

## Molecular Epidemiology of *Listeria monocytogenes* by Ribotyping

Byoung-Seon Yang<sup>†</sup>

Department of Clinical Pathology, Jinju Health College

Ten *Listeria monocytogenes* were isolated from clinical specimens and mussels, and their physio-biochemical characters were compared with the type strains. Ribotyping was used as a taxonomic tool to determine molecular epidemiological marker. Chromosomal DNA was cleaved with restriction enzymes *Hind*III and *Eco*RI. The fragment were subjected to Southern blot hybridization with 16S rDNA from *B. subtilis* by PCR. *Eco*RI patterns of *Listeria* strains showed 6 to 8 bands ranging from 0.75 kb to 11 kb band and they were classified into 6 groups. In comparison, *Hind*III patterns revealed that 5 to 7 bands ranging from 2.75 kb to 7.75 kb band and they classified into 5 groups. The various patterns of *Listeria* strains were observed within genus, species and isolated sources. 16S rRNA gene restriction patterns (ribotyping) are useful in epidemiological and taxonomic study.

**Key Words:** *Listeria monocytogenes*, *Eco*RI, *Hind*III, Ribotyping

### 서 론

자연계에 널리 분포하는 *Listeria*속은 *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. grayi* 6종이 밝혀져 있으며 통성혐기성으로, 그람양성의 포자를 형성하지 않는 운동성 간균이다. 특히 *Listeria*속 세균중에서 *L. monocytogenes*는 유일하게 사람에게 병원성을 나타낸다<sup>3,6,8,10</sup>.

*L. monocytogenes*는 집단발생의 우려가 크므로 발병시 정확한 역학조사가 반드시 선행되어야 하며, 이때 역학조사를 위해 효과적인 균주 (strains) 구별 방법이 필요하다. 균주 구별 방법은 세균의 전파 경로 및 전파원을 규명하여 병원체를 찾는 데 중요하다. 균주 구별은 과거에는 여러가지 표현형적 특성에 의존하였다<sup>4,12</sup>. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)분석은 병원 미생물의 균주 구별에 많이 이용되고 있다. 이 경우, 염색체 DNA는 band수가 많기 때문에 해석이 어려우나 DNA 절편을 membrane에 옮겨 toxin producer genes 및 antibiotic resistance genes 등의 특이적 probe를 사용하여 잡종화시키면 band수를 감소시킬 수 있다. 단 DNA probe가 특이종 내에 존재하는 균주에만 국한되는 단점이 있다<sup>5,10</sup>. Ribotyping의 경우, rRNA coding gene은 진화하는 동안 대단히 잘 보존되어 있으며 모든 세균에 존재하는 다복제유전자로써, 이 유전자를 사용하여 잡종화시키면 균주에 따라서 7~12개의

band를 관찰할 수 있어 다른 속, 종의 동정이나 세균의 subgroup 구별에도 이용된다<sup>2,7,9</sup>. rRNA유전자 (rrn) 부위가 고보존된다는 사실이 밝혀진 이후 rRNA를 탐식자로 이용하여 많은 연구가 이루어져 왔다. Grimont 등<sup>7</sup>은 40종의 그람음성 및 양성 세균의 분류를 위한 제한효소양상 분석에 *E. coli*의 16S 및 23S rRNA를 보편탐식자 (universal probe)로 이용하였으며, Stull 등<sup>10</sup>은 methicillin resistant *S. aureus* (MRSA)의 역학조사에 *E. coli*의 total rRNA를 probe로 사용하여 보고한 바 있다. RFLP분석이나 ribotyping과 같은 molecular typing 방법은 컴퓨터와 연결하여 data분석을 하고 이를 동정에 이용할 수 있다<sup>11,13,15</sup>. 그러므로 molecular typing은 진화적 역학조사 방법으로, 재현성이 뛰어나고 우수한 감별력으로 표준화를 가능하게 한다.

본 연구에서는 임상뇌척수액 140검체로부터 *L. monocytogenes* 3균주를 분리하고, 홍합유래의 *Listeria monocytogenes* 7균주를 분리하고, 표준균주와 대조하여 16S rRNA gene restriction patterns (ribotyping)를 *Listeria*종 및 균주 구별에 적용함으로써 분자유전학적 접근을 통한 *Listeria*의 분류학적 특성 및 역학적인 연구를 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 사용 균주

본 연구에 사용된 균주는 뇌척수액 140검체로부터 분리한 *L. monocytogenes* 3균주 및 홍합유래의 *L. monocytogenes* 7균주와 *Listeria*종의 표준 6균주, 그리고 *Listeria*종 이외의 그람양성 및 음성 세균 4균주를 사용하였다 (Table 1).

