pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 2, pp. 141~147 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.2.141

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

즉석 섭취 식품에서 *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus cereus* 검출을 위한 Conventional PCR과 Real-Time PCR법 비교

이유시† · 김석환† · 김미경 · 김순한*
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 미생물과

Comparison of Conventional PCR and Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in Ready-to-Eat Foods

Yu-Si Lee†, Seokhwan Kim†, Migyeong Kim, Soon Han Kim*
Food Microbiology Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea

(Received January 14, 2021/Revised March 24, 2021/Accepted April 7, 2021)

ABSTRACT - In the present study, the performance of different PCR assays was compared for the rapid detection of *S. aureus* and *B. cereus* in ready-to-eat foods such as sandwiches. The limit of detection (LOD) and specificity of two assays (conventional PCR and real-time PCR) were compared. The LOD of real-time PCR ranged from 10^3 to 10^6 CFU/mL for *S. aureus* and from 10^2 to 10^5 CFU/mL for *B. cereus*. The LOD of conventional PCR ranged from 10^4 to 10^6 CFU/mL for *S. aureus* and from 10^3 to 10^5 CFU/mL for *B. cereus*. The LOD of real-time PCR assay for *S. aureus* and *B. cereus* in sandwiches ranged from 10^4 to 10^6 CFU/mL and from 10^3 to 10^5 CFU/mL, while the LOD of conventional PCR was from 10^4 to 10^6 CFU/mL and from 10^3 to 10^5 CFU/mL, respectively. The LOD of the real-time PCR was 10-fold higher than that of the conventional PCR. In conclusion, these results show that real-time PCR could be used as an effective screening test for the rapid detection of *S. aureus* and *B. cereus* in sandwiches compared to conventional PCR.

Key words : Real-time PCR, Conventional PCR, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*

최근 즉석 섭취 및 신선편의식품의 소비가 증가함에 따라, 이들 식품 섭취에 의한 식중독 발생 위험도 함께 증가하고 있다[1-5]. 특히 *Bacillus cereus*와 *Staphylococcus aureus*등 식중독 세균이 각종 식품에서 검출되면서 식중독 예방을 위해 이들 식중독 세균에 대한 주의가 요구되고 있다[1,6-10].

*S. aureus*는 식중독을 일으키는 주요한 원인균 중 하나로 자연계에 광범위하게 분포하며, 동물이나 사람의 화농성 병소뿐만 아니라 건강한 사람과 동물의 피부 등에도 상재하고 있어 식품과 인체에 오염될 가능성이 매우 높다[11-12]. *S. aureus*는 식품 내에 증식하면서 내열성 장독소(enterotoxin)를 생성하여 식품을 섭취할 때 함께 장독소를 섭취하여 설사, 위경련, 구토를 동반하는 독소형 식중독을 일으킨다[11-13]. 이는 식중독을 유발하는 병원성 인자로 면역학적 분류에 따라 enterotoxin A, B, C, D, E, F, G, H, I, J형으로 분류되며, 주로 A형이나 D형에 의한 식중독 사례가 많은 것으로 보고되고 있다[10,14].

한편 *B. cereus*는 토양, 먼지, 물 등 자연계에 널리 분포하여 농작물 등의 식품을 섭취할 때 식중독을 일으킬 수 있는 병원성 세균이다[15]. 이 균은 내열성 포자를 생산하는데, 식품에서 포자가 형성되면 가열 조리 과정에서도 사멸하지 않고, 환경 변화에 따라 포자가 발아되고 균이 성

†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: +82-43-719-4305, Fax: +82-43-719-4300
E-mail: lambndog@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.

장하며 생성된 독소에 의해 식중독을 일으킬 수 있다[1,16]. *B. cereus*로 인한 식중독은 균이 체내에서 성장하는 동안 생성된 장독소에 의한 설사형(diarrhoeal type)과 *B. cereus* 균이 식품에서 영양 세포 상태로 성장하는 동안 생성된 구토독소(emetic toxin)에 의한 구토형(emetic type)으로 구분할 수 있다[1,17]. 설사형 식중독은 설사와 복통이 주 증상으로 NHE (non-hemolytic enterotoxin), HBL (hemolysin BL), CytK (cytotoxin K), BceT (enterotoxin T)와 EntFM (enterotoxin FM) 등의 enterotoxin이 관여하며, 구토형 식중독은 emetic toxin (cereulide, CER)이 짧은 잠복기를 거쳐 구토와 복통 등의 증상을 유발한다[18-20].

