajos tuvieron aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de casos individuales en rumiantes (Ribeiro et al. 2006, Konradt et al. 2017, Canton et al. 2018) pero no caracterizaron los aislamientos.

En Uruguay hasta ahora no hay un análisis descriptivo pormenorizado de la enfermedad en rumiantes, donde se describan sus formas clínicas, especies y categorías de los animales afectados, frecuencia de la enfermedad en los distintos sistemas de producción, estacionalidad, y tipo de alimentación, entre otros. Como ya se mencionó en la sección anterior, la mayoría de los casos reportados no tienen aislamiento de *Listeria* sp. y por ende, no se conoce qué especie está provocando enfermedad en los rumiantes. El aislamiento bacteriano es importante para complementar el estudio de esta enfermedad, ya que en primer lugar, permite determinar qué especie de *Listeria* está ocasionando el cuadro clínico y realizar otros estudios de laboratorio como: ensayos de virulencia, caracterización y comparación genética de las cepas circulantes, detección de fenotipos y genotipos de resistencia, entre otros. Sumado a lo mencionado hasta ahora, para conocer mejor la epidemiología de la listeriosis en rumiantes a pastoreo, es necesario también realizar estudios en el ambiente de los predios. Esto posibilitaría determinar las posibles fuentes de infección para los animales (pasturas, ensilados, raciones, agua de bebida, entre otros) como ha sido reportado por otros trabajos científicos, principalmente en sistemas productivos del hemisferio norte (Gudmundsdottir et al. 2004, Nightingale et al. 2004, Dreyer et al. 2015). Por lo tanto, al combinar la información de los aislamientos de casos clínicos con los aislamientos recuperados del ambiente de los predios agropecuarios, mediante herramientas moleculares altamente discriminatorias, se podría establecer el vínculo epidemiológico de los casos o brotes.

HIPÓTESIS

Para profundizar en el conocimiento de la listeriosis en rumiantes en Uruguay pueden utilizarse múltiples técnicas diagnósticas como: patología, bacteriología y herramientas moleculares.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Realizar un análisis descriptivo de una serie de casos de listeriosis en rumiantes en Uruguay y caracterizar los aislamientos de *Listeria* spp. recuperados, utilizando técnicas de histopatología, inmunohistoquímica, microbiología tradicional y métodos moleculares.

Objetivos específicos:

1. Describir las principales características epidemiológicas de la enfermedad: especie y categoría de los animales afectados, estimación de la morbilidad y letalidad, momento del año en que se presenta, ubicación y giro productivo de los predios afectados, entre otros.
2. Describir la sintomatología, las lesiones macroscópicas e histológicas observadas en los casos de listeriosis analizados.
3. Obtener mediante cultivo y aislamiento microbiológico cepas de *Listeria* spp. de casos con diagnóstico clínico de listeriosis. Caracterizar los aislamientos en cuanto a: serotipo, presencia del gen que codifica internalina A (*inlA*) y en aquellos cultivos que lo ameriten, secuenciación completa del genoma.
4. Crear y mantener un banco de cepas del género *Listeria* a partir de los aislamientos obtenidos.

ANEXOS

Esta tesis está basada en los siguientes cuatro trabajos, a los que se referirá por su número romano.

- I. Matto, C.; Rodriguez, V.; Giles, M.; Varela, G.; Braga, V.; Mota, M.I.; Vico, V.; Adrien, M.L.; Gianneechini, E.; Rivero, R. 2019. Detección de *Listeria monocytogenes* en un rodeo de bovinos de carne en el que previamente ocurrió un caso clínico de listeriosis nerviosa. *Veterinaria* (Montevideo) 211 (3): 14-20.
- II. Matto, C.; D'Alessandro, B.; Mota, M.I.; Braga, V.; Buschiazzo, A.; Gianneechini, E.; Varela, G.; Rivero R. 2022. *Listeria innocua* isolated from diseased ruminants harbour minor virulence genes of *L. monocytogenes*. *Vet. Med. Sci.* 8 (2): 735-740.
- III. Matto, C.; Gianneechini, R.E.; Rodríguez, V.; Schanzembach, M.A.; Braga, V.; Mota, M.I.; Rivero, R.; Varela, G. 2023. *Listeria innocua* and serotypes of *Listeria monocytogenes* isolated from clinical cases in small ruminants in the northwest of Uruguay. *Pesq. Vet. Bras.* 43: e07174.
- IV. Matto, C.; Mota, M.I.; D'Alessandro, B.; Gianneechini, R.E.; Rodríguez, V.; Schanzembach, M.A.; Braga, V.; Rivero, R.; Varela, G. 2023. Listeriosis en bovinos en Uruguay: epidemiología, formas clínicas y aislamientos recuperados en ocho años de estudio. Manuscrito.

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

CONSIDERACIONES GENERALES:

Para los trabajos (publicaciones I, II, III y IV) se utilizaron las muestras de bovinos y pequeños rumiantes con sospecha clínica de padecer listeriosis, remitidas al Laboratorio Regional Noroeste de la DILAVE “Miguel C. Rubino” entre los años 2014 y 2021 inclusive.

Se incluyeron los casos que cumplieron con los siguientes criterios: presencia de signos clínicos compatibles con cuadros de listeriosis (signos nerviosos, abortos de último tercio, muertes perinatales), y, que hubieran remitido órganos fijados en formol bufferado al 10% y órganos refrigerados. Aquellos casos que remitieron únicamente material fijado en formol fueron excluidos de este estudio.

Con respecto a los fetos sólo se incluyeron aquellos especímenes que en la necropsia presentaron lesiones macroscópicas a nivel de hígado (áreas pequeñas, redondeadas, de color blanco o amarillento de distribución multifocal) sugestivas de un aborto por *Listeria* (Schlafer & Foster 2016).

Por último, todos los casos incluidos en los diferentes trabajos poseían la siguiente información: especie y categoría animal, ubicación del predio donde ocurrieron los casos, signos clínicos, tipo de alimentación, número de animales enfermos y muertos y total en riesgo.

I. DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO:

El encéfalo o sistema nervioso central (SNC), constituido por los dos hemisferios cerebrales, cerebelo y tronco encefálico se seccionó longitudinalmente en dos mitades (ambas incluían las tres áreas mencionadas). Una de las mitades se sumergió completamente en formol bufferado al 10% para estudios de histopatología y la otra mitad, se mantuvo refrigerada a 4°C para cultivo y aislamiento bacteriológico.

Muestras de las diferentes vísceras colectadas de los fetos también se fijaron en formol bufferado al 10%. La histopatología se realizó en el Laboratorio de Patobiología del Laboratorio Central de DILAVE (Montevideo).

Histopatología (Publicaciones I, II, III y IV):

Cuarenta y ocho horas después de que el SNC o las vísceras fetales se encontraban sumergidas en formol bufferado al 10%, se retiraron del fijador. Se realizaron cortes seriados de diferentes áreas del SNC incluyendo corteza cerebral frontal, temporal y occipital, ganglio basal, tálamo, mesencéfalo, cerebelo, puente, médula oblonga y medula espinal cervical. En vísceras fetales se tomaron cortes de hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón, timo, piel, lengua y SNC. Estas piezas fueron deshidratadas mediante pasajes seriados por alcoholes de graduación creciente, xileno y fueron embebidas en parafina, para ser luego cortadas a 5 µm de espesor y coloreadas con Hematoxilina-Eosina (HE) según protocolo de la Armed Forces Institute of Pathology (AFIP 1995).

Inmunohistoquímica (Publicación I):

Se realizó según el protocolo descrito por Easton et al. (2012). Se utilizaron bloques parafinados de medula oblonga y puente. Se realizaron nuevos cortes de 5 µm de espesor, se desparafinaron mediante pasajes sucesivos en xileno y alcoholes de graduación decreciente. Luego se sumergieron en peróxido de hidrógeno al 10% en

metanol durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se sumergieron en leche descremada al 5% por 25 minutos. Se lavaron nuevamente y se incubaron con el anticuerpo primario *Listeria* O antisuero poliserotipo 1 y 4 (Difco®) a una dilución de 1/200 durante una hora a 37°C. Luego se incubaron con el anticuerpo anti-conejo secundario (LSAB) (Dako®) 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente y se sumergieron en Streptavidina-Peroxidasa de rábano picante (HRP) (Dako®) otros 20 minutos a temperatura ambiente. Para el revelado de la reacción se incubaron las láminas con solución cromógena DAB (Dako®) durante 5 a 10 minutos y como coloración de contraste se utilizó Hematoxilina de Harris. Los cortes se deshidrataron mediante pasajes seriados por alcoholes de graduación creciente, xileno y se montaron para su observación al microscopio.

II. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO (Publicaciones I, II, III, IV):

La otra mitad del SNC, muestras de pulmón e hígado fetal conservadas a 4°C, fueron asépticamente trozadas y se sumergieron en 225 mL de caldo Buffered *Listeria* Enrichment Broth (BLEB) (Oxoid®) durante 48 horas a 30°C en aerobiosis. A las 24 y 48 horas, se tomaron muestras de 100 µL de caldo y se sembraron en una placa de Modified Oxford Agar (MOX) (Oxoid®) (Hitchins et al. 2020). Las placas fueron incubadas en aerobiosis a 35°C, chequeando el desarrollo de colonias a las 24 y 48 horas. Aquellas colonias sospechosas de *Listeria*, pequeñas, oscuras, rodeadas por un halo negro, fueron transferidas a una placa de agar sangre ovina al 5% (ASO-5%). Para determinar la especie se realizó: tinción de Gram, prueba de la catalasa e hidrólisis de esculina y fermentación de xilosa, manitol, glucosa y rhamnosa. Se verificó además la producción o no de β-hemólisis en la placa de ASO-5% y, se realizó el test de CAMP en placa de ASO-5% con *Staphylococcus aureus* productor de β-lisina y *Rhodococcus equi* (Hitchins et al. 2020, Carlin et al. 2021).

Los aislamientos que se tipificaron como *Listeria* spp. fueron remitidos al Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina, Universidad de la República.

III. DIAGNÓSTICO MOLECULAR (Publicaciones I, II, III, IV):

Presencia del gen que codifica Internalina A:

Se realizó por PCR según protocolo de Liu et al. (2007). Se utilizaron los siguientes cebadores: 5'ACGAGTAACGGGACAAATGC3' y 5'CCCGACAGTGGTGCTAGATT3' (800bp) (Liu et al. 2007). La PCR se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 0.8 U de Taq DNA polimerasa, buffer de PCR 1×, 200 µM de cada dNTP y aproximadamente 10 ng de ADN bacteriano junto a 40 pmol de cada cebador para *inlA*. Las reacciones de amplificación se realizaron en termociclador (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems®), el programa consistió en 1 ciclo de 94 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos y 72 °C por 50 segundos; y 1 ciclo de 72 °C por 2 minutos. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 0.5X y posteriormente revelados con bromuro de etidio.

Determinación del perfil de serotipo en *L. monocytogenes*:

Posteriormente, en los aislamientos de *L. monocytogenes* se realizó determinación del perfil de serotipo mediante PCR múltiple según técnica descrita por Doumith et al. (2004).

Para la extracción de ADN las cepas se sembraron en placas de agar infusión cerebro corazón (BHIA) y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Se tomaron 3 a 5 colonias de un cultivo puro con ansa descartable y se resuspendieron en 50 µL de solución de lisis (dodecil sulfato de sodio al 0,25% y NaOH 0,05 N). La suspensión se incubó a 99°C durante 15 minutos, se agregaron 100 µL de agua ultrapura tipo MilliQ a cada tubo y se centrifugaron a 12.000 rpm por 10 minutos. Cada sobrenadante se conservó a -20°C hasta su utilización como molde (2 µL) en las distintas reacciones de amplificación. Como controles se incluyeron las siguientes cepas de referencia: *L. monocytogenes* serotipo 1/2a (CIP 89381), *L. monocytogenes* serotipo 1/2b (CIP 90602), *L. monocytogenes* 1/2c (CIP 89756) y *L. monocytogenes* serotipo 4b (CIP 88868).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µL conteniendo 1,25 U de Taq DNA polimerasa, 0.2 mM de cada dinucleótido trifosfatado (dNTP), y 50 mM Tris-HCl–10 mM K Cl–50 mM (NH₄)₂SO₄ –2 mM MgCl₂ por tubo, a pH 8,3. Los cinco sets de *primers* se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: 1 µM para el *L. monocytogenes* o0737, ORF2819 y ORF2110; 1.5 µM para *L. monocytogenes* o1118; y 0.2 µM para *prs*. Para las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems®) y el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos; seguido por 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 53°C por 75 segundos y 72°C por 75 segundos cada uno; con un ciclo de extensión final de 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR se separaron por electroforesis sumergida en geles de agarosa al 2%. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 100V y 40 mA en buffer TBE 0,5X (90 mM base Trizma, 90 mM ácido bórico y 2 mM EDTA a pH 8.3) durante al menos 1 hora. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0,5 µL/mL) durante 15 minutos, se destiñeron con agua destilada durante 20 minutos, se observaron con luz ultravioleta y se fotografiaron.

IV. SECUENCIACIÓN GENÓMICA (Publicación II):

La extracción del ADN bacteriano se realizó con el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®). De un cultivo overnight en agar infusión cerebro corazón (BHIA) se resuspendió un ansa de cultivo puro en 180 µL de buffer de lisis enzimática (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, Triton 1,2%, lisozima 20mg/mL) incubándose a 56°C por 30 minutos. Se trató por 5 minutos a temperatura ambiente con 4 µL de RNAsa 100 µg/mL y luego con proteinasa K y buffer AL durante 30 minutos a 56°C. Se precipitó con 200 µL de etanol ppa.

Para la purificación y elución del ADN, se transfirió la mezcla obtenida del paso anterior a un set de columnas DNAeasy spin con tubos colectores de 2 mL. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto y se descartó el tubo colector. Se colocó la columna en un nuevo tubo colector, y se agregó 500 µL de buffer AW1. Se realizó una segunda centrifugación a la misma velocidad, se colocó la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL y se agregó 500 µL de buffer AW2. Por último, se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos. Se descartó el tubo colector, se colocó la columna en un nuevo tubo y se agregó 100 µL de buffer AE a la columna. Se incubó por 3 a 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 rpm durante 1 minuto.

Para chequear el resultado de la extracción de ADN se corrieron 5 µL del eluido en gel de agarosa al 1% en TBE 0,5X durante 60 minutos a 156 voltios, 30 mAmp con un marcador de peso molecular de 1,5 a 10 kb. Se visualizó el gel con tinción por bromuro de etidio, empleando las condiciones descritas anteriormente.

La secuenciación de los dos primeros aislamientos de *L. innocua* se realizó en Macrogen (Corea del Sur) utilizando un equipo Illumina MiSeq platform con el TruSeq Nano library kit. El ensamblado del genoma se realizó utilizando el software SPAdes (version 3.13.1) (Prjibelski et al. 2020) con los siguientes settings: -k 21,33,55,77 --careful --only-assembler --cov-cutoff 'auto'. En primer lugar, para verificar si ambos genomas correspondían efectivamente a *L. innocua*, se utilizó la herramienta “Average Nucleotide Identity” (ANIb, <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) (Rodriguez-R & Konstantinidis 2014), utilizando como genoma de referencia el Clip11262 (NCBI accession NC_003212.1). En segundo lugar, se estudió el relacionamiento filogenético entre ambos aislamientos y además, se compararon con otros 12 genomas de *L. innocua* disponibles en la base de datos pública del NCBI Genome Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>). Para ello, se utilizó el Enterobase Tool Kit (EToKi) pipeline (Zhou et al. 2020). Primero se corrió el módulo de alineación utilizando la secuencia de la cepa Clip11262 como referencia, con las siguientes opciones: -a- y -c 1. Luego, realizar la filogenia sobre el archivo de salida se utilizó el software RAxML-NG (version 0.9.0) (Kozlov et al. 2019) con las siguientes opciones: --model GTR+G, --seed 3 y --bs-metric fbp. Utilizando esta configuración el bootstrapping convergió después de 550 réplicas. Los valores del árbol fueron representados según el mejor valor para la probabilidad estimada. Por último, el análisis de las secuencias de ambos aislamientos se focalizó en determinar la presencia de genes de virulencia. Se utilizó el software ABRicate version 1.0.1 (<https://github.com/tseemann/abricate>) con los siguientes parámetros: $\geq 80\%$ identidad de secuencia y $\geq 80\%$ cobertura secuencia. Se utilizó el dataset de la base Virulence Finder Database 2.0 (VFDB) (última actualización en Abril 2020), este dataset solo contiene genes de factores de virulencia que han sido verificados experimentalmente (Liu et al. 2019). En todos los genes encontrados utilizando este método, se realizó un curado manual verificando la presencia de codones de parada prematuros y secuencias parciales.

V. MUESTREO DE UN RODEO DE BOVINOS Y DEL AMBIENTE (Publicación I):

Para el cálculo de la cantidad de animales que se debían analizar para detectar portadores asintomáticos, se utilizó la fórmula de Dohoo et al. (2003):

$$n = (1 - (1 - \alpha)^{1/D}) \times (N - (D - 1) \div 2).$$

Donde α corresponde a (1- intervalo de confianza), D a la prevalencia mínima esperada en la población/rodeo y N a la totalidad del rodeo problema (70 animales). En base a la bibliografía (Nightingale et al. 2004; Esteban et al. 2009) se asumió que la prevalencia de portadores en el rodeo (D en este caso) era del 10%, con un intervalo de confianza de 95% (o 0,95) y que la sensibilidad de la prueba utilizada (cultivo en este caso) era del 90%, obteniéndose un número (n) de 27 animales a muestrear. La elección de las vacas fue aleatoria. La materia fecal se tomó del recto de cada animal con guante individual y se depositó en bolsas plásticas estériles individuales.

Se tomó una muestra de 500 mL de agua del arroyo que corría por el potrero. Se colectaron dos muestras de pastura (campo natural) del potrero donde se encontraba el rodeo de vacas. Para la toma de muestras, se recorrió el potrero, colectando el forraje en 10 puntos distintos determinados aleatoriamente. Cada muestra fue identificada y se mantuvo refrigerada en conservadoras a 4°C durante 4 horas hasta su procesamiento en el laboratorio.

El procesamiento se realizó en base a protocolos de Nightingale et al. (2004) y USDA-FSIS (2019). Se pesaron 25 g de material fecal de cada animal y 25 g de pastura. La muestra de agua se filtró asépticamente, y se utilizó para cultivo el filtro de celulosa. A cada muestra se le agregó 225 mL de medio líquido *Listeria* Enrichment Broth (*Listeria* UVM I, Oxoid®) y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Luego se transfirió 100 µL del caldo a 10 mL de caldo de enriquecimiento *Listeria* UVM II (Oxoid®) y se incubó otras 24 horas a 30°C. Posteriormente, se sembraron 100 µL en una placa de Agar Oxford Modificado (MOX) (Oxoid®) que permaneció en estufa 48 horas a 35°C. Las placas fueron incubadas en aerobiosis a 35°C, chequeando el desarrollo de colonias a las 24 y 48 horas. Las colonias sospechosas, oscuras, pequeñas, rodeadas por un halo negro fueron reaisladas y se siguió la metodología mencionada en el punto II.

VI. FORMACIÓN DEL BANCO DE CEPAS DE *Listeria* sp.

Todos los aislamientos identificados como *Listeria* sp. se inocularon en un vial de 1,5 ml de caldo soja tripticasa (TSB) con glicerol al 30%, para su conservación por congelación a -80°C. Las cepas fueron almacenadas por duplicado en ultrafreezers ubicados en el Laboratorio Regional Noroeste (Paysandú) y en el laboratorio de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene (UdelaR) (Montevideo).

RESULTADOS GENERALES

En la Tabla 1 se presentan todos los casos estudiados durante el desarrollo de la Tesis de Doctorado, que fueron incluidos en los diferentes trabajos que la integran.

En primer lugar, como principal resultado, se diagnosticaron 20 casos de listeriosis en bovinos, ovinos y caprinos. Once ocurrieron en bovinos, 10 correspondieron a la forma nerviosa de la enfermedad y uno a un aborto de tercer tercio de gestación (publicación IV). Mientras que, en pequeños rumiantes se registraron nueve casos de la forma nerviosa de la enfermedad (publicación III). Aparte de los casos mencionados, tres casos en bovinos y dos en ovinos, quedaron excluidos de este trabajo por remitir únicamente órganos fijados en formol al 10%.

Se observó una clara estacionalidad en la presentación de listeriosis tanto en bovinos como pequeños rumiantes, siendo la primavera la estación del año con más casos (15/20, 75%) y en segundo lugar el invierno (5/20, 25%).

Durante el estudio se registraron casos de listeriosis en 16 establecimientos de 9 de los 19 departamentos del país (47%), la mayoría ubicados dentro del área de influencia del Laboratorio Regional Noroeste. Tres predios presentaron casos de la enfermedad en más de una ocasión: el D en los años 2016 y 2017 ocasionados por diferentes especies de *Listeria* (publicación III); el establecimiento G en 2017 y 2018 por *L. monocytogenes* pero de serotipos diferentes (publicación III) y por último, el establecimiento J con dos casos en 2018 por *L. monocytogenes* de diferentes serotipos y con dos presentaciones clínicas distintas de la enfermedad (publicación IV) (Tabla 1).

En los casos registrados en bovinos se analizó también el giro productivo de los predios donde ocurrió la enfermedad, siendo que la misma fue más frecuente en sistemas ganaderos que lecheros (siete y cuatro casos, respectivamente). Dentro de los sistemas ganaderos se registraron tres casos en cría extensiva, dos casos en recría, un caso en invernada y otro en una cabaña de reproductores (publicación IV).

La forma nerviosa de la enfermedad fue la presentación clínica predominante tanto en bovinos como en pequeños rumiantes (19 de 20 casos analizados) (publicación III y IV). En todas las muestras de SNC examinadas mediante histopatología se observó la lesión en el tronco encefálico, caracterizada por una meningoencefalitis supurativa con microabscesos. En la publicación I se evidenció además inmunomarcación positiva para *L. monocytogenes* en cortes de médula oblonga y puente. De 197 fetos bovinos en los que se realizó necropsia para el diagnóstico integral de aborto, solo uno presentó lesiones macroscópicas que sugerían un aborto por *Listeria*. Al examen histopatológico si bien el material presentaba una autólisis moderada, se logró observar en hígado y riñón múltiples áreas de necrosis central rodeada por neutrófilos degenerados y linfocitos (publicación IV). Mientras que en ovinos, de 18 fetos recibidos para diagnóstico de aborto ninguno presentó lesiones macro e histológicas compatibles con infección por *Listeria*.

Con respecto al diagnóstico de listeriosis utilizando cultivo y aislamiento bacteriológico, en 18 muestras de 20 cultivadas (90%) hubo recuperación de colonias de *Listeria* (publicación III y IV). De los 18 cultivos, 15 correspondieron a *L. monocytogenes* y tres a *L. innocua*.

Dado que en la literatura científica existen escasos reportes de listeriosis en rumiantes ocasionados por *L. innocua*, se realizó la comunicación que incluyó el análisis del genoma completo (whole genome sequencing, WGS) de los dos primeros aislamientos (publicación II). Los resultados de la secuenciación mostraron que

ambos portaban 13 genes (*iap/cwhA*, *lpeA*, *clpC*, *clpE*, *clpP*, *fbpA*, *gtcA*, *lap*, *lplA1*, *lspA*, *oatA*, *pdgA* y *prsA2*) que han sido identificados en la Virulence Factor Database 2.0 (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/genus.cgi?Genus=Listeria>) como genes que codifican factores de virulencia implicados en la invasión celular y/o replicación intracelular de *Listeria*.

En la publicación I, a partir de un bovino que presentó síntomas nerviosos con diagnóstico posterior de listeriosis, se realizó un estudio ambiental y de detección de *L. monocytogenes* en el rodeo. Además de confirmar la sospecha clínica mediante histopatología, inmunohistoquímica y bacteriología, otro hallazgo relevante de este trabajo fue la detección de vacas de cría clínicamente sanas que excretaban *L. monocytogenes* o *L. innocua* con sus heces (Tabla 1).

Tanto en los bovinos como en los pequeños rumiantes hubo mayor cantidad de casos individuales de la enfermedad (nueve y cinco, respectivamente), que casos colectivos o brotes (dos y tres, respectivamente). La mediana de la morbilidad en los casos bovinos (n=11) fue de 1,4%, mientras que en pequeños rumiantes (n=9) fue de 0,8%. La letalidad fue del 100% en todas las especies (publicación III y IV).

Con respecto a las categorías afectadas en bovinos, de los 11 casos, nueve (82%) ocurrieron en animales mayores a dos años y, los restantes dos (18%) en animales menores a dos años de edad (publicación IV). En los pequeños rumiantes ocurrió una situación similar ya que de los nueve casos, siete (77,7%) ocurrieron en categorías adultas y dos (22,3%) en categorías jóvenes (publicación III).

En cuanto a la información de la alimentación que constaba en la historia de los casos estudiados, en los bovinos, en cinco de los 11 casos (45%) se mencionaba que había consumo únicamente de pasturas (tres de campo natural y dos pasturas implantadas). Mientras que en cinco casos (45%) los responsables declararon el consumo de pasturas y ensilados y, en un caso (10%), únicamente los animales consumieron ensilados (publicación IV). En los pequeños rumiantes se registró la misma situación, donde en siete de los nueve casos (77,7%) los animales habían consumido pasturas exclusivamente, mientras que en dos casos (22,3%) había antecedentes de consumo previo de ración y granos (publicación III).

En todos los aislamientos de *L. monocytogenes* se identificó el serotipo. En los bovinos, se registró una mayor cantidad de casos clínicos asociados al serotipo 4b (seis casos) y, en segundo lugar, dos casos asociados al serotipo 1/2a. En cuanto a los bovinos portadores asintomáticos, se identificó la presencia de cepas de *L. monocytogenes* del serotipo 4b y 1/2a (publicación IV). Mientras que en los pequeños rumiantes, predominó el serotipo 1/2b (cuatro casos), seguido por el 4b (dos casos) y por último, el 1/2a (un caso).

Con respecto a la determinación de la presencia del gen que codifica la Internalina A (*inlA*) realizado mediante PCR, todos los aislamientos de *L. monocytogenes* lo portaban, pero estaba ausente en todos los aislamientos de *L. innocua*. En los dos primeros aislamientos de *L. innocua* reportados (publicación II), la ausencia del gen *inlA* fue confirmada en la secuenciación del genoma.

Tabla 1: Aislamientos de *Listeria* analizados durante el trabajo de Tesis, a partir de casos con sintomatología clínica compatible (Publicaciones I, II, III y IV) o de estudio de presencia en un rodeo (Publicación I).

