

美作地域の食品リステリア菌汚染および病原遺伝子解析

Foods contamination and its pathogenic gene analysis of the *Listeria spp.* in Mimasaka area

山口 仁孝・宮地 功大*

キーワード： *Listeria* 菌、病原遺伝子 (*hlyA*、*prfA*、*inlA*、*iap*、*actA*)

要 約

美作地域で販売されている非加熱喫食 (RTE: Ready to eat) 食品および生鮮食肉 126 検体を調査した結果、牛ミノ、牛大腸の 2 検体から、*Listeria monocytogenes* を分離・同定し、一部の病原遺伝子を保有していることを確認した。また、鶏ムネ肉からは、*Listeria innocua* を分離・同定した。

病原性 *Listeria* 菌のもつ遺伝子 (*hlyA*、*prfA*、*inlA*、*iap*、*actA*) について検索した結果、今回分離した株では、宿主に対する病原性発現に大きく影響する *hlyA* や *prfA* が認められなかったことから、現時点ではリステリア菌による食中毒リスクは大きくはないものと想像された。しかしながら、病原遺伝子 *actA* について、DNA の挿入が認められたことから、今後新たにヒトに対してより強い病原性遺伝子が挿入された株が出現する可能性も考えられるため、引き続き環境や食品中のリステリア菌について、その動向に注意する必要があるものと考えられた。

はじめに

リステリア菌は土壌や下水などの自然界に広く存在し、発育温度域は 0℃~45℃と広く、10℃以下の低温でも増殖できることや他の細菌と比べ、耐塩性、耐酸性であることが知られている。また、宿主細胞内で増殖する細胞内寄生性であることや、多くの動物も感染する人獣共通感染菌であることも特徴として挙げられる。一方、リステリア菌を経口摂取して感染するリステリア症については、軽症の場合は、発熱や下痢などの食中毒様の症状を呈す程度であるが、重症化した場合には、髄膜脳炎や敗血症などを引き起こし、致死率が約 20~30% に及ぶと報告されており、食品を関して経口感染する危険な食中毒起因菌のひとつとして知られている¹⁾。

本邦における重度のリステリア症患者は、毎年平均

83 人程度と推定されている²⁾が、リステリア症発生の際の報告義務が病院等に課せられておらず、また、患者によって潜伏期間が一定しないため、ほぼすべての事例で感染源および感染経路はともに明らかにされることがない。

海外で感染源が判明した事例については、牛乳、チーズといった乳製品、ベーコンやスモークサーモン、たらこなどの畜水産加工品が³⁾、本邦においては、ナチュラルチーズが感染源として判明した唯一の集団感染事例として報告され⁴⁾、いずれも RTE 食品が主な原因食品である。

また、本邦における市販食品の汚染実態調査によると、他の RTE 食品に比べ、スモークサーモン (11.1~27.8%)、ネギトロ (14.3%)、魚卵 (10.4%) などの水産加工食品における汚染率が高いことが特徴の一つと言われている²⁾。

*美作大学生生活科学部食物学科学学生

岡山県においては、2005年に「動物を含めた環境中及び食肉のリステリア汚染状況と迅速な菌種同定」が報告され、市販食肉（ウシ、ブタ）などのサンプルから、病原性を持つリステリア菌が、26検体中4株（15.4%）検出されている⁵⁾。

一方、2011年アメリカにおいては、これまでに報告がない、メロンを原因食品としたリステリア菌による集団食中毒が発生し、13人もの死者を出したことで大きな社会問題となった⁶⁾。

これらのことから、リステリア症の予防には、環境や食品中の幅広い汚染実態の把握がきわめて重要と考えられる。そこで、本研究では、美作地域で栽培・販売されている、野菜、果物などの RTE 食品および生

