

PESQUISA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM SOLOS

ERNESTO HOFER & MARINETE MARINS PÓVOA

Foi investigada a presença de L. monocytogenes em 20 amostras de solos da superfície, oriundas de diferentes áreas ecológicas do Estado do Rio de Janeiro (perímetro urbano, pasto, mata e horta).

A análise bacteriológica evidenciou 32 amostras do microrganismo, revelando maior incidência no solo não cultivado (mata) que representou 56,25% dos isolamentos, ficando em segundo plano a área urbana com 25%. No levantamento, destacam-se os sorotipos L1/2b (46,87%), L4b (25%) e L1/2a (18,75%) como os mais frequentes, embora incidindo de maneira heterogênea em relação às áreas analisadas.

Entre os vários aspectos estudados, salienta-se que 50% das amostras se comportaram como patogênicas, em decorrência da produção de ceratoconjuntivite em cobaia, detalhe este intimamente relacionado com a atividade hemolítica "in vitro".

Confirma-se que tanto as formas virulenta e avirulenta de L. monocytogenes sobrevivem às condições impostas pelo solo, sendo provavelmente a causa primária desta contaminação os dejetos eliminados por diferentes espécies de animais portadores, corroborada pela presença de coliformes fecais nas áreas analisadas.

Os estudos realizados sobre a epidemiologia e ecologia da listeriose, ainda não permitiram desvendar completamente o enigma do reservatório do agente etiológico em natureza. As especulações estão direcionadas para dois pontos: o solo e a presença de portadores animais que o eliminam através das fezes (Kampelmacher & Jansen, 1972). Todavia, não se tem os elementos básicos para configurar de modo peremptório que a *Listeria monocytogenes* seja um microrganismo originalmente de natureza telúrica ou que, após sua excreção pelas fezes, o solo funcionaria como simples receptáculo (Welshimer & Donker-Voet, 1971 e Weis & Seeliger, 1975).

Na presente investigação, se procurou focalizar a incidência de *Listeria* em solos de diferentes áreas do Estado do Rio de Janeiro, com o intuito de ampliar as observações sobre o problema em nosso meio e complementar as abordagens efetuadas em várias fontes de infecção (Hofer & Moraes, 1969; Hofer, 1971; 1974a, b; Takeuchi et al., 1974 e Esper et al., 1978) e vias de transmissão (Hofer, 1975a, b).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas vinte amostras de solos colhidos da superfície, em quantidades de aproximadamente, 10g. Os locais selecionados para a colheita se concentraram no perímetro urbano da cidade do Rio de Janeiro (Vila Isabel, Lins, Tijuca, Manguinhos e Copacabana) e no meio rural, distinguidas em áreas de criação de animais herbívoros (município de Itaguaí), de hortaliças (municípios de Nova Iguaçu e Itaguaí) e de mata (município de Mangaratiba).

Os espécimens em porções aproximadas de 1g foram inoculados em 30ml de caldo triptosado (Tryptose Phosphate Broth – DIFCO) e em idêntico volume de caldo triptosado com 3,75g% (p/v) de Sulfocianeto de potássio (Lehnert, 1965). O primeiro meio foi incubado a 4°C durante 1 mês e o segundo, à temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) por 96h. Após as incubações assinaladas, os crescimentos foram transferidos para quatro meios seletivos, representados pelas seguintes fórmulas:

1 – Agar triptosado (Tryptose Agar-DIFCO) contendo 5mcg/ml de sulfato de polimixina B. – Pfizer e 40mcg/ml de ácido nalidíxico – Winthrop (Hofer, 1974a);

2 – Agar de Ralovich et al. (1971);

3 – 1ª modificação do meio de Ralovich (Hofer, 1974b);

4 – 2ª modificação do meio de Ralovich (Hofer, 1975b).

O período de incubação das placas semeadas foi de 48h a 37°C, por vezes com o acréscimo de 24h à temperatura ambiente.

