

최 종
연구보고서

Salmonella 항원 검출을 위한
dipstick 진단키트 개발

Development of a dipstick for the rapid detection
of *Salmonella* antigen

연구기관

경북대학교

(주) 에니젠

국립수의과학검역원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “*Salmonella* 항원 검출을 위한 dipstick 진단키트 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 11월 06일

주관연구기관명 : 경북대학교

총괄연구책임자 : 이 영 주

세부연구책임자 : 이 영 주

연 구 원 : 곽 동 미

연 구 원 : 배 동 화

연 구 원 : 공 도 현

연 구 원 : 장 능 훈

협동연구기관명 : (주) 에니젠

협동연구책임자 : 오 진 식

협동연구기관명 : 국립수의과학검역원

협동연구책임자 : 권 준 현

요 약 문

I. 제 목

Salmonella 항원 검출을 위한 dipstick 진단키트 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구개발의 목적은 *Salmonella pullorum-Salmonella gallinarum* (*S. pullorum-S. gallinarum*)에 의해 유발되는 국내 제 2종 가축법정전염병인 추백리-가금티푸스 진단과 아울러 국내 「축산물위해요소중점관리기준」에 따른 식육 중 *Salmonella* spp. 모니터링을 위하여 별도의 실험실적 장비를 필요로 하지 않는 면역크로마토그래피법을 이용한 진단키트를 개발하고 개발된 키트의 민감성 및 특이성 확인과 최종 국내·외 시판을 위한 산업화 실시를 연구의 목표로 한다.

2. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

항원-항체 반응원리를 이용한 진단방법은 응집반응, ELISA 등이 현재까지 유용하게 사용되고 있으나 이는 비특이반응의 유발 및 특정 검사장비의 사용, 장시간의 검사시간 소요 등으로 야외에서 그 효용성이 그리 높지 않은 것으로 알려져 있다. 최근에 많은 부분에서 응용되고 있는 면역크로마토그래피법을 이용한 dipstick 진단키트는 시약의 사용이 간편하고, 검사소요 시간이 10분이내로서 매우 짧으며 특별히

고가의 검사장비를 필요로 하지 않아 검사비용도 매우 저렴하다는 장점을 가지고 있다. 즉, 1~2 step으로 모든 실험이 완결되는 바, 신속하게 결과를 판단할 수 있으며 또한 특이항체가 접합된 gold-conjugate와의 항원-항체 반응은 민감성과 특이성이 우수한 것으로 이미 알려져 있다. *Salmonella* 항원 동정은 현재까지도 균분리에 기초한 방법만이 유용하게 사용되고 있으나 균분리 동정을 위해서는 최소 5~7일이상이 소요되고 있고, 기타 최근에 보고되고 있는 PCR기법 등은 연구적 차원에서만 유용할 뿐 야외상황에서는 적용될 수 없는 현실이다. 따라서 야외에서 유용하게 사용될 수 있는 dipstick의 개발은 국내 「추백리-가금티푸스 방역실시 요령」 및 「축산물 위해요소 중점관리 기준 고시」의 *Salmonella* 모니터링에 효과적으로 적용할 수 있을 것이다.

2) 경제·산업적 측면

*S. pullorum*과 *S. gallinarum*에 의해 유발되는 추백리-가금티푸스는 국내 방역정책의 일환으로 120일 이상의 종계에 의무적으로 항체검사를 실시하여 양성계를 살처분하고 있다. 그러나 현재에도 본 질병의 발생은 계속적으로 이루어지고 있으며, 난계대되는 본 질병의 특징으로 어린 병아리에서 큰 경제적 피해를 유발하고 있다. 「추백리-가금티푸스 방역실시 요령」에 따라 항체검사로만 종계검사를 실시하고 있으나 추후 선진국과 같이 항원검사를 실시할 계획에 있고, 또한 어린 병아리에 발생시 진단까지의 소요시간이 길어 효과적인 방역이 어려움에 따라 신속·정확한 진단기법의 개발은 절실하다. 또한 「축산물위해요소중점관리기준 고시」의 모니터링 검사로 실시되고 있는 축종별 식육의 *Salmonella*의 검사시 시간적 및 인력적 낭비는 간과할 수 없는 부분으로 특히 진단상의 어려움으로 실질적으로 정확한 오염여부의 판별이 용의하지 않다. 따라서 본 진단키트를 식육의 *Salmonella* 검사에 적용시 효과적으로 진단에 응용될 수 있을 것으로 판단되며, 이는 위생적이

고 안전한 축산물을 공급하는데 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

전 세계적으로 2,500여종 이상 알려져 있는 살모넬라균종은 혈청형이 매우 다양하다. 본 연구에서는 크게 두 종류의 살모넬라 진단키트를 생산하는 것을 목표로 하나는 「축산물위해요소중점관리기준 고시」에 따른 살모넬라 모니터링시 손쉽게 검사를 실시할 수 있도록 하는데 목적을 두고 살모넬라 양성일 경우 *Salmonella* capture line과 control line 모두에 양성반응이, 살모넬라 음성일 경우는 control line에만 반응이 나타나도록 진단키트를 생산하는 것이다. 또 다른 하나는 *S. pullorum*, *S. gallinarum* 및 *S. enteritidis*를 진단하기 위한 키트로서 이들 균종은 국내의 양계산업에서 현재까지도 많은 경제적 문제를 유발하고 있는 살모넬라 균종으로 이들 균종은 모두 살모넬라 혈청형 group D에 포함된다. 따라서 본 키트는 *Salmonella* group D 항원만을 진단할 수 있도록 개발함으로써 야외에서의 신속하고 정확하게 질병을 진단하는데 목적이 있다. 본 키트의 적용시 검체에 *Salmonella* group D 항원 양성일 경우 *Salmonella* group D capture line과 control line 모두에 반응이, 살모넬라 항원 음성이거나 살모넬라이더라도 group D에 속하는 항원이 아닐 경우에는 control line에만 반응이 나타나도록 생산한다.

이들 진단키트의 생산을 위해서는 살모넬라 특이항체의 개발이 필수이며 따라서 *S. pullorum-S. gallinarum* 및 *S. enteritidis*가 포함됨 *Salmonella* serogroup D의 특이항체와 모든 종류의 *Salmonella*들을 다 검출할 수 있는 다클론 항체 (polyclonal antibodies)를 생산, 정제하고 항체의 특이성을 조사한다.

