

중합효소연쇄반응을 이용한 실험적 리스테리아 감염증의 신속진단

강호조 · 이성미 · 석주명* · 이덕규** · 손원근***

경상대학교 수의과대학 · 경상대학교 동물의학연구소*
마산전문대학 방사선과** · 캐나다 식품검사국***

(1998년 4월 14일 접수)

Rapid diagnosis of experimental listeriosis in mice by polymerase chain reaction

Ho-jo Kang, Seong-mi Lee, Ju-myoungh Suk* , Deog-kyu Lee** , Won-geun Son***

College of Veterinary Medicine Gyeongsang National University
Institute of Animal Medicine, Gyeongsang National University*
Masan Junior College**

Health Canada, Animal Disease Research Institute, Canadian Food Inspection Agency***

(Received Apr 14, 1998)

Abstract : The polymerase chain reaction(PCR) assay was used for rapid diagnosis from blood and organ samples experimentally infected with *Listeria monocytogenes*. This method used a pair of primers based on a unique region in the 16S rRNA sequence of *L. monocytogenes*.

Procedure A was based on dilution of the blood sample followed by lysis of bacterial cell and direct analysis of the lysate with PCR. In artificially infected blood samples with *L. monocytogenes*, it was possible to detect fewer than 40 cells per ml of blood. However, *L. monocytogenes* was detected low rates on infected organs by the direct PCR.

In procedure B, enrichment cultivation was used to increase numbers of bacteria before lysis and PCR. *L. monocytogenes* was detected from 23 samples of 24 liver and spleen, respectively, and 18 samples of 24 blood were found to be positive by PCR on a subset of 72 organ samples, whereas *L. monocytogenes* were detected on 63 organ samples in classical culture technique. It was required to analyze including enrichment steps were 6h and 18h on the procedure A and B, respectively.

Key words : *Listeria monocytogenes*, experimental listeriosis, polymerase chain reaction, rapid diagnosis.

서 론

*L. monocytogenes*는 임산부, 신생아 및 노인을 비롯한 암, 간장질환, 당뇨병, AIDS 환자 등 면역기능이 저하된 사람에서 잘 감염된다¹. 성인환자의 대다수는 수막염, 균혈증 및 국소감염(심내막염, 패혈증성 관절염, 골수염, 복막염 등)을 일으키며², 임산부에 감염할 때는 증상이 없거나 감기증상으로 가볍게 경과하여도 유산, 사산, 조산, 신생아 패혈증, 유아의 수막염 등을 일으킬 수 있다¹. 또한 건강인의 2~6%가 이 세균을 증상없이 보균하고 있다는 점²을 고려할 때 면역억제체의 투여를 계속 받는 환자의 경우 이들 균에 대한 저항성이 약화되어 감염가능성이 높아질 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 *L. monocytogenes*는 자연계에 널리 존재하며, 4℃ 이하의 낮은 온도에서도 성장이 잘 될 뿐만 아니라 식품산업의 발전과 식생활 패턴이 다양해짐에 따라 식품오염을 통한 감염 가능성은 더욱 높아지고 있다³. *Listeria spp.* 가운데 *L. monocytogenes*와 *L. ivanovii*만이 병원성이 있으며, 마우스의 경우 모두 마우스의 저항성이나 감수성과는 관계없이 50% 이상의 치사율을 나타내며 간장과 비장에서 증식한다^{4,5}.

지난 몇년동안 리스테리아증의 발생에 대한 역학적 조사를 비롯한 각종 식품에 대한 *Listeria* 균의 정기적 검사를 위한 새로운 기법이 계속 개발되어 왔지만 현재 가장 효율적인 방법으로 널리 이용되고 있는 것은 중균배양법이다. 이 방법은 중균배양후 균을 분리동정하는데 최소한 4~5일 정도로 많은 시간이 소요되는 결점이 있다⁶. 근년 단백질 항원에 대한 직접적인 단클론항체를 이용한 효소면역법(ELISA)이 식품중의 *Listeria* 균을 검출하는 방법으로 개발되었으나 많은 수의 균수를 필요로 하기 때문에 검출시간을 단축시키는데는 기대에 미치지 못하였고 교차반응을 일으키는 경우가 있어 실용화 되는데는 아직 문제가 남아 있다^{7,8}. 최근에 개발된 특이 primer를 이용한 중합효소연쇄반응(PCR)은 특이성과 민감성이 매우 높고 검출시간도 직접 PCR법은 6시간대로 단축시킬 수 있으며, 중균배양을 병행한 PCR을 할 경우 1~2일이면 분석이 가능하게 되었다^{6,9}.

