

원유로부터 *Listeria monocytogenes*의 신속검색을 위한 종합효소 연쇄반응법의 개선

이철현 · 손원근* · 강호조

경상대학교 수의과대학
경상대학교 동물면역연구소*
(1995년 9월 18일 접수)

Improvement of polymerase chain reaction methods for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk

Chul-hyun Yi, Won-geun Son*, Ho-jo Kang

College of Veterinary medicine Gyeongsang National University
Animal Immunology Research Institute, Gyeongsang National University*

(Received Sep 18, 1995)

Abstract : The present study was conducted to rapidly detect *Listeria monocytogenes* in raw milk. Specificity and sensitivity of polymerase chain reaction(PCR) technique, and direct PCR were examined in raw milk, also were compared the classical culture methods with PCR technique. This method used a pair of primers based on a unique region in the 16S rRNA sequence of *L. monocytogenes*.

In the PCR specificity tests, each of the 10 strains of *L. monocytogenes* tested gave a single 70-bp band. But the other six *Listeria* spp tested gave negative results. Results of the sensitivity tests showed that as few as 2 CFU of *L. monocytogenes* in pure cultures could be detected with 16S rRNA-based primers, L-1 and L-2. In different PCR cycles, a PCR product was detected with 10^3 cells of *L. monocytogenes* from 25 cycles to 50 cycles and the concentration of PCR products was cycle-dependent.

Raw milk samples added *L. monocytogenes* cells gave negative results. However, these samples gave a single 70-bp band by pretreatment of pronase, and PCR products were detected with 10^3 cells of *L. monocytogenes*. To determine the most sensitive culture protocol to use in conjunction with the PCR assay, raw milk samples were inoculated with *L. monocytogenes* at concentrations ranging from 1 to 5.7×10^6 CFU/ml. PCR assays from *Listeria* enrichment broth(LEB) containing raw milk samples added *L. monocytogene* EGD could detect 10 cells in pronase-pretreated samples without incubation, and 1 cell of *L. monocytogenes* in both 12 hr and 24 hr incubation, respectively. Isolation rate of PCR assays was similar to that of classical culture methods, but required time for detection of *L. monocytogenes* could remarkably be reduced compare to culture methods.

Key words : raw milk, PCR, *Listeria monocytogenes*.

Address reprint requests to Dr Ho-jo Kang, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Republic of Korea.

서 론

*Listeria monocytogenes*는 Gram 양성, 비아포성의 통성혐기성 간균이며, 냉온성의 미생물로서 자연계에 널리 분포하고 있다^{1,2}. 이 세균에 의한 사람에서의 리스테리아증은 1923년 미국에서 처음 보고되었으나 '80년대 이전까지 리스테리아병은 반추수에서 뇌막염을 일으키는 질병으로써 감염동물과 접촉하는 양축가와 수의사 등에서 산발적으로 발생하는 인수공통전염병으로 알려져 왔다³. 그리고 이 질병은 면역결핍환자, 신행아 및 임신부에서 산발적으로 발생하는 것으로 보고되어 왔으나⁴ 1983년 미국 Massachusetts주에서 본 균에 오염된 저온살균유를 먹고 47명이 감염되어 17명이 사망하였고⁵, 1985년에는 Los Angeles에서 멕시코 치즈의 오염에 기인된 142명의 환자중 49명이 사망하는 등^{6,7}, 리스테리아증이 식품을 매개로 하여 집단발생됨이 입증됨으로써 식품위생에서 중요한 병원체로 부각되었다.

근년 미국 질병예방센터의 보고에 의하면 미국에서만 매년 1,600건 이상의 리스테리아증이 발생하여 400여명이 사망하였고⁸, Seeliger⁹는 1990년까지 리스테리아병은 10,000여건이 발생되었다고 하였다. 그러나 진단방법이 비교적 발달한 북미나 유럽 등 선진국에서 이 질병이 주로 발생되었고 전세계적으로 원인균 검출기술이 널리 보급되지 않은 실정이므로 이 숫자는 전체 발생건수의 아주 적은 부분에 지나지 않을 것이라고 하였다. 이와같이 국내에서도 본 균에 대한 연구가 부족한 실정이고, 또 검색기술이 취약한 현실로 미루어 보아 이들 질병발생이 거의 보고되지 않는 것은 정확한 원인균 검색이 이루어지지 않기 때문이라고 볼 수 있다.

식품에서 *L. monocytogenes*를 검색하는 방법 가운데 일반적으로 널리 이용되고 있는 미생물학적 배양법은 본 균을 분리, 동정하는데 너무 많은 시간을 요하고¹⁰⁻¹², 방법 또한 까다로우며 실험자의 많은 경험을 요구하는 등의 여러 문제점들을 내포하고 있다. 따라서 최근에 몇가지 개선된 방법들이 보고되어 있고^{13,14}, 국내에서도 강 등¹⁵이 modified FDA 및 modified USDA 방법을 개발하여 보고한 바 있다. 그러나 이들 변형된 방법들은 분리효율을 높이는 하였으나 동정을 위해서는 증균을 통한 순수한 *L. monocytogenes*의 집락을 얻어야 하므로 많은 시간이 소요되는 단점을 극복하기는 어렵다¹⁶.

근년 검색이 빠르고 특이적인 대체방법으로서 면역학적 방법 즉, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)가 Kerr et al¹⁷과 Mattingly et al¹⁸에 의해

보고된 바 있다. 그런데 ELISA 그 자체는 2.5시간 밖에 걸리지 않지만, $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml의 균수가 필요한 검출한계 때문에 증균 및 도말배양이 필요하므로 시간이 많이 소요되는 단점이 있다. 또한 병원균인 *L. monocytogenes*와 비병원균인 *L. innocua*를 구별할 수 없기 때문에 *L. monocytogenes*만이 분비하는 단백질인 listeriolysin O와 지연형 과민반응 인자를 검출하는 등 *L. monocytogenes*를 확인하는 작업이 뒤따라야 한다¹⁸.

최근 분자생물학의 발달로 *L. monocytogenes*를 순수 배양하지 않고도 특이적인 유전자 탐침(probe)을 이용하여 식품시료내에서 본 균을 검출할 수 있게 되었다¹⁹. 유전자 혼성화(hybridization)기법을 이용하여 본 균을 동정하려는 시도는 주로 병원성 인자를 가진 유전자를 검출하는데 목적이 있으며, listeriolysin O의 생산을 지배하는 *hlyA* 유전자²⁰를 비롯하여 β -haemolysin²¹, *msp*²¹, *dtr*²², *iap*²³⁻²⁴ 유전자 등을 목적유전자로 하여 혼성화한 결과들이 보고되어 있다.

