

PCR을 이용한 육류 내 *Salmonella* sp. 및 *Salmonella* Typhimurium 분리 검출

주종원^{1*} · 홍경표² · 김용휘² · 조상범³

¹중부대학교 애완동물자원학과, ²중부대학교 호텔외식산업학과, ³건국대학교 동물자원연구센터

Selective Detection of *Salmonella* sp. and *Salmonella* Typhimurium in Meat by Polymerase Chain Reaction

Jong-Won Joo^{1*}, Kyung-Pyo Hong², Yong-Hui Kim² and Sang-Buem Cho³

¹Dept. of Companion Animal and Animal Resources Science, Joongbu University, Chungnam 312-702, Korea

²Dept. of Hotel and Foodservice Industry, Joongbu University, Chungnam 312-702, Korea

³Animal Resources Research Center, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract

The specificity and sensitivity of oligonucleotide primers were examined for the rapid detection of *Salmonella* in meat samples. The oligonucleotide primers used in this study were designed with the modification of *mdh* and *invA* sequence in the chromosome of *Salmonella* Typhimurium. Through the subsequent analysis of the specificity and sensitivity of the primers, two types of oligonucleotide primers, SLM1 and SLT4 were selected for the detection of *Salmonella* genus specific and *S. Typhimurium* species specific, respectively. The lowest detection limit of each primer was represented as 1 cell per reaction when reacted with a prepared DNA solution. The detection efficiency of the two primers was analysed with beef and pork samples intentionally contaminated with a mixture of *Salmonella* culture, and three preparation methods -, namely direct reaction after extraction, enrichment after extraction, and DNA extraction after enrichment for PCR reaction, - were also compared. No differences were found in the results according to meat sources and preparation methods.

Key words : *Salmonella* sp. *Salmonella* Typhimurium, rapid detection, meat food, polymerase chain reaction.

서 론

세계적으로 세균에 의한 식중독은 발생 빈도가 높은 질병 중 하나이며, 발병 빈도나 피해 규모가 크게 줄어들지 않고 있다(Han *et al* 1999). 세균성 식중독의 원인으로 분류되는 대표적인 병원균으로 *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica* 그리고 *Listeria monocytogenes* 등을 들 수 있다(Stem *et al* 1980, Swaminathan *et al* 1982, Toyofuku 2008, McGann *et al* 2008, Silva *et al* 2008, Wesley *et al* 2008, Kilonzo-Nthenge *et al* 2008). *Salmonella* 속에 속하는 다수의 *Salmonella* 들은 식중독에서부터 장열, 패혈증, 위장염 등을 일으키는 병원성 균이다. 이 중 어린 소에 감염하여 1개월 이내에 치사율 50~100%를 유발하는 *S. dublin*과 국내 발병 빈도는 낮지만 돼지에서 급성 패혈증을 일으키는 *S. choleraesuis* 및 *S. typhisuis*가 있으며, 만성장염을 일으키는 *S. derby*가 있다. 하지만 가장 심각한 *Salmonella*

속은 *S. Typhimurium*과 *S. enteritidis*이며 이들 균주는 감염 및 발병 대상에 대한 특이성이 없이 사람과 동물 모두에서 식중독이나 만성 장염을 일으키는 것으로 알려져 있고, 국내에서의 발병 빈도도 가장 높다(Cover & Aber, 1989, Tassinari *et al* 1994, Lim *et al* 1999).

식품에 오염된 세균은 일반적으로 식품 시료 현탁액을 평판배지에서 배양한 후에 검출되며, 병원성 세균과 같은 특정한 종의 검출을 위해서는 대상 세균의 생리학적 특성을 이용한 추가적인 배양이 요구되며, 검출에 소요되는 시간도 최소 2일에서 2주 이상으로 상당하다. 따라서 세계 각국의 공중보건당국과 식품업체들은 병원성 세균에 의한 식품의 오염 여부를 신속하게 검사할 수 있는 방법의 개발이 시급하게 되었다. 보다 신속하고 정확한 병원균 진단을 위하여 최근 식품에서 핵산이나 항원 등을 추출하여 오염 여부를 판단하는 기술들이 개발되고 있다. 대표적인 것으로는 PCR 진단법과 면역학적 방법이 있으며, 면역학적 방법은 병원균에 대한 항체를 제조하여 발색 반응을 유도하는 것으로서 구성이 간단하고 빠르게 검출할 수 있는 장점이 있다. 그러나 검출에 대한

