pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 1, pp. 15~20 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.1.15

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

반려동물 사료의 *Salmonella* spp. 신속검출을 위한 증균배양법, 면역학적 검출법 및 종 특이 프라이머를 이용한 PCR 방법 비교

윤혜정[1]* · 차선호[2] · 이승화[1] · 정민희[1] · 나태웅[1] · 김혜진[1] · 조현정[1] · 홍성희[1]
[1]국립농산물품질관리원 시험연구소 성분검정과
[2]제노텍 유전체분석센터

Comparison of Conventional Culture Method, Enzyme Immune Method, and PCR for the Rapid Detection of *Salmonella* spp. in Pet Food

Hyejeong Yun[1]*, Sun Ho Cha[2], Seung-Hwa Lee[1], Min-Hee Jeong[1], Tae-Woong Na[1], Haejin Kim[1], Hyunjeong Cho[1], Seong-Hee Hong[1]
[1]*Division of Safety Analysis, National Agricultural Products Quality Management Service, Gimcheon, Korea*
[2]*GenoTech Corporation, Daejeon, Korea*

(Received October 14, 2021/Revised February 21, 2022/Accepted February 21, 2022)

ABSTRACT - The purpose of this study was to compare the conventional culture method, enzyme immune method and the PCR method using species-specific primer in the analysis on the *Salmonella* spp. found in domestically distributed pet foods. For the study, *Salmonella* spp. were detected from 175 samples. From the conventional culture method and the PCR method, two samples (jerky and corn gluten) were determined as positive. Also, from the enzyme immune method, one sample (corn gluten) was test-positive. The study revealed that application of the PCR method with species-specific primer allows better distinguishment between the species of the strain collected from the samples than the conventional culture method and/or the enzyme immune method.

Key words: *Salmonella*, Pet food, Rapid detection, PCR

Salmonella spp.는 통성혐기성 그람음성 간균으로 장내세균과에 속하며, 동물과 사람에 장염, 위장염 및 패혈증 등을 일으키는 인수공통전염병의 원인균으로 알려져 있다[1-3]. *Salmonella* spp.는 Salmonellosis의 원인체로 동물의 장관내에 상재하고 있으며 주로 오염된 날고기, 가공육류(가공육, 돈육 ,우육), 과일 및 야채 등을 통해 식중독을 일으킨다[4]. 현재까지 *Salmonella* spp.는 약 2,500 종류의 다양한 혈청형이 발견되었으며, *S. enterica* serotype Enteritidis (*S.* Enteritidis)와 *S. enterica* serotype Typhimurium (*S.* Typhimurium)이 식중독 사고를 일으키는 주요 혈청형이다[5].

*Correspondence to: Hyejeong Yun
Division of Safety Analysis, National Agricultural Products Quality Management Service, Gimcheon 39660, Korea
Tel: +82-54-429-7814, Fax: +82-54-429-7779
E-mail: yhj1217@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

또한 동물에 따른 숙주 특이성이 있는 *Salmonella* spp.와 숙주 특이성이 없는 *Salmonella* spp.로 구분되고 있다. *S. typhi*와 *S. paratyphi* A는 주로 사람에 대해 숙주 특이성을 나타내며, *S. dublin*은 소, *S. choleraesuis*는 돼지, *S. abortus equi*는 말, *S. abortus ovis*는 양에 주로 감염되어 병원성을 나타낸다. *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. anatum* 등은 숙주 특이성이 없이 다양한 동물에 감염되어 병원성을 나타내며, *S. typhimurium*은 각종 동물에서 가장 많이 분리되는 혈청형으로 알려져있다[1,6].

현재 사료에서 유해미생물로 관리되고 있는 *Salmonella* D group (*S.* Typhi, *Salmonella* Enteritidis, *S.* Dublin, *S.* Pullorum, *S.* Gallinarum, *S.* Ontario)을 검출하는 방법은 배지를 이용하는 방법으로 시료에 증균배지를 첨가하여 전증균배양, 선택 증균배양, 선택 배양, 확인 시험, 혈청시험 단계로 이루어져 최종적으로 *Salmonella* D group을 확인하는데 6-7일 정도 소요된다[7-9]. 이러한 방법은 사료 중 유해미생물 검출을 위해 많은 시간이 소요되어 미생물의 신

속검출법으로 사용하기에 한계가 있으며 과도한 노동력이 필요로 하여 효율성이 떨어지는 문제점이 있다[10].