鮮食肉を中心に、リステリア菌の汚染実態調査を行うとともに、分離した株について病原遺伝子を解析し、食中毒のリスクについて若干の考察を行った。

材料と方法

野菜 28種類 84検体（美作地域産 68、県内産 7、県外産 9）、果物 11種類 15検体（美作地域産 6、県内産 2、県外産 6、外国産 1）、肉類 12種類 20検体（美作地域産 9、県内産 1、県外産 3、国産 6、外国産 1）、魚介類（産地又は加工地）7種類 7検体（美作地域産 2、県内産 4、県外産 1）の合計 126検体について調査を行った（表1）。

表1 サンプル内訳

No.	分類	サンプル名	産地	No.	分類	サンプル名	産地	No.	分類	サンプル名	産地
1	野菜	大葉	津山産	43	野菜	トマト	美作産	85	果物	青りんご	長崎県産
2	野菜	オクラ	長崎県産	44	野菜	トマト	長崎県産	86	果物	いちじく	和歌山県産
3	野菜	オクラ	熊本県産	45	野菜	ナス	長崎県産	87	果物	巨峰	長崎県産
4	野菜	オクラ	吉備中央産	46	野菜	ニラ	津山産	88	果物	デラウエア	鳥取県産
5	野菜	かぶ	津山産	47	野菜	ニラ	津山産	89	果物	なし	和歌山県産
6	野菜	キャベツ	津山産	48	野菜	ニラ	奥津産	90	果物	びわ	久米南産
7	野菜	キャベツ	津山産	49	野菜	ニラ	高知県産	91	果物	ブルーベリー	津山産
8	野菜	キャベツ	津山産	50	野菜	ニンジン	津山産	92	果物	ブルーベリー	吉備中央産
9	野菜	キャベツ	津山産	51	野菜	ニンジン	津山産	93	果物	マスカット	久米南産
10	野菜	キャベツ	津山産	52	野菜	ニンジン	鏡野産	94	果物	マスカット	久米南産
11	野菜	キャベツ	津山産	53	野菜	ネギ	奥津産	95	果物	メロン	メキシコ産
12	野菜	キャベツ	津山産	54	野菜	ネギ	久米南産	96	果物	メロン	津山産
13	野菜	キャベツ	津山産	55	野菜	ネギ	西粟倉産	97	果物	もも	和歌山県産
14	野菜	キャベツ	美作産	56	野菜	白菜	西粟倉産	98	果物	もも	吉備中央産
15	野菜	キャベツ	西粟倉産	57	野菜	ピーマン	津山産	99	果物	山もも	津山産
16	野菜	キャベツ	久米南産	58	野菜	ピーマン	美作産	100	肉類	牛小腸	津山産
17	野菜	きゅうり	津山産	59	野菜	ピーマン	長崎県産	101	肉類	牛小腸	津山産
18	野菜	きゅうり	津山産	60	野菜	ピーマン	宮崎県産	102	肉類	牛小腸	国産
19	野菜	きゅうり	鏡野産	61	野菜	ふき	鏡野産	103	肉類	牛干枚	国産
20	野菜	きゅうり	久米南産	62	野菜	フロッコリー	美作産	104	肉類	牛大腸	津山産
21	野菜	きゅうり	美作産	63	野菜	ほうれん草	奥津産	105	肉類	牛大腸	津山産
22	野菜	きゅうり	長崎県産	64	野菜	ほうれん草	西粟倉産	106	肉類	牛大腸	津山産
23	野菜	ごぼう	津山産	65	野菜	みつば	美作産	107	肉類	牛大腸	国産
24	野菜	ごぼう	鏡野産	66	野菜	みつば	美作産	108	肉類	牛ミノ	津山産
25	野菜	小松菜	津山産	67	野菜	ミニトマト	鏡野産	109	肉類	牛ミノ	津山産
26	野菜	サニーレタス	津山産	68	野菜	ミニトマト	新見産	110	肉類	牛ミノ	津山産
27	野菜	サニーレタス	新見産	69	野菜	ミニトマト	美作産	111	肉類	牛ミノ	国産
28	野菜	サニーレタス	美作産	70	野菜	ミニトマト	津山産	112	肉類	牛レバー	津山産
29	野菜	サニーレタス	吉備中央産	71	野菜	ミニトマト	津山産	113	肉類	鶏皮	宮崎県産
30	野菜	しょうが	久米南産	72	野菜	ミニトマト	吉備中央産	114	肉類	鶏肝	宮崎県産
31	野菜	しょうが	高知県産	73	野菜	ミニトマト	津山産	115	肉類	鶏手羽先	岡山県産
32	野菜	セロリ	吉備中央産	74	野菜	らっきょう	奥津産	116	肉類	鶏ムネ肉	国産
33	野菜	大根	津山産	75	野菜	レタス	津山産	117	肉類	鶏もも肉	宮崎県産
34	野菜	たけのこ	鏡野産	76	野菜	レタス	津山産	118	肉類	豚角切り	国産
35	野菜	たけのこ	津山産	77	野菜	レタス	津山産	119	肉類	豚肩ロース	カナダ産
36	野菜	玉ねぎ	津山産	78	野菜	レタス	津山産	120	魚介類	あじ	愛媛県産
37	野菜	玉ねぎ	津山産	79	野菜	レタス	鏡野産	121	魚介類	あまご	鏡野産
38	野菜	玉ねぎ	鏡野産	80	野菜	レタス	新見産	122	魚介類	いか	吉備中央産
39	野菜	玉ねぎ	久米南産	81	野菜	レタス	美作産	123	魚介類	しじみ	吉備中央産
40	野菜	タラの芽	鏡野産	82	野菜	レタス	西粟倉産	124	魚介類	サバ	吉備中央産
41	野菜	トマト	津山産	83	野菜	レタス	奥津産	125	魚介類	たらこ	津山産
42	野菜	トマト	鏡野産	84	野菜	レタス	久米南産	126	魚介類	めんたいこ	吉備中央産

