

MÉTODOS

COMPARAÇÃO ENTRE CALDOS DE PRÉ-ENRIQUECIMENTO PARA A DETECÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM MATRIZES CÁRNEAS

DEGENHARDT, Roberto^{*}; ALMEIDA, Régis P. Fernandes^{**}; FRANCHIN, Paulo Rogério^{***}

Resumo

O presente estudo comparou o procedimento de pré-enriquecimento de amostras em Caldo Universidade de Vermont (UVM), usualmente empregado na análise de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos com o procedimento alternativo empregando Água Peptonada Tamponada (APT), usualmente empregada para a detecção de outros patógenos, visando à otimização e à diminuição de custos da análise. Foram avaliadas 354 amostras de produtos cárneos cozidos e crus de aves e suínos durante o período de 30 dias. O protocolo utilizado para a validação do método foi baseado na ISO 16140 e como método/referência foi utilizada a metodologia ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004, sendo modificado apenas o caldo de pré-enriquecimento, substituindo-se o Caldo Demi-Fraser (DF) pelo Caldo Universidade de Vermont (UVM). O método alternativo consistiu na substituição do Caldo DF pela APT. Os resultados foram avaliados pelo teste não paramétrico de McNemar e calculadas as taxas de resultados falso-negativos e a reprodutibilidade. A avaliação estatística entre os dois métodos não revelou diferença significativa entre o método de referência e o método alternativo, indicando uma sensibilidade relativa (SE) de 47,06%, especificidade relativa (SP) de 94,66% e acurácia relativa de 92,37%. Concluiu-se que nas condições de execução deste trabalho os dois métodos foram equivalentes, e, em virtude do custo mais baixo da Água Peptonada Tamponada em relação ao Caldo Universidade de Vermont, o método alternativo viável para a redução de custo das análises.

Palavras-chave: Caldo Universidade de Vermont. Água peptonada tamponada. Pré-enriquecimento.

Análise de alimentos.

^{*} Mestre em Ciência dos Alimentos; Biólogo; Professor e Pesquisador na Universidade do Oeste de Santa Catarina, Rua Getúlio Vargas, 2125, Bairro Flor da Serra, 89600000, Joaçaba, SC; roberto.degenhardt@unoesc.edu.br

^{**} Especialista em Microbiologia; Biólogo; Analista de Laboratório na empresa BRF/SA; regis.almeida@brf-br.com

^{***} Doutor em Ciência dos Alimentos; Farmacêutico Bioquímico; paulofranchin@yahoo.com.br

***Comparison between pre-enrichment broth for detection of
Listeria monocytogenes in meat products***

Abstract

This study compared the process of pre-enrichment broth samples with University of Vermont (UVM) usually employed to analyze detection of L. monocytogenes in foods with the alternative procedure employing Buffered Peptone Water (BPW), usually employed for detection of other pathogens, targeting optimization and cost reduction analysis. 354 samples of cooked meat products and raw poultry and pigs were evaluated during the period of 30 days. The protocol used for validation of the method was based on ISO 16140 and as reference method used was ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004, was used as the reference method only being modified pre-enrichment broth, replacing the Demi-Fraser Broth (DF) at the University of Vermont broth (UVM). The alternative method consisted in the substitution of DF by APT broth. The results were evaluated by the nonparametric McNemar test, and calculated rates of false negative results and reproducibility. The statistical evaluation between the two methods showed no significant difference between the reference method and the alternative method, indicating a relative sensitivity (SE) of 47,06%, relative specificity (SP) of 94,66% and relative accuracy of 92,37%. It was concluded that the conditions for the application of this work both methods were equivalent, and because of the lower cost of Buffered Peptone Water Broth regarding the University of Vermont, alternative method was considered viable for reducing the cost of analysis .

Keywords: University of Vermont Broth. Buffered Peptone Water. Pre-enrichment. Food analysis.

1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é o agente etiológico responsável pela listeriose em humanos e animais. Segundo Oravcová et al. (2008), a listeriose acomete preferencialmente gestantes, recém-nascidos e indivíduos com o sistema imunológico debilitado, incluindo idosos e crianças, podendo apresentar uma taxa de 30% de mortalidade se forem acometidos por esse microrganismo. Por essa razão, ele tem sido considerado um dos patógenos mais importantes envolvidos em doenças transmitidas por alimentos em razão da alta taxa de mortalidade que provoca em grupos de risco (THÉVENOT et al., 2005). A característica ubiqüitária, causando doenças graves no homem e animais, destaca-o como um dos principais patógenos transmitidos pelos alimentos, justificando a grande preocupação nas indústrias alimentícias e domicílios (SCHWAB; EDELWEISS, 2003).