Na etapa de caracterização das colônias foi utilizada a técnica de iluminação oblíqua transmitida de acordo com as especulações de Gray (1957). Na segunda modificação instituída no meio de Ralovich, o reconhecimento e isolamento das colônias suspeitas de *Listeria* se efetuou macroscopicamente, baseado na capacidade deste microrganismo desdobrar a esculina à esculetina, que em presença do substrato revelador, citrato férrico, evidencia colônias com centro negro e bordos fluorescentes de tonalidade amarelo-esverdeada.

Quanto ao número de colônias isoladas por meios seletivos, ficou na dependência da maior ou menor expressividade, isto é, naqueles que se visualizavam numerosas colônias, recolhiam-se em média 10, enquanto nas de menor vulto, resumiu-se ao número detectado, geralmente, variando de 1 a 5.

As colônias suspeitas foram semeadas em agar semi-sólido (Tryptose Broth, DIFCO com 0,4g% de agar), mantendo-se os tubos à temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) durante 5 dias. Todas as amostras que evidenciaram a mobilidade característica, foram examinadas em suas particularidades morfotintórias (método de Gram) e atividade catalásica, sendo posteriormente analisadas quanto ao seu perfil bioquímico, adotando-se as recomendações de Seeliger (1961).

A identificação das estruturas antigênicas, somáticas e flagelares, foi realizada de acordo com a técnica descrita por Donker-Voet (1959).

A patogenicidade das estirpes isoladas foi executada segundo o método apresentado por Anton (1934). Quanto à caracterização da hemólise, empregou-se o agar triptosado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e de coelho, incubado a 37°C e realizando-se a leitura, 24 a 48h após.

Em complemento foi investigada a presença de coliformes nas amostras analisadas, utilizando-se alíquotas de 1ml do caldo triptosado semeado com o material, antes que este sofresse o frio-enriquecimento. Os processos de isolamento e identificação dos constituintes deste grupo obedeceram às normas apresentadas por Costa & Hofer (1972).

RESULTADOS

A análise bacteriológica das vinte amostras de solos permitiu o isolamento e a identificação de 32 culturas de *Listeria monocytogenes*.

A distribuição da frequência do microrganismo de acordo com as áreas analisadas revelou a maior incidência no solo não cultivado (mata), representado por 18 amostras (56,25%) e em segundo plano, pelo material proveniente de área urbana (8 amostras ou 25%). Em relação à eficiência dos meios de enriquecimento, salienta-se os resultados mais satisfatórios obtidos através do crio-enriquecimento, que revelou 21 amostras ou 65,62% do total de isolamentos, em contraposição aos 34,37% ou 11 estirpes resultantes da passagem pelo caldo sulfocianeto (Tabela I).

TABELA I

Distribuição dos isolamentos de *Listeria monocytogenes* de acordo com os meios de cultura e as origens dos solos analisados

Meios de enriquecimento	Meios Seletivos*	Solos de Origem				Total	
		Urbana	Pasto	Mata	Horta	Nº	%
Caldo Tryptose 4°C	AT	—	3	2	—	5	15,62
	R	—	—	—	—	—	—
	RI	—	—	6	—	6	18,75
	RII	—	—	10	—	10	31,25
Caldo KSCN	AT	8	1	—	1	10	31,25
	R	—	—	—	—	—	—
	RI	—	—	—	1	1	3,12
	RII	—	—	—	—	—	—
Total nº		8	4	18	2	32	
		25,0	12,5	56,25	6,25	99,99	

* AT — Agar triptose com polimixina e ácido nalidíxico

R — Agar Ralovich

RI — 1ª modificação do meio de Ralovich

RII — 2ª modificação do meio de Ralovich

Quando se analisa o problema da associação de meios de enriquecimento aos seletivos (Tabela I), destaca-se o equilíbrio dos resultados dos isolamentos entre caldo triptose mais a segunda modificação do Agar de Ralovich e o caldo KSCN aliado ao agar triptose com ácido nalidíxico e polimixina.

