

농림부 장관 귀하

나노생체막을 이용한 *Salmonella* spp. 신속
편이성 면역학적 검출법의 개발
**Novel Immunoassay for *Salmonella* spp. using
Nanoliposome**

본 보고서를 “나노 생체막을 이용한 *Salmonella* spp. 신속 편이성
면역학적 검출법의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 14 일

한국식품연구원

농 립 부

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 신 원 선

세부연구책임자 : 김 남 수

연 구 원 : 윤 혜 숙

연 구 원 : 이 현 정

요 약 문

I. 제 목: 나노생체막을 이용한 *Salmonella* spp. 신속 편이성 면역학적 검출법의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성:

*Salmonellae*는 Gram-음성의 0.7 1.5 X 2 5 μm 의 Enterobacteriaceae family에 속하는 통성 혐기성 병원성 간균으로 운동성이 있는 것과 없는 것으로 구별됨(1). *Salmonella enterica* serovar Enteritidis에 감염되 유발되는 인간 질병이 1970년대 중반부터 시작하여 전세계적으로 증가하고 있음. 이 serovar는 salmonellosis의 주원인으로 식품의 안전성을 위협하고 있다. 식품유래의 salmonellosis는 살아있는 *Salmonella*가 오염된 식품을 통하여 인간의 소화기에 침투하고 이 균이 소장에서 자라면서 12 36 시간의 잠복기 후 enteric fever, enterocolitis, septicemia 같은 증상을 유발함으로써 나타난다. Salmonellosis 증상의 정도와 발현 기간은 오염된 *Salmonella*의 종류, 섭취한 음식과 *Salmonella*의 양, 환자의 감수성에 따라 다르지만 어린이나 노인 또는 질병으로 면역 체계가 약한 사람의 경우는 치명적일 수도 있다.

본 연구에서 제안하는 immunomagnetic beads의 이용은 target 위해 미생물을 선택적으로 food matrix로부터 분리함과 동시에 농축의 효과를 가져와 최종 assay를 행할 때 matrix에 의한 간섭 효과를 극소화하고 농축의 효과로 강화 배양 시간을 단축하려는 시도에서 그 중요성이 있다. 나노 생체막인 liposome은 target 위해 미생물을 인식할 뿐만 아니라 signal detection에 필요한 marker를 vesicle 내부에 포함하고 있으므로 기존의 enzyme immunoassay 또는 enzyme-linked immunosorbent assay와는 달리 detection signal을 얻기 위한 효소기질 반응이 생략되어 분석 시간이 단축될 수 있을 것으로 판단된다.

III. 연구개발 내용 및 범위:

균주확보: *Salmonella enteritidis*와 *typhimurium*

Immunoliposome 준비 및 magnetic bead와 anti-Salmonella IgG 결합

검출법의 확립

- 강화배양 조건 최적화
- 선택적 분리/농축 조건 설정
- Liposome immunoassay 조건 검토 (Immunoliposome과 배양액의 양 검토)
- Cross-reactivity 평가에 대한 자료 수집
- Cross-reactivity 평가
- 다른 균종 혼합하여 sensitivity, specificity 평가

- 식품에의 적용을 위한 기초 실험
- 식품을 대상으로 강화배양 조건 변형
- 식품을 대상으로 분석조건 검토 및 변형
- 검출을 저하 원인의 규명

상업용과 실험실에서 제조된 bead와의 비교실험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- Liposome immunoassay의 최적 반응 조건을 설정하기 위하여 Immunomagnetic beads와 *Salmonella*와의 혼합 시간은 signal의 증가폭과 민감도를 고려하여 반응시간을 60분으로 설정하였다. *Salmonella* 균이 10^6 CFU/mL 수준인 조건에서 가장 큰 분석 signal을 보이는 반응 tube는 borosilicate 재질이었다. 비특이적 반응의 감소화시키기 위하여 immunomagnetic beads-Salmonella-immunoliposome 결합 complex가 형성된 후 결합에 이용되지 않은 잉여의 immunoliposome을 세척할 때, BSA가 포함된 세척버퍼를 사용할 경우 동일한 조건에서 분석 signal이 background 수준으로 낮게 나타나 BSA가 비특이적 반응을 줄이는 것으로 판단되었다. 분석에 영향을 미치는 liposome 농도는 1/70로 희석해 사용하는 것이 효과적이었으며 균의 수에 대한 분석 signal의 정량 관계를 살펴본 결과, 검출한계인 10^5 CFU/mL 수준까지 균을 증폭시키면 *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*을 검출할 수 있을 것으로 판단되었다. *Salmonella enteritidis*는 100-200 rpm 범위의 진탕수범위에서 균의 증식에 큰 영향을 받지 않았으나, *Salmonella typhimurium*은 진탕수에 따른 생균수의 변화가 크게 나타나 150 rpm에서 우수한 결과가 200 rpm에서는 생균수가 저조하였다. 배양 온도별 생균수의 변화를 알아보기 위해 Brain Heart Infusion 배지에 *Salmonella enteritidis*와 *Salmonella typhimurium*을 각각 접종하고 30, 37, 42 조건에서의 실험을 한 결과, *Salmonella enteritidis*는 30, 37, 42 에서의 생장이 모두 양호한 것으로 나타났으며, *Salmonella typhimurium*은 30 와 37 에서의 성장은 양호하나 42 에서의 성장은 미약했다. *Salmonella* spp. 4 종에 대한 배지 종류에 따른 생균수 영향 실험의 결과는 BHI 배지가 *Salmonella* spp. 4 종에 대해 배양 9 시간 이내의 시점에서 균수 증폭에 가장 적합한 배지로 나타나 BHI 배지를 향후 식품적용 실험의 증균 배지로 선택하였다. BHI 배지를 사용하여 *Salmonella* spp. 2 종에 대한 배양시간에 따른 성장 곡선을 조사한 결과, 배양 12 시간 이후로는 성장 속도가 둔화 또는 감소해 stationary phase에 진입하는 양상을 보였다. *Salmonella* 집락 분리용 선택배지로 SCM은 false-positive인 균주가 나타나는 비율이 가장 적어 정확성이 높고, 배지 성분에 의한 저해작용이 일어나지 않는 장점이 있다. 그러므로 동정에 필요한 노동력과 시간이 단축되므로 IMS-LIA와 같은 신속

검출법과 동시에 사용하기 위한 배지로 적합하였다.

- 계란(무정란, 세척)을 0.1% tween 80이 포함된 saline solution(0.85%)에 침지하고 25 stomacher에서 20분간 stirring하여 0시간 및 35 에서 18시간 증균배양액을 SCA에 도말하여 48시간 배양한 다음, SCA에 나타난 집락은 API 20E로 동정하였다. IMS-LIA 결과 계란 껍질은 *Salmonella* 음성으로 나타났다. 이때 배지 내의 균수는 10(8)-10(9) CFU/mL 이었으나 SCA에서 *Salmonella*는 동정되지 않았다. 따라서 계란 껍질은 IMS-LIA와 배지검사 방법의 결과가 일치하여 BHI 증균 방법을 IMS-LIA에 적용할 수 있는 것으로 판단된다. 계란을 BHI 배지에 침지하여 35 에서 24시간 증균한 액을 IMS-LIA를 측정함과 동시에 SCA 배지에 도말하여 장내세균 의심 집락을 생화학적 방법인 API 20E로 동정하였다. 유정란과 무정란 모두 IMS-LIA는 대조군 보다 낮은 값을 보여 살모넬라는 음성으로 나타났으며, 전통적 배지법에 의한 동정결과 및 면역학적 방법을 이용하는 간이 kit 검사에서도 같은 결과가 나타났다. 무정란의 껍질의 SCA 배지에서 보라색 집락은 API 20E로는 동정할 수 없었으며, 과란색으로 나타난 집락은 *Enterobacter cloacae*로 동정되었다. 또한 상업적 kit인 Singlepath Salmonella로 BHI 증균 배양액($10^7 \sim 10^9$ CFU/mL)을 검사한 결과 유정란, 무정란 모두 껍질과 난황, 난백의 증균액에서 살모넬라 양성인 결과는 나타나지 않았다. 따라서 유정란과 무정란 모두 background microflora는 살모넬라 측정을 위한 IMS-LIA에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 유정란 껍질의 증균방법 차이에 따른 IMS-LIA와 상업용 kit와의 성능 비교하기 위하여 BHI 증균배양 및 FDA's Bacteriological Analytical Manual(BAM) protocols의 변형방법으로 검사하였다. 유정란을 IMS-LIA, 전통적 배지 방법, 상업적 시판 키트로 동시에 검사한 결과 세 방법 모두 살모넬라 양성으로 나타난 true-positive는 없었다. 14개 브랜드의 유정란을 증균방법을 달리하여 SCA에 나타난 살모넬라 의심 집락을 동정(API 20E)한 결과 *Salmonella*가 동정된 시료는 없었고, 껍질 부위의 BHI 증균액에서 Gram 음성인 *Enterobacter cloacae*, *Escherichia hermannii*, *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*가 동정되었다. 그 결과, IMS-LIA로 검출하였을 때 false-positive가 1개였고, 상업적 시판 키트로 검출하였을 때는 6개의 false-positive로 판단되었다.
- 닭고기 표면에 존재하는 살모넬라를 IMS-LIA 방법 및 전통적 배지 방법으로 검사하였다. *Salmonella*를 인위적으로 spiking하지 않은 시료를 IMS-LIA 측정된 결과, BPW와 RV broth 증균액 모두 살모넬라 음성으로 나타났다. XLD 배지는 *Citrobacter freundii*와 *Salmonella arizona*를 구분하지 못하는 등 유사 장내세균과 구분하기 힘든 것으로 알려져 있어, XLD agar에 나타난 의심 집락을 색깔별로 구분하여 동정하였으나 모두 API 20E로 동정할 수 없었다. 따라서 IMS-LIA가 전통적 배지법에 의한 살모넬라 검출법의 정확성과 크게 다르지 않음을 알 수 있다. *Salmonella*를 닭껍질에 136 CFU/g spike하여 IMS-LIA검출실험을 수행한 결과, BPW 배양에서는 unspiked control과 2개의 spiked sample 중 1개가 양성이었으나, *Salmonella*선택증균 배지인 RV broth에서는 negative control(RV)에 대하여 모두 양성이었다. 닭껍질에서 IMS-LIA로 *Salmonella enteritidis*

를 검출하고자 할 때 1차 BPW 증균 및 2차 RV broth 선택증균 과정을 모두 거치는 것이 민감도가 더 우수하였으며, 2차 증균 단계에서 IMS-LIA로 식품 g당 10개 이하의 *Salmonella*가 존재하여도 검출이 가능함을 알 수 있었다. IMS-LIA에 의한 분석법 사용시 유사한 분석 signal을 보이는 균의 종류를 파악하기 위해 *Salmonella*, *Citrobacter*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7 증균액의 IMS-LIA signal을 비교하였다. *E. coli* O157:H7은 10^7 CFU/mL 이하로 존재할 때는 *Salmonella* 항체와 non-specific binding이 일어나지 않으며, *Salmonella* IgG-tagged liposome을 이용한 IMS-LIA test에 영향을 주지는 않는 것으로 생각된다. 또한, Non-target organism인 *Shigella*(F)와 *Citrobacter*(G)는 IMS-LIA에서 유사균종에 의한 교차반응은 나타나지 않는 것으로 판단하였다. IMS-LIA로 *Salmonella* 유사균종에 대해 cross-reactivity를 측정된 결과, reverse phase method로 합성한 *Salmonella* IgG-tagged immunoliposome은 식품을 매개로 식중독을 일으키는 *Salmonella typhimurium*과 *Salmonella enteritidis* 분석에 이용이 가능하리라 생각된다.

℃

- 본 기술 개발 성공시, 식품 안전성 분야에서 우려가 되는 *E.coli* O157, *Listeria*, *Staphylococcus* 등을 포함해 의학적으로 문제가 되는 병원성 세균의 검출에 그 응용이 기대된다. 본 연구에서 개발한 IMS-LIA법은 수일이 소요되는 전통적인 *Salmonella* spp. 검출시간을 단축할 수 있으며 고가의 분석 설비를 필요로하지 않으므로 비숙련인도 친숙하게 사용이 용이하리라 기대된다.

Summary

Title: Novel Immunoassay for *Salmonella* spp. using Nanoliposome

Salmonella is a rod-shaped, motile bacterium, nonmotile exceptions *S. gallinarum* and *S. pullorum*, nonsporeforming and Gram-negative. There is a widespread occurrence in animals, especially in poultry and swine. Environmental sources of the organism include water, soil, insects, factory surfaces, kitchen surfaces, animal feces, raw meats, raw poultry, and raw seafoods, to name only a few. Acute symptoms caused by *Salmonella* are nausea, vomiting, abdominal cramps, minimal diarrhea, fever, and headache. Chronic consequences are known as arthritic symptoms may follow 3-4 weeks after onset of acute symptoms. Various *Salmonella* species have long been isolated from the outside of egg shells. The present situation with *S. enteritidis* is complicated by the presence of the organism inside the egg, in the yolk. This and other information strongly suggest vertical transmission, i.e., deposition of the organism in the yolk by an infected layer hen prior to shell deposition. Foods other than eggs have also caused outbreaks of *S. enteritidis* disease. All age groups are susceptible, but symptoms are most severe in the elderly, infants, and the immunosuppressed group.

The objective of this study is to develop a rapid and easy method for the detection of a food-borne pathogen, *Salmonella* spp. The detailed studies include selective separation of *Salmonella* spp. (esp. *S. enteritidis*, *S. typhimurium*) using immunomagnetic beads, enrichment of *Salmonella* spp., and cross-reactivity test in the food matrix.

1. The optimum mixing time for the formation of immunomagnetic beads-*Salmonella* complex was 60 minutes. The maximum fluorescent signal with IMS-LIA for *Salmonella* was shown in the borosilicate-tube at the level of $10(6)$ cfu/ml. The BSA-added TBS buffer significantly decreased the background fluorescent signal, indicating that the non-specific binding was decreased due to the excessive immunoliposome were effectively removed. The optimum diluted level for immunoliposome was 1/70, and the detection limit was $10(5)$ cfu/ml both in the pure culture of *S. enteritidis* and *S. typhimurium*.

The maximum viable cells and the optimum temperature both in *S. typhimurium* and *S. enteritidis* were obtained at 150 rpm and at 30°C and 37°C. The BHI (brain heart infusion) was selected for the optimum enrichment media for both in *S. enteritidis* and *S. typhimurium*.

2. Contamination levels (CFU/mL) of indicator organisms in fertilized eggs in Seoul and Bun-dang areas (Korea) were investigated. A total of 48 eggs of 14 brands collected from the department food stores. Egg shells and egg content were examined by both pre-enrichment of brain heart infusion broth (method 1) and buffered peptone water followed by enrichment of RV broth (method 2). Using BHI broth enrichment method, the initial population of total aerobic counts (TAC) on egg shell was $35\sim 7.2 \times 10^2$ CFU/mL which had become a range from 1.010^8 to 9.5×10^8 cfu/mL after 24 h pre-enrichment among 21 eggs of 5 brands. And no suspected *Salmonella* on SCA plates appeared at the very first but the range of presumptive *Salmonella* was $1.910^4\sim 8.3 \times 10^8$ cfu/mL after 24 hr pre-enrichment. Egg content of 9 eggs of 3 brands were examined using method 1 in this research and no microorganisms and presumptive *Salmonella* were detected before and after 24 h pre-enrichment. The population of TAC was $7\sim 6.2 \times 10^3$ CFU/mL before pre-enrichment but there were no microorganisms detected between two brands so that $0\sim 1.4 \times 10^5$ CFU/mL were the number of microorganism after 24 h pre-enrichment by modified BAM method. Egg content of 27 eggs of 9 brands were examined using method 2 in this research and no TAC and presumptive *Salmonella* were detected before 24 h pre-enrichment (Table 2). After 24 hr incubation presumptive *Salmonella* colony was detected 9 CFU/mL. *Salmonella* presumptive colonies were attempted to be identified by biochemical test using API 20E protocols. However, other organisms were discovered and identified to be *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae*. However, No *Salmonellas* were isolated by cultural methods in this study.

3. Contamination levels (CFU/mL) of *Salmonella* spp. in the chicken skin were investigated. No *Salmonella* in the BPW and RV broth was detected in the no-*Salmonella* spiked samples using both the classical plate methods and IMS-LIA. And, the presumptive colonies in the XLD agar plate were not identified with API 20E kits. When *Salmonella* was artificially contaminated on

the chicken skin at the level of 4 cfu/g sample, *S. enteritidis* was more sensitively detected in the selective enrichment with RV broth than the simple enrichment with BPW. However, when the 136 cfu/g of sample was artificially spiked, *S. enteritidis* was detected using IMS-LIA method after the enrichment with BPW. Also, there was no cross-reactivity among *E. coli* O157:H7, *Citrobacter* and *Shigella*. These results described above indicate that *Salmonella* IgG-tagged immunoliposome synthesized by reverse phase method could apply to the detection of *S. typhimurium* and *S. enteritidis* from the food samples.

Technology developed in this project can be utilized for the detection of clinically important pathogenic bacteria as well as food-borne pathogenic bacteria like *Staphylococcus*, *Listeria* and *Campylobacter*. IMS-LIA could be an alternative to the expensive commercial kits imported. IMS-LIA should have wide applications in rapid and easy monitoring/screening system that is widely adopted in slaughtering plants, food processing plants, catering company and clinical laboratories.

목 차

요약문	i
Summary	v
제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	2
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	5
제 4 장 연구개발결과의 활용계획	55
제 5 장 참고문헌	56

1

1. 연구의 배경

살모넬라균은 각종 보건 분야에서 식품과 관련하여 가장 문제가 되는 식균이고, 그들은 식육, 가금류, 계란에 오염되어 식중독을 발생시키는 원인이 된다. 그러므로 신속하고 민감한 방법으로 살모넬라 속을 검출할 수 있는 방법을 필요로하게 되었다. 미국에서는 식중독과 관련되어 매년 7천만건의 환자와 5000명의 사망자가 발생한다고 추정하고 있다. 또한, 식품유래 질병과 관련된 식품 안전성 검사와 보건진료에 사용되는 비용은 거의 백억 달러가 소요된다고 발표하였다. 살모넬라는 salmonellosis의 원인으로 이는 식품에서 유래되어 발생하는 질병의 절반 이상에 해당된다고 알려져 있다. 대부분의 salmonellosis 환자는 식육, 가금류, 유제품을 포함하는 동물성 식품과 관련이 있다. 대부분의 살모넬라 혈청형들이 잠재적으로 병원성이 있는 것으로 여겨지며, 살모넬라를 위한 신속하고 신뢰성있는 검사방법의 개발이 절실하다. 전통적으로, culture-based method를 살모넬라 동정을 위해 사용했지만, 노동 집약적이고, 시간 소모적인 방법으로 방법을 얻기 위해 3-6일이 필요하다. 적절한 때에 결과를 알 수 없는 것은 사고 발생을 통제하고 예방하는 것을 지연시킨다. Immunoblotting, ELISA, PCR-based assay, electrochemical assay, array-based biosensor와 같은 면역학적 검사법이 이런 결점을 극복하기 위해 개발되었다. 이 가운데 Salmonella 검출방법으로 면역자기 비드를 사용한 연구들이 1990년대 중반 이후로 많이 개발되어왔으며, IMS-Plating과 같이 단순히 배지에 도달하던 방법에서 Immunomagnetic separation-enzyme immunoassay (AIMS-EIA), Immunomagnetic particle based ELISA (IMP-ELISA), IMS-multiplex PCR method, IMS-bacteriophage assay 등 다양한 면역학적 기법을 접목시켜 검출시간 단축 및 민감도를 높이려 하였다. IMS 방법을 사용하는 관련 연구들 가운데 가금류의 환경 샘플의 분석효능을 비교하기 위해 전통적 배지 증균법과 automated immunomagnetic separation (AIMS) 방법을 비교하였을 때, AIMS의 민감도가 15.5% 더 높았다고 하였다.

