



Research Article

Comparative efficacy of loop-mediated isothermal amplification, real-time PCR, and selective agar method for detection of *Listeria monocytogenes* in food

*Listeria monocytogenes*의 검출을 위한 loop-mediated isothermal amplification, real-time PCR, 배지 도말법의 검출 성능 및 특성 비교

Kye-Hwan Byun¹, Sang Ha Han¹, Seungho Choi², Hyeon-Jo Bang², Seong Il Kang², Sookyoung Kim², Sang-Do Ha^{1*}

변계환¹ · 한상하¹ · 최승호² · 방현조² · 강성일² · 김수경² · 하상도^{1*}

¹Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansong 17546, Korea

²3M Korea Ltd., Food Safety Department, Health Care Business Groups, Seoul 07321, Korea

¹중앙대학교 식품공학과, ²한국쓰리엠 주식회사



OPEN ACCESS

Citation: Byun KH, Han SH, Choi S, Bang HJ, Kang SI, Kim S, Ha SD. Comparative efficacy of loop-mediated isothermal amplification, real-time PCR, and selective agar method for detection of *Listeria monocytogenes* in food. Korean J Food Preserv, 29(3), 521-529 (2022)

Received: December 29, 2021

Revised: March 12, 2022

Accepted: March 16, 2022

***Corresponding author**

Sang-Do Ha

Tel: +82-31-670-4831

E-mail: sangdoha@cau.ac.kr

Copyright © 2022 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract *Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogen causing listeriosis, which can be fatal in specific high-risk groups. The aim of this study was to compare the performance (accuracy, sensitivity, and specificity) of 3M™ Molecular Detection System (3M™ MDS) and Korean Food Codex [real-time PCR (RT-PCR) and selective agar] for the detection of *L. monocytogenes* in various food matrices. The detection performance of the three methods was determined against 10⁰–10³ CFU/mL of *L. monocytogenes in vitro* and showed high accuracy in the order of RT-PCR, 3M™ MDS, and selective agar. There was no difference in sensitivity and specificity of the three methods. Eleven food matrices, selected from agricultural, livestock, and seafood products, were artificially inoculated with 10⁰–10³ CFU/25 g of *L. monocytogenes* and enriched in 3M™ Demi-Fraser Broth. None of the three methods could completely detect low concentrations of *L. monocytogenes* in a food matrix. However, 3M™ MDS, which is a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based technology for rapid detection, showed a higher positive detection rate than RT-PCR did, but lower than that of selective agar. These data indicated that 3M™ MDS was superior for the rapid detection of *L. monocytogenes*, compared to RT-PCR in food matrices containing various inhibitors. Consequentially, the study findings suggest that the LAMP method is a promising alternative to RT-PCR for the rapid detection of foodborne pathogens.

Keywords 3M™ Molecular Detection System, RT-PCR, *L. monocytogenes*, rapid detection, validation

1. 서론

*Listeria monocytogenes*는 그람 양성, 통성 혐기성 균으로 사람 및 동물과 물, 토양, 하수

를 포함하는 자연에 광범위하게 분포하며, 노인, 영유아, 임산부, 그리고 면역력이 약한 개인에게 치사율이 높은(10–40%) 세균성 식중독 증상인 listeriosis를 일으키는 병원성 미생물이다(Swaminathan과 Gerner–Smidt, 2007). *L. monocytogenes*는 살모넬라나 대장균과 같은 다른 식중독 세균에 비해 식중독 발생빈도와 규모가 작지만, 높은 치사율로 인해 식중독으로 인한 사망자의 대부분을 차지한다. *L. monocytogenes*는 환경 적응능력이 우수하여 자연환경뿐만 아니라, 식품의 가공과 보관, 저온유통환경에서도 생존 및 증식할 수 있기에 신선채소, 주스, 유제품 및 육가공품 등 다양한 식품군에서 검출된다(Datta와 Burall, 2018). 또한, *L. monocytogenes*는 식품과 식품접촉재료의 표면에서 미생물막(biofilm)을 형성함으로써 외부 환경의 변화나 다양한 살균 방법으로부터 안전한 상태를 유지하기 때문에, 식품 원부재료에 적절한 수준의 가열과 살균과정은 *L. monocytogenes*으로부터 인간의 안전을 지키는 데 필수적이다.