Fecha	Predio/Departamento	Especie	Aislado de	Aislamiento	Serotipo	Presencia gen <i>inlA</i>
oct-14	A/Canelones	Bovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+
oct-15	B/Paysandú	Bovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+
oct-15	B/Paysandú	Bovino	Mat fecal*	<i>L. monocytogenes</i>	1/2 ^a	+
oct-15	B/Paysandú	Bovino	Mat fecal*	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+
oct-15	B/Paysandú	Bovino	Mat fecal*	<i>L. innocua</i>	n/c	-
oct-15	B/Paysandú	Bovino	Mat fecal*	<i>L. innocua</i>	n/c	-
oct-15	B/Paysandú	Bovino	Mat fecal*	<i>L. innocua</i>	n/c	-
oct-15	B/Paysandú	Bovino	Mat fecal*	<i>L. innocua</i>	n/c	-
oct-15	B/Paysandú	Bovino	Mat fecal*	<i>L. innocua</i>	n/c	-
oct-15	B/Paysandú	Bovino	Mat fecal*	<i>L. innocua</i>	n/c	-
oct-16	C/Flores	Bovino	SNC	<i>L. innocua</i>	n/c	-
nov-16	D/Paysandú	Ovino	SNC	<i>L. innocua</i>	n/c	-
nov-16	E/Flores	Bovino	SNC	Sin desarrollo	n/c	n/c
ago-17	F/Paysandú	Caprino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+
set-17	G/Paysandú	Ovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	1/2 ^a	+
set-17	H/San José	Bovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+
oct-17	I/Colonia	Ovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	+
nov-17	D/Paysandú	Ovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	+
jul-18	J/Salto	Bovino	Pulmón fetal	<i>L. monocytogenes</i>	1/2 ^a	+
oct-18	G/Paysandú	Ovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	+
oct-18	K/Paysandú	Ovino	SNC	Sin desarrollo	n/c	n/c
oct-18	J/Salto	Bovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+
nov-18	L/Paysandú	Bovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+
ago-20	M/Rocha	Bovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	1/2 ^a	+
set-20	N/Florida	Bovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+
ago-21	O/Soriano	Ovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	+
ago-21	O/Soriano	Ovino	SNC	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+
oct-21	P/Soriano	Bovino	SNC	<i>L. innocua</i>	n/c	-

*: animales sin síntomas clínicos, portadores asintomáticos.

n/c: no corresponde

DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo se realizó un abordaje detallado de una serie de casos de listeriosis en rumiantes destinados a la producción de alimentos, utilizando la patología, el aislamiento bacteriológico y las técnicas moleculares como principales herramientas de laboratorio. Puntualmente, en algunos casos se complementó el análisis de las cepas recuperadas con técnicas de secuenciación genómica. Este abordaje generó información nacional nueva de esta patología en rumiantes, con impacto en la producción de alimentos.

En primer lugar, cabe destacar que durante el desarrollo de este trabajo se detectaron más casos en bovinos que en pequeños rumiantes. En contraposición a nuestro resultado, la bibliografía menciona que los ovinos son más susceptibles a la enfermedad que los bovinos o caprinos (Low & Donachie 1997; Brugère-Picoux 2008; Bagatella et al. 2022). Este hecho se podría relacionar al valor económico de los animales, ya que el precio de un bovino fue mayor al de un ovino durante el período estudiado (INAC 2023). Es probable, además, que el hecho de detectar menos casos en ovinos se explique por las características de los sistemas de producción ovina de Uruguay. En base a datos oficiales, sabemos que la mayoría de los ovinos se encuentra en el norte del país, con lo cual están relativamente alejados de los laboratorios de diagnóstico y, en sistemas de producción de tipo extensivo (MGAP 2022). Si a estos datos se suma el hecho de que la mayoría de los casos de listeriosis son individuales, es probable que no se remita material para diagnóstico de uno o unos pocos animales afectados en un predio y en consecuencia, haya un sub registro de la enfermedad en ovinos. Reportes en Brasil dan cuenta de una mayor cantidad de casos en pequeños rumiantes que en bovinos (Rissi et al. 2010a; Konradt et al. 2017), pero en Argentina ocurre una situación similar a Uruguay, con mayor cantidad de casos en bovinos que en ovinos (Campero et al. 2002; Späth & Becker 2012).

Tanto en los casos bovinos como en los ovinos se observó una marcada estacionalidad de la enfermedad, siendo la primavera el momento del año donde ocurren la mayoría de los casos (75%), e invierno en una proporción menor (25%). Este hecho tiene similitud con varios reportes de la enfermedad tanto en el hemisferio norte (Barlow & McGorum 1985, Wilesmith & Gitter 1986, Brugère-Picoux 2008, Dreyer et al. 2015) como en el hemisferio sur (Rissi et al. 2010c, Margineda et al. 2012) que mencionan una estacionalidad marcada. El predominio de los casos de listeriosis durante primavera se podría relacionar a eventos previos de alta exposición a la bacteria, ya que el período de incubación de la forma nerviosa varía de una a siete semanas (Brugère-Picoux 2008, Oevermann et al. 2010b). En ese sentido, Nightingale et al. (2005), Mohammed et al. (2009) y Strawn et al. (2013) han reportado que en el invierno se encuentra la mayor prevalencia de *L. monocytogenes* en el ambiente de predios agropecuarios. Además, parece que la humedad tiene influencia en la presencia de *L. monocytogenes*, ya que se ha observado una mayor prevalencia de la bacteria en suelos y pasturas con alta humedad (Strawn et al. 2013). Reforzando la hipótesis de la estacionalidad de *Listeria* en el ambiente de los predios, Nightingale et al. (2005) reportó una mayor excreción fecal de la bacteria por parte de los bovinos en invierno, mientras que Bandelj et al. (2018) en primavera. Los antecedentes mencionados hasta ahora, son congruentes con nuestros resultados y reafirman el hecho de ser una enfermedad estacional, lo cual aporta un dato importante para el diagnóstico diferencial de las enfermedades neurológicas de los rumiantes en Uruguay.

Tomando en cuenta que en este trabajo se detectaron casos de listeriosis en 9 de los 19 departamentos del país (47%), sumado a que la enfermedad se observó en diferentes sistemas de producción, tanto de ganado de carne como lechero y en ovinos, podemos pensar que es probable que la enfermedad ocurra a lo largo de todo Uruguay. Este resultado concuerda y refleja la información sobre la enfermedad que posee la Unidad de Registros de Diagnóstico (UNIRADD) de DILAVE, donde entre los años 1991 a 2021 se diagnosticaron focos de listeriosis en rumiantes en 16 de los 19 departamentos del país (84%) (Dutra 2023, comunicación personal).

Con respecto a las formas clínicas de listeriosis, tanto en los bovinos como en los pequeños rumiantes, en esta serie de casos hubo una clara predominancia de la forma nerviosa de la enfermedad, en concordancia con reportes regionales (Sanches et al. 2000, Campero et al. 2002, Guedes et al. 2007, Galiza et al. 2010, Rissi et al. 2010b, Margineda et al. 2012, Konradt et al. 2017, Santos et al. 2018) e internacionales (Oevermann et al. 2010b, Kessel et al. 2011, Bagatella et al. 2022). Por otra parte, este hecho resalta el valor del diagnóstico de las enfermedades neurológicas de los rumiantes, ya que indirectamente se realiza vigilancia pasiva de enfermedades de impacto en el comercio de productos de origen animal y/o zoonosis como: Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), Rabia, Scrapie, Maedi-Visna y Artritis-Encefalitis Caprina (CAE) (OMSA 2023).

De los 197 fetos bovinos examinados en el período, solo se registró un aborto por *L. monocytogenes*. En pequeños rumiantes, si bien el número de fetos analizados fue bastante menor (18), no se observaron casos de la enfermedad. Este resultado sugiere que las formas clínicas caracterizadas por aborto y muerte perinatal por infección *in útero* por *Listeria* son muy raras en Uruguay. Situación similar se reporta en la región, donde se describen escasos abortos en bovinos por listeriosis (Margineda et al. 2012, Alvarez et al. 2018) o de muerte perinatal en ovinos (Cantón et al. 2018) en Argentina. Mientras que en Brasil no se han reportado estas formas clínicas de listeriosis. Probablemente este hecho pueda explicarse por los diferentes mecanismos patogénicos (ya mencionados) que tienen la forma nerviosa y el aborto (Oevermann et al. 2010b, Bagatella et al. 2022). En ese sentido, cuando un rumiante hembra que está gestando muere por neurolisteriosis, donde la bacteria ingresó al animal vía intraneuronal retrograda, no habría bacteriemia ni pasaje transplacentario, con lo cual el contenido uterino es estéril (Cantile & Youssef 2016).

En la serie de casos estudiada, la enfermedad ocurrió más frecuentemente en bovinos y pequeños rumiantes adultos (82% y 77,7% respectivamente). Varios reportes mencionan al igual que en nuestro trabajo, una mayor prevalencia de la enfermedad en rumiantes adultos (Sanches et al. 2000, Ribeiro et al. 2006, Rissi et al. 2006, Oevermann et al. 2010a, Rissi et al. 2010c, Kessel et al. 2011, Margineda et al. 2012). Mientras que en una proporción menor, se han reportado casos en Brasil y Argentina en rumiantes menores a dos años de edad (Campero et al. 2002, Guedes et al. 2007, Konradt et al. 2017, Ribeiro et al. 2022). Por último, otra recopilación de casos de INTA Balcarce, menciona que la listeriosis es una enfermedad muy frecuente tanto en bovinos adultos como en menores de 2 años de edad (Späth & Becker 2012). Tomando en cuenta la patogenia de la enfermedad, no es posible una explicación a este hallazgo, y en esa línea algunos autores sugieren que no existe una predisposición por edad para la enfermedad (Bagatella et al. 2022). Por otro lado, tanto en bovinos como en pequeños rumiantes predominaron los casos individuales sobre los brotes colectivos. Varios reportes mencionan la misma situación que la observada en este trabajo, con uno o unos pocos animales afectados en un rodeo o majada (Rissi et al. 2010c, Walland et al. 2015). Este hecho establece la hipótesis de que la enfermedad podría ocurrir por exposición desigual a la bacteria en el ambiente de los predios, al consumo repetido

de alimentos contaminados, a la presencia de factores que debilitan la respuesta inmune de los animales o todos simultáneamente. Sin embargo, hasta ahora los factores predisponentes para la enfermedad en los rumiantes no están del todo esclarecidos (Walland et al. 2015, Bagatella et al. 2022).

Con respecto a los antecedentes de alimentación, en los casos registrados en bovinos y en pequeños rumiantes, hubo un alto porcentaje sin antecedentes de consumo de ensilados (45% y 77,7% respectivamente). Como ya se mencionó, tradicionalmente la presentación de la enfermedad se asoció al consumo de ensilados contaminados con *Listeria* (Wilesmith & Gitter 1986, Low & Donachie 1997, Gudmundsdottir et al. 2004, Brugère-Picoux 2008, Ribeiro et al. 2006, 2022). Aunque algunos autores cuestionan este hecho (Rissi et al. 2010c, Walland et al. 2015, Bandelj et al. 2018, Rodriguez et al. 2021, Bagatella et al. 2022) y se ha probado mediante estudios epidemiológicos en predios agropecuarios, que pueden ocurrir casos de listeriosis asociados al consumo de pasturas contaminadas, agua de bebida o suelo (Dreyer et al. 2015, Matto et al. 2017, Whitman et al. 2020). Por lo tanto, diferentes alimentos de consumo animal, agua de bebida o suelo también pueden ser fuentes de contaminación para los rumiantes. Considerando además que *Listeria* es capaz de tolerar un amplio margen de pH (4,5 a 9,0) y temperatura (1°C a 45°C) (Vázquez-Boland et al. 2001), este agente puede permanecer y distribuirse en el ambiente de los predios agropecuarios, como ha sido demostrado por diversos autores (Gudmundsdottir et al. 2004, Nightingale et al. 2005, Mohammed et al. 2009, 2010, Strawn et al. 2013, Dreyer et al. 2015, Castro et al. 2018, Whitman et al. 2020). Esto podría explicar el hecho de que algunos predios estudiados en este trabajo presentaron casos de la enfermedad en diferentes meses o años, inclusive por diferentes especies o serotipos de *Listeria*.

El abordaje del diagnóstico de los casos clínicos combinando la patología, bacteriología y las técnicas moleculares, demostró ser congruente y aportó información nueva acerca de la enfermedad en rumiantes. En primer lugar, las lesiones histológicas en el SNC o en tejidos fetales de los casos estudiados coinciden con lo reportado por diferentes autores (Campero et al. 2002, Oevermann et al. 2010a, Rissi et al. 2010c, Kessel et al. 2011; Cantile & Youssef 2016, Schlafer & Foster 2016) y dadas sus características morfológicas, no representan una dificultad al momento del diagnóstico. En cuanto a la bacteriología, el porcentaje de recuperación de *Listeria* a partir de muestras de casos clínicos fue superior a otros reportes (Johnson et al. 1995, Campero et al. 2002, Easton et al. 2012, Margineda et al. 2012, Konradt et al. 2017), ya que en este estudio se obtuvieron 18 aislamientos de *Listeria* en 20 muestras cultivadas (90%). Por este motivo, no se continuó realizando la inmunohistoquímica como técnica complementaria al diagnóstico. Cabe destacar también que en este trabajo se recuperaron cepas de *L. innocua* y *L. monocytogenes* a partir de muestras de materia fecal de vacas clínicamente sanas. Una posible explicación al alto porcentaje de recuperación bacteriana, podría ser el tipo de medios de cultivo utilizados, donde se emplearon medios de enriquecimiento selectivo que favorecen específicamente el desarrollo de *Listeria* y que son de uso rutinario en la industria alimenticia (Hitchins et al. 2020) y también en protocolos de investigación (Nightingale et al. 2004, 2005). Los trabajos regionales que emplearon para el diagnóstico de la enfermedad patología y bacteriología, utilizaron otras metodologías de cultivo bacteriano como siembra en agar sangre Columbia (Campero et al. 2002, Margineda et al. 2012, García et al. 2016, Konradt et al. 2017, Canton et al. 2018) y/o enriquecimiento en frío (Johnson et al. 1995, Margineda et al. 2012, Konradt et al. 2017), y es probable que esto haya afectado negativamente el porcentaje de recuperación bacteriana. Otro hecho que también pudo contribuir, fue la utilización

de la mitad del SNC (que incluía las tres áreas del encéfalo), lo que posibilitaría la presencia de bacterias viables en el tejido analizado. Otros reportes que realizaron cultivo bacteriológico, utilizaban únicamente una muestra de tronco encefálico (Johnson et al. 1995, Campero et al. 2002, Margineda et al. 2012, Konradt et al. 2017). Considerando la patogenia de la enfermedad, cabe recordar que al llegar al tronco encefálico las bacterias son fagocitadas por los neutrófilos y macrófagos en el neuroparénquima. Sin embargo, estas avanzan en sentido caudal y rostral mediante transporte intraaxonal (Oevermann et al. 2010a), lo que las mantendría viables para el cultivo microbiológico. En línea con este resultado, Low & Donachie (1997) mencionan que en los casos de encefalitis en rumiantes, casi siempre se obtiene el aislamiento de *Listeria* a partir del SNC.

Otro hallazgo de relevancia obtenido durante este trabajo fue el diagnóstico de tres casos de listeriosis (dos en bovinos y uno en un ovino) asociados a la infección por *L. innocua* no hemolítica. En los tres casos se observó la misma lesión histológica que la ocasionada por *L. monocytogenes* pero de menor severidad, al igual que lo reportado previamente por Walker et al. (1994) y Rocha et al. (2013). La secuenciación genómica de los dos primeros aislamientos demostró que ambos eran genéticamente muy próximos a pesar de corresponder a casos clínicos distantes geográficamente y sin vínculos epidemiológicos evidentes entre sí, y que además, poseían 13 genes de virulencia de *L. monocytogenes* conocidos como “menores”. Es probable que la presencia de estos genes haya permitido la invasión a las células de los huéspedes, ya que se ha probado que todos cumplen diferentes roles en la invasión o replicación celular. Por otro lado, el otro factor que pudo incidir en la ocurrencia de la enfermedad fue el estatus inmunitario previo del animal, aunque como ya se ha mencionado, los factores de riesgo para la enfermedad aun no son del todo conocidos (Walland et al. 2015). Estos casos son los primeros reportados en Uruguay y en el hemisferio sur, reforzando el valor del aislamiento bacteriológico como forma de obtener conocimiento preciso de los agentes causantes de enfermedad en los rumiantes.

Como ya se mencionó, en el primer trabajo publicado de esta Tesis se detectó la presencia de bovinos de carne (concretamente vacas de cría) que excretaban *L. monocytogenes* o *L. innocua* por materia fecal. A esto, se suma la detección en trabajos previos de bovinos de leche del rodeo uruguayo que excretaban *L. monocytogenes* o *L. innocua* en materia fecal (Matto et al. 2017, 2018). Este hallazgo es importante, ya que se postula que los bovinos actúan como dispersores de la bacteria en el ambiente de los predios agropecuarios (Nigthingale et al. 2004) y constituyen además, posibles fuentes de contaminación de los principales productos de origen animal como la carne y la leche. En ese sentido, los lácteos (fundamentalmente quesos frescos), fiambres y embutidos son una de las principales fuentes de infección para los seres humanos (CDC 2023), además de puerta de entrada de la bacteria a las industrias alimenticias. Ratificando la relevancia de los alimentos de origen animal como posible fuente de infección para los humanos, un relevamiento reciente en Uruguay de diferentes alimentos, detectó un mayor porcentaje de *L. monocytogenes* en alimentos congelados y quesos (Braga et al. 2017).

Con respecto a la caracterización molecular, todos los aislamientos de *L. monocytogenes* portaban el gen *inlA*, mientras que estaba ausente en todos los de *L. innocua*. La internalina A es sumamente importante, ya que como se mencionó en antecedentes, es una proteína que promueve la entrada de la bacteria en las células del hospedador (Vázquez-Boland et al. 2001). Sin embargo, un trabajo reciente reporta cepas de *L. innocua* hemolíticas portadoras de los genes presentes en LIPI-1 e *inlA* (Moura et al. 2019). Esto resalta una vez más, la importancia del aislamiento

bacteriológico y la necesidad de continuar caracterizando mediante herramientas moleculares las cepas circulantes. Por otra parte, tanto en los aislamientos recuperados de *L. monocytogenes* de los casos clínicos como en los bovinos portadores asintomáticos, los serotipos identificados correspondieron a los más frecuentemente asociados a enfermedad en animales y seres humanos (1/2b, 4b y 1/2a) (Vázquez-Boland et al. 2001, Oevermann et al. 2010b) y en alimentos de consumo humano en nuestro país (Braga et al. 2017). En los casos estudiados en pequeños rumiantes predominó el serotipo 1/2b, mientras que en los bovinos el más frecuente fue el 4b. En Uruguay, Argentina y Brasil a pesar de que listeriosis es una enfermedad con múltiples reportes, solo un trabajo ha serotipificado sus aislamientos. Concretamente, Campero et al. (2002) caracterizó mediante aglutinación los serotipos presentes, reportando que los 10 aislamientos (3 de ovinos y 7 de bovinos) correspondían al serotipo 4. Cabe destacar que a nivel mundial el serotipo 4b es el más comúnmente asociado a brotes de la enfermedad en humanos y es responsable por el 50-60% de los casos clínicos (Cartwright et al. 2013), así como en casos de neurolisteriosis en rumiantes (Bagatella et al. 2022). Sin embargo, dado que todos los casos de la enfermedad ocurren por los tres serotipos mencionados previamente, solo el estudio del serotipo como forma de establecer posibles vínculos epidemiológicos, es de uso muy limitado (Datta & Burall 2018). Con lo cual, es necesario utilizar herramientas moleculares con mayor poder discriminatorio para el análisis del genoma de los aislamientos y de esa forma, establecer a qué linajes pertenecen, sus relaciones filogenéticas, presencia y/o ausencia de factores de virulencia o resistencia, entre otros.

Considerando que en esta región de América del Sur hay muy pocos aislamientos de *Listeria*, siendo que listeriosis es una enfermedad frecuente en rumiantes, es necesario promover el cultivo y aislamiento de casos clínicos sospechosos, a fin de caracterizar con más detalle la mayoría de las cepas circulantes. Asimismo, sería necesario el abordaje de más muestreos ambientales en predios agropecuarios, para establecer los nichos donde se encuentra presente *Listeria*. Esto permitiría profundizar en el conocimiento de la enfermedad y en la epidemiología en rumiantes en nuestros sistemas pastoriles.

CONCLUSIONES GENERALES

Listeriosis es una enfermedad que está presente en sistemas de producción bovina dedicados a la ganadería y lechería, así como en pequeños rumiantes en todo el Uruguay.

La forma nerviosa de la enfermedad o neurolisteriosis es la forma clínica más frecuente tanto en bovinos como en pequeños rumiantes. Los abortos de último tercio son raros, mientras que no se registran hasta ahora otras formas clínicas.

La combinación de técnicas patológicas, bacteriológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad es congruente. En esta serie de casos *Listeria monocytogenes* fue el agente más comúnmente aislado, seguido en menor proporción por *L. innocua* no hemolítica.

Tanto en bovinos como en pequeños rumiantes un alto porcentaje de casos no tienen antecedentes de consumo de ensilados.

Se constata la presencia de bovinos portadores asintomáticos que excretan *L. monocytogenes* o *L. innocua* en materia fecal, lo que constituye fuentes de mantenimiento y dispersión del agente en el ambiente de los predios agropecuarios.

Los serotipos de *L. monocytogenes* recuperados de casos clínicos en rumiantes como en portadores asintomáticos, corresponden a los más comúnmente aislados en casos humanos y animales de listeriosis (4b, 1/2a y 1/2b). Destaca la predominancia del serotipo 4b en bovinos, asociado a una mayor patogenicidad en humanos y rumiantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armed Forces Institute of Pathology (1995) Métodos Histotecnológicos. Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) Washington, DC. 280 p.
2. Álvarez I, Cirone K, Méndez A, Maldonado J, Cheuquepan F, García J, Scioli V, Cantón G, Morrell E (2018) Aborto bovino por *Listeria monocytogenes*: confirmación bacteriológica e inmunohistoquímica. XXII Reunión Científico Técnica de la AAVLD, Argentina. https://www.researchgate.net/publication/328581691_Aborto_bovino_por_Listeria_Monocytogenes_confirmacion_bacteriologica_e_inmunohistoquimica. Fecha de visita 14/06/2023.
3. Bandelj P, Jamnikar-Ciglenecki U, Ocepek M, Blagus R, Vengust M (2018) Risk factors associated with fecal shedding of *Listeria monocytogenes* by dairy cows and calves. J Vet Intern Med. 32:1773-1779.
4. Bagatella S, Tavares-Gomes L, Oevermann A (2022) *Listeria monocytogenes* at the interface between ruminants and humans: A comparative pathology and pathogenesis review. Vet. Pathol. 59(2):186-210.
5. Barlow M, McGorum B (1985) Ovine listerial encephalitis: analysis, hypothesis and synthesis. Vet. Record 116: 233-236.
6. Borucki MK, Reynolds J, Gay CC, McElwain KL, Kim SH, Knowles DP, Hu J (2004) Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. J. Food Prot. 67(11): 2496-2499.
7. Braga V, Vázquez S, Vico V, Pastorino V, Mota MI, Legnani M, Schelotto F, Lancibidad G, Varela G (2017). Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. Braz. J Microbiol. 48 (4): 689-694.
8. Brugère-Picoux J (2008) Ovine listeriosis. Small Rum. Res. 76: 12-20.
9. Campero CM, Odeón AC, Cipolla AL, Moore DP, Poso MA, Odriozola E (2002) Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health 49: 379-383.
10. Cantile C, Youseff S (2016) Nervous system. En: Maxie MG: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals. Vol. 1: 250-406.
11. Canton G, Fiorentino A, Manes J, Scioli V, Maldonado J, Moore P, Morrell E (2018) Listeriosis neonatal en cordero: reporte de caso. En: Robles C.A. Enfermedades de ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos. INTA Ediciones. Pp 19-20. Recuperado de: <https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/4835>.
12. Carlin CR, Liao J, Weller D, Gou X, Orsi R, Wiedmann M (2021) *Listeria cossartiae* sp.nov., *Listeria farberi* sp. nov., *Listeria immoviles* sp.nov., *Listeria portnoyi* sp. nov., and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 71(5):004795.
13. Cartwright EJ, Jackson KA, Johnson SD, Graves LM, Silk BJ, Mahon BE (2013) Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. Emerg. Infec. Dis. 19: 1-9.
14. Castro H, Jaakkonen A, Hakkinen M, Korkeala H, Lindström M (2018) Occurrence, persistence and contamination routes of *Listeria monocytogenes* genotypes on three Finnish dairy cattle farms: a longitudinal study. Appl. Environ. Microbiol. DOI: [10.1128/AEM.02000-17](https://doi.org/10.1128/AEM.02000-17)

15. Centers for Disease Control and Prevention (2023) Prevent *Listeria*. Disponible en: <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/prevention.html>. Fecha de visita 16/06/2023.
16. Costa RA, Matto C, Schanzembach M, Rodriguez V, Varela G, Braga V, Vico MV, Riet-Correa F (2018) Romboencefalite por *Listeria monocytogenes* em ovinos criados a pasto. Pesq. Vet. Bras. 38(supl.): 113-115.
17. Datta AR, Burall LS (2018) Serotype to genotype: The changing landscape of listeriosis outbreak investigations. Food Microbiol. 75: 18-27.
18. den Bakker HC, Warchocki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS, Stasiewicz MJ, Burrell A, Roof S, Strawn LK, Fortes E, Nightingale KK, Kephart D, Wiedmann M (2014) Five new species of *Listeria* (*L. floridensis* sp. nov., *L. aquatica* sp. nov., *L. cornellensis* sp. nov., *L. riparia* sp. nov., and *L. grandensis* sp. nov.) from agricultural and natural environments in the United States. Int J Syst Evol Microbiol. 64:1882-1889.
19. Dohoo I, Martin W, Stryhn H (2003) Sampling. En: Dohoo I, Martin W, Stryhn H. Veterinary Epidemiologic Research. Ed. AVC, 1ª ed. Prince Edward Island, Cap. 2, pp.27-52.
20. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 42(8): 3819-3822.
21. Dreyer M, Thomann A, Böttcher S, Frey J, Oevermann (2015) Outbreak investigation identifies a single *Listeria monocytogenes* strain in sheep with different clinical manifestations, soil and water. Vet. Microbiol. 179: 69-75.
22. Dutra (2020) Archivo Veterinario del Este. Recuperado de: https://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/23_a52814f9/archivosAdjuntos/ano-2020.pdf. Fecha de visita 16/06/2023.
23. Dutra (2019) Archivo Veterinario del Este. Recuperado de: https://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/23_a52814f9/archivosAdjuntos/ano-2019.pdf Fecha de visita 16/06/2023.
24. Dutra (2015) Archivo Veterinario del Este. Recuperado de: https://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/13_e751e508/archivosAdjuntos/n-2.pdf. Fecha de visita: 23/05/2019.
25. Dutra (2012) Archivo Veterinario del Este. Recuperado de: http://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/10_e945ce47/archivosAdjuntos/n-2.pdf. Fecha de visita: 23/05/2019.
26. Dutra (2011) Archivo Veterinario del Este. Recuperado de: http://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/9_f4adb0cd/archivosAdjuntos/n-3.pdf Fecha de visita: 23/05/2019.
27. Easton C, Preliasco M, Paullier C, Marcolongo-Pereira C, Nakazato L, Rivero R (2012) Estudio retrospectivo para la identificación de agentes infecciosos que provocan encefalitis en bovinos de Uruguay. Veterinaria (Montevideo) 48 (186): 13-18.
28. Esteban JI, Oporto B, Arduiz G, Juste RA, Hurtado A (2009) Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. BMC Vet. Res. doi: 10.1186/1746-6148-5-2.
29. Evans K, Smith M, McDonough P, Wiedmann M (2004) Eye infections due to *Listeria monocytogenes* in three cows and one horse. J Vet. Diagn. Invest. 16: 464-469.
30. Fairley RA, Pesavento PA, Clark RG (2012) *Listeria monocytogenes* infection of the alimentary tract (enteric listeriosis) of sheep in New Zealand. J. Comp. Path 146: 308-313.

