pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 1, pp. 93~99 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.1.93

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Research note

PCR 법을 이용한 농산물 중 *Clostridium perfringens* 검출을 위한 전처리법 확립

최송이[1] · 서민경[2] · 윤재현[1] · 나겐드란 라잘링감[1] · 황인준[1] · 김세리[1]*
[1]농촌진흥청 국립농업과학원 유해생물팀, [2]식품의약품안전처 식품식품위해평가과

Establishment of Sample Preparation Method for PCR Detection of *Clostridium perfringens* from Agricultural Products

Song-Yi Choi[1], Min-Kyoung Seo[2], Jae-Hyun Yoon[1], Nagendran Rajalingam[1], Injun Hwang[1], Se-Ri Kim[1]*
[1]*Microbial Safety Team, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju, Korea*
[2]*Food Safety Risk Assessment Division, Natioanal Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea*

(Received October 10, 2020/Revised November 10, 2020/Accepted November 26, 2020)

ABSTRACT - This study was undertaken to compare the efficacy of different sample preparation (stomaching, pulsifying, and sonication) and DNA extraction methods (boiling and commercial kit) for detection of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens* from produce by polymerase chain reaction (PCR). Each produce type was inoculated at concentrations of 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, and 10^7 spores/g. Produce inoculated with spores was treated with three sample preparation methods, and DNA was extracted by boiling method and a commercial kit, followed by PCR. The detection limit of stomached samples was lower than that of pummeled and sonicated samples by 10-100 times. Moreover, the DNA extraction efficiency of the commercial kit was found to be superior to that of boiling. In particular, the PCR efficiency of cherry tomato and perilla leaf samples was greatly affected by sample preparation and DNA extraction method. These data suggest that DNA extraction with a commercial kit after pulsification is an optimum sample preparation method for detection of *C. perfringens* by PCR.

Key words : *Clostridium perfringens*, Sample preparation method, Produce, Polymerase chain reaction

*Clostridium perfringens*는 그람 양성 포자 형성 혐기성 간균으로 설사를 유발하는 주요 식중독세균이다[1]. *C. perfringens*는 생산되는 외독소에 따라 A형-E형으로 분류할 수 있다. A형은 주로 α-toxin을, B형은 α-toxin, β-toxin, ε-toxin을, C형은 α-toxin, β-toxin을, D형은 α-toxin, ε-toxin을, E형은 α-toxin, ι-toxin을 분비한다[2,3]. 그리고 최근에는 사람과 동물에게 괴사성 장염을 일으키는 독소로 알려진 β2 toxin을 생성하는 *C. perfringens*도 보고되고 있다[4]. 이 중 식중독을 일으키는 주요한 독소형은 A형이며, A형이 생산하는 장독소(enterotoxin)에 의해 식중독이 발생한다[5]. *C. perfringens*가 분비하는 장독소는 대장균의 장독소와 유사하며 주 증상은 설사로 경과는 비교적 짧은 편이다[5].

국내에서 *C. perfringens*에 의한 식중독사고는 최근 5년간(2015-2019) 총 54건이 발생하였으며 이로 인한 환자수는 1,842명이었다[6]. 아직까지 국내에 *C. perfringens*에 오염된 농산물로 인한 식중독 사고는 보고된 바는 없으나 농산물 중 *C. perfringens*의 검출은 지속적으로 보고되고 있다[7-9].

식약처에 따르면 *C. perfringens* 모니터링과 관련된 12건의 논문 및 보고서에서 총 11,647점 시료에 대한 *C. perfringens* 오염률 자료를 확보하여 분석하였으며 그 결과 *C. perfringens*는 육류 및 가공품에서 0-16.7%, 채소 및 가공품에서 0-22.2%, 곡류 및 가공품에서 0-6.7%의 검출률을 보였다고 보고하였다[7]. 또한 2006년 인천시 보건환

*Correspondence to: Se-Ri Kim, Microbial Safety Team, Agro-Food Safety & Crop Protection Department, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea
Tel: +82-63-238-3395, Fax: +82-63-238-3840
E-mail: seri81@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

경연구원에서 수행한 “비가열 섭취 채소류 미생물 오염조사” 결과에 의하면 124개의 농산물 중 5.6%에서 *C. perfringens*가 검출되었고, 농산물별로는 미나리 13.3%, 부추 23.1%, 상추 8.0%에서 검출되었다고 보고하였다[8]. 2012년 서울시 보건환경연구원에서 발표한 “국내 신선 채소류의 미생물 오염 특성” 연구에서는 총 187건 중 20건(10.7%)의 농산물에서 *C. perfringens*가 검출되었다고 보고하였으며 농산물별로는 상추 11.9%, 들깻잎, 7.5%, 시금치 20.0%, 치커리 10.0%, 미나리 22.2%, 과일 6.3%에서 검출되었고 *C. perfringens*의 오염농도는 3.0×10^2 CFU/g - 1.4×10^5 CFU/g 수준으로 오염되었다고 보고한 바 있어 농산물도 *C. perfringens*에 대한 안전관리가 필요하다[9].

