

유제품과 육제품에서 황색포도상구균 신속검출을 위한 PCR법의 비교검증

김홍석 · 천정환 · 김동현 · 송광영 · 서건호*
전국대학교 KU 식품안전연구소

Evaluation of a PCR Assay for the Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* in Milk and Meat Products

Hong-Seok Kim, Jung-Whan Chon, Dong-Hyeon Kim, Kwang-Young Song, and Kun-Ho Seo*
KU Center for Food Safety, College of Veterinary Medicine, Konkuk University

Abstract The aim of this study was to compare the performance of a standard culture method and polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in milk and meat products. Milk, dried infant formula, sausage and ground beef that had been artificially inoculated with *S. aureus* were enriched in tryptic soy broth. After the enrichment, a loopful was inoculated onto Baird-Parker agar with egg-yolk-tellurite. In parallel, 23S rRNA was amplified by PCR from samples of the enriched broth. Suspected *S. aureus* colonies grown on selective agars were finally confirmed by a coagulase test and colony PCR. No significant statistical differences were observed between the incidence of *S. aureus* detected by the culture method and the incidence detected by PCR, in milk or dried infant formula. However, in sausage and ground beef, the number of positives detected by PCR was significantly higher than by the culture method ($p < 0.05$). Our findings suggest that PCR could be an effective screening tool for the detection of *S. aureus* compared to the standard culture method.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, detection, culture method, PCR, livestock products

서 론

*Staphylococcus aureus*는 중요한 식중독 원인균 중 하나로 자연 환경에 대한 저항성이 강하며 사람과 동물의 화농성 병소에 존재할 뿐만 아니라 피부 등에 상재하여 식품으로의 오염 경로도 매우 다양하다(1). 식품에 오염된 *S. aureus*는 내열성의 장독소(enterotoxin)를 생성하여 구토, 설사, 위경련 등의 증상을 동반하는 독소형 식중독을 일으킨다(1,2).

현재 *S. aureus*에 대해서는 독소생성여부와 관계없이 제조, 가공용 원료를 제외한 축산물에서 불검출기준이 적용되고 있으며 축산물의 가공기준 및 성분규격의 배지배양법을 표준검출법으로 하여 검출하고 있다(3). 이 검출법에 따르면 10% NaCl을 첨가한 tryptic soy broth (TSB)에서 증균 후 Baird-Parker (BP) agar, coagulase 확인시험 등을 사용하여 *S. aureus*를 검출하는데, 이 같은 배지배양법은 높은 위양성 결과와 장시간의 검사기간(5-6일), 노동력의 과다소모 등이 고질적인 단점으로 지적되어 왔다(4-6). 다양한 신속검출법 중 polymerase chain reaction (PCR) 기법은 고가의 장비 없이도 신속 정확하게 목표균을 검출할 수 있어서 식중독세균 검출 목적으로 널리 사용되어 왔다(7-9).

*S. aureus*의 내열성 유전자인 extracellular thermostable nuclease

(*nuc*) 유전자와 cytoplasmic protein (*femA*) 유전자는 모든 *S. aureus*에서 발견되는 유전자들로 알려져 있어 PCR primer의 목표 유전자로 가장 널리 이용되고 있다(10-12). 또한 각종 세균에 종 특이적으로 존재하는 16S 및 23S ribosomal DNA/RNA 유전자 역시 *S. aureus*의 PCR 검출법 개발에 많이 이용되었다(13-15). 이 유전자들은 다른 *S. aureus* 특이 유전자들인 coagulase 유전자(*coa*)나 protein A 유전자(*spa*)와는 달리 단일 amplification product size를 나타내어 PCR 검출에 더욱 용이하다(16,17).