31. Fedio WM, Schoonderwoerd M, Shute RH, Jackson H (1990) A case of bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*. Can. Vet. J. 31: 773-775.
32. Galiza GJN, Silva MLCR, Dantas AFM, Simões SVD, Riet-Correa F (2010) Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. Pesq. Vet. Bras. 30(3):267-276
33. García JA, Micheloud JF, Campero CM, Morrell EL, Odriozola ER, Moreira AR (2016) Enteric listeriosis in grazing steers supplemented with spoiled silage. J. Vet. Diagn. Invest. 28:65-69.
34. Gudmundsdottir KB, Aalbæk B, Sigurdarson S, Gunnarsson E (2004) The diversity of *Listeria monocytogenes* strains from 10 Icelandic sheep farms. J. App. Microbiol. 96: 913-921.
35. Guedes KMR, Riet-Correa F, Dantas AFM, Simões SVD, Miranda Neto EG, Nobre VMT, Medeiros RMT (2007) Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. Pesq. Vet. Bras. 27(1): 29-38.
36. Headley SA, Bodnar L, Fritzen JTT, Bronkhorst DE, Fernandes Alfieri A, Okano W, Alcindo Alfieri A (2013) Histopathological and molecular characterization of encephalitic listeriosis in small ruminants from northern Paraná, Brasil. Braz J. Microbiol. 44(3): 889-896.
37. Hellström S, Kiviniemi K, Autio T, Korkeala H (2008) *Listeria monocytogenes* is common in wild birds in Helsinki region and genotypes are frequently similar with those found along the food chain. J. Appl. Microbiol. 104: 883-888.
38. Hitchins AD, Jinneman K, Chen Y (2020) Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. Bacteriological Analytical Manual. United States Food and Drug Administration. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>. Fecha de visita 16/06/2023.
39. Instituto Nacional de la Carne (2023) Precios de Hacienda. Evolución semanal por indicador. Disponible en: <https://www.inac.uy/innovaportal/v/17274/10/innova.front/precios-de-hacienda-bovinos-y-ovinos>. Fecha de visita 15/08/2023.
40. Ivanek R, Gröhn YT, Ho AJJ, Wiedmann M (2007) Markov chain approach to analyze the dynamics of pathogen fecal shedding-Example of *Listeria monocytogenes* shedding in a herd of dairy cattle. J. Theo. Biol. 245:44-58.
41. Johnson GC, Fales WH, Maddox CW, Ramos-Vara JA (1995) Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 223-228.
42. Kessel AE, Finnie JW, Windsor PA (2011) Neurological diseases of ruminant livestock in Australia. III: bacterial and protozoal infections. Aust. Vet. J. (807): 289-296.
43. Konradt G, Bassuino DM, Prates KS, Bianchi MV, Snel GGM, Sonne L, Driemeier D, Pavarini SP (2017) Suppurative infectious diseases of the central nervous system in domestic ruminants. Pesq. Vet. Bras. 37(8): 820-828.
44. Kozlov AM, Darriba D, Flouri T, Morel B, Stamatakis A (2019) RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. Bioinformatics, 35, 4453-4455.
45. Latorre AA, Van Kessel JAS, Karns JS, Zurakowski MJ, Pradhan AK, Zadoks RN, Boor KJ, Schukken YH (2009) Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. Appl. Environ. Microbiol. 75 (5):1315-1323.

46. Leaniz R, Selinke H, Chaves O, Pintos JO, Bello S (1960) Listeriosis en ovinos. Su comprobación en el Uruguay. Publicación Cátedra de Enfermedades Infecto-contagiosas de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. 14p.
47. León EA, Duffy SJ (2009) ProMESA 1.3 (Programa de Muestreo Estadístico en Sanidad Animal). Unidad de Epidemiología, CICVyA, INTA, Argentina.
48. Linke K, Rückerl I, Brugger K, Karpiskova R, Walland J, Muri-Klinger S, Tichy A, Wagner M, Stessl B (2014) Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. Appl. Environ. Microbiol. 80(18): 5583-5592.
49. Liu B, Zheng DD, Jin Q, Chen LH, Yang J (2019) VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. Nucleic Acids Research, 47, D687-D692.
50. Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ (2007) A multiplex PCR for species and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. J Microbiol Methods. 71:133-140.
51. Low JC, Donachie W (1997) A review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. Vet. Journal. 153:9-29.
52. Lyautey E, Lapen DR, Wilkes G, McCleary K, Pagotto F, Tyler K, Hartmann A, Piveteau P, Rieu A, Robertson WJ, Medeiros DT, Edge TA, Gannon V, Topp E (2007) Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the south nation river watershed, Ontario, Canada. Appl. Environ. Microbiol. 73(17): 5401-5410.
53. Lyautey E, Hartmann A, Pagotto F, Tyler K, Lapen DR, Wilkes G, Piveteau P, Rieu A, Robertson WJ, Medeiros DT, Edge TA, Gannon V, Topp E (2007b) Characteristics and frequency of detection of fecal *Listeria monocytogenes* shed by livestock, wildlife, and humans. Can. J. Microbiol. 53:1158-1167.
54. Margineda CA, Cantón G, Lischinsky L, Moreira A, Campero CM (2012) Listeriosis en bovinos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev. Vet. 23 (1): 32-37.
55. Matto C, Varela G, Braga V, Vico V, Giannechini RE, Rivero R (2018) Detection of *Listeria* spp. in cattle and environment of pasture based dairy farms. Pesq. Vet. Bras. 38(9): 1736-1741.
56. Matto C, Varela G, Mota MI, Giannechini R, Rivero R (2017) Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in a pastured bull. J. Vet. Diagn. Invest. 29(2): 228-231.
57. Microbiology Laboratory Guidebook, United States Department of Agriculture (2019) Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-to-eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Samples. Disponible en: https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-03/mlg-8.pdf Fecha de visita: 16/08/2023.
58. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (2022) Anuario Estadístico Agropecuario https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2022/O_MGAP_Anuario_estad%C3%ADstico_%202022-DIGITAL.pdf. Fecha de visita 14/06/2023.
59. Mohammed HO, Atwill E, Dunbar L, Ward T, McDonough P, Gonzalez R, Stipetic K (2010) The risk of *Listeria monocytogenes* infection in beef cattle operations. J Appl Microbiol. 108(1):349-56.
60. Mohammed HO, Stipetic K, McDonough PL, Gonzalez RN, Nydam DV, Atwill ER (2009) Identification of potential on-farm sources of *Listeria monocytogenes* in herds of dairy cattle. Am. J. Vet. Res. 70(3):383-388.

61. Moura A, Disson O, Lavina M, Thouvenot P, Huang L, Leclercq A, Fredriksson-Ahomaa M, Eshwar AK, Stephan R, Lecuit M (2019) Atypical haemolytic *Listeria innocua* isolates are virulent, albeit less than *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 87. doi: 10.1128/[A].00758-18.
62. Moura A, Criscuolo A, Pouseele H, Maury MM, Leclercq A, Tarr C, Björkman JT, Dallman T, Reimer A, Enouf V, Laroneur E, Carleton H, Bracq-Dieye H, Katz LS, Jones L, Touchon M, Tourdjman M, Walker M, Stroika S, Cantinelli T, Chenal-Francisque V, Kucerova Z, Rocha EPC, Nadon C, Grant K, Nielsen EM, Pot B, Gerner-Smidt P, Lecuit M, Brisse S (2016) Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. Nature Microbiology (2). DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.185.
63. Nightingale KK, Fortes ED, Ho AJ, Schukken YH, Gröhn YT, Wiedmann M (2005) Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227:1808-1814.
64. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Gröhn YT, McDonough PL, Wiedmann M (2004) Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. Appl. Environ. Microbiol. 70(8):4458-4467
65. Oevermann A, Di Palma S, Doherr MG, Abril C, Zurbriggen A, Vandeveld M (2010a) Neuropathogenesis of naturally occurring encephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in ruminants. Brain Path. 20: 378-390.
66. Oevermann A, Zurbriggen A, Vandeveld M (2010b) Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise?. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.
67. Organización Mundial de Salud Animal (2023) Código sanitario para los animales terrestres. Capítulo 1.3 Enfermedades, infecciones e infestaciones de la lista de la OIE. Disponible en: https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmfile=chapitre_oie_listed_disease.htm. Fecha de visita 14/06/2023.
68. Preliasco M, Alonzo P, Easton MC, Paullier C, Lopez F, Bove R, Lima AL, Franchi M (2013) Enfermedades de pequeños rumiantes diagnosticadas en el laboratorio de Anatomía patológica DILAVE Montevideo (2002 - 2012). Poster, XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú. Pp: 188-189.
69. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A (2020) Using SPAdes De Novo Assembler. Curr Protoc Bioinformatics 70.
70. Ribeiro LS, Scheid HV, Marques LS, Venancio FR, da Silva ER, Ladeira SRL, Schild AL (2022) Listeriosis outbreak in sheep raised in feedlots in the southern region of Rio Grande do Sul State, Brazil. Acta Scientiae Veterinariae. 50 (Suppl 1): 738.
71. Ribeiro LAO, Rodrigues NC, Fallavena LCB, Oliveira SJ, Brito MA (2006) Listeriose em rebanho de ovinos leiteiros na região serrana do Rio Grande do Sul: relato de caso. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 8(3): 326-319.
72. Rissi DR, Pierezan F, Oliveira-Filho JC, Lucena RB, Carmo PMS, Barros CSL (2010a) Abordagem diagnostica das principais doenças do sistema nervoso de ruminantes e equinos no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 30(11): 958-967.
73. Rissi DR, Figuera RA, Irigoyen LF, Kommers GD, Barros CSL (2010b) Doenças neurológicas de ovinos na região central do Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 30(3): 222-228.

74. Rissi DR, Kommers GD, Marcolongo-Pereira C, Schild AL, Barros CSL (2010c) Meningoencefalite por *Listeria monocytogenes* em ovinos. Pesq. Vet. Bras. 30(1): 51-56.
75. Rissi DR, Rech RR, Barro RR, Kommers GD, Langohr IM, Pierezan F, Barros CSL (2006) Forma nervosa de listeriose em caprinos. Pesq. Vet. Bras. 26(1): 14-20.
76. Rocha PRD, Dalmaso A, Grattarola C, Casalone C, Del Piero F, Bottero M, Capucchio MT (2013) Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. Res. Vet. Sci. 94: 111–114.
77. Rodriguez C, Taminiau B, García-Fuentes E, Daube G, Korsak N (2021) *Listeria monocytogenes* dissemination in farming and primary production: Sources, shedding and control measures. Food Control (120): 107540.
78. Rodriguez-R LM, Konstantinidis KT (2014) Estimating coverage in metagenomics data sets and why it matters. The ISME Journal, 8, 2349-2351.
79. Santos BL, Estima-Silva P, Coelho ACB, Oliveira PA, Soares MP, Sallis ESV, Bruhn FRP, Schild AL (2018) Doenças do sistema nervoso central de bezerros no sul do Rio Grande do Sul: uma contribuição ao diagnóstico diferencial. Pesq. Vet. Bras. 38(4): 685-691.
80. Sanches AWD, Langohr IM, Stigger AL, Barros CSL (2000) Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. Pesq. Vet. Bras. 20(3): 113-118.
81. Schlafer DH, Foster RA (2016) Female genital system. En: Maxie MG: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals. Vol. 3: 358-464.
82. Späth EJA, Becker BE (2012) Análisis epidemiológico de 8 años de diagnósticos de enfermedades de los bovinos. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA, Argentina. 50 p. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmpinta_boletin160_8aossdvebalcarce.pdf. Fecha de visita 16/06/2023.
83. Strawn LK, Fortes ED, Bihn EA, Nigthingale KK, Gröhn YT, Worobo RW, Wiedmann M, Bergholz PW (2013) Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. App. Environ. Microbiol. 79(2): 588-600.
84. Pintado CMBS, Grant KA, Halford-Maw R, Hampton MD, Ferreira MASS, McLauchlin J (2009) Association between a case study of asymptomatic ovine listerial mastitis and the contamination of soft cheese and cheese processing environment with *Listeria monocytogenes* in Portugal. Food. Path Dis. 6: 569-575.
85. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14(3):584-640.
86. Walker JK, Morgan JH, McLauchlin J, Grant KA, Shallcross JA (1994) *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. Vet. Microbiol. 42, 245-253.
87. Walland J, Lauper J, Frey J, Imhof R, Stephan R, Seuberich T, Oevermann A (2015) *Listeria monocytogenes* infection in ruminants: Is there a link to the environment, food and human health? A review. Schweiz Arch Tierheilkd, 157: 319-328.
88. Wilesmith JW, Gitter M (1986) Epidemiology of ovine listeriosis in Great Britain. Vet. Record 119: 467-470.
89. Winter P, Schilcher F, Bagó Z, Schoder D, Egerbacher M, Baumgartner W, Wagner M (2004) Clinical and histopathological aspects of naturally occurring

- mastitis caused by *Listeria monocytogenes* in cattle and ewes. J. Vet. Med. 51:176-179.
90. Whitman KJ, Bono JL, Clawson ML, Doy JD, Bosilevac JM, Arthur TM, Ondrak JD (2020) Genomic-based identification of environmental and clinical *Listeria monocytogenes* strains associated with an abortion outbreak in beef heifers. BMC Veterinary Research. 16, 70.
 91. Zhou Z, Alikhan NF, Mohamed K, Fan Y, Agama Study Group, Achtman M (2020) The EnteroBase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. Genome Research, 30, 138-152.

ANEXO I

Detección de *Listeria monocytogenes* en un rodeo de bovinos de carne en el que previamente ocurrió un caso clínico de listeriosis nerviosa

Detection of *Listeria monocytogenes* in a beef cattle herd in which previously occurred a clinical case of nervous listeriosis

Matto C¹ 0000-0002-7902-8676

Rodriguez V¹ 0000-0002-0166-551X

Giles M² 0000-0002-2061-8209

Varela G³ 0000-0003-4354-0608

Braga V³ 0000-0002-2749-5264

Mota MI³ 0000-0002-7042-5616

Vico V³ 0000-0001-9538-6855

Adrien ML⁴ 0000-0001-5914-1981

Giannechini E¹ 0000-0003-4908-9678

Rivero R¹ 0000-0003-0364-9908

¹ Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino". Ruta 3 km 369, CP 60000, Paysandú, Uruguay. Correspondencia C. Matto: cmatto@mgap.gub.uy

² Veterinario Ejercicio libre, Paysandú, Uruguay.

³ Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene-Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

⁴ Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios, Facultad de Veterinaria, Paysandú, Uruguay.

Veterinaria (Montevideo) Volumen 55

Nº 211 - 3 (2019) 14-20

Recibido :

Aceptado:

Resumen

Listeriosis es una enfermedad asociada al consumo de alimentos contaminados con bacterias del género *Listeria*. Este trabajo se realizó en un sistema de cría extensiva de bovinos. Los objetivos fueron confirmar la sospecha clínica de un caso de listeriosis nerviosa en un bovino de carne a pastoreo, detectar la presencia de portadores asintomáticos de *Listeria* sp. en el rodeo y establecer la presencia de bacterias del género *Listeria* en pasturas y agua de bebida del predio. Se realizó la necropsia de una vaca de cría que presentaba marcha en círculos, decúbito y muerte. En sistema nervioso central (SNC) se recuperaron colonias de *Listeria monocytogenes*, mientras que en la histopatología se observó meningoencefalitis supurativa con múltiples microabscesos en tronco encefálico e inmunomarcación positiva a *L. monocytogenes*. Se detectaron dos vacas de cría portadoras asintomáticas que excretaban *L. monocytogenes* y seis que excretaban *L. innocua* en materia fecal. En las muestras de pasturas no hubo aislamiento, mientras que en la muestra de agua de arroyo se recuperó *L. innocua*. El aislamiento de *L. monocytogenes* obtenido de SNC y otro de una vaca portadora asintomática se tipificaron como perfil de serotipo 4b, el restante se tipificó como perfil 1/2a. Estos serotipos coinciden con los más comúnmente reportados a nivel mundial en casos humanos y animales, así como en alimentos para consumo humano a nivel nacional. Es necesario continuar los estudios epidemiológicos en los sistemas de producción cárnica y lechera de Uruguay para conocer la dispersión del agente, establecer su relación con casos de listeriosis en humanos y diseñar/aplicar medidas de control adecuadas que disminuyan su diseminación entre animales de producción.

Palabras clave: Rumiante, romboencefalitis, pastoreo

Summary

Listeriosis is a disease associated with the consumption of food contaminated with bacteria of the genus *Listeria*. This study was carried out in an extensive beef cattle operation. The aims were to confirm the clinical suspicion of nervous listeriosis in a beef cattle, to detect asymptomatic carriers of *Listeria* sp. within the herd and to establish the presence of bacteria of the genus *Listeria* in pastures and drinking water from the farm. A cow showed circling, decubitus and death. Necropsy was performed and *Listeria monocytogenes* was isolated from the central nervous system (CNS). Suppurative meningoencephalitis with multiple microabscesses was observed in the brainstem and positive *L. monocytogenes* immunostaining was detected. Two asymptomatic cows were shedding *L. monocytogenes* and six were shedding *L. innocua* in feces. *Listeria* sp. was not isolated from pasture samples, while *L. innocua* was isolated in the water sample from the stream. *L. monocytogenes* isolates from CNS and another from an asymptomatic carrier cow were typified as serotype 4b profile, and the other one as serotype 1/2a. Both serotypes belong to the most commonly reported worldwide in humans and animals diseases, as well as in foods for human consumption nationwide. More epidemiological studies are necessary in beef and dairy cattle operations of Uruguay in order to investigate the dispersion of the agent, establish its relationship with cases of listeriosis in humans and design/apply control measures that reduce its dissemination among animals.

Key words: ruminant, rhombencephalitis, grazing

Introducción

El género *Listeria* está constituido por bacterias gram positivas, ampliamente distribuidas en el medio ambiente (Vázquez-Boland y col., 2001; Linke y col., 2014). Hasta la fecha se han identificado 17 especies (Orsi y Wiedmann, 2016). *Listeria monocytogenes* es la principal especie que se asocia a enfermedad en animales y humanos (Vázquez-Boland y col., 2001), aunque también se han descrito casos de listeriosis con aislamiento de *L. innocua* (Walker y col., 1994; Rocha y col., 2013; Favaro y col., 2014). Los productos lácteos y cárnicos (frankfurters, chacinados), ensaladas y alimentos listos para el consumo (RTE) contaminados con *L. monocytogenes* son los alimentos más frecuentemente relacionados a casos de la enfermedad en humanos (Cartwright y col., 2013).

Los rumiantes son particularmente susceptibles a la infección por *L. monocytogenes*, siendo la forma nerviosa la presentación clínica más común, caracterizada por hipoalgesia de la cara, dificultades masticatorias, parálisis facial unilateral, nistagmo, marcha en círculos, entre otros signos de afectación de pares craneanos (Oevermann y col., 2010). También se han reportado, aunque menos frecuentemente, casos de abortos, septicemia neonatal, queratoconjuntivitis/uveítis y enteritis (Oevermann y col., 2010; Fairley y col., 2012). Muchos trabajos han demostrado que los rumiantes sanos son portadores asintomáticos de bacterias del género *Listeria* incluyendo *L. monocytogenes*, excretándolas a través de materia fecal (Nightingale y col., 2004; Esteban y col., 2009). Dentro de los rumiantes, la especie bovina es la que tiene mayor prevalencia de animales portadores (Nightingale y col., 2004; Esteban y col., 2009), esto se relacionaría a una mayor prevalencia de *L. monocytogenes* a nivel ambiental en los predios que contienen bovinos (Nightingale y col., 2005).

En Uruguay, las enfermedades nerviosas de los bovinos tienen particular interés en su estudio y diagnóstico, debido a que integran el diagnóstico diferencial de la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2001). Un estudio retrospectivo realizado por Easton y col. (2012) reportó que las principales enfermedades infecciosas en Uruguay que afectan el sistema nervioso central de bovinos son rabia, meningoencefalitis por Herpesvirus bovino (BoHV), listeriosis y fiebre catarral maligna. Los objetivos de este trabajo fueron detectar la presencia de *L. monocytogenes* en un animal con signología nerviosa compatible, así como bovinos portadores asintomáticos en el mismo rodeo de carne pastoreando a campo natural. Además, detectar la presencia de bacterias del género *Listeria* sp. en el medio ambiente del predio.

Materiales y métodos

Predio en estudio

Este trabajo se realizó en un establecimiento agrícola ganadero ubicado en el Departamento de Paysandú (32°01'45" S,

57°25'17" W), Uruguay. El caso se presentó en un potrero de 100 hectáreas de campo natural donde pastoreaban 70 vacas de cría, algunas con cría al pie, sin suplementación. El agua de bebida se obtenía del arroyo que corría por el potrero.

En Setiembre de 2015 se consulta al Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino" porque una vaca Hereford, de ocho dientes, con ternero al pie, presentaba marcha en círculos hacia el mismo lado, no podía alimentarse, ni tomar agua. En las 24 horas siguientes el animal adoptó posición de decúbito permanente y muere sin recibir tratamiento alguno. No se constató dentro del rodeo otro animal afectado, ni abortos. Al día siguiente 12 horas luego de ocurrida la muerte, se concurrió al predio a realizar la necropsia.

Durante la necropsia se colectaron muestras (1cm × 1cm) de todos los órganos parenquimatosos y se sumergieron en formol bufferado al 10%. Se extrajo sistema nervioso central (SNC) que se dividió en dos mitades, una se colocó en formol para estudio histopatológico y la otra en bolsa estéril refrigerada para estudio bacteriológico.

Muestreo del rodeo problema y del ambiente

Nueve días después, se concurrió al predio a extraer muestras de materia fecal de 27 bovinos (vacas de cría) que se encontraban pastoreando junto al animal enfermo, de pasturas del potrero donde se encontraba el rodeo y del agua de bebida.

Para el cálculo de la cantidad de animales que se debían muestrear para detectar portadores asintomáticos, se utilizó la fórmula de Dohoo y col. (2003): $n = (1 - (1 - \alpha)^{1/D}) \times (N - (D - 1) \div 2)$.

Para este cálculo se asumió en base a la bibliografía (Nightingale y col., 2004; Esteban y col., 2009) que la prevalencia de portadores en el rodeo es del 10%, con un intervalo de confianza de 95% y que la sensibilidad de la prueba (cultivo en este caso) es del 90%, obteniéndose un número (n) de 27 animales a muestrear.

La elección de las vacas a muestrear fue aleatoria. La materia fecal se tomó del recto de cada animal con guante individual y se depositó en bolsas plásticas estériles individuales.

Se tomó una muestra de 500 mL de agua del arroyo que corría por el potrero. Para la recolección de esta muestra se sumergió un frasco estéril con tapa a rosca, allí se abrió la tapa y se cerró antes de sacarlo al exterior.

Se colectaron dos muestras de pastura (campo natural) del potrero donde se encontraba el animal afectado. Para la toma de muestras, se recorrió el potrero, colectando el forraje en 10 puntos distintos determinados aleatoriamente. El mismo se encontraba a una distancia de 5 cm del suelo, no incluía raíces, materia fecal, ni restos de suelo.

Cada muestra fue identificada y se mantuvo refrigerada en conservadoras a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Aislamiento microbiológico

Procedimiento

Esta actividad se realizó en la sección Bacteriología del Laboratorio Regional Noroeste. El procesamiento de las muestras de agua, pasturas, SNC y materia fecal se realizó siguiendo el protocolo de Nightingale y col. (2004).

La mitad del SNC, 25 g de cada muestra de materia fecal o pastura se colocaron en bolsas estériles Stomacher (Stomacher, UK) y se le agregó aseptícamente 225 mL de caldo de enriquecimiento *Listeria* (Oxoid, UK). El agua fue filtrada utilizando un filtro de celulosa estéril de 0,45 µm (Sartorius, Alemania), el filtro se transfirió a una bolsa Stomacher estéril y se le agregó 100 mL de caldo de enriquecimiento *Listeria* (Oxoid, UK). Las muestras se homogeneizaron durante 30 segundos a 200 rpm en Stomacher Circulator 400 (Stomacher, UK) y se incubaron durante 24 horas en aerobiosis a 30°C en estufa. Al día siguiente se transfirió aseptícamente una alícuota de 100 µL a 10 mL de caldo de enriquecimiento secundario FRASER (Oxoid, UK) incubándose por otras 24 horas en aerobiosis a 30°C. Luego se sembraron 100 µL de FRASER en placa de agar Oxford Modificado (Oxoid, UK). Las placas se incubaron a 35°C, en aerobiosis durante 48 horas. A las 24 y 48 horas fueron inspeccionadas para detectar crecimiento bacteriano.

Identificación de cepas del género *Listeria*

Las colonias con morfología sospechosa en agar Oxford Modificado [blancas, pequeñas y rodeadas de un halo marrón negro (hidrólisis de la esculina)] fueron repicadas en placas de agar sangre ovina al 7% y se incubaron 24 horas a 37°C en estufa. Sobre las colonias sospechosas de *Listeria* se realizaron las siguientes pruebas para la identificación de especie: tinción de Gram, prueba de catalasa, presencia/ausencia de un halo estrecho de β-hemólisis, prueba de CAMP con *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi*, y producción de ácido a partir de D-glucosa, L-ramnosa, manitol y D-xilosa.

Las colonias identificadas como *L. monocytogenes* fueron remitidas al Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene “Prof. Arnoldo Berta”, Facultad de Medicina, Universidad de la República, para la realización de estudios moleculares.

PCR multiplex para determinación del perfil de serotipo

Se utilizó un procedimiento de PCR múltiple para diferenciar los principales perfiles de serotipos de *L. monocytogenes*: 1/2a; 1/2b; 1/2c y 4b, según técnica descrita por Doumith y col. (2004).

Para la extracción de ADN las cepas de *L. monocytogenes* se sembraron en placas de agar infusión cerebro corazón (BHIA) y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Se tomaron 3 a 5 colonias de un cultivo puro con ansa descartable y se resuspendieron en 50 µL de solución de lisis (dodecil sulfato de sodio al 0,25% y NaOH 0,05 N). La suspensión se incubó a 99°C durante 15 mi-

nutos, se agregaron 100 µL de agua ultrapura tipo MilliQ a cada tubo y se centrifugaron a 12.000 rpm por 10 minutos. Cada sobrenadante se conservó a -20°C hasta su utilización como molde (2 µL) en las distintas reacciones de amplificación.

