

Salmonella enterica serovars Gallinarum과 *S Pullorum*의 감별을 위한 2가지 진단법: allele-specific real-time PCR과 3'-tailed PCR의 비교

이세미, 서자영¹, 이재일¹, 김태중*

BK21 바이오치료인력양성팀, ¹전남대학교 수의과대학
(접수 2008. 10. 17. 게재승인 2008. 12. 23.)

Comparison of two diagnostic methods, allele-specific
real-time PCR and 3'-tailed PCR to discriminate between
Salmonella enterica serovars Gallinarum and *S Pullorum*

Se-Mi Lee, Ja-Young Seo¹, Jae-Il Lee¹, Tae-Jung Kim*

BK21 Biotherapy Human Resources Center, ¹College of Veterinary Medicine, Chonnam
National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received 17 October 2008, accepted in revised form 12 23, 2008)

Abstract

Salmonella enterica serovars Gallinarum (SG, causative agent of fowl typhoid) and *S Pullorum* (SP, causative agent of pullorum disease) are very important bacterial pathogens in poultry industry. They share some common antigenic properties though the characteristics of outbreaks are quite different. To discriminate between SG and SP, we developed two rapid diagnostic methods, allele-specific real-time PCR and 3'-tailed PCR over 2 single nucleotide polymorphisms (237th and 598th). In both methods, 237th allele was found to be a good target for differential diagnosis, while 598th allele produced some non-specific reactions.

Key words : *Salmonella enterica* serovars Gallinarum and *S Pullorum*, Real-time PCR, 3'-tailed PCR

*Corresponding author

Tel : +82-62-530-2858, Fax : +82-62-530-2857

E-mail : tjkim@chonnam.ac.kr

서 론

Salmonella enterica serovars Gallinarum (SG) 과 *S. Pullorum*(SP)은 *Salmonella* serogroup D에 속해있는 비운동성의 병원체로 닭에서 가장 빈번하게 분리된다^{1,2)}. SG와 SP는 항원 구조는 아주 유사하지만 닭에서 확연히 다른 질병을 일으킨다^{3,4)}. SP에 의한 추백리는 세계 대부분의 지역에서 근절되어왔지만 SG에 의한 가금티푸스(fowl typhoid)는 아프리카, 중동, 중남미, 그리고 아시아지역에서 여전히 가금 산업에 심각한 경제적 손실을 주고 있다⁴⁾. 따라서 이 두 살모넬라 혈청형을 특이적으로 진단하는 것은 과거에 질병발생을 일으킨 것으로 알려진 혈청형을 분류하는 데 있어서 아주 중요하다¹⁾. 이 두 원인체의 감별진단은 주로 serotyping과 생화학적 검사법을 통해 이루어지고 있으나^{1,2)} 항원연관성이 높고 생화학적 양상이 비슷하게 나타나는 것이 사실이다⁵⁾. 기존의 진단방법중 일반적으로 가장 많이 사용되는 진단법인 Kaufmann White scheme이 여전히 *Salmonella* spp의 혈청형을 분류하는 방법으로 여겨지고 있지만 SG와 SP를 구별해 낼 수는 없는 단점이 있다¹⁾. 그로 인해 SG와 SP를 구별하는데 있어서는 추가적으로 O antigen sub-factors의 sub-typing이 필요하거나 maltose, dulcitol, rhamnose, ornithine decarboxylase의 발효작용과 D-tartrate를 사용해야 한다²⁾. 이 분석시험법 중에서 몇몇 방법들은 반응이 느리고 정확한 진단을 얻는데 수일의 시간이 소요된다. 그리고 다양한 생화학적 양상을 나타내는 중간 형태의 균주에 대해서 이러한 생화학적 분석법은 적합하지 않은 것으로 여겨지고 있다^{2,6)}. 이와 같은 혈청학적 및 생화학적 진단에 비해 유전자 염기서열의 차이를 규명하는 방법은 SG와 SP를 구분하는데 더 유용한 방법인데, 특히 O-antigens의 생합성에 관여하는 효소를 암호화하는 *rfbS* gene cluster의 분자적 특성규명법이 살모넬라 혈청군을 특이적으로 진단하는 데 유용하게 이용되어왔다⁷⁻⁹⁾. 이후, *Salmonella*