식중독 세균을 검출하기 위한 전통적인 방법으로는 배양법 및 생화학적 확인검사법이 사용되고 있다. 하지만 이 시험법은 증균배양부터 생화학적 확인검사까지 많은 시간과 노동이 소요되기 때문에, 대규모 식중독 사고가 발생했을 때 신속하게 식중독 원인균을 검출하여 식중독 확산을 차단하는 데 어려움이 있었다[21,22]. 이러한 단점을 보완하여 식중독 세균을 신속하게 검출하기 위해 식중독 세균의 특정 유전자 검출에 기반한 PCR법이 활용되고 있다[22]. 특히 conventional PCR (cPCR)보다 추가적인 전기영동 확인 과정 없이 실시간으로 검출 결과를 확인 할 수 있는 real-time PCR이 신속검출기법으로 여러 분야에서 활용되고 있다[23-27]. 따라서 본 연구에서는 즉석 섭취 식품에서 식중독을 유발할 수 있는 *S. aureus*와 *B. cereus*의 신속검출을 위해 독소 유전자를 타겟으로 하는 cPCR과 real-time PCR 사이의 특이도 및 민감도를 비교 검증하였다. 또한 즉석 섭취 식품 중 샌드위치를 시료로 선정하여 대상균을 인위접종하여 두 PCR법 사이의 민감도를 확인하였다.

Materials and Methods

사용 균주와 DNA 추출

본 연구에 사용한 균주는 *Staphylococcus aureus* 89종과 *Bacillus cereus* 78종이다. 실험 균주는 초저온 냉동고에서 보관된 균주를 해동한 뒤, Tryptone Soya Agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK)에 획선 도말(streaking)하여 37°C에서 24±2시간 배양하였다. 실험 균주는 DNA 추출을 위해서 단일 집락(colony)을 취하여 자동화 장비 (Nanobiosys UltraFast Prep G2-16TU, Nanobiosys, Seoul, Korea)를 이용해 DNA를 추출하였고, Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA)를 이용하여 DNA 순도를 확인한 후 이를 DNA template로 사용하였다.

민감도 및 특이성 평가

S. aureus 검출을 위해 enterotoxin 유전자인 *sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei* 유전자와 *B. cereus* 검출을 위해 *bceT, hblC, nheA, CER, cytK, entFM* 유전자를 타겟으로 하는 cPCR[28] 및 주문 제작한 real-time PCR 키트 (Kogenbiotech Co., Ltd., Seoul, Korea)를 사용하였다. Real-time PCR 민감도(LOD) 측정을 위해 DNA를 추출한 후, 이를 통하여 얻은 DNA를 농도별 (10^1-10^6 copies/μL)로 단계 희석하여 유전자증폭기(7500 Fast real-time PCR, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 타겟이 되는 유전자를 보유하고 있는 양성대조균주로써 *S. aureus* ATCC 23235 (*sea, seb, sed*), *S. aureus* ATCC 19095 (*sec, seg, she, sei*), *S. aureus* KCCM 41324 (*see*), *B. cereus* ATCC 12480 (*bceT, hblC, nheA*), *B. cereus* NCCP 14043 (*CER, Cytk*, *entFM*)을 사용하였다. 두 시험법의 특이도(specificity) 평가를 위해 *S. aureus* 50종과 non-*S. aureus* 39종 및 *B. cereus* 50종과 non-*B. cereus* 28종을 이용하였고, 이를 두 가지 시험법 cPCR과 real-time PCR로 확인하였다.