PCR 기법을 활용한 식품에서 *S. aureus*의 검출은 특이성과 감도가 좋은 우수한 검출기법으로 알려지긴 하였으나(18), 실제 다양한 축산식품에서 표준배양법에 비해 특이도나 검출감도가 어느 정도인지에 대한 명확한 비교검증 연구는 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 *S. aureus*의 효과적인 검출을 위해 23S rRNA, *nuc*, *femA*를 표적 유전자(target gene)로 사용하여 우유, 분유, 소시지, 소고기 분쇄육에서 특이성 및 검출한계를 비교검증하였다. 검증 결과, 가장 우수한 검출능력을 보인 primer를 선정하여, 각 식품에 *S. aureus*를 인위적으로 접종한 후 PCR법과 배지배양법의 검출능력을 비교하여 검증하였다. 한편, 배지 배양법에서 *S. aureus* 의심검출에 대해 확인동정법으로 사용되는 coagulase test의 효율성을 colony PCR법과 비교하는 검증시험도 동시에 수행하였다.

재료 및 방법

사용된 공시 균주 및 배양

PCR법의 특이성검사(inclusivity, exclusivity)를 위해 총 23종의 *S. aureus* (ATCC 6538, PH SEA-SEE, PH M 1-10, PH F 1-7)

*Corresponding author: Kun-Ho Seo, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
Tel: 82-2-450-4121
Fax: 82-2-3436-4128
E-mail: bracstu3@konkuk.ac.kr
Received September 14, 2013; revised October 12, 2013;
accepted October 14, 2013

와 4종의 non-*S. aureus* (*S. vitulinus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*) 및 11종의 non-*Staphylococcus* (*Bacillus cereus* ATCC 1475, *Campylobacter jejuni* NCTC 11168, *C. coli* ATCC 33559, *Clostridium perfringens* ATCC 8238, *Cronobacter Sakazakii*, *Enterococcus faecium* ATCC 70021, *E. faecalis* ATCC 51299, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Listeria monocytogenes* ATCC 51776, *Salmonella* spp.)가 사용되었다. 표준균주를 제외한 균주는 모두 식품분리 균주로서 KU식품안전연구소에서 보유하고 있는 것을 사용하였으며, 식품에 접종하기 위해 사용된 *S. aureus*는 표준균주인 ATCC 6538을 사용하였다. 영하 70°C에 냉동보관되어 있던 균주를 해동한 뒤 nutrient agar(NA; Difco, Detroit, MI, USA)에 획선도말(streaking)하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. Tryptic soy broth (TSB, Difco)에 10%의 NaCl (Junsei Chemicals, Tokyo, Japan)을 넣어 배양액(10% NaCl TSB)을 제조한 후 NA에서 잘 자란 집락을 37°C에서 24시간 증균 배양하였다. 접종을 위한 균주는 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Sigma, St. Louis, MO, USA)에 10배수로 희석한 뒤 NA에 100 µL를 평판도말(spreading)하였고 37°C에서 24시간 배양한 후 집락 수를 계수하여 사용하였다.

DNA 추출

배양액에서의 DNA 추출은 Seo와 Brackett(19)의 방법으로 하였으며 자세한 방법은 다음과 같다. 순수 배양액 또는 식품 시료에서의 배양액 1 mL을 취해 16,000×g로 3분간 원심분리하여 상층액을 버린 후, 각각의 pellet에 200 µL의 PrepMan™ Ultra reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 첨가하였다. 10초 이상 강력한 vortexing으로 잘 혼합한 후 100°C에서 10분간 가열해준 후, 2분간 상온에서 식히고 16,000×g로 3분간 재원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 상층액을 PCR을 위한 template DNA로 사용하였다.

PCR법에 사용된 primer 및 PCR 수행방법

*S. aureus*의 23S rRNA, *nuc*, *femA*를 목표유전자로 각각 사용한 3종의 PCR primer들의 유전자 서열 및 PCR 산물의 크기 등의 정보를 Table 1에 제시하였다.

PCR 수행을 위해 추출한 DNA 1 µL를 각각 1 µM 농도의 forward/reverse primer와 함께 Maxime PCR premix (Intron Biotechnology, Sungnam, South Korea)에 혼합하였으며 최종 용량은 20 µL가 되도록 하였다. T-Personal Thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany)를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 각 PCR 조건은 선행 연구들을 참조하여 제조사(Intron Biotechnology)의 지시에 따라 각 단계별 시간을 최적화하였다(Table 1).

