

해산식품과 채소에서 *Vibrio parahaemolyticus* 검출을 위한 배지배양법과 real-time PCR의 비교검증

천정환 · 현지연 · 황인균¹ · 곽효선¹ · 한정아¹ · 정윤희² · 송광영 · 서건호*
건국대학교 수의과대학, ¹식품의약품안전청 식품미생물팀, ²한국소비자원 시험검사소

Comparison of the Standard Culture Method and Real-time PCR for the Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafoods and Vegetables

Jung-Whan Chon, Ji-Yeon Hyeon, In-Gyun Hwang¹, Hyo-Sun Kwak¹, Jeong-A Han¹, Yun-Hee Chung², Kwang-Young Song, and Kun-Ho Seo*

Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University

¹Food Microbiology Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Korea Food and Drug Administration

²Test and Research Center, Korea Consumer Protection Board

Abstract *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*), which is commonly found in raw seafood, causes gastroenteritis in humans. Rapid and effective methods have been developed as culture methods require up to 5-7 days. In this study, real-time PCR was compared with the standard culture method for detecting *V. parahaemolyticus* in seafood and radish sprout samples. Five hundred grams of the samples were artificially contaminated with *V. parahaemolyticus* then divided into 20 samples. The samples were incubated in alkaline peptone water and then streaked onto thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar. Biochemical tests for suspicious colonies were performed using the API 20NE strip. In parallel, real-time PCR was performed targeting the *toxR* gene using the enrichment broth. The real-time PCR was sensitive in discriminating *V. parahaemolyticus* from other foodborne pathogens. The detection limit of the real-time PCR was 10³ CFU/mL in phosphate-buffered saline. Although the real-time PCR detected more positive samples (76 out of 180, 42%) than the culture method (66 out of 180, 37%), there was no significant statistical difference ($p>0.05$) between the two methods. In conclusion, real-time PCR assays could be an alternative to the standard culture method for detecting *V. parahaemolyticus* in seafood and radish sprouts, which has many advantages in terms of detection time, labor, and sensitivity.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, real-time PCR, culture method, comparison

서 론

Vibrio parahaemolyticus (*V. parahaemolyticus*)는 해수에서 서식하는 그람음성의 호염성 간균으로 일본 및 동남아시아와 더불어 국내에서 빈번한 식중독을 일으킨다(1,2). *V. parahaemolyticus*에 의한 식중독은 주로 수온이 높은 여름철에 어패류나 갑각류 등의 해산물을 날것으로 혹은 부적절하게 조리하여 섭취하는 경우 발생하며(3,4) 조리기구 및 해산물과 함께 섭취되는 채소류 등에서 교차오염 되는 경우도 있다(5,6). 보통 수온이 높은 여름에서 가을에 걸쳐 발생하는데 국내의 경우 해산물에서 *V. parahaemolyticus*의 오염도와 식중독 발생율은 살모넬라, 황색포도상구균 등과 함께 매우 높은 수준으로 알려져 있다. 실제로 2008년 장염비브리오의 발생건수는 24건으로 전체 세균성 식중독 발생건수 중 가

장 높은 비율을 차지했다(7). 광어나 우럭, 굴 등의 어패류를 날 것으로 섭취하는 한국인의 특성을 고려할 때, 이러한 해산식품과 교차오염의 가능성이 있는 신선야채류 내의 *V. parahaemolyticus*의 빠르고 정확한 검출은 식품위생 및 공중보건의 측면에서 매우 중요하다.

현재 *V. parahaemolyticus*는 국내 모든 식품에서 불검출기준이며(8) 표준검출법인 배지배양법을 표준으로 하여 검출하고 있다. Alkaline peptone water(APW)를 증균배지로 thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar(TCBS)를 선택배지로 사용하는 배지배양법은 증균배양, 선택배양, 생화학적 동정을 포함하여 5-7일 가량의 긴 기간이 소요되고 노동력의 소모가 많으며 실제 병원성이 있는 *V. parahaemolyticus*를 검출하기 위해서는 추가적인 확인시험이 필요하다. 따라서 배지배양법의 이러한 단점을 보완할만한 빠르고 신속한 검출기법의 개발이 지속적으로 이루어졌으며 실제로 많은 검출방법들이 소개되었다(9). 그 중 목적하는 유전자를 증폭시켜 검출하는 PCR법이 현재 널리 사용되고 있는데, 형광의 발현량을 통해 PCR의 증폭산물을 실시간으로 측정하여 목적하는 유전자를 검출하는 real-time PCR기법은 정성검출은 물론 정량검출까지 가능한 최신검출기법으로서(10) 증균과정을 포함하여 24시간 내에 *V. parahaemolyticus*의 검출이 가능하고 일반 PCR과는 달리 전기영동 과정을 요하지 않아 노동력을 크게 절감시킬 수 있다.

