



MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS: DESAFIOS E APLICAÇÃO EM ESPÉCIES DO GÊNERO *LISTERIA*

Cristhiane M. F. dos Reis^a, Gustavo Luis de P. A. Ramos^{a,b}, Deyse Christina Vallim da Silva^c, Leonardo Emanuel de Oliveira Costa^a

^a Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

^b Faculdade de Farmácia – Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ

^c Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ

Resumo

Listeria monocytogenes é um patógeno humano responsável pela listeriose, uma doença transmitida por alimentos com taxa de mortalidade de 20-30%, que afeta principalmente idosos, recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos. Embora não patogênica, o isolamento e identificação de *L. innocua* são de extrema importância já que podem indicar a presença de *L. monocytogenes*, uma vez que são espécies intimamente relacionadas e amplamente distribuídas no ambiente e nas plantas industriais de processamento de alimentos. Cepas atípicas do gênero *Listeria*, que não podem ser distinguidas de outras espécies usando apenas métodos fenotípicos convencionais, foram relatadas em humanos, inclusive em casos raros de septicemia e meningite por *L. innocua*. Nos últimos anos, várias alternativas foram propostas para uma identificação mais rápida de microrganismos, como métodos fenotípicos automatizados e a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF/MS). Este trabalho tem como objetivo sintetizar os desafios de identificação de espécies do gênero *Listeria*, assim como conceituar métodos atuais de identificação de micro-organismos, aplicados ao gênero *Listeria*.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*; VITEK; MALDI-TOF; testes bioquímicos; segurança de alimentos.



1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o método analítico mais utilizado para a detecção de patógenos bacterianos em alimentos ainda é o cultivo microbiológico convencional, que inclui etapas de enriquecimento em caldos com agentes seletivos, isolamento em meio sólido e identificação das colônias por testes bioquímicos e sorológicos. Todavia, são métodos demorados e caros, que não fornecem informações rápidas e precisas sobre as contaminações de alimentos, limitando a capacidade de proteger os consumidores de potenciais riscos microbianos (Rohde et al., 2015).

Embora *L. monocytogenes* seja um microrganismo bastante estudado em países desenvolvidos, no Brasil há carência de informações sobre este importante patógeno responsável por altas taxas de letalidade. Os dados nacionais são extremamente difusos e incipientes, com raras investigações sobre o monitoramento de casos de listeriose com o agente etiológico ligado ao consumo de alimentos.

Métodos rápidos alternativos, como identificação bioquímica automatizada e espectrometria de massas, vêm sendo cada vez mais utilizados. O objetivo deste trabalho é conceituar outras metodologias de identificação microbiana, com enfoque nos desafios que o gênero *Listeria* oferece quanto à identificação de suas espécies.

2. GÊNERO *LISTERIA* E IDENTIFICAÇÃO DE SUAS ESPÉCIES

As dificuldades de técnicas de isolamento de *L. monocytogenes* datam da década de 60, quando Gray e Killinger apontaram a necessidade de aperfeiçoar as técnicas de isolamento e sugeriram que laboratórios de saúde pública, na medida do



possível, enviassem as culturas suspeitas de *L. monocytogenes*, para centros de referência, devido às dificuldades de isolamento e caracterização de material contaminado (Gray & Killinger, 1966).

Além disso, as técnicas convencionais de identificação baseadas em características fenotípicas podem dificultar a interpretação dos resultados quando estas não são expressas (Välilmaa et al., 2015). Os testes bioquímicos podem ser variáveis frente à ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, quando se utiliza um número limitado de testes, gerando risco de interpretações errôneas e demora no processo de identificação microbiano (Gandra et al., 2008; Andrade et al., 2010).

A identificação de *L. monocytogenes* é frequentemente realizada através de análise microbiológica em meios de cultura específicos, associada aos métodos bioquímicos clássicos de identificação. Vários estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar os meios sólidos, quanto à recuperação e isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos e, observa-se a prevalência dos meios seletivos PALCAM e OXFORD (Pinto et al., 2001; Tahoun et al., 2017), além dos meios cromogênicos, como por exemplo o ágar ALOA.