No Brasil, não há relatos de surtos, e a listeriose humana pode ser subdiagnosticada e subnotificada (Silva et al., 2007); portanto, registros de casos transmitidos por alimentos são inexistentes (Destro, 2006), embora *L. monocytogenes* esteja comprovadamente presente em diversos produtos, sobretudo, em derivados lácteos e cárneos (Degenhardt; Sant'anna, 2007; Brito et al., 2008; Martins; KABUKI; KUAYE, 2009). É provável que a maioria dos humanos que tenha sido contaminada por *L.*

monocytogenes teve contato com alimentos susceptíveis à contaminação por esse patógeno (Hofer; Nascimento; Oliveira, 2006), o que reforça a necessidade de identificar as fontes de infecção e os possíveis alimentos envolvidos.

A gravidade da enfermidade causada por *L. monocytogenes* suscita uma grande preocupação com o controle e a prevenção da contaminação nas indústrias alimentícias (SCHWAB; EDELWEISS, 2003), e, por conta desta preocupação, valores consideráveis são empregados em análises de controle de qualidade, não somente objetivando assegurar a inocuidade dos alimentos em relação à *L. monocytogenes*, mas também outros patógenos importantes como *Salmonella* spp, *E. coli* patogênica, *S. aureus* e *Clostridium* patogênico. Em virtude disso, a otimização dos recursos destinados ao controle de qualidade sem a perda de nível de segurança é uma busca constante das áreas técnicas na indústria.

A indústria de alimentos requer métodos analíticos rápidos para a liberação de lotes de alimentos com segurança; assim, existem disponíveis diversas metodologias alternativas como as baseadas em tecnologia de PCR (RODRIGUES et al., 2011) ou ELISA para detectar a presença de *L. monocytogenes* em alimentos; entretanto a etapa de enriquecimento em caldo ainda é necessária. Esta etapa é fundamental não apenas para aumentar a concentração de células viáveis em uma amostra, mas também reanimar células estressadas e danificadas fisiologicamente (KIM; BHUNIA; SEL, 2008). A recuperação das células estressadas é importante, uma vez que as bactérias subletalmente lesadas podem, em condições adequadas, reparar-se e se recuperar ou até se tornar mais patogênicas (DUPONT; AUGUSTINI, 2009). Por outro lado a utilização de alguns caldos de pré-enriquecimento seletivos possui a desvantagem de que na composição do meio de cultura os agentes seletivos podem se tornar inibitórios atrasando a recuperação ou crescimento de patógenos saudáveis ou estressados, ocasionando falsos resultados analíticos (KIM; BHUNIA; SEL, 2008).

A injúria de células microbianas tem duas grandes consequências quanto ao comportamento de patógenos em caldos e enriquecimento. A primeira relacionada à sensibilidade aos componentes seletivos presentes no caldo, e, dessa maneira, a população bacteriana estressada corre o risco de não iniciar sua multiplicação. A outra consequência se deve à reparação celular requerer mais tempo e as células estressadas possuem uma fase lag maior do que as células saudáveis, arriscando-se de não chegarem à concentração bacteriana necessária para a detecção do agente patogênico no período de incubação nestes caldos de cultivo (DUPONT; AUGUSTINI, 2009).

Outro fator que interfere diretamente no resultado analítico está relacionado à microbiota acompanhante presente nas amostras em análise. Segundo Oravcová et al. (2008), na presença de uma microflora heterogênea, a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos pode ser difícil, uma vez que essas bactérias são normalmente encontradas em número muito baixo e geralmente ocorre a presença simultânea com outras espécies de *Listeria* não patogênicas.

Durante as etapas do enriquecimento ocorre a multiplicação de todas as espécies do gênero *Listeria*, e estudos demonstram que o tempo de geração das espécies não patogênicas pode ser menor do que o tempo de geração de *L. monocytogenes* em meios seletivos de enriquecimento. Nesse caso, a

taxa de multiplicação de algumas espécies deste gênero em relação à *L. monocytogenes* poderia causar um resultado falso-negativo (ORAVCOVÁ et al., 2008).

