

AUDECIR GIOMBELLI

**FATORES DE PATOGENICIDADE DE *Listeria monocytogenes* DE  
AMBIENTES DE LATICÍNIOS, DE ALIMENTOS E DE HUMANOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de "*Magister Scientiae*"

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2000

## RESUMO

GIOMBELLI, Audecir, M.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2000. **Fatores de patogenicidade de *Listeria monocytogenes* de ambientes de laticínios, de alimentos e de humanos.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e José Mário da Silveira Mezencio.

A atividade *in vitro* das citolisinas, listeriolisina O (LLO) e fosfatidilcolina-fosfolipase C (PC-PLC), uma lecitinase e a virulência *in vivo*, de isolados de *Listeria monocytogenes* proveniente de ambientes de laticínios, de alimentos e de humanos foram determinados. A susceptibilidade a agentes antimicrobianos também foi avaliada e foi feita uma comparação entre dois meios de cultura, para determinar a atividade de PC-PLC. Os isolados de alimentos e de humanos pertenciam aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b; e 60% dos isolados procedentes de ambientes de laticínios pertenciam ao sorogrupo 4. A atividade hemolítica em hemácias de carneiro foi constatada em todos os isolados analisados, com exceção do isolado 506/82, proveniente de líquido cefalorraquidiano. A atividade de PC-PLC em ágar BHI, contendo 2% de NaCl e 5% de emulsão de gema de ovo, foi detectada em 91,9% dos isolados de *L. monocytogenes* após 96 h de incubação sob anaerobiose. Nas espécies *L. innocua*, *L. grayi*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri*, não foi observada atividade hemolítica nem de PC-PLC. A virulência, avaliada em embriões de galinha de

14 dias, foi constatada em 88,4% dos isolados de *L. monocytogenes*. Dois isolados de alimentos que apresentaram atividade hemolítica e o isolado 506/82, não-hemolítico, proveniente de humanos, foram avirulentos. Não foi possível relacionar os sorotipos e a presença de fatores de patogenicidade *in vitro* com a virulência *in vivo*. Os isolados de outras espécies de *Listeria* não foram considerados patogênicos por promoverem a morte de 40% ou menos dos embriões inoculados. A resistência a antibióticos foi constatada em 25 (71,4%) dos 35 isolados de *L. monocytogenes* avaliados. A resistência a cefoxitina foi verificada em 54,3% dos isolados, enquanto 48,6% foram resistentes à kanamicina, 8,6% à cefotaxima e 2,9% à amicacina. Entre os isolados resistentes, 11 (44%) apresentaram resistência a um antibiótico e 14 (56%) foram resistentes a dois ou três agentes antimicrobianos. A comparação do ágar BHI com o ágar Vogel-Johnson para detecção da atividade de PC-PLC revelou que resultados positivos podem ser observados a partir de 24 h de incubação em ágar Vogel-Johnson, em anaerobiose, enquanto, no ágar BHI, a maioria dos resultados positivos ficam evidentes após 72 h de incubação, sob as mesmas condições. Dos 71 isolados de *L. monocytogenes* avaliados, 55 (77,5%) apresentaram atividade de PC-PLC mas apenas em condições de anaerobiose. Os 34 isolados das outras espécies de *Listeria* não demonstraram atividade dessa enzima em nenhum dos dois meios de cultura avaliados. Estes resultados permitem sugerir a adoção do teste de PC-PLC em meio Vogel-Johnson entre os testes bioquímicos de diferenciação da espécie *L. monocytogenes* das demais espécies do gênero.

## ABSTRACT

GIOMBELLI, Audecir, M.S., Universidade Federal de Viçosa, September 2000.  
**Pathogenicity factors of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy industries, foods, and humans.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti.  
Committee members: Elza Fernandes de Araújo and José Mario da Silveira Mezenzio.

The *in vitro* activity of the cytolytins, listeriolysin O (LLO) and phosphatidylcholine phospholipase C (PC-PLC), a lecithinase, and the *in vivo* virulence of some *L. monocytogenes* strains isolated from dairy industries, foods, and humans were evaluated. The susceptibility to antimicrobial agents and PC-PLC activity in two different culture media were also evaluated. Isolates obtained from foods and humans corresponded to serotypes 1/2a, 1/2b, and 4b, and 60% of those from the dairies belonged to serogroup 4. A hemolytic activity of sheep hematocytes was observed for all isolates but 506/82, obtained from cephalo-rachidian liquid. PC-PLC activity in BHI containing 2% NaCl and 5% yolk emulsion was detected for 91.9% of the isolates of *L. monocytogenes* after 96h of incubation under anaerobiosis. For *L. innocua*, *L. grayi*, *L. welshimeri*, and *L. seeligeri*, no hemolytic or PC-PLC activity was observed. Virulence, evaluated in 14-day-old chicken embryos, was observed for 88.4% of the isolates of *L. monocytogenes*. Two food isolates presenting hemolytic activity and the non-hemolytic isolate 506/82, isolated from humans, were avirulent. No correlation could be established between the serotypes, the *in vitro* presence of

pathogenicity factors, and *in vivo* virulence. The isolates of other species of *Listeria* that caused the death of 40% or less of the inoculated embryos were not considered pathogenic. Resistance to antibiotics was detected for 25 (71.4%) of the 35 *L. monocytogenes* isolates. Resistance to ceftiofur was observed for 54.3% of the isolates, while 48.6% were resistant to kanamycin, 8.6% to cefotaxime, and 2.9% to amikacin. Among the resistant isolates, 11 (44%) were resistant to one antibiotic and 14 (56%) were resistant to two or three. Comparisons between BHI and Vogel-Johnson agar for the detection of PC-PLC activity demonstrated that positive results could be obtained after 24h of incubation on Vogel-Johnson agar under anaerobiosis, while in BHI, most of the positive results were evident after 72h of incubation under the same conditions. Among the 71 isolates of *L. monocytogenes* evaluated, 55 (77,5%) presented PC-PLC activity only under anaerobiosis. The 34 isolates of other species of *Listeria* did not produce lecithinase in none of the tested media. These results suggest that the PC-PLC test on Vogel-Johnson agar can be used with other biochemical tests to distinguish *L. monocytogenes* from the other species of the genus.