실험결과를 얻는데 까지 소요되는 시간이 짧은 것은 분명히 면역학적 방법의 장점이 다. 그러나 이 방법들은 전통적 방법에 비해 민감도와 정확성면에서 낮은 경우도 있기 때문에 언제나 적절한 것은 아니며, 많은 electrochemical methods와 biosensor가 면역학적 기법에 기초를 두고 있지만, 이들은 항체의 cross-reactivity로 인해 한계가 있는 것이 일반적인 결과였기 때문에 신속검출법 개발 시 검출한계의 규명 및 검출저해요인의 파악과 이를 감소시킬 수 있는 방법의 연구가 필요하다.

2. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

가) Salmonellae는 Gram-음성의 0.7 1.5 X 2 5 μm의 Enterobacteriaceae family에 속하는 통성 혐기성 병원성 균으로 운동성이 있는 것과 없는 것으로 구별됨(1). *Salmonella enterica* serovar Enteritidis에 감염되 유발되는 인간 질병이 1970년대 중반부터 시작하여 전세계적으로 증가하고 있음. 이 serovar는 salmonellosis의 주원인으로 식품의 안전성을 위협하고 있다.

나) 식품유래의 salmonellosis는 살아있는 *Salmonella*가 오염된 식품을 통하여 인간의 소화기에 침투하고 이 균이 소장에서 자라면서 12 36 시간의 잠복기 후 enteric fever, enterocolitis, septicemia 같은 증상을 유발함으로써 나타난다. Salmonellosis 증상의 정도와 발현 기간은 오염된 *Salmonella*의 종류, 섭취한 음식과 *Salmonella*의 양, 환자의 감수성에 따라 다르지만 어린이나 노인 또는 질병으로 면역체계가 약한 사람의 경우는 치명적일 수도 있다.

다) 식품유래의 질병을 방지하기 위해서는 농장, 식품가공/제조업체, 도축장, 그리고 주방에서 예방적인 수단의 모색과 철저한 surveillance system이 상호 유기적으로 병행되어야 함. 효율적인 surveillance system을 구축하기 위해서는 병원성 미생물의 오염이 의심되는 식품이 소비자에 노출되기 전에 검색되어야 하므로 이에 부응하기 위해 신속 정확한 검출법의 개발이 절실히 필요하다.

2) 경제 산업적 측면

가) 식중독 사고 발생시, 건전한 노동력의 상실과 보건의료기관등에 필요한 재정적 지원 등으로 국가가 부담하게될 비용은 상당하다. Roberts와 Sockett(8)의 1992년도 보고에 의하면 *Salmonella* 감염으로 인해 England와 Wales에서 국가적으로 연간 소비한 비용은 350,000,000 502,000,000에 달한다고 한다. 산업체도 법적인 해결, 소비자에 의한 신뢰도 저하로 파생되는 시장 점유율의 하락, 그리고 기업 나름대로의 surveillance system 재정비 비용 등으로 큰 손해를 보게 된다.

나) 농산물과 가공식품의 국가간 교역이 활발해짐에 따라 새로운 미생물의 유입 가능성이 증가하고 감염의 폭이 확산되고 있음. 실제로, 한 국가에서 유래하여 전파되는 다국적 식중독 발생 사고의 경우가 보고되고 있으며, New Zealand를 비롯한 서구의 여러 나라에서는 uncooked chicken meat을 수입하는 경우 자국에서 발견되지 않는 종류의 *Salmonella*가 검출되어서는 안된다는 교역 방침을 설정하고 있다.

다) 우리나라에서도 위생적으로 안전한 식육의 보급을 위해 축산물가공장에 HACCP를 적용하고 있는데 *Salmonella*는 정기적 monitoring을 요하는 식중독 미생물의 하나이다. 따라서 국내 식품의 안전성 확보와 더불어 오염된 수입식품의 국내 유통을 방지하기

위해 신속 편이성 검출 방법의 개발이 필요하다.

3) 사회 문화적 측면

가) 비교적 상당한 통계자료를 보유하고 있는 미국의 예를 들면, 매년 40,000 건의 salmonellosis가 보고되고 있는데 증상이 약한 경우는 진단/보고되지 않는 상황이므로 실제 수치는 20배 이상이 되는 것으로 예상되며 대략 연간 1,000여명이 급성 salmonellosis로 사망하는 것으로 추정된다.

나) 미국정부는 salmonella 감염율을 현재 인구 100,000 명당 15.1에서 2010년에는 6.8로 낮추기 위해 노력하고 있음. 현실적으로 미생물에 관한 한 zero-tolerance가 불가능함을 인정하면서도 어린이에게 공급되는 학교 급식의 식육에 대해서는 철저한 test를 고수하고 있다.

다) 우리나라의 경우도 축산물가공장의 성공적인 HACCP system이 학교 또는 단체 급식의 위생관리 방안으로 확대 보급될 때 식중독 발생으로 유발되는 개인적 고통과 국가적 부담을 최소화하여 건강한 국민으로 성장하는데 기여할 것으로 판단되며 이를 위해 식중독 미생물의 신속 검출 개발에 연구 지원이 절실하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1) *Salmonella*를 검출하기 위한 전통적 방법은, pre-enrichment, selective enrichment in broth, selective enrichment on agar, confirmatory test의 4 단계를 거쳐 이루어진다. 이 전통적 방법의 주요 문제점은 결과 판독까지 72-96 시간이 소요되어 위해 미생물의 오염 여부를 신속히 경제적으로 진단하기 어렵다는 것이다 (그림 1).

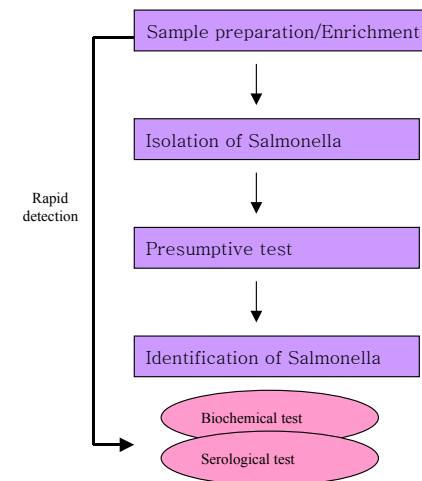


Fig. 1. Comparison of rapid detection with conventional methods

2) 현재 판매되고 있는 대부분의 rapid detection kit이 해결하여야 할 두 가지의 큰 문제는 미생물 또는 target DNA의 수를 signal을 얻기 위한 수준으로 증폭시켜야 하므로 여전히 장시간의 강화배양 또는 DNA 증폭 시간이 필요하다는 것과 real sample test시 food matrix에 의한 감도 저하의 문제이다.

3) 본 연구 계획서에서 제안하는 immunomagnetic beads의 이용은 target 위해 미생물을 선택적으로 food matrix로부터 분리함과 동시에 농축의 효과를 가져와 최종 assay를 행할 때 matrix에 의한 간섭 효과를 극소화하고 농축의 효과로 강화 배양 시간을 단축하려는 시도에서 그 중요성이 있다. 나노 생체막인 liposome은 target 위해 미생물을 인식할 뿐만 아니라 signal detection에 필요한 marker를 vesicle 내부에 포함하고 있으므로 기존의 enzyme immunoassay 또는 enzyme-linked immunosorbent assay와는 달리 detection signal을 얻기 위한 효소기질 반응이 생략되어 분석 시간이 단축될 수 있을 것으로 판단된다.

4) *Salmonella* 검출을 위한 신속 민감형의 대표적인 기술은 독소 또는 균체를 분석하는 immunoassay format과 target 유전자를 증폭 후 전기 영동을 하는 polymerase chain reaction 분석이 있음. Immunoassay는 저가의 장비와 시약으로 숙련된 전문 연구원이 아니라도 수행할 수 있다는 점과 시료의 전처리 과정이 단순하다는 장점이 있으며 이것은 신속 고감도용 진단용 kit 상품 비율을 비교할 때 immunoassay를 이용한 진단용 kit이 80%, DNA-based kit는 13%, 그리고 biochemical 특성을 이용한 kit는 7%를 차지하는 것에서도 알 수 있음. 따라서 immunoassay를 이용한 다양한 기술의 개발은 계속 증가하리라 전망됨.

5) 나노 생체막과 immunomagnetic bead를 동시에 이용한 병원성 식중독 미생물의 검출은 국외적으로 발표된 적이 없으므로 국외에서의 기술 도입이 불가능함.

3

1 절. 연구개발 내용

제 장 연구개발

1. 균주 확보: *Salmonella enteritidis*

2. Immunoliposome 준비 및 ma

3. 검출법의 확립

가) 강화배양 조건 최적화: *Sal*

나) 선택적 분리/농축 조건 설정
에 소요되는 시간, 분리/농

다) Liposome immunoassay 조

라) Cross-reactivity 평가에 대

마) Cross-reactivity 평가

바) 다른 균주 혼합하여 sensit

7) 식품에 대한 적용을 위한 기초

8) 식품을 대상으로 강화배양

9) 식품을 대상으로 분석조건

10) *Salmonella* spp.를 포함하여

11) 실험실에서 제조

12) KPL로부터 구입하였다.

2 절. 연구개발 방법

1. 균주 및 항체의 확보

식품유래의 salmonellosis의 주요 원인 strain인 *Salmonella enteritidis*를 중심으로 연구를 진행하며 균주는 American Type Culture Collection으로부터 확보하였다. *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) 과 고려대학교에서 분양받은 것으로 우리나라 생담에서 분리한 *Salmonella* 균주를 실험에 사용하였다. Cross-reactivity의 유무를 확인하기 위해 *Enterobacter agglomerans* (ATCC 29917), *Shigella flexneri* (ATCC 25619) *Citrobacter freundii* (ATCC 29935)를 사용하였다. *Salmonella* 항체는 *Salmonella* spp.를 범용적으로 인식하는 것으로써 KPL로부터 구입하였다.

2. Immunomagnetic bead의 확보

Dynal Inc.로부터 magnetic bead의 표면에 *Salmonella*을 인식하는 항체가 coating된 immunomagnetic bead 구입하였다.

3. Liposome 합성

Reverse-phase evaporation 방법을 응용하여 검출 marker인 형광물질 sulforhodamine B를

포집하는 liposome을 아래와 같이 합성하였다 (그림 2).

3. DPPE-ATA 합성

DPPE 5 mg과 SATA 3.5 mg을 boiling flask에 넣고 1 mL의 chloroform에 녹인 triethylamine 용액 (0.7%, v/v) 을 가해 질소 가스 아래 45 °C 의 water bath 안에서 1 분간 sonication 하면서 녹인다. Sonication 후, 0.5 mL의 0.7% triethylamine 용액을 다시 넣고 45 °C water bath에 1 분간 방치한다. Shaker로 옮겨 20 분간 약하게 mixing한다. Chloroform 2 mL을 가하고 rotary vacuum evaporator로 45 °C 에서 triethylamine을 제거한다. 이를 두 번 더 반복한다. 약 0.1 mL의 DPPE-ATA이 얻어지게 되며 여기에 1 mL 의 chloroform을 가한다.

4. Liposomes의 합성

DPPC 29.6 mg, DPPG 3 mg, cholesterol 15.8 mg을 round flask에 넣는다. Chloroform 3 mL과 methanol 0.5 mL을 가해 45 °C water bath에서 lipids를 녹인다. 이 lipid mixture에 0.5 mL의 DPPE-ATA를 가한다. Isopropyl ether 3 mL을 가한 후 이 lipid suspension을 잘 섞는다. Lipid suspension이 든 flask를 45 °C water bath에 넣고 질소 가스 아래에서 1 분간 sonication한다. 100 mM SRB 용액 2 mL을 질소 가스 아래에서 sonication하면서 lipid suspension에 가한다. Sonication을 3 분간 하면서 flask를 가끔 흔들어 준다. 유기용매를 45 °C 에서 rotary vacuum evaporator로 제거한다. 나머지 2 mL의 100 mM SRB 용액을 가하고 1 분간 sonication을 한다. 다시 rotary vacuum evaporator로 잔존하는 유기용매를 제거한다. 균일한 suspension을 얻을 때까지 sonication과 evaporation을 반복한다. Liposomes preparation을 10 분 정도 45 °C water bath에 방치한다. Miniextruder에 0.4 µm의 filter를 끼운 후 45 °C hot plate에 30 분 정도 방치한다. 위의 miniextruder로 liposomes preparation을 통과시킨다. 통과된 액을 Sephadex G-50-150 column에 loading해 포집되지 않은 SRB를 분리한다. SRB가 포집된 liposomes fraction만을 모아 투석한다.

5. Immunoliposome 합성

Cross-linker를 이용해 liposome을 구성하는 인지질 성분의 하나인 phosphatidyl entanolamine과 *Salmonella*을 인식하는 항체를 공유적으로 결합시켜 immunoliposome을 합성하였다. Liposomes과 항체의 공유결합은 liposomes의 surface를 thiol group으로 activation시키고 이를 maleimide group derivatized IgG와 반응시킴으로써 이루어진다. DPPE를 SATA와 반응시켜 DPPE-ATA를 얻고 reverse-phase evaporation 방법으로 이를 liposomes의 lipid bilayer로 incorporation시킨다. Hydroxylamine을 이용하여 liposomes의 surface위 acetylthioacetate group을 deacetyl화하여 -SH group을 생성시킨다. Antibody는 heterocross-linker인 sulfo-KMUS을 이용하여 maleimide group으로 유도시킨다. 즉, sulfo-KMUS의 sulfosuccinimidyl group은 IgG의 primary amine과 반응하게 된다. 이렇게

형성된 maleimide derivatized IgG와 -SH group을 표면에 가지고 있는 liposomes은 thioether linkage에 의해 안정되게 coupling된다. 세부 방법은 다음과 같다(그림 3).

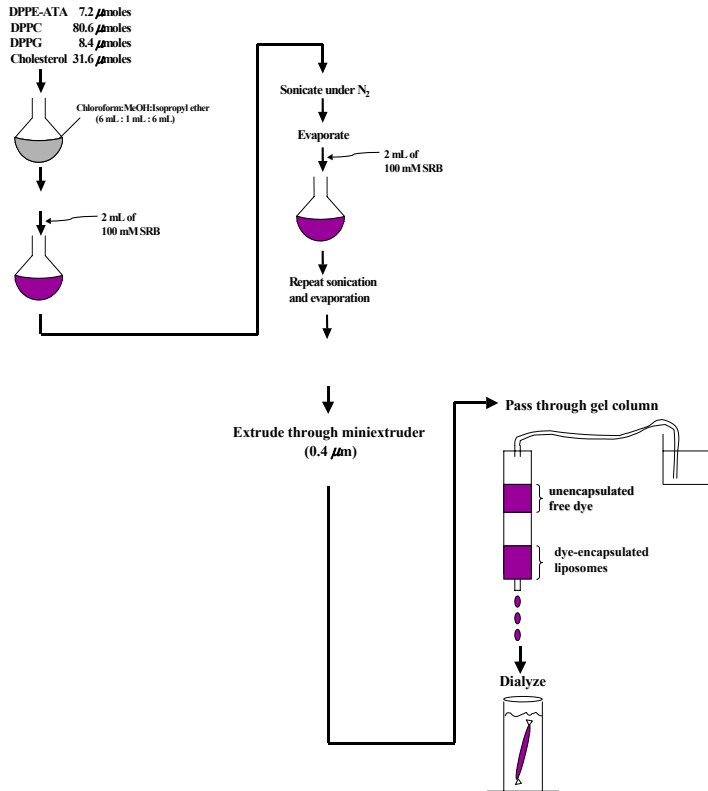


Fig. 2. Liposome 합성과정

5. Maleimide group을 이용한 IgG의 derivatization

Anti-Salmonella IgG 용액을 1 mM EDTA와 0.01% NaN₃가 녹아있는 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.8) 로 투석한다. Sulfo-KMUS 2 mg을 0.1 mL의 DMSO에 녹인다. Sulfo-KMUS 용액을 투석한 IgG 용액과 섞는다. 2-3 시간 동안 상온에서 반응시킨다. 반응액을 0.02 M PBS (pH 7.0) 로 투석한다.

6. Liposomes의 SH groups의 deprotection

DPPE-ATA liposomes에 0.5 M hydroxylamine hydrochloride을 10:1의 비율 (v/v) 로 가한 후 1 분간 N₂ 가스를 통과해 주고 2 시간 동안 상온의 암실에서 반응시킨다.

7. Maleimide-derivatized IgG와 SH-tagged liposomes의 conjugation

SH-tagged liposomes를 0.5 M KH₂PO₄를 사용하여 pH 7.0으로 조절한다. Maleimide-derivatized IgG와 섞은 후 1 분간 N₂ 가스를 통과해 주고 상온에서 4 시간 동안 반응시킨다. 4°C의 cold room으로 옮겨 18 시간 동안 반응시킨다. 반응이 안된 SH groups을 quenching 하기 위해 ethylmaleimide을 가한다. 상온에서 30 분간 반응시킨다. Sepharose CL-4B column (1.5 cm×18 cm) 을 통과시켜 IgG-tagged liposomes을 반응이 안된 maleimide-derivatized IgG와 분리시킨다. 이때 column chromatography를 위해 0.01% NaN₃를 포함하는 0.02 M TBS, pH 7.0의 완충액을 사용한다. Void volume 바로 뒤에 나오는 fraction을 모아 0.11 M sucrose를 포함하는 위의 buffer로 투석하고 냉장고에 보관하면서 사용한다.

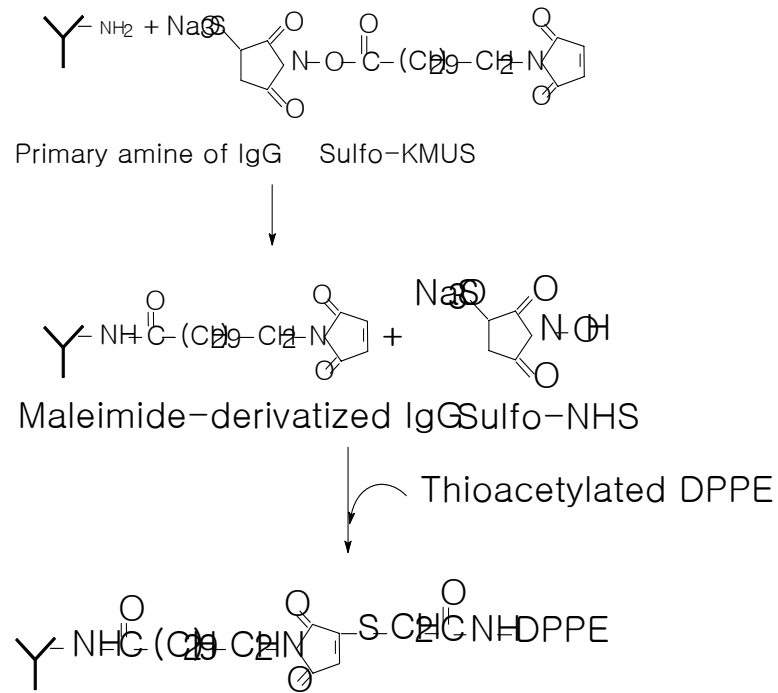


Fig. 3. Immunoliposome 합성과정.

8. IMS-LIA 분석과정 (그림 4)

Dynal Inc.의 방법을 변형하고 이에 맞게 liposome immunoassay 방법을 아래와 같이 1차년도와 2차년도에 설정하였으며 분석의 원리는 Fig. 4와 같다. 이하 실험 방법은 이 방법에 준하였다.