* Corresponding author : Jong-Won Joo, Tel : +82-41-750-6874, E-mail : joojw@hanmail.net or joojw@joongbu.ac.kr

민감도가 임상적 질병 유발 균농도($10^7 \sim 10^8$ CFU/mL) 수준보다 낮은 $10^6 \sim 10^{10}$ CFU/mL로 떨어지는 단점이 있다(Oh *et al* 1996, Lee *et al* 2000).

PCR 진단법은 PCR을 수행하여 확인할 수 있는 별도의 장치가 필요한 단점이 있으나, 면역학적 방법과는 달리 시료 내에 병원균에 관한 특정 염기 서열을 프라이머를 이용하여 증폭하여 진단하는 방법으로 반응 용액 당 한 개의 증폭 가능한 염기 서열이 존재하여도 검출이 가능하며 빠른 시간 안에 분석이 가능하다(Jung HK 2001). 또한, PCR 진단법의 정확성을 향상시키기 위하여서는 다양한 살모넬라 속의 균주들에 대하여 보다 특이적인 프라이머 구성이 필요로 된다(Sunil *et al* 2008).

따라서 본 연구는 PCR 진단법을 이용하여 식품에 오염된 살모넬라를 보다 특이적으로 다른 세균과 구별하여 검출할 수 있는 프라이머를 개발하기 위하여 수행되어졌다.

재료 및 방법

1. Microorganisms 및 배양 조건

실험에 사용된 살모넬라속 균주들은 CCARM(Culture Collection of Antimicrobial Resistance Microbes, 한국)으로부터 분양받았으며, 각각 *Salmonella* Typhimurium(CCARM8153, 8107, 8100) *S. ardwick*(CCARM8110, 8109, 8106), *S. enteriti*(CCARM8050, 8047, 8042), *S. risen*(CCARM8036, 8034), 그리고 *S. derby*(CCARM8026, 8025) 균주를 사용하였다. 프라이머의 특이성 검정에 사용된 균주들로는 *Campylobacter jejuni* CCARM13157과 *C. coli* CCARM 13078 균주를 사용하였고, *Escherichia coli* K12는 생명공학연구원(대전)에서 제공받았다. 각 균주들의 배양은 nutrient media(Oxoid, 영국)를 이용하여 36°C에서 24시간 동안 배양한 후에 사용하였다. 살모넬라에 오염된 시료는 균주들의 배양액을 멸균된 NaCl 용액(0.8%)으로 희석하여 소고기와 돼지고기에 10^2 cfu/g 수준이 되도록 혼합하였다.

2. Genomic DNA의 추출

20시간 동안 배양된 각각의 균주 배양액을 원심분리(13,000 rpm - 10 min)하여 세균을 회수한 후에 멸균 증류수로 2~3회 세척한 후 사용하였다. 준비된 세균 균체를 1 mL의 용액 A (2% CTAB, 2% PVP4000, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA(pH 8.0), 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 2% 2-mercaptoethanol)에 현탁한 후, 다시 1 mL의 6 M guanidine HCl을 첨가하여 1분간 강하게 교반한 후 2 mL의 chloroform을 첨가하여 강하게 교반하였다. 혼합액의 상층액을 수거하고, isopropanol 2 mL를 첨가한 후에 강하게 교반하였고, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리

하였다. 침전된 pellet은 차가운 70% ethanol을 이용하여 세척한 후에 상온에서 건조하여 용매를 휘발시켰고, 다시 1 mL의 TE-buffer(pH 8.0) 용액에 녹여 실험에 사용하였다.

3. Oligonucleotide Primer의 제작

살모넬라의 검출을 위하여 사용된 프라이머는 *Salmonella* Typhimurium의 *invA* 유전자와 *mdh* 유전자를 참조하여 Genotech 사(Korea)에 의뢰하여 합성하였으며, 사용된 각각의 프라이머들의 염기서열은 Table 1과 같다.