검출한계

선정한 세 가지 표적유전자에 대한 PCR법의 검출한계를 알아

보기 위하여 Lee 등(20)의 연구를 참조하여 검출한계를 분석하였다. 순수 배양액의 검출한계와 식품에서의 검출한계를 알아보기 위하여 나누어 실험을 실시하였다. 순수 배양액에서 검출한계를 알아보기 위하여 10% NaCl TSB에서 37°C에서 24시간 배양된 *S. aureus* 배양액 1 mL를 멸균된 PBS 9 mL에 10배수로 희석하였다. 희석액은 희석단계별로 100 µL를 NA에 도말하여 37°C에서 24시간 배양 후, 균 수를 계산하였다. 또한 식품에 접종시의 검출한계를 알아보기 위하여 우유, 분유, 소시지, 소고기 분쇄육 각각에 10배수로 단계별 희석한 *S. aureus* 배양액 1 mL를 접종하고, 10% NaCl TSB 90 mL를 넣어 BagMixer stomacher (Interscience, Saint Nom, France)를 이용하여 상온에서 30초간 균질화하였다. 이들을 각각 1 mL씩 취하여 위에서 언급한 바와 같이 DNA를 추출하고 PCR을 수행하였다.

시료 준비와 상재균 수 측정 및 검증

대표적인 축산식품들 중 각 성상을 고려하여 유제품에 해당하는 우유와 분유, 육제품에 해당하는 소시지와 소고기 분쇄육을 시료로 선정하여 실험을 실시하였으며 모든 식품시료는 2012년 6월부터 8월까지 광진구에 위치한 대형마트에서 구매하였다. 각 식품 내 상재균이 목적균의 성장에 영향을 준다는 선행 연구들을 참고하여(20,21), 접종 전 호기성 상재균 수를 측정하였다. 각 식품 시료 25 g 또는 25 mL에 buffered peptone water (BPW, Difco) 225 mL를 첨가하고 BagMixer stomacher (Interscience)을 이용하여 30초간 균질화 한 후, 100 µL를 취해 10배수로 희석한 희석액을 NA에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하여 호기성 상재균 수를 측정하였다.

*S. aureus*의 식품 내 검증 실험은 통계학적 유의차를 비교할 수 있도록, 20개의 시료(각 25 g씩)에서 부분적인 양성률과 음성률 일 수 있는 적정한 수의 균을 접종하여 수행하였다. 추가적으로 50 g을 준비하여 각각 25 g씩 음성 및 양성 대조군으로 사용하였으며, 음성에는 1 mL의 PBS를, 양성에는 10⁷ CFU/g 이상의 균을 접종하였다. 접종 후 모든 시료는 실제 식품 시료 보관 환경과 유사하게 4°C에서 18-24시간 동안 보관하는 안정화 과정을 거쳤다(22,23). 식품접종과 동시에 실제 접종된 *S. aureus*의 수를 측정하기 위해 접종에 사용된 양과 동일한 균량을 적절히 희석한 후 NA에 도말하여 균수를 산정하였다.

배지법과 PCR법을 이용한 *S. aureus* 검출 및 최종확인시험

표준 시험법인 배지법을 사용한 *S. aureus*의 검출은 축산물 가공기준 및 성분 규격에 제시되어 있는 정성 시험방법을 사용하여 실험을 실시하였다(3). 안정화를 마친 500 g의 시료를 25 g씩 20개로 나누어 225 mL의 10% NaCl TSB와 함께 넣은 다음 stomacher를 이용하여 30초간 균질화 하고 37°C에서 24시간 증균 배양하였으며, 음성 및 양성 대조군도 동일한 과정을 거쳤다. 증균 배양액을 선택배지인 egg-yolk-tellurite (50 mL/L, Oxoid, Bas-