검출한계 비교

각 시험법의 검출한계(limit of detection)는 순수 배양액 및 식품에 세균 접종을 함으로써 확인하였다. 순수 배양액에서는 Tryptone Soya Broth에서 37°C, 24시간 배양된 균을 0.85% 생리식염수로 10배씩 단계 희석 (10^1-10^6 CFU/mL)하였다. 균수 확인은 희석액을 Tryptone Soya Agar 에 도말하여 37°C, 24시간 배양 후 측정하였다. 또한 식품에서는 즉섭섭취식품인 샌드위치(5종)에 단계 희석한 대상균 배양액 1 mL을 접종 시켜 30초간 균질화하였다. 순수 배양액과 식품에 접종한 시료에서 단계희석액을 취하여 앞에서 언급한 바와 같이 동일한 방법으로 DNA를 추출하여 두 시험법을 실시하였다.

Conventional PCR 조건

cPCR을 이용한 *S. aureus*와 *B. cereus*의 독소 유전자를 검출하기 위하여 수인성식품매개질환 실험실 진단 실무지침의 방법을 따랐다[28]. cPCR은 SensoQuest LabCycler (SensoQuest GmbH, Gottingen, Germany)를 사용하였으며, AccuPower PCR Premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 추출한 DNA 5 μL와 forward와 reverse primer (10 pmol) 각각 1 μL를 혼합하여 최종 용량이 20 μL가 되도록 하였다. 반응 조건은 *S. aureus*의 경우 95°C에서 10분 가열한 뒤, 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초로 35회 반복하였고, 72°C에서 10분간 더 반응시켰다. *B. cereus*의 경우 94°C 5분, 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분의 cycle를 35회 반복한 후, 72°C에서 10분을 더 하여 총 1시간 15분 정도 소요되었다. 추가적으로 cPCR 반응이 끝난 산물은 전기영동을 실시하여 증폭된 특이적인 밴드를 확인하였다.

Real-time PCR 조건

Real-time PCR의 경우 *S. aureus*와 *B. cereus* 모두 주문 제작한 키트(Kogenbiotech Co., Ltd., Seoul, Korea)를 사용하였다. 제조사에서 제시한 방법에 따라 혼합물에 template DNA 5 μL를 넣어 총 20 μL로 유전자증폭기(7500 Fast real-time PCR, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)를 실시하였다. 반응은 multiplexing 조건에서 50°C 2분, 95°C 10분, 95°C 15초, 60°C 1분의 cycle로 40 cycles 반응시켰으며, 총 1시간 20분 정도 소요되었다. 민감도 비교를 위해 real-time PCR 결과는 cPCR의 증폭 cycles와 동일하게 C_T (cycle threshold) 값 35 이하인 경우 양성으로 판단하였다.

Results and Discussion

cPCR과real-time PCR의 특이도 및 검출한계 비교

cPCR과 real-time PCR의 특이도(specificity)를 확인하기 위하여 총 89종 *S. aureus*와 78종 *B. cereus*를 대상으로 실험하였다. 특이도 시험 결과 각각의 표적유전자에 대해 두 시험법 모두 동일한 결과를 나타내었다(Table 1, 2). 총 50주 *B. cereus* 중 *hblC* 31주, *nheA* 28주, *entFM* 36주, *cytK* 18주, *bceT* 31주, *CER* 19주에서 양성의 증폭반응이 일어났고, 28주 non-*B. cereus* 균주들에서는 26주에서만 음성결과를 보였다. Non-*B. cereus* 대상균인 *Bacillus thuringiensis* 2주에서 cPCR과 real-time PCR 모두 *hblC*, *nheA*, *entFM*, *bceT*에서 특이적인 반응을 나타내었다. *B.*

Table 1. Specificity between cPCR and real-time PCR assay for the detection of *Bacillus cereus*

Bacteria strains	No. of examined strains	No. of positive strains					
		hblC	*nheA*	*entFM*	*cytK*	*bceT*	*CER*
Bacillus cereus (n = 50)							
B. cereus	50	31	28	36	18	31	19
Non-*Bacillus cereus* (n = 28)							
Bacillus thuringiensis	2	2	1	1	0	2	0
Bacillus spp.	2	0	0	0	0	0	0
Vibrio parahaemolyticus	5	0	0	0	0	0	0
Yersinia enterocolitica	5	0	0	0	0	0	0
Clostridium perfringens	5	0	0	0	0	0	0
Vibrio cholera	5	0	0	0	0	0	0
Staphylococcus aureus	4	0	0	0	0	0	0
Total number of strains		78					