4. PCR 조건

20 μ L 반응을 기준으로 0.4 μ M의 프라이머와 200 μ M의 dNTP 혼합액(Larova사, 독일), PCR buffer(20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.5 U Taq DNA polymerase, 5 μ L의 sample DNA 혹은 2 μ L의 세균 현탁액을 template로 첨가하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 pre-incubation 과정을 거친 후에, 40 cycle로 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응시킨 후, 72°C에서 10분간 final extension시키고 반응을 종결하였으며, 일련의 과정은 T1 Thermal Cycler(Biometra, USA)를 이용하여 수행하였다.

Table 1. Nucleotide sequences of *Salmonella* sp. and *Salmonella* Typhimurium specific primers based on *invA* and *mdh* genes

Primer	Sequence (5' to 3')	Amplicon size(bp)
<i>Salmonella</i> genus specific		
SLM1-For	CTG CGC GCG AAC GGC GAA GCG TAC	386
SLM1-Rev	GAA TCC CGG CAG AGT TCC CAT TGA AAT GG	
SLM2-For	CTC ACC AGG GAG TTA CAA CAT GG	284
SLM2-Rev	AGC TCA GAC CAA AAG TGA CCA TC	
SLM3-For	CGC TCT TTC GTC TGG CAT TAT C	408
SLM3-Rev	CCG CAA ATA AAG TTC ACA AAG	
<i>S. Typhimurium</i> specific		
SLT1-For	GTC AGC AGT GTA TGG AGC GA	143
SLT1-Rev	AGT AGC GCC AGG ACT CGT TA	
SLT2-For	ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT	224
SLT2-Rev	AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT	
SLT3-For	GGT CCA GCT CTG TCG CC	444
SLT3-Rev	CCG GGC AGA TGA TAC CC	
SLT4-For	AGC TGC CAA CGA AAG TTG AAG TGC CGG TG	267
SLT4-Rev	AGG CGC ATT CCA CCA CGC CCT TCT CGC	

5. Agarose Gel Electrophoresis

10 μ L의 PCR product를 ethidium bromide(5 μ g/mL)가 포함된 1.5% agarose gel에 loading한 후 전기영동을 실시하여 이것을 다시 UV transilluminator에서 band pattern을 분석하였다. 살모넬라 종에 대하여 특이적이고 *S. Typhimurium* 속에 대하여 특이적인 프라이머를 선별하기 위하여 PCR 과정을 통하여 각각의 세균들에 대한 amplification efficiency를 측정하였다. 균주는 DNA를 정제하지 않고 bacterial suspension을 직접 사용하였으며, 1 μ L 당 100 cell 이상 포함될 수 있도록 하여 반응을 진행시켰다.

6. 프라이머의 민감도 평가

S. Typhimurium(CCARM 8153)를 각각 2 μ L 당 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 CFU가 되도록 희석한 후에 각각의 프라이머에 대한 민감도 실험에 사용하였다.

7. 음식 샘플로부터 Bacteria 농축 및 DNA 제조

각각 100 CFU/mL의 살모넬라 현탁액이 혼합된 쇠고기와 돼지고기 시료 1 g을 50 mL 증류수에 넣고 교반(200 rpm, 30분) 후 침전을 통하여 시료내 쇠고기와 돼지고기를 제거한 후 수거된 50 mL의 세척한 용액을 이후의 실험을 위한 시료로서 준비하였다. 준비된 전체 시료 50 mL 중 25 mL는 증균 과정을 통하지 않고 직접 PCR 기법으로 살모넬라를 검출하는 데에 적용하였으며(before enrichment), 나머지 25 mL는 통상적인 증균 과정을 거친 후에 PCR 기법으로 검출하는 데에 적용하였으며(after enrichment), 이 중 일부는 직접 PCR을 적용하였으며(bacterial suspension), 나머지는 genomic DNA를 추출한 후에 PCR 기법을 적용하였다(DNA solution). 각각 시료의 상세한 준비 과정은 다음과 같다. 준비된 전체 시료 50 mL 중 25 mL를 원심분리한 후 상등액은 버리고, 펠렛(pellet)을 STE(100 mM 염화나트륨, 50 mM Tris-HCl(pH 7.0), 1 mM EDTA(pH 8.0))에 현탁하고, 다시 원심분리한 후 이것을 2 mL 증류수에 녹인 후 직접 PCR 분석(direct PCR analysis)에 이용하였다. 수거된 샘플 중 나머지 25 mL는 BPW(buffered peptone water, 1% peptone, 0.5% NaCl, 0.35% disodium phosphate, 0.15% mono-potassium phosphate, pH 7.2) 225 mL에 첨가하고 36°C에서 4시간 동안 진탕 배양하였다. 배양이 완료된 후에 각각 1/2씩 분리하여 원심분리 후 한 부분은 1 mL의 증류수에 녹여 직접 PCR 분석을 실시하였고, 나머지 1/2 부분은 위와 동일한 genomic DNA 추출 과정을 거쳐서 사용하였다. 최종적으로 agarose gel에서 얻어진 PCR product band들의 강도를 판단하여 검출 감도를 각각 poor(+), medium(++) 그리고 good(+++)으로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 살모넬라 검출을 위한 Broad Spectrum Primer SLM과 *Salmonella* Typhimurium Specific Primer SLT의 선별

