

발간등록번호

11-1543000-001476-01

**유통 농산물의 위생 강화를 위한 수출형 식중독균  
신속검사 키트 개발**

**(Development of Export Type Rapid Detection Kit for  
Foodborne Pathogens to Improve the Safety of  
Commercial Fresh Produce)**

강원대학교 산학협력단

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유통 농산물의 위생 강화를 위한 수출형 식중독균 신속검사 키트 개발 ”  
(개발기간 : 2013. 8. 26. ~ 2016. 8. 25.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 12. 12.

주관연구기관명 : 강원대학교 산학협력단 (대표자) (인)

협동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) (인)

협동연구기관명 : 코젠바이오텍(주) (남용석) (인)

협동연구기관명 : 래피젠(주) (박재구) (인)

주관연구책임자 : 오덕환

협동연구책임자 : 서건호

협동연구책임자 : 남용석

협동연구책임자 : 조일재

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에  
동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	313010-3	해당단계 연구기간	2013.8.26. ~ 2016.8.25. (3년간)	단계구분	(3차년도)/ (3차년도)
연구사업명	중사업명	수출전략기술개발사업			
	세부사업명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	유통 농산물의 위생 강화를 위한 수출형 식중독균 신속검사 키트 개발			
연구책임자	오덕환	해당단계 참여 연구원 수	총: 26명 내부: 26명 외부: 0명	해당단계 연구개 발비	정부: 1,110,000천원 민간: 375,000천원 계: 1,485,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 78명 내부: 78명 외부: 0명	총연구개 발비	정부: 1,110,000천원 민간: 375,000천원 계: 1,485,000천원
연구기관명 및 소속부서명	강원대학교 산학협력단 건국대학교 산학협력단			참여기업명	(주)코젠바이오텍 (주)래피젼
위탁연구	연구기관명: 해당없음			연구책임자: 해당없음	
<p>요약: 농산물 관련 7대 식중독 세균들, 병원성대장균, 살모넬라, 리스테리아, 캄필로박터, 이질균, 황색포도상구균, 바실러스 등에 대한 중균-농축-검사 등 신속검사 관련 기술 개발 및 상용화를 목표로 함.</p> <p>-식중독 세균 6~8시간 이내 신속증균배지 개발                      -식중독 세균 100배 농축시스템 개발                      -식중독 세균 고효율 항원 및 DNA 추출 시스템 개발                      -신속진단 키트: 식중독 세균 7종 동시 검출 real-time PCR Kit 개발 및 상용화                      -신속진단 키트: 면역 래피드 키트(5종류) 개발 및 상용화                      -개발된 키트들의 성능을 AOAC방법을 통해 비교 검증                      -다소비 농산물에 대한 세균 오염률 조사 및 기준 규격(안) 마련                      -농산물에서 식중독세균의 국내외 기준규격 조사 및 국내 기준규격(안)제시</p>					보고서 면수 총454쪽 (본문445쪽)

## 4. 국문 요약문

		코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>목적: 친환경 및 유기농업 등을 포함한 다양한 방식으로 생산되는 농산물 중 미생물 오염 가능성이 있는 유통 농산물의 위생 강화를 위한 수출형 식중독 세균 신속검사 kit 개발 및 농산물 식중독 사고 사전예방 안전관리 대책 확립</p> <p>내용:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 농산물 대상 식중독 세균 7종에 대한 신속 증균배지의 개발</li> <li>2. 식중독 세균의 농축 및 정제 시스템 개발</li> <li>3. 식중독 세균 고효율 항원 및 DNA 추출 시스템 개발</li> <li>4. 식중독 세균 신속 진단용 Multiplex real-time PCR 키트의 개발 및 상용화</li> <li>5. 식중독 세균 신속 진단용 면역 래피드 키트의 개발 및 상용화</li> <li>6. 개발된 신속진단 키트들의 AOAC 기반 성능 검증 및 검사 매뉴얼 개발</li> <li>7. 다소비 농산물에 대한 세균 오염률 조사 및 기준 규격(안) 마련</li> <li>8. 신선 농산물에서 세균의 국내외 기준규격 조사 및 국내 기준규격(안) 제시</li> </ol>		
연구개발성과	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 식중독 세균 7종(<i>Bacillus cereus</i>, <i>Campylobacter jejuni</i>, <i>EHEC E. coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Salmonella spp.</i>, <i>Shigella spp.</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>)에 대한 전처리 증균배지를 개발함. <ul style="list-style-type: none"> <li>• 개발된 증균배지들은 기존의 증균배지보다 약 10배 더 신속하게 증균하고 손상세포들에 대한 회복 및 증균에서도 더 높은 증균 활성을 보였음.</li> <li>• 초기 균수 <math>10^1</math> cfu/ml에서 6시간 이내 <math>10^{4-5}</math> 이cfu/ml로 증식함.</li> <li>• 리스테리아 및 캄필로박터의 경우 긴 세대주기 시간으로 더 오랜 배양시간이 요구됨.</li> </ul> </li> <li>2. 식중독 세균 농축시스템으로 면역자기분리법(IMS) 및 실린지 필터법 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 농산물 시료에서 각 세균을 효율적으로 농축 분리하였으며 신속진단키트에 적용할 수 있음.</li> <li>• 리스테리아를 제외한 세균들의 IMB-Ab와의 결합효율은 기존 세균수 대비 1 log 이하의 차이로 우수하여 신속진단키트 적용에 문제없음.</li> </ul> </li> <li>3. 식중독세균 신속 고효율 DNA 추출법으로 개선된 PrepMan 시약은 기존의 1시간 보다 빠른 20분 이내 DNA를 추출할 수 있으며 PCR 키트에서 잘 작동하였음. 증류수만으로도 높은 추출 효율을 나타냈음.</li> <li>4. 식중독 세균 7균종에 대한 신속진단키트 multiplex real-time PCR Kit를 개발하고 상용화함. <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7종의 식중독 세균을 3개의 세트로 나누고 이들을 통합하여 하나의 키트로 개발하여 100분 이내 동시진단이 가능함.</li> <li>• 민감도, 특이도 및 검출한계에서 우수한 시험 성적을 보임.</li> <li>• 상품화하여 내수 및 수출의 기반을 마련함.</li> </ul> </li> <li>5. 식중독 세균 5종에 대한 신속진단키트 Immuno rapid Kit 개발 및 상용화 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 대장균 O157:H7, 리스테리아, 황색포도상구균, 살모넬라, 쉬겔라 등 5종 검출 키트로 10분 이내 검출 가능하며 각 키트는 교차반응이 없거나 약하고 검출한계는 약 <math>10^5</math> CFU/mL이었음.</li> <li>• 상품화하여 내수 및 수출의 기반을 마련함</li> </ul> </li> <li>6. 개발된 신속진단 키트들의 검증: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 인위오염시킨 농산물 시료에서 개발된 진단 키트들의 세균 검출 성능을 국제적 공인 방법인 AOAC법으로 검증을 수행한 결과, 기존 배지배양법과 비교하여 개발된 키트들의 성능이 동등하거나 더 우수하였음.</li> <li>• 키트들의 검증을 위한 AOAC 기반 사용자 프로토콜을 개발하였음</li> </ul> </li> </ol>		



	<p>7. 대상 식중독균으로 서울시 보건환경연구원(10종) 및 건국대 자체 모니터링 (7종)을 총 2년간 수행하였는데, 국내외 자료조사결과와 마찬가지로 거의 검출이 되지 않았음.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 이에 따라, 농산물 시료 간 미생물 오염도를 비교하기 위하여 일반세균, 대장균군, 바실러스를 대상으로 조사한 결과, 바실러스 경우 일반제품보다 유기농제품에서 또는 마트 제품보다 농장 시료에서 오염률이 더 높았음.</li> </ul> <p>8. 다소비 농산물에 대한 세균 오염률 조사 및 기준규격(안)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 다소비 농산물에 대한 생산/보관/유통/소비 과정 중 위해 식중독 세균 오염률 조사 - 유통 농산물에서의 식중독균 검출률은 극히 낮음</li> <li>• 신선농산물에서 식중독 세균의 국내·외 기준규격 조사 및 국내 기준·규격(안): 유통농산물 식중독 세균 기준 규격(안)을 설정하기 위해 다양한 국가(호주, 캐나다, 아일랜드, 홍콩, 뉴질랜드, 유럽연합)의 기준을 조사함.</li> <li>• 모니터링 결과와 함께 ICMSF의 n, c, m, M 기준 설정원칙에 현재까지 진행된 농산물 모니터링 결과와 앞서 진행된 국제적인 미생물 기준을 적용하여 유통농산물에 오염가능성이 있는 7종 식중독 세균에 대한 개별 규격안을 제시하였음.</li> </ul> <p>❖ 연구개발 성과 : 논문 총14편(SCI 9, 비SCI 5) 및 학술대회 11편, 특허 16건(출원 13건, 등록 3건), 기술실시 2건, 상품화 9건, 인력고용 1건, 인력양성 3건, 전시참가 3건</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>1. 기술적·과학적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 식중독세균에 대한 선택 증균배지 및 신속검출기술 개발의 원천기술 확보 및 신속검출 기술을 개발하여 국산화 및 수출에 기여</li> <li>• 신속 증균배지, 세균 농축기술, 신속 DNA 추출기술, 신속진단기술 등을 표준화된 검출기법과 융합하여 검출시간과 정확도 개선 및 사용자 편의성을 증대한 one-step 진단 시스템 기술을 개발</li> <li>• 국제규격의 시험법 도입과 과학적 검증(AOAC 기반 검증법)을 통한 선진 국형 시험법 확립</li> <li>• 유통농산물의 식중독검사법, 검사 절차 매뉴얼, 위생관리 방안의 수립에 기여</li> </ul> <p>2. 경제적·산업적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 식중독세균 신속진단·검출법의 산업화를 통해 국내 BT 산업 활성화 기대</li> <li>• 개발된 식중독 검출 키트의 국내·외 판매를 통한 고용 및 외화 수입 기대</li> <li>• 공인시험법을 사용하여 품질 관리된 식품 생산을 유도 국민 건강 향상 기대</li> <li>• 사용자 편의 신속 검출법을 통해 생산자의 자발적 식품 검사 기대</li> </ul>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>식품 위생</p>	<p>식중독 세균</p>	<p>신속 검사법</p>	<p>실시간 PCR</p>	<p>면역진단 키트</p>

## 5. 영문 요약문 <SUMMARY>

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Development of export type rapid detection kits for foodborne pathogens to improve the safety of commercial fresh produce.</li> <li>• 7 target foodborne pathogens: <i>Bacillus cereus</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Enterohaemorrhagic E. coli</i> (EHEC), <i>Salmonella spp.</i>, <i>Shigella spp.</i>, and <i>Campylobacter jejuni</i>.</li> <li>• Developments of new enrichment media, immunomagnetic separation systems (IMS), DNA extraction methods, real-time PCR kits and immuno-rapid kits for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria, and their application in agricultural produce and Validation of developed kits using AOAC validation method.</li> <li>• Development of microbiological protocols and guidelines for detection of foodborne pathogenic bacteria in food and fresh produce.</li> </ul>					
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>• New developed enrichment media can be used to decrease the growth time of pathogens to reach <math>10^{4-6}</math> cfu/mL within 6 to 8 hours in stressed environment.</li> <li>• Immunomagnetic separation methods were developed for specific and efficient separation of 7 pathogens respectively, and under optimal conditions, the capture efficiencies (CE) ranged from 50% to 95% for <math>10^0-10^5</math> CFU/mL of target pathogens among high numbers of other competing bacteria in food or fresh produce.</li> <li>• Multiplex real-time PCR kits were developed to simultaneously detect 7 pathogens with 100 minutes of performance time, lower than <math>10^1</math> copy/<math>\mu</math>L of detection limits, and 100% of sensitivity and specificity among 51 tested bacterial strains.</li> <li>• Immuno-rapid kit were developed for 5 pathogens respectively with 10 minutes of immunoreaction time, about <math>10^5</math> CFU/mL of detection limits, and 100% of sensitivity and specificity among tested bacterial strains.</li> <li>• Validation of developed kits based on AOAC method in artificially inoculated fresh produce showed the developed kits gave similar or better detection abilities when compared to conventional media culture methods.</li> <li>• The results of screening foodborne pathogens in 20 kinds of fresh produce for 2 years showed that almost no pathogens were detected except <i>B. cereus</i>. and new microbiological criteria and guidelines for detecting foodborne pathogens were suggested for food safety.</li> </ul>					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Development and improvement for rapid detection methods of foodborne pathogens within a day in the agriculture, food industry, and human health fields.</li> <li>• Contributinal effort to the related research area and education for research scientists: providing the high technology of rapid detection fields</li> </ul>					
Keywords	Food safety	foodborne pathogenic bacteria	detection methods	real-time PCR	Immuno-rapid kit	

## <Contents>

1. Overview of the research project .....	1
2. Status of domestic and international technology development .....	12
3. Contents and results of research performance .....	16
3.1 Development of new enrichment media for foodborne pathogenic bacteria I ..	25
3.2 Development of new enrichment media for foodborne pathogenic bacteria II ·	74
3.3 Development of immunomagnetic separation system (IMS) .....	111
3.4 Development of highly efficient DNA extraction system .....	159
3.5 Development of real-time PCR for detecting foodborne pathogenic bacteria ..	190
3.6 Development of multiplex real-time PCR Kit and its commercialization .....	217
3.7 Development of immuno-rapid Kit and its commercialization .....	270
3.8 Validation of developed kits using AOAC method .....	317
3.9 Development of new microbiological criteria and guidelines for food safety ..	372
4. Goal performance index and contribution to interdisciplinary research area ..	426
5. Significance and future plan of research .....	433
6. Foreign science and technology information .....	435
7. Security level of the research .....	439
8. Status of research facility and equipment registered in the National Science and Technology Information System .....	439
9. Safety measure of the research laboratory .....	439
10. Major research capabilities and performance .....	440
11. Miscellaneous .....	442
12. Reference .....	443

## 〈 목 차 〉

1장	연구개발 과제의 개요 .....	1
2장	국내외 기술 개발 현황 .....	12
3장	연구개발 수행 내용 및 결과 .....	16
1절	식중독 세균 그람양성 3종에 대한 신속 증균배지 개발 .....	25
2절	식중독 세균 그람음성 4종에 대한 신속 증균배지 개발 .....	74
3절	식중독 세균 농축 및 정제 시스템 개발 .....	111
4절	식중독 세균 고효율 DNA 추출 기술 개발 .....	159
5절	식중독 세균 검출용 real-time PCR 개발, 농산물 적용 및 검출한계 .....	190
6절	식중독 세균 신속진단 multiplex real-time PCR 키트 개발 및 상용화 .....	217
7절	식중독 세균 신속진단 면역 래피드 키트 개발 및 상용화 .....	270
8절	개발된 신속진단 키트들의 AOAC 기반 성능 검증 평가 .....	317
9절	유통 농산물에서 식중독 세균 오염률 조사 및 기준 규격 개선안 제시 .....	372
4장	연구개발 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도 .....	426
5장	연구개발 결과의 활용 계획 .....	433
6장	연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	435
7장	연구개발결과의 보안등급 .....	439
8장	국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황 .....	439
9장	연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	439
10장	연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	440
11장	기타사항 .....	442
12장	참고문헌 .....	443

# 1. 연구개발 과제의 개요

코드번호

D-03

## 1. 연구개발 목적

- 다양한 생산방식(친환경, 유기농업 등)에 의해 생산되는 농산물 중 미생물 오염 가능성이 있는 유통 농산물의 위생 강화를 위한 수출형 식중독균 신속검사 kit(8시간 이내 : 6+2시스템) 개발 및 농산물 식중독 사고 사전예방 안전관리 대책 확립

## 2. 연구개발의 필요성

### 가. 식중독의 발생의 증가와 식중독균 검출의 중요성

- 신속정확한 식중독세균의 검사는 농산물 HACCP 및 GAP 시스템의 효율적인 운영과 안전한 농산물 생산-소비와 국산 농산물의 경쟁력 향상에 매우 중요
- 식중독균 검출 시장은 증가가 예상되어 국내기술의 확보로 바이오산업 발전과 수출증대에 기여할 수 있음
- 산업이 발전하고 수입 자유화에 따른 식품 교역량이 늘어나면서 세계적으로 식품유래성 질병이 늘어나고 있음.
- 식중독이란 ‘식품 또는 물의 섭취에 의해 발생되었거나 발생된 것으로 생각되는 감염성 또는 독소형 질환’을 의미함.
- 식품위생법상 집단 식중독은 역학적 조사결과 식품 또는 물이 질병의 원인으로 확인된 경우로서 동일한 식품이나 동일한 공급원의 물을 섭취한 경우 2인 이상의 사람이 유사한 질병을 경험한 사건으로 정의됨.
- 현재 식중독 검사는 발병 후 역학적으로 관련이 있는 식품에서 원인 물질이 검출되거나 환자 2인 이상에서 동일한 형태의 혈청형 또는 유전자형의 미생물이 검출되면 식중독으로 판정하고 있음.
- 하지만 식품의 경우 다양한 물질의 혼합물이기 때문에 검출에 어려움이 있으며, 다양한 원인 물질 검사 방법의 부족 및 극미량의 원인 물질로 검출에 제한이 있음.
- 특히 채래식 방법을 통한 식품 유해물질 검사는 아직도 높은 비용과 오랜 시간(2-5일 이상)을 요구하는 노동 집약적인 방법이 사용되는 경우가 많아서 신속 정확한 검사방법 개발이 시급함.
- 식품검사의 수요증가에 맞추어 신속 검사키트의 수요도 증가하고 있으며 일선 위생담당자들의 검사능력에도 직접적인 관계가 있음.
- 식중독 사고의 예방과 진단, 역학 조사는 신속·정확한 표준화된 미생물 시험법이 전제.

- 식중독 원인균에 대한 표준화된 검출법을 통한 식품안전 관리는 생산자의 자발적인 검사 시스템을 유도하고 국민의 신뢰도를 획득할 수 있음.

#### 나. 농산물에서 식중독 발생 증가

- 신선농산물 섭취의 기하급수적인 증가
- 최근 발생하는 식중독 사고는 대부분 신선 농산물과 관계가 있음
- 농산물에서 식중독세균은 열처리 기공, 바이오필름 등 농산물 표면 깊숙이 부착되어 있어 세척살균에 저항성이 있고 검사를 위한 탈리도 어려움
- 세계무역기구(WTO)체제의 출범으로 농산물과 가공식품의 생산과 교역은 더욱 활발해짐.
- 국가간 무역보호 장벽이 무너지고 위생 및 검역협정 (Agreement on the Application of the Sanitary and Phytosanitary Measure, SPS)이 발효됨.
- 최근 웰빙 열풍을 타고 농산물에 대한 소비자의 수요가 국내외적으로 급증하는 추세임
- 그러나 농산물의 경우 식중독균이 육류 등에 비해 상대적으로 적음에도 불구하고 별도의 가열조리 없이 섭취되므로, 높은 위해도를 가지고 있음.
- 우리나라 원인식품별 식중독 발생 건수 및 환자수('12년)는 야채류 및 그 가공품(24건, 1,546명), 어패류 및 그 가공품(16건, 326명), 복합조리식품(9건, 157명), 육류 및 그 가공품(6건, 231명)로 “야채류 및 그 가공품”에서 가장 높은 발생빈도를 보이고 있으며, 유기농 농산물에 대한 소비자의 수요가 급증하고 있음.

#### 다. 농산물에서의 새로운 수출형 신속검출 기술 개발의 필요성

##### (1) 식품에서의 신속검출기법의 적용 증가

- 최근 HACCP, GAP등 농산물 위생관리 시스템에 있어서 가장 중요한 부분은 식중독 미생물의 정확한 검출이라고 할 수 있음.
- 현재 세균의 검출은 배지검출법을 표준화된 방법으로 예비중균배양, 선택중균배양, 선택배지배양 후 생화학적인 동정 검사, 면역학적 검사 등을 거쳐 5-10일 정도가 소요되는 비효율적인 방법임.
- 따라서 최근 식품에서는 신속검출기술을 기반으로 한 검출법이 증가하고 있음.
- 칩, 바이오센서, 마이크로 어레이, 나노입자, 라만센서 법 등 첨단기술을 활용한 식중독세균 검출기술이 개발되었으나 다양하고 복잡한 매트릭스를 지니고 있는 식품에서의 실용가능성이 문제가 되어 상용화된 제품은 전무함.

- 현재까지 개발되어 실용화 및 상용화된 신속검출기법은 주로 항원-항체 반응을 사용한 면역기법과 DNA나 RNA정보를 이용한 유전자기법이 주된 방법이고 분석시간도 20분에서 2시간이내여서 신속검사법의 범주에 든다고 할 수 있음.
- 또한, 현재 대부분의 신속검출기법은 24-48시간 내로 증균하고, 이후 3시간 미만의 신속검출기법을 적용하여 균을 검출하는 시스템임.
- 다만, 유전자 기법과 면역기법도 식품에서 검출한계 세균수가 높아( $10^3$ - $10^5$  CFU/g) 이상) 낮은 세균수(100 CFU/g 이하)로 농산물에 오염되어 있는 식중독세균을 증균과정 없이 검출할 수는 없어 검출한계 이상으로 식중독세균 수를 신속하게 증균하는 기술이 전제되어야 진정한 의미의 신속검출법이라고 할 수 있음.
- 따라서, 검출한계 이상으로 목표 식중독세균을 6시간 이내에 증균할 수 있는 증균배지 시스템이 개발될 경우 유전자기법과 면역기법은 시간과 노동력을 단축하면서 8 시간 내에 세균을 높은 민감도를 가지고 검출할 수 있다는 장점이 있어 그 개발의 필요성이 증대하고 있음.
- 그러나, 최근에는 8시간 이내 증균 후 검출하는 시스템이 도입되어, 실제 검출현장에서 많이 활용되고 있음.
- 총 소요시간은 증균 8시간 정도, 신속검출 2-3시간 이내로, 총 12시간 내에 신속검출이 가능함.
- 특히 항체가 코팅된 Magnetic bead를 활용한 FDLB Pathtrix의 경우, 5시간 이내로 증균하고, 3시간 이내로 검출하여, 총 8시간 이내로 검출이 가능하고, 검출한계는 25 g에서 2 CFU 이내임.

## (2) 농산물에서 적용하기 힘든 신속검출기법

- 그러나, 현행 사용되는 대부분의 배지검출법 및 신속검출법은 신선야채류, 채소류와 같이 같이 정상세균총이 높은 수준으로 존재하는 식품의 경우 배지검출법은 물론 PCR 방법과 같은 신속검출법의 검출능력이 현저하게 감소함.
- 농산물은 매트릭스가 다양하고, 정상세균총의 수준이 높아(g 당 6-7 log CFU 수준) 일반 배지검출법은 물론이고 신속기법으로도 검출이 잘 되지 않는 경우가 많음.
- 특히 농산물에 있는 정상세균총의 경우, 증균 과정에서 목적하는 균을 억제하는 inhibitor로 작용하는 경우가 많아, 원하는 균의 선택적인 증균 배양이 어려움.
- 이러한 경우 목적균이 검출한계 이하로 자라게 되어, 검출감도가 좋은 신속검출기법을 사용하더라도 정확하고 빠르게 검출할 수 없음.
- 또한 농산물 자체가 가지고 있는 형광 background가 많아 형광기반의 센서기술을 적용하기에도 어려움이 많음.

- 특히 농산물의 경우 다른 식품과 달리 검출시간이 오래 걸리면 원료품의 신선도가 하락할 우려가 있으므로 신속 정확한 농산물 내 검출법의 개발 및 개선이 절실한 상황임.
- 실제 다양한 농산물에서 개발된 키트를 사용하여 검출하였을 때, 면역학적 키트는 대단히 낮은 검출능력을 보였으며, qPCR의 경우에도 특정 농산물에서는 검출률이 낮았음.
- 위에서 언급한 8시간 이내 혹은 12시간 이내의 검출법을 야채에서 적용하였을 때, 대부분 좋지 않은 검출률을 보였으며, 검출률이 좋은 경우에도 특정 농산물에서는(Lollo Rosa 등) 검출률이 떨어지는 것이 연구를 통해 확인되었음.
- 식품검사 시장의 기하급수적인 성장과 생명공학 기술의 발달로 첨단기술을 탑재한 식품 유해물질 진단 키트가 지속적으로 개발되고 있음. 야채는 매트릭스가 복잡하고 세균총이 많아 균의 검출이 어려움에도 농산물을 대상으로 한 키트는 개발되지 않은 상태임.
- 신선도가 생명인 농산물에서의 검사를 위해 8시간 이내로 증균 및 신속검출이 가능한 키트를 개발해야 함.
- 상용화된 검사 키트를 공정한 검증을 거쳐 사려 깊게 사용한다면 비용, 시간, 노동력 절감이라는 일석삼조의 경제적 효과를 얻을 수 있을 것임.
- 특히 식중독 세균 검사키트는 대부분 수입에 의존하고 있어 국산화가 시급함.
- 해당 연구를 통해 국산 식품 유해물질 진단 산업을 활성화 시키는 발판을 마련할 수 있을 것이며 BT 산업 발전은 수출 분야에서도 큰 몫을 차지하게 될 것임.
- 면역학적 기법과 PCR의 검출한계를 개선하는 것은 한계가 있으므로, 8시간 이내로 농산물 내의 식중독 균 검출을 위해서는 새로운 증균배지의 개발, 새로운 전처리 기법의 개발이 함께 이루어져야 함.

#### 라. 농산물에서의 수출형 신속검출 키트 개발의 단계

- 기존의 분석방법으로 그 결과를 얻기까지 원료품의 신선도가 하락할 우려가 있으며 완제품의 유효기간을 낭비할 수밖에 없는 상황이어서 신속 정확한 식품 유해물질 검사키트 사용의 활성화가 시급함.
- 현재 Q-PCR 키트를 비롯한 다양한 분자생물학적, 면역학적 키트가 개발되었으나 농산물에 최적화된 검출키트는 개발이 되지 않았음.
- 농산물의 특성이 고려된 증균, 전처리, 검출 일원화(one-step) 키트가 개발되면 일선 현장에서 검출자의 편의에 맞게 용이하게 사용할 수 있을 뿐 아니라, 농산물에서 8-12시간 이내에 신속하게 균을 검출하는 효과를 누릴 수 있을 것으로 판단됨.
- 특히 이러한 키트의 개발을 위해서는 증균배지, 전처리 기술의 개발 및 개선 외에도 PCR 및 면역키트 등 분자유전학적, 면역학적 검출기법의 개선과 이를 활용한 검출키트



의 개발이 동시에 이루어져야 함.

### (1) 농산물에서의 오염도 조사 및 단계별 오염률 분석의 필요성

- 농산물은 유통기간이 짧고 냉장유통되어야 신선함이 유지되어 보관, 수송 관리가 중요함.
- 특히 종류가 매우 다양하고, 농산물마다 가지고 있는 정상세균총의 종류와 성상이 제각각이어서 특성을 분석하여 이를 바탕으로 다소비 농산물을 중심으로 한 위생관리 및 식중독 균 오염 저감화를 위한 제어방안이 필요함.

### (2) 증균배지 개발의 필요성

- 식중독 세균의 검출에 있어서 PCR이나 ELISA, Biosensor 등을 이용한 여러 가지 신속 검출기법이 증가하고 있으나 이러한 신속검출기법을 적용하기 위해서는 손상된 세포를 선택적으로 적절히 회복시킬 수 있는 증균배지의 개발이 필수적임.
- 식중독 세균을 어느 샘플(인체분변, 동물분변, 식품, 물, 환경, 토양)에서 검출하느냐에 따라 그 민감도와 특이도에 있어서 검출법마다 현저한 차이를 보임. 특히 균수가 많고 손상된 세포(injured cell)이 적은 분변에서는 식중독균의 검출이 쉬우나 성장(matrix)이 다양하고 산도, 온도, 수분활성도등의 다양한 요소가 개입되는 농산물에서는 정상세균총이 높은 수준으로 증식해 원하는 식중독균의 선택적 증균이 쉽지 않음.
- 따라서, 식중독균은 손상된 세균을 회복시키는 증균과정을 필수적으로 거쳐야하며 그렇지 않을 경우, 손상된 세균은 검출되지 않을 확률이 높음.
- 특히 농산물에서는 정상세균총을 효과적으로 억제하고 스트레스 상태에 있는 세균을 선택적으로 증식시킬 수 있는 선택성과 우수한 회복력을 지닌 증균배지의 개발이 절대적임.
- 세계적으로 신속하고 높은 민감도로 세균을 증균할 수 있는 배지의 개발에 대한 연구가 시행되고 있으며 이렇게 개발된 배지는 ISO나 FDA/BAM 등 다양한 공인검출법에서 높은 민감도와 선택성을 승인받아 사용되고 있는 경우가 많음
- 현재 대부분 면역학적, 혹은 PCR 키트 등에는 증균배지가 함께 포함된 one-step kit가 많은데, 이러한 대부분의 키트는 24-48시간을 증균시간으로 함.
- 따라서, 선택성과 빠른 균의 회복력을 갖춘 증균배지의 개발이 8시간 이내 신속검출 기법 개발의 핵심임.
- 최근에는 다양한 식중독 세균을 한번에 검출가능한 시스템(multipathogen platforms) 구축을 위해 Universal preenrichment broth(동시증균배지)에 대한 관심도 높아졌음.
- Bailey and Cox는 최초로 Universal pre-enrichment broth를 개발하여 두 가지 이상의 균을 하나의 증균배지에서 증균할 수 있도록 하였음(문헌). 이러한 배지들은 다양하게 개

발되고 상업화되어 현재 Difco 등에서는 두가지의 균을 동시에 선택증균 가능한 Universal pre-enrichment broth등을 시판하고 있음. 최근에는 *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7을 한꺼번에 선택증균 가능한 SEL broth도 개발되었음.

- Universal pre-enrichment broth의 경우, 증균후 바로 multiplex PCR, protein/antibody microarray biosensors, array-based immunosorbent assays, DNA microarray method 등의 최신 검출기법을 통해 한 번에 여러 가지 식중독균의 검출이 가능함.
- 이러한 검출시스템은 빠르고 정확한 식중독의 역학조사를 가능하게 하며, 최소한의 노동력과 시간으로 식품 내 식중독균을 검출할 수 있게 함.
- 샘플마다 다르겠지만 이러한 배지는 mL당 10 cfu 수준의 균도 검출가능한 수준으로 적절하게 증균 가능한 것으로 알려져 있음.

### (3) 최적화된 전처리 방법 개발의 필요성

- 신속검출기법을 적용하는 경우에도, 식중독 위해인자는 농산물에서 매우 낮은 양으로 오염되어 있고 스트레스로 인해 증식하지 않는 경우도 많으며 시료 내에 비균질하게 오염되어 있어 신속한 검출을 위해서는 탈리, 정제, 농축 등의 전처리 과정이 필요함.
- 최적의 샘플 처리과정은, 1) 샘플에서 얻어낼 수 있는 위해인자의 양이 최대여야 하며, 2) 세포독성이 있는 물질이나 PCR inhibitor가 제거되어야 함.
- 특히 농산물에서의 신속검출전 시료 전처리는 증균 후 적절한 정제/농축과정 없이는 불가능함.

#### (가) 농축 및 정제 기법의 개발

- 신속검출법 적용을 위해서는 검출법 이전까지 손실(loss)을 최소화해야 하며 위해인자의 농축 및 정제를 수행해야 하며 그 방법은 다음과 같음.
- 한편 현재 식중독 검출 기술에서 가장 널리 사용되는 농축 및 정제 기술은 immunomagnetic bead separation (IMS)를 사용한 기술로서 실제 많은 공인검출법에서 사용하고 있을 정도로 검증된 방법임.
- Immunomagnetic bead(IMB, 면역자기구슬)을 부착인자로 활용하는데 IMB에 항체를 부착시키고 자기력을 이용하여 IMB만을 선택적으로 분리하는 균의 분리-농축 방법임.
- IMS 방법을 거치는 경우 균이 농축되어 원하는 균을 효율적으로 분리할 수 있음.
- 실제 미국 FDA BAM이나 USDA FSIS 같은 선진국의 공인검출법에는 신속검출 이전에 등을 활용하여 정제 및 농축과정을 거치고 있음.

- IMS 방법은 항원-항체 반응을 이용하기 때문에 민감도와 특이도가 다른 방법에 비해 대단히 높아 식품의 정상 및 정상세균총 수준 등에 관계없이 높은 효율을 보이고 있음.
- 그러나 IMS 방법은 항원-항체 반응을 사용하는데 있어서, 항체의 수입은 절차가 까다롭고, 어떤 항체를 쓰느냐에 따라 민감도가 제한되는 경우가 많음.
- 또한 *Salmonella*, *E. coli* O157, 리스테리아 등 주요 식중독균 위주로 제한적으로 개발되었고 생산비용 측면에 있어서 개선의 필요성이 있음.

#### (나) 핵산추출기술의 개발

- 핵산 추출법은 주요 전처리 과정중 하나로서 다양한 원리를 이용하여 적용되나 최근에는 키트를 사용하여 검출하는 경우가 많음.
- 핵산추출 시, 자동화된 방법을 사용함으로써 시간과 노동력을 크게 줄일 수 있으며 관련된 방법이 지속적으로 개발되고 있음.
- 핵산분석방법의 장점은 급성기 이후에도 100 particle/ml보다 작은 농도의 환자의 분변에서뿐만 아니라 4°C에서 여러 달, -70°C에서 여러 해 봉안 보관된 샘플에서도 검출이 가능하다는 것임.
- 최근에는 다양한 자동화 기계를 사용한 핵산추출법이 적용되어 짧은 시간에 빠르게 식품 내 병원성 인자의 핵산을 추출하고 있음.

#### (다) 수출형 Q-PCR 기반 키트의 개발

- PCR은 내열성 DNA 중합효소를 이용하여 시험관내에서 DNA 혹은 RNA(cDNA)를 대량으로 증폭시키는 기술로 이론적으로는 한 가닥의 template DNA를 검출할 수 있을 정도로 감도가 높은 방법.
- 1980년대 개발된 이래 생명공학뿐만 아니라 범죄사건 등을 해결하는 학문인 forensic science 등에도 쓰일 정도로 널리 이용됨.
- 특히 병원균에 특이적으로 존재하는 DNA 정보를 사용하여 목표하는 세균을 검출할 수 있어서 식품위생 분야에 널리 사용됨.
- 제 3세대 PCR인 Real-time PCR (실시간 PCR)은 1990년대 후반에 소개되어 2000년대 들어서 기하급수적으로 그 사용빈도가 높아짐.
- 이는 목표하는 유전자에 특이적으로 결합하는 primers 이외에 형광물질을 부착한 probe를 추가로 사용하여 PCR 증폭과정을 실시간으로 모니터링 하는 방법.
- Real-time PCR의 장점

- ◆ PCR 증폭과정을 실시간으로 모니터링 가능
- ◆ 추가적인 전기영동 확인 과정이 필요 없음
- ◆ 신속성 : 1시간 이내 검사 완료
- ◆ 특이성 : Real-time PCR의 경우 Primers이외에 Probe의 특이성 추가
- ◆ 민감성 : 이론적으로 1 CFU
- ◆ 효율성 : PCR기기와 시약의 자동화와 키트화로 사용이 편리하고 많은 샘플가능
- ◆ 정량시험 : Ct 값과 균수(혹은 DNA 양)과의 관계를 이용하여 정량시험 - 가장 큰 장점
- ◆ 복수균검출능 (multiplex PCR) : Probe의 형광물질 색을 복수로 사용 다수의 병원균 동시검출
- 특히 병원균에 특이적으로 존재하는 DNA 정보를 사용하여 목표하는 세균을 검출할 수 있어서 식품위생 분야에 널리 사용됨.
- PCR 기법 등 유전자 정보를 이용하여 상품화된 식중독균 진단키트 중 많은 제품들이 미국과 캐나다 등의 선진국에서 공식 시험법으로 채택되어 있음.
- 한편 기존에는 multiplex qPCR이 가장 선호되는 방법으로 사용되었으나, 96 well- 혹은 384 well- 최근에는 1,536 well- qPCR까지 나오면서 다양한 well을 활용한 qPCR이 각광받게 되었음.
- 특히 multiplex qPCR의 경우, 다른 형광스펙트럼을 잡는 real-time 기반에서는 triplex 이상 어려운 점이 있고, 하나의 well에 희석된 농도의 master mix 등이 들어가 반응이 약해지는 단점이 있음.
- 따라서, 7종의 병원성 세균, 혹은 다종의 독소는 각각 다른 well을 사용하는 방법을 활용한다면 하나의 plate에서 동시적인 검출이 가능함.
- 현재 Q-PCR은 인체 유전자 발현 규명 및 암진단 등에서 사용되고 있으나 10여종의 병원성 세균과 toxin을 대상으로 개발된 상품이 없음.

#### (라) 수출형 면역키트 개발의 필요성

- 최근 ELISA, EIA, Ab-ppt 등을 활용한 다양한 종류의 면역화학적 기법이 개발되고 있음.
- 자동화된 ELISA system인 VIDAS 등을 비롯하여 다양한 신속간이 검출키트가 ISO나 AOAC 등에서 공인되어 상용화 되고 있음.
- 국내에서는 살모넬라를 대상으로 한 키트는 부분적으로 개발되었으나, 이외의 것은 개발되어 일선현장에서 상용화 된 것이 없고, 특히 농산물을 대상으로 한 신속검출키트의 개

받은 전무하여 해당 기술의 국산화가 시급함.

- 면역키트의 사용을 결정짓는 것은 가격과 일선 현장에서의 사용편이성, 검출감도 등임
- 본 팀에서는 살모넬라 엔터리티디스를 타겟으로 하여 면역키트를 개발하였으며, (주)코젠 바이오텍 등에서는 살모넬라를 타겟으로 하여 개발된 상용화 키트가 있음.
- 특히 본 팀의 협동기관인 (주)래피젠은 항원만 탐색되면 이를 기반으로 한 키트의 개발, 제작에 있어 국내 최고의 기술수준을 가지고 있음.
- 현재 뎅기열, 말라리아, 디스토펜 등 인의 혹은 수의 기반 신속간이키트를 개발하여 국내 외적으로 널리 판매하고 있으며, 이 기반기술을 본 연구에 활용하여 식중독 9균에 대한 신속간이키트를 개발할 예정임.

#### (마) 개발된 기술의 검증 필요성 - AOAC 혹은 Field test

- 미생물 시험법은 국내 유통 식품 종류별, 사용된 배지, 시약, 확인 방법 등에 대해 과학적인 평가(evaluation)나 검증(validation) 과정을 거쳐서 표준방법의 대체 방법으로 사용되어져야함.
- 더욱이 식품 수출입 양이 증가함에 따라 검사량도 증가하고 있는데 검사의 국제적 신뢰도와 공정성 확보를 위해서 사용되는 검사방법에 대해서 공인 평가(evaluation) · 검증(validation) 과정을 거쳐야 함.
- 검사업무를 담당하고 있는 미국 FDA나 USDA 그리고 캐나다의 Health Canada는 첨단 기술을 사용한 진단키트나 유전자 기법의 사용을 권장하고 있음.
- 프랑스, 캐나다, 미국 등에서는 식품검사에 상용되는 키트에 대한 허가나 인증은 의료용 진단키트와는 달리 허가기관의 허가를 승인받는 시스템이 아님.
- 다만 사용하는 식품검사 방법은 공신력을 갖기 위하여 반드시 소정의 검증을 거쳐 효용성이 증명된 방법만을 공식법으로 채택·사용함.
- 자체 개발을 위해서는 많은 연구 인력과 다년간의 연구기간이 필요하고 진단키트 개발회사들이 우수한 제품들을 제조하기 때문에 미국이나 캐나다의 식품안전 행정기관에서는 상용화된 제품들을 Validation하여 공식법으로 채택하는 경우가 대부분임.
- 이 중 신속 검사법의 검증을 담당하는 기관은 AFNOR, Rapid AOAC Official Methods, AOAC Performance Tested Methods, Certification Reports, MicroVal, NordVal 등임.
- 유럽에서도 Q-PCR 방법과 같은 새로운 식중독 원인균 검출 방법이 활발히 개발되어 왔으며 표준화 방법으로 채택되기 위해서는 CEN (Comite Europeen de Normalisation)의 인증을 받아야 함.
- 이와 같이 더욱 적합한 샘플링법, 새로운 선택배지, 신속검출법 등이 현재도 꾸준히 개발되고

있으며 미국 FDA나 USDA등에서는 검증을 통해 적극적으로 공인 검사법으로 이용하고 있음.

- AOAC, CEN, AFNOR, DIN 등과 같은 국제공인 검증기관에서 심도 있는 평가 과정을 거쳐서 각 단계별 검증 증서를 받아 제품에 명시함.
- 신속 검출법 및 시험법이 개발될 경우 AOAC validation법 등 세계적인 공인시험법에 준하여 검증을 실시하여야 함.
- 본 연구팀에서는 2006년도 수행된 과제를 통해 AOAC 가이드라인에 기초한 식품의약품 안전청 시험법검증 가이드라인을 확립하였음.
- 또한 이를 기반으로 각종 과제와 연구논문에서 AOAC 가이드라인을 이용한 validation 시험을 수행하여 이 분야에 국내 최고의 노하우를 가지고 있음.

#### (바) 농산물에서의 검출법 표준화 및 신속검출 매뉴얼 개발의 필요성

- 농산물은 균의 검출이 어려워 농산물 고유의 특성을 고려하여 검출법을 확립해야 함.
- 농산물의 신선도 하락 우려에 따른 제한된 검출시간을 고려했을 때, 신속검출법을 기반으로 한 농산물 대상의 검출기법 표준화가 요구됨.
- 국내의 검출법은 식품(식품공전) 혹은 축산식품(축산물의 가공기준 및 성분규격)을 대상으로 하고 있으며 농산물을 대상으로 한 검출기법의 표준화는 이루어지지 않았음.
- 미국 FDA BAM 검출법 등에서는 농산물 시료일 경우 시료의 양을 늘이거나, 배양시간을 조절하는 식으로 농산물에 대한 검출법의 차이를 두고 있음.
- 시료 채취 및 전처리 과정 등에 있어서 농산물의 전반적인 식중독 세균 검사/분리/동정을 위한 모니터링 표준화기법을 개발해야 함.
- 또한 이를 바탕으로 농산물의 유통 단계별 위생적 처리, 관리, 보관방법에 대한 식중독 위생관리 지침을 수립해야 함.
- 미국 USDA의 “Laboratory Guidebook” 의 *Salmonella* 검출 방법의 *Salmonella* 균 검출에 대한 내용을 보면 총 17페이지의 매뉴얼로 작성함으로써 배지 제조방법부터 혈청형 검사법 까지 자세히 서술되어있음.
- 또한 간단한 flow chart로 형식으로 도식화함으로써 검사자가 한눈에 알아보기 쉽게 되어있음.

### 3. 연구개발 범위

- 농산물 대상 식중독균 신속검사법(칩, 키트 등) 개발

: (목표) 현재 검사 소요기간 1.5 ~ 2.0일 ⇒ 최소 8시간(6+2 시스템) 이내 검사

: 다소비 농산물 20품목이상 대상으로 최소 7종 이상 식중독균을 검사할 수 있는 기기 개발

- 엽채류, 양념채소, 과일, 나물류, 김치채소, 샐러드용 채소 등 20종 이상의 다소비 농산물 대상
- 병원성대장균, 살모넬라, 리스테리아, 캄필로박터, 이질균, 황색포도상구균, 바실러스 등 농산물 관련 7대 식중독 세균 증균-농축-검사 등 신속검사 관련 기술 개발 및 상용화
- ◆ 식중독세균 6시간 이내 신속증균배지 개발
- ◆ 식중독세균 100배 농축시스템 개발 및 Kit화
- ◆ 식중독세균 고효율 항원 Extraction 시스템 개발 및 Kit화
- ◆ 식중독세균 고효율 DNA/RNA Extraction 시스템 개발 및 Kit화
- ◆ 20분 이내 검출 Immuno Kit 개발 및 상용화(내수 및 수출판매)
- ◆ 100분 이내 검출 식중독세균 동시 검출 Q-PCR Kit 개발 및 상용화(내수 및 수출판매)

○ 농산물 식중독검사법 검증 및 검사 절차 매뉴얼 개발

: (목표) 신속검사를 위한 표준절차 및 방법 확립 : 개발 기술을 활용 8시간 이내

⇒ (6시간 시료준비+2시간 검사) 시스템 개발

- ◆ AOAC Validation 기법을 사용한 개발 기술의 민감도/특이도/8시간 검사 등의 과학적인 검증
- ◆ FDA/BAM Manual을 벤치마킹한 Flow-Diagram식 사용자편이 검사 절차 매뉴얼 개발

○ 농산물에 의한 식중독 위생관리 개선방안 마련

: (목표) 생산/보관/유통/소비과정의 오염실태분석을 통한 식중독 위생관리 개선 내용 제시

- ◆ 농산물에서 식중독세균 검사/분리/동정을 위한 모니터링 표준화기법 개발 및 확립
- ◆ 생산/보관/유통/소비과정의 농산물 및 환경의 오염률 조사 및 단계별 오염원 조사
- ◆ 농산물 유통 단계별 위생적 처리, 관리 및 보관 방법 등 식중독 위생관리 지침 개발
- ◆ 유관기관 전문가자문위원회 개최(분기별 1회) : 농림부, 식약처, 시도보건환경연구원 등

## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

### 1. 국외 연구 및 기술개발 현황

- 생명공학 기술의 발전으로 식품 내 식중독균의 검출도 나날이 발전하고 있음. 식중독 원인균의 검사방법은 선택 (selective) 배지를 사용한 방법이 표준검출법으로 사용되나 생명공학 기술의 발달로 인해 식중독 원인균의 검출 방법도 다양화 되어 ELISA와 같은 면역기법, PCR과 같은 유전자 기법 등이 새롭게 개발되어 일상적으로 사용됨.
- 미국 FDA에서도 BAM 시험법에 유전자 기법과 신속검출법을 추가로 기재하는 등 미생물 시험법의 대 변혁기를 지나고 있음. 이러한 방법은 항원-항체 반응을 이용한 면역기법과 DNA/RNA 정보를 활용한 유전자기법으로 크게 양분됨.
- 면역기법은 ELISA, IMB 등이 널리 사용되고 있으나, 효율성 높은 항체의 생산이 필수적으로 이루어져야 함. 최근에는 높은 특이성, 안정성, 대량생산능력, 경제성 등의 장점을 가진 IgY를 활용한 다양한 면역화학 기법에 대한 연구가 활발.
- 유전자기법으로는 최근에 가장 연구가 많이 되고 있고 별도의 전기영동 과정 없이 실시간으로 결과를 알 수 있기 때문에 폭발적인 인기를 모으고 있는 Q-PCR 방법이 식중독 원인균 검출을 위해 가장 적합한 것으로 보고됨.
- 그러나, Q-PCR은 식중독 원인식품에서 실제 균주를 분리하는 검사법은 아니므로 신속하게 식중독 세균의 유무만을 판정하는 예비검사법(presumptive screening)으로 주로 활용되고 양성으로 판단되었을 경우에는 반드시 표준방법인 배지배양법을 활용하여 균을 분리해내야 하며 대부분 신속검사법과 동시에 사용되는 경우가 많음.
- 신속검출법과 전통 배지 검출법 모두 식품에서 검출한계가 대략 각각  $10^3$ - $10^5$  CFU/g수준이어서 식중독사고 원인균규명에 한계가 있고, 정량검출에 용이하지 못한 단점이 있어, IMB를 포함한 다양한 방법으로 세균을 분리-농축하는 기법들에 관한 연구가 활발하게 진행 중.
- 샘플의 특성과 시험법에 따라 보다 나은 시료준비 방법이 연구되고 크롬아가 개발, 기존배지의 개선 등 다양한 선택배지들이 개발되고 있으며 개발된 새로운 시험법이나 배지 등에 대해 기존 방법과의 비교 검증연구가 활발히 이루어지고 있음.
- 기존의 ELISA와 같은 면역기법이나 PCR(polymerase chain reaction)과 같은 유전자 기법 등의 신속검출 기법이 연구 개선되어 보다 간편하고 효과적인 결과를 기대할 수 있음.
- FDA의 식품검사업무를 담당하는 ORA(Office of Regulatory Affairs)의 실험실에서는 Q-PCR 기기를 갖추고 *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Vibrio*, Norovirus 등의 검출에 사용하기 위한 검출법 평가와 검증 과정을 거쳐 적극 활용함으로써 식품검사에 능동적으로 대처함.
- 새로운 검출방법은 AOAC에서 제정한 가이드라인에 따른 검증(validation) 과정을 거쳐 FDA BAM에 수록되어 공식적인 인증을 받음.



- 이렇게 인정받은 기법은 미국 FDA의 BAM과 USDA의 FSIS에도 유전자 기법과 신속검출기법이 적극적으로 채택되어 보다 신속하고 경제적인 식중독균의 관리에 기여하고 있음.
- 현재 PCR 기법 등 유전자 정보를 이용하여 상품화된 식중독균 진단키트 중 많은 제품들이 미국과 캐나다 등의 선진국에서 공식 시험법으로 채택되어 있음.
- 현재 식품에서 사용되는 신속검출 기법은 대부분 전처리 시간과 검출시간이 2시간 이내이나, 16-24시간 동안 예비증균을 하도록 명시하고 있음.
- 8시간 이내의 검출기술은 대장균 등을 중심으로 개발되었으나, 육류나 우유 등의 축산물 시료가 아닌 농산물 시료에서는 그 감도가 매우 떨어진다는 연구결과가 있음.

## 2. 국내 연구현황

- 국내에서도 배지의 개발, Q-PCR과 면역화학적 방법을 이용한 키트 등 식중독균 검출을 위한 다양한 방법이 개발되고 있으며 상품화되는 사례도 보고됨.
- 국내에서도 인공유전자인 PNA(peptide nucleic acid) 칩을 이용한 신선농산물에서의 식중독균 6균 검출기술을 개발하였고 증균을 이용하여 10시간내에 신속검출이 가능한 시스템을 개발하였음. 그러나 해당 기술에 대해서는 실제 다양한 농산물에서 추가적인 검증이 필요함.
- 2000년 3월에 설립된 "(주)코젠 바이오텍"은 식품위해물질 검출법 제조회사로는 가장 많은 제품을 출시하고 있음. (주)코젠바이오텍의 주력 품목은 14종의 식중독균 신속검출을 위한 Q-PCR 키트, GMO 판별 키트가 돋보이고 최근에 발생한 노로 바이러스 식중독 사고를 겨냥하여 노로 바이러스 Q-PCR 키트도 출시함.
- 그 외에도 신흥 벤처회사들이 앞 다투어 식중독 진단키트를 개발하고 있고 농림부의 ARPC 과제나 보건복지부의 보건의료기기 개발 과제를 통하여 학교 및 연구소 등에서 면역크로마토그래피를 이용한 스트립형 식중독 검출키트들이 개발되었음.

## 3. Real-time PCR을 이용한 foodborne pathogen 검출 기술 현황

- 질병관리본부에서 2009년 신종플루 발생시 Real-time PCR 기법을 검사에 이용하면서 국내에서 Real-time PCR을 이용한 다양한 연구 및 진단 사업이 본격화되었음.
- Real-time PCR법은 bacteria나 virus 등 감염성 질환의 원인이 되는 병원균의 검출에 있어서 기존의 배양법이나 면역학적 진단보다 정확하고 검사 시간이 짧으며, 민감도가 높다는 장점이 있어 다방면에서 응용되고 있음.
- 식품의약품안전처에서도 「식중독 이동차량 시험법」에서 신속한 원인조사를 위해 Real-time PCR 검출기법을 채택하여 사용하고 있음.

- 국내에서 코젠바이오텍, 씨젠, LG 생명과학, 솔젠트, 바이오니아, 인트론, 나노바이오시스 등의 분자진단 회사들에서 PCR 키트를 개발 및 상용화하고 있음.
- 이들 중 대부분이 인체 질병 또는 동물 질병 진단용 제품을 개발하고 있으며 코젠바이오텍, 인트론, 나노바이오시스 등의 회사들이 foodborne pathogen을 타겟으로 하는 제품 라인을 보유하고 있음.
- 이들 중 인트론은 conventional PCR 용 키트가 주를 이루고 있으며, 나노바이오시스의 제품은 singleplex Real-time PCR 제품이 다수라는 특징이 있음.
- 최근에는 씨젠이 PCR 및 Real-time PCR 기반 동시 다중 분자진단 원천 기술 개발에 성공함으로써 다중 진단 트렌드가 확산되고 있으며, 코젠바이오텍은 다년간의 multiplex Real-time PCR 노하우와 기술력을 바탕으로 이미 다수의 multiplex 검출용 제품을 보유하고 있으며 국내에서 분자 진단 시약 공급 확대 및 세계 분자 진단 시장으로의 진출을 목표로 기술 개발을 하고 있음.

#### 4. 국내외 식중독 세균 신속 검출을 위한 면역기반 키트들

- 국외로는 면역적인 기술을 활용하여 다양한 방법과 종류의 키트들이 실용화 되어있음.
- 반면 국내는 SD사에서 사람을 대상으로 진단하는 콜레라와 살모넬라 타이피 제품이 있고, 중검사에서 법정1종 감염병에 해당되는 식중독 균주 4종에 대한 진단혈청을 생산하고 있음.
- 이 제품은 순수 분리된 균주의 혈청형을 확인하는 제품으로서 검출시간은 짧으나 그 앞의 과정에서 균주분리 등의 일련의 작업이 있어야 하기에 본과제의 내용과는 부합되지 않음
- 아래 현재 시판되고 있는 국내외 식중독 세균 검출을 위한 면역기반 키트들의 예를 제시 하였음.

##### 가. 국내 식중독 세균 검출을 위한 면역기반 키트들

- (1) SD Cholera Ag kit, Standard Diagnostics, Inc, 대한민국, 검출기법: Immuno assay, 소요시간 : 증균후 10~20분, 검사가능균: *V. cholera*, *Salmonella typhi*; 인증 :
- (2) 진단혈청 제품: JOONGKYEON, Inc; Standard Diagnostics, Inc; 대한민국; immuno agglutination, 증균후 3min; *V. cholera*, *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella*; 인증 :

##### 나. 국외 식중독 세균 검출을 위한 면역기반 키트들

- (1) Reveal® Test kit for Listeria: Neogen; 미국; Immunochromatography; 8~42시간; *E.*

*coli*, *E. coli* O157:H7, *Listeria*, *Salmonella*; 인증 : AOAC

- (2) VIDAS(Vitek Immuno Diagnostic Assay System) : Biomerieux; 프랑스; Enzyme-Linked Fluorescent Immuno Assay; 24시간~48시간; *Staphylococcal enterotoxin*, *Salmonella*, *Listeria* spp, *E. coli* O157, *Campylobacter*; 인증 : ISO, AOAC
- (3) Rapid Chek; SDIX; 미국; Double antibody sandwich immunoassay; 8시간~48시간; *Salmonella*, *Listeria* spp, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter*; 인증 : AOAC
- (4) Transia Elisamatic II : Rasio Diagnostics; 스웨덴; Immunofluorescence; 24~48시간; ; *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli* O157, *Campylobacter*; 인증 : AFNOR, NordVal, AOAC
- (5) Latex Agglutination Test Kit : Oxoid UK, Microgen UK ; 영국; Rapid latex agglutination; 24~48시간; *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli* O157, *Campylobacter*, *S. aureus*, *Streptococcus*; 인증 : AOAC, AFNOR
- (6) BD BBL™ Test Kit : BD Difco; 미국; Rapid latex agglutination; 24~48시간; *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Streptococcus* spp
- (7) TECRA kit : 3M; 미국; Immuno Assay Kit; 18~48시간; *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli* O157, *Campylobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcal* Enterotoxin; 인증 : AOAC
- (8) Rapid Chek Assurance® EIA : Biocontrol system; 미국; Enzyme Immuno assay; 10~48시간; *Salmonella*, EHEC, *Listeria*; 인증 : AOAC
- (9) Transia Elisamatic II VIP® Gold : Biocontrol system; 미국; Lateral flow Immuno assay; 8~24시간; *Salmonella*, EHEC, *Listeria*; 인증 : AOAC, Health Canada MFLP

### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

#### 1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

##### 가. 연구개발의 최종목표

- 친환경 및 유기농업 등을 포함한 다양한 방식으로 생산되는 농산물 중 미생물 오염 가능성이 있는 유통 농산물의 위생 강화를 위한 수출형 식중독균 신속검사 키트(8시간 이내: 6+2시스템) 개발 및 농산물 식중독 사고 사전예방 안전관리 대책 확립

##### 나. 연구개발의 주요내용

##### 제1절 식중독 세균 3종에 대한 신속 증균배지의 개발

- *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* 3종에 대한 신속 증균배지들을 BHI 배지를 기본으로 생육인자들의 조성을 변화시켜 개발하고 이 개발된 증식배지들은 손상세포 회복능 및 농산물에서 세균 증식의 촉진 효과를 보였음
- 농산물 시료에 인위오염된 각 세균들은 개발된 증균배지에서 6시간 증균하면 접종한 세균수 약  $10^1$  cfu/mL에서  $10^{4-5}$  cfu/ml까지 증식함. 단, 리스테리아의 경우  $10^{3-4}$  cfu/ml까지 증식함.

##### 제2절 식중독 세균 4종에 대한 신속 증균배지의 개발

- 살모넬라 및 이질균의 경우 신속동시증균배지로 개발되어 검사 비용 절감 등 활용성이 높을 것으로 판단됨
- 대장균 O157:H7용 신속증균배지는 새로운 물질을 첨가하지 않고 기존조성비를 조정하여 개발되었기에 추후 검증이 용이할 것으로 판단됨
- 또한 추가연구를 통해 개발된 살모넬라 단일증균배지는 배지법에서의 검사시간을 하루 단축시킬 수 있어 활용도가 높을 것으로 판단됨
- 살모넬라, 이질균 및 병원성대장균 3종에 대한 신속동시증균 배지 및 캄필로박터(미호기성) 전용 증균배지를 개발하고 그 효능을 우수성을 입증하고 특허출원하였음

##### 제3절 식중독 세균의 농축 및 정제 시스템 개발

- 7종의 세균에 대한 면역자기분리법(IMS)을 개발하고 이를 농산물 속 세균 추출에 적용하여 PCR 키트 및 면역레피드 키트 등에 접목시 효과가 클 것으로 판단됨

- 각 IMB-항체에 따른 차이는 있으나 황색포도상구균(CE ≥90%), 병원성 대장균(CE ≥ 90%), 살모넬라(CE ≥90%), 세균성이질(CE ≤70%), 캄필로박터(CE ≤60%), 등에서는 매우 높은 결합효율(CE)을 보임. 세균수가 많을수록 CE%는 떨어짐.
- 바실러스 세레우스(CE <50%)는 상대적으로 낮은 결합효율을 가지나, 농산물에서 IMS 처리후 증균하면 더 높은 검출율을 얻었음
- 캄필로박터의 실린지 필터법은 매우 간편하면서도 검출효율을 크게 증진시키는데, 특히 rapid kit에 접목시 큰 효과를 보일 것으로 판단됨.

#### 제4절 식중독 세균 고효율 DNA 추출 기술 개발

- 개량된 PrepMan 용액을 이용한 방법은 20분 이내 DNA 추출이 가능하므로 식중독 세균 신속진단 키트에 적용할 수 있음.
- 참여기업 개발 PCR kit에 적용하기 위한 핵산추출법 평가 결과 단일 추출 reagent인 prepman으로도 검출이 잘 수행됨
- 그람 음성균으로 오염된 농산물 시료의 경우 증류수를 사용해서 핵산을 추출하더라도 충분히 적용이 가능한 것을 확인하여 검사비용을 낮추는데 도움이 될 것임.

#### 제5절 식중독 세균 신속진단 multiplex real-time PCR 키트 개발

- nonnspecific probe(SYBR Green Dye)를 이용하는 multiplex real-time PCR 방법을 개발하고 농산물 시료에서 식중독 세균 3종에 대한 검출 능력을 분석하였음.
- 인위오염시킨 농산물 시료에서 1) 증균없이 직접 PCR한 경우, 2) 증균없이 IMS 처리 후 PCR한 경우, 그리고 3) 6시간 증균후 바로 PCR한 경우, 각각의 검출한계는 대략  $10^{3-4}$ ,  $10^{2-3}$ ,  $10^{1-2}$  CFU/g sample이였음. 즉, 증균없이 < IMS 처리 < 증균후 순으로 검출 효율이 높음(검출한계가 대략 10배씩 낮아짐)

#### 제6절 식중독 세균 신속진단 multiplex real-time PCR 키트 개발

- 식중독 세균 7종의 검출을 위한 conventional PCR 개발: 세균 7종에 대한 특이 유전자 마커 탐색하고 특정 프라이머와 프로브 세트를 개발 및 선정하고, 1시간 이내 Q-PCR 및 2시간 이내 수출형 Conventional PCR 개발함
- 식중독 세균의 동시 검출용 Multiple Real-time PCR set 구성

- Real-time PCR cycling 조건: 95°C, 10분; (95°C, 15초; 60°C, 1분)x 40 cycle
- PCR 반응액 조성: 2X Real-time PCR MasterMix 10  $\mu$ l, 10 pmol/ $\mu$ l로 희석한 primer pair 1  $\mu$ l, 2 pmol/ $\mu$ l로 희석한 TaqMan probe 1 $\mu$ l 및 template DNA 5 $\mu$ l를 사용, DW로 total volume을 20  $\mu$ l로 맞추었음.
- primer/probe set: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)의 VT1 및 VT2, *Shigella* spp.의 ipaH 및 *Bacillus cereus*의 groEL 기존 마커 사용, 나머지는 새로 디자인
- Multiplex Set 1: *Bacillus cereus*의 groEL, *Listeria monocytogenes*의 iap 및 *Staphylococcus aureus*의 nuc gene을 triplex로 조합함.
- Multiplex set 2: *Campylobacter jejuni*의 mapA *Salmonella* spp.의 his gene을 검출할 수 있는 duplex primer/probe set임.
- Multiplex set 3: EHEC(장출혈성 대장균)의 VT1, VT2 및 *Shigella* spp.의 ipaH를 동시 검출 할 수 있는 triplex set로 구성하였음

#### ○ Multiplex Real-time PCR 조건 최적화:

- 식중독 관련 균주 51개에 대하여 특이도 확인.
- 타겟 DNA의 재조합 벡터로 민감도 확인-각 set별 검출한계(LOD)는 10<sup>1</sup> copies/ $\mu$ l 수준
- 일정 농도(10<sup>4</sup>~10<sup>0</sup> CFU/mL)의 세균을 식품에 인위 오염시킨 후 16시간 증균 배양 후 Real-time PCR로 분석하였을때, 초기 균량이 10<sup>0</sup> CFU/mL인 샘플까지 검출함
- Q-PCR 자동분석 시스템 개발: 증폭 곡선과 threshold 선이 교차하는 Ct 값을 자동으로 결과분석하여 검출 유무 또는 양성/음성 유무를 “+/-” 또는 Ct 값으로 자동 분석하는 프로그램을 개발하여 사용자 편의성을 높임(그림 6.43)

#### ○ 개발된 수출형 PCR 기술의 키트화 및 수출형

- 내부양성대조균(IPC 위음성 판단용), 양성대조균 DNA 첨가, 사용자 편이 제품 설명서 제작, Foodborne Pathogen Multiplex Real-Time PCR Kit로 명명
- 개발기술의 상용화 및 수출기반 확립: 해외 전시 등

### 제7절 식중독 세균 신속진단 면역 래피드 키트 개발 및 상용화

#### ○ 식중독 세균 7종의 면역 래피드 키트를 개발하기 위한 항체 선정 및 확보

- 위해 식중독 세균 7종에 대한 특이 항체/항원을 특이도 및 교차반응, 결합하는 에피토프, 면역화시킨 항원, 가격 등을 토대로 하여 선정하여 확보하고 면역 래피드 키트를 위한 immuno-chromatograph (Lateral flow Immuno assay) 기술 개발

- 항체 선정을 위한 페어링 테스트: colloidal gold를 항체와 결합하여 사용, 대조선용과 검사선용 두 가지 각각 0.5 및 0.2~0.5 mg/ml분주함 ,

#### ○ 식중독 7종 래피드 키트의 개발

- *키트 개발*: 스트립 및 검체 전개액 제조, 검사선 및 금-축합체의 최적농도 설정, 최적 검체 전개액 개발, 제품에 대한 민감도, 특이도, 검출한계 테스트 등을 수행
- *Shigella* 용 키트: 검출한계 약  $10^5$  CFU/ml, 교차반응 없음
- *Listeria monocytogenes* 용 키트: 검출한계 약  $10^5$  CFU/ml, 교차반응 있음
- *Escherichia coli* O157 용 키트: 검출한계 약  $10^5$  CFU/ml, 교차반응 없음
- *Salmonella* 용 키트: 검출한계 약  $10^5$  CFU/ml, 교차반응 없음
- *Staphylococcus aureus* 용 키트: 검출한계 약  $10^{5-6}$  CFU/ml, 교차반응 없음
- *B. cereus*, *Campylobacter jejuni* 등 2종의 경우 항체 페어링 문제, 낮은 민감도 및 높은 비특이성 등으로 키트 제작을 중단함. 개선된 항체의 확보가 우선되어야 함

#### ○ 키트 구성품 및 사용자 매뉴얼 제작

- 개발된 제품 구성은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* 등 5개의 제품에 대하여, 박스, 파우치 포장된 디바이스, 사용설명서 등으로 구성하였음.(단, 대장균은 버퍼 들어있음.)

#### ○ 상용화 및 수출기반 확립

- 해외 전시회에 제품을 전시: Medica(독일), Arabhealth(아랍 두바이) 등
- 아직 매출은 없으나 동남아시아 수출을 진행 중임

### 제8절 개발된 신속진단 키트의 AOAC 기반 성능 검증 평가

- 식중독 미생물 7균종(*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter*, *E. coli* O157, *Shigella*)에 대하여 본 과제에서 개발한 신속진단키트들인 다중실시간 PCR키트(코젠바이오텍)와 면역래피드 키트(레피젠)의 세균 검출 성능을 AOAC 프로토콜에 기반한 검증법으로 평가하였음.
- AOAC 검증 방법에 근거하여 한 균종 당 3가지 농산물 시료에 대하여 각각 1균주로 인위오염시키고 증균배양한 후, 3가지 검출 방법인 전통적 배지배양법, 면역키트, PCR 키트 등의 세균 검출 성능을 시험하고 통계처리하여 비교분석하였음.
- 그 결과 배지배양법과 비교하여 개발된 PCR 키트와 면역 키트 둘 다 성능이 유의한 차이가 없이 동등한 것으로 나타났음.

- 대부분의 농산물 시료에는 해당 미생물들의 오염이 없으므로, 인위오염시킨 농산물 시료들에서 음성 대조군은 모두 음성으로 나왔음. 단, B. cereus의 경우 여러 시료들이 자연 오염되어 모두 양성으로 나오기도 하였음.
- 본 연구과제에서 개발한 식중독 미생물 7종에 대한 신속증균배지들로 전처리 증균배양한다면 6-8시간 내에 PCR 키트에 의한 검출이 가능할 것임.
- 면역 키트의 경우 검출한계가  $10^{5-6}$  cfu/ml이므로 6-8시간보다 긴 증균배양이 필요함. 특히 상대적으로 늦게 생육하는 리스테리아의 경우 8 시간 이상의 증균배양이 필요함.
- 강원대 및 건국대 연구팀은 AOAC 기반 성능 검증 기술을 체계화하고 사용자 편의 프로토콜을 만들었으며, 참여기업에서 개발한 real-time PCR kit 및 면역 rapid kit는 농산물 시료에서 신속하고 간편한 세균 검증 방법임을 검증하였음.
- 검증에 사용된 kit들은 모두 농산물의 경쟁균 및 성분에 의한 반응 억제 및 비특이 결과를 보이지 않았으며, 개발한 증균 배지와 호환성도 문제가 없어 개발한 일련의 제품들을 일원화하여 one-step kit로 제품화할 수 있을 것으로 기대됨.

## 제9절 유통 농산물에서 식중독 세균 오염률 조사 및 기준 규격 개선안 제시

### ○ 다소비 농산물에 대한 생산/보관/유통/소비 과정 중 위해 식중독 세균 오염률 조사 :

- 국내외 모니터링 선행연구 조사 결과 유통 농산물에서의 식중독균 검출률은 극히 낮은 것으로 보여, 해당 식품으로 부터의 식중독 사고 발생은 대부분 post-contamination에 의한 것으로 보임
- 따라서, 조사결과를 바탕으로 유의미한 결과를 보일 수 있는 indicator (일반세균, 대장균군, 바실러스 외)들을 선정하여 실험을 실시하였으며, 특히 바실러스의 경우 일반제품보다는 유기농제품에서/ 마트 제품 보다는 농장 샘플에서 오염률이 높았음
- 대상 식중독균으로 서울시 보건환경연구원 (10종) 및 건국대 자체 모니터링 (7종)을 총 2년간 수행하였으나 사전 조사결과와 마찬가지로 거의 검출이 되지 않음

### ○ 신선농산물에서 식중독 세균의 국내·외 기준규격 조사 및 국내 기준·규격(안) 확립:

- 유통농산물 식중독 세균 기준 규격(안)을 설정하기 위해 다양한 국가(호주, 캐나다, 아일랜드, 홍콩, 뉴질랜드, 유럽연합)의 기준을 조사하였으며, 모니터링 결과와 함께 ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods)의 n, c, m, M 기준 설정원칙에 현재까지 진행된 농산물 모니터링 결과와 앞서 진행된 국제적인 미생물 기준을 적용하여 유통농산물에 오염가능성이 있는 7종 식중독 세균에 대한 개별 규격안을 제시하였음

### ○ 농산물에 대한 식중독 세균 검사 표준절차 매뉴얼 개발 및 위생관리 개선방안 개발:



- 모니터링 결과에 따라, 위생관리지침 제시에 적합한 식중독 세균이자 포자를 생성하여 소독/세척제에 대해 저항성이 높은 바실러스 세레우스를 Surrogate로 활용하여, 수확 후 가공과정을 거치지 않은 lettuce 및 sprouts에서 일반세균수 및 B. cereus를 대상으로 재배방식별로 다른 살균소독법(유기산, 염소기반소독제)을 적용하여 그 소독력을 비교/평가하는 것과 그 결과를 바탕으로 재배유형(유기농, 일반)에 따른 위생관리지침을 제시
- 다소비 농산물 생산/보관/유통/소비까지 단계별 식중독 위생관리지침 개발 및 농산물에서의 식중독 세균 조기 실시간 진단체계 구축: 미국 GAP(Good Agricultural Practice) 및 GHP(Good Handling Practice)에 대해 국내에서도 유사하게 실시하고 있으나, 진입장벽이 높고 국내 실정에 적합하지 않은 규정이 많아 현재 GAP로 분류된 농산물은 총 생산의 10% 이하로 인증절차의 통합 및 간소화 전략을 통해 국내 실정에 맞는 모델의 필요성을 제시

## 다. 연구개발 성과

### ○ 연구 목표 대비 성과표

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보진시	
												SC I	비 SC I						
최종 목표	6	1		2		5						6	6						
연구기간내 달성실적	13	3		2		9		1				9	4	11		3		3	
달성율 (%)	217	300		100		180		100				150	67	100		100		100	

### ○ 연구개발 성과 목록

(1) 논문 (총13편: SCI 9편 비SCI 4편)

논문 게재 년월	논문명	제1저자	교신저자	논문게재지	권 (호)	(SCI 여부)
2014-05	Evaluation of Potassium-Clavulanate-Supplemented Modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar for Enumeration of Campylobacter in Chicken Carcass Rinse	천정환	서건호	Journal of Food Science	79(5)	SCI
2014-06	Angiotensin- I Converting Enzyme(ACE) 저해효과를 갖는 Sodium Caseinate 가수분해물의 기능적 특성에 관한 연구: 총설	이건봉	서건호	한국유가공기술 과학회지	32(1)	비SCI
2014-06	인간 질병의 위험 요인에 대한 Probiotics의 효과: 총설	천정환	서건호	한국유가공기술 과학회지	32(1)	비SCI
2014-07	Modification of Karmali Agar by Supplementation with Potassium Clavulanate for the Isolation of Campylobacter from Chicken Carcass Rinses	천정환	서건호	Journal of Food Protection	77(7)	SCI
2014-11	Comparison of Culture, Conventional and Real-time PCR Methods for Listeria monocytogenes in Foods	김동현	서건호	Kor. J. for Food Science of Animal Resources	34(5)	SCI
2015-02	Detection and Enumeration of Lactic Acid Bacteria, Acetic Acid Bacteria and Yeast in Kefir Grain and Milk Using Quantitative Real-time PCR	김동현	KUN-HO SEO	Journal of Food Safety	35(1)	SCI
2015-03	Probiotics를 이용한 새로운 건강 증진 기능성 유제품 개발에 관한 연구: 총설	김동현	서건호	한국유가공기술 과학회지	33(1)	비SCI
2015-08	Prevalence and characterization of extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in ready-to-eat vegetables	김홍석,	서건호	International Journal of Food Microbiology	207	SCI
2015-08	Quantitative Prevalence and Toxin Gene Profile of Bacillus cereus from Ready-to-Eat Vegetables in South Korea	천정환	서건호	Foodborne Pathogens and Diseases	12(9)	SCI
2015-12	Rapid, Sensitive, and Specific Detection of Salmonella Enteritidis in Contaminated Dairy Foods using Quantum Dot Biolabeling Coupled with Immunomagnetic Separation	Hong-Seok Kim	Kwang-Yo ung Song, Kun-Ho Seo	J. Milk Sci. Biotechnol.	33(4) 271-275	비SCI
2016-02	Citrobacter braakii: A Major Cause of False-Positive Results on MacConkey and Levine's Eosin-Methylene Blue Selective Agars Used for the Isolation of Escherichia coli from Fresh Vegetable Samples	Hong-Seok Kim	Kun-Ho Seo	Journal of Food Safety	36(1) 33-37	SCI
2016-06	Dynabeads Protein G Antibody Conjugates Combined with Modified Brain Heart Infusion Broth for the Enrichment and Separation of Bacillus cereus in Artificially Contaminated Vegetables	Shuai Wei	Deog-Hwan Oh	Food Science and Biotechnology	25(3)	SCI
2016-06	Highly efficient and specific separation of Staphylococcus aureus from lettuce and milk using Dynabeads protein G conjugates	Shuai Wei	Deog-Hwan Oh	Food Science and Biotechnology	25(5)	SCI

**(2) 학술발표 (총 11건)**

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국식품영양과학회 2014년도 국제심포지엄, 정기학술대회	Shuai Wei 외	2014-10-27~29	대전컨벤션센터	한국
2	한국식품영양과학회 2014년도 국제심포지엄, 정기학술대회	Shuai Wei 외	2014-10-27~29	대전컨벤션센터	한국
3	한국식품영양과학회 2015년도 국제심포지엄, 정기학술대회	Shuai Wei 외	2015-08-24~26	평창 알펜시아 리조트 컨벤션센터	한국
4	IAFP 2015 (International Association for Food Protection)	오덕환	2015-07-25~28	오레곤주 포트랜드	미국
5	IAFP 2015 (International Association for Food Protection)	오덕환	2015-07-25~28	오레곤주 포트랜드	미국
6	2015년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄, 정기학술대회	박병재 외	2015-08-24~26	평창 알펜시아 리조트 컨벤션센터	한국
7	Aptamer 2015	김홍석 외	2015-03-31~04-01	옥스퍼드, St Hilda's College	영국
8	Aptamer 2015	김영지 외	2015-03-31~04-01	옥스퍼드, St Hilda's College	영국
9	2015년도 제39회 보건학종합학술대회	김홍석 외	2015-04-10	서울 숙명여대 백주년기념관	한국
10	2015 KOSFOST International Symposium and Annual Meeting	김홍석 외	2015-06-03~05	부산, 벡스코 컨벤션센터	한국
11	2015 KOSFOST International Symposium and Annual Meeting	김영지 외	2015-06-03~05	부산, 벡스코 컨벤션센터	한국

**(2) 특허 (출원 13건 및 등록 3건)**

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2013.10.	트리클로산이 첨가된 개선된 배지 조성물 및 그 용도 (T-bolton)	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0119310
2013.11.	증균배지가 들어있는 멸균백, 그 제조방법 및 그 응용	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0135380
2013.12.	혈청을 포함하는 캄필로박터에 대한 배지 조성물과 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-016747
2014.04.	캄필로박터 특이 크로모제닉 액체배지 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0038841
2014.04.	케피어 발효유 감별 및 락토바실러스 케피라노팍시엔스 유산균 특이적인 정량 검출용 조성물 및 그 검출 방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0040636
2014.04.	케피어 발효유 내 미생물 그룹별 정량적인 실시간 중합효소 연쇄반응 분석용 조성물 및 그 분석방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0041430
2014.11.	크로노박터 검출을 위한 선택증균용 배지 조성물 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0165221
2014.10.	크로노박터균과 살모넬라균 검출을 위한 증균배지 조성물 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0136929
2015.06.	세포테탄을 포함하는 캄필로박터에 대한 민감성 및 선택성을 개선한 볼튼 배지 조성물 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0081979
2015.06.	세포테탄을 포함하는 캄필로박터에 대한 민감성 및 선택성을 개선한 배지 조성물 및 그	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0081316

등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2015.06.	세폭시틴을 포함하는 캄필로박터에 대한 민감성 및 선택성을 개선한 볼튼 배지 조성물 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0082585
2015.06.	세폭시틴을 포함하는 캄필로박터에 대한 민감성 및 선택성을 개선한 배지 조성물 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0081978
2015.12.	2차 증균과정 생략이 가능한 살모넬라균 단일증균배지 조성물, 그 제조방법 및 그 용도	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0172451
2014.01.	캄필로박터에 대한 민감성 및 선택성을 개선한 배지 조성물 및 그 제조방법 (CCPD)	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-1350444
2015.02.	트리클로산이 첨가된 개선된 배지 조성물 및 그 용도	건국대학교 산학협력단	대한	10-1493230
2015.07.	증균배지가 들어있는 멸균백, 그 제조방법 및 그 응용	건국대학교 산학협력단	대한	10-1536705

<제품화: 총 9건>

번호	구분	제품명(내용)	개발자	역할
1	제품개발	Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR Kit	(주)코젠바이오텍	개발
2	제품개발	Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR Kit I	(주)코젠바이오텍	개발
3	제품개발	Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR Kit II	(주)코젠바이오텍	개발
4	제품개발	Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR Kit III	(주)코젠바이오텍	개발
5	제품개발	<i>E. coli</i> O157:H7 검출키트	(주)래피젠	개발
6	제품개발	<i>Listeria monocytogenes</i> 검출키트	(주)래피젠	개발
7	제품개발	<i>Salmonella</i> 검출키트	(주)래피젠	개발
8	제품개발	<i>Shigella</i> 검출키트	(주)래피젠	개발
9	제품개발	<i>Staphylococcus aureus</i> 검출키트	(주)래피젠	개발

## 제3장 연구수행 내용 및 결과

### 제1절 식중독 세균 그람 양성 3종에 대한 신속 증균배지의 개발 (*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*)

#### 1. 증균 배지 개발의 필요성

- 식중독 세균을 어느 샘플(인체분변, 동물분변, 식품, 물, 환경, 토양)에서 검출하느냐에 따라 그 민감도와 특이도에 있어서 검출법마다 현저한 차이를 보이고 있으며, 특히 성장(matrix)이 다양하고 산도, 온도, 수분활성도 등의 다양한 요소가 개입되는 농산물에서는 정상 세균 총이 높은 수준으로 증식해 원하는 식중독균의 선택적 증균이 쉽지 않음.
- 또한 식중독 세균의 검출에 있어서 PCR이나 ELISA, Biosensor 등을 이용한 여러 가지 신속검출기법을 적용하기 위해서는 손상된 세포를 선택적으로 적절히 회복시킬 수 있는 증균 배지의 개발이 필수적임.
- 따라서 신속하고 높은 민감도로 세균을 증균할 수 있는 배지의 개발에 대한 연구가 시행되고 있으며 이렇게 개발된 배지는 ISO나 US FDA/BAM 등 다양한 공인검출법에서 높은 민감도와 선택성을 승인받아 사용되고 있는 경우가 많음.
- 최근에는 다양한 식중독 세균들을 한 번에 검출 가능한 시스템(multipathogen platforms) 구축을 위해 Universal preenrichment broth(동시증균배지)에 대한 관심도 높아졌으며, Bailey and Cox는 최초로 Universal preenrichment broth를 개발하여 두 가지 이상의 균을 하나의 증균배지에서 증균할 수 있도록 하였음.
- 이러한 배지들은 다양하게 개발되고 상업화되어 현재 Difco 등에서는 두 가지의 균을 동시에 선택증균 가능한 Universal preenrichment broth 등을 시판하고 있음(그림 1.1).
- 최근에는 *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7을 한꺼번에 선택 증균 가능한 SEL broth 등을 개발하여 증균 후 바로 multiplex PCR, protein/antibody microarray biosensors, array-based immunosorbent assays, DNA microarray method 등의 최신 검출기법을 통해 한 번에 여러 식중독균의 검출이 가능하도록 연구하고 있음.

#### 2. 증균배지 개발 현황 및 특성

##### (1) *Bacillus cereus* (*B. cereus*)의 증균배지 개발의 국내외 현황 및 특성

- *B. cereus* 증균 배지의 첨가 성분으로 magnesium sulphate, sodium pyruvate, tryptone,

- yeast extract 등을 사용하였으며, 각 성분 첨가시 *B. cereus*의 성장을 촉진하거나 포자 발아를 촉진하는 특징을 갖고 있음(표 1.1).

**User Quality Control**

**Identity Specifications**  
**Difco™ Universal Preenrichment Broth**  
 Dehydrated Appearance: Light beige, free-flowing, homogeneous.  
 Solution: 3.8% solution, soluble in purified water. Solution is light to medium amber, slightly opalescent to opalescent, may have a precipitate.  
 Prepared Appearance: Light to medium amber, slightly opalescent to opalescent, may have a precipitate.  
 Reaction of 3.8% Solution at 25°C: pH 6.3 ± 0.2

**Cultural Response**  
**Difco™ Universal Preenrichment Broth**  
 Prepare the medium per label directions. Inoculate and incubate at 35 ± 2°C for 18-24 hours.

ORGANISM	ATCC™	INOCULUM CFU	RECOVERY
<i>Listeria monocytogenes</i>	19115	10-10 <sup>2</sup>	Good
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> serotype Enteritidis	13076	10-10 <sup>2</sup>	Good
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> serotype Typhimurium	14028	10-10 <sup>2</sup>	Good

그림 1.1 현재 시판되고 있는 Universal pre-enrichment broth의 예

표 1.1 Characteristic of each component and enriching media for *B. cereus*

Pathogen	Component and Enrichment media	Characteristics	Reference
<i>B. cereus</i>	Magnesium sulphate	Promote germination of <i>Bacillus cereus</i> spores	Restaino, L.(2001)
	Sodium pyruvate	Promote the growth and facilitate spore formation	Holbrook, R., & Anderson, J. M. (1980)
	Tryptone	more effective in stimulating the growth	de Vasconcellos, et.al. (1995)
	Yeast extract	promote the growth	H.peng (2001)

## (2) *Staphylococcus aureus*의 증균배지 개발의 국내의 현황 및 특성

- *S. aureus*의 증균배지로 Brain heart infusion, Tryptone soya broth, Selective mannitol broth (SMB), Aztreonam broth, Giolitti-Cantoni Broth Base 등이 개발되어 현재 사용되고 있으며, Giolitti-Cantoni Broth Base 배지는 ISO에서 2003년도에 인증되어 사용되고 있음(표 1.2).
- 각 증균배지는 *S. aureus*의 성장을 촉진하도록 돕거나 37°C에서 18시간 내에 성장할 수 있도록 성장을 촉진, 증진하는 특징을 갖고 있음.

표 1.2. Characteristic of each component and enriching media for *S. aureus*

Pathogen	Component and Enrichment media	Characteristics	Reference
<i>S. aureus</i>	Brain heart infusion	Help get more positive results 18-24h enrichment at 35°C	Hagen, R. M., (2005)
	Tryptone soya broth	Support growth of all of the strains tested 18-24h enrichment at 35°C 18-20h enrichment at 35°C	Böcher, S., (2008)
	Selective mannitol broth (SMB)	Give sensitive than other selective agars 18h enrichment at 37°C	Gurran, C., (2002)
	Aztreonam broth	Improve the sensitivity for the isolation 18h enrichment at 37°C	Gurran, C., (2002)
	Giolitti-Cantoni Broth Base	Enrich small numbers of staphylococci 24-48h incubation at 35-37°C	ISO ( 2003 )

(3) *Listeria monocytogenes* 증균배지 개발의 국내외 현황 및 특성

- *L. monocytogenes*의 증균 배지로 UVM modified Listeria Enrichment Broth, Modified Listeria Enrichment Broth, Fraser broth, Aztreonam broth, Listeria Enrichment Broth (LEB), Buffered Listeria Enrichment Broth Base 등이 개발되어 현재 사용되고 있으며, Listeria Enrichment Broth (LEB)을 제외하고 USDA, FDA, IDF에서 승인되어 사용되고 있음(표 1.3).
- 각 배지는 *L. monocytogenes*를 빠르게 증균배양 시키거나 여러 가지 복잡한 식품 matrix에서 *L. monocytogenes*만 선택적으로 성장하도록 하는 특징을 갖고 있음.

표 1.3 Characteristic of each component and enriching media for *L. monocytogenes*

Pathogen	Component and Enrichment media	Characteristics	Reference
<i>L. monocytogenes</i>	UVM modified Listeria Enrichment Broth	Rapidly isolate of <i>L. monocytogenes</i> 20-24h enrichment at 30°C	USDA
	Modified Listeria Enrichment Broth	Seletively enriching Listeria from milk 48h incubation at 30°C	IDF
	Fraser broth	Enables the presumptive detection of Listeria spp. 26±2h enrichment at 35°C	USDA, FDA
	Listeria Enrichment Broth (LEB)	Ensure a satisfactory enrichment of <i>L. monocytogenes</i> 4 day enrichment at 30°C	Mavrothalassitis, P. (1977)
	Buffered Listeria Enrichment Broth Base	Seletively enriching Listeria 48h incubation at 30°C	FDA

### 3. 식중독 세균들의 특성, 발병 사례, 원인식품 및 임상 증상

#### (1) 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*, *B. cereus*)

##### ① 특징

- 토양세균의 일종으로 사람의 생활환경을 비롯하여 토양, 수중, 공기, 식물표면 등 자연계에 널리 분포.
- 증식온도는 5-50℃ (최적발육온도 30-37℃) / pH 범위는 4.9-9.3
- 음식물에서 쉽게 135℃에서 4시간 가열해도 견딜 수 있는 내열성 아포 생성
- 포자형성으로 인한 살균우유, 조리식품의 오염이 문제
- 다른 균주의 포자에 비해 어느 표면이든 잘 들러붙어 세척과 소독이 어려움

##### ② 발병사례 (국내 2012년 기준)

- 2008년 10월, 수원 모 고교 단체급식 식중독 발생
- 2007년 6월 식품의약품안전청에서 영유아식 156개 제품을 검사한 결과 8개 제품에서 바실러스 세레우스가 검출됐으며 이 가운데 기준치(g당 100마리 이하)를 초과한 4개 제품을 만든 업체에 제품을 회수
- 1993년 버지니아, 오염된 도시락 섭취한 67명 바실러스 세레우스 감염
- 1980년 미국 CDC에서 소고기, 칠면조, 멕시코 음식에 감염된 9건의 집단발생보고
- 1981년 미국 CDC 쌀밥과 조개로 인한 8건의 집단발생 보고
- 유럽지역에서 판매되는 Reconstituted milk-based formula에서 Enterotoxigenic *B. cereus* 검출 (Rowan and Anderson, 1998)
- FAO/WHO는 조제분유와 관련하여 *Bacillus cereus*는 Category "C" organism으로 분류
- 일본의 경우 매년 6-24건의 바실러스 세레우스 감염과 그로인한 860여명의 환자발생이 있었음.
- 우리나라도 2003년 3건 198명, 2004년 2건 84명, 2005년 1건 24명, 2006년 5건 59명의 세레우스 환자 발생이 있었음.

##### ③ 분포 및 원인식품

- 토양 상재균으로 자연계에 널리 분포하고 있으므로 자연적으로 토양과 밀접한 관계가 있는 식품원재료와 가공조리식품이 연루
- 곡류를 포함한 농작물과 채소에 높은 비율로 감염
- 설사형 감염의 경우 육류, 향신료, 채소수프, 푸딩, 소시지, 우유, 크림 등에서 감염 보고
- 구토형 감염의 경우 쌀밥이나 볶음밥, 샌드위치, 삼각김밥, 분유, 선식 등에서 감염 보고

##### ④ 임상증상

- 바실러스 세레우스에 의한 식중독 증상은 크게 설사형과 구토형으로 나뉨
- 설사형 증상은 클로스트리디움 퍼프린젠스 식중독과 증상이 유사
- 음식섭취 6-16시간 이후에 수인성 설사 및 어지러움 증과 복통이 일어남



- 구토형 증상은 황색포도상구균 식중독과 증상이 유사
- 1-5시간의 잠복기 이후 메스꺼움, 구토를 일으키며 가끔 복통과 설사동반

## (2) 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)

### ① 특징

- 주로 온혈동물의 피부, 피부 분비기관, 점막 등에 상재하는 균으로 일부 균주는 병원성
- 사람과 동물의 화농성질환의 원인균일뿐만 아니라 식중독의 원인균
- 계절에 관계없이 발병
- 역학조사의 필요성에 따라 혈청형, phage형, coagulase형으로 분류
- 발육온도 범위는 4-46℃로 비교적 넓지만 발육최적온도는 35-38℃로 식중독의 원인이 되는 enterotoxin도 이 최적온도에서 잘 생성됨.
- 균체가 생성한 enterotoxin은 내열성이 대단히 커서 균이 사멸해도 잔존
- 발육 pH 범위는 4.2-9.3이며 최적 pH는 7.0-7.5이고 pH 4.3 이하에서는 사멸
- 내염성이 있어 식염 10% 농도에서도 충분히 자람

### ② 발병사례 (국내 2012년 기준)

- 5월 대전 10명(enterotoxin A), 제주 5명
- 9월 대전 8명
- 10월 경기 10명, 대전 4명
- 11월 경기 57명(클로스트리듐 퍼프린젠스와 중복)
- 12월 울산 8명

### ③ 분포 및 원인식품

- 원인식품은 아주 다양하며 식물성 식품 특히 전분질을 많이 함유하는 식품이 많은 것이 살모넬라 식중독과 차이임.
- 유럽과 미국의 경우 우유, 버터, 치즈, 크림 등을 비롯한 육제품, 알제품 등 단백질 식품에 많이 오염
- 일본과 국내의 경우 김밥, 떡, 도시락, 빵 등의 곡류와 그 가공식품이 가장 많음.

### ④ 임상증상

- 황색포도상구균 식중독의 임상증상은 바실러스 세레우스 구토형 독소에 의한 증상과 매우 흡사함.
- 다른 세균성 식중독에 비해 대단히 짧은 것이 특징임.
- 증상은 급격하여 처음에는 침의 분비가 증가하고 이어서 메스꺼움과 구토가 시작되고 복통과 설사도 따름.
- 사망하는 예는 거의 없으나 노인, 유아 등 병약자에게서는 구토에 의한 토물이 기관지 폐쇄를 일으켜 사망하는 일도 있음.

### (3) 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes* *L. monocytogenes*)

#### ① 특징

- 환경, 물, 토양, 하수, 야채와 사람 및 동물의 분변등에 광범위하게 존재하며 몇몇 종은 사람과 동물에 대해 병원성이며 유제품에 오염되어질 수 있음.
- 리스테리아는 8개의 균종이 있으며 이중 *L. monocytogenes*와 *L. ivanovii*의 두 개 균종만이 인체병원성을 가짐(주로 *L. monocytogenes*에 의한 감염사례가 많음)
- 최적발육온도는 30-37°C이지만 발육온도영역은 0-45°C로 광범위함.
- 보통 pH 6-9의 범위에서 발육하지만 pH 4.5 이하에서도 발육 및 생존 가능
- 냉장온도에서도 성장할 수 있어 안전하다고 생각되는 냉장, 저장 식품을 통해 식중독을 발생시킴.

#### ② 발병사례 (국내 2012년 기준)

- 2009년부터 현재까지 국내 발생사례는 아직 없음.
- 2011년 미국에서 총 26개 주에서 123명이 감염되고 25명이 사망함, 원인식품은 멜론이었음.
- 2008년 캐나다에서 가공육에 의한 리스테리아 감염으로 12명이 사망하였음.

#### ③ 분포 및 원인식품

- 야생동물 및 가금류 등 동물의 장내, 토양, 하수 등 자연계에 널리 분포되어 있음.
- 동물의 상채세균인 *L. monocytogenes*는 부적절한 축산제품의 취급·처리 및 적절하지 못한 물의 사용 등으로 오염
- 원유, 살균처리하지 않은 우유, 핫도그, 치즈(특히 소프트 치즈), 아이스크림, 소시지 및 건조 소시지, 가공·비가공 식육 등 식육제품과 비가공·훈연 생선 및 채소류 등이 주요 원인식품군으로 알려짐.

#### ④ 임상증상

- 1923년 미국에서 처음 보고
- *L. monocytogenes*가 오염된 식품의 섭취에 의해서 발생되며 감염된 동물에서 사람에게로 간접적으로 전파될 수 있음이 밝혀짐.
- 발열, 오한 등 감기와 유사한 식중독 초기 증상이 12시간 만에 나타나고, 감염자의 건강 상태나 감염 균량에 따라 심각한 경우 평형 감각 손실 및 경련 등이 나타남.
- 특히 임산부의 경우 발열, 두통, 척추 통증 등이 있으며, 중증일 경우에는 유산, 사산 등을 유발함.
- 전신적 감염상태인 패혈증과 뇌에 침투하여 뇌수막염을 일으켜 지각 장애, 보행 이상 등의 신경증상을 나타낼 수 있음.

#### 4. 식중독 세균에 대한 기존 증균배지의 생육도 비교

##### (1) 세균 배양 및 기본 배지 선정 방법

- *B. cereus* (ATCC 25621), *S. aureus* (ATCC 13565), *L. monocytogenes* (ATCC 19116) 균주를 사용하였으며 TSB에 각 균주들을 0.1 mL씩 접종한 후 적당한 온도에서 24시간 2회 계대배양하여 사용하였음.
- 모든 세포 현탁액은 3,000×g 으로 4°C에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 0.1% 멸균 생리 식염수 10 ml에 넣어 vortexing하였음. 세척 과정을 2회 반복하였음.
- 기존 증균배지들, buffered peptone water(BPW), brain hart infusion(BHI), luria broth(LB), tryptic soy broth(TSB)를 선정하여 실험하였음.
- 세균 균주들, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* 및 *Listeria monocytogenes*를 약 5 log CFU/mL의 0.1 mL을 위의 배지들 9.9 mL에 각각 접종하여 매 시간 마다 생육도를 측정하였음.

##### (2) *Bacillus cereus*(*B. cereus*)의 기존 증균 배지에서 생육도 비교

- *B. cereus* 균의 최적 기본 증균 배지를 선정하기 위해 buffer peptone water(BPW) ,brain hart infusion(BHI), luria broth(LB), tryptic soy broth(TSB)를 사용하였고, 30°C에서 14시간 배양한 결과는 그림 1.2와 같음.
- *B. cereus*의 초기 균수는 3.19 log CFU/mL이었으며, 3시간 이후 BHI, TSB, BPW, LB의 순으로 각각 6.40, 6.20, 4.74, 4.71 log CFU/mL로 다른 세 배지보다 BHI에서 가장 높은 생육도를 확인할 수 있었음
- 6시간 이후의 실험결과에서도 BHI, TSB, LB, BPW순으로 각각 6.77, 6.40, 6.20, 6.18 log CFU/mL의 농도로 다른 세 배지보다 BHI에서 가장 높은 생육도를 확인할 수 있었음(그림 1.2).
- 결론: 6시간 배양시 가장 높은 생육도를 나타낸 BHI를 *B. cereus*의 기본 증균배지로 선정하였음.

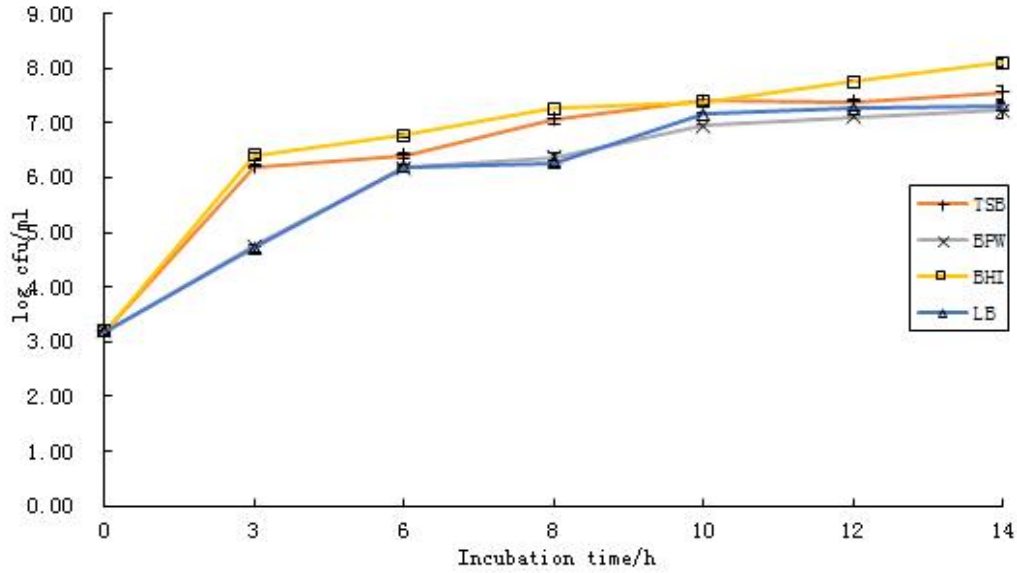


그림1.2 Growth curve of *B. cereus* in BPW, BHI, LB and TSB for 14h at 30°C

### (3) *Staphylococcus aureus*의 기존 증균 배지에서 생육도 비교

- *S. aureus* 균의 최적 기본 증균 배지를 선정하기 위해 buffer peptone water(BPW), brain hart infusion(BHI), luria broth(LB), tryptic soy broth(TSB)를 사용하였고, 35°C에서 14시간 배양한 결과는 그림 3과 같음.
- *S. aureus*의 초기 균수는 2.98 log CFU/mL이었으며, 3시간 이후 BHI, TSB, LB, BPW의 순으로 각각 4.76, 4.70, 4.22, 3.26 log CFU/mL로 다른 세 배지보다 BHI에서 가장 높은 생육도를 확인할 수 있었음.
- 6시간 이후의 실험결과에서도 BHI, TSB, LB, BPW순으로 각각 6.14, 6.07, 5.73, 3.54 log CFU/mL의 농도로 다른 세 배지보다 BHI에서 가장 높은 생육도를 확인할 수 있었음(그림 1.3).
- 결론: 6시간 배양시 가장 높은 생육도를 나타낸 BHI를 *S. aureus*의 기본 증균배지로 선정하였음.

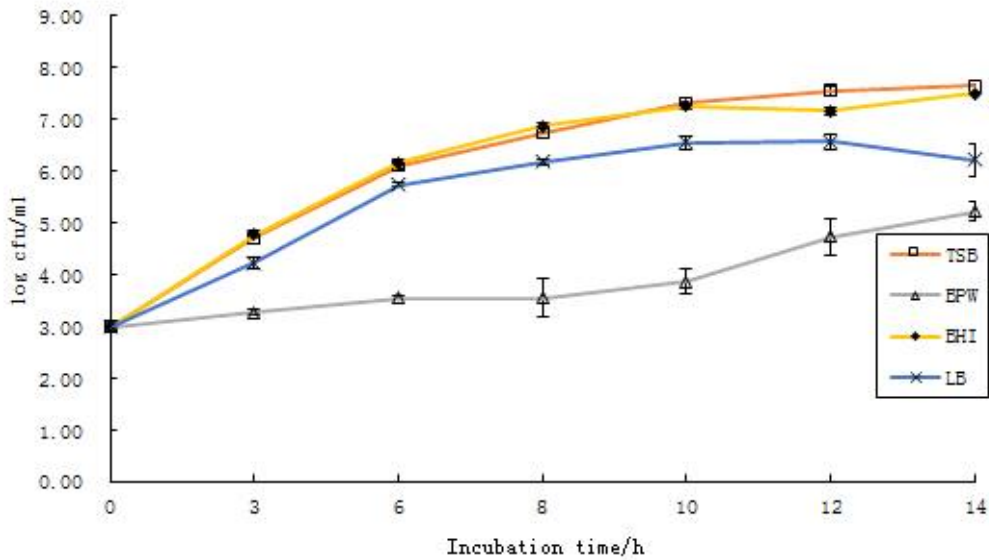


그림1.3 Growth curve of *S. aureus* in BPW, BHI, LB and TSB for 14h at 35°C

#### (4) *Listeria monocytogenes*의 기존 증균 배지에서 생육도 비교

- *L. monocytogenes* 균의 최적 기본 증균 배지를 선정하기 위해 buffer peptone water(BPW), brain hart infusion(BHI), luria broth(LB), tryptic soy broth(TSB)를 사용하였고, 35°C에서 14시간 배양한 결과는 그림 1.4와 같음.
- *L. monocytogenes* 균의 초기 균수는 3.26 log CFU/mL이었으며, 3시간 이후 BHI, TSB, BPW, LB의 순으로 각각 3.87, 3.73, 3.66, 3.21 log CFU/mL로 다른 세 배지보다 BHI에서 가장 높은 생육도를 확인할 수 있었음.
- 6시간 이후의 실험결과에서도 BHI, TSB, BPW, LB순으로 각각 5.32, 5.14, 4.89, 4.06 log CFU/mL의 농도로 다른 세 배지보다 BHI에서 가장 높은 생육도를 확인할 수 있었음.
- 결론: 6시간 배양시 가장 높은 생육도를 나타낸 BHI를 *L. monocytogenes*의 기본 증균 배지로 선정하였음.

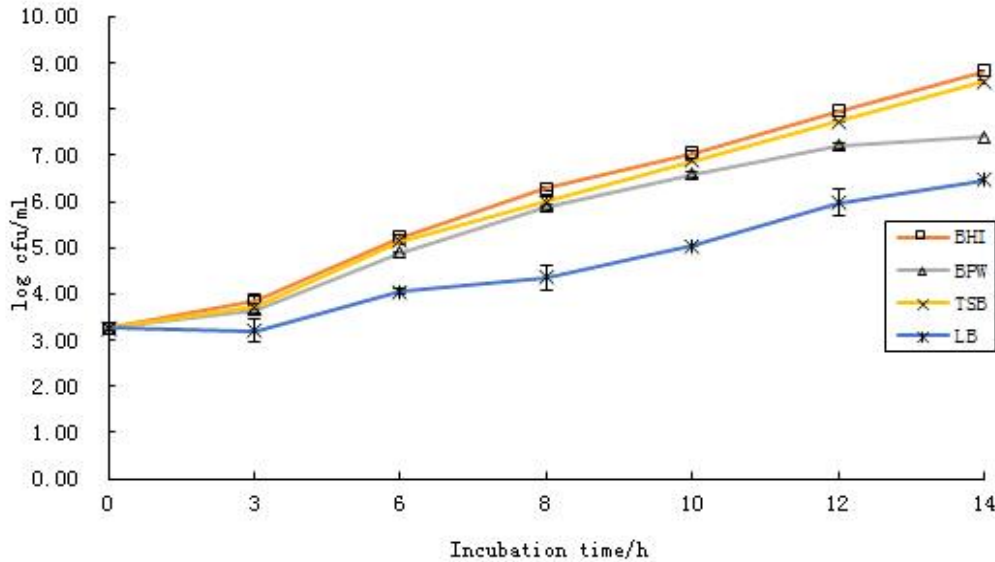


그림1.4 Growth curve of *L. monocytogenes* in BPW, BHI, LB and TSB for 14h at 35°C

## 5. 식중독 세균의 생육에 미치는 생육촉진인자의 영향

### (1) 생육촉진인자 농도 결정 방법

- *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*의 성장을 위한 최적화된 생육촉진인자인 magnesium sulfate, sodium citrate, yeast extract, sodium pyruvate, ferrous sulfate를 각각 적당한 농도로 BHI에 첨가하여 이들 생육인자가 각 식중독 균의 생육도에 미치는 영향을 분석하였음.
- 생육촉진인자의 농도를 최적화하기 위해 Design Expert 프로그램(Ver 8.0.6)을 이용하여 Response Surface Methodology(RSM) - Box-Behnén design(BBD)으로 실험결과를 분석하여 최적 농도를 설정하였음.
- BHI(대조구)와 BHI+생육촉진인자를 첨가한 것(실험구)에 *B. cereus*, *S. aureus* 및 *L. monocytogenes*를 접종하고 4시간과 6시간 배양 후에 균수를 측정하였으며, 3회 반복하여 ANOVA로 유의적인 차이를 분석하였음.

### (2) *B. cereus*의 증균에 미치는 생육촉진인자의 발굴

- 국내외 증균배지에 대한 연구자료들을 비교분석하여, 4종류의 성분들(magnesium sulfate, sodium citrate, yeast extract, sodium pyruvate)을 *B. cereus* 균의 생육촉진인자로 선택하였고, 표 1.4에 제시한 바와 같이 각 적당한 농도로 BHI에 독립적으로 첨가하였음.

표 1.4 Supplements added to BHI for *B. cereus*

Supplements	g/l				
Magnesium sulfate	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Sodium citrate	1.0	3.0	5.0	7.0	9.0
Yeast extract	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
Sodium pyruvate	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5

- BHI와 다른 농도의 생육촉진인자+BHI에 *B. cereus* 현탁액(초기 농도: 1.20 log CFU/mL)을 접종하여 30°C에서 6시간동안 배양한 후 성장한 균수의 변화를 그림 1.5 ~ 그림 1.8에 나타냈음.
- 본 연구 결과, magnesium sulfate는 0.2-0.4 g/l, yeast extract는 0.2-0.4 g/l, sodium pyruvate는 7.5-12.5 g/l을 첨가하였을 때 균의 생육이 다른 농도에서 보다 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며, 이 농도를 최적의 농도로 선택하여 Response Surface Methodology(RSM) - Box-Behn design(BBD)으로 실험결과를 분석하여 최적 농도를 선택하였음.

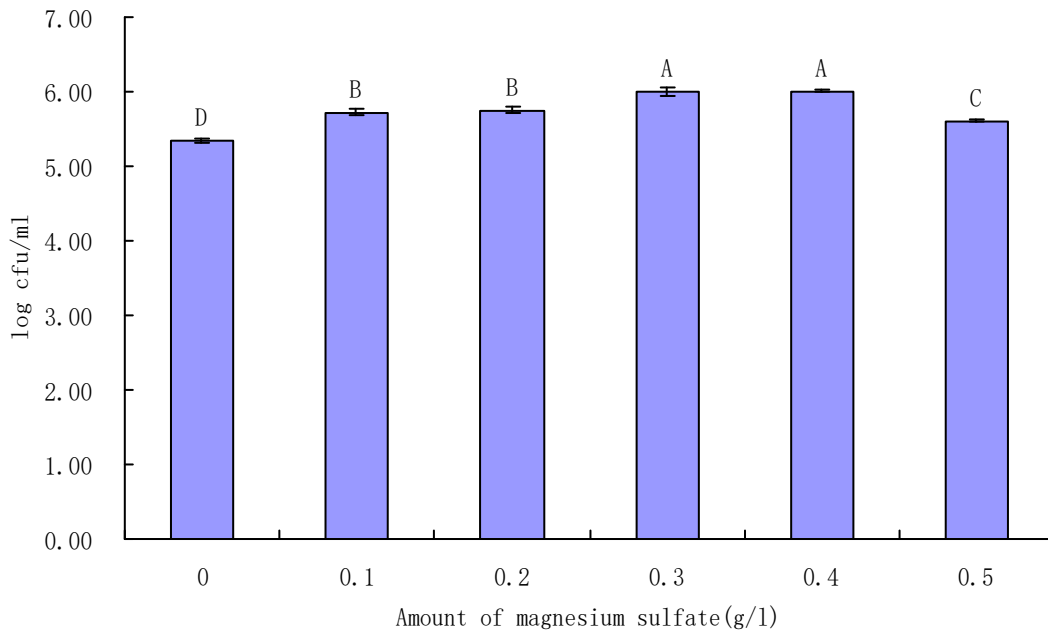


그림1.5 Effects of magnesium sulfate on growth of *B. cereus* in BHI for 6 h incubation at 30°C.

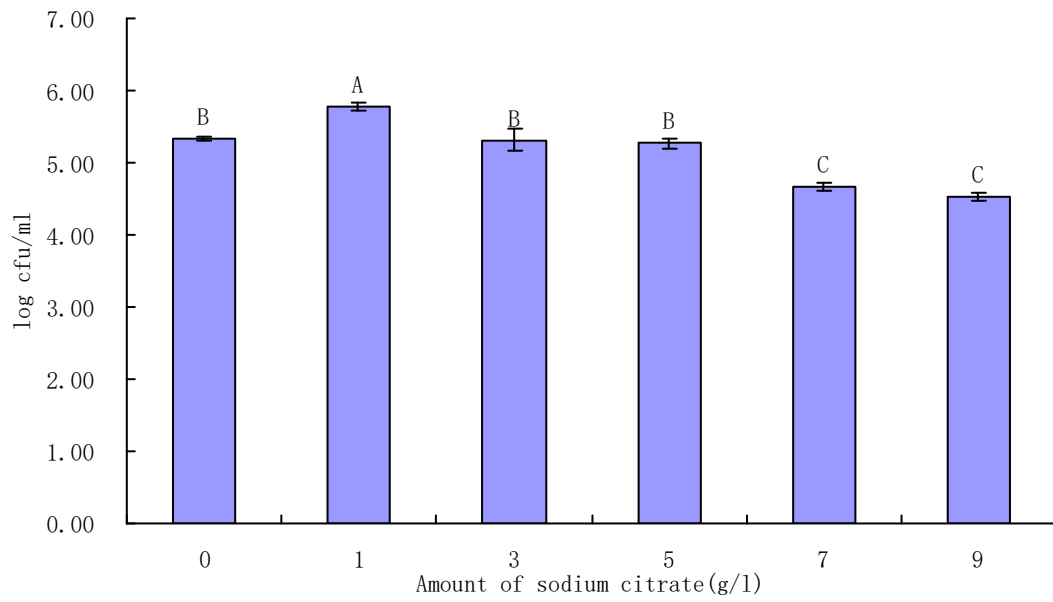


그림1.6 Effects of sodium citrate on growth of *B. cereus* in BHI for 6 h incubation at 30°C.

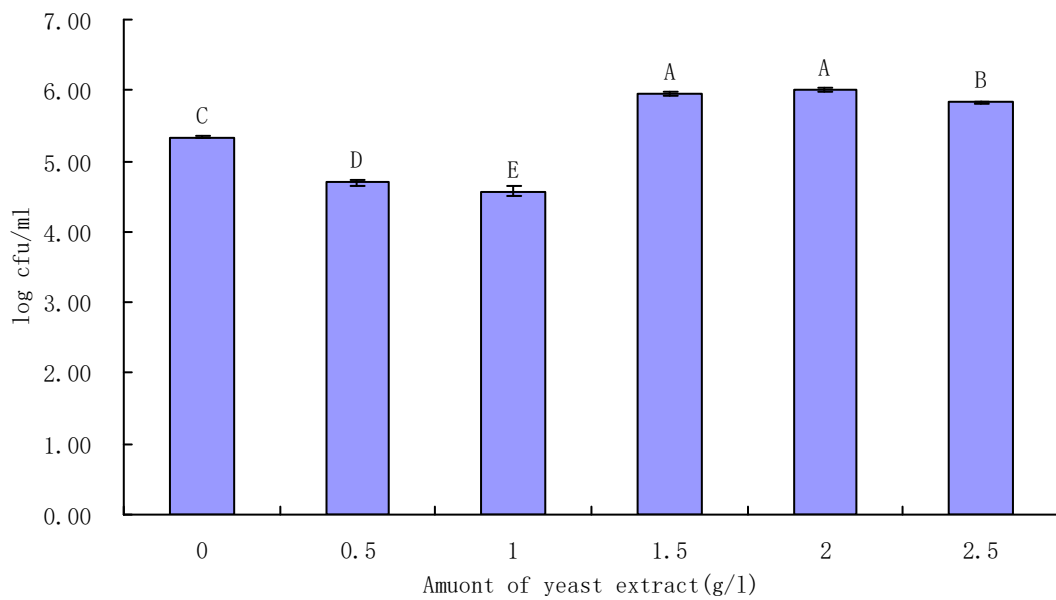


그림1.7 Effects of yeast extract on growth of *B. cereus* in BHI for 6 h incubation at 30°C



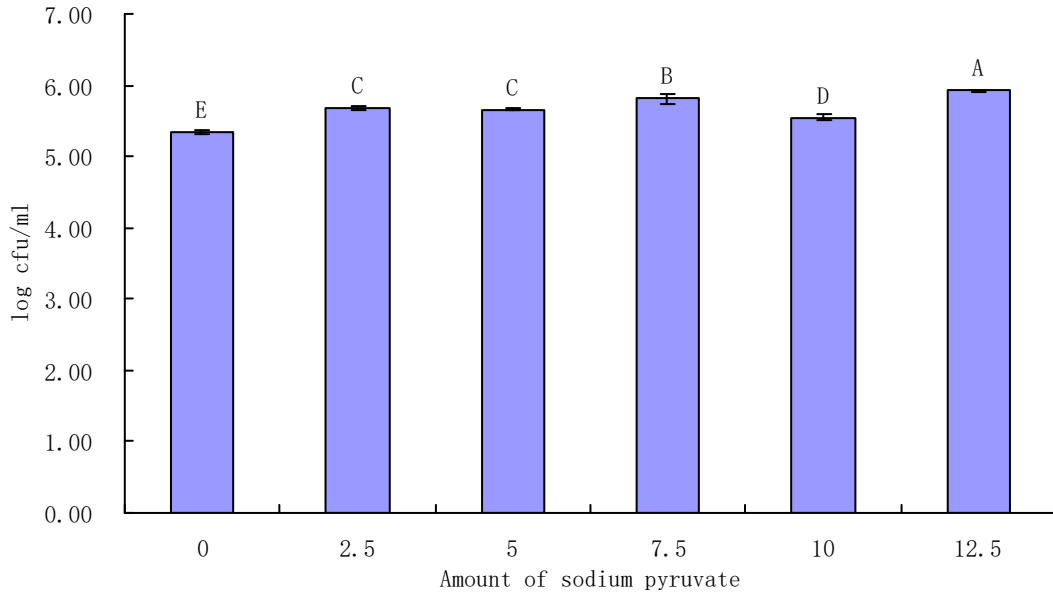


그림1.8 Effects of sodium pyruvate on growth of *B. cereus* in BHI for 6 h incubation at 30°C

### (3) 발굴된 *B. cereus*용 생육촉진인자의 최적농도 설정

- Magnesium sulfate, yeast extract, sodium pyruvate 간의 상호작용을 알아보기 위하여 표 1.5과 같이 17 가지 조합의 실험결과값을 사용하였음
- 그 결과를 Box-Behn design(BBD)에서 적용하여 각각의 농도를 매개변수 범위로 사용하여 분석하였음(magnesium sulfate: 0.2-0.4 g/l, yeast extract: 1.5-2.5 g/l, sodium pyruvate: 7.5-12.5g/l).
- BBD 실험 설계에 맞춘 최종 모델 방정식은 다음과 같음.

$$\text{Colony number(log cfu/mL)} = 6.343 + 0.09(A) + 0.132625(B) - 0.054875(C) - 0.0175(A*B) - 0.0125(A*C) - 0.1725(B*C) - 0.082875(A)^2 + 0.087375(B)^2 - 0.127625(C)^2$$

A-Magnesium sulfate (g/l), B-Sodium pyruvate (g/l), C-Yeast extract (g/l)

- Response surface analysis를 통해 모델 방정식과 표 1.6의 다양한 결과값을 얻었음.
- Prob > F (*p* value)는 0.012로 0.05보다 작아 본 모델 방정식에 의해 결정된 생육촉진인자 (magnesium sulfate 0.34 g/l, sodium pyruvate 12.08g/l, yeast extract 1.82 g/l)의 농도가 표 1.6의 다른 농도보다 *B. cereus*의 생육에 유의적인 영향을 끼쳐 가장 최적의 평균 배지 농도임을 나타냈음.

☿ 1.5 Matrix of BBD experiment design for *B. cereus* at 30°C for 6 h

Trials	Magnesium sulfate (g/l)	Sodium pyruvate (g/l)	Yeast extract (g/l)	Colony number (log CFU/mL)
1	0.3	12.5	1.5	6.54 ± 0.12
2	0.3	7.5	1.5	6.18 ± 0.13
3	0.4	12.5	2.0	6.53 ± 0.12
4	0.2	10	2.5	6.01 ± 0.15
5	0.2	10	1.5	6.09 ± 0.11
6	0.3	10	2.0	6.37 ± 0.15
7	0.3	12.5	2.5	6.39 ± 0.03
8	0.2	7.5	2.0	6.13 ± 0.13
9	0.3	10	2.0	6.46 ± 0.07
10	0.4	7.5	2.0	6.36 ± 0.05
11	0.2	12.5	2.0	6.37 ± 0.03
12	0.3	7.5	2.5	6.10 ± 0.12
13	0.3	10	2.0	6.21 ± 0.05
14	0.3	10	2.0	6.38 ± 0.01
15	0.3	10	2.0	6.30 ± 0.03
16	0.4	10	2.5	6.15 ± 0.03
17	0.4	10	1.5	6.28 ± 0.08

☿ 1.6. Analysis of variance ☿ for response surface quadratic model

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	Prob > F (p-value)
Model	0.36	9	0.040	6.29	0.012
Residual	0.044	7	0.0063		
Lack of Fit	0.0078	3	0.0025	0.28	0.84
Pure error	0.037	4	0.0092		
Cor Total	0.40	16			
R <sup>2</sup> =0.89 <sup>a</sup>		R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub> =0.7485 <sup>b</sup>			

df : degree of freedom; Prob-probability value.

<sup>a</sup> Coefficient of determination.

<sup>b</sup> Adjusted determination coefficient.

- 결정계수( $R^2$ )는 0.89로 1에 근접해 본 모델 방정식이 적합한 것으로 확인되었음.
- 결합결여도(lack of fit)의  $p$  value는 0.84로 0.05보다 높게 나왔으며, 이는 본 모델 방정식에 의해 얻은 *B. cereus*의 생육 예측값과 실제 생육값이 유의적으로 다르지 않고, 예측 생육도와 실제 생육도가 유사한 것을 확인할 수 있었음.
- 얼마나 예측값과 실측값이 같은지를 비교해주는 수정결정계수( $R^2_{Adj}$ )는 0.7485로 예측값과 실측값이 다소 정확하다는 것을 확인할 수 있었음.
- Box-Behn design(BBD) 분석결과, *B. cereus* 균의 생육을 촉진시키는 최적 매개변수값은 magnesium sulfate 0.34 g/l, sodium pyruvate 12.08g/l, yeast extract 1.82 g/l으로 나타났으며, 최적 증균 배지 조성을 표 1.7에 나타내었음.

표 1.7. The new enrichment medium BcEM<sup>a</sup> formula for *B. cereus*

Components	g/l
Calf Brains	7.7
Beef Heart	9.8
Proteose Peptone	10
Dextrose	2
Sodium Chloride	5
Disodium Phosphate	2.5
Magnesium sulfate <sup>b</sup>	0.34
Sodium pyruvate <sup>b</sup>	12.08
Yeast extract <sup>b</sup>	1.82

<sup>a</sup> Modified BHI for *B.cereus*

<sup>b</sup> Components added to BHI

- *B. cereus*의 증균을 위해 개발된 증균배지(BcEM)의 각 성분들의 최적 비율은 magnesium sulfate 0.034%, sodium pyruvate 1.208%, yeast extract 0.182%로 초기 균수 1.12 log CFU/mL로 하였을 때 30°C에서 4시간과 6시간 배양한 후 *B. cereus*의 농도가 각각 4.11 ± 0.08, 6.23 ± 0.29 log CFU/mL로 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었음.
- 최종 모델 방정식을 이용하여 30°C에서 6시간 배양조건에서 균의 생육정도를 예측한 결과 6.54 log CFU/mL로 실제 생육도와 유사한 값을 얻었음.
- 6시간 증균 이후 PCR 또는 ELISA 방법을 사용하여 식중독균을 신속하게 진단할 수 있을 것으로 판단됨(그림 1.9 & 1.10).

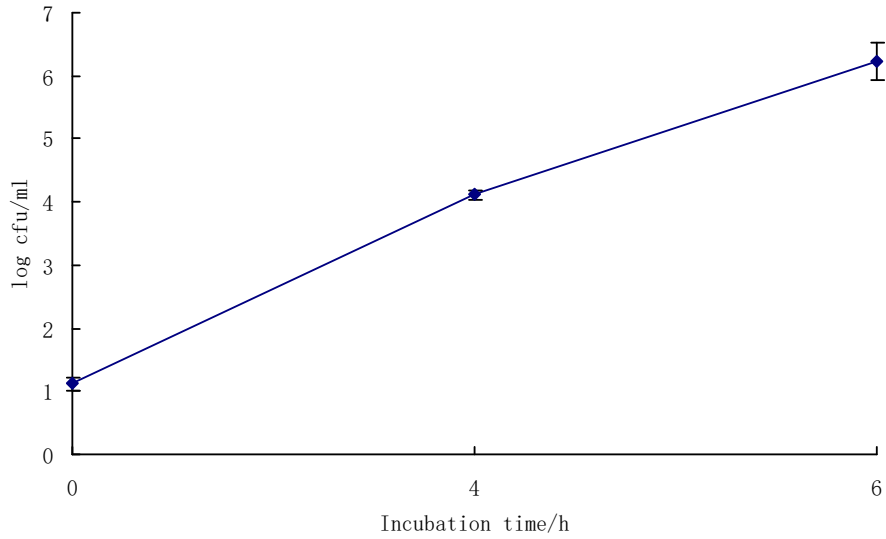


그림1.9. Growth curve of *B. cereus* in BcEM at 30°C for 6h.

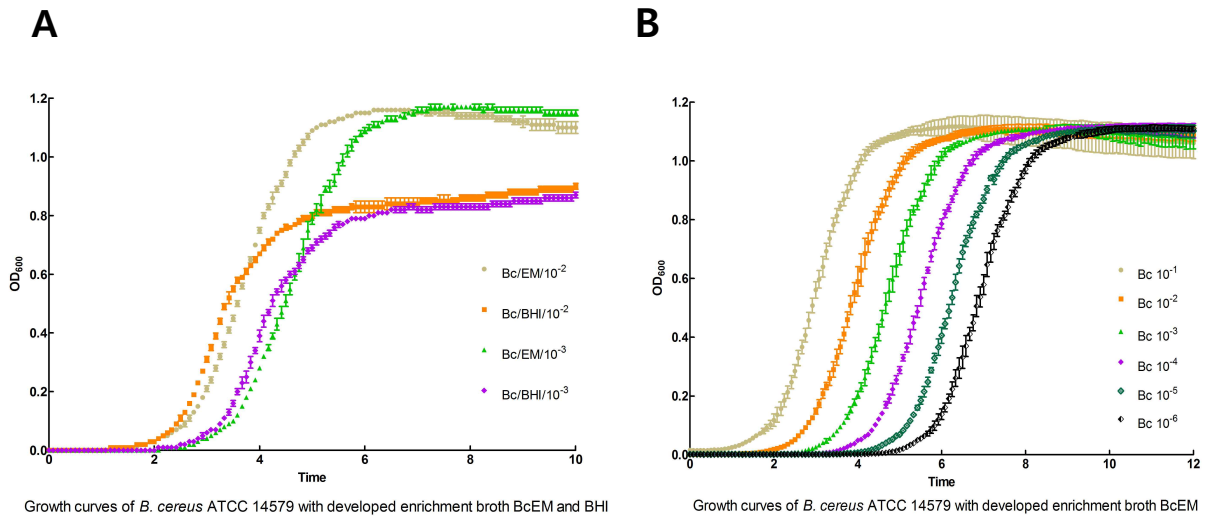


그림1.10 A) Comparison of growth curves of *B. cereus* with developed enrichment media BcEM and BHI at 35°C for 10h. B) growth curves of *B. cereus* with serial dilution of inocula in developed enrichment media BcEM at 35°C for 12h.

## <요약>

- 결론적으로, *B. cereus*를 위해 개발된 최적 증균배지의 조성은 기본 증균 배지 BHI에 다음의 생육인자 및 농도를 첨가한 것임: BHI, 0.034% magnesium sulfate, 1.208% sodium pyruvate, 0.182% yeast extract(표 1.7).
- 개발된 증균배지(BcEM)를 사용하여 *B. cereus*균을 30°C에서 배양하였을 때 초기 농도 1.12 log CFU/mL에서 6시간 배양 후 6.23 ± 0.29 log CFU/mL로 현저하게 증가하였음
- 그러므로, 개발된 증균배지(BcEM)는 6시간 이내에 PCR 또는 ELISA 방법을 사용하여 해당 식중독균을 신속하게 진단할 수 있는 증균 배지로 활용할 수 있을 것임.

(4) *S. aureus*의 증균에 미치는 생육촉진인자의 영향

- 국내외 증균배지에 대한 연구결과를 비교분석한 후, 4종류의 성분(magnesium sulfate, sodium citrate, mannitol, sodium pyruvate)을 *S. aureus* 균의 생육촉진인자로 선택하였고, 표 1.8에 제시한 바와 같이 각 적당한 농도로 BHI에 독립적으로 첨가하였음.

표 1.8 Supplements added to BHI for *S. aureus*

Supplements	g/l				
Magnesium sulfate	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Sodium citrate	1.0	3.0	5.0	7.0	9.0
Mannitol	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0
Sodium pyruvate	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5

- BHI와 다른 농도의 생육촉진인자+BHI에 *S. aureus* 현탁액(초기 농도: 1.39 CFU/mL)을 접종하여 35°C에서 6시간동안 배양한 후 성장한 균수의 변화를 나타내었음(그림 1.11-1.14).
- 본 연구 결과, magnesium sulfate는 0.1-0.3 g/l, mannitol는 10.0-20.0 g/l, sodium pyruvate는 7.5-12.5 g/l을 첨가하였을 때 균의 생육이 다른 농도에서보다 증가하는 것으로 나타났음.
- 이 농도를 최적의 농도로 선택하여 Response Surface Methodology(RSM) - Box-Behnken design(BBD)으로 실험결과를 분석하여 최적 농도를 선택하였음.

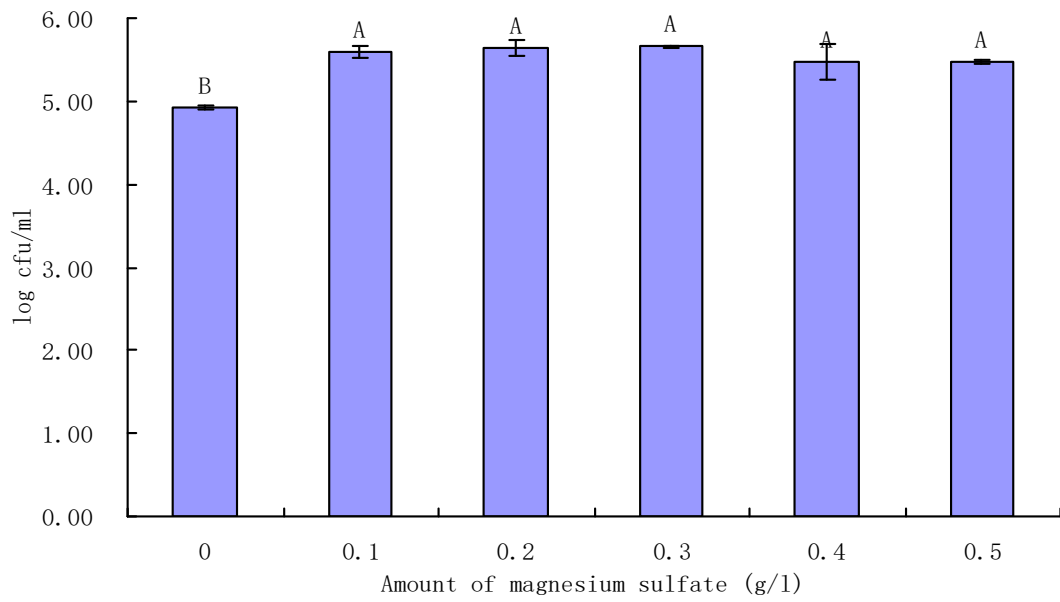


그림1.11 Effects of magnesium sulfate on growth of *S. aureus* in BHI for 6 h incubation at 35°C.

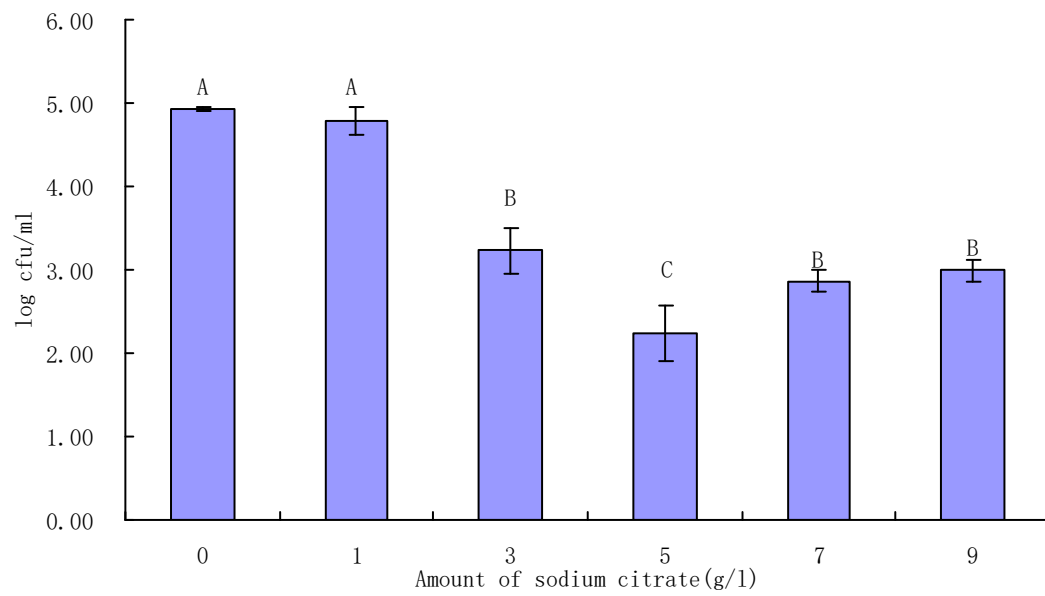


그림1.12 Effects of sodium citrate on growth of *S. aureus* in BHI for 6 h incubation at 35°C.

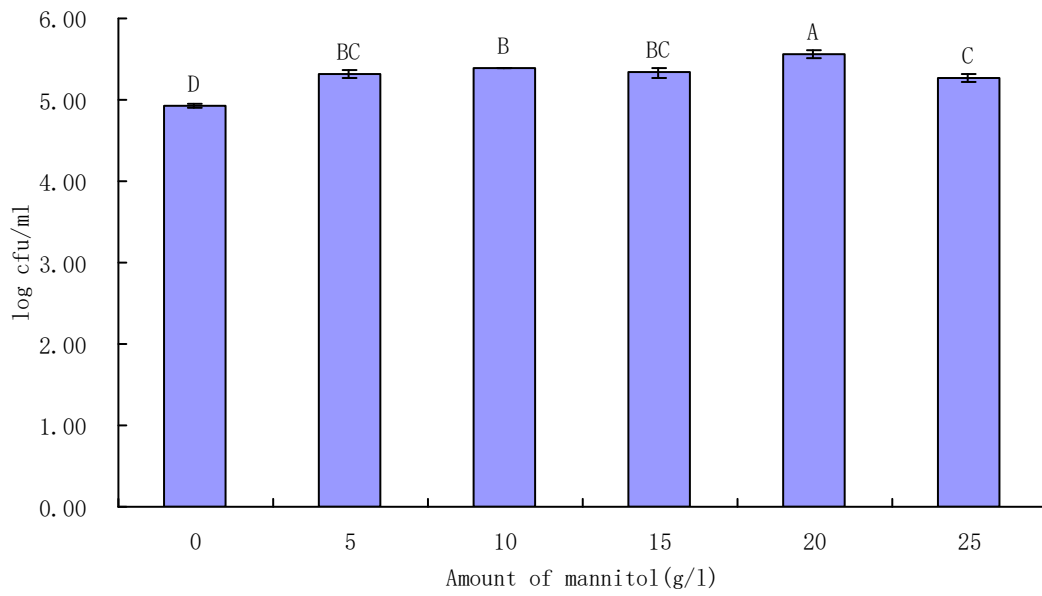


그림1.13 Effects of mannitol on growth of *S. aureus* in BHI for 6 h incubation at 35°C.

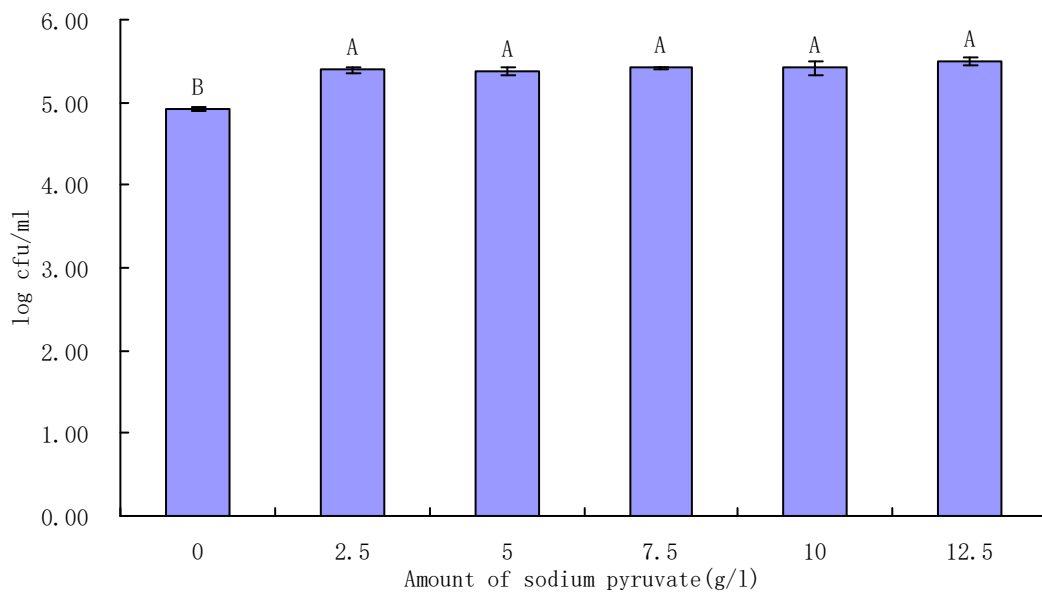


그림1.14 Effects of sodium pyruvate on growth of *S. aureus* in BHI for 6 h incubation at 35°C



(5) 발굴된 *S. aureus*의 증균을 위한 생육촉진인자의 최적농도설정

- magnisum sulfate, mannitol, sodium pyruvate간의 상호작용을 알아보기 위하여 표 1.9과 같이 17 가지 조합의 실험결과값을 사용하였음.
- 그 결과를 Box-Bcehnen design(BBD)에서 적용하여 각각의 농도를 매개변수 범위로 사용하여 분석하였음(magnesium sulfate는 0.1-0.3 g/l, mannitol는 10.0-20.0 g/l, sodium pyruvate는 7.5-12.5 g/l).

표 1.9 Matrix of BBD experiment design for *S. aureus* at 35°C for 6 h

Trials	Magnesium sulfate (g/l)	Sodium pyruvate (g/l)	Mannitol (g/l)	conlony number (log CFU/mL)
1	0.2	12.5	15	4.94 ± 0.29
2	0.2	7.5	15	5.22 ± 0.04
3	0.3	7.5	10	5.24 ± 0.15
4	0.2	10	10	4.95 ± 0.10
5	0.4	12.5	15	5.29 ± 0.04
6	0.3	10	15	4.91 ± 0.17
7	0.3	10	15	5.03 ± 0.27
8	0.4	7.5	15	5.37 ± 0.19
9	0.3	12.5	20	5.35 ± 0.04
10	0.4	10	10	5.13 ± 0.13
11	0.3	10	15	5.12 ± 0.03
12	0.2	10	20	5.26 ± 0.08
13	0.3	12.5	10	5.31 ± 0.17
14	0.3	10	15	5.01 ± 0.14
15	0.3	10	15	5.06 ± 0.08
16	0.4	10	20	5.47 ± 0.15
17	0.3	7.5	20	5.42 ± 0.20

○ BBD 실험 설계에 맞춘 최종 모델 방정식은 다음과 같음.

$$\text{Colony number}(\log \text{ cfu/mL}) = 8.594 - 2.1425(A) - 0.5064(B) - 0.13415(C) + 0.2(A*B) + 0.015(A*C) - 0.0028(B*C) + 2.575(A)^2 + 0.02452(B)^2 - 0.00603(C)^2$$

A- Magnesium sulfate (g/l), B-Sodium pyruvate (g/l), C-Mannitol (g/l)

○ response surface analysis를 통해 모델 방정식과 다양한 결과값을 얻었음(표 1.10).

○ Prob > F (*p* value)는 0.0196로 0.05보다 작으므로 본 모델 방정식에 의해 결정된 생육촉진 인자(magnesium sulfate는 0.1-0.3 g/l, mannitol는 10.0-20.0 g/l, sodium pyruvate는 7.5-12.5 g/l)의 농도가 표 10의 다른 농도보다 *S. aureus*의 생육에 유의적인 영향을 끼쳐 가장 최적의 증균 배지 농도임을 나타냈음.

○ 결정계수( $R^2$ )는 0.87로 본 모델 방정식이 적합한 것으로 확인되었음.

○ 결함결여도(lack of fit)의 *p* value는 0.2197로 본 모델 방정식에 의해 얻은 *S. aureus*의 예측 생육도와 실제 생육도가 유의적으로 다르지 않다는 것을 확인할 수 있었으며 수정결정 계수( $R^2_{Adj}$ )은 0.71로 예측값과 실측값이 다소 정확하다는 것을 확인할 수 있었음.

표 1.10 Analysis of variance 표 for response surface quadratic model

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	Prob > F ( <i>p</i> -value)
Model	0.44	9	0.048	5.28	0.0196
Residual	0.065	7	0.0092		
Lack of Fit	0.041	3	0.014	2.295	0.2197
Pure error	0.024	4	0.0059		
Cor Total	0.50	16			
$R^2=0.87^a$		$R^2_{Adj}=0.71^b$			

df: degree of freedom; Prob-probability value.

<sup>a</sup> Coefficient of determination.

<sup>b</sup> Adjusted determination coefficient.

- Box-Behn design(BBD) 분석결과, *S. aureus* 균의 생육을 촉진시키는 매개변수값은 magnesium sulfate 0.23 g/l, sodium pyruvate 7.62 g/l, manitol 19.86 g/l으로 나타났음.
- 최적 증균 배지 조성을 나타냈음(표 1.11).

표 1.11 The new enrichment medium SaEM<sup>a</sup> formula for *S. aureus*

Components	g/l
Calf Brains	7.7
Beef Heart	9.8
Proteose Peptone	10
Dextrose	2
Sodium Chloride	5
Disodium Phosphate	2.5
Magnesium sulfate <sup>b</sup>	0.23
Sodium pyruvate <sup>b</sup>	7.62
Mannitol <sup>b</sup>	19.86

<sup>a</sup> Modified BHI for *S.aureus*

<sup>b</sup> Components added to BHI

- *S. aureus*의 증균을 위해 개발된 증균배지(SaEM)의 각 성분들의 최적 비율은 magnesium sulfate 0.023%, sodium pyruvate 0.762%, manitol 1.986%로 초기 균수 1.01 log CFU/mL로 하였을 때 35℃에서 4시간과 6시간 배양한 후 균의 농도가 3.89 ± 0.12, 5.43 ± 0.18 log CFU/mL로 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었음.
- 최종 모델 방정식을 이용하여 35℃에서 6시간 배양조건에서 균의 생육정도를 예측한 결과 5.51 log CFU/mL로 실제 생육도와 유사한 값을 얻었음(그림 1.15 & 1.16).
- 6시간 증균 이후 PCR 또는 ELISA 방법을 사용하여 식중독균을 신속하게 진단할 수 있을 것으로 판단됨.

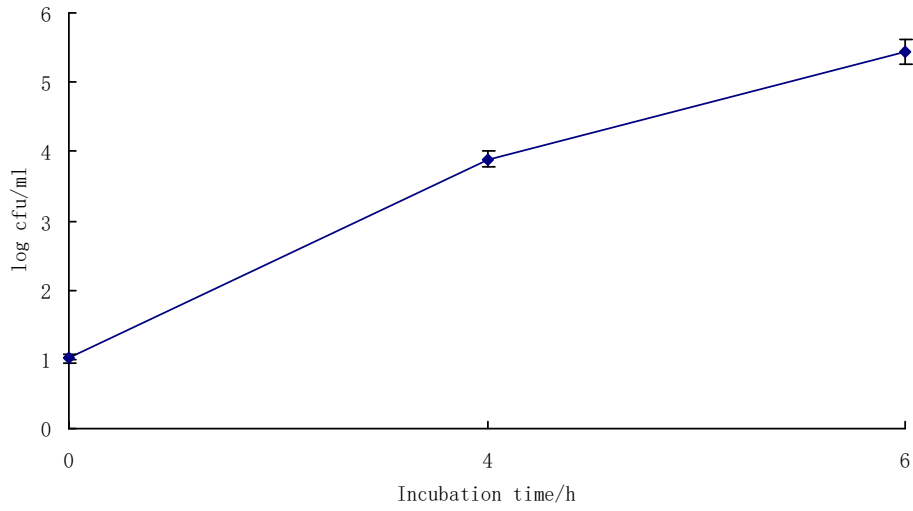


그림1.15. Growth curve of *S. aureus* in SaEM at 35°C for 6h.

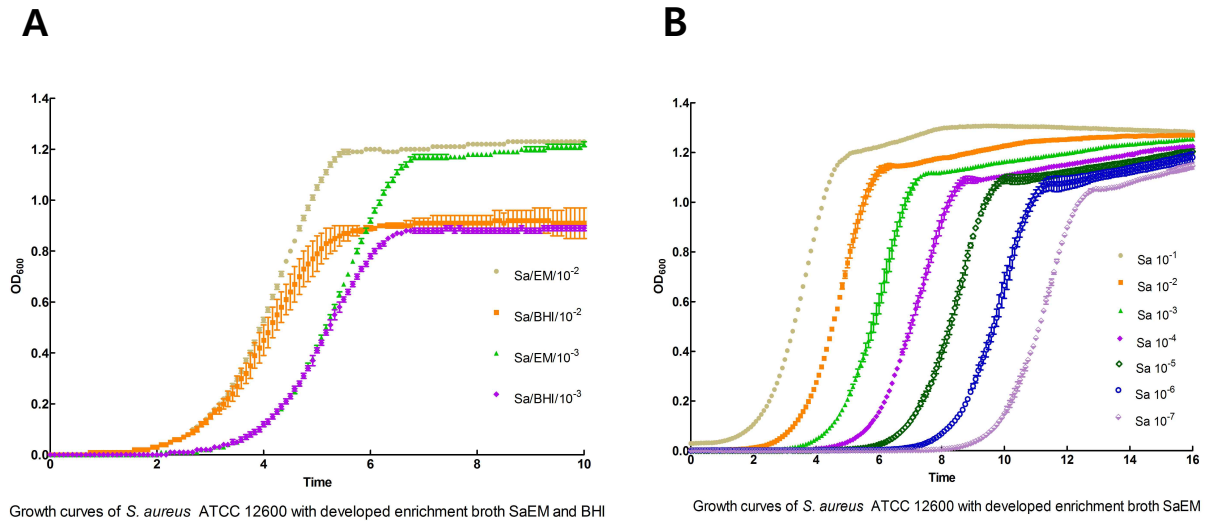


그림1.16 Comparison of growth curves of *S. aureus* with developed enrichment media SaEM and BHI at 35°C for 10h (A), and with serial dilution of inocula in developed enrichment media SaEM at 35°C for 16h (B).

## <요약>

- *S. aureus*의 개발된 최적 증균배지의 조성은 기본 증균 배지 BHI에 다음의 생육인자 및 농도를 첨가한 것임: BHI, 0.023% magnesium sulfate, 0.762% sodium pyruvate 및 1.986% manitol (표 12).
- 개발된 증균 배지 SaEM을 사용하여 *S. aureus* 균을 35°C, 6시간 동안 배양하였을 때 *S. aureus*의 초기 농도가 1.01 log CFU/mL에서 5.43 ± 0.18 log CFU/mL로 현저하게 증가하였음.
- 그러므로, 개발된 증균배지(SaEM)는 6시간 이내에 PCR 또는 ELISA 방법을 사용하여 해당 식중독균을 신속하게 진단할 수 있는 증균 배지로 활용할 수 있을 것임.

(6) *L. monocytogenes*의 증균에 미치는 생육촉진인자의 영향

- 국내외 증균배지에 대한 연구결과를 비교분석한 후, 4종류의 성분(magnesium sulfate, ferrous sulfate, sodium pyruvate, yeast exyract)을 *L. monocytogenes* 균의 생육촉진인자로 선택하였고, 표 13에 제시한 바와 같이 각 적당한 농도로 BHI에 독립적으로 첨가하였음(표 1.12).
- BHI와 다른 농도의 생육촉진인자+BHI에 *L. monocytogenes* 현탁액(초기 농도: 1.63 CFU/mL)을 접종하여 35℃에서 6시간동안 배양한 후 성장한 균수의 변화를 나타내었음(그림 1.17-1.20).
- 본 연구 결과, Magnesium sulfate는 5.0-9.0 g/l, sodium pyruvate 2.5-7.5 g/l, yeast extractg/l, 6.0-10.0 g/l을 첨가하였을 때 균의 생육이 다른 농도에서보다 증가하는 것으로 나타났음.
- 이 농도를 최적의 농도로 선택하여 Response Surface Methodology(RSM) - Box-Bcehnen design(BBD)으로 실험결과를 분석하여 최적 농도를 선택하였음.