Como controles se incluyeron las siguientes cepas de referencia: *L. monocytogenes* serotipo 1/2a (CIP 89381), *L. monocytogenes* serotipo 1/2b (CIP 90602), *L. monocytogenes* 1/2c (CIP 89756) y *L. monocytogenes* serotipo 4b (CIP 88868).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µL conteniendo 1,25 U de Taq DNA polimerasa, 0,2 mM de cada dinucleótido trifosfatado (dNTP's), y 50 mM Tris-HCl-10 mM KCl-50 mM (NH₄)₂SO₄-2 mM MgCl₂ por tubo, a pH 8,3. Los cinco sets de *primers* se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: 1 µM para el *L. monocytogenes* o0737, ORF2819 y ORF2110; 1,5 µM para *L. monocytogenes* o1118; y 0,2 µM para *prs*.

Para las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, EEUU) y el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos; seguido por 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 53°C por 75 segundos y 72°C por 75 segundos cada uno; con un ciclo de extensión final de 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR se separaron por electroforesis sumergida en geles de agarosa al 2%. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 100V y 40 mA en buffer TBE 0,5X (90 mM base Trizma, 90 mM ácido bórico y 2 mM EDTA a pH 8,3) durante al menos 1 hora. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0,5 µL/mL) durante 15 minutos, se destiñeron con agua destilada durante 20 minutos, se observaron con luz ultravioleta y se fotografiaron.

Histopatología e inmunohistoquímica

Se realizó en la sección Patología del Laboratorio Regional Noroeste DILAVE “Miguel C. Rubino”. Se tomaron muestras representativas de todos los órganos muestreados así como de las principales regiones anatómicas del sistema nervioso central fijados en formol bufferado al 10%: corteza frontal, parietal y occipital, *corpus striatum*, tálamo, mesencéfalo, puente, cerebelo, bulbo y obex. Fueron procesadas en forma rutinaria para estudio histopatológico, cortadas a 5 micras de espesor y coloreadas con Hematoxilina y Eosina (H&E). La inmunohistoquímica se realizó siguiendo el protocolo de Easton y col. (2012). Los cortes de tronco encefálico se desparafinaron de forma rutinaria y se sumergieron en peróxido de hidrógeno al 10% en metanol durante 15 minutos. Luego se lavaron con agua destilada y se sumergieron en leche descremada al 5% por 25 minutos. Se lavaron nuevamente y se incubaron con el anticuerpo primario *Listeria monocytogenes* (Difco, EEUU) a una dilución de 1/200 durante una hora a 37°C. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario (LSAB) (Dako, EEUU) 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente y se sumergieron en streptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) (Dako, EEUU) otros 20 minutos a temperatura ambiente. Para el revelado de la reacción se incubaron las láminas con solución cromógena DAB (Dako, EEUU) durante 5 a 10 minutos y como contraste se utilizó Hematoxilina de Harris. Los cortes se deshidrataron rutinariamente y se mon-

taron para su observación al microscopio.

Resultados

Caso clínico

El animal en la necropsia presentó mucosas oculares congestivas. En cavidad abdominal se observó intestino delgado y grueso con escaso contenido. Al corte de los preestómagos no se observaron lesiones de significación. El hígado presentaba escasos trayectos fibrosados. En cavidad torácica destacaban áreas enfisematosas en ambos pulmones. En la apertura de cavidad craneana se observaron meninges congestivas.

En el SNC se aislaron colonias de *L. monocytogenes*.

En el estudio histopatológico, a nivel de tronco encefálico (puente, bulbo raquídeo y obex) se observó severa romboencefalitis caracterizada por meningitis supurativa moderada, difusa; infiltrado perivascular multifocal (“manguitos perivasculares”) compuesto por células mononucleares; múltiples microabscesos y focos de malacia (Figura 1). En la inmunohistoquímica se observó inmunomarcación positiva a *L. monocytogenes* en el citoplasma de neutrófilos y linfocitos de múltiples microabscesos (Figura 2). No se observaron lesiones significativas en el resto de los órganos examinados.

Muestreo del rodeo problema y el ambiente

Se realizaron 30 cultivos, 27 correspondieron a muestras individuales de materias fecales de vacas, una muestra de agua y dos muestras de pasturas. Se obtuvieron 2 aislamientos de *L. monocytogenes* (6,6 %) y 7 de *L. innocua* (23,3 %) (Cuadro 1). En la muestra de agua se recuperó *L. innocua*. En las muestras de pasturas no se aislaron bacterias del genero *Listeria*. De las 27 muestras de materia fecal, hubo aislamiento de *L. innocua* en seis (22,2%) de ellas, mientras que en dos (7,4%) se recuperó *L. monocytogenes* (Cuadro 1).

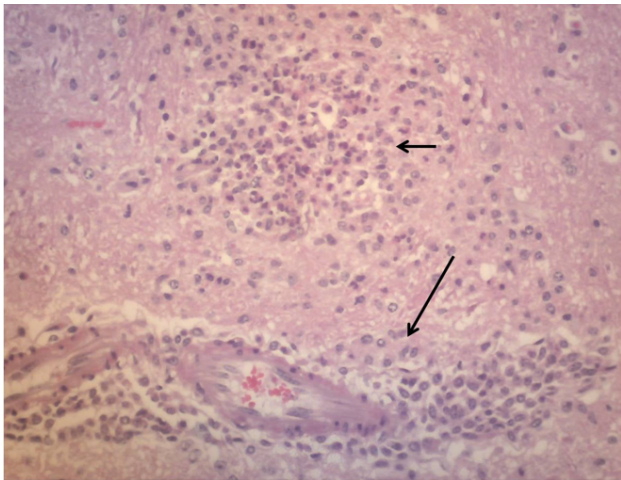


Figura 1: Bovino, SNC (puente). Infiltrado perivascular constituido por células inflamatorias mononucleares (flecha grande) y microabsceso (flecha pequeña). H&E, 100×.

Cuadro 1: Aislamientos realizados por tipo muestra y especie del Género **Listeria** en el establecimiento estudiado.

	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Negativo	Total
Agua	1	0	0	1
Pastura	0	0	2	2
Materia fecal	6	2	19	27
Total	7	2	21	30

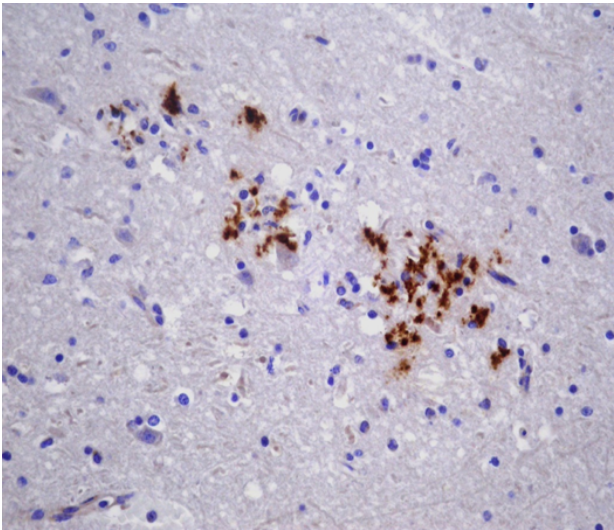


Figura 2: Bovino, SNC (puente). Inmunomarcación positiva a *L. monocytogenes* (áreas de color marrón) en el citoplasma de neutrófilos y linfocitos de un microabsceso, DAB, 400×.

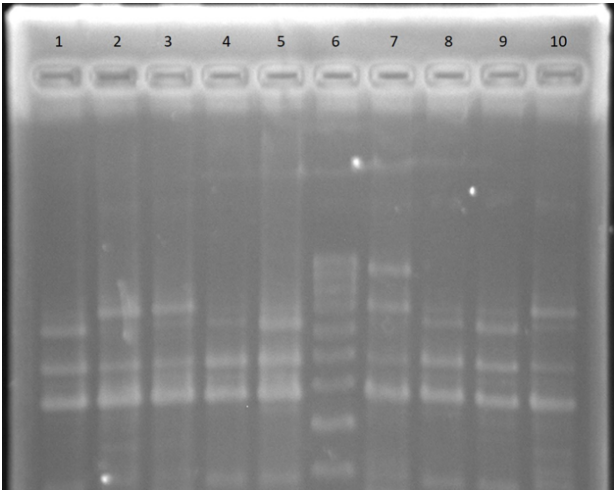


Figura 3: PCR Multiplex: Perfil de serotipo de los aislamientos de *L. monocytogenes* obtenidos. Línea 1: *L. monocytogenes* recuperada del sistema nervioso central de la vaca necropsiada. Línea 2: Control positivo de *L. monocytogenes* serotipo 1/2a. Línea 3: *L. monocytogenes* recuperada de materia fecal de bovino portador. Línea 4: Control positivo de *L. monocytogenes* serotipo 1/2b. Línea 5: *L. monocytogenes* recuperada de materia fecal de bovino portador. Línea 6: Marcador molecular. Línea 7: Control positivo de *L. monocytogenes* serotipo 1/2c. Línea 8: Control positivo de *L. monocytogenes* serotipo 4b. Línea 9: Control positivo de *L. monocytogenes* serotipo 4b. Línea 10: Control positivo de *L. monocytogenes* serotipo 1/2a.

PCR multiplex para determinación del perfil de serotipo

El aislamiento obtenido del sistema nervioso central así como uno de los aislamientos de materia fecal se tipificaron como perfil de serotipo 4b. El otro aislamiento obtenido de materia fecal se tipificó como perfil 1/2a (Figura 3).

Discusión

Se confirmó la sospecha clínica de listeriosis nerviosa en una vaca de cría con ternero al pie en un sistema extensivo de producción de carne. Esta enfermedad ha sido descrita en rumiantes en Uruguay por varios autores (Dutra, 2009; Dutra, 2010; Easton y col., 2012; Matto y col., 2017), sin embargo, existía un solo reporte en bovinos en condiciones extensivas (Dutra, 2009). En este caso, el aislamiento en SNC se asoció a las lesiones histológicas y la marcación inmunohistoquímica observada en tronco encefálico. La romboencefalitis es la forma más común de listeriosis en rumiantes (Oevermann y col., 2010) y en Uruguay *L. monocytogenes* es uno de los principales agentes causales de encefalitis en bovinos (Easton y col., 2012).

Teniendo en cuenta que solo enfermó un bovino en un total de 70 que formaban el rodeo, se sospecha que ese animal presentaba alguna afección que lo hizo susceptible a la infección, debido a que *L. monocytogenes* suele ser un patógeno oportunista (Vázquez-Boland y col., 2001; Oevermann y col., 2010). El factor predisponente para este episodio no pudo determinarse con los estudios realizados.

En coincidencia con lo registrado en este episodio, se ha reportado que los casos de listeriosis en rumiantes tienen una mayor prevalencia en invierno e inicio de la primavera, debido a una mayor excreción fecal del agente y, en consecuencia, mayor contaminación ambiental (Nightingale y col., 2005). Además se dan condiciones ambientales de mayor humedad y frío que permiten la sobrevivencia del agente (Vázquez-Boland y col., 2001).

Se detectaron dos vacas asintomáticas cohabitantes que excretaban *L. monocytogenes* dentro del rodeo. Esto favorecería la dispersión del agente en el predio a través de la materia fecal, perpetuando el ciclo de transmisión de la bacteria en el medio ambiente (Ivanek y col., 2006). En un estudio realizado por Nightingale y col. (2004), se reportó que en aquellos predios con casos de listeriosis, la prevalencia de *L. monocytogenes* en ambientes y animales fue significativamente mayor. Por otra parte, en la bibliografía existen escasos trabajos que estudien la prevalencia de bovinos portadores de *L. monocytogenes* en sistemas de producción de carne. Esteban y col. (2009) en un muestreo en el País Vasco, España, reportaron una prevalencia de 7,7% mientras que, Mohammed y col. (2009) describen una prevalencia promedio de portadores asintomáticos de 3,4 % en establecimientos de cría y 0,3 % en *feedlots* en el estado de California, Estados Unidos. En este trabajo se detectaron además 6 vacas que excretaban *L. innocua* en materia fecal; aunque es una especie clasificada como no patógena, se han reportado casos de listeriosis tanto en seres humanos como en rumiantes (Walker y col., 1994; Rocha y col., 2013; Favaro y col., 2014).

El hecho de detectar bovinos portadores asintomáticos que excretan *L. monocytogenes* en materia fecal, tendría repercusión además a nivel de la industria de la carne, ya que en el proceso de faena en el momento del cuereado podría contaminarse la carcasa (Rivera-Betancourt y col., 2004; Guerini y col., 2007). El trabajo de Rivera-Betancourt y col. (2004) reporta contaminación de los cueros bovinos por *L. monocytogenes* en plantas frigoríficas de Estados Unidos en una prevalencia de 9,9%.

Este caso se presentó en un bovino alimentado a campo natural, sin la administración de ensilado ni suplementos. Tradicionalmente, esta enfermedad se asocia al consumo de ensilado en mal estado (Nightingale y col., 2004). Sin embargo, en Nueva Zelanda, Argentina y Uruguay se han descrito casos de listeriosis en rumiantes asociados a condiciones de pastoreo (Fairley y col., 2012; Margineda y col., 2012; Matto y col., 2017). En el presente estudio no se detectó la presencia de *Listeria* sp. en las muestras de pasturas analizadas. Esto podría explicarse debido a que la pastura no fue la fuente de infección o que, debido a la extensión del potrero problema no se tomaron la cantidad de muestras suficientes para su detección. Mohammed y col. (2009) reportaron una prevalencia de 5,3% de *L. monocytogenes* en pasturas en establecimientos ganaderos, donde el 28% de los predios presentaban al menos una muestra positiva. Por otro lado, se detectó la presencia de *L. innocua* en muestra de agua del arroyo, este hallazgo podría indicar una posible fuente de infección. Estudios realizados por Lyautey y col. (2007), Mohammed y col. (2009) y Linke y col. (2014) recuperaron en aguas fluviales (lagos, tajamares y/o arroyos) especies no patógenas como *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. floridensis* entre otras, así como también especies patógenas como *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*. Esto sugeriría que el agua no potable y contaminada con materia fecal de animales podría constituir un vehículo potencial para la diseminación de *Listeria*.

El aislamiento de *L. monocytogenes* del caso clínico y el de otro bovino portador asintomático fueron tipificados como perfil de serotipo 4b, el aislamiento restante (portador asintomático) se identificó como 1/2a. Estos serotipos se encuentran entre los más frecuentemente aislados en casos de enfermedad en humanos y animales (Vázquez-Boland y col., 2001; Oevermann y col., 2010). El serotipo 4b es frecuente en casos de listeriosis en humanos a nivel mundial. Tiende a producir brotes y formas clínicas severas, así como también se asocia a la forma nerviosa en rumiantes (Vázquez-Boland y col., 2001; Oevermann y col., 2010). Por otro lado, Nightingale y col. (2004) observaron mayor prevalencia del serotipo 1/2a en rumiantes clínicamente sanos. La presencia del serotipo 1/2a circulando en los animales y ambiente de los predios, constituye además un riesgo importante para la contaminación de los productos de origen animal. Este serotipo tiene mayor capacidad de adherirse a superficies inertes como acero inoxidable y formar *biofilms*, contaminando el ambiente de las industrias procesadoras y los alimentos (Borucki y col., 2003; Orsi y col., 2011).

En un estudio realizado en Uruguay en alimentos para consumo humano, se encontró que el 87% de los aislamientos de *L. monocytogenes* corresponden a los serotipos 1/2b y 4b, mientras

que el 6,94% al serotipo 1/2a (Braga y col., 2017). En el mismo sentido, los serotipos 4b y 1/2b son los más frecuentes en casos humanos de listeriosis en nuestro país (Mota y col., 2018). Estos resultados sugieren que habría riesgo potencial de contaminación por *L. monocytogenes* de los subproductos de origen animal para consumo humano. Se necesitan más estudios que incluyan encuestas epidemiológicas detalladas y la comparación genética de aislamientos humanos y animales para establecer si existe un vínculo epidemiológico.

Conclusiones

Ante la sospecha clínica de la enfermedad se logró el aislamiento de *L. monocytogenes* del sistema nervioso central, confirmando el diagnóstico en un rodeo de bovinos de carne en un sistema de producción extensiva.

Se detectaron vacas de cría portadoras asintomáticas que excretaban *L. monocytogenes* o *L. innocua* en sus materias fecales. Esta situación contribuiría a la dispersión y perpetuación del agente en el ambiente del predio, así como también, podría ser un riesgo de contaminación de la canal en plantas de faena a través de cueros contaminados.

Sería necesario continuar los estudios epidemiológicos en los sistemas de producción cárnica y lechera de Uruguay para conocer la dispersión del agente, establecer su relación con casos de listeriosis en humanos y diseñar/aplicar medidas de control adecuadas que disminuyan su diseminación entre animales de producción.

Bibliografía

1. Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(12): 7336-7342.
2. Braga V, Vázquez S, Vico V, Pastorino V, Mota MI, Legnani M, Schelotto F, Lancibidad G, Varela G. (2017). Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. *Braz J Microbiol.* 48 (4): 689-694.
3. Cartwright EJ, Jackson KA, Johnson SD, Graves LM, Silk BJ, Mahon BE. (2013). Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 19: 1-9.
4. Dohoo I, Martin W, Stryhn H. (2003). Sampling. En: Dohoo I, Martin W, Stryhn H. *Veterinary Epidemiologic Research*. Charlottetown, Ed. AVC, 706 p.
5. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42(8): 3819-3822.
6. Dutra F. (2009). Archivo Veterinario del Este, Boletín N°1. Disponible en: https://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/7_f7791f92/archivosAdjuntos/n-1.pdf Fecha de visita: 31/07/2018.
7. Dutra F. (2010). Archivo Veterinario del Este, Boletín N°7. Disponible en: https://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/8_b5adbb8e/archivosAdjuntos/n-4.pdf Fecha de visita: 31/07/2018.
8. Easton C, Preliasco M, Paullier C, Marcolongo-Pereira C, Nakazato L, Rivero R. (2012). Estudio retrospectivo para la identificación de agentes infecciosos que provocan encefalitis en bovinos de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (186): 13-18.
9. Esteban JI, Oporto B, Arduiz G, Juste RA, Hurtado A. (2009). Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Vet. Res.* 5(2): Vet. Res. doi: 10.1186/1746-6148-5-2.
10. Fairley RA, Pesavento PA, Clark RG. (2012). *Listeria monocytogenes* infection of the alimentary tract (Enteric listeriosis) of sheep in New Zealand. *J. Comp. Path.* 146: 308-313.
11. Favaro M, Sarmati L, Sancesario G, Fontana C. (2014). First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and etanercept. *JMM Case Rep.* doi: 10.1099/jmmcr.0.003103. 1(2): 1-5.
12. Guerini MN, Brichta-Harary DM, Shackelford SD, Arthur TM, Bosilevac JM, Kalchayanand N, Wheeler TL, Koohmaraie M. (2007). *Listeria* prevalence and *Listeria monocytogenes* serovar diversity at cull cow and bull processing plants in the United States. *J. Food Prot.* 70(11): 2578-2582.
13. Ivanek R, Gröhn YT, Wiedmann M. (2006). *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. *Food. Path. Dis.* 3(4): 319-336.
14. Linke K, Rückerl I, Brugger K, Karpiskova R, Walland J, Muri-Klinger S, Tichy A, Wagner M, Stessl B. (2014). Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(18): 5583-5592.
15. Lyautey E, Lapen DR, Wilkes G, McCleary K, Pagotto F, Tyler K, Hartmann A, Piveteau P, Rieu A, Robertson WJ, Medeiros DT, Edge TA, Gannon V, Topp E. (2007). Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the south nation river watershed, Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(17): 5401-5410.
16. Margineda C, Cantón G, Lischinsky L, Moreira A, Campeiro C. (2012). Listeriosis en bovinos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. vet.* 23 (1): 32-37.
17. Matto C, Varela G, Mota MI, Giannechini R, Rivero R. (2017). Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in a pastured bull. *J. Vet. Diagn. Investig.* 29(2): 228-231.
18. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (2001) *Legislación Sanitaria Animal*. 483 p.
19. Mohammed H, Atwill E, Dunbar L, Ward T, McDonough

- P, Gonzalez R, Stipetic K. (2009). The risk of *Listeria monocytogenes* infection in beef cattle operations. J Appl Microbiol. 108(1):349-56.
20. Mota MI, Braga V, Vico V, Vázquez S, Matto C, Pardo L, Schelotto F, Varela G. (2018). Tipificación de aislamientos de *Listeria monocytogenes* de origen humano, bovino, ambiental y alimentario en Uruguay, 2010-2017. Congreso Latinoamericano de Microbiología, XXIV, Santiago de Chile, Chile, 133p.
21. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Gröhn YT, McDonough PL, Wiedmann M. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. Appl. Environ. Microbiol. 70(8):4458-4467.
22. Nightingale KK, Fortes ED, Ho AJ, Schukken YH, Gröhn YT, Wiedmann M. (2005). Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227:1808-1814.42: 245-253.
23. Oevermann A, Zurbriggen A, Vandvelde M. (2010). Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: A zoonosis on the rise? Interdiscipl Perspect Infect Dis. doi: 10.1155/2010/632513.
24. Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int. J. Med. Microbiol. 301:79-96.
25. Orsi RH, Wiedmann M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100: 5273-5287.
26. Rivera-Betancourt M, Shackelford SD, Arthur TM, Westmoreland KE, Bellinger G, Rossman M, Reagan JO, Koohmaraie M. (2004) Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. J. Food Prot. 67(2): 295-302.
27. Rocha PRD, Dalmaso A, Grattarola C, Casalone C, Del Piero F, Bottero MT, Capucchio MT. (2013). Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. Res. Vet. Sci. 94: 111-114.
28. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14(3):584-640.
29. Walker JK, Morgan JH, McLauchlin J, Grant KA, Shallcross JA. (1994). *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. Vet. Microbiol. 42: 245-253.

ANEXO II

CASE REPORT

Listeria innocua isolated from diseased ruminants harbour minor virulence genes of *L. monocytogenes*

Carolina Matto¹  | Bruno D'Alessandro² | María Inés Mota³ | Valeria Braga³ | Alejandro Buschiazzi⁴ | Edgardo Giannechini¹ | Gustavo Varela³ | Rodolfo Rivero¹

¹ Laboratorio Regional Noroeste DILAVE 'Miguel C. Rubino' DGSG-MGAP, Paysandú, Uruguay

² Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

³ Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

⁴ Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

Correspondence

Carolina Matto, Laboratorio Regional Noroeste, DILAVE 'Miguel C. Rubino', Ruta 3 km 369, Paysandú, Uruguay.
Email: cmatto@mgap.gub.uy

Carolina Matto and Bruno D'Alessandro authors contributed equally to this work.

Funding information

Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Grant/Award Number: FSSA_1_2019_1_160057

Abstract

Listeriosis is one of the most common nervous diseases in ruminants, and is caused almost exclusively by the Gram-positive bacterium, *Listeria monocytogenes*. However, there are few reports of listeriosis associated with *L. innocua*, which is genetically closely related to *L. monocytogenes*, but considered non-pathogenic. In this work, we report two cases of suppurative meningoencephalitis in apparently previously healthy ruminants from different farms, in which two strains of *L. innocua* were recovered. The whole genomes from both isolates were sequenced, allowing phylogenetic analyses to be performed, which indicated that the two strains were very closely related. Virulence determinants were searched, especially genes coding for the main *L. monocytogenes* virulence factors which have been previously described in *L. innocua*. Surprisingly, the two isolates do not possess such virulence determinants. Instead, both strains carried a set of genes that encode for other virulence factors of the genus *Listeria* detected using the Virulence Factor Database (VFDB): *iap* (division and invasion of host cells), *lpeA* (entry into non-professional phagocytes cells), *fbpA* (multifunctional virulence factor, including adherence to host cells), *lspA* (surface protein anchoring), *lap* (adhesion to enterocytes and trans epithelial translocation), *pdgA* (resistance to lysozyme), *oatA* (resistance to different antimicrobial compounds and also required for growth inside macrophages), *lplA1* (use of host-metabolites for in vivo growth), *gtcA* (catalyses teichoic acid of bacterial wall), *prsA2* (cell invasion, vacuole lysis and intracellular growth), *clpC*, *clpE* and *clpP* (survival under several stress conditions). These genes among others detected, could be involved in the ability of *L. innocua* to produce damage in animal and human hosts. These results highlight the multifactorial profile of *Listeria* pathogenesis and the need for comprehensive scientific research that address microbiological, environmental and veterinary aspects of listeriosis.

KEYWORDS

cattle, genome, listeriosis, sheep, virulence factors

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Veterinary Medicine and Science* published by John Wiley & Sons Ltd.

1 | INTRODUCTION

Listeriosis is one of the most common nervous diseases reported in ruminants. The etiological agent responsible for the disease is *Listeria monocytogenes*, a Gram-positive, facultative intracellular bacterium, which enters the host through contaminated feed (Walland et al., 2015).

L. innocua is genetically close to *L. monocytogenes*, but classically considered non-pathogenic (Buchrieser et al., 2003). It has a wide distribution in the environment, including in ruminant farms as well as in the food industries (Matto et al., 2018; Moreno et al., 2012). Contradicting the classical idea, it has been shown that haemolytic strains of *L. innocua* are capable of infecting eukaryotic cells in experimental models like mouse and zebrafish (Moura et al., 2019). However scarce, there are reports of this agent in humans (Favaro et al., 2014; Perrin et al., 2003) and animal infections (Rocha et al., 2013; Walker et al., 1994).

Here we describe two cases of nervous listeriosis in ruminants associated with non-haemolytic *L. innocua* isolates, as well as the phylogenetic analysis and the virulence profile based on the complete genomic sequences.

2 | MATERIALS AND METHODS

The Northwest Regional Laboratory of DILAVE 'Miguel C. Rubino', DSGG-MGAP Uruguay, received the complete central nervous system (CNS) (cerebral hemispheres, cerebellum and brainstem) of a 1-year-old Aberdeen Angus bull. The animal came from a beef cattle operation in Flores County, Uruguay. The bull showed circling, aggressiveness and ataxia. The clinical symptoms lasted two days until death. Of 41 bulls in the herd, only one was affected.

A second specimen was received from a different farm, corresponding to the whole CNS of a 1-year-old crossbreed sheep. The animal showed lateral left head deviation and circling. The nervous symptoms lasted seven days until death. It was the only sheep affected from a flock of 120 animals, located in Paysandú County, Uruguay.

The CNS of both animals was sectioned longitudinally in two halves. One half was fixed in 10% buffered formalin for histopathology. Different anatomical sections were dehydrated, embedded in paraffin and cut at 5 μ m for haematoxylin and eosin staining.

The other half was immersed in buffered *Listeria* enrichment broth (BLEB) (Oxoid®) and incubated for 48 h at 30°C in aerobiosis. At 24 and 48 h, 100 μ l of broth was scattered on a Modified Oxford Agar plate (MOX) (Oxoid®). Plates were incubated in aerobiosis at 35°C, checking for growth at 24 and 48 h. Small white colonies surrounded by a black halo, were transferred to a 5% sheep blood agar plate (SBA-5%) and also, inoculated in a 1.5 ml vial with trypticase soybean broth (TSB) plus glycerol to preserve them at -80°C. To identify the isolates, we performed Gram stain; catalase test, esculin hydrolysis; and sucrose, glycerol, D-xylose, D-mannitol and D-mannose utilisation assays (Carlin et al., 2021; Hitchins et al., 2020). We also used the API *Listeria* system (BioMérieux®) following the manufacturer's instructions. *L. monocytogenes* ATCC 19111 was included as control. PCR was also performed to detect the *inlA* gene, according to Liu et al. (2007).

