

## PESQUISA SOBRE A OCORRÊNCIA DE LISTERIA MONOCYTOGENES EM FEZES HUMANAS \*

Ernesto Hofer \*\*

*Foi pesquisada em 107 amostras de fezes procedentes de indivíduos com distúrbios intestinais a presença de Listeria monocytogenes.*

*Como processo de enriquecimento, as fezes foram semeadas em caldo triptose fosfatado e mantidas a 4°C durante 1 mês. Ao findar este prazo, foram os espécimes semeados em quatro meios seletivos: 1) Agar triptosado com 5 mcg/ml de Polimixina; 2) Agar triptosado com 50 cmg/ml de ácido nalidíxico; 3) Meio de Ralovich e cols (Agar com 5% de soro normal de cavalo, acrescido de 50 mcg/ml de ácido nalidíxico e 50 mcg/ml de tripaflavina (Bayer); 4) Uma modificação do meio de Ralovich (Agar triptosado, contendo 40 mcg/ml de ácido nalidíxico, 50 mcg/ml de acetato de tálio, 25 mcg/ml de tripaflavina e 0,3% de extrato de levedura).*

*Para reconhecimento das colônias suspeitas nos diferentes meios, fez-se uso da técnica de Henry. A identificação primária se baseou na observação da motilidade e nas características morfotintoriais, sendo a seguir, confirmada através das provas bioquímicas e sorológicas.*

*Três amostras de Listeria monocytogenes foram isoladas, caracterizando-se duas no sorotipo 4b e uma no tipo 1/2a.*

No transcurso do último decênio desenvolveram-se inúmeras investigações, que visaram primordialmente esclarecer os vários aspectos obscuros e controvertidos da epidemiologia da listeriose humana e animal (3, 5, 13, 22). Assim, acumularam-se novas e interessantes observações sobre outras fontes de infecção até então desconhecidas, sobre os possíveis mecanismos envolvidos na transmissão da *Listeria* e que culminaram, graças aos ensaios bacteriológicos, na caracterização de outra importante via de eliminação do microrganismo,

aquela exatamente efetivada através do trato gastro-entérico (7, 8, 16).

Esses dados vieram a se constituir em provas fundamentais para o reconhecimento definitivo da importância desempenhada pela via entérica, como ponto de localização e de provável manutenção da *Listeria monocytogenes*, caracterizando conclusivamente o seu mecanismo de acesso ao meio exterior, através das fezes.

Um dos fatores que mais concorreram para esse incremento, sem dúvida alguma decorreu do aperfeiçoamento das técnicas

\* Apresentado na IV Conferência Internacional sobre os Impactos Globais da Microbiologia Aplicada (GIAM IV), 23-28 de Julho de 1973. São Paulo.

\*\* Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz C. P. 926. Guanabara.  
Recebido para publicação em 5-3-1974

bacteriológicas utilizadas para o isolamento desse microrganismo, tendo como marco inicial desta fase a descrição do meio contendo ácido nalidíxico, por Beerens e Tahon-Castel (2). Paulatinamente, novos ensaios foram realizados nesse campo, destacando-se as investigações de Kramer e Jones (21) e mais recentemente de Ralovich e colaboradores (28), que obtiveram meios de elevado grau de seletividade para o isolamento de *Listeria*.

Considerando a importância atual do problema, aliada à ausência de investigações que tivessem assinalado este aspecto em nosso meio, motivou-nos a execução desse levantamento em amostras de fezes, assim como possibilitou-nos uma pequena avaliação do comportamento de diferentes meios seletivos para o isolamento de *Listeria monocytogenes*.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas ao total 107 amostras de fezes, provenientes de 75 indivíduos adultos e de 32 crianças (até 10 anos) portadoras de distúrbios gastro-entéricos, para os quais foram solicitados a realização de coproculturas, na tentativa de isolamento de enterobactérias patogênicas, como medida para o esclarecimento do quadro clínico.

Os espécimes, após homogeneização e diluição em caldo triptosado na proporção de duas alças de 4 mm de diâmetro do material em 5 ml do meio, foram inoculados em volumes de 0,5 ml em dois tubos, contendo 10 ml de caldo triptosado e fosfato (Difco) e incubados a 4°C durante trinta dias.