*C. perfringens*에 대한 안전관리를 위해서는 빠르고 정확한 진단이 필수적이다. 식품공전법 등 표준분석법을 활용하여 분석하는데는 최소 3일이상 소요되기 때문에 보다 신속한 분석을 위하여 분자생물학적 원리를 이용한 PCR법 등 다양한 방법들이 개발되어 왔다[10]. 특히 신속진단기술의 정확성을 높이고 검출한계를 낮추기 위해서는 시료에서 세균을 탈리하는 전처리 과정이 매우 중요하다[11].

그동안 농산물 전처리 기술로 stomacher[12], blender[13] 및 swab[14]과 같은 여러 방법을 사용해 왔다. 그 중에서는 두 개의 폐달로 플라스틱 백 내용물을 분쇄하여 샘플을 균질화하는 stomacher는 전 세계 실험실에서 사용되는 주요 장치이다. 그러나 내용물의 분쇄로 인해 stomacher로 처리된 샘플 백에는 상당한 양의 농산물 부스러기가 발생하고 전처리액이 혼탁해 진다[11]. 특히 농산물의 내부 구성물질, pH, 농산물을 시료전처리한 후 발생하는 농산물 부스러기(debris)는 PCR법 등 신속 진단기술의 민감도에 영향을 끼친다고 보고되고 있어 이에 대한 개선이 필요하다[11]. 그러나 시료 전처리가 분석에서 중요한 부분을 차지함에도 불구하고 이에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 PCR법을 이용하여 농산물 중 enterotoxin 생성 *C. perfringens*를 신속 분석할 수 있도록 전처리법을 비교 평가하였다.

Materials and Methods

전처리법에 따른 농산물 중 *Clostridium perfringens*의 PCR검출한계 비교

대상 균주

농산물 중 *C. perfringens*를 PCR법으로 검출하기 위하여 전처리법을 확립하였다. 본 연구에 사용된 균주는 *C. perfringens* H3 (Hobb’s serotypes 3, NTCT 8239)를 사용하였으며 *C. perfringens*는 혐기성 세균으로 자연환경 속에서는 대부분 포자형태로 존재하기 때문에 포자상태로 농산물에 접종하여 본 연구를 수행하였다.

포자 생성법

*C. perfringens*의 포자 생성법은 다음과 같다. 0.1 mL의 *C. perfringens* glycerol stock culture를 10 mL의 cook meat medium에 접종하고 37°C, 24시간 배양하였다. Cook meat medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에서 배양한 액 0.1 mL를 10 mL의 Fluid thioglycollate broth (FTG; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK)에 접종하고 75°C에서 20분간 반응시켰다. 이후 실온에서 냉각시킨 후 37°C에서 18-24시간 배양하였다. 0.1 mL의 FTG 배양액을 10 mL의 FTG에 접종하고 37°C, 4시간 배양한 후 1.5 mL의 FTG 배양액을 30 mL의 Duncan-Strong (DS) 배지에 접종하고 37°C, 24-48시간 배양하였다. 이후 4,000 rpm으로, 10분간 원심분리하고 Phosphate-buffered saline (PBS)으로 두 번 세척 후 PBS에 현탁하였다.

시료 접종 및 전처리

전처리법 확립을 위하여 상추, 토마토, 고추, 들깻잎에 포자를 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 spore/g의 농도로 접종하였다. 포자가 접종된 농산물들은 pulsifier로 15초, stomacher 2분, sonicator 2분간 처리하였다. 이후 DNA는 Inclone사의 DNA 추출 kit (G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit, Intron, Korea)를 사용하여 제조사 매뉴얼에 따라 추출하였다. 또한 PCR 방법으로 α-toxin과 enterotoxin 생성유전자를 검출하였다. α-toxin 유전자를 검출하기 위한 primer 서열은 Augustynowicz 등[10]의 연구를, enterotoxin 유전자를 검출하기 위한 primer 서열은 Miki 등[15]의 연구를 참고하여 제작하였다. PCR 반응 용액은 Intron사의 PCR pre-mix (Intron, Korea)를 사용하였다. pre-mix에는 reaction buffer, taq polymerase가 함유되어 있어 10 pM primer 와, 5 μL의 DNA를 첨가하고 3차 멸균 증류수를 사용하여 최종 반응용액을 20 μL로 조절하였다. 또한 PCR thermal cycler의 반응 조건은 pre-denaturation 94°C에서 5분, denaturation 94°C에서 1분, annealing 각각 55°C에서 30초, extension 72°C에서 1분간 30 cycle을 진행하고, final extension을 72°C에서 7분간 실시하였다. PCR에 의한 증폭생성물은 1.8% agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다.

