J. Fd Hyg. Safety 18(2), 67–72 (2003)

Listeria spp.의 RAPD typing을 위한 Primer의 분리력 비교

임형근 · 홍종해* · 박경진** · 최원상†

*동국대학교 생명공학과, *강원대학교 수의학과, **한국보건산업진흥원 HACCP팀*

Primers for typing *Listeria* spp. using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ANalysis

Hyungkun Lim, Chong-Hae Hong*, Gyung-Jin Bahk, and Weon Sang Choi†**

Department of Biotechnology, College of Natural Sciences, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

**Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Kangwon-do, Chunchon 200-701, Korea*

***HACCP Team, Korea Health Industry Development Institute, Seoul 156-050, Korea*

Abstract – Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis is based on the amplification of random DNA segment using a single arbitrary primer. Polymorphic DNA patterns identified by this method can be used for typing *Listeria monocytogenes*. To select the primers for RAPD typing *Listeria* spp., the performance of 31 primers were compared by analyzing 13 *Listeria* spp. reference strains. Reproducible electrophoresis patterns were obtained. Among 31 primers, 6 primers (primer 6, HLWL74, UBC155, UBC127, Lis5, Lis11) showed better differentiation, when discrimination index, band clarity, band number, difficulty of band scoring were considered than the others. These primers will be useful for typing *Listeria* spp. in the future. Currently, we are under investigation for the RAPD typing of contaminated *L. monocytogenes* for the risk analysis of pork processing plant using these primers.

Key words: Random amplified polymorphic DNA (RAPD), *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*

리스테리아균(*Listeria* spp.)은 Gram 양성 간균으로[1] 총 8가지의 종으로 분류되나 이중 *Listeria monocytogenes*만이 사람에게 병원성이다.[2] *L. monocytogenes*는 우유, 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 같은 다양한 식품으로부터 분리되었으며 이에 감염된 식품 또는 식품 원료 물질을 섭취하면 수막염, 심내막염 및 파종성육아종을 유발하고 임산부의 경우 유산, 사산, 조산 등을 일으킬 수 있는 리스테리아증(listeriosis)에 걸릴 수 있다.[3] 따라서 리스테리아균을 빨리 효과적으로 typing 할 수 있는 방법의 개발은 식중독 사고의 역학적 조사와 식품공장에서의 오염원 규명에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 그러나 현재 많이 사용되고 있는 serotyping 방법은 O(somatic)와 H(flagella) 항원의 변이에 기초한 것으로[4] 모든 리스테리아균을 단지 13가지 serovar로만 분류하기 때문에 그 유용성에 있어 다소 제한적이다. phage-typing 기술도 있지만 이는 리스테리아균 중의 일부를 1/2a, 1/2b와 4b로 구별하나 일부 실험실에서만 typing이 가능하고 또 모든 균을 다 typing할 수 있는 것도 아니다.[5]

이 같은 문제점들을 극복하기 위해 분자생물학적인 방법들 즉 pulsed-field gel electrophoresis(PFGE), ribotyping, random amplified polymorphic DNA(RAPD), single-stranded conformation polymorphism(SSCP), restriction enzyme analysis, PCR-based hybridization 등의 기술이 *L. monocytogenes*를 typing하기 위해 이용되었다.[6-10] 비록 이 기술들 중의 하나인 PFGE가 미국의 Food Safety and Inspection Service (FSIS)와 다른 공중 보건 기관 등에서 리스테리아균의 typing에 다소 성공적으로 활용되고 있으나[11] 이를 위해서는 손상되지 않은 온전한 상태로 DNA를 정제해야 하고 비싼 기구를 이용해야 한다는 점에서[12] 많은 시료의 취급이 가능해야 할 routine typing에는 부적절하다. 이 같은 점에서 RAPD는 그 대안으로 사용될 수 있다. 사실 RAPD는 비록 실험실간의 pattern 재연성면에서는 다소 문제가 있는 것으로 보고되고 있으나 여러 곳에서 *L. monocytogenes*의 typing에 성공적으로 활용된 바 있고[13-16] 분석을 위해 PFGE에 비해 높은 순도의 DNA를 요구하지 않으며 많은 시료를 빠른 시간 내에 처리할 수 있으면서도 PFGE에 필적하는 분리력을 가지고 있기 때문이다.

