

Multiplex PCR 기법을 이용한 *Salmonella* Enteritidis와 *Salmonella* Typhimurium의 특이적 검출에 관한 연구

이우원[†] · 이승미 · 이강록 · 김금향 · 이동수

축산물 위생검사소

Identification of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium by Multiplex Polymerase Chain Reaction

Woo-Won Lee[†], Seung-Mi Lee, Gang-Rok Lee, Geum-Hyang Kim and Dong-Soo Lee

Veterinary Service Laboratory

Abstract

Salmonella species are the most important etiologic agents of food-borne acute gastroenteritis. The most common serotypes isolated from humans are *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (*S. Typhimurium*) and *S. Enteritidis*. Traditional detection methods for *Salmonella* are based on cultures using selective media and characterization of suspicious colonies by biochemical and serological tests. These methods are generally time-consuming and not so highly sensitive. Recently, the polymerase chain reaction (PCR) has been used as a highly sensitive, specific, and rapid test for the presence of pathogenic bacteria. In this study, a multiplex PCR (m-PCR) was used to detect *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*. We selected m-PCR target genes, which were the *spv* (virulence plasmid specific for *S. Enteritidis*) and *sefA* (*S. Enteritidis* fimbrial antigen) genes, *fliC* (H1-i antigen specific for *S. Typhimurium*) and a randomly cloned sequence specific for the genus *Salmonella*.

With the m-PCR, random sequence was detected from all strains of *Salmonella* spp., *spv* and *sefA* were detected from all strains of *S. Enteritidis* (100%), and *fliC* was detected from all strains of *S. Typhimurium* (100%). This assay indicates that the specificity of the m-PCR makes them potentially valuable tool for detection of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*.

Key Words : *Salmonella* species, Gastroenteritis, Multiplex polymerase chain reaction.

서 론

*Salmonella*속 균은 그람음성의 통성 혐기성 세포내 기생세균으로서 사람과 동물을 비롯하여 자연계에 널리 분포하고 있다. 이들 균에 감염되면 설사, 쇠약, 발열 및 패혈증 등의 전신성 증상을 일으키며, 특이성이 있는 몇몇 균종을 제외한 대부분의 균 속이 인수공통전염병의 원인세균으로 알려져 있다^{7,30}.

*Salmonella enterica*는 수십 년 동안 사람에서 식중독의 주요 병원체로 인식되어 왔으며, 주로 동물유래 균으로 오염된 음식물 섭취를 통하여 감염된 것으로 알려져 있다²⁰. 살모넬라 감염증은 사람에서 가장 흔한 식품매개 질병으로서 미국에서 발생하는 식중독의 약 30%를 차지하며, 국내에서도 식중독 원인세균 중 가장 높은 분포를 나타내고 있다^{23,30}.

Salmonella enterica serotype Enteritidis (*S. Enteritidis*)는 1980년대 중반 이후 사람에서 식품매개를 통한 질병이 증가되고 있다. 이 균은 사람과 동물에 감염하여 주

로 급성장염을 일으키며, 오염된 계란이나 식품을 통하여 폭발적인 식중독 발생을 일으키고 있다^{15,24}. 특히 NSC (National *Salmonella* Center)는 이 균을 1997년 이후부터 살모넬라 감염증에서 가장 많이 분리되는 serotype (50%)으로 보고하고 있다⁴.

*S. Typhimurium*은 전 세계에 널리 분포하고 있는 균종으로, 사람을 비롯하여 소, 말, 양, 개, 가금, 설치류 및 조류 등 다양한 숙주에 감염되어 장염, 패혈증, 유산 및 폐렴 등을 일으키며, 사람에서 식품을 매개로 한 식중독 발생이 많아 공중보건학적으로 매우 중요시되고 있다^{6,18}. 소의 살모넬라 감염증에는 75종 이상의 serotype이 관련되어 위장염, 패혈증, 수막염, 관절염, 폐렴, 유산, 유량감소 및 발육지연 등을 일으키고³, 돼지에서는 *S. Choleraesuis*와 *S. Typhisuis*에 의한 급성·열성패혈증과 *S. Typhimurium* 등에 의한 급·만성위장염을 유발하여 경제적인 피해가 큰 것으로 알려져 있다^{3,20}.

