

가공식품과 비가공식품에서의 황색포도상구균 검출을 위한 배지법과 Real-time PCR법의 비교

이재훈 · 송광영 · 현지연 · 황인균¹ · 곽효선¹ · 한정아¹ · 정윤희² · 서건호*

건국대학교 수의과대학, ¹식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 ²한국소비자원

Comparison of Standard Culture Method and Real-time PCR Assay for Detection of *Staphylococcus aureus* in Processed and Unprocessed Foods

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

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

¹Korea Food and Drug Administration, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul 122-704, Korea

²Korea Consumer Agency, Seoul 137-700, Korea

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the major pathogens that can cause staphylococcal infection and food poisoning. In this study, we compared conventional culture methods and real-time PCR for detection of *S. aureus* in artificially inoculated milk, sausage, raw pork, and vegetable salad. The performance of a coagulase test for confirming *S. aureus* was also compared with a colony PCR test. Bulk food samples (500 g each) were artificially inoculated with *S. aureus* and divided into 20 samples (25 g or mL each). All samples were added to tryptic soy broth (225 mL/sample) with 10% NaCl and incubated at 37°C for 24 h. After the enrichment, broth cultures were streaked onto Baird-Parker (BP) agar with egg yolk tellulite, and incubated at 37°C for 24 h. In addition, 1 mL of broth cultures was collected to perform real-time PCR. Two suspicious colonies from the BP agar were picked up and plated on nutrient agar and incubated at 37°C for 24 h followed, by a coagulase confirmation test and a colony PCR analysis. There were no statistical differences between culture methods and real-time PCR in food samples with low background microflora, such as milk and sausage. However, a significant statistical difference was found between the culture methods and real-time PCR for raw pork and vegetable salad. Furthermore, the colony PCR test of the presumptive colonies on BP agar for confirming *S. aureus* is more accurate and efficient than the coagulase test for unprocessed foods.

Key words: standard culture methods, real-time PCR, foods

서 론

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 세계적으로 널리 알려진 식중독균 중 하나이며 사람과 동물에게 화농성 질환 및 위장관계 질환을 일으키는 대표적인 원인균이다 (Alarcon *et al.*, 2006). 이 균은 일반적으로 환경에 저항성이 강하여 건강한 성인의 비강, 피부, 구강 등에서도 존재하며 자연계에도 널리 분포되어 있어 동물의 상처부위를 통한 전염이나 식품을 취급하는 사람을 통해 식품을 오염

시킬 기회가 많다(Moon *et al.*, 2004). 특히 식품에 오염된 황색포도상구균은 내열성의 장독소(enterotoxin)를 생성하여 구토, 설사, 위경련 등의 증상을 동반하는 독소형 식중독을 일으킨다(Rall *et al.*, 2008).

한국식품의약품안전청(KFDA)에서 발표한 한국의 2003-2007년 식중독 발생 통계에 따르면 황색포도상구균에 의한 연간 식중독 발생률은 노로 바이러스와 살모넬라, 병원성 대장균과 더불어 꾸준히 높은 수치를 나타내었으며 매년 완만한 식중독 발생 증가양상을 보이고 있다(<http://www.foodnara.go.kr>). 이러한 황색포도상구균 식중독 원인 식품은 어패류, 가공식품, 야채류, 곡류 등으로 다양하게 보고되고 있으며 특히 육제품(가공육, 돈육, 우육)과 우유, 치즈, 크림 등의 유제품에서의 황색포도상구균 식중독 발

*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: bractstu3@konkuk.ac.kr

생 보고도 꾸준히 이루어지고 있다(<http://www.foodnara.go.kr>). 2007년 오스트리아에서의 식중독 발생 보고에 따르면 황색포도상구균 식중독 감염식품의 20% 이상을 육제품과 유제품이 차지하였으며(Much *et al.*, 2009) 한국에서도 2007년에 육류 및 가공품에서 40건 이상의 황색포도상구균 식중독 발생이 보고되어 축산식품에서의 황색포도상구균 관리가 중요한 문제로 인식되고 있다(<http://www.foodnara.go.kr>).

식중독 발생의 주요 원인균인 황색포도상구균에 의한 식중독 발생 예방과 식중독 발생시 신속한 검사 및 역학조사를 위해 식중독 발생 식품에서 황색포도상구균을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 여러 가지 방법이 있는데 현재 한국식품의약품안전청의 식품공전 및 미국식품의약품안전청의 BAM에 등재된 표준 시험법은 증균 배양과 선택배지를 이용한 방법이다. 그러나 표준 시험법인 배지법은 여러 배양단계와 생화학적 확인검사를 거쳐야 하므로 결과를 얻기까지 많은 시간과 노동력이 소요되며 위양성이나 위음성의 결과를 얻을 수 있는 단점이 있다(Palomares *et al.*, 2003). 황색포도상구균은 일반적으로 mannitol 분해능, coagulase 생성능, enterotoxin 생성능, thermonuclease 생성능력을 가지고 있어서 이러한 여러 가지 특징들이 표준 시험법에 사용되고 있으며 그 중에서 특히 coagulase 확인시험은 최종적으로 황색포도상구균을 감별하는데 널리 사용되고 있다(Palomares *et al.*, 2003). 그러나 coagulase는 *Staphylococcus anaerobius*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphini* 등에서도 생성되며 이러한 균주들이 식품에서 분리된 보고도 있기 때문에 coagulase 확인시험을 사용하는 표준시험법의 확인방법은 오인된 결과를 나타낼 수 있는 가능성이 있다(Ellender *et al.*, 1995; Marin *et al.*, 1992).

