pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 1, pp. 50~57 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.1.50

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

Ultrafast Real-time PCR법을 이용한 살모넬라의 신속 검출

김석환† · 이유시† · 주인선 · 곽효선 · 정경태 · 김순한*
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 미생물과

Rapid Detection for *Salmonella* spp. by Ultrafast Real-time PCR Assay

Seok Hwan Kim†, Yu-Si Lee†, In-Sun Joo, Hyo Sun Kwak, Gyung Tae Chung, and Soon Han Kim*
Food Microbiology Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea
(Received May 12, 2017/Revised June 17, 2017/Accepted November 21, 2017)

ABSTRACT - *Salmonella* continue to be a major cause of food poisoning worldwide. The rapid detection method of food-borne *Salmonella* is an important food safety tool. A real-time polymerase chain reaction (PCR) has been used as a rapid method for the detection of pathogens. It has been recently reported that NBS LabChip real-time PCR is a novel, ultrafast, and chip-type-convenient real-time PCR system. We developed the assay method based on NBS LabChip real-time PCR for the rapid detection of *Salmonella*, which its reaction time was within 20 minutes. Two target genes (*inv*A and *stn*) were selected to design target specific primers and probes. The new method was validated by checking specificity and sensitivity (limit of detection). This study included forty-two target and twenty-one non-target strains to assess the specificity. This assay was able to identify the 42 *Salmonella* strains correctly. The limit of detection (LOD) was 10^1 copies/μL in *Salmonella* genomes DNA, while LOD incubated for 4 hr in the inoculated sausage sample ranged from 10^1 CFU/g to 10^2 CFU/g as an inoculated cell count. The assay developed in this study could be applied for the investigation of food poisoning pathogens.

Key words : Pathogenic *Salmonella* spp., Rapid detection, Real-time PCR

세균성 식중독의 주요 병원균으로는 *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens* 등을 들 수 있다[1]. 이 중 *Salmonella*에 의한 식중독 사고는 전 세계적으로 가장 많이 발생하고 있으며, 매년 340만 건이 발생하고 치사율이 20%로 보고되고 있다[2,3]. 국내에서 발생한 살모넬라 식중독은 지난 15년 간 보고에 따르면 연간 약 20건씩 발생하고 있으며, 국외에서는 연간 2~13억 건에 이르고 중국의 경우 세균성 식중독 사고의 70% 이상이 살모넬라로 인해 발생된다고 보고되고 있다[4,5]. 실제로 식품의약품안전처 식중독 발생통계에 따르면 2016년 국내에서 발생한 살모넬라 식중독은 21건으로 354명 환자가 발생한 것으로 보고되고 있다[6].

†Both authors contributed equally to this work
*Correspondence to: Soon Han Kim, Food Microbiology Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4308, Fax: 82-43-719-4300
E-mail: lambndog@korea.kr

살모넬라는 동물의 장내에서 서식할 수 있는 장내세균과로 닭, 소, 돼지 등 가축의 장관 및 토양과 물 등 자연계에 널리 분포하고 있다[7]. 주로 살모넬라균이 오염된 식품이나 가축의 매개 형태로 발생하여 장독소(enterotoxin)를 생성하여 48시간 이내에 위장염을 일으켜 설사, 발열, 복통, 장티푸스 등 심각한 질병을 발생시키기도 한다[8-14]. 특히 영유아, 노인, 면역이 저해된 사람에게 감염 시 임상증상은 중증에서 사망까지 이르는 치명적인 결과를 야기할 수 있다[8,15]. 살모넬라는 현재까지 약 2,500여 종류의 다양한 혈청형이 보고되었고, 이 가운데 *Salmonella enterica* serotype Enteritidis (*S.* Enteritidis)와 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (*S.* Typhimurium)가 식중독 사고를 일으키는 대표적인 혈청형으로 알려졌다[5]. 이들 균주는 감염 및 발병 대상에 대한 특이성이 없어 동물과 사람 모두에서 식중독을 일으키는 것으로 알려져 있다[16,17]. 이처럼 살모넬라는 식중독을 일으키는 주요 원인균으로서 식중독 사고를 방지하고 식품산업 및 공중보건의 측면에서 신속 정확한 검출이 매우 중요하다[18].