유전자 추출법 비교

유전자 추출법에 따른 농산물 중 *C. perfringens*의 PCR 검출한계를 비교하기 위하여 상추, 토마토, 고추, 들깻잎에 포자농도 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 spore/g농도로 접종하였다. 포자가 접종된 농산물들은 pulsifier로 15초간 처리하였다. DNA추출방법은 boiling법과 DNA extraction kit를 사용한 방법 두 가지를 적용하였다. Boiling법은 전처리 용액 10 mL를 취하여 4,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 이후 1 mL의 증류수를 가하여 현탁시킨 후 e-tube로 옮겨 담

고 100°C, 10분 반응시켰다. 반응액은 13,000 rpm, 5분 원심분리 후 상등액 200 μL를 취하여 PCR에 사용하였다. DNA extraction kit 사용한 추출법은 Intron사의 매뉴얼에 따라 실험을 하였다. 이후 PCR 조건은 앞서 언급한 바와 같다.

Results and Discussion

전처리법에 따른 농산물 중 *Clostridium perfringens*의 PCR검출한계 비교

전처리법 확립을 위하여 포자농도 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 CFU/g농도로 접종된 상추, 토마토, 고추, 들깻잎을 pulsifier, stomacher, sonicator로 처리하였다. 이후 *cpa* 유전자 증폭 결과 고추, 상추의 검출한계는 전처리 방법에 따른 차이가 없었다(Fig. 1). 토마토의 경우 전처리방법별 검출한계는 stomacher 1.1×10^3 spore/g, pulsifier와 sonicator는 1.1×10^2 spore/g이었고, 들깻잎 전처리방법별 검출한계는 stomacher 7.0×10^5 spore/g, pulsifier 7.0×10^4 spore/g, sonicator는 7.0×10^6 spore/g이었다. 따라서 토마토와 들깻잎에서는 3가지 방법 중 pulsifier가 가장 PCR 검출한계를 낮출 수 있다. *cpe* 유전자 증폭 결과 토마토 전처리법에 따른 검출한계는 stomacher 1.1×10^3 spore/g, pulsifier와 sonicator는 1.1×10^2 spore/g이었고, 고추는 stomacher, sonicator 8.4×10^2 spore/g, pulsifier 8.4×10^1 spore/g이었다 (Fig. 2). 상추의 전처리법에 따른 검출한계는 sonicator 3.1×10^5 spore/g, stomacher 3.1×10^4 spore/g, pulsifier는 3.1×10^3 spore/g이었고, 들깻잎의 전처리법에 따른 검출한계는 sonicator는 7.0×10^5 spore/g, stomacher 7.0×10^4 spore/g, pulsifier는 7.0×10^2 spore/g였다. 따라서 모든 농산물에서 pulsifier의 검출한계가 가장 낮았다.

PCR 검출한계에 영향을 미치는 인자는 농산물표면으로부터 탈리, 농산물 내부 구성물질 등이 영향을 미칠 수 있다[11]. 들깻잎이나 상추처럼 g당 표면적이 큰 농산물은 전

