

Real-Time PCR을 이용한 신선편이 양배추에서 *Salmonella* spp.의 신속검출

방미경¹ · 박승주¹ · 김윤지¹ · 김지강² · 오세욱^{3*}

¹한국식품연구원 안전성연구단

²국립원예특작과학원

³국민대학교 식품영양학과

Rapid Detection of *Salmonella* spp. in Fresh-Cut Cabbage by Real-Time PCR

Mi-Kyung Bang¹, Seung-Ju Park¹, Yun-Ji Kim¹, Ji Gang Kim², and Se-Wook Oh^{3*}

¹Food Safety Team, Korea Food Research Institute, Gyeonggi 463-746, Korea

²National Institute of Horticultural and Herbal Science, Gyeonggi 440-706, Korea

³Dept. of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

Abstract

This study was conducted to find out the minimal time needed for detection of *Salmonella* spp. which exist at very low concentration in foods by using real-time PCR. The sal-F and sal-R sequences were used as primers and sal-P was used as a probe. The detection limit of *Salmonella* spp. was 3.77×10^2 cfu/mL in buffered peptone water (BPW). Microbial growth was monitored after artificially inoculated *Salmonella* spp. into BPW. The obtained growth curve was well fitted with the equation, $y = 0.0127x^2 + 0.5927x - 0.4317$ ($R^2 = 0.99$), if assuming that 1 cell exists in 25 g sample (0.04 cfu/mL). The microbial concentration will be reduced to 10 fold by adding BPW during sample treatment, so actual initial concentration at the starting point of enrichment is 0.004 cfu/mL. At this condition, real-time PCR detection would be possible only when microbial concentration increase occurs to exceed the detection limit (377 cfu/mL). The time needed for microbial increase was calculated from the growth curve equation as 7 hours and 20 minutes. Therefore the total time required for detection was less than 10 hours including the PCR operating time.

Key words: rapid detection, *Salmonella* spp., real-time PCR

서 론

Salmonella spp.는 그람 음성, 간균형태의 통성혐기성균으로 사람이나 온혈동물의 장관에서 발견되며 종종 분변을 통한 오염에 의해 식품으로 전이된다(1). Salmonellosis는 장관계통에 질병을 유발하는 식품유래 감염 병으로서 세계적으로 널리 발생하고 있는 식중독 질병이다(2). 살모넬라균을 가진 가축, 야생 동물, 보균자나 오염되어 있는 우유, 계란 등에 의해 오염될 수 있으며 1차 오염된 신선편이 식품, 샐러드 등에 의해 감염되기도 한다. 우리나라에서는 노로 바이러스, 병원성 대장균, 황색포도상구균 다음으로 높은 비율로 식중독을 유발하는 것으로 알려져 있으며 매년 완만한 증가양상을 나타내고 있다(3).

핵가족화현상과 고령화 등에 따라 시간과 노동력 절약을 위한 전처리식품(간편 조리 및 신선편이식품)에 대한 수요가 빠르게 증가되고 있어 신선편이식품에 대한 소비가 증가하고 있다. 신선편이식품은 현재의 생산방법으로는 식중독균이 완전히 제거될 수 없기 때문에 생산단계, 가공단계 및

유통단계에서 효과적인 식품안전을 보장할 수 있는 기술이 반드시 필요한 것으로 알려져 있다(4). 따라서 식품에서 문제가 되는 목표 미생물을 보다 신속하게 검출할 수 있는 기술이 개발된다면 신선편이 제품을 생산하는 공장에서의 제품 품질관리에 효율적으로 사용될 수 있다.

현재 우리나라 식품공전에는 *Salmonella* spp. 검출을 위한 방법으로 배지를 이용한 방법이 등재되어 있다. 그러나 이 방법은 증균배양, 분리배양, 확인시험, 혈청시험 등의 일련의 과정으로 이루어져 있어 *Salmonella* spp.로 최종확인까지 적어도 5일이 소요된다(5). 이렇듯 배지법은 많은 시간이 소요되어 미생물의 신속검출법으로 사용할 수 없으며 과도한 노동력을 필요로 하기 때문에 효율성이 떨어지는 것으로 알려져 있다(6). 따라서 최근에는 항원항체 반응을 이용한 lateral flow system 방법, 전기전도도를 이용하는 방법, DNA를 이용하는 방법 등이 다양하게 개발되어 이용되고 있지만(7), 식중독균과 같이 식품에 소량 존재하는 미생물을 바로 검출하기는 어려우며 따라서 대부분의 경우 미생물 증폭과정을 필요로 한다.