일반적인 살모넬라 표준검출법으로는 선택 배지를 이용

한 배양법이 사용되지만, 이 시험법은 증균배양, 분리배양, 생화학 시험 등의 과정이 필요하기 때문에 5일 이상의 장시간이 소요되며 많은 노동력이 필요하다[6,8]. 이러한 배양에 의한 시험방법은 국제적으로 식중독 원인체 규명을 위한 표준 시험법으로 널리 통용되고 있지만 신속한 결과를 규명하기에는 시간적으로 한계점이 따른다. 식중독 세균의 신속 검출법(rapid method)으로는 ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), 직접형광항체법, 유전자 기반의 검출 방법인 DNA hybridization과 PCR (Polymerase Chain Reaction)법이 널리 응용되고 있다[19]. 그 중 Polymerase chain reaction (PCR)법은 식중독균의 특정 유전자를 증폭시켜 전기영동 겔을 통해 확인하는 방법으로 단시간 내에 결과를 도출하고 높은 특이도와 민감도를 나타낸다[8,20,21]. 특히 real-time PCR법은 추가적인 전기영동 과정 없이 실시간으로 검출 결과를 확인할 수 있어 병원체 신속검사법으로 적용되고 있다[22]. 최근에도 병원체를 신속하게 검출하기 위해 다양한 real-time PCR 시스템이 개발되고 있으며, 20분 이내로 PCR 반응이 가능한 칩타입의 초고속 real-time PCR 시스템(NBS Labchip G2-4)이 보고되어 감염병 진단에 활용되고 있다[23,24]. 따라서 본 연구에서는 식중독의 주요 원인균으로 알려진 살모넬라를 신속하게 검출하기 위해 초고속 real-time PCR 기법을 이용하여 검출한계(민감도)와 특이도를 확인하였다.

Materials and Methods

사용 균주 및 생화학 동정 확인

Salmonella spp. 표준균주 9주와 식품 등에서 분리한 균주(MFDS 균주) 33주 및 Non-target *Salmonella* spp. 21주 등 총 63주를 확보하여 VITEK 2 compact system (Bio-Merieux, Marcy I'Etoile, France)을 통해 생화학적 동정형을 거쳐 확인한 후 실험에 사용하였다(Table 1).

Primer/probe 제작

Real-time PCR법에 사용된 primer와 probe 서열은 *Salmonella*의 병원성 유전자인 *invA* (GenBank accession no. DQ644631)와 *stn* (L16014)을 타겟으로 설계하였다. 각각의 프라이머와 프로브는 primer 3 프로그램(http://www.primer3plus.com) 및 primer express 3.0.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 설계하였다. 설계된 프라이머의 특이성은 미국 NCBI 사이트(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 통해 검증하였다(Table 2). 합성 oligonucleotide primer와 probe는 바이오니아(Bioneer, Daejeon, Korea)에 주문 제작하여 사용하였다. 설계된 프로브의 5'에 FAM 형광물질을 결합하였으며, quencher로서 3'에 BHQ1를 결합하였다.

Target 유전자에 대한 민감도 및 특이성

제작한 프라이머와 프로브의 검출한계는 *invA* gene 양성 대조군의 경우 유전자 증폭부위를 합성하여 pBHA 벡터에 삽입하여 플라스미드를 제작하였다(Bioneer, Daejeon, Korea). *stn* gene은 *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 순수 배양액에서 DNA를 추출한 후 이로부터 얻은 plasmid DNA를 농도별(10^7~10^1 copies/μL)로 단계 희석하여 real-time PCR을 통해 민감도를 실험하였다.

특이도 평가를 위해서 *Salmonella* spp. 균주 42주와 비대상균주 21주를 대상으로 real-time PCR을 실시하였다. 또한 국내에서 동일 타겟으로 시판되고 있는 살모넬라 검출 kit (KogeneBiotech, Seoul, Korea)로 real-time PCR (7500 Fast real-time PCR, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)을 시행하여, 두 real-time PCR법에 대한 결과 일치도를 비교하였다.

식품 적용 시 검출한계 평가

제작된 NBS LabChip real-time PCR의 검출한계(detection limit)를 알아보기 위하여 순수 배양액(pure culture)과 식품으로 나누어 실시하였다. 순수 배양액에서 검출한계를 알아보기 위하여 *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076을 Tryptone Soya Broth (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK)에서 37°C, 24시간 배양하였다. 이를 0.85% 생리식염수로 10배씩 단계 희석(10^7~10^1 CFU/mL)한 후 Tryptone Soya Agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, U.K)에 도말하여 37°C, 24시간 배양 후 균수를 계산하였고, 이를 대조군인 증균 전 단계(before enrichment)로 적용하였다. 또한 식품에서는 소시지에 10배수로 단계 희석한 살모넬라 배양액 1 mL을 접종시켜 30초간 균질화한 다음 4시간 증균 과정을 거친 후에 검출하였다(after enrichment).

순수 배양액과 식품 샘플에서의 배양액을 단계희석액 1 mL 취해서 원심 분리한 후 상등액은 버리고, 펠렛(pellet)을 DNA isolation kit (Ultraclean microbial DNA isolation kit, Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 유전자를 추출 한 뒤 검출한계를 분석하였다.

