

식품에 인위접종된 *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii*의 신속검출을 위한 Real-time PCR과 Loop-mediated isothermal amplification 비교

김진희 · 오세욱*
국민대학교 식품영양학과

Comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification and Real-Time PCR for the Rapid Detection of *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Cronobacter sakazakii* Artificially Inoculated in Foods

Jin-Hee Kim and Se-Wook Oh*

Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul, Korea
(Received December 7, 2018/Revised December 31, 2018/Accepted March 13, 2019)

ABSTRACT - The objective of this research was to compare loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with real-time polymerase chain reaction (PCR) for the rapid detection of pathogens in foods. In this study, the limits of detection (LODs) for *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, and *Cronobacter sakazakii* were evaluated in various foods. Among 11 samples tested for *S. Typhimurium*, LAMP and real-time PCR had the same LODs in beef and duck meat whereas real-time PCR was more sensitive than the LAMP in 8 samples. However, *S. Typhimurium* in chocolate samples was not detected by real-time PCR. The sensitivity of real-time PCR was high in all samples inoculated with *L. monocytogenes* and *C. sakazakii* whereas LAMP was more sensitive than real-time PCR in oil-rich foods. Therefore, LAMP can be shown as an easier, more convenient method, as well as effective analytical method for testing difficult samples when employed in PCR.

Key words : 3M molecular detection system; Validation; Real-time PCR

식품에 존재하는 병원균을 검출하기 위한 전통적인 방법은 생화학적 및 혈청학적 특징에 의한 표현형 확인에 기초한다. 이 방법은 일반적으로 액체 배지에서 비선택적 혹은 선택적 전배양을 거친 후에 고체 배지에서 선택적 분리 과정을 거쳐 혈청학적 검사까지 진행된다. 따라서 많은 단계를 거치기 때문에 결과가 나오기까지 3~5일의 비교적 오랜 시간이 소요된다.

최근핵산 증폭 기술이 발전함에 따라 전통적인 배양방법보다 신속하고 정확한 검출이 가능하게 되었다. 증폭 기반 방법으로는 PCR, multiplex PCR 또는 real-time PCR을 사용하는데, thermal cycle과 probe를 이용한 real-time PCR에 의한 식품유래 병원균 검출 논문이 다수 보고되고 있다¹⁻³⁾.

또한 등온조건에서 고리 매개 등은 증폭 방법(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)에 의해서도 검출이 가능한데, 3M Molecular Detection System(3M MDS)은 이를 기반으로 제조되어 AFNOR의 NF Validation과 AOAC의 PTM SM 인증을 받아 산업적으로 이용되고 있다⁴⁻⁷⁾.

현재 식품유래 병원균 검출에 이용 가능한 분자 방법 중 real-time PCR이 가장 일반적으로 사용되며 민감한 방법이지만 식품 구성 성분에 의한 유기물의 영향으로 증폭 효율이 저해된다고 보고되고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 이에 비해서 LAMP는 PCR과 비교하여 배양 배지 및 특정 유기물에 의한 증폭 효율 저해에 덜 민감한 것으로 보고되고 있다¹¹⁻¹³⁾.

본 연구에서는 다양한 식품성분이 *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* 및 *Cronobacter sakazakii*의 신속 검출에 미치는 영향을 파악하기 위하여 수행되었다. 다양한 식품에 비교적 고농도로 접종된 식중독균은 전배양과정을 거치지 않고, 식품에서 직접 균을 회수하여 LAMP를 기반

*Correspondence to: Se-Wook Oh, Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul, 02707, Korea
Tel: +82-2-910-5778, Fax: +82-2-910-5249
E-mail: swoh@kookmin.ac.kr

Table 1. Set of primers in real-time PCR for detection of *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, and *C. sakazakii*