따라서 이러한 표준 시험법을 개선하고 보완하기 위한 추가적인 검출법이 요구되는 실정이며 실제로 식중독균의 신속하고 정확한 검출을 위하여 면역 기법이나 유전자 기법을 활용한 검출법의 활용이 증가하고 있다(Han *et al.*, 2008). 여러 진단기법 중 특히 real-time PCR법을 이용한 시험법이 신속하고 효과적인 방법으로 알려져 있는데 이 방법은 PCR 증폭과정을 실시간으로 모니터링 할 수 있고 추가적인 전기영동 확인과정이 필요 없어 노동력이 적게 들고 신속하며 정성시험과 정량시험이 모두 가능하다. 따라서 식중독균 검출에 있어서 신속하게 양성유무를 판단

하는 presumptive screening 방법으로 사용될 뿐만 아니라 선택배지의 의심 집락에 대한 PCR 확인 동정 방법인 colony PCR법에 효과적으로 사용될 수 있어서 그 이용이 기하급수적으로 증가되고 있는 실정이다(Alarcon *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2008).

이러한 Real-time PCR법을 통한 황색포도상구균 검출에는 몇 가지의 특정 표적 유전자(target gene)가 사용되는 것으로 보고되고 있는데 coagulase 유전자(*coa*)와 내열성 유전자인 extracellular thermostable nuclease 유전자(*nuc*), 그리고 황색포도상구균에만 종 특이적으로 존재하는 cytoplasmic protein 유전자(*femA*) 등이 있다(Riyaz-UI-Hassan *et al.*, 2008, Suarez *et al.*, 2008). 이 중에서 *femA* 유전자는 coagulase 양성 황색포도상구균은 모두 가지고 있기 때문에 이 유전자를 마커로 사용하여 황색포도상구균만을 정확하게 검출할 수 있다(Riyaz-UI-Hassan *et al.*, 2008).

이에 본 연구에서는 상재균의 수준이 각기 다른 축산 가공식품과 비가공식품에서 황색포도상구균의 검출을 위해 표준 시험법인 배지법과 *femA* 유전자를 표적 유전자로 사용하여 24시간 이내에 검출이 가능한 real-time PCR법을 개발하여 검출도를 평가하고 배지법에서 사용되는 황색포도상구균 coagulase 확인시험과 real-time PCR법을 활용한 colony PCR 시험법을 비교하여 두 방법간의 균 동정 능력을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

Real-time PCR법에 사용된 primer and probe 제작

Real-time PCR법에 사용된 primer와 probe서열은 황색포도상구균의 *femA* 유전자 서열(GenBank accession no. X17688)을 바탕으로 prime express software(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 이용하여 86 bp 이내의 chromosomal DNA sequence에서 제작하였다. Probe의 5' 말단에는 형광물질인 6-carboxyfluorescein(FAM: the reporter dye)를 3'말단 쪽엔 non-fluorescent quencher인 MGB(minor groove binder)를 붙여 제작하였고 합성된 oligonucleotide primer와 probe는 ABI(Applied Biosystems)에 주문 제작하여 사용하였다(Table 1).

사용균주 확보 및 배양

Real-time PCR법의 특이성 검사(양성특이성 검사:

Table 1. Primer and probe sequence used in this study

Primer & Probe	Sequence (5' to 3')	Location within the <i>femA</i> gene
<i>femA</i> Forward	AATAATAACGAGGTCATTGCAGCTT	757-781
<i>femA</i> Reverse	TGGACCGCGATTTGAATAAAA	843-824
<i>femA</i> Probe	FAM-CTTACTTACTGCTGTACCTGTT-MGB ¹⁾	783-804

1) FAM, 6-carboxyfluorescein (the reporter dye), MGB, minor groove binding (the non fluorescent quencher).

inclusivity test, 음성특이성 검사: exclusivity test)를 위한 황색포도상구균과 그 외 균주들은 미국 FDA(5100 Paint Branch Park way, College Park, Maryland, 20740, USA) 및 한국소비자원(108 Yangjae-daero, Seocho-gu, Seoul)과 한국식품의약품안전청(5 Nokbeon-dong, Eun pyeong-gu, Seoul)에서 제공받아 사용하였으며(Table 2) 식품에 접종하기 위해 사용된 황색포도상구균은 A형 독소를 생성하는 *S. aureus* PH A1을 사용하였다. 영하 70°C에 냉동보관되어 있던 균주를 해동한 뒤 nutrient agar(Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. Tryptic soy broth(TSB, Difco)에 10%의 NaCl(Junsei Co. Tokyo, Japan)를 넣어 배양액을 제조한 후(10% NaCl TSB) nutrient agar(Difco)에서 잘 자란 집락을 루프(loop)로 취해 배양액에 부유한 뒤 37°C에서 24시간 증균 배양하였다. 접종을 위한 균주는 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 10배수로 희석한 뒤 nutrient agar(Difco)에 100 µL를 도말하고 37°C에서 24시간 배양한 후 집락 수를 계수하여 사용하였다.

검출한계

제작된 real-time PCR법의 검출한계(detection limit)를 알아보기 위하여 검출한계를 분석하였다. 실험은 순수 배양액(pure culture)의 검출한계와 식품에서의 검출한계를 알아보기 위하여 나누어 실시하였다. 순수 배양액에서 검출한계를 알아보기 위하여 10% NaCl TSB 에서 37°C에서 24시간 배양된 황색포도상구균 배양액 1 mL를 멸균된 PBS 9 mL에 10배수로 희석하였다. 희석액은 단계별로 100 µL를 nutrient agar(Difco)에 도말(spreading)하여 37°C에서 24시간 배양 후 균 수를 계산하였다. 또한 식품에 접

종 시의 검출한계를 알아보기 위하여 총 상재균 수가 약 3.5×10^1 CFU/mL인 우유와 약 11×10^5 CFU/mL인 야채 셀러드에 10배수로 단계별 희석한 황색포도상구균 배양액 1 mL를 접종하고, 10% NaCl TSB 90 mL를 넣어 stomacher blender인 Bag mixer®(Interscience, Boston, USA)를 이용하여 30초간 균질화 하였다. 순수 배양액과 식품 샘플에서의 배양액을 희석 단계별로 각각 1 mL씩을 취해 DNA를 추출 한 뒤 ABI prism 7500(Applied Biosystems)을 사용하여 real-time PCR법을 통해 검출한계를 분석하였다.

