

*Listeria monocytogenes*의 신속검출을 위한 선택배지 및 multiplex PCR 기법 개발

정병열*, 임현숙¹, 정석찬

국립수의과학검역원, ¹대구광역시 보건환경연구원

(게재승인: 2003년 4월 30일)

Development of Differential Media and Multiplex PCR Assays for the Rapid Detection of *Listeria monocytogenes*

Byeong-yeal Jung*, Hyun-sook Lim¹, Suk-chan Jung

National Veterinary Research and Quarantine Service, MAF,

¹Research Institute of Public Health & Environment, Daegu

(Accepted: April 30, 2003)

Abstract: *Listeria (L.) monocytogenes* in samples could not be detected occasionally by faster growth of other *Listeria* spp. especially *L. innocua*. The aim of this study was to develop the differential media and multiplex polymerase chain reaction (PCR) assays for the rapid detection of *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* colonies were characterized by their β -hemolysis with fluorescence under 366 nm UV light on the *Listeria* hemolysis agar (LHA). *L. innocua*, a species commonly present in foods, did not produce β -hemolysis on LHA. Therefore, one or more colonies of *L. monocytogenes* were easily distinguished from large populations of *L. innocua*. The multiplex PCR assays were developed to distinguish from *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. with two pairs of primers. The primers were designed in 16S rRNA and listeriolysin O gene for specific amplification of all members of the genus *Listeria* and *L. monocytogenes*, respectively. The multiplex PCR assays produced 560 and 938 bp products in *L. monocytogenes*; only 938 bp products in the genus *Listeria*. The multiplex PCR assays could detect as little as 50 pg of *L. monocytogenes* DNA. These results indicated that the differential media and multiplex PCR assays might be useful diagnostic tools for the rapid detection of *L. monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*, differential media, multiplex PCR

서 론

Listeria 속균은 운동성이 있는 그람양성균으로서 *L. monocytogenes*를 비롯하여 *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murrayi* 등 7종이 분포하나, 유전자 상관관계에 따라 *L. murrayi*를 *L. grayi*

에 포함시키기도 한다 [15]. *Listeria* 속균 중 *L. monocytogenes*만이 사람의 listeriosis에 관련된 인수공통전염 병원균이며, 균체항원과 편모항원에 근거하여 13종의 혈청형이 존재하나 1/2a, 1/2b, 4b가 분리균주의 대부분을 차지하고 있다. 사람에서의 *Listeria* 감염증은 주로 *L. monocytogenes*에 오염된 식품을 통한 경우가 많으며, 특

This work was supported by the Korea Agricultural Research and Development Promotion Center (grant No. 298014-3).

* Corresponding author: Byeong-yeal Jung

National veterinary research and quarantine service, 480, Anyang 6 dong, Anyang city, Gyunggi Province, 430-824, Korea
Tel: +82-31-467-1733, Fax: +82-31-467-1740, E-mail:jungby@nvrqs.go.kr

히 임신부, 신생아, 노인에게 감염될 경우 유산, 중추신경계 감염, 균혈증, 심내막염 등을 유발하기도 한다 [8].

*L. monocytogenes*는 토양 등 자연환경에 널리 존재할 뿐만 아니라 냉장상태에서도 증식할 수 있어, 냉장 및 냉동식품의 소비가 급격히 증가하는 요즘 본 균의 오염 문제가 심각히 대두되고 있다. 최근에는 식품중 *Listeria* 속균의 오염유무를 신속히 검출하기 위해서 단클론 항체를 이용한 ELISA 키트 [4], 또는 immunochromatographic assay 키트 (Oxoid FT0401) 등이 개발되어 있다. 그러나 이들 키트에 사용되고 있는 항체가 *Listeria* 속균에 모두 반응하기 때문에 키트로 스크리닝한 결과가 양성인 시료에 대해서도 계속 균분리 동정을 실시하여 *L. monocytogenes* 오염유무를 확인하여야 하는 번거로움이 있다.