면역크로마토그래피법(immunochromatographic assay) 원리를 이용한 개발품은 플라스틱 외부에 둥근 검체 주입 부위와 사각형의 표시창에 검사선 (T)과 대조선 (C)이 표시되게 하였다. 플라스틱 내부에는 검체 주입부위부터

차례대로 검체 패드(Sample pad), gold 입자가 살모넬라 항체와 결합되어 있는 골드 패드 (gold conjugate pad), 멤브레인 (membrane), 흡습 패드 (adsorbent pad)가 중첩되어 있다. 멤브레인에는 검사선 위치에 살모넬라 항체가 흡착되도록 유도한다.

살모넬라 항원 신속진단키트는 평균 24시간 이내 모든 실험을 완결하게 된다. 즉, 1차 배양된 검체를 검체 주입구에 소량 투여하면, 전처리 여과용 필터를 통과한 후 양성일 경우 검체중에 있는 살모넬라 항원이 1차적으로 살모넬라 항원에 특이적인 항체가 접합된 골드 콘주게이트와 반응하여 항원-항체 결합체를 형성한다. 이후 이 항원-항체 결합체는 연속적으로 진단시약 내부에 있는 여러 패드를 통과해서 나이트로셀룰로우스막까지 수평적으로 흘러가게 되면서 나이트로셀룰로우스막위에 코팅되어있는 단클론항체와 반응하여 색상을 발현, 감염여부를 육안으로 진단할 수 있도록 해준다.

생산된 시제품은 특이성 및 민감성을 조사하고 또한 민감성을 높일 수 있는 선택배지와 배양시간 등의 조건을 설정하며, 현장적용시험을 통하여 본 진단키트의 실용성을 최종 파악한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 살모넬라 특이항체 개발

Salmonella serogroup B, C1, C2, D1, E1, E2 및 E4에 대하여 항체를 가지는 Pan *Salmonella* 항체와 *Salmonella* serogroup D에 대하여 항체를 가지는 Sal group D 항체에 대한 평판응집반응과 western blotting 결과 각각의 특이적인 항원항체반응이 나타남을 알 수 있었다.

2. 시제품 제제화

살모넬라 항원이 함유된 검체를 키트내에서 최초로 수용하는 검체 패드는 검체의 조건을 확립하기 위하여 각 제조회사별로 제품 형태로 나오는 검체 패드에 2.5 ml의 20X PBS, 5 ml의 10% BSA, 2.5 ml의 10% tween 20을 혼합하여 DW로 최종 50 ml가 되도록 조정하고 이를 검체 패드 (2x30cm)에 적신 다음 37°C 항온실에서 하루동안 건조시켜 검체 패드를 준비하였다. 건조된 검체 패드, 골드 패드, 나이트로셀룰로스 멤브레인, 흡습 패드를 중첩하여 임시로 시제품을 제작하였다. 검체 시료는 살모넬라 항원을 10^7 CFU되게 하여 각 키트에 150 μ l씩 첨가하여 검체 패드 최적화 시험을 실시하였으며 10회 반복시험하여 그 평균을 산출하였다. 그 결과, 시험에 이용된 검체 패드중 Whatmann사의 903 패드가 최초 전개 시간이 21초, 전개 완료 시간이 1분 53초, background clear시간이 6분 21초로 가장 우수하게 확인되었다

또한 약 40 nm크기의 colloidal gold를 제조하기 위하여 완전히 수세된 삼각플라스크에 증류수 94 ml을 넣고 열교반기에서 교반하면서 50°C가 되었을때 1%(w/v) gold chloride용액을 1 ml첨가하였다. 그리고 다시 90°C가 되었을 때 0.2%(w/v) trisodium citrate용액 5 ml을 신속하게 첨가하여 반응용액의 색상이 노란색, 검은색, 보라색으로 바뀌다가 최종적으로 맑은 선홍색을 나타내면 실온에서 추가로 30분간 교반하였다. 반응이 종료되면 0.1M potassium carbonate를 이용하여 pH 7.2로 조정하고 538 nm에서 흡광도를 측정하여 10 ± 1 이 되게 함으로서 colloidal gold를 제조하였다.

Pan *Salmonella* 항체 및 *Salmonella* group D 항체에 대한 conjugation은 다음과 같이 실시하였다. 즉, colloidal gold 1 ml에 Pan *Salmonella* 항체는 농도가 25 μ g되게, *Salmonella* group D 항체는 18 μ g 첨가하여 10분 동안 stirring 하면서 NaOH용액으로 pH 9.0으로 조정하여 conjugation되게 하였다. 최종 conjugation이 완료된 후에는 1%

(w/v)의 BSA를 첨가하여 blocking시키고, HCl로 pH 7.0으로 재조정하였다. 이렇게 conjugation된 항체는 원심분리 (10,000 rpm, 1시간)하여 상층액을 제거하고 2 mM borax 용액에 재 부유시켜 다시 재 원심분리하고, pellet을 0.3 ml의 10% BSA, 3 ml의 1% (w/v) sodium azide, 26.7 ml의 2 mM borax (pH 7.2)가 혼합된 용액으로 완전히 부유시켜 골드 패드 처리에 이용하였다.

Nitrocellulose membrane의 종류에 따라 음, 양성 구별 및 검체의 전개 속도를 확인하여 신속하면서도 음, 양성 구별이 가장 뚜렷한 membrane을 선정하고자 하였다. 각 멤브레인에 1 mg/ml되게 PBS로 희석한 후 Bio-Dot (USA)을 이용하여 1 μ l/cm로 분사하여 37°C에서 2시간 건조하였다. 임시로 검체 패드, 골드 패드 및 흡습패드를 중첩하여 키트를 제작한 후 각 멤브레인 최적화 시험을 실시하였다. 시험에 이용된 양성 검체용 항원은 *S. typhimurium*과 *S. enteritidis*를 이용하였으며, 음성 검체는 *E. coli*를 이용하였다. 각 음, 양성 검체를 1:10으로 검체희석액과 혼합한 후 검체적용홀에 150 μ l씩 점적하여 10분내에 음, 양성 구별이 가장 큰 membrane을 선정하고자 하였다. 그 결과, MDI 10 membrane이 10분내에 음, 양성 구별이 가장 우수하였다

각 검사 키트당 MDI 10 nitrocellulose membrane (0.45 cm width)의 검사선 (T) 위치에는 Pan *Salmonella* 항체는 2.1 μ g, Sal group D 항체는 1.3 μ g을, 그리고 대조선(C) 위치에는 산양 항마우스 항체를 2 μ g되게 coating되도록 PBS로 희석하여 coating하였다. 각 항체의 coating은 Bio-Dot(USA)을 이용하여 신속히 분사하고 건조한 후 제품 생산 전까지 제습된 상태(습도 10%이하)에 보관하였다.

