

편육과 브로콜리싹에서 *Salmonella* spp. 검출을 위한 배지법과 Real-time PCR 및 신속 검사키트(VIDAS®)의 비교검증

현지연 · 황인균¹ · 곽효선¹ · 박종석² · 허 석² · 최인수³ · 박찬규⁴ · 서건호*

건국대학교 수의과대학 공중보건학, ¹식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 미생물과
²식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 연구기획조정과
³건국대학교 수의과대학 전염병학, ⁴건국대학교 동물생명과학대학

Evaluation of an Automated ELISA (VIDAS®) and Real-time PCR by Comparing with a Conventional Culture Method for the Detection of *Salmonella* spp. in Steamed Pork and Raw Broccoli Sprouts

Ji-Yeon Hyeon, In-Gyun Hwang¹, Hyo-Sun Kwak¹, Jong-Seok Park², Seok Heo²,
In-Soo Choi³, Chankyu Park⁴, and Kun-Ho Seo*

Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

¹Food Microbiology Division, Food Safety Evaluation Department,

National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul 122-704, Korea

²Research Planning & Management Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul 122-704, Korea

³Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

⁴Department of Animal Biotechnology, College of Animal Bioscience and Technology, Konkuk University,
Seoul 143-701, Korea

Abstract

Salmonellosis is an important worldwide foodborne infectious disease that is transmitted by many food vehicles including raw and processed animal products and fresh produce. In this study, the effectiveness of automated ELISA (VIDAS®) and real-time PCR in the detection of *Salmonella* spp. in steamed pork and raw broccoli sprouts was evaluated by comparing their results with those of a conventional culture method. Bulk samples (500 g) of steamed pork and raw broccoli sprouts were inoculated with various levels of *Salmonella* and divided into 20 samples (25 g each). All the samples, including the controls, were analyzed using a conventional culture method, VIDAS®, and real-time PCR to detect the presence of *Salmonella*. In addition, the levels of background flora in the steamed pork and the raw broccoli sprouts were determined. In the steamed pork that contained less than 100 CFU/g of aerobic bacteria, all three methods detected low levels of *Salmonella* without a statistical difference in their performance. In the broccoli sprouts with high quantities of background flora (ca. 6.7×10^7 CFU/g), however, all three methods were unable to detect low levels of *Salmonella*, and real-time PCR and VIDAS® more sensitively detected *Salmonella* than the culture method, with significant statistical differences. In conclusion, VIDAS® and real-time PCR could be superior to conventional culture methods in detecting *Salmonella* in food with high levels of background flora.

Key words: *Salmonella*, culture method, VIDAS®, Real-time PCR

서 론

Salmonellosis는 장관계통 질병을 유발하는 식품유래 감염병 중 하나로 세계적으로 널리 발생하는 식중독 질병

이다(Oliveira *et al.*, 2003; Catarama 2006). *Salmonella*는 Salmonellosis의 원인체로 동물의 장관 내에 상재하고 있으며 주로 오염된 식품에 의해 사람으로 전파된다(Wang *et al.*, 2004). 전파 식품 중 가장 일반적인 것은 오염된 날고기나 가공된 육류(가공육, 돈육, 우육)이며 최근 과일이나 야채에 의해서도 식중독이 발생된 바 있다(Bansal *et al.*, 2006). 조사결과 미국에서는 매년 2,000,000건의 캄필로박터 식중독 환자 발생 다음으로 1,340,000건의 Salmonellosis

*Corresponding author : Kun-Ho Seo, Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: 82-2-450-4121, Fax: 82-2-450-3037, E-mail: bracstu3@konkuk.ac.kr

발생 환자가 보고되고 있다(Korsak *et al.*, 2004). 우리나라 역시 현재 식중독 원인체 중 노로 바이러스와 병원성 대장균 다음으로 *Salmonella*가 높은 비율을 차지하고 있으며 매년 완만한 증가양상을 나타내고 있다(<http://fm.kfda.go.kr/>).

*Salmonella*를 검출하는 방법 중 표준방법은 전통적인 배지법으로 현재 우리나라 식품공전법에도 이러한 배지를 이용한 방법이 등재되어 있다. 배지법은 예비 증균, 분리 증균, 혈청학적 분리과정으로 이루어져 있어 *Salmonella*로 최종 확인하기까지 적어도 5일을 소요하게 된다(Bohaychuk *et al.*, 2007). 그리고 이 방법은 민감도가 낮고 많은 노동력을 필요로 하기 때문에 비효율적인 검출법인 것으로 알려져 있다(D'Aoust *et al.*, 1992). 따라서 최근 배지법 외에 신속 정확하게 검출 가능한 진단법으로 면역 화학법이나 유전자 기법이 개발되고 있으며 그 활용이 증가하고 있다(Shearer *et al.*, 2001).