샘플 준비와 호기성 상재균 수 측정 및 접종

모든 샘플 준비는 무균 조건하에서 시행되었다. 식품 내 존재하는 상재균 수에 따른 검출력의 차이를 보기 위하여 각기 다른 수준의 상재균 수를 갖는 우유, 소시지, 생 돼지고기, 야채 셀러드를 샘플로 선정하여 실험을 실시하였다. 모든 샘플들은 서울시 광진구 소재의 대형 마트에서 구입하였다. 접종 전 각 식품에 존재하는 호기성 상재균 수를 측정하기 위해 각 식품 샘플 25 g 또는 25 mL에 buffered peptone water(BPW, Difco) 225 mL를 첨가하여 stomacher blender인 Bag mixer®(Interscience)를 이용하여 30초간 균질화하고, 100 µL를 취하여 10배수로 희석한 희석액을 nutrient agar(Difco)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양 후 총 상재균 수를 측정하였다.

총 상재균 수 측정 후 각각 500 g의 준비된 식품 샘플에 황색포도상구균을 접종하였다. 500 g의 샘플을 25 g씩 20개 샘플로 나누어 검출 실험을 하였을 때 각 식품에 상재균 수에 따라 최소한 한 개의 양성샘플을 얻을 수 있는 접종량이 달라짐을 여러 예비실험을 통해 실험적으로 고려하여 상재균이 적은 샘플인 우유와 소시지에는 1-100 CFU/500 g의 황색포도상구균이, 상재균이 많은 생 돼지고기와 야채셀러드에는 보다 높은 양인 1-1500 CFU/500 g의 황색포도상구균이 접종되도록 만든 황색포도상구균 희석액 1 mL에서 100 µL를 피펫으로 취하여 샘플 전 부분에 골고루 접종하였다. 최종 접종된 황색포도상구균의 수는 접종에 사용된 동일한 튜브에서 100 µL를 취하여 위에 설명된 균 수 확인 방법에 따라 계수하여 확인하였다. 실험의 유효성을 증명하기 위하여 모든 실험에는 샘플 25 g에 황색포도상구균 10^6 CFU/mL를 100 µL 접종한 양성 대조군과 멸균된 PBS를 100 µL 접종한 음성 대조군을 포함시켜 실험을 진행하였으며 모든 샘플은 접종 후 24시간 동안 4°C에서 보관함으로써 실제 식품 샘플 보관 환경과 유사한 환경 속에서 안정화 과정을 거쳤다.

배지법을 이용한 황색포도상구균의 검출

표준 시험법인 배지법을 사용한 황색포도상구균의 검출은 한국식품의약품안전청 식품공전에 제시되어 있는 정성 시험방법을 사용하여 실험을 실시하였다(Fig. 1). 접종된

Table 2. Inclusivity and exclusivity tests by real-time PCR

Strain	Reaction	Source ¹⁾
<i>Staphylococcus aureus</i> PH A1	+	FDA
<i>Staphylococcus aureus</i> PH B1	+	FDA
<i>Staphylococcus aureus</i> PH C1	+	FDA
<i>Staphylococcus aureus</i> PH D1	+	FDA
<i>Staphylococcus aureus</i> PH E1	+	FDA
<i>Staphylococcus aureus</i> PH A2	+	KCA
<i>Staphylococcus aureus</i> PH A3	+	KCA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 41664	-	KCA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 33844	-	KFDA
<i>Campylobacter jejuni</i> PH G15	-	FDA
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC3624	-	FDA
<i>Listeria monocytogens</i> PH B203	-	FDA
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 57329	-	FDA
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 PH B19	-	FDA
<i>Salmonella typhimurium</i> PH A16	-	FDA

¹⁾Source-FDA: U.S. Food and Drug Administration
KCA: Korea Consumer Agency
KFDA: Korea Food and Drug Administration

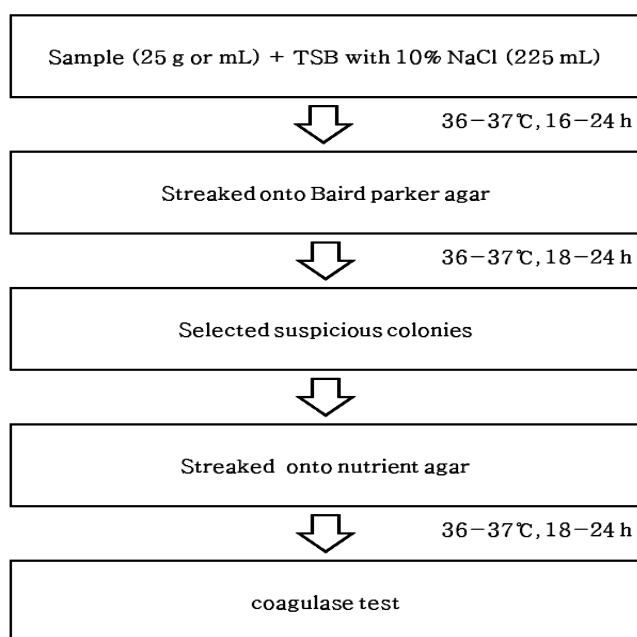


Fig. 1. Flow chart of conventional culture methods.