International Organization for Standardization (ISO)에서 추천하는 Palcam 배지 또는 Oxford 배지는 모두 esculin 분해능을 기초로 하여 *Listeria* 속균의 분리를 시도하고 있으나 이 배지에서 *L. monocytogenes*와 다른 *Listeria* 속균을 구분하는 것은 불가능하다. 더욱이 esculin을 분해하는 세균들은 *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus* 등 여러 균종들이 있을 뿐 아니라 [18], *L. monocytogenes*와 다른 *Listeria* 속균과 혼합 오염에 대한 보고가 많아 [17], esculin 분해능에만 의존하여 균분리를 실시하는 것은 한계가 있다. 한편 최근에는 *L. monocytogenes*의 β -hemolysis를 이용한 선택배지 개발이 보고되고 있다 [7, 14].

*L. monocytogenes*의 분리동정은 주로 미국의 FDA 또는 USDA법을 따라 실시하고 있으나 실험시간이 1주일 이상 소요되며, listeriolysin O (*hlyA*), *iap* 또는 *dth* 유전자를 이용한 hybridization기법은 민감도가 낮으므로 최근에는 *L. monocytogenes*의 특이유전자를 이용한 PCR기법이 많이 소개되고 있다 [1].

본 연구의 목적은 식품중에 *L. monocytogenes*와 다른 *Listeria* 속균의 혼합 오염시 *L. monocytogenes*를 효율적으로 분리할 수 있는 선택배지를 개발하고, 또한 multiplex PCR기법을 이용하여 *L. monocytogenes*를 신속히 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에 사용된 균주는 Table 1에 나타난 바와 같으며, 각 균종별로 최적발육조건에서 배양하여 실험에 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains used in this study

Organisms	Source
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC* 15313
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19113
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19114
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19115
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19117
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19118
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 35152
<i>L. innocua</i>	NCTC 11288
<i>L. ivanovii</i>	ATCC 19119
<i>L. seeligeri</i>	ATCC 35967
<i>L. murrayi</i>	ATCC 25401
<i>L. grayi</i>	ATCC 19120
<i>L. welshimeri</i>	ATCC 35897
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Actinomyces pyogenes</i>	field isolate, NVRQS
<i>Aerococcus spp.</i>	field isolate, NVRQS
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	field isolate, NVRQS
<i>Staphylococcus aureus</i>	field isolate, NVRQS

* ATCC, American Type Culture Collection; NCTC, National Culture Type Collection.

Listeria hemolysis agar (LHA) 제작

*L. monocytogenes*를 효율적으로 분리하기 위하여 Beumer et al [5]에 준하여 아래의 변법으로 LHA 배지를 제작하였다. 즉 trypticase soy blood agar base EH (Difco, USA) 40 g과 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (MU β G; Sigma, USA) 50 mg을 증류수 1 liter에 녹여서 고압 증기 멸균한 후 50°C로 식혀서 기본배지를 준비하고, Palcam supplement (Merck 12122) 2 vials 및 여과 멸균된 lithium chloride (Sigma) 7.5 g과 nalidixic acid (Sigma) 40 mg 및 멸균 PBS (pH 7.2)로 2회 원심수세된 신선한 탈삼유 면양혈액 50 ml을 첨가하여 LHA배지를 제작하였다.

Listeria 속균의 분리방법 및 선택배지별 분리효율 조사

Listeria 속균의 분리방법은 USDA법 [12]을 사용하였다. 도계장에서 닭의 장내용물 50건을 수거하여 10 ml UVM I broth (LAB M, UK)에 접종하여 30°C, 24시간 배양한 후 배양액 0.1 ml을 9.9 ml Fraser broth (Difco)에 재접종하여 30°C, 48시간동안 2차 증균을 실시하였다. 2차 증균액을 Palcam agar (PAL; Difco) 배지, Oxford agar (OX; Difco) 배지 및 제작된 LHA배지에 각각 접종하여 37°C, 48시간 배양하였다. PAL배지, OX배지에서는 esculin을 분해한 검은색 집락을 선택하고, LHA배지에

서는 자외선 조사시 형광을 나타내는 균주를 대상으로 하였으며, 선택배지별로 5~10개의 *Listeria* 유사 집락을 택하여 순수배양한 후 생물화학적 성상시험 등을 이용한 균동정을 실시하였다.

Primers

본 연구에서 제조된 primers의 염기서열과 증폭부위는 Table 2에 나타난 바와 같다. UI primer는 모든 세균에 공통적인 16S rRNA 부위를 근거로 하여 제작하였으며 [11], LI1 primer는 *Listeria* 속균의 16S rRNA를 대상으로 제작하였다 [16]. 한편 LL1과 LL4 primer들은 *L. monocytogenes*에만 특이적인 listeriolysin O 유전자를 대상으로 제작하였다 [9].