사료의 유해미생물을 신속한 검출을 위해 Polymerase chain reaction (PCR)방법은 식중독균의 특정 유전자를 증폭시켜 전기영동 겔을 통해 확인어렵다. 따라서 본 연구에서는 사료에서 유해미생물로 관리되고 있는 *Salmonella* spp.를 검출하기 위해 증균배양법, 면역학적 검출법 및 종특이 프라이머를 이용한 PCR 방법을 적용하여 *Salmonella* spp.의 검출 결과를 비교하고자 한다. 또한 신속한 검출을 위해 특이 유전자 마커를 개발하고 보다 신속하게 분석하기 위한 방법을 개발하고자 하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 표준균주

본 연구에 사용된 반려동물(개, 고양이) 사료는 유통단계 사료(원료 93점, 제품 82점) 175점을 분석하였다. 전체 시료 중 반려동물 개 52점(29.7%), 고양이 30점(17.1%) 및 원료 93점(53.1%)으로 이루어져 있다.

표준균주는 *Escherichia coli* NCTC 12923 (Bioball, BioMerieux, Marcy-I'Étoile, France), *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 (Bioball, BioMerieux, France), *Staphylococcus aureus* NCTC 10788 (BioMerieux, France), *S. typhimurium* ATCC 14028 (MBL, University Boulevard Manassas, VA, 20110, USA) 및 -80°C 냉동고에서 cryo bead (Microbank, Prolab Diagnostic, Richmond Hill, Canada)에 보관되어 있는 *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* O157:H7 ATCC 43844, *S. abaetetuba* NCTC 8244, *S. enterica subsp. enterica serova* Typhimurium ATCC 13311, *S. enterica subsp. enterica serova* Enteritidis ATCC 13076, *S. senftenberg* KVCC 0590 균주를 해동시키고, nutrient agar (NA; Merck, Darmstadt, Germany)에 획선도말하여 37°C에서 24시간 배양하여 분석에 사용하였다.

증균배양법에 의한 분석

살모넬라 분석은 사료표준분석방법 유해미생물 분석절차에 따라 실시하였다. 시료 25 g을 취하여 225 mL의 펩톤수(buffered peptone water, Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)에 가한 후 35-37°C 에서 24±2시간 증균배양을 실시하였다. 1차 증균배양액 0.1 mL를 취하여 10 mL의 Rappaport-Vassiliadis broth (Biomeriux, France)에 접종하고 42±1°C에서 24±2시간 배양하였다. 또한 1차 증균 배양액 1 mL를 취하여 10 mL의 Tetrathionate broth (Biomeriux, France)에 접종하고 36±1°C에서 24±2시간 배양하였다. 각각의 2차 증균 배양액 1-2 백금이를 XLD agar (Difco, USA), Brilliant Green Sulfa agar (Difco, USA)에 도말하여 35-37°C에서 24±2시간 배양한 후 의심 집락은 확인시험을 실시하였다. 의심집락은 tryptic soy agar (TSA, Difco, USA)배지에 옮겨 37°C에서 24시간 배양하여 단독콜로니를 VITEK2 (BioMeriux, France)의 gram negative card (BioMerieux, France)를 이용하여 생화학적 동정을 실시하였다. 생화학 검사결과 살모넬라로 판단되는 균은 O 항원 다가(polyvalent) 항혈청(Difco, USA)으로 슬라이드 응집반응을 실시하여 polygroup을 결정한 후 단일(single) 항혈청(Difco, USA) 슬라이드 응집반응을 통해 혈청군(serogroup)을 결정하여 D group 여부를 확인하였다.