Genomic DNA from both isolates was extracted with the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen®) and used for whole-genome sequencing (WGS) on an Illumina MiSeq platform with a TruSeq Nano library kit. The reads were trimmed using the software Trimmomatic (version 0.39) (Bolger et al., 2014), with the following parameters ILLUMINA-CLIP: 'adapter file':2:30:10 LEADING:20 TRAILING:20 SLIDINGWINDOW:5:20 AVGQUAL:20 MINLEN:90, being that the adapter file used (TruSeq3-PE-2.fa) is part of the Trimmomatic distribution. Genome assembly was performed using SPAdes software (version 3.13.1) (Prijbelski et al., 2020) with the following settings: -k 21,33,55,77 -careful -only-assembler -cov-cutoff 'auto'. Quality of assemblies was assessed using QUAST software (version: 5.0.2) (Gurevich et al., 2013) (see Supplementary Table S1). Genome-based species identification was performed using the average nucleotide identity (ANiB) with the reference genome Clip11262 (NCBI accession NC_003212.1) (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) (Rodriguez-R & Konstantinidis, 2014).

The genomes of other 12 *L. innocua* strains were selected from the NCBI Genome Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) for phylogenetic and virulence profile analysis (see Supplementary Table S2). Whole genome phylogeny was performed from the assemblies using the Enterbase Tool Kit (EToKi) pipeline (Zhou et al., 2020). First, the *align* module was run using the genome sequence of strain Clip11262 as the reference with the following options: -a- and -c 1. Then, the alignment output file obtained in the previous step was used to perform the phylogeny using the RAXML-NG software (version 0.9.0) (Kozlov et al., 2019) with the following options: -model GTR+G, -seed 3 and -bs-metric fbp. Using this setup the bootstrapping converged after 550 replicates. The tree support values were drawn on the best-scoring tree (best value for estimated likelihood).

To complement this information, a comparative test was performed to count the difference in single nucleotide polymorphisms (SNPs) between the two isolates. To obtain specific SNPs between pairs of genomes, the *nucmer* module of the MUMmer software (Marçais et al., 2018) (version 4.0.0) was used with the settings -maxmatch and -l 12, followed by the *show-snps* module with the -CHiRT setting.

Finally, genome sequence analysis was focused on the presence of genes encoding putative virulence factors. The software ABRicate version 1.0.1 (<https://github.com/tseemann/abricate>) was run with default parameters ($\geq 80\%$ sequence identity and $\geq 80\%$ sequence coverage) using the core dataset from the Virulence Factor Database 2.0 (VFDB) (last update in April 2020). The core dataset of VFDB only contains genes from virulence factors experimentally verified from the same genus as the query genome (Liu et al., 2019). For all the genes found using this approach, the presence of premature stop codons and partial sequencing coverage was checked by manual curation. To search for orthologs of these putative virulence genes, the genomes were first annotated using Prokka (Seeman, 2014), to then retrieve target genes' protein sequences from the .faa files, together with their genome feature metadata (.gff files). Automatic annotations were confirmed by finding orthologous sequences on the UniProtKB database with two rounds of PSI-BLASTp (blast.ncbi.nlm.nih.gov) followed by multiple sequence alignments of hits (using Cobalt at the NCBI server), spanning different *Listeria* species and other bacterial genera including pathogenic species. These results also allowed us to manually

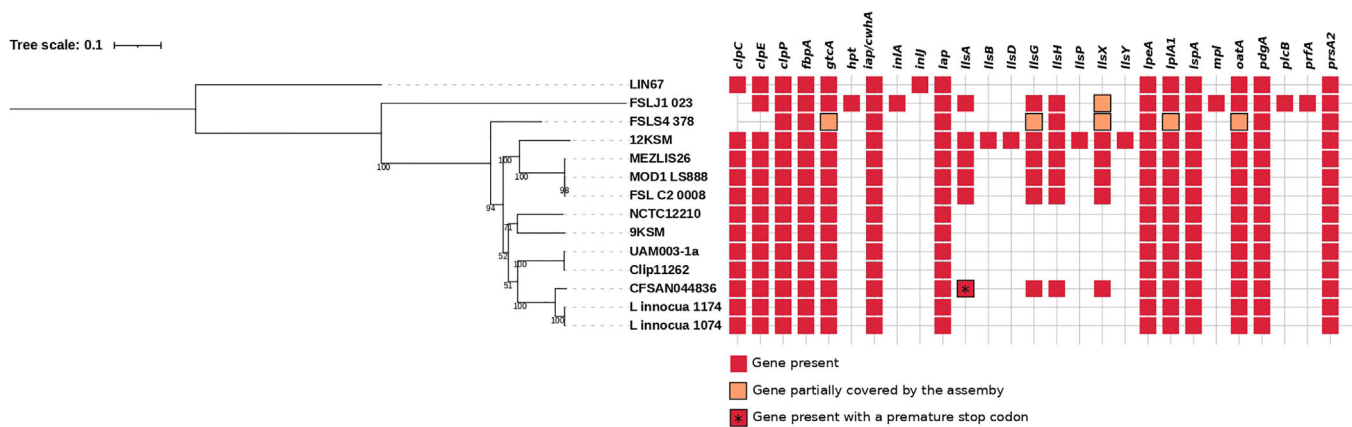


FIGURE 1 Whole genome maximum likelihood phylogenetic tree including the two reported *L. innocua* strains (*L. innocua* 1074 and *L. innocua* 1174) and another 12 representative strains of the *L. innocua* diversity, selected from the NCBI Genome Database. The tree is rooted to the LIN67 leaf and the reference genome is Clp11262. Coloured boxes represent the presence of the different genetic traits obtained with the VFDB core dataset. Red boxes indicate the presence of a complete gene. Red boxes with stars indicate truncated genes due to the presence of internal stop codons. Pale orange boxes indicate genes partially covered by the assembly. FBP bootstrap values are shown

confirm conservation of key residues of target proteins in some cases. A more extensive virulence profile of all the *L. innocua* genomes used in this work was also performed using the BIGSdb-Lm server from the Institut Pasteur (Moura et al., 2016); however, these results were not manually curated. The plugin Gene Presence was ran using the Virulence scheme and the following parameters: $\geq 80\%$ sequence identity, $\geq 80\%$ sequence coverage and 20 bp BLASTN word size (https://bigsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_listeria_isolates).

3 | RESULTS

Histopathology analyses of both CNS samples showed a moderate suppurative meningoencephalitis with presence of multifocal microabscess lesions, compatible with listeriosis.

In both CNS cultures grew suspicious colonies of *Listeria* spp. The colonies were non-haemolytic, made up of Gram-positive rods, catalase-positive, capable of hydrolysing esculin, sucrose and glycerol fermenters, and unable to produce acid from D-xylose, D-mannitol or D-mannose. The API Listeria yielded the bionumber 7510 corresponding to *L. innocua* with a 99.6% probability. They were PCR-negative for the gene encoding internalin A. According to these results, the isolates were identified as *L. innocua*, and named *L. innocua* 1074 (cattle isolate) and *L. innocua* 1174 (sheep isolate), respectively.

Whole genomes from both isolates were sequenced (reads are available in the SRA database from NCBI; see supplementary Table S2), and their ANIb analysis confirmed both as *L. innocua* species (98.8% identity with the reference genome).

A whole genome phylogenetic analysis was performed, including the two isolates reported here and 12 additional genomes that span *L. innocua* diversity. The obtained tree showed that the local isolates obtained from both animals were closely related to each other (Figure 1). This was further studied by a SNPs comparative analysis,

which resulted in a difference of 86 SNPs using the cattle isolate as reference, and of 115 SNPs if the reference was the sheep strain.

Virulence factor profiling using the VFDB core dataset identified the presence of 13 genes conserved in both isolates as shown in Figure 1. Manual curation of these results showed that none of these genes had premature stop codons or failed to be covered by the sequencing process. Through this analysis we also found that the virulence factors harboured in these two isolates were also present in most of *L. innocua* reference strains (Figure 1). A more extensive profiling using the BIGSdb-Lm confirmed these results as well as the presence of other genes potentially involved in *Listeria* pathogenesis, which were also present in the other *L. innocua* genomes used in this study (see Supplementary Table S3).

4 | DISCUSSION

In this work *L. innocua* was isolated from the central nervous system of two animals with encephalitis. Along with the observed histopathologic lesion in the CNS, this supports the hypothesis that *L. innocua* was the agent responsible for the nervous symptoms of these animals. It has been previously described that cattle are asymptomatic carriers of *L. innocua*, shedding this microorganism in the faeces (Hofer & Reis, 2005; Matto et al., 2018). However, there are only two reports of *L. innocua* as the cause of meningoencephalitis in ruminants (Rocha et al., 2013; Walker et al., 1994), to be contrasted to the numerous reports of animal listeriosis due to *L. monocytogenes* strains (Walland et al., 2015). This is the first report of nervous listeriosis in ruminants due to *L. innocua* in which their genomes were sequenced, and the presence of virulence factors was studied.

The narrow phylogenetic difference found between the genomes of the two isolates is quite interesting (Figure 1), as they were isolated from different animals in two unrelated farms, distanced more than

150 km apart, and without exchange of animals between them. This result suggests a common source of contamination or, a common circulation pathway for these bacteria in ruminants throughout the country or the region. Also, our results encourage the need to maintain the surveillance of cases of nervous diseases in ruminants, and to sequence more *Listeria* isolates, in order to confirm or refute these hypotheses.

Neither of both isolates showed β -haemolysis in SBA-5% plates. This finding is consistent with the absence of the *hly* gene, coding for haemolysin O (a cholesterol-dependent pore-forming toxin), one of the main virulence factors of *L. monocytogenes*, located in the cluster called LIPI-1 (Vázquez-Boland et al., 2001). The absence of *hly* motivated us to search for the entire LIPI-1 cluster, finding that neither of both isolates possessed any LIPI-1 genes. Other authors have reported β -haemolytic *L. innocua* strains, but harbouring LIPI-1 genes (such as *prfA*, *plcA*, *hly*, *actA*, *mpl* and *PlcB*) (Clayton et al., 2013; Johnson et al., 2004; Moura et al., 2019). Similarly, Moreno et al. (2012) described six *L. innocua* isolates with the presence of the *hly* gene and the *inlAB* operon.

Moving further in the study of the genetic background of these *L. innocua* isolates, we did not find any of the internalin genes. The absence of the *inlA* gene was first detected by PCR and then confirmed with the whole genome sequences. Additionally, neither of these two isolates possess the listeriolysin S gene cluster (LIPI-3) of *L. monocytogenes*. Other reports described the presence of *inlA* gene in 9 out of 42 *L. innocua* isolates (Moura et al., 2019), or the LIPI-3 cluster (Clayton et al., 2013; Moura et al., 2019). However, both isolates harboured full LIPI-4 cluster and involved in placental and neural tropism of *L. monocytogenes* clonal complex CC4 (Maury et al., 2016). Moura et al. (2019) also reported the presence of the LIPI-4 cluster in most of the *L. innocua* isolates studied in their work; however, some of them presented mutations.

Taking into account our results, we wonder if the genes identified in VFDB (Figure 1) could provide the molecular basis to explain the pathogenic behaviour of the isolates of this work. Some of these genes have been reported in *L. monocytogenes* and other Gram-positive bacteria, individually associated with roles in virulence and/or pathogenicity (Burkholder & Bhunia, 2010; Forster et al., 2011; Keeney et al., 2007; Meireles et al., 2020; Osanai et al., 2013; Rae et al., 2011; Réglier-Poupet et al., 2003a,b; Vázquez-Boland et al., 2001). At least 5 of the 13 virulence genes found encode proteins related to bacterial adhesion to, and/or invasion into mammalian cells. (i) The *iap* gene (invasion-associated protein) codes for the extracellular protein p60 with murein hydrolase activity and necessary for bacterial division and invasion of host cells (Vázquez-Boland et al., 2001; Wuenscher et al., 1993). (ii) The *lpeA* gene encodes a protein that belongs to the Lipoprotein Receptor-associated Antigen I (Lral) superfamily. Lral proteins are associated to the bacterial surface and include several adhesion proteins from many Gram-positive pathogenic bacteria such as PsaA adhesins from *Streptococcus pneumoniae*, FimA from *S. parasanguis* and EfmA from *Enterococcus faecium*, among others. Like the other Lral proteins, *L. innocua* LpeA includes an extracellular SBP domain ('Streptococcal solute-binding proteins'), which in *L. monocytogenes* binds Zn^{+2} and Mn^{+2} and mediates the entry to eukaryotic cells including hepatocytes and macrophages (Réglier-Poupet et al., 2003b). (iii) The identification

of the *lspA* gene further confirms the role of LpeA in promoting cell entry. LpsA is a type II signal peptidase, shown to be essential for LpeA maturation (Réglier-Poupet et al., 2003a), with genetic defects in *lpsA* inducing faulty LpeA maturation, consequent loss of its proper surface localisation, and ultimately significant attenuation of *L. monocytogenes* virulence (Réglier-Poupet et al., 2003a). (iv) *lap* (Listeria adhesion protein) promotes adhesion to intestinal epithelial cells and facilitates extraintestinal dissemination of the bacteria (Burkholder & Bhunia, 2010). (v) Finally, the *fbpA* gene encodes an adhesin comprising fibronectin-binding domains, FbpA, that functions as an adhesion protein to host cells, especially hepatocytes (Osanai et al., 2013).

Among the virulence-encoding genes, these *L. innocua* isolates also include genes coding for enzymes that protect bacteria against host defences, or that enhance their survival within the cytosol of infected cells. For example, the *pdgA* and *oatA* genes (peptidoglycan N-deacetylase and O-acetylase, respectively) may be essential to resist the host's lysozyme. Mutants in these two genes result in increase of peptidoglycan's sensitivity to lysozyme inducing *L. monocytogenes* virulence attenuation (Rae et al., 2011). We also found the *lplA1* gene, which encodes a lipotease, an enzyme that promotes *Listeria* cytosolic replication within host cells (Keeney et al., 2007).

Other two genes found in these two genomes encode for enzymes that likely play important roles in maintaining the integrity and stability of the bacterial wall in *Listeria*. The *gtcA* gene encodes an enzyme that catalyses teichoic acid glycosylation on *L. monocytogenes* wall. Proper glycosylation mediates key pathogenicity features: the correct anchoring of major surface virulence factors (Ami e InlB); resistance to antimicrobial peptides and decreased susceptibility to antibiotics (Meireles et al., 2020). The second gene present is *prsA2*, which encodes a peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase that assists in correct protein folding. As such, PrsA2 regulates the maturation and secretion of some proprotein virulence factors (such as phospholipase C PC-PLC) of *L. monocytogenes* (Forster et al., 2011).

Finally, three genes that encode proteases, *clpC*, *clpE* and *clpP*, were also identified; these are proposed to act as stress response mediators and to assist with intracellular replication (Vázquez-Boland et al., 2001).

This genetic background might be consistent with virulence retention in both *L. innocua* isolates from clinical cases of listeriosis. The genes identified using VFDB and BIGSdb-Lm databases, code for virulence factors called minor or accessory but it has been proven that many are capable of promote cell invasion and/or intracellular replication (Burkholder & Bhunia, 2010; Forster et al., 2011; Keeney et al., 2007; Meireles et al., 2020; Osanai et al., 2013; Rae et al., 2011; Réglier-Poupet et al., 2003a,b; Vázquez-Boland et al., 2001). It is noteworthy that genes identified in both isolates are present in most of the reference strains of *L. innocua* from the NCBI genome database. However, none of them were obtained from diseased ruminants. As we mentioned above, there are only two cases of animal listeriosis due to *L. innocua* reported previously, but their genome sequences are not available to compare with those described here.

Regarding that just one of several animals per farm was affected, other issues to be considered in order to attempt to explain the

situation are (i) the previous animal health condition and (ii) bacterial exposure load to which these animals were subjected. Disease could be due to unequal exposure to *L. innocua* present in feed or farm environment, presence of debilitating factors in these animals, or both simultaneously. However, until now, individual risk factors for ruminants are poorly understood (Walland et al., 2015). The findings reported in this work highlight the multifactorial nature of the *Listeria* pathogenesis and reinforce the need for detailed scientific research that include microbiological, environmental and veterinary aspects.

ACKNOWLEDGEMENTS

Carolina Matto has a Doctoral scholarship from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII-Uruguay) number POS_NAC_2019_1_157866. The investigation received funding from [Agencia Nacional de Investigación e Innovación](#) (ANII-Uruguay) identified as FSSA_1_2019_1_160057.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

ETHICAL STATEMENT

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to. No ethical approval was required because the laboratory received samples which correspond to dead animals at farms.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Carolina Matto: funding acquisition; investigation; methodology; resources; visualisation; writing – original draft; writing – review & editing. **Bruno D'Alessandro:** data curation; formal analysis; methodology; resources; software; visualisation; writing – review & editing. **Edgardo Giannechini:** investigation; methodology; resources; writing – review & editing. **Gustavo Varela:** conceptualisation; formal analysis; investigation; methodology; resources; supervision; visualisation; writing – review & editing. **Rodolfo Rivero:** conceptualisation; formal analysis; methodology; supervision; visualisation; writing – review & editing. **María Inés Mota:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Software, Visualization, Writing – review & editing. **Valeria Braga:** Formal analysis, Investigation, Resources, Software, Writing – review & editing. **Alejandro Buschiazzi:** Data curation, Formal analysis, Resources, Writing – review & editing.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Both *Listeria innocua* sequences data have been submitted to the GenBank database under accession number SAMN22746544/SRR16633068 and SAMN22746545/SRR16633067.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/vms3.710>.

ORCID

Carolina Matto  <https://orcid.org/0000-0002-7902-8676>

REFERENCES

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Buchrieser, C., Rusiniok, C., Kunst, F., Cossart, P., Glaser, P., & The *Listeria* Consortium. (2003). Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: Clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, 207–213. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00448-0](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00448-0)
- Burkholder, K.M., & Bhunia, A.K. (2010). *Listeria monocytogenes* uses *Listeria* Adhesion Protein (LAP) to promote bacterial transepithelial translocation and induces expression of LAP Receptor Hsp60. *Infection and Immunity*, 78, 5062–5073. <https://doi.org/10.1128/IAI.00516-10>
- Carlin, C.R., Liao, J., Weller, D., Gou, X., Orsi, R., & Wiedmann, M. (2021). *Listeria* *cossartiae* sp. nov., *Listeria* *farberi* sp. nov., *Listeria* *immoviles* sp. nov., *Listeria* *portnoyi* sp. nov., and *Listeria* *rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71, <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004795>
- Clayton, E.M., Daly, K.M., Guinane, C.M., Hill, C., Cotter, P.D., & Ross, P.R. (2013). Atypical *Listeria innocua* strains possess an intact LIPI-3. *BMC Microbiology*, 14, <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-58>
- Favaro, M., Sarmati, L., Sancesario, G., & Fontana, C. (2014). First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and etanercept. *Journal of Medical Microbiology Case Reports*, 1, <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.003103>
- Forster, B.M., Zemansky, J., Portnoy, D.A., & Marquis, H. (2011). Posttranslocation chaperone PrsA2 regulates the maturation and secretion of *Listeria monocytogenes* proprotein virulence factors. *Journal of Bacteriology*, 193, 5961–5970. <https://doi.org/10.1128/JB.05307-11>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29, 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hitchins, A.D., Jinneman, K., & Chen Y. (2020). Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. *Bacteriological Analytical Manual*. United States Food and Drug Administration. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>
- Hofer, E., & Reis, C.M.F. (2005). Espécies e serovares de *Listeria* isolados de animais doentes e portadores no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 25, 79–83.
- Johnson, J., Jinneman, K., Stelma, G., Smith, B.G., Lye, D., Messer, J., Ulaszek, J., Evsen, L., Gendel, S., Bennet, R.W., Swaminathan B., Pruckler, J., Steigerwalt, A., Kathariou, S., Yildirim, S., Volokhov, D., Rasooly, A., Chizhikov, V., Wiedmann, M., Fortes, E., Duvall, R.E., & Hitchins, A.D. (2004). Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4256–4266. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4256-4266.2004>
- Keeney, K. M., Stuckey, J. A., & O'Riordan, M. X. D. (2007). LplA1-dependent utilization of host lipoyl peptides enables *Listeria* cytosolic growth and virulence. *Molecular Microbiology*, 66, 758–770. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05956.x>
- Kozlov, A.M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAXML-NG: A fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35, 4453–4455. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>
- Liu, B., Zheng, D.D., Jin, Q., Chen, L.H., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, 47, D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
- Liu, D., Lawrence, M.L., Austin, F.W., & Ainsworth, A.J. (2007). A multiplex PCR for species and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiology Methods*, 71, 133–140.

- Marçais, G., Delcher, A.L., Phillippy, A.M., Coston, R., Salzberg, S.L., & Zimin, A. (2018). MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. *PLoS Computational Biology*, 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005944>
- Matto, C., Varela, G., Braga, V., Vico, V., Giannechini, R.E., & Rivero, R. (2018). Detection of *Listeria* spp. in cattle and environment of pasture-based dairy farms. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 38, 1736–1741.
- Mauray, M.M., Tsai, Y.H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., Criscuolo, C., Gaultier, C., Roussel, S., Brisabois, A., Disson, O., Rocha, E.P.C., Brisse, S., & Lecuit, M. (2016). Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature Genetics*, 48, 308–313. <https://doi.org/10.1038/ng0617-970d>
- Meireles, D., Pombinho, R., Carvalho, F., Sousa, S., & Cabanes, D. (2020). *Listeria monocytogenes* wall teichoic acid glycosylation promotes surface anchoring of virulence factors, resistance to antimicrobial peptides, and decreased susceptibility to antibiotics. *Pathogens*, 9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040290>
- Moreno L.Z., Paixão, R., Gobbi, D.D., Raimundo, D.C., Ferreira, T. P., Hofer, E., Matte, M.H., & Moreno, A.M. (2012). Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. *Research in Microbiology*, 163, 268–271. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.02.004>
- Moura, A., Disson, O., Lavina, M., Thouvenot, P., Huang, L., Leclercq, A., Fredriksson-Ahomaa, M., Eshwar, A.K., Stephan, R., & Lecuit, M. (2019). Atypical haemolytic *Listeria innocua* isolates are virulent, albeit less than *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 87. <https://doi.org/10.1128/00758-18>
- Moura, A., Criscuolo, A., Pouseele, H., Mauray, M.M., Leclercq, A., Tarr, C., Björkman, J.T., Dallman, T., Reimer, A., Enouf, V., Larssonneur, E., Carleton, H., Bracq-Dieye, H., Katz, L.S., Jones, L., Touchon, M., Toudjman, M., Walker, M., Stroika, S., Cantinelli, T., ... Brisse, S. (2016). Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nature Microbiology*, 2, 1–10. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.185>
- Osana, A., Li, S.H., Asano, K., Sashinami, H., Hu, D.L., & Nakane, A. (2013). Fibronectin-binding protein, FbpA, is the adhesin responsible for pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiology and Immunology*, 57, 253–262. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12030>
- Perrin, M., Bemer, M., & Delamare, C. (2003). Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5308–5309. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5308-5309.2003>
- Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- Rae, C. S., Geissler, A., Adamson, P.C., & Portnoy, D. A. (2011). Mutations of the *Listeria monocytogenes* peptidoglycan N-deacetylase and O-acetylase result in enhanced lysozyme sensitivity, bacteriolysis, and hyper induction of innate immune pathways. *Infection and Immunity*, 79, 3596–3606. <https://doi.org/10.1128/IAI.00077-11>
- Réglier-Poupet, H., Frehel, C., Dubail, I., Beretti, J.C., Berche, P., Charbit, A., & Raynaud, C. (2003a). Maturation of lipoproteins by type II signal peptidase is required for phagosomal escape of *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 49469–49477. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307953200>
- Réglier-Poupet, H., Pellegrini, E., Charbit, A., & Berche, P. (2003b). Identification of LpeA, a PsaA-like membrane protein that promotes cell entry by *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 71, 474–482. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.474-482.2003>
- Rocha, P.R.D., Dalmasso, A., Grattarola, C., Casalone, C., Del Piero, F., Bottero, M.T., & Capucchio, M.T. (2013). Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. *Research in Veterinary Science*, 94, 111–114. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.017>
- Rodriguez-R, L.M., & Konstantinidis, K.T. (2014). Estimating coverage in metagenomics data sets and why it matters. *The ISME Journal*, 8, 2349–2351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.76>
- Seeman, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30, 2068–2069.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 584–640. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001>
- Walker, J.K., Morgan, J.H., McLauchlin, J., Grant, K.A., & Shallcross, J.A. (1994). *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. *Veterinary Microbiology*, 42, 245–253.
- Walland, J., Lauper, J., Frey, J., Imhof, R., Stephan, Roger, Seuberlich, T., & Oevermann A. (2015). *Listeria monocytogenes* infection in ruminants: Is there a link to the environment, food and human health? A review. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 157, 319–328. <https://doi.org/10.17236/sat00022>
- Wuenschel, M.D., Köhler, S., Bubert, A., Gerike, U., & Goebel, W. (1993). The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *Journal of Bacteriology*, 175, 3491–3501. <https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3491-3501.1993>
- Zhou, Z., Alikhan, N.F., Mohamed, K., Fan, Y., Agama Study Group, & Achtmann, M. (2020). The Enterobase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Research*, 30, 138–152. <https://doi.org/10.1101/gr.251678.119>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Matto, C., D'Alessandro, B., Mota, M. I., Braga, V., Buschiazzi, A., Giannechini, E., Varela, G., & Rivero, R. (2022). *Listeria innocua* isolated from diseased ruminants harbour minor virulence genes of *L. monocytogenes*. *Veterinary Medicine and Science*, 1–6. <https://doi.org/10.1002/vms3.710>

ANEXO III



***Listeria innocua* and serotypes of *Listeria monocytogenes* isolated from clinical cases in small ruminants in the northwest of Uruguay¹**

Carolina Matto^{2*} , Ruben E. Giannechini², Víctor Rodríguez²,
Marcos A. Schanzembach², Valeria Braga³, Maria Inés Mota³,
Rodolfo Rivero² and Gustavo Varela³

ABSTRACT.- Matto C., Giannechini R.E., Rodríguez V., Schanzembach M.A., Braga V., Mota M.I., Rivero R. & Varela G. 2023. *Listeria innocua* and serotypes of *Listeria monocytogenes* isolated from clinical cases in small ruminants in the northwest of Uruguay. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 43:e07174, 2023. Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino", Ruta 3 Km 369, Paysandú, Uruguay. E-mail: cmatto@mgap.gub.uy

Listeriosis is an infectious disease caused by bacteria of the genus *Listeria*, the neurological form being more common in ruminants. There are many reports of listeriosis in small ruminants in the region that includes Brazil, Argentina and Uruguay. However, these diagnoses were mainly based on histological lesions in the central nervous system (CNS) without the isolation and characterization of the involved *Listeria* strains. The aim of this study was to report sheep and goats listeriosis cases from 2016 to 2021 in northwestern Uruguay. The diagnosis was made according to lesions observed at histopathology, plus *Listeria* isolation in CNS, identifying it at specie and serotype level. Nine animals (n=9) of three outbreaks and five sporadic cases of listeriosis were studied. Sheep was the species with more cases in relation to goats, and adults were the category most affected. Cases occurred in spring and less frequently in winter. All presented neurological clinical signs and the lesions in the CNS were consistent with suppurative meningoencephalitis and micro-abscesses in the brainstem. In eight of nine CNS samples, *Listeria* strains were isolated (seven *L. monocytogenes* and one *L. innocua*). All the *L. monocytogenes* isolates carried the *inlA* gene; serotyping showed that four strains belonged to serotype 1/2b, two isolates belonged to serotype 4b, and one to serotype 1/2a. Considering that listeriosis is a common disease in this region and the fact that isolates are scarcely recovered from small ruminants, it would be important to emphasize the need for *Listeria* isolation to better characterize the strains that affect animals. Not only to improve knowledge about the epidemiology of disease but also with the objective of developing serotype specific vaccines for animal use.

