식중독세균 신검출 기법 – PCR 기법

Rapid detection method for foodborne pathogens - PCR

홍 광 원
Kwang-Won Hong

동국대학교
Dongguk University

Conventional PCR

최근에 외식산업이 급격히 팽창하고 학교나 직장에서 대량급식이 증가하는 추세와 더불어 식중독 사고의 발생 가능성이 항상 잠재하고 있다. 미생물에 의한 식중독의 발생을 줄이기 위해 식품이 원산지에서 소비자에 이르기까지 전 과정에 걸쳐 식중독균의 존재여부를 정확하게 판단할 수 있는 미생물 검출시스템이 필요하다. 현재 식품에서 박테리아의 존재를 확인하기 위해 주로 사용하는 분석방법은 액체배지에서 증균한 다음 여러 단계를 거쳐 선택배지에 도말하거나 생화학적 또는 혈청학적 분석방법을 이용하고 있다. 이러한 전통적인 배지법은 공인된 방법이긴 하나 시간과 노력이 많이 요구되는 단점이 있으며 그 결과가 명확하지 않는 경우도 종종 있다. 그러므로 이를 보완하거나 대체하기 위해 항원항체 반응을 이용하는 immunoassay나 nucleic acid의 검출을 기반으로 하는 polymerase chain reaction (PCR) 방법이 새로운 신속 검출방법으로 대두되고 있다.

PCR은 1980년대 중반에 개발된 이래 의학, 약학, 법의학 등의 분야에서 유전병의 진단, genetic fingerprinting, 유전자 cloning, 친자확인, 감염성 질병의 진단 등 여러 목적으로 폭넓게 이용되어 왔다. 근래에 식품산업에서도 DNA나 RNA의 검출을 기반으로 하는 신속검출 방법으로 식중독을 일으키는 세균이나 바이러스의 검출 및 동정, GMO의 확인 및 식품에의 혼입 여부, 가공식품 내에 hidden allergen의 존재 여부 등을 확인하는 등 그 활용 가능성이 점차 증대하고 있다.

1) Polymerase Chain Reaction의 원리

PCR은 내열성 DNA 중합효소를 이용하여 시험관내에서 DNA를 대량으로 증폭시키는 기술이다. 단일 target gene을 대상으로 DNA를 증폭하는 conventional PCR의 reaction mixture는 template DNA, dNTPs, target gene에 특이적인 forward 및 reverse primers, 내열성 DNA polymerase 및 buffer로 구성된다. 반응은 thermocycler에서 온도에 따라 구분하면 먼저 denaturation 단계로 온도가 94–

Corresponding author : Kwang-Won Hong
Department of Food Science and Technology, Dongguk University, 26, 3 Pil-dong, chung-gu, Seoul, 100-715, Korea
Tel: +82-2-2260-3369 / Fax: +82-2-2285-3988
E-mail: hkwon@dongguk.edu

95℃로 올라가면 double strand DNA가 두 가닥으로 분리가 된다. 다음의 annealing 단계에서 primer들의 melting temperature에 따라 차이가 있으나 온도가 대략 50-60℃ 사이로 내려가면 과량으로 넣어준 forward 및 reverse primer들이 각각 DNA의 상보적인 서열에 특이적으로 결합한다. 이어서 extension 단계로 온도를 내열성 DNA polymerase의 최적 온도인 72℃로 올려주면 중합반응이 개시되며 DNA가 증폭되는 일정 시간이 지나면 다시 denaturation 단계로 연결된다. 이 세 단계가 1 cycle을 구성하여 이론적으로 합성되는 DNA의 양이 매 cycle마다 2배씩 증가하게 된다. 일반적으로 PCR 반응은 30-40 cycle 동안 진행되며 증폭된 DNA product (amplicon)의 양은 반응 초기에는 지수적으로 2배씩 증가하여 정량이 가능하나 증폭된 양이 적어 육안으로 확인할 수는 없다. 초기 이후에는 점진적으로 효소 활성의 감소, 효소 저해물질의 축적, 기질의 소모 등으로 인해 증폭효율이 점차 감소하기 시작하여 종료시에는 증폭효율이 zero에 근접하여 생성되는 DNA product의 양이 cycle 수에 비례하지 않는다. 그러므로 conventional PCR은 반응 종료후의 DNA 생성을 확인하는 것이므로 정성적인 분석방법이 된다 (그림 1).

