



Research Article

Comparison of SureTect™ with phenotypic and genotypic method for the detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods

즉석섭취식품에 존재하는 *Salmonella* spp.와 *Listeria monocytogenes*의 검출을 위한 SureTect™와 표현형 및 유전자형 방법의 비교

Kye-Hwan Byun^{1,2}, Byoung Hu Kim¹, Ah Jin Cho¹, Eun Her¹, Sunghye Yoon³, Tacik Kim⁴, Sang-Do Ha^{1*}
 변계환^{1,2} · 김병후¹ · 조아진¹ · 허은¹ · 윤성희³ · 김태익⁴ · 하상도^{1*}

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

²Research Group of Food Safety and Distribution, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Korea

³Bosung Scientific Co., Ltd., Seoul 08378, Korea

⁴Microbiology Division, Thermo Fisher Scientific Korea, Seoul 06349, Korea

¹중앙대학교 식품공학과, ²한국식품연구원,

³보성과학(주), ⁴써모피셔 사이언티픽 코리아

Abstract The objective of this study is to compare and assess the effectiveness of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), and the selective agar plate method for the detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods. In RTE foods, the detection performance of the three methods (RT-PCR [SureTect™ kit and PowerChek™ kit], LAMP [3M MDS], selective agar) were similar at 0–10, 10–50, 50–100, and 100– CFU/mL of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. We found that with RT-PCR, the Ct value of salad was significantly higher ($p < 0.05$) than other RTE foods, indicating that fiber plays a critical role as an obstacle to the rapid detection of *Salmonella* spp. However, the Ct value displayed a mixed pattern according to the inoculation level of *L. monocytogenes*. The use of rapid detection kits and machines mostly depends on the user's choice, with accuracy, ease of use, and economy being the primary considerations. As an RT-PCR kit, SureTect™ and PowerChek™ showed high accuracy in detecting *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in RTE foods, showing that they can replace the existing RT-PCR kits available. Additionally, LAMP also showed excellent detection performance, suggesting that it has the potential to be used as a food safety management tool.



OPEN ACCESS

Citation: Byun KH, Kim BH, Cho AJ, Her E, Yoon S, Kim T, Ha SD. Comparison of SureTect™ with phenotypic and genotypic method for the detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Korean J Food Preserv, 30(2), 262-271 (2023)

Received: January 30, 2023

Revised: April 04, 2023

Accepted: April 05, 2023

***Corresponding author**

Sang-Do Ha

Tel: +82-31-670-4831

E-mail: sangdoha@cau.ac.kr

Copyright © 2023 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.

Keywords *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, real-time PCR, LAMP

1. 서론

최근 사회의 1인 가족 증가와 고령화 그리고 웰빙 의식 및 식사의 편의성에 대한 요구 증대로 즉석섭취식품의 소비가 증가하고 있다. 그러나, 즉석섭취식품은 추가적인 가열과 조리 없이

그대로 섭취하기 때문에 식중독 세균의 주된 전파 매개체로 매년 즉석섭취식품에 의한 식중독이 지속적으로 발발하고 있으며 식중독 세균 오염의 심각성이 꾸준히 보고되고 있다(Jeon 등, 2022). 즉석섭취식품 섭취에 의한 식중독 발생의 주요한 원인은 식중독 세균에 의한 것으로 원인 물질의 절반 이상을 차지하고 있으며, 인체에 침입 시 발열, 근육통, 두통, 복통, 경련 등의 질환을 유발하기에 특별한 관리가 요구된다. 식중독 세균 중에서도 *Salmonella* spp.와 *Listeria monocytogenes*는 사람 및 동물, 자연, 식품에 광범위하게 분포하는 병원성 세균으로, 노인, 영유아, 임산부, 그리고 면역력이 약한 개인에게 치사율이 높은 salmonellosis와 listeriosis를 유발하기 때문에 특별한 관리가 요구된다(Chlebicz와 Śliżewska, 2018). 이러한 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*는 환경 변화에 대한 적응 능력이 우수하고 적대적인 외부 환경으로부터 생존을 가능하게 하는 3차원 입체 구조인 미생물막(biofilms)을 형성할 수 있어 식품 가공과 유통환경에서 생존하여 인체로 침투한다(Aryal과 Muriana, 2019). 그렇기 때문에, 즉석섭취식품에 존재하는 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*의 섭취에 의한 식중독을 예방하고 대규모 발병을 막기 위해서는 식품 공급 체인에서 정확하고 신속한 검출을 통해 식중독 세균의 확산을 조기에 차단하는 위생관리가 필수적이다.