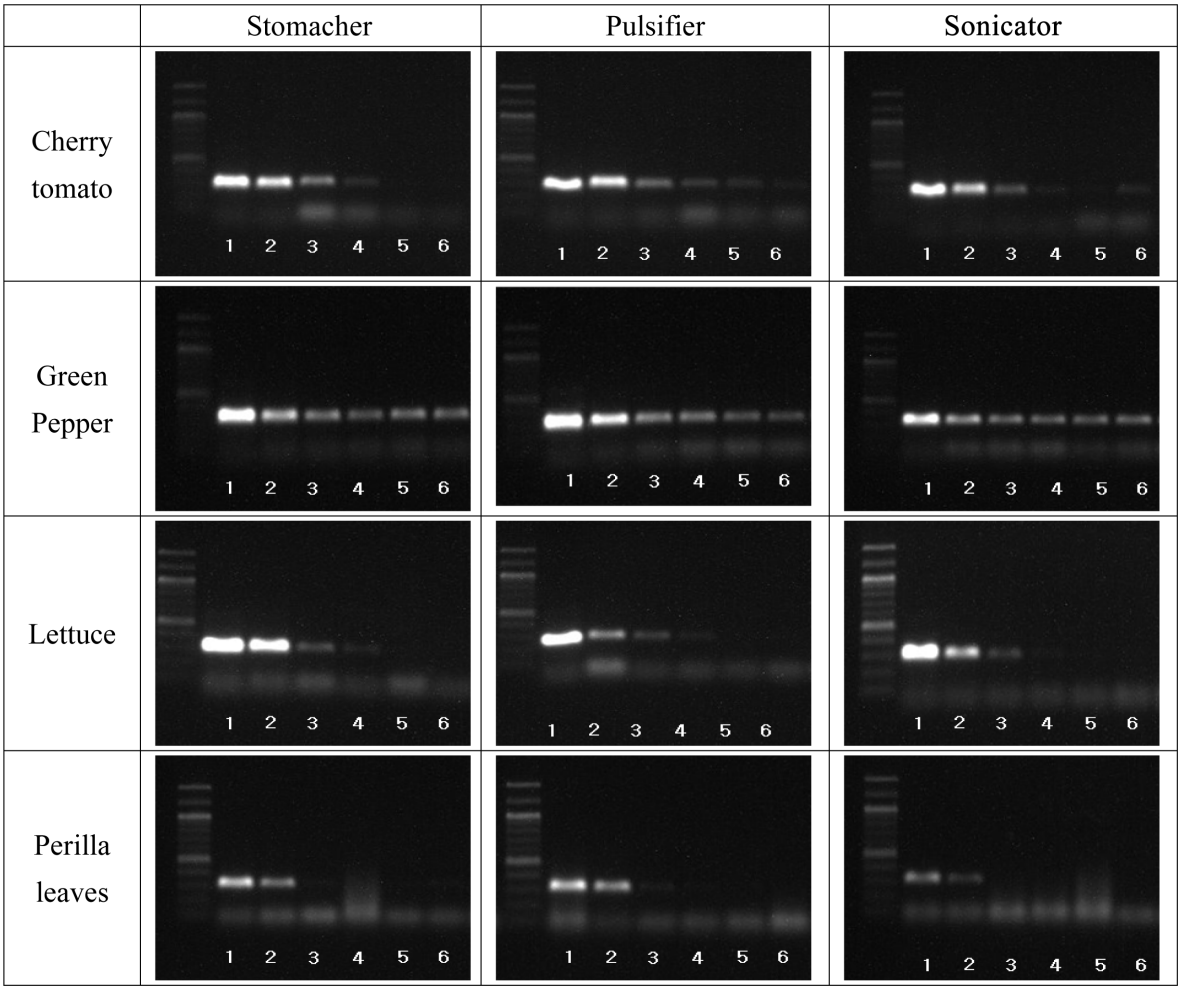

Fig. 1. Detection limit of *cpa* gene of *C. perfringens* from cherry tomato, green pepper, lettuce, and perilla leaves treated by stomaching, pulsifying, and sonication.
Lane 1 : 10^7 CFU/g, Lane 2 : 10^6 CFU/g, Lane 3: 10^5 CFU/g, Lane 4: 10^4 CFU/g, Lane 5: 10^3 CFU/g, Lane 6: 10^2 CFU/g