각 패드 제조는 다음과 같다. 검체 패드는 903을 검체 패드 (2x30 cm)로 하여 검체 패드 처리 용액 (2.5 ml의 20X PBS, 5 ml의 10% BSA, 2.5 ml의 10% tween 20을 혼합하여 DW로 최종 50 ml가 되도록 조정)에 처리하여 건조 시켜 lamination (각 패드 중첩 공정)전까지 제습상태로 보관하였다. 골드패드는 Gold conjugate를 540 nm에서 흡광

도 10 ± 1.0 으로 조정하여 polyester (MDI, 0.7×30 cm)에 적신후 완전히 건조시키고 lamination전까지 제습상태로 보관하였다. 이때 각 검사 키트당 (0.7×0.45 mm)에 8.3 ± 1.6 μ l의 gold conjugate가 포함되었다. 흡습 패드는 SM-18150 (Millipore, 1.8×30 cm)를 37°C 에서 하룻밤 완전히 건조한 후 lamination전까지 제습상태로 보관하였다. 멤브레인은 BioDot으로 살모넬라 항체 (검사선 위치)와 산양 항 마우스 항체(대조선 위치)를 코팅한 MDI 10 (MDI, Indo)을 37°C 에서 2시간 완전히 건조한 후 lamination전까지 제습상태로 보관하였다.

시제품의 제조시 디바이스는 검체 패드, 골드 패드, 멤브레인 및 흡습 패드를 오른쪽부터 왼쪽으로 차례대로 서로 중첩하였으며 총 길이는 6.05 cm가 되게 하여 플라스틱 카드에 조립하였다. 이렇게 조립된 것을 cutter기 (Bio-Dot, USA)로 0.45 cm되게 정확하게 cutting하여 strip을 제조하였다. 각각의 strip을 디바이스 하판에 넣고 상판을 완전히 눌러 검사용 디바이스를 조립하였다. 드롭퍼는 검체를 점적할 dropper는 4-5방울 점적하였을 때 $120-150$ μ l가 점적될 수 있는 것으로 하였다. 본 시제품의 최적 용법 및 용량을 설정하기 위하여 음성 및 양성 표준검체를 이용하여 각각 5분, 10분, 15분, 20분 및 30분 경과시 결과를 판정하였으며, 반응 후 시간 경과에 따라 양성 표준검체를 양성으로, 음성 표준검체를 음성으로 정확하게 판정하면서 주변의 background와 대조선, 검사선이 명확해지는 시점을 본 제제의 반응시간으로 정하였다. 양성 및 음성 표준검체는 다음과 같이 제조하여 시험에 공시하였다. 즉, *Salmonella* 항원을 희석하여 단 단계별로 검사한 후 육안 밴드 강도로서 구분하여 저역가 (RP 5301), 중역가 (RP 5302), 고역가 (RP 5303) 농도의 표준 검체를 설정하였으며 표준 음성 검체 (RP 5304)는 검체 희석액을 음성 표준 검체로 하였다. 그 결과, 검체 점적후 5분 경과 시부터 양성 및 음성 표준 검체의 판정이 가능하였으나 저역가 시제품의 판정강도는 10분경과시 보다 뚜렷해짐을 알 수 있었다. 또한 10분 경과시에는 주변 background 와 반응선의 구분이 명

확해졌으며 15분 및 20분 경과시에도 양성 및 음성 표준 검체의 판정을 정확히 하였으나 판독 시간의 신속함을 위해 상기의 결과를 근거로 하여 본 제제를 용법 용량에 따라 시험할 때의 판정 시간을 10분으로 설정하였다.

3. 시제품의 살모넬라 검출한계

23종의 살모넬라 시험균주와 5종의 기타 병원성 세균을 10진희석하여 단계별로 본 제제의 용법, 용량에 따라 시험하고 (4방울 점적, 10분후 판정) 본 제제의 판정 방법에 따라 양성으로 판정하는 최고의 희석배수와 역가를 정하였다. 그 결과 살모넬라 혈청형에 따라 약간의 차이가 있었으나 Pan *Salmonella* 항원검출용 키트 (Pan Sal kit) 및 *Salmonella* group D 항원검출용 키트 (Sal group D kit) 모두 검출한계는 평균 10^4 CFU 이상임을 알 수 있었다.

4. 살모넬라 증균조건 설정

시제품의 살모넬라 검출한계가 평균 10^4 CFU이상임에 따라 1차 증균이 필요하다고 판단되어 적절한 증균조건을 설정하기 위하여 5수의 도계육을 대상으로 조건을 설정하였다. 임의의 *S. enteritidis*가 첨가된 BPW를 18시간 배양하고 10 ml Rappaport vasiliadis broth (RV broth)와, 10 ml selenite cystein broth에 각각 배양액 1 ml씩을 첨가하여 18시간 배양 후 시제품의 용법 및 용량에 따라 점적하여 결과를 관찰한 결과 Pan sal kit 및 Sal group D kit 모두 RV broth보다 SC broth에서의 민감성이 높게 나타났으며 SC broth에서는 10^0 CFU 접종시 두 kit 모두 5개 도체 중 1개 도체에서 양성을 보였으며 10^1 CFU 접종시 5개 도체 모두에서 양성을 나타내었다.