Real-time PCR 반응조건

반응액의 조성은 PCR 튜브에 Master Mix (Nanobiosys, Seoul, Korea), primer/probe, DW를 7 μL이 되도 혼합한 후 시료 DNA 2 μL를 첨가하여 총량을 9 μL로 하였고, 이를 8 μL씩 각 채널에 주입하였다. NBS LabChip real-time PCR (UltraFast real-time PCR G2-4 system, Nanobiosys, Seoul, Korea)를 사용하여 95°C 12초를 반응시킨 후 95°C 4초, 56°C 15초를 1회로 하여 총 40 cycles을 수행하였으며, running time으로 18분이 소요되었다.

Results and Discussion

특이도 확인

Real-time PCR의 특이도는 target만 검출해내는 inclusivity와 non target은 검출하지 않는 exclusivity 결과로 평가하게 된다. 본 연구에서는 *invA* 및 *stn* 유전자를 target인 *Salmonella* 균주 42주에서 모두 검출하였고, non target 균주 21주에서는 검출되지 않아 위양성, 위음성 결과가 나타나지 않았음을 확인하였다(Table 1). 또한 기존에 살모넬라 검출을 위해 사용되고 있는 국내 제품인 살모넬라 검출 kit (Kogenbiotech, Seoul, Korea)와 비교를 진행한 결과, 모두 100% 일치하여 두 방법간 특이도 결과에 차이가 없었다(Table 1). Moore 등[26]의 연구에서도 real-time PCR을 이용하여 살모넬라 양성 균주에서 *stn* 유전자를 확인

Table 1. Inclusivity and exclusivity tests by two types of real-time PCR methods

	Strains	Source	A		B	
			invA	*stn*	*invA*	*stn*
Salmonella strains	*S.* Braenderup ATCC BAA-664	ATCC[a]	+[g]	+	+	+
	S. Enteritidis ATCC 13076	ATCC	+	+	+	+
	S. Typhimurium ATCC 14028	ATCC	+	+	+	+
	S. Typhimurium NCCP 10337	NCCP[b]	+	+	+	+
	S. Typhimurium NCCP 12241	NCCP	+	+	+	+
	S. Typhimurium NCCP 14772	NCCP	+	+	+	+
	S. Dublin ATCC 13312	ATCC	+	+	+	+
	S. arizonae ATCC 13314	ATCC	+	+	+	+
	S. diarizonae ATCC 29934	ATCC	+	+	+	+
	S. spp. MFDS[c] 1000256	Steamed meat	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1000257	Steamed conch	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1000258	Pan-fried pollack	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1000259	Skewered food	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1000260	Deep-fried shrimp	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1000301	Cooking utensils	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1000302	Cooking utensils	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1000303	Cooking utensils	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002066	Dried green laver salad	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002390	NA[f]	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002391	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002392	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002393	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002395	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002396	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002397	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002398	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002399	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002400	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002401	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002402	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002403	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002404	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002405	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002406	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002407	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002408	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002409	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002410	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002411	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002413	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002414	NA	+	+	+	+
	S. spp. MFDS 1002416	NA	+	+	+	+

Table 1. (continued) Inclusivity and exclusivity tests by two types of real-time PCR methods

	Strains		Source	A		B	
				invA	*stn*	*invA*	*stn*
Non-*Salmonella* strains	*E. coli*	ATCC 43887	ATCC	-	-	-	-
		NCCP 11090	NCCP	-	-	-	-
		ATCC 23982	ATCC	-	-	-	-
		ATCC 43893	ATCC	-	-	-	-
		KCCM 21052	KCCM[d]	-	-	-	-
		KCCM 40219	KCCM	-	-	-	-
		NCCP 13715	NCCP	-	-	-	-
	S. aureus	KCCM 12256	KCCM	-	-	-	-
		ATCC 35548	ATCC	-	-	-	-
		ATCC 6538	ATCC	-	-	-	-
		KCCM 40881	KCCM	-	-	-	-
		ATCC 13565	ATCC	-	-	-	-
		KCCM 11812	KCCM	-	-	-	-
		ATCC 49775	ATCC	-	-	-	-
	V. parahaemolyticus	ATCC 17802	ATCC	-	-	-	-
		KCCM 41664	KCCM	-	-	-	-
	V. vulnificus	ATCC 27562	ATCC	-	-	-	-
		ATCC 29307	ATCC	-	-	-	-
	C. perfringens	KCCM 40946	KCCM	-	-	-	-
		KCCM 12098	KCCM	-	-	-	-
		KCTC 5101	KCTC[e]	-	-	-	-