한편 증폭된 DNA product들은 agarose gel electrophoresis를 통해 그 크기에 따라 전개된다 (그림 2). DNA는 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator로 보호장치를 착용한 상태에서 육안으로 관찰할 수 있다. 각 amplicon들이 target gene에서 제대로 증폭되었는지를 확인하는 방법은 보통 그 크기로 판단하나 필요한 경우 amplicon에 특이적인 probe로 Southern blotting을 하거나, 제한효소로 절단하여 생성된 DNA 단편의 크기를 확인하거나, DNA sequencing을 통해 최종적으로 확인할 수 있다.

2) PCR의 quality control

PCR을 이용하여 식중독균을 검출 및 확인하고자할 때 target gene의 선정과 primer의 제작이 그 성패를 좌우하게

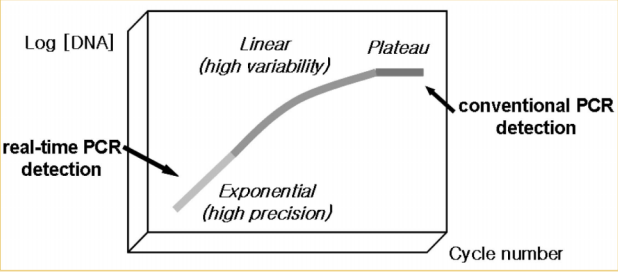

그림 1. PCR을 이용한 DNA의 증폭 과정.

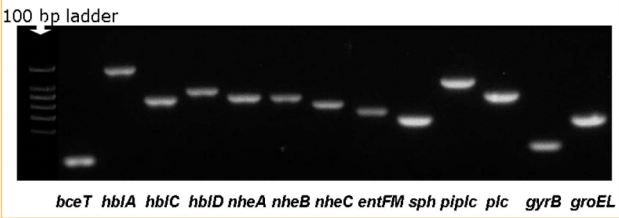

그림 2. PCR로 증폭한 *B. cereus* DNA 단편들의 agarose gel 전기영동 결과.

표 1. PCR을 이용한 식중독균의 검출에 사용되는 유전자

Strain	Target Gene
Bacillus cereus	*cerAB*, 16S rRNA, *groEL*, *gyrB*, *nhe*, *hbl*, *bceT*
Campylobacter spp	*fla*, 16S rRNA, *ask*, *mapA*, *ceuE*, *ccoN*, *omp50*
Clostridium perfringens	*etxB/D*, *pls*, *cpe*, *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe*
Eschericiha coli O157:H7	*stx1*, *stx2*, *uidA*, *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *fliCh7*, *hlyAO15*
Listeria monocytogenes	*iap*, *hlyA*, *iap*, *hlyA*, *inlAB*, 16S rRNA, *actA*, *hlyA*
Salmonella spp	*oriC*, *ompC*, *invA*, *16S* rRNA, *rfbS*, *sefA*, *orf6e*
Shigella spp	*spa*, *rfc*, *virA*, *ial*, *ipaH*
Staphylococcus aureus	*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *tst*, *eta*, *etb*, 23S rRNA, *entC*
Vibrio spp	*tdh*, *vvhA*, *toxR*, *hlyA*, *tdh*, *trh*, *tlh*
Yersinia enterocolitica	16S rRNA, *yadA*, *ail*, *yst*

출처: Mustapha (2006)

된다. 일반적으로 target gene은 해당 균에만 특이적으로 존재하는 toxin gene과 같은 virulence factor들과 예를 들어 16S rRNA gene과 같이 모든 균에 존재하는 nonvirulence factor들을 대상으로 할 수 있다 (표 1). Nonvirulence factor의 염기서열을 이용하는 경우 다른 여러 종들의 염기서열을 같이 비교하여 primer의 염기서열이 서로 유사하지 않도록 제작해야 한다. 제작한 primer set는 가능한 적은 수의 cell을 검출할 수 있으면서 동시에 같은 종은 모두 인식하고 다른 종은 물론 유전적으로 매우 유사한 종들도 구분할 수 있어야 한다.