BPW에서의 최적 배양시간을 선별하기 위하여 선택배지 선발과 동일

한 방법으로 5수의 도계를 사용였다. 임의로 *S. enteritidis*가 첨가된 BPW를 6시간 또는 18시간 배양하고 배양액 1 ml을 10 ml SC broth에 첨가하여 18시간 배양 후 시제품에 점적하여 결과를 관찰하였다. 검사결과 Pan sal kit 및 Sal group D kit 모두 6시간 배양보다 18시간 배양에서 민감성이 높게 나타났으며 6시간 배양에서는 10^0 CFU 접종시 두 kit 모두 5개 도체 모두에서 양성을 나타내지 않았으나 18시간 배양에서는 10^0 CFU 접종시 2개의 개체에서, 10^1 CFU 접종시 5개 도체 모두에서 양성을 나타내었다. 각 도체별 *S. enteritidis*를 접종하지 않은 1개의 배양병은 최종 살모넬라군 분리를 실시하여 시험샘플의 살모넬라 오염 여부를 확인하였으며, 살모넬라가 검출된 도계의 경우에는 시험성적에서 제외시켰다.

5. Reveal kit (미국, Neogene)과 시제품의 비교 조사

Reveal kit의 용법 및 용량은 시제품의 용법과 거의 유사하였으나 pre-enrichment media인 BPW에서의 시간이 2-4시간으로 시제품보다 짧게 설정되어 있었다. 그러나 본 시험에서는 앞서의 증균조건 설정시험과 유사하게 5개의 도체를 사용하여 임의로 *S. enteritidis*를 BPW에 첨가하고 6시간 또는 18시간 배양후 배양액 1 ml을 10 ml SC broth에 첨가하여 18시간 배양하였다. 배양액을 동일한 용법으로 Reveal kit과 시제품에 점적하여 결과를 관찰한 결과, Reveal kit 및 시제품 Pan sal kit 및 Sal group D kit 모두 동일한 성적을 나타내었으며 6시간 배양보다 18시간 배양에서 민감성이 높게 나타났다. 6시간 배양에서는 10^0 CFU 접종시 세 kit 모두 5개 도체 모두에서 양성을 나타내지 않았으나 10^1 CFU 접종시 1개의 도체에서 양성을 보인 반면, 18시간 배양에서는 10^0 CFU 접종시 2개의 개체에서, 10^1 CFU 접종시 5개 도체 모두에서 양성을 나타내었다.

6. 현장적용

도계장의 도계와 소도축장의 지육을 대상으로 본 진단키트의 현장적용을 실시하였다. 「축산물 가공기준 및 성분규격」에 제시된 살모넬라분리 방법에 따라 15수의 도계육을 대상으로 실시하였다. 멸균 BPW 400 ml을 5개의 멸균시료백에 붓고 각각의 도체를 넣은 후 50회 이상 좌우로 흔들어서 도체를 제거하고 세척액 25 ml을 225 ml의 BPW에 넣어 6시간 배양하고 10 ml SC broth에 각각 배양액 1 ml씩을 첨가하여 18시간 배양 후 시제품에 점적함과 아울러 Rambach agar에 도말하였으며 의심되는 집락에 대해서 Difco사 (미국)의 O 및 H 항혈청으로 최종 균동정을 실시하였다. 시험결과, 15수 도계중 Pan sal kit에는 9수가, Sal group D kit에는 7수가 양성반응을 보였으며 시제품에 양성반응을 보인 총 9수 중 7수에서는 *S. enteritidis* 및 *S. blockley*가 분리되었다. Pan sal kit에는 양성반응을 나타내었으나 균분리가 되지 않은 2수의 개체는 본 성적에서는 제시되지 않았으나 SC broth에서 48시간 배양 후 Rambach agar에 도말하였을 때 *Salmonella* 균이 분리되어 kit의 비특이 반응은 아님을 알 수 있었다. 따라서 본 성적으로 보아 Pan sal kit 및 Sal group D kit의 도계장 적용시 키트의 민감성이 균분리동정과 비교하였을 때 상당히 높음을 알 수 있었다.

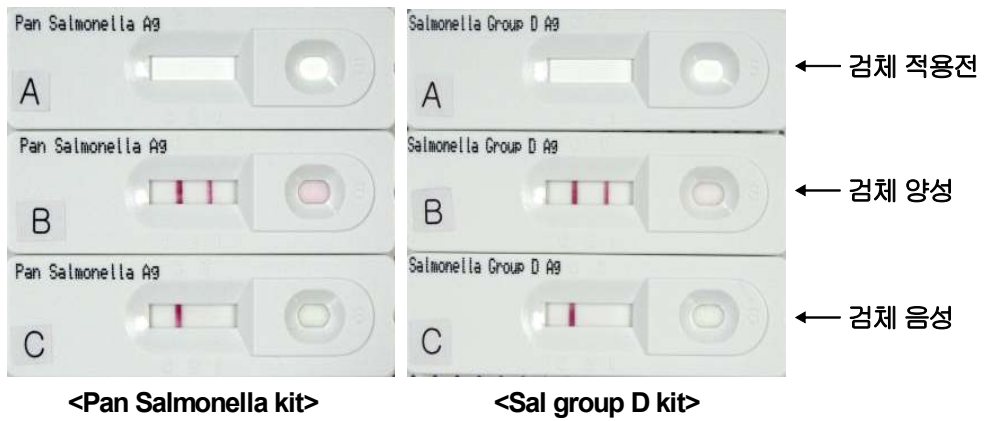
15수의 소지육을 대상으로 실시할 때는 도체의 표면 (10cm X 10cm)의 3개 부위를 거어즈로 닦아내어 225 ml의 BPW에 넣어 6시간 배양하고 10 ml SC broth에 각각 배양액 1 ml씩을 첨가하여 18시간 배양 후 시제품에 점적과 함께 Rambach agar에 도말하였으며 의심되는 집락에 대해서 Difco사 (미국)의 O 및 H 항혈청으로 최종 균동정을 실시하였다. 시험결과 소도체에는 살모넬라 분리가 전혀 이루어지지 않았으며 또한 시제품 Pan sal kit 및 Sal group D kit 모두 음성을 나타내었다.

7. 연구결과물

가. 실험사진



나. 양성 및 음성 판정 기준



8. 활용에 대한 건의

본 연구는 총연구기간이 3년이었으나 2년차로 조기완결된 과제이다. 따라서 현재 두가지 측면에서 추가연구가 필요하다. 하나는 진단키트에 대한 현장적용 추가시험으로 좀 더 대단위의 추가시험을 통하여 본 키트의 단점을 보다 구체적으로 파악하고 아울러 시판키트와의 비교 조사로 민감성 및 특이성에 대한 보완을 실시하여야 하며 또한, 축산물을 이용한 본 진단키트의 적용법은 기 확립되었으나 기타, 야외농장에 직접 적용시 필요하다고 판단되는 검체 즉, 실질장기와 분변등의 이용시 본 키트를 좀 더 효과적으로 사용할 수 있는 배지의 선택 등 조건의 추가 확립이 요구된다.

