

EFICIÊNCIA DOS CALDOS DE ENRIQUECIMENTO (LEB₁ E LEB₂) E DOS ÁGARES SELETIVOS (LPM E LSAB-CAN) NO ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Listeria* EM CARNE BOVINA E ÁGUA RESIDUÁRIA DE LAVAGEM DE CARÇAÇA¹

Albenones José de Mesquita,² Sebastião Timóteo Iaria² e Iolanda Aparecida Nunes²

ABSTRACT

Efficiency of the Enrichment Broths (LEB₁ and LEB₂) and Selective Agars (LPM and LSAB-CAN) to Isolate Bacteria of the Genus *Listeria* in Meat and Residual Water of Washing Carcass

In this paper it was observed the efficiency of enrichment broths for *Listeria* (LEB₁ and LEB₂), associated to the passage of the culture through a 0,25% potassium hydroxide solution, verifying that the secondary enrichment broth (LEB₂ and LEB₂KOH) was better than the primary enrichment broth (LEB₁KOH) for this purpose. On the other hand, lithium chloride-phenylethanol-moxalactam agar and the selective *Listeria* agar base, supplemented with cicloheximide, acriflavine and nalidixic acid (LSAB-CAN) showed equivalency, at the statistic point of view ($p=0,1442$), in relation to the number of positive samples for *Listeria* spp., although the LSAB-CAN agar had given the greatest number of bacteria isolated from this genus.

KEY WORDS: Enrichment broth, selective agar, *Listeria*.

RESUMO

No presente trabalho verificou-se a eficiência dos caldos de enriquecimento para *Listeria* (LEB₁ e LEB₂) associados à passagem da cultura por uma solução de hidróxido de potássio a 0,25%, constatando-se que o caldo de enriquecimento secundário (LEB₂ e LEB₂KOH) foi superior ao caldo de enriquecimento primário (LEB₁KOH). Por outro lado, o ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam (LPM) e o ágar base seletivo para *Listeria*, suplementado com cicloheximida, acriflavina e ácido nalidixico (LSAB-CAN) equivaleram-se estatisticamente ($p=0,1442$) em relação ao número de amostras positivas para *Listeria*, embora o ágar LSAB-CAN tenha proporcionado um maior número de isolamentos da bactéria.

PALAVRAS-CHAVE: Caldo de enriquecimento, ágar seletivo, *Listeria*

¹ Entregue para publicação em agosto de 1995.

² Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. C.P. 131. CEP 74.001-970. Goiânia-GO.

INTRODUÇÃO

As dificuldades e irregularidades no isolamento da *Listeria* foram observadas já no trabalho inicial de Murray *et al.* (1926) sobre listeriose em coelho. Estudos subsequentes que objetivaram recuperar a bactéria de amostras de solo, silagem, fezes e certos tecidos animais contaminados com microrganismos competidores também enfatizaram problemas no isolamento (Gray & Killinger 1966).

Os percentuais de positividade de *Listeria* observados em amostras de alimentos, ambiente ou material clínico, assim como os recentes surtos devidamente comprovados de listeriose humana de origem alimentar, têm mostrado a necessidade de se melhorarem as técnicas de isolamento e identificação deste gênero bacteriano (Klinger 1988).

Tendo em vista as dificuldades encontradas na detecção do microrganismo por plaqueamento direto, devido à intensa competição de outros gêneros bacterianos, diversos autores têm trabalhado no desenvolvimento de técnicas mais rápidas e seguras, que envolvem sempre uma ou mais etapas de enriquecimento e meios seletivos de isolamento. Nesse sentido, a literatura registra, dentre outros, os trabalhos de McBride & Girard (1960), Gray & Killinger (1966), Mavrothalassitis (1977), Martin *et al.* (1984), Lee & McClain (1986), Doyle & Schoeni (1986), Loessner *et al.* (1988) e Curtis *et al.* (1989).

