

Random Amplified Polymorphic DNA 분석법을 이용한 *Salmonella typhi* 의 형별 구분

장철훈 · 신정환 · 손한철 · 김철민* · 이주현**

부산대학교 의과대학 임상병리학교실, 생화학교실*, 부산광역시 보건환경연구원**

Molecular Typing of *Salmonella typhi* by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis

Chul Hun Chang, M.D., Jeong Whan Shin, M.D., Han Chul Son, M.D.,
Chul Min Kim*, M.D. and Ju Hyun Lee**, M.D.

Department of Clinical Pathology and Biochemistry*, College of Medicine, Pusan National
University, Pusan Institute of Health & Environment**

Background : In the year 1996, there were some outbreaks of *Salmonella typhi* infection in Pusan and therefore, the incidence of *S. typhi* infection was markedly increased in comparison with the previous year. To differentiate the isolates epidemiologically, a random amplified polymorphic DNA(RAPD) fingerprinting method has been developed.

Methods : A total of 9 arbitrary primers were screened with *S. typhi* strains isolated in Pusan, 1996. This allowed selection of a panel of primers capable of detecting DNA polymorphisms among *S. typhi* isolates. This panel was used to examine 54 strains of *S. typhi*, which had been isolated in Pusan including the cases of outbreaks that was previously characterized by phage typing.

Results : Four single primers and one combination of two primers were selected to discriminate the *S. typhi* isolates. RAPD analysis resolved the 54 strains into 20 different subtypes. At least two outbreaks were found by RAPD analysis. The isolates of E1 phage type, which are the most common in Korea, were perfectly differentiated with each other, except the strains isolated within the outbreaks.

Conclusion : The RAPD approach is the useful epidemiologic tool to *S. typhi* subtyping, which is providing high discriminatory power. There were at least two outbreaks when the epidemic *Salmonella* infections of Pusan in 1996 had been occurred. The primers or their combination capable to discriminate the *S. typhi* isolates were described.

Key words : *Salmonella typhi*, Random amplified polymorphic DNA analysis,
Molecular epidemiology

교신저자 : 장 철 훈

(602-739) 부산시 서구 아미동 1가 10번지

부산대학교병원 임상병리과

전화 : 052-240-7418 Fax : 051-247-6560

E-mail : cchl@hitel.net

Table 1. Primers used in the RAPD fingerprinting of *S. typhi* strains

	Primers	Sequence	G+C content(%)
1	OPB-15	5'-GGAGGGTGT	60
2	OPB-17	5'-AGGGAACGAG	60
3	OPB-6	5'-TGCTCTGCCC	70
4	23L	5'-CCGAAGCTGC	70
5	P1254	5'-CCGCAGCCAA	70
6	OPA-4	5'-AATCGGGCTG	60
7	AP-8	5'-GCTGGTGG	75
8	AP-15	5'-GTGGTGGTGGTGGTG	67
9	AP-16	5'-GATAGATAGATAGATA	25

서 론

1996년 6-8월 사이에 우리 나라에서 발생하여 국립 보건원에 보고된 *Salmonella typhi* 감염증 환자는 234명 이었으며, 그 중 부산 지역에서 발생한 건수는 136명 (58.1%)이었다[1,2]. 이는 전년도 같은 기간에 비해 발생률이 전국적으로 37%, 부산 지역에서는 249% 이상 높은 것으로[3-5], 역학 조사 결과 하나의 감염원에 의한 집단 발병이 일부 있었음을 고려하여도[6] 부산 지역에서의 발생률이 현저하게 증가한 것이다. 이처럼 장티프스 감염증은 우리나라에 이미 토착된 전염병으로, 언제든지 전염병 감시가 소홀해지면 산발적 혹은 집단적으로 발생할 가능성이 높은 질환이다. 그러므로 장티프스 감염증 환자에 대한 역학 조사는 즉시 이루어져야 하며, 감염원을 재빨리 색출하여 전파를 차단하는 것이 중요하다. *S. typhi*의 형별 분류는 전통적인 phage typing 뿐만 아니라[7], plasmid profile [8-10], biotyping[11,12], ribotyping[13,14], IS200 profile[14, 15], PFGE(pulsed-field gel electrophoresis)[14,16] 등 DNA를 이용한 방법들이 이용되고 있다. 그러나 실제 환자가 집단 발생했을 때 적은 노력과 비용으로 빠른 시간 안에 쉽게 적용할 수 있는 검사 방법으로서 RAPD(random amplified polymorphic DNA) 분석이 가장 좋으며[17], *S. enteritidis*에 대해서 RAPD 분석을 적용한 결과 양호한 분별력을 보였다는 보고가 있다[18]. 이에 1996년 2-8월 사이에 부산 지역에서 검출되어 생화학 적, 혈청학적으로 동정되고 Vi 항원의 phage type이 조사된 *S. typhi*에 대해서 RAPD 분석을 실시하여, RAPD 분석이 *S. typhi*의 분자역학적 조사 도구로 유용한지를 검토하여 보았고, 아울러 조사 대상 균주 중 일부가 동일 감염원에 의한 집단 감염이었음을 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료와 방법