*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

Received December 24, 2009; revised February 17, 2010;

accepted February 18, 2010

특히 real-time PCR은 독소유전자를 이용해서 병원성 장염비브리오만을 선택적으로 검출할 수 있는 장점이 있다(11). *V. parahaemolyticus*가 식중독을 일으키기 위해서는 thermo-stable direct hemolysin(TDH)이나 TDH-related hemolysin(TRH) 같은 식중독 유발 독소가 있어야하는데(12,13) 실제 식품이나 환경에서 검출되는 장염비브리오 중 이러한 독소를 가지고 있는 균은 1% 미만에 불과하다(14-16). 배지배양법에서는 병원성 *V. parahaemolyticus*만을 선택적으로 검출할 경우 확인동정 이후에도 추가적인 독소검출시험이 필요하지만, multiplex real-time PCR 기법을 이용하면 TDH와 TRH의 독소 유전자인 *tdh* 유전자와 *trh* 유전자를 가진 병원성 장염비브리오만을 선택적으로 검출가능하며(11) 이러한 방법은 KAP-RPLA나 ELISA를 이용한 독소검출에 비해 높은 민감도를 지니고 있는 것으로 알려져 있다(17,18).

Real-time PCR을 통한 장염비브리오의 검출은 효율성과 감도가 좋은 우수한 검출기법으로 사료되나 실제 식품에서 배지배양법에 비교하여 검출능력과 검출감도가 어느 정도인지에 대해서는 정확한 비교검증이 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 real-time PCR과 표준검출법으로 사용되고 있는 배지배양법을 비교검증하여 실제 식품에서 real-time PCR의 검출감도와 검출효율을 평가하였다. 식품의 성장과 정상세균총의 수준이 다른 다양한 식품샘플에 대해 실험하였으며, 두 방법간의 정확한 통계학적 차이를 분석하기 위해 총 20개의 샘플 중에서 부분양성과 부분음성이 나와 양성검출율의 차이를 비교할 수 있도록 실험을 설계하였다.

재료 및 방법

실험에 사용된 균주

*V. parahaemolyticus*는 한국소비자원으로부터 분양 받아 실험실에서 보유하고 있던 식품분리 균주를 사용하였으며 -70°C 에 보관하여 필요할 때마다 균주를 해동하여 사용하였다. *V. parahaemolyticus*는 3%의 NaCl이 포함되어있는 nutrient agar(NA, Difco, Sparks, MD, USA)에 도말하여 37°C 에서 20-22시간 배양하였다. 배양된 집락 중 하나의 집락을 선택하여 3% NaCl이 포함된 tryptic soy broth(Difco)에 증균배양하였고, 2번 계대배양한 균액을 사용하였다.

식품샘플의 선정 및 접종

네 종류의 해산물과 한 종류의 채소류에 대해 실험을 실시하였다. 사용된 해산물 샘플은 패류에서는 굴과 홍합, 갑각류에서는 새우살, 어류에서는 연어가 사용되었다. 해산물은 걸썩데기를 벗겨낸 가공된 해산물을 사용하였고, 해수소독 등의 방법으로 해산물을 위생적으로 취급하는 대형마트에서 모든 샘플을 구입하여 자연오염의 가능성을 배제하였다. 채소식품은 일식이나 샐러드 등을 통해 해산물과 함께 조리 및 섭취되어 교차감염 가능성이 높은 무순(radish sprouts)을 샘플로 함께 선정하였다. 접종량은 두 방법간의 유의차를 통계학적으로 비교하기 위해 20개의 샘플이 부분적인 양성과 음성이 나오는 것을 목표로 하였으며 각각의 샘플당 1-2회의 실험을 실시하였다. 실험회차 당 총 550g의 샘플이 사용되었으며, 500g의 bulk 샘플에 목적하는 양의 *V. parahaemolyticus*를 접종한 후 균이 고르게 분포되도록 손으로 적절히 균질화 해주었다. 음성 및 양성대조균은 각각 25 g씩 선정하여 음성은 1 mL의 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)를 접종하였고 양성에는 10^6 CFU/mL 이상의 균을 접종하였다. 접종이 끝난 샘플은 4°C 에서 18-24시간 동안 보관하여 실제 식품샘