1) 食品からの菌分離

常法⁷⁾に従い、滅菌生理食塩水を用い、10 % (w/v) サンプル乳剤を作成し、緩衝リステリア増菌ブイヨン (Oxoid) 9 ml にサンプル乳剤 1 ml を添加し、30℃、24 時間培養後、PALCAM 培地 (Oxoid) に画線塗抹し、30℃、24 時間～72 時間好気培養を行った。

2) *Listeria monocytogenes* の PCR スクリーニング DNA 抽出操作

- ① PALCAM 培地上のリステリア菌が疑われるコロニーを 1 白金耳それぞれ釣菌し TSA 培地 (Difco) で純培養後、それらから単一コロニーを釣菌して TSB (Difco) で 30℃、24 時間増菌培養した。
- ② TSB 1 ml を 1.5 ml チューブに移し、遠心分離 (12,000rpm) を 2 分間行った。

③ 上澄み液を捨て、細菌沈渣に滅菌蒸留水 1 ml を加え、Vortex 後 10 分間、煮沸した。

④ 遠心分離 (12,000rpm) を 2 分間行い、上澄み液を PCR 用 Template として使用した。

Listeria monocytogenes 特異 Primer の設計・PCR NCBI GENE データベースより *Listeria* 菌の *gyrB* 配列 (*L.innocua*: NC 003212、*L.welshimeri*: NC 008555、*L.seeligeri*: NC 013891、*L.ivanovii*: NC 016011、*L.monocytogenes*: AE 017262 (Serotype 4 b)、FR 720325 (Serotype 7)、FR 733643 (Serotype 4 d)、HF 558398 (Serotype 4 b)) を参照し、各塩基配列を Alignment 後、*Listeria monocytogenes* 特異配列を認識する Primer を設計した (表 2)。

