

## Artigo Técnico

# DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* PELA TÉCNICA DA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO *IN NATURA*

## Detection of *Listeria monocytogenes* by the polymerase chain reaction (PCR) technique in samples of raw bovine milk

Camila AGOSTINI<sup>1</sup>

Caroline Schwertner KRELING<sup>2</sup>

Ivan Cunha BUSTAMANTE-FILHO<sup>3</sup>

Cláucia Fernanda Volken de SOUZA<sup>4</sup>

Vanderlei BIOLCHI<sup>5</sup>

Adriane POZZOBON<sup>6\*</sup>

### SUMÁRIO

Considerando a possível incidência de *Listeria monocytogenes* em alimentos crus e sua patogenicidade e risco para a saúde, o presente trabalho teve como objetivo comparar técnicas de extração de DNA bacteriano de amostras de leite e investigar a presença de *L. monocytogenes* pela Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras de leite bovino *in natura*. Foram testados quatro protocolos diferentes de extração (genericamente identificados: A, B, C, e D) para o isolamento do DNA bacteriano diretamente do leite. Em todos eles foi obtida a identificação do produto de 702 pb (pares de bases) correspondente ao gene da Listeriolisina de *L. monocytogenes*. O protocolo B que continha proteinase K e fenol tamponado, foi o escolhido para a extração de DNA das amostras de leite de oito produtores de médio porte no interior do RS. A posterior amplificação por PCR com o DNA obtido pelo protocolo B permitiu a identificação de *L. monocytogenes* a partir de 103 UFC/mL. Nenhuma das amostras dos produtores foi positiva para *L. monocytogenes* pela técnica de PCR ou pela análise microbiológica convencional. Com o presente estudo conclui-se que, dos protocolos testados, o protocolo B foi mais eficaz para a detecção de *L. monocytogenes* pela técnica de PCR. Além disso, com relação às amostras dos produtores, o resultado pela técnica por PCR foi obtido em um período de tempo menor que na análise convencional de *L. monocytogenes*, fato que pode possibilitar um tratamento mais precoce dos animais contaminados e assim evitar perdas ao produtor.

**Palavras-chave:** micro-organismo; Listeriolisina; proteinase K.

- 1 Biomédica. Centro Universitário UNIVATES, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: camila.a.gostini@hotmail.com.
- 2 Graduada em Biomedicina. Centro Universitário UNIVATES, Centros de Ciências Biológicas e da Saúde, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: carol\_csk@hotmail.com.
- 3 Médico Veterinário, Doutor em Zootecnia (UFRGS). Centro Universitário-UNIVATES, Centro de Gestão Organizacional, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: ivanbustamante@univates.br.
- 4 Química Industrial, Doutora em Biologia Molecular (UFRGS). Centro Universitário-UNIVATES, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: claucia@univates.br.
- 5 Farmacêutico Bioquímico, Doutor em Fisiologia (UFRGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Dep. Fisiologia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: vbiolchi@gmail.com.
- 6 Bióloga, Doutora em Fisiologia (UFRGS). Centro Universitário-UNIVATES, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: pozzobon@univates.br.

\* Autor para correspondência: Centro Universitário UNIVATES, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Rua Avelino Tallini, 171 – Bairro Universitário, CEP: 95900-000, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: pozzobon@univates.br.

Recebido / Received: 02/03/2012

Aprovado / Approved: 13/09/2012

## ABSTRACT

Considering the possible incidence of *Listeria monocytogenes* in raw foods and their pathogenicity and health risk, this study aimed to compare techniques for extraction of bacterial DNA from milk samples and investigate the presence of *L. monocytogenes* by Polymerase Chain Reaction (PCR) in raw milk. We tested four different extraction protocols (generally identified: A, B, C, and D) for isolation of bacterial DNA directly from milk. In all of them was obtained identifying the product of 702 bp (base pairs) corresponding to the listeriolysin gene from *L. monocytogenes*. The protocol B containing proteinase K and phenol buffered, was chosen for the extraction of DNA from milk samples from eight dairy farms within the RS. The subsequent PCR amplification with DNA obtained by the protocol B allowed the identification of *L. monocytogenes* from 103 CFU/mL. None of the samples was positive for the producer *L. monocytogenes* by PCR or by conventional microbiological analysis. With this study it is concluded that the tested protocols, the protocol B was more effective for the detection of *L. monocytogenes* by PCR. Moreover, for the samples of the producers, the result PCR technique was obtained in a shorter time than conventional analysis of *L. monocytogenes*, which may allow earlier treatment of infected animals and thus avoid losses to the producer.