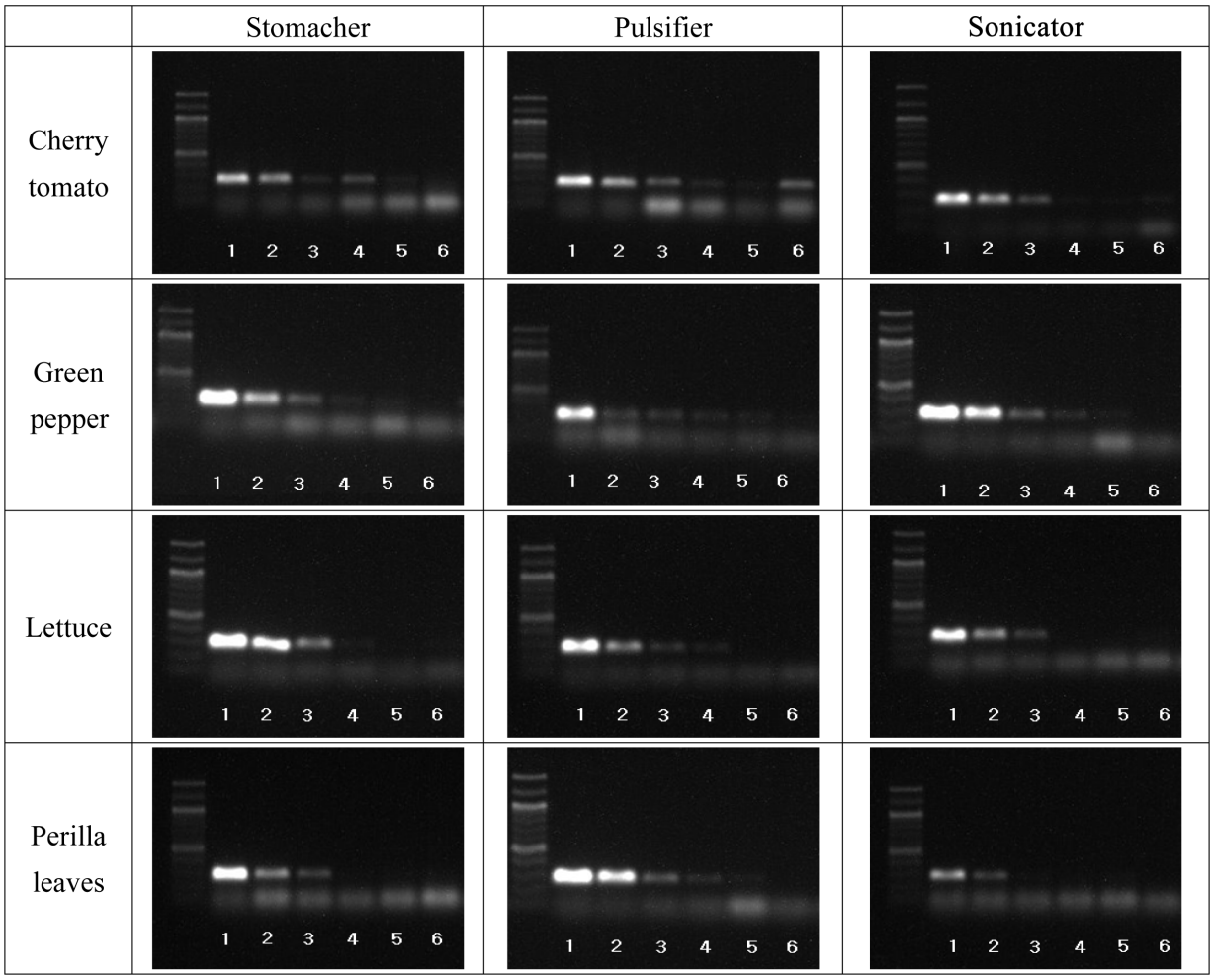

Fig. 2. Detection limit of *cpe* gene of *C. perfringens* from cherry tomato, green pepper, lettuce, and perilla leaves treated by stomaching, pulsifying, and sonication.
Lane 1 : 10^7 CFU/g, Lane 2 : 10^6 CFU/g, Lane 3: 10^5 CFU/g, Lane 4: 10^4 CFU/g, Lane 5: 10^3 CFU/g, Lane 6: 10^2 CFU/g.

처리 팩 내에서 농산물 표면이 외부로 노출된 부분은 초음파가 도달하여 표면에서 세균을 탈리시킬 수 있으나 농산물 표면이 겹쳐진 부분이나 시료 전처리팩 내 중앙 부위에 있는 시료는 초음파가 도달하지 못하여 세균을 표면으로부터 탈리시키지 못한 것으로 판단된다. 또한 Kim 등[16]의 연구에 stomacher와 pulsifier으로 전처리하였을 때 회수된 균수는 유의적 차이가 없었다고 보고하였지만 전처리 후 PCR법을 적용했을 때 검출한계가 pulisifer가 더 낮은 이유는 처리 후 탁도가 stomacher로 전처리한 경우 상당히 증가하였기 때문으로 판단된다. Kim[11] 등의 연구에 따르면 stomacher로 전처리 전 후 탁도는 각각 0.15, 541 NTU로 전처리 후 탁도가 상당히 증가하였고 전처리 후 탁도를 형성하는 농산물 부서러기, 거품 및 농산물추출액은 PCR, ATP 측정 등 미생물 분석에 영향을 줄 수 있다고 보고 하였다. 따라서 들깻잎과 같은 엽채류는 표면적이 넓고 샘플 표면이 서로 겹쳐서 초음파가 도달하기 어렵고 stomacher 후 탁도를 높게 형성하기 때문에 pulsifier와 같은 전처리 후 탁도가 낮고 진동이 충분히 전달되어 농산물표면으로부터 식중독세균의 탈리가 용이한 방법을 선택하는 것이 적절할 것으로 판단된다.

