

Avaliação de protocolos de extração de DNA genômico na verificação da presença de *Listeria monocytogenes* por PCR

Francielli Casanova Monteiro¹, Maíke Taís Maziero Montanhini², Juliana Vitoria

Messias Bittencourt^{3*}

Resumo: *Listeria monocytogenes* é um patógeno transmitido por alimentos que pode causar sérias doenças, principalmente em indivíduos imunodeprimidos. A identificação rápida e precisa desta bactéria nos alimentos é uma grande aliada na prevenção da sua transmissão. Os métodos moleculares têm se mostrado efetivos no que se refere a estes quesitos, no entanto, ainda é difícil determinar a melhor técnica de extração do DNA em função das características de cada micro-organismo. A eficiência da PCR depende de DNA em quantidade e qualidade satisfatórios. O presente trabalho teve por objetivo avaliar duas técnicas de extração de DNA, uma por detergente CTAB e outra por lise térmica. Foram utilizadas quatro cepas de *L. monocytogenes*, sendo uma ATCC 19117 e três isoladas de ambiente industrial (ralos de um frigorífico), previamente identificadas por métodos convencionais e confirmadas por métodos moleculares. A extração por lise térmica apresentou resultados satisfatórios, proporcionando a visualização de bandas visíveis e sem interferentes na reação de PCR. A lise térmica mostrou-se um bom protocolo de extração, pois além de fornecer DNA na quantidade e qualidade necessária para a amplificação, é uma técnica simples, rápida e barata.

Palavras-chave: Métodos moleculares; microbiologia; detergente CTAB; lise térmica.

Evaluation of protocols for genomic DNA extraction of the verification of *Listeria monocytogenes* presence by PCR

Abstract: *Listeria monocytogenes* is a pathogen transmitted by foods that can cause serious illness, especially in immunocompromised individuals. The rapid and accurate identification of these bacteria in foods is a great ally in preventing its transmission. The molecular methods have proven to be effective for that; however, is still difficult to determine the optimal DNA extraction technique based on the characteristics of each microorganism. The efficiency of PCR depends on satisfactory amounts and quality of DNA. This study aimed to evaluate two DNA extraction techniques, CTAB detergent and thermal lysis. Four strains of *L. monocytogenes* were used, one ATCC 19117 and three isolated industrial environment (thinning of a slaughterhouse), previously identified by conventional methods and confirmed by molecular methods. The extraction by thermal lysis showed satisfactory results, providing visualization of visible bands and without interfering in the PCR reaction. The thermal lysis proved to be an adequate extraction protocol, as well as providing the amounts and quality of DNA required for the amplification, being simple, fast and an inexpensive technique.

Key-words: Molecular methods; microbiology; CTAB detergent; thermal lysis.

¹ Engenharia de Produção, Universidade Tecnológica Federal do Paraná

² Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná

³ Genética Molecular, Universidade Tecnológica Federal do Paraná

* Autora para correspondência: Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Campus Ponta Grossa – Avenida Monteiro Lobato, S/N, Km 04, CEP: 84016-210, Ponta Grossa – PR – Brasil. E-mail: juvitoria@hotmail.com

Introdução

O gênero *Listeria* compreende seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi* (LIU, 2006). São bactérias resistentes a grandes variações de pH, temperatura e concentrações salinas; em função destas características, podem estar presentes em ampla variedade de ambientes, incluindo solo, água, efluentes e alimentos (GANDHI et al., 2007). Somente duas espécies do gênero são consideradas patogênicas, *L. monocytogenes* para o homem e outros animais e *L. ivanovii* para outros mamíferos (LIU, 2006). A doença causada no homem inclui infecções severas, como septicemias, encefalite, meningite e aborto, com altas taxas de hospitalizações e mortes. Acomete principalmente pessoas idosas, recém-nascidos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos

(SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007).

A listeriose em humanos, apesar de apresentar menor incidência em comparação com outras doenças veiculadas por alimentos, tem sido responsável por até um terço dos óbitos em decorrência desse grupo de enfermidades (EFSA, 2013). Os casos de listeriose em humanos são causados quase que exclusivamente por *L. monocytogenes*, portanto essa espécie tem sido o foco dos critérios microbiológicos em legislações concernentes à inocuidade dos alimentos. O parâmetro ausência de *L. monocytogenes* tem sido adotado, de acordo com o país, para alimentos de pronto consumo em geral, ou apenas para aqueles que serão consumidos por grupos de risco, ou que propiciam a multiplicação da bactéria (YANG et al., 2006; EFSA, 2013).