Ao findar esse prazo, considerado como a fase de enriquecimento, foram as amostras semeadas nos seguintes meios seletivos: 1) Agar triptosado (Tryptose Agar-Difco) com 5 mcg/ml de sulfato de Polimixina \*; 2) Agar triptosado contendo 50 mcg/ml de ácido nalidíxico\*\*; 3) Meio descrito por Ralovich e colaboradores (Agar triptosado com 5% de soro normal de cavalo, ao qual se adicionaram 50 mcg/ml de tripaflavina \*\*\* e 50 mcg/ml de ácido nalidíxico); 4) Modificação do meio de Ralovich (Agar triptosado acres-

cido de: 0.3% de extrato de levedura, 40 mcg/ml de ácido nalidíxico, 50 mcg/ml de acetato de tálio e 25 mcg/ml de tripaflavina).

As placas semeadas foram incubadas a 37°C durante 24 horas, principalmente no caso dos meios contendo polimixina e ácido nalidíxico, enquanto que, aquelas constituídas do meio de Ralovich e de sua modificação, permaneceram por 48 horas a 37°C.

De um modo geral, as placas foram ainda mantidas após esta incubação por mais de 24 horas à temperatura ambiente (entre 28 a 30°C), quando realmente se efetivaram as leituras definitivas das placas.

Como método para a seleção das colônias, foi empregado o processo da iluminação oblíqua de Henry (14), seguindo as recomendações descritas por Gray (12), no qual são consideradas colônias suspeitas de *Listeria*, nos meios incolores, como no caso daqueles constituídos de polimixina e ácido nalidíxico, todas as colônias que apresentam uma tonalidade variável do azul acinzentado à luz transmitida.

Nos meios contendo a tripaflavina, também se fez uso da técnica de Henry, sendo isoladas apenas as colônias de coloração amarelo esverdeada ligeiramente fluorescentes à luz direta, de superfície lisa, não elevadas e transparentes, principalmente nos bordos.

Após o reconhecimento preliminar, essas colônias foram isoladas, semeando-as para tubos contendo agar semi-sólido (caldo triptosado fosfato, Difco, com 0,4% de agar) e caldo triptosado, permanecendo à temperatura ambiente (28-30°C) entre 48 a 96 horas.

Aquelas amostras isoladas que revelaram a mobilidade característica do gênero *Listeria*, foram a seguir, analisadas em suas propriedades morfo-tintoriais (pequenos bacilos ou forma cocoide, Gram-positivos); e bioquímicas, adotando-se as recomendações técnicas de Seeliger (30), Bojsen-Moller (8) e Larsen (22). Somente após a execução e leitura das provas bioquímicas, foram as amostras tipificadas sorologicamente, de acordo com o processo de Donker-Voet (9, 10).

\* Sulfato de Polimixina B-Pfizer Quimica do Brasil.

\*\* Ácido nalidíxico-semicro la Wintrop Products Inc.

\*\*\* Cloreto 3,6 — Diamino-10 — Metilacridina da I. G. Farbenindustrie Aktiengesellschaft-Bayer.

A sensibilidade aos antibióticos foi investigada através do processo de difusão pelo sistema dos discos impregnados, (Multodiscos Oxoid, tipo Standard, código n.º 2033 E), acrescidos ainda dos seguintes discos isolados: Gentamina (Difco), Bacitracina (B-D Mérieux), Kanamicina (Difco), Neomicina (Difco); Ácido nalidixico (Difco); Polimixina B; Heclox (Laboratória Bristol) e Cefalotina sólida (Lilly).

O meio de cultura esteve representado pelo D.S.T. Agar Base (Oxoid), enquanto que, o inóculo, a incubação e a leitura, obedeceram à orientação dada por Bojsen-Moller (8).

## RESULTADOS

Nos 107 exames efetuados, foram isoladas, em três oportunidades, *Listeria monocytogenes*, reconhecidas preliminarmente sob o ponto de vista bioquímico e identificadas de modo conclusivo, por meio da técnica de aglutinação lenta, como pertencentes aos sorotipos 4b (amostras n.ºs 16/72 e 93/72) e 1/2a (amostra n.º 41/72).