방울토마토의 경우는 stomacher로 처리하였을 때 보다 pulsifier이나 sonicator처럼 내부 구성 물질이 방출되지 않는 방법을 사용했을 때 PCR법의 검출 한계를 낮출 수 있다. Kim[16] 등의 연구에서도 stomacher로 전처리하였을 때 hand shaking법이나 sonicator으로 회수했을 때보다 회수율이 0.6-0.7 log CFU/cm^2 정도 낮았다. 또한 방울토마토 추출액에 15분 동안 식중독세균을 노출하였을 때 0.3-0.5 log CFU/mL 정도 감소하였다. 따라서 방울토마토의 경우는 pulsifier나 sonicator처럼 농산물을 파괴하지 않고 표면에 존재하는 식중독세균을 회수할 수 있는 방법으로 전처리한 후 PCR법 등 식중독세균 분석법에 적용하는 것이 필요하다.

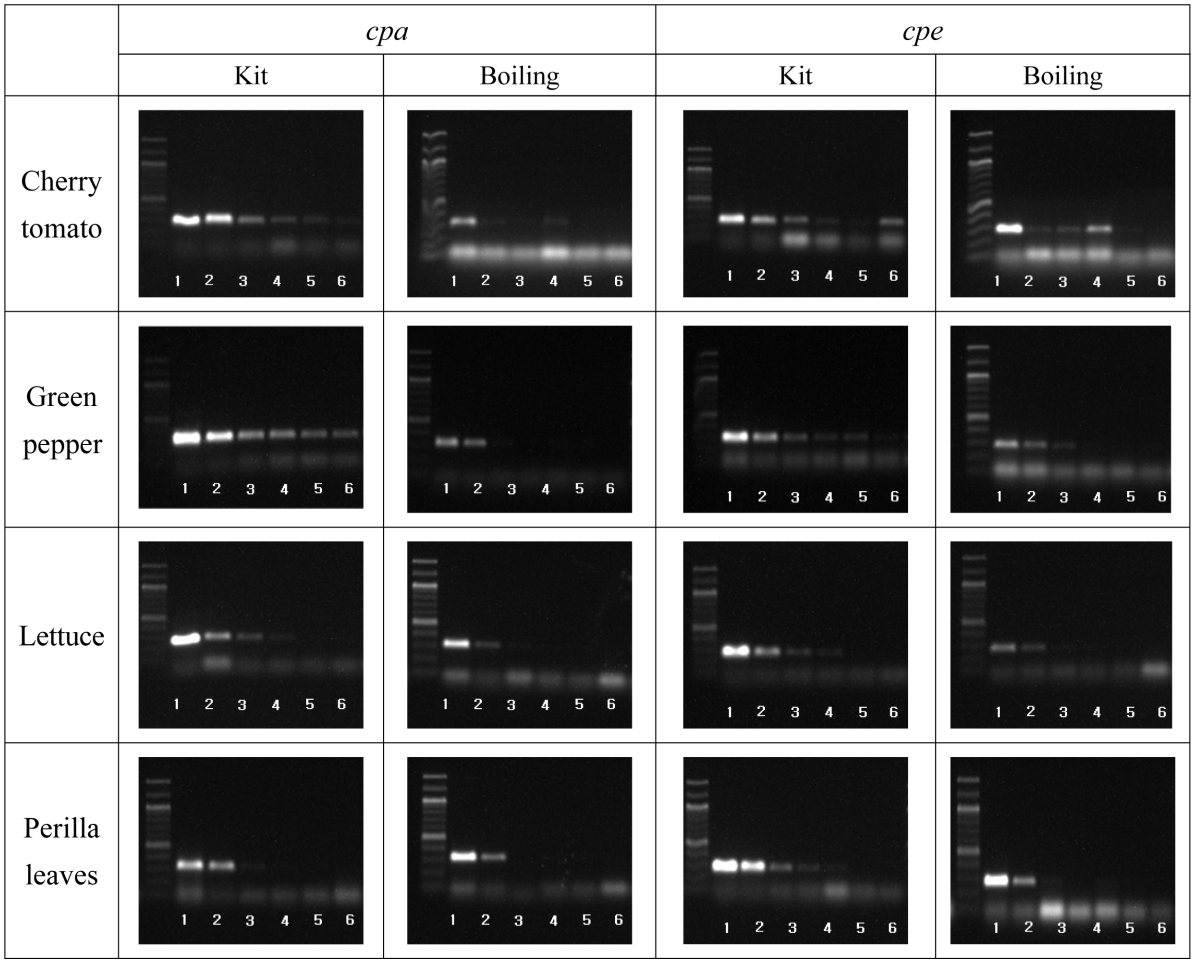

Fig. 3. Detection limit of *cpa* and *cpe* gene of *C. perfringens* from cherry tomato, green pepper, lettuce, and perilla leaves according to different DNA extraction methods.
Lane 1 : 10^7 CFU/g, Lane 2 : 10^6 CFU/g, Lane 3: 10^5 CFU/g, Lane 4: 10^4 CFU/g, Lane 5: 10^3 CFU/g, Lane 6: 10^2 CFU/g.