샘플 500 g을 통계학적 분석을 위해 각각 25 g(혹은 25 mL)으로 나누어 20개의 stomach bag에 225 mL의 10% NaCl TSB와 함께 넣은 다음 Bag mixer[®](Interscience)를 이용해 30초간 균질화 하였다. 이렇게 균질화된 20개의 식품 샘플과 양성 및 음성 대조군들과 함께 37°C에서 24시간 증균 배양하였다. 선택배지는 Baird-Parker(BP)agar(Oxoid, Hampshire, England)에 egg yolk tellulite emulsion(50 mL/L, Oxoid)을 첨가하여 사용하였다. 증균 배양 후 선택 배양을 위해 BP agar(Oxoid)에 증균 배양액을 루프(loop)로 도말(streaking)하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양한 뒤 BP agar(Oxoid)에서 투명한 환으로 둘러싸인 검은 광택이 나는 양성 의심 집락을 nutrient agar(Difco)에 옮겨 동일한 조건에서 하루 배양한 뒤 최종적으로 coagulase 확인시험을 실시하여 양성유무를 판단하였다. Coagulase 확인시험은 staphylase test kit(Oxoid)를 사용하여 메뉴얼대로 실험하였는데 간단히 요약하면 다음과 같다. 테스트 시약과 컨트롤 시약을 각각 한 방울씩 카드에 떨어뜨린 후 의심 집락을 루프(loop)로 취해 시약과 섞어준 후 양성 확인은 응집유무로 판단하며 응집이 생기면 황색포도상구균으로 확정하였다. Coagulase 양성으로 확정된 균주들은 추후 colony PCR법을 통한 재확인 시험에 사용하였다.

DNA 추출 및 real-time PCR법을 사용한 신속 검출

배지법에서 사용되었던 동일한 샘플 배양액 1 mL를 1.5 mL 튜브에 취하여 20,000 g에서 3분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 각각의 pellet에 200 μ L의 sample preparation reagent(PrepMan[™] Ultra, Applied Biosystems)을 넣었다. 교반기를 이용하여 pellet과 잘 혼합한 후 100°C

에서 10분 동안 끓인 뒤 실온에서 3분간 식히고, 다시 20,000 g에서 3분 동안 다시 원심분리 하여 얻은 상층액(5 μ L)을 96-well microwell plate에 넣었다. 각각의 primer와 probe를 900 nM의 농도로 희석하여 2.5 μ L씩 넣었으며 TaqMan[®] gene expression master mix(Applied Biosystems) 12.5 μ L를 넣어 최종 용량이 25 μ L가 되도록 만든 뒤 ABI prism 7500(Applied Biosystems)을 사용하여 50°C에서 2분, 94°C에서 10분간 반응시킨 후에 뒤이어 94°C에서 15초, 60°C에서 1분을 1회로 하여 40 cycle을 반응시켰다. Ct-value(threshold cycle value)는 형광커브와 역치선이 만나는 cycle 값으로써 증폭반응이 일어나 Ct-value가 15-37 사이의 안정된 값을 나타내면서 음성 샘플의 Ct-value 보다 작은 경우는 양성으로 판단하였으며 증폭이 일어나지 않거나 37 이상의 Ct-value를 나타내는 경우는 음성으로 판단하였다.

Colony PCR 법을 이용한 최종 확인 시험

배지법의 최종 확인시험인 coagulase 확인시험에서 양성으로 판명된 집락을 1 mL의 PBS에 부유한 후 위의 DNA 추출 및 real-time PCR법을 사용한 신속 검출방법과 동일하게 DNA를 추출하고 real-time PCR법을 실시하여 coagulase 확인시험결과와 비교하였다.

통계학적 분석

각 식품별로 동일한 실험을 coagulase 확인시험, colony PCR 확인시험, real-time PCR법의 검출결과가 각각 최소한 1개 이상의 양성 결과가 2회 나올 때까지 동일한 실험을 실시하여 두 실험 결과를 합산하여 통계분석을 하였다. 통계 프로그램인 GraphPad InStat(GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA)을 사용하여 95 %의 신뢰한계를 갖고 배지법의 확인시험법인 coagulase 확인시험과 colony PCR법을 비교하여 두 확인시험법 간의 통계학적인 유의차(P value)를 분석하였다. 또한 배지법의 colony PCR법 결과와 real-time PCR법에 의한 검출결과를 비교하여 통계학적인 유의차(P value)를 분석하였다. P value가 0.05 미만인 경우 통계학적으로 각 방법간의 유의차가 큰 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

Real-time PCR법의 특이도와 민감도

황색포도상구균에만 특이적으로 존재하는 *femA* 유전자를 이용하여 자체 제작한 real-time PCR의 특이도와 민감도는 Table 2와 Table 3에 나타내었다. 총 7종의 황색포도상구균에 대하여 real-time PCR법의 특이도를 검사한 결과 모든 황색포도상구균에서 real-time PCR 양성반응이 일어난 반면에 황색포도상구균이 아닌 다른 8종의 균들에서

Table 3. Detection limit of real-time PCR for *Staphylococcus aureus* from PBS, milk and vegetable salad

Inoculation level (CFU/mL)	PBS	Milk	Vegetable salad
8.0×10^7	+	+	+
8.0×10^6	+	+	+
8.0×10^5	+	+	+
8.0×10^4	+	+	-
8.0×10^3	+	-	-
8.0×10^2	-	-	-

는 음성결과를 보였다(Table 2). Real-time PCR법의 검출 한계를 분석한 결과 PBS에서는 8.0×10^3 CFU/mL까지 검출이 가능하였다. 우유와 야채 샐러드에서는 각각 8.0×10^4 CFU/mL와 8.0×10^5 CFU/mL의 단계까지 검출이 가능하였다(Table 3). 가공식품인 우유에서는 상재균 수가 거의 없는 반면 비가공식품인 야채 샐러드는 식품 내 상재균 수가 많아 황색포도상구균이 증균 과정에서 상재균의 영향을 받아 성장이 저해되고 이에 민감도의 차이가 나는 것으로 사료된다.