국내에서 *L. monocytogenes*에 의한 대규모 식중독 발생 사례는 보고된 바 없으나, 국내 유통 중인 축산물, 수산물, 농산물에서 *L. monocytogenes*가 빈번하게 검출 및 분리되고 있다(Go 등, 2011; Kim 등, 2008). 한편, 국외에서는 *L. monocytogenes*에 의한 식중독 발생이 빈번하게 보고되는데, 미국에서는 2020년에 오염된 빵이머섯의 섭취로 4명이 사망하였고, 유럽에서는 2019년에 오염된 즉석섭취식품[ready-to-eat(RTE) 식품]의 섭취로 3명이 사망하였다(Torresi 등, 2020). 특히, 영국에서는 유통되는 RTE 식품의 5% 내외가 *L. monocytogenes*에 오염된 것으로 조사되어 인체에 listeriosis를 일으키는 주된 전파 매개체로 주목받고 있다. 따라서 점차 증가하는 RTE 식품의 소비 증가로 인해 최소한의 가공만을 거쳐 유통되는 즉석/편의 섭취식품을 구성하는 다양한 원부재료에 대한 엄격한 미생물학적 품질관리가 이루어져야 한다.

식품에서 *L. monocytogenes*의 주된 오염경로는 원부재료 또는 최종제조과정에서 외부와의 접촉에 의한 것으로 알려져 있다(Kim 등, 2011). 비록, 현재까지 국내에서 식품으로 인한 listeriosis 발병은 보고된 바 없지만, 국외로 수출하는 식품에서 지속적으로 *L. monocytogenes*가 검출됨에 따라 추후 국내에서도 대규모 listeriosis 발병 가능성이 있음을 시사하고 있다. 오염된 식품의 유통은 사회적

이나 경제적으로 막대한 경제적 손실을 초래하기 때문에, 신속한 검출을 통한 *L. monocytogenes*에 오염된 식품의 유통 차단으로 식중독 사고의 예방이 우선되어야 한다(Kim과 Park, 2010).

현재 국내 식품공전(Food Code)에는 식중독균의 검출 방법으로 선택배지를 이용한 방법과 real-time polymerase chain reaction(RT-PCR)을 이용한 방법이 등재되어 있다. 선택배지를 이용한 식중독균의 검출은 증균 및 분리배양, 확인시험으로 진행되고, 확정까지 약 5일 이상의 시간이 소요되며 많은 노동력이 필요하기 때문에, 식중독균에 대한 신속 대응 능력이 떨어진다. 반면, RT-PCR법은 식중독균의 특정 유전자를 이용한 분자생물학적 방법으로 목적 유전자의 DNA 증폭을 실시간으로 확인이 가능하며, 낮은 검출 한계를 가져 효과적이고 신속한 검출이 가능하다(Lee 등, 2019). 최근에는 기존의 복잡하고 숙련된 작업자가 필요한 RT-PCR 방법을 대체하기 위하여 새로운 핵산 증폭 방법인 등온증폭방법[looped-mediated isothermal amplification (LAMP)]을 이용한 검출방법이 활발히 개발되고 있다(Cho 등, 2013). LAMP 방법은 DNA를 등온에서 증폭하기에 변성, 접합, 신장을 위해 온도의 변화를 주어야 하는 RT-PCR 방법보다 정확하고 신뢰 가능하며 신속한 결과의 확인이 가능하다. 또한, LAMP 방법은 식품 성분에 의한 저해를 받지 않아 RT-PCR에 비해 정확도가 높은 기술로 각광받고 있다.

본 연구의 목표는 *L. monocytogenes*의 검출을 위한 방법으로서 LAMP, RT-PCR, 선택배지의 성능을 비교하고, 다양한 식품(농산물, 축산물, 수산물)에 존재하는 *L. monocytogenes*의 신속 검출능력을 평가하는 것이다.

2. 재료 및 방법

2.1. 사용 균주 및 활성화

실험에 사용한 *L. monocytogenes*(ATCC 19111, ATCC 19115, ATCC 15313)는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 -80°C 에서 30% glycerol stock(w/v)에 보관하여 사용하였다. 각각의 균주는 10 mL의 tryptic soy broth(TSB; Difco, Detroit, MI, USA)에 0.1 mL를 접종한 후 37°C , $250 \times g$ 의 진탕 배양기에서 24시간 동안 배양하여 활성화

켰다. 활성화된 각각의 균은 앞서 언급된 방법을 2회 반복한 후 균액을 동일한 비율(1:1:1)로 혼합하였다. 혼합된 균액은 phosphate-buffered saline(PBS; Oxoid, Basingstoke, UK)으로 10^0 - 10^3 CFU/mL 수준으로 희석하여 실험에 사용하였다.