효소면역기법(Enzyme Immunoassay;EIA) KIT에 의한 분석

시료 25 g을 칭량하여 225 mL 펩톤수에 가한 후 1 mL salmonella supplement (green)를 첨가하여 41.5±1°C에서 18-24시간 증균 배양 후 EIA 키트에 증균한 배양액 0.5 mL를 넣고 100°C에서 5분간 가열한 후 키트을 빼서 10분간 방냉했다. 전자동 효소 형광 면역 분석기기(Mini Vidas, BioMerieux, France)를 이용하여 측정 한 값이 <0.25은 경우 음성(불검출), ≥0.25인 경우 양성(검출)로 판정하였다. 양성인 경우 증균배양액을 MacConkey 한천배지, Desoxycholate Citrate 한천배지, XLD 한천배지 또는 Bismuth Sulfite 한천배지에 접종하여 35-37°C에서 24±2시간 배양한 후 전형적인 집락이 보이면 보통한천배지에 옮겨 35-37°C에서 18-24시간 배양한 후 확인시험을 실시하였다. 생화학 검사 결과 살모넬라로 판단되는 균들의 혈청학적 검사를 실시하는데 먼저 O항원 다가 항혈청으로 슬라이드 응집반응을 실시하여 polygroup을 결정한 후 단일 항혈청 슬라이드 응집반응을 통해 혈청군(serogroup)을 결정하여 D group 여부를 확인하였다.

DNA 추출

시료의 DNA 추출은 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 분석을 실시하였다. 시료의 증균 배양액 1-2 mL을 취한 후 제조사의 권장 방법에 따라 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 실험에 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

Primer 설계 제작

PCR법에 사용된 프라이머는 Kim 등[11-14]의 연구결과를 참고하여 *Salmonella* sp. 및 serogroup A, B, C1, C2 특이 프라이머를 각각 설계하였다(Table 1). 이때 *Salmonella* sp. 특이 유전자로는 invA, *S.* Dublin 특이 유전자로는 vagC, *S.* Enteritidis 특이 유전자로는 spvA를 사용하였다. *Samonella* sp. A, D group 특이 유전자로는 rfbS, *Samonella* spp. B group 특이 유전자로는 rfbJ (B1) 및 rfbJ (B2), *Samonella* spp. C1 group 특이 유전자로는 rfbM를 사용하였다. 각각의 프라이머는 (주)제노텍(Daejeon, Korea)에 주문 제작하여 사용하였다.

Table 1. Species-specific primers designed for detection of *Salmonella* spp.

Strain	Target gene	Sequence ('5 to '3)	Amplicon size (bp)
Salmonella genus	*invA*	F: GCGCGAACGACGAAGCGT R: CGGGTCATCCCCACCGAA	151
Salmonella enteritidis	*spvA*	F: GCAGACATTATCAGTCTTCAGG R: TCAGGTTCGTGCCATTGTCAA	351
Salmonella dublin	*vagC*	F: ATTTTGAGGGGGTGAGCGAG R: GGTCAGCTTTTTCGAGCTGC	108
Salmonella group A, D	*rfbS*	F: TCACGACTTACATCCTAC R: CTGCTATATCAGCACAAC	721
Salmonella group B	*rfbJ* (B1)	F: GCGATGACCTTTTTGAAAG R: TAACCGTTTCAGTAGTTC	903
	rfbJ (B2)	F: AGAATATGTAATTGTCAG R: TAACCGTTTCAGTAGTTC	882
Salmonella group C1	*rfbM*	F: CAGGAAAATGATTACACCAAT R: TAATTACGACCATACTTATCTG	1,422
Salmonella group C2	*rfbJ* (C2)	F: ATGCTTGATGTGAATAAG R: CTAATCGAGTCAAGAAAG	820

PCR 분석

증균배양법 및 효소면역기법에 의해 *Samonella* spp.로 확인된 균주에 대해 PCR 분석을 실시하여 D group 여부를 확인하였다. PCR 혼합용액은 PCR 튜브에 각 균종 특이 프라이머를 각각 제조하여 사용하였다(Table 1). 준비된 DNA, 5X Taq-PCR Mix (GenoTech, Daejeon, Korea), 프라이머 및 DW를 총 20 μL 가 되도록 반응물을 혼합하여 사용하였다. MiniAmp Thermal Cycler (ThermoFisher, Waltham, MA, USA)를 사용하여 94°C에서 5분을 반응시킨 후 94°C에서 40초, 55°C에서 40초, 72°C 분을 1회로 총 35 cycles을 반응시켰다.