[†] Corresponding author. E-Mail: wwlee@busan.go.kr
Phone: 051-331-0095, Fax: 051-338-8266

*S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 진단하기 위해서는 먼저 *Salmonella*속 균의 분리 및 동정이 선행되어야 한다. 또한 lipopolysaccharide (LPS, O항원)와 flagella antigen (H 항원)을 이용하여 2,500여 혈청형 구분을 위한 검사가 이루어져야 한다^{21,22}. 전통적인 배양방법이 많은 시간과 복잡한 절차가 요구되어 최근에는 *Salmonella*속 균을 신속하고 정확하게 분리하기 위하여 선택성이 높은 Rambach agar를 이용하거나²³ MUCAP test 시약 등을 이용하기도 한다²⁴. 혈청형을 동정하기 위해서는 항원에 대한 인자 혈청을 이용한 응집반응법이 이용되고 있고, 다른 방법으로 whole cell, LPS 및 OMP 항원을 이용한 ELISA 기법은 유용하고 시간을 절약할 수 있으나 다른 균종과의 교차반응으로 인한 위양성 반응이 흔하여 특이성에서 문제 시 되고 있다²⁵. 이러한 문제점을 해결하고자 근년에는 plasmid profile, 중합효소연쇄반응 (PCR), southern blot hybridization 기법을 기초로 한 분자유전학적 분석 및 제한효소 처리에 의한 DNA의 절단 양상 등을 분석하여 역학관계를 규명하고 있다^{19,21,22,25~28,31}.

*Salmonella*속 균의 유전자는 chromosomal DNA 복제에 관여하는 유전자인 *oriC*²⁶, phosphate 결핍 환경에서 유도되는 균체 외막 단백질 발현 유전자인 *phoE*^{29,30}, LPS O항원 합성과 관련된 *rfb*³, fimbria 항원 유전자인 *agf*¹⁹, *sef*^{5,28}, plasmid에 암호된 병원성 발현유전자인 *spv*¹⁴, 상피세포에 대한 부착과 침습에 관련된 *inv*^{11,31}, fimbria 구조항원 유전자인 *fim*¹⁸ 등에 대해 PCR 기법을 이용하여 *Salmonella*속 균을 신속하고 특이적으로 검출하여 보고된 바 있다. 그러나 이들 유전자는 *Salmonella*속 균과 그람음성 세균에 다양하게 분포되어 있어 균종과 혈청형간 특이성에 대한 문제가 항상 제기되고 있다. *S. Enteritidis*의 thin filamentous fimbriae를 암호하는 *sef* 유전자는 *sefA*, *sefB* 및 *sefC*의 3종류로 구성되어 있으며 이에 대한 염기구조가 보고된 바 있으며³ 이 중 *sefA*는 serogroup D1에만 특이하게 관찰된다고 보고된 바 있다²⁸. 또

한 *S. Enteritidis*만을 특이적으로 검출할 수 있는 plasmid에 암호된 병원성 발현유전자인 *spv*²⁷와 *S. Typhimurium*을 특이적으로 검출하기 위한 phase-1 (H1) 항원 (H:i) 유전자인 *fliC*^{21,22} 및 *Salmonella*속 균을 특이적으로 검출하기 위한 random primer (ST11-ST15)¹¹를 사용하여 multiplex PCR 기법으로 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 특이적으로 감별 진단 보고한 바 있다^{2,21,22,25}.

국내에서의 연구실정을 보면 PCR 기법으로 *Salmonella*속 균을 특이적으로 검출하기 위하여 상피세포에 대한 부착과 침습에 관련된 *inv* 유전자를 검출 보고하였고³¹, phosphate 결핍 환경에서 유도되는 균체 외막 단백질 발현 유전자인 *phoE* 유전자를 검출하였으며^{29,30}, *S. Enteritidis*만을 특이적으로 검출하기 위하여 fimbriae를 암호하는 *sefA* 유전자³² 및 plasmid에 암호된 병원성 발현유전자인 *spv* 유전자를 검출 보고³³한 바 있으나 이들은 주로 *Salmonella*속 균을 특이적으로 검출하거나 *S. Enteritidis*만을 특이적으로 검출하는데 한정되어 있다.