- 1) 75×12 mm (height×O.D.) 크기의 borosilicate tube에 IMS bead 20 μL을 첨가한다.
- 2) 시료당 세 개의 tube 각각에 negative control로써 살균된 배지 1 mL과 시료로써 *Salmonella* 배양액 1 mL을 가한다.
- 3) Tube rack안에 tube를 집어넣은 후 platform shaker위에서 60 분 동안 상온에서 70 rpm의 회전수로 mixing한다. 이 사이에 배양액을 적당히 희석하여 0.1 mL을 SCA plate에 도말하고 37 incubator에서 배양하여 다음 날 생균수를 측정한다.
- 4) MPC 안에 tube를 넣고 immunomagnetic beads (IMB)의 수거를 위해 적어도 3분 동안 tube를 정지한 후 상등액을 제거한다.
- 5) MPC에서 tube를 꺼내고 1 mL의 0.01 M PBS-0.05% Tween 20 용액으로 IMB를 1번 washing 한다. Step 4를 반복한다.
- 6) 1 mL의 0.02 M TBS-0.13 M sucrose-0.5% BSA로 IMB를 washing 하고 step 4를 반복한다.
- 7) Step 6을 다시 한 번 반복하여 IMB-*Salmonella* complex를 회수한다.
- 8) 희석한 anti-*Salmonella* IgG tagged-liposomes 용액 70 μL을 첨가한다.
- 9) 15 분 동안 tube를 platform shaker 위에서 mixing한다.
- 10) Step 4를 반복한다.
- 11) Tube를 MPC 밖으로 꺼낸다. 1 mL의 0.02 M TBS-0.13 M sucrose-0.5% BSA로 IMB를 3번 washing 한다.
- 12) Tube에 0.02 M TBS로 녹인 30 mM의 Octyl β-D-glucopyranoside (OG) 200 μL을 첨가하고 강하게 vortexing한다.
- 13) MPC 안에 tube를 넣고 3 분 동안 정지 후 10×10×48 mm cuvette에 상등액 150 μL을 옮긴다.
- 14) Cuvette에 0.02 M TBS 2,850 μL을 첨가한다.
- 15) Excitation wavelength는 543 nm, emission wavelength는 596 nm에서 형광도를 측정한다. 이때 blank는 30 mM OG 150 μL에 0.02 M TBS 2,850 μL를 가한 것으로 한다.

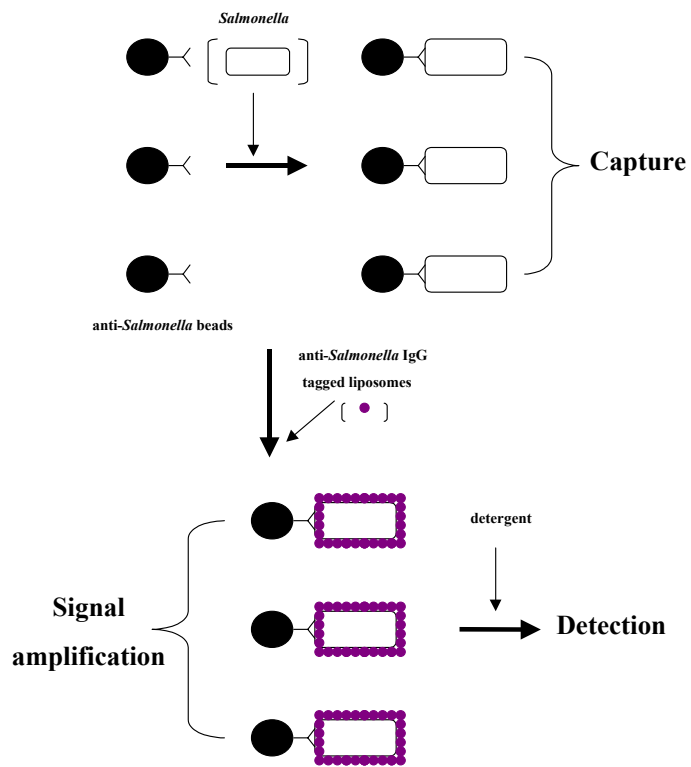


Fig. 4. Principle of assay procedure.

9. Target 병원성 식중독 세균과 immunomagnetic bead의 상호 작용 최적화를 위한 Liposome immunoassay 조건이 검토

- 1) Immunoliposomes 양이 분석에 미치는 영향
- 2) Immunomagnetic beads의 양이 분석에 미치는 영향
- 3) 비특이적 반응을 최소화하기 위한 방안으로써 세척버퍼의 영향

10. Liposome immunoassay를 위한 최적 반응 조건

Liposome 회석배수, 균주의 회석배수 및 정량관계, 최종 immunomagnetic beads의 반응 부피 설정을 위한 조건을 검토하였다.

11. 강화배양 조건의 검토

Salmonella의 세포수를 최단 시간 내에 검출 범위에 들도록 조건을 검토하며 최종적으로는 식품에 적용시의 선택적 강화배양 조건을 검토하였다.

1) 온도

배양 온도별 생균수의 변화를 알아보기 위해 30, 37, 42 조건에서의 실험을 진행하고 있다. 특히, 배양 시간을 단축하기 위해 배양 9 시간 이전에서 생균수를 비교할 때 가장 최적의 온도가 선정될 것이다. 병원성 세균 전용의 incubator가 부족한 상황이므로 동시에 비교 실험이 진행되지 못하는 어려움이 있으나 각 실험마다 온도 이외의 모든 factor를 일정하게 유지함으로써 재현성 있는 결과를 얻고자 한다.

2) shaking 효과

진탕수에 따른 생균수의 변화를 알아보기 위해 100, 150, 200 rpm로 설정한 incubator의 조건 아래 실험을 진행하고 있다. 온도 실험과 마찬가지로 배양 9 시간 이전에서 최대의 생균수를 나타내는 조건이 설정될 것이다. 병원성 세균 전용의 incubator가 부족한 상황이므로 동시에 비교 실험이 진행되지 못하는 어려움이 있으나 각 실험마다 회전수 이외의 모든 factor를 일정하게 유지하여 재현성 있는 결과를 얻고자 한다.

3) 배지종류

문헌조사를 통해 살모넬라 배양에 빈번하게 사용되는 배지 5 종류를 선별하였다. 각 배지의 제조법은 아래와 같다.

- Brain Heart Infusion (BHI) : BHI 배지 3 g/100 mL
- Buffered Peptone Water with Cysteine (BPW+C) : peptone 2 g & cysteine 2 mg/100 mL
- Rappaport-Vassiliadis (RV) broth : RV 3 g/100 mL
- Tryptic Soy Broth (TSB) : TSB 3 g/100 mL

- Tryptic Soy Broth (TSB) with Cysteine (TSB+C) : TSB 3 g & cysteine 2 mg/100 mL

12. IMS-LIA의 *Salmonella* 검출 한계 : Dose-response relationship

BHI 배지에서 35 에서 18시간 동안 각각 순수 배양한 *Salmonella enteritidis* (ATCC 4931), *Salmonella typhimurium*(ATCC 13311)을 *Salmonella*-IgG가 magnetic bead에 공유 결합 되어있는 Dynabead anti-*Salmonella* (Dynal)와 반응시켰다. 검출한계를 알아보기 위해 순수 배양액(10^8)을 단계별로 희석하여 형광도를 측정하였다.

13. 최적 증균 배지 및 분리용 배지(원) 설정

1) *Salmonella* 증균배지

살모넬라가 단시간 내에 빨리 증균될 수 있는 배지를 찾기 위하여 문헌고찰을 통해 *Salmonella* 검출 시 사용되는 배지를 조사하여, 선택성이 없으면서 미생물이 빨리 생육할 수 있는 BHI, Lactose broth, BPW의 증균배지 3종을 선정하였다. *Salmonella enteritidis*(ATCC 4931), *Salmonella typhimurium*(ATCC 13311)의 각각의 균주를 BHI, Lactose broth, BPW에 0.24 CFU/mL 수준으로 접종하여 35 에서 진탕배양하면서 0, 3, 5, 시간의 균수를 PCA와 XLD에서 동시에 측정하였다.

2) *Salmonella* 집락 분리용 선택배지 선정

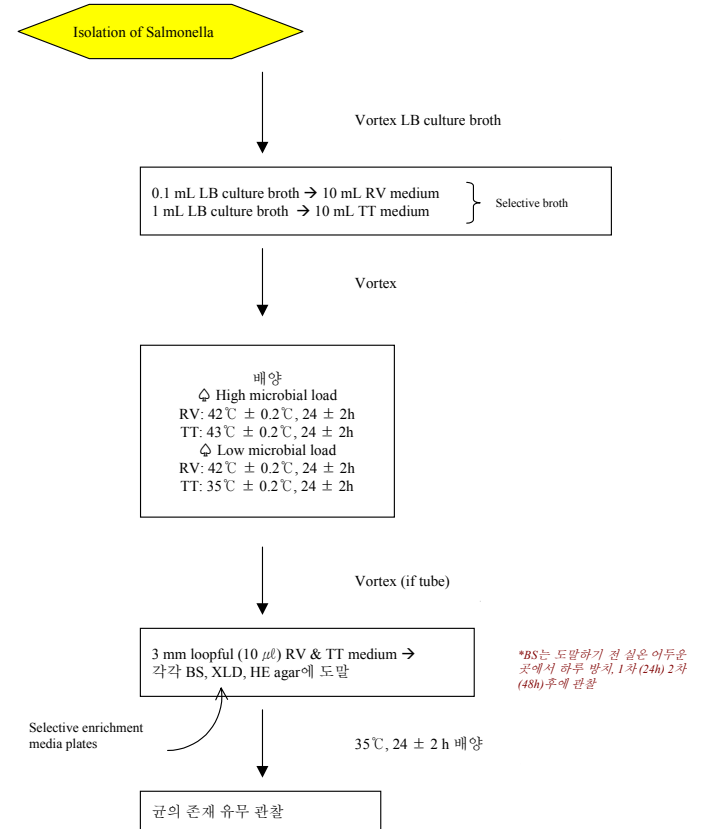
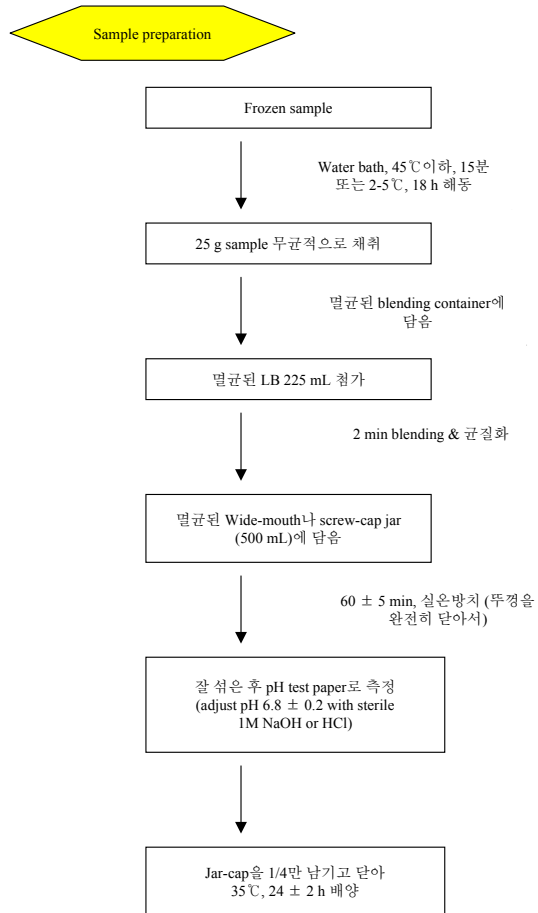
신속검출법을 개발하고자 할 때 얻은 결과를 확인하기 위하여 일반적으로 전통적인 미생물 검사방법을 병행한다. 식품의 *Salmonella* 검출 시 전통적으로 사용되어온 AOAC, USDA의 BAM protocol은 culture-based method로서, 일반적으로 시료 무게의 10배 부피의 lactose broth에 1차 증균배양 후 RV, TT broth에서 선택 배양한 액을 BS, XLD, HE agar에 도말하는 과정으로 이루어져 있다. 각 단계의 증균액을 IMS-LIA test 와 동시에 배지에 도말하여 의심집락을 생화학적 방법으로 동정하였다. 일반적으로 전통적 배지 증균방법에 의한 *Salmonella* 검출 과정은 동정을 위한 의심집락을 얻기까지 3~6일의 시간이 소요되는 단점이 있다.

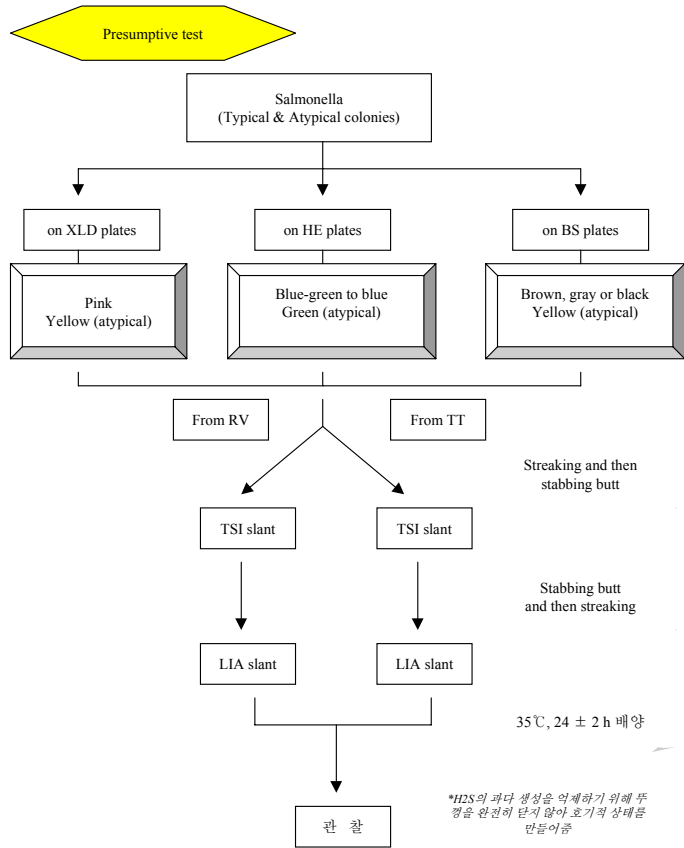
XLD agar에서 *Salmonella*가 나타나는 원리는 이들이 xylose를 분해하여 노란색의 집락인데, lysine이 탈탄산 효소화하여 집락은 서서히 분홍색에서 적색으로 되며, sodium thiosulfate와 ferric ammonium citrate에 의해 황화수소(H_2S)를 생성하여 중심부가 흑색으로 변한다. 이 배지는 살모넬라 의심 집락을 확인 동정하는데 유용하지만, *Salmonella* 균주와 *Proteus*, *Citrobacter*가 매우 유사한 집락으로 나타나기 때문에 배지 상에서 구분하기가 힘들고, false positive인 결과가 나타날 확률이 높다. 따라서 최종적인 결과를 얻기 위해서는 반드시 추가적인 생화학적, 혈청학적 동정이 필요하다. 따라서 XLD와 다른 원리로 *salmonella*를 검출할 수 있는 배지와 비교를 통해서 검출시간이 단축될 수 있는지를 알아보았다.

LB broth에 ATCC 균주(*Citrobacter youngae* 및 *Salmonella* spp.)를 접종하여 35 에서 18 시간 증균하여 순수 배양액을 얻어 이 증균액 1mL을 RV broth 10mL에 접종하여 4 2 에서 24시간 정지배양했다. 2차 증균배양액은 XLD 및 SCA(*Salmonella chromogenic agar*) medium에 LB broth 증균액과 RV broth 증균액 0.1mL을 도말하였다.

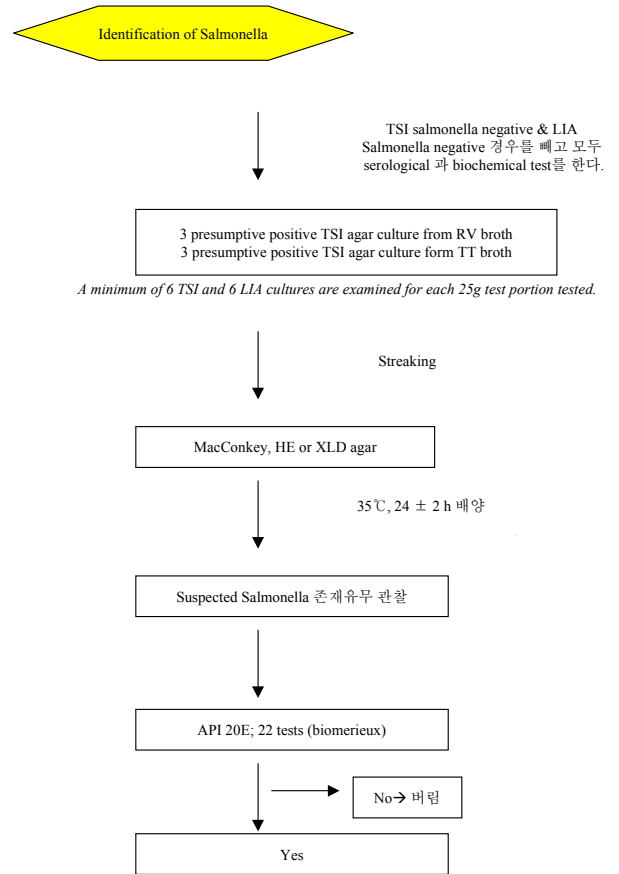
℃

℃



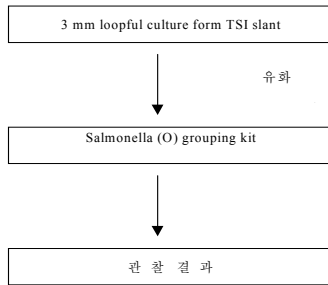


	TSI (+)	LIA (±)
Salmonella	Alkaline (red) slant & Acid (yellow) butt w/wo H ₂ S (blackening of agar)	Alkaline (purple) butt



Confirmation

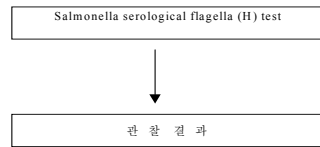
1. Welcolex color Salmonella (Remel Inc.)를 이용한 Salmonella serological somatic (O) test



© classification of polyvalent somatic (O) test

	mixture	control	
positive	o	x	교착: O 비교착: X
negative	x	x	
nonspecific	o	o	Additional test 필요 AOAC 967.27(17.9.03)

2. Salmonella latex test (Oxoid)를 이용한 Salmonella serological flagella (H) test



© classification of polyvalent somatic (H) test

	mixture	control	
positive	o	x	교착: O 비교착: X
negative	x	x	
nonspecific	o	o	Additional test 필요 AOAC 967.27(17.9.03)

14. 검출법의 신뢰성 검증 : 식품 적용 실험

1) 계란 표면에 존재하는 microflora 조사

계란(무정란, 세척)을 0.1% tween 80이 포함된 saline solution(0.85%)에 침지하고 25 stomacher에서 20분간 stirring하여 0시간 및 35 에서 18시간 증균배양액을 PCA에 도말하여 48시간 배양하였다. PCA에 나타난 집락은 API 20E로 동정하였다.

2) 계란의 non-selective media 증균 배양시간과 미생물

BHI 배지에 유정란을 침지하고, 35 에서 7, 24시간 배양하면서 배양시간에 따른 총균수 측정(PCA)과 Salmonella 의심집락(XLD)을 분리하였다. XLD agar에 나타난 살모넬라 의심 집락은 좀 더 뚜렷하게 살모넬라 여부를 확인 할 수 있도록 살모넬라가 보라색으로 나타나는 Salmonella chromogenic agar(SCA, Oxoid)로 옮겨서 성상을 파악하였고, 의심집락은 API 20E strip(bioMerieux)으로 동정하였으며, 동시에 항원-항체 반응 원리로 검사하는 Reveal kit Salmonella(Neogen)로 확인하였다.

3) 유정란의 부위별 IMS-LIA

난황과 난백의 혼합물 25g은 무균적으로 분리하여 균질화한뒤 Salmonella 증균배양 효과가 가장 좋았던 BHI 배지에서 35 , 24시간 배양하였다. BHI 증균액으로 IMS-LIA를 실시하였으며, 동시에 총균수 및 Salmonella 의심집락을 분리하였다(PCA 및 SCA). 분리된 의심집락은 API 20E strip(bioMerieux) 및 Singlepath Salmonella(Merck)로 동정하였다.