효율적인 살모넬라 검출 primer를 선별하기 위하여 각각의 oligonucleotide primer에 대한 amplification efficiency를 분석하였다. 살모넬라와 대장균 그리고 *Campylobacter*에 대한 SLM1 primer의 효율 분석 결과는 Fig. 1에서 보는 것과 같다. 대장균을 포함한 다양한 병원성 세균에 대하여 PCR을 수행한 결과, 살모넬라에 특이적인 반응을 나타내는 것으로 나타났다. Primer SLM3의 경우 SLM1보다는 특이성이 낮게 나타났다. *Campylobacter*의 경우에는 반응성이 없는 반면 대장균에서 반응이 나타났으며, 또한, *Salmonella* Typhimurium과는 반응이 나타나지 않았다(Fig. 2). 이 외 primer SLM2의 경우 반응성이 매우 낮고, 특이성이 나타나지 않았다(data not shown). Primer SLT1의 경우, 대장균과 *Campylobacter*에서는 반응이 나타나지 않았으며, *Salmonella* Typhimurium뿐만 아니라 다양한 살모넬라 균주들과 반응이 나타났(Fig. 3). 그러나 SLT4 primer의 경우 다른 병원균뿐만 아니라 다른 종류의 살모넬라 균주들과도 반응하지 않고 *S. Typhimurium*에만 특이적으로 나타났(Fig. 4). 이외 primer SLT2와 SLT3

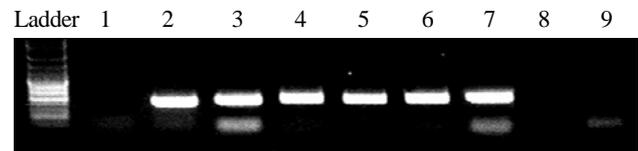


Fig. 1. Primer specificity of SLM1 in each bacterial species mixtures.

Lane 1, *Escherichia coli*; Lane 2, *Salmonella* spp.; Lane 3, *S. ardwick* CCARM 8110; Lane 4, *S. derby* CCARM 8026; Lane 5, *S. enteritidis* CCARM 8050; Lane 6, *S. rissen* CCARM8036; Lane 7, *S. Typhimurium* CCARM 8100; Lane 8, *Campylobacter coli* CCARM 13157; Lane 9, *C. jejuni* CCARM 13078.

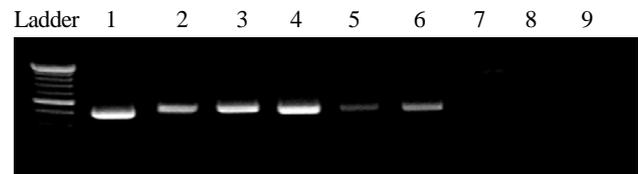


Fig. 2. Primer specificity of SLM3 in each bacterial species mixtures.

Lane 1, *Escherichia coli*; Lane 2, *Salmonella* spp. ; Lane 3, *S. ardwick* CCARM 8110, Lane 4, *S. derby* CCARM 8026; Lane 5, *S. enteritidis* CCARM 8050; Lane 6, *S. rissen* CCARM 8036; Lane 7, *S. Typhimurium* CCARM 8100; Lane 8, *Campylobacter coli* CCARM 13157; Lane 9, *C. jejuni* CCARM 13078.