Table 2. Specificity between cPCR and real-time PCR assay for the detection of *Staphylococcus aureus*

Bacteria strains	No. of examined strains	No. of positive strains							
		sea	*seb*	*sec*	*sed*	*see*	*seg*	*seh*	*sei*
Staphylococcus aureus (n = 50)									
S. aureus	50	23	3	10	4	1	35	4	34
Non-*Staphylococcus aureus* (n = 39)									
Staphylococcus spp.	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Campylobacter spp.	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Clostridium perfringens	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Yersinia enterocolitica	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacillus spp.	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Shigella spp.	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Vibrio spp.	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Salmonella spp.	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Listeria monocytogenes	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Total number of strains		89							

Table 3. The limit of detection (LOD) of the real-time PCR for toxigenic genes of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*

Species	Target gene	Equation	R^2	LOD (copies/uL)
Staphylococcus aureus	*sea*	y = -3.42x + 37.019	0.999	10^1
	seb	y = -3.412x + 37.436	0.999	10^1
	sec	y = -3.51x + 37.897	0.999	10^1
	sed	y = -3.546x + 38.311	0.999	10^1
	see	y = -3.501x + 37.217	0.997	10^0
	seg	y = -3.533x + 38.227	0.997	10^0
	seh	y = -3.495x + 38.359	0.998	10^1
	sei	y = -3.392x + 36.766	0.997	10^0
Bacillus cereus	*bceT*	y = -3.356x + 36.763	1.0	10^1
	CER	y = -3.248x + 37.566	0.999	10^1
	hblC	y = -3.29x + 36.523	0.999	10^1
	nheA	y = -3.269x + 35.697	0.999	10^1
	cytK	y = -3.334x + 36.638	1.0	10^1
	entFM	y = -3.188x + 37.051	0.999	10^1

Table 4. Comparison of the limit of detection of cPCR and real-time PCR assay in *Staphylococcus aureus* cultures

Target gene	Conventional PCR (CFU/mL)						Real-time PCR (CFU/mL)					
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
sea	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
seb	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
sec	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
sed	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
see	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
seg	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
seh	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
sei	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+

+: positive test result, -: negative test result.

thuringiensis 중 일부는 장독소 유전자를 획득하여 장독소가 발현되는 경우 식중독을 유발할 수 있다고 보고되었다[29-32]. 또한 Rivera 등[33]의 연구에서도 74개 *B. thuringiensis*에서 모두 *nhe*를 가지고 있으며, 일부 균주에서 *hblC*, *bceT* 유전자를 가지고 있다고 하였으며, Hansen 등[34]도 *B. thuringiensis*에서 *hbl A, C, D*와 *nhe A, B, C*를 확인하였다고 보고한 바가 있다.

S. aureus 89종을 대상으로 한 특이도 분석 결과에서도 8개 유전자에 대해 inclusivity및 exclusivity 모두 100%로 확인되었다. Kim 등[14]은 본 연구에서 사용한 *S. aureus* ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 23235 (*sed*)에 대해 각각 *sea, seb, sed* 유전자를 확인한 바 있으며, 본 연구에서도 동일한 결과를 확인하였다.

Real-time PCR 민감도 평가는 multiplexing 조건에서 *S. aureus*의 표적 유전자 8종인 *sea, seb, sec, sed, seh* 유전자는 10 copies/μL 이며, *see, seg, sei* 유전자는 1 copy/μL 였다. *B. cereus*의 6개 표적유전자 모두 10 copies/μL까지 검출이 가능하였다. 또한 이 때의 R^2값은 0.997이상 수준을 나타내었다(Table 3).

cPCR과 real-time PCR에서 민감도 비교

순수배양액에서 각 표적유전자들에 대한 cPCR과real-time PCR을 이용하여 검출한계를 비교했을 때, target에 따라 차이를 보였다(Table 4, 5). 검출 범위는 *S. aureus*의 경우 cPCR은 10^4-10^6 CFU/mL이며, real-time PCR은 10^3-10^6 CFU/mL이었다. *B. cereus*는 cPCR (10^3-10^5 CFU/mL)이고, real-time PCR (10^2-10^5 CFU/mL) 수준으로 검출되었다. 대체적으로 real-time PCR법이 cPCR법 보다 10배 이상 높은 민감도를 보였다.