식품에서 병원성 식중독 세균을 검출하기 위한 표준시험 방법은 높은 정확성을 보이지만, 2번의 연속적인 배양, 특정 고체 배지에서의 분리, 집락의 생화학적 및 혈청학적 최종 식별 단계를 거치기에 최대 7일 이상의 시간이 소요되어 식중독 예방에 신속하고 효과적인 대응 수단이라고 할 수 없다(Rodriguez-Lazaro 등, 2015). 따라서, 표준시험방법의 노동 집약적이고 시간적 한계를 보완하여 신속한 검출을 통해 식중독 사고의 발생을 최소화하는 것을 목적으로, DNA 증폭을 기반으로 하는 분자생물학적 검출 방법인 중합효소연쇄반응법(real-time polymerase chain reaction, Real-Time PCR)과 등온증폭방법(looped-mediated isothermal amplification, LAMP)이 개발되어 사용되고 있다(Garrido-Maestu 등, 2017). 분자생물학적 검출은 특정 유전자의 DNA 증폭을 통해 식중독 세균의 유무를 확인하는 방법으로, 사용 편의성 우수, 정확한 결과의 확인, 낮은 검출 한계 등의 장점을 가지고 있다. 현재 국내 식품공전에서는 식중독

세균 검출 방법으로 선택 배지를 사용한 표준시험방법과 함께 real-time PCR의 사용을 허용하고 있으며, 해외 기관에서는 LAMP의 사용 또한 허용하고 있어 분자생물학적 검출 kit와 장비의 사용에 있어서 사용자의 선택을 다양하게 하고 있다(Becherer 등, 2020).

분자생물학적 분석은 높은 정확도와 특이적인 검출로 인해 식품 산업에서 가장 많이 사용되는 검출방법이다. 그러나, 즉석섭취식품은 여러 원부재료를 사용해 제조되고 품목마다 함유하는 성분과 식품을 구성하는 매트릭스(matrix)가 상이하여 식중독 세균을 효율적으로 검출하는 데 큰 장애가 되고 있다(Jayan 등, 2020). 따라서, 이를 극복하고 효율적인 검출을 할 수 있는 표준화된 방법을 목적으로 Real-Time PCR과 LAMP의 개선과 정확성의 검증이 이루어지고 있다. 본 연구는 즉석섭취식품(샌드위치, 소시지, 햄버거, 김밥, 베이컨, 샐러드)에 존재하는 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*의 검출을 위해 분자생물학적 방법으로 real-time PCR과 LAMP를 선택해 표준시험방법인 선택 배지 도말법과 비교 및 평가하였다. 또한, 식품에 저농도와 고농도로 식중독균을 인위적으로 접종 후 동일한 배양 과정을 거쳤을 때 real-time PCR, LAMP, 선택 배지의 검출 성능을 비교하고 식품 매트릭스가 real-time PCR의 신속 검출에 미치는 영향을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 사용 균주 및 배양 조건

Salmonella spp.(*S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhimurium* ATCC 14028)와 *L. monocytogenes*(ATCC 19111, ATCC 19115, ATCC 15313)는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 분양받아 -80°C 에서 30% glycerol stock(w/v)에 보관하며 실험에 사용하였다. 모든 균주는 10 mL의 tryptic soy broth(TSB; Difco, Detroit, MI, USA)에 0.1 mL를 접종한 후 37°C , 160 rpm의 진탕 배양기에서 12시간 동안 1차 배양 후, 24시간 동안 동일한 조건에서 2차 배양하여 활성화시켰다. 각각의 활성화된 균액은 동일한 비율로 혼합 후 phosphate-buffered saline(PBS; Oxoid, Basingstoke, UK)으로 0–10 CFU/mL, 10–50 CFU/mL, 50–100 CFU/mL, 100– CFU/mL 수준으로

회석하여 실험에 사용하였으며, 접종 농도를 확인하기 위해 *Salmonella* spp.는 xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD; Oxoid)에 *L. monocytogenes*는 polymyxin-acriflavine-LiCl-ceftazidime-aesculin-mannitol(PALCAM; Oxoid)에 도말하고 37°C에서 48시간 동안 배양한 다음 형성된 집락을 계수하였다.

2.2. 시료 준비 및 미생물 접종

실험에 사용된 시료(샌드위치, 소시지, 햄버거, 김밥, 베이컨, 샐러드)는 편의점에서 구매하여 사용하였다. 식품의 식중독 세균 오염을 확인하기 위해 접종되지 않은 식품 25 g과 225 mL의 PBS를 혼합하여 강하게 진탕한 다음 배지 도말법으로 식중독 세균의 유무를 확인하였으며, 음성으로 판정된 식품을 사용하였다. 각 시료를 위생적으로 25 g씩 채취하여 멸균 비닐백(whirl-pak, 1930 cm; Nasco, Fort Atkinson, WI, USA)에 넣고 0-10 CFU/mL, 10-50 CFU/mL, 50-100 CFU/mL, 100- CFU/mL 수준으로 회석된 *Salmonella* spp. 또는 *L. monocytogenes* 균 현탁액을 1 mL씩 접종하였다. *Salmonella* spp.를 접종한 시료에는 buffered peptone water(BPW; Oxoid) 225 mL를 *L. monocytogenes*를 접종한 시료에는 24 Listeria enrichment broth(LEB) selective supplement(Oxoid)로 보충된 24 LEB(Oxoid) 225 mL를 넣어 2분간 강하게 진탕한 후, 37°C에서 24시간 동안 증균 배양하여 실험에 사용하였다.

