

Инновационные приемы при бактериологическом исследовании на листериоз

И.А.Деревянченко¹, Е.В.Смирнова¹, Л.А.Краева²

¹Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» в Невском и Красногвардейском районах, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

²ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Российская Федерация

В последние годы инфекция, обусловленная листериями, приобретает все большую актуальность. Расширение ассортимента потребляемых сыров, рыбных и мясных продуктов, в том числе из мяса диких животных, требует постоянного контроля производимой продукции. Авторы статьи предложили оптимизировать бактериологический метод исследования, доступный в лаборатории любого уровня оснащения. Для этого предложено использовать несколько дополнительных простых тестов, которые позволяют дифференцировать различные виды листерий.

Кроме того, для скрининга продуктов питания и смывов на листерии предложен быстрый, достоверный и недорогой способ межвидовой идентификации бактерий рода *Listeria*, основанный на классическом бактериологическом исследовании. Для его реализации используют чиповые технологии, позволяющие значительно экономить расходные материалы и сокращать время проведения исследования. Технологические решения в виде автоматизированного считывания результата и обработки полученной информации с помощью специальных компьютерных программ дают возможность получить объективный результат высокого уровня достоверности (87%) через 3 часа. При разработке способа выращивания и идентификации бактерий использовали технологии лаборатории-на-чипе. Биологическую пробу выращивали в специальном ростовом блоке на платформе в виде чипа. Результаты роста бактерий регистрировали при помощи микроскопии сформировавшихся микроколоний при увеличении в 630 раз. Визуальные образы микроколоний были обработаны с помощью компьютерной программы. Результат исследования содержит данные о виде бактерий и количестве микроорганизмов в исследуемом образце. Авторская разработка защищена тремя патентами.

Ключевые слова: *Listeria*, лабораторная диагностика, бактериологическое исследование, экспрессная идентификация, лаборатория-на-чипе

Для цитирования: Деревянченко И.А., Смирнова Е.В., Краева Л.А. Инновационные приемы при бактериологическом исследовании на листериоз. Бактериология. 2018; 3(4): 21–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-21-25

Innovative approaches at bacteriological research on listeriosis

I.A.Derevyanchenko¹, E.V.Smirnova¹, L.A.Krayeva²

¹Branch of Center for Hygiene and Epidemiology in the city of St. Petersburg in the Nevsky and Krasnogvardeisky districts, St. Petersburg, Russian Federation;

²Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

In recent years the infection caused by *Listeria* is becoming increasingly important. Expanding the range of consumed cheeses, fish and meat products, including meat from wild animals, requires constant monitoring of products. The authors of the article proposed to optimize the bacteriological method of research available in the laboratory of any level of equipment. For this purpose, it is proposed to use several additional simple tests that allow to differentiate various types of *Listeria*.

In addition, a fast, reliable and inexpensive method of identification of bacteria of the genus *Listeria*, based on a classical bacteriological study, is proposed for screening of food products and flushes on *Listeria*. For its implementation, chip technologies are used to significantly save consumables and reduce the time of the study. Technological solutions in the form of automated reading of the result and processing of the information obtained with the help of special computer programs make it possible to obtain an objective result of a high level of reliability (87%) in 3 hours. In developing the method of cultivation and identification of bacteria used technologies lab-on-a-chip. The biological sample was grown in a special growth block on a platform in the form of a chip. The results of bacterial growth were recorded by microscopy of the microcolonies formed with an increase of 630 times. Visual images of microcolonies were processed with the help of a computer program. The result of the study contains data on the type of bacteria and the number of microorganisms in the test sample. The author's development is secured by three patents.

Keywords: *Listeria*, laboratory diagnostics, bacteriological research, express identification, laboratory-on-chip

For citation: Derevyanchenko I.A., Smirnova E.V., Krayeva L.A. Innovative approaches at bacteriological research on listeriosis. Bacteriology. 2018; 3(4): 21–25. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-21-25

Для корреспонденции:

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

Телефон: (812) 498-0939

E-mail: lykraeva@yandex.ru

Статья поступила 17.10.2018 г., принята к печати 25.12.2018 г.