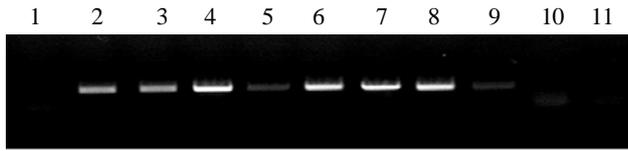


Fig. 3. Primer specificity of SLT1 in each bacterial species mixtures.

Lane 1, *Escherichia coli*; Lane 2, *S. Typhimurium* CCARM 8153; Lane 3, *S. Typhimurium* CCARM 8107; Lane 4, *S. Typhimurium* CCARM 8100; Lane 5, *Salmonella* spp.; Lane 6, *S. ardwick* CCARM 8110; Lane 7, *S. derby* CCARM 8026; Lane 8, *S. enteritidis* CCARM 8050; Lane 9, *S. rissen* CCARM8036; Lane 10, *Campylobacter coli* CCARM 13157; Lane 11, *C. jejuni* CCARM 13078.



Fig. 4. Primer specificity of SLT4 in each bacterial species mixtures.

Lane 1, *Escherichia coli*; Lane 2, *S. Typhimurium* CCARM 8153; Lane 3, *S. Typhimurium* CCARM 8107; Lane 4, *S. Typhimurium* CCARM 8100; Lane 5, *Salmonella* spp.; Lane 6, *S. ardwick* CCARM 8110; Lane 7, *S. derby* CCARM 8026; Lane 8, *S. enteritidis* CCARM 8050; Lane 9, *S. rissen* CCARM8036; Lane 10, *Campylobacter coli* CCARM 13157, Lane 11, *C. jejuni* CCARM 13078.

의 경우 반응성이 매우 낮고, 특이성이 나타나지 않았다(data not shown). 일련의 효율성 분석 결과를 통하여 다양한 살모넬라 균주에 대하여 broad spectrum을 나타내는 primer로는 SLM1 그리고 *Salmonella* Typhimurium에 대한 specific primer로는 SLT4를 선발할 수 있었다.

본 실험과 같이 PCR 방법은 검출하고자 하는 병원균의 고유 유전자를 특이적으로 증폭시키는 방법으로 대상 병원균을 분리, 배양할 필요가 없이 존재 여부를 단시간 내에 검출할 수 있어 식품에 오염된 미생물의 검출 방법으로 개발되어 왔다. PCR 방법을 이용하여 병원성 세균을 식품으로부터 검출하기 위하여서는 특정 병원균에 특이적인 DNA 염기서열로부터 검출을 위한 primer들의 염기서열들이 결정되는데 주로 질병에 관련된 유전자를 포함하여 다양한 유전자들이 사용된다. 우유, 치즈, 요구르트에서 *Campylobacter jejuni*, *C. coli* 균의 분리에 관하여서는 *flaA*, *flaB* 유전자를 활용하는 방법이 연구된 바 있고(Wegmuller *et al* 1993), 굴에서 *Salmonella* 균의 검출을 위하여 *himA* 유전자가 활용된 바 있으며(Bej *et al* 1994), 닭의 피부에서 *Campylobacter*의 16S ribosomal RNA sequence를 이용하여 *Campylobacter jejuni*, *C. coli*,

C. lari 균을 분리하는 연구가 수행된 바 있다(Giesendorf *et al* 1992). 이러한 분자생물학적 기술을 통한 병원균의 선별에서는 제작된 primer의 정확성과 특이성이 매우 중요하여 현재까지도 다양한 유전자들을 활용하여 primer 제작에 관한 연구가 진행 중에 있다.

2. SLM3와 SLT4의 검출 민감도 측정

Broad spectrum primer와 *S. Typhimurium* specific primer로 선별된 각각의 SLM3과 SLT4의 최소 검출 농도를 측정하기 위하여 *S. Typhimurium*의 농도를 10^0 cell/tube에서 10^3 cell/tube까지 다양화한 후에 검출 감도를 측정한 결과, SLM3와 SLT4 primer 모두 10^0 cell/mL에서부터 검출되기 시작하여 선별된 primer의 검출 감도는 최소 1 cell인 것으로 나타내어 그 검출 민감도가 매우 우수한 것으로 나타났다(Fig. 5). 식품으로부터 병원균의 검출은 특이성뿐만 아니라 민감성 또한 매우 중요한 요인으로 작용한다. 이에 PCR 방법의 민감도와 특이성의 개선을 위해 nested PCR 방법과 PCR 방법과 함께 Ligase Chain Reaction(LCR) 또는 Nucleic Acid Sequence-based Amplification(NASBA)(Hashimoto *et al* 1995, Uyttendaele *et al* 1995)을 병행하여 분석하는 방법에 대한 연구도 수행된 바 있다.