본 연구에서는 리스테리아 감염증을 신속하게 진단할 수 있는 방법을 모색하기 위하여 감수성이 높은 마우스에 *L. monocytogenes* 균을 경구감염시킨 후 혈액, 간장 및

비장을 진단재료로 하여 16S rRNA-based primer를 이용하여 PCR을 실시하였다.

재료 및 방법

사용균주 : 본 시험에 사용한 균주는 *L. monocytogenes* scott A 균주로서 캐나다 보건후생 미생물 연구부에서 분양받았으며, 사용전 tryptic soy broty(TSB), listeria enrichment broth(LEB) 및 oxford agar(Difco)에 수회 계대 배양하였다.

동물접종 : 실험동물은 6~8주령의 SPF(specific pathogen free) ICR 마우스로서 암·수 구별 양고 사용하였다. 균접종은 Bailey *et al*¹⁰의 방법을 참고로 하여 TSB에 접종하고 35℃에서 24시간 배양한 후 PBS로 2회 원심세척하여 10⁷ CFU/ml 수준의 균부유액을 만들었다. 다음 마우스용 경구 주입기를 사용하여 마우스의 위내로 0.2ml 씩 접종하였고, 대조구는 PBS 0.2ml씩을 경구접종하였다. 균접종 마우스는 일반적인 조건하에서 사육하였고, 음수와 마우스용 펠릿사료를 충분히 공급하였다.

혈액 및 장기채취는 균 접종후 24시간째부터 2일 간격으로 마우스를 ether로 흡입 마취하고, 70% alcohol로 복부를 소독한 다음 절개하여 심장채혈하는 한편, 간장과 비장을 무균적으로 채취하여 실험재료로 사용하였다.

Oligonucleotide primers: 본 시험에 사용한 primer는 Wang *et al*¹¹이 설계한 16S rRNA-based primer L-1(5'-CACGTGCTACAATGGATAG-3')과 L-2(5'-AGAATAGTTTATGGGATTAG-3')를 한국생공에서 합성정제한 것을 사용하였다.

Genomic DNA 추출 : DNA 분리는 Wang *et al*¹¹ 그리고 Niederhauser *et al*¹²의 방법을 참고하였다. 혈액은 0.1 ml에 1ml의 멸균중류수를 가하여 용혈시키고, 장기재료는 glass homogenizer로 마쇄하여 10~100배량의 중류수를 가하고 1,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 13,000rpm에서 5초간 원심집중하였다. 여기에 0.1M PBS (pH 7.4)를 가하여 같은 방법으로 2회 세척하고, 다시 1×PCR buffer를 가하여 원심세척한 다음 50μl의 Proteinase K(0.5mg/ml, PCR buffer)를 가하여 37℃에서 30분간 처리한 후 100℃에서 5분간 열처리하고 즉시 얼음에 묻어 냉각하였다.

PCR 분석 : 앞에서 처리한 용균액(template DNA) 5μl를 PCR용 시험관에 취하고 여기에 Primer L-1 및 L-2 각

각 5 μ l(1mM), dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Promega) 각 2 μ l(1mM), MgCl₂ 6 μ l(1.3mM), 10X PCR buffer(100mM Tris, pH 9.0 : 500mM KCl ; 1% Triton \times 100) 10 μ l 및 Ampli Tag DNA polymerase(Promega) 0.5 μ l(2.5IU)를 가한후 멸균된 3차 증류수로 총량이 100 μ l가 되게 하고, mineral oil 50 μ l를 증충하여 PCR 분석시료로 사용하였다¹¹.

PCR 분석은 Wang *et al*¹¹의 방법을 변형하여 DNA thermal cycler(Perkin Elmer)로 시료 DNA를 증폭시켰다. 이때 증폭회수는 총 40 cycle로 하고, 매 cycle당 95 $^{\circ}$ C에서 40초간 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 40초간 extension의 순으로 반응하였으며 단, 최초의 cycle은 denaturation을 4분, 최종 cycle은 extension을 4분으로 하였다. 다음 PCR product를 4 $^{\circ}$ C에 보존하고 1.5% agarose gel로 전기영동하여 EtBr로 염색한 후 target DNA의 증폭여부를 확인하였다.

