

면역리포솜을 이용한 계란에서의 살모넬라 분석과 시판 간이키트와의 비교

신원선¹ · 김윤숙² · 이준수³ · 김명희*

영남대학교 식품공학과, ¹한양대학교 식품영양학과
²한국식품연구원 산업원천기술연구본부, ³충북대학교 식품공학과

Analysis of *Salmonella* Species from Eggs Using Immunoliposomes and Comparison with a Commercial Test Kit

Weon-Sun Shin¹, Yoonsook Kim², Junsoo Lee³, and Myunghee Kim*

Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

¹Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

²Emerging Innovative Technology Division, Korea Food Research Institute, Sunghnam 463-746, Korea

³Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract

To suggest an improved diagnostic method for *Salmonella* spp., analyses were conducted with immunoliposomes and compared with the results from a commercial test kit. One sample out of 36 samples of eggshell was *Salmonella*-positive via immunoliposomes. In the case of the use of the commercial test kit, six samples out of 36 samples were *Salmonella*-positive. These *Salmonella*-positive samples were subjected to biochemical identification tests that confirmed that they were *Salmonella*-negative. As for the egg content samples, they were *Salmonella*-negative in both analyses with immunoliposomes and the commercial test kit. The *Salmonella* analysis with immunoliposomes reduced detection time, by 24 h compared to the commercial test kit. Bacteria, including *Acinetobacter baumannii*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Escherichia hermannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea* spp., and *Pasteurella pneumotropica*, were isolated from the eggshells. Other than *Acinetobacter baumannii* and *Pasteurella pneumotropica* most of the isolates were known to frequently appear during egg production processing.

Key words : bacteria, commercial test kit, egg, immunoliposomes, *Salmonella* species

서 론

리포솜은 인지질 2중층으로 이루어진 직경이 수십 nm에서 수백 μm 에 이르는 구형체로서 수용액 상과 지질층에 각각 친수성 물질과 친유성 물질들을 포집할 수 있다(Bangham *et al.*, 1965). 또한, 리포솜 구형체의 외부 표면을 화학적으로 변형시킴으로써 특정 목표 물질에 특이적으로 결합하는 성질을 갖도록 할 수 있다(New, 1990). 이렇게 물리적, 화학적으로 유연하게 변형될 수 있는 특성 때문에 리포솜은 분석, 의약, 식품 등의 분야에서 응용성이 커지고 있다. 특히, 리포솜의 외부표면에 항체를 결합시켜 만든 면역리포솜은 항체에 대한 특정 항원에만 작용

하므로 항원-항체 반응을 이용한 다양한 면역분석에 이용될 수 있다. 면역리포솜을 이용한 면역분석법의 개발에 관한 연구는 농약, 약물, 자연독소 등 광범위한 물질을 대상으로 보고되고 있다(Rongen *et al.*, 1997). 면역분석은 수행하기가 편리하고 신속하게 결과를 얻을 수 있다는 장점과 더불어 간편한 키트의 형태로 제품화가 가능하므로 각종 정성, 정량 분석에 범용적으로 쓰이고 있다.

병원성 미생물인 살모넬라는 Enterobacteriaceae에 속하는 그람음성의 통성혐기성 간균으로 살모넬라 속에는 *Salmonella enterica* 와 *Salmonella bongori* 2 종이 존재하며 2,500개 이상의 혈청형이 알려져 있다(Popoff *et al.*, 2003). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*)와 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium(*S. Typhimurium*)을 포함하는 *S. enterica* subsp. *enterica*에 속하는 일부 혈청형들이 주요 식중독 원인균으로 알려져 있다(Anonymous, 2003). 살모넬라 식중

*Corresponding author : Myunghee Kim, Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea. Tel: 82-53-810-2958, Fax: 82-53-810-4662, E-mail: foodtech@ynu.ac.kr