\*논문 접수: 2002년 4월 13일

수정재접수: 2002년 5월 10일

<sup>†</sup>별책 요청 저자: 양병선, (우) 660-757 경남 진주시 상봉서동 1142번지 진주보건대학 임상병리과

Tel: 055-840-1851, e-mail: ybseon@chc.ac.kr

**Table 1.** Species and sources of the bacteria used in this study

Species	Source
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC15313 <sup>T</sup>
CH6	CSF
CH15	CSF
CH126	CSF
NH1	Mussel
NH2	Mussel
NH3	Mussel
NH4	Mussel
NH5	Mussel
NH6	Mussel
NH7	Mussel
<i>L. innocua</i>	ATCC33090 <sup>T</sup>
<i>L. ivanovii</i>	ATCC19119 <sup>T</sup>
<i>L. grayi</i>	ATCC19120 <sup>T</sup>
<i>L. seeligeri</i>	ATCC35967 <sup>T</sup>
<i>L. welshimeri</i>	ATCC35897 <sup>T</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC29213
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC12345
<i>Bacillus subtilis</i>	IAM12188
<i>E. coli</i> K12	KCTC11116

T, type strain; ATCC, American Type Culture Collection; KCTC, Korean Collection Type Culture; IAM, Institute of Applied Microbiology, The university of Tokyo, Japan; CSF, Cerebrospinal Fluid

## 2. 세균 동정을 위한 특성 조사

생리·생화학적 특성 조사는 VITEK system (595 Anglum Drive, Hazelwood, MO 63042)을 이용하여 VITEK Gram-positive identification card (Product No. V1305)를 사용하였다. GPI card를 이용한 생리·생화학적 검사는 컴퓨터 프로그램에 의해 자동적으로 저장하여 분석하였고 4~15시간 배양하여 reader/incubator에 있는 각 카드의 상태를 data terminal에 입력하여 인쇄하였다. Normalize % 가능성은 첫번째, 두번째를 선택해서 동정하였다. GPI card 대조균주는 *L. monocytogenes* ATCC-15313<sup>T</sup>과 *S. aureus* ATCC29213을 사용하였다.

## 3. Ribotyping

16S rDNA의 증폭은 Stull 등<sup>16)</sup>의 방법으로 실시하였다. 16S rDNA의 증폭을 위하여 *E. coli* 16S rRNA의 8-27 nucleotide position에 상보적인 서열을 forward primer (5'-AGAGTTTG-

ATCCTGGCTCAG-3')로 하였으며, reverse primer로는 1513-1494 nucleotide position에 상보적인 서열 (5'-TACGGCTACC-TTGTCACGAC-3')을 사용하였다. 최종 반응량은 100 µl였으며, 이 반응액에는 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 200 µM dNTP, 각 oligonucleotide primer를 200 nM, 2.5 U의 *Taq* polymerase 그리고 정제된 DNA 1 µg을 혼합하여 DNA thermal cycler에서 30 cycle 반응시켰다. 반응 조건은 94°C에서 1분간 60°C에서 1분간 72°C에서 2분간 chain extension시켰으며, 30 cycle 후 최종적으로 7분간 chain을 extension시켰다. 증폭된 DNA을 확인을 위하여 PCR반응액 10 ml를 취하여 1% agarose gel을 이용하여 100 V에서 1시간 전기영동 후 EtBr용액으로 염색하여 UV하에서 관찰하고 polaroid film으로 촬영하였다. 증폭된 DNA의 크기를 측정하기 위한 marker로는 1 kb ladder를 사용하였다<sup>14)</sup>.

표준균주 및 분리균주의 염색체 DNA을 제한효소 (*EcoRI*, *HindIII*)를 사용하여 절단한 후 전기영동하여 Southern transfer 시켜 HRP로 표식된 16S rDNA probe와 hybridization을 실시하였다.

