

# ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM ÁGUA DE ESGOTO.<sup>1</sup>

ERNESTO HOFER \*

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, R.J.

**SUMÁRIO:** São apresentados os resultados preliminares, sobre a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em vinte amostras de água de esgoto, colhidas de afluentes de duas estações de tratamento.

Como esquema de isolamento, foram utilizados o processo de enriquecimento à baixa temperatura, segundo Gray, e quatro meios seletivos.

Foram isoladas duas amostras de *Listeria*, em análise sorológica identificadas como sorotipos L4b e L4ab.

VEM se observando nestes últimos anos, um interesse crescente em pesquisar a capacidade natural de sobrevivência da *Listeria monocytogenes* nas diferentes condições apresentadas ou impostas pelo meio ambiente. Tal empenho está refletido, principalmente, em várias referências encontradas, entre outras detalhando aspectos como o da presença de *Listeria* em águas de um rio (21) e as de JASINSKA (14), SEELIGER e colaboradores (26), que efetuaram isolamentos a partir de águas de esgoto. Naturalmente, não se poderia deixar de mencionar, sob esse prisma, as inúmeras tentativas que se concentraram em investigar a ocorrência de *Listeria* em vegetais, particularmente nas forragens ensiladas, salientando-se, nesse terreno, as observações de GRAY (67), PALSSON (22), KRÜGER (17), LEHNERT (20), DIJKSTRA (3), LARSEN (18), WELSHIMER (28), WELSHIMER e DONKERVOET (29).

Conquanto já se tenha um número razoável de informações que retrataram, sobre os vários aspectos, a distribuição e ocorrência da *Listeria monocytogenes* no reino animal e em natureza (8), não foram, no entanto, capazes de fornecer os subsídios definitivos, necessários para esclarecer a intrincada epidemiologia desta

infecção, nem desvendar conclusivamente o habitat real desse microrganismo.

Considerando que atualmente, a *Listeria* tem sido caracterizada com relativa freqüência, em fezes de pessoas e de animais aparentemente hígidos, nada mais circunstancial admitir, também, sua existência nas águas cloacais ou residuais. Esta foi a conjetura básica para a execução deste ensaio, no qual, se faz uma pequena avaliação do comportamento de diferentes meios seletivos empregados para o isolamento desse microrganismo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 20 amostras de águas de esgoto, oriundas dos afluentes das estações de tratamento de esgotos da Penha e do Galeão, localizadas na zona suburbana e na Ilha do Governador, respectivamente. De cada uma das estações, foram ensaiadas dez amostras.

Como primeira etapa, fez-se a sedimentação do material, realizada por meio de centrifugação a 3.000 rpm, durante 20 minutos. O sedimento foi ressuspenso com, aproximadamente, 2 ml de caldo simples, sendo semeados volumes de 0.5 ml deste material em dois tubos, contendo 10 ml de caldo triptosado (Tryptose Phosphate Broth-Difco) e incubados a 4°C, durante 90 dias.

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 16 de abril de 1974.

\* Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz. C.P. 926, Rio de Janeiro.

Ao fim dos períodos de 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias de incubação, foram retirados das amostras, que estavam mantidas a baixa temperatura, inóculos representados por uma alça de 4 mm de diâmetro, para os seguintes meios seletivos:

- 1 – Agar triptosado (Tryptose Agar-Difco), com 5 mcg/ml de sulfato de polimixina B (Pfizer Corporation do Brasil).
- 2 – Agar triptosado, contendo 50 mcg/ml de ácido nalidíxico (Winthrop Products Inc.);
- 3 – Agar triptosado com 5% de soro normal de cavalo, acrescido de 50 mcg/ml de Tripaflavina ou cloreto de 3,6 diamino-10-metilacridina (I. G. Farbenindustrie Aktiengesellschaft – Bayer) e 50 mcg/ml de ácido nalidíxico. Esta fórmula foi descrita por RALOVICH e colaboradores (23).
- 4 – Agar triptosado acrescido de 0.3% de extrato de levedura, 40 mcg/ml de ácido nalidíxico, 50 mcg/ml de acetato de tálio e 25 mcg/ml de Tripaflavina. Constitui esta fórmula uma variação do meio Ralovich e colaboradores, previamente, experimentada e introduzida por HOFER (12) na pesquisa de *Listeria* em fezes.