전기영동을 통한 결과 확인

PCR 반응이 끝난 증폭산물 3 μL를 1.5% 아가로스 겔의 well에 주입하여 200 V 전압으로 전기영동하여 증폭산물의 유무 및 크기를 확인하였다.

PCR 증폭산물 염기서열 분석

PCR 증폭산물은 GenoAid PCR/Gel Combo Kit (GenoTech)을 이용하여 정제한 후 (주)제노텍에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다.

균주 계통분석

분석된 PCR 증폭산물의 염기서열을 National Center for Biotechnology Information의 Basic Local Alignment Search Tool (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)을 사용하여 검색하였다.

MALDI-TOF 이용한 분리동정

의심집락은 TSA 배지에 옮겨 37°C에서 24시간 배양하여 단독 콜로니를 분석에 사용하였다. 슬라이드에 분리된 콜로니를 도말하고 1 μL α-cyano-4-hydroxycinn amic acid solution (CHCA matrix, BioMerieux)을 첨가하고 실온에서 건조하였다. 건조 시킨 슬라이드를 질량분석기인 VITEK®MS (BioMeriux, France)를 이용하여 동정을 실시하였다. 스펙트럼 분석을 위해 VITEK®MS IVD system v2.0을 사용하였고 분석 결과는 제조자가 제공한 라이브러리 v2.0과 비교하였다. 스펙트럼은 대장균(*E. coli*, ATCC 8739)을 사용하여 정도 관리를 시행하였다. VITEK®MS 분석 결과 값이 90% 이상의 신뢰 수준을 보였을 경우 유효한 결과로 사용하였다.

Results and Discussion

증균배양법에 의한 분석

증균배양에 의한 *Salmonella* spp. 검출 결과를 Table 2에 나타내었다. 반려동물 사료 중 살모넬라 분석 결과 제품 81점 모두 음성으로 *Salmonella* spp.가 검출되지 않았다. 원료 94점 중 6점의 시료(육포 1점, 혼합성 단미 1점, 옥수수 글루텐 1점, 인삼박 1점, 대두박 3점)에서 선택배지에서 양성으로 나타났으나, 의심콜로니의 순수분리 및 생화학 분석결과 육포, 혼합성단미, 옥수수글루텐 시료 2점에서만 *Salmonella* spp.가 검출되었으며 4점의 시료에서 위양성을 나타내었다. 인삼박 및 대두박 시료에서 분리된 균주는 *Citrobacter*, *Klebsiella*로 최종 확인되었으며 이들 균주는 선택배지에서 위양성을 나타내었다. Bang 등[15]의 연구에서 양배추(n=50)에서 real-time PCR과 증균배양법에 의한 *Salmonella* Typhimurium 검출 결과에서 real-time PCR 결과 32점, 증균배양법에 의한 분석 결과 28점의 시

Table 2. Comparision of culture method, enzyme immuno assay, and PCR for the detection of *Salmonella* spp.

	Postive sample/tested sample					
	Culture method		Enzyme immuno assay		PCR	
	Result	Identification	Result	Identification	Result	Identification
Sample	2/175	*Salmonella* spp.	1/175	*Salmonella* spp.	2/175	*Salmonella* Enteritidis *Salmonella* Schwarzengrund

료에서 양성으로 측정되었다. 증균배양법에서 양성으로 측정된 시료는 모두 real-time PCR방법에서도 양성으로 측정되었다. 일반적인 증균과정은 비선택적 증균배양과 선택적 증균배양으로 구분된다. 선택적인 증균배양은 목적하지 않는 균의 성장을 억제하는 물질 등이 있어 목적균 자체의 성장에도 영향을 미칠 수 있다. 비선택적 증균배양은 균의 성장을 억제하지 않는 배지 조성을 가지며 선택성이 떨어 질 수 있다. 본 실험에서는 증균배지로 BPW를 사용한 비선택적 배양방법으로 인해 4점의 위양성 시료가 확인된 것으로 판단된다.