4) 유정란과 무정란의 부위별 IMS-LIA 비교

계란을 BHI 배지에 침지하여 35 에서 24시간 증균한 액을 IMS-LIA를 측정함과 동시에 SCA 배지에 도말하여 장내세균 의심집락을 생화학적 방법인 API 20E로 동정하였다.

5) 유정란 껍질의 증균방법 차이에 따른 IMS-LIA와 상업용 kit와의 성능 비교

유정란의 살모넬라 측정을 위해서 두 가지 방법을 채택하였다. 즉 표준균주로 측정했을 때 살모넬라 증균율이 좋았던 BHI 증균배양(그림 5) 및 FDA's Bacteriological Analytical Manual(BAM) protocols의 변형방법(그림 6)으로 검사하였다. BAM protocols은 계란 무개의 10배의 BPW에서 증균한 후에 0.1mL을 취해 RV broth에 옮겨 42 에서 24시간 선택배양하여 SCA 배지에 도말하였다. 동시에 RV broth 증균액으로 IMS-LIA 및 commercial test kit을 이용하여 검사를 실시하였다. 유정란은 각 제조원 별로 최소 3개의 시료로 IMS-LIA를 실시하였다.

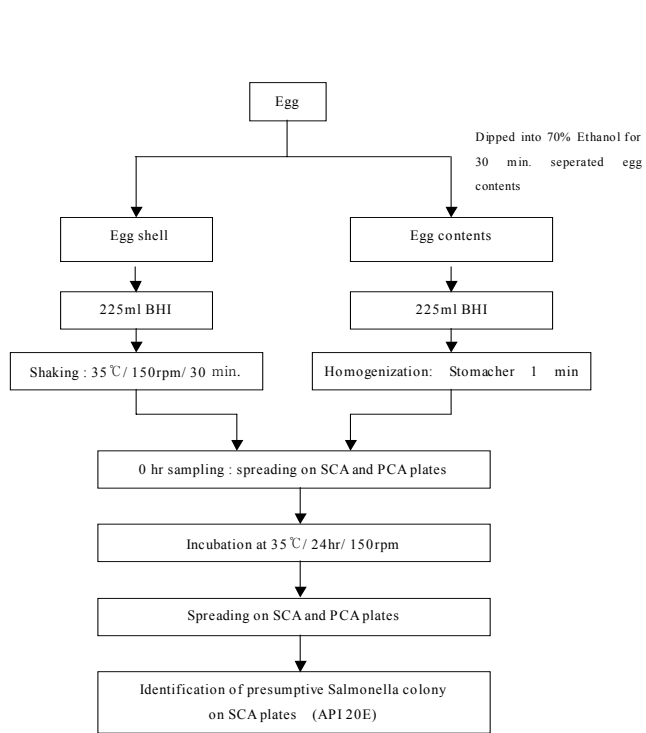


Fig. 5. Flow chart for isolation Salmonella from fertilized chicken eggs by BHI broth enrichment method.

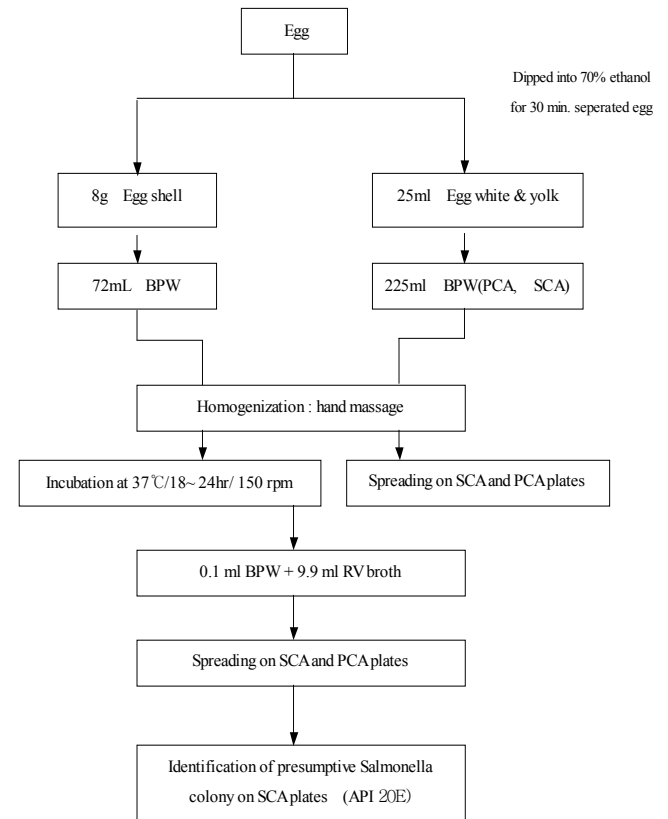


Fig. 6. Flow chart for isolation Salmonella from fertilized chicken eggs by modified from FDA's Bacteriological Analytical Manual protocols.

6) 닭껍질에서 Salmonella 검출을 위한 IMS-LIA(unsiked)

식품의 살모넬라 감염과 관련하여 계란 이외에 닭의 오염이 주로 문제가 되어왔다. 특히 살모넬라와 다른 병원성 세균은 닭고기 표면 부위를 오염시키므로, 닭고기 표면에 존재하는 살모넬라를 IMS-LIA 방법 및 전통적 배지 방법으로 검사하였다. 닭껍질은 무균적으로 25g 채취하여 0.1% BPW에서 증균배양(37, 18시간)한 뒤 0.1mL을 취해 RV broth에서 선택배양(42, 24시간)하였다. IMS-LIA는 BPW, RV broth 증균액 각각 1mL을 Dynabeads anti-Salmonella(Dynal)와 반응시켜 측정하였다. 동시에 BPW 증균 전과 RV broth 증균 후에 XLD, PCA 배지에 도말하여 총균수 및 의심집락을 얻었고, RV broth 증균 후의 XLD 집락을 API 20E로 동정하였다.

7) Salmonella를 spiking한 닭껍질의 IMS-LIA

Salmonella enteritidis (ATCC 4931)를 닭껍질 g당 4 CFU, 136 CFU 수준으로 접종하여 BPW 증균배양 후와 RV broth 선택배양 후의 IMS-LIA signal을 비교하였으며, 배지에 도말하여 확인실험을 진행하였다.

Spiking하기 위한 Salmonella enteritidis는 BHI broth에 접종하여 35에서 18시간 배양하여 얻은 stock culture를 10(-7)까지 희석하여, 균수과약을 위해 nutrient agar에 도말하였다.

닭껍질은 포장 판매하는 도계육을 구입하여 껍질부위를 무균적으로 채취하였으며, 25g을 0.1% BPW와 혼합하여 균질화하였다. 균질액에 희석한 살모넬라 증균액 1mL을 접종하고 37에서 18~24시간 증균하였다. BPW 증균액 0.1mL을 RV broth(42)에 접종하고 24시간 증균하였다. IMS-LIA는 Dynabeads anti-Salmonella(Dynal)를 사용하여 BPW 및 RV broth 증균액을 각각 측정하였다.

3 절. 연구결과

1. Liposome immunoassay를 위한 최적 반응 조건 탐색

1) 혼합시간의 영향

Immunomagnetic beads와 Salmonell와의 혼합 시간이 길어질수록 균이 beads 표면에 결합할 확률이 커지게 된다. Beads 표면에 결합한 균이 많을수록 immunoliposomes의 결합 부위가 증가하므로 이는 signal 증폭과 연관된다. 본 실험에서는 이러한 상관관계를 알아보고자 beads와 Salmonella를 혼합한 후 반응시간을 80분까지 두어 분석 signal의 변화를 추적하였다 (그림 7).

결과에 따르면 반응시간이 길어질수록 beads와 결합하는 균의 수가 많아져 혼합 시간 80 분이 가장 우수한 결과를 보였다. 혼합 시간 80 분이 가장 우수한 결과를 보이지만 signal의 증가폭이 감소하는 추세이고 반응시간을 증가시키는 것은 결국 분석에 소요되는 전체적인 시간을 연장시키게 되므로 분석을 보다 빨리 완료한다는 것을 목표로 한다면 민감도를 고려한 적당한 반응시간을 설정할 필요가 있다. 이러한 견지에서 반응시간을 60 분으로 설정하였다.

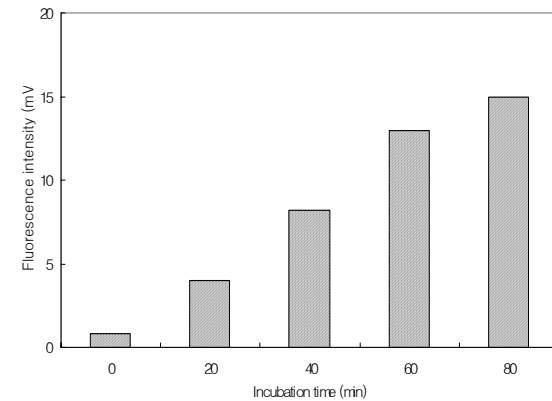


Fig. 7. Effect of mixing time.

2) 반응 튜브 재질의 영향

본 분석법은 일련의 반응이 test tube 안에서 이루어진다. Test tube의 재질이 면역분석 signal에 미치는 영향을 살펴보고자 borosilicate, silicon이 처리된 borosilicate, polypropylene 재질의 test tube에 대하여 분석을 실시하였다 (그림 8).

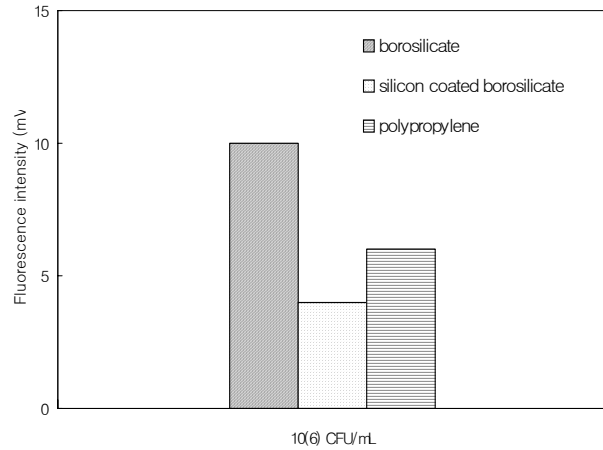


Fig. 8. Effect of test tube.

Salmonella 균이 10^6 CFU/mL 수준인 조건에서 가장 큰 분석 signal을 보이는 tube는 borosilicate 재질의 tube였다. Silicon이 처리된 borosilicate tube의 signal은 가장 저조하였는데 분석과정 중 다량의 immunomagnetic beads의 손실이 관찰된 것으로 보아 이것이 signal 저하의 직접적인 원인으로 작용한 것으로 사료된다. Polypropylene tube도 마찬가지로 immunomagnetic beads의 회수율이 borosilicate tube에 비해 떨어져 signal이 저해되었다. 따라서, 본 실험에 적합한 tube는 borosilicate 재질임을 알 수 있다.

3) 비특이적 반응의 감소화

본 분석법에서는 immunomagnetic beads-*Salmonella*-immunoliposome 결합 complex가 형성된 후 결합에 이용되지 않은 잉여의 immunoliposome을 세척하는 단계가 수반된다. 이때 세척에 쓰이는 버퍼가 분석 signal에 미치는 영향을 살펴보았다 (그림 9). 문헌조사를 통해 면역분석법의 비특이적 반응 감소에 주로 사용되는 bovine serum albumin을 버퍼에 첨가하여 그 효과를 살펴보았다. 이 실험은 균이 없는 상태에서 실시하였다. 균이 없는 상태이므로 당연히 분석 signal은 최소값으로 나타나야 한다. 결과에 나타난 것처럼 세척버퍼에 BSA가 포함되지 않은 경우는 분석 signal이 높게 나타나 비특이적 반응이 높음을 알 수 있다. BSA가 포함된 세척버퍼의 경우는 동일한 조건에서 분석 signal이 background 수준으로 낮게 나타났다. 따라서 BSA가 비특이적 반응을 줄이는데 기여함을 알 수 있다.

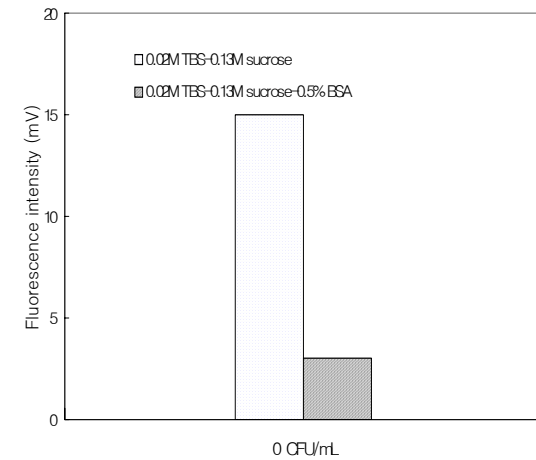


Fig. 9. Effect of BSA.

4) Liposome 희석배수

Liposome 희석배수가 분석 signal에 미치는 영향을 알아보기 위해 1/35와 1/70로 희석한 liposome을 사용하여 분석 signal을 비교하였다 (그림 10). 그 결과 농축된 liposome 사용시 분석 signal의 강도가 높았다. 그러나 이때는 negative control의 signal도 같이 증가해 signal/noise의 비율을 비교한다면 liposome을 1/70로 희석해 사용하는 것이 더욱 효과적임을 알 수 있었다.

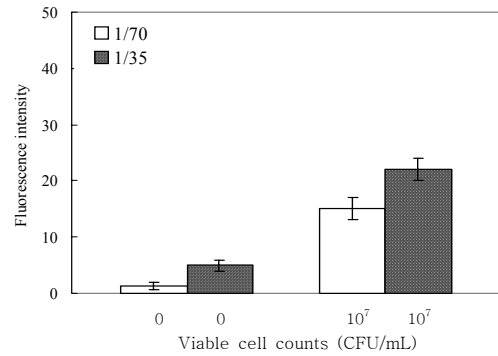


Fig. 10. Dilution effect of liposome

5) 균주의 희석배수

배양 균주의 원액을 사용한 경우와 이를 1/10으로 희석하여 사용한 경우에 있어서의 분석 signal을 살펴보았다 (그림 11). 이론적으로는 원액 사용시 희석액에 비해 이에 함유된 균의 수가 많으므로 분석 signal이 더 커야하는데 실험 결과는 반대로 나타났다. Magnetic bead를 사용하는 가장 큰 이유 중의 하나는 immunoassay의 방해요소인 matrix effect를 줄이기 위함인데 matrix에 의한 간섭효과가 효과적으로 줄어들기는 하여도 완벽한 제거는 이루어지지 않은 것으로 보인다.

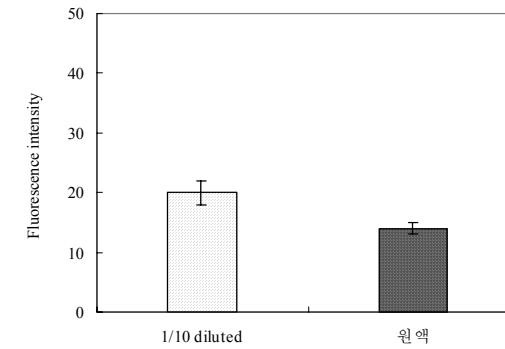


Fig. 11. Dilution effect of cell culture.

6) 최종 반응 부피 설정

Magnetic bead 사용시 최적의 부피를 설정하기 위해 사용 목적은 다르지만 제조사에서 제시하는 20 μ L을 기준으로 부피를 달리하여 분석 signal을 비교하였다. 본 실험의 주된 목적은 magnetic bead에 의한 비특이적 반응 signal 발생이 있는가에 대한 것이다. 실험 결과, magnetic bead의 양이 10 40 μ L인 조건에서 비특이적 반응에 의한 signal 발생은 미미한 것으로 나타났다 (그림 12). 이후 magnetic bead 이용을 가급적 제한하기 위해 그 사용량을 20 μ L로 고정하였다.

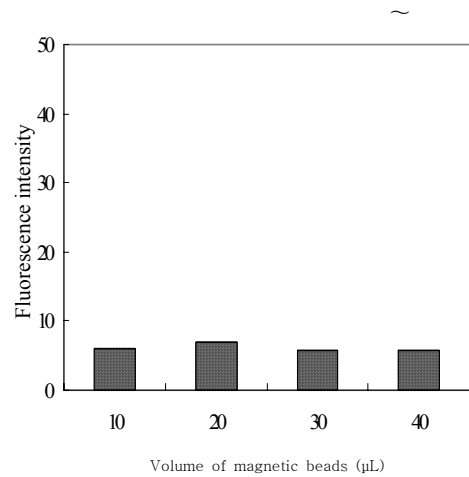


Fig. 12. Effect of volume of magnetic beads.

6) 정량 곡선 획득(Dose-response relationship)

현 단계까지 설정된 조건을 토대로 균의 수에 대한 분석 signal의 정량 관계를 살펴보았다 (그림 13). 그 결과, 생균수의 양이 증가함에 따라 분석 signal의 크기도 증가하는 관계를 보였다.

BHI 배지에서 35 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 각각 순수 배양한 *Salmonella enteritidis* (ATCC 4931), *Salmonella typhimurium*(ATCC 13311)를 *Salmonella*-IgG가 magnetic bead에 공유 결합 되어있는 Dynabead anti-*Salmonella* (Dyna)와 반응시켰다. 검출한계를 알아보기 위해 순수 배양액(10^8)을 단계별로 희석하여 형광도를 측정하였다.

BPW에서 *Salmonella* 오염 정도와 분석 강도와와의 관계를 IMS-LIA 방법으로 측정하였다 (그림 13). *Salmonella enteritidis* (ATCC 4931)는 10^4 CFU/mL에서 negative control(0 CFU/mL)과 표준편차(0.3)의 3배 이상 차이가 나는 positive signal이 나타났고, *Salmonella typhimurium*(ATCC 13311)은 10^6 CFU/mL부터 positive signal이 나타났다. 따라서 검출한계인 10^5 CFU/mL 수준까지 균을 증폭시키기 위해 증균 단계가 필요하지만, 이 범위의 오염도에서는 *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*을 검출할 수 있을 것이다.

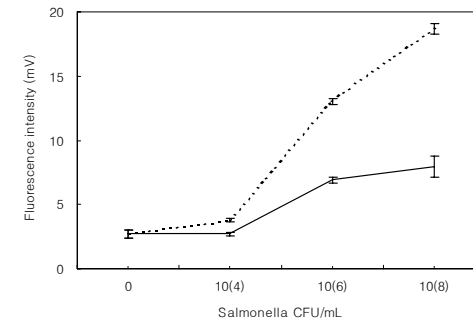


Fig. 13. Dose-response curves for *Salmonella* spp. in BHI broth, results obtained using IMS-LIA.

— *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311)

..... *Salmonella enteritidis* (ATCC 4931)

* STD. of the background(BPW) is 0.3

Positive signal is greater than 3.5 ($3 \times 0.3 = 0.9$)

2. 강화 배양 조건의 실험실적 조건 탐색

1) Shaking 효과

진탕수에 따른 생균수의 변화를 알아보기 위해 100, 130, 180 rpm로 설정한 incubator의 조건 아래 실험을 진행하였다. 온도 실험과 마찬가지로 배양 9 시간 이전에서 최대의 생균수를 나타내는 조건이 설정될 것이다. 각 실험마다 회전수 이외의 모든 factor를 일정하게 유지하여 재현성 있는 결과를 얻고자 한다 (그림 14).

결과에 따르면, *Salmonella enteritidis*는 진탕수가 100-200 rpm으로 변환에 따라 배양시간에 따른 생균수의 변화가 있었으나 일정한 경향을 보이지는 않고 서로 유사한 결과를 보여 진탕수에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 반면 *Salmonella typhimurium*은 진탕수에 따른 생균수의 변화가 크게 나타나 150 rpm에서 우수한 결과가 200 rpm에서는 생균수가 저조하였다.