Table 1. Sequences of primers and PCR reaction conditions used in this study

Target gene	Primer sequence (5'-3')	Size	Reference	Reaction condition
23S rRNA	F: ACGGAGTTACAAAGGACGAC R: AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	1250 bp	Straub <i>et al.</i> , 1999 (13)	95°C, 2 min - (94°C, 20 s - 64°C, 20 s - 72°C, 60 s)×30 cycles - 72°C, 3 min
<i>nuc</i>	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R: AGCCAAGCCTTGACGAATAAAGC	279 bp	Brakstad <i>et al.</i> , 1992 (24)	94°C, 2 min - (94°C, 20 s - 64°C, 10 s - 72°C, 30 s)×30 cycles - 72°C, 3 min
<i>femA</i>	F: GCAAAGTGTGGCCACTATG R: TCATCACGATCAGCAAAAAGC	594 bp	Riyaz-Ul-Hassan <i>et al.</i> , 2008 (12)	94°C, 2 min - (94°C, 20 s - 64°C, 10 s - 72°C, 40 s)×30 cycles - 72°C, 3 min

ingstoke England)를 첨가한 BP agar (Oxoid)에 획신 도달하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 또한 증균 배양액 중 1mL를 취해 위에서 언급한 바와 동일한 방법으로 DNA를 추출하고 PCR법을 통해 양성여부를 판정하였다. 식품 내 인위접종을 통한 *S. aureus*의 검출은 검출한계 검사에서 가장 높은 민감도를 보인 primer로만 PCR이 진행되었다.

선택배지에서 배양이 끝난 후 투명한 환으로 둘러싸인 검은 광택이 나는 양성 의심 집락을 NA에서 계대배양하였다. 최종적으로 Staphylect Plus (Oxoid)를 이용한 coagulase 확인 시험을 통해 양성여부를 판정하였다. Coagulase 양성으로 확인된 균주들을 추후 colony PCR법으로 재확인하여 두 확인시험 결과를 비교하였다.

통계학적 분석

각 식품별로 2반복 실험을 수행한 후, GraphPad Instat (Graph-Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 통계분석을 실시하였으며 Fisher's exact test로 양성 검출률의 통계학적인 유의차($p < 0.05$)를 분석하였다.

결과 및 고찰

PCR법의 특이도와 민감도

총 23종의 *S. aureus*와 다른 15종의 균들에 대하여 PCR법의 특이도를 23S rRNA, *nuc*, *femA* 각 세 가지 표적유전자별로 검사한 결과 각각의 표적유전자에 대해 모든 *S. aureus*에서 PCR 양성반응이 일어난 반면, *S. aureus*가 아닌 다른 균들에서는 음성결과를 보였다(자료 미제시). 따라서 특이도는 모두 동일한 것으로 보였다.

세 가지 표적유전자에 대한 PCR법의 검출 한계를 분석한 결과 23S rRNA를 표적으로 했을 때 민감도가 가장 높았다. PBS, 분유, 소고기 분쇄육에서는 5.8×10^3 CFU/mL까지 검출이 가능하였으며, 우유와 소시지에서는 5.8×10^4 CFU/mL까지 검출이 가능하였다. 이와 비교하여 *nuc*를 표적으로 한 경우 PBS, 우유, 소시지에서는 동일한 검출한계를 보였으나, 분유와 소고기 분쇄육에서는 5.8×10^4 CFU/mL까지 검출이 가능하여 차이를 보였다. *femA*를 표적으로 했을 때는 모든 식품에서 민감도가 낮았으며, 특히 소고기 분쇄육에서 가장 큰 차이를 보였다(Table 2).

각 primer 서열이 발표된 앞선 연구들에서 각 표적유전자들에 대한 검출한계는 순수배양액에서 *nuc*의 경우 10^2 CFU/mL 이하(24), *femA*의 경우 10^2 CFU/mL 수준으로(12) 본 연구에서 도출된 검출한계보다 약 100배가량 높은 민감도를 보였다. 이 같은 차이는 본 연구에서 *S. aureus* 검출시간을 단축시키기 위해 설정한 DNA 추출과정, PCR 반응물 조성 및 반응 조건을 세 가지 표적유전자에 대해 동일하게 적용한 결과로 사료된다. 반면, 23S

rRNA의 경우 크립에서 검출한계가 10^3 CFU/mL 수준으로 보고 되어(13), 본 연구 중 성상이 유사한 유제품들에서의 검출한계와 비교적 큰 차이를 보이지 않았다. 위의 결과를 토대로 볼 때 세 가지 primer의 특이도는 모두 동일했으나 본 실험 방법에서 민감도는 23S rRNA primer가 가장 높은 결과를 보여주어 추후 PCR 기법과 coagulase법 및 배지법과의 비교시험에 이 primer를 사용하였다.