表 2 *Listeria monocytogenes gyr B* 塩基配列を特異的に認識する Primer set

Primer	Sequence
<i>L.m.gyrB</i> -s	5'- cgt tgt agc ttc tcg tgc acg tct gg -3'
<i>L.m.gyrB</i> -as	5'- gct gta ttt agt gtc tcc gtc aag gg -3'

Amplicon size : 570bp

PCR は、Takara Ex Taq HS (Takara) を用い、常法⁸⁾に従い、MJ mini Thermal Cycler (Bio-Rad) を用い PCR を実施 (表 3) 後、EtBr 加 Agarose gel を用いた電気泳動を Mupid[®] -2 Plus で行った後、

Transilluminator (TFML-20 E : フナコシ) にて増幅バンドを確認し、ポラロイドカメラ (DS-300 : フナコシ) でゲルを撮影した。

表 3 PCR condition

pre-heating	94℃	5min.	} 35cycles
Denature	94℃	30sec.	
Annealing	55℃	30sec.	
Extention	74℃	30sec.	
Final Extension	74℃	5min.	
post-cooling	4℃	∞	

3) 同定試験

菌分離においてリステリア菌を疑うコロニーまたは PCR スクリーニングで陽性であった菌株については、リステリア菌属同定キット「API Listeria」 (biomerieux) を用い同定試験を実施した。

① PALCAM 培地で 30℃、24 時間～72 時間培養。

② 単離コロニーを釣菌し、リステリア緩衝ブイヨンで増菌 (30℃、24 時間)。

③ TSA 培地で 30℃、24 時間純培養。

- ④生理食塩水で菌液を調製 (McFarland=3)。
 ⑤API リステリアの各 well に菌液を注入し、35℃、24 時間培養後判定した。

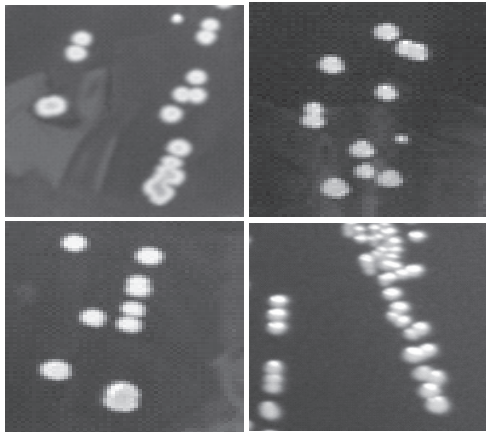
4) 病原遺伝子の解析

食中毒患者から分離されるリステリア菌株の多くは、宿主細胞への接着や寄生細胞内での菌体防御、隣接細胞への移動などに関与する病原遺伝子を複数持つことが確認されている¹⁾。そこで、今回分離したリステリア菌株について、*hlyA*、*prfA*、*inlA*、*iap*、*actA* の 5 種類の病原遺伝子について、Indrawattana らの文献⁹⁾を参考に、PCR 法を用いて病原遺伝子の有無を確認した。

結 果

1) 食品からの菌分離結果

野菜、果物、肉類、魚介類など合計 126 サンプル検体から菌分離を試みた結果、PALCAM 培地上にコロニーが確認されたのは、No.17、18、19 きゅうり、No.30 しょうが、No.34、35 たけのこ、No.95 メロン、No.104、105 牛大腸、No.108、109、110 牛ミノ、No.116 鶏ムネ肉の合計 13 検体で、特に *Listeria monocytogenes* 標準株 (ATCC 13932) と同様、淡緑色コロニーを形成し、コロニー周辺が黒化していたのが確認されたサンプルは No.104 牛大腸、No.108 牛ミノ、No.116 鶏ムネ肉であった (図 1)。