이러한 여러 DNA probe를 이용한 검출방법의 중요한 단점은 많은 목적의 세균들이 존재하는 상태에서 확실한 결과를 얻기 위해서는 상대적으로 $10^4 \sim 10^5$ cells 수준의 세균이 존재해야 한다는 것이다^{10,12}. 또한 일이 많고 조작이 까다로우며, 많은 비용을 부담해야 하고 표준화 하기도 어렵다²⁵. 이러한 단점을 보완하여 16S rRNA sequence를 인식하는 특이적인 probe를 이용한 혼성화 기법이 보고되었으며^{26,27}, 이 DNA probe는 다른 DNA probe보다 서로 다른 미생물을 구별하는데 있어 특이적이고 감도가 매우 높으며^{12,28,29} 상품화 되어 있다^{12,30}. 그러나 이 kit를 이용하여 분석하려면 하룻밤의 예비배양과 luminometer가 필요하고²⁹, *L. monocytogenes*에만 특이적인 것이 아니라 다른 *Listeria* spp와도 반응하는 단점이 있다¹². De-long et al³⁰은 포르말린에 고정된 세균의 16S rRNA에 형광체를 표지한 oligodeoxynucleotide를 반응시켰을 때 single cell까지 검출할 수 있고, Giovannoni et al³¹도 방사성 동위원소가 표지된 16S rRNA-based probe와 microautoradiography로 single cell까지 검출했다고 보고한 바 있으나, Wang et al³²은 이들 방법이 매우 특이적이고 고감도인 것은 사실이지만 빠른 검출법은 아니라고 하였다.

PCR 기법은 열에 안정한 DNA polymerase³³를 이용하면서 본격적으로 발달하기 시작하여 여러 병원성 미생물을 검출하는데 이용되어 왔으며, 감도는 보통 single cell 수준까지도 가능한 것으로 알려져 있다³⁴. PCR법의 장점은 무엇보다도 목적 유전자를 매우 빠르게 증폭시킬 수 있다는 것이며, 이 기법이 *Listeria* spp에 이용된 것은 1990년 Border et al³⁵에 의

해 보고된 것이 처음이다. Bessesen et al³³도 같은 시기에 *L monocytogenes*를 검출하기 위해 PCR법을 이용하였으나 결과에 있어 감도가 낮고 서로 일치되지 않았다고 하였다. 1991년 Thomas et al³⁴이 PCR을 이용하여 우유와 마쇄우유에서 본 균을 검출하여 보고한 후 식품에서 본 균을 검출하기 위한 PCR 기법의 연구가 활발하게 진행되었다^{11,18,29,34-43}.

초기의 연구들은 식품을 증균배지에 혼합하여 24 시간 이상 배양한 후 다시 선택배지에 도말배양하여 얻어진 균집락을 취하여 DNA를 분리하거나 균집락의 crude lysates를 PCR 분석에 사용하였다^{36,41,43}. 그 이후 선택배지를 사용하지 않고 증균배지에서 1차 또는 2차 증균한 시료를 취하여 직접 PCR하거나^{11,25,36,39} 증균된 균액을 원침회수하여 보다 많은 수의 균을 용균하여 PCR한 경우도 있고¹¹, 특이적인 단클론성 항체가 결합된 magnetic bead를 이용해 증균배지에서 target cell만 회수하여 PCR한 경우도 있다¹⁸. 이러한 방법들은 증균과정이라는 시간적 부담을 가지고 있지만 특이성과 감도는 매우 높다. 반면 치즈나 우유 등의 식품에서 증균과정 없이 직접 PCR한 경우도 보고되어 있는데^{29,36,37,40} 이들의 경우 식품 구성물질중 PCR 억제제로 작용하는 것이 있어 PCR 감도가 낮아졌다고 하며, 보고된 예마다 검출한계를 다르게 제시하고 있다.

PCR 분석에서의 목적유전자들은 대부분 병원성과 관련된 유전자들이 이용되고 있는데 listeriolysin O 유전자 즉, *hlyA* 유전자가 가장 많이 이용되며^{11,18,34-36,39-41}, 그외 *iap*^{11,44-46}, *mpl*⁴⁶, *prfA*⁴⁶, *dth*⁴⁵ 유전자 등과 *L monocytogenes*의 균체 표면단백질과 관련된 유전자⁴⁷를 이용한 보고도 있다. 한편 16S rRNA sequence는 유전자 혼성화기법에서 DNA probe의 특이성을 인정받았고 상품화(kit)되어 널리 사용되어 왔음에도 불구하고 Wang et al²⁹의 보고외에는 PCR에서 이용된 바가 거의 없다.

본 연구에서는 원유로부터 *L monocytogenes*의 신속 검출을 위한 효율적인 PCR 기법개선을 위하여 16S rRNA based primer²⁹를 사용하여 그 특이성과 감도를 확인하였고, 원유성분인 PCR 억제물질을 효과적으로 제거함으로써 보다 효율적으로 PCR 기법을 개선하는 한편, 우유시료에서 *L monocytogenes* DNA를 신속하게 검색할 수 있는 방법을 모색하였다.

재료 및 방법

공시균주 : 시험에 사용한 공시균주는 Table 1과

같으며 공시된 *L monocytogenes* 10주중, *L monocytogenes* HPB #3(Scott A), HPB #410, HPB #503은 캐나다 보건후생성 미생물연구부로 부터 EGD와 Mackaness는 독일의 Wurzburg대학으로 부터 분양받은 것이며 *L monocytogenes* V7과 *L ivanovii*, *L seeligeri*, *L welshimeri*, *L grayi*, *L murrayi* 그리고 *L innocua* ATCC 33090은 미국의 Arkansas대학에서 분양받은 균주들이다.

Table 1. Bacterial strains used

Strains	Strain No.	Origins
<i>L monocytogenes</i>	HPB #3	HPB ^{a)}
<i>L monocytogenes</i>	HPB #410	HPB
<i>L monocytogenes</i>	HPB #503	HPB
<i>L monocytogenes</i>	EGD	UWG ^{b)}
<i>L monocytogenes</i>	Mackaness	UWG
<i>L monocytogenes</i>	V7	UA ^{c)}
<i>L monocytogenes</i>	B1	Our Lab.
<i>L monocytogenes</i>	B2	Our Lab.
<i>L monocytogenes</i>	B3	Our Lab.
<i>L monocytogenes</i>	BS5	Our Lab.
<i>L ivanovii</i>	ATCC 33090	UA
<i>L seeligeri</i>	LA-15	UA
<i>L welshimeri</i>	ATCC 35897	UA
<i>L grayi</i>	ATCC 19120	UA
<i>L murrayi</i>	ATCC 25401	UA
<i>L innocua</i>	ATCC 33090	UA
<i>L innocua</i>	W4	Our Lab.
<i>L innocua</i>	L5	Our Lab.
<i>L innocua</i>	LBS12	Our Lab.
<i>L innocua</i>	CB13	Our Lab.

a) Health Protection Branch, health and Welfare, Canada, B) University of Wurzburg, Germany, c) University of Arkansas, U.S.A.