serogroup D에 속하는 혈청형을 특이적으로 진단하는 데 있어서 *rfbS* gene의 증폭을 기초로 한 PCR방법이 개발되었다^{10,11)}. 또한 SG와 SP의 237과 598번째 염기서열에 single nucleotide polymorphism (SNP)가 존재함이 밝혀져 이를 바탕으로 SG와 SP를 구별하는 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 분석법이 개발되었고¹²⁾, 최근에는 SG를 특이적으로 진단하는 allele-specific PCR 방법도 개발되었다⁵⁾. 더불어 PCR보다 민감도와 특이성이 높은 것으로 알려진 real-time PCR이 개발되어 진단방법으로 연구되고 있는데¹³⁾, 일반 PCR과 달리 real-time PCR은 증폭결과를 실시간으로 그래프를 통해 확인할 수 있어 더 신속한 진단법으로 여겨지고 있다¹⁴⁾.

이에 본 연구에서는 기존의 연구를 바탕으로 *rfbS* 유전자의 237번 및 598번 염기가 다형성인 것에 착안하여 allele-specific real-time PCR과 3'-tailed PCR 을 이용해 SG와 SP를 신속하게 감별 진단하는 방법들을 개발하고 이들을 비교하고자 실시되었다.

재료 및 방법

공시 균주 및 DNA 준비

Salmonella 연구를 위한 균주로는 SP 표준 균주인 ATCC 19945, SG 표준균주인 ATCC 9120과 9184, 그리고 수의과학검역원에서 분리 및 보관중인 SP 4, 11, 296 strain 3종 및 전남대학교 수의과대학에서 분리한 6개의 SG 야외균주를 이용하였다. *Salmonella* spp의 배양을 위해서 동결 보관된 균주를 brain-heart infusion (BHI) broth에서 1차 증균시키고 이를 다시 *Salmonella-Shigella* 배지에서 colony를 selection하였다. 선별된 colony들은 5ml의 BHI broth에서 배양 후 AccuPrep[®] genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 이용하여 각각 균주의 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 50 ng/ml의 농도로 준비한 뒤 실험에 이용되었다.

rfbS 유전자좌 증폭

본 실험은 SG의 *rfbS* 유전자 (GenBank #AF442573)와 SP의 *rfbS* 유전자 (GenBank #DQ074436)에서 각각 237번 염기와 598번 염기가 SG에서는 "A", SP에서는 "G"인것에 착안하여 감별진단을 design하였다. 이를 위해 먼저 *Salmonella* genomic DNA를 이용하여 *rfbS* 유전자를 증폭하였다. 증폭을 위해 2개의 *rfbS* 유전자 특이적 primers (forward: 5'-TCACGACTTACATCCTAC-3', 그리고 reverse: 5'-CTGCTATATCAGCACAAC-3')를 이용하여, 94°C/5분: pre-denaturation, 94°C/1분: denature, 45°C/1분: annealing, 72°C/2분: extension으로 30 cycle의 PCR을 수행하고, 72°C/10분: post-annealing을 실시하였다. 2종간의 *rfbS* 유전자 염기서열의 분석을 위해 PCR 산물을 sequencing하여 염기서열을 분석하였다.

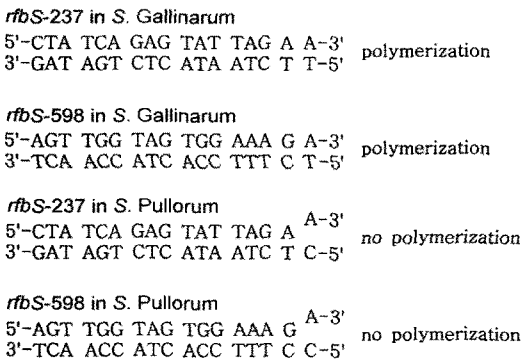


Fig 1. Representative diagram of the mechanism of 3'-tailed primer(s) during DNA polymerization.