즉석섭취식품에서 cPCR과 real-time PCR의 검출한계 비교

식품에서 검출한계를 알아보고자 인위적으로 즉석섭취식품에 대상균을 오염시켜 cPCR과 real-time PCR 시험을 수행한 결과 Table 6, 7과 같이 검출되었다.

Table 5. Comparison of the limit of detection of cPCR and real-time PCR assay in *Bacillus cereus* cultures

Target gene	Conventional PCR (CFU/mL)					Real-time PCR (CFU/mL)				
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
bceT	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
hblC	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
nheA	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
CER	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
cytk	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
entFM	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+

+: positive test result, -: negative test result.

Table 6. Comparison between cPCR and real-time PCR assay for the detection of *Staphylococcus aureus* in sandwich

Target gene	Conventional PCR (CFU/mL)						Real-time PCR (CFU/mL)					
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
sea	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
seb	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
sec	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
sed	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
see	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
seg	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
seh	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
sei	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+

+: positive test result, -: negative test result.

Table 7. Comparison between cPCR and real-time PCR assay for the detection of *Bacillus cereus* in sandwich

Target gene	Conventional PCR (CFU/mL)					Real-time PCR (CFU/mL)				
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
bceT	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
hblC	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
nheA	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
CER	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
cytk	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
entFM	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+

+: positive test result, -: negative test result.

*S. aureus*에 대한 검출한계는 cPCR과 real-time PCR 모두 10^4-10^6 CFU/mL 범위를 나타내었고, *B. cereus* 는 cPCR과 real-time PCR 모두10^3-10^5 CFU/mL 검출 범위를 보였다. 순수배양액과 식품에서 검출한계는 각각의 유전자에 따라 차이는 있었지만 대체적으로 real-time PCR법이 민감도가 높은 경향을 보였는데, 이는 전기영동에 의하여 분석하는 cPCR과 형광강도로 분석하는 real-time PCR기법의 민감도 차이 때문임을 확인하였다[35]. 또한 real-time PCR의 검출효율성은 다른 선행연구에서도 보고된 바 있다[36]. Kim 등[37]이 *Vibrio vulnificus ToxR* gene을 대상으로 cPCR과 real-time PCR을 실시한 결과 민감도는 각각 5×10^3 copies/μL와 5copies/μL 이었고, Kim 등[38]의 연구에서도 *Listeria monocytogenes*를 대상으로 cPCR과 real-time PCR을 실시한 결과 순수 배양액의 검출한계가 각각 7.2×10^3 CFU/mL, 7.2×10^2 CFU/mL으로 나타나 본 연구와 같이 real-time PCR의 민감도가 높은 것으로 나타났다. 이처럼 PCR 기법은 유전자를 증폭시켜 적은 양의 DNA로도 식중독균 타겟 유전자의 검출이 가능하기 때문에 병원성 미생물의 신속 검출에 활용되고 있다. 또한 배지법과 비교 시 그 효율성이 매우 뛰어나 PCR 기법을 기초로 한 신속한 검출 방법에 대한 연구결과들이 다양한 분야에서 보고되고 있다[39,40].

이러한 연구 결과를 종합하여 볼 때, PCR은 선행 연구에서 보고한 바와 같이 식중독 세균을 보다 신속하게 검출할 수 있는 우수한 검출 기법인 것으로 판단된다. 검출능력은 두 시험법 모두 Guillermo 등[41]에서 보고한 PCR 검출 수준인 10^3 CFU/mL 농도 이상에서 검출되었고, *S. aureus*

(*sed*)와 *B. cereus* (*nheA*) 유전자를 제외한 대부분의 유전자에 대해 cPCR보다 real-time PCR이 동등이상의 민감도를 나타내었다. 또한 real-time PCR은 유전자 증폭반응 이후 전기영동 과정이 필요하지 않기 때문에 conventional PCR 보다 효율적인 방법으로 사료된다.