PCR의 유효성을 검증하기 위해서 일명 gold standard라고 불리는 전통적인 배지법의 결과와 비교하여 PCR positive이나 culture negative인 false-positive와 역으로 PCR negative이지만 culture positive인 false-negative를 확인하는 것이 필요하다. False-positive는 여러 원인에 의해 일어날 수 있다. dead cells, 살아 있으나 배양은 되지 않는 상태의 cells, cell들이 상해를 받았거나 주변 환경이 좋지 않을 때 일어날 수 있으며 또한 template DNA, 시약, 기구 등과 같은 PCR 시스템이 오염되어 일어날 수 있다. False-positive는 실험적으로 흔히 일어날 수 있는 오염을 줄임으로서 어느 정도 예방이 가능하다. 샘플에서 DNA를 추출, 시약의 제조, PCR setup, thermocycler의 사용, PCR product를 확인하는 작업을 하는 구역들을 가능한 물리적으로 구분하여 사용하는 것이 바람직하다. 또한 positive control과 template DNA가 들어있지 않은 negative control을 항상 같이 시행하거나, primers의 non-specific binding으로 인한 PCR products의 생성을 막기 위해 hot-start 방법을 사용하는 것이 좋다. 식품중의 균을 검출할 경우 일어나기 쉬운 false-negative는 주로 food matrix들에 들어있는 PCR 저해물질들에 의한 경우가 많다. false-negative를 막기 위해서는 미생물과 전혀 상관없는 control DNA (virus 또는 plasmid DNA 등)를 동시에 증폭시키는 internal amplification control을 각 PCR 시스템마다 구성하여 사용하는 것이 좋다.

conventional PCR이 식중독균을 검출하고 확인하는데 기존의 배지법, 생화학적 분석 및 혈청학적 방법보다 매우 신속하고 예민하며 정확하나 여러 한계를 가지고 있다. target gene의 정확한 증폭 여부를 주로 DNA product의 size에 의존하다 보니 추가로 확인 단계가 필요할 수 있으며 PCR 반응후 agarose gel electrophoresis하는 과정에서 cross contamination이 일어날 수 있고 정성적이며 다량의 샘플을 다루기가 곤란하고 자동화가 어렵다는 단점을 지니고 있다.

Modified PCR techniques

conventional PCR 방법의 한계를 극복하고자 기존 방법에 비해 신속성, 정확성, 검출한계 등이 우수하거나 자동화 및 정량도 가능한 방법들이 속속 개발되어 사용되고 있다. 식중독균의 검출과 관련하여, 먼저 여러 primer pair를 사용하여 여러 target 유전자들을 동시에 검출하는 multiplex PCR, viable cell의 확인을 목적으로 RNA를 검출하는 reverse transcription PCR, PCR과 ELISA 방법을 혼용한 PCR-ELISA 등이 알려져 있다. 또한 정성적이며 자동화가 곤란한 conventional PCR 방법의 단점을 보완하기 위해 nonspecific fluorescent double-stranded DNA-binding dyes (SYBER Green 등)이나 specific fluorescent probe (TaqMan probe 등)를 사용하여 실시간으로 정량적 측정이 가능한 real-time PCR 방법이 개발되어 널리 사용되고 있다.

1) Multiplex PCR을 이용한 식중독균의 검출

Multiplex PCR은 여러 primer set을 이용하여 한 종 또는 여러 종에서 동시에 여러 target DNA를 검출하는 방법이다. 이 방법은 많은 시간과 노력을 줄일 수 있어 DNA를 검사하는 genotyping, GMO detection, pathogen detection 등 여러 분야에서 많이 이용되고 있다. Multiplex PCR은 증폭 과정 중 여러 primer set들 간의 간섭으로 primer-dimer들이 형성되거나 amplicon들의 양적인 차이가 날 수 있으며 그로 인해 sensitivity가 감소할 수도 있다. 따라서 최적의 결과를 얻기 위해서 primer, template DNA, polymerase, buffer, 2가 양이온 등의 농도나 annealing 온도 등을 최적화하는 과정이 까다로운 단점이 있다. 그러나 일단 최적화된 multiplex PCR assay는 식품에서 식중독균들을 검출하거나

구분하는데 경제적으로 매우 유용하게 활용될 수 있다. Multiplex PCR은 식중독균인 *Clostridium perfringenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylocccus aureus* 등에서 각각의 multiple toxin gene들을 동시에 검출하였으며, *Campylobacter jejuni*와 *C. coli*와 같은 유사한 종들을 구분하는데 이용되었다. 식품에서 *E. coli* O157:H7, *Salmonella*나 *Shigella*와 같은 여러 종을 동시에 검출하는 목적으로도 이용되고 있다.