Em relação ao comportamento dos diferentes meios seletivos empregados na fase de isolamento, ficou demonstrado a superioridade do meio de Ralovich modificado, que possibilitou o isolamento das três amostras ora estudadas. Situando-se em plano secundário, tem-se a fórmula original, descrita por Ralovich e colaboradores, propiciando o reconhecimento de *Listeria* em duas oportunidades, representadas pelas amostras dos sorotipos 1/2a (41/72) e 4b (93/72). Finalmente, assinala-se a posição ocupada pelo meio com ácido nalidixico, que revelou, em uma única ocasião, a presença de *Listeria* (amostra 93/72).

Convém salientar que a existência de numerosas colônias de microrganismos, principalmente representantes dos gêneros *Pseudomonas* e *Proteus*, constituíram-se na causa primordial da total ineficiência do meio contendo polimixina, no presente ensaio.

No que tange aos meios contendo tripaflavina, embora não tenham evidenciado uma erradicação absoluta dos contaminantes mais comuns, foram no entanto capazes de restringir a tal ponto o crescimento da flora de associação, refletindo

este aspecto no discreto número de colônias de tais microrganismos, que sempre evidenciaram uma posição de inferioridade quando confrontados aos de *Listeria*.

Os testes bioquímicos das amostras isoladas apresentaram os resultados que constam da tabela I.

Quanto ao aspecto da sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos, os resultados encontrados podem ser apreciados na tabela II.

A determinação do teor de aglutininas anti-*Listeria* nos soros dos portadores só foi efetivada após o isolamento dos microrganismos, isto é, aproximadamente dois meses após o início das coproculturas. Cumpre ainda destacar que somente se obtiveram os soros de dois dos portadores referentes às amostras n.ºs 16/72 e 93/72.

Os antígenos utilizados para a execução desta determinação (prova de aglutinação lenta) foram de natureza somática e propiciaram os resultados que estão assinalados na tabela III.

## DISCUSSÃO

Já se tornou notório entre os estudiosos desse microrganismo, que este poderá sem a intervenção de grandes recursos técnicos, ser isolado com relativa facilidade de determinados materiais, como por exemplo do líquido, de sangue ou do mecônio, normalmente isentos de germes contaminantes.

A presença do crescimento concomitante desses microrganismos tende a exercer uma extraordinária interferência nas fases de reconhecimento e isolamento de colônias suspeitas de *Listeria*, principalmente se os meios estão desprovidos de uma substância qualquer, de natureza impediente, controladora ou inibidora do crescimento da flora de associação.

Acresce ainda mais a importância desse problema, que muitos dos microrganismos considerados contaminantes elaboram nas diferentes fases do crescimento, substâncias com características peculiares, que podem exercer uma atividade inibitória no desenvolvimento normal das listérias, fenômeno este por sinal estudado detalhadamente por Larsen (22).

Todas essas dificuldades aqui assinaladas para o cultivo e em particular para o isolamento da *Listeria monocytogenes*, representam, sem dúvida alguma, um dos

TABELA I

Comportamento bioquímico das amostras isoladas

	A M O S T R A S		
	16/72	41/72	93/72
Arabinose	—	—	—
Dulcitol	—	—	—
Galactose	+	+	+
Glicose	+	+	+
Lactose	+4d	+7d	+8d
Maltose	+	+	+
Manitol	—	—	—
Mannose	+	+	+
Rhamnose	+3d	+	+
Salicina	+	+	+
Sorbitol	+7d	+7d	+4d
Sacarose	+10d	+6d	+11d
Xilose	—	—	—
Indol	—	—	—
H <sub>2</sub> S	—	—	—
VM	+	+	+
VP (Barrit)	+	+	+
Catalase	+	+	+
Mobilidade (30°C)	+	+	+

+: Reação positiva.

—: Reação negativa.

principais fatores determinantes do pouco êxito na identificação dessa bactéria, a partir de coproculturas.