**Keywords:** micro-organism; Listeriolysin; proteinase K.

## 1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado um dos alimentos mais completos por apresentar vários elementos importantes para a nutrição humana (SGARBIERI, 2005). Contudo, as mesmas características físico-químicas que conferem seu valor nutricional, fazem do leite um substrato adequado para o crescimento de diversos micro-organismos, em especial patógenos associados às infecções alimentares.

Dentre as doenças transmitidas por alimentos, destaca-se a listeriose, com relevante importância para a saúde pública. Seu agente etiológico é a *Listeria monocytogenes*, um patógeno psicotrófico que se multiplica em temperaturas entre -0,4 a 50°C (DONELLY, 2001). Esta bactéria possui ampla distribuição no ambiente e sua presença no trato gastrointestinal de vários animais pode contaminar o leite e seus derivados (SWAMINATHAN, 2001). A transmissão dá-se por contato direto e indireto com fontes contaminadas, podendo ocorrer por via oral, ocular, cutânea, respiratória e urogenital, destacando-se a via oral (MARTH, 1988). A listeriose em humanos caracteriza-se por sintomas de gripe, podendo evoluir para casos mais graves causando o óbito (PEARSON; MARTH, 1980).

O controle de qualidade na produção de alimentos é a principal estratégia para a prevenção de toxinfecções alimentares. No Brasil diversos trabalhos apontam a falta de segurança alimentar no consumo de leite cru e derivados, especialmente artesanais, nos quais a *L. monocytogenes* foi identificada (ZAFFARI et al., 2007; SOUZA et al., 2006; CARVALHO et al., 2007; BRITO et al., 2008; ABRAÃO et al., 2008; MARTINS et al., 2009). Catão; Ceballos (2001) identificaram *L. monocytogenes* em amostras de leite cru e pasteurizado no estado da Paraíba indicando a baixa

qualidade destes produtos, bem como elevado risco de contaminação dos consumidores.

Os métodos tradicionais de isolamento e diagnóstico de *L. monocytogenes*, aprovados por agências regulamentadoras, requerem enriquecimento e plaqueamentos seletivos e confirmação bioquímica dos isolados, demandando semanas para confirmação diagnóstica da contaminação (GASANOV et al., 2005). Desta forma, o uso de métodos moleculares é proposto como uma alternativa para otimização de tempo e trabalho na obtenção do diagnóstico microbiológico.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido empregada para detectar *L. monocytogenes* em diferentes tipos de alimentos, incluindo leite e derivados (AZNAR; ARACÓN, 2003; MANZANO et al., 1998; RIJSENS; HERMAN, 2004; STARBUCK et al., 1992). Porém, a diversidade dos métodos utilizados para extração de DNA de leite dificulta a escolha de um protocolo padrão, o que viabilizaria a utilização da técnica como rotina na indústria de alimentos. Assim, este estudo teve como objetivo comparar técnicas de extração de DNA bacteriano de amostras de leite, bem como investigar a presença de *L. monocytogenes* em amostras de leite bovino *in natura* pela técnica de PCR.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### Comparação de protocolos de extração de DNA de leite bovino

A contaminação artificial do leite foi realizada baseando-se no protocolo de GUIDO (2003). Resumidamente, inoculou-se *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 em amostras de leite integral UHT nas concentrações finais de 10 a 107 UFC/mL. As

diluições foram realizadas a partir da fase estacionária do micro-organismo, cultivado em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) de 18 - 24 h em estufa a 36°C. A quantificação nesta fase foi realizada por plaqueamento em profundidade das suspensões do micro-organismo em PCA (*Plate Count Agar*) e incubação a 36°C por 48 h.