독의 원인 식품으로 가금류, 난류, 육류, 유제품, 생선, 새우, 소스 및 샐러드 드레싱, 케익믹스, 땅콩버터, 코코아, 초콜렛, 신선 과채류, 오렌지 주스 등의 다양한 식품이 알려져 있다(Beucaht, 1996; van Benden *et al.*, 1999). 2005년도에 오스트리아에서 보고된 식중독 사고의 76%는 *Salmonella* spp. 때문인 것으로 나타났고 원인식품으로는 난류가 57%, 육류 특히 가금육이 30%, 우유 및 낙농제품이 4%를 차지하는 것으로 나타났다(Much *et al.*, 2007). 2006년도 여름, 영국에서 3명이 입원하고 1명의 사망자가 발생한 살모넬라 식중독 사고는 날계란으로 만든 티라미슈에 오염된 *S. Enteritidis*에 의한 것으로 추정되었다(Calvert *et al.*, 2007). 위와 같이 난류는 살모넬라에 의한 식중독 사고에 빈번하게 연루되어 있는데, 양계장의 사육두수, 닭을 닭장에서 키우는지 또는 풀어서 키우는지에 따른 사육 방식, 산란 닭의 연령 등에 의하여 산란 닭 자체의 *S. Enteritidis* 감염 정도가 영향을 받는 것으로 보고된다(Mollenhorst *et al.*, 2005; Namata *et al.*, 2008).

이렇듯, 살모넬라에 의한 식품오염은 인간의 건강과 농·축산경제에 큰 위협이 되고 있는데, 배지배양법을 이용하여 살모넬라를 분석하기 위해서는 3-5일이 소요되므로(Andrews and Hammack, 1998) 산업체와 정부기관의 신속한 대응이 어려운 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 분석시간을 단축하고 향상된 진단법을 제시하기 위하여 면역리포솜으로 구성된 진단시약을 응용하여 살모넬라 진단법을 확립하고 이 진단법을 이용하여 계란에서 살모넬라를 분석함으로써 면역리포솜의 식품 적용성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

Sulforhodamine B(SRB)는 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine(DPPE), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(DPPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)](DPPG), 미니 익스트루더, 여과막(기공 크기 0.4 μ m)은 Avanti Polar Lipids(Alabaster, AL, USA)에서 구입하였다. *N*-succinimidyl-*s*-acetylthioacetate(SATA)는 Pierce(Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. 항 살모넬라 다클론 항체는 Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 트리메틸아민, 클로로포름, 콜레스테롤, 메탄올, 이소프로필에테르, Sephadex G50-150, Sepharose CL-4B, sucrose, sodium chloride, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, bovine serum albumin(BSA), octyl β -D-glucopyranoside(OG), trizma base, Tween 20은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Nutrient agar(NA)는

Difco Laboratories(Detroit, MI, USA) 제품을, brain heart infusion(BHI)과 xylose lysine desoxycholate(XLD)는 BD-Diagnostic Systems(Franklin Lakes, NJ, USA) 제품을 사용하였다. 항 살모넬라 IgG 자성비드, magnetic particle concentrator(MPC)는 Dynal Inc.(Lake Success, NY, USA)에서 API 20E 스트립은 bioMérieux(Marcy-l'Etoile, France)에서 구입하였다. 형광도의 측정은 Jasco FP 550(Tokyo, Japan)을 이용하였다. 실험에 사용한 계란은 서울 및 수도권 지역의 대형할인마트, 백화점, 소규모 슈퍼마켓에서 14개의 각기 다른 상표의 제품을 구입하여 사용하였다.

리포솜과 면역리포솜의 합성

리포솜은 앞서 보고한 방법을 변형하여 합성하였다(Kim *et al.*, 2003a; Kim *et al.*, 2003b). 간략히 설명하면, 먼저 5 mg의 DPPE와 3.5 mg의 SATA를 반응시켜 DPPE-acylthioacetate(DPPE-ATA)를 합성한 후 여기에 29.6 mg의 DPPC, 3 mg의 DPPG, 15.8 mg의 콜레스테롤을 가해 클로로포름, 메탄올, 이소프로필에테르(6:1:6)의 혼합용매로 녹여 감압 증발과 초음파 처리를 병행하여 검출마커인 형광물질 SRB를 포집하는 리포솜을 합성하고 minixtruder를 통과시켜 입자의 크기를 균일화하고 Sephadex G50-150 컬럼을 통과시켜서 SRB가 포집된 리포솜을 분리하였다. 이렇게 얻어진 리포솜과 항체의 공유결합은 리포솜의 겔표면을 -SH기로 activation시키고 여기에 maleimide기로 유도된 항체와 반응시킴으로써 면역리포솜을 합성하였다. 합성 후 남은 자유 리포솜과 자유 항체는 Sepharose CL-4B 컬럼 통과와 0.02 M tris-buffered saline(TBS)으로 18시간 동안 투석하는 과정을 통하여 제거하였다.