## 4. Computer 분석

PCR반응을 통해 증폭된 16S rDNA의 restriction pattern으로부터 각각의 band size를 1 kb ladder와 비교 측정하여 각 restriction enzyme에 생성된 band를 크기에 따라 정리하였다. 통계처리 program인 MVSP plus V2.0의 UPGMA방법과 simple matching coefficient로 각 균주간의 similarity matrix를 구성하고, plot program을 이용하여 각 세균들간의 16S rDNA restriction pattern에 의한 dendrogram을 작성하였다.

## 결 과

### 1. 세균 동정

VITEK system을 이용하여 당 이용능, 기질 가수분해, NaCl 및 bile에서 성장유무 등의 생리·생화학적 시험에 의한 동정 결과, 모든 분리균주가 β-hemolysis 양성으로 나타났으나 10% bile에서의 생장은 CH6, CH15, CH126균주는 성장하지 않았으나 NH1, NH2, NH3, NH4, NH5, NH6, NH7균주는 성장하였다. 실험된 10균주는 *L. monocytogenes* 99%로, *S. cohnii* 1% 미만으로 또는 *Listeria* sp.로 동정되었다. *L. monocytogenes* ATCC15313<sup>T</sup>의 경우, β-hemolysis음성, 10% bile음성으로 나타나 *L. monocytogenes* 99%로, *S. auricularis* 1% 미만으로 동정되었으나 그 외의 *Listeria*종의 경우는 *Listeria* sp.로 동정되었다.

### 2. Ribotyping

임상검체에서 분리한 CH6, CH15, CH126균주와 혼합에서

**Table 2.** Classification of *Listeria* species in combined *EcoRI*-*HindIII* ribotypes

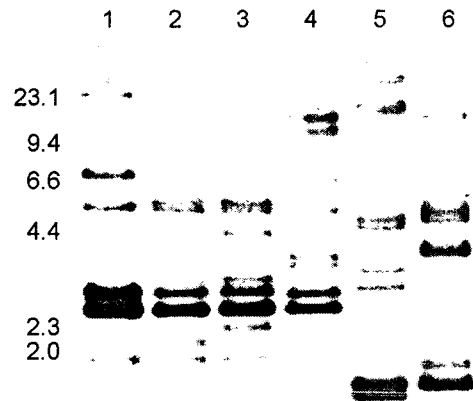
Species	Strain	Source	Ribogroup	
			<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC15313 <sup>T</sup>	Rabbit	EG1	HG1
	CH6	Human	EG2	HG1
	CH15	Human	EG2	HG1
	CH126	Human	EG2	HG1
	NH1	Mussel	EG3	HG2
	NH2	Mussel	EG3	HG2
	NH3	Mussel	EG3	HG2
	NH4	Mussel	EG3	HG2
	NH5	Mussel	EG3	HG2
	NH6	Mussel	EG3	HG2
	NH7	Mussel	EG3	HG2
<i>L. innocua</i>	ATCC33090 <sup>T</sup>	Cow	EG4	HG3
<i>L. ivanovii</i>	ATCC19119 <sup>T</sup>	Sheep	EG5	HG4
<i>L. grayi</i>	ATCC19120 <sup>T</sup>	Chinchilla	EG6	HG5

T, type strain; ATCC, American Type Culture Collection; EG, *EcoRI* group; HG, *HindIII* group

분리한 NH1, NH2, NH3, NH4, NH5, NH6, NH7균주 그리고 표준균주 *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. grayi* 균주의 ribotyping을 역학조사에의 적용여부를 검토하기 위하여 16S rDNA gene restriction pattern을 분석하여 분리원에 따른 pattern양상을 비교하였다. 염색체 DNA는 *EcoRI*, *HindIII*를 사용하여 절단하고, PCR을 사용하여 증폭한 *B. subtilis* 16S rDNA를 probe로 사용하여 Southern blot hybridization을 실시한 결과, *EcoRI*로 절단한 경우에는 실험된 14균주는 6개의 그룹으로 나뉘어 균종에 따라 구분된 pattern을 나타냈다. *L. monocytogenes*의 경우, 분리원과 상응하는 pattern을 나타내었다. *HindIII*로 절단한 경우, *EcoRI* 경우와 달리 토끼와 사람이 분리원인 경우, 동일한 band pattern을 나타내었다 (Table 2).