Por outro lado, foram realizados estudos específicos, motivados essencialmente pelos diversos surtos de listeriose humana com vítimas fatais, visando ao isolamento e à identificação de bactérias do gênero *Listeria*, especialmente a *L. monocytogenes*, a partir de alimentos. Nesse sentido, podem ser citados os trabalhos de Rodriguez *et al.* (1985), Hayes *et al.* (1986), Doyle & Schoeni (1986), Slade & Collins-Thompson (1987), Hao *et al.* (1987), Lovett *et al.* (1987), Buchanann *et al.* (1987), Bannerman & Bille (1988), Golden *et al.* (1988), Fraser & Sperber (1988), Van Netten *et al.* (1988), Pini & Gilbert (1988), Truscot & McNab (1988), McClain & Lee (1988), Brackett & Beuchat (1989), Buchanann *et al.* (1989) e McClain & Lee (1989).

Relativamente ao isolamento de *L. monocytogenes* a partir de amostras de carnes vermelhas e de aves e derivados, McClain & Lee (1988) desenvolveram um método específico e mais rápido do que o tradicional enriquecimento a frio (4°C). O método proposto pelos autores preconiza duas etapas de enriquecimento, nas quais são empregados, respectivamente, os caldos de enriquecimento primário e secundário seletivos para *Listeria* (LEB₁ e LEB₂). O caldo de enriquecimento de Donnelly & Baigent (1986) foi ligeiramente modificado para conter 20 ao invés de 40 mg/l de ácido nalidíxico, dando origem ao LEB₁. Já o LEB₂ resultou da adição de 25 ao invés de 12 mg/l de acriflavina ao LEB₁. Na fase de plaqueamento seletivo, os autores empregaram um meio de isolamento de alta seletividade para *Listeria*, o ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam (LPM), proposto por Lee & McClain (1986).

A multiplicidade de meios disponíveis para o isolamento de *Listeria* indica que não foi desenvolvido, ainda, um meio satisfatório para a detecção do microrganismo. Assim, Curtis *et al.* (1989) compararam a eficiência dos meios seletivos de isolamento, ágar McBride (MLA) e ágar base seletivo para *Listeria*, suplementado com cicloheximida, sulfato de colistina, acriflavina, cefotetana e fosfomicina (ágar Oxford), com vistas ao

isolamento de *L. monocytogenes* a partir de amostras clínicas contendo uma microbiota composta por 78 cepas de *Listeria* sp. e 44 de outros gêneros bacterianos. Os autores observaram que a recuperação de cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua* foi similar nos dois meios, mas cinco cepas de *L. seeligeri* foram inibidas no ágar Oxford e uma no MLA. Em relação aos outros gêneros, somente o *Staphylococcus* cresceu no ágar Oxford, enquanto quase todos os Gram-positivos e alguns Gram-negativos cresceram no MLA.

McClain & Lee (1989) propuseram uma modificação no suplemento do ágar Oxford de Curtis *et al.* (1989), substituindo a cicloheximida, a acriflavina, a cefotetana e a fosfomicina por dois mililitros de uma solução de moxalactam a 1% para cada 1.000 ml de base. O meio assim constituído recebeu a denominação de ágar MOX e o seu emprego foi sugerido para o isolamento de *L. monocytogenes* em amostras de carnes vermelhas, de aves e derivados.

O presente trabalho tem como objetivo comparar a eficiência de dois caldos de enriquecimento para *Listeria* (LEB₁ e LEB₂) e dois meios seletivos de plaqueamento, o ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam (LPM) e o ágar base seletivo para *Listeria*, suplementado com cicloheximida, acriflavina e ácido nalidixico (LSAB-CAN), no isolamento de listérias em amostras de carne bovina colhidas na indústria, no comércio e em água residuária de lavagem de carcaças bovinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 150 amostras, sendo 100 oriundas de um matadouro-frigorífico de bovinos, sob inspeção federal, localizado no município de Goiânia - GO. Destas 100 amostras, 70 eram de carne crua proveniente de carcaças aptas para o consumo e 30 de água residuária obtida após a operação de lavagem das meias-carcaças. As outras 50 eram constituídas por carne bovina moída, adquiridas em casas de carnes, açougues e supermercados.