Acknowledgments

본 연구는 2017년도 식품의약품안전처 자체연구개발비 (16161위생안023)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

*Staphylococcus aureus*와 *Bacillus cereus*는 식중독을 일으키는 주요한 원인균 중 하나로 각종 식품에서 검출되면서 많은 주의가 요구되고 있다. 식중독 발생의 원인균을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 여러 가지 방법 중 DNA 분석을 기반으로 하는 PCR 검출법이 보편적으로 사용되고 있다. 본 연구에서는 샌드위치와 같은 즉석 섭취 식품에서 식중독을 유발할 수 있는 *S. aureus*와 *B. cereus*의 신속검출을 위해 conventional PCR과 real-time PCR의 특이도 및 민감도를 비교하였다. 그 결과, 검출한계 범위가 배양액에서는 cPCR의 경우 *S. aureus* (10^4-10^6 CFU/mL), *B. cereus* (10^3-10^5 CFU/mL) 이였고, real-time PCR의 경우 *S. aureus* (10^3-10^6 CFU/mL), *B. cereus* (10^2-10^5 CFU/mL) 이였다. 식품에서는 cPCR의 경우 *S. aureus* (10^4-10^6 CFU/mL), *B. cereus* (10^3-10^5 CFU/mL) 이고, real-time PCR의 경우 *S. aureus* (10^4-10^6 CFU/mL), *B. cereus* (10^3-10^5 CFU/mL)으로 나타났다. Real-time PCR법이 cPCR법 보다 10배 이상 더 민감한 것으로 나타났다. 따라서 real-time PCR은 우수한 민감도를 지닌 검출기법으로 식중독 세균 검출에 있어 매우 효과적인 방법으로 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Yu-Si Lee https://orcid.org/0000-0002-9369-8502
Seokhwan Kim https://orcid.org/0000-0003-1859-5703
Migyeong Kim https://orcid.org/0000-0002-0969-6257
Soon Han Kim https://orcid.org/0000-0002-1477-6315