[a]ATCC: American Type Culture Collection
[b]NCCP: National Culture Collection for Pathogens
[c]MFDS: Ministry of Food and Drug Safety
[d]KCCM: Korean Culture Center of Microorganisms
[e]KCTC: Korean Collection for Type Cultures
[f]NA: Not available
[g]+: positive test result, -: negative test result

Table 2. Sequences of primers and probes used for the *Salmonella*-specificity assay

Target gene		Sequence (5' to 3')	Size (bp)
stn	Forward	GCCCCAGGCCTGTCCCGTCA	162
	Reverse	CGATTGGCCGCCAGGGAACG	
	Probe	TCGCCTCCAGCTGATCCGGGGCGA	
invA	Forward	GCGCGCGAACGACGAAGCGT	151
	Reverse	GGCGGGTCATCCCCACCGAA	
	Probe	TCAAAGGTGACGCCATTGCCGGCATCA	

하였다고 보고하여 본 연구와 같은 결과를 보였다.

민감도 측정

살모넬라 *stn*과 *invA*를 이용하여 자체 제작한 NBS LabChip real-time PCR의 민감도는 Figs. 1, 2, 3에 나타내었다. *stn*과 *invA* 모두 10^1 copies/μL까지 검출이 가능하여 높은 민감도를 확인할 수 있었다(Figs. 1, 2). 검출한계를 구한 범위 내에서 real-time PCR이 최적화되었는지 평가하기 위해 standard plot으로부터 얻어지는 R^2 값이 0.98 이상인지를 평가한다[25]. 본 연구에서 *stn* 및 *invA*의 정량 곡선으로부터 얻어진 R^2 값은 각각 0.9961 및 0.9982의 신뢰도를 입증하였다(Fig. 3). 또한 *Salmonella* Entritidis ATCC 13076 *stn* gene과 양성대조군 *invA* gene에 대한 NBS LabChip real-time PCR 반응액은 2% agarose gel에서 전기영동하여 각각의 밴드를 확인한 결과, 각각 162 bp와 151 bp에서 특이적인 증폭산물을 확인하였다(Figs. 1, 2).

식품적용 평가

소시지에 살모넬라를 접종한 후 제작된 프라이머와 프로브를 이용하여 real-time PCR을 수행한 결과를 Fig. 4에

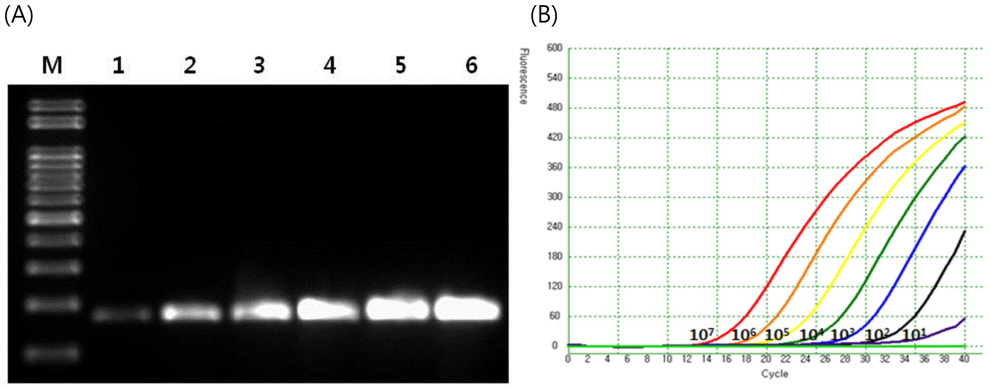

Fig. 1. Sensitivity of the ultrafast real-time PCR amplication in detecting *Salmonella stn* gene. (A) Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons of *Salmonella stn* gene. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1-6: 10^1 to 10^6 CFU/mL. (B) Ultrafast real-time PCR amplification of *Salmonella stn* gene.