식품의 호기성 상재균 수와 접종량

실험 전 호기성 상재균 수를 측정된 결과 우유는 3.5×10^1 CFU/mL, 소시지는 9.0×10^1 CFU/g, 돼지고기는 2.7×10^4

CFU/g, 야채 샐러드는 11×10^5 CFU/g 로 나타나 가공식품과 비가공식품 간 상재균 수의 차이가 있었다(Table 4, Table 5). 각 검출법의 통계학적 비교분석을 위해서는 500 g의 대량 샘플을 25 g씩 20개 샘플로 나누었을 때 부분 양성 결과(20개 샘플 중 1개 이상과 19개 이하의 양성 샘플)가 나와야 하는데 이에 필요한 접종농도는 상재균 수가 적은 샘플인 우유와 소시지에는 각각 12-14 CFU/500 g과 13-30 CFU/500 g의 낮은 접종량이 필요했고 상재균 수가 많은 생 돼지고기와 야채샐러드에는 최소 2배에서 최대 40배까지 높은 25-90 CFU/500 g과 1205-1240 CFU/500 g의 접종량이 각각 요구되었다(Table 4, 5). 이는 생육과 야채에 존재하는 상재균이 황색포도상구균의 성장을 억제하여 검출력에 영향을 미치는 것으로 여겨지며 이와 관련된 연구의 한 예로 Hyeon 등(2009)은 편육과 브로콜리 싹에서 배지법과 신속 검출법을 이용하여 살모넬라의 검출법을 비교 하였는데 부분 양성 결과를 얻기 위해서 편육에서는 32-43 CFU/500 g의 낮은 접종량이 필요하였지만 브로콜리 싹에서는 1,635 CFU/500 g의 높은 접종량이 필요하였다. 이는 생육과 야채샘플에서는 다른 식품에 비해 높은 농도가 오염되어야 양성 검출 결과를 얻을 수 있으며 상대적으로 생육과 야채에 낮은 농도의 식중독균이 오염될 경우에는 식품 내 존재하는 높은 농도의 상재균에 의해 증균 과정에서 식중독균의 증식이 저해되기 때

Table 4. Comparison of culture methods and real-time PCR for detection of *Staphylococcus aureus* from artificially inoculated milk and sausage

Samples (Number of background microflora)	Inoculum levels (CFU/500g)	Number of positive samples/number of samples tested			Real-time PCR
		Culture methods			
		Coagulase test	Colony PCR	False positive	
Milk (3.5×10^1 CFU/mL)	12	5/20	5/20	0	5/20
	14	7/20	6/20	1	6/20
Total		12/40	11/40	1	11/40
Sausage (9.0×10^1 CFU/g)	13	2/20	2/20	0	3/20
	30	8/20	8/20	0	12/20
Total		10/40	10/40	0	15/40

Table 5. Comparison of culture methods and real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus* from artificially inoculated raw pork and vegetable salad

Samples (Number of background microflora)	Inoculum levels (CFU/500g)	Number of positive samples/number of samples tested			Real-time PCR
		Culture methods			
		Coagulase test	Colony PCR	False positive	
Raw pork (2.7×10^4 CFU/g)	25	8/20	2/20	6	3/20
	90	6/20	1/20	5	3/20
Total		14/40	3/40	11*	6/40
Vegetable salad (11×10^5 CFU/g)	1205	19/20	16/20	3	17/20
	1240	18/20	6/20	12*	7/20
Total		37/40	22/40	15*	24/40

*Significantly different between coagulase test and colony PCR.

문에 위양성 및 위음성 결과가 초래되어 검출결과에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

가공식품인 우유와 소시지에서 배지법과 real-time PCR 법의 비교

식품 내의 총 상재균 수가 1.0×10^2 CFU/g 이하의 축산 가공식품인 우유와 소시지에서 배지법의 확인시험법인 coagulase 확인시험과 colony PCR 확인시험 그리고 real-time PCR법을 이용한 신속 검출법과 비교한 결과는 Table 4에 나타내었다. 모든 실험에서 음성과 양성 대조균의 결과가 각각 음성, 양성으로 나타나 식품에 황색포도상구균이 오염되지 않았음을 확인하였으며 실험상의 오류는 없었다(결과 미제시).

Ingham 등(2003)은 BP agar는 유제품에서 황색포도상구균의 검출에 있어서 뛰어난 선택성을 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서도 우유와 소시지의 경우 선택배지상에서 황색포도상구균을 제외한 다른 균들이 거의 발생하지 않아 선택성이 매우 좋은 것으로 나타났으며 특히 우유

샘플의 경우 양성 대조균의 BP agar에는 황색포도상구균이 잘 자란 반면 음성 대조균의 BP agar에는 어떠한 미생물도 자라지 않아 매우 좋은 선택성을 나타내었다(Fig. 2).

각 식품 샘플별로 coagulase 확인시험, colony PCR 확인시험, real-time PCR 검출결과가 각각 최소한 1개 이상의 양성 결과가 2회 나올 때까지 동일한 실험을 실시하여 두 실험 결과를 합산하여 통계분석을 하였다. 가공식품인 우유 샘플의 경우 배지법인 coagulase 확인시험에서는 40개의 샘플 중 총 12개의 양성 결과가 검출되었는데 이 중 colony PCR 확인시험 결과 11개의 양성 결과가 검출되어 1개의 위양성이 검출되었다(Table 4). Real-time PCR법을 사용한 신속검사 결과 11개의 양성 결과가 검출되어 배지법의 coagulase 확인시험과는 1개 샘플에서 차이가 있었으나 colony PCR 확인시험과는 동일한 양성 결과를 나타내었으며 세가지 방법간의 통계적 유의차는 발견되지 않았다(Table 4). 소시지 샘플의 경우 배지법의 coagulase와 colony PCR 확인시험 결과 동일하게 40개의 샘플 중 10개의 양성 결과가 검출되어 위양성은 검출되지 않았다(Table 4). Real-time PCR