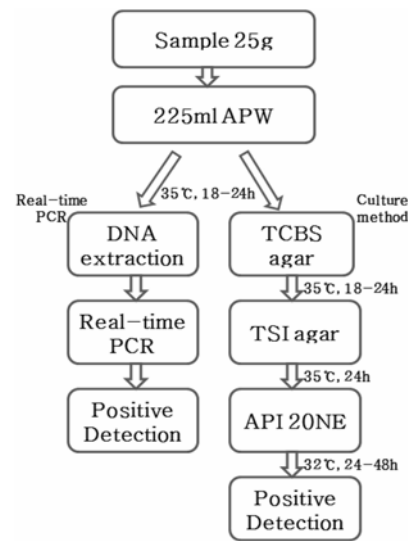


Fig. 1. Flow chart of standard culture method and real-time PCR for detection for *V. parahaemolyticus*.

플과 유사하도록 안정화 과정을 거쳤다. 식품접종과 동시에 접종량과 동일한 균량을 3% NaCl이 첨가된 NA에 접종하여 실제 식품샘플에 어느 정도의 균량이 접종되었는지 확인하였다. 3% NaCl이 첨가된 NA에 접종된 균은 35°C 에서 18-24시간 배양 후 집락의 수를 계수하여 실제 식품에 접종된 균량을 산정하였다.

정상세균총의 측정

식품내에 원래부터 존재하고 있던 정상세균총이 증균과정에서 *V. parahaemolyticus*와 경쟁적으로 성장하여 목적균의 성장 및 검출에 영향을 줄 수 있다는 Hyeon 등(19)의 연구를 참조하여 정상세균총의 영향을 적절히 평가하기 위해 샘플로 사용된 해산식품 및 채소 25g의 정상세균총을 측정하였다. 균이 접종되지 않은 25g의 샘플을 stomacher bag에 225 mL buffered peptone water와 함께 넣은 후 bagmixer(Interscience, St Nom, France)를 이용하여 30초간 균질화 시켜주었다. 균질화가 끝난 후, 즉시 100 μL 를 뽑아서 10진 희석법으로 단계별 희석하여 NA배지에 접종하여 37°C 에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 집락을 계수하여 식품에 존재하는 정상세균총의 수준을 산정하였다.

예비증균과정

안정화가 끝난 500g의 샘플은 20개로 나누어 stomacher bag에 담은 후 각각 비닐백에 225 mL의 alkaline pepton water(Oxoid, Hampshire, UK)를 넣어 stomacher을 이용하여 30초간 균질화 시켰다. 양성과 음성대조균도 동일한 과정을 거쳤으며 균질화 시킨 샘플은 35°C 에서 18-24시간 동안 증균배양하였다.

선택배양 및 확정동정

APW에서 증균배양이 끝난 샘플에서 선택배지를 이용한 배지배양법과 real-time PCR로 *V. parahaemolyticus*를 검출하였다(Fig. 1).

증균배양 후 APW배지의 균액을 thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar(Oxoid)에 일회용 루프를 사용하여 획선도말(streaking)하여 35°C 에서 18-24시간 동안 선택배양하였다. 배양이 끝난 후, 2-4 mm의 진한 청록색의 집락을 보이는 의심집락 1-3개를 선별하였다. 진한 초록색으로 나온 단일집락을 triple sugar iron(TSI,

Difco) 사면배지에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 TSI 배지를 관찰하여 사면부분이 빨간색, 고층부분이 노란색을 보이며, 가스와 H₂S를 생성하지 않는 경우, 해당집락에 대하여 API 20NE strip(BioMérieuxsa, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 생화학적 테스트를 실시하였다. API 20NE strip은 제조자의 매뉴얼대로 31-32°C에서 24-48시간 배양 후 동정결과를 확인하였다.