Por sinal, nota-se nitidamente as influências exercidas pelos esquemas de meios empregados, com base nos sorotipos identificados.

Desta forma, observa-se que os tipos L1/2b e L1/2a, os mais incidentes, originaram-se quase exclusivamente da primeira associação, enquanto que, as amostras pertencentes ao sorotipo L4b provieram do segundo esquema, supramencionado (Tabelas I e II).

A caracterização e distribuição dos sorotipos, segundo as áreas consideradas, demonstrou também aspecto interessante, com as predominâncias dos tipos L1/2b incidindo, essencialmente, nos solos não cultivados (matas) e do sorotipo L4b, na área urbana (Tabela II).

A ação hemolítica relacionada ao quadro de ceratoconjuntivite em cobaia evidenciou que 50% das estirpes isoladas eram possuidoras destas propriedades. Paradoxal-

TABELA II

Frequência dos sorotipos de *L. monocytogenes* segundo as áreas pesquisadas

Sorotipos	Origem dos Solos				Total	
	Urbana	Pasto	Mata	Horta	Nº	%
L 1/2 a	—	—	6	—	6	18,75
L 1/2 b	—	2	12	1	15	46,87
L 3 a	—	—	—	1	1	3,12
L 4 a	1	—	—	—	1	3,12
L 4 b	7	1	—	—	8	25,00
L 4 f	—	1	—	—	1	3,12
Total	8	4	18	2	32	99,98

mente, em quatro amostras oriundas de solos não cultivados (matas) foram detectadas as hemolisinas sem, todavia, apresentar as reações na conjuntiva ocular dos animais. Outro detalhe digno de menção refere-se às 8 amostras oriundas de solo de área urbana, representadas pelos sorotipos L4a e L4b, das quais apenas uma se comportou como patogênica, segundo os critérios adotados (Tabela III).

Quanto à detecção de coliformes no solo, assinala-se que todas as amostras que positivaram a *Listeria*, provenientes das áreas urbanas, de horta e de pasto, propiciaram o reconhecimento de *Escherichia coli*, fato este não observado no solo cultivado (mata). Entretanto, nesta área foi possível caracterizar outros constituintes do grupo dos coliformes, representados por *Klebsiella* e *Enterobacter* (Tabela IV).

DISCUSSÃO

A hipótese formulada sobre a capacidade de sobrevivência de *Listeria monocytogenes* às condições impostas por um dos componentes da biosfera, isto é, o solo, encontra o devido respaldo em observações experimentais (Lehnert, 1960 e Welshimer, 1960) assim como, em natureza (Welshimer, 1968; Welshimer & Donker-Voet, 1971 e Weis & Seeliger, 1975).

Segundo Welshimer (1960), tudo indica que este microrganismo tenha um ciclo saprofítico no solo, favorecido pelos restos vegetais que desempenhariam uma função nutriente para a sua manutenção. É evidente que uma série de outros fatores participam neste fenômeno, em particular os de natureza edáfica, como a umidade, pH, temperatura, sombreamento, além dos constituintes químicos desta estrutura. Por outro lado, sob o aspecto biótico, não se poderá dissociar as influências exercidas pela concorrência vital entre os microrganismos constituintes desta microbiocenose, e que variam, consideravelmente, quanto à região analisada.

Apesar de todas as possíveis interações, observa-se que a *Listeria monocytogenes* foi isolada nas diferentes áreas pesquisadas, o que permite caracterizar sua distribuição como ubiqüitária neste universo e, colocar em plano secundário, o conceito de sua ocorrência mais freqüente nas áreas de atividades agrícola e de criação de animais. Aliás, este aspecto é similar com aquele apontado por Welshimer & Donker-Voet (1971) nos E.U.A.