Os métodos tradicionais de isolamento de *L. monocytogenes*,

aprovados por agências regulamentares, requerem vários dias para serem concluídos, pois exigem enriquecimento seletivo, plaqueamento em meios seletivos e confirmação bioquímica dos isolados (GASANOV et al., 2005).

Vários métodos envolvendo genes estão sendo utilizados com êxito na tipagem molecular de *L. monocytogenes* (PARISI et al., 2010; DESTRO, 2000). De acordo com CORCORAN et al. (2006), o ajuste de técnicas envolvendo os processos fenotípicos com genotípicos tende a ser benéfico na averiguação de ocorrências de surtos de listeriose, já que os fenotípicos são úteis para uma primeira despistagem, relativamente à vicência de relação de afinidade entre estirpes, e os genotípicos para a sustentação das relações existentes. Dentre as técnicas existentes, destaca-se a PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), a qual tornou-se o método genético mais conhecida e utilizada em diagnóstico

microbiológico (MALORNY et al., 2003).

Uma das etapas decisivas nas análises moleculares é o isolamento do DNA bacteriano em quantidade e qualidade suficiente para amplificação pela PCR. Para extração de DNA podem ser empregados vários procedimentos de rompimento da parede celular em bactérias, que podem ser classificados em métodos enzimáticos, químicos, não-mecânicos e mecânicos (PERSSON et al., 2011). No entanto, há uma grande diferença na quantidade e na qualidade do DNA obtido em função da técnica de extração utilizada (QUIGLEY et al., 2012). A extração e purificação do DNA bacteriano é uma etapa fundamental para o sucesso da reação de PCR, considerando que os alimentos, assim como outras amostras orgânicas, apresentam grande quantidade de inibidores, que interferem diretamente na amplificação do DNA (LIU, 2008).

Existem diversos métodos para a extração do DNA a ser utilizado nas análises moleculares, o que dificulta a escolha de um protocolo padrão. O presente trabalho tem por objetivo avaliar o uso de duas metodologias para isolamento de DNA genômico de *L. monocytogenes*, de modo a estabelecer um protocolo eficiente na identificação deste micro-organismo.

Material e Métodos

Para a realização deste experimento foram utilizadas 4 cepas de *L. monocytogenes*, sendo uma cepa ATCC 19117 e três isoladas de ambiente industrial (ralos de um frigorífico), previamente identificadas por métodos convencionais e confirmadas por métodos moleculares.

As amostras foram incubadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa - PR, em caldo BHI a 37 °C por 18h, 24h e 36h para determinação do tempo ideal

de incubação. Logo após, foram encaminhadas para o Laboratório de Bioengenharia do mesmo Campus, para posterior extração de DNA e reação de PCR.

Extração de DNA

Foram testados dois protocolos de extração de DNA bacteriano, um deles utilizando CTAB e outro utilizando a técnica de lise térmica.

Extração com detergente CTAB

Para extração de DNA das cepas bacterianas, utilizou-se o protocolo proposto por Olindo et al. (2009), no qual uma quantidade de 2,5 mL de amostra foram precipitados em tubos de microcentrífuga com 1,7 mL por meio de um pulso de centrifugação a 14.000 rpm. O sobrenadante foi eliminado e este processo foi repetido até que todo o volume (2,5 mL) fosse precipitado. Ao pellet obtido foram adicionados 700 µL de tampão de extração (1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20mM EDTA, pH8,0; PVP-40 1%; CTAB 2%;

Proteinase K, 20mg/mL; δ -Mercaptoetanol 0,2%). A solução foi misturada em vórtex e incubada por 30 minutos a 65°C em banho-maria, sendo misturada com o cuidado de não se fazer movimentos bruscos a cada 10 minutos. Foram acrescentados 650 μ L de clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1), a solução foi homogeneizada até formar uma emulsão e centrifugada a 14.000 rpm durante 7 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionada de 200 μ L de tampão de extração sem Proteinase K, homogeneizado, e adicionados então 650 μ L de clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1), homogeneizada novamente e centrifugada a 14.000 rpm por 7 minutos. O processo com 650 μ L de clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1) foi repetido por mais duas vezes até que a fase aquosa adquirisse aparência translúcida. O DNA foi precipitado com 1 volume de Isopropanol conservado em temperatura ambiente,

homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm durante 7 minutos. O sobrenadante foi então removido e a superfície do precipitado foi lavada por duas vezes com 70 mL de etanol 70%, preparado um pouco antes do uso. A cada lavagem o precipitado foi centrifugado por 2 minutos a 14.000 rpm. Em seguida o pellet foi seco em temperatura ambiente por 30 minutos e ressuspendido em 40 μ L de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0 + 10 mg/ μ L de RNase) e deixado em banho-maria a 37°C por 30 minutos.