효소면역기법 KIT에 의한 분석

분석에 사용된 시료 중 옥수수글루텐, 대두박 시료 2점에서 양성으로 나타났다(Table 3). 효소면역학적 분석 결과 양성으로 확인된 시료는 분리배양 후 생화학적 확인시험을 통해 최종적으로 살모넬라로 판정하였다. 생화학적 분석 결과 옥수수글루텐 시료만 *Salmonella* spp.로 나타났다. 대두박 시료에서 분리된 균주는 *Citrobacter freundii*로 최종 확인되었다.

효소면역기법 분석 장비는 면역 형광 분석 방법을 이용한 전자동 스크리닝 장비로 *Salmonella* spp. 검출 한도가 2.2×10^4-7.7×10^5 CFU/mL이다. 본 실험에서 시료의 증균 후 *Salmonella* spp. 농도가 2.2×10^4-7.7×10^5 CFU/mL 미만으로 검출한계 이하의 수준으로 분석장비를 통한 확인이 불가능한 것으로 판단된다. Hyeon 등[16]의 연구에서 배지법과 신속 검사키트를 이용하여 편육과 브로콜리싹에서 *Salmonella* spp.의 검출결과를 비교한 결과 시료내 상재균이 *Salmonella* spp.의 성장을 억제하여 검출력에 영향을 미치는 것으로 보고한 바 있다. 또한 De Medici 등[17]의 연구에서는 가금육에 *Salmonella* spp.를 10 CFU/25 g의 수준으로 접종한 후 배지법과 신속 검사키트의 결과를 비교한 결과 시료내 상재균에는 영향을 받지 않으나 *C. freundii*가 높은 농도로 존재하는 시료에서 모두 음성으로 나타났다. 육류(가금육, 돈육, 우육)에서 배지법과 신속 검사키트를 이용하여 *Salmonella* spp.를 검출한 연구[18]에서도 상재균이 적은 가공축산물에서 분석방법에 따른 유의적인 차이가 없이 동일한 검출률을 나타내었다. 일반적으로 배지법은 널리 사용되는 방법으로 증균과정, 선택배양 등을 시료 내 세균총과의 경쟁에 의해 증균과정을 거치면서 검출력에 영향을 미친다. 효소면역기법은 항원 항체 반응을 이용한 검출법으로 다른 세균의 영향을 덜 받으며 분석기간이 배지법(6-7일)에 비해 3일로 단축되는 특징이 있다. 본 연구에서는 유통 사료 중 *Salmonella* spp. 검출시 배양법 적용시 175점 중 2점, 효소면역기법에서 1점이 검출되었다. 단미사료인 옥수수글루텐에서만 두 가지 검출방법에서 동일하게 검출되었고, 육포에서는 배지법에서만 *Salmonella* spp.가 검출되었다.

증균배양을 통한 배지법은 시료내 존재하는 살아있는 유해미생물을 최종 확인할 수 있는 방법이며, 효소면역법 등의 신속검출방법은 유통되는 사료의 유해미생물 검출 과정 시 음성 시료를 신속하게 선별할 수 있는 presumptive screening 과정에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

PCR 분석 및 동정

증균배양법 및 효소면역기법에 의해 *Salmonella* spp. 로 확인된 균주 및 *Salmonella* spp. 표준균주로 *S.* Enteritidis

Table 3. Species identification based on PCR using target gene

Sample	Source	Target gene							Serogroup
		invA	vagC	spvA	rfbS	rfbJ (B1)	rfbJ (B2)	rfbM	rfbJ (C2)	
S. Enteritidis	ATCC 13076	O	X	O	O	X	X	X	X	D
S. Typhimurium	ATCC 14028	O	X	X	X	O	X	X	X	B
S. Typhimurium	ATCC 13311	O	X	X	X	O	X	X	X	B
A	Beef jerky	O	X	O	O	X	X	X	X	D
B	Corn gluten	O	X	X	X	O	X	X	X	B