본 실험에서는 사람에서 주요 식중독균으로 알려진 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 신속하고 특이적으로 검출하기 위하여 이들 *Salmonella* specific random primer, *sefA*, *spv*, *fliC* 유전자를 동시에 증폭하는 multiplex PCR 기법을 확립하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시균주

공시균주는 2005년 이³⁴가 소와 돼지에서 분리한 *Salmonella*속 균 34종의 serotype 457주 중 *S. Typhimurium* (*S. Typhimurium* variant Copenhagen 포함) 54주, *S. Enteritidis* 20주, *Salmonella* serogroup B (*S. Agona*, *S.*

Table 1. Synthetic oligonucleotides used as primers for PCR

Target gene	Primer	Sequence (5' - 3')	Size (bp)	Tm (°C)	Reference
Random sequence	ST11	GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA	429	55 or 56	Soumet <i>et al.</i> (1999)
	ST15	GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G			
<i>fliC</i>	Fli 15	CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T	620	55	Soumet <i>et al.</i> (1999)
	Typ04	ACT GGT AAA GAT GGC T			
<i>spv</i>	S1	GCC GTA CAC GAG CTT ATA GA	250	55	Soumet <i>et al.</i> (1999)
	S4	ACC TAC AGG GGC ACA ATA AC			
<i>fliC</i>	Fli 15	CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T	559	56	Soumet <i>et al.</i> (1999)
	Tym	ACT CCT GCT GGC GGT GCG ACT T			
<i>sefA</i>	<i>sef</i> 167	AGG TTC AGG CAG CGG TTA CT	312	56	Soumet <i>et al.</i> (1999)
	<i>sef</i> 478	GGG ACA TTT AGC GTT TCT TG			

Derby 및 *S. Schwarzengrund* 각 5주), C₁ (*S. Ardwick*, *S. mbandaka* 및 *S. Rissen* 각 5주), E₁ (*S. Westhampton* 1주), E₄ (*S. Senftenberg* 1주), L (*S. Ruiru* 5주) 등 111주를 공시하였다. 기타 대조균주로는 본 연구원에서 보관중인 대장균 및 포도상구균을 사용하였다.

DNA 추출

공시된 균주로부터 genomic DNA 추출은 이³⁰⁾의 방법에 따라 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 사용하였다.

Oligonucleotide primer의 합성

m-PCR에 사용된 oligonucleotide primer의 염기서열, 증폭산물의 크기 및 온도는 Table 1에서와 같이 random sequence (ST11-ST15) 등 5종을 Genomine (Korea)에 합성 의뢰하여 사용하였다.

m-PCR에 의한 유전자의 검출

m-PCR 수행은 T-gradient (Biometra, Germany)를 이용하였다.

Random sequence, *fliC* 및 *spv* 유전자

Random sequence, *fliC* (Fli15-Typ04) 및 *spv* 유전자의 동시 검출을 위한 m-PCR은 Soumet 등²⁹⁾의 방법을 약간 수정 보완하여 10× PCR buffer 2.5 μ l, 10 mM dNTP 2.5 μ l, template DNA 1 μ l, 20 pM primer 각 0.5 μ l, Taq polymerase (TaKaRa, Japan) 0.2 μ l를 포함하여 최종량이 25 μ l가 되게 하였다. PCR은 94°C에서 5분간 denaturation

시킨 후, 94°C에서 20초, 55°C에서 40초, 72°C에서 1분 조건으로 총 35 cycle을 수행한 다음 72°C에서 10분간 extension 시켰다.

Random sequence, *fliC* 및 *sefA* 유전자

Random sequence, *fliC* (Fli15-Tym) 및 *sefA* 유전자 검출을 위한 m-PCR은 Soumet 등²⁹⁾의 방법을 약간 수정 보완하여 10× PCR buffer 2.5 μ l, 10 mM dNTP 2.5 μ l, template DNA 1 μ l, 20 pM primer 각 0.5 μ l, Taq polymerase (TaKaRa, Japan) 0.2 μ l를 포함하여 최종량이 25 μ l가 되게 하였다. PCR은 94°C에서 5분간 denaturation 시킨 후, 94°C에서 20초, 56°C에서 40초, 72°C에서 1분 조건으로 총 35 cycle을 수행한 다음 72°C에서 10분간 extension 시켰다.