Species		Sequence (5' - 3')	Reaction condition	Reference
<i>S. Typhimurium</i> (<i>invA</i>)	Forward	GCG TTC TGA ACC TTT GGT AA	40 cycles consisted of denaturation at 95°C for 10 s, 60°C for 20 s for annealing and extension.	(1)
	Reverse	CGT TCG GGC AAT TCG TTA		
	probe	FAM-TGG CGG TGG GTT TTG TTG TCT TCT-TAMRA		
<i>L. monocytogenes</i> (<i>hly</i>)	Forward	CAT GGC ACC ACC AGC ATC T	45 cycles consisted of denaturation at 95°C for 15 s, 63°C for 60 s for annealing and extension.	(3)
	Reverse	ATC CGC GTG TTT CTT TTC GA		
	Probe	FAM- CGC CTG CAA GTC CTA AGA CGC CA -TAMRA		
<i>C. sakazakii</i> (<i>tRNAGlu</i>)	Forward	CCG GAA CAA GCT GAA AAT TGA	45 cycles consisted of denaturation at 95°C for 5 s, 62°C for 20 s for annealing and extension.	(2)
	Reverse	TCT TCG TGC TGC GAG TTT G		
	Probe	FAM-ACT CTG ACA CAC CGC GCA TTC CTG-TAMRA		

으로 한 LAMP와 conventional real-time PCR을 비교 평가하고자 하였다. 또한 LAMP 방법의 검출한계를 향상시킬 수 있는 가능성을 모색하고자 하였다.

Materials and Methods

사용 균주

이 연구에서는 세가지 표준 균주가 사용되었다. *Salmonella* Typhimurium (ATCC 19585), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Cronobacter sakazakii*(KCTC 2949)는 한국 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양 받아 사용하였다. 모든 균주는 tryptic soy broth (Difco, Franklin Lakes, New Jersey, USA) 10 mL에 접종하여 37°C에서 10 시간 동안 1차 배양한 뒤, 18 시간 동안 2차 배양하여 균주를 활성화한 후 사용하였다.

시료 준비 및 미생물 접종

고기류(햄, 닭가슴살, 계란, 돼지고기, 소고기, 오리고기), 즉석섭취식품류(액상음료, 샐러드), 과자류(콘플레이크, 초콜릿), 사료는 대형마트에서 구매하여 사용하였다. 각 식품에 균을 접종하기 위하여 식품을 10 g씩 멸균 비닐백(Whirl-pak, 19 × 30 cm; Nasco, Fort Atkinson, WI, USA)에 넣고 *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *C. sakazakii*의 배양액을 10² cfu/g 이하, 10²-10⁴ cfu/g과 10⁴ cfu/g 이상의 3종류의 농도로 접종하여 실험하였다. 각 식품별 검출 빈도가 높은 균주를 대상으로 *S. Typhimurium*은 고기류, 즉석섭취식품류, 과자류, 사료에 접종하였고, *L. monocytogenes*는 고기류, 즉석섭취식품류에 *C. sakazakii*는 사료에 접종하여 각각의 전통적 배양방법, real-time PCR방법 및 LAMP (3M MDS)방법으로 실험에 사용하였다. 대조구로는 접종되지 않은 식품을 대상으로 각각 real-time PCR, LAMP, 배지배양 방법을 사용하여 음성을 확인하였다.

전통적 배양방법을 이용한 검출

각 식품에 접종되어있는 미생물을 분석하기 위해 식품 10 g에 90 mL의 멸균한 0.85% NaCl(saline) 용액을 첨가하여 stomacher (Laboratory Blender Stomacher 400; Seward, MO, USA)로 2분간 균질화하였다. 그 후, saline을 사용하여 십진 희석하였다. *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *C. sakazakii*는 각각 선택배지인 xylose-lysine-deoxycholate agar (XLD, Oxoid, Hampshire, UK), *Listeria* selective agar base (Oxford formulation, Oxoid), brilliance enterobacter sakazakii agar (DFI, Oxoid)에 도말하였다. 도말 후 37°C에서 24-48 시간 배양하고 XLD, Oxford 배지에서 검은색 집락을 DFI 배지에서는 청록색 집락을 계수하였다.