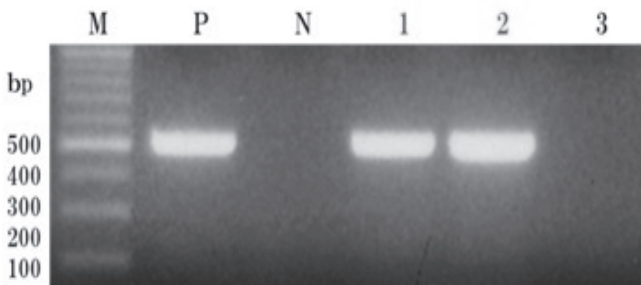
1	3
2	4

1	<i>Listeria monocytogenes</i> 標準株
2	No. 104 牛大腸
3	No. 108 牛ミノ
4	No.116 鶏ムネ肉

図 1 PALCAM 培地上の *Listeria* 様コロニー

- 2) *Listeria monocytogenes* の PCR スクリーニング
 リステリア菌が疑われた上記 13 検体について、純培養後 *Listeria monocytogenes gyrB* 特異プライ

マーを用いた PCR スクリーニングを行った結果、No.104 牛大腸、No.108 牛ミノ分離株の DNA において、遺伝子の増幅が確認された。(図 2)



Lane No.	Sample
M	100bp DNA Ladder Marker
P	<i>Listeria monocytogenes</i> 標準株
N	Negative control
1	No.104 牛大腸
2	No.108 牛ミノ
3	No.116 鶏ムネ肉

図 2 *Listeria monocytogenes gyrB* 特異配列の PCR 結果

4) 分離株の同定試験結果

菌分離でリステリア菌を疑うコロニーを呈した鶏ムネ肉、PCR スクリーニングで遺伝子の増幅が確認できた牛ミノ、牛大腸分離株について、API リステリ

アを用いた同定試験を実施した結果、No.104 牛大腸、No.108 牛ミノ分離株を *Listeria monocytogenes*、No.116 鶏ムネ肉分離株を *Listeria innocua* と同定した (図3)。

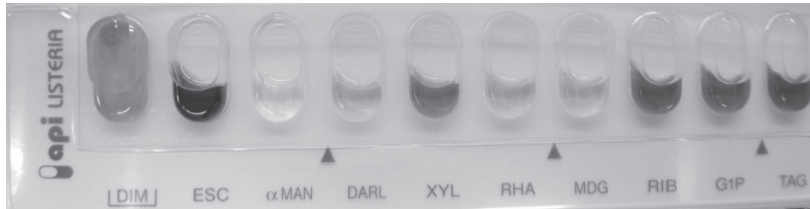


図3 API Listeria (No.104 牛大腸分離株)の糖分解

表4 API Listeria による同定試験結果

サンプル	糖 種 類										菌 名
	DIM	ESC	αMAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	GIP	TAG	
ATCC 13932	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	<i>L.monocytogenes</i>
牛ミノ	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	<i>L.monocytogenes</i>
牛大腸	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	<i>L.monocytogenes</i>
鶏ムネ肉	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	<i>L.innocua</i>