### 3. *EcoRI*에 의한 RFLP

*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*와 *S. aureus*, *B. subtilis*의 *EcoRI* pattern의 경우 균종별 상이한 band pattern을 나타내었으며, 5.25 kb, 2.75 kb, 2.5 kb에서 *Listeria*속 특이적 공통 band를 나타내었다. *L. monocytogenes*의 경우, 11 kb, 1.26 kb, 0.75 kb에서 특정 band를 나타내었다 (Fig. 1). 표준균주와 임상분리균주 그리고 혼합유래균주간의 *EcoRI* pattern에 있어 11 kb, 5.25 kb, 2.75 kb, 2.5 kb, 1 kb에서 종 특이적인 band를 갖는 한편, *L. monocytogenes* 표준균주는 7 kb, 0.1 kb, CH6, CH15, CH126의 경우, 3.5 kb, 0.1 kb, NH1, NH2의 경우, 6 kb, 3.5 kb의 band를 나타내어 분리원에 따른 band pattern의



**Fig. 1.** Ribotype patterns generated with *EcoRI*, of *Listeria* species and related species. Lanes: 1, *L. monocytogenes* ATCC-15313<sup>T</sup>; 2, *L. innocua* ATCC33090<sup>T</sup>; 3, *L. ivanovii* ATCC19119<sup>T</sup>; 4, *L. grayi* ATCC19120<sup>T</sup>; 5, *S. aureus* ATCC29213; 6, *B. subtilis* IAM12188.

차이를 나타내었다. *EcoRI*로 절단한 경우에는 실험된 14균주는 6개의 그룹으로 나누어 졌으며, 균종에 따라 구분된 pattern을 나타내었다. *L. monocytogenes*의 경우, 분리원과 상응하는 pattern을 나타내었다 (Fig. 2).

### 4. *HindIII*에 의한 RFLP

*HindIII* pattern의 경우, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*의 모든 *Listeria*종에서 4.25 kb, 3.5 kb의 공통

band를 나타냈으며, *L. monocytogenes*는 9.5 kb, 7.7 kb, 2.75 kb, *L. ivanovii*는 7.75 kb, 6 kb, 4.75 kb, *L. innocua*는 7.75 kb, 6 kb, 5 kb, 4.5 kb, *L. grayi*는 9.5 kb, 6.75 kb, 5.5 kb에서 특정 band를 나타내었다 (Fig. 3). 표준균주와 임상분리균주 그리고 홍합유래 균주간의 *Hind*III pattern은, 7.75 kb, 4.25 kb, 3.5 kb, 2.75 kb에서 공통 band를 갖는 한편, 표준균주 *L. monocytogenes*와 CH6, CH15, CH126균주는 동일한 band pattern을 나타내었다. 토끼와 사람유래의 *L. monocytogenes*균주는 동일한 band pattern을 나타내었으나 NH1, NH2균주의 홍합유래균주와는 상이한 pattern을 나타내었다 (Fig. 4).

### 5. Computer 분석

본 실험에서 임상검체에서 분리한 세균들과 홍합유래균주, 표준균주들의 16S rDNA restriction pattern에 대하여 simple

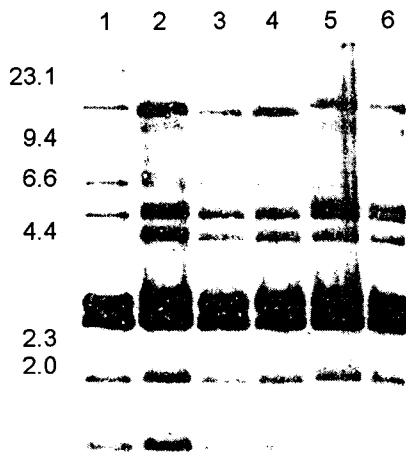


Fig. 2. Ribotype patterns generated with *Eco*RI, of *L. monocytogenes* strains. Lanes: 1, *L. monocytogenes* ATCC15313<sup>T</sup>; 2, CH6; 3, CH15; 4, CH126; 5, NH1; 6, NH2.