Table 1. *Salmonella* species allele-specific 3'-tailed primers used in this study

Oligo Name	Sequence (5'→3')
<i>rfbS</i> -237	5'-CTA TCA GAG TAT TAG AA*
<i>rfbS</i> -598	5'-AGT TGG TAG TGG AAA GA*
<i>rfbS</i> -R	5'-CTG CTA TAT CAG CAC AAC TA

* 3'-tailed unmatching base for *S. Pullorum*, which means these primers would bind easily to *S. Gallinarum* only

rfbS 유전자좌에 대한 allele-specific 3'-tailed primer PCR

추출된 PCR 산물을 template로 하여 allele-specific 3'-tailed PCR을 김 등¹⁵⁾에 준해 수행하였다. 이를 위해 allele-specific 3'-tailed primer set를 준비하였다. 즉, SG의 genomic DNA와는 100% similarity를 보여 binding을 잘하지만 SP과는 맨 마지막 3'-end가 상보적이지 않아 primer binding이 잘 되지 못하도록 primer를 design하였다(Fig 1). 사용된 allele-specific 3'-tailed primer는 Table 1과 같다.

2개의 primer(*rfbS*-237 및 *rfbS*-598)는 allele-specific 3'-tailed forward primers로 사용되었고 *rfbS*-R은 위 2개의 primer에 공동으로 사용되는 reverse primer로 사용되었다. Allele-specific 3'-tailed PCR에 대한 조건으로 94°C/5분: pre-denaturation, 94°C/1분: denature, 반응의 특이성을 높이기 위해 60°C/1분: annealing, 72°C/1분; extension을 30 cycle 실시하고 마지막으로 72°C/2분: post-extension을 실시하였다. 한편 unmatching 3'-tail의 PCR 온도조건 설정을 위해 45°C부터 65°C까지 10개의 gradient annealing 온도구역설정으로 gradient PCR (Tprofessional; Biometra[®])을 실시하였다.

rfbS 유전자좌에 대한 real-time PCR

rfbS 유전자좌에 있는 SNP (237번 및 598번)를 대상으로 2 set의 primer 및 probe set를 Table 2와 같이 합성하여 real-time PCR을 박 등¹⁶⁾에 준해 실시하였다.

준비된 primer 및 fluorescence-labelled TaqMan™ MGB probes (SP: VIC-labelled, SG: FAM-labelled)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 PCR mixture를 만들었다.

즉, real-time PCR용 96-well plate에 각각의 sample당 TaqMan™ Universal PCR Master mix, No AmpErase UNG (2×)를 12.5μl, 40×

assay mix (primer 및 probe 혼합액) 0.625μl, 20μg/μl genomic DNA in 11.875μl 증류수를 섞어 총 25μl의 reaction volume을 만들었다. 이들을 Applied Biosystems사의 7000 Sequence Detection System에 loading 후 initial step으로 95°C/10분, 그리고 denature를 92°C/15초 및 anneal/extend를 60°C/1분간 40 cycle을 실시하였다.

Table 2. Primer and probe sets used for the *Salmonella* species allele-specific real-time PCR

Name		Sequence (5'→3')
<i>rfbS</i> -237 primers	<i>rfbS</i> -237-F	ACGAACCTGCAACAGCTTTAATAGA
	<i>rfbS</i> -237-R	GGCAGTGATGTTCCACAATTTATGAA
<i>rfbS</i> -237 probes	<i>rfbS</i> -237-G-VIC	CTATCAGAGTATTAGAG*TCTATC-VIC-labelled
	<i>rfbS</i> -237-A-FAM	TCAGAGTATTAGAA*TCTATC-FAM-labelled
<i>rfbS</i> -598 primers	<i>rfbS</i> -598-F	TCCCCAAATTTTCATAGTATTGAAGTTGGT
	<i>rfbS</i> -598-R	AATTGCTTTTTGTGATATTTTTAACAGTCTCTACAT
<i>rfbS</i> -598 probes	<i>rfbS</i> -598-G-VIC	ACGAATTGATATAGC*CTTT-VIC-labelled
	<i>rfbS</i> -598-A-FAM	ACGAATTGATATAGT*CTTT-FAM-labelled