Table 2. Sequences of oligonucleotide primers

Primers	Sequences (5' to 3')	Target region	Product size (bp)
UI	CAGCMGCCGCGTAATWC	16S rRNA	938
LI1	CTCCATAAAGGTGACCT		
LL1	GACATTCAAGTTGTGAA	listeriolysin O	560
LL4	CGCCACACTTGAGATAT		

M denotes A or C; W denotes A or T.

DNA 추출

사용균주의 genomic DNA 추출을 위하여 boiling 방법을 사용하였다. 즉 순수배양된 균액 1 ml을 원심 집균하여 멸균 생리식염수로 1회 원심 수세하였다. 수거된 pellet을 멸균 증류수 200 ul에 부유시켜 100℃, 10분간 증탕하여 균체를 파괴하고 열음에 15분간 방치하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 template DNA로 사용하였다.

Multiplex PCR 기법

PCR mixture는 10× PCR buffer (Promega, USA) 5 ul, 10 mM dNTPs (Gibco BRL, USA) 1 ul, 25 mM MgCl₂ (Promega) 4 ul, Taq DNA polymerase (Promega) 1 unit, 100 pmole/ul로 희석된 4종의 primer들 각각 1 ul, template DNA 5 ul를 혼합한 후 멸균증류수로 최종 50 ul 되게 조정하였다. DNA thermal cycler (Perkin-Elmer 9600)를 이용하여 multiplex PCR을 실시하였으며, 반응조건은 initial denaturation (95℃, 2분) 후, denaturation (94℃, 1분), annealing (55℃ 1분), extension (72℃, 2분)을 30회 반복하고 final extension (72℃, 5분)하였다. PCR 증폭산물 10 ul를 1% agarose상에서 전기영동하여 특이 유전자 증폭유무를 관찰하였다.

Multiplex PCR 기법의 특이도 및 민감도 검사

Multiplex PCR 기법의 특이도 검사는 Table 1에 나타난 *L. monocytogenes* 등 18종의 균을 이용하여 실시하였으며, 민감도는 *L. monocytogenes*의 template DNA를 Gene-Quant (Pharmacia Biotech)로 농도를 측정하여 100 ng/ul 부터 1 fg/ul까지 십진 단계희석하여 multiplex PCR 기법의 민감도를 검사하였다.

결 과

***Listeria* hemolysis agar (LHA)**

제작된 LHA배지에 4종의 *Listeria* 표준균주를 접종하여 β-hemolysis 양상을 관찰하였다 (Fig. 1). *L. ivanovii*는 아주 강한 β-hemolysis를 보였고, *L. monocytogenes*는 β-hemolysis가 상대적으로 약하여 *L. ivanovii*와는 육안적으로 충분히 구별할 수 있었으며, *L. innocua*와 *L. welshimeri*는 β-hemolysis가 나타나지 않았다. 따라서 제작된 LHA배지상에서 *Listeria* 속균의 β-hemolysis 양상은 일반 면양혈액배지와 동일함을 알 수 있었다.

닭의 장내용물을 2차 증균배양한 후 LHA배지에 접종하여 *Listeria* 속균의 분리를 실시한 결과 (Fig. 2), 육안적으로 β-hemolysis를 보이면서 동시에 자외선 조사시 형광을 나타내는 집락은 *L. monocytogenes*로 동정되었고, β-hemolysis가 없으면서 형광만 나타내는 집락은 본 연구에서 *L. innocua*로 동정되었다.

선택배지별 *L. monocytogenes* 분리 효율조사

닭의 장내용물 50건을 2차 증균하여 PAL배지, OX배지, LHA배지에 각각 접종하여 선택배지별로 *Listeria* 속균의 분리 효율에 대해서 조사한 결과, Table 3과 같이 OX배지보다는 PAL배지가 상대적으로 *Listeria* 분리 효율이 높았다. 한편, PAL배지와 제작된 LHA배지의 비교시 *L. monocytogenes*만 분리된 시료는 모두 2건씩 동일하여 두 배지간의 분리 효율에 대한 차이는 없었다. 그러나 *L. monocytogenes*와 *L. innocua*가 함께 분리된 예가 LHA 배지에서는 7건, PAL배지에서는 4건이 검출되었는데, 차이가 나는 3건의 시료에 대해서 PAL배지에서는 *L. monocytogenes*를 분리하지 못하였고 *L. innocua*만 분리되었다. 따라서 *L. monocytogenes*와 *L. innocua*가 혼합 오염된 경우 esculin 분해능에만 의존하여 *Listeria* 속균을 분리하는 PAL배지이나 OX배지보다는 β-hemolysis와 형광능에 근거하여 분리하는 LHA배지가 훨씬 더 많이 *L. monocytogenes*를 분리할 수 있었다.