*Corresponding author. E-mail: swoh@kookmin.ac.kr
Phone: 82-2-910-5778, Fax: 82-2-910-5249

미생물을 신속하게 검출하기 위해서는 검출되기 위해 필요로 하는 최소한의 미생물 농도를 나타내는 검출한계가 중요한 기준이 된다. 각각의 신속검출법에는 고유의 검출한계가 있다. 검출한계가 낮을수록 낮은 농도에서 목표 미생물 검출이 가능함을 의미하며 따라서 민감한 검출방법이라 할 수 있다. Real-time PCR은 다른 실험방법에 비해 낮은 검출한계를 가지는 것으로 알려져 있어 매우 낮은 농도의 오염까지 검출할 수 있으며, 신속검출에 효과적으로 활용될 수 있다(8). Real-time PCR법은 기존의 PCR과는 달리 전기영동 과정이 필요 없이 유전자의 증폭 시 증가되는 형광을 모니터링 상에서 실시간으로 관찰할 수 있어 결과해석이 빠르고 신뢰성이 높은 장점이 있다(9). 실제로 real-time PCR을 이용하여 식품에 존재하는 *Salmonella* spp.를 검출한 다수의 보고가 있다(10-15). 그러나 기존의 연구는 buffered peptone water(BPW)와 Rappaport-Vassiliadis broth(RV)를 단독 또는 연속으로 사용하는 증균배양 과정을 거쳐 최소한 18시간 이상이 소요되므로 신속검출이라고 하기 어렵다.

미생물을 신속하게 검출하기 위해서는 검출한계가 가장 중요한 고려사항이 된다. 각각의 신속검출법에는 고유의 검출한계가 있고, 검출한계가 낮을수록 신속하게 검출하는 것이 가능하기 때문이다. Real-time PCR은 현재까지 상업적으로 활용되고 있는 신속 검출법 가운데 가장 낮은 수준의 검출 한계를 가지는 것으로 알려져 있어 배지상태에서 10^{1-3} cfu/mL 수준의 검출한계를 가지는 것으로 알려져 있다(16). 한편, 식품공전에 따른 *Salmonella* spp.의 분리는 먼저 시료에 9배량의 BPW를 가하여 18시간 증균배양을 실시하게 된다. 그러므로 증균배양이 완료되기 전 검출이 가능해야 실질적인 신속검출이라고 할 수 있다. 따라서 증균배양 배지상태에서 real-time PCR 검출한계 이상으로 증식된 시점을 정확히 파악할 수 있다면 18시간의 증균배양 과정 없이 검출시간을 획기적으로 단축시킬 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서는 식품에 극소량 존재하는 *Salmonella* spp.를 검출하기 위하여, 증균배양 배지에서의 real-time PCR 검출한계 측정, 증균배양 배지에서의 성장곡선 모델링, 성장곡선을 이용한 검출소요 최단시간을 산출하였으며 이를 식품에서 검증하여 *Salmonella* spp.에 대한 신속검출 가능성을 타진하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

냉동고에 보관되어 있는 *Salmonella* Typhimurium(ATCC 14028)을 녹여 BPW(Oxoid, Hampshire, England)를 이용하여 35°C에 18시간 배양한 후 tryptic soy agar(TSA, Oxoid)에 도말 배양하여 형성된 단일 콜로니를 분리하여 실험에 사용하였다. 배양된 균은 2,600×g에서 20분간 원심분리 하여 균체를 회수하였으며 0.9% 생리식염수로 2차례 수세하였으며 최종적으로 생리식염수 100 µL에 풀어 식품에 대한

접종 실험 등에 사용하였다. 증균배양 배지로 BPW, Rappaport-Vassiliadis broth(RV, Oxoid)를 사용하였으며 분리 배지로는 xylose lysine deoxycholate agar(XLD, Oxoid)를 사용하였다.

DNA 분리

Real-time PCR에 사용된 bacterial DNA은 boiling method에 따라 분리하였다(17). 즉, 원심분리관에 증균 배양액 1 mL을 취하여 12,000 rpm에서 3분간 원심분리 한 후 pellet에 멸균증류수 20 µL를 넣어 재현탁하고 100°C로 조정된 heating block에 10분간 처리하여 열변성 시킨 후 15분간 얼음에 방치하였다. 이후 12,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 상등액을 DNA 시료로 사용하였다.