Durante os trabalhos normais de abate foram colhidas 70 amostras de carne bovina, em três pontos distintos do fluxograma de produção: antes, depois do resfriamento e durante a desossa. Assim, ao longo do estudo foram obtidas: a) *na ante-câmara*, ou seja, antes do resfriamento, 20 amostras correspondentes a 20 meias-carcaças; b) *no tendal*, depois do resfriamento, 20 amostras relativas às mesmas meias-carcaças; c) *na sala de desossa*, 30 amostras de retalhos de carne oriunda da operação de desossa manual aérea do traseiro especial, porém, sem possibilidades de identificação das carcaças originais.

Com auxílio de bisturi de lâmina fixa e pinça anatômica esterilizados foram colhidos, em condições de assepsia, cerca de 50 gramas de carne de diversos pontos da região cervical da meia-carcaça, próximo ao local da incisão para sangria. Esta região foi escolhida por se evitarem possíveis danos econômicos gerados por depreciação e por se tratar de um local supostamente mais contaminado, em decorrência da operação de sangria, na qual podem ocorrer contaminações tendo como origem a faca, a pele, os pêlos, sangue e o próprio operário.

As amostras de retalhos de carne oriundas do traseiro especial foram colhidas adotando-se o mesmo procedimento descrito para as amostras obtidas na região cervical

das meias-carcaças, tendo-se o cuidado de compor cada uma delas com porções de carne recolhidas diretamente sobre as mesas de aço inoxidável utilizadas na limpeza individual dos cortes de carne. A mesma conduta foi observada com relação às porções obtidas nas caixas plásticas onde foram reunidos todos os retalhos provenientes da operação de desossa.

Uma vez colhidas, as amostras foram depositadas em frascos de Erlenmeyer de 250 ml, esterilizados e, a seguir, acondicionadas em caixas de material isotérmico contendo gelo triturado, nas quais foram transportadas ao laboratório.

Em casas de carnes, açougues e supermercados localizados em 12 bairros/setores de Goiânia foram adquiridos, na condição de consumidor, 150 gramas de carne de primeira ou segunda qualidade. No momento da pesagem, a carne era empacotada em embalagem plástica e posteriormente protegida por papel bobina, habitualmente empregado por aqueles estabelecimentos.

De cada amostra colhida foram pesados, assepticamente, 25 g de carne e homogeneizados por liquidação durante um minuto com 225 ml de caldo de enriquecimento primário "LEB₁" (McClain & Lee 1988). Posteriormente, verteu-se o homogeneizado em um Erlenmeyer de 250 ml esterilizado, que foi mantido em incubadora para B.O.D. a 30°C por 48 horas.

Após homogeneização manual, a amostra de 120 ml de água foi filtrada em algodão em funil de vidro, ambos esterilizados, visando à retirada de elementos grosseiros como porções de carne, gordura, coágulos sangüíneos e esquirulas ósseas oriundas da divisão da carcaça em duas meias-carcaças e da operação de serragem do peito. A seguir, 100 ml do filtrado foram concentrados em membrana de éster de celulose de 47 mm de diâmetro e poros de 0,45 micrômetros ("Millipore"), através de filtração a vácuo. Concluída a concentração, a membrana foi retirada do suporte do filtro com auxílio de uma pinça esterilizada e levada a um frasco de Erlenmeyer contendo 100 ml do caldo de enriquecimento primário "LEB₁", onde foi cortada em pequenos pedaços com tesoura esterilizada. Em seguida, o frasco foi mantido em incubadora para B.O.D. a 30°C por 48 horas.