A diferenciação entre as espécies do gênero é realizada através de testes de fermentação de carboidratos (D-Manitol, L-Ramnose, D-Xilose, α -D-manosídeo), produção de hemólise total em Agar Sangue de carneiro a 5%, incluindo teste de Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) (Tabela 1).

Algumas espécies são beta-hemolíticas (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*) e as demais não produzem hemolisina. A inoculação em ágar semissólido,



incubação à temperatura de 20 a 25 °C e seu crescimento a partir de 48 horas evidenciam a figura típica de um “guarda-chuva”. Na semeadura em placa com Ágar Triptosado, as colônias visualizadas são acinzentadas, brilhantes sob iluminação normal e, de coloração azul esverdeada quando observadas sob a técnica de iluminação oblíqua (Schuchat et al.,1991).

Tabela 1. Diferenciação bioquímica das espécies mais comuns do gênero *Listeria*, segundo Rocourt et al., 1983.

Testes	<i>Listeria</i>					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
β-Hemólise	+	-	+	+	-	-
CAMP (<i>S. aureus</i>)	+	-	-	+	-	-
CAMP (<i>R. equi</i>)	-/+	-	+	-	-	-
D -Manitol**	-	-	-	-	-	+
L – Ramnose	+	V	-	-	V	-
D –Xilose	-	-	+	+	+	-
α-D-manosídeo	+	+	-	-	+	+
Hidrólise esculina	+	+	+	+	+	+
Redução NO ₃ ⁻ – NO ₂ ⁻	-	-	-	-	-	-

*Algumas amostras não são hemolíticas em sangue de carneiro, cavalo ou bovino

** Leitura após 24-48 horas de incubação a 35-37°C.

(+): positivo; (-): negativo; (V): variável: 11 a 89% das amostras positivas.

Um dos maiores desafios para os microbiologistas é a ausência de um método totalmente eficaz para diferenciar *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria*, associadas na mesma amostra de alimento, especialmente *L. innocua* (Andrade et al., 2014).



L. monocytogenes e *L. innocua* apresentam perfis bioquímicos semelhantes, sendo diferenciados pela presença da hemolisina na espécie patogênica. Em contraste com *L. monocytogenes*, *L. innocua* não é patogênica para os mamíferos, embora casos excessivamente raros de septicemia e infecções por meningite tenham sido relatados em humanos e ruminantes causados por cepas de *L. innocua* atípicas (Moura et al., 2019).

Moreno et al. (2014) realizaram a caracterização fenotípica e genotípica de amostras isoladas de suínos e descrevem *L. innocua* atípica por apresentarem baixa atividade hemolítica. A presença de cepas atípicas relacionadas ao gênero *Listeria* desperta grande interesse para saúde pública, já que cepas patogênicas podem ser identificadas erroneamente e vice-versa, causando a disseminação das DTAs e aumentando assim a subnotificação.

Nos últimos anos várias alternativas têm sido propostas para a identificação de microrganismos em alimentos, através de testes de diagnósticos rápidos, específicos e sensíveis. Alguns kits comerciais, como por exemplo o API (*Analytab Products* INC) *Listeria*[®] *System* e o VIDAS[®] (*Vitek Immuno Diagnostic Assay System*) (Biomerieux, 2019), capazes de distinguir diversas espécies de *Listeria* têm sido utilizados na tentativa de identificações mais rápidas e simples (Andrade et al., 2010).

Oktay e Heperkan (2006) ao comparar o método ISO 11290-1:2017 (identificação convencional por provas bioquímicas) e VIDAS[®] obtiveram 100% de sensibilidade e especificidade para o VIDAS[®] em amostras de queijos, manteigas e batatas cozidas. A metodologia VIDAS[®] foi citada como método adequado para



identificação de *Listeria* sp. em amostras de carne bovina e suína, necessitando de testes adicionais para confirmação de *L. monocytogenes* (Meyer et al., 2011). Em 2013, Benetti e colaboradores relataram resultados favoráveis ao API quando comparados à metodologia ISO 11290-1:2017 para identificação de *Listeria* sp. e *Salmonella* sp. em salsicha resfriada.