2.3. Real-time PCR을 이용한 식품 중 식중독 세균 검출

식품 중에 존재하는 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*를 real-time PCR로 검출하기 위해 SureTect™ kit와 PowerChek™ kit를 사용하였다. SureTect™ kit는 10 µL의 증균 배양액을 제품에 동봉된 lysis tube에 옮긴 후 SimpliAmp™ Thermal Cycler을 이용하여 lysate를 준비하였다. 준비된 lysate 중 20 µL는 PCR tube에 옮겨진 후 매뉴얼에 따라 사용되었고, 음성 대조군으로 20 µL의 증균배지를 사용하였다. 검출을 위한 DNA의 증폭은 QuantStudio™ 5 Food Safety real-time PCR Instrument(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 통해 이루어지고,

RapidFinder™ Analysis Software를 활용하여 결과가 분석되었다. RapidFinder™ Analysis Software에서, 증폭 결과는 양성(+)은 +, 음성은 -로 도출되었다. PowerChek™ kit는 DNeasy Blood & Tissue kit(QIAGEN)를 사용하여 DNA를 추출 후 5 µL의 주형 DNA를 PCR premix tube에 옮겨 매뉴얼에 따라 사용하였으며, 음성 대조군으로 5 µL의 멸균 증류수를 사용하였다. 검출을 위한 DNA의 증폭은 QuantStudio™ 5 Food Safety real-time PCR Instrument(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 통해 이루어지고, Design and Analysis Software를 활용하여 결과가 분석되었다. 제조사에서 제공하는 판독 기준에 따라, Ct 33 이하에서 증폭이 나타났을 경우 양성으로 판정하였다.

2.4. LAMP를 이용한 식품 중 식중독 세균 검출

식품 중에 존재하는 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*를 LAMP로 검출하기 위해 3M Molecular Detection Assay(MDA) *Salmonella* kit와 *L. monocytogenes* kit를 사용하였으며, 3M Molecular Detection System(3M MDS; 3M Food Safety, St. Paul, MN)을 활용하여 분석하였다. 증균 배양액 20 µL를 3M MDA kit의 lysis tube에 넣고 100°C의 가열 블록에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 후 lysis tube를 냉각 블록에서 5분간 냉각시킨 후, lysis tube의 상층액 20 µL를 취하여 각각의 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*를 타겟으로 하는 reagent tube에 분주하고 피펫팅하여 혼합하였다. 양성(+)과 음성(-) 대조군을 설정하기 위해 증균 배양액 대신 *Salmonella* spp.는 BPW를 *L. monocytogenes*는 24 LEB 20 µL를 reagent control과 negative control에 분주하였다. 준비된 모든 샘플은 loader tray에 넣고 3M MDS에서 DNA를 증폭시켰으며 3M™ Molecular Detection System Software를 활용하여 분석하였다. 3M™ Molecular Detection System Software에서, 증폭 결과는 양성(+)은 +, 음성은 -로 도출되었다.

2.5. 선택 배지를 이용한 식품 중 식중독 세균 검출

Salmonella spp.와 *L. monocytogenes*를 선택 배지로 검출하기 위해 증균 배양액을 PBS로 십진 희석한 후, 1 mL

를 취하여 각각의 선택 배지인 XLD 또는 PALCAM 배지 3장에 나누어 도말하였다. 도말한 배지는 37°C에서 48시간 배양하고 배지에 형성된 *Salmonella* spp. 또는 *L. monocytogenes*의 전형적인 집락을 개수하였다.

2.6. *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes* 확인 실험

real-time PCR, LAMP, 선택 배지에서 양성 판정된 시료를 대상으로 생화학적 방법에 따른 확인 실험을 진행하였다. 증균 배양된 액 10 µL를 Brilliance™ *Salmonella* Agar (Oxoid) 또는 Brilliance™ *Listeria* Agar(Oxoid)에 streaking 후, 37°C에서 48시간 동안 배양하여 집락을 형성시켰다. 형성된 집락 중 *Salmonella* spp. 또는 *L. monocytogenes*의 전형적인 집락 3개를 선별하여, *Salmonella* spp.는 Microbact™ GNB 24E로 *L. monocytogenes*는 Microbact™ *Listeria* 12L을 사용하여 최종 판정하였다.

2.7. 통계 처리

모든 실험은 3회 반복 수행되었으며 실험 결과는 평균과 표준편차로 나타내었다. 실험 결과는 SPSS Statistics(IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하여, one-way ANOVA로 유의성 검정을 수행하고, Duncan’s multiple range test로 유의확률(p<0.05)을 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Real-time PCR, LAMP, 선택 배지의 검출 성능 비교