현재 널리 쓰이고 있는 *Salmonella* 신속검출키트는 면역반응 원리를 이용한 것이 많다. 그 대표적인 예로 자동화된 정성 분석용 면역효소 형광반응(enzyme-linked fluorescent immunoassay, ELFA)을 이용한 Vitek-immunodiagnostic assay *Salmonella*(VIDAS® SLM; BioMérieux, Lyons, France)가 있다. 이는 팁 모양의 SPR(solid phase receptacle)에 코팅되어 있는 *Salmonella*의 O 항원과 H 항원에 대한 항체와 strip에 주입된 샘플이 반응하여 형광을 발하는 원리로 반응 전의 형광 초기값과 반응 후 샘플에서 측정된 형광값을 비교하여 *Salmonella*의 유무를 결정하는 원리로 이용된다(Uyttendaele *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2001). 이 방법은 많은 양의 샘플 분석이 가능하고 2일간의 증균 후 빠른 시간 내에 균 검출이 가능하다는 장점이 있다.

유전자 기법으로는 현재 real-time polymerase chain reaction(real-time PCR) 기법이 가장 빠르고 신뢰성 있는 방법으로 알려져 있다(Catarame *et al.*, 2006; Malorny *et al.*, 2004). 이 방법은 기존의 PCR과는 달리 전기영동의 과정이 필요 없이 유전자의 증폭 시 증가되는 형광을 모니터 상에서 실시간으로 관찰 할 수 있다는 장점이 있다(Hein *et al.*, 2006). 따라서 전기영동에 의한 오염을 줄이고 검출 시간을 줄일 수 있으며 정량적인 분석까지 가능하다. 또한 검출한계가 이론상 1 CFU/25 g인 매우 민감한 방법이므로 적은 양의 오염까지 검출 가능하다(Bohaychuk *et al.*, 2007; Hein *et al.*, 2006; Krascenicsova *et al.*, 2008). 이러한 장점으로 인해 real-time PCR의 활용은 다양한 분야에서 증가하고 있는 상황이다.

식품의 안전성 검사는 식품의 유효기간 내에 신속하게 이루어져야 한다는 점에서 오랜 시간을 소요하는 배지법보다 빠른 시간 내에 검출 가능한 면역 키트법 또는 real-time PCR법과 같은 신속 검출법의 요구가 증가하고 있다. 이러한 신속 검출법이 표준방법의 대체 방법으로 사용되기 위해서는 검사방법의 공인 평가(evaluation) 및 검증

(validation) 과정을 거쳐 국제적 신뢰도와 공정성이 확보되어야 한다. 따라서 현재 신속키트법과 표준법을 비교 검증하는 연구가 활발히 진행되고 있는 상황이다(Cheung *et al.*, 2007; Uyttendaele *et al.*, 2003; Yeh *et al.*, 2002). 그러나 자연적으로 오염된 샘플을 이용한 이전의 검증연구는 병원균의 오염 정도가 불확실하였고, 인위적으로 접종한 샘플을 이용한 검증연구에서는 샘플 하나하나에 높은 농도(100, 10, 1 CFU/25 g)를 접종하였기 때문에 낮은 농도의 오염에 대해서는 검증이 부족하였다. 예를 들어 Uyttendaele 등(2003)의 연구에서는 자연적으로 오염된 육류에서 배지법과 VIDAS®법을 비교하였으며, Cheung 등(2007)의 연구에서는 육류샘플에 100 CFU/25 g의 높은 농도의 *Salmonella*를 접종하고 real-time PCR(BAX system)과 배지법을 이용하여 검출한 결과를 비교하였다. 특히 최근 축산환경에서 유래한 *Salmonella*나 *Escherichia coli* O157:H7에 오염된 신선야채를 통한 식중독 사고가 증가하고 있음에도 불구하고 자연 상재균 수가 많은 분변이나 신선야채에 존재하는 식중독균 검출법에 대한 비교검증연구는 전 세계적으로도 부족한 상황이다(Shearer *et al.*, 2001).