DNA 추출

APW에서 증균배양이 끝난 샘플에서 1 mL을 채취하여 DNA를 추출하였으며 DNA 추출과정은 Seo 등(20)의 연구에서 사용된 방법을 참조하였다. 각 샘플에서 채취한 1 mL의 배지액을 14,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 상층액을 버리고 PrepMan Ultra reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA) 200 µL를 혼합한 후 남아 있는 고형물(pellet)이 적절히 파쇄될 수 있도록 10초 이상 vortexing을 실시하였다. 뒤이어 100°C의 물에서 10분간 가열해준 후, 2분간 상온에서 식히고 14,000 rpm으로 3분간 다시 원심분리 하였다. 원심분리가 끝난 샘플의 상층액을 새로운 튜브에 따로 담아 real-time PCR을 수행할 샘플 DNA로 사용하였다.

Real-time PCR

종 단위(species-level)까지 검출이 가능하도록 모든 *V. parahaemolyticus*에 존재하는 toxin regulatory gene인 *toxR* 유전자 (GenBank accession number AY527396)를 타겟으로 하여 primer와 probe를 제작하여 사용하였다. Primers/probe set의 서열은 Primer Express 3.0 software(Applied Biosystems)를 사용하여 제작하였으며 미국 NCBI사이트(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)에서 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)를 통해 검증하였다. Forward primer는 GAG CCA GCT TCT GAT AAC AAT GAC, reverse primer는 CTT CTG GTT CAA CGA TTG CG, Probe는 5'-6-FAM-TAC TAA TGA GGT AGA AAC GAT-MGBNFQ-3'를 사용하였다. 반응액의 조성은 TaqMan® universal PCR master mix(Applied Biosystems) 12.5 µL, forward and reverse primer(900 nM) 각각 2.5 µL, probe(250 nM) 2.5 µL, 샘플 DNA 5 µL로 총량을 25 µL로 하였다. ABI PRISM 7500HT sequence detection system(Applied Biosystems)을 사용하여 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 반응시킨 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분을 1회로 반응조건을 맞추어 40 cycles를 반응시켰다.

Real-time PCR의 특이도와 검출한계설정

자체 제작된 primers/probe set를 이용하여 특이도와 검출한계를 측정하였다. 8개의 *V. parahaemolyticus*와 9개의 *V. parahaemolyticus*가 아닌 균주에서 real-time PCR을 실시하여 특이도를 측정하였으며 특이도 검증을 위한 모든 식중독균 균주는 -70°C 보관되어 있던 실험실 보유균주를 해동하여 사용하였다. 검출한계는 위에서 언급된 방법으로 균수를 측정하여 1.66×10⁷ CFU/mL 수준으로 균수가 미리 측정된 순수배양균액을 사용하여 측정되었다. 순수배양균액의 DNA를 추출한 후, 추출된 DNA중 5 µL를 45 µL의 PBS에 10진 희석법으로 희석하여 1.66×10⁷ CFU/mL 수준부터 1.66×10⁰ CFU/mL까지 real-time PCR을 시행하여 검출한계를 측정하였다.

자료의 분석

배지배양법과 real-time PCR과의 검출을 차이분석은 통계프로그램인 GraphPad Instat(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하였으며 Fisher's exact test로 통계학적인 유의

Table 1. Specificity of the real-time PCR

Reference strain	Strain no.	Reaction	Source ¹⁾
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	+	KFRI
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 33844	+	KFRI
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 41664	+	KFRI
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CPBS1	+	KCA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CPBS2	+	KCA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CPBS4	+	KCA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CPBS5	+	KCA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CPBS6	+	KCA
<i>Vibrio cholera</i>	SV1	-	SIHE
<i>Vibrio vulnificus</i>	SV8	-	SIHE
<i>Staphylococcus aureus</i>	3390H	-	U.S. FDA
<i>Campylobacter jejuni</i>	KCD3	-	KCDC
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 3624	-	KFDA
<i>Listeria monocytogens</i>	G3982	-	U.S. FDA
<i>Chronobacter sakazakii</i>	SMA13	-	U.S. FDA
<i>E.coli</i> O157:H7	HB101	-	U.S. FDA
<i>Salomonella typhimurium</i>	16	-	U.S. FDA