살모넬라의 분석

계란으로부터 살모넬라를 분석하는 전체적인 흐름도는 다음과 같다. 시판 간이키트는 Singlepath® *Salmonella*(Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하여 살모넬라를 분석하고 이 결과를 면역리포솜에 의한 살모넬라 분석결과와 비교하였다. 즉, 시료로서 계란을 난각과 난황을 포함하는 난백 내용물의 두 부분으로 분리하고 BHI 225 mL에 시료를 넣어 37°C에서 18시간 동안 1차 증균배양한 후 배양액 0.1 mL을 10 mL의 Rappaport-Vassiliadis(RV, Merck) 배지에 옮겨 41.5°C에서 24시간 동안 2차 선택증균배양하였다. 증균배양액 160 μ L를 취해서 간이키트에 떨어뜨리고 20분 후에 결과를 읽었다. 키트의 control line과 test line 모두에서 발색선이 나타나면 살모넬라 양성이므로 이 경우에는 RV 증균배양액 일부를 XLD 평판배지에 도말하여 단일직립을 분리하였다.

면역리포솜을 이용한 살모넬라의 분석은 이전에 보고한 방법(Kim *et al.*, 2003(a))을 변형하여 실시하였다. 즉, 75×12 mm(높이×외경) 크기의 borosilicate 시험관에 항 살

모넬라 IgG 자성비드 20 μ L을 넣고 여기에 BHI broth로 증균배양한 시료 1 mL을 가하였다. 교반기 위에서 60분 동안 70 rpm의 회전수로 반응시킨 후 MPC를 이용해서 자성복합체를 분리하고 상등액은 제거하였다. 자성복합체를 1 mL의 0.01 M phosphate-buffered saline(PBS)-0.05% Tween 20 용액으로 2번 세척하였다. 이후, 1 mL의 0.02 M TBS-0.13 M sucrose-0.5% BSA 용액으로 다시 세척하고 여기에 희석조정된 면역리포솜 용액 70 μ L을 첨가하였다. 교반기 위에서 15분 동안 반응시킨 후 다시 1 mL의 0.02 M TBS-0.13 M sucrose-0.5% BSA 용액으로 3번 세척하였다. 마지막으로, 0.02 M TBS로 녹인 30 mM의 OG 용액 200 μ L을 첨가하고 강하게 vortexing하였다. MPC 안에 시험관을 넣어 정치시킨 후에 형성된 상등액 150 μ L를 0.02 M TBS로 희석한 후 이를 10 \times 10 \times 48 mm cuvette에 옮겨서 여기과장 543 nm와 발광과장 596 nm에서 형광도를 측정하였다. 간이키트 분석과 마찬가지로, 면역리포솜에 의한 분석결과가 양성일 때는 RV 증균배양액 일부를 취해 XLD 평판배지에 도말하여 단일집락을 분리하였다.

분리균의 동정

XLD 배지 상에서 분리된 균은 NA 평판배지에 옮겨 배양한 후, API 20E 스트립을 이용하여 생화학적 실험을 거쳤다. 스트립 상에 나타난 각 반응의 결과를 기록하고 동정은 API Lab Plus software(bioMérieux)에 의해 실시하였다.

결과 및 고찰

면역리포솜을 이용한 살모넬라의 분석 곡선

면역리포솜을 이용하여 살모넬라를 분석했을 때 얻은 전형적인 정량곡선은 Fig. 1과 같다. 배지에 살모넬라가 존재하지 않는 경우, 최저의 형광도를 보이다가 살모넬라의 양이 증가하면 형광도도 증가하는 양상을 보였다. *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*에서 모두 면역리포솜과의 항

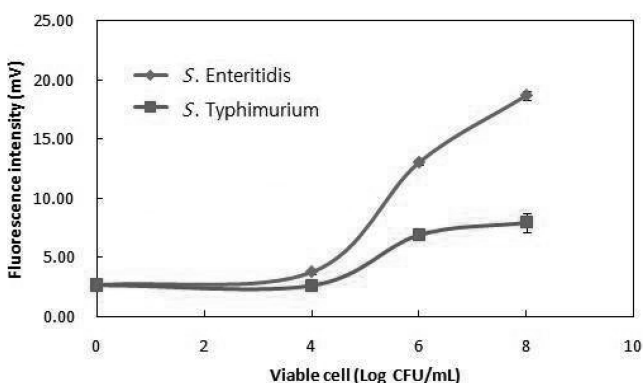


Fig. 1. Dose-response curves for *Salmonella* spp. using immunoliposomes.