* SNP locations

결 과

rfbS 유전자좌에 대한 3'-tailed primer PCR을 이용한 감별진단

Salmonella genomic DNA를 이용하여 *rfbS* 유전자를 증폭하였다. 모든 *Salmonella* sample에서 720bp 크기의 PCR 산물이 생산되었다(Fig 2). 생산된 모든 PCR 산물은 gel elution을 하여 sequencing한 결과 SG는 237번 및 598번에 "A"가, 그리고 SP는 "G"의 염기서열을 가지고 있음을 확인하였다.



Fig 2. The result of *rfbS* gene amplification. Lane 1-8: SG ATCC 9120, 9184, and 6 isolates; lane 9-12: SP ATCC 19945, 4, 11, and 296. M: 1kb size marker.

60°C의 annealing 조건을 사용할 경우, 237번 염기 및 598번 염기에 대한 SG의 PCR 증폭 실험 결과에서 기대되는 크기인 501 bp 및 140 bp의 PCR 산물이 모든 sample에서 증폭되었다. 반면 SP의 PCR 증폭 실험 결과에서는 기대되는 크기인 501 bp의 PCR 산물이 어느 sample에서도 증폭되지 않았다(Fig 3).

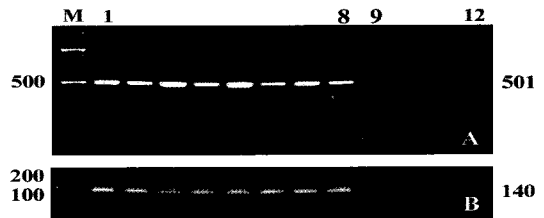


Fig 3. The result of PCR amplification at 65°C annealing temp. using 237th (A) and 598th (B) allele-specific primers, *rfbS*-237 and *rfbS*-598. Lane 1-8: SG ATCC 9120, 9184, and 6 isolates; lane 9-12: SP ATCC 19945, 4, 11, and 296. M: 100bp size marker. Note no PCR product was produced in SP lanes.

하지만 gradient PCR을 이용한 실험결과, *rfbS*-598의 경우는 *rfbS*-237과는 달리, annealing 온도 56.3°C 이하에서는 비특이적으로 PCR이 이루어짐을 알 수 있었다(Fig 4).

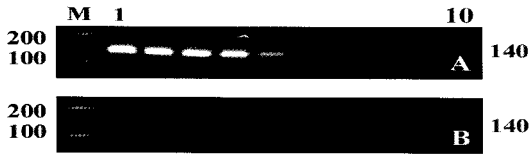


Fig 4. The result of gradient PCR amplification using 598th (A) and 237th (B) allele-specific primers, *rfbS*-598 and *rfbS*-237. Template DNA from SP ATCC 19945 was used. Lane 1-10: annealing temp. 45, 46.9, 49, 51.4, 53.7, 56.3, 58.6, 61, 63.1, and 65°C. M: 100bp size marker. Note PCR products were amplified from 56.3°C in 598th allele-specific PCR (A).

rfbS 유전자좌에 대한 allele-specific real-time PCR을 이용한 감별진단

PCR 산물에 의한 형광도의 증가, 즉 원하는 target sequence를 가지고 있는 template에 대한 검출을 통해 실험결과를 해석하였다. 그 결과, 237번 allele에 대한 allele-specific real-time PCR은 species-specific하게 형광의 증가를 볼 수 있었으나(Fig 5), 598번 allele-specific real-time PCR 결과, SP의 경우 FAM과 VIC dye 모두에서 double-positive의 결과를 나타내어 (Fig 6) 중간 감별이 되지 않음을 알 수 있었다.