증폭산물의 확인

PCR에 의해서 증폭된 산물은 이³⁰⁾의 방법에 준하여 loading buffer (30% glycerol, 50 mM EDTA, 0.025% bromophenol blue in 50 mM Tris · HCl, pH 8.5)와 2:1로 혼합하여 2.0% agarose (Sigma, USA) gel상에 loading하고 TBE buffer (40 mM Tris, 20 mM boric acid, 1 mM EDTA; Invitrogen) 하에서 120~140 volt로 약 1시간 동안 전기영동을 실시하였다. Agarose (Sigma, USA) gel을 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide (Gibco, USA) 용액으로 염색시킨 후 UV transilluminator (Hoefer, USA)를 사용하여 DNA 산물을 확인하였다. Marker로는 100 bp DNA Ladder (Promega, USA)를 사용하였다.

Table 2. Evaluation of the specificity of m-PCR using three primer pairs on different bacterial strains

Strains	Serogroup	No. of strains	Positive result by m-PCR with amplified products of				
			429 bp	620 bp	250 bp	559 bp	312 bp
<i>S. Enteritidis</i>	D ₁	20	20	0	20	0	20
<i>S. Typhimurium</i>	B	54	54	54	0	54	0
<i>S. Agona</i>	B	5	5	0	0	0	0
<i>S. Derby</i>	B	5	5	0	0	0	0
<i>S. Schwarzengrund</i>	B	5	5	0	0	0	0
<i>S. Ardwick</i>	C ₁	5	5	0	0	0	0
<i>S. Mbandaka</i>	C ₁	5	5	0	0	0	0
<i>S. Rissen</i>	C ₁	5	5	0	0	0	0
<i>S. Westhampton</i>	E ₁	1	1	0	0	0	0
<i>S. Senftenberg</i>	E ₄	1	1	0	0	0	0
<i>S. Ruiru</i>	L	5	5	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	-	2	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	2	0	0	0	0	0
Total		115	111	54	20	54	20

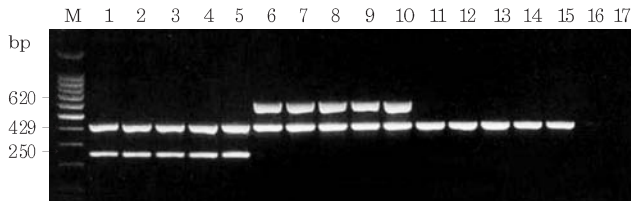


Figure 1. Multiplex PCR products amplified from *Salmonella* strains using three pairs of primers (random sequence, *fliC* and *spv*). M; 100 bp DNA Ladder (Promega). lane 1~5; *S. Enteritidis*, lane 6~10; *S. Typhimurium*, lane 11; *S. Agona*, lane 12; *S. Derby*, 13; *S. Ardwick*, lane 14; *S. Westhampton*, lane 15; *S. Ruiru*, lane 16; *E. coli*, lane 17; *Staphylococcus aureus*.

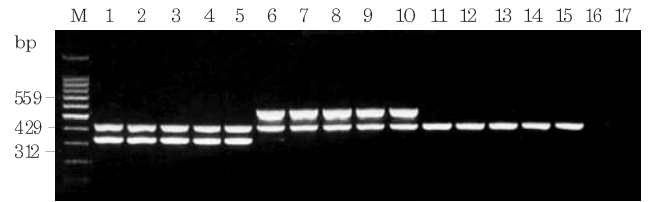


Figure 2. Multiplex PCR products amplified from *Salmonella* strains using three pairs of primers (random sequence, *fliC* and *sefA*). M; 100 bp DNA Ladder (Promega). lane 1~5; *S. Enteritidis*, lane 6~10; *S. Typhimurium*, lane 11; *S. Agona*, lane 12; *S. Schwarzengrund*, 13; *S. Mbandaka*, lane 14; *S. Rissen*, lane 15; *S. Senftenberg*, lane 16; *E. coli*, lane 17; *Staphylococcus aureus*.