따라서 본 연구에서는 *Salmonella* 신속검출법을 비교검증하기 위하여 상재균 수가 적은 편육과 많은 브로콜리썩에 *Salmonella* 농도를 단계별로 접종한 후 20개 샘플로 나누어 배지법, VIDAS®, real-time PCR을 사용하여 동시에 *Salmonella*를 검출하였고, 그 후 배지법과 두 종류의 신속 검출법의 양성 검출률을 각각 통계학적으로 비교함으로써 VIDAS®과 real-time PCR의 검출도를 비교 검증하였으며 추가적으로 각 식품에 존재하는 상재균 수가 검출률에 어떤 영향을 미치는가를 평가하였다.

재료 및 방법

균 배양

Salmonella enterica subsp. *enterica* serotypes Enteritidis (SE)와 Typhimurium(ST)은 미국 FDA(MD, USA)에서 분양 받아 실험실에서 보유하고 있던 균주를 사용하였다. 냉동보관(-70°C) 되어 있던 균주를 녹여 tryptic soy broth (TSB, Difco, USA)에서 37°C에 18시간 증균 배양하였다. 배양한 균액을 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 10배수로 희석하여 nutrient agar(Difco laboratory)에 100 µL를 도말하고 37°C에 18시간 배양하여 집락 수를 확인하였다. 균 수는 위와 같은 방법으로 필요할 때마다 확인하였다.

샘플 준비 및 접종

모든 샘플 준비는 무균 조건하에서 시행되었다. 샘플은 편육과 브로콜리썩을 선정하였고 모두 서울시 광진구 소재의 대형 마트에서 구입하였다. 통계학적 분석을 위해 식

품 샘플 500 g을 멸균 stomacher bag에 담고 SE와 ST 중 한가지 균을 접종한 후 20개(25 g/샘플)로 나누어 각 검출법의 결과를 비교하였다. 접종량은 각 식품에 낮은 농도 (<15 CFU/500 g), 중간 농도(15-100 CFU/500 g), 높은 농도 (100-1000 CFU/500 g)를 각각 접종하였고 브로콜리싹에는 >1000 CFU/500 g의 가장 높은 농도를 추가 접종하였다. 접종과 동시에 접종한 균량을 nutrient agar(Difco, USA)에 도말하고 37°C에서 24시간 배양 후 집락 수를 세어 접종량을 확인 하였다. 대조균은 음성과 양성을 준비하였다. 음성 대조균의 경우에는 식품 25 g를 멸균 stomacher bag에 담고 멸균된 PBS를 100 µL 접종하고, 양성 대조균의 경우에는 식품 25 g에 100 µL SE와 ST 중 한가지 균을 매우 높은 농도인 10⁶ CFU/mL로 접종하였다. 모든 샘플은 24시간 동안 4°C의 환경에서 보관함으로써 실제 식품 샘플과 유사하도록 안정화 과정을 거쳤다.

호기성 총 균수 측정

각 식품에 존재하는 총 세균 수를 측정하기 위해 각 식품 샘플 25 g를 멸균 stomacher bag에 담고 buffered peptone water(BPW, Difco laboratory) 225 mL를 첨가하여 laboratory stomacher blender(Interscience, USA)를 이용하여 30초간 균질화하였다. 그 후, 100 µL를 취하여 10배수로 희석하고 nutrient agar에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 집락 수를 세어 평균 총 세균 수를 측정하였다.

예비 증균 과정

접종된 샘플 500 g을 무균 조건하에서 각각 25 g으로 나누어 20개의 stomacher bag에 BPW 225 mL와 함께 넣은 다음 laboratory stomacher blender를 이용해 30초간 균질하게 섞었다. 이렇게 균질화된 20개의 식품 샘플과 각각 한 개씩 설정한 대조균(양성, 음성)을 37°C에서 24시간 배양하였다.

배지법에 의한 *Salmonella* spp. 검출

총 22개의 샘플을 예비 증균 후, 분리배양을 위해 선택 배지인 Rappaport Vassiliadis(RV, BioMrieux, France)의 10 mL에 예비 증균된 BPW 100 µL를 접종하여 42°C에서 24시간 배양하였다. 배양된 RV를 xylose lysine deoxycholate agar(XLD, Difco, USA)에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하였다. XLD에서 양성이 의심되는 검정색 집락을 triple sugar iron(TSI, Difco, USA) slants에 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 “O”와 “H” 항체(Difco, USA)로 혈청형을 확인하였다.