2) Reverse-Transcription PCR을 이용한 식중독균의 검출

Reverse-Transcription PCR (RT-PCR)은 RNA를 reverse transcriptase를 이용하여 complementary DNA로 전환시킨 후 이 cDNA를 PCR로 증폭시키는 기술이다. 일반적으로 bacteria에서 RNA, 특히 mRNA는 half-life가 대략 40 초에서 20 분으로 매우 짧고 죽으면 즉시 분해 되므로 viable cell의 지표로 이용할 수 있다. PCR을 이용하여 bacteria의 DNA를 증폭하는 경우 dead cell의 DNA가 증폭되어 false-positive를 나타낼 수도 있다. 그러므로 mRNA를 target으로 하는 RT-PCR을 이용하면 dead cell에 의한 false-positive를 줄일 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 식품에 RT-PCR assay의 적용은 식품의 복잡한 성분 때문에 식중독균에서 분해되지 않은 상태의 mRNA를 추출하기가 쉽지 않아 제한적이기는 하나 *Listeria monocytogenes*, *Vibrio. cholerae*, *S. aureus*, *E. coli* 등의 검출 사례가 알려져 있다. RT-PCR의 검출 한계는 target gene에 따라 좌우되며 균이 생육하는 동안 target gene의 transcription level이 일정하게 높은 것이 바람직하다. *E. coli* O157:H7의 경우 RT-PCR 방법이 PCR 방법보다 덜 예민하기 때문에 RT-PCR 방법을 이용할 경우 더 많은 양의 균을 사용해야 하는 것으로 알려졌다. RT-PCR product들을 agarose gel에서 ethidium bromide로 염색하여 관찰하는 것보다 digoxigenin-labeled probe를 이용한 Southern hybridization 방법을 사용하는 것이 대략 500배 정도의 sensitivity를 증가시키는 것으로 알려져 *L. monocytogenes*의 major extracellular protein gene인 *iap*를 target으로 한 경우 순수 배양액에 대해 10-15 cfu/ml 까지 검출한 것으로 보고되었다.

3) PCR-ELISA

PCR-enzyme linked immunosorbant assay (PCR-ELISA)는 PCR로 증폭된 DNA product들을 ELISA로 확인하는 매우 신속하고 정확한 방법이다. PCR의 기질로 digoxigenin (DIG)-labeled dUTP가 사용되어 DNA product들이 DIG으로 표지되면 이들과 상보적으로 결합할 수 있는 biotin-labeled capture probe가 DNA product를 well plate에 고정화시키고 ELISA 방법으로 분석한다. PCR-ELISA는 우유나 육류에 인위적으로 접종한 *Salmonella* spp의 *inv* gene을 target으로 하였을 때 food sample 25 g에서 5 cell을 검출할 수 있을 정도로 대단히 예민한 결과를 보여주었다. 가금류에서도 *Campylobacter*의 *ceuE* gene과 *Salmonella enterica*의 *inv* gene을 target으로 각각 $4x10^1$과 $2x10^2$ cfu/ml의 검출한계를 기록하여 conventional PCR 방법보다 100-1000 배의 sensitivity를 보였다. 그 외에도 Shiga toxin을 생성하는 *E. coli* (STEC)의 경우 STEC의 serotypes이나 Shiga toxins의 genotypes에 따라 검출한계는 0.1-10 cfu로 역시 단일 PCR 방법보다 sensitivity가 증가하였다.

Real-time PCR

1) real-time PCR의 원리

real-time PCR 방법은 target gene에 특이적으로 결합하는 primer set에 의해 생성된 DNA 단편 (amplicon)에 특이적으로 결합하는 fluorescent probe를 이용하여 DNA가 지수적으로 증가하기 시작하는 초기부터 종료할 때까지 전 증폭과정을 실시간으로 파악할 수 있는 기술로서 conventional PCR에 비해 PCR 반응의 specificity와 sensitivity를 비약적으로 향상시켰다. 정량적 real-time PCR에서 이용되는 fluorescent