Deve-se também levar em consideração, aliado ao detalhe supracitado, que a presença de *Listeria* nas fezes provavelmente se faz em número sempre bem inferior aos dos germes saprófitas, assim como a sua capacidade de adaptação e multiplicação nos meios de cultura se realizam de modo muito mais vagaroso que a maioria dos contaminantes.

Com o intuito de contornar tais problemas, inúmeras foram as tentativas que se concentraram em investigar o comportamento da *Listeria* diante de certas substâncias que tivessem a propriedade de restringir ou suprimir o crescimento da flora contaminante. Assim, na evolução desse aspecto, inicialmente foram experimentadas elevadas concentrações de cloreto de sódio (32), passando a seguir para as utilizações do telurito de potássio (11,30), do

álcool fenil etílico, isolado ou associando-o ao cloreto de lítio e a glicina (1,23), até que em épocas mais recentes surgiu a incorporação aos meios, de certos antibióticos, como a poliximina B (5,6) e o ácido nalidíxico (2).

Sem sombra de dúvida, o advento do recurso de meios seletivos contendo antibióticos veio a se constituir no ponto de maior aperfeiçoamento para as investigações atuais, que por ora se concentram em analisar com minúcias a distribuição de *Listeria monocytogenes* em vários âmbitos, possibilitando inclusive a Bojsen-Moller (8) isolar com relativa facilidade esta bactéria de fezes de indivíduos de espécie humana, normais e doentes.

Com a generalização do emprego do meio à base de ácido nalidíxico, surgiram maiores oportunidades de ensaiar sua combinação a outros elementos, com diferentes espectros de impediência, com intuito precípuo de obter um meio de elevada seleti-

TABELA II

Sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos das amostras isoladas

	Concentração	AMOSTRA		
		16/72	41/72	93/72
Bactrim	25 mcg	S	S	S
Ampicilina	2 mcg	S	S	S
Cloranfenicol	10 mcg	S	S	S
Penicilina	1,5 U	S	S	S
Meticilina	10 mcg	S	S	PS
Eritromicina	10 mcg	S	S	S
Tetraciclina	10 mcg	S	S	S
Sulfadiazina	50 mcg	S	S	S
Gentamicina	10 mcg	S	S	S
Ácido nalidixico	30 mcg	R	R	R
Kanamicina	30 mcg	PS	S	PS
Polimixina B	50 mcg	R	R	R
Bacitracina	5 U.	R	R	R
Celafotina	30 mcg	S	S	S
Heclox *		S	S	S

S = Sensível      PS = Pouco sensível      R = Resistente.

\* Constituição de 25 mcg de Hetaciclina e 12,5 mcg de dicloxacilina.

TABELA III

• Determinação da nível de aglutininas anti-*Listeria* dos soros 16/72 e 93/72.

ANTÍGENOS	S O R O S		
	4b	16/72	93/72
1/2a	—	1/20	1/10
4a	1/20	1/20	1/20
4b	1/320	1/160	1/320

vidade. Dentre todas as substâncias testadas, merece um destaque especial a tripaflavina, cuja observação inicial se deve a Ralovich e colaboradores (28). Ainda no que tange à associação do ácido nalidixico a outras substâncias, pontificam as experiências da junção ao meio do acetato de tálio, idealizado por Kramer e Jo-

nes (21) e Hofer (15), assim como uma nova agregação representada pela reunião do sulfocianeto de potássio à tripaflavina, de acordo com as experiências encetadas por Bockemühl e colaboradores (4).

Considerando portanto esta linha de investigação, foram efetuadas, no presente ensaio, algumas modificações no meio original de Ralovich, que consistiram nos seguintes aspectos: na retirada da fórmula, do soro normal de cavalo; nas diminuições das concentrações do ácido nalidixico e da tripaflavina; na introdução do acetato de tálio; na inclusão do extrato de levedura e finalmente, na utilização de um meio básico constante, representado pelo agar triptosado (Difco).

Muito embora o número de observações e os resultados auferidos nos isolamentos, não tenham possibilitado, por ora, maiores considerações, destacamos no entanto, que a fórmula modificada foi capaz de melhor evidenciar, sob os aspectos numérico e pela facilidade de identificação, as colônias de *Listeria*. Infere-se do exposto, que tal resultado, provavelmente se deve a determinadas circunstâncias, como excelente li-

mitação do crescimento exercida por esse meio modificado, sobre os microrganismos contaminantes.