표 1.12 Supplements added to BHI for *L. monocytogenes*

Supplements	g/l				
Magnesium sulfate	1.0	3.0	5.0	7.0	9.0
Ferrous sulfate	1.0	3.0	5.0	7.0	9.0
Sodium pyruvate	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
Yeast exyract	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0

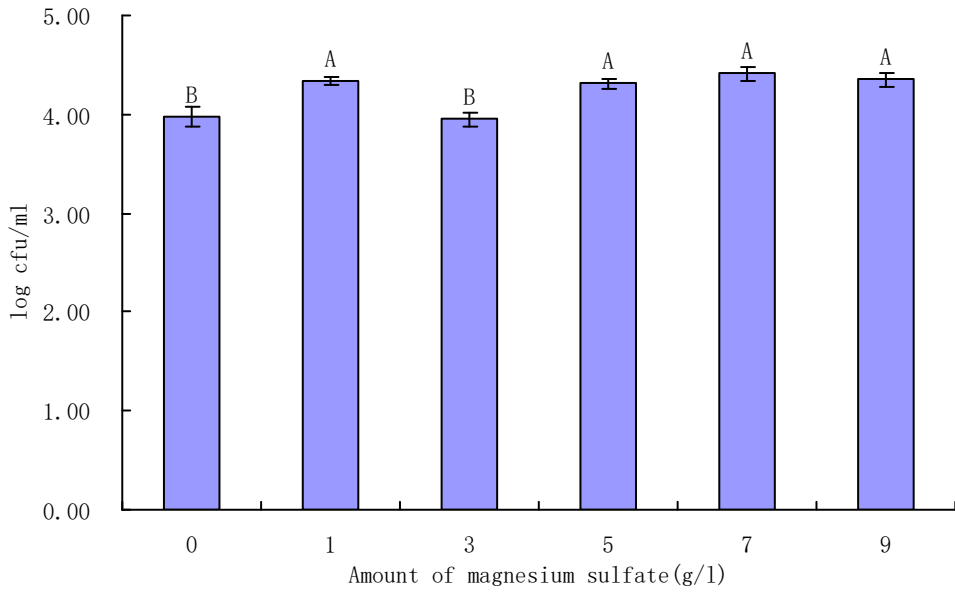


그림1.17 Effects of magnesium sulfate on growth of *L. monocytogenes* in BHI for 6 h incubation at 35°C.

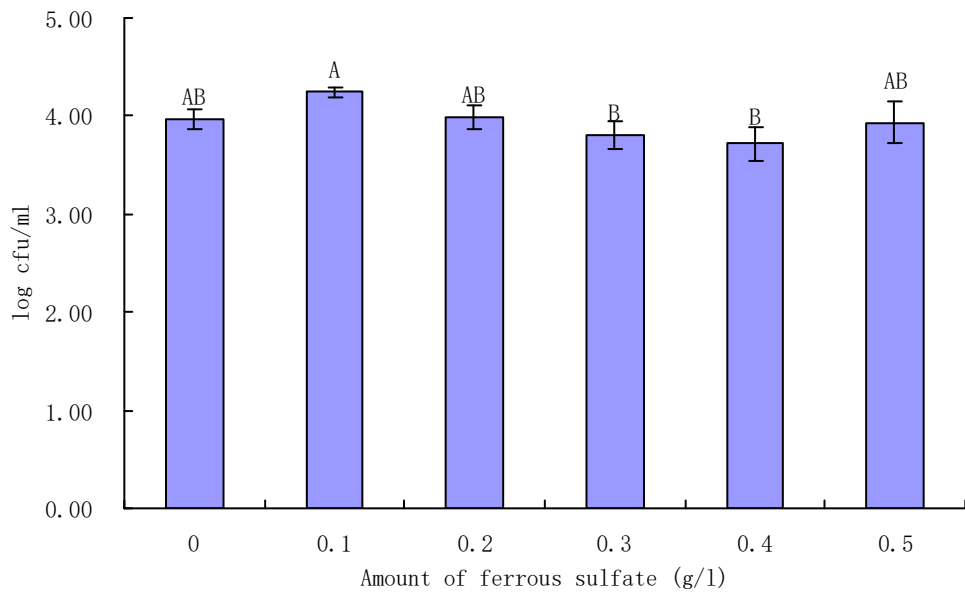


그림1.18 Effects of ferrous sulfate on growth of *L. monocytogenes* in BHI for 6 h incubation at 35°C.

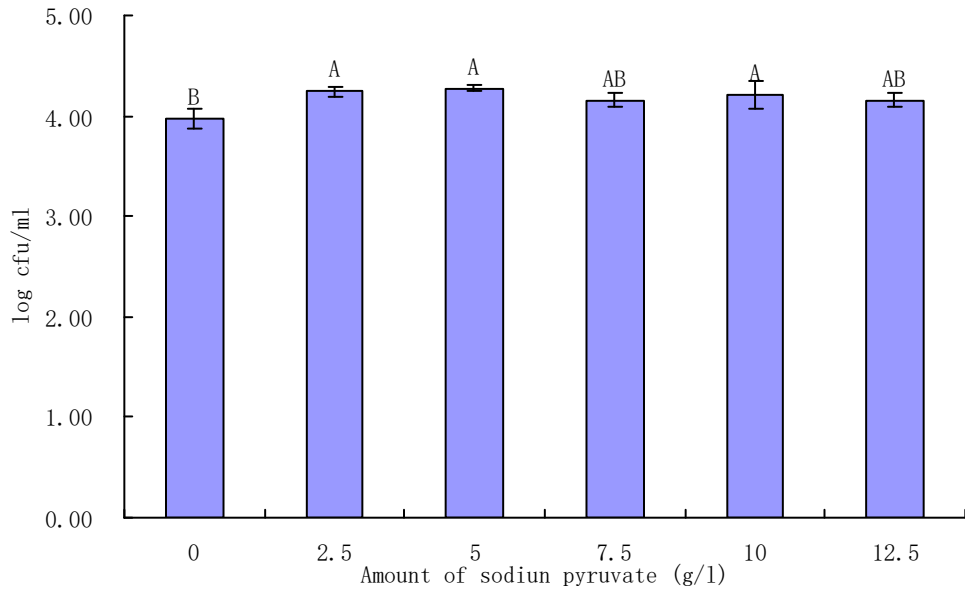


그림1.19 Effects of sodium pyruvate on growth of *L. monocytogenes* in BHI for 6 h incubation at 35°C.

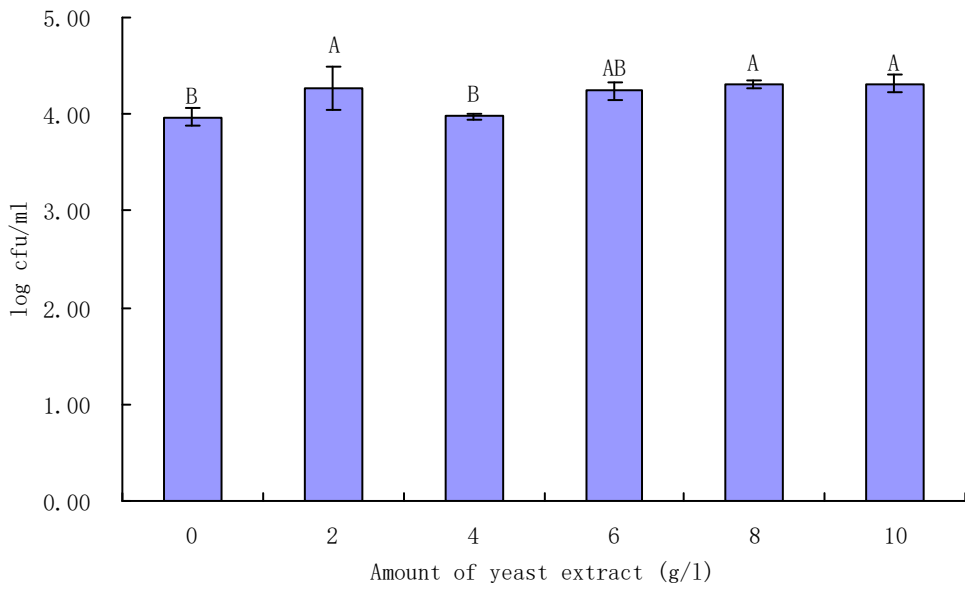


그림 1.20 Effects of yeast exytract on growth of *L. monocytogenes* in BHI for 6 h incubation at 35°C.



(7) 발굴된 *L. monocytogenes* 생육촉진인자의 최적농도설정

○ magnisum sulfate, sodium pyruvate, yeast extract 간의 상호작용을 알아보기 위하여 표 1.13과 같이 17 가지 조합의 실험결과값을 사용하였음.

표 1.13 Matrix of BBD experiment design for *L. monocytogenes*

Trials	Manganese sulfate (g/l)	Sodium pyruvate (g/l)	Yeast extract (g/l)	Colony number (log CFU/ml)
1	7.0	2.5	6.0	4.47 ± 0.01
2	9.0	5.0	10.0	4.28 ± 0.08
3	5.0	2.5	8.0	4.30 ± 0.09
4	9.0	2.5	8.0	4.27 ± 0.03
5	7.0	7.5	6.0	4.32 ± 0.12
6	7.0	5.0	8.0	4.35 ± 0.02
7	7.0	5.0	8.0	4.45 ± 0.04
8	9.0	7.5	8.0	4.20 ± 0.11
9	7.0	5.0	8.0	4.43 ± 0.07
10	7.0	5.0	8.0	4.50 ± 0.13
11	9.0	5.0	6.0	4.22 ± 0.05
12	5.0	5.0	10.0	4.24 ± 0.11
13	7.0	7.5	10.0	4.38 ± 0.07
14	5.0	5.0	6.0	4.16 ± 0.06
15	5.0	7.5	8.0	4.12 ± 0.08
16	7.0	5.0	8.0	4.42 ± 0.01
17	7.0	2.5	10.0	4.40 ± 0.06

○ 그 결과를 Box-Behn design(BBD)에서 적용하여 각각의 농도를 매개변수 범위로 사용하여 분석하였음(magnesium sulfate는 5.0-9.0 g/l, sodium pyruvate는 2.5-7.5 g/l, yeast extract는 6.0-10.0 g/l).

○ BBD 실험 설계에 맞춘 최종 모델 방정식은 다음과 같음.

$$\text{Colony number}(\log \text{ cfu/mL}) = 4.431365 + 0.01875(A) - 0.05229(B) + 0.016464(C) + 0.0275(A*B) - 0.005(A*C) + 0.032928(B*C) - 0.1884(A)^2 - 0.02047(B)^2 - 0.01797(C)^2$$

A- Manganese sulfate (g/l), B- Sodium pyruvate (g/l), C- Yeast extract (g/l)

○ response surface analysis를 통해 모델 방정식과 표 1.14의 다양한 결과값을 얻었음.

표 1.14 Analysis of variance 표 for response surface quadratic model

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	Prob > F (p-value)
Model	0.19	9	0.021	9.38	0.0037
Residual	0.016	7	0.0023		
Lack of Fit	0.0039	3	0.0013	0.43	0.7406
Pure error	0.012	4	0.0030		
Cor Total	0.21	16			
R <sup>2</sup> =0.92 <sup>a</sup>		R <sup>2</sup> Adj=0.82 <sup>b</sup>			

df-degree of freedom; Prob-probability value

a-Coefficient of determination.

b-Adjusted determination coefficient

○ Prob > F (p value)는 0.0037로 0.05보다 작으므로 본 모델 방정식에 의해 결정된 생육촉진 인자(magnesium sulfate는 5.0-9.0 g/l, sodium pyruvate는 2.5-7.5 g/l, yeast extract는 6.0-10.0 g/l)의 농도가 표 14의 다른 농도보다 *L. monocytogenes*의 생육에 유의적인 영향을 끼쳐 가장 최적의 평균 배지 농도임을 나타냈음.

○ 결정계수(R<sup>2</sup>)는 0.92로 본 모델 방정식이 적합한 것으로 확인되었음.

○ 결함결여도(lack of fit)의 p value는 0.7406으로 본 모델 방정식에 의해 얻은 *L. monocytogenes*의 예측 생육도와 실제 생육도가 유의적으로 다르지 않다는 것을 확인할 수

있었으며 수정결정계수( $R^2_{Adj}$ )가 0.82로 예측값과 실측값이 다소 정확하다는 것을 확인할 수 있었음.

- Box-Behn design(BBD) 분석결과, *L. monocytogenes* 균의 생육을 촉진시키는 매개변수 값은 magnesium sulfate 6.96 g/l, sodium pyruvate 2.50 g/l, yeast extract 7.09 g/l으로 나타났다으며, 최적 증균 배지 조성을 표 1.15에 나타내었음.
- *L. monocytogenes*의 증균을 위해 개발된 증균배지(LmEM)의 각 성분들의 최적 비율은 magnesium sulfate 0.696%, sodium pyruvate 0.25%, yeast extract 0.709%로 초기 균수 1.52 log CFU/mL에서 35°C에서 4시간과 6시간 배양한 후 균의 농도가  $2.97 \pm 0.08$ ,  $4.38 \pm 0.18$  log CFU/mL로 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었음.
- 35°C에서 6시간 증균 배양 후  $4.38 \pm 0.18$  이상 증가한 것으로 보아, *L. monocytogenes*는 *B. cereus*나 *S. aureus*와 달리 6시간 증균 이후 PCR 또는 ELISA 방법을 사용하여 식중독 균을 신속하게 진단할 수 있을 것으로 판단된다(그림 1.21 & 1.22).
- 최종 모델 방정식을 이용하여 35°C에서 6시간 배양조건에서 균의 생육정도를 예측한 결과 4.47 log CFU/mL로 실제 생육도와 유사한 값을 얻었음.

표 1.15 The new enrichment medium LmEM<sup>a</sup> formula for *L. monocytogenes*

Components	g/l
Calf Brains	7.7
Beef Heart	9.8
Proteose Peptone	10
Dextrose	2
Sodium Chloride	5
Disodium Phosphate	2.5
Manganese sulfate	6.96
Sodium pyruvate	2.5
Yeast extract	7.09

<sup>a</sup> Modified BHI for *L. monocytogenes*

<sup>b</sup> Components added to BHI

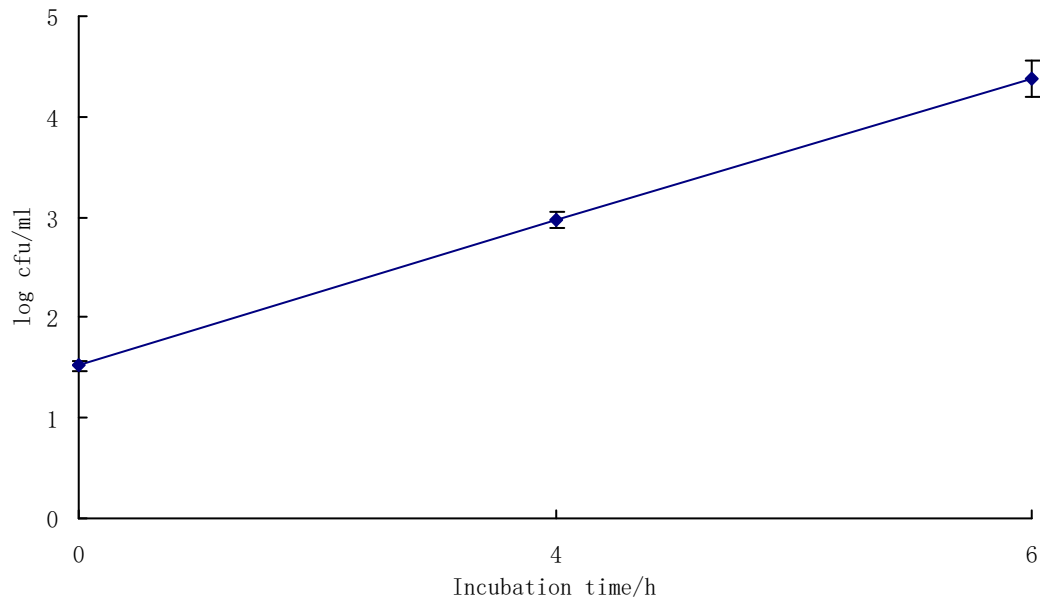


그림1.21 Growth curve of *L. monocytogenes* in LmEM at 35°C for 6h.

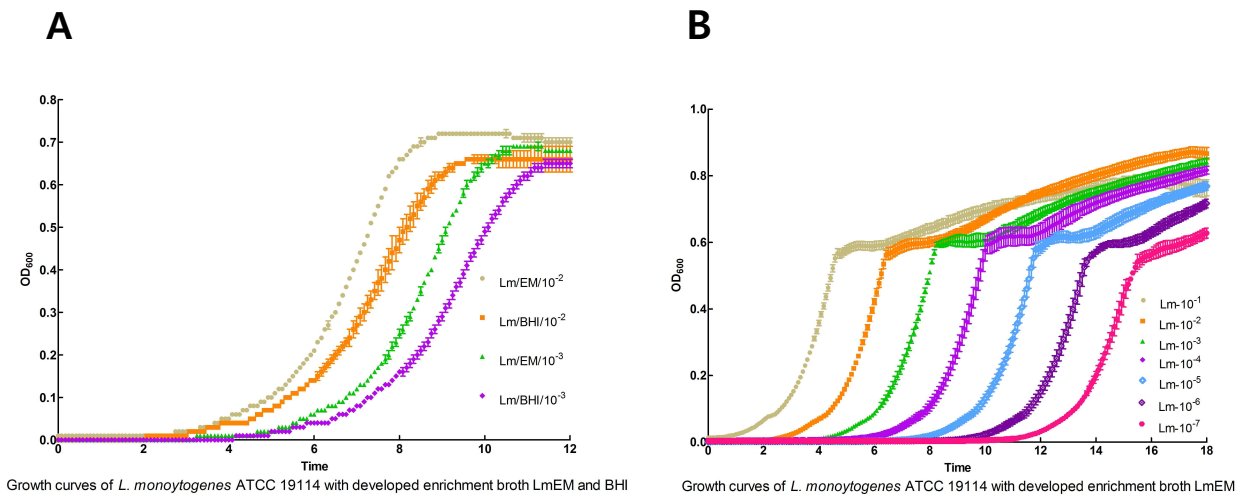


그림1.22 Comparison of growth curves of *L. monocytogenes* with developed enrichment media LmEM and BHI at 35°C for 12h (A), and with serial dilution of inocula in developed enrichment media LmEM at 35°C for 18h (B).

### <요약>

- *L. monocytogenes*의 개발된 최적 증균배지(LmEM)의 조성은 기본 증균 배지 BHI에 다음의 생육인자 및 농도를 첨가한 것임: 0.696% magnesium sulfate, 0.25% sodium pyruvate 및 0.709% yeast extract (표 1.15).
- 개발된 증균 배지(LmEM) 조성을 사용하여 *L. monocytogenes* 균을 35°C, 6시간 동안 배양하였을 때 *L. monocytogenes*의 초기 농도가 1.52 log CFU/mL에서 4.38 ± 0.18 log CFU/mL로 현저하게 증가하였음.
- 그러나, *L. monocytogenes*는 *B. cereus*나 *S. aureus*와 달리 6시간 증균으로는 5 - 6 log CFU/mL 이상으로 증균할 수 없으므로, PCR 법으로는 검출이 가능하겠으나 면역항체 진단키트 등의 기법으로는 더 오랜 시간의 배양이 필요한 것으로 판단됨.

## 6. 개발한 최적 증균 배지에서 손상세포의 회복능 비교

### 가. 연구 방법: 손상세포(injured cell)의 준비

- 개발한 최적 증균 배지와 일반 배지에서 injured cell의 회복능 비교를 위하여 acid, heat, and cold temperature로 3종의 식중독 세균을 손상시킨 후 상기에서 개발한 최적 증균 배지와 일반 증균 배지에서 회복능을 다음과 같이 조사하였음.

#### (1) 산처리 손상세포

- 세척된 세균 현탁액에 2 mL의 0.85% 멸균 생리 식염수를 현탁시킨 후, pH가 1.5로 조정된 citric acid 용액을 첨가하여 최종 세균 현탁액의 pH를 4.0으로 맞춘 후 실온에서 12시간 보관하여 세균을 산에 의해 세포를 손상시킨 후 실험에 사용하였음.
- 세균 현탁액에 산 처리를 하여 세포손상을 일으킨 후, 세포 현탁액을 0.1% 펩톤수에 적절한 농도( $10^1$ - $10^2$ cfu/mL,  $10^2$ - $10^3$ cfu/mL)로 단계 희석하여 각 최적 증균 배지와 BHI에 각각 접종하여 30°C에서 4시간과 6시간씩 배양하여 콜로니수를 계수하였음.

#### (2) 열처리 손상세포

- 세척된 세균 현탁액에 2 mL의 0.85% 멸균 생리 식염수를 현탁시킨 후, water bath에 55°C로 10분간 가열하여 세균을 열에 의해 세균을 손상시켰음. 처리 직후에 추가적인 열 손상을 방지하기 위해 튜브를 ice bath에 30초간 냉각시킨 후 실험에 사용하였음.
- 세균 현탁액에 열 처리를 하여 세포손상을 일으킨 후, 세포 현탁액을 0.1% 펩톤수에 적절한 농도( $10^1$ - $10^2$ cfu/mL,  $10^2$ - $10^3$ cfu/mL)로 단계 희석하여 각 최적 증균 배지와 BHI에 각각 접종하여 30°C에서 4시간과 6시간씩 배양하여 콜로니수를 계수하였음.

#### (3) 저온처리 손상세포

- 세척된 세균 현탁액에 2 mL의 0.85% 멸균 생리 식염수를 현탁시킨 후, 4°C에서 5시간 유지시켜 저온에 의해 세균을 손상시킨 후, 세균의 추가적인 저온 손상을 방지하기 위해 흐르는 물에 1분간 노출 시킨 후, 실험에 사용하였음.
- 세균 현탁액에 저온 처리를 하여 세포손상을 일으킨 후, 세포 현탁액을 0.1% 펩톤수에 적절한 농도( $10^1$ - $10^2$ cfu/mL,  $10^2$ - $10^3$ cfu/mL)로 단계 희석하여 각 최적 증균 배지와 BHI에 각각 접종하여 30°C에서 4시간과 6시간씩 배양하여 콜로니수를 계수하였음.

### 나. 연구 결과

#### (1) injured *B. cereus*의 회복능에 대한 개발된 증균배지의 효과

○ *B. cereus*에 산, 열 및 저온 처리한 결과는 다음과 같음(표 1.16).

**(가) 무처리구**

○ 아무 처리 하지 않는 대조구에서는 저농도와 고농도의 초기 균수(저농도:  $0.59 \pm 0.16$  CFU/mL, 고농도:  $1.64 \pm 0.15$  CFU/mL)에서 30℃, 4시간 배양하였을 때 BcEM가 BHI보다 저농도는  $0.32 \log$  CFU/mL, 고농도는  $0.28 \log$  CFU/mL만큼 같은 시간 내에 균의 성장에 도움을 주었으며 6시간 배양하였을 때 BcEM가 BHI보다 저농도는  $0.35 \log$  CFU/mL, 고농도는  $0.33 \log$  CFU/mL만큼 같은 시간 내에 균의 성장에 도움을 주었음.

○ 4시간과 6시간에서 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났음.

**(나) 산처리 손상세포 (Acid injured cell)**

○ 산처리에 의해 세균을 손상시킨 후 회복능을 측정한 결과는 표 1.16과 같음.

○ 낮은 초기 균수( $0.54 \pm 0.09$  CFU/mL) 실험구에서는 4시간 증균배양 시, BcEM와 BHI에서 각각  $3.47 \pm 0.02$ ,  $3.06 \pm 0.03$  CFU/mL로 BcEM가 BHI보다  $0.41 \log$  CFU/mL 만큼 균의 생육을 유의적으로 증가시켰으며 6시간 증균배양 시, 각각  $4.36 \pm 0.12$ ,  $4.04 \pm 0.06$  CFU/mL로  $0.32 \log$  CFU/mL 만큼 균의 생육을 유의적으로 증가시켰음.

○ 손상된 세균의 회복능에 두 배지간의 유의적인 차이가 있는 것으로 확인되었음.

○ 높은 초기 균수( $1.65 \pm 0.15$  CFU/mL) 실험구에 산처리를 한 후, 손상된 세균을 BcEM와 BHI에 4시간 배양한 결과, BcEM는  $4.40 \pm 0.32$  CFU/mL, BHI는  $4.15 \pm 0.11$  CFU/mL로 두 배지간의 회복능에 유의적인 차이가 없었음.

○ 6시간 배양 결과에서도 각각  $5.41 \pm 0.02$ ,  $5.12 \pm 0.05$  CFU/mL로 두 배지간의 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었음(표 1.16).

**(다) 열처리 손상세포(Heat injured cell)**

○ 열처리에 의해 세균을 손상시킨 후 회복능을 측정한 결과는 표 1.16과 같음.

○ 낮은 초기 균수( $0.15 \pm 0.21$  CFU/mL) 실험구에서는 4시간 증균배양 시, BcEM와 BHI에서 각각  $3.41 \pm 0.13$ ,  $3.00 \pm 0.06$  CFU/mL로  $0.41 \log$  CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였으며 6시간 증균배양 시, 각각  $4.79 \pm 0.06$ ,  $4.29 \pm 0.25$  CFU/mL로  $0.50 \log$  CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였음.

○ 4시간과 6시간 배양 후 손상된 세균의 회복능에 BcEM가 BHI보다 열처리에 의해 손상된 세균을 회복시키는데 효과가 있는 것으로 확인되었음.

- 높은 초기 균수( $1.14 \pm 0.09$  CFU/mL)에서 4시간 배양하였을 시 BcEM와 BHI는 각각  $4.48 \pm 0.12$ ,  $3.95 \pm 0.07$  CFU/mL로 0.50 log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였음.
- 그러나 6시간 배양 결과에서는 0.25 log CFU/mL만큼 생육을 증가시켜 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었음.
- 높은 농도( $1.14 \pm 0.09$  CFU/mL)에서 6시간 배양한 결과를 제외하고 **BcEM가 BHI보다 빠른 시간 내에 균의 성장을 촉진하는 것을 확인할 수 있었음.**

표 1.16. Efficacy of BcEM and BHI in recovering injured cells of *B. cereus* by acidification, heat and cold

Treatment	Initial cell number	Mean log CFU/mL			
		BHI	BcEM*	BHI	BcEM
		4h		6h	
None (uninjured)	$0.59 \pm 0.16^{e**}$	$3.30 \pm 0.14^d$	$3.62 \pm 0.05^c$	$4.98 \pm 0.03^b$	$5.33 \pm 0.15^a$
	$1.64 \pm 0.15^e$	$4.43 \pm 0.05^d$	$4.71 \pm 0.08^c$	$5.92 \pm 0.05^b$	$6.25 \pm 0.04^a$
Acidification	$0.54 \pm 0.09^e$	$3.06 \pm 0.03^d$	$3.47 \pm 0.02^c$	$4.04 \pm 0.06^b$	$4.36 \pm 0.12^a$
	$1.65 \pm 0.05^c$	$4.15 \pm 0.11^b$	$4.40 \pm 0.32^b$	$5.12 \pm 0.05^a$	$5.41 \pm 0.02^a$
Heating	$0.15 \pm 0.21^e$	$3.00 \pm 0.06^d$	$3.41 \pm 0.13^c$	$4.29 \pm 0.25^b$	$4.79 \pm 0.06^a$
	$1.14 \pm 0.09^d$	$3.95 \pm 0.07^c$	$4.48 \pm 0.12^b$	$5.58 \pm 0.12^a$	$5.83 \pm 0.11^a$
Cold	$0.80 \pm 0.14^e$	$3.46 \pm 0.12^d$	$3.84 \pm 0.18^c$	$4.01 \pm 0.13^b$	$4.39 \pm 0.06^a$
	$1.74 \pm 0.27^e$	$3.90 \pm 0.04^d$	$4.55 \pm 0.04^c$	$5.05 \pm 0.14^b$	$5.61 \pm 0.02^a$

\* Modified BHI for *B. cereus*

\*\* Within rows, means with different letter (a,b,c,d or e) are significantly different( $P < 0.05$ )

#### (라) Cold injured cell

- 저온처리한 세균의 회복능을 측정한 결과는 표 1.16과 같음.
- 낮은 초기 균수( $0.80 \pm 0.14$  CFU/mL) 실험구에서 4시간 증균배양 시, BcEM와 BHI에서 각각  $3.84 \pm 0.18$ ,  $3.46 \pm 0.12$  CFU/mL로 0.38 log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였으며 6시간 증균배양 시, 각각  $4.39 \pm 0.06$ ,  $4.01 \pm 0.13$  CFU/mL로 0.38 log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였음.



- 저온처리 시 4시간과 6시간 배양 처리구에서 BcEM가 BHI보다 같은 시간 내에 균의 성장을 촉진하는 것을 확인할 수 있었음.
- 높은 초기 균수( $1.74 \pm 0.27$  CFU/mL)에서 4시간 배양하였을 시 BcEM와 BHI는 각각  $4.55 \pm 0.04$ ,  $3.90 \pm 0.04$  CFU/mL로  $0.65$  log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였으며 6시간 배양 결과에서도 각각  $5.61 \pm 0.02$ ,  $5.05 \pm 0.14$  CFU/mL로  $0.56$  log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였음.
- BcEM가 BHI보다 손상된 세균의 회복에 유의적으로 효과가 있는 것으로 확인됨.

## (2) 손상된 *S. aureus* 세포의 회복능에 대한 개발된 증균배지(SaEM)의 효과

### (가) 무처리구

- *S. aureus*에 산, 열 및 저온 처리한 결과를 표 1.17에 나타내었으며 그 결과는 다음과 같음.
- 아무 처리 하지 않는 대조구에서는 저농도와 고농도의 초기 균수(저농도:  $0.69 \pm 0.12$  CFU/mL, 고농도:  $1.39 \pm 0.12$  CFU/mL)에서 30℃, 4시간 배양하였을 때 SaEM가 BHI보다 저농도는  $0.45$  log CFU/mL, 고농도는  $0.32$  log CFU/mL만큼 균의 생육을 증가시켰으며 SaEM가 BHI보다 같은 시간내에 균의 성장에 유의적인 효과가 있는 것으로 나타났음.
- 6시간 배양하였을 때 SaEM가 BHI보다 저농도는  $0.32$  log CFU/mL, 고농도는  $0.35$  log CFU/mL만큼 같은 시간내에 균의 성장에 도움을 주는 것으로 나타났음.

### (나) Acid injured cell

- 산처리에 의해 세균을 손상시킨 후 회복능을 측정한 결과는 표 1.17과 같음.
- 낮은 초기 균수( $0.74 \pm 0.07$  CFU/mL) 실험구에서는 4시간 증균배양 시, SaEM와 BHI에서 각각  $2.70 \pm 0.11$ ,  $2.31 \pm 0.08$  CFU/mL로 SaEM가 BHI보다  $0.39$  log CFU/mL 만큼 균의 생육을 유의적으로 증가시켰으며 6시간 증균배양 시, 각각  $3.82 \pm 0.07$ ,  $3.42 \pm 0.14$  CFU/mL로  $0.40$  log CFU/mL 만큼 균의 생육을 유의적으로 증가시켰음.
- 손상된 세균을 35℃에서 4시간과 6시간 동안 배양하였을 때 두 배지간의 회복능 효과가 유의적으로 차이가 있는 것으로 확인되었음.
- 높은 초기 균수( $1.95 \pm 0.06$  CFU/mL) 실험구에 산처리를 한 후, 손상된 세균을 SaEM와 BHI에 4시간 배양한 결과, SaEM는  $3.71 \pm 0.05$  CFU/mL, BHI는  $3.38 \pm 0.08$  CFU/mL로

0.33 log CFU/mL 만큼 균의 생육을 유의적으로 증가시켰으며 6시간 배양 결과에서도 각각  $4.81 \pm 0.21$ ,  $4.45 \pm 0.08$  CFU/mL로 0.36 log CFU/mL 만큼 균의 생육을 유의적으로 증가시켰음.

#### (다) Heat injured cell

- 열처리에 의해 세균을 손상시킨 후 회복능을 측정한 결과는 표 1.17과 같음.
- 낮은 초기 균수( $0.72 \pm 0.17$  CFU/mL) 실험구에서는 4시간 증균배양 시, SaEM와 BHI에서 각각  $2.72 \pm 0.09$ ,  $2.22 \pm 0.32$  CFU/mL로 0.50 log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였으며 6시간 증균배양 시, 각각  $4.32 \pm 0.06$ ,  $3.51 \pm 0.13$  CFU/mL로 0.81 log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였음.
- 4시간과 6시간 배양 후 손상된 세균의 회복능에 SaEM가 BHI보다 열처리에 의해 손상된 세균을 회복시키는데 효과가 있는 것으로 확인되었음.
- 높은 초기 균수( $1.63 \pm 0.21$  CFU/mL)에서 4시간 배양하였을 시 SaEM와 BHI는 각각  $3.69 \pm 0.06$ ,  $3.23 \pm 0.16$  CFU/mL로 0.46 log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였음.
- 그러나 6시간 배양 결과에서는 0.20 log CFU/mL만큼 생육을 증가시켜 유의적인 차이는 없는 것으로 확인되었음.
- 높은 농도( $1.63 \pm 0.21$  CFU/mL)에서 6시간 배양한 결과를 제외하고 SaEM가 BHI보다 빠른 시간 내에 균의 성장을 촉진하는 것을 확인할 수 있었음.

#### (라) Cold injured cell

- 저온처리한 세균의 회복능을 측정한 결과는 표 1.17과 같음.
- 낮은 초기 균수( $0.39 \pm 0.12$  CFU/mL) 실험구에서 4시간 증균배양 시, SaEM와 BHI에서 각각  $2.60 \pm 0.04$ ,  $2.25 \pm 0.07$  CFU/mL로 0.35 log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였으며 6시간 증균배양 시, 각각  $4.44 \pm 0.02$ ,  $4.07 \pm 0.07$  CFU/mL로 0.37 log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였음.
- 저온처리 시 4시간과 6시간 배양 처리구에서 SaEM가 BHI보다 같은 시간 내에 균의 성장을 촉진하는 것을 확인할 수 있었음.
- 높은 초기 균수( $1.15 \pm 0.21$  CFU/mL)에서 4시간 배양하였을 시 SaEM와 BHI는 각각  $3.54 \pm 0.07$ ,  $3.02 \pm 0.03$  CFU/mL로 0.52 log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확

인하였으며 6시간 배양 결과에서도 각각  $5.02 \pm 0.06$ ,  $4.69 \pm 0.08$  CFU/mL로 0.33 log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였음.

○ SaEM가 BHI보다 손상된 세균의 회복에 유의적으로 효과가 있는 것으로 확인되었음.

표 1.17 Efficacy of SaEM and BHI in recovering injured cells of *S. aureus* by acidification, heat and cold

Treatment	Mean log CFU/mL				
	Initial cell number	BHI	SaEM*	BHI	SaEM
		4h		6h	
None (uninjured)	$0.69 \pm 0.12^{e**}$	$3.11 \pm 0.02^d$	$3.56 \pm 0.10^c$	$4.16 \pm 0.17^b$	$4.48 \pm 0.07^a$
	$1.39 \pm 0.12^e$	$4.01 \pm 0.15^d$	$4.29 \pm 0.16^c$	$5.34 \pm 0.11^b$	$5.69 \pm 0.07^a$
Acidification	$0.74 \pm 0.07^e$	$2.31 \pm 0.08^d$	$2.70 \pm 0.11^c$	$3.42 \pm 0.14^b$	$3.82 \pm 0.07^a$
	$1.95 \pm 0.06^e$	$3.38 \pm 0.08^d$	$3.71 \pm 0.05^c$	$4.45 \pm 0.08^b$	$4.81 \pm 0.21^a$
Heating	$0.72 \pm 0.17^e$	$2.22 \pm 0.32^d$	$2.72 \pm 0.09^c$	$3.51 \pm 0.13^b$	$4.32 \pm 0.06^a$
	$1.63 \pm 0.21^d$	$3.23 \pm 0.16^c$	$3.69 \pm 0.06^b$	$4.80 \pm 0.19^a$	$5.00 \pm 0.05^a$
Cold	$0.39 \pm 0.12^e$	$2.25 \pm 0.07^d$	$2.60 \pm 0.04^c$	$4.07 \pm 0.07^b$	$4.44 \pm 0.02^a$
	$1.15 \pm 0.21^e$	$3.02 \pm 0.03^d$	$3.54 \pm 0.06^c$	$4.69 \pm 0.08^b$	$5.02 \pm 0.06^a$

\* Modified BHI for *S. aureus*

\*\* Within rows, means with different letter (a,b,c,d or e) are significantly different ( $P < 0.05$ )

### (3) 손상된 *L. monocytogenes* 세포의 회복능에 대한 개발된 증균배지(SaEM)의 효과

#### (가) 무처리구

○ *L. monocytogenes*에 산, 열 및 저온 처리한 결과는 다음과 같음 (표 1.18).

○ 아무 처리 하지 않는 대조구에서는 저농도와 고농도의 초기 균수(저농도:  $0.50 \pm 0.28$  CFU/mL, 고농도:  $1.84 \pm 0.04$  CFU/mL)에서 35°C, 4시간 배양하였을 때 LmEM가 BHI보다 저농도는 0.40 log CFU/mL, 고농도는 0.61 log CFU/mL만큼 균의 생육을 증가시켰으며 LmEM가 BHI보다 같은 시간내에 균의 성장에 유의적인 효과가 있는 것으로 나타났음.

○ 그러나 6시간 배양하였을 때 LmEM가 BHI보다 저농도는 0.29 log CFU/mL만큼 균이 성장하였지만 유의적인 차이는 없었으며 고농도는 0.63 log CFU/mL만큼 자라 같은 시간 내에 균의 성장에 유의적으로 도움을 주는 것으로 나타났음.

#### (나) Acid injured cell

- 산처리에 의해 세균을 손상시킨 후 회복능을 측정한 결과는 표 1.18과 같음.
- 낮은 초기 균수( $0.39 \pm 0.12$  CFU/mL) 실험구에서는 4시간 증균배양 시, LmEM와 BHI에서 각각  $1.72 \pm 0.04$ ,  $1.45 \pm 0.04$  CFU/mL로 LmEM가 BHI보다  $0.27 \log$  CFU/mL 만큼 균의 생육을 유의적으로 증가시켰으며 6시간 증균배양 시, 각각  $2.38 \pm 0.05$ ,  $2.01 \pm 0.04$  CFU/mL로  $0.37 \log$  CFU/mL 만큼 균의 생육을 유의적으로 증가시켰음.
- 손상된 세균을 35°C에서 4시간과 6시간 동안 배양하였을 때 두 배지간의 회복능 효과가 유의적으로 차이가 있는 것으로 확인되었음.
- 높은 초기 균수( $1.37 \pm 0.17$  CFU/mL) 실험구에 산처리를 한 후, 손상된 세균을 LmEM와 BHI에 4시간 배양한 결과, LmEM는  $2.37 \pm 0.08$  CFU/mL, BHI는  $2.02 \pm 0.04$  CFU/mL로  $0.35 \log$  CFU/mL 만큼 균의 생육을 유의적으로 증가시켰고 6시간 배양 결과에서는 각각  $3.14 \pm 0.03$ ,  $2.91 \pm 0.08$  CFU/mL로  $0.23 \log$  CFU/mL 만큼 균의 생육을 증가시켰지만, 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났음.

#### (다) Heat injured cell

- 열처리에 의해 세균을 손상시킨 후 회복능을 측정한 결과는 표 1.18과 같음.
- 낮은 초기 균수( $0.54 \pm 0.09$  CFU/mL) 실험구에서는 4시간 증균배양 시, LmEM와 BHI에서 각각  $1.73 \pm 0.07$ ,  $1.51 \pm 0.10$  CFU/mL로  $0.22 \log$  CFU/mL만큼 생육이 증가한 것을 확인하였지만 유의적인 차이는 없었으며, 6시간 증균배양 시, 각각  $2.39 \pm 0.09$ ,  $1.97 \pm 0.04$  CFU/mL로  $0.42 \log$  CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였음.
- 6시간 배양 후 손상된 세균의 회복능에 LmEM가 BHI보다 열처리에 의해 손상된 세균을 회복시키는데 효과가 있는 것으로 확인되었음.
- 높은 초기 균수( $1.71 \pm 0.08$  CFU/mL)에서 4시간 배양하였을 시 LmEM와 BHI는 각각  $2.67 \pm 0.08$ ,  $2.39 \pm 0.07$  CFU/mL로  $0.28 \log$  CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였음. 6시간 배양 결과도  $0.40 \log$  CFU/mL만큼 생육을 증가시켜 유의적인 있는 것으로 나타났음.
- 높은 농도( $1.71 \pm 0.08$  CFU/mL)에서 4시간과 6시간 배양한 결과 LmEM가 BHI보다 빠른 시간 내에 균의 성장을 촉진하는 것을 확인할 수 있었음.

#### (라) Cold injured cell

- 저온처리한 세균의 회복능을 측정한 결과는 표 1.18과 같음.
- 낮은 초기 균수( $0.63 \pm 0.21$  CFU/mL) 실험구에서 4시간 증균배양 시, LmEM와 BHI에서

각각  $1.80 \pm 0.08$ ,  $1.56 \pm 0.08$  CFU/mL로 0.24 log CFU/mL만큼 생육이 증가하였지만 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 6시간동안 증균배양하였을 때는 각각  $2.72 \pm 0.13$ ,  $2.41 \pm 0.13$  CFU/mL로 0.31 log CFU/mL만큼 증가하여 LmEM가 BHI보다 6시간 배양 시 균의 성장을 촉진하는 것을 확인할 수 있었음.

○ 높은 초기 균수( $1.14 \pm 0.09$  CFU/mL)에서 4시간 배양하였을 때 LmEM와 BHI는 각각  $2.24 \pm 0.07$ ,  $1.89 \pm 0.04$  CFU/mL로 0.35 log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였으며 6시간 배양 결과에서도 각각  $3.27 \pm 0.13$ ,  $2.84 \pm 0.07$  CFU/mL로 0.43 log CFU/mL만큼 유의적으로 생육이 증가한 것을 확인하였음.

○ LmEM가 BHI보다 손상된 세균의 회복에 유의적으로 효과가 있는 것으로 확인되었음.

표 1.18 Efficacy of LmEM and BHI in recovering injured cells of *L. monocytogenes* by acidification, heat and cold

Treatment	Mean log CFU/mL				
	Initial cell number	BHI	LmEM*	BHI	LmEM
		4h		6h	
None (uninjured)	$0.50 \pm 0.28^{d**}$	$1.64 \pm 0.08^c$	$2.04 \pm 0.06^b$	$2.60 \pm 0.09^a$	$2.89 \pm 0.05^a$
	$1.84 \pm 0.04^e$	$2.80 \pm 0.11^d$	$3.41 \pm 0.05^c$	$3.78 \pm 0.06^b$	$4.41 \pm 0.04^a$
Acidification	$0.39 \pm 0.12^e$	$1.45 \pm 0.04^d$	$1.72 \pm 0.04^c$	$2.01 \pm 0.04^b$	$2.38 \pm 0.05^a$
	$1.37 \pm 0.17^d$	$2.02 \pm 0.04^c$	$2.37 \pm 0.08^b$	$2.91 \pm 0.08^a$	$3.14 \pm 0.03^a$
Heating	$0.54 \pm 0.09^d$	$1.51 \pm 0.10^c$	$1.73 \pm 0.07^c$	$1.97 \pm 0.04^b$	$2.39 \pm 0.09^a$
	$1.71 \pm 0.08^e$	$2.39 \pm 0.07^d$	$2.67 \pm 0.08^c$	$3.05 \pm 0.03^b$	$3.45 \pm 0.06^a$
Cold	$0.63 \pm 0.21^c$	$1.56 \pm 0.08^b$	$1.80 \pm 0.08^b$	$2.41 \pm 0.13^a$	$2.72 \pm 0.13^a$
	$1.14 \pm 0.09^e$	$1.89 \pm 0.04^d$	$2.24 \pm 0.07^c$	$2.84 \pm 0.07^b$	$3.27 \pm 0.13^a$

\* Modified BHI for *L. monocytogenes*

\*\* Within rows, means with different letter (a, b, c, d or e) are significantly different ( $P < 0.05$ )

## <요약>

- 개발된 증균배지들에 대하여 산, 열 및 저온처리 등에 의한 야기된 손상세포의 회복능에 미치는 효과를 기본 증균배지 BHI와 비교 분석하였음.
- 본 연구에서 개발된 *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*에 대한 최적 증균배지들 (BcEM, SaEM, LmEM)은 기존의 BHI 배지보다 **산, 열, 저온 등에 의한 손상세포의 회복능에 유의적으로 효과가 좋은 것으로 나타났음.**
- *B. cereus*, *S. aureus*의 경우, 초기 세균수가 낮은 수준(<1 log CFU/mL)에서 시작하여 6시간 증균 후 PCR 방법으로 각 식중독균을 검출할 수 있는 한계 수준 이상(>2 log CFU/mL)으로 증균할 수 있는 것으로 나타났음.
- *L. monocytogenes*의 경우, 초기 세균수가 낮은 수준(<1 log CFU/mL) 및 높은 수준 (1.14~1.84 log CFU/mL)에서 시작하여 6시간 증균 후 각각 2.24-3.45 log CFU/mL 및 3.14~3.45 log CFU/mL 정도 생육하는 것으로 나타났으므로, *B. cereus*나 *S. aureus*에 비하여 *L. monocytogenes*의 경우 면역 키트의 검출 한계(>5~6 log cfu/mL) 수준으로 증균하는데 더 많은 시간이 소요될 것으로 판단됨.

## 7. 농산물에서 개발된 증균배지를 이용한 3종의 식중독 세균의 생육변화

### 가. 유통 중인 주요 다소비 농산물 선정

- 3종의 식중독 세균의 생육변화 및 IMS의 농축효율 분석을 위한 농산물 선정 기준은 신선 농산물에서 최근 20년간 발생한 식중독 빈도수와 1인 1일 섭취량을 기준으로 하여 선정하였음(표 26-27).
- 조사결과를 바탕으로 식중독 세균 대상 국내 다소비 농산물로 시금치, 상추, 콩나물을 선정하였고, 최적 증균 배지를 이용하여 3종의 식중독 세균의 생육 변화를 확인하였음.

표 1.19 최근 20년간 식중독 발병 식품의 종류, 횟수, 감염자 수

순위	종류	질병 발병횟수 (회)	감염자 수 (명)	순위	종류	질병 발병횟수 (회)	감염자 수 (명)
1	상추, 시금치	363	13,568	6	치즈	83	2,761
2	달걀	352	11,163	7	아이스크림	74	2,594
3	참치	268	2,341	8	토마토	31	3,292
4	굴	132	3,409	9	콩나물	31	2,022
5	감자	108	3,659	10	베리	25	3,397

표 1.20 국내에서 유통중인 다소비 농산물

No.	농산물	1인 1일 섭취량(g)	No.	농산물	1인 1일 섭취량(g)
1	배추	70.63	16	오렌지	9.32
2	무	48.99	17	무청	7.93
3	수박	30.60	<b>18</b>	<b>시금치</b>	<b>7.40</b>
4	고추	24.27	19	마늘	5.49
5	밀감	23.28	20	당근	5.39
6	사과	21.09	<b>21</b>	<b>상추</b>	<b>3.90</b>
7	양파	17.05	22	복숭아	3.78
8	감	16.44	23	딸기	3.77
9	배	15.44	24	양배추	3.50
10	포도	14.01	25	유자	3.18
11	호박	12.73	26	바나나	2.70
12	토마토	11.70	27	토란대	2.27
13	참외	11.30	28	취나물	2.20
14	파	10.95	∴	∴	∴
15	오이	9.75	<b>41</b>	<b>콩나물</b>	<b>1.75</b>

(자료출처 : 농촌진흥청, 2012)

## 나. 농산물 시료의 준비 및 인위오염 방법

- 신선 농산물에서 최적 증균 배지를 사용한 각 식중독 세균의 생육도 및 IMS 농축효율의 분석은 다음과 같이 하였음. 농산물에서 최근 20년간 발생한 식중독 빈도수와 1인 1일 섭취량을 기준으로 하여 시금치, 상추, 콩나물을 실험재료로 선정하였음.
- *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*를 0.1% peptone water에 저농도(1-2 log CFU/mL)와 고농도(2-3 log CFU/mL)로 단계 희석하고, 3가지 샘플들에 *B. cereus*, *S. cereus*, *L. monocytogenes* 최종 농도가 저농도(0-1 log CFU/mL)와 고농도(1-2 log CFU/mL)가 되도록 접종한 후, 25g의 시금치, 상추, 콩나물을 225mL의 BHI와 BcEM, SaEM, LmEM에 섞어주어 4시간, 6시간, 8시간씩 증균배양하였음.

## 다. 신선 농산물에서 *B. cereus*의 증균 및 농축효율

- *B. cereus*를 각 농산물에 접종하여 최적 증균 배지에서 증균한 후 IMS 흡착효율을 분석한 결과는 표 1.21과 같음.
- *B. cereus*를 상추, 시금치, 콩나물에 저농도( $0.62 \pm 0.05$  log CFU/g)로 접종하여 BcEM에서 30°C에서 6시간동안 배양하였을 때, 각각  $3.94 \pm 0.05$ ,  $4.47 \pm 0.07$ ,  $4.01 \pm 0.03$  log CFU/mL의 균이 성장하는 것을 확인하였고, BHI에서는  $3.61 \pm 0.09$ ,  $3.84 \pm 0.07$ ,  $3.65 \pm 0.10$  log CFU/mL 성장하는 것을 확인하였음.
- *B. cereus*가 접종된 시금치, 상추, 콩나물을 각각 BcEM와 BHI에 6시간 배양한 후 *B. cereus*의 생육도를 비교한 결과 BcEM 배지가 BHI보다 *B. cereus*의 증균을 유의적으로 높게 하는 것으로 나타났음.
- 한편, *B. cereus*를 상추, 시금치, 콩나물에 고농도( $1.58 \pm 0.03$  log CFU/g)로 접종하여 BcEM에서 30°C에서 4시간동안 배양하였을 때, 각각  $3.47 \pm 0.06$ ,  $3.66 \pm 0.06$ ,  $3.39 \pm 0.06$  log CFU/mL의 균이 성장하는 것을 확인하였고, BHI에서는  $3.12 \pm 0.12$ ,  $3.26 \pm 0.08$ ,  $3.07 \pm 0.15$  log CFU/mL 성장하는 것을 확인하였음.
- *B. cereus*가 접종된 시금치, 상추, 콩나물을 각각 BcEM와 BHI에 4시간 배양한 후 *B. cereus*의 생육도를 비교한 결과 저농도의 결과와 같이 BcEM 배지가 BHI보다 *B. cereus*의 증균을 유의적으로 높게 하는 것으로 나타났음.
- 나머지 저농도와 고농도로 상추, 시금치, 콩나물에 접종하여 4시간, 6시간 및 8시간 증균한 실험 결과도 상기의 결과와 유사한 경향을 보였으며, 신속검출을 위해 *B. cereus*가 저농도(0-1 log CFU/mL) 존재시에는 6시간 증균, 고농도(1-2 log CFU/mL) 존재시에는 4시간 증균배양하여 *B. cereus*를 농축한 후 PCR 또는 ELISA 실험을 진행하는 것이 좋을 것으로 판단됨.



표 1.21 Growth of *B. cereus* spiked on spiniach, lettuce and sprout in BcEM\* and BHI for 8h at 30°C

Incubation time	Food samples (log CFU/mL)		
	lettuce	spinach	sprout
initial cell number	0.62±0.05 <sup>p**</sup>	0.62±0.05 <sup>p</sup>	0.62±0.05 <sup>p</sup>
	1.58±0.03 <sup>o**</sup>	1.58±0.03 <sup>o</sup>	1.58±0.03 <sup>o</sup>
4h in BHI	1.96±0.05 <sup>n</sup>	1.99±0.16 <sup>n</sup>	1.93±0.08 <sup>n</sup>
	3.12±0.12 <sup>m</sup>	3.26±0.08 <sup>m</sup>	3.07±0.15 <sup>m</sup>
4h in BcEM	2.29±0.02 <sup>l</sup>	2.48±0.11 <sup>l</sup>	2.26±0.06 <sup>l</sup>
	3.47±0.06 <sup>k</sup>	3.66±0.06 <sup>k</sup>	3.39±0.06 <sup>k</sup>
6h in BHI	3.61±0.09 <sup>j</sup>	3.84±0.07 <sup>j</sup>	3.65±0.10 <sup>j</sup>
	4.14±0.05 <sup>i</sup>	4.32±0.04 <sup>i</sup>	4.00±0.06 <sup>i</sup>
6h in BcEM	3.94±0.05 <sup>h</sup>	4.47±0.07 <sup>h</sup>	4.01±0.03 <sup>h</sup>
	4.73±0.15 <sup>g</sup>	4.80±0.06 <sup>g</sup>	4.68±0.05 <sup>g</sup>
8h in BHI	4.79±0.07 <sup>f</sup>	4.95±0.07 <sup>f</sup>	4.84±0.07 <sup>f</sup>
	5.42±0.14 <sup>e</sup>	5.48±0.05 <sup>e</sup>	5.21±0.03 <sup>e</sup>
8h in BcEM	5.13±0.07 <sup>d</sup>	5.79±0.06 <sup>d</sup>	5.09±0.05 <sup>d</sup>
	5.78±0.10 <sup>c</sup>	6.02±0.07 <sup>c</sup>	5.74±0.17 <sup>c</sup>

\*Modified BHI for *B.cereu*

\*\*Within columns in each BHI and BcEM for each incubation time, means with different letter (a-p) are significantly different( $P<0.05$ )

#### 라. 신선 농산물에서 *S. aureus*의 증균

- *S. aureus*를 각 농산물에 접종하여 최적 증균 배지에서 증균한 후 IMS 흡착효율을 분석한 결과는 표 1.22와 같음. *S. aureus*를 상추, 시금치, 콩나물에 저농도( $0.54 \pm 0.05 \log \text{CFU/g}$ )로 접종하여 SaEM에서 35°C에서 6시간동안 배양하였을 때, 각각  $3.89 \pm 0.08$ ,  $4.43 \pm 0.07$ ,  $3.86 \pm 0.08 \log \text{CFU/mL}$ 의 균이 성장하는 것을 확인하였고, BHI에서는  $3.52 \pm 0.15$ ,  $3.79 \pm 0.11$ ,  $3.50 \pm 0.08 \log \text{CFU/mL}$  성장하는 것을 확인하였음.
- *S. aureus*가 접종된 시금치, 상추, 콩나물을 각각 SaEM와 BHI에 6시간 배양한 후 *S. aureus*의 생육도를 비교한 결과 SaEM 배지가 BHI보다 *S. aureus*의 증균을 유의적으로 높게 하는 것으로 나타났음.
- 한편, *S. aureus*를 상추, 시금치, 콩나물에 고농도( $1.35 \pm 0.04 \log \text{CFU/g}$ )로 접종하여 SaEM에서 35°C에서 4시간동안 배양하였을 때, 각각  $3.16 \pm 0.04$ ,  $3.22 \pm 0.07$ ,  $3.15 \pm 0.04$

log CFU/mL의 균이 성장하는 것을 확인하였고, BHI에서는  $2.92 \pm 0.02$ ,  $2.87 \pm 0.13$ ,  $2.84 \pm 0.05$  log CFU/mL 성장하는 것을 확인하였음.

- *S. aureus*가 접종된 시금치, 상추, 콩나물을 각각 SaEM와 BHI에 4시간 배양한 후 *S. aureus*의 생육도를 비교한 결과 저농도의 결과와 같이 BcEM 배지가 BHI보다 *S. aureus*의 증균을 유의적으로 높게 하는 것으로 나타났음.
- 저농도와 고농도로 상추, 시금치, 콩나물에 접종하여 4시간, 6시간 및 8시간 증균한 실험 결과도 상기의 결과와 유사한 경향을 보였으며, 신속검출을 위해 *S. aureus*가 저농도(0-1 log CFU/mL) 존재시에는 6시간 증균, 고농도(1-2 log CFU/mL) 존재시에는 4시간 증균배양하여 *S. aureus*를 농축한 후 PCR 또는 ELISA 실험을 진행하는 것이 좋을 것으로 판단됨.

표 1.22 Growth of *S. aureus* spiked on spinach, lettuce and sprout in SaEM\* and BHI for 8h at 35°C

Incubation time	Food samples (log CFU/mL)		
	lettuce	spinach	sprout
initial cell number	0.54±0.05 <sup>p**</sup>	0.54±0.05 <sup>p</sup>	0.54±0.05 <sup>p</sup>
	1.35±0.04 <sup>o</sup>	1.35±0.04 <sup>o</sup>	1.35±0.04 <sup>o</sup>
4h in BHI	1.91±0.05 <sup>n</sup>	1.85±0.06 <sup>n</sup>	1.80±0.05 <sup>n</sup>
	2.92±0.02 <sup>m</sup>	2.87±0.13 <sup>m</sup>	2.84±0.05 <sup>m</sup>
4h in SaEM	2.23±0.07 <sup>l</sup>	2.31±0.08 <sup>l</sup>	2.22±0.04 <sup>l</sup>
	3.16±0.04 <sup>k</sup>	3.22±0.07 <sup>k</sup>	3.15±0.04 <sup>k</sup>
6h in BHI	3.52±0.15 <sup>j</sup>	3.79±0.11 <sup>j</sup>	3.50±0.08 <sup>j</sup>
	4.49±0.11 <sup>j</sup>	4.52±0.17 <sup>j</sup>	4.54±0.06 <sup>j</sup>
6h in SaEM	3.89±0.08 <sup>h</sup>	4.43±0.07 <sup>h</sup>	3.86±0.08 <sup>h</sup>
	4.82±0.04 <sup>g</sup>	4.90±0.09 <sup>g</sup>	4.92±0.05 <sup>g</sup>
8h in BHI	4.78±0.11 <sup>f</sup>	4.85±0.07 <sup>f</sup>	4.76±0.11 <sup>f</sup>
	5.42±0.08 <sup>e</sup>	5.50±0.16 <sup>e</sup>	5.47±0.07 <sup>e</sup>
8h in SaEM	5.15±0.08 <sup>d</sup>	5.18±0.08 <sup>d</sup>	5.08±0.07 <sup>d</sup>
	5.83±0.17 <sup>c</sup>	6.01±0.04 <sup>c</sup>	5.91±0.11 <sup>ac</sup>

\*Modified BHI for *S.aureus*

\*\*Within columns in each BHI and SaEM for each incubation time, means with different letter (a,b,c,d,e,f or g) are significantly different( $P<0.05$ )

#### 마.신선 농산물에서 *L. monocytogenes*의 증균

- *L. monocytogenes*는 *B. cereus*나 *S. aureus*와는 달리 생육도가 2종의 식중독 균주보다 늦었으며, 따라서 저농도에서는 8시간 배양, 고농도에서는 6시간 배양을 진행한 결과는 표 1.23과 같음.
- *L. monocytogenes*를 상추, 시금치, 콩나물에 저농도( $0.75 \pm 0.07 \log \text{ CFU/g}$ )로 접종하여 LmEM에서 35°C에서 8시간동안 배양하였을 때, 각각  $3.71 \pm 0.05$ ,  $3.54 \pm 0.16$ ,  $3.34 \pm 0.02 \log \text{ CFU/mL}$ 의 균이 성장하는 것을 확인하였고, BHI에서는  $3.22 \pm 0.15$ ,  $3.02 \pm 0.09$ ,  $3.01 \pm 0.11 \log \text{ CFU/mL}$  성장하는 것을 확인하였음.
- *L. monocytogenes*가 접종된 시금치, 상추, 콩나물을 각각 LmEM와 BHI에 8시간 배양한 후 *B. cereus*의 생육도를 비교한 결과 LmEM 배지가 BHI보다 *L. monocytogenes*의 증균을 유의적으로 높게 하는 것으로 나타났음.
- 한편, *L. monocytogenes*를 상추, 시금치, 콩나물에 고농도( $1.54 \pm 0.09 \log \text{ CFU/g}$ )로 접종하여 LmEM에서 35°C에서 6시간동안 배양하였을 때, 각각  $3.58 \pm 0.12$ ,  $3.51 \pm 0.09$ ,  $3.46 \pm 0.09 \log \text{ CFU/mL}$ 의 균이 성장하는 것을 확인하였고, BHI에서는  $3.12 \pm 0.06$ ,  $3.09 \pm 0.06$ ,  $3.04 \pm 0.06 \log \text{ CFU/mL}$  성장하는 것을 확인하였음.
- *L. monocytogenes*가 접종된 시금치, 상추, 콩나물을 각각 LmEM와 BHI에 6시간 배양한 후 *L. monocytogenes*의 생육도를 비교한 결과 저농도의 결과와 같이 BcEM 배지가 BHI보다 *L. monocytogenes*의 생육을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났음.
- 나머지의 저농도와 고농도로 상추, 시금치, 콩나물에 접종하여 4시간, 6시간 및 8시간 증균한 실험 결과도 상기의 결과와 유사한 경향을 보였으며, 신속하면서 정확한 검출을 위해서는 균수를  $3 \log \text{ CFU/mL}$  이상으로 증균시켜야 하므로 *L. monocytogenes*가 저농도( $0-1 \log \text{ CFU/mL}$ ) 존재시에는 8시간 증균, 고농도( $1-2 \log \text{ CFU/mL}$ ) 존재시에는 6시간 증균배양하여 *L. monocytogenes*를 농축한 후 PCR 또는 ELISA 실험을 진행하는 것이 좋을 것으로 판단됨.

Æ 1.32 Growth of *L. monocytogenes* spiked on spiniach, lettuce and sprout in LmEM\* and BHI for 8h at 35°C

Incubation time	Food samples (log CFU/mL)		
	lettuce	spinach	sprout
initial cell number	0.75±0.07 <sup>p**</sup>	0.75±0.07 <sup>p</sup>	0.75±0.07 <sup>p</sup>
	1.54±0.09	1.54±0.09 <sup>o</sup>	1.54±0.09 <sup>o</sup>
4h in BHI	0.98±0.03 <sup>n</sup>	0.77±0.10 <sup>n</sup>	0.84±0.09 <sup>n</sup>
	1.77±0.04 <sup>m</sup>	1.74±0.06 <sup>m</sup>	1.72±0.06 <sup>m</sup>
4h in LmEM	1.32±0.09 <sup>l</sup>	1.08±0.05 <sup>l</sup>	1.25±0.10 <sup>l</sup>
	2.11±0.09 <sup>k</sup>	2.10±0.11 <sup>k</sup>	2.05±0.07 <sup>k</sup>
6h in BHI	2.34±0.06 <sup>j</sup>	2.49±0.14 <sup>j</sup>	2.22±0.02 <sup>j</sup>
	3.12±0.06 <sup>j</sup>	3.09±0.06 <sup>j</sup>	3.04±0.06 <sup>j</sup>
6h in LmEM	2.79±0.12 <sup>h</sup>	2.84±0.02 <sup>h</sup>	2.56±0.04 <sup>h</sup>
	3.58±0.12 <sup>g</sup>	3.51±0.09 <sup>g</sup>	3.46±0.09 <sup>g</sup>
8h in BHI	3.22±0.15 <sup>f</sup>	3.02±0.09 <sup>f</sup>	3.01±0.11 <sup>f</sup>
	4.08±0.05 <sup>e</sup>	4.05±0.07 <sup>e</sup>	4.00±0.07 <sup>e</sup>
8h in LmEM	3.71±0.05 <sup>d</sup>	3.54±0.16 <sup>d</sup>	3.34±0.02 <sup>d</sup>
	4.62±0.09 <sup>c</sup>	4.59±0.16 <sup>c</sup>	4.54±0.10 <sup>c</sup>

\*Modified BHI for *L.monocytogenes*

\*\*Within columns in each BHI and LmEM for each incubation time, means with different letter (a,b,c,d,e,f or g) are significantly different( $P<0.05$ )

## <요약>

### 제1절 식중독 세균 그람양성 3종 신속 증균배지 개발

- *B. cereus*의 증균을 위해 BHI 배지를 기본으로 개발된 증균배지 BcEM은 magnesium sulfate 0.034%, sodium pyruvate 1.208%, yeast extract 0.182%를 포함하고 있음.
- *S. aureus*의 증균을 위해 BHI 배지를 기본으로 개발된 증균배지 SaEM는 sulfate 0.023%, sodium pyruvate 0.762%, mannitol 1.986%를 포함하고 있음.
- *L. monocytogenes*의 증균을 위해 BHI 배지를 기본으로 개발된 증균배지 LmEM는 magnesium sulfate 0.696%, sodium pyruvate 0.25%, yeast extract 0.709%를 포함하고 있음.
- 상추, 시금치, 콩나물에 *B. cereus*를 저농도(0.62 log CFU/g)로 접종하여 BcEM에서 30°C에서 6시간동안 배양한 결과, 각각 3.94, 4.47, 4.01 log CFU/mL의 균이 성장하는 것을 확인하였음.
- 상추, 시금치, 콩나물에 *S. aureus*를 저농도(0.54 log CFU/g)로 접종하여 BcEM에서 35°C에서 6시간동안 배양한 결과, 각각 3.89, 4.43, 3.86 log CFU/mL의 균이 성장하는 것을 확인하였음.
- 상추, 시금치, 콩나물에 *L. monocytogenes*를 저농도(0.75 log CFU/g)로 접종하여 LmEM에서 35°C에서 8시간동안 배양한 결과, 각각 3.71, 3.54, 3.34 log CFU/mL의 균이 성장하는 것을 확인하였음.
- ➔ *B. cereus*, *S. aureus*의 경우 식중독 세균의 신속검출을 위해 저농도(0-1 log CFU/mL) 존재시에는 6시간 증균, 고농도(1-2 log CFU/mL) 존재시에는 4시간 증균배양하여 PCR 실험을 진행하는 것이 좋을 것으로 판단됨.
- ➔ *L. monocytogenes*의 경우, 신속하면서 정확한 검출을 위해서는 균수를 3 log CFU/mL 이상으로 증균시켜야 *L. monocytogenes*를 농축한 후 다시 증균하여 PCR 또는 ELISA 실험을 진행하는 것이 좋을 것으로 판단됨.

## 제2절 식중독 세균 그람음성 4종에 대한 신속 증균배지 개발 (병원성대장균, 살모넬라, 세균성 이질, 캄필로박터)

### 1. 증균 배지 개발의 필요성

가. 국내외 공인검출법에서의 8시간 검사법 적용여부 분석 및 실험방향 설정

#### (1) 4종 식중독세균에 대한 신속검사법 조사

- 4종 식중독세균에 대한 상업화된 신속검출시스템의 제조사별 제품 분석을 실시하였음.
- 권장 증균시간, 인증기관, 공인법 등 재여부를 파악하여 표 2.1에 제시하였음.

표 2.1 4종 식중독세균 검출법의 증균시간 및 공인법 등재여부 분석

균	회사	제품명	증균 시간	인증	공인법
<b><i>E. coli</i></b> <b>O157:H7</b>	DUPONT	BAX	8 hr	AOAC	USDA FDA Health canada
	Neogen	Reveal	8 hr	AOAC	FDA
	R o m e r labs	Rapidcheck	8 hr	AOAC	USDA Health canada
	Biocontrol systems	GDS	8 hr	AOAC	Health canada
<b><i>Salmon-e</i></b> <b><i>lla</i></b>	DUPONT	BAX-System PCR Assay for salmonella	8-22 hr	AOAC AFNOR Nordval	USDA FDA
		BAX® System PCR Assay for Salmonella 2	8-22 hr	AOAC AFNOR Nordval	USDA FDA
	Reveal	Reveal 2.0 for Salmonella	within 24 hr	AOAC	FDA
		Reveal 2.0 for Salmonella Enteritidis	48 hr		FDA
		Reveal 2.0 for Salmonella, Complete System with RV	within 24 hr	AOAC	FDA
		Reveal 2.0 for Salmonella, Complete System with RV and M	within 24 hr	AOAC	FDA

		broth			
		Reveal 2.0 for Salmonella, Environmental Sampling System	within 24 hr	AOAC	FDA
		Reveal 2.0 for Salmonella, One step Complete system	within 24 hr	AOAC	FDA
	Biocontrol systems	1-2 test	14 hr	AOAC	FDA Health Canada
		Assurance GDS® for Salmonella	21 hr	AOAC AFNOR	FDA Health Canada
	Norcom -bio	RapidChek® SELECT™ Salmonella	16-22 h	AOAC AFNOR	-
		RapidChek® Salmonella	24-48 hr	AOAC	-
		RapidChek® SELECT™ Salmonella Enteritidis	16-22 hr	AOAC	FDA
		RapidChek® CONFIRM Salmonella Enteritidis	-	-	-
	<b><i>Campylo bacter</i></b>	DUPONT	BAX® System Real-Time PCR Assay	24 hr	AOAC NordVal
Biocontrol systems		SimPlate®	48 hr	AOAC	-
<b><i>Shigella</i></b>	DUPONT	BAX	8-20 hr	-	-

## (2) 조사결과 분석을 통한 실험방향 설정

- USDA에서는 2011년부터 농산물에서 식중독균의 prevalence를 광범위하게 조사하는 MDP(Microbiological Data Program)을 실시하고 있으며, 2011년부터 병원성대장균, 살모넬라 외 리스테리아 검사가 추가되었음.
- 살모넬라, 이질, 병원성대장균의 경우 최소증균시간은 8시간이나 병원성대장균을 제외하면 약 20시간 이상 증균을 권장하고 있음.
- 살모넬라와 이질균의 경우 최소감염량 및 손상균까지 고려한 신속증균배지를 개발시 기존 상업화 배지와의 차별성을 비교적 쉽게 보일 수 있을 것으로 분석되었음.
- 또한 살모넬라와 이질균은 Salmonella-Shigella agar, Macconkey agar, XLD agar 등 선택 배지를 공유하는 등 비슷한 생화학적 특성을 보이기 때문에 동시증균배지 개발이 용이할

것으로 판단하였음.

- 대장균의 경우 일반적으로 배지에 상관없이 증균이 가능하기에 개발된 살모넬라-이질 동시 증균배지에 함께 적용하는 것이 가능할 것으로 사료되었음.(\*검증결과 대장균 회복효과가 미비하여 전용증균배지 새로 개발함)
- 캄필로박터의 경우 다른 세균들에 비해 현저히 긴 Doubling-time을 가지며, 배양시 미호기 환경 및 혈액성분이 필요하여 다른 균들과의 특성이 크게 차이나기 때문에 별도로 분리하여 개발에 착수하였음.

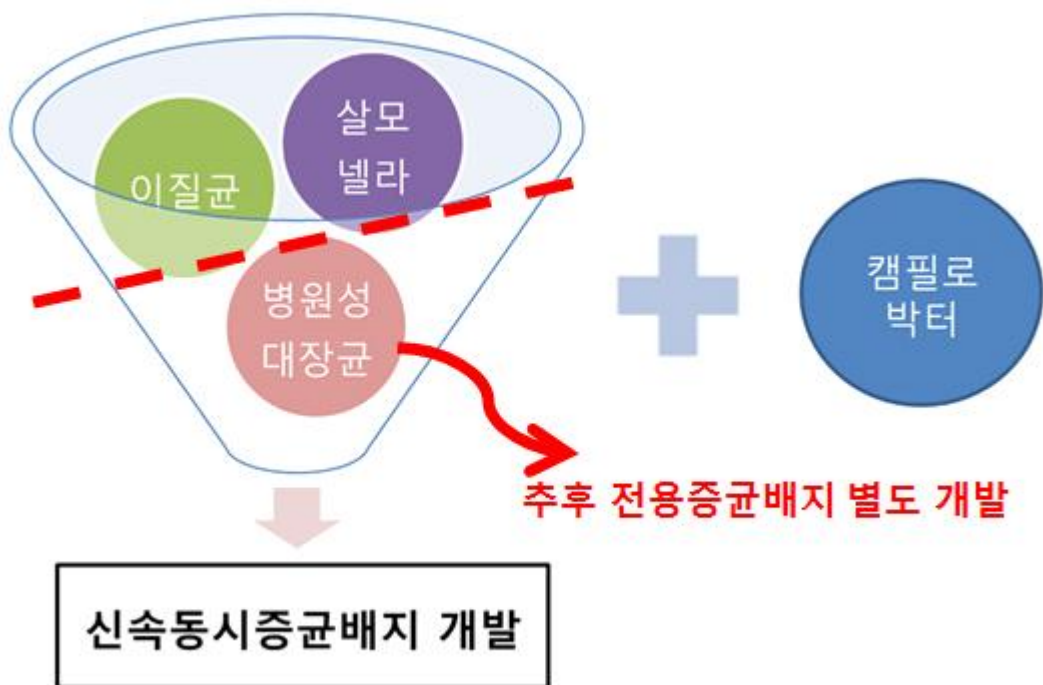


그림 2.1 제 1협동기관 증균배지 개발 모식도



나. 살모넬라, 이질균, 병원성대장균 3종 신속동시증균 배지 개발 연구

(1) 증균에 사용되는 상용화 배지 및 기개발 배지 구성 supplements 분석

- Oxoid, Neogen, BD 등에서 제시하고 있는 증균배지들의 조성을 분석하고, 국제 학술 데이터베이스인 Web of Science 및 Pubmed를 활용하여 기개발된 증균배지 및 기존배지 조성별 효과를 분석하였음.

표 2.2 *Salmonella/Shigella/E. coli O157* 증균에 사용되는 상용화 배지 구성 Buffer 분석

<b>Buffer</b>		
<b>Component</b>	<b>Capability</b>	<b>Broth</b>
Dibasic sodium phosphate, Disodium phosphate		BPW, BPW-VCC, SVV*
Dibasic potassium phosphate, Dipotassium phosphate	pH buffer	mEC, TSB, GN broth, Food Pathogen Enrichment broth
Monopotassium phosphate Potassium dihydrogen Phosphate(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )		mEC. BPW. BPW-VCC
Phosphate buffer mix		Rapidcult E.coli enrichment broth
Lactose	pH buffer (selenite 감소로 인한 알칼리화방지)	mEC, Selenite F
Magnesium chloride 6H <sub>2</sub> O	osmotic pressure 증가, pH낮게 일조	RV
Mineral salts		Rapidcult E.coli enrichment broth
Monopotassium phosphate, Potassium dihydrogen phosphate		BPW, RV, SVV*, GN broth, Shigella broth
Potassium hydrogen phosphate		Shigella broth
Salt buffer mix		One broth
Sodium chloride(NaCl)	osmotic balance	mEC, BPW, TSB, RV, TT, Peptone water, GN broth, SVV* Shigella broth, BPW-VCC, Sal-5*
NaHSO <sub>3</sub>		Food Pathogen Enrichment broth
L-cystine HCl		Food Pathogen Enrichment broth
Sodium phosphate(Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )		selenite F

\*SVV: *Salmonella/Vibro* 동시증균배지(Xiao *et al.*, 2010), Sal-5: *Salmonella* spp 증균배지(Zhang *et al.*, 2013)

표 2.3 *Salmonella/Shigella/E. coli O157* 증균에 사용되는 상용화 배지 구성 Growth Factor 분석

<b>Growth factor</b>		
<b>Component</b>	<b>Capability</b>	<b>Broth</b>
Anhydrous sodium sulfite		SVV
Casein peptone	essential nitrogenous and carbon compounds 공급	Shigella broth
Dextrose	fermen표 carbohydrate	TT, GN broth, Shigella broth
d-mannitol	fermen표 carbohydrate/살모넬라, 쉬겔라에서 성장 강화 및 proteus 등 저해	TT, GN broth SVV
Glucose	energy source	TSB, SVV
Growth promotor mix		One broth
Pancreatic digest of casein		mEC, TSB, GN broth, Selenite F
Papaic digest of soybean meal	nitrogen, 아미노산 공급	TSB, Food Pathogen Enrichment broth
Peptic digest of animal tissue	nitrogen, 아미노산 공급	GN broth
Peptone	nitrogen, 아미노산 공급	BPW, SVV Peptone water, One broth, Rapidcult E.coli enrichment broth, BPW-VCC
Sodium pyruvate	source of energy, protective effects against hydrogen peroxide	SVV, Food Pathogen Enrichment broth
Soya peptone	carbon, nitrogen 공급	RV
Tryptose		TT
Beef(meat) extract		Food Pathogen Enrichment broth
Yeast extract	growth factor, vitamin 공급	TT, One broth, Sal-5

표 2.4 *Salmonella/Shigella/E. coli O157* 증균에 사용되는 상용화 배지 구성 Inhibitor 분석

<b>Inhibitor</b>		
<b>Component</b>	<b>Capability</b>	<b>Broth</b>
Acrobiose	0~0.1% 사이에서 <i>S. aureus</i> , <i>S. flexneri</i> 억제효과 / 0.1%이상은 별 의미 없음	Sal-5
Bile salt no.3	그람양성세균 억제	SVV*mEC, Sal-5
Brilliant green	coliform, 그람양성균 억제	TT
Cefixime		BPW-VCC
Cefsulodin		BPW-VCC
LiCl	0.4% 이내에선 SE promotor 역할하고 0.2%에서 최적이나 이때 <i>E. coli</i> 및 <i>C. freundii</i> 도 promote시킴 / 기본적으로 gram positive inhibitor 0.2%	Sal-5
Malachite green	pH 낮게 유지	RV
Novobiocin		One broth, Shigella broth, mEC
Potassium tellurite		SVV
Sodium citrate	그람 양성균 및 일부 음성균 억제	GN broth, SVV
Sodium deoxycholate	Inhibit of growth of coliform, G+ bacteria	TT, GN broth,
Sodium selenite	Inhibit of growth of coliform enterococci, streptococci(fecal)	Selenite F
Sodium thiosulfate	with tetrathionate, Inhibit of growth of coliform	TT
Vancomycin		BPT-VCC

표 2.5 *Salmonella/Shigella/E. coli O157* 증균에 사용되는 상용화배지 구성 Neutralizer 분석

<b>Neutralizer</b>		
<b>Component</b>	<b>Capability</b>	<b>Broth</b>
Calcium carbonate	neutralizer(Absorbed substance)	toxic TT
Polisorbate 80	toxic-neutralizing, surfactant capacity	Shigella broth

(2) 분석한 결과 및 Pilot 실험을 통하여 최종후보균 선정

- 조사한 성분들의 실제 효능을 저널검색 및 예비실험을 통하여 확인하고 동시증균을 위한 성분들의 최종 후보균을 정리하였음.

(가) 배지 기본 조성 및 Buffer 성분 결정

- 배지조성은 BPW 조성을 기반으로 하여 성장촉진 및 손상균 회복물질을 첨가하는 방식을 사용하였음.
- BPW의 세부 성분은 제조회사별로 차이가 있으나, 이들을 비교한 기존 연구를 바탕으로 아래 표와 같은 buffer 성분을 구성하였음.

표 2.6 살모넬라/이질균 및 병원성대장균 신속동시증균을 위한 supplement 최종후보균 (NEW1 broth)

Role	Component	Function	Reference	
Buffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	pH buffer	BPW	Baylis et al., 2000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH buffer		
	NaCl	Osmotic balance		TSB, UPB, GN broth..
Growth factor	peptone	Nitrogen, amino acid		
	D-Mannitol	Carbohydrate	Oxoid, Xiao et al., 2010	
	Yeast-Extract	Various vitamins, minerals..	Kim et al., 2008 Gurtler et al., 2009	
Recovery	Ferrous sulfate, TDP, Na Pyruvate. Na thioglycolate	Antioxidants	Gurtler et al., 2009 Kobayashi et al., 2005	
Inhibitor*	Novobiocin	inhibitors of DNA gyrase	Jensen et al., 2003	
	Na deoxycholate	G+, parial G-	Deoxycholate citrate agar	
	Na citrate	G+, parial G-	Xiao et al., 2010	

\*inhibitor들은 추후 농산물시료에서의 실험시, 경쟁균의 과다증식으로 인한 목적균 성장저해에 대비하여 후보균에 포함시켰음

## (나) Growth Factor 농도 결정

○ 조사한 내용을 바탕으로 아래와 같이 Growth Factor 세 가지를 선정하였음.

- ✓ **Peptone:** BPW의 기본구성성분으로 최종후보군에 포함시켰으나, 추후 background flora가 많은 유통농산물에서의 부작용이 예상되어 일단 배제하고 추후 세 목적균의 고른 성장을 위한 첨가제로 활용하기로 하였음.
- ✓ **Yeast Extract:** 다양한 증균배지 개발 연구에서 사용되고 있으며 회복물질로서의 효과도 가진다고 알려져 있어 선택하였음.
- ✓ **D-Mannitol:** 살모넬라 및 이질균의 성장을 강화시킬 수 있다는 조사결과에 따라 선택하였음.

- 실험방법: ELISA를 이용한 시간대별 OD값 측정을 통한 세균성장곡선의 변화를 관찰

● 각 supplement들의 농도별 성능 및 배합 조건은 Multiskan FC(Thermoscientific) 장비를 이용하여 시간대별 Optical Density 600nm를 측정하여 확인하였음. 측정된 값은 SkanIt for Multiskan FC 3.1를 사용하여 분석하였으며 sigmaplot 12.5 software를 이용하여 그래프로 전환하였음.

- ① 각 세균 증균액을 washing 후 신선한 BPW로 풀어줌
- ② 탁도계를 이용하여 1.0 McFarland Standard(약  $3.0 \times 10^8$  CFU/ml)로 탁도를 일정하게 맞춤
- ③ 건강한 세균의 경우 BPW로 10배 희석 후 시험할 supplement들이 2x 농도로 들어간 BPW와 1:1로 섞어줌(열처리를 하는 경우 10배 희석 후 미리 온도를 맞춘 water bath에서 일정시간 반응 후 1분간 상온의 DW에서 식힌 후 동일하게 진행)
- ④ 200ul씩 96well microplate에 분주
- ⑤ 15분 내지 30분간격으로 ELISA 장비를 이용하여 OD 600값을 측정

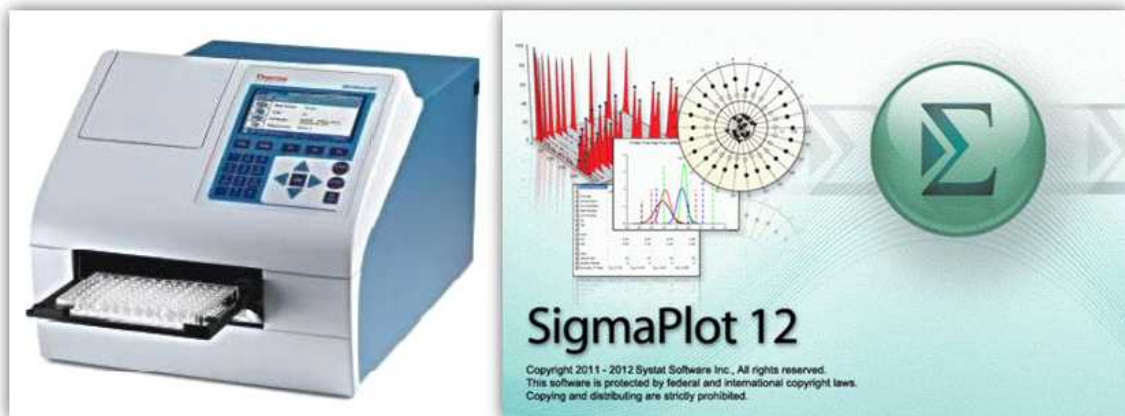


그림 2.2 세균성장곡선 작성에 사용된 Multiskan FC(좌)와 Sigmaplot software(우)

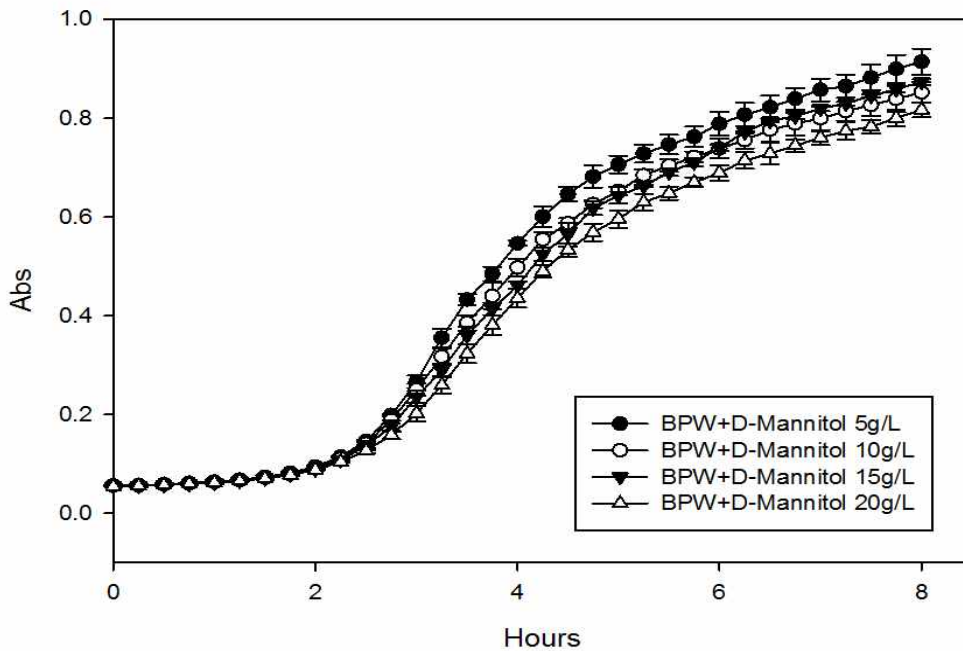
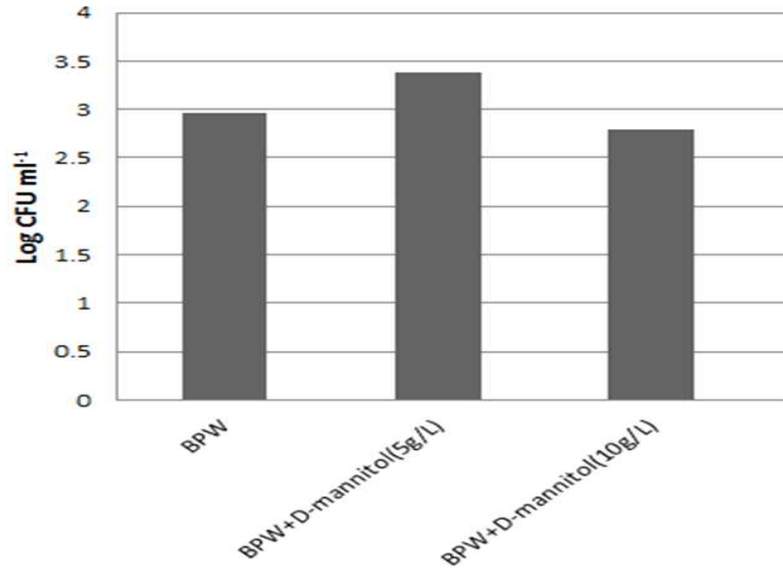


그림 2.3 후보 조성물의 용량별 효과 확인의 예: 살모넬라에서의 Mannitol 용량 결정

- mannitol 무첨가, 5g/L, 10g/L를 첨가한 실험군에 대해 비교하였으며, 5g/L 첨가시 가장 증균력이 높았음.
- D-Mannitol: 예비실험시 5g/L에서는 성장이 촉진되었으나, 10g/L에서 억제되었었는데, ELISA를 이용한 성장곡선 작성했을 때 5g/L 이상의 농도에서는 오히려 성장이 저해되는 것을 확인하였음

다. 살모넬라, 이질균, 병원성대장균의 세포 손상균 활력증강제 분석 및 신속동시 증균배지 개발 연구

(1) Ferrous sulfate, 3'3'-thiodipropionate(TDP), sodium pyruvate 등 3종의 회복물질 검증 실험

- 일반적으로 세균의 generation time은 거의 일정하기 때문에 신속증균은 세균의 lag phase를 감소시킴으로써 가능하다. 이런 lag phase의 길이는 세균의 손상 정도와 비례하기 때문에 세포 손상균의 활력을 증가시켜 lag phase를 단축시키는 것이 신속증균 여부의 척도라 볼 수 있음. 활성산소(ROS)는 세균의 회복을 저해하는 가장 중요한 요소로 알려져 있으며, 이를 제거하기 위한 항산화제로서 다양한 물질들이 연구된바 있음.
- Ferrous sulfate, 3'3'-thiodipropionate(TDP), sodium pyruvate들은 다른 회복물질들에 비해 살모넬라 회복율이 높다고 알려져 있어 우선적으로 실험에 적용하였음. (Gurtler et al., 2009)

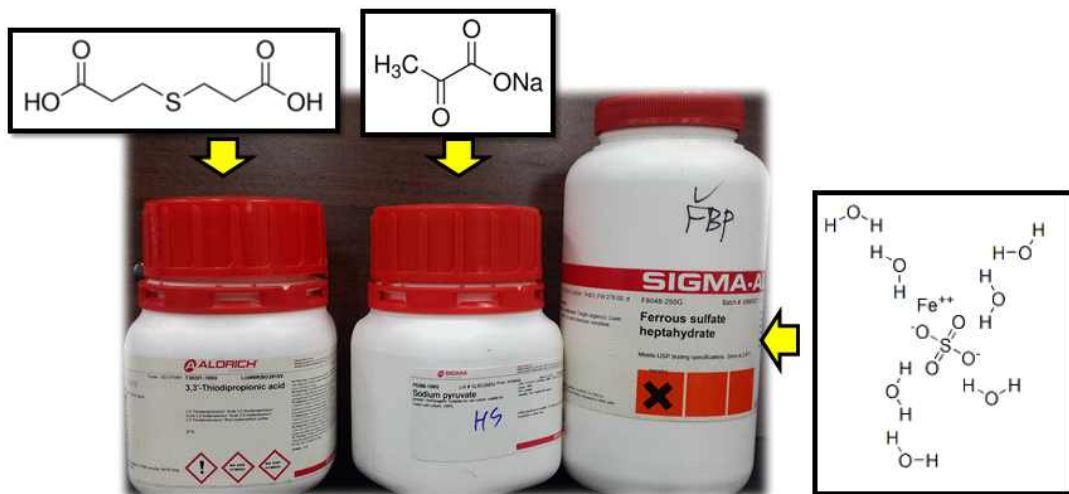


그림 2.4 회복물질 후보군, 왼쪽부터(TDP, Na pyruvate, Ferrous sulfate)

- 인위적으로 세포 손상을 주는 방법으로 heat, cold, starvation, acid, salt 처리 등이 있음. 본 연구에서는 우선 heat-injury로 진행하였으며, 일정 온도(54-60℃)에서의 incubation time의 변화로 손상의 강도를 조절하였음.
- heating time과 손상 정도는 비례하였음. (lag phase 연장)
- 동일한 조건이어도 세균에 따라 lag phase 연장되는 정도가 달랐는데, 이질균 > 살모넬라 > 대장균 순으로 열에 민감하였음.

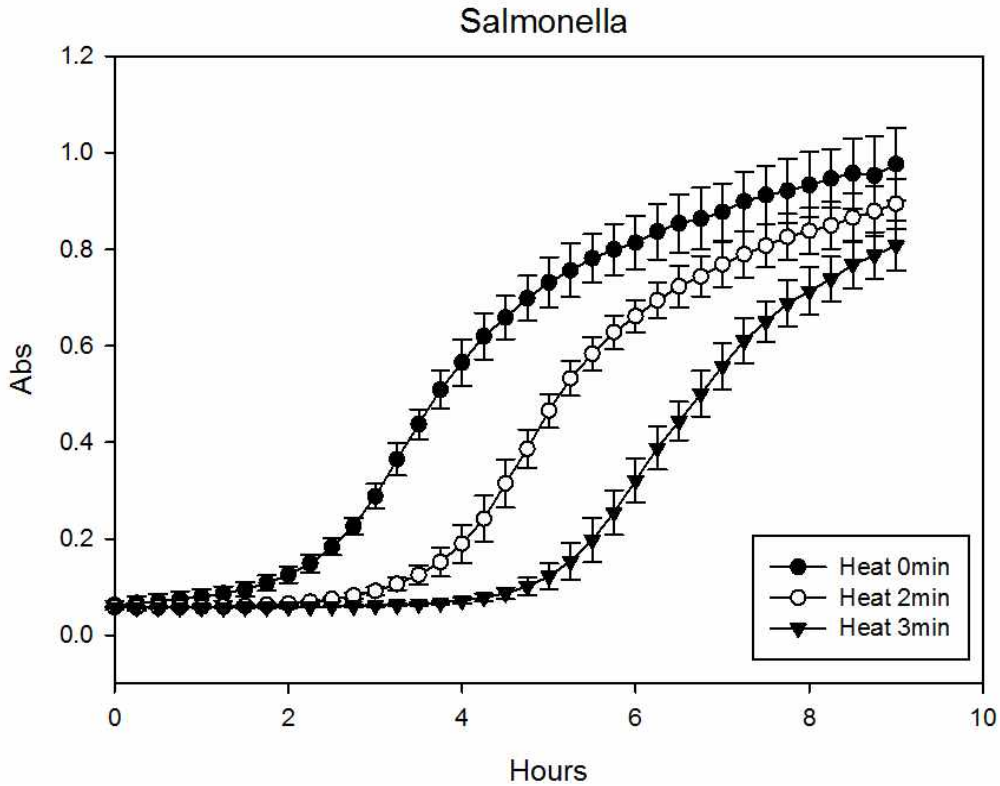


그림 2.5 손상정도에 따른 lag phase 변화

- 회복물질의 효과 및 동시증균을 위한 적정배합비 결정을 위해 예비 실험결과 TDP의 경우 2g/L이상의 농도에서는 오히려 inhibitor로 작용하였고, Na Pyruvate는 용량이 증가할수록 MPD(Maximum Population Density)는 계속 증가하나 2g/L부터 lag phase 감소정도는 차이가 없었음.
- BPW대비 BPW에 TDP 1g/L, Na Pyruvate 2g/L를 첨가한 증균배지에서의 손상균의 회복 효과를 아래 그림과 같이 검증하였음.
- 각 세균별 회복물질들의 농도에 따른 효과를 확인하였는데 Ferrous sulfate의 경우 DNA 추출시 문제가 있어 실험에서 배제하였음.
- BPW에서 회복이 되지 않을 정도로 강하게 손상시켰을 때, TDP, Na Pyruvate을 첨가한 BPW에서는 lag time이 길어지긴 하나 성장이 이루어졌음.
- 열처리하지 않은 세균을 양성대조군으로 넣어 실험이 제대로 이루어졌음을 확인하였음.
- 24시간 후 선택배지에 plating하여 오염이 아닌 목적균이 증균되었음을 확인하였음.
- 선택된 회복물질의 배합과 농도는 손상된 살모넬라와 이질균 모두 회복에 적합하여 동시증균에 적용할 수 있을 것으로 판단된다.



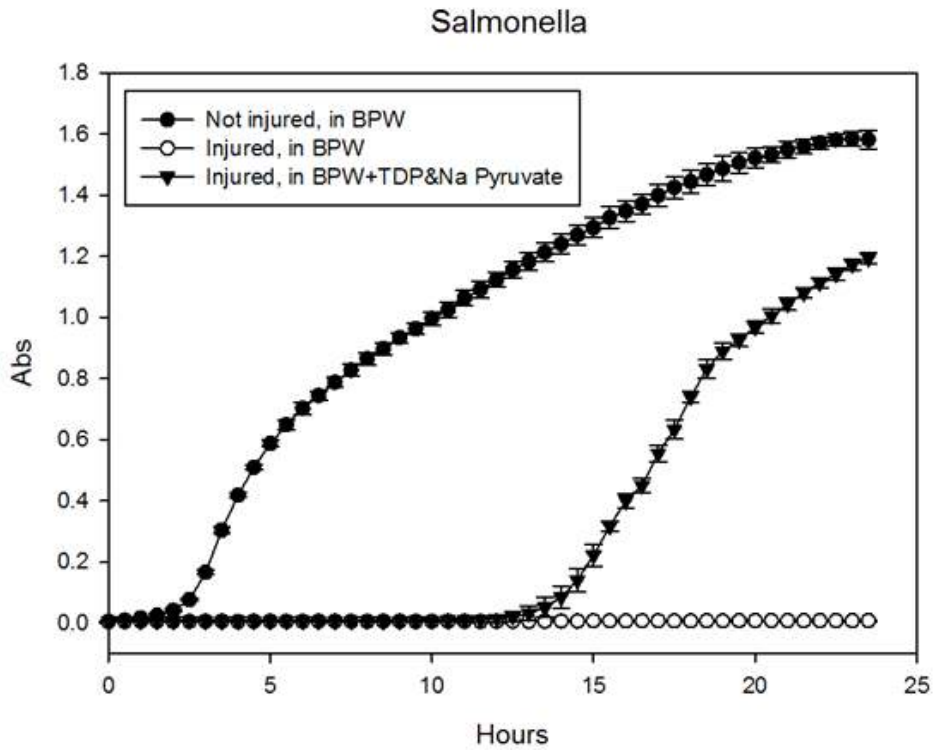


그림 2.6 살모넬라 손상균에 대하여 BPW에 회복물질 첨가시 lag time 감소 확인

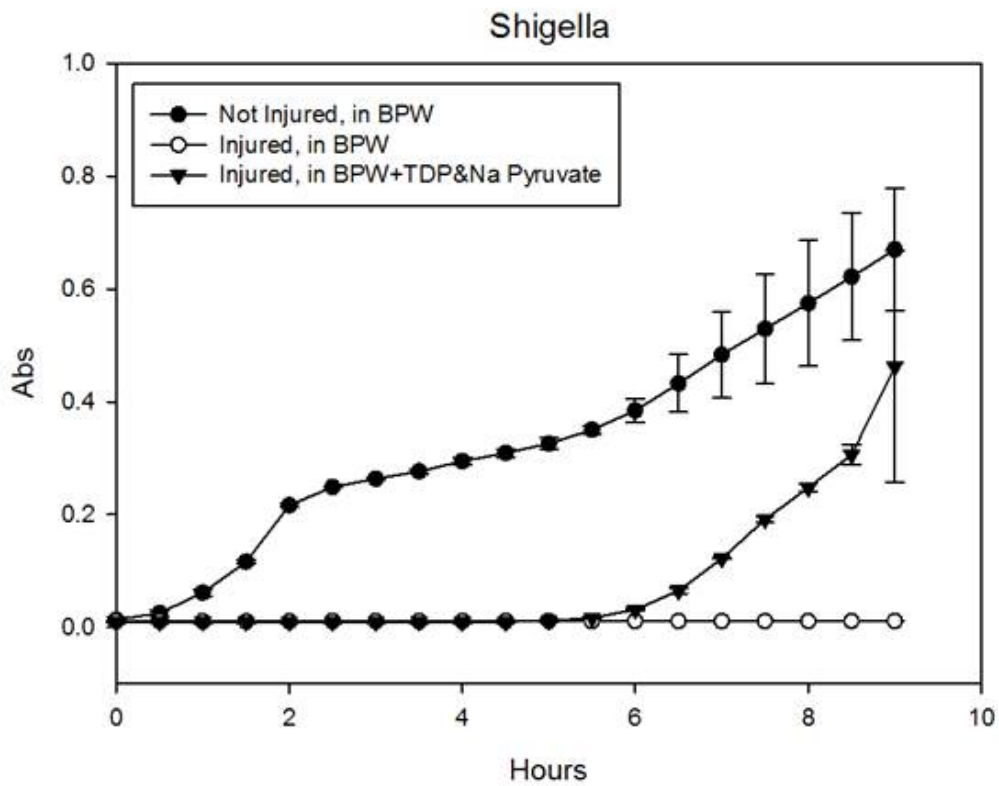


그림 2.7 이질균 손상균에 대하여 BPW에 회복물질 첨가시 lag time 감소 확인

- 위의 실험을 통해 3균의 신속 증균을 위한 최종 배지조성을 아래와 같이 확정하였음(표 2.7).
- 이를 바탕으로 아래 표와 같이 새로운 배지조성을 확정하고 검증 실험을 진행하였음.

**표 27 개발된 신속동시증균배지(NEW2 broth) 조성**

Role	Component	Formula (g/L)
Buffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5
	NaCl	5
Growth factor	peptone*	0-5
	D-Mannitol	5
	Yeast-Extract	6
Recovery	TDP	1
	Na Pyruvate	2

\* 하기 제시한 실험에서 peptone 첨가여부에 따라 각기 다른 회복능력을 보이므로 농도조절을 통해 각 세균의 고른 성장을 유도.

**(가) 건강한 세균에서 기존 증균배지 대비 개발배지의 증균력 확인**

- 3종균에 대해 BPW에 대한 개발배지(NEW2)의 효과를 확인하였으며, 개발배지에 Peptone 5g/L를 첨가한 배지도 함께 확인하였음. (세균의 peptone 이용률 차이를 확인하고 추후 고른 동시증균 효과를 얻기 위함)
- 세포손상을 주지 않았을 때에는 이질균을 제외하고는 성장에 큰 차이를 보이지 않았음.

○ 이질균의 경우 NEW2+Peptone > NEW2 > BPW 순으로 성장속도의 차이를 보였음.

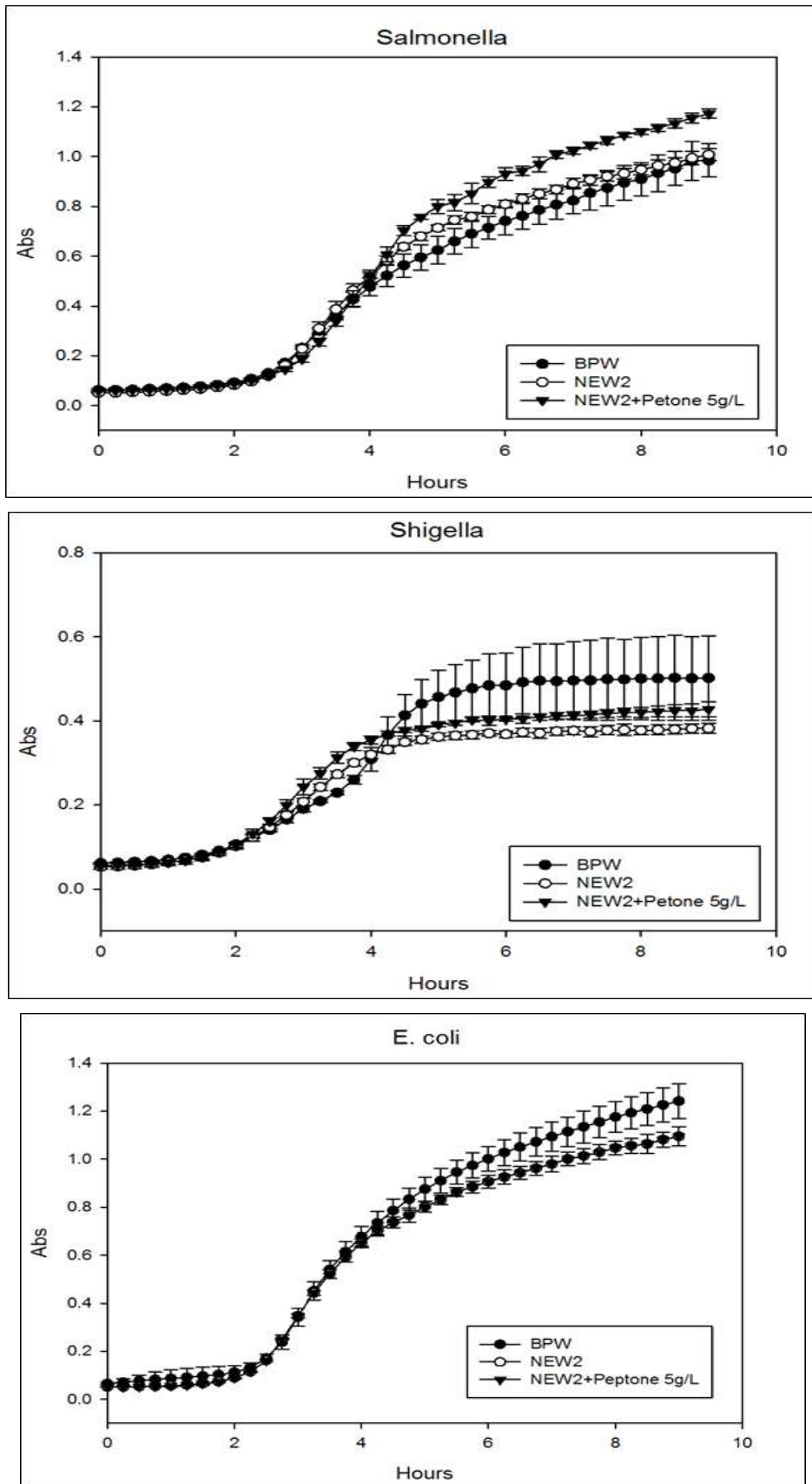


그림 2.8 BPW, NEW2, NEW2+Peptone(5g/L)에서 각 건강한 세균성장곡선 비교 (위에서부터 살모넬라, 이질균, 대장균 O157)

(나) 세포 손상된 세균에서 기존 증균배지 대비 개발배지의 증균력 확인

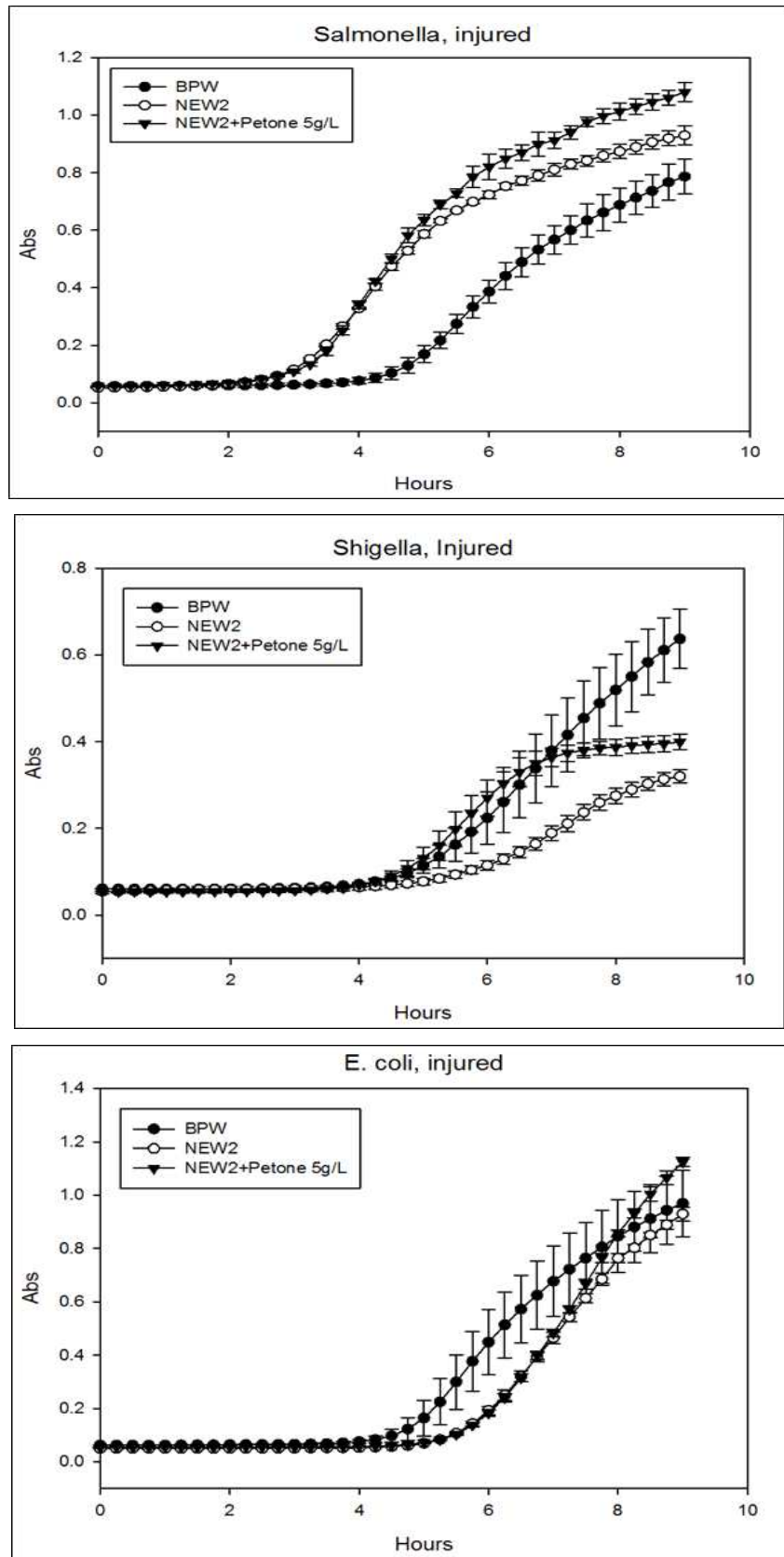


그림 2.9 BPW, NEW2, NEW2+Peptone(5g/L)에서 각 손상된 세균성장곡선 비교 (위에서부터 살모넬라, 이질균, 대장균 O157)

- 열처리를 통해 손상시킨 3종균에 대해 BPW에 대한 개발배지(NEW2)의 효과를 건강한 세균에서 실험한 것과 동일하게 진행하였음.
- **살모넬라**: BPW에 비해 나머지 두 배지의 효과가 뚜렷하게 나타났으며, 살모넬라균의 회복에 peptone의 영향은 미미한 것으로 보여졌다.
- **이질균**: 손상을 주지 않았을 때와 큰 차이점은 NEW2에서 회복이 더디다는 점으로, 이질균의 회복에 peptone의 영향이 클 것으로 판단된다.
- **대장균**: 손상된 균에서는 오히려 개발된 배지가 오히려 성장속도를 늦추었으나, 일반적으로 generation time이 다른 세균에 비해 짧은 것을 고려할 때, 오히려 세가지 세균의 고른 성장을 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

**(다) 개발된 NEW2 배지의 살모넬라, 이질균 전용 증균배지로 활용 평가**

- 개발된 배지가 대장균의 증균능력 개선효과가 미비하다는 평가 의견에 의거, 살모넬라 및 이질균 2종 전용으로 그 기능을 평가하였음.
- 일반적으로 실험실 환경에서의 세균 실험은 TSB, BPW, BHI 등의 영양이 풍부한 비선택배지 및 최적의 온도 (37 또는 42도)에서 증균된 세균(non-stressed cell)을 그대로 또는 희석하여 사용함.
- 하지만 실제 식품 내 존재하는 세균은 식품의 조성 및 보관 환경에 따라 다양한 stress를 받는다. 따라서 검출의 최초단계인 증균과정에서의 non-stressed cell 뿐만 아니라 실제환경에 따른 stressed cell의 회복능력 평가는 중요함.
- heat, cold, acid, salt 등 다양한 stress 요인이 있는데, 이 중 유통 농산물에서 가장, 그리고 보편적으로 세균에 영향을 미칠 수 있는 인자는 cold stress임.
- 따라서 cold-stressed cell의 회복효과를 균 성장곡선을 통해 검증하였음.

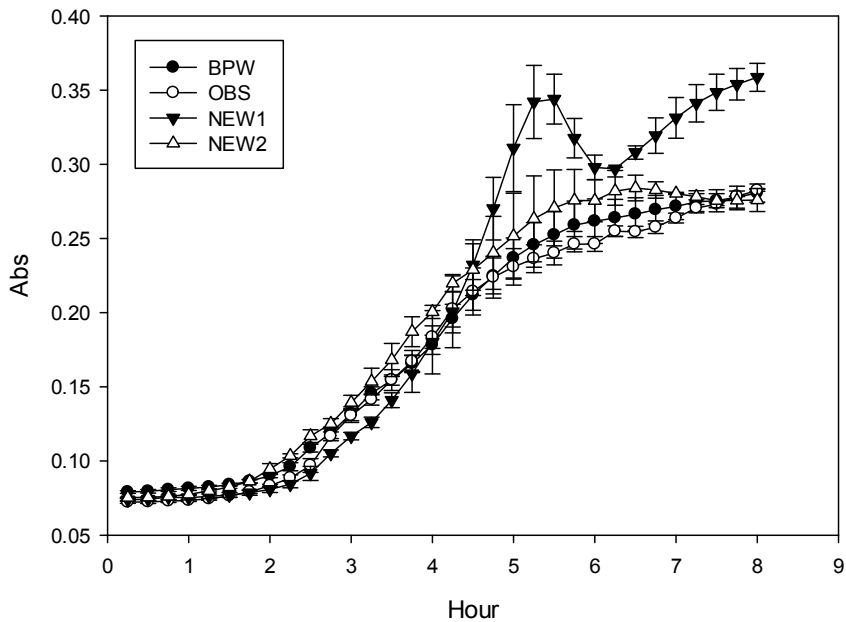
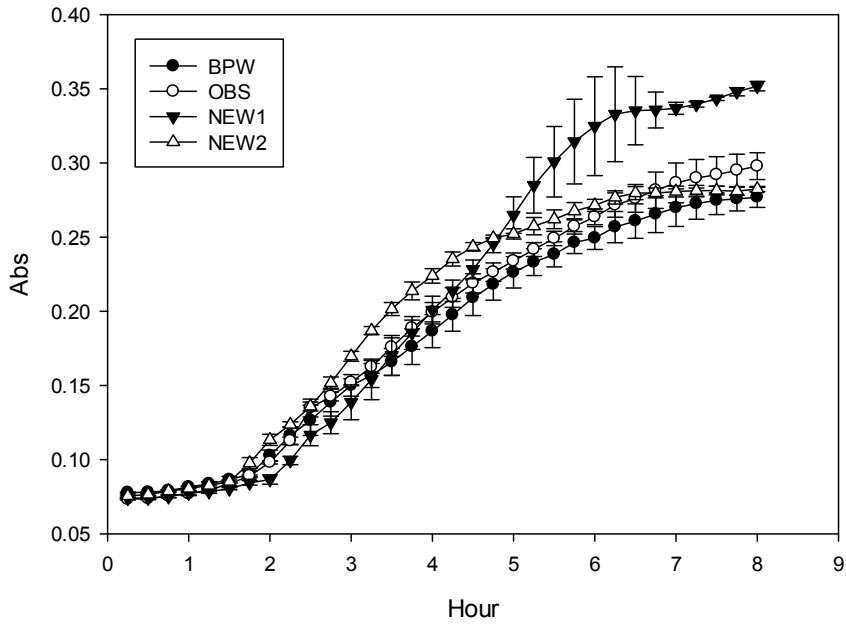


그림 2.10 BPW, 상업화 단일증균배지 OBS(One Broth Salmonella; Oxoid), NEW1, NEW2의 살모넬라 신송증균력 비교: healthy cell (상), cold-stressed cell (하)

- 살모넬라: 본 실험결과 전년도 개발된 살모넬라, 이질균용 신속증균배지 NEW2는 cold-stressed cell에서도 BPW 및 상업화된 단일증균배지인 OBS보다 균을 보다 빠르게 회복시키는 것으로 나타났다.
- Sodium citrate (그람양성균 등 경쟁균 억제역할, 살모넬라는 이용가능) 10g/L가 첨가된 NEW1의 경우 초기 살모넬라의 성장을 지연시켜 신속증균배지 대신 선택배지와 접목시 적합할 것으로 판단된다.

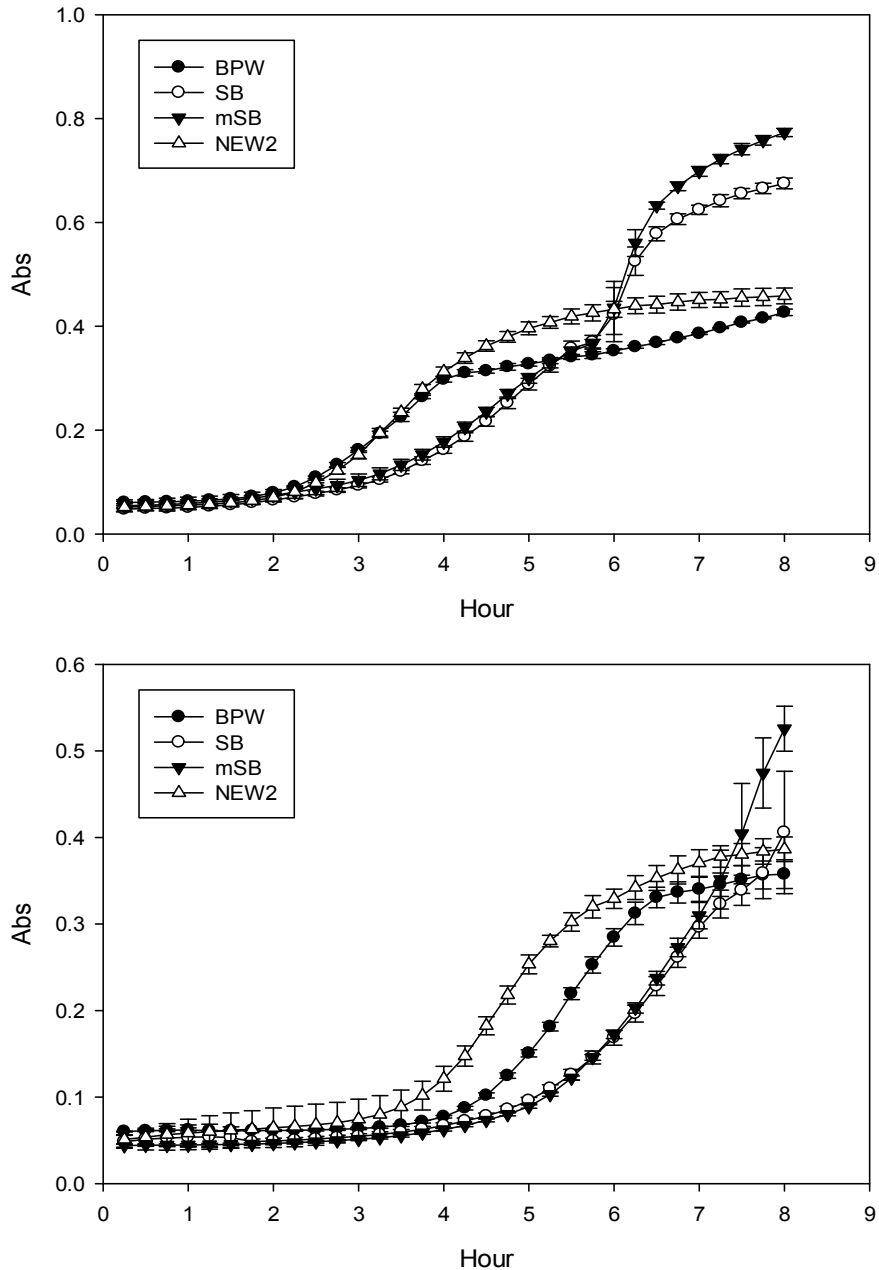


그림 2.11 BPW, 공인배지인 SB(Shigella Broth), NEW1, NEW2의 살모넬라  
신송증균력 비교: healthy cell (상), cold-stressed cell (하)

- 본 실험결과 공인법으로 사용되는 Shigella broth는 일반선택배지 BPW에 비해 느린 회복율을 보였는데, 이는 본래 배지검출용으로 개발되었기 때문으로 사료된다.
- 전년도에 이질균 증균에 효과적인 것으로 확인된 회복물질 sodium pyruvate를 첨가하더라도 초기 회복율 증진에는 별다른 효과가 없었음.
- 본 연구팀에서 개발한 NEW2의 경우 healthy cell에서는 BPW와 유사한 효과를 보였으며, cold-stressed cell에서는 BPW에 비해 우수한 성능을 보였음.

**라. 병원성대장균 전용 신속증균 배지 개발 평가**

- 개발된 배지가 대장균의 증균능력 개선효과가 미비하다는 평가 의견에 의거, 대장균O157 전용 증균배지 새로 개발함
- 미국 공인법 FDA BAM에 등재된 mBPWp (modified buffered peptone water with sodium pyruvate)는 대장균 O157:H7 검출에 사용되는 유일한 배지임
- mBPWp에는 기존 BPW에 다양한 추가 supplements (casamino acid, yeast extract, lactose, sodium pyruvate 및 기타 항생제)가 첨가되는데, 해당 조성은 선택배지와 호환성을 고려하여 개발되었기 때문에, 신속증균에 초점을 맞춰 각 조성들의 농도를 최적화하였음.

**Modified Buffered Peptone water with pyruvate (mBPWp)**

Peptone	10.0 g
NaCl	5.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g
Casamino acids	5.0 g
Yeast extract	6.0 g
Lactose	10.0 g
Sodium Pyruvate	1.0g
Distilled water	1000 ml (Use 500 ml for 2× strength)

pH to 7.2 ± 0.2

그림 2.12 미국 FDA BAM에 등재되어 있는 mBPWp 조성

- 일반적으로 실험실 환경에서의 세균 실험은 TSB, BPW, BHI 등의 영양이 풍부한 비선택배지 및 최적의 온도 (37 또는 42도)에서 증균된 세균(non-stressed cell)을 그대로 또는 희석하여 사용한다.
- 하지만 실제 식품 내 존재하는 세균은 식품의 조성 및 보관 환경에 따라 다양한 stress를 받는다. 따라서 검출의 최초단계인 증균과정에서의 non-stressed cell 뿐만 아니라 실제환경에 따른 stressed cell의 회복능력 평가는 중요하다.
- heat, cold, acid, salt 등 다양한 stress 요인이 있는데, 이 중 유통 농산물에서 가장, 그리고 보편적으로 세균에 영향을 미칠 수 있는 인자는 cold stress임. 따라서 cold-stressed cell의 회복효과를 균 성장곡선을 통해 검증하였음.



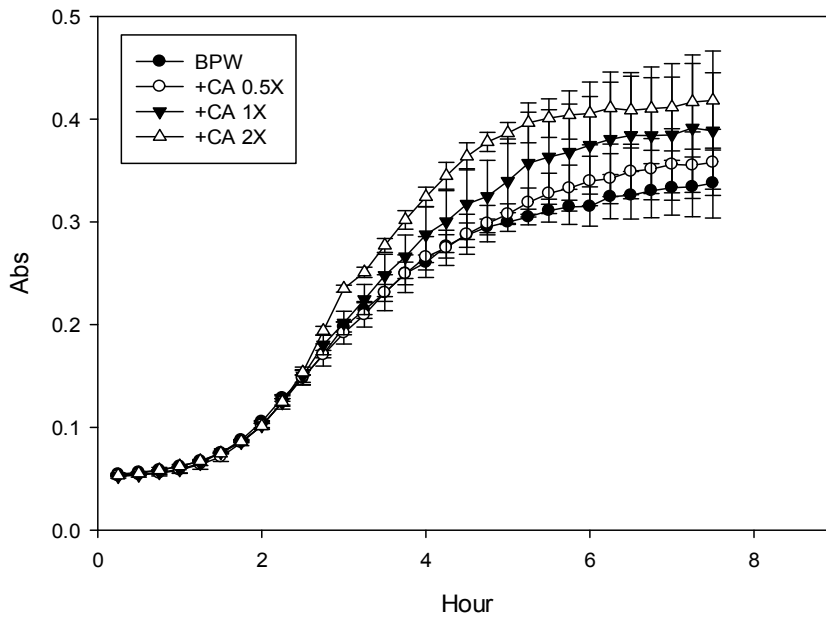
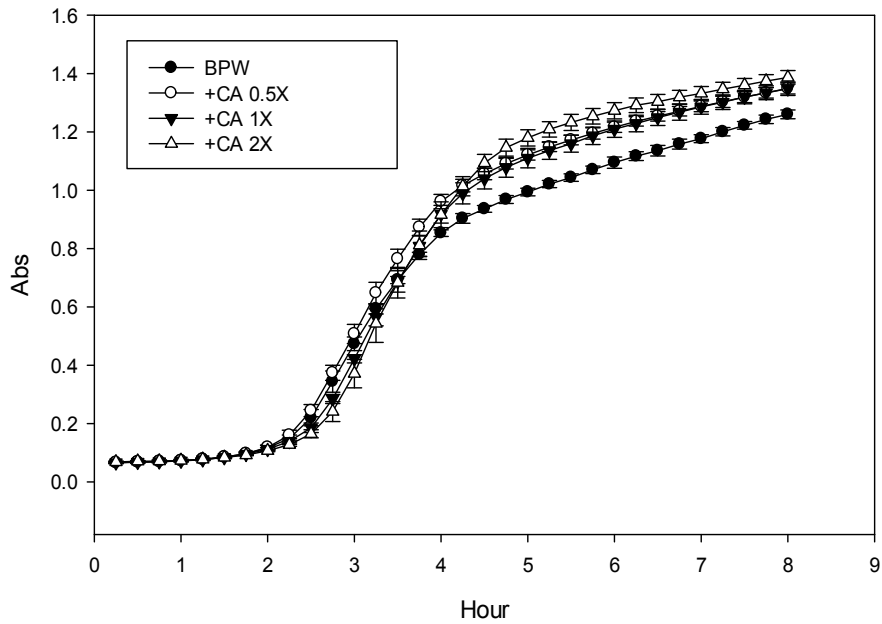


그림 2.13 Casamino acid (CA) 농도에 따른 growth curve 변화: healthy cell (상), cold-stressed cell (하)

- healthy cell에서는 1X이상의 농도에서 초기회복이 지연되는 현상을 보였으나 그 차이가 크지 않았다
- cold-stressed cell의 경우 Casamino acid에 따른 초기회복의 차이는 거의 없었으며, 약 3시간째부터는 농도와 회복율이 비례하는 현상이 나타났다.

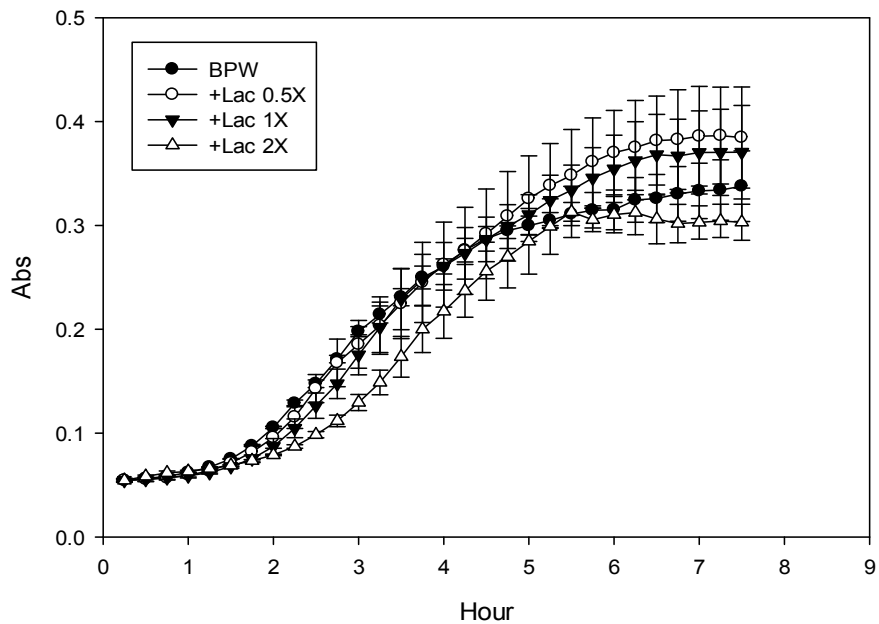
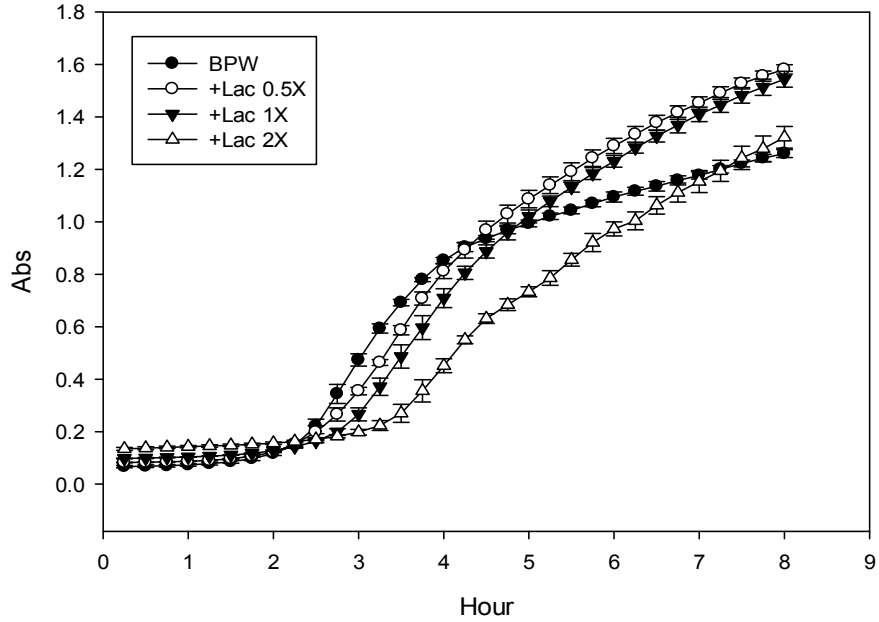


그림 2.14 Lactose (Lac) 농도에 따른 growth curve 변화: healthy cell (상), cold-stressed cell (하)

- healthy cell에서 lactose의 농도가 증가할수록 세균의 회복이 지연됨을 확인할 수 있었음.
- cold-stressed cell의 경우 그 차이가 덜했으나, 경향은 healthy cell의 그것과 일치하였음.
- 대장균은 lactose를 이용할 수 있어 lactose 이용능이 없는 세균들과의 경쟁시, lactose 첨가는 대장균 선택증균에 유리하나 살모넬라 증균시의 NEW2의 sodium citrate와 같이 초기 회복을 지연시켜 신속증균에는 부적합한 것으로 판단된다.

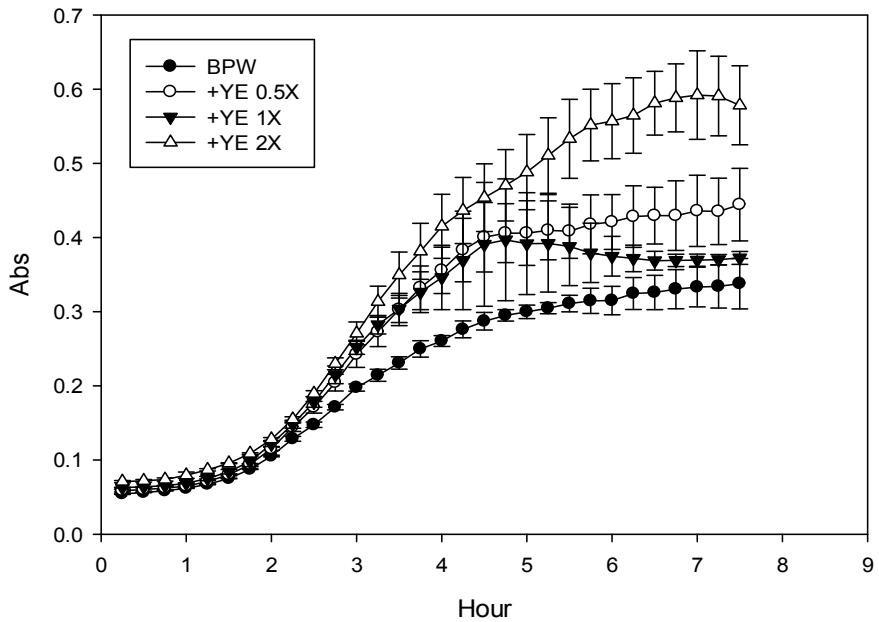
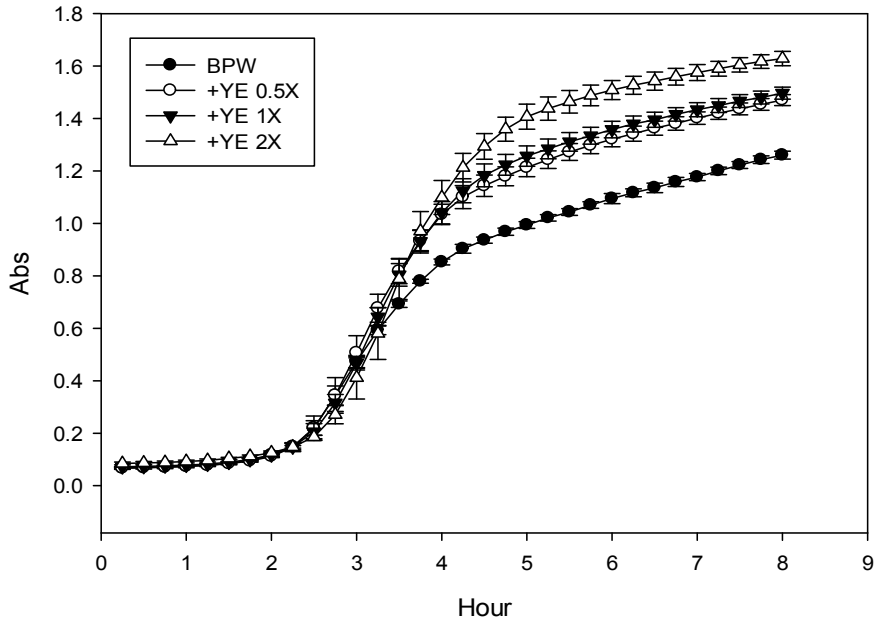


그림 2.15 Yeast extract (YE) 농도에 따른 growth curve 변화: healthy cell (상), cold-stressed cell (하)

○ healthy cell에서 yeast extract는 초기 회복율에 영향을 미치지 않았음.

○ 이와는 달리 cold-stressed cell의 경우에는 yeast extract유무에 따라 초기 회복속도에 차이를 보였음.

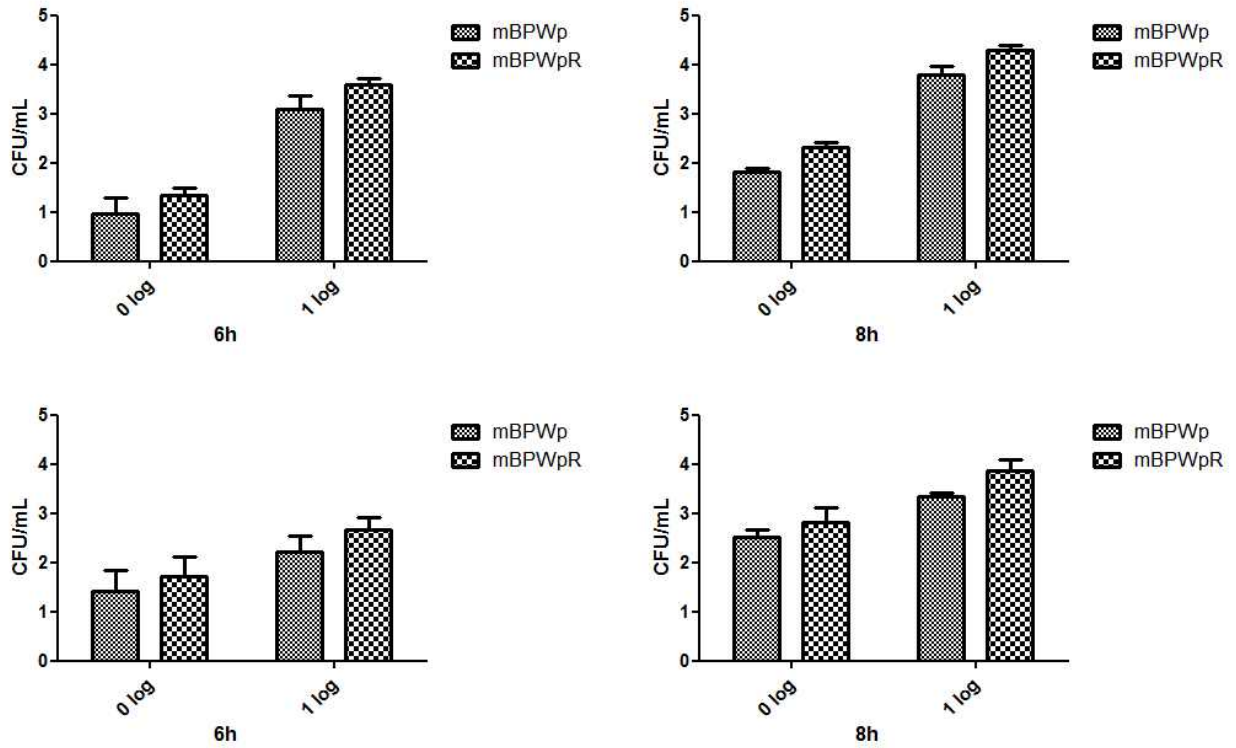


그림 2.16 농산물에서의 mBPWpR(NEW3)성능 평가: healthy cell (상), cold-stressed cell (하)

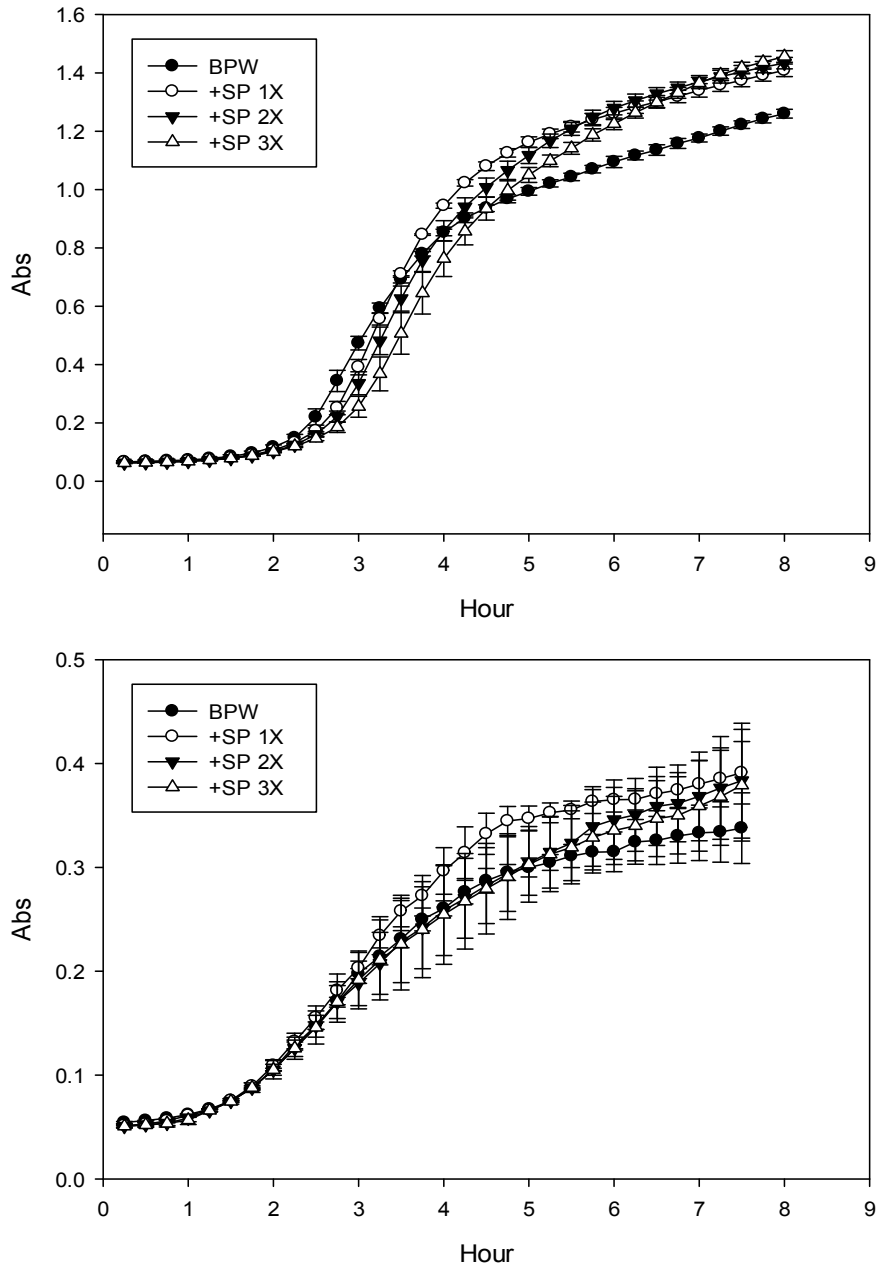


그림 2.17 Sodium pyruvate (SP) 농도에 따른 growth curve 변화: healthy cell (상), cold-stressed cell (하)

- 본 실험결과 healthy cell에서는 sodium pyruvate 농도에 따라 세균의 초기회복을 약간 지연시키는 효과를 보였음.
- 하지만, cold-stressed cell의 경우 초기회복에 별다른 차이를 보이지 않았음.
- Sodium pyruvate 1X 농도는 초기 이후에 회복에 긍정적인 영향을 보이므로, 사용에 적합한 것을 판단된다.

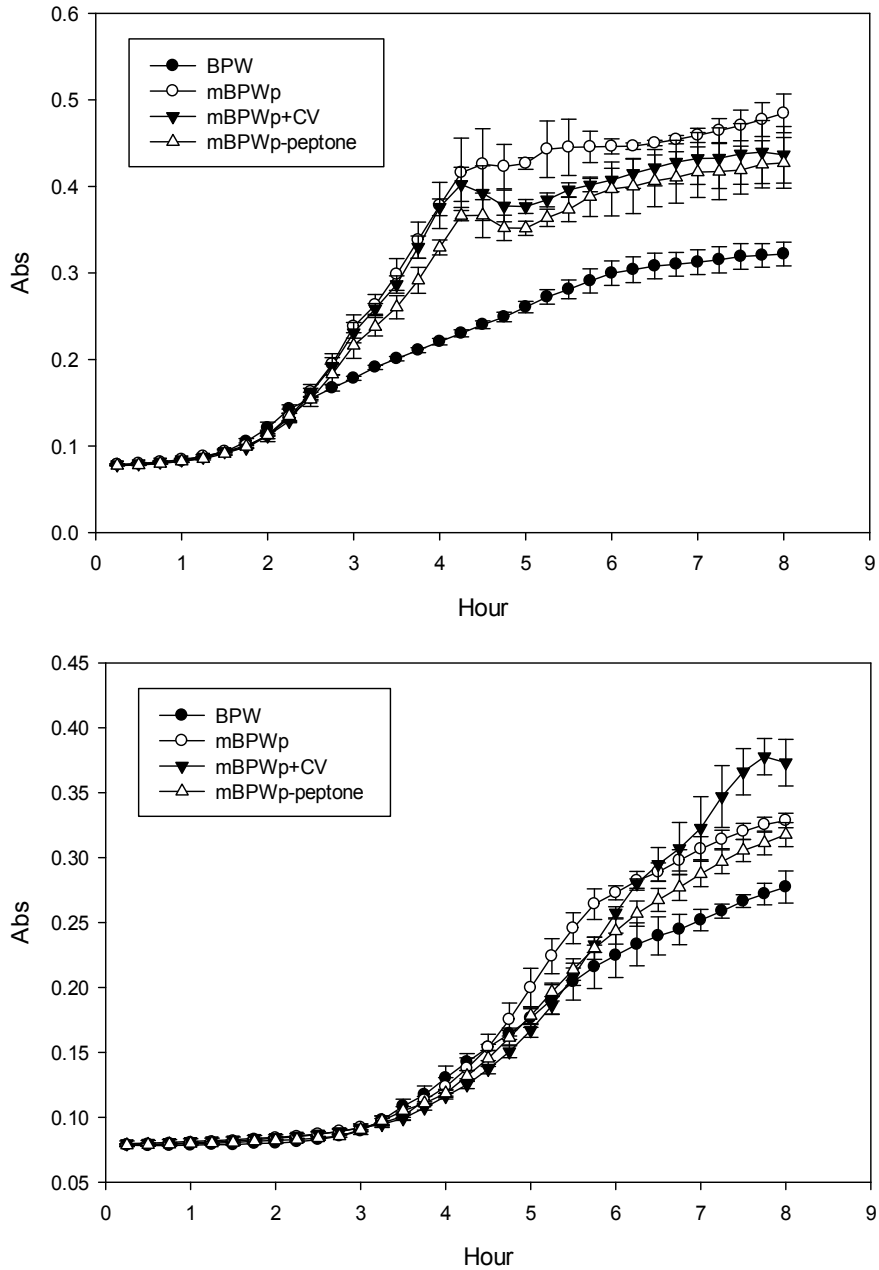


그림 2.18 peptone 제거 및 항생제 (CV) 첨가에 따른 growth curve 변화: healthy cell (상), cold-stressed cell (하)

- healthy cell에서는 항생제의 첨가에 따른 초기 회복 차이는 없었으나, cold-stressed cell에서는 항생제가 첨가된 mBPWp에서 균의 회복이 약간 지연되었음.
- 비선택적 영양소인 peptone을 제거한 mBPWp의 경우 mBPWp에 비해 균의 회복이 조금 더디므로, 성장을 저해하지 않는 수준에서 최소 농도를 결정할 필요가 있을 것으로 판단된다.

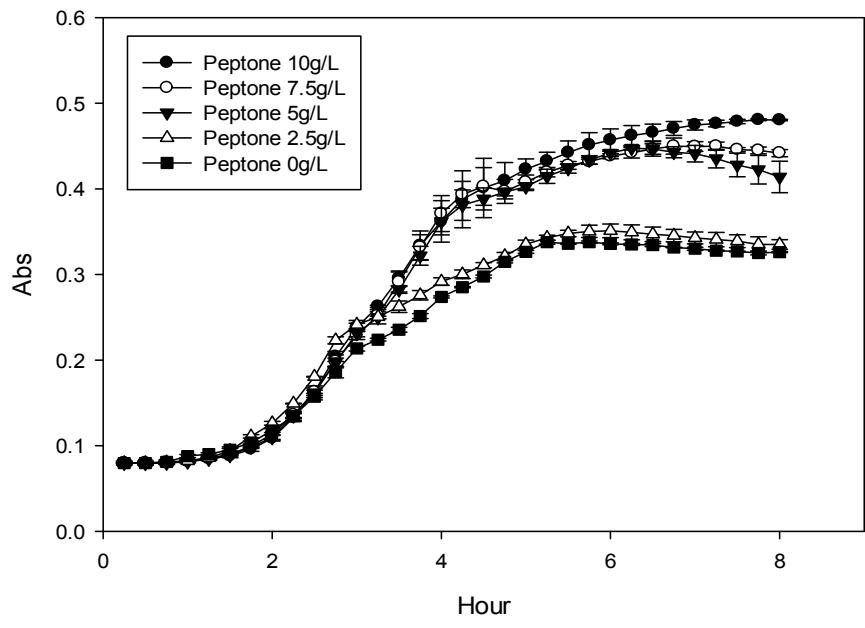
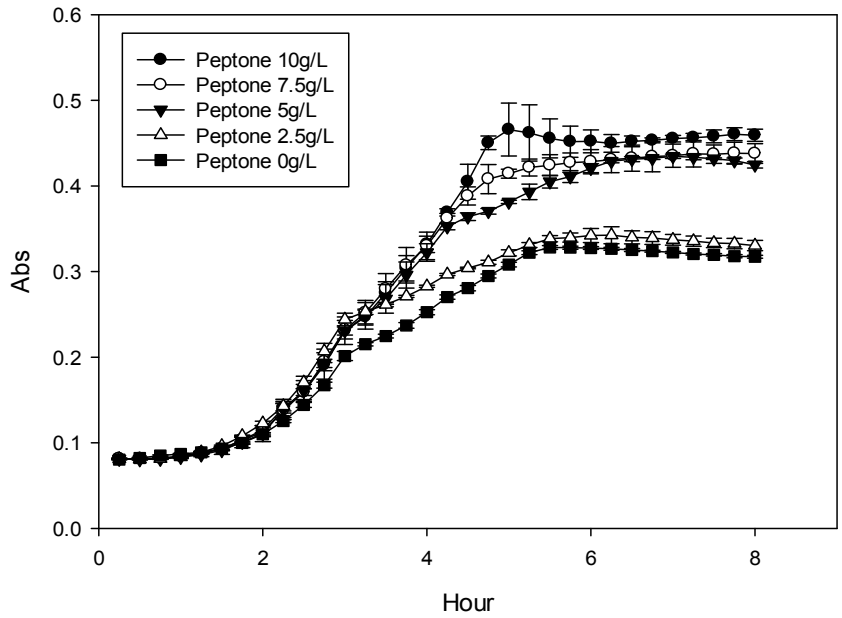


그림 2.19 peptone 농도에 따른 lactose가 제거된 mBPWp에서의 대장균 O157:H7의 growth curve 변화: healthy cell (상), cold-stressed cell (하)

- 위의 실험결과에 따라 lactose는 균의 초기 회복을 저해하므로 mBPWp에서 제하였다
- healthy cell, cold-stressed cell 모두 peptone 농도가 2.5g/L 이상일 때, peptone이 비첨가된 균에 비해 초기 회복효과가 더 빠르게 나타났으며, 근소하지만 2.5g/L 농도에서 가장 효과가 좋았다.
- 다만 해당농도에서는 영양성분이 비교적 빨리 고갈되므로, 배지검출시에는 5g/L의 농도가 적합할 것으로 판단된다.