Convém salientar que a presença de *Listeria* nos vários tipos de solos analisados não refuta a possibilidade da existência de portadores animais, veiculando o microrga-

TABELA III

Ação hemolítica e produção de ceratoconjuntivite

Áreas	Identificação Amostras	Sorotipos	Hemólise		Prova de Anton (Ceratoconjuntivite)
			Carneiro	Coelho	
Urbana	T	L 4 a	-	-	-
	M 1	L 4 b	-	-	-
	M 2	"	+	+	+
	M 3	"	-	-	-
	C 1	"	-	-	-
	C 2	"	-	-	-
	L	"	-	-	-
	VI	"	-	-	-
Pasto	HR 1	L 1/2 b	-	-	-
	HR 2	L 4 b	-	-	-
	HR 3	L 4 f	-	-	-
	B 2	L 1/2 b	-	-	-
Horta	AR 1	L 3 a	+	+	+
	AR 2	L 1/2 b	+	+	+
Mata	SR 1	L 1/2 a	+	+	+
	SR 2	"	+	+	-
	SR 3	"	+	+	+
	SR 4	"	+	+	+
	SR 5	"	+	+	+
	SR 6	"	+	+	+
	SR 7	L 1/2 b	+	+	+
	SR 8	"	+	+	+
	SR 9	"	+	+	+
	SR 10	"	+	+	+
	SR 11	"	-	+	-
	SR 12	"	+	+	+
	SR 13	"	+	+	+
	SR 14	"	+	+	+
	SR 15	"	-	-	-
	SR 16	"	+	+	-
	SR 17	"	+	+	-
	SR 18	"	+	+	+

+: Hemólise beta e desenvolvimento da ceratoconjuntivite

TABELA IV

Relação entre o isolamento de *Listeria* do solo e presença de bactérias do grupo de coliformes

Origem	Presença de			
	<i>Listeria</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>
Urbana	+	+	+	+
Pasto	+	+	+	—
Horta	+	+	+	—
Mata	+	—	+	+

nismo através das fezes, uma vez que, nas amostras provenientes das áreas urbanas, de pastagem e de horta, foi detectada *Escherichia coli*. Em contraposição, no solo não cultivado (mata) que revelou o maior contingente de *Listeria*, curiosamente não foi evidenciado o coli fecal, embora se tenha evidenciado outros membros do grupo dos coliformes (*Klebsiella* e *Enterobacter*).

Em princípio, este resultado indicaria a existência de uma contaminação fecal, mas algumas suposições devem ser aventadas, na tentativa de explicar este fenômeno paradoxal. Assim, considerando as diversas áreas de colheita como uma biocenose, pode-se admitir a discreta e/ou dispersa população animal da região, associada talvez ao problema da pouca capacidade de sobrevivência de *Escherichia coli* neste ambiente.

Outro aspecto digno de menção, situa-se nas variações dos coliformes fecais eliminados pelas diferentes espécies animais, que segundo Geldreich et al. (1962) e Smith & Crabb (1961), os mamíferos silvestres, particularmente os roedores e marsupiais excretam entre 10^1 a 10^5 coliformes por grama de fezes, concentração inferior àquela observada no homem (10^6 a 10^9) e de 10^4 a 10^7 nos animais domésticos. Salientam ainda os referidos autores que esta variação de coliformes está na dependência direta da dieta a que estão submetidos os indivíduos e que, nas condições silvestres, pode ser rotulada como extremamente aleatória.

Por outro lado a detecção de *Klebsiella* nas amostras de solo não cultivado (mata) corrobora de certa forma pela ocorrência de contaminação fecal, tendo em vista que este coliforme está presente em 30 a 40% das fezes dos mamíferos (Guarria, 1972).