A natureza da matriz também pode ser responsável por resultados falsos negativos, pois amostras ambientais altamente contaminadas, produtos fermentados e produtos com bactérias probióticas representam desafios maiores aos microbiologistas que amostras com baixas cargas microbianas (BREIDT; FLEMING, 1998; AMÉZQUITA; BRASHEARS, 2002). Segundo a ISO 7218 (2003), para essas matrizes problemáticas, experimentos usando microrganismos representativos devem ser realizados para verificar se o método é compatível com a matriz.

O presente estudo comparou o pré-enriquecimento de amostras em Caldo Universidade de Vermont (UVM) recomendado pelo UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE/FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2012) para a análise de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos com Água Peptonada Tamponada (APT), visando verificar a equivalência entre os caldos e, conseqüentemente, a diminuição de custos da análise.

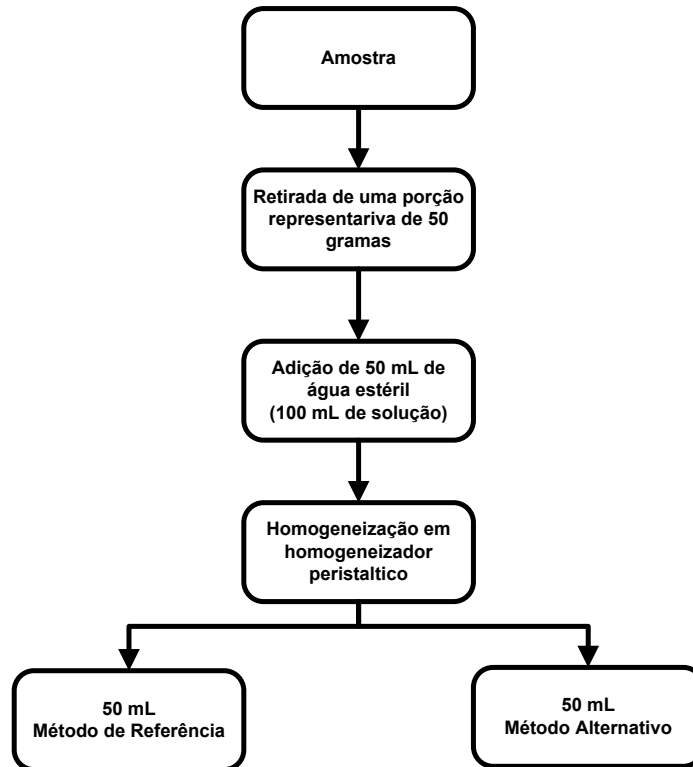
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PROTOCOLO DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram avaliadas 354 amostras de produtos cárneos crus (169 amostras) e termoprocessados (185 amostras) de aves e suínos durante o período de 30 dias. O protocolo utilizado para a validação do método foi baseado na ISO 16140:2003 (Fluxograma 1).

Inicialmente foram transferidas 50 gramas de cada da amostra para uma embalagem plástica estéril e em seguida adicionado 50 mL de água estéril. A solução foi homogeneizada em homogeneizador peristáltico (AES Chemunex, BioMerieux, Bélgica) por 2 minutos em velocidade normal. Após a obtenção de uma mistura homogênea, esta foi dividida em duas partes iguais (subamostras) de 50 gramas em embalagens plásticas estéreis.

Fluxograma 1 – Procedimento de preparação inicial das amostras para protocolos de validação de metodologias de detecção de patógenos



Fonte: ISO 16140 (2003).

Uma das subamostras de 50 g foi analisada conforme a metodologia de análise ISO 11290-1:2004 (modificada) consistindo na análise pelo Método de Referência (Fluxograma 2). A modificação do método original consistiu na utilização de Caldo Universidade de Vermont (UVM – Remel cód. R455252) em substituição ao Caldo Demi-Fraser. Após a adição do caldo de pré-enriquecimento, as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 30 °C por 24h na ausência de luz.

O método alternativo empregou no pré-enriquecimento Água Peptonada Tamponada (MERCK cod. 1.07228), semelhante ao realizado com a fração da amostra analisada pelo método de referência; os 50 g de subamostra (25 g de amostra + 25 g de água estéril) foram homogeneizados com 225 mL de APT e a cultura incubada a 36 °C/24h.