식품공전법에 의한 *Salmonella* spp. 분리

시료 25 g에 225 mL의 BPW를 첨가하여 균질화 하여 35°C에서 18시간 비선택적 증균배양을 실시하였으며 이후 선택적 증균배양 배지인 RV로 옮겨서 42°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 XLD agar에 접종하여 추정균주를 분리하였으며 이후 triple sugar iron(TSI, Oxoid) slant에 접종한 후 urease test 등 생화학적 실험을 통하여 확인하였다(18).

Real-time PCR 조건

Forward primer로는 5'-GCG TTC TGA ACC TTT GGT AAT AA-3' 염기서열을, reverse primer로는 5'-CGT TCG GGC AAT TCG TTA-3' 염기서열을 사용하였다. Probe로는 5'-FAM-TGG CGG TGG GTT TTG TTG TCT TCT-TAMRA-3' 서열을 사용하였다(19). Reporter dye는 FAM(6-carboxyfluorescein)을 사용하였으며 quencher dye로는 TARMA(6-carboxytetramethylrhodamine)를 사용하였다. Real-time PCR을 위한 반응물 조성은 Taqman gene expression master mix(Applied Biosystems, Foster City, USA) 12 µL, DNA 용액 3 µL, 1000 nM 농도의 forward와 reverse primer 2 µL씩, probe 1 µL(250 nM)로 구성하였다. 96-well의 microplate를 이용하여 ABI 7500® real-time PCR System(Applied Biosystems)에서 real-time PCR을 수행하였다. 반응조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 반응시킨 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분을 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 반응시켰다. Cot(threshold cycle) 값은 ABI 7500® software(Applied Biosystems)로 분석하였다.

BPW에서의 검출한계치 산출

BPW를 사용하여 35°C에서 24시간 배양한 *S. Typhimurium* 배양액을 연속적으로 10배 희석하여 $10^1 \sim 10^6$ cfu/mL의 농도로 조정하였다. 각 희석액에서 1 mL을 취하여 DNA를 분리하고 real-time PCR을 수행하여 검출한계값을 구하였다. 동시에 희석액을 TSA에 분주하여 성장시킨 후 균수를 측정하여 검출한계값을 보정하였다.

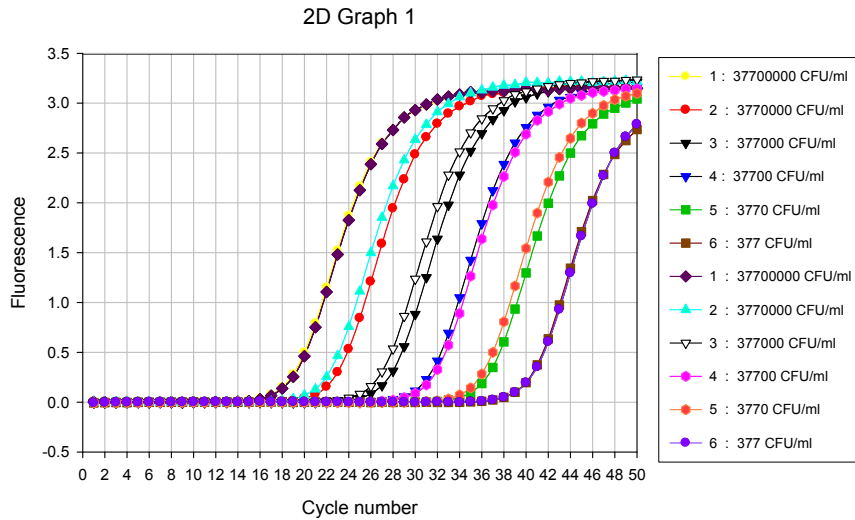


Fig. 1. Detection limit of *Salmonella* Typhimurium by real-time PCR in buffered peptone water. Serially diluted *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 culture were tested for real-time PCR detection. The threshold is set by 0.46 and the 3.77×10^2 cfu/g was determined as a detection limit.

BPW에서의 성장 곡선 모델

*S. Typhimurium*을 BPW에 1~10 cfu/mL 수준으로 접종하고 35°C에서 배양하면서 매 시간마다 1 mL을 취하여 TSA에 도말하였으며 이를 35°C에서 24시간 배양한 후 균수를 측정하였다. 배양 시간에 따른 균 성장곡선을 그렸으며 Microsoft Office Excel 2007 program으로 분석하여 가장 적합한 회귀방정식을 구하였다.