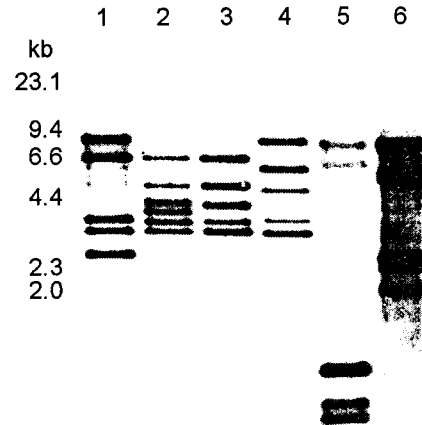


Fig. 3. Ribotype patterns generated with *Hind*III, of *Listeria* species and related species. Lanes: 1, *L. monocytogenes* ATCC-15313<sup>T</sup>; 2, *L. innocua* ATCC33090<sup>T</sup>; 3, *L. ivanovii* ATCC19119<sup>T</sup>; 4, *L. grayi* ATCC19120; 5, *S. aureus* ATCC29213; 6, *B. subtilis* IAM12188.

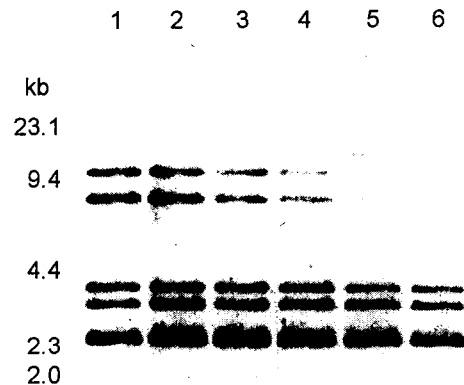


Fig. 4. Ribotype patterns generated with *Hind*III, of *L. monocytogenes* strains. Lanes: 1, *L. monocytogenes* ATCC15313<sup>T</sup>; 2, CH6; 3, CH15; 4, CH126; 5, NH1; 6, NH2.

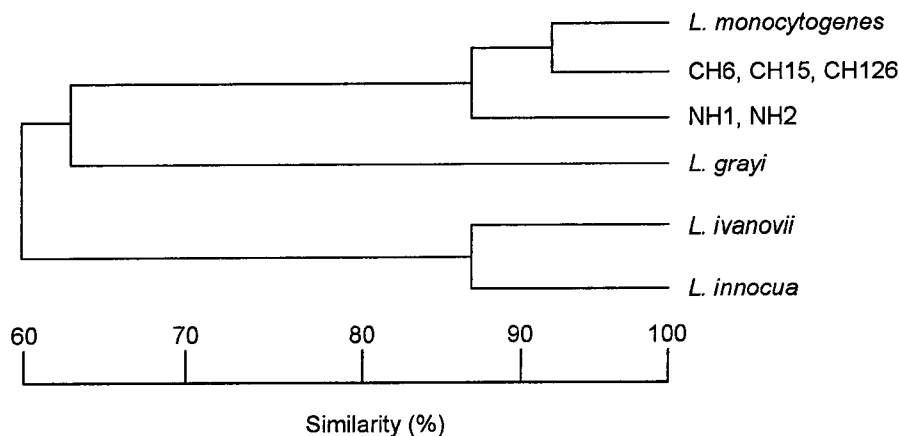


Fig. 5. UPGMA cluster phenogram of *Listeria* species and strains based on ribotyping data.

matching coefficient를 이용한 UPGMA 군집분석을 실시함으로써 dendrogram을 작성하여 분리군주 및 실험군주들간의 유연관계를 조사하였다. 실험한 결과 *Listeria*종에 따라 각각 별개의 cluster을 형성하였다. 분리군주 CH6, CH15, CH126, NH1, NH2은 *L. monocytogenes* ATCC15313<sup>T</sup>와 동일한 cluster을 형성하며, 사람유래의 CH6, CH15, CH126과 혼합유래의 NH1, NH2은 동일 cluster 내에서 다른 위치를 점하였다 (Fig. 5).