원-항체 반응 시그널이 나타났으므로 두 균종을 검지하기에 적합한 분석법임을 알 수 있었다. 결과에 나타난 바와 같이, 살모넬라 생균수가 10⁴ CFU/mL 미만인 경우는 균이 존재함에도 불구하고 공시료인 0 CFU/mL과 비교해볼 때 반응 시그널의 차이를 보이지 않으므로 식품에 오염된 살모넬라 균의 수준이 10⁴ CFU/mL 미만인 경우에는 먼저 증균배양을 실시하여 생균수의 수준을 검출범위에 이르도록 증폭시켜야 함을 알 수 있었다. 간이키트에서는 살모넬라 균이 10⁶ CFU/mL 이상일 때 발색선이 나타나므로 면역리포솜에 의한 진단법이 더 민감한 것으로 나타났다.

계란에서의 살모넬라 분석

난각과 내용물을 분리하여 각각 BHI 배지로 증균배양한 후 면역리포솜을 이용하여 살모넬라를 분석한 예는 Fig. 2와 같다. 분석결과 해석은 살모넬라를 포함하지 아니한 배지인 공시료에서 나타나는 반응 시그널+3표준편차 이상의 반응 시그널을 보이는 시료는 살모넬라 양성(AOAC, 2005)으로 규정하였다. 그 결과, 살모넬라를 포함하지 아니한 배지인 공시료 SC와 CC의 반응 시그널+3표준편차를 상회하는 반응 시그널이 난각과 내용물의 어느 시료에도 나타나지 않았으므로 난각과 내용물 모두에서 살모넬라 음성이라는 결과가 도출되었다. 계란 내용물 C1, C2, C3에서의 반응 시그널은 난각시료 S1, S2, S3에서의 반응 시그널에 비해 낮았는데, 그 이유는 난백과 난황이 살모넬라의 분석 과정 중에 자성비드의 소실을 유발시켜 전반적으로 반응 시그널이 낮게 나왔기 때문인 것으로 추측된다. 이러한 현상은 Cudjoe 등(1994)이 난황 및 난백은 점성이 매우 강한 물질이므로 자성비드의 소실을 일으킨다는 보고와 일치하였다.

면역리포솜을 이용하여 난각과 내용물 시료에서 살모넬라를 분석한 결과는 음성으로 나타났으며 이 결과는 API 20E에 의한 생화학적 검사결과와도 일치하였다. 특히, 난

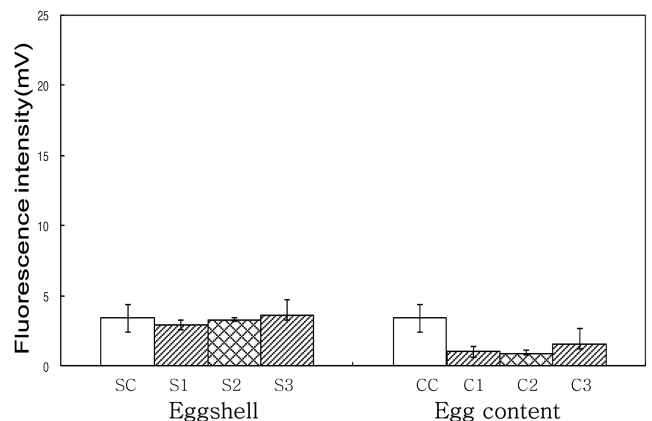


Fig. 2. Examples of immunoliposomes analyses for eggshell and egg content. SC, control; S1, S2, and S3 are samples for eggshell analyses. CC, control; C1, C2, and C3 are samples for egg content analyses.

각시료는 BHI 증균배양 후에 총 호기성 세균수가 10^8 - 10^9 CFU/mL에 달했는데, 이러한 background microflora가 면역리포솜 분석에 영향을 끼치지 않았다는 것은 면역리포솜 분석의 선택성(selectivity)이 우수한 것으로 평가된다.