Quanto à *Listeria monocytogenes*, qualquer que seja a sua proveniência é reconhecida sua capacidade de sobreviver por longo tempo no solo, possibilitando desta maneira incriminar portadores animais como responsáveis pela contaminação do meio ambiente. Embora não se tenha pesquisado esta bactéria em animais das áreas em que o material foi analisado, deve-se levar em conta que Weis & Seeliger (1975), em trabalho semelhante, detectaram 17,3% de aves portadoras dos sorotipos L1/2b e L4b, também os mais incidentes no solo.

A hipótese da contaminação fecal ainda inspiraria certa dúvida, principalmente quando se baseia na análise dos resultados obtidos nos solos de pastagem e de cultivo de hortaliças, em que a incidência de *Listeria* foi bem inferior às outras áreas. O mesmo fato, Weis & Seeliger (1975) assinalaram nos seus resultados, particularmente naqueles de pastos.

Outra faceta extremamente interessante se concentra na prova de virulência, cujos resultados apontaram que a quase totalidade das amostras de *Listeria* oriundas das

áreas urbana e de pastagem foram incapazes de provocar a ceratoconjuntivite em cobaia. Em contraposição, a maioria das estirpes isoladas de solos cultivados (hortaliças) e de mata caracterizaram-se como patogênicas, observando-se íntima correlação entre a capacidade de produzir ceratoconjuntivite e ação hemolítica total.

Convém salientar que nas amostras apatogênicas pertencentes ao sorogrupo 04, excetuando L4f, nenhuma demonstrou a presença do fator somático XV. De acordo com as opiniões de Welshimer & Donker-Voet (1971) e Weis & Seeliger (1975) as amostras possuidoras da referida fração antigênica são anemolíticas, e por conseguinte, avirulentas. Aliás, Seeliger & Schoofs (1979), com base na análise dos fatores antigênicos de amostras não hemolíticas, sugerem que os sorotipos L4f e L4g, sejam classificados no sorogrupo 06, englobando dois tipos: 6a (4f) e 6b (4g), identificados pelos fatores somáticos XV e XI, respectivamente. Como fato mais recente, Seeliger (1981) situa os dois sorotipos em nova espécie, *Listeria innocua*, circunstanciado também pela incapacidade deste microrganismo promover a monocitose nos hospedeiros.

Em conclusão, destaca-se que tanto as amostras de *Listeria monocytogenes*, patogênicas como apatogênicas, sobrevivem às condições ambientais impostas pelos diferentes tipos de solos analisados e que, provavelmente, a origem desta contaminação se deve à presença de portadores animais, em vista da detecção de um dos indicadores de poluição fecal, os coliformes.

SUMMARY

Was investigated the presence of *L. monocytogenes* in 20 samples from surface soils, from different ecological areas of Rio de Janeiro State (urban, pasture, forest and plantation areas).

The bacteriological analysis revealed 32 samples showing more incidence in the non cultivated soil which represented 56.25% of the isolations; the urban area contributed with 25.0%. In the survey detached the serotypes L1/2b (46.87%), L4b (25.0%) and L1/2a (18.75%) as more frequent although the incidence was heterogeneous in relation to the analysed areas.

Amongst the several studied aspects must be emphasized that 50.0% of the samples showed to be pathogenic due to the production of ceratoconjunctivites in guinea pigs which is very much related with hemolytic activity "in vitro".

Therefore the virulent and non virulent strains of *L. monocytogenes* can survive under the conditions imposed by the soil being probably the primary motive of this contamination the stools eliminated by different species of harbouring animals, confirmed by the presence of fecal coliforms in the analysed areas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às técnicas Rosemary Ribeiro e Deise Paranhos, pela assistência prestada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- COSTA, G.A. & HOFER, E., 1972. Isolamento e identificação de Enterobactérias. Monografia Inst. Oswaldo Cruz, 120p.