Após a incubação, de cada cultura de enriquecimento primário foi retirada uma alíquota de 0,1 ml e inoculada em 10 ml de caldo de enriquecimento secundário "LEB₂" (McClain & Lee 1988). O caldo inoculado permaneceu na incubadora para B.O.D. a 30°C por 48 horas.

Com o auxílio de uma zaragatoa, a cultura de enriquecimento secundário foi semeada diretamente em ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam (LPM) (Lee & McClain 1986) e em ágar base seletivo para *Listeria* suplementado com cicloheximida, acriflavina e ácido nalidíxico (LSAB-CAN), uma modificação do meio de Curtis *et al.* (1989). Na área de meia placa de cada meio seletivo, a alíquota transportada pela zaragatoa foi espalhada, tendo por finalidade proporcionar uma semeadura pesada. A outra metade foi estriada com alça de níquel-cromo de três milímetros de diâmetro, através da técnica de esgotamento, visando à obtenção de colônias isoladas. Após a inoculação, as placas foram mantidas em incubadora para B.O.D. a 30°C por 48 horas para o ágar LPM e por 24-36 horas para o ágar LSAB-CAN.

Com a finalidade de eliminar parte da microbiota contaminante, foi retirada uma alíquota de 1,0 ml das culturas de enriquecimento primário e secundário, sendo esta homogeneizada rapidamente em tubo contendo 4,5 ml de solução de hidróxido de potássio a 0,25%. Após a homogeneização e dentro do limite de tempo de um minuto, foi realizada a semeadura do homogeneizado nos ágar LPM e LSAB-CAN. A técnica de semeadura, a temperatura, bem como os períodos de incubação foram idênticos aos adotados para o plaqueamento seletivo após o enriquecimento secundário.

Após a incubação, as placas de ágar LPM foram submetidas à leitura sob uma fonte de luz oblíqua, em ângulo de 45°. Transiluminadas, as colônias de *Listeria* apresentaram uma coloração verde-azulada ou branca.

Três colônias suspeitas de pertencerem ao gênero *Listeria* foram retiradas de cada placa dos meios seletivos LPM e LSAB-CAN e purificadas em placas de ágar trypticase-soja com extrato de levedura (TSA-YE). Após a estriação, as placas foram mantidas em incubadora para B.O.D. a 30°C por 24-36 horas. Para certificação da pureza das culturas, as placas foram submetidas à transiluminação. À partir destas culturas, procedeu-se à verificação da morfologia bacteriana em esfregaços corados pelo método de Gram e às provas de hemólise (Lovett 1987, McClain & Lee 1988) e identificação bioquímica (Lovett 1988).

Na análise estatística dos resultados empregou-se teste para comparação entre duas proporções segundo Snedcor & Cochran 1980.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A detecção de *Listeria*, segundo o método de isolamento, pode ser vista na Tabela 1. Verifica-se que, partindo-se do caldo de enriquecimento primário associado à passagem pela solução de hidróxido de potássio a 0,25% (LEB₁KOH) e empregando-se o ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam (LPM) como meio seletivo, não foi possível isolar nenhuma cepa de bactéria do gênero *Listeria*. No entanto, com o emprego do caldo de enriquecimento secundário (LEB₂) e do ágar LPM foi possível obter, a partir de seis amostras, 14 isolamentos, que passaram a 17 em nove amostras, quando o caldo foi associado à passagem pela solução de hidróxido de potássio (LEB₂KOH).

Por outro lado, fazendo-se uso do LEB₁KOH e tendo-se o ágar base seletivo para *Listeria* suplementado com cicloheximida, acriflavina e ácido nalidíxico (LSAB-CAN) como meio seletivo, foi possível obter 14 isolamentos de *Listeria* spp., que passaram a 22 com o uso do LEB₂ ou LEB₂KOH.