본 개발품은 국내 최초의 살모넬라 항원 신속진단키트로서 기존의 ELISA를 비롯한 항원 진단 키트들의 장단점을 상호 보완할 것이며, 현재 국내에서 판매되고 있는 개 파보바이러스, 개 디스토펙퍼바이러스, 개 심장사상충 및 조류인플루엔자 바이러스 항원 신속진단 키트처럼 임상평가실험을 통한 성능 및 효능 검증을 거친 후 국내 살모넬라의 신속한 검사에 크게 기여할 것으로 예상된다. 또한 이 연구에 이용된 원리 및 경험은 동물유래의 인수공통전염병(zoonosis)들에 대한 신속진단키트 개발로 이어질 것으로 예상된다.

SUMMARY

Foodborne diseases are among the most serious health problems affecting public health and development worldwide (WHO, 1984). Industrialization, mass food production, decreasing trade barriers, and human migration have disseminated and increased the incidence and severity of foodborne diseases worldwide (Gomez *et al.*, 1997; Kaferstein *et al.*, 1997; Todd, 1997).

Salmonellae are among the most common bacterial foodborne pathogens worldwide (Todd, 1997). They cause an estimated 1.4 million cases of foodborne disease each year in the United States alone (Voetsch *et al.*, 2004). *Salmonella* strains are zoonotic enterobacteria responsible for outbreaks of both human and animal clinical diseases and have important worldwide hygienic and economic significance. There are several routes of transmission for salmonellosis, but the majority of human infections result from the consumption of contaminated foods and water. Foods most often associated with the transmission of *Salmonella* include those of animal origin, such as beef, pork, poultry, eggs, raw milk, and milk products; however, other foods, including fresh fruits, unpasteurized fruit juices, and vegetables such as sprouts, have also served as vehicles for the transmission of the pathogen (Philippe *et al.*, 2005; Jennifer *et al.*, 2005; Eleni *et al.*, 2006; Centers for Disease Control and Prevention, 2006).

The genus *Salmonella* is a typical member of the family Enterobacteriaceae and consists of Gram-negative, nonspore-forming bacilli (Philippe *et al.*, 2005). Bacteria constituting the genus contain three different types of antigens. The agglutinating properties of the somatic O, flagella H and capsular Vi antigens are used to differentiate among more than 2,500 serologically distinct types of *Salmonella* (Popoff *et al.*, 2003). O antigen is a carbohydrate antigen that is

the outermost component of lipopolysaccharide (LPS).

Because it is laborous and time-consuming to isolate the pathogens, many laboratory have used the other methods (PCR, biochemical tests) and screening kit (sandwich ELISA) to identify the pathogens in the samples. Even though the methods were very rapid and accurate, they were also needed the knowledge of molecular biology and a lot of equipment.

The convenience and speed of the test have been achieved by a novel concept of immunochromatographic assay, which depends on the transport of tag (usually is colloidal gold)-labeled antibody (or antigen) probe to its binding partner-specific antigen (or antibody) immobilized on the surfaces of the membrane. The transfer is induced by the capillary action of aqueous medium through membrane pores to separate the unbound reactant from the bound complex at the liquid-solid interface. Among different tags/marks-labeled test systems, colloidal gold appears to be most attractive.

Colloidal gold has found application as labels for molecular detection in microscopy and electrophoresis blotting techniques for its resonance absorbance in visible spectroscopy (Horrisberger, 1979; Horisberger and Vauthey, 1984). Unlike fluorescence or enzyme-detection system, gold probes are more stable and easy to use. There are no need for 繁琐 operations as incubation, washing and enzymatic reactions during signal generation, which distinctly shorten the detection time. Furthermore, nanoscale surfaces provided by colloidal gold particles could accelerate antibody-antigen reaction sufficiently, which provide an amplified signal for immunoassy (Faulk and Taylor, 1971; Richards, 1996). Especially, the results can be read directly by naked eyes, which ensures the convenience of assay on-site. Therefore, nanoglod based IC systems cannot only accelerate the analytical procedure but also provide a means for performing the test without the handling of reagents, allowing a one-step assay (Paek et al., 1999)

We developed the dipstick using immunochromatographic method for the detection of Salmonella spp. The sensitivity of the dipstick are 10^0 CFU after enrichment of the samples. It is useful for the laboratory that treat the many samples.

Dipstick are very useful for the laboratories treated with the small samples. It doesn't need the equipment and specific knowledge to use the kits. Just apply the 4–5 drops of the enrichment samples onto the kits and get the results after 10 minutes. Dipstick can also detect the meat samples after enrichment that contaminated with food-borne bacteria with 10^0 CFU. These rapid screening kits can be commercially and available in many laboratores.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines of Rsearch Project.....	20
Section 1. Objective of the project.....	20
Section 2. Necessities of the project.....	20
Section 3. Scope of the project.....	30
 Chapter 2. Current Status of Domestic and Foreign Development Technology	 37
Section 1. Current technique and problem of domestic and foreign development technology	 37
Section 2. Present development status of domestic and foreign development technology.....	38
Section 3. Scheme of the project	40
Section 4. Potential of research institution about development of the technology	40
 Chapter 3. Methods and Results.....	 42
Section 1. Technical contents and scope.....	42
Section 2. Research methods.....	49
Section 3. Research results.....	56
Section 4. Final product.....	87

Chapter 4. Achievement and contribution in relevant research field	90
Chapter 5. Application plan for research results.....	94
Chapter 6. Data collection during project	96
Chapter 7. References	97

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	20
제 1 절	연구개발의 목적	20
제 2 절	연구개발의 필요성	20
제 3 절	연구개발의 범위	30
제 2 장	국내·외 기술개발 현황	37
제 1 절	국내·외 기술 및 문제점	37
제 2 절	국내·외 개발 현황	38
제 3 절	개발대상 기술의 개요	40
제 4 절	개발대상 기술에 대한 연구기관 잠재력	40
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	42
제 1 절	기술개발 내용 및 범위	42
제 2 절	연구방법	49
제 3 절	연구결과	56
제 4 절	최종제품	87
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	90
제 1 절	계획대비 실적 및 성과	90
제 2 절	관련분야의 기여도	92