- DONKER-VOET, J., 1959. A serological study of some strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan. *Am. J. Vet. Res.*, 20 :176-179.
- ESPER, M.R.N.R.; PESSÔA, G.V.A.; HOFER, E.; LEE, I.M.L.; MELLES, C.E.A.; SAKATA, E.E. & CALZADA, C.T., 1978. Meningite por *Listeria monocytogenes* em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38 :37-41.
- GELDREICH, E.E.; BORDNER, R.H.; HUFF, C.B.; CLARK, H.F. & KABLER, P.W., 1962. Type Distribution of Coliform Bacteria in the Feces of Warm-Blooded Animals. *J. Water Poll. Control. Fed.*, 34 :295.
- GRAY, M.L., 1957. A rapid method for the detection of colonies of *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, 169 :373-379.
- GUARRIA, L., 1972. Brief Literature Review of Klebsiella as Pathogens. In: *Significance of Fecal Coliform in Industrial Wastes*, R.H. Bordner; B.J. Carrol, Ed. Denver Field Enforcement Center, U.S: E.P.A., Denver, Colorado.
- HOFER, E., 1971. Presença de *Listeria monocytogenes* em material encefálico de bovino. *Arq. Inst. Biol., S. Paulo*, 38 :285-287.
- HOFER, E., 1974a. Contribuição ao estudo epidemiológico da ocorrência de portadores de *Listeria monocytogenes* entre operários de matadouro e indivíduos com distúrbios entéricos. Tese Livre Docência U.F.R.R.J. Rio de Janeiro – R.J.
- HOFER, E., 1974b. Pesquisa sobre a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em fezes humanas. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, 8 :109-116.
- HOFER, E., 1975a. Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes* em água de esgoto. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 73 :31-38.
- HOFER, E., 1975b. Pesquisa de *Listeria* em vegetal consumido pelo homem. VI Cong. Bras. Microbiologia, pág. 192. Salvador – Bahia.
- HOFER, E. & MORAES, D.M.S., 1969. Isolamento de *Listeria monocytogenes* de secreção vaginal. *An. Microbiol.*, 16 :158.
- 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.
- LEHNERT, C., 1960. Die Tenazität von *Listeria monocytogenes* in der Aussenwelt. *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, 180 :350-356.
- LEHNERT, C., 1965. Zur züchtung von *Listeria monocytogenes* aus Keimhaltigem Material. *Z. ges. Hyg.*, 11 :633-636.
- RALOVICH, B.; FORRAY, A.; MÉRO, E.; MALOVICS, H. & SZÁZADOS, I., 1971. New Selective Medium for Isolation of *L. monocytogenes*. *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, 216 :88-91.
- SEELIGER, H.P.R., 1961. *Listeriosis*. 2nd. Hafner Publ. Co. Inc. New York, 308p.
- SEELIGER, H.P.R., 1981. Apathogene Listerien *L. innocua* sp.n. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A* 249 :487-493.
- SEELIGER, H.P.R. & SCHOOF, M., 1979. Serological Analysis of non-hemolysing *Listeria* - Strains belonging to a species different from *Listeria monocytogenes*, p. 24-28. In: I. Ivanov (ed.). *Problems of Listeriosis*. Proc. Seventh Int. Symp., Sofia, Bulgaria.
- SMITH, H.W. & CRABB, W.F., 1961. The fecal bacterial flora of animals and man: Its Development in the Young. *J. Path. Bacteriol.*, 82 :53.
- TAKEUCHI, C.; PESSÔA, G.V.A.; HOFER, E.; MELLES, C.E.A. & RASKIN, M., 1974. Isolamento de *Listeria monocytogenes* de líquido cefalorraquidiano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43 :101-107.

WEIS, J. & SEELIGER, H.P.R., 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Nature. *Appl. Microbiol.* 30 :29-32.

WELSHIMER, H.J., 1960. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *J. Bacteriol.*, 80 :316-320.

WELSHIMER, H.J., 1968. Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. *J. Bacteriol.*, 95 :300-303.

WELSHIMER, H.J. & DONKER-VOET, J., 1971. *Listeria monocytogenes* in Nature. *Appl. Microbiol.* 21 :516-519.