즉석섭취식품(샌드위치, 소시지, 햄버거, 김밥, 베이컨, 샐러드)에 인위적으로 접종된 다양한 농도의 *Salmonella* spp.의 검출 성능을 real-time PCR, LAMP, 선택 배지를 사용하여 비교하였다. 그 결과, 0-10 CFU/mL, 10-50 CFU/mL, 50-100 CFU/mL, 100- CFU/mL로 접종된 모든 샘플에서 *Salmonella* spp.가 양성으로 검출되었다(Table 1). 즉석섭취식품에 존재하는 *Salmonella* spp.의 검출을 위해 real-time PCR, LAMP, 선택 배지 검출 방법을 비교한 결과, 인위적으로 *Salmonella* spp.를 접종한 시료에서 3가지 검출 방법의 성능의 차이는 없었다. 즉석섭취식품(샌드위치, 소시지, 햄버거, 김밥, 베이컨, 샐러드)에 인위적으로 접종된 다양한 농도의 *L. monocytogenes*의 검출을 real-time PCR, LAMP, 선택 배지를 사용하여 비교한 결과, 0-10 CFU/mL, 10-50 CFU/mL, 50-100 CFU/mL, 100- CFU/mL로 접종된 모든 샘플에서 *L. monocytogenes*가 양성으로 검출되었다(Table 2). 즉석섭취식품에 존재하는 *L. monocytogenes*의 검출을 위해 real-time PCR, LAMP, 선택 배지 검출 방법을 비교한 결과, 인위적으로 *L. monocytogenes*를 접종한 시료에서 3가지 검출 방법의 성능의 차이는 없었다.

Table 1. Comparison of real-time polymerase chain reaction¹⁾, loop-mediated isothermal amplification²⁾, and agar plate method for detection of *Salmonella* spp. in ready-to-eat³⁾ food (n=3)

	RT-PCR				LAMP				Agar plate							
	SureTect™ kit				PowerChek™ kit				MDS				XLD			
	Inoculation level (CFU/mL)				Inoculation level (CFU/mL)				Inoculation level (CFU/mL)				Inoculation level (CFU/mL)			
	0-10	10-50	50-100	100-	0-10	10-50	50-100	100-	0-10	10-50	50-100	100-	0-10	10-50	50-100	100-
Sandwich	3 ⁴ /3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Sausage	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Hamburger	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Kimbap	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Bacon	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Salad	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

¹⁾RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

²⁾LAMP, loop-mediated isothermal amplification.

³⁾RTE, ready-to-eat.

⁴⁾Means the number of detected samples among three iterations.

Table 2. Comparison of real-time polymerase chain reaction¹⁾, loop-mediated isothermal amplification²⁾, and agar plate method for detection of *L. monocytogenes* in ready-to-eat³⁾ food (n=3)

	Real-time PCR								LAMP				Agar plate			
	SureTect™ kit				PowerChek™ kit				MDS				PALCAM			
	Inoculation level (CFU/mL)				Inoculation level (CFU/mL)				Inoculation level (CFU/mL)				Inoculation level (CFU/mL)			
	0-10	10-50	50-100	100-	0-10	10-50	50-100	100-	0-10	10-50	50-100	100-	0-10	10-50	50-100	100-
Sandwich	3 ⁴⁾ /3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Sausage	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Hamburger	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Kimbap	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Bacon	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Salad	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

¹⁾RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

²⁾LAMP, loop-mediated isothermal amplification.

³⁾RTE, ready-to-eat.

⁴⁾Means the number of detected samples among three iterations.

현재 식품공전에서는 표준시험방법과 함께 분자생물학적 분석의 사용을 허용하고 있어, 다양한 유형의 식품에 존재하는 식중독 세균의 검출을 위해 신속 검출법의 사용 적절성이 평가되고, 이를 개선하기 위한 연구가 꾸준히 수행되고 있다. 분자생물학적 분석은 특정 식중독 세균의 고유한 염기서열을 증폭하기에 특이적인 검출이 가능하고, 증균 배양 과정이 포함되도록 설계되어 있어 매우 적은 양의 미생물이 존재하더라도 신속한 검출이 가능하다. 그렇기 때문에 노동집약적이고 시간 소비가 큰 표준시험방법을 대체하여 신속한 검출을 목적으로 다양한 분야에서 활용되고 있으며, 그중에서도 *Taq* DNA polymerase를 사용하는 real-time PCR과 *Bst* DNA polymerase를 사용하는 LAMP법의 비교가 가장 활발히 이루어지고 있다(Kim 등, 2010; Law 등, 2015). 그러나, 식품공전에서 표준시험방법은 구체적으로 사용 배지를 명시하고 있지만, 분자생물학적 분석은 가이드라인만을 제시하고 있기 때문에 분석 kit 및 장비 등을 사용함에 있어 사전에 충분한 검증이 이루어져야 한다. 본 연구에 사용된 SureTect™ kit, PowerChek™ kit, 3M MDS kit는 즉석섭취식품에 존재하는 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*의 검출에 표준시험방법과 동등한 검출 성능을 보여 분자생물학적 분석 kit로 사용이 적절한 것으로 판단된다.

