

Ciência Rural



Todo o conteúdo deste periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma Licença Creative Commons. Fonte:
https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000100024&lng=pt&tln g=pt. Acesso em: 13 jul. 2020.

REFERÊNCIA

ANDRADE, Rafael Rocha de et al. Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo hot dog a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 1, p. 147-152, jan. 2014. DOI:
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000100024>. Disponível em:
https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000100024&lng=pt&tln g=pt. Acesso em: 13 jul. 2020.

Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo *hot dog* a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal

Occurrence and differentiation of *Listeria* spp. in “hot dog” sausages sold in bulk and ground beef samples marketed in the Federal District, Brazil

Rafael Rocha de Andrade^I Patrícia Helena Caldeira da Silva^{II} Nara Rúbia Souza^{II}
Luci Sayori Murata^{II} Vitor Salvador Picão Gonçalves^{II} Angela Patrícia Santana^{II*}

RESUMO

Listeria monocytogenes é um patógeno relevante veiculado por alimentos. Sua identificação precisa é importante para a correta determinação do risco associado à ingestão do alimento. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência das espécies de *Listeria* spp. em amostras de salsichas tipo hot dog e carne moída bovina, comercializadas a granel no Distrito Federal. Foram analisadas 162 amostras, sendo 127 de salsichas tipo hot dog e 35 amostras de carne moída bovina. O isolamento e a identificação do gênero foram feitos por metodologia convencional e a distinção das espécies foi verificada por kit bioquímico específico (API-*Listeria*[®]) e por análise de restrição de fragmentos da reação em cadeia da polimerase (RFLP-PCR) do gene 23 rRNA. Foram isoladas 26 cepas de *Listeria* spp. das amostras de salsichas tipo hot dog, sendo identificadas 18 cepas de *Listeria innocua* e 08 cepas de *Listeria monocytogenes*. Das 35 amostras de carne moída bovina, foram isoladas 16 cepas de *Listeria* spp., sendo identificadas 12 cepas de *Listeria innocua* e 04 de *Listeria monocytogenes*. Houve concordância total na distinção das espécies de *Listeria* spp. através dos dois métodos empregados. A presença de *Listeria* spp. em amostras de salsicha do tipo hot dog a granel e em carne moída bovina a granel, de estabelecimentos comerciais do Distrito Federal, representa risco à saúde do consumidor.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, produtos cárneos, PCR.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a pathogen disclosed by foods. Its accurate identification is important for the correct determination of the risk associated with the ingestion of food. The aim of this research was to determine the occurrence of *Listeria* spp. in samples of hot dog sausages and ground beef, sold in bulk in the Federal District. A total of 162 samples, 127 hot dog sausages and 35 samples of ground beef cattle, were analyzed. The isolation and identification of the genus were made by conventional methodology and distinction of species was verified by specific biochemical kit

(API-*Listeria*[®]) and by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of 23S rRNA gene. Twenty-six strains of *Listeria* spp. were isolated. Samples of hot dog sausages identified 18 strains of *Listeria innocua* and 08 strains of *Listeria monocytogenes*. Of the 35 samples of ground beef cattle were isolated, 16 strains of *Listeria* spp., 12 strains of *Listeria innocua* and 04 strains of *Listeria monocytogenes*. There was total agreement in the distinction of *Listeria* species using the two methods. The presence of *Listeria* spp. in samples of hot dog sausages and ground beef, sold in bulk in commercial establishment of the Federal District represents a risk to consumer health.

Key words: *Listeria monocytogenes*, meat products, PCR.

INTRODUÇÃO

O gênero *Listeria* compreende seis diferentes espécies: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). A associação da *L. monocytogenes* com alimentos contaminados sugere que esta seja a principal forma de transmissão da listeriose humana, com a maioria dos casos em indivíduos imunossuprimidos, crianças e gestantes (JERSEK, 1999). Segundo LECUIT (2007), o potencial de letalidade está acima de 30%. A ocorrência dessa bactéria em alimentos cárneos refrigerados foi observada em 20% das amostras de frango na Malásia (GOH et al., 2012) e em 26,4% em carcaças bovinas na China (ZHU et al., 2012). Esse microrganismo apresenta como característica a tolerância a baixas temperaturas, o que favorece muitas vezes altas prevalências (SCHMID et al., 2009;

^IFaculdade de Medicina, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brasil.