As placas semeadas foram incubadas a 37°C, durante 24 horas, no caso dos meios contendo polimixina e ácido nalidíxico, enquanto que, as com o meio de Ralovich e sua modificação, permaneceram por prazo de 48 horas a 37°C. De modo geral, as placas foram ainda mantidas, após tais períodos de incubação, por mais 24 horas em temperatura ambiente (em torno de 28 a 30°C), quando, realmente, se efetivaram as observações para o isolamento das colônias consideradas suspeitas.

O critério adotado, para a seleção das colônias de *Listeria*, se baseou no aspecto e na tonalidade apresentados pelo crescimento desta bactéria, quando da utilização da técnica de iluminação oblíqua transmitida, segundo HENRY (9) e descrita, pormenorizadamente, para *Listeria* por GRAY (5). Nesta circunstância, as colônias de *Listeria*, nos meios incolores, como no caso daqueles representados pela polimixina e ácido nalidíxico, apresentam-se bem homogêneas em sua massa, com superfície lisa e coloração azul, com certa tendência para o azul-acinzentado, à luz transmitida.

Nos outros meios, constituídos de tripaflavina, consideram-se como possíveis colônias suspeitas, aquelas que tenham evidenciado uma tonalidade amarelo-esverdeada, e observadas à luz direta e natural, tenham demonstrado, também, uma ligeira fluorescência, principalmente, delimitada aos bordos. Deve-se salientar que, após um pequeno adestramento, torna-se extremamente fácil o reconhecimento, a olho nu das colônias consideradas suspeitas de *Listeria*, nos meios à base de tripaflavina.

Como etapa subsequente, as colônias isoladas foram semeadas em agar semi-sólido (BactoTryptose Broth-Difco com 0.4% de agar), mantendo-se os tubos à temperatura ambiente (28-30°C), durante uma semana.

Todas as amostras, que revelaram mobilidade característica do gênero *Listeria* (figura 1), foram analisadas em suas propriedades morfotintórias (pequenos bacilos ou formas cocóides, Gram positivas, com ausência de granulações citoplasmáticas), bioquímicas, adotando-se, para tanto, as recomendações técnicas de SEELIGER (25), BOJSEN-MOLLER (2) e LARSEN (19). Após a execução e leitura das provas bioquímicas, fez-se a tipificação sorológica, de acordo com o processo descrito por DONKER-VOET (4) aliada à execução da prova de ANTON (1), que visa caracterizar a ação patogênica do microrganismo.

A sensibilidade aos antibióticos foi ensaiada, usando o processo de difusão, pelo sistema dos discos impregnados (Multodiscos Oxoid, tipo Standard, código n.º 2 033 E), no qual se incorporaram os seguintes discos isolados: Gentamicina (Difco); Bacitracina (B-D Mérieux); Kanamicina (Difco); Neomicina, Heclox (Laborterápica Bristol) e Cefalotina sódica (Lilly).

Na realização do antibiograma, foi empregado como meio de cultura o D.S.T. Agar Base (OXOID), enquanto que as particularidades referentes ao inóculo, tempo de incubação e a leitura dos resultados, obedeceram à orientação imprimida por Bojsen-Møller.

## RESULTADOS

Nos vinte exames realizados, em duas oportunidades foram isoladas e identificadas amostras de *Listeria monocytogenes*. A caracterização conclusiva se baseou nos resultados auferidos nas provas bioquímicas (tabela I), assim como, na determinação dos antígenos somáticos, por meio da técnica de aglutinação em tubos (tabela II).

A identificação sorológica evidenciou a existência de dois sorotipos distintos, representados pelos tipos 4ab (amostra 8P) e 4b (amostra 13P), ambos provenientes da estação de tratamento de esgoto da Penha.

