pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 40, No. 3, pp. 209~218 (2025)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2025.40.3.209

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

식품 및 환경 시료에서의 식중독균 검출을 위한 현장형 다중 실시간 PCR 검출법 개발

이소영[1] · 백소영[2] · 김동현[2] · 오세욱[1]*
[1]국민대학교 식품영양학과
[2]진시스템

Development of a Portable Multiplex Real-time PCR Assay for the Detection of Foodborne Pathogens in Food and Environment

So-Young Lee[1], Soyoung Baek[2], Donghyun Kim[2], Se-Wook Oh[1]*
[1]*Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul, Korea*
[2]*Genesystem Co. Ltd., Daejeon, Korea*

(Received March 28, 2025/Revised May 25, 2025/Accepted May 26, 2025)

ABSTRACT - Foodborne pathogens can spread during food production, processing, and distribution, leading to widespread outbreaks. Ensuring food safety from "farm to table" requires rapid and accurate detection. However, conventional PCR systems are limited to laboratory settings, restricting their use in field applications. To overcome this problem, portable PCR devices have been developed for flexible and on-site monitoring. Microfluidic chips further enhance detection by enabling high-throughput, cost-effective, and multiplex pathogen analysis using compartmentalized reaction chambers. In this study, we developed and validated a lab-on-a-chip system for the rapid and on-site detection of foodborne pathogens. The system integrates swab-based DNA extraction, a portable real-time PCR device, and microfluidic chips. Using this approach, we successfully extracted the DNA of four major foodborne pathogens, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*, from food and environmental samples. The GENECHECKER® UF-300 Real-time PCR System enabled target gene detection within 30 min, with a detection limit of 10^5-10^1 CFU/mL (cm^2) for each pathogen, demonstrating its ability to provide rapid, sensitive, and simultaneous pathogen identification. These results demonstrate the potential of portable real-time PCR systems integrated with microfluidic chips for rapid, sensitive, and on-site food safety monitoring, which is a significant advancement in outbreak prevention.

Key words: Foodborne pathogens, Rapid detection, Multiplex real-time PCR, Microfluidic chip, Direct DNA extraction

세균, 바이러스, 진균 및 기생충과 같은 생물학적 식중독 원인체는 매년 수백만 건의 질병을 초래하며, 심각한 경우 사망으로 이어진다[1]. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에 따르면, 매년 전 세계 인구의 약 10%가 식품 매개 질환에 노출되고, 이로 인해 약 42만 명이 사망한다고 추산된다[2]. 또한, 식품의약품안전처 식중독 발생 통계에 따르면 국내에서 2023년 세균성 식중독으로 인한 발생 환자는 6,776명에 달하며, 이는 전체의 77.09%를 차지한다[3]. 특히, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, 및 *Vibrio* spp. 등은 세균성 식중독의 주요 원인으로 잘 알려져 있다[4].

세균성 식중독은 주로 오염된 식품 원재료가 조리 부족이나 온도 관리 미흡으로 인해 그대로 섭취되는 경우와 오염된 개인 혹은 오염된 조리기구를 통해 2차적으로 전파되는 경우에 의해 발생한다[5]. 따라서, 식품뿐만 아니라 생산, 가공, 조리 환경에서의 철저한 위생 관리가 필수적

*Correspondence to: Se-Wook Oh, Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul 02727, Korea
Tel: +82-2-910-5778 Fax: +82-2-910-5249
E-mail: swoh@kookmin.ac.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.

이다[6]. 이를 위해 미생물 검출 및 분석이 중요한 도구로 활용되며, 이러한 환경을 고려한 시험법으로는 한국의 식품공전(food code)에 등재된 미생물 시험법이 있다. 식품공전에 따르면 고체표면검체 및 도체표면시료에서 일정 면적(100 cm^2)을 멸균거즈나 멸균 면봉(swab)으로 닦아내어 미생물을 샘플링한 후 시험용액으로 사용한다[7].

세균성 식중독으로 인한 식중독 사고를 예방하기 위해서 신속하고 정확한 검출이 요구된다. 신속하고 정확한 검출은 오염된 식품이 퍼지는 것을 방지하여 대규모의 식중독 사고가 일어나는 것을 예방할 수 있다[8]. 그러나 현재 식품 산업에서 생산, 가공, 유통, 섭취까지의 모든 과정에서 식중독균의 오염이 일어날 수 있음에도, 대부분의 식중독균 검출법은 원인 식품이나 분석하고자 하는 샘플을 수거하여 실험실 분석에 의존한다[1,9]. 이러한 이유로, 실험실이 아닌 저자원 지역에서 휴대 가능하고 빠르며 민감하고 사용자 친화적인 검출을 제공하는 현장형 검출의 필요성이 증가하고 있다[10,11].

일반적으로 식중독균 검출 방법은 배지 배양법, 면역학적 방법, 그리고 분자생물학적 방법이 사용된다[12]. 배지 배양법은 높은 정확성과 신뢰성을 제공하지만 결과를 얻기까지 5일 이상의 긴 시간이 소요되며, 노동 집약적이다[13]. 면역학적 방법은 비교적 빠른 검출이 가능하지만, 민감도와 특이성이 제한적일 수 있다[14]. 분자생물학적 방법, 특히 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 고감도와 고특이성을 제공하며, 다양한 병원체를 신속하게 검출할 수 있는 기술로 널리 사용되고 있다[15]. 그러나 기존 PCR 기반 검출은 다양한 식중독균이 존재함에도 불구하고, 형광단(fluorophore)의 개수로 제한되는 다중 검출의 한계점과 고가의 열순환 장비는 현장 검출을 어렵게 만드는 주요 요인이다[16,17]. 이러한 이유로 일정 온도에서 증폭이 이루어지는 등온증폭 기술은 현장 검출에 적하다고 평가된다[18]. 하지만, 등온증폭은 비특이적 증폭으로 인한 위양성(false positive) 발생 위험이 높아 실질적인 활용이 어렵다[19].

대부분의 연구에서 분자생물학적 방법을 기반으로 연구된 현장 검출법은 DNA 추출법이 충분히 고려되지 않는다. 컬럼 추출법, 가열 추출법, 자성나노입자 추출법과 같이 DNA 추출에 일반적으로 사용되는 방법은 원심분리 등의 추가 장비와 반복적인 과정이 필요하기 때문에 현장 검출에 큰 제약이 될 수 있다[20,21].

따라서, 본 연구에서는 랩온어칩 기술과 함께 direct DNA 추출법을 활용하여 복잡한 샘플 준비 과정을 간소화하고, 식품 및 환경 시료에서 주요 병원체를 신속하게 검출할 수 있는 시스템을 개발하고자 하였다. 네 가지 주요 식중독균(*E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus*)를 대상으로 한 다중 real-time PCR을 설계하였으며, 검출 민감도와 특이성을 평가하여 다양한 매트릭스 조건에서의 성능을 비교 분석하였다.