^{II}Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV), UnB, 70910-900, Brasília, DF, Brasil. E-mail: patvet@unb.br. *Autor para correspondência.

ZHU et al., 2012). A *L. monocytogenes* é considerada patogênica para o homem e a de maior importância para a saúde pública, embora existam evidências de que cepas de *L. ivanovii* também possuam potencial patogênico (McLAUCHLIN, 1997). São cosmopolitas e facilmente encontradas no solo, nas fezes dos animais e na água (PAILLARD et al., 2003).

Um dos maiores desafios atualmente é a ausência de um método eficiente para se distinguir *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria* associadas na mesma amostra de alimento, especialmente *L. innocua*. Nos últimos anos, poucos trabalhos fizeram distinção entre diferentes espécies de *Listeria* em amostras isoladas de alimentos, e a maioria deles faz menção apenas da presença de bactérias do gênero (LACIAR et al., 2006). Em alguns casos, a diferenciação se faz apenas por meio de análises fenotípicas das colônias em meios de cultivo, podendo haver falhas na especificidade e tornando oneroso o preço da análise, devido ao alto custo dos meios empregados.

Tendo em vista a importância deste microrganismo no contexto da saúde pública, no que diz respeito à segurança dos alimentos de origem animal, e por se tratar de um microrganismo potencialmente patogênico, este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* em salsichas tipo *hot dog* a granel e em amostras de carne moída bovina comercializados no Distrito Federal, isolar por método tradicional e identificar as espécies através da comparação entre os métodos API-*Listeria* e RFLP-PCR do gene 23S rRNA.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das amostras

Foram adquiridas 127 amostras de salsichas tipo *hot dog* comercializadas a granel e 35 amostras de carne moída bovina provenientes de estabelecimentos comerciais diversos, localizados no Distrito Federal, escolhidas ao acaso, simulando assim uma situação real de compra pelo consumidor. Cada unidade de amostra adquirida era composta por 100g em bandejas não havendo uma marca específica. Essas amostras foram individualizadas em sacos plásticos do próprio estabelecimento e acondicionadas sob refrigeração a 4°C para em seguida proceder ao transporte e o posterior isolamento microbiológico.

Isolamento de *Listeria monocytogenes*

A etapa de isolamento microbiológico do gênero *Listeria* seguiu a metodologia preconizada pela Instrução Normativa nº 40 (Brasil, 2005). Assim, 25g±1,0g das amostras foram pesadas em sacos de

homogeneização estéreis, sendo adicionados 225mL de caldo UVM para incubação a 30°C±2°C por 24 horas. Em seguida, transferiu-se 0,1mL do caldo UVM para 10ml de caldo Fraser, incubados a 35°C por 26h. Distribuiu-se 0,1mL do caldo Fraser, que apresentava hidrólise da esculina, para uma placa de ágar MOX, incubando em seguida a 35°C por 24h. As colônias pequenas e com halo de hidrólise de esculina foram colhidas e plaqueadas em ágar sangue de carneiro a 7% para a realização dos testes bioquímicos.

Identificação das cepas isoladas pelo método API-*Listeria* e RFLP-PCR

Foram utilizados controles positivos de cepas *L. monocytogenes* oriundos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – Rio de Janeiro), tanto para cultivo microbiológico como para análise molecular. A identificação das cepas foi realizada com kits comerciais API-*Listeria*® (API®-*Listeria*, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França). Para a realização da extração de DNA, uma colônia isolada de *Listeria* spp. da placa de ágar sangue foi selecionada e inoculada em um tubo falcon de 15ml, contendo 3ml de caldo L (peptona de caseína 1%, extrato de levedura 0,5% e cloreto de sódio 1%) esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos e incubada em estufa com agitação (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA) à 200 rpm, 37°C por 12h. Foram utilizados 400µl dessa cultura para proceder à extração de DNA com fenol/clorofórmio (1:1), segundo SAMBROOK et al. (2001). Posteriormente, foi realizada a quantificação de DNA total da amostra com marcador de massa molecular High Mass® *Ladder* Invitrogen e com visualização em gel de agarose 0,8% com brometo de etídio a 0,02% em transiluminador (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, França)