Depreende-se ainda da análise da Tabela 1 que o desempenho do caldo de enriquecimento secundário (LEB₂) e deste associado à passagem pela solução de hidróxido de potássio (LEB₂KOH) foi superior ao do caldo de enriquecimento primário combinado com a passagem pela solução alcalina (LEB₁KOH), permitindo, portanto, um maior número de isolamentos de *Listeria* spp. Esse melhor desempenho do LEB₂/LEB₂KOH em relação ao LEB₁KOH pode ser explicado pela maior seletividade do primeiro e pela seleção prévia da microbiota, ocorrida durante o enriquecimento primário.

Tabela 1: Detecção de *Listeria*, segundo o método de isolamento, empregando-se dois meios seletivos de enriquecimento (LEB₁ e LEB₂) associados a dois ágar seletivos de isolamento (LPM e LSAB-CAN) e resultados do teste de Z.

Procedimento	Nº amostras (+)/ Nº isolamentos	Total ¹	%
LEB ₁ KOHLPM	0/0	0/0	
LEB ₂ LPM	6/14(6+8)		
LEB ₂ KOHLPM	9/17(9+8)	23/25	92,00
LEB ₂ LPM/LEB ₂ KOHLPM	8		
LEB ₁ KOHL SAB-CAN	13 ² /14(13+1)		
LEB ₂ LSAB-CAN	13 ² /22(13+7+2)		
LEB ₂ KOHL SAB-CAN	13 ² /22(13+1+7+1)	24/25	96,00
LEB ₁ KOHL SAB-CAN/	1		
LEB ₂ KOHL SAB-CAN			
LEB ₂ LSAB-CAN/	7		
LEB ₂ KOHL SAB-CAN			
LEB ₂ LSAB-CAN	2		
LEB ₂ KOHL SAB-CAN	1		

1 - Número de amostras positivas/Total de amostras positivas do experimento.

2 - Refere-se às mesmas amostras.

Valor de Z calculado: -1,458 (não significativo pelo teste de diferença entre duas proporções). Valor de Z tabelado: -1,96.

Em que pese a obtenção de um maior número de isolamentos com o emprego do ágar LSAB-CAN como meio seletivo, o número de amostras isoladas a partir dos dois meios, ágar LPM ou LSAB-CAN, foi muito semelhante, 23/25 e 24/25, respectivamente, proporcionando percentuais de 92 e 96%, respectivamente. Esses percentuais, quando comparados estatisticamente pelo teste de diferença entre duas proporções, não apresentaram diferença significativa ($p=0,1442$). Durante o levantamento bibliográfico não foram constatados estudos comparando os dois meios de isolamento seletivo com vistas à detecção de *Listeria* spp. a partir de carnes naturalmente contaminadas.

Com referência à contaminação da carne bovina, os resultados encontrados na literatura mostram grandes discrepâncias devido, provavelmente, não só aos aspectos regionais, mas também à inexistência de uma metodologia padrão empregada para o isolamento de *Listeria* em carnes e derivados. Entretanto, o ágar LPM tem sido utilizado com sucesso como meio seletivo para a detecção de *L. monocytogenes* em carnes (McClain & Lee 1988). Mostrou-se, também, eficiente e seletivo no isolamento e enumeração desta bactéria, injuriada e não injuriada, em presunto (Cassiday *et al.* 1989). Quando comparados ao ágar modificado de Vogel-Johnson (MVJ) para a detecção de *Listeria* spp. em carnes frescas de bovinos, aves e alimentos marinhos, os dois meios mostraram-se aproximadamente equivalentes (Buchanan *et al.* 1989).

Destro (1990) examinou 140 amostras de carne, leite e derivados adquiridas no comércio varejista de Campinas, SP, empregando os ágar LPM e MVJ, em paralelo, como meios de isolamento seletivos para *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*. De um total de 67 amostras positivas para *Listeria* spp., 59 (88%) foram detectadas simultaneamente nos dois meios; 3 (4,5%) propiciaram isolamentos somente a partir do ágar PM e 5 (7,5%), do ágar MVJ. Das 45 amostras positivas para *L. monocytogenes*, 9 (20%) foram obtidas simultaneamente dos dois meios; 4 (9%) forneceram resultado positivo somente a partir do ágar LPM e 32 (71%), do MVJ.