## 고 찰

*L. monocytogenes*는 악성 종양이나 백혈병과 같이 면역기능이 감소된 환자에 심한 기회감염을 일으켜 치명적인 결과를 초래한다는 것은 이미 잘 알려져 있다<sup>4)</sup>. 최근 항암요법제가 개발되고 장기이식 수술 후 스테로이드 등의 면역억제제의 사용빈도가 증가하면서 이러한 약제를 투여 받는 환자의 주요한 사망 원인으로 listeriosis가 대두되면서 이 균의 조기 발견 및 치료에 임상주의 관심과 주의가 요구되고 있다<sup>1)</sup>. *L. monocytogenes*의 감염 경로는 오염된 낙농제품, 육류, 해산물 등의 섭취에 의하며, 따라서 listeriosis가 집단으로 발생할 우려가 있어 원인과 전염 경로의 추적이 필요하며, 이를 위한 방법들로서 생화학적 검사나 혈청형 검사가 주로 쓰이고 있다. 그러나 이와 같은 표현형적 특성들은 항생제의 투여 여부나 배양 조건 등 여러 환경 조건에 따라 발현 양상이 불안정하다는 한계가 있다. 종래의 표현형적 특성 검사들이 갖고 있는 문제점을 보완하는 방법으로서 최근에 발달된 분자생물학적 기법을 역학조사에 도입하려는 시도들이 많이 이루어지고 있다<sup>5)</sup>. 염색체 DNA를 분석하는 방법중 기술적으로 가장 간단한 방법은 제한효소로 DNA를 처리하여 그 다형성 양상을 분석하는 방법이다. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)은 절단부위의 존재유무를 결정하는 단일 염기쌍의 변이 정도에 따라 다르게 나타나는 것이 가장 큰 원인이지만 그 외에도 DNA의 삽입, 결손, 또는 재배열 등에 의해서도 다르게 나타날 수 있다는 단점을 가지고 있다. 또한 분석의 대상이 되는 유전자 분획들의 수가 너무 많이 나타나기 때문에 절편들간의 구별이 명확히 안되는 경우가 많다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위해서 개발된 방법들중의 하나가 잘려진 유전자 분획들중 일부에만 결합하는 probe를 이용하는 것이다. *E. coli*의 rRNA 유전자 (rrn) 부위가 고보존된다는 사실이 밝혀진 이후 rRNA를 probe로 이용하여 많은 연구들이 이루어졌다<sup>6)</sup>. Grimont 등<sup>7)</sup>은 40종의 그람 음성 및 양성 세균의 분류를 위한 제한효소양상 분석에 *E. coli*의 16S+23S rRNA를 보편탐식자 (universal probe)로 이용하였다. 이들은 *E. coli*와 계통발생학적으로 먼 균종에도 *E. coli*의 rRNA가 탐식자로 반응한다는 것과 대상이 된 균종들사이에 다양한 제한효소양상이 존재한다는 것을 밝혔다. 현재 ribotyping을 위해 가장 널리 쓰이는

probe는 DNA로 이는 역전사효소를 이용하여 rRNA로부터 직접 만들어진 cDNA이거나, rrnDNA가 cloning된 재조합 plasmid 또는 16S나 16S+23S rRNA 유전자의 염기배열로부터 구성된 합성 oligonucleotide를 사용한다<sup>8)</sup>. Blanc 등<sup>9)</sup>은 *Pseudomonas aeruginosa*의 ribotyping에 관한 연구에서, 균종간의 감별력을 높이기 위해서는 불명확한 제한효소를 더 추가시키는 것보다 적합한 제한효소를 잘 선택하는 것이 중요하다고 주장하였다.

본 실험에서는 ribotyping을 *L. monocytogenes*의 역학조사에 대한 적용여부를 검토하기 위하여 임상뇌척수액으로부터의 140검체와 혼합에서 분리한 *L. monocytogenes* 그리고 표준균주 *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. grayi*의 염색체 DNA와 PCR을 사용하여 증폭한 *B. subtilis* 16S rDNA를 probe로 사용하여 Southern blot hybridization을 실시한 결과, *EcoRI* pattern의 경우, 5.25 kb, 2.75 kb, 2.5 kb에서 *Listeria*속 특이적인 공통 band를 나타냈으며, *L. monocytogenes*의 경우는 11 kb, 1.26 kb, 0.75 kb, *L. grayi*의 경우는 9.75 kb, 8.5 kb, 6.5 kb, 3.75 kb, 3.5 kb의 band차이가 나타났다. 표준균주와 임상분리균주 그리고 혼합분리균주간의 *EcoRI* pattern에 있어 11 kb, 5.25 kb, 2.75 kb, 2.5 kb, 1 kb에서 종 특이적인 공통 band를 가졌고, *L. monocytogenes*는 7 kb, 0.1 kb, CH6은 3.5 kb, 0.1 kb, NH1은 6 kb, 3.5 kb의 band를 형성하여 분리원이 다른 경우에는 차이를 나타냈으나 분리원이 같은 경우는 일치하였다.