Na etapa de realização da PCR, das cepas isoladas das amostras, foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos (*primers*), S1 e S2, segundo metodologia descrita por PAILLARD et al. (2003). As sequências dos oligonucleotídeos foram S1F (5' agtcggatagatccttac 3'), S1R (5' ggctctaactactgttaggc 3'), S2F (5' gcctacaagtagtagagcc 3') e S2R (5' actggtacaggaatctctac 3'), sendo que eles amplificam fragmentos de 460bp e 890bp, respectivamente, do gene 23S rRNA. A programação utilizada para a amplificação dos fragmentos no termociclador (PTC-100, M.J Research Inc., Watertown, USA) foi de 29 ciclos para a seguinte combinação de temperaturas: 95°C por 2min, 94°C por 1min, 57°C por 1min, 72°C por 2,5min e 72°C por 5min. Ao final, a temperatura 4°C foi programada para a retirada dos tubos. As

concentrações das soluções para a PCR foram de DNTP (2mM), tampão com concentração final de 1X, MgCl₂ de concentração final de 2,5mM, 10pmoles mL⁻¹ de cada oligonucleotídeos e 4ng mL⁻¹ DNA total da amostra, completando-se o volume final de 50µl com água milli-Q esterilizada. A visualização e a quantificação dos fragmentos S1 e S2 foi realizada com marcador de massa molecular Low Mass Ladder Invitrogen® em gel de agarose 1,5% com adição de brometo de etídio na concentração de 0,02% e visualizado em transiluminador.

Para a identificação e confirmação da espécie, foram realizadas duas análises de restrição (RFLP) do *amplicon* de 890bp (S2), obtidas através de digestões com as endonucleases *XmnI* e *CfoI* com incubação em banho-maria a 37°C por 2h, segundo metodologia proposta por PAILLARD et al. (2003). Para tanto, em um volume final de 25µL, foram utilizados 100ng do *amplicon* S2, Tampão Multi-Core™ com concentração final de 1X (Promega Corporation, Madison, USA), 10µg µl⁻¹ de BSA acetilado e 2U de endonuclease. Os perfis de restrição foram visualizados em gel de agarose 2,0%, contendo brometo de etídio na concentração de 0,02% em transiluminador. O produto de PCR S2 (890bp) foi cortado primeiramente com a endonuclease *XmnI*, resultando nos perfis: a) 650pb, 120pb e 120pb para as espécies de *L. grayi*, *L. innocua* ou *L. welshimeri* e b) perfil de 770pb e 120pb para *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* ou *L. ivanovii*. A restrição do produto de PCR S2 pela *CfoI* individualiza a *L. grayi* (600pb, 170pb, 120pb) e *L. monocytogenes* (470pb, 170pb, 130pb e 120pb). O perfil do corte do S2 (890bp) com *CfoI* de *L. innocua* ou *L. welshimeri* (470pb, 170pb, 130pb e 120pb) e o perfil de *L. seeligeri* ou *L. ivanovii* (600pb, 170pb e 120pb) são presuntivos. A digestão do produto de PCR S1 (460pb) com a enzima *AluI* diferencia a *L. innocua* (460pb, 330pb e 130pb) da *L. welshimeri* (270pb, 190pb, 150pb e 120pb) e a digestão do S1 por *Clal* diferencia a *L. ivanovii* (460pb) da *L. seeligeri* (350pb e 110pb).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorrência de cepas de *Listeria* spp. em amostras de salsichas tipo *hot dog*

Das 127 amostras de salsicha tipo “*hot dog*” a granel, foram isoladas 26 (20,4%) cepas de *Listeria* spp. Os resultados da análise de identificação bioquímica realizada pelo kit Api-Listeria® revelaram que, das 26 cepas, 8 (6,2%) eram de *L. monocytogenes* e 18 (14,1%) eram de *L. innocua*.