간이키트와 면역리포솜을 이용한 살모넬라 분석 비교

시판 간이키트와 면역리포솜을 이용하여 계란의 난각과 내용물에서 살모넬라를 분석하였다. 시판키트는 control line과 test line에 동시에 발색선이 보일 때, 면역리포솜 분석은 공시료에서의 평균 반응 시그널+3표준편차를 상회하는 반응 시그널을 보이는 경우에 양성 판정을 하였다. 그 결과, 증균배양한 계란 내용물에서는 두 분석법 모두에서 살모넬라가 검출되지 않았다. 그러나, 난각에서는 시판 간이키트를 사용한 결과 36개의 시료 중에 6개의 시료에서 그리고 면역리포솜 분석의 경우는 36개의 시료 중에 1개의 시료에서 살모넬라 양성 반응이 나타났다(Table 1). 살모넬라 양성반응을 보인 이들 시료에 대한 생화학적 동정 실험을 한 결과, 그 균들은 살모넬라 속이 아닌 것으로 확인되었다(Table 1). 이것은 면역리포솜 분석의 위양성 확률이 1/36이며 상업용 키트의 위양성 확률은 1/6로 면역리포솜 분석의 정확도가 보다 높음을 시사한다. 위음성 확률의 경우, 면역리포솜 분석은 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*에 대해 위음성 결과를 보이지 않았다. 이것은 본 연구에 사용한 항 살모넬라 다클론 항체가 *Salmonella* serotype A, B, C, D, E를 포함한 광범위한 *Salmonella* 그룹에 반응한다는 제조사의 메뉴얼에 상응하는 결과라고 판단된다. 또한, 면역리포솜 분석은 2차 선택증균배양을 거치지 않으므로 시판 간이키트 분석에 비해 분석소요시간이 24시간 단축되어 보다 신속한 분석법으로 나타났다.

Cho와 Shin(1985)은 양계장에서 직접 구입한 계란을 실온에서 2주 동안 저장했을 때, 0.38%의 계란에서 난각, 난백, 난황으로부터 살모넬라가 분리되었다고 보고하였다. 반면, 본 연구와 유사하게 Lee 등(2002)은 백화점 유통 중인 57품목 계란의 난각과 난황에서 살모넬라 균이 검출되지 않았다고 보고하였다. 위생처리가 미흡하고 실온유통을 하던 과거에는 살모넬라 오염의 가능성이 높았고 계란의 위생처리를 거친 후 백화점에 납품되는 현재의 유통시스템에서는 살모넬라 오염빈도가 낮아진 것으로 추측된다.

오염된 난 및 난제품의 섭취는 *S. Enteritidis*에 의한 감염의 중요한 원인이다(Kim *et al.*, 1989). 계란이 *S. Enteritidis*에 의해 오염되는 것은 산란 닭의 난소와 난관에서부터 시작하는 것으로 추측되며 난각에서는 다양한 살모넬라 혈청형이 분리되고 있고 이 가운데 *S. Enteritidis*는 침투력이 있어서 종종 깨끗하고 상처가 없는 계란의 내용물에서도 분리된다고 보고된다(Humphrey, 1990; Murchie *et al.*, 2008). 산란 시점에는 큐티클 층이 미성숙하고 닭의 체온(42°C)보다 낮은 실내온도 때문에 계란의

Table 1. Comparison of test results for *Salmonella* spp. in eggshells with a commercial test kit and immunoliposomes followed by the identification of the positive sample

Eggshell (No.)	Commercial test kit	Immunoliposomes analysis	Identification of the <i>Salmonella</i> positive sample
1	-	-	
2	+	-	<i>Escherichia hermannii</i>
3	-	-	
4	-	-	
5	-	-	
6	-	-	
7	-	-	
8	-	-	
9	-	-	
10	-	-	
11	-	-	
12	-	-	
13	-	-	
14	-	-	
15	-	-	
16	-	-	
17	-	-	
18	-	-	
19	-	-	
20	-	-	
21	-	-	
22	-	-	
23	-	+	Identification not valid
24	+	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
25	-	-	
26	-	-	
27	+	-	Identification not valid
28	+	-	Identification not valid
29	-	-	
30	+	-	Identification not valid
31	-	-	
32	-	-	
33	+	-	Identification not valid
34	-	-	
35	-	-	
36	-	-	

내부에 음의 압력이 생기므로 산란직후에 살모넬라는 난각을 쉽게 통과하는 것으로 알려져 있다(Miyamoto *et al.*, 1998; Murchie *et al.*, 2008; Pardon, 1990). 따라서, 유통시스템 못지 않게 양계장 시설의 위생적인 환경구축도 중요하다 할 수 있다.