Para a extração do DNA foram utilizados quatro protocolos diferentes, que diferiram com relação ao método de lise celular, uso de fenol, agentes caotrópicos e tratamentos enzimáticos. O protocolo A utilizou como princípio o Isotiocianato de Guanidina e Tween-20, onde em 200 µL da amostra de leite, acrescentou-se 20 µL de Tween-20 homogeneizando por 10s; seguida de centrifugação (12.000 xg) por 10min (20°C). Descartou-se o sobrenadante e suspendeu-se o sedimento em 200 µL de tampão Tris (150 mM Tris-HCl, pH 8,0). Acrescentou-se 100 µL de clorofórmio, centrifugando por 5min (4°C) e após 750 µL de propanol absoluto gelado, seguido de centrifugação (12.000 xg) por 20min. Desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 500 µL de etanol 70%, centrifugando por 15min. Finalmente o precipitado foi ressuscitado com tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) (CHOMKZYNSKI, 1993). O protocolo B utilizou fenol tamponado e proteinase K, sendo adicionado em 200 µL da amostra de leite, 20 µL de Tween-20 e homogeneizando por 10s; seguida de centrifugação (12.000 xg) por 10min (20°C). Suspendeu-se o sedimento em tampão de lise (tampão de lise: 60 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA; 250 mM NaCl e 30 µL de SDS a 10%, 15 µL de proteinase K (20 mg/mL), 195 µL de água ultra-pura.) incubando por 1 h a 37°C. A seguir, adicionou-se fenol tamponado (pH 8,0) centrifugando (12.000 x g) por 5min. Foi adicionado 100 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), centrifugando (12.000 x g) 5min. Após, acrescentou-se 26,5 µL de acetato de sódio (2 M) e 400 µL de etanol absoluto estocando a -20°C por 12 a 18 h. Ao final, a amostra foi centrifugada (12.000 x g), sendo o precipitado ressuscitado em tampão TE (DE GRACIA, 1997). O protocolo C utilizou Lisozima e proteinase K. Centrifugou-se (14.000 x g) a amostra por 4min e descartou-se o sobrenadante, ressuscitando o precipitado em Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,8). A seguir adicionou-se 500 µL de tampão de PCR 10X (100 mM Tris HCl; 500 mM KCl, pH 8,8), centrifugando (14.000 xg) por 4min. O precipitado foi ressuscitado em 100 µL tampão de PCR 1X com 100 µL de lisozima (2 mg/mL) e 4 µL de proteinase K (400 µg/mL), incubando por 1 h a 56°C. A amostra foi fervida por 15 min e centrifugada (14.000 x g) por 45s. Após, adicionou-se 500 µL de etanol absoluto gelado, estocando a -20°C por 1 h. Finalmente, centrifugou-se por 4min, ressuscitando o precipitado em 100 µL de água ultra-pura (AHMADI et al., 2010). Finalmente o protocolo D foi baseado no

Kit comercial Chemagic® (Chemagen (Baesweiler, Alemanha), com detergentes e agentes caotrópicos e sílica associada a partículas magnéticas, onde seguiu-se as instruções do fabricante com algumas adaptações (lavagens da amostra com as soluções descritas no protocolo C antes de utilizar o kit comercial).

Após a extração de DNA, realizou-se a PCR em termociclador TC-512 (Techne® Barloworld Scientific, Stone, Staffordshire, UK) para identificação da presença de *L. monocytogenes*. Para tanto, foram utilizados os seguintes primers baseados no gene da Listeriolisina, gerando um amplicon de 702 pb: LM1 5'CCTAAGACGCAATCGAA3' e LM2 5'AAGCGCTTGCAACTGCTC3' (LAWRENCE; GILMOUR, 1994). As condições da reação foram: 94°C por 80s, 50°C por 90s e 72°C por 2 min durante 30 ciclos. Os produtos do PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com Brometo de Etídio. A análise dos géis foi feita através do sistema de captura de imagem e fotodocumentação Gel Logic 200 (KODAK® Raytest GmbH, Straubenhardt, Alemanha).

#### **Análise da presença de *Listeria monocytogenes* nas amostras de leite *in natura***

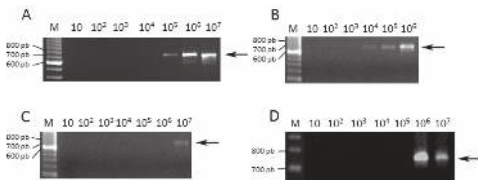
Amostras de leite bovino *in natura* foram obtidas de oito produtores locais de médio porte de municípios da região do Vale do Taquari, RS. A análise ocorreu nos meses de setembro a novembro de 2011. Foram analisadas 24 amostras em duplicata de 26 mL de leite bovino *in natura*. Utilizou-se o protocolo B para extração do DNA do leite *in natura*, seguindo as condições de PCR e análise dos dados descrita acima. Como controle positivo, utilizou-se o extrato de DNA obtido da amostra de leite inoculada com 107 UFC de *L. monocytogenes*/mL (ATCC/19114) e negativo ausência de DNA na reação.