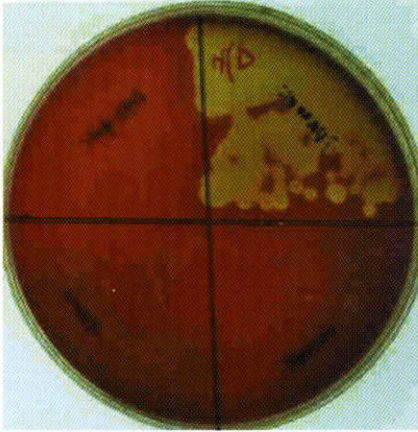


Fig. 1. Various hemolytic patterns of *Listeria* spp. on the *Listeria* hemolysis agar. This plate was incubated at 37°C, 48 hrs. Right upper; *L. ivanovii*, right bottom; *L. innocua*, left upper; *L. welshimeri*, left bottom; *L. monocytogenes*.

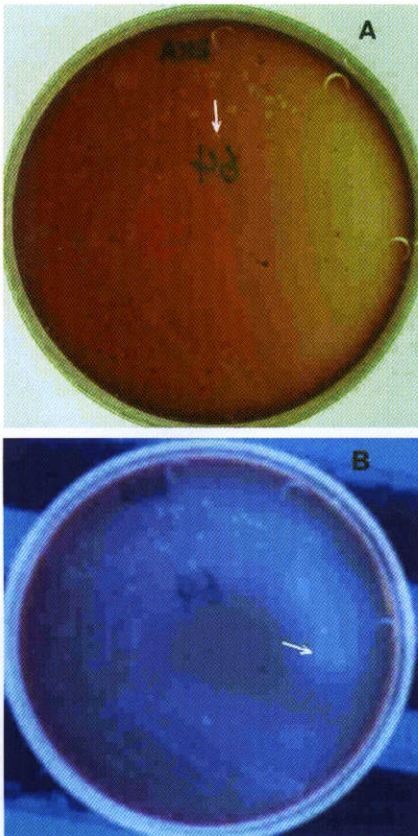


Fig. 2. Simultaneous detection of β -hemolysis and fluorescence phenotypes of *L. monocytogenes* by using *Listeria* hemolysis agar.

The pre-enriched cecal contents of fowls were inoculated on *Listeria* hemolysis agar and then incubated at 37°C, 48 hrs. The colonies were examined β -hemolytic pattern and fluorescence under 366 nm UV light, simultaneously. Fluorescent colony with β -hemolysis (arrow in panel A) was identified as *L. monocytogenes* and fluorescent colony without β -hemolysis (arrow in panel B) was confirmed as *L. innocua*.

Table 3. Isolation of *Listeria* spp. in cecal contents (n=50) of fowls according to selective isolation media

Isolates	No. of isolates in each selective media [*]		
	PAL	OX	LHA
<i>L. monocytogenes</i> only	2	1	2
<i>L. innocua</i> only	17	15	14
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i>	4	4	7
Total	23 (46%)	20 (40%)	23 (46%)

^{*}PAL, Palcam agar; OX, Oxford agar; LHA, *Listeria* hemolysis agar

Multiplex PCR기법의 특이도 및 민감도 검사

개발된 multiplex PCR기법의 특이도 검사는 Table 1에서와 같이 7종의 *L. monocytogenes*와 6종의 *Listeria* 속균 및 *Staphylococcus aureus* 등 총 18주를 대상으로 실시하였다. Fig 3에서 나타난 바와 같이 모든 *Listeria* 속균에서는 938 bp의 특이유전자 증폭산물이 확인되었고 (lane 1~13), *L. monocytogenes*에서는 혈청형에 상관없이 938 bp와 560 bp의 특이유전자 증폭산물이 확인되었으며 (lane 1~7), 기타 세균에서는 전혀 유전자 증폭산물이 형성되지 않아 (lane 14~18), 본 multiplex PCR기법으로 *L. monocytogenes*와 다른 *Listeria* 속균을 신속히 구분할 수 있었다.