배지법과 PCR법 결과 및 최종확인시험 결과 비교

우유, 분유를 포함한 유제품과 소시지, 소고기 분쇄육을 포함한 유제품에서 배지법의 확인시험인 coagulase 확인시험과 colony PCR 확인시험 그리고 PCR법을 이용한 신속 검출법과 비교한 결과를 식품별 상재균 수 및 500 g 당 집중량과 함께 각각 Table 3와 Table 4에 나타내었다. 모든 실험에서 시료의 음성 및 양성 대조군은 배지배양법과 PCR에서 결과가 모두 음성과 양성으로 나타나 사용된 시료 및 실험방법이 적합했음을 보여주었다. 또한 음성 대조군이 적절하게 나왔으므로 사용된 식품들은 자연적으로 오염된 시료가 없었고 위양성의 가능성은 배제되었다고 가정하였다. 유제품과 육제품 모두에서 coagulase와 colony PCR 확인 시험 비교 결과 두 방법 모두 동일하게 양성으로 검출되어 두 방법 간에 차이가 없었다(자료 미제시). 표준검출법인 배지배양법의 coagulase 확인시험은 비가공식품의 경우 위양성 결과가 많이 나올 수 있어 colony PCR 같은 확인시험으로의 개선이 필요하다는 보고가 있으나(20), 본 연구에서는 비가공식품인 소고기 분쇄육을 포함한 모든 식품에서 coagulase와 colony PCR 확인시험의 결과가 동일하게 나타났다(Table 4). 본 연구에서 사용된 선택배지인 Baird Parker agar의 검출대상은 coagulase positive staphylococci로, 시료에 존재하는 자연감염균의 종류 및 오염정도에 따라 위양성 집락이 나타날 수 있으며, 그로 인해 *S. aureus*의 최종 검출률이 달라질 수 있다고 보고되어 있다(25,26). 같은 비가공식품 이더라도 앞선 연구의 생 돼지고기와 야채 셀러드가 본 연구의 소고기 분쇄육보다 non-*aureus* coagulase positive staphylococci의 오염정도가 높았을 것으로 사료된다. 또한 소고기 분쇄육과 앞선 연구 중 이와 성상이 유사한 생 돼지고기에 대한 *S. aureus* 접종량은 각각 213-384, 25-90(CFU/500 g)이며 상재균 수는 각각 1×10^4 , 2.7×10^4 (CFU/mL)으로 소고기 분쇄육의 비교적 낮은 상재균 수와 높은 집중량도 위 시험 결과에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다.

각 시료 종류에 따른 PCR법 및 배지배양법의 검출능력 분석

PCR법과 배지배양법의 비교 결과는 유제품과 육제품에서 차이를 보였다(Table 3, Table 4). 유제품인 우유의 경우 PCR법을 사용한 신속검사 결과 34개의 양성 검출되어 위 두 확인시험법과 1개의 시료에서 차이가 있었지만 PCR법과 배지배양법간의

Table 2. Detection limit of PCR for *Staphylococcus aureus* from pure culture and experimentally inoculated food samples

Inoculation level (CFU/mL)	Control			Milk Products						Meat products					
	PBS			Milk			Dried Infant Formula			Sausage			Ground Beef		
	23S	<i>nuc</i>	<i>femA</i>	23S	<i>nuc</i>	<i>femA</i>	23S	<i>nuc</i>	<i>femA</i>	23S	<i>nuc</i>	<i>femA</i>	23S	<i>nuc</i>	<i>femA</i>
5.8×10^6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5.8×10^5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5.8×10^4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
5.8×10^3	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
5.8×10^2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 3. Comparison of culture methods and PCR for detection of *Staphylococcus aureus* from artificially inoculated milk and powdered infant formula