Extração por lise térmica

Para o procedimento de extração de DNA, seguiu-se o protocolo utilizado por Peres et al. (2010), utilizando o método de lise térmica com adaptações. Transferiu-se 2 ml de cada amostra para um microtubo estéril. Após centrifugação a 5.000 rpm durante 4 minutos, o sobrenadante foi desprezado, o pellet foi lavado três vezes com 500 μ L de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM

EDTA, pH 7,8) e submetido a uma centrifugação por dois minutos a 5.000 rpm. O pellet foi suspenso novamente em 100 µl de TE e mantido no banho seco, com temperatura de 98° por 10 minutos. Em seguida foi feita centrifugação a 12.000 g durante 30 segundos e o sobrenadante foi estocado a -20°C para posterior utilização.

Reação da PCR

Para a reação de PCR, seguiu-se o protocolo descrito por Peres et al. (2010) com adaptações devido a marcas de reagentes e também equipamentos. A reação denominada “mix”, continha 1 µl de cada primer (10 µM), 5 µl de tampão de PCR 10 X, 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl da mistura de

nucleotídeos (10 mM), 0,2 U de Taq polimerase, 3ul de DNA bacteriano e água Milli-Q para completar um volume de 25 µl. As condições de amplificação foram: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos à temperatura de anelamento dos primers, que foi 50°C e 45 segundos a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C, como descrito por Aznar e Alarcón (2003). Como controle positivo da reação, utilizou-se DNA extraído da amostra de *L. monocytogenes* ATCC 19117, e como controle negativo, água Milli-Q esterilizada. Os *primers* utilizados na reação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Primers utilizados na reação da PCR para identificação de *Listeria monocytogenes*

Primers	Gene-alvo	Produto amplificado (pb)	Referência
CCTAAGACGCCAATCG	hlyA F	702pb	BORDER et al.
AA	hlyA R		(1990)
AAGCGCTTGCAACTGC			
TC			

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose, aproximadamente uma hora utilizando-se 70 volts. O gel de agarose foi submerso em solução de brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL, por 10 minutos e fotodocumentados em transiluminador ultravioleta utilizando software LpiX Image para a visualização das bandas. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100 pb para estimativa do tamanho dos produtos de PCR.

Resultados e Discussão

O tempo ideal de incubação das cepas em caldo BHI foi de 24h a 37 °C. O Período de 18h mostrou-se ineficiente, uma vez que a cultura não atingiu a fase estacionária da curva de crescimento, não produzindo assim a massa celular necessária para a extração do DNA na quantidade necessária. SILVA (2010), disserta que ao inocular *L. monocytogenes* em meio líquido de

BHI à 37 °C, observa-se uma turvação no meio somente após 18-24 h.

O período de 36h também se mostrou eficiente neste estudo; o mesmo resultado foi relatado CESAR et al. (2011). No entanto, este tempo de incubação pode ser considerado uma desvantagem quando se procura rapidez no resultado, uma vez que, como observado anteriormente, com 24 horas consegue-se uma boa quantidade de biomassa para realização das análises de PCR.

A quantidade de massa celular é importante para facilitar a extração do DNA na quantidade e qualidade necessária para a reação de PCR. Avaliando-se os protocolos de extração testados, verificou-se que o produto da extração de DNA por CTAB apresentou pouca quantidade e qualidade para a reação de PCR. Resultados semelhantes foram observados por MESQUITA et al. (2001) que utilizou protocolo com CTAB e a proteinase K, apresentando

baixa quantidade de DNA e alta quantidade de proteína. Esse fato pode representar a causa mais provável da não amplificação pela PCR do DNA obtido com esta metodologia de extração.

No entanto, a extração por lise térmica apresentou DNA em quantidade e qualidade satisfatórios para a amplificação pela reação de PCR (Figura 1). Produtos de PCR de boa qualidade a partir de lisado celular de *L.*

monocytogenes já foram descritos em outros estudos (FLUIT et al., 1993; AZNAR & ALARCÓN, 2003; ASLAM et al., 2003; RIPJENS & HERMAN, 2004). A extração por lise térmica é mais rápida e simples, por utilizar pequenas quantidades de soluções-tampão, sendo assim mais econômica, oferecendo menos riscos à saúde do manipulador e causa menos impactos ao meio ambiente (GARCIA et al., 2008).