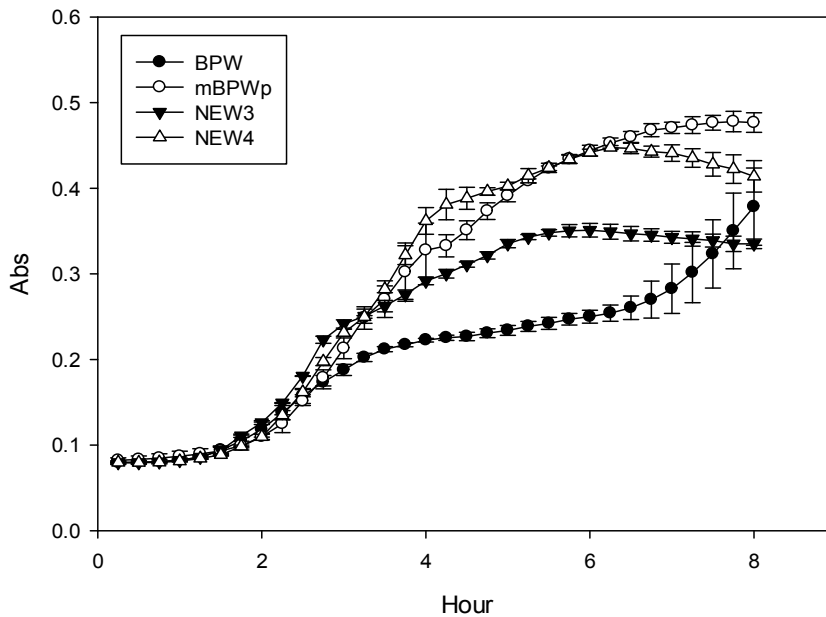
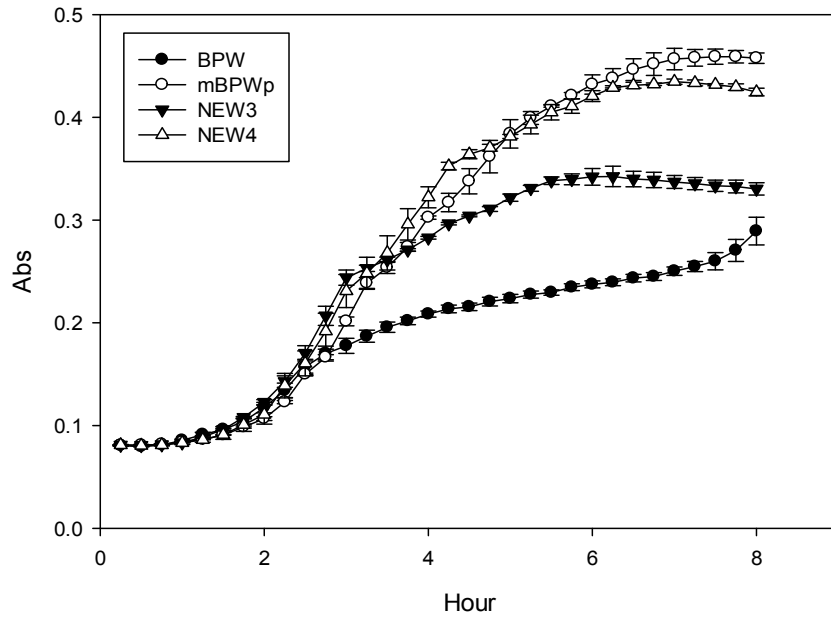


그림 2.20 최종 후보균 NEW3, NEW4와 기존증균배지인 BPW 및 mBPWp에서의 대장균 O157:H7의 growth curve 변화: healthy cell (상), cold-stressed cell (하)

- 개발된 NEW3, NEW4 배지 모두 mBPWp, BPW보다 우수한 초기 회복효과를 보였음.
- 초기 회복효과면에서 NEW3는 가장 우수한 효과를 보여 신속증균배지로서 적합할 것으로 판단된다.



마. 캄필로박터 전용 선택증균 배지 개발 평가

(1) 증균에 사용되는 상용화 배지 및 기개발 배지 구성 supplements 분석

- Oxoid, Neogen, BD 등에서 제시하고 있는 증균배지들의 조성을 분석하고, 국제 학술 데이터베이스인 Web of Science 및 Pubmed를 활용하여 기개발된 증균배지 및 기존배지 조성별 효과를 분석하였음.

표 2.8 *Campylobacter spp* 증균에 사용되는 상용화 배지 구성 Buffer 분석

<b>Buffer</b>		
<b>Component</b>	<b>Capability</b>	<b>Broth</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	pH buffer	FPE broth*
NaHSO <sub>3</sub>		FPE broth
Sodium chloride	osmotic balance	Hunt broth, Bolton broth, Preston broth, CCPD broth**

\* FPE Broth: *Campylobacter spp.* 증균배지 (Hayashi et al., 2013), CCPD Broth: *Campylobacter spp* 증균배지(Chon et al., 2013)

표 2.9 *Campylobacter spp* 증균에 사용되는 상용화 배지 구성 Growth Factor 분석

<b>Growth factor</b>		
<b>Component</b>	<b>Capability</b>	<b>Broth</b>
a-ketoglutamic acid		Bolton broth
Beef extract		Hunt broth, Preston broth
casein hydrolysate		CCPD broth
Enzymatic Digest of Animal Tissue		Bolton broth
Lab-Lemcopowder		FPE broth, CCPD borth
Lactalbumin Hydrolysate		Bolton broth
Peptic digest of animal tissue	nitrogen, 아미노산 공급	Preston broth
Peptone	nitrogen, 아미노산 공급	Hunt broth, CCPD broth
soybean casein digest		FPE broth
Yeast extract	growth factor, vitamin 공급	Hunt broth, Bolton broth

표 2.10 *Campylobacter spp* 증균에 사용되는 상용화 배지 구성 Inhibitor 분석

<b><i>Inhibitor</i></b>		
<b>Component</b>	<b>Capability</b>	<b>Broth</b>
Amphotericin B		Hunt broth, CCPD broth
Polymyxin B		CCPD broth
Sodium Cefoperazone		Hunt broth, CCPD broth
Sodium deoxycholate	Gram + 균 성장 억제	CCPD broth
Trimethoprim lactate		Hunt broth, CCPD broth
Vancomycin		Hunt broth, CCPD broth

표 2.11 *Campylobacter spp* 증균에 사용되는 상용화 배지 구성 Neutralizer 분석

<b><i>Neutralizer</i></b>		
<b>Component</b>	<b>Capability</b>	<b>Broth</b>
Hemin	Neutralises toxic compount	Bolton broth, FPE broth
Sodium carbonate	Absorbed toxic substance	Bolton broth
Bacteriological charcoal	oxygen scavenger	CCPD broth
Ferrous sulphate	oxygen scavenger	Hunt broth, CCPD broth
Sodium metabisulphite	oxygen scavenger	Hunt broth, CCPD broth
Sodium pyruvate	oxygen scavenger	Hunt broth, Bolton broth, FPE broth

## (2) 분석한 결과 및 저널 검색 내용을 토대로 캄필로박터 선택증균배지 개발

- 캄필로박터는 배양조건이 까다로워 검출율을 높이는 것이 가장 중요하다. 일반적으로 선택 증균에 사용하는 액체배지는 ISO, FDA BAM, USDA FSIS 등 국제적인 검출기관에서는 대부분 Bolton broth를 사용하고 있음.
- Bolton broth는 산소에 대한 독소분해력이 좋고 캄필로박터의 회복력이 뛰어나다고 알려져 있음. Bolton broth에서 캄필로박터의 다른 세균의 성장을 억제하기 위하여 다양한 항생제 supplements(cefoperazone, trimethprim, vancomycin, amphotericin B)를 사용하나 실제 식품에서는 그람음성의 정상세균총을 억제하는데 한계가 있다고 알려져 있음. (Chon et al., 2011)
- 특히 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 생성균은 Bolton broth에서 억제되지 않고 살아남아, 캄필로박터의 선택적인 검출을 어렵게 하며, 농산물은 이러한 ESBL 생성균들이 많이 상재하는 식품군으로써 농산물에서 이들 경쟁집락을 억제함으로써 캄필로박터의 검출력 향상이 가능할 것으로 판단된다. 본 연구팀에서는 새로운 항생제인 Triclosan의 선택제제로서의 가능성을 평가하였음.
- 트리클로산은 비누, 세정제 등에 함유된 항생물질로 그람음성 및 양성세균에 넓게 작용하고 있음. 본 연구에서는 기존에 가장 널리 사용되는 캄필로박터 증균배지인 Bolton broth에 트리클로산을 일정량 첨가하여 캄필로박터 선택증균의 가장 큰 걸림돌인 ESBL 생성 박테리아를 억제하는 새로운 증균배지를 개발하였다(T-Bolton broth).
- 새롭게 개선된 배지를 기존의 배지와 비교하여 triclosan의 함유로 인한 ESBL 생성 E. coli 억제효과를 평가하고 동시에 함유된 triclosan이 캄필로박터의 성장에 영향을 주는지를 실험적으로 평가하였음.

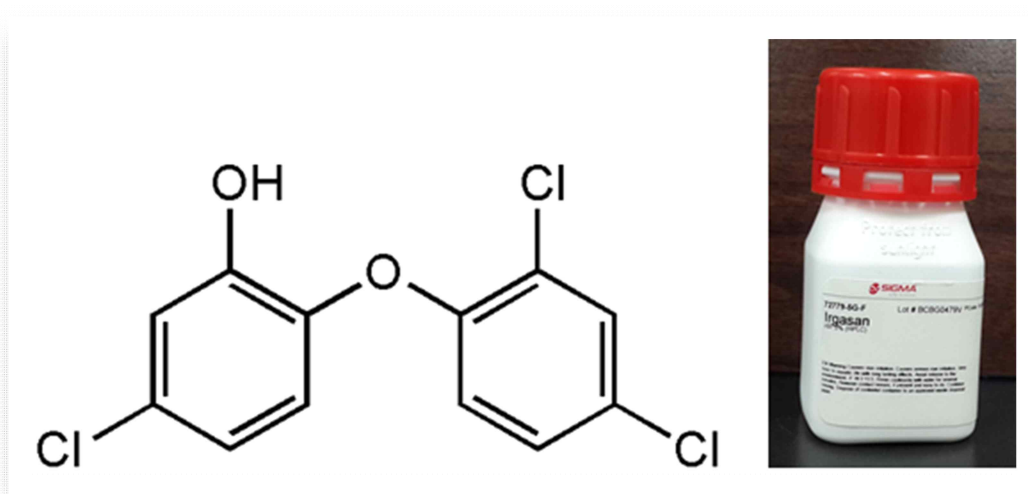


그림 2.21 본 연구에서 사용한 트리클로산(상품명 irgasan)

(가) 개발 broth 내 triclosan 농도 산정

- ESBL 생성 대장균을 억제가능한 최소한의 트리클로산 농도(Minimum inhibitory concentration; MIC를 측정하기 위하여 본 연구실이 보유한 30여종의 식품분리 ESBL 생성 대장균을 실험에 사용하였음. Bolton broth에 트리클로산을 농도별로 넣고, ESBL 생성 대장균의 성장여부를 확인하였으며 그 결과는 아래의 표와 같음.

표 2.12 ESBL 생성 E. coli의 triclosan에 대한 저항성 및 성장여부 측정

증균배지 종류	Triclosan의 농도 (mg/L)	양성으로 자란 균주 수 / 사용된 총 균주 수 (%)
기존 Bolton broth	0	30 / 30 (100)
개선 Bolton broth	0.5	2 / 30 (6.7)
	<b>1.0</b>	<b>0 / 30 (0)</b>
	2.0	0 / 30 (0)
	4.0	0 / 30 (0)

- 개선된 Bolton broth는 기존 Bolton broth에 비해 훨씬 높은 수준의 ESBL 생성 E. coli 억제능력을 보였음. 위 표의 결과를 보면, 트리클로산의 농도가 최소 1.0 mg/L 이상만 되면 실험에 사용한 모든 ESBL 생성 E. coli를 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 따라서 30개의 ESBL 생성 대장균을 100% 억제가능한 1.0 mg/L의 농도를 기존 Bolton broth에 추가로 함유하여 사용하였음.

(나) T-Bolton broth에서의 다양한 캄필로박터의 증균능력 평가

- 트리클로산의 함유로 인해 기존 캄필로박터의 성장이 억제되는지의 여부를 관찰하기 위하여 본 연구팀이 보유한 12종의 캄필로박터 균주를 기존 Bolton broth와 새로 개발된 T-Bolton broth에 접종 후 배양하고, 혈액배지에서 균수를 측정하였음. 각 균주를 1반복으로 간주하여 총 12균주에서 나온 결과를 t-test를 이용하여 유의적 차이를 분석하였음.

표 2.13 두 가지 broth에서의 12종 캄필로박터의 증균능력 평가

균종	균주번호	접종량 (CFU/ml)	증균된 균수 (Log CFU/ml)	
			Bolton broth	T-Bolton broth <sup>a</sup>
<i>C. jejuni</i>	NCTC 11168	3.8	8.18	7.56
	GD_3	6.4	8.14	7.38
	SS_4	5.0	8.19	8.02
	SD_2	4.5	7.74	7.40
	DD	10.0	7.36	7.57
	CJcli_1	3.9	7.51	6.88
	CJcli_2	4.8	7.46	7.08
<i>C. coli</i>	CCA_11	5.3	8.75	7.91
	CCH_B4	8.3	8.53	8.38
	CCHS12-2	7.7	7.72	7.38
	CCA_9	13.0	8.46	8.38
	CCA_1	8.2	7.19	6.96
<b>Mean ± SD (Log CFU/ml) <sup>b</sup></b>			<b>7.94 ± 0.51 A</b>	<b>7.58 ± 0.51 A</b>

a T-Bolton broth: Bolton broth supplemented with 1 mg/L of triclosan

b 동일열에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차(p < 0.05)가 난다는 것을 의미함

- 12종의 캄필로박터 균주의 평균적인 성장능력은 유의적인 차이를 보이지 않아, 1ml/L 농도의 triclosan의 함유는 캄필로박터 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 평가되었음. 따라서 기존 T-Bolton broth는 캄필로박터의 선택증균에 적합한 것으로 판단된다.

- 본 팀에서 개발한 트리클로산 함유 캠필로박터 증균배지는 아래와 같이 특허로 출원되었음.

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자	2013.10.07
특기사항	심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호	10-2013-0119310 (접수번호 1-1-2013-0906852-19)
출원인명칭	건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)
대리인성명	특허법인 수(9-2012-100162-1)
발명자성명	서건호 천정환 임진혁 김동현
발명의명칭	트리클로산이 첨가된 개선된 배지 조성물 및 그 용도

### (3) 캠필로박터 세포 손상균 활력증강제 개발

- 캠필로박터는 산소에 매우 민감하기 때문에 선택배지자체에 산소독성을 완화시켜주는 중화제가 첨가되는데 일반적으로 멸균된 혈액이나 활성탄을 사용함.
- 활성탄의 경우 PCR의 inhibitor로 작용할 가능성이 있고, 혈액의 경우 멸균된 것을 얻기 어렵고 가격이 비싼 단점이 있음.
- 특히 냉장보관후 오랜기간 보관하기 힘들다는 어려움이 있고 경우에 따라서는 PCR inhibitor로 작용가능함.
- 그러나 혈액과 구성성분이 유사한 혈청은 냉동 보관하여 장기간 유지가 가능하므로, 냉장 보관하여 짧은 유통기한을 가진 혈액에 비해 장점이 있음.
- 특히 혈청은 배지에 넣어도 액체배지 자체가 투명한 상태를 유지하기 때문에 균의 생장여부를 용이하게 관찰할 수 있는 이점이 있음.
- 본 실험에서는 소태아혈청(FBS)을 활력증강제 후보군으로 선정하여, 실제 효과를 측정하였음.



그림 2.23 소태아 혈청(FBS)

- 본 연구에서는 혈청(Serum)을 혈액이나 활성탄 대신 넣어 혈청의 산소독성 중화제로서의 가능성을 평가하였음.
- 캄필로박터 배지로 널리 사용되는 Cefex 배지를 무첨가-혈액첨가-혈청첨가-활성탄 첨가로 총 4버전의 배지로 제작하였음.

표 2.13 사용된 배지의 조성

	무첨가 배지	혈액첨가 배지	활성탄 첨가배지	혈청첨가배지
1차 증류수	1000mL	1000mL	1000mL	1000mL
아가 베이스	Campy-Cefex (아큐미디어), 44.4g	Campy-Cefex (아큐미디어), 44.4g	Campy-Cefex (아큐미디어), 44.4g	Campy-Cefex (아큐미디어), 44.4g
첨가제	첨가제 없음	멸균 말혈액 (옥소이드) 50mL	Activated charcoal (시그마), 4g	Fetal Bovine Serum (시그마), 10~100 ml

#### (4) 혈청 함유 캄필로박터 배지에서의 캄필로박터 균 회복력 평가

- 4종류의 캄필로박터 균주의 집락을 PBS에 현탁한 후 단계별로 희석하고, 단계별 희석액을 각각의 배지에 duplication 하여 평판도말하였음.

- 20-200개의 집락을 보이는 배지를 선별하고 집락수를 log unit으로 변환한 후, ANOVA를 이용하여 각 배지별 집락의 수를 유의적으로 비교하였음.
- 혈청은 기존 사용되는 혈액 및 활성탄과 비교하여 통계학적으로 유의차 없는 균 회복효과를 보였음. 또한 혈액보다 높지는 않았으나 무첨가-활성탄 첨가 배지보다는 더 높은 균 회복력을 보였음.
- 따라서 혈청은 캄필로박터 선택증균배지의 균 활력증강물질로 사용 가능할 것으로 보인다.

표 2.14 4종류의 배지를 활용한 캄필로박터 균 회복력 비교

균종	균주명	각 배지에서 회복된 균수 (Log CFU/ one plate)			
		무첨가	혈액첨가	활성탄 첨가	혈청첨가
캄필로박터 콜리	SD_4	1.59	1.87	1.57	1.92
	A5	1.41	1.76	1.76	1.62
캄필로박터 제주니	ATCC 11168	1.88	2.18	1.95	2.10
	Clin_11	1.30	1.51	1.18	1.38
평균값		1.55±0.25A	1.83±0.28A	1.61±0.33A	1.75±0.32A

b 동일열에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차(p < 0.05)가 난다는 것을 의미함

- 본 팀에서 개발한 혈청함유 캄필로박터 배지는 아래와 같이 특허로 출원되었음.

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2013.12.23

특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)

출원번호 10-2013-0161747 (접수번호 1-1-2013-1179229-65)

출원인명칭 건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)

대리인성명 한양특허법인(9-2000-100005-4)

발명자성명 서건호 천정환

발명의명칭 혈청을 포함하는 캄필로박터에 대한 배지 조성물과 그 제조방법



## <요약>

### 제2절 식중독 세균 그람음성 4종에 대한 신속 증균배지의 개발

- 4종 식중독세균(병원성대장균, 살모넬라, 세균성 이질, 캄필로박터)의 신속검사시스템 개발을 위해 국내외 선행연구에 기반하여 새로운 증균 배지 조성을 구성함.
- 기존 공인 증균배지 대비 신속한 증균 여부 평가결과, healthy cell 및 stressed cell에서 초기 증균력이 우수함을 확인할 수 있었음.
- 살모넬라 및 이질균의 경우 신속동시증균배지로 개발되어 검사 비용 절감 등 활용성이 높을 것으로 판단되며,
- 대장균 O157:H7용 신속증균배지는 새로운 물질을 첨가하지 않고 기존조성비를 조정하여 개발되었기에 추후 검증이 용이할 것으로 판단됨.
- 또한 추가연구를 통해 개발된 살모넬라 단일증균배지는 배지법에서의 검사시간을 하루 단축시킬 수 있어 활용도가 높을 것으로 판단됨.

## 제3절 식중독 세균 농축 및 정제 시스템 개발

### 1. IMS를 이용한 3종 식중독 세균 농축 및 항원 추출법 개발

#### 가. 서론

##### (1) 농축·정제기술의 필요성

- 식중독 위해인자(세균)는 농산물에서 매우 낮은 양으로 오염되어 있고 스트레스로 인해 증식하지 않는 경우도 많으며 시료 내에 비균질하게 오염되어 있어 신속한 검출을 위해서는 탈리, 정제, 농축 등의 전처리 과정이 필요함.
- 최적의 샘플 처리과정은, 1) 샘플에서 얻어낼 수 있는 위해인자의 양이 최대여야 하며, 2) 세포독성이 있는 물질이나 PCR inhibitor가 제거되어야 함.
- 특히 농산물에서의 신속검출전 시료전처리는 증균 후 적절한 정제/농축과정 없이는 매우 어려움.
- 식중독 위해인자(세균)는 농산물에서 매우 낮은 양으로 오염되어 신속한 검출을 위해서는 증균 배양 후, 경우에 따라 탈리, 정제, 농축 등의 전처리 과정이 필요함.
- 신속검출법 적용을 위해서는 검출법 이전까지 세균의 손실(loss)을 최소화해야 하며 표적 인자의 농축 및 정제를 수행해야 함.
- 식중독세균의 최적 신속검출을 위해 사용된 농축 및 정제 기술의 방법과 특징을 표 3.1에 나타내었음.
- 현재 식중독 검출 기술에서 가장 널리 사용되는 농축 및 정제 기술은 면역자기분리법 (immunomagnetic bead separation, IMS)을 사용한 기술로서, 미국 FDA BAM이나 USDA FSIS 등의 공인검출법에서 신속검출 이전에 정제 및 농축법으로 이용되고 있음.
- 면역자기분리법(immunomagnetic bead separation, IMS)의 장점으로서는 항원-항체 반응을 이용하기 때문에 민감도와 특이도가 다른 방법에 비해 대단히 높아 선택적으로 원하는 식중독균을 효율적으로 분리할 수 있으며, 식품의 성상 및 정상 세균총 수준에 관계없이 높은 효율을 보임.
- 그러나 IMS 방법은 항원-항체 반응을 사용하는데, 항원(세균)에 대한 항체의 존재 여부와 이용도, 그리고 항체의 종류에 따른 민감도 및 특이도가 제한되는 경우가 많음.

- *Salmonella*, *E. coli* O157, 리스테리아 등 주요 식중독균 위주로 제한적으로 개발되었고 생산비용 측면에 있어서 개선의 필요성이 있음.

표 3.1 농축(concentration) / 정제 (purification) 방법 및 특징

방법	종류	방법 및 장단점	
antibody capture assay	immunomagnetic bead (IMB)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 불순물이나 PCR inhibitor를 제거하기 위한 샘플준비</li> <li>• 매우 특이적</li> </ul>	
Centrifugation	differential centrifugation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 빠르고 저렴, 간단하고 크기가 큰 샘플에 적당</li> <li>• 바이러스 등은 matrix complex와 흡착 및 침전생길 수 있음</li> </ul>	
	ultracentrifugation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 바이러스 검출시 유용</li> <li>• 비용이 비싸고 시간이 오래 걸림</li> </ul>	
Filtration	centrifugal ultrafiltration	<ul style="list-style-type: none"> <li>• size-exclusion filtration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• filter asorption-elution</li> </ul>
	electro-positive/negative filtration	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 빠르고 간단,</li> <li>• 비특이적, 필터가 빨리 막히고 필터에서 세균이 잘 떨어지지 않음, 크기가 큰 샘플에 부적당</li> </ul>	
polymer two-phase seperation	chloroform extraction	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 빠르고 저렴하며 간단</li> <li>• 비교적 비특이적, 분리가 불완전,</li> <li>• 지방에 의해서 분리 방해,</li> <li>• 바이러스 생존에 영향을 미칠 가능성 존재</li> </ul>	
precipitation	acid precipitation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 용액의 pH를 낮춤으로써 beef extract에 바이러스를 침전</li> </ul>	
	organic flocculation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 원심분리후에 얻어진 침전물을 sodium phosphate buffer (pH 9.5)에 풀어줌</li> </ul>	
	polyethylene glycol (PEG) precipitation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH 조정 불필요</li> <li>• PEG-6000이 PEG-8000보다 우수함</li> </ul>	

## (2) 식중독균 농축 및 정제 기법으로 IMS의 개발

- 면역자기분리법은 면역자성 구슬(Immunomagnetic bead)를 이용하여 시료 반응물 속에서 병원균을 항원-항체 특이성을 이용하여 분리해내는 것임.
- 면역자기구슬은 부착인자로 활용하는 방법으로 IMB에 항체를 부착시키고 자기력을 이용하

여 IMB만을 선택적으로 분리하는 균의 분리-농축 방법임(그림3.1).

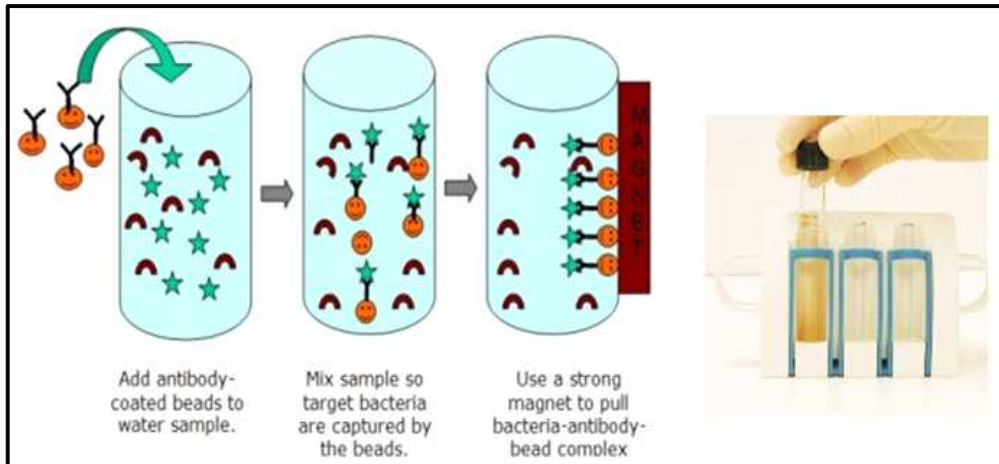


그림3.1. IMS를 활용한 식품내 위해인자 정제/농축 방법.

- 상용화된 Dynabeads® protein G (Invitrogen)은 식품 샘플로부터 분리된 항원과 IMB의 항체 사이의 결합에 사용되는데, 구슬의 지름이 2.8  $\mu\text{m}$ 로 균일한 superparamagnetic bead의 표면에 Protein G가 공유결합되어 있음.
- Protein G는 Immunoglobulin(IgG)와 높은 친화성 갖는 세균 세포벽 성분임. Protein G는 human group G Streptococcal 균주로부터 분리되며, 인간 IgG subclass, 토끼 IgG, 쥐 IgG 모두에 결합함.
- IMS법의 장점으로서는 항원-항체 반응을 이용하기 때문에 민감도와 특이도가 다른 방법에 비해 대단히 높아 선택적으로 원하는 식중독균을 효율적으로 분리할 수 있으며, 식품의 성상 및 정산세균총 수준에 관계없이 높은 효율을 보이고 있음.

#### 나. 연구 방법 및 재료

(*S. aureus*를 위한 IMS 방법을 예로 기술함. *B. cereus* alc *L. monocytogenes*에 대한 실험법도 기본적으로 동일함. 단 해당 항체나 세균 배지 등은 제외)

##### (1) 실험에 사용한 세균 (Bacteria strains)

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 13150, 13565, and 25923)
- *Bacillus cereus* (ATCC 14579)
- *Micrococcus luteus* (ATCC 10240),
- *Lactobacillus plantarum* (ATCC8014)

##### (2) 배지 (culture media)

- TSB (tryptic soy broth; Becton Dickenson and company, Sparks, MD, USA), TSA (tryptic soy agar)
- MRS agar (deMan, Rogosa, and Sharpe Agar; BD) for *L. plantarum*
- PBS (phosphate buffered saline, Gibco, Auckland, NZ)

### (3) IMB-항체의 제조 (Preparation of IMBs)

- anti-*S. aureus* rabbit polyclonal antibody (2.8 mg/ml, Prajna Biology, Shanghai, China)
  - Dynabeads® proteinG (30 mg/ml, Life Technologies, AS, Oslo, Norway)
- ① Dynabeads®는 40초 동안 vortexing하여 잘 섞어 재현탁시키고, 1 mg (33.3 µl)를 1.5 mL 튜브에 옮긴다.
  - ② 용액에서 자기구슬을 분리하기 위하여 그 튜브를 자석(magnetic particle concentrator: Dynal MPCTM-S, Life Technologies, AS, Norway) 위에 올려 놓는다.
  - ③ 상층액을 마이크로파이펫을 사용하여 제거한다.
  - ④ 항체(anti-*S. aureus* antibody) 5.4 µL를 200 µl PBS-T 완충액 (phosphate-buffered saline, pH 7.4, with 0.02% Tween®-20)으로 희석하고 위에서 준비한 Dynabeads® 1 mg에 첨가하여 섞는다.
  - ⑤ Dynabeads®-Ab 복합체는 상온에서 회전기(HulaMixer® Sample Mixer: Life Technologies, AS, Norway) 위에서 30분 동안 15 rpm으로 회전시키면서 반응시킨 후, magnetic particle concentrator 위에 놓아 상층액을 제거한다.
  - ⑥ Dynabeads®-Ab 복합체는 200 µl PBS-T를 첨가하여 재현탁시키고 4°C에서 보관한다.

### (4) 면역자성분리법 실험과정 (Procedure of IMS)

- ① 실험 대상 균주(예, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 14579)를 TSB 배지에서 35°C, 18~24시간 배양한 후, PBS 완충액으로  $10^4$ - $10^6$  CFU/mL이 되도록 희석한다.
- ② 이 희석된 세균 1 mL을 20 µl IMBs-Ab와 혼합한다.
- ③ 이 혼합액을 rotator (15 rpm)를 이용하여 실온에서 20분간 반응시킨 후 magnetic particle concentrator를 이용하여 농축시킨다(separation).
- ④ 상층액을 제거하고 IMB-Ab-bacteria conjugate를 500 µl PBS로 0-2회 씻어준다(optional).
- ⑤ 최종적으로 IMB-Ab-bacteria conjugate에 100 µl PBS 용액을 넣고 vortexer로 가볍게 섞어 재현탁시킨다.
- ⑥ 이 혼합액을 10배 연속 희석액을 만들고 각 희석액의 100 µl를 선택배지 BPA (Baird Parker Agar with egg yolk and tellurite emulsion, Oxiod, England)(*B. cereus*의 경우 MYP 배지)에 도말하고 35°C, 24시간 배양한다.
- ⑦ Dynabeads®-Ab 복합체는 100 µl PBS에 재현탁되고, 적절한 농도로 희석 후 100 µl씩 선택배지(BPA, MYP agar 등)에 도말한다.
- ⑧ 하루밤 배양된 선택배지에서의 콜로니 수를 계수한다.

### (5) IMS 최적화를 위한 핵심 결정 요건 (Key parameters of IMS)

- 결합효율을 최적화 하기 위하여 다음의 주요 요소들의 조건을 최적화 하여야 함.

- IMBs 양 (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5 mg),
- 면역 반응 시간 (10, 20, 30, 40, and 60 min),
- IMB 분리 시간 (1, 3, 5, 7, and 10 min),
- 세균(eg. *S. aureus*) 농도 ( $10^0 - 10^5$  CFU/mL).

#### (6) 특이도 분석 (Specificity test assay)

- ① The specificity of the IMBs was conducted using *S. aureus* (ATCC 13150, 13565, and 25923) and *S. aureus* (ATCC 25923) mixed with other non-*S. aureus* bacteria.
- ② All *S. aureus* were cultured in TSB at 35°C for 18 - 24 h and then serially diluted to  $10^4 - 10^5$  CFU/mL.
- ③ 1 mL of *S. aureus* was mixed with IMBs to test the adequacy of the *S. aureus* antibody.
- ④ A total of 0.25 mL of *S. aureus* cells at concentrations of  $10^3$  and  $10^5$  CFU/mL were mixed with 0.75 mL of  $10^7$  CFU/mL of a competitive flora (comprising *B. cereus*, *M. luteus* and *L. plantarum*).
- ⑤ Different wash times were performed for the IMBs-bacteria conjugates with once or twice wash or without wash.
- ⑥ An aliquot of 500  $\mu$ L PBS was used for each wash.
- ⑦ Moreover, the same amount of Dynabeads® was mixed with the bacteria as a blank control.
- ⑧ An aliquot (0.1 mL) from the washing solution was spread on BPA after appropriate dilution, whereas *B. cereus* and *M. luteus* were plated onto TSA and *L. plantarum* was plated onto MRSA (Weagant et al. 2001).

#### (7) Detection of *S. aureus* in artificially contaminated food samples

- ① Lettuce and whole milk were purchased from a local retail market and used for the artificial contamination experiment.
- ② Uneaten, wilted, and damaged portions of lettuce were trimmed.
- ③ The lettuce and milk samples were then tested as negative samples for *S. aureus* to exclude potential false positive results by plating on BPA after 24 h enrichment in TSB at 35°C.
- ④ *S. aureus* was incubated in TSB at 35°C for 18 - 24 h and serially diluted in PBS.
- ⑤ Lettuce (25 g portions) was inoculated by depositing droplets at 20 locations using 0.5 mL of the appropriate dilutions of the culture to achieve a final inoculation concentration of  $10^2$  to  $10^5$  CFU/mL.
- ⑥ Milk (25 mL) was inoculated with 0.5 mL of the appropriate dilutions of the culture to achieve a final inoculation concentration of  $10^2$  to  $10^5$  CFU/mL.
- ⑦ Following inoculation, the samples were held at 2 - 5°C overnight prior to analysis to allow the organisms to equilibrate with the sample.
- ⑧ After equilibration, each inoculated sample was homogenized with 225 mL PBS in a

Whirl-Pak bag using a Lab-blender 400 (Seward, London, UK) for 2 min.

- ⑨ For each type of food sample, a blank control was prepared by adding 0.5 mL of PBS instead of the *S. aureus* culture.
- ⑩ A total of 1 mL of each sample was mixed with 0.4 mg IMBs and incubated at room temperature for 20 min with rotation at 15 rpm.
- ⑪ After separation, an aliquot of 100  $\mu$ L from the supernatant was spread onto BPA plates for enumeration after appropriate dilution.
- ⑫ All enumeration experiments were performed in triplicate.

**(8) 흡착 효율 및 통계 분석 (Capture efficiency and statistical analysis)**

- 농축 과정에서 흡착 효율(또는 결합효율, capture efficiency, CE)은 시료의 전체 세균수에 대한 면역입자에 결합되어 남아있는 세균수의 백분율로 정의됨.
- 흡착 효율은 다음의 방정식에 따라 계산하였음.

$$CE (\%) = (C_b / C_o) \times 100 \%$$

$C_o$  : 시료에 존재하는 세균의 총수(CFU/1 mL)

$C_b$  : 면역자기구슬(IMBs)에 결합한 세균수(CFU/100  $\mu$ L)

- 또는 다음의 방정식으로 계산할 수도 있음(Varshney et al. 2005).  $CE (\%) = (1 - C_u/C_o) \times 100\%$ , 여기서  $C_o$ 는 시료 속의 총 세균수(CFU/mL)이고,  $C_u$ 는 IMBs에 결합하지 않은 세균수임(CFU/mL, 즉, 상등액과 세척액 속의 세균수).
- 통계 프로그램 SPSS (version 21.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였으며, CE 계산은 Fisher's exact test로 수행하였고, 통계적 유의성은 P 값 0.05 이하로 평가함

## 다. *S. aureus*에 대한 IMS의 개발 및 최적화

### (1) IMS 조건의 최적화 (Optimization for the amount of IMBs)

- 앞의 실험방법에서 기술한 것처럼 anti-*S. aureus* rabbit polyclonal antibody를 Dynabeads® protein G와 결합시킨 것을 편의상 IMB로 표기함.
- IMS 최적화를 위한 핵심 결정 요건 및 특이도 분석: IMB의 양(0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 및 0.5 mg), 면역반응의 시간(10, 20, 30, 40, 60분), 자기 분리 시간(1, 3, 5, 7, 10분), 세척 회수, 및 세균의 농도( $10^0 - 10^5$  CFU/mL)에 따른 항-*S. aureus* 항체의 결합 역학과 용량(capacity)을 조사함.
- 황색포도상구균의 총균수는 BPA 한천배지, 경쟁균 총균수는 TSA 한천배지에서 계수함.

### (1) IMB 양의 최적화 (Optimization for the amount of IMBs with Dynabeads®)

- IMB의 양(0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 및 0.5 mg)에 따라 *S. aureus*  $6.8 \times 10^4$  CFU/mL(4.83 log cfu/mL)를 반응시켜 얻은 결합효율(CE)은 4.93%에서 97.06%까지 증가함(그림 3.2 및 표 3.2).
- IMB 0.4 mg와 0.5mg에 대한 CE 값은 통계적으로 유의한 차이( $p > 0.05$ )가 없으므로, 이후 실험에서는 최적 IMB의 양을 0.4 mg 정함.
- 이론적 계산으로 IMB 0.4 mg은  $2.68 \times 10^7$  개의 자기구슬에 해당함. Varshney 등에 따르면, 대략  $1.9 \times 10^7$  개의 IMB 가 *S. aureus*  $6.8 \times 10^4$  CFU/mL을 100% 흡착하기 위하여 필요함(Varshney et al. 2005).
- 이러한 CE의 차이는 immunomagnetic particle과 세포들 사이에서 일어나는 cluster 형성, 한 자기 입자가 여러 세균을 흡착할 가능성, plating count method에 의한 콜로니 수의 감소 등의 가능성이 있음(Varshney et al. 2005; Shukla et al. 2016; Sun et al. 2002; Linda et al. 2001).



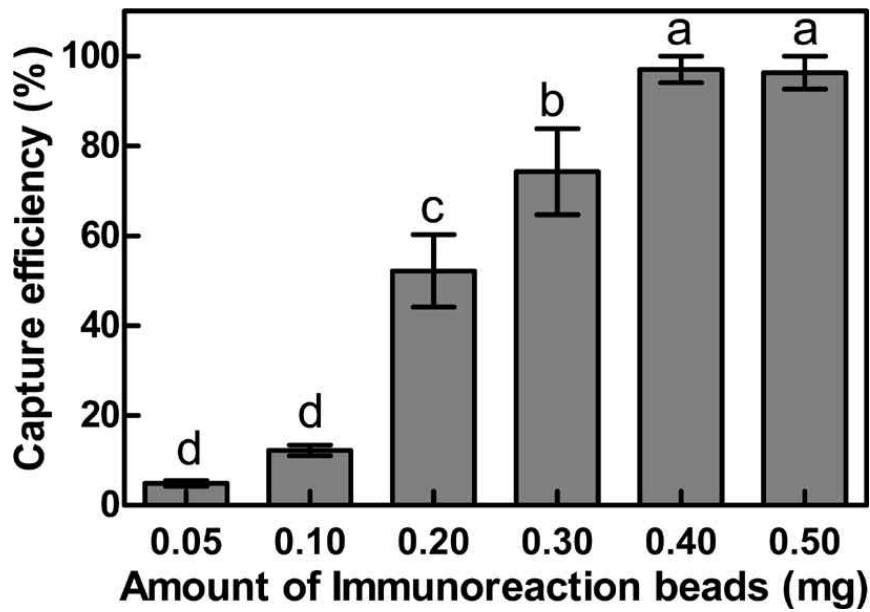


그림 3.2 Effect of the amount of immunomagnetic beads on capture efficiency (CE) against *S. aureus* at concentration of  $6.80 \times 10^4$  CFU/mL. Data are presented as means of CE $\pm$ SD; Bars labeled with different letters at different amounts of IMBs indicate significant ( $p < 0.05$ ) difference in CE.

표 3.2 Effect of the amount of immunomagnetic beads (IMB-Abs) on capture efficiency (CE) against *S. aureus* at concentration of  $6.80 \times 10^4$  CFU/mL (4.83 log cfu/mL)

Strain	IMBs (mg/ $\mu$ L)	Capture cells (log cfu/100 $\mu$ L)	CE (%)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.05/10	3.53	4.93%
	0.1/20	3.92	12.2%
	0.2/40	4.56	52.2%
	0.3/60	4.71	74.3%
	0.4/80	4.82	97.1%
	0.6/120	4.82	96.3%

(2) 면역 반응 및 분리 시간의 최적화 (Optimization for immunoreaction time and separation time)

- 면역반응 시간 10, 20, 30, 40 및 60분에 대한 결합효율(CE)은 각각 58.79%, 96.97%, 95.15%, 97.58% 및 98.79%임. 이때 사용한 균수는  $8.25 \times 10^4$  CFU/mL (그림 3.3)
- 20분 보다 더 긴 시간에서 결합효율은 통계적으로 유의하게 증가하지 않으므로 *S. aureus*의 IMS 최적 반응시간을 20분으로 정함.
- 타 연구 논문에서의 면역반응 시간은 15분부터 45분까지 다양한데, 이보다 더 긴 시간동안 반응으로 결합효율의 증가가 일어나지 않음이 보고됨(Xiong et al. 2014; Varshney et al. 2005; Yang et al. 2007; Shan et al. 2014).

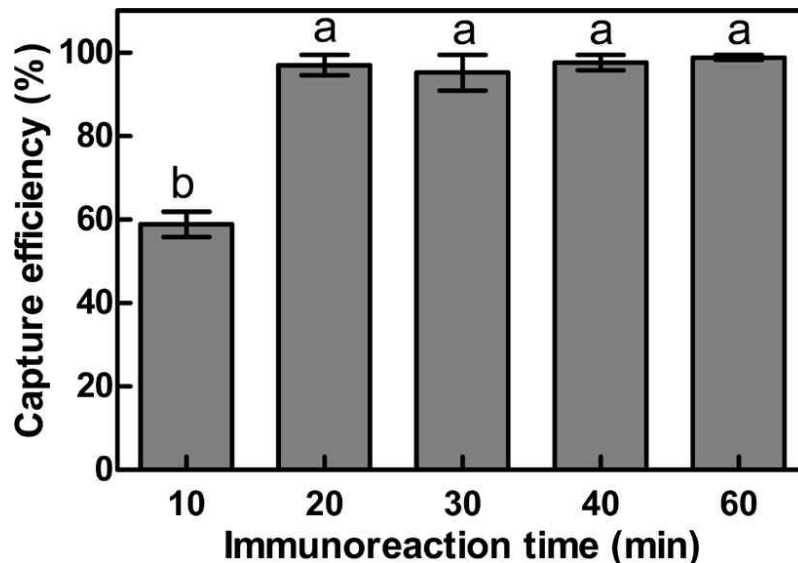


그림3.3 Effect of immunoreaction time on capture efficiency (CE) of 0.4 mg immunomagnetic beads against *S. aureus* at concentration of  $8.25 \times 10^4$  CFU/mL. Data are presented as means of  $CE \pm SD$ ; Bars labeled with different letters at different immunoreaction time indicate significant ( $p < 0.05$ ) difference in CE.

- 자기분리(농축) 시간 최적화: 면역반응 후 PBS 용액에서 IMBs-bacteria 복합체를 자석을 이용한 분리 시간을 1, 3, 5, 7 및 10 min으로 수행 한 후 결합효율을 측정 한 결과는 각각 90.85, 94.58, 92.88, 95.59 및 97.63% 였는데, 서로 통계적으로 유의한 차이가 없었음. 이때 사용한 균수는  $5.18 \log$  CFU/mL. (그림 3.4)
- 그러므로, *S. aureus*에 대한 IMS의 최적 분리 시간을 1분으로 정함. 이것은 Invitrogen의 Dynabead 실험 manual에서 추천한 값과 동일함.

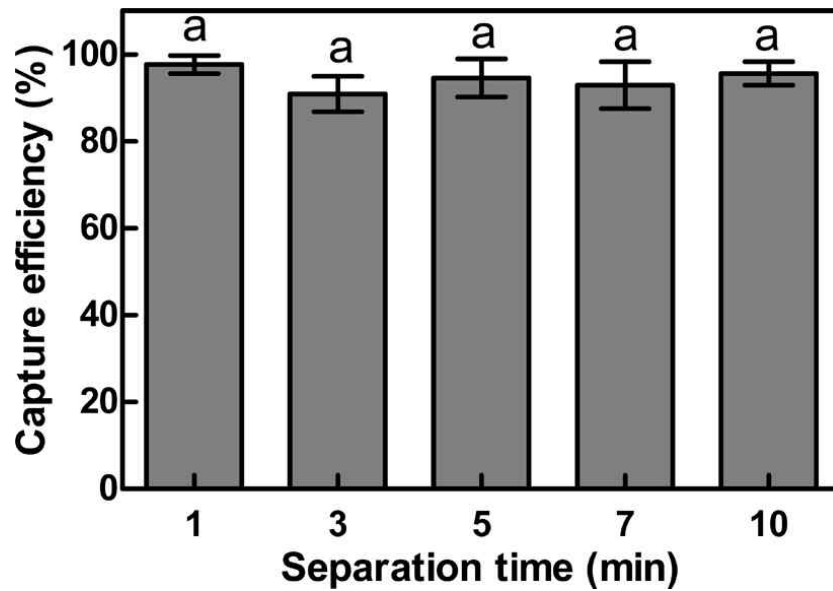


그림3.4 Effect of separation time on capture efficiency (CE) of 0.4 mg immunomagnetic beads against *S. aureus* at concentration of  $1.48 \times 10^5$  CFU/mL with an immunoreaction time of 20 min. Data are shown as means of CE $\pm$ SD; Bars labeled with different letters at different separation time indicate significant ( $p < 0.05$ ) difference in CE.

### (3) IMS의 특이도, 민감도 및 기타 특성 (Specificity and characterization of IMS)

○ 특이도 높음: *S. aureus* 균주 ATCC 13150, 13565 및 25923의 IMS 결합효율(CE)는 각각 85.0%, 91.7% 및 93.4%였음.

strains of <i>S. aureus</i>	IMS CE(%)
ATCC 13150	85.0
ATCC 13565	91.7
ATCC 25923	93.4

○ *S. aureus*와 경쟁균총(competitive flora: *B. cereus*, *M. luteus*, *L. plantarum*)의 비율을 1:100 및 1:10,000으로 정하고 혼합한 후 IMS의 특이성을 조사하였음(표 3.4).

○ 경쟁균 총균수의 비율(1:100 및 1:10,000) 사이에는 CE 값(세척없을 때, 85.5 및 87.8%)은 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았음.

○ 그러나, 순수배양 조건에서의 CE 값(약 97%)에 비하면 감소함(약 86%).

○ 세척 단계는 CE를 낮춤: 세척 회수(0, 1, 2회)에 따른 CE 값(각각 85.5, 70.5, 65.0%)의 감

소가 발생하므로 대개의 경우 IMS 후 washing 하지 않는 것이 더 높은 CE를 얻을 수 있음(표 3.4)

- 그러나, 세척 단계는 간섭 또는 억제 물질(inhibitors)의 제거하는데 도움이 되지만, 동시에 표적 세균도 제거됨을 유의해야 함(Yang et al. 2007).
- 그러므로 세척 단계는 부차적 실험의 경우에 따라 적용을 고려해야 할 것임.

표 3.4 Capture efficiency (CE) of immunomagnetic beads against *S. aureus* from a constant competitive flora of *B. cereus*, *M. luteus*, and *L. plantarum* with different wash times

<i>S. aureus</i> /competitive flora (CFU)	Number of washes	CE (%)
$2.0 \times 10^5 / 5.15 \times 10^7$ (1:100)	0	85.5±6.5 <sup>a</sup>
	1	70.5±4.5 <sup>a</sup>
	2	65.0±5.0 <sup>a</sup>
$2.0 \times 10^3 / 5.15 \times 10^7$ (1:10,000)	0	87.8±2.3 <sup>a</sup>
	1	76.3±4.8 <sup>ab</sup>
	2	67.0±6.0 <sup>b</sup>

CE values are means±standard deviation (n=3); means within the same column of the same bacteria concentration with different letters indicate significant (p<0.05) difference.

- 민감도 높음: IMS 최적 조건 하에서, 다양한 농도의 *S. aureus* ( $4.1 \times 10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  및  $10^5$  CFU/mL)에 대한 IMS 결합효율은 모두 90% 이상임(각각 97.6, 97.6, 98.8, 96.3, 95.1 및 91.5%)(그림 3.5 & 표 3.5).
- 단 단위부터 십만 단위 농도까지 모두 90% 이상의 CE 값을 보여줌. 그러므로 IMS 반응 한계를 매우 낮게 설정할 수 있음.
- 최근, magnetic nanoparticle이 선호되고 있는데, 그것은 나노입자의 더 큰 surface-to-volume ratio와 유동성(mobile)이 더 나은 검출 한계를 제공하게 때문으로 사료 됨(Shukla et al. 2016; Shan et al. 2014).
- 그러나, 더 작은 구슬은 더 적은 자성물질을 가지므로 더 오랜 분리시간과 더 센 자석이 필요하고, 다시 이것은 IMBs가 cluster 형성을 일으키게 할 수 있을 것임(Rida et al. 2004; Wang et al. 2011).

- 대조적으로, 더 큰 구슬은 같은 밀도의 더 작은 구슬보다 더 많은 시료 용액 속을 움직여 표적 세균과 조우할 기회가 더 커짐. 2.8  $\mu\text{m}$  자기구슬이 1  $\mu\text{m}$  구슬보다 더 효과적으로 흡착한다는 보고가 있음(Tu et al. 2009).
- Dynabeads®(지름 2.8  $\mu\text{m}$ )는 수많은 면역 실험에서 자기운반체(magnetic carrier)로 사용되고 있음(Parham et al. 2003; Zhu et al. 2011)

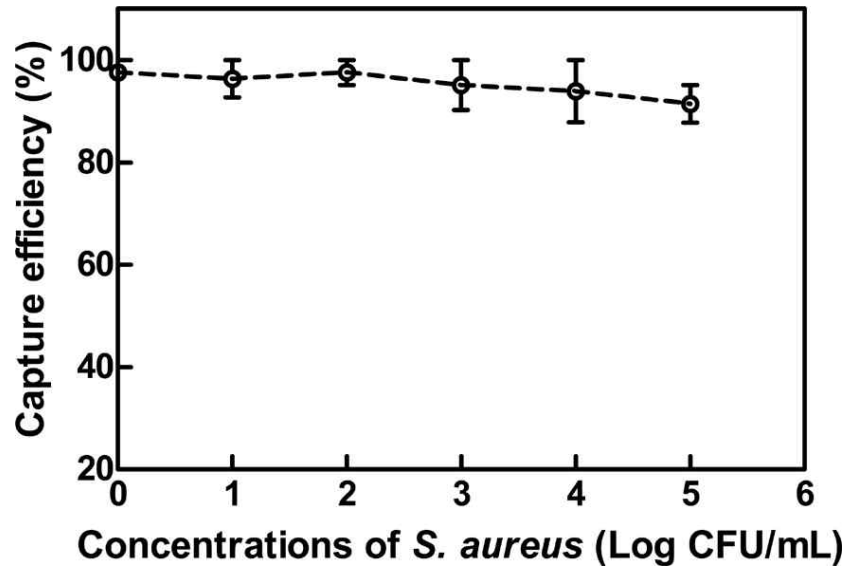


그림3.5 The capture efficiency (CE) of 0.4 mg immunomagnetic beads against *S. aureus* at a concentration of  $4.10 \times 10^0$  CFU/mL to  $4.10 \times 10^5$  CFU/mL.

표 3.5 The effect of the number of *S.aureus* under optimized conditions of IMS. The capture efficiency of IMBs against *S. aureus* at  $4.10 \times 10^0$  CFU/mL to  $4.10 \times 10^5$  CFU/mL.

Strain	Inoculum cells (log cfu/mL)	Capture cells (log cfu/100 $\mu\text{L}$ )	CE (%)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.61	0.60	97.56%
	1.61	1.60	97.56%
	2.61	2.61	98.78%
	3.61	3.60	96.34%
	4.61	4.59	95.12%
	5.61	5.57	91.46%

(4) 식품 시료에서 *S. aureus* 에 대한 IMS 결과

- 식품 시료인 상추와 우유에서 *S. aureus*에 대한 IMS의 흡착 효율을 평가하였음(표 3.6).
- *S. aureus* 의 세균수 농도가 다음과 같을 때( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  및  $10^5$  CFU/mL), 우유에서의 결합효율은 각각 95, 83, 84 및 79%였으며, 상추에서의 결합효율은 73, 65, 69 및 60%이었음.
- 상추가 우유에서보다 낮은 CE 값을 보이므로 상추에는 IMS CE 값을 낮출 수 있는 다양한 간섭 물질(예: 경쟁세균총, 미세 식품 입자들 등)의 존재를 시사함.
- IMS가 culture-based detection의 민감도(sensitivity)를 높이는 데 도움이 될 수 있음. natural microflora가 많은 식품, complex matrix의 식품, raw ground beef, 셀러드, alfalfa spout 시료으로부터 표적 세균의 분리에 적용됨(Weagant et al. 2011; Weagant et al. 2001; Fedio et al. 2011; Prentice et al. 2006).

표 3.6 Capture efficiency (CE) of immunomagnetic beads against *S. aureus* in spiked lettuce and milk samples

Food samples	CE (%) against different concentration of <i>S. aureus</i> (CFU/mL)			
	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$
Lettuce	73.27±3.96 <sup>a</sup>	65.22±6.09 <sup>a</sup>	69.41±8.24 <sup>a</sup>	60.00±4.02 <sup>a</sup>
Whole milk	94.77±9.80 <sup>a</sup>	83.23±4.19 <sup>a</sup>	84.42±7.67 <sup>a</sup>	78.70±4.65 <sup>a</sup>

CE values are means±standard deviation (n=3); means within the same row with different letters indicate significant (p<0.05) difference.

### <요약>

#### 식중독 세균 *S. aureus*에 대한 면역자기분리법(IMS)의 개발 및 최적화:

- *S. aureus*의 IMS 최적 반응 조건은 IMBs 0.4 mg, 면역반응시간 20분, 자석 분리 시간 1분 등.
- *S. aureus*의 IMS는 높은 민감도 및 특이도를 가짐. 세균수  $10^0$ - $10^5$  CFU/mL에서 결합 효율은 98 - 91% 사이였음. *S. aureus* ATCC 13150, 13565 및 25923의 CE는 각각 85.0%, 91.7% 및 93.4%였음.
- 높은 경쟁균 총균수의 존재(100 및 10,000배)에서 IMS 결합효율은 높았음(85.5 및 87.8%).
- washing step은 CE값을 낮춤(0, 1, 2회 세척시 각각 85.5, 70.5, 65.0%로 감소)
- *S. aureus*의 세균수 농도가 다음과 같을 때( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  및  $10^5$  CFU/mL), 우유에서의 IMS 결합효율은 각각 95, 83, 84 및 79%였으며, 상추에서의 IMS 결합효율은 73, 65, 69 및 60%이였음.
- *S. aureus*에 대한 IMS는 다양한 환경 조건에서 높은 결합효율을 보이므로 식중독 세균의 신속검출을 위해 농축 및 정제 기술로 사용가능함.

## 라. *B. cereus*에 대한 IMS의 개발 및 최적화

### (1) 면역자기분리법(IMS) 제작(Dynabeads® protein G with anti-*B. cereus* antibody)

- 기본 실험 방법은 *S. aureus*의 경우와 동일하게 진행함.
- 항체: anti-*B. cereus* antibody (Abcam)를 구입하여 Dynabeads® 와 결합시켜 IMBs를 제작하여 사용함.

Bacteria	Bead	Antibody	Target bacteria (antigen)
<i>B. cereus</i>	Dynabeads® Protein G (invitrogen)	Anti- <i>B. cereus</i> antibody (abcam)	<i>B. cereus</i> and <i>B. subtilis</i>

- *B. cereus* strains: ATCC 10876, 11778, 12480, 14579, 21366, 25621
- 세균 배양: TSB 배지에서 35 °C, 18-24 시간 동안 계대배양함
- 세균 수 측정 용 선택배지: Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar(MYPA)

### (2) *B. cereus*에 대한 IMS 특이도 결과

- 바실러스 세레우스 6 균주들에 대한 IMS의 결합효율 결과, 가장 높은 결합효율의 *B. cereus* ATCC 10876과 ATCC 14579의 결합효율이 각각 17.0 %과 11.6 %
- 이것은 *B. cereus* 6균주들 중에서는 높은 값이나 IMS 결합효율로는 상대적으로 낮은 값임.
- 결합효율의 차이는 사용한 항체에 대한 각 균주들의 항원성이 다를 수 있음을 의미함.

표 3.7 Recovery of *B. cereus* strains using 20 µL IMBs

<i>B. cereus</i> strains	Inoculum log CFU/ml	Final suspension log CFU/100µL	Capture efficiency
ATCC 10876	5.33	4.56	17.0%
ATCC 11778	6.21	3.00	0.1%
ATCC 12480	5.54	4.04	3.2%
ATCC 14579	5.39	4.45	11.6%
ATCC 21366	5.60	4.18	3.8%
ATCC 25621	5.88	3.30	0.3%



(3) *B. cereus*에 대한 IMS 반응 조건 최적화 결과

(가) IMB의 양

○ IMB의 양(0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 mg/μL)의 증가에 따라 결합효율(CE값 각각 5.97, 13.06, 28.69, 53.17, 55.45%)도 증가하였음.

○ IMB 0.4 mg 과 0.5 mg 사이의 CE값은 통계적 유의한 차이가 없으므로, IMB 양이 최소화를 위하여 0.4 mg(80μL)을 선택함.

표 3.8 Recovery of *B. cereus* from pure cultures using different amounts of IMBs

Strain	IMBs	Capture efficiency (CE %)
<i>B. cereus</i> ATCC 14579  (Inoculum cells 3.99 log cfu/ml)	0.05 mg/10 μL	5.97
	0.1 mg/20 μL	13.06
	0.2 mg/40 μL	28.69
	0.4 mg/80 μL	53.17
	0.5 mg/100 μL	55.45

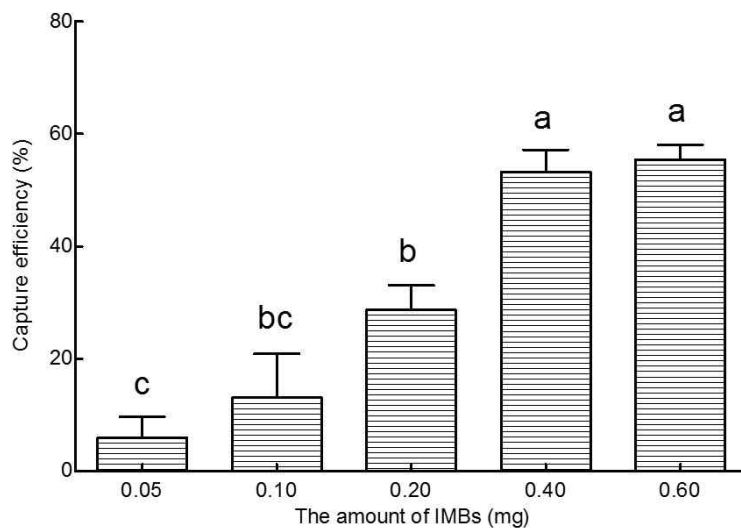


그림3.6 Effects of the amount of IMBs on the capture efficiency. Data are shown as means of capture efficiency ± SD; Bars labeled with different letters at different amounts and immunoreaction time indicate a significant difference in the capture efficiency (p < 0.05).

(나) IMS의 최적 반응 시간

- 면역자성구슬-항체 복합체와 *B. cereus*의 IMS 면역반응 시간에 따른 결합효율은 표 3.9와 같음
- IMB의 면역반응 시간, 10, 20, 30, 40, 50분에 따른 각각의 결합효율은 33.67, 58.32, 53.57, 50.20, 59.49%였음. 면역반응을 20분 이상 증가시켜도 결합효율이 증가하지 않으므로( $p > 0.05$ ) 20분을 면역반응 시간으로 선택함.
- 개발자 프로토콜은 IMS 실험에서 Dynabeads® protein G를 사용시 면역반응 시간으로 10분을 추천하나 본연구 결과는 20분이 더 좋은 효율을 보였으며 타 연구 결과들에서도 면역반응 시간이 15분 - 90분으로 다양하게 보고됨(Mao et al. 2016; Varshney et al. 2005; Xiong et al. 2014; Shan et al. 2014).

표 3.9 Recovery of *B. cereus* using different immunoreaction time

Strain	Immunoreaction time (min)	Capture efficiency (CE %)
<i>B. cereus</i> ATCC 14579  (Inoculum cells 3.99 log cfu/ml)	10	33.67
	20	58.32
	30	53.57
	40	50.20
	50	59.49

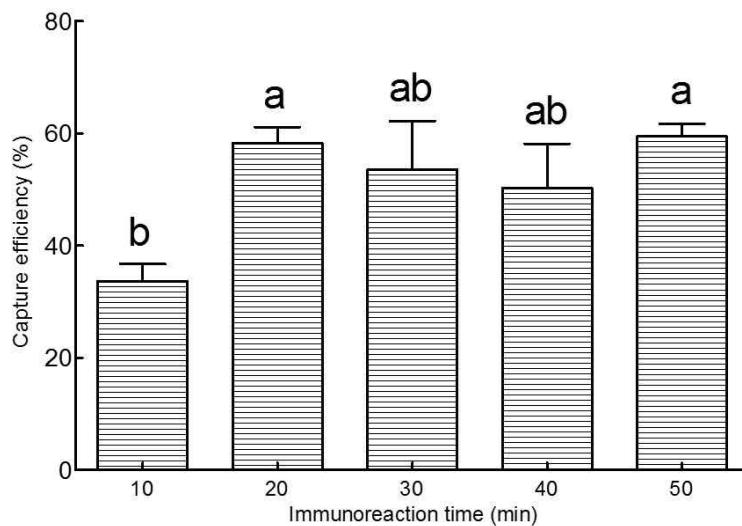


그림3.7 Effects of immunoreaction time on the capture efficiency. Data are shown as means of capture efficiency  $\pm$  SD; Bars labeled with different letters at different amounts and immunoreaction time indicate a significant difference in the capture efficiency ( $p < 0.05$ ).

#### (4) 농산물 시료에서 *B. cereus*에 대한 IMS 최적화 조건 확립

##### (가) 시료의 준비 및 증균배양

- 시료 준비: 새싹채소, 콩나물, 상추, 시금치 등을 지역 시장 소매점에서 구입하여 손상부위, 시든 부위, 먹을 수 없는 부위 등은 제거하고 사용함
- 농산물 시료들은 목표 세균의 자연 오염에 의한 위양성을 배제하기 위하여 *B. cereus*의 오염을 체크함(Kim et al. 2013).
- 새싹채소, 콩나물, 상추 및 시금치는 각각 *B. cereus* ATCC 14579, ATCC 25621, ATCC 11778, 및 ATCC 12480으로 인위오염시킴.
- 인위접종을 위하여 해당 바실러스 균주를 TSB배지에 하루밤 배양하고 0.1% 멸균PW으로 연속 희석함
- 해당 농산물 시료를 10 g 씩 준비한 후, 세균 농도가 low(~0.1 CFU/g) 또는 high(~1 CFU/g)으로 인위 오염시킬 수 있도록 앞의 연속 희석 배양균액 0.2 ml을 접종함.
- 이때 시료 10 g 당 20곳 부위 적당히 떨어뜨려 오염시킴.
- 분석에 앞서 equilibration시키기 위하여 접종후 냉장실(2-5°C)에서 overnight시킴.
- stomach bags (Nasco Whirl-pak, Janesville, WI, USA) 속의 오염된 시료 10 g에 90 mL MBHI를 넣고 스토마커(Lab-blender 400; Seward, London, UK)에서 2분간 섞어줌.
- 35°C에서 6시간 또는 24시간 배양한 후 1 mL을 취하여 0.4 mg IMB-Ab를 넣어 섞어주고 세척된 IMB-bacteria를 0.1 mL PBS로 현탁하고, 50 µL 씩 MYP agar에 도말함
- 한편, 배양된 시료의 1 ml을 취하여 0.1% PW로 연속희석을 한 후, 희석액에서 0.1 ml을 MYP agar에 도말하여 균수를 측정함
- 각 균주별로 각 농산물 시료를 선택하고 두 레벨, low(~0.1 CFU/g) 및 high(~1 CFU/g) 농도로 인위 오염시킨 후 증균배지로 6시간 및 24시간 35°C에서 증균한 후 IMS 처리 또는 미처리후 MYP agar에 도말하여 해당 균주의 검출/존재 여부를 평가함.

##### (나) 결과

- 낮은 레벨(~0.1 CFU/g) 오염, 6시간 배양의 경우: IMS 미처리 및 처리에서 양성은 28/40(70%), 40/40(100%)였음(표 3.10).

- 낮은 레벨 오염, 24시간 배양의 경우: IMS 미처리 및 처리에서 양성은 35/40(87.5%), 40/40(100%)였음(표 3.10)
- 이 실험의 IMS 처리가 미처리 보다 더 높은 검출율/양성값( $p < 0.05$ )을 나타냄.
- 높은 레벨(~1 CFU/g) 오염에서 6시간 증균배양한 경우: IMS 미처리 및 처리에서 양성은 29/40(72.5%), 40/40(100%)였으며, 24시간 증균배양한 경우: IMS 미처리 및 처리에서 양성은 37/40(92.5%), 40/40(100%)였음(표 3.11).
- 이 실험의 IMS 처리가 미처리 보다 더 높은 검출율/양성값( $p < 0.05$ )을 나타냄.
- 배양후 직접 MYP 배지에 도달한 것보다 IMS 처리후 도달한 경우 더 높은 검출율을 보이므로 이것은 IMS가 식품 시료에서 해당 세균을 효과적으로 농축 및 분리할 수 있음을 의미함(Weagant et al. 2001; Weagant et al. 2011).
- 콩나물에서는 *B. cereus*은 높은 산 물질을 만들어 MYP 배지에서 분홍색이 아닌 노란색 콜로니를 형성하므로 콜로니 분별을 어렵게 함(Fricker et al. 2008). 그러나 IMS 처리군에서는 모두 양성으로 나타남.

표 3.10 Detection of *B. cereus* in artificially contaminated vegetable samples at a low level (0.04–0.10 CFU/g) enriched in BcEM incubated at 35°C for 6 h and 24 h.

Samples	<i>B. cereus</i> (inocula cfu/g)	Incubation time	Positive results without IMS	Positive results with IMS
Baby sprouts	ATCC 14579 (0.04)	6 h	7/10	10/10
		24 h	8/10	10/10
Bean sprouts	ATCC 25621 (0.10)	6 h	5/10	10/10
		24 h	8/10	10/10
Lettuce	ATCC 11778 (0.078)	6 h	9/10	10/10
		24 h	10/10	10/10
Spinach	ATCC 12480 (0.063)	6 h	7/10	10/10
		24 h	9/10	10/10
Total		6 h	28/40c	40/40a
Total		24 h	35/40b	40/40a

Totals with the same letter assigned are not significantly difference at  $p > 0.05$ .

표 3.11 Detection of *B. cereus* in artificially contaminated vegetable samples at a high level (0.4~1.0 CFU/g) enriched in BcEM incubated at 35°C for 6 h and 24 h.

Samples	<i>B. cereus</i> (inocula cfu/g)	Incubation time	Positive results without IMS	Positive results with IMS
Baby sprouts	ATCC 14579 (0.4)	6 h	7/10	10/10
		24 h	9/10	10/10
Bean sprouts	ATCC 25621 (1.0)	6 h	6/10	10/10
		24 h	8/10	10/10
Lettuce	ATCC 11778 (0.78)	6 h	8/10	10/10
		24 h	10/10	10/10
Spinach	ATCC 12480 (0.63)	6 h	8/10	10/10
		24 h	10/10	10/10
Total		6 h	29/40b	40/40a
Total		24 h	37/40a	40/40a

Totals with the same letter assigned are not significantly difference at  $p = 0.05$ .

#### <요약>

#### 식중독 세균 *B. cereus*에 대한 면역자기분리법(IMS)의 개발 및 최적화:

- *B. cereus* ATCC 14579의 IMS 최적 반응 조건은 IMBs 0.4 mg, 면역반응시간 20분이며, 이때 결합효율은 58%였음
- *B. cereus* 6균주에 대한 IMS의 결합효율은 서로 큰 차이를 보임 (IMB 0.1 mg 사용시 0.1~17%)
- 농산물 시료에서 *B. cereus*를 낮은 농도(0.04~0.1 및 0.4~1.0 cfu/mL)로 인위 오염시키고 6 또는 24시간 증균배양후 직접 선택배지에 도말한 것보다 IMS 처리하여 도말한 경우 더 높은 검출율을 보였음(28/40 vs 40/40 for 6h; 35/40 vs 40/40 for 24h enrichment,  $p < 0.05$ )
- 이것은 IMS가 농식품 시료에서 *B. cereus*를 효과적으로 농축 및 분리할 수 있음을 의미함.

## 마. *L. monocytogenes*에 대한 IMS의 개발 및 최적화

### (1) 면역자기분리법(IMS) 제작

- 기본 실험 방법은 *S. aureus*의 경우와 동일하게 진행함.
- 항체: 상용화되어 시판되고 있는 Dynabeads® anti-Listeria (Invitrogen)를 사용하거나, 항체 anti-*L. monocytogenes* antibody (Abcam)를 구입하여 Dynabeads® 와 결합시켜 IMBs를 만들어 사용함.

표 3.12 Dynabeads and antibodies used for *L. monocytogenes*

Bacteria	Immunomagnetic Bead-Antibody	Target bacteria (antigen)
<i>L. monocytogenes</i>	Dynabeads® anti-Listeria(invitrogen)	<i>Listeria</i> spp

### (2) *L. monocytogenes*의 IMS 결합효율 분석

- *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313, 19114, 19115, 19116, 19118, and scottA) 균주들을 TSB 배지에서 35°C, 18-24h 배양하고, 연속 희석하여 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> CFU/mL PBS 농도로 맞추어 20 µL Dynabeads® anti-*Listeria* 항체와 혼합하여 결합시킴.
- 결합효율(capture efficiency, CE)은 다음의 식으로 계산함: CE (%) = C<sub>b</sub>/C<sub>o</sub> × 100%. 여기서, C<sub>o</sub>는 시료에 존재하는 총균수(CFU/mL), C<sub>b</sub>는 IMB-Ab에 결합한 세균수(CFU/100µL)를 의미함.
- CE 값을 여러 리스테리아 균주들에 대하여 비교함 (표 3.13).
- ATCC 19114와 ATCC 19115의 CE 값은 각각 29.9% 및 29.5%로써 다른 균주들보다 높았음.
- 이것은 사용한 항체에 대한 각 균주들의 고유한 항원성(antigenicity)의 차이 때문으로 사료됨.

표 3.13 The Capture efficiency of immunomagnetic separation with *L. monocytogenes* strains. Recovery of *L. monocytogenes* from pure cultures using 20 µL of Dynabeads® anti-Listeria.

<i>L. monocytogenes</i> strains	Inoculum (log CFU/ml)	Final suspension (log CFU/100µL)	Capture efficiency, CE(%)
ATCC 15313	4.96	3.81	7.2%
ATCC 19114	4.89	4.36	29.9%
ATCC 19115	4.93	4.40	29.5%
ATCC 19116	5.11	3.18	1.2%
ATCC 19118	5.13	3.74	4.1%
Scott A	5.00	3.90	8.0%

(3) 면역자기구슬과 항체의 결합을 위한 cross-linking reagent의 사용

- Dynabead-proteinG와 항체의 결합을 강화하기 위하여 cross-linking 시약을 사용하여 그 효율을 측정하였음 (표 3.14).
- *S. aureus*와 *L. monocytogenes*의 경우, cross-linking 처리를 한 경우, 처리하지 않은 것보다 더 높은 결합효율을 보여주었으나 크게 차이나지는 않았음. 그러나, *B. cereus*의 경우 그 효과가 증가하지 않았음.
- 결론적으로, Dynabead-proteinG와 항체의 결합으로 충분하다고 판단함.

표 3.14 Comparisons of the CE with 20 µl Dynabeads Protein G and antibodies added cross linking reagent against *B. cereus*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*

Strain	With BS <sub>3</sub> or not	Antibody (ug)	Inoculum (log CFU/ml)	Final suspension (log CFU/100ul)	CE (%)
<i>B. cereus</i>	BS <sub>3</sub> added	5	4.02	1.74	0.52±0.14
<i>B. cereus</i>	-	5	4.02	2.13	1.29±0.14
<i>L. monocytogenes</i>	BS <sub>3</sub> added	5	3.34	1.74	2.50± 0.23
<i>L. monocytogenes</i>	-	5	3.34	1.30	0.91±0.45
<i>S. aureus</i>	BS <sub>3</sub> added	5	3.13	1.40	1.85±1.11
<i>S. aureus</i>	-	5	3.13	1.00	0.74±0.00

(4) *L. monocytogenes*에 대한 IMS 실험 결과

(가) 민감도: 표적 세균의 초기 반응 세균수에 따른 IMS의 결과

- *L. monocytogenes*에 대한 immunomagnetic bead-Ab (Dynabeads®anti-Listeria)를 사용하여 다양한 크기의 세균수에 대한 IMS 실험 후, 각 세균수별 결합효율(CE %)을 측정하였음
- 그 결과, 반응액 속에 세균수가 많을수록 IMS는 더 많은 세균과 결합하나 2 - 7 log CFU/ml 범위의 세균에 대한 IMS의 결합효율은 매우 낮게 나왔음(CE < 5.67%).

표 3.15 Recovery of *L. monocytogenes* from pure cultures using Dynabeads®anti-Listeria

Strain	Inoculum (log CFU/ml)	Final suspension (log CFU/100µl)	CE (%)
<i>L. monocytogenes</i>	2.25	1.00	5.65±0.00
	3.25	1.16	1.21±0.37
	4.25	2.58	2.15±0.56
	5.25	3.64	2.49±0.45
	6.25	4.62	2.34±0.14
	7.25	5.30	1.13±0.23

(2) *L. monocytogenes*에 대한 IMS 실험에서 immunoreaction time의 영향 비교

- *L. monocytogenes*에 대한 immunomagnetic bead-Ab (Dynabeads®anti-Listeria)를 사용하여 다양한 면역반응 시간에 따른 IMS 실험 후, 각 시간별 결합효율(CE %)을 측정하였음
- 면역반응 시간을 각각 10, 20, 40분으로 하여 IMS를 수행한 결과, 20분에서 가장 높은 결합력을 보였음.
- 그러나, 10분 면역반응 결과와 큰 차이가 없으므로 앞으로의 면역 반응 시간은 10분으로 정하였음.



표 3.16 Recovery of *L. monocytogenes* with Inoculum 6.76 log CFU/ml using 20 and 40  $\mu$ l Dynabeads® anti-Listeria with different immunoreaction time

Dynabeads® anti-Listeria ( $\mu$ l)	Immunoreaction time (min)	Final suspension (log CFU/100 $\mu$ l)	CE (%)
20	<b>10</b>	4.77	1.04±0.02
	20	4.81	1.14±0.11
	40	4.73	0.94±0.01
40	10	5.40	4.38±0.08
	20	5.41	4.48±0.20
	40	5.38	4.20±0.32

(3) *L. monocytogenes*에 대한 IMS 실험에서 항체 사용량의 영향 비교

- 다양한 부피(5, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu$ l)의 IMB-Ab를 사용하여 *L. monocytogenes*에 대한 IMS 실험 후, 각 부피별 결합 세균수와 결합효율(CE %)을 측정하였음.
- 면역자기구슬의 사용량(20 및 40  $\mu$ l)에서 수행한 결과는 40  $\mu$ l에서 다 높은 세균수 CFU/ml를 나타냈으나, 20  $\mu$ l에서도 충분히 높은 결합력을 보이므로 20  $\mu$ l를 사용하였음.
- Dynabeads® anti-Listeria의 경우, 20  $\mu$ l의 사용이 가장 경제적이고 효과적으로 나타났음.
- 결론적으로, Dynabeads® anti-Listeria의 경우, 20  $\mu$ l와 10 min reaction time이 최적 조건으로 선정하였음.

표 3.17 Recovery of *L. monocytogenes* with Inoculum 7.30 log CFU/ml from pure cultures using different volumes of Dynabeads® anti-Listeria

Strain	Dynabeads® anti-Listeria ( $\mu$ l)	Final suspension (log CFU/100 $\mu$ l)	CE (%)
<i>L. monocytogenes</i>	5	4.68	0.24±0.00
	10	4.92	0.42±0.01
	<b>20</b>	5.31	1.01±0.22
	40	5.63	2.13±0.25
	80	5.69	2.45±0.20
	160	6.06	5.80±0.30

(4) *L. monocytogenes*에 대한 IMS 실험에서 항체의 특이성 결과

- 다양한 비표적 세균들의 존재 하에서 항-Listeria 항체의 특이성 및 민감성을 실험하였음.
- 배경 경쟁 세균으로 *B. cereus*, *S. aureus* 및 *E.coli* (각각 7 log CFU/ml)의 존재 하에서 수행하였음.
- 결론적으로, 다른 세균들의 존재 하에서도 Dynabeads®anti-Listeria의 *L. monocytogenes*에 대한 IMS 실험 결과, 충분한 결합 세균수와 결합효율(CE %)을 나타냈음 (표 3.10).

표 3.18 Recovery of *L. monocytogenes* in the presence of a non-listeria flora (7.76 log) using 20 µl of Dynabeads®anti-Listeria

Strain	Inoculum (log CFU/ml)	Final suspension (log CFU/100µl)	CE (%)
<i>L. monocytogenes</i>	3.55	2.00	2.79±0.56
	4.55	3.16	4.04±1.25

<요약>

식중독 세균 *L. monocytogenes*에 대한 면역자기분리법(IMS)의 개발 및 최적화:

- *L. monocytogenes*의 IMS의 결합효율은 상대적으로 낮았음(CE % = 1.13 ~ 5.65)
- *L. monocytogenes* 균주들에 따라 IMS 결합효율도 차이를 보임
- 높은 경쟁 세균으로 *B. cereus*, *S. aureus* 및 *E.coli* (각각 7 log CFU/ml)의 존재 하에서 *L. monocytogenes* 세포수 3.55 log cfu/mL 및 4.55 log cfu/mL에서의 IMS 결합효율은 2.79% 및 4.04%였음.
- 결론적으로 리스테리아에 대한 현재의 IMB-Ab를 사용한 IMS의 결합효율은 매우 낮으므로 해당 세균의 농축이나 정제 등의 실험에 적용할 수 없음. 보다 효과적인 새로운 IMB-Ab을 개발할 필요성이 있음

## <요약>

### 제3절 식중독 세균의 농축 및 정제 기법 개발

#### 1. 면역자기분리법(IMS)를 이용한 세균/항원 농축법 개발

- 식중독 세균(*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*)의 농축, 항원 추출 및 정제 기법으로 면역자기분리법(IMS, ImmunoMagnetic Separation)을 개발하고 각 세균별 IMS의 최적 반응 조건(반응농도 및 시간, 등), 민감도 및 특이도 및 농산물에서의 세균 검출시 적용하였음
- *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*에 대한 IMS의 결합효율은 최적조건에서 98%, 58% 및 5.7%였음.
- *S. aureus*와 *B. cereus*에 대한 IMS 최적 반응 조건은 IMBs 0.4 mg, 면역반응시간 20분, 자석 분리 시간 1분이었음.
- *S. aureus*의 IMS는 높은 민감도 및 특이도를 가짐. 세균수  $10^0$ - $10^5$  CFU/mL에서 결합효율은 98 - 91% 사이였음. *S. aureus* ATCC 13150, 13565 및 25923의 CE는 각각 85.0%, 91.7% 및 93.4%였음. 높은 경쟁균 총균수의 존재(100 및 10,000배)에서도 IMS 결합효율은 높았음(85.5 및 87.8%). washing step은 CE값을 낮춤(0, 1, 2회 세척시 각각 85.5, 70.5, 65.0%로 감소)
- 농식품 시료에서 인위오염시킨 *S. aureus*에 대한 IMS의 결합효율도 매우 높게 나타났음: 세균수 농도가 다음과 같을 때( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  및  $10^5$  CFU/mL), 우유에서의 IMS 결합효율은 각각 95, 83, 84 및 79%였으며, 상추에서의 IMS 결합효율은 73, 65, 69 및 60%이었음.
- 농산물 시료에서 *B. cereus*를 낮은 농도(0.04~0.1 및 0.4~1.0 cfu/mL)로 인위 오염시키고 6 또는 24시간 증균배양후 직접 선택배지에 도말한 것보다 IMS 처리하여 도말한 경우 더 높은 검출율을 보였음(28/40 vs 40/40 for 6h; 35/40 vs 40/40 for 24h enrichment, ( $p < 0.05$ ))
- *L. monocytogenes*에 대한 IMS 경우, 결합효율이 상대적으로 매우 낮으나(~5.65%) 경쟁 총균수가 존재에서도 목표 세균의 분리 정제 및 농축에 적용할 수 있음.
- *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*에 대한 IMS는 결합효율의 차이는 있으나 다양한 환경 조건에서 높은 결합효율 및 특이도를 보이므로 식중독 세균의 신속검출을 위한 농축 및 정제 기술로 사용가능함.

## 2. IMB를 이용한 4종 식중독 세균 농축 및 항원 추출법 개발

### 가. 선택 농축을 위한 특이 IMB 개발

#### (1) IMS를 위한 식중독균 4종의 Immunomagnetic bead(bead+antibody) 후보균 선정

- *Salmonella* 및 *Shigella*의 경우 genus specific antibody가 상업화되어 있으나, 나머지 두 균의 경우 그렇지 못하여 가장 위해도가 높은 *E. coli* O157 및 *Campylobacter jejuni*를 target으로 하여 실험을 진행하였음.

표 3.19 4종 식중독균 IMB 선정결과

Bacteria	Bead	Antibody	Target
병원성 대장균	Dynabeads® anti- <i>E. coli</i> O157 (invitrogen)		<i>E. coli</i> O157
살모넬라	Dynabeads® anti- <i>Salmonella</i> (invitrogen)		<i>Salmonella</i> spp.
세균성 이질	Dynabeads® Protein G (invitrogen)	Anti- <i>Shigella</i> antibody(abcam)	<i>Shigella</i> spp.
캠필로박터	Dynabeads® Protein G (invitrogen)	<i>Campylobacter jejuni</i> Antibody(santa cruz)	<i>Campylobacter jejuni</i>

- *E. coli* O157과 *Salmonella*: 항체와 bead가 결합된 제품 구입하여 사용하였음.
- *Shigella* 및 *Campylobacter*: 항체와 bead를 각기 구입하여 결합시킨 후 실험에 이용하였음.
- Dynabeads® Protein G는 rabbit IgG(이질 항체), mouse IgG1(캠필로박터 항체)와 결합이 우수하기에 선정하였음.

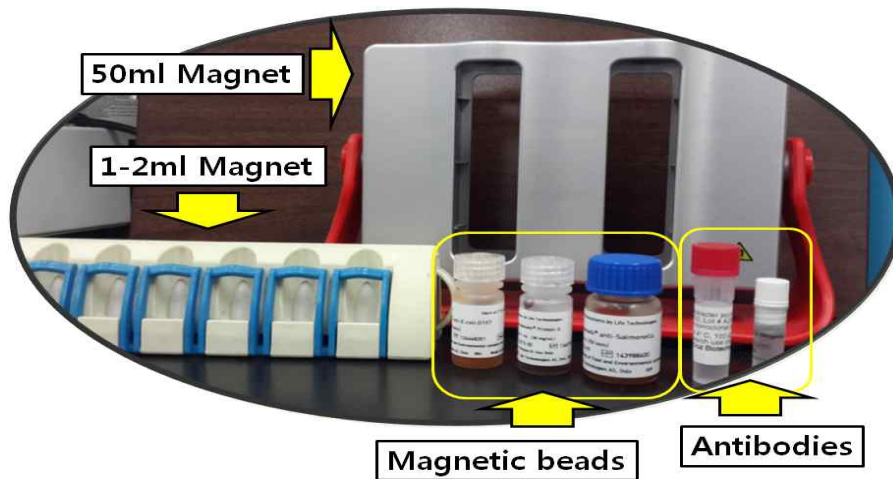


그림 3.8 IMS를 위한 시약 및 기구들

## (2) IMS 결과 확인을 위한 primer 결정 및 standard curve 작성

○ 농축결과 확인은 추후 연구 적용을 위해 Real-time PCR을 이용하였음.

○ 같은 target gene이라도 primer의 성능에 따라 ct값이 달라질 수 있기에, 보다 높은 민감도를 얻기 위해 사용하는 제품(SYBR Green, TAKARA)에서 권장하는 조건으로 새롭게 primer를 디자인하고 이를 기발표된 논문들의 primer와 비교하였음.

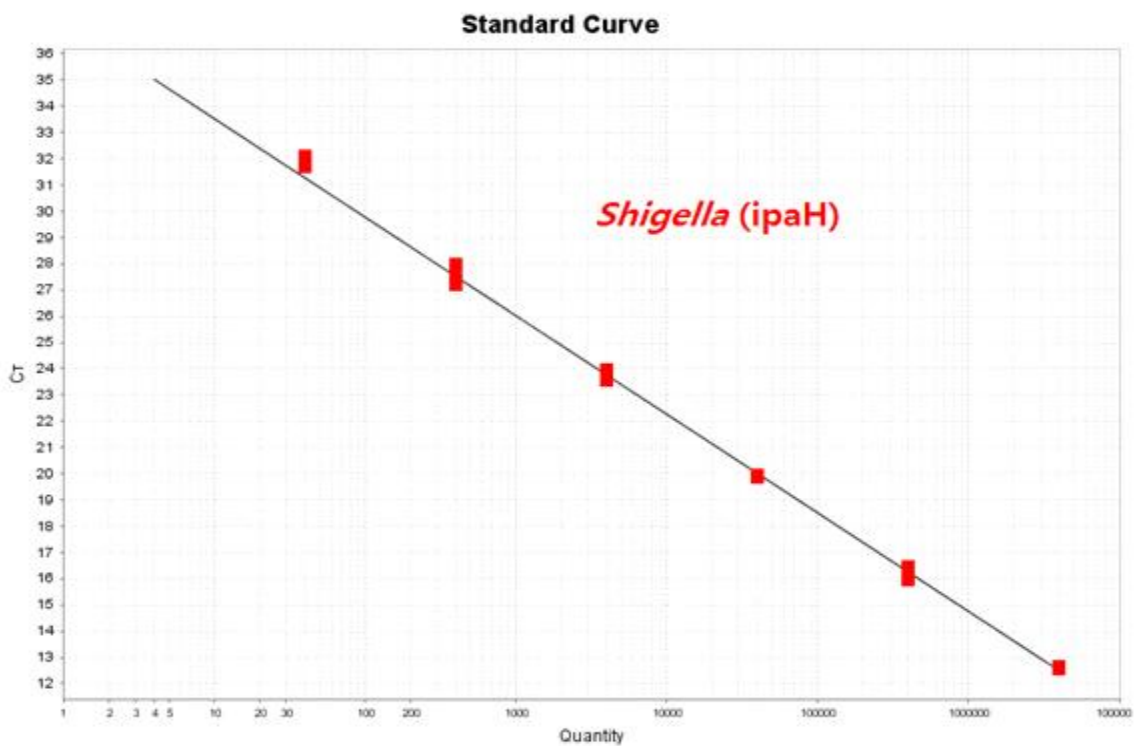
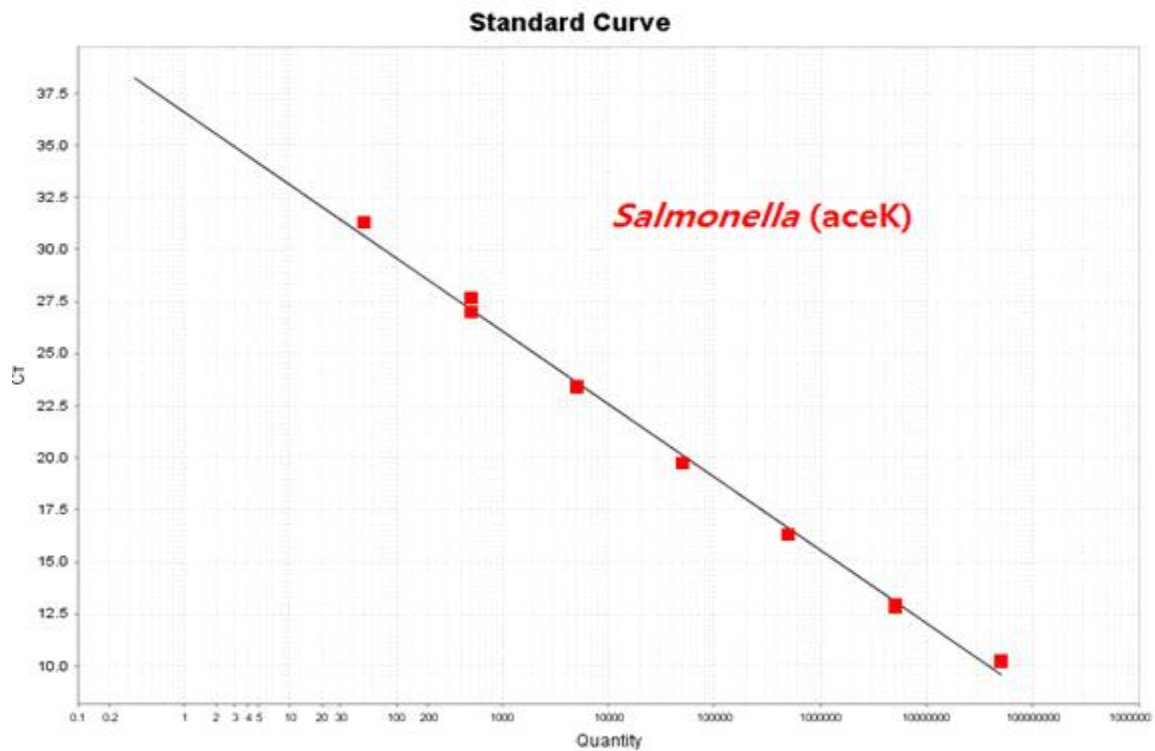
○ 이질균과 대장균의 경우 본 연구에서 새롭게 디자인한 primer의 민감도가 높았으나, 살모넬라와 캄필로박터의 경우 별다른 차이가 없거나 기존의 primer의 민감도가 높았다.

○ 실험에 사용된 primer의 조건은 아래 표와 같음.

표 3.20 실험에 사용된 primer 정보

Bacteria (Target gene)	Primer (5'→3')	Std. curve equation	Reference
<i>Salmonella</i> ( <i>aceK</i> )	F: CCGCGCTGGTTGAGTGG R: GCGGGCGAATTTGTCTTTA	$y = -3.508x + 36.617$	Edel <i>et al.</i> , 2008
<i>Shigella</i> ( <i>ipaH</i> )	F: ACAGCAAATGACCTCCGCAC R: TGTTCACTCTCACGCATCACC	$y = -3.755x + 37.304$	<i>this study</i>
<i>E. coli</i> O157 ( <i>eaeA</i> )	F: GTAAAAGCAACACGACCGATGAC R: ACCGACCTGACCAAATGCC	$y = -3.563x + 34.931$	<i>this study</i>
<i>Campylobacter</i> (16s rRNA)	F: CGTGCTACAATGGCATATACAATGA R: CGATTCGGCTTCATGCTC	$y = -3.5x + 34.045$	Lund <i>et al.</i> , 2004

- 배지증균력 및 capture efficiency 확인을 위한 Standard curve 작성: 4종 세균을 각각 증균한 후 핵산추출 자동화 기기인 easyMag을 이용하여 DNA를 추출하여 standard curve 작성을 위한 template으로 사용하였음. 동일한 증균액에 대해 plating을 실시하여 균수를 측정하였음.



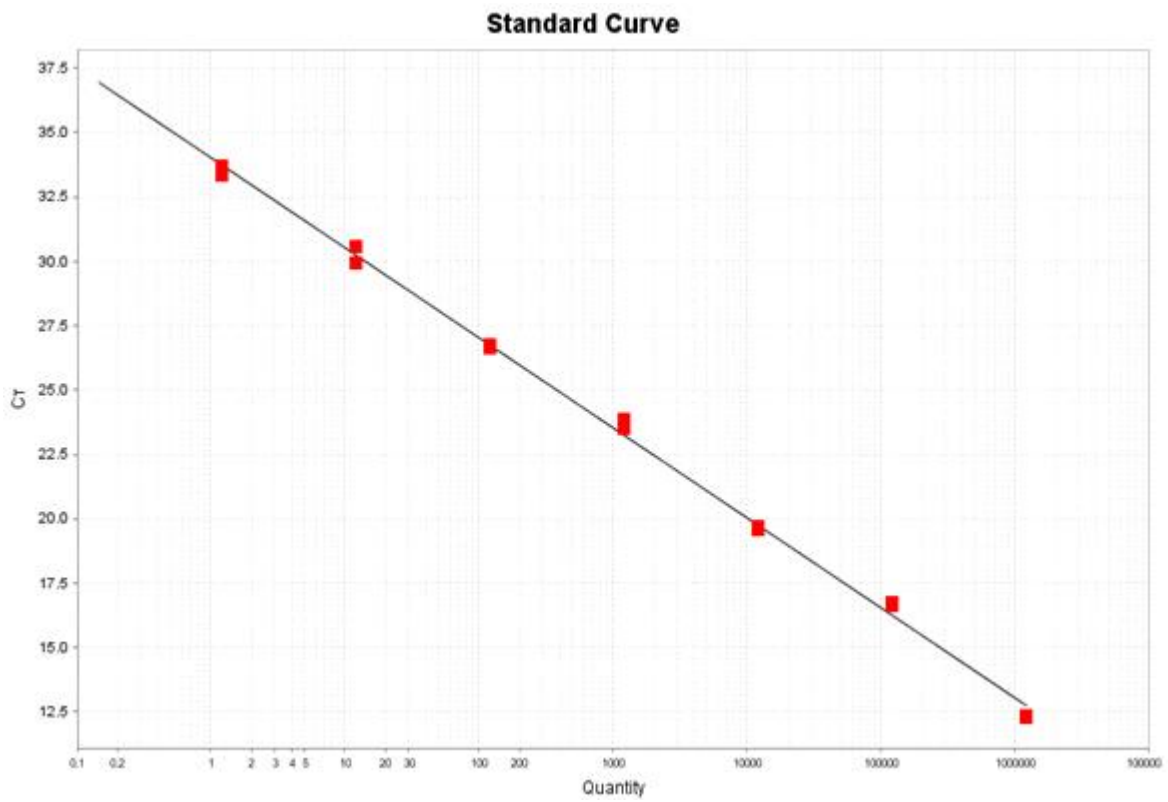
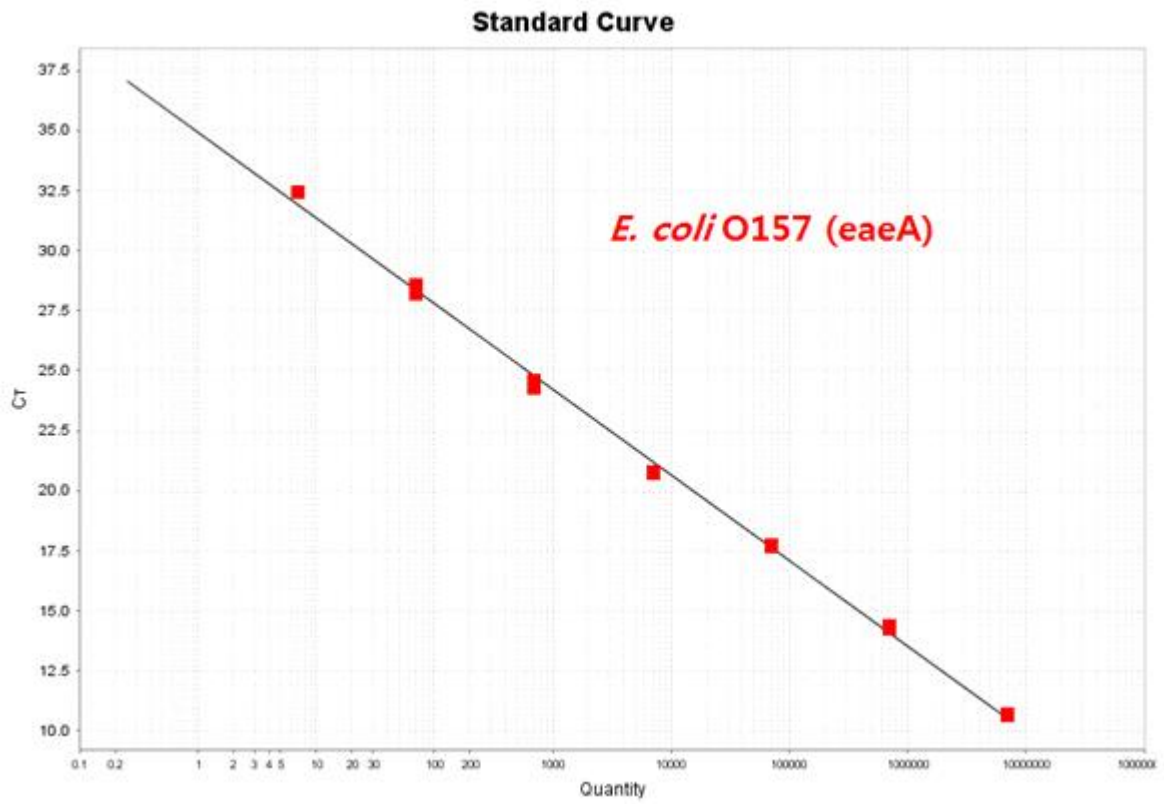


그림 3.10 4종균에 대한 standard curve 작성

### (3) IMB를 활용한 균의 분리·농축법 확보

#### ○ IMB 제작방법

\*Buffer는 PBST: PBS (pH 7.4) with 0.02 Tween<sup>®</sup>-20 사용

- ① 냉장보관된 Bead를 30초 이상 vortexing하여 고르게 섞어준다.
- ② 50ul(1.5mg)의 bead를 tube로 옮긴다.
- ③ magnet을 이용하여 상층액을 제거한다.
- ④ 준비해둔 200ul PBST로 희석된 항체 10ug을 tube에 넣고 rotator를 이용하여 상온에서 10분간 결합시킨다.
- ⑤ magnet을 이용하여 상층액을 제거한다.
- ⑥ PBST 200ul를 넣고 천천히 pipetting하여 씻어낸다.
- ⑦ 보관은 응집반응을 막기 위해 PBST를 사용하며 10ug/ul 농도로 보관한다.

#### ○ Target 균과의 결합 및 결합 여부 확인 (1ml 사용시)

\*Buffer는 PBST: PBS (pH 7.4) with 0.02 Tween<sup>®</sup>-20 사용

- ① 증균액 1ml를 tube로 옮긴다.
- ② 1)에서 제작한 IMB 20ug을 tube에 넣고 천천히 pipetting하여 섞어준다.  
(살모넬라, 대장균: IMB 20ul 사용)
- ③ rotator를 이용하여 10분간 결합시킨다.
- ④ magnet을 이용하여 상층액을 제거한다.
- ⑤ 500ul의 PBST를 넣고 천천히 pipetting하여 씻어낸다.
- ⑥ magnet을 이용하여 상층액을 제거한다.
- ⑦ ⑤-⑥을 2번 더 반복하여 결합된 antigen(target 세균)만 남긴다.
- ⑧ IMB-Ag complex를 200ul PBS로 풀어준다
- ⑨ DNA를 추출하고 Real-time PCR을 실시하여 결합여부를 확인한다.



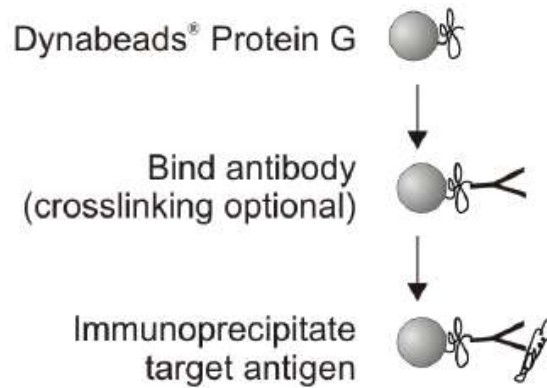


그림 3.11 항체와 magnetic bead와의 결합 및 antigen(타겟균)과의 결합 모식도

- IMB의 작용을 확인하기 위해 각 세균 증균액 1ml에 대하여 확립된 IMS방법을 적용하였음.
- 살모넬라와 대장균의 경우 제조사의 사용권장량인 20ul이나, bead 농도가 높아 10ul로도 실험을 수행하였음.
- 항체와 비드를 직접 결합시킨 이질균과 캄필로박터의 경우, 기존 논문을 참고하여 1회 bead 사용량을 20-30ug으로 결정하였음. (Suh et al., 2013)
- 4가지 균 모두 IMS 후 real-time PCR을 통한 세균의 검출이 가능하였음.
- 살모넬라와 대장균의 경우 10ul의 IMB를 사용하는 경우에도 검출이 가능하였는데, 낮은 세균 농도에서의 효과도 동일한지 확인해야 할 것으로 판단된다.
- 이질균 및 캄필로박터의 경우 ct값이 비교적 높게 나와 (특히 캄필로박터) 낮은 세균 농도에서 실험시 더 많은 양의 IMB를 사용해야 할 것으로 보인다.

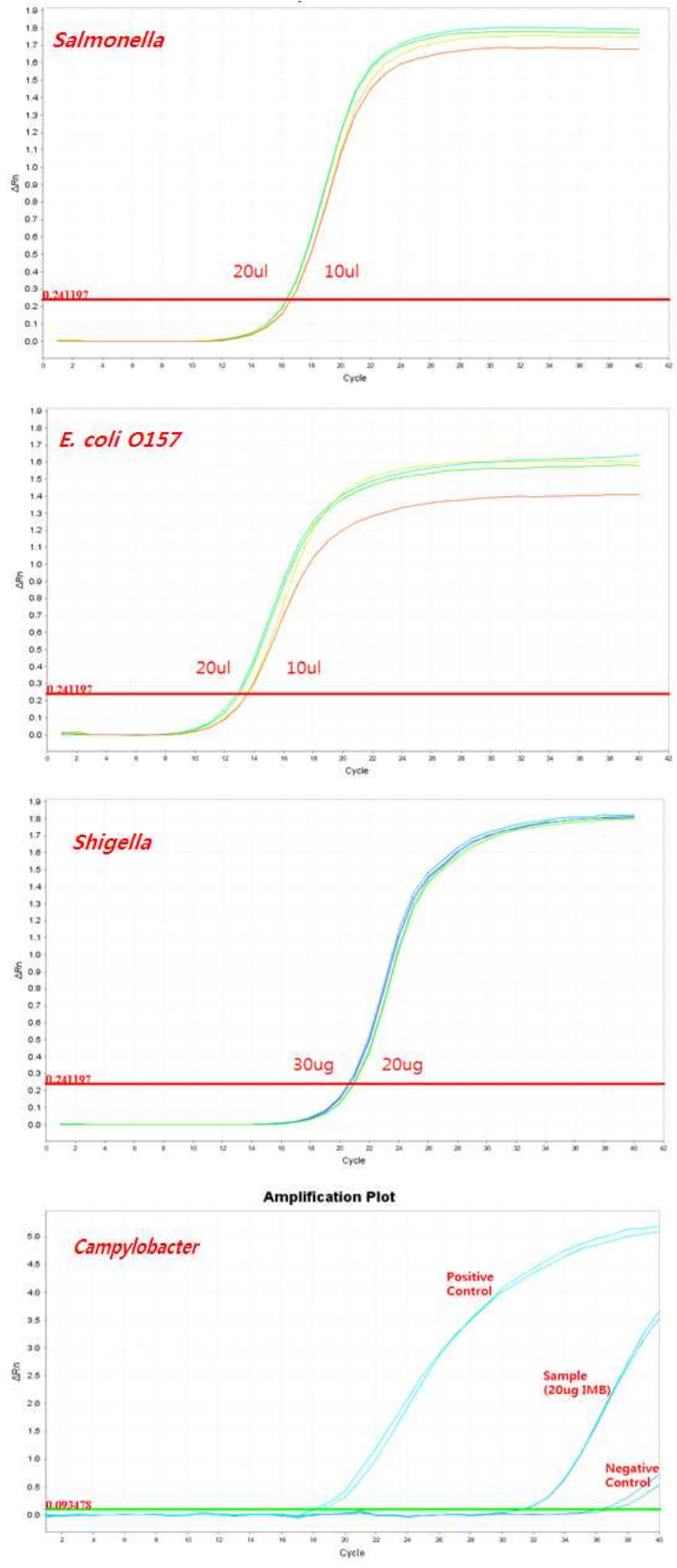


그림 3.12 살모넬라, 대장균, 이질균의 결합확인 및 캠필로박터 IMS 결과확인 (1ml 농축시 IMS 작용 평가 및 bead 농도에 따른 검출차이 확인)

- 세균 농도에 따른 실제 IMB에 결합된 세균수와 Real-time PCR에서의 검출한계를 평가하였음.
- IMS 후 배지에 plating하여 확인했을 때 결합효율은 위의 표와 같이 2-5 log에서 약 40% 였으나, Real-time PCR 후 standard curve를 이용하여 확인시 큰 폭으로 떨어지는 것을 볼 수 있었음.
- 이는 DNA 추출 전 균의 유실이나 추출효율의 문제로 보여짐.
- 본 실험결과에서 순수배양액에서의 Real-time PCR의 검출한계는 위 그림과 같이 약 2-3 log로 검사에 충분한 수치로 보임.

표 3.21 IMS 후 plating 및 Real-time PCR에 따른 capture efficiency 비교 (살모넬라)

초기세균 농도 (CFU/ml)	Real-time PCR		Plating to Media	
	결합 세균 수 (CFU)	결합 효율 (%)	결합 세균 수 (CFU)	결합 효율 (%)
1.97.E+08	1.89.E+06	1	8.00.E+06	4
1.97.E+07	1.14.E+06	6	5.00.E+06	25
1.97.E+06	9.59.E+04	5	8.00.E+05	41
1.97.E+05	7.39.E+03	4	8.10.E+04	41
1.97.E+04	9.32.E+02	5	7.50.E+03	38
1.97.E+03	2.22.E+02	11	8.20.E+02	42

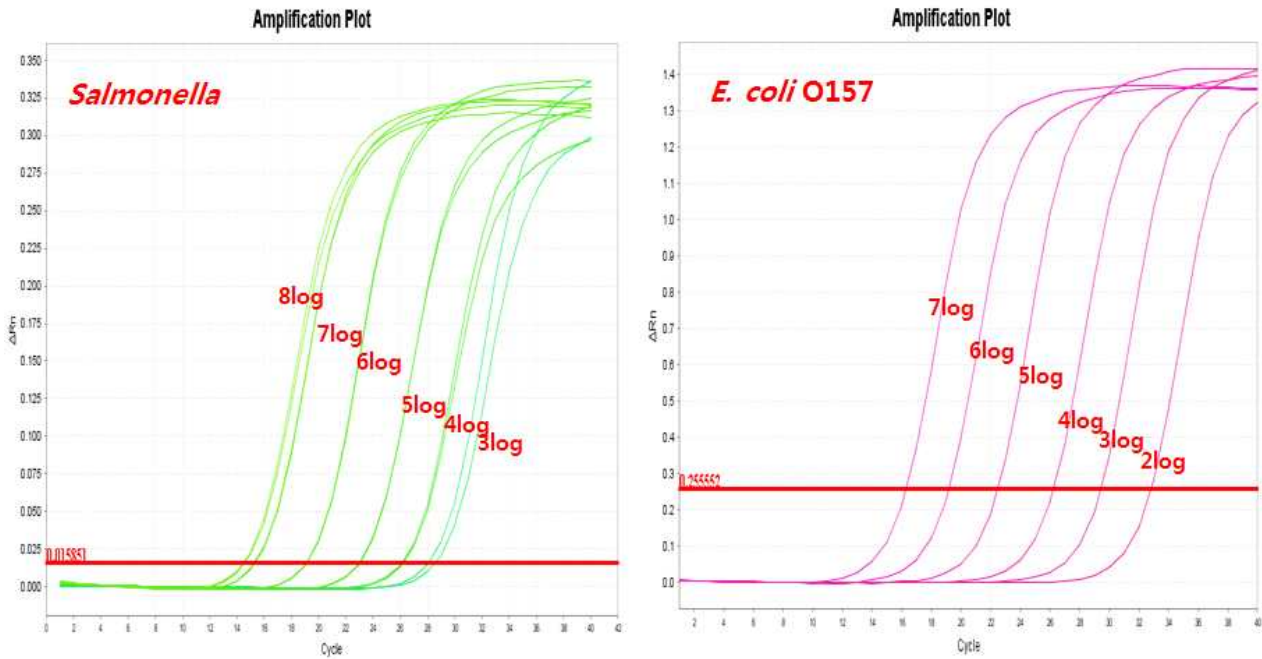


그림 3.13 IMS 후 Real-time PCR 검출한계 확인실험 일부

○ **Target 균과의 결합 및 결합 여부 확인 (50ml 사용시)**

\*Buffer는 PBST: PBS (pH 7.4) with 0.02 Tween<sup>®</sup>-20 사용

- ① 증균액 50ml를 conical tube로 옮긴다.
- ② 1)에서 제작한 IMB **50ug**을 tube에 넣고 천천히 pipetting하여 섞어준다.  
(살모넬라, 대장균: IMB 20ul 사용)
- ③ rotator를 이용하여 **30분간** 결합시킨다.
- ④ 50ml 전용 magnet을 이용하여 상층액을 제거한다.
- ⑤ 1ml의 PBST를 넣고 가볍게 vortexing 및 spin down
- ⑥ magnet을 이용하여 상층액을 제거한다.
- ⑦ 1ml의 PBST를 넣고 풀어준 후 E-tube로 옮긴다.
- ⑧ 500ul PBST로 3번 washing 후 200ul PBS로 풀어준다.
- ⑨ DNA를 추출하고 Real-time PCR을 실시하여 결합여부를 확인한다.

○ 1ml에서 IMS하는 경우 결합시간을 10분에서 30분으로 증가시켜도 결합효율 차이는 거의 없었으나, 50ml에서는 결합시간에 따라 큰 폭의 차이를 보였음.

○ 또한 직접 결합시킨 IMB의 경우 20ug 사용시 비교적 효율이 낮기 때문에 scale up시에 용량도 함께 늘려 개발될 kit에 적용할 예정임.

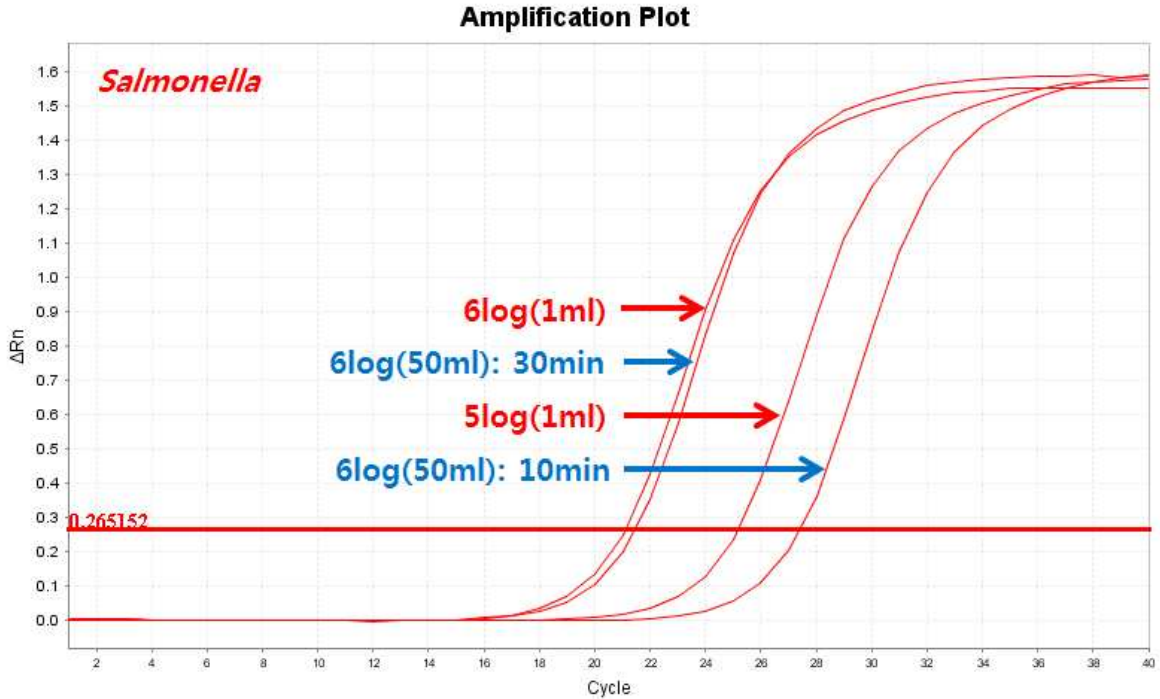


그림 3.14 IMS Scale up(50ml)시 결합시간에 따른 capture efficiency 차이

(4) 실제 농산물에 적용하기 위한 IMS 결합·분리시간 최적화를 통한 항원추출조건 확립

○ 전세계적으로 개발된 식중독세균의 검출용 래피드 키트들에서는 별도의 항원추출과정 없이 세균 자체(증균액)를 항원으로 적용한다. 증균액 자체에서 항원 추출시 목적균 외에 세균의 단백질 등이 함께 추출될 수 밖에 없으므로 별 의미가 없기 때문임. IMS를 통해 목적균을 분리하고 이에 대한 항원을 추출하는 것은 하나의 대안이 될 수 있으나, IMS 및 추출과정의 추가로 인한 검출시간이 늘어나는 것을 최소화할 필요가 있음.

○ 래피드 키트 및 IMS는 모두 항체를 기반으로 한 기술이며 IMS로 분리된 세균의 증가는 곧 래피드키트에 적용되는 항원의 양의 증가를 뜻하므로, IMS의 효율증진은 곧 래피드 키트 효율증진을 간접적으로 시사한다. 1차년도에 개발된 각 IMB(Immunomagnetic bead)의 효율을 극대화하기 위하여, IMB와 세균의 결합시간 및 magnet으로부터의 세균이 결합된 IMB의 분리시간을 최적화하였음. 고농도 농축을 위해 50ml magnet을 이용하여 IMS 능을 테스트하였음. 또한 실제 농산물에서의 IMS저해양상을 파악하고, 적합한 실험조건을 설정하기 위해 순수배양액 뿐만 아니라, 실제농산물(토마토, 상추, 야채샐러드)에서도 실험을 수행하였음.

(가) 실험방법: 순수배양액 및 농산물에서의 IMS 조건 최적화

- 공통

\*Buffer는 PBST: PBS (pH 7.4) with 0.02 Tween<sup>®</sup>-20 사용

① 증균액 x ml를 tube로 옮긴다.

- ② IMB 첨가
  - ③ rotator를 이용하여 x분간 결합시킨다.
  - ④ magnet을 이용하여 상층액을 제거한다.
  - ⑤ PBST를 넣고 천천히 pipetting하여 씻어낸다.
  - ⑥ magnet을 이용하여 상층액을 제거한다.
  - ⑦ ⑤-⑥을 2번 더 반복하여 결합된 antigen(target 세균)만 남긴다.
  - ⑧ IMB-Ag complex 희석액 100ul를 배지에 평판도말하여 균수 측정하여 IMS전 균수와 비교
- 최대 결합시간(1시간) 및 분리시간(10분)에서 세균 농도별 결합효율을 측정하여 일정 IMB에 대한 최대 세균 농도를 결정 (순수배양액)
  - 결정된 세균 농도에 대해, 시간별 (결합시간: 10, 30, 60분, 분리시간: 2, 5, 10분) IMS실험진행 (순수배양액)
  - 농산물 경쟁집락에 따른 IMS결과 확인 (실제 농산물)
    - ① 농산물(tomato, lettuce, mixed salads) 25g을 BPW로 10배 희석
    - ② Stomaching 후 24시간 증균
    - ③ 증균액 1 ml씩 각tube로 옮긴다.
    - ④ 원심분리 (5000g, 5분) 후 상층액을 제거하고 PBST로 희석 (1X, 0.1X, 0.01X)
    - ⑤ 위에서 결정된 식중독세균 농도로 접종 후 IMS 수행
  - 통계분석: One way ANOVA (Tukey's test)

#### (나) 실험결과 (살모넬라)

- 본 실험결과, 사용된 살모넬라 IMB(20ul)는 4-6log CFU의 세균에 대해서 90% 이상의 효율을 보였으며, 해당구간에서는 통계적 유의차를 보이지 않았음.
- 더 높은 세균 수(7log CFU)에 대해서는 결합효율이 급격히 저하되었는데, 이는 IMB 20ul 당 6-7log CFU 수준의 세균까지 결합할 수 있음을 시사한다.
- 해당 결합효율은 30분 및 10분의 결합시간에도 유지되었음.
- 하지만 식품에서의 IMS 적용시 10분의 결합시간은 통계학적으로 유의차가 날만큼 불충분하다는 선행연구(Zheng et al., 2014) 및 예비실험을 통하여, 결합시간 30분에 따른 결합효율을 평가하였음.
- 전반적으로 competing flora가 감소할수록 결합효율이 증가하였으며, 선택배지상에서의 background도 감소하는 경향을 보였음.

- competing flora 수에 따른 결합효율의 통계학적 유의차가 남에도 불구하고 1log 이상차이가 나지 않아, 해당 IMS기법은 다양한 농산물 시료의 증균 후 래피드 키트의 검출한계 이상의 항원을 확보하는데 적합할 것으로 판단된다.

표 3.22 최대 결합시간(1시간) 및 분리시간(10분)에서 세균 농도별 결합효율

Inoculum level (log CFU/mL)	CE (%) <sup>a</sup>
7	34.8 ± 9.80 A
6	90.4 ± 6.44 B
5	95.5 ± 1.64 B
4	95.3 ± 4.43 B

<sup>a</sup> 동일칸에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함

표 3.23 결합시간별 IMS실험

	Bead incubation time		
	10 min	30 min	60 min
CE(%)	91.1 ± 3.62 A	93.0 ± 4.69 A	93.5 ± 2.77 A

<sup>a</sup> 동일열에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함

표 3.24 농산물 경쟁집락에 따른 IMS결과

Matrix	CE(%)		
	Competing flora (9log CFU/mL)	Competing flora (8log CFU/mL)	Competing flora (7log CFU/mL)
Tomato	41.3 ± 16.3 A	80.0 ± 2.82 B	93.0 ± 5.99 B
Lettuce	52.6 ± 12.2 A	80.1 ± 13.1 AB	84.7 ± 7.32 B
Mixed salads	30.1 ± 5.10 A	69.5 ± 12.7 B	89.7 ± 7.28 B
Total	41.4 ± 14.3 A	76.6 ± 10.6 B	89.1 ± 7.00 B

<sup>a</sup> 동일열에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함

**(다) 실험결과 (병원성대장균 O157)**

- 본 실험결과, 사용된 대장균 O157 IMB(20ul)는 4-6log CFU의 세균에 대해서 약90% 수준의 효율을 보였으며, 해당구간에서는 통계적 유의차를 보이지 않았음.
- 더 높은 세균 수(7log CFU)에 대해서는 결합효율이 급격히 저하되었는데, 이는 IMB 20ul 당 6-7log CFU 수준의 세균까지 결합할 수 있음을 시사한다.
- 해당 결합효율은 30분 및 10분의 결합시간에도 유지되었음.
- 하지만 식품에서의 IMS 적용시 10분의 결합시간은 통계학적으로 유의차가 날만큼 불충분하다는 선행연구(Zheng et al., 2014) 및 예비실험을 통하여, 결합시간 30분에 따른 결합효율을 평가하였음.
- 전반적으로 competing flora가 감소할수록 결합효율이 증가하였으며, 선택배지상에서의 background도 감소하는 경향을 보였음.
- competing flora 수에 따른 결합효율의 통계학적 유의차가 남에도 불구하고 1log 이상차이가 나지 않아, 해당 IMS기법은 다양한 농산물 시료의 증균 후 래피드 키트의 검출한계 이상의 항원을 확보하는데 적합할 것으로 판단된다.

표 3.25 최대 결합시간(1시간) 및 분리시간(10분)에서 세균 농도별 결합효율

Inoculum level (log CFU/mL)	CE (%) <sup>a</sup>
7	27.4 ± 10.7 A
6	86.9 ± 5.97 B
5	91.2 ± 2.73 B
4	92.7 ± 1.85 B

<sup>a</sup> 동일칸에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함

표 3.26 결합시간별 IMS실험

	Bead incubation time		
	10 min	30 min	60 min
CE(%)	88.2 ± 5.57 A	90.7 ± 5.35 A	89.3 ± 1.93 A

<sup>a</sup> 동일열에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함



표 3.27 농산물 경쟁집락에 따른 IMS결과

Matrix	CE(%)		
	Competing flora (9log CFU/mL)	Competing flora (8log CFU/mL)	Competing flora (7log CFU/mL)
Tomato	60.8 ± 20.3 A	78.5 ± 8.93 B	80.2 ± 4.47 B
Lettuce	46.4 ± 12.4 A	56.0 ± 5.91 A	87.5 ± 7.92 B
Mixed salads	23.3 ± 11.8 A	72.9 ± 10.4 B	81.7 ± 1.71 B
Total	43.5 ± 21.1 A	69.1 ± 12.6 A	83.1 ± 5.70 B

<sup>a</sup> 동일열에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함

(라) 실험결과 (세균성 이질)

- 본 실험결과, 사용된 이질균 IMB(20ul)의 4-6log CFU의 세균에 대한 결합효율은 통계학적 유의차는 나지 않았으나, 큰 표준편차 값에서 알 수 있듯이 데이터가 일관적으로 얻어지지 않았음.
- 이는 IMB의 성능이 불완전하다는 것을 의미하는데, 이에 대한 원인으로 항체의 부분 변성 및 Magnetic bead와의 결합력 저하 등이 의심된다.
- 토마토, 상추의 농산물 시료에서 테스트 시에도 위의 살모넬라 및 대장균 O157 IMS 결과에 비해 현저히 낮은 결합효율을 보였음.

표 3.28 최대 결합시간(1시간) 및 분리시간(10분)에서 세균 농도별 결합효율

Inoculum level (log CFU/mL)	CE (%) <sup>a</sup>
7	ND
6	38.1 ± 14.9 A
5	69.2 ± 23.4 A
4	59.6 ± 20.8 A

<sup>a</sup> 동일칸에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함

표 3.29 농산물 경쟁집락에 따른 IMS결과

Matrix	CE(%)		
	Competing flora (9log CFU/mL)	Competing flora (8log CFU/mL)	Competing flora (7log CFU/mL)
Tomato	2.4	22.0	51.2
Lettuce	ND	10.6	48.0

(마) 실험결과 (캠필로박터)

- 본 실험결과, 사용된 캠필로박터 IMB(20ul)의 4-6log CFU의 세균에 대한 결합효율은 통계학적 유의차는 나지 않았으나, 큰 표준편차 값에서 알 수 있듯이 데이터가 일관적으로 얻어지지 않았음.
- 이는 IMB의 성능이 불완전하다는 것을 의미하는데, 이에 대한 원인으로 항체의 부분 변성 및 Magnetic bead와의 결합력 저하 등이 의심된다.
- 토마토, 상추의 농산물 시료에서 테스트 시에도 위의 살모넬라 및 대장균 O157 IMS 결과에 비해 현저히 낮은 결합효율을 보였음.

표 3.30 최대 결합시간(1시간) 및 분리시간(10분)에서 세균 농도별 결합효율

Inoculum level (log CFU/mL)	CE (%) <sup>a</sup>
7	ND
6	42.0 ± 20.9 A
5	45.0 ± 25.9 A
4	63.5 ± 17.6 A

<sup>a</sup> 동일칸에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함

표 3.31 농산물 경쟁집락에 따른 IMS결과

Matrix	CE(%)		
	Competing flora (9log CFU/mL)	Competing flora (8log CFU/mL)	Competing flora (7log CFU/mL)
Tomato	ND	7.21	70.6
Lettuce	ND	21.9	78.1

### 3. 실린지 필터를 이용한 캠�필로박터균 농축 및 항원 추출법 개발 평가

- 정상세균총의 많은 농산물에서의 효과적인 캠�필로박터 균 검출을 위해서는 균의 농축외에도 균의 순수 분리정제 기술이 필수적임.
- 캠틀로박터는 다른 균에 비해 크기가 작고 나선형이며, 운동성도 좋기 때문에 0.65 $\mu$ m의 필터를 통과할 수 있음.
- 따라서 경쟁집락의 적절한 배제를 위하여 이전부터 캠틀로박터의 검출 시 멤브레인 필터(membrane filter)를 종종 사용하여 왔음.
- 그러나 멤브레인 필터를 사용한 방법은 멤브레인 자체를 선택배지 위에 올려서 20분 정도 시간을 기다리기 때문에, 시간이 걸리고 오염의 위험이 있는 단점을 갖고 있음.
- 본 연구에서는 실린지 필터(syringe filtration)를 이용한 캠틀로박터의 선택적 검출법을 개발하였음.
- 실린지 필터법은 실린지 필터를 주사기(syringe)에 끼운 후, 위에서 누르는 압력을 이용하여 균을 필터사이로 통과시키는 방법으로 시간이 매우 단축되고 오염의 가능성도 적으면서 기존 멤브레인 필터와 동일한 효과를 볼 수 있음.
- 특히 멤브레인 필터를 사용하는 경우 배지에만 도달이 가능하지만, 실린지 필터법으로 균을 정제한 경우 정제액을 튜브 등에 모아 PCR 및 immunoassay 등으로 검출 가능하기 때문에 본 연구개발 주제에 매우 적합하다고 할 수 있음.
- 검증시험에 사용될 농산물은 무순/새싹류로 결정하였는데, 식품 내 높은 경쟁균수로 인해 가장 검출이 어려운 농산물로 알려져 있어, 이를 대상으로 개발된 기술을 평가하였음.



그림 3.15 상용화된 실린지 필터(좌상), 실린지 필터 사용(우상) 멤브레인 필터 방법(좌하), 본 연구에서의 실린지 필터 방법(우하)

가. 순수배양액에서의 실린지 필터법과 멤브레인 필터법의 비교

(1) 실린지 필터법의 검출한계 측정

- 두 개의 캄필로박터 균종을 농도별로 실린지 필터와 멤브레인 필터에 통과시켜 각 방법의 검출한계를 측정하였음.
- 실린지 필터법은 기존 멤브레인 필터법과 비교하여 동등한 검출한계를 보였음. 실린지 필터법이 멤브레인 필터법에 비해 간편하고 정제액을 모을 수 있다는 점을 고려할 때, 실린지 필터법은 캄필로박터 정제에 가장 효과적인 방법으로 판단된다. 추후 모아진 정제액으로 PCR 및 immunoassay 등의 실험을 수행할 수 있을 것으로 보인다.

표 3.32 실린지 필터와 멤브레인 필터의 검출감도 비교

Strain	접종량 (CFU)	실린지 필터 (Syringe filter)	멤브레인 필터 (Membrane filter)
캄필로박터 제주니 ATCC 11168	10 <sup>5</sup>	+	+
	10 <sup>4</sup>	+	+
	10 <sup>3</sup>	+	+
	10 <sup>2</sup>	+	+
	10 <sup>1</sup>	-	-
캄필로박터 콜리 SCCJH-12	10 <sup>5</sup>	+	+
	10 <sup>4</sup>	+	+
	10 <sup>3</sup>	+	+
	10 <sup>2</sup>	+	+
	10 <sup>1</sup>	-	-

(2) 증균된 배양액에서의 실린지 필터법의 효과검증

- 열 두 개의 캄필로박터 균주를 사용하여 증균액을 실린지 필터했을 때, 균수가 어느 정도 감소하는지 측정하였음. 증균액을 실린지 필터한 것과 그렇지 않은 것을 각각 혈액배지에 평판도말하여 균수를 측정하였음. t-test를 이용하여 두 방법간의 유의적인 차이를 비교하였음.
- 본 실험결과 필터를 한 것과 하지 않은 것이 유의차 없는 균수를 보여, 실린지 필터를 하는 경우에도 캄필로박터 균의 손실없이 민감한 검출이 가능할 것으로 사료되었음. 따라서 본 팀이 개발한 실린지 필터 후 증균기법을 활용한다면 캄필로박터 균의 효과적인 정제가 가능할 것으로 판단된다.

표 3.33 증균배양액의 필터 전후 균수 측정

균종	균명	캄필로박터 균수	
		(Log CFU / mL)	
		필터하지 않는 경우	필터하는 경우: 0.65 µm Syringe filter
캄필로박터 제주니	NCTC 11168	8.67	8.63
	SB_12	8.08	7.76
	DC_2	8.36	8.16
	CJclin_4	7.63	6.94
	SC_2	8.09	7.75
	CJclin_2	8.67	8.33
캄필로박터 콜리	CCA_1	7.56	7.04
	CCA_9	8.69	8.45
	CCA_11	8.30	8.04
	GC_4	8.50	8.03
	CCHS12_2	8.00	7.89
	CCH_BH	8.37	8.12
<b>Mean ± SD<sup>a</sup></b>		<b>8.24 ± 0.38<sup>A</sup></b>	<b>7.93 ± 0.51<sup>A</sup></b>

<sup>a</sup> 동일열에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함

(3) 실제 농산물 시료에서의 실린지 필터법 효과 검증

○ 시중에 유통되는 신선편의채소에 일정량의 캠�필로박터균을 접종한 후, 증균액에서 일반검출법, 멤브레인 필터법, 실린지 필터법으로 검출감도를 비교하였음. 특히 필터후 획선도말법, 평판도말법을 비교하여 어떤 방법이 더 검출율이 높은지도 비교하였음. 4종의 신선편의 채소(RTE vege표)에 3-4 log unit 수준의 캠�필로박터를 접종하여 총 20개의 시료가 부분음성 및 부분양성이 나올 수 있도록 하였음. 캠�필로박터 증균에 널리 사용되는 볼튼브로스로 증균배양 한 후, 실린지 필터법 및 멤브레인 필터법으로 증균액을 거른 후 mCCDA 배지에 도말하고 미호기 조건으로 증균하였음. 일반 방법은 필터를 거치지 않고 그대로 mCCDA 배지에 도말하였음. 의심집락을 골라낸 후 colony PCR 방법으로 최종 확인동정하였음. 검출법간 통계적 유의차는 SPSS 프로그램을 사용하여 Fisher's exact test로 검증하였음.

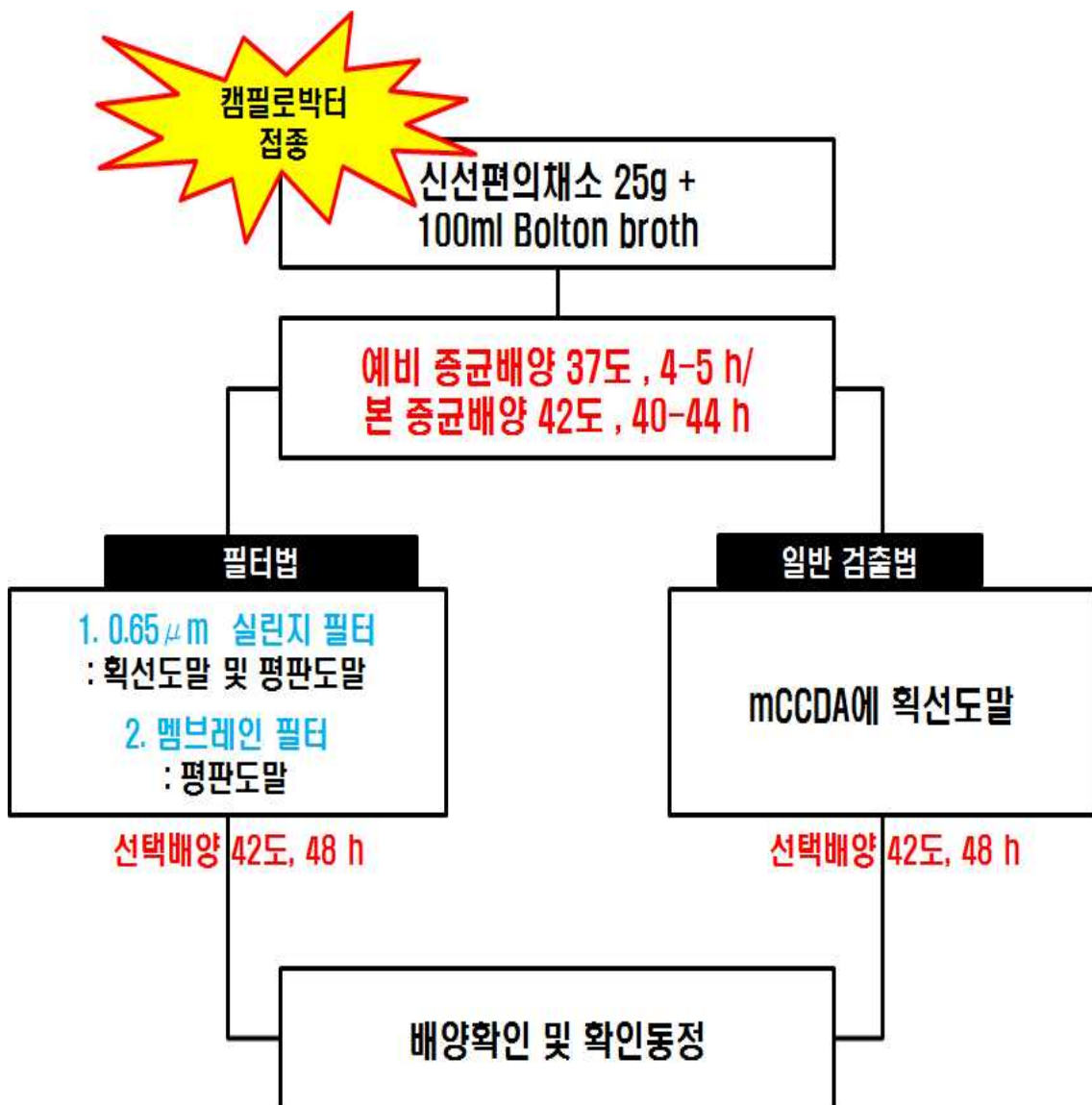


그림 3.16 신선채소류에서 캠�필로박터 검출을 위한 실린지 필터법 검증실험 모식도

- 본 실험결과 필터를 하는 경우 필터하지 않는 경우에 비해 유의적으로 훨씬 높은 수준의 검출능력을 보였다. 이는 필터법이 농산물에 함유된 높은 수준의 정상세균총을 억제하기 때문으로 분석된다. 특히 실린지 필터를 평판 도말하는 경우 모든 방법을 통틀어 가장 높은 검출효율을 보여 본 연구팀이 개발한 실린지 필터법이 신선야채등의 농산물에서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 보인다.

표 3.34 신선편의 채소에서 캄필로박터 검출을 위한 필터법 검증 결과

시료	필터하지 않음(%)		실린지 필터법(%)		멤브레인 필터법 (접종량 0.1ml)(%)
	회선도말 (접종량 0.01ml)	평판도말 (접종량 0.1ml)	회선도말 (접종량 0.01ml)	평판도말 (접종량 0.1ml)	
새싹믹스1	1/20(0.5)	0/20(0)	9/20(45)	13/20(65)	12/20(60)
무순	3/20(6)	3/20(1.5)	3/20(15)	4/20(20)	3/20(15)
브로콜리쌈	3/20(15)	0/20(0)	17/20(85)	18/20(90)	17/20(85)
새싹믹스2	1/20(5)	2/20(10)	17/20(85)	18/20(90)	17/20(85)
<b>계</b>	<b>8/80(10)a</b>	<b>5/80(16)a</b>	<b>46/80(57.5)b</b>	<b>53/80(66.3)b</b>	<b>49/80(61.3)b</b>

<sup>a</sup> 동일열에 있는 다른 알파벳(a, b)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함

#### (4) 농산물 경쟁집락에 따른 필터법 성능확인

##### (가) 실험방법

- ① 농산물(tomato, lettuce, mixed salads) 25g을 Bolton broth로 10배 희석
- ② Stomaching 후 미호기 상태로 24시간 증균
- ③ 증균액 1 ml씩 각tube로 옮긴다.
- ④ 원심분리 (5000g, 5분) 후 상층액을 제거하고 PBS로 희석 (1X, 0.1X, 0.01X)
- ⑤ 캄필로박터 제주니 6log CFU를 접종한 후 0.65um 실린지 필터로 필터 적용 (대조군은 필터 하지 않음)
- ⑥ 1000배 희석한 후 100ul를 Blood agar에 평판 도말하여 집락수 계산

(나) 실험결과

- 본 실험결과, 필터여부에 따른 결과가 크게 차이가 났는데, 필터를 하지 않은 경우 competing flora로 배지가 뒤덮여 캄필로박터의 계수가 불가능하였음.
- 반면 필터를 한 경우, 모든 배지에서 캄필로박터의 회복을 확인할 수 있었으며, 회복율은 competing flora의 농도가 감소할수록 증가하는 경향을 보였음.
- 필터한 경우 배지상에 경쟁균 집락은 관찰되지 않았는데, 이는 집중한 캄필로박터 계수에 적합한 농도로 희석 후(1000배 희석) 평판도말한 결과로 판단된다.
- 하지만 이는 필터시 최소 약 3 log 이상 경쟁균이 감소된다는 것을 의미하며, 이는 래피드 키드와의 접목시 민감도 증진에 효과적인 방법으로 사용될 수 있음을 시사한다.

표 3.35 농산물 경쟁집락에 따른 필터법 성능확인 결과

Competing flora (CFU/mL)	회복된 캄필로박터 균 수/초기 캄필로박터균 수 (%)				회복된 경쟁균 수 (CFU/ml)			
	필터하지 않음		실린지 필터법		필터하지 않음		실린지 필터법	
	Tomato	Lettuce	Tomato	Lettuce	Tomato	Lettuce	Tomato	Lettuce
8log	ND	ND	57.9	43.0	TNTC	TNTC	<1000	<1000
7log	ND	ND	91.2	88.2	TNTC	TNTC	<1000	<1000
6log	ND	ND	93.4	96.5	TNTC	TNTC	<1000	<1000



## <요약>

### 제3절 식중독 세균의 농축 및 정재 기법 개발

- 7종의 세균에 대한 면역자기분리법(IMS)을 개발하고 이를 농산물 속 세균 추출에 적용하여 PCR 키트 및 면역래피드 키트 등에 접목시 효과가 클 것으로 판단됨
- 각 IMB-항체에 따른 차이는 있으나 황색포도상구균(CE  $\geq 90\%$ ), 병원성 대장균(CE  $\geq 90\%$ ), 살모넬라(CE  $\geq 90\%$ ), 세균성이질(CE  $\leq 70\%$ ), 캄필로박터(CE  $\leq 60\%$ ), 등에서는 매우 높은 결합효율(CE)을 보임. 세균수가 많을수록 CE%는 떨어짐.
- 바실러스 세레우스(CE  $< 50\%$ ), 리스테리아(CE  $< 10\%$ ) 등에서는 낮은 결합효율을 가지나, 인위오염된 농산물에서 IMS 처리후 증균하면 더 높은 검출율을 얻었음
- Immunomagnetic bead(IMB)를 이용한 균의 농축은 자체개발한 이질균 및 캄필로박터균의 경우 비교적 목적균과 결합효율이 낮았으나, log 수준의 차이는 나지 않아 신속 검출법에 활용이 가능함.
- 캄필로박터의 경우 작은 세포 크기를 이용한 실린지 필터법은 매우 간편하면서도 검출효율을 크게 증진시키는데, 경쟁균 집락을 최소 약 3 log 이상 감소시키며, 캄필로박터 회복율을 증가시키므로, 특히 rapid kit에 접목시 큰 효과를 보일 것으로 판단됨.
- 농산물 시료에서 *B. cereus*를 낮은 농도(0.04~0.1 및 0.4~1.0 cfu/mL)로 인위 오염시키고 6 또는 24시간 증균배양후 직접 선택배지에 도말한 것보다 IMS 처리하여 도말한 경우 더 높은 검출율을 보였음(28/40 vs 40/40 for 6h; 35/40 vs 40/40 for 24h enrichment,  $p < 0.05$ )

## 제4절 식중독 세균 고효율 DNA 추출 기술 개발

### 1. 신속간편 DNA 추출 키트 개발의 필요성

#### 가. 시판되는 DNA 추출 키트들의 장·단점

- 유전체 DNA 추출 및 정제를 위해 판매되는 일반적인 DNA 추출 키트들은 여러 단계와 많은 용액을 사용함으로써 상대적으로 복잡하고 긴 시간이 요구됨.
- 일반적인 DNA 추출 방법을 요약하면, 버퍼는 세척제를 포함하고, 용균 효소들이 세균 샘플을 용균 시키는데 사용됨.
- 고농도의 염 조건하에서, 용균액 속의 DNA가 분리막과 결합하고, 불순물들은 분리막을 통과하여 collection 튜브로 들어감.
- 분리막은 남아있는 단백질, 세포파편 및 염들을 제거하기 위하여 여러 단계의 알코올과 버퍼로 세척함.
- 최종적으로 증류수나 낮은 이온 강도의 완충액으로 분리막으로부터 순수한 DNA를 collection tube로 얻음.
- 일반적인 판매용 키트들은 용해, 결합, 세척, 용출 등과 같은 많은 시간이 걸리는 DNA 분리와 정제의 단계들을 포함하고 있음(그림 4.1).



그림 4.1 The protocol of the normal commercial DNA extraction kit

- 표 2.1에서 현재 시판되는 4가지 DNA 추출 kit들의 소요 시간을 비교하였음.
- 그 결과 DNA 추출 시에 최소 51분이 필요하였음. 특히, GeneAll® Exgene™ Tissue SV kit의 경우 이론적으로 96분 정도가 필요하지만 실제로 거의 2시간이 필요하였음.
- 그 이유는 buffer를 준비하고, 튜브를 교체하고, 원심분리를 기다리는데 시간이 걸리기 때문임.

표 4.1 The time needed for the DNA extraction kit

Kit	Preparing sample (min)	Lysing step (min)	Binding step (min)	Washing step (min)	Total time (min)
GeneAll®Exgene™Tissue SV kit	1	30	60	5	96
QIAamp DNA Mini kit	10	30	45	7	92
DNeasy®Tissuekit	10	30	30	7	77
NucleoSpin®Tissuekit	5	40-70		6	51-81

(1) GeneAll® Exgene™ Tissue SV kit의 프로토콜

- ① 세균들(*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*) 배양액 1.5 ml을 12,000 rpm으로 1분 동안 원심분리하여 침전시킨다. 상등액을 버린다.
- ② 준비된 용균효소 혼합액(lysosome for *B. cereus* and *L. monocytogenes*, lysostaphin for *S. aureus*) 180 µl에 pellet을 재현탁하고, 37°C, 30분간 배양한다.
- ③ Proteinase K solution 20 µl과 Buffer BL. 200 µl를 강하게 vortexing하여 완전히 섞어준다.
- ④ 56°C, 30분간 배양하고, 다시 70°C, 30분간 추가로 배양한다. 가볍게 원심분리하여 뚜껑에 묻은 용액을 제거한다.
- ⑤ 샘플에 에탄올 200 µl를 가하고, 철저히 섞어준다. 다시 가볍게 원심분리하여 뚜껑에 묻은 용액을 제거한다.
- ⑥ 혼합물 전부를 SV column에 옮긴 후, 8,000 rpm으로 1분간 원심분리 한다. 새로운 collection tube를 새로운 튜브로 바꿔준다.
- ⑦ Buffer BW를 600 µl 넣어주고, 8,000 rpm으로 1분간 원심분리 한다. 새로운 collection tube를 새로운 튜브로 바꿔준다.
- ⑧ Buffer TW를 700 µl 넣어주고 8,000 rpm으로 1분간 원심분리한다. 용출액을 버리고, SV column을 다시 그 collection tube에 끼워 넣는다.
- ⑨ 남은 잔여 buffer들을 제거하기 위해 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하고, SV column을 새로운 깨끗한 1.5 ml 튜브에 끼워 넣는다.
- ⑩ Buffer AE를 50 µl 넣고, 상온에서 1분간 배양한 후, 13,000 rpm으로 1분간 원심분리한다.

## 나. 새로운 신속한 DNA 추출 방법의 개발

### (1) PrepMan™ Ultra Sample Preparation kit 장점

- 기존의 시판되는 DNA 추출 키트들은 여러 용액과 단계들을 필요로 함.
- 그러므로 이러한 단계들이 간소화된 단일 핵산 추출 시약을 이용한 DNA 추출법들이 개발되고 사용되고 있음.
- 그 중에서 PrepMan™ Ultra Sample Preparation (Life Technologies) 방법을 본 과제에 적용하여 현장에서 쉽고 간편하고 빠르게, 20분 이내에 DNA 추출이 가능한지를 시험하였음.

### (2) PrepMan™ Ultra Sample Preparation kit의 프로토콜

- ① 2 ml screw-cap tube에서 세균(*B. cereus*, *L. monocytogenes*, or *S. aureus*) 배양액을 15,000 rpm으로 2분간 원심분리하고 상등액을 제거한다.
- ② 평균적으로 PrepMan™ Ultra Sample preparation reagent 100 µl을 각 튜브에 넣고, 튜브의 뚜껑을 닫은 뒤, 샘플을 매우 강하게 vortex한다.
- ③ 그 microfuge screw-cap 튜브를 heat block에 넣어 100°C에서 10분간 끓인다. 샘플들이 끓는 동안, 새로운 2 ml microfuge screw-cap tube에 라벨을 표시한다.
- ④ 샘플 튜브를 heat block에서 빼서 상온에서 2분간 식힌다.
- ⑤ 마이크로원심분리기에 튜브를 넣고 15,000 rpm에서 2분간 원심분리한다.
- ⑥ 원심분리한 튜브에서 50 µl의 상층액을 라벨을 표시한 screw-cap tube에 넣고, 나머지 상층액은 버린다.
- ⑦ 이 상층액들이 DNA 추출물이므로, 바로 상층액을 PCR assay에 사용하면 됨.

### (3) modified PrepMan 방법의 장점과 다른 DNA 추출 방법의 비교

- ① 위의 방법과 동일하나 마지막 ⑤ 번을 수행한 후 상층액 50µl을 spin column으로 옮긴다.
- ② 그 후, 15,000 rpm에서 2분간 원심분리한다. 이것은 새로운 튜브를 사용하므로 시간은 더 걸리지만 상등액의 섞임을 방지할 수 있으며 보다 정제된 시료를 얻을 수 있다.
- ③ 이 상등액들이 DNA 추출물이므로, 바로 상층액을 PCR assay에 사용하면 됨.

## 다. 개발한 DNA 추출법의 장점과 기존의 상용 DNA 추출 방법의 비교

- 세 가지 방법으로 DNA 추출하여 그 결과를 비교하였음.

- (1) PrepMan™ Ultra sample preparation reagent
- (2) modified PrepMan™ Ultra sample preparation reagent
- (3) GeneAll®Exgene™TissueSV kit

- 추출한 DNA 농도의 결정은 Optizen Pop Bio (Mecasys, Daejeon, Korea)의 auto-spectrophotometer를 사용하였음.