A continuidade da análise seguiu as indicações do método de referência conforme o Fluxograma 2.

2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram tratados estatisticamente pelo teste de McNemar para dados não paramétricos, no programa Estatística 7.0, admitindo-se um erro padrão de 5% ($\alpha = 0,05$).

A acurácia relativa (grau de correspondência entre a resposta obtida pelo método de referência e a resposta obtida pelo método de alternativo em amostras idênticas), a sensibilidade relativa (fração

do total de resultados positivos corretamente identificados) e a especificidade relativa (fração do total de negativos corretamente identificados) (ISO, 2000; ISO, 2003) foram calculadas se empregando as Equações de 1 a 3.

$$\text{Acurácia relativa (AC)} = (PA + NA) / N \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Especificidade relativa (SP)} = NA/N_{-} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Sensibilidade relativa (SE)} = PA/N_{+} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

PA = Número de resultados positivos nos dois métodos utilizados;

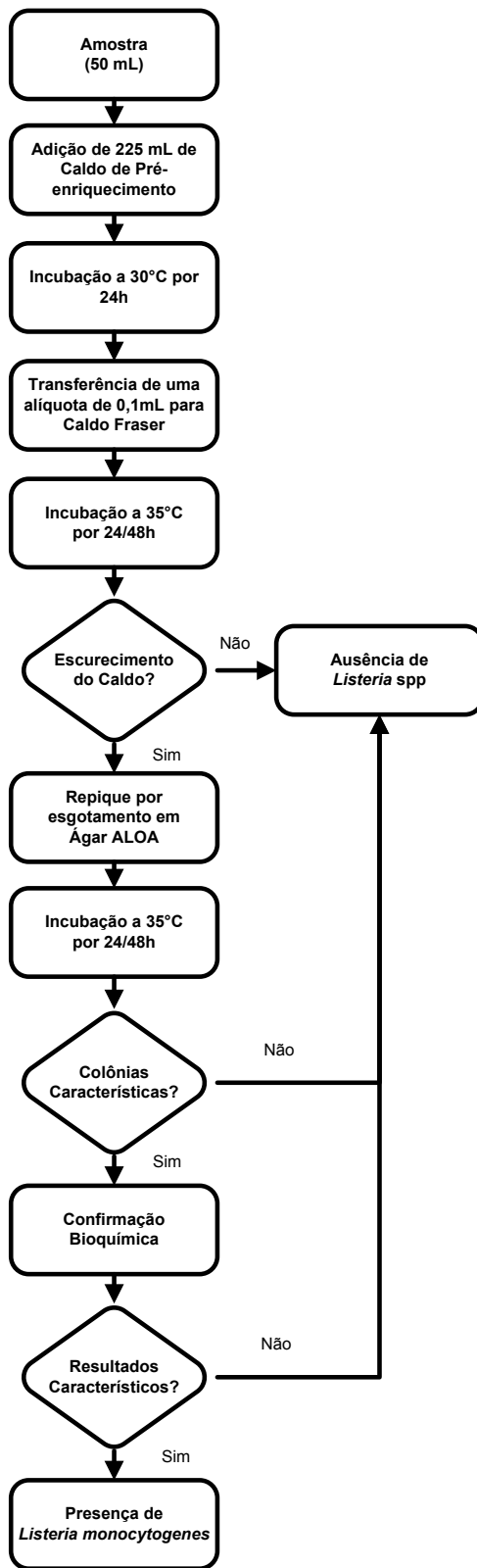
NA = Número de resultados negativos nos dois métodos utilizados;

N- = Total de resultados negativos obtidos pelo método de referência;

N+ = Total de resultados positivos obtidos pelo método de referência;

N = Número de amostras analisadas.

Fluxograma 2 – Protocolo de análise de *Listeria monocytogenes*



Fonte: ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação entre as duas formas de pré-enriquecimento (Tabela 1) demonstra uma maior detecção do patógeno (2,54 p.p) quando o pré-enriquecimento foi realizado com Água Peptonada Tamponada (APT); entretanto, a avaliação estatística demonstrou que não existe diferença significativa ($\alpha = 0,05$) entre os dois procedimentos ($\chi = 2,37$ e poder do teste igual a 40,55%).