Andrade et al. (2014) isolaram, pelo método tradicional, cepas de *Listeria* sp. (carne moída bovina e salsichas tipo hot dog) e identificaram as espécies através da comparação entre os métodos API e metodologia molecular e, obtiveram concordância total na distinção das espécies de *L. monocytogenes* e *L. innocua* por ambas as técnicas. Porém, são métodos demorados e algumas vezes dependentes de provas bioquímicas adicionais para conclusão da identificação do microrganismo.

3. TESTES BIOQUÍMICOS AUTOMATIZADOS

O VITEK 2 Compact[®] é um sistema de identificação microbiana totalmente automatizado, o que proporciona uma otimização do fluxo de trabalho. Possui um vasto banco de dados que permite detectar uma variedade de microrganismos. O sistema opera com cartões com códigos de barras, o que assegura uma completa rastreabilidade e o risco de erros de transcrição é minimizado. O tempo de preparação e de resultado final pode ser obtido num intervalo de 2 a 18 horas, dependendo do metabolismo da bactéria e do cartão utilizado. O software do VITEK 2 Compact[®] é extremamente intuitivo e, portanto, requer menos treinamento técnico, resultando em uma maior produtividade (Biomerieux, 2019).



O cartão GP, utilizado para bactérias Gram positivas, baseia-se em métodos bioquímicos que medem a utilização de carbono, resistência e atividade enzimática, totalizando 43 testes bioquímicos. A porcentagem de probabilidade é realizada pelo software através da comparação do conjunto de reações do teste com o conjunto de reações esperadas para cada microrganismo que possa ser identificado pelo equipamento. As reações observadas são comparadas com reações típicas de cada microrganismo, gerando um valor quantitativo. A probabilidade de porcentagem de 99% é obtida quando ocorre uma correspondência perfeita entre o padrão de reação do teste e o padrão de reação característico de um determinado microrganismo. Quando não se obtém uma correspondência perfeita ainda é possível para o padrão de reação estar próximo ao padrão de reação esperado, de modo que possa ser fornecida uma decisão clara quanto à identificação do microrganismo.

O intervalo de porcentagem de probabilidades no caso de escolha única é de 85 a 99%. Os valores próximos a 99% indicam uma correspondência mais próxima do padrão típico para o microrganismo em questão. Quando o padrão de reação não é suficiente para diferenciar entre dois a três microrganismos, as porcentagens de probabilidades refletem esta ambiguidade. Os valores de probabilidade reportados indicam, relativamente, a ordem pela qual o padrão de reação corresponde melhor às possibilidades enumeradas.

O VITEK 2 Compact® é capaz de identificar as seguintes espécies do gênero *Listeria*: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri*.



Wallet et al. (2005) relataram o bom desempenho do equipamento em isolados clínicos e salientaram o nível de precisão de identificação altamente aceitável, assim como Tahoun et al. (2017), obtiveram bons resultados em amostras de leite cru. O maior surto de listeriose relatado na África ocorreu no período de janeiro de 2017 a julho de 2018 e a identificação bacteriana foi realizada por bioquímica automatizada através do Vitek 2 Compact® (Smith et al., 2019).

4. MÉTODOS MOLECULARES BASEADOS EM DETECÇÃO DO DNA

Os métodos moleculares são mais rápidos e confiáveis quando comparados aos métodos bioquímicos, porém, relativamente mais caros, necessitando de minuciosa técnica (Jadhav et al., 2012).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método utilizado na detecção e identificação de *L. monocytogenes* em diferentes tipos de produtos alimentícios e amostras clínicas. Gonçalves et al. (2014) descreveram o método como sendo rápido e sensível na detecção de agentes patogênicos e citaram o crescimento gradativo da técnica nas indústrias de alimentos. Em seu trabalho os autores avaliaram o limite de detecção para *Salmonella* spp e *L. monocytogenes* e demonstraram boa sensibilidade da técnica. Hudson et al. (2001) descreveram a utilização da técnica para detecção do gene *hly*, que codifica a listeriolisina O (LLO), principal fator de virulência de *L. monocytogenes*. A PCR surge como uma ferramenta útil para confirmação dos sorotipos do gênero *Listeria* (Doumith et al., 2004).