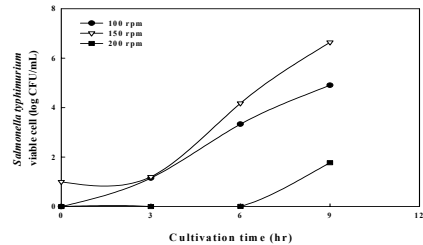
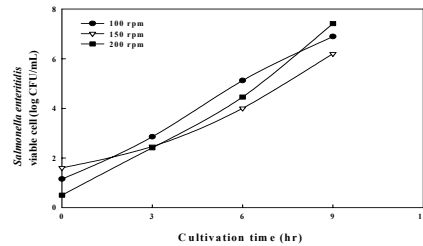
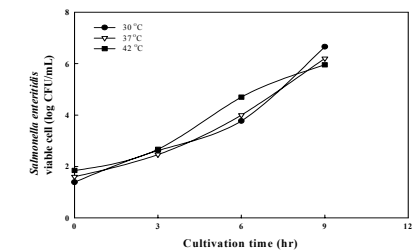
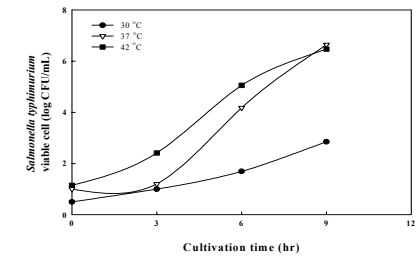


Fig. 14. Effect of agitation.

2) 온도

배양 온도별 생균수의 변화를 알아보기 위해 Brain Heart Infusion 배지에 *Salmonella enteritidis*와 *Salmonella typhimurium*을 각각 접종하고 30, 37, 42 °C 조건에서의 실험을 하였다. 특히, 배양 시간을 단축하기 위해 배양 9 시간 이전에서의 가장 최적의 온도를 검토하였다 (그림 15).

결과에 따르면, *Salmonella enteritidis*는 30, 37, 42 °C에서의 생장이 모두 양호한 것으로 나타났다. *Salmonella typhimurium*은 30 °C와 37 °C에서의 생장은 양호하나 42 °C에서의 생장은 미약했다. 기존의 많은 보고에서 42 °C의 배양온도를 명시하지는 하지만 본 실험의 결과 이는 균주마다 다를 수 있다는 것을 알 수 있다.



3) 배지종류

Salmonella spp. 4 종에 대한 배지 종류에 따른 생균수 영향 실험의 결과는 그림 16, 17과 같다. 실험 결과, 5 종의 배지 가운데 BHI 배지가 *Salmonella spp.* 4 종에 대해 배양 9 시간 이내의 시점에서 균수 증폭에 가장 적합한 배지임을 알 수 있었다.

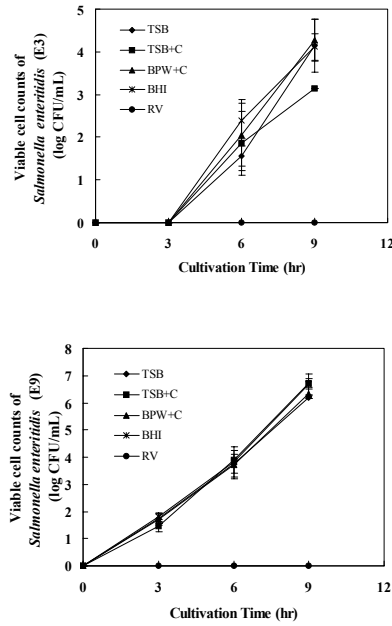


Fig. 16. Effect of culture media on the growth of *Salmonella enteritidis*.

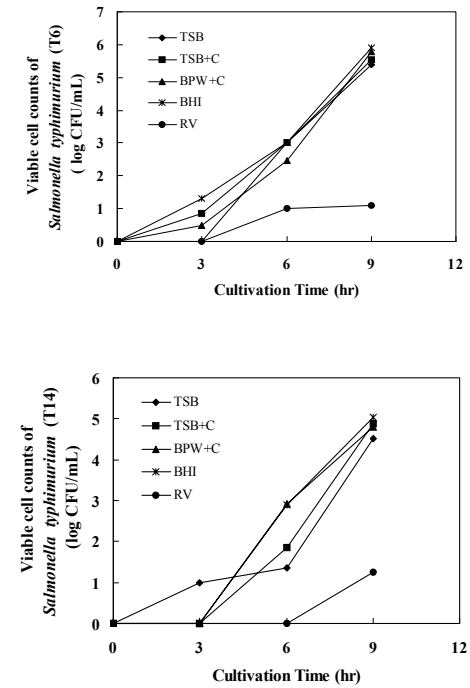


Fig. 17. Effect of culture media on the growth of *Salmonella typhimurium*.

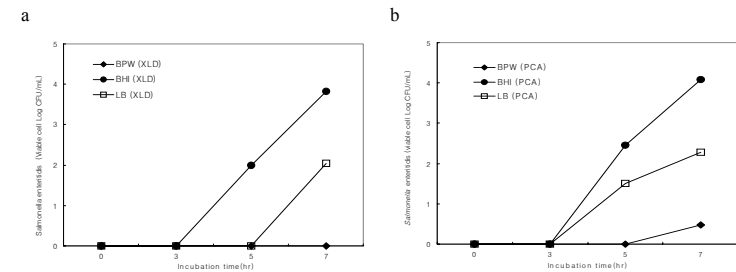
4) *Salmonella* 증균배지

살모넬라가 단시간 내에 빨리 증균될 수 있는 배지를 찾기 위하여 문헌고찰을 통해 *Salmonella* 검출시 사용되는 배지를 조사하여, 선택성이 없으면서 미생물이 빨리 생육할 수 있는 BHI, Lactose broth, BPW의 증균배지 3종을 선정하였다. *Salmonella enteritidis*(ATCC 4931), *Salmonella typhimurium*(ATCC 13311)의 각각의 균주를 BHI, Lactose broth, BPW에 0.24 CFU/mL 수준으로 접종하여 35 에서 진탕배양하면서 0, 3, 5, 시간의 균수를 PCA와 XLD에서 동시에 측정하였다 (그림 18).

*Salmonella enteritidis*는 0.24 CFU/mL 접종시 BHI에서 증균이 가장 많이 되었다. 이런 결과는 XLD agar와 PCA agar에 나타난 집락 수를 비교했을 때도 모두 동일하였다. XLD, PCA 배지에 나타난 두 균주의 균수는 BHI> LB> BPW 순서였으며, 3시간 이후부터 7시간 까지 배지 간의 증균 정도의 차이가 뚜렷하게 나타났다. 이런 결과는 *Salmonella* 증균에 가장 일반적으로 사용되는 peptone water가 다른 배지들 보다 *Salmonella* 증식에 있어서 가장 효과가 적음을 나타내는 것이다. 이것은 peptone water가 높은 *Salmonella* 성장을 지지하기에는 영양의 품질이 낮은 것으로 설명할 수 있다. 따라서 BHI 배지를 향후 식품적용 실험의 증균 배지로 선택하였다.

℃

① *Salmonella enteritidis* (ATCC 4931) - 0.24 CFU/mL spiked



Salmonella typhimurium (ATCC 13311) - 0.003 CFU/mL spiked

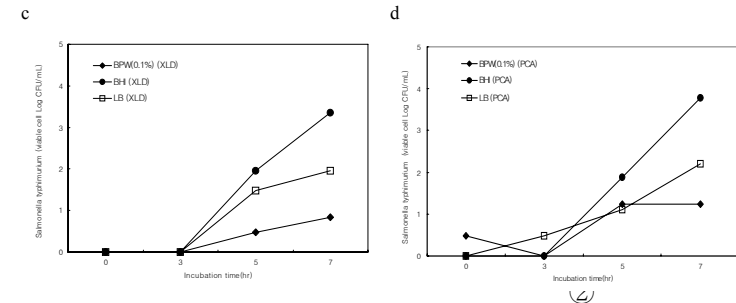


Fig. 18. Growth curve of *Salmonella* spp. in various non-selective broths.

5) 배양시간

BHI 배지를 사용하여 *Salmonella spp.* 2 종에 대한 배양시간에 따른 성장 곡선을 조사하였다. 그 결과 배양 12 시간 이후로는 성장 속도가 둔화 또는 감소해 stationary phase에 진입하는 양상을 보였다 (그림 19, 20).

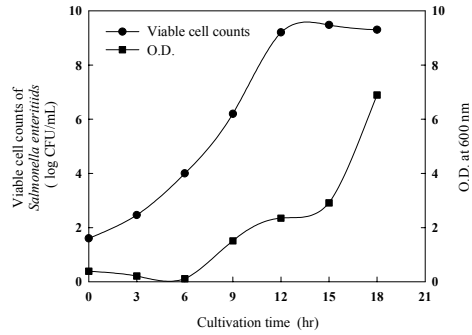


Fig. 19. Growth curve of *Salmonella enteritidis* in BHI media.

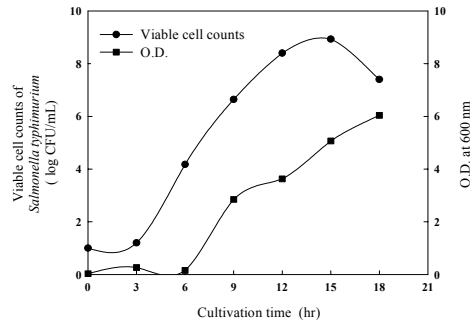


Fig. 20. Growth curve of *Salmonella typhimurium* in BHI media.

6) *Salmonella* 집락 분리용 선택배지 선정

LB broth에 ATCC 균주(*Citrobacter youngae* 및 *Salmonella spp.*)를 접종하여 35 에서 18 시간 증균하여 순수 배양액을 얻어 이 증균액 1mL을 RV broth 10mL에 접종하여 42 에서 24시간 정치배양했다. 2차 증균배양액은 XLD 및 SCA(*Salmonella chromogenic agar*) medium에 LB broth 증균액과 RV broth 증균액 0.1mL을 도말하였다.

IMS-LIA와 병행하여 전통적 배지검사 방법으로 RV 및 TT broth에서 *Salmonella* 및 다른 장내세균을 증균했을 때 XLD 배지에 나타나는 집락의 모양 관찰 결과 *Salmonella*는 가운데 황화수소에 의한 검은 점이 있는 투명한 노란색의 집락으로 나타났다. *Citrobacter youngae*는 살모넬라 선택 증균에 사용되는 RV 및 TT broth에서 증균했을 때 XLD agar에서 집락은 나타나지 않았고, LB broth 증균액을 도말했을 때 살모넬라와 유사한 노란색의 황화수소 발생 집락과 노란색의 집락이 혼재되어 나타났다 (표 1).

IMS-LIA는 전통적으로 사용되어온 배지 증균법에 바탕을 두기는 하지만, 확인 실험을 위한 배지 방법이 false-negative인 결과가 높은 것은 비효율적이다. 따라서 최근에는 황화수소를 발생시키거나 lactose를 분해하지 않는 집락을 구별하는 XLD와 같은 기존의 배지보다 최근에는 유사 장내세균을 억제하지 않으면서 살모넬라만이 분해할 수 있는 색소를 첨가하여 집락을 구분할 수 있는 chromogenic medium이 많이 개발되었다. *Salmonella chromogenic medium* (SCM, OXOID)과 XLD의 *Salmonella* 집락의 모양을 비교하여 관찰하였을 때 SCM은 *Salmonella*가 Magenta-cap (5-bromo-6-chloro-3-indolylcaprylate)을 가수분해하여 자주색 또는 분홍색 집락으로 보이고, 다른 Enterobacteriaceae는 파란색 또는 무색으로 나타난다 (그림 21). *Ps. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *C. albicans* 등은 false-positive로 나타나기도 하지만, Chromogenic substrates를 사용하는 여러 배지들 가운데 SCM은 false-positive인 균주가 나타나는 비율이 가장 적어 정확성이 높고, 배지 성분에 의한 저해작용이 일어나지 않는 장점이 있다. 그러므로 동정에 필요한 노동력과 시간이 단축되므로 IMS-LIA와 같은 신속검출법과 동시에 사용하기 위한 배지로 적합하다고 생각된다.

Table 1. Colony shape of *Salmonella* and *Citrobacter* on XLD agar.











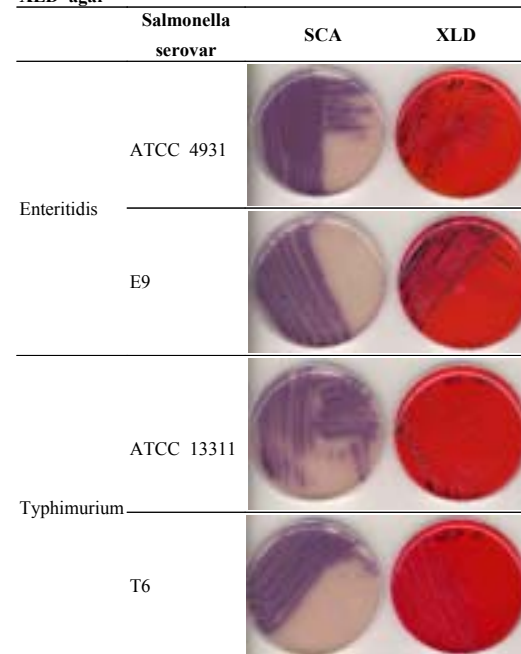
Microbial strain	Enrichment broth	Colony shape on XLD agar
ATCC 4931 <i>Salmonella enteritidis</i>	RV	Inhibition (no colony)
	TT	 opaque, red-gray colony with black center
	LB	 transparent, colonies red with black centers
ATCC 13311 <i>Salmonella typhimurium</i>	RV	 transparent, colonies red with black centers
	TT	 transparent, colonies red with black centers
	LB	 transparent, colonies red-gray with black centers
ATCC 29935 <i>Citrobacter youngae</i>	RV	Inhibition (no colony)
	TT	Inhibition (no colony)
	LB	 opaque, yellow colony and yellow colony with black centers
E9(SC-22-02) <i>Salmonella enteritidis</i>	RV broth	 opaque, red-yellow colony with black center
	TT broth	 opaque, red-yellow colony with black center
T6(KC-140-9) <i>Salmonella typhimurium</i>	RV broth	 transparent, colonies red with black centers
	TT broth	 transparent, colonies red with black centers

Fig. 21. Colony shape of *Salmonella* Chromogenic agar and XLD agar



3. 식품 적용 실험 : 계란

1) 계란 표면에 존재하는 microflora 조사

계란(무정란, 세척)을 0.1% tween 80이 포함된 saline solution(0.85%)에 침지하고 25 stomacher에서 20분간 stirring하여 0시간 및 35 에서 18시간 증균배양액을 PCA에 도말하여 48시간 배양하였다. PCA에 나타난 집락은 API 20E로 동정하였다.

계란 표면에 존재하는 천연의 미생물군 가운데 Salmonella와 생육특성이 유사하여 IMS-LIA 검출 시 cross-reactivity 가능성이 있는 균주를 알아보기 위하여 실험한 결과, 계란 표면에 부착된 균주는 *Pantoea* spp., *Pasteurella pneumotropica/haemolytica*였다. 이들은 Gram 음성 간균이며, *Pantoea*는 1989년 이전에는 *Enterobacter agglomerans*로 분류되었다. *Pantoea*는 다양한 환경과 여러 동물 및 식물에서 분리되어온 균주이다. 이 균주는 특히 당근과 양상치, 셀러드용 냉이 및 파, 콩에서 발견되었다. *Pasteurella pneumotropica*는 가금류에서 발견되는 균이고, 마우스, 랫, 햄스터와 기니아 피그에서 발견되며 이런 실험동물의 주요 병원균이지만 이들의 심각성은 높지 않다. Musgrove(2004) 등의 계란의 세척효과에 관한 미생물실험에서도 *Pasteurella*가 동정되었으나, 본 연구에서는 세척된 계란을 사용하였기 때문에 장내세균 배지인 XLD agar에서 집락이 형성되지 않고 PCA에만 나타난 것으로 생각된다.

2) 계란의 non-selective media 증균 배양시간과 미생물

BAM protocol에 따르면 계란의 1차 증균배양 배지는 lactose broth이다. 그러나 본 연구에서는 BHI 배지가 가장 효과가 가장 좋았으므로, BHI를 계란의 증균배지로 선정하였다. BHI는 non-selective media이므로 *Salmonella* 검출에 영향을 줄 수 있는 competitive microflora를 조사할 필요가 있다.

유정란은 제품 특성상 세척살균 단계를 거치지 않아 *Salmonella*와 같은 유해한 장내세균에 노출될 수 있기 때문에 시료로 선정하였다. 유정란 껍질 표면에는 닭의 분변이나 깃털 잔여물이 붙어있는 경우가 많아 측정부위로 선택하였다.

Table 2. Identification of presumptive Salmonella isolates from cultural suspension(BHI) of unwashed fertilized egg shell surface plated onto Salmonella Chromogenic Agar

Cultivation time of eggs (hr)	SCA(Salmonella Chromogenic Agar)	Reveal kit Salmonella	API 20E
	7	Purple Blue	(+) (-)
24	Purple	(-)	<i>Acinetobacter baumannii/calco.</i>
	Purple	(-)	<i>Acinetobacter baumannii/calco.</i>

°C

표 2에 계란 표면에서 미생물을 측정된 결과를 나타내었다. 면역학적 방법을 사용하는 진단키트(Reveal Salmonella)에서 양성 반응을 나타냈고, SCA에서 보라색 집락이 나타난 것은 *Chryseomonas luteola*(92%)로 동정되었다. *Chryseomonas luteola*는 그람음성의 간균으로, 주로 물, 토양, 습한 환경에서 주로 발견되는 것으로 알려져있다. 이 균의 감염증은 패혈증, 뇌막염, 골수염, 심장내막염, 복막염 등과 관련이 있고, 면역억제제 치료, 만성 신장 기능 부전, 악성종양 환자와 관련이 있다.

또한 진단키트에서는 음성이었으나 보라색으로 나타난 집락은 *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*(98.1%)였다. *Acinetobacter calcoaceticus*는 Gram음성구균으로 예전에 *Acinetobacter lowffi*, *Mima polymorpha*로 분류되었다. *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*는 *Pantoea*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* 등과 함께 SCM(Salmonella chromogenic medium)에서 false-positive를 나타내는 균주들이며, 이들은 *Salmonella*와 배지 내에 공존할 때 경쟁적 저해를 일으키는 것으로 알려져있다. 따라서 증균배양에서 *Salmonella* 이외의 장내세균을 감소시킨다면 IMS-LIA를 식품에 적용할 때 false-positive 결과가 나타날 확률이 작아질 것이다. 따라서 BHI 배지에서 유정란을 24시간 증균 배양 한 뒤에 IMS-LIA를 실시하여 false-negative 결과가 나타날 수 있는 가능성을 확인할 필요성이 있다.

3) 유정란의 부위별 IMS-LIA

난황 및 난백은 계란의 실제 가식부위이므로 껍질과 별도로 *Salmonella*를 검사하였다. 난황 및 난백은 배지에서 총균 및 살모넬라 의심집락이 나타나지 않았으며, 껍질 증균액에서 *Enterobacter aloacae*를 분리하였다 (그림 22). 난황 및 난백의 24시간 증균액

에서 살모넬라 의심검락(SCA) 및 총균(PCA)이 나타나지 않은 것은 난백의 lysozyme, ovotransferrin과 알칼리성인 pH 때문에 대부분의 미생물의 생육이 저해되거나 미생물이 자랄 수 없도록하기 때문이다. 일반적으로 계란의 살모넬라 감염율은 낮지만, 계란에서 살모넬라가 검출되는 경우는 저장기간이 길어지는 동안에 이들이 스스로 ovotransferrin에 대항 할 수 있는 chelator를 분비하여 계란에서 살아남을 수 있는 능력이 있기 때문이다.