그외 *L monocytogenes* B1 등 4주와 *L innocua* W4 등 4주는 본 연구실에서 식품 및 환경재료에서 분리한 균주이다. 그리고 *Listeria* 속균이외 그람 양성균 4종 (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus agalactiae*, *Str. thermophilus*)과 그람 음성균 5종 (*Pseudomonas fluorescens*, *proteus vulgaris*, *E. coli*, *Samonella* spp., *Enterobacter* spp.)을 사용하였다.

Oligonucleotide primers의 합성 : 본 실험에 사용된 primer는 Wang et al²⁹이 설계한 16S rRNA-based primer로서 L-1(5'-CACGTGCTACAATGGATA-G-3')과 L-2(5'-AGAATAGTTTTATGGGATTA-G-3')를 한국생공(Korea Biotech., In C.)에서 정제 합성하였다.

세균의 genomic DNA 추출 : DNA 분리는 Wang et al²⁹의 방법을 참고로 하여 각 균주를 10ml의

TSB(tryptic soy broth, Difco)에 접종하여 18시간 진탕배양(37°C, 200rpm)한 후 3,000rpm으로 15분간 원심분리하여 균체를 침전시키고 배지성분을 제거한 후 0.1M PBS(pH 7.4)를 가하여 같은 방법으로 2회 원심세척하였다. 다음 이 균체에 1X PCR buffer를 가하여 1회 원심세척하고 50 μ l의 lysozyme(2.5mg/ml, PCR buffer)과 50 μ l의 proteinase K(0.5mg/ml, PCR buffer)를 가하여 각각 37°C에서 30분간 처리로 세포막을 파괴하였다. 다음 100°C에서 5분간 열처리한 후 즉시 얼음에 넣어 냉각하였다.

PCR mixture의 준비: 앞에서 처리한 5 μ l의 용균액(template DNA)를 PCR용 시험관에 취하고 여기에 primer L-1 및 L-2 각 5 μ l(1 μ M), dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP., Promega) 각 2 μ l(1mM), MgCl₂ 6 μ l(1.3mM), 10X PCR buffer(100mM Tris, pH 9.0: 500mM KCl; 1% Triton X100) 10 μ l 및 Ampli Tag DNA polymerase(Promega) 0.5 μ l(2.5IU)를 가한 후 멸균된 3차 증류수로 총량이 100 μ l가 되게 하고, mineral oil 50 μ l를 증충하여 PCR 분석시료로 사용하였다.

PCR 분석: PCR 분석은 Wang et al²⁹의 방법을 변형하여 DNA thermal cycler(Perkin Elmer)로 시료 DNA를 증폭하였다. 이때 증폭횟수는 총 40cycle로 하였으며, 매 cycle당 95°C에서 40초간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 40초간 extension의 순으로 반응하였고, 단 최초의 cycle은 denaturation을 4분, 최종 cycle은 extension을 4분으로 하였다. 다음 PCR products를 4°C에 보존하고 1.5% agarose gel로 전기영동하여 EtBr로 염색한 후 target DNA의 증폭 여부를 확인하였다.

Primer의 PCR 특이성 시험: Primer의 특이성을 확인하기 위하여 *L. monocytogenes* 10균주와 *Listeria* spp 10균주, *Listeria* 속균 이외의 그람양성세균 4종 및 그람음성균 5종으로 부터 genomic DNA를 분리하여 동일한 조건하에서 PCR amplification한 다음, 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 *L. monocytogenes*의 특이 증폭산물인 70bp의 DNA 절편을 검사하였다.

PCR의 민감성 시험: PCR 법으로 검출가능한 DNA의 최소량을 알아보기 위하여 *L. monocytogenes* EGD의 genomic DNA를 1 μ g, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg 및 1fg으로 희석하여 PCR을 실시하였다. 한편 검출가능한 최소 세균수를 알아보기 위하여 *L. monocytogenes* EGD를 LEB에 배양하여 PBS로 원심 세척한 다음, 증류수로 희석하여 균수를 4 \times 10⁸, 4 \times 10⁷, 4 \times 10⁶, 4 \times 10⁵, 4 \times 10⁴, 4 \times 10³, 4, 2 및 1로 한 각 균액을 100°C에서 5분간 가열하여 용균시킨 후 PCR amplification을 실시하였

다.

PCR cycle수에 따른 증폭효율시험: PCR cycle수가 *L. monocytogenes* EGD 균주의 target DNA 증폭효율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 균수를 4 \times 10⁸으로 하고 cycle 수를 20, 25, 30, 35, 40, 45 및 50으로 하여 PCR amplification을 실시하였다.

원유에 대한 PCR의 적용시험: 우유로부터 직접 *L. monocytogenes*를 검출할 경우 우유성분에 의한 PCR 억제여부를 알아보기 위하여 *Listeria* 균을 오염시킨 우유시료를 앞에서와 같은 방법으로 PCR amplification을 실시하였다. 한편 PCR 증폭 억제능을 제거하기 위하여 40ml의 원유에 *L. monocytogenes* EGD의 균수를 달리 접종하고 10 \times degestion buffer 5ml를 가하여 균질화시킨 다음, 3M NaOH를 가하여 pH 8.0으로 조절하였다. 다음 pronase(Boehringer Mannheim)를 ml당 0.5mg을 첨가하여 40°C에서 3시간 반응시키고 그 1ml를 microfuge tube에 옮겨 원심침전한 다음, TE buffer로 3회, PCR buffer로 1회 세척하였다. 여기에 lysozyme과 proteinase K를 가하여 용균시킨 후 PCR 분석을 실시하여 PCR 증폭 억제물의 제거 효과를 조사하였다.

신속검색을 위한 PCR 기법개선: *L. monocytogenes* EGD 균주의 균수를 달리한 각기의 원유시료 10ml를 90ml의 *Listeria* enrichment broth(LEB)에 첨가하여 증균시키지 않고 원심침전하여 집균한 것, 30°C에서 12시간 증균배양한 것 그리고 24시간 증균한 각 시료를 PCR 분석하는 한편, 24시간 증균한 시료를 Oxford agar(Difco)에 도말하고 35°C에서 24~48시간 배양하여 각각의 분리물과 검색에 요하는 시간을 검토하였다.