Estes resultados são similares aos observados por PETINATI et al. (2006) na cidade de São Paulo, no que se refere à presença de *L. monocytogenes* em amostras de salsichas tipo *hot dog*, com a presença de 55,4%. Entretanto, esses autores não realizaram a identificação das outras espécies de *Listeria*. BORGES et al. (1999) observaram que, de 81 amostras de salame coletadas na cidade do Rio de Janeiro, 12 (14,8%) estavam contaminadas por *Listeria* spp., sendo 6 (50%) identificadas como *L. innocua* e 6 (50%) como *L. monocytogenes*.

COLAK et al. (2007) constataram, em 300 amostras de salsicha fermentada (chouriço turco), em Istambul, 63 (21%) positivas para bactérias do gênero *Listeria* spp., sendo 35 (11,6%) identificadas como *Listeria monocytogenes*. MENA et al. (2004), em Portugal, observaram uma (3,7%), em 27 amostras de alimentos cárneos refrigerados, contaminada por essa bactéria.

Vale ressaltar que a contaminação por *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo, como, por exemplo, a salsicha tipo *hot dog*, é mais preocupante do que a contaminação por essa bactéria em alimentos que serão submetidos ao cozimento. Isso se deve ao hábito de muitas pessoas consumirem esses produtos sem antes submetê-lo a um tratamento térmico, pois esse microrganismo possui a habilidade de crescer em temperaturas de refrigeração e a capacidade de formar biofilmes (PELISSER et al., 2001; LIU et al., 2002)..

A metodologia de isolamento de *L. monocytogenes* proposta pela Instrução Normativa nº 40 (BRASIL, 2005) foi eficaz e proporcionou o isolamento de culturas puras de bactérias do gênero *Listeria* spp. Os inconvenientes desse método foram o tempo de isolamento, de aproximadamente sete dias, e o custo elevado dos meios de cultura necessários, conforme metodologia proposta.

Ocorrência de cepas de *Listeria* spp. em amostras de carne moída bovina

Das 35 amostras de carne moída bovina, isolaram-se 16 (45,7%) cepas de *Listeria* spp.. Os resultados da análise bioquímica realizada pelo kit API-Listeria® revelaram que, dessas 16 cepas, 4 (11,4%) foram *L. monocytogenes* e 12 (34,2%) *L. innocua*.

KASNOWSKI (2004), em pesquisa realizada na cidade do Rio de Janeiro, com amostras de alcatra bovina, observou que, de um total de 173 cepas de *Listeria* spp. isoladas, 72 (41,62%) eram originárias de peças inteiras (cortes) e 101 (58,38%) de carne moída, sendo a *L. innocua* mais observada que a *L. monocytogenes*. De modo

similar, MANTILLA et al. (2007b) verificaram a presença de *Listeria* spp. em 30 amostras de carne moída bovina, também na cidade do Rio de Janeiro, na qual 15 (50%) amostras estavam contaminadas e, desse total, 13 (86%) eram *L. innocua* e duas (14%) *L. monocytogenes*. OKTEN et al. (2006), na Turquia, verificaram que, de 30 amostras de carne bovina, quatro (13,75%) estavam contaminadas por *Listeria monocytogenes*. MANTILLA et al. (2007a) justificam que a carne moída é um alimento que possui maior risco de contaminação por *Listeria* spp., uma vez que é preciso a manipulação para sua fabricação e por possuir maior área de superfície. Entretanto, um estudo mais aprofundado deve ser conduzido no sentido de se verificar qual ou quais os principais pontos de incorporação dessa bactéria neste tipo de alimento.