Methods and Materials

사용 균주 및 배양 조건

본 연구에서는 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *S.* Typhimurium ATCC 14028, *L. monocytogenes* ATCC 19113 그리고 *S. aureus* ATCC 6538가 사용되었다. 모든 사용 균주는 -80°C에서 50% (v/v) glycerol이 포함된 tryptic soy broth (TSB; Oxoid, Basingstoke, UK)에 사용 전까지 냉동 보관하였다. 모든 사용 균주는 tryptone soya agar (TSA; Oxoid)에 획선도말하여 37°C에서 하룻밤 배양하여 단일 집락을 얻었으며, 단일 집락은 10 mL의 TSB (Oxoid)에 접종하여 37°C에서 16-18시간 진탕 배양 (200 rpm) 하여 사용하였다. 균주의 초기 농도는 0.85% (v/v) NaCl (멸균 생리 식염수; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)로 십진 희석하여, TSA (Oxoid)에 도말하고 37℃에서 24시간 동안 배양하여 초기 농도를 계산하였다. 다중 검출을 위해 배양된 10^9 CFU/mL 농도의 *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *L. monocytogenes* 및 *S. aureus*은 8,000 × g로 4°C에서 15분간 원심분리 후, 멸균 생리 식염수로 세척하여 각 4종의 식중독 균을 혼합하여 제조된 culture cocktail을 제조하였으며, culture cocktail은 멸균생리식염수로 십진희석하여 10^1-10^7 CFU/mL로 농도로 준비되었다.

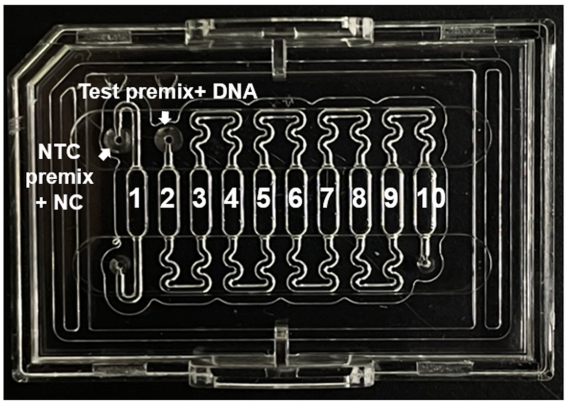
DNA 추출

Trans:Direct™ extraction kit (Genesystem Co., Ltd., Daejeon, Korea)을 사용하여 DNA 추출을 수행되었다. 1 mL의 순수배양물을 trans: direct lysis buffer (DLB; Genesystem Co., Ltd.)가 포함된 tube에 넣고 10회 흔들어 섞어준 뒤 상온에서 5분간 정치하여 배양되었다. 이후 tube의 상등액 200 μL을 DNA로 사용하였다.

미세유체칩 기반 현장형 다중 real-time PCR

본 연구에서는 TaqMan probe 방법을 기반으로 한 TotalPatho™ multiplex foodborne pathogens detection kit (Genesystem Co., Ltd.)와 현장형 real-time PCR (GENECHECKER UF-300 Real-time PCR System, Genesystem Co., Ltd.)을 사용하였다. 실험군으로 35 μL의 DNA는 test premix tube와 혼합되었으며, 대조군으로 5 μL의 nuclease free water (NC)는 NTC Premix와 혼합되었다. Test premix 및 NTC premix는 중합효소 완충액으로 구성되었다. Primer 및 probe가 포함된 미세유체칩(rapi:chip, Genesystem Co., Ltd.)은 양성대조군(positive control, PC), 음성대조군(negative control, NC), 및 내부대조군(internacl control, IC)을 포함한다. 또한, STEC, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes, S. aureus,* 및 *E. coli* O157의 특이 유전자인 *invA, femA, prfA, stx2,* 및 *rfbE*를 타겟으로 primer 및 probe가 포함되어 있다(Fig. 1). 각 유전자를 검출할 수 있

(a)



(b)

	FAM	ROX
1	Negative control (NC)	Internal control (IC)
2	-	-
3	-	-
4	-	STEC (*stx2*)
5	-	-
6	*L. monocytogenes* (*prfA*)	-
7	-	*Salmonella* spp. (*invA*)
8	*S. aureus* (*femA*)	-
9	*E. coli* O157 (*rfbE*)	-
10	Positive control (PC)	

Fig. 1. Microfluidic lab-on-a-chip design for multiplex detection: (a) Rapi:chip; (b) Detection scheme for foodborne pathogen and control.

는 대표 균주는 본 연구에서 *E. coli* O157:H7 (*stx2* 및 *rfbE)*, *S.* Typhimurium (*invA*), *L. monocytogenes* (*prfA*) 그리고 *S. aureus* (*femA*)가 사용되었다.

미세유체칩의 1번 well에 NTC Premix 반응액 8.5 μL를 주입하고 2번 well은 test premix 반응액 64 μL를 주입하였다. 반응액 주입구를 포함한 미세유체칩을 sealing tape를 이용하여 밀봉한 뒤 현장형 real-time PCR에 넣고 PCR 반응을 수행하였다. Real-time PCR의 반응 조건은 95°C에서 30초간 초기 변성 후 95°C에서 3초간 변성, 56°C에서 7초간 유전자 결합, 72°C에서 3초간 신장 반응이 일어나는 것을 1회로 하여 총 7회 증폭 반응 후 95°C에서 3초간 변성, 60°C에서 7초간 유전자 결합, 72°C에서 3초간 신장 반응이 일어나는 것을 1회로 하여 총 40회 증폭반응을 수행하였다. 증폭 결과는 현장형 real-time PCR 화면에 표시되는 증폭 곡선 및 Ct value를 확인하였다.

환경 및 식품 시료 준비 및 표면 인위 접종

환경 시료인 스테인리스 스틸 및 폴리프로필렌과 식품 표면 시료인 돼지껍데기는 서울에 위치한 대형마트에서 구입하여 사용하였다. 스테인리스 스틸은 121°C에서 15분 동안 고압증기 멸균하였으며, 폴리프로필렌의 표면은 사용 전 40W UV-C을 3시간 이상 조사하여 살균한 뒤 실험에 사용하였다. 환경 및 식품 시료는 biosafety food 안에 멸균된 알루미늄 호일 위에 두고 10^1-10^7 CFU/mL 농도의 culture cocktail을 100 μL을 피펫으로 취하여 10×10 cm^2의 범위에 골고루 접종한 뒤 1시간 동안 실온에서 자연 건조하여 균이 표면에 부착되게 하였다. 스테인리스 스틸, 폴리프로필렌 및 돼지껍데기의 *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *L. monocytogenes* 및 *S. aureus*의 농도는 10^0-10^5 CFU/cm^2이었다.

Swab 분석

4종의 식중독균이 인위 접종된 스테인리스 스틸, 폴리프로필렌 및 돼지 껍데기의 표면 10×10 cm^2을 10 mL의 멸균생리식염수 혹은 trans: direct lysis buffer (DLB; Genesystem Co., Ltd.)가 적셔진 멸균 swab (BNF KOREA Co., Ltd., Gimpo, Korea)으로 문지른 후, 균체를 수집한 swab은 DNA 추출을 위해 사용되었다.