결 과

Primer의 특이성: 16S rRNA based primer L-1 및 L-2의 *L. monocytogenes*에 대한 특이성을 확인하기 위하여 *L. monocytogenes* 10균주와 *Listeria* spp 10균주로부터 추출한 각 genomic DNA를 PCR로 증폭시킨 다음, 1.5% agarose gel에서 전기영동한 결과는 Fig 1 2에서와 같다. *L. monocytogenes*는 10균주 모두 70bp 크기의 증폭산물을 나타내었으나, 공시한 다른 균종에서는 같은 크기의 증폭산물이 나타나지 않아 L-1 및 L-2 primer는 *L. monocytogenes*에만 특이적으로 증폭산물을 생성하는 primer임을 인정할 수 있었다.

PCR의 민감성: PCR에 의하여 검출 가능한 최소 세균수를 측정하기 위하여 *L. monocytogenes* EGD 균

Table 2. Comparison between PCR and culture method for rapid detection of *L. monocytogenes* from artificially contaminated raw milk

Detection methods	Initial cell number(CFU/ml)					% Total detected
	5.7×10^4	5.7×10^3	5.7×10^2	5.7×10^1	6 3 1	
LEBO-PCR ^{b)}	7 ^{a)}	7	7	7	0 0 0	57.1
LEB12-PCR ^{c)}	7	7	7	7	7 5 2	85.7
LEB24-PCR ^{b)}	7	7	7	7	7 6 3	89.8
LEB24-OxA ^{c)}	7	7	7	7	7 5 3	87.8

a) No. of samples positive among 7 samples tested.
 b) PCR without enrichment.
 c) PCR after 12h incubation at 30°C.

d) PCR after 24h incubation at 30°C.
 e) Cultivation on oxford agar for 24h at 35°C.

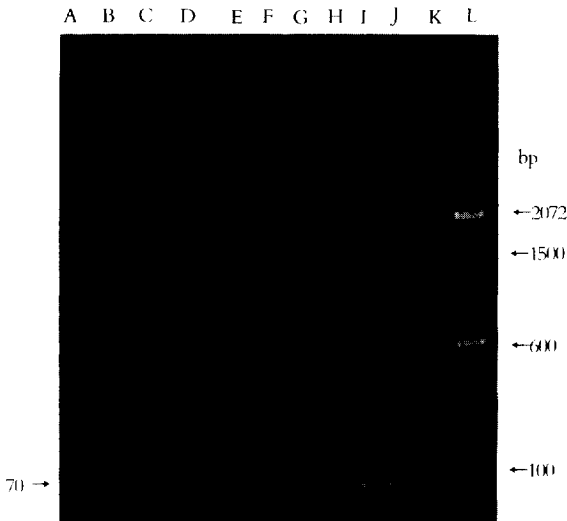


Fig 1. Products obtained from crude cell lysates of *Listeria monocytogenes* were subjected to PCR. Lane A, strain HPB #3(Scott A); B, strain HPB #410; C, strain HPB #503; D, strain EGD; E, strain Mackaness; F, strain V7; G, strain B1; H, strain B2; I, strain B3; J, strain B55; K, no cells(negative control); L, 100bp DNA ladder(GIBCO BRL).

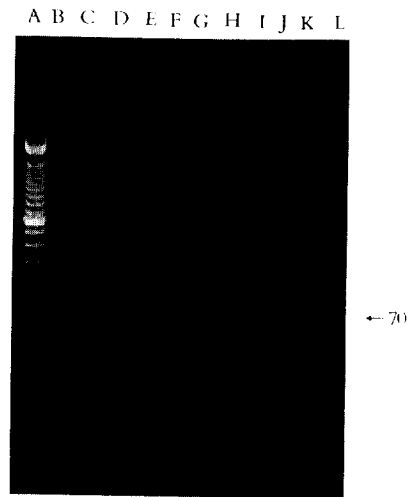


Fig 2. Specificity of the PCR assay by using crude cell lysates from different *Listeria* spp. Amplification products obtained with crude cell lysates of 3.7×10^7 CFU/ml derived from different *Listeria* spp were analysed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. Lane A, 100 bp DNA ladder; B, *L. ivanovii* ATCC 33090; C, *L. seeligeri* La-15; D, *L. welshimeri* ATCC 35897; E, *L. grayi* ATCC 19120; F, *L. murrayi* ATCC 25401; G, *L. innocua* ATCC 33090; H, *L. innocua* W4; I, *L. innocua* LBS12; J, *L. innocua* L5; K, *L. innocua* CB13; L, *L. monocytogenes* EGD(positive control)

주를 4×10^6 cell 수준에서 1 cell 수준으로 조정하여 PCR한 결과, 검출가능한 최소 세균수는 2 cell 이었다(Fig 3). 한편 genomic DNA를 단계희석하여 PCR에 적용한 결과 검출이 가능한 DNA 최소량은 1pg 수준이었으며, 이는 원유시료에 PCR을 직접 적용하는데 있었기 때문에 그림은 나타내지 않았다.

PCR cycle 수에 따른 증폭효과 : PCR cycle 수에 따른 *L. monocytogenes* EGD 균주의 PCR 최적반응조건을 조사하기 위하여 균수를 4×10^6 수준으로 하고 cycle 수를 20에서 50 cycle까지 각각 PCR한 결과,

25 cycle에서 50 cycle까지 70bp의 PCR 산물이 관찰되었고, cycle 수가 증가할수록 증폭량도 증가하는 것으로 인정되었다(Fig 4).

원유에 대한 PCR 적용 : 우유로부터 *L. monocytogenes*를 배양하지 않고 직접 검출할 경우, 우유성분

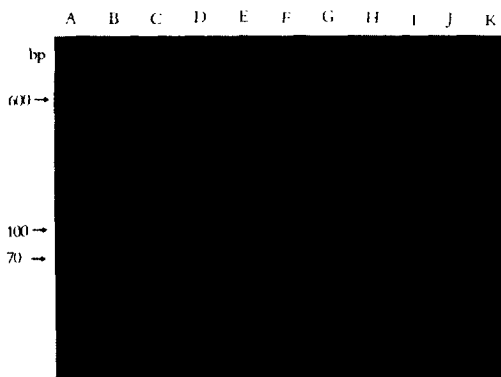


Fig 3. Sensitivity of the PCR assay in detecting *L. monocytogenes* EGD. Lane A, 100 bp DNA ladder; B, 4×10^6 cells; C, 4×10^5 cells; D, 4×10^4 cells; E, 4×10^3 cells; F, 4×10^2 cells; G, 4×10^1 cells; H, 4 cells; I, 2 cells; J, 1 cell; K, no cells.