신속 검출 키트의 분석 - VIDAS® *Salmonella* test (VIDAS® SLM)

VIDAS®는 키트 설명서에 있는 과정에 따라 시행하였는

데 간략히 요약하면 다음과 같다. 앞서 서술한 대로 예비 증균된 BPW 100 µL 균액을 10 mL의 RV와 Muller-Kauffmann tetrathionate with novobiocin(MKTTn, BioMrieux, France)에 접종하여 42°C에서 8시간 배양하였다. 배양 후 1 mL의 RV와 MKTTn을 각각 10 mL의 M broth(BioMrieux, France)에 접종하여 42°C에서 20시간 추가 배양하였다. 그 후 두 개의 M broth에서 1 mL씩 채취하여 한 튜브에 모아 100°C에서 15분간 가열하였다. VIDAS®를 시행하기 위해 4°C에 보관되어 있던 시약 및 키트를 미리 꺼내어 실온에 놓고 automated VIDAS® instrument(BioMrieux, France)도 미리 켜놓았다. 하나의 샘플에 각각 한 개의 VIDAS® “SLM” strip과 VIDAS® “SLM” SPR®(the solid phase receptacle)을 사용하였다. 샘플을 분석하기 전에 먼저 calibrating을 하고 준비가 다 되었으면 SPR과 strip을 장치에 끼운 다음 각각의 strip에 500 µL의 가열된 M broth를 넣고 분석을 시작하였다. 결과는 test value로 확인하였으며 0.05 이상의 수치가 나오면 양성으로 판정하였다. Test value란 샘플의 RFV(relative fluorescence value)를 표준 시약의 RFV로 나눈 값을 말한다.

DNA 추출

Real-time PCR을 위한 DNA를 준비하기 위해 예비 증균된 1 mL의 BPW를 1.5 mL 튜브에 옮겼다. 샘플이 들어있는 튜브를 16,000×g에서 3분간 원심분리 하고 상층액을 버린 후 pellet에 PrepMan™ Ultra Reagent(Applied Biosystems, USA) 200 µL를 넣어주어 pellet이 풀릴 때까지 vortexing을 하였다. 그 후 100°C에서 10분간 가열하고, 2분 동안 상온에서 식힌 후 16,000×g에서 3분간 다시 원심분리하였다. 원심분리가 끝나면 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 DNA를 분리하였다. 이렇게 추출된 DNA는 -20°C에 보관되어 real-time PCR을 수행할 때 사용되었다.

Real-time PCR

Real-time PCR을 위한 반응액의 조성은 Taqman gene expression Master Mix 12.5 µL(Applied biosystems), forward primer(300 nM); 서열(5-CTC ACC AGG AGA TTA CAA CAT GG-3')와 reverse primer(900 nM); 서열(5-CTC ACC AGG AGA TTA CAA CAT GG-3') 그리고 probe(200 nM); 서열(5-Cy3-CAC CGA CGG CGA GAC CGA CTT T-BHQ3-3')를 각각 2.5 µL 넣고, 샘플 DNA 5 µL로 총량이 25 µL이 되게 하였다. *Salmonella* spp.에 특이적인 primers와 probe는 94-bp의 *ttr* gene을 증폭하도록 제작되었다(GenBank accession no.:AF 282268)(Malorny *et al.*, 2004). Real-time PCR은 ABI 7500® real-time PCR System (Applied Biosystems)을 사용하였으며 반응 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 반응시킨 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분을 1회로 하여 40 cycle을 반응시켰다. Ct

(threshold cycle) 값은 형광커브와 역치선이 만나는 cycle 값으로 ABI 7500® software(Applied Biosystems)로 분석하였다.

통계학적 분석

배지법, 검출키트, real-time PCR을 수행하여 얻은 양성 샘플 수 결과를 바탕으로 통계프로그램인 GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA)을 사용하여 95%의 신뢰한계를 갖고 Fisher's exact test를 통해 각 방법 간의 통계학적 유의차(p값)을 비교하였다. p값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의차가 큰 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

호기성 정상 세균총의 수가 다른 편육과 브로콜리싹을 샘플로 선정하였으며 실험에 앞서 그 수를 측정하였다. 그

Table 1. Comparison of the number of background microflora naturally present in steamed pork and broccoli sprout (n=3)

Food	the number of background microflora (CFU/g±SD)
Steamed pork	< 100 CFU/g
Broccoli sprout	6.7(±1.5)×10 ⁷ CFU/g