Swab 분석과 DNA 추출법의 연계

표면 시료인 스테인리스 스틸(10^5 CFU/cm^2)에서 식중독균 수집한 swab을 4가지 DNA 추출법의 추출 효율을 비교평가 하였다. 변형된 추출법은 DLB의 기본 protocol을 변형하여 설계하였다. 4가지 DNA 추출은 (1) DLB에 적셔진 멸균 swab, (2) Saline에 적셔진 멸균 swab, (3) Buffered peptone water (BPW; Oxoid)가 적셔진 멸균 swab으로 100 cm^2의 표면에서 미생물을 수집한 후 DLB가 포함된 tube에 넣어준 후 밀봉하였다. (4) BPW가 적셔진 멸균 swab으로 미생물을 수집한 후 10 mL의 BPW과 30초간 교반 한 뒤 1 mL을 DLB가 포함된 tube에 넣어준 후 밀봉하였다. 이후 네 가지 처리구는 10회 흔들어 섞어준 뒤 상온에서 5분간 정치하여 배양한 뒤, tube의 상등액 200 μL을 DNA로 사용하였다. 추출된 DNA를 미세유체칩 기반 현장형 다중 real-time PCR에서 확인된 Ct value를 비교한 후 낮은 Ct value가 나온 처리구를 표면 시료에서 DNA 추출법으로 최종 선정하였다. 추출된 DNA는 즉시 사용하거나, 분석 전까지 -20°C에서 보관되었다.

환경 및 식품시료에서 민감도 평가

10^0-10^5 CFU/cm^2 농도의 culture cocktail이 인위 접종된 환경시료(스테인리스 스틸 및 폴리프로필렌) 및 식품시료(돼지껍데기)의 표면은 상기 작성한 바와 같이 멸균 swab을 이용하여 미생물을 수집하고 DNA를 추출하여 민감도를 비교 평가하였다.

통계분석

모든 측정은 3회 반복하여 수행되었으며, 결과는 평균±

표준 편차로 표시되었습니다. SPSS 버전 28.0.0.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 일원 배치 분산 분석(ANOVA)의 경우 사후검정으로 다중범위검정(Duncan's multiple range test)의 결과로 유의성(P<0.05)을 검증하였다.

Results and Discussion

미세유체칩 기반 multiplex real-time PCR 시스템의 구축

Fig. 1과 같이, primer 및 probe가 포함된 미세유체칩(Rapi:chip, Genesystem Co., Ltd.)은 10개의 well로 구성되어 있으며, 각 well은 FAM과 ROX 두 종류의 형광에 기반한 dual channels로 설계되었다. *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes,* 및 *S. aureus*의 특이 유전자인 *invA, femA, prfA, stx2,* 및 *rfbE*를 검출하였으며, *E. coli* O157:H7 (*stx2* 및 *rfbE)*, *S.* Typhimurium (*invA*), *L. monocytogenes* (*prfA*)그리고 *S. aureus* (*femA*)을 대표 균주로 사용하였다.

일반적으로 TaqMan probe 기반 real-time PCR에서 다중 검출을 수행하기 위해 목적 유전자 수만큼 primer와 probe의 종류가 증가하게 되며, 이는 primer dimer와 같은 위양성 결과 발생 가능성을 높이는 요인이 된다. 게다가, TaqMan probe 기반 real-time PCR의 경우 fluorophore (FAM, VIC, JUN, ROX 등)의 종류에 따라 다중 검출 가능 개수가 제한된다. 이는 fluorophore를 인식하는 장비의 성능에 따라 다중 검출의 범위가 결정되며, 결과적으로 장비 비용 상승으로 인해 현장 검출의 실현 가능성을 저해하는 주요 원인이 된다. 그러나 본 연구에서 사용된 미세유체칩은 목적 유전자 증폭을 위한 각 well이 독립적으로 분리되어 있어 primer 및 probe 간의 혼합으로 인한 위양성 결과 발생 가능성을 최소화할 수 있다. 또한, fluorophore의 개수에 의존하지 않고 channels 기반의 다중 검출 방식을 적용하여, FAM과 ROX 두 가지 형광만으로도 효과적인 다중 검출이 가능함을 확인하였다. 게다가 현장형 real-time PCR (GENECHECKER UF-300 Real-time PCR System)의 판 형태의 heat block은 평평한 형태의 미세유체칩 표면이 접촉된 구조로 열전도율이 높기 때문에 40 cycles의 완료 및, 결과 확인에 30분이 소요되었다. 이는 기존의 1시간에서 3시간의 증폭 시간이 필요한 real-time PCR 비해 신속한 분석이 가능하다.

Fig. 2는 10^7 CFU/mL 농도의 culture cocktail을 사용한 양성 증폭 결과와 증류수의 음성 증폭 결과를 보여준다. 양성 샘플의 결과, *L. monocytogenes* (*prfA*), *S.* Typhimurium (*invA*), *S. aureus* (*femA*), 및 *E. coli* O157:H7 (*stx2*, *rfbE*)의 target gene이 명확한 증폭 곡선을 형성하였다(Fig. 2a). PC와 IC은 성공적으로 검출되었으며, NC에서는 증폭이 발생하지 않았다. 음성 샘플의 결과(Fig. 2b), PC와 IC를 제외한 모든 target gene에서 Ct 값이 검출되지 않았고, 비특이적 증폭곡선 또한 관찰되지 않았다. 이는 양성 및 음성 샘플 간의 결과가 명확히 구분되었으며, multiplex 조건에서도 위양성 신호가 발생하지 않았음을 나타낸다. 이러한 결과는 미세유체칩 기반 multiplex real-time PCR 시스템이 높은 특이성을 바탕으로 다양한 식중독균을 빠르고 간단하면서도 동시에 검출하는 데 적합하다는 것을 의미한다.

순수 배양액에서의 민감도 확인

미세유체칩 기반 multiplex real-time PCR 시스템에서 순수 배양에서 얻어진 *L. monocytogenes* (*prfA*), *S.* Typhimurium (*invA*), *S. aureus* (*femA*), 및 *E. coli* O157:H7 (*stx2*, *rfbE*)에 대한 표준 정량 곡선 및 민감도를 Fig. 3에 나타내었다. 각 그래프는 log CFU/mL 농도에 따른 Ct 값의 관계를 나타내며, 결정계수(R^2)는 0에서 1 사이의 값을 가지며 일반적으로 R^2 값이 1에 가까울수록 신뢰성이 높은 결과로 판단된다. PCR 기반의 데이터는 정확도와 민감도가 중요하므로, R^2 값이 0.9 이상일 때 신뢰할 수 있는 검출 모델로 평가된다[22]. *stx2*는 R^2=0.9787, *prfA*는 R^2=0.9990, *invA*