For correspondence:

Ludmila A. Kraeva, MD, PhD, DSc, head of the laboratory of medical bacteriology, Saint-Petersburg Pasteur Institute

Address: 14 Mira str., St. Petersburg, 197101, Russian Federation

Phone: (812) 498-0939

E-mail: lykraeva@yandex.ru

The article was received 17.10.2018, accepted for publication 25.12.2018

Несмотря на то что возбудитель листериоза был открыт более 100 лет назад, интерес ученых и клиницистов к листериозной инфекции значительно возрос лишь в последние 20 лет. Заболеваемость листериозом в 2017 г. в высокоразвитых странах составила от 0,3‰ до 1,5‰, в России – 0,04‰. При этом показатели в крупных регионах превышают таковые по стране в 4 раза, что объясняется разным качеством клинической и лабораторной диагностики [1–3]. Так, в 2017 г. в стране было зарегистрировано 58 случаев листериозной инфекции (0,04 на 100 тыс. населения) с преимущественной регистрацией в Москве и Санкт-Петербурге (22 и 15 случаев соответственно). Однако показатель заболеваемости выше в Санкт-Петербурге (0,29‰), чем в Москве (0,18‰). В остальных регионах отмечались единичные случаи листериоза, хотя, учитывая схожие факторы передачи возбудителя инфекции и его устойчивость во внешней среде, можно было бы ожидать высоких цифр заболеваемости в Сибирском и Дальневосточном округах Российской Федерации (РФ).

Особое значение в патологии человека имеет возможность передачи листерий от инфицированной беременной женщины к плоду [4]. Тем не менее, по международному классификатору болезней МКБ-10, листериоз представлен еще в нескольких позициях: кожный листериоз, листериозный менингит и менингоэнцефалит, листериозная септицемия, другие формы листериоза [5, 6]. Причем смертность при осложнениях, обусловленных несвоевременной постановкой диагноза, может достигать 30% [7–9]. Так, в РФ смертность от листериоза в 2017 г. составила 26% от числа заболевших: в Санкт-Петербурге – 0,08‰, в Москве – 0,04‰ (по данным отчетных форм ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» за 2017 г.).

Возбудителем листериоза у людей чаще всего является *Listeria monocytogenes*, хотя нельзя исключать возможности заражения любым другим видом из 19 известных. По данным зарубежных авторов, наиболее часто продукты питания контаминированы, помимо *L. monocytogenes*, следующими видами листерий: *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* [10–14]. Поэтому важно уметь не только своевременно выделить культуру листерий, но и идентифицировать ее до вида.

Цель работы: предложить быстрый, достоверный и недорогой способ межвидовой идентификации бактерий рода *Listeria*.

*L. monocytogenes**L. innocua**L. welshimeri**L. ivanovii*

Рис. 1. Вид микроколоний листерий после инкубации 3 ч (×630).

Таблица. Дополнительные характеризующие признаки для дифференциации биологических видов представителей рода *Listeria*

Вид <i>Listeria</i>	Характеризующий признак СAMP-тест с					
	β-гемолиз	<i>R. equi</i>	<i>S. aureus</i>	Лецитиназа (наличие)	D-аланин (расщепление)	Лизин (расщепление)
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	+	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	+	+
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	+	+	+
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	+	+	+
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	-	+	+
<i>L. grayii</i>	-	-	-	-	+	+

*разные штаммы дают разную реакцию (16–84% позитивны).

Материалы и методы

Изучены 118 штаммов листерий, выделенных из пищевых продуктов в Санкт-Петербурге в 2017–2018 гг. В работе использованы классический бактериологический метод, масс-спектрометрический метод, молекулярный (полимеразная цепная реакция, ПЦР), серологический метод, авторский способ идентификации бактерий по визуальному образу микроколоний.

При проведении классического бактериологического исследования использовали среду «ПБЛ Оболенск» и среду «ПАЛ Оболенск». Для дальнейшей характеристики и иден-

тификации культуры пересевали на мясопептонный агар с 1% глюкозы (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и мясопептонный бульон (МПБ) с 1% глюкозы (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Биохимическую идентификацию осуществляли с помощью Microbact теста (Oxoid). Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF проводили на приборе Bruker Daltonics. Серологическое типирование осуществляли в реакции латекс-агглютинации (ЛАГ) на стекле с помощью «Латексной тест-системы *Listeria monocytogenes*» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Для проведения ПЦР использовали «Набор реагентов для определения ДНК *Listeria monocytogenes* в биологическом материале методом полимеразной цепной