Real-time PCR을 이용한 검출

S. Typhimurium, *L. monocytogenes*, *C. sakazakii*가 접종된 각각의 식품들은 전통적인 배양방법과 동일하게 균질화시킨 후 균질액 1 mL를 PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 제조사의 지침에 따라 추출하였고, 최종 elution 용량을 100 µL로 하였다. 추출한 DNA는 Table 1과 같은 PCR primer 및 반응 조건에 따라 각 시료의 PCR 산물을 얻었다. Real-time PCR을 위한 반응물의 조성은 SensiFAST Probe Hi-ROX mix(Bioline, London, UK) 10 µL, 400 nM 정방향 및 역방향 프라이머, 100 nM 프로브, 및 DNA 주형 2 µL로 구성하여 총 20 µL가 되도록 하였다. Real-time PCR은 StepOne Plus real-time PCR systems(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 결과는 StepOne 소프트웨어(Applied Biosystems)를 사용하여 분석하였다.

Loop-mediated isothermal amplification를 이용한 검출

본 연구에는 3M Molecular Detection System(3M MDS; 3M Food Safety, St. Paul, MN, USA)를 사용하여 loop-

mediated isothermal amplification(LAMP)에 사용하였다. 세 종의 균주가 각각 접종된 식품 균질액 20 µL를 3M 용해 튜브에 넣고 100°C에서 15 분 동안 반응하였다. 가열 직후, 용해 튜브를 냉각용 블록에서 5 분간 냉각시켰다. 용해 튜브의 상층액 20 µL를 취하여 각각의 *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*와 *C. sakazakii*를 타겟으로하는 반응 튜브에 분주하고 pipetting으로 혼합하였다. 균을 접종하지 않은 각각의 식품 균질액을 위와 동일한 방법으로 용해 튜브에 넣어 가열, 냉각 과정을 거쳐 상층액 20 µL를 컨트롤 튜브와 반응 튜브에 분주해 양성 대조구와 음성 대조구로 하였다. 모든 샘플을 옮기고 섞은 후 튜브를 3M Molecular Detection Speed Loader Tray(3M Food Safety)에 넣고 3M Molecular Detection instrument(3M Food Safety)에 넣었다. 증폭결과는 실시간으로 연결된 컴퓨터로 나타났고 양성 결과는 +, 음성결과는 -의 형태로 도출되었다.

Modified 3M MDS를 이용한 검출

전체 90 mL의 균질액 중 20 µL를 사용함에 따라 희석되는 균주의 손실을 줄이기 위해 균질화된 샘플 중 1 mL을 사용하여 원심분리(16,000×g, 3 min) 후 최종 20 µL로

재현탁 하여균주를 농축하여 분석에 사용하였다.이후 20 µL로 재현탁 한 농축 시료는 3M MDS 분석 방법과 동일하게 가열, 냉각, 증폭 과정을 수행한 후, 결과를 컴퓨터로 나타내어 분석하였다.

Results and Discussion

식품공전에 제시되어있는 기존의 real-time PCR 방법은 DNA 추출 방법이 특정되어 있지 않으며, 사용되는 방법과 kit의 종류에 따라 분석 및 검출시간이 상이하다. Boling 방법을 기반으로 하는 PrepMan 방법의 경우 DNA 추출 시간이 20분으로 짧다. Spin column을 사용하는 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit (TaKaRa, Ohtsu, Shiga, Japan)의 경우 적어도 60분의 추출 시간이 필요하지만 DNA정제도가 높다는 장점을 가지고 있다. 실험에 사용된 real-time PCR 방법의 검출 시간은 sample의 균질화부터 DNA 추출, 결과 확인까지 약 120 분이 소요되었다. LAMP는 3M MDS 제조사의 방법에 따라 90 분에서 120 분의 분석시간이 소요되었다. 하지만 3M MDS 방법의 경우 원심분리 과정이 불필요하며 primer

Table 2. Comparison between 3M MDS and real-time PCR for the detection of *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* and *C. sakazakii* in various food products