No Brasil, estudos realizados por Camargo et al. (2016) citam a PCR multiplex desenvolvida por Doumith et al. (2004) com 100% de precisão na classificação



sorotípica de *L. monocytogenes* oriundas de cortes de carne, amostras clínicas e ambientais isoladas no país. Concomitantemente, Palma et al. (2016) obtiveram resultados positivos com a mesma metodologia em isolados oriundos de cortes bovinos e abatedouros no Distrito Federal. Em amostras humanas e de origem alimentar no Brasil, Almeida et al. (2017) confirmaram o sorogrupo de cepas de *L. monocytogenes* utilizando a metodologia de Doumith et al. (2004) e destacaram a prevalência dos tipos 4b e 1/2b em ambas as fontes.

A aplicação do método da PCR foi relatada por Liu et al. (2004) para diferenciar *L. welshimeri* de outras espécies de *Listeria* e de bactérias Gram positivas. Ryu et al., (2013) desenvolveram uma PCR multiplex para detecção simultânea de seis espécies, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* em amostras de produtos cárneos.

Em 2016, Rosimin et al. descreveram pela primeira vez, com sucesso, a utilização de uma PCR quadriplex para a discriminação simultânea de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. innocua* atípica. Ainda em 2016, Pournajaf et al. descreveram uma PCR multiplex que permite a confirmação rápida e simultânea de espécies de *L. monocytogenes* e sua virulência em amostras clínicas e não clínicas.

Tao et al. (2017) confirmaram 28 cepas do gênero *Listeria*, previamente isoladas de alimentos e, obtiveram acurácia e sensibilidade na caracterização das espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* e *L. innocua* através de multiplex PCR. Já em 2018, Kljujev et al. obtiveram sucesso com a técnica utilizando o marcador para gene *hly* e confirmaram a espécie *L. monocytogenes* em vegetais.



5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas de biomoléculas vem sendo utilizada e aperfeiçoada, e atualmente é possível obter não somente o espectro de uma grande biomolécula (como proteínas), mas também um perfil de espectros de várias moléculas, que pode ser utilizado como um fingerprinting do microrganismo analisado (Carbonnelle et al., 2011).

A utilização da tecnologia *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight/ Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/MS) tem se mostrado de grande relevância para a identificação de espécies bacterianas de importância clínica, devido à simples execução dos protocolos, à rápida liberação dos resultados e ao baixo custo por análise (Kohlmann et al., 2015; Celandroni et al., 2016). Uma das principais vantagens do uso desta tecnologia é o tempo para obtenção dos resultados, que é reduzido de 1 a 6 dias a menos de uma hora. Além disso, MALDI-TOF/MS permite a identificação precisa de uma grande variedade de bactérias de origem alimentar e ambiental (Rodrigues et al., 2017).

A técnica de MALDI-TOF/MS, usada para a identificação de microrganismos, consiste na mistura da cultura a ser identificada com uma matriz polimérica (geralmente ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico - CHCA) que absorve luz e permite a ionização das proteínas, por excitação através de um feixe de laser. Em seguida, campos elétricos orientam os íons gerados dentro de um tubo de vácuo, onde ocorre uma separação por massa/carga segundo o tempo de passagem pelo tubo até o detector (tempo de voo). Cada partícula ionizada gera um espectro e o conjunto de partículas detectadas é convertido em um perfil de espectros. Por meio de uma base



algorítmica, este perfil de espectros é comparado com o perfil de diversas espécies presentes no banco de dados e interpretados como um resultado de identificação, associado a um nível de confiança. Resultados com identificações menores e/ou iguais a 70% não são considerados confiáveis.

O aperfeiçoamento da técnica com o uso de uma matriz que permitisse a ionização de proteínas ribossômicas – mais conservadas que as de superfície, por exemplo, favoreceu o estabelecimento de perfis de espectros característicos que conduziram à identificação de espécies e subespécies (Pavlovic et al., 2013).