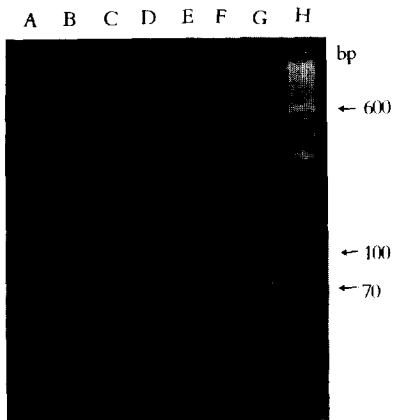


Fig 5. Detection limit of the PCR method for *L. monocytogenes* EGD cells inoculated into raw milk. Lane A, negative control; B, 2 cells; C, 4 cells; D, 3.6×10^4 cells; E, 3.6×10^3 cells; F, 3.6×10^2 cells; G, 3.6×10^1 cells; H, 100 bp DNA ladder.

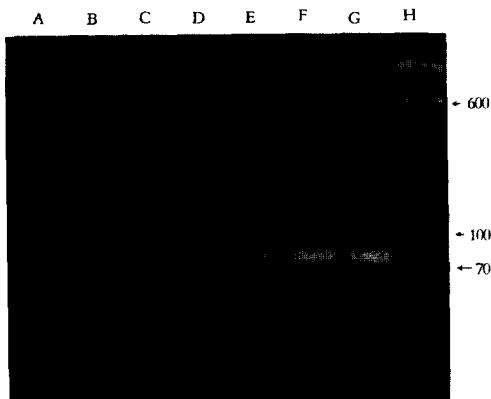


Fig 4. Products obtained from crude cell lysates of *L. monocytogenes* EGD were subjected to PCR in various cycle numbers. Lane A, 20 cycles; B, 25 cycles; C, 30 cycles; D, 35 cycles; E, 40 cycles; F, 45 cycles; G, 50 cycles; H, 100 bp DNA ladder.

에 의한 비특이적 반응으로 PCR 증폭이 억제되어 양성반응을 판정할 수 없었다. 이들 억제물질을 제거하기 위하여 *L. monocytogenes* EGD 균주를 3.6×10^4 cell/ml 수준에서 2 cells/ml 수준까지 균수를 달리하여 40ml의 원유에 각각 접종한 다음, pronase로 전처

리하여 PCR한 결과 균수가 10^1 수준까지 PCR 산물을 관찰할 수 있었다(Fig 5).

신속검색을 위한 PCR 기법의 개선효과 : 우유로부터 *L. monocytogenes*를 간편하고 신속하게 검색할 수 있는 PCR 기법을 모색하기 위하여 *L. monocytogenes* EGD 균주의 균수를 5.7×10^4 CFU/ml에서 1 CFU/ml 까지 여러 단계로 우유에 접종하고 우유시료를 직접 PCR하는 방법, 증균후 PCR하는 방법 그리고 직접 도말배양하여 얻은 양성률을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

시료를 직접 PCR한 시험구는 균수가 10^1 CFU/ml 까지 검색이 가능하여 49시료중 57.1%의 검색율을 나타내었고, 12시간 및 24시간 증균한 시험구 그리고 Oxford agar에 도말배양한 시험구는 1 cell 수준까지 검출가능하여 각각 85.7, 89.8 및 87.8%의 검색율을 나타내었다.

고 찰

*L. monocytogenes*는 동물과 사람에서 뇌막염, 패혈증, 유산을 일으키며 특히 임산부, 신생아, 면역기

능이 억제된 사람에서 잘 감염된다^{11,12}. 그러나 1980년대의 북미와 유럽에서 발생한 5건의 주요 리스테리아증 발생사례를 비롯한 여러 보고에 의하면 리스테리아증은 산발적인 발생 뿐만아니라 집단적으로도 발생하며, *L. monocytogenes*에 오염된 음식을 섭취함으로써 건강한 개체도 이 균에 감염되어 발병할 수 있다^{7,13,14}. *L. monocytogenes*는 자연계에 널리 분포하고 있고 냉장온도에서도 증식할 수 있기 때문에 이 세균을 다양한 식품에서 근본적으로 제거하기란 매우 어렵다^{13,15}. 따라서 리스테리아증의 발생을 예방하기 위하여 원인식품으로부터 본 균을 검색해야 할 필요성이 증대됨으로써 이에 대한 많은 연구가 수행되었다. 본 연구는 최근 크게 발전하고 있는 PCR 기법을 이용하여 원유에서 *L. monocytogenes*를 검색하고자 하였다.

Border et al¹⁶은 16S rRNA based primer를 세 종류로 합성하여 처음으로 *Listeria* spp에 대한 PCR 검색 결과를 보고하였다. 이들은 세 종류의 primer를 두 가지로 조합하여 408bp와 938bp의 PCR products를 증폭시켰는데, 408bp의 PCR 산물은 *Listeria* spp 뿐만아니라 시험하였던 다른 속균 모두에서 증폭되었고, 938bp의 PCR 산물은 *Listeria* spp 전체에 대해서 특이적이었으며, 1987년 이전까지 *Listeria denitrificans*라 불리우던 *Jonesia denitrificans*에서도 이 PCR 산물이 증폭되었다고 하였다. Wang et al¹⁷은 *Listeria* spp의 16S rRNA 염기서열 제1228번과 129번 사이(70bp)에서 1245, 1278, 1292 세 영역이 *L. monocytogenes*와 그의 *Listeria* spp 간에 서로 다른 것을 발견하고 이를 기초로 한 16S rRNA based primer를 제작하여 PCR 검색을 하였던 바 *L. monocytogenes*에 특이적이었다고 하였다. 본 연구에서 Wang et al¹⁷이 제작하였던 primer L-1 L-2를 합성하여 primer의 특이성을 확인한 결과, 공시된 *L. monocytogenes* 표준균주 6주와 분리균주 4주 전 균주에서 70bp의 PCR 산물이 확인되었고, *L. monocytogenes*와 16S rRNA sequence가 가장 유사한 *L. innocua* 5주를 비롯하여 *L. ivanovi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*에서는 70bp의 PCR 산물이 증폭되지 않았다. 그 밖에 공시한 그람양성균 4종과 그람음성균 5종에서도 같은 크기의 증폭산물이 인정되지 않아 16S rRNA based primer L-1 및 L-2는 *L. monocytogenes*에 특이적인 것으로 인정할 수 있었다. 이 primer를 이용한 PCR 분석의 민감도는 *L. monocytogenes* EGD 균주에서 2 cell 수준에서도 target DNA가 증폭되어 PCR 감도가 매우 높은 것으로 인정되며, 이는 Wang et al¹⁷의 보고와 일치하였다.