성장곡선을 이용한 검출한계값에 도달하는 시간 산정

Real-time PCR로 검출하였을 때 소요되는 최단 시간을 산출하였다. 25 g 시료에 *S. Typhimurium*이 1 cell 존재한다고 가정하였을 때를 초기 균 농도로 하여 real-time PCR 검출한계 균 농도까지 소요되는 시간을 성장곡선 모델에 대입하여 구하였다.

양배추에서의 검증

소매점(분당)에서 절단 양배추를 구입하여 우선적으로 식품공전법에 의한 *Salmonella* spp. 검출실험을 실시하였다. 음성으로 판정된 양배추 25 g에 *S. Typhimurium*이 1~10 cfu 농도로 존재할 수 있도록 인위적으로 접종하여 총 50개의 시료를 제조하였다. 양배추에 표면 10군데에 점적하여 최대 로 골고루 분산될 수 있도록 접종하였다. 제조된 시료에 대하여 식품공전법과 real-time PCR으로 분석하였다. Real-time PCR은 35°C로 유지된 peptone water에 시료를 첨가하여 35°C에서 8시간 배양시킨 후 실시하였다. 또한 시판되고 있는 신선편이 야채류 30종을 수거하여 식품공전법과 10시간 real-time PCR 방법에 따라 검출실험을 실시하였다.

결과 및 고찰

BPW에서의 real-time PCR 검출한계치

우리나라 식품공전에는 식품에서 *Salmonella* spp. 검출 시 BPW가 비선택적인 증균배양 배지로 권고되고 있다.

Table 1. Detection limit of *Salmonella* Typhimurium in BPW by real-time PCR

Detection limit	R ²	Slope	Efficiency (%) ¹⁾
3.77×10^2	0.99	-4.371	69.34

¹⁾Efficiency = $(10^{-1/slope}) - 1$.

BPW를 시료에 9배량 첨가하고 35°C에서 18시간 배양하는 증균배양 단계를 거쳐 균을 성장시키며 이후 RV 배지를 이용하여 선택적인 증균배양을 하는 2단계의 증균배양 과정을 거치게 되면 42시간 이상이 소요된다. 따라서 real-time PCR 기술이 신속검출법이 되기 위해서는 BPW로 증균 되는 과정인 18시간 이내에서 검출이 가능해야 한다. 배양되는 과정 중 검출이 가능한 시점을 찾기 위해서 우선적으로 real-time PCR의 검출한계값을 측정하였다. 10진 희석된 연속적인 균 농도에 대하여 real-time PCR을 이용한 검출실험 결과 검출한계값은 3.77×10^2 cfu/mL로 측정되어 10² 수준의 검출한계값을 가지는 것으로 측정되었다(Fig. 1). 증폭곡선의 기울기는 -4.371로 측정되었으며 E(efficiency) = $(10^{-1/slope}) - 1$ 로 계산된 증폭효율은 69.34%로 측정되었다(16)(Table 1).

BPW에서의 성장곡선

시료는 우선적으로 BPW에서 비선택적인 증균배양이 진행된다. BPW에서의 성장곡선은 인위적으로 접종한 후 시간에 따라 배양액을 취하여 균수를 측정하여 작성하였다. 작성된 그래프에 대하여 Microsoft Office Excel 2007 프로그램을 이용하여 2차 다항식으로 추세선을 구한 결과 성장곡선은 $y = 0.0127x^2 + 0.5927x - 0.4317$ (R²=0.99)로 산출되었다(Fig. 2).