신속 검출법의 사용에 있어 식품에 존재하는 지방, 단백질, 유기물질, 2가 양이온 등의 물질이 DNA의 증폭을 저해하고 식품 매트릭스는 식중독 세균의 회수를 방해하여, 식중독 세균 검출의 일률적인 검사를 방해하는 장애 요소가 되고 있다(Schrader 등, 2012). 일반적으로 real-time PCR법은 식품에 존재하는 물질의 영향을 받아 DNA의 증폭이 매우 민감하게 반응하여 정확성과 민감성이 저해된다고 보고되는 반면, LAMP법은 주형 DNA를 등온에서 증폭시키고 4개 이상의 유전자를 사용하기에 real-time PCR 방법과 비교했을 때 식품의 성분에 영향을 적게 받는 것으로 보고되고 있다(Anupama 등, 2021; Schrader 등, 2012). 그러나, Liu 등(2021)과 Law 등(2015)에 따르면 LAMP법 또한 식품의 유기물 또는 염에 의해서 primer의 손상과 DNA의 증폭 효율이 저해될 수 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구의 결과, *Salmonella* spp. 또는 *L. monocytogenes*로 접종된 샘플에서 real-time PCR과 LAMP법의 검출 성능 차이를 확인할 수 없었기에, 식품 성분이 real-time PCR과 LAMP법의 DNA 증폭에 미치는 영향은 동일한 것으로 판단되며, 이는 식품 성분에 따른 Real-Time PCR과 LAMP법의 검출 성능의 차이는 없다고 보고한 Techathuvanan과 D'Souza(2020) 및 Zhang 등(2011)의 연구와도 동일하다.

3.2. 식품 매트릭스에 따른 real-time PCR 검출 비교
 식품 매트릭스에 따른 real-time PCR의 검출 민감성 비교를 위해 real-time PCR의 Ct value를 분석한 결과를 Table 3과 4에 나타내었다. 식품 매트릭스에 따른 Real-

Table 3. Ct values of *Salmonella* spp. analyzed by real-time PCR on different food matrix

		Inoculation level (CFU/mL)			
		0-10	10-50	50-100	100-
SureTect™ kit	Sandwich	23.52±1.20 ^{A,b}	23.32±0.24 ^{A,b}	22.72±1.20 ^{AB,a}	19.71±0.42 ^{B,c}
	Sausage	17.92±0.21 ^{AB,d}	23.08±0.45 ^{B,d}	18.26±0.14 ^{A,c}	17.86±0.46 ^{AB,d}
	Hamburger	19.76±0.79 ^{B,c}	21.43±0.34 ^{A,bc}	21.80±0.58 ^{A,a}	21.34±0.08 ^{A,b}
	Kimbap	25.87±2.46 ^{A,b}	19.87±0.53 ^{B,c}	19.78±0.18 ^{B,b}	19.50±0.37 ^{B,c}
	Bacon	19.20±0.23 ^{AB,c}	18.77±0.81 ^{AB,cd}	20.98±0.15 ^{A,b}	19.86±0.47 ^{A,c}
	Salad	30.72±0.52 ^{A,a}	27.80±2.85 ^{AB,a}	21.79±3.93 ^{B,a}	25.29±0.98 ^{AB,a}
PowerChek™ kit	Sandwich	15.38±0.34 ^{B,d}	18.28±0.68 ^{A,b}	17.93±0.34 ^{A,b}	17.91±1.30 ^{A,ab}
	Sausage	15.48±0.16 ^{A,d}	14.02±0.29 ^{B,d}	14.04±0.38 ^{B,d}	13.63±0.44 ^{B,c}
	Hamburger	15.58±0.92 ^{AB,cd}	16.12±0.05 ^{A,b}	16.57±0.43 ^{A,c}	15.80±0.22 ^{A,b}
	Kimbap	22.20±2.43 ^{A,b}	16.06±0.51 ^{B,b}	16.39±0.27 ^{B,c}	16.19±0.40 ^{B,b}
	Bacon	16.37±0.31 ^{A,cd}	15.48±0.24 ^{B,c}	16.17±0.24 ^{A,c}	16.10±0.61 ^{A,b}
	Salad	26.53±0.62 ^{A,a}	23.81±2.11 ^{B,a}	21.10±1.66 ^{C,a}	20.84±1.18 ^{C,a}

Each values are mean with standard deviation of three replicate. Different letters in the same row (^{A-C}) indicate significant difference (p<0.05) between inoculation level at the same food and different letters in the same column (^{a-d}) indicate significant difference (p<0.05) between foods at the same inoculation level.

Table 4. Ct values of *Listeria monocytogenes* analyzed by real-time PCR on different food matrix

		Inoculation level (CFU/mL)			
		0-10	10-50	50-100	100-
SureTect™ kit	Sandwich	19.32±0.87 ^{A,ab}	19.87±0.18 ^{A,b}	16.80±0.21 ^{B,c}	16.92±0.26 ^{B,c}
	Sausage	19.79±1.39 ^{AB,ab}	23.03±0.55 ^{A,a}	22.00±0.27 ^{AB,a}	19.87±0.36 ^{AB,b}
	Hamburger	19.07±0.51 ^{B,b}	20.29±0.03 ^{A,b}	19.72±0.17 ^{AB,ab}	19.00±0.37 ^{B,b}
	Kimbap	21.27±1.67 ^{A,a}	18.64±0.38 ^{AB,c}	18.19±0.44 ^{AB,b}	17.12±0.39 ^{B,c}
	Bacon	19.27±0.54 ^{A,b}	20.26±1.16 ^{A,b}	19.10±0.41 ^{AB,ab}	18.99±0.41 ^{B,b}
	Salad	20.40±0.11 ^{B,a}	19.86±1.40 ^{B,b}	20.57±1.96 ^{B,ab}	23.01±1.10 ^{A,a}
PowerChek™ kit	Sandwich	15.80±1.03 ^{A,bc}	13.01±0.89 ^{B,c}	14.01±1.27 ^{AB,c}	14.56±0.43 ^{AB,b}
	Sausage	17.58±1.82 ^{A,a}	18.73±0.81 ^{A,a}	17.84±0.61 ^{A,a}	15.33±0.39 ^{B,b}
	Hamburger	15.96±0.69 ^{A,c}	15.77±0.55 ^{A,b}	15.76±0.14 ^{A,b}	14.73±0.54 ^{B,b}
	Kimbap	18.43±2.37 ^{A,a}	16.07±0.85 ^{AB,b}	15.43±0.55 ^{B,b}	14.89±0.72 ^{B,b}
	Bacon	17.87±1.64 ^{A,a}	18.12±2.18 ^{A,a}	16.14±1.25 ^{B,ab}	15.54±1.25 ^{C,b}
	Salad	16.85±0.18 ^{B,b}	15.36±0.86 ^{C,b}	17.03±1.68 ^{AB,a}	18.68±0.78 ^{A,a}