¹⁾KFRI, Korea Food Research Institute, Sung-Nam; KCA, Korea Consumer Agency, Seoul; SIHE, Research Institute of Public Health & Environment, Seoul; U.S. FDA, U.S. Food and Drug Administration, College Park, MD.; KCDC, Korean Centers for Disease Control and Prevention, Seoul; KFDA, Korea Food and Drug Administration, Seoul

Table 2. Number of cycles required for detecting various populations of *V. parahaemolyticus* in phosphate-buffered saline

No. of cells (CFU/mL)	Threshold cycle no.
1.66×10 ⁷	22.74
1.66×10 ⁶	26.06
1.66×10 ⁵	30.08
1.66×10 ⁴	33.35
1.66×10 ³	36.81
1.66×10 ²	ND ¹⁾
1.66×10 ¹	ND
1.66×10 ⁰	ND
Negative control	ND

¹⁾ND: Not detected

차(*p*<0.05)를 분석하였다. 검출율의 차이의 통계학적 유의차를 전체 및 각 실험회차별로 비교하였다.

결과 및 고찰

Primers/probe set의 특이도 및 검출한계

Primers/probe set는 종 특이적인 *toxR*유전자를 타겟으로 제작되었다. Table 1에 제시된 것처럼 8개의 *V. parahaemolyticus*에서는 양성을 나타내고 9개의 non-*V. parahaemolyticus* 균주에서는 음성을 나타내어 제작된 primer와 probe가 *V. parahaemolyticus*의 검출에 적합함을 확인하였다.

균수가 측정된 순수 배양균액의 genomic DNA를 PBS로 10진 희석한 후, real-time PCR을 실시하여 각 단계별 농도에서 Ct값을 측정하였다. 측정된 Ct값은 Table 2에 제시되어 있으며 검출 가능한 한계농도는 10³ CFU/mL 수준으로 나타났다. 해당 검출한계는 증균을 거치는 정성실험에서 활용가능할 것으로 보이며 정

Table 3. Comparison of the numbers of *V. parahaemolyticus* positive samples between a standard culture method and real-time PCR in artificially inoculated seafoods and vegetable

Sample	Background flora ¹⁾	Inoculum level (CFU/500 g)	Culture method ²⁾	Real-time PCR ²⁾	<i>p</i> value ³⁾
Salmon	0	4	4/20	6/20	0.7164
		29	17/20	17/20	1.3386
Mussel	3.3	12	9/20	7/20	0.7475
		30	14/20	14/20	1.2689
Oyster	3.8	32	7/20	8/20	1.0000
Shrimp	4.7	16	5/20	10/20	0.1908
		24	2/20	2/20	1.3950
Radish sprout	7.5	1076	5/20	7/20	0.7311
		2284	3/20	5/20	0.6948
Total	-		66/180	76/180	0.3318

¹⁾Each value is the mean log CFU/g from 2 trials

²⁾Number of positive samples/tested total samples

³⁾There is statistical difference between two methods if the *p* value is less than 0.05

량실험에서의 활용여부에 대해서는 추가적인 정량평가 실험이 필요할 것으로 보인다.