본 연구는 장차 field에서 분리된 리스테리아균을 효과적으로 typing할 수 있는 primer를 엄선하기 위한 것으로 리

†Author to whom correspondence should be addressed.

스테리아 표준균주 13종을 대상으로 기존에 리스테리아의 RAPD에 사용된 primer들과 살모넬라의 RAPD에 사용된 primer들을 이용하여 RAPD를 행하고 이로부터 이들 primer의 typing 능력을 비교하여 장차의 field에서 분리된 리스테리아균들의 RAPD를 위한 기초자료로 삼고자 하였다.

재료 및 방법

시약

Taq DNA polymerase와 PCR을 위한 모든 시약은 Takara사(일본)에서 구입하였다. 리스테리아 배양을 위한 Tryptic soy broth와 yeast extract는 Difco사로부터 구입하였다. 그 외 모든 시약은 특별한 언급이 없을 경우 Sigma제를 사용하였다.

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences(5'-3')	T_m value (°C)	reference
DG89(OPB-17)	AGGGAACGAG	28.9	23
DG90 (OPB-6)	TGCTCTGCCC	33.0	23
DG91 (S)	TCACGATGCA	24.8	24
DG92 (OPS-19)	GAGTCAGCAG	28.9	25
DG93 (A)	AGCAGCGCCTCA	42.5	27
DG94 (OPG04)	AGCGTGTCTG	28.9	26
DG95 (OPG08)	TCACGTCCAC	28.9	26
DG96 (OPG10)	AGGGCCGTCT	33.0	26
DG97 (OPH04)	GGAAGTCGCC	33.0	26
DG98 (OPH13)	GACGCCACAC	33.0	26
DG99 (OPL-02)	TGGGCGTCAA	28.9	22
DG100 (OPL-03)	CCAGCAGCTT	28.9	22
DG101 (OPL-12)	GGGCGGTACT	33.0	22
DG102 (primer 1)	GGTGCGGGAA	33.0	21
DG103 (primer 2)	GTTTCGCTCC	28.9	21
DG104 (primer 3)	GTAGACCCGT	28.9	21
DG105 (primer 4)	AAGAGCCCGT	28.9	21
DG106 (primer 5)	AACGCGCAAC	28.9	21
DG107 (primer 6)	CCCGTCAGCA	33.0	21
DG108	GGCTGCAGAA	28.9	28
DG112 (ERIC2)	AAGTAAGT-GACTGGGGTGAGCG	62.1	16
DG113 (PB1)	GGAACTGCTA	24.8	15
DG114 (PB4)	AAGGATCAGC	24.8	13,15
DG115 (HLWL74)	ACGTATCTGC	24.8	5,13,15
DG116 (OPM-01)	GTTGGTGGCT	28.9	14,16
DG117 (OPM-13)	GAGGGTGGCGGTTCT	53.3	16
DG118 (P-2)	GTTTCGCTCC	28.9	16
DG119 (UBC155)	CTGGCGGCTG	37.1	29
DG120 (UBC127)	ATCTGGCAGC	28.9	13,29
DG121 (Lis5)	GCTGGAGTCA	28.9	13
DG122 (Lis11)	AGCCAGGTCA	28.9	13

Primers

본 실험에 사용한 primer들을 Table 1에 정리하였다. 모든 primer는 제노텍(대전)에서 구입하였다.

균주

본 실험에 사용된 리스테리아 균주들은 국립수의과학검역원(안양)에서 분양 받아 TSBY배지(Tryptic soy broth에 0.6% yeast extract를 첨가한 배지)에서 배양하여 사용하였다. 총 13종의 리스테리아 표준균주(Table 2)가 사용되었으며 이 중 7종은 *L. monocytogenes*였다.