References

1. Kim, T.S., Kim, M.J., Kang, Y.M., Oh, G., Choi, S.Y., Oh, M.S., Yang, Y.S., Seo, J.M., Ryu, M.G., Kim, E.S., Ha, D.R., Cho, B.S., Molecular characterization and toxin profile of *Bacillus cereus* strains isolated from ready-to-eat foods. *J. Food Sci. Technol*., **46**, 334-340 (2014).
2. Kim, J.Y., Kwon, K.I., Ha, S.Y., Hong, C.H., Changed of contamination level of *Listeria* spp. during the processing environment in Kimbaab restaurants. *J. Food Hyg. Saf.*, **20**, 232-236 (2005).
3. Bank, G.J., Chun, S.J., Park, K.H., Hong, C.H., Kim, J.W., Survey on the foodborne illness experience and awareness of food safety practice among Korean consumers. *J. Food Hyg. Saf.*, **18**, 139-145 (2003).
4. Kim, J.K., Lee, Y.W., A review study of food poisoning in Korea. *J. Food Hyg. Saf.*, **4**, 199-255 (1989).
5. Lee, Y.W., A study on the trend of food poisoning outbreaks, reported cases, in Korea. *J. Food Hyg. Saf.*, **2**, 215-237 (1987).
6. Ministry of Food and Drug Safety, (2021, April 20). The trend of food poisoning outbreaks. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr
7. Kim, J.B., Kim, J.M., Cho, S.H., Oh, H.S., Choi, N.J., Oh, D.H., Toxin genes profiles and toxin production ability of *Bacillus cereus* isolated from clinical and food samples. *J. Food Sci*., **76**, T25-29 (2011).
8. Jo, M.J., Jeong, A.R., Kim, H.J., Lee, N.R., Oh, S.W., Kim, Y.J., Chun, H.S., Koo, M.S., Microbiological quality of fresh-cut produce and organic vegetables. *Korean J. Food Sci. Technol*., **43**, 91-97 (2011).
9. Cho, Y.S., Jung, E.Y., Lee, M.K., Yang, C.Y., Shin, D.B., Survival, isolation and characterization of *Bacillus cereus* from sunshik. *J. Food Hyg. Saf.*, **23**, 343-347 (2008).
10. Kim, J.B., Kim, H., Jin, H.S., Kim, Y.S., Kim, K.S., Kang, Y.S., Park, J.S., Lee, D.H., Woo, G.J., Kim, C.M., Detection of enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens and Kimbap using multiplex PCR. *J. Biomed. Lab. Sci.*, **7**, 85-89 (2001).
11. Alarcon, B., Vicedo, B., Aznar, R., PCR-based procedure for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in foods. *J. Appl. Microbiol*., **100**, 352-364 (2006).
12. Oh, S.Y., Nam, K.W., Yoon, D.H., Analysis of pathogenic microorganism's contamination on organic leafy vegetables at greenhouse in Korea. *J. Food Hyg. Saf.*, **33**, 31-37 (2018).
13. Rall, V.L.M., Vieira, F.P., Rall, R., Vieitis, R.L., Fernandes, A., Candeias, J.M.G., Cardoso, K.F.G., Araujo, J.P., PCR detection of Staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet. Microbiol*., **132**, 408-413 (2008).
14. Kim, J.S., Lee, J.H., Kim, J.H., Choi, J.M., Kim, S.R., Ha, S.D., Kim, K.S., Lee, K.H., Kim, M.G., Kim, K.Y., Kim, C.H., Chung, D.H., Characteristics of enterotoxigenic genes and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from tomato farms in western Gyeongnam. *Korean J. Food Sci. Technol*., **38**, 295-303 (2006).
15. Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Haapasalo, M., Epidemiology