고 찰

SG와 SP는 각각 가금티푸스와 추백리의 원인체로 양계농가에 막대한 경제적 손실을 입히고 있다. 이들 병원체들은 난계대로 전염 되는데 특히나 가금티푸스는 국내에서 1992년 처음 보고되었으며, 이후 전국적으로 발병하여 국내 양계산업에 가장 피해를 크게 주는 질병 중의 하나이다^{17,18)}. SG와 SP를 진단하는데 있어서 원인균을 선택배지에 배양하여 분리

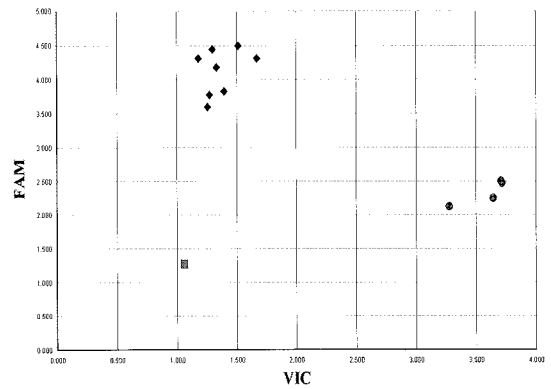


Fig 5. The result of 237th allele-specific real-time PCR. X-axis: VIC dye intensity, Y-axis: FAM dye intensity. Diamond: SG, round: SP, square: no template control (blank).

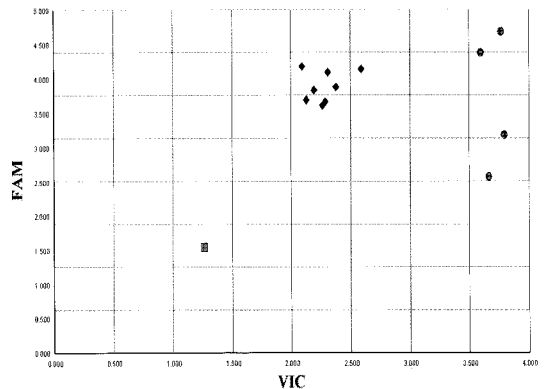


Fig 6. The result of 598th allele-specific real-time PCR. X-axis: VIC dye intensity, Y-axis: FAM dye intensity. Diamond: SG, round: SP, square: no template control (blank). Note double-positive result was shown in SP samples

하거나 IMVic test와 같은 생화학적 검사를 이용해 동정하는 등의 전통적 방법을 주로 이용했다¹⁾. 그러나 기존의 이 방법들은 진단과정에 많은 시간이 필요하여 신속한 진단이 이루어지지 못하고 있고 항원연관성 및 유사한 생화학적 특성으로 인해 좀 더 정확한 감별진단이 요구되어 왔다^{3,19-22)}. 이에 분자생물학적 방법들이 개발되어 보고되고 있고 특히 PCR을 이용한 방법들이 많이 보고되고 있다^{5,12,14,23)}. 이와 같은 감별진단을 위한 대상 유전자로는 phase 1 flagella

C gene^{24,25)}, *fimH*²⁶⁾ 및 *rfbS* 유전자좌에 대한 연구가 있었고²⁷⁾, *rfbS* 유전자좌에서 SG와 SP에 특이적인 SNP가 발견되었다^{8,9)}. SG은 237번째와 598번째 모두 A가 위치했고 반면에 SP은 모두 G가 위치했다. 그리고 이러한 *rfbS* 유전자의 다형성(polymorphism)으로 인해 PCR-RFLP을 이용하여 SP로부터 SG를 구별하는 방법이 개발되었다¹²⁾. 이후에 allele-specific PCR 법을 이용해 SG와 SP를 비롯한 *Salmonella* serogroup D를 감별하는 방법이 개발되었다⁵⁾.