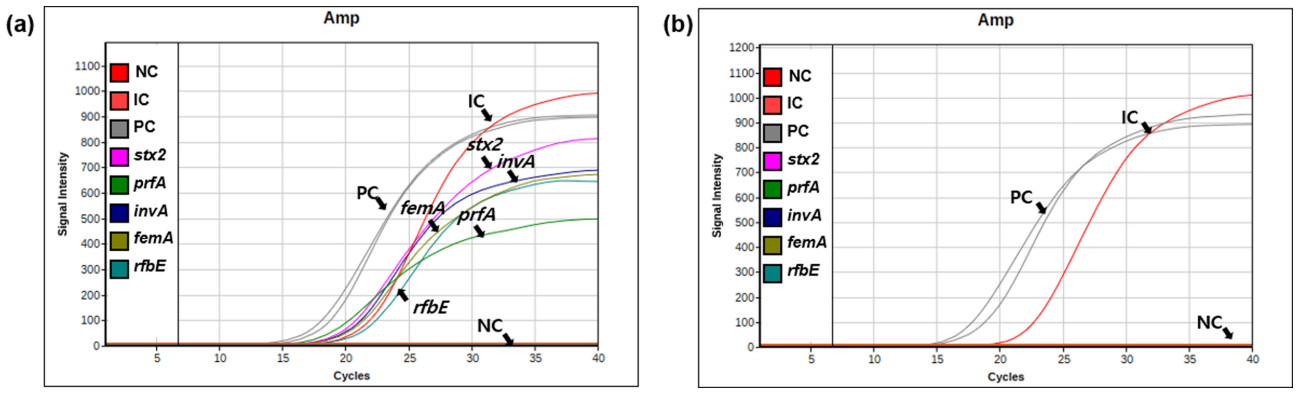


Fig. 2. (a) Positive (10^7 CFU/mL of culture cocktail) and (b) Negative (distilled water) results of multiplex real-time PCR for detecting *stx2, prfA, invA, femA,* and *rfbE.*

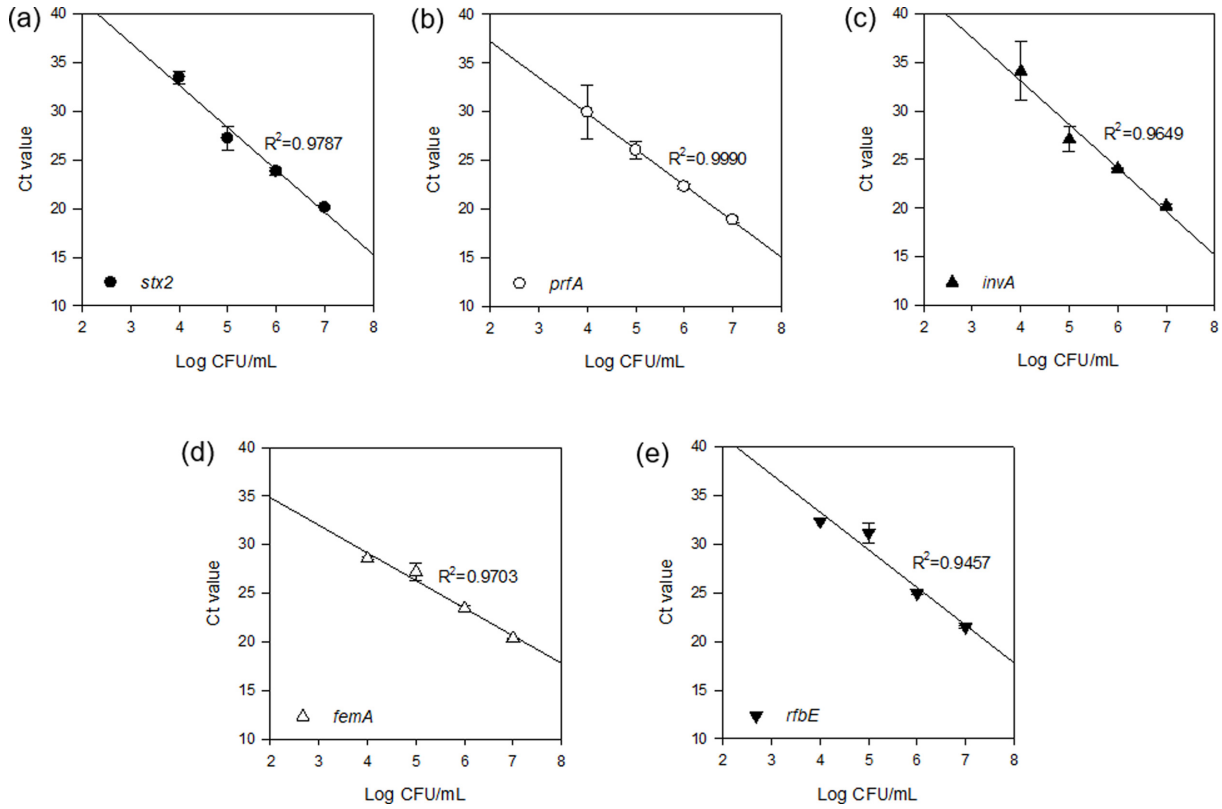


Fig. 3. Standard curve of (a) *stx2*, (b) *prfA*, (c) *invA*, (d) *femA*, and (e) *rfbE* on pure culture (*E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *S.* Typhimurium).

는 R^2=0.9649, *femA*는 R^2=0.9703, *rfbE*는 R^2=0.9457으로 모든 target gene에서 높은 결정계수 (R^2>0.9)가 확인되었다. 3반복의 실험중 3반복이 모두 검출된 경우를 검출한계로 설정하였으며 각 균 종의 검출한계는 *stx2, femA* 및 *rfbE*은 10^5 CFU/mL, *prfA* 및 *invA*은 10^4 CFU/mL이었다.

일반적으로 분자증폭 기반 현장형 검출법은 등온증폭을 사용하거나, 비용효율적 측면을 고려하여 현장형 conventional PCR을 기반으로한 비색검출을 사용한다. 이러한 분자증폭 기반 현장형 검출법은 정성분석에 효과적이지만, 농도에 따른 정량 분석에는 한계가 있다. Zhang 등[23]에 따르면 현장형 conventional PCR와 크리스퍼 유전자 가위를 사용하여 양성과 음성의 뚜렷한 형광 차이로 *Vibrio parahaemolyticus*을 효과적으로 검출하였다. 하지만, *V. parahaemolyticus*의 농도에 따른 형광차이를 구분하기 어려웠다. 마찬가지로, Li[24] 등은 재조합효소-중합효소 증폭법(recombinase-polymerase amplification, RPA)과 측방유동면역분석법(lateral flow immunoassay, LFA)을 사용한 *Salmonella*의 현장 검출법을 보고했지만 *Salmonella*의 정량분석은 어려웠다. 반면, 우리의 연구에서 현장형 real-time PCR을 이용하여 각 target gene이 농도에 따라 선형적으로 증폭되어 현장 분석 기술뿐만아니라 정량 분석 기술로의 활용 가능성도 보여주었다.

Swab 분석과 연계된 DNA 추출법의 비교평가

분자증폭 기반 현장형 검출법은 DNA 증폭법을 고려하지 않은 경우가 일반적이며, DNA 추출법은 크게 column DNA 추출법, boiling 방법, 자성입자 추출법 등이 주로 사용되며, 이러한 방법들은 원심분리와 같은 추가 장비와 반복적인 시약 처리가 요구되기 때문에 시간 소요와 장비 의존성이 높아 현장 진단에 제약으로 작용한다[20]. 이에 본 연구에서는 환경 및 식품 표면 시료에서 식중독균의 현장형 신속 검출 시스템을 구축하기 위해 swab 분석과 DNA 추출법을 연계하여 평가하였다.