Each values are mean with standard deviation of three replicate. Different letters in the same row (^{A-C}) indicate significant difference (p<0.05) between inoculation concentration at the same food and different letters in the same column (^{a-d}) indicate significant difference (p<0.05) between foods at the same inoculation concentration.

Time PCR의 민감성을 비교한 결과, *Salmonella* spp.의 경우 SureTect™ kit로 분석하였을 때 0–10 CFU/mL, 10–50 CFU/mL, 100–CFU/mL로 접종된 식품 중 샐러드의 Ct value가 다른 식품에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 높았고, 50–100 CFU/mL로 접종하였을 때는 샌드위치, 햄버거, 샐러드의 Ct value가 다른 식품에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 높았다. PowerChek™ kit로 분석하였을 때는 모든 접종 농도에서 샐러드의 Ct value가 다른 식품에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 높았다. *L. monocytogenes*의 경우 SureTect™ kit로 분석하였을 때 0–10 CFU/mL는 김밥과 샐러드, 10–50 CFU/mL와 50–100 CFU/mL는 소시지, 100–CFU/mL는 샐러드의 Ct value가 다른 식품에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 높았고, PowerChek™ kit로 분석하였을 때는 0–10 CFU/mL는 소시지, 김밥, 베이컨, 10–50 CFU/mL는 소시지와 베이컨, 50–100 CFU/mL는 소시지와 샐러드, 100–CFU/mL는 샐러드의 Ct value가 다른 식품에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 높아 혼합적인 양상을 보였다. 전반적으로 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*의 접종 농도가 증가함에 따라 Ct value가 유의적으로 감소하는 경향을 보였으나, 일부 식품과 접종농도에서는 혼합적인 양상을 보였다.

즉석섭취식품은 다양한 원부재료를 이용하여 만들어지는 복합적인 식품으로 품목에 따라 식품 매트릭스가 이질적이고 상이하기 때문에, 식중독균의 신속한 검출을 방해하는 중요한 장애물이다(Lee 등, 2021). 본 실험에 사용된 즉석섭취식품에 존재하는 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*의 real-time PCR Ct value를 비교한 결과, *Salmonella* spp.의 경우 야채를 포함하는 샌드위치와 샐러드에서의 Ct value가 다른 즉석섭취식품에 비해 높았으며, *L. monocytogenes*의 경우 저농도(50 CFU/mL 미만)에서는 육류인 소시지와 베이컨이, 고농도에서는 샐러드의 Ct value가 다른 즉석섭취식품에 비해 높아, 공통적으로 샐러드에서 real-time PCR을 이용한 신속 검출이 다른 식품에 비해 저해됨을 알 수 있었다. 이는 다양한 식품 매트릭스에 존재하는 위해 물질의 검출을 연구한 다른 연구(Tramuta 등, 2022)에서도 나타나는 결과로, 식물의 섬유질이 위해 물질을 포집하여 검출을 방해하는 것으로 알려져 있으며(Salihah 등, 2016), Schrader 등(2012)은 식물에 존재하는 pectin, polyphenols, polysaccharides가 DNA의 증폭과 침전된 핵산의 현탁

을 방해하여 위음성을 초래할 수 있는 것으로 보고하고 있다. 그렇기 때문에, 식물성 재료가 많은 식품에 존재하는 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*의 검출을 위해서는 균질화를 통해 섬유질에 포집되어 있는 위해 물질의 배출과 함께 DNA 증폭을 방해하는 물질의 제거가 동시에 수반되어야 한다.