이를 바탕으로 본 연구에서는 *rfbS* 염기서열의 차이점을 이용한 allele-specific 3'-tailed PCR과 real-time PCR을 실시하였다. 먼저 *rfbS*의 genomic sequence를 확인한 결과, 237번 및 598번 allele에서 SP는 A, SG는 G의 염기를 보여 이전의 실험결과와 동일한 것임이 밝혀졌다. 전체 실험결과, 3'-tailed PCR 및 real-time PCR 두 가지 실험 모두에서 237번 allele은 효과적인 감별진단이 이루어진 반면 598번 allele의 경우는 그렇지 못했다. 실험설계단계에서 allele-specific 3'-tailed PCR의 경우, 3'-end에 unmatching base를 첨가하여 DNA polymerase가 더 이상 진행하지 못하는 구조를 부여하였다. 하지만 598번 allele의 경우, annealing 온도가 낮아짐에 따라 비특이적인 PCR반응이 이루어졌다. 이는 annealing 온도가 낮아짐에 따라 primer와 target template의 binding affinity가 증가하여 unmatching base pair에서 DNA polymerase가 탈락하지 못하고 계속 진행이 이루어진 것으로 판단된다.

또한 real-time PCR의 경우에는 probe가 target template와 완전히 matching하지 않은 경우 probe 중간에 unmatching base pair에 의해 DNA polymerase가 계속 진행하지 못하고 떨어지도록 설계되었다. 그러나 598번 allele의 경우 SP의 시료들은 FAM 및 VIC 모두에 형광을 발현하였다. 이는 237번 allele의 경우는 probe상에서 SNP 양옆에 A와 T가 존재하나, 598번 allele의 probe의 경우(*rfbS*-598-G-VIC 및 *rfbS*-598-A-FAM) 양옆에 G와 C가 존재하여 probe가 약하게나마 binding하여 polymerase가 probe상에

서 진행을 한 것으로 판단된다.

결 론

SP와 SG를 감별진단하고자 실시한 allele-specific 3'-tailed PCR 및 real-time PCR은 두 방법 비록 598번 allele에 대해서는 비특이적인 반응이 있지만 237번 allele을 이용할 경우 두 방법 모두 특이적 방법이라고 말할 수 있다. 다만 allele-specific 3'-tailed PCR의 경우 PCR 이후 전기영동을 실시해야하므로 시간이 오래 걸리는 단점이 있으나 고가의 장비가 필요하지 않는다는 장점이 있고, 이에 반해 real-time PCR은 전기영동과정을 거치지 않으므로 짧은 시간 내에 실시간으로 진단이 가능하고 더불어 낮은 농도의 template DNA에도 검출양상이 잘 드러나므로 민감도 또한 높기 때문에 신속하고 정확한 진단에 더 적합하다고 여겨진다.

감사의 글 : 이 연구의 일부는 대한민국 교육과학기술부 (전 교육인적자원부) BK21 사업비로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Ewing WH. 1986. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. 4 ed. Elsevier's Science. New York : 81-318.
2. Shah DH, Roy A, Purohit JH. 2000. Comparative efficacy of different culture media used for isolation of *Salmonella gallinarum*. *Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis* 21 : 79-80.
3. Gast RK. 1997. Detecting infections of chickens with recent *Salmonella pullorum* isolates using standard serological methods. *Poult Sci* 76 : 17-23.
4. Shivaprasad HL. 2000. Fowl typhoid and Pullorum disease. *Rev Sci Tech* 19 : 405-424.