4가지 swab 기반 DNA 추출법으로 추출된 DNA의 증폭 효율은 미세유체칩 기반 multiplex real-time PCR 시스템에서 확인된 Ct value를 통해 비교 되었다(Table 1). DLB에 적셔진 멸균 swab을 이용해 추출한 1번 처리구와 saline에 적셔진 멸균 swab을 이용해 추출한 2번 처리구는 BPW가 사용된 3번, 4번 처리구와 비교하여 모든 목적 유전자의 Ct 값이 유의적으로 낮았다(P<0.05). 이는 BPW의 특정 성분이 PCR 반응을 저해하는 PCR 억제제로 작용하여 DNA 증폭 효율을 낮춘 것으로 판단된다[25].

1번 처리구는 DLB 만을 이용하여 비교적 간단하며, DNA 추출 과정에서 높은 효율을 제공할 수 있다. 하지만, DLB가 환경 및 식품 표면에서 직접적으로 접촉할 경우 발생

Table 1. Comparison of Ct values from DNA extracted using different swab-based methods in a microfluidic multiplex real-time PCR. Different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05) between Ct values

	Methods	*E. coli* O157:H7 (*stx2*)	*E. coli* O157:H7 (*rfbE*)	*L. monocytogenes* (*prfA*)	*S.* Typhimurium (*invA*)	*S. aureus* (*femA*)
		10^5 CFU/cm^2	10^5 CFU/cm^2	10^5 CFU/cm^2	10^5 CFU/cm^2	10^6 CFU/cm^2
1	DLB+swab	16.80±0.37 a	18.14±0.37 ab	17.44±0.22 a	15.82±0.43 a	19.52±0.40 a
2	Saline+swab	17.09±0.07 a	17.76±0.38 a	17.82±0.50 a	15.72±0.27 a	19.74±0.37 a
3	BPW+swab	18.80±0.94 b	18.99±0.07 b	18.07±0.53 a	16.87±0.40 b	19.50±0.48 a
4	1 mL of BPW+swab	21.18±0.14 c	22.22±0.04 c	21.64±0.24 b	20.24±0.03 c	22.82±0.54 b

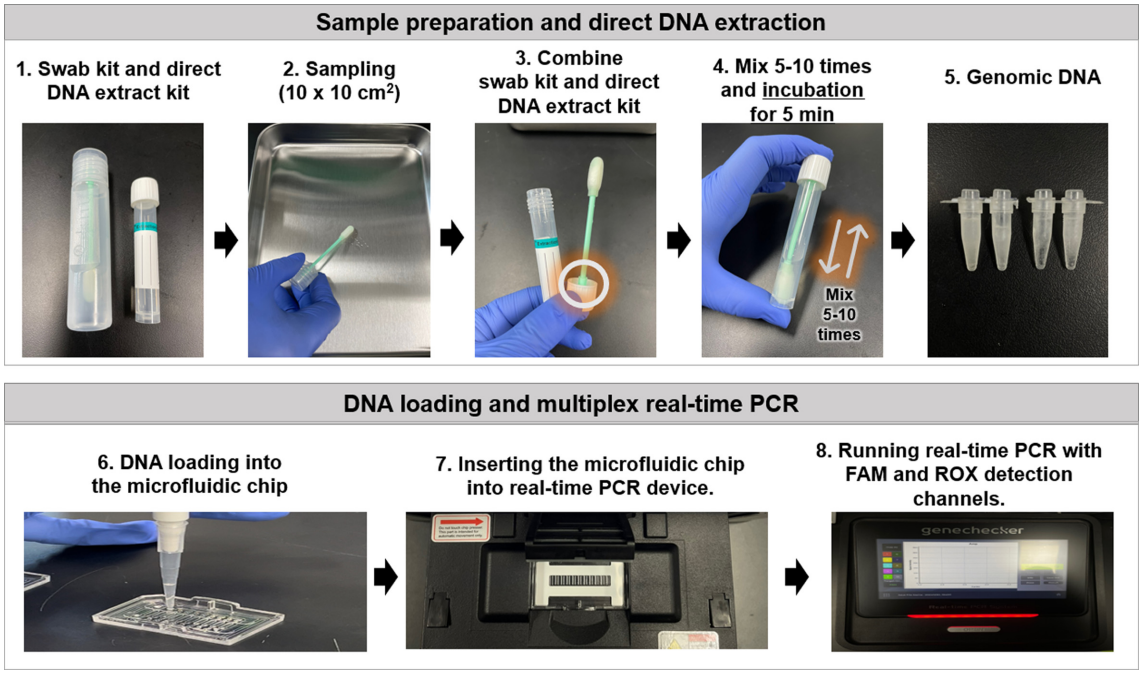


Fig. 4. Workflow for on-site detection.

할 수 있는 잠재적인 안전성 문제가 발생할 가능성이 있다. 이에 반해, 2번 처리구는 saline을 사용해 미생물을 포집한 후 DLB를 이용하여 DNA를 추출함으로써 1번과 동등한 DNA 추출 효율을 유지하면서도 직접적 접촉의 안전성을 확보할 수 있었다. 따라서, 2번 처리구는 현장형 신속 검출 시스템의 표면 시료 분석에 가장 적합한 방법으로 선정되었다. 최종적으로 선정된 DNA 추출법과 추출된 DNA를 사용한 미세유체칩 기반 multiplex real-time PCR 시스템은 Fig. 4에 나타내었다. 간단하게, swab을 이용한 표면 시료 채취부터 DNA 추출 및 분석까지의 전체 과정을 포함한다. 샘플링한 표면에서 직접 DNA를 추출한 후, 미세유체칩 기반의 multiplex real-time PCR을 통해 FAM 및 ROX 형광 채널을 사용하여 각 목표 유전자를 동시에 검출하였다. 이러한 통합 시스템은 간소화된 프로토콜로 신속하고 효율적인 분석을 가능하게 하며, 현장형 진단 시스템으로서의 높은 잠재력을 보여준다.

환경 및 식품 표면에서의 적용성 평가

식품 취급 혹은 가공 표면이나 식품 가공 또는 보관 구역에서 주로 사용되는 스테인리스스틸과 폴리프로필렌을 환경 표면으로 선정하였으며, 식품 표면과 식육의 도체 표면 시료에서의 표면 검사를 고려하여 돼지 껍데기를 식품 표면으로 선정하였다. *L. monocytogenes* (*prfA*), *S.* Typhimurium (*invA*), *S. aureus* (*femA*), 및 *E. coli* O157:H7 (*stx2*, *rfbE*)을 10^5-10^0 CFU/cm^2 농도로 환경 및 식품 표면에 인위 접종한 후 swab 분석과 연계된 DNA 추출법을 통해 DNA를 추출하였다. 이후 추출된 DNA는 multiplex real-time PCR 시스템에서 확인된 검출한계를 통해 환경 및 식품 표면에서의 적용성을 평가하였다.