제 5 장	연구개발결과의 활용계획	94
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	96
제 7 장	참고문헌	97

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구개발의 목적은 *Salmonella pullorum-Salmonella gallinarum* (*S. pullorum-S. gallinarum*)에 의해 유발되는 국내 제 2종 가축법정전염병인 추백리-가금티푸스 진단과 아울러 국내 「축산물위해요소중점관리기준」에 따른 식육 중 *Salmonella* spp. 모니터링을 위하여 별도의 실험실적 장비를 필요로 하지 않는 면역크로마토그래피법을 이용한 진단키트를 개발하고 개발된 키트의 민감성 및 특이성 확인과 최종 국내·외 시판을 위한 산업화 실시를 연구의 목표로 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 배경

경제성장과 더불어 식품 중 축산물이 차지하는 비중은 크게 높아져 이제는 식량의 범주에서 큰 점유율을 차지하고 있으며, 특히 최근에는 학교급식과 인스턴트식품 등으로 인하여 일상에서 쉽게 접할 수 있게 되었다. 그러나 축산식품은 여러 가지 복잡한 생산과정을 거쳐 유통되며 축산식품의 구성성분과 그 특성으로 인수공통전염병을 비롯해 축산식품유래 식중독과 유해물질 등의 잔류에 의해 때로는 이를 섭취하는 소비자에게 치명적인 위해를 가할 수 있기에 그 취급이나 위생관리에 소홀할 수 없는 실정이다.

전 세계적으로 축산식품의 위생에 대한 관심은 꾸준히 증가되었으며

이러한 경향에 발맞추어 국내에서도 식품의 안전성 확보와 식품산업의 국제 경제력 제고를 위하여 1995년 12월에 보건복지부에서 식품위생법을 개정하여 식품위해요소중점관리기준 규정을 신설하고, 1996년 12월 ‘식품 위생요소중점관리기준’을 고시한 바 있으며, 또한 농림부에서도 1997년 12월에 축산물 가공처리법이 개정되어 도축장 및 축산물 가공자에 이 제도를 도입토록 ‘축산물위해요소중점관리기준 (HACCP)’을 규정하고 있다. 2001년 7월 1일부터는 HACCP가 본격 시행됨에 따라 2005년 11월 15일 현재, 총 285개소의 축산물 작업장 및 사료회사가 HACCP를 인증 받았으며 닭도축장의 경우 38개소가 HACCP에 따라 도축을 시행하고 있다.

근년에도 미국, 영국, 일본 등에서는 *E. coli* O157, *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* 등 각종 식중독 유발균으로 인한 사회적 물의가 일어나고 있으며 때로는 국내적으로 전국적인 유행 발생으로 인하여 국가적 대혼란이 초래되는 한편, 국제간에는 식품 수출입의 금지조치 등 식품무역의 국가분쟁이 야기되기도 하였다.

이 중 *Salmonella*속 균은 비교적 넓은 숙주영역을 가지며 자연계에 널리 존재하면서 닭, 돼지 등의 각종 식용동물뿐만 아니라 애완동물과 야생동물에까지 보균되어 장염, 패혈증, 폐렴 등의 질병을 일으켜 경제적 손실을 유발함과 아울러, 보균동물은 사람에게 대한 감염원으로 작용함에 따라 공중보건상 아주 중요시 되고 있다 (Angulo, 1996; Davis et al., 1990). 특히 *Salmonella*속 식중독은 오염된 육류, 계란, 우유 등의 식품을 날로 먹거나 완전히 가열되지 않은 식품을 섭취했을 경우에 주로 발병을 하며 계란과 관련된 *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*)에 의한 감염증가와 분리 균주들간의 항생제에 대한 저항성 증가 그리고 국가간 축산물 교역에 의한 국제적인 발생이 공중보건상의 중요한 문제로 대두되고 있다 (Angulo, 1996).

*S. enteritidis*에 의한 발생은 해마다 증가추세를 보이고 있는 바, England의 경우 1981년 1,087건 식중독 사고가 1988년에는 15,427건으로 크게 증가하였음을 보고하였는데 이 중 *S. enteritidis*에 의한 것이 전체

의 56%로 대부분을 차지하였다고 밝힌 바 있다 (Timoney et al., 1988; Ward and Rowe, 1987). 미국에서도 *Salmonella*에 의한 식중독 감염은 연간 200~600만명으로 사망자 또한 1,000 여명에 이르는 것으로 보고된 바 있다 (Angulo, 1996). 국내에서도 식중독의 원인균별 발생현황에 *Salmonella*에 기인한 식중독의 발생이 가장 높은 것으로 보고되고 있으며, 김 등은 인천지역의 사람에서 발생하는 병원성 세균 중 하나가 *Salmonella* spp.임으로 보고하였을 뿐 아니라, 이의 발병율은 해마다 증가추세를 보이고 있다.

HACCP에 따라 계육을 생산하고 있음에도 불구하고 국내 도계육에서의 *Salmonella* 오염은 여전히 높은 것으로 보고되고 있는 바, 이는 닭고기의 도계처리 공정과정 중 계육 상호간의 교차오염 기회가 다른 축종보다 높아 유해한 병원 미생물의 오염 기회가 많기 때문인 것과 아울러, 국내 계육의 생산체계가 집단사육 및 계열화로 변화됨에 따라 HACCP가 제대로 시행되고 있지 않은 닭 도축장 이전 단계인 사료공장, 종계장, 부화장에서의 *Salmonella* 오염이 제대로 control되지 않은 상황에서 닭 도축장으로 들어오는 최종 육계의 *Salmonella* 보균율이 상대적으로 높기 때문인 것으로 추정된다.

2. 국내 살모넬라 오염 성적

살모넬라 오염은 특히 양계분야에 문제가 큰 것으로 알려져 있다. 농장에서는 앞서 말한 바와 같이 *S. pullorum*, *S. gallinarum*과 같은 숙주 특이성인 살모넬라와 함께 *S. enteritidis*가 문제시 되어 현재까지도 꾸준한 경제적 피해를 유발하고 있으며 이와 더불어 도계육의 살모넬라 오염도 심각한 것으로 보고되고 있다.