- DNA 농도와 수율은 세 가지 방법 중에서 modified PrepMan를 사용하였을 때 제일 높았음 (표 4.2, 그림 4.2).
- 세 가지 균주들(*B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*) 모두의 경우에서, modified PrepMan 방법을 사용한 DNA 추출의 수율이 다른 두 방법보다 더 높게 나타났음. (modified-PrepMan, 92.75 µg; PrepMan, 23.25 µg; GeneAll, 5.25 µg in *B. cereus*).
- 순수한 DNA에서는 A260/A280의 비가 1.8~2.0의 범위를 나타내는데, 사용한 모든 키트들의 모든 DNA 비율이 1.8 이상이므로 추출된 DNA 시료는 순도가 높은 것으로 평가되었음. 그런데 GeneAll 키트가 상대적으로 더 순도 높은 DNA 시료를 제공함.
- 결론: PrepMan 방법으로 세균의 DNA 추출은 20분 이내에 수행할 수 있었음.

표 4.2 Comparison of the DNA concentration using GeneAll® Exgene™ Tissue SV kit, PrepMan™ Ultra and modified PrepMan Ultra

Bacteria	Kits	DNA concentration (ng/µl )	Ratio (260/280)	DNA Yield (µg)
<i>B. cereus</i> (2.1×10 <sup>7</sup> )	GeneAll® Exgene™ Tissue SV kit	52.5	2.00	5.3
	PrepMan™ Ultra	465.0	1.89	23.3
	Modified PrepMan™ Ultra	927.5	2.00	92.7
<i>S. aureus</i> (3.4×10 <sup>7</sup> )	GeneAll® Exgene™ Tissue SV kit	130.0	2.00	13.0
	PrepMan™ Ultra	372.5	1.82	18.6
	Modified PrepMan™ Ultra	625	1.92	62.5
<i>L. mono-cytogenes</i> (2.5×10 <sup>7</sup> )	GeneAll® Exgene™ Tissue SV kit	5.0	2.00	0.5
	PrepMan™ Ultra	202.5	1.84	10.1
	Modified PrepMan™ Ultra	307.5	1.88	30.7

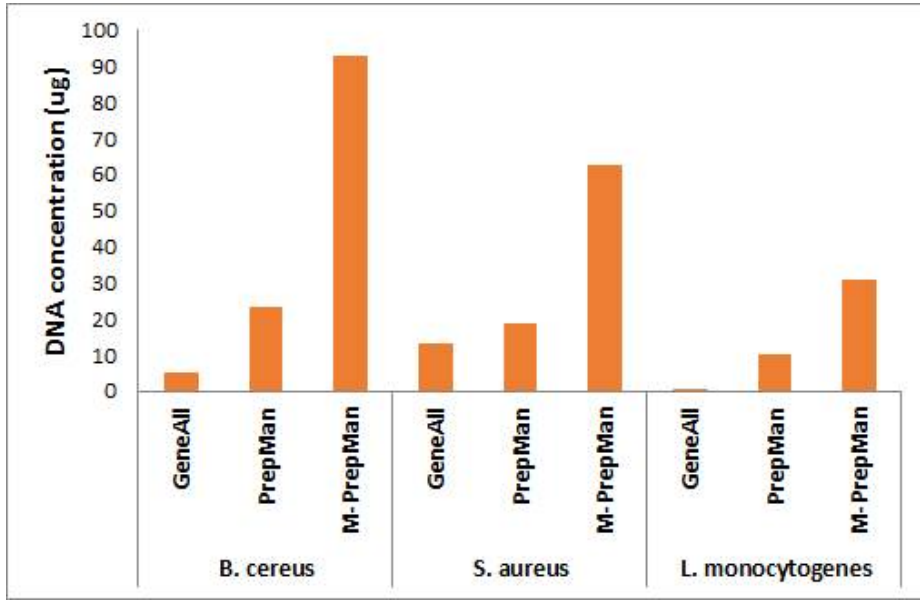


그림 4.2 Comparison of abilities of 3 kinds of DNA preparation kits to prepare genomic DNA in bacteria. The values for plot of graph are total amounts of extracted genomic DNA in three kinds of bacteria from 표 6

#### 라. Real-time PCR을 이용한 시료 DNA 추출법의 비교

- 같은 양의 DNA는 Real-time PCR(qPCR)의 Ct값을 비교하여 시료 속의 타겟 DNA 양을 측정할 수 있음.
- GeneAll® Exgene™ Tissue SV kit, PrepMan™ Ultrasample preparation reagent, modified PrepMan™ Ultra sample preparation reagent를 이용하여 추출한 *B. cereus*와 *S. aureus*의 DNA 20 ng과 *L. monocytogenes*의 DNA 5 ng을 Real-time PCR 방법으로 측정된 결과, modified PrepMan sample이 가장 높은 Ct 값을 나타냈음.
- 이것은 modified PrepMan™ Ultra sample kit를 사용하면 보다 적은 양의 표적 샘플로도 real-time PCR 반응이 가능하다는 것을 의미함(표 2, 그림 12, 13, 14).
- 그러나, 비록 주형 DNA가 같을지라도 분리된 DNA 질이나 시료속의 inhibitor 등의 존재에 따라 Real-time PCR 결과가 달라질 수 있음.
- 결과는 PrepMan과 modified PrepMan 키트로 뽑은 DNA가 GeneAll® 키트의 DNA 보다 순도가 좋지 않은 것으로 나타남(표 6, 그림 2.3, 2.4, & 2.5).
- 결론적으로, modified PrepMan 방법은 비록 Ct 값은 높을 지라도 Real-time PCR을 위한 DNA 시료로는 문제가 없으므로, modified PrepMan 방법은 신속한 시간(20분) 내에 세균으로부터 게놈 DNA를 추출할 수 있으므로 신속 진단을 위한 DNA 추출에 적용 가능함.

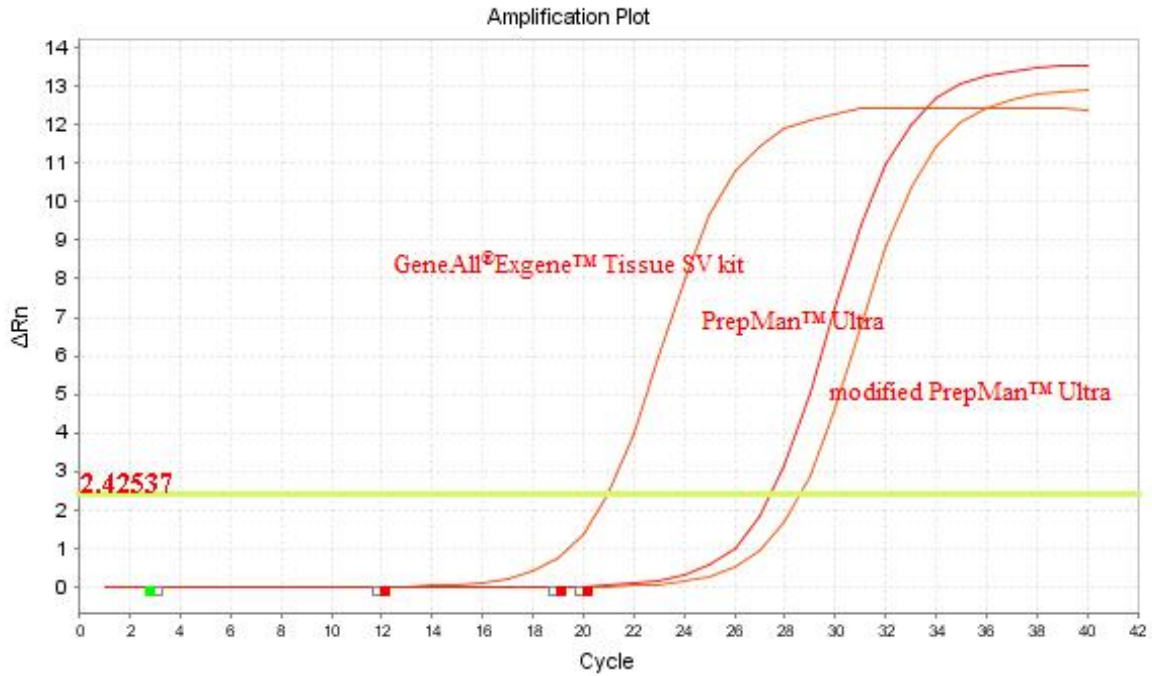


그림 4.3 The amplification curves of *B. cereus* using 20 ng DNA template with real time PCR from the GeneAll® Exgene™ Tissue SV kit, PrepMan™ Ultra sample preparation reagent and modified PrepMan™ Ultra sample preparation reagent

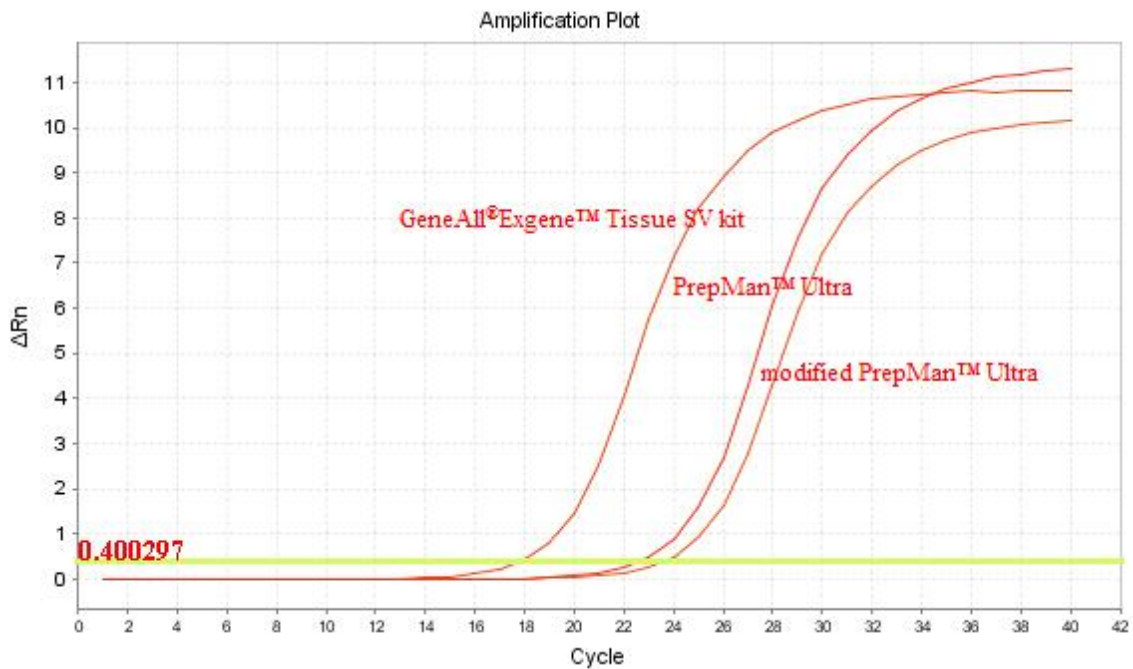


그림 4.4 The amplification curves of *S. aureus* using 20 ng DNA template with real time PCR from the GeneAll® Exgene™ Tissue SV kit, PrepMan™ Ultra sample preparation reagent and modified PrepMan™ Ultra sample preparation reagent.

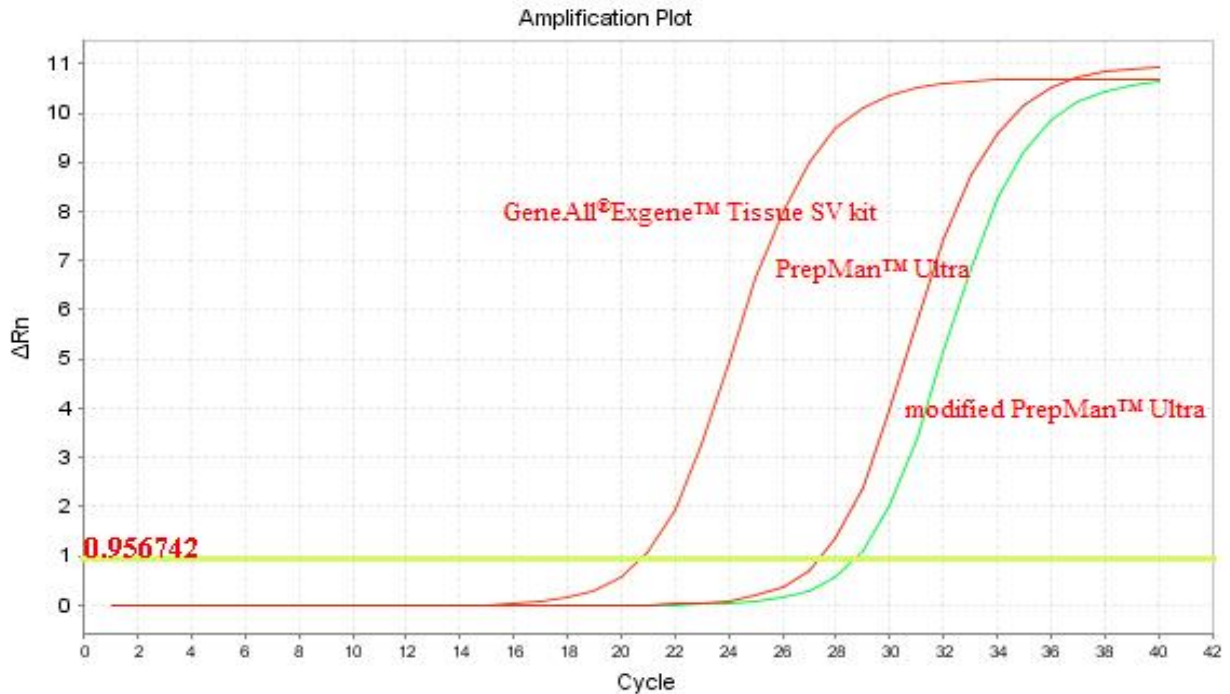


그림 4.5 The amplification curves of *L. monocytogenes* using 5 ng DNA template with real time PCR from the GeneAll®Exgene™ Tissue SV kit, PrepMan™ Ultra sample preparation reagent and modified PrepMan™ Ultra sample preparation reagent

### <요약>

## 식중독 세균에 대한 PCR 키트를 위한 고효율 DNA 추출 기술 개발

### 가. 20분 이내 DNA 추출 키트의 개발

- 여러 가지 DNA 추출키트를 비교한 결과, Prepman kit 및 modified PrepMan kit 방법을 사용하여 신속하게-20분 이내- 유전체 DNA를 추출할 수 있었음.
- 개발된 DNA 추출법으로 준비된 DNA 시료를 사용한 real-time PCR결과는 식중독균 3종 각각에 대해서 특이적 양성반응을 나타냈음
- 결론적으로, Prepman kit를 사용하면 20분 이내 세균으로부터 유전체 DNA를 추출하여 신속진단 PCR 키트에 적용할 수 있음



## 마. 개발된 DNA 추출법의 real-time PCR 적용 검증

### (1) 개발된 신속 DNA 추출 키트에 대한 real-time PCR 검증:

#### (가) 신속 DNA 추출 키트(20분 소요)와 기존 상용 제품(60분 소요)에 대한 real-time PCR의 비교

- DNeasy mericon Food Kit는 Qiagen사에서 공급하는 DNA 추출 키트로서 식품에서 세균의 유전체 DNA를 추출하는 용도로 널리 사용되고 있음.
- 이 키트의 장점은 순수한 DNA를 얻을 수 있음은 것임. 그러나 이 키트로 DNA를 추출하는데는 약 1시간 정도 걸림.
- 본 실험에 개발하여 사용한 modified PrepMan kit는 Applied Biosystem사에서 공급하는 DNA 추출 키트를 변형한 것으로 장점은 20분 이내에 DNA 추출을 할 수 있음은 것임. 그러나 단점은 DNA 순도가 낮다는 것임.
- 두 키트를 사용하여 인위 접종한 농산물에서의 각 세균을 검출하는 효율을 비교 분석을 목적으로 함.
- 농식품 시료 준비: 배추, 상추, 시금치, 콩나물, 토마토를 시중에서 구입하였고, 먹을 수 없는 부위와 시든 부위 및 손상 부위는 제거하여 사용하였음.
- 각 시료 25 g을 측정하여 4°C에 보관하고 24시간 이내 사용하였음.
- 농산물 시료에 세균 인위접종 방법: 각 시료는 크린벤치에서 알루미늄 호일 위에 놓고, 각 세균의 0.1 ml ( $10^6$  CFU/ml)를 접종한 후 30분 동안 건조시켜서 세균의 부착을 유도하였음 ( $10^5$  CFU/25 g =  $4 \times 10^3$  CFU/g).
- 멸균 stomacher bag에 이들 세균을 접종한 각 시료를 넣은 후, 멸균 0.1% buffered peptone water 225 ml을 넣고 stomacher를 사용하여 2분간 섞어줌(10배 희석).
- 그 후, 각 실험에 따라 각 시료 혼합액 1 ml을 꺼내어 DNA 추출에 사용하였음.
- (참고: 세균수 계산)  $10^4$  CFU/25 g =  $4 \times 10^2$  CFU/g =  $1 \times 10^4$  CFU/250 mL =  $4 \times 10^1$  CFU/ml = ca.  $2 \times 10^1$  DNA/50 ul eluent = ca. 0.8 DNA/2 ul for PCR reaction

(2) *B. cereus*에 대한 두 DNA 추출법의 real-time PCR 결과 비교

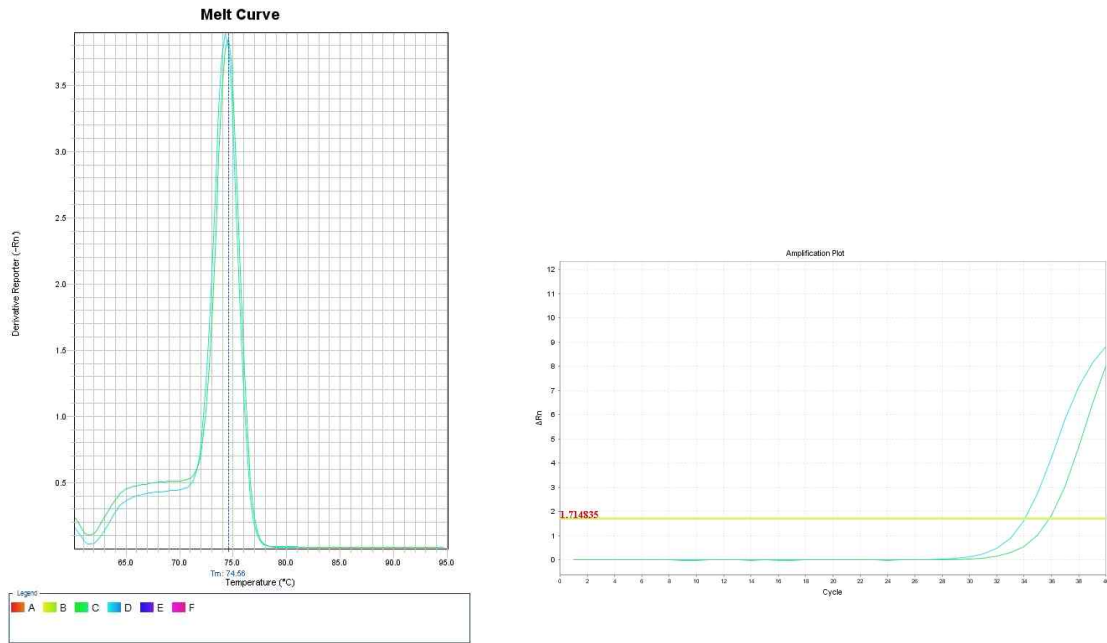


그림 4.6 배추. Amplification plot and melt curve for detection of *B. cereus* with DNA extracted from inoculated chinese cabbage by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

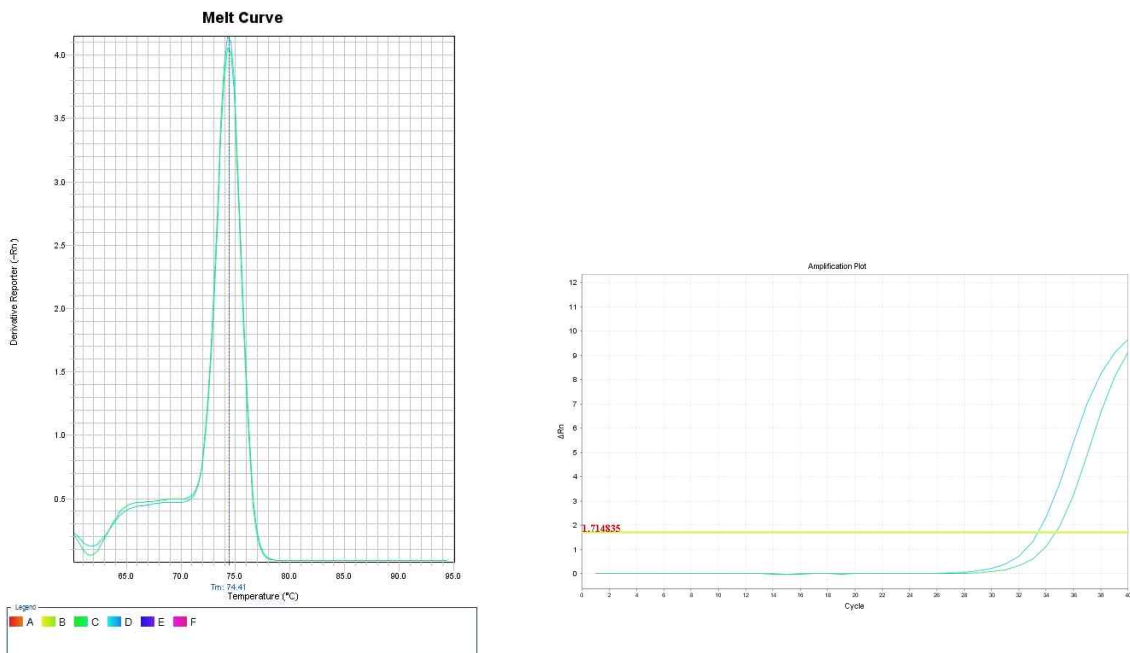


그림 4.7 상추 Amplification plot and melt curve for detection of *B. cereus* with DNA extracted from inoculated lettuce by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

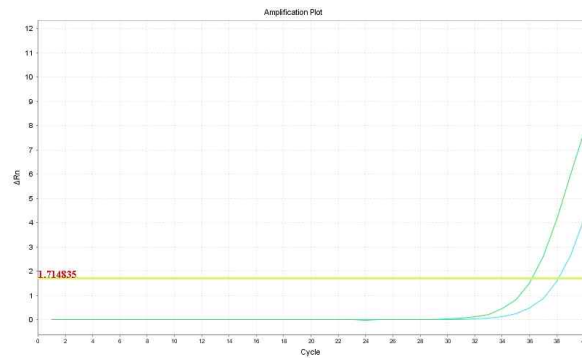
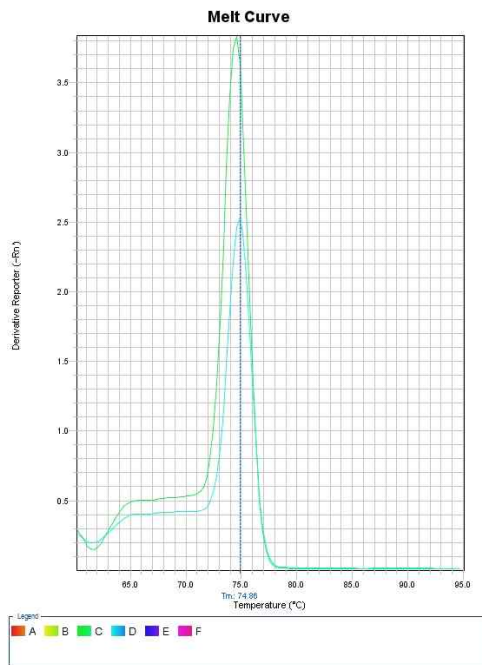


그림 4.8 시금치. Amplification plot and melt curve for detection of *B. cereus* with DNA extracted from inoculated spinach by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

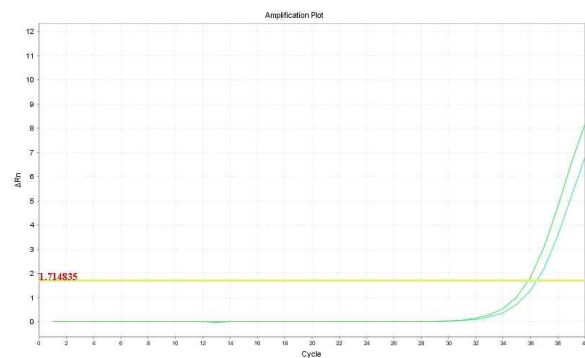
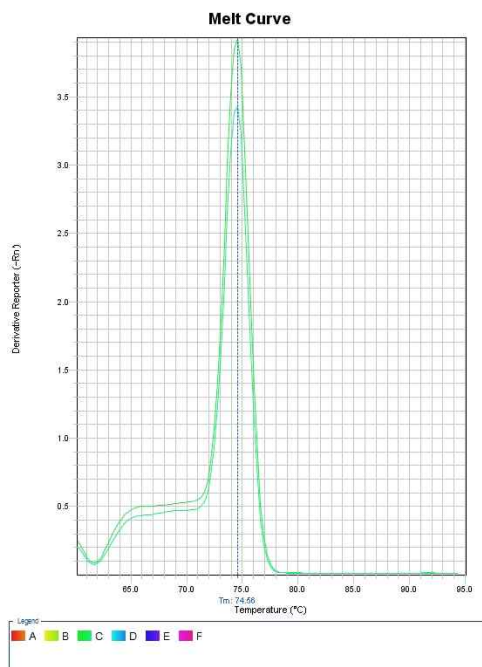


그림 4.9 콩나물. Amplification plot and melt curve for detection of *B. cereus* with DNA extracted from inoculated sprout by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

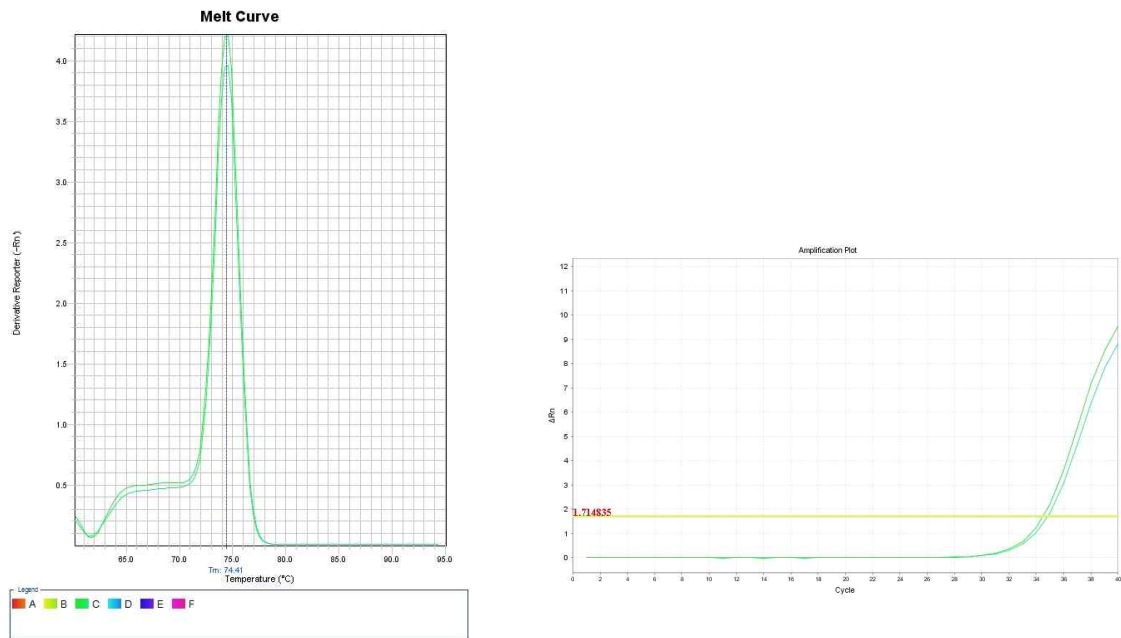


그림 4.10 토마토. Amplification plot and melt curve for detection of *B. cereus* with DNA extracted from inoculated tomato by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

표 4.3 Results of real-time PCR with PrepMan kit and DNeasy Mericon Food kit for *B. cereus* (inoculum of  $4 \times 10^3$  CFU/g means ca. 8 CFU/PCR rxn)

Samples	$C_t$		$T_m$ (°C)	
	Prepman kit	DNeasy Mericon Food Kit	Prepman kit	DNeasy mericon Food Kit
Chinese cabbage	34.03	35.88	74.26	74.56
Lettuce	33.41	34.74	74.41	74.41
Spinach	38.12	36.18	74.86	74.56
Sprout	36.47	35.85	74.41	74.56
tomato	34.86	34.53	74.41	74.41

(3) *L. monocytogenes* 에 대한 두 키트의 real-time PCR 결과 비교

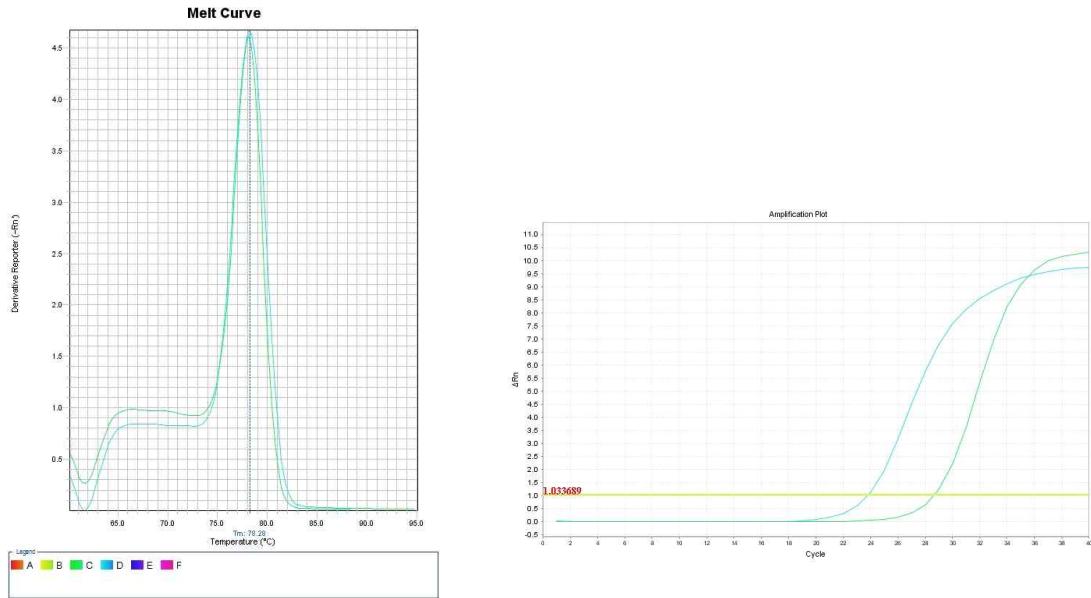


그림 4.11 배추. Amplification plot and melt curve for detection of *L. monocytogenes* with DNA extracted from inoculated Chinese cabbage by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

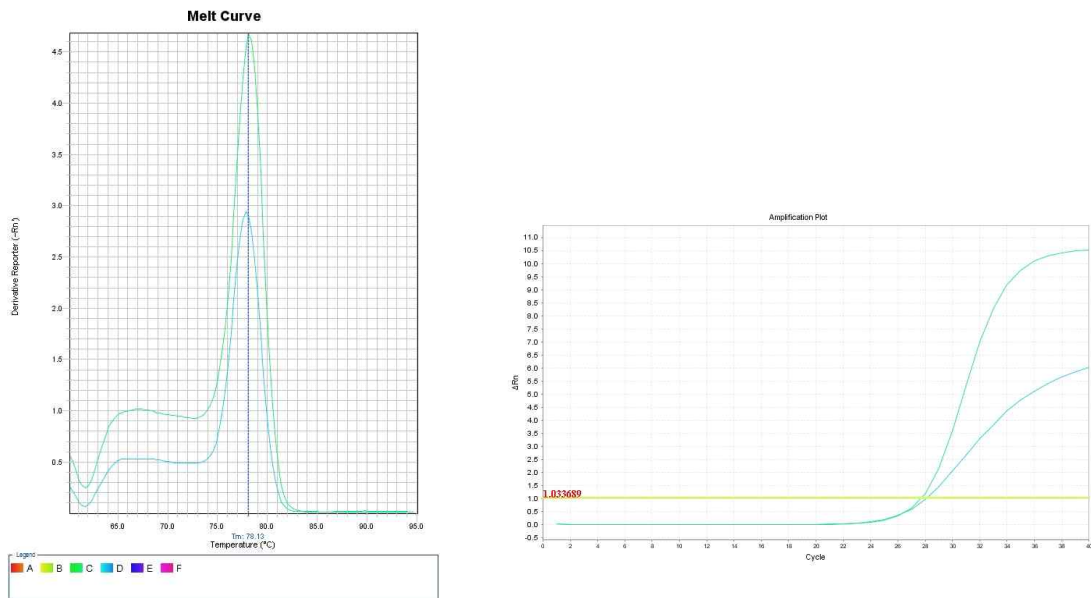


그림 4.12 상추. Amplification plot and melt curve for detection of *L. monocytogenes* with DNA extracted from inoculated lettuce by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

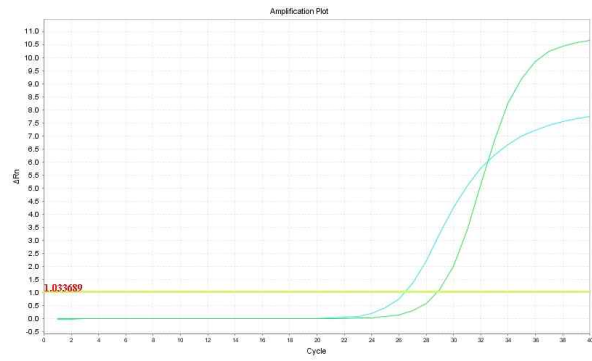
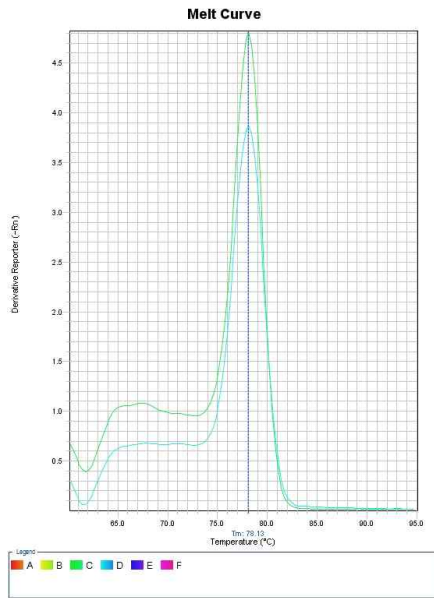


그림 4.13 시금치. Amplification plot and melt curve for detection of *L. monocytogenes* with DNA extracted from inoculated spinach by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

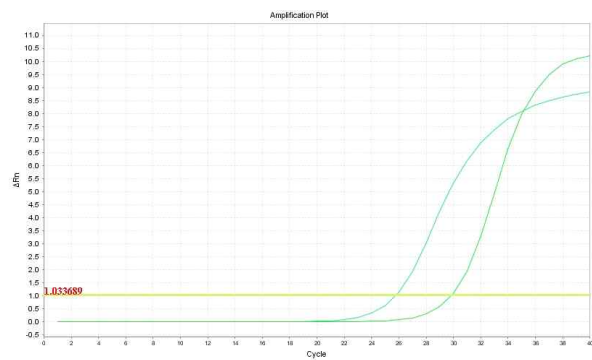
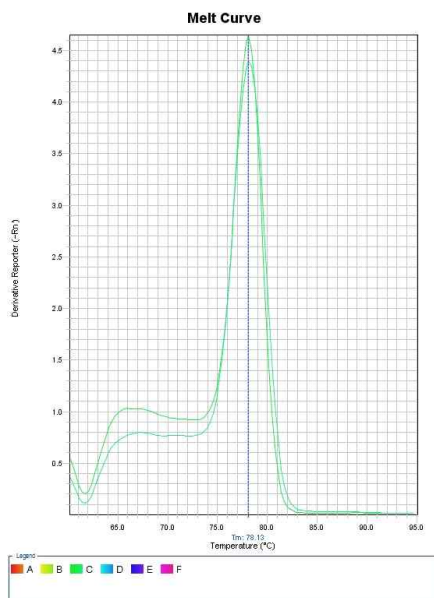


그림 4.14 콩나물. Amplification plot and melt curve for detection of *L. monocytogenes* with DNA extracted from inoculated sprout by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

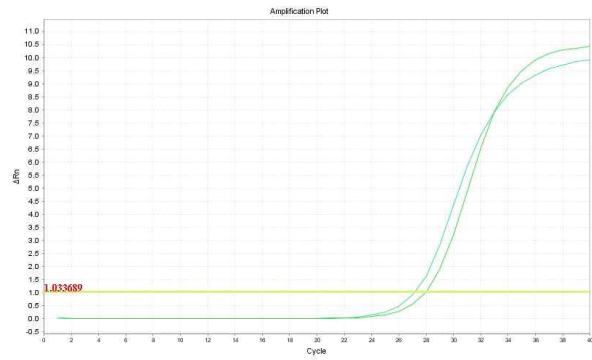
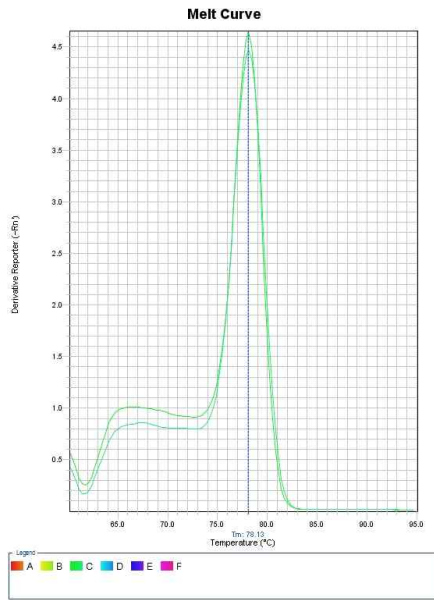


그림 4.15 토마토. Amplification plot and melt curve for detection of *L. monocytogenes* with DNA extracted from inoculated tomato by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

표 4.4 Results of real-time PCR with PrepMan kit and DNeasy mericon Food kit for *L. monocytogenes*

Samples	Ct		Tm (°C)	
	Prepman kit	DNeasy Mericon Food Kit	Prepman kit	DNeasy Mericon Food Kit
Chinese cabbage	23.87	28.73	78.28	78.13
Lettuce	28.15	27.78	77.83	78.13
Spinach	26.48	28.90	78.13	78.13
Sprout	25.83	29.93	78.13	78.13
Tomato	27.18	27.97	78.13	78.13

(4) *S. aureus* 에 대한 두 키트의 real-time PCR 결과 비교

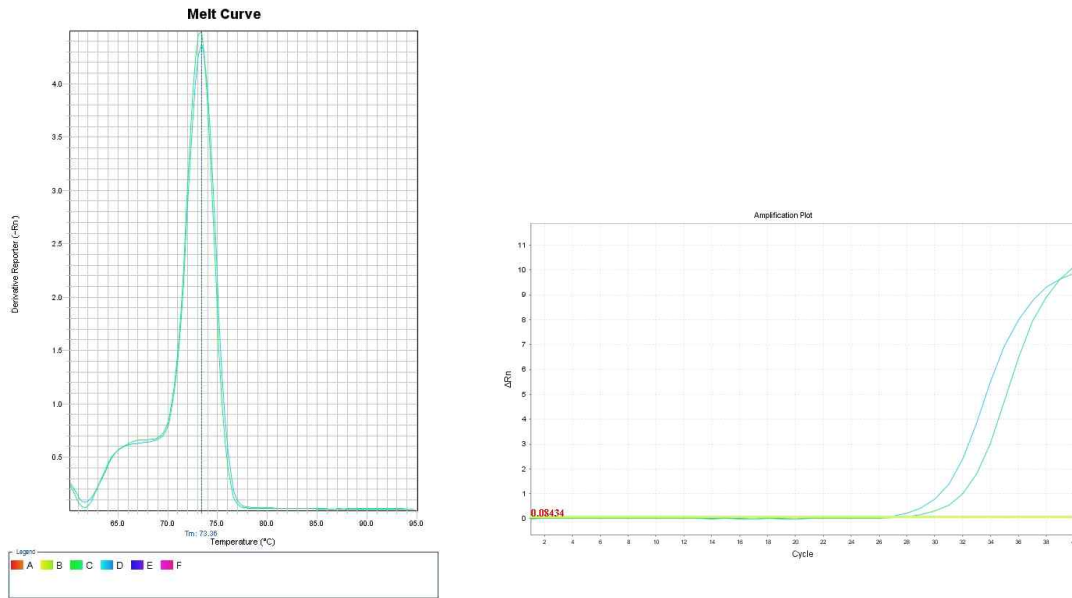


그림 4.16 배추. Amplification plot and melt curve for detection of *S. aureus* with DNA extracted from inoculated chinese cabbage by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

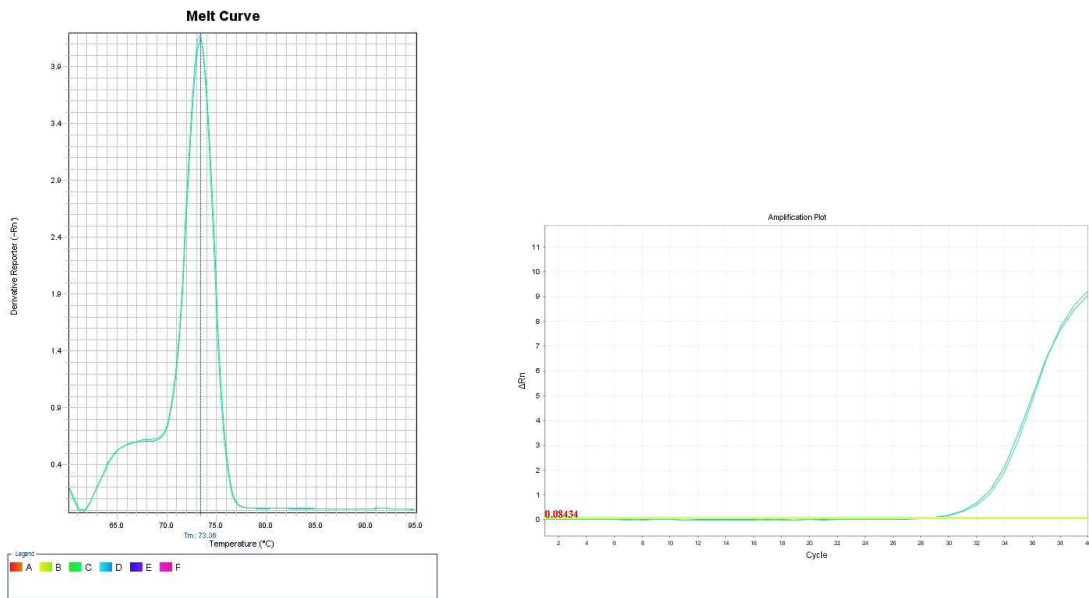


그림 4.17 상추. Amplification plot and melt curve for detection of *S. aureus* with DNA extracted from inoculated lettuce by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.



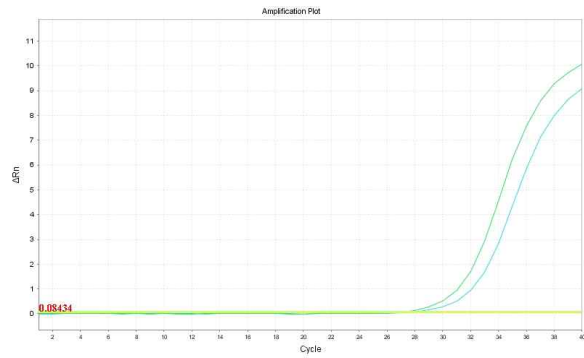
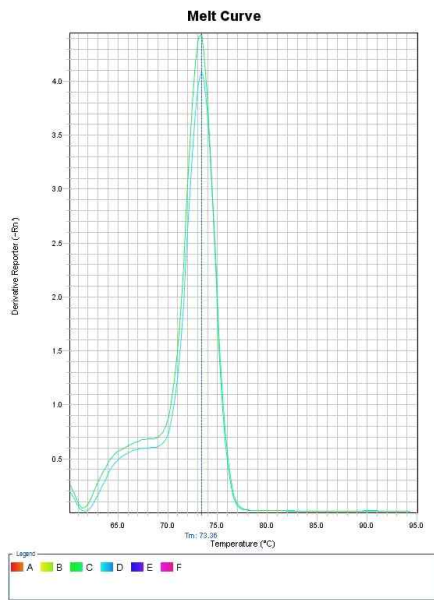


그림 4.18 시금치. Amplification plot and melt curve for detection of *S. aureus* with DNA extracted from inoculated spinach by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

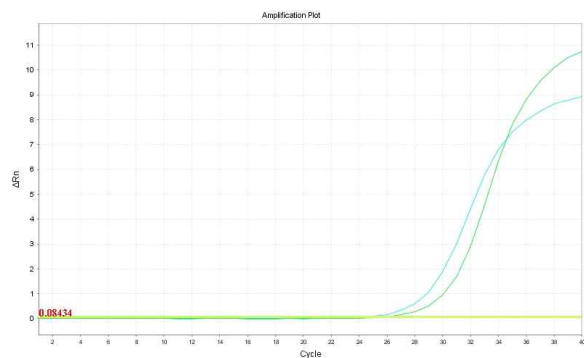
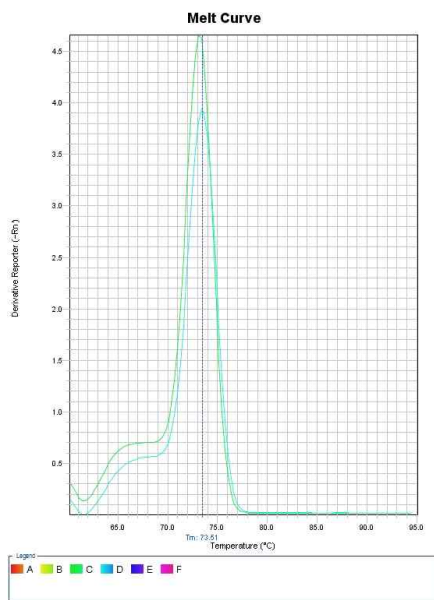


그림 4.19 콩나물. Amplification plot and melt curve for detection of *S. aureus* with DNA extracted from inoculated sprout by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

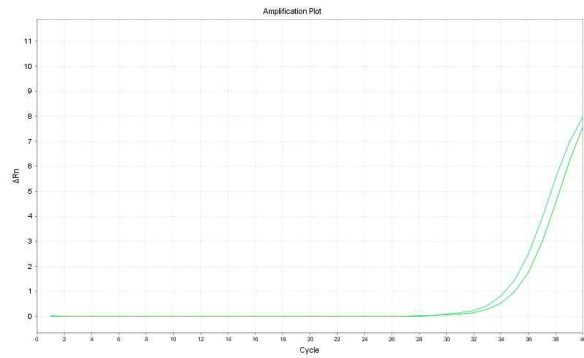
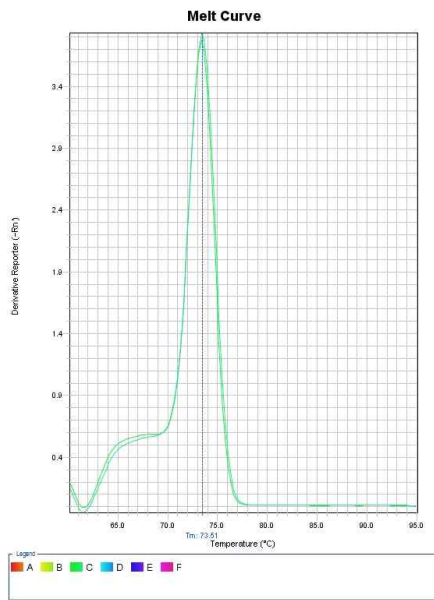


그림 4.20 토마토. Amplification plot and melt curve for detection of *S. aureus* with DNA extracted from inoculated tomato by two kits, PrepMan kit and DNeasy mericon Food Kit.

표 4.5 Results of real-time PCR with PrepMan kit and DNeasy Mericon Food kit for *S. aureus*

Samples	Ct		Tm (°C)	
	Prepman kit	DNeasy Mericon Food Kit	Prepman kit	DNeasy Mericon Food Kit
Chinese cabbage	26.61	28.03	73.36	73.21
Lettuce	28.74	28.87	73.36	73.36
Spinach	28.26	27.29	73.36	73.21
Sprout	24.96	26.25	73.51	73.21
tomato	30.39	31.13	73.51	73.36

## <요약>

### 제4절 식중독 세균 고효율 DNA 추출 기술 개발

#### 1. 개발된 신속 DNA 추출 키트에 대한 real-time PCR 검증

- 3균종의 식중독 세균으로 인위접종한 농산물(spiked food samples), 배추, 상추, 시금치, 콩나물 및 토마토에서 두 종류의 DNA 추출 키트(PrepMan kit와 DNeasy mericon Food Kit)를 성능을 비교하였고, 두 키트로 추출한 DNA에 대한 real-time PCR의 결과는 큰 차이가 없음을 보여주었음.
- 특정 세균의 해당 프라이머에 의하여 정해진 real-time PCR의 Ct 값 및 Tm 값은 다섯 가지 농산물 모든 시료에서 두 추출 방법의 결과는 유사하게 나타났음. 즉, 두 방법/키트에 의한 PCR 결과는 거의 같았음.
  - *B. cereus*의 Ct 및 Tm 값은 각각 33~38 및 74.41~74.86였으며,
  - *L. monocytogenes*의 Ct 및 Tm 값은 각각 23~29 및 77.83~78.28°C
  - *S. aureus*의 Ct 값과 Tm 값은 각각 24~31 및 73.21~73.51°C이였음.
- 시료에서 DNA를 추출하는 시간은 PrepMan kit는 20분이 소요되나, DNeasy kit는 55분 정도 걸림. 그러나 PrepMan kit의 DNA 용액 순도는 상대적으로 낮으나 PCR을 위해서는 문제가 없음
- 결론적으로, 개발된 Prepman DNA 추출 키트를 사용하여 20분 이내 농산물 시료에 존재하는 세균의 유전체 DNA를 추출하여 신속진단 검출방법인 real-time PCR 에 적용할 수 있음.

## 2. 식중독 세균 고효율 DNA 추출 기술 개발 II

### 가. 핵산 추출 시스템의 개발의 필요성

#### (1) 시간 및 노동력 감소를 위한 단일 추출 reagent의 개발 및 활용

- 시료 종류에 따른 다양한 핵산 추출 키트들이 판매되고 있으나, 대부분은 비교적 많은 step을 거치고 buffer의 종류도 3~4가지 이상 사용하게 된다. 시료의 수가 많은 경우 하나의 step만 줄여도 많은 시간을 단축할 수 있음.
- 따라서 고순도의 정제가 필요한 subtyping, sequencing 등의 실험의 경우를 제외하고, 현장에서는 일반 PCR 등의 기법에서는 cell lysis부터 별도의 buffer 교환 없이 바로 template으로 적용이 가능한 단일 핵산추출 reagent를 많이 택하게 됨.
- 이러한 단일 핵산추출 reagent들 중에 가장 널리 사용되는 **PrepMan Ultra (Life technologies)** 제품은 다른 추출방법에 비해 쉽고 간편하게 사용할 수 있음에도 불구하고 다른 핵산추출키트들과 비슷한 추출효율을 보인다고 보고된 바 있다(Heller et al., Appl. Environ. Microbiol., 2003).
- 또한 최근 각광받고 있는 핵산자동화 추출기인 **NucliSENSE easyMAG(Biomérieux)** 장비를 이용한 핵산추출은 본 연구의 전년도 결과에서도 나타났듯이 PrepMan Ultra를 이용한 boiling method 이상의 결과를 보인다.
- 본 자동화추출법에서 사용되는 lysis buffer는 분쇄능이 강력하여 거의 모든 시료에 적용이 가능하며, 핵산의 안정화 기능을 동시에 수행하는 역할을 한다.
- 본 연구에서는 PrepMan Ultra(PM)과 easyMAG의 lysis buffer(LB)의 배합을 통한 검사키트의 민감도 증진 연구를 수행하였음.

#### (가) PM, LB의 배합비 결정

- 각 실험은 각각의 well에 정제된 동량의 DNA를 첨가하여 real-time PCR 후 ct값 비교를 통해 진행하였음.
- 단일 reagent에서 추출 및 PCR template으로 적용되므로, PM과 LB의 비율을 각각 10:0, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8, 0:10으로 배합하여 real-time PCR을 통해 예비 테스트한 결과 LB(20% 이상)가 첨가된 경우 PCR 반응이 일어나지 않는다는 것을 확인하였음.
- 따라서, LB의 농도(2%, 4%, 6%, 8%)에 따른 real-time PCR 저해 정도를 파악하여 적정 농도를 2%로 산출하였음. (3'DW를 base로 한 경우 4%의 LB 농도에서도 반응이 일어나나

일정하지 않았으며, PM을 base로 한 경우에는 반응이 일어나지 않았음)

- 위의 결과는 PM과 LB의 혼합시 PCR 반응을 저해시킬 수 있음을 시사하므로, LB의 농도를 2%로 고정했을 때, PM의 농도에 따라 (20-80%) ct값의 변화를 측정하여 적정 PM 농도를 60%로 결정하였음. (60% 이하에서는 ct값의 변화가 적었기에, 실제 샘플에서 lysis능을 고려하여 최대 농도인 60%로 결정)

표 4.6 최종 modified PrepMan(mPM)의 조성

	Reagent	농도
<b>modified PrepMan (mPM)</b>	NucliSENSE Lysis buffer (Biomerieux)	2%
	PrepMan (Life Technologies)	60%
	3'DW	38%

(나) 순수배양액에서의 3'DW, PM, modified PrepMan(mPM)의 추출효율 비교

- 새롭게 조성된 mPM의 3'DW, PM에 대한 핵산추출능을 그람양성균(*S. aureus*, *B. cereus*), 그람음성균(*S. Enteritidis*) 순수배양액을 이용하여 확인하였음.
- 추출방법은 일반적으로 널리 사용되는 boiling method (10분)외 두 가지 방법을 추가하여 총 세가지 방법으로 진행하였으며, 그 방법은 다음과 같음.

표 4.7 실험에 사용된 추출방법

추출방법	특징 요약	장점
A	일반 boiling method (10분 가열)	-
B	가열시간 5분으로 단축	가열시간 단축
C	가열처리 대신 10분간 상온처리	가열장치 필요 없음

○ 각 방법에 따라 추출된 핵산을 nanodrop 및 real-time PCR을 통하여 비교하였으며 결과는 다음과 같음.

표 4.8 nanodrop 결과

Nucleic acid concentration (ng/ul)									
추출 reagent	3'DW			PM			mPM		
추출방법	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>S. aureus</i>	318	350	177	323	230	125	298	227	110
<i>B. cereus</i>	243	233	74	325	280	130	334	197	163
<i>S. Enteritidis</i>	560	589	57	501	368	53	246	203	64

표 4.9 real-time PCR 결과 (동일 template에 대해 3번 반복하여 중간값으로 제시 함)

ct value									
추출 reagent	3'DW			PM			mPM		
추출방법	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>S. aureus</i>	11.49	12.38	17.06	15.6	16.44	16.43	11.6	11.46	12.16
<i>B. cereus</i>	15	14.91	24.42	15.01	16.38	19.06	17.13	16.81	17.18
<i>S. Enteritidis</i>	10.5	9.77	25.63	11.65	13.75	20.49	15.9	18.59	23.1

○ 아래 그림과 같이, 살모넬라의 경우 nanodrop 값 증가에 따라 ct 값이 비교적 일정하게 감소( $R^2=0.923$ )하였으나, 그람양성균 특히 *S. aureus*에 대해서는 그렇지 않았음. 이는 nanodrop 값만으로 추출 효율을 비교하는 것은 적합하지 않음을 시사함.

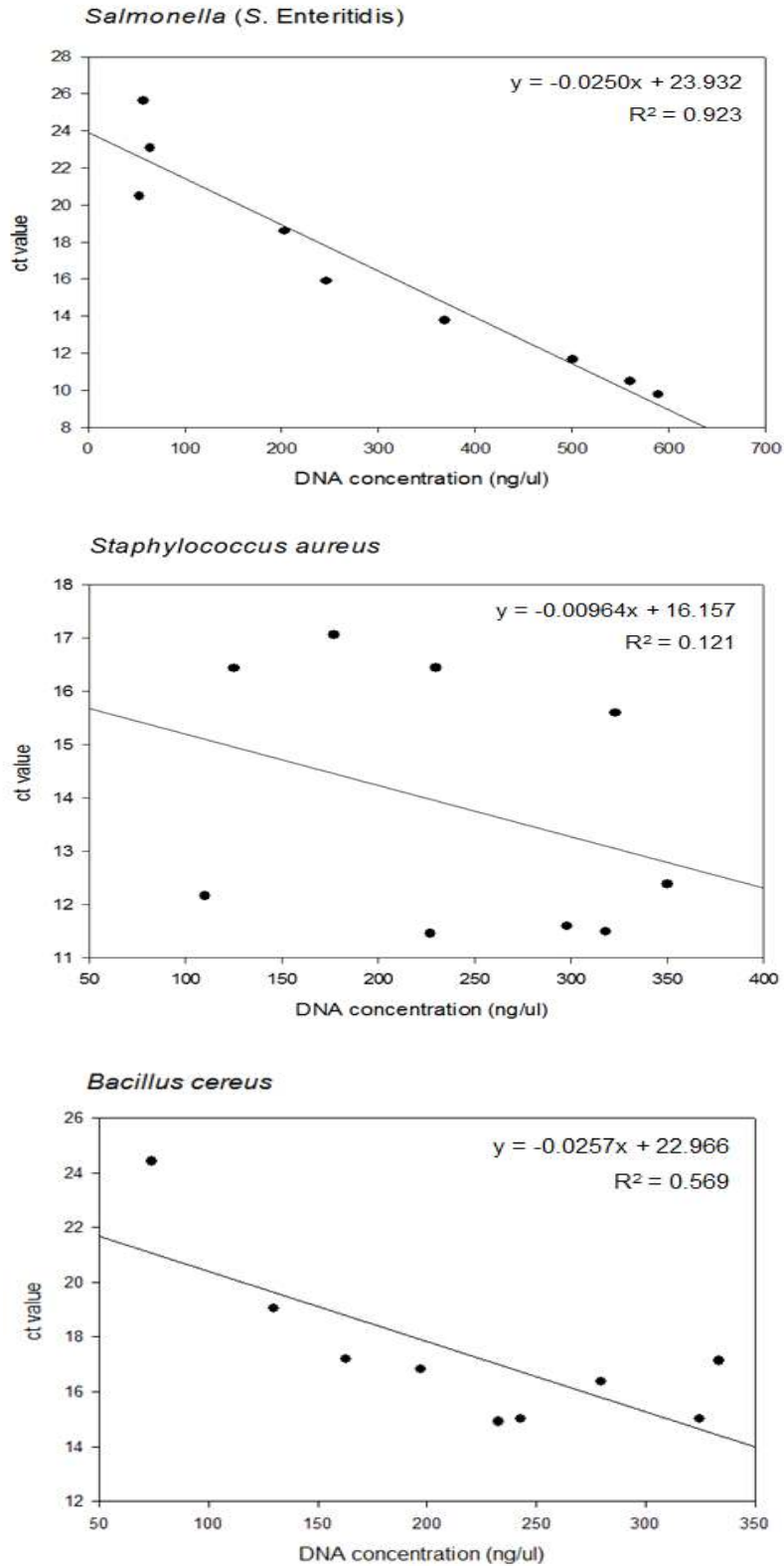


그림 4.21 nanodrop 결과와 ct값 관계, 살모넬라(상), 황색포도상구균(중), 바실러스(하)

- real-time PCR 결과를 기준으로 하였을 때, 개발한 mPM은 모든 검사대상균에 대해 기존 추출법보다 뛰어난 효과를 보이지 못했지만, *S. aureus*와 *B. cereus*를 대상으로 한 실험에서 boiling 없이도 높은 추출효율을 보여, 개선의 여지를 나타냈음.

*\*위 실험과정 도중 본 실험실의 real-time PCR 장비 (Life technologies, ABI 7500)의 고장으로 인해, 아래부터는 새로 구입한 장비(Bio-rad, CFX-96)로 데이터 재구성하였음*



그림 4.22 새로 구비하여 이용한 CFX-96 real-time PCR

#### (다) 순수배양액에서의 추출법 비교 실험결과

- 본 실험결과, 전반적으로 핵산추출에 가장 큰 영향을 미치는 인자는 그람음성균의 경우 온도(boiling), 그람양성균(바실러스 제외)의 경우에는 추출 reagent의 성분으로 확인되었음.
- 바실러스의 경우 오히려 DW만으로 boiling하여 추출시 가장 효율이 높은 등의 살모넬라나 대장균에서의 결과와 일부 유사한 경향을 보였음.
- 리스테리아와 황색포도상구균의 경우 boiling 여부에 따른 추출효율의 차이가 없거나 크지 않아, 굳이 boiling 처리할 필요 없이 mPM 또는 PM으로 상온처리하여 추출하는 것이 가능할 것으로 판단된다.
- 또한 일부는 DW로 추출할 경우 효율이 오히려 더 높게 나타나 비용절감 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.
- 이러한 순수배양액에서의 결과는 실제 식품접종시 그 경향이 일부 달라질 수 있으므로, 식품접종 실험을 통해 다시 고찰할 필요가 있음.



- 살모넬라 (*Salmonella Enteritidis*)

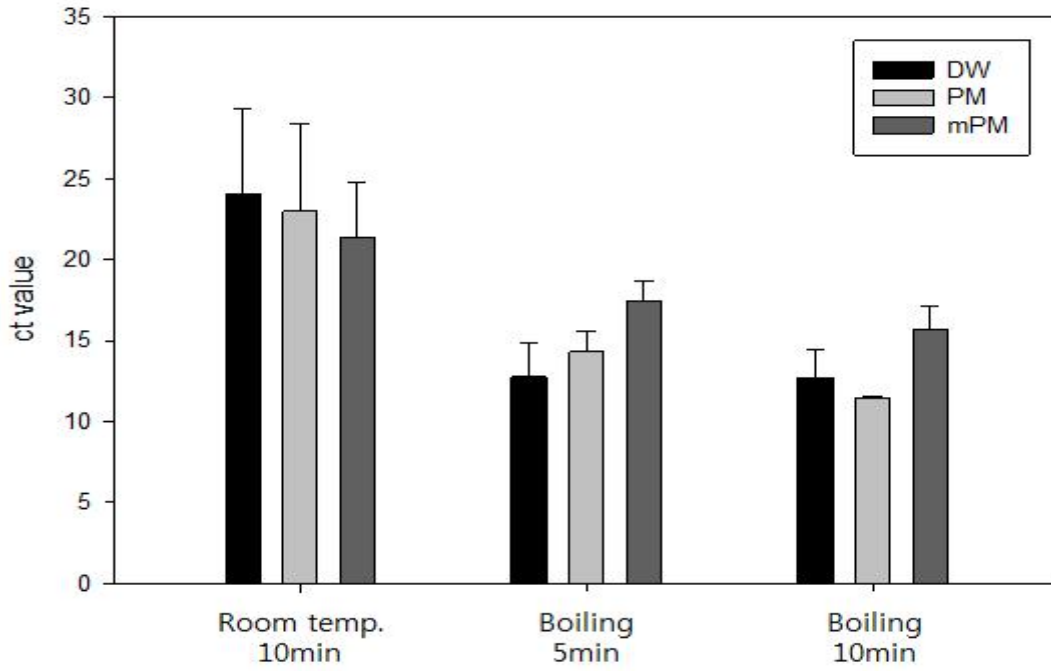


그림 4.23 순수배양액에서의 추출법 비교 실험결과: 살모넬라

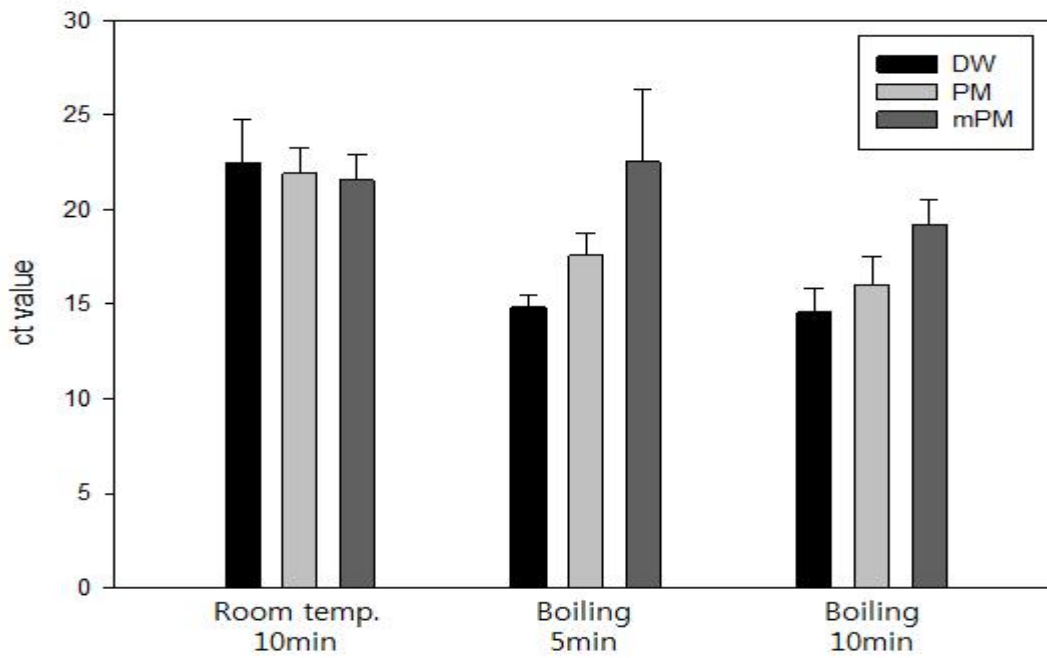


그림 4.24 순수배양액에서의 추출법 비교 실험결과: 병원성 대장균 (*E. coli* O157:H7)

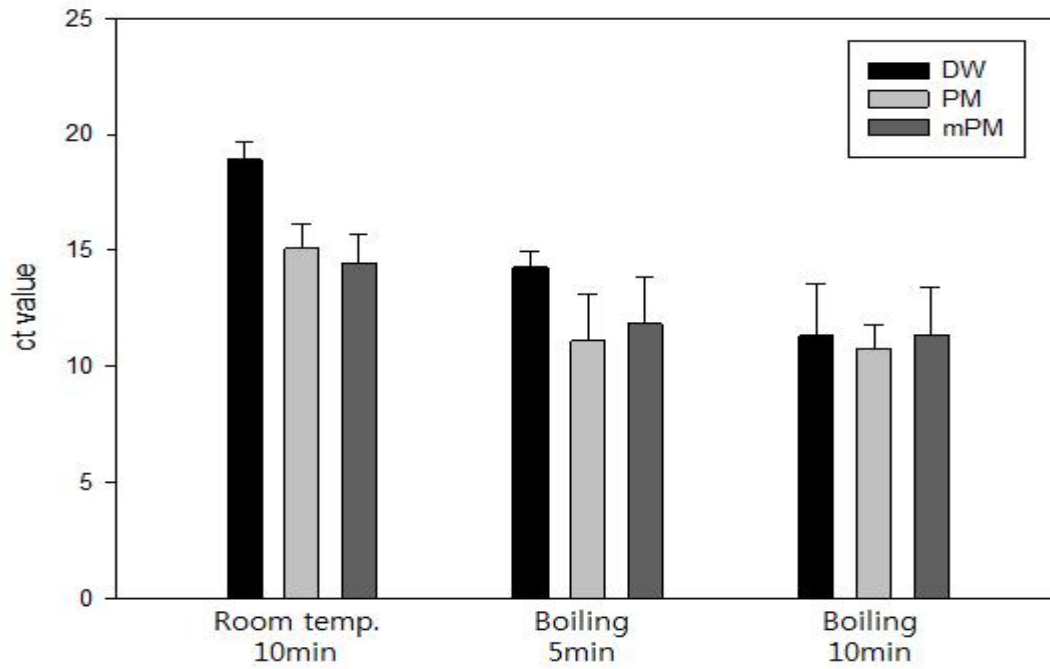


그림 4.25 순수배양액에서의 추출법 비교 실험결과: 세균성 이질 (*Shigella sonnei*)

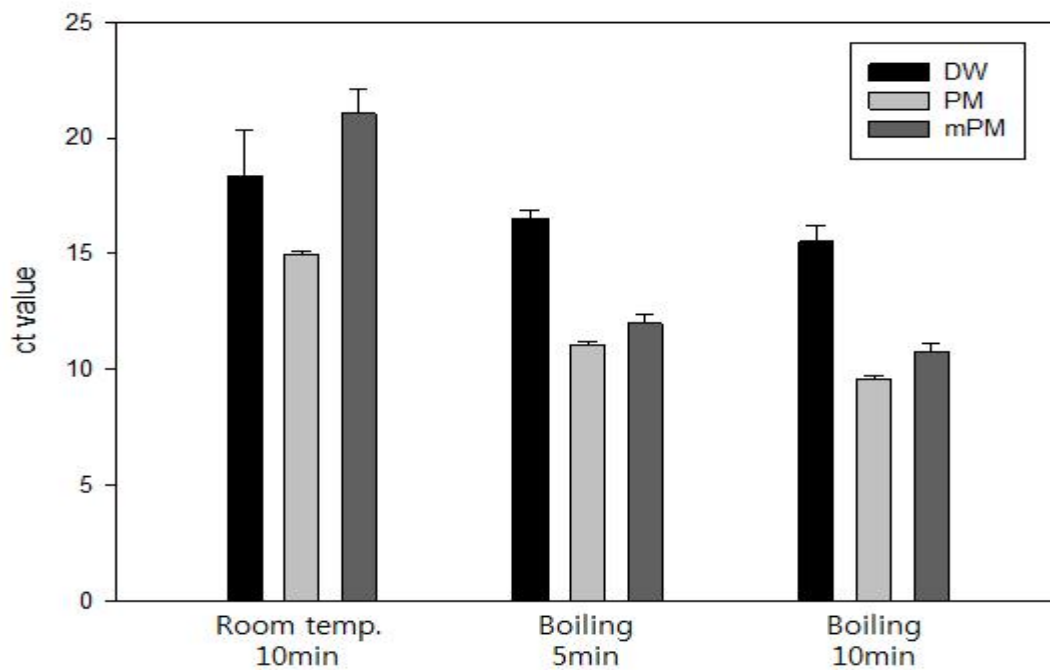


그림 4.26 순수배양액에서의 추출법 비교 실험결과: 캠필로박터 (*Campylobacter jejuni*)

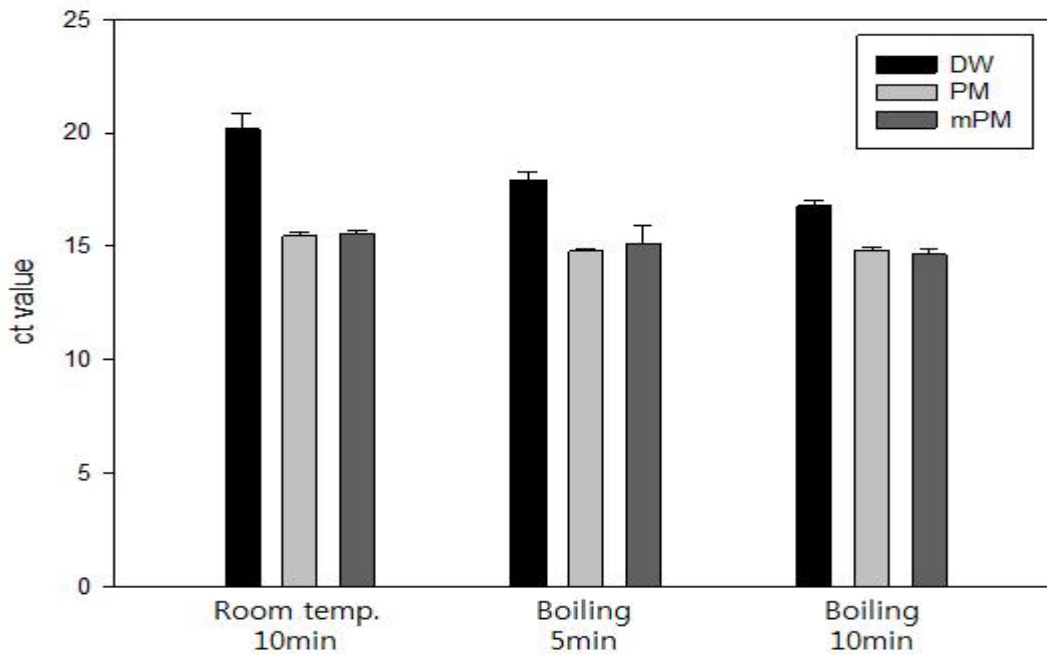


그림 4.27 순수배양액에서의 추출법 비교 실험결과: 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*)

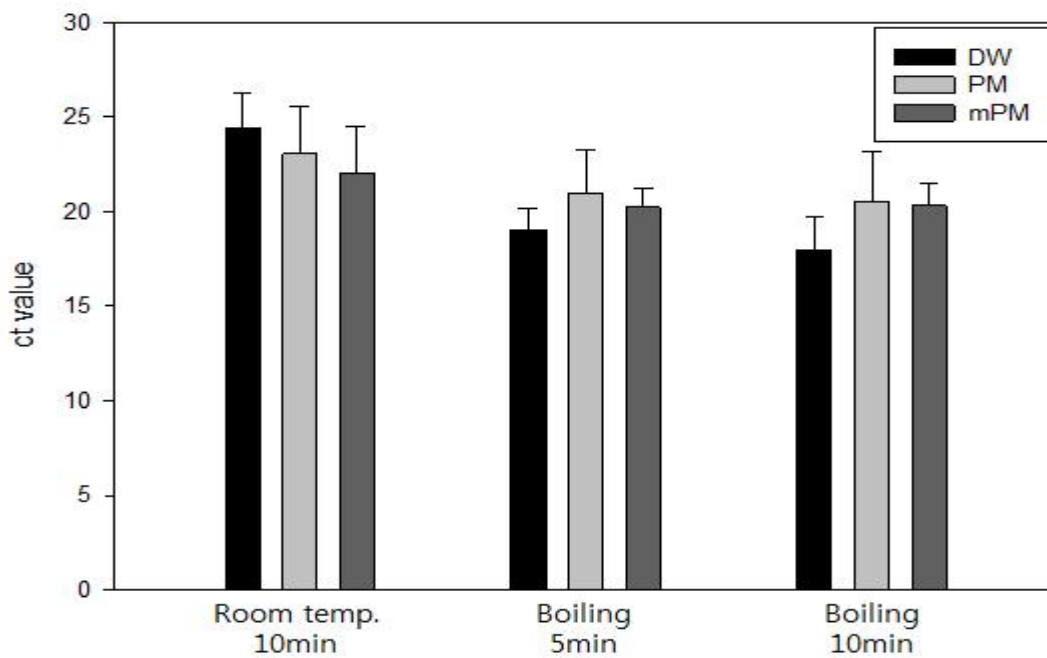


그림 4.28 순수배양액에서의 추출법 비교 실험결과: 바실러스 (*Bacillus cereus*)

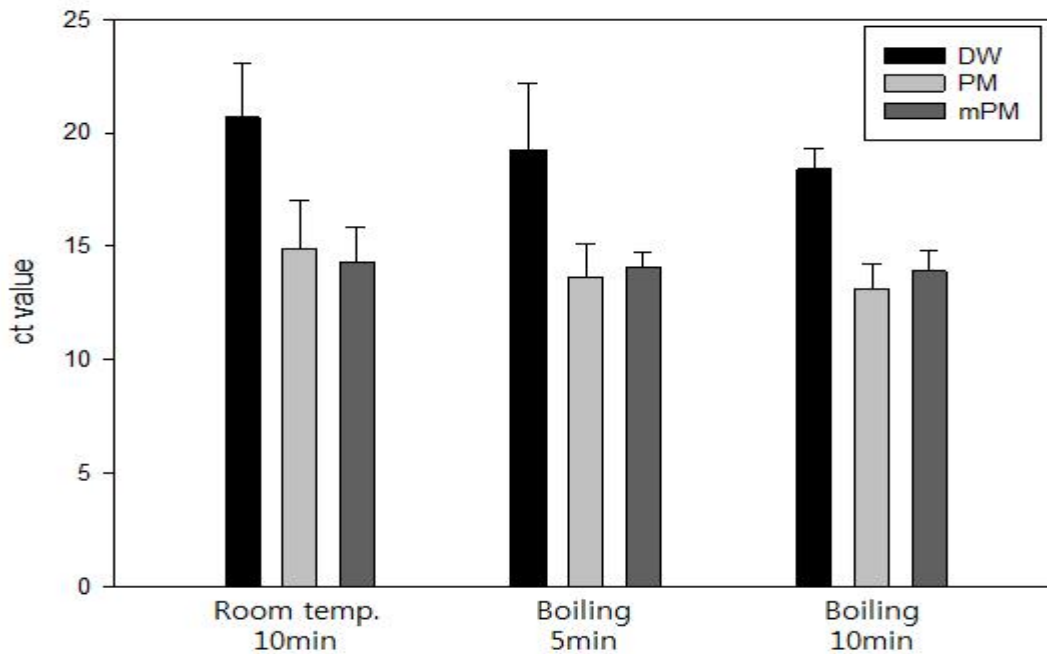


그림 4.29 순수배양액에서의 추출법 비교 실험결과: 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)

(라) 농산물(상추, 토마토)에서의 추출법 비교 실험결과

- 위 추출법들을 실제 농산물 증균액에서 평가하였으며 실험방법은 다음과 같음.
  - ① 다소비 농산물 상추, 토마토 25g씩 준비
  - ② 각 식중독세균 약 1log CFU를 각각의 농산물에 접종
  - ③ BPW 225ml 첨가
  - ④ 60초간 stomaching
  - ⑤ 37도 24시간 증균
  - ⑥ 위 1), 나)에 제시된 방법에 따라 핵산을 추출하고 real-time PCR을 통해 ct값 산출
- 본 실험결과, 전반적으로 순수배양액에서의 결과와 같이 온도(boiling)가 핵산추출효율에 가장 큰 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었음.
- 또한 전반적으로 boiling시 PM, mPM의 추출효율과 DW의 추출효율의 차가 크지 않아 실제 농산물에서 위 3종 식중독세균 검출시 별도의 추출 reagent의 구입은 불필요한 것으로 판단된다.
- PM은 본래 그람음성균을 타겟으로 개발된 reagent이나, 본 연구결과에서는 DW와 별 차이를 보이지 못했다.

○ 이는 PM이 지질 함량이 높은 식품의 PCR inhibitor를 불활화하는 역할로서 추출효율을 증대시키는데, 대부분의 유통농산물(과일, 채소)의 지질함량이 높지 않아 위 실험결과와 같은 데이터가 얻어진 것으로 판단된다.

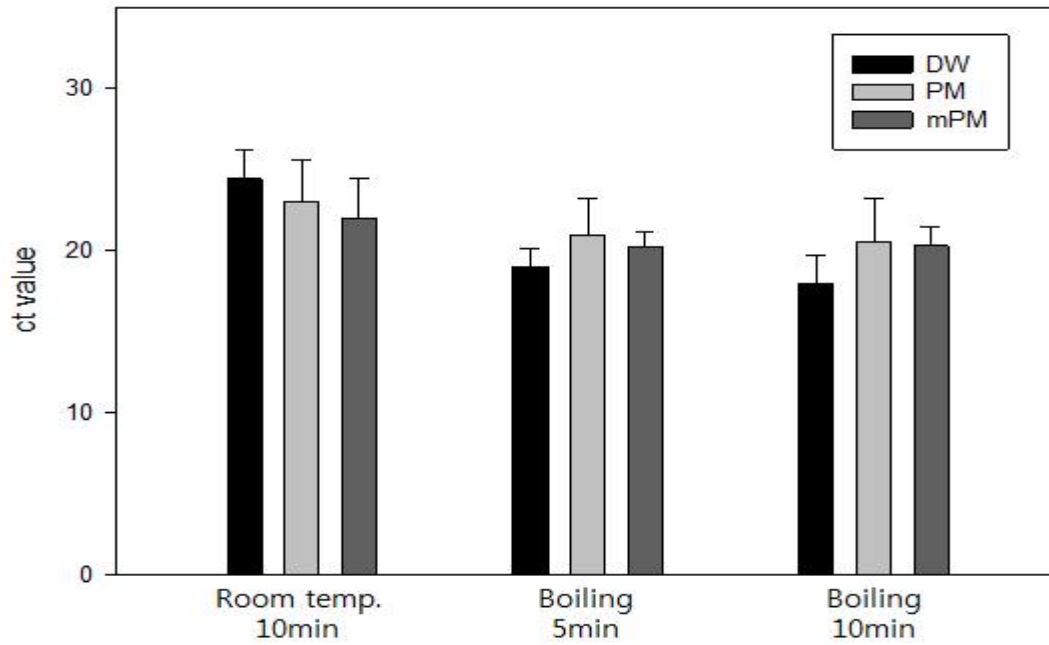


그림 4.30 살모넬라 (*Salmonella* Enteritidis): 상추

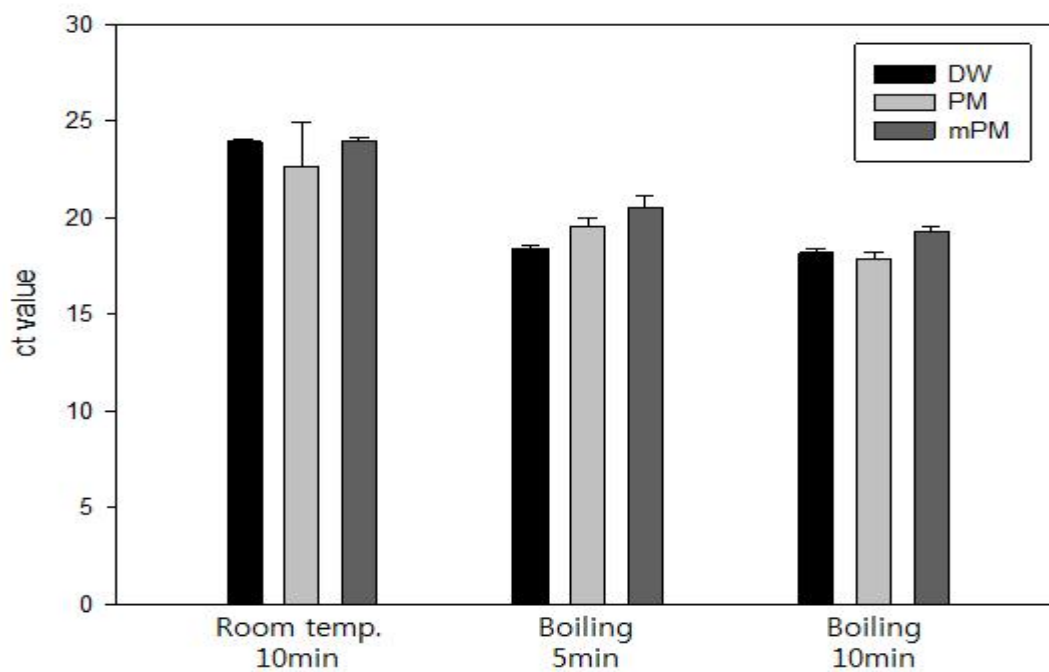


그림 4.31 살모넬라 (*Salmonella* Enteritidis): 토마토

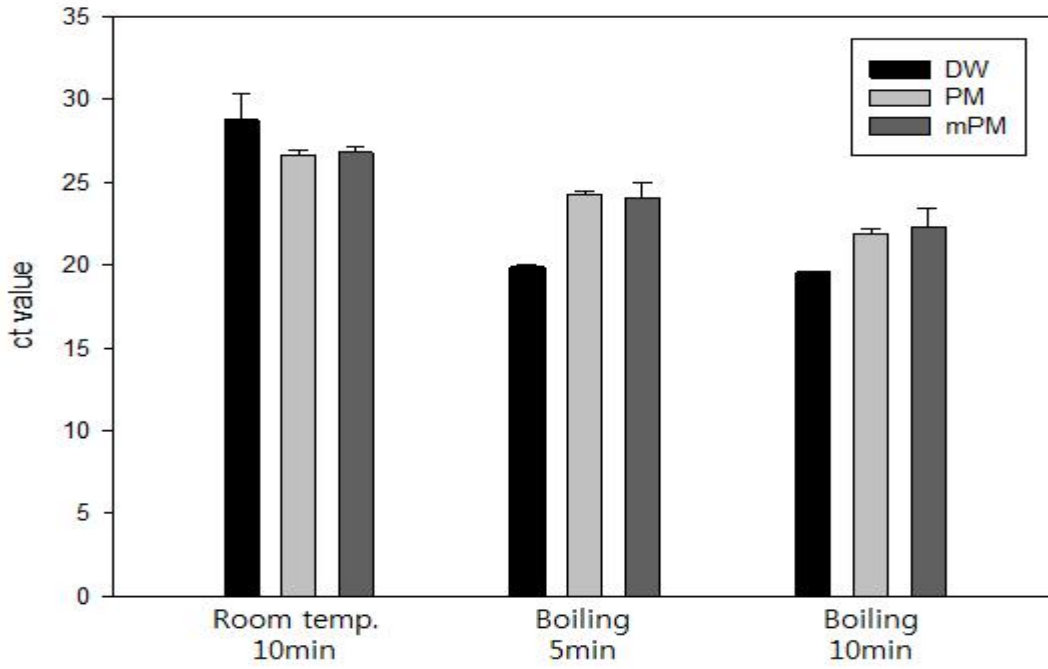


그림 4.32 병원성 대장균 (*E. coli* O157:H7) - 상추

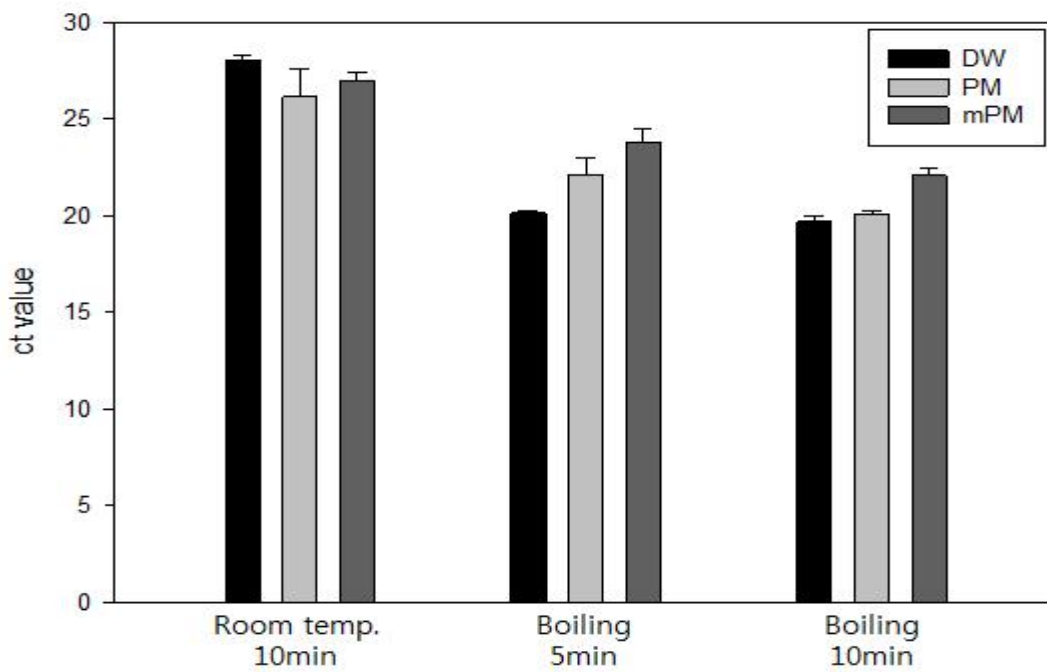


그림 4.33 병원성 대장균 (*E. coli* O157:H7) - 토마토

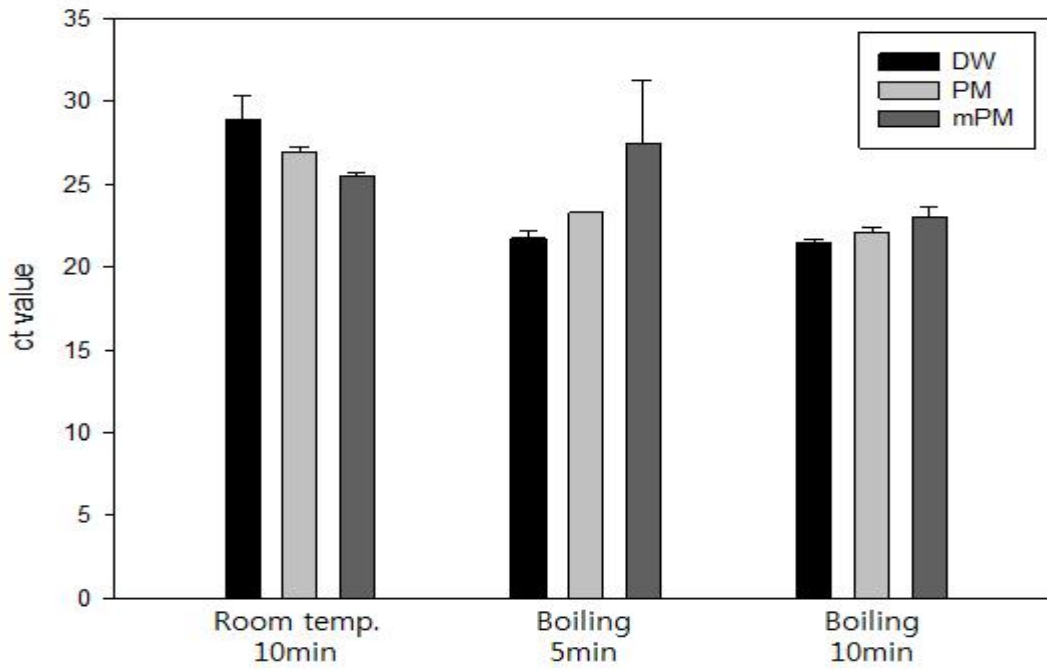


그림 4.34 세균성 이질 (*Shigella sonnei*) - 상추

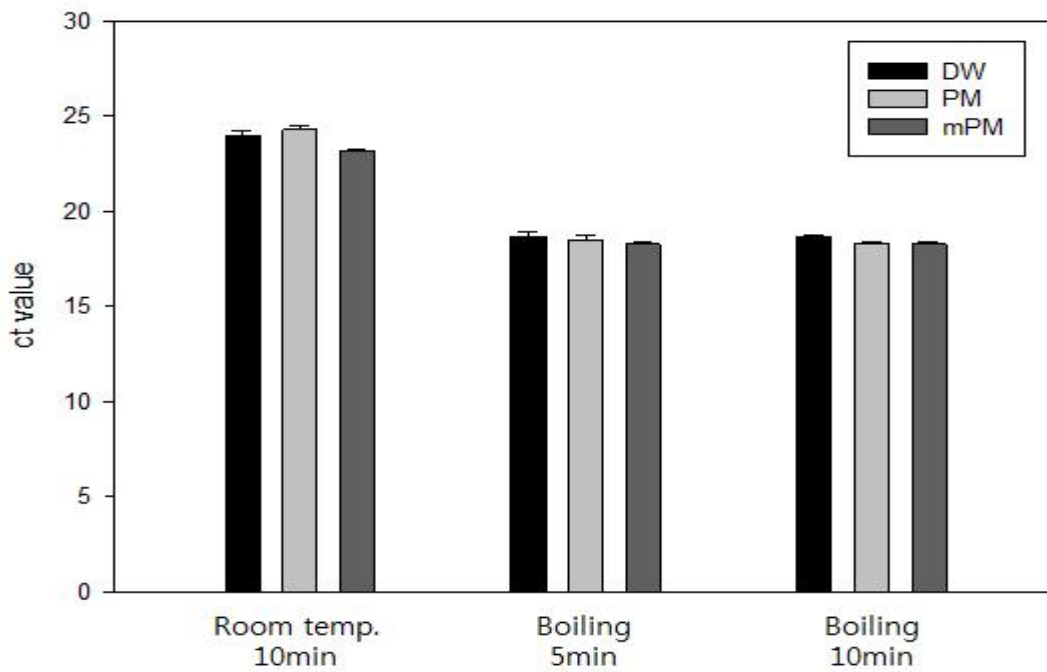


그림 4.35 세균성 이질 (*Shigella sonnei*) - 토마토

## <요약>

### 제4절 식중독 세균 고효율 DNA 추출 기술 개발

- 식중독 세균으로 인위접종한 농산물들(spiked food samples), 배추, 상추, 시금치, 콩나물 및 토마토에서 두 종류의 DNA 추출 키트(PrepMan kit와 DNeasy mericon Food Kit)를 성능을 비교하였고, 두 키트로 추출한 DNA에 대한 real-time PCR의 결과는 큰 차이가 없음을 보여주었음.
- 개량된 PrepMan 용액을 이용한 방법은 20분 이내 DNA 추출이 가능하므로 식중독 세균 신속진단 키트에 적용할 수 있음.
- 그람 음성균로 오염된 농산물 시료의 경우 증류수를 사용해서 핵산을 추출하더라도 충분히 적용이 가능한 것을 확인하여 검사비용을 낮추는데 도움이 될 것임.
- 그러나 PrepMan kit의 DNA 용액 순도는 상대적으로 낮으나 PCR을 위해서는 문제가 없음
- 결론적으로, 개발된 Prepman DNA 추출 키트를 사용하여 20분 이내 농산물 시료에 존재하는 세균의 유전체 DNA를 추출하여 신속진단 검출방법인 real-time PCR 에 적용할 수 있음.



## 제5절 식중독 세균 검출용 real-time PCR 개발, 농산물 적용 및 검출한계

### 1. 식중독 세균 검출을 위한 real-time PCR 개발 및 최적화

#### 가. 실험 방법 및 재료

- 세균의 배양: *B. cereus* (ATCC 25621), *L. monocytogenes* (ATCC 19116), *S. aureus* (ATCC 13565) 3종의 식중독 세균을 얻기 위해 TSB(Tryptone Soy Broth) 배지 9ml에 각각 0.1ml씩 각각 접종하고 18~24시간 동안 배양하였음.
- 시료 DNA의 준비: 샘플 DNA는 *B. cereus* (ATCC 25621), *L. monocytogenes* (ATCC 19116), *S. aureus* (ATCC 13565)에서 각각 분리·정제하였음. 시료 DNA의 농도는 nano-drop spectrophotometer를 사용하여 결정하였음.
- Real-time PCR 시약: 추출한 시료 DNA의 연속 10배 희석액, FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) reagent, FastStart Taq DNA Polymerase를 포함한 2x concentrated master mix, Reaction Buffer, Nucleotides (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), SYBR Green I, reference dye를 사용하여 수행하였음.
- PCR primers : 실험에 사용한 프라이머들은 표 5.1에 나타냄.
- Real-time PCR 기기: ABI StepOne™ Real-timePCR system (Applied Biosystems)의 방법을 사용했음.
- Real-time PCR 반응 설정: 95℃에서 10분 동안 그리고 95℃에서 15초, 60℃에서 1분씩 40 cycles 진행하였음. 차후에 Real-time PCR의 DNA 산물에 대한 melting curve의 분석을 위해 온도를 0.3℃/cycle씩 60℃부터 95℃까지 점진적으로 증가시켜 반응시켰음.
- Real-time PCR 결과 분석: StepOne™ software v2.2.2 (Applied Biosystems)를 통해서 염료의 검출을 가시화한 형광 신호의 증가를 확인할 수 있었음.
- Real-time PCR 한계주기(cycle threshold, Ct): Ct 값이란 각 증폭 곡선에서 정해진 한계를 넘어 첫 번째 형광의 증가가 일어나는 때의 PCR 주기 값임.
- 대조군: 목표 세균과 비목표 세균을 각각 양성 대조군 및 음성 대조군으로 각각의 세균으로부터 추출한 유전체 DNA를 각 프라이머의 특이성을 측정하기 위하여 사용하였음.
- 특이도 및 녹는점 곡선: 증폭 곡선 외에 Real-time PCR의 특이성은 PCR cycles이 완전히

끝난 후에 얻어진 PCR 생성물의 녹는점 곡선으로부터 계산된 녹는점(Tm)으로 평가됨.

- PCR 생성물들의 녹는점(Tm) 피크는 미세한 온도 변화에서 기인하는 첫번째 형광 신호에 기초하여 계산됨.

표 5.1 실험에 사용한 프라이머들 (Primes used for real-time PCR)

Bacteria (Target gene)	Oligonucleotide	Primers	Reference
<i>B. cereus</i> ( <i>gyrB</i> )	5'-CTG GTA TGT ATA TTG GAT CTA C-3'	Forward	Dzieciol et al.(2013)
	5'GGT CAT AAT AAC TTC TAC AGC AGG A-3'	Reverse	
<i>S. aureus</i> ( <i>nuc</i> )	5'-CAT CGG AAA CAT TGT GTT CTG TAT G-3'	Forward	Peters et al.(2007)
	5'-TTT GGC TGG AAA ATA TAA CTC TCG TA-3'	Reverse	
<i>L. monocytogenes</i> ( <i>hly</i> )	5'-CAT GGC ACC ACC AGC ATC T-3'	Forward	Rodríguez et al.(2004)
	5'-ATC CGC GTG TTT CTT TTC GA-3'	Reverse	

#### 나. *B. cereus* 검출을 위한 real-time PCR 개발 및 최적화

- *B. cereus* (ATCC 25621)와 다른 6종의 세균[*B. subtilis* (KCTC 3135), *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), *S. aureus* (ATCC 13565), *S. typhimurium* (ATCC 29629), *L. monocytogenes* (ATCC 19116), *C. perfringens* (NCCP 10347)]의 특이성을 분석하였음.
- real-time PCR 결과, *B. cereus*에서만 정확하게 PCR 산물이 증폭하였으나, 다른 세균들에서는 형광 신호가 없었음. 예외적으로 *L. monocytogenes*에서는 *B. cereus*(Ct 19.55)보다 상당히 낮은 형광신호(Ct 37.01)를 보였음.
- 양성대조군(*B. cereus*)에서 Tm의 피크값은 74.32°C인데 비하여, 음성대조군에서는 74.32°C에서 어떤 Tm값도 보이지 않았지만, *L. monocytogenes*에서만 Tm값이 74.85가 나왔음(그림 5.1).
- *B. cereus* 세포수를 정량하기 위하여, TSB에서 배양한 *B. cereus*에서 추출된 DNA를 여러 번 희석하여 표준곡선은 만들었음. 표준곡선의 직선부위는  $5.0 \times 10^7$  CFU/ml 부터  $5.0 \times 10^2$  CFU/ml까지로 10의 6승 범위에 해당함(그림 5.2).
- 선형회귀에 의해 계산된 직선은  $y = -3.6112x + 44.4457$ 의 값을 가졌고, 회귀계수의 제곱인  $R^2 = 0.9994$ 를 보였으며(그림 5.3), 반응효율( $E = 10^{-1/\text{slope} - 1}$ )은 89.2%였음.
- 위와 같은 조건으로  $R^2$ , E value 반응조건을 결정하였음.

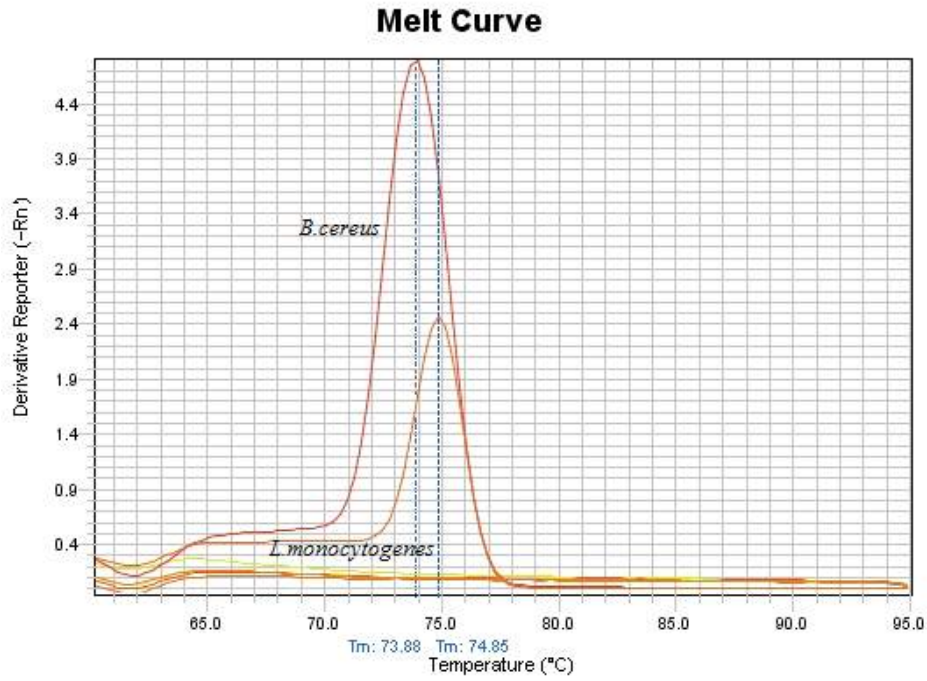


그림 5.1 Melting curve analysis of the amplification products of *B. cereus* specific gyrB gene in specificity test

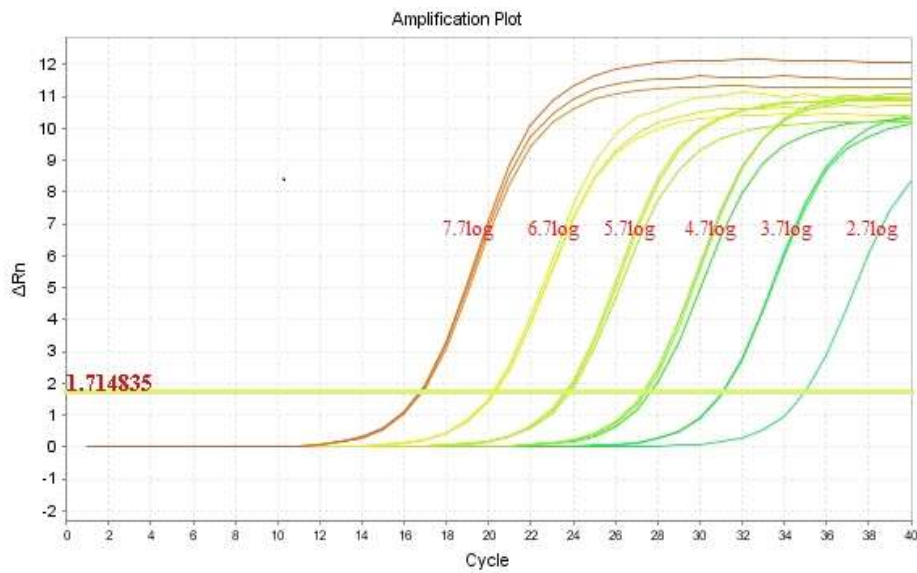


그림 5.2 Amplification curves of *B. cereus* with the real time PCR. Colony forming units of the amplification curves (from left to right) were  $5.0 \times 10^7$ ,  $5.0 \times 10^6$ ,  $5.0 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^4$ ,  $5.0 \times 10^3$ ,  $5.0 \times 10^2$  CFU/ml respectively

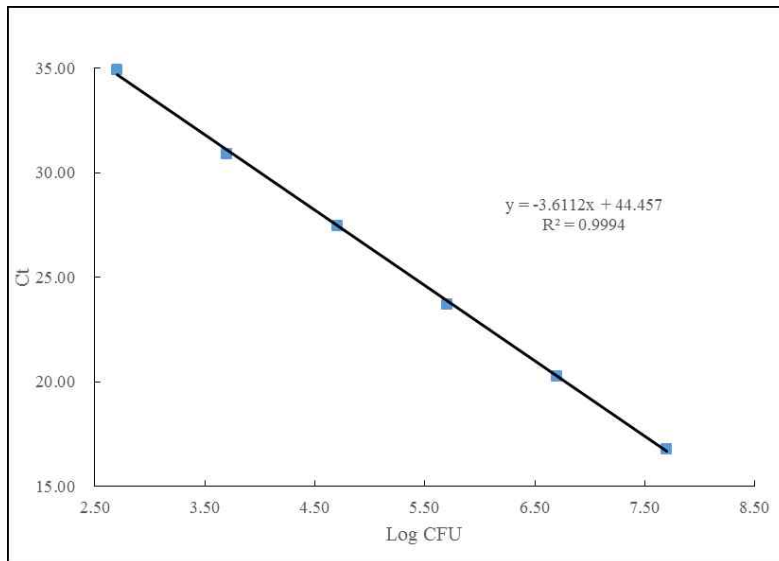


그림 5.3 Standard curve generated by real time PCR amplification of serial dilution of DNA isolated from *B. cereus*

#### 다. *S. aureus* 검출을 위한 real-time PCR 개발 및 최적화

- real-time PCR 실험을 위해 기본 방법 및 시약은 *B. cereus*와 동일함. real-time PCR 설정은 95°C에서 10분 동안 그리고 95°C에서 15초, 60°C에서 1분씩 40 cycles 진행하였음.
- species-specific Sa442 DNA 단편을 Real-time PCR에서의 *S. aureus* 검출을 위한 타겟 유전자로 선택하였음.
- *S. aureus*(ATCC 13565)와 다른 6종의 세균[E. coli O157:H7 (ATCC 43895), *B. cereus* (ATCC 25621), *S. typhimurium* (ATCC 29629), *L. monocytogenes* (ATCC 19116), *C. perfringens* (NCCP 10347), *C. jejuni* (ATCC 49943)]의 특이성을 분석하였음.
- *S. aureus*에서는 정확히 증폭하였고, 다른 비목표 세균들에서는 임계값보다 훨씬 낮은 형광 신호를 보였다. 그러나 *B. cereus*에서는 피크가 나타나는데, Ct값이 35.32로 *S. aureus*(Ct 17.92)에 비교하여 더 낮은 형광 신호를 보였음.
- 양성대조군(*S. aureus*)은 Tm 피크값이 73.28°C이고, 반면 음성대조군에서는 73.28°C에서 Tm 값이 없었음. 그러나 *B. cereus*에서는 Tm 값이 73.65로 나타났음(그림 5.4).
- *S. aureus*의 세포를 정량하기 위한 표준곡선의 직선부위는  $9.1 \times 10^7$  CFU/ml 부터  $9.1 \times 10^2$  CFU/ml까지로 10의 6승 범위에 해당함(그림 5.5).
- 선형회귀에 의해 계산된 직선은  $y = -3.3008x + 37.55$ 의 값을 가졌고, 회귀계수의 제곱인

$R^2=0.9993$ 를 보였으며, 반응효율( $E=10^{-1/\text{slope}-1}$ )은 100.9%였음. 위와 같은 조건으로  $R^2$ , E value 반응조건을 결정하였음.(그림 5.6).

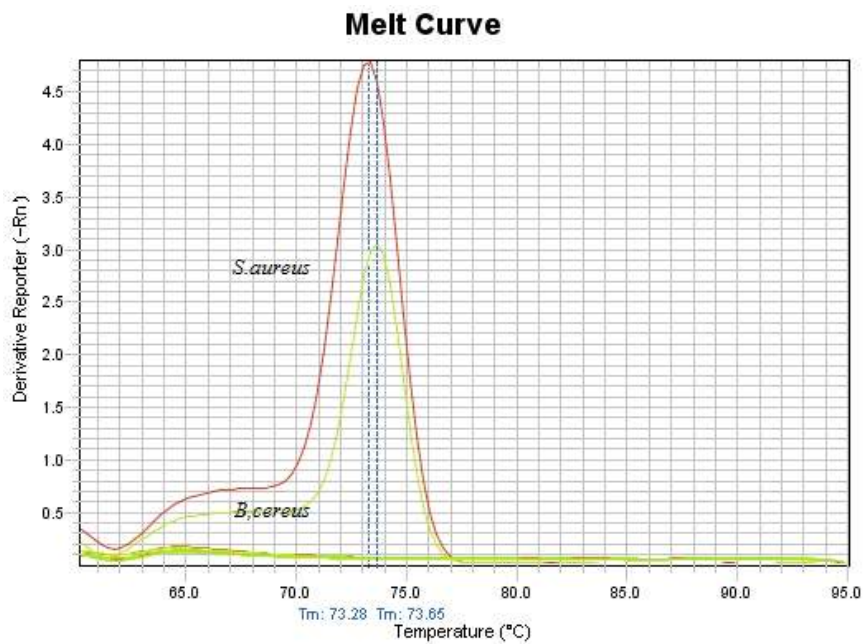


그림4.4 Melting curve analysis of the amplification products of *S. aureus* specific Sa442 DNA fragment in specificity test

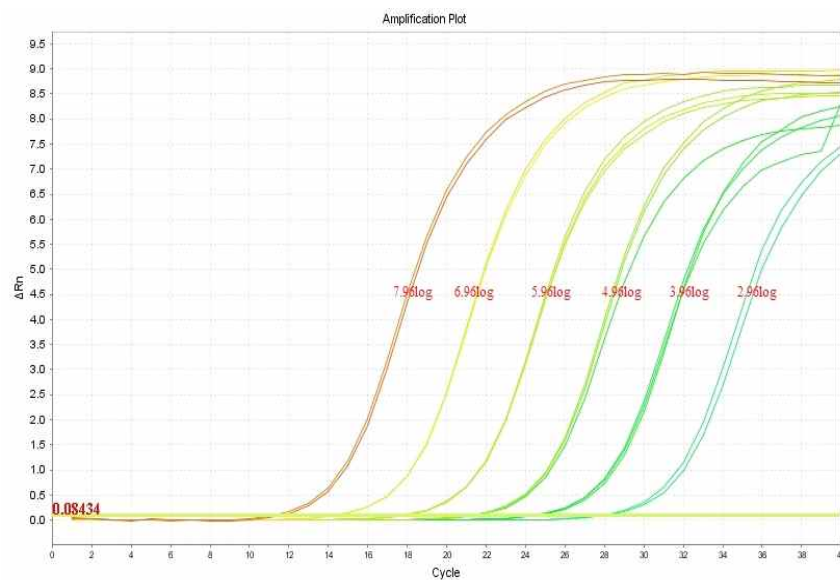


그림4.5 Amplification curves of *S. aureus* with the real time PCR. Colony forming units of the amplification curves (from left to right) were  $9.1 \times 10^7$ ,  $9.1 \times 10^6$ ,  $9.1 \times 10^5$ ,  $9.1 \times 10^4$ ,  $9.1 \times 10^3$ ,  $9.1 \times 10^2$  CFU/ml respectively.

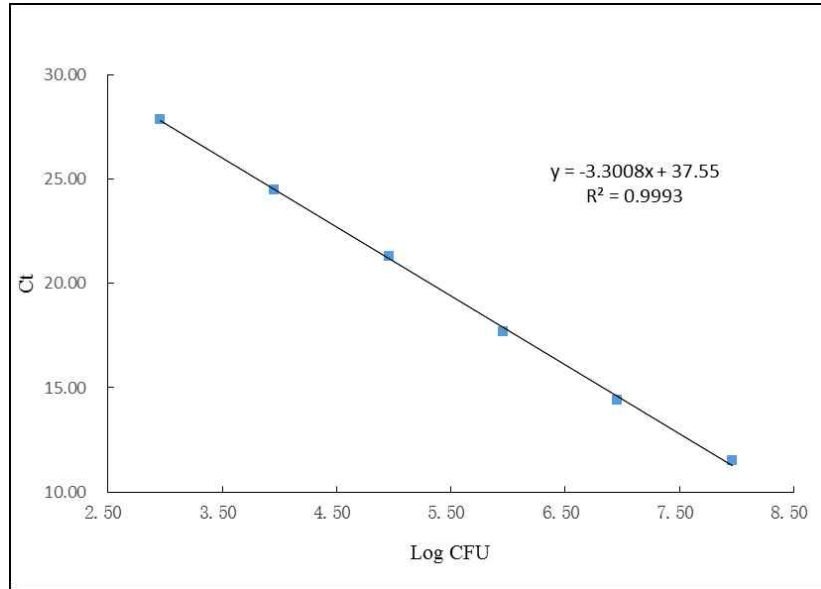


그림 5.6 Standard curve generated by real time PCR amplification of serial dilution of DNA isolated from *S. aureus*. ( $9.1 \times 10^7$ ,  $9.1 \times 10^6$ ,  $9.1 \times 10^5$ ,  $9.1 \times 10^4$ ,  $9.1 \times 10^3$ ,  $9.1 \times 10^2$  CFU/ml respectively.)

#### 라. *L. monocytogenes* 검출을 위한 real-time PCR 개발 및 최적화

- real-time PCR을 위해 사용된 시약과 반응물은 *B. cereus*의 경우와 동일함. real-time PCR 설정은 95°C에서 10분 동안 그리고 95°C에서 15초, 62°C에서 1분씩 40cycle 진행하였음.
- *L. monocytogenes* 검출을 위한 Real-time PCR의 타겟 유전자로 hly 유전자의 512bp 절편을 선택하였음.
- *L. monocytogenes* (ATCC 19116)와 다른 6종의 세균[E. coli O157:H7 (ATCC 43895), *B. cereus* (ATCC 25621), *S. Typhimurium* (ATCC 29629), *S. aureus* (ATCC 13565), *C. perfringens* (NCCP 10347), *C. jejuni* (ATCC 49943)]의 특이성을 분석하였음.
- *L. monocytogenes* 에서만 PCR이 증폭되었으며, Tm 피크값이 77.98°C인데 반하여, 음성대조군에서는 78.98°C에서 Tm값이 나타나지 않았음(그림 5.7).
- *L. monocytogenes*의 세포를 정량하기 위한 표준곡선의 직선부위는  $1.4 \times 10^7$  CFU/ml 부터  $1.4 \times 10^2$  CFU/ml까지로 10의 6승 범위에 해당함(그림 5.8).
- 선형회귀에 의해 계산된 직선은  $y = -3.6443x + 42.847$ 의 값을 가졌고,  $R^2=0.9942$ 를 보였음. 반응효율( $E=10^{-1/\text{slope}-1}$ )은 88.1%였음(그림 5.9). 위와 같은 조건으로  $R^2$ , E value 반응조건을 결정하였음.

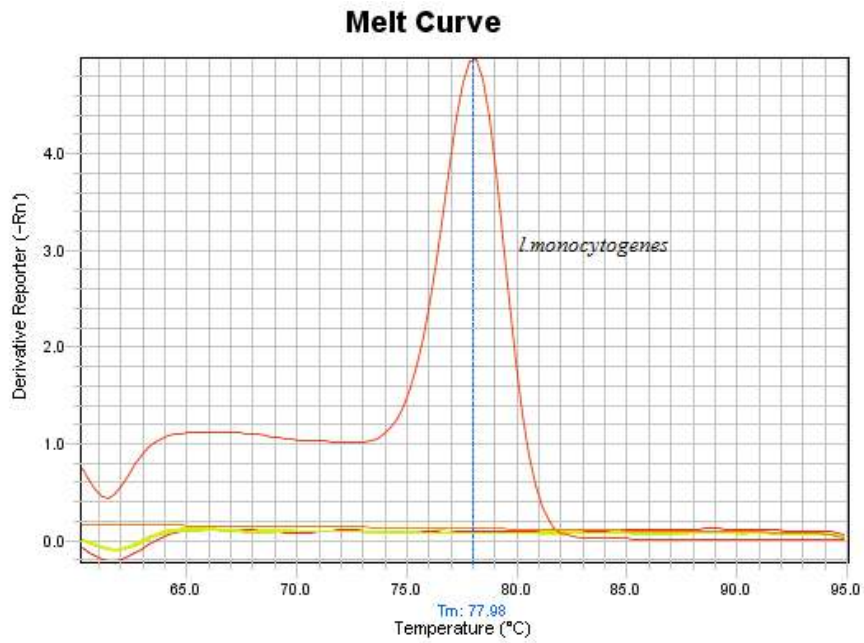


그림 5.7 Melting curve analysis of the amplification products of *L. monocytogenes* specific hly gene in specificity test.

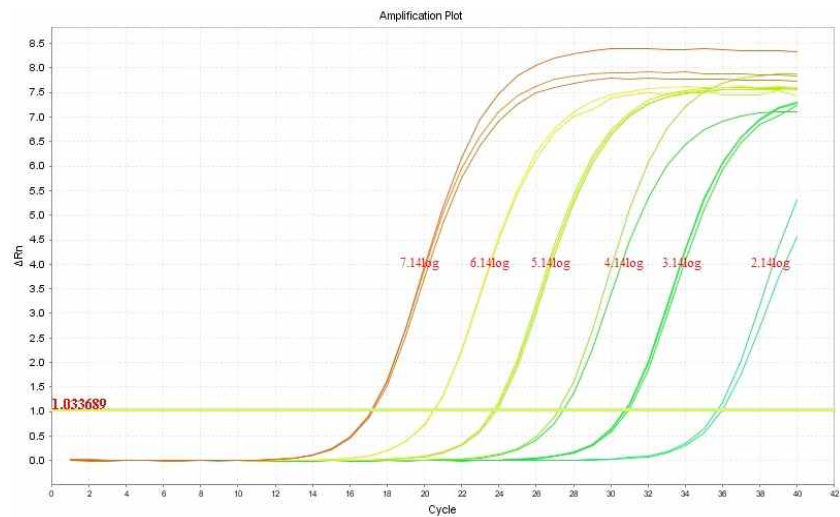


그림 5.8 Amplification curves of *L. monocytogenes* with the real time PCR. Colony forming units of the amplification curves (from left to right) were  $1.4 \times 10^7$ ,  $1.4 \times 10^6$ ,  $1.4 \times 10^5$ ,  $1.4 \times 10^4$ ,  $1.4 \times 10^3$ ,  $1.4 \times 10^2$  CFU/ml respectively.

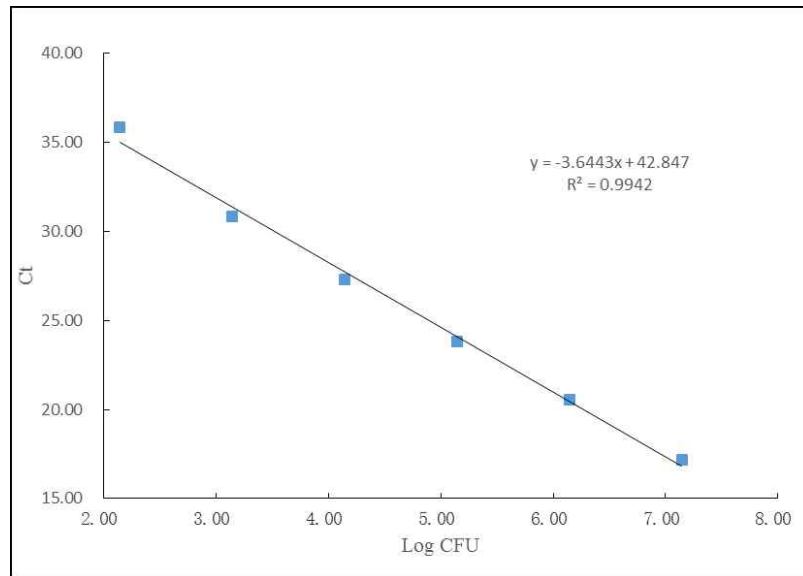


그림 5.9 Standard curve generated by real time PCR amplification of serial dilution of DNA isolated from *L.monocytogenes*.

### <결과 요약>

#### 식중독 세균 검출을 위한 real-time PCR 개발 및 최적화

- 본 실험결과, 개발된 *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* 검출을 위한 real-time PCR은 각 표적 세균에서만 양성이고 다른 대조군 세균들에서는 음성이었으므로 PCR의 특이성이 검증됨,
- 시료 DNA의 양, 즉 세균수에 비례하여 real-time PCR이 수행되었음.
- 본 real-time PCR의 결과, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* 의 최소량은 각각  $5.0 \times 10^2$ ,  $9.1 \times 10^2$ ,  $1.41 \times 10^2$  CFU/ml이었으며 이때의  $C_T$ 값은 각각 35, 28, 36이었음.
- 그러므로 각 균주 및 프라이머 등의 특성에 따라 차이는 있겠으나, real-time PCR 검출한계는  $10^2 - 10^3$  CFU/ml 정도일 것임.



## 2. 농산물에서 식중독균의 신속·정확한 검출을 위한 real-time PCR 적용

### 가. 농산물에서 *B. cereus* 검출을 위한 real-time PCR

#### (1) 농산물에서 *B. cereus* 검출을 위한 real-time PCR의 검출 한계

- 국내 유통중인 다소비 농산물 중 상추, 시금치, 콩나물을 시료로 사용하여 real-time PCR의 검출 한계와 현장 적용을 위한 최적화를 검증하였음.
- 3종의 식중독균을 하룻밤 배양한 후 일정 세균수를 세고, 이를 10배 연속 희석하고 농도별로 농산물에 인위 접종한 후 균질화하고 증균배양 전 및 후 일정량을 취하여 DNA를 추출한 후 real-time PCR을 수행하였음.
- 시료 준비 및 배양 방법을 보다 자세히 서술하면, 상추, 시금치, 콩나물은 소매상에서 구입하여 사용하였음. 먹을 수 없는 부위와 시든 부위 및 손상 부위는 제거하여 사용하였음.
- 각 시료 25 그램을 측정하여 4°C에 보관하고 24시간 이내 사용하였음.
- 각 시료는 크린룸에서 알루미늄 호일 위에 놓고, 각 세균의 연속 희석액 0.1 ml를 접종한 후 30분 동안 건조시켜서 세균의 부착을 유도하였음.(희석액은 멸균된 0.1% pepton water(PDW)이며, 희석액 0.1 ml 속의 세균 농도가 각각  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  cfu/ml임)
- 멸균 stomacher bag에 이들 세균을 접종한 각 시료를 넣은 후, 멸균 0.1% buffered peptone water, 또는 각각의 세균에 대한 enrichment media를 225 ml을 넣고 stomacher를 사용하여 2분간 섞어줌.
- 그 후, 각 실험에 따라 각 시료 혼합액 1 ml을 꺼내어 DNA 추출에 사용하였음.
- 또는 각 실험에 따라 4시간 및 6시간 enrichment 배양을 한 후 1 ml을 꺼내어 DNA 추출하고 real-time PCR에 사용함
- 각 시료의 DNA 추출은 modified PrepMan kit 방법을 사용하였으며 최종 DNA 추출액은 50  $\mu$ l이었으며 각 real-time PCR mixture를 위해 최종 사용한 DNA 시료량은 2  $\mu$ l를 사용하였음(반응액 총부피: 20  $\mu$ l reaction).
- real-time PCR에서 반응 곡선이 양성반응을 보이는 경우 CT값 및 TM 값을 구하여 비교하였음(그림 5.1, 5.2, 5.3 및 표 5.1).
- real time PCR 결과, DNA의 Tm 값은 74.42 to 75.02°C이였으며, 각 시료에서의 민감도(sensitivity)는 다음과 같았음: inoculated food samples, 상추에서는  $1.6 \times 10^4$  CFU/g, 시금치와 콩나물에서는  $1.6 \times 10^3$  CFU/g sample.

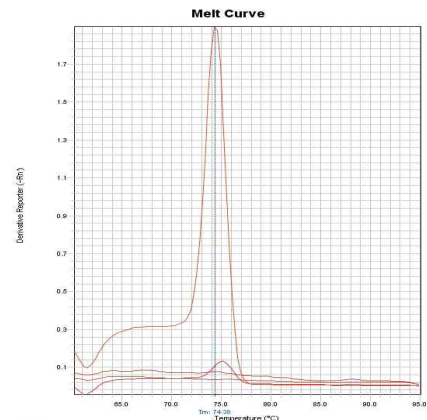
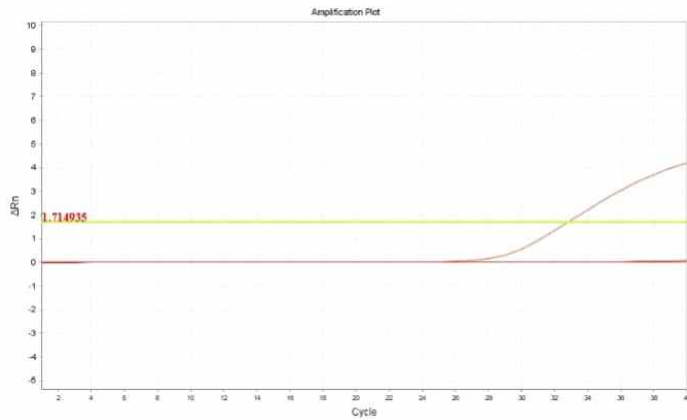


그림 5.1 Amplification plot and melt curve for *B. cereus* in lettuce. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $1.6 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

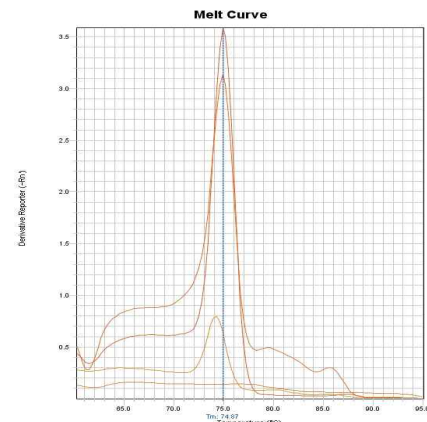
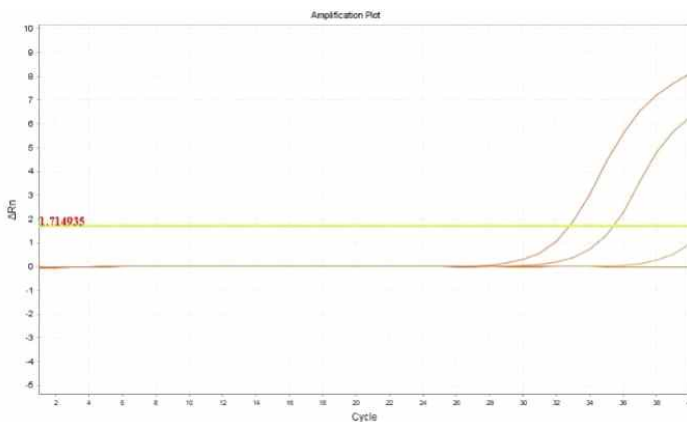


그림 5.2 Amplification plot and melt curve for *B. cereus* in spinach. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $1.6 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

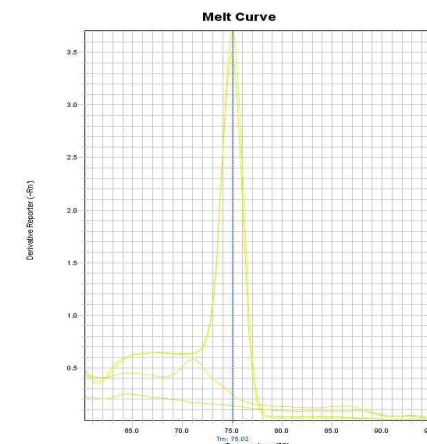
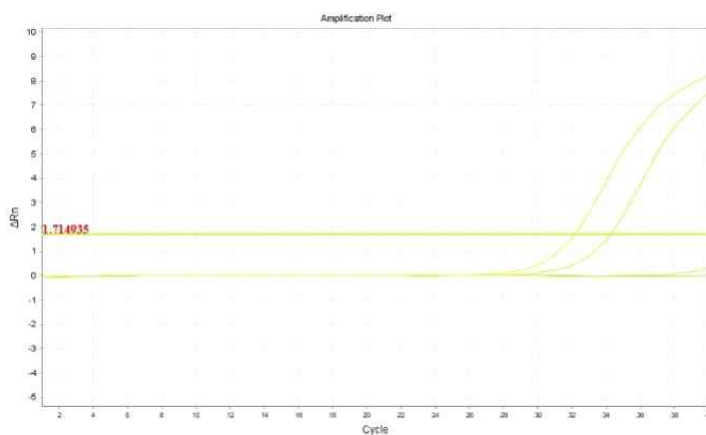


그림 5.3 Amplification plot and melt curve for *B. cereus* in sprout. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $1.6 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

표 5.1 real-time PCR with gyrB primers for <i>B. cereus</i>			
Samples	cfu/g sample	Ct	Tm (°C)
Lettuce	1.6x10 <sup>4</sup>	32.84	74.42
	1.6x10 <sup>3</sup>	-	-
	1.6x10 <sup>2</sup>	-	-
	1.6x10 <sup>1</sup>	-	-
Spinach	1.6x10 <sup>4</sup>	32.80	74.87
	1.6x10 <sup>3</sup>	35.37	74.87
	1.6x10 <sup>2</sup>	-	-
	1.6x10 <sup>1</sup>	-	-
Sprout	1.6x10 <sup>4</sup>	32.15	75.02
	1.6x10 <sup>3</sup>	34.22	74.87
	1.6x10 <sup>2</sup>	-	-
	1.6x10 <sup>1</sup>	-	-

(2) 농산물에서 *B. cereus* 검출을 위하여 면역자기분리법을 적용한 경우의 real-time PCR의 검출 한계

- 면역자기분리법(IMS)을 이용하여 농산물 속의 세균을 농축하고 DNA를 추출한 후, real-time PCR을 수행하여 검출한계를 측정하였음(그림 5.4, 4.5, 4.6 및 표 5.2)
- 기본적인 실험 방법은 4.1.1과 동일함.
- IMS를 위하여, stomacher에서 혼합한 시료액 1ml을 취하여 IMB-Ab를 넣어 반응시킨 후, 최종 IMB-Ab-bacteria의 농축액-상등액 100 µl DNA 추출에 사용하였음.
- real time PCR 결과, DNA의 Tm 값은 74.42 to 75.17°C이었으며, 각 시료에서의 민감도 (sensitivity)는 다음과 같았음:
- 상추에서는 IMS 처리 후 1.6x10<sup>2</sup> cfu/g에서 Ct 값이 33.16 이었음. IMS 없는 경우 1.6x10<sup>4</sup> cfu/g에서 32.84이었음.
- 시금치와 콩나물의 경우 둘 다 1.6x10<sup>2</sup> cfu/g에서 양성으로 IMS 처리 전과 후의 차이가 없었음.

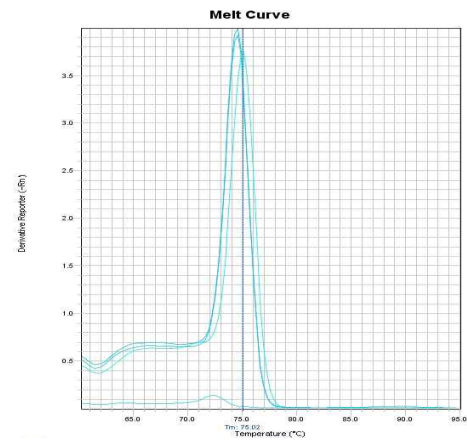
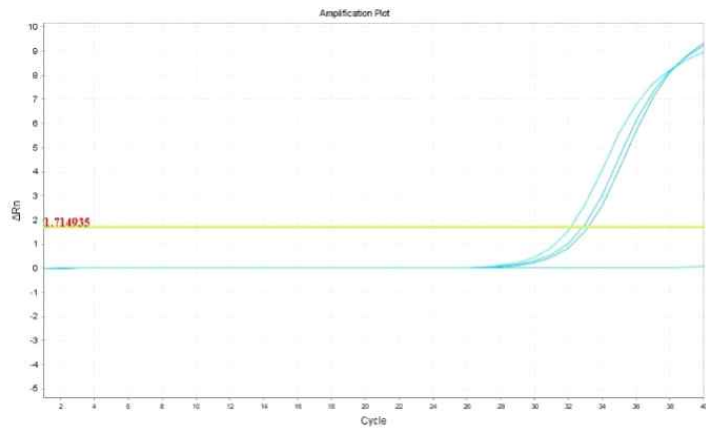


그림 5.4 Amplification plot and melt curve for *B. cereus* in lettuce with IMS. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $1.6 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

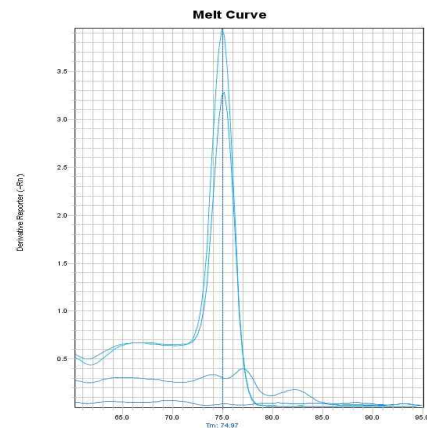
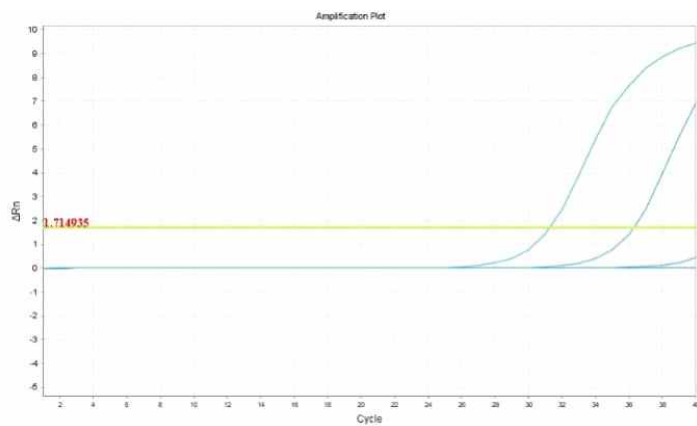


그림 5.5 Amplification plot and melt curve for *B. cereus* in spinach with IMS. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $1.6 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

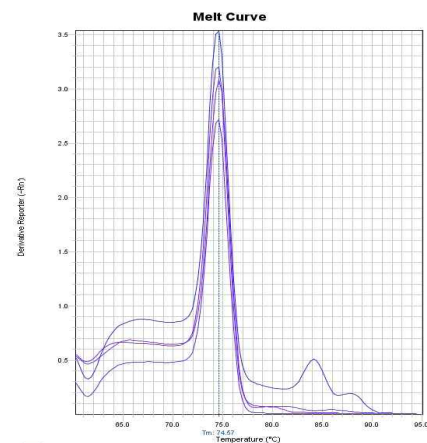
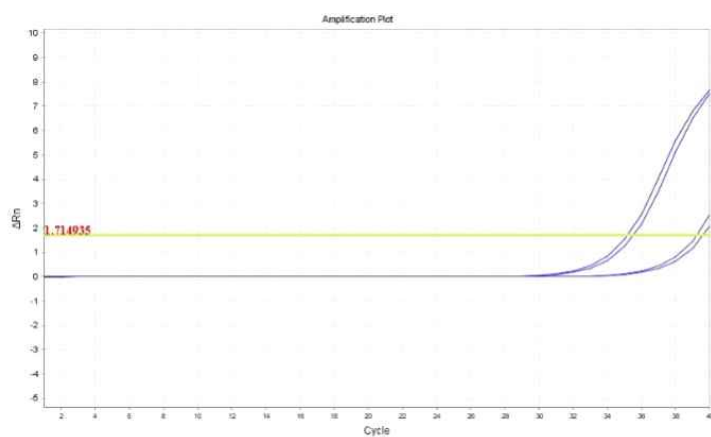


그림 5.6 Amplification plot and melt curve for *B. cereus* in sprout with IMS. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $1.6 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

Samples	cfu/g	Ct	Tm (°C)
Lettuce	$1.6 \times 10^4$	32.11	75.02
	$1.6 \times 10^3$	32.86	74.87
	$1.6 \times 10^2$	33.16	74.42
	$1.6 \times 10^1$	-	-
Spinach	$1.6 \times 10^4$	31.27	75.02
	$1.6 \times 10^3$	36.26	75.02
	$1.6 \times 10^2$		-
	$1.6 \times 10^1$		-
Sprout	$1.6 \times 10^4$	35.16	75.17
	$1.6 \times 10^3$	35.53	74.42
	$1.6 \times 10^2$	39.61	74.57
	$1.6 \times 10^1$	39.24	75.17

(3) 농산물에서 *B. cereus* 검출을 위하여 증균배양(enrichment)을 한 경우의 real-time PCR의 검출 한계

○ 농산물 시료에 목표세균을 일정량 접종하고 증균배양을 한 경우의 real-time PCR의 검출한계를 측정하였음(그림 5.7, 4.8, 4.9 및 표 5.3)

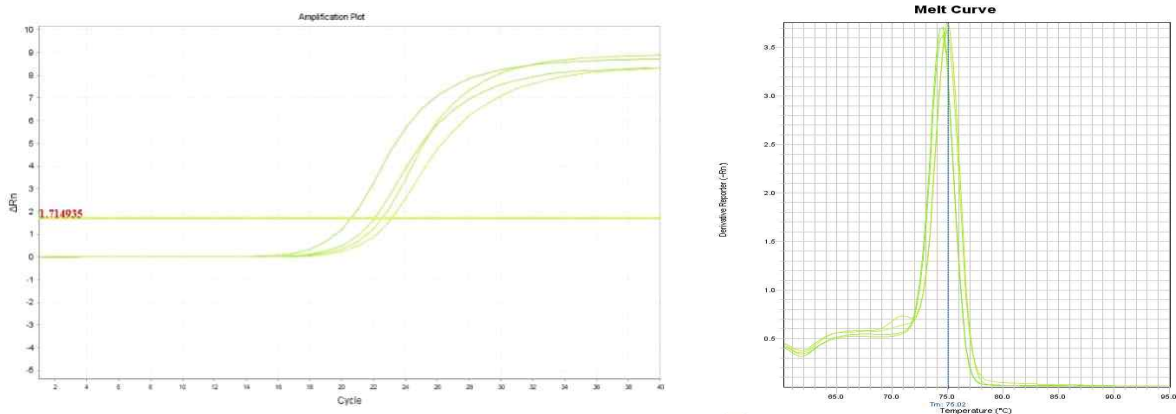


그림 5.7 Amplification plot and melt curve for *B. cereus* in lettuce after enrichment. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $1.6 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

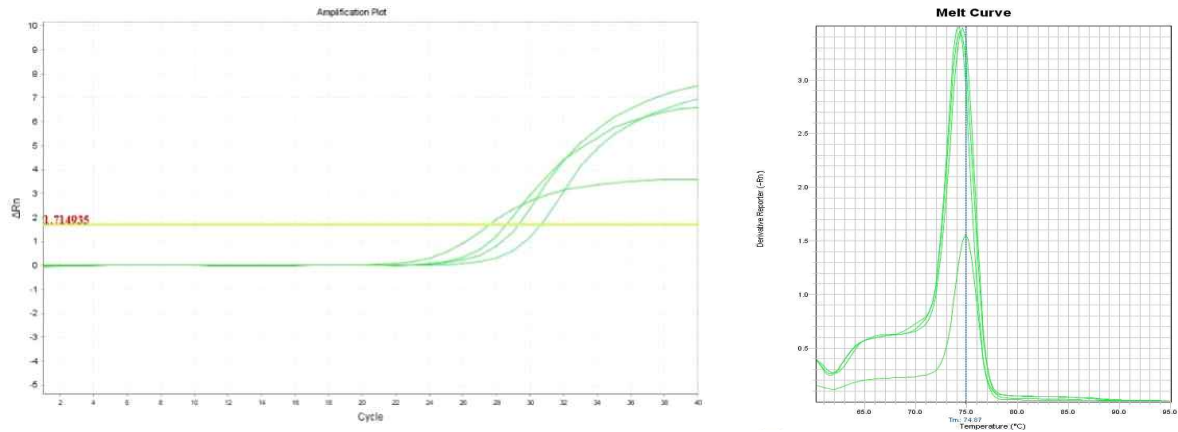


그림 5.8 Amplification plot and melt curve for *B. cereus* in spinach after enrichment. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $1.6 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

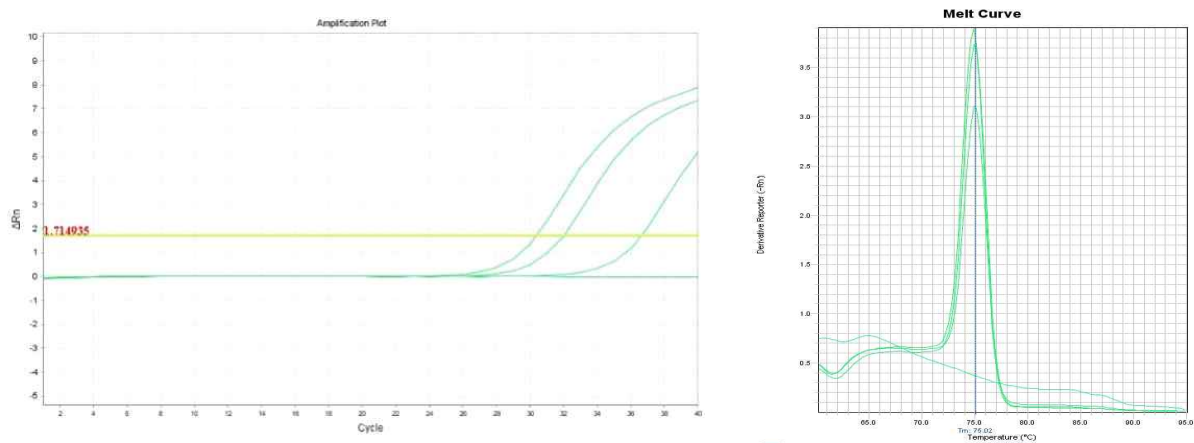


그림 5.9 Amplification plot and melt curve for *B. cereus* in sprout after enrichment. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $1.6 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

표 5.3. results of real-time PCR for <i>B. cereus</i> after enrichment			
Samples	cfu/g	Ct	Tm (°C)
Lettuce	$1.6 \times 10^4$	20.59	74.87
	$1.6 \times 10^3$	22.01	75.02
	$1.6 \times 10^2$	22.53	74.42
	$1.6 \times 10^1$	23.10	74.42
Spinach	$1.6 \times 10^4$	27.63	74.87
	$1.6 \times 10^3$	28.58	74.27
	$1.6 \times 10^2$	29.26	74.57
	$1.6 \times 10^1$	30.65	74.12
Sprout	$1.6 \times 10^4$	30.38	74.87
	$1.6 \times 10^3$	31.98	75.02
	$1.6 \times 10^2$	36.64	75.02
	$1.6 \times 10^1$	-	-

## 나. 농산물에서 *L. monocytogenes* 검출을 위한 real-time PCR

### (1) 농산물에서 *L. monocytogenes* 검출을 위한 real-time PCR의 검출 한계

- 기본적인 실험 방법 및 조건은 *B. cereus*의 경우와 동일함.
- *L. monocytogenes*를 위한 선택배지, 접종 세균수, PCR primers, 등만 다름.
- *L. monocytogenes*을 하룻밤 배양한 후 일정 세균수를 세고, 이를 10배 연속 희석하고 농도 별로 농산물에 인위 접종한 후 균질화하고 증균배양 전 및 후 일정량을 취하여 DNA를 추출한 후 real-time PCR을 수행하였음(그림 5.10, 5.11, 5.12 및 표 5.4)
- *L. monocytogenes* 검출을 위하여 real-time PCR의 검출 한계는 상추, 시금치, 콩나물에 대하여 각각  $9.0 \times 10^4$ ,  $9.0 \times 10^2$ , 및  $9.0 \times 10^1$  cfu/g 시료였음.
- real time PCR 결과, DNA의 Tm 값은 77.07~ 77.92°C이였음.

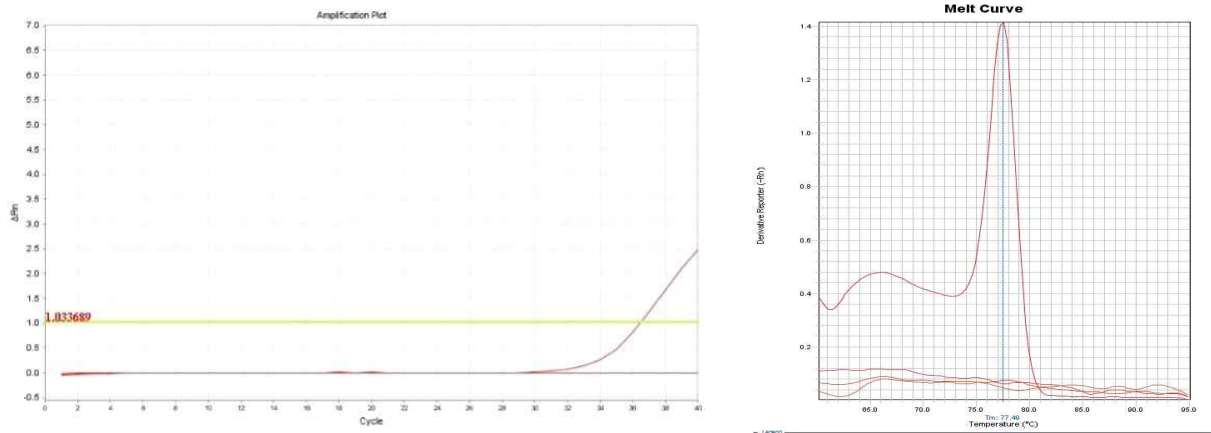


그림 5.10 Amplification plot and melt curve for *L. monocytogenes* in lettuce. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $9.0 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

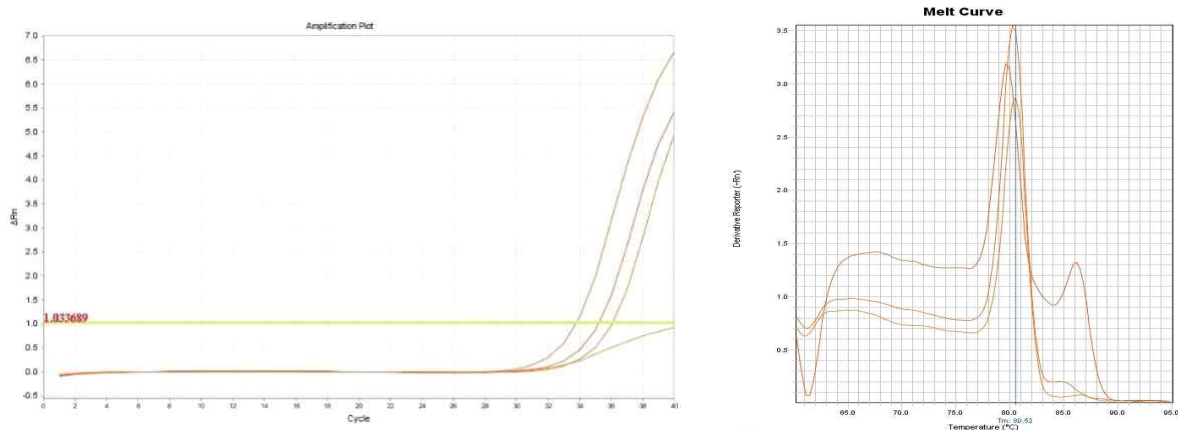


그림 5.11 Amplification plot and melt curve for *L. monocytogenes* in spinach. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $9.0 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

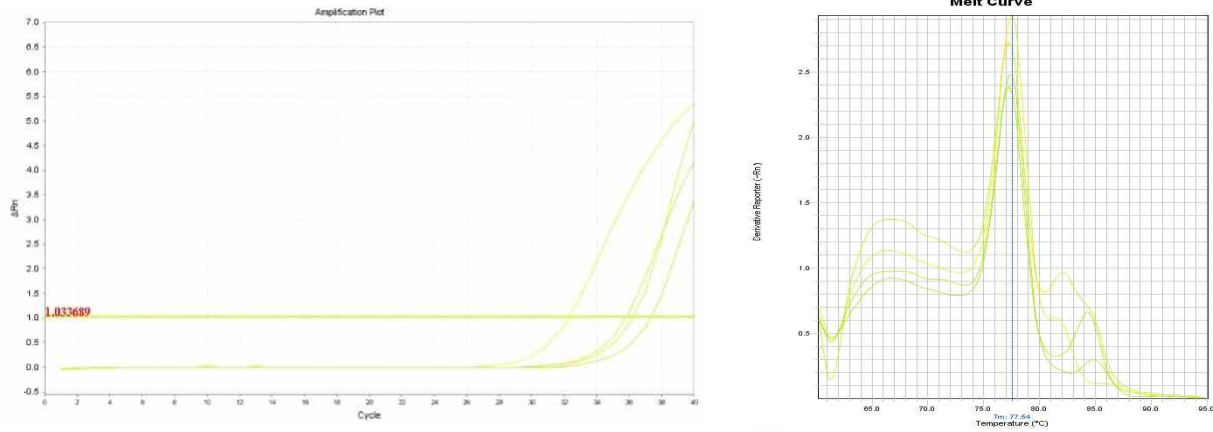


그림 5.12 Amplification plot and melt curve for *L. monocytogenes* in sprout. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $9.0 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

표 5.4 results of real-time PCR with hly primers for *L. monocytogenes*

Samples	cfu/g	Ct	Tm (°C)
Lettuce	$9.0 \times 10^4$	36.53	77.39
	$9.0 \times 10^3$	-	-
	$9.0 \times 10^2$	-	-
	$9.0 \times 10^1$	-	-
Spinach	$9.0 \times 10^4$	33.83	77.99
	$9.0 \times 10^3$	35.21	77.39
	$9.0 \times 10^2$	36.04	77.39
	$9.0 \times 10^1$	-	-
Sprout	$9.0 \times 10^4$	32.32	77.39
	$9.0 \times 10^3$	35.83	77.54
	$9.0 \times 10^2$	36.23	77.24/77.54
	$9.0 \times 10^1$	37.31	77.24



(2) 농산물에서 *L. monocytogenes* 검출을 위하여 면역자기분리법을 적용한 경우의 real-time PCR의 검출 한계

○ 면역자기분리법(IMS)을 이용하여 농산물 속의 세균을 농축한 후 DNA를 추출한 후, real-time PCR을 수행하여 검출한계를 측정하였음(그림 5.13, 5.14, 5.15 및 표 5.5)

○ real time PCR 결과, DNA의 Tm 값은 77.24에서 77.99°C이였음.