결과 편육은 호기성 정상세균총의 수가 100 CFU/g 이하였으며 브로콜리싹은 6.7×10⁷ CFU/g로 매우 큰 차이가 있었다(Table 1). 배지법, 신속 검출 키트, real-time PCR를 이용하여 편육과 브로콜리싹에 인위적으로 접종한 *Salmonella*를 검출한 결과는 Table 2과 3에 각각 정리하였다. 각 검출법에 따른 *Salmonella* 검출에서는 음성과 양성 대조군의 결과가 각각 음성, 양성으로 나타났으므로 실험 상에는 오류가 없었다(결과 미제시). 두 검출법을 비교 검증 하기 위해서는 20개 샘플 중 절반 정도 양성이 나오도록 접종하는 것이 중요한데 샘플에 따라 필요한 접종농도가 현저하게 차이가 있었다. 표준법인 배지법에서 20개 샘플 중 절반 정도 양성이 나오게 하는데 필요한 접종농도는 상재균 수가 g 당 100 CFU 이하(Table 1)인 편육의 경우 43 CFU/500 g(Table 2)과 32 CFU/500 g(Table 3)인 반면, 상재균 수가 6.7×10⁷ CFU/g(Table 1)로 많은 브로콜리 싹의 경우에는 1635 CFU/500 g(Table 2, 3)으로 매우 높은 농도였다. 이는 브로콜리싹에 존재하는 상재균이 *Salmonella*의 성장을 억제하여 검출력에 영향을 미치는 것으로 여겨지며 이와 관련된 연구의 한 예로 De Medici 등(1998)의 연구 결과에 의하면 가금육에 인위적으로 10 CFU/25 g의 *Salmonella*를 접종한 후 VIDAS®와 배지법을 비교한 결과 상재균의 수와 관계 없이 두 방법에서 양성 결과를 나타내었지만 *Citrobacter freundii*가 높은 농도로 존재하는 샘플

Table 2. Comparison of a culture method and ELISA (VIDAS®) for detecting *Salmonella* in artificially contaminated steamed pork and broccoli sprout

Food	Inoculum level (CFU/ 500 g±SD)	Positive sample/tested sample		P value*
		culture method	VIDAS®	
Steamed pork	low (15±2.5)	13/20	13/20	1.2589
	middle (43±2.8)	12/20	14/20	0.7411
	high (336±4.5)	20/20	20/20	-
Broccoli sprout	low (12±2.1)	0/20	0/20	-
	middle (45±3.5)	0/20	0/20	-
	high (312±2.6)	11/20	20/20	0.0012
	extremely high (1635±2.1)	8/20	20/20	<0.0001

*If p<0.05, the culture method and VIDAS® are significantly different.

Table 3. Comparison of a culture method and real-time PCR for detecting *Salmonella* in artificially contaminated steamed pork and broccoli sprout

Food	Inoculum level (CFU/ 500 g)	Positive sample/tested sample		P value*
		culture method	real-time PCR	
Steamed pork	low (7±2.5)	6/20	6/20	1.2689
	middle (32±3.1)	12/20	15/20	0.0506
	high (336±3.2)	20/20	19/20	1.0000
Broccoli sprout	low (10±2.1)	1/20	1/20	1.6667
	middle (62±2.4)	4/20	15/20	0.0012
	high (758±3.5)	3/20	10/20	0.0407
	extremely high (1635±2.5)	8/20	17/20	0.0079

*If p<0.05, the culture method and real-time PCR are significantly different.

플에서는 1.9 CFU/sample 접종 시 두 방법 모두에서 음성 결과를 나타내었다. 그 외에 Bohaychuk(2007) 등의 연구에 의하면 양배추에 1 CFU/sample에 접종하고 BPW에서 24시간, RV와 TT에서 24시간 배양 후 배지법과 real-time PCR법으로 검출한 결과, serotype Typhimurium의 경우 5개 중 1개의 샘플이, serotype Lichfield의 경우 0개의 샘플이 양성으로 검출되었다. 이처럼 야채샘플은 다른 식품에 비해 높은 농도가 오염되어야 양성 결과를 얻을 수 있는데, 이는 야채에 낮은 농도의 식중독균이 오염될 경우에는 위음성 결과가 초래된다는 것을 의미한다. 그 원인은 식품 내 존재하는 높은 농도의 상재균에 의해 증균 과정에서 식중독균의 증식이 저해되기 때문인 것으로 여겨진다.