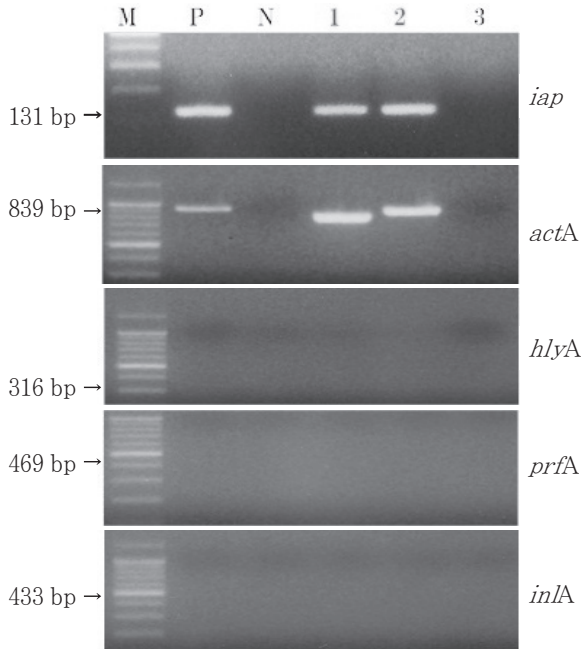
4) 病原遺伝子の解析結果

今回、分離・同定したリステリア菌について、5種類の病原遺伝子 (*hlyA*、*prfA*、*inlA*、*iap*、*actA*) の解析を行った結果、No.116 鶏ムネ肉分離株 *Listeria innocua* は、いずれの遺伝子についても増幅は確認できなかった。一方、No.104 牛ミノ、No.108 牛大腸分離株においては、*iap* および *actA* の2つの病原遺伝子について、両株ともPCR 増幅遺伝子が認められた(表5、図4)。とくに、*actA* については、*Listeria monocytogenes* 標準株および No.108 牛ミノ分離株と No.104 牛大腸分離株との間で、増幅遺伝子断片長の違いが確認された(図4)。

表5 病原遺伝子検索結果

病原遺伝子		amplicon size (bp)	PCR 結果		
名称	機能		104	108	116
<i>iap</i>	細胞侵入	131	+	+	-
<i>actA</i>	細胞質内移動	839	+	+*	-
<i>hlyA</i>	リステリオシンO	316	-	-	-
<i>prfA</i>	病原遺伝子発現調節	469	-	-	-
<i>inlA</i>	細胞表面付着	458	-	-	-

*予想サイズより約100bp高い位置



Lane No.	Sample
M	100bp DNA Ladder Marker
P	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC13932
N	Negative control
1	No.104 牛大腸
2	No.108 牛ミノ
3	No.116 鶏ハネ肉

図4 病原遺伝子解析結果

actA の制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析

actA の RFLP 解析には、*Sph* I と *Sac* I の 2 種類の制限酵素を用いて行った。

Sph I は *actA* PCR 増幅遺伝子断片 839 bp の 5' 末端側から 157 bp、*Sac* I は、同じく増幅断片の 5' 末端側から 467 bp で切断するため、*Sph* I では約 160 bp と 680 bp、*Sac* I では約 370 bp と 470 bp のそれぞれ 2 断片に切断されると考えられる (図5、6)。

RFLP 解析の結果、*Sph* I では、160 bp 付近の断片が全てのサンプルで認められたこと、そして、牛ミノ分離株では 680 bp 付近に、標準株および牛大腸分離株では 780 bp 付近に断片が存在することから、標準株および牛大腸分離株では *Sph* I 682 bp 断片中のどこかに約 100 bp の insertion が含まれていることが考えられた (図6)。

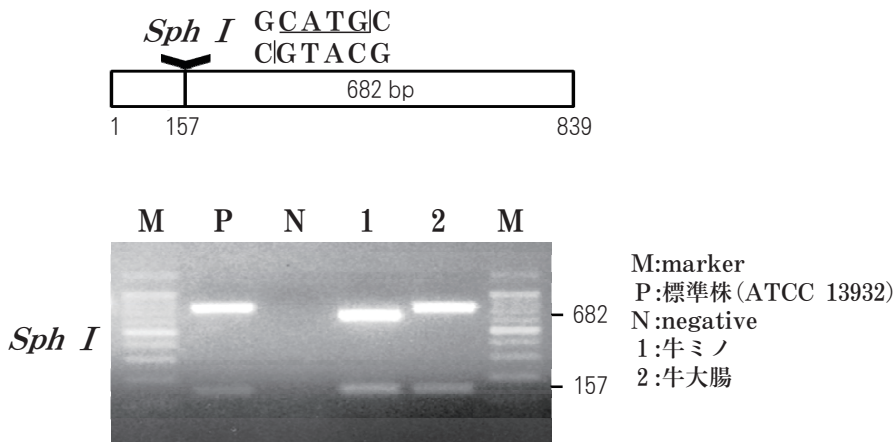


図5 予想される制限酵素 *Sph* I 切断部位と実際の *Sph* I 切断結果

さらに *Sac I* を用いた解析で、370 bp および 470 bp 付近の 2 つの断片長がすべてのサンプルで認められ、かつ *actA* 増幅断片が長いサンプル（標準株および牛大腸分離株）では、100 bp 前後の断片が 3 本目