난각에 존재하는 세균

난각 시료를 증균, 선택배양한 후 선택평판배지에 옮겨 배양했을 때 나타난 집락을 형태, 색깔 별로 선정하여 생화학적 동정을 실시한 결과, 난각에서 분리된 장내세균과

Table 2. Some isolated microorganisms from eggshells

Microorganism isolated
<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Chryseomonas luteola</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia hermannii</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Pantoea</i> spp.
<i>Pasteurella pneumotropica</i>

이와 관련된 세균은 Table 2와 같다. 분리된 세균 가운데, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*는 Musgrove 등(2008)이 보고한 분리세균들과 일치하였는데, 저자들은 계란의 전처리 과정 중 12 곳에서 계란을 채취해서 세균을 분리하였을 때, *E. coli*가 55.8%를 차지한다고 보고하였다. *Acinetobacter baumannii*는 최근 병원 환경에서 많이 분리되는 것으로 보고되며 피부나 호흡기에 집락을 형성하는 것으로 알려져 있으며(Cetin *et al.*, 2009) *Pasteurella pneumotropica*는 설치류에 피부병을 일으키는 병원성 균으로 알려져 있다(Harvey, 1995). *A. baumannii*와 *P. pneumotropica*는 임상학적으로 중요한 균이지만 이 균들에 의해 식품위생상의 문제가 제기된 보고는 아직 발견되고 있지 않다.

요 약

보다 우수한 살모넬라 진단법을 개발하고자, 면역리포솜을 이용하여 계란에서의 살모넬라를 분석하는 새로운 진단법과 시판 간이키트를 사용한 살모넬라 분석과의 결과를 비교하였다. 면역리포솜을 이용하여 난각을 분석한 결과, 36개의 계란 시료 중 1건에서 살모넬라 양성 결과가 나타났으며 시판 간이키트를 이용하여 분석한 결과, 36개의 계란 시료 중 6건에서 살모넬라 양성 결과가 나타났다. 총 7건의 양성 결과는 생화학적 동정에 의해서 살모넬라 균이 아닌 것으로 확인되었다. 난황과 난백으로 이루어진 내용물의 경우, 두 분석법에 의하여 살모넬라 균이 전혀 검출되지 않았으며 이는 배지 배양법과 일치하는 결과였다. 면역리포솜을 이용한 진단법은 시판 간이키트에 비해 민감도가 높고 분석에 소요되는 총 시간이 24시간 단축되는 우수성을 보였다. 난각에서는 *Acinetobacter baumannii*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Escherichia hermannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea* spp., *Pasteurella pneumotropica*와 같은 세균이 분리되었는데, *A. baumannii*와 *P. pneumotropica*를 제외한 대부분의 세균들은 계란의 전처리 공정 중에 빈번하게 분리되는 균들로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Andrews, W. H. and Hammack, T. S. (1998) Chapter 5. *Salmonella*. In: Bacteriological analytical manual. FDA, Silver Spring, MD.
- Anonymous (2003) *Salmonella*: annual summary 2001. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, pp. 1-154.
- AOAC (2005) Official methods of analysis. 18th ed, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, Appendix E.
- Bangham, A. D., Standish, M. M., and Watkis, J. C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238-252.
- Beuchat, L. R. (1996) Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Protect.* **59**, 204-216.
- Calvert, N., Murphy, L., Smith, A., and Copeland, D. (2007) A hotel-based outbreak of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) in the United Kingdom, 2006. *Euro. Surveill.* **12**, 222.
- Cetin, E. S., Durmaz, R., Tetik, T., Otlu, B., Kaya, S., and Çaliskan, A. (2009) Epidemiologic characterization of nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections in a Turkish university hospital by pulsed-field gel electrophoresis. *Am. J. Infect. Control* **37**, 56-64.
- Cho, D-I. and Shin, K-S. (1985) Isolation and identification of *Salmonellae* and *Escherichia coli* from chicken eggs. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* **9**, 13-18.
- Cudjoe, K. S., Krona, R., Gron, B., and Olsen, E. (1994) Use of ferrous sulphate and immunomagnetic separation to recover *Salmonella enteritidis* from raw eggs. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 149-158.
- Harvey, C. (1995) Rabbit and rodent skin diseases. *Semin. Avian Exotic Pet Med.* **4**, 195-204.
- Humphrey, T. J. (1990) Public health implications of the infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *World Poult. Sci. J.* **46**, 5-13
- Kim, C. J., Emery, D. A., Rinke, H., Nagaraja, K. V., and Halvorson, D. A. (1989) Effect of time and temperature on growth of *Salmonella enteritidis* in experimentally inoculated eggs. *Avian Dis.* **33**, 735-742.
- Kim, M., Kim, W. J., Shin, W-S., Shon, D-H., and Cha, S. K. (2003a) Feasibility study on the use of liposomes for detecting food-borne pathogenic bacteria. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **23**, 278-283.
- Kim, M., Oh, S., and Durst, R. A. (2003b) Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 using a combined immunomagnetic separation and liposome immunoassay. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 509-516.
- Kim, M., Shon, D-H., Cha, S. K., and Kim, S. Y. (2003c)