Samples (No. of background microflora)	Trials	Inoculum levels (CFU/500g)	No. of positive samples/number of samples tested		
			Culture methods		PCR
			Coagulase test	Colony PCR	
Milk (0 CFU/mL)	1	36	17/20	17/20	17/20
	2	60	18/20	18/20	17/20
Total ¹⁾			35/40 ^A	35/40 ^A	34/40 ^A
Dried infant formula (0 CFU/g)	1	33	5/20	5/20	5/20
	2	56	7/20	7/20	7/20
Total ¹⁾			12/40 ^A	12/40 ^A	12/40 ^A

¹⁾Different letters within a row indicate a significant difference ($p < 0.05$).

Table 4. Comparison of culture methods and PCR for detection of *Staphylococcus aureus* from artificially inoculated sausage and ground beef

Samples (No. of background microflora)	Trials	Inoculum levels (CFU/500 g)	No. of positive samples/number of samples tested		
			Culture methods		PCR
			Coagulase test	Colony PCR	
Sausage (0 CFU/g)	1	47	6/20	6/20	10/20
	2	70	7/20	7/20	14/20
Total ¹⁾			13/40 ^A	13/40 ^A	24/40 ^{B*}
Ground beef (1.0×10 ⁴ CFU/g)	1	213	8/20	8/20	12/20
	2	384	11/20	11/20	20/20
Total ¹⁾			19/40 ^A	19/40 ^A	32/40 ^{B**}

¹⁾Different letters within a row indicate a significant difference ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$).

통계학적 유의차는 없었으며, 분유의 경우 각 방법에서 모두 12개의 양성인 검출되어 동일한 결과를 나타내었다. 육제품인 소시지의 경우 PCR법을 사용한 신속검사 결과 24개의 양성인 검출되었고, 위 두 확인시험법과 11개의 시료에서 차이를 보여 PCR과 두 확인시험법간의 통계적 유의차가 있었고($p < 0.05$), 소고기 분쇄육의 경우 PCR법과 배지배양법에서 각각 32개와 19개의 시료에서 양성인 검출되어 각 방법간의 높은 통계학적 유의차를 보였다($p < 0.01$).

본 연구에서 PCR법은 육제품에서 보다 육제품에서 배지배양법에 비해 보다 많은 양성을 검출하였는데, 이는 우유 속의 칼슘이 co-factor인 마그네슘과 경쟁하여 *Taq* polymerase inhibitor로 작용함으로써 PCR 반응을 저해시킬 수 있다고 보고한 앞선 연구처럼(27), 육제품 내 칼슘 등의 어떤 물질이 PCR 반응의 inhibitor로 작용하여 민감도를 저하시켰을 것으로 사료된다. 칼슘으로 인한 PCR 반응저하는 마그네슘이나 *Taq*의 첨가로도 거의 개선이 안되고, 또한 humic acid, melanin, hematin, tannic acid 같은 다른 PCR inhibitor에 효과적인 BSA (bovine serum albumin)로도 효과가 없다고 보고 되었다(28). 따라서 육제품에서의 PCR법의 검출 효율을 증가시키기 위해서는 추가적인 연구가 절실히 필요할 것으로 사료된다.

또한 같은 육제품 중에서도 소시지에서 보다 소고기 분쇄육에서 PCR법은 배지배양법에 비해 더욱 많은 양성을 검출해 냈는데, 이는 소고기 분쇄육에 분포하는 상재균들에 의해 접종된 *S. aureus*의 성장이 저해되어 배지배양법에서의 결과에 영향을 미친 것으로 사료된다. 식품의 다양한 성장과 식품 내 상재균 수가 많은 경우에 목표하는 원인균의 분리가 어렵기 때문에(29), 식중독

균의 신속하고 정확한 검출을 위해서는 식품의 종류에 적합한 효과적인 검출법을 확립하는 것이 매우 중요하다고 사료된다.