のバンドとして特異的に確認された（図 6）。このことから、*Sac I* サイト付近に 100 bp 前後の insertion が含まれていることが推察された（図 7）。

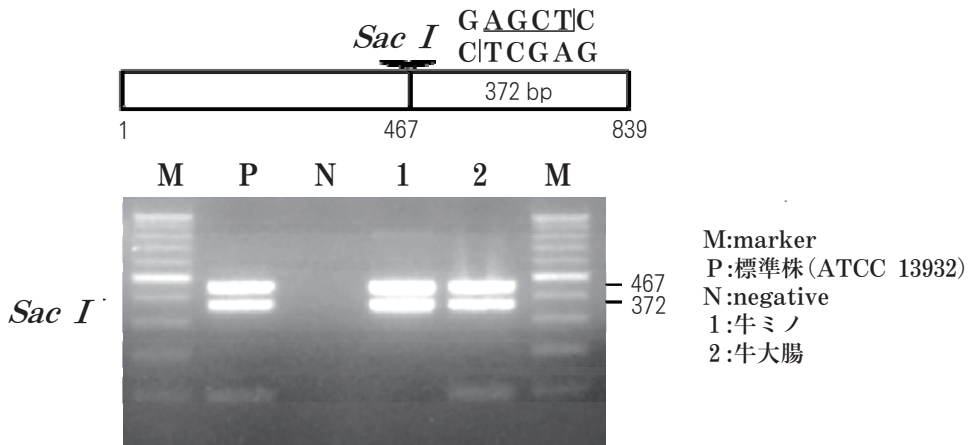


図 6 予想される制限酵素 *Sph I* 切断部位と実際の *Sph I* 切断結果

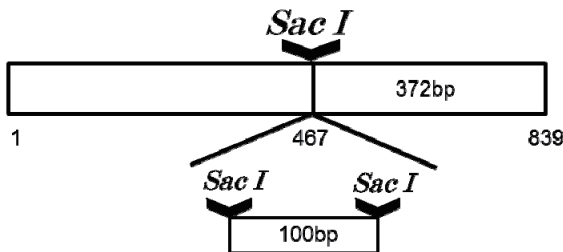


図 7 想像される insertion 部位

考 察

今回、主に美作地域で市販されている 126 検体の食品サンプルについて調査を行った結果、3 検体 (2.4%) から *Listeria spp.* を分離した。通常、リステリア食中毒患者から分離される *hlyA* や *prfA* 遺伝子を保有する発症リスクの高い *Listeria spp.* は分離されなかった。

しかしながら、過去の報告⁴⁾のとおり、牛ミノ、牛大腸の 2 検体から *Listeria monocytogenes* 2 株、鶏ムネ肉から *Listeria innocua* 1 株を分離・同定し、畜産物においてリステリア菌汚染率が高いことが再確認できた。このことから、とくに牛や鶏の堆肥、さらにそれらを有機肥料として用いて栽培する野菜や果物

についても、リステリア菌汚染のリスクがあるものと考えられた。

分離株の病原遺伝子解析においては、*iap*、*actA* の 2 つ病原遺伝子を保有した株が検出されたものの、タンパク質溶解毒リステリオリシン O の遺伝子 *hlyA* や複数の病原遺伝子の制御や発現に関与する *prfA* が確認できなかったことから、いずれの株もヒトに対しては病原性が非常に弱い株であると考えられた。

また、*actA* については、今回とは異なる Jaradat ら¹⁰⁾ の primer を用いた過去の報告で、今回と同様に増幅断片長の違いが確認され、血清型との関連が指摘されているが、insert 部分の位置や遺伝子配列・病原性の違い等の詳細についてはまったく検索されていない¹¹⁾。