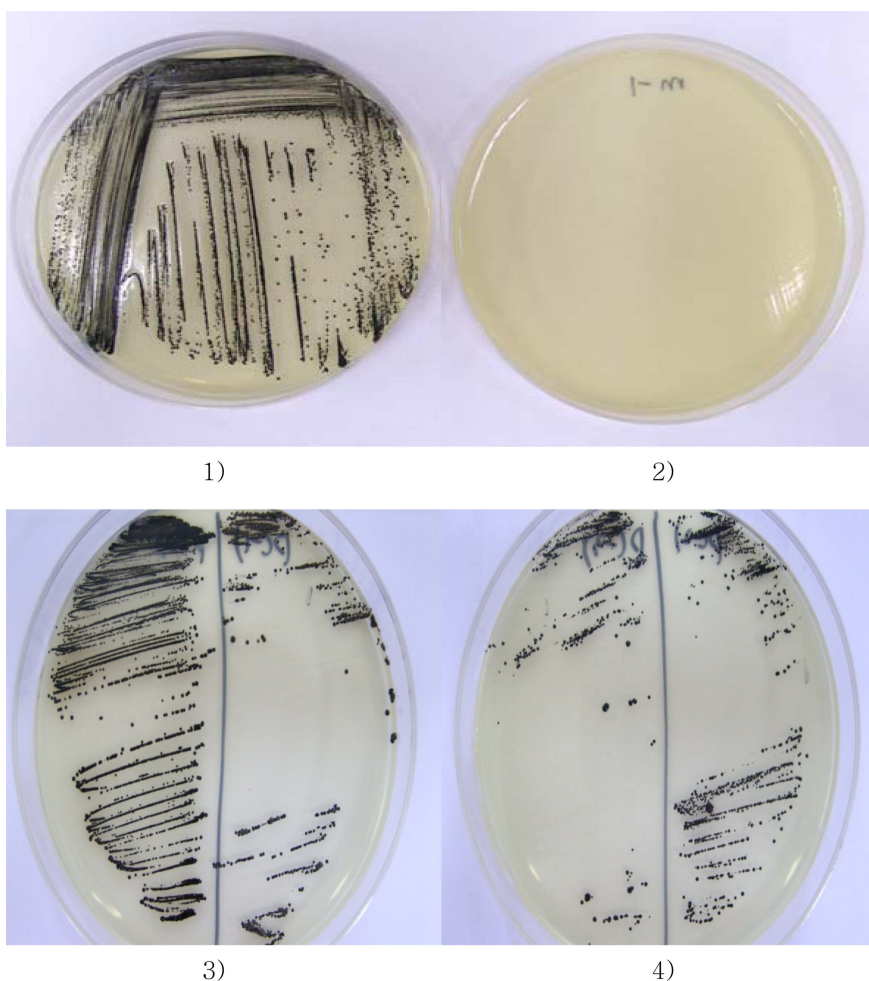


Fig. 2. Comparisons of positive and negative control from milk and raw pork samples. 1) Milk (Positive control), 2) Milk (Negative control), 3) Raw pork (Positive control), 4) Raw pork (Negative control).

법을 사용한 신속검출 결과 15개의 양성(+)이 검출되어 배지법의 coagulase 확인시험과 colony PCR 확인시험보다 5개 많은 수의 양성(+) 검출을 나타내었지만 세 방법간의 통계적 유의차는 발견되지 않았다(Table 4). 가공처리 과정 중에 상재균 수가 감소된 우유와 소시지에서는 선택배지 상에서 황색포도상구균의 정확한 분리가 이루어져 coagulase 확인시험만으로도 황색포도상구균의 검출이 용이한 것으로 나타났다. Real-time PCR법을 사용한 황색포도상구균 신속검출 결과도 동일하거나 우수하게 나타나 결과 확인에 3-4일이 소요되는 표준 배지시험법을 대체하여 가공식품에서 황색포도상구균 검사에 사용할 수 있는 적합한 시험법으로 여겨진다.

비가공식품인 생 돼지고기와 야채 샐러드에서 배지법과 real-time PCR법의 비교

식품 내의 총 상재균 수가 1.0×10^4 CFU/g 이상인 생 돼지고기와 야채 샐러드에서 배지법의 coagulase 확인시험과 colony PCR 확인시험을 비교한 결과와 real-time PCR법을 이용한 신속 검출법과 비교한 결과는 Table 5에 나타내었다.

생 돼지고기의 경우 우유와 소시지 같은 가공식품과는 다르게 음성 대조군을 포함한 대부분의 BP agar에 검은색의 양성 의심 집락이 발견되었다. BP agar에 생긴 집락들은 양성 집락의 형태와 유사한 검은 집락의 형태를 띠고 있었으며 투명한 구분이 쉽지 않았다(Fig. 2). 야채 샐러드의 경우 역시 BP agar에서 생 돼지고기의 경우와 마찬가지로 집락 자체가 검은색 또는 갈색을 나타내며 대체적으로 크기가 작아 양성 집락과의 구분이 쉽지 않았다(결과 미제시). 또한 거의 모든 실험마다 음성 대조군의 BP agar에서 한 개 이상의 양성 의심 집락이 발견되었으며 이러한 집락들을 coagulase 확인시험을 실시한 결과 음성 대조군을 포함한 많은 수의 BP agar에서 coagulase 양성(+)이 검출되었다(결과 미제시). 하지만 colony PCR 확인시험과 real-time PCR법의 결과는 음성과 양성 대조군의 결과가 각각 음성, 양성으로 나타나 실험상의 오류는 없었다(결과 미제시).