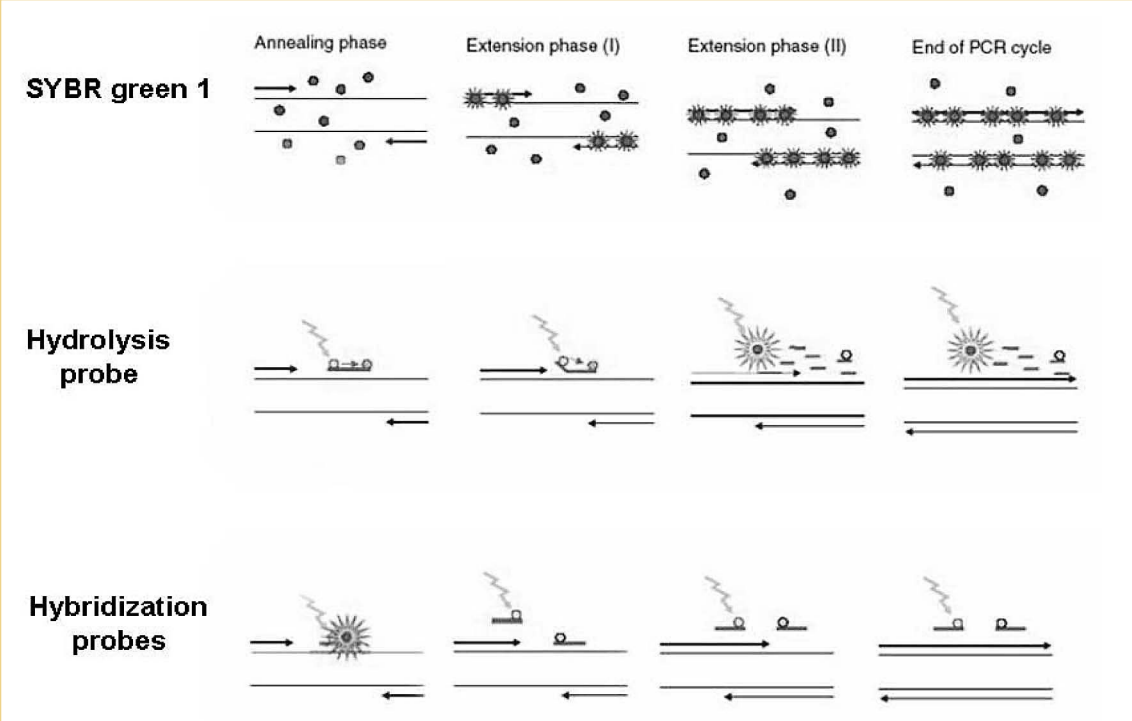

그림 3. Fluorescent probe의 사용에 따른 정량적 real-time PCR 기술의 원리. 출처: van der Velden (2003)

probe가 형광을 내는 방법에 따라 probe는 DNA-binding agents, hydrolysis probes 및 hybridization probe로 크게 세 종류로 나누어 볼 수 있다 (그림 3).

DNA-binding agents (SYBR Green 또는 SYBR Gold)는 nonspecific한 fluorescent dyes로서 증폭되는 이중가닥 DNA의 minor groove에 결합할 때 형광을 낸다. Hydrolysis probe는 amplicon과 상보적인 염기서열을 가지는 oligonucleotide로 구성된 TaqMan probe나 molecular beacon 등이 있으며 이들의 5'말단에는 reporter dye가 3' 말단에는 quencher가 각각 부착되어 있다. TaqMan probe의 경우, DNA 중합효소가 중합반응 도중 증폭된 DNA의 한 가닥과 상보적 결합을 한 probe를 만나면 exonuclease 활성을 이용하여 probe의 5'말단부터 절단하여 제거한다. 이때 reporter dye가 유리되면서 형광을 나타낸다. 한편 LightCycler에서 사용하는 hybridization probe는 amplicon과 상보적인 염기서열을 가지는 donor probe와 acceptor probe 두 종류의 oligonucleotides로 구성된다. 두 probe가 증폭된 DNA의 한 가닥과 1-5 nucleotide 정도의 아주 근접한 거리에서 상보적 결합을 할 경우 형광을 나타낸다.

정량적 real-time PCR에서 초기에 증폭되는 DNA의 양에 비례하여 fluorescent probe에 의한 형광의 강도도 비례적으로 증가한다. 기계적으로 일정한 양의 형광 검출이 가능한 시점을 cycle threshold (C_t) 값으로 나타낼 수 있다. C_t는 PCR 증폭 도중에 발생하는 형광의 양이 정해진 threshold를 초과하여 검출되기 시작하는 cycle의 수를 말하며 최초 DNA copy수의 log 값에 역비례한다 (그림 4). 즉 C_t 값이 작을수록 초기 DNA의 양이 더 많다는 것을 의미한다. $\triangle$Rn은 PCR 반응 도중 생성되는 형광의 세기를 나타낸다.

2) Real-time의 quality control

Amplicon에 특이적인 probe (hydrolysis probes 및 hybridization probe)를 사용하는 real-time PCR의 경우, 반응을 최적화하기 위해 사용하는 primer sets와 probes를 조합하여 일정한 template DNA 농도에서 높은 $\triangle$Rn과 가장 낮