균 주: 1996년 2월 28일부터 8월 30일 사이에 부산광역시 보건환경연구원에 보고되고 수집된 124균주 중 균주가 확보된 54균주(혈액 배양 25균주, 대변 배양 28균주, 역학 조사에서 발견된 하수 배양 1균주)를 대상으로 하였다. 실험할 때까지 skim milk 배지에 부유한 집락을 -70°C 냉동고에 보관하였다.

Vi 항원 phage typing : Central Public Health Laboratory(London, 영국)로부터 분양받은 phage로 시험하였다.

DNA 분리 : -70°C 냉동고에 보관된 균주를 혈액한천 배지에 계대배양하여 얻어진 순집락 2-3개를 증류수 150 µL에 부유하여 5분간 끓인 후 microcentrifuge에서 2분간 원심분리를 하여 상청액을 얻었다. DNA 농도는 Gilford System 2600(Gilford)으로 260nm에서 측정하였다.

시발체(primers) : 사용한 시발체의 종류는 표 1과 같으며, (주) 제노텍에서 주문하여 사용하였다.

RAPD 형별 구분 : PCR은 20 µL 부피로 광유를 덮어서 실시하였으며, 반응액에 들어가는 각 성분들과 농도는 다음과 같다; *S. typhi* DNA 40ng, MgCl₂ 3.5mM, 시발체 50pmol(두개의 시발체를 조합한 경우 각각 25pmol), Taq polymerase 0.5U(Promega Corp., Madison, Wis.), dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각각 200mM. Thermal cycler는 Mastercycler 5330(eppendorf, Germany)을 이용하였다. PCR 반응 주기는 다음과 같다; 94°C 4분-35°C 4분-72°C 4분 주기로 4회, 94°C 30초-35°C 1분-72°C 2분 주기로 30회, 72°C 4분 1회. PCR 반응 후에 반응 산물에 6×sample loading buffer를 가하여 2% agarose 전기영동 장치에서 100V 일정 전압으로 30분 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide 용액에 염색하여 자외선 하에서 관찰하였다.

결 과

각각의 시발체를 1개씩 또는 조합으로 사용하여



Fig. 1. Representative results of RAPD fingerprinting generated by RAPD-PCR using each primers or their combination.

RAPD를 실시한 결과 2개 이상의 형별로 구분되어 분자역학적으로 분별력이 있는 것으로 확인된 것은 시발체 OPB-6, 23L, OPA-4, P1254, OPA-4와 AP-8의 조합이었으며, 각각 9, 7, 2, 9, 9개의 형별로 나누어졌다(Fig 1). 시발체 OPB-17, OPB-15, AP-15, AP-16과, OPA-4/ AP-8의 조합을 제외한 다른 두 개의 시발체의 조합은 전 균주가 동일한 증폭 양상을 보여 분별력이 없었다.

동일한 형별이 2균주 이상인 경우는 6가지였다(Table 2). 부산광역시 남구 소재의 환자 또는 하수에서 발견된 균주 25개 중에서 5월 17일부터 7월 13일 사이에 검출된 22균주가 동일한 RAPD 형별을 보였으며, 이들의 Vi 항원 phage형은 비분류 균주였다. 나머지 3균주는 각각 다른 RAPD 형별을 보였는데, 그 중 2균주는 동일한 형별을 보인 22균주가 분리된 시기와 비슷하게 각각 5월 29일과 6월 14일에 분리되었으나 Vi 항원 phage형은 M1형으로 달랐고, 1균주는 4월 16일 분리되었으며 Vi 항원 phage형은 퇴화형이었다. 따라서 이 지역에서 유행한 *S. typhi* 감염증은 대부분 동일 감염원에 의한 것이었으며, 집단 발병을 포함하여 적어도 3개의 다른 감염원으로부터 산발적인 감염이 있었던 것을 알 수 있었다.