결 과

m-PCR의 특이성

공시 균주로부터 genomic DNA를 추출한 다음 각각의 3중 primer sets (random sequence, *fliC*, *spv* 및 random sequence, *fliC*, *sefA*)를 이용하여 m-PCR을 수행한 결과는 Table 1, Fig 1 및 Fig 2와 같다. 먼저 random sequence, *fliC* 및 *spv* primer sets를 이용하여 m-PCR 결과 random sequence (ST11-ST15)는 모든 *Salmonella*속 균에 대하여 429 bp에서 특이적인 증폭산물이 나타났으나 *Salmonella*속 균이 아닌 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다. *fliC* (Fli15-Typ04)는 *S. Typhimurium* 54균주 모두에서 620 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았으며, 또한 *spv* (S1-S4)는 *S. Enteritidis* 20균주 모두에서만 250 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났다.

Random sequence, *fliC* 및 *sefA*를 이용하여 m-PCR을 수행한 결과 *fliC* (Fli15-Tym)는 *S. Typhimurium* 54균주 모두에서 559 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았고, *sefA* (*sef167-sef478*)는 *S. Enteritidis* 20균주 모두에서 312 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다.

고 찰

살모넬라감염증의 역학적 연구는 serotype, 생물형, 약제내성형, phage type의 조사 등으로 이루어지고 있으나 이들을 파악하는 것만으로는 미흡한 실정이므로 최근에는 plasmid profile, 중합효소연쇄반응 (PCR), southern blot

hybridization 기법을 기초로 한 분자유전학적 분석 및 제한효소 처리에 의한 DNA의 절단 양상 등을 분석하여 역학관계를 규명하고 있다^{5,8,11,14,19,26,28,29,30,31}.

*Salmonella*속 균의 유전자는 chromosomal DNA 복제에 관여하는 유전자인 *oriC*, phosphate 결핍 환경에서 유도되는 균체 외막 단백질 유전자인 *phoE*, LPS O항원 합성과 관련된 *rfb*, fimbria 항원 유전자인 *agf*, *sef*, plasmid에 암호화된 병원성 발현유전자인 *spv*, 상피세포에 대한 부착과 침습에 관련된 *inv*, fimbria 구조항원 유전자인 *fim* 등에 대해 PCR 기법을 이용하여 *Salmonella*속 균을 신속하고 특이적으로 검출하는 연구가 다각도로 진행되고 있다^{5,8,11,14,19,26,28,29,30,31}. 또한 *S. Enteritidis*를 특이적으로 검출하기 위한 *spv*, *sefA* 유전자와 *S. Typhimurium*을 특이적으로 검출하기 위한 phase-1 항원 (H:i) 유전자인 *fliC* 및 *Salmonella*속 균 random primer (ST11-ST15)를 사용하여 m-PCR 기법으로 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 특이적으로 감별진단 보고한 바 있다^{2,22}.

본 실험에서는 사람에서 주요 식중독균으로 알려진 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 신속하고 특이적으로 검출하기 위하여 이들 *Salmonella* specific random primer, *sefA*, *spv*, *fliC* 유전자를 동시에 증폭하는 m-PCR 기법을 이용한 결과 random sequence는 모든 *Salmonella*속 균에 대하여 429 bp에서 특이적인 증폭산물이 나타났으나 *Salmonella*속 균이 아닌 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다. *fliC* (Fli15-Typ04) 및 *fliC* (Fli15-Tym)는 *S. Typhimurium* 54균주 모두에서 각각 620 bp 및 559 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다. 또한 *spv* (S1-S4) 및 *sefA* (*sef167-sef478*)는 *S. Enteritidis* 20균주 모두에서만 각각 250 bp 및 312 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다.

이는 Soumet 등^{21,22}이 random sequence는 모든

*Salmonella*속 균에 대해서만 429 bp에서 특이적인 증폭산물이 나타났고, *fliC* (Fli15-Typ04) 및 *fliC* (Fli15-Tym)는 *S. Typhimurium* 5균주 및 36균주 모두에서 각각 620 bp와 559 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았으며, *spv* (S1-S4) 및 *sefA* (*sef167-sef478*)는 *S. Enteritidis* 6균주 및 12균주 모두에서만 각각 250 bp 및 312 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났다고 보고한 결과와 일치하였다. 또한 Lim 등³¹이 *fliC* 유전자는 *S. Typhimurium* 38균주 모두에서 특이적인 증폭산물이 나타났다고 보고한 성적과도 일치하였으며, 조 등³⁰이 *S. Enteritidis*에서 *spv* 유전자를 검출 보고한 것과 전 등³⁰이 *Salmonella* serogroup D1에서 *sefA* 유전자를 검출 보고한 성적과도 유사하였다.