Tabela 1 – Avaliação estatística dos resultados de análise de *L. monocytogenes* em matrizes de carne crua e termoprocessada pelo teste de MacNemar

		Método Referência		Total Método Alternativo
		(+)	(-)	
Método	(+)	8 (2,26%)	18 (50,85%)	26 (7,34%)
Alternativo	(-)	9 (2,54%)	319 (90,11%)	328 (92,65%)
Total Método Referência		17 (4,8%)	337 (95,2%)	354

Fonte: os autores.

Estes dados corroboram com Walsh et al. (1998), que afirmam que o uso de caldos de enriquecimento não seletivos para o isolamento de *Listeria* em alimentos fornece vantagens sobre o enriquecimento seletivo, como uma maior recuperação de células danificadas em períodos mais curtos de enriquecimento. Beumer et al. (1996) observaram que células estressadas ou danificadas são mais lentas para se recuperar ou não se recuperam em meios seletivos, levando a atrasos ou falhas na detecção direta de agentes patogênicos. Duffy et al. (2001) compararam dois meios de enriquecimento (seletivo e não seletivo) para a detecção de *Listeria monocytogenes* em carne contendo *Listeria innocua*, e, da mesma forma, não observaram diferença significativa ($\alpha = 0,05$) entre os números após 24 horas de enriquecimento com APT e UVM.

A avaliação da correlação entre os dois métodos de pré-enriquecimento demonstrou que entre as 35 amostras positivas, independentemente do caldo utilizado, apenas oito (22,86%) foram positivas simultaneamente nos dois caldos, indicando uma sensibilidade relativa (SE) de 47,06% e uma especificidade relativa (SP) de 94,66%. Podem ser atribuídas duas principais razões para a baixa correlação entre os resultados obtidos pelos dois métodos: a primeira, envolvendo o papel dos agentes seletivos na inibição de *L. monocytogenes*, como citado por Walsh et al. (1998), e a segunda, pelo baixo número de células de *L. monocytogenes* existentes em matrizes naturalmente contaminadas (SILVA; VILARDI; TIBANA, 1998; PRADEL NETO, 2007) e que não necessariamente estão igualmente distribuídas na preparação da matriz na etapa que antecede a análise.

Ainda, uma terceira razão poderia ser cogitada para a baixa correlação observada e estaria relacionada à microbiota competitiva presente na amostra, que seria mais significativamente inibida pelo Caldo UVM em relação à APT; entretanto quando se comparam os resultados entre matrizes

cruas, que apresentam uma microbiota mais variada em relação às matrizes termoprocessadas (Tabelas 2 e 3), também não se observam diferenças significativas entre as duas formas de pré-enriquecimento.

Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizado por Ryser et al. (1996) com a recuperação de diferentes ribotipos de *Listeria* enriquecidas com dois meios de cultura primários (UVM e LRB), em carne crua refrigerada de suíno e de ave naturalmente contaminadas, onde não constatarem diferença estatística ($p = 0,05$) entre os meios avaliados.

Franchi (2008) avaliou e comparou os métodos ISO e do United States Department of Agriculture em relação aos métodos moleculares e concluiu que a utilização de um único protocolo de isolamento pode resultar em 13 a 16% a menos de resultados positivos na análise de *L. monocytogenes*, e apesar de considerar esse índice alto, não encontrou diferença estatística entre os resultados obtidos pelas metodologias avaliadas. A combinação do uso de mais de um protocolo de pré-enriquecimento elevou a taxa de detecção de amostras positivas, da mesma forma que foi observado neste estudo. Outros autores como Pritchard e Donnelly (1999) obtiveram resultados similares estudando recuperação de *Listeria* a partir de mais de um caldo de enriquecimento.

Tabela 2 – Avaliação estatística dos resultados de análise de *L. monocytogenes* em matrizes de carne crua pelo teste de MacNemar

		Método (+)	Referência (-)	Total Método Alternativo
Método	(+)	3 (1,78%)	10 (5,92%)	13 (7,69%)
Alternativo	(-)	4 (2,37%)	152 (89,94%)	156 (92,31%)
Total Método Referência		7 (4,14%)	162 (95,86%)	169

$\chi^2 = 1,79$ ($p = 0,1815$); poder do teste de 34,93; AC = 91,72%; SP = 93,83%; SE = 42,86%

Fonte: os autores.