No estudo de prevalência de *Listeria* spp. em produtos cárneos, em vários países (entre os anos de 1971 e 1994), JAY et al. (1996) afirmam que a contaminação de *L. monocytogenes* é altamente variável neste tipo de alimento e que a ocorrência média desta bactéria encontrada foi de 16%. Segundo esses autores, a detecção desta bactéria em carnes era esperada devido à sua ampla disseminação na natureza, e também sugere que essa bactéria esteve sempre presente nos produtos cárneos e seus derivados, fato que a fez ser considerada como indicadora biológica de contaminação ambiental ou fecal. MENA et al. (2004) relatam que, de 17 amostras de carne crua analisadas em Portugal, três (17,7%) estavam contaminadas com *L. monocytogenes*, afirmando ainda que a ocorrência dessa bactéria em carnes cruas se deve ao fato de sua natureza ubiqualitária.

Extração e quantificação de DNA total e realização da RFLP-PCR das cepas de *Listeria* spp. isoladas de salsichas tipo *hot dog* e carne moída bovina

Após a extração de DNA total de 400µL dos inóculos em meio L, obteve-se concentração média aproximada de DNA total de 6ng µL⁻¹. A extração de DNA total, por fenol/clorofórmio (1:1) foi realizada com êxito em todas as 42 cepas de *Listeria* spp. isoladas dos dois tipos de alimentos de origem animal.

Em seu estudo, PAILLARD et al. (2003) também obteve êxito na forma de obtenção de DNA total em todas as 182 cepas de *Listeria* spp. testadas. Porém, esse processo foi realizado por meio de fervura das cepas. Neste trabalho, optou-se por realizar a extração de DNA total por meio do fenol/clorofórmio para se minimizar o risco de reações inespecíficas da PCR ou de falsos negativos, devido ao excesso de proteínas.

A PCR com os *primers* descritos por PAILLARD et al. (2003) foi realizada com êxito em todas as 42 cepas de *Listeria* spp., isoladas previamente dos dois tipos de alimentos, e proporcionou em todas as amostras a obtenção de fragmentos S1 (460pb) e S2 (890pb), que foram quantificados através do uso do marcador Low Mass Invitrogen® (Figura 1A). A menos que se faça o sequenciamento de cada um deles, estes oligonucleotídeos não permitem diferenciar as espécies, apenas confirmam o gênero *Listeria*. Vale ressaltar que as cepas utilizadas como *template* por PAILLARD et al. (2003) foram isoladas de seis efluentes de estações de tratamento de água, localizados na cidade Bordeaux, França. Os mesmos oligonucleotídeos funcionaram com as cepas oriundas de outra matriz, sugerindo a conservação do gene 23S rRNA.

A figura 1B mostra os amplicons S2 de três cepas isoladas de amostras de salsichas tipo *hot dog* a granel, submetidos individualmente à reação enzimática com a endonuclease *XmnI*, o que resultou em fragmentos de 770pb e 120pb, característicos das espécies *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* ou *L. ivanovii*, e de 650pb, 130pb e 120pb no caso de detecção das espécies *L. innocua*, *L. grayi* e *L. welshimeri*.

Após a análise de restrição com a enzima *XmnI*, os amplicons S2 (890pb) dessas três amostras foram submetidos individualmente a uma segunda reação enzimática, dessa vez utilizando a enzima *CfoI* (Figura 1C). A análise de restrição dessa reação enzimática demonstrou a presença de fragmentos de 470pb, 170pb, 130pb e 120pb nas três amostras. Dessa forma, as duas amostras que obtiveram fragmentos de 770pb e 120pb, após digestão com a enzima *XmnI* (A.3 e A.5 da Figura 1A), foram identificadas como *L. monocytogenes*. A amostra presente em C.4 da figura 1C foi submetida a uma nova reação de digestão enzimática para diferenciação da espécie envolvida, utilizando o *amplicon* S1 (460pb) com a enzima *AluI* (Figura 1D), obtendo os fragmentos de 330pb e 130pb, que caracterizaram a espécie *Listeria innocua*, conforme descrito por PAILLARD et al. (2003).