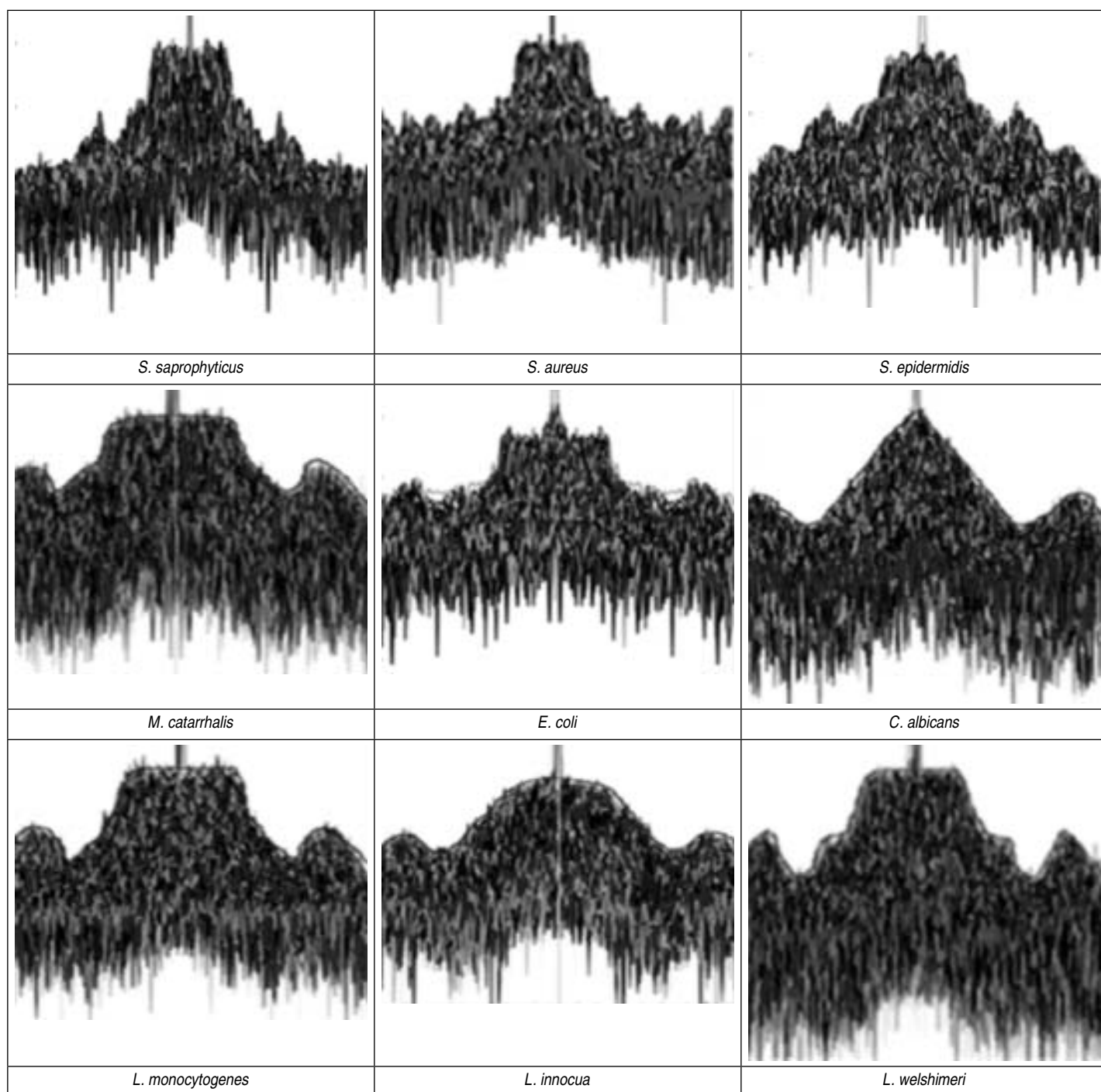


Рис. 2. 3D-спектры полученных шаблонов микроколоний некоторых бактерий.

реакции (ПЦР) «АмплиСенс® *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL».