혈액시료에 대한 PCR 민감도 시험 : 직접 PCR 기법으로 혈액시료에 대한 검출 가능한 최소 세균수를 알아보기 위하여 마우스 혈액 0.1ml에 *L monocytogenes* scott A 균주를 3.8 \times 10⁵부터 2 CFU까지 접종하고, 증류수 1ml을 가하여 진탕·용혈시킨 후 1,000rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 여기서 얻은 상층액을 13,000rpm에서 5초간 원심, 집균한 후 0.1M PBS로 2회 세척하고 다시 1 \times PCR buffer로 1회 세척하였다. 음성대조구는 마우스 혈액만을 그리고 양성대조구는 접종균 3.8 \times 10⁶ CFU만을 배치하여 앞서와 같은 방법으로 DNA를 추출하고, 같은 조건하에서 PCR amplification 한 다음 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 *L monocytogenes* 특이 DNA의 증폭여부를 확인하였다.

감염장기에 대한 PCR 분석 : 경구접종후 1일째부터 2일 간격으로 7일간 감염 마우스의 혈액, 간장 및 비장을 채취하여 각각 glass homogenizer로 마쇄하고, 혈액은 10~100배량의 멸균증류수를 가하여 진탕하였다. 다음 1,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 13,000rpm에서 5초간 원심집균하여 PBS로 2회 세척하고, 다시 1 \times PCR buffer로 1회 세척한 다음 앞의 genomic DNA 추출에서와 같은 방법으로 처리하여 직접 또는 증균을 병행한 PCR 기법으로 분석하였다.

미생물학적 분석 : 혈액 및 마쇄한 장기재료를 PBS로 희석하여 modified UVM(University of Vermont Medium, Difco)에 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였다²⁸. 이 배양액을 Oxford agar(Difco) 평판에 접종하여 35 $^{\circ}$ C에서 24시

간 배양한 다음 *L monocytogenes*로 의심되는 colony를 혈액배지에 접종하여 용혈성 시험, CAMP 및 혈청형 검사 등을 실시하여 접종균임을 확인하였다.

결 과

혈액시료에 대한 PCR 민감도 시험 : 혈액시료에 대한 직접 PCR 기법의 검출한계를 검토하기 위하여 균수를 3.8 \times 10⁵ CFU부터 2 CFU까지 첨가한 혈액시료로부터 각기 genomic DNA를 추출하여 직접 PCR한 바 3.8 \times 10⁵ CFU까지 70bp 크기의 PCR 산물이 검출되었다(Fig 1).

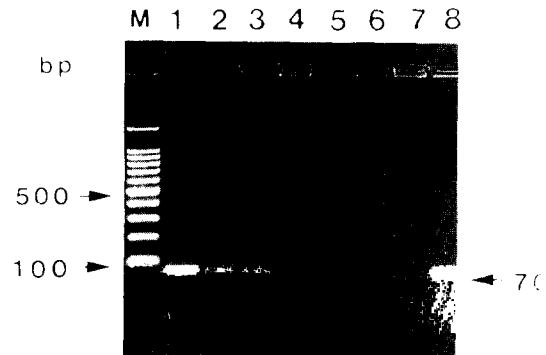


Fig 1. Detection limit of the direct PCR method for *L monocytogenes* Scott A inoculated into blood samples. Primers L-1 and L-2 were used. Lane M, DNA size markers ; Cell numbers in CFU ; Lane 1, 3.8 \times 10⁴ ; Lane 2, 3.8 \times 10³ ; Lane 3, 3.8 \times 10² ; Lane 4, 3.8 \times 10¹ ; Lane 5, 4 ; Lane 6, 2 ; Lane 7, no cells(negative control) ; Lane 8, *L monocytogenes* Scott A 3.8 \times 10⁶ CFU(positive control).

감염장기에 대한 PCR 검색 : *L monocytogenes*의 균수를 10⁷ CFU 수준으로 마우스에 경구 접종하고, 24시간 후에 채취한 혈액, 간장 및 비장을 앞서와 같이 처리하여 직접 PCR 분석한 결과 18시료중 약 39%의 분리율을 나타내었으나 이들 시료를 UVM에서 12시간 증균한 시료를 PCR 분석한 경우는 약 89%의 검출율을 나타내었다(Fig 2).