ATCC 13076, *S.* Typhimurium ATCC 14028, *S.* Typhimurium ATCC 13311을 사용하여 특이 유전자를 이용한 PCR 방법을 적용해 분리균주의 동정을 실시하였다. 설계된 primer는 *Salmonella* spp.의 종 구분을 확인하기 위하여 *Salmonella* A, B, C, D 그룹의 특이 primer를 사용하였다(Table 3). 표준균주 *S.* Enteritidis는 D group으로 분류되는 균주이며 PCR 분석 결과 invA target gene이외 *Salmonella* A, D group의 target gene인 rfbS 및 *S.* Enteritidis의 target gene인 spvA gene의 발현이 확인되었으나, *S.* dublin의 target gene인 vagC, *Salmonella* B group의 target gene인 rfbJ (B1, B2), *Salmonella* C group의 target gene인 rfbM (C1), rfbJ (C2)은 발현이 나타나지 않았다. *S.* Typhimurium은 invA target gene 이외 rfbJ (B1) gene만 발현이 확인되어 *Salmonella* B group임을 확인하였다. 분석시료 중 육포에서 invA, spvA, rfbS gene이 발현되었으며 염기서열 분석 결과 *S.* Enteritidis로 나타났으며 *Salmonella* D group으로 확인되었다. 이러한 결과는 의심균주의 혈청군 시험에서 *Salmonella* D group으로 확인된 바와 동일한 결과를 나타내었다. 옥수수 글루텐 시료에서 invA, rfbJ (B1) gene이 발현되었으며 염기서열 분석 결과 *S.* Schwarzengrund 으로 나타나 *Salmonella* B group으로 확인되었다. 본 연구에서는 *Salmonella* D group 검출을 위한 사료표준분석방법에서 사용되는 증균과정을 통한 배지법, 효소면역기법에 의한 검출법 이외에 target gene을 이용한 PCR방법을 적용하였다. 배지법 및 PCR 분석 결과 육포 및 옥수수글루텐 시료에서 동일하게 *Salmonella*가 검출되었고, PCR방법 적용시 *Salmonella* D group 판별이 가능하였다. 기존 5일 이상 소요되는 배지법에 비해 PCR 방법은 증균과정 후 DNA 추출 및 분석을 실시하여 분석기간이 2-3일로 단축되며, 양성 확인시 사균(死菌) 및 오염에 의한 위양성 확인을 위해 배양을 통해 최종 확인을 해야한다. 긴급사고시 국내외 유통사료의 *Salmonella* D group 오염 여부 확인을 위해 기존 검출 방법 이외 target gene을 이용한 PCR방법은 보완적인 방법으로 음성 시료를 신속히 배제할 수 있으며 선제적인 사료안전 관리 수단으로 활용 가능 할 것으로 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 2020년도 국립농산물품질관리원 자체연구개발비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

국내 유통되는 반려동물 사료의 살모넬라 분석시 증균배양법, 효소면역기법에 의한 분석, 종 특이 primer를 활용한 PCR 방법을 활용하여 비교 평가하였다. 시료 175점 *Salmonella* spp. 검출 결과 증균배양법 및 종 특이 primer를 활용한 PCR 방법에 의한 검출 방법에서 2점의 시료(육포, 옥수수 글루텐)가 양성으로 확인되었고, 효소면역기법에 의한 검출방법에서는 1점의 시료(옥수수 글루텐)가 양성으로 확인되었다. 증균배양법 및 효소면역기법에 의한 검출방법에 비해 종 특이 primer를 활용한 PCR 방법을 적용 할 경우 시료에서 분리된 균주의 종(species) 판별이 가능하였다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Hyejeong Yun https://orcid.org/0000-0001-5100-7155
Sun Ho Cha https://orcid.org/0000-0002-2556-254x
Seung-Hwa Lee https://orcid.org/0000-0003-9356-8819
Min-Hee Jeong https://orcid.org/0000-0002-9356-925x
Tae-Woong Na https://orcid.org/0000-0001-8447-083x
Haejin Kim https://orcid.org/0000-0001-8447-8201
Hyunjeong Cho https://orcid.org/0000-0003-2967-3631
Seong-Hee Hong https://orcid.org/0000-0002-4211-2700