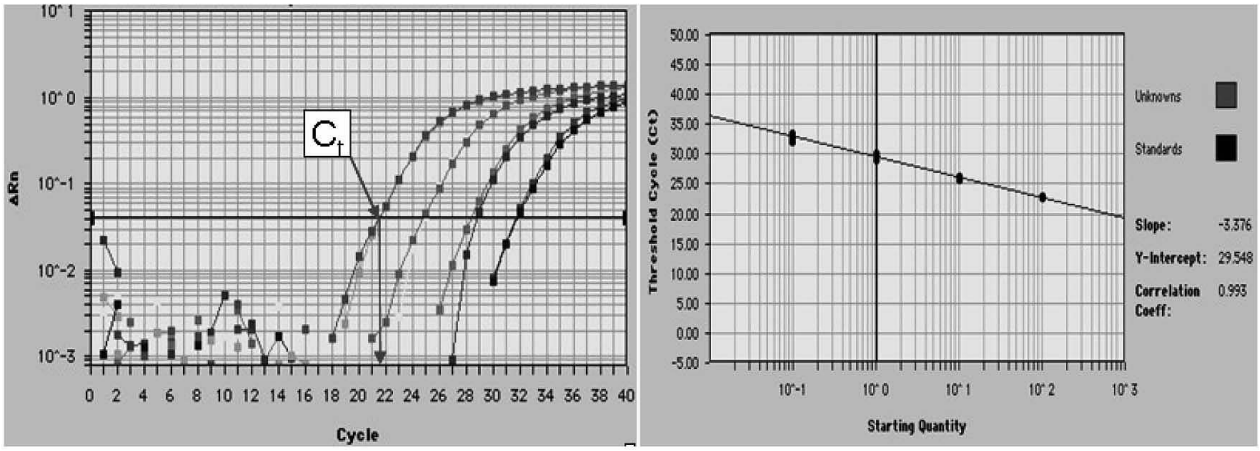

그림 4. Real-time PCR (TaqMan probe)을 이용한 *Enterobacter sakazakii* 16S rDNA 단편의 증폭. C_t: threshold cycle.

은 C_t 값을 나타내는 primer set와 probe를 선택한다. Template DNA를 십진법으로 여러 단계 희석하여 표준곡선을 구하고 (그림 4), 완성된 표준곡선의 correlation coefficient는 0.99 이상이어야 한다. 이때 표준곡선의 slope (기울기) 값은 real-time PCR의 증폭효율을 나타낸다. 이론적으로 매 cycle당 DNA의 양이 2배씩 증가할 때 그 효율을 100%라 하면 이때의 기울기는 약 -3.3의 값을 갖는다. 증폭 효율이 90-100%인 범위만 인정한다면 기울기는 대략 -3.6에서 -3.3이므로 작성한 표준곡선의 기울기가 이 범위를 벗어날 경우 primer를 교체하는 것이 바람직하다.

한편 SYBR Green과 같은 nonspecific한 fluorescent dye를 사용하는 경우, primer set의 nonspecific binding으로 인한 non target DNA products의 생성은 melting temperature (Tm)의 분석으로 가려낼 수 있다. 그림 5는 56종의 *Staphylococcus aureus*에 대한 SYBR Green real-time PCR 결과를 나타낸 것이다. Dissociation curve에서 모두 동일한 Tm을 나타낸다면 사용한 template DNA에서 모두 종 특이적 primer set에 의해 DNA가 증폭되었음을 의미한다. 이때 primer set의 nonspecific binding에 의해 증폭되었을 경우 Tm 값은 specific binding의 경우보다 감소하게 되어 보다 낮은 온도에서 피크를 형성하게 되므로 쉽게 구분할 수 있다.

3) Real-time PCR을 이용한 식중독균의 검출

Real-time PCR은 conventional PCR에 비해 비록 고가의 장비를 사용해야하나 전기영동 과정이 생략됨으로서 오염 가능성이 낮아지고 확인에 소요되는 시간이 매우 짧아졌다. 또한 특이성, 감도, 재현성이 뛰어나고, 정량적 측정이 가능하며, 다량의 샘플을 처리할 수 있는 장점이 있어 식품에서 식중독균의 검출 및 확인에 많이 이용되고 있다.

TaqMan probe를 이용하여 육류를 비롯한 다양한 식품 샘플에서 *C. jejuni*를 대략 12 genome equivalents까지 검출할 수 있었고 ground beef에서는 *E. coli*의 여러 serotypes인 O157, O111 및 O26들이, 계란에서 *Salmonella enteritidis*가 그리고 ground pork에서 *Y. enterocolitica* 등을 검출하였다. 이외에도 SYBR Green을 이용하여 굴에서 *Vibrio vulnificus*를 검출하거나 정량한 사례가 알려져 있다.