Convém salientar, que a amostra 8P foi isolada do meio de Ralovich modificado, entre todos, o único que favoreceu o crescimento do germe. Já, em relação à amostra 13P, foi reconhecida e isolada dos meios seletivos contendo polimixina, de Ralovich, como também, de sua modificação.



Fig. 1 – Aspecto da mobilidade de *Listeria monocytogenes* em agar semi-sólido, mantido à temperatura ambiente durante 72 horas.



Fig. 2 – Conjuntivite purulenta, em cobaia, 48 horas após a instilação de uma das amostras isoladas (13P).



Fig. 3 – Recrudescência do quadro anterior para a forma de querato – conjuntivite (7 dias).

TABELA I

Comportamento bioquímico das amostras de *Listeria* isoladas (8P e 13P)

Provas	Amostras		Provas	Amostras	
	8P	13P		8P	13P
Arabinose	—	—	Indol	—	—
Esculina	+	+	H <sub>2</sub> S	—	—
Galactose	—	—	VM	+	+
Glicose	+ (sem gás)	+ (sem gás)	VP (Barrit)	+	+
Lactose	+ 7 dias	+ 7 dias	Citrato de Simmons	—	—
Maltose	+	+	Urease	—	—
Manitol	—	—	KCN	—	—
Manose	+	+	Lisina Descarboxilase	—	—
Ramnose	+ 7 dias	+ 7 dias	Arginina-Dihidrolase	—	—
Sacarose	+ 10 dias	+ 7 dias	Ornitina-Decarboxilase	—	—
Salicina	+	+	Gelatina	—	—
Sorbitol	+ 7 dias	+ 14 dias	Catalase	+	+
Trealose	+	+	Mobilidade ( $\pm 30^{\circ}\text{C}$ )	+	+
Xilose	—	—			

Legenda: + Reação positiva em 24 horas  
 — " negativa.

P = Proveniente da estação de Tratamento da Penha.

TABELA II

Caracterização sorológica das amostras de *Listeria* isoladas

Antígenos Somáticos	Anti-Soros Somáticos		
	4a	4b	4ab
4a	1/320	1/40	1/80
4b	1/80	1/640	1/80
4ab	1/40	1/80	1/320
8P	1/40	1/40	1/320
13P	1/20	1/320	1/20

TABELA III

Sensibilidade das amostras isoladas de *Listeria* aos antibióticos e quimioterápicos

	Concentração	Amostras	
		8P	13P
Ácido nalidíxico	30 mcg	R	R
Ampicilina	2 mcg	S	S
Bacitracina	5 U	R	R
Bactrim	25 mcg	S	S
Cefalotina	30 mcg	S	S
Cloranfenicol	10 mcg	S	S
Eritromicina	10 mcg	S	S
Gentamicina	10 mcg	S	S
Heclox*	—	S	S
Kanamicina	30 mcg	PS	PS
Meticilina	10 mcg	PS	S
Penicilina G	1,5 U	S	S
Polimixina B	50 mcg	R	R
Sulfadiazina	50 mcg	S	S
Tetraciclina	10 mcg	S	S

Legenda: S = Sensível  
 PS = Pouco sensível  
 R = Resistente

\* Constituído de 25 mcg de Hetacilina e 12,5 mcg de dicloxacilina.

Ambas as amostras foram capazes de desenvolver o quadro típico de conjuntivite, e posterior queratite nas cobaias, em 72 horas e 9 dias respectivamente (figuras 2 e 3).

Quanto aos resultados encontrados nos antibiogramas das amostras, poderão ser melhor analisados através da observação dos dados consignados na tabela III.

### DISCUSSÃO

Desde o seu reconhecimento como agente etiológico de doença no homem e nos animais, até alguns anos passados, considerava-se o isolamento de *Listeria monocytogenes* um acontecimento excepcional. Esta idéia se arraigou de tal forma, incutindo na maioria dos bac-

teriologistas e clínicos, o conceito da rara ocorrência desta bactéria, assim como, da doença, entre os vários membros do reino animal.