위해 미생물 신속 검출을 위한 장비와 kit의 사용은 전적으로 사용자의 선택에 의존하고 있기 때문에, 사용자는 상황에 맞는 장비, 성능, 사용 편의성, 경제성을 고려하여 식품의 위해 미생물을 검출하여야 한다. 현재 시중에는 다양한 kit가 상용화되어 있으며 사용자의 편의성 강화와 함께, 오염 없이 신속하고 민감한 검출을 위하여 주형 DNA를 효율적으로 정제하고 추출할 수 있도록 하고 있다(Dundon 등, 2021; Mertens 등, 2014). 주형 DNA의 추출은 물리, 효소, 화학적 방법을 사용해 정제할 수 있으며 그중에서도 lysozyme과 proteinase K 등의 효소를 이용하여 lysate를 얻는 방법이 DNA의 회수가 가장 우수하고 사용이 간편하기 때문에 보편적으로 활용되고 있다(EI-Ashram 등, 2016). 본 연구에서 사용된 SureTect™ kit는 39 미만, PowerChek™ kit는 33 이하의 Ct value 판독 기준을 가지고 있으며, 두 kit 모두 30–80%의 범위에서 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*를 검출할 수 있었다. 그러나, PowerChek™ kit는 사용자가 정제 및 추출한 주형 DNA를 사용하기 때문에 해당 과정에서의 오염 가능성이 높고 주형 DNA 추출에 사용하는 kit와 사용자의 숙련도에 따라 DNA의 정제와 추출이 불완전할 수 있다. 반면 SureTect™ kit는 자체적으로 제공하는 효소를 이용해 lysate를 얻기에 오염 가능성이 낮고 추출된 DNA를 편리하게 검출에 사용할 수 있어 사용자에 따른 오류를 최소화할 수 있다. 미량의 DNA를 증폭하여 검출에 이용하는 신속 검출법에서 여러 번의 DNA 이동은 검출을 위한 적절한 양의 DNA의 사용에 어려움을 초래하고 그 과정에서 위음성을 발생시켜 결과의 해석에 영향을 줄 수 있기에, 간편한 방법을 이용하고 작업을 최소화하는 DNA 추출은 사용자의 편의성을 증가시키고 신뢰성 있는 결과의 확보를 보장할 수 있다. 또한, SureTect™ kit의 PCR tube는 개별적으로 위음성 확인을 위한 내부 양성대조군(internal positive control)이 포함되어 있어, 다양한 성분을 포함하는 식품에 의한 DNA 증폭 방해와 기계

의 오작동에 구애받지 않고 식중독균 신속 검출 결과를 확보할 수 있었다.

식중독균의 신속 검출은 오염된 식품을 사전에 차단할 수 있는 중요한 수단으로 식품의 유통과정에서 오염 시점을 파악할 수 있는 중요한 방법이다. real-time PCR법은 식품공전에 유일하게 등재되어 있는 식중독균 신속 검출 방법으로 신뢰성이 높으며, 현재 시중에 판매되는 real-time PCR kit는 사용하는 장비, DNA 증폭 조건, 시약 구성 성분 등이 상이하지만 우수한 식중독균 검출 성능을 보여주고 있다. 따라서, real-time PCR kit의 선택에 있어 식품공전 가이드라인을 충족 후 여러 식품 유형에서 동일한 수준의 검출 성능을 보인다면 사용자의 판단에 따라 오류를 최소화하고 사용 환경에 적합한 제품의 선택이 적절한 것으로 생각되며, SureTect™ kit와 PowerChek™ kit는 기존 real-time PCR kit의 대체재로서 사용이 가능할 것으로 판단된다. 또한, 본 연구에서 사용된 신속 검출 기술 중 하나인 LAMP도 real-time PCR과 평판 배지와 동등한 검출 성능을 보여 식품에 존재하는 식중독 세균의 검출에 사용이 적합함을 시사하고 있다.

4. 요약

본 연구에서는 real-time PCR(SureTect™ kit와 PowerChek™ kit), LAMP(3M MDS), 선택 배지를 이용하여 즉석섭취식품에 존재하는 *Salmonella* spp.와 *L. monocytogenes*의 검출 능력을 비교 및 평가하고 식품 매트릭스가 real-time PCR의 결과에 미치는 영향을 조사하였다. 4가지 서로 다른 농도로 접종된 식품을 동일한 증균배지를 이용하여 증균 후 세 가지 방법으로 검출한 결과, real-time PCR, LAMP, 선택 배지에서 모두 양성으로 검출되어 인위적으로 접종된 식품에서의 검출 성능은 동등한 것으로 나타났다. 또한, 식품 매트릭스가 real-time PCR의 신속 검출에 미치는 영향을 조사한 결과, *Salmonella* spp.의 검출에서 샐러드가 다른 식품에 비해 Ct value가 유의적으로 높은 것으로 나타나, 섬유질이 풍부한 식품에 존재하는 *Salmonella* spp.의 검출을 위해서는 충분한 균질화와 균체의 탈리, 그리고 효율적인 DNA의 증폭이 필요함을 알 수 있었다. 반면, *L. monocytogenes*의 검출은 식품 매트릭스

마다 상이하며 혼합적인 양상을 보였다. 현재의 식품공전 규정에서 식품에 존재하는 식중독균의 신속 검출을 위한 장비와 시약의 사용은 대부분 사용자의 선택에 의존하고 있다. 본 실험에서 real-time PCR로 사용된 SureTect™ kit와 PowerChek™ kit는 기존 real-time PCR kit의 대체재로서 사용이 가능할 것으로 판단되며, 또한, LAMP도 우수한 검출 성능을 보였기에 식품안전 관리 수단으로 활용될 가능성이 있음을 시사하고 있다.