본 연구 결과에 의하면 소시지와 소고기 분쇄육 같은 육제품에서 표준검출법인 배지배양법보다 PCR법에서 보다 많은 양성을 검출하였기 때문에 육제품에서는 PCR법이 보다 효과적인 것으로 사료된다. 육제품의 경우에도 두 방법간의 통계적 유의차가 존재하지 않으므로, 기존의 배지배양법에 비해 비교적 빠른 시간 내에 검출이 가능한 PCR법으로 대체 가능할 것으로 사료된다.

이러한 결과를 종합해 볼 때, 본 연구에서 선별된 23S rRNA를 표적 유전자로 하는 PCR법은 5-6일이 소요되는 기존의 표준검출법과 비교하여 2일 이내에 신속하게 검출이 가능하다. 또한 해당 기법은 육제품 내의 칼슘 같은 PCR inhibitor의 존재에도 불구하고 기존의 표준검출법과 거의 동일한 검출 능력을 보이는 한편, 식품 조성과 총 세균 수에 별다른 영향을 받지 않아 특히 상대적으로 상재균 수가 많은 비가공식품을 포함한 육제품에서는 배지배양법에 비해 뛰어난 검출 능력을 보인다. 따라서 *S. aureus*를 검출하기 위한 PCR법은 다양한 축산 식품에서 효과적인 검출법의 하나로 사용이 가능하다고 사료된다.

요 약

본 연구에서는 육제품 및 육제품에서 *Staphylococcus aureus*를 검출하기 위한 PCR과 배지배양법을 비교검증 하였다. 우유, 분유, 소시지, 소고기 분쇄육에 *S. aureus*를 인위적으로 접종시킨 후, 축산물 가공기준 및 성분규격에 따라 10% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth(TSB)에서 증균배양 하였으며, Baird Parker agar

에 선택배양 하였다. PCR은 TSB에서 1 mL를 채취한 후 DNA를 추출하여 시행하였으며, *S. aureus*의 23s rRNA를 표적으로 하는 primer를 사용하였다. 의심집락에 대해 coagulase test와 colony PCR을 통한 확인시험을 실시하였다. 실험결과 우유와 분유에서는 배지배양법과 PCR간에 통계학적 유의차가 존재하지 않았다. 소시지와 소고기 분쇄육의 경우에는 PCR이 배지법에 비해 더 많은 양성을 검출하여 높은 통계학적 유의차를 보였다($p < 0.05$). 연구결과를 종합하면, 유제품 및 육제품에서 PCR을 통한 *S. aureus*의 검출은 기존 배지배양법에 비해 시간과 노동력을 절감할 수 있는 효과적인 방법으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 건국대학교 학술진흥연구비 지원에 의한 논문입니다.