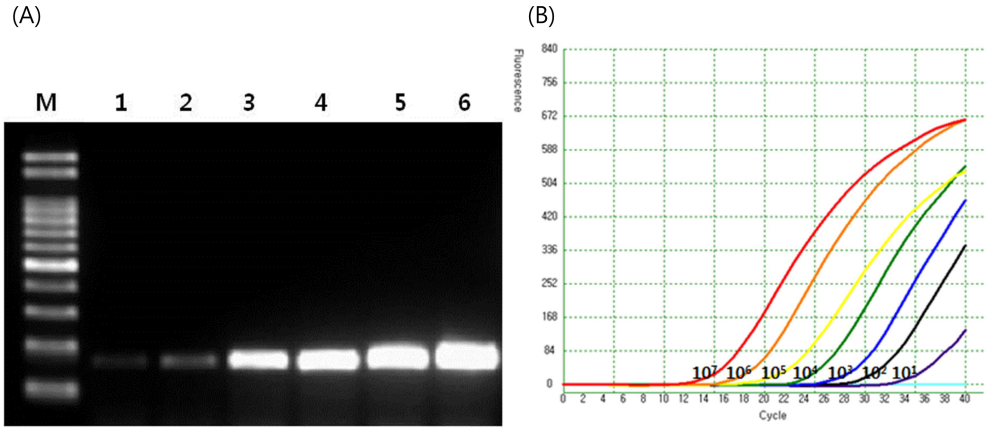

Fig. 2. Sensitivity of the ultrafast real-time PCR amplication in detecting *Salmonella invA* gene. (A) Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons of *Salmonella invA* gene. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1-6: 10^1 to 10^6 copies/μL. (B) Ultrafast real-time PCR amplification of *Salmonella invA* gene.

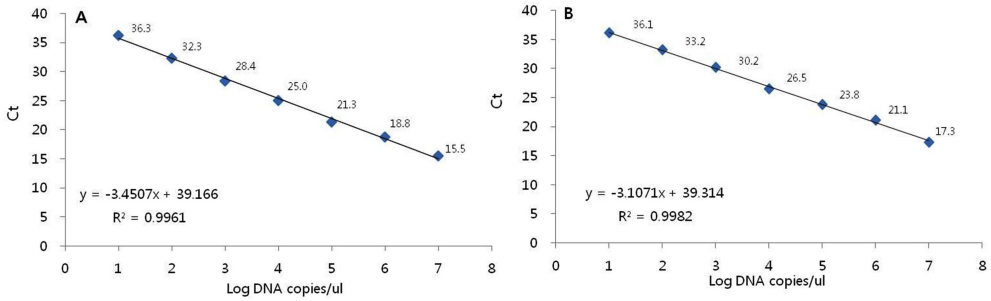

Fig. 3. Detection limits of *Salmonella* (A) *stn* gene and (B) *invA* gene using designed primer and probe.

나타내었다. 대조군인 증균 전 단계로 적용된 살모넬라 순수배양액(before enrichment)의 경우 *invA*와 *stn* 모두 10^3 CFU/g이며, 접종 후 4시간 증균한(after enrichment) 결과 *invA* 유전자는 접종균수로서 10^1 CFU/g, *stn* 유전자는 접종균수로서 10^2 CFU/g 수준의 감도를 보였다(Fig. 4).

식품으로부터 병원균의 검출은 특이성뿐만 아니라 민감성 또한 매우 중요한 요인으로 작용한다[27]. Kumar 등[28]의 연구에 따르면 살모넬라를 seeded fish에 접종하여 Chromo 4 Real-time system (MJ Research Corp., U.S.A.)을 통해 *invA*를 확인한 결과 20~10^6 CFU/mL 검출이 가능하였다.

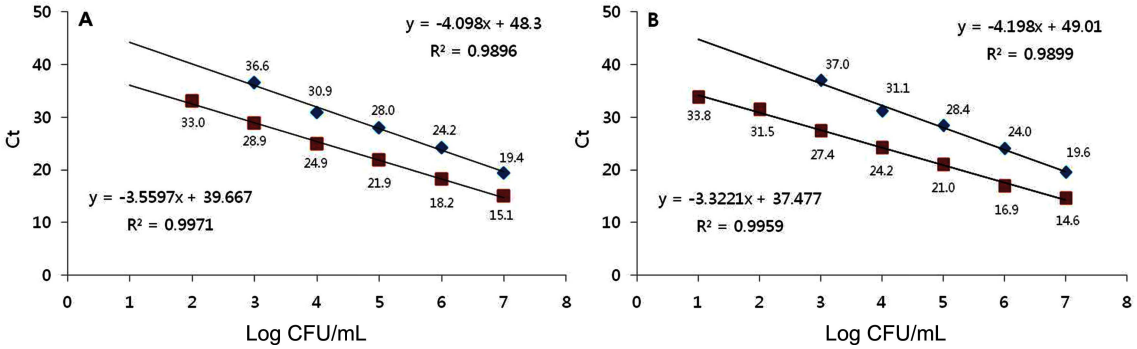

Fig. 4. Detection limits of *Salmonella* enterotoxin ATCC 13076 (A) *stn* gene and (B) *invA* gene. ◆ : *Salmonella* enterotoxin ATCC 13076 cells grown in broth, ■ : Artificially inoculated sausage samples after enrichment for 4 h.