Quanto à presença de *Listeria monocytogenes* em fezes humanas, provenientes de indivíduos hígidos ou portadores de distúrbios gastro-entéricos, merecem ser consignados os achados resultantes das investigações de Bojsen-Moller (6, 7, 8), de Kampelmacher e Noorle Jansen (18, 19), de Ralovich e colaboradores (27, 28) e de Ortel (25), em que de acordo com os dados obtidos, foram assinaladas, como porcentagens extremas de isolamento, as frequências entre 4,8 a 20,1%.

Confrontando todos esses inquéritos, verifica-se que um dos trabalhos realizados por Kampelmacher e Jansen (19), se destacou pela elevada frequência de reconhecimento da *Listeria*, em apenas 52 fezes pesquisadas e provenientes de funcionários de um laboratório de Saúde Pública local. Foram encontrados, nessa amostragem, 36 portadores de *Listeria* (69,2%) não demonstrando, curiosamente, nenhuma predominância nos isolamentos entre o grupo de laboratoristas (tendo contato frequente com *Listeria*) sobre o material do pessoal de escritório (sem contato com *Listeria*); salientam, ainda, a ocorrência em várias oportunidades, de uma mesma pessoa carrear concomitantemente dois tipos sorológicos distintos. Concluindo, assinalam que a alta frequência de isolamentos decorreu principalmente da utilização de oito amostras de fezes, de cada indivíduo.

Este fato mais uma vez veio atestar a tese emitida por Jessen e Bojsen-Moller (16) e Bojsen-Moller (7, 8), que baseados nos resultados de exaustivos ensaios nesse campo, avaliaram que na população humana da Dinamarca o número de pessoas excretoras de *Listeria*, através das fezes, estivessem em torno de 1%, ou mesmo, em determinadas condições ecológicas, atingissem a uma incidência bem mais elevada. Cabe, portanto, aos autores citados, o grande mérito de provar conclusivamente, que o trato intestinal desempenha, do ponto de vista bacteriológico e epidemiológico, uma função de um dos mais destacados, ou mesmo, o principal ponto de localização da *Listeria*, nas diferentes espécies animais.

Aliás, cumpre destacar que a possibilidade do trato intestinal representar a porta de entrada e de localização da *Listeria monocytogenes*, tinha sido sugerida por

Murray, Webb e Swann (24), já em 1926. Esta hipótese recebeu posteriormente apoio através das confirmações das experiências perpetradas por Julianelle (17), Rolle e Mayer (29) e por Osebold (26). Também encontramos na literatura citações sobre a ocorrência de diarréia entre os pacientes acometidos de listeriose (30, 31).

Em relação às três amostras isoladas na presente investigação, salienta-se que estas adviram de indivíduos adultos, todos situados na mesma faixa etária (20-29 anos), sendo dois representantes do sexo masculino e uma do feminino. Eram portadores de problemas da esfera gastro-entérica, não tendo sido, porém, evidenciado em nenhuma oportunidade a presença de enterobactérias patogênicas (*Salmonella*, *Shigella* ou *Escherichia*), bem como, as pesquisas de formas vegetativas, de cistos de protozoários e de ovos de helmintos, redundaram negativas.

Por outro lado, a determinação do título de anticorpos séricos, em dois dos portadores de *Listeria* (amostras n.ºs 16/72 e 93/72), caracterizaram-se por títulos relativamente altos e com acentuado grau de especificidade para o tipo sorológico, que, de acordo com a orientação imprimida por Seeliger (30), podem ser interpretados como positivos, sugerindo um estado de natureza infecciosa determinado pela presença da *Listeria*.

Quanto aos resultados alcançados na determinação da sensibilidade das amostras diante dos antibióticos e quimioterápicos, demonstraram uma nítida concordância dos achados com aqueles obtidos por Bojsen-Moller, acentuando-se particularmente a resistência apresentada pelas amostras à poliximina, à bacitracina e ao ácido nalidixico. Da mesma forma, o comportamento irregular das reações em presença da kanamicina e da metecilina, também são dados que se assemelham com as observações do autor supracitado.