IMS-LIA 결과 계란 껍질은 Salmonella 음성으로 나타났다. 이때 배지 내의 균수는 10(8)~10(9) CFU/mL 이었으나 SCA에서 Salmonella는 동정되지 않았다. 따라서 계란 껍질은 IMS-LIA와 배지검사 방법의 결과가 일치하여 BHI 증균 방법을 IMS-LIA에 적용할 수 있는 것으로 판단된다.

그러나 난황 및 난백의 IMS-LIA 결과는 Salmonella 음성으로 판단할 수 있으나, negative control인 BHI의 형광도가 높았다. 그 이유는 배지와 시료간의 점성의 차이에서 기인한다고 생각된다. Cudjoe 등(1994)에 따르면 난황 및 난백은 매우 점성이 높은 시료이기 때문에 회석을 하지 않고 IMS를 실시할 경우에 magnetic bead의 소실이 78% 까지 일어나고, 10배 희석했을 때는 8%라고 하였다. 생선 시료에 중금속의 존재는 산화환원 전위에 영향을 주어 IMS에 사용되는 magnetic particle이 응집되도록하여 false-negative인 결과가 나타나도록 하였다.

Immunoassay를 실시할 때 검출저해요인의 대표적인 것으로 식품 matrix의 특성에서 기인하는 다양한 matrix 문제가 있다. Sprout에 많은 양이 포함되어 있는 polyphenol 물질은 항체에 부착되어 항원-항체 결합을 막아 immunoassay를 방해하여 검출한계를 높였다. 우유에 Staphylococcal enterotoxin B가 있을 때 immunoassay의 검출한계가 증가되었다. 이외에 식품 내 본래 존재하는 미생물(indigenous microflora)이 높은 수준으로 존재하는 것도 분석에 영향을 끼칠 수 있다. Normal flora bacteria는 일반적으로 심각한 health risk를 갖지 않으나 이들의 물리적 존재는 특정 목표 미생물의 선택적 분리 및 동정을 방해할 수 있기 때문이다.

따라서 시료의 조건이 달라 지기 때문에 Liposome immunoassay에서 형광도 측정값이 달라질 수 있으며, 회석하여 IMS-LIA를 실시할 경우에 균수가 적어지게 되므로 증균 단계에서 효과적으로 Salmonella를 증폭시킬 수 있는 방법을 모색해야 하겠다.

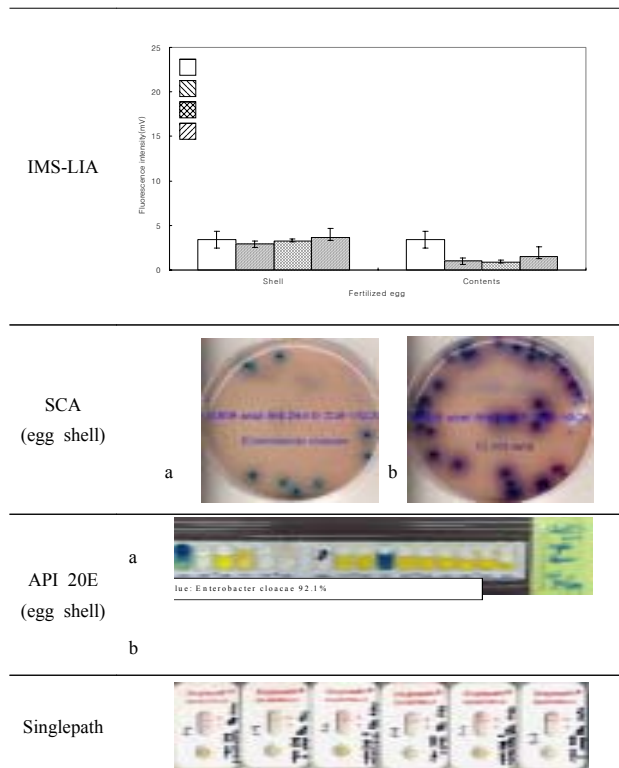


Fig. 22. Comparison of IMS-LIA procedure with commercial kit in retail fertilized eggs.

A:
B:
C:
D:
* : PC

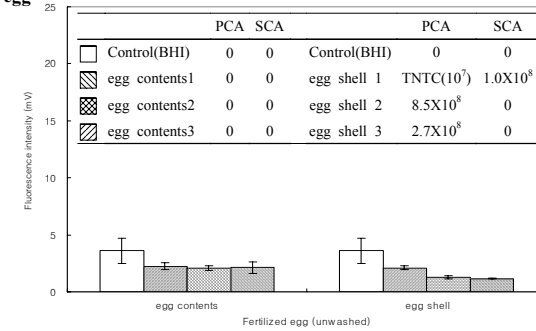
4) 유정란과 무정란의 부위별 IMS-LIA 비교

계란을 BHI 배지에 침지하여 35 에서 24시간 증균한 액을 IMS-LIA를 측정함과 동시에 SCA 배지에 도달하여 장내세균 의심집락을 생화학적 방법인 API 20E로 동정하였다.

세척 살균 과정을 거치지 않은 유정란과 위생처리를 거친 무정란은 존재하는 미생물군이 서로 다를 것이므로, 자연적으로 존재하는 background microflora가 IMS-LIA에 미치는 영향을 파악하고자 하였다. 유정란과 무정란 모두 IMS-LIA는 대조군 보다 낮은 값을 보여 살모넬라는 음성으로 나타났으며, 전통적 배지법에 의한 동정결과 및 면역학적 방법을 이용하는 간이 kit 검사에서도 같은 결과가 나타났다 (그림 23). 무정란의 껍질의 SCA 배지에서 보라색 집락은 API 20E로는 동정할 수 없었으며, 파란색으로 나타난 집락은 *Enterobacter cloacae*로 동정되었다. 또한 상업적 kit인 Singlepath Salmonella로 BHI 증균 배양액($10^7 \sim 10^9$ CFU/mL)을 검사한 결과 유정란, 무정란 모두 껍질과 난황, 난백의 증균액에서 살모넬라 양성인 결과는 나타나지 않았다. 따라서 유정란과 무정란 모두 background microflora는 살모넬라 측정을 위한 IMS-LIA에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

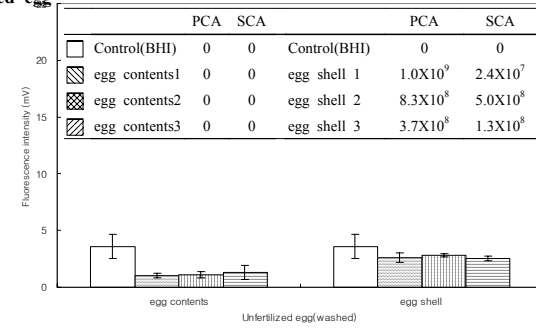
IMS-LIA (BHI, 24hr)

fertilized egg



IMS-LIA(BHI, 24hr)

unfertilized egg



Singlepath kit

SCA



Fertilized egg contents Fertilized egg shell Unfertilized egg contents Unfertilized egg shell No Salmonella

Fig. 23. Comparison of IMS-LIA procedure with commercial kit in retail fertilized eggs.

5) 유정란 껍질의 증균방법 차이에 따른 IMS-LIA와 상업용 kit와의 성능 비교

유정란의 살모넬라 측정용을 위해서 두 가지 방법을 채택하였다. 즉 표준균주로 측정했을 때 살모넬라 증균율이 좋았던 BHI 증균배양 (그림 5) 및 FDA's Bacteriological Analytical Manual(BAM) protocols의 변형방법 (그림 6)으로 검사하였다.

유정란을 IMS-LIA, 전통적 배지 방법, 상업적 시판 키트로 동시에 검사한 결과 세 방법 모두 살모넬라 양성으로 나타난 true-positive는 없었다 (표 3, 표4). 그러나 BPW-RV 배양방법으로 1개가 양성이었다고, 상업적으로 시판되고 있는 살모넬라 키트에서 양성인 것은 A, F, G, H, I의 6개였다. 동일한 시료에 대하여 IMS-LIA에서 양성으로 나타났으나, 상업적 kit와 SCA 배지 동정결과는 음성으로 나타난 false-positive가 1개(F23) 있어 IMS-LIA 방법을 식품에 적용함에 있어서 다양한 검출 저해 요인이 있음을 추정해볼 수 있으나, 상업적 시판 키트와 비교하면 정확성이 더 우수함을 알 수 있었다.

결론적으로 14개 브랜드의 유정란을 증균방법을 달리하여 SCA에 나타난 살모넬라 의심집락을 동정(API 20E)한 결과 *Salmonella*가 동정된 시료는 없었고, 껍질 부위의 BHI 증균액에서 Gram 음성인 *Enterobacter cloacae*, *Escherichia hermannii*, *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*가 동정되었다. IMS-LIA는 false-positive가 1개였고, 상업적 시판 키트는 6개였다. 따라서 IMS-LIA 방법의 정확도가 상업적 시판 키트 보다는 우수하다고 판단된다.

전체 14개 브랜드의 살균세척 과정을 거치지 않은 유정란을 증균방법을 달리하여 살모넬라를 측정된 결과 4개 브랜드에서 살모넬라 의심집락을 얻었다. 보라색 집락은 살모넬라로 추정되었으나 이들은 *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia coli* 1, 2, *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae*로 동정되었다. 동정에 사용된 API 20E strip은 genus나 species level 까지 동정이 가능하며, 동정 신뢰도가 90%이상인 것을 결과로 선택하였다. 분리된 균주들의 colony 성상을 Table 에 나타내었으며, *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*는 측정한 시료들 가운데 가장 많이 검출되었다(3 isolates from 48 eggs).

Cudjoe et al.(1994)은 계란껍질을 RV 배지에서 선택증균한 뒤에 BGA와 XLD 배지에 도달하는 방법으로 검사한 결과 살모넬라는 검출할 수 없었다고 보고하였다. 또한 이런 낮은 검출율은 검출방법의 불완전성에서 기인할 수도 있다. 본 연구에서는 전통적 배지방법에 의한 살모넬라 검출방법으로 RV broth 및 TT broth를 사용하는 미국 FDA의 BAM protocol을 따르고 있으며, RV 배지는 증균배양 후 평판배지에 도달하였을 때 가장 많은 수의 집락이 나타나며, 경쟁 미생물에 의한 방해가 가장 적다고 하였다. 그러나, Chen et al. (1993)에 따르면 살모넬라의 혈청형에 따라 다르지만 RV broth 등의 선택배지 증균 시 증균 배양 후에 최소한 10^2 - 10^5 colony forming units이 되어야 배지 내에서 살아남을 수 있음을 보고하였다. 살모넬라의 숫자가 적을 때는 *E. coli*가 우점종으로 존재하는 R-10 broth, selenite broth에서 살모넬라를 분리하는 것이 어려울 수 있지만 Tetrathionate는 *E. coli*가 많은 배지에서 살모넬라 수의 많고 적음에 상관없이 살

모넬라가 자랄 수 있도록 해준다. 이는 살모넬라 선택 증균에 사용되는 배지의 특성에 따라서 살모넬라의 성장이 어느 정도 저해될 수 있는 가능성을 나타낸다.

Baker(1980) 등은 14 개의 농장으로부터 1400개의 계란을 검사한 결과 두 개의 농장의 세 개의 계란 껍질에서 *Salmonella typhimurium*이 검출되었다. Musgrove(2004)등의 연구에서는 계란 껍질의 표면에서 가장 많이 검출된 장내세균은 *Escherichia*였으며, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter youngae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea* 등도 검출되었다고 하였고, 이들은 계란의 주요 오염원은 먼지, 토양, 분변이라고 하였다. *Salmonella*, *Escherichia*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter youngae*, *Klebsiella pneumoniae*는 계란 껍질의 표면에서 발견될 가능성이 충분하다. 이런 세균들은 37 에서 가장 잘 자라며 일상적인 환경이나 축추동물의 소화기관에서 분리되어왔기 때문이다. 특히 *Salmonella*는 조류와 이들의 등지 및 가공공장의 환경에서 분리되어왔다. 이들 장내세균은 식품의 위생적 품질 지표이며, 이들이 발견된 식품은 분변의 오염과 관련있다고 할 수 있다. 즉 식품에서 coliform이 발견되는 것은 일반적으로 분변성 물질과 식품이 직접적으로 접촉하였다고 생각할 수 있다. 장내세균의 다양한 구성원(*Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Escherichia*)이 사람의 건강과 관련하여 중요한 것은 이들이 장관의 건강을 해치는 중요한 원인인 enterotoxin을 분비하기 위한 능력이 있는 장관병원성 세균이기 때문이다.

*Klebsiella*는 물에 사는 균이기 때문에 해산물과 어류에서 일반적으로 발견되는 균이다. 물에 *Klebsiella*균수가 증가하는 것은 배설물에 오염되었기 때문이며 이것은 어류와 다른 해산물을 인간이 소비하므로써 다시 인간에게 돌아온다. *Klebsiella*는 해산물과 어류의 상재균으로서 많이 발견되어왔다. *Klebsiella*는 bacteremia와 pneumonia 그리고 urinary tract infection을 일으키는 opportunistic pathogen이다.

*Klebsiella*는 야채를 표면을 수돗물로 세척하는 과정에 의해서는 쉽게 제거되지 않는다. 이들은 냉장상태에서도 오랫동안 살아남을 수 있고, pH 3.6의 환경에서도 자랄 수 있음을 알 수 있었다. *Klebsiella pneumoniae*는 호흡기, 인간과 동물의 장내에서 *E. coli*보다 적게 발견되지만, 노령층이나 면역력이 약한 환자에게 심각한 감염증을 일으킬 수 있다. *Klebsiella pneumoniae*는 평상시에는 호흡기 및 장내에 *E. coli*보다 매우 낮은 수준으로 존재하고 있다가 노년층과 면역력이 약화된 환자들에게 bacteremia, genitourinary, respiratory의 감염증 및 다른 심각한 감염증을 일으킨다. 주변환경에서 *E. coli*가 없을 때 faecal coliform 양성인 *Klebsiella pneumoniae* 분리는 분변오염의 지표로 여겨져야만하고, faecal coliform 양성인 *Klebsiella*에 노출되는 것은 잠재적인 인간 건강의 위험지표이다. 또한 *Enterobacter cloacae*와 *Enterobacter agglomerans*는 야채와 과일에서 가장 빈번하게 동정되는 균주들의 하나이고, 이들은 종종 함께 동정되는 경우가 많다. 그러므로 이 두 균주는 종종 *Klebsiella pneumoniae*와 함께 동정되기도 한다. 계란에서 *Salmonella*를 검출한 선행연구 결과들을 살펴보면 *Salmonella*가 계란에서 검출된 경우는 많지 않았으나, 그 위험성은 크므로 오염을 막기 위해 대부분의 계란이 세척공정을 거쳐 생산되도록 하고 있다.

계란의 세척공정의 처리와 장내세균 오염 실태에 관한 선행연구를 보면 세척공정을 거친 포장계란은 30일의 유통기한 이내는 장내세균이 없었으며, 냉장저장 5주 이후의 세척된 계란에서 *Salmonella arizonae*와 *Enterobacter amnigenus*가 동정되었다. 이는 이들이 검출 가능한 수준까지 자라기보다 계란의 표면에서 살아남아 있기 때문인 것으로 보인다. 따라서 상업적인 계란의 세척공정은 식용 계란 표면에 존재하는 많은 미생물군을 감소시킴을 알 수 있었다.

결과를 종합해서 보면 유통란에서 분리한 장내세균들이 병원성을 일으키는 역할을 하는 것에 대한 명료한 증거는 없다. 그러나 닭과 관련하여 인간에게 병원성을 유발하는 많은 분리균이 있으므로 공중보건에 관심을 두어야 하며, 병원균의 기회감염이라는 관점에서 봤을 때 계란표면에 *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter spp.*가 존재하는 것은 바람직하지 못하며, 생산단계에서 이들을 감소시키려는 노력이 있어야 한다. 그리고 일부의 유통란에서 병원성 미생물이 동정된 결과는 유통란의 살균공정이 필요하다는 가설을 지지한다. 그리고 계란 생산과정에서 *Salmonella* 감시를 위한 monitoring 방법으로 IMS-LIA를 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

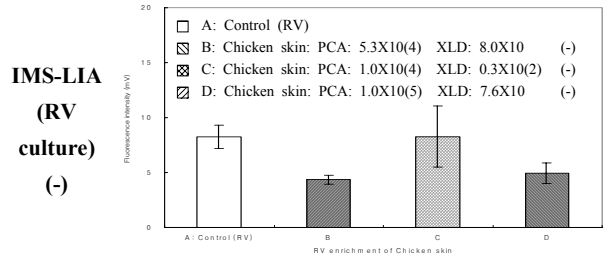
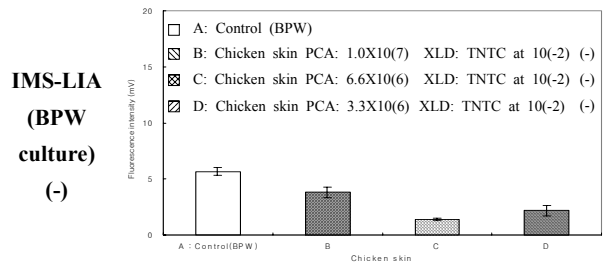
4. IMS-LIA의 식품 적용 실험 : 닭껍질

1) 닭껍질에서 *Salmonella* 검출을 위한 IMS-LIA(unspiked)

식품의 살모넬라 감염과 관련해서 계란 이외에 닭의 오염이 주로 문제가 되어왔다. 특히 살모넬라와 다른 병원성 세균은 닭고기 표면 부위를 오염시키므로, 닭고기 표면에 존재하는 살모넬라를 IMS-LIA 방법 및 전통적 배지 방법으로 검사하였다 (그림 24).

Salmonella 를 인위적으로 spiking하지 않은 시료를 IMS-LIA 측정된 결과 BPW, RV broth 증균액 모두 살모넬라 음성으로 나타났다. XLD 배지는 *Citrobacter freundii*와 *Salmonella arizonae*를 구분하지 못하는 등 유사 장내세균과 구분하기 힘든 것으로 알려져 있어, XLD agar에 나타난 의심집락을 색깔별로 구분하여 동정하였으나 모두 API 20E로 동정할 수 없었다. 따라서 IMS-LIA가 전통적 배지법에 의한 살모넬라 검출법의 정확성과 크게 다르지 않음을 알 수 있다.

Primary total aerobic colony count of chicken skin (PCA)	
Chicken skin	A: -
	B: Chicken skin: 7.8X10(5)
	C: Chicken skin: 2.0X10(8)
	D: Chicken skin: 4.3X10(7)



After RV broth enrichment		
XLD	Sample B	Sample C
API 20E	Unacceptable profile	Doubtful profile
	Citrobacter freundii Citrobacter youngae Salmonella arizonae Rahnella aquatilis Escherichia coli 1	Pseudomonas aeruginosa 57.2% Chryseomonas luteola 33.9% Pseudomonas fluorescens/putida 8.6%

Fig. 24. Comparison of IMS-LIA procedure with conventional culture method in retail chicken skin(Unspiked)

2) Salmonella를 spiking한 닭껍질의 IMS-LIA(Salmonella enteritidis 4 CFU/g spiked)

Salmonella enteritidis (ATCC 4931)를 닭껍질 g당 4 CFU, 136 CFU 수준으로 접종하여 BPW 증균배양 후와 RV broth 선택배양 후의 IMS-LIA signal을 비교하였으며, 배지에 도달하여 확인실험을 진행하였다.