3. 살모넬라에 오염된 식품으로부터 *Salmonella* sp.와 *S. Typhimurium*의 검출

쇠고기와 돼지고기에 살모넬라를 접종한 후에 선별된 primers를 이용하여 PCR 분석을 수행한 결과, Table 2와 같이 양호한 검출 성능이 나타난다. 음식물 샘플에서는 민감도는 세균을 증균하지 않았을 경우나 증균한 경우, 그리고 DNA만을 추출한 경우 모두에서 유사한 검출 감도를 나타내었다. 쇠고기나 돼지고기 시료 내에는 PCR 민감도를 떨어뜨리는 다양한 요인들이 포함되어 있는 것으로 알려져 있으나(Wolffs

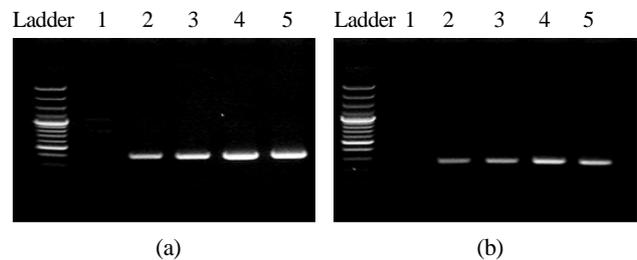


Fig. 5. Sensitivity of primer SLM1 and SLT2 to various concentration of *S. Typhimurium* CCARM 8153.

(a) Primer SLM1, Lane 1, negative control; Lane 2, 10^0 cell/tube; Lane 3, 10^1 cell/tube; Lane 4, 10^2 cell/tube; Lane 5, 10^3 cell/tube.
(b) Primer SLT4, Lane 1, negative control; Lane 2, 10^0 cell/tube; Lane 3, 10^1 cell/tube; Lane 4, 10^2 cell/tube; Lane 5, 10^3 cell/tube.

Table 2. Results of PCR performed with food samples with and without enrichment

Primers/ samples	Before enrichment	After enrichment	
		Bacterial suspension	DNA solution
SLM1	Beef	+++	++
	Pork	+	++
SLT2	Beef	+	++
	Pork	+++	++

+, poor detection efficiency; ++, medium detection efficiency; +++, good detection efficiency.

et al 2004), 본 실험에서는 식품 시료 자체에서도 높은 검출 감도를 나타내었다.

요 약

본 연구에서는 육류 식품 시료에서 단시간 내에 살모넬라를 검출하기 위하여 PCR을 이용한 검출용 프라이머들의 특이성과 민감성을 평가하였다. 실험에 사용된 프라이머들은 *Salmonella* Typhimurium의 *mdh*와 *invA* 유전자의 염기서열에 기초하여 제작되었다. 각각의 primer들의 검출 감도를 평가하여 최종적으로 broad spectrum primer SLM1과 *S.* Typhimurium specific primer SLT4를 선발하였다. 또한, 시료에 오염된 병원균의 최소 검출량이 어느 정도인지를 확인하기 위하여 살모넬라 균수를 reaction tube당 $10^0 \sim 10^3$ cell까지 다양하게 하여 검출 감도를 측정한 결과, 최소 1 cell에서도 PCR 산물을 나타내어 검출 감도가 매우 우수한 것으로 나타났다. 살모넬라 균주를 혼합한 소고기와 돼지고기 시료에서 각각 프라이머들의 검출 감도를 평가한 결과, 평균하지 않은 시료 자체와 세균학적 방법으로 증균 배양한 시료 그리고 증균 배양된 시료로부터 세균의 DNA를 추출한 시료 간에 큰 차이를 나타내지 않았다. 이에 육류 식품에서 살모넬라 혹은 *S.* Typhimurium의 검출을 위한 프라이머로서 효율적으로 사용이 가능할 것으로 판단된다.