Finalmente, em dois dos portadores de *Listeria* (das amostras n.ºs 16/72 e 93/72) foi possível obter algumas informações relacionadas às condições sanitárias do meio de suas convivências. Todavia, nenhum esclarecimento de maior vulto pode ser relacionado ao problema epidemiológico em questão, uma vez que não foram relatadas circunstâncias que comprovassem, por exemplo, a existência ou o contato com qualquer espécie animal, ou da presença

entre os membros mais próximos da família, de algum elemento com os mesmos problemas entéricos, ou que algum tenha relatado história recente ou passada da ocorrência de abortos habituais ou que ainda, tenham tido ou tenham, atividades profissionais que envolvam contatos com produtos de origem animal.

#### AGRADECIMENTOS

A Sra. Maria de Lourdes Sant'Ana Pereira e ao Sr. José Gonçalves da Silva, técnicos do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia, os nossos sinceros agradecimentos pela cooperação dada nas tarefas auxiliares.

#### S U M M A R Y

*The occurrence of Listeria in faeces was investigated in 107 samples of persons with enteric disturbance. For enrichment, Tryptose Phosphate broth was used and incubated at 40°C for 4 weeks. Subsequent at the cold-enrichment, the cultures were streaked on plates of four selective media: Tryptose agar with 5 mcg/ml of polymyxin B; Tryptose agar with 50 mcg/ml of nalidixic acid; Trypaflavin-Nalidixic acid, described by Ralovich and a modification introduced in the last medium (Tryptose agar containing 40 mcg/ml of nalidixic acid, 50 mcg/ml of tallous acetate and 25 mcg/ml of trypaflavin). Identification of suspected colonies was read under a scanning microscope using the oblique light technique according to Henry (14).*

*In three of these faecal specimens, Listeria was isolated: two strains belonged to serotype 4b against only one to type 1/2a.*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEARNS, R.E. & GIRARD, K.F. — On the isolation of *Listeria monocytogenes* from biological specimens. *Am. J. Med. Technol.*, 25: 120-126, 1959.
- BEERENS, H. & TAHON — CASTEL M.M. — Milieu à l'acide nalidixique pour l'isolement des streptocoques, *D. pneumoniae*, *Listeria*, *Erysipelothrix*. *Ann. Inst. Pasteur*, 111: 90-93, 1966.
- BLENDEN, D.C. & SZATALOWICZ, F.T. — Ecologic aspects of *Listeriosis*. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 151: 1761-1766, 1967.
- BOCKEMÜHL, J., SEELIGER, H. P. R. & KATHKE, R. — Acridinfarbstoffe in Selektivährböden zur Isolierung von *Listeria monocytogenes*. *Med. Microbiol. Immunol.*, 157: 84-95, 1971.
- BOJSEN-MOLLER, J. — Studies on the growth and isolation of *Listeria monocytogenes* at low temperature. *Second Symp. Listeric Infection* (Ed. M.L. Gray). — Bozeman, Montana State College, pg 169-182, 1963.
- BOJSEN-MOLLER, J. — Growth of *Listeria monocytogenes* in mixed cultures and isolation from faeces after incubation 40°C. *Proc. Third Internat. Symp. Listeriosis, Bilthoven*, pg. 51-63, 1966.
- BOJSEN-MOLLER, J. & JESSEN, O. — Occurrence of *Listeria monocytogenes* in human faeces: Epidemiological and Pathogenic Aspects. *Proc. Third Internat. Symp. Listeriosis, Bilthoven*, pg. 415-421, 1966.
- BOJSEN-MOLLER, J. — Human *Listeriosis*. *Diagnostic, Epidemiological and Clinical Studies*. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, section B. suppl. 229, 157, pg., 1972.
- DONKER-VOET, J. — A serological study of some strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan. *Am. J. Vet. Res.*, 20: 176-179, 1959.
- DONKER-VOET, J. — A serological study of some strains of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Third Internat. Symp. Listeriosis, Bilthoven*, pg. 133-137, 1966.
- GRAY, M.L., STAFSETH, H.J. & THORP, F. — The use of sodium azide, potassium tellurite, and acetic acid in a selective medium for isolation of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, 59: 443-444, 1950.
- GRAY, M.L. — A rapid method for the detection of colonies of *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakt. Abt. I Orig.*, 169: 373-379, 1957.