생 돼지고기와 야채 샐러드 샘플 역시 각 샘플별로 coagulase 확인시험, colony PCR 확인시험, real-time PCR법의 검출결과가 모두 최소한 1개 이상의 양성 결과가 2회 나올 때까지 동일한 실험을 실시하여 두 실험 결과를 합산하여 통계분석을 하였다. 비가공식품인 생 돼지고기 샘플의 경우 배지법인 coagulase 확인시험에서는 40개의 샘플 중 총 14개의 양성(+)이 검출되었고 그 중 colony PCR 확인시험 결과 3개의 샘플만이 양성(+)이 검출되어 결과적으로 11개의 위양성(+)이 검출되어 coagulase와 colony PCR 확인시험법 간의 통계적 유의차가 발견되었다(Table 5). Real-time PCR법을 사용한 신속검출 결과는 6개의 양성(+)이 검출되어 colony PCR 확인시험보다는 3개가 많은 양성(+)이

검출되었으나 colony PCR법과 real-time PCR법 사이의 통계적 유의차는 발견되지 않았다(Table 5). 야채 샐러드 샘플의 경우 배지법인 coagulase 확인시험에서는 40개의 샘플 중 37개의 양성(+)이 검출되었으나 colony PCR 확인시험 결과 22개의 양성(+)이 검출되어 15개의 위양성(+)이 검출되었으며 coagulase 확인시험과 colony PCR 확인시험 간의 통계적 유의차가 발견되었다(Table 5). Real-time PCR법에서는 24개의 양성(+)이 검출되어 colony PCR법 보다 2개 많은 수의 양성(+) 검출을 나타내었지만 colony PCR확인시험과 real-time PCR법 사이의 통계적 유의차는 발견되지 않았다(Table 5).

상재균이 많은 샘플에서 배지법의 coagulase 확인시험을 실시하였을 경우 초기에 발생한 양성 샘플 수는 모두 real-time PCR법보다 많았지만 추가적인 colony PCR 확인시험 결과 대부분 위양성으로 판명되었다. 상재균이 많은 샘플에서는 BP agar에서 황색포도상구균 이외의 다른 많은 균들이 자랄 수 있다. 실제 coagulase 확인시험에서는 양성을 나타냈지만 colony PCR 확인시험에서는 음성을 나타낸 집락들을 API 20E(BioMerieux, France)를 이용하여 생화학적 테스트를 통해 동정한 결과 야채 샐러드에서는 *Klebsiella*, *Serratia* 등의 균들로 조사되었으며 생 돼지고기에서도 *Yersinia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *E. coli* 등의 각기 다른 균들로 조사되었다(결과 미제시). 따라서 BP agar에서 다양한 균들이 발육할 수 있기 때문에 실제 양성 의심 집락만을 육안으로 확인히 구분하기가 어렵고 이러한 대부분의 의심 집락들이 최종 확인시험인 coagulase 확인시험에서도 양성을 나타내기 때문에 의심 집락 선별과정에서의 실수를 판별하기가 어려울 수 있으며 이로 인해 오인된 결과를 얻을 수 있다고 여겨진다.

식품에서 황색포도상구균을 검출하는 방법은 여러 가지가 있지만 식품은 종류에 따라 상재하는 총 세균 수도 다르고 식품 조성도 다르기 때문에 식품 종류에 따라서 어떤 방법을 사용하여 검출하느냐에 따라 검출률이 달라질 수 있다. 본 연구에서는 가공식품과 비가공식품에서의 배지법과 real-time PCR법의 비교를 통해 차이를 발견하였으며 배지법의 사용시 비가공식품에서 더 많은 수의 위양성(+)이 발생할 수 있다는 사실을 발견하였다.

실제로 식품의 다양한 매트릭스와 식품에 본래 존재하는 상재균 수가 많은 경우에 목표 미생물의 분리가 어렵다는 보고가 있기 때문에(Kim *et al.*, 2003) 식중독 원인의 신속하고 정확한 검출을 위해서는 식품의 종류에 맞는 효과적인 검출법의 확립이 필요하다고 사료된다. 본 연구 결과로 미루어 보아 비가공식품의 경우 배지법을 통해 검출하면 높은 수준의 상재균 수의 영향을 받아 위양성(+)의 결과를 나타낼 수 있기 때문에 colony PCR 확인시험 같은 추가적인 동정 과정이 필요하지만 real-time PCR의 경우 신속하게 한번에 검출이 가능하며 또한 비가공식품에

서 colony PCR법보다 real-time PCR법에서 보다 많은 양성을 검출 하였기 때문에 비가공식품에서는 real-time PCR법이 보다 효과적인 것으로 사료된다.

이러한 결과를 종합해 볼 때 본 연구에서 자체 개발한 real-time PCR법은 3-4일이 소요되는 기존의 배지법과 비교하여 24시간 이내에 신속하게 검출이 가능하다고 여겨지며 또한 식품의 총 세균 수와 종류에 크게 영향을 받지 않고 위양성 결과를 줄여주어 효과적인 검출법의 하나로 사용이 가능하다고 여겨진다. 그리고 coagulase 확인시험에 의한 황색포도상구균의 검출은 위양성 결과가 많이 나올 수 있기 때문에 추가적인 생화학 실험을 통한 확인 동정이 꼭 필요하다고 생각되며 본 연구에서 개발된 *femA* 유전자를 마커로 한 colony PCR법 등과 같은 신속 정확한 방법에 의한 확인 동정법의 개발과 보급이 시급한 것으로 여겨진다.