DNA 분리 정제

리스테리아균체로부터 DNA를 분리하기 위해 guanidine thiocyanate/phenol/chloroform method[17] 를 사용하였다. 이를 간략히 기술하면 약 0.5 m*l*의 리스테리아 배양액에 0.25 m*l*의 solution D(4 M gunidine thiocyanate, 0.025 M sodium citrate, 0.5% sarcosyl)와 0.5 m*l*의 phenol-chloroform(1:1)을 첨가하여 약 1시간 정도 tumbling시키고 원심분리하여 수용액층을 회수한 후 DNA를 isopropanol로 침전시켰다. 얻어진 pellet을 70% ethanol로 세척한 후 말려서 증류수에 녹여 PCR에 사용하였다.

RAPD-polymerase chain reaction(PCR) 조건

각각의 50 μ*l* PCR 반응액에는 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl2, 200 μM dNTPs, 2.5

Table 2. *Listeria* spp. strains used in this study[a]

Serial number	Species	Strains	Serotypes	Isolation
1	*L.monocytogenes*	ATCC19113	3	human
2	*L.monocytogenes*	ATCC19114	4a	
3	*L.monocytogenes*	ATCC19115	4b	human
4	*L.monocytogenes*	ATCC19117	4d	sheep
5	*L.monocytogenes*	ATCC19118	4e	chicken
6	*L.monocytogenes*	HPB#410	1/2a	
7	*L.monocytogenes*	ATCC35152		guinea pig
8	*L.ivanovii*	ATCC19119		sheep
9	*L.innocua*	ATCC33090	6a	cow brain
10	*L.welshimeri*	ATCC35897	6b	decaying plant
11	*L.seeligeri*	ATCC35967		soil
12	*L.grayi*	ATCC19120		chinchilla feces
13	*L.murrayi*	ATCC25401		corn stalks and leaves

[a]Source: Adapted from Choi and Hong[17]

units Taq DNA polymerase, primer 100 pmol과 DNA template가 함유되도록 하였다. 각 시료는 thermocycler (Perkin-Elmer 2400, Foster, CA)에서 증폭 cycle을 시작하기 전에 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후 cycle로 진입하게 하였으며 각 cycle은 94°C 1분, 35°C 2분, 72°C 2분으로 하였고 30 cycle후 72°C에서 7분간 extension시킨 후 반응을 종료하였다.

RAPD data 분석

discrimination index는 다음 식을 이용하여 계산하였다.[18)]

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{s} nj(nj-1)$$

여기서 D는 numerical index of discrimination, N은 사용된 균주 총수, s는 RAPD type의 수, nj는 j type에 속하는 균주의 숫자를 의미한다.

군집분석은 TREECON software[19)]를 이용하여 Link 등[20)]의 계산식을 이용한 UPGMA방법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

모든 RAPD 분석은 최소한 2회 이상 실시하여 결정하였고 대부분의 경우 동일기기, 동일 조건 하에서는 RAPD pattern은 재현성이 있었다. 그러나 동일 균주와 동일 primer라 하더라도 이미 보고된 다른 group의 RAPD pattern과는 차이를 보였다.[15)] 이는 PCR 조건이 약간 다르기 때문인 것으로 보이나 분리력 면에서는 사실상 같은 결과를 보였다. 비록 1가지 primer만으로 모든 리스테리아 표준균주들을 분리할 수는 없었지만 몇 가지 primer를 이용하여 RAPD를 행한 후 이를 종합해서 판단하면 사실상 모든 리스테리아 표준균주들을 쉽게 분리할 수 있었다. 사용된 primer들간의 분리력은 매우 차이가 있었고 총 31가지 primer중 비교적 분리가 나은 14가지 primer의 분리력을 분석한 결과를 Table 3에 정리하였다. discrimination index만으로 primer의 분리력을 비교하면 DG107, DG120, DG121 그리고 DG122가 분리력이 가장좋고 DG116과 DG119가 다음으로 좋으며 DG118이 가장 나쁜 것으로 나타났다. 그러나 실제로 이를 typing에 적용할 경우를 가정하면 band scoring의 난이도가 discrimination index만큼 중요한 판단기준으로 작용할 것으로 보인다. 특히 DG115의 경우는 discrimination index는 DG107, DG120, DG121, DG122에 비해 떨어지지만 band가 명확하면서도 band의 숫자도 적당하여 리스테리아의 RAPD typing에 매우 유용한 primer라고 판단되었다. 따라서 discrimination index, band의 숫자, band scoring 난이도 등을 종합적으로 고려할 때 DG107, DG115, DG119, DG120, DG121, DG122가 나머지 25개 primer들 보다 나은 primer로 판단되었다. 이중 DG107(primer 6)은 *Salmonella*의 RAPD에 적용해 본 바는 있으나[21)] *L. monocytogenes*의 RAPD에는 적용해 본 바가 없다. 본 연구 결과 DG107도 *L. monocytogenes*의 RAPD typing에 좋은 결과를 보여주어 장차 *L. monocytogenes*의 RAPD 분석에 이용될 것이 기대된다. 이외에도 이미 *Salmonella*의 RAPD typing에 사용된