INDEX TERMS: Meningoencephalitis, sheep, goat, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, circling disease, pasture, nervous diseases, South America.

RESUMO.- [*Listeria innocua* e serotipos do *Listeria monocytogenes* isoladas dos casos clínicos em pequenos ruminantes no noroeste do Uruguai.] Listeriose uma doença bacteriana causada pelo gênero *Listeria*, a forma nervosa é a

mais comum em ruminantes. No Brasil, Argentina e Uruguai há vários relatos de listeriose em pequenos ruminantes com diagnóstico baseado na histopatologia do sistema nervoso central (SNC), sem o isolamento e a caracterização do agente. O objetivo deste trabalho foi relatar uma série de casos diagnosticados em ovinos e caprinos no período 2016-2021 no noroeste do Uruguai. O diagnóstico foi feito baseado nas lesões observadas na histopatologia, e caracterização das cepas de *Listeria* recuperadas do SNC quanto à espécie e sorotipo. Nove animais (n=9) do três surtos e cinco casos isolados de listeriose foram estudados. Os ovinos foram a

¹ Received on September 13, 2022.

Accepted for publication on September 27, 2022.

² Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino", Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), Ruta nº 3 Km 369, C.P 60.000, Paysandú, Uruguay. *Corresponding author: cmatto@mgap.gub.uy

³ Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Alfredo Navarro 3051, C.P. 11.600, Montevideo, Uruguay.

espécie com o maior número de casos em relação aos caprinos, sendo os animais adultos a categoria mais afetada em ambas espécies. A doença ocorreu principalmente na primavera com alguns casos observados no inverno. Todos os casos apresentavam sinais clínicos nervosos e as lesões no SNC caracterizavam-se por meningoencefalite supurativa com presença de microabscessos no tronco encefálico. Em oito de nove amostras do SNC foram isoladas cepas de *Listeria* (sete *L. monocytogenes* e uma *L. innocua*). Todos os isolados de *L. monocytogenes* continham o gene *inlA*; a sorotipagem apresentou quatro cepas do serotipo 1/2b, duas cepas serotipo 4b e uma cepa 1/2a. Levando em consideração que nesta região a listeriose é uma doença frequente e que existem poucos isolados recuperados de casos clínicos em pequeno ruminantes, torna-se relevante o isolamento deste agente para caracterização das cepas que afetam os animais. Não só para melhorar o conhecimento sobre a epidemiologia da doença, mas também com o objetivo de desenvolver vacinas sorotipo-específicas para uso animal.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: meningoencefalite, ovino, caprino, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, torneio, pastagem, doenças nervosas, América do Sul.

INTRODUCTION

Listeriosis is an infectious disease caused by *Listeria monocytogenes* and, less frequently *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* or *L. grayi* (Wilesmith & Gitter 1986, Walker et al. 1994, Bagatella et al. 2022). It has different clinical manifestations in ruminants, but the neurological form is by far the most commonly seen (Oevermann et al. 2010b, Rissi et al. 2010b, Konradt et al. 2017). It is characterized by suppurative meningoencephalitis with brainstem micro-abscesses (Oevermann et al. 2010a). Other clinical manifestations included late-term abortion, neonatal septicemia, and in rare cases, mastitis, gastroenteritis and keratoconjunctivitis/uveitis (Brugère-Picoux 2008, Oevermann et al. 2010b, Fairley et al. 2012).

In South America, including Brazil, Argentina and Uruguay, listeriosis is one of the main neurological diseases of small ruminants (Campero et al. 2002, Guedes et al. 2007, Rissi et al. 2010a, Dutra 2015, Konradt et al. 2017). There are many reports of listeriosis in sheep (Campero et al. 2002, Ribeiro et al. 2006, Rissi et al. 2010a, 2010b, Dutra 2012, 2015, Konradt et al. 2017, Canton et al. 2018, Costa et al. 2018, Ribeiro et al. 2022) as well as in goats (Rissi et al. 2006, Guedes et al. 2007, Headley et al. 2013, Konradt et al. 2017). However, most of these reports based their diagnoses on histopathological lesions, and some of them included immunohistochemistry but did not perform the isolation and characterization of *Listeria*. Therefore, the aim of this study was to describe a case series of listeriosis in small ruminants from 2016 to 2021 in northwestern Uruguay, in which the diagnosis was based on histopathology and bacteriological procedures.

MATERIALS AND METHODS

Case selection. This study included sheep and goat cases received by the Laboratorio Regional Noroeste DILAVE “Miguel C. Rubino” from 2016 to 2021 that met the following conditions: i) presence of neurological signs, ii) availability of the whole brain (or central nervous system, CNS) without

gross lesions and iii) had fresh CNS for bacteriological culture. Those cases of small ruminants with nervous signs in which only formalin-fixed organs were submitted were excluded from this study.

All cases considered had a record that included data on animal species, category, clinical signs, feeding, number of animals affected, dead and at-risk animals.

Pathological evaluation. The brain was sectioned longitudinally in two halves (including cerebral hemispheres, cerebellum and brainstem). For histopathology, different areas of the CNS (frontal, temporal and occipital hemispheres, basal ganglia, thalamus, mesencephalon, cerebellum, pons, medulla oblongata and cervical spinal cord) previously fixed in 10% buffered formalin for 48 hours were routinely embedded in paraffin, sectioned into 5µm-thick sections, and then stained with hematoxylin-eosin (HE).

Bacterial analysis. The other half of the CNS was immersed in 225 ml buffered *Listeria* enrichment broth (BLEB) (Oxoid®) and incubated for 48 hours at 30°C under aerobiosis. At 24 and 48 hours, 100µl of broth was inoculated on modified Oxford agar plates (MOX) (Oxoid®). Plates were incubated under aerobiosis at 35°C, checking for growth at 24 and 48 hours. Small gray to black colonies surrounded by a black halo was transferred to a 5% sheep blood agar plate (SBA-5%) and inoculated in a 1.5ml vial with trypticase soybean broth (TSB) plus glycerol (20%) to preserve them at -80°C (Hitchins et al. 2022).

Suspected isolates of *Listeria* were submitted to the Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR for further assays. To determine species identity, Gram staining, catalase and esculin hydrolysis tests, and sucrose, glycerol, xylose, mannitol, glucose and rhamnose fermentation assays were performed (Carlin et al. 2021, Hitchins et al. 2022). Additionally, PCR was performed according to Liu et al. (2007) to detect the *inlA* gene. Another multiplex PCR was performed on all *L. monocytogenes* isolates to group them into serogroups, according to Doumith et al. (2004). On the strains of serogroups IIa, IIb, IIc and IVb, serotyping searching for somatic antigens 1 and 4 were performed using commercially available *Listeria* antisera (BD Difco®).

RESULTS

Epidemiology and clinical data

Table 1 shows the main epidemiological data, *Listeria* species recovered from CNS and serotype of *L. monocytogenes* of the nine animals received (eight sheep and one goat) during the study. In total, 19 animals were affected, and all died. They belonged to six different farms. Three outbreaks included 14 animals from farms D, E and F, while in the other farms (A, B and C), only single cases occurred (n=5). Furthermore, two farms (A and C) had listeriosis cases in different years (farm A in 2016 and 2017, caused by different *Listeria* species; farm C in 2017 and 2018 *L. monocytogenes* in both but different serotypes). There were more cases in sheep (n=18) than in goats (n=1). In sheep, the most affected category was the ewe (16/18, 88.9%), followed by lambs in a much smaller proportion (2/18, 11.1%). In goats, an adult female was affected (Table 1).

Most cases occurred during spring (13/19, 68.4%), and the remaining occurred in winter (6/19, 31.6%). There were no

cases in summer or autumn. Records on feeding showed that in four farms (4/6, 66.6%), the animals only grazed natural or cultivated pastures. Meanwhile, in the other two farms (2/6, 33.3%), animals were fed grain and/or commercial feeds in addition to pasture. None of the cases were previously fed with silage (Table 1).

Like sheep, goats presented with the neurological form of the disease. The clinical signs described were unilateral facial paralysis (drooped ear and upper eyelid, flaccid lip), circling, lateral deviation of the head, depression, hypersalivation, ataxia and recumbency. Clinical signs lasted between two and seven days until death. Morbidity and mortality were 0.56% to 100% (median 0.8%), respectively, while lethality was 100% (Table 1).

Histopathological findings

According to the clinical signs described in all cases, the main lesion was in the brainstem.

At histopathology, in simple identified as one (Table 1), there were in pons and medulla oblongata scarce accumulation of neutrophils and lymphocytes, diffuse gliosis, multiple

perivascular cuffs made of lymphocytes and some histiocytes (Fig.1). These lesions were consistent with a mild suppurative meningoencephalitis. While in the remaining samples (from samples two to nine, Table 1), lesions observed were more severe. At medulla oblongata and pons, there were multifocal to coalescent areas of neuropil aggregates of neutrophils mixed with some lymphocytes and histiocytes (microabscesses) (8/8) (Fig.2), multiple perivascular cuffs made of lymphocytes and histiocytes (8/8), gliosis (Fig.3) and, mild leptomeningeal infiltration by lymphocytes (8/8). In four cases (id samples five, seven, eight and nine), these lesions extend rostrally to the mesencephalon and, in two (cases eight and nine), also affected the thalamus.

Bacterial results

Listeria sp. was recovered in eight out of nine CNS samples. There was no growth in the culture of CNS from case number six. Of these eight isolates, seven belong to *L. monocytogenes* and one to *L. innocua* (Table 1). A case of meningoencephalitis due to *L. innocua* was recently reported (Matto et al. 2022). Whole genome sequencing of this isolate revealed that the

Table 1. Cases of small ruminant listeriosis diagnosed in the northwest of Uruguay from 2016 to 2021. Main epidemiological data, bacterial isolates and *Listeria monocytogenes* serotypes

Number sample	Year	Farm/County	Category	Season	Animals affected	Animals at risk	Feed	Isolation	Serotype
1	2016	A/Paysandú	Lamb	Spring	1	120	Pasture	<i>L. innocua</i>	n/d
2	2017	B/Paysandú	Goat	Winter	1	1	Pasture + sorghum grain	<i>L. monocytogenes</i>	4b
3	2017	C/Paysandú	Ewe	Winter	1	wd	Pasture	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a
4	2017	D/Colonia	Ewe	Spring	2	360	Pasture	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b
5	2017	A/Paysandú	Ewe	Spring	1	130	Pasture	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b
6	2018	E/Paysandú	Ewe	Spring	8	285	Pasture + barley grain + ration	Negative culture	n/d
7	2018	C/Paysandú	Lamb	Spring	1	wd	Pasture	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b
8 and 9	2021	F/Soriano	Ewe	Winter	4	600	Pasture	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b and 4b

wd = Without data available, n/d = not determined.

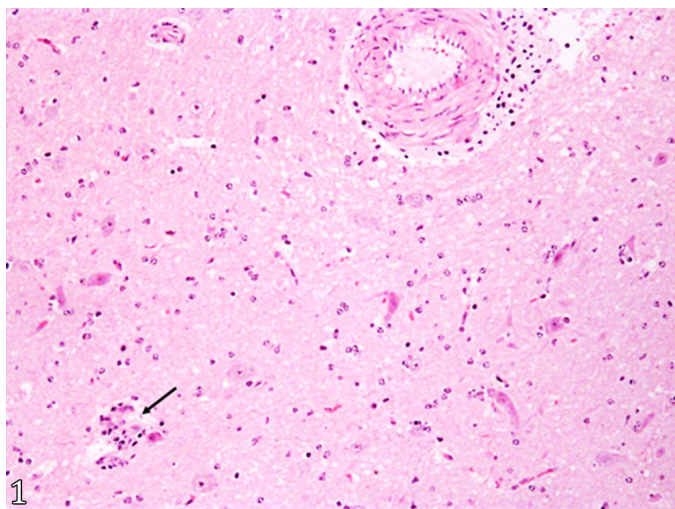


Fig.1. Isolate case of listeriosis due to *Listeria innocua*. Sample no. 1 (lamb). Brain, medulla oblongata. Neuropil infiltration of lymphocytes, diffuse, discrete; diffuse gliosis; accumulation of neutrophils and lymphocytes, focal discrete (arrow); perivascular cuff made of lymphocytes. HE, obj.100x.

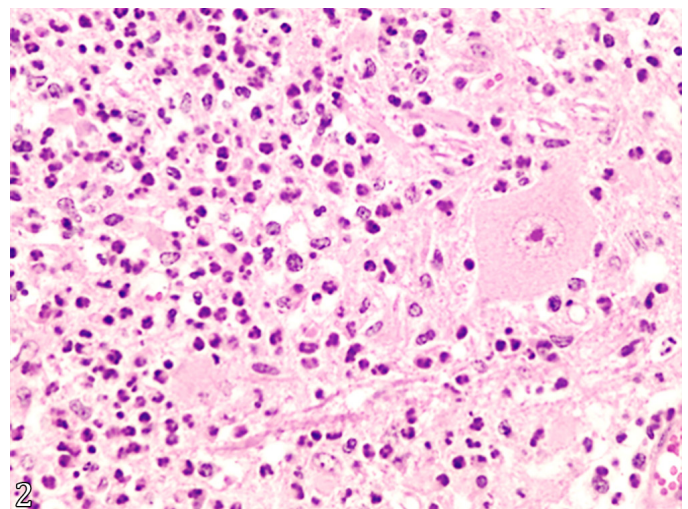


Fig.2. Outbreak of nervous listeriosis on a sheep flock due to *Listeria monocytogenes*. Sample no. 8 (ewe). Brain, medulla oblongata. Diffuse neuropil infiltration by neutrophils mixed with scarce histiocytes. HE, obj.400x.

internalin A gene (*inlA*) was not present. Instead, it carried other accessory virulence genes capable of promoting cell invasion and/or intracellular replication (Matto et al. 2022).

The seven *L. monocytogenes* isolates carried the *inlA* gene, and there was a major presence of serotype 1/2b (4/7, 57%), followed by serotype 4b (2/7, 29%) and serotype 1/2a (1/7, 14%) (Table 1).

DISCUSSION

During this study (2016-2021), the nine animal samples showed histological lesions in the CNS consistent with listeriosis, and in eight of them, *Listeria* strains were recovered. We recorded more cases in sheep than in goats, likely because there are more sheep than goats raised as livestock in Uruguay. Raising goats is rare and is related to the production of milk and its subproducts (Anuario Estadístico Agropecuario 2021). Adults were the most affected categories in both species. The same situation was previously reported by other authors (Campero et al. 2002, Ribeiro et al. 2006, Rissi et al. 2006, Oevermann et al. 2010a, Rissi et al. 2010b). However, other reports from Brazil mentioned that listeriosis occurred in animals under one year old (Guedes et al. 2007, Ribeiro et al. 2022). Therefore, the evidence from different reports suggests that there is no age-related predisposition to listeriosis, as Bagatella et al. (2022) propose.

Similar to many reports from the Northern Hemisphere, the cases of listeriosis occurred mostly in spring and less frequently in winter (Barlow & McGorum 1985, Wilesmith & Gitter 1986, Brugère-Picoux 2008, Dreyer et al. 2015). The predominance of listeriosis during winter and spring could be related to the previous high exposure to the bacteria because the incubation period of the neurological form varies between one and seven weeks (Brugère-Picoux 2008, Oevermann et al. 2010b). Nightingale et al. (2005) and Strawn et al. (2013) found that winter has the highest prevalence of *L. monocytogenes* in the farm environment. However, Rissi et al. (2010b) and Headley

et al. (2013) in southern and southwestern Brazil reported cases in summer. In the same region, Ribeiro et al. (2022) described an outbreak in spring. Such difference could not be attributed to the weather because Uruguay and these regions of Brazil belong to the same Köppen-Geiger climate classification (humid subtropical) (Peel et al. 2007). Therefore, differences in disease seasonality might be explained by other factors, such as the management of animals, the sanitary status, and the type of feed. Characteristics of circulating *Listeria* could also be associated with this variation, as other reports mentioned differences in its capacity to infect animals and survive in the farm environment (Nightingale et al. 2004, Haley et al. 2015).

All cases studied herein exhibited the neurological form of the disease. The predominance of this clinical form agrees with data reported previously by other authors (Barlow & McGorum 1985, Wilesmith & Gitter 1986, Guedes et al. 2007, Oevermann et al. 2010b, Rissi et al. 2010b, Ribeiro et al. 2022). During this study, five single cases and three disease outbreaks occurred, and the morbidity and mortality were 0.8% (median). The fact that few animals per farm were affected has not been clear until now. One reason may be the unequal exposure of animals to *Listeria* spp. due to focal accumulation in the feeds or the farm environments (Walland et al. 2015). Another potential cause would be animal stressors (external and internal) because they weaken the immune system and favor *Listeria* invasion; however, true animal risk factors are not well understood (Brugère-Picoux 2008, Walland et al. 2015, Bagatella et al. 2022). Similarly, Wilesmith & Gitter (1986) and Dreyer et al. (2015) mentioned that there is little evidence that supports the hypothesis of immunosuppression or concomitant diseases when many animals are affected in a flock.

Like in other regional reports (Campero et al. 2002, Guedes et al. 2007, Rissi et al. 2010b, Costa et al. 2018), most of the cases occurred in grazing animals, without data on previous silage intake. In contrast, other authors associate the disease with silage fed (Wilesmith & Gitter 1986, Gudmundsdottir et al. 2004, Ribeiro et al. 2006, 2022, Brugère-Picoux 2008). A previous review of the disease in ruminants by Walland et al. (2015) estimated that up to one-third of cases were unrelated to previous silage intake. Reinforcing this hypothesis, an epidemiological study in a sheep farm where cases of listeriosis occurred found the same strain of *L. monocytogenes* in drinking water, soil, and diseased animals, concluding that water and soil could be the sources of infection (Dreyer et al. 2015). In the same way, other reports in Uruguay have confirmed the presence of *L. monocytogenes* on pastures associated with clinical cases of listeriosis in ruminants (Matto et al. 2017) as well as the fecal shedding of the bacteria by clinically asymptomatic cattle (Matto et al. 2018). Therefore, different feeds consumed by animals and drinking water and/or soil could be sources of contamination. In this case series, it is noteworthy that we recorded cases in different years and with different *Listeria* species or serotypes on farms A and C. This finding might be associated with the ubiquitous condition of this agent (Brugère-Picoux 2008), since its presence was reported in different areas of farms, such as drinking water, feed and/or soil over a prolonged time (Gudmundsdottir et al. 2004, Nightingale et al. 2005, Strawn et al. 2013, Dreyer et al. 2015, Castro et al. 2018). Moreover, in small ruminant farms with previous cases of listeriosis, the prevalence of *L.*

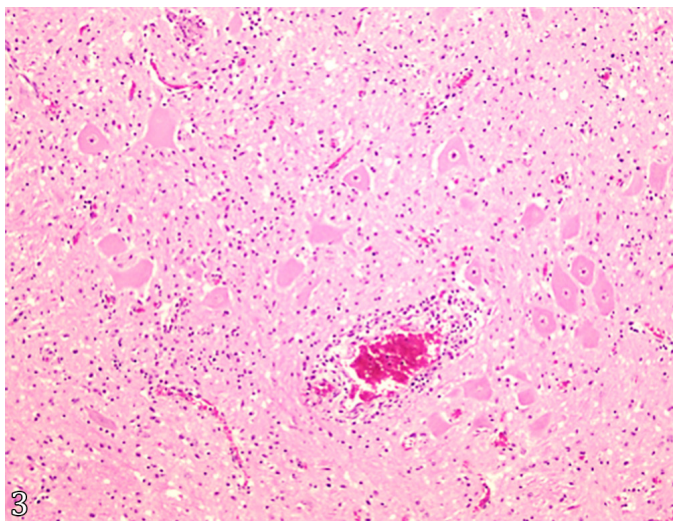


Fig.3. Outbreak of nervous listeriosis on a sheep flock due to *Listeria monocytogenes*. Sample no. 9 (ewe). Brain, medulla oblongata. Large perivascular cuff composed of lymphocytes and some histiocytes. Diffuse neuropil infiltration by lymphocytes. HE, obj.100x.

monocytogenes in the soil, feed and water was statistically superior (Nightingale et al. 2004). Therefore, to better understand the epidemiology of listeriosis in grazing small ruminants, it would be necessary to conduct studies in the farm environments to establish the possible sources of contamination (pasture, silages, soil, beds, drinking water, among others), as has been extensively reported in many scientific papers (Wiedmann et al. 1994, Gudmundsdottir et al. 2004, Nightingale et al. 2004, Dreyer et al. 2015).

The histological lesions caused by *Listeria* in the CNS have been previously described (Barlow & McGorum 1985, Campero et al. 2002, Oevermann et al. 2010a, Rissi et al. 2010b, Konradt et al. 2017). They do not represent a difficulty in the diagnosis of the disease. The kind of inflammatory cells that infiltrates the neuroparenchyma allow us to assess a temporal progression of the encephalitis (Oevermann et al. 2010a). In the nine cases studied, there was a predominance of neutrophilic microabscesses compatible with acute encephalitis. Some authors propose that small ruminants are more susceptible to *Listeria* infection with a clinical course shorter than cattle (Oevermann et al. 2010b, Bagatella et al. 2022). Another interesting finding in this study was that in case number one, CNS lesions due to *L. innocua* were the same as those caused by *L. monocytogenes* but less severe, as reported by Walker et al. (1994) and Rocha et al. (2013).

In the present study, the isolation of *Listeria* from the CNS seems to be more successful (eight positive cultures out of nine samples, 88.8%) than in other reports that diagnose the disease using histopathology and microbiological procedures (Johnson et al. 1995, Campero et al. 2002). A possible explanation may be the changes in techniques for *Listeria* isolation. Previous works used cold enrichment incubation, whereas we used specific selective enrichment media to favor *Listeria* growth (Hitchins et al. 2022). In the CNS of sheep from farm E (case six), we did not recover *Listeria* from culture, despite histopathology showing lesions consistent with listeriosis. This result could be related to a small number or absence of viable bacteria in the CNS at the time of culture (Johnson et al. 1995). Many authors mention that recovery of *Listeria* from fresh organs is difficult for different reasons; for example, the submission of fresh material not properly preserved, the need for appropriate culture media to support the growth of *Listeria*, and the low sensitivity of culture as a diagnostic technique (Johnson et al. 1995, Brugère-Picoux 2008). However, we considered it important to try bacterial isolation because it allows the characterization and comparison of the *Listeria* strains involved. For example, the neurological form of listeriosis could be due to *L. innocua* or different serotypes of *L. monocytogenes*. In the scientific literature, there are few reports of *L. innocua* as a cause of meningoencephalitis in ruminants (Walker et al. 1994, Rocha et al. 2013, Matto et al. 2022), likely because, in most cases, a bacteriological culture is not performed. A comparable situation occurs with sheep abortion, which could be related to *L. monocytogenes* (Wilesmith & Gitter 1986) or *L. ivanovii* (Low et al. 1993, Chand & Sadana 1999). Another fact to consider is that recovering *L. monocytogenes* isolates from clinical cases in ruminants would allow us to study certain characteristics of circulating bacteria, such as serotypes, lineages and/or clonal complexes. This kind of information, complemented with data on isolates recovered from the farm environment,

would enable us to link the clinical cases with the possible source of contamination.

Regarding the *L. monocytogenes* serotypes recovered, all of them are associated with clinical cases in both humans and animals (1/2a, 1/2b and 4b) (Oevermann et al. 2010b). We recorded a major presence of serotype 1/2b. In contrast, Great Britain and Iceland reports mentioned a higher prevalence of serotype 1/2a in the neurological form in small ruminants (Wilesmith & Gitter 1986, Low et al. 1993, Gudmundsdottir et al. 2004). Another interesting result occurred in the farm F outbreak, in which we recovered two strains of *L. monocytogenes*, one of serotype 1/2b and the other of serotype 4b (Table 1). This finding, plus the others mentioned above, could be related to the hypothesis that inside farms, there is a high strain diversity of circulating *Listeria* (Gudmundsdottir et al. 2004, Nightingale et al. 2004, Haley et al. 2015). As mentioned previously, only four regional reports isolated *L. monocytogenes* from clinical cases in small ruminants (Campero et al. 2002, Ribeiro et al. 2006, Konradt et al. 2017, Canton et al. 2018). The first recovered three isolates out of four CNS cultures, and all belonged to serotype 4 (Campero et al. 2002). However, the latter three reports did not serotype the isolates (Ribeiro et al. 2006, Konradt et al. 2017, Canton et al. 2018). On the other hand, Headley et al. (2013) amplified the gene *hly* of *L. monocytogenes* from the brainstem of small ruminants with neurological clinical signs compatible with listeriosis, but no established which serotypes were associated with those cases. Considering that in this region of South America, there are few isolates recovered from clinical cases in small ruminants and that listeriosis is a common disease, it would be important to emphasize the need to isolate *Listeria* to characterize in detail the strains that affect animals. On the other hand, since vaccination is one of the most successful strategies to prevent infectious diseases in animals, the complete characterization of *Listeria* strains involved becomes additionally important for its development and, above all, its evaluation (Calderón-González et al. 2014).

Finally, we want to mention the two main limitations of the present work – at first, the low number of cases studied. We only fully studied nine of 19 animals with nervous signs (47%). Second, as mentioned above, of the nine CNS cultured, we recovered *Listeria* in eight (88.8%). This fact suggests that auxiliary tests such as immunohistochemistry are important in cases where there is no bacterial recovery from culture.

CONCLUSION

In northwest Uruguay, neurolisteriosis was the main form of the disease in small ruminants, affecting mainly adult animals. Cases were more common during spring and winter, occurring as outbreaks or isolated cases. Most of the affected animals were on pasture without fed silage. *Listeria monocytogenes* serotypes 1/2b and 4b were more commonly isolated, and both are associated with human listeriosis. *Listeria innocua* may affect small ruminants less frequently.

Acknowledgements.- Carolina Matto has a Ph.D. scholarship from “Agencia Nacional de Investigación e Innovación” (ANII) Uruguay: POS_NAC_2019_1_157866. The investigation received funding from ANII Uruguay, identified as FSSA_1_2019_1_160057.