농산물은 다양한 형태, g당 표면적, 내부구성물질에 따라 전처리법을 표준화하는 것이 필요하며 추후 PCR법 등 다양한 식중독세균분석법에 연계할 수 있는 사과, 수박 등 크기가 큰 농산물에 대한 전처리법에 대한 연구가 필요하다.

유전자 추출 방법에 따른 농산물 중 *C. perfringens*의 PCR검출한계 비교

유전자 추출 방법에 따른 농산물 중 *C. perfringens*의 PCR검출한계를 비교하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 토마토에서는 *cpa, cpe* 유전자 증폭 시 kit 법의 검출한계는 1.1×10^2 spore/g, boiling법은 1.1×10^4 spore/g이었고, 고추는 두 유전자 모두 kit 법 8.4×10^1 spore/g, boiling 법은 1.1×10^2 spore/g이었다. 또한 상추에서 *cpa* 유전자 증폭시 kit 법의 검출한계는 3.1×10^4 spore/g, boiling 법은 3.1×10^4 spore/g이었고, 들깻잎에서는 각각 7.0×10^2 spore/g, 7.0×10^4 spore/g로 나타나 전반적으로 boiling 법에 비하여 kit로 추출하였을 때 검출한계를 10-100배 가량 낮출 수 있었다. 일반적으로 DNA 추출 방법에는 세포 파괴, DNA 추출 및 DNA 정제의 세 가지 주요 단계가 포함되는데 boiling 법은 가장 쉽고 저렴한 방법이지만 DNA 정제과정을 거치지 않기 때문에 DNA 수율과 순도가 낮은 단점이 있다고 알려져 있다[17-19]. 또한 boiling 법은 DNA에 부착된 농산물 유래 PCR 억제제를 제거할 수 있는 과정이 없기 때문에 농산물에서 유래된 PCR 억제제로 인하여 검출한계를 높일 수 있을 것으로 판단된다[20,21]. 이에 반해 상용화된 DNA 추출 kit는 DNA를 흡착하는 크로마토그래피 친화성 막이 부착된 컬럼을 사용하여 고농도 DNA를 추출할 수 있다. 뿐만 아니라 에탄올을 사용하여 DNA를 세척하여 불순물과 오염 물질을 제거하기 때문에 여러 연구자들은 상용화된 DNA 추출 kit를 사용하여 식품 및 환경에서 직접 미생물의 DNA를 추출하는 것이 적합하다고 보고하였다[21,22].

따라서 PCR법으로 농산물 중 *C. perfirngens*를 검출하기 위해서는 농산물로부터 탈리가 용이하고 농산물 부스러기 및 내부 구성 물질이 유출되지 않는 방법으로 전처리하여 DNA 추출 kit를 활용하여 DNA를 추출한다면 PCR의 효율을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ00953302)의 지원에 의해 이루어진 것임.

국문요약

본 연구에서는 PCR법을 이용하여 농산물 중 enterotoxin 생성 *Clostridium perfringens*를 신속 분석할 수 있도록 전처리법을 확립하고자 수행하였다. 이를 위하여 *C. perfringens* 포자를 상추, 토마토, 고추, 들깻잎에 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 spore/g 농도로 포자를 접종하였다. 포자가 접종된 농산물들은 pulsifier, stomacher, sonicator로 처리하고 boiling법 혹은 상용화 된 kit로 DNA를 추출한 후 PCR법을 수행하고 검출한계를 비교하였다. 그 결과, 3가지 전처리법에 있어서는 pulsifier가, DNA 추출에 있어서는 상용화된 DNA 추출 kit를 활용하는 것이 농산물 중 *C. perfringens*의 검출한계를 10-100배 낮출 수 있었다. 특히 들깻잎, 방울토마토처럼 전처리 방법에 따른 탁도의 변화가 큰 농산물은 전처리법과 DNA 추출법이 PCR 반응에 미치는 영향이 큰 것으로 나타났다. 따라서 본 연구 결과를 통해 볼 때 PCR법을 이용한 농산물 중 *C. perfringens*를 검출하는데 있어 검출감도를 높이기 위해서는 pulsifier를 이용하여 전처리하고 상용화된 DNA 추출 kit를 사용하는 것이 적절한 것으로 판단된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Song-Yi Choi https://orcid.org/0000-0002-5343-2945
Min-Kyoung Seo https://orcid.org/0000-0002-9682-3081
Jae-Hyun Yoon https://orcid.org/0000-0002-8144-7458
Nagendran Rajalingam https://orcid.org/0000-0003-0585-4606
Injun Hwang https://orcid.org/0000-0001-8960-9354
Se-Ri Kim https://orcid.org/0000-0001-6857-8317