2.2. LAMP, RT-PCR, 선택배지의 정확도, 민감도, 특이도 비교

In vitro 상에서 LAMP, RT-PCR, 선택배지의 정확도(accuracy), 민감도(sensitivity), 특이도(specificity)를 비교하기 위하여 PBS로 희석된 *L. monocytogenes*를 동시에 검출을 진행하였다. LAMP 검출 방법으로 3M™ Molecular Detection System(3M™ MDS; 3M Food Safety, St. Paul, MN, USA), RT-PCR 검출 방법으로 VERI-Q PCR 204(Biomed, Seongnam, Korea), 선택배지 방법으로는 식품공전에 등재된 polymyxin-acriflavine-LiCl-ceftazidime-aesculin-mannitol(PALCAM; Oxoid)을 사용하였다. 실험은 농도별로 각 30회 반복하였으며 정확도(accuracy), 민감도(sensitivity), 특이도(specificity)는 다음의 수식을 이용하여 계산되었다.

정확도(accuracy)

$$= \text{True positive} / (\text{Total number of sample}) \times 100$$

민감도(% sensitivity)

$$= \text{True positive} / (\text{True positive} + \text{False negative}) \times 100$$

특이도(% specificity)

$$= \text{True negative} / (\text{True negative} + \text{False positive}) \times 100$$

2.3. 시료 준비 및 미생물 접종

실험에 사용된 모든 식품(농산물, 축산물, 수산물)은 안정에 위치한 대형마트에서 구매하여 사용하였다. 균을 접종하기 위하여 위생적으로 시료를 25 g씩 채취하여 멸균 비닐백(Whirl-pak, 19×30 cm; Nasco, Fort Atkinson, WI, USA)에 넣고 10^0 - 10^3 CFU/mL 수준으로 희석된 *L.*

monocytogenes 균 현탁액을 1 mL씩 식품에 접종하였다. *L. monocytogenes*를 접종한 농산물과 축산물에는 225 mL의 3M™ Demi-Fraser broth(3M™ DFB; 3M Food Safety, St. Paul, MN, USA)를, 그리고 수산물에는 475 mL의 3M™ DFB를 넣어 2분간 stomaching을 한 후, $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 28 ± 1 시간 동안 증균 배양하였다. 모든 식품 시료는 실험에 사용하기 전 RT-PCR을 이용하여 *L. monocytogenes*의 존재 여부를 확인하였으며, 그 결과 모든 식품 시료에는 *L. monocytogenes*가 존재하지 않았다.

2.4. 선택배지를 이용한 식품 중 *L. monocytogenes* 검출

식품에 존재하는 *L. monocytogenes*를 선택배지를 이용하여 검출하기 위해 3M™ DFB에 37°C , 28시간 동안 증균 배양된 액 1 mL를 취하여 PALCAM 배지에 도말하였다. 도말한 PALCAM 배지는 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 48시간 배양하고, PALCAM에서 형성되는 *L. monocytogenes*의 전형적인 집락을 개수하였다. 그 후 형성된 집락을 분리하여 생화학적 확인시험을 통해 양성 여부를 확인했다.

2.5. RT-PCR을 이용한 식품 중 *L. monocytogenes* 검출

식품 중에 존재하는 *L. monocytogenes*를, RT-PCR을 이용하여 검출하기 위해 VERI-Q PCR 204를 사용하였다. 제조사의 지침에 따라 3M™ DFB에서 37°C , 28시간 동안 증균 배양된 액 1 μL 를 취한 후 VERI-Q PCR 204 - *L. monocytogenes* onetouch kit의 master mix tube에 넣고 혼합하였다. 그 후, 각 혼합물의 8 μL 를 취하여 LabChip에 주입 후, LabChip case에 넣어 장비에 삽입하였다. RT-PCR 반응조건은 95°C 에서 8초간 방치하여 최초 변성이 일어나게 한 후, 95°C 에서 7초간 변성 그리고 56°C 에서 14초간 유전자 결합 및 반응이 일어나는 것을 1회로 하여 총 40회의 증폭이 일어나게 하였다. 이후 증폭곡선을 확인하였으며, 제조사의 지침에 따라 Ct value가 35 미만인 샘플만을 양성으로 판정하였다.