Tabela 3 – Avaliação estatística dos resultados de análise de *L. monocytogenes* em matrizes de carne termoprocessada pelo teste de MacNemar

		Método (+)	Referência (-)	Total Método Alternativo
Método	(+)	5 (2,7%)	8 (4,32%)	13 (7,03%)
Alternativo	(-)	5 (2,7%)	167 (90,27%)	172 (92,97%)
Total Método Referência		10 (5,41%)	175 (94,59%)	185

$\chi^2 = 0,31$ ($p = 0,5791$); poder do teste de 12,46; AC = 92,97%; SP = 95,43%; SE = 50%

Fonte: os autores.

A baixa correlação da positividade obtida pelos dois caldos de pré-enriquecimento sugere uma avaliação mais detalhada dos resultados positivos e negativos obtidos em cada um dos métodos de pré-enriquecimento.

O pré-enriquecimento em Caldo UVM resultou na detecção de *L. monocytogenes* em 17 amostras. Observando os resultados destas amostras pré-enriquecidas em APT constatou-se que em oito, os resultados de presença do patógeno coincidiram e que em nove, o resultado foi de ausência do

microrganismo. Dessa forma, a taxa de resultados falso-negativos (o método não detectou o patógeno quando ele estava presente) no pré-enriquecimento em APT foi de 52,94%. Na mesma forma de avaliação, na qual se compararam as amostras que foram positivas no pré-enriquecimento em APT e as respectivas amostras pré-enriquecidas em UVM, observa-se que das 26 amostras positivas no APT apenas oito foram positivas no UVM, resultando em uma taxa de falso-negativo no UVM de 69,23%. Salienta-se que, neste estudo, utilizaram-se amostras naturalmente contaminadas e a distribuição das células não é uniforme; durante o preparo preliminar da amostra poder-se-ia ter uma homogeneização não suficiente, para que parte das células fosse dividida entre as duas alíquotas de 50 g. Entretanto, essa condição somente interferiria na análise se a quantidade de células fosse muito pequena, sendo isso previsto no protocolo de validação e na metodologia de análise.

Segundo Pritchard e Donnelly (1999 apud Franchin, 2008), “[...] a verdadeira incidência de *Listeria monocytogenes*, possivelmente presente em amostras, pode não ser detectada nos protocolos analíticos existentes e por isto ser subestimada.” Neste estudo, pode-se verificar que essa condição se fez presente, onde a combinação dos dois caldos resultou em um número maior de resultados positivos (35 amostras, 9,89%), que representam a contaminação “verdadeira” no conjunto de amostras avaliadas, em relação ao enriquecimento com caldo UVM (17 amostras, 4,8%) e APT (26 amostras, 7,34%).

A avaliação comparada dos resultados negativos entre cada uma das subamostras obtidas após a preparação preliminar levou à observação de que o pré-enriquecimento em Caldo UVM resultou em uma taxa de falso-negativo (negativo no pré-enriquecimento em UVM e positivo em APT) de 5,34%, enquanto entre os resultados negativos do pré-enriquecimento em APT 2,74% foram positivos no pré-enriquecimento em UVM.

A acurácia observada entre os resultados positivos ($n = 8$) e negativos ($n = 319$) entre os dois caldos de pré-enriquecimento foi de 92,37%.

A análise de custo entre os dois caldos de enriquecimento demonstra que o emprego da APT é bastante atrativo em termos financeiros. Um frasco de 500 gramas do meio de cultura desidratado permite a preparação de caldo suficiente para a análise de 87 amostras, enquanto um frasco de 500 gramas de Caldo UVM rende caldo suficiente para a análise de 42 amostras. Em termos financeiros, o valor da APT representa em torno de 20% do custo do caldo UVM, e o valor gasto para a análise de uma amostra com UVM permite a análise de 10 amostras com APT. Salienta-se, ainda, que a mesma preparação utilizada para a análise de *Listeria* com a APT permite ainda a análise de outros microrganismos como a *Salmonella*.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que a utilização dos dois meios de cultura de pré-enriquecimento avaliados não apresentaram diferença significativa, como mostrou o teste estatístico MacNemar ($\alpha = 0,05$), e a especificidade entre as duas formas de pré-enriquecimento

é alta (superior a 90%); a taxa de resultados falso-negativos, quando se observam apenas os resultados de ausência entre os dois procedimentos também é baixa (próxima a 5%).