Além da utilização da técnica de MALDI-TOF/MS na caracterização de bactérias, alguns autores (Dhiman et al., 2011) citam o uso da técnica na identificação de fungos e até de vírus (Sun et al., 2011) na clínica médica e animal. Seu uso tem sido considerado de excelente desempenho (Deng et al., 2014), inclusive quando comparado aos métodos utilizados rotineiramente na identificação clínica, como kits bioquímicos (Guo et al., 2014). Em amostras ambientais, o uso de MALDI-TOF/MS pode ser aplicado, mas o banco de dados associado é citado como crítico na identificação dos microrganismos. Rahi et al. (2016) citam o banco de dados como limitação da técnica, já que o número limitado de organismos que não sejam de interesse clínico, resulta em baixa porcentagem de identificação (43 a 65%) para microrganismos isolados do solo, água e outros ambientes.

Chen et al. (2017) utilizaram diferentes metodologias tradicionais e novas, incluindo MALDI-TOF/MS, na identificação de *L. monocytogenes* em amostras de origem alimentar, obtendo resultados com sucesso e rapidez. A utilização da técnica foi apontada como vantagem significativa por Rodríguez-Sánchez et al. (2019) na



determinação dos padrões de suscetibilidade antimicrobiana produzindo resultados confiáveis, classificando o MALDI-TOF/MS como uma excelente ferramenta no monitoramento epidemiológico de patógenos altamente resistentes.

Nos últimos anos, o uso relativamente simples do MALDI-TOF/MS mudou o fluxo de trabalho dos laboratórios na identificação microbiana. Andrade et al. (2018) avaliaram a adequação da técnica para identificação de bactérias isoladas do ambiente de salas limpas em uma indústria farmacêutica e consideraram o desempenho do método confiável. No período de de 2009 a 2018, verificou-se que a rápida identificação dos microrganismos através do MALDI-TOF/MS permitiu a otimização do tratamento do paciente, proporcionando o início rápido e correto do mesmo, diminuindo assim, o tempo de permanência hospitalar e o custo por paciente com impacto positivo na higiene hospitalar e na saúde pública (Rodríguez-Sánchez et al., 2019). O uso do MALDI-TOF/MS na rotina clínica tem um potencial significativo devido ao alto grau de precisão, além do aspecto econômico de custo-benefício. A técnica permite a rápida identificação de patógenos através dos fluidos biológicos, aliado a identificação e características de resistência a antibióticos (Hou et al., 2019).

6. CONCLUSÃO

Atualmente um dos maiores desafios para os microbiologistas é a ausência de um método eficaz para distinguir as espécies com perfil atípico de *L. monocytogenes* e *L. innocua*, uma vez que fenotipicamente as espécies são muito semelhantes, levando a possíveis equívocos na identificação. Apesar de *L. innocua* não apresentar



o arcabouço de genes de virulência completo, o que não a classifica como patogênica, a sua presença pode mascarar a presença de *L. monocytogenes* no ambiente ou alimento, sendo considerada um indicador importante, ressaltando a necessidade de caracterizar o isolado atípico tanto fenotipicamente como geneticamente. Uma vez identificado erroneamente um patógeno passa a ser subdiagnosticado podendo levar a ocorrência de óbitos.

Metodologias moleculares baseadas no DNA e espectrométricas tem se tornado cada vez mais populares por apresentarem precisão, sensibilidade e especificidade. Entretanto, a aquisição desses equipamentos envolve alto custo havendo a necessidade de pessoal treinado para a realização das técnicas. A segurança alimentar, ao longo dos anos, ganhou considerável importância mundial, razão pela qual métodos rápidos e sistemas confiáveis para detectar a contaminação de produtos com *L. monocytogenes* e outros patógenos são continuamente procurados pela indústria alimentícia.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, R. M. D., Barbosa, A. V., Lisbôa, R. D. C., Santos, A. F. D. M., Hofer, E., Vallim, D. C., & Hofer, C. B. (2017). Virulence genes and genetic relationship of *L. monocytogenes* isolated from human and food sources in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21: 282-289.