PCR 증폭 프로그램에 대해서 Thomas et al¹²은 PCR 분석의 민감도를 개선하기 위하여 cycle time을

줄이고 cycle 횟수를 늘리는 방향으로 변화하는 것이 바람직하다고 하였고, Wang et al¹⁷도 같은 견해라고 하였다. Wang et al¹⁷은 또한 PCR 분석하기 전에 template DNA를 100°C에서 5분간 가열시킨 후 즉시 냉각시키면 template DNA의 유출과 denaturation이 일어나기 때문에 첫 PCR cycle에서 denaturation time을 95°C에서 비교적 짧은 시간인 3분간만 하여도 효과적이며 *Taq* polymerase의 역가가 저하되는 것도 막을 수 있다고 하였다. 그리고 100°C에서 5분간의 가열을 하지 않았을 경우에는 첫 cycle에서의 denaturation time을 6~7분으로 해야 하며, 이때는 20~40cycle의 범위에서는 cycle 수를 증가시켜도 PCR products가 증가하지 않았고 비특이반응이 생길 수 있다고 하였다. Powell et al¹⁸은 우유내에 존재하거나 시료처리과정에서 첨가시킨 proteinase를 5분간의 가열을 통하여 대부분 불활성화시킴으로써 *Taq* polymerase의 역가가 떨어지는 것을 막을 수 있다고 하였다.

본 연구에서는 crude cell lysates를 100°C에서 5분간 가열하고 첫 cycle에서 denaturation time를 4분으로 하여 PCR 분석을 한 결과 총 cycle수 25에서부터 products가 확인되었고 cycle 수가 증가할수록 products가 증가하였으며 비특이반응도 나타나지 않았다. 따라서 50 cycle로 횟수를 증가시키면 products는 증가하겠지만 증폭시간에 따른 효율을 감안할 때 35 cycle만 하여도 무방할 것으로 생각된다.

Thomas et al¹²은 10ml의 우유와 LEB 증균배지 90ml를 혼합하여 증균하지 않고 직접 PCR 검색한 결과 PCR products를 검출할 수 없었다고 하였고, Bessen et al¹⁹은 우유와 뇌척수액에서 10³CFU/ml의 *L. monocytogenes*를 직접 PCR 법으로 검출할 수 있었다고 보고하였다. Wernars et al²⁰은 cheese를 직접 PCR 검색한 결과 어떤 시료에서는 10³CFU/0.5g에서 양성반응을 보였으나 어떤 시료에서는 10⁶CFU/0.5g에서도 PCR products를 검출할 수 없는 등, 제품의 종류에 따라 다양한 결과를 나타내었다고 보고하였다. 식품에서 병원균을 증균과정 없이 직접적으로 PCR 검색하여 매우 빠르게 병원균을 검색하는 것은 공중위생상 중요한 의의가 있다고 할 수 있으나 식품시료내에 존재하는 PCR inhibitor 때문에 효과적인 검색이 어려워 이를 제거해야 하는 문제를 안고 있다²¹. 이는 식육에서 보다 유제품에서 강한 간섭 및 억제현상을 나타내며²², 이 문제해결을 위하여 Wang et al¹⁷은 시료의 여과, 세척, 희석 등의 방법을 권하고 있으나 4~10CFU 수준에서는 기계적인 작업과정중 균체의 소실로 인하여 음성반응을 나타내었다고 하였다. Thomas et al¹²과 Furrer et al²³은

선택평판배지에서 우선적으로 세균을 분리해야 한다고 하였고, Warnars et al¹⁴은 추가 정제과정으로서 TE buffer를 이용해 2~3시간의 투석을 실시하였으나 좋은 결과를 얻지 못하고 phenol-extraction과 affinity chromatography가 가장 효과적이었다고 하였다. 이에 대하여 Fitter et al¹⁵은 Warnars et al¹⁴의 방법으로는 추가 정제과정에서 DNA가 유실되기 쉬우므로 식품시료에서 직접 검색하기 어려운 점이 있다고 하였다. 또한 식품검색상의 문제가 치즈 등에 존재하는 내재성 inhibitor와 적은 오염균수 그리고 적은 양의 추출 가능한 DNA 뿐만아니라, 목적 유전자의 부위가 과연 증폭되었는지의 증거가 미약하여 primer 제작에 세심한 주의를 기울일 것과 37°C에서 18시간동안 진탕배양하는 비교적 짧은 증균과정을 병행해야 한다고 하였다. 이러한 경우 10~100CFU까지 검출이 가능하며 사멸한 세균에 의한 양성반응은 방지할 수 있을 것이라 하였다. Wang et al¹⁶도 이미 사멸한 세균에 의한 PCR 양성반응을 지적하고 배양법과 병행할 것을 권하였으며, PCR 법은 식품에서 우선적으로 원인체를 screen 하기에 매우 유용한 방법으로 양성반응을 나타낸 시료에 한하여 배양법을 병행하는 것이 효과적이라고 하였다. Thomas et al¹²은 선택적 증균배지를 사용하여 미리 증균을 하면 target cell 즉, target DNA를 증가시키는 반면 non-*Listeria* DNA를 줄이고 시료내의 PCR inhibitor를 줄일 수 있을 뿐만아니라 살아있는 균으로부터 target DNA를 얻을 수 있는 장점이 있다고 하였다. 그러나 시간이 걸리는 부담을 감수해야 하며 24시간 증균후 우유에서 PCR 분석을 했을 때 25CFU 수준까지 검출이 가능하다고 하였다.