○ *L. monocytogenes* 검출을 위한 IMS 후 real-time PCR의 검출 한계는 상추, 시금치, 콩나물에 대하여 각각 ( $9.0 \times 10^2$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively). CFU/g 시료였음

○ 세균을 농축하기 위하여 IMS를 수행한 실험의 검출한계가 IMS를 수행하지 않은 경우 보다 더 낮았음.

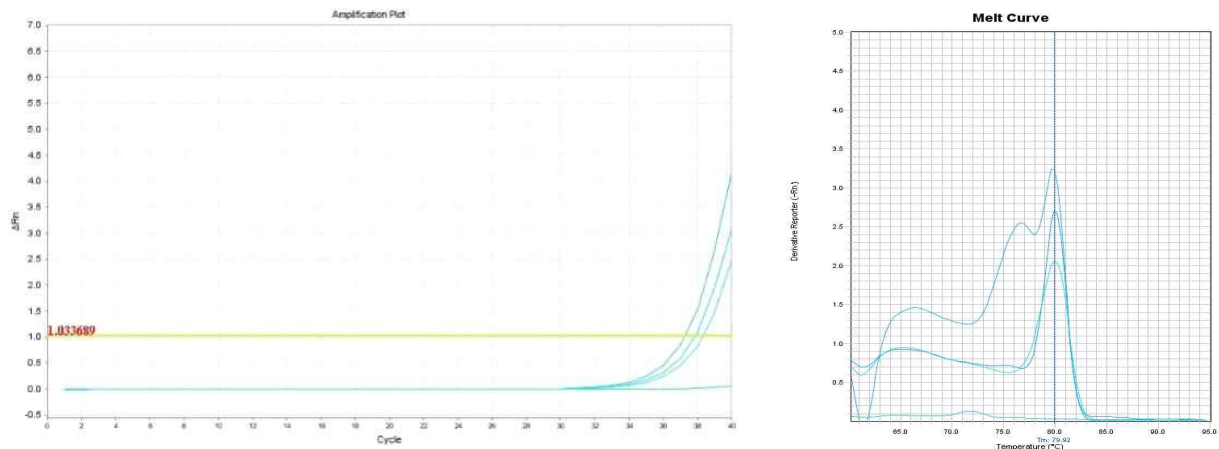


그림 5.13 Amplification plot and melt curve for *L. monocytogenes* in lettuce with IMS. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $9.0 \times 10^4$ ,  $9.0 \times 10^3$ ,  $9.0 \times 10^2$ , and  $9.0 \times 10^1$  cfu/g samples, respectively).

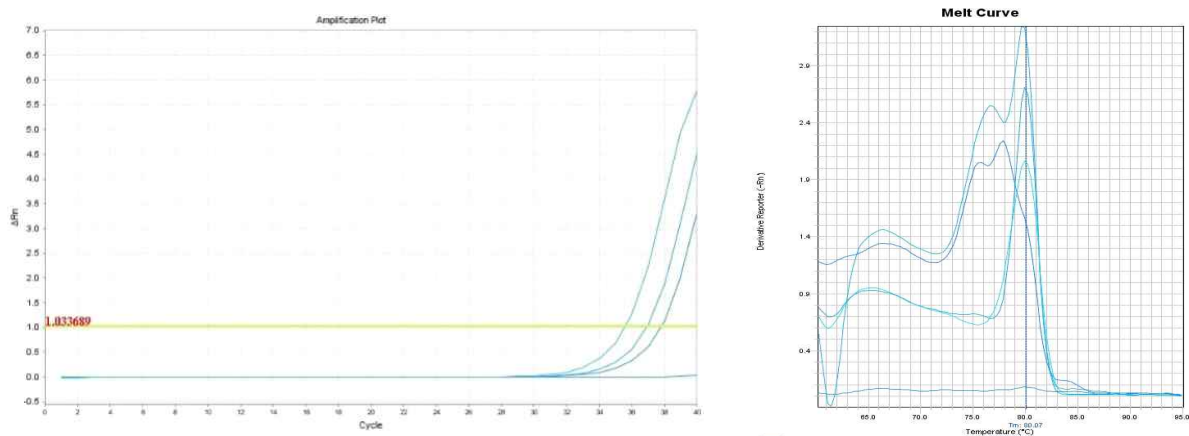


그림 5.14 Amplification plot and melt curve for *L. monocytogenes* in spinach with IMS. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $9.0 \times 10^4$ ,  $9.0 \times 10^3$ ,  $9.0 \times 10^2$ , and  $9.0 \times 10^1$  cfu/g samples, respectively).

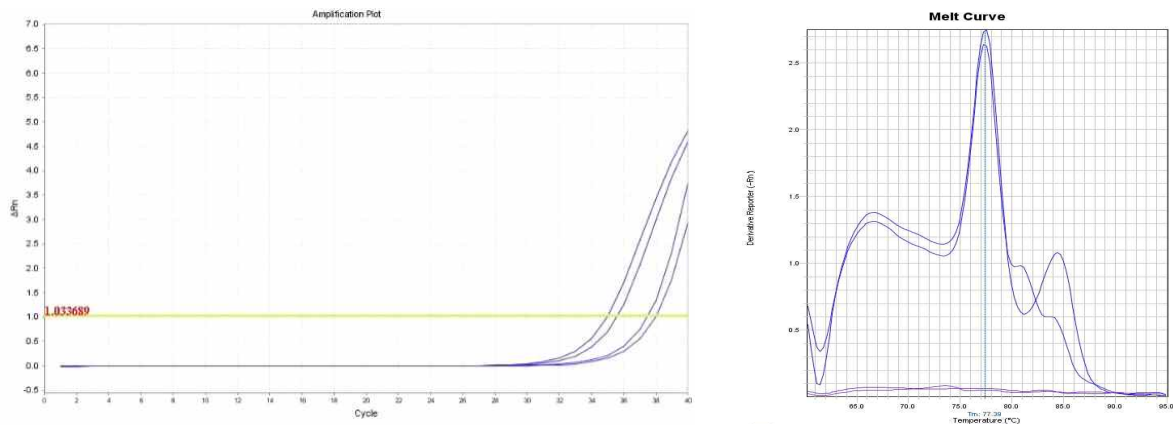


그림 5.15 Amplification plot and melt curve for *L. monocytogenes* in sprout with I. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $9.0 \times 10^4$ ,  $9.0 \times 10^3$ ,  $9.0 \times 10^2$ , and  $9.0 \times 10^1$  cfu/g samples, respectively).

표 5.5 Results of real-time PCR for <i>L. monocytogenes</i> after IMS			
Samples	cfu/g	Ct	Tm (°C)
Lettuce	$9.0 \times 10^4$	38.34	77.69
	$9.0 \times 10^3$	37.31	77.92
	$9.0 \times 10^2$	37.89	77.73
	$9.0 \times 10^1$	-	-
Spinach	$9.0 \times 10^4$	35.64	77.78
	$9.0 \times 10^3$	36.95	77.92
	$9.0 \times 10^2$	37.85	77.78
	$9.0 \times 10^1$	-	-
Sprout	$9.0 \times 10^4$	34.97	77.39
	$9.0 \times 10^3$	35.60	77.39
	$9.0 \times 10^2$	37.55	77.07
	$9.0 \times 10^1$	38.04	77.07

(3) 농산물에서 *L. monocytogenes* 검출을 위하여 증균배양(enrichment)을 한 경우의 real-time PCR의 검출 한계

○ 농산물 시료에 목표세균을 일정량 접종하고 증균배양을 한 경우의 real-time PCR의 검출한계를 측정하였음(그림 5.16, 5.17, 5.18 및 표 5.6)

○ real time PCR 결과, DNA의 Tm 값은 77.24~ 77.84℃이였음.

○ *L. monocytogenes* 검출을 위하여 증균배양한 경우의 real-time PCR의 검출 한계는 상추, 시금치, 콩나물에 대하여 모두  $9 \times 10^2$  CFU/g 시료였음.

○ 접종 후 바로 PCR을 수행한 경우, 접종후 바로 IMS 처리하고 PCR을 수행한 경우, 접종후 증균한 경우, 등 세가지 실험의 결과, 증균한 경우  $9 \times 10^2$  CFU/g의 경우까지 real-time PCR를 목표 세균을 검출할 수 있었음.

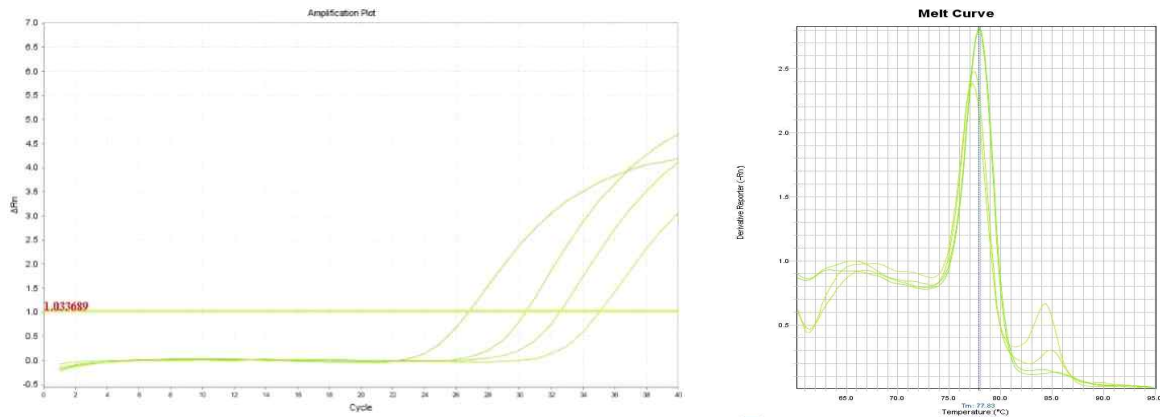


그림 5.16 Amplification plot and melt curve for *L. monocytogenes* in lettuce after enrichment. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $9.0 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

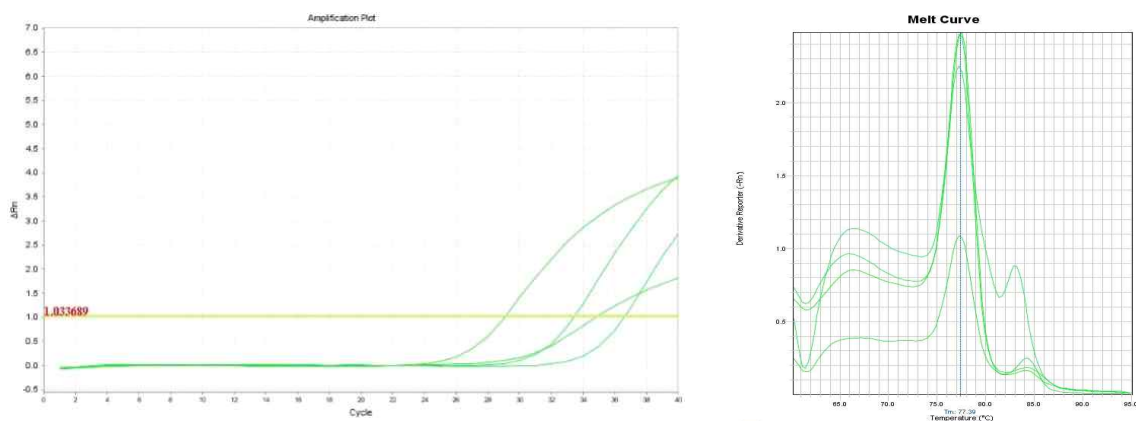


그림 5.17 Amplification plot and melt curve for *L. monocytogenes* in spinach after enrichment. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $9.0 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

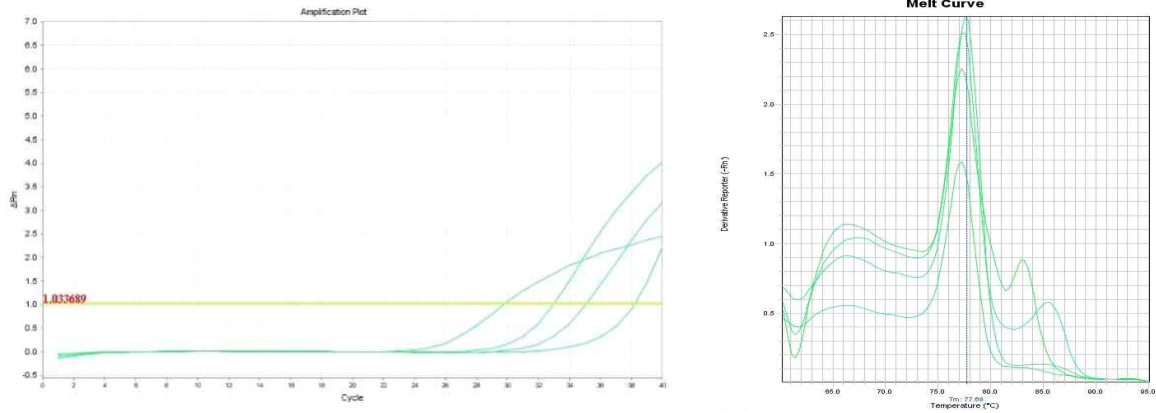


그림 5.18 Amplification plot and melt curve for *L. monocytogenes* in sprout after enrichment. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $9.0 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

표 5.6 Results of real-time PCR for *L. monocytogenes* after enrichment

Samples	cfu/g	Ct	Tm (°C)
Lettuce	$9.0 \times 10^4$	26.86	77.24
	$9.0 \times 10^3$	30.44	77.39
	$9.0 \times 10^2$	32.61	77.84
	$9.0 \times 10^1$	35.12	77.99
Spinach	$9.0 \times 10^4$	29.12	77.39
	$9.0 \times 10^3$	33.50	77.39
	$9.0 \times 10^2$	34.97	77.39
	$9.0 \times 10^1$	36.63	77.24
Sprout	$9.0 \times 10^4$	29.91	77.24
	$9.0 \times 10^3$	33.05	77.69
	$9.0 \times 10^2$	35.13	77.39
	$9.0 \times 10^1$	38.23	77.69

## 다. 농산물에서 *S. aureus* 검출을 위한 real-time PCR

### (1) 농산물에서 *S. aureus* 검출을 위한 real-time PCR의 검출 한계

- 기본적인 실험 방법 및 조건은 *B. cereus*의 경우와 동일함.
- *S. aureus*를 위한 선택배지, 접종 세균수, PCR primers, 등만 다름.
- *S. aureus*을 하룻밤 배양한 후 일정 세균수를 세고, 이를 10배 연속 희석하고 농도별로 농산물에 인위 접종한 후 균질화하고 증균배양 전 및 후 일정량을 취하여 DNA를 추출한 후 real-time PCR을 수행하였음(그림 5.19, 5.20, 5.21 및 표 5.7)
- real time PCR 결과, DNA의 Tm 값은 72.34 ~ 72.63°C이였음.
- *S. aureus* 검출을 위하여 real-time PCR의 검출 한계는 상추, 시금치, 콩나물에 대하여 모두  $2.8 \times 10^3$  CFU/g 시료였음

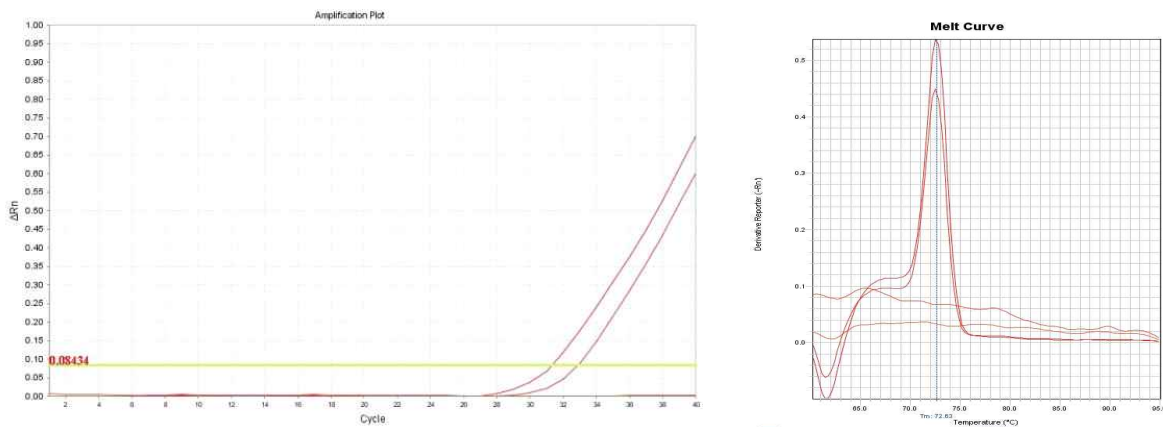


그림 5.19 Amplification plot and melt curve for *S. aureus* in lettuce. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $2.8 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

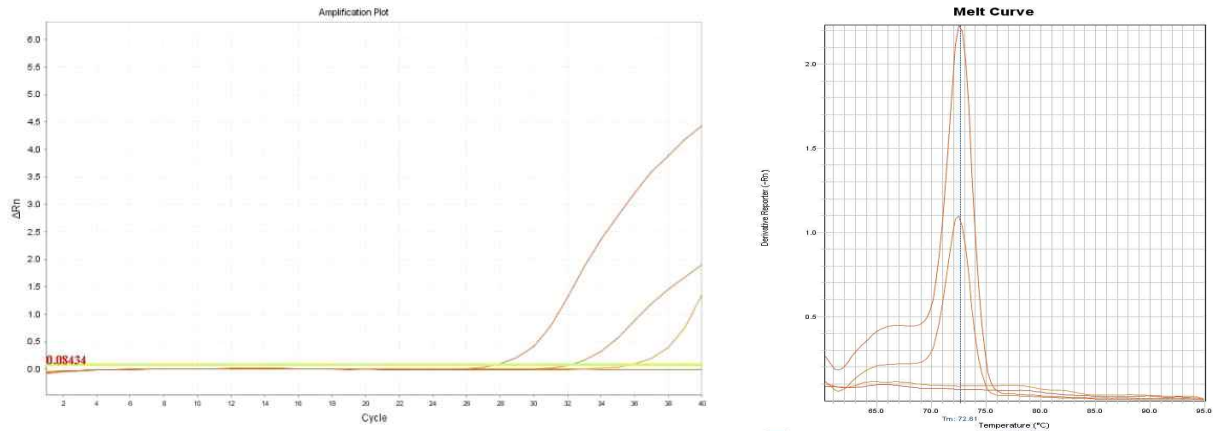


그림 5.20 Amplification plot and melt curve for *S. aureus* in spinach. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $2.8 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

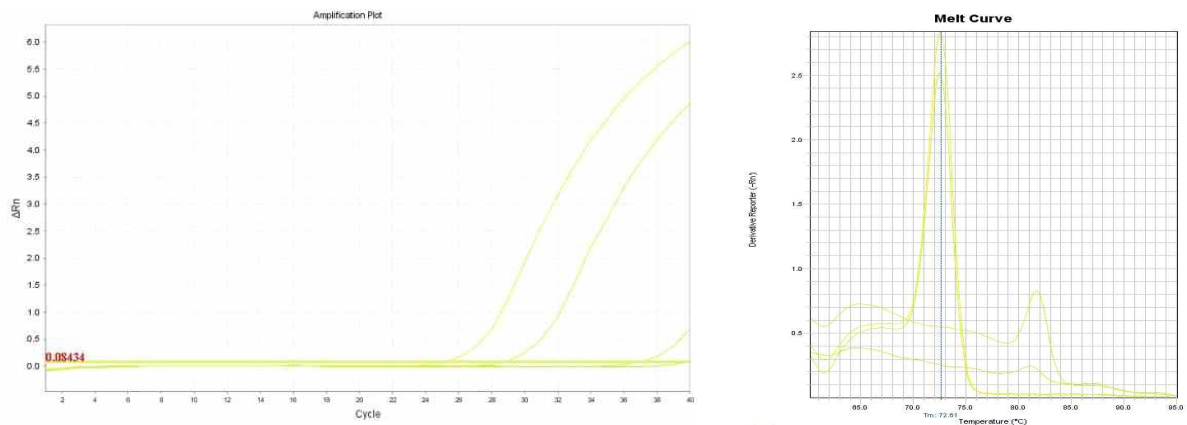


그림 5.21 Amplification plot and melt curve for *S. aureus* in sprout. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $2.8 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

표 5.7 Results of real-time PCR with sa442 primes for <i>S. aureus</i>			
Samples	cfu/g	Ct	Tm (°C)
Lettuce	$2.8 \times 10^4$	31.30	72.63
	$2.8 \times 10^3$	32.90	72.48
	$2.8 \times 10^2$	-	-
	$2.8 \times 10^1$	-	-
Spinach	$2.8 \times 10^4$	27.90	72.63
	$2.8 \times 10^3$	32.18	72.34
	$2.8 \times 10^2$	35.88	72.48
	$2.8 \times 10^1$	-	-
Sprout	$2.8 \times 10^4$	25.29	72.48
	$2.8 \times 10^3$	28.78	72.48
	$2.8 \times 10^2$	37.14*	72.34
	$2.8 \times 10^1$	-	-

(2) 농산물에서 *S. aureus* 검출을 위하여 면역자기분리법을 적용한 경우의 real-time PCR의 검출 한계

- 면역자기분리법(IMS)을 이용하여 농산물 속의 세균을 농축한 후 DNA를 추출한 후, real-time PCR을 수행하여 검출한계를 측정하였음(그림 5.22, 5.23, 5.24 및 표 5.8).
- real time PCR 결과, DNA의 Tm 값은 72.48 ~ 73.23°C이였음.
- *S. aureus* 검출을 위한 IMS 후 real-time PCR의 검출 한계는 상추, 시금치, 콩나물에 대하여 각각 2.8x10<sup>4</sup>, 2.8x10<sup>3</sup>, 2.8x10<sup>3</sup> CFU/g 시료였음.
- 세균을 농축하기 위하여 IMS를 수행한 실험의 검출한계가 IMS를 수행하지 않은 경우와 큰 차이가 없었음.

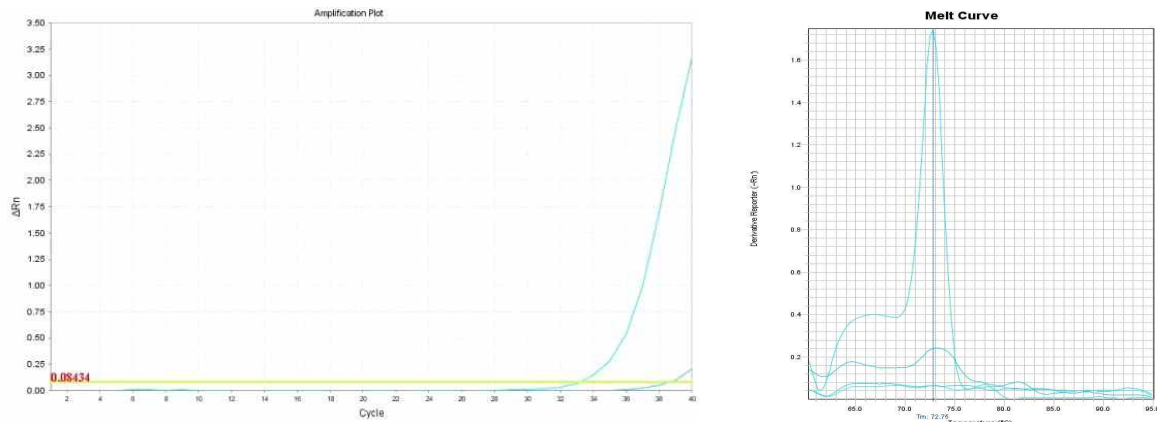


그림 5.22 Amplification plot and melt curve for *S. aureus* in lettuce with IMS. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $2.8 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

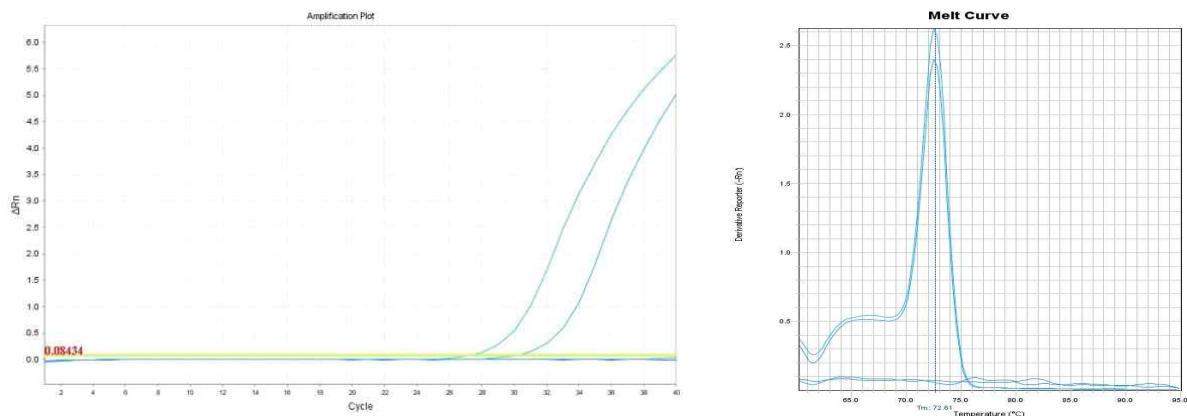


그림 5.23 Amplification plot and melt curve for *S. aureus* in spinach with IMS. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $2.8 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

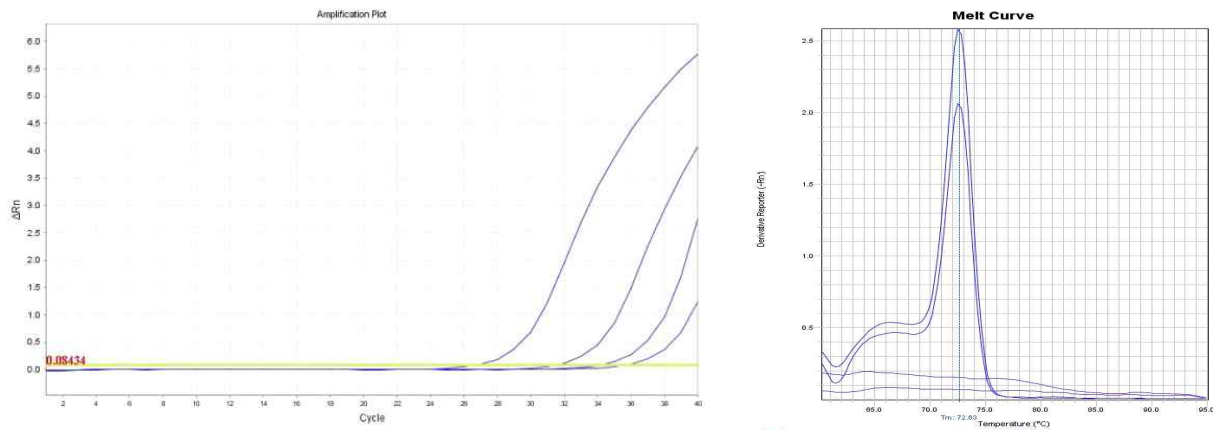


그림 5.24 Amplification plot and melt curve for *S. aureus* in sprout with IMS. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $2.8 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

표 5.8 Results of real-time PCR for *S. aureus* with IMS

Samples	cfu/g	Ct	Tm (°C)
Lettuce	$2.8 \times 10^4$	33.36	73.23
	$2.8 \times 10^3$	38.65*	72.78
	$2.8 \times 10^2$	-	-
	$2.8 \times 10^1$	-	-
Spinach	$2.8 \times 10^4$	27.45	72.48
	$2.8 \times 10^3$	30.31	72.48
	$2.8 \times 10^2$	-	-
	$2.8 \times 10^1$	-	-
Sprout	$2.8 \times 10^4$	26.89	72.63
	$2.8 \times 10^3$	31.63	72.63
	$2.8 \times 10^2$	34.36*	73.23
	$2.8 \times 10^1$	35.82*	72.48



(3) 농산물에서 *S. aureus* 검출을 위하여 증균배양을 한 경우의 real-time PCR의 검출 한계

- 농산물 시료에 목표세균을 일정량 접종하고 증균배양을 한 경우의 real-time PCR의 검출한계를 측정하였음(그림 5.25, 5.26, 5.27 및 표 5.9).

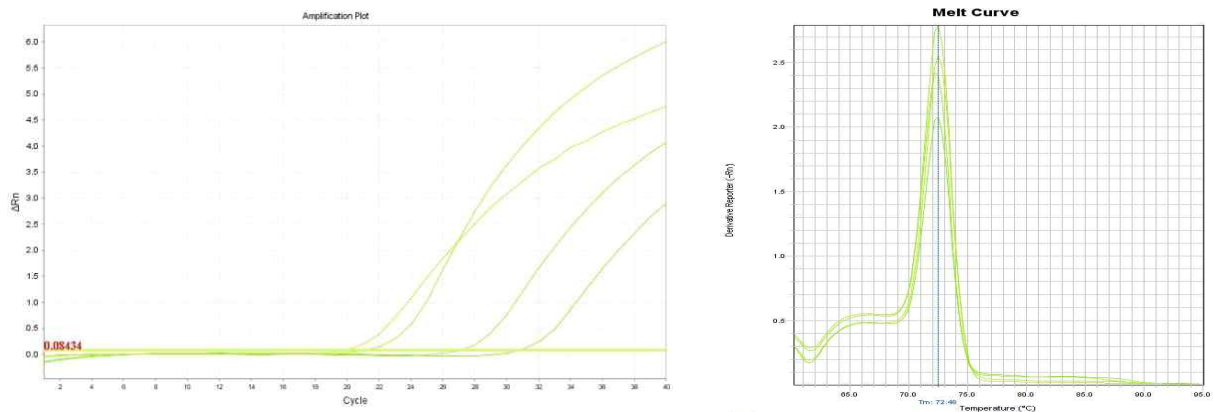


그림 5.25 Amplification plot and melt curve for *S. aureus* in lettuce after enrichment. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples (2.8 x 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> and 10<sup>1</sup> cfu/g samples, respectively).

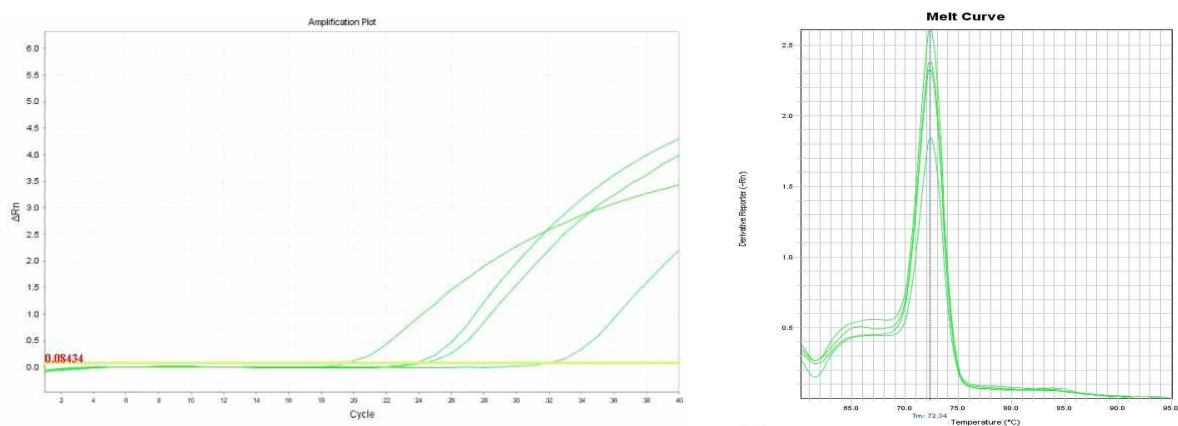


그림 5.26 Amplification plot and melt curve for *S. aureus* in spinach after enrichment. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples (2.8 x 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> and 10<sup>1</sup> cfu/g samples, respectively).

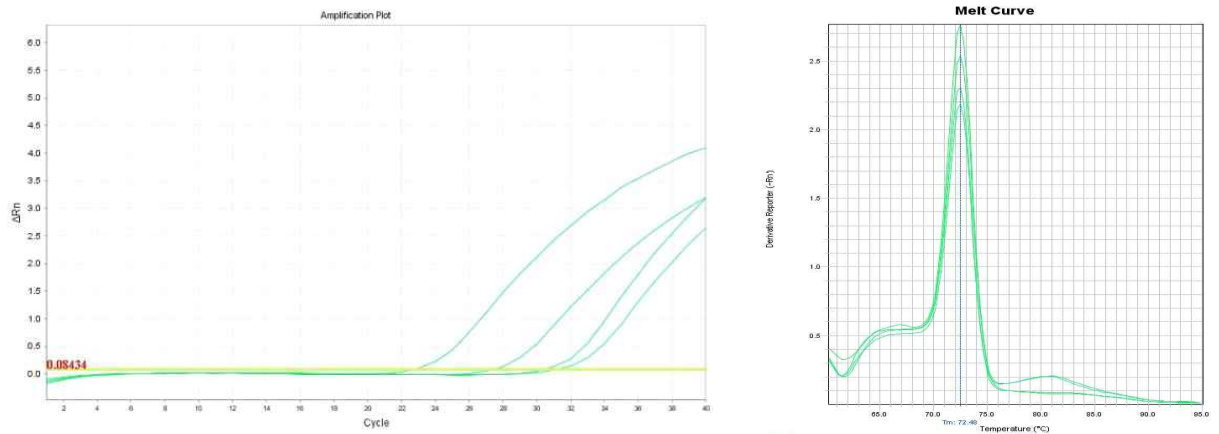


그림 5.27 Amplification plot and melt curve for *S. aureus* in sprout after enrichment. The sample DNAs were extracted from serial inoculated samples ( $2.8 \times 10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  cfu/g samples, respectively).

표 5.9 Results of real-time PCR for <i>S. aureus</i> after enrichment			
Samples	cfu/g	Ct	Tm (°C)
Lettuce	$2.8 \times 10^4$	19.94	72.48
	$2.8 \times 10^3$	21.35	72.48
	$2.8 \times 10^2$	27.23	72.34
	$2.8 \times 10^1$	30.89	72.34
Spinach	$2.8 \times 10^4$	19.71	72.34
	$2.8 \times 10^3$	24.44	72.34
	$2.8 \times 10^2$	23.91	72.34
	$2.8 \times 10^1$	32.09	72.34
Sprout	$2.8 \times 10^4$	22.86	72.48
	$2.8 \times 10^3$	27.54	72.48
	$2.8 \times 10^2$	30.62	72.34
	$2.8 \times 10^1$	31.41	72.48

<요약>

**제5절 식중독 세균 검출용 real-time PCR 개발, 농산물 적용 및 검출한계  
(농산물에서 각 식중독균의 신속검사용 real-time PCR 최적화)**

- 본 real-time PCR의 결과, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* 의 최소량은 각각  $5.0 \times 10^2$ ,  $9.1 \times 10^2$ ,  $1.41 \times 10^2$  CFU/ml이었으며 이때의  $C_T$ 값은 각각 35, 28, 36이었음.
- *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* 검출용 real-time PCR의 검출한계는 순수배양액 시료, PrepMan DNA 추출 조건에서 약  $10^{2-3}$  CFU/ml ( $C_T$  값  $\leq 35$  cycle 임의 기준).

※ 농산물(상추, 시금치, 콩나물)에서의 real-time PCR의 검출한계 (inoculua cfu/g)

- *B. cereus*의 경우:

- 증균, IMS 없이 직접: 약  $10^4 \sim 10^3$  CFU/g sample
- 증균없이 IMS 농축만: 약  $10^3 \sim 10^2$  CFU/g sample
- 6시간 증균했을 경우: 약  $10^2 \sim 10^1$  CFU/g sample

- *L. monocytogenes*의 경우:

- 증균, IMS 없이 직접: 약  $10^4 \sim 10^3$  CFU/g sample
- 증균없이 IMS 농축만: 약  $10^5 \sim 10^3$  CFU/g sample
- 6시간 증균했을 경우: 약  $10^2 \sim 10^1$  CFU/g sample

- *S. aureus*의 경우:

- 증균, IMS 없이 직접: 약  $10^3$  CFU/g sample
- 증균없이 IMS 농축만: 약  $10^4 \sim 10^2$  CFU/g sample
- 6시간 증균했을 경우: 약  $10^1$  CFU/g sample

◆ 본 과제에서 개발한 real-time PCR의 농산물 시료에서의 식중독 세균 3종에 대한 검출 능력은 대체로 증균업시 < IMS 처리 < 증균후 순으로 검출 효율이 높음(검출한계가 대략 10씩 낮아짐)

◆ PCR의 검출한계의 영향요인으로 농식품의 종류, inhibitor의 존재여부, DNA 추출 방법 차이, PCR 조건 등을 고려할 수 있음. 또 IMS 처리시 IMBs-Abs의 결합효율이 중요한 요인이 도리 것임

## 제6절 식중독 세균 신속진단 Multiplex real-time PCR kit 개발 및 상용화

### 1. 위해 식중독 세균 7종에 대한 특이 유전자 마커 탐색

○ 본 연구과제에서 목표로 하는 식중독 세균 7종 즉, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni* 및 Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)의 PCR 검출법에 관한 선행 논문들을 조사하여 활용 가능한 마커를 탐색하였음(표 6.1).

#### 가. 위해 식중독 세균 7종의 검출을 위한 conventional PCR 개발

○ *Shigella* spp. 검출용 target 유전자는 모든 연구에서 사용하고 있는 ipaH를 대상으로 하였으며, EHEC의 경우 verotoxin 1 또는 verotoxin 2의 보유 여부에 의해서 균이 정의되므로 다른 대안이 없이 VT1 및 VT2 유전자를 사용하였음.

○ 나머지 식중독 세균에 대한 target 유전자는 선행 연구논문 또는 CDC (Centers for Disease Control and Prevention) 등의 기관에서 사용 빈도수가 높은 유전자로 선정하였음.

○ 선정된 유전자에 specific primer 세트를 디자인하였으며 미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture), 국가병원체자원은행(National Culture collection for Pathogens) 및 식품의약품안전처 미생물과에서 분양받은 40여종의 식중독 세균을 테스트하여 개발한 프라이머 세트의 inclusivity와 exclusivity를 포함한 특이도를 확인하였음(표 6.2 & 그림 6.1~6.14).

표 6.1 식중독 세균의 PCR 용 유전자 마커 탐색 결과

Bacteria	Target gene	Description
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>prfA</i>	involved in the regulation of listeriolysin synthesis
	<i>actA</i>	lactate dehydrogenase
	<i>inlA</i>	Internalin A
	<i>lmaA</i>	antigen A
	<i>hly</i>	listeriolysin
	<i>plcB</i>	Encodes a lecithinase involved in cell-to-cell spread
	<i>flaA</i>	Encodes flagellin
	<i>iap</i>	Invasion associated protein
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femA</i>	a factor which is essential for methicillin resistance
	<i>nuc</i>	unique thermonuclease
	<i>coa</i>	coagulase
	<i>cpn60</i>	60-kDa chaperonin
	<i>orfX</i>	Putative glycoprotease
	<i>lys</i>	Phage lytic enzyme
	<i>pnp</i>	Polynucleotide phosphorylase

	<i>clfA</i>	Cell clumping factor
	<i>seas</i>	Histidine protein kinase
	<i>scn</i>	Chemotaxis inhibitory protein
	<i>chp</i>	Staphylococcal complement inhibitor
	<i>sak</i>	Immune evasion protein staphylokinase
	<i>fib</i>	Fibrinogen binding protein
	<i>epbS</i>	Elastin-binding protein
	<i>map</i>	Broad specificity adhesion
<i>Bacillus cereus</i>	<i>groEL</i>	Molecular chaperonin
	<i>adk</i>	Adenylate cyclase
	<i>ccpA</i>	catabolic control protein A
	<i>ftsA</i>	cell division protein
	<i>glpT</i>	glycerol-3-phosphate permease
	<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyl transferase
	<i>recF</i>	DNA replication and repair protein
	<i>sucC</i>	Succinyl coenzyme A synthetase
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	Invasion gene A
	<i>his</i>	Salmonella genus specific histidine transport operon
	<i>himA</i>	Binding protein
<i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i>	Invasion plasmid antigen
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>hipO</i>	Hippurate hydrolase
	<i>cadF</i>	37kDa outer membrane protein
	<i>mapA</i>	Membrane protein
	<i>VS1</i>	Unnamed protein product unique to <i>C.jejuni</i>
<i>EHEC</i>	<i>VT1</i>	Vero toxin/shiga-like toxin 1
	<i>VT2</i>	Vero toxin/shiga-like toxin 2

표 6.2 Conventional PCR 시스템의 특이도 테스트 결과

Bacteria	Strain	<i>L.mono-cytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>Salmonella</i> spp.
		<i>prfA</i>	<i>femA</i>	<i>groEL</i>	<i>invA</i>
		450bp	264bp	303bp	675bp
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCCP 10220	-	+	-	-
	NCCP 11470	-	+	-	-
	NCCP 11472	-	+	-	-
	ATCC 27664	-	+	-	-
	ATCC 13565	-	+	-	-
	ATCC 14458	-	+	-	-
	ATCC 19095	-	+	-	-
	ATCC 23235	-	+	-	-
	ATCC 10832	-	+	-	-

	ATCC 25923	-	+	-	-
	ATCC 6538	-	+	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 33814	-	-	-	-
	ATCC 27562	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCCP 10807	+	-	-	-
	ATCC 19115	+	-	-	-
<i>Listeria welschimeri</i>	NCCP 10965	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33250	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Dublin	NCCP 10860	-	-	-	+
	NCCP 12232	-	-	-	+
<i>Salmonella</i> Heidelberg	NCCP 10322	-	-	-	+
<i>Salmonella</i> Typhi	NCCP 10337	-	-	-	+
	NCCP 12241	-	-	-	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium	NCCP 10812	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. Enterica	ATCC 14028	-	-	-	+
<i>E.coli</i> O157	NCCP 11090	-	-	-	-
<i>E.coli</i> (STEC)	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> (EHEC)	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> (EHEC)	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	NCCP 10084	-	-	+	-
	NCCP 10623	-	-	+	-
	NCCP 10624	-	-	+	-
	NCCP 10715	-	-	+	-
	ATCC 14579	-	-	+	-
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 9290	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 29930	-	-	-	-
<i>Shigella boydii</i>	ATCC 8700	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC14810	-	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33250	-	-	-	-

Bacteria	Strain	<i>C.jejuni</i>	<i>Shigella</i> <i>spp.</i>	<i>EHEC</i>	
		<i>hipO</i>	<i>ipaH</i>	<i>VT1</i>	<i>VT2</i>
		114bp	141bp	637bp	297bp
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCCP 10220	-	-	-	-
	NCCP 11470	-	-	-	-
	NCCP 11472	-	-	-	-
	ATCC 27664	-	-	-	-
	ATCC 13565	-	-	-	-
	ATCC 14458	-	-	-	-
	ATCC 19095	-	-	-	-
	ATCC 23235	-	-	-	-
	ATCC 10832	-	-	-	-
	ATCC 25923	-	-	-	-
ATCC 6538	-	-	-	-	
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 33814	-	-	-	-
	ATCC 27562	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCCP 10807	-	-	-	-
	ATCC 19115	-	-	-	-
<i>Listeria welschimeri</i>	NCCP 10965	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33250	+	-	-	-
<i>Salmonella</i> Dublin	NCCP 10860	-	-	-	-
	NCCP 12232	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Heidelberg	NCCP 10322	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhi	NCCP 10337	-	-	-	-
	NCCP 12241	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium	NCCP 10337	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. Enterica	NCCP 12241	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	NCCP 10812	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	ATCC 14028	-	-	-	-

<i>E.coli</i> O157	NCCP 11090	-	-	+	+
<i>E.coli</i> (STEC)	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> (EHEC)	-	-	-	+	-
<i>E.coli</i> (EHEC)	-	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	NCCP 10084	-	-	-	-
	NCCP 10623	-	-	-	-
	NCCP 10624	-	-	-	-
	NCCP 10715	-	-	-	-
	ATCC 14579	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 9290	-	+	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 29930	-	+	-	-
<i>Shigella boydii</i>	ATCC 8700	-	+	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022				
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC14810	-	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33250	+	-	-	-

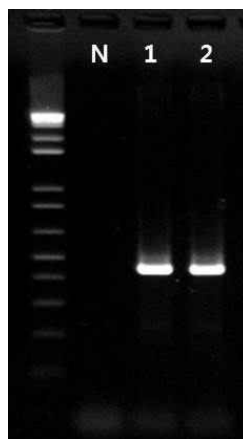


그림 6.1. *Listeria monocytogenes* 프라이머의 inclusivity test  
(Lane N; No template control(NTC), Lane 1; *L.monocytogenes* NCCP 10807, Lane 2;  
*L.monocytogenes* ATCC 19115



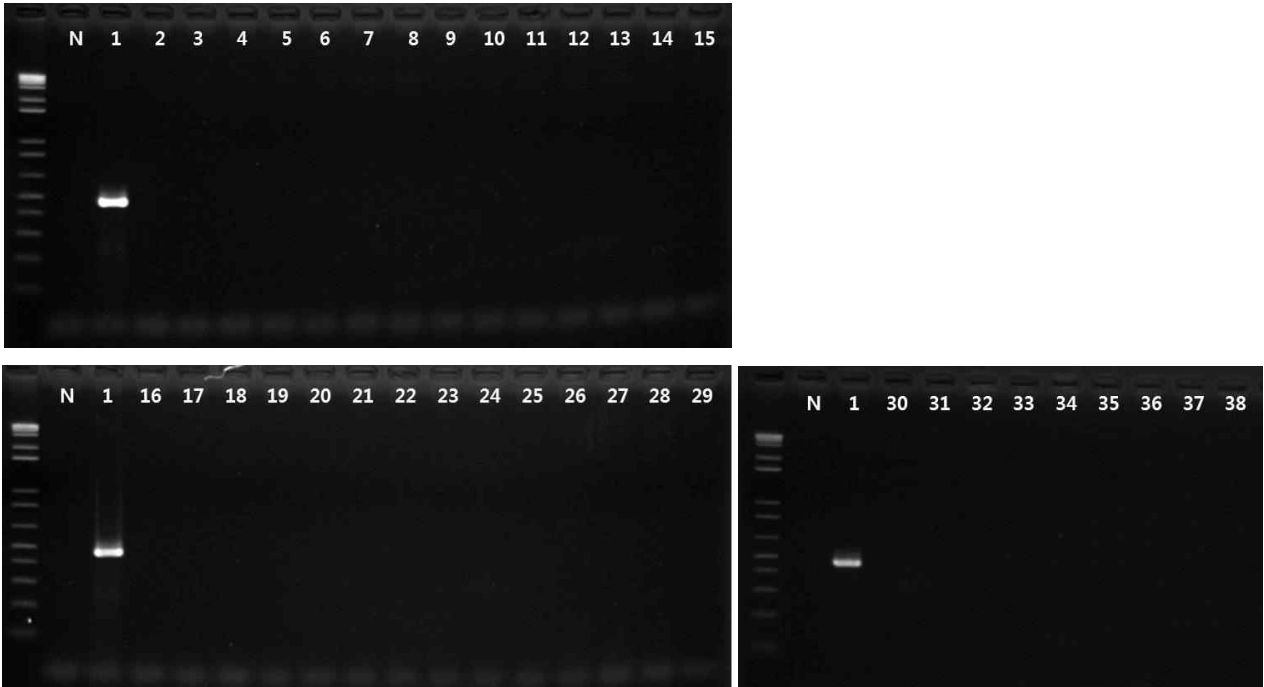


그림 6.2. *Listeria monocytogenes* 프라이머의 exclusivity test

(Lane N; No template control(NTC), Lane 2; *L.monocytogenes* NCCP 108070, Lane 2~38; Other bacterial species)

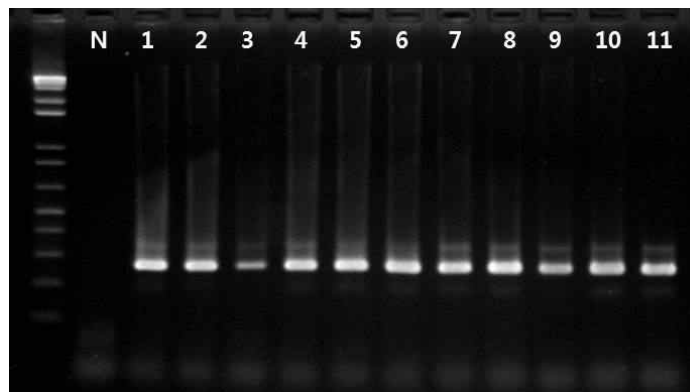


그림 6.3. *Staphylococcus aureus* 프라이머의 inclusivity test (Lane N; No template control(NTC), Lane 1; *Saureus* NCCP 10220, Lane 2; NCCP 11470, Lane 3; NCCP 11472, Lane 4; ATCC 27664, Lane 5; ATCC 13565, Lane 6; ATCC 14458, Lane 7; ATCC 19095, Lane 8; ATCC 23235, Lane 9; ATCC 10832, Lane 10; ATCC 25923, Lane 11; ATCC 6538)

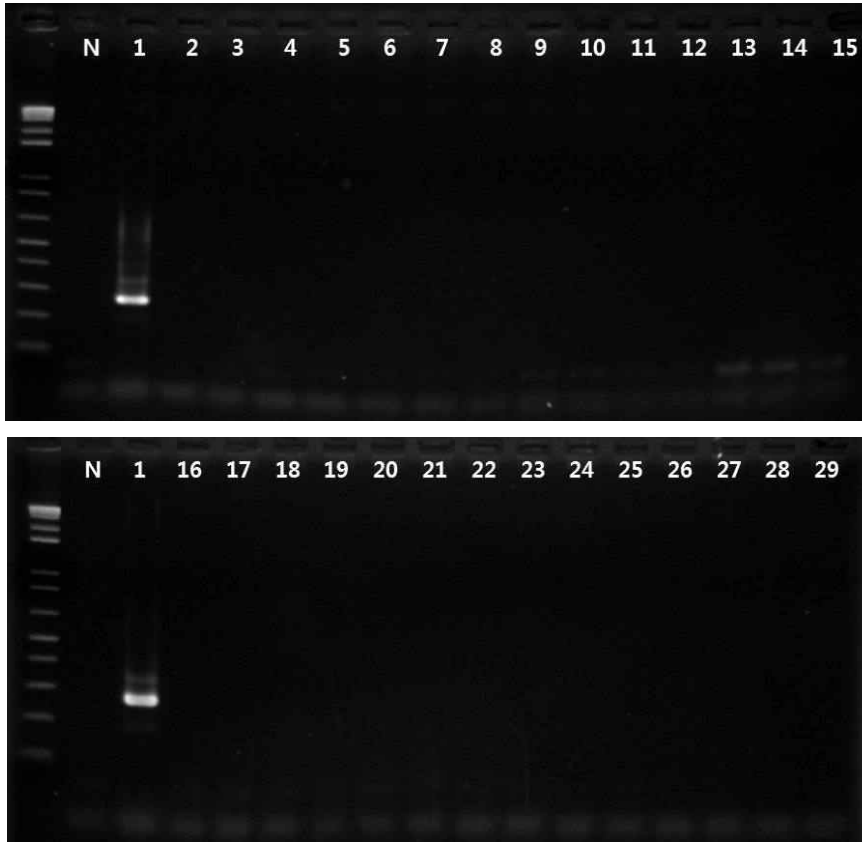


그림 6.4. *Staphylococcus aureus* 프라이머의 exclusivity test (Lane N; No template control(NTC), Lane 2; *S.aureus* ATCC 23235, Lane 2~29; Other bacterial species)

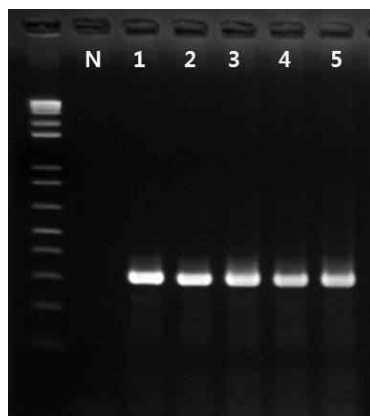


그림 6.5. *Bacillus cereus* 프라이머의 inclusivity test (Lane N; No template control(NTC), Lane 1; *B.cereus* NCCP 10084, Lane 2; NCCP 10623, Lane 3; NCCP 10624, Lane 4; NCCP 10715, Lane 5; ATCC 14579)

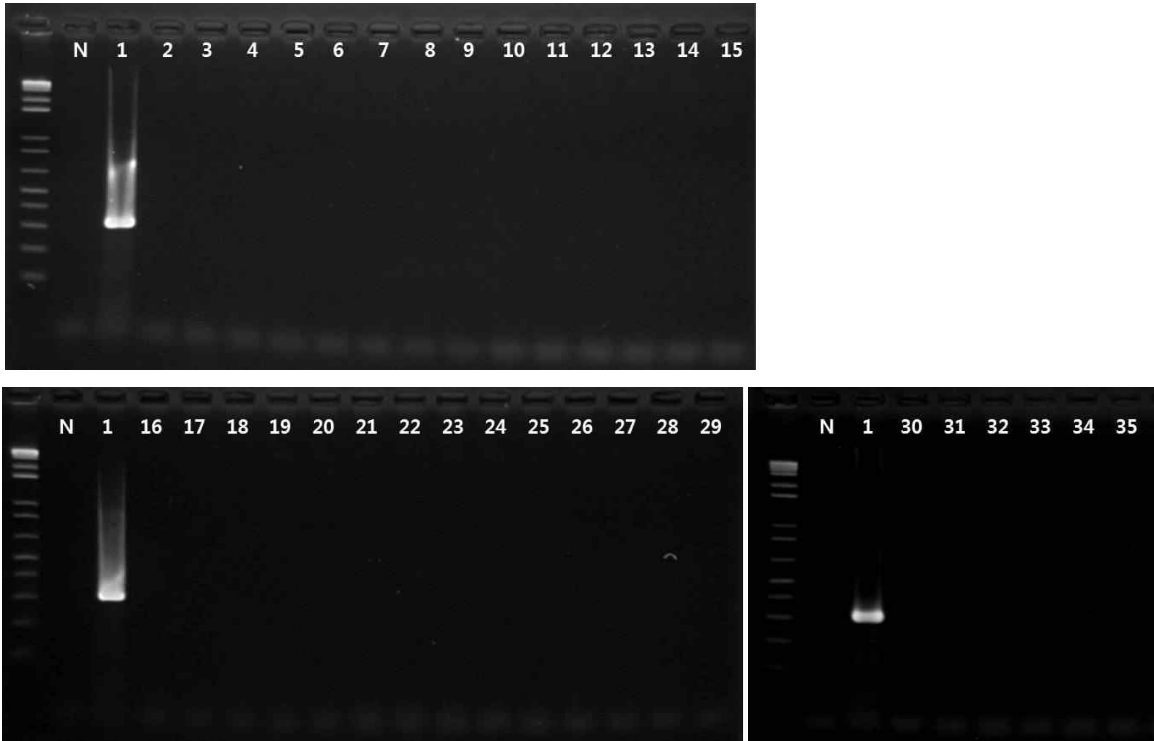


그림 6.6. *Bacillus cereus* 프라이머의 exclusivity test (Lane N; No template control(NTC), Lane 2; *B.cereus* ATCC 14579, Lane 2~35; Other bacterial species)

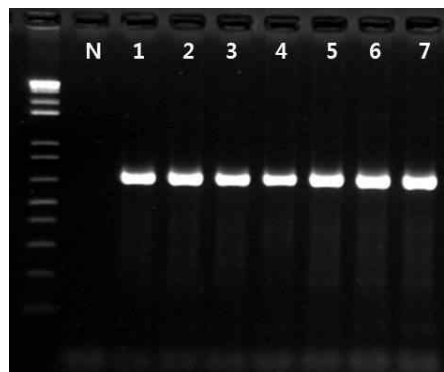


그림 6.7. *Salmonella* spp. 프라이머의 inclusivity test (Lane N; No template control(NTC), Lane 1; *Salmonella Dublin* NCCP 10860, Lane 2; NCCP 12232, Lane 3; *Salmonella Heidelberg* NCCP 10322, Lane 4; *Salmonella typhi* NCCP 10337, Lane 5; *Salmonella typhimurium* NCCP 10812, Lane 6; *Salmonella typhi* NCCP 12241, *Salmonella enterica* subsp.*enterica* ATCC 14028)

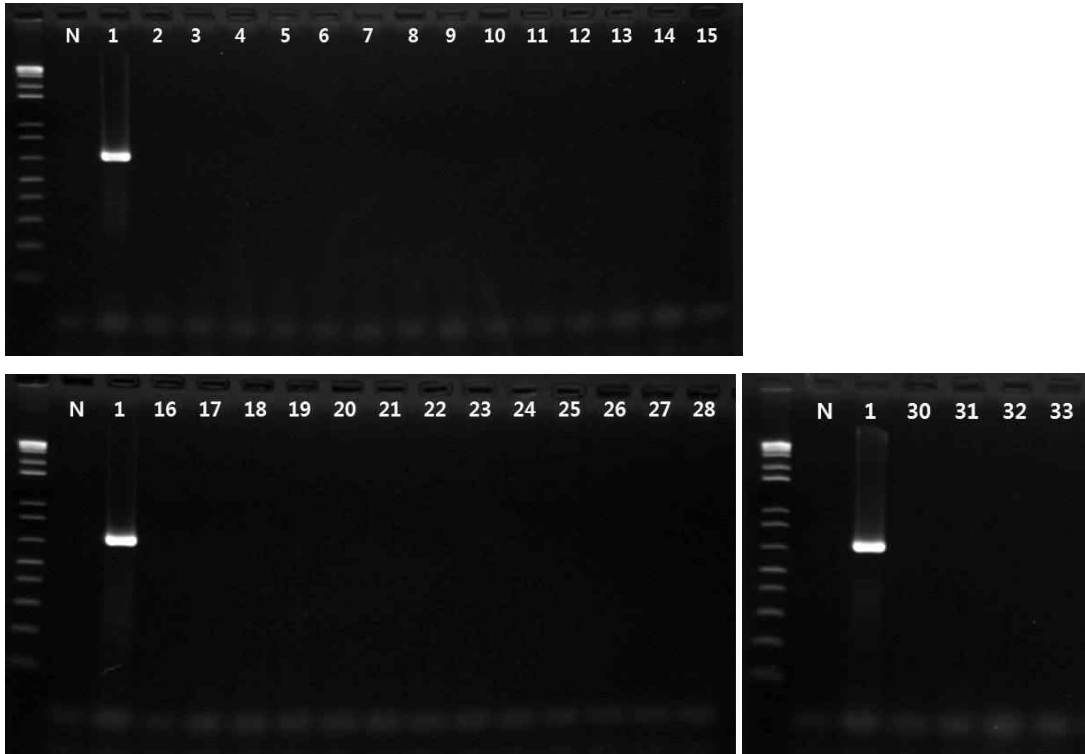


그림 6.8. *Salmonella* spp. 프라이머의 exclusivity test (Lane N; No template control(NTC), Lane 2; *Salmonella enterica* subsp.*enterica* ATCC 14028, Lane 2~33; Other bacterial species)

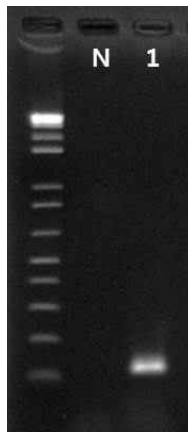


그림 6.9. *Campylobacter jejuni* 프라이머의 inclusivity test (Lane N; No template control(NTC), Lane 1; *Campylobacter jejuni* ATCC 33250)

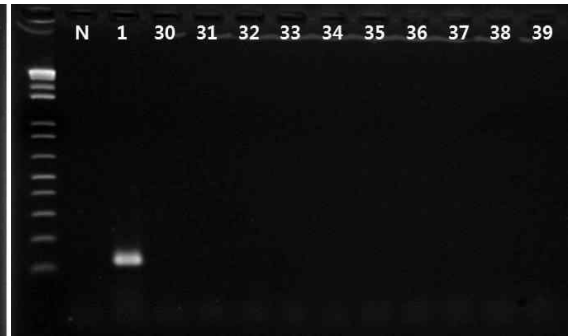
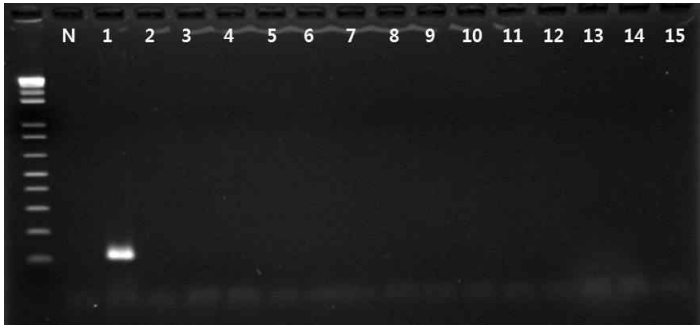


그림 6.10. *Campylobacter jejuni* 프라이머의 exclusivity test (Lane N; No template control(NTC), Lane 2; *Campylobacter jejuni* ATCC 33250, Lane 2~39; Other bacterial species)

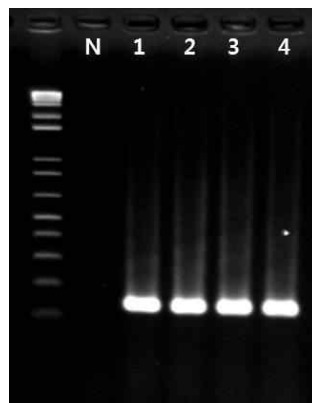


그림 6.11. *Shigella* spp. 프라이머의 inclusivity test (Lane N; No template control(NTC), Lane 1; *Shigella sonnei* ATCC 9290, Lane 2; *Shigella sonnei* ATCC 29930, Lane 3; *Shigella boydii* ATCC 8700, Lane 4; *Shigella flexneri* ATCC 12022)

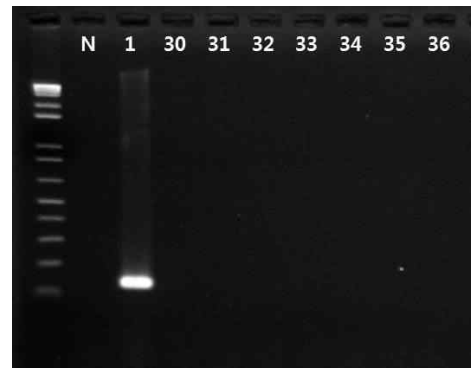


그림 6.12. *Shigella* spp. 프라이머의 exclusivity test (Lane N; No template control(NTC), Lane 2; *Shigella sonnei* ATCC 9290, Lane 2~36; Other bacterial species)

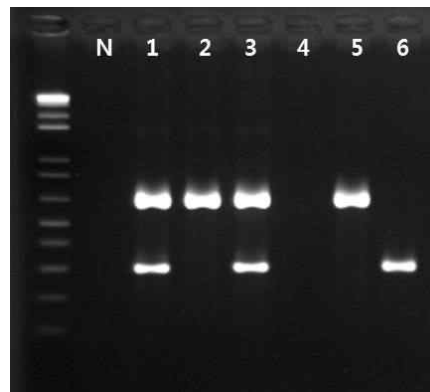


그림 6.13. EHEC 프라이머의 inclusivity test (Lane N; No template control(NTC), Lane 1; *E.coli* O157, Lane 2; *E.coli* O157, Lane 3; *E.coli* O157 NCCP 11090, Lane 4; *E.coli* (ST), Lane 5; *E.coli* (VT1), Lane 6; *E.coli* (VT2))

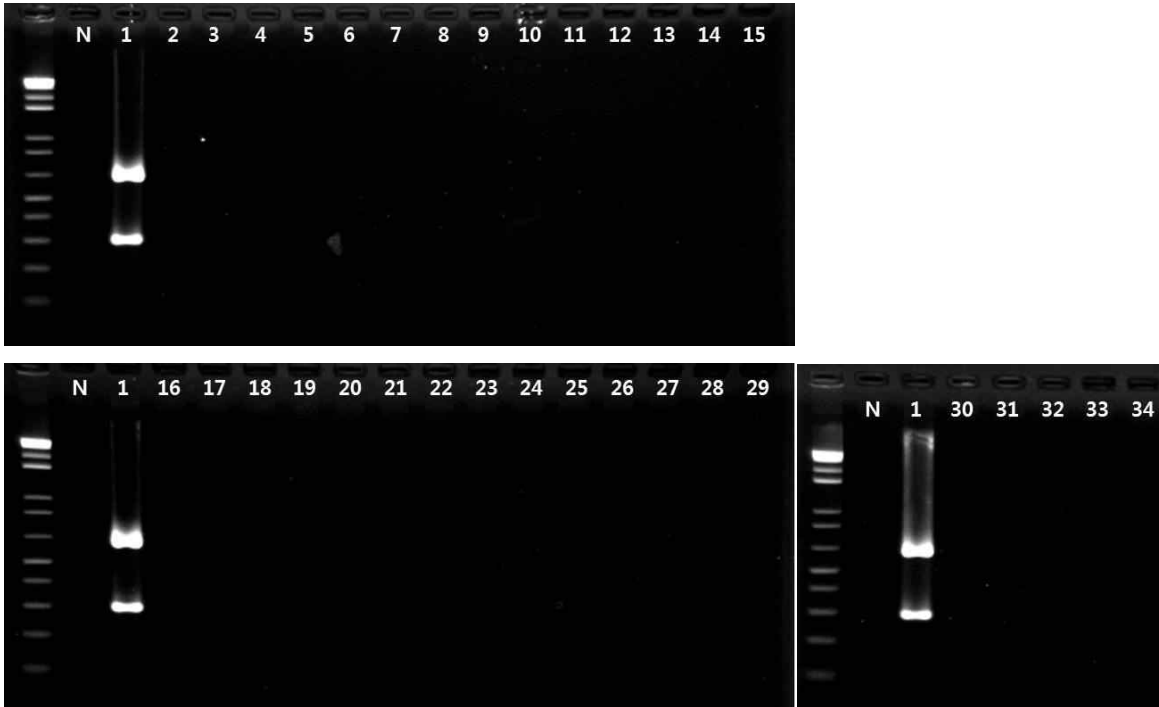


그림 6.14. EHEC 프라이머의 exclusivity test (Lane N; No template control(NTC), Lane 2; *E.coli* O157 NCCP 11090, Lane 2~34; Other bacterial species)

#### 나. 식중독균 특이적 반응성 Real-time PCR 용 프라이머/프로브 세트 개발 및 선정

- Real-time PCR 용 프라이머/프로브 세트 개발을 위한 목표 유전자는 다른 유전자를 선택 가능한 균의 경우 conventional PCR과 겹치지 않게 선정하였고, 선택이 불가능한 균인 Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)의 VT1 및 VT2, *Shigella* spp.의 ipaH 및 *Bacillus cereus*의 groEL은 그대로 사용하였음.
- 각 유전자들의 염기서열은 NCBI Genbank 에서 제공받았고 Genious 4.8.5 프로그램을 이용하여 multi alignment를 수행, non-target 균들과의 sequence 유사성을 확인한 뒤, 이를 바탕으로 primer 및 probe를 디자인하였음.

표 6.3. 목표 유전자별 reference sequence

Accession No.	Description	Target
JF967606	Listeria monocytogenes ATCC 19117 invasion associated protein p60 (iap) gene, complete cds	L.monocytogenes (iap)
DQ507379	Staphylococcus aureus strain R26 thermostable nuclease (nuc) gene, partial cds	S.aureus (nuc)
AY112852	Bacillus cereus ATCC 14579 heat shock protein 60 gene, partial cds	B.cereus (groEL)
CP006053	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Bareilly str. CFSAN000189, complete genome	Salmonella (his)
X80135	C.jejuni mapA gene	C.jejuni (mapA)
M32063	S.flexnery invasion plasmid antigen H (ipaH) gene, complete cds	Shigella (ipaH)
EF441576	Escherichia coli strain DEC8B Shiga toxin 1 A subunit gene, partial cds; and Shiga toxin 1 B subunit gene, complete cds	EHEC (VT1)
AB052227	Escherichia coli genes for Shiga toxin 2 A subunit, Shiga toxin 2 B subunit, ORFa, ORFb, complete cds	EHEC (VT2)

- 각 유전자들의 염기서열은 NCBI Genebank 에서 제공받았고 Genious 4.8.5 프로그램을 이용하여 blast 및 multi alignment를 수행, non-target 균들과의 sequence 유사성을 확인한 뒤, 이를 바탕으로 primer 및 probe를 디자인하였음.
- TaqMan probe 제작 시 일반적으로 고려해야 할 사항으로 oligonucleotide primer의 길이, GC contents 및 dimer의 형성 여부를 확인 하였으며 5' 말단에 G 염기가 있는 것은 probe 선정에서 제외하였음.
- Primer의 Tm (melting temperature) 값은 55~59℃, 길이는 20~29mer, probe의 Tm은 68 ~70℃, 길이는 34mer 이하의 범위로 디자인하였으며 Primer Express Software for Real-time PCR (Version 3.0.1)을 이용하였음.
- Target 유전자 내 primer pair와 probe의 위치 및 Primer Express software로 계산된 parameter들을 나타내었음.



○ *Listeria monocytogenes iap* gene (Accession No. JF967606)

ATGAATATGAAAAAAGCAACTATCGCGGCTACAGCTGGGATTGCGGTAACAGCATTGCTGCTCCAACAA  
 TCGCATCCGCAAGCACTGTAGTAGTTGAGGCTGGTGATACTCTTTGGGGTATCGCACAAAGTAAAGGGACT  
 ACTGTTGACGCAATTAAAAAAGCAAACAATTTAACAACAGATAAAATCGTACCAGGTCAAAAATTACAA  
 GTAAATGAGGTTGCTGCTGCTGAAAAACAGAGAAATCTGTTAGCGCAACTTGGTTAAACGTTTCGTAGTG  
 GCGCTGGTGTGATAACAGTATTATTACGTCAATCAAAGGCGGAACAAAAGTAACTGTTGAATCAACCGA  
 ATCTAATGGCTGGAACAAAATTACTTACAACGACGGGGAAACTGGTTTTCGTTAACGGTAAATACTTAACT  
 GTCAAAGTAGCAAGCACTCCTGTTGCACCAACACAAGAAGTGAAAAAAGAACTACTATTCAACAAGCTG  
 CACCTGCTGCAGAAAACAAAACACTGAAGTAAAACAACTACACAAGCAACTACACCTGCACCTAAAAGTAGC  
 AGAAACGAAAGAACTCCAGTGGTAGATCAAAATGCTACTACACACGCTGTTAAAAGCGGTGACACTATT  
 TGGGCTTTATCCGTAATAACGGTGTTCGGTTCAAGACATTATGTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTT  
 CTATTTATGTAGGTCAAAACTTGTATTAAACAACAGCCAACACAGTTACTCCAAAAGCAGAAGTGAA  
 AAAAGAAGCTCCAGCAGCTGAAAAACAAGCTGCACCAGTAGTTAAAGAAAATACTAACACTAACACAAAT  
 ACTACTACAGAGAAAAAAGAAACAACAACAACAACAGCACCTAAAGCACCAACAGAAGCTGCAAAAC  
 CAGCTCCCGCACCATCTACAAACACAAATGCTAATAAAACGAATACGAATACAAACAATACTAATACAAG  
 TACACCATCTAAAAATACCAATACTAATAACAACTCCAATACGAATACAACTCAAATACGAATGCTAAT  
 CAAGGTTCTTCTAACAATAACAGCAATTCAGTGCAAGTGCTATTATTGCTGAAGCTCAAAAACACCTTG  
 GAAAAGCTTATTCATGGGGTGGTAACGGACCAACTACATTTGATTGCTCTGGTTACACTAAATATGTATT  
 TGCTAAAGCGGGAATCTCCCTTCCACGTAATCTGGCGACAATACGCTAGCACTACAAGAATCTCTGAAT  
 CTCAAGCAAACCTGGTGATTTAGTATTCTTTGACTATGGTAGCGGAATTTCTCACGTTGGTATCTACGT  
 TGGTAAATGGTCAAATGATTAACG**CGCAAGACAATGGCGTTAAAT**ACG**ATAACATCCACGGCTCTGGCTGG**  
**CGTAAA****TATCTAGTTGGCTTCGGTCCG**GTATAA

Primer Probe Test Tool

Document Type: TaqMan® Quantification Parameter: Default Browse

Fwd Primer: CGCAAGACAATGGCGTTAAAT

Rev Primer: TATCTAGTTGGCTTCGGTCCG

Probe 1: ATAACATCCACGGCTCTGGCTGGG

Probe 2: [Empty]

Tm	%GC	Length
58.8	43	21
58.1	52	21
70.2	60	25
0.0	0	0

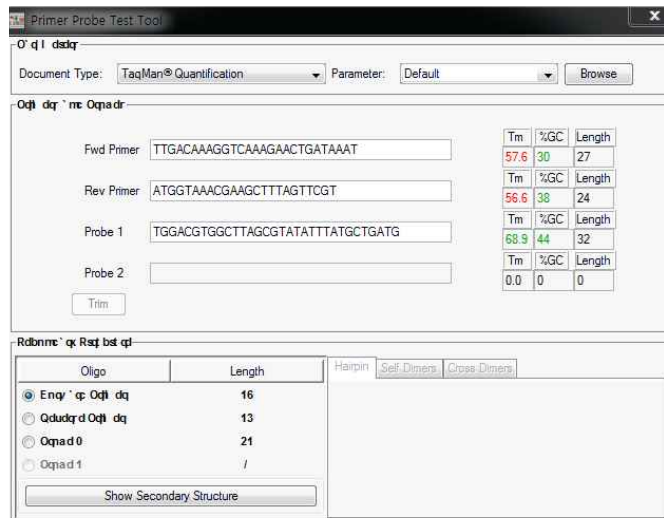
Oligo Length

- Enq' q' Oqti dq 10
- Qdudq' d Oqti dq 10
- Oqna d 0 14
- Oqna d 1 /

Show Secondary Structure

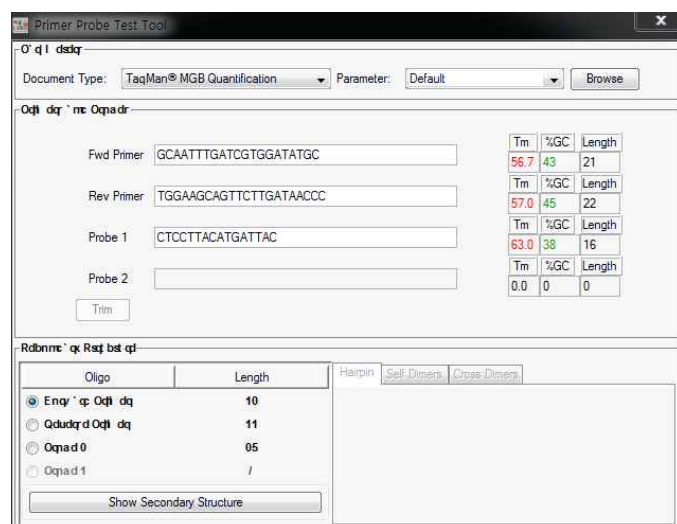
○ *Staphylococcus aureus nuc* gene (Accession No. DQ507379)

TCGAAAGAACAATACGCAAAGAGGTTTTCTTTTTTCGCTACTAGTTGCTTAGTGTAACTTTAGTTGTAGCTTCAA  
 GTCTAAGTAGCTCAGCAAATGCATCACAAACAGATAATGGCGTAAATAGAAGTGGTTCTGAAGATCCAACAGTATA  
 TAGTGCAACTTCAACTAAAAAATACATAAAGAACCTGCGACATTAATTAAGCGATTGATGGTGATACTGTAA  
 ATTAATGTACAAAGGTCAACCAATGACATTCAGACTATTATTGGTTGATACACCTGAAACAAAGCATCCTAAAAAA  
 GGTGTAGAGAAAATATGGTCCTGAAGCAAGTGCATTTACGAAAAGATGGTAGAAAATGCAAAGAAAATTGAAGTC  
 GAGT **TTGACAAAGGTCAAAGAAGCTGATAAAAT** **TGGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGATG** GAAAA**AT**  
**GGTAAACGAAGCTTTAGTTTCGT** CAAGGCTTGGCTAAAGTTGCTTATGTTTATAAACCTAACATACACATGAAC  
 AACTTTTAAGAAAAGTGAAGCACAAAGCGAAAAAAGAGAAATTAATATTT



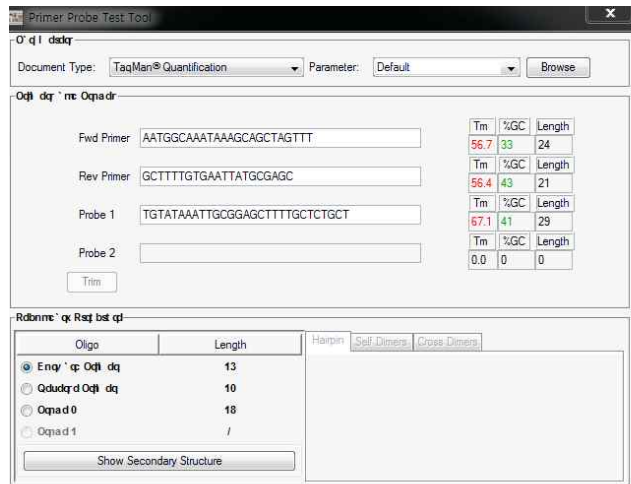
○ *Bacillus cereus groEL* gene (Accession No. EF685262)

GCAACTGTATTAGCGCAAGCTATGATTCGTGAAGGTCTTAAAAACGTAACAGCTGGTGCGAACCCAATGGGTCTTC  
 GTAAAGGTATCGAAAAGCTGTTACTGCTGCAATTGAAGAATTA AAAACGATTTCTAAACCAATCGAAGGTAAT  
 CTTCTATCGCACAAAGTAGCTGCTATTTCTGCTGCTGACGAAGAAGTAGGTCAATTAATCGCTGAAGCAATGGAGCGC  
 GTTGGTAACGACGGCGTTATTACTTTAGAAGAATCTAAAGGCTTCAACAGAATTAGACGTAGTAGAAGGTAT**GC**  
**AATTTGATCGTGGATATGC**AT **CTCCTTACATGATTAC** TGATTCTGACAAA**TGGAAGCAGTTCTTGATAACC**  
**C**ATACATCTTAATCACTGATAAAAAGATTTCTAACATTC AAGAAATCTTACCAGTATTAGAGCAAGTGGTACAAC  
 AAGGTAACCACCTCTTATCATTTGCTGAAGATGTAGAAGGCGAAGCGTTAGCTACATTAGTAGTGAACAACTTCG  
 TGGTACATTCAATGTAAGTAGCTGTT



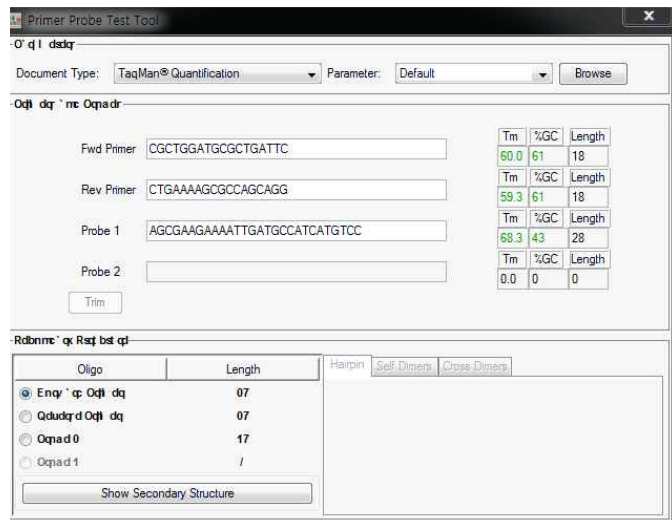
○ *Salmonella* spp. *his* gene (Accession No. CP006053)

ACTGGCGTTATCCCTTTCTCTGGTGGCTGGCATTTCAGCGCTACCGCAGCATTGCGGCTATTCCACAAAAGATTC  
 GTATCGGTACCGATCCTACATACGGCGCCGTTTGAATCCAAAAATGCACAAGGTGAATTGGTCCGGCTTTGATATCGAT  
 CTGGCCAAAGAAGCTGTGCAAACGTATCAACACACAGTGTACGTTTCGTGGAAAACC**CGCTGGATGCGCTGATTC**CGT  
 CTTTAAA**AGCGAAGAAAATTGATGCCATCATGTCC**TCGCTGTCCATCA**CTGAAAAGCGCCAGCAGG**AAATCGCG  
 TTTACCGACAAGCTTTACGCCGCTGATTCCCGTCTGGTGGTGGCGAAGAAGCTCTGATATTCAGCCGACCGTCGCGTCG  
 CTGAAAGGCAAGCGCTCGCGGTGCTACAGGGGACGACGCAGGAGACCTTCGGCAATGAGCACTGGGCGCCGAAAGG  
 GATTGAGATCGTCTCTTACCAGGGGCAGGAC



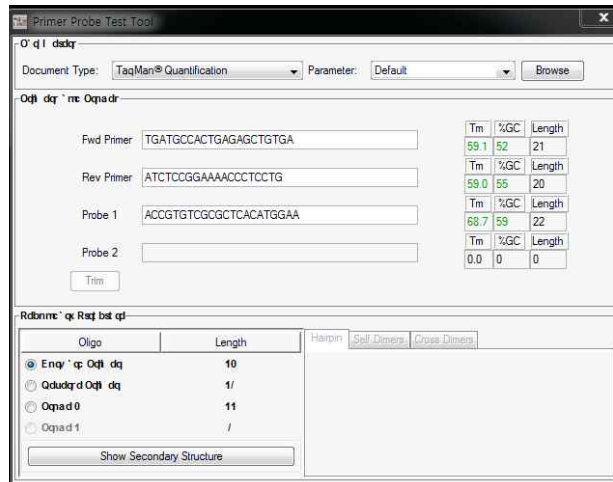
○ *Campylobacter jejuni* *mapA* gene (Accession No. X80135)

AGTCCTGGTGGTTTTGAAGCAAAGATTAAGGGCTTTTATACATTAGCGATGTTGGAATCAATGTTGTGCCAATA  
 AACGCACCTTAGACACTGGTATTGCTTTGAAAAAGGTTTATTTACATAGATTTTATGATTTAAAAGAAGGGCAA  
 AGGTTTTTAAATGCTAAAGGGAAAAAGTTATTTGTCGATGTGAATTTTAAATGCGGTATTTTATACTTATTTAAAAC  
 AAGAACTTGAAGCTAGAGGAATAGTTGTGCTTGACAATAACGATCAAAATTCACCTTATGTGAGTAAGATTGATT  
 TAGAATTTATATCTTATGGAGCAACTCAAGATGCTATAGGATTACATTCAAAAGTAGTAGGAGTTTTACAAGTTA  
 GTGATATAAATAAAAATAAGAAATTTACAATCCGCACCAAGCAAGATGTACAAGGTTTTGATGATTTAAAAGAAA  
 CAACTTTTTATACTCATTGTTAATAAAAACA**AATGGCAAATAAAGCAGCTAGTTT**AATCTCTGAACCTTTGAGG**T**  
**GTATAAATTGCGGAGCTTTTGCTCTGCT**CT**GCTTTTGTGAATTATGCGAGC**TAGAGCTTCTGAATTTTCTTT  
 AAATGTAAGAAAGCT



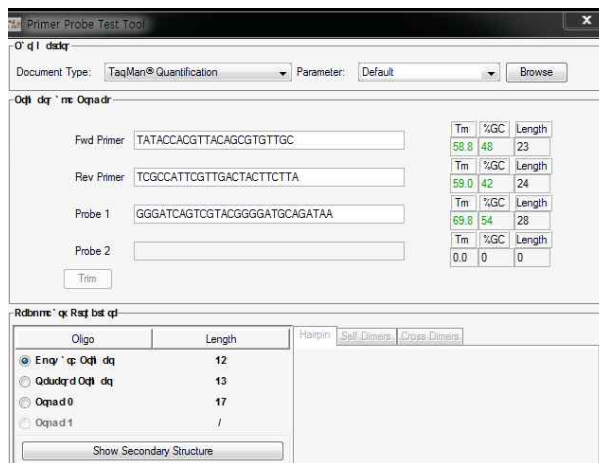
○ *Shigella* spp. ipaH gene (Accession No. CP000038 )

CATGGCTGGAAAACTCAGTGCCTCTGCGGAGCTTCGACAGCAGTCTTTCGCTGTTGCTGC **TGATGCCACT**  
**GAGAGCTGTGA**GG**ACCGTGTGCGGCTCACATGGAA**CA**ATCTCCGGAAAACCTCCTG**GTCCATCAGGC  
 ATCTGAAGGCCTTTTCGATAATGATACCGGCGCTCTGCTCTCCCTGGGCAGGGAAATGTTCCGCCTCGAAA  
 TTCTGGAGGACATTGCCCGGGATAAAGTCAGAACTCTCCATTTTGTGGATGAGATAGAAGTCTACCTGGCC  
 TTCCAGACCATGCTCGCAGAGAACTTCAGCTCTCCACTGCCGTGAAGGAAATGCGTTTCTATGGCGTGTG  
 GGGAGTGACAGCAAATGACCTCCGCACTGCCGAAGCCATGGTCAGAAGCCGTGAAGAGAATGAATTTACGG  
 ACTGGTTCTCCCTCTGGGGACCATGGCATGCTGTACTGAAGCGTACGGAAGCTGACCGCTGGGCGCT



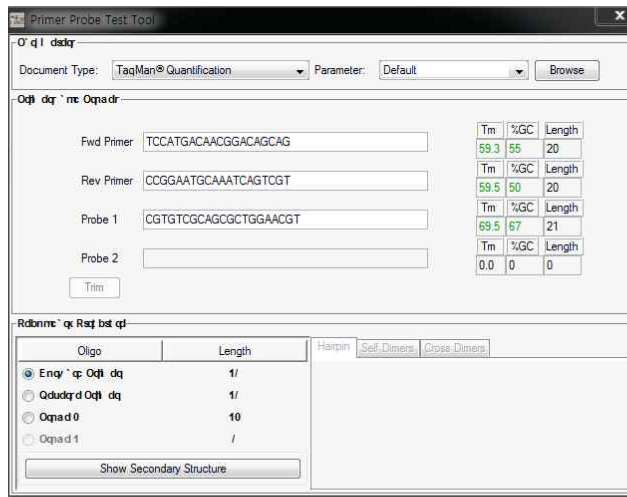
○ EHEC *V71* gene (Accession No. EF441576)

CTGCAAAGACGTATGTAGATTGCTGAATGTCATTGCTCTGCATAGGTAAGTCCATTACAGACTATTTTCATCAGGA  
 GGTACGTCTTTACTGATGATTGATAGTGGCACAGGGGATAATTTGTTTGCAGTTGATGTCAGAGGGATAGATCCAG  
 AGGAAGGGCGGTTTAATAATCTACGGCTTATTTGTTGAACGAAATAATTTATATGTGACAGGATTTGTTAACAGGAC  
 AAATAATGTTTTTTATCGCTTTGCTGATTTTTTCACATGTTACCTTTCCAGGTACAACAGCGGTTACATTGTCTGGT  
 GACAGTAGC **TATACCACGTTACAGCGTGTGC**A**GGGATCAGTCGTACGGGGATGCAGATAA**A**TCGCCATTTCGT**  
**TGACTACTTCTTA**TCTGGATTTAATGTCGCATAGTGGAAACCTCACTGACGCAGTCTGTGGCAAGAGCGATGTTACG  
 GTTTGTTACTGTGACAGCTGAAGCTTTACGTTTTCCGGCAAATACAGAGGGGATTTTCGTACAACACTGGATGATCTC  
 AGTGGGCGTTCTTATGTAATGACTGCTGAAGATGTTGATCTTACATTGAACTGGGGAAGGTTGAGTAGCGTCCCTGC  
 CTGACTATCATGGACAAGACTCTGTTTCGTGTAGGAAGAATTTCTTTTGGAAAGCATTAAATGCAATTCGGGAAGCGT  
 GGCATTAATACTGAATTTGTCATCATCATGCATCGCGAGTTGCCAGAATGGCATCTGATGAGTTTCCTTCTATGTGT  
 CCGGCAGATGGAAGAGTCCG



○ EHEC VT2 gene (Accession No. AB052227)

ATGAAGTGTATATTGTTAAAATGGGTACTGTGCCTGTTACTGGGCTTTTCTTCGGTATCCTATTCCCGGAATTTA  
 CGATAGACTTTTCGACTCAACAAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGACCCCTCTTGA  
 ACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACCACACCCCACCGGCAGTTATTTTGCTGTGGATATAC  
 GAGGGCTTGATGTCTATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAGCAAAATAATTTATATGTGGCCGG  
 GTTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAGATTTTACACATATATCAGTGCCCCGGTGTGACAACG  
 GTT **TCCATGACAACGGACAGCAG** TTATACCACTCTGCAA **CGTGTCCGACGCGCTGGAACGT** **CCGGAATGCAAA**  
**TCAGTCGT** CACTCACTGGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATC  
 CAGAGCAGTTCTGCGTTTTGTCACTGTACAGCAGAAGCCTTACGCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTTCGTCAGG  
 CACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGATGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCGAATCAGC  
 AATGTGCTTCCGGAGT



다. Real-time PCR 용 프라이머/프로브 세트의 증폭곡선 확인

- 합성 제작된 primer 및 probe를 테스트하기 위해서 각 target 균주들에서 추출한 DNA를 template로 사용, 확인한 결과 정상적인 amplification plot이 확인되었음.
- 이때 PCR 반응액 조성은 2X Real-time PCR MasterMix 10 $\mu$ l, 10pmol/ $\mu$ l로 희석한 primer pair 1 $\mu$ l, 2pmol/ $\mu$ l로 희석한 TaqMan probe 1 $\mu$ l 및 template DNA 5 $\mu$ l를 사용, DW로 total volume을 20 $\mu$ l로 맞추었음.
- Real-time PCR cycling 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 incubation 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 40 cycle을 진행하였음.

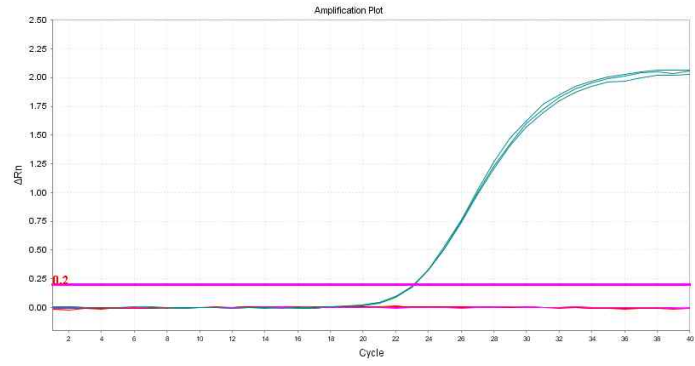


그림 6.15. *Listeria monocytogenes*의 amplification plot 확인

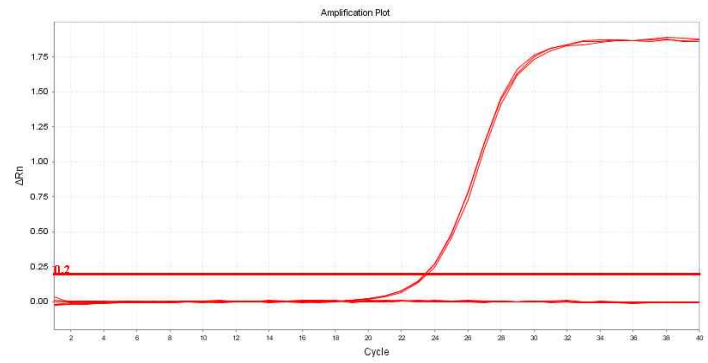


그림 6.16. *Staphylococcus aureus*의 amplification plot 확인

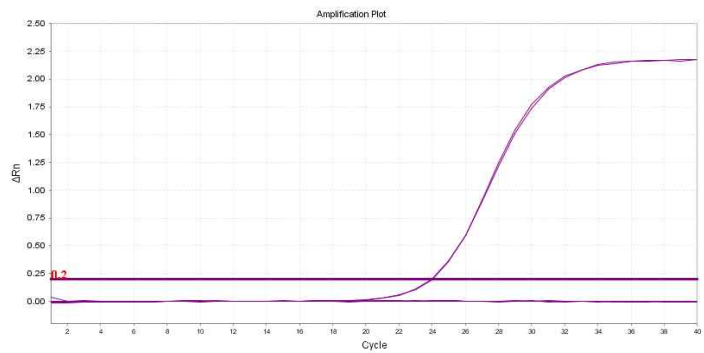


그림 6.17. *Bacillus cereus*의 amplification plot 확인

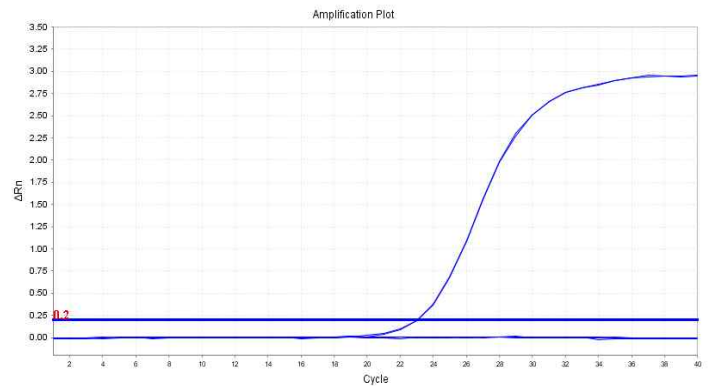


그림 6.18. *Salmonella* spp.의 amplification plot 확인

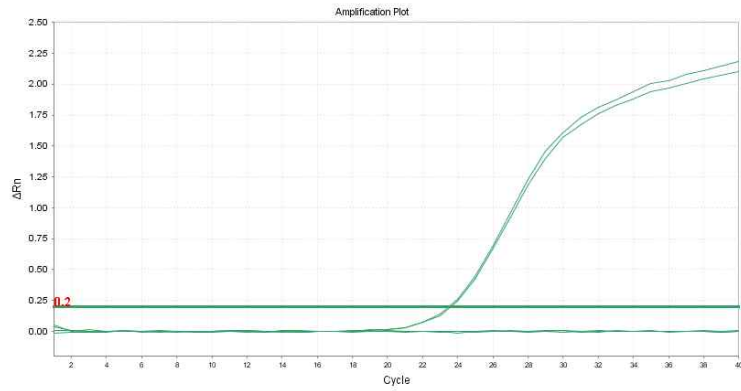


그림 6.19. *Shigella* spp.의 amplification plot 확인

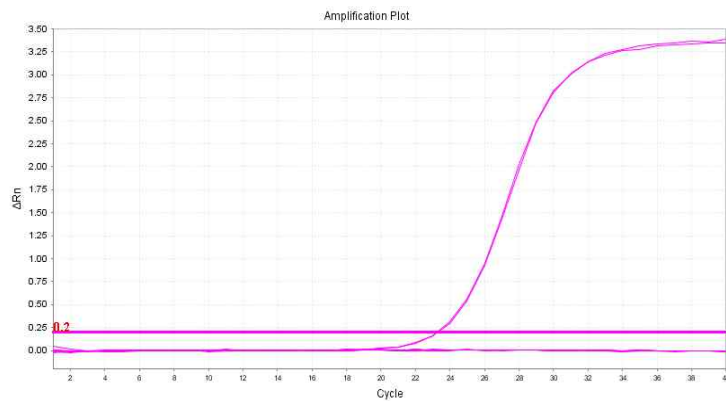


그림 6.20. EHEC verotoxin1(VT1)의 amplification plot 확인

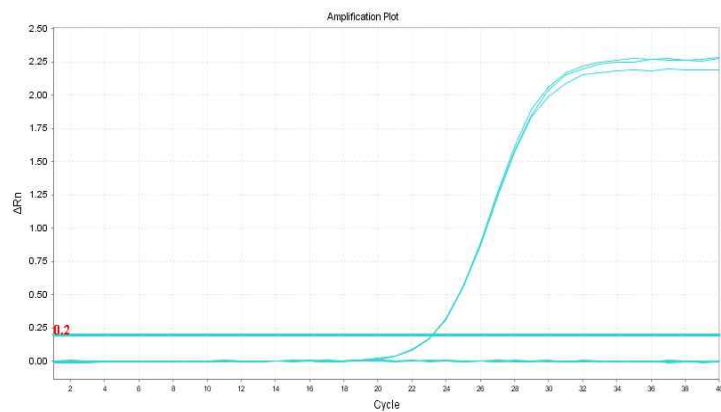


그림 6.21. EHEC verotoxin2(VT2)의 amplification plot 확인

#### 라. Real-time PCR 용 프라이머/프로브 세트의 특이도 확인

- 제작된 프라이머/프로브의 특이도를 확인하기 위하여 미생물자원센터 (Korean Collection for Type Culture), 국가병원체자원은행 (National Culture Collection for Pathogens) 및 식품의약품안전처 미생물과에서 분양받은 41 종의 식중독 세균에서 추출한 DNA를 테스트하였음.



○ 모두 target 균주에서만 증폭반응이 일어나고 다른 non-target 균주 DNA에서는 음성반응 즉, amplification plot이 형성되지 않아 디자인한 **primer 및 probe가 테스트 균주 내에서 특이도 100%임을 확인하였음.**

표 6.4. Real-time PCR의 특이도 테스트 결과

Bacteria	Strain No.	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>Salmonella spp.</i>
		<i>iap</i>	<i>nuc</i>	<i>groEL</i>	<i>his</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCCP 10807	+	-	-	-
	ATCC 19115	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCCP 10220	-	+	-	-
	NCCP 11470	-	+	-	-
	NCCP 11472	-	+	-	-
	ATCC 27664	-	+	-	-
	ATCC 13565	-	+	-	-
	ATCC 14458	-	+	-	-
	ATCC 19095	-	+	-	-
	ATCC 23235	-	+	-	-
	ATCC 10832	-	+	-	-
	ATCC 25923	-	+	-	-
	ATCC 6538	-	+	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	NCCP 10084	-	-	+	-
	NCCP 10623	-	-	+	-
	NCCP 10624	-	-	+	-
	NCCP 10715	-	-	+	-
	ATCC 14579	-	-	+	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 33814	-	-	-	-
	ATCC 27562	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	-	-	-	-
<i>Listeria welschimeri</i>	NCCP 10965	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33250	-	-	-	-
<i>Salmonella Dublin</i>	NCCP 10860	-	-	-	+
	NCCP 12232	-	-	-	+
<i>Salmonella Heidelberg</i>	NCCP 10322	-	-	-	+
<i>Salmonella typhi</i>	NCCP 10337	-	-	-	+
	NCCP 12241	-	-	-	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	NCCP 10812	-	-	-	+
<i>Salmonella enterica subsp.enterica</i>	ATCC 14028	-	-	-	+
<i>E.coli O157</i>	NCCP 11090	-	-	-	-
STEC	-	-	-	-	-



EHEC (VT1)	-	-	-	-	-
EHEC (VT2)	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 9290	-	-	-	-
	ATCC 29930	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-	-	-	-
<i>Shigella boydii</i>	ATCC 8700	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC14810	-	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559	-	-	-	-

Bacteria	Strain No.	<i>C.jejuni</i>	<i>Shigella spp.</i>	EHEC	
		<i>mapA</i>	<i>ipaH</i>	VT1	VT2
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCCP 10807	-	-	-	-
	ATCC 19115	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCCP 10220	-	-	-	-
	NCCP 11470	-	-	-	-
	NCCP 11472	-	-	-	-
	ATCC 27664	-	-	-	-
	ATCC 13565	-	-	-	-
	ATCC 14458	-	-	-	-
	ATCC 19095	-	-	-	-
	ATCC 23235	-	-	-	-
	ATCC 10832	-	-	-	-
	ATCC 25923	-	-	-	-
	ATCC 6538	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	NCCP 10084	-	-	-	-
	NCCP 10623	-	-	-	-
	NCCP 10624	-	-	-	-
	NCCP 10715	-	-	-	-
	ATCC 14579	-	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 33814	-	-	-	-
	ATCC 27562	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	-	-	-	-
<i>Listeria welschimeri</i>	NCCP 10965	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33250	+	-	-	-
<i>Salmonella Dublin</i>	NCCP 10860	-	-	-	-
	NCCP 12232	-	-	-	-
<i>Salmonella Heidelberg</i>	NCCP 10322	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	NCCP 10337	-	-	-	-

	NCCP 12241	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	NCCP 10812	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	ATCC 14028	-	-	-	-
<i>E. coli O157</i>	NCCP 11090	-	-	+	+
STEC	-	-	-	-	-
EHEC (VT1)	-	-	-	+	-
EHEC (VT2)	-	-	-	-	+
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 9290	-	+	-	-
	ATCC 29930	-	+	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-	+	-	-
<i>Shigella boydii</i>	ATCC 8700	-	+	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 14810	-	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559	-	-	-	-

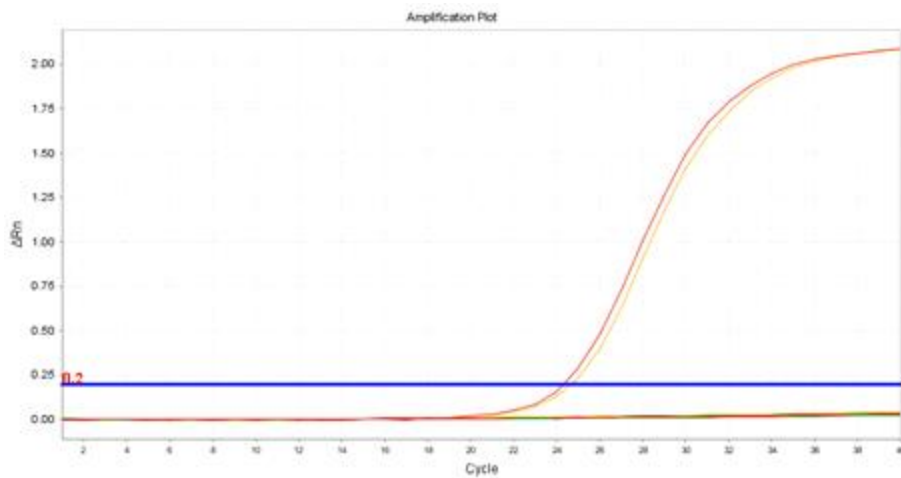


그림 6.22. *Listeria monocytogene* 프라이머 및 프로브의 특이도 확인

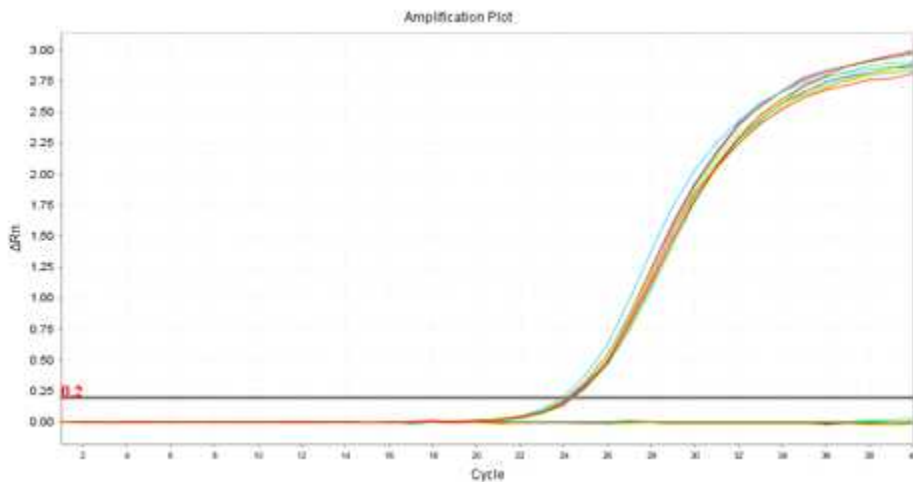


그림 6.23. *Staphylococcus aureus* 프라이머 및 프로브의 특이도 확인

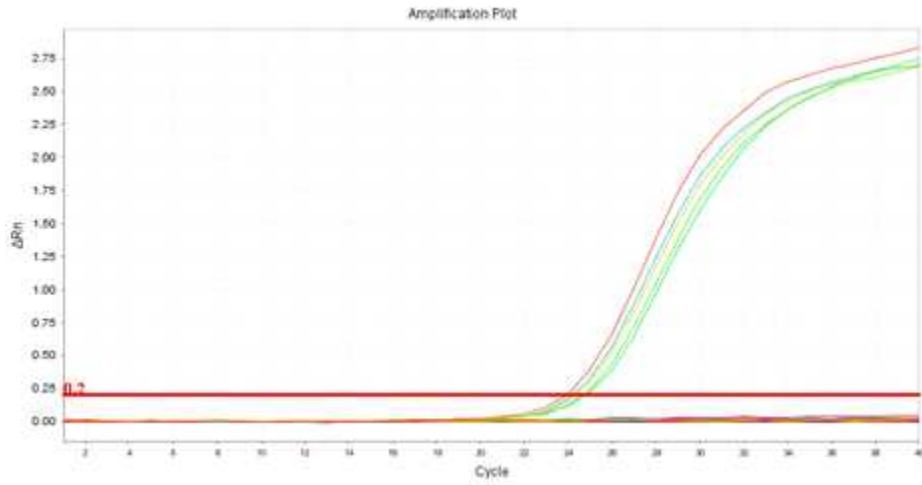


그림 6.24. *Bacillus cereus* 프라이머 및 프로브의 특이도 확인

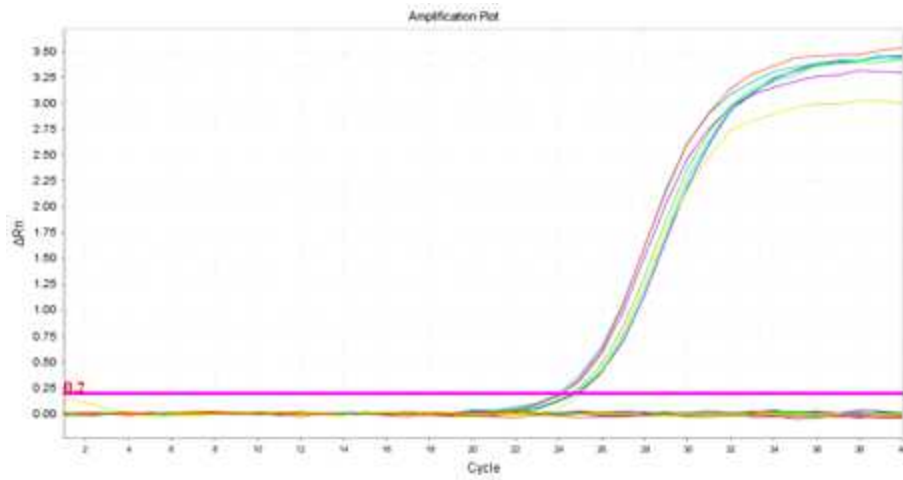


그림 6.25. *Salmonella* spp. 프라이머 및 프로브의 특이도 확인

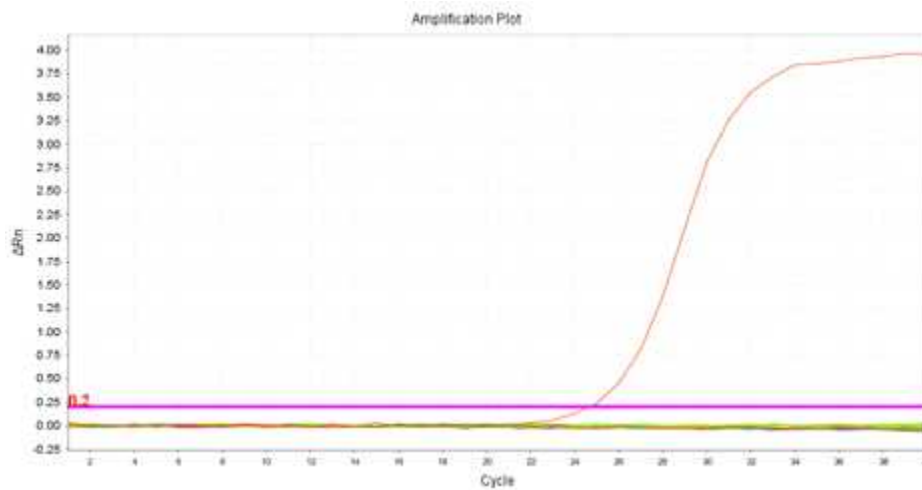


그림 6.26. *Campylobacter jejuni* 프라이머 및 프로브의 특이도 확인

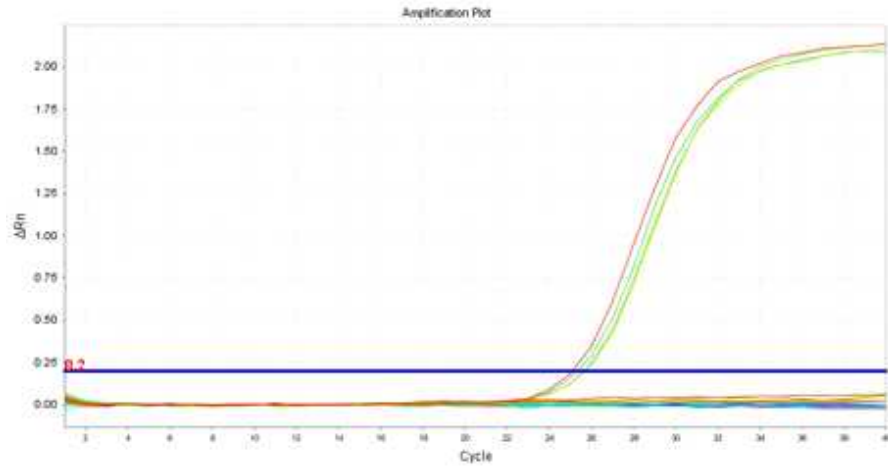


그림 6.27. *Shigella* spp. 프라이머 및 프로브의 특이도 확인

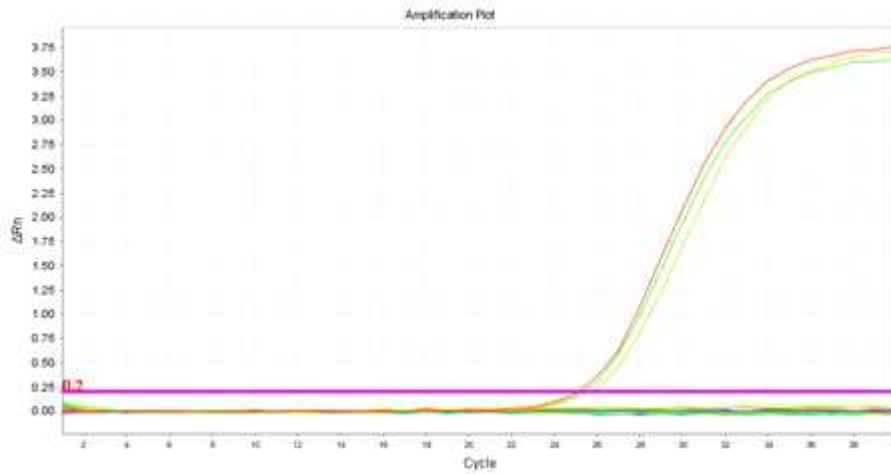


그림 6.28. EHEC VT1 프라이머 및 프로브의 특이도 확인

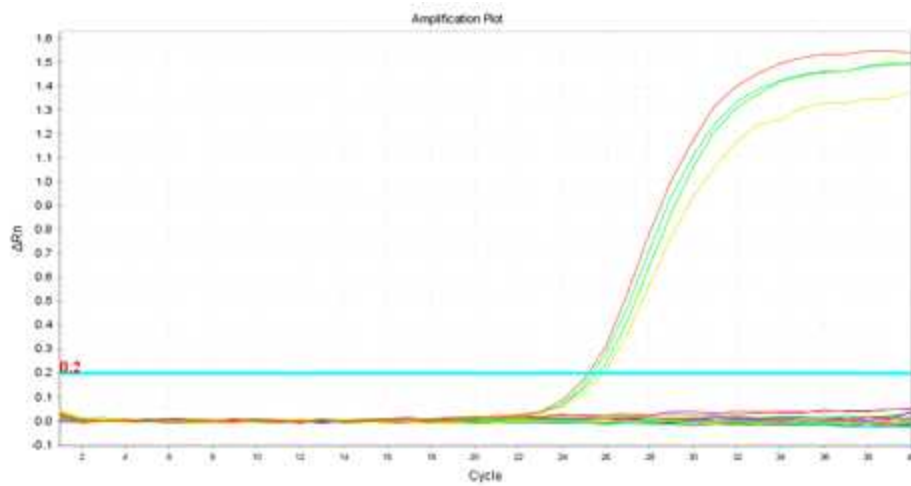


그림 6.29. EHEC VT2 프라이머 및 프로브의 특이도 확인

(6) Real-time PCR 용 프라이머/프로브 세트의 민감도 확인

- 제작된 프라이머/프로브의 민감도를 확인하기 위해서 각 target 유전자 부위가 PCR reaction 당  $10^7 \sim 10^1$  copies/ $\mu$ l 까지 포함되도록 첨가하여 테스트함.
- $10^1$  copies/ $\mu$ l 까지 증폭곡선이 확인되어 singleplex Real-time PCR의 검출한계는  $10^1$  copies/ $\mu$ l 임을 확인하였음.

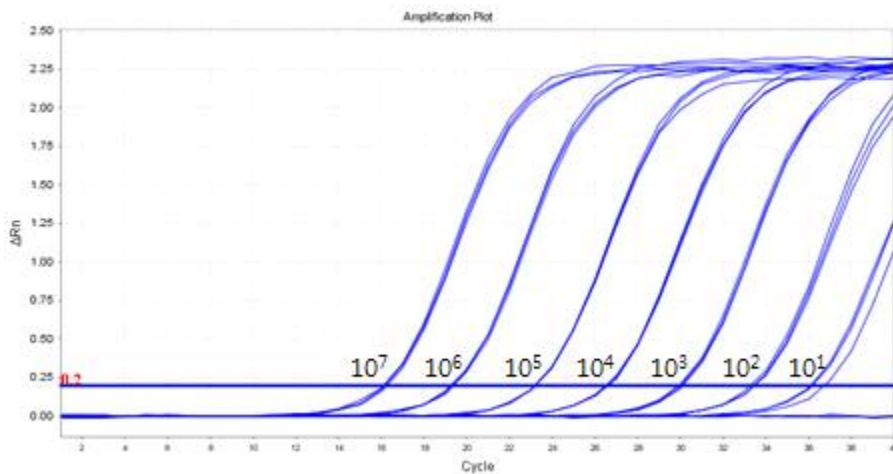


그림 6.30. *Listeria monocytogenes* 프라이머 및 프로브의 검출한계 확인 (단위: copies/ $\mu$ l)

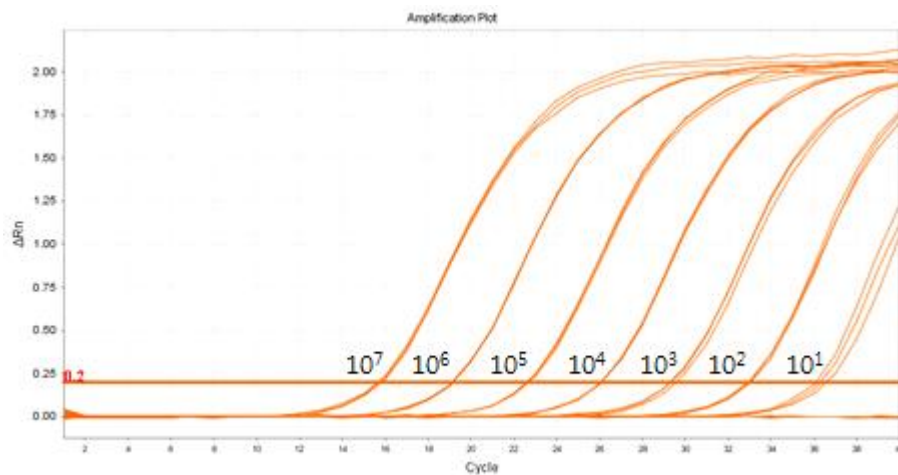


그림 6.31. *Staphylococcus aureus* 프라이머 및 프로브의 검출한계 확인 (단위: copies/ $\mu$ l)

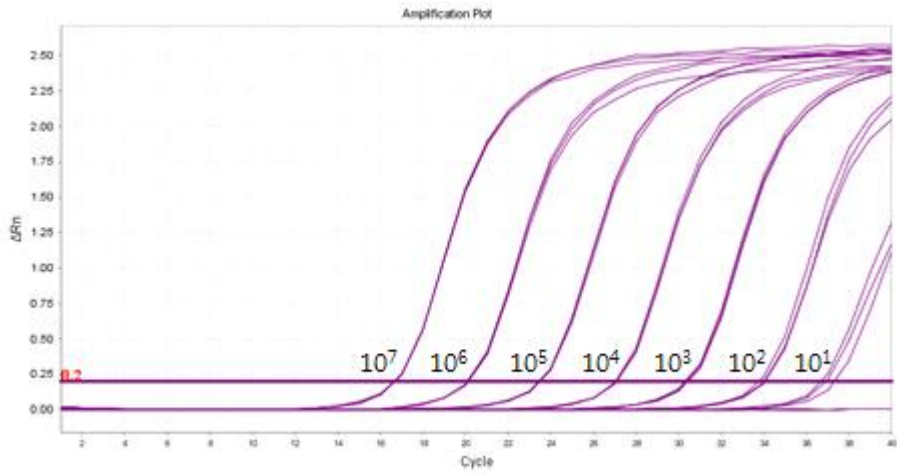


그림 6.32. *Bacillus cereus* 프라이머 및 프로브의 검출한계 확인 (단위: copies/ $\mu\text{l}$ )

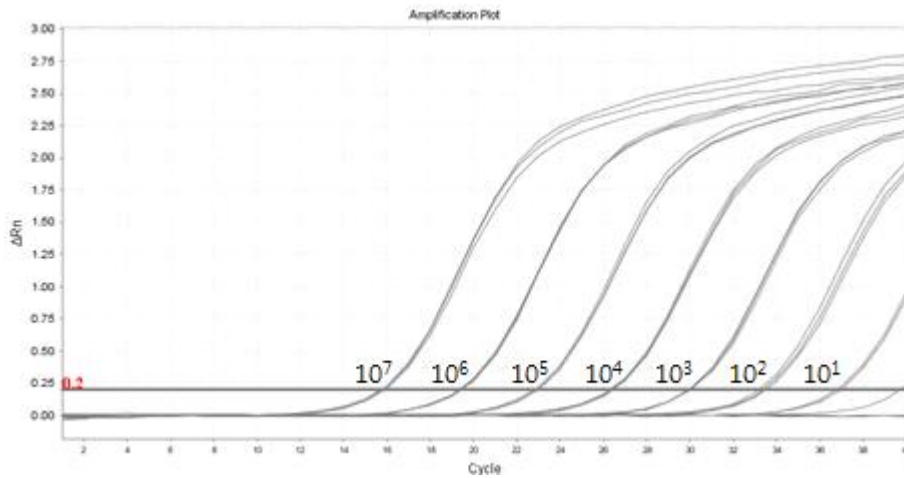


그림 6.33. *Salmonella spp.* 프라이머 및 프로브의 검출한계 확인 (단위: copies/ $\mu\text{l}$ )

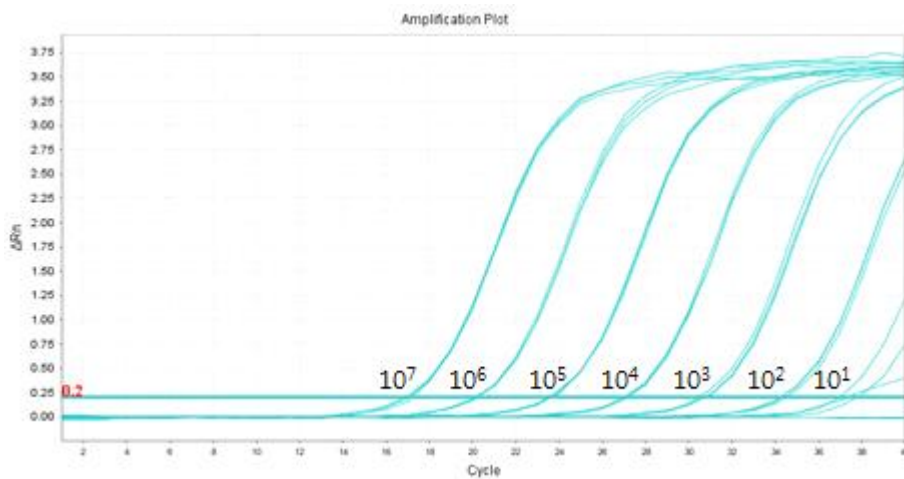


그림 6.34. *Campylobacter jejuni* 프라이머 및 프로브의 검출한계 확인 (단위: copies/ $\mu\text{l}$ )

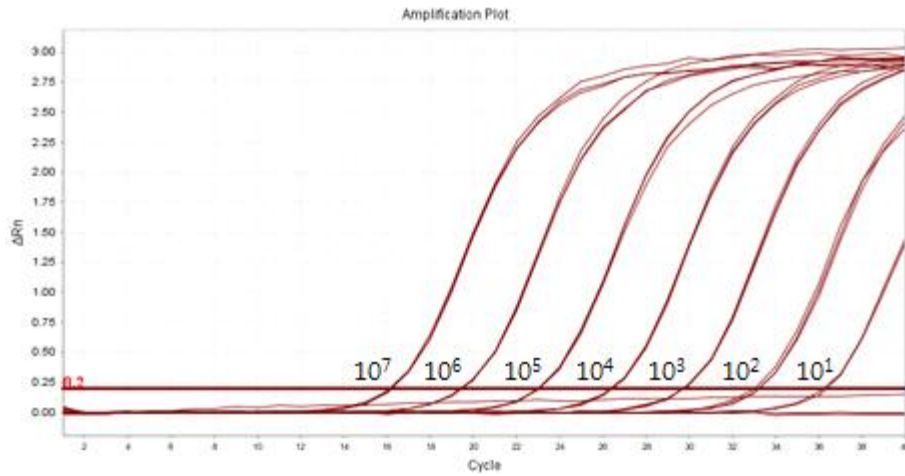


그림 6.35. *Shigella* spp. 프라이머 및 프로브의 검출한계 확인 (단위: copies/ $\mu l$ )

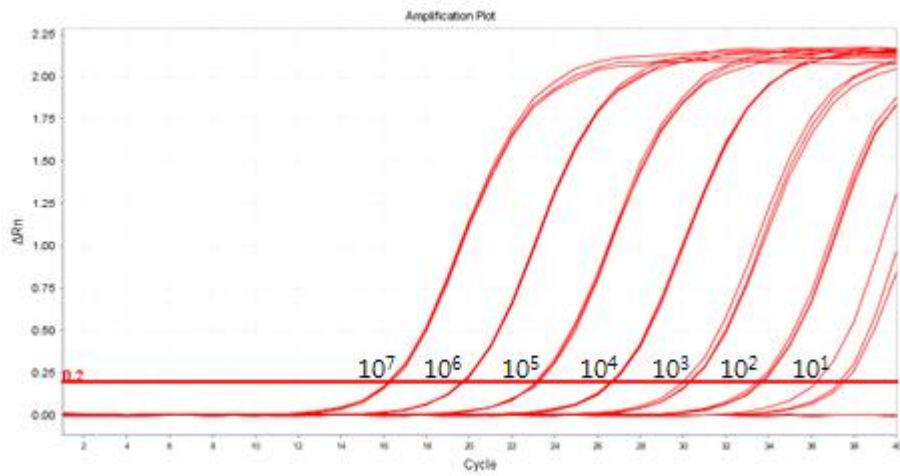


그림 6.36. *EHEC VT1* 프라이머 및 프로브의 검출한계 확인 (단위: copies/ $\mu l$ )

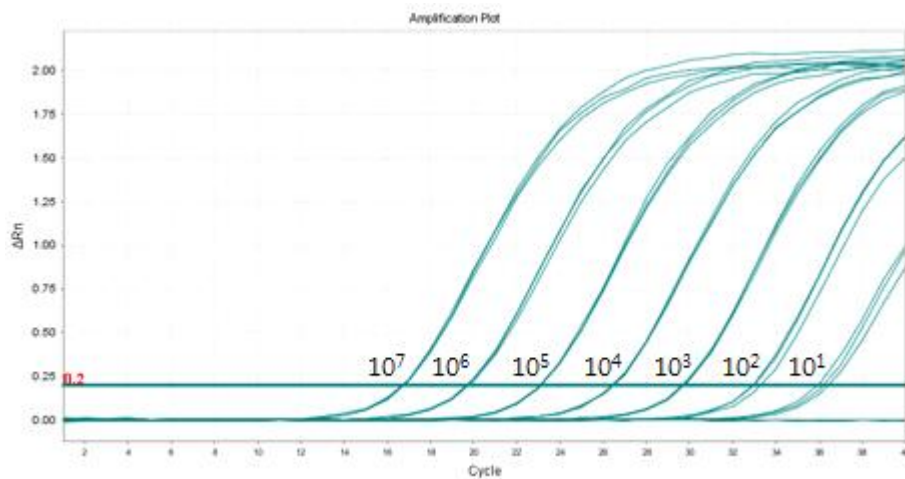


그림 6.37. *EHEC VT2* 프라이머 및 프로브의 검출한계 확인 (단위: copies/ $\mu l$ )



(7) 실제 식품에 접종, 증균 배양한 생균의 양과 Real-time PCR 결과의 상관관계 확인

- 본 실험의 대상은 *Listeria monocytogenes*와 *Salmonella* Enteritidis로 선정하였으며 TSB agar plate에 획선 도달한 균의 single colony를 TSB medium 10 ml에 접종한 후 37 °C에서 12시간 Shaking incubation 하였음.(그림 6.39)
- 12시간 배양 후 균수를  $10^8 \sim 10^{10}$  cfu/ml로 가정하고 0.85% NaCl 용액을 이용해 serial dilution을 한 후, 균 희석액 1 ml을 우유 25 g에 접종하고 *Listeria monocytogenes*의 경우 Listeria enrichment broth, *Salmonella* Typhimurium은 pepton water를 225mL 가하고 stomacher로 균질화하여 인위적 접종 샘플을 제조하였음.
- 각 시료에 접종된 균의 수를 측정하기 위해서 균 희석액 1 mL을 선택배지에 도달하고 인위적 접종한 샘플은 37 °C에서 16시간 배양함.
- 배양한 샘플은 stomacher를 이용해 1분간 고속 균질화하였고, 균질화 된 배양액 100 uL를 1.5 mL tube에 옮기고 DNA extraction kit로 추출후 template로 사용하였음.
- 선택배지 상의 colony를 counting 하여 각 샘플에 접종한 균의 수를 계산하였음.
- 실험 결과 식품에 인위적 접종한 균의 양 (contamination level)은  $10^4 \sim 10^0$  CFU/mL이었으며 16시간 증균 배양(pre-enrichment)을 거친 후 추출한 DNA를 Real-time PCR로 분석하였을 때, 초기 균량이  $10^0$  인 샘플까지 모두 동등하게 검출이 가능하였음.
- *Listeria monocytogenes*의 경우 균량(CFU/mL)에 따라 제조한 샘플별로 Ct value가 22.5~25.5 사이로 분포하고 있었으며, *Salmonella*는 19.5~20에서 균등하게 검출되었음(그림 6.38).

Pathogen	Enrichment Time	Average Ct
<i>Listeria monocytogenes</i>	16 hours	24.7
<i>Salmonella enteritidis</i>	16 hours	19.9

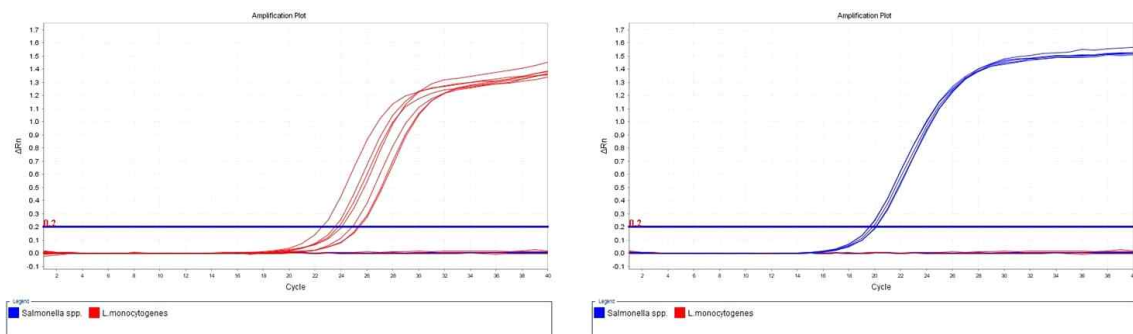


그림 6.38. 식품에 배양한 생균의 양과 Real-time PCR 결과의 상관관계 실험 결과



<인위 오염시킨 식품 시료에서 세균의 양과 Real-time PCR 결과의 상관관계 실험 과정>

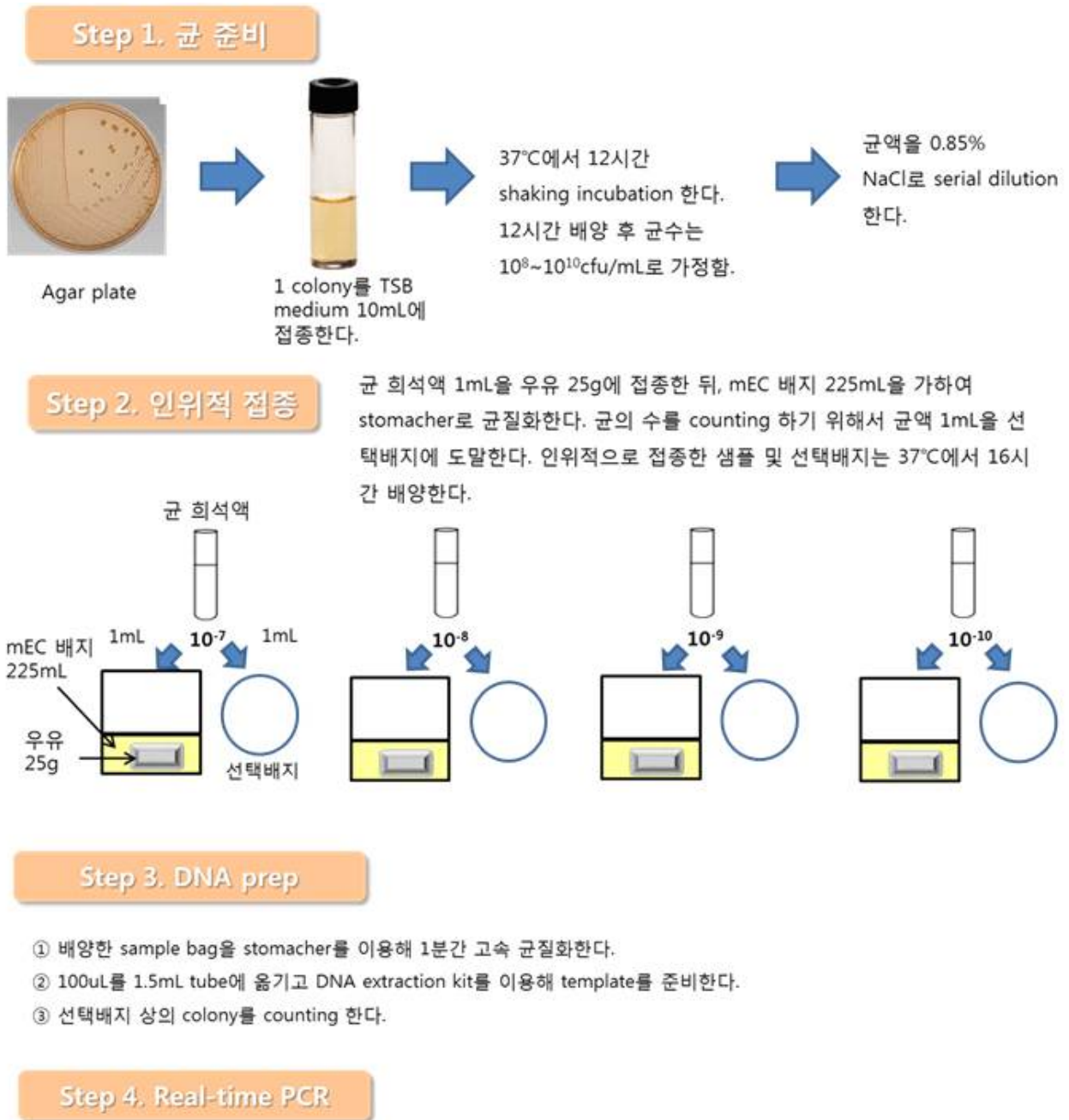


그림 6.38. 식품에 배양한 생균의 양과 Real-time PCR 결과의 상관관계 실험 과정

## <요약>

### 제6절 식중독 세균 신속진단용 Multiplex real-time PCR kit의 개발 및 상용화

#### 1. 위해 식중독 세균 7종에 대한 특이 유전자 마커 탐색

- 식중독 세균 7종 즉, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni* 및 Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)의 PCR 검출법에 관한 선행 논문들을 조사하여 활용 가능한 마커를 탐색하였음(표 6.1).
- 7종 식중독 세균들에 특정한 유전자를 선별하고, Genious 4.8.5 프로그램 이용하여 PCR용 primer set을 디자인하고, 일반 PCR법으로 band를 확인 후, inclusivity와 exclusivity, 특이도 등을 확인하여 프라이머의 성능 평가함(표 6.2)
- **식중독균 특이적 반응성 Real-time PCR 용 프라이머/프로브 세트 개발 및 선정**
  - **primer/probe set:** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)의 VT1 및 VT2, *Shigella* spp.의 ipaH 및 *Bacillus cereus*의 groEL 기존 마커 사용, 나머지는 새로 마커 사용함.
  - **Real-time PCR cycling 조건:** 95°C, 10분; (95°C, 15초; 60°C, 1분)x 40 cycle
  - **PCR 반응액 조성:** 2X Real-time PCR MasterMix 10  $\mu$ l, 10 pmol/ $\mu$ l로 희석한 primer pair 1  $\mu$ l, 2 pmol/ $\mu$ l로 희석한 TaqMan probe 1 $\mu$ l 및 template DNA 5 $\mu$ l를 사용, DW로 total volume을 20  $\mu$ l로 맞추었음.
- **Real-time PCR 용 프라이머/프로브 세트의 특이도 및 민감도 확인:**
  - 10<sup>1-2</sup> copies/ $\mu$ l 까지 증폭곡선이 확인되어 singleplex Real-time PCR의 검출한계는 PCR 반응 당 10<sup>1</sup> copies/ $\mu$ l 임을 확인하였음.
  - **식중독 세균 리스트:** 미생물자원은행(KCTC), 식약처, 국가병원체자원은행(NCCP)에서 분양받은 총 51 균주들을 확보하여 primer/probe set의 특이도 100% 확인
- **실제 식품에 접종, 증균 배양한 생균의 양과 Real-time PCR 결과의 상관관계 확인**
  - 일정 농도(10<sup>4</sup>~10<sup>0</sup> CFU/mL)의 세균을 식품에 인위 오염시킨 후 16시간 증균 배양 후 Real-time PCR로 분석하였을때, 초기 균량이 10<sup>0</sup> CFU/mL인 샘플까지 검출함

## 2. 위해 식중독 세균의 동시 검출용 Multiple Real-time PCR set 구성

### 가. 식중독 세균의 동시 검출용 Multiple Real-time PCR set 구성

- 신선편의식품의 정의는 농·임산물을 세척, 박피, 절단 또는 세절 등의 가공공정을 거치거나 이에 단순히 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로서 그대로 섭취할 수 있는 샐러드나 새싹 채소 등의 식품을 말함.
- 신선편의식품의 원료 대부분은 토양에서 유래하고 미생물 또한 종류에 상관없이 토양에 가장 많이 상재함.
- 또한 신선편의식품은 별도의 가열 및 소독 과정이 없어서 원료에서부터 유통단계까지 식중독균에 노출될 위해요소가 다양하게 존재함.
- Garcia-Gimeno 등이 저술한 논문에서는 스페인에서 70종의 혼합 샐러드 중 *Listeria monocytogenes*의 검출을 보고하였고 미국, 일본 등지에서도 상추 등 다양한 샐러드용 채소에서 *Salmonella* spp., *E.coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei* 등의 검출 및 식중독 유발 사례를 보고함.
- 한국의 경우 Kim 등이 샐러드에서 *E.coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* 등의 검출을 보고한 바 있음.
- 이에, 식중독 원인 세균 7종의 **균별 위해도 및 특성**을 고려하여 multiplex Real-time PCR set를 구성하였음.
- **EHEC(장출혈성 대장균)**과 *Shigella* spp.는 **법정 제1군전염병**으로 지정되어 있어 위해도가 가장 높은 세균임.
- 식품공전의 신선편의식품에 대한 *Salmonella* spp.의 기준규격은  $n=5, c=0, m=0/25g$  이며 상대적으로 위해도가 낮은 *Bacillus cereus*와 *Staphylococcus aureus*는 각각 1g 당 1,000 이하, 1g 당 100이하의 정량 규격이 명시되어 있음.
- 1차로 균별 위해도를 기준으로 grouping을 한 뒤, 기준규격이 없는 *Listeria monocytogenes*는 *Bacillus cereus*와 *Staphylococcus aureus*와 같은 그램 양성균이므로 같은 group으로 설정하였고 *Campylobacter jejuni*는 그램 음성균으로써 *Salmonella* spp.와 함께 grouping 하였음.
- 따라서 Multiplex 1번 set는 *Bacillus cereus*의 *groEL*, *Listeria monocytogenes*의 *iap* 및 *Staphylococcus aureus*의 *nuc* gene을 triplex로 조합하였고

- 2번 set는 *Campylobacter jejuni*의 *mapA* 와 *Salmonella spp.*의 *his gene*을 검출할 수 있는 duplex primer/probe set임.
- 3번 set는 EHEC(장출혈성 대장균)의 VT1, VT2 및 *Shigella spp.*의 *ipaH*를 동시 검출할 수 있는 triplex set로 구성하였음(표 6.5).
- TaqMan probe의 reporter dye 구성은 첫 번째 marker에 FAM, 두 번째 JOE 및 세 번째로 Cy5를 사용함.
- Reporter dye의 emission wavelength는 각각 FAM 520 nm, JOE 548nm 및 Cy5 670nm이며 이들은 cross talk이 발생하지 않는 범위임.

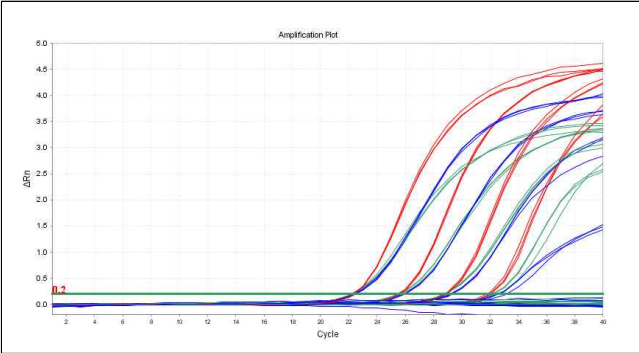
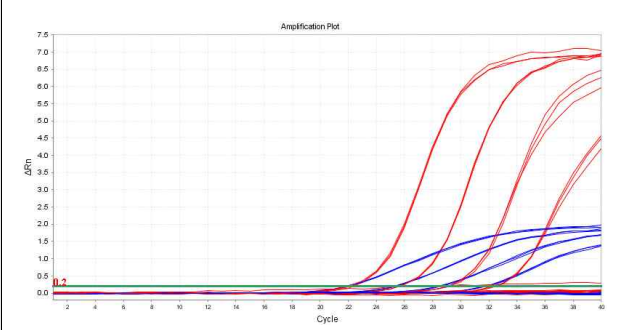
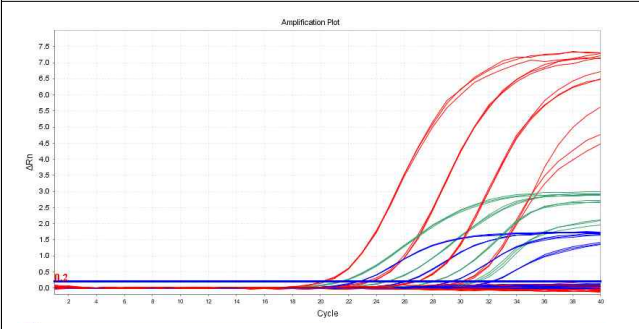
표 6.5. Multiplex Real-time PCR set 구성 및 reporter dye

Dye	Set 1		Set 2		Set 3	
	Bacteria	Gene	Bacteria	Gene	Bacteria	Gene
FAM	<i>Bacillus cereus</i>	<i>groEL</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>mapA</i>	EHEC	VT1
JOE	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>iap</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>his</i>	EHEC	VT2
Cy5	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i>			<i>Shigella spp.</i>	<i>ipaH</i>

#### 나. Multiplex Real-time PCR 조건 최적화

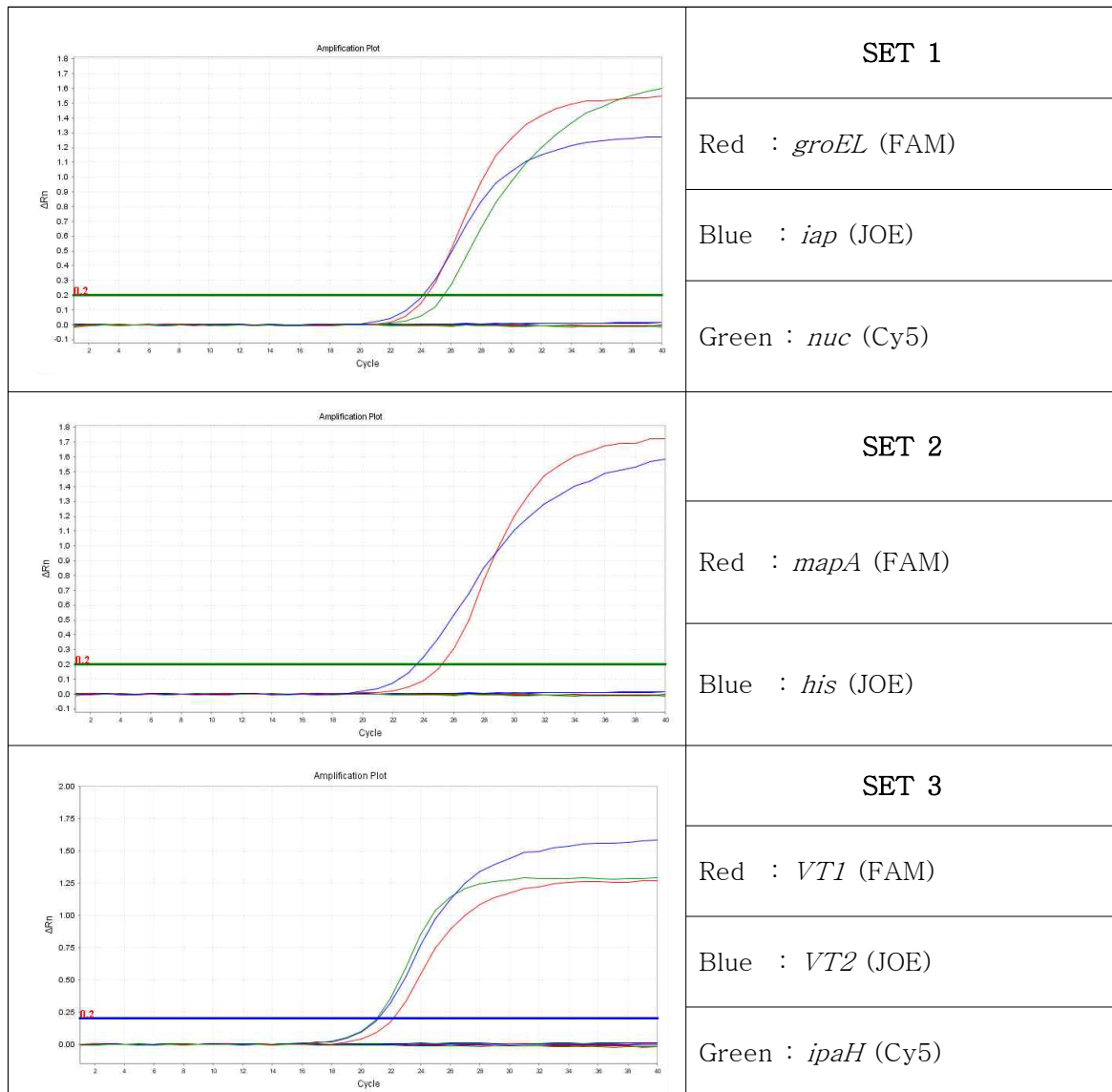
- 반응액 조성은 2 x MasterMix 10  $\mu$ L, primer와 probe 각 농도 및 template DNA 5  $\mu$ L를 첨가하고 멸균 증류수로 총 volume을 20  $\mu$ L로 함.
- Thermal cycle 은 95 $^{\circ}$ C 10분을 반응시켜 Taq polymerase를 활성화시킨 후 95 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 1분을 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 수행하였음.
- 1차로 각 marker별 primer 및 probe의 농도를 동일하게 사용하고 template DNA를 serial dilution 하여 첨가 후 amplification plot의 패턴을 확인하였음(표 6.6).