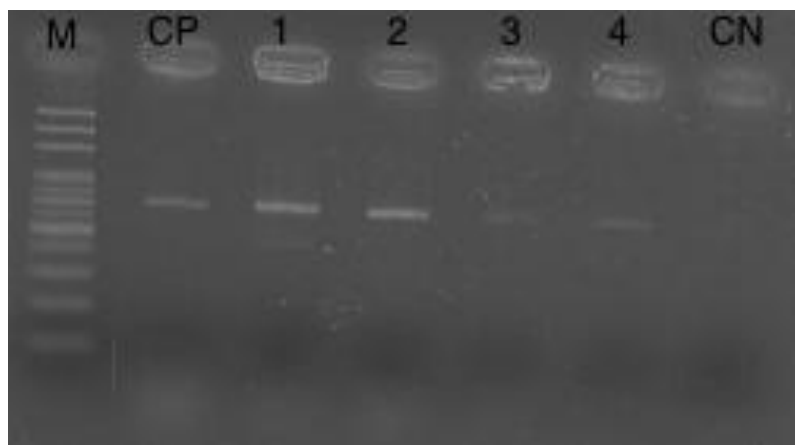


Figura 1 - Produtos de amplificação de 702pb, específicos de *L. monocytogenes*, obtidos pelo método de extração de DNA por lise térmica (M: marcador de peso molecular; CP: controle positivo, 1,2,3,4: amostras, CN: controle negativo)

FLÔRES et al. (2003) comparam dois métodos de extração de DNA – a extração por tratamento

térmico e a técnica de extração pelo CTAB – em amostras de 100 ovos de galinha contaminados artificialmente

com uma cepa de *L. monocytogenes*. O material obtido com as extrações foi submetido a PCR. Comparando os métodos de extração, observou-se diferença na capacidade de detecção, considerando o método com CTAB eficaz, mas com baixa quantidade de DNA, assemelhando-se ao resultado encontrado nesta pesquisa.

Em outro estudo conduzido por GERMINI et al. (2009) os autores descrevem quatro diferentes procedimentos de extração de DNA para detecção de *L. monocytogenes* e *E. coli* em ovos. O melhor desempenho descrito pelos autores também foi o do método que utiliza a lise celular térmica.

BRANKICA et al. (2011) constata que a PCR é um método rápido e eficiente na detecção de *L. monocytogenes*, mas cuja aplicação correta a amostras de alimentos está limitada, por estes terem geralmente baixas concentrações de agentes

patogênicos, populações bacterianas heterogêneas e elevados volumes de matriz de alimento que contêm substâncias que podem inibir alguns dos compostos da reação de PCR .

A PCR destaca-se como técnica complementar, já que é utilizada na confirmação de resultados, o que é muito comum nas pesquisas científicas. Nestes casos, as técnicas convencionais são utilizadas nas etapas iniciais da pesquisa e a PCR substitui a identificação bioquímica por ser mais rápida e confiável. Além da técnica de PCR apresentar maior sensibilidade que a identificação bioquímica, o tempo de análise é reduzido significativamente, o que é de grande interesse para a indústria de alimentos (FRECE et al., 2010).

Atualmente são encontrados no mercado diversos kits para extração com bons resultados no que se refere a qualidade e quantidade de DNA, facilitando muito a rotina no laboratório

(QUIGLEY et al., 2012). No entanto, estes kits ainda apresentam elevado custo, inviabilizando muitas vezes a análise em laboratórios de rotina.

Estudos que confirmem a eficiência da metodologia para extração do DNA bacteriano facilitam a escolha por pesquisadores no momento de implementar uma metodologia e contribuem para o desenvolvimento da técnica de PCR como ferramenta no controle de qualidade na indústria de alimentos.

Conclusão

As técnicas moleculares estão cada vez mais presentes nos laboratórios de controle de qualidade bem como em laboratórios de pesquisa na área de alimentos, pois já comprovaram ser alternativas viáveis e confiáveis no diagnóstico de patógenos. No entanto, o sucesso da detecção depende da escolha correta de protocolos de análise. A extração do DNA bacteriano é uma etapa

fundamental deste processo e a escolha do protocolo ideal pode levar tempo.

A extração do DNA de *L. monocytogenes* por lise térmica se mostrou eficiente, favorecendo a amplificação durante a PCR. Além disso, trata-se de uma metodologia simples, rápida e barata, o que viabiliza sua utilização na rotina de um laboratório.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelo financiamento da pesquisa e aos colaboradores do Laboratório de Bioengenharia da UTFPR, Ponta Grossa-PR, pelo auxílio na execução das análises.

Referencias Bibliográficas

ASLAM, M; HOGAN, J; SMITH, KL. Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in milk. **Food Microbiology**, v.20, p.345-350, 2003.