본 연구에서는 원유에서 *L. monocytogenes*를 증균과정없이 직접 검색함으로써 PCR 검색에 소요되는 시간을 단축시키고자 하였다. 먼저 원유중에 존재하는 PCR inhibitor를 제거하기 위하여 Wegmuller et al¹⁷이 원유와 유제품에서 *Campylobacter jejuni*와 *Campylobacter coli*의 검색에 적용한 방법을 참고로 하여 시료 ml 당 0.5mg의 pronase를 이용하여 전처리 함으로써 효과적으로 PCR inhibitor를 제거할 수 있었던 것은 pronase의 casein 용해작용과 관련이 있는 것으로 사료된다. 또한 4회에 걸쳐 원심분리하여 우유중 고농도의 Ca²⁺ 농도를 낮추고¹⁸ 그 밖의 PCR 억제물질의 농도를 낮추므로써¹⁹ 10¹ ccf 수준까지 검색이 가능하였다. 이 결과는 18시간의 증균과정을 거친 Fitter et al¹⁵의 결과와 일치하였으며, Besscsen¹³과 Warnars et al¹⁴의 성적에 비하여 월등히 우수한 결과인 것으로 사료된다. 그리고 본 시험에서 PCR 분석에 pronase로 전처리한 시료 1ml를 사용했던 점을 감안할 때,

시료의 양은 더 늘어서 원심집균할 경우는 보다 우수한 결과도 기대할 수 있을 것으로 사료된다. Niederhauser et al²⁰은 증균배양후의 PCR 검색법이 미생물학적 배양법에 비하여 더 우수하거나 같은 것으로 보고하고 있으며, 또한 이들 두 방법은 DNA probe-hybridization법 보다 우수하다고 하였다. Thomas et al¹²은 원유 10ml를 LEB 90ml에 혼합한 시료에 대하여 PCR법으로 분석이 불가능하였다고 보고하였으나 본 연구에서는 이들과 같은 양의 시료에 pronase를 이용하여 전처리하여 PCR 억제물질을 제거함으로써 10¹CFL/ml 수준의 균수까지 검출이 가능하였다. Wang et al¹⁶은 식육시료와 University of Vermont broth(UVM) 증균배지를 혼합하여 직접 PCR로 분석했을 때 배지성분의 어떤 형광기질이 90~140bp에 해당하는 지점에 나타났다고 보고하였으나 본 연구에서는 관찰되지 않았다.

한편 증균배지와 희석한 원유를 12시간 배양한 후 PCR한 결과 *L. monocytogenes*의 균수를 1CFU/ml 수준으로 집중한 7개의 시료중 2에서 양성반응을 나타내었다. 이와같은 결과는 Thomas et al¹²의 성적과 유사하며, 24시간 증균배양한 후 Oxford agar에 도말하여 배양한 성적과 거의 일치하였다. 그리고 24시간 증균한 후 PCR 분석에서는 배양법에서의 양성률과 거의 비슷하거나 더 우수한 결과를 나타내었다. Thomas et al¹²은 현재까지의 PCR 분석법이 해결해야 할 많은 문제점들을 가지고 있지만 감도를 높이고, 시간을 단축하는 방향으로 계속 발전할 것이고 그 주요방향은 원심분리나 여과 등의 방법을 통한 식품시료에서의 균 회수를 증대와 세포용해나 DNA 추출방법을 수정하여 그 효율을 증대시키는 일이며, 식품시료의 PCR 억제물질을 줄이거나 제거하는 방법을 모색하고 PCR products를 빠르고 정확하게 검출하는 방법을 찾는 방향이 될 것이라고 하였다.

건강한 사람이 *L. monocytogenes*에 감염된 경우 대부분 무증상을 보이나, 임신부나 신생아 그리고 면역기능이 억제된 사람에서 임상증상이 발현될 수 있는 것으로 보고되어 있고²¹, 최근 건강한 개체도 이 균이 오염된 식품의 섭취로 인하여 발병할 수 있다는 사실이 알려져 있으나 사람에서 *L. monocytogenes*의 감염량을 산출한다는 것은 매우 어려운 일이다²². Ajel-10²³의 보고에 의하면 1985년 California에서 리스테리아증이 집단발생한 사례에서는 문제가 된 치즈의 g 당 *L. monocytogenes* 수는 100~1,000CFU 이었다고 한다. 이상과 같은 결과로 미루어 볼 때 원유로부터 *L. monocytogenes*를 신속하게 검색하는 방법으로서 16S rRNA based primer를 이용한 PCR 기법을 적용할

때는 다량의 시료를 원침 집균하여 pronase 처리후 직접 PCR 분석하거나 최소한 12시간 증균한 시료에 적용하면 보다 효율적이고 신속하게 검색할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

원유중 *L. monocytogenes*의 신속검색을 위하여 16S rRNA-based oligonucleotide primer를 이용한 PCR 특이성과 민감성을 확인하고, 원유에서의 direct PCR 시 DNA 증폭에 영향을 미치는 요인을 제거함으로써 PCR 감도를 높이는 한편, 신속하고 간편하게 PCR 분석효율을 높일 수 있는 방법을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *L. monocytogenes* 10주에 대한 PCR 분석결과 모두 70bp 크기의 PCR products를 확인할 수 있었고, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. wesheimeri*, *L. grayi* 각 1주와 *L. innocua* 5주에서는 동일한 products가 증폭되지 않으므로써 16S rRNA based primer의 *L. monocytogenes*에 대한 PCR 특이성이 인정되었다.

2. PCR 분석법의 감도는 *L. monocytogenes* EGD에서 2 cell 수준에서도 target DNA가 증폭되어 PCR 감도가 높은 것으로 나타났다.

3. PCR cycle 수를 달리하여 PCR products를 증폭한 결과 25 cycle부터 50 cycle까지 뚜렷한 70bp 크기의 products가 관찰되었고, cycle 수가 증가할수록 DNA 증폭량도 증가하는 것으로 인정되었다.

4. 원유에서 PCR을 직접 적용한 결과 비특이반응으로 products를 확인할 수 없었으나 pronase를 전처리함으로써 PCR 억제반응을 방지할 수 있었다.