Table 3. RAPD typing results of *Listeria* spp.

Serial number of *Listeria* spp.	RAPD profiles														Cumulative RAPD profiles
	DG99	DG100	DG107	DG112	DG113	DG114	DG115	DG116	DG117	DG118	DG119	DG120	DG121	DG122	
1	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1	K1	L1	M1	N1	1
2	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2	I2	J2	K2	L2	M2	N2	2
3	A2	B3	C3	D3	E2	F3	G3	H3	I3	J2	K3	L3	M3	N3	3
4	A2	B3	C4	D3	E2	F3	G3	H4	I3	J2	K4	L3	M3	N3	4
5	A3	B2	C5	D3	E2	F4	G4	H5	I2	J2	K5	L4	M4	N4	5
6	A4	B4	C6	D4	E1	F5	G5	H6	I4	J1	K6	L5	M5	N5	6
7	A5	B4	C6	D5	E3	F5	G6	H7	I4	J1	K7	L6	M6	N6	7
8	A6	B5	C7	D6	E4	F6	G7	H8	I5	J3	K8	L7	M7	N7	8
9	A7	B6	C8	D7	E5	F7	G8	H9	I6	J4	K9	L8	M8	N8	9
10	A8	B7	C9	D8	E6	F8	G9	H10	I7	J5	K10	L9	M9	N9	10
11	A9	B8	C10	D9	E7	F9	G10	H11	I8	J6	K11	L10	M10	N10	11
12	A7	B6	C11	D7	E8	F7	G8	H9	I6	J4	K9	L11	M8	N8	12
13	A7	B6	C11	D7	E9	F7	G8	H9	I6	J7	K9	L8	M11	N11	13
D value	0.923	0.923	0.974	0.923	0.910	0.935	0.948	0.961	0.935	0.871	0.961	0.974	0.974	0.974	

Table 4. RAPD profiling results of *L. monocytogenes* isolated from different researches

Laboratories	Number of strains tested	Primers used	RAPD pattern numbers
I[5]	35[a]	HLWL74(DG115)	13
II[13]	287[b]	PB4(DG114) HLWL74(DG115) UBS127(DG120) Lis5(DG121) Lis11(DG122)	17(composite)
III[15]	54[c]	PB1(DG113) PB4(DG114) HL74(DG115)	10 7 6 40(composite)
IV[16]	432[d]	ERIC2(DG112) OPM - 1(DG116) OPM - 13(DG117) P - 2(DG118)	141(composite)
V[29]	115[e]	UBC155(DG119) UBC127(DG120)	11 16 24(composite)

[a] 14 epidemic strains isolated during outbreaks in France in 1992 and 1993.
21 strains isolated from food and the environment.
[b] collected from five French pork slaughtering and cutting plants.
[c] meats from 6 different countries (Korea, USA, Denmark, Belgium, China and New zealand).
[d] from clinical and veterinarian cases of listeriosis, dairy, vegetable, meat-and fish-based food items, environmental samples and samples collected from one transport terminal, one poultry-processing company and four Atlantic salmon processing plants.
[e] from shrimp processing plant in Brazil.