Andrade, L. D. O., Awasthi, R., Dua, K., & de Jesus Andreoli Pinto, T. (2018). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of bacteria isolated from pharmaceutical clean rooms. *Interventional Medicine and Applied Science*, 10(1): 45-53.

Andrade, R. R. D., Silva, P. H. C. D., Souza, N. R., Murata, L. S., Gonçalves, V. S. P., & Santana, A. P. (2014). 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*, 44: 147-152.



Andrade, R. B., Gemelli, T., Dall Onder, L. P., Cristina, K., Brito, T. D., Barboza, A. A. L., & de Brito, B. G. (2021). Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*. *Arquivos do Instituto Biológico*, 77: 741-750.

Biomerieux. (2019). *Listeria monocytogenes*. Disponível em: <
<https://www.biomerieux.com.br/produto/solucao-vidasr>>.

Camargo, A. C., Vallim, D. C., Hofer, E., & AUGUSTO NERO, L. U. Í. S. (2016). Molecular serogrouping of *Listeria monocytogenes* from Brazil using PCR. *Journal of Food Protection*, 79(1): 144-147.

Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J. L., ... & Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*, 44(1): 104-109.

Celandroni, F., Salvetti, S., Gueye, S. A., Mazzantini, D., Lupetti, A., Senesi, S., & Ghelardi, E. (2016). Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. *PLoS One*, 11(3): e0152831.

Chen, J. Q., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S., & Hu, Z. (2017). Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*, 6(3): 97-120.

Deng, J., Fu, L., Wang, R., Yu, N., Ding, X., Jiang, L., ... & Che, X. (2014). Comparison of MALDI-TOF MS, gene sequencing and the Vitek 2 for identification of seventy-three clinical isolates of enteropathogens. *Journal of thoracic disease*, 6(5): 539.

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8): 3819-3822.



- Gandra, E. Á., Gandra, T. K. V., de Mello, W. S., & da Silva Godoi, H. (2008). Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. *Acta Scientiarum Technology*, 30(1): 109-118.
- Gonçalves, J. S., Cheirubim, A. P., de Brito, K. C. T., & de Brito, B. G. (2014). Detecção de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* através de técnica de PCR. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 17(4).
- Gray, M. L., & Killinger, A. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological reviews*, 30(2): 309-382.
- Guo, L., Ye, L., Zhao, Q., Ma, Y., Yang, J., & Luo, Y. (2014). Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. *Journal of Thoracic Disease*, 6(5): 534.
- Hudson, J. A., Lake, R. J., Savill, M. G., Scholes, P., & McCormick, R. E. (2001). Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4): 614-621.
- ISO - International Organization for Standardization. (2017). ISO 11290-1:2017 :2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 1: Detection method.
- Jadhav, S., Bhave, M., & Palombo, E. A. (2012). Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of microbiological methods*, 88(3): 327-341.
- Kljujev, I., Raicevic, V., Jovicic-Petrovic, J., Vujovic, B., Mirkovic, M., & Rothballer, M. (2018). *Listeria monocytogenes*—Danger for health safety vegetable production. *Microbial Pathogenesis*, 120: 23-31.
- Kohlmann, R., Hoffmann, A., Geis, G., & Gatermann, S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid



pathogen identification from positive blood cultures. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(4-5): 469-479.

Liu, D., Ainsworth, A. J., Austin, F. W., & Lawrence, M. L. (2004). Identification of a gene encoding a putative phosphotransferase system enzyme IIBC in *Listeria welshimeri* and its application for diagnostic PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 38(2), 151-157.

Meyer, C., Fredriksson-Ahomaa, M., Sperner, B., & Märtilbauer, E. (2011). Detection of *Listeria monocytogenes* in pork and beef using the VIDAS® LMO2 automated enzyme linked immunoassay method. *Meat Science*, 88(3): 594-596.