and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect*., **2**, 189-198 (2000).
16. Cho Y.S., Jung E.Y., Lee M.K., Yang C.Y., Shin D.B., Survival, isolation and characterization of *Bacillus cereus* from Sunshik. *J. Food Hyg. Saf.*, **23**, 343-347 (2008).
17. Drobniewski, F.A., *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*, **6**, 324-338 (1993).
18. Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol*. *Rev.*, **32**, 579-606 (2008).
19. Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M.H., Monthan, A., Berge, O., Fricker, M., Svensson, B., Toxin gene profiling of enterotoxin and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol*. *Lett*., **260**, 232-240 (2006).
20. Kim, S.R., Lee, J.Y., Lee, S.H., Ryu, K.Y., Park, K.H., Kim, B.S., Yoon, Y.H., Shim, W.B., Kim, K.Y., Ha, S.D., Yun, J.C., Chung, D.H., Profiles of toxin genes and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from perilla leaf and cultivation areas. *Korean J. Food Sci. Technol*., **43**, 134-141 (2011).
21. Seong, J.Y., Ko, Y.J., Myeong, H.K., Oh, S.W., Development of a rapid foodborne-pathogen-detection method involving whole-genome amplification. *Korean J. Food Sci. Technol*., **48**, 128-132 (2016).
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. Hong, K.W., (2021, April 21). Rapid detection method for foodborne pathogens-PCR. Retrieved from http://www.foodhygiene.or.kr/down/downt.php?o=04-16-23%ED%8A%B9%EC%A7%911(%ED%99%8D%EA%B4%91%EC%9B%90).PDF&r=04-16-23%ED%8A%B9%EC%A7%911(%ED%99%8D%EA%B4%91%EC%9B%90).PDF
24. Kim, H.S., Chon, J.W., Kim, D.H., Song, K.Y., Seo, K.H., Evaluation of a PCR assay for the rapid detection of *Staphylococcus aureus* in milk and meat products. *Korean J. Food Sci. Technol*., **45**, 791-795 (2013).
25. Lee, S., Park, Y.J., Lee, H.K., Kim, S.Y., Kim, J.Y., Lee, S.Y., Yoo, J.K., Detection of 13 enteric bacteria and 5 viruses causing acute infectious diarrhea using multiplex PCR from direct stool specimens. *Ann. Clin. Microbiol*., **16**, 33-38 (2013).
26. Kim, K.H., Kim, M.R., Park, Y.E., Kim, Y.S., Lee, H.Y., Park, Y.C., Kim, S.Y., Choi, J.D., Jang, Y.M., Detection and differentiation of intentional and unintentional mixture in raw meats using real-time PCR. *J. Food Hyg. Saf.*, **29**, 340-346 (2014).
27. Pinto, B., Chenoll, E., Aznar, R., Identification and typing of foodborne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. *Syst. Appl. Microbiol*., **28**, 340-352 (2005).
28. National Institute of Health, 2015. Guideline for Water and Foodborne Diseases, Cheongju, Korea. pp. 41-45.
29. Perani, M., Bishop, A.H., Vaid, A., Prevalence of β–exotoxin, diarrhoeal toxin and specific δ-endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett*., **160**, 55-60 (1998).
30. Prss, B.M., Dietrich, R., Nibler, B., Märtlbauer, E., Scherer, S., The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 5436-5442 (1999).
31. Damgaard, P.H., Laesen, H.D., Hansen, B.M., Bresciani, J., Jorensen, K., Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett. Appl. Microbiol*., **23**, 146-150 (1996).
32. Jeon, J.H., Park, J.H., Toxin gene analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated from cooked rice. *Korean J. Food Sci. Technol*., **42**, 361-367 (2010).
33. Rivera, A.M.G., Granum, P.E., Priest, F.G., Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett*., **190**, 151-155 (2000).
34. Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol*., **67**, 185-189 (2001).
35. Yoo, M.S., Kim, I.W., Kang, M.H., Han, S.H., Yoon, B.S., Development of real-time PCR method for the detection of Kashmir bee virus and Israel acute paralysis virus. *Korean J. Apiculture*, **23**, 97-102 (2008).
36. Chon, J.W., Song, K.Y., Kim, S.Y., Hyeon, J.Y., Kim, Y.G., Hwang, I.G., Kwak, H.S., Seo, K.H., Comparison of real-time PCR and conventional culture method for detection of *Cronobacter* spp. in powdered foods. *Korean J. Microbiol*., **47**, 87-91 (2011).
37. Kim, H.S., Kim, D.M., Neupane, G.P., Lee, Y.M., Yang, N.W., Jang, S.J., Jung, S.I., Park, K.H., Park, H.R., Lee, C.S., Lee, S.H., Comparison of conventional, nested, and real-time PCR assays for rapid and accurate detection of *Vibrio vulnificus*. *J. Clin. Microbiol*., **46**, 2992-2998 (2008).
38. Kim, D.H., Chon, J.W., Kim, H.S., Kim, H.S., Choi, D.S., Kim, Y.J., Yim, J.H., Moon, J.S., Seo, K.H., Comparison of culture, conventional and real-time PCR methods for *Listeria monocytogenes* in foods. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour*., **34**, 665-673 (2014).
39. Park, Y.S., Lee, S.R., Kim, Y.G., Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in kimchi by multiplex polymerase chain reaction. *J. Microbiol*., **44**, 92-97 (2006).
40. Pournajaf, A., Ardebili, A., Goudarzi, L., Khodabandeh, M., Narimani, T., Abbaszadeh, H., PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles. *Asian Pac*. *J. Trop*. *Biomed*., **4**, S293-S297 (2014).
41. López-Campos, G.H., Martínez-Suárez, J.V., Aguado-Urda, M., López-Alonso, V., Detection, identification, and analysis of foodborne pathogens. In: López-Campos, G.H., Martínez-Suárez, J.V., Aguado-Urda, M., López-Alonso, V. (Eds), Microarray detection and characterization of bacterial foodborne pathogens. Springer, New York, USA, pp. 13-32 (2012).