부산광역시 영도구 청학동에서 8월 23일 하루에 발

생한 환자의 대변으로부터 검출한 7균주는 모두 같은 RAPD 형별을 보였으며, 이들 균주의 Vi 항원 phage형은 모두 E1형이어서, 동일 감염원에 의한 집단 감염임이 확인되었다.

그 외 2균주 이상 동일한 RAPD 형별을 보인 경우는 4가지로, 각각 5균주, 2균주, 2균주, 2균주씩 같은 RAPD 양상을 보였다. 그러나 이들 사이에는 지역이나 Vi 항원 phage형이 다른 경우가 있었고(Strain No. 30-34, 35-36) 지역적으로 멀리 떨어져 있는 경우도 있어서(Strain No. 30-34, 35-36, 39-40), 각각 동일한 감염원에서 기원했다는 사실이 확인되지는 않았으며 감염원이 다름에도 불구하고 동일한 RAPD 양상을 보였을 가능성을 배제할 수는 없었다.

5회의 RAPD에 의한 분자역학적 형별로 54 균주가 총 20개의 군으로 나뉘어졌다. Vi 항원 phage형은 비분류주가 가장 많았으나, 2개의 집단감염 발생 균주를 각각 하나의 균주로 생각하면 27균주 중 E1형이 가장 많은 10균주를 차지하였으며, 이들이 RAPD 분석에서 각각 다른 10개의 형별로 구분되었다.

고 찰

RAPD에 의한 형별 구분은 PCR의 원리를 이용하나, 시발체가 특정한 서열을 가진 DNA에 부착할 수 있는 특이 염기 서열이 아닌 임의의 염기 서열을 가지도록 고안되었으며, annealing 온도를 낮춤으로써 비특이적으로 DNA에 달라붙어서 결과적으로 PCR에 의해서 다양한 크기의 증폭 산물을 만들어낸다. 따라서 RAPD는 특정한 세균의 어떤 부분을 증폭하기 위해 일부의 염기 서열을 알 필요도 없으며, 세균의 종에 따라서 특이한 시발체를 고안할 필요도 없다. 이 때문에 시간과 비용을 크게 들이지 않고 분자역학적인 형별 구분 방법으로 이용하기가 쉬우며, 다양한 세균에 대해서 똑같은 시발체를 이용해서 형별 구분을 시도해 볼 수 있다. 다만 RAPD에 사용하고자 하는 시발체 모두가 모든 세균에 대해서 형별을 구분하는 분별력이 우수하지는 않으므로 많은 종류의 시발체 중 비교적 분별력이

Table 2. RAPD patterns of clinical isolates of *S. typhi*

Strain No.	Address	Date of collection	Specimen	Phage type of Vi antigen	Primers				
					OPB-6	23L	OPA-4	P1254	Comb*
1	남구 대연2동	5/17	blood	Untypable					
2	남구 우암1동	5/21	blood	Untypable					
3	남구 우암1동	5/21	blood	Untypable					
4	남구 대연2동	5/23	blood	Untypable					
5	남구 대연2동	5/23	blood	Untypable					
6	남구 우암1동	5/23	blood	Untypable					
7	남구 대연2동	5/27	feces	Untypable					
8	남구 대연2동	5/27	feces	Untypable					
9	남구 대연2동	5/27	feces	Untypable					
10	남구 대연2동	5/27	feces	Untypable					
11	남구 대연2동	5/27	feces	Untypable					
12	남구 대연2동	5/27	blood	Untypable	b	d	a	d	g
13	남구 대연4동	5/27	feces	Untypable					
14	남구 대연2동	5/28	blood	Untypable					
15	남구 우암1동	5/29	blood	Untypable					
16	남구 대연2동	5/31	blood	Untypable					
17	남구 대연2동	5/31	feces	Untypable					
18	남구 대연2동	6/7	feces	Untypable					
19	남구 대연2동	6/7	feces	Untypable					
20	남구 대연2동	6/7	feces	Untypable					
21	남구 대연6동	7/2	feces	Untypable					
22	남구 대연2동	7/13	sewage	Untypable					
23	영도구 청학2	8/23	feces	E1					
24	영도구 청학2	8/23	feces	E1					
25	영도구 청학2	8/23	feces	E1					
26	영도구 청학2	8/23	feces	E1	a	g	a	i	d
27	영도구 청학2	8/23	feces	E1					
28	영도구 청학2	8/23	feces	E1					
29	영도구 청학2	8/23	feces	E1					
30	동구 범일4동	6/5	blood	-					
31	영도구 청학2	6/8	feces	E1					
32	영도구 동삼1	6/11	blood	-	b	d	a	f	i
33	중구 영주2동	6/13	feces	-					
34	사하구 당리동	6/14	blood	M1					
35	남구 대연4동	5/29	blood	E1	c	b	a	e	f
36	동구 수정3동	5/29	blood	Untypable					
37	사하구 신평1	6/26	blood	-	b	d	a	g	i
38	금정구 부곡1	6/27	feces	-					
39	서구 아미2동	6/7	blood	-	c	c	b	b	f
40	중구 부평1동	6/7	blood	-					
41	진구 부전1동	4/1	feces	Degraded	b	d	a	d	i
42	북구 감천2동	6/14	blood	M1	b	d	a	f	a
43	서구 아미2동	5/13	feces	E1	b	b	a	e	g
44	남구 우암1동	6/14	feces	E1	f	d	a	f	i
45	기장군 기장면	6/15	blood	E1	e	c	b	b	f
46	진구 부암3동	6/22	feces	E1	g	e	a	f	i
47	북구 감천1동	6/28	blood	E1	h	d	a	g	i
48	경상북도 봉화	7/2	feces	E1	i	d	a	g	i
49	경상남도 양산	7/11	blood	Degraded	i	c	a	h	h
50	사하구 구평동	6/22	feces	-	d	f	a	g	i
51	영도구 동삼3	5/13	feces	M1	a	a	a	d	e
52	서구 남부민동	4/3	blood	-	a	c	a	b	f
53	남구 대연6동	4/16	blood	Degraded	a	c	b	a	b
54	사하구 다대1	5/1	blood	E1	a	d	a	c	c