Real-time PCR의 경우도 multiplex real-time PCR이 가능하다. Real-time PCR thermocycler가 형광을 측정할 수 있는 filter가 최대 5개 장착되어 각각 4-5종의 형광을 측정할 수 있다. 그러나 TaqMan과 같은 specific probes를 동시에 사용할 경우 fluorescent dye들 간의 간섭으로 보통 2-3종의 동시 측정이 가능하다. SYBR Green을 사용하는 경우도 Tm 값이 서로 다른 probe를 사용함으로서 multiplex real-time PCR이 가능하다. TaqMan probe를 사용하는 경

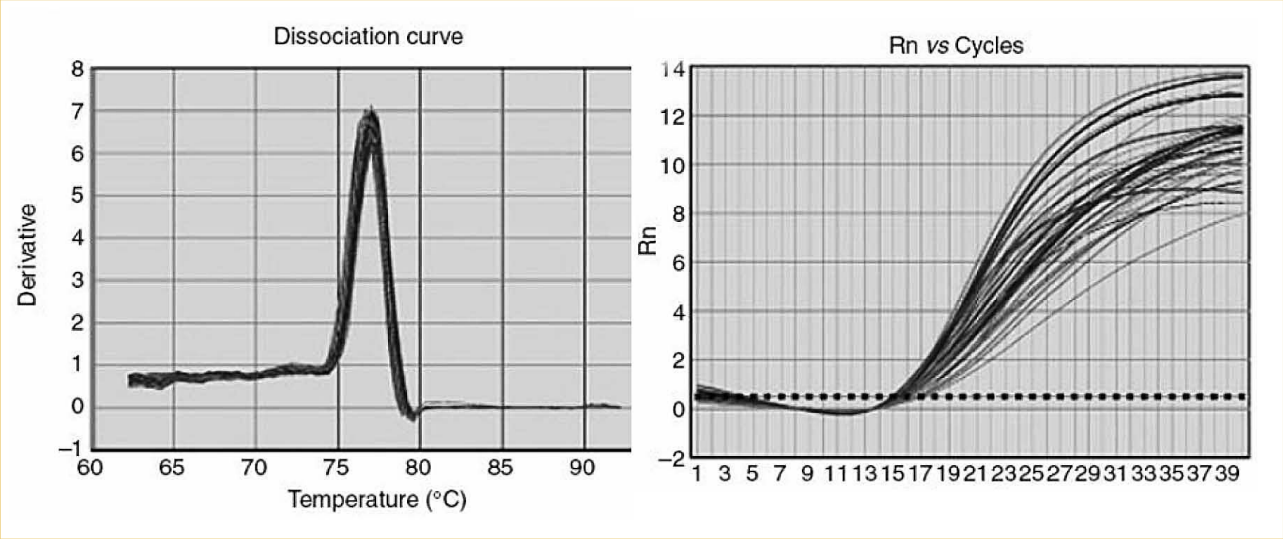

그림 5. *Staphylococcus aureus*의 *nuc* gene에 대한 real-time PCR (SYBR green)의 melting curves와 C_t values.
출처: Alarcón (2006)

우 FAM, TET 및 VIC 3가지의 fluorescent dye를 이용하여 *E. coli* O157, *Salmonella* spp 및 *L. monocytogenes*를 각각 동시에 검출하였다. SYBR Green I을 이용하는 경우도 Tm 값이 서로 다른 probes를 사용하여 *E. coli* O157:H7의 Shiga toxin genes을 검출하거나 shellfish에서 *V. vulnificus*를 검출한 사례가 알려져 있다.

현재 전 세계적으로 국제적인 기관들의 인증을 받아 사용되고 있는 real-time PCR test가 몇 가지 알려져 있다. SYBR Green을 사용하는 BAX Dupont-Qualicon과 TaqMan probe를 사용하는 Food-proof Roche는 *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, 및 *L. monocytogenes*를 검출하는데 쓰이고 있으며 molecular beacon을 사용하는 IQ-Check BioRad는 *Salmonella*를 검출하는데 상업적으로 사용되고 있다.

결 론

현재 전 세계적으로 식중독 미생물의 검사에 전통적인 배지법이 다수를 차지하고 있으나 PCR이나 면역분석법과 같은 신속검출법들의 사용이 급속한 증가추세에 있다. 지금까지 개발된 여러 PCR 방법들이 식품이나 검체에서 식중독 미생물을 확인하고 검출하는 매우 강력한 방법이기는 하나 거의 대부분의 경우 증균과정을 필요로 하는 한계가 있다. 현장에서 증균과정 없이 샘플에서 직접 식중독 미생물을 검출하기 위해서는 소량으로 존재하는 식중독균의 농축기술, 보다 효율적인 DNA 추출방법, PCR 저해제에 내성을 갖는 중합효소의 개발 등이 필요하며 아울러 소형화되어 휴대가 가능한 PCR 장비의 개발도 필요하다. 멀지 않은 미래에 식중독균의 오염여부를 즉석에서 확인할 수 있는 PCR 시스템의 개발은 식중독사고를 예방하는데 큰 기여를 할 수 있을 것으로 보인다.