primer들 중에 primer 1, 2, 3, 4, 5,[21] OPL12,[22] OPB-6, OPB-17,[23] S,[24] OPS-19,[25] OPG04, OPG08, OPG10, OPH04, OPH13[26] 등은 DNA segment의 amplification이 되지 않거나 된다 하더라도 band가 희미하거나 분리력이 좋지 않아 *L. monocytogenes*의 RAPD에는 적합하지 않았다. 본 실험에서 비교해 본 primer들 중 DG112(ERIC2), DG113(PB1), DG114(PB4), DG115(HLWL74), DG116(OPM-1), DG117(OPM-13), DG118(P-2), DG119(UBC115), DG120 (UBC127), DG121(Lis5), G122(Lis11)는 이미 다른 연구자들이 야외분리 *L. monocytogenes* spp.의 RAPD를 위해 적용한 바 있으며, 이를 본 실험에서 사용한 primer의 명칭과 결부시켜 요약하면 Table 4와 같다.[5,13,15,16,29] 이 결과를 분석해보면 야외분리주의 경우 검사한 총 균주수에 비해 RAPD pattern수가 현저히 적은데 이는 같은 균주가 반복 분리되었기 때문으로 보인다. 이에 비해 본 실험은 표준균주를 이용하였으므로 13균주에서 primer에 따라 9-11개의 RAPD pattern이 얻어졌고 composie의 경우 13개 표준균주로 부터 13개의 RAPD pattern을 분리할 수 있었다고 판단된다.

RAPD typing은 serotype이 다르면 RAPD pattern도 다르다는 것을 보여준다(Table 2, Table 3). 또한 분리된 균주들 간에 유전적으로 얼마나 가깝고 먼지도 쉽게 계산이 가능한데 이중 DG121(Lis5)을 이용하여 분석한 결과를 Fig. 1에 정리하였다. 이로부터 *L. monocytogenes* 19115과 19117, *L. innocua*와 *L. gray*는 DG121로 분석한 경우 유전적으로 거의 유사하다는 것을 보여준다. 그리고 *L. monocytogenes* 7종을 한 군집, *L. murrayi*, *L. innocua*, *L. grayi*를 또 다른 군집, *L. ivanovii*와 *L. seeligeri*를 또 다른 군집으로 총 3개의 군집으로 나눌 수 있음을 보여준다.

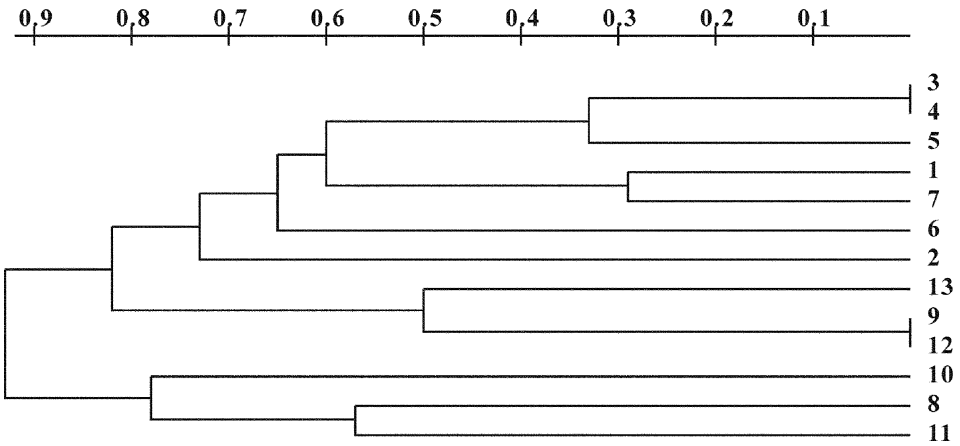

Fig. 1. UPGMA cluster analysis of RAPD profiles obtained with primer DG121 for 13 *Listeria* spp. strains. The strains were divided into 3 groups based on the distance. Each strain was noted as number in Table 2.