* combination of primers OPA-4 and AP-8.

높은 것을 골라 내는 일이 선행되어야 한다. 또한 RAPD는 원리상 시발체가 비특이적으로 부착하기 때문에 한 반응에서 2종류의 시발체를 넣는 것이 꼭 필요하지는 않으며, 하나의 시발체만 이용한 반응에서 균주 사이의 분별력이 높은 결과를 보고하고 있다[17].

저자들은 총 아홉 종류의 시발체를 가지고 단독으로 또는 2개의 시발체를 같이 넣어서 반응을 시켜 보았다. 그 결과 모든 실험 균주를 2개 이상의 군으로 나눌 수 있는 시발체 또는 그 조합은 다섯 종류였으며, 54 균주를 총 20개의 군으로 나눌 수 있었다. *Salmonella* 속은 많은 혈청형이 있지만 분자생물학적으로 볼 때 염색체의 상동성이 높아 단일 군종으로 분류할 수 있다고 한다[18]. Lin 등[19]은 세계 각지(주로 미국 내의 여러 지역)에서 분리된 *S. enteritidis* 29균주를 대상으로 65개의 arbitrary primer를 이용해서 형별 분류를 시도한 결과, OPB-6, 23L, OPA-4, P1254, OPB-17, OPB-15의 6개의 시발체가 분별력이 우수하다고 하였으며, 총 20개의 형별로 구분할 수 있었다. 본 연구에서는 OPB-17과 OPB-15는 전 균주가 동일한 증폭 양상을 보여 분별력이 없었다. 이와 같은 차이를 보인 이유는 두 가지로 생각해 볼 수 있을 것이다. 즉, 하나는 *Salmonella* 속에 속하는 세균의 균주 간에 상동성이 높다고 하여도 Lin 등은 *S. enteritidis*를 이용하였고 저자들은 *S. typhi*를 이용하여서 혈청형이 다른 때문일 수 있고, 다른 하나는 균주의 수집 장소가 본 연구에서는 1균주(경상북도)를 제외하고는 모두 부산 또는 그 인근으로 동일한 지역이고 Lin 등은 미국 전역과 유럽에서 수집된 균주를 대상으로 하였기 때문일 것이다.