증균과정에서 식품샘플 내 정상세균총의 수준과 영향

Table 3에는 각 샘플의 정상세균총의 수준과 샘플에 따른 접종량이 제시되어 있다. 해산물과 야채는 정상세균총과 접종량에서 차이를 보였으며 야채에서 정상세균총과 접종량이 더 높은 경향을 보였다. 연어, 홍합, 굴, 새우 등 해산물의 경우는 모든 샘플이 10^5 CFU/g 이하의 정상세균총 수준을 보였으나 무순에서는 10^7 CFU/g 이상으로 나타나 무순이 해산물에 비해 100배 이상 높은 수준의 정상세균총을 가지고 있음을 확인하였다. 무순은 다양하고 높은 수준의 토양세균을 갖고 있기 때문에 해산물에 비해 정상세균총이 높았던 것으로 보인다. 정상세균총이 높은 무순의 경우는 부분음성/부분양성을 보이기 위한 접종량도 해산물에 비해 훨씬 높았는데, 해산물의 경우에는 접종량이 4-32 CFU/500 g 수준이었으나 무순에서는 1,076-2,284 CFU/500 g 수준이었다(Table 3). 이는 무순의 경우 높은 수준의 균을 접종했어도 증균과정에서 정상세균총에 의해 목적균의 성장이 저해되었기 때문으로 보이며 이러한 결과는 높은 수준의 정상세균총이 목적균의 성장을 억제할 수 있다는 Hyeon 등(19)이나 Vold 등(21)의 연구결과와 일치한다. 결론적으로 실제 식품에서 무순 같이 정상세균총의 수준이 높은 식품의 경우에는 목적균의 수가 적으면 위음성의 결과를 보일 수도 있다. *V. parahaemolyticus*는 고염도에서도 생존이 가능하므로(13) 정상세균총의 수준이 높은 식품샘플의 경우 보통 염도가 2%인 APW의 염도를 높여주어 정상세균총을 더 효과적으로 배제하는 것이 필요할 것으로 보인다.

Real-time PCR과 배지배양법의 검출능력비교

본 연구에서 사용된 샘플의 음성과 양성대조군은 배지배양법과 real-time PCR에서 결과가 모두 음성과 양성으로 나타나 사용된 샘플 및 실험방법이 적합했음을 입증하였다. 특히 음성대조군이 적절하게 나왔으므로 사용된 식품들은 자연적으로 오염된 샘플이 없었고 위양성의 가능성도 배제되었다.

각 샘플에서의 배지배양법과 real-time PCR 검출율의 차이는 Table 3에서 비교되었다. 각 실험은 샘플당 1-2회에 걸쳐 실시되었으며 통계학적 비교를 위해 20개의 샘플 중 부분양성과 부분

음성이 나오는 것을 목표로 접종량을 설정하였다. 배지배양법에서는 총 180개의 샘플 중 총 66개가 양성을 보였고, real-time PCR에서는 180개중 76개의 양성을 보여 real-time PCR이 배지배양법에 비해 더 많은 양성을 검출했으나 두 방법간의 *p* value는 0.3318로 통계학적인 유의차($p < 0.05$)는 보이지 않았다. 각각의 샘플별로 살펴보면 연어, 굴, 새우살, 무순에서는 real-time PCR에서 더 많은 양성이 검출되었고, 홍합에서는 배지배양법이 더 많은 양성을 검출했다. 샘플과 회차별로 검출율의 차이는 다소 있었으나 통계학적 유의차를 보이지 않았다(Table 3). 이러한 연구 결과를 종합하여 볼 때, real-time PCR은 *V. parahaemolyticus*의 검출에 있어서 식품의 성상이나 정상세균총의 수에 관계없이 표준검출법인 배지배양법과 동등하거나 더 우수한 검출민감도를 가진 기법으로 사료된다. 이는 육류 및 우유샘플에서 real-time PCR과 배지배양법을 이용한 *Salmonella* spp. 검출에 있어서 real-time PCR법이 100%의 높은 민감도와 특이도를 보인 Malorny 등(22)의 연구결과와 일치한다.

Hyeon 등(19)의 연구에서는 정상세균총의 수가 많을수록 real-time PCR법이 배지배양법과 비교해 훨씬 높은 민감도를 보였으나 본 실험에서는 정상세균총의 수준이 높은 식품에서도 두 방법간에 통계학적 유의차를 보이지 않았다. 이는 현재 표준배지배양법에서 가장 널리 사용되고 있는 TCBS 배지의 선택성이 전반적으로 좋지 때문으로 보인다(23,24). 하지만 무순과 새우샘플과 같이 정상세균총이 다른 샘플에 비해 높았던 경우에, TCBS 배지상에서 2-4 mm의 짙은 초록색의 양성시집락이 확인동정에서는 음성으로 나오는 경우가 많았다. 이는 Bottone 등(25)의 연구에서 언급되었듯이 *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas* species 등이 TCBS 배지상에서 *V. parahaemolyticus*와 유사한 청록색의 집락을 보여, 양성집락구분에 혼동을 주었기 때문으로 보인다. 이러한 경우, TCBS 배지에 염도를 추가하여 선택성을 강화한다면 *V. parahaemolyticus*를 더 효과적으로 검출할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 신속하고 정확한 TaqMan® real-time PCR을 이용한 *V. parahaemolyticus*의 검출을 통해 real-time PCR이 표준검출기법으로 사용되는 배지배양법과 비교하여 어느 정도의 검출능력을 지니는지 알기 위해 두 방법간의 비교검증을 시도하였다. 두 방법은 성상이 다른 여러가지 해산식품 및 채소에서 비교되