표 6.6. Multiplex primer 및 probe set 농도 테스트

	<b>SET 1</b>
	Red : <i>groEL</i> (FAM)
	Blue : <i>iap</i> (JOE)
	<b>SET 2</b>
	Red : <i>mapA</i> (FAM)
	Blue : <i>his</i> (JOE)
	<b>SET 3</b>
	Red : <i>VT1</i> (FAM)
	Blue : <i>VT2</i> (JOE)
	Green : <i>ipaH</i> (Cy5)

- Set 1의 경우 JOE channel의 *iap* gene이 low copy에서 다른 marker에 의해 inhibition을 받는 것을 확인하였고, Set 2와 Set 3의 경우는 FAM의  $\Delta Rn$ 이 다른 dye들에 비해서 월등히 높은 것으로 나타났음.
- 위 결과를 토대로 primer 및 probe의 농도를 최적화하였으며, 이때 고려사항은 각 target 별  $\Delta Rn$ 과 amplification plot의 shape을 유사하게 조절하고 non-specific 증폭산물의 생성 배재를 목적으로 target에 대한 증폭 효율을 유지하는 선에서 primer의 농도 수준을 최소화 하였음.
- 미생물들의 co-infection 상황에서 각각의 **amplification plot**의  $\Delta Rn$ 과 shape이 유사하게 형성될 경우 키트화 후 user들이 결과 확인을 쉽게 할 수 있으며 low copy number에서 inhibition을 최소화 할 수 있음.

표 6.7. 최적화된 조건의 multiplex amplification plot



#### 다. Multiplex Real-time PCR의 특이도 확인

- 식품에서 검출될 가능성이 있는 식중독균 총 51 strains를 테스트하였으며 추출한 bacterial DNA 50 ng을 각 set별 반응액에 첨가하여 확립된 온도 조건에 따라서 Real-time PCR을 수행하였음.
- 그 결과 모두 target 균주들에서만 증폭반응이 일어나 본 시스템의 특이도가 테스트 균주 내에서 100%임을 확인하였음(표 6.8, 6.9, 6.10).

표 6.8. Multiplex Real-time PCR set 1의 특이도 확인 결과

Bacteria	Strain no.	Ct value		
		FAM( <i>groEL</i> )	JOE( <i>iap</i> )	Cy5( <i>nuc</i> )
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 21366	27.5	-	-
	NCCP 10084	20.8	-	-
	NCCP 10623	24.1	-	-
	NCCP 10624	22.4	-	-
	NCCP 10715	23.8	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC 2213	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	KCTC 1108	26.9	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33250	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 10145	-	21.3	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19113	-	22.3	-
<i>Listeria welshimeri</i>	ATCC 35897	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>	KCTC 3586	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	-	-	-
	ATCC 11607	-	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	ATCC 49642	-	-	-
<i>Pseudomonas brenneri</i>	ATCC 21244	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 27853	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	-	-	-
<i>Salmonella enterica subsp. Houtenae</i>	ATCC 43974	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	-	-	-
<i>Salmonella Dublin</i>	ATCC 15480	-	-	-
<i>Salmonella Heidelberg</i>	ATCC 8326	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 9290	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	KCTC 2517	-	-	-
<i>Shigella boydii</i>	KCTC 22528	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 22530	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 27664	-	-	24.1
	ATCC 13565	-	-	24.2
	ATCC 14458	-	-	24.4
	ATCC 19095	-	-	23.9
	ATCC 23235	-	-	24.2
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	-	-	-
	KCTC 2982	-	-	-
	ATCC 19115	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM 41657	-	-	-
	ATCC 9610	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	NCCP 11090	-	-	-
	NCCP 13718	-	-	-
	NCCP 13717	-	-	-
	NCCP 13721	-	-	-
	NCCP 13715	-	-	-
	NCCP 14038	-	-	-
	ATCC 29194	-	-	-
	ATCC 35421	-	-	-
	ATCC 8739	-	-	-
	ATCC 51446	-	-	-
	ATCC 4157	-	-	-
	ATCC 11775	-	-	-
	NCCP 10369	-	-	-

표 6.9. Multiplex Real-time PCR set 2의 특이도 확인 결과

Bacteria	Strain no.	Ct value	
		FAM( <i>mapA</i> )	JOE( <i>his</i> )
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 21366	-	-
	NCCP 10084	-	-
	NCCP 10623	-	-
	NCCP 10624	-	-
	NCCP 10715	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC 2213	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	KCTC 1108	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33250	16.8	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 10145	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19113	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>	ATCC 35897	-	-
<i>Listeria innocua</i>	KCTC 3586	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	-	-
	ATCC 11607	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	ATCC 49642	-	-
<i>Pseudomonas brenneri</i>	ATCC 21244	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 27853	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	-	21.9
<i>Salmonella enterica subsp. Houtenae</i>	ATCC 43974	-	22.9
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	-	22.3
<i>Salmonella Dublin</i>	ATCC 15480	-	19.7
<i>Salmonella Heidelberg</i>	ATCC 8326	-	20.4
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 9290	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	KCTC 2517	-	-
<i>Shigella boydii</i>	KCTC 22528	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 22530	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 27664	-	-
	ATCC 13565	-	-
	ATCC 14458	-	-
	ATCC 19095	-	-
	ATCC 23235	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	-	-
	KCTC 2982	-	-
	ATCC 19115	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM 41657	-	-
	ATCC 9610	-	-
<i>Escherichia coli</i>	NCCP 11090	-	-
	NCCP 13718	-	-
	NCCP 13717	-	-
	NCCP 13721	-	-
	NCCP 13715	-	-
	NCCP 14038	-	-
	ATCC 29194	-	-
	ATCC 35421	-	-
	ATCC 8739	-	-
	ATCC 51446	-	-
	ATCC 4157	-	-
	ATCC 11775	-	-
	NCCP 10369	-	-



표 6.10. Multiplex Real-time PCR set 3의 특이도 확인 결과

Bacteria	Strain no.	Ct value		
		FAM(VT1)	JOE(VT2)	Cy5(ipaH)
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 21366	-	-	-
	NCCP 10084	-	-	-
	NCCP 10623	-	-	-
	NCCP 10624	-	-	-
	NCCP 10715	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC 2213	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	KCTC 1108	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33250	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 10145	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19113	-	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>	ATCC 35897	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>	KCTC 3586	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	-	-	-
	ATCC 11607	-	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	ATCC 49642	-	-	-
<i>Pseudomonas brenneri</i>	ATCC 21244	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 27853	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	-	-	-
<i>Salmonella enterica subsp. Houtenae</i>	ATCC 43974	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	-	-	-
<i>Salmonella Dublin</i>	ATCC 15480	-	-	-
<i>Salmonella Heidelberg</i>	ATCC 8326	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 9290	-	-	18.1
<i>Shigella flexneri</i>	KCTC 2517	-	-	15.5
<i>Shigella boydii</i>	KCTC 22528	-	-	14.3
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 22530	-	-	17.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 27664	-	-	-
	ATCC 13565	-	-	-
	ATCC 14458	-	-	-
	ATCC 19095	-	-	-
	ATCC 23235	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	-	-	-
	KCTC 2982	-	-	-
	ATCC 19115	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM 41657	-	-	-
	ATCC 9610	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	NCCP 11090	20.1	19.7	-
	NCCP 13718	-	-	-
	NCCP 13717	-	-	-
	NCCP 13721	-	-	-
	NCCP 13715	-	-	-
	NCCP 14038	-	-	-
	ATCC 29194	-	-	-
	ATCC 35421	-	-	-
	ATCC 8739	-	-	-
	ATCC 51446	-	-	-
	ATCC 4157	-	-	-
	ATCC 11775	-	-	-
	NCCP 10369	-	-	-

라. Multiplex Real-time PCR의 민감도 확인

○ 각 균별 target 유전자의 amplification region을 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)를 이용하여 cloning한 뒤 추출한 plasmid DNA를  $10^6 \sim 10^0$  copies/ $\mu$ l로 serial dilution하였으며 이를 template로  $5\mu$ l 사용하여 테스트한 결과 **각 set별 LOD는  $10^1$  copies/ $\mu$ l 수준**임을 확인하였음.

표 6.11. Multiple Real-time PCR의 분석적 성능 평가 결과 정리

Set	Target	Specificity	Sensitivity
1	<i>Bacillus cereus (groEL)</i>	Inclusivity 100% Exclusivity 100%	10 copies/ $\mu$ l
	<i>Listeria monocytogenes (iap)</i>		
	<i>Staphylococcus aureus (nuc)</i>		
2	<i>Campylobacter jejuni (mapA)</i>	Inclusivity 100% Exclusivity 100%	10 copies/ $\mu$ l
	<i>Salmonella spp.(his)</i>		
3	EHEC (VT1 )	Inclusivity 100% Exclusivity 100%	10 copies/ $\mu$ l
	EHEC (VT2 )		
	<i>Shigella spp.(ipaH)</i>		

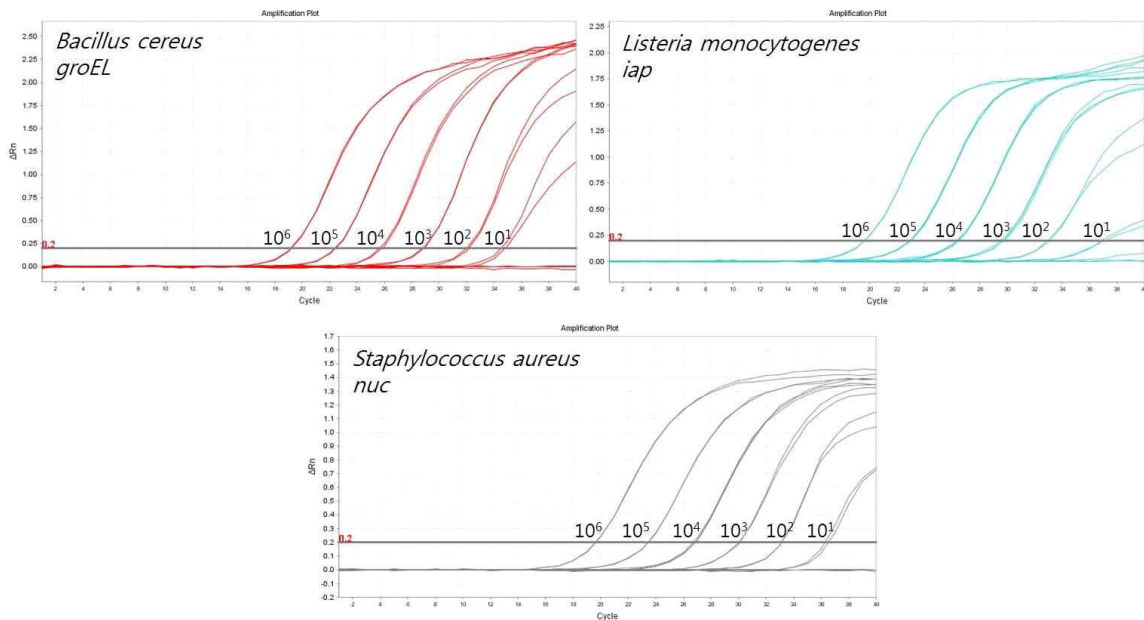


그림 6.40. Multiplex Real-time PCR set 1의 민감도 테스트 결과

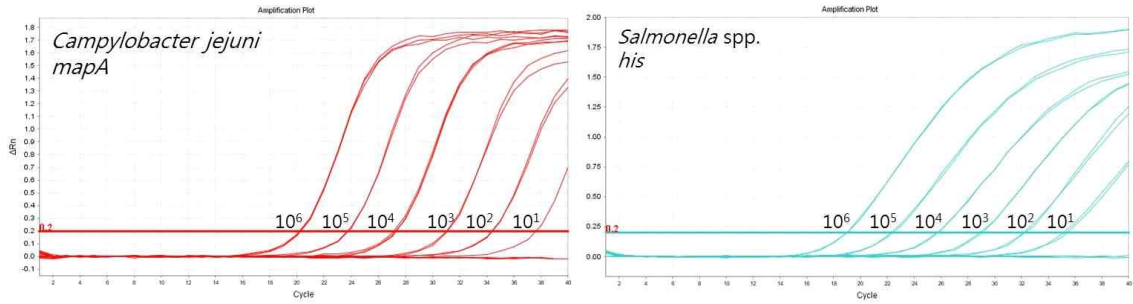


그림 6.41. Multiplex Real-time PCR set 2의 민감도 테스트 결과

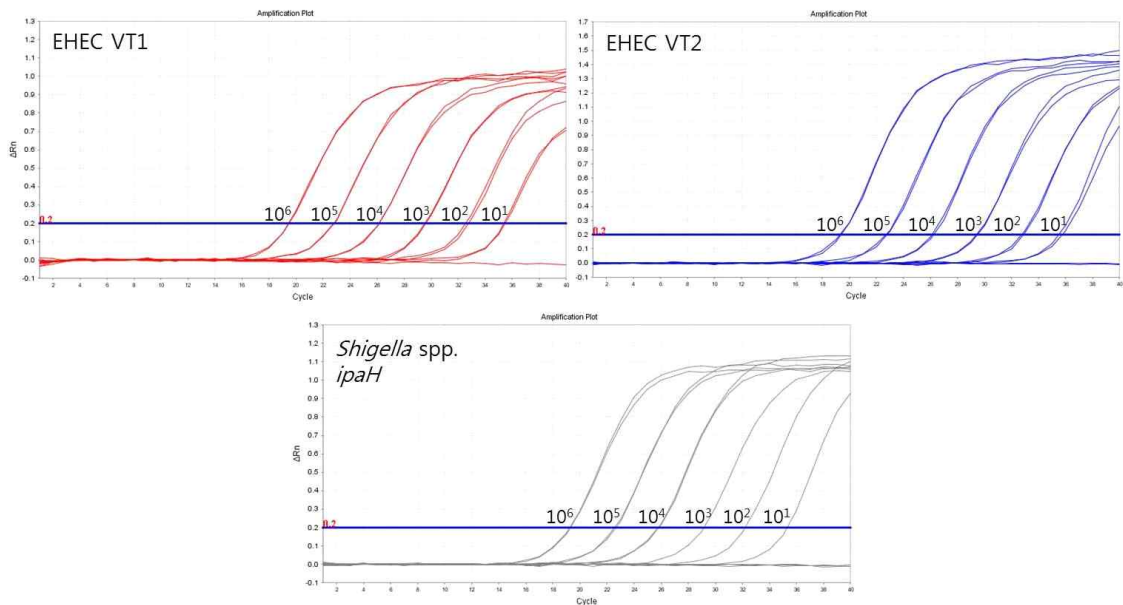


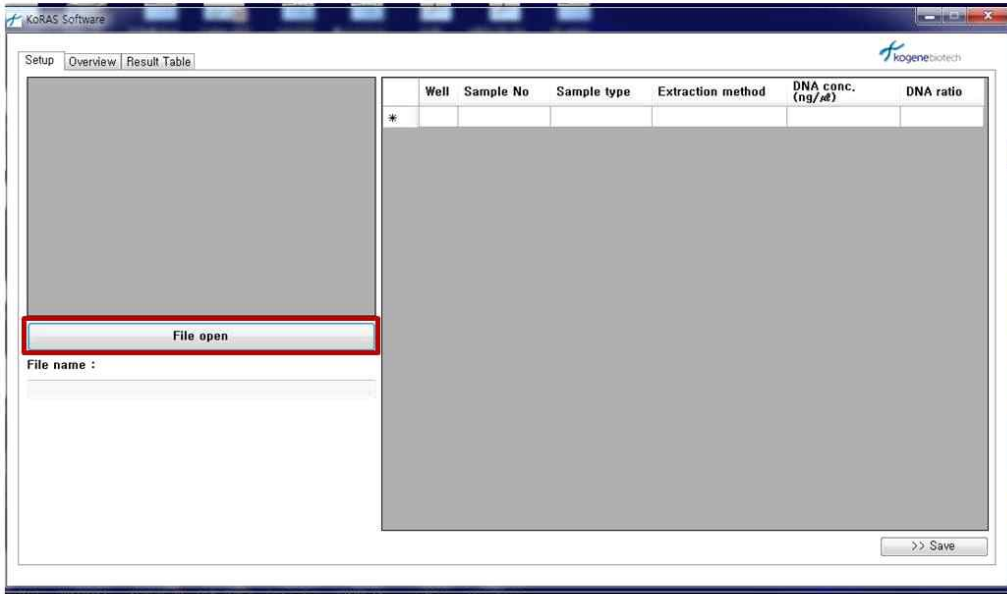
그림 6.42. Multiplex Real-time PCR set 3의 민감도 테스트 결과

#### 마. Q-PCR 자동분석 시스템 개발

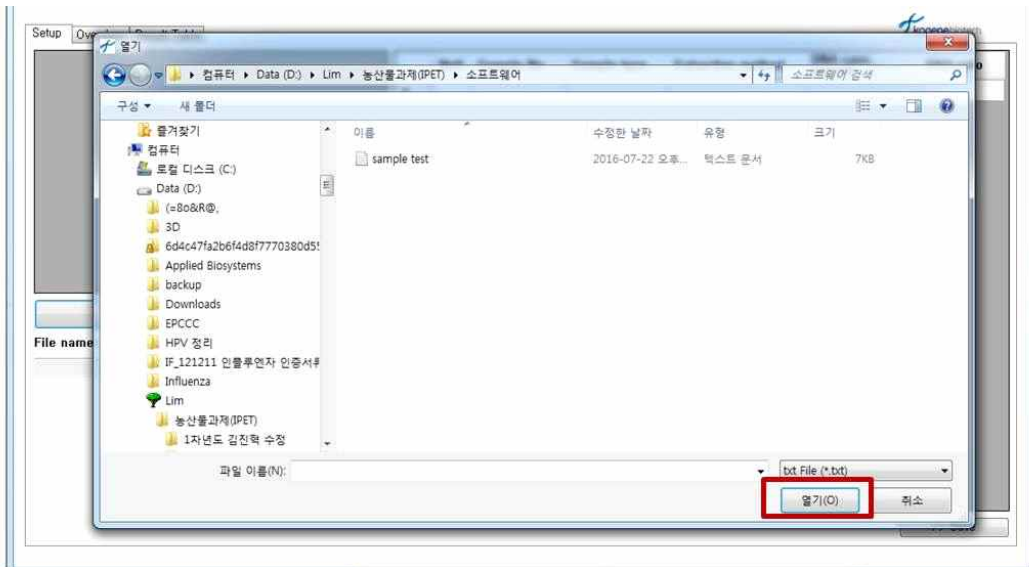
- Real-time PCR을 이용한 실험분석 결과는 amplification plot과 threshold line이 교차하는 지점으로 산출된 Ct value(threshold cycle)를 확인해야 함.
- Real-time PCR software 내 Ct value report를 확인할 수가 있으나 정성분석에 대한 검출 또는 불검출의 결과가 직관적으로 표시되지 않아 비숙련자의 경우 신속한 데이터 확인이 어려울 수 있음. 따라서 Real-time PCR 후 Ct value 데이터를 추출하여 자동으로 연동 분석이 가능한 소프트웨어를 개발하는 것이 목적임.
- 자동분석 결과 확인은 “+” 검출, “-” 불검출로 표현이 되며, excel 파일 형식으로 저장이 가능하여 분석 결과를 출력할 수도 있음.
- 자동분석 소프트웨어의 사용법은 사용자 편의성을 고려하여 최대한 조작성이 간편하게 디자인하였으며 총 7단계로 이루어짐(그림 6.43).



Step 1. 바탕화면의 KORAS 아이콘을 더블클릭한다.

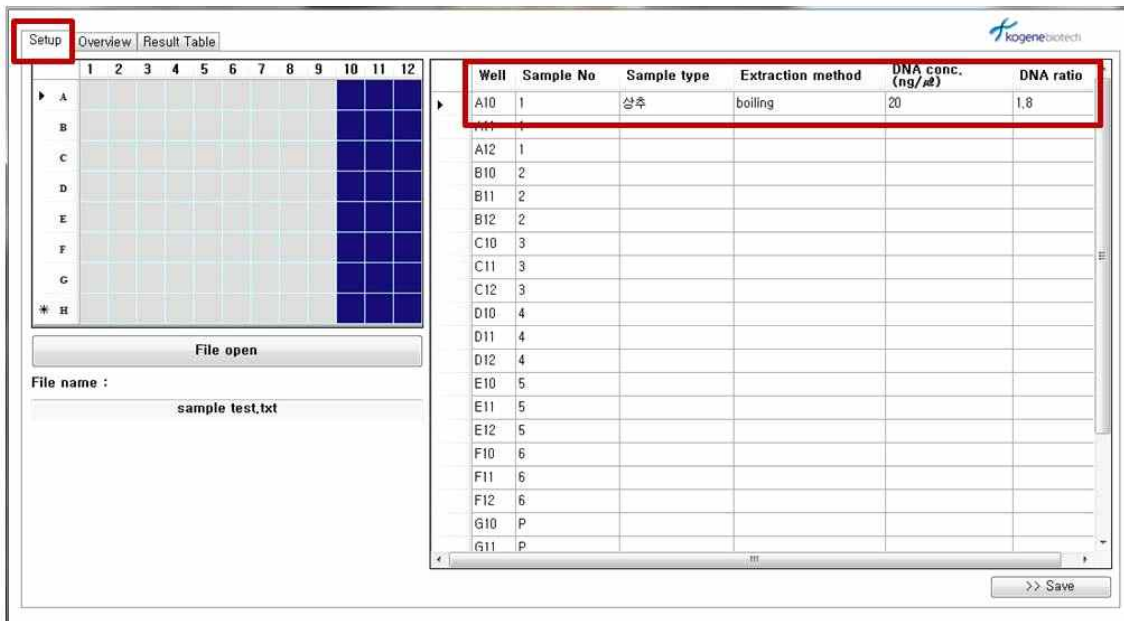


Setp 2. 소프트웨어가 활성화되면 File open을 클릭한다.

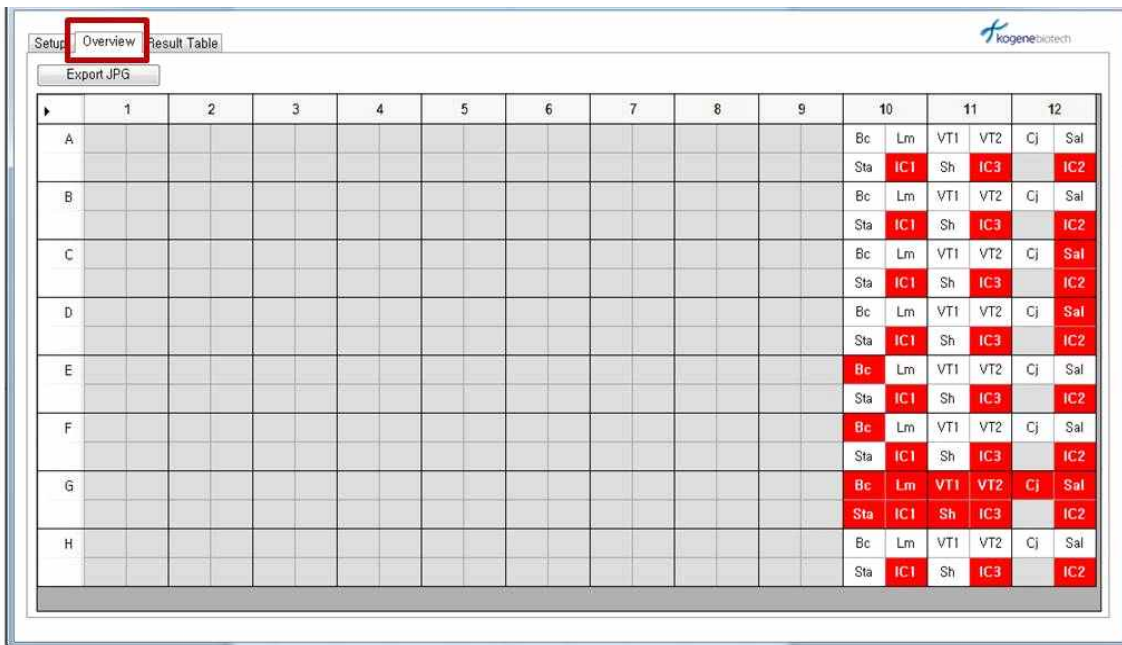


Step 3. AB7500 Real-time PCR system 장비 구동이 끝난 후 Export 한 파일을 선택하여 연다.

그림 6.43. 자동분석 소프트웨어 사용법(계속)

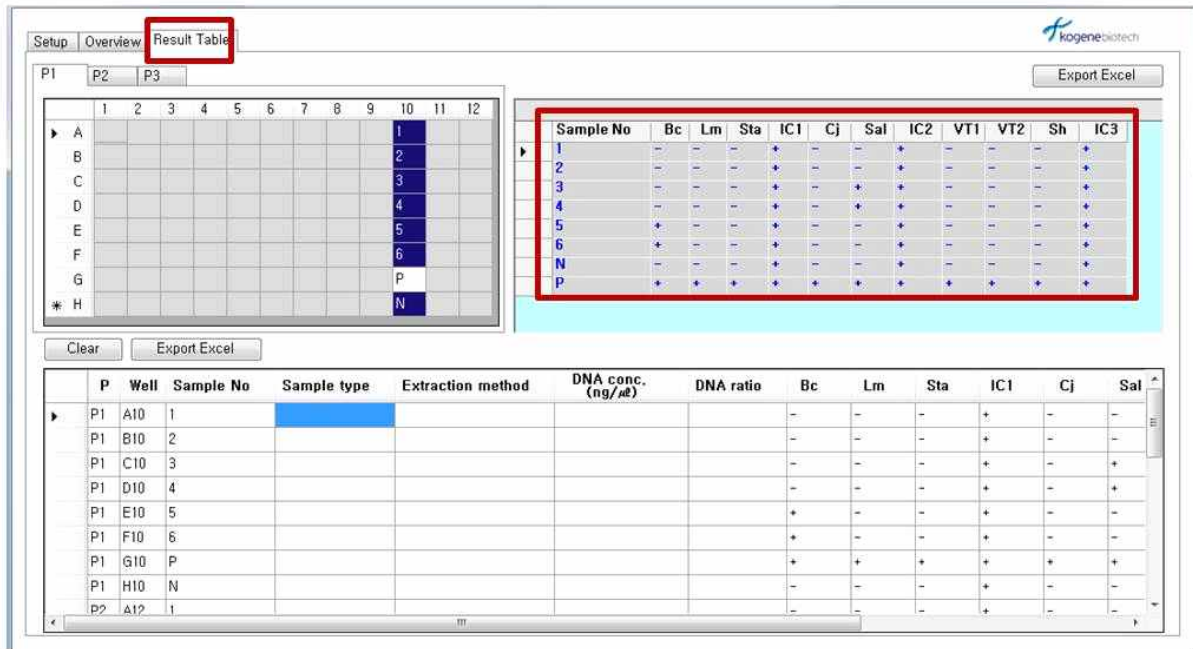


Step 4. 왼쪽 상단 메뉴 중 'Setup' 탭에서는 Real-time PCR run 시 선택된 well을 보여준다. 필요 시 오른쪽에 샘플 및 추출에 관한 정보를 입력할 수 있다.

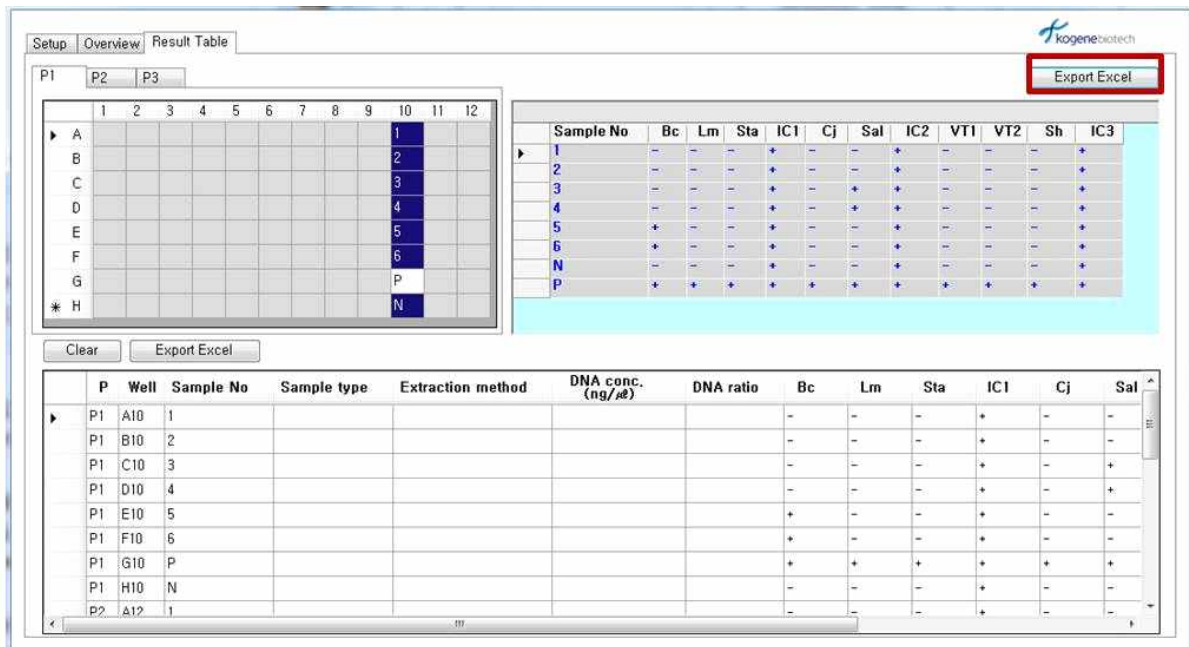


Step 5. 'Overview' 탭에서는 각 well 별 선택된 target을 확인 할 수 있다.

그림 6.44. 자동분석 소프트웨어 사용법(계속)



Step 6. 'Result Table' 탭에서는 sample 별 결과를 "+" (검출), "-" (불검출)로 확인할 수 있다.



Step 7. 오른쪽 상단 'Export Excel'을 클릭하여 Excel 파일로 저장이 가능하다.

그림 6.45. 자동분석 소프트웨어 사용법

## <요약>

### 제6절 식중독 세균 신속진단키트 Multiplex real-time PCR kit의 개발 및 상용화

#### 2. 위해 식중독 세균의 동시 검출용 Multiple Real-time PCR set 구성

- 식중독 원인 세균 7종의 균별 위해도 및 특성을 고려하여 multiplex Real-time PCR set 를 구성하였음(표 6.5)
- **EHEC(장출혈성 대장균)과 Shigella spp.는 법정 제1군전염병**으로 지정되어 있어 위해도가 가장 높은 세균임.
- 식품공전의 신선편의식품에 대한 **Salmonella spp.**의 기준규격은 n=5, c=0, m=0/25g
- 상대적으로 위해도가 낮은 **Bacillus cereus**와 **Staphylococcus aureus**는 각각 1g 당 1,000 이하, 1g 당 100 이하의 정량 규격이 명시되어 있음.
- **Multiplex Set 1:** Bacillus cereus의 groEL, Listeria monocytogenes의 iap 및 Staphylococcus aureus의 nuc gene을 triplex로 조합함.
- **Multiplex set 2:** Campylobacter jejuni의 mapA Salmonella spp.의 his gene을 검출할 수 있는 duplex primer/probe set임.
- **Multiplex set 3:** EHEC(장출혈성 대장균)의 VT1, VT2 및 Shigella spp.의 ipaH를 동시 검출 할 수 있는 triplex set로 구성하였음
- **Multiplex Real-time PCR 조건 최적화: 특이도, 민감도 확인**
  - 식중독 관련 균주 41개에 대하여 특이도 확인.
  - 타겟 DNA의 재조합 벡터로 민감도 확인-각 set별 검출한계(LOD)는  $10^1$  copies/ $\mu$ l 수준
- **Q-PCR 자동분석 시스템 개발:** 증폭 곡선과 threshold 선이 교차하는 Ct 값을 자동으로 결과분석하여 검출 유무 또는 양성/음성 유무를 "+/-" 또는 Ct 값으로 자동 분석하는 프로그램을 개발하여 사용자 편의성을 높임(그림 6.43)

### 3. 개발된 수출형 PCR 기술의 키트화 및 상용화

#### 가. 내부양성대조군 (Internal positive control, IPC) 첨가

##### (1) 내부양성대조군 (Internal positive control, IPC) 장점

- PCR 반응액 내에 저해물질(PCR inhibitor)의 혼입 여부 판단을 목적으로 한 내부양성대조군(Internal positive control, IPC)을 Multiplex Real-time PCR set에 추가로 첨가하였음.
- matrix에는 다양한 PCR 저해물질이 포함되어 있는데 대표적인 성분은 fat, protein, calcium, chelators, collagen 및 phenolic compounds 등이 있으며 이들은 DNA와 직접적으로 상호작용 하거나 thermostable DNA polymerase 또는 cofactor의 작용을 방해함으로써 그 효과를 발휘함.
- PCR 저해물질의 존재에 의한 위음성 샘플의 발생은 부정확한 결과 분석을 초래하게 되므로 근본적인 해결책은 순도 높은 DNA의 추출이 필수적임.
- 하지만 최근에는 PCR 반응액 내에서도 저해물질의 존재 유무를 확인함으로써 검사의 유효 또는 비유효한 결과를 판별할 수 있도록 internal positive control을 첨가하는 것이 해외 상용화 제품들에서 일반화된 현상임.
- 따라서 해외 수출을 목표로 multiplex Real-time PCR set 내 IPC 첨가를 추가로 진행하였음.
- IPC는 exogenous positive control 전략을 사용하였으며, artificial sequence를 target 하는 specific primer, probe 및 template를 multiplex set 내에 첨가하여 PCR 반응이 유효할 경우 모든 반응액 튜브에서 일정한 수준에서 증폭 곡선을 확인 할 수가 있음.
- 또한, IPC 검출용 TaqMan probe는 대부분의 Real-time PCR 장비에서 범용적으로 사용할 수 있는 ROX dye를 선택하여 합성하였음.
- 결과분석 시에 검사하고자 하는 target 식중독균이 모두 음성이며, ROX channel에서만 증폭곡선이 확인될 경우 시료에서 추출한 DNA 내에 식중독균 DNA가 존재하지 않음을 판단할 수 있으며, target 식중독균 뿐만 아니라 ROX channel의 IPC 역시 증폭 음성 반응이 나타났을 경우는 PCR 저해물질에 의한 유효하지 않은 반응으로 판단하여 template로 사용한 DNA를 회석하여 저해물질을 뭉개 하여 재 반응하거나 순도 높은 DNA를 재추출하여 재 반응하여야 함.



### ☒ 6.12. Examples of PCR inhibitors and their mechanisms of action

Inhibitor	Mechanisms of action	References
Polyphenols Polysaccharides	Co-precipitation with nucleic acid; reduction in the ability to resuspend precipitated RNA	John (1992), Sipahioglu et al. (2006), Su and Gibor (1988), Wan and Wilkins (1994) and Wilkins and Smart (1996)
Bacterial cells Cell debris Detergents PCR additives Proteins Polysaccharides Salts Solvents	Degradation/sequestration of nucleic acids	Burkardt (2000), Katcher and Schwartz (1994), Peist et al. (2001), Rossen et al. (1992), Weyant et al. (1990) and Wilson (1997)
Polyphenols Polysaccharides Humic acids Collagen Melanin	Cross-linking with nucleic acids; change of chemical properties of nucleic acids	John (1992), Opel et al. (2010) and Wilkins and Smart (1996)
Humic acid Humic matter	Binding/adsorption to nucleic acid and enzymes	Abbaszadegan et al. (1993)
Haematin Indigo	Incomplete melting of DNA	Opel et al. (2010)
Metal ions	Reduction in specificity of primers	Abbaszadegan et al. (1993)
Detergents Proteases Urea	Degradation of polymerases	Powell et al. (1994), Rossen et al. (1992), Saulnier and Andremont (1992) and Wilson (1997)
Calcium Collagen Haematin Herbal metabolites IgG Melanin Myoglobin Polysaccharides Sodium Tannic acid	Inhibition of DNA polymerase or reverse transcriptase activity	Al-Soud et al. (2000a), Al-Soud (1998), Eckhart et al. (2000), Opel et al. (2010), Peist et al. (2001) and Wilkins and Smart (1996)
Polyphenols Tannic acid	Chelation of metal ions	Abbaszadegan et al. (1993) and Opel et al. (2010)
EDTA	Chelation of metal ions including Mg <sup>++</sup>	Rossen et al. (1992)
Calcium ions	Competition with co-factors of the polymerase	Bickley et al. (1996), Opel et al. (2010)
Antiviral substances (e.g. acyclovir)	Competition with nucleotides, inhibition of DNA elongation	Yedidag et al. (1996)
Exogenic DNA	Competition with template	Tamariz et al. (2006)

## 나. 키트 양성대조군 (Positive control DNA) 제작

- Primer, probe 염기서열 및 buffer, enzyme 등 시약들의 정상적인 작동 여부를 확인할 수 있는 키트 양성대조군으로써 각각의 primer 및 probe의 서열을 포함하는 plasmid를 제작하였음.
- 각 target 유전자 부위를 PCR로 증폭한 뒤, pGEM T-Easy Vector System (Promega, USA)을 이용하여 vector내에 삽입하였고, 이를 DH5a cell에 도입하고 배양한 후 plasmid DNA를 추출하였음.
- 획득한 각 plasmid DNA는 NanoDrop (Thermo scientific, USA)으로 정량한 뒤, 키트의 성능 유지를 위한 quality control 목적 및 키트 사용 시, 양성대조물질로 사용하였음.

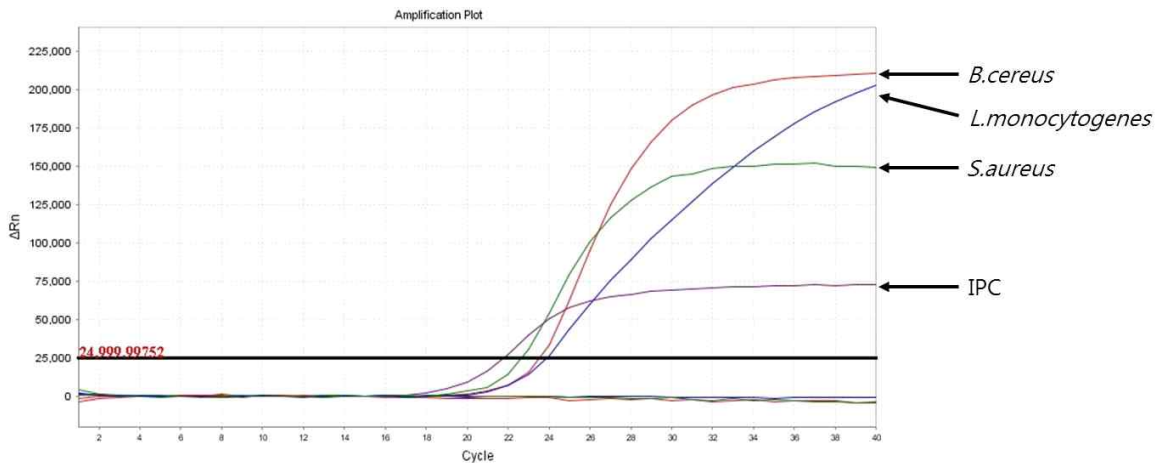


그림 6.45. Multiplex set 1의 Control DNA 증폭곡선

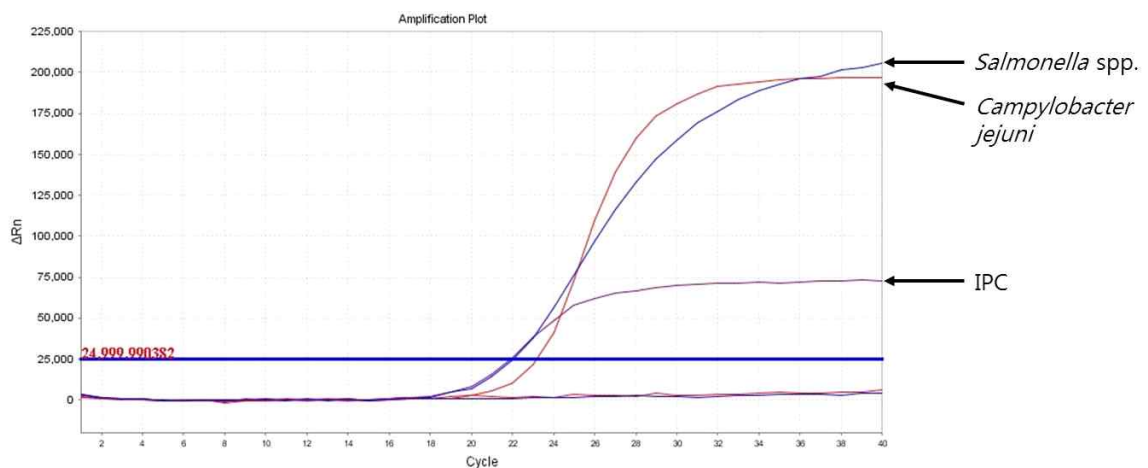


그림 6.46. Multiplex set 2의 Control DNA 증폭곡선

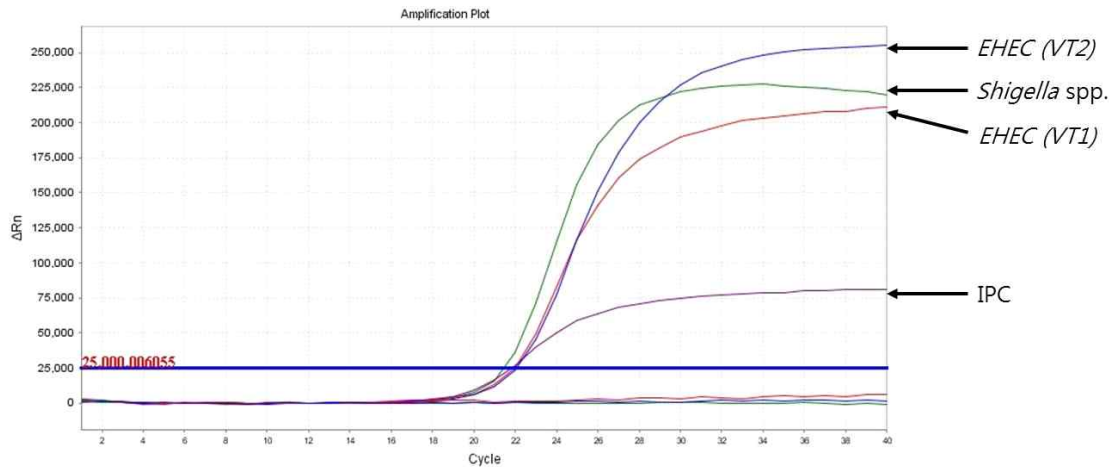


그림 6.47. Multiplex set 2의 Control DNA 증폭곡선

#### 다. 키트 구성품 및 사용자 매뉴얼 제작

- 본 기술개발을 이용한 키트명은 Foodborne Pathogen Mutliplex Real-time PCR Kit로 명명하였으며 총 4종류의 키트를 제작하였음.
- 키트는 총 50 tests 분량으로 multiplex primer/probe mix와 2x Real-time PCR MasterMix 및 Control DNA, 사용자 매뉴얼로 구성되어 있음.
- “Foodborne Pathogen Mutliplex Real-time PCR Kit”는 본 연구과제에서 개발한 총 3개 set의 multiplex primer/probe가 모두 포함되어 있어 7종의 식중독균을 모두 검사하고자 하는 사용자에게 편리하게 제공할 수 있음.
- 즉, “Foodborne Pathogen Mutliplex Real-time PCR Kit”는 1 set부터 3 set까지 각 1 tube 와 2x Real-time PCR MasterMix 3 tube, Control DNA 각 set 별 1 tube 및 사용자 매뉴얼로 구성되어 있음.
- “Foodborne Pathogen Mutliplex Real-time PCR Kit I”은 Multiplex set 1 즉, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus* 이상 3종에 대해서만 검사하는 사용자를 위해서 multiplex set 1에 대한 시약을 포함하고 있음.
- “Foodborne Pathogen Mutliplex Real-time PCR Kit II”와 Foodborne Pathogen Mutliplex Real-time PCR Kit III”는 Multiplex set 2 또는 set 3만 포함된 키트임.
- Primer/probe mix와 2X Real-time PCR MasterMix는 외부 빛이 차단되도록 갈색 tube에 분주하며 Control DNA는 잔여량을 확인할 수 있도록 투명 tube에 제공함.

- 각각의 tube 뚜껑에는 사용자가 쉽게 구별할 수 있도록 서로 다른 색깔의 스티커를 이용하여 각 성분의 약자를 인쇄하여 부착하였고, tube의 옆면에도 성분에 대한 표시를 해주었음.
- 각 tube들이 고정될 수 있도록 종이로 제작한 rack에 꽂은 상태로 사용자 매뉴얼과 함께 플라스틱 재질의 박스 안에 위치시켰음.
- 사용자 매뉴얼은 소비자가 최대한 한 눈에 사용법을 숙지할 수 있도록 키트 구성품 및 사용법을 알기 쉽게 한 장으로 요약하여 제작하였음.



그림 6.48. Foodborne Pathogen Mutliplex Real-time PCR Kit의 외형 및 구성품



그림 6.49. Foodborne Pathogen Mutliplex Real-time PCR Kit I, II 및 III의 외형 및 구성품

Store at -20 °C !!

## Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR kit

( 50 rxns)

### Description

Pathogen Multiplex Real-time PCR kit은 식중독을 유발하는 주요 병원성 박테리아의 유전자를 검사할 수 있는 multiplex Real-time PCR 키트이다.

본 제품은 한 번에 다수의 유전자를 동시에 검출할 수 있어 식중독 outbreak 시 스크리닝 검사법으로 활용하여 보다 신속하고 정확한 원인 조사에 기여할 수 있다.

### Kit components

(Store at -20 °C)

Component parts	Cap	Volume (μl)	Amount
Primer/probe Mix 1 (Pathogen multiplex 1 set)	P1	250	1
Primer/probe Mix 2 (Pathogen multiplex 2 set)	P2	250	1
Primer/probe Mix 3 (Pathogen multiplex 3 set)	P3	250	1
2X Real-time PCR Master Mix	2XM	500	3
Control DNA 1 (Pathogen multiplex 1 set)	C1	50	1
Control DNA 2 (Pathogen multiplex 2 set)	C2	50	1
Control DNA 3 (Pathogen multiplex 3 set)	C3	50	1

### Multiplex Information

Multiplex	Pathogen	Fluorescent Dye
1 set	<i>Bacillus cereus</i>	FAM
	<i>Listeria monocytogenes</i>	VIC
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cy5
	Internal control	ROX
2 set	<i>Camylobacter jejuni</i>	FAM
	<i>Salmonella</i> spp.	VIC
	Internal control	ROX
3 set	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (VT1)	FAM
	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (VT2)	VIC
	<i>Shigella</i> spp.	Cy5
	Internal control	ROX

### Protocol

1. Template DNA 준비. DNA 추출키트, 또는 각 실험실에서 사용하는 추출방법에 따라 추출 DNA 를 준비한다.
2. 제품 (키트) 의 해동/개봉. 제품을 개봉하고 제품에 포함된 시약 및 효소들의 activity가 영향받지 않도록 가급적 ice 나 lap top cooler 를 이용하여 해동시킨다. Tube를 원심분리 (spin-down) 하여 시약이류브 밑으로 보이게 한다.
3. Real-time PCR 반응액 제조. Tube의 뚜껑을 조심스럽게 열고 아래 테이블의 반응 조성에 따라 반응액을 제조한다.

Composition	Volume (μl)
Each Primer/probe Mix	5
2XReal-time PCR Master Mix	10
Template DNA	5
Total	20

※ 양성 대조군 : Template DNA 대신 제품에 포함된 "Control DNA " 사용 (C1, C2, C3)

\* Control DNA는 반드시 vortex 후 spin-down하여 사용하십시오.

※ 음성 대조군 : Template DNA 대신 실험실에서 사용하는 물균류용수 사용 (NTC : No template control)

4. Tube의 뚜껑을 닫고 시약과 DNA가 혼합될 수 있도록 튜브를 가급적 흔한 후 원심분리 (spin-down) 하여 혼합액이 튜브 밑으로 보이게 한다.
5. Real-time PCR Run. 다음 테이블의 온도 조건에 따라 PCR 장비를 세팅하고 Realtime PCR을 수행한다.

Temp. (°C)	Time	Cycle
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	

### Results

- 음성 대조군에서 PCR 증폭이 일어나지 않으며 양성 대조군에서 증폭이 일어나고, 분석한 시료에서 증폭이 확인되었을 경우, 시료는 해당 미생물에 오염된 것으로 판정한다.
- 음성 대조군에서 증폭이 관찰되었을 경우에는 "오염"으로 간주하고 재분석을 실시한다.
- 양성 대조군에서 증폭이 일어나지 않았을 경우 재분석을 실시한다.

그림 6.50. 사용자 매뉴얼 1



**Store at -20°C!!**

## Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR kit I

(50 rxns)

### Description

**Pathogen Multiplex Real-time PCR kit**은 식중독을 유발하는 주요 병원성 박테리아의 유전자를 검사할 수 있는 multiplex Real-time PCR 키트이다.

본 제품은 한 번에 다수의 유전자를 동시에 검출할 수 있어 식중독 outbreak 시 스크리닝 검사법으로 활용하여 보다 신속하고 정확한 원인 조사에 기여할 수 있다.

### Kit components

(Store at -20°C)

Component parts	Cap	Volume(μl)	Amount
Primer/probe Mix 1 (Pathogen multiplex 1 set)	P1	250	1
2X Real-time PCR Master Mix	2XM	500	1
Control DNA 1 (Pathogen multiplex 1 set)	C1	50	1

### Protocol

- Template DNA 준비.** DNA 추출키트, 또는 각 실험실에서 사용하는 추출방법에 따라 주형 DNA 를 준비한다.
- 제품(키트)의 해동/개봉.** 제품을 개봉하고 제품에 포함된 시약 및 효소들의 activity가 영향받지 않도록 가급적 ice 나 lap top cooler 를 이용하여 해동시킨다. Tube를 원심분리(spin-down) 하여 시약이 튜브 밑으로 모이게 한다.
- Real-time PCR 반응액 제조.** Tube의 뚜껑을 조심스럽게 열고 아래 테이블의 반응 조성에 따라 반응액을 제조한다.

Composition	Volume(μl)
Each Primer/probe Mix	5
2 X Real-time PCR Master Mix	10
Template DNA	5
Total	20

※ 양성 대조군 : Template DNA 대신 제품에 포함된 "Control DNA" 사용 (C1, C2, C3)

\* Control DNA는 반드시 vortex 후 spin-down하여 사용하십시오.

※ 음성 대조군 : Template DNA 대신 실험실에서 사용하는 멸균종류수 사용 (NTC : No template control)

- Tube의 뚜껑을 닫고 시약과 DNA가 혼합될 수 있도록 튜브를 가볍게 흔한 후 원심분리(spin-down) 하여 혼합액이 튜브 밑으로 모이게 한다.
- Real-time PCR Run.** 다음 테이블의 온도 조건에 따라 PCR 장비 를 세팅하고 Real-time PCR을 수행한다.

Pathogen	Fluorescent Dye
<i>Bacillus cereus</i>	FAM
<i>Listeria monocytogenes</i>	VIC
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cy5
Internal control	ROX

Temp. (°C)	Time	Cycle
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	

### Results

- 음성 대조군에서 PCR 증폭이 일어나지 않으며 양성 대조군에서 증폭이 일어나고, 분석한 시료에서 증폭이 확인되었을 경우, 시료는 해당 미생물에 오염된 것으로 판정한다.
- 음성 대조군에서 증폭이 관찰되었을 경우에는 "오염"으로 간주하고 재분석을 실시한다.
- 양성 대조군에서 증폭이 일어나지 않았을 경우 재분석을 실시한다.

### Exp.

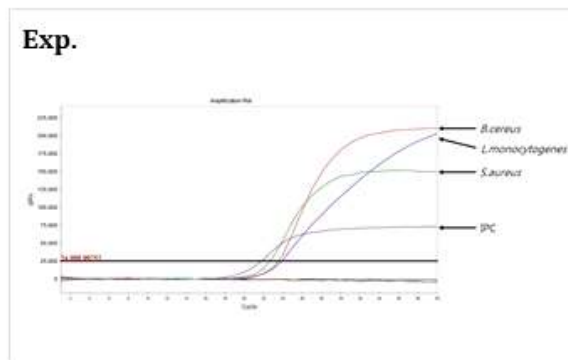


그림 6.51. 사용자 매뉴얼 2

## 라. 상용화 및 수출기반 확립

- 키트화 완료 후, 2016년1월 25일부터 28일까지 UAE 두바이에서 개최된 Arab Health Exhibition과 3월 20일부터 23일까지 진행된 Arab Lab 총 2번의 해외 전시회에 참가하여 판로 확보와 수출을 위한 마케팅 활동을 하였음.
- 홍보 부스 내에 Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR kit 모형을 전시, 홍보하였으며 현재까지 매출 발생은 없는 상황임.

### (연구성과 활용실적 및 계획)

- 본 연구개발 과제를 통하여 농산물에서 주요 위해요소로 작용하는 7가지 세균 즉, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp. 및 Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)의 동시 검출을 위한 multiplex Real-time PCR 기술을 개발하였으며 기술실시 1건과 4건의 상용화 키트 시제품 제작을 완료하였음.
- 본 키트들의 성능에 대한 신뢰도 및 객관성 확보를 위하여 다양한 기관의 현장 샘플들을 이용한 데이터 축적을 수행할 것이며, 국가 기관 및 농산물 품질 관리 검사 기관에서의 매출 발생을 기대함.



그림 6.52. 2016 Arab Health 전시회 부스 내 키트 모형 전시(왼쪽), 2016 Arab Lab 전시회 부스 내 키트 모형 전시(오른쪽)

## <요약>

### 제6절 식중독 세균 신속진단키트 Multiplex real-time PCR kit의 개발 및 상용화

#### 3. 개발된 수출형 PCR 기술의 키트화 및 상용화

- **내부양성대조군 (Internal positive control, IPC) 첨가함**
  - PCR 저해물질의 존재 유무를 확인함으로써 검사의 위음성을 판단할 수 있음.
  - exogenous 양성 대조군 전략을 사용하여 인위적 시퀀스를 타겟으로 하는 primer, probe, template를 PCR 세트에 첨가하여 PCR 반응이 유효할 경우 항상 일정한 수준의 증폭 곡선을 확인할 수 있음
  - IPC용 TaqMan probe는 ROX dye를 선택하여 합성함.
- **양성대조군 (Positive control DNA ) 첨가함:** 각 target 유전자 부위를 vector에 재조합하고 DNA 정량하여 별도의 튜브로 제공함(그림 6.45-47)
- **키트 구성품 및 사용자 매뉴얼 제작**
  - **Foodborne Pathogen Multiplex Real-Time PCR Kit로 명명,** 1 set부터 3 set까지 각 1 tube와 2x Real-time PCR MasterMix 3 tube, Control DNA 각 set 별 1 tube 및 사용자 매뉴얼로 구성되어 있음.
  - Kit I : Multiplex set 1 즉, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus* 이상 3종만 검사
  - Kit II : Multiplex set 2 즉, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. 검출용
  - kit III : multiplex set 3 즉, EHEC(장출혈성 대장균)의 VT1, VT2 및 *Shigella* spp. 검출용
  - 사용자 매뉴얼 제작 : 간편하고 이해하기 쉽고 손쉽게 따라할 수 있고 결과를 해석할 수 있게 제작함
- **상용화 및 수출기반 확립:** 시제품 제작하여 Arab Health Exhibition과 Arab lab 등 전시회에 참가함



## 제7절 식중독 세균 신속진단 면역 래피드 키트 개발 및 상용화

### 1. 식중독 세균 7종에 대한 상용화된 항체 확보

#### 가. 식중독 세균 7종에 대한 상용화된 항체 조사

- 위해 식중독 세균에 대한 특이적이고 안정적 생산 및 지속 가능한 항체 선별을 위하여 기존 상용화된 7종균에 대한 항체를 회사별로 조사하였음.

#### (1) *Listeria Monocytogenes*

회사명	제품명	특징
KPL	1) Anti-Listeria, Genus Specific Antibody 01-90-90,	- 10종 검출 - Polyclonal antibody - Streptococcus종과 낮은 교차반응
Santa cruz biotech	1) Listeria monocytogenes antibody (LX32) sc-52056,	- monoclonal IgG - L. monocytogenes 검출
AbD Serotec	1) Listeria monocytogenes Antibody 0400-0027	- monoclonal antibody - L. monocytogenes 검출 - L. innocua/L. ivanovii과 교차반응
Thermo	1) Listeria monocytogenes Antibody PA1-7230	- Polyclonal antibody - L. monocytogenes 검출
Fitzgerald	1) Listeria antibody 10-1482	- monoclonal antibody - 다음의 종에 특이적으로 반응 L. monocytogenes, L. Innocua L. ivanovii, L. Seeligeri, L.welshimer
Hytest	1) Listeria monocytogenes antibody 3L1, IgG for MAb-LZH1	- Listeria monocytogenes와 특이적으로 결합 - 추천항체: Capture-LZH1, Detection: LZF7
Virostat	1) Listeria sp. #. 4201	- Listeria 종에 특이적으로 결합

(2) *Staphylococcus aureus*

회사명	제품명	특징
KPL	1) Anti-Staphylococcus aureus Antibody 011-90-05, 255.20/0.1mg	- S. aureus에 높은 특이도를 보임
Fitzgerald	1) Staphylococcus aureus antibody, 10-S30A, \$379.50/mg	- S. aureus에 특이적으로 반응
Hytest	1) Monoclonal mouse anti-Staphylococcus aureus Enterotoxin type A, 2S7	- S. aureus Enterotoxin type A에 특이적으로 반응
Virostat	1) Staphylococcus aureus #. 6881, \$175/ml	- S. aureus에 특이적으로 반응
Abd serotec	1) Staphylococcus aureus #8400-0509	- monoclonal antibody

(3) *Bacillus cereus*

회사명	제품명	특징
Meridian	1) Bacillus spores B65413R	- B. cereus와 B. subtilis와 반응 - Bacillus 다른종과 교차반응 일으남
ViroStat	1) Bacillus Spores Antiserum Products	- B. cereus와 B. subtilis의 포자에서 추출 - Bacillus 다른 종과 교차반응 일으남
Abcam	1) Anti-Bacillus cereus antibody ab20556	- B. cereus와 B. subtilis와 특이적으로 결합

(4) *E. coli* O157:H7

회사명	제품명	특징
KPL	- Anti-Escherichia coli O157:H7 Antibody 01-95-90, \$330.10/mg	- 높은 민감도를 보임 - 다른 균주의 E. coli와 교차반응이 낮음
Fitzgerald	- E. coli O157:H7 Antibody 70-XG13, \$264/mg	- E. coli O157:H7와 특이적으로 반응 - Salmonella 종과 약한 교차반응성

(5) *Salmonella enterica*

회사명	제품명	특징																																																																																								
KPL	- Anti-Salmonella CSA-1 Antibody 01-91-99, \$388/mg	- 래피드키트를위한 이상적인 항체 - 현재상용으로 파는 다른 단클론 항체보다 더 민감도가 좋음 - Salmonella A,B,C,D,E 타입의 항원형에 특이적으로 결합																																																																																								
Hytest	- Monoclonal mouse anti-A,B,D group specific Salmonella O-antigens 3SO22 A group: 10B10G D group: 4G7C A,B,D group: 10D9H Pan Salmonella: 5D12A	- O-antigen은 다음의 항원형에 특이적임. O-antigen specificity of MAbs : <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Sero-group</th> <th rowspan="2">MAb isotype</th> <th rowspan="2">MAb</th> <th colspan="10">Cross-reactivity</th> <th rowspan="2">Ag Determinant</th> </tr> <tr> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>IgG1</td> <td>10B10G</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>0-2</td> </tr> <tr> <td>Pan</td> <td>IgG1</td> <td>5D12A</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>Core</td> </tr> <tr> <td>D</td> <td>IgG1</td> <td>4G7C</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>0-9</td> </tr> <tr> <td>A,B,D</td> <td>IgG1</td> <td>10D9H</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>±</td> <td>±</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>0-12</td> </tr> </tbody> </table> <p>1 - <i>Salmonella paratyphi</i>, 2 - <i>Salmonella typhimurium</i>, 3 - <i>Salmonella enteritidis</i>, 4 - <i>Salmonella choleraesuis</i>, 5 - <i>Salmonella newport</i>, 6 - <i>Salmonella anatum</i>, 7 - <i>Salmonella Selandia</i>, 8 - <i>E. coli</i> O55:B5, 9 - <i>E. coli</i> K12, 10 - <i>Klebsiella pneum</i></p>	Sero-group	MAb isotype	MAb	Cross-reactivity										Ag Determinant	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A	IgG1	10B10G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-2	Pan	IgG1	5D12A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Core	D	IgG1	4G7C	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-9	A,B,D	IgG1	10D9H	+	+	+	-	-	-	±	±	-	-	-	-	0-12
Sero-group	MAb isotype	MAb				Cross-reactivity											Ag Determinant																																																																									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10																																																																														
A	IgG1	10B10G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-2																																																																											
Pan	IgG1	5D12A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Core																																																																											
D	IgG1	4G7C	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-9																																																																											
A,B,D	IgG1	10D9H	+	+	+	-	-	-	±	±	-	-	-	-	0-12																																																																											
Virostat	1) Salmonella sp. #. 0701, \$175/ml	1) Salmonella O-항원형에 양성반응 E. Coli, Klebsiella, Citrobacter, Pseudomonas, Yersinia, Shigella, Proteus & Legionella에 음성반응 2) Salmonella "O"와"H" 항원에 특이적임 장내세균과 교차반응이 있음.																																																																																								

(6) *Shigella species*

회사명	제품명	특징
Virostat	1) Shigella sp. #. 0901, \$175/ml	- Shigella 항원에 특이적으로 반응함. - 장내세균과 교차반응이 일어남.
KPL	1) Anti-Shigella Species Antibody 01-90-01, \$160/mg	- 래피드키트에 이상적인 항체 - Shigella종에 특이적으로 반응
Fitzgerald	1) Shigella antibody 20-SR04, \$77/mg	- Shigella 종에 특이적으로 반응

(7) *Campylobacter*

회사명	제품명	특징
KPL	- Anti-Campylobacter Species Antibody 01-92-93, \$315/mg	- Campylobacter 종에 특이적으로 결합 - Helicobacter pylori와 낮은 교차반응이 있음.
Fitzgerald	1) Campylobacter jejuni antibody 20-CR89, \$250/ml	- Campylobacter jejuni와 특이적으로 결 합.
Virostat	1) Campylobacter jejuni # 4501	- Campylobacter jejuni와 특이적으로 결 합.
Hytest	1) Monoclonal mouse anti- Campylobacter jejuni 3CJ2, MAb: H3, H2	- Campylobacter jejuni와 특이적으로 결 합.

## 나. 식중독 세균 7종에 대한 항체의 선정

- 상용화된 항체 원료에 대해서 나와 있는 특이도 및 교차반응, 결합하는 에피토프, 면역화시킨 항원, 가격 등을 토대로 하여 선정하여 주문하였음.
- 우선적으로 테스트 후 결과에 따라서 차 후 추가 원료를 주문하였음.

Product Name	Cat. No.
Shigella antibody	20-SR04
E. coli O157:H7 antibody	70-XG13
Listeria mAB	10-1479
Listeria mAB	10-1481
Staphylococcus aureus Ab	10-S30A
E. coli O157 mAB	10-E13A
E. coli O157 mAB	10-ER13
Salmonella mAB	10-S05F
Salmonella mAB	10-S05H
Bacillus antibody	B65413R
Bacillus antibody	ab20556-1
anti-Campylobacter jejuni	3CJ2, H2
anti-Campylobacter jejuni	3CJ2, H3

## 다. 항체 선정을 위한 식중독균의 확보

- 원료의 평가에 사용된 식중독 세균은 1세부와 2세부로부터 분양받았으며, 사용된 균주는 다음과 같음.

No.	Bacteria
1	<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168
2	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 51776
3	<i>E. coli</i> O157 (from FDA)
4	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 1475
5	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
6	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931
7	<i>Salmonella enteritidis</i> (from FDA)

- 분양받은 균주는 배양하여 80% glycerol과 1:1로 혼합 후 -70℃보관하여 필요시 배양하여 사용하였음.
- 단 *Campylobacter jejuni* 균주는 미호기성 균주이기 때문에 건국대학교에서 필요시 배양해주었음.

#### 라. 항체 선정을 위한 페어링 테스트

- 골드 콜로이드 용액은 검사선용과 대조선용 두 가지로 제조하였으며, gold chloride solution에 Na-citrate의 비율을 조정하여 gold chloride를 환원시켰음.
- 생성된 Colloidal gold는 항체에 결합시켜 사용하였음. 대조선 및 검사선은 라인분주기로 분주하였음.
- 대조선은 0.5mg/ml, 검사선은 0.2~0.5mg/ml로 분주하여 균체를 이용하여 페어링 테스트를 진행하였음.

## 2. 식중독 7종 래피드 키트의 개발

### 가. *Shigella* 제품의 개발

#### (1) *Shigella* 스트립 및 검체 전개액 제조

##### (가) *Shigella* 검사선 및 금-축합체의 최적농도 설정

###### ① 실험조건 및 준비

- *Shigella* 스트립의 적절한 검사선의 항체농도를 설정하기 위하여 *Shigella* 검출에 적합하다고 판단한 항체(Fitzgerald, 20-SR04)를 0.3mg/ml, 0.4mg/ml, 0.5mg/ml, 0.6mg/ml, 0.7mg/ml의 농도로 멤브레인의 검사선 위치에 분주하였음.
- 대조선은 산양항토키항체를 0.9mg/ml의 농도로 분주하였음. 각 두 종류의 항체의 분주는 Biodot사의 XYZ3000 모델을 사용하였음.
- 그 후 분주완료된 멤브레인은 30℃ 드라이오븐에서 48시간동안 건조시키고 습도 30%이하의 장소에서 보관 후 사용하였음.
- 금-축합체의 골드량은 test당 2 $\mu$ l, 3 $\mu$ l, 4 $\mu$ l, 5 $\mu$ l, 6 $\mu$ l이 되게하여 버퍼 및 blocking solution 과 조합하여 유리섬유패드에 분주하였음.
- 분주한 패드는 완전히 건조 후 습도 30%이하의 장소에 보관하여 사용하였음. 검체패드 및 흡습패드는 셀룰로오스 종이패드를 규격에 맞게 절단한 후 보관하였음.
- 래피드 키트 디바이스 타입용 플라스틱 카드에 분주된 멤브레인을 부착하고 금-축합패드 및 셀룰로오스 종이패드를 부착시켰음.
- 그 후 3.9mm의 크기로 절단 한 후에 디바이스에 결합시켜 최적 항체량 설정을 위한 시험에 사용하였음.

###### ② 최적농도 설정

- 본 시험에 사용되는 양성검체는 건국대에서 분양받은 *Shigella sonnei*( $3.7 \times 10^8$  CFU/ml)를 사용하였음.
- 양성검체를 디바이스에 넣고 전개하기 위한 전개액은 기본버퍼를 사용하였음. 감도는 20분 까지 관찰하였으며 농도에 따른 결과는 다음과 같음.

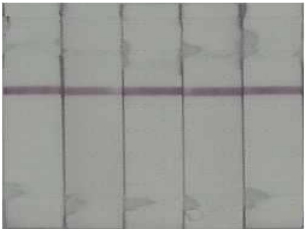
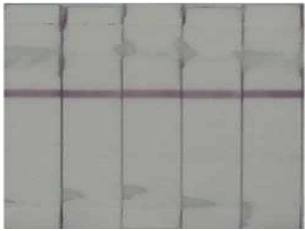
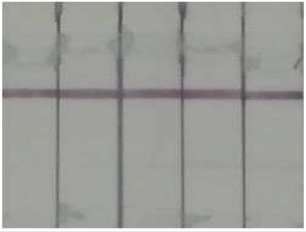
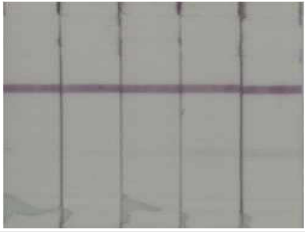
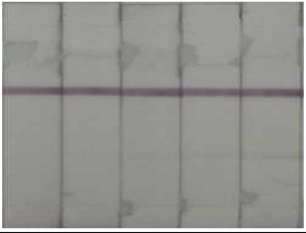
양성검체감도										
검사선 농도	0.3					0.4				
골드량	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6
양성검체감도										
검사선 농도	0.5					0.6				
골드량	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6
양성검체감도										
검사선 농도	0.7									
골드량	2	3	4	5	6					

그림 7.1 *Shigella*의 검사선 및 금-축합골드량 별 양성감도 테스트

- 라인 농도 0.4mg/ml이하에서는 골드량을 최대한 넣어주었을 때 육안으로 보일듯한 감도를 나타내었음.
- 반면 라인 농도 0.5mg/ml이상에서는 적절한 골드량(3~5 $\mu$ l)에서 양성 감도가 잘 보였음.
- 이에 라인농도 0.6mg/ml과 0.7mg/ml의 농도에서 위와 같은 골드량으로 비특이 테스트를 진행하였음.
- 비특이 테스트 결과 라인농도 0.6mg/ml에서는 양호하나 0.7mg/ml의 골드량 5 이상에서는 희미한 잔상이 보여서 가장 적절한 비율의 검사선 농도와 골드량은 검사선 농도 0.6mg/ml와 5 $\mu$ l로 정하였음.



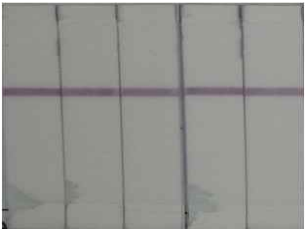
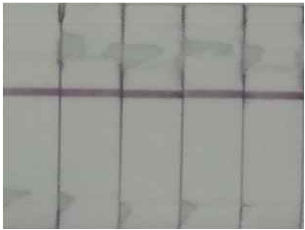
비특이										
검사선 농도	0.6					0.7				
골드량	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6

그림 7.2 *Shigella*의 검사선 및 금-축합골드량 별 비특이 테스트

## (2) *Shigella* 최적 검체 전개액 개발

- 검사선 농도 0.6mg/ml로 분주된 멤브레인 패드와 골드량 5 $\mu$ l로 축합된 골드패드로 조립된 *Shigella* 검출 키트를 전개할 버퍼설정을 위하여 다양한 버퍼 조성에 따른 비특이와 감도 테스트를 진행하였음.

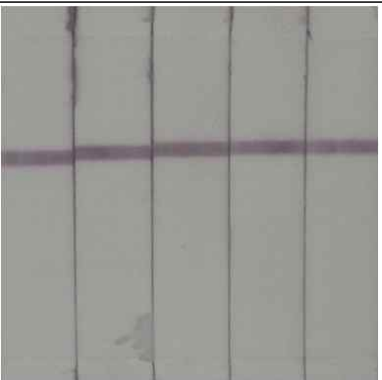
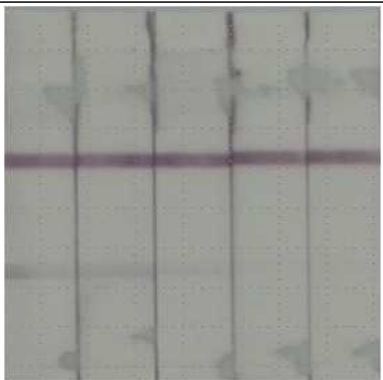
비특이						양성감도					
버퍼조성	A	B	C	D	E	버퍼조성	A	B	C	D	E

그림 7.3 *Shigella*의 검체전개액 조성별 비특이 및 양성감도 테스트

- 버퍼 조성 농도 비율에 따라 테스트 해본 결과 A 버퍼에서 가장 감도가 우수하였으나 약간의 비특이가 나타났음.
- 따라서 비특이가 없으면서 가장 감도가 높게 나온 검체 전개액 조성인 B를 선택하였음.
- 위와 같이 제작된 *Shigella*를 검출 하는 스트립의 균주 검출 한계를 측정하기 위하여 균주를 Triplic soy agar 배지에 하루 배양하였음.
- 배양된 fresh한 균주를 *Shigella* 증균배지에 10배씩 단계별로 희석하여 10 $\mu$ l를 래피드 키트에 넣고 검체전개액 120 $\mu$ l를 넣어 전개하였음.

- 또한 증균배지액에 희석된 균주를 120 $\mu$ l 넣어 배양 후 바로 사용할 수 있는지의 여부를 테스트하였음.



그림 7.4 *Shigella*의 검체전개액 및 배양액으로 감도 테스트

- 고농도의 검체를 검체전개액을 사용하여 로딩할 때만 감도가 나왔으며 양성검체액 만을 사용할 때는 감도가 나오지 않았음.
- 감도를 더 높이기 위하여 양성검체의 전처리가 필요할 것으로 사료되어 boiling 및 sonication 전처리를 시행하였음.

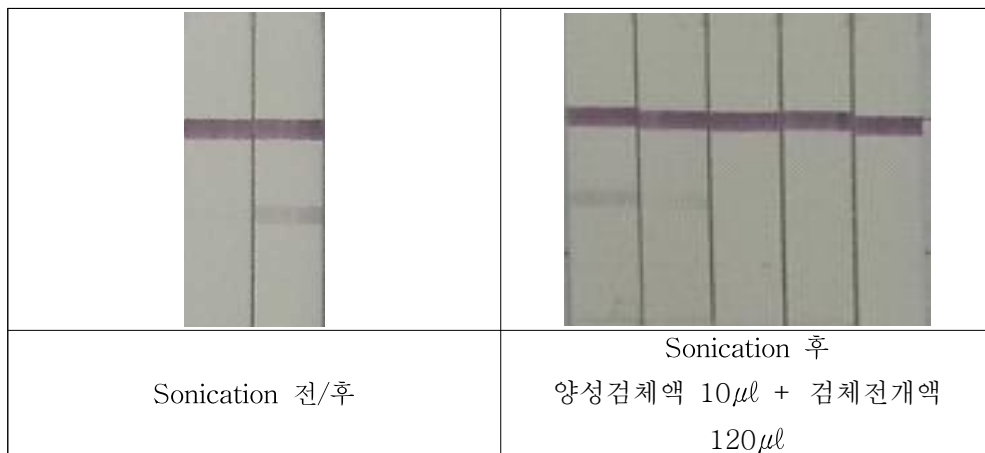


그림 7.5 *Shigella* 양성검체 sonication 후 감도 테스트

- Boiling을 처리한 검체에서는 특별한 감도 증가는 없었으며 파쇄가 진행하였을 때 감도의 증가가 나타났음.
- *Shigella* 균의 특성상 균이 파쇄되어야 민감도가 증가되는 것으로 사료되며 키트의 제작을 위해서 검체전개액으로 균을 파쇄할 수 있는 방법을 구상하였음.



미첨가    첨가  
(Cell 량 =  $10^8$ )

그림 7.6 *Shigella* 양성검체 검체전개액으로 인한 감도 증가

- 검체 전개액에 계면활성제를 첨가하여 양성검체가 파쇄되는 정도의 효과를 얻었으며 양성 검체액은 최대한 많이 넣기 위하여 검체전개액을 골드패드에 처리하기로 하였음.

### (3) *Shigella* 제품에 대한 민감도, 특이도, 검출한계 테스트

- 최적화가 진행 된 후 *Shigella* kit의 검출한계는 약  $10^5$  CFU/ml이었음.

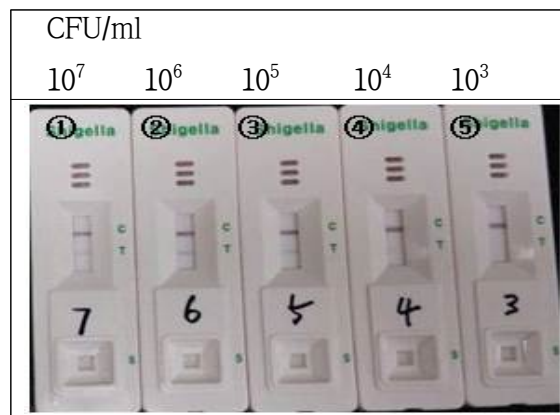


그림 7.7 *Shigella* kit의 검출한계 테스트

- *Shigella* kits는 *S. sonnei*와 *S. flexneri* 두 균주로 민감도 테스트를 진행하였음.
- 두 균주는 각각 *Shigella* D serogroup과 B serogroup에 속하는 균주이며 두 균주에서 모두 양성반응을 나타내었음.

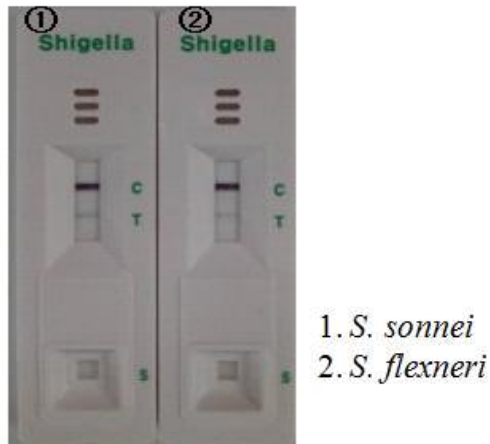


그림 7.8 *Shigella* kit의 민감도 테스트

- 검체전개액이 처리된 골드패드로 제작한 시제품으로 각각의 균주들을 가지고 교차반응 테스트를 진행하였음.
- 약  $10^8$  CFU/ml가량의 균주들로 교차반응 테스트 결과 *Shigella*에서만 양성반응을 보이고 나머지 균에서는 교차반응은 일어나지 않았음.



그림 7.9 *Shigella* kit에 다른 균주 교차반응 테스트

## 나. *Listeria monocytogenes* 제품의 개발

### (1) *Listeria monocytogenes* 스트립 및 검체 전개액 제조

#### (가) *Listeria monocytogenes* 검사선 및 금-축합체의 최적농도 설정

##### ① 실험조건 및 준비

- *Listeria* 스트립의 적절한 검사선의 항체농도를 설정하기 위하여 *Listeria* 검출에 적합하다고 판단한 항체(Fitzgerald, 10-1481)를 0.2mg/ml, 0.4mg/ml, 0.6mg/ml, 0.8mg/ml의 농도로 멤브레인의 검사선 위치에 분주하였음.
- 대조선은 산양향토끼항체를 0.9mg/ml의 농도로 분주하였음. 각 두 종류의 항체의 분주는 Biodot사의 XYZ3000 모델을 사용하였음.
- 그 후 분주완료 된 멤브레인은 30℃ 드라이오븐에서 48시간동안 건조시키고 습도 30%이하의 장소에서 보관 후 사용하였음.
- 금-축합체의 골드의 항체(Fitzgerald, 10-1479)의량은 test당 2 $\mu$ l, 3 $\mu$ l, 4 $\mu$ l, 5 $\mu$ l, 6 $\mu$ l이 되게하여 버퍼 및 blocking solution과 조합하여 유리섬유패드에 분주하였음.
- 분주한 패드는 완전히 건조 후 습도 30%이하의 장소에 보관하여 사용하였음. 검체패드 및 흡습패드는 셀룰로오스 종이패드를 규격에 맞게 절단한 후 보관하였음.
- 래피드 키트 디바이스 타입용 플라스틱 카드에 분주된 멤브레인을 부착하고 금-축합패드 및 셀룰로오스 종이패드를 부착시켰음.
- 그 후 3,9mm의 크기로 절단 한 후에 디바이스에 결합시켜 최적 항체량 설정을 위한 시험에 사용하였음.

##### ② 최적농도 설정

- 본 시험에 사용되는 양성검체는 건국대에서 분양받은 *Listeria monocytogenes*(3.7 $\times$ 10<sup>8</sup> CFU/ml)를 사용하였음.
- 양성검체를 디바이스에 넣고 전개하기 위한 전개액은 기본버퍼를 사용하였음.
- 감도는 20분 까지 관찰하였으며 농도에 따른 결과는 다음과 같음.

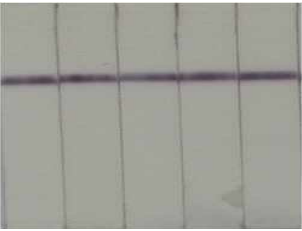
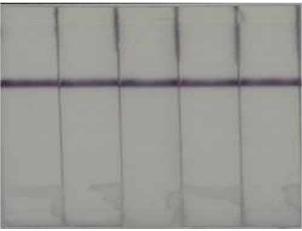
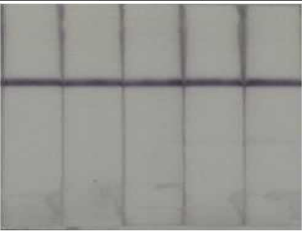
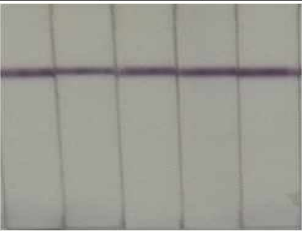
양성검체감도										
검사선 농도	0.2					0.4				
골드량	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6
양성검체감도										
검사선 농도	0.6					0.8				
골드량	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6

그림 7.10 *Listeria*의 검사선 및 금-축합골드량 별 양성감도 테스트

- 라인 농도 0.4mg/ml이하에서는 골드량을 최대한 넣어주어도 육안으로 양성 감도가 잘 보이지 않았음.
- 반면 라인 농도 0.6mg/ml, 0.8mg/ml에서는 골드량 5 $\mu$ l, 6 $\mu$ l에서 양성 감도가 잘 보였음. 또한 0.6mg/ml과 0.8mg/ml에서의 감도 세기는 비슷하였음.
- 따라서 라인농도 0.6mg/ml의 농도에서 위와 같은 골드량으로 비특이 테스트를 진행하였음.

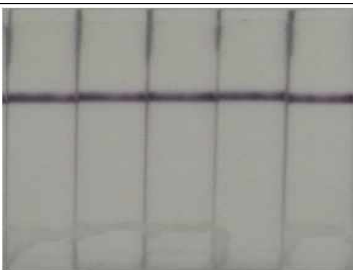
비특이					
검사선 농도	0.6				
골드량	2	3	4	5	6

그림 7.11 *Listeria*의 검사선 및 금-축합골드량 별 비특이 테스트

- 비특이 테스트 결과 라인농도 0.6mg/ml에서 비특이는 나오지 않았으며 이에 따라 가장 적절한 비율의 검사선 농도와 골드량은 각각 0.6mg/ml와 6 $\mu$ l로 정하였음.

○ 그런데 균주량에 대한 감도를 측정하기에는 감도가 너무 낮아 다른 페어로 진행하기로 하였음.

③ 다른 페어 테스트

○ 여러 후보 항체 중 다른 항체 (Hytest, 3L1MAbLZF7)를 가지고 위와 같은 테스트를 진행하였음.

○ 결과 같은 조건에서 더 좋은 결과를 얻었으며 line농도 0.5mg/ml의 농도에서 골드량이 7일 때 가장 좋은 감도를 나타내었음.

○ 검체전개액은 *Shigella*와 같은 조성으로 사용하였음.

(2) *Listeria monocytogenes* 시제품 테스트

○ 위와 같이 제작된 *Listeria*를 검출 하는 스트립의 균주 검출 한계를 측정하기 위하여 균주를 Tripic soy agar 배지에 하루 배양하였음.

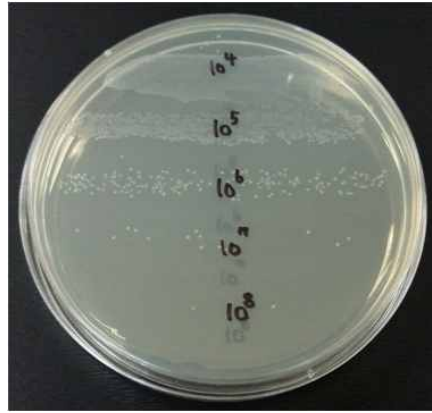
○ 배양된 fresh한 균주를 증균배지에 10배씩 단계별로 희석하여 10 $\mu$ l를 래피드 키트에 넣고 검체전개액 120 $\mu$ l를 넣어 전개하였음.

○ 또한 증균배지액에 희석된 균주를 120 $\mu$ l 넣어 배양 후 바로 사용할 수 있는지의 여부를 테스트하였음.

○ 단계별로 희석한 균주는 다시 TSA 배지에 10 $\mu$ l씩 도말하여 균수를 측정하였음.



그림 7.12 *Listeria* 양성검체의 검체전개액 및 배양액 감도 비교 및 한계검출 테스트



\*  $14 \times 10^7 \text{ cfu}/10\mu\text{l} = 1.4 \times 10^8 \text{ cfu}/\text{ml}$

그림 7.13 *Listeria* 양성검체의 검체전개액 및 배양액 감도 비교 및 한계검출 테스트

- *Listeria*는 검체전개액으로 전개하는 것보다 배양액을 직접 전개하는 것이 감도가 더 좋았음.
- 들어가는 균주의 양이 더 많기 때문에 감도가 더 좋게 나온 것으로 사료됨.
- 그때의 **검출한계는  $10^4$ 이였으며** 균주전처리를 하면 더 좋은 결과를 얻을 것으로 기대되어 검체를 boiling 후에 테스트하였음.



그림 7.14 *Listeria* 양성검체 boiling 후의 검체전개액 및 배양액 감도 테스트

- 검체를 boiling 후에 감도 변화는 눈에 띄게 일어나지는 않았음.
- 좀 더 민감도가 우수한 키트의 제작을 위해서는 검체전개액을 골드패드에서 처리하여 진행하였음.



- 양성검체액 120 $\mu$ l에서 더 좋은 감도를 보였지만 검체전개액을 골드패드에 처리한 후에 약한 단계(10배) 가량의 감도상승 효과를 보여주었음.



미처리 처리  
(Cell 량 = 10<sup>6</sup>)

그림 7.15 검체전개액을 골드패드에 처리후 감도 변화

(3) *Listeria monocytogenes* 제품에 대한 민감도, 특이도, 검출한계 테스트

- *Listeria monocytogenes* 19116 균주로 테스트한 결과 검출한계는 10<sup>6</sup> CFU/ml 로 나타났음.. 그리고 NEOGEN 제품과 감도를 비교한 결과 유사하게 나타났음.

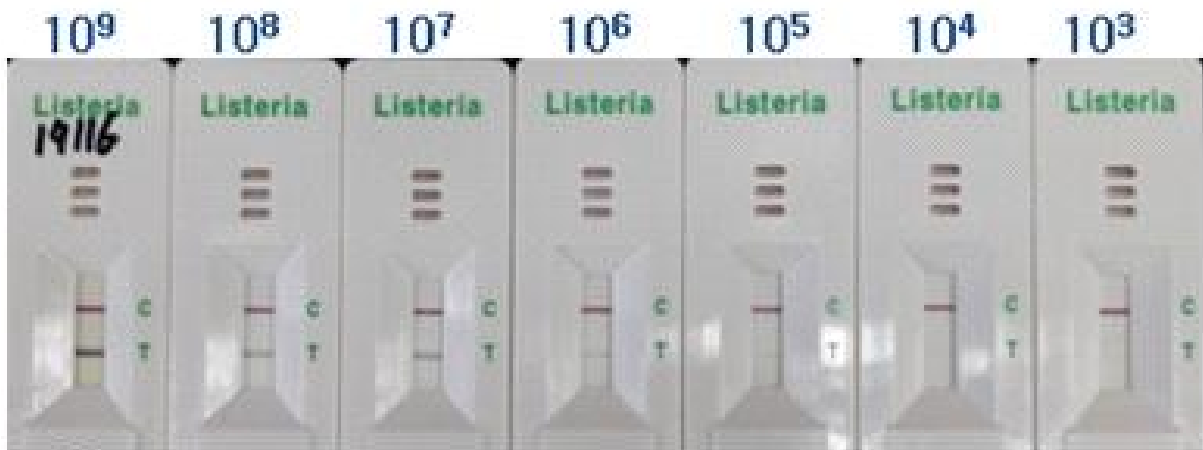


그림 7.16 *Listeria monocytogenes* kit의 검출한계 테스트



그림 7.17 *Listeria monocytogenes* kit의 NEOGEN 사 제품과 비교

- *L. monocytogenes*는 총 6가지의 strain(ScottA, 15313, 19114, 19115, 19116, 19118)에서 모두 강한 양성반응을 나타내었음.

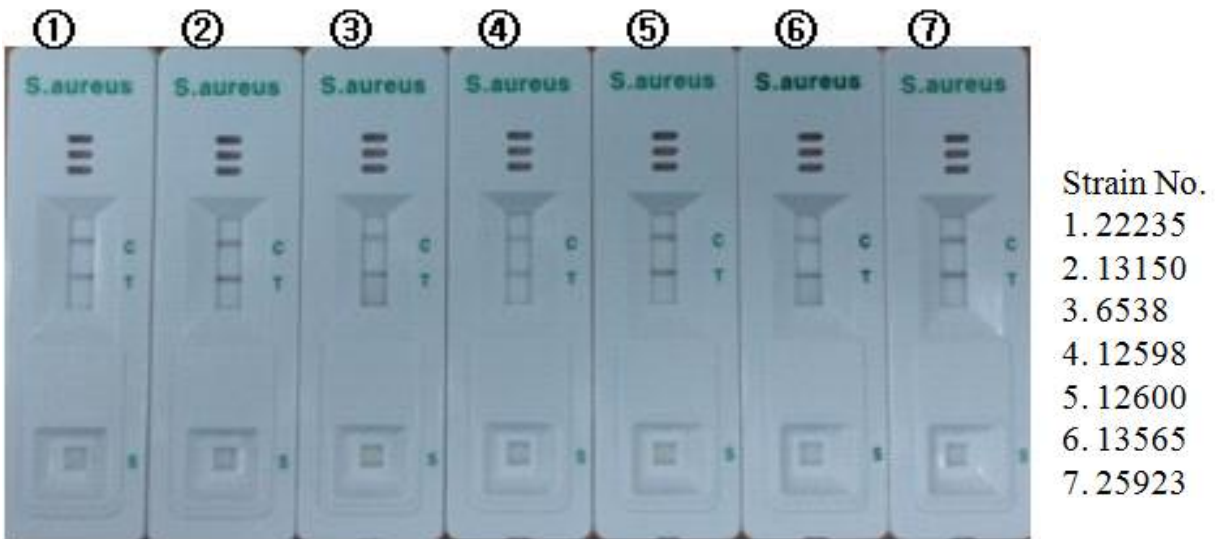


그림 7.18 *Staphylococcus aureus* kit의 민감도 테스트

- *L. monocytogenes* kit는 다른 균주와 교차반응성을 나타내었음. 특히 *Bacillus cereus*와의 교차반응이 제일 강하게 나타났으며 *S. aureus*와도 반응이 나타났음.
- 그 외의 균주들은 육안으로 식별하기 어려운 정도만 나타났음.. 반면 NEOGEN 제품은 모든 균주에서 교차반응이 심하게 나타났음.

- 우리가 개발하는 제품의 신속증균배지와 같이 사용한다면 다른 균주들보다 *Listeria* 균주가 우점하고 kit의 감도차이도 매우 크기 때문에 교차반응이 비교적 약하게 나타날 것으로 사료됨.



그림 7.19 *Listeria monocytogenes* kit의 특이도 테스트

## 다. *Escherichia coli* O157 제품의 개발

### (1) *E. coli* O157 스트립 및 검체 전개액 제조

#### (가) *E. coli* O157 검사선 및 금-축합체의 최적농도 설정

##### ① 실험조건 및 준비

- *E. coli* 스트립의 적절한 검사선의 항체농도를 설정하기 위하여 *E. coli* 검출에 적합하다고 판단한 항체(Fitzgerald, 20-ER13)를 0.3mg/ml, 0.5mg/ml, 0.7mg/ml, 0.9mg/ml의 농도로 멤브레인의 검사선 위치에 분주하였음.
- 대조선은 산양향토끼항체를 0.9mg/ml의 농도로 분주하였음.
- 각 두 종류의 항체의 분주는 Biodot사의 XYZ3000 모델을 사용하였음.
- 그 후 분주완료 된 멤브레인은 30℃ 드라이오븐에서 48시간동안 건조시키고 습도 30%이하의 장소에서 보관 후 사용하였음.
- 금-축합체의 골드의 항체(Fitzgerald, 70-XG13)의량은 test당 2 $\mu$ l, 3 $\mu$ l, 4 $\mu$ l, 5 $\mu$ l, 6 $\mu$ l이 되게하여 버퍼 및 blocking solution과 조합하여 유리섬유패드에 분주하였음.
- 분주한 패드는 완전히 건조 후 습도 30%이하의 장소에 보관하여 사용하였음.
- 검체패드 및 흡습패드는 셀룰로오즈 종이패드를 규격에 맞게 절단한 후 보관하였음.
- 래피드 키트 디바이스 타입용 플라스틱 카드에 분주된 멤브레인을 부착하고 금-축합패드 및 셀룰로오즈 종이패드를 부착시켰음.
- 그 후 3.9mm의 크기로 절단 한 후에 디바이스에 결합시켜 최적 항체량 설정을 위한 시험에 사용하였음.

##### ② 최적농도 설정

- 본 시험에 사용되는 양성검체는 건국대에서 분양받은 *E. coli* O157(4.7 $\times$ 10<sup>8</sup> CFU/ml)를 사용하였음.
- 양성검체를 디바이스에 넣고 전개하기 위한 전개액은 기본버퍼를 사용하였음.

○ 감도는 20분 까지 관찰하였으며 농도에 따른 결과는 다음과 같음.

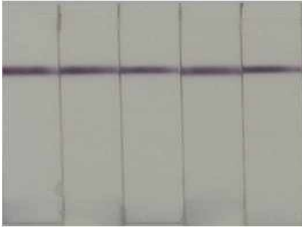
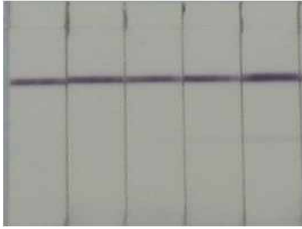
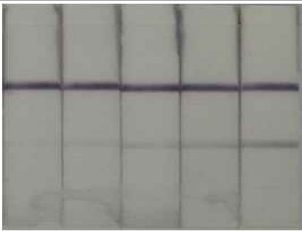
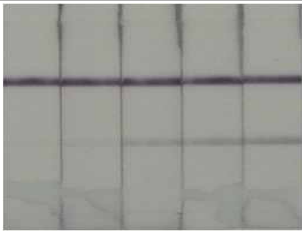
양성검체감도										
검사선 농도	0.3					0.5				
골드량	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6
양성검체감도										
검사선 농도	0.7					0.9				
골드량	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6

그림 7.20 *E. coli*의 검사선 및 금-축합골드량 별 양성감도 테스트

○ 라인 농도 0.7mg/ml 이상에서 골드량에 따른 감도가 제일 우수하였으며 라인농도 0.7mg/ml, 0.9mg/ml의 농도에서 위와 같은 골드량으로 비특이 테스트를 진행하였음.

○ 비특이 테스트 결과 라인농도 0.7mg/ml에서 비특이는 나오지 않았으며 이에따라 가장 적절한 한 비율의 검사선 농도와 골드량은 각각 0.7mg/ml와 6 $\mu$ l로 정하였음.

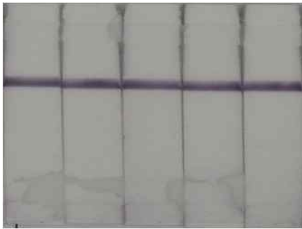
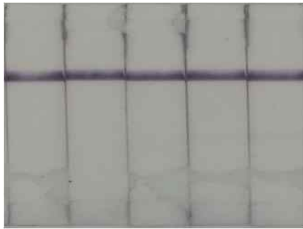
비특이										
검사선 농도	0.7					0.9				
골드량	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6

그림 7.21 *E. coli*의 검사선 및 금-축합골드량 별 비특이 테스트

(2) *E. coli* O157 최적 검체 전개액 개발

- 검사선 농도 0.6mg/ml로 분주된 멤브레인 패드와 골드량 6 $\mu$ l로 축합된 골드패드로 조립된 *E. coli* O157 검출 키트를 전개할 버퍼설정을 위하여 다양한 버퍼 조성에 따른 비특이와 감도 테스트를 진행하였음.

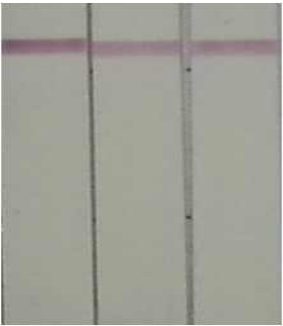
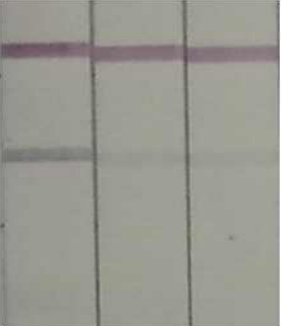
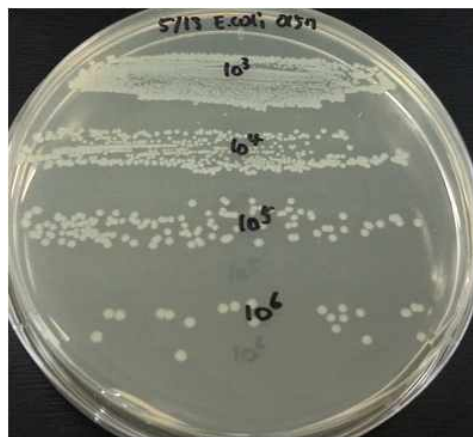
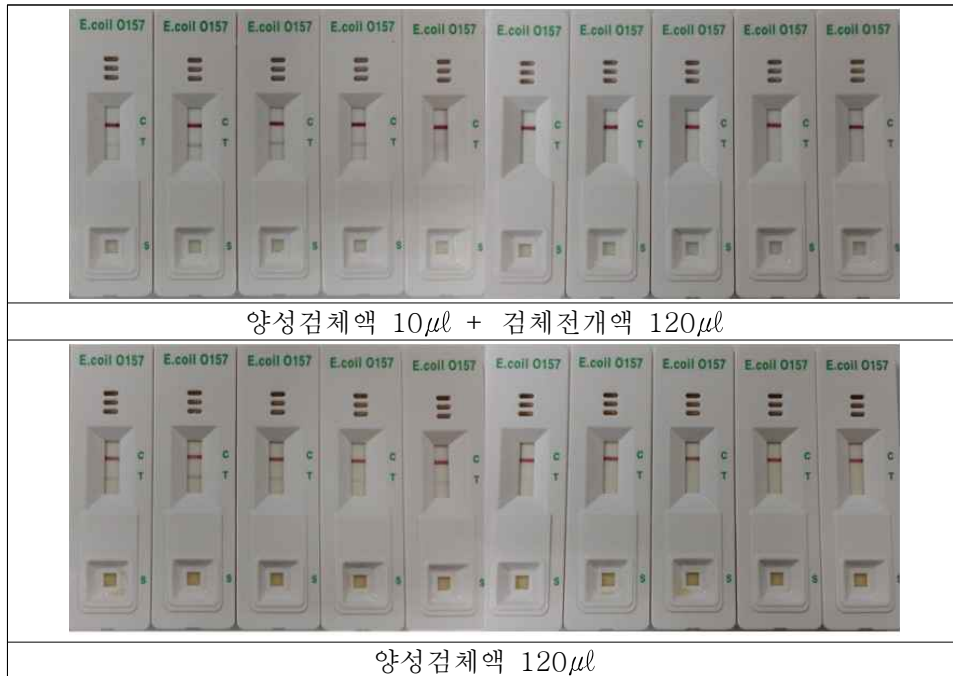
비특이				양성감도			
	버퍼조성	A	B		C	버퍼조성	A

그림 7.22 *E. coli* O157의 검체전개액 조성별 비특이 및 양성감도 테스트

- 버퍼 조성 농도 비율에 따라 테스트 해본 결과 A 버퍼에서 가장 감도가 우수하였으며 비특이도 나타나지 않았음.
- 위와 같이 제작된 *E. coli* O157을 검출 하는 스트립의 균주 검출 한계를 측정하기 위하여 균주를 Triplic soy agar 배지에 하루 배양하였음.
- 배양된 fresh한 균주를 증균배지에 10배씩 단계별로 희석하여 10 $\mu$ l를 래피드 키트에 넣고 검체전개액 120 $\mu$ l를 넣어 전개하였음.
- 또한 증균배지액에 희석된 균주를 120 $\mu$ l 넣어 배양 후 바로 사용할 수 있는지의 여부를 테스트하였음.
- 단계별로 희석한 균주는 다시 TSA 배지에 10 $\mu$ l씩 도말하여 균수를 측정하였음.
- *E. coli* O157 진단키트는 검체전개액으로 전개하는 것이 배양액을 직접 전개하는 것보다 감도가 조금 더 진행함.
- 하지만 이 정도의 감도의 차이면 배양액을 직접 전개하는 것이 사용의 편리상 더 좋을 것으로 사료됨.

○ 균수 측정 후 검출한계는  $10^3$  cfu/ml이었으며  $10^8$  cfu/ml이상에서는 양성 검체가 과도하게 많아 감도가 저하되는 후크현상을 나타내었음.

○ 하지만 그 농도 이상으로 배양되어 감도가 나오지 않는 경우는 거의 가능성이 희박하기에 무시하였음.



$$* 21 \times 10^6 \text{ cfu}/10\mu\text{l} = 2.1 \times 10^9 \text{ cfu}/\text{ml}$$

그림 7.23 *E. coli* 양성검체의 검체전개액 및 배양액 감도 비교 및 한계검출 테스트

### (3) *E. coli* O157 제품에 대한 민감도, 특이도, 검출한계 테스트

○ 검출한계 테스트를 위해서는 균주를 증균 배지에 10배씩 dilution하여 테스트를 진행하고 그 희석액을 media agar plate에 도말하여 균수를 측정하였음.

- *E. coli* O157 균주를 테스트한 결과 **검출한계는  $10^5$  CFU/ml**였다. 감도는  $10^8$  CFU/ml에서 가장 강하게 나타났으며  $10^9$  CFU/ml 일 때는 다소 흐려지는 후크현상이 나타났음.

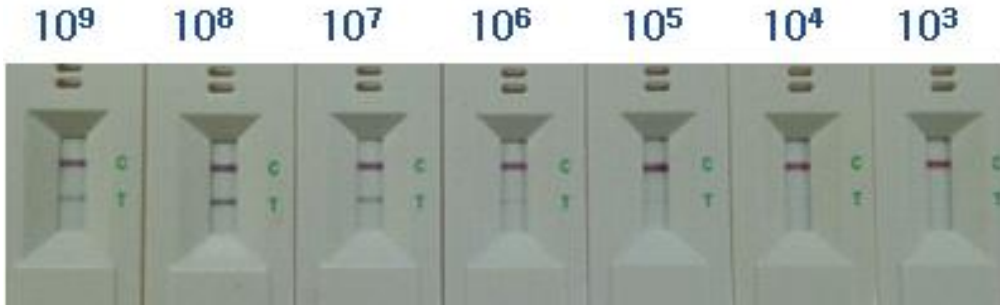
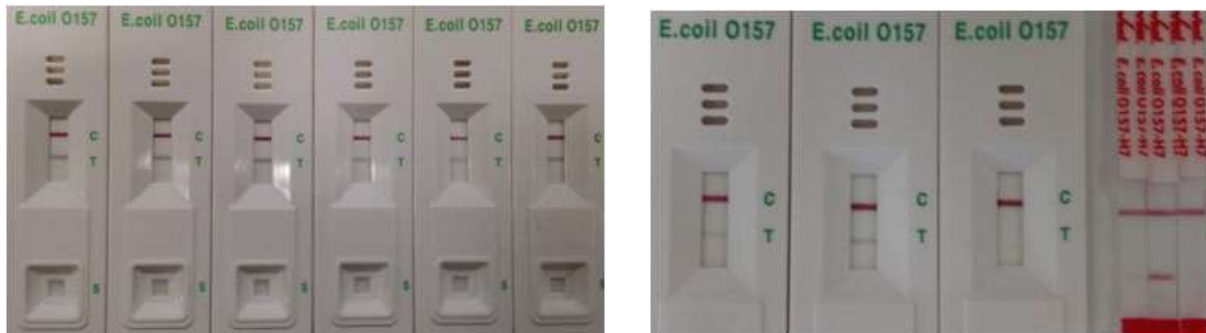


그림 7.24 *E. coli* O157 kit의 검출한계 테스트

- *E. coli* O157은 총 6종의 서로 다른 곳에서 분리된 균주를 테스트 진행한 결과 모두 양성 반응을 나타내었으며 감도의 세기 또한 우수하였음.
- 양성 균주를  $10^9$ ,  $10^7$ ,  $10^4$ 회석하여 테스트하였을 때 Neogen 제품은 고농도의 대장균에서 감도가 흐려지는 후크현상이 나타났으나 우리 제품은 고농도에서의 감도는 비교적 안정적이었음.



*E. coli* O157 6 strain test

*E. coli* O157  $10^9$ ,  $10^7$ ,  $10^4$  CFU/ml

그림 7.25 *E. coli* O157 kit의 민감도 테스트

<특이도>

- *E. coli* O157 키트는 *Shigella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Salmonella*균주에서 양성반응이 나타나지 않았음.
- 또한 같은 *E. coli*의 O26과 O111에서도 양성반응은 없었음.





1. *E. coli* O157
2. *Shigella sonnei*
3. *Listeria monocytogenes*
4. *Staphylococcus aureus*
5. *Salmonella enteritidis*



1. *E. coli* O26
2. *E. coli* O111

그림 7.26 *E. coli* O157 kit의 특이도 테스트

## 라. *Salmonella* 키트의 제작

### (1) *Salmonella* 스트립 및 검체 전개액 제조

#### (가) *Salmonella* 검사선 및 금-축합체의 최적농도 설정

##### ① 실험조건 및 준비

- *Salmonella* 스트립의 적절한 검사선의 항체농도를 설정하기 위하여 *Salmonella* 검출에 적합하다고 판단한 항체(Fitzgerald, 10-S05H)를 0.3mg/ml, 0.5mg/ml, 0.7mg/ml, 0.9mg/ml의 농도로 멤브레인의 검사선 위치에 분주하였음.
- 대조선은 산양항토키항체를 0.9mg/ml의 농도로 분주하였음. 각 두 종류의 항체의 분주는 Biodot사의 XYZ3000 모델을 사용하였음.
- 그 후 분주완료된 멤브레인은 30℃ 드라이오븐에서 48시간동안 건조시키고 습도 30%이하의 장소에서 보관 후 사용하였음.
- 금-축합체의 골드의 항체(Fitzgerald, 10-S05F)의량은 test당 2 $\mu$ l, 3 $\mu$ l, 4 $\mu$ l, 5 $\mu$ l, 6 $\mu$ l이 되게 하여 버퍼 및 blocking solution과 조합하여 유리섬유패드에 분주하였음.
- 분주한 패드는 완전히 건조 후 습도 30%이하의 장소에 보관하여 사용하였음.
- 검체패드 및 흡습패드는 셀룰로오스 종이패드를 규격에 맞게 절단한 후 보관하였음.
- 래피드 키트 디바이스 타입용 플라스틱 카드에 분주된 멤브레인을 부착하고 금-축합패드 및 셀룰로오스 종이패드를 부착시켰음.
- 그 후 3.9mm의 크기로 절단 한 후에 디바이스에 결합시켜 최적 항체량 설정을 위한 시험에 사용하였음.

##### ② 최적농도 설정

- 본 시험에 사용되는 양성검체는 건국대에서 분양받은 *Salmonella enterica* ( $4.7 \times 10^8$  CFU/ml)를 사용하였음.
- 양성검체를 디바이스에 넣고 전개하기 위한 전개액은 기본버퍼를 사용하였음.

○ 감도는 20분 까지 관찰하였으며 농도에 따른 결과는 다음과 같음.

○ 대체적으로 감도가 너무 낮다고 사료되어 다른 페어를 테스트하여 선정하기로 하였음.

	비특이					양성검체				
비특이										
검사선 농도	0.3					0.3				
골드량	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6
비특이										
검사선 농도	0.5					0.5				
골드량	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6
비특이										
검사선 농도	0.7					0.7				
골드량	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6
비특이										
검사선 농도	0.9					0.9				
골드량	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6

그림 7.27 *Salmonella* 의 검사선 및 금-축합골드량 별 양성감도 테스트

③ 다른 페어 테스트

○ Hytest사의 원료를 가지고 페어테스트를 진행하였음. Hytest사의 항체원료는 다음과 같음.

O-antigen specificity of MAbs :

Sero-group	MAb isotype	MAb	Cross-reactivity										Ag Determinant
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	IgG1	10B10G	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-2
Pan	IgG1	5D12A	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Core
D	IgG1	4G7C	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0-9
A,B,D	IgG1	10D9H	+	+	+	-	-	±	±	-	-	-	0-12

1 - *Salmonella paratyphi*, 2 - *Salmonella typhimurium*, 3 - *Salmonella enteritidis*, 4 - *Salmonella choleraesuis*, 5 - *Salmonella newport*, 6 - *Salmonella anatum*, 7 - *Salmonella Selandia*, 8 - *E. coli* 055:B5, 9 - *E. coli* K12, 10 - *Klebsiella pneum*

그림 7.28 Hytest사의 원료 cross-reactivity 표

○ 위의 내용을 참고로 sero-group Pan인 5D12A의 항체로 line을 분주하고 분주한 항체를 포함하여 모든 항체로 골드컨쥬게이션하여 pair여부를 확인하였음.

희석배수	10 <sup>0</sup> 10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> C	10 <sup>0</sup> 10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> C	10 <sup>0</sup> 10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> C	10 <sup>0</sup> 10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> C
Gold항체	5D12A	10B10G	4G7C	10D9H
line항체	5D12A			

그림 7.29 Hytest사의 원료 페어링 테스트

○ 라인 5D12A에 사용될 수 있는 항체는 감도는 나오면서 비특이반응이 없는 4G7C와 10D9H였으나 10D9H는 희미한 비특이가 계속 나와서 4G7C 한가지만을 선택하였음.

○ 이전과 같이 검사선 및 금-축합골드량 별 테스트를 거친 후에 검체전개액 선정을 하였음.

(2) *Salmonella* 시제품 테스트

- 위와 같이 제작된 *Salmonella*를 검출 하는 스트립의 균주 검출 한계를 측정하기 위하여 균주를 Triplic soy agar 배지에 하루 배양하였음.
- 배양된 fresh한 균주를 증균배지에 10배씩 단계별로 희석하여 10 $\mu$ l를 래피드 키트에 넣고 검체전개액 120 $\mu$ l를 넣어 전개하였음.
- 또한 증균배지액에 희석된 균주를 120 $\mu$ l 넣어 배양 후 바로 사용할 수 있는지의 여부를 테스트하였음.
- 단계별로 희석한 균주는 다시 TSA 배지에 10 $\mu$ l씩 도말하여 균수를 측정하였음.
- *Salmonella* 진단키트는 검체전개액으로 전개하는 것이 배양액을 직접 전개하는 것보다 감도가 더 좋으며 검출한계도 우수하였음.



\*  $21 \times 10^7 \text{ cfu}/10\mu\text{l} = 2.1 \times 10^8 \text{ cfu}/\text{ml}$

그림 7.30 *Salmonella* 양성검체의 검체전개액 및 배양액 감도 비교 및 한계검출 테스트

○ 검체전개액을 골드패드에 처리하고 난 후는 검체전개액으로 전개하는 것과 감도가 비슷하였으며 균수 측정 후 검출한계는  $10^5$  cfu/ml이었음.

○ 더 좋은 감도를 위해 균을 boliling하고 테스트하였을 때는 감도가 전혀 나오지 않았음.

**(3) *Salmonella* 제품에 대한 민감도, 특이도, 검출한계 테스트**

○ *Samonella* kit의 검출한계는 위에 있는 내용과 같이  $10^5$ cfu/ml이었음.

○ *Salmonella* kit는 B와 D serogroup에서 강한 양성 반응을 보였음.

○ 그리고 C group에선 같은 C1 group의 균주임에도 3번 균주가 2번 균주보다 감도가 많이 약하였음.

○ 이는 같은 group의 균주이지만 항체가 target하는 곳의 epitope차이로 인한 것으로 사료됨.

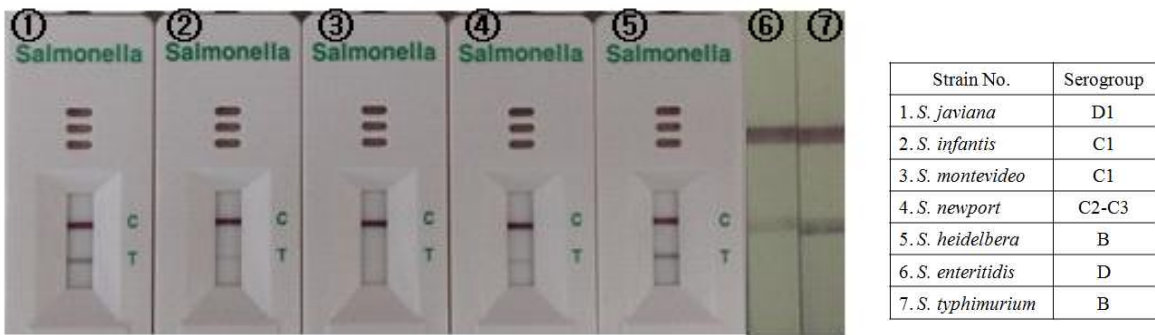


그림 7.31 *Salmonella* kit의 민감도 테스트

○ *Salmonella* kit는 다른 균주들과 교차반응은 나타나지 않았음.



그림 7.32 *Salmonella* kit의 특이도 테스트

## 마. *Staphylococcus aureus* 키트의 제작

### (1) *Staphylococcus aureus* 스트립 및 검체 전개액 제조

#### (가) *S. aureus* 페어링 테스트

- 1차년도 Fitzgerald사 antibody(10-S30A)로 테스트한 결과 자사의 골드 조건과 상이하여 페어링이 되지 못하였음.
- 따라서 타회사의 원료로 페어링 테스트를 시행하였음. 항체는 Virostat사의 Cat. 6881제품 다클론항체를 사용하였음.
- 위 항체를 0.5mg/ml의 농도로 멤브레인의 검사선 위치에 분주하고, 대조선은 산양항토끼항체를 0.9mg/ml의 농도로 분주하였음.
- 각 두 종류의 항체의 분주는 Biodot사의 XYZ3000 모델을 사용하였으며 분주완료된 멤브레인은 30℃ 드라이오븐에서 48시간동안 건조시키고 습도 30%이하의 장소에서 보관 후 사용하였음.
- 골드 컨쥬게이션을 위하여 6881항체를 0.1mg/ml의 농도로 희석하고 10<sup>5</sup>μl당 1μg~18μg이 되게 blocking buffer와 조합한 후에 페어링 테스트를 시행하였음.
- 양성검체는 건국대에서 분양받은 *S. aureus* 균주를 사용하였고 농도는 8.00×10<sup>7</sup> CFU/ml이었음.
- 테스트는 자사에서 개발한 On-plate rapid test system으로 시행하였음.

#### (나) *S. aureus* 검사선 및 금-축합체의 최적농도 설정

##### ① 실험조건 및 준비

- *S. aureus* 스트립의 적절한 검사선의 항체농도를 설정하기 위하여 *S. aureus* 검출에 적합하다고 판단한 항체(Virostat, 6881)를 0.3mg/ml, 0.5mg/ml, 0.7mg/ml의 농도로 멤브레인의 검사선 위치에 분주하였음.
- 대조선은 산양항토끼항체를 0.9mg/ml의 농도로 분주하였음. 각 두 종류의 항체의 분주는 Biodot사의 XYZ3000 모델을 사용하였음.
- 그 후 분주완료된 멤브레인은 30℃ 드라이오븐에서 48시간동안 건조시키고 습도 30%이하

의 장소에서 보관 후 사용하였음.

- 금-축합체의 골드량은 test당  $5\mu\text{l}$ ,  $7\mu\text{l}$ 이 되게하여 버퍼 및 blocking solution과 조합하여 유리섬유패드에 분주하였음.
- 분주한 패드는 완전히 건조 후 습도 30%이하의 장소에 보관하여 사용하였음. 검체패드 및 흡습패드는 셀룰로오스 종이패드를 규격에 맞게 절단한 후 보관하였음.
- 래피드 키트 디바이스 타입용 플라스틱 카드에 분주된 멤브레인을 부착하고 금-축합패드 및 셀룰로오스 종이패드를 부착시켰음.
- 그 후 3.9mm의 크기로 절단 한 후에 디바이스에 결합시켜 최적 항체량 설정을 위한 시험에 사용하였음.

② 최적농도 설정

- 본 시험에 사용되는 양성검체는 건국대에서 분양받은 *S. aureus*( $2.8 \times 10^8$  CFU/ml)를 사용하였음.
- 양성검체를 디바이스에 넣고 전개하기 위한 전개액은 기본버퍼를 사용하였음.
- 감도는 20분 까지 관찰하였으며 농도에 따른 결과는 다음과 같음.




양성검체감도							
	검사선 농도		0.3		0.5		0.7
골드량	5	7	5	7	5	7	

그림 7.33 *S. aureus*의 검사선 및 금-축합골드량 별 양성감도 테스트

- 라인 농도 0.7mg/ml에서 골드량에 상관없이 감도가 우수했으나 비특이 때문에 사용할 수가 없었음.
- 0.3mg/ml농도에서는 감도가 약하였고 0.5mg/ml의 농도에서 골드량  $7\mu\text{l}$ 가 가장 적절하였음.



(다) *S. aureus* 검체전개액 설정

- 검사선 농도 0.5mg/ml로 분주된 멤브레인 패드와 골드량 7 $\mu$ l로 축합된 골드패드로 조립된 *S. aureus* 검출 키트를 전개할 버퍼설정을 위하여 다양한 버퍼 조성에 따른 비특이와 감도 테스트를 진행하였음.



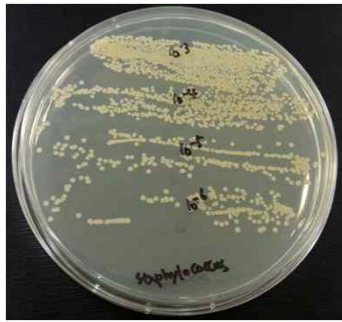
비특이						양성감도					
	버퍼조성	A	B	C	D		E	버퍼조성	A	B	C

그림 7.34 *S. aureus*의 검체전개액 조성별 비특이 및 양성감도 테스트

- 버퍼 조성 농도 비율에 따라 테스트 해본 결과 A 버퍼에서 가장 감도가 우수하였으나 약간의 비특이가 나타났음.
- 따라서 비특이가 없으면서 가장 감도가 높게 나온 검체 전개액 조성인 B를 선택하였음.
- 위와 같이 제작된 *Staphylococcus aureus*를 검출 하는 스트립의 균주 검출 한계를 측정하기 위하여 균주를 Tripic soy agar 배지에 하루 배양하였음.
- 배양된 fresh한 균주를 증균배지에 10배씩 단계별로 희석하여 10 $\mu$ l를 래피드 키트에 넣고 검체전개액 120 $\mu$ l를 넣어 전개하였음.
- 또한 증균배지액에 희석된 균주를 120 $\mu$ l 넣어 배양 후 바로 사용할 수 있는지의 여부를 테스트하였음.
- 단계별로 희석한 균주는 다시 TSA 배지에 10 $\mu$ l씩 도말하여 균수를 측정하였음.



\*  $100 \times 10^6 \text{ cfu}/10\mu\text{l} = 1 \times 10^{10} \text{ cfu}/\text{ml}$

Strain	log CFU/mL	Results
ATCC 12600	9.62	+
	8.62	+
	7.62	+
	6.62	+
	5.62	+
	4.62	+/-
	3.62	-
<b>5.62 log CFU/ml</b>		
ATCC 13565	8.86	+
	7.86	+
	6.86	+
	5.86	+
	4.86	+
	3.86	-
	2.86	-
<b>5.86 log CFU/ml</b>		
ATCC 25923	9.09	+
	8.09	+
	7.09	+
	6.09	+
	5.09	+
	4.09	-
	3.09	-
<b>5.09 log CFU/ml</b>		

그림 7.35 *Staphylococcus aureus* kit의 검출한계 테스트

○ *S. aureus* 래피드 kit의 검출한계는 약  $10^5$  cfu/ml이었음.

○ *S. aureus*는 총 6가지의 strain(ScottA, 15313, 19114, 19115, 19116, 19118)에서 모두 강한 양성반응을 나타내었음.

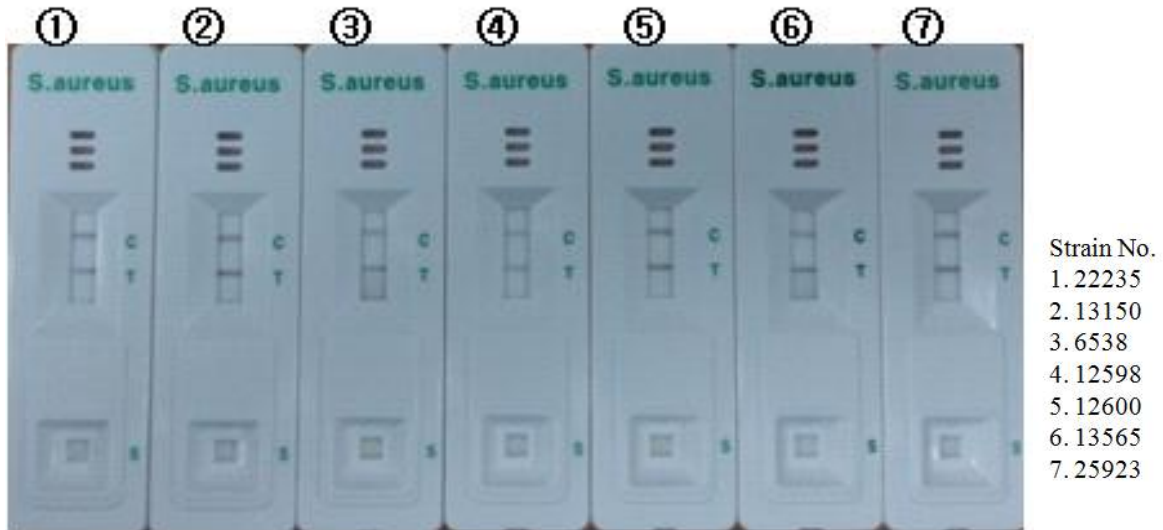


그림 7.36 *Staphylococcus aureus* kit의 민감도 테스트

○ *S. aureus* kit는 다른 균주들과 교차반응은 나타나지 않았음.

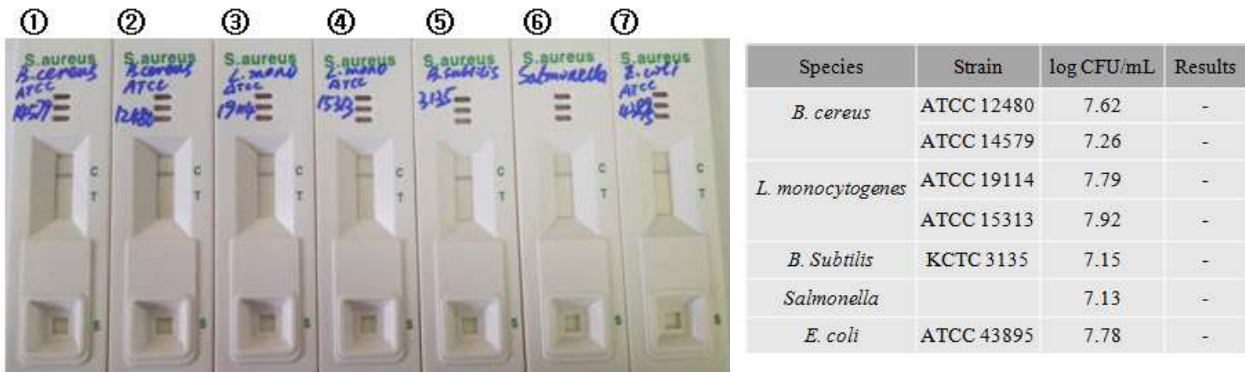


그림 7.37 *Staphylococcus aureus* kit의 교차반응 테스트

## 6. *Bacillus cereus* kit의 개발

- 바실러스 균주에 대한 페어링 테스트 다음과 같은 항체를 이용하여 진행한 결과 양성의 결과를 얻을 수 없었음.
- 모든 페어에서 감도 또는 비특이 모두 나오지 않았음.

No.	A	B	C	D
라인용 항체	5413R	ab20556-1	B65413R	ab20556-1
골드용 항체	B65413R	B65413R	ab20556-1	ab20556-1

- 조사한 상용화된 원료들은 spore로 면역화 시켜 만든 항체들이며, *B. cereus*와 *B. subtilis*에 모두 결합한다고 각 제품 설명서에 명시되어 있음.
- 진단키트는 *B. cereus*와 *B. subtilis* 모두 검출을 하게 만들며, 2협동의 PCR 진단키트로 *B. cereus*가 있는지 확인하는 방향으로 진행하였음.
- 양성검체를 사용할 때 24시간 배양 후 사용하는 것이 아니라 3~4일 후 spore가 생겼다고 판단되는 시기의 균주를 사용하였고 그 결과는 다음과 같음.

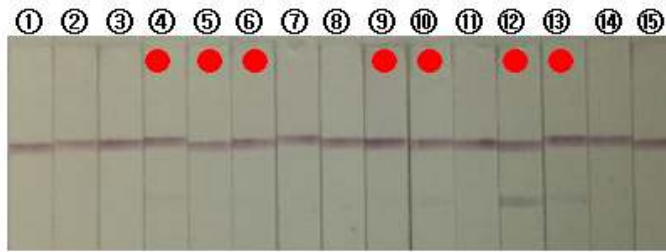


그림 7.38 *Bacillus cereus* kit의 테스트

- 3일 배양한 균에는 파쇄하지 않은 상태가 감도가 더 높았으나 1일 배양한 균에서는 sonication한 후가 더 감도가 증가되었다.
- 본 연구과제의 목적은 증균 후 바로 검출하는 것이 목적이기 때문에 1일 배양 후

sonication 한 여러 균주에 대하여 테스트를 진행하였음.

### Sonication X



1. *B. pseudomycooides* KACC 12098
2. *B. mycooides* ATCC 6462
3. *B. cereus* KCTC 3624
4. *B. cereus* ATCC 25621
5. *B. cereus* ATCC 21366
6. *B. cereus* ATCC 12481
7. *B. subtilis* KCTC 3135
8. *B. weihenstephanensis*
9. *B. cereus* ATCC 11778
10. *B. cereus* ATCC 10876
11. *B. cereus* F4810
12. *B. cereus* F4433
13. *B. thuringiensis* GB413
14. *B. cereus* ATCC 14579
15. *B. thuringiensis* ATCC 10792

### Sonication O

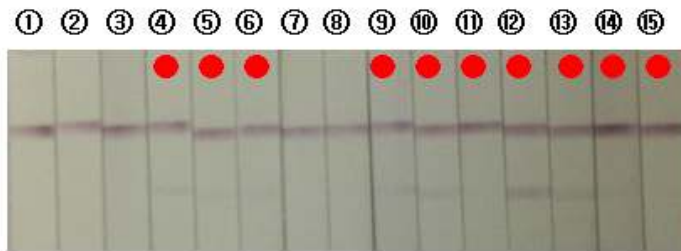


그림 7.39 *Bacillus cereus* 균주들의 sonication 전/후의 비교 감도 테스트

- **Sonication**을 하기 전보다 후가 더 많은 균주와 양성반응이 일어나고 감도 또한 증가하였음.
- 개발하는 제품의 사용법 상 빠른 시간에 배양 후 균주를 검출하는 것이 목적인데 spores나 sonication처리 후에 검출이 더 잘 일어났음.
- 따라서 spores가 아닌 균주를 잡는 항체를 보유하거나 효과적인 감도를 얻기 위한 균주 전 처리기술이 필요할 것으로 사료됨.

## 사. *Campylobacter jejuni* kit의 개발

### (1) *C. jejuni* 항체 페어링의 준비

○ 페어링은 다음의 4가지 조건으로 설정하여 페어링 실험을 진행하였음.

No.	1	2	3	4
라인용 항체	H2	H3	H2	H3
골드용 항체	H2	H2	H3	H3

### (2) *C. jejuni* H2, H3-골드 축합체 소량 제조

○ 항체는 0.1mg/ml 로 희석하여 사용하였음.

○ 항체양에 따른 *C. jejuni*균의 검출 감도를 확인 하기위하여 다음표와 같이 항체를 사용하였음.

○ H2, H3-골드 축합체는 다음과 같이 동일하게 제조하였음.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
항체[ul]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
컨쥬게이션버퍼[ul]	104	103	102	101	100	99	98	97	96	95

No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
항체[ul]	11	12	13	14	15	16	17	8	19	20
컨쥬게이션버퍼[ul]	94	93	92	91	90	89	88	87	86	85

### (3) 실험결과

○ 이용 가능한 *C. jejuni* 항체의 비특이도가 강하게 나타났고, 감도도 낮아 더 이상의 키트 개발을 수행하지 않음.

No. 1 Line: H2, Gold conjugation: H2	
비특이	양성검체 감도
- 비특이가 강하게 나타남	- 비특이에 의한 감도로 보임

No. 2 Line: H3, Gold conjugation: H2	
비특이	양성검체 감도
- 비특이가 강하게 나타남	- 비특이에 의한 감도로 보임

No. 3 Line: H2, Gold conjugation: H3	
비특이	양성검체 감도
- 비특이가 강하게 나타남	- 비특이에 의한 감도로 보임

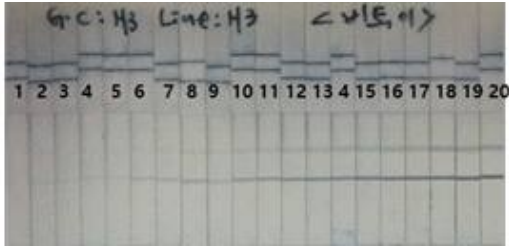
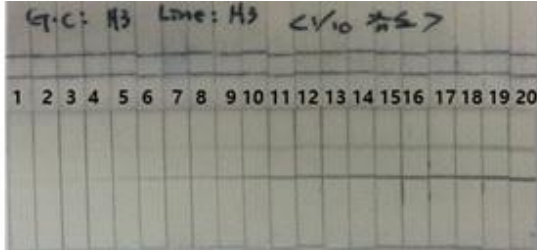
No. 4 Line: H3, Gold conjugation: H3	
비특이	양성검체 감도
	
- 비특이가 강하게 나타남	- 비특이에 의한 감도로 보임

그림 39. *C. jejuni* 항체의 pairing 테스트



### 3. 개발 제품의 상용화 및 수출기반 확립

#### 가. 제품의 구성

○ 개발된 제품 구성은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* 5개의 제품에 대하여

- 박스,
  - 파우치 포장된 디바이스,
  - 사용설명서
- 등 으로 구성하였음.(단, 대장균은 버퍼 들어있음.)



그림 40. 개발된 제품 포장사진 그림 및 제품 홍보를 위한 샘플 포장

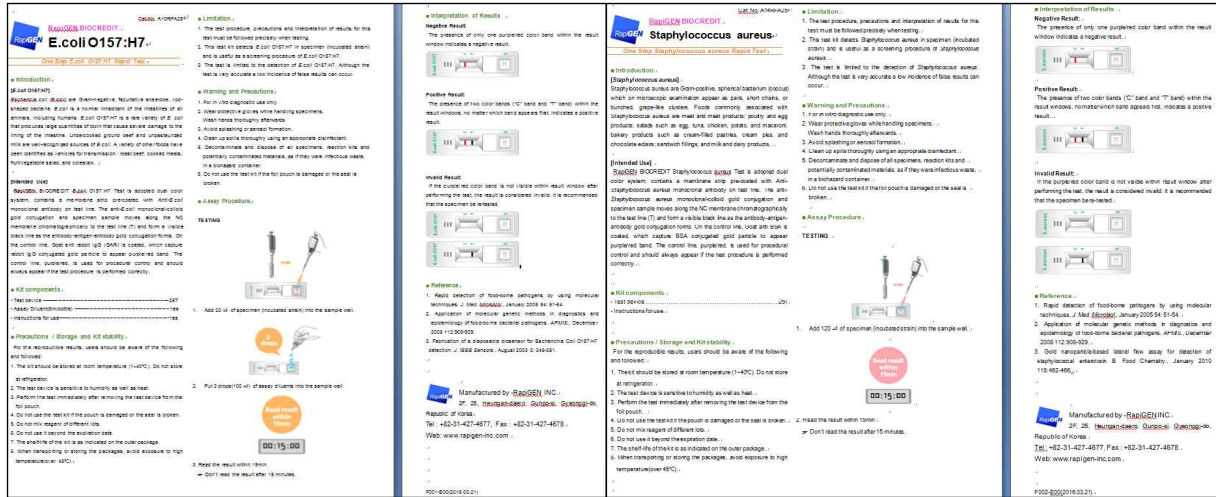


그림 41. 개발 제품의 사용자 편의 사용설명서 제작

### icpGEN E.coli O157:H7 TEST

**One Step E.coli O157:H7 Test**

icpGEN E.coli O157:H7 Test is a rapid, sensitive, and specific method for the detection of E.coli O157:H7 in various samples. The test is performed in a single step, and the results are displayed on the device's LCD screen within 15 minutes. A safety protocol has been developed to ensure the safe use of the device.

**Information**  
icpGEN E.coli O157:H7 Test is a microbiological assay for the detection of E.coli O157:H7 in isolated strains.  
-Control: positive, test kit - (box)

**Components**  
- icpGEN E.coli O157:H7 Test device or strip  
- Easy Clean

**Procedure**

1. Add 200 µl of specimen (diluted or undiluted) into the sample well.
2. Put 2 drops (100 µl) of water (distilled or deionized) into the sample well.
3. Perform within 15 min.

**Interpretation**

Negative	Positive	Invalid

### icpGEN Listeria monocytogenes TEST

**One Step Listeria monocytogenes Test**

icpGEN Listeria monocytogenes Test is a rapid, sensitive, and specific method for the detection of Listeria monocytogenes in various samples. The test is performed in a single step, and the results are displayed on the device's LCD screen within 15 minutes. A safety protocol has been developed to ensure the safe use of the device.

**Information**  
icpGEN Listeria monocytogenes Test is a microbiological assay for the detection of Listeria monocytogenes in isolated strains.  
-Control: positive, test kit - (box)

**Components**  
- icpGEN Listeria monocytogenes Test device or strip

**Procedure**

1. Add 200 µl of specimen (diluted or undiluted) into the sample well using micropipette.
2. Heat the sample within 15 min.

**Interpretation**

Negative	Positive	Invalid

**Ordering Information**

Kit No.	Product	Type	Package size	Supplier
A18702	Listeria monocytogenes TEST	Device	17x23x31	Foodnet chain
A18702	Listeria monocytogenes TEST	Strip	17x23x31	Foodnet chain

### icpGEN Salmonella TEST

**One Step Salmonella Test**

icpGEN Salmonella Test is a rapid, sensitive, and specific method for the detection of Salmonella in various samples. The test is performed in a single step, and the results are displayed on the device's LCD screen within 15 minutes. A safety protocol has been developed to ensure the safe use of the device.

**Information**  
icpGEN Salmonella Test is a microbiological assay for the detection of Salmonella in isolated strains.  
-Control: positive, test kit - (box)

**Components**  
- icpGEN Salmonella Test device or strip

**Procedure**

1. Add 200 µl of specimen (diluted or undiluted) into the sample well using micropipette.
2. Heat the sample within 15 min.

**Interpretation**

Negative	Positive	Invalid

**Ordering Information**

Kit No.	Product	Type	Package size	Supplier
A18703	Salmonella TEST	Device	17x23x31	Foodnet chain
A18703	Salmonella TEST	Strip	17x23x31	Foodnet chain

### icpGEN Shigella TEST

**One Step Shigella Test**

icpGEN Shigella Test is a rapid, sensitive, and specific method for the detection of Shigella in various samples. The test is performed in a single step, and the results are displayed on the device's LCD screen within 15 minutes. A safety protocol has been developed to ensure the safe use of the device.

**Information**  
icpGEN Shigella Test is a microbiological assay for the detection of Shigella in isolated strains.  
-Control: positive, test kit - (box)

**Components**  
- icpGEN Shigella Test device or strip

**Procedure**

1. Add 200 µl of specimen (diluted or undiluted) into the sample well using micropipette.
2. Heat the sample within 15 min.

**Interpretation**

Negative	Positive	Invalid

**Ordering Information**

Kit No.	Product	Type	Package size	Supplier
A18704	Shigella TEST	Device	17x23x31	Foodnet chain
A18704	Shigella TEST	Strip	17x23x31	Foodnet chain

### icpGEN Staphylococcus aureus TEST

**One Step Staphylococcus aureus Test**

icpGEN Staphylococcus aureus Test is a rapid, sensitive, and specific method for the detection of Staphylococcus aureus in various samples. The test is performed in a single step, and the results are displayed on the device's LCD screen within 15 minutes. A safety protocol has been developed to ensure the safe use of the device.

**Information**  
icpGEN Staphylococcus aureus Test is a microbiological assay for the detection of Staphylococcus aureus in isolated strains.  
-Control: positive, test kit - (box)

**Components**  
- icpGEN Staphylococcus aureus Test device or strip

**Procedure**

1. Add 200 µl of specimen (diluted or undiluted) into the sample well using micropipette.
2. Heat the sample within 15 min.

**Interpretation**

Negative	Positive	Invalid

**Ordering Information**

Kit No.	Product	Type	Package size	Supplier
A18705	Staphylococcus aureus TEST	Device	17x23x31	Foodnet chain
A18705	Staphylococcus aureus TEST	Strip	17x23x31	Foodnet chain

그림 42. 개발 제품의 카달로그 자료

## 나. 개발 기술의 상용화 및 수출기반 확립

- 개발 제품의 상용화 및 수출을 위해서 해외 전시회에 제품을 전시하였음.
- 독일에서 열리는 MEDICA 전시회와 두바이에서 열리는 아랍헬스 전시회에서 전시하였음.

### (1) 2015년 MEDICA 전시



그림 44. Medica 전시회 사진

### (2) 2016년 Arabhealth 전시



그림 45. 아랍헬스 전시회 사진 (개인정보 보호를 위하여 얼굴부분 가림 )

## 다. 사업화 계획 및 매출 실적

○ 현재 싱가포르 업체와 대장균 O157:H7에 대한 제품계약 관련 건이 진행 중임.

○ 예상 수요량은 1년에 10,000 Test로 진행 중에 있음.

### (1) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	3 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 50 % 국외 : 5 %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			3위 이내

### (2) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		1		
	소요예산(백만원)		10		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0	3	9
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	-	-
국외		0	1	3	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		검출한계 10 <sup>3</sup> CFU/ml에 해당하는 수준의 검출키트의 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	-	-	
	수 출	0	3	9	

### (3) 사업화와 관련된 근거 자료

○ 대부분의 시장에서는 Neogen 제품을 사용하고 있으며, 현재 계약이 진행 중인 대장균 키트 관련하여 싱가포르 시장에서는 9750 Reveal for *E. coli* O157:H7 8 hour complete system 제품을 주로 이용하고 있으며 그것의 대체품으로 본 회사의 제품을 사용을 고려 중임.

합계금액 : 금 삼백팔십삼만오천칠백원정							3,835,700
순위	품명	규격	단위	수량	단가	공급가액	비고
1	9750 Reveal for E.coli 0157 : H7 8 hour complete system		ea	1	507,200	507,200	NEOGEN044
2	9751 Reveal for E.coli 0157 : H7 20 hour complete system		ea	1	484,200	484,200	NEOGEN045
3	9755 Reveal for E.coli 0157 : H7 - contains 20 Individually packed devices		ea	1	366,900	366,900	NEOGEN042
4	9754 Multi-pak REVEAL for E.coli 0157 : H7		ea	1	단종품(대체품X)		
5	9760 Reveal Medium- 8 hour		ea	1	222,000	222,000	NEOGEN046
6	9770 Reveal Medium- 20 hour		ea	1	117,300	117,300	NEOGEN049
7-1	9765 REVEAL Bulk Medium - 8 Hour	500g	ea	1	234,600	234,600	NEOGEN047
7-2	9765 REVEAL Bulk Medium - 8 Hour	2kg	ea	1	885,500	885,500	NEOGEN048
8	9779 REVEAL Bulk Medium - Modified 8 Hour		ea	1	검색X		
9-1	9758 REVEAL Bulk Medium - Modified 20 Hour	500g	ea	1	140,300	140,300	NEOGEN050
9-2	9758 REVEAL Bulk Medium - Modified 20 Hour	2kg	ea	1	529,000	529,000	NEOGEN051

<Neogen 제품 시장가 견적 자료>

- 국내 Neogen 제품을 유통 중인 회사로부터 제품을 견적 받았으며, 증균배지 포함 20 Tests에 507,200원으로서 한 test기준으로는 25,360원/Test임.
- 소비자 가격이고 국내는 유통마진을 높게 잡는 경향이 있어 대략적으로 6,000원~8,000원이 도매가격으로 판단되며 실제 UAE에서 MED link사의 시장 조사에도 비슷한 가격으로 추정되었음.
- 현재 대장균과 살모넬라만이 수요가 보이며 나머지 제품들은 낮은 수요를 보이는 것으로 보아 두 제품만이 매출로 이어질 것으로 예상됨.
- 선진국 보다는 먼저 개발도상국이 문의가 있었던 것으로 보아 그들의 인구수 등을 고려하였을 때 한 국가에 연 10,000 Test를 사용한다고 추정될 수 있으며, 연 증가를 고려했을 때, 다음과 같이 매출 증가를 예상할 수 있음.

	향후 연도	1년차	2년차	3년차	4년차	5년차
매출액	대장균 O157:H7키트	60,000	120,000	180,000	300,000	420,000
	살모넬라키트	60,000	120,000	180,000	300,000	420,000
	기타	0	0	0	0	60,000
매출 총계(천원)		120,000	240,000	360,000	600,000	900,000

단, Neogen 제품 대리점을 통해 들은 바에 의하면 국내에는 전혀 팔리지 않는다고 조사됨.

## <요약>

### 제7절 식중독 세균 신속진단 면역 래피드 키트 개발 및 상용화

- **식중독 세균 7종의 면역 래피드 키트를 개발하기 위한 항체 선정:**
  - 면역 래피드 키트 개발의 핵심은 목표 세균에 대한 민감도, 특이도가 높으면서, 안전적 생산 및 지속 가능한 항체를 확보하는 것임.
  - 항체 제작/판매 회사들(Abcam, Abd serotec, Fitzgerald, Virostat, KPL, Hytest, Meridian, Santa cruz Biotech, Thermo 등)
- **식중독 세균 7종에 대한 항체의 확보**
  - 상용화된 항체에 대해서 특이도 및 교차반응, 결합하는 에피토프, 면역화시킨 항원, 가격 등을 토대로 하여 선정하여 확보
  - 항체 선정을 위한 식중독균의 확보
  - 항체 선정을 위한 페어링 테스트: colloidal gold를 항체와 결합하여 사용, 대조선용과 검사선용 두 가지 각각 0.5 및 0.2~0.5 mg/ml분주함 ,
- **식중독 7종 래피드 키트의 개발**
  - *키트 개발:* 스트립 및 검체 전개액 제조, 검사선 및 금-축합체의 최적농도 설정, 최적 검체 전개액 개발, 제품에 대한 민감도, 특이도, 검출한계 테스트 등을 수행
  - *Shigella* 용 키트: 검출한계 약  $10^5$  CFU/ml, 교차반응 없음
  - *Listeria monocytogenes* 용 키트: 검출한계 약  $10^5$  CFU/ml, 교차반응 약간 있음
  - *Escherichia coli* O157 용 키트: 검출한계 약  $10^5$  CFU/ml, 교차반응 없음
  - *Salmonella* 용 키트: 검출한계 약  $10^5$  CFU/ml, 교차반응 없음
  - *Staphylococcus aureus* 용 키트: 검출한계 약  $10^{5-6}$  CFU/ml, 교차반응 없음
  - *B. cereus*, *Campylobacter jejuni* 경우 항체 페어링 문제, 낮은 민감도 및 높은 비특이성 등으로 키트 제작을 중단함. 개선된 항체의 확보가 우선되어야 함
- **키트 구성품 및 사용자 매뉴얼 제작**
  - 개발된 제품 구성은 *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* 등 5개의 제품에 대하여, 박스, 파우치 포장된 디바이스, 사용설명서 등으로 구성하였음.(단, 대장균은 버퍼 들어있음.)
- **상용화 및 수출기반 확립**
  - 해외 전시회에 제품을 전시: Medica(독일), Arabhealth(아랍 두바이) 등
  - 아직 매출은 없으나 동남아시아 수출을 진행 중임



## 제8절 개발된 신속진단 키트들의 AOAC 기반 성능 검증 평가

### 1. 식중독 세균 3종에 대한 개발한 multiplex real-time PCR kit 1의 검증 (Multiplex real-time PCR detection kits for *B. cereus*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*)

#### 가. Multiplex real-time PCR detection kits의 구성

##### (1) 식중독균 7종에 대한 Multiplex Real-time PCR set 구성 및 PCR 기기 및 조건

- 제2협동기관인 참여기업 (주)코젠바이오텍에서 개발한 foodborne pathogene multiplex real-time PCR kits는 다음과 같으며 이들 시제품을 공급받아 시험에 사용함(표 8.1).