Neste estudo, a análise de restrição dos produtos de PCR S1 e S2 identificou a espécie de *Listeria* spp. em todas as amostras previamente isoladas de salsichas tipo *hot dog* e carne moída bovina, a granel, comercializadas no Distrito Federal, conforme metodologia desenvolvida por PAILLARD et al. (2003). Todas as cepas de *Listeria* spp. identificadas pela RFLP em nosso estudo apresentaram concordância com a identificação obtida pelo teste de identificação bioquímica realizada pelo *kit* comercial API-*Listeria*®.

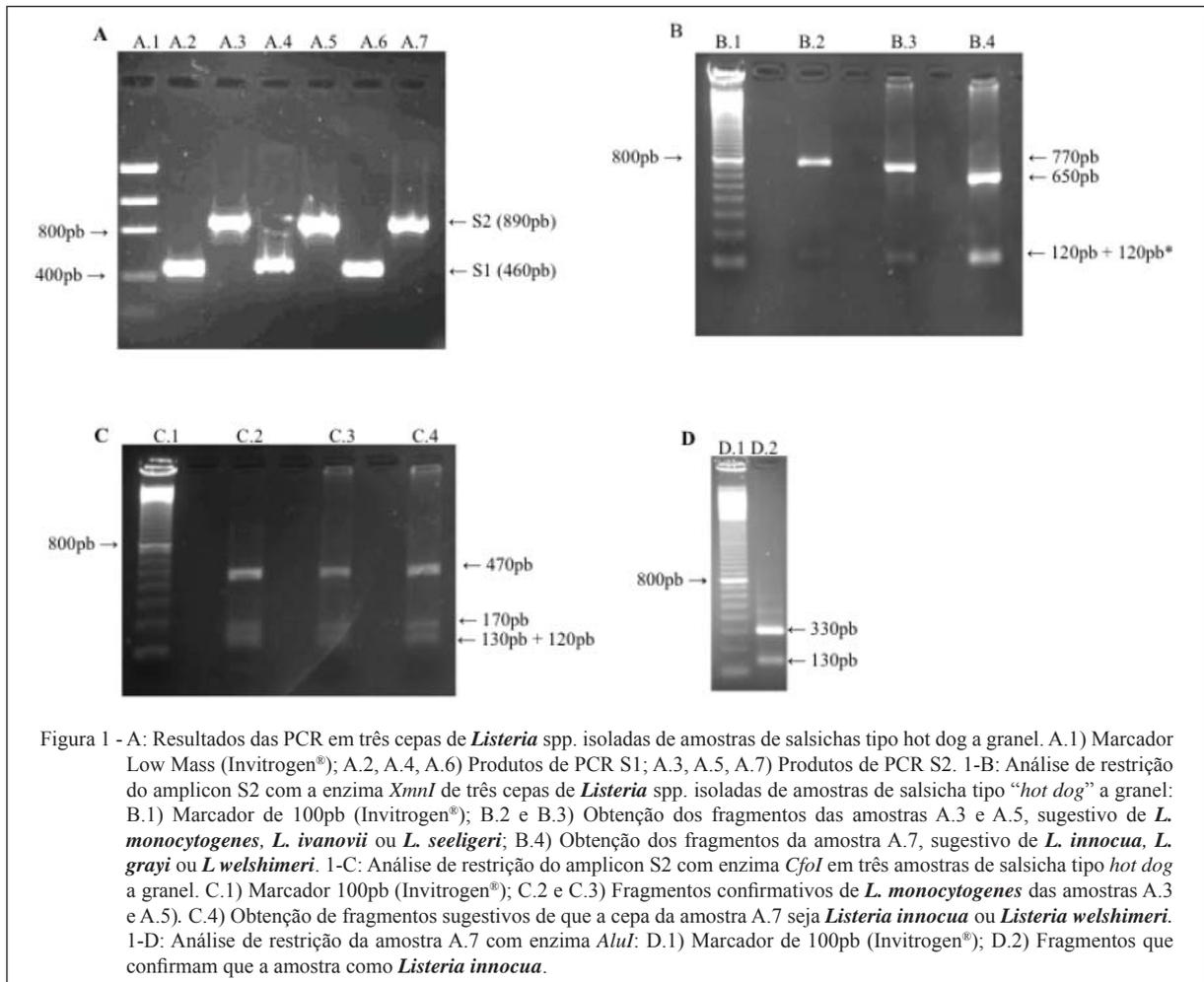


Figura 1 - A: Resultados das PCR em três cepas de *Listeria* spp. isoladas de amostras de salsichas tipo hot dog a granel. A.1) Marcador Low Mass (Invitrogen®); A.2, A.4, A.6) Produtos de PCR S1; A.3, A.5, A.7) Produtos de PCR S2. 1-B: Análise de restrição do amplicon S2 com a enzima *XmnI* de três cepas de *Listeria* spp. isoladas de amostras de salsicha tipo “hot dog” a granel: B.1) Marcador de 100pb (Invitrogen®); B.2 e B.3) Obtenção dos fragmentos das amostras A.3 e A.5, sugestivo de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ou *L. seeligeri*; B.4) Obtenção dos fragmentos da amostra A.7, sugestivo de *L. innocua*, *L. grayi* ou *L. welshimeri*. 1-C: Análise de restrição do amplicon S2 com enzima *CfoI* em três amostras de salsicha tipo hot dog a granel. C.1) Marcador 100pb (Invitrogen®); C.2 e C.3) Fragmentos confirmativos de *L. monocytogenes* das amostras A.3 e A.5). C.4) Obtenção de fragmentos sugestivos de que a cepa da amostra A.7 seja *Listeria innocua* ou *Listeria welshimeri*. 1-D: Análise de restrição da amostra A.7 com enzima *AluI*: D.1) Marcador de 100pb (Invitrogen®); D.2) Fragmentos que confirmam que a amostra como *Listeria innocua*.

CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível verificar a ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de salsicha do tipo “hot dog” e carne moída bovina do Distrito Federal, com o isolamento de 42 cepas e, destas, 8 (6,2%) eram *Listeria monocytogenes*, 18 (14,1%) *L. innocua* em salsichas, 4 (11,4%) *L. monocytogenes* e 12 (34,2%) *L. innocua* em carne moída bovina. A identificação foi possível tanto pela RFLP-PCR como pelo API®-Listeria. Por se tratar de uma doença de grande interesse na saúde pública, uma vez que possui alta taxa de letalidade, a biologia da *Listeria* spp. precisa ser melhor estudada para que ocorra maior controle dessa bactéria associada à linha de produção na indústria de produtos cárneos.

REFERÊNCIAS

- BORGES, M.F. et al. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 30, n. 4, Dec. 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37141999000400012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24 jan. 2013. doi: 10.1590/S0001-37141999000400012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 40 de 12 de dezembro de 2005. Aprovar os Métodos Analíticos, Isolamento e Identificação da *Salmonella* na carne bovina, avicultura e produtos derivados de ovos - MLG - 4.03, Metodologia Alternativa de Salmonella A-Bax -MLG 4C .01, Isolamento e Identificação de *Listeria monocytogenes* em carne vermelha, carne de ave, ovos e amostras ambientais, MLG 8.04 - Metodologia Alternativa de *Listeria* A-BAX MLG-8 A .01, *Escherichia coli*, MPN AOAC 966.24, Método Petrifilm AOAC 998.08, que passam a constituir Padrões Oficiais para Análise de Microbiologia de Produtos de Origem Animal. **DOU**, 16/12/2005, seção 1, p.70, 2005.
- COLAK, H. et al. Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish Style Fermented Sausage (Sucuk). *Food Control*, v.18, p.30-32, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713505001799>>. Acesso em: 24 jan. 2013. doi: 10.1016/j.foodcont.2005.08.003.
- CZAJKA, J. et al. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies

- discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.1, p.304-308, 1993. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/59/1/>>. Acesso em: 28 ago. 2012. doi: 0099-2240/93/010304-05\$02.00/0.
- GOH, S.G. et al. *Listeria monocytogenes* in retail raw chicken meat in Malaysia. **Poultry Science**, v.91, n.10, p.2686-2690, 2012. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22991558&retmode=ref&cmd=prlinks>>. Acesso em: 15 out. 2012. doi: 10.3382/ps.2012-02349.
- JAY, J.M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, v.07, n.04, p.209-214, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713596000436>>. Acesso em 15 out. 2012. doi: 10.1016/S0956-7135(96)00043-6.
- JERSEK, B. et al. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.103-109, 1999. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/37/1/103.full.pdf+html>>. Acesso em: 24 jan. 2013. doi: 0095-1137/99/\$04.00+0.
- KASNOWSKI, M.C. *Listeria* spp, *Escherichia coli*: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. 2004. 111f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. Disponível em: <http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/maria_kasnowski_completa_mestrado.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2013.
- LACIAR, L. et al. DNA Fingerprinting by ERIC-PCR for comparing *Listeria* spp. strains isolated from different sources in San Luis, Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.38, p.55-60, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412006000200002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 out. 2012. ISSN 1851-7617.
- LECUIT, M. Human *Listeriosis* and animal models. **Microbes and Infection**, v.9, p.1216-1225, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457907001852>>. Acesso em: 28 ago. 2012. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.009.
- LIU, S. et al. Identification of *Listeria monocytogenes* expressed in response to growth at low temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p.1697-1705, 2002. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/68/4/1697.full>>. Acesso em: 30 ago. 2012. doi: 10.1128/AEM.68.4.1697-1705.2002.
- MANTILLA, S.P.S. et al. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da FZVA**, v.14, n.1, p.180-192, 2007. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/te/ojs/index.php/fzva/article/view/2487/1946>>. Acesso em: 30 out. 2012.
- MANTILLA, S.P.S. et al. Ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina moída comercializadas no município de Niterói, RJ, Brasil. Comunicado. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.4, p.1225-1230, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000400042&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30 ago. 2012. doi: 10.1590/S1413-70542007000400042.
- McLAUCHLIN, J. The identification of *Listeria* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.77-81, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816059700086X>>. Acesso em: 15 out. 2012. doi: 10.1016/S0168-1605(97)00086-X.
- MENA, C. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, v.21, p.213-216, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002003000571>>. Acesso em 30 ago. 2012. doi: 10.1016/S0740-0020(03)00057-1.
- OKTEN, A.B. et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in some turkish foodstuffs. **Journal of Food Quality**, v.29, n.1, p.76-86, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4557.2006.00057.x/pdf>>. Acesso em 15 out. 2012. doi: 10.1111/j.1745-4557.2006.00057.x.
- PAILLARD, D. et al. Rapid identification of *Listeria* species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-Amplified 23S rRNA gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p.6386-6392, 2003. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/69/11/6386.full>>. Acesso em 30 ago. 2012. doi: 10.1128/AEM.69.11.6386-6392.2003.
- PELISSER, M.R. et al. Detection of *Listeria* in refrigerated chicken carcasses using Clearview™ and a modified cultured method. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.113-116, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822001000200008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 30 ago. 2012. doi: 10.1590/S1517-83822001000200008.
- PETTINATI, N.N. et al. *Listeria monocytogenes* in “hot dog” sausages obtained from groceries stores in the city of São Paulo – A comparative and retrospective analysis of human listeriosis isolates. **Veterinária e Zootecnia**, v.13, n.2, p.182-191, 2006. Disponível em: <<http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/499/390>>. Acesso em 28 ago. 2012. ISSN 0102-5716.
- SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 3.ed. Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. V.1.
- SCHMID, B. et al. Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.6, p.1621-1627, 2009. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/75/6/1621.full>>. Acesso em 10 jan. 2013. doi: 10.1128/AEM.02154-08.
- VÁSQUEZ-BOLAND, J.A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.3, p.584-640, 2001. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/14/3/584.full.pdf+html>>. Acesso em 30 ago. 2012. doi: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.
- ZHU, L. et al. Prevalence and Serotype of *Listeria monocytogenes* contamination in chinese beef processing plants. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, n.6, p.556-560, 2012. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/pdfplus/10.1089/fpd.2011.1088>>. Acesso em: 24 jan. 2013. doi: 10.1089/fpd.2011.1088.