3반복의 실험 중 3회 모두 검출된 경우를 검출한계로 설정하였으며, 스테인리스스틸에서 각 균 종의 검출한계는 *stx2*은 10^1 CFU/cm^2, *prfA*, *invA*, 및 *femA*는 10^1 CFU/cm^2, *rfbE*은 10^2 CFU/cm^{2}까지 검출 가능하였으며 각 검출한계

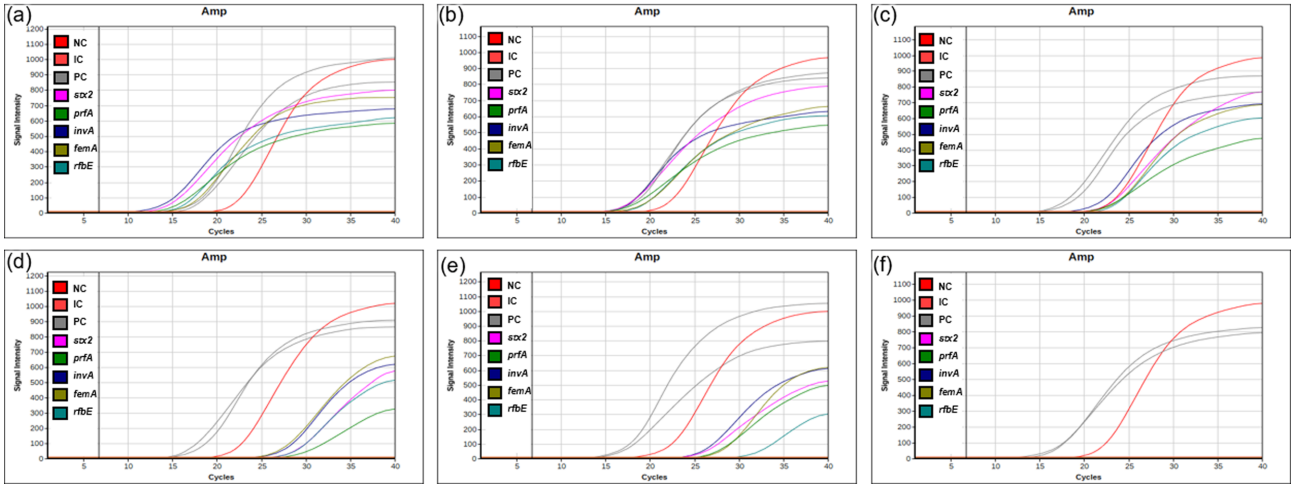


Fig. 5. Sensitivity of multiplex real-time PCR for detecting *stx2* (*E. coli* O157:H7), *prfA* (*L. monocytogenes*), *invA* (*S.* Typhimurium), *femA* (*S. aureus*), and *rfbE* (*E. coli* O157:H7) in stainless steel surfaces at different concentrations: (a) 10^5 CFU/cm^2, (b) 10^4 CFU/cm^2, (c) 10^3 CFU/cm^2, (d) 10^2 CFU/cm^2, (e) 10^1 CFU/cm^2, and (f) 10^0 CFU/cm^2. All the experiments were performed three times, and the assay outcomes were documented with representative pictures.

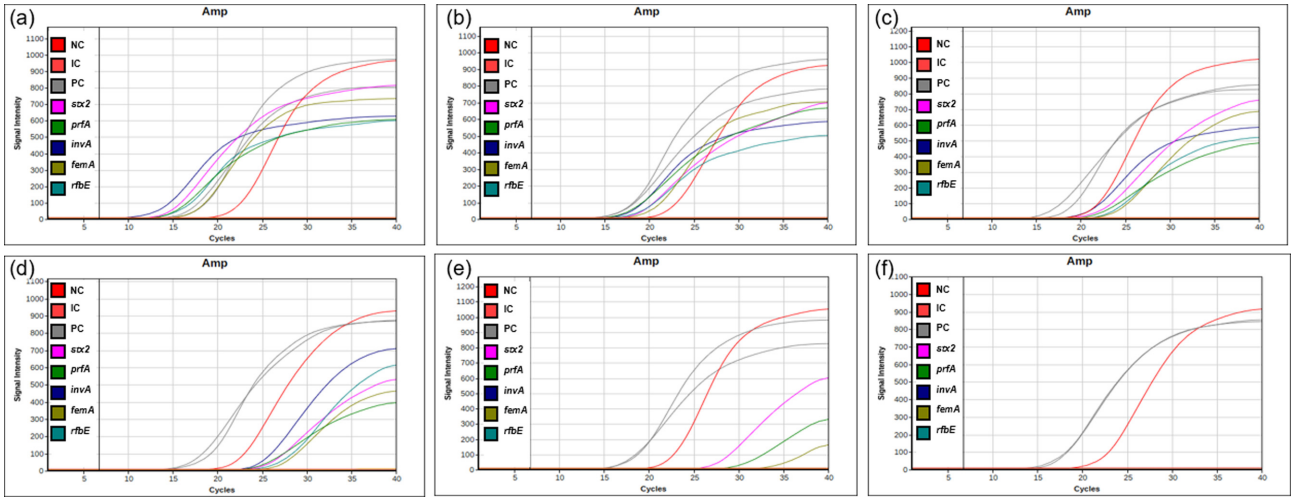


Fig. 6. Sensitivity of multiplex real-time PCR for detecting *stx2* (*E. coli* O157:H7), *prfA* (*L. monocytogenes*), *invA* (*S.* Typhimurium), *femA* (*S. aureus*), and *rfbE* (*E. coli* O157:H7) in polypropylene surfaces at different concentrations: (a) 10^5 CFU/cm^2, (b) 10^4 CFU/cm^2, (c) 10^3 CFU/cm^2 , (d) 10^2 CFU/cm^2 , (e) 10^1 CFU/cm^2 , and (f) 10^0 CFU/cm^2 . All the experiments were performed three times, and the assay outcomes were documented with representative pictures.

에서 Ct value는 27.34±1.02, 30.82±2.66, 27.66±1.26, 30.05±2.71 및 31.38±1.01 이었다(Fig. 5). 폴리프로필렌에서 각 균 종의 검출한계는 *stx2*및 *prfA*은 10^1 CFU/cm^2, *invA*, *femA* 및 *rfbE*은 10^2 CFU/cm^{2}까지 검출 가능하였으며 각 검출한계에서 Ct value는 27.95±0.44, 33.54±2.96, 24.86±0.28, 28.33±0.62 및 27.59±0.42이었다(Fig. 6). 폴리프로필렌은 고분자 플라스틱으로, 가공 후 표면이 비교적 균일하고 매끄럽지만, 세밀하게 보면 스테인리스스틸 금속에 비해 약간 더 거친 표면 질감을 가질 수 있기 때문에, 검출 민감도의 차이가 나타났을 것으로 판단되었다[26].