Реализация авторского способа идентификации листерий до вида по визуальному образу микроколоний осуществлялась по разработанным и зарегистрированным ранее технологиям (патент «Способ выращивания колоний микробных клеток и устройство для его реализации» RU 2522005 (2014 г.), патент «Способ выращивания факультативно-анаэробных микроорганизмов» RU 2668172 (2016 г.)). Запись изображений выросших колоний проводилась через 3 ч роста на плотной питательной среде с помощью микроскопа AxioScore A1 (Zeiss, Германия) при увеличении $\times 630$ и профессиональной цифровой камеры AxioCam HRC Rev3. Использовали специальный объектив N-achroplan, предназначенный для работы с 3D-образами. Изображения микроколоний с помощью встроенной компьютерной программы переводили в 3D-спектры и сравнивали с внутренней базой данных визуальных образов микроколоний бактерий («Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2018620878» (2018 г.)).

Результаты и обсуждение

После исследования выделенных 118 штаммов листерий вышеперечисленными методами оказалось, что 73% из них представлены *L. monocytogenes*, 13% – *L. innocua*, 12% – *L. welshimeri*, 2% – *L. ivanovii*. Поскольку наиболее специфичным методом является молекулярный, то результаты, полученные в ПЦР-анализе, были приняты за основу. С полученными данными полностью совпали результаты серологического и масс-спектрометрического анализов. Кроме того, последний метод помог идентифицировать все виды выделенных листерий.

К сожалению, не все лаборатории пока оснащены необходимым оборудованием для проведения молекулярных и масс-спектрометрических методов исследования бактерий. Поэтому бактериологический метод, описанный в ГОСТ 32031-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*», остается необходимым и востребованным. С помощью классического бактериологического метода были идентифицированы до вида 71% штаммов. Учитывая этот факт, авторами предложено дополнительно к стандартным коммерческим биохимическим наборам использовать несколько тестов, рекомендуемых в Определителе бактерий Берджи [15]. Одним из них является определение гемолитической и лецитиназной активностей. Однако надо иметь в виду, что они могут меняться в процессе накопления культуры и изучения штамма [16–18]. Поэтому необходимо работать с пробами и выделенными штаммами листерий быстро, не допуская множественных пересевов. Кроме того, целесообразно использовать CAMP-тест как со *Staphylococcus aureus*, так и с *Rhodococcus equi* (по возможности), тем более что эти тесты более стабильны, чем два предыдущих. Также помогают в дифференциации видов листерий простые тесты на выявление ферментов, расщепляющих лизин и D-аланин. Из всех наиболее часто встречающихся листерий только представители *L. monocytogenes* имеют эти ферменты. Использование указанных дополнительных тестов позволило правильно идентифици-

ровать 93% штаммов листерий. Такие характерные признаки представлены в таблице.

Однако такой метод диагностики, даже при использовании рекомендуемых питательных сред, позволяет дать результат лишь через 48 ч.

Применение инновационного способа выращивания бактерий и их идентификации по визуальному образу микроколоний дает возможность получить результат уже через 3 ч. Для этого исследуемый материал после прободготовки засевают на поверхность питательной среды в ростовом блоке лаборатории-на-чипе. Через 3 ч инкубации микроскопируют ростовую платформу (рис. 1) и с помощью компьютерной программы получают промежуточный результат в виде 3D-спектров (рис. 2), а затем в текстовом формате – результат идентификации выросших бактерий и число выросших колоний. С помощью такого способа были идентифицированы все штаммы изучаемых листерий. Этот экспрессный способ позволил получить результаты исследования, совпадающие на 87% с результатами ПЦР и MALDI-TOF.

Использование такого способа идентификации листерий позволяет недорого и быстро проводить скрининг продуктов питания и смывов на наличие в них любых листерий, в том числе патогенных. Более того, в 7% случаев при исследовании продуктов питания из одной пробы выделяли 2 вида листерий (например, *L. monocytogenes* и *L. innocua*). Причем использование среды обогащения зачастую приводило к вытеснению патогенных листерий и искажению результатов исследования, что согласуется с наблюдениями ряда исследователей [19, 20]. Поэтому крайне важно получить результат исследования из первичного посева образца.