References

- Alarcon B, Vicedo B, Aznar R. PCRbased procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. J. Appl. Microbiol. 100: 352-364 (2006)
- Bae HJ, Park HJ. Hazard analysis of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat sandwiches. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 36: 938-943 (2007)
- QIA. The Processing Standards and Ingredient Specifications for Livestock Products. Korean Animal and Plant Quarantine Agency. Anyang, Korea. pp. 203-205 (2012)
- Warren BR, Parish ME, Schneider KR. Comparison of conventional culture methods and fta filtration-nested PCR for the detection of *Shigella boydii* and *Shigella sonnei* on tomato surfaces. J. Food Protect. 68: 1606-1612 (2005)
- Pagadala S, Parveen S, Schwarz JG, Rippen T, Luchansky JB. Comparison of automated BAX PCR and standard culture methods for detection of *Listeria monocytogenes* in blue crabmeat (*Callinectes sapidus*) and blue crab processing plants. J. Food Protect. 74: 1930-1933 (2011)
- Shalaby MA, Mohamed MS, Mansour MA, Abd EHA. Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods for diagnosis of *Listeria monocytogenes* isolated from different clinical specimens and food stuffs. Clin. Lab. 57: 919-924 (2011)
- Malorny B, Huehn S, Dieckmann R, Krmer N, Helmuth R. Polymerase chain reaction for the rapid detection and serovar identification of *Salmonella* in food and feeding stuff. Food Anal. Method. 2: 81-95 (2009)
- Hwang BH, Lee WJ, Cha HJ. Polymerase chain reaction-based detection of total and specific *Vibrio* species. Appl. Biochem. Biotech. 162: 1187-1194 (2010)
- Chon JW, Park JS, Hyeon JY, Park C, Song KY, Hong KW, Hwang IG, Kwak HS, Seo KH. Development of real-time PCR for the detection of *Clostridium perfringens* in meats and vegetables. J. Microbiol. Biotechn. 22: 530-534 (2012)
- Rushdy AA, Salama MS, Othman AS. Detection of methicillin/oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from some clinical hospitals in Cairo using *MecA/Nuc* genes and antibiotic susceptibility profile. Int. J. Agric. Biol. 9: 800-806 (2007)
- Thomas LC, Gidding HF, Ginn AN, Olma T, Iredell J. Development of a real-time *Staphylococcus aureus* and MRSA (SAM-) PCR for routine blood culture. J. Microbiol. Meth. 68: 296-302 (2007)
- Riyaz-Ul-Hassan S, Verma V, Qazi GN. Evaluation of three different molecular markers for the detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. Food Microbiol. 25: 452-459 (2008)
- Straub JA, Hertel C, Hammes WP. A 23S rRNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. J. Food Protect. 62: 1150-1156 (1999)
- Maes N, Magdalena J, Rottiers S, De Gheldre Y, Struelens MJ. Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures. J. Clin. Microbiol. 40: 1514-1517 (2002)
- Chikkala R, George NO, Ratnakar KS, Iyer RN, Sriharan V. Heterogeneity in *femA* in the indian isolates of *Staphylococcus aureus* limits its usefulness as a species specific marker. Adv. Infect. Dis. 2: 82-88 (2012)
- Jonas D, Grundmann H, Hartung D, Daschner FD, Towner KJ. Evaluation of the *mecA femB* duplex polymerase chain reaction for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Clin. Microbiol. 18: 643-647 (1999)
- Stephan R, Annemiller C, Hassan AA, Lmmler C. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. Vet. Microbiol. 78: 373-382 (2001)
- Pinto B, Chenoll E, Aznar R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. Syst. Appl. Microbiol. 28: 340-352 (2005)
- 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)
- Lee JH, Song KY, Hyeon JY, Hwang IG, Kwak HS, Han JA, Chung YH, Seo KH. Comparison of standard culture method and real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus* in processed and unprocessed foods. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 30: 410-418 (2010)
- Hyeon JY, Hwang IG, Kwak HS, Park JS, Heo S, Choi IS, Park C, Seo KH. 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 (2009)
- Han SR, Hyeon JY, Kim HY, Park JS, Heo S, Shin HC, Seo KH. 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: 616-622 (2008)
- Chon JW, Song KY, Kim SY, Hyeon JY, Kim YG, Hwang IG, Kwak HS, Seo KH. Comparison of real-time PCR and conventional culture method for detection of *Cronobacter* spp. in powdered foods. Korean J. Microbiol. 47: 87-91 (2011)
- Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J. Clin. Microbiol. 30: 1654-1660 (1992)
- De Buyser ML, Lombard B, Schulten SM, In't Veld PH, Scotter SL, Rollier P, Lahellec C. Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: 1999-Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. Int. J. Food Microbiol. 83: 185-194 (2003)
- Davis JA, Farrah SR, Wilkie AC. Selective growth of *Staphylococcus aureus* from flushed dairy manure wastewater using acriflavinesupplemented mannitol salt agar. Lett. Appl. Microbiol. 42: 606-611 (2006)
- Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HC. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. Lett. Appl. Microbiol. 22: 153-158 (1996)
- Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. J. Forensic Sci. 55: 25-33 (2010)
- Kim MH, Kim WJ, Shin WS, Shon DH, Cha SK. Feasibility study on the use of liposomes for detecting food-borne pathogenic bacteria. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 23: 278-283 (2003)