성장곡선을 이용한 최단검출시간 산정

Real-time PCR 방법이 신선 절단양배추에 존재하는 *Salmonella* spp.를 검출할 수 있는 최단 검출시간을 산출하고자 하였다. 시료 25 g에 1 cell의 *Salmonella* spp.가 존재한다고 가정하였을 때의 초기 농도(0.04 cfu/mL)에서 9배량의

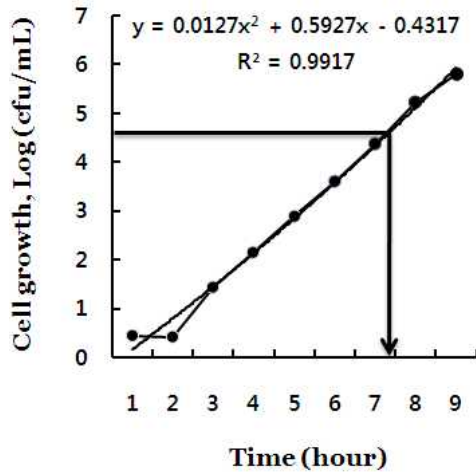


Fig. 2. Growth curve of *Salmonella* Typhimurium in BPW and the required time for real-time PCR detection. The time required to increase the cell counts from 1 cfu/25 g samples to the detection time, 3.77×10^2 cfu/mL. The required time, 7 hours and 20 minutes was calculated by extrapolating in growth curve.

BPW를 첨가한 후에 미생물 농도인 0.004 cfu/mL에서 real-time PCR 검출한계값인 377 cfu/mL까지의 미생물 성장이 일어나야 검출이 가능할 것으로 생각되었다. 이를 log로 전환하면 -2.3974에서 2.5764만큼의 증가가 필요하며 이는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 성장곡선에 대입하면 7시간 20분이 필요함을 알 수 있었다. 따라서 시료 25 g에 1 cell이 존재할 경우 배양시간 7시간 20분 이상, DNA 추출시간 30분과 real-time PCR 수행시간 2시간을 모두 합하여 모두 10시간 이내 검출이 가능함을 산술적으로 알 수 있었다.

양배추에서의 검증

양배추에 극소량 존재하는 *Salmonella* spp.에 대하여 10 시간 real-time PCR 방법으로 검출실험을 실시하여 신속검출법으로서의 효율성을 검증하였다. 50개의 시료에 대하여 식품공전법과 real-time PCR 방법으로 분석하였다. Real-time PCR 방법은 식품공전법의 첫 증균배양 단계인 BPW를 이용한 증균 과정에서 7시간 30분 후 배양액을 채취하여 분석을 실시하였다. 그 결과, 4일이 소요된 식품공전 방법에 의해 50개 시료 중 28개 시료가 양성으로 측정되었으며 총 10시간이 소요된 real-time PCR로는 식품공전법보다는 4개 더 많은 32개 시료가 양성으로 측정되었다. 식품공전법으로 양성으로 측정된 시료는 모두 real-time PCR에서도 양성으로 측정되었으며 이외에 4개의 시료가 위양성(false-positi-

Table 2. Comparison of *Salmonella* Typhimurium detection by real-time PCR and KFSA recommended method

Result	Real-time PCR	KFSA recommended method
positive/total	32/50 ¹⁾	28/50

¹⁾Number of positive samples/ Total samples.

²⁾50 different samples were prepared by inoculating *Salmonella* Typhimurium at the level of 1~10 cfu/25 g.

ve)을 나타내었다(Table 2).

시판되고 있는 신선편이 야채류를 30종 수거하여 식품공전법과 10시간 real-time PCR에 의한 *Salmonella* spp. 검출 실험을 실시하였다. 그 결과 새싹 샐러드 제품인 1개의 시료가 real-time PCR에 의한 잠정적인 양성시료(presumptive positive)로 측정되었다(Fig. 3). 식품공전에 의한 분석결과 동일한 시료에서만 양성으로 측정되었으며 나머지 29개 시료는 음성으로 판정되었다.

Real-time PCR은 인위적으로 접종된 시료에 대하여 4개의 시료에서 위양성이 나타났지만 위음성은 없는 것으로 측정되었다. 이는 절단 양배추가 접종된 *Salmonella* spp.의 성장을 억제하지 않았음을 의미하지만 선택성(specificity)은 감소하였음을 알 수 있었다. 반면에 시판되고 있는 시료에 대한 분석 결과 음성으로 판정된 시료에 대하여 위양성을 나타내지 않았으며 양성으로 확정된 시료에 대해서만 양성을 나타내어 어느 정도 선택성이 있음을 알 수 있었다.