한편 *L monocytogenes*를 7.5 \times 10⁷ CFU 수준으로 마우스에 경구접종한 후 1일째부터 7일까지 2일 간격으로 채취한 혈액, 간장 및 비장재료를 12시간 증균배양하여 PCR 분석한 결과 24시료중 혈액에서 18예, 간장과 비장에서 각각 23예가 PCR 양성을 나타내어 균분리배양법

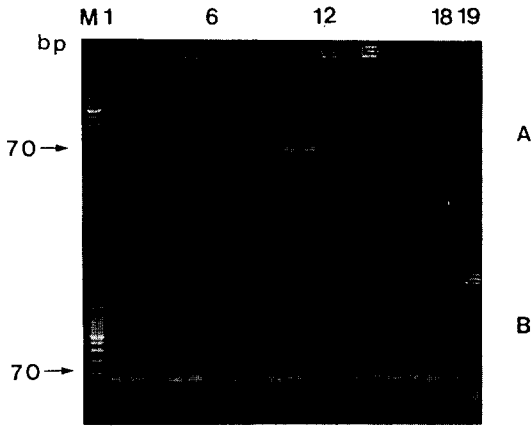


Fig 2. PCR detection of *L. monocytogenes* Scott A infected in organs of mice infected at 24h after oral inoculation with 10^7 bacteria. (A) Direct PCR results; (B) PCR results after 12h enrichment in the UVM at 30°C. Lane M, DNA size markers; Lane 1-6, blood; Lane 7-12, liver; Lane 13-18, spleen; Lane 19, not inoculated(negative control).

Table 1. Detection of *L. monocytogenes* scott A from blood and organs of mice orally infected with the bacterium by PCR and cultural method

Day after inoculation	No. of mouse tested	No. of positive samples		
		blood	liver	spleen
1	6	4 ^a (4) ^b	6(6)	6(6)
3	6	6(6)	6(6)	6(6)
5	6	5(5)	6(6)	6(6)
7	6	3(3)	5(5)	5(4)
Total	24	18(18)	23(23)	23(22)

^a PCR results at 12h after enrichment with UVM at 30°C(UVM 12h-PCR).

^b Figures in parentheses are results by cultural method.

에 비해서 약간 높은 분리율을 나타내었다(Table 1).

고 찰

L. monocytogenes 감염에 기인한 리스테리아병의 가장 일반적인 증상은 뇌염까지 진전하는 수막염이 압도적으로 많으며 그 다음이 패혈증의 소견이 주된 증상으로서

흔히 발열, 두통, 구토 등의 전구증상이 갑자기 일어난다^{6,11,13}. 따라서 이들 균의 감염을 받기 쉬운 환자들에 대한 본병의 발생을 방지하고 치료대책을 강구하기 위해서는 이들 환자재료로부터 원인균을 신속하게 검출하는 것이 무엇보다도 중요한 일이다. 이미 연자들은 동물성 식품에서 *L. monocytogenes* 의 신속검색을 위한 PCR 기법 개발연구에서 Wang *et al*¹¹이 작성한 primer L-1과 L-2로 PCR 분석하여 특이성과 민감성이 대단히 우수함을 확인한 바 있다¹⁴.