었으며, 정상세균총을 함께 측정하여 정상세균총이 검출율에 영향을 줄 수 있는지를 살펴보았다. 연구결과, 해산식품 및 채소에서 *V. parahaemolyticus* 검출 시 real-time PCR이 배지배양법에 비해 동등하거나 우수한 검출감도를 지닌 검출법이라는 사실을 확인하였다. 또한 식품 내 존재하는 정상세균총은 증균배양에서 *V. parahaemolyticus*의 성장을 저해하나 선택배지와 real-time PCR을 활용한 검출에는 큰 영향을 미치지 않은 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 *toxR* 유전자를 타겟 유전자로 primer/probe set를 합성하여 사용하였는데, 사용된 primer/probe set는 10³ CFU/mL 수준까지 *V. parahaemolyticus*의 검출이 가능하여 증균된 세균의 검출에 적합함을 확인하였다. 결론적으로 real-time PCR은 여러 가지 식품 내 *V. parahaemolyticus*의 검출에 있어 표준검출법인 배지배양법에 앞서 음성샘플을 신속하게 배제 할 수 있는 선별 검사에 사용하기에 적합할 것으로 판단된다.

요 약

*V. parahaemolyticus*는 국내에서 여름과 가을철에 걸쳐 발생되며 생선이나 패류 등의 해산식품을 날것으로 섭취하거나 불완전하게 익혀 먹을 경우 식중독을 일으키는 병원균이다. 본 연구의 목적은 표준 검출기법인 배지배양법을 이용한 *V. parahaemolyticus*의 검출과 real-time PCR을 이용한 *V. parahaemolyticus*의 검출에 있어서 그 유효성과 효율성을 검증하는 것이다. *V. parahaemolyticus*의 발생기록과 발생가능성이 있는 여러 해산식품과 무순에 적절한 균량을 접종하고 APW로 증균배양하였다. 증균배양이 끝난 후 TCBS선택배지에 배양액을 희석도말하고, 동시에 증균배양액에서 1 mL을 채취하여 real-time PCR을 실시하였다. TCBS에서 초록색이 나온 집락의 1-3개 선별하여 TSI 배지에 접종하여 screening test를 거친 후 API 20NE strip을 사용하여 확인동정하였다. 또한 정상세균총이 목적균의 성장과 검출에 어느 정도의 영향을 미치는지 평가하기 위하여 25 g의 식품 내 정상세균총의 수준을 함께 측정하였다. 실험결과, 자체 제작한 real-time PCR 서열은 *V. parahaemolyticus*를 특이적으로 검출할 수 있었고 검출 한계는 PBS에서 10³ CFU/mL 였다. 또한, 식품 내 정상세균총이 높을 경우 증균배양 시 목적균의 성장에 영향을 미칠 수 있다는 것을 확인하였다. Real-time PCR은 180개의 전체 샘플 중 76개의 양성 결과를 보여 66개의 양성 결과를 낸 배지배양법에 비해 더 많은 양성 검출율을 보였으나 통계학적인 유의차는 발견되지 않았다. Real-time PCR은 표준검출법인 배지배양법과 비교해 볼 때 동등하거나 우수한 검출력을 지닌 것으로 보이며 이러한 real-time PCR법은 24시간 이내에 확정동정까지 가능하여 시간과 노동력의 소모가 많은 배지배양법에 앞서 선별검사로 사용할 경우 시간, 비용, 노동력 절감에 매우 유효할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 식약청 용역사업(08072식품안060)의 연구비지원과 Brain Korea 21(BK21) 사업의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다. 또한 실험에 도움을 아끼지 않은 이재훈, 김윤경, 김선영, 박준호, 성장현에게 감사드립니다.