2.6. LAMP을 이용한 식품 중 *L. monocytogenes* 검출

식품 중에 존재하는 *L. monocytogenes*를 검출하기 위해 3M™ MDS를 사용하였다. 제조사의 지침에 따라 3M™ DFB에서 증균 배양된 액 20 μL 를 취한 후 3M™ Molecular

Detection Assay kits - *L. monocytogenes*의 lysis tube에 넣고 100°C의 가열 블럭에서 15분 동안 가열하였다. 가열 후 lysis tube를 냉각 블럭에서 5분간 냉각시킨 후, 냉각된 lysis tube의 상층액 20 µL를 취하여 *L. monocytogenes*를 타겟으로 하는 reagent tube에 분주하고 피펫팅하여 혼합하였다. 또한, 양성과 음성 대조구를 설정하기 위해 증균 배양된 3M™ DFB 대신 멸균된 3M™ DFB 20 µL를 reagent control과 negative control에 분주하였다. 준비된 모든 샘플은 loader tray에 넣고 3M™ MDS에서 75분간 반응하였으며, 증폭과 검출 결과는 실시간으로 확인되었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. *L. monocytogenes* 검출을 위한 LAMP, RT-PCR, 선택배지의 정확도, 민감도, 특이도 비교

LAMP, RT-PCR, 선택배지의 *L. monocytogenes* 검출 정확도(accuracy), 민감도(sensitivity), 특이도(specificity)를 비교한 결과는 Table 1과 같다. 각 농도별로 30회 반복하여 측정한 결과, 10^0-10^1 CFU/mL의 균을 검출하는 정확도는 각 66.66%, 43.33%, 93.33%, 10^1-10^2 CFU/mL의 균을 검출하는 정확도는 96.66%, 96.66%, 100%였다. 세가지 검출 방법 모두 10^2-10^3 CFU/mL의 균을 100% 확률로 검출하였다. 결과적으로 *in vitro*에 존재하는 *L. monocytogenes*를 검출하는 정확도는 선택배지, LAMP, 그리고 RT-PCR 순으로 우수하였다. 특히, 낮은 농도

(10^0-10^1 CFU/mL)의 *L. monocytogenes*를 검출하는 데 선택배지와 LAMP법은 50% 이상의 정확도를 보였지만 RT-PCR은 50% 미만의 정확도를 보여 상대적으로 낮은 정확도를 보였다. 세 가지 검출 방법의 *L. monocytogenes* 검출의 민감도와 특이도를 확인한 결과, 모두 100%로 위양성(false positive)과 위음성(false negative)은 나타나지 않았음을 확인하였다.

균을 검출하기 위한 방법으로 인정받기 위해 평가받아야 하는 대표적인 지표는 신속성, 정확성, 민감성, 특이성 등이 있다(Han 등, 2008). 기존에 흔히 사용하던 방법인 선택배지는 5일 이상 소요되는 현저하게 느린 검출 속도로 인해 식중독 발생에 대한 신속한 대응이 어렵기 때문에, 최근에는 DNA를 증폭하여 단시간에 식중독균의 유무를 확인하는 방법인 LAMP법과 RT-PCR이 주로 활용하고 있다. 식중독 세균의 DNA를 추출하여 증폭하기 위해서는 증균배지를 사용하는데, 몇몇 증균배지(*L. monocytogenes*의 증균배지인 Fraser broth나 *Salmonella*의 증균배지인 Rappaport broth)에 존재하는 특정 물질은 PCR 반응을 저해한다는 보고가 있다(Rossen 등, 1992). 그렇기 때문에 본 연구에서는 DNA의 증폭에 최소한의 영향만을 주는 TSB에 균을 배양하여 검출에 사용하였다(Torresi 등, 2020). 그 결과로 LAMP법이 선택배지에 비해서는 낮지만 RT-PCR에 비해서는 더 민감하게 *L. monocytogenes*를 검출할 수 있는 것으로 나타났다. 동일한 조건에서 배양된 균의 검출을 위한 LAMP법, RT-PCR, 선택배지의 비교는 다른 식중독균

Table 1. Accuracy, sensitivity, and specificity of LAMP, RT-PCR, and selective agar at different concentration of *L. monocytogenes* *in vitro*