#### **Análise microbiológica das amostras de leite *in natura***

Utilizou-se 90 mL de caldo Fraser ½ concentração (Laborclin®) Reg. ANVISA 10097010149, que foi inoculado com 10 mL da amostra de leite bovino *in natura*, e a seguir incubado a 30°C por 24 h. Após, retirou-se uma alíquota de 1 mL que foi inoculada novamente em Caldo Fraser (Laborclin®), seguida de incubação a 30°C por 48 h. Finalmente, foi realizada a semeadura qualitativa em meio Ágar Aloa para *Listeria* (reg. ANVISA 10097010134) que foi incubado a 35°C por 48 h para posterior análise por plaqueamento (Método Normalizado – *International Organization for Standardization* (ISO) 11290-1, 2004). Considerando todos os períodos de tempo de todas as etapas de incubação deste método convencional de análise microbiológica para *L. monocytogenes*, o intervalo de tempo necessário para esta análise foi de cinco dias.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo buscou comparar métodos de extração de DNA bacteriano de leite para a confirmação da contaminação deste alimento por *L. monocytogenes*. Dos métodos testados, o protocolo B destacou-se diante dos demais, com detecção a partir de 103 UFC/mL (Figura 1). Os demais protocolos detectaram o micro-organismo a partir de 105 UFC/mL (protocolo A), a partir de 106 UFC/mL (protocolo C), e a partir de 107 UFC/mL (protocolo D).



**Figura 1** – Protocolos para a detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR. As letras dos géis correspondem aos protocolos testados. As setas correspondem ao fragmento de 702 pb correspondendo a *L. monocytogenes*. M – Marcador (100 bp DNA Ladder 1 µg/µL – Invitrogen® Carlsbad, CA, EUA). Gel de agarose 1,5%.

A diferença encontrada entre os limites mínimos de detecção dos protocolos pode estar relacionada ao fato de o leite apresentar em sua composição uma série de substâncias capazes de inibir a PCR. As proteases presentes no leite, por exemplo, podem dificultar a amplificação pela PCR (POWEL et al., 1994). Além disso, a gordura do leite poderia cobrir a superfície bacteriana e dificultar a lise celular, assim, diminuindo a capacidade de extração de DNA e, por conseguinte a sensibilidade da PCR (KIM et al., 2001). Um estudo recente avaliou sete protocolos diferentes para o isolamento do DNA de micro-organismos gram positivo e gram negativo a partir de amostras de leite cru e de queijo (QUIGLEY et al., 2012). O mesmo estudo demonstrou a grande diferença que existe entre os protocolos com relação à qualidade e à quantidade do DNA obtido, fatores que influenciam diretamente na etapa posterior de detecção do patógeno pela técnica de PCR. A enzima proteinase K (PK) é responsável pela degradação das proteínas e rápida inativação de nucleases que podem degradar o DNA, portanto é possível que este reagente possa ter atuado de forma mais eficiente em conjunto com o fenol tamponado e o Tween-20 no processo de extração pelo protocolo B utilizado no presente trabalho. Destaca-se ainda, que os resultados da PCR apresentaram total concordância com o método microbiológico padrão. Através dos testes realizados pôde-se verificar que dos protocolos

testados aqueles que empregaram substâncias como detergentes e álcalis, além de enzimas como a lisozima, foram os melhores para o isolamento do DNA deste patógeno a partir do leite.