Выводы

1. Для улучшения дифференциации видов листерий при бактериологическом исследовании рекомендовано использовать ряд простых дополнительных тестов.
2. Предложен быстрый, достоверный и недорогой способ межвидовой идентификации бактерий рода *Listeria* – бактериологическое исследование в формате лаборатории-на-чипе.

Литература

1. Олещенко ЕП, Алферова ЕВ. Листерии как возбудители пищевых инфекций. Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2012;49(3-4):211-2.
2. Храмов МВ, Костенко ЮГ, Юшина ЮК, Батаева ДС. Листерииоз: лабораторная диагностика в современных условиях. Инфекция и иммунитет. 2016;6(3):121.
3. Щербинин АВ, Мезенцев СВ, Спиркина ОС. Листерии в продукции мясоперерабатывающих предприятий. Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2014;8(118):101-4.
4. Бакулов ИА, Васильев ДА, Колбасов ДВ, и др. Листерии и листерииоз. 2-е издание, исправленное и дополненное. Ульяновск, 2016.
5. Farber J, Peterkin P. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev. 1991 Sep;55(3):476-511.
6. Low J, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Vet J. 1997 Jan;153(1):9-29.
7. Painter J, Slutsker L. Listeriosis in humans. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007, p. 75-95.

8. Siegman-Igra Y, Levin R, Weinberger M, Golan Y, Schwartz D, Samra Z, et al. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerg Infect Dis.* 2002 Mar;8(3):305-10. DOI: 10.3201/eid0803.010195
9. Wing EJ, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *J Infect Dis.* 2002 Feb 15;185 Suppl 1:S18-24. DOI: 10.1086/338465
10. Chapin TK, Nightingale KK, Worobo RW, Wiedmann M, Strawn LK. Geographical and meteorological factors associated with isolation of *Listeria species* in New York State produce production and natural environments. *J Food Prot.* 2014 Nov; 77(11):1919-28. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-14-132.
11. Hofer E, Ribeiro R, Feitosa DP. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000 Sep-Oct;95(5):615-20.
12. Linke K, Rückerl I, Brugger K, Karpiskova R, Walland J, Muri-Klinger S, et al. Reservoirs of *Listeria species* in three environmental ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Sep;80(18):5583-92. DOI: 10.1128/AEM.01018-14.
13. McAuley CM, Mcmillan K, Moore SC, Fegan N, Fox EM. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. *J Dairy Sci.* 2014 Dec;97(12):7402-12. DOI: 10.3168/jds.2014-8735
14. Stea EC, Purdue LM, Jamieson RC, Yost CK, Hansen LT. Comparison of the prevalences and diversities of *Listeria species* and *Listeria monocytogenes* in an urban and a rural agricultural watershed. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Jun; 81(11):3812-22. DOI: 10.1128/AEM.00416-15
15. Vos P, Garrity GM, Jones D, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume Three, Phylum XIII - The Firmicutes, 2009, p. 244-256.
16. Ермолаева СА, Белый ЮФ, Тартаковский ИС. Изменение уровня экспрессии факторов вирулентности *Listeria monocytogenes* под влиянием внешних условий. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2000; 1:17-9.
17. Карпова ТИ, Ермолаева СА, Васкес-Боланд ХА. Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes*. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001;3(3):266-73.
18. Data AR, Kothary MH. Effects of glucose. Growth temperature, and pH on listeriolisine O production in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Oct;59(10):3495-7.
19. Cornu M, Kalmokoff M, Flandrois J-P. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *Int J Food Microbiol.* 2002 Mar;73(2-3):261-74.
20. Curiale MS, Lewus C. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *J Food Prot.* 1994;57:1048-51.
8. Siegman-Igra Y, Levin R, Weinberger M, Golan Y, Schwartz D, Samra Z, et al. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerg Infect Dis.* 2002 Mar;8(3):305-10. DOI: 10.3201/eid0803.010195
9. Wing EJ, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *J Infect Dis.* 2002 Feb 15;185 Suppl 1:S18-24. DOI: 10.1086/338465
10. Chapin TK, Nightingale KK, Worobo RW, Wiedmann M, Strawn LK. Geographical and meteorological factors associated with isolation of *Listeria species* in New York State produce production and natural environments. *J Food Prot.* 2014 Nov; 77(11):1919-28. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-14-132.
11. Hofer E, Ribeiro R, Feitosa DP. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000 Sep-Oct;95(5):615-20.
12. Linke K, Rückerl I, Brugger K, Karpiskova R, Walland J, Muri-Klinger S, et al. Reservoirs of *Listeria species* in three environmental ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Sep;80(18):5583-92. DOI: 10.1128/AEM.01018-14.
13. McAuley CM, Mcmillan K, Moore SC, Fegan N, Fox EM. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. *J Dairy Sci.* 2014 Dec;97(12):7402-12. DOI: 10.3168/jds.2014-8735
14. Stea EC, Purdue LM, Jamieson RC, Yost CK, Hansen LT. Comparison of the prevalences and diversities of *Listeria species* and *Listeria monocytogenes* in an urban and a rural agricultural watershed. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Jun; 81(11):3812-22. DOI: 10.1128/AEM.00416-15
15. Vos P, Garrity GM, Jones D, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume Three, Phylum XIII - The Firmicutes, 2009, p. 244-256.
16. Ermolaeva SA, Belyi YuF, Tartakovskii IS. Izmenenie urovnya ekspressii faktorov virulentnosti *Listeria monocytogenes* pod vliyaniem vneshnikh uslovii. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2000;1:17-9.
17. Karpova TI, Ermolaeva SA, Vaskes-Boland KhA. Novye metody identifikatsii *Listeria monocytogenes*. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2001;3(3):266-73.
18. Data AR, Kothary MH. Effects of glucose. Growth temperature, and pH on listeriolisine O production in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Oct;59(10):3495-7.
19. Cornu M, Kalmokoff M, Flandrois J-P. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *Int J Food Microbiol.* 2002 Mar;73(2-3):261-74.
20. Curiale MS, Lewus C. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *J Food Prot.* 1994;57:1048-51.