표 8.1 본 연구팀에서 개발한 multiplex real-time PCR kit의 구성

Dye	Set 1		Set 2		Set 3	
	Bacteria	Gene	Bacteria	Gene	Bacteria	Gene
FAM	<i>Bacillus cereus</i>	<i>groEL</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>mapA</i>	<i>EHEC</i>	<i>VT1</i>
JOE	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>iap</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>his</i>	<i>EHEC</i>	<i>VT2</i>
Cy5	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i>			<i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i>

- *groEL* : Molecular chaperonin
- *iap* : Invasion associated protein
- *nuc* : Unique thermonuclease
- *mapA* : Membrane protein
- *his* : Salmonella genus specific histidine transport operon
- VT1, VT2 : Verotoxin 1, 2
- *ipaH* : Invasion plasmid antigen

- multiplex real-time PCR detection kit는 primers, probes, 2x real-time PCR master mix 및 control DNA 로 구성됨
- 본 실험실에서는 AB7500 real-time PCR 기기 대신, Light Cycler® 480 (Roche, Basel, Switzerland)를 real-time PCR 기기로 사용함. 이때 사용된 각 형광 염색시약의 Excitation filter 및 emission filter의 범위는 아래 표 13과 같음(표 8.2 & 8.3)
- real-time PCR 조건은 95 °C 10 min, (95 °C 15 s and 60 °C 1 min) x40 cycles임(표 8.4)



Table 8.2 Excitation and emission comparison with the AB7500 and LC 480 II

The excitation and emission with AB7500 from KogenBiotech			
Target (gene)	Dye Filter	Excitation (nm)	Emission (nm)
<i>B. cereus (groEL)</i>	FAM	470 ± 15	520 ± 15
<i>L. monocytogenes (iap)</i>	VIC	520 ± 10	558 ± 12
<i>S. aureus (nuc)</i>	Cy5	640 ± 10	682 ± 14
IAP	ROX	580 ± 10	623 ± 14

Table 8.3 The primers and florescent dyes in multiplex real-time PCR kit used with the LightCycler® 480 II

PCR kit		Fluorescent Dyes	LightCycler® 480	
Bacteria	Genes		Excitation filters (nm)	Emission filters (nm)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>groEL</i>	FAM	465	510
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>iap</i>	JOE	533	580
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i>	Cy5	618	660
Internal control		ROX	533	610

Table 8.4 The reaction volume of components for multiplex real-time PCR kit used with the LightCycler® 480

Composition	Volume (µL)
Primer/probe mix	5
2× Real-time PCR master mix	10
Template DNA	5
Total	20

## (2) 순수배양액에서 추출한 DNA 시료에 대한 본 다중실시간 PCR kit의 성능 평가

- 각 세균 순수배양액 시료의 DNA는 minipreparation kit of bacterial genome DNA(PrepMan kit, ABI)로 준비하여 각 동일량을 섞은 후 혼합액의 5  $\mu$ L를 주형 DNA로 사용하였음.
- primer/probe mix에는 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* 및 IAC 프라이머들이 모두 포함되어 있고 각각 FAM, VIC/JOE, Cy5 및 ROX 형광필터를 사용함.
- 3 균종에 대한 PCR의 결과를 각 균주용 형광채널로 나타냈음(그림 8.1~8.4)

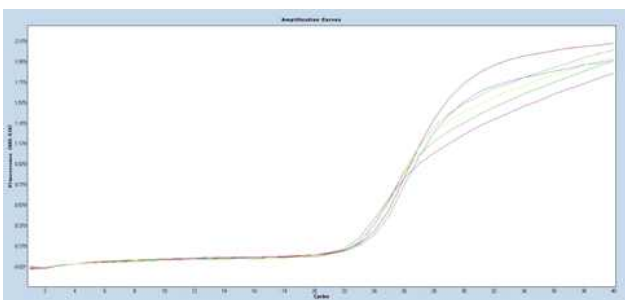


Figure 8.1 PCR amplification curves with Filter FAM 465-510 for *B.cereus*

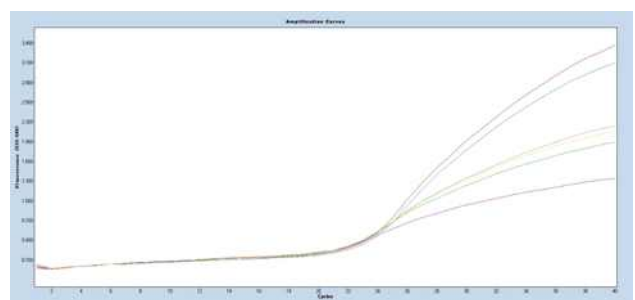


Figure 8.2 PCR amplification curves with Filter VIC 533-580 for *L.monocytogenes*

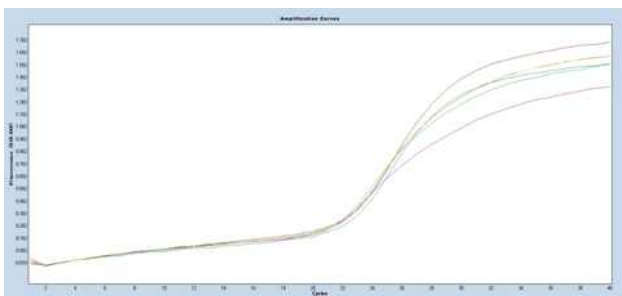


Figure 8.3 PCR amplification curves with Filter Cy5 618-660 for *S.aureus*

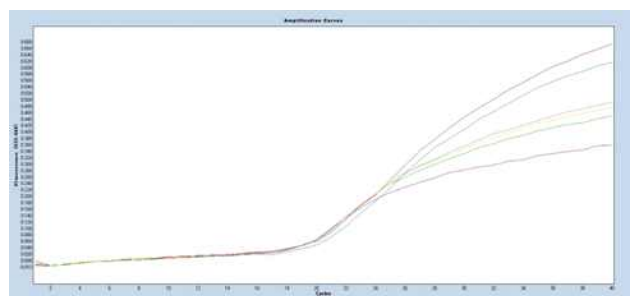


Figure 8.4 PCR amplification curves with Filter ROX 533-640 for internal amplification control (IAC)

## (3) AOAC 검증 기법을 활용한 20대 농산물에서 개발된 신속진단키트들의 성능 검증 방법

- AOAC 검증을 위한 사용자 편의 “노하우” 프로토콜을 개발하여 각 협동기관들에 제공함. 모든 협동기관 실험실들은 본 과제에서 준비된 “AOCA 검증 프로토콜”에 따라 검증 실험을 수행함.
- 그림 5.5는 “AOCA 검증 프로토콜”의 모식도를 나타냄 (AOAC, 2002; Chua et al., 2011; Li

et al., 2012; Petrauskene et al., 2012).

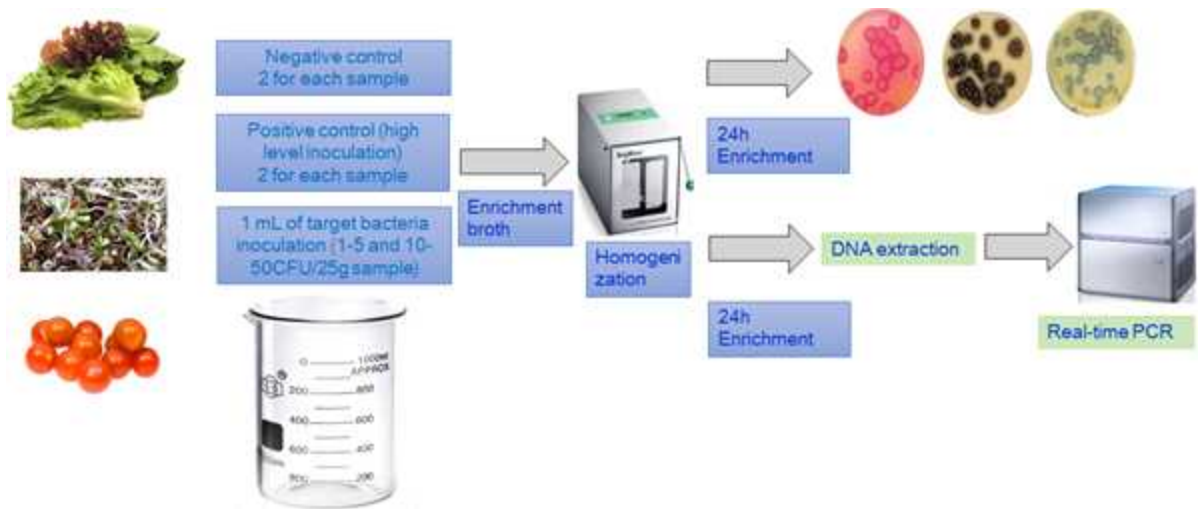


Figure 8.5 Diagram in the validation protocol based on AOAC method for developed kits

- 기본적으로, AOAC 가이드라인에 따라 검증과정을 수행하는 각 실험실에서는 해당 미생물에 적당한 농식품 시료 세 가지를 선택하고 각 시료에 각 세균을 적당한 농도로 인위오염시켜서 잘 혼합한 후 25 g씩 분주하여 수행함.
- 각 시료에 대하여 각각 10 고농도 접종 시료(high inoculum level inoculated sample), 10 저농도 접종 시료(low inoculum level inoculated samples), 2 음성대조군(negative controls without inoculation) 그리고 2 양성대조군(positive control, either pure strain culture or DNA from positive references)에 대한 결과를 얻을 것임. 적당한 농도라 함은 해당 시료에 인위오염시키고 10개로 분주한 시료에서 각각 양성 및 음성 결과가 나오는 것을 의미함. 모두 음성이나 양성이 나오면 부적절한 농도임.
- 한 균종에 대하여 3 균주와 3 시료를 시험한다면 72개(24 x 3) 시료 데이터를 얻게 될 것임. 또는 저농도 인위접종만 한다면 42개(14 x3) 데이터를 얻게 됨.
- 배양배지법 및 새로운 키트 검사법의 결과는 Mantel-Haenszel chi-square test를 사용하여 통계적으로 분석함.

## <AOAC 검증을 위한 “사용자 편의 프로토콜”>

- ① 농식품은 멸균적으로 수집하여 적당한 처리를 한 후 각 시료들을 모아서 한 덩이(bulk) 시료로 준비한다.
- ② 각 시료는 3부분으로 나누어 1) 음성대조군(2개 시료), 2) 저농도오염군(1-5 cfu/25 g 시료)용 (10개 시료), 3) 고농도 오염군(10-50 cfu/25 g 시료)용 (10개 시료)으로 준비한다.
- ③ 자연적 오염 상황을 재현하기 위하여 접종한 시료들은 시험 전까지 24-48시간 동안 냉장고에 저장한다.
- ④ 각 시료들은 25 g 씩 각 멸균 filter-lined stomacher bag에 분주하고 시료 25g 당 225 mL 증균배지를 넣고 2분 동안 stomacher를 사용하여 잘 섞어준다. 그 후 30-35°C에서 24시간 배양한다.
- ⑤ 증균배양 후, 각 오염 및 미오염 배양액들에서 각각 1 ml 시료를 취하여 키트 사용법에 따라 DNA를 추출한다.
- ⑥ 5번의 증균배양 후, 각 오염 및 미오염 배양액들에서 각각 0.1 ml 시료를 취하여 적당한 선택배지(예, Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar for *B. cereus*, Modified Oxford (MOX) agar for *S. aureus*, 또는 Baird-Parker (BP) agar for *L. monocytogenes*)에 도말하고 35°C에서 24 ~ 48시간 까지 배양하며 관찰한다.
- ⑦ 5번의 DNA 시료는 개발된 PCR 키트로 PCR을 수행한다. PCR 방법은 개발된 키트의 프로토콜을 따라 수행한다. 간단하게, master mix 와 primer/probe mix를 섞고, 각 PCR tube에 15씩 분주한 후 마지막으로 DNA 시료를 5 씩 넣어 총 20 부피를 맞춘다.
- ⑧ real-time PCR 기기는 코젠바이오텍사에서는 AB7500 (Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System) 기기를 사용하여 키트를 개발하였다. 그러나, 상황에 따라 적당한 기기를 이용할 수 있다. 본 연구팀은 Light Cycler<sup>®</sup> 480 (Roche, Basel, Switzerland)를 사용함.
- ⑨ 통계분석: 표준방법(배양배지법) 및 시험방법(새로운 키트)의 결과는 Mantel-Haenszel chi-square test를 사용하여 통계적으로 분석한다. 통계분석을 위한 분할표(2× 2) 및 공식은 는 아래와 같음:

Methods	No. of positives	No. of negatives	Total
Test	A	B	A+B
Reference	C	D	C+D
	A+C	B+D	n

$$\chi^2 = (n - 1)(AD - BC)^2 / [(A + B)(A + C)(B + D)(C + D)].$$

- ⑩ 통계 chi-square test에 기초하여, 만약  $\chi^2$  value < 3.84 하다면 두 시험방법에서 양성값이 통계적으로 유의한 차이가 없음을 의미하고( $p > 0.05$ ), 또는 만약  $\chi^2$  value  $\geq 3.84$  하다면 두 방법 사이의 양성값이 통계적으로 유의한 차이가 있음을 의미한다( $p \leq 0.05$ )

**<Validation validation based Protocol for real time PCR detection kit>(영문 버전)**

- ① Foods (lettuce, baby vegetables, cherry tomato, milk, pork and rice) were prepared by aseptically combining the contents of individual packages and mixing to prepare a bulk sample.
- ② Each food matrix were divided into 3 portions of which one portion (2 samples) was used as the negative control, a second portion (10 samples) was inoculated at a level of 1–5 cfu/25 g and a third portion (10 samples) was used as a high inoculum level (10–50 cfu/25 g).
- ③ In order to stress the organism and simulate the natural contamination condition, the bulk inoculated samples were kept under refrigeration for 24-48 h prior to testing.
- ④ A 25 g representative portion from each food type (unspiked or spiked) was mixed with 225 ml of enrichment broth in a sterile filter-lined stomacher bag. The samples were then homogenized for 2 min using a stomacher, followed by incubation at 30 °C for 24 h.
- ⑤ After enrichment, 1 ml sub-sample from each culture of spiked and unspiked samples was used for DNA extraction according to the kit manufacture.
- ⑥ After enrichment, a 0.1 ml sub-sample from each culture of spiked and unspiked samples was spread on Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar, Modified Oxford (MOX) agar and Baird-Parker (BP) agar. These selective agars were then incubated for up to 48 h of incubation at 35 °C.
- ⑦ The master mix and primer/probe mix were mixed and separated to each well (15 µ L), and 5 µL DNA from each sample was added. Then the multiplex real-time PCR was performed using the LightCycler 480II.
- ⑧ Statistical analysis The results from the test method and reference method were analyzed statistically using Mantel-Haenszel chi-square test ( $\chi^2$ ). A contingency table (2× 2) for statistical analysis is shown below:

Methods	No. of positives	No. of negatives	Total
Test	A	B	A+B
Reference	C	D	C+D
	A+C	B+D	n

$$\chi^2 = (n - 1)(AD - BC)^2 / [(A + B)(A + C)(B + D)(C + D)]$$

- ⑨ Based on the chi-square test, a a  $\chi^2$  value < 3.84 indicates that the proportions positive for the alternative and reference method are not significantly different. While, a  $\chi^2$  value equal to or more than 3.84 indicated that the proportions positive for two method differ significantly at the 5% level of significance (P < 0.05).

## 나. 개발된 PCR 키트의 성능 검증

- 식중독 세균 3균종과 3가지 식품의 조합은 기본적으로 아래 표와 같음(표 8.5).

Table 8.5 combination of Bacteria and food matrixes used in AOAC validation

Samples	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
Lettuce	ATCC 14579	ATCC 19116	ATCC 12600
Baby vegetables	ATCC 12480	ATCC 19114	ATCC 23235
Cherry tomato	F4810/72	ATCC 19117	ATCC 25923

### (1) *B. cereus* 검출 성능 검증

- AOAC validation 방법에 기반하여 6종 식품, 즉 상추, 새싹채소, 방울토마토, 우유, 돼지고기, 쌀 등을 *B. cereus* ATCC 14579, ATCC 12480, F4710/72 등 3 균주 중 한 균주를 저농도(1-5 CGU/25g 시료) 및 고농도(10-50 CGU/25g 시료)로 인위접종을 한 후 배지배양법과 개발된 PCR 키트를 적용하여 세균 검출 시험을 수행하여 키트의 성능 검증 시험을 수행함(표 8.6 & 8.7 및 그림 8.6 & 8.7).
- 상추와 새싹채소의 경우: 두 신선농산물 시료의 경우 음성대조군을 포함한 인위접종 시료 모두에서 배지법 및 PCR 키트법 양쪽 모두에서 양성으로 결과가 나옴, 이것은 야채 시료가 자연적으로 바실러스 세레우스에 오염되어 있음을 의미함. 방울토마토, 우유, 돼지고기, 쌀의 경우: 음성대조군이 음성으로 나왔으므로 자연적 오염이 없는 것을 의미함.
- 방울토마토의 경우: 저농도(1.3 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 4개 였으나, 키트의 경우 5개였음. 고농도(14.8 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 6개 였으나, 키트의 경우 10개였음.
- 우유의 경우: 저농도(1.89 cfu/25mL 시료) 접종한 경우, 배지배양법과 PCR 키트법에서 양성 시료가 각각 5개와 10개였음(표 8.7).
- 돼지고기의 경우: 저농도(0.79 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법과 PCR 키트법에서 양성 시료가 각각 6개와 7개였음(표 8.7).
- 쌀의 경우: 저농도(0.25 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법과 PCR 키트법에서 양성 시료가 각각 6개와 10개였음(표 8.7).

#### <논의 및 결론>

- 결과를 종합하면, 6가지 식품(food matrixes)(상추, 새싹채소, 방울토마토, 우유, 돼지고기, 쌀)에서 본 multiplex real-time PCR kit의 검출 성능은 배지배양법과 동일하거나 우수하였음(Table 5.8 & 5.9).

○ 우유와 돼지고기의 경우: Mantel - Haenszel chi-square test의 결과 두 방법 사이의 통계분석 결과, chi-square ( $\chi^2$ )값이 3.84보다 작으므로( $P > 0.5$ ) 이것은 두 방법에서 얻은 양성 시료 값의 차이가 통계적으로 유의하지 않음을 의미함.

○ 방울토마토와 쌀의 경우: chi-square ( $\chi^2$ )값이 4.75이므로( $P < 0.5$ ) 이것은 두 방법에서 얻은 양성 시료 값의 차이가 통계적으로 유의함을 의미함.

Table 8.6 Raw data obtained from the validation of foodborne pathogen multiplex real-time kit with 3 different foods - *B. cereus*(lettuce, baby vegetables and cherry tomatoes)

상추		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	MYP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	qPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
High	MYP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	qPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

새싹채소		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	MYP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	qPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
High	MYP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	qPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

방울토마토		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	MYP	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
	qPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
High	MYP	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+
	qPCR	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+

\* “+”: positive results; “-”: negative result; qPCR: real time PCR

Table 8.7 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과 Raw data obtained from the validation of foodborne pathogen multiplex real-time kit with 3 different foods - *B. cereus* (milk, pork and rice)

sample	Detection method	Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
milk	MYP	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
	qPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
pork	MYP	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
	qPCR	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
rice	MYP	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
	qPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

Table 8.8 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과의 분석 Summarized results for foodborne pathogen multiplex real-time kit and MYP agar culture method (*B. cereus*)

Inoculum level	Detection method	Lettuce (ATCC 12480)		Baby vegetables (ATCC 14579)		Cherry tomato (F4810/72)	
		positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives
Low	MYP	10 <sup>a</sup>	0	10 <sup>a</sup>	0	4 <sup>a</sup>	6
	qPCR	10 <sup>a</sup>	0	10 <sup>a</sup>	0	5 <sup>a</sup>	5
High	MYP	10 <sup>a</sup>	0	10 <sup>a</sup>	0	6 <sup>b</sup>	4
	qPCR	10 <sup>a</sup>	0	10 <sup>a</sup>	0	10 <sup>a</sup>	0

\*Numbers labeled with different letters for each inoculation level of every individual food type indicate a significant difference between the two methods

Table 8.9 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과의 분석 Summarized results for foodborne pathogen multiplex real-time kit and MYP agar culture method (*B. cereus*, milk, pork and rice)

Inoculum level	Detection method	milk (ATCC 14579)		pork (ATCC 12480)		rice (F4810/72)	
		positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives
Low	MYP	5 <sup>b</sup>	5	6 <sup>a</sup>	4	6 <sup>b</sup>	4
	qPCR	10 <sup>a</sup>	0	7 <sup>a</sup>	3	10 <sup>a</sup>	0

\*Numbers labeled with different letters for each inoculation level of every individual food type indicate a significant difference between the two methods



A.



B.

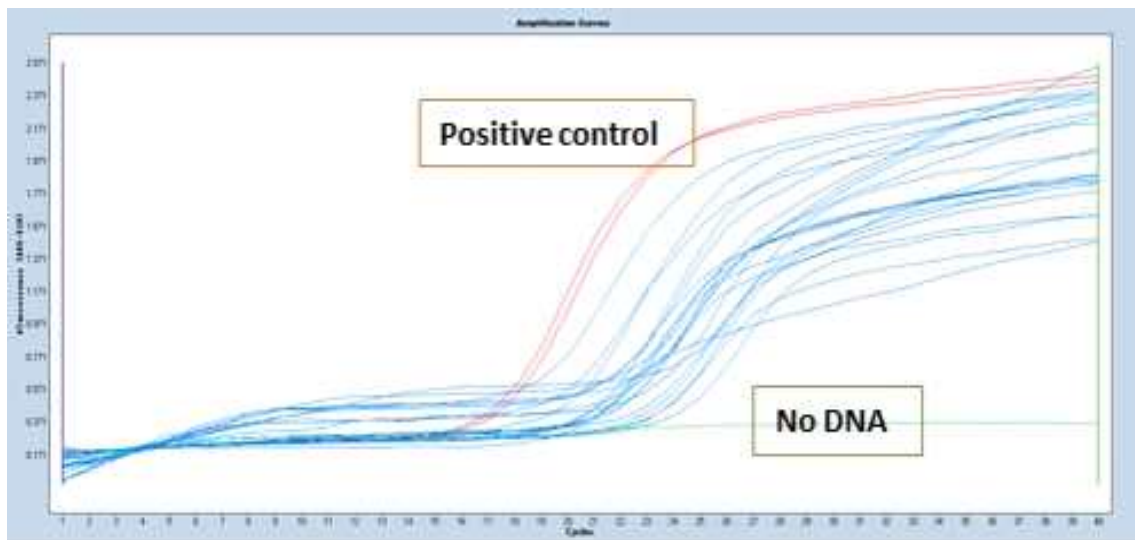
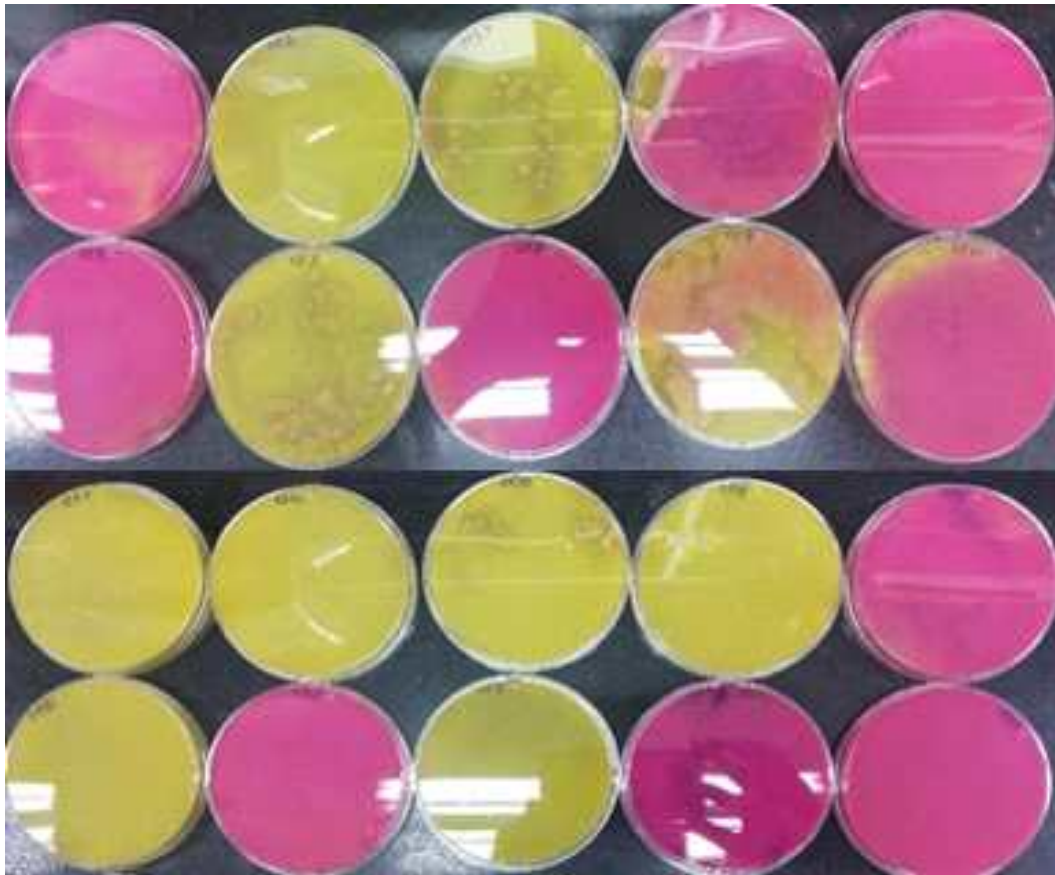


그림 8.6 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과의 raw data. B. cereus ATCC 12480를 두 가지 농도로 인위접종한 시료(상추) 각 10개. A) 배지배양법(MYP 배지). 분홍색은 바실러스의 존재를 의미함. B) PCR 키트. 녹색선은 음성대조군(No DNA), 붉은선은 양성대조군, 파란색 선들은 인위접종한 시료들.

A.



B.

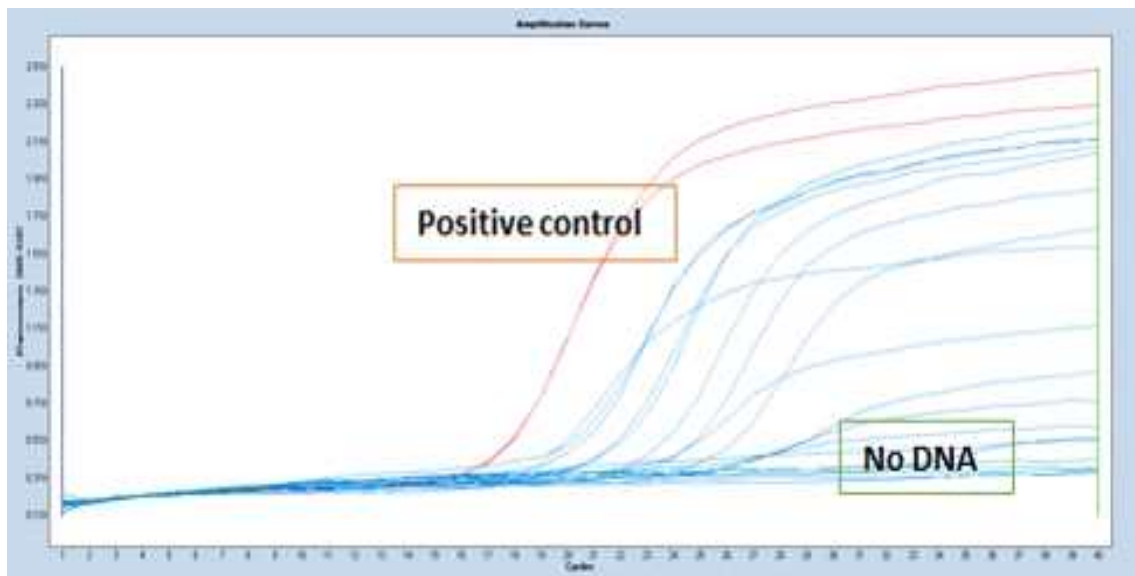


그림 8.7 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과의 raw data. *B. cereus* F4810/72를 두 가지 농도로 인위접종한 방울토마토 각 10개. A) 배지배양법(MYP 배지). 분홍색은 바실러스의 존재를 의미함. B) PCR 키트. 녹색선은 음성대조군(No DNA), 붉은선은 양성대조군, 파란색 선들은 인위접종한 시료들.

## (2) *L. monocytogenes* 검출 성능 검증

- AOAC validation 방법에 기반하여 3가지 식품, 즉 상추, 새싹채소, 방울토마토 등을 *L. monocytogenes* ATCC 19114, 19116, 19117 등 3 균주 중 한 균주를 저농도(1-5 cfu/25g 시료) 및 고농도(10-50 cfu/25g 시료)로 인위접종을 한 후 배지배양법과 개발된 PCR 키트를 적용하여 세균 검출 시험을 수행하여 키트의 성능 검증 시험을 수행함(표 8.10 & 8.11 및 그림 8.8 & 8.9).
- 시험에 사용한 모든 농산물에서 음성대조군이 음성으로 나왔으므로 자연적 오염이 없는 것을 의미함.
- 상추의 경우: *L. monocytogenes* ATCC 19114를 저농도(4.2 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 6개 였으나, PCR 키트의 경우 4개였음. 고농도(34.3 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 5개 였으나, 키트의 경우 9개였음.
- 새싹채소의 경우: *L. monocytogenes* ATCC 19116를 저농도(5.1 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 4개 였으나, PCR 키트의 경우 0개였음. PCR 키트의 경우 10 시료 중에서 IAC(internal amplification control)도 음성으로 PCR이 작동하지 않은 시료가 4개였음. 고농도(41.0 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 7개 였으나, 키트의 경우 7개였음. PCR 키트의 경우 10 시료 중에서 IAC(internal amplification control)도 음성으로 PCR이 작동하지 않은 시료가 1개였음.
- 방울토마토의 경우: *L. monocytogenes* ATCC 19117를 저농도(5.5 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 7개 였으나, PCR 키트의 경우 8개였음. 고농도(37.9 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 7개 였으나, 키트의 경우 9개였음.

### <논의 및 결론>

- 결과를 종합하면, 3가지 식품(food matrices)(상추, 새싹채소, 방울토마토)에서 본 multiplex real-time PCR kit의 검출 성능은 배지배양법과 동일하거나 우수하였음(Table 8.11).
- 3가지 식품에 대한 결과의 통계적 분석: Mantel - Haenszel chi-square test의 결과 두 방법 사이의 통계분석 결과, chi-square ( $\chi^2$ )값이 3.84보다 작으므로( $P > 0.5$ ) 이것은 두 방법에서 얻은 양성 시료 값의 차이가 통계적으로 유의하지 않음을 의미함. 단, 새싹채소의 저농도에서 배지배양법의 양성값은 PCR 키트의 값보다 통계적 유의하게 더 높았음( $\chi^2 = 5.5$ )

Table 8.10 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과. Raw data obtained from the validation of multiplex real time PCR detection kit with 3 different foods - L. monocytogenes (lettuce, baby vegetables and cherry tomatoes)

상추		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	MOXA	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
	qPCR	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
High	MOXA	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	qPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+

새싹채소		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	MOXA	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
	qPCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
High	MOXA	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
	qPCR	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+

방울토마토		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	MOXA	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
	qPCR	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
High	MOXA	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	qPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+

“+”: positive results; “-”: negative result; qPCR: real time

Table 8.11 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과의 분석 Summarized results for foodborne pathogen multiplex real-time kit and MOX agar culture method (*L. monocytogenes*)

Inoculum level	Detection method	Lettuce (ATCC 19114)		Baby vegetables (ATCC 19116)		Cherry tomato (ATCC 19117)	
		positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives
Low	MOXA	6 <sup>a</sup>	4	4 <sup>a</sup>	2	7 <sup>a</sup>	3
	qPCR	4 <sup>a</sup>	6	0 <sup>b</sup>	6	8 <sup>a</sup>	2
High	MOXA	5 <sup>a</sup>	5	7 <sup>a</sup>	2	7 <sup>a</sup>	3
	qPCR	9 <sup>a</sup>	1	7 <sup>a</sup>	2	9 <sup>a</sup>	1

\*Numbers labeled with different letters for each inoculation level of every individual food type indicate a significant difference between the two methods

A.



B.

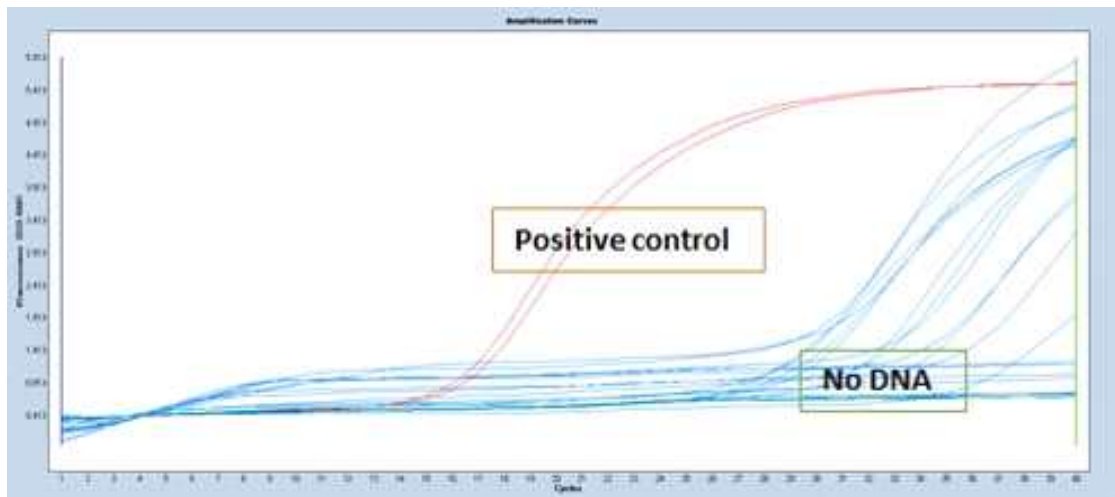
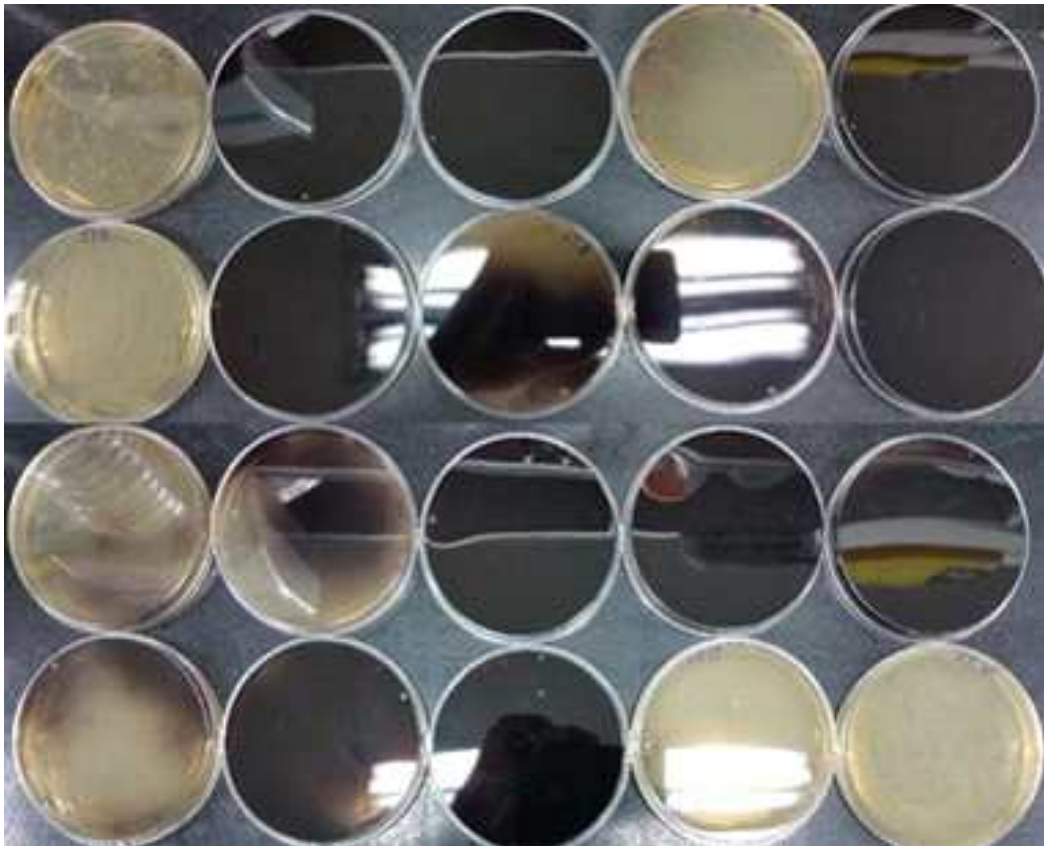


그림 8.8 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과. *L. monocytogenes* ATCC 19114를 두 가지 농도로 인위접종한 시료(상추) 각 10개. A) 배지배양법(MOX agar). 검은색은 리스테리아의 존재를 의미함. B) PCR 키트. 녹색선은 음성대조군(No DNA), 붉은선은 양성대조군, 파란색 선들은 인위접종한 시료들.



A.



B.



그림 8.9 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과. *L. monocytogenes* ATCC 19117를 두 가지 농도로 인위접종한 방울토마토 각 10개. A) 배지배양법(MOX agar). 검은색은 리스테리아의 존재를 의미함. B) PCR 키트. 녹색선은 음성대조군(No DNA), 붉은선은 양성대조군, 파란색 선들은 인위접종한 시료들.

### (3) *S. aureus* 검출 성능 검증

- AOAC validation 방법에 기반하여 4가지 식품, 즉 상추, 새싹채소, 방울토마토 및 우유 등을 *S. aureus* ATCC 12600, 23235, 25923 등 3 균주 중 한 균주를 저농도(1-5 CFU/25g 시료) 및 고농도(10-50 CFU/25g 시료)로 인위접종을 한 후 배지배양법과 개발된 PCR 키트를 적용하여 세균 검출 시험을 수행하여 키트의 성능 검증 시험을 수행함(표 8.12 & 8.13 및 그림 8.10 ~ 8.12).
- 시험에 사용한 모든 농산물에서 음성대조군이 음성으로 나왔으므로 자연적 오염이 없는 것을 의미함.
- 상추의 경우: *S. aureus* ATCC 12600를 저농도(0.6 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 5개 였으나, PCR 키트의 경우 10개였음.
- 새싹채소의 경우: *S. aureus* ATCC 23235를 저농도(2.0 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 2개 였으나, PCR 키트의 경우 2개였음. PCR 키트의 경우 10 시료 중에서 IAC 음성인 시료가 4개였으며 이는 통계에서 제외하였음
- 방울토마토의 경우: *S. aureus* ATCC 25923를 저농도(0.8 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 10개 였으나, PCR 키트의 경우 7개였음. 고농도(19.4 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 10개 였으나, 키트의 경우 8개였음.
- 우유의 경우: *S. aureus* ATCC 12600를 저농도(0.4 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 6개 였으나, PCR 키트의 경우 4개였음.

#### <논의 및 결론>

- 결과를 종합하면, 4가지 식품(food matrices)(상추, 새싹채소, 방울토마토, 우유)에서 본 multiplex real-time PCR kit의 검출 성능은 배지배양법과 동일하거나 우수하였음(표 8.13).
- 4가지 식품에 대한 결과의 통계적 분석: Mantel - Haenszel chi-square test의 결과 두 방법 사이의 통계분석 결과, chi-square ( $\chi^2$ )값이 3.84보다 작으므로( $P > 0.5$ ) 이것은 두 방법에서 얻은 양성 시료 값의 차이가 통계적으로 유의하지 않음을 의미함. 단, 상추의 저농도에서 PCR 키트의 양성값은 배지배양법의 값보다 통계적으로 유의하게 더 높았음( $\chi^2 = 6.3$ )



Table 8.12 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과. Raw data obtained from the validation of multiplex real time PCR detection kit with 3 different foods - S. aureus (lettuce, baby vegetables, cherry tomatoes and milk)

상추		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	BPA	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
	qPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

새싹채소		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	BPA	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	qPCR	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+

방울토마토		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	BPA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	qPCR	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
High	BPA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	qPCR	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+

milk		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	BPA	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	qPCR	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+

Table 8.13 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과의 분석 Summarized results for foodborne pathogen multiplex real-time kit and BP agar culture method (*S. aureus*)

Inoculum level	Detection method	Lettuce (ATCC 12600)		Cherry tomato (ATCC 25923)		Baby vegetables (ATCC 23235)		milk (ATCC 12600)	
		positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives
Low	BP	5 <sup>b</sup>	5	10 <sup>a</sup>	0	2 <sup>a</sup>	4	6 <sup>a</sup>	4
	qPCR	10 <sup>a</sup>	0	7 <sup>a</sup>	3	2 <sup>a</sup>	4	4 <sup>a</sup>	6

\*Numbers labeled with different letters for each inoculation level of every individual food type indicate a significant difference between the two methods

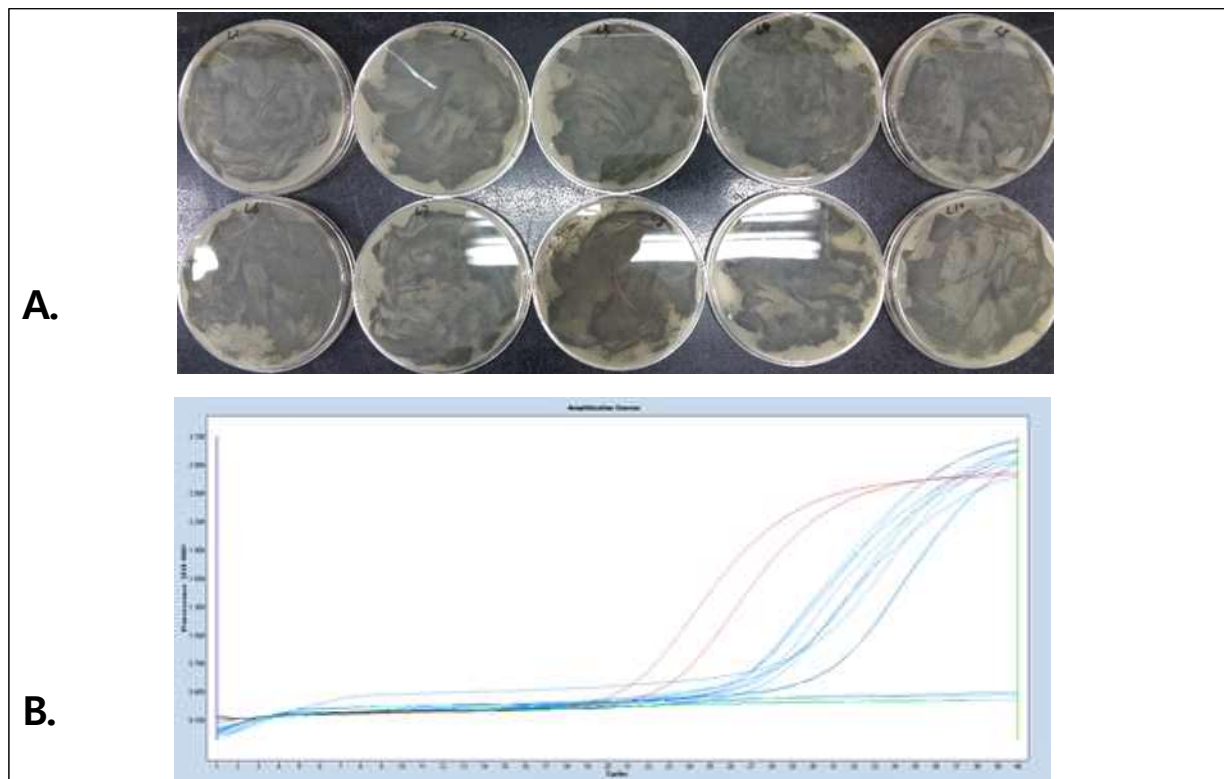


그림 8.10 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과. *S. aureus* ATCC 12600를 두 가지 농도로 인위접종한 상추 시료 10개. A) 배지배양법(BP agar). 검은색은 리스테리아의 존재를 의미함. B) PCR 키트. 녹색선은 음성대조군(No DNA), 붉은선은 양성대조군, 파란색 선들은 인위접종한 시료들.

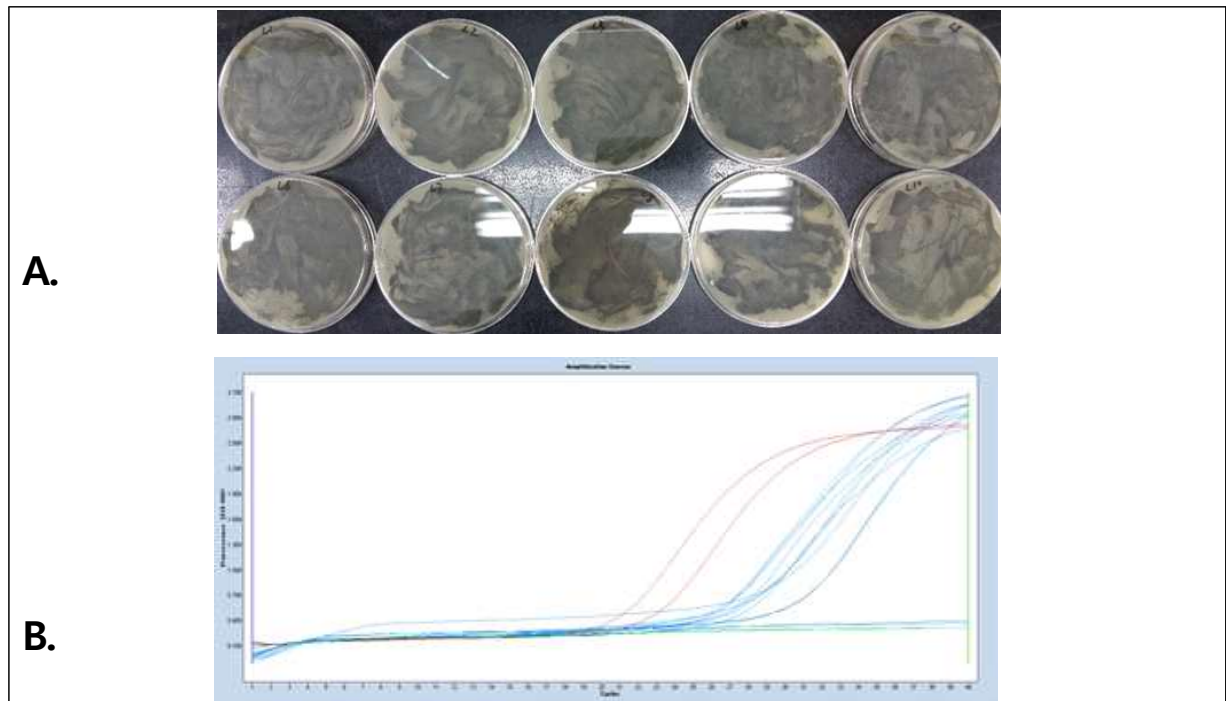


그림 8.11 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과. *S. aureus* ATCC 23235 를 두 가지 농도로 인위접종한 새싹채소. A) 배지배양법(BP agar). 검은색은 리스테리아의 존재를 의미함. B) PCR 키트. 녹색선은 음성대조군(No DNA), 붉은선은 양성대조군, 파란색 선들은 인위접종한 시료들.

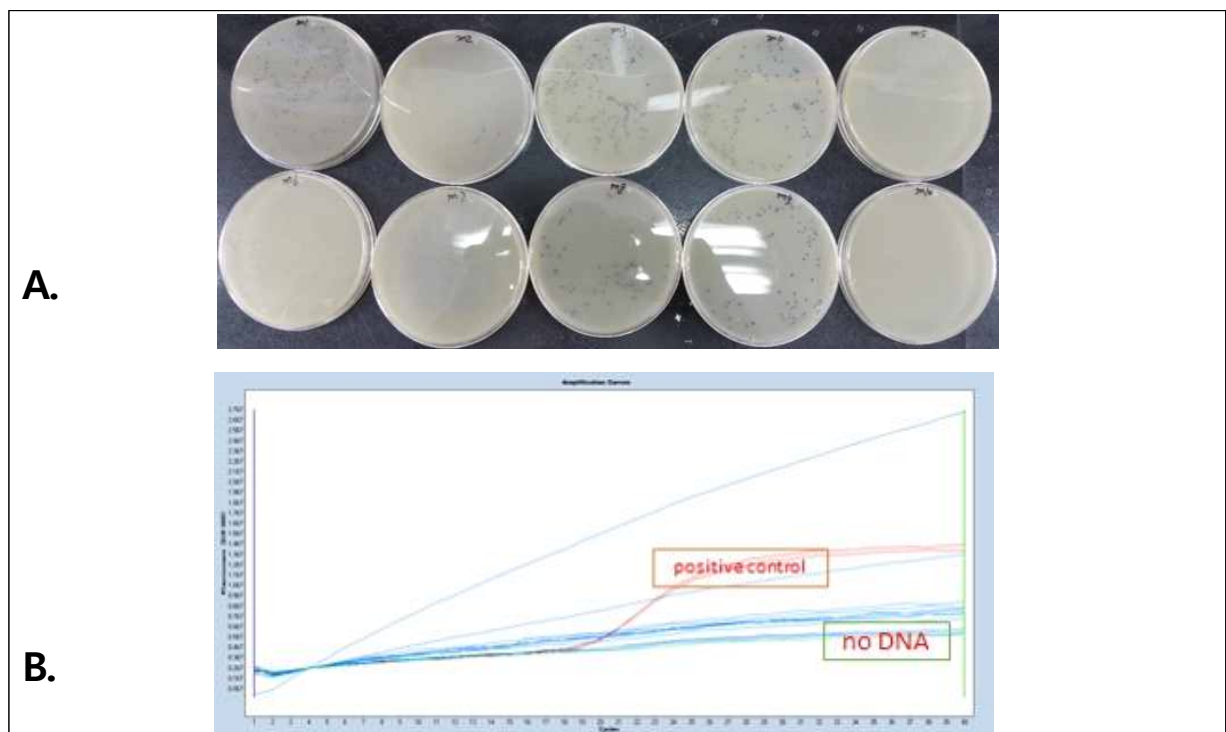


그림 8.12 AOAC 검증 방법으로 수행한 PCR 키트의 성능 검증 결과. *S. aureus* ATCC 12600 를 두 가지 농도로 인위접종한 우유. A) 배지배양법(BP agar). B) PCR 키트. 녹색선은 음성대조군(No DNA), 붉은선은 양성대조군, 파란색 선들은 인위접종한 시료들.

## 2. 식중독 세균 3종에 대한 개발한 면역 래피드 키트의 검증

### 가. *L. monocytogenes*용 면역 래피드 키트의 검출한계, 특이도 검증

#### (1) 면역키트 및 세균 시료의 준비 (Preparation of the Immuno-rapid kits and bacterial samples)

- 면역 래피드 키트들은 제3협동기관인 참여기업 (주)래피젠에서 시제품을 만들어 제공함.
- *L. monocytogenes* (ATCC 15313, 19114, 19115, 19116, 19118, and scottA) 균주들은 TSB 배지, 35°C, 18-24시간 배양 후, PBS로 연속 희석한 후, 120 μL를 면역반응에 사용함.
- 면역 래피드 키트의 민감도를 *L. monocytogenes* ATCC 19116 연속 희석액으로 시험하여 평가함.
- 면역 래피드 키트의 inclusivity를 여러 *L. monocytogenes* 균주들에 대하여 시험하여 평가함.

#### (2) *L. monocytogenes* 검출용 면역 키트의 검출한계

- *L. monocytogenes* 검출용으로 개발된 면역 키트들은 30초 또는 10분 내에 밴드를 나타냄. 이 경우 균주의 농도는 9 log cfu/mL.
- 면역키트의 검출한계는 *L. monocytogenes* ATCC 19116에 대하여 약 5 log cfu/mL (그림 8.13)이었으며, *L. monocytogenes* ATCC 15313에 대한 면역 키트의 검출한계는 약 7 log cfu/mL 이었음(그림 8.14).

<i>L. m</i> 19116 (log cfu/ml)	Time needed
9	30 s
8	2 m
7	4 m
6	10 m
5	1 h
4	-

그림 8.13 *L. monocytogenes* ATCC 19116에 대한 면역 래피드 키트의 검출 한계/민감도. 검출한계는 ATCC 19116의 순수배양액 시료 약 5 log cfu/mL이었음.



그림 8.14 *L. monocytogenes* ATCC 15313에 대한 면역 래피드 키트의 검출 한계/민감도. 검출한계는 ATCC 19116의 순수배양액 시료 약 7 log cfu/mL이었음.

### (3) *L. monocytogenes* 검출용 면역 키트의 inclusivity

- 실험에 사용된 *L. monocytogenes* 균주들: ATCC 15313, 19114, 19115, 19116, 19118, and scottA.
- 개발된 면역 래피드 키트의 검출결과 모든 균주들에서 분명한 밴드를 나타냈음(그림 8.15).

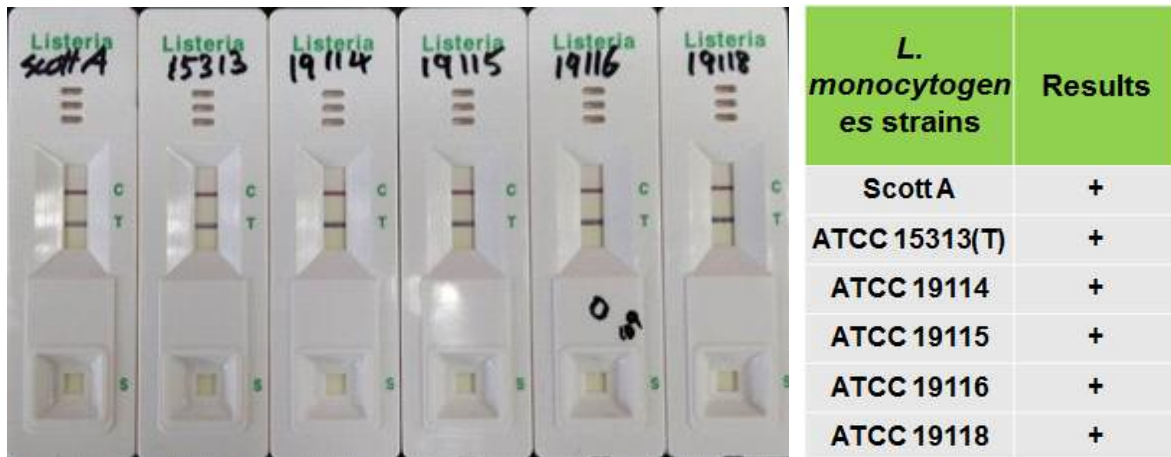


그림 8.15 리스테리아 검출용 면역 키트의 inclusivity 검증. *L. monocytogenes* ScottA, ATCC 15313, 19114, 19115, 19116, 19118, and scottA19116에 대한 면역 래피드 키트의 검출결과 모두 분명한 밴드를 나타냈음.



## 나. *Staphylococcus aureus* 용 면역 래피드 키트의 검출한계, 특이도 검증

### (1) 면역키트 및 세균 시료의 준비 (Preparation of the Immuno-rapid kits and bacterial samples)

- 면역 래피드 키트들은 제3협동 (주)래피젠에서 시제품을 만들어 제공됨
- *S. aureus* (ATCC 6538, 12598, 12600, 13150, 13565, 23235, 25923, 29740 and KCCM 41294) 균주들은 TSB 배지, 35°C, 18-24시간 배양 후, PBS로 연속 희석한 후, 120 µL를 면역반응에 사용함.
- 면역 래피드 키트의 민감도를 *S. aureus* ATCC 12600, 13565, 25923 균주의 연속 희석액으로 시험하여 평가함.
- 면역 래피드 키트의 inclusivity를 여러 *S. aureus* 균주들에 대하여 시험하여 평가함.
- 면역 래피드 키트의 exclusivity를 여러 non-*S. aureus* 균주들에 대하여 시험하여 평가함.

### (2) *S. aureus* 검출용 면역 키트의 inclusivity/exclusivity 시험

- 개발된 *S. aureus* 검출용 면역 래피드 키트는 ATCC 6538, 12598, 12600, 13150, 13565, 23235, 25923, 29740 and KCCM 41294) 균주들 모두에서 양성 반응을 나타냄. 균주 농도는 7 log cfu/mL를 사용함(그림 8.16).



그림 8.16 황색포도상구균 검출용 면역 키트의 inclusivity/exclusivity 검증. 키트는 *S. aureus* ATCC 6538, 12598, 12600, 13150, 13565, 23235, 25923, 29740 and KCCM 41294 균주들 모두에서 양성 반응을 나타냄. 시험한 균주 농도는 7 log cfu/mL임.

- 개발된 *S. aureus* 검출용 면역 래피드 키트는 non-*S. aureus* 균주들(*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *Salmonella* 및 *E. coli*)에 대하여 모두 음성으로 나타남. 시험한 균주 농도는 8-9 log cfu/mL를 사용함(그림 8.17).



그림 8.17 황색포도상구균 검출용 면역 키트의 inclusivity/exclusivity 검증. 키트는 non-*S. aureus* 균주들(*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *Salmonella* 및 *E. coli*)에 대하여 모두 음성으로 나타남. 시험한 균주 농도는 7 log cfu/mL임.

(3) *S. aureus* 검출용 면역 키트의 검출한계:

○ *S. aureus* 검출용으로 개발된 면역 키트들은 10분 내에 밴드를 나타냄. 이 경우 균주의 농도는 9 log cfu/mL.

○ 면역 래피드 키트의 검출한계는 ATCC 12600, 13565 및 25923에 대하여 각각 5.6, 4.9 및 5.1 log cfu/mL이었음(그림 8.18).



그림 8.18 황색포도상구균 검출용 면역 키트의 검출한계 결과. 면역 래피드 키트의 검출한계는 ATCC 12600, 13565 및 25923에 대하여 각각 5.6, 4.9 및 5.1 log cfu/mL이었음.



## 다. 래피젠 면역 키트의 성능 검증

(Validation of Rapigen Immuno detection kit for *L. monocytogenes* and *S. aureus*)

### (1) AOAC 검증 기법을 활용한 개발된 신속진단키트들의 성능 검증 방법

- AOAC 검증을 위한 사용자 편의 “노하우” 프로토콜을 개발하여 각 협동기관들에 제공함. 모든 협동기관 실험실들은 본 과제에서 준비된 “AOAC 검증 프로토콜”에 따라 검증 실험을 수행함.
- 그림 5.19는 “AOAC 검증 프로토콜”의 모식도를 나타냄 (AOAC International OMA Program Manual: Feldsine et al. 2002; Li et al., 2012; Petrauskene et al., 2012).

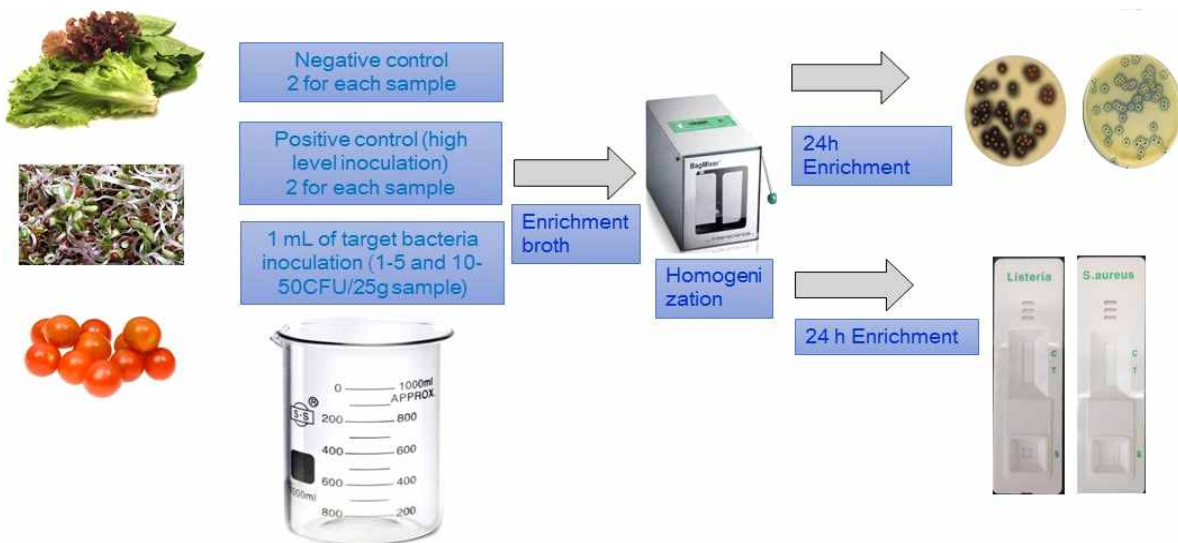


Figure 8.19 Diagram in the validation protocol based on AOAC method for developed kits

- 기본적으로, AOAC 가이드라인에 따라 검증과정을 수행하는 각 실험실에서는 해당 미생물에 적당한 농식품 시료 세 가지를 선택하고 각 시료에 각 세균을 적당한 농도로 인위오염시켜서 잘 혼합한 후 25 g씩 분주하여 수행함.
- 각 시료에 대하여 각각 10 고농도 접종 시료(high inoculum level inoculated sample), 10 저농도 접종 시료(low inoculum level inoculated samples), 2 음성대조군(negative controls without inoculation) 그리고 2 양성대조군(positive control, either pure strain culture or DNA from positive references)에 대한 결과를 얻을 것임. 적당한 농도라 함은 해당 시료에 인위오염시키고 10개로 분주한 시료에서 각각 양성 및 음성 결과가 나오는 것을 의미함. 모두 음성이나 양성이 나오면 부적절한 농도임.

## <AOAC 검증을 위한 “사용자 편의 프로토콜”> Rapigen kit용

- ① 농식품은 멸균적으로 수집하여 적당한 처리를 한 후 각 시료들을 모아서 한 덩어리(bulk) 시료로 준비한다.
- ② 각 시료는 3부분으로 나누어 1) 음성대조군(2개 시료), 2) 저농도오염군(1-5 cfu/25 g 시료)용 (10개 시료), 3) 고농도 오염군(10-50 cfu/25 g 시료)용 (10개 시료)으로 준비한다.
- ③ 자연적 오염 상황을 재현하기 위하여 접종한 시료들은 시험 전까지 24-48시간 동안 냉장고에 저장한다.
- ④ 각 시료들은 25 g 씩 각 멸균 filter-lined stomacher bag에 분주하고 시료 25 g 당 225 mL 증균배지를 넣고 2분 동안 stomacher를 사용하여 잘 섞어준다. 그 후 30-35°C에서 24시간 배양한다.
- ⑤ 증균배양 후, 각 오염 및 미오염 배양액들에서 각각 1 ml 시료를 취하여 키트 사용법에 따라 DNA를 추출한다.
- ⑥ 5번의 증균배양 후, 각 오염 및 미오염 배양액들에서 각각 0.1 ml 시료를 취하여 적당한 선택배지(예, Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar for *B. cereus*, Modified Oxford (MOX) agar for *S. aureus*, 또는 Baird-Parker (BP) agar for *L. monocytogenes*)에 도말하고 35°C에서 24 ~ 48시간 까지 배양하며 관찰한다.
- ⑦ 5번의 증균배양 후, 각 오염 및 미오염 배양액들에서 각각 0.12 mL 시료를 취하여 Rapigen immuni kit에 떨어뜨린다. 2-10분후 음성 및 양성을 평가한다.
- ⑧ 통계분석: 표준방법(배양배지법) 및 시험방법(새로운 키트)의 결과는 Mantel-Haenszel chi-square test를 사용하여 통계적으로 분석한다. 통계분석을 위한 분할표(2× 2) 및 공식은 는 아래와 같음:

Methods	No. of positives	No. of negatives	Total
Test	A	B	A+B
Reference	C	D	C+D
	A+C	B+D	n

$$\chi^2 = (n - 1)(AD - BC)^2 / [(A + B)(A + C)(B + D)(C + D)]$$

- ⑨ 통계 chi-square test에 기초하여, 만약  $\chi^2$  value < 3.84 하다면 두 시험방법에서 양성값이 통계적으로 유의한 차이가 없음을 의미하고( $p > 0.05$ ), 또는 만약  $\chi^2$  value  $\geq 3.84$  하다면 두 방법 사이의 양성값이 통계적으로 유의한 차이가 있음을 의미한다( $p \leq 0.05$ )

## (2) 개발된 래피젠 키트 검증 결과

### (가) *L. monocytogenes*

- 래피젠 면역 진단키트를 AOAC validation 방법에 기반한 인위접종 실험을 통하여 성능 검증을 수행하였음(표 8.14 - 5.17 및 그림 5.20 - 5.22).
- 6 가지 농식품, 즉 상추, 새싹채소, 방울토마토, 우유, 돼지고기, 콩나물 등을 *L. monocytogenes*에 의한 자연 오염이 검출되지 않았음(표 8.14 & 5.15).
- 상추의 경우: *L. monocytogenes* ATCC 19114를 저농도(4.2 cfu/25 g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 6개 였으며, 래피젠 키트의 경우 10개였음. 고농도(34.3 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 5개 였으며, 래피젠 키트의 경우 10개였음(표 8.14 & 5.16).
- 새싹채소의 경우: *L. monocytogenes* ATCC 19116를 저농도(5.1 cfu/25 g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 8개 였으며, 래피젠 키트의 경우 10개였음. 고농도(41.0 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 8개 였으며, 래피젠 키트의 경우 10개였음.
- 방울토마토의 경우: *L. monocytogenes* ATCC 19117를 저농도(5.5 cfu/25 g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 7개 였으며, 래피젠 키트의 경우 9개였음. 고농도(37.9 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 7개 였으며, 키트의 경우 9개였음.
- 우유의 경우: *L. monocytogenes* ATCC 19116를 저농도(0.05 cfu/25 ml 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 1개 였으며, 래피젠 키트의 경우 3개였음(표 8.15 & 5.17).
- 돼지고기의 경우: *L. monocytogenes* ATCC 19114를 저농도(0.16 cfu/25 g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 6개 였으며, 래피젠 키트의 경우 4개였음.
- 콩나물의 경우: *L. monocytogenes* ATCC 19117를 저농도(0.2 cfu/25 g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 10개 였으며, 래피젠 키트의 경우 10개였음.

### <논의 및 결론>

- 결과를 종합하면, 6가지 농식품에서 본 래피젠 키트의 검출 성능은 배지배양법과 동일하거나 우수하였음(표 8.16).
- 상추를 제외한 5가지 농식품에 대한 결과의 통계적 분석(Mantel - Haenszel chi-square test)의 결과 두 방법 사이의 chi-square ( $\chi^2$ )값이 3.84보다 작으므로( $P > 0.5$ ) 이것은 두 방법에서 얻은 양성 시료 값의 차이가 통계적으로 유의하지 않음을 의미함. 단, 상추의 경

우 저농도 및 고농도 접종 모두에서 래피젠 키트의 양성값은 배지배양법의 값보다 통계적 유의하게 더 높았음( $\chi^2 = 4.75$  &  $6.3$  means  $P < 0.05$ )

Table 8.14 Raw data obtained from the validation of rapigen kit with 3 different foods - L. monocytogenes (lettuce, baby vegetables and cherry tomatoes)

상추		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	MOXA	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
	Rapigen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
High	MOXA	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	Rapigen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

새싹채소		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	MOXA	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
	Rapigen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
High	MOXA	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
	Rapigen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

방울토마토		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	MOXA	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
	Rapigen	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
High	MOXA	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	Rapigen	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+

“+”: positive results; “-”: negative result; qPCR: real time PCR

Table 8.15 Raw data obtained from the validation of rapigen kit with 3 different foods - L. monocytogenes(milk, pork and bean sprouts)

Milk		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	MOXA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
	Rapigen	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+

Pork		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	MOXA	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
	Rapigen	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+

Bean sprouts		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	MOXA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	Rapigen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

“+”: positive results; “-”: negative result; qPCR: real time PCR

Table 8.16 Summarized results of rapigen kit and MOX agar culture method for *L. monocytogenes* in lettuce, baby vegetables and cherry tomato

Inoculum level	Detection method	Lettuce (ATCC 19114)		Baby vegetables (ATCC 19116)		Cherry tomato (ATCC 19117)	
		positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives
Low	MOXA	6 <sup>b</sup>	4	8 <sup>a</sup>	2	7 <sup>a</sup>	3
	Rapigen	10 <sup>a</sup>	0	10 <sup>a</sup>	0	9 <sup>a</sup>	1
High	MOXA	5 <sup>b</sup>	5	8 <sup>a</sup>	2	7 <sup>a</sup>	3
	Rapigen	10 <sup>a</sup>	0	10 <sup>a</sup>	0	10 <sup>a</sup>	0

\*Numbers labeled with different letters for each inoculation level of every individual food type indicate a significant difference between the two methods

Table 8.17 Summarized results of rapigen kit and MOX agar culture method for *L. monocytogenes* in milk , pork and bean sprouts

Inoculum level	Detection method	Milk (ATCC 19116)		Pork (ATCC 19114)		Bean sprouts (ATCC 19117)	
		positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives
Low	MOXA	1 <sup>a</sup>	9	6 <sup>a</sup>	4	10 <sup>a</sup>	0
	Rapigen	5 <sup>a</sup>	5	4 <sup>a</sup>	6	10 <sup>a</sup>	0

\*Numbers labeled with different letters for each inoculation level of every individual food type indicate a significant difference between the two methods

**A.**



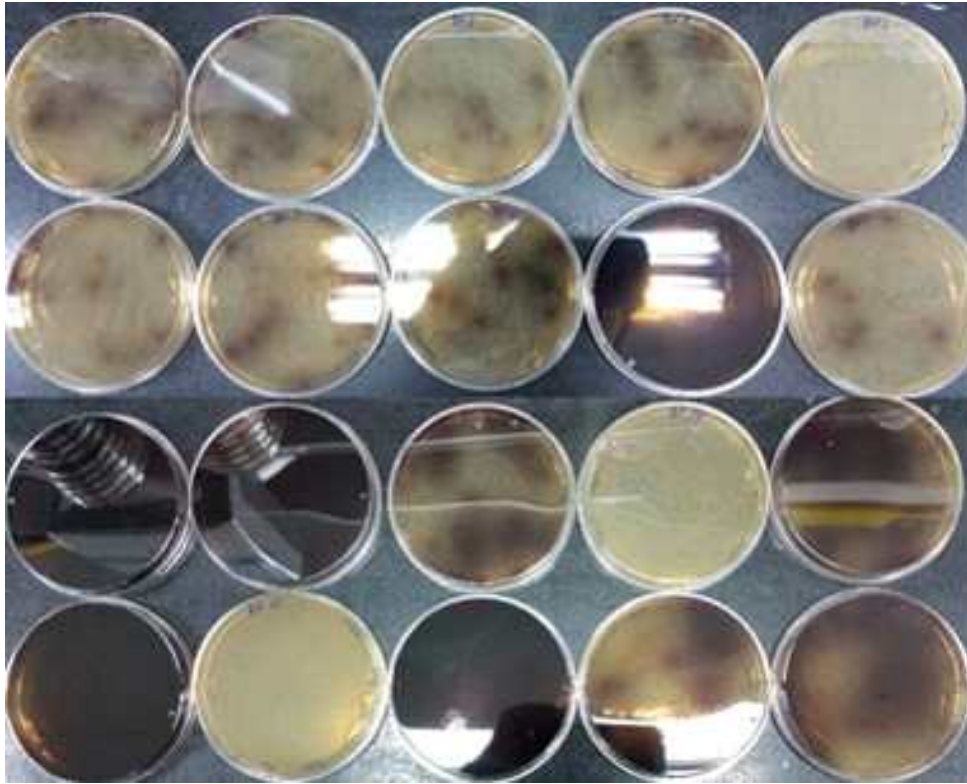
**B.**



Figure 8.20 Validation results for **lettuce** inoculated with *L. monocytogenes* ATCC 19114 A) MOX agar results for low level and high level inoculum (each 10 samples); B) rapigen kit results for low level and high level inoculum (each 10 samples)



A.



B.



Figure 8.21 Validation results for **baby vegetables** inoculated with *L. monocytogenes* ATCC 19116 A) MOX agar results for low level and high level inoculum (each 10 samples); B) rapigen kit results for low level and high level inoculum (each 10 samples)



**A.**



**B.**



Figure 8.22 Validation results for cherry tomato inoculated with *L. monocytogenes* ATCC 19117 A) MOX agar results for low level and high level inoculum (each 10 samples); B) rapigen kit results for low level and high level inoculum (each 10 samples)

## (2) *S. aureus*

- 래피젠 면역 진단키트를 AOAC validation 방법에 기반한 인위접종 실험을 통하여 성능 검증을 수행하였음(표 8.18 - 8.21 및 그림 8.23 - 8.25).
- 5 가지 농식품, 즉 상추, 새싹채소, 방울토마토, 우유, 콩나물 등을 *S. aureus*에 의한 자연 오염이 검출되지 않았음(표 8.18 & 8.19).
- 상추의 경우: *S. aureus* ATCC 00000를 저농도(2.7 cfu/25 g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 4개 였으며, 래피젠 키트의 경우 1개였음. 고농도(22.3 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 4개 였으며, 래피젠 키트의 경우 5개였음(표 8.14 & 8.16). 또 다른 실험에서 저농도(0.6 cfu/25 g 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 5개 였으며, 래피젠 키트의 경우 2개였음.
- 새싹채소의 경우: *S. aureus* ATCC 00000를 저농도(1.9 cfu/25 g 시료) 및 고농도(20.7 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법 및 래피젠 키트 모두 음성이였음(0/10). 에서는 양성 시료가 0개 였으며, 래피젠 키트의 경우 0개였음. 또 다른 실험에서 저농도(2.0 cfu/25 g 시료) 접종의 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 2개 였으며, 래피젠 키트의 경우 4개였음.
- 방울토마토의 경우: *S. aureus* ATCC 00000를 저농도(0.8 cfu/25 g 시료) 및 고농도(19.4 cfu/25g 시료) 접종한 경우, 배지배양법 및 래피젠 키트 모두 양성이였음(10/10 & 10/10).
- 우유의 경우: *S. aureus* ATCC 00000를 저농도(0.4 cfu/25 ml 시료) 접종한 경우, 배지배양법에서는 양성 시료가 6개 였으며, 래피젠 키트의 경우 4개였음(표 8.19).

### <논의 및 결론>

- 결과를 종합하면, 5가지 농식품에서 본 래피젠 키트의 검출 성능은 배지배양법과 동일하거나 우수하였음(표 8.16).
- 5가지 농식품에 대한 결과의 통계적 분석(Mantel - Haenszel chi-square test)의 결과 두 방법 사이의 chi-square ( $\chi^2$ )값이 3.84보다 작으므로( $P > 0.5$ ) 이것은 두 방법에서 얻은 양성 시료 값의 차이가 통계적으로 유의하지 않음을 의미함.

Table 8.18 Raw data obtained from the validation of rapigen kit with 4 different foods –S. aureus (lettuce, baby vegetables, cherry tomatoes and milk)

상추		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	BP media	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Rapigen kit	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
High	BP media	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Rapigen kit	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	+	+

새싹채소		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	BP media	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rapigen kit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
High	BP media	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rapigen kit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

방울토마토		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	BP media	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	Rapigen kit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
High	BP media	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	Rapigen kit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

Table 8.19 Raw data obtained from the validation of rapigen kit for *S. aureus* in milk, lettuce, baby vegetables and bean sprout.

milk		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	BP media	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	Rapigen kit	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+

상추		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	BP media	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
	Rapigen kit	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+

새싹채소		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	BP media	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	Rapigen kit	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+

Bean sprouts		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control	
Inoculum level	Detection method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Low	BP media	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	Rapigen kit	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+

Table 8.20 Summarized results for rapigen kit and BP agar culture method for *S. aureus*

Inoculum level	Detection method	Lettuce (ATCC 12600)		Baby vegetables (ATCC 23235)		Cherry tomato (ATCC 25923)	
		positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives
Low	BP media	4 <sup>a</sup>	6	0	10	10 <sup>a</sup>	0
	Rapigen kit	1 <sup>a</sup>	9	0	10	10 <sup>a</sup>	0
High	BP media	4 <sup>a</sup>	6	0	10	10 <sup>a</sup>	0
	Rapigen kit	5 <sup>a</sup>	5	0	10	10 <sup>a</sup>	0

\*Numbers labeled with different letters for each inoculation level of every individual food type indicate a significant difference between the two methods

Table 8.21 Summarized results for rapigen kit and BP agar culture method for *S. aureus*

Inoculum level	Detection method	milk (ATCC 12600)		Lettuce (ATCC 12600)		Baby vegetables (ATCC 23235)		Bean sprouts (ATCC 25923)	
		positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives
Low	BP media	6 <sup>a</sup>	4	5 <sup>b</sup>	5	2 <sup>a</sup>	8	5 <sup>a</sup>	5
	Rapigen kit	4 <sup>a</sup>	6	2 <sup>b</sup>	8	4 <sup>a</sup>	6	7 <sup>a</sup>	3

\*Numbers labeled with different letters for each inoculation level of every individual food type indicate a significant difference between the two methods

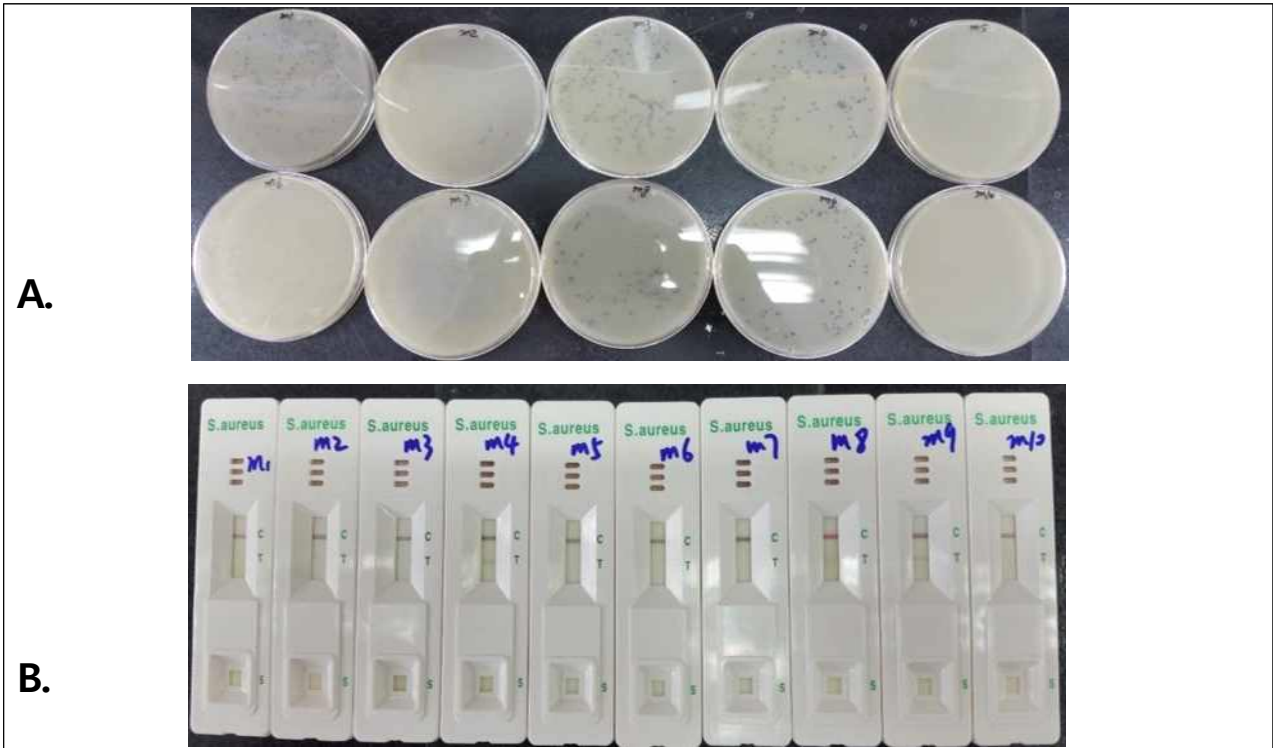


Figure 8.22 Validation results for **milk** inoculated with *S. aureus* ATCC 12600 A) BP agar results for low level (10 samples); B) rapigen kit results for low level inoculum (10 samples)

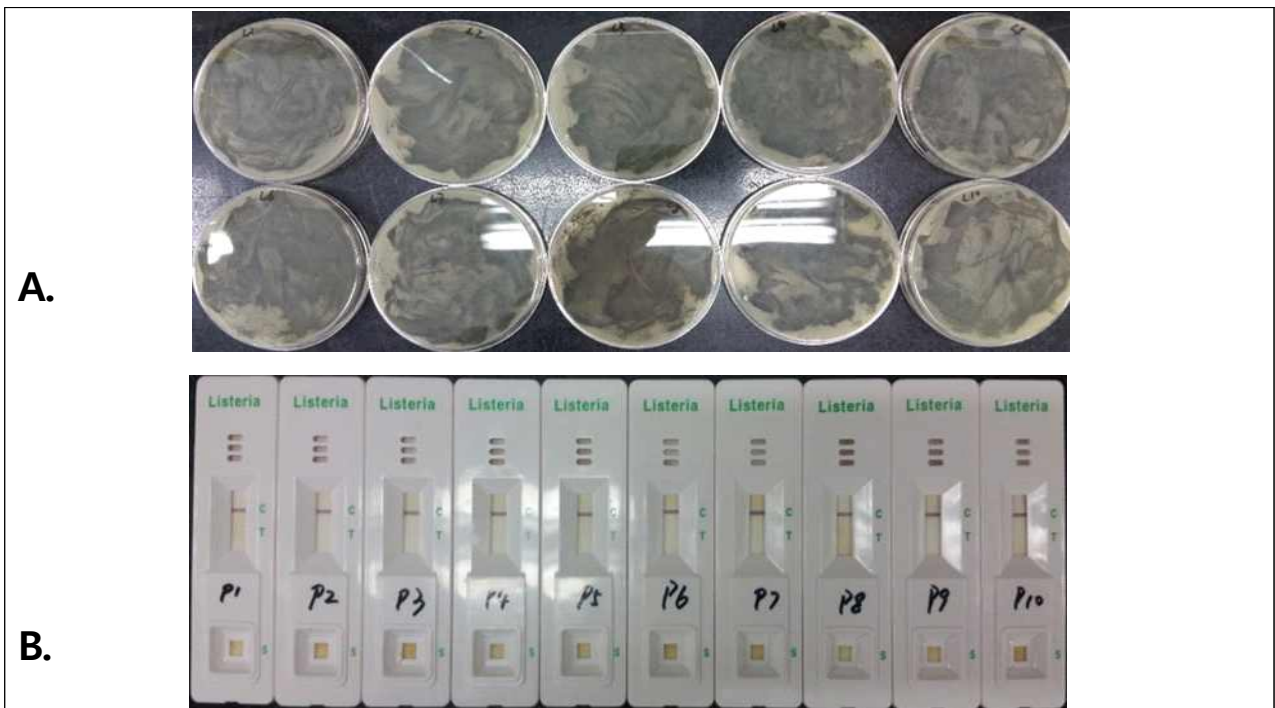


Figure 8.23 Validation results for **lettuce** inoculated with *S. aureus* ATCC 12600 A) BP agar results for low level (10 samples); B) Rapigen kit results for low level inoculum (10 samples)

### 3. 식중독 세균 4종에 대한 개발한 신속진단키트들의 검증 평가 및 검사 매뉴얼 제작

#### 가. AOAC validation 기반 Multiplex real-time PCR kit 및 Rapid kit 검증

- 제2협동기관인 참여기업 코젠바이오텍에서 개발한 real-time PCR kit의 경우 그림 8.24와 같이 살모넬라, 캄필로박터 / 대장균 O157, 이질균을 효과적으로 검출하였다.
- 다소비 농산물 18종 (고추, 사과, 양파, 감, 포도, 호박, 파, 오이, 오렌지, 무청, 시금치, 마늘, 상추, 딸기, 양배추, 바나나, 토란대, 취나물, 깻잎)의 증균시료에서 추출한 DNA에 대해 그림 x.x와 같이 위양성결과를 보이지 않아 농산물에 적용하기 적합한 것으로 판단된다.

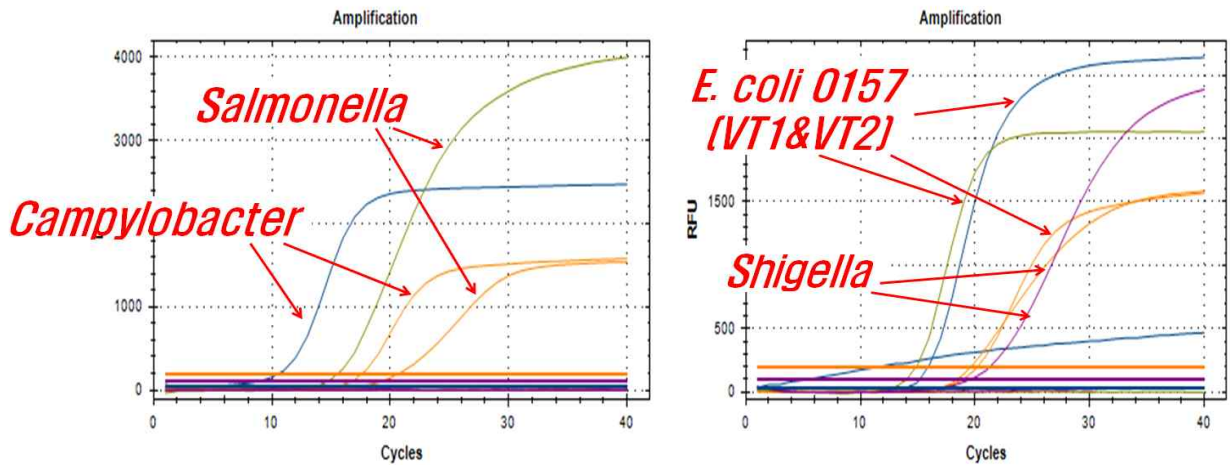


그림 8.24 제2협동(코젠바이오텍) 개발 real-time multiplex pcr kit의 순수배양액 검증

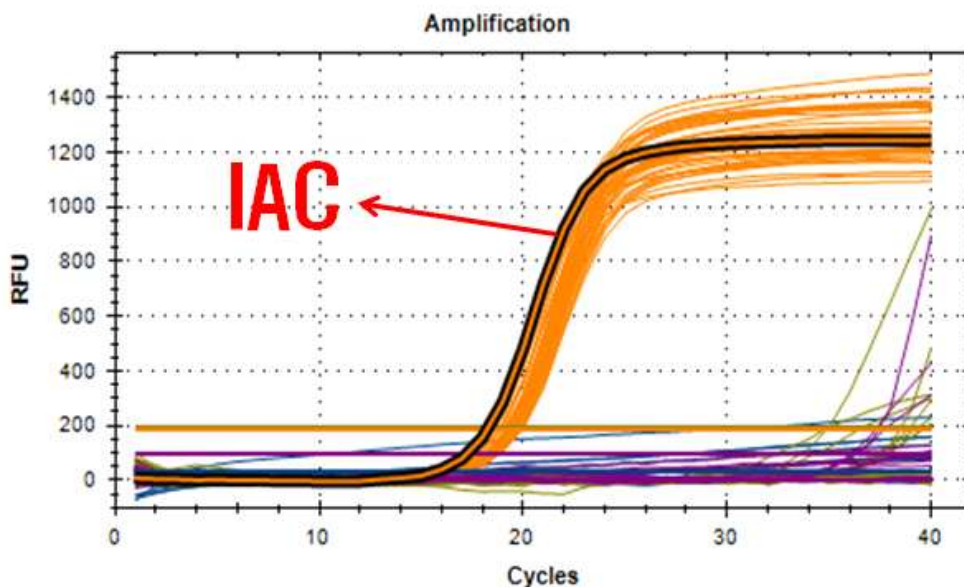


그림 8.25 제2협동(코젠바이오텍) 개발 real-time multiplex pcr kit의 농산물 시료 검증



- 제3협동기관인 참여기업 래피젠에서 개발하여 제공된 3종 rapid kit (대장균 O157, 살모넬라, 이질균)의 경우 대장균 및 살모넬라 kit는 순수배양액 및 농산물 시료에서 비특이 반응을 보이지 않아 이 후 검증 실험을 진행하였다.



그림 8.26 제3협동(래피젠) 개발 kit 순수배양액 및 농산물 증균액 검증 (대장균 O157)

- 이질균 kit의 경우, 감도는 매우 뛰어났으나 순수배양액 및 농산물 시료에서 비특이 반응이 일어나 검증실험에서 배제하였다. 보다 특이도가 높은 kit 개발이 필요할 것으로 보인다.



그림 8.27 제3협동(래피젠) 개발 이질균 kit 비특이 반응



<실제 농산물 시료에서의 병원성 대장균 O157 kit 검증>

- AOAC validation 방법에 기반한 인위접종 실험을 통한 3종 야채(토마토, 양상추, 믹스샐러드)에서의 개발된 병원성 대장균 O157 kit의 검출 효율을 평가 하였다.

- 실험방법

- 대장균 O157 균주를 tryptic soy broth에 접종하여 하루 배양한 균액 (약 9 log CFU/ml)에 대해 phosphate buffered saline으로 10진 희석하여 1 ml당 1 log CFU의 균액을 준비
- 3종의 야채 시료 각각을 250g (25g x 10개의 시료군) 씩 계량하여, 대용량 멸균 시료 봉투에 넣은 후, 아래 표와 같이 시료별로 준비한 대장균 O157:H7 균액 1 ml를 접종하고 잘 섞어줌
- 또한 별도로 25g 씩을 계량하여 음성대조군으로 사용함 (시료별 2개씩)
- 접종된 시료를 다시 25g 씩 10개의 멸균시료봉투에 소분하여 225ml의 buffered peptone water에서 42℃에서 24시간 동안 배양함
- 배양시작 후 8시간 후에 DNA추출 및 rapid kit에 적용하기 위해 균액을 약 2ml 취하여, 1ml는 prepman method를 이용하여 DNA를 추출하고, 나머지 균액의 일부 (120ul) 는 rapid kit에 적용
- 증균 24시간 후에도 위와 동일하게 실험을 수행하고, 추출된 DNA (5ul)는 real-time PCR kit에 제조사 지시에 따라 적용함.
- 배지법과 비교를 위해 대장균 O157:H7 선택배지인 cefixime tellurite sorbitol MacConkey (CT-SMAC)에 희석도말하고 37℃에서 하루 증균 후 콜로니 양상을 확인하고 전형집락에 대해 colony PCR을 실시하여 위양성 배제함

표 8.22 야채별 접종균주 정보 및 최종접종농도

시료종류	접종균주	최종접종농도
토마토	<i>E. coli</i> O157:H7 4 (식품유래균주)	<0 log CFU/g
양상추	<i>E. coli</i> O157:H7 6 (식품유래균주)	
믹스샐러드	<i>E. coli</i> O157:H7 9 (식품유래균주)	

표 8.23 병원성 대장균 O157:H7에 대한 농산물시료(토마토, 양상추, 믹스샐러드) 검증결과

검출법 시료종류		8 시간		24 시간		
		Rapid kit	RT-PCR	Rapid kit	RT-PCR	배지법
토마토	1	-	+	+	+	+
	2	-	+	+	+	+
	3	-	+	-	+	+
	4	-	+	+	+	+
	5	-	+	+	+	+
	6	-	+	-	+	-
	7	-	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+
	9	-	+	-	+	-
	10	-	+	+	+	+
	subtotal	1/10	10/10	7/10	10/10	8/10
양상추	1	-	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+
	4	-	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	6	-	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	-
	subtotal	7/10	10/10	10/10	10/10	9/10
믹스 샐러드	1	-	+	-	+	+
	2	-	+	-	+	-
	3	-	+	-	+	+
	4	-	+	-	+	-
	5	-	+	-	+	-
	6	-	+	-	+	-
	7	-	+	+	+	+
	8	-	+	+	+	+
	9	-	+	-	+	+
	10	-	+	-	+	+
	subtotal	0/10	10/10	2/10	10/10	6/10
<b>합계</b>		<b>8/30A</b>	<b>30/30C</b>	<b>19/30B</b>	<b>30/30C</b>	<b>23/30B</b>

<sup>a</sup> 동일열에 있는 다른 알파벳(A, B, C)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함

<실제 농산물 시료에서의 살모넬라 kit 검증>

- AOAC validation 방법에 기반한 인위접종 실험을 통한 3종 야채(토마토, 양상추, 믹스샐러드)에서의 개발된 살모넬라 kit의 검출 효율을 평가 하였다.

- 실험방법

- 살모넬라 균주를 tryptic soy broth에 접종하여 하루 배양한 균액 (약 9 log CFU/ml)에 대해 phosphate buffered saline으로 10진 희석하여 1 ml당 1 log CFU의 균액을 준비
- 3종의 야채 시료 각각을 250g (25g x 10개의 시료군) 씩 계량하여, 대용량 멸균 시료 봉투에 넣은 후, 아래 표와 같이 시료별로 준비한 살모넬라 균액 1 ml를 접종하고 잘 섞어줌
- 또한 별도로 25g 씩을 계량하여 음성대조군으로 사용함 (시료별 2개씩)
- 접종된 시료를 다시 25g 씩 10개의 멸균시료봉투에 소분하여 225ml의 buffered peptone water에서 42℃에서 24시간 동안 배양함
- 배양시작 후 8시간 후에 DNA추출 및 rapid kit에 적용하기 위해 균액을 약 2ml 취하여, 1ml는 prepman method를 이용하여 DNA를 추출하고, 나머지 균액의 일부 (120ul) 는 rapid kit에 적용
- 증균 24시간 후에도 위와 동일하게 실험을 수행하고, 추출된 DNA (5ul)는 real-time PCR kit에 제조사 지시에 따라 적용함.
- 배지법과 비교를 위해 살모넬라 선택증균배지인 Rappaport Vassiliadis Broth에서 하루 더 증균 후, 선택배지인 xylose lysine deoxycholate agar에 획선도말하고 37℃에서 하루 증균 후 콜로니 양상을 확인하고 전형집락에 대해 colony PCR을 실시하여 위양성 배제함

표 8.24 야채별 접종균주 정보 및 최종접종농도

시료종류	접종균주	최종접종농도
토마토	<i>S. Enteritidis</i> 110 (식품유래균주)	<0 log CFU/g
양상추	<i>S. Typhimurium</i> 18 (식품유래균주)	
믹스샐러드	<i>S. Enteritidis</i> 106 (식품유래균주)	

표 8.25 살모넬라에 대한 농산물시료(토마토, 양상추, 믹스샐러드) 검증결과

시료종류	검출법	8 시간		24 시간		
		Rapid kit	RT-PCR	Rapid kit	RT-PCR	배지법
토마토	1	-	+	+	+	+
	2	-	+	+	+	+
	3	-	+	+	+	+
	4	-	+	+	+	+
	5	-	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	subtotal	5/10	10/10	10/10	10/10	9/10
양상추	1	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+
	5	-	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	subtotal	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10
믹스 샐러드	1	-	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+
	8	-	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	subtotal	8/10	10/10	10/10	10/10	8/10
합계	22/30A	30/30B	30/30B	30/30B	27/30AB	

<sup>a</sup> 동일열에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함

<실제 농산물 시료에서의 이질균 kit 검증>

- AOAC validation 방법에 기반한 인위접종 실험을 통한 3종 야채(토마토, 양상추, 믹스샐러드)에서의 개발된 살모넬라 kit의 검출 효율을 평가 하였다.

- 실험방법

- 이질균 균주를 tryptic soy broth에 접종하여 하루 배양한 균액 (약 9 log CFU/ml)에 대해 phosphate buffered saline으로 10진 희석하여 1 ml당 0 log CFU의 균액을 준비
- 3종의 야채 시료 각각을 250g (25g x 10개의 시료군) 씩 계량하여, 대용량 멸균 시료 봉투에 넣은 후, 아래 표와 같이 시료별로 준비한 이질균 균액 1 ml를 접종하고 잘 섞어줌
- 또한 별도로 25g 씩을 계량하여 음성대조군으로 사용함 (시료별 2개씩)
- 접종된 시료를 다시 25g 씩 10개의 멸균시료봉투에 소분하여 225ml의 buffered peptone water에서 42℃에서 24시간 동안 배양함
- 배양시작 후 8시간 후에 DNA추출 및 rapid kit에 적용하기 위해 균액을 약 2ml 취하여, 1ml는 prepman method를 이용하여 DNA를 추출함. (비특이 반응으로 인해 rapid kit 적용은 진행하지 않음)
- 증균 24시간 후에도 위와 동일하게 실험을 수행하고, 추출된 DNA (5ul)는 real-time PCR kit에 제조사 지시에 따라 적용함.
- 배지법과 비교를 위해 이질균 선택배지인 MacConkey agar에 획선도말하고 37℃에서 하루 증균 후 콜로니 양상을 확인하고 전형집락에 대해 colony PCR을 실시하여 위양성 배제함

표 8.26 야채별 접종균주 정보 및 최종접종농도

시료종류	접종균주	최종접종농도
토마토	<i>S. flexneri</i> 29903 (표준균주)	<-1 log CFU/g
양상추	<i>S. flexneri</i> 12022 (표준균주)	
믹스샐러드	<i>S. sonnei</i> 25931 (표준균주)	

표 8.27 이질균에 대한 농산물시료(토마토, 양상추, 믹스샐러드) 검증결과

검출법		8 시간		24 시간	
		RT-PCR	RT-PCR	배지법	
시료종류					
토마토	1	+	+	-	
	2	+	+	+	
	3	+	+	+	
	4	+	+	+	
	5	+	+	-	
	6	+	+	+	
	7	+	+	+	
	8	+	+	-	
	9	+	+	-	
	10	+	+	-	
	subtotal	10/10	10/10	5/10	
양상추	1	+	+	+	
	2	-	-	-	
	3	+	+	+	
	4	+	+	+	
	5	+	+	-	
	6	+	+	+	
	7	+	+	+	
	8	+	+	+	
	9	+	+	+	
	10	+	+	+	
	subtotal	9/10	9/10	8/10	
믹스 샐러드	1	+	+	-	
	2	+	+	-	
	3	+	+	-	
	4	+	+	-	
	5	+	+	-	
	6	+	+	-	
	7	+	+	+	
	8	+	+	+	
	9	+	+	-	
	10	+	+	-	
	subtotal	10/10	10/10	2/10	
<b>합계</b>		<b>29/30A</b>	<b>30/30A</b>	<b>15/30B</b>	

<sup>a</sup> 동일열에 있는 다른 알파벳(A, B)은 통계학적 유의차( $p < 0.05$ )가 난다는 것을 의미함

<실제 농산물 시료에서의 캄필로박터 kit 검증>

- AOAC validation 방법에 기반한 인위적 접종 실험을 통한 3종 야채(토마토, 양상추, 믹스샐러드)에서의 개발된 캄필로박터 kit의 검출 효율을 평가 하였다.

- 실험방법

- 캄필로박터 제주니 균주 (NCTC 11168, J1, J2)를 항생제를 첨가하지 않은 Bolton broth 에 접종하여 42℃에서 48시간 동안 미호기로 배양함
- McFaland 탁도계와 10진 희석법을 통하여 1 ml 당 2 log CFU의 캄필로박터 균액을 준비함
- 3종의 야채 시료 각각을 125g (25g x 5개의 시료군) 씩 계량하여, 대용량 멸균 시료 봉투에 넣은 후, 아래 표와 같이 시료별로 준비한 캄필로박터 균액 1 ml을 접종하고 잘 섞어줌

표 8.28 야채별 접종균주 정보 및 최종접종농도

시료종류	접종균주	최종접종농도
토마토	J1 (식품유래균주)	<1 log CFU/g
양상추	J2 (식품유래균주)	
믹스샐러드	NCTC 11168 (표준균주)	

- 또한 별도로 25g 씩을 계량하여 음성대조군으로 사용함 (시료별 2개씩)
- 접종된 시료를 다시 25 g 씩 5개의 멸균시료봉투에 소분하여 100 ml의 Bolton broth에서 미호기로 42℃에서 48시간 동안 배양함
- 배양시작 후 12시간 간격으로 배지법과 개발된 RT-PCR법으로 캄필로박터 검출효율을 비교하였으며, 각각의 방법은 아래 표와 같음

표 8.29 배지법 및 RT-PCR 수행방법

검출법 실험순서	배 지 법	RT-PCR
순 서	① 24, 48시간 경과 후 10 ul loop를 활용하여 mCCDA 배지에 3구획으로 희선도말함 ② mCCDA 배지를 37℃에서 48시간 동안 미호기로 배양함	① 12시간 간격으로 시료증균액 1 ml 씩 채취하여 prepman method로 DNA를 추출함 ② 제조사의 Manual에 따라 RT-PCR을 실시하고 Ct값 (35 cyc) 에 따라 음·양성을 판독함

표 8.30 캄필로박터균에 대한 농산물시료(토마토, 양상추, 믹스샐러드) 검증결과

검출법 시료종류		12 시간		24 시간		36 시간		48 시간	
		배지법	RT-PCR	배지법	RT-PCR	배지법	RT-PCR	배지법	RT-PCR
토마토	1	-	-	-	-	+	+	+	+
	2	-	-	-	-	+	+	+	+
	3	-	-	-	+	+	+	+	+
	4	-	-	-	+	+	+	+	+
	5	-	-	+	+	+	+	+	+
	sub-total	0/5	0/5	1/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5
양상추	1	-	-	-	-	-	+	+	+
	2	-	-	-	+	-	+	+	+
	3	-	-	-	+	-	+	+	+
	4	-	-	-	+	-	+	+	+
	5	-	-	+	+	+	+	+	+
	sub-total	0/5	0/5	2/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5
믹스 샐러드	1	-	-	-	-	-	+	+	+
	2	-	-	-	+	-	+	+	+
	3	-	-	-	+	-	+	+	+
	4	-	-	-	+	-	+	+	+
	5	-	-	+	+	+	+	+	+
	sub-total	0/5	0/5	1/5	4/5	1/5	5/5	5/5	5/5
<b>Total</b>		<b>0/15</b>	<b>0/15</b>	<b>4/15</b>	<b>11/15</b>	<b>9/15</b>	<b>15/15</b>	<b>15/15</b>	<b>15/15</b>



## - kit 검증 결과

- 대장균 O157:H7 - 배지법에서의 결과가 부분 양성으로 보여 접종량이 적절했음을 확인하였다. real-time PCR kit는 8, 24시간째에 모든 시료에서 목적균을 검출하여 그 감도가 배지법 대비 매우 우수함을 확인할 수 있었다. rapid kit의 경우 24시간째에는 배지법과 유사한 검출률을 보였으나, 8시간 째에는 검출 효과가 낮아 참여기업에서 개발한 검체전개액 등을 활용한 민감도 개선연구가 필요할 것으로 판단되었다.
- 살모넬라 - 배지법에서의 결과가 부분 양성으로 나왔으나, 양성검출률이 매우 높아 접종량이 약간 높았던 것으로 판단되었다. real-time PCR kit는 대장균 O157 kit와 마찬가지로 8, 24시간째에 모든 시료에서 목적균을 검출하여 배지법 대비 그 감도가 우수함을 확인할 수 있었다. rapid kit의 경우 8시간째에는 검출률이 비교적 낮았으나 배지법 결과와 통계적 유의차는 나지 않았으며, 24시간째에는 모든 시료에서 목적균을 검출하였다.
- 이질균 - 배지법에서의 결과가 부분 양성으로 나타나 접종량이 적절했음을 확인하였다. rapid kit는 음성대조균 등에서의 비특이 반응으로 본 실험에 사용되지 않았다. real-time PCR kit는 8, 24시간째에 하나의 시료를 제외한 모든 시료에서 목적균을 검출하여 그 감도가 배지법 대비 매우 우수함을 확인할 수 있었다. 이질균의 경우 선행실험에서 ct값이 다른 균에 비해 낮은 경향을 보여 더 낮은 접종농도를 사용하였기에 일부 음성결과가 나왔을 것으로 판단된다.
- 캄필로박터 - 캄필로박터의 경우 해당 농도 이하로 접종시 증균이 제대로 이루어지지 않았기에 다른 균에 비해 높은 접종량을 사용하였다. 이는 캄필로박터의 긴 doubling time 및 다른 균에 비해 민감한 특성 때문에 경쟁균에 의해 성장이 억제되어 증균이 제대로 이루어지지 않았을 것으로 판단된다. 48시간째에는 배지법에서도 모든 시료에서 양성결과를 나타냈으나, 24, 36시간 결과를 볼 때, real-time PCR kit는 배지법에 비해 단시간 내 높은 감도로 목적균을 검출할 수 있음이 확인되었다. 또한 배지법의 경우, 경쟁세균에 의하여 캄필로박터의 집락이 뒤덮여 원활한 검출이 어려웠으나, RT-PCR의 경우 경쟁세균에 의한 비특이 반응 없이 양성반응을 관찰할 수 있었다.

### <Rapid kit 민감도 개선 연구>

- 앞선 검증실험에서 대장균의 경우 실제 농산물에서 8시간째에 검출효과가 좋지 않은 관계로 본 팀에서 개발한 신속증균배지 및 IMB, 제3협동에서 개발한 검체전개액 등을 활용한 rapid kit 민감도 개선 연구를 수행하였다.
- 다양한 대장균 O157:H7을 이용하여 개발한 신속증균배지와 rapid kit 간에 호환성을 검사하였을 때 감도 저하 등의 문제가 없었음, 기존 구성 성분을 토대로 최적화하였기 때문에 추가적인 검증을 불필요할 것으로 보임
- 제3협동에서 개발한 검체전개액 이용시 균량을 기존 보다 1/10 이하로 사용함에도 불구하고 증균액을 직접 적용하는 방법과 유사한 민감도를 보여, 증균액 내 균을 농축시 감도 개선이 가능할 것으로 판단되었다.
- IMB를 이용하여 농축시 검출한계 1 log CFU 개선 효과를 보여 검출에 필요한 증균시간 단축에 활용할 수 있을 것으로 판단되었다.
- 개발 증균배지와 IMB 농축 및 원심분리를 이용한 농축을 통해 검출한계 개선을 시도하였고, 순수배양액 및 농산물 모두에서 효과를 보였다.



그림 8.28 다양한 O157:H7균주를 이용한 개발증균배지와 rapid kit의 호환성 확인

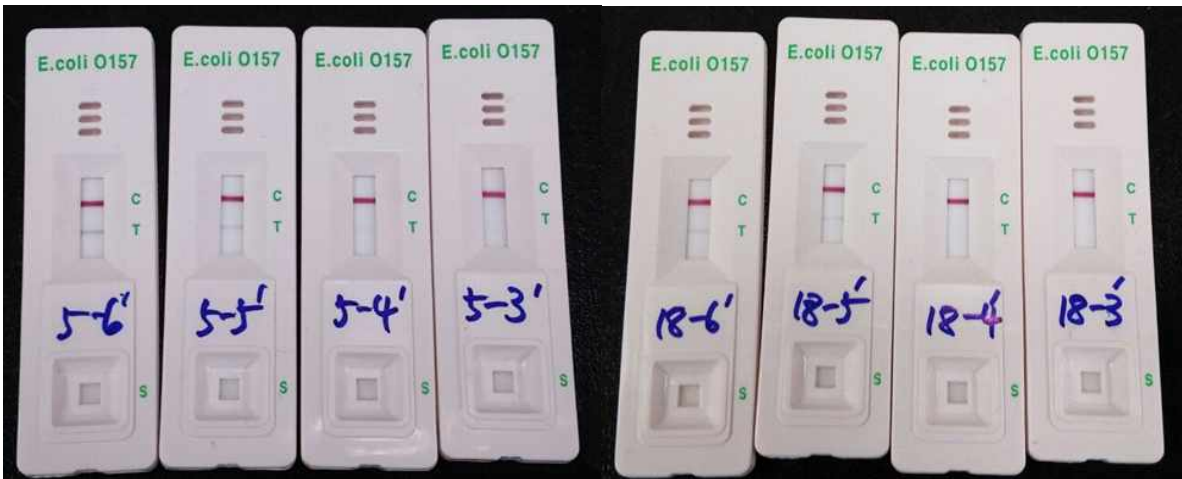
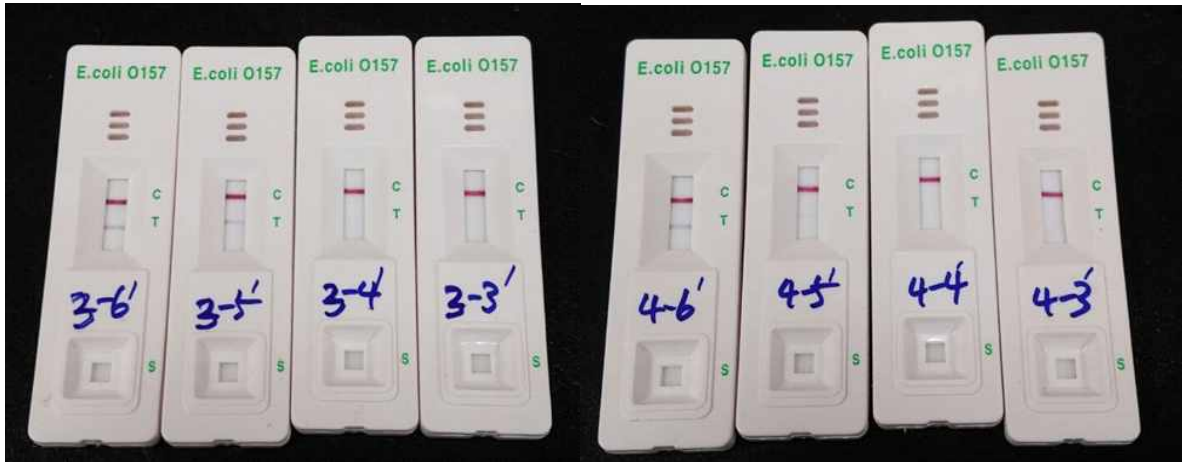


그림 8.29 검체전개액을 이용한 테스트: 적용 균량은 1/10이하이나 동일한 민감도 보임

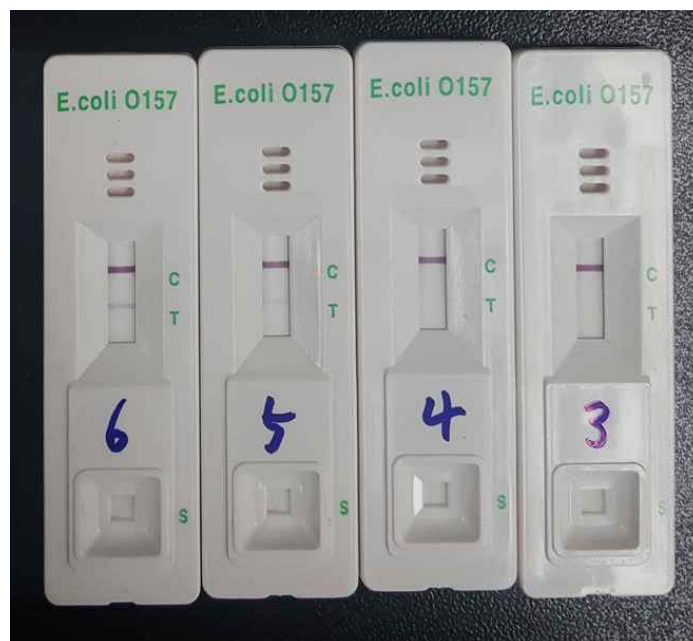


그림 8.30 민감도 개선을 위한 IMB 적용: 증균액 1ml에 Dynabead E. coli O157:H7 10ul를 넣고 10분 반응 후 상층액 제거하고 PBS 120ul에 IMB를 재현탁 후 rapid kit에 적용: 기존 검출한계 대비 1log CFU 개선 (6 log CFU -> 5 log CFU)

표 8.31 순수배양액에서 mBPWp와 NEW3의 증균력비교 및 검출한계 개선을 위한 IMB+전개액 처리 및 원심분리+전개액 처리시 효과 확인

- 4번균주 실험 결과

증균 시간	접종량	Direct		IMB+검체전개액		원심분리+검체전개액	
		mBPWp	New3	mBPWp	New3	mBPWp	New3
6h	1 log CFU	- <sup>a</sup>	-	++	++	++	++
	2 log CFU	+	++	++	++	++	++
8h	1 log CFU	++	++	NP	NP	NP	NP
	2 log CFU	++	++	NP	NP	NP	NP

<sup>a</sup>-, 음성; +, 밴드연합; ++, 밴드진합; ND, 진행하지 않음

- 18번균주 실험 결과

증균 시간	접종량	Direct		IMB+검체전개액		원심분리+검체전개액	
		mBPWp	New3	mBPWp	New3	mBPWp	New3
6h	1 log CFU	-	-	-	-	-	-
	2 log CFU	-	-	+	++	+	++
8h	1 log CFU	-	-	++	++	++	++
	2 log CFU	+	+	++	++	++	++

<sup>a</sup>-, 음성; +, 밴드연합; ++, 밴드진합

표 8.32 제3협동(래피젠) 개발 immuno rapid kit와 본 팀이 개발한 증균배지의 호환성을 농산물에서 검증결과

증균 시간	접종량 (CFU/10g)	Direct		원심분리+검체전개액		Direct		원심분리+검체전개액	
		mBPWp	New3	mBPWp	New3	mBPWp	New3	mBPWp	New3
6h	0 log	-	-	-	+	-	-	-	+
	1 log	-	-	+	+	-	-	+	++
8h	0 log	-	-	+	++	-	-	+	+
	1 log	-	-	++	++	-	-	++	++

<sup>a</sup>-, 음성; +, 밴드연합; ++, 밴드진합

## <요약>

### 제8절 개발된 신속진단 키트의 AOAC 기반 성능 검증 평가

- 식중독 미생물 7균종(*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter*, *E. coli* O157, *Shigella*)에 대하여 본 과제에서 개발한 신속진단키트들인 다중실시간 PCR키트(코젠바이오텍)와 면역래피드 키트(레피젠)의 세균 검출 성능을 AOAC 프로토콜에 기반한 검증법으로 평가하였음.
- AOAC 방법에 따라 3가지 농산물 시료에 대하여 각각 1균주로 인위오염시키고 증균배양한 후, 3가지 검출 방법인 전통적 배지배양법, 면역키트, PCR 키트 등의 세균 검출 성능을 시험하고 통계처리하여 비교분석하였음.
- 그 결과 배지배양법과 비교하여 개발된 PCR 키트와 면역 키트 둘 다 성능이 유의한 차이가 없이 동등한 것으로 나타났음.
- 대부분의 농산물 시료에는 해당 미생물들의 오염이 없으므로, 인위오염시킨 농산물 시료들에서 음성 대조균은 모두 음성으로 나왔음. 단, *B. cereus*의 경우 여러 시료들이 자연오염되어 모두 양성으로 나오기도 하였음.
- 본 연구과제에서 개발한 식중독 미생물 7종에 대한 신속증균배지들로 전처리 증균배양한다면 6-8시간 내에 PCR 키트에 의한 검출이 가능할 것임.
- 면역 키트의 경우 검출한계가  $10^{5-6}$  cfu/ml이므로 6-8시간보다 긴 증균배양이 필요함. 특히 상대적으로 늦게 생육하는 리스테리아의 경우 8 시간 이상의 증균배양이 필요함.
- 참여기업에서 개발한 real-time PCR kit 및 면역 rapid kit는 농산물 시료에서 신속하고 간편한 세균 검증 방법임을 검증하였음. 검증에 사용된 kit들은 모두 농산물의 경쟁균 및 성분에 의한 반응 억제 및 비특이 결과를 보이지 않았으며, 개발한 증균 배지와 호환성도 문제가 없어 개발한 일련의 제품들을 일원화하여 one-step kit로 제품화할 수 있을 것으로 기대됨.
- 강원대 및 건국대 연구팀은 AOAC 기반 성능 검증 기술을 체계화하고 사용자 편의 프로토콜을 만들었으며, 참여기업들이 개발한 키트들에 대한 검출 성능 검증을 수행하여 개발된 키트들의 인증 및 신뢰도를 향상시킴으로써 국내외 사업화에 기여할 것임.

# 제9절 유통 농산물에서 식중독 세균 오염률 조사 및 기준규격 개선안 제시

## 1. 다소비 농산물에서의 식중독 세균 모니터링 결과

### 가. 국내외 선행연구에 기반한 대상 농산물 및 주요 세균 선정

#### (1) 국외의 유통농산물로 인한 outbreak 및 모니터링 프로그램 분석

- 미국의 경우 해마다 유통농산물로부터의 식중독 사고가 발생하고 있으며, 이에 대한 원인균은 모두 살모넬라, 병원성대장균, 리스테리아 중 하나였음.(CDC, List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigations)

표 9.1 2006년부터 2013년까지 미국에서의 유통농산물로 인한 outbreak 발생현황 (CDC)

Year	Pathogen	Source	비고
2013	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Ready-to-Eat salads	
	<i>Salmonella</i>	Cucumbers Tahini Sesame Paste	호박 -
2012	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Spinach, Spring mix	시금치, -
	<i>Salmonella</i>	Mangoes Cantaloupe Lettuce/tomatoes	망고 켄탈루프 양배추/토마토
	<i>Escherichia coli</i> O26	Sprouts	새싹
2011	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Lettuce Hazelnuts	양배추 개암
	<i>Salmonella</i>	Pine Nuts Papayas Sprouts	잣 파파야 새싹
	<i>Listeria</i>	Cantaloupe	켄탈루프
2010	<i>Salmonella</i>	Sprouts Frozen Mamey Fruit Pulp	새싹 -
	<i>Escherichia coli</i> O145	Lettuce	양배추
2009	<i>Salmonella</i>	Sprouts Pistachios	새싹 피스타치오
2008	<i>Salmonella</i>	Cantaloupes	켄탈루프
2007	<i>Salmonella</i>	Veggie Booty	-
2006	<i>Salmonella</i>	Tomatoes	토마토
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Fresh Spinach	시금치

- USDA에서는 2011년부터 농산물에서 식중독균의 prevalence를 광범위하게 조사하는 MDP(Microbiological Data Program)을 실시하고 있으며, 2011년부터 병원성대장균, 살모넬라 외 리스테리아 검사가 추가되었음.

표 9.2 2011년도 USDA MDP Data 요약

Pathogen	No. of positives / No. of total samples (%)
STEC, 병원성 대장균	27/16390 (0.16)
대장균 O157:H7	2/174 (1.15)
살모넬라	33/16959 (0.19)
리스테리아	4/1168 (0.34)
<b>Total</b>	<b>66/34691 (0.19)</b>

(2) 국내의 유통농산물에서의 식중독세균 모니터링 데이터 및 유통농산물에 대한 미생물 규격 조사

- 국내기관 중 본과제 협력기관인 서울시보건환경연구원-강남농수산물검사소에서는 10종 식중독 세균에 대해 식품공전 공인검출법을 사용하여 유통농산물에 대한 식중독세균 모니터링을 진행하고 있음.

표 9.3 2012년 유통농산물에서의 모니터링 결과: 315개 시료 중 단 한 개의 시료에서 *B. cereus* (660 CFU/g) 양성이 확인되었음

Sample	No. of positives / No. of total samples (%)
fruits	0 / 44 (0)
vegetables	1 / 271 (0.37)
<b>Total</b>	<b>1 / 315 (0.31)</b>



- 현재 식품공전의 규격 기준에 제시된 신선편의식품(유통농산물 포함)의 미생물 규격은 정량 규격 4가지(대장균, 황색포도상구균, 클로스트리디움 퍼프린젠스, 바실러스 세레우스), 불검출기준 2가지(병원성 대장균, 살모넬라)로 이루어져 있음.

<p>(3) 신선편의식품</p> <p>농·임산물을 세척, 박피, 절단 또는 세절 등의 가공공정을 거치거나 이에 단순히 식품 또는 식품첨가물을 가한 것으로서 그대로 섭취할 수 있는 샐러드, 새싹채소 등의 식품을 말한다.</p> <p>5) 규격</p> <p>(1) 대장균 : 1 g 당 10 이하(신선편의식품에 한하며 즉석섭취식품은 음성이어야 한다).</p> <p>(2) 세균수 : 1 g 당 100,000 이하 (즉석조리식품에 해당하며, 발효제품, 발효제품 첨가, 또는 유산균 첨가제품은 제외한다)</p> <p>(3) 황색포도상구균 : 1 g 당 100 이하</p> <p>(4) 살모넬라 : n=5, c=0, m=0/25 g</p> <p>(5) 장염비브리오균 : 1 g당 100 이하(즉석섭취식품, 신선편의식품 중 해산물 함유 제품에 한한다).</p> <p>(6) 바실러스 세레우스 : 1 g 당 1,000 이하(즉석섭취식품, 신선편의식품에 한한다)</p> <p>(7) 장출혈성 대장균 : n=5, c=0, m=0/25 g(신선편의식품에 한한다).</p> <p>(8) 클로스트리디움 퍼프린젠스 : 1 g 당 100 이하(즉석섭취식품, 신선편의식품에 한한다).</p>
---

그림 9.1 신선편의식품의 성분규격

### (3) 주요 농산물 및 모니터링 대상 세균 선정

- 국내외 데이터를 바탕으로 했을 때, 유통농산물에서의 실제 outbreak과 연관된 세균들을 검출하기 위해서는 최소 천단위의 시료가 필요할 것으로 분석되어, 현실적으로 본 과제에서 7종 식중독균에 대한 모니터링은 불가능하다고 판단되었음.
- 따라서 실제 시료별, 단계별 오염도를 비교할 수 있는 방향으로 목표를 수정하였음.



그림 9.2 실험 대상균 선정 모식도

- 대장균군 및 대장균은 분변오염의 지표세균으로서 많은 연구들에서 기본적으로 모니터링하고 있는 세균이며, 바실러스의 경우 토양에 오염되기 쉬운 지표세균으로 활용될 수 있기에 선정하였음.
- 정성기준이 적용되는 병원체인 살모넬라와 장출혈성대장균(O157:H7) 중 국내에서 위험성이 대두되어 2009년 신선편의 식품 성분규격에서 신설된 대장균 O157:H7을 모니터링하기로 결정하였음.

제 목	2009년 제1차 미생물분과 회의개최 결과		
등록일	2009-07-30	조회수	12372
식품위생심의위원회의(미생물분과) 심의 결과보고			
○ 일시 : 2009. 7. 7(화) 14:00 ~			
○ 참석위원 : 미생물 분과위원 16인 중 10인 참석			
○ 심의안건 :			
- 심의안건 1. 즉석섭취·편의식품류 중 대장균 및 식중독균 규격 재·개정			
1) 대장균 : 1g 당 10 이하 (신선편의식품에 한하며, 즉석섭취식품은 음성이어야 한다).			
2) 대장균 O157:H7 : 음성이어야 한다 (신선편의식품에 한한다).			
3) 클로스트리디움 퍼프린젠스 : 1 g 당 100 이하 (즉석섭취식품, 신선편의식품에 한한다).			

그림 9.3 2009년 식품위생심의위원회 심의 결과보고: 대장균 O157:H7 신설

## 나. 선정된 검사항목들에 대한 모니터링 수행

(1) 대형마트에서 유통되고 있는 lettuce와 sprouts에서의 재배방식별(유기농재배, 일반재배) 병원성 미생물의 Prevalence와 항생제 내성에 대한 비교 연구

### (가) 실험 구성

- 국외에서는 일찍이 항생제나 농약, 소독제와 같은 Micro-organism controlling agent에 의해 조장된 미생물의 내성과 관련된 연구가 활발히 진행되고 있음.
- 이 뿐만 아니라 이러한 물질들을 사용하지 않고 대체요법을 사용하는 유기농 재배 식품(Organic food) 과 화학물질들을 직접적으로 사용하는 일반 식품(Conventional food)의 비교 연구 또한 최근 많이 진행되고 있는 추세임.
- 그러나 농산물에서는 항생제 대신에 다른 disinfectant들을 사용하여 미생물이나 유해곤충등을 억제해 나가기에 이러한 연구는 항생제를 직접적으로 사용하는 ‘축산식품’ 에서 주를 이루고 있음.
- 하지만 항생제를 직접적으로 사용하지 않아도 소독제나 농약과 같은 Disinfectant에 의해서도 미생물들이 항생제에 대한 내성을 획득하게 되는 ‘Multiple Drug Resgistance’ 현상이 일어날 수 있음이 알려져 있음.

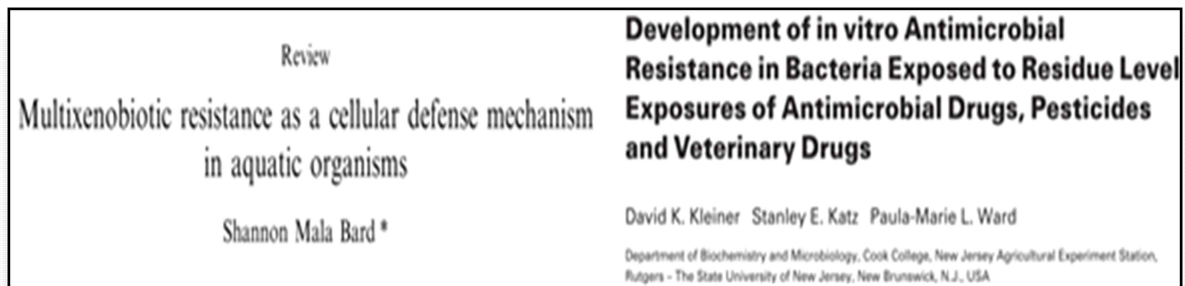


그림 9.4 Multiple Drug Resistance가 유도됨을 증명한 연구

- 따라서, 본 실험을 통하여 국내 재배방식별 병원성미생물들의 오염도를 조사함과 동시에 이들의 항생물질에 대한 내성 정도를 판단하는 것이 이 실험의 목적임.
- 샘플링은 대형마트에서 유통되고 있는 쌈채소류 및 무순을 재배방식(유기농, 일반)에 따라 100개씩 통해 진행하였으며 오염도를 비교하고 분리된 균주들에 대한 항생제 내성검사를 실시하였음.



그림 9.5 모니터링 검사 모식도

(나) 모니터링 결과: 유통농산물(양상추와 무순)에서의 미생물 오염분석

표 9.4 일반세균수 및 대장균군수 모니터링 결과

농산물 종류	세균수 평균(CFU/g)			
	일반세균수		대장균군수	
	유기농	일반	유기농	일반
상추	2.E+05	2.E+05	-	-
무순	3.E+07	2.E+07	2.E+05	2.E+05

- 일반세균수의 경우 유기농과 일반시료 모두 7log 정도의 값을 보였으며 이는 기존의 연구 결과들과 일치되는 결과임
- 대장균/대장균군의 경우 국외의 결과와는 다르게 lettuce에서 coliform bacteria가 발견되지 않았음

- 국내의 경우 국외와 비교하여 대장균군에 대한 기준이 엄격하며 이에 따라 재배방식이 분변오염의 가능성이 높은 노지재배에서 좀 더 위생적인 재배가 가능한 시설·수경재배가 유행하면서 생긴 결과로 사료됨. (국내의 경우 1g당 10이하)

표 9.5 농산물 종류에 따른 대장균 O157 정성결과

유통단계	No. of samples with E. coli O157 (%)	
	유기농	일반
상추	0/55 (0.0)	0/55 (0.0)
무순	0/45 (0.0)	0/45 (0.0)
합계	0/100 (0.0)	0/100 (0.0)

- 대장균 O157의 경우 총 200개의 시료중 단 하나도 검출되지 않았음.

표 9.6 농산물 종류에 따른 바실러스 세레우스 정량결과

농산물 종류	No. of B. cereus positives/total samples (%)					
	ND		102 - 103 CFU/g		103 - 104 CFU/g	
	유기농	일반	유기농	일반	유기농	일반
상추	12/55 (21.8)	35/55 (63.6)	31/55 (56.4)	20/55 (36.4)	12/55 (21.8)	0/55 (0.0)
무순	18/45 (40.0)	35/45 (77.8)	16/45 (35.6)	9/45 (20.0)	11/45 (24.4)	1/45 (2.2)
합계	30/100 (30.0)	70/100 (70.0)	47/100 (47.0)	29/100 (29.0)	23/100 (23.0)	1/100 (1.0)

- 유기농 샘플 100개중 70개의 샘플에서 바실러스가 검출되었으며 이들 중 규격 이상의 바실러스 세레우스가 검출된 샘플이 23개로 조사되었음. (신선편의 식품에서의 바실러스 세레우스의 규격은 g당 1,000이하임.)
- 일반샘플의 경우 샘플 100개중 30개의 샘플에서 바실러스가 검출되었으며 이들 중 규격 이상의 바실러스 세레우스가 검출된 샘플은 1개로 조사되었음.

(다) 모니터링 결과: 분리균주에 대한 항생제 내성시험

- 분리된 바실러스 균주 100개(유기농균주 70개, 일반균주 30개)에 대한 항생제 내성 검사를 진행하였음.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 기준에 따라 디스크 확산법(disk diffusion test)으로 시험하였음.
- 사용한 항생제: Ampicillin(10ug), cefepime(30ug), cefotetan(30ug), ciprofloxacin(5ug), chloramphenicol(30ug), penicillin(10U), gentamicin(10ug), tetracycline(30ug), erythromycin(15ug), imipenem(10ug), oxacillin(1mg), vancomycin(30ug), sulfamethoxazole/trimethoprim(25ug)

- 실험방법

- ① 감수성시험 대상균주를 Mueller Hinton Broth에 35℃, 2-6시간 동안 배양하여 균 농도를 McFarland No. 0.5로 조정 한 후, 멸균면봉을 이용하여 MHA배지에 도포
- ② 평판을 3~5분간 말리고 15분 이내에 항생제 Disc를 dispenser로 접종
- ③ 35℃에서 16~18시간 배양 후 균 억제대(inhibition zone)의 크기를 관찰하여 내성여부를 판정

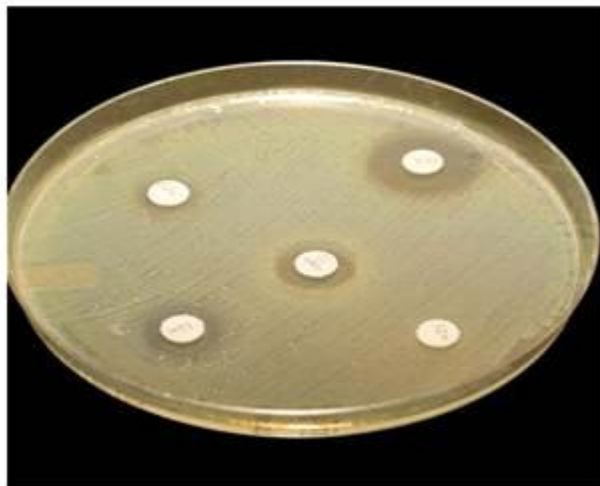


그림 9.6 항생제 감수성 검사 결과 예시

표 9.7 분리된 균주들에 대한 항생제 내성검사 결과

Antibiotics	No. of strains (%), n=100					
	S		I		R	
	유기농	일반	유기농	일반	유기농	일반
Ampicillin	0%	0%	0%	0%	100%	100%
Cefepime	0%	0%	0%	0%	100%	100%
Cefotetan	52%	36%	10%	8%	38%	56%
Ciprofloxacin	100%	100%	0%	0%	0%	0%
Cloramphenicol	100%	100%	0%	0%	0%	0%
Erythromycin	75%	80%	25%	20%	0%	0%
Gentamycin	100%	100%	0%	0%	0%	0%
Imipenem	100%	100%	0%	0%	0%	0%
Oxacillin	0%	0%	0%	0%	100%	100%
Penicillin	0%	0%	0%	0%	100%	100%
Rifampin	5%	4%	11%	0%	84%	96%
Tetracycline	100%	92%	0%	8%	0%	0%
Sulfameth-/trimethoprim	100%	100%	0%	0%	0%	0%
Vancomycin	100%	100%	0%	0%	0%	0%

- 내성검사결과 Ampicillin, Cefepime, Oxacillin, Penicillin에는 100개의 균주 모두 유의차 없이 100% 내성을 보였으며 Rifampin에는 유기농 균주는 84%, 일반 균주는 96%의 내성을 보였음.
- 또한 Ciprofloxacin, Cloramphenicol, Gentamycin, Imipenem, Tetracycline, Vancomycin, Sulfamethoxazole/trimethoprim 에는 모든 균주가 100% 감수성을 보였으며 Erythromycin에서는 유기농균주 75% 일반균주 80%가 감수성을 보였음.
- penicillin계열 항생제중 cefotetan에서는 유기농균주 38% 일반균주 56%가 내성을 보였는데 이러한 cefotetan에 대한 내성은 바실러스의 독소유전자의 발현과 관련된 것으로 알려져 있음.

(2) 유통단계별(대형마트, 시장, 농장) 병원성 미생물의 오염도 조사와 특성비교

(가) 실험 구성

- 먹거리 문화의 다양화와 함께 소비자들이 다양한 방법으로 농산물을 소비하기 시작하게 되며 특히 최근에는 체험농장, 주말농장등이 활성화되며 이러한 추세가 가속화되고 있는 실정임.
- 미생물은 주변환경의 변화에 따라 그 병원성을 획득하거나 잃기도 하며 사멸되거나 폭발적으로 성장하기도 한다고 알려져 있음.
- 작물의 재배단계부터 소비자가 제품을 소비하게 될 때까지의 유통상황과 환경은 다양할 것이며 그에 따라서 병원균들의 오염도나 미생물학적 특성이 변화하게 될 것으로 사료된다.
- 따라서, 본 연구를 통하여 유통단계별로 병원성미생물의 오염도와 그 특성을 비교 연구함으로써 농산물의 안전성을 평가하는 것이 이 연구의 목적임.

표 9.8 유통단계별 비교 연구에서의 실험 진행

	대형마트	도매시장	농장
유기농	30(완료)	30(완료)	30(완료)
일반	30(완료)	30(완료)	30(완료)

(나)모니터링 결과

- 전반적으로 유통단계(농장-도매시장-대형시장)에 따라 일반세균수 및 대장균군수가 감소하는 경향을 보이나, 그 정도가 크지 않았음.
- 유기농 도매시장에서 대장균군이 검출되지 않았는데, 표 32에서 바실러스 세레우스 기준치 이상의 샘플수가 유기농 대형시장, 일반 도매시장에서 보다 해당 샘플군에서 낮아 상관성을 보였음.
- 대장균 O157의 경우 앞 실험과 마찬가지로 진행완료된 90개의 샘플 모두에서 단 한건도 발견되지 않았음.



표 9.9 유통단계별 일반세균수 및 대장균군수 정량결과

유통단계	세균수 평균(CFU/g)			
	일반세균수		대장균군수	
	유기농	일반	유기농	일반
대형시장	1.E+06	6.E+05	5.E+01	7.E+00
도매시장	1.E+06	4.E+06	0.E+00	4.E+02
농장	4.E+06	5.E+06	3.E+02	9.E+02

표 9.10 유통단계별 대장균 O157 정성결과

유통단계	No. of samples with E. coli O157 (%)	
	유기농	일반
대형시장	0/30 (0.0)	0/30 (0.0)
도매시장	0/30 (0.0)	0/30 (0.0)
농장	0/30 (0.0)	0/30 (0.0)
합계	0/90 (0.0)	0/90 (0.0)

표 9.11 유통단계별 바실러스 세레우스 정량결과

유통단계	No. of <i>B. cereus</i> positives/total samples (%)					
	ND		2-3log		3-4log	
	유기농	일반	유기농	일반	유기농	일반
대형시장	7/30 (23.3)	20/30 (66.7)	17/30 (56.7)	10/30 (33.3)	6/30 (20.0)	0/30 (0.0)
도매시장	3/30 (10.0)	9/30 (30.0)	24/30 (80.0)	15/30 (50.0)	3/30 (5.0)	6/30 (20.0)
농장	0/30 (0.0)	0/30 (0.0)	0/30 (0.0)	0/30 (0.0)	30/30 (100.0)	30/30 (100.0)
합계	10/90 (11.1)	21/90 (23.3)	41/90 (45.6)	25/90 (27.8)	39/90 (43.3)	36/90 (40.0)

- 대형시장에서의 바실러스 세레우스 오염도는 실험1과 마찬가지로 유기농 샘플에서 성분규격 이상의 바실러스가 30개 샘플 중 6개에서 발견되었음. 반면에 일반샘플에서는 규격을 어긴 제품은 단 한건도 발견되지 않았음.
- 도매시장에서의 오염도는 유기농의 경우 대형시장과 유사한 경향을 보였으나, 일반 샘플의 경우 20%가 기준치를 넘었음.
- 또한 농장 시료에서는 유기농 일반 모두 기준치 이상의 바실러스 세레우스 오염도를 보여, 농장으로부터 시장으로 유통될 때의 세척의 중요성을 나타냄.

(3) 다양한 신선편의류 유통농산물에 대한 10종 식중독 세균 모니터링

(가) 실험 구성

- 협력기관(서울시보건환경연구원-강남농수산물검사소)에서는 신선편의류 유통농산물에서의 10종 식중독 세균에 대해 모니터링을 수행하였음. 검출은 공인검출법인 식품공전에 의거하여 진행되었음.

(나) 모니터링 결과

- 대장균 총 100개 중 2개 시료에서 분리되었으나, 병원성 대장균은 아니었다.
- 22개의 시료에서 바실러스 세레우스 양성을 보였으나, 기준규격 이상의 바실러스가 오염된 시료는 없었음.
- 나머지 식중독 세균에 대해서는 100개 시료 모두 음성결과를 보였음.

표 9.12 신선편의류 야채에서의 E. coli 정성검사 결과

시료	No. of samples with E. coli (%)
야채류(신선편의)	2 / 100 (2.0)

표 9.13 신선편의류 야채에서의 B. cereus 정량검사 결과

시료	No. of B. cereus positives/total samples (%)		
	ND	1-2log	2-3log
야채류(신선편의)	78/100 (78.0)	9/100 (9.0)	13/100 (13.0)

## 다. 식중독균 모니터링 지속 수행 결과 (2차년도)

- 1차년도에 이어 식중독 세균 모니터링 연구를 지속수행하였음.
- 당해연도에서는 다소비 농산물 19종에 대한 정성검사를 실시하였으며, RTE 야채를 대상으로 황색포도상구균에 대한 정량검사를 실시하였음.

### (1) 정성검사: 살모넬라, 쉬겔라, 대장균O157, 캄필로박터, 리스테리아

- 불검출 기준인 5종 식중독세균 (살모넬라, 이질균, 대장균 O157, 캄필로박터, 리스테리아)에 대해서 정성검사를 실시하였음. 전년도 조사 및 실험 내용에서도 시사하듯이 유통농산물에서의 식중독세균의 검출율을 1%도 채 안되기 때문에 유의미한 데이터를 얻기 힘들다. 따라서 해당년도에서는 검출율을 높이기 위해 real-time PCR을 통해 스크리닝을 실시하였으며, 양성으로 추정되는 시료에 대해서만 배지검출을 시도하였음. Primer는 전년도에 본 팀에서 검증한 민감도가 우수한 set를 위주로 선별하여 사용하였음.

#### (가) 시료 선정

<국내에서 유통중인 다소비 농산물> (자료출처 : 농촌진흥청, 2012)

No.	농산물	1인 1일 섭취량(g)	No.	농산물	1인 1일 섭취량(g)
1	배추	70.63	16	오렌지	9.32
2	무	48.99	17	무청	7.93
3	수박	30.60	18	시금치	7.40
4	고추	24.27	19	마늘	5.49
5	밀감	23.28	20	당근	5.39
6	사과	21.09	21	상추	3.90
7	양파	17.05	22	복숭아	3.78
8	감	16.44	23	딸기	3.77
9	배	15.44	24	양배추	3.50
10	포도	14.01	25	유자	3.18
11	호박	12.73	26	바나나	2.70
12	토마토	11.70	27	토란대	2.27
13	참외	11.30	28	취나물	2.20
14	파	10.95	29	깻잎	2.20
15	오이	9.75	30	고사리	2.15

○ 시료의 선정은 농촌진흥청에서 집계된 다소비 농산물을 기준으로 선정하였음. 선정된 시료는 19종으로 세부 항목은 아래 표와 같음.

(나) 모니터링 진행한 유통 농산물 목록

종 류	개 수
딸 기	20
바 나 나	20
오 렌 지	20
포 도	18
양 배 추	17
양 파	15
취 나 물	20
토 란 대	20
고 추	12
깻 잎	20
파	15
감	11
사 과	12
오 이	20
호 박	14
상 추	20
시 금 치	20
마 늘	20
무 청	19
<b>합 계</b>	<b>333</b>

(다) 실험 결과

모니터링 항목	양성 시료 수 / 전체 시료 수
대장균 O157	0/333
살모넬라	0/333
이질균	0/333
캠필로박터	0/333
리스테리아 모노사이토젠스	0/333

- 본 실험결과, 모든 농산물에서 불검출기준인 식중독세균이 모두 검출되지 않았으며, 이는 전년도 조사 및 실험결과와 일치함.
- 소수의 시료에서 Real-time PCR시 증폭이 일어났으나, melting curve peak 차이를 보여 위 양성으로 확인되었고, peak가 일치하는 경우에도 선택배지 상에서 의심집락이 확인되지 않았음.
- 추후 농산물에서는 미국 USDA의 MDP program 같이 국가차원의 대규모 시험을 수행하지 않는 한, 인위접종을 통한 농산물의 식중독세균오염 모델을 통해 개발된 검출기술의 검증 연구를 수행하는 것이 중요하다는 기초자료로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

**(2) 정량검사: 황색포도상구균**

- 황색포도상구균은 환경에 상재해 있는 식중독 세균으로서, 정량검사법이 적용되는 미생물 임. 식품공전에 제시된 방법을 따라 40개의 유통농산물에 대하여 정량검사를 진행하였음.

**(가) 실험방법**

- ① 농산물 시료 25 g을 225 ml의 Butterfield's phosphate distilled buffer(BPD)로 희석하여 2분간 고속으로 균질화하였다.
- ② 이 후, 10배 단계 희석액을 만든 다음 각 단계별 희석액을 Baird-Parker 배지 3장에 333ul 씩 접종액이 1mL이 되게 도말하였다.
- ③ 접종액이 배지에 완전히 흡수되도록 도말한 후 10분간 실내에서 방치시킨 후 37 °C에서 24 시간동안 배양하였다
- ④ 배양한 다음 투명한 환을 보이는 검정색 집락을 계수하고 5개 이상의 전형적인 집락을 선별하여 Coagulase test와 Vitek 2 system kit 검사를 통하여 확인시험을 진행하였다.
- ⑤ 확인 동정된 균수에 희석배수를 곱하여 균수를 계산하였다.

**(나) 시료구성**

- 시료의 경우 황색포도상구균이 오염될 가능성이 높은 새싹·무순과 같은 뿌리채소와 믹스샐러드를 선정하여 모니터링 검사를 진행하였음. 세부 항목은 다음과 같음.

종 류	개 수
새싹·무순	23
믹스샐러드	10
기타 뿌리채소	11
<b>합계</b>	<b>44</b>

(다) 실험결과

번호	log CFU/g	번호	log CFU/g
1	ND	23	ND
2	ND	24	ND
3	ND	25	ND
4	ND	26	ND
5	ND	27	ND
6	ND	28	ND
7	ND	29	ND
8	ND	30	ND
9	ND	31	ND
10	ND	32	ND
11	ND	33	ND
12	ND	34	1
13	ND	35	ND
14	ND	36	ND
15	ND	37	ND
16	ND	38	ND
17	ND	39	ND
18	ND	40	ND
19	ND	41	ND
20	ND	42	ND
21	ND	43	ND
22	ND	44	ND

- 실험결과 40종의 시료중 한 시료에서만 황색포도상구균이 동정되었으며, 1 log CFU/g을 수준으로 오염되어 있었음.
- 신선편의식품에서의 황색포도상구균 규격기준이 1 g 당 100 CFU 임을 고려했을 때, 44개의 농산물 모두 규격기준을 만족하는 것으로 나타났음.

**(3) 다양한 신선편의류 유통농산물에 대한 10종 식중독 세균 모니터링**

- **실험구성:** 서울시보건환경연구원 강남농수산물검사소 (협력기관)에서는 신선편의류 유통농산물에서 10종 식중독세균에 대해 모니터링을 수행하였음. 검출방법은 식품공전을 기준으로 하여 시행되었음.
- **모니터링 결과:** 모니터링 진행한 모든 시료에서 바실러스 세레우스를 제외한 타 식중독 세균들은 검출되지 않았음. 바실러스 세레우스의 오염률과 오염수준은 아래와 같음.

항 목	값
오염률 (%)	31%
오염수준 (CFU/g)	1.67

- 모니터링 진행한 모든 시료에서 바실러스 세레우스를 제외한 9종의 식중독 세균은 검출되지 않았음.
- 바실러스 세레우스의 오염률은 31%로 측정되었고 오염수준은 1.67 CFU/g 으로 신선편의식품의 미생물규격(1 g 당 1,000 이하)을 충분히 만족하는 정도였음.
- 유통되고 있는 농산물이 미생물적으로 안전하게 관리되고 있음을 알 수 있었음.



## 2. 유통 농산물 식중독세균 기준·규격(안) 확립

### 가. 국내 유통 농산물 기준 규격·조사 분석

- 국외 농산물에 대한 미생물 기준 규격에 대해 조사하였으며, 각 국가별 (호주, 캐나다, 아일랜드, 홍콩, 뉴질랜드, 유럽연합) 미생물 기준을 제시하는 기준서는 표 9.14와 같음.

표 9.14 각국 농산물에 대한 미생물 기준이 제시된 기준서 및 관장 기관 정보

국가	기준서	기관
호주	Standard 1.6.1. Microbiological limits in foods	Food Standards Australia New Zealand
캐나다	Health Products and Food Branch (HPFB) Standards and Guidelines for Microbiological Safety of Food - An Interpretive Summary	Health Canada
아일랜드	Guidelines for the Interpretation of Results of Microbiological Analysis of Some Ready-to-Eat Foods Sampled at Point of Sale	Food Safety Authority of Ireland
홍콩	Microbiological Guidelines for Ready-to-Eat Food	Centre for Food Safety (Food and Environmental Hygiene Department)
뉴질랜드	Microbiological Reference Criteria for Food	New Zealand Food Regulations
유럽연합	COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005	European Commission

- 해당 기준에서 각국 농산물은 아래와 같은 식품 카테고리 분류되고 있음 (표 9.15)

표 9.15 국가별 농산물 해당 식품 카테고리 정보

국가	식품 카테고리
호주	Ready-to-Eat Food
캐나다	Ready-to-Eat Food (Category 3)
아일랜드	Ready-to-Eat Food
홍콩	Food category 5
뉴질랜드	Ready-to-Eat Food, Salad
유럽연합	Pre-cut fruit and vegetables (Ready-to-Eat)

○ 각국의 농산물에 대한 미생물 기준은 아래와 같음(표 9.16).

표 9.16 국가별 농산물 미생물 기준

국가	미생물 기준
호주	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Listeria monocytogenes</i> (n=5, c=0, m=0, M=0)</li> </ul>
캐나다	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coliforms : 만족 (&lt;10<sup>2</sup>), 중간 (&lt;10<sup>3</sup>), 불만족 (&gt;10<sup>3</sup>)</li> <li>- <i>Escherichia coli</i> : 만족 (&lt;10), 중간 (&lt;10<sup>2</sup>), 불만족 (&gt;10<sup>2</sup>)</li> <li>- <i>Salmonella</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Shigella</i>, <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i>, <i>V. cholera</i>, <i>V. parahaemolyticus</i> : 불검출</li> <li>- <i>C. perfringens</i> : &lt;10<sup>2</sup></li> <li>- Coagulase positive <i>staphylococci</i> : &lt;10<sup>2</sup></li> <li>- <i>B. cereus</i> : &lt; 10<sup>3</sup></li> </ul>
아일랜드	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Enterobacteriaceae</i> : &lt;10<sup>2</sup></li> <li>- <i>Escherichia coli</i> : &lt;20</li> <li>- <i>Salmonella</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Shigella</i>, VTEC, <i>L. monocytogenes</i>, <i>V. cholera</i>, 불검출</li> <li>- <i>C. perfringens</i> : &lt;10</li> <li>- Coagulase positive <i>staphylococci</i>, <i>V. parahaemolyticus</i> : &lt;20</li> <li>- <i>B. cereus</i> : &lt; 10<sup>3</sup></li> </ul>
홍콩	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Salmonella</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Shigella</i>, <i>E. coli</i> O157, <i>L. monocytogenes</i>, <i>V. cholera</i>, : 불검출</li> <li>- <i>Escherichia coli</i>, <i>V. parahaemolyticus</i>, <i>S. aureus</i>, <i>C. perfringens</i> : &lt;10<sup>2</sup></li> <li>- <i>B. cereus</i> : &lt;10<sup>4</sup></li> </ul>
뉴질랜드	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aerobic plate count : n=5, c=2, m=10<sup>3</sup>, M=10<sup>5</sup></li> <li>- Coagulase producing <i>staphylococcus</i> : n=5, c=2, m=10<sup>2</sup>, M=10<sup>3</sup></li> <li>- Faecal coliform : n=5, c=2, m=10<sup>2</sup>, M=10<sup>3</sup></li> <li>- <i>Salmonella</i> : n=5, c=0, m=0, M=0</li> </ul>
유럽연합	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Salmonella</i> : n=5, c=0, m=0, M=0</li> </ul>

- 호주는 Food Standards Australia New Zealand에서 제시하는 Standard 1.6.1 Microbiological Limits in Food에서 농산물에 대한 미생물 기준을 제시하고 있음.
- 과일과 야채류는 ready-to-eat food에 속하며, ready-to-eat food를 또한 ready-to-eat food를 *Listeria monocytogenes*가 발생가능한 것과 발생 가능성이 없는 식품으로 나누어 기준을 제시함.