Niu 등[29]은 Fast real-time PCR (Applied Biosystems, USA)을 이용한 우유에서 살모넬라를 10^2 CFU/mL까지 검출하여 본 연구에서 사용한 real-time PCR과 비슷한 결과를 나타냈다.

선행 연구에 의하면 Malorny등[30]은 육류 및 우유에서 *Salmonella* spp. 검출법에 있어서 배지 배양법보다 real-time PCR법이 100%의 높은 민감도와 특이도를 보여 real-time PCR법의 우수성을 발표하였다. Lee 등[22]에 따르면 비가공식품에서 colony PCR법 보다 real-time PCR법이 보다 많은 양성의 결과를 보여 더 효과적인 검사법이라고 하였고, 돼지고기에 *S. aureus*를 접종하였을 때 배지배양법에 비해 효율성이 더 우수하다고 보고하였다. Jeong 등[31]도 *Salmonella*와 *V. parahaemolyticus* 균주에 혼합되어 있는 *S. aureus*만을 검출하는 PCR법을 보고하였다. 또한 우유, 치즈 등 유제품에서 *Campylobacter coli* 및 *C. jejuni* 검출[32]과 소시지 및 햄류에서 *L. monocytogenes* 검출을 보고하는[33] 등 이처럼 여러 분야에서 PCR법이 수행되고 있다.

또한 우유에 살모넬라를 접종한 후 증균 시간에 따라 검출율을 비교한 결과 증균 단계를 거치지 않을 경우 10^3 CFU/mL인 반면 18시간 이상 증균 할 경우 10^0 CFU/mL을 나타냈다고 하였다[34]. Sharma 등[35]도 고기에서 *Salmonella*와 *E. coli* O157:H7를 인위적으로 접종하여 확인한 결과 최소 6~18시간 배양해야 10 CFU/g까지 검출할 수 있어 증균 단계의 필요성을 발표하였다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때, PCR 법은 병원성 세균을 분리, 배양 단계를 거치지 않고 존재 여부를 빠른 시간 내에 확인할 수 있어 식품에서 미생물의 검출에 효과적이다[27].

일반적으로 real-time PCR에 따른 식품에서 검출한계는 10^3~10^4 CFU/mL 수준이며 분석시간은 30분~90분이 소요되지만[21,36-38] 본 연구에서는 식품에서 높은 감도와 20분 내에 결과를 도출할 수 있어 신속한 검출 속도를 나타내었다. 또한 PCR 검출한계 이상의 결과를 얻기 위해서는 8시간 이상의 증균 과정을 거쳐야 하지만[39] 본 연구에서는 최소 증균 과정(4시간)을 거쳐 10^1~10^2 CFU/mL 수준까지 검출이 가능하였다.

따라서 본 연구에서 개발한 프라이머/프로브를 이용하여 NBS LabChip real-time PCR법으로 4시간 동안 배양한 증균액만으로 20분 내에 결과를 판정할 수 있기 때문에 분석 시간 및 비용을 절감할 수 있고, 시료 내에 적은 농도로 존재하는 *Salmonella* 균을 검출할 수 있었다. 또한 식품에서 검출감도를 높이기 위해서는 최소 4시간 이상의 증균 과정을 거쳐야 할 것으로 사료된다. 최종적으로 본 연구에서는 *Salmonella*의 *stn*과 *invA* gene의 신속 검출법을 마련하여 민감도와 특이성을 확인하였으며, 향후 식품과 식중독 원인조사에 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgement

본 연구는 2014년도 식품의약품안전처 자체연구개발비(14161예방안074)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

*Salmonella*는 전세계적으로 식중독을 유발하는 주요 원인 균으로서, 식중독을 유발하는 *Salmonella*를 신속하게 검출하는 방법은 식품 안전을 위한 중요한 도구이다. Real-time PCR은 식중독균을 검출하기 위한 신속검사법으로 널리 사용되어 왔다. 최근에는 NBS LabChip real-time PCR이라는 새로운 시스템이 칩타입으로 조작이 간편하며 초고속의 real-time PCR 시스템이라는 보고가 있었다. 본 연구에서는 살모넬라의 신속한 검출을 위하여 NBS LabChip real-time PCR에 기반하여 real-time PCR 반응 시간이 20분 이내인 검출법을 확인하고자 하였다. 프라이머와 프로브 설계를 위해 두 개의 타겟 유전자(*invA*, *stn*)가 선택되었으며, 특이도와 민감도(검출한계)를 평가함으로 개발된 검출법을 검증하고자 하였다. 본 연구에서는 특이도 검증