Conflict of interest statement.- The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Anuario Estadístico Agropecuario 2021. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, República Oriental del Uruguay. Available at <<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-agropecuario-2021>> Accessed on Jun. 1, 2022.
- Bagatella S., Tavares-Gomes L. & Oevermann A. 2022. *Listeria monocytogenes* at the interface between ruminants and humans: A comparative pathology and pathogenesis review. *Vet. Pathol.* 59(2):186-210. <<https://dx.doi.org/10.1177/03009858211052659>> <PMid:34856818>
- Barlow M. & McGorum B. 1985. Ovine listerial encephalitis: analysis, hypothesis and synthesis. *Vet. Rec.* 116(9):233-236. <<https://dx.doi.org/10.1136/vr.116.9.233>> <PMid:4002594>
- Brugère-Picoux J. 2008. Ovine listeriosis. *Small Rum. Res.* 76(1/2):12-20. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.022>>
- Calderón-González R., Frande-Cabanes E., Bronchalo-Vicente L., Lecea-Cuello M.J., Pareja E., Bosch-Martínez A., Fanarraga M.L., Yañez-Díaz S., Carrasco-Marín E. & Alvarez-Domínguez C. 2014. Cellular vaccines in listeriosis: role of the *Listeria* antigen GAPDH. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 21:4-22. <<https://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2014.00022>> <PMid:24600592>
- Campero C.M., Odeón A.C., Cipolla A.L., Moore D.P., Poso M.A. & Odriozola E. 2002. Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. *J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Public Health* 49(8):379-383. <<https://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00586.x>> <PMid:12449246>
- Canton G., Fiorentino A., Manes J., Scioli V., Maldonado J., Moore P. & Morrell E. 2018. Listeriosis neonatal en cordero: reporte de caso, p.19-20. En: Robles C.A. (Ed.), *Enfermedades de Ovinos, Caprinos y Camélidos Sudamericanos*. INTA Ediciones, Buenos Aires. Available at <<https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/4835>> Accessed on Jun. 3, 2022.
- Carlin C.R., Liao J., Weller D.L., Gou X., Orsi R. & Wiedmann M. 2021. *Listeria cossartiae* sp. nov., *Listeria farberii* sp. nov., *Listeria immoviles* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov., and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71(5):004795. <<https://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004795>> <PMid:33999788>
- Castro H., Jaakkonen A., Hakkinen M., Korkeala H. & Lindström M. 2018. Occurrence, persistence, and contamination routes of *Listeria monocytogenes* genotypes on three Finnish dairy cattle farms: a longitudinal study. *Appl. Environ. Microbiol.* 84(4):e02000-17. <<https://dx.doi.org/10.1128/AEM.02000-17>> <PMid:29222098>
- Chand P. & Sadana J.R. 1999. Outbreak of *Listeria ivanovii* abortion in sheep in India. *Vet. Rec.* 145(3):83-84. <<https://dx.doi.org/10.1136/vr.145.3.83>> <PMid:10460032>
- Costa R.A., Matto C., Schanzembach M., Rodríguez V., Varela G., Braga V., Vico M.V. & Riet-Correa F. 2018. Romboencefalite por *Listeria monocytogenes* em ovinos criados a pasto. *Pesq. Vet. Bras.* 38(Supl.):113-115.
- Doumth M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C. & Martin P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42(8):3819-3822. <<https://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>> <PMid:15297538>
- Dreyer M., Thomann A., Böttcher S., Frey J. & Oevermann A. 2015. Outbreak investigation identifies a single *Listeria monocytogenes* strain in sheep with different clinical manifestations, soil and water. *Vet. Microbiol.* 179(1/2):69-75. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.025>> <PMid:25726302>
- Dutra F. 2012. Boletín nº 14 y 15. Archivo Veterinario del Este, Laboratorio Regional Este de DILAVE "Miguel C Rubino", Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), Treinta y Tres, Uruguay. Available at <https://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/23_a52814f9/archivosAdjuntos/ano-2012-p-2.pdf> Accessed on Jun. 1, 2022.
- Dutra F. 2015. Boletín nº 18. Archivo Veterinario del Este, Laboratorio Regional Este de DILAVE "Miguel C Rubino", Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), Treinta y Tres, Uruguay. Available at <https://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/23_a52814f9/archivosAdjuntos/ano-2015-p-2.pdf> Accessed on Jun. 1, 2022.
- Fairley R.A., Pesavento P.A. & Clark R.G. 2012. *Listeria monocytogenes* infection of the alimentary tract (enteric listeriosis) of sheep in New Zealand. *J. Comp. Pathol.* 146(4):308-313. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.08.004>> <PMid:21925677>
- Gudmundsdottir K.B., Aalbaek B., Sigurdarson S. & Gunnarsson E. 2004. The diversity of *Listeria monocytogenes* strains from 10 Icelandic sheep farms. *J. Appl. Microbiol.* 96(5):913-921. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02183.x>> <PMid:15078506>
- Guedes K.M.R., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Simões S.V.D., Miranda Neto E.G., Nobre V.M.T. & Medeiros R.M.T. 2007. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. *Pesq. Vet. Bras.* 27(1):29-38. <<https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2007000100006>>
- Haley B.J., Sonnier J., Schukken Y.H., Karns J.S. & Van Kessel J.A.S. 2015. Diversity of *Listeria monocytogenes* within a U.S. dairy herd, 2004-2010. *Foodborne Pathog. Dis.* 12(10):844-850. <<https://dx.doi.org/10.1089/fpd.2014.1886>> <PMid:26325149>
- Headley S.A., Bodnar L., Fritzen J.T.T., Bronkhorst D.E., Fernandes Alfieri A., Okano W. & Alcindo Alfieri A. 2013. Histopathological and molecular characterization of encephalitic listeriosis in small ruminants from northern Paraná, Brasil. *Braz. J. Microbiol.* 44(3):889-896. <<https://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822013000300036>> <PMid:24516457>
- Hitchins A.D., Jinneman K. & Chen Y. 2022. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. *Bacteriological Analytical Manual*, United States Food and Drug Administration. Available at <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>> Accessed on Jun. 1, 2022.
- 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. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7(2):223-228. <<https://dx.doi.org/10.1177/104063879500700210>> <PMid:7542480>
- Konradt G., Bassuino D.M., Prates K.S., Bianchi M.V., Snel G.G.M., Sonne L., Driemeier D. & Pavarini S.P. 2017. Suppurative infectious diseases of the central nervous system in domestic ruminants. *Pesq. Vet. Bras.* 37(8):820-828. <<https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2017000800007>>
- Liu D., Lawrence M.L., Austin F.W. & Ainsworth A.J. 2007. A multiplex PCR for species and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Methods* 71(2):133-140. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.007>> <PMid:17884210>
- Low J.C., Wright F., McLauchlin J. & Donachie W. 1993. Serotyping and distribution of *Listeria* isolates from cases of ovine listeriosis. *Vet. Rec.* 133(7):165-166. <<https://dx.doi.org/10.1136/vr.133.7.165>> <PMid:8236705>
- Matto C., D'Alessandro B., Mota M.I., Braga V., Buschiazzi A., Giannechini E., Varela G. & Rivero R. 2022. *Listeria innocua* isolated from diseased ruminants harbour minor virulence genes of *L. monocytogenes*. *Vet. Med. Sci.* 8(2):735-740. <<https://dx.doi.org/10.1002/vms3.710>> <PMid:35040277>
- Matto C., Varela G., Braga V., Vico V., Giannechini R.E. & Rivero R. 2018. Detection of *Listeria* spp. in cattle and environment of pasture-based dairy farms. *Pesq. Vet. Bras.* 38(9):1736-1741. <<https://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5663>>
- Matto C., Varela G., Mota M.I., Giannechini R. & Rivero R. 2017. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in a pastured bull. *J. Vet. Diagn. Invest.* 29(2):228-231. <<https://dx.doi.org/10.1177/1040638716689116>> <PMid:28166691>
- Nightingale K.K., Fortes E.D., Ho A.J., Schukken Y.H., Grohn Y.T. & Wiedmann M. 2005. Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. *J.*

- Am. Vet. Med. Assoc. 227(11):1808-1814. <<https://dx.doi.org/10.2460/javma.2005.227.1808>> <PMid:16350271>
- Nightingale K.K., Schukken Y.H., Nightingale C.R., Fortes E.D., Ho A.J., Her Z., Gröhn Y.T., McDonough P.L. & Wiedmann M. 2004. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. Appl. Environ. Microbiol. 70(8):4458-4467. <<https://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.8.4458-4467.2004>> <PMid:15294773>
- Oevermann A., Di Palma S., Doherr M.G., Abril C., Zurbriggen A. & Vandeveld M. 2010a. Neuropathogenesis of naturally occurring encephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in ruminants. Brain Pathol. 20(2):378-390. <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00292.x>> <PMid:19476464>
- Oevermann A., Zurbriggen A. & Vandeveld M. 2010b. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise? Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2010:632513. <<https://dx.doi.org/10.1155/2010/632513>> <PMid:20204066>
- Peel M.C., Finlayson B.L. & McMahon T.A. 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. Hydrol. Earth Syst. Sci. 11:1633-1644. <<https://dx.doi.org/10.5194/hess-11-1633-2007>>
- Ribeiro L.A.O., Rodrigues N.C., Fallavena L.C.B., Oliveira S.J. & Brito M.A. 2006. Listeriose em rebanho de ovinos leiteiros na região serrana do Rio Grande do Sul: relato de caso. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 58(3):316-319. <<https://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352006000300005>>
- Ribeiro L.S., Scheid H.V., Marques L.S., Venancio F.R., Silva E.R., Ladeira S.R.L. & Schild A.L. 2022. Listeriosis outbreak in sheep raised in feedlots in the southern region of Rio Grande do Sul State, Brazil. Acta Scient. Vet. 50(Supl.1):738. <<https://dx.doi.org/10.22456/1679-9216.119176>>
- Rissi D.R., Figuera R.A., Irigoyen L.F., Kommers G.D. & Barros C.S.L. 2010a. Doenças neurológicas de ovinos na região central do Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 30(3):222-228. <<https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000300006>>
- Rissi D.R., Kommers G.D., Marcolongo-Pereira C., Schild A.L. & Barros C.S.L. 2010b. Meningoencefalite por *Listeria monocytogenes* em ovinos. Pesq. Vet. Bras. 30(1):51-56. <<https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000100008>>
- Rissi D.R., Rech R.R., Barro R.R., Kommers G.D., Langohr I.M., Pierezan F. & Barros C.S.L. 2006. Forma nervosa de listeriose em caprinos. Pesq. Vet. Bras. 26(1):14-20. <<https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2006000100004>>
- Rocha P.R.D., Dalmasso A., Grattarola C., Casalone C., Del Piero F., Bottero M.T. & Capucchio M.T. 2013. Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. Res. Vet. Sci. 94(1):111-114. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.017>> <PMid:22898534>
- Strawn L.K., Fortes E.D., Bihn E.A., Nightingale K.K., Gröhn Y.T., Worobo R.W., Wiedmann M. & Bergholz P.W. 2013. Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. Appl. Environ. Microbiol. 79(2):588-600. <<https://doi.org/10.1128/AEM.02491-12>> <PMid:23144137>
- Walker J.K., Morgan J.H., McLauchlin J., Grant K.A. & Shallcross J.A. 1994. *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. Vet. Microbiol. 42(2/3):245-253. <[https://dx.doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90023-x](https://dx.doi.org/10.1016/0378-1135(94)90023-x)> <PMid:7533963>
- Waland J., Lauper J., Frey J., Imhof R., Stephan R., Seuberlich T. & Oevermann A. 2015. *Listeria monocytogenes* infection in ruminants: Is there a link to the environment, food and human health? A review. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 157(6):319-328. <<https://dx.doi.org/10.17236/sat00022>> <PMid:26753347>
- Wiedmann M., Czajka J., Bsat N., Bodis M., Smith M.C., Divers T.J. & Batt C.A. 1994. Diagnosis and epidemiological association of *Listeria monocytogenes* strains in two outbreaks of Listerial encephalitis in small ruminants. J. Clin. Microbiol. 32(4):991-996. <<https://dx.doi.org/10.1128/jcm.32.4.991-996.1994>> <PMid:8027356>
- Wilesmith J.W. & Gitter M. 1986. Epidemiology of ovine listeriosis in Great Britain. Vet. Rec. 119(19):467-470. <<https://dx.doi.org/10.1136/vr.119.19.467>> <PMid:3788010>

ANEXO IV

Listeriosis en bovinos en Uruguay: epidemiología, formas clínicas y aislamientos recuperados en ocho años de estudio

Matto, C.^{1*}; Mota, M.I.²; D'Alessandro, B.³; Giannechini, R.E.¹; Rodríguez, V.¹; Schanzembach, M.A.¹; Braga, V.¹; Rivero, R.¹; Varela, G.²

RESUMEN

En Uruguay los reportes de listeriosis en la bibliografía están basados en las lesiones histológicas, existen muy pocos trabajos que han realizado el aislamiento y caracterización de *Listeria*. El objetivo fue realizar un análisis descriptivo de una serie de casos de listeriosis en bovinos diagnosticados mediante patología, bacteriología y técnicas moleculares entre los años 2014 y 2021 inclusive. Se diagnosticaron 11 casos de listeriosis, 10 correspondieron a la forma nerviosa de la enfermedad y uno a un aborto de tercer tercio de gestación. La enfermedad se presentó principalmente en primavera y en menor proporción en invierno (82% y 18% de los casos, respectivamente), afectando sobre todo a animales adultos (mayores a dos años) en casos individuales, tanto a nivel de sistemas ganaderos extensivos como lecheros. Un hallazgo relevante fue que el 45% de los casos no tenían antecedentes de consumo de alimentos ensilados. En la histopatología en los casos de neurolisteriosis se observó meningoencefalitis supurativa con microabscesos en el tronco encefálico, y en el feto abortado hepatitis y nefritis necrosupurativa. De los 11 casos clínicos en 10 hubo recuperación bacteriana (91%), donde *Listeria monocytogenes* se aisló en ocho casos y *Listeria innocua* en dos, mientras que solo uno no hubo desarrollo bacteriano. Los serotipos de *L. monocytogenes* 4b, 1/2b y 1/2a recuperados tanto de los casos clínicos como de una muestra de ensilado, correspondieron a los más frecuentemente reportados en casos humanos y animales a nivel mundial. Todos los aislamientos de *L. monocytogenes* portaban el gen que codifica la internalina A, uno de los principales factores de virulencia de esta especie. Sin embargo, ninguno de los aislamientos de *L. innocua* lo poseía. Considerando que listeriosis es una enfermedad frecuente en rumiantes, es necesario promover el cultivo y aislamiento de casos clínicos, a fin de caracterizar con más detalle la mayoría de las cepas circulantes.

Palabras clave: Encefalitis, *Listeria*, circling disease, pastoreo, aborto.

INTRODUCCIÓN

Listeriosis es una enfermedad infecciosa causada por bacilos Gram positivo, intracelulares del género *Listeria*, principalmente *Listeria monocytogenes* y menos frecuentemente por *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* o *L. grayi* (Bagatella et al. 2022). Los rumiantes y los seres humanos son los hospederos más frecuentemente afectados (Low & Donachie 1997; Vázquez-Boland et al. 2001).

En los rumiantes, la forma nerviosa (o neurolisteriosis) es la presentación clínica más común (Low & Donachie 1997; Oevermann et al. 2010a). También se han reportado otras formas clínicas menos frecuentes, como abortos de último tercio (Margineda et al. 2012), septicemia neonatal (Bagatella et al. 2022) y más raramente, mastitis (Fedio et al. 1990; Winter et al. 2004),

¹ Laboratorio Regional Noroeste DILAVE “Miguel C. Rubino”, Paysandú, Uruguay.

² Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

³ Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

*Autor de correspondencia: Carolina Matto. E-mail: cmatto@mgap.gub.uy

gastroenteritis (García et al. 2016), y queratoconjuntivitis/uveítis (Evans et al. 2004). En Uruguay, existen algunos reportes de la forma nerviosa en bovinos, basados en las lesiones histológicas observadas en el encéfalo (Easton et al. 2012, Dutra 2019, 2020; Matto et al. 2017; Matto et al. 2019; Matto et al. 2022). Sin embargo, la mayoría de estos reportes describen casos individuales/aislados y son escasos los aislamientos de *Listeria* recuperados.

Los bovinos tienen además la particularidad de ser portadores asintomáticos de *Listeria*, excretándola por materia fecal, constituyéndose como dispersores del agente en el ambiente de los predios agropecuarios (Nigthingale et al. 2004, Bandelj et al. 2018). Esta condición se ha comprobado previamente en Uruguay tanto en bovinos lecheros (Matto et al. 2017, 2018), como en bovinos de carne (Matto et al. 2019).

En base a lo mencionado hasta ahora, podemos afirmar que en Uruguay no hay un análisis descriptivo pormenorizado de la enfermedad en bovinos, donde se describan sus formas clínicas, categorías de los animales afectados, frecuencia de la enfermedad en los distintos sistemas de producción, estacionalidad, y tipo de alimentación. La mayoría de los casos reportados no tienen aislamiento de *Listeria* sp. y por ende, no se conoce qué especie está provocando enfermedad, lo cual es importante para complementar su estudio. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar un análisis descriptivo de una serie de casos de listeriosis en bovinos en Uruguay, abordando el diagnóstico desde la patología, bacteriología y técnicas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los casos

Los casos incluidos en este trabajo correspondieron a muestras de bovinos con sospecha clínica de padecer listeriosis, remitidas al Laboratorio Regional Noroeste de la DILAVE “Miguel C. Rubino” entre los años 2014 y 2021 inclusive. Solo se consideraron los casos que en su historia clínica presentaban signos clínicos compatibles con cuadros de listeriosis (signos nerviosos, abortos de último tercio o muertes perinatales), y, que hubieran remitido órganos fijados en formol bufferado al 10% y órganos refrigerados. Aquellos casos que remitieron únicamente material fijado en formol fueron excluidos de este estudio.

Con respecto a los fetos sólo se incluyeron aquellos especímenes que en la necropsia presentaron lesiones macroscópicas a nivel de hígado (áreas pequeñas, redondeadas, de color blanco o amarillento de distribución multifocal) sugestivas de un aborto por *Listeria* (Schlafer & Foster 2016).

Todos los casos presentados poseían la siguiente información: especie y categoría animal, ubicación del predio donde ocurrieron los casos, signos clínicos, tipo de alimentación, número de animales enfermos y muertos y total en riesgo.

Diagnostico patológico:

El encéfalo, de aquí en adelante SNC, constituido por los dos hemisferios cerebrales, cerebelo y tronco encefálico se seccionó longitudinalmente en dos mitades (donde ambas incluían las tres áreas mencionadas). Una de las mitades se sumergió completamente en formol bufferado al 10% para estudios de histopatología y la otra mitad, se mantuvo refrigerada a 4°C para cultivo y aislamiento bacteriológico.

Muestras de las diferentes vísceras de los fetos también se fijaron en formol bufferado al 10%. La histopatología se realizó en el Laboratorio de Patobiología del Laboratorio Central de DILAVE (Montevideo).

Histopatología: Cuarenta y ocho horas después de que el SNC se encontraba sumergido en formol bufferado al 10%, se retiró del fijador y se realizaron cortes seriados de diferentes áreas del SNC incluyendo corteza cerebral frontal, temporal y occipital, ganglio basal, tálamo, mesencéfalo, cerebelo, puente, médula oblonga y medula espinal cervical. Estas piezas se procesaron rutinariamente y fueron embebidas en parafina, para ser luego cortadas a 5 µm de espesor y coloreadas con Hematoxilina-Eosina (HE) según protocolo de la Armed Forces Institute of Pathology (AFIP 1995).

Diagnóstico bacteriológico:

Muestras de órganos refrigerados (mitad del SNC, pulmón e hígado fetal) y 25 g de alimentos ensilados que habían sido consumidos previamente por los animales (casos 9 y 10, Tabla 1), fueron asépticamente trozadas y se sumergieron en 225 mL de caldo Buffered Listeria Enrichment Broth (BLEB) (Oxoid®) durante 48 horas a 30°C en aerobiosis. A las 24 y 48 horas, se tomaron 100 µL de caldo y se sembraron en una placa de Modified Oxford Agar (MOX) (Oxoid®) (Hitchins et al. 2020). Las placas fueron incubadas en aerobiosis a 35°C, chequeando el desarrollo de colonias a las 24 y 48 horas. Aquellas colonias pequeñas, blancas, rodeadas por un halo negro, fueron transferidas a una placa de agar sangre ovina al 5% (ASO-5%) y además, inoculadas en un vial de 1,5 ml de caldo soja tripticasa (TSB) con glicerol, para congelación a -80°C. Para determinar la especie se realizó: tinción de Gram, prueba de la catalasa e hidrólisis de esculina y fermentación de xilosa, manitol, glucosa y rhamnosa, Se verifico además la producción o no de β-hemolisis en la placa de ASO-5% y, se realizó el test de CAMP en placa de ASO-5% con *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi* (Hitchins et al. 2020; Carlin et al. 2021).

Los aislamientos que se tipificaron como *Listeria* spp. fueron remitidos al Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Diagnóstico molecular:

Presencia de gen que codifica Internalina A:

Se realizó por PCR según protocolo de Liu et al. (2007). Se utilizaron los siguientes cebadores: 5'ACGAGTAACGGGACAAATGC3' y 5'CCCGACAGTGGTGCTAGATT3' (800bp). La PCR se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo 0.8 U de Taq DNA polimerasa, buffer de PCR 1×, 200 µM de cada dNTP y aproximadamente 10 ng de ADN bacteriano junto a 40 pmol de cada cebador para *inlA*. Las reacciones de amplificación se realizaron en termociclador (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems®), el programa consistió en 1 ciclo de 94 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos y 72 °C por 50 segundos; y 1 ciclo de 72 °C por 2 minutos. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 0.5X y posteriormente revelados con bromuro de etidio.

Determinación del perfil de serotipo en *L. monocytogenes*:

Posteriormente, en los aislamientos de *L. monocytogenes* se realizó determinación del perfil de serotipo mediante PCR múltiple según técnica descrita por Doumith et al. (2004).

Para la extracción de ADN las cepas se sembraron en placas de agar infusión cerebro corazón (BHIA) y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Se tomaron 3 a 5 colonias de un cultivo puro con ansa descartable y se resuspendieron en 50 µl de solución de lisis (dodecil sulfato de sodio al 0,25% y NaOH 0,05 N). La suspensión se incubó a 99°C durante 15 minutos, se agregaron 100 µl de agua ultrapura tipo MilliQ a cada tubo y se centrifugaron a 12.000 rpm por 10 minutos. Cada sobrenadante se conservó a -20°C hasta su utilización como molde (2 µl) en las distintas reacciones de amplificación. Como controles se incluyeron las siguientes cepas de

referencia: *L. monocytogenes* serotipo 1/2a (CIP 89381), *L. monocytogenes* serotipo 1/2b (CIP 90602), *L. monocytogenes* 1/2c (CIP 89756) y *L. monocytogenes* serotipo 4b (CIP 88868). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µL conteniendo 1,25 U de Taq DNA polimerasa, 0.2 mM de cada dinucleótido trifosfatado (dNTP), y 50 mM Tris-HCl-10 mM K Cl-50 mM (NH₄)₂SO₄ -2 mM MgCl₂ por tubo, a pH 8,3. Los cinco sets de *primers* se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: 1 µM para el *L. monocytogenes* o0737, ORF2819 y ORF2110; 1.5 µM para *L. monocytogenes* o1118; y 0.2 µM para *prs*. Para las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems®) y el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos; seguido por 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 53°C por 75 segundos y 72°C por 75 segundos cada uno; con un ciclo de extensión final de 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR se separaron por electroforesis sumergida en geles de agarosa al 2%. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 100V y 40 mA en buffer TBE 0,5X (90 mM base Trizma, 90 mM ácido bórico y 2 mM EDTA a pH 8.3) durante al menos 1 hora. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0,5 µl/ml) durante 15 minutos, se destiñeron con agua destilada durante 20 minutos, se observaron con luz ultravioleta y se fotografiaron.

RESULTADOS

Entre los años 2014 y 2021 se diagnosticaron 11 casos de listeriosis en bovinos, donde 10 correspondieron a la forma nerviosa de la enfermedad y un caso a un aborto de tercer tercio de gestación. Los principales datos epidemiológicos se presentan en la Tabla 1.

Se observó una clara estacionalidad en la enfermedad, siendo la primavera la estación del año con más casos (9/11, 82%) y en segundo lugar el invierno (2/11, 18%). Se registraron casos de listeriosis en 9 de los 19 departamentos del país (47%), la mayoría ubicados dentro del área de influencia del Laboratorio Regional Noroeste. En el predio identificado como “F” hubo dos casos de la enfermedad en el mismo año, pero en meses distintos y con dos presentaciones clínicas distintas (neurolisteriosis y aborto) (Tabla 1 y 2). Listeriosis fue más frecuente en sistemas ganaderos que lecheros (siete y cuatro casos, respectivamente). Dentro de los sistemas ganaderos se registraron tres casos en cría extensiva, dos casos en recría, un caso en invernada y otro en una cabaña de reproductores (Tabla 1).

La enfermedad se presentó más frecuentemente afectando un solo individuo que como casos colectivos (9 y 2 respectivamente). Cabe destacar que en cinco de los 11 casos (45%) se mencionaba que había consumo únicamente de pasturas (tres de campo natural y dos pasturas implantadas). En otros cinco casos (45%) había antecedentes de consumo de pasturas y ensilados (dentro del que se encontraba el caso 10) y, en un caso (10%), únicamente los animales consumían ensilados (caso 9). En ese sentido, los dos casos donde se registró más de un animal enfermo había antecedentes recientes de consumo de ensilados. En el caso 9 que afectó un lote de terneros, hubo aislamiento de *L. monocytogenes* serotipo 1/2b en el ensilado remitido al Laboratorio. Mientras que en el caso 10, se cultivaron nueve muestras de ensilados que consumieron los animales afectados, pero no hubo recuperación de *Listeria* en ninguno de ellos.

Con respecto a las categorías afectadas de los 11 casos, nueve (82%) ocurrieron en animales mayores a dos años y, los restantes dos (18%) en animales menores a dos años de edad. Los principales signos clínicos observados en cada caso se detallan en la Tabla 2. En los casos con sintomatología nerviosa, se mencionó que los animales enfermos presentaban marcha en círculos (o torneo) con desvío de la cabeza hacia un lado (Figura 1), depresión, parálisis facial unilateral dada por caída de la oreja, parpado, narina y labio, babeo, nistagmo, dificultad en la marcha (ataxia). En todos los casos el cuadro clínico duró entre 2 a 5 días hasta la muerte de los animales.

En cuanto al diagnóstico patológico, en los 10 casos con síntomas nerviosos la lesión principal se observó en el tronco encefálico. En médula oblonga y puente en neuroparénquima había múltiples manguitos perivasculares constituidos por linfocitos e histiocitos (10/10), gliosis moderada (10/10) (Figura 2), infiltración de meninges por linfocitos (10/10), múltiples acúmulos de linfocitos, histiocitos y neutrofilos (microabscesos) (10/10) (Figura 3). En tres casos se observó además áreas multifocales de necrosis (malacia) y presencia de esferoides axonales. En cinco casos las lesiones se extendían rostralmente afectando mesencéfalo y en un caso el tálamo inclusive. Mientras que en cuatro casos las lesiones se extendían también de forma caudal, afectando el obex. En los casos 3 y 11, donde se recuperó *L. innocua*, la severidad de las lesiones fue menor.