국내 양계생산 체계는 계열화 사업에 의해 농장에서부터 도계장에 이르기까지 한 회사에서 생산을 담당하고 있는 경향이 크며, 최근에 두 곳의 육계계열화 농장에 대하여 살모넬라 오염정도를 조사해 본 결과, 종

계장, 부화장, 육계농장 및 도계장에 이르기까지 살모넬라 오염은 대단히 심각한 상황이었다 (표 1~표 4, 그림 1). 종계장에서의 살모넬라 오염은 부화장, 육계농장 및 도계장과 비교시 높은 편은 아니었지만 아랫단계로 내려갈 수록 오염의 정도는 심각하였으며 최종 사람이 섭취하는 계육을 생산하는 도계장 단계에의 오염은 HACCP가 실시되고 있는 이 시점에도 대단히 높은 비율을 보였다. 또한 종계장에서 분리된 균주가 궁극적으로 도계장까지 전파가 되고 있음을 알 수 있었으며 따라서 농장 및 도계장 차원에서의 살모넬라 오염여부 파악은 궁극적으로 공중위생학적 차원에서 대단히 중요하다 판단된다.

표 1. 육계계열화 회사 2곳에 소속된 종계장의 *Salmonella* 오염도

Company code	Farm code	Flock size (×1,000 chickens)	Flock age (weeks)	Sample site				
				Cloacal swabs	Cecal dropping	Nest boxes	Wall dust	Egg sorting/dispatch area
A	I	Empty ^a	-	NS	NS	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>	-ve
	I	25	17	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
	II	54	27	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
B	III	18.5	24	-ve	-ve	<i>S. heidelberg</i>	-ve	<i>S. heidelberg</i>
	IV	12.5	28	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
Total	-	-	-	0/4 (0) ^b	0/4 (0)	2/5 (40.0)	1/5 (20.0)	1/5 (20.0)

^aThe little on which the birds were kept was fully removed, and cleaning and disinfection of the house were carried out.
NS, not sampled.

-ve, negative results in *Salmonella* culture.

^bNumber of positive for *Salmonella*/number of farms tested (%).

표 2. 육계계열화 회사 2곳에 소속된 부화장의 *Salmonella* 오염도

Company code	Hatchery code	Hatchery capacity ^a	Sample site				
			Hatcher interiors	chick sorting/dispatch area	chick box/meconium	Ventilation outlets	Waste area
A	I	250	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>	-ve	-ve	<i>S. enteritidis</i>
	II	110	<i>S. mbandaka</i>	<i>S. enteritidis</i>	-ve	-ve	-ve
B	I	70	-ve	<i>S. senftenberg</i> <i>S. heidelberg</i>	<i>S. senftenberg</i>	<i>S. enteritidis</i> <i>S. Ssnftenberg</i>	<i>S. enteritidis</i>
	II	160	<i>S. senftenberg</i>	<i>S. heidelberg</i> <i>S. enteritidis</i>	<i>S. senftenberg</i>	<i>S. heidelberg</i> <i>S. enteritidis</i> <i>S. senftenberg</i>	<i>S. heidelberg</i> <i>S. enteritidis</i>
Total	-	-	3/4 (75.0) ^b	4/4 (100)	2/4 (50.0)	2/4 (50.0)	3/4 (75.0)

^a×1,000 eggs/week.

-ve, negative results in *Salmonella* culture.

^bNumber of positive for *Salmonella*/number of hatcheries tested (%).

표 3. 육계계열화 회사 2곳에 소속된 육계농장의 *Salmonella* 오염도

Company code	Farm code	Flock size (×1,000 chickens)	Flock age (days)	Sample site		
				Cloacal swabs	Cecal dropping	Dust
A	I	15	31	<i>S. enteritidis</i>	-ve	-ve
	II	Empty ^a	-	NS	-ve	-ve
	III	50	10	-ve	-ve	-ve
	IV	67.3	2	<i>S. enteritidis</i>	-ve	<i>S. enteritidis</i>
	V	70	11	-ve	-ve	-ve
B	I	42	15	-ve	-ve	-ve
	II	32	23	-ve	-ve	-ve
	III	32	15	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>	-ve
	IV	58.5	27	<i>S. blockley</i>	<i>S. blockley</i>	-ve
	V	80	30	<i>S. gallinarum</i> <i>S. senftenberg</i>	<i>S. senftenberg</i> <i>S. blockley</i>	<i>S. blockley</i>
Total	-	-	-	5/9 (55.6) ^b	3/10 (30.0)	2/10 (20.0)

-ve, negative results in *Salmonella* culture.

^aThe little on which the birds were kept was fully removed, and cleaning and disinfection of the house were carried out.

NS, not sampled.

^bNumber of positive for *Salmonella*/number of farms tested (%).

표 4. 육계계열화 회사 2곳에 소속된 도계장의 *Salmonella* 오염도

Company code	Slaughter house code	Slaughter capacity ^a	Sample site						
			1st chilling water	3rd chilling water	carcasses				
					1	2	3	4	5
A	I	120	-ve	-ve	-ve	-ve	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>
B	I	270	<i>S. heidelberg</i> <i>S. virchow</i> <i>S. enteritidis</i> <i>S. blockley</i>	-ve	<i>S. virchow</i> <i>S. enteritidis</i>	<i>S. heidelberg</i> <i>S. virchow</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>
Total	-	-	1/2 (50.0) ^b	0/2 (0)			8/10 (80.0)		

^a×1,000 chickens/day

-ve, negative results in *Salmonella* culture.

^bNumber of positive for *Salmonella*/number of samples tested (%).