VIDAS[®]를 이용하여 편육에서 *Salmonella*를 검출한 후 배지법과 비교한 결과, 낮은 농도(15 CFU/500 g)에서는 두 방법 모두 20개 중 13개 샘플을 검출하였으며, 중간 농도(43 CFU/500 g)에서 배지법은 12개, VIDAS[®]는 14개, 높은 농도(336 CFU/500 g)에서는 20개 모든 샘플이 두 방법에서 양성으로 검출되었다. 3단계 접종농도 모두 배지법과 VIDAS[®] 간의 통계학적 유의차가 나타나지 않았다(Table 2). 이와 유사한 연구결과로 육류(가금육, 돈육, 우육)에서 semi-solid medium법을 이용한 배지법과 VIDAS[®]법을 비교한 다른 연구에서도 자연적으로 오염된 120개의 샘플에서 95%의 일치도로 *Salmonella*가 검출되었다는 결과가 보고되었다(Uyttendaele *et al.*, 2003). 이러한 결과로 미루어 볼 때 상재균이 비교적 적은 가공축산식품에서는 전통 배지법 뿐만 아니라 신속키트법도 통계학적 유의차 없이 동일한 검출률로 식중독 균을 검출할 수 있는 것으로 여겨진다.

반면에 본 연구에서 상재균이 높게 함유된 브로콜리 짙을 이용하였을 때 낮은 농도(12 CFU/500 g)와 중간 농도(45 CFU/500 g)를 접종했을 때에는 위에서 설명한 바와 같이 두 방법 모두 20개의 샘플에서 모두 음성 결과를 보였다. 다만 높은 농도(312 CFU/500 g)와 가장 높은 농도(1635 CFU/500 g)를 접종했을 때에는 두 방법간에 통계학적인 유의차($p < 0.05$)를 보이며, VIDAS[®]에서 더 많은 샘플이 검출되었는데 높은 농도에서 배지법은 20개 샘플 중 11개, VIDAS[®]는 20개, 가장 높은 농도에서는 배지법은 8개, VIDAS[®]는 20개를 검출하였다(Table 2). 브로콜리 짙과 같이 상재균 수가 많은 샘플인 도축장의 환경 샘플에서 VIDAS[®]와 배지법으로 *Salmonella*를 검출하였을 때 본 연구와 유사한 결과가 나타났는데, 총 18개의 샘플 중 VIDAS[®]가 배지법에 비해 4개 더 많은 양성 샘플을 검출 하였다(Yeh *et al.*, 2002).

이것으로 미루어 보아 배지법은 정상 세균총과의 경쟁에 의해 예비 증균과정에서 *Salmonella*의 생장이 저해되는 것 뿐만 아니라 분리 배양 과정에서도 선택배지에 *Salmonella* 의심 집락이 형성되는 것이 억제되기 때문에

검출률이 감소하게 되는 것으로 보인다. 그러나 VIDAS[®]는 선택 증균과정에서 RV와 MKTTn을 모두 이용한다는 점과 선택 증균 후 또 한번 M broth에서 증균을 한다는 점에서 유리할 수 있으며, 배지법과는 달리 항원 항체 반응을 이용한 검출법이므로 다른 세균의 영향을 덜 받으면서 *Salmonella* 검출이 가능한 것으로 보인다.

Real-time PCR과 배지법을 이용하여 편육에서 *Salmonella*를 검출하고 비교한 결과, 낮은 농도(7 CFU/500 g)에서는 두 방법 모두 6개 샘플을 검출하였으며, 중간 농도(32 CFU/500 g)에서 배지법은 12개, real-time PCR는 15개, 높은 농도(336 CFU/500 g)에서는 배지법은 20개 real-time PCR는 19개 샘플이 양성으로 검출되었다. VIDAS[®] 결과와 같이 3 단계 접종농도 모두 배지법과 통계학적 유의차가 나타나지 않았다(Table 3). Real-time PCR을 시행한 다른 연구에 의하면, 육류샘플에 100 CFU/25 g의 *Salmonella*를 접종하고 BPW에서 20시간, BHI에서 3시간 배양 후 real-time PCR(BAX system)과 배지법을 이용하여 검출한 결과를 비교했을 때, 배지법과 real-time PCR 모두 양성 결과를 나타내었다(Cheung *et al.*, 2007). 그 외 Bohaychuk 등(2007)에 의하면 다양한 육류(가금육, 우육, 돈육)에 1 CFU/sample을 접종한 후 BPW에서 24시간, RV와 TT에서 24시간 배양 후 배지법과 real-time PCR법으로 검출한 결과, 육류에 5개 중 5개 모두 양성결과가 나타났다. 즉, 본 연구의 결과와 유사하게 육류샘플에 높은 농도와 낮은 농도를 접종했을 때 배지법과 real-time PCR간의 검출률에는 차이가 없었다. 따라서 real-time PCR법도 신속키트법과 같이 상재균이 비교적 적은 가공축산식품에서 전통배지법과 차이 없이 효율적으로 식중독균을 검출할 수 있는 것으로 여겨진다.