De 197 fetos bovinos en los que se realizó necropsia entre 2014 y 2021 para el diagnóstico integral de feto, solo uno presentó lesiones macroscópicas que sugerían un aborto por *Listeria*. En la histopatología, las vísceras examinadas presentaban una autólisis moderada, aunque se logró observar en hígado y riñón múltiples áreas de necrosis central rodeada por neutrófilos degenerados y linfocitos.

Con respecto al diagnóstico utilizando cultivo y aislamiento bacteriológico, de las 11 muestras cultivadas hubo recuperación de colonias de *Listeria* en 10 (91%), donde ocho correspondieron a *L. monocytogenes* y dos a *L. innocua* (Tabla 2). De las ocho *L. monocytogenes*, seis se tipificaron como serotipo 4b y dos serotipo 1/2a; todos los aislamientos portaban el gen que codifica internalina A. Sin embargo, los aislamientos de *L. innocua* no lo poseían.

DISCUSIÓN

En el periodo estudiado se diagnosticaron 11 casos de listeriosis en bovinos, donde la mayoría (9/11, 82%) correspondió a casos individuales y los brotes o casos colectivos ocurrieron en una proporción menor (2/11, 18%). La enfermedad ocurrió más frecuentemente en animales adultos mayores a dos años (9/11, 82% de los casos), al igual que lo descrito por algunos reportes (Sanches et al. 2000, Oevermann et al. 2010a, Kessel et al 2011, Margineda et al. 2012). Mientras que otros autores en Brasil y Argentina describen casos en bovinos menores a dos años de edad (Campero et al. 2002, Konradt et al. 2017). Otra recopilación de casos de INTA Balcarce, menciona que la listeriosis es una enfermedad muy frecuente tanto en bovinos adultos como en menores de 2 años de edad (Späth & Becker 2012). Por lo tanto, tomando en cuenta la patogenia de la enfermedad, no es posible una explicación a este hallazgo, y en esa línea algunos autores sugieren que no existe una predisposición por edad para la enfermedad (Bagatella et al. 2022).

La primavera fue el momento del año donde se registró la mayoría de los casos. Este hecho se podría relacionar a eventos previos de alta exposición a la bacteria, ya que el período de incubación de la forma nerviosa varía de una a siete semanas (Oevermann et al. 2010b). En ese sentido, Mohammed et al. (2010), Nightingale et al. (2005) y Strawn et al. (2013) han reportado que en el invierno se encuentra la mayor prevalencia de *L. monocytogenes* en el ambiente de predios agropecuarios. Además, la humedad tiene un rol importante en la presencia de *L. monocytogenes* en el ambiente, ya que se ha observado una mayor prevalencia de la bacteria en suelos y pasturas con alta humedad (Strawn et al. 2013). Reforzando la hipótesis de la estacionalidad de *Listeria* en el ambiente de los predios, Nightingale et al. (2005) reportó una mayor excreción fecal de la bacteria por parte de los bovinos en invierno, mientras que Bandelj et al. (2018) en primavera. Lo expuesto hasta ahora, sumado a las características de *Listeria* de tolerar un amplio rango de temperatura (1 a 45°C) y de pH (4.5-9) (Vázquez-Boland et al. 2001) permitirían que la bacteria permanezca viable en ciertos nichos del ambiente, lo que podría explicar por qué en el predio F se observaron casos de la enfermedad en distintos momentos del año.

Con respecto a los antecedentes de la alimentación se registraron dos hechos importantes: el primero, fue que el 45% de los casos no tenía antecedentes recientes de consumo de alimentos ensilados, por lo cual la fuente de infección probablemente provino desde la pastura o el agua de bebida. En línea con este resultado, trabajos previos realizados por esta autora en predios lecheros de Uruguay, detectaron pasturas contaminadas por *L. monocytogenes* (Matto et al. 2017, Matto et al. 2018), así como también otros autores han constatado la presencia de *Listeria* en agua, alimentos y suelo de predios ganaderos (Nigthingale et al. 2005, Mohammed et al. 2010, Whitman et al. 2020). En ese sentido, otros reportes o revisiones establecen que no todos los casos de listeriosis en rumiantes están asociados al consumo de ensilados (Walland et al. 2015, Bagatella et al. 2022). El segundo hallazgo, fue que los dos casos colectivos registrados si tenían al ensilado en la dieta, aislando inclusive en una muestra de ensilado del caso nueve *L. monocytogenes* serotipo 1/2b. Esta bacteria prolifera en áreas de los ensilados donde queda oxígeno remanente y por lo tanto, el pH no desciende lo suficiente para limitar el desarrollo de microorganismos (Low & Donachie 1997). Lo expuesto hasta aquí, podría explicar por qué la mayoría de los casos de listeriosis se observaron en predios ganaderos, sobre todo de tipo extensivo, donde el consumo de alimentos ensilados no es tan frecuente como en los sistemas lecheros.

En cuanto a las formas clínicas de listeriosis en esta serie de casos hubo una clara predominancia de la forma nerviosa de la enfermedad, en concordancia con reportes regionales (Sanches et al. 2000, Campero et al. 2002, Galiza et al. 2010, Margineda et al. 2012, Konradt et al. 2017, Santos et al. 2018). Los síntomas clínicos observados reflejaron la lesión a nivel de tronco encefálico, donde se localizan los núcleos de los pares craneales V (nervio trigémino), VII (nervio facial), VIII (nervio abducente) y sistema vestibular (Walland et al. 2015). Por otra parte, este hecho resalta el valor del diagnóstico de las enfermedades neurológicas de los bovinos, ya que indirectamente se realiza vigilancia pasiva de enfermedades de impacto en el comercio de productos de origen animal y/o zoonosis como Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) y Rabia (OMSA 2023).

Durante los ocho años en los que se analizaron 197 fetos bovinos solo se registró un (1) aborto por *L. monocytogenes*. Este resultado sugiere que el aborto y la muerte perinatal por infección *in útero* por *Listeria* son esporádicas en Uruguay. Situación similar se reporta en la región, donde se describen escasos abortos en bovinos por listeriosis (Margineda et al. 2012, Alvarez et al. 2018) en Argentina. Mientras que en Brasil no se han reportado estas formas clínicas de la enfermedad. Probablemente este hecho pueda explicarse por los diferentes mecanismos patogénicos que tienen la forma nerviosa y el aborto (Oevermann et al. 2010b, Bagatella et al. 2022).

El abordaje del diagnóstico de los casos clínicos combinando la patología, bacteriología y las técnicas moleculares, demostró ser congruente y aportó información nueva acerca de la enfermedad en rumiantes. En primer lugar, las lesiones histológicas en el SNC o en tejidos fetales de los casos estudiados coinciden con lo reportado por diferentes autores (Campero et al. 2002, Oevermann et al. 2010a, Kessel et al. 2011; Cantile & Youssef 2016, Schlafer & Foster 2016). En los dos casos de listeriosis nerviosa asociados a la infección por *L. innocua* no hemolítica, se observó la misma lesión histológica que la ocasionada por *L. monocytogenes* pero de menor severidad, al igual que lo reportado previamente por Rocha et al. (2013). En cuanto a la bacteriología, el porcentaje de recuperación de *Listeria* a partir de muestras de casos clínicos fue superior a otros reportes (Johnson et al. 1995, Campero et al. 2002, Easton et al. 2012, Konradt et al. 2017, Margineda et al. 2012), ya que en este estudio se obtuvieron 10 aislamientos de *Listeria* en 11 muestras cultivadas (91%). Una posible explicación al alto porcentaje de recuperación bacteriana, podría ser el tipo de medios de cultivo utilizados, donde se emplearon medios de enriquecimiento selectivo que favorecen específicamente el desarrollo

de *Listeria* y que son empleados rutinariamente en la industria alimenticia (Hitchins et al. 2020) y también en protocolos de investigación (Nightingale et al. 2004, 2005).

Todos los aislamientos de *L. monocytogenes* portaban el gen *inlA*, mientras que estaba ausente en los dos aislamientos de *L. innocua*. Este factor de virulencia es sumamente importante, ya que promueve la entrada de la bacteria en las células del hospedador y media el traspaso de las barreras intestinal y placentaria, así como también la invasión del SNC (Vázquez-Boland et al. 2001). En el primer aislamiento de *L. innocua* (caso 3) se secuenció el genoma completo de la bacteria, confirmando la ausencia del gen *inlA*, pero se determinó la presencia de otros genes que codifican otros factores de virulencia de *L. monocytogenes* (Matto et al. 2022).

Por otro lado, en los aislamientos de *L. monocytogenes* predominó el serotipo 4b, y en menor proporción el 1/2a. Estos serotipos son los frecuentemente asociados a enfermedad en animales y seres humanos (1/2b, 4b y 1/2a) (Vázquez-Boland et al. 2001, Oevermann et al. 2010b). Sin embargo, la serotipificación no es una herramienta precisa para el estudio epidemiológico de la enfermedad, siendo necesario utilizar técnicas de mayor poder discriminatorio como la secuenciación de genoma completo (WGS) (Datta & Burall 2018).

Considerando que en esta región de América del Sur hay muy pocos aislamientos de *Listeria*, siendo que listeriosis es una enfermedad frecuente en rumiantes, es necesario promover el cultivo y aislamiento de casos clínicos sospechosos, a fin de caracterizar con más detalle la mayoría de las cepas circulantes. Asimismo, sería necesario el abordaje de más muestreos ambientales en predios agropecuarios, para establecer los nichos donde se encuentra presente *Listeria*. Esto permitiría profundizar en el conocimiento de la enfermedad y en la epidemiología en rumiantes en nuestros sistemas pastoriles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armed Forces Institute of Pathology (1995) Métodos Histotecnológicos. Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) Washington, DC. 280 p.
2. Álvarez I, Cirone K, Méndez A, Maldonado J, Cheuquepan F, García J, Scioli V, Cantón G, Morrell E (2018) Aborto bovino por *Listeria monocytogenes*: confirmación bacteriológica e inmunohistoquímica. XXII Reunión Científico Técnica de la AAVLD, Argentina.
https://www.researchgate.net/publication/328581691_Aborto_bovino_por_Listeria_Monocytogenes_confirmacion_bacteriologica_e_inmunohistoquimica. Fecha de visita 14/06/2023.
3. Bandelj P, Jamnikar-Ciglenecki U, Ocepek M, Blagus R, Vengust M (2018) Risk factors associated with fecal shedding of *Listeria monocytogenes* by dairy cows and calves. J Vet Intern Med. 32:1773-1779.
4. Bagatella S, Tavares-Gomes L, Oevermann A (2022) *Listeria monocytogenes* at the interface between ruminants and humans: A comparative pathology and pathogenesis review. Vet. Pathol. 59(2):186-210.
5. Campero CM, Odeón AC, Cipolla AL, Moore DP, Poso MA, Odriozola E (2002) Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health 49: 379-383.
6. Cantile C, Youseff S (2016) Nervous system. En: Maxie MG: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals. Vol. 1: 250-406.
7. Carlin CR, Liao J, Weller D, Gou X, Orsi R, Wiedmann M (2021) *Listeria cossartiae* sp.nov., *Listeria farberi* sp. nov., *Listeria immoviles* sp.nov., *Listeria portnoyi* sp. nov., and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 71(5):004795.

8. Datta AR, Burall LS (2018) Serotype to genotype: The changing landscape of listeriosis outbreak investigations. *Food Microbiol.* 75: 18-27.
9. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42(8): 3819-3822.
10. Dutra (2020) Archivo Veterinario del Este. Recuperado de: https://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/23_a52814f9/archivosAdjuntos/ano-2020.pdf. Fecha de visita 16/06/2023.
11. Dutra (2019) Archivo Veterinario del Este. Recuperado de: https://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/23_a52814f9/archivosAdjuntos/ano-2019.pdf Fecha de visita 16/06/2023.
12. Easton C, Preliasco M, Paullier C, Marcolongo-Pereira C, Nakazato L, Rivero R (2012) Estudio retrospectivo para la identificación de agentes infecciosos que provocan encefalitis en bovinos de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (186): 13-18.
13. Evans K, Smith M, McDonough P, Wiedmann M (2004) Eye infections due to *Listeria monocytogenes* in three cows and one horse. *J Vet. Diagn. Invest.* 16: 464-469.
14. Fedio WM, Schoonderwoerd M, Shute RH, Jackson H (1990) A case of bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*. *Can. Vet. J.* 31: 773-775.
15. Galiza GJN, Silva MLCR, Dantas AFM, Simões SVD, Riet-Correa F (2010) Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesq. Vet. Bras.* 30(3):267-276
16. García JA, Micheloud JF, Campero CM, Morrell EL, Odriozola ER, Moreira AR (2016) Enteric listeriosis in grazing steers supplemented with spoiled silage. *J. Vet. Diagn. Invest.* 28:65-69.
17. Hitchins AD, Jinneman K, Chen Y (2020) Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. *Bacteriological Analytical Manual*. United States Food and Drug Administration. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>. Fecha de visita 16/06/2023.
18. Johnson GC, Fales WH, Maddox CW, Ramos-Vara JA (1995) Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 223-228.
19. Kessel AE, Finnie JW, Windsor PA (2011) Neurological diseases of ruminant livestock in Australia. III: bacterial and protozoal infections. *Aust. Vet. J.* (807): 289-296.
20. Konradt G, Bassuino DM, Prates KS, Bianchi MV, Snel GGM, Sonne L, Driemeier D, Pavarini SP (2017) Suppurative infectious diseases of the central nervous system in domestic ruminants. *Pesq. Vet. Bras.* 37(8): 820-828.
21. Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ (2007) [A multiplex PCR for species and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*](#). *J Microbiol Methods.* 71:133-140.
22. Low JC, Donachie W (1997) A review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet. Journal.* 153:9-29.
23. Margineda CA, Cantón G, Lischinsky L, Moreira A, Campero CM (2012) Listeriosis en bovinos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Vet.* 23 (1): 32-37.
24. Matto C, D'Alessandro B, Mota MI, Braga V, Buschiazzi A, Giannechini E, Varela G, Rivero R (2022). *Listeria innocua* isolated from diseased ruminants harbour minor virulence genes of *L. monocytogenes*. *Vet. Med. Sci.* DOI: 10.1002/vms3.710.
25. Matto C, Rodriguez V, Giles M, Varela G, Braga V, Mota MI, Vico V, Adrien ML, Giannechini E, Rivero R (2019) Detección de *Listeria monocytogenes* en un rodeo de

- bovinos de carne en el que previamente ocurrió un caso clínico de listeriosis nerviosa. Veterinaria (Montevideo), 211-3:14-20.
26. Matto C, Varela G, Braga V, Vico V, Giannechini RE, Rivero R (2018) Detection of *Listeria* spp. in cattle and environment of pasture based dairy farms. Pesq. Vet. Bras. 38(9): 1736-1741.
 27. Matto C, Varela G, Mota MI, Giannechini R, Rivero R (2017) Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in a pastured bull. J. Vet. Diagn. Invest. 29(2): 228-231.
 28. Mohammed HO, Atwill E, Dunbar L, Ward T, McDonough P, Gonzalez R, Stipetic K (2010) The risk of *Listeria monocytogenes* infection in beef cattle operations. J Appl Microbiol. 108(1):349-56.
 29. Mohammed HO, Stipetic K, McDonough PL, Gonzalez RN, Nydam DV, Atwill ER (2009) Identification of potential on-farm sources of *Listeria monocytogenes* in herds of dairy cattle. Am. J. Vet. Res. 70(3):383-388.
 30. Nightingale KK, Fortes ED, Ho AJ, Schukken YH, Gröhn YT, Wiedmann M (2005) Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227:1808-1814.
 31. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Gröhn YT, McDonough PL, Wiedmann M (2004) Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. Appl. Environ. Microbiol. 70(8):4458-4467
 32. Oevermann A, Di Palma S, Doherr MG, Abril C, Zurbriggen A, Vandeveld M (2010a) Neuropathogenesis of naturally occurring encephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in ruminants. Brain Path. 20: 378-390.
 33. Oevermann A, Zurbriggen A, Vandeveld M (2010b) Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise?. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.
 34. Organización Mundial de Salud Animal (2023) Código sanitario para los animales terrestres. Capítulo 1.3 Enfermedades, infecciones e infestaciones de la lista de la OIE. Disponible en: https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-terrestre/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_oie_listed_disease.htm. Fecha de visita 14/06/2023.
 35. Rocha PRD, Dalmaso A, Grattarola C, Casalone C, Del Piero F, Bottero M, Capucchio MT (2013) Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. Res. Vet. Sci. 94: 111-114.
 36. Santos BL, Estima-Silva P, Coelho ACB, Oliveira PA, Soares MP, Sallis ESV, Bruhn FRP, Schild AL (2018) Doenças do sistema nervoso central de bezerras no sul do Rio Grande do Sul: uma contribuição ao diagnóstico diferencial. Pesq. Vet. Bras. 38(4): 685-691.
 37. Sanches AWD, Langohr IM, Stigger AL, Barros CSL (2000) Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. Pesq. Vet. Bras. 20(3): 113-118.
 38. Schlafer DH, Foster RA (2016) Female genital system. En: Maxie MG: Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals. Vol. 3: 358-464.
 39. Späth EJA, Becker BE (2012) Análisis epidemiológico de 8 años de diagnósticos de enfermedades de los bovinos. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA, Argentina. 50 p. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmpinta_boletin160_8aossdvebalcarce.pdf. Fecha de visita 16/06/2023.

- 429 40. Strawn LK, Fortes ED, Bihn EA, Nigthingale KK, Gröhn YT, Worobo RW, Wiedmann
430 M, Bergholz PW (2013) Landscape and meteorological factors affecting prevalence of
431 three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. *App. Environ. Microbiol.*
432 79(2): 588-600.
- 433 41. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel
434 W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular
435 virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(3):584-640.
- 436 42. Walker JK, Morgan JH, McLauchlin J, Grant KA, Shallcross JA (1994) *Listeria*
437 *innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. *Vet. Microbiol.* 42, 245-
438 253.
- 439 43. Walland J, Lauper J, Frey J, Imhof R, Stephan R, Seuberich T, Oevermann A (2015)
440 *Listeria monocytogenes* infection in ruminants: Is there a link to the environment, food
441 and human health? A review. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 157: 319-328.
- 442 44. Winter P, Schilcher F, Bagó Z, Schoder D, Egerbacher M, Baumgartner W, Wagner M
443 (2004) Clinical and histopathological aspects of naturally occurring mastitis caused by
444 *Listeria monocytogenes* in cattle and ewes. *J. Vet. Med.* 51:176-179.
- 445 45. Whitman KJ, Bono JL, Clawson ML, Doy JD, Bosilevac JM, Arthur TM, Ondrak JD
446 (2020) Genomic-based identification of environmental and clinical *Listeria*
447 *monocytogenes* strains associated with an abortion outbreak in beef heifers. *BMC*
448 *Veterinary Research.* 16, 70.
- 449

450 **Tabla 1:** Datos epidemiológicos de los casos de listeriosis en bovinos en Uruguay
 451 diagnosticados por el Laboratorio Regional Noroeste-DILAVE entre 2014 y 2021.

Caso	Año	Estación meteorol ógica	Predio/Ubicación	Categoría	Raza	Animales enfermos	Animales muertos	Total en riesgo
1	2014	Primavera	A/Canelones	Toro	Kiwi	1	1	64
2	2015	Primavera	B/Paysandú	Vaca	Hereford	1	1	70
3	2016	Primavera	C/Flores	Toro	A.Angus	1	1	41
4	2016	Primavera	D/Flores	Vaca	Holando	1	1	s/d
5	2017	Primavera	E/San José	Vaca	Holando	1	1	13
6	2018	Invierno	F/Salto	Vaca	Hereford	1	0	245
7	2018	Primavera	F/Salto	Vaca	Hereford	1	1	450
8	2018	Primavera	E/Paysandú	Nov. 2-3 años	Hereford	1	1	293
9	2020	Invierno	G/Rocha	Ternero	Hereford	7	7	550
10	2020	Primavera	H/Florida	Vaca	Holando	2	2	s/d
11	2021	Primavera	I/Soriano	Ternero	Cruza	1	1	65

452 s/d: sin datos

453

Tabla 2: Principales síntomas clínicos, aislamientos bacterianos recuperados, serotipos y presencia del gen *InlA* en los casos de listeriosis en bovinos en Uruguay, diagnosticados por el Laboratorio Regional Noroeste-DILAVE entre 2014 y 2021.

Caso	Síntomas clínicos	Aislamiento	Serotipo	Presencia gen <i>InlA</i>
1	Marcha en círculos, depresión	SNC, <i>L. monocytogenes</i>	4b	+
2	Marcha en círculos, ataxia	SNC, <i>L. monocytogenes</i>	4b	+
3	Marcha en círculos, ataxia	SNC, <i>L. innocua</i>	n/c	-
4	Marcha en círculos, parálisis facial unilateral	SNC, sin desarrollo	n/c	n/c
5	Parálisis facial unilateral, babeo, depresión	SNC, <i>L. monocytogenes</i>	4b	+
6	Aborto 7 meses de gestación	Pulmón fetal, <i>L. monocytogenes</i>	1/2a	+
7	Marcha en círculos, ataxia	SNC, <i>L. monocytogenes</i>	4b	+
8	Marcha en círculos	SNC, <i>L. monocytogenes</i>	4b	+
9	Marcha en círculos, ataxia, parálisis facial unilateral	SNC, <i>L. monocytogenes</i>	1/2a	+
10	Marcha en círculos, parálisis facial unilateral	SNC, <i>L. monocytogenes</i>	4b	+
11	Nistagmo, decúbito	SNC, <i>L. innocua</i>	n/c	-



Figura 1: Bovino, caso 11. Marcha en círculos (torneo)
y desvío de la cabeza hacia la izquierda.

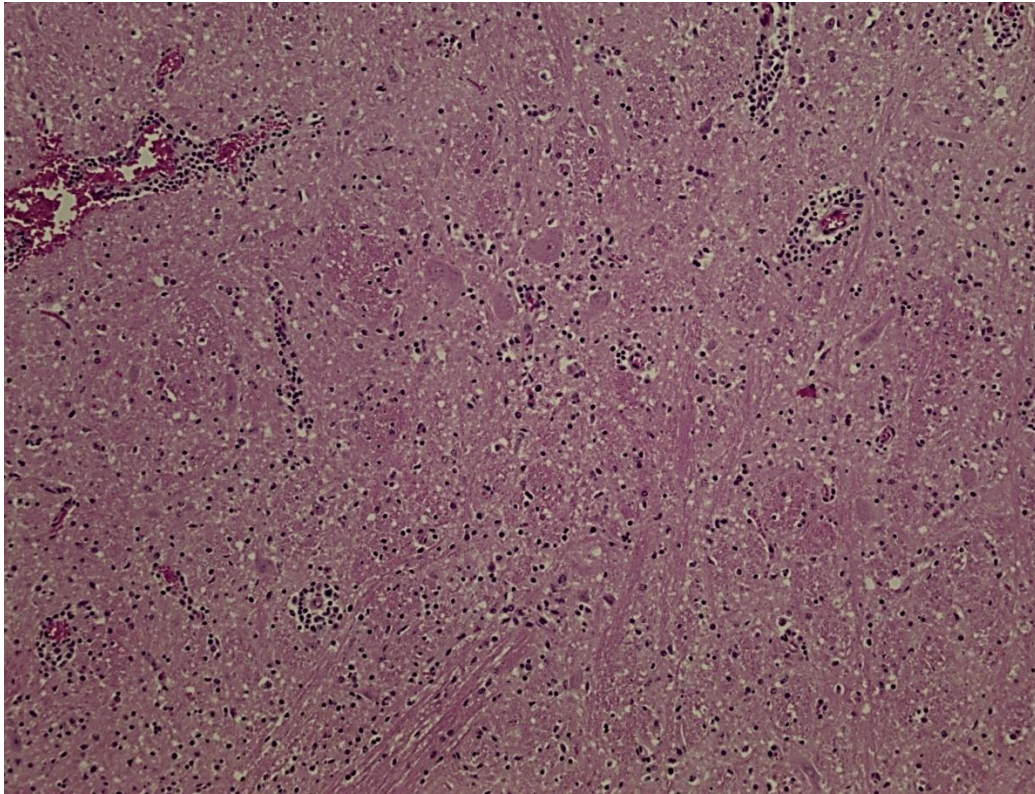


Figura 2: Bovino, puente. Múltiples manguitos perivascuales, gliosis multifocal a coalescente. HE 100x.

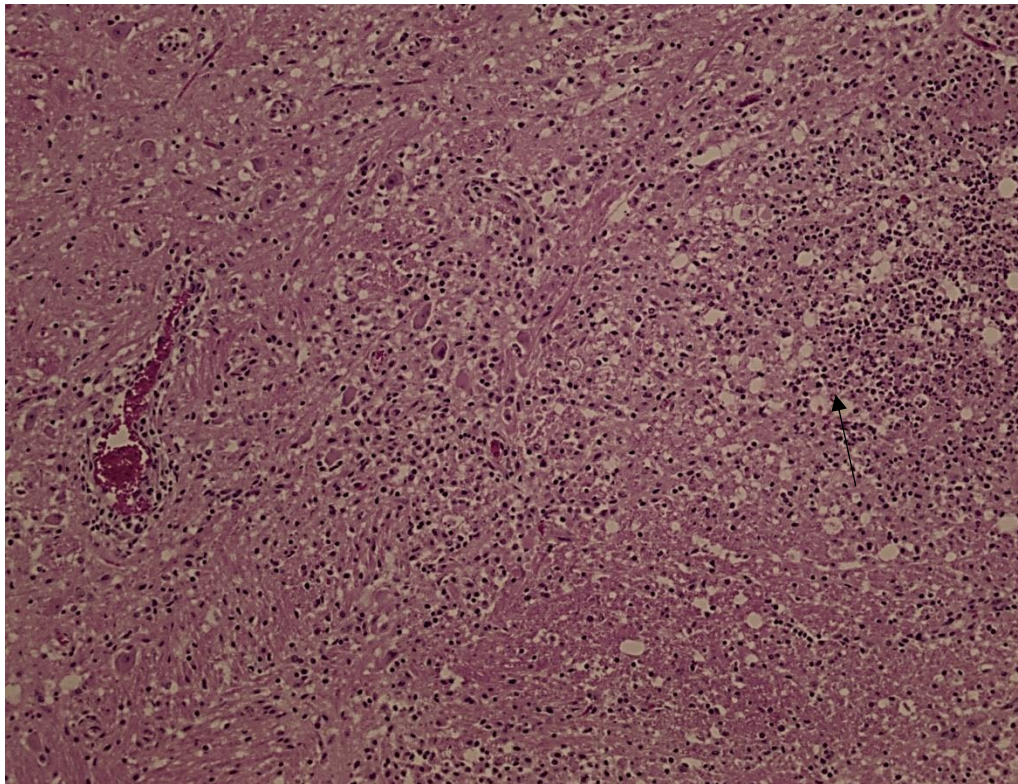


Figura 3: Bovino, puente: microabsceso (flecha), malacia y presencia de esferoides axonales, manguito perivascular. HE 100x.