**STANDARD 1.6.1**  
**MICROBIOLOGICAL LIMITS IN FOOD**

---

**Purpose**

This Standard specifies the microbiological food safety criteria which determine the acceptability of a lot or consignment of food for sale or intended for sale. The Schedule to the Standard sets out sampling plans and the limits that a lot or consignment of food must comply with. Foods that fail to meet these limits may pose a risk to human health and must not be offered for sale.

**Table of Provisions**

1	Interpretation
2	Application
3	Sampling of foods for microbiological analysis
4	Reference methods of analysis
5	Microbiological limits in food
6	Food in which growth of <i>Listeria monocytogenes</i> will not occur

Schedule          Microbiological limits in food


**ready-to-eat food** means a food that –

- (a) is ordinarily consumed in the same state as that in which it is sold; and
- (b) will not be subject to a listericidal process before consumption; and
- (c) is not one of the following –
  - (i) shelf stable foods;
  - (ii) whole raw fruits;
  - (iii) whole raw vegetables
  - (iv) nuts in the shell;
  - (v) live bivalve molluscs.

Column 1	Column 2	Column 3	Column 4	Column 5	Column 6
Food	Microorganism	n	c	m	M
Ready-to-eat food in which growth of <i>Listeria monocytogenes</i> will not occur	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	10 <sup>2</sup> cfu/g	
Ready-to-eat food in which growth of <i>Listeria monocytogenes</i> can occur	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	not detected in 25 g	

그림 9.7 호주 Standard 1.6.1 Microbiological Limits in Food (상), 농산물 분류 (중), 리스테리아 오염 가능성 여부에 따른 구분 (하)

- 캐나다는 Health Canada에서 제시하는 Health Products and Food Branch (HPFB) Standards and Guidelines for Microbiological Safety of Food에서 농산물에 대한 미생물 기준을 제시하고 있음.
- 과일과 야채류는 ready-to-eat food 중 category 3에 속하며, Indicator organism으로 coliform과 *Escherichia coli*에 대한 정량기준을 가지고 있으며, 10개 식중독균에 대한 정성 및 정량 기준을 가지고 있음.


 Health Canada    Santé Canada  
 Your health and safety... our priority.    Votre santé et votre sécurité... notre priorité.

## Microbial Guidelines for Ready-to-Eat Foods – A Guide for the Conveyance Industry and Environmental Health Officers (EHO)

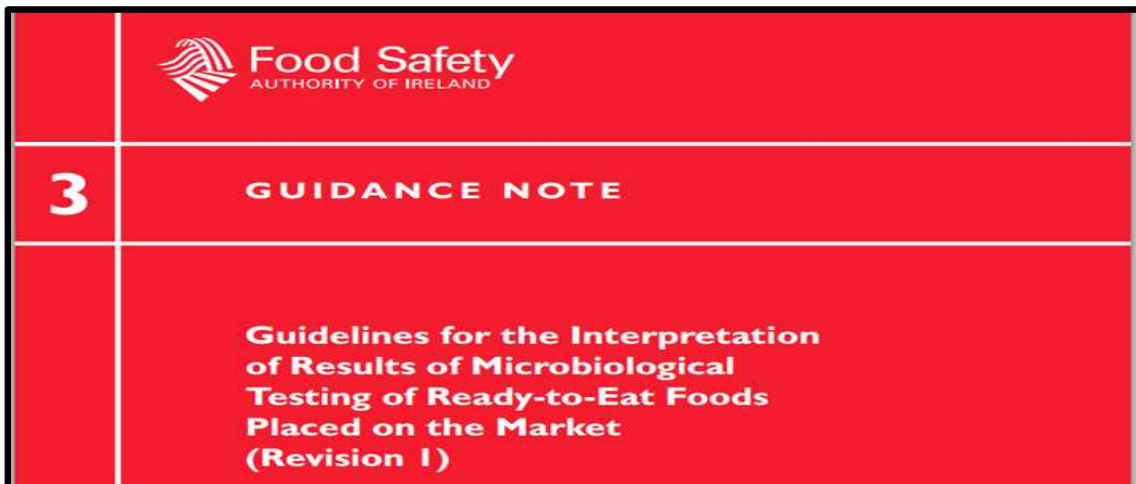
- Category 1**
- These foods are ready-to-eat and are comprised entirely of components that have been cooked in the preparation of the final product without subsequent handling or processing of any kind prior to distribution or sale (ex. soups, bread, quiche, cooked meat, fish & seafood and vegetables).
- Category 2**
- These foods contain some components that have been cooked, but may have been further handled prior to or during the preparation of the final product. This category also applies to any foods that are assembled from ready-to-eat foods (excluding those in category 3) that are not subsequently cooked (ex. hot dogs, sandwiches, burgers).
- Category 3**
- Examples of foods in this category are foods such as fresh fruits or vegetables, deli meats, fermented foods, chicken salad, taboulé, all kind of sprouts and cultured dairy products or any food product incorporating these foods (such as sandwiches), where it is expected that high standard (aerobic) colony counts would be present due to the normal microbial flora associated with these items. As such, ACC does not apply (ex. pitas, potato or pasta salad, salad rolls).

**Microbial Guidelines for Ready-to-Eat Foods**

Test	Microbial Guideline (CFU per gram unless otherwise stated)			
	Satisfactory	Marginal	Unsatis	Potentially
Aerobic Colony Count				
Category 1	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>5</sup>	≥10 <sup>5</sup>	
Category 2	<10 <sup>5</sup>	<10 <sup>7</sup>	≥10 <sup>7</sup>	
Category 3	N/A	N/A	N/A	
<b>Indicator Organisms</b>				
Coliforms <sup>(a)</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>3</sup>	≥10 <sup>3</sup>	
<i>Escherichia coli</i>	<10	<100	≥100	See VTEC
<b>Pathogens</b>				
<i>Salmonella</i> spp.	Not detected in		Detecte	
<i>Campylobacter</i> spp.	Not detected in		Detecte	
<i>Shigella</i> spp.*	Not detected in		Detecte	
<i>E. coli</i> 0157: H7 & VTEC	Not detected in		Detecte	
<i>L. monocytogenes</i>	Not detected in	10-≤100 <sup>(b)</sup>	≥100 <sup>(b)</sup>	
<i>V. cholerae</i> **	Not detected in		Detecte	
<i>V. parahaemolyticus</i> <sup>(b)</sup>	Not detected in	Detected but	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	≥10 <sup>3</sup>
<i>Clostridium perfringens</i>	<10	20-100	100-	≥10 <sup>4</sup>
Coagulase positive staphylococci	<205	<10 <sup>2</sup>	100-	≥10 <sup>4</sup>
<i>B. cereus</i> and other pathogens Bacillus	<50	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>4</sup>	≥10 <sup>4</sup>

그림 9.8 Health Canada에서 제시하는 가이드라인 (상), 농산물 분류 (중), 식중독균 정성/정량 기준 (하)

- 아일랜드는 Food Safety Authority of Ireland에서 제시하는 Guidelines for the Interpretation of Results of Microbiological Analysis of Some Ready-to-Eat Foods Sampled at Point of Sale에서 농산물에 대한 미생물 기준을 제시하고 있음.
- *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *L. monocytogenes*를 위생 지표 세균으로 삼고 정량 및 정성기준을 제시하고 있으며, 10개 식중독균에 대한 정성 및 정량 기준을 가지고 있음.



Hygiene Indicator	Result Based on cfu/g or presence in 25g		
	Satisfactory No action required	Borderline See Table 5 for action required	Unsatisfactory See Table 5 for action required
<i>Enterobacteriaceae</i> <sup>(a) (b) (c)</sup>	<10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> - ≤10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>
<i>E. coli</i> <sup>(d)</sup>	<20	20 - ≤10 <sup>2</sup>	>10 <sup>2</sup>
<i>Listeria</i> spp. (other than <i>L. monocytogenes</i> )	Foods that can't support the growth of <i>Listeria</i> spp. <sup>(e)</sup>	<10	10 - ≤10 <sup>2</sup>
	Foods that can support the growth of <i>Listeria</i> spp.	Not detected	Borderline result not applicable

Pathogen <sup>(a)</sup> /toxin <sup>(b)</sup>	Result Based on cfu/g or absence/presence in 25g <sup>(c)</sup>		
	Satisfactory No action required	Borderline See Table 2 for action required	Unsatisfactory See Table 3 for action required
<i>Bacillus cereus</i> and other pathogenic <i>Bacillus</i> spp. <sup>(d)</sup>	<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> - ≤10 <sup>5</sup>	>10 <sup>5</sup>
<i>Campylobacter</i> spp.	Not detected	Borderline result not applicable	Detected
<i>Clostridium perfringens</i>	<10	10 - ≤10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>
Coagulase-positive staphylococci <sup>(e)</sup>	<20	20 - ≤10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup> <sup>(f)</sup>
<i>Salmonella</i> spp. <sup>(d)</sup>	Not detected	Borderline result not applicable	Detected
<i>Shigella</i> spp.	Not detected	Borderline result not applicable	Detected
Staphylococcal enterotoxin <sup>(b)</sup>	Not detected	Borderline result not applicable	Detected
Verotoxigenic <i>E. coli</i> (VTEC) <sup>(f)</sup>	Not detected	Borderline result not applicable	Detected
<i>Vibrio cholerae</i> (O1 and O139)	Not detected	Borderline result not applicable	Detected
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<20	20 - ≤10 <sup>3</sup>	>10 <sup>3</sup>

그림 9.9 아일랜드 Food Safety Authority에서 제시하는 농산물 미생물 기준 가이드라인 (상), 위생지표세균 (중), 10개 식중독균 정성 정량 기준 (하)



- 홍콩은 Centre for Food Safety (Food and Environmental Hygiene Department)에서 제시하는 Microbiological Guidelines for Ready-to-Eat Food에서 농산물에 대한 미생물 기준을 제시하고 있음.
- 홍콩에서 과일과 야채류는 Food category 분류상 category 5에 속하며, Indicator organism으로 *Escherichia coli*에 대한 정량 기준을 가지고 있으며, 9개 식중독균에 대한 정성 및 정량 기준을 가지고 있음.

## Microbiological Guidelines for Ready-to-eat Food

Food group	Food Item	Category
Savoury	Bean curd	5
	Cheese-based bakery products	2
	Fermented foods	5
	Flan / quiche	2
	Dips	4
	Mayonnaise / dressings	2
	Samosa	2
	Satay	3
	Spring rolls	3
Vegetable	Coleslaw / salads (with or without meat)	3
	Fruit and vegetables (dried)	3
	Fruit and vegetables (fresh)	5
	Rice	3
	Vegetables and vegetable meals (cooked)	2

Criterion	Microbiological quality			
	Colony-forming unit (cfu) per gram unless specified			
	Class A Satisfactory	Class B Acceptable	Class C Unsatisfactory	Class D Unacceptable
Aerobic colony count (ACC) [30°C/48hours]				
Food	1	$< 10^3$	$10^3 - < 10^4$	$\geq 10^4$
Category	2	$< 10^4$	$10^4 - < 10^5$	$\geq 10^5$
(see table next page)	3	$< 10^5$	$10^5 - < 10^6$	$\geq 10^6$
	4	$< 10^6$	$10^6 - < 10^7$	$\geq 10^7$
	5	N/A	N/A	N/A
Indicator organism (applies to all food categories)				
<i>E. coli</i> (total)	$< 20$	$20 - < 100$	$\geq 100$	N/A
Pathogens (apply to all food categories)				
<i>Campylobacter</i> spp.	Not detected in 25g	N/A	N/A	Present in 25g
<i>E. coli</i> O157	Not detected in 25g	N/A	N/A	Present in 25g
<i>Salmonella</i> spp.	Not detected in 25g	N/A	N/A	Present in 25g
<i>V. cholerae</i>	Not detected in 25g	N/A	N/A	Present in 25g
<i>L. monocytogenes</i>				
For food under refrigeration (excluding frozen food) or food intended for infants	Not detected in 25g	N/A	N/A	Present in 25g
For other ready-to-eat food	$< 20$	$20 - < 100$	N/A	$\geq 100$
<i>V. parahaemolyticus</i>	$< 20$	$20 - < 100$	$100 - < 10^3$	$\geq 10^3$
<i>S. aureus</i>	$< 20$	$20 - < 100$	$100 - < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>C. perfringens</i>	$< 20$	$20 - < 100$	$100 - < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>B. cereus</i>	$< 10^3$	$10^3 - < 10^4$	$10^4 - < 10^5$	$\geq 10^5$

N/A denotes "Not applicable"

그림 9.10 홍콩 Center for Food Safety에서 제시하는 농산물에 대한 미생물 기준 가이드라인 (상), 농산물 분류 (중), 지표균 정보 및 9개 식중독균 정성 정량 기준 (하)

- 뉴질랜드는 New Zealand Food Regulations에서 제시하는 Microbiological Reference Criteria for Food에서 농산물에 대한 미생물 기준을 제시하고 있음
- 뉴질랜드에서 과일과 야채류는 SALADS - vegetable or fruit에 속함,
- Aerobic plate count, faecal coliform 정량 기준을 가지고 있으며, *Salmonella* 및 Coagulase producing *Staphylococcus* 등 2개 식중독균에 대한 정성 및 정량 기준을 가지고 있음.

5.25 SALADS - vegetable or fruit - excluding combination with meat				
Aerobic plate count at 35°C (/g)	n = 5	c = 2	m = 10 <sup>5</sup>	M = 10 <sup>6</sup>
Coagulase producing staphylococcus (/g)	n = 5	c = 2	m = 10 <sup>2</sup>	M = 10 <sup>3</sup>
Faecal coliform (/g)	n = 5	c = 2	m = 10 <sup>2</sup>	M = 10 <sup>3</sup>
Salmonella (/25 g)	n = 5	c = 0	m = 0	

그림 9.11 뉴질랜드 Food Regulations에서 제시하는 농산물 기준 규격

- 유럽연합은 European Commission에서 제시하는 COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005에서 농산물에 대한 미생물 기준을 제시하고 있음.
- Pre-cut fruit and vegetables (ready-to eat)에 대하여 Salmonella에 대한 정성기준을 가지고 있음(불검출).

22.12.2005	EN	Official Journal of the European Union	L 338/1
I			
(Acts whose publication is obligatory)			
<b>COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005</b>			
<b>of 15 November 2005</b>			
<b>on microbiological criteria for foodstuffs</b>			
(Text with EEA relevance)			

Food category	Micro-organisms/their toxins, metabolites	Sampling-plan (*)		Limits (*)		Analytical reference method (*)	Stage where the criterion applies
		n	c	m	M		
1.18. Sprouted seeds (ready-to-eat) (12)	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
1.19. Pre-cut fruit and vegetables (ready-to-eat)	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
1.20. Unpasteurised fruit and vegetable juices (ready-to-eat)	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence in 25 g		EN/ISO 6579	Products placed on the market during their shelf-life
1.21. Cheeses, milk powder and whey powder, as referred to in the coagulase-positive staphylococci criteria in Chapter 2.2 of this Annex	Staphylococcal enterotoxins	5	0	Not detected in 25g		European screening method of the CRL for Milk (13)	Products placed on the market during their shelf-life

그림 9.12 European Commission에서 제시하는 미생물 기준

- 호주, 캐나다, 아일랜드, 홍콩, 뉴질랜드, 유럽연합 등에서 농산물에 대해서 제시하는 미생물 기준을 조사를 실시하였음
- 대부분의 국가에서 농산물은 Ready-to-eat food 에 속하고 있었으며, fresh-cut produce, pre-cut fruit and vegetables 등 고유의 분류를 가지고 있는 국가들도 있음.
- 위생지표로 *Escherichia coli*, Aerobic plate count, *Enterobacteriaceae*, Faecal coliform등을 사용하고 있었으며, 이들에 대한 정량 기준을 제시하고 있음.
- 아일랜드 등의 국가는 *Listeria monocytogenes*를 위생 지표 세균으로 사용하기도 하며 불검출 기준을 가지고 있음.
- *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, *C. perfringens*, Coagulase positive *staphylococci*, *B. cereus*등 다양한 식중독 세균에 대한 정성 및 정량 기준을 제시하고 있음.
- 호주에서는 *L. monocytogenes*, 뉴질랜드에서는 *Salmonella*와 Coagulase producing *Staphylococcus*, 유럽에서는 *Salmonella* 등 일부 식중독균에 대한 규제만 가지고 있는 국가들도 있음.



나. 유통 농산물에서의 식중독 세균 기준·규격(안) 설정

❖ ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods)의 n, c, m, M 기준 설정원칙에 현재까지 진행된 농산물 모니터링 결과와 앞서 진행된 국제적인 미생물 기준을 적용하여 유통농산물에 오염가능성이 있는 7종 식중독 세균에 대한 개별 규격안을 제시하였음.

(1) 미생물별 case와 n, c값의 설정

- 해당값들은 ICMSF에서 제시하는 case 분류표 (표x) 와 식중독균 또는 외독소의 위해도 기준표 (표x) 에 근거하여 설정하였음.
- Case 분류표의 경우 3가지 factor (①위해도 종류, ②해당 식품에서 검사 후 섭취까지 미생물의 증식가능성에 따른 위해도 변화 ③섭취대상의 민감도)를 기준으로 설정되어있음.

표 9.17 ICMSF에서 제시하는 CASE 분류표

위해도 종류	시료채취 후의 위해도 변화		
	위해도 감소	변화 없음	위해도 증가
건강상의 위해가 없음	Case 1	Case 2	Case 3
낮은 위해, 지표세균	Case 4	Case 5	Case 6
생명을 위협하지 않는 중증도의 위해	Case 7	Case 8	Case 9
심각한 위해, 경우에 따라 생명을 위협	Case 10	Case 11	Case 12
매우 심각한 위해, 생명을 위협하거나 장기간의 치료를 요함	Case 13	Case 14	Case 15

표 9.18 ICMSF의 식중독균과 독소의 위해성 분류

위해정도	균명(또는 독소)
<p><b>A severe (일반집단에 위해)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>일반집단에서 심각한 위해</li> <li>생명을 위협하거나 상당한 만성 후유증을 남기거나 장기간의 치료를 요함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Brucella</i> (<i>B.melitensis</i>, <i>B.abortus</i>, <i>B.suis</i>)</li> <li><i>Cl. botulinum</i> 독소</li> <li><b>EHEC</b> (<i>E.coli</i> O157:H7, O111:NM)</li> <li><i>Salmonella</i> (<i>S.typhi</i>, <i>S.paratyphi</i>)</li> <li><b>Shigella dysenteria</b></li> <li><i>Vibrio cholerae</i> O1 and O139</li> <li><i>Mycobacterium bovis</i></li> </ul>
<p><b>B severe (특정집단에 위해)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>면역이 취약한 특정집단에 심각한 위해</li> <li>생명을 위협하거나 상당한 만성 후유증을 남기거나 장기간의 치료를 요함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Campylobacter jejuni</b> serovar O:19 or GBS 관련 serovar</li> <li>Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)</li> <li>Enterotoxigenic <i>E.coli</i> (ETEC)</li> <li><i>Clostridium perfringens</i> type C (enteritis necroticans)</li> <li><i>Clostridium botulinum</i> (type A and B)</li> <li><i>Enterobacter sakazakii</i></li> <li><b>Listeria monocytogenes</b></li> <li><i>Vibrio vulnificus</i></li> <li>Hepatitis A virus, <i>Cryptosporidium parvum</i></li> </ul>
<p><b>Serious (중증도의 위해)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>정상생활이 불가능 하지만 생명에는 지장이 없으며 후유증이 남지 않음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Salmonella</i> (<b>S. Enteritidis</b>, <i>S. Typhimurium</i> and other <i>Salmonella</i> serovars)</li> <li><i>Yersinia</i> (<i>Y.enterocolitica</i> and <i>Y.pseudotuberculosis</i>)</li> <li><i>Shigella</i> (<i>S.flexineri</i>, <i>S.boydii</i>, <i>S.sonnei</i>)</li> <li><b>Listeria monocytogenes</b></li> <li>Hepatitis A virus, <i>Cryptosporidium parvum</i></li> <li><i>Acrobacter butzleri</i> and <i>A.cryaerophila</i></li> <li><i>Cyclospora cayetanensis</i></li> </ul>
<p><b>Mild (심각하지 않은 위해)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>심한 불편함을 유발할 수 있지만 후유증이 없으며 대개 짧은 이환기간을 보이며 증상이 자가 제한적임</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Bacillus cereus</b> (gastroenteritis and emetic)</li> <li><i>Clostridium perfringens</i> type A</li> <li><i>E.coli</i> (EPEC, ETEC)</li> <li><b>Staphylococcus aureus</b> (toxin)</li> <li><i>Vibrio parahaemolyticus</i></li> <li>Small round structured virus(SRSV) including norwalk virus</li> </ul>

○ 해당 기준들을 참고하여 모니터링 실시한 세균들을 위해도에 따라 분류 수행함

표 9.19 모니터링 식중독 세균들에 대한 Case별 위해도 분류 수행

위해도 종류	미생물	시료채취 후의 위해도 변화		
		감소	없음	증가
건강상의 위해가 없음	-	Case 1	Case 2	Case 3
낮은 위해, 지표세균	-	Case 4	Case 5	Case 6
생명을 위협하지 않는 중증도의 위해	황색포도상구균, 바실러스 세레우스,	Case 7	Case 8	Case 9
심각한 위해, 경우에 따라 생명을 위협	살모넬라, 리스테리아 모노사이토제네스 캄필로박터 제주니	Case 10	Case 11	Case 12
매우 심각한 위해, 생명을 위협하거나 장기간의 치료를 요함	<i>E.coli</i> O157:H7, 장출혈성 대장균, 이질균	Case 13	Case 14	Case 15

표 9.20 Case 별 n, c값의 범위

Cases	n (샘플 수)	c (조건합격 최대허용 수)	type
1, 4	5	3	삼균법
2, 5, 7	5	2	삼균법
3, 6, 8	5	1	삼균법
9	10	1	삼균법
10	5	0	이균법
11	10	0	이균법
12	20	0	이균법
13	15	0	이균법
14	30	0	이균법
15	60	0	이균법

## (2) 미생물별 m, M 값 설정

- ❖ 미생물별로 위해도에 따라 case 분류를 파악한 후, 해당 미생물이 불검출 기준인지 정량 기준인지를 판단하여 불검출 기준일 경우  $c=0, m=0$  (불검출 기준) 의 값을 적용함
- ❖ 정량기준의 경우 모니터링 결과와 ICMSF의 m, M 설정 가이드라인을 참고하여 해당 값을 제시함
- ❖ 7종 미생물 중 불검출 기준이 적용되는 세균은 병원성 대장균, 살모넬라, 캄필로박터\*, 이질균\*, 리스테리아 모노사이토젠스\* 이며 정량 기준이 적용되는 세균은 황색포도상구균과 바실러스 세레우스임

\* 해당 균들의 경우 규격이 존재하지 않으나 위해도 분류 결과를 근거로 하여 불검출 기준을 적용하였음.

○ m값과 M값은 ICMSF의 가이드라인 및 예시를 기준으로 하되 국가의 상황에 맞게 정할 수 있음.

○ ICMSF의 m, M 설정 가이드라인은 아래와 같다

- m: GHP, HACCP 등이 적용된 공정을 통해 생산된 식품의 모니터링 자료를 활용하여 설정
- M: 아래 사항을 참고하고 전문가 조언을 통해 설정
  - 맛이나 냄새 등으로 알 수 있는 미생물적 오염도
  - 지표세균: 완전히 허용 불가능한 수준의 위생을 의미하는 오염수준
  - 병원성균: 최소 감염량과 회당 섭취량, 주요 소비층의 민감도 고려

○ 위의 가이드라인을 기초로 하고 식품공전의 현행기준을 반영하여 m, M을 설정하여 세균별로 n, c, m, M 값을 설정하였음.

## (3) 미생물별 n, c, m, M 규격안 제시

- ❖ n, c, m, M 설정가이드라인과 모니터링 결과를 ICMSF에서 제공하는 시뮬레이션 소프트웨어에 대입하여 이론적 수치를 검증하고 국제적인 미생물기준과 국내 요건들을 복합적으로 고려하여 최종 값 설정하였음.

(가) 불검출 기준 적용 세균

- n, c, m, M 가이드라인에 따른 불검출 기준 적용 세균은 장출혈성 대장균, 살모넬라, 이질균, 캄필로박터, 리스테리아 모노사이토젠스임.
- 해당 식중독세균들에 대한 모니터링 결과를 ICMSF에서 제공하는 NEWsampleplans2 program을 이용하여 적합한 n, c, m, M의 값을 산출하였음.

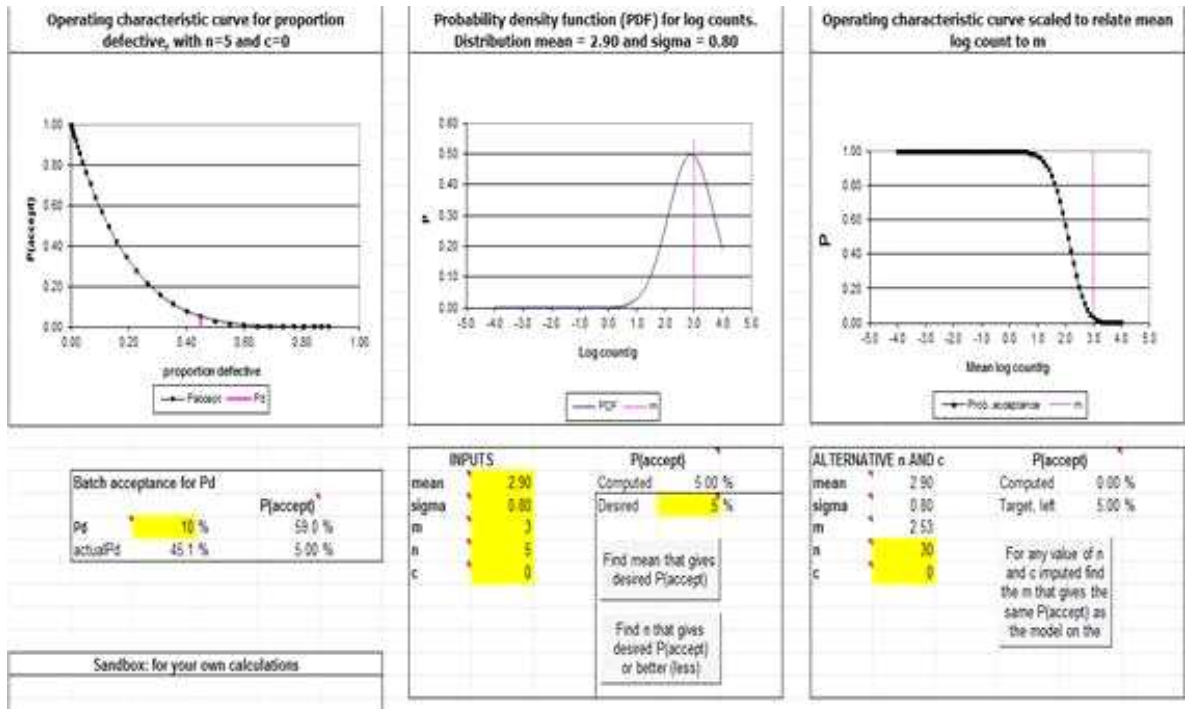


그림 9.13 NEW sampleplan2 program의 수치에 따른 simulation 산출 예시 (2분법)

- 해당 세균들의 경우 333개의 농산물 모니터링 수행결과 단 하나의 시료에서도 검출되지 않았음.
- 가이드라인에 따르면 병원성 대장균과 이질균은 그 위해도가 매우 높아 Case 14로 분류되어 n=30 기준이 적용되며 살모넬라, 캄필로박터, 리스테리아의 경우 Case 11로 분류되어 n=10의 기준이 적용됨.
- 그러나 해당 식중독 세균들의 경우 일반적으로 농산물보다는 축산물에서의 오염률이 높은 세균이며 앞서 조사한 국제적인 미생물 기준들 또한 n 값이 5를 초과하는 경우가 없었다는 점을 미루어봤을 때, 이론적으로 제시되는 n 값이 실제 필요 시료량 보다 높게 설정될 수 있다는 판단에 따라 n 값을 5 또는 10으로 설정하였음.

표 9.21 신선편의식품에서 불검출 기준이 적용되는 세균들에 대한 규격안 제시

항 목	case	현 행 규 격	개 정 안
병원성 대장균	14	n=5, c=0, m=0/25g	n=10, c=0, m=0/25g
살모넬라	11	n=5, c=0, m=0/25g	현행 규격 유지
캠필로박터	11	-	n=5, c=0, m=0/25g
이질균	14	-	n=10, c=0, m=0/25g
리스테리아 모노사이토젠스	11	-	n=5, c=0, m=0/25g

(나) 불검출 기준 적용 세균

- 정량 기준이 적용되는 세균은 바실러스 세레우스와 황색포도상구균임.
- m값과 M값은 ICMSF의 가이드라인 및 예시를 기준으로 하되 국가의 상황에 맞게 정할 수 있음.
- 의 가이드라인과 동시에 모니터링 결과를 ICMSF의 NEWsampleplans2 program으로 합격률(accept)을 계산하여 제안된 이론적 규격안에 대한 검증을 진행하였음.
- 가이드라인에 따라 합격률이 95% 정도일 때를 기준으로 n, c, m, M 의 값을 설정하였음

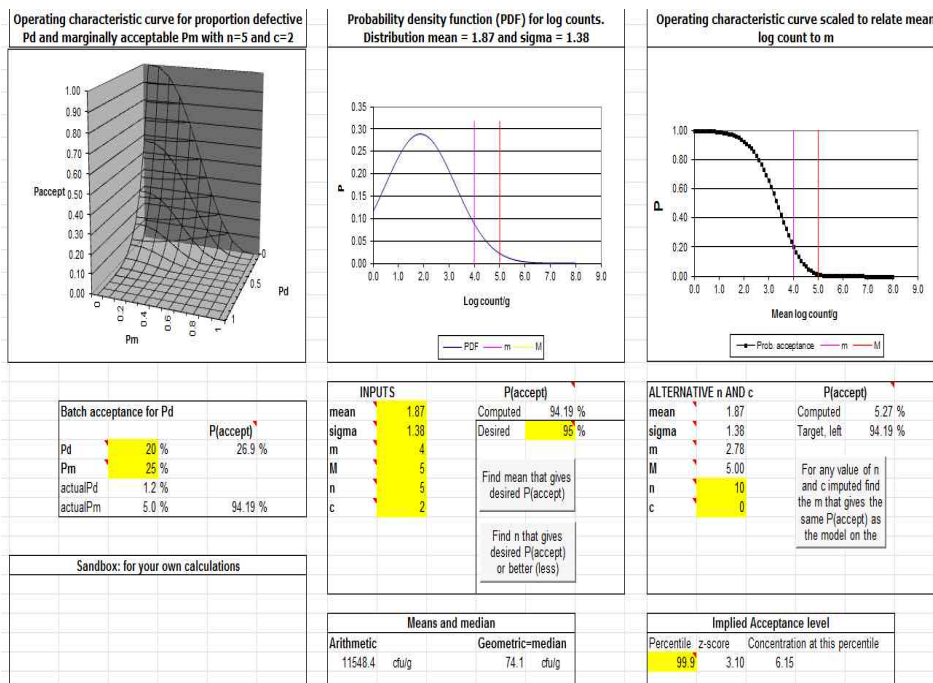


그림 9.14 NEW sampleplan2 program의 수치에 따른 simulation 산출 예시 (3분법)

- 황색포도상구균의 경우 앞서 보고한 44개의 농산물에서의 정량실험결과를 바탕으로 n, c, m, M의 적정 값을 산출하였음.
- 황색포도상구균의 경우 44개의 시료에서 1개의 시료에서만 검출되었으며, 평균오염수준은  $-0.64 \log \text{CFU/g}$  이며 표준편차는  $0.17 \log \text{CFU/g}$  으로 나타났으며 이는 현재 기준규격 (1 g 당  $2 \log \text{CFU/g}$ )을 충분히 만족시키는 수준이었음.
- 현재 모니터링 결과의 표준편차 수치는 시뮬레이션 값 산출시에 특정 로트에만 편중된 값을 산출할 수 있기 때문에, wilson et al. (1935)이 보고한 보정된 표준편차 수치를 대입하여 n, c, m, M의 값을 산출하였음(로트 내 미생물 분포 표준편차: 액체시료(0.2); 비교적 잘 섞일 수 있는 식품(0.4); 고체시료(0.8)).

표 9.22 황색포도상구균 모니터링 수행결과

번호	log CFU/g	번호	log CFU/g
1	ND	23	ND
2	ND	24	ND
3	ND	25	ND
4	ND	26	ND
5	ND	27	ND
6	ND	28	ND
7	ND	29	ND
8	ND	30	ND
9	ND	31	ND
10	ND	32	ND
11	ND	33	ND
12	ND	34	1
13	ND	35	ND
14	ND	36	ND
15	ND	37	ND
16	ND	38	ND
17	ND	39	ND
18	ND	40	ND
19	ND	41	ND
20	ND	42	ND
21	ND	43	ND
22	ND	44	ND

○ 시뮬레이션 적용결과  $n=5, c=0, m=1, M=2$  일 때, 99%의 합격률로 적합하게 나타났음.

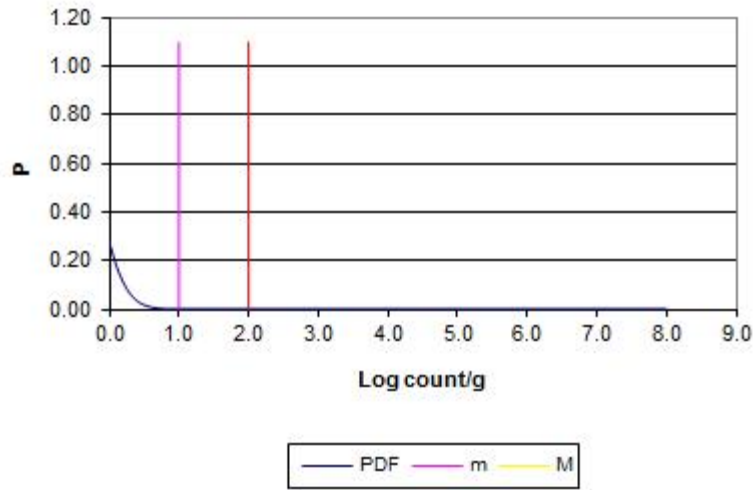


그림 9.15 평균  $-0.64 \log$  CFU/g 편차 0.17 일 때의 probability density function

○ 제안된 이론적 규격안은 현재 기준보다 강화된 규격이지만 국제적인 추세를 살펴보았을 때, 뉴질랜드를 제외한 모든 국가에서 황색포도상구균을 100 CFU/g 이하로 관리하고 있는 점으로 미루어봤을 때, 일정 수준의 규격강화는 필요할 것으로 판단됨.

표 9.23 신선편의식품(일반)에서 황색포도상구균에 대한 식품공전 및 제안된 이론적 규격안

규격	미생물 기준
식품공전	황색포도상구균: 100 CFU/g 이하
제안된 이론적 규격안	$n=5, c=0, m=10, M=100$

#### 다. 바실러스 세레우스의 경우

○ 바실러스 세레우스의 경우 1차년도 모니터링 연구결과를 바탕으로  $n, c, m, M$ 의 적정값을 산출하였음.



- 유기농(organic)시료와 일반(conventional)시료에서의 오염수준의 차이가 유의적으로 나타나 규격 기준을 개별적으로 제안하였음.

표 9.24 일반 시료에서의 바실러스 세레우스 모니터링 수행결과

번호	log CFU/g	번호	log CFU/g	번호	log CFU/g
1	2.48	35	2.00	69	ND
2	ND	36	ND	70	ND
3	2.00	37	ND	71	ND
4	ND	38	ND	72	2.00
5	2.00	39	2.60	73	ND
6	ND	40	2.00	74	2.30
7	ND	41	2.48	75	ND
8	ND	42	2.00	76	ND
9	ND	43	ND	77	ND
10	ND	44	2.78	78	ND
11	2.00	45	ND	79	2.48
12	ND	46	ND	80	ND
13	ND	47	ND	81	ND
14	ND	48	ND	82	2.30
15	2.48	49	ND	83	ND
16	ND	50	ND	84	2.60
17	2.95	51	ND	85	ND
18	ND	52	ND	86	ND
19	2.00	53	2.00	87	2.00
20	ND	54	ND	88	ND
21	ND	55	ND	89	3.89
22	ND	56	ND	90	ND
23	ND	57	ND	91	2.00
24	ND	58	ND	92	ND
25	2.30	59	2.48	93	ND
26	ND	60	ND	94	2.30
27	2.00	61	ND	95	ND
28	ND	62	ND	96	ND
29	ND	63	ND	97	2.00
30	ND	64	ND	98	ND
31	2.48	65	ND	99	ND
32	ND	66	ND	100	2.30
33	ND	67	ND		
34	ND	68	2.00		

- 일반 시료에서 바실러스 세레우스를 분석한 결과 총 100개의 시료 중 30개의 시료에서 바실러스 세레우스가 검출되었음.
- 모니터링 결과에 대한 평균은 2.15 log CFU/g 이며 표준편차는 2.89 log CFU/g 으로 나타났으며, 그 중 1개의 시료에서 현재 식품공전상의 기준을 상회하는 값의 바실러스 세레우스가 검출되었음.
- 현재 모니터링 결과의 표준편차 수치는 시뮬레이션 값 산출시에 특정 로트에만 편중된 값을 산출할 수 있기 때문에, wilson et al. (1935)이 보고한 보정된 표준편차 수치를 대입하여 n, c, m, M의 값을 산출하였음(로트 내 미생물 분포 표준편차: 액체시료(0.2); 비교적 잘 섞일 수 있는 식품(0.4); 고체시료(0.8)).
- 시뮬레이션 프로그램 수행결과 n=5, c=1, m=1,000, M=10,000 일 때, 합격률이 99.73%로 적당하게 나타남을 알 수 있었음(그림 x).

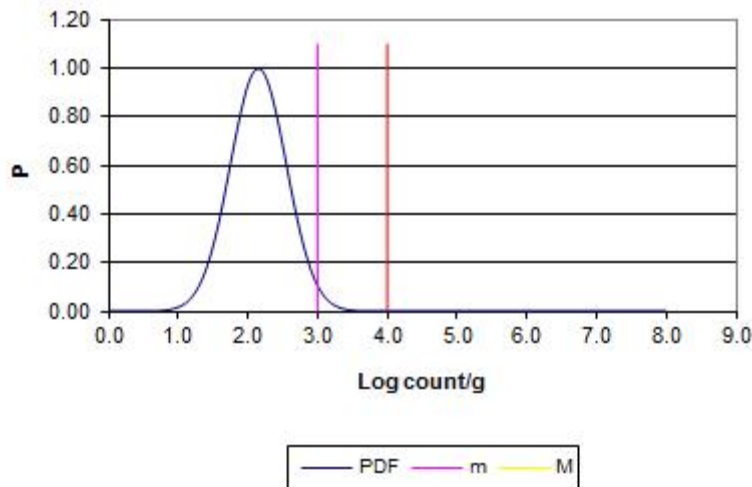


그림 9.16 평균 2.15 log CFU/g 편차 0.4 일 때의 probability density function

- 현행기준 (3 log CFU/g) 보다 완화된 기준이지만, HPA(Health Protection Agency) guideline에 제시된 신선편의식품에서의 바실러스 세레우스 기준은 4 log CFU/g 임을 고려하였을 때, 제안된 이론적 규격안은 적합한 수치라고 판단됨.

표 9.25 신선편의식품(일반)에서 바실러스 세레우스에 대한 식품공전 및 제안된 이론적 규격안

규격	미생물 기준
식품공전	바실러스 세레우스: 1,000 CFU/g 이하
제안된 이론적 규격안	n=5 c=1 m=1,000 M=10,000

- 또한, 1차년도 서울시 보건환경연구원에서 진행된 모니터링결과에도 해당 규격안을 적용해 보았음.
- 모니터링은 137개의 신선편의식품시료에 대하여 진행되었으며 평균은 2.36 log CFU/g 으로 제안된 이론적 규격안을 적용하였을 때, 아래와 같이 97.30%의 합격률을 보여주었음.

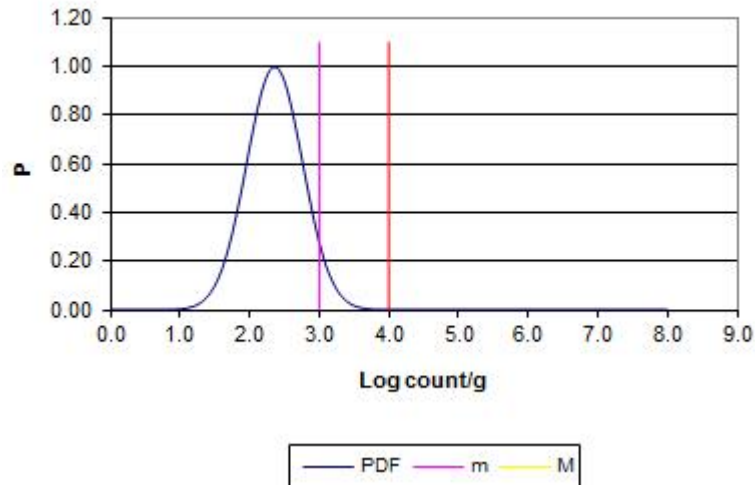


그림 9.17 평균 2.36 log CFU/g 편차 0.4 일 때의 probability density function

- 따라서, 제안된 규격안이 새로운 미생물 규격기준으로서 활용될 근거를 얻을 수 있었음.
- 유기농 시료의 경우 일반시료와는 달리 100개의 시료 중 70개의 시료에서 바실러스 세레우스가 검출되었음.
- 모니터링 결과에 대한 평균은 3.48 log CFU/g 이며 표준편차는 4.20 으로 나타났으며, 그 중 19개의 시료에서 현재 식품공전상의 기준을 상회하는 값의 바실러스 세레우스가 검출되었음.
- 앞서 언급한바와 같이 표준편차를 0.4로 보정하여 시뮬레이션 프로그램을 적용시켰을 때,  $n=5$ ,  $c=2$ ,  $m=10,000$ ,  $M=100,000$  값에서 합격률이 99.19%로 측정됨을 알 수 있었음.

표 9.26 유기농 시료에서의 바실러스 세레우스 모니터링 수행결과

번호	log CFU/g	번호	log CFU/g	번호	log CFU/g
1	4.39	35	2.00	69	3.41
2	2.00	36	2.00	70	2.00
3	2.30	37	2.00	71	3.45
4	2.30	38	2.00	72	3.20
5	2.90	39	2.48	73	2.60
6	ND	40	ND	74	3.36
7	3.38	41	2.00	75	ND
8	2.48	42	ND	76	3.65
9	2.00	43	2.60	77	ND
10	2.48	44	2.00	78	ND
11	2.48	45	2.48	79	2.00
12	3.00	46	ND	80	5.19
13	ND	47	2.70	81	4.09
14	4.15	48	ND	82	ND
15	3.00	49	ND	83	ND
16	ND	50	3.11	84	ND
17	3.51	51	2.00	85	ND
18	2.30	52	2.00	86	2.30
19	2.00	53	3.18	87	3.91
20	2.48	54	2.30	88	ND
21	2.90	55	2.30	89	2.00
22	2.00	56	2.30	90	ND
23	2.30	57	2.00	91	2.00
24	2.00	58	ND	92	ND
25	ND	59	ND	93	2.30
26	2.00	60	ND	94	4.01
27	3.04	61	2.30	95	2.85
28	ND	62	3.00	96	2.00
29	3.08	63	ND	97	2.00
30	ND	64	2.00	98	ND
31	ND	65	ND	99	3.82
32	2.00	66	2.00	100	4.50
33	ND	67	ND		
34	3.20	68	2.30		

- 유기농 시료의 경우 일반시료와는 달리 100개의 시료 중 70개의 시료에서 바실러스 세레우스가 검출되었음.
- 니터링 결과에 대한 평균은 3.48 log CFU/g 이며 표준편차는 4.20 으로 나타났으며, 그 중 19개의 시료에서 현재 식품공전상의 기준을 상회하는 값의 바실러스 세레우스가 검출되었음.
- 앞서 언급한바와 같이 표준편차를 0.4로 보정하여 시뮬레이션 프로그램을 적용시켰을 때, n=5, c=2, m=10,000, M=100,000 값에서 합격률이 99.19%로 측정됨을 알 수 있었음.

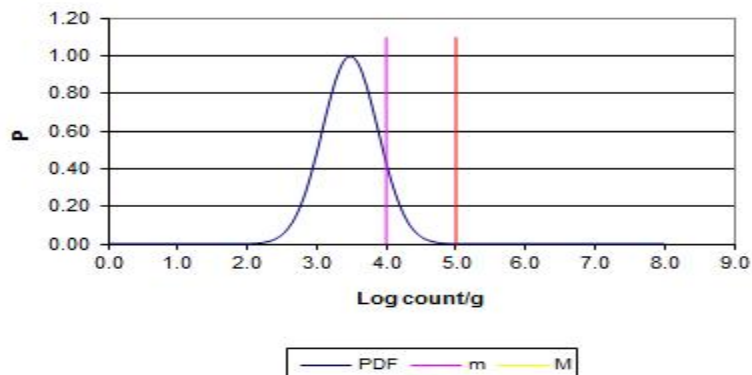


그림 9.18 평균 3.48 log CFU/g 편차 0.4 일 때의 probability density function

- 일반제품과 유기농제품의 기본적인 오염수준의 차이가 있는 만큼 개별적 미생물 기준 도입이 타당할 것으로 판단됨.
- 현행기준 (3 log CFU/g) 보다 완화된 기준이지만, HPA(Health Protection Agency) guideline에 제시된 신선편의식품에서의 바실러스 세레우스 기준은 4 log CFU/g 이며 유기농 제품에서의 오염수준을 고려하였을 때, 현 시행규격의 완화가 필요할 것으로 사료됨.

표 9.25 신선편의식품(유기농)에서 바실러스 세레우스에 대한 식품공전 및 제안된 이론적 규격안

규격	미생물 기준
식품공전	바실러스 세레우스: 1,000 CFU/g 이하
제안된 이론적 규격안	n=5 c=2 m=10,000 M=100,000

### 3. 모니터링 결과 및 미국 GAP·GHP 벤치마킹에 따른 위생관리지침 제시

#### 가. 수확 후 세척효율 비교·평가에 따른 위생관리지침 제시

(1) 수확 후 가공과정을 거치지 않은 lettuce와 sprouts에서의 세척방식별(유기농채배-lactic acid, 일반채배-chlorine based sanitizer) 일반세균수 및 B. cereus 사멸률 비교>

##### (가) 실험 배경

- 유통농산물에서 위해도가 높은 식중독세균에 대하여 기준규격을 제시하기 위하여 다소비 농산물을 대상으로 모니터링을 진행하였으나 병원성 대장균, 살모넬라균, 캠필로박터균, 리스테리아, 이질균 모두 한 건도 검출되지 않아 직접적인 위생관리지침 설정에 어려움이 있음.
- 따라서, 식중독세균이자 포자를 생성하여 소독/세척제제에 대해 저항성이 높은 바실러스 세레우스를 Surrogate로 활용하여 2종의 다소비 농산물(sprouts, lettuce)에서의 채배방식별 위생관리지침을 제시하였음

##### (나) 실험 목적

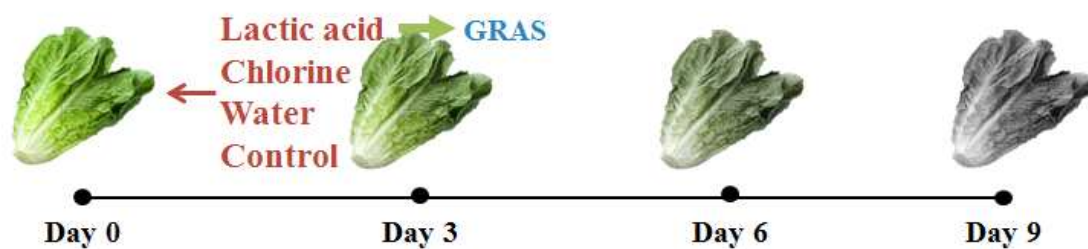
- 신선편의야채 (fresh cut vegetable)의 경우 수확 후 진공 예냉 > 저온 저장 > 선별 > 세척 > 다듬기, 절단 > 탈수 > 포장 > 제품 검사의 과정을 거쳐 출하됨.



그림 9.19 신선편의야채의 수확 후 가공과정

- 수확 후 식중독을 유발할 수 있는 미생물을 제어하는 방법은 야채전용소독제 (vegetable sanitizer)를 사용한 살균세척임.
- 살균세척방법은 재배방식(유기농재배, 일반재배)에 따라 방법이 다르며, 일반재배에서는 일상생활에서도 흔히 사용되는 락스회석액과 같은 염소기반 소독제제가 많이 사용됨.
- 반면에 유기농재배에서는 살균세척용 소독제로 사용될 수 있는 제제는 GRAS (Generally Recognized As Safe) 로 분류되는 제제들로서 천연추출물 (자몽추출물, 포도씨추출물 etc.) 이나 유기산(lactic acid, citric acid etc.)등이 활용될 수 있음.
- *B. cereus*의 경우 그 자체로 식중독을 유발할 수 있는 세균일 뿐만 아니라 포자를 생성하여 외부환경 및 소독제제에 대한 저항성이 높아, 수확 후 가공과정을 거치며 생존할 가능성이 높을 세균으로, 살균소독의 효율을 비교/평가하는 *Surrogate*로 활용되어 왔음.
- 본 연구의 목적은 1) 수확 후 가공과정을 거치지 않은 lettuce 및 sprouts에서 일반세균수 및 *B. cereus*를 대상으로 재배방식별로 다른 살균소독법(유기산, 염소기반소독제제)을 적용하여 그 소독력을 비교/평가하는 것과 그 결과를 바탕으로 2) 재배유형(유기농, 일반)에 따른 위생관리지침을 제시하는 것임.

(다) 실험 구성/방법



	Water (control)	Lactic acid	Chlorine
Step 1.	물세척 (이물제거)	물세척 (이물제거)	물세척 (이물제거)
Step 2.	물세척	살균소독 (lactic acid)	살균소독 (chlorine)
Step 3.	물세척	물세척 (잔여소독제 제거)	물세척 (잔여소독제 제거)
Step 4.		탈수	
Step 5.		포장	
세균수측정	저장 0, 3, 6, 9일에 일반세균수와 바실러스 세레우스를 정량함		

그림 9.20 실험방법 모식도

- 경기도 인근 농장에서 수확 후 가공과정을 거치지 않은 lettuce와 sprouts를 각각 20 sample씩 구매함.
- 각 sample을 25 g 씩 3 그룹(water, lactic acid, chlorine)으로 나눠 물세척(이물제거) > 살균소독(water, lactic acid, chlorine) > 물세척(잔여소독제 제거) > 탈수 > 포장과정을 진행함
- 각 소독방법은 선행연구에 따라 진행하였으며, Chlorine 세척제는 약 80 mg/L 농도의 유효 염소를 함유하고 있었으며, Lactic acid의 경우 5ml/L (0.5%) 농도로 사용하였음.
- 이 후, 3일 간격으로 일반세균수와 바실러스 세레우스의 오염정도를 미국 Food and Drug Administration에서 제공하는 BAM (Bacteriological Analytical Methods)에 따라 측정함.
- 측정결과는 log CFU 로 변형하여 ANOVA를 통하여 그룹별 유의차를 검증하였음.

#### (라) 실험결과1 (lettuce)

- Lettuce에서의 세척방법별 일반세균수 측정결과는 아래 표와 같음.

표 9.26 Lettuce에서의 세척방법별 날짜별 일반세균수 측정결과

Treatment (n)	Aerobic plate count (log CFU/g)			
	time (day)			
	0	3	6	9
DW (20)	5.9 ± 0.3 <sup>A</sup>	6.0 ± 0.4 <sup>A</sup>	6.1 ± 0.3 <sup>A</sup>	6.0 ± 0.4 <sup>A</sup>
LA (20)	4.3 ± 0.3 <sup>B</sup>	6.0 ± 0.6 <sup>A</sup>	6.1 ± 0.6 <sup>A</sup>	6.0 ± 0.4 <sup>A</sup>
CH (20)	4.2 ± 0.6 <sup>B</sup>	6.0 ± 0.5 <sup>A</sup>	6.0 ± 0.6 <sup>A</sup>	6.0 ± 0.6 <sup>A</sup>

DW; distilled water, LA; lactic acid, CH; chlorine

n; sample treated

- 세척당일 측정결과, DW 처리군에 비하여 LA, CH 군에서 약 1.5 log CFU 정도 적은 수의 일반세균수가 관찰되었음.
- 그러나, 저장 3일이 경과하였을 때부터 9일차 까지, 3가지 세척군 모두 약 6 log CFU/g 수준의 일반세균수가 관찰되었음.



○ Lettuce에서의 세척방법별 바실러스 세레우스 측정결과는 아래 표와 같음.

표 9.27 Lettuce에서의 세척방법별 날짜별 바실러스 세레우스 측정결과

Treatment (n)	<i>Bacillus cereus</i> count (log CFU/g)			
	time (day)			
	0	3	6	9
DW (20)	2.0 ± 1.5 <sup>A</sup>	2.4 ± 1.5 <sup>A</sup>	2.8 ± 1.2 <sup>A</sup>	2.6 ± 1.2 <sup>A</sup>
LA (20)	1.6 ± 1.1 <sup>A</sup>	2.3 ± 1.5 <sup>A</sup>	2.4 ± 1.6 <sup>A</sup>	2.4 ± 1.4 <sup>A</sup>
CH (20)	0.6 ± 1.0 <sup>B</sup>	0.8 ± 1.1 <sup>B</sup>	0.8 ± 1.2 <sup>B</sup>	0.8 ± 1.3 <sup>B</sup>

DW; distilled water, LA; lactic acid, CH; chlorine  
n; sample treated

- 세척당일 측정결과, DW세척군과 LA세척군은 약 2 log CFU/g의 바실러스 세레우스가 관찰되었으며 CH 세척군의 경우 0.6 log CFU/g 수준으로 관찰되었음.
- 이 후, 각 그룹 모두에서 바실러스 세레우스가 소폭 증가하였으나, CH군의 경우 DW군, LA군에 비하여 유의차 있게 낮은 수준의 바실러스 세레우스가 관찰되었음( $p < 0.05$ ).

#### (마) 실험결과2 (sprouts)

○ Sprouts에서의 세척방법별 일반세균수 측정결과는 아래 표와 같음.

표 9.28 Sprouts에서의 세척방법별 날짜별 일반세균수 측정결과

Treatment (n)	Aerobic plate count (log CFU/g)			
	time (day)			
	0	3	6	9
DW (20)	8.1 ± 0.1 <sup>A</sup>	8.2 ± 0.1 <sup>A</sup>	8.4 ± 0.1 <sup>A</sup>	8.6 ± 0.1 <sup>A</sup>
LA (20)	6.7 ± 0.1 <sup>B</sup>	6.7 ± 0.1 <sup>B</sup>	8.2 ± 0.3 <sup>A</sup>	8.6 ± 0.1 <sup>A</sup>
CH (20)	7.1 ± 0.1 <sup>B</sup>	7.1 ± 0.1 <sup>B</sup>	7.9 ± 0.1 <sup>A</sup>	8.4 ± 0.1 <sup>A</sup>

DW; distilled water, LA; lactic acid, CH; chlorine  
n; sample treated

- 세척당일 측정결과, DW 처리군에 비하여 LA, CH 군에서 약 1 log CFU 정도 적은 수의 일반세균수가 관찰되었음.

- 그러나, 저장 6일이 경과하였을 때부터 9일차 까지, 3가지 세척군 모두에서 약 8 log CFU/g 수준의 일반세균수가 관찰되었음( $p > 0.05$ ).
- Lettuce에서의 세척방법별 바실러스 세레우스 측정결과는 아래 표와 같음.

표 9.29 Sprouts에서의 세척방법별 날짜별 바실러스 세레우스 측정결과

Treatment (n)	<i>Bacillus cereus</i> count (log CFU/g)			
	time (day)			
	0	3	6	9
DW (20)	2.6 ± 0.3 <sup>A</sup>	3.1 ± 0.1 <sup>A</sup>	3.1 ± 0.4 <sup>A</sup>	3.0 ± 0.2 <sup>A</sup>
LA (20)	2.5 ± 0.3 <sup>A</sup>	2.9 ± 0.3 <sup>A</sup>	3.1 ± 0.1 <sup>A</sup>	2.9 ± 0.3 <sup>A</sup>
CH (20)	1.8 ± 0.4 <sup>B</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>B</sup>	2.3 ± 0.3 <sup>B</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>B</sup>

DW; distilled water, LA; lactic acid, CH; chlorine  
n; sample treated

- 세척당일 측정결과, DW세척군과 LA세척군은 약 2 log CFU/g 이상의 바실러스 세레우스가 관찰되었으며 CH 세척군의 경우 1.8 log CFU/g 수준으로 관찰되었음.
- 이 후, 각 그룹 모두에서 바실러스 세레우스가 소폭 증가하였으나, CH군의 경우 DW군, LA군에 비하여 유의차 있게 낮은 수준의 바실러스 세레우스가 관찰되었음( $p < 0.05$ ).

#### (바) 실험 결과고찰 / 위생관리지침 제시

- 본 연구를 통하여 lettuce와 sprouts에서 일반세균수와 바실러스 세레우스에 대한 lactic acid와 chlorine 의 세척효율을 평가하였음.
- 평가결과 세척당일에는 일반세균수에서는 세척제의 종류에 관계없이 대조군(증류수 세척군) 대비 낮은 수준의 일반세균수가 관찰되었으나, 저장기간이 증가할수록 대조군과 동일한 수준의 일반세균수가 관찰되었음 (lettuce; 3일차, sprouts; 6일차).
- 바실러스 세레우스의 경우, lettuce와 sprouts 모두에서 Lactic acid으로 세척했을 때, 실험기간(0일-9일) 동안 대조군과 차이 없는 결과를 나타내었으나 ( $p > 0.05$ ), Chlorine으로 세척하였을 때는 지속적으로 대조군 대비 낮은 수준의 바실러스 세레우스가 검출되었음( $p < 0.05$ ).
- 식품의약품안전처에서 고시하는 식품공전에서 신선편의식품의 경우 바실러스 세레우스 규격기준은 1 g 당 1,000 CFU임.

- 본 실험에서 lettuce의 경우 모든 세척군에서 규격기준을 초과하는 수준의 바실러스 세레우스는 검출되지 않았으나, Lactic acid 세척군의 경우 Chlorine 세척군에 비하여 높은 수준의 바실러스 세레우스가 검출되었으며, 그 오염수준은 규격기준(1,000 CFU/g)에 근접하는 수준이었음.

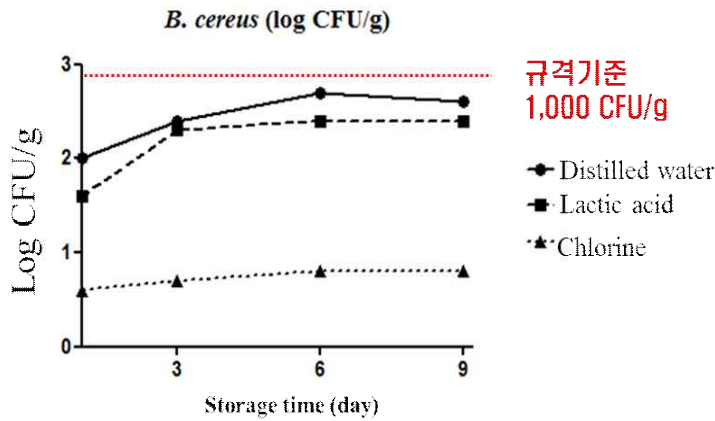


그림 9.21 Lettuce에서의 날짜별 바실러스 세레우스 오염수준

- Sprouts의 경우, Chlorine 세척군을 제외한 다른 세척군에서의 저장 기간 동안 규격기준을 초과 또는 근접한 수준의 바실러스 세레우스가 검출되었음.

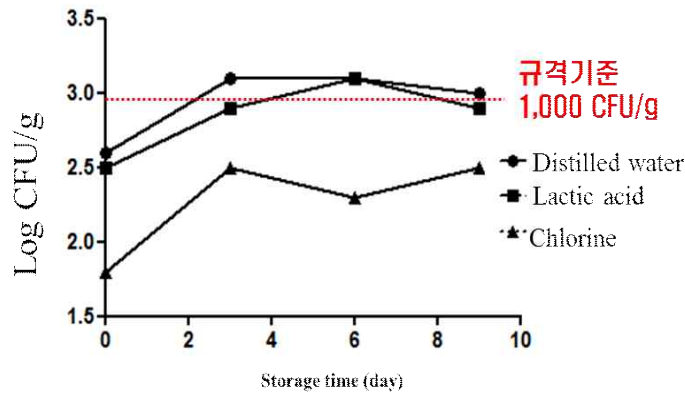


그림 9.22 Sprouts 에서의 날짜별 바실러스 세레우스 오염수준

- 결론적으로 유기농 야채의 경우 수확 후 적용되는 세척제들이 일반 야채의 경우보다 낮은 효율을 나타낼 가능성이 있으므로, 유통 후 수일 이내에 섭취할 것이 권장됨.
- 또는, Retail 단계에서 구매한 유기농 야채의 경우 각 가정에서 섭취 전에 친환경 세척제로 다시 한 번 세척하여 섭취하는 것이 식중독 예방에 도움이 될 것으로 판단됨.
- 일반 야채의 경우, 적합한 수확 후 처리과정을 거쳐서 Cold chain system 상에서 원활하게 유통된 제품의 경우 별다른 처리 없이 섭취가능할 것으로 판단됨.

## 나. GAP·GHP 벤치마킹에 따른 위생관리지침

- 미국의 경우, 1990년 후반부터 과채류 농산물의 미생물학적 식품 위생 확보를 위한 국가적 차원의 위생 관리 지침 개발을 시작하였음
- 1998년 10월 미국 FDA는 미생물에 의한 과채류 농산물 오염의 위험을 감소시키기 위한 포괄적 가이드라인을 발표하였음
- 즉, "신선한 과일과 야채에 대한 미생물 식품 안전 위험을 최소화하기 위한 가이드"(미국 FDA 가이드)는, 오염 고위험지역에 대한 정보 및 오염을 최소화시킬 수 있는 방안에 대해서 제시하고 있음
- 본 가이드의 출시 이후, 과채류 농산물 도매업자 및 식품 소비자들은 제 3자 감사 제도를 통해 Good agricultural practice (GAP) 및 good handling practice (GHP) 준수를 바탕으로 한 안전성이 보장된 상품을 선호하기 시작하였음
- 과채류 산업에서의 적극적 수요로 인하여 USDA Agricultural Marketing Service (AMS) 및 Association of Fruit and Vegetable Inspection and Standardization Agencies (AFVISA) 협업을 통한 FDA guide 준수 여부 감사 프로그램을 실시하였음
- 2001년 8월, USDA AMS는 GAP&GHP 감사에 대한 파일럿 프로젝트를 승인 및 실시하였으며 이듬해 1월에는 최종적으로 USDA GAP&GHP 감사 검증 프로그램을 시행하였음
- 최종적으로 오늘날, 미국의 경우 United States Department of Agriculture (USDA)에서 유통농산물의 위생관리 방안에 대한 가이드라인인 "Good Agricultural Practices and Good Handling Practices Audit Verification Program (2011)"을 제시하기에 이룸



United States  
Department of  
Agriculture

Agricultural  
Marketing  
Service

Fruit and  
Vegetable  
Programs

Fresh  
Products  
Branch

# Good Agricultural Practices and Good Handling Practices Audit Verification Program

## User's Guide

April 2011

<미국 USDA에서 제시하는 GAP & GHP Audit Verification Program>

○ 본 가이드라인은 Agricultural Marketing Service, Fruit and Vegetable Programs, Fresh Products Branch 등 생산/보관/유통/소비 등 전과정에서의 농산물 위생을 위한 가이드라인을 다루고 있음

○ 다음과 같은 흐름을 통해 농산물의 안전을 관리하고 있음

<농산물 안전 관리 체계 흐름>

<b>1. Preparing for an audit</b> - Internal audit - Documentation	<b>1. 감사 준비하기</b> - 내부 감사 - 서류 작성
<b>2. Scheduling an audit</b> - participation agreement	<b>2. 감사 계획하기</b> - 참가자 동의받기
<b>3. The Audit</b> - Initial audit - Follow-up audit - Unannounced verification visit - Performing an audit for a diversified farming operation	<b>3. 감사</b> - 감사 개시 - 후속 감사 - 불시 방문 검증 - 다각도 농장 감사 실시
<b>4. Non-conformity and corrective action policy</b>	<b>4. 부적합 사항 및 개선 조치</b>
<b>5. Audit scopes</b> - GAP&GHP audit is divided into seven sections or scopes, each which covers a specific portion of the supply chain	<b>5. 감사 범위</b> - 7개 분야로 나뉘지며 이들 section은 각각 공급체인의 특이적 부분을 감시하기 위함
<b>6. General questions</b> - Food safety plan - Traceability - Recall program - Worker health and hygiene - Pesticide/chemical use	<b>6. 일반 질문</b> - 식품 안전 계획 - 제조이력 및 유통과정 - 회수 프로그램 - 작업자 건강 및 위생 - 살충제 및 화학제 사용
<b>7. Farm review</b> - Water use - Soil amendments - Animals/wildlife/livestock - Land use& land use history	<b>7. 농장 조사</b> - 농업용수 - 토지 개간 - 동물/야생동물/가축 확인 - 토지 이용 및 토지 이용 이력
<b>8. Field Harvest &amp; Field Packing Activities</b> -Pre-harvest assessment -Field sanitation units	<b>8. 현장 수확 및 현장 포장</b> - 수확전 평가 - 현장 위생 단위

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Harvesting containers &amp; equipment</li> <li>- Transportation of produce</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 수확물 창고</li> <li>- 수확물 이송</li> </ul>
<p><b>9. House Packing Facility</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Water use in packing facility</li> <li>- Treatment of processing water</li> <li>- Sanitation program/general housekeeping</li> <li>- Worker health and hygiene</li> <li>- Container</li> <li>- Pest control</li> </ul>	<p><b>9. 포장시설</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시설내 농업용수 사용</li> <li>- 사용된 물의 처리</li> <li>- 위생프로그램 및 일반 시설관리</li> <li>- 작업자 건강 및 위생</li> <li>- 보관소</li> <li>- 해충 구제</li> </ul>
<p><b>10. Storage and transportation</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mechanical equipment</li> <li>- Ice and refrigeration</li> <li>- Transportation and loading</li> </ul>	<p><b>10. 보관 및 수송</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기계적 장비</li> <li>- 냉동 또는 냉장</li> <li>- 수송 및 선적</li> </ul>
<p><b>11. Wholesale distribution center/terminal warehouse</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Receiving</li> <li>- Sanitation program/general housekeeping</li> <li>- Water use in packing facility</li> <li>- Treatment of processing water</li> <li>- Storage facility/temperature control</li> <li>- Containers</li> <li>- Mechanical equipment</li> </ul>	<p><b>11. 도매센터 / 종합물류창고</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 집하</li> <li>- 위생프로그램 및 일반 시설관리</li> <li>- 사용된 물의 처리</li> <li>- 보관시설 및 온도 조절</li> <li>- 보관소</li> <li>- 기계 장비</li> </ul>
<p><b>12. Preventive food defence procedures</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Food defence plan</li> <li>- Personnel</li> <li>- Facility procedures</li> <li>- Key/Entrance accountability</li> <li>- Deliveries</li> <li>- Separation of products</li> <li>- Allergens</li> </ul>	<p><b>12. 식품안전 예방조치</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식품안전계획</li> <li>- 개인</li> <li>- 시설 절차</li> <li>- 출입 통제</li> <li>- 배달</li> <li>- 생산물 분류</li> <li>- 알러젠 확인</li> </ul>
<p><b>13. USDA GAP&amp;GHP program audit scoring</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Automatic unsatisfactory condition</li> </ul>	<p><b>13. USDA GAP&amp;GHP 프로그램 감사 점수</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 자동적인 불만족 조건</li> </ul>
<p><b>14. Post audit activities</b></p>	<p><b>14. 감사 후 활동</b></p>
<p><b>15. Appeals, complaints &amp; disputes</b></p>	<p><b>15. 어필, 컴플레인 및 논의</b></p>
<p><b>16. Additional resources</b></p>	<p><b>17. 추가 자료</b></p>

- 위 흐름도에서 볼 수 있듯 과일 및 야채의 안전은 생산 전 과정에서 감시 및 이후의 추적까지 포함하는 ‘예방 및 조치’의 두 가지 개념을 모두 포함하고 있음
- 즉, USDA GAP&GHP audit은 7개의 분야로 구성되며, 각 분야는 유통체인의 각 단계들에 대한 위생을 관리하게 됨

- General Questions
- Part 1 – Farm Review
- Part 2 – Field Harvesting & Field Packing Activities
- Part 3 – House Packing Facility
- Part 4 – Storage & Transportation
- Part 5 – (No Longer Used)
- Part 6 – Wholesale Distribution Center/Terminal Warehouse
- Part 7 – Preventative Food Defense Procedures

- 농장 경영자의 경우 재배기가 오기 전부터 감사를 철저히 준비해야하며, 이를 USDA에 보고해 GAP&GHP 이행여부를 등록해야함
- 감사의 범위는 매년 행해지는 농장 및 기기시설의 GAP&GHP 이행여부 감사, 이후에 이뤄지는 후속 감사 뿐 아니라 불시 방문해 지속적인 위생관리를 하고 있는지 현장을 검증하는 불시 감사, 다각도 농장 감사가 시행됨
- 감사의 항목 중 가장 필수적으로 모든 단계에서 이뤄져야하는 항목을 ‘general question’이라고 하며, 이들은 과채류 수확부터 보관 및 수송, 나아가 식품보관 및 예방조치부분까지 모든 단계에서 의무적으로 적용됨. 이는 GAP&GHP가 엄격한 안전관리 체계임을 시사하는 바임
- 감사의 범위는 매년 행해지는 농장 및 기기시설의 GAP&GHP 이행여부 감사, 이후에 이뤄지는 후속 감사 뿐 아니라 불시 방문해 지속적인 위생관리를 하고 있는지 현장을 검증하는 불시 감사, 다각도 농장 감사가 시행됨
- 흥미로운 것은, 농업에 사용되는 농업용수의 종류에 따라서 감사를 아래와 같이 세별하여 실시함. 이는 농업용수가 과채류 농산물의 위생을 저하시킬 수 있는 미생물학적 위해 요인의 오염원으로 작용할 수 있기 때문임

- ▶ **도시용수(Municipal water):** 수질 검사 결과를 지방 행정 기관에서 얻을 수 있으며, 연간 최소 1회의 결과를 얻을 수 있음
- ▶ **저수(Well water):** 재배기에 1회 검사를 실시함. 만약 fecal coliform이 존재하는 경우, 만약 분변지표세균이 존재하는 경우, 해당 저수는 소독 처리하여 병원균의 수준을 감소시

킨 뒤 재검사를 실시해야함. 저수의 관리에서 중요한 것은 저수의 수원지 근처에 동물이 나 가축의 분변 처리소 등이 없어야 하며 주변 환경이 청정해야 한다는 것임

▶ **지표수(Surface water):** 재배기동안 총 3번동안 검사를 실시함 - 파종시기 1회, 사용량이 가장 많은 시기에 1회, 그리고 추수 전 1회

○ 수확 전 평가에서는 아래와 같은 다양한 환경요인을 검사함

- 화장실 및 세척시설은 적절하게 분포되어있는가?
- 농부들에게 충분한 가용수가 공급되고 있는가?
- 수확물 보관소가 청결한가? 또한 적절한 위치에 존재하며 외부 환경으로부터 보호되어있는가?
- 수확 도구들은 모두 사용 가능하며 상태는 청결한가?
- 농경지에 무단 침입은 잘 관리되고 있는가?
- 야생동물에 의한 농작물 피해는 없는가?
- 농작물에 물리적 오염은 존재하는가?
- 석유나 기타 화학약품에 의한 오염이 존재하는가?
- 상기 오염원에 의해 오염된 지역이 있다면, 수확 지역과 구분되어 "수확 금지구역"으로 설정하였는가?
- 그 밖에 식품위생에 영향을 끼칠만한 생물학적 또는 물리적 오염원들 (쓰레기 투기소, 분변처리시설, 소각폐기물, 폐수 등)이 존재하는가?
- 운반도구는 청결하며 사용 가능한가?

○ 수확 후 농업용수(Processing water)의 평가에서는 아래와 같은 항목을 검사함

- 교차오염을 방지하기 위한 소독제 (chlorine and pH)
- 정기적인 채수 및 미생물검사 실시
- 위생을 유지하기 위한 수원 교체
- 수원 교체와 관련하여 SOPs (standard operating procedures or sanitary operating plans)의 설정
- 물을 사용하는 모든 단계에 대해서 물의 소독 및 배관의 접촉면의 위생, 물 저장고의 위생상태 등을 검사
- 합법적인 역류장치 및 공조시설 설치를 통한 오염 방지
- 여과 및 염소소독 장치 등의 상태 점검

○ 이 밖에도 모든 위생 감시 프로그램 및 일반 관리에는 모든 food contact surface 및 농산물과 간접 접촉이 될 수 있는 pipe, duct, fans, ceiling 등의 시설, 작업자 통로 등에 대한 위생 관리 지침을 제시하고 있음



○ 최종적으로, 감사된 항목들을 아래와 같은 차트에 표시

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE Agricultural Marketing Service Fruit and Vegetable Programs Fresh Products Branch		REQUEST FOR AUDIT SERVICES	
(This is the only acceptable form for fax or electronic submission to USDA for audit requests)			
NOTE: Fill in all appropriate blocks. Requested services may be delayed because of incomplete information. Type of service requested must be selected below.			
DATE OF REQUEST:		ANTICIPATED DATE OF AUDIT:	
AUDITEE INFORMATION		FARM/ FACILITY INFORMATION	
Company Name		Location	
Street Address			
City, State & Zip		Total Acres / Total Sq Feet to be audited	
Phone Number			
Contact Person			
APPLICANT INFORMATION		COMMODITIES TO BE COVERED BY AUDIT (Please List)	
Company Name			
Phone Number			
Fax Number			
E-mail			
Contact Person			
TYPE OF AUDIT SERVICES REQUESTED			
Type of Audit(s) Requested (Please choose at least one)		Scope of GAP & GHP Audit (Please choose all that apply)	
<input type="checkbox"/> Good Agricultural Practices & Good Handling Practices (GAP & GHP) (Select Audit Scope(s))		<input type="checkbox"/> Part 1 – Farm Review	
<input type="checkbox"/> Multistate Specific GAP Audit (M-GAP)		<input type="checkbox"/> Part 2 – Field Harvest & Field Packing Activities	
<input type="checkbox"/> Tomato Audit Protocol (T-GAP)		<input type="checkbox"/> Part 3 – House Packing Facility	
<input type="checkbox"/> Leafy Greens Audit (LGMMA)		<input type="checkbox"/> Part 4 – Storage & Transportation	
<input type="checkbox"/> Identity Preservation Audit (IP)		<input type="checkbox"/> Part 6 – Wholesale Distribution Center / Terminal Warehouse	
<input type="checkbox"/> Other, Specify:		<input type="checkbox"/> Part 7 – Preventative Food Defense Procedures	
ADDITIONAL REMARKS			
To download a copy of the USDA Good Agricultural Practices & Good Handling Practices audit checklist, please visit the USDA website at <a href="http://www.ams.usda.gov/audit">http://www.ams.usda.gov/audit</a>			
Once a request has been received, a USDA representative will make contact within 48 hours of receipt to schedule the audit			
According to the Freedom of Information Act of 1986, an agency may not provide or sponsor, and a person is not required to respond to a collection of information unless it displays a valid OIG control number. The valid OIG control number for this information collection is 0581-0225. The time required to complete this information collection is well under average (30 hours per response, including the time for reviewing instructions, searching existing data sources, gathering and maintaining the data needed, and completing and reviewing the collection of information).			
The U.S. Department of Agriculture (USDA) prohibits discrimination in all its programs and activities on the basis of race, color, national origin, age, disability, and where applicable, sex, marital status, parental status, religion, sexual orientation, and/or information, political beliefs, marital or because all or part of an individual's income is derived from any public assistance program. (Not all prohibited bases apply to all programs.) Persons who desire information about our non-discrimination policies, including our complaint procedures, should contact the USDA National Center for Consumer and Complaint Assistance at (202) 720-6380 (voice) or (202) 720-6382 (TDD). USDA is an equal opportunity provider and employer.			

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE Agricultural Marketing Service Fruit and Vegetable Programs Fresh Products Branch		Audit Agreement for Practice & Good Handling Practices Audit Programs (GAP & GHP) Identity Preservation Program (IP) Partners in Quality/Audit Program (PIQ) & Other Audit Programs	
AGREEMENT FOR PARTICIPATION IN AUDIT VERIFICATION PROGRAMS			
Company Information			
I, _____ a duly authorized representative of			
(Insert Name)			
_____		_____	
(Name of Company)		(Street Address, City, State, and Zip Code)	
hereinafter referred to as the applicant, do hereby agree to be audited under the a voluntary USDA, AMS, Fresh Products Branch audit program. The audit shall include verification of the company's farm(s), packing facilities, storage facilities, wholesale distribution centers or other locations as applicable to the audit scope(s).			
1. The applicant agrees that with respect to:			
a. <b>Laws, Regulation, Statutes</b> - To conform with all applicable Federal, State, and local government laws, regulations, or statutes, including, but not limited to: Regulations Governing Inspection and Certification of Fruits and Vegetables and Related Products (7 CFR, Part 52), any other pertinent regulations, and any such instructions covering inspection and certification of the products and verification of the processes as may be issued by AMS.			
b. <b>Audit Request</b> - To contact and schedule the audit with the appropriate federal or federal-state inspection office (using the FV-237A form). The request for the initial audit will be made no later than two (2) weeks prior to the end of the growing/harvesting/packing season.			
c. <b>Records</b> - To maintain all records required by the specific audit program including, but not limited to, quality manual, food safety manual, water test results, employee training records, minutes use records, laboratory testing results and other records as required by the quality manual, food safety manual or specific audit program requirements. The applicant shall make these records available to USDA federal and/or federal-state auditors.			
d. <b>Access to Facilities</b> - To grant permission for AMS authorized personnel to enter any and all farms and/or facilities covered by the specific audit program for the purposes of conducting the audit. This includes the initial audit and any unannounced audits as may be required by the program.			
e. <b>Payment</b> - To pay by credit card, check, draft, or money order drawn to the order of the appropriate federal or federal-state agency for the services covered herein on or before the due date specified on the billing statement. Charges for GAP & GHP audits include, but are not limited to, the audit fee as listed in the fee schedule of Federal Register and travel expenses for the initial audit and any unannounced audits as may be required by the program.			
2. AMS agrees that with respect to:			
a. <b>Perform Audit</b> - To provide objective third-party verification of the applicant's specific audit program using internationally recognized audit principles.			
b. <b>Opening &amp; Exit Interviews</b> - To discuss the audit prior to and report the results and observations with the applicant after each audit and provide a copy of the completed audit report or checklist.			
c. <b>Reports</b> - To issue to the applicant reports of all audits and evaluations of the applicant's specific audit program and provide written notification of any deficiencies found, if any.			
d. <b>Confidentiality</b> - To consider and treat any trade secrets or confidential information as proprietary and confidential. To consider any records and related information provided to AMS as information that is voluntarily submitted to AMS because of their participation in the specific audit program.			
e. <b>Issuance of Certificate, Posting and Sharing Audit Results</b> - To issue a certificate to the applicant and to post audit results to the USDA website, (with the exception of the Preventative Food Defense Procedures scope), only when the applicant receives at least the minimum passing score for each scope being audited. To provide the specific applicant checklist and results of individual questions to other parties only at the written request of the applicant. NOTE: Reports containing a compilation of generic audit information may be shared with the Food and Drug Administration. Any personal information linking the audit results to the auditee shall be redacted prior to issuance.			
FV-237A (09-10)		Page 1 of 2	

○ 또한, 감사에서 지적받은 사항들에 대한 개선 조치를 아래의 양식에 작성하여 USDA에 보고해야 함

○ 이처럼, 선진국인 미국에서는 유통 농산물에서 미생물학적 위해요소의 오염을 최소화시키기 위해서 농업의 모든 단계 뿐만 아니라 농업에 사용되는 토지, 용수, 작업자, 시설, 환경에 대한 모든 사항을 검사하고 있으며, 부적절한 요인이 발견되는 경우 이에 대한 개선사항을 하달하여 즉각적으로 해당 농장이 농산물 위생을 확보할 수 있도록 조치하고 있음

USDA Fruit and Vegetable Programs Good Agricultural Practice & Good Handling Practices		Report #:
CORRECTIVE ACTION REPORT		
Company Name/Farm:	Date:	
Lead Auditor:	Crop:	
Description of Non-Conformity:		
Notified company staff at time of finding non-conformity: YES or NO		
Checklist question number and/or section of auditee food safety plan non-conformity is associated with:		
Company Representative Signature:		
SIGNATURE AFFIRMS FACTS CONCERNING NON-CONFORMITY ARE CORRECT		
Corrective Action Proposed and Time Frame for Implementation: (Attach separate sheet if necessary)		
Auditor Signature for Acceptance of Proposed Corrective Action and Timetable for Implementation:		

Top portion for AUDITOR USE ONLY; bottom portion for Company and Auditor use.

※ 국내 관리 현황 및 이에 따른 벤치마킹 포인트

- 국내에서도 일찍이 우수농산물관리제도 (GAP, Good Agricultural Practices) 도입을 결정하고 우선 2003년부터 2005년까지 3년간 시범사업을 추진하였음
- 2006년 1월 「농산물품질관리법」 시행규칙을 일부 개정하여 우수농산물인증 절차, 인증품의 표시방법 등을 규정하여 2006년도부터 우수농산물품질관리제도를 본격적으로 실시하고 있음
- 또한, 생산이력제(traceability)를 도입하여 유통되는 농·임산물을 역추적 가능하게 함으로써 생산자에게 각 생산단계별 식품안전에 대한 책임성을 부여하고 있음

<GAP 제도 도입경과 및 운영 현황>

- ◎ 약용작물에 대한 GAP 실시 지침마련 및 제도 도입: 2003.03
- ◎ 과일, 채소, 약용작물에 대한 시범사업 실시: 2004.01
- ◎ 농산물품질관리법 개정(GAP도입)으로 법적 근거 마련: 2005.08
- ◎ GAP 제도 시행: 2006.01
- ◎ 제도개선: 농산물품질관리법 개정 (2009.06) 및 하위법령정비 (2009.12)
  - GAP 명칭 변경: 우수농산물관리 → 농산물우수관리
  - 인증대상 품목: 105개 → 전 농산물
  - 농산물 우수관리시설 처리 예외품목 고시
- ◎ GAP 활성화 대책 (2012.07)
  - 인증유효기간: 1년 → 2년
  - 인증신청 및 심사 시 부담경감을 위해 집단인증제 도입
  - 자체 생산한 농산물의 수확 후 관리시설의 GAP 시설 인정기준 마련
  - 기본 교육 의무 이수기준 변경: 1년마다 → 2년에 1회 이상

- 그러나, 현재 국내에 운영 중인 우수농산물관리제도는 진입장벽이 높고, 국내실정에 적합하지 않은 규정들이 많아 현재 GAP로 분류된 농산물은 총 생산의 10% 미만임
- 또한, 국외와 비교하였을 때 생산방식별(유기농, 일반)로 차별화된 위생관리지침 제시가 부족하며, Allergen 제어부분 규정이 미흡함
- 따라서, 국외의 GAP 모델을 벤치마킹하여 국내 실정에 맞는 GAP 간소화 모델을 적용해야

할 것으로 판단됨

○ 국외의 간소화 모델에 착안한 구체적인 간소화 모델 개발 및 적용방법은 아래와 같음

항 목	내 용
1. GAP 인증 절차 통합	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GAP 인증절차 통합 및 구비서류 감축</li> <li>- 이력추적관리 간편화</li> <li>- GAP 지정시설 경유 의무 완화</li> </ul>
2. GAP 인증 기준 내실화/보완	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 생산방식별(유기농, 일반) 위해요소 관리제도 도입</li> <li>- GAP 시설 기준 정비/GAP 인증표시개선</li> <li>- Allergen 제어부분 규정 보완</li> </ul>
3. GAP 교육·컨설팅 강화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GAP 교육·훈련강화</li> <li>- 사후관리 및 컨설팅 지도 강화</li> </ul>
4. 유통·수요기반 강화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GAP 농산물 유통사업단 육성</li> <li>- GAP 농산물 계획거래 추진</li> <li>- 홍보강화</li> </ul>
5. 관련 정책사업과 융복합 연계 강화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GAP 활성화를 위한 정책 사업간 연계 지원 체계마련</li> <li>- GAP 확대 추진협의회 구성·운영</li> </ul>

○ 위의 표와 같이 도입·시행 중인 GAP 제도에서 불필요한 요소들을 제거/간소화 하고 홍보는 강화하며 국가 차원에서 융·복합 사업을 실시한다면 GAP 제도를 확산하고 간소화된 위생관리지침 제시에 도움이 될 것으로 판단됨

## <요약>

### 제9절 유통 농산물에서 식중독 세균 오염률 조사 및 기준규격 개선안 제시

- 국내외 모니터링 선행연구 조사 결과 유통 농산물에서의 식중독균 검출률은 극히 낮은 것으로 보여, 해당 식품으로 부터의 식중독 사고 발생은 대부분 post-contamination에 의한 것으로 보임
- 따라서, 조사결과를 바탕으로 유의미한 결과를 보일 수 있는 indicator (일반세균, 대장균군, 바실러스 외)들을 선정하여 실험을 실시하였으며, 특히 바실러스의 경우 일반제품 보다는 유기농제품에서/ 마트 제품 보다는 농장 샘플에서 오염률이 높았음
- 대상 식중독균 서울시 보건환경연구원 (10종) 및 건국대 자체 모니터링 (7종)을 총 2년간 수행하였으나 사전 조사결과와 마찬가지로 거의 검출이 되지 않음
- 유통농산물 식중독 세균 기준 규격(안)을 설정하기 위해 다양한 국가(호주, 캐나다, 아일랜드, 홍콩, 뉴질랜드, 유럽연합)의 기준을 조사하였으며, 모니터링 결과와 함께 ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods)의 n, c, m, M 기준 설정원칙에 현재까지 진행된 농산물 모니터링 결과와 앞서 진행된 국제적인 미생물 기준을 적용하여 유통농산물에 오염가능성이 있는 7종 식중독 세균에 대한 개별 규격안을 제시하였음
- 모니터링 결과에 따라, 위생관리지침 제시에 적합한 식중독세균이자 포자를 생성하여 소독/세척제제에 대해 저항성이 높은 바실러스 세레우스를 Surrogate로 활용하여, 수확 후 가공과정을 거치지 않은 lettuce 및 sprouts에서 일반세균수 및 B. cereus를 대상으로 재배방식별로 다른 살균소독법(유기산, 염소기반소독제제)을 적용하여 그 소독력을 비교/평가하는 것과 그 결과를 바탕으로 재배유형(유기농, 일반)에 따른 위생관리지침을 제시
- 미국 GAP(Good Agricultural Practice) 및 GHP(Good Handling Practice)에 대해 국내에서도 유사하게 실시하고 있으나, 진입장벽이 높고 국내 실정에 적합하지 않은 규정이 많아 현재 GAP로 분류된 농산물은 총 생산의 10% 이하로 인증절차의 통합 및 간소화 전략을 통해 국내 실정에 맞는 모델의 필요성을 제시

#### 4. 연구개발 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

##### 4-1. 목표달성도

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 지식재산권: 특허 출원 6건, 등록 1건	목표 초과 달성함: 특허 출원 13건, 등록 3건
② 기술실시 2건	목표 달성함: 기술실시 2건
③ 제품화 5건	목표 달성함: 제품화 9건(면역진단 5건, PCR 4건)
④ 학술성과: 논문 12편(SCI 6편, 비SCI 6편)	목표 달성함: 논문 14편(SCI 9편, 비SCI 5편)
⑤ 기타 (당초 목표에 없음)	학술발표 11, 고용창출1건, 인력양성 3건, 홍보전시 4건

##### <1 세부>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 2013 - 2014	3종 식중독 세균 6시간 이내 증균배지 개발	ISO, FDA, USDA, 식품공전 등 국내·외 증균배지 연구결과 조사·분석	100	국내·외 증균배지에 대한 연구결과를 Science direct, PubMed 등에서 조사·분석 하였음.
		증균용 촉진물질/선택증균물 질/선택항생물질 등을 활용 한 6시간 증균배지 개발	100	3종 식중독 세균의 6시간 증균을 위한 배 지를 개발하였음.
	3종 식중독 세균에 대한 100배 농축 기법 개발	식중독 특이항체를 활용한 IBM(immunomagnetic bead) 제작 및 이를 활용한 균농축 법 개발	100	식중독 특이항체를 활용한 IBM (immunomagnetic bead)를 제작하였고, 이 를 활용하여 균 농축법을 개발하였음.
		엽채류 등의 농산물에서 식 중독세균 탈리용액 개발	100	엽채류(시금치, 상추, 콩나물)의 농산물에서 식중독세균 탈리용액을 개발하였음.
1차년도 유관기관 전문가자문위 원회 개최(분기별 1회)	농림부, 식약처, 시도보건환 경연원 등(1세부가 주최, 타 협동기관 모두 참여)	100	분기별로 유관기관 전문가위원회를 구성하 여 다양한 분야의 의견을 수렴하였음.	
2차 년도 2014 - 2015	전년도 개발된 탈리-농축-증 균 배지의 6시간 이내 검출 시스템 최적화	3균종 식중독 세균에 대한 real-time PCR 개발 및 최적화	100	-3종 식중독 세균에 대한 real-time PCR 개 발 및 최적화함
				-3종 식중독 세균의 증균 배지에 대한 농식 품에서의 적용성을 검증함 -Ct, standard curve, Tm 값 결정함 -농식품으로부터 PCR 검출 조건 최적화함
	식중독 세균 3종 PCR 키트	20분 이내 DNA/RNA 추출 키트 개발	100	-20분 이내 DNA/RNA 추출 키트 개발함 -개발한 DNA 추출 키트와 기존 상용 제품과의 추출효율 및 추출 시간 성능

	최적 DNA/RNA 추출 기술 개발 및 키트화		비교 분석함 -각 표적 세균에 대한 DNA 추출 키트 적용 후 추출 DNA에 대한 real-time PCR 검증함
		제2협동기관 (주)코젠바이오텍의 상용화 제품에 적용 검증	100 -신속 DNA 추출 키트를 이용한 각 표적 세균에 대한 DNA 추출 후 real-time PCR 키트로 검증함
	식중독 세균 3종 수출형 신속 검사용 최적 항원 추출법 개발 및 키트화	식중독 세균별 특이 항원 추출 수출형 kit 개발	100 -샘플로부터 표적 항원(세균)을 특이·신속·효율적으로 분리하기 위한 면역자성 분리법의 개발함 -3종 식중독 특이항체를 활용한 IMB (immunomagnetic bead)를 활용하여 세균 농축법을 최적화함
	2차년도 유관기관 전문가자문위원회 개최	농림부, 식약처, 시도보건환경연구원 등	100 -전문가자문위원회 개최함 (분기별 1회씩 총 4/4회)
3차 년도 2015 - 2016	위해 식중독 세균 3종에 대한 신속검사 시스템 개발 검증 및 표준절차 매뉴얼 개발	8시간 이내 신속검사 시스템 개발 및 검증	100 -real-time PCR 개발 및 검증 -면역 래피드 키트의 개발 및 검증 -AOAC 검증 방법을 활용한 다소비 농산물에서 검사시스템의 검증
		농산물 식중독 세균 검사 표준절차 매뉴얼 개발	100 -국내외 농산물에서 식중독세균 검사법 조사 분석을 통한 최적의 표준검사 매뉴얼 개발 -신속검사법을 활용한 presumptive screening 검사 매뉴얼 개발
		농산물에 의한 식중독 위생 관리 개선방안 구축	100 -농산물 생산/소비/유통/소비 과정의 오염원 조사/분석을 통한 관리방안 도출 -농산물 유통 단계별 위생적 처리, 관리 및 보관 방법 등 식중독 위생관리 지침 개발
		농산물에서 식중독 세균 검사/분리/동정을 위한 모니터링 표준화 기법 및 검사 매뉴얼 개발	100 -flow-diagram 사용자 편이 검사 절차 매뉴얼 개발 -FDA/BAM Manual 등 조사 및 참고
		3차년도 유관기관 전문가자문위원회 개최	100 -분기별 1회 개최하여 다양한 분야의 의견을 수렴

<제 1 협동>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	4종 식중독 세균 신속증균배지 개발	국내외 공인검출법에서의 8시간 검사법 적용여부 분석	100	-4종 식중독세균 검출법의 증균시간 및 공인법 등재여부 분석
		신속, 선택적 증균을 위한 배지 조성물 스크리닝 및	100	-증균에 효과적인 후보물질 선정하기 위해 기개발된 상업배지 및 기발표된 논문

		후보군 선정		자료를 분석하고 실험을 통한 후보군 선정	
		세균 손상균 활력증강제 개발	100	-손상균 회복물질 및 물질의 농도별 성장곡선을 작성하여 효과적인 배합비 산정하고 최종 증균배지 완성	
	4종 식중독 세균 농축시스템 개발	선택 농축을 위한 특이 IMB 개발	100	-4종 세균에 대해 적합한 항체 및 magnetic bead를 선정하고 개발된 IMB의 실제 작용 확인	
		IMB를 활용한 균의 분리·농축법 확보	100	-실제 검사에 이용될 농도를 결정하기 위하여 검출한계 검증	
		필터를 이용한 농축기술 개발(캠필로박터)	100	-캠필로박터균의 비교적 작은 사이즈를 이용한 syringe filter법 개발	
	유통농산물에서의 주요 식중독 세균 모니터링	국내외 선행연구에 기반한 대상 농산물 및 주요 세균 선정	100	-실제 미생물학적 오염도를 파악, 분석할 수 있도록 검사항목을 일반세균 및 대장균(균) 정량, 바실러스 세레우스 일반대장균 및 O157 정성으로 결정	
		선정된 검사항목들에 대한 모니터링 수행	90	-일반세균 오염도(양상추/새싹-무순), -유통단계(농장/마트), 재배형태(유기농/일반) 별로 구분하여 모니터링 수행	
	2차년도	전년도 개발된 탈리-농축-증균 배양 기술의 키트화 및 6시간 시료준비 시스템 개발	개발된 증균배지의 stressed cell 회복효과 검증 및 추가 개발	100	-실제 보관환경에 따른 cold-stressed cell의 성장곡선확인 -병원성 대장균용 증균배지의 추가개발 -전년도 개발배지의 살모넬라 단일증균 배지로서의 활용
			고효율 핵산·항원 추출법 개발	90	-단일추출 reagent를 통한 식중독세균 핵산 추출 효율을 순수배양액 및 농산물에서 확인 -4종 식중독세균에 대한 IMS시 결합 및 분리시간 최적화 및 필터법(캠필로박터)를 활용한 항원추출 조건 확립
		1차년도 식중독 세균 모니터링 연구 지속수행	다소비 농산물에서 모니터링 지속수행	100	-19종 다소비 농산물에 대해 식중독세균 모니터링 수행
유통 농산물 및 환경시료에서 식중독 세균 기준·규격(안) 확립		국내외 유통 농산물 기준·규격 조사분석	100	-국내 및 국외 (EU, 미국, 캐나다, 호주, 뉴질랜드, 홍콩, 아일랜드) 유통 농산물 기준·규격 조사분석	
	유통 농산물에서 의 식중독 세균 기준·규격(안) 설정	100	-조사 및 모니터링 내용을 바탕으로 ICMSF(International Commission on Microbiological Specification for Foods) 분석틀을 활용한 개선안 제시		
3차년도	위해 식중독 세균 4종에 대한 신속검사 시스템 개발 검증 및 표준절차 개발	4종 식중독세균 신속검사시스템 개발 및 AOAC법을 활용한 검증	100	-자연오염 농산물 및 인위접종 모델에서 AOAC 검증 방법을 이용한 개발된 수출형 kit의 현장 적용 검증 -안정성, 사용자 편의성을 고려한 One-Step kit를 개발하고 농산물에서의 민감도, 특이도 검증	
		농산물 오염 4종 식중독 세균 검사 표준절차 매뉴얼 개발 및 확립	100	-농산물에서 식중독 세균 검사/분리/동정을 위한 Flow-Diagram식 사용자 편의 검사 절차 매뉴얼 개발	
		농산물에서 식중독 오염	100	-농산물에서 식중독 세균 검사/분리/동정을	

	저감화 방안을 위한 위생관리 개선방안 마련		위한 모니터링 표준화 기법 및 검사메뉴얼 개발을 통하여 위생 관리 개선방안을 제시
	자연오염 농산물에서 AOAC 검증방법을 이용한 개발된 수출형 kit의 현장 적용 검증	100	-농산물에서 4종 식중독균에 대한 qPCR 및 immuno-Rapid kits의 현장 적용 검증
	다소비 농산물 생산에서 소비까지 단계별 식중독 위생관리지침 개발	100	-모니터링 결과를 바탕으로 다소비 농산물 및 환경에서의 오염원인 개선안 구축 -농산물 유통 단계별 위생적 처리, 관리 및 보관방법 등을 고려한 식중독 위생관리지침 개발(제1세부 협력)

<제 2 협동>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	PCR 검출기술 개발	문헌조사	100	-선행연구 결과 조사
			100	-위해 식중독 세균 7종에 대한 특이 유전자 마커 탐색
		식중독 세균 7종의 검출을 위한 conventional PCR system 개발	100	-균별 특이적 프라이머 세트 설계, 개발
			100	-특이도 확인 (Inclusivity, exclusivity)
		식중독 세균 진단용 Real-time PCR system 개발	100	-Target 유전자 선정 및 특이적 프라이머/프로브 디자인
			100	-제작된 프라이머/프로브 확인
			100	-특이도 확인(Inclusivity, exclusivity)
			100	-균별 검출한계 확인
2차 년도	위해 식중독균 동시 검출 수출형 Q-PCR 개발 및 자동분석 시스템 구축	식중독 세균의 동시 검출을 위한 Mutlplex Real-time PCR system 개발	100	- <i>Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Enterohemorrhagic E. coli, Salomonella spp., Campylobacter jejuni</i> 를 grouping 하여 multiplex set 구성
			100	-Multiplex Real-time PCR의 최적 조건 확립
			100	-개발된 기술의 특이도 확인(Specificity test)
			100	-개발된 기술의 민감도 확인
		Real-time PCR 자동분석 소프트웨어 개발	100	-자동분석 소프트웨어 디자인
			100	-소프트웨어 제작
3차 년도	개발된 PCR 기술의 키트화,실시간 진단체계 구축 및 개발	개발된 식중독 세균 검출을 위한 Multiplex Real-time PCR system의 성능 테스트	100	-실제 식품 matrix에 균의 인위적 접종 후 테스트 -민감도 측정, total 분석 시간 측정
		개발된 기술의 키트화	100	-Mutlplex Real-time PCR 세트 별 양성



제품 국내·외 판매		컨트롤 제작, -매뉴얼 제작 -사용자 편의를 고려한 키트내 component 구성 및 제작 -시제품 제작
	개발 기술의 상용화 및 수출기반 확립	100 -키트의 제품화, 판매 개척

**<제 3 협동>**

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	농수산물 위해 식중독 세균에 대한 특이 항체 확보	7종에 대한 상용화된 식중독 세균의 항체를 탐색하고, 실험을 통해서 제품개발에 사용가능한 가를 판단.	100	-식중독균 7종에 대한 항체의 회사별 상용화된 제품 검색
			100	-문헌 및 회사에서 제공하는 정보를 바탕으로 1차 실험용으로 선정 및 확보
	래피드 키트 개발을 위한 스트립 타입 Immuno-chromatograph 기술 최적 조건 확립	항체에 최적화된 항체-금 축합체 조건 확립 실험 수행	100	-항체량에 따른 골드 감도 실험
		검사선용 항체 최적 농도 결정 실험 수행	100	-라인농도에 따른 감도 실험
		검체 전개액에 따른 민감도, 특이도, 비특이도 변화 실험 수행	100	-세균용에 적합한 검체 전개액 성분의 확립
	스트립 타입 Immuno-chromatograph 기술 최적 조건 확립	NC Membrane 선정	100	-1항체별 최상의 결과를 보이는 스트립 선정 실험 수행 (Nupore, 밀리포아, MDI등)
		금-축합체 최적 반응 조건 실험	100	-조건별 금-축합체 제조 및 민감도와 특이도 검사
		최적의 항체 선정을 위한 페어링 실험	100	-조건별로 페어링 실험 진행, -민감도와 특이도, 비특이가 없는 페어링 실험 진행
	2차 년도	식중독 세균 20분 이내 검사용 래피드 키트 개발 및 시제품 제작	스트립 개발	100
검체 전개액 제작			100	-민감도, 특이도, 반응속도를 고려한 검체 전개액 제조
시제품 제작			100	-제품 테스트를 위한 시제품 생산
3차 년도	개발된 키트의 민감도 및 특이도 검사	순수배양액에서의 민감도와 특이도, 검출한계 검사	100	-순수 배양액으로부터 개발 제품의 민감도 및 특이도, 검출한계를 검사
	개발 제품의 Field-test 및 사용자 편의 제품 설명서의 제작	검출하는 기관에서 활용하기 위한 사용설명서 제작	100	-사용자 편의 제품 사용설명서 제작
	개발제품의 상용화 및 수출기반 확립	개발 제품의 홍보 및 영업활동	100	-전시회 홍보 및 사업화 활동

## 4-2. 관련분야 기여도

### ○ 개발된 식중독 세균 신속진단키트: multiplex real-time PCR kit (코젠바이오텍)

- ◆ 식품의약품안전처에서도 「식중독 이동차량 시험법」에서 신속한 원인조사를 위해 Real-time PCR 검출기법을 채택하여 사용하고 있음.
- ◆ 국내에서 코젠바이오텍, 씨젠, LG 생명과학, 솔젠트, 바이오니아, 인트론, 나노바이오시스 등의 분자진단 회사들에서 PCR 키트를 개발 및 상용화하고 있음.
- ◆ 그러나 다중 동시진단 분야에서 multiplex real-time PCR kit는 본 연구팀에서 독보적 기술 및 제품화 기술을 보유하고 있고 시장에 진출하고 있음
- ◆ 개발된 시스템은 사용자 편의성을 고려한 구성품 및 매뉴얼을 제작하여 키트화하였으며 본 연구개발 과제 중 AOAC validation을 수행하여 이 자료를 국내 판매 및 국외로 수출 시 활용할 예정임.
- ◆ 농산물 품질관리에 있어서 최신 진단 기술 트렌드인 Multiplex Real-time PCR 기반의 시약 키트를 제공함으로써 신속하고 정확한 검사법 확립을 통해 유통 전 미생물학적 위해 요소를 신속 발견 및 차단함으로써 농산물 품질 향상과 국민 건강 유지에 기여할 것으로 예상됨.

### ○ 개발된 식중독 세균 신속진단키트: 면역 래피드 키트 (래피젠)

- ◆ 본연구팀의 래피젠은 농산물 식중독 세균 7종 중 5종에 대한 면역래피드 키트를 개발하여 시제품을 만들었으며 해외 시장 진출을 진행 중임.
- ◆ 본 보고서의 “2장 국내외기술개발 현황“에서 언급한 것과 같이 현재 이 분야의 기술 및 키트들은 대부분 해외 기업의 제품이지만 이들 제품의 검출한계나 검출 세균 범위도 한정적임.
- ◆ 현재 기술로 개발된 진단키트 중에 가장 간편하고 신속한 기법은 면역진단키트일 것임. 그러나 항원-항체 면역 반응성 및 항체의 단백질 특성 등에서 오는 고유한 내재적 약점은 대상 세균들의 민감도, 특이도 등에 약점으로 작용함
- ◆ 그래도 본 연구팀의 래피젠은 대표적 7종 식중독 세균 중 5종에 대한 키트를 개발하여 국내외 판매를 예상하고 있음.

### ○ AOAC 기반 검증 기술: 개발된 식중독 세균 신속진단키트들의 국제적 성능/효능 인증

- ◆ 본연구팀이 보유한 AOAC 기반 검증 기술은 개발된 키트들의 검출 성능에 대한 인증 및 인정으로 국내외 비즈니스에 큰 도움이 될 것임.

○ 식중독균 증균배지 기술 개발과 배지의 특허 및 상품화 그리고 신속진단기술과 연계 일원화

- ◆ 현재 진단 기술의 검출한계는 PCR의 경우 >1 copy/PCR 반응 (= 약 >10<sup>2</sup> cfu/g시료), 면역 래피드 키트의 경우 >10<sup>5</sup> cfu/ml 정도.
- ◆ 그러므로 농산물 시료 속의 세균 검출은 전처리과정인 증균의 신속성이 중요해짐.
- ◆ 그러나 세균의 증식속도(generation time, doubling time)에는 한계가 있고 균종마다, 배지 등 환경에 따라 차이가 있음.
- ◆ 본연구팀의 7종 세균에 대하여 개발된 배지들은 6-8시간 내 신속증균하여 약 10<sup>5</sup> cfu/ml 이 가능함을 보여줌. 이것은 1일 이내 (8시간 이내 검사완료) 검사 완료의 목표를 가능하게 함.

4-3. 평가의 착안점 및 기준

평가항목	단위	비중 (%)	세계최고 수준 (보유국/보유기업)	개발목표치	평가방법
1. 대장균 증균시간 단축 배지개발	hr	10	증균시간 6hr (미국/Neogen)	현재 증균시간 대비 10% 이상 단축	-PCR 검출 한계 10 <sup>3</sup> CFU 양성 검출 90% -래피드 키트 검출 한계 10 <sup>4</sup> CFU 양성 검출 90%
2. 살모넬라 증균시간 단축 배지개발	hr	10	증균시간 18hr (미국/Difco)	현재 증균시간 대비 10% 이상 단축	-PCR 검출 한계 10 <sup>3</sup> CFU 양성 검출 90% -래피드 키트 검출 한계 10 <sup>4</sup> CFU 양성 검출 90%
3. 리스테리아 증균시간 단축 배지개발	hr	10	증균시간 24hr (영국/Oxoid)	현재 증균시간 대비 10% 이상 단축	-PCR 검출 한계 10 <sup>3</sup> CFU 양성 검출 90% -래피드 키트 검출 한계 10 <sup>4</sup> CFU 양성 검출 90%
4. 황색포도상구균 증균시간 단축 배지개발	hr	10	증균시간 24hr (미국Difco)	현재 증균시간 대비 10% 이상 단축	-PCR 검출 한계 10 <sup>3</sup> CFU 양성 검출 90% -래피드 키트 검출 한계 10 <sup>4</sup> CFU 양성 검출 90%
5. 바실러스 이질균, 캄필로박터균 증균시간 단축 배지개발	hr	10	증균시간 24~48hr (미국Difco, 영국Oxoid)	현재 증균시간 대비 10% 이상 단축	-PCR 검출 한계 10 <sup>3</sup> CFU 양성 검출 90% -래피드 키트 검출 한계 10 <sup>4</sup> CFU 양성 검출 90%
6. 병원성 대장균 래피드 키트 개발 및 시제품 제작	CFU	10	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup> CFU (미국/Neogen)	검출한계 10 <sup>4</sup> CFU 이하	-농산물에서 최적 증균 후 양성 반응 90% 이상
7. 리스테리아균 래피드 키트 개발 및 시제품 제작	CFU	10	10 <sup>5</sup> ~10 <sup>6</sup> CFU (미국/Neogen)	검출한계 10 <sup>5</sup> CFU 이하	-농산물에서 최적 증균 후 양성 반응 90% 이상
8. 살모넬라 래피드 키트 개발 및 시제품 제작	CFU	10	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup> CFU (미국/Neogen)	검출한계 10 <sup>4</sup> CFU 이하	-농산물에서 최적 증균 후 양성 반응 90% 이상
9. 식중독세균 동시검출 multiplex strip형 키트 개발	종	10	2~4종 (미국/듀폰)	2종 이상 동시 검출 strip형 키트	-농산물에서 최적 증균 후 동시 검출 능력 90% 이상
10. 다소비 농산물 유통 단계별 식중독세균 오염도 분석	CFU	10	100CFU이상 (미국/FDA)	다소비 농산물 5종 이상 20개 이상 샘플에서 100 CFU 이하까지 오염도 분석	-다소비 농산물 단계별 위해 식중독 미생물 오염률 조사 (모니터링) 및 위해요소 통계학적 분석 결과

## 5. 연구개발 결과의 활용계획

코드번호

D-07

### 5-1. 식중독 세균 신속진단키트 : Foodborne Pathogen Multiplex Real-Time PCR Kit

- 본 연구개발 과제를 통하여, 농산물에서 주요 위해요소로 작용하는 7가지 세균 즉, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp. 및 Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)의 동시 검출을 위한 multiplex Real-time PCR 기술을 개발하였으며 총 4건의 상용화 키트를 완성하였음.
- 개발된 키트는 그람 양성균과 그람 음성균을 구분하여 multiplex set를 구성함으로써 PCR 결과에 영향을 미치는 주요 인자인 DNA 추출 효율에 따른 검출 효율의 차이를 최소화하고자 하는 전략을 내세웠음.
- 또한 모든 multiplex set 내부에 PCR 반응의 inhibition 여부를 확인할 수 있도록 IC (internal control)를 첨가하였으며, 이는 template DNA purity에 따른 반응 실패로 나타날 수 있는 위음성 결과를 방지할 목적임.
- 개발된 키트 제품은 사용자 편의성을 고려한 구성품 및 매뉴얼을 제작하여 키트화하였으며 본 연구개발 과제 중 AOAC validation을 수행하여 이 자료를 국내 판매 및 국외로 수출시 활용할 예정임.
- 시제품 제작 후 판매처 확보를 위한 마케팅 활동을 진행하고 있으며, 판로 확대 후 생산량 증가에 따른 고용 창출 효과가 이루어질 것으로 전망됨.

No.	제품명 (by Kogenbiotech)
1	Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR Kit
2	Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR Kit I
3	Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR Kit II
4	Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR Kit III

### 5-2. 식중독 세균 신속진단키트 : Rapigen ImmunoRapid Kit for Detection to Pathogen

- 5종 식중독 세균들에 대한 래피드 키트를 개발하였음(검출 한도가  $10^5 \sim 10^6$  cfu/mL)
- Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*

No.	제품명 (by Rapigen)
1	<i>E. coli</i> O157:H7 검출 키트
2	<i>Listeria monocytogenes</i> 검출 키트
3	<i>Salmonella</i> 검출 키트
4	<i>Shigella</i> 검출 키트
5	<i>Staphylococcus aureus</i> 검출 키트

- 개발된 키트들을 대상으로 국내외 판매를 위한 마케팅을 진행 중이며, 수요가 있는 지역에 대한 네트워크를 구축 중에 있음.
- 향후 골드기반 검출 방법을 형광이나 골드에 효소를 접목시키는 방법 등을 이용하여 검출 한도를 현재의 약  $10^5$  CFU/mL에서  $10^3$  CFU/mL까지 낮추는 키트를 개발할 계획임.

### 3. 신속 증균배지의 개발과 제품화: 식중독 세균 신속진단키트 : 8시간 신속진단 시스템의 개발

- 신속진단시스템에서 진단기기에 의한 자체 시험에 소요되는 시간은 수분에서 2시간 이내로 감소하여 신속해졌음.
- 신속진단시스템의 시료 채취에서 진단/검출까지 전체 과정을 8시간 이내 해결하기 위해서는 신속진단기술이 가지는 검출한계를 해결해야 하며, 이를 위해서는 시료에 존재하는 세균의 수를 검출한계 이상으로 신속하게 증균 하여야 하므로 신속증균배지의 개발이 중요해짐.
- 단일 균종 및 여러 세균들을 동시 증균할 수 있는 배지 개발이 요청되며 진행되고 있음.
- 향후에도 이 분야의 연구개발의 필요성과 수요가 계속 요청될 것으로 전망됨.
- 현재 증균 배지를 진단 기술과 접목하여 One-Step detection system/kit 개발이 시장의 요청(need)이므로, 사용자 편의성을 고려하여 증균배지도 간편한 포장(예, 튜브형 또는 알약형)으로 제공하여 개발된 키트와 한 묶음으로 제품화 하는 것이 선행 과제임

## 6. 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

### 6-1. 면역항체 기반 신속진단 키트 분야

- 현재 면역항체 기반 래피드 키트의 검출 한도는 대개  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL임.
- 최근, 향후 골드기반 검출 방법을 형광이나 골드에 효소를 접목시키는 방법 등을 이용하여 검출 한도를 약 1,000배 낮은  $10^2 \sim 10^3$  CFU/mL까지 검출할 수 있는 방법들이 개발 진행 중임.
- 최근 한 연구 논문의 경우: 백금/금 복합체에 *E. coli* O157:H7 항체와 효소를 결합시켜 감도를 증가시켰다고 보고함(Jiang 외, Biosensors and Bioelectronics 77 (2016)).
- 기술/방법은 peroxidase 효소가 붙어있는 PT/AU bimetal을 전개시킨 후 기질인 TMB를 넣어 주었을 때 감도가 1000배 증가되었으며, 검출한계가  $10^2$  cells/ml 까지 검출 가능하다고 보고함. PT/AU 복합체만의 감도가 본 연구결과의 개발한 키트와 같이  $10^{5 \sim 6}$  cells/ml이 검출한계였음. 이와 같이 골드 기반 제품에서 감도를 더 증가시키는 방법을 고려하여 검출한계를 계속 높이는 연구를 진행할 계획임.
- 현재의 해외 시장 정보에서도 세균의 검출은  $10^5$  cells/ml까지가 거의 한계라고 알려지고 있음. 만일,  $10^3$  cells/ml 수준의 제품을 개발하게 된다면 획기적인 상품이 될 것임. 물론, 각 항체의 민감도 및 특이도 등의 문제 해결이 아직 숙제로 남아 있음.
- 현재 세계 시장에서 식중독 관련 키트를 개발하는 업체는 많지 않으며, 수요 또한 세계적으로 각국의 정부 기관(주로 식품 검사기관)으로 한계가 있음. 따라서 해외에 판매될 경우 대리점을 통한 정부 입찰일 가능성이 매우 높음.
- 한편으로, 사람 관련 일반 질병 진단 키트 분야보다 식품관련 식중독 검사 키트는 시장 진입 절차가 쉽고, 경쟁이 적어 가격 수준이 높게 책정되는 장점도 있음.
- Neogen사의 Reveal 제품 시리즈가 식중독 관련 키트에서는 세계 1위의 점유율을 차지하고 있음. 단 그 회사의 제품은 *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria* 제품 3가지로만 한정되어 있음.

### 6-2. real-time PCR 기반 신속진단 키트 분야

#### (1) 국내 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

- Polymerase chain reaction (PCR)은 DNA 또는 RNA 분절을 다량으로 복제하는 방법으로 oligonucleotide primer 및 DNA 중합효소를 사용하여 가열, 냉각 과정을 반복하여 DNA를 복제하는 기술임.
- Real-time PCR 기술은 기존 PCR 검사의 가양성과 낮은 민감도, 특이도를 극복할 수 있으

며 전기영동 과정이 필요 없이 PCR 반응 중에 증폭되는 과정을 실시간으로 확인이 가능하다는 장점이 있음.

- 주요 활용 분야는 체외진단, 동물질병 진단, 바이오마커 개발, forensic 및 식품안전검사 등이 있음.
- Real-time PCR 기술을 상용화한 국내 기업은 씨젠, 바이오니아, 인트론, 제넷바이오와 본 연구과제의 참여 기업인 코젠바이오텍이 있음.
- 씨젠은 multiplex 기술 최대 보유사이며 주로 체외진단시약을 개발하여 clinical 시장에 집중하고 있으며, 아직 식품안전 분야로의 적극적인 진출은 미비한 상황임.
- 바이오니아와 인트론은 주로 동물질병 진단 시장에 집중하고 있으며, 제넷바이오는 최근 Real-time PCR 키트도 선보이고 있으나 현재까지 conventional PCR 키트의 비중이 높음.
- 본 연구과제의 참여 기업인 코젠바이오텍은 다양한 식중독 관련 pathogen을 검출하기 위한 conventional PCR 및 Real-time PCR 키트를 보유하고 있으며 multiplex Real-time PCR 기술을 이용한 키트의 생산 및 판매량이 높음.
- 특히, 코젠바이오텍의 PowerChek™ 20 pathogen Multiplex PCR kit는 식품 위해 세균의 20개 유전자를 동시에 검출할 수 있는 시약 키트로써 수년간 식품 분야에서의 검증이 이루어진 상태로 「2015년 식중독 원인조사 검사지침」에 등재되어 있어 국가기관 및 식품 제조 회사들에서 신속 검사법으로써 널리 사용하고 있음(출처 : 2015년 식중독 원인조사 시험법, 식품의약품안전처).

## (2) 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

- 국외 식품안전 분야의 Real-time PCR 키트의 주요 생산기업은 DuPont (미국), Lifetechnologies (미국), BioRad (미국), Qiagen (독일) 및 3M (미국) 등이 있음.
- 국내와 달리 국외 시장에서는 AOAC, AFNOR, MicroVal 및 NordVal 등의 인증을 취득해야만 시장에 진입이 가능하다는 특이점이 있으며 현재까지 인증을 받은 제품들은 모두 *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *E.coli* O157:H7 및 STEC에 한정된 singleplex 제품이며, 서로 다른 species의 균을 동시에 검사할 수 있는 multiplex 제품은 없는 실정임.

표 1. 분자진단 기술을 이용한 상용화 키트의 인증 현황

Product Name	Target Organism	Manufacturer	External Validation
3M™ Molecular Detection Assay <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> spp.	3M Health Care	AFNOR #3M 01/11-11/12
ADIAFOOD Detection System: <i>Salmonella</i> species	<i>Salmonella</i> spp.	AES Chemunex Canada	AOAC-RI #070402
ADIAFOOD <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> spp.	AES Chemunex	AFNOR # AES 10/09 - 07/10
Assurance GDS® <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> spp.	BioControl Systems, Inc.	AFNOR # TRA02/12-01/09
Assurance GDS® <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> spp.	BioControl Systems, Inc.	AOAC-OMA #

			2009.03
Atlas™ Salmonella Detection Assay	<i>Salmonella</i> Enterica	Roka Biosciences, Inc.	AOAC-RI # 031201
BAX® Salmonella PCR (BAX® Classic and BAX® Q7) BAX® System with Automated Detection PCR Assay for Screening <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Oxid, Thermo Fisher Scientific	NordVal # 030
BAX® System PCR Assay for <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> spp.	DuPont Qualicon	AOAC-RI # 100201
BAX® System PCR Assay <i>Salmonella</i> spp. (automated)	<i>Salmonella</i> spp.	DuPont Qualicon	AFNOR # QUA 18/03 - 11/02
BAX® System <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> spp.	DuPont Qualicon (DuPont Nutrition & Health Diagnostics)	AOAC-OMA # 2003.09
foodproof® <i>Enterobacteriaceae</i> plus <i>E. sakazakii</i> combined with foodproof® <i>Salmonella</i> Detection Kit	<i>Enterobacteriaceae, Salmonella</i> spp.	BIOTECON Diagnostics GmbH	MicroVal # 2011-LR39
foodproof® <i>Salmonella</i> Detection Kit, Hybridization Probe and foodproof® <i>Salmonella</i> Detection Kit, 5' Nuclease with foodproof® Shortprep I Kit	<i>Salmonella</i> spp.	BIOTECON Diagnostics GmbH	NordVal # 023
foodproof® <i>Salmonella</i> Detection Kit, Hybridization Probe for <i>Salmonella</i> spp. and foodproof® <i>Salmonella</i> Detection Kit, 5' Nuclease for <i>Salmonella</i> spp. in combination with foodproof® ShortPrep I Kit or StarPrep One Kit	<i>Salmonella</i> spp.	BIOTECON Diagnostics GmbH	AOAC-RI # 120301
iQ-Check™ <i>Salmonella</i> II Kit	<i>Salmonella</i> spp.	Bio-Rad Laboratories	AFNOR # BRD 07/06 - 07/04
iQ-Check™ <i>Salmonella</i> II Kit	<i>Salmonella</i> spp.	Bio-Rad Laboratories	AOAC-RI # 010803
iQ-Check™ <i>Salmonella</i> II Kit	<i>Salmonella</i> spp.	Bio-Rad Laboratories	NordVal # 038
MicroSEQ® <i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	Life Technologies	AFNOR # ABI 29/02 - 09/10
MicroSEQ® <i>Salmonella</i> spp. Detection Kit	<i>Salmonella</i> spp.	Life Technologies	AOAC-RI # 031001
Molecular Detection Assay <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> spp.	3M	AOAC-RI # 031208
<i>Salmonella</i> detection method by real-time PCR	<i>Salmonella</i> spp.	Danish Technological Institute, DMRI	NordVal # 041
SAS™ Molecular Tests <i>Salmonella</i> spp. Detection Kit	<i>Salmonella</i> spp.	SA Scientific, Ltd.	AOAC-RI # 021202
SureFood PATHOGEN <i>Salmonella</i> PLUS	<i>Salmonella</i> spp.	CONGEN Biotechnologie GmbH	MicroVal # RQA2008LR43
SureFood PREP <i>Salmonella</i> & SureFood PATHOGEN <i>Salmonella</i> PLUS V/R/LC	<i>Salmonella</i> spp.	CONGEN Biotechnologie GmbH	AOAC-RI # 041103
TaqMan® <i>Salmonella enterica</i> Detection Kit	<i>Salmonella enterica</i>	Applied Biosystems	AFNOR # ABI 29/01 - 09/07
TaqMan® <i>Salmonella enterica</i> Detection Kit	<i>Salmonella enterica</i>	Applied Biosystems	AOAC-RI # 020803
mericon™ <i>Salmonella</i> spp. Kit	<i>Salmonella</i> spp.	Qiagen GmbH	AOAC-RI # 071204
BAX® System Real-Time PCR Assay for <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	DuPont Qualicon	AOAC-RI # 081201
Pathatrix® Auto <i>Salmonella</i> spp Kit Linked to MicroSEQ® <i>Salmonella</i> spp. Detection Kit	<i>Salmonella</i> spp.	Life Technologies	AFNOR # ABI 29/07 - 11/13
3M™ Molecular Detection Assay (MDA) <i>Salmonella</i> Method	<i>Salmonella</i> spp.	3M Food Safety	AOAC-OMA # 2013.09
BAX® System Real-Time PCR Assay for <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> spp.	DuPont Nutrition & Health Diagnostics	AOAC-OMA # 2013.02
BAX® System Real-Time PCR Assay for <i>Campylobacter jejuni, coli, and lari</i>	<i>Campylobacter jejuni; Campylobacter coli; Campylobacter lari</i>	DuPont Nutrition & Health Diagnostics	NordVal # 039
BAX® System Real-Time PCR Assay for <i>Campylobacter jejuni, coli, and lari</i>	<i>Campylobacter jejuni; Campylobacter coli; Campylobacter lari</i>	DuPont Qualicon (DuPont Nutrition & Health Diagnostics)	AOAC-RI # 040702
<i>Campylobacter</i> real-time PCR	<i>Campylobacter</i> spp.	Eurofins Steins, Denmark	
iQ-Check™ <i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter jejuni; Campylobacter coli; Campylobacter lari</i>	Bio-Rad Laboratories	AOAC-RI # 031209
AccuProbe <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	bioMérieux, sa	AFNOR # BIO 12/4 -02/95



ADIAFOOD Advanced Detection System: <i>Listeria</i> spp. environmental sample testing	<i>Listeria</i> spp.	AES Chemunex Canada	AOAC-RI # 021109
ADIAFOOD Detection System: <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	AES Chemunex Canada	AOAC-RI # 040402
ADIAFOOD <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	AES Chemunex	AFNOR # AES 10/08 - 12/09
Atlas® <i>Listeria monocytogenes</i> LmG2 Detection Assay	<i>Listeria monocytogenes</i>	Roka Bioscience, Inc	AOAC-RI # 111301
BAX® system <i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	DuPont Qualicon (DuPont Nutrition & Health Diagnostics)	AOAC-OMA # 2003.12
BAX® System PCR Assay for Genus <i>Listeria</i> 24E	<i>Listeria</i> spp.	DuPont Qualicon (DuPont Nutrition & Health Diagnostics)	AOAC-RI # 050903
BAX® System PCR Assay for Genus <i>Listeria</i> 24E	<i>Listeria</i> spp. excluding <i>L. grayi</i>	DuPont Qualicon (DuPont Nutrition & Health Diagnostics)	AFNOR # QUA 18/06 - 07/08
BAX® System PCR Assay for <i>Listeria monocytogenes</i> 24E	<i>Listeria monocytogenes</i>	DuPont Qualicon (DuPont Nutrition & Health Diagnostics)	AOAC-RI # 080901
BAX® System PCR Assay for <i>Listeria monocytogenes</i> 24E	<i>Listeria monocytogenes</i>	DuPont Qualicon (DuPont Nutrition & Health Diagnostics)	AFNOR # QUA 18/05 - 07/08
BAX® System PCR Assay for <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	DuPont Qualicon (DuPont Nutrition & Health Diagnostics)	AOAC-RI # 070202
BAX® System PCR Assay for Screening Genus <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp. including <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. ivanovii</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i>	DuPont (DuPont Nutrition & Health Diagnostics)	AOAC-RI # 030502
foodproof® <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit in combination with the foodproof® ShortPrep II Kit	<i>Listeria monocytogenes</i>	BIOTECON Diagnostics GmbH	AOAC-RI # 070401
foodproof® <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit, Hybridization Probes and foodproof® <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit, 5' Nuclease in combination with foodproof® ShortPrep II Kit	<i>Listeria monocytogenes</i>	BIOTECON Diagnostics GmbH	NordVal#025
iQ-Check™ <i>Listeria monocytogenes</i> sII	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bio-Rad Laboratories	AFNOR # BRD 07/10 - 04/05
iQ-Check™ <i>Listeria monocytogenes</i> sII	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bio-Rad Laboratories	NordVal#037
iQ-Check™ <i>Listeria monocytogenes</i> II Real Time PCR	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bio-Rad Laboratories	AOAC-RI # 010802
iQ-Check™ <i>Listeria</i> species	<i>Listeria</i> spp.	Bio-Rad Laboratories	AFNOR # BRD 07/13 - 05/07
iQ-Check™ <i>Listeria</i> spp. Real-Time PCR	<i>Listeria</i> spp.	Bio-Rad Laboratories	AOAC-RI # 090701
MICRO-ID <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Organon Teknika Corporation	AOAC-OMA # 992.18
MicroSEQ <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> spp.	Life Technologies SAS	AFNOR # ABI 29/05 - 12/11
MicroSEQ <i>Listeria</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.	Life Technologies SAS	AFNOR # ABI 29/04 - 12/11
MicroSEQ® <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit	<i>Listeria monocytogenes</i>	Applied Biosystems	AOAC-RI # 011002
MicroSEQ® <i>Listeria</i> spp. Detection Kit	<i>Listeria</i> spp.	Applied Biosystems	AOAC-RI # 021108
Molecular Detection Assay <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	3M	AOAC-RI # 081203
ThermoScientific™ SureTect™ <i>Listeria monocytogenes</i> PCR Assay	<i>Listeria monocytogenes</i>	Thermo Fisher Scientific	AOAC-RI # 061302

## 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당 사항 없음		

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
○		

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문)	논문명 (총 14편)	소속 기관명	역할	코드번호		D-12		
					논문게재지	Impact Factor	논문게재 일	사사여부 (단독 중복)	특기사항 (SCI여부)
1	논문	Evaluation of Potassium-Clavulanate-Supplemented Modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar for Enumeration of Campylobacter in Chicken Carcass Rinse	건국대, 강원대	제1저자, 참여저자, 교신저자	Journal of Food Science	1.791	2014-05-01	단독사사	SCI
2	논문	Angiotensin- I Converting Enzyme(ACE) 저해효과를 갖는 Sodium Caseinate 가수분해물의 기능적 특성에 관한 연구: 총설	건국대	제1저자, 참여저자, 교신저자	한국유가공기술과학회지	0	2014-06-01	단독사사	비SCI
3	논문	인간 질병의 위험 요인에 대한 Probiotics의 효과: 총설	건국대	제1저자, 참여저자, 교신저자	한국유가공기술과학회지	0	2014-06-01	단독사사	비SCI
4	논문	Modification of Karmali Agar by Supplementation with Potassium Clavulanate for the Isolation of Campylobacter from Chicken Carcass Rinses	건국대	제1저자, 참여저자, 교신저자	Journal of Food Protection	1.797	2014-07-01	단독사사	SCI
5	논문	Comparison of Culture, Conventional and Real-time PCR Methods for Listeria monocytogenes in Foods	건국대	제1저자, 참여저자, 교신저자	Kor. J. for Food Science of Animal Resources	0.253	2014-11-28	단독사사	SCI
6	논문	Detection and Enumeration of Lactic Acid Bacteria, Acetic Acid Bacteria and Yeast in Kefir Grain and Milk Using Quantitative Real-time PCR	건국대	제1저자, 참여저자, 교신저자	Journal of Food Safety	0.931	2015-02-01	단독사사	SCI
7	논문	Probiotics를 이용한 새로운 건강 증진 기능성 유제품 개발에 관한 연구: 총설	건국대	제1저자, 참여저자, 교신저자	한국유가공기술과학회지	0	2015-03-01	단독사사	비SCI
8	논문	Prevalence and characterization of extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in ready-to-eat vegetables	건국대	제1저자, 참여저자, 교신저자	International Journal of Food Microbiology	3.082	2015-08-17	단독사사	SCI
9	논문	Quantitative Prevalence and Toxin Gene Profile of Bacillus cereus from Ready-to-Eat Vegetables in South Korea	건국대, 강원대	제1저자, 참여저자, 교신저자	Foodborne Pathogens and Diseases	1.905	2015-08-28	단독사사	SCI
10	논문	Rapid, Sensitive, and Specific Detection of Salmonella Enteritidis in Contaminated Dairy Foods using Quantum Dot Biolabeling Coupled with Immunomagnetic Separation	건국대	제1저자, 참여저자, 교신저자	J. Milk Sci. Biotechnol.	0(?)	2015-12-01	단독사사	비SCI
11	논문	Citrobacter braakii: A Major Cause of False-Positive Results on MacConkey and Levine's Eosin-Methylene Blue Selective Agars Used for the Isolation of Escherichia coli from Fresh Vegetable Samples	건국대	제1저자, 참여저자, 교신저자	Journal of Food Safety	0.915	2016-02-01	단독사사	SCI
12	논문	Dynabeads Protein G Antibody Conjugates Combined with Modified Brain Heart Infusion Broth for the Enrichment and Separation of Bacillus cereus in Artificially Contaminated Vegetables	강원대	제1저자, 참여저자, 교신저자	Food Science and Biotechnology	0.699	2016-06-30	단독사사	SCI
13	논문	Antimicrobial activity of epigallocatechin gallate from green tea (Camellia sinensis) on pathogenic Salmonella Enteritidis in braised quail eggs	건국대	제1저자, 참여저자, 교신저자	Korean J. Food Sci. Technol.	0	2016-08-31	단독사사	비SCI
14	논문	Highly efficient and specific separation of Staphylococcus aureus from lettuce and milk using Dynabeads protein G conjugates	강원대	제1저자, 참여저자, 교신저자	Food Science and Biotechnology	0.699	2016-10-30	단독사사	SCI

<특허 출원 및 등록: 총 16건>

	출원연 도	특허명	출원인	출원국	출원번호
1	2013.10.	트리클로산이 첨가된 개선된 배지 조성물 및 그 용도 (T-bolton)	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2013- 0119310
2	2013.11.	증균배지가 들어있는 멸균백, 그 제조방법 및 그 응용	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2013- 0135380
3	2013.12.	혈청을 포함하는 캄필로박터에 대한 배지 조성물과 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2013- 016747
4	2014.04.	캄필로박터 특이 크로모제닉 액체배지 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2014- 0038841
5	2014.04.	케피어 발효유 감별 및 락토바실러스 케피라노팍시엔스 유산균 특이적인 정량 검출용 조성물 및 그 검출 방법	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2014- 0040636
6	2014.04.	케피어 발효유 내 미생물 그룹별 정량적인 실시간 중합효소 연쇄반응 분석용 조성물 및 그 분석방법	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2014- 0041430
7	2014.11.	크로노박터 검출을 위한 선택증균용 배지 조성물 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2014- 0165221
8	2014.10.	크로노박터균과 살모넬라균 검출을 위한 증균배지 조성물 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2014- 0136929
9	2015.06.	세포테탄을 포함하는 캄필로박터에 대한 민감성 및 선택성을 개선한 볼튼 배지 조성물 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2015- 0081979
10	2015.06.	세포테탄을 포함하는 캄필로박터에 대한 민감성 및 선택성을 개선한 배지 조성물 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2015- 0081316
11	2015.06.	세폭시틴을 포함하는 캄필로박터에 대한 민감성 및 선택성을 개선한 볼튼 배지 조성물 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2015- 0082585
12	2015.06.	세폭시틴을 포함하는 캄필로박터에 대한 민감성 및 선택성을 개선한 배지 조성물 및 그 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2015- 0081978
13	2015.12.	2차 증균과정 생략이 가능한 살모넬라균 단일증균배지 조성물, 그 제조방법 및 그 용도	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-2015- 0172451
	등록연 도	특허명	등록인	등록국	등록번호
1	2014.01.	캄필로박터에 대한 민감성 및 선택성을 개선한 배지 조성물 및 그 제조방법 (CCPD)	건국대학교 산학협력단	대한민 국	10-13504 44
2	2015.02.	트리클로산이 첨가된 개선된 배지 조성물 및 그 용도	건국대학교 산학협력단	대한 민국	10-14932 30
3	2015.07.	증균배지가 들어있는 멸균백, 그 제조방법 및 그 응용	건국대학교 산학협력단	대한 민국	10-15367 05

<제품화: 총 9건>

번호	구분	제품명(내용)	개발자	역할
1	제품개발	Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR Kit	(주)코젠바이오텍	개발
2	제품개발	Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR Kit I	(주)코젠바이오텍	개발
3	제품개발	Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR Kit II	(주)코젠바이오텍	개발
4	제품개발	Foodborne Pathogen Multiplex Real-time PCR Kit III	(주)코젠바이오텍	개발
5	제품개발	<i>E. coli</i> O157:H7 검출키트	(주)래피젠	개발
6	제품개발	<i>Listeria monocytogenes</i> 검출키트	(주)래피젠	개발
7	제품개발	<i>Salmonella</i> 검출키트	(주)래피젠	개발
8	제품개발	<i>Shigella</i> 검출키트	(주)래피젠	개발
9	제품개발	<i>Staphylococcus aureus</i> 검출키트	(주)래피젠	개발

<학술 발표: 11편>

번호	발표자	발표제목	학회명	발표일시	장소/국명
	오덕환	<i>Improved Detection of Staphylococcus aureus with Medium Combined with Immunomagnetic Separation in Lettuce and Sprouts</i>	IAFP 2015 (International Association for Food Protection)	2015-07-25	미국 포틀랜드
2	오덕환	<i>Rapid Detection of Bacillus cereus by Immunomagnetic Separation and Real-time PCR</i>	IAFP 2015 (International Association for Food Protection)	2015-07-25	미국 포틀랜드
3	Shuai Wei	<i>Rapid Detection of Listeria monocytogenes using real time PCR based on immunomagnetic separation in spinach and sprouts</i>	한국식품영양과학회 2015년도 국제심포지엄, 정기학술대회	2015-08-24	강원도 평창 알펜시아 리조...
4	Shuai Wei	<i>Detection of Bacillus Cereus by enrichment medium combined immunomagnetic separation in lettuce and spinach</i>	한국식품영양과학회 2014년도 국제심포지엄, 정기학술대회	2014-10-28	대한민국 대전컨벤션 센터
5	Shuai Wei	<i>Development of enrichment medium modified brain heart infusion combined immunomagnetic separation for detection of Listeria monocytogenes in lettuce</i>	한국식품영양과학회 2014년도 국제심포지엄, 정기학술대회	2014-10-28	대한민국 대전컨벤션 센터
6	김영지	<i>Improvement of Karmali Agar by Supplementation with Tazobactam Sodium Salt for Detecting Campylobacter from Chicken Carcass Rinse</i>	2015 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	2015-06-03	BEXCO, Busan, Korea
7	김홍석	Development of a Single-step Enrichment Medium for Non-chromogenic Detection of Salmonella spp. in Fresh Vegetables	2015 KoSFoST International Symposium and Annual Meeting	2015-06-03	BEXCO, Busan, Korea
8	김홍석	<i>In vitro selection of RNA Aptamers that specifically bind to Staphylococcus aureus enterotoxin A</i>	Aptamer 2015	2015-03-31	St Hilda's College, Oxfo...
9	김영지	<i>Selection and Identification of single-stranded DNA Aptamers Targeted to Cronobacter sakazakii</i>	Aptamer 2015	2015-03-31	St Hilda's College, Oxfo...
10	김영지	<i>Improvement of Karmali Agar by Supplementation with Tazobactam for Detecting Campylobacter from Chicken Carcass Rinse</i>	IAFP 2016 (International Association for Food Protection)	2016-08-02	St. Louis, USA
11	서건호	<i>Improvement of Polymyxin-Egg Yolk-Mannitol Bromothymol Blue Agar for the Enumeration and Isolation of Bacillus cereus in Various Foods</i>	IAFP 2016 (International Association for Food Protection)	2016-08-02	St. Louis, USA

<기술실시 2건>

번호	기술실시 계약명	대상기관명	실시기술권 유형	실시기 술 유형	기술실시 형태	유무상 여부	기술실시계약 년도
1	농산물 위해 식중독균 검출용 Real-Time PCR 법	(주)코젠바이오텍	직접실시	노하우	영리법인 직접실시	유상	2016
2	식중독균 신속검사 키트의 생산	(주)래피젠	직접실시	노하우, 기타	영리법인 직접실시	유상	2016

11. 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당없음	

## 12. 참고문헌

코드번호	D-14
Andreas V., Victoria L., Maria A., Charalambos K., Leondios B., Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis in environmental and clinical samples, BMC Microbiology, 9:97 (2009)	
Andrew D. Sails, Andrew J. Fox, Frederick J. Bolton, David R. A. Wareing, David L. A. Greenway, A real-time PCR assay for the detection of campylobacter jejuni in foods after enrichment culture, Applied and environmental microbiology, 69(3), 1383-1390 (2002)	
Chengbo Yang, Yuan Jiang, Kehe Huang, Changqing Zhu, Yulong Yin, Application of real-time PCR for quantitative detection of Campylobacter jejuni in poultry, milk and environmental water, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 38, 263-271 (2003)	
Cho, J.I., Lee, S.H., Lim, J.S., Kwak, H.S., Wang, I.G.: Development of predictive model describing the growth of Listeria monocytogenes in fresh cut vegetable. J. Fd Hyg. Safety, 26(1), 25-30 (2011)	
Fedio WM, Jinneman KC, Yoshitomi KJ, Zapata R, Wendakoon CN, Browning P, Weagant SD. Detection of E. coli O157: H7 in raw ground beef by Pathatrix™ immunomagnetic-separation, real-time PCR and cultural methods. Int. J. Food Microbiol. 148: 87-92 (2011)	
Feldsine, Philip, Carlos Abeyta, and Wallace H. Andrews. "AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis." Journal of AOAC International 85.5 (2002): 1187-1200.	
Fricker M, Reissbrodt R, Ehling-Schulz M. Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of Bacillus cereus. Int. J. Food Microbiol 121: 27-34 (2008)	
Hyun-Joo Kim, Yong-Soo Kim, Myung-Sub Chung, Deog-Hwan Oh, Gyung-Jin Bahk, Hyang-Sook Chun, and Sang-Do Ha, Trends in Rapid Detection Methods for Food-borne pathogenic Microorganisms by Using New Technologies, Journal of Food Hygiene and Safety 25 (2010) 376-387	
J.E. Olsen, S. Aabo, O.F. Rasmussen and L. Rossen, Oligonucleotide probes specific for the genus Salmonella and for Salm. typhimurium, Letters in Applied Microbiol. 20, 160-163 (1995)	
Jimenez, K.B., McCoy, C.B., Achi, Ro, Detection of Shigella in lettuce by the use of a rapid molecular assay with increased sensitivity, Brazilian J of Microbiol, 41, 993-1000 (2010)	
Jothikumart, N., Griffiths, M.W., Rapid Detection of Escherichia coli O157:H7 with Multiplex Real-Time PCR Assays. American Society for Microbiology 68, 3169-3171 (2002)	
KATARÍNA ORAVCOVÁ, TERÉZIA TRNČÍKOVÁ, EVA KACLÍKOVÁ, Comparison of three real-time PCR-based methods for the detection of Listeria monocytogenes in food. Journal of Food and Nutrition Research 46, 63-67 (2007)	
Kim D-H, Kim H, Chon J-W, Moon J-S, Song K-Y, Seo K-H. Development of	

blood-yolk-polymyxin B-trimethoprim agar for the enumeration of *Bacillus cereus* in various foods. *Int. J. Food Microbiol* 165: 144-147 (2013)

Kwon, J.W., Lee, C.H., Trends of Recent Food-Borne Disease Outbreaks in Korea. *대한 의사협회지*, 50, 573-581 (2007)

Lee S.H., Jung, B.Y., Rayamahji, N., Lee, H.S., Jeon, W.J., Choi, K.S., Kweon, C.H., Yoo H.S., A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. *Journal of Veterinary Science* 10, 43-51 (2009)

Li, Jun, et al. "Samsung *Salmonella* Detection Kit." *Journal of AOAC International* 95.6 (2012): 1656-1668.

Linda S, Uknalis J, Tu S-I. Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats. *J. Immunol. Methods*. 256: 11-18 (2001)

Mackay, IM., Arden, KE., Nitsche, A., Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30(6), 1292-1305 (2002)

Mao Y, Huang X, Xiong S, Xu H, Aguilar ZP, Xiong Y. Large-volume immunomagnetic separation combined with multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanoviini* in lettuce. *Food Control* 59: 601-608 (2016)

Mily Leblanc Maridor, François Beaudreau, Henri Seegers, Martine Denis, Catherine Belloc, Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by real-time PCR in pure cultures and in complex samples, *BMC Microbiology*, 11(113), 1471-2180 (2011)

Oliwa-Stasiak, K., Molnar, C.I., Arshak, K., Bartoszcze, M., Adley, C.C.: Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species. *J of Appl Microbiol*, 108, 266-273 (2010)

Parham N, Spencer J, Taylor D, Ternent H, Innocent G, Mellor D, Roberts M, Williams A. An adapted immunomagnetic cell separation method for use in quantification of *Escherichia coli* O157: H7 from bovine faeces. *J. Microbiol. Meth.* 53: 1-9 (2003)

Prentice N, Murray JS, Scott MF, Coombs JP, Parton A. Rapid isolation and detection of *Escherichia coli* O157: H7 in fresh produce. *J. Rapid Meth. Aut. Mic.* 14: 299-308 (2006)

Petrauskene, Olga V., et al. "Evaluation of Applied Biosystems MicroSEQ® Real-Time PCR System for Detection of *Listeria* spp. in Food and Environmental Samples." *Journal of AOAC International* 95.4 (2012): 1074-1083.

Rida A, Gijis M. Manipulation of self-assembled structures of magnetic beads for microfluidic mixing and assaying. *Anal. Chem.* 76: 6239-6246 (2004)

Shan S, Zhong Z, Lai W, Xiong Y, Cui X, Liu D. Immunomagnetic nanobeads based on a streptavidin-biotin system for the highly efficient and specific separation of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 45: 138-142 (2014)

Shukla S, Lee G, Song X, Park S, Kim M. Immunoliposome-based immunomagnetic concentration and separation assay for rapid detection of *Cronobacter sakazakii*. *Biosens. Bioelectron.* 77: 986-994 (2016)

- Sun W, Khosravi F, Albrechtsen H, Brovko L, Griffiths M. Comparison of ATP and in vivo bioluminescence for assessing the efficiency of immunomagnetic sorbents for live *Escherichia coli* O157: H7 cells. *J. Appl. Microbiol.* 92: 1021–1027 (2002)
- Zahraei, T. Salehi, M. Mahzounieh et al., Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method, *Int. J. Poult. Sci.* 2005(8) 557:559
- Tao Jiang, Yang Song, Tianxiang Wei, He Li, Dan Du, Mei-Jun Zhu, Yuehe Lin, Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 using Pt–Au bimetal nanoparticles with peroxidase-like amplification, *Biosensors and Bioelectronics* 77 (2016) 687–694
- Tu S–I, Reed S, Gehring A, He Y, Paoli G. Capture of *Escherichia coli* O157: H7 using immunomagnetic beads of different size and antibody conjugating chemistry. *Sensors* 9: 717–730 (2009)
- Varshney M, Yang L, Su X–L, Li Y. Magnetic nanoparticle–antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli*O157:H7 in ground beef. *J. Food Prot* 68: 1804–1811 (2005)
- Wang H, Li Y, Wang A, Slavik M. Rapid, sensitive, and simultaneous detection of three foodborne pathogens using magnetic nanobead–based immunoseparation and quantum dot–based multiplex immunoassay. *J. Food Protect.* 74: 2039–2047 (2011)
- Weagant SD, Bound AJ. Evaluation of techniques for enrichment and isolation of *Escherichia coli*O157:H7 from artificially contaminated sprouts. *Int. J. Food Microbiol* 71: 87–92 (2001)
- Weagant SD, Jinneman KC, Yoshitomi KJ, Zapata R, Fedio WM. Optimization and evaluation of a modified enrichment procedure combined with immunomagnetic separation for detection of *E. coli*O157:H7 from artificially contaminated alfalfa sprouts. *Int. J. Food Microbiol* 149: 209–217 (2011)
- Weagant SD. Detection of *E. coli* O157: H7 in raw ground beef by Pathatrix™ immunomagnetic–separation, real–time PCR and cultural methods. *Int. J. Food Microbiol.* 148: 87–92 (2011)
- Wei, S., Forghani, F., Park, Y. S., Park, B. J., Seo, K. H., & Oh, D. H. (2016). Dynabeads protein G antibody conjugates combined with modified brain heart infusion broth for the enrichment and separation of *Bacillus cereus*. *Food Science and Biotechnology*, 25(3), 941–947.
- Xiong Q, Cui X, Saini JK, Liu D, Shan S, Jin Y, Lai W. Development of an immunomagnetic separation method for efficient enrichment of *Escherichia coli*O157:H7. *Food control* 37: 41–45 (2014)
- Yang H, Qu L, Wimbrow AN, Jiang X, Sun Y. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle–based immunomagnetic separation and realtime PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 118: 132–138 (2007)
- Zhu P, Shelton DR, Li S, Adams DL, Karns JS, Amstutz P, Tang C–M. Detection of *E. coli* O157: H7 by immunomagnetic separation coupled with fluorescence immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* 30: 337–341 (2011)



## 8. 뒷면지

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.