Cuidados devem ser tomados na avaliação dos resultados, pois quando se observou unicamente o conjunto de resultados positivos a discrepância entre os resultados foi grande (> 50%); entretanto, na prática laboratorial deve-se observar o risco da emissão de um resultado expressando ausência do microrganismo, quando na verdade ele está presente.

A análise de custo de análise foi realizada considerando a relação entre o preço que os materiais têm no mercado, e demonstrou que economicamente o uso de Água Peptonada Tamponada (APT) em lugar do Caldo Universidade de Vermont (UVM) se mostrou viável sem a perda de qualidade analítica, bem como com um maior número de amostras positivas detectadas que melhor representam a contaminação real do produto.

REFERÊNCIAS

AMÉZQUITA, A.; BRASHEARS, M. M. Competitive inhibition of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products by lactic acid bacteria. **J. Food. Prot.**, v. 65, n. 2, p. 316-325, 2002.

BEUMER, R. R. et al. The effect of acriavine and naladixic acid on the growth of *Listeria* spp. in enrichment media. **Food Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 137-148, abr. 1996.

BREIDT, F.; FLEMING, H. P. Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 9, p. 3159-3165, set. 1998.

BRITO, 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**, v. 74, n. 15, p. 4954-4961, ago. 2008.

DEGENHARDT, R.; SANT'ANNA, E. S. Pesquisa de *Listeria* sp em embutidos cárneos fermentados produzidos na região Meio-Oeste de Santa Catarina, Brasil. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 133-140, jan./jun. 2007.

DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de alimentos: da produção primária ao consumidor final. 2006. 74p. Tese (Livre-Docência)–Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DUFFY, G. et al. Comparison of selective and non-selective enrichment media in the detection of *Listeria monocytogenes* from meat containing *Listeria innocua*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 994-999, jun. 2001.

DUPONT, C.; AUGUSTINI, J.-C. Influence of Stress on Single-Cell Lag Time and Growth Probability for *Listeria monocytogenes* in Half Fraser Broth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 10, p. 3069-43076, maio 2009.

FRANCHIN, P. R. **Comparação de Metodologias Alternativas para Detecção de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* em Carnes e Produtos Cárneos**. 2008. 114 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R. S. do; OLIVEIRA, M. A. de. Menigite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 2, n. 31, p. 173-177, mar./abr. 2006.

INTERNATIONAL STANDART ORGANIZATION. **ISO 7218** – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations. Geneve: ISO, 2003. 73 p.

_____. **ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004** – Microbiological 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. Geneve: ISO, 2004. 4 p.

_____. **ISO/TR 13843** – Water quality – Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods. Geneve: ISO, 2000. 47 p.

_____. **ISO 16140** – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods. Geneve: ISO, 2003. 74 p.

KIM, H.; BHUNIA, A. K. SEL, a Selective Enrichment Broth for Simultaneous Growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4853-4866, ago. 2008.

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.

ORAVCOVÁ, K. et al. Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 429-437, 2008.

PRADEL NETO, H. **Utilização de Pediocina em Produto Cárneo tipo Lingüiça Frescal Toscana para Controle de *Listeria monocytogenes***. 2007. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)–Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

PRITCHARD, T. J.; DONNELLY, C. W. Combined secondary enrichment of primary enrichment broths increases *Listeria* detection. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 5, p. 532-535, maio 1999.

RODRIGUES, M. X. et al. Inovação em métodos analíticos microbiológicos na indústria alimentícia. **LAJBM**, v. 2, n. 2, p. 54-81, jul./dez. 2011.

RYSER, E. T. et al. Recovery of different *Listeria* ribotypes from naturally contaminated, raw refrigerated meat and poultry products with two primary enrichment media. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1781-1787, maio 1996.

SCHWAB, J. P.; EDELWEISS, M. I. A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunoistoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 111-114, 2003.

SILVA, M. C. D.; VILARDI, T. C. C.; TIBANA, A. **Avaliação de Métodos para a detecção de *Listeria em Queijos***. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 150-155, maio/jul. 1998.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 536 p.

THÉVENOT, D. et al. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, n. 2, p. 189-200, 2005.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE/FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Laboratory Guidebook**, 2012. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG-8.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2013.

WALSH, D. et al. Comparison of selective and non-selective media for the isolation of *Listeria* species from retail foods. **Journal of Food Safety**, v. 18, n. 2, p. 85-89, jul. 1998.

Recebido em 26 de agosto de 2013
Aceito em 30 de novembro de 2013