今回の解析で PCR 増幅断片 5' 末端から 370 bp (Sac I サイト) 付近に約 100 bp の DNA insertion を含むもの (標準株および No.108 牛ミノ分離株) と含まない株 (No.104 牛大腸分離株) が確認されたことから、自然界では病原遺伝子の部位に変異や挿入等が頻繁に起こっていることが想像された。しかしながら、今回の解析では insertion DNA のシーケンスを確認していないため、この insertion DNA が何らかのタンパク質をコードしたものなのか、*actA* あるいはその下流にある病原遺伝子の発現に影響を与えているのかなど、不明な点が多く残された。今後さらなるステップとして、これら変異株の汚染実態の把握とともに、*actA* insertion を持つ *Listeria spp.* の病原性の有無・強弱について、細胞や動物を用いた毒性試験等を行い精査する必要があるものと思われた。

謝 辞

遺伝子検索において、試薬の提供等をしていただきました、本学食物学科亀井正治教授に深謝いたします。

参考文献

- 1) M L Gray and A H Killinger, *Listeria monocytogenes* and listeric infections, *Bacteriol. Rev.* 1966, 30(2):309-371
- 2) 社団法人 畜産技術協会, 平成 21 年度食品安全確保総合調査「食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書」, 22 リステリア菌, 平成 22 年 3 月
- 3) J M Farber and P I Peterkin, *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen, *Microbiol. Rev.*, 55(3) : 476-511, 1991
- 4) A. OKUTANI, Y. OKADA, S. YAMAMOTO AND S. IGIMI, *Epidemiol. Infect.*, 132 : 769-772, 2004
- 5) 狩屋英明, 大畠律子, 中嶋洋, 国富泰二: 動物を含めた環境中及び調理用食肉の *Listeria* 汚染状況, 岡山県環境保健センター年報, 2005
- 6) Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Jensen Farms Cantaloupe-United States, August-September 2011, *MMWR / October 7 / Vol. 60 / No. 39* 1357-8, 2011
- 7) 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針微生物編, 2 章細菌, 9 試料の調整, p 61-3, (社) 日本食品衛生協会, 2004
- 8) J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. , 2001
- 9) Nitaya Indrawattana et al., Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Raw Meats Marketed in Bangkok and Characterization of the Isolates by Phenotypic and Molecular Methods. *J. HEALTH POPUL NUTR* ; Feb ; 29(1) : 26-38, 2011
- 10) Jaradat.Z.W., Schutze.G.E., Bhunia.A.K. : Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes, *Int.J.Food.Microbiol.*, 76, 1-10, 2002
- 11) 狩屋英明, 大畠律子, 中嶋洋: 食肉及び牛直腸内容物から検出された *Listeria* の生化学的性状と病原遺伝子保有状況並びにその遺伝子系統解析, 岡山県環境保健センター年報, 2007

SUMMARY

We surveyed the contamination of *Listeria spp.* for 126 samples of RTE (ready to eat) or raw meat in Mimasaka area. For the results, two strains were identified from cattle meat (stomach I, large intestine) as *Listeria monocytogenes* which have two pathogenic genes, and one strain was identified *L.innocua* from chicken meat.

These strains were examined about pathogenic *Listeria spp.* possessing five major virulent

genes (*hlyA*, *prfA*, *inlA*, *iap*, *actA*) by PCR. As the most important genes for express pathogenicity such as *hlyA* or *prfA* were not determined, so it seems there is not high risk for the human *Listeriosis* from these foods for now. But we found the insertion in *actA* gene at one strain, so it was concerned to appear the strain which has integrated the newly stronger virulent genes in the future.

These data shows that monitoring for fields and foods (RTE or raw meat) contamination of *Listeria spp.* widely would be necessary to continue.