저자들의 연구에서 다섯가지의 RAPD 형별이 모두 같은 것이 2균주 이상 보이는 경우는 모두 6가지 양상의 42균주였다(Table 2). 이 중 bdadg 양상을 보이는 23균주는 모두 부산광역시 남구에서 수집된 균주로, 이는 이미 당시의 역학 조사 결과 하수가 오염원(Strain No. 22)일 것으로 추정되는 대규모의 집단 감염의 일부이다. 그러나, 표에서 보듯이 비슷한 지역에서 같은 시기에 발생한 환자에서 나온 균주 중 일부가 다른 RAPD 양상 또는 다른 Vi 항원 phage typing을 보이는 것으로 보아서 또다른 감염원이 있었음을 배제할 수는 없을 것으로 생각된다. agaid 형별을 보이는 8균주는 모두 한날 한 동네에서 집단 발병한 환자의 검체에서 분리된 것으로, 당시 역학 조사가 시도되지 않아 감염원은 밝히지 못했으나 분자생물학적으로 같은 감염원임을 알 수 있었다. 5균주, 2균주, 2균주, 2균주가 각각 같은 RAPD 양상을 보인 네 경우에 있어서는 일부 검출 지역과 시기가 일치하기는 하나 각각 동일한 감염원에서 기원했다는 사실이 확인되지는 않았으며, 감염원이 다름에도 불구하고 동일한 RAPD 양상을 보였을 가능성을 배제할 수는 없다.

Phage typing, plasmid profile, antibiogram, biotyping,

ribotyping, RFLP(restriction fragment length polymorphism), PFGE, RAPD[5-16] 등 여러 가지 방법이 같은 종의 세균의 형별을 구분하는 데 이용되고 있다. 역학 조사의 도구로서 가장 중요한 기능은 분별력, 즉 같은 곳에서 기원한 균주는 같은 형별로, 다른 곳에서 기원한 균주는 다른 형별로 구분해주는 능력이다. 그런 면에서 볼 때 PFGE가 현재 분자역학적 조사 방법으로 gold standard로 일컬어지고 있다. 그러나 이 방법은 장비, 기술, 시간, 비용이 많이 든다. 역학 조사 도구로서 요구되는 또 하나의 조건은 쉽게 어디서나 적용할 수 있는 방법이어야 한다는 것이다. 그 이유는 역학 조사의 목적이 분리된 같은 군종 중 같은 감염원에서 기원한 것을 신속하게 가려내고 감염원을 빨리 찾아내어 전파를 방지하고자 하는데 있기 때문이다. 즉, 조사하고자 하는 기관에서 조사의 필요가 있을 때 즉시 검사를 할 수 있어야 하는 것이다. 그러나 분별력도 가장 높고, 쉽게 적용할 수 있는 이상적인 검사 방법은 없다. 그러므로 실제로는 antibiogram처럼 분별력은 낮으나 쉽게 이용할 수 있는 검사 방법 몇가지를 조합하거나 또는 쉽게 적용할 수 있는 분자역학적 검사 방법을 먼저 시도하여, 형별이 달라서 같은 감염원이 아님이 분명한 일부를 배제하는 것이 순서일 것이다. 그러면 PFGE와 같은 분별력이 높은 방법으로 형별 구분을 시도하는 데에 시간과 비용을 많이 절약할 수 있다. 그런 면에서 볼 때 다양한 종류의 시발체만 갖추고 있으면 RAPD에 의한 형별 구분은 군종에 관계없이 쉽게 적용할 수 있어서 매우 유용한 검사 방법이다. 그리고 *S. typhi*처럼 집단으로 발병할 가능성이 있는 군종에 대해서는 미리 분별력이 높은 시발체 몇 종류를 스크리닝해 두는 것이 필요할 것으로 생각한다.

저자들은 해마다 부산 지역에서 다수의 *S. typhi* 감염증 환자가 발생하는 것을 고려하여, 1996년 부산지역에서 집단 발생 균주를 포함한 54 균주를 대상으로 RAPD에 의한 형별 분석을 시도하여 동일한 감염원에 의한 집단 감염이 일부 있었음을 밝혔으며, *S. typhi*의 형별 구분에 분별력이 있는 몇종류의 시발체를 확인하였다.

요 약

배 경 : *S. typhi*에 의한 감염증 우리나라에 이미 토착된 전염병으로 최근 집단 혹은 산발적인 발생이 증가하고 있다. 장티프스 감염증 환자에 대한 역학 조사는 즉시 이루어져야 하며, 감염원을 재빨리 색출하여 전파를 차단하는 것이 중요하다. 1996년 2-8월 사이에 부산 지역에서 검출되어 생화학적, 혈청학적으로 동정되고 Vi 항원의 phage type이 조사된 *S. typhi*에 대해서 RAPD 분석을 실시하였다.

방 법 : 1996년 2월 28일부터 8월 30일 사이에 부산광

역시 보건환경연구원에 보고된 균주 중 54균주를 대상으로, 총 9개의 시발체를 각각 또는 조합으로 사용하여 94°C 4분-35°C 4분-72°C 4분 주기로 4회, 94°C 30초-35°C 1분-72°C 2분 주기로 30회, 72°C 4분 1회의 PCR 과정을 진행한 후 증폭된 band의 다형성을 관찰하였다.