우리는 *hlyA* gene이 *L. monocytogenes*에 specfic하므로 *hlyA* gene의 일부를 primer로 하여 PCR을 행하면 *L. monocytogenes*와 일반 리스테리아균들 간에는 쉽게 구분이 된다고 보고한 바 있다.[17] 따라서 실제로 field에서 역학 조사시에는 hlyA gene을 이용하여 *L. monocytogenes*인지 여부를 우선 판별하고 이중 *L. monocytogenes*로 분류될 경우, 즉 *hlyA* specific fragment가 확인될 경우 이번에 선발된 6가지 primer중 3-4가지를 이용하여 RAPD를 행하여 결과를 종합하면 쉽게 typing이 가능할 것으로 보인다.

RAPD typing은 분리력에 있어 현재 알려진 많은 typing 방법중 가장 분리력이 좋은 것으로 알려진 PFGE와 비슷한 것으로 보고되고 있고[5] 고도의 정제도와 손상되지 않은 DNA 그리고 고가의 장비를 요구하는 PFGE에 비해 장비가 싸고 상대적으로 쉽게 이용할 수 있는 기술이므로 장차 식중독사고의 역학조사와 식품공장의 오염원 조사추적 등에 많이 활용될 수 있을 것으로 보인다.

결론적으로 우리는 총 31가지 primer를 이용하여 리스티리아 표준균주 13종의 RAPD typing을 행한 후 discrimination index, band의 숫자, band scoring의 난이도 등을 고려하여 가장 분별력이 좋은 primer 6개를 엄선하였다. 현재는 이들 primer를 이용하여 돈육공장에서의 오염원 규명을 위한 연구가 진행 중이 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2002년도 농림부·농림기술개발사업(202138031SB010)의 연구비 지원으로 이루어진 것으로서 이에 감사 드립니다.

국문요약

RAPD 분석은 한 개의 primer를 이용하여 임의의 DNA조각을 증폭하는 것이다. 이때 만들어지는 여러 형태의 DNA pattern을 이용하여 리스테리아 모노사이토제네스를 분류할 수 있다. 리스테리아균들을 효과적으로 RAPD typing 할 수 있는 primer들을 엄선하기 위하여 리스테리아 표준균주 13종을 대상으로 총 31가지 primer들의 RAPD 분리력을 비교하여 보았다. 결과는 재현성이 높았으며 이중 6가지 primer(primer 6, HLWL74, UBC155, UBC127, Lis5, Lis11)가 discrimination index, band의 숫자, band scoring의 난이도 등을 고려해 볼 때 나머지 primer 들에 비해 우수한 분리력을 보였다. 이들 primer들은 장차 리스테리아의 RAPD typing에 이용될 수 있을 것으로 보이며, 현재는 이들을 이용하여 돈육공장의 오염원 규명을 위한 연구를 수행 중이다.

참고문헌

1. Seeliger, H.P.R. and Welshimer, H.J. *In Bergy's Manual of Determining Bacteriology*, 8th edn. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, p. 593 (1974).
2. Hitchins, A.D. *Listeria monocytogenes*. *In Bacteriological Analytical Manual*. 7th edn. AOAC International, Arlington, VA, USA, p.141-151 (1992).
3. 이우주: 의학사전, 아카데미서적, 서울, pp. 612 (1992).
4. Seeliger, H.P.R. and Hohne, K.: Serotyping of *Listeria monocytogenes*. *In Method in Microbiology* (Bergan, T and Norris, J.R. Eds), Vol. 13, Academic Press, New York, p. 31-49 (1979).
5. Kerouanton, A., Brisabois, A., Denoyer, E., Dilasser, F., Grout, J., Salvat, G. and Picard, B.:Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. *International J. Food Microbiol.* **43**, 61-71 (1998).
6. Manzano, M., Cocolin, L., Cantoni, C. and Comi, G: A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. *International J. Food Microbiol*. **42**, 207-212 (1998).
7. Lehner, A., Loncarevic, S., Wagner, M., Kreike, J. and Brandl, E.: A rapid differentiation of *Listeria monocytogenes* by use of PCR-SSCP in the listeriolysin O (*hlyA*) locus. *J. Microbiol. Methods* **34**, 165-171 (1999).
8. Wang, C. and Hong, C.: A rapid PCR-based hybridization assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in channel catfish. *Food Microbiol.* **16**, 291-297 (1999).
9. Pourshaban M., Gianfranceschi, M., Gattuso, A., Menconi, F. and Aureli, P.: Identification of *Listeria monocytogenes* contamination sources in two fresh sauce production plants by pulse-field gel electrophoresis. *Food Microbiol*. **17**, 393-400 (2000).
10. Jaradat, Z.W., Schutze, G.E. and Bhunia, A.K.: Genetic homogenety among *Listeria monocytogenes* strains from

infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. *International J. Food Microbiol*. **76**, 1-10 (2002).