*HindIII* pattern의 경우, 모든 *Listeria*종에서 4.25 kb, 3.5 kb의 공통 band를 나타냈으며, *L. monocytogenes*는 9.5 kb, 7.7 kb, 2.75 kb, *L. ivanovii* 경우, 7.75 kb, 6 kb, 4.75 kb, *L. innocua* 경우, 7.75 kb, 6 kb, 5 kb, 4.5 kb, *L. grayi*는 9.5 kb, 6.75 kb, 5.5 kb에서 band차이를 나타내었다. 표준균주와 임상분리균주 그리고 혼합분리균주간의 *HindIII* pattern은 7.75 kb, 4.25 kb, 3.5 kb, 2.75 kb에서 공통 band를 나타내었고, 표준균주 *L. monocytogenes*와 CH6균주간에는 일치를 보였으나 NH1균주와는 10.5 kb가 일치하지 않아 분리원에 따른 균주의 구별이 불가능하였다. Ribotyping방법의 경우에 제한효소 (*EcoRI*, *HindIII*) 따른 *Listeria*속과 종 구별은 가능하였으나 *L. monocytogenes*의 분리원에 따른 균주 구별의 경우는 *EcoRI*효소를 사용한 경우에는 구별가능 하였으나 *HindIII*효소의 경우에는 표준균주와 임상 검체 분리균주와 구별이 불가능하여 제한효소의 선택이 중요하다. 본 방법은 *Listeria*속, 종 동정 및 제한효소에 따른 역학 조사에 유용하며, *Listeria*속 세균에 대한 ribotyping은 재현성이 있는 역학추적 방법임을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 진주보건대학 학술연구논문 연구비에 의해 수행된 연구 결과이며, 이에 감사 드립니다.

## 참 고 문 헌

- 1) Ausubel FMR, Brent RE, Kingston DD, Moore JG, Seidman JA, Smith and Struhl K (1987): Current protocols in molecular biology, pp. 241-262. John Wiley & Sons. Inc. New York.
- 2) Blanc DS, Siegrist HH, Sahli R and Francioli P (1993): Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa* discriminatory power and usefulness as a tool for epidemiological studies. *J Clin Microbiol*, **31**: 71-77.
- 3) Farber JM and Peterkin PL (1991): *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*, pp. 476-511.
- 4) Farber JM and Speirs JI (1987): Monoclonal antibodies directed against the flagellar antigens of *Listeria* spp. and their potential in EIA-based methods. *J Food Prot*, **50**: 479-484.
- 5) Fiona M, Thomson-carter PE, Carter and Pennington PH (1989): Differentiation of *Staphylococcal* species and strains by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J Gen Microbiol*, **135**: 2093-2097.
- 6) Fleming KW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Gray ML and Killinger AH (1966): *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev*, **30**: 309-382.
- 7) Grimont F and Grimont PA (1986): Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, **137B**: 165-175.
- 8) Groves RD and Welshimer HJ (1977): Separation of pathogenic from apathogenic *Listeria monocytogenes* by three in vitro reactions. *J Clin Microbiol*, **5**: 559-556.
- 9) Gutell R, Larsen RN and Woese CR (1994): Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev*, **58**: 10-26.
- 10) Jenkins EM, Njoku-Obi AN and Adams EA (1964): Purification of the soluble hemolysins of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, **88**: 418-424.
- 11) Kostman JR, Edlind TD, Lipuma JJ and Stull TL (1992): Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J Clin Microbiol*, **30**: 2084-2087.
- 12) Krieg NR and Holt JG (1984): Bergey's manual of Systematic Bacteriology Vol. 2. pp. 1235-1245. Williams & Wilkins Baltimore/London.
- 13) Ludwig WK, Schleifer H and Stackebrandt E (1984): 16S rRNA analysis of *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix therosphacta*. *FEMS Microbiol Letters*, **25**: 199-204.
- 14) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- 15) Notermans S, Chakraborty T, Leimeister-Wachter M, Dufrenne J, Heuvelman KJ, Maas H, Jansen W, Wernars K and Guinee P (1989): Specific gene probe for detection of biotyped and serotyped *Listeria* strains. *Appl Environ Microbiol*, **55**: 902-906.
- 16) Stull TL, Lipuma JJ and Edlind TD (1988): A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacterial Ribosomal RNA. *J Infect Dis*, **157**: 280-286.