이 연구에서는 먼저 PCR을 이용한 혈액중 *Listeria* 균수를 달리 접종하여 직접 PCR 분석을 실시하였던 바 3.8×10^1 CFU 수준까지 70bp 크기의 PCR 산물을 인정할 수 있었다. 이는 강 등¹⁵이 우육 및 돈육으로부터 진탕법에 의하여 채취한 시료를 원심집균하여 PCR 분석한 검출한계와 비슷한 결과였다. *L. monocytogenes* 와 *L. ivanovii* 는 마우스의 경우 50% 이상의 치사율을 나타내며 간장과 비장에서 증식한다¹⁶⁻¹⁸. Makino *et al*¹⁹은 동물에서 *Bacillus anthracis* DNA를 PCR에 의하여 직접 검색한 결과 *B. anthracis* 를 투여한 후 8시간내에 마우스의 혈액 및 비장에서 *Cap A gene*을 특이적으로 검출하고, 이 방법은 단 1개의 아포 수준까지 매우 적은 세균을 함유하는 시료에서도 288bp DNA 단편의 증폭이 가능하였고 이 PCR 기법은 환경에 오염된 *B. anthracis* 를 monitoring을 하는데 적용할 수 있다고 하였다. 또 Makino *et al*²⁰은 동물에서 *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA를 직접 PCR에 의하여 분석한 결과 6시간내에 마우스의 비장에서부터 마리당 20 CFU 이하의 아주 적은 균수를 함유하는 시료에서도 407bp DNA 단편이 증폭 가능하여 실제 적용가능성을 시사하였다. 본 연구에서는 감염된 마우스의 혈액, 간장 및 비장재료에 직접 PCR 기법을 적용한 바 혈액 이외의 장기재료에서는 시료에 따라 분리율에서 차이가 많았고, 기존 분리배양법과 비교할 때 분리율이 크게 떨어지는 것으로 인정되었다. 이는 가검물에 함유된 조직성분 등의 DNA 증폭 억제물질에 의하여 PCR 민감도가 떨어지는 것으로 보고되어 있다^{8,15,21-23}. 이를 해결하기 위하여 강 등¹⁵은 동물성 식품에서 시료를 여과, 원심분리 및 희석 등의 방법을 적용하여 2 CFU 수준까지 적은 균수를 검색할 수 있었으나 오염 균수가 적은 시료의 경우는 희석 등의 작업과정에서 균이 소실되어 음성으로 판정될 가능성은 배제할 수 없다고 하였다. Fitter *et al*²⁴은 직접 PCR법은 시료의 추출 정제과정에서 DNA가 유실되

기 쉬우므로 식품시료에서는 직접 PCR 기법을 적용하여 검색하기 어려운 점이 있고 또 식품시료에 존재하는 DNA 증폭억제물질, 적은 오염균수 그리고 목적유전자가 증폭되었는지의 증거가 미약하다는 등의 이유를 들어 primer 제작에 세심한 주의를 요하며, 37℃에서 18시간 증균배양을 병행할 경우 10~100 CFU까지 검출가능하고, 사멸한 세균에 의한 위양성반응을 방지할 수 있다고 하였다. Thomas *et al*¹은 선택배지를 사용하여 미리 증균하면 target cell 즉, target DNA를 증가시키는 반면, 시료내의 증폭억제물질을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 살아있는 균으로부터 target DNA를 얻을 수 있는 장점이 있다고 하였다.

한편 감염된 마우스의 혈액, 간장 및 비장재료를 12시간 UVM에 증균배양하여 PCR한 결과 88.9%의 검출율을 나타내어 분리배양법의 결과와 일치되었다. 이것은 Niederhauser *et al*¹²이 치즈를 분석한 실험에서 증균배양후의 PCR법은 미생물학적 배양법에 비하여 더 우수하거나 같은 것으로 보고한 성적과 일치되었다.

이상과 같은 연구결과를 종합해보면 리스테리아 감염증을 신속하게 진단할 목적으로 직접 PCR 기법을 적용하기 위해서는 장기조직중의 PCR 증폭억제물질을 제거하는 문제가 해결되지 않고는 실제 적용에는 무리가 있을 것으로 판단되며, 12시간 증균배양을 병행한 PCR 기법은 기존의 배양법에서 보다 분리율이 약간 높고 분석에 소요되는 시간도 4~5일에서 18시간대로 단축시킬 수 있으므로 본 연구에서 개발한 증균배양을 병행한 PCR 기법(UVM 12h-PCR)은 리스테리아 감염증의 진단 및 분리균을 확인하는데 효율적인 기법이 될 것으로 사료된다.

결 론

리스트테리아 감염증의 신속진단을 위하여 16S rRNA-based primer를 이용한 중합효소연쇄반응(PCR)으로 감염장기를 분석하였다.

A법은 용균한 혈액시료를 회석하여 직접 PCR한 결과 인위적으로 접종한 혈액시료에서는 3.8×10^1 CFU/ml까지 검출가능하였으나 감염된 마우스의 장기재료에서는 검출빈도가 현저하게 낮았다. B법은 감염된 장기재료를 용균시키기 전에 세균농도를 높이기 위하여 12시간 증균배양한 후 PCR 하였다. 그 결과 감염후 1일부터 7일까지

채취한 장기재료 72예(혈액 24예 중 18예, 간장 및 비장재료 각각 24예 중 23예) 가운데 64예가 PCR 양성을 나타낸데 대하여 분리배양법은 63예가 양성이었다. 분석소요시간은 A법은 증균시간을 포함하여 6시간, B법은 18시간 소요되었다.