Target bacteria	Food category	Foodproduct	Limit of detection		
			3M MDS	Real-time PCR	
<i>S. Typhimurium</i>	Meats	Ham	++	+	
		Chicken breast	++	++	
		Egg	++	++	
		Pork	++	+	
		Beef	++	++	
		Duck meat	+	+	
	Ready to eat	Beverage	++	++	
		Salad	++	++	
		Confectionery	Serial	++	+
			Chocolate	++	-
Pet food	Dog food	++	+		
<i>L. monocytogenes</i>	Meats	Ham	+++	++	
		Chicken breast	+++	++	
		Egg	+++	++	
		Pork	+++	++	
		Beef	+++	+	
		Duck meat	+++	++	
	Ready to eat	Beverage	+++	+	
		Salad	+++	++	
<i>C. sakazakii</i>	Infant food	Powdered milk	++	+	

-: Not detected, +: Detected less than 10² cfu/g, ++: Detected between 10² cfu/g and 10⁴ cfu/g, +++: Detected more than 10⁴ cfu/g

첨가를 따로 하지 않아 오염의 가능성이 낮은 장점이 있었다.

S. Typhimurium, *L. monocytogenes*과 *C. sakazakii*에 대하여 식품공전에서 권고하는 식품 종류를 선정하여 민감도를 비교하였다. 각 균주에 대해 분석 결과는 Table 2에 나타내었고 음성 대조구는 나타내지 않았다.

식품 종류에 따른 각 균주의 민감도를 LAMP와 real-time PCR 방법으로 비교하였고, 같은 샘플에서 각 균주별 선택배지를 사용하여 정확한 접종량을 계수하여 검출 민감도의 지표로 나타내었다(Table 2). *S. Typhimurium*에서는 햄, 돼지고기, 시리얼, 사료를 포함한 4가지 식품에서 real-time PCR방법이 LAMP방법보다 검출 민감도가 적게는 10배에서 많게는 100배 높게 나타났다. 하지만 닭가슴살, 계란, 소고기, 오리고기, 음료, 샐러드를 포함한 6종의 식품에서는 LAMP가 real-time PCR과 같은 수준의 검출 한계를 보였다. 그러나 초콜릿과 같은 지방성분이 높은 식품에서는 LAMP에서만 단독으로 검출이 가능하였다. 이전의 연구 결과에 따르면, Rosman 등¹⁴⁾은 초콜릿 파우더에서 DNA의 추출이 불가능했다고 보고하였다. 또한 Gryson 등¹⁵⁾의 결과에도 초콜릿 파우더의 매트릭스가 PCR반응의 inhibitor로 작용되었다고 보고하였다. 이는 초콜릿을 구성하는 복합적 매트릭스가 real-time PCR의 저해제로 작용하여 증폭이 방해되었을 것으로 판단된다. 따라서 초콜릿에서 DNA clean-up kit를 적용한다면 PCR 반응에 대한 억제효과를 줄일 수 있을 것으로 판단되었다. 11가지 식품 중 4가지 식품에서 real-time PCR의 검출 민감도가 우세한 경향을 보였지만 식품 종류에 따라 LAMP검출법의 민감도가 real-time PCR과 동등하게 나타났다. Wang 등¹⁶⁾에 의하면 3M MDS와 같은 등온증폭방법이 식품 조건 하에서 PCR 보다 검출 확률이 높다는 것으로 보고하고 있다. 따라서 LAMP방법은 식품 구성 성분에 따라 real-time PCR이 검출하지 못하는 식품환경에서의 검출이 가능하기 때문에 real-time PCR보다 더 다양한 식품에서의 검출이 가능할 것으로 판단되었다.

*L. monocytogenes*를 접종하여 검출한 식품에서는 고기류, 즉석섭취식품류를 포함한 8가지 식품에서 real-time PCR의 민감도가 LAMP보다 100배에서 10000배 더 높았다. *S. Typhimurium*과 *C. sakazakii*를 대상으로 한 LAMP결과와

비교하였을 때, *L. monocytogenes*의 검출민감도가 10배에서 100 배 더 낮았다. 이는 LAMP방법에서 *L. monocytogenes*에 대한 민감도 개선이 필요할 것으로 판단되었다.