- AZNAR, R.; ALARCÓN, B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, n.5, p.958-966, 2003.
- BORDER, P.M.; HOWARD, J.J.; PLASTOW, G.S.; SIGGENS, K.W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, n.3, p.158-162, 1990.
- BRANKICA, L.; STJEPANOVIC, A.; TOLINACKI, M.; GOLIC N.; TOPISIROVIC L. Improved sensitivity and reproducibility of the PCR method for detection of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in milk. **Acta Veterinaria**, v.61, n.2-3, p.239-245, 2011.
- CESAR, A.P.R.; MESQUITA, A.J.; PRADO, C.S.; NUNES, I.A.; ALMEIDA FILHO, E.S. *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* na produção de salsichas tipo hot dog. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.2, p.339-352, 2011.
- CORCORAN, D.; CLANCY, D.; O'MAHONY M.; GRANT K.; HYLAND E.; SHANAGHY N.; WHYTE P.; MCLAUHLIN J.; MOLONEY A.; FANNING S. Comparison of *Listeria monocytogenes* strain types in Irish smoked salmon and other foods. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.209, n.6, p.527-534, 2006.
- DESTRO, M.T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, n.3, p.191-196, 2000.
- EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2011. **EFSA Journal**, v.11, n.4, a.3129, 2013.

- FLÔRES, M.M.; NASCIMENTO, V.P.; CARDOSO, M.; SANTOS, L.R.; LOPES, R.F.F.; WALD, V.B.; BARBOSA, T.M.C. Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da Polimerase. **Ciência Rural**, v.33, n.3, p.553-557, 2003.
- FLUIT, A.C.; TORENSMA, R.; VISSER, M.J.C. Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, n.5, p.1289-1293, 1993.
- FRECE, J.; MARKOV, K.; CVEK, D.; KOLAREC, K.; DELAS, F. Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. **Journal of Dairy Research**, v.77, n.1, p.112-116, 2010.
- GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiological**. v.113, n.1, p.1-15, 2007.
- GARCIA, P.M.; ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Escherichia coli* 0157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1241-1249, 2008.
- GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, n.5, p.851-75, 2005.

- GERMINI, A.; MASOLA, A.; CARNEVALI, P.; MARCHELLI, R. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella spp.*, and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. **Food Control**, v.20, n.8, p.733-738, 2009.
- LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, n.1, p.645-59, 2006.
- LIU, D. Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. **International Journal of Food Microbiology**, v.122, n.3, p.229-242, 2008.
- MALORNY, B.; TASSIOS, P.T.; RÅDSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, n.1, p.39-48, 2003.
- MESQUITA, R.A.; ANZAI, E.K.; OLIVEIRA, R.N.; NUNES, F.D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para a amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontologica Brasileira**, v.15, n.4, p.314-319, 2001.
- OLINDO, C.S.; CHAPAVAL L.; VILLARROEL, A.B.S.; ALVES, F.S.F.; SOUSA, F.G.C.; FERNANDES, F.E.P.F.; ALVES, F.S.F.; SOUSA, F.G.C.; FERNANDES, F.E.P. Detecção de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.7, p.1317-1321, 2009.
- PARISI, A.; LATORRE, L.; NORMANNO, G.; MICCOLUPO, A.; FRACCALVIERI, R.; LORUSSO, V.; SANTAGADA, G. Amplified fragment length polymorphism and multilocus

sequence typing for high resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment. **Food Microbiology**, v.27, n.1, p.101-108, 2010.

PERES, N.D.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; ARCURI, E.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.4, p.973-979, 2010

PERSSON, S.; BOER, R.F.; KOOISTRA-SMID, A.M.D.; OLSEN, K.E.P. Five commercial DNA extraction systems tested and compared on a stool sample collection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.69, n.3, p.240-244, 2011.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T.P.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; COTTER, P.D. A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, n.1, p.96-106, 2012.

RIJPENS, N.; HERMAN, L. Comparison of selective and nonselective primary enrichments for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. **Journal of Food Microbiology**, v.94, n.1, p.15-22, 2004.

SILVA, A.C.M. A influência do tempo de refrigeração na virulência inicial de *Listeria monocytogenes*. 2010. 64p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar). Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal, 2010.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **MICROBES AND INFECTION**, v.9, n.10, p.1236-1243, 2007.

YANG, Y.; SU, X.; YUAN, Y.; KANG, C.; LI, Y.; ZHANG, W.; ZHONG, X. Detection of *Staphylococcus aureus* in

dairy products by Polymerase Chain
Reaction assay. **Agricultural Science
in China**, v.6, n.7, p.857-862, 2007.