편육과는 달리 브로콜리 짙을 이용한 실험에서는 낮은 농도(10 CFU/500 g)에서는 두 방법 모두 20개 샘플 중 1개의 샘플만이 양성을 나타냈으며, 낮은 농도를 제외한 모든 접종 농도에서 두 방법간에 통계학적인 유의차($p < 0.05$)를 보이며 real-time PCR에서 더 많은 샘플이 검출되었다(Table 3). 중간 농도(62 CFU/500 g)에서 배지법은 4개 real-time PCR은 15개, 높은 농도(758 CFU/500 g)에서 배지법은 3개 real-time PCR은 10개, 가장 높은 농도(1635 CFU / 500g)에서는 배지법은 8개 real-time PCR은 17개를 검출하였다. 과일 및 야채 샘플에서 시행한 다른 연구에 의하면, *Salmonella*를 1, 10, 100 CFU/sample(25 g)로 접종한 후 real-time PCR(BAX system)과 배지법을 이용하여 검출하였을 때 배지법과 real-time PCR이 동일한 검출률을 보였다는 연구결과가 있다(Shearer *et al.*, 2001). 그러나 이들의 연구는 gold-standard법으로 nalidixic acid resistant strain을 사용하여 nalidixic acid가 포함된 XLD로 검출한 것으로 다른 경쟁 세균의 영향을 받지 않고 검출되기 때문에 배지법이 PCR법과 동일한 검출률을 보인 것으로 여겨지며 이는 실제 상황을 반영하지 못한다는 한계가 있다. 그

러나 본 연구에서는 wild type 균주를 사용함으로써 현장과 같은 상황을 재현하였으며, 그 결과 새싹 식품에서 real-time PCR법이 통계학적 유의차를 나타내며 배지법보다 우수한 검출률을 나타내었다.

본 연구의 결과를 종합해볼 때 상재균 수가 적은 편육과 같은 축산가공식품에서는 낮은 접종 농도에서도 양성 샘플이 검출되었으며 VIDAS®법이나 real-time PCR법을 사용하였을 때에도 전통배지법과 통계학적으로 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 상재균이 많은 브로콜리 짝과 같은 야채식품에서는 낮은 농도를 접종했을 때에는 양성이 검출되지 않았고 배지법에 비해 VIDAS®법이나 real-time PCR법이 더 우수한 검출력을 나타내었다. 결론적으로 VIDAS® 같은 신속키트법이나 real-time PCR과 같은 유전자 기법을 이용하면 배지법과 동등한 민감도로 축산식품에서 *Salmonella* 검출이 가능하며, 특히 상재균이 많은 야채 식품의 경우에는 배지법은 경쟁 세균에 의해 검출이 저해되므로 이보다 경쟁 세균의 영향을 덜 받는 VIDAS®법이나 real-time PCR법을 이용하여 검출하는 것이 더 효과적이라고 할 수 있겠다. 또한 이러한 신속 진단법을 이용하면 기존의 5일 이상이 소요되는 배지법에 비해 VIDAS®는 3일, real-time PCR은 선택 증균 없이 BPW에서의 24시간 예비 증균 한 번으로도 배지법보다 높은 검출률로 *Salmonella*를 검출할 수 있는 것으로 나타났다. 이러한 신속 검출법은 실제 식품검사에서 많이 나오게 되는 음성 샘플을 신속하게 배제하기 위한 presumptive screening 과정에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 여겨지며 또한 야채 내의 상재균에 의해 검출이 저해받는 배지법을 개선하기 위해서는 이들의 성장을 낮출 수 있는 새로운 선택 증균법 개발이 시급한 것으로 여겨진다.

요 약

본 연구에서는 편육과 브로콜리 짝에 *Salmonella* 농도를 단계별로 접종하고 배지법, VIDAS®, real-time PCR의 양성 검출률을 비교함으로써 VIDAS®, real-time PCR의 *Salmonella* 검출력을 검증하였으며, 또한 각 식품별로 검출률에 차이가 있는가를 알아보았다. 편육과 브로콜리 짝(500 g)에 3단계 농도(<15, 15-100, 100-1000 CFU/500 g)를 접종하고 20개 샘플로 나눈 후 배지법, VIDAS® *Salmonella* (VIDAS® SLM), real-time PCR법을 시행하여 검출능력을 비교하였다. 편육에서 배지법, VIDAS®, real-time PCR를 이용하여 *Salmonella*를 검출한 결과, 낮은 접종 농도(<15 CFU/500 g)에서도 *Salmonella*가 검출되었고 VIDAS®와 real-time PCR 모두 배지법과 통계학적 유의차가 나타나지 않았다. 반면에 브로콜리 짝을 이용하였을 때 낮은 접종 농도에서는 *Salmonella*가 검출되지 않았으며 VIDAS®와 real-time PCR 모두 배지법보다 더 많은 샘플을 검출하