*C. sakazakii*를 대상으로 한 시료는 분유 하나로 선정하였다. 분유에 접종한 *C. sakazakii*의 검출민감도는 LAMP와 real-time PCR에서 각각 10² CFU/g~10⁴ CFU/g과 10² CFU/g 이하로 나타났다. 따라서 LAMP의 검출민감도는 *S. Typhimurium*과 비슷한 수준이지만 real-time PCR의 검출민감도가 더욱 높은 것으로 측정되었다. LAMP의 검출민감도가 다소 낮게 나타난 것은 본래의 3M MDS방법은 배지를 이용하여 enrichment를 거치는 것이 원래의 방법이지만,본 실험에서는 식품 종류에 따른 DNA 증폭 저해를 고찰하기 위해서 식품에서 직접 검출하였기 때문인 것으로 생각되었다.

*S. Typhimurium*과 *L. monocytogenes*에서 LAMP 결과 중 상대적으로 검출 민감도가 낮은 식품을 대상으로 향상된 검출 민감도를 얻기 위해 두 번째 실험을 진행하였다. 3M MDS에서 사용하는 20 µL의 샘플 균질액 대신 1 mL을 원심분리한 후 20 µL로 재현탁하여 LAMP분석에 사용하였다.기존의 3M MDS방법과 변형된 3M MDS방법의 검출민감도 비교를 Table 3에 나타내었다. *S. Typhimurium*에서는음료, 샐러드를 대상으로 기존의 민감도 10⁴ CFU/g에서 각각 10³ CFU/g과 10² CFU/g으로 10-100배 향상되었다. *L. monocytogenes*의 경우에는 오리고기,샐러드에서 기존의 3M MDS 민감도인 10⁶ CFU/g에서 10⁵ CFU/g으로 10배 향상된 민감도를 나타내었다. Stevens 등¹⁷⁾에 의하면 원심분리를 사용하여 세균 회수율을 증가시킴에 따라 검출 민감도가 향상되었다고 보고하였다. 따라서 3M MDS 분석에 사용되는 샘플을 물리적으로 농축하여 분석할 수 있는 균의 양을 증가시킴으로 인해 검출 민감도가 향상될 수 있는 가능성도 있음을 알 수 있었다.

국문요약

식품에 존재하는 병원균을 신속검출하기 위한 방법으로 LAMP와 real-time PCR 방법을 비교 평가 하였다. *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *C. sakazakii*의 3종에 대해

Table 3. Comparison of 3M MDS with modified 3M MDS for the detection of *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* in various food products

Target bacteria	Products	Limit of detection (CFU/g)	
		3M MDS	Modified 3M MDS
<i>S. Typhimurium</i>	Beverage	5.97 × 10 ⁴	1.30 × 10 ³
	Salad	1.67 × 10 ⁴	7.95 × 10 ²
<i>L. monocytogenes</i>	Duck meat	1.05 × 10 ⁶	1.18 × 10 ⁵
	Salad	9.00 × 10 ⁶	1.12 × 10 ⁵

식품공전에서 권고하는 식품 종류를 선별하여 민감도를 분석하였다. *S. Typhimurium*에서는 11종의 식품(햄, 닭가슴살, 계란, 돼지고기, 소고기, 오리고기, 액상음료, 쉐러드, 콘플레이크, 초콜릿, 사료)중 4종(햄, 돼지고기, 시리얼, 사료)에서 LAMP보다 real-time PCR에서 검출 민감도가 10배 이상 더 높았고, 6종(닭가슴살, 계란, 소고기, 오리고기, 음료, 쉐러드)에서는 real-time PCR과 비슷한 수준을 그리고 초콜릿에서는 real-time PCR로는 검출되지 않았으며 LAMP로만 검출되는 결과가 나타났다. *L. monocytogenes*와 *C. sakazakii*에서는 9종 모두에서 LAMP보다 real-time PCR에서 검출 민감도가 더 높았다. 또한 *L. monocytogenes*에서 LAMP의 검출 민감도가 *S. Typhimurium*과 *C. sakazakii* 보다 10배 이상 낮았다. 3M MDS의 검출한계 향상을 위해 변형된 3M MDS의 민감도는 기존대비 10배 이상 증가되었다. 따라서 식품에 존재하는 병원균의 검출을 위해 식품의 구성성분에 따라 LAMP와 real-time PCR를 적절히 선택하는 것이 바람직할 것으로 생각되었다. 한편, 농축 방법을 이용해 LAMP방법의 민감도를 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