Todavia, os progressos alcançados no setor referente aos meios seletivos de isolamento, e melhor caracterização, do ponto de vista bioquímico e sorológico deste microrganismo, propiciaram condições tais aos investigadores que a barreira da fase de inusitada ocorrência foi ultrapassada e a presença de *Listeria* se tornou patente.

Considerando, portanto, a evolução atual do problema, verifica-se que o isolamento dessa bactéria não é mais um fato tão insólito, como se supunha outrora, principalmente, quando se cogita em analisar o apreciável número de

portadores hígidos, reconhecidos nas populações humana e animal, em diferentes regiões do mundo (2, 3, 15, 16, 19, 23).

Por sinal, este aspecto delineou, de modo categórico, a importância representada pelo trato digestivo, pois, ficou demonstrado ser este sistema uma das principais portas de entrada da bactéria, assim como, desempenhando também, função idêntica, quanto à eliminação da *Listeria* para o meio exterior. É bem provável que, à semelhança do que ocorre com outras espécies bacterianas, apresentando eletivamente localização entérica, esses portadores hígidos venham constituir uma das peças fundamentais para a perpetuação do ciclo epidemiológico da listeriose humana e animal.

Abordando o assunto, em tal estado de conhecimento, necessário se faz enfatizar o aspecto, anteriormente, discutido por SEELIGER e colaboradores (1965), que sugeriram, na ocasião, a importância representada pelas fezes e pelas águas cloacais, contendo *Listeria*, na contaminação do solo e de vegetais. Aliás, essa suspeita vem de longa data, pois SEELIGER e colaboradores (24), admitiram a hipótese de que o homem viesse a se contaminar pela *Listeria*, por ingestão de verduras frescas representadas, principalmente, por hortaliças, bem como, frutos crescidos praticamente à pequena altura do solo, como os morangos.

A hipótese de que a *Listeria monocytogenes* é capaz de sobreviver às condições inadequadas da biosfera, encontrou um sustentáculo nos resultados das observações experimentais efetuadas por LEHNERT (20) e WELSHIMER (27), que demonstraram a extraordinária capacidade desse microrganismo de permanecer por um longo período de tempo no solo. Mais recentemente, WELSHIMER (28) analisa, em condições naturais, a presença de *Listeria* em vegetais, conseguindo inclusive, neste material, o isolamento de uma nova espécie, a qual denominou de *Listeria murrayi* (30).

Levando-se em consideração todos os elementos, até então, arrolados, não se pode deixar de admitir a influência que, provavelmente, é desempenhada pelas águas de esgoto, como um elemento que congrega os microrganismos oriundos dos dejetos de população

humana e/ou animal, no mecanismo de veiculação da *Listeria*, do meio exterior para novas fontes de infecção, com a alternativa da passagem, prévia ou não, pelos vegetais.

Curiosamente, no entanto, as tentativas para averiguar a existência de *Listeria monocytogenes* em água de esgoto são muito discretas em número citando-se como investigação de maior destaque a realizada por LARSEN na Dinamarca (19).

Uma das principais causas dessa precariedade de informações sobre a verdadeira distribuição ecológica do germe, é óbvio, deve-se às dificuldades encontradas, pela maioria dos investigadores, no isolamento primário da *Listeria*. Somente, com o advento de novos meios seletivos e, em particular, após a introdução da polimixina (2) e do ácido nalidíxico (15), como elementos básicos na inibição da flora contaminante, foi possível obter isolamentos com muito maior facilidade e frequência.

Esses vários aperfeiçoamentos introduzidos nos processos seletivos, para o reconhecimento de *Listeria*, atingiram a um clímax com a descrição de RALOVICH e colaboradores, que verificaram a magnífica ação inibitória imposta pela associação de ácido nalidíxico à tripaflavina, sobre os microrganismos contaminantes.