참 고 문 헌

1. Rocourt J. *Listeria monocytogenes* : the state of the science, Dairy, Food and Environmental sanitation. 14:70-82, 1994.
2. Nieman RE, Lorber B. Listeriosis in adult : a changing pattern-Report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. *Rev Infect Dis* , 2:207-227, 1980.
3. Guyer S, Jemmi T. Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Appl Environ Microbiol* , 57:1523-1527, 1991.
4. Mainou-Fowler T, McaGowan AP, Postle-thwaite R. Virulence of *Listeria* spp.: Course of infection in resistant and susceptible mice. *J Med Microbiol* , 27:131-140, 1988.
5. Stelma GN, Teyes AL, Peeler JT, *et al* . Pathogenicity test for *Listeria monocytogenes* using immunocompromised mice. *J Clin Microbiol* , 25:2085-2089, 1989.
6. Thomas EJG, King RK, Burchak J, *et al* . Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* , 57:2576-2580, 1991.
7. Kerr KG, Rotowa NA, Hawkey PM, *et al* . Incidence of *Listeria* spp. in precooked, chilled chicken products as determined by culture and enzyme-linked immunosassay(ELISA). *J Food Pro* , 53:606-607, 1990.
8. Makino SI, Okada Y, Maruyama T. A new method for direct detection of *L. monocytogenes* from by PCR. *Appl and Environ Microbiol* , 61: 3745-3747, 1995.
9. Starbuck MAB, Hill PJ, Stewart GSAB. Ultra sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction(PCR). *Lett Appl Microbiol* , 15:258-252, 1992.
10. Bailey JS, Fletcher DL, Cox NA. *Listeria monocyto-*

- genes* colonization of broiler chickens. *Poul Sci*, 69: 457-461, 1990.
11. Wang RF, Cao WW, Johnson MG. 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detected *Listeria monocytogenes* cells added to foods. *Appl Environ Microbiol*, 58:2827-2931, 1992.
 12. Niederhauser C, Candrian U, Hofelein C, et al. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Appl and Environ Microbiol*, 58:1564-1568, 1992.
 13. Warburton DW, Farber JM, Armstron A, et al. A comparative study of the "FDA" and "USDA" methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int J Food Microbiol*, 13:105, 1991.
 14. 이철현, 손원근, 강호조. 원유로부터 *Listeria monocytogenes* 의 신속검색을 위한 중합효소연쇄반응법의 개선. 대한수의학회지, 36:119-129, 1996.
 15. 강호조, 석주명, 손원근. 수입동물성 식품에서 *Listeria monocytogenes* 의 신속검색을 위한 중합효소연쇄반응기법의 개발 및 적용. 한국수의공중보건학회지, 21:149-157, 1997.
 16. Doyle MP, Schoeni JL. Selective-enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens. *Appl Environ Microbiol*, 51:1127-1129, 1986.
 17. Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, et al. Acute bacterial meningitis in adults-A review of 493 episodes. *New Engl J Med*, 328:21-28, 1993.
 18. Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, et al. Pasteurized milk as vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Bngl J Med*, 312:402-407, 1985.
 19. Makino SI, Iinuma-okada Y, Maruyama T, et al. Direct detection of Bacillus anthracis DNA in animals by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 31:547-551, 1993.
 20. Makino S, Ckada Y, Maruyama T, et al. Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. *J Clin Microbiol*, 32:1526-1531, 1994.
 21. Lieve M, Herman F, Jan HG, et al. Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 milliliters of raw milk by a Two-step PCR with nested primers. *Appl and Environ Microbiol*, 61:817-819, 1995.
 22. Wernars K, Heuvelman CJ, Chakraborty T, et al. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J of Appl Bacteriol*, 70:121-126, 1991.
 23. Wegmuller B, Luthy J, Candrian U. Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Appl Environ Microbiol*, 59:2161-2165, 1993.
 24. Fitters S, Heuzenroder M, Thomas CJ. A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol*, 73:53-59, 1992.