결 과 : *S. typhi*의 형별 분석에 유용한 시발체는 OPB-6, 23L, OPA-4, P1254, OPA-4와 AP-8의 조합이었고, 54개의 균주가 총 20개의 군으로 분리되었다. 동일한 형별이 2균주 이상인 경우는 6가지였으며, 이중 두 경우는 각각 집단 발병에 의한 경우였다. Vi 항원 phage형 중 E1형이 RAPD 분석에서 각각 다른 10개의 형별로 구분되었다.

결 론 : RAPD 분석이 *S. typhi*의 형별 구분에 유용하고 편리하면서 경제적인 도구로 생각되며, 분별력이 있는 5종류의 시발체를 확인하였다. 특히 한국에서 가장 많이 분리되는 E1형의 Vi phage형을 구분해내는데 우수한 분별력을 보였다. 또한 1996년 부산 지역에서 유행한 *S. typhi* 감염증 중에 각각 동일한 감염원에 의한 집단 발병이 적어도 2회 있었음을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. 국립보건원 통계. 감염병발생정보 1996;7(9):107-9.
2. 국립보건원 통계. 감염병발생정보 1996;7(10):118-21.
3. 국립보건원 통계. 감염병발생정보 1995;6(8):103-8.
4. 국립보건원 통계. 감염병발생정보 1995;6(9):119-21.
5. 국립보건원 통계. 감염병발생정보 1995;6(10):130-3.
6. 신영학, 유정식, 박미선, 강연호, 이복권, 김호훈. 1996년 부산에서 집단발생한 장티프스 환자들로부터 분리한 *Salmonella typhi*의 PFGE 양상, phage형 및 항균제 감수성. 감염 1997;29:201-8.
7. 이복권, 김기상, 이명원, 정태화. 한국에서 분리된 장티프스균의 Vi-phage types에 관하여(1983-1984). 국립보건원보 1984;21:157-64.
8. Dorn CR, Silapanuntakul R, Angrick EJ, Shipman LD. Plasmid analysis and epidemiology of *Salmonella enteritidis* infection in three commercial layer flocks. Avian Dis 1992;36(4):844-51.
9. Dorn CR, Silapanuntakul R, Angrick EJ, Shipman LD. Plasmid analysis of *Salmonella enteritidis* isolated from human gastroenteritis cases and from epidemiologically associated poultry flocks. Epidemiol Infect 1993;111(2):239-43.
10. Selander RK, Smith NH, Li J, Beltran P, Ferris KE, Kopecko DJ, et al. Molecular evolutionary genetics of the cattle-adapted serovar *Salmonella dublin*. J Bacteriol 1992;174(11):3587-92.
11. Barker RM and Old DC. The usefulness of biotyping in studying the epidemiology and phylogeny of salmonellae. J Med Microbiol 1989;29(2):81-8.
12. Stubbs AD, Hickman Brenner FW, Cameron DN, Farmer JJ 3rd. Differentiation of *Salmonella enteritidis* phage type 8 strains; evaluation of three additional phage typing systems, plasmid profiles, antibiotic susceptibility patterns, and biotyping. J Clin Microbiol 1994;32(1): 199-201.
13. Altwegg M, Hickman-Brenner FW, Farmer JJ. Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity of typing *Salmonella typhi* strains. J Infect Dis 1989;160:145-9.
14. Olsen JE, Skov MN, Threlfall EJ, Brown DJ. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. J Med Microbiol 1994;40(1):15-22.
15. Threlfall EJ, Torre E, Ward LR, Davalos Perez A, Rowe B, Gibert I. Insertion sequence IS200 fingerprinting of *Salmonella typhi*: an assessment of epidemiological applicability. Epidemiol Infect 1994;112(2):253-61.
16. Nair S, Poh CL, Lim YS, Tay L, Gok KT. Genomic fingerprinting of *Salmonella typhi* by pulsed-field gel electrophoresis for subtyping common phage types. Epidemiol Infect 1994;113:391-402.
17. del Tufo JP and Tingey SV. RAPD assay. A novel technique for genetic diagnostics. Methods Mol Biol 1994;28:237-41.
18. The Enterobacteriaceae. In Koneman EW, ed. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 1997:200-1.
19. Lin AW, Usera MA, Barrett TJ, Goldsby RA. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. J Clin Microbiol 1996;34:870-6.