마지막으로, 식품 표면에서 검출한계를 비교하였다(Fig. 7). 식품의 복잡한 매트릭스로 인해, 가령 돼지고기의 경우 지방 성분, 혈액, 단백질과 같은 PCR 억제제가 작용하여 검출한계가 높아질 수 있다[27]. 하지만 PCR 억제제가 있음에도 불구하고, 본 연구에서는 trans:Direct™ extraction kit는 고농도 알칼리성 화합물 기반 버퍼를 활용하여, 별도의 정제 과정 없이도 식품 표면에서 DNA를 간단히 추출할 수 있었으며, 억제 성분의 영향을 최소화하고 안정적인 PCR 증폭 결과를 확인할 수 있었다. 검출한계는 *stx2* 및 *rfbE*은 10^2 CFU/cm^2, *prfA*는 10^3 CFU/cm^2, *invA* 및 *femA*는 10^2 CFU/cm^{2}까지 검출 가능하였으며 각 검출한계에서 Ct value는 26.85±1.10, 24.65±0.40, 26.27±1.57, 32.55±3.05 및

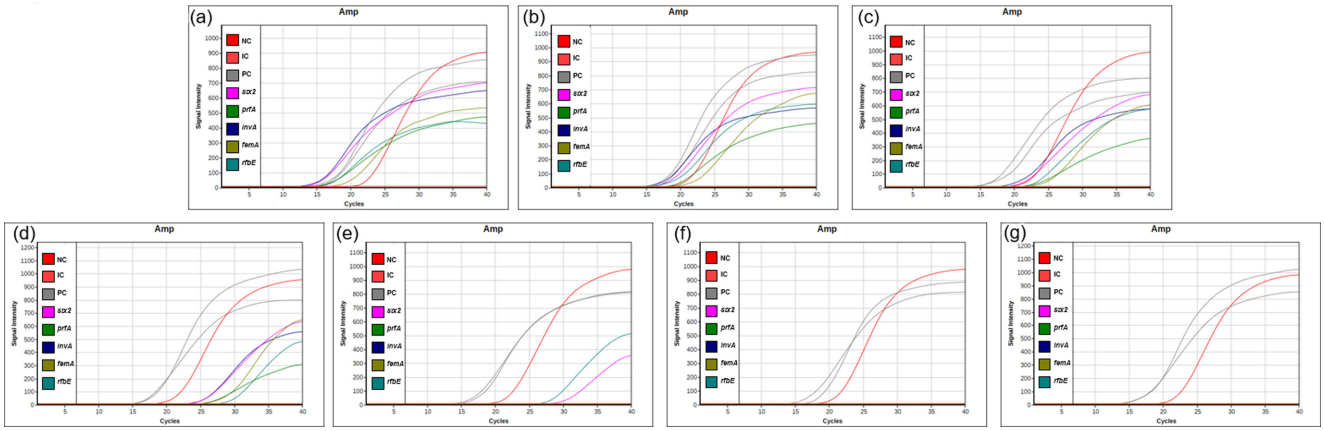


Fig. 7. Sensitivity of multiplex real-time PCR for detecting *stx2* (*E. coli* O157:H7), *prfA* (*L. monocytogenes*), *invA* (*S.* Typhimurium), *femA* (*S. aureus*), and *rfbE* (*E. coli* O157:H7) in pork surfaces at different concentrations: (a) 10^5 CFU/cm^2, (b) 10^4 CFU/cm^2, (c) 10^3 CFU/cm^2, (d) 10^2 CFU/cm^2, (e) 10^1 CFU/cm^2, and (f) 10^0 CFU/cm^2, (g) negative control. All the experiments were performed three times, and the assay outcomes were documented with representative picture.

30.20±0.04이었다. 실험에 사용된 식품 표면 시료인 돼지 껍데기는 인위적 접종이 없는 negative control에서 target 균주가 없다는 것을 확인하였다(Fig. 7g).

Real-time PCR에서 다중검출을 수행할 때 FAM, VIC, JUN, ROX와 같은 fluorophores의 종류에 따라 다중검출이 가능하다[28]. 하지만 개발된 방법은 채널에 따른 다중검출 방법으로 기존 real-time PCR과 동일하게 TaqMan probe 1-2개 사용하는 것 만으로도 13개 이상의 균 종을 동시에 검출할 수 있으며, 특이성이 높게 실시간 검출이 가능하다. Gwak 등[29]은 real-time PCR을 이용하여 *E. coli* O157:H7 와 *S.* Typhimurium을 검출했으며, 이때 사용된 real-time PCR의 증폭시간은 1.5 시간이 소요되었다. 반면, 본 연구에서 사용한 미세유체칩 기반 시스템은 real-time PCR 반응 시간이 30분으로 기존 방법 대비 60% 이상 시간 절감이 가능하였다. 따라서, 본 연구에서 개발된 방법은 빠른 반응 시간과 높은 다중 검출 능력을 통해 현장 분석에 적합하다고 판단되었다. 결과적으로 본 연구에서는 미세유체칩과 현장형 실시간 PCR을 통합하여 식품 및 환경 샘플에서 식중독균을 효과적으로 검출할 수 있음을 시사한다.

Conclusion

본 연구에서는 미세유체칩 기반의 현장형 다중 real-time PCR 시스템을 개발하여 주요 식중독균을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법을 제시하였다. Swab 분석을 통한 표면 시료 채취와 direct DNA 추출법을 결합하여, 실험실 기반의 복잡한 샘플 준비 과정을 최소화하고 현장에서 직접 검출이 가능하도록 설계되었다. 결과적으로, 본 검출 시스템은 *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium, *L. monocytogenes*, *S. aureus*의 주요 유전자를 높은 민감도와 특이도로 검출할 수 있었으며, 환경 및 식품 표면 시료에서도 실용적인 검출 한계를 보였다. 특히, 기존 1시간-3시간 소요되는 real-time PCR 분석 대비 미세유체칩 기반의 현장형 다중 real-time PCR 시스템은 30분 이내의 짧은 반응시간으로 분석이 완료되었으며, 형광 채널 기반의 다중 검출 방식을 활용하여 최소한의 형광 표지로도 여러 병원체를 동시에 검출할 수 있었다. 따라서, 본 연구에서 개발한 미세유체칩 기반 다중 real-time PCR 시스템은 식품 안전 관리 및 식중독 예방을 위한 효과적인 현장형 진단 도구로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 향후, 다양한 식품 매트릭스 및 실제 환경에서의 적용성을 더욱 확대하는 연구가 필요할 것이다.

Acknowledgement

이 논문은 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(No. NRF-2021R1A2C1014181)이며, 이에 감사드립니다.