References

1. Brynestad, S., Granum, P.E., *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int. J. Food Microbiol*., **74**, 195-202 (2002).
2. Park, S.H., Choi, O.K., Jeong, J.A., Kim, W.H., Lee, Y.E., Park, K.H., Yoon, M.H., Genetic diversity of *Clostridium perfringens* form food-poisoning outbreak in Gyeonggi-do 2013-2014. *Korean J. Microbiol.*, **52**, 286-297 (2016).
3. Petit, L., Gibert, M., Popoff, M.R., *Clostridium perfringens* toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.,* **7**, 104-110 (1999).
4. Harrison, B., Raju, D., Garmory, H.S., Brett, M.M., Titball, R.W., Sarker, M.R., Molecular characterization of *Clostridium perfringens* isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-toxinencoding gene. *Appl. Environ. Microbiol.,* **71**, 8362-8370 (2005).
5. Sparks, S.G., Carman, R.J., Sarker, M.R., McClane, B.A., Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 883-888 (2001).
6. Ministry of Food and Drug Safety, (2020, September 5). Statistics of food borne outbreaks. Retrieved from http://foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat
7. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, 2018. Chaper 2. Risk assessment, risk assessment of *Clostridium perfringens* in red pepper powder, shredded red pepper and composite seasonings. Cheongju, Korea. pp. 5-15.
8. Jung, S.H., Hur, M.J., Ju, H.H, Kim, J.A., Oh, S.S., Go, J.M., Kim, Y.H., Im, J., Microbiological evaluation of raw vegetables. *J. Food Hyg. Saf.*, **21**, 250-257 (2006).
9. Hong, C.K., Seo, Y.H., Choi, C.M., Hwang, I.S., Kim, M.S., Microbial quality of fresh vegetables and fruit in Seoul, Korea. *J. Food Hyg. Saf.,* **27,** 24-29 (2012).
10. Augustynowicz, E., Gzyl, A., Slusarczyk, J., Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* with a duplex PCR. *J. Med. Microbiol.,* **51**, 169-172 (2002).
11. Kim, D.K., Kim, S.J., Kang, D.H., Comparison of a four-section spindle and stomacher for efficacy of detaching microorganisms from fresh vegetables. *J. Food Prot.*, **78**, 1380-1386 (2015).
12. Sharpe, A.N., Jackson, A.K., Stomaching a new concept in bacteriological sample preparation. *Appl. Microbiol.*, **24**, 175-178 (1972).
13. Moret, S., Conte, L.S., High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *J. Chromatogr.* A, **729**, 363-369 (1996).
14. Scherer, K., Made, D., Ellerbroek, L., Schelengburg, J., Johne, R., Klein, G., Application of a swab sampling method for the detection of norovirus and rotavirus on artificially contaminated food and environmental surfaces. *Food Environ. Virol.,* **1**, 42-49 (2009).

15. Miki, Y., Miyamoto, K., Ikuko, K.H., Fujiuchi, K., Akimoto, S., Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 5366-5372 (2008).
16. Kim, S.R., Yoon, Y.H., Kim, W.I., Park, K.H., Yun, H.J., Chung, D.H., Yun, J.C., Ryu, K.Y., Comparison of sample preparation methods for the recovery of foodborne pathogens from fresh produce. *J. Food Prot.*, **75**, 1213-1218 (2012).
17. Reischl, U., Linde, H.J., Metz, M., Leppmeier, B., Lehn, N., Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2429-2433 (2000).
18. Sepp, R., Szabó, I., Uda, H., Sakamoto, H., Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J. Clin. Pathol.,* **47**, 318-323 (1994).
19. De Medici, D., Croci, L., Delibato, E., Di Pasquale, S., Filetici, E., Toti, L., Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* in poultry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 3456-3461 (2003).
20. Wilson, I.G., Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.,* **63**, 3741-3751 (1997).
21. Giacomazzi, S., Leroi, F., Joffraud, J.J., Comparison of three methods of DNA extraction from cold-smoked salmon and impact of physical treatments. *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 1230-1238 (2005).
22. Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Paul Ross, R., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *J. Appl. Microbiol.*, **113**, 1364-5072 (2012).