식중독균 증폭과정은 보통 증균배양 배지를 이용하여 수행되는데, 증균배양 단계는 비선택적인 증균배양과 선택적인 배양의 2가지로 나눌 수 있다. 선택적인 증균배양은 목적하지 않는 균 성장을 억제하는 물질이 들어 있어 목적균 자체의 성장에도 영향을 미칠 수 있다. 반면에 비선택적인 배양은 균의 성장을 억제하지 않는 배지 조성을 가지지만 선택성(specificity)이 떨어진다고 할 수 있다. 본 실험에 사용된 증균배양배지는 BPW로서 비선택적 배양이 일어나 선택성이 떨어질 수 있다고 할 수 있지만 염기서열에 따라 반응하는 real-time PCR이 가지는 고유의 선택성이 있으므로 비선택적 배양에서 기인하는 선택성 저하를 보상할 수 있다고 할 수 있다. 25 g 시료에 대하여 1~10 cfu 수준으로 접종한 시료에 대한 실험결과 식품공전법에 비하여 4개가 위양성으

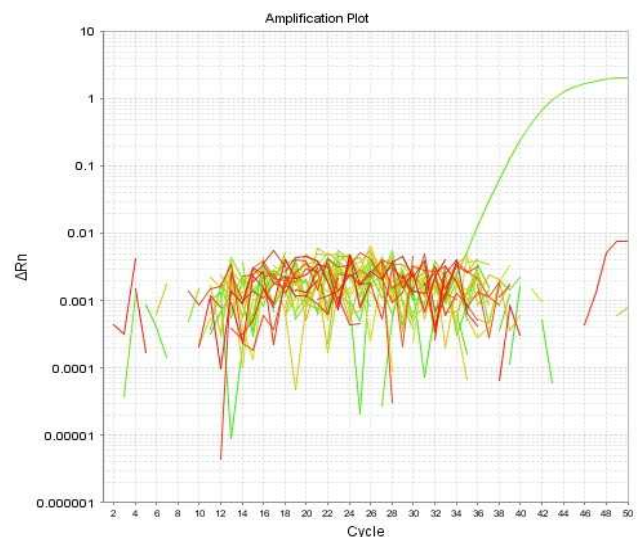


Fig. 3. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. from the fresh produce. Totally 30 different fresh produce was purchased from the local market and analyzed by real-time PCR method. One sprout produce showed the positive signal.

로 검출된 것이 선택성이 저하되었기 때문으로 생각되었지만 양성인 위음성으로 검출될 만큼 선택성이 저하되지는 않은 것으로 판단되었다.

자연적으로 존재하는 상재균이 높은 수준으로 존재할 경우, 셀러드, 신선편이 야채에 존재하는 미량($10 < \text{cfu}/25 \text{ g}$)의 *E. coli* O157:H7의 검출이 어려운 것으로 알려져 있다(20). Hyeon 등(21)은 특히 상재균이 많은 야채의 경우 배지법은 상재균에 의해 검출이 저해되므로 이보다 상재균의 영향을 덜 받는 real-time PCR 방법이 미량으로 존재하는 식중독균 검출에 더 효과적이라고 하였다.

30종의 시판 시료에 대한 real-time PCR 분석결과 29개가 음성시료로 측정되었으며 1개의 시료가 잠정적인 양성(pre-sumptive positive)로 측정된 결과에서 알 수 있듯이 10시간 real-time PCR법은 실제 식품검사에서 높은 비율로 존재하는 음성시료를 신속하게 제거할 수 있는 1차적인 선별실험(presumptive screening method)로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각되었다.

Real-time PCR을 이용한 신속검출기술은 더욱 더 낮은 검출한계를 가질 수 있는 primer, probe 선발을 통해서 개선될 수 있으며 또한 검출 목적균을 신속하게 성장시킬 수 있는 배지 개발 또는 균 농축기술 개발을 통하여 더욱 더 신속한 검출이 가능할 것으로 생각되었다.