References

1. Gillespie, J.H., Timoney, J.F., Scott, F,W., Barlough, J.E., 1988. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. 8th ed, Comstock Pub. Assoc., Ithaca and London, USA, pp. 74-88.
2. Linton, A.H., 1983. Guidelines on prevention and control of *Salmonellosis*. WHO Geneva, pp. 10-128
3. Wang, X., Jothikumar, N., Griffiths, M.W., Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *J. Food Prot.,* **67**, 189-192 (2004).
4. Bansal, N.S., Gray, V., McDonell, F., Validated PCR assay for the routine detection of Salmonella in food. *J. Food Prot.,* **69**, 282-287 (2006).
5. Yang, B., Qu, D., Zhang, X., Shen, J., Cui, S., Shi, Y., Xi, M., Sheng, M., Zhi, S., Meng, J., Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *Int. J. Food Micobiol.*, **141**, 63-72 (2010).
6. Calnek, B.W., Barnes, HJ., 1995. Disease of Poultry. 9th ed, Iowa State University Press, Ames, IA, UAS, pp. 81-129
7. Chansoo, Lee., (2021, March 1). Food Standards and Standards Notice. Retrieved from https://www.mfds.go.kr/brd/m_211/view.do?seq=14667
8. Cho, A.R., Dong, H.J., Cho, S.B., Rapid and sensitive detection of Salmonella spp. by using a loop-mediated isothermal

amplification assay in duck carcass sample. *Food Sci. Anim. Resour.,* **33**, 655-663 (2013).
9. Bohaychuk, V.M., Gensler, G.E., McFall. M.E., King. R.K., Renter. D.G., A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food animal matrics. *J. Food Prot.,* **70**, 1080-1087 (2007).
10. Melissa, O.P., Maria, C., Martha, E.S., Frank, J., Peter, D., Sensitivity, specificity, and predictive values of three *Salmonella* rapid detection kits using fresh and frozen poultry environmental samples versus those of standard plating. *Appl. Environ. Microbiol.,* **65**, 1055-1060 (1999).
11. Kim, S.H., Lee, Y.S., Joo, I.S., Kwak, H.S., Chung, G.T., Kim, S.H., Rapid detection for *Salmonella* spp. by ultrafast real-time PCR Assay. *J. Food Hyg. Saf.,* **33**, 50-57 (2018).
12. Lampel, K.A., Keasler, S.P., Hanes, D.E., Specific detection of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis using the polymerase chain reaction. *Epidemiol. Infect.,* **116**, 137-145 (1996).
13. Persson, S., Jacobsen, T., Olsen, J.E., Olsen, K.E.P., Hansen, F., A new real-time PCR method for the identification of *Salmonella* Dublin. *J. Appl. Microbiol.,* **113**, 615-621 (2012).
14. Luk, J.M., Kongmuang, U., Reeves, P.R., Linberg, A.A., Selective amplification of abequose and paratose synthase genes (rfb) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C2, and D). *J. Clin.. Microbiol.,* **31**, 2118-2123 (1993).
15. Bang, M.K., Park, S.J., Kim, Y.J., Kim, J.G., Oh, S.W., Rapid detection of *Salmonella* spp. in fresh-cut cabbage by Real-time PCR. *J. Korean Soc.. Food Sci. Nutr.,* **39**, 1522-1527 (2010).
16. Hyeon, J.Y., Hwang, I.G., Kwak, H.S., Park, J.S., Heo, S., Choi, I.S., Park, C.K., Seo, K.H., Evaluation of an automated ELISA (VIDAS$^{(R)}$) and Real-time PCR by comparing with a conventional culture method for the detection of *Salmonella* spp. in steamed pork and raw broccoli sprouts. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.,* **29**, 506-512 (2009).
17. De Medici, D., Pezzotti, G., Marfoglia, C., Caciolo, D., Foschi, G., Orefice, L., Comparison between ICS-Vidas, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. *Int. J. Food Microbiol*. **45**, 205-210 (1998).
18. Uyttendaele, M., Vanwildmeersch, K.., Debevere, J., Evaluation of real-time PCR as automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Lett. Appl. Microbiol.,* **37**, 386-391 (2003).