	Bacteria concentration	N	% Accuracy	% Sensitivity	% Specificity
LAMP	10^0-10^1	30	66.66	100	100
	10^1-10^2	30	96.66	100	100
	10^2-10^3	30	100	100	100
RT-PCR	10^0-10^1	30	43.33	100	100
	10^1-10^2	30	96.66	100	100
	10^2-10^3	30	100	100	100
Selective agar	10^0-10^1	30	93.33	100	100
	10^1-10^2	30	100	100	100
	10^2-10^3	30	100	100	100

을 대상으로도 수행된 바 있으며, 공통적으로 LAMP법이 RT-PCR의 정확도와 검출한계가 유사하거나 더 민감한 것으로 보고하였다(Ahn 등, 2010; Cho 등, 2013). 본 결과를 통해 비록 정확성의 측면에서 선택배지가 가장 우수하지만, 신속 검출을 목적으로는 RT-PCR보다는 높은 정확도를 보여주는 LAMP법이 좋은 대안이 될 것임을 시사하고 있다.

3.2. 식품공전 등재 시험법(선택배지와 RT-PCR)과 LAMP를 이용한 식품에서의 검출 성능 비교

농산물(양배추, 팽이버섯, 새송이버섯)에 *L. monocytogenes*를 농도별로(10^0 – 10^3 CFU/g) 접종한 후 LAMP, RT-PCR, 그리고 선택배지를 이용하여 동시에 검출하였다(Table 2). 그 결과, LAMP와 선택배지로 검출하였을 때 10^1 – 10^3 CFU/25 g으로 접종한 모든 시료는 양성으로 검출되었으며, 10^0 CFU/25 g으로 접종한 시료는 부분적으로 양성으로 판정되었다. RT-PCR로 검출하였을 때는 10^2 – 10^3 CFU/25 g으로 접종한 모든 시료에서 양성으로 검출되었지만, 10^0 – 10^1 CFU/25 g으로 접종한 시료의 경우 부분적으로 양성으로 판정되었다.

축산물(구운 닭 가슴살과 닭고기)에 *L. monocytogenes*를 농도별로(10^0 – 10^3 CFU/g) 접종한 후 LAMP, RT-PCR, 그리고 선택배지를 이용하여 동시에 검출한 결과는 Table

3과 같다. LAMP와 선택배지를 이용하였을 때, 구운 닭 가슴살과 닭고기에 10^1 – 10^3 CFU/25 g으로 접종한 모든 시료는 양성으로 검출되었으며, 10^0 CFU/25 g으로 접종한 시료는 부분적으로 양성으로 판정되었다. RT-PCR로 분석하였을 때, 10^2 – 10^3 CFU/25 g으로 접종한 모든 시료는 양성으로 검출되었지만, 10^0 – 10^1 CFU/25 g으로 접종한 시료는 부분적으로 양성으로 판정되었다. 특히, RT-PCR은 10^0 CFU/25 g으로 접종된 구운 닭 가슴살에서는 *L. monocytogenes*를 검출하지 못했다.

수산물(바지락살, 광어, 연어, 홍합, 해산물 믹스, 황태포)에 *L. monocytogenes*를 농도별로(10^0 – 10^3 CFU/g) 접종한 후 LAMP, RT-PCR, 그리고 선택배지를 이용하여 동시에 검출한 결과는 Table 4와 같다. 선택배지를 이용하였을 때, 10^1 – 10^3 CFU/25 g으로 접종한 샘플에서는 양성으로 검출되었으며, 10^0 CFU/25 g으로 접종한 모든 샘플은 부분적으로 양성으로 판정되었다. LAMP법을 이용했을 때, 10^2 – 10^3 CFU/25 g으로 접종한 모든 샘플은 양성으로 검출되었지만, 10^0 – 10^1 CFU/25 g으로 접종한 샘플은 부분적으로 양성으로 판정되었다. RT-PCR로 분석하였을 때, 10^3 CFU/25 g으로 접종한 모든 샘플은 양성으로 검출되었지만, 나머지는 부분적으로 양성으로 판정되었다. 특히, 10^0 CFU/25 g으로 접종된 수산물에서 RT-PCR은 바지락살, 광어, 황태포에서 *L. monocytogenes*를 검출하지

Table 2. Comparison of LAMP, RT-PCR, and selective agar method for detection of *L. monocytogenes* in agricultural products