13. GRAY, M.L. & KILLINGER, A.H. — *Listeria monocytogenes* and Listeric Infections. *Bact. Rev.* 30: 309-382, 1966.
14. HENRY, B.S. — Dissociation in the genus *Brucella*. *J. Inf. Dis.*, 52: 374-402, 1933.
15. HOFER, E. — Ensaio sobre a utilização de um meio com ácido nalidíxico e acetato de tálho para o isolamento de *Listeria*. Apresentado no III Congresso Brasileiro de Microbiologia, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1871.
16. JESSEN, O. & BOJSEN-MOLLER, J. — The frequency and the clinical types of human listeriosis. A four year study in Denmark. Second Symp. Listeric Infections, Bozeman, Montana College State, pg. 255-262, 1963.
17. JULIANE7LLE, L.A. — The function of *Listerella* in infection. *Ann. Int. Med.*, 14: 608-620, 1940.
18. KAMPELMACHER, E.H. & van NOORLE JANSEN, L.M. — Isolation of *Listeria monocytogenes* from faeces of clinically healthy humans and animals. *Zbl. Bat. I Abt. Orig.*, 211: 353-359., 1969.
19. KAMPELMACHER, E.H. & van NOORLE JANSEN, L.M. — Further studies on the isolation of *L. monocytogenes* in clinically healthy individuals. *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A.* 221: 70-77, 1972.
20. KAMPELMACHER, E.H. & van NOORLE JANSEN, L.M. — Isolierung von *L. monocytogenes* mittels Nalidixinsäuretrypaflavin. *Zbl. Bakt Hyg., I. Abt. Orig. A.* 221: 139-140, 1972.
21. KRAMER, P. & JONES, D. — Media selective for *Listeria monocytogenes*. *J. appl. Bact.*, 32: 381-394, 1969.
22. LARSEN, E.H. — *Listeria monocytogenes*. Studies on Isolation Techniques and Epidemiology. Thesis. Carl Fr. Mortensen. Copenhagen. 256 pg. 1969.
23. McBRIDE, M.E. & GIRARD, K.F. — A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. *J. Lab. Clin. Med.*, 55: 153-157, 1960.
24. MURRAY, E.G.D., WEBB, R.A. & SWANN, M.B.R. — A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. s.). *J. Path. Bact.*, 29: 407-439, 1926.
25. ORTEL, S. — Ausscheidung von *Listeria monocytogenes* im Stühl fesunder Personen. *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, 217: 41-46, 1971.
26. OSEBOLD, J.W. — Some aspects of the pathogenesis of listeriosis. Second Symp. Listeric Infection, Bozeman, Montana State College, pg. 109, 1963.
27. RALOVICH, B., FORRAY, A., MÉRO, E. & MÁLOVICS, H. — Additional Data on Diagnosis and Epidemiology of *L. monocytogenes*. *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, 214: 231-235, 1970.
28. RALOVICH, B., FORRAY, A., MÉRÖ, E., MÁLOVICS, H. & SZÁZADOS, I. — New selective medium for isolation of *L. monocytogenes*. *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, 216: 88-91, 1971.
29. ROLLE, M. & MAYER, H. — Zur Pathogenese der Listeriose. *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*, 166: 479-483, 1956.
30. SEELIGER, H.P.R. — Listeriosis, 2 nd ed. Hafner Publishing Co. Inc., New York, 308 pg., 1961.
31. SEELIGER, H.P.R., WINKHAUS, I., ANDRIES, L. & VIEBAHN, A. — Die Isolierung von *Listeria monocytogenes* aus Stuhl, Klärschlamm und Erdproben. Schweiz. Z. Path. Mikrobiol., 28: 590-601, 1965.
2. WRAMBY, G.O. — Citado por Gray, M.L. & Killinger, A.H. in *Listeria monocytogenes* and Listeric Infections 1944.