5. Shah DH, Park JH, Cho MR, et al. 2005. Allele-specific PCR method based on *rfbS* sequence for distinguishing *Salmonella gallinarum* from *Salmonella pullorum*: sero-type-specific *rfbS* sequence polymorphism. *J Microbiol Methods* 60:169-177.
6. Jia L, Smith NH, Nelson K, et al. 1993. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile Salmonellae. *J Med Microbiol* 38:129-139.
7. Liu D, Verma NK, Romana LK, et al. 1991. Relationships among the *rfb* regions of *Salmonella* serovars A, B, and D. *J Bacteriol* 173:4814-4819.
8. Xiang SH, Haase AM, Reeves PR. 1993. Variation of the *rfb* gene clusters in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 175:4877-4884.
9. Xiang SH, Hobbs M, Reeves PR. 1994. Molecular analysis of the *rfb* gene cluster of a group D2 *Salmonella enterica* strain: evidence for its origin from an insertion sequence-mediated recombination event between group E and D1 strains. *J Bacteriol* 176:4357-4365.
10. Luk JMC, Kongmuang U, Reeves PR, et al. 1993. Selective amplification of a-be- quose and paratose synthetase (*rfb*) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C2, and D). *J Clin Microbiol* 31:2118-2123.
11. Luk JMC, Kongmuang U, Tsang RSW, et al. 1997. An enzyme linked immuno- sorbant assay to detect PCR products of the *rfbS* gene from serogroup D sal- monellae: a rapid screening prototype. *J Clin Microbiol* 35:714-718.
12. Park MK, Choi KS, Kim MC, et al. 2001. Differential diagnosis of *Salmonella gallinarum* and *S. pullorum* using PCR- RFLP. *J Vet Sci* 2:213-219.
13. Chen W, Martinez G, Mulchandani A. 2000. Molecular Beacons: A real-time poly- merase chain reaction assay for detec- ting *Salmonella*. *Anal Biochem* 280:166-172.
14. 이영성, 최경성, 김명철 등. 2002. TaqMan 실시간 중합효소 연쇄반응에 의한 살모넬라속의 검출 및 *ompC* 항원단백 유전자의 비교. *대한수의학회지* 42:513-522.
15. 김태중, 박성도, 이재일. 2004. 소 모색관련 MC1R 유전자의 SNP와 관련한 3'-tailed primer를 이용한 한우육의 판별. *동물자원지* 46:897-902.
16. 박성도, 김태중, 이재일. 2005. 소 모색관련 MC1R 유전자의 SNP와 관련한 MGB probe에 기초한 real-time PCR을 이용한 한우육과 Holstein육의 판별. *대한수의학회지* 45:25-28.
17. 김기석, 이희석, 모인필. 1995. 국내 닭에서 의 가금티푸스(Fowl typhoid) 발생. *농업과학논문집* 7:544-549.
18. 오강희, 최원필. 1994. 초생추 유래 *Salmonella* 속군의 생물학적 특성. *대한수의학회지* 34:501-510.
19. Gast RK. 2003. *Salmonella* infections. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE (eds.). *Diseases of Poultry*. 11 eds. Iowa State University Press. Ames:567-613.
20. Gast RK, Holt PS. 1998. Application of flagellar-based immunoassays for sero- logic detection of *Salmonella pullorum* infection in chickens. *Avian Dis* 42:807-811.
21. Holt PS, Chaubal LH. 1997. Detection of motility and putative synthesis of fla- gella proteins in *Salmonella pullorum*

- cultures. *J Clin Microbiol* 35 : 1016-1020.
22. Thorns CJ, Sojka MG, McLaren IM, et al. 1992. Characterization of monoclonal antibodies against fimbrial structure of *Salmonella enteritidis* and certain other serogroup D salmonellae and their application as serotyping reagents. *Res Vet Sci* 53 : 300-308.
 23. Lampel KA, Keasler SP, Hanes DE. 1996. Specific detection of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 116 : 137-145.
 24. Cha SY, Jang DH, Kim SM, et al. 2008. Rapid Detection and discrimination of the three *Salmonella* serotypes, *S. Pullorum*, *S. Gallinarum* and *S. Enteritidis* by PCR-RFLP of ITS and *fliC* Genes. *Korean J Poultry Sci* 35 : 9-13.
 25. Kwon HJ, Park KY, Yoo HS, et al. 2000. Differentiation of *Salmonella enterica* serotype *gallinarum* biotype pullorum from biotype *gallinarum* by analysis of phase 1 flagellin C gene (*fliC*). *J Microbiol Methods* 40 : 33-38.
 26. Kisiela D, Kuczkowski M, Kiczak L, et al. 2005. Differentiation of *Salmonella Gallinarum* biovar *Gallinarum* from *Salmonella Gallinarum* biovar *Pullorum* by PCR-RFLP of the *fimH* gene. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52 : 214-218.
 27. Verma N, Reeves P. 1989. Identification and sequence of *rfbS* and *rfbE*, which determine antigenic specificity of group A and group D Salmonellae. *J Bacteriol* 171 : 5694-5701.