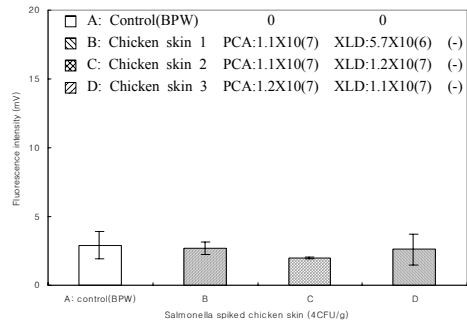
살모넬라 검출 위한 IMS-LIA의 검출 한계 파악 및 증균 단계를 최소화하기 위하여 살모넬라 오염이 문제되는 식품인 닭고기에 살모넬라를 적은 수준부터 인위적으로 접종하여 검출 signal의 변화를 측정하였다.

Salmonella를 접종하기 전에 닭껍질의 총균수 측정 및, Salmonella 선택배지(XLD)에 도달한 결과 분리율(Salmonella spp 48.5%, Salmonella paratyphi A 46.3%, Citrobacter braakii 4.7%)이 낮아 Salmonella로 동정되지는 않았으나, 90% 이상의 가능성으로 Salmonella로 추정되는 집락이 발견되었다(그림 25).

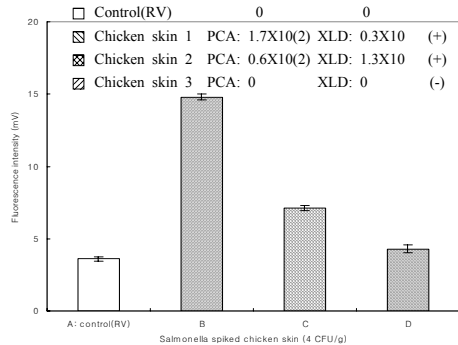
10개 이하의 수준에서는 닭껍질에 Salmonella를 spiking했음에도 불구하고 control과 sample의 IMS signal 차이가 1차 및 2차 증균 단계 모두 확연히 나타나지 않았다. 초기의 닭껍질 총균수가 10(6)~10(7) CFU/g인 닭껍질에 Salmonella enteritidis를 4 CFU/g 접종하여 측정된 결과 BPW 증균배양액은 삼반복 시료 모두 살모넬라 음성으로 나타났다. 또한 XLD 배지에 BPW 증균배양액을 도달하여 살모넬라 의심집락이 아닌 장내세균으로 의심되는 yellow colony를 얻었으나, 다른 잡균들에 의해 변형된 Salmonella 일 수 있으므로 API 20E로 동정하여 확인하였다. 결과 Aeromonas hydrophila group 2 (99.0%)로 동정되었으며, Aeromonas는 Pseudomonas와 함께 계란 및 도계육에서 종종 발견되는 균이다. RV 증균액에서는 3개 가운데 2개의 시료가 Salmonella 양성하였고, 이런 결과는 XLD에 나타난 의심집락의 수와도 일치하는 결과를 보인다. RV broth도 장내세균인 yellow colony만이 나타났다.

Primary total aerobic colony count of chicken skin (PCA)	
Chicken skin	A: Control(BPW)
	B: Chicken skin: 3.0X10(6) cfu/g
	C: Chicken skin: 5.3X10(6) cfu/g
	D: Chicken skin: 1.7X10(7) cfu/g

IMS-LIA (BPW culture) (-)



IMS-LIA (RV culture) (+)



XLD	Primary plating (Before spiking)	After BPW enrichment
	Yellow colonies with black center	Yellow colony

API 20E



Low discrimination
 Salmonella spp 48.5%
 Salmonella paratyphi A 46.3%
 Citrobacter braakii 4.7%



Doubtful profile
 Aeromonas hydrophila group 2 99.0%

Fig. 25. Comparison of IMS-LIA procedure with conventional culture method in Salmonella spiked chicken skin (4 CFU/g)

3) Salmonella를 spiking한 닭껍질의 IMS-LIA(Salmonella enteritidis 136 CFU/g spiked)

BPW 배양에서는 unspiked control과 2개의 spiked sample 중 1개가 양성이었으나, Salmonella 선택증균 배지인 RV broth에서는 negative control(RV)에 대하여 모두 양성이었다. 이는 살모넬라를 낮은 수준으로 접종하였을 때 보다 100배 많은 수의 살모넬라를 시료에 접종해서 18시간 증균 후에 더 많은 수의 살모넬라가 배지에 존재하기 때문인 것으로 생각된다 (그림 26).

Acinetobacter, Aeromonas spp.는 닭의 processing line 및 닭고기에서 분리된 주요 세균으로 본 연구에서도 동정되었다. 이들은 가금류, 육류, 우유 및 유제품, 수산물, 채소, 경관급식, 음료수 등 분포 범위가 매우 광범위한 균이다.

닭껍질에서 IMS-LIA로 Salmonella enteritidis를 검출하고자 할 때 1차 BPW 증균 및 2차 RV broth 선택증균 과정을 모두 거치는 것이 민감도가 더 우수함을 알 수 있었다. 그리고 2차 증균 단계에서 IMS-LIA로 식품 g당 10개 이하의 Salmonella가 존재하여도 검출이 가능함을 알 수 있었다.

Ziad et al. (2004)은 일반적으로 살모넬라 증균에 사용되는 lactose broth, peptone water, trypticase soy broth 가운데 peptone water가 계란에 접종한 Salmonella enteritidis에 대한 증균 효과가 가장 낫다고 하였다. 이는 Peptone water가 살모넬라 증균에 가장 일반적으로 사용되기는 하지만, 살모넬라가 많은 수로 증균되기에는 배지의 영양성분의 품질이 낮기 때문으로 볼 수 있다.

또한 닭고기나 계란 껍질에는 경쟁 미생물군이 매우 많이 존재하여 Salmonella가 충분히 증균되지 못하는 것도 이유가 될 것이다. 일반적으로 살모넬라가 증균 배양액에서 성장할 때 시료 종류, 경쟁 미생물군, 선택제 유무, 배양온도, 살모넬라의 혈청형, 살모넬라의 세포손상 여부 등 많은 요인들에 의해 영향을 받는다.

가금류, 계란 제품과 같이 신선하면서, 가공처리 되지 않은 식품을 구성하는 미생물군의 대부분이 Enterobacteriaceae, Pseudomonas 등의 Gram 음성균들이고, 이들은 Salmonella와 생육특성이 유사한 경쟁 미생물들이다. 특히 Pseudomonas 속은 식품 및 식물과 관련된 병원성 세균의 성장을 저해시킨다. Gram 음성균(Pseudomonas spp., Proteus spp., Citrobacter 등)은 저해제의 작용에 대해 강한 내성을 가지고 있어 Salmonella와 함께 평판배지에서 검출된다. 이들은 식품을 취급하는 과정에서 주변 환경으로부터 오염이 일어나고, 이들은 주로 살모넬라의 분리와 동정 시에 문제가 되는 장내세균이 대부분이다. 이들 중 Proteus spp., Citrobacter는 Salmonella와 생육특성이 유사하여 선택배지에서 구분하기 힘들고, 따라서 살모넬라 검출을 위해 특별한 배양 기법과 배지의 개발이 필요하다.

그렇기 때문에 대부분의 살모넬라 검출 시스템에서 저해제가 포함된 초기의 증균배양을 실시한다. 선택성이 없는 살모넬라 배지에서 초기에 살모넬라를 증균시키는 것은 검출하고자 하는 목표 미생물 이외에 경쟁미생물도 함께 증균된다는 단점이 있으나,

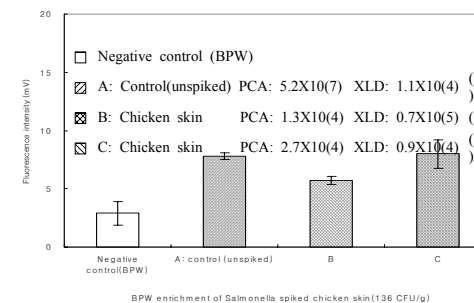
false-negative가 나타나지 않도록하는데 중요하다. 따라서 선택성이 없는 증균배지에서 함께 증균된 경쟁 미생물 군에 의한 검출을 저하 문제 때문에 신속검출법을 위한 *Salmonella* 증균 시 semi-selective reagent로 buffered peptone water에 novobiocin, ferrioxamine E 등의 항생제, malachite green 첨가로 배지조성을 변경시킨 증균방법을 사용해왔다.

본 연구에서도 닭껍질의 *Salmonella* 증균과정에서 malachite green이 포함된 RV broth의 선택배양과정을 거치는 동안 다른 장내세균들은 저해되고 닭껍질에 처음부터 존재하던 *Salmonella* spp. 또는 인위적으로 접종한 *Salmonella enteritidis*가 선택적으로 증균된 것으로 생각되며, 선택증균액을 IMS-LIA로 검사한 결과 식품의 다양한 물질 조성 과 경쟁 미생물군의 변수가 존재하는 가운데 살모넬라의 분리율이 우수함을 나타내었고, 특히 이차 선택배양 결과가 선택성이 없는 일차 증균배양 보다 더 우수함을 알 수 있었다.

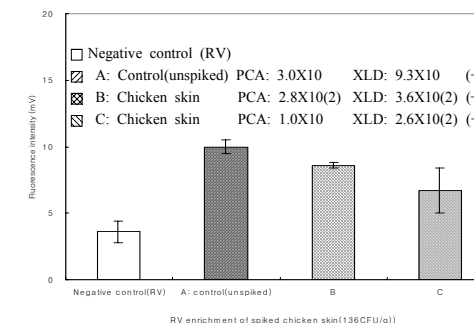
PCR, ELISA와 같이 증폭기술에 의존하지 않는 검출 방법이라 하더라도, 현재의 미생물 검출기술로는 일정 수준이상으로 미생물을 증폭시키는 단계를 거치는 것이 검출 결과의 정확성이 더 우수하다. 신속검출법 개발에서는 전통적인 배지 방법 보다 검사에 소요되는 시간이 단축되는 신속성과 민감성이 모두 중요하다. 따라서 이차의 선택증균 이전에 일차 증균 단계에서 살모넬라균의 저해는 일어나지 않는 범위로 배지에 semi-selective reagent를 첨가하여 Gram 양성균 및 생육특성이 유사한 장내세균을 억제하면서 *Salmonella*에 대한 선택성을 증가시킬 수 있는 방안을 찾는다면 보다 신속하게 살모넬라를 검출할 수 있을 것이다.

Chicken skin	Primary total aerobic colony count of chicken skin (PCA)	
	A: Chicken skin:	5.2X10(9) cfu/g
	B: Chicken skin:	1.3X10(6) cfu/g
	C: Chicken skin:	2.7X10(6) cfu/g

IMS-LIA (BPW culture)



IMS-LIA (RV culture)




PCA	Primary plating (Before spiking)
API 20E	
	GOOD ID. (<i>Acinetobacter baumannii/calcoacetatus</i> 99.0%)

Fig. 26. Comparison of IMS-LIA procedure with conventional culture method in *Salmonella* spiked chicken skin (136 CFU/g)

*Salmonella enteritidis*는 0.24 CFU/mL 접종시 BHI에서 중균이 가장 많이 되었다. 이런 결과는 XLD agar와 PCA agar에 나타난 집락 수를 비교했을 때도 모두 동일하였다. XLD, PCA 배지에 나타난 두 균주의 균수는 BHI> LB> BPW 순서였으며, 3시간 이후부터 7시간 까지 배지 간의 중균 정도의 차이가 뚜렷하게 나타났다. 이런 결과는 *Salmonella* 중균에 가장 일반적으로 사용되는 peptone water가 다른 배지들 보다 *Salmonella* 증식에 있어서 가장 효과가 적음을 나타내는 것이다. 이것은 peptone water가 높은 *Salmonella* 성장을 지지하기에는 영양의 품질이 낮은 것으로 설명할 수 있다. 따라서 BHI 배지를 향후 식품적용 실험의 중균 배지로 선택하였다.

Table 3. Comparison of IMS-LIA procedure with commercial test kits by BHI broth enrichment method in fertilized eggs.

Fertilized egg	Commercial Test Kit	IMS-LIA (BHI broth culture)	Isolate colonies	After BHI enrichment (24hr)		Before BHI enrichment (0hr)		
				Total bacterial counts (CFU/mL)	Presumptive Salmonella colony counts (CFU/mL)	Total bacterial counts (CFU/mL)	Presumptive Salmonella colony counts (CFU/mL)	
A	1	-	1.8	<i>Enterobacter cloacae</i> 95.1%	1.7X10(9)	3.3X10(9) (Blue)	1.2X10(2)	0
	2	+	7.2	<i>Escherichia hermannii</i> 97.7%	4.7X10(6)	2.0X10(8) (Purple:Small)	2.3X10	0
	3	-	1.7	Identification not valid	7.7X10(8)	4.7X10(5) (Purple:Large)	5.3X10(2)	0
	4	-	3	.	9.7X10(8)	-	6.9X10	0
	5	-	3.3	Identification not valid	7.3X10(8)	3.7X10(5) (Light-Blue)	2.0X10(3)	0
	6	-	3.6	<i>Enterobacter cloacae</i> 92.1%	1.5X10(9)	6.3X10(8) (Purple-Blue)	7.9X10	0
B	7	-	7.5	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> 99.7%	4.3X10(8)	2.7X10(4) (Purple)	6.9X10	0
	8	-	2.9	.	1.9X10(9)	1.5X10(9) (Blue)	2.0X10(3)	0
	9	-	3.6	<i>Escherichia coli</i> 2 99.9% <i>Enterobacter cloacae</i> 99.4%	7.9X10(9)	2.3X10(8) (Blue-green/Purple-blue)	7.9X10	0
Egg shell	10	-	2.1	.	1.9X10(9)	2.4X10(7) (Blue)	6.2X10	0
	11	-	1.3	.	8.3X10(8)	5.0X10(8) (Blue)	6.9X10(2)	0
	12	-	1.2	.	3.7X10(8)	1.3X10(8) (Blue)	7.0X10(2)	0
	13	-	.	Identification not valid	1.3X10(8)	2.3X10(3) (Purple/mud yellow)	3X10	0
	14	-	.	.	2.0x10(8)	0	1.4X10(2)	0
D	15	-	.	.	3.7X10(8)	5.2X10(4) (Purple)	1.2X10(2)	0
	16	-	2.8	.	5.3X10(8)	0	2.4X10(2)	0
	17	-	2.2	.	5.7X10(8)	6.0X10(4) (Blue)	1x10	0
E	18	-	3.3	.	5.0X10(8)	6.0X10(2) (Blue)	4.7X10(2)	0
	19	-	.	.	3.7X10(8)	5.1X10(6) (Purple)	3	0
	20	-	.	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> 99.0%	9.7X10(8)	5.0X10(8) (Blue/white)	4.3X10	0
	21	-	.	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> 99.0%	9.3X10(8)	4.5X10(8) (Purple)	6X10	0

a. No suspicious *Salmonella* colonies on SCA b. Threshold limit for positive signal is greater than 3 times the standard deviation of the background.

Table 4. Comparison of IMS-LIA procedure with commercial test kits by Rappaport-Vassiliadis broth enrichment method(BAM) in fertilized eggs.

Fertilized egg	Commercial Test Kit	IMS-LIA (RV broth culture)	Isolate colonies	After RV broth enrichment (24hr)		Before BPW enrichment (0hr)		
				Total bacterial counts (CFU/mL)	Presumptive Salmonella colony counts (CFU/mL)	Total bacterial counts (CFU/mL)	Presumptive Salmonella colony counts (CFU/mL)	
F	22	-	- 2.1	-	1.3X10(2)	0	0	0
	23	-	+ 13.0	control	5.3X10	0	0	0
	24	+	- 5.6	<i>Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae</i> 98%	1.0X10(2)	2.7X10 (dark blue/light blue)	0	0
G	25	-	- 3.7	-	6.6x10	0	0	0
	26	-	- 4.9	control	1.4X10(3)	0	0	0
	27	+	- 9.7	17.6±2.5	4.7X10(3)	0	0	0
Egg shell	28	+	- 7.8	-	0	0	0	0
	29	-	- 14.3	control	0	0	0	0
	30	+	- 8.9	13.3±1.8	2.1X10(2)	0	0	0
I	31	-	- 0.02	-	1.4X10(5)	0	0	0
	32	-	- 0.03	control	1.7X10(5)	0	0	0
	33	+	- 0.11	0.27±0.02	1.1X10(5)	0	0	0
J	34	-	- 0.01	-	0	0	0	0
	35	-	- 0.01	control	0	0	0	0
	36	-	- 0.01	0.01±0.01	0	0	0	0

5. Cross-reactivity 조사

IMS-LIA에 의한 분석법 사용시 유사한 분석 signal을 보이는 균의 종류를 파악하기 위해 *Salmonella*, *Citrobacter*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7 중균액의 IMS-LIA signal을 비교하였다. 식중독균의 검출 방법으로 특이적 항원-항체 반응 원리를 이용하여 다양한 분석방법이 개발되어왔으며, 구조적으로 유사하지 않은 항원을 분석할 때는 상당히 효과적이다. 그러나, 서로 유사한 구조를 갖는 균종은 특정 종류의 항체에 의해 공동으로 인식될 수도 있으므로 분석의 특이성을 떨어뜨릴 수 있다. 그러므로 면역학적 방법을 이용한 진단용 시약 또는 kits 개발시 cross-reactivity의 평가는 반드시 수행되어야 하며 이 평가를 바탕으로 cross-reactivity의 범위를 정확히 기술하여 진단용 시약 또는 kits의 사용 범위를 명확히 제시하여야 한다.

본 연구에서 개발한 분석 방법은 *Salmonella*를 검출하는 방법으로써 *Salmonella* 이외의 다른 균은 검출되지 않는 것이 이상적이다. ATCC에서 구입한 균주 2종 *Shigella flexneri*, *Citrobacter freundii*에 대하여 cross-reactivity를 평가하였다. 또한 본 연구에서 개발한 분석 방법이 ATCC 유래의 *Salmonella* 뿐만 아니라 우리나라에서 분리된 *Salmonella* 균도 검출할 수 있는지 확인하였다 (그림 27).

또한 유사균종이 아니면서 식중독 유발세균인 *E. coli* O157:H7에 의한 cross-reactivity 반응이 일어나는지를 평가하였다(그림 28). *E. coli* O157:H7 중균액 1X는 형광도가 1.6으로 negative control(TSB)의 1.5와 비교해서 positive로 나타났으나, 10(-1) 희석에서는 negative로 나타났다. 따라서 *E. coli* O157:H7에 의한 교차반응은 균수가 10⁸ CFU/mL 정도일 때에도 나타나지 않는 것으로 판단된다.

교차반응에 관한 선행연구들을 살펴보면, *E. coli* strain(병원성, 비병원성 모두)과 *Yersinia enterocolitica*가 *Salmonella* 검출에 사용하는 DNA probe, antibody와 교차반응을 일으켰으며, 이들은 계통적 근사성에서 기인하는 genomic sequence 또는 항원의 특성의 유사함 때문에 검출되기도 하는 것으로 보고되었다. 따라서 경쟁 비생물균이 많을 때는 IMS-LIA에 사용하는 시료를 적절히 희석하는 것이 더 정확한 결과일 것이다. 따라서 *E. coli* O157:H7은 10⁷ CFU/mL 이하로 존재할 때는 *Salmonella* 항체와 non-specific binding이 일어나지 않으며, *Salmonella* IgG-tagged liposome을 이용한 IMS-LIA test에 영향을 주지는 않는 것으로 생각된다.

Salmonella 검출을 위한 IMS-LIA의 특이성을 알아보기로 하자 *Salmonella*, *Citrobacter*와 *Shigella*를 대상으로 cross-reactivity를 비교평가하였다. *Salmonella*는 serotype이 다른 *Salmonella* 2종, ATCC 균주 및 우리나라 닭에서 분리한 균주 및 *Salmonella*와 유사한 생리적 특성을 가지며 *Salmonella* 검출 시 문제가 될 수 있는 균종으로, Gram 음성으로 운동성이 있으며 *Salmonella* spp.와 같은 O 항원을 가지고 있는 *Citrobacter*와 *Shigella*를 선택하였다.