	Inoculation level	LAMP	RT-PCR	Selective agar
Cabbage	10^0 CFU/25 g	7/10	7/10	6/10
	10^1 CFU/25 g	10/10	7/10	10/10
	10^2 CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
	10^3 CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
Enoki mushroom	10^0 CFU/25 g	6/10	3/10	8/10
	10^1 CFU/25 g	10/10	7/10	10/10
	10^2 CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
	10^3 CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
Pine mushroom	10^0 CFU/25 g	9/10	6/10	8/10
	10^1 CFU/25 g	10/10	8/10	10/10
	10^2 CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
	10^3 CFU/25 g	10/10	10/10	10/10

Table 3. Comparison of LAMP, RT-PCR, and selective agar method for detection of *L. monocytogenes* in livestock products

	Inoculation level	LAMP	RT-PCR	Selective agar
Grilled chicken breast	10 ⁰ CFU/25 g	6/10	0/10	8/10
	10 ¹ CFU/25 g	10/10	4/10	10/10
	10 ² CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
	10 ³ CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
Chicken meat	10 ⁰ CFU/25 g	8/10	2/10	7/10
	10 ¹ CFU/25 g	10/10	5/10	10/10
	10 ² CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
	10 ³ CFU/25 g	10/10	10/10	10/10

Table 4. Comparison of LAMP, RT-PCR, and selective agar method for detection of *L. monocytogenes* in seafood products

	Inoculation level	LAMP	RT-PCR	Selective agar
Short necked clam	10 ⁰ CFU/25 g	3/10	0/10	8/10
	10 ¹ CFU/25 g	8/10	1/10	10/10
	10 ² CFU/25 g	10/10	9/10	10/10
	10 ³ CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
Flat fish	10 ⁰ CFU/25 g	2/10	0/10	8/10
	10 ¹ CFU/25 g	9/10	7/10	10/10
	10 ² CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
	10 ³ CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
Salmon	10 ⁰ CFU/25 g	5/10	1/10	4/10
	10 ¹ CFU/25 g	10/10	4/10	10/10
	10 ² CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
	10 ³ CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
Mussel	10 ⁰ CFU/25 g	5/10	2/10	5/10
	10 ¹ CFU/25 g	7/10	8/10	10/10
	10 ² CFU/25 g	10/10	9/10	10/10
	10 ³ CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
Mixed seafoods	10 ⁰ CFU/25 g	3/10	1/10	8/10
	10 ¹ CFU/25 g	10/10	7/10	10/10
	10 ² CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
	10 ³ CFU/25 g	10/10	10/10	10/10
Dried pollock	10 ⁰ CFU/25 g	8/10	0/10	7/10
	10 ¹ CFU/25 g	9/10	3/10	10/10
	10 ² CFU/25 g	10/10	6/10	10/10
	10 ³ CFU/25 g	10/10	10/10	10/10

못했다.

LAMP, RT-PCR, 그리고 선택배지를 이용하여 농산물, 축산물, 수산물 총 11개의 식품을 대상으로 *L. monocytogenes*의 검출능력을 평가한 결과, 농산물과 축산물에 존재하는 *L. monocytogenes*의 검출은 LAMP와 선택배지가 RT-PCR에 비해 높은 정확도를 보였으며 수산물에 존재하는 *L. monocytogenes*의 검출은 선택배지, LAMP, 그리고 RT-PCR 순으로 정확도가 우수하였다. 종합적으로 식품에서 *L. monocytogenes* 검출의 정확도는 선택배지가 가장 높았으며, 다음으로는 LAMP법, 마지막은 RT-PCR이었으며 이는 앞서 다양한 식품을 대상으로 수행된 여러 선행 연구들의 결과와 동일하였다(Gwak 등, 2019; Lee 등, 2019). 또한, 식품에 존재하는 *L. monocytogenes*를 검출하는 여러 가지 방법 중 정확성의 측면에서 선택배지의 우수함은 Beumer 등(1997)과 Jamali 등(2013)의 연구에서도 나타나 있다. 또한, 세 가지 검출 방법의 식품에 존재하는 *L. monocytogenes* 검출의 민감도와 특이도를 확인한 결과, 모두 100%로 위양성(false positive)과 위음성(false negative)은 나타나지 않았음을 확인하였는데(data not shown), 이는 개별적인 농도의 실험에서 반복 수가 적었기 때문으로 생각된다.