- Development of a field-portable immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunoliposome. Project No. (01-PJ1-PG3-21200-0043), Ministry of Health & Welfare, Seoul, Korea.
16. Lee, S-M., Kim, K-H., Lee, J-G., Park, E-J., Lee, S-W., and Hong, C-H. (2002) Hygiene quality of eggs in the department food stores in the Incheon metropolitan area. *J. Fd. Hyg. Safety* **17**, 129-136.
 17. Miyamoto, T., Horie, T., Baba, E., Sasai, K., Fukata, T., and Arakawa, A. (1998) *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *J. Food Prot.* **61**, 350-353.
 18. Mollenhorst, H., van Woudenberg, C. J., Bokkers, E. G., and de Boer, I. J. (2005) Risk factors for *Salmonella enteritidis* infections in laying hens. *Poult. Sci.* **84**, 1308-1313.
 19. Much, P., Pichler, J., and Allerberger, F. (2007) Food borne infectious outbreaks, Austria 2005. *Wien. Klin. Wochenschr.* **119**, 139-141.
 20. Murchie, L., Xia, B., Madden, R. H., Whyte, P., and Kelly, L. (2008) Qualitative exposure assessment for *Salmonella* spp. in shell eggs produced on the island of Ireland. *Int. J. Food Microbiol.* **125**, 308-319.
 21. Musgrove, M. T., Northcutt, J. K., Jones, D. R., Cox, N. A., and Harrison, M. A. (2008) Enterobacteriaceae and related organisms isolated from shell eggs collected during commercial processing. *Poult. Sci.* **87**, 1211-1218.
 22. Namata, H., Méroc, E., Aerts, M., Faes, C., Abrahantes, J. C., Imberechts, H., and Mintiens, K. (2008) *Salmonella* in Belgian laying hens: an identification of risk factors. *Prev. Vet. Med.* **83**, 323-336.
 23. New, R. R. C. (1990) *Liposomes: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 76-79.
 24. Pardon, M. (1990) *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Dis.* **34**, 463-465.
 25. Popoff, M. Y., Bockemühl, J., and Gheesling, L. L. (2003) Supplement 2001 (No. 45) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* **154**, 173-174.
 26. Rongen, H. A. H., Bult, A., and van Bennekom, W. P. (1997) Liposomes and immunoassays. *J. Immunol. Methods* **204**, 105-133.
 27. van Beneden, C. A., Keene, W. E., Strang, R. A., Werker, D. H., King, A. S., Mahon, B., Hedderg, K., Bell, A., Kelly, M. T., Balan, V. K., Mac Kenzie, W. R., and Fleming, D. (1999) Multinational outbreak of *Salmonella enteric* serotype Newport infections due to contaminated alfalfa sprouts. *JAMA.* **281**, 158-162.

(Received 2009.3.16/Revised 1st 2009.8.2, 2nd 2009.8.11/
Accepted 2009.8.11)