Procedimentos e estudos para isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos têm aumentado nos últimos anos. A característica do micro-organismo de crescer em temperatura de refrigeração, aliado à sua resistência ao congelamento e aos diversos antibióticos, tornaram o mesmo um dos principais patógenos transmitidos por alimentos. Os métodos microbiológicos tradicionais para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos são baseados na utilização de meios de cultivo específicos para o isolamento e testes bioquímicos para a confirmação, desta forma empregando o método padrão recomendado para isolamento de *L. monocytogenes* são necessários cinco dias para confirmar o resultado negativo e mais de 10 dias para confirmar o resultado positivo (GRADY et al., 2008; VANEGAS et al., 2009). Estudos recentes demonstraram maior sensibilidade de detecção pela técnica de PCR, se comparada aos métodos microbiológicos tradicionais, além da redução do tempo de análise para apenas dois dias (AMAGLIANI et al., 2012; FRECE et al., 2010).

O protocolo C, que neste estudo apresentou limiar mais alto para detecção, foi considerado o método ideal para o isolamento de *Staphylococcus aureus* do leite e posterior análise por PCR por AHMADI et al. (2010). Diante disto, é possível ponderar que características intrínsecas da bactéria, como a composição de proteínas e glicídios de membrana e parede, possam influenciar na eficiência da lise, tornando o micro-organismo mais resistente ao uso de determinados reagentes e condições de temperatura, dificultando a escolha de um protocolo ideal para todos os micro-organismos.

O protocolo B foi o escolhido para a extração do DNA de *L. monocytogenes* em amostras de leite *in natura* oriundas de produtores locais. Nesta análise, constatou-se total concordância entre os resultados obtidos pelo método molecular e pela análise microbiológica. Ambos os resultados foram negativos para a detecção de *L. monocytogenes*. Ressalta-se que este trabalho diferencia-se por realizar o isolamento de *L. monocytogenes* diretamente do leite para posterior análise molecular por PCR. Trabalhos publicados isolaram a bactéria do leite após o crescimento em placa, sendo a extração de DNA realizada a partir dessa cultura e não diretamente do leite (PERES et al., 2010; NOGVA et al., 2000). Este fato onera e retarda o processo de identificação do patógeno. AZNAR; ALARCÓN (2003), empregando metodologia de extração de DNA de uma *kit* comercial, detectaram *L. monocytogenes* inoculada artificialmente em diferentes alimentos pela técnica de PCR, com sensibilidade de 1 a 10 UFC/mL. Entretanto, o estudo não isolou o DNA bacteriano diretamente dos alimentos e sim após

o enriquecimento com caldo específico para *Listeria* (LEB) e semeadura em placa.

Diante do exposto pode-se inferir que a utilização da PCR na análise de qualidade de alimentos, entre eles o leite, pode ser uma alternativa viável em relação aos métodos microbiológicos utilizados com maior frequência, uma vez que apresenta custo compatível e maior sensibilidade, além de fornecer resultados com maior rapidez no diagnóstico.

#### 4 CONCLUSÃO

Os dados da presente pesquisa demonstraram que a técnica otimizada de extração de DNA de *L. monocytogenes* diretamente do leite permite a sua identificação pela técnica de PCR. Dos protocolos testados, o protocolo B foi o utilizado para extração de DNA e posterior identificação do patógeno por PCR a partir de 103 UFC/mL. Além disso, as amostras de leite *in natura* coletados da região do Vale do Taquari, RS, analisadas tanto por PCR quanto pela metodologia padrão não apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*. A técnica de PCR pode fornecer um diagnóstico mais rápido se o resultado for negativo, podendo ser considerado definitivo. Entretanto, quando o resultado é positivo, ainda se faz necessário à análise da amostra por métodos convencionais.

#### AGRADECIMENTOS

Ao setor de Unianálises e funcionária Claudia Majolo por conceder e preparar as cepas de *Listeria monocytogenes*, além do auxílio nas análises microbiológicas.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, W. M. et al. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 289-296, 2008. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-93322008000200014](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322008000200014)> Acesso em: 2 out. 2012. doi:10.1590/S1516-93322008000200014.

AHMADI, M.; ROHANI, S. M. R.; AYREMLOU, N. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by PCR. **Comparative Clinical Pathology**, Irã, v. 19, n. 1, p. 91-94, 2010. doi: 10.1007/s00580-009-0901-0.

AMAGLIANI, G. et al. Microbiological Surveillance of a Bovine Raw Milk Farm Through Multiplex Real-Time PCR. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 9, n. 5, p. 406-411, 2012. doi: 10.1089/fpd.2011.1041.