요 약

황색포도상구균은 사람과 동물에서 화농성 질환과 위장관계 질환을 일으키는 세균으로 자연계에 널리 상재하며 식품으로의 감염이 일어날 수 있어 식중독의 원인이 된다. 이에 신속하고 정확한 황색포도상구균의 검출이 요구되는 실정이다. 본 연구에서는 상재균의 오염도가 다른 다양한 축산 가공식품과 비가공식품에서 황색포도상구균의 검출을 위해 표준 시험법인 배지법과 자체 개발한 real-time PCR법의 검출도를 비교하였고 황색포도상구균 coagulase 확인시험과 real-time PCR법을 활용한 colony PCR 확인 시험을 비교하여 균 동정 능력을 비교하였다. 상재균 수가 적은 식품인 우유와 소시지 그리고 상대적으로 상재균 수가 많은 생 돼지고기와 야채 샐러드를 샘플로 선정하여 인위적으로 500 g 혹은 mL의 샘플을 25 g씩 20개의 시료 샘플로 나누어 실험하였을 때에 최소한 한 개 이상 양성 결과가 나오도록 황색포도상구균을 접종하여 배지법과 real-time PCR법을 시행하여 검출능력을 비교하였다. 배지법에서 획득한 의심 집락의 확인 동정은 coagulase 시험과 real-time PCR법을 활용한 colony PCR 확인시험을 병행하여 비교하였으며 각각의 결과를 real-time PCR법으로 신속 검출한 결과와 비교하였다.

식품 내 상재균 수가 적은 축산 가공식품인 우유나 소시지 등에서 황색포도상구균을 검출할 경우에는 배지법의 coagulase 확인시험과 colony PCR 확인시험과의 유의차가 없었으며 colony PCR 확인시험을 이용한 확인동정 결과와 real-time PCR법을 사용한 24시간 신속 검출 결과 사이에도 역시 유의차가 없었다. 반면에 상대적으로 상재균 수가 많은 비가공식품인 생 돼지고기나 야채 샘플에서는 coagulase 시험법을 사용한 황색포도상구균의 확인동정은 유효성이 매우 떨어졌으며 colony PCR 확인시험 결과와

유의적인 차이를 보였다. Real-time PCR법을 사용한 24시간 신속 검출법은 배지법의 coagulase 시험법의 양성 수보다 낮은 검출률을 보였으나 colony PCR 확인시험보다 높은 검출률을 보여 상재균 수가 높은 샘플에서도 배지법을 대체해서 사용할 수 있는 효율적인 방법임을 보여주었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 본 연구에서 개발한 real-time PCR법은 기존 배지법을 대체하여 24시간 이내에 신속하게 황색포도상구균을 검출할 수 있고 coagulase 확인 시험을 대체할 수 있는 방법으로 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 건국대학교 학술진흥연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사 드립니다. 또한 실험에 많은 도움을 준 김윤경, 천정환에게 감사 드립니다.

참고문헌

- Alarcon, B., Vicedo, B., and Aznar, R. (2006) PCR-based procedure for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in foods. *J. Appl Microbiol.* **100**, 352-364.
- Ellender, R. D., Huang, L., Sharp, S. L., and Telleton, R. P. (1995) Isolation, enumeration, and identification of Gram-positive cocci from frozen crabmeat. *J. Food Prot.* **58**, 853-857.
- Goto, M., Takahashi, H., Segawa, Y., Hayashidani, H., Takanori, K., and Hara-Kudo, Y. (2007) Real-time PCR method for quantification of *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Food Prot.* **70**, 90-96.
- Han, S. R., Hyeon, J. Y., Kim, H. Y., Park, J. S., Heo, S., Shin, H. S., and Seo, K. H. (2008) Evaluation of conventional culture methods and validation of immunoassays for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dairy and processed foods. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **28**, 16-622.
- Hyeon, J. Y., Hwang, I. G., Kwak, H. S., Park, J. S., Heo, S., Choi, I. S., Park, C. K., and Seo, K. H. (2009) Evaluation of an automated ELISA(VIDAS[®]) and real-time PCR by comparing with a conventional culture methods for the detection of *Salmonella* spp. in steamed pork and raw broccoli sprouts. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **29**, 506-512
- Ingham, S. C., Becker, K. L., and Fanslau, M. A. (2003) Comparison of the Baird-Parker agar and 3M Petrifilm Staph Express Count plate methods for enumeration of *Staphylococcus aureus* in naturally and artificially contaminated foods. *J. Food Prot.* **66**, 2151-2155.
- Kim, M. H., Kim, W. J., Shin, W. S., Shon, D. H., and Cha, S. K. (2003) Feasibility study on the use of liposomes for detecting food-borne pathogenic bacteria. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **23**, 278-283.
- Marin, M. E., de la Rosa, M. C., and Cornejo, I. (1992) Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from

- Spanish dry-cured hams. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1067-1069.
9. Moon, J. Y., Lee, E. J., and Kim, Y. B. (2004) Rapid detection of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. *J. Bacteriol. Virol.* **34**, 91-100.
 10. Much, P., Pichler, J., Kasper, S. S., and Allerberger, F. (2009) Foodborne outbreaks, Austria 2007. *Wien Klin Wochenschr.* **121**,77-85
 11. Palomares, C., Torres, M. J., Torres, A., Aznar, J., and Palomares, J. C. (2003) Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **45**, 183-189.
 12. Rall, V. L. M., Vieira, F. P., Rall, R., Vieitis, R. L., Fernandes, Jr., Candeias, J. M. G., Cardoso, K. F. G., and Araujo, Jr. J. P. (2008) PCR detection of Staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet. Microbiol.* **132**, 408-413.
 13. Riyaz-Ul-Hassan, S., Verma, V., and Qazi, G. N. (2008) Evaluation of three different molecular markers for the detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Food Microbiol.* **25**, 452-459.
 14. Suarez, M. J., Arias, M. L., and del Mar Gamboa, M. (2008) *Staphylococcus aureus* enterotoxin A detection using the polymerase chain reaction (PCR) and its correlation with coagulase and thermonuclease tests. *Arch. Latinoam. Nutr.* **58**, 59-63.
 15. Yoon, J. H., Lee, S. J., and Hong, K. W. (2008) A multiplex PCR assay for the direct detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Staphylococcus aureus* in food. *Food Eng. Prog.* **12**, 24-31.

(Received 2009.11.23/Revised 2010.3.17/Accepted 2010.3.19)