Embora não se tenha, no presente ensaio, um número significativo de exames realizados como, também, de amostras isoladas, este fato, entretanto, não invalida nenhum dos conceitos previamente formulados, vindo a constituir, ao contrário, mais um dado de extrema importância, para comprovar a vasta disseminação da *Listeria* em a natureza.

Demonstra-se, também, a eficiência do processo de enriquecimento à baixa temperatura, idealizado por GRAY, que, por ora é a única técnica exequível para o crescimento sobrepujante da *Listeria*, em presença de numerosos outros microrganismos.

Revelam, ainda, os resultados a vantagem do meio de Ralovich, ou de sua modificação, como processo de extraordinária seletividade, facilitando o reconhecimento mais rápido das colônias de *Listeria* que, na maioria das vezes, podem ser identificadas a olho nu, não se

tendo, portanto, a necessidade de recorrer à técnica de HENRY.

No que concerne aos outros aspectos averiguados, deve-se salientar a caracterização do sorotipo 4ab, totalmente desconhecido em nosso meio até então, e a confirmação de trabalhos anteriores da presença do tipo 4b (10, 11). Convém, ainda, destacar que o confronto dos perfis bioquímicos e os comportamentos das amostras diante dos antibióticos e quimioterápicos são extremamente similares aos resultados verificados, em estudo anterior, com amostras isoladas de fezes (13).

### SUMMARY

Data are presented, as a preliminary report of a study of the occurrence of *Listeria monocytogenes*, in twenty samples of sewage water collected from affluents of two different sewage treatment station.

A scheme for the isolation of the bacterium involving different selective media and employing Gray's cold incubation technique has been used for the purpose.

In two opportunities, *Listeria* were isolated and the serological study of these strains were identified as serotypes L4b and L4ab.

### AGRADECIMENTOS

À Sr.<sup>a</sup> Guiomar Vieira Fernandes e Sr. José da Silva, técnicos do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia, os nossos agradecimentos pela valiosa cooperação nas tarefas auxiliares; e ao Sr. Newton Azevedo pela execução do trabalho fotográfico.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – ANTON, W., 1934, Kritisch-experimenteller Beitrag zur Biologie des Bakterium monocytogenes. Mit besonderer Berücksichtigung Seiner Beziehung zur Infektiösen Mononukleose des Menschen. *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, 131: 89-103.
- 2 – BOJSEN-MØLLER, J., 1972, Human Listeriosis. Diagnostic, Epidemiological and Clinical Studies. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, Section B, Suppl. 229, 157 p.
- 3 – DIJKSTRA, R. G., 1966, Epidemiological investigations on Listeriosis in cattle. Proc. Third International Symposium on Listeriosis. 1966, 215-225, Bilthoven.
- 4 – DONKER-VOET, J., 1959, A serological study of some strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan. *Am. J. vet. Res.*, 20: 176-179.
- 5 – GRAY, M. L., 1957, A rapid method for the detection of colonies of *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, 169: 373-379.
- 6 – GRAY, M. L., 1960, Isolation of *Listeria monocytogenes* from oat silage. *Science*, 132: 1767-1768.
- 7 – GRAY, M. L., 1960, Silage feeding and listeriosis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 136: 205-208.
- 8 – GRAY, M. L. & KILLINGER, A. H., 1966, *Listeria monocytogenes* and Listeric Infections. *Bact. Rev.*, 30: 309-382.
- 9 – HENRY, B. S., 1933, Dissociation in the genus *Brucella*. *J. Inf. Dis.*, 52: 347-402.
- 10 – HOFER, E. & MORAES, D. M. S., 1969, Isolamento de *Listeria monocytogenes* de secreção vaginal. *An. Microbiol.*, 16: 158.
- 11 – HOFER, E., 1971, Presença de *Listeria monocytogenes* em material encefálico de bovino. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 38: 285-287.
- 12 – HOFER, E., 1972, Isolamento e identificação de *Listeria monocytogenes* de fezes humanas e de água de esgoto. Apresentado no 4.º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Niterói, Estado do Rio de Janeiro.
- 13 – HOFER, E., 1973, Isolamento de *Listeria monocytogenes* de fezes humanas. Apresentado no IV Global Impacts of Applied Microbiology, S. Paulo.
- 14 – JASINSKA, S., 1961, Area irrigated with sewage. As higienic and sanitary evaluation. V. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* and bacteriophages anti-*Listeria* in small mammalia, from irrigated area and in sewage. *Acta microbiol. pol.*, 10: 443-446.
- 15 – KAMPELMACHER, E. H. & van NOORLE JANSEN, L. M., 1969, Isolation of *Listeria monocytogenes* from faeces of clinical healthy humans and animals. *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, 211: 353-359.
- 16 – KAMPELMACHER, E. H. & van NOORLE JANSEN, L. M., 1972, Further studies on the isolation of *L. monocytogenes* in clinically healthy individuals. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A*, 221: 70-77.