AZNAR, R.; ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting

sensitivity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 958-966, 2003. doi: 0.1046/j.1365-2672.2003.02066.x.

BRITO, J. R. et al. Retail survey of Brazilian milk and Minas Frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 15, p.4954-4961, 2008. Disponível em <<http://aem.asm.org/content/early/2008/05/23/AEM.01828-07.full.pdf>> Acesso em: 8 out. 2012.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYNE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 262-267, 2007. doi:10.1016/j.foodcont.2005.10.005.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria spp.*, Coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. **Biotechniques**. New York, v. 15, n. 3, p. 532-537, 1993.

DONNELLY, Y. C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v. 59, n. 6, p. 183-194, 2001. doi: 10.1111/j.1753-4887.2001.tb07011.x.

DE GRACIA, A. S. **Deteção de DNA de *Brucella abortus* em amostras de leite bovino experimentalmente contaminado através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**. 1997. 37f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses) – Faculdade de Medicina veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

FRECE, J. et al. Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. **Journal of Dairy Research**, London, v. 77, n. 1, p. 112-116, 2010. doi: <<http://dx.doi.org/10.1017/S002202990990379>>.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 5, p. 851-875, 2005. doi:10.1016/j.femsre.2004.12.002.

GUIDO, M. C. **Deteção de DNA de *Brucella abortus* pela PCR em leite bubalino experimentalmente contaminado pela amostra 1119-3**. 2003. 46f. Tese

(Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GRADY, J. O et al. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. **Food Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 75-84, 2008. doi:10.1016/j.fm.2007.07.007.

INTERNATIONAL STANDART ORGANIZATION (ISO). **ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004** – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. International Standart Organization. Geneve, 2004. 20p.

KIM, C. H. M. et al. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 74-83, 2001. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74454-2.

LAWRENCE, L. M.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria* spp and *Listeria monocytogenes* in a poultry products and their confirmation by multiplex PCR. **Applied Environmental Microbiology**. Washington, v. 60, p. 4600-4604, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202027/>>. Acesso em: 3 out.2012.

MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C. A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 207-212, 1998. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00086-5.

MARTH, E. H. Disease characteristic of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago. v. 42, n. 51, p. 165-168, 1988.

MARTINS, I. M.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. Determination and characterization of pathogens found in dairy products. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 3, p. 359-365, 2009. Disponível em: <[http://revista.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\\_remository&Itemid=27&func=fileinfo&id=517](http://revista.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=27&func=fileinfo&id=517)>. Acesso em: 3 out. 2012.

NOGVA, H. K. et al. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim, milk, and unpasteurized whole milk. **Applied Environmental Microbiology**. Washington, v. 66, n. 10, p. 4266-4271, 2000. doi: 10.1128/AEM.66.10.4266-4271.2000.

PEARSON, L. J.; MARTH, E. H. *Listeria monocytogenes*: threat safe a food supply. **Journal of Dairy Science**,

Champaign, v. 73, n. 6, p. 912-928, 1980. doi :10.3168/jds.S0022-0302(90)78748-6.

PERES, N. D. et al. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte. v. 62, n. 4, p. 973-979. 2010. doi: 10.1590/S0102-09352010000400029.

POWELL, H. A. et al. Proteinase Inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 18, n. 1, p. 59-61, 1994. doi: 10.1111/j.1472-765X.1994.tb00802.x.

QUIGLEY, L. et al. A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, n. 1, p. 96-105, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05294.x.

RIJPENS, N., HERMAN, L. Comparison of selective and nonselective primary enrichments for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 1, p. 15-22, 2004. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.016.

SGARBIERI, V. C. Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005. Disponível em <<http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/brazilianjournal/free/p05185.pdf>> Acesso em 3 de out.2012.

SOUZA, R. A. et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho artesanal, comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza, CE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, p. 66-69, 2006.

STARBUCK, M. A. B.; HILL, P. J.; STEWART, G. S. A. B. Ultra sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction (PCR). **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 15, n. 6, p. 248-252, 1992. doi: 10.1111/j.1472-765X.1992.tb00775.x.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 2001. p. 383-409.

VANEGAS, M. C. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Columbia by Real Time PCR. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 4, p. 430-432, 2009. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.07.007.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862-867, 2007. doi: 10.1590/S0103-84782007000300040.