국문요약

식중독균은 식품의 생산, 가공 및 유통 과정에서 확산될 수 있으며, 이는 대규모 식중독 사고로 이어질 수 있다. ‘Farm to table’ 전 과정에서의 식품 안전을 확보하기 위해서는 신속하고 정확한 검출 기술이 필수적이다. 그러나 기존 PCR 시스템은 실험실 환경에 제한되어 있어 현장 적용이 어렵다. 이를 해결하기 위해 현장형 PCR 기기가 개발되었으며, 마이크로유체칩(microfluidic chip)은 고속처리, 비용 효율성 및 다중 검출 기능을 갖춘 기술로 주목받고 있다. 특히, 반응 구획이 분리된 다중 반응 챔버를 활

용하면 여러 병원체를 동시에 검출할 수 있다. 본 연구에서는 현장형 실시간 PCR 장비와 마이크로유체칩을 통합한 Lab-on-a-chip 시스템을 개발하고, 이를 이용한 식중독균의 신속한 현장 검출법을 검증하였다. 본 시스템은 swab 분석을 이용한 DNA 추출법과 현장형 실시간 PCR을 결합하여 *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus*의 DNA를 식품 및 환경 시료에서 효과적으로 추출하고 분석할 수 있었다. GENECHECKER® UF-300 실시간 PCR 시스템을 활용한 검출 결과, 30분 이내에 10^5-10^1 CFU/mL (cm^2) 수준의 검출 한계를 나타내며, 신속하고 민감한 다중 병원체 검출이 가능함을 확인하였다. 본 연구 결과는 마이크로유체칩을 활용한 현장형 실시간 PCR 시스템이 식품 안전 모니터링 및 현장 진단에 효과적으로 활용될 가능성을 보여준다. 현장형 다중 검출 시스템을 통해 식중독균을 보다 신속하게 검출할 수 있어, 식중독 예방 및 감시 체계에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

So-Young Lee	https://orcid.org/0000-0001-8825-0802
Soyoung Baek	https://orcid.org/0009-0000-8925-0986
Donghyun Kim	https://orcid.org/0009-0003-3091-6028
Se-Wook Oh	https://orcid.org/0000-0002-8580-6032

References

1. Zhao, X., Lin, C.W., Wang, J., Oh, D.H., Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol*., 24, 297-312 (2014).
2. World Health Organization (WHO), (2024, January 1). Food safety. Retrieved from https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety.
3. Statistics Korea, (2025, September 15). Incidence and number of patients of foodborne illnesses. Retrieved from https://www.index.go.kr/unity/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=2761.
4. Silva, F.V.M., Pasteurization of food and beverages by high pressure processing (HPP) at room temperature: inactivation of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, and other microbial pathogens. *Appl. Sci*., **13**, 1193 (2023).
5. Mohammad, A.M., Chowdhury, T., Biswas, B., Absar, N., 2018. Food poisoning and intoxication: a global leading concern for human health. In: food safety and preservation, Elsevier, Aemstelredam, Netherlands, pp. 307-352.
6. Ababio, P.F., Lovatt, P., A review on food safety and food hygiene studies in Ghana. *Food Control,* **47**, 92-97 (2015).
7. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), (2024, September 21). Food code. Retrieved from https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#/ext/Document/FC.
8. Bhunia, A.K., One day to one hour: how quickly can foodborne pathogens be detected?. *Future Microbiol*., **9**, 935-946 (2014).
9. Vidic, J., Vizzini, P., Manzano, M., Kavanaugh, D., Ramarao, N., Zivkovic, M., Radonic, V., Knezevic, N., Giouroudi, I., Gadjanski, I., Point-of-need DNA testing for detection of foodborne pathogenic bacteria. *Sensors,* **19**, 1100 (2019).
10. Kaygusuz, D., Vural, S., Aytekin, A.Ö., Lucas, S.J., Elitas, M., DaimonDNA: a portable, low-cost loop-mediated isothermal amplification platform for naked-eye detection of genetically modified organisms in resource-limited settings. *Biosens. Bioelectron*., **141**, 111409 (2019).
11. Luppa, P.B., Müller, C., Schlichtiger, A., Schlebusch, H., Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives. *Trends Anal. Chem*., **30**, 887-898 (2011).
12. Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C., An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnol. Adv.,* **28**, 232-254 (2010).
13. Panwar, S., Duggirala, K.S., Yadav, P., Debnath, N., Yadav, A.K., Kumar, A., Advanced diagnostic methods for identification of bacterial foodborne pathogens: Contemporary and upcoming challenges. *Crit. Rev. Biotechnol.,* **43**, 982-1000 (2023).
14. Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K., Pal, U.K., Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *Am. J. Food Technol.,* **6**, 87-102 (2011).
15. Umesha, S., Manukumar, H., Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,* **58**, 84-104 (2018).
16. Kreitmann, L., Miglietta, L., Xu, K., Malpartida-Cardenas, K., D'Souza, G., Kaforou, M., Brengel-Pesce, K., Drazek, L., Holmes, A., Rodriguez-Manzano, J., Next-generation molecular diagnostics: leveraging digital technologies to enhance multiplexing in real-time PCR. *Trends Anal. Chem.,* **160**, 116963 (2023).
17. Zhang, M., Ye, J., He, J.S., Zhang, F., Ping, J., Wu, J., Visual detection for nucleic acid-based techniques as potential on-site detection methods. A review. *Anal. Chim. Acta,* **1099**, 1-15 (2020).
18. Oliveira, B.B., Veigas, B., Baptista, P.V., Isothermal amplification of nucleic acids: The race for the next “gold standard”. *Front. Sens.,* **2**, 752600 (2021).
19. Kim, S.H., Lee, S.Y., Kim, U., Oh, S.W., Diverse methods of reducing and confirming false-positive results of loop-mediated isothermal amplification assays: a review. *Anal. Chim. Acta,* **1280**, 341693 (2023).
20. Barbosa, C., Nogueira, S., Gadanho, M., Chaves, S., 2016. DNA extraction: finding the most suitable method. In: molecular microbial diagnostic methods, Elsevier, Aemstelredam, Netherlands, pp. 135-154 .

21. Sajid, M., Advances in on-site analytical sample preparation for analysis of environmental waters: a review. *Trends Environ. Anal. Chem.,* **36**, e00175 (2022).
22. Mälarstig, A., Tenno, T., Jossan, S., Åberg, M., Siegbahn, A., A quantitative real-time PCR method for tissue factor mRNA. *Thromb. Res.,* **112**, 175-183 (2003).
23. Zhang, M., Liu, C., Shi, Y., Wu, J., Wu, J., Chen, H., Selective endpoint visualized detection of *Vibrio parahaemolyticus* with CRISPR/Cas12a assisted PCR using thermal cycler for on-site application. *Talanta,* **214**, 120818 (2020).
24. Li, J., Ma, B., Fang, J., Zhi, A., Chen, E., Xu, Y., Yu, X., Sun, C., Zhang, M., Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow immunoassay for rapid detection of *Salmonella* in food. *Foods,* **9**, 27 (2020).
25. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., PCR inhibitors–occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol*., **113**, 1014-1026 (2012).
26. Keeratipibul, S., Laovittayanurak, T., Pornruangsarp, O., Chaturongkasumrit, Y., Takahashi, H., Techaruvichit, P., Effect of swabbing techniques on the efficiency of bacterial recovery from food contact surfaces. *Food Control,* **77**, 139-144 (2017).
27. Moon, Y.J., Lee, S.Y., Oh, S.W., A review of isothermal amplification methods and food-origin inhibitors against detecting food-borne pathogens. *Foods* ,**11**, 322 (2022).
28. Candotti, D., Temple, J., Owusu-Ofori, S., Allain, J.P., Multiplex real-time quantitative RT-PCR assay for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol. Methods,* **118**, 39-47 (2004).
29. Gwak, S.H., Kim, J.H., Oh, S.W., How to rapidly and sensitively detect for *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium in cabbage using filtration, DNA concentration, and real-time PCR after short-term enrichment. *LWT*, **132**, 109840 (2020).