참고 문헌

1. Markoulatos, P., Siafakas, N., and Moncany, M.: Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. J. Clinical Laboratory Analysis., **16:** 47-51. (2002)
2. Chen, T.R., Chiou, C.S., and Tsen, H.Y.: Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisioning cases and food samples in Taiwan. Int. J. Food Microbiol. **92:** 189-197. (2004)
3. Uzal, F.A., Plumb, J.J., Blackall, L.L., and Kelly, W.R.: PCR

detection of *Clostridium perfringens* producing diffent toxins in fecess of goats. Lett. Appl. Microbiol. **25:** 339-344. (1997)
4. Mustapha, A. and Yong, Li. Molecular detection of foodborne bacterial pathogens. pp. 69-90. In: PCR methods in foods. Maurer J(ed). Springer, Inc., New York, NY, USA (2006)
5. Yaron, S. and Matthews, K.R.: A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes. J. Appl. Microbiol. **92:** 633-640. (2002)
6. Klein, P.G. and Juneja, V.K.: Sensitive detection of viable by reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol. **63:** 4441-4448. (1997)
7. Bej, A.K., Ng, W.Y., Morgan, S., Jones, D.D. and Mahbubani, M.H.: Detection of viable *Vibrio cholerae* by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (PCR). Molecular Biotechnology **5:** 1-10. (1996)
8. Perelle, S., Dilasser, F., Malorny, B., Grout, J., Hoorfar, J., and Fach, P.: Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. Mol. Cell Probes. **18(6):** 409-420. (2004)
9. Hong, Y., Berrang, M.E., Liu, T., Hofacre, C.L., Sanchez, S., Wang, L., and Maurer, J.J.: Rapid detection of *Campylobacter coli, C. jejuni*, and *Salmonella enterica* on poultry carcasses by using PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. Appl. Environ. Microbiol. **69(6):** 3492-3499. (2003)
10. Ge, B., Zhao, S., Hall, R., and Meng, J.: A PCR-ELISA for detecting Shiga toxin- producing *Escherichia coli*. Microbes Infect. **4(3):** 285-290. (2002)
11. Maurer, J. The mythology of PCR. pp. 27-40. In: PCR methods in foods. Maurer J(ed). Springer, Inc., New York, NY, USA (2006)
12. Scheu, P., Gasch, A., and Berghof, K.: Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-ELISA. Lett. Appl. Microbiol. **29(6):** 416-420. (1999)
13. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J.: Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia. **17(6):** 1013-1034. (2003)
14. Alarcón, B., Vicedo, B. and Aznar, R.: PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. J. Appl. Microbiol. **100:** 352-364. (2006)
15. Wilhelm, J. and Pingoud, A.: Real-time polymerase chain reaction. ChemBioChem. **4:** 1120-1128. (2004)
16. Sails, A.D., Fox, A.J., Botton, F.J., Wareing, D.R. and Greenway, D.L.: A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. 69(3): 1383-1390. (2003)
17. Sharma, V.K.: Detection and quantitation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O111, and O26 in beef and bovine feces by real-time polymerase chain reaction. J. Food Prot. **65(9):** 1371-1380. (2002)
18. Seo, K.H., Valentin-Bon, I.E., Brackett, R.E., Holt, P.S.: Rapid, specific detection of *Salmonella enteritidis* in pooled eggs by real-time PCR. J. Food. Prot. **67:** 864-869. (2004)
19. Panicker, G., Myers, M.L., and Bej, A.K.: Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR. Appl. Environ. Microbiol. **70:** 498-507. (2004)
20. Jourdan, A.D., Johnson, S.C., and Wesley, I.V.: Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the *ail* gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Appl. Environ. Microbiol. **66:** 3750-3755. (2000)
21. Yoshitomi, K.J., Jinneman, K.C., and Weagant, S.D.: Detection of Shiga toxin genes stx1, stx2, and the +93 *uid*A mutation of *E. coli* O157:H7/H-using SYBR Green I in a real-time multiplex PCR. Mol. Cell. Probes. **20(1):** 31-41. (2006)
22. Panicker, G., Vickery, M.C., and Bej, A.K.: Multiplex PCR detection of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in shellfish. Can. J. Microbiol. **50(11):** 911-922. (2004)