Moreno, L. Z., Paixão, R., Sena de Gobbi, D. D., Raimundo, D. C., Porfida Ferreira, T. S., Micke Moreno, A., ... & Matté, M. H. (2014). Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. *BioMed Research International*, 2014.

Moura, A., Disson, O., Lavina, M., Thouvenot, P., Huang, L., Leclercq, A., ... & Lecuit, M. (2019). Atypical hemolytic *Listeria innocua* isolates are virulent, albeit less than *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 87(4): e00758-18.

Oktay, H. I., & Heperkan, D. (2006). Evaluation of ISO method and VIDAS automated system for identifying *Listeria* and *Salmonella* in selected foods. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 14(2): 133-145.

Palma, J. M., Lisboa, R. C., Rodrigues, D. P., Santos, A. F., Hofer, E., & Santana, A. P. (2016). Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36: 957-964.

Pavlovic, M., Huber, I., Konrad, R., & Busch, U. (2013). Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. *The Open Microbiology Journal*, 7: 135.



- Pinto, M., Burri, S., Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., & Gibbs, P. A. (2001). Comparison of Oxford Agar, PALCAM and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for the recovery of *L. monocytogenes* from foods and environmental samples. *Food Control*, 12(8): 511-514.
- Pournajaf, A., Rajabnia, R., Sedighi, M., Kassani, A., Moqarabzadeh, V., Lotfollahi, L., ... & Irajian, G. (2016). Prevalence, and virulence determination of *Listeria monocytogenes* strains isolated from clinical and non-clinical samples by multiplex polymerase chain reaction. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49: 624-627.
- Rahi, P., Prakash, O., & Shouche, Y. S. (2016). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based microbial identifications: challenges and scopes for microbial ecologists. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1359.
- Rocourt, J., Alonso, J. M., & Seeliger, H. P. (1983, May). Comparative virulence of the 5 genomic groups of *Listeria monocytogenes* (sensu lato). *Annales de microbiologie*, 134(3): 359-364.
- Rodrigues, N. M. B., Bronzato, G. F., Santiago, G. S., Botelho, L. A. B., Moreira, B. M., Coelho, I. D. S., ... & Coelho, S. D. M. D. O. (2017). The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48: 132-138.
- Rodríguez-Sánchez, B., Cercenado, E., Coste, A. T., & Greub, G. (2019). Review of the impact of MALDI-TOF MS in public health and hospital hygiene, 2018. *Eurosurveillance*, 24(4): 1800193.
- Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., & Al Dahouk, S. (2015). FISHing for bacteria in food—A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria?. *Food Microbiology*, 46: 395-407.



Rosimin, A. A., Kim, M. J., Joo, I. S., Suh, S. H., & Kim, K. S. (2016). Simultaneous detection of pathogenic *Listeria* including atypical *Listeria innocua* in vegetables by a quadruplex PCR method. *LWT-Food Science and Technology*, 69: 601-607.

Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S. H., Kim, Y. R., & Kim, H. Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control*, 32(2): 659-664.

Schuchat, A., Swaminathan, B., & Broome, C. V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(2): 169-183.

Smith, A. M., Tau, N. P., Smouse, S. L., Allam, M., Ismail, A., Ramalwa, N. R., ... & Thomas, J. (2019). Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017–2018: laboratory activities and experiences associated with whole-genome sequencing analysis of isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(7): 524-530.

Tahoun, A. B., Abou Elez, R. M., Abdelfatah, E. N., Elsohaby, I., El-Gedawy, A. A., & Elmoslemany, A. M. (2017). *Listeria monocytogenes* in raw milk, milking equipment and dairy workers: molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10: 264-270.

Tao, T., Chen, Q., Bie, X., Lu, F., & Lu, Z. (2017). Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. *Food Control*, 73: 704-711.

Välimaa, A. L., Tilsala-Timisjärvi, A., & Virtanen, E. (2015). Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain—a review. *Food Control*, 55: 103-114.

Wallet, F., Loiez, C., Renaux, E., Lemaitre, N., & Courcol, R. J. (2005). Performances of VITEK 2 colorimetric cards for identification of gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9): 4402-4406.