민감도 검사는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 *L. monocytogenes*에서 추출된 DNA용액을 정량하여 100 ng/ul부터 1 fg/ul까지 십진 단계희석한 후 각각의 희석된 DNA를 5 ul씩 multiplex PCR을 실시한 결과, *L. monocytogenes*에서 추출된 DNA 50 pg까지 검출이 가능하였다.

고 찰

본 연구에서는 공중보건학상 위해가 큰 *L. monocytogenes*의 효율적인 분리를 위해 선택배지를 제작하였으며, *L. monocytogenes*와 다른 *Listeria* 속균을 구별하기 위하여 multiplex PCR기법을 개발하였다.

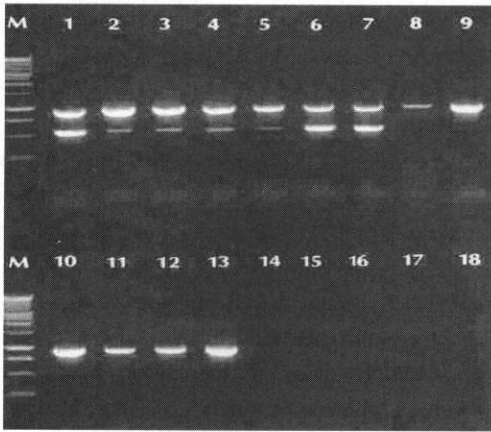


Fig. 3. Specificity of the multiplex PCR assays for detection of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes*. The PCR products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. Lane 1 to 7 was applied with *L. monocytogenes*. Lane 8; *L. ivanovii*, lane 9; *L. innocua*, lane 10; *L. seeligeri*, lane 11; *L. murrayi*, lane 12; *L. grayi*, lane 13; *L. welshimeri*, lane 14; *Staphylococcus aureus*, lane 15; *Bacillus subtilis*, lane 16; *Aerococcus* spp, lane 17; *Actinomyces pyogenes*, lane 18; *Klebsiella pneumoniae*, M; 1 kb DNA ladder (Promega).

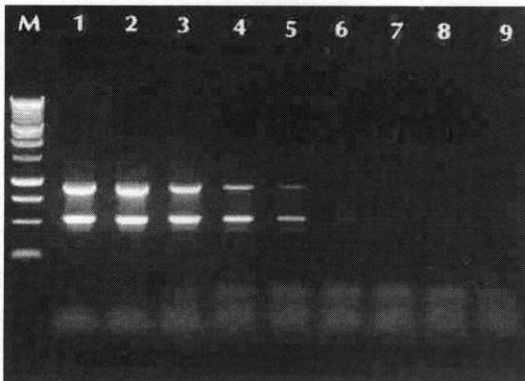


Fig. 4. Sensitivity of the PCR assays for detection of *L. monocytogenes* DNA. Lane 1 to 9; serial 10-fold dilution of genomic DNA (500 ng to 5 fg) M; 1 kb DNA ladder (Promega).

Listeria 속군중에서 *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*만 β -hemolysis를 나타낸다. 그러나 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 *L. ivanovii*는 β -hemolysis가 아주 강하여 다른 *Listeria* 속군과 육안적으로 쉽게 구분이 가능하며, *L. seeligeri*는 *L. monocytogenes*와 β -hemolysis 양

상은 유사하나 식품중에서는 거의 분리되지 않고 일부 환경시료에서 극소수 분리되고 있다 [6].