문 헌

Bej AK, Mahbubani MH, Boyce MJ, Atlas RM (1994) Detection of *Salmonella* sp. in oysters by PCR. *Appl Environ Microbiol* 60: 368-373.
Cover TL, Aber RC (1989) Medical progress-(*Yersinia enterocolitica*). *N Engl J Med* 321: 16-24.

Giesendorf BA, Quint WG, Henkens MH, Stegerman H, Huf FA, Niesters HG (1992) Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* sp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 3804-3808.
Han JP, Baek BS, Bae MJ (1999) Productivity, isolation and purification of egg yolk antibody (IgY) against food poisoning bacteria (*Salmonella typhimurium*). *J East Asian Soc Dietary Life* 9: 200-206.
Hashimoto Y, Itho Y, Fujinaga Y, Khan AQ, Sultana F, Miyake M, Hirose K, Yamamoto K, Ezaki T (1995) Development of nested PCR based on the *viaB* sequence to detect *Salmonella typhi*. *J Clin Microbiol* 33: 775-777.
Jung HK (2001) Comparison of sensitivity of detection for enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxin and *Clostridium perfringens* Type A enterotoxin by means of the reversed passive latex agglutination and the polymerase chain reaction. *J East Asian Soc Dietary Life* 11: 26-32.
Kilonzo-Nthenge A, Chen FC, Godwin SL (2008) Occurrence of *Listeria* and *Enterobacteriaceae* in domestic refrigerators. *J Food Prot* 71:608-12.
Lee YK, Choi SM, Shin JY, Ryeom K (2000) Rapid detection method for pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a multiplex PCR. *Korean J Sanitation* 15: 105-113.
Lim SY, Lee DH, Park SH, Kim CM (1999) Characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from foods. *Korean J Food Sci Tech* 31: 183-188.
McGann P, Raengpradub S, Ivanek R, Wiedmann M, Boor KJ (2008) Differential regulation of *Listeria monocytogenes* internalin and internalin-like genes by sigmaB and PrfA as revealed by subgenomic microarray analyses. *Foodborne Pathog Dis* 5: 417-435.
Oh HJ, Kim CM, Seong WK, Min HK (1996) Study on the development of rapid detection method for pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by polymerase chain reaction (in Korean). *J Korean Soc Microbiol* 31: 165-173.
Silva S, Teixeira P, Oliveira R, Azeredo J (2008) Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *J Food Prot* 71:1379-85.
Stem NJ, Pierson MD, Kotula AW (1980) Effects of pH and sodium chloride on *Y. enterocolitica* growth at room and refrigeration temperatures. *J Food Science* 45: 64-67.
Sunil DS, Shashidhar R, Karani M, Bandekar JR (2008) Rapid, sensitive, and validated method for detection of *Sal-*

- monella* in food by enrichment broth culture-Nested PCR combination assay *Mol Cell Probes* 22: 201-206.
- Swaminathan B, Harmon MC, Mehlman IJ (1982) A review *Yersinia enterocolitica*. *J Appl Bacteriol* 52: 151-154.
- Tassinari A, Franco BDG, Landgraf M (1994) Incidence of *Yersinia* spp. in food in Sao Paulo, Brazil. *Int J Food Microbiol* 21: 262-270.
- Toyofuku H (2008) Epidemiological data on food poisonings in Japan focused on *Salmonella*, 1998-2004. *Food Addit Contam* 15: 1-9.
- Uyttendaele M, Schukink R, Germen B, Debevere J (1995) Detection of *Campylobacter jejuni* added to foods by using combined selective enrichment and nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Appl Environ Microbiol* 61: 1341-1347.
- Wegmuller B, Luthy J, Candrian U (1993) Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Appl Environ Microbiol* 59: 2161-2165.
- Wesley IV, Bhaduri S, Bush E (2008) Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in market weight hogs in the United States. *J Food Prot* 71: 1162-1168.
- Wolffs P, Knutsson R, Norling B, Rådström P (2004) Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR. *J Clin Microbiol* 42: 1042-1047.
- (2009년 2월 26일 접수, 2009년 3월 26일 채택)