- 17 – KRÜGER, W., 1963, Das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in den verschiedenem Silage und dessen ätiologische Bedeutung. *Arch. exp. Vet. Med.*, 17: 181-203.
- 18 – LARSEN, H. ERREBO, 1964, Investigations on the epidemiology of Listeriosis. The distribution of *Listeria monocytogenes* in environments in which clinical outbreaks have not been diagnosed. *Nord. Vet. Med.*, 16: 890-909.
- 19 – LARSEN, H. ERREBO, 1969, *Listeria monocytogenes*. Studies on Isolation Techniques and Epidemiology. Thesis. Carl. Fr. Mortensen Ed. Copenhagen, 256 pg.
- 20 – LEHNERT, CHR., 1964, Bakteriologische, serologische und tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese, Epizootiologie und Prophylaxe der Listeriose. *Arch. exp. Med. Vet.*, 18: 981-1027 e 1247-1301.
- 21 – OLSUFEV, N. G., PETROV, V. G. & SHLYGINA, K. N., 1959, The detection of the causal organisms of erysipeloid and listeriosis in stream Water. *Z. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 30: 112-119.
- 22 – PALSSON, P. A., 1963, Relation of silage feeding to listeric infection in sheep. Second Symposium on Listeric Infection. Ed. M. L. Gray, 1963. 73-84, Bozeman.
- 23 – RALOVICH, B., FORRAY, A., MÉRO, E., MALOVICS, H. & SZÁZADOS, I., 1971, New Selective Medium for isolation of *L. monocytogenes*. *Zbl. Bakt., 1 Abt. Orig.*, 216: 88-91.
- 24 – SEÉLIGER, H. P. R. & LINZENMEIER, G., 1953, Die Listeriose und ihre Erregerer. (*Listeria monocytogenes*). *Z. Hyg. Infekt-Kr.*, 136: 335-378.
- 25 – SEELIGER, H. P. R., 1961, Listeriosis. 2nd ed. Hafner Publishing Co. Inc., New York, 308 p.
- 26 – SEELIGER, H. P. R., WINKHAUS, SCHINDL, I., ANDRIES, L. & VIEBAHN, A., 1965, Die Isolierung von *Listeria monocytogenes* aus Stuhl -, Klärschlamm - und Erdproben (mit einem Hinweis auf die Epidemiologie der Listeriose). *Path. et Microbiol.*, 28 (4): 590-601.
- 27 – WELSHIMER, H. J., 1960, Survival *Listeria monocytogenes* in soil. *J. Bact.*, 80: 316-320.
- 28 – WELSHIMER, H. J., 1968, Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. *J. Bact.*, 95: 300-303.
- 29 – WELSHIMER, H. J. & DONKER-VOET, J., 1971, *Listeria monocytogenes* in Nature. *Appl. Microbiol.*, 21: 516-519.
- 30 – WELSHIMER, H. J. & MEREDITH, A. L., 1971, *Listeria murrayi* sp. n.: a Nitrate-Reducing Mannitol-Fermenting *Listeria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 21: 3-7.