문 헌

1. Joseph SW, Cowell RR, Kaper JB. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. Crit. Rev. Microbiol. 10: 77-123 (1983)

2. Su YC, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food Microbiol. 24: 549-558 (2007)

3. Morris JG. Cholera and other types of vibriosis: A story of human pandemics and oysters on the half shell. Clin. Infect. Dis. 37: 272-280 (2003)

4. DePaola A, Hopkin LH, Peeler JT, Wentz B, McPhearson RM. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters and oysters. Appl. Environ. Microb. 56: 2299-2302(1990)

5. Jung SH, Hur MJ, Ju JH, Kim KA, Oh SS, Go JM, Kim YH, Im JS. Microbiological evaluation of raw vegetables. J. Food Hyg. Safety, 21: 250-257 (2006)

6. Kim MH, Shin WS. Microbiological quality of raw and cooked foods in middle and high school food service establishments. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37: 1343-1356 (2008)

7. Korea Food and Drug Administration. Food & Drug Statistical Yearbook for 2009. Available from <http://www.kfda.go.kr/index.kfda?mid=96&pageNo=1&seq=7181&cmd=v>, Accessed Nov. 10, 2009.

8. Korea Food and Drug Administration. Food code. Available from http://safefood.kfda.go.kr/RS/food_menu.jsp, Accessed Nov. 21, 2009.

9. Ward LN, Bej AK. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiples real-time PCR with TaqMan[®] fluorescent probes. Appl. Environ Microb. 72: 2031-2042 (2006)

10. Yang C, Jiang Y, Huang K, Zhu C, Yin Y. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk, and environmental water. FEMS Immunol Med Mic. 38: 265-271 (2003)

11. Nordstrom JL, Vickery MC, Blackstone GM, Murray SL, DePaola A. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. Appl. Environ Microb. 73: 5840-5847 (2007)

12. Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related hemolysins. Rev. Med. Microbiol. 4: 106-113 (1993)

13. Hondo S, Goto I, Minematsu I, Ikeda N, Asano N, Ishibashi M, Kinoshita Y, Nishibuchi N, Honda T, Miwatani T. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. Lancet 1: 331-332 (1987)

14. Dileep V, Kumar HS, Kumar Y, Nishibuchi M, Karunasagar I, Karunasagar I. Application of polymerase chain reaction for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment. Lett. Appl. Microbiol. 36: 423-427 (2003)

15. Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *tox R* gene. J. Clin. Microbiol. 37: 1173-1177(1999)

16. Thompson CA, Vanderzant C. Serological and hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from marine sources. J. Food Sci. 41: 150-151(1976)

17. Kawatsu K, Ishibashi M, Tsukamoto T. Development and evaluation of a rapid, simple, and sensitive immunochromatographic assay to detect thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* in enrichment cultures of stool specimens. J. Clin. Microbiol. 44: 1821-1827 (2006)

18. Blackstone GM, Nordstrom JL, Vickery MC, Bowen MD, Meyer RF, DePaola A. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichment by real-time PCR. J. Microbiol. Methods 53: 149-155 (2003)

19. Hyeon JY, Hwang IG, Kaw HS, Park JS, Heo S, Choi IS, Park CK, Seo KH. Evaluation of an automated ELISA 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. Anim. Resour. 29: 506-512 (2009)

20. Seo KH, Brackett RE. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. J. Food Protect. 68: 59-63 (2005)

21. Vold L, Holck A, Wasteson Y, Nissen H. High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. Int. J. Food Microbiol, 56: 219-225 (2000)

22. Malorny B, Paccassoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, Helmuth R. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ Microb.* 70: 7064-7052 (2004)
23. Bolinches J, Romalde JL, Toranzo AE. Evaluation of selective media for isolation and enumeration of *vibrios* from estrarine waters. *J. Microbiol. Meth.* 8: 151-160 (1988)
24. Alam MJ, Tomochika K, Miyoshi S, Shinoda S. Analysis of seawaters for the recovery of culturable *Vibrio parahaemolyticus* and some other vibrios. *Microbiol. Immunol.* 45: 393-397 (2001)
25. Bottone EJ, Robin T. *Vibrio parahaemolyticus*: Suspicion of presence based on aberrant biochemical and morphological features. *J. Clin. Microbiol.* 8: 760-763 (1978)