식품에 존재하는 다양한 성분들은 DNA의 증폭 과정에서 inhibitor로 작용하여 증폭 효율을 낮추거나 저해하는 것으로 보고되고 있다(Oliveira 등, 2003). 농산물, 축산물, 수산물에 존재하는 *L. monocytogenes*를 신속 검출하는 방법 중 LAMP는 수산물에서 검출이 저해되었고, RT-PCR은 축산물과 수산물에서 검출이 저해되는 것을 확인하였다. LAMP는 식품에 존재하는 다양한 inhibitor의 영향을 받지 않고 DNA의 효율적인 증폭을 위해 여러 개의 primer와 *Bst* polymerase를 사용하기 때문에 RT-PCR에 비해 축산물에서 검출 효율이 높았던 것으로 생각된다(Li 등, 2017). 그러나, LAMP와 RT-PCR 공통적으로 수산물에서는 검출 효율이 저해되었는데, 이는 수산물에 존재하는 다양한 염들이 inhibitor로 작용하여 DNA의 증폭에 영향을 주었기 때문이다(Kampeera 등, 2020). 따라서, 수산물에서 나타나는 DNA 증폭의 저해를 해결하기 위하여 LAMP와 RT-PCR의 검출 효율을 개선하는 다양한 연구들

이 수행되고 있으며, 특히 LAMP는 높은 민감성과 특이성을 바탕으로 경제성까지 확보하기 위한 연구가 진행되고 있다(Kampeera 등, 2020; Yang 등, 2020).

본 연구를 통하여 식품에 존재하는 *L. monocytogenes*의 검출을 목적으로 RT-PCR보다 LAMP가 우수한 방법이며 이는 선택배지와 동등한 수준의 정확도를 보여줄 수 있었다. 또한, 결과의 확인까지 오랜 시간이 소요되기 때문에 신속 검출의 방법으로는 부적합한 선택배지 검출 방법과 식품에 존재하는 inhibitor에 의해 결과의 영향을 받는 RT-PCR을 대신하여, LAMP법이 *L. monocytogenes*의 신속 검출을 통한 안전관리에 효과적으로 활용될 수 있음을 확인하였다.

4. 요약

본 연구에서는 LAMP(3M™ MDS), RT-PCR (VERI-Q PCR 204), 선택배지(PALCAM)를 이용하여 *in vitro* 상과 식품에서 *L. monocytogenes*의 검출 능력에 대하여 비교 및 평가하였다. DNA 증폭에 영향을 최소화하는 증균배지에서 배양된 *L. monocytogenes*를 10^0 - 10^3 CFU/mL 농도로 희석 후 세 가지 방법으로 검출한 결과, 선택배지, LAMP, RT-PCR 순으로 정확도가 높았으며, 세 가지 방법 모두에서 위양성과 위음성은 검출되지 않았다. 농산물(3종류), 축산물(2종류), 수산물(6종류)에 10^0 - 10^3 CFU/25 g의 수준으로 *L. monocytogenes*를 접종 후 세 가지 방법으로 검출한 결과, 농산물과 축산물에서는 LAMP와 선택배지가 동등한 수준의 정확도를 보였지만, 수산물에서는 선택배지, LAMP, RT-PCR 순으로 정확하였다. LAMP와 선택배지는 모든 샘플에서 *L. monocytogenes*를 검출하였지만, RT-PCR은 10^0 CFU/25 g으로 접종된 수산물(바지락살, 광어)에서 *L. monocytogenes*를 검출하지 못했다. 정확도의 측면에서 선택배지가 가장 정확도가 높았지만 확정까지의 시간이 오래 소요된다는 점에서, 그리고 RT-PCR은 증균배지나 식품에 존재하는 여러 inhibitor의 영향을 받는다는 점에서, LAMP는 식품에 존재하는 *L. monocytogenes*의 신속 검출 방법으로서 효과적으로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

Acknowledgements

This research was supported by the Chung-Ang University research grant in 2021.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Byun KH, Choi S. Data curation: Byun KH, Han SH. Formal analysis: Byun KH, Bang HJ. Methodology: Kang SI, Kim S. Validation: Choi S. Writing – original draft: Byun KH. Writing – review & editing: Byun KH, Choi S, Ha SD.

Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

ORCID

Kye-Hwan Byun (First author)

<https://orcid.org/0000-0003-0301-3862>

Sang Ha Han

<https://orcid.org/0000-0002-8420-3352>

Seungho Choi

<https://orcid.org/0000-0001-5718-1971>

Hyeon-Jo Bang

<https://orcid.org/0000-0001-8982-1101>

Seong Il Kang

<https://orcid.org/0000-0002-8627-7494>

Sookyoung Kim

<https://orcid.org/0000-0002-1542-6640>

Sang-Do Ha (Corresponding author)

<https://orcid.org/0000-0002-6810-2092>

References

Ahn YC, Cho MH, Yoon IK, Jung DH, Lee EY, Kim JH, Jang WC. Detection of *Salmonella* using the loop mediated isothermal amplification and

real-time PCR. *J Korean Chem Soc*, 54, 215–221 (2010)

Beumer RR, te Giffel MC, Rombouts FM. A comparison of rapid methods for the detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria monocytogenes* Detection and Behaviour in Food and in the Environment. Beumer RR (Editor), Rijkelt Beumer, Netherlands, p 69–86 (1997)

Cho AR, Dong HJ, Cho S. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* spp. by using a loop-mediated isothermal amplification assay in duck carcass sample. *Korean J Food Sci An*, 33, 655–663 (2013)

Datta AR, Burall LS. Serotype to genotype: The changing landscape of listeriosis outbreak investigations. *Food Microbiol*, 75, 18–27 (2018)

Go EK, Park HJ, Wee SH, Heo EJ, Kim YJ, Moon JS. Prevalence of *Listeria monocytogenes* isolated from livestock processed products in Korea. *Korean J Vet Publ Hlth*, 35, 214–219 (2011)

Han SR, Hyeon JY, Kim HY, Park JS, Heo S, Shin HC, Seo KH. Evaluation of conventional culture methods and validation of immunoassays for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dairy and processed foods. *Korean J Food Sci Ani Resour*, 28, 616–622 (2008)

Jamali H, Chai LC, Thong KL. Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. *Food Control*, 32, 19–24 (2013)

Kampeera J, Pasakon P, Karuwan C, Arunrut N, Sappat A, Sirithammajak S, Dechokiattawan N, Sumranwanich T, Chaivisuthangkura P, Ounjai P, Chankhamhaengdecha S, Wisitsoraat A, Tuantranont A, Kiatpathomchai W. Point-of-care rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood using loop-mediated isothermal amplification and graphene-based screen-printed electrochemical sensor. *Biosens Bioelectron*, 132, 271–278 (2019)

Kim HK, Lee SS, Lee HT, Kim JH. Analysis of

- microbiological contamination in ready-to-eat food. *J Food Hyg Saf*, 23, 285–290 (2008)
- Kim HY, Oh SW, Chung SY, Choi SH, Lee JW, Yang JY, Seo EC, Kim YH, Park HO, Yang CY, Ha SC, Shin IS. An investigation of microbial contamination of ready-to-eat products in Seoul, Korea. *Korean J Food Sci Technol*, 43, 39–44 (2011)
- Kim SH, Park YH. Reemergence of foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Safe Food*, 5, 13–18 (2010)
- Lee SY, Gwak SH, Kim JH, Oh SW. Comparison of isolation agar method, real-time PCR and loop-method isothermal amplification-bioluminescence for the detection of *Salmonella typhimurium* in mousse cake and tiramisu. *J Food Hyg Saf*, 34, 290–295 (2019)
- Li Y, Fan P, Zhou S, Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb Pathog*, 107, 54–61 (2017)
- Oliveira SD, Rodenbusch CR, Ce MC, Rocha SLS, Canal CW. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Lett Appl Microbiol*, 36, 217–221 (2003)
- Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol*, 17, 37–45 (1992)
- Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*, 9, 1236–1243 (2007)
- Torresi M, Ruolo A, Acciari VA, Ancora M, Blasi G, Camma C, Centorame P, Centorotola G, Curini V, Guidi F, Marcacci M, Orsini M, Pomilio F, Di Domenico M. A real-time PCR screening assay for rapid detection of *Listeria monocytogenes* outbreak strains. *Foods*, 9, 67 (2020)
- Yang X, Zhang X, Wang Y, Shen H, Jiang G, Dong J, Zhao P, Gao S. A real-time recombinase polymerase amplification method for rapid detection of *Vibrio vulnificus* in seafood. *Front Microbiol*, 11, 586981 (2020)