을 위해 *Salmonella* 균주 42주와 Non-*Salmonella* 균주 21주를 포함하였으며, 본 방법으로 *Salmonella* 42주에 대해서만 정확하게 검출이 가능하였다. 검출한계는 살모넬라 genome DNA 기준으로 10^1 copies/μL 였으며, 소시지에서는 4시간 증균 이후 접종균수로서 10^1 CFU/g 에서 10^2 CFU/g까지 검출이 가능하였다. 본 연구에서 개발된 검출법은 신속한 식중독 원인조사에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Park N.B., Song E.J., Kim K.B.W.R., Lee C.J., Jung J.Y., Kwak J.H., Choi M.K., Kim M.J., Nam K.W., Ahn D.H.: Antimicrobial activity of *Myagropsis yendoi* extract. *Kor. J. Fish Aquat. Sci*., **43**, 642-647 (2010).
2. Kim G.Y., Yang G.M., Park S.B., Kim Y.H., Lee K.J., Son J.Y., Kim H.J., Lee S.R.: Rapid detection kit for *Salmonella* typhimurium. *J. Biosystems Eng*., **36**, 140-146 (2011).
3. Trong T.A, Nicholas A.F., Melita A.G., Karen H.K., Frederick J.A., Jon A.C.: Global burden of invasive nontyphoida salmonella disease, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, **21**, 941-949 (2015).
4. Coburn B., Grassl G.A., Finlay, B.B.: *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol*. *Cell Biol.,* **85**, 112-118 (2007).
5. Yang B., Qu D., Zhang X., Shen J., Cui S., Shi Y., Xi M., Sheng M., Zhi S., Meng J.: Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *Int. J. Food Microbiol*., **141**, 63-72 (2010).
6. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS): www.foodsafetykorea.go.kr (2017).
7. Na D.H., Hong Y.H., Yoon M.Y., Park E.J., Lim T.H., Jang J.H., Kim B.Y., Lee D.H., Song C.S.: Prevalence of *Salmonella* species isolated from old hen delivery trucks in Korea and application of disinfectant for the reduction of *Salmonella* contamination. *Korean J. Poult. Sci*., **40**, 11-16 (2013).
8. Cho A.R., Dong H.J., Cho S.B.: Rapid and sensitive detection of *Salmonella* spp. by using a Loop-Mediated isothermal amplification assay in duck carcass sample. *Korean J. Food Sci*., **33**, 655-663 (2013).
9. Cowden J.M., Lynch D., Joseph C.A., OMahony M., Mawer S.L., Rowe B., Bartlett C.L.: Case-control study of infections with *Salmonella* enteritidis phage type 4 in England. *BMJ,* **299**, 771-773 (1989).
10. Nastasi A., Mammina C., Piersante G.P., Robertazzo M., Caruso P.: A foodborne outbreak of *Salmonella* enteritidis vehicled by duck and hen eggs in southern Italy. *New Microbiol*., **21**, 93-96 (1998).
11. Tansel O., Ekuklu G., Otkun M., Otkun M.T., Akata F., Tugrul M.: A food-borne outbreak caused by *Salmonella* enteritidis. *J. Yonsei Med*., **44**, 198-202 (2003).
12. Humphrey T.J.: Contamination of eggs and poultry meat with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, In: *Salmonella enteric* serovar Enteritidis in humans and animals. *Epidemiology, Pathogenesis, and Control. Iowa State University Press,* Ames, IA, pp. 183-192 (1999).
13. Lu S., Manges A.R., Xu Y., Fang F.C., Riley L.W.: Analysis of virulence of clinical isolates of *Salmonella* enteritidis in vivo and in vitro. *Infect*. *Immun*., **67**, 5651-5657 (1999).
14. Meyer H.: Animals as sources of infections in humans-salmonellosis. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr*., **106**, 344-351 (1999).
15. Gast, R.K. and Beard, C.W.: Isolation of *Salmonella* Enteritids from internal organs of experimentally infected hens. *Avian. Dis*., **34**, 991-993 (1990).
16. Cover, T.L. and Aber, R.C.: Medical progress (*Yersinia enterocolitica*). *N. Engl. J. Med.,* **321**, 16-24 (1989).
17. Tassinari A., Franco B.D.G., Landgraf M.: Incidence of *Yersinia* spp. in food in Sao Paulo, Brazil. *Int*. *J. Food Microbiol.*, **21**, 262-270 (1994).
18. Park H.J., Kim H.J., Park S.H., Shin E.G., Kim J.H., Kim H.Y.: Direct and quantitative analysis of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium using real-time PCR from artificially contaminated chicken meat. *J. Microbiol. Biotechnol*., **18**, 1453-1458 (2008).
19. Kim H.J., Kim Y.S., Chung M.S., Oh D.H., Bahk G.J., Chun H.S., Ha S.D.: Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J. Fd. Hyg. Safety*, **25**, 376-387 (2010).
20. Mandal P.K., Biswas A.K., Choi K., Pal U.K.: Methods for rapid detection of foodborne pathogens: An overview. *American J. Food Technology*, **6**, 87-102 (2011).
21. Guillermo L.C., Joaquin V.M.S., Monica A.U., Victoria L.A.: Microarray detection and characterization of bacterial foodborne pathogens. *Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition*, USA, pp. 13-114 (2012).
22. Lee J.H., Song K.Y., Hyeon J.Y., Hwang I.G., Kwak H.S., Han J.A., Chung Y.H., Seo K.H.: 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).
23. Lee S.H., Kim S.W., Lee SH., Kim E.S., Kim D.J., Park S.H., Lee E.J., Lee S.Y., Lee J.S., Lim C.S., Kim W.K., In K.H.: Rapid detection of *mycobacterium tuberculosis* using a novel ultrafast chip-type real-time polymerase chain reaction system. *Chest*., **146**, 1319-1326 (2014).
24. Song H.O., Kim J.H., Ryu H.S., Lee D.H., Kim S.J., Kim D.J., Suh I.B., Choi D.Y., In K.H., Kim S.W., Park H.P.: Polymeric labchip real-time PCR as a point-of-care-potential diagnostic tool for rapid detection of influenza A/H1N1 virus in human clinical specimens. *Plos one*, **12**, 1-8 (2012).
25. Johnson G., Nolan T., Bustin S.A.: Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. *Methods Mol. Biol*., **943**, 1-16 (2013).
26. Moore, M.M. and Feist, M.D.: Real-time PCR method for *Salmonella* spp. targeting the *stn* gene. *J. Appl. Microbiol*., **102**, 516-530 (2007).
27. Joo J.W., Hong K.P., Kim Y.H., Cho S.B.: Selective detection of *Salmonella* sp. and *Salmonella* Typhimurium in meat by polymerase chain reaction. *J. East Asian Soc*. *Dietary Life,* **19**, 295-300 (2009).