였다. 따라서 정상 세균총이 많은 야채 식품의 경우 배지법은 경쟁 세균에 의해 검출이 저해되므로 이보다 영향을 덜 받는 VIDAS®법이나 real-time PCR법을 이용하여 검출하는 것이 더 효과적이라고 할 수 있겠다. 또한 이러한 신속 진단법을 이용하면 VIDAS®는 3일, real-time PCR은 1일 이내에 배지법과 같거나 보다 높은 검출률로 *Salmonella*를 검출할 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단(KRF-2006-331-F00051)의 지원과 Brain Korea 21(BK21)사업의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사 드립니다. 또한 실험에 도움을 아끼지 않은 양효진, 이재훈, 천정환, 김윤경에게 감사드립니다.

참고문헌

- Bansal, N. S., Gray, V., and McDonell, F. (2006) Validated PCR assay for the routine detection of *Salmonella* in food. *J. Food Protect.* **69**, 282-287.
- Bohaychuk, V. M., Gensler, G. E., McFall, M. E., King, R. K., and Renter, D. G. (2007) A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. *J. Food Protect.* **70**, 1080-1087.
- Catarama, T. M. G., O'Hanlon, K. A., McDowell, D. A., Blair, I. S., and Duffy, G. (2006) Comparison of a real-time polymerase chain reaction assay with a culture method for the detection of *Salmonella* in retail meat samples. *J. Food Safety* **26**, 1-15.
- Cheung, P. Y., Kwok, K. K., and Kam, K. M. (2007) Application of BAX system, Tecra Unique™ *Salmonella* test, and a conventional culture method for the detection of *Salmonella* in ready-to-eat and raw foods. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 219-227.
- D'Aoust, J. Y., Sewell, A. M., and Warburton, D. W. (1992) A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* **16**, 41-50.
- De Medici, D., Pezzotti, G., Marfoggia, C., Caciolo, D., Foschi, G., and Orefice, L. (1998) Comparison between ICS-VIDAS, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. *Int. J. Food Microbiol.* **45**, 205-210.
- Hein, I., Flekna, G., Krassnig, M., and Wagner, M. (2006) Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *J. Microbiol. Methods* **66**, 538-547.
- Korsak, N., Degeye, J. N., Etienne, G., China, B., and Daube, G. (2004) Comparison of four different methods for *Salmonella* detection in fecal samples of porcine origin. *J. Food Protect.* **67**, 2158-2164.
- <http://fm.kfda.go.kr/>
- Krascenicsova, K., Piknova, L., Kaclikova, E., and Kuchta,

- T. (2008) Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and real-time polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**, 483-487.
11. Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., and Helmuth, R. (2004) Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7046-7052.
12. McMahon, W. A., Schultz, A. M., and Johnson, R. L. (2004) Evaluation of VIDAS *Salmonella* (SLM) immunoassay method with Rappaport-Vassiliadis (RV) medium for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. *J. AOAC Int.* **87**, 867-883.
13. Oliveira, S. D., Rodenbusch, C. R., Ce, M. C., Rocha, S. L. and Canal, C. W. (2003) Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**, 217-221.
14. Shearer, A. E., Strapp, C. M., and Joerger, R. D. (2001) Evaluation of a polymerase chain reaction-based system for detection of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp., and *Listeria monocytogenes* on fresh fruits and vegetables. *J. Food Protect.* **64**, 788-795.
15. Uyttendaele, M., Vanwildemeersch, K., and Debevere, J. (2003) Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 386-391.
16. Walker, R. L., Kinde, H., Anderson, R. J., and Brown, A. E. (2001) Comparison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using Moore swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. *Int. J. Food Microbiol.* **67**, 123-129.
17. Wang, X., Jothikumar, N., and Griffiths, M. W. (2004) 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 Protect.* **67**, 189-192.
18. Yeh, K. S., Tsai, C. E., Chen, S. P., and Liao, C. W. (2002) Comparison between VIDAS automatic enzyme-linked fluorescent immunoassay and culture method for *Salmonella* recovery from pork carcass sponge samples. *J. Food Protect.* **65**, 1656-1659.

(Received 2009.6.4/Revised 2009.7.29/Accepted 2009.8.3)