Acknowledgements

This research was supported by a grant (21153MFDS605) from the Ministry of Food and Drug Safety in 2023

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Byun KH, Ha SD. Data curation: Byun KH, Kim BH. Formal analysis: Cho AJ, Her E. Methodology: Yoon S, Kim T. Validation: Yoon S, Kim T. Writing – original draft: Byun KH. Writing – review & editing: Yoon 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>

Byoung Hu Kim

<https://orcid.org/0000-0001-6107-1919>

Ah Jin Cho

<https://orcid.org/0000-0003-2935-4518>

Eun Her

<https://orcid.org/0000-0003-0738-4441>

Sunghee Yoon

<https://orcid.org/0000-0002-3500-607X>

Taeik Kim

<https://orcid.org/0000-0002-6147-3317>

Sang-Do Ha (Corresponding author)

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

References

- Anupama KP, Nayak A, Karunasagar I, Karunasagar I, Maiti B. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay along with conventional and real-time PCR assay for sensitive detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from seafood sample without enrichment. *Mol Biol Rep*, 48, 1009–1016 (2021)
- Aryal M, Muriana PM. Efficacy of commercial sanitizers used in food processing facilities for inactivation of *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, and *Salmonella* biofilms. *Foods*, 8, 639 (2019)
- Becherer L, Borst N, Bakheit M, Frischmann S, Zengerle R, von Stetten F. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal Methods*, 12, 717–746 (2020)
- Chlebicz A, Slizewska K. Campylobacteriosis, salmonellosis, yersiniosis, and listeriosis as zoonotic foodborne diseases: A review. *Int J Environ Res Public Health*, 15, 863 (2018)
- Dundon WG, Settypalli TB, Spiegel K, Steinrigl A, Revilla-Fernandez S, Schmoll F, Naletoski I, Lamien CE, Cattoli G. Comparison of eleven *in vitro* diagnostic assays for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *J Virol Methods*, 295, 114200 (2021)
- El-Ashram S, Al Nasr I, Suo X. Nucleic acid protocols: Extraction and optimization. *Biotechnol Rep*, 12, 33–39 (2016)
- Garrido-Maestu A, Fucinos P, Azinheiro S, Carvalho J, Prado M. Systematic loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection and characterization of *Salmonella* spp., Enteritidis and Typhimurium in food samples. *Food Control*, 80, 297–306 (2017)
- Jayan H, Pu H, Sun DW. Recent development in rapid detection techniques for microorganism activities in food matrices using bio-recognition: A review. *Trends Food Sci Technol*, 95, 233–246 (2020)
- Jeon JH, Roh JH, Lee CL, Kim GH, Lee JY, Yoon KS. Microbial qualities of parasites and foodborne pathogens in ready to eat (RTE) fresh-cut produces at the on/offline markets. *J Food Hyg Saf*, 37, 87–96 (2022)
- Kim HJ, Kim YS, Chung MS, Oh DH, Chun HS, Ha SD. Trends in rapid detection methods for food-borne pathogenic microorganisms by using new technologies. *J Food Hyg Saf*, 25, 376–387 (2010)
- Law JWF, Ab Mutalib NS, Chan KG, Lee LH. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol*, 5, 770 (2015)
- Lee YS, Kim S, Kim M, Kim SH. Comparison of conventional PCR and multiplex Real-Time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in ready-to-eat foods. *J Food Hyg Saf*, 36, 141–147 (2021)
- Liu D, Walcott R, Mis Solval K, Chen J. Influence of bacterial competitors on *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* growth in microbiological media and attachment to vegetable seeds. *Foods*, 10, 285 (2021)
- Mertens K, Freund L, Schmoock G, Hänsel C, Melzer F, Elschner MC. Comparative evaluation of eleven commercial DNA extraction kits for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis* spores in spiked dairy samples. *Int J Food Microbiol*, 170, 29–37 (2014)
- Rodriguez-Lazaro D, Gonzalez-Garcia P, Valero A, Hernandez M. Application of the SureTect detection methods for *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. in meat, dairy, fish, and vegetable products. *Food Anal Methods*, 8, 1–6 (2015)
- Salihah NT, Hossain MM, Lubis H, Ahmed MU. Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction. *J Food Sci Technol*, 53, 2196–2209 (2016)

- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*, 113, 1014–1026 (2012)
- Techathuvanan C, DSouza DH. Propidium monoazide for viable *Salmonella enterica* detection by PCR and LAMP assays in comparison to RNA-based RT-PCR, RT-LAMP, and culture-based assays. *J Food Sci*, 85, 3509–3516 (2020)
- Tramuta C, Decastelli L, Barcucci E, Ingravalle F, Fragassi S, Lupi S, Bianchi DM. Detection of peanut traces in food by an official food safety laboratory. *Foods*, 11, 643 (2022)
- Zhang G, Brown EW, Gonzalez-Escalona N. Comparison of real-time PCR, reverse transcriptase real-time PCR, loop-mediated isothermal amplification, and the FDA conventional microbiological method for the detection of *Salmonella* spp. in produce. *Appl Environ Microbiol*, 77, 6495–6501 (2011)