28. Kumar R., Surendran P.K., Thampuran N.: Rapid quantification of *Salmonella* in seafood using real-time PCR assay. *J. Microbiol. Biotechnol*., **20**, 569-573 (2010).
29. Niu P.H., Zhang C., Wang J., Tan W.J., Ma X.J.: Detection and identification of six foodborne bacteria by two-tube multiplex real time PCR and melting curve analysis. *Biomed. Environ. Sci*., **27**, 770-778 (2014).
30. Malorny B., Paccassoni E., Fach P., Bunge C., Martin A., Helmuth R.: Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ. Microbiol*., **70**, 7064-7052 (2004).
31. Jeong Y.S., Jung H.K., Jeon W.B., Seo H.J., Hong J.H.: Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus, Salmonella enterica* subsp. *Vibrio parahaemolyticus* by multiplex polymerase chain Reaction. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*., **39**, 595-601 (2010).
32. Wegmuller B., Luthy J., Candrian U.: Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Appl*. *Environ*. *Microbiol*., **59**, 2161-2165 (1993).
33. Heo E.J., Song B.R., Park H.J., Kim Y.J., Moon J.S., Wee S.H., Kim J.S., Yoon Y.H.: Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by real-time PCR in processed meat and dairy products, *J. Food Protection*, **77**, 453-458 (2014).
34. Nam H.M., Srinivasan V., Gillespie B.E., Murinda S.E., OliverT S.P.: Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Int. J. Food Microbiology*, **102**, 161-171 (2005).
35. Sharma, V.K. and Carlson, S.A.: Simultaneous detection of Salmonella strains and Escherichia coli O157:H7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture. *Appl. Environ. Microbiol*. **66**, 5472-5476 (2000).
36. Rodriguez-Lazaro, D. and Hernandez, M.: Isolation of *Listeria monocytogenes* DNA from meat products for quantitative detection by real-time PCR. *J. Rapid Method Automat Microbiol*., **14**, 395-404 (2006).
37. Navas J., Ortiz S., Lopez P., Jantzen M.M., Lopez V., Martinez-Suarez J.V.: Evaluation of effects of primary and secondary enrichment for the detection of *Listeria monocytogenes* by real-time PCR in retail ground chicken meat. *Foodborne Pathog. Dis*., **3**, 347-354 (2006).
38. Jasson V., Jacxsens L., Luning P., Rajkovic A., Uyttendaele M.: Review. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol*., **27**, 710-730 (2010).
39. Kim J.H., Koo E.J., Seong J.Y., Myeong H.K., Oh S.W.: Rapid methods for the detection of foodborne pathogens from seafoods. *Safe Food*, **11**, 16-24 (2016).