요 약

식품에 극소량 존재하는 *Salmonella* spp.를 real-time PCR로 검출 시 필요한 최소시간을 구하고자 하였다. Sal-F, Sal-R 서열이 primer로 사용되었으며 sal-P 서열이 probe로 사용되었다. BPW에서 산출된 검출한계는 $3.77 \times 10^2 \text{ cfu/mL}$ 로 측정되었다. BPW에 인위적으로 *Salmonella* spp.를 접종하였으며 성장곡선을 구하였다. 성장곡선은 $y = 0.0127x^2 + 0.5927x - 0.4317 (R^2 = 0.99)$ 식을 나타내었다. 25 g 시료에 1 cell의 *Salmonella* spp.가 존재한다고 가정할 경우, 시료처리 과정에서 10배로 희석되므로 초기 균 농도는 0.004 cfu/mL이며 이 농도에서 검출한계까지의 균수 증가가 발생해야 real-time PCR로 검출이 가능할 것으로 판단되었다. 성장곡선에서 균수 증가에 필요한 시간을 측정해 본 결과 7시간 20분으로 산출되었으며 따라서 PCR 수행시간을 포함하여 10시간이면 검출이 가능함을 알 수 있었다. 식품에서의 실증 실험을 위하여 시중에서 판매되고 있는 신선편이 양배추를 구하여 25 g에 1~10 cfu의 수준으로 *S. Typhimurium*을 인위적으로 접종한 후 real-time PCR 방법과 식품공전방법으로 검출하였을 때 두 방법 모두 동일하게 30개 중 29개 시료에 대하여 음성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 농업과학기술개발 공동연구과제

연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- David M, Nancy RR, Richard L. 2005. *Essentials of Food Safety and Sanitation*. Pearson Prentice Hall, New Jersey, USA. p 50.
- Oliveira SD, Rodenbusch CR, Ce MC, Rocha SL, Canal CW. 2003. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Lett Appl Microbiol* 36: 217-221.
- <http://e-stat.kfda.go.kr>
- Kim J, Mosana M, Castell-Perez E. 2010. Simulation of pathogen inactivation in whole and fresh-cut cantaloupe (*Cucumis melo*) using electron beam treatment. *J Food Eng* 97: 425-433.
- Bohaychuk VM, Gensler GE, McFall ME, King RK, Renter DG. 2007. A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food animal matrices. *J Food Prot* 70: 1080-1087.
- Melissa OP, Maria C, Martha ES, Frank J, Peter D. 1999. Sensitivity, specificity, and predictive values of three *Salmonella* rapid detection kits using fresh and frozen poultry environmental samples versus those of standard plating. *Appl Environ Microbiol* 65: 1055-1060.
- Yan Z, Zhou L, Zhao Y, Wang J, Huang L, Hu K, Liu H, Wang H, Guo Z, Song Y, Huang H, Yang R. 2006. Rapid quantitative detection of *Yersinia pestis* by lateral-flow immunoassay and up-converting phosphor technology-based biosensor. *Sens Actuators B* 119: 656-663.
- Krascenicsova K, Piknova L, Kaclikova E, 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.
- Hein I, Flekna G, Krassnig M, 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.
- Catarama TMG, O'Hanlon KA, McDowell DA, Blair IS, 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.
- Malorny B, Paccassoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, Helmuth R. 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl Environ Microbiol* 70: 7046-7052.
- McGuinness S, McCabe E, O'Regan E, Dolan A, Duffy G, Burgess C, Fanning S, Barry T, O'Grady J. 2009. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of *Salmonella* on fresh meat. *Meat Sci* 83: 555-562.
- Malorny B, Bunge C, Helmuth R. 2007. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *J Microbiol Methods* 70: 245-251.
- Liming SH, Bhagwat AA. 2004. Application of a molecular beacon-real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables. *Int J Food Microbiol* 95: 177-187.
- Rodriguez-Lazaro D, Hernandez M, Esteve T, Hoorfar J, Pla M. 2003. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *salmonella* spp. *J Microbiol Methods* 54: 381-390.
- Bhagwat AA. 2002. Simultaneous detection of *Escherichia*

- coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *Int J Food Microbiol* 84: 217-224.
17. Jung BY, Lim HS, Jung SC. 2003. Development of differential media and multiplex PCR assays for the rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Korean J Vet Res* 43: 231-237.
 18. Korea Food & Drug Administration. 2008. *Food code*. Seoul, Korea.
 19. Luke TD, William JB, James CM, Margaret SN, Lynn AC, Williams BH, Linda G, Riggins WS. 2002. Real-time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. *J Clin Microbiol* 40: 3050-3052.
 20. Prentice N, Murray JS, Scott MF, Coombs JP, Rarton A. 2006. Rapid isolation and detection of *Escherchia coli* O157:H7 in fresh produce. *J Rapid Methods Auto Microbiol* 14: 299-308.
 21. Hyeon JY, Hwang IG, Kwak HS, Park JS, Heo S, Choi IS, Park C, Seo KH. 2009. 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. *Korean J Food Sci Ani Resour* 29: 506-512.

(2010년 7월 16일 접수; 2010년 8월 11일 채택)