5. 우유에서 *L. monocytogenes*를 신속하게 검색할 수 있는 방법을 모색하기 위하여 시료를 세가지 방법으로 처리하여 PCR을 적용한 바 우유시료를 직접 PCR 분석한 것은 10⁶CFU/ml까지 검색이 가능하며 49시료에서 57.1%의 검색률을 나타내었다. 12시간 및 24시간 증균하여 PCR 분석한 것과 균분리 배양에서는 1 cell까지 검출이 가능하여 각각 85.7%, 89.8% 및 87.8%의 검출률을 나타내었다. 특히 원유 시료에 직접 PCR을 적용하면 pronase 처리와 PCR을 위하여 각기 3시간, 전기영동에 1시간이 소요되어 7시간 이내로 검색시간을 단축시킬 수 있으며 10⁶CFU/ml까지 검색할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Barza M. Listeriosis and milk. *New Eng J Med* 1985; 312: 438~440.
2. Brackett RE. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Technol*, 1988; 42: 162~164.
3. Marth EH. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Food Technol* 1988; 42: 165~168.
4. Gellin BG, Broome CV. Listeriosis *J Am Med Assoc* 1989; 261: 1313~1320.
5. Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, et al. Pasteurized milk as vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Engl J Med* 1985; 312: 404~407.
6. CDC. Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese-California. *Morbidity Mortality Weekly Report* 1985; 34: 357~359.
7. Linnan MJ, Mascola L, Lou XD, et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New Engl J Med* 1988; 319: 823~828.
8. Gellin BG, Broome CV, Hightower AW. Geographic differences in listeriosis in the united states. *Abstracts of the 27th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. New York Oct. 5. 1987.
9. Seeliger HPR. Listeriosis-avoidable risk? In Miller AJ, Smith JL, Somkutieds GA. *Topic in Industrial Microbiology: Foodhome Listeriosis*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford 1990.
10. Border PM, Howard JJ, Plastow GS, et al. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 1990; 11: 158~162.
11. Niederhauser C, Candrian U, Hofelein C, et al. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 1564~1568.
12. Thomas EG, King RK, Burchak J, et al. Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 2576~2580.
13. Donald WW, Jeffrey MF, Andrew A, et al. A Canadian comparative study of modified versions of the "FDA" and "USDA" methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. *J Food Pro* 1991; 54: 669~676.
14. Zoreky NA1, Sandine WE. Highly selective medium for isolation of *Listeria monocytogenes* from food. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 3154~3157.
15. 강호조, 이철현, 손원근 등. 원유로부터 *Listeria monocytogenes*의 분리방법에 대한 비교시험. 한국수

- 의공중보건학회지 1995; 19: 131~138.
16. Kerr KG, Rotowa NA, Hawkey PM, et al. Incidence of *Listeria* spp in precooked, chilled chicken products as determined by culture and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Food Pro* 1990; 53: 606~607.
 17. Mattingly JA, Butman BT, Plandk ML, et al. Rapid monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Listeria* in food products. *J Assoc of Anal Chem* 1988; 71: 679~681.
 18. Fluit AC, Torensma R, Visser MJC, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 1289~1293.
 19. Mengand J, Vicente MF, Chenevert J, et al. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1988; 56: 766~772.
 20. Datta AR, Wentz BA, Shook D, et al. Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes for detection of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54: 2933~2937.
 21. Flamm RK, Hinrichs DJ, Thomashow MF. Cloning of a gene encoding a major secreted polypeptide of *Listeria monocytogenes* and its potential use as a species-specific probe. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55: 2251~2256.
 22. Notermans S, Chakraborty T, Leimeister-Wachter M, et al. A specific gene probe for detection of bio- and serotyped *Listeria* strains. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55: 902~906.
 23. Datta AR, Wentz BA, Hil WE. Detection of hemolytic *Listeria monocytogenes* by using DNA colony hybridization. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 2256~2259.
 24. Kohler S, Leimeister-Wachter M, Chakraborty T, et al. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1990; 58: 1943~1950.
 25. Blais BW. Transcriptional enhancement of the *Listeria monocytogenes* PCR and simple immunoenzymatic assay of the product using anti-RNA: DNA antibodies. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 348~352.
 26. Klinger JD, Johnson A, Croan D, et al. Comparative studies of nucleic acid hybridization assay for *Listeria* in foods. *J Assoc of Anal Chem* 1988; 71: 669~673.
 27. Wang RF, Cao WW, Johnson MG. Development of a 16S rRNA-based oligomer probe specific for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 3666~3670.
 28. Enns RK. DNA probes : an overview and comparison with current methods. *Lab Med* 1988; 19: 295~300.
 29. Wang RF, Cao WW, Johnson MG. 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2827~2831.
 30. DeLong EF, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic stains : ribosomal RNA-based probe for the identification of single cells. *Science* 1989; 243: 1360~1363.
 31. Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, et al. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J Bacteriol* 1988; 170: 720~726.
 32. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487~491.
 33. Bessesen MT, Luo Q, Rotbart HA, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 2930~2932.
 34. Bohnert M, Dilasser F, Dalet C, et al. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Res Microbiol* 1992; 143: 271~280.
 35. Fitters S, Heuzenroeder M, Thomas CJ. A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol* 1992; 73: 53~59.
 36. Furrer B, Candrian U, Hoefelein C, et al. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of hamolysin gene fragments. *J Appl Bacteriol* 1991; 70: 372~379.
 37. Herman L, Ridder H de, De Ridder H. Comparison of different methods for detection of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *Milchwissenschaft* 1993; 48: 684~686.
 38. Herman L, Ridder H de, De Ridder H. Cheese components reduce the sensitivity of detection of *Listeria monocytogenes* by the polymerase chain reaction. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 1993; 47: 23~29.
 39. Niederhauser C, Hoefelein C, Luthy J, et al. Comparison of "Gen-Probe" DNA probe and PCR for detec-

- tion of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated soft cheese and semi-soft cheese, *Res Microbiol* 1993; 144: 47~54.
40. Powell HA, Gooding CM, Garrett SD, et al. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Letters in Appl Microbiol* 1994; 18: 59~61.
 41. Rossen L, Holmstrom K, Olsen JE, et al. A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food sample. *Int J Food Microbiol* 1991; 14: 132~145.
 42. Sazano G, Coppola R, Maddonni MF, et al. Identification of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese by polymerase chain reaction employment. *Annali di Microbiol ed Enzimol* 1993; 43: 159~163.
 43. Wernars K, Heuvelman CJ, Chakraborty T, et al. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J Appl Bacteriol* 1991; 70: 121~126.
 44. Bubert A, Kohler S, Goebel W. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2625~2632.
 45. Jaton K, Sahli R, Billi J. Development of polymerase chain reaction assays for detection of *Listeria monocytogenes* in clinical cerebrospinal fluid samples. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1931~1936.
 46. Vines A, Reeves MW, Hunter S, et al. Restriction fragment length polymorphism in four virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes*. *Res Microbiol* 1992; 143: 281~294.
 47. Wang RF, Cao WW, Johnson MG. Development of cell surface protein associated gene probe specific *Listeria monocytogenes* and detection of the bacteria in food by PCR. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 119~129.
 48. Lovett J, Francis DW, Peeler JT, et al. Quantitative comparison of two enrichment methods for isolating *Listeria monocytogenes* from seafoods. *J Food Protec* 1991; 54: 7~11.
 49. Wegmuller B, Luthy J, Candrian U. Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 2161~2165.
 50. Ajello GW. As cited in Ryser ET, Marth EZ. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of camambert cheese. *J Food Prot* 1987; 50: 372~378.