References

Информация об авторах:

Деревянченко Ирина Анатольевна, биолог бактериологической лаборатории филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» в Невском и Красногвардейском районах
Адрес: 192012, Санкт-Петербург, ул. Ново-Александровская, 12
Телефон: (812) 362-4094
E-mail: tamiirina110804@mail.ru

Смирнова Елена Викторовна, врач-бактериолог, заведующая бактериологической лабораторией филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» в Невском и Красногвардейском районах
Адрес: 192012, Санкт-Петербург, ул. Ново-Александровская, 12
Телефон: (812) 362-4094
E-mail: elenasmirno@yandex.ru

Information about authors:

Irina A. Derevjanchenko, biologist, Center of hygiene and epidemiology in the city of St. Petersburg in the Nevsky and Krasnogvardeisky districts
Address: 12, Novo-Aleksandrovskaya str., St. Petersburg, 192012, Russian Federation
Phone: (812) 362-4094
E-mail: tamiirina110804@mail.ru

Elena V. Smirnova, bacteriologist, head of bacteriological laboratory Center of hygiene and epidemiology in the city of St. Petersburg in the Nevskom and Krasnogvardeiskom districts
Address: 12, Novo-Aleksandrovskaya str., St. Petersburg, 192012, Russian Federation
Phone: (812) 362-4094
E-mail: elenasmirno@yandex.ru

1. Oleshchenko EP, Alferova EV. *Listeria* as causative agents of food borne infections. *Health. Medical ecology. Science.* 2012;49(3-4):211-2. (In Russian).
2. Khramov MV, Kostenko YuG, Yushina YuK, Bataeva DS. *Listeriosis: laboratornaya diagnostika v sovremennykh usloviyakh.* Russian Journal of Infection and Immunity. 2016;6(3):121. (In Russian).
3. Shcherbinin AV, Mezentsev SV, Spirkina OS. *Listeriae* in the products of meat-processing companies. *Bulletin of Altai State Agricultural University.* 2014; 8(118):101-4. (In Russian).
4. Bakulov IA, Vasil'ev DA, Kolbasov DV, et al. *Listerii i listerioz [Listeria and listeriosis].* 2nd ed. Ul'yanovsk, 2016. (In Russian).
5. Farber J, Peterkin P. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 1991 Sep;55(3):476-511.
6. Low J, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J.* 1997 Jan;153(1):9-29.
7. Painter J, Slutsker L. Listeriosis in humans. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food Safety.* Boca Raton, FL: CRC Press, 2007, p. 75-95.