11. Brosch, R., Brett, M., Catimel, B., Luchansky, J.B., Ojeniyi, B. and Rocourt, J.: Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *International J. Food Microbiol.* **32**, 343-355 (1996).
12. Franciosa, G., Pourshaban, M., Gianfranceschi, M., and Aureli, P.: Genetic typing of human and food isolates of *Listeria monocytogenes* from episodes of listeriosis. *Eur. J. Epidemiol.* **14**, 205-210 (1998).
13. Giovannacci, I., Ragimbeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendeuvre, J.-L., Carlier, V. and Ermel, G.: *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants : use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International J. Food Micribiol.* **53**, 127-140 (1999).
14. Gravesen, A., Jacobsen, T., Moller, P.L., Hansen, F., Larsen, A.G. and Knochel, S.:Genotyping of *Listeria monocytogenes*: comparision of RAPD, ITS, and PFGE. *International J. Food Microbiol.* **57**, 43-51 (2000).
15. Byun, S.-K., Jung, S.C. and Yoo, H.S.:Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. *International J. Food Microbiol*. **69**, 227-235 (2001).
16. Martinez, I., Rorvik, L.-M., Brox, V., Lassen, J., Seppola, M., Gram, L. and Fonnesbech-Vogel, B.: Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. *International J. Food Microbiol.* in press (2003).
17. Choi, W.S. and Hong, C.-H.:Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using competitive PCR. *International J. Food Microbiol*. **84**, 79-85 (2003).
18. Hunter, P.R. and Gaston, M.A.: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol*. **26**, 2465-2466 (1998).
20. Link, W., Dixens, C., Singh, M., Schwall, M. and Melchinger, A.E.: Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **90**, 27-32 (1995).
19. Van de Peer, Y., and De Wachter, R.: TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* **10**, 569-570 (1994).
21. Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Bangtrakulnonth, A., Sasipreeyajan, J., Svenson, S.B.: Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella entrica* subsp. *enterica*. *FEMS Immunology and Medical Microbiol.* 29, 221-225 (2000).
22. Mare, L., Dicks, L.M.T. and van der Walt, M.L.: Characterization of South African isolates of *Salmonella enteritidis* by phage typing, numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. *International J. Food Microbiol*. **64**, 237-245 (2001).
23. Lin, A.W., Usera, M.A., Barret, T.J. and Goldsby, R.A.: Application of randomly amplified polymorphic DNA analysis ti differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J. Clin. microbiol.* **34**, 870-876 (1996).
24. Willams, J.G.K., Kubelin, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.: DNA polymorphism amplified by artitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. **18**, 6531-6535 (1990).
25. Laconcha, I., Lopez-Molina, N., Rementeria, A., Audicana, A., Perales, I. and Garaizar, J.: Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. *International J. Food Microbiol.* **40**, 27-34 (1998).
26. Milleman, Y., Lesage-Descauses, M.-C., Lafont, J.-P. and Chaslus-Dancla, E.: Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* **14**, 129-134 (1996).
27. Miyata, M., Aoki, T., Inglis, V., Yoshida, T. and Endo, M.: RAPD analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. : *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 181-185 (1995).
28. Tsen, H., Hu, H.H., Lin, J.S., Huang, C.H. and Wang, T.K.: Analysis of the *Salmonella typhimurium* isolates from food-poisoning cases by molecular subtyping methods. *Food Microbiol.* **17**, 143-152 (2000).
29. Destro, M., Leitao, M.F.F. and Farber, J.M.: Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(2)**, 705-711 (1996).