그러나 Wood 등²⁹이 *spv* 유전자는 *S. Enteritidis*에서 단지 30%만이 검출되었다고 보고한 성적보다는 훨씬 높았고, Pan과 Liu¹⁷가 *spv* 유전자는 *S. Enteritidis* 27균주 중 25균주 (92.6%)에서 검출되었다고 보고한 성적보다는 다소 높았으며, *sefA* 유전자는 27균주 중 27균주 (100%) 모두에서 검출되었다고 보고한 성적과는 일치하였다.

본 실험에서의 결과로 미루어 볼 때 사람에서 주요 식중독균으로 알려진 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 검출하기 위하여 *Salmonella* specific random primer, *sefA*, *spv*, *fliC* 유전자를 동시에 증폭하는 multiplex PCR 기법이 신속하고 특이적으로 나타나 향후 본 혈청형을 진단하는데 매우 유용할 것으로 판단된다.

결 론

사람의 주요 식중독균으로 알려진 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 신속하고 특이적으로 검출하기 위하여 *Salmonella* specific random primer, *sefA*, *spv*, *fliC* 유전자를 동시에 증폭하는 multiplex PCR 기법을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Salmonella specific random primer (ST11-ST15)는 모든 *Salmonella*속 균에 대하여 429 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 *Salmonella*속 균이 아닌 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다. *fliC* (Fli15-Typ04) 및 *fliC* (Fli15-Tym)는 *S. Typhimurium* 54균주 모두에서 각각 620 bp 및 559 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella* serogroup (B, C1, E1, E4 및 L) 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다.

spv (S1-S4) 및 *sefA* (*sef167-sef478*)는 *S. Enteritidis* 20균주 모두에서만 각각 250 bp 및 312 bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않아 *S. Enteritidis*에 대해서만 특이적인 양성반응을 보였다.

참 고 문 헌

1. Aabo S, Rasmussen OF, Rossen L, Sorensen PD and Olsen JE. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Molecu and Cellu Probes*, 7, pp171-178(1993)
2. Baggesen DL, Sandvang D and Aarestrup F. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J Clin Microbiol*, 38(4), pp1581-1586(2000)
3. Bean NH and Griffin PM. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogen, vehicles and trends. *J Food Prot*, 53(9), pp804-817(1990)
4. Betancor L, Schelotto F, Martinez A, Pereira M, Algorta G, Rodriguez MA, Vignoli R and Chabalgoity JA. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. *J Clin Microbiol*, 42(3), pp1155-1162(2004)
5. Clouthier SC, Muller K, Doran JL, Collinson SK and Kay WW. Characterization of three fimbrial genes, *sefABC*, of *Salmonella enteritidis*. *J Bacteriol*, 175(9), pp2523-2533(1993)
6. Duijkeren EV, Wannet WJB, Houwers DJ and Pelt WV. Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. *J Clin Microbiol*, 40(11):3980-3985(2002).
7. Edwards PR and Galton MM. Salmonellosis. *Adv Vet Sci*, 11, pp1-63(1967)
8. Fitzgerald C, Sher wood R, Gheesling LL, Brenner FW and Fields PI. Molecular analysis of the O antigen gene cluster of *Salmonella enterica* serogroup O:6, 14 and development of a serogroup-specific PCR assay. *Appl and Environ Microbiol*, 69(10), pp6099-6105(2003)
9. Freydiere A and Gille Y. Detection of *Salmonella* by using Rambach agar and a C8 esterase spot test. *J Clin Microbiol*, 29, pp2357-2359(1991)
10. Gahring LC, Heffron F, Finlay BB, et al. Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect Immun*, 58, pp443-448(1990)
11. Galan JE, Ginocchio C and Costeas P. Molecular