O ágar LPM apresenta o inconveniente da necessidade de transiluminação para o reconhecimento das colônias e, neste aspecto, torna-se suplantado pelo ágar LSAB-CAN, que dispensa tal procedimento, uma vez que em sua formulação inclui-se um sistema indicador/revelador que facilita a visualização das colônias suspeitas de pertencerem ao gênero *Listeria*. Além disso, neste último meio as colônias consideradas suspeitas podem ser examinadas, a olho nu, em 12-24 horas, sendo este mais um fator limitante no uso do ágar LPM.

No que se refere ao meio seletivo de isolamento proposto por Curtis *et al.* (1989), denominado ágar Oxford (ágar base seletivo para *Listeria* + suplemento), deve-se salientar que os autores empregaram-no, originalmente, em paralelo com o ágar McBride para o isolamento de *L. monocytogenes* a partir de amostras de material clínico, contendo uma microbiota muito diversificada. A recuperação de *L. monocytogenes* e *L. innocua* foi similar nos dois meios.

Por outro lado, McClain & Lee (1989) modificaram ligeiramente o suplemento original de Curtis *et al.* (1989), denominaram o meio resultante de ágar Oxford modificado (MOX) e sugeriram seu emprego no isolamento de *L. monocytogenes* a partir de amostras de carnes vermelhas e de aves e derivados.

Em decorrência das dificuldades e irregularidades observadas na detecção das bactérias do gênero *Listeria* a partir de amostras de alimentos, muitos pesquisadores têm empregado, em paralelo, na fase de plaqueamento, dois meios seletivos de isolamento. Conseqüentemente, tornam-se necessários estudos envolvendo os diversos meios de plaqueamento disponíveis, objetivando a escolha da melhor combinação para o isolamento de *Listeria* em amostras de carnes vermelhas e de aves e derivados.

CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- independentemente do ágar seletivo empregado, o desempenho do caldo de enriquecimento secundário (LEB₂ e LEB₂KOH) foi superior ao do caldo de enriquecimento primário (LEB₁KOH).
- o ágar cloreto de lítio-feniletanol-moxalactam (LPM) e o ágar base seletivo para *Listeria*, suplementado com cicloheximida, acriflavina e ácido nalidíxico (LSAB-CAN), foram estatisticamente equivalentes ($p=0,1442$) em relação ao número detectado de amostras positivas para *Listeria* spp., embora o ágar LSAB-CAN tenha proporcionado um maior número de isolamentos para este gênero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Babberman, E. S. & J. Bille. 1988.** A new selective medium for isolating *Listeria* spp. from heavily contaminated material. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (1): 165-7.
- Brackett, R. E. & L. R. Beuchat. 1989.** Methods and media to the isolation and cultivation of *L. monocytogenes* from various food. *Int. J. Food Microbiol.*, 8: 219-223.
- Buchanan, R. L., H. G. Stahl, & D. L. Archer. 1987.** Improved plating media for simplified, quantitative detection of *L. monocytogenes* in foods. *Food Microbiol.*, 4: 269-275.
- Buchanan, R. L. 1989.** Comparison of lithium-chloride-phenylethanol-moxalactam and modified Vogel-Johnson agars for detection of *Listeria* spp. in retail level meats, poultry and seafood. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 599-603.
- Cassiday, P. K., R. E. Brackett & L. R. Beuchat. 1989.** Evaluation of ten selective direct plating media for enumeration of *L. monocytogenes* in hams and oysters. *Food Microbiol.*, 6: 113-25.
- Curtis, G. D. W. 1989.** Selective differential medium for the isolation of *L. monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8: 95-8.
- Destro, M. T. 1990.** Isolamento de *Listeria* spp. e estudo de sua ocorrência em carnes, leite e derivados. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP. 73 p.
- Donnelly, C. W. & G. J. Baigent. 1986.** Method for flow cytometric detection of *L. monocytogenes* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 689-95.
- Doyle, M. P. & J. L. Schoeni. 1986.** Selective-enrichment procedure for isolation of *L. monocytogenes* from fecal and biologic specimens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 1127-29.
- Fraser, J. A. & W. H. Sperber. 1988.** Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. *J. Food Prot.*, 51: 762-5.
- Golden, D. A., L. R. Beuchat & R. E. Brackett. 1988.** Evaluation of selective direct plating media for their suitability to recover uninjured, heat-injured and freeze-injured *L. monocytogenes* from foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 1451-6.
- Gray, M. L. & A. H. Killinger. 1966.** *L. monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.*, 30: 309-382.
- Hao, D. Y., L. R. Beuchat & R. E. Brackett. 1987.** Comparison of media and methods for detecting and enumerating *L. monocytogenes* in refrigerated cabbage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 955-7.
- Hayes, P. S. 1986.** Isolation of *L. monocytogenes* from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 438-40.
- Klinger, J. D. 1988.** Isolation of *Listeria*: a review of procedures and future prospects. *Infection*, 16: S98-S105. (suppl. 2).
- Lee, W. H. & D. McClain. 1986.** Improved *L. monocytogenes* selective agar. *Environ. Microbiol.*, 52: 1215-7.