특히 *L. innocua*는 용혈성 차이를 제외하고는 *L. monocytogenes*와 생물화학적 성장시험 결과과 매우 유사할 뿐 만 아니라 [8], 세대시간이 짧아 증균배지내에서 *L. monocytogenes*보다 훨씬 빨리 증식되어 *L. monocytogenes* 검출을 어렵게 만든다 [13]. 따라서 *L. monocytogenes*와 *L. innocua*가 혼합 오염되어 있는 경우 PAL 배지나 OX 배지에서는 두 균을 구분하지 못하나, LHA 배지에서는 형광을 띄면서 β -hemolysis를 보이는 한 개의 집락만 있어도 *L. monocytogenes*로 추정하여 균분리 동정을 실시하므로 균분리 효율을 높이고 생물화학적 성장시험을 줄일 수 있다. 비용혈성 *L. monocytogenes*에 의한 가음성반응과 *L. seeligeri*에 의한 가양성 반응이 유발될 수도 있으나 이러한 균들은 분포율이 극히 낮으며 [6], 더욱이 LHA배지처럼 초대분리배지에서 *L. monocytogenes*와 다른 *Listeria* 속군을 직접 구분하면 시료내 *L. monocytogenes*의 균수카운터에도 활용이 가능하다.

혈액을 이용한 *Listeria* 선택배지에서 selective agents는 용혈성에 많은 영향을 주기 때문에 본 연구에서는 용혈성과 균발육을 증가시키기 위하여 acriflavine을 첨가하지 않았다 [5, 14]. Cox et al [7]은 sphingomyelinase의 첨가가 *L. monocytogenes*의 용혈성을 증가시킨다고 하였다. 그러나 자료로 제시되지는 않았으나 sphingomyelinase 첨가에 따른 용혈성 증가 효과는 극히 미약하였을 뿐 만 아니라 경제적인 이유로 본 연구에서는 사용하지 않았다. 한편 환경에 널리 분포하고 있는 *Bacillus* spp.는 *L. monocytogenes*와 용혈성이 비슷하여 판독에 많은 장애를 초래할 수 있으므로 nalidixic acid (40 mg/l)를 첨가하여 이러한 문제점을 극복하고자 하였다 [5]. 항응고제로 사용되는 EDTA와 citrate 그리고 혈장 구성성분중의 하나인 cholesterol 등은 *L. monocytogenes*의 용혈성을 억압하는 효과가 있다 [8]. 만약 혈장중에 *Listeria* 항체가 존재한다면 이는 *Listeria* 속군의 발육을 억제시킬 수 있다. 따라서 혈장중에 있는 cholesterol과 *Listeria* 항체를 제거하기 위하여 탈섬유된 면양혈액을 멸균 PBS로 원심수제한 후 LHA배지를 제작하였으나, 자료로 제시되지는 않았지만, 원심수제한 것과 원심수제하지 않은 면양혈액과의 β -hemolysis에는 큰 차이가 없었다.

담의 장내용물의 증균액에서 선택배지별 *L. monocytogenes* 분리효율성을 조사한 결과, PAL배지가 OX배지보다 *Listeria* 속군의 분리 효율이 높다는 Johansson [10]의 보고와 유사하였다. 특히 PAL배지와 LHA배지의 비교시 *L. monocytogenes*와 *L. innocua*가 동시에 분리된 경우가 LHA배지에서는 7건이었으나, 동일시료에 대해

서 PAL배지에서는 4건이 검출되었고 나머지 3건은 *L. innocua*만 단독 분리되어 LHA배지가 *L. monocytogenes*를 분리하는데 훨씬 효율적이었다.

*L. monocytogenes*에 특이적인 유전자를 이용한 PCR 기법이 많이 소개되어 있으나, 본 연구에서 개발된 multiplex PCR은 혈청형에 상관없이 모든 *L. monocytogenes*에서 938 bp와 560 bp의 특이유전자 증폭산물을 형성하였으며, 기타 *Listeria* 속군에서는 938 bp의 특이유전자 증폭산물만 관찰되어 *L. monocytogenes*와 다른 *Listeria* 속군을 쉽게 구분할 수 있었다.