References

1. Daum, L.T., William J.B., James C.M., Margaret S.N., Lynn A.C., William B.H., Linda G., Riggins W.S., Sandra M., Ann S.: Real-time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3050-3052 (2002).
2. Liu Y., Cai X., Zhang X., Gao Q., Yang X., Zheng Z., Luo M., Huang X.: Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Microbiol. Methods.*, **65**, 21-31 (2006).
3. Rodríguez-Lázaro D., Hernández M., Scortti M., Esteve T., Vázquez-Boland J.A., Pla M.: Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of hly, iap, and lin02483 targets and AmpliFluor technology. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 1366-1377 (2004).
4. Fortes E.D., David J., Koeritzer B., Wiedmann M.: Validation of the 3M molecular detection system for the detection of *Listeria* in meat, seafood, dairy, and retail environments. *J. Food Prot.*, **76**, 874-878 (2013).
5. Bird P., Flannery J., Crowley E., Agin J.R., Goins D.: Evaluation of the 3MTM molecular detection assay (MDA) 2–*Salmonella* for the detection of *Salmonella* spp. in select Foods and environmental surfaces: Collaborative study, First Action 2016.01. *JAOAC Int.*, **99**, 980-997 (2016).
6. Hu L., Ma L., Zheng S., He X., Wang H., Brown E., Hammack T., Zhang G.: Evaluation of 3M molecular detection system and ansr pathogen detection system for rapid detection of *Salmonella* from egg products. *Poult. Sci.*, **96**, 1410-1418 (2016).
7. Bergamo G., Timm C.D., Carvalho N.R., Helbig E., Gandra E.A.: Comparison between the 3M MDS® method and phenotypic methods to detect *Salmonella* spp. in foods. *LWT - Food Sci. Technol.*, **97**, 693-696 (2018).
8. Demeke T., Jenkins G.R.: Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**, 1977-1990 (2010).
9. Guy R.A., Payment P., Krull U.J., Horgen P.A.: Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5178-5185 (2003).
10. Shannon K., Lee D.Y., Trevors J., Beaudette L.: Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Sci. Total Environ.*, **382**, 121-129 (2007).
11. Mori Y., Notomi T.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.*, **15**, 62-69 (2009).
12. Bakheit M.A., Torra D., Palomino L.A., Thekisoe O.M., Mbatia P.A., Ongerth J., Karanis P.: Sensitive and specific detection of *Cryptosporidium* species in PCR-negative samples by loop-mediated isothermal DNA amplification and confirmation of generated LAMP products by sequencing. *Vet. Parasitol.*, **158**, 11-22 (2008).
13. Kokkinos P., Ziros P., Bellou M., Vantarakis A.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of *Salmonella* in food. *Food Anal Methods.*, **7**, 512-526 (2014).
14. Rosman, N., NFK M., ME A., S M.: Inhibitory effect of chocolate components toward lard detection in chocolate using real time PCR. *Int. J. Food Prop.*, **19**, 2587-2595 (2016).
15. Gryson, Nicolas, Koen D., Kathy M.: Influence of cocoa components on the PCR detection of soy lecithin DNA. *Eur. Food Res. Technol.*, **226**, 247-254 (2007).
16. Wang X., Seo D.J., Lee M.H., Choi C.: Comparison of conventional PCR, multiplex PCR, and loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection of *Arcobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, **52**, 557-563 (2014).
17. Stevens K., Jaykus L.A.: Direct detection of bacterial pathogens in representative dairy products using a combined bacterial concentration-PCR approach. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 1115-1122 (2004).