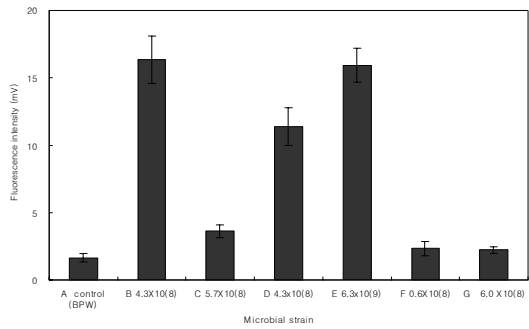


Fig. 27. Fluorescent signal intensity from IMS-LIA with *Salmonella* spp. strains and cross-reactivity with other Enterobacteriaceae.

A : Negative control (Buffered peptone water)		
B : <i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 4931)	+	
C : <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 13311)	+	
D : <i>Salmonella typhimurium</i> (T6)	+	
E : <i>Salmonella enteritidis</i> (E9)	+	
F : <i>Shigella flexneri</i> (ATCC 25875)	-	
G : <i>Citrobacter youngae</i> (ATCC 29935)	-	

STD. of the background(BPW) is 0.3.
Positive signal is greater than 2.9. ($3 \times 0.3 = 0.9$)

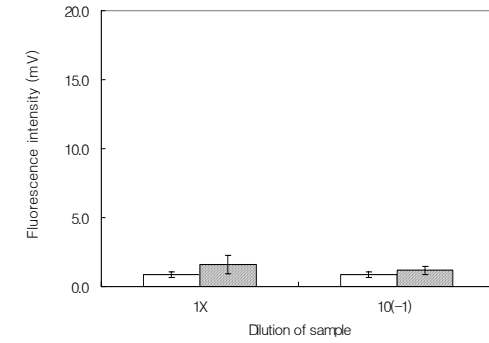


Fig. 28. Cross-reactivity of IMS-LIA using *Salmonella* IgG tagged-liposome and bead in pure culture of *E. coli* O157:H7

- Control(TSB)
- ▨ *E. coli* O157:H7(ATCC 43895) CFU on SMAC agar
1X; 7.3×10^8 (+) 10(-1); 7.3×10^7 (-)

* STD. of the background(BPW) is 0.2.
Positive signal is greater than 1.5 ($3 \times 0.3 = 0.9$)

균주의 순수 배양액으로 cross-reactivity 측정결과 모든 *Salmonella* 균주는 검출이 가능하였다(그림 27). *Salmonella enteritidis*는 ATCC 4931 균주(B) 및 우리나라 닭에서 분리한 E9 균주(E) 모두 negative control 보다 형광도가 높아 양성이었다. 그러나 *Salmonella typhimurium*(C, D)은 양성으로 나타났으나 *Salmonella enteritidis*와 비교했을 때 불규칙하고 낮은 형광도를 나타내었다. 또한 non-target organism인 *Shigella*(F)와 *Citrobacter*(G)는 negative control 보다 낮은 형광도를 나타내어 IMS-LIA에서 유사균종에 의한 교차반응은 나타나지 않는 것으로 판단하였다.

대부분의 살모넬라 균주들(B-E)은 대조군과 뚜렷하게 구별되는 양성의 결과가 나타났다. *Salmonella typhimurium*(C, D)은 2종 모두 균수 증가에 비례적으로 signal이 증가하지는 않아 *Salmonella enteritidis*(E, F) 보다 immunoliposome에 대한 반응이 민감하게 일어나지는 않았다. 이는 동일한 genus의 구성원이라 할지라도 서로 다른 세포 표면 특성을 나타낼 수 있음을 말해준다.

IMS-LIA로 *Salmonella* 유사균종에 대해 cross-reactivity를 측정한 결과, reverse phase method로 합성한 *Salmonella* IgG-tagged immunoliposome은 식품을 매개로 식중독을 일으키는 *Salmonella typhimurium*과 *Salmonella enteritidis* 분석에 사용할 수 있음을 나타냈다.

제 4 장 연구개발결과의 활용계획

1. 본 기술 개발 성공시, 식품 안전성 분야에서 우려가 되는 *E.coli* O157, *Listeria*, *Staphylococcus* 등을 포함해 의학적으로 문제가 되는 병원성 세균의 검출에 그 응용이 기대된다.
2. 보건기관, 식품 수출입 관련기관들에게 간편한 위해 미생물 monitoring 방법을 제공할 수 있을 것이다.
3. 수일이 소요되는 전통적인 *Salmonella* spp. 검출법을 급격히 감소시킬 수 있을 것이다.
4. 고가의 분석 설비를 필요로하지 않으므로 비숙련인도 친숙하게 사용이 용이하리라 기대된다.
5. 나노 생체막의 연구는 drug을 내부에 포집한 후 target organ에 특이적으로 운반하는 drug delivery system과 화장품 공업에서 liposome을 이용한 유효 성분의 피부 속 전달, 식품 분야에서 기능성 물질의 포집 및 전달 등 그 이용 범위가 무한하므로 이의 활용이 기대된다.
6. 고가로 수입되는 검출 kit의 대체 효과와 식중독 사고로 과급되는 경제적 손실을 줄이고 수입 및 국내 유통 식품의 강화된 위생 관리로 국민 건강에 기여할 것이다.
7. 도축장 등 주기적인 식중독 미생물 monitoring을 요하는 시설에서 저렴한 비용으로 이용될 수 있을 것이다.
8. 단체 급식, 농/축산물 가공 처리장, 식품 가공 업체, 식품 검사소, 보건원에서의 간편하고 신속한 hazard monitoring에 활용 가능할 것이다.
9. 국내외 유명 학술지에 실험 결과를 게재하고 학술 대회 등을 통하여 연구결과를 발표함.

제 5 장 참 고 문 헌

이건섭, 김승곤, 김신무, 정경석, 김영권, 정태화, 오홍백 (1989)진단병원미생물학. 고려의학. p. 593

축산물가공장 위해요소중점관리기준(HACCP)적용 매뉴얼 (2001), 농림부 국립수의과학연구원.

Addis E, Fleet GH, Cox JM, Kolak D, Leung T. (2001) The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. Int J Food Microbiol. Sep 19;69(1-2):25-36.

Ahn S, Walt DR. (2005) Detection of Salmonella spp. Using microsphere-based, fiber-optic DNA microarrays. Anal Chem. Aug 1;77(15):5041-7

Andrews, W.H., (1986) Resuscitation of injured Salmonella spp. and coliforms from foods. J. Food Prot. 49, 62- 75.

Arroyo G, Arroyo JA. (1995) Selective action of inhibitors used in different culture media on the competitive microflora of Salmonella. J Appl Bacteriol. Mar;78(3):281-9

Arthur Hinton Jr., J. A. Cason, Kimberly D. Ingram (2004) Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. International journal of food microbiology 91, 155~165

Bagge-Ravn D, Ng Y, Hjelm M, Christiansen JN, Johansen C, Gram L. (2003) The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. Int J Food Microbiol. Nov 1;87(3): 239-50.

Baker RC, Golf JP, Timoney JP (1980) Prevalence of Salmonellae on eggs from poultry farms in New York State. Poult. Sci. 59: 289 292

Bathey AS, Schaffner DW. (2001) Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by Acinetobacter calcoaceticus and Gluconobacter oxydans. J Appl Microbiol. Aug;91(2):237-47

Baumler, A.J., Hargis, B.M., and Tsolis, R.M. (2000) Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. *Science* 287: 50-52.

Berlau J, Aucken HM, Houang E, Pitt TL. (1999) Isolation of Acinetobacter spp. including A. baumannii from vegetables: implications for hospital-acquired infections. J Hosp Infect. Jul;42(3):201-4.

Bhoj Raj Singh and S. B. Kulshreshtha (1992) Preliminary examinations on the enterotoxigenicity of isolates of Klebsiella pneumoniae from seafoods. International journal of food microbiology, 16, 349~352

Brinkman E., Van Beurden R., Mackintosh R., Beumer R. (1995) Evaluation of a new dip-stick test for the rapid detection of Salmonella in food. J. Food Protection, 58, 1023~1027

Brooks J (1960) Mechanism of the multiplication of Pseudomonas in the hen's egg. J. Appl. Bacteriol., 23: 499~509

Cabo Verde S., Tenreiro R. (2004) Sanitation of chicken eggs by ionizing radiation: HACCP and inactivation studies, Radiation Physics and Chemistry 71 p.27-31

Chen H, Fraser ADE, Yamazaki H (1993) Evaluation of the toxicity of *Salmonella* select media for shortening the enrichment period. International J. Food Microbiology 18: 151~159

Cheng CM, Doyle MP, Luchansky JB (1995) Identification of Pseudomonas fluorescence strains isolated from raw pork and chicken that produce siderophores antagonistic towards food borne pathogens. J. food Protection 58, 1340~1344

Chihab W., Alaoui AS., Amar M. (2004) *Chryseomonas luteola* Identified as the Source of Serious Infections in a Moroccan University Hospital, J. Clin. Microbiol 42(4) p. 1837-1839

Cudjoe KS, Hagtvedt T, Dainty R. (1995) Immunomagnetic separation of Salmonella from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP)-ELISA. Int J Food Microbiol. Sep;27(1):11-25.

Cudjoe KS, Krona R, Gron B, Olsen E. (1994) Use of ferrous sulphate and immunomagnetic separation to recover Salmonella enteritidis from raw eggs. Int J Food Microbiol. Oct;23(2):149-58.

Cudjoe KS, Krona R, Olsen E (1994) IMS : a new selective enrichment technique for detection of *Salmonella* in foods. Int. Journal of Food Microbiology. 23: 159~165

Davies RH, Breslin M. (2003) Investigation of Salmonella contamination and disinfection in farm egg-packing plants. J Appl Microbiol. ;94(2):191-6.

Dictionary of microbiology, A willy-Interscience Publication

Duncanson P, Wareing DR, Jones O. (2003) Application of an automated immunomagnetic separation-enzyme immunoassay for the detection of Salmonella spp during an outbreak associated with a retail premises. Lett Appl Microbiol. ;37(2):144-8.

Dusch, H., and M. Altwegg. (1995). Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. J. Clin. Microbiol. 33:802-804

Eigner, U., R. Reissbrodt, R. Hammann, and A. M. Fahr. (2001) Evaluation of a new chromogenic medium for the isolation and presumptive identification of *Salmonella* species from stool specimens. Eur. J. Clin. Microbiol.Infect. Dis. 20:558-565.

EL-Gazzar, F.E. and Marth, E.H. (1992) Salmonellae, salmonellosis, and dairy foods: a review. *Journal of Dairy Science* 75(9): 2327-2343.

Fajardo-Lira C., Henning SM., Lee HW, Go VLW., Heber D. (2002) Abstr. 2002 Annu. Meet. Inst. Food Technologists, abstr. 46C-20,

Favrin SJ, Jassim SA, Griffiths MW. (2003) Application of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for the detection of Salmonella enteritidis and Escherichia coli O157:H7 in food. Int J Food Microbiol. Aug 15;85(1-2):63-71.)

Fodor L, Varga J, Hajtos I, Molnar T. (1999) Serotypes of Pasteurella haemolytica and Pasteurella trehalosi isolated from farm animals in Hungary. Zentralbl Veterinarmed B. May;46(4):241-7

Freney, J., W. Hansen, J. Etienne, F. Vandenesch, and J. Fleurette. (1988) Postoperative infant septicemia caused by *Pseudomonas luteola* (CDC group Ve-1) and *Pseudomonas oryzihabitans* (CDC group Ve-2). J. Clin. Microbiol. 26:1241-1243.

Garibaldi JA (1970) Role of microbial iron transport compounds in the bacterial spoilage of eggs. Appl. Microbiol. 20: 558~560

Goode D, Allen VM, Barrow PA. (2003) Reduction of experimental Salmonella and Campylobacter contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. Appl Environ Microbiol. Aug;69(8):5032-6.

Guard-Peter, J. (2001) The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environmental Microbiology* 3(7): 421-430.

Haines RB, (1939) Microbiology in the preservation of the hen's egg. G.P. Dep. Sci. Ind. Res. Food Invest. Board, Spec. Rep. 47

Himathathon S, Riemann H, Ernst R (1999) Efficacy of disinfection of shell eggs externally contaminated with *Salmonella* Enteritidis (Implications for egg testing), International Journal of Food microbiology. 49: 161-167

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (2000) Group 5. Facultatively anaerobic gram-negative rods. p. 175~189 In Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.

Hong BX, Jiang LF, Hu YS, Fang DY, Guo HY, (2004) Application of oligonucleotide array technology for the rapid detection of pathogenic bacteria of foodborne infections. *J. microbiol. methods* 58, 403-411

Hoorfar, J., D. L. Baggesen, and P. H. Porting. (1999) A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. *J. Microbiol. Methods* 35:77-84.

Hoorfar, J., Mortensen, A.V. (2000) Improved culture methods for isolation of *Salmonella* organisms from swine feces. *Am. J. Vet. Res.* 61, 1426-1429

Hsieh HY, Tsen HY. (2001) Combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food samples. *J Food Prot.* Nov;64(11):1744-50.

<http://edition.cnn.com/2002/HEALTH/diet.fitness/04/18/food.poisoning>

Humphrey TJ, Whitehead A, Gawler AHL, Rowe B(1991) Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hen's eggs. *Epidemiol. Infect.* 103: 489-496

Hamilton-Miller J.M.T. , Shah Saroj (2001) Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18:81-83

Jayaram BM, Wang L, A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk, *Journal of dairy Science* 82: 2620-2624.

Jensen AN, Sorensen G, Baggesen DL, Bodker R, Hoorfar J.(2003) Addition of Novobiocin in pre-enrichment step can improve *Salmonella* culture protocol of modified semisolid Rappaport-Vassiliadis, *Journal of Microbiological Methods* 55 249- 255

RIGBY CE., PETTIT JR. (1980) Delayed Secondary Enrichment for the Isolation of *Salmonellae* from Broiler Chickens and Their Environment, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Oct. p. 783-786

Soriano JM, Rico H, Molto JC, Manes J (2001) Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants, *Food Microbiology* 18, p. 159-163

Kim, M., Durst, R.A. (1999) Multi-analyte determination based on flow injection liposome immunoanalysis (FILIA):alachlor and solanine as model analytes. American Chemical Society National Meeting, Anaheim, CA.

Kuklinsky-Sobral J., Araujo WL, Mendes R., Geraldi IO., Pizzirani-Kleiner A.A., Azevedo JL (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion, *Environmental Microbiology* 6(12), 1244-1251

Lim, E., Koh, W-H., Loh, S-F., Lam, M-S., and Howe, H-S. (2001) Non-thyphoidal salmonellosis in patients with systemic lupus erythematosus. A study of fifty patients and a review of the literature. *Lupus* 10: 87-92.

Lynch MJ, Leon-Velarde CG, McEwen S, Odumeru JA. (2004) Evaluation of an automated immunomagnetic separation method for the rapid detection of *Salmonella* species in poultry environmental samples. *J Microbiol Methods.* Aug;58(2):285-8.

Macdiarmid, S. (1999) New Zealand MAF releases risk analysis for specified poultry product importation. *World Food Regulation Review* 24-30.

Mansfield, L.P., Forsythe, S.J. (2000) Detection of salmonellae in food. *Reviews in medical microbiology* 11(1): 37-46.

Minor, L.L.E. (1984) *Salmonella*. Page 427 in *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. 9th ed. J.G. Holt, ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

Musgrove MT, Jones DR, Northcutt JK, Cox NA, Harrison MA. (2004) Identification of Enterobacteriaceae from washed and unwashed commercial shell eggs. *J Food Prot.* 67(11) p. 2613-6

O'Conner-Shaw RE., Guthrie JA., Dunlop KJ., Roberts R. (1995) Coliforms in processed mango: Significance and control. *International journal of food microbiology*, 25, 51-61

Okuma T, Nakamura M, Totake H, Fukunaga Y. (2000) Microbial contamination of enteral feeding formulas and diarrhea. *Nutrition*. Sep;16(9):719-22.

Olsson C, Ahrne S, Pettersson B, Molin G. (2003) The bacterial flora of fresh and chill-stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *Int J Food Microbiol.* Jun 25;83(3):245-52.

Patil MD, Parhad NM (1986) Growth of salmonellas in different enrichment media. *J. Applied Bacteriology* 61: 19-24

Reeves, S.G., Siebert, S.T.A., Roberts, M.A., Durst, R.A. (1995) Liposome immunosensing devices for environmental contaminant screening. *Trends in Analytical Chemistry* 14:351-355.

Reissbrodt R., (1995) Conventional and alternative methods for isolation and identification of Salmonella; an overview. *Biotest Bull.* p. 143-156.

Reissbrodt, R., Vieltz, E., Kormann, E., Rabsch, W., Kuhn, H.(1996) Ferrioxamine E-supplemented pre-enrichment and enrichment media improve various isolation methods for Salmonella. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 81-91

Ripabelli G, Sammarco ML, Ruberto A, Iannitto G, Grasso GM. (1997) Immunomagnetic separation and conventional culture procedure for detection of naturally occurring Salmonella in raw pork sausages and chicken meat. *Lett Appl Microbiol.* Jun;24(6):493-7.

Roberts, J.A., and Sockett, P.N. (1994) The socio-economic impact of human *Salmonella enteritidis* infection. *International Journal of Food Microbiology* 21: 117-129.

Ryoko NOZU, Kazuo GOTO, Hiroaki OHASHI, Akira TAKAKURA, Toshio ITOH. (1999) Evaluation of PCR as a Means of Identification of *Pasteurella pneumotropica*. *Experimental Animals* Vol. 48 No. 1 51-54

Schutze, G.E., Schutze, S.E., and Kirby, R.S. (1997) Extraintestinal salmonellosis in a children's hospital. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 16(5): 482-485.

Sharp, J.C.M. and Reilly, W.J. (1994) Recent trends in foodborne infections in Europe and North America. *British Food Journal* 96(7): 35-40.

Shaw SJ, Blais BW, Nundy DC. (1998) Performance of the Dynabeads anti-Salmonella system in the detection of Salmonella species in foods, animal feeds, and environmental samples. *J Food Prot.* Nov;61(11):1507-10.

Stephenson, P., Satchell, F.B., Allen, G., Andrews, W.H. (1991) Recovery of Salmonella from shell eggs. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 821-826

Tornadizo ME, Garcia MC, Fresno JM, Carballo (2001) study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simon cheese, *Food microbiology* 18: 499-509

U.S. Food and Drug Administration (2005) /CFR, Bacteriological Analytical Manual online January 2001: <http://www.cfsan.fda.gov/> Accessed Jan. 28. 2005

Van Bebeden, C.A. et al. (1999) Multinational outbreak of *Salmonella enterica* serotype Newport infections due to contaminated alfalfa sprouts. *JAMA* 281(2): 158-162.

Verdea SC, Tenreiro R, Botelho ML (2004) Sanitation of chicken eggs by ionizing radiation: HACCP and inactivation studies, *Radiation Physics and Chemistry.* 71: 27-31

Wang H, Boyle E, Farber J. (2000) Rapid and specific enzyme immunoassay on hydrophobic grid membrane filter for detection and enumeration of thermophilic *Campylobacter* spp. from milk and chicken rinses. *J Food Prot.* Apr 63(4):489-94.

Warburton, D. W., B. Bowen, A. Konkle, C. Crawford, S. Durzi, R. Foster, C. Fox, L. Gour, G. Krohn, P. LaCasse, G. Lamontagne, S. McDonagh, V. Arling, J. Mackenzie, E. C. D. Todd, J. Oggel, R. Plante, S. Shaw, N. P. Tiwari, Y. Trottier, and B. D. Wheeler. (1994) A comparison of six different plating media used in the isolation of *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 22:277-289.

Yu, H., and Bruno JG. (1996) Immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella typhimurium* in foods and environmental water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:587-592.

Ziad W. Jaradat, Joanna H. Bzikot, Jerzy Zawistowski and Arun K. Bhunia. (2004) Optimization of a rapid dot-blot immunoassay for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in poultry products and environmental samples *Food Microbiology*, Volume 21, Issue 6, December Pages 761-769