일반적으로 PCR기법은 특이유전자를 증폭하기 때문에 DNA probe보다도 민감도가 좋다. 배지내에는 살아 있는 세균과 죽은 세균이 함께 존재하기 때문에 PCR 기법의 민감도를 설정하는데 DNA양과 균체 수를 직접 비교하는 것은 무리가 있으나, 개발된 multiplex PCR은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 boiling에 의하여 추출된 *L. monocytogenes* DNA를 약 1,000개의 균체에 해당하는 50 pg까지 검출이 가능하였다 [2]. 이러한 결과는 listeriolysin O 유전자를 이용한 Bessesen et al [3]의 결과보다는 약 2,000배 더 민감하나, *dth* 유전자를 이용한 Werners et al [19]의 결과보다는 약 100배 정도 민감도가 낮았으며 이러한 PCR 민감도의 차이는 target gene에 따라 다양하다고 일반적으로 알려져 있다. 한편 Wernars et al [19]은 치즈 0.5 g당 10^3 개의 *L. monocytogenes*를 검출하였으나 10^8 개의 *L. monocytogenes*를 검출하지 못해 PCR 민감도가 일정하지 않다고 보고하였으며, 이는 식품 중의 여러 가지 성분들과 다른 세균들의 DNA가 PCR inhibitors로 작용하기 때문인 것으로 추정하였다. 따라서 이러한 민감도의 문제점을 해결하기 위해서는 target DNA 양을 늘리고 non-*Listeria* DNA와 여러 가지 PCR inhibitor들을 희석하기 위해서는 증균과정을 통한 PCR기법의 적용이 좋을 것으로 사료된다.

이상에서와 같이 LHA배지는 시료중 *Listeria* 속군이 혼합 오염된 경우에도 PAL배지보다 효율적으로 *L. monocytogenes*를 분리할 수 있었으며, multiplex PCR 기법을 이용하여 *L. monocytogenes*와 다른 *Listeria* 속군을 신속히 구분할 수 있었다.

참고문헌

1. Bansal, N. S. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Lett. Appl. Microbiol. 1996, **22**, 353-356.
2. Bej, A. K., DiCesare, J. L., Haff, L. and Atlas, R. M. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uid*. Appl. Environ. Microbiol. 1991, **57**, 1013-1017.
3. Bessesen, M. T., Luo, Q., Rotbart, A., Blaser, M. J. and Ellison III, R. T. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 1990, **56**, 2930-2932.
4. Beumer, R. R. and Brinkman, E. Detection of *Listeria* spp. with a monoclonal enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). Food Microbiol. 1989, **6**, 171-177.
5. Beumer, R. R., te Giffel, M. C. and Cox, L. J. Optimization of haemolysis in enhanced haemolysis agar (EHA)-a selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 1997, **24**, 421-425.
6. Beumer, R. R., te Giffel, M. C., Kok, M. T. C. and Rombouts, F. M. Confirmation and identification of *Listeria* spp. Lett. Appl. Microbiol. 1996, **22**, 448-452.
7. Cox, L. J., Siebenga, A., Pedrazzini, C., and Moreton, J. Enhanced haemolytic agar(EHA)-an improved selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol. 1991, **8**, 37-49.
8. Farber, J. M. and Peterkin, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. 1991, **55**, 476-511.
9. Golsteyn Thomas, E. J., King, R. K., Burchak, J. and Gannon, V. P. J. Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 1991, **57**, 2576-2580.
10. Johansson, T. Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. Int. J. Food Microbiol. 1998, **40**, 77-85.
11. Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. and Pace, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Nat. Aca. Sci. USA. 1985, **82**, 6955-6959.
12. McClain, D. and Lee, W. H. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1988, **71**, 660-664.
13. McDonald, F. and Sutherland, A. D. Important differences between the generation times of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in two *Listeria*

- enrichment broth. J. Dairy Res. 1994, **61**, 433-436.
14. **Poysky, F. T., Paranjpye, R. N., Lashbrook, L. C., Peterson, M. E., Perloy, G. A. and Eklund, M. W.** Selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* from foods. J. Food Prot. 1993, **56**, 326-329.
 15. **Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C. and Piffaretti, J. C.** Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1992, **42**, 171-174.
 16. **Stackenbrandt, E. and Curiale, M.** Detection of *Listeria*. European Patent Application 88308820.5. 1988.
 17. **Skovgaard, N. and Morgan, C. A.** Detection of *Listeria* spp in feces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. Int. J. Food Microbiol. 1988, **6**, 229-242.
 18. **Warburton, D. W., Farber, J. M., Armstrong, A., Caldeira, R., Hunt, T., Messier, S., Plante, R., Tiwari, N. P. and Vinet, J.** A comparative study of the 'FDA' and 'USDA' methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Int. J. Food Microbiol. 1991, **13**, 105-118.
 19. **Wernars, K., Heuvelman, C. J., Chakraborty, T. and Notermans, S. H.** Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. J. Appl. Bacteriol. 1991, **70**, 121-126.