- Loessner, M. J. 1988.** Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria* spp. Appl. Environ. Microbiol., 54: 3003-7.
- Lovett, J., D. W. Francis & J. M. Hunt. 1987.** *L. monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. J. Food Prot., 50: 188-92.
- Lovett, J. 1988.** Isolation and enumeration of *L. monocytogenes*. Food Technol., 42:72-5.
- Martin, R. S., R. K. Sumarah & M. A. Mac Donald. 1984.** A synthetic based medium for the isolation of *L. monocytogenes*. Clin. Invest. Med., 7: 233-7.
- Mavrothalassitis, P. 1977.** A method for the rapid isolation of *L. monocytogenes* from infected material. J. Appl. Bacteriol., 43: 47-52.
- McBride, M. E. & K. F. Girard. 1960.** A selective method for the isolation of *L. monocytogenes* from mixed bacterial populations. J. Lab. Clin. Med., 55 : 153-7.
- McClain, D. & W. H. Lee . 1988.** Development of USDA-FSIS method for isolation of *L. monocytogenes* from raw meat and poultry. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71: 660-4.
- McClain, D. & W. H. Lee. 1989.** FSIS method for the isolation and identification of *L. monocytogenes* from processed meat and poultry products. Laboratory communication n° 57, revised 24 May . U. S. D. A., FSIS, Beltsville.
- Murray, E. G. D., R. E. Webb & M. B. R. Swann . 1926.** A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. J. Pathol. Bacteriol., 29: 407-439.
- Pini, P. N. & R. J. Gilbert. 1988.** A comparison of two procedures for the isolation of *L. monocytogenes* from raw chickens and soft cheeses. Int. J. Microbiol., 7: 331-7.
- Rodriguez, L. D. 1985.** Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* a partir de lait cru destiné a la consommation humaine. Can. J. Microbiol., 31: 938-41.
- Slade, P. J. & D. L. Collins-Thompson. 1988.** Two-stage enrichment procedures for isolating *L. monocytogenes* from raw milk. J. Food Sci., 53: 1694-5.
- Snedcor, G.W. W. G. Cochram. 1980.** Statistical methods. 7 ed. Iowa State University Press. 507p.
- Truscott, R. B. & W. B. McNab. 1988.** Comparison of media and procedures for the isolation of *L. monocytogenes* from ground beef. J. Food Prot., 51: 626-8.
- Van Netten, P., I. Perales & D. A. A. Mossel. 1988.** An improved selective and diagnostic medium for isolation and counting of *Listeria* spp. in heavily contaminated foods. Lett. Appl. Microbiol., 7: 17-21.