- and functional characterization of *Salmonella* the invasion gene *invA* : homology of *invA* to members of a new protein family. *J Bacteriol.* 174, pp4338–4349(1992)
12. Joys TM. The covalent structure of the phase-1 flagellar filament protein of *Salmonella* Typhimurium and its comparison with others flagellins. *J Biol Chem.* 260, pp15758–15761 (1985)
 13. Lim YH, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, Itoh KI, Tamura K, Kim SI and Watanabe H. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Jpn J Infect Dis.* 56, pp151–155(2003)
 14. Mahon J and Lax AJ. A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian feces of *salmonella* carrying the *spvR* gene. *Epidemiol Infect.* 111, pp455–464(1993)
 15. Nygard K, Jong BD, Guerin PJ, Anderson Y, Olsson A and Giesecke J. Emergence of new *Salmonella* Enteritidis phage types in Europe Surveillance of infections in returning travellers. *BMC Medicine.* 2, p32(2004)
 16. Olsen M and Wollinder SA. Identification of *Salmonella* with the 4-methylumbelliferoyl caprylate Fluorescence test. *J Clin Microbiol.* 29, pp2631–2632(1991)
 17. Pan TM and Liu YJ. Identification of *Salmonella enteritidis* isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. *J Microbiol Immunol Infect.* 35, pp147–151 (2002)
 18. Rabsch W, Andrews HL, Kingsley RA, Prager R, Tschape H, Adams LG and Baumler LJ. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun.* 70(5), pp2249–2255(2002)
 19. Rajashekara G, Munir S, Alexeyev MF, Halvorson DA, Wells CL and Nagaraja KV. Pathogenic role of SEF14, SEF17, and SEF21 fimbriae in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection of chickens. *Appl and Environ Microbiol.* 66(4), pp1759–1763(2000)
 20. Smith BP, Roden LD and MC Thurmond. Prevalence of *Salmonellae* in cattle and in the environment on California dairies. *JAMA.* 205(3), pp467–471(1994)
 21. Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G and Colin P. Evaluation of a Multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Lett Appl Microbiol.* 28, pp113–117(1999)
 22. Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G and Colin P. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. *Lett Appl Microbiol.* 29, pp1–6(1999)
 23. Taitt CR, Shubin YS, Angel R and Ligler FS. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by using a rapid, array-based immunosensor. *Appl Environ Microbiol.* 70(1), pp152–158(2004)
 24. Tansel O, Ekuklu G, Otkun M, Tatman-Oktun M, Akata F and Tugrul M. A food-borne outbreak caused by *Salmonella* Enteritidis. *Yonsei Med J.* 44(2), pp198–202(2003)
 25. Turcotte C and Woodward MJ. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene coding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella* Enteritidis. *J Gener Microbiol.* 139, pp1477–1485(1993)
 26. Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Keller BHI and Verhoef J. Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. *Europ J of Clin Microbiol and Inf Dis.* 10, pp935–938(1991)
 27. Wood MW, Mahon J and Lax AJ. Development of a probe and PCR primers specific to virulence plasmid of *Salmonella* Enteritidis. *Molecu and Cellu Probes.* 8, pp473–479(1994)
 28. Woodward MJ and Kirwan SES. Detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs by the polymerase chain reaction. *Vet Rec.* 138, pp411–413(1996)
 29. 김원용, 장영효, 박경윤, 김철중, 신광순, 박용하. Polymerase chain reaction과 Southern hybridization을 이용한 *Salmonella*속 균의 신속한 검출. 대한수의학회지. 35(3), pp531–536
 30. 박두희, 김원용, 김철중, 마점술. Polymerase chain reaction에 의한 *Salmonella* 속균의 검출. 대한수의학회지. 34(1), pp115–125(1994)
 31. 이우원. 가축유래 다제내성 *Salmonella* 속균의 유전자 및 단백질에 관한 연구. 경상대학교대학원 박사학위 논문 (2005)

32. 전무형, 김태중, 장경수, 강경임, 김귀현, 김기석, 유상식, 김현수, 신광순, 김철중. *SefA* 유전자 PCR에 의한 serogroup D1의 특이적 검출. 대한수의학회지. 39(3), pp523-530(1999)
33. 조미영, 여용구, 김영섭, 이정학, 이병동. PCR을 이용한 *Salmonella enteritidis*의 특이적 검출. 한국가축위생학회지. 23(3), pp227-233(2000)