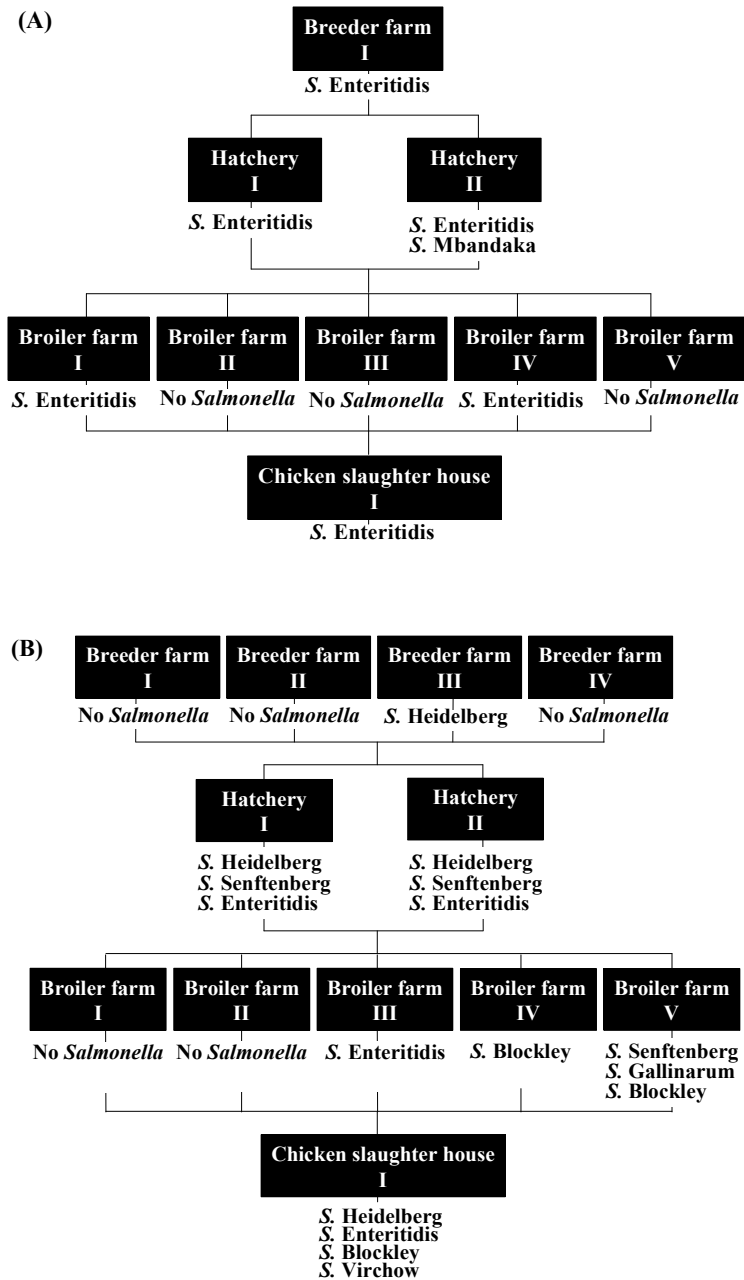


그림 1. 육계 계열화 회사의 단계별 살모넬라 오염. (A), A 육계계열화 회사 (B), B 육계계열화 회사

3. 기술적 측면

항원-항체 반응원리를 이용한 진단방법은 응집반응, ELISA 등이 현재까지 유용하게 사용되고 있으나 이는 비특이반응의 유발 및 특정 검사장비의 사용, 장시간의 검사시간 소요 등으로 필드에서 그 효용성이 그리 높지 않은 것으로 알려져 있다. 최근에 많은 부분에서 응용되고 있는 면역크로마토그래피법을 이용한 dipstick 진단키트는 시약의 사용이 간편하고, 검사소요 시간이 10분이내로서 매우 짧으며 특별히 고가의 검사장비를 필요로 하지 않아 검사비용도 매우 저렴하다는 장점을 가지고 있다. 즉, 1~2 step으로 모든 실험이 완결되는 바, 신속하게 결과를 판단할 수 있으며 또한 특이항체가 접합된 gold-conjugate와의 항원-항체 반응은 민감성과 특이성이 우수한 것으로 이미 알려져 있다. *Salmonella* 항원 동정은 현재까지도 균분리에 기초한 방법만이 유용하게 사용되고 있으나 균분리 동정을 위해서는 최소 5~7일이상이 소요되고 있고, 기타 최근에 보고되고 있는 PCR기법 등은 연구적 차원에서만 유용할 뿐 일반 야외에서는 적용될 수 없는 상황이다. 따라서 필드에서 유용하게 사용될 수 있는 살모넬라 항원진단용 dipstick의 개발은 국내 「추백리-가금티푸스 방역실시 요령」 및 「축산물 위해요소 중점관리 기준 고시」의 *Salmonella* 모니터링에 효과적으로 적용할 수 있을 것이다.

4. 경제·산업적 측면

*S. pullorum*과 *S. gallinarum*에 의해 유발되는 추백리-가금티푸스는 국내 방역정책의 일환으로 120일이상의 종계에 의무적으로 항체검사를 실시하여 양성계를 살처분하고 있다. 그러나 현재에도 본 질병의 발생은 계속적으로 이루어지고 있으며, 난계대되는 본 질병의 특징으로 어린 병아리에서 큰 경제적 피해를 유발하고 있다. 「추백리-가금티푸스 방역실시 요령」에 따라 항체검사만으로 종계검사를 실시하고 있으나 추후 선진국과 같이 항원검사를 실시할 계획에 있고, 또한 어린 병아리에 발생시 진단까지의 소요시간이 길어 효과적인 방역이 어려움에 따라 신속·정확한 진단기법의 개발은 절실하다. 또한

「축산물위해요소중점관리기준 고시」의 모니터링 검사로 실시되고 있는 축종별 식육의 *Salmonella*의 검사시 시간적 및 인력적 낭비는 간과할 수 없는 부분으로 특히 진단상의 어려움으로 실질적으로 정확한 오염여부의 판별이 용의하지 않다. 따라서 본 진단키트를 식육의 *Salmonella* 검사에 적용시 효과적으로 진단에 응용될 수 있을 것으로 판단되며, 이는 위생적이고 안전한 축산물을 공급하는데 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 살모넬라 dipstick 진단키트 개발 목표

가. 살모넬라 항원검출을 위한 dipstick 진단키트 개발

전세계적으로 2,500여종 이상 알려져 있는 살모넬라균종은 혈청형이 매우 다양하다. 본 키트는 다양한 혈청형의 대부분을 검출할 수 있는 dipstick으로 「축산물위해요소중점관리기준 고시」에 따른 살모넬라 모니터링시 손쉽게 검사를 실시할 수 있도록 하는데 목적이 있다 (그림 2). 본 키트의 적용시 검체에 살모넬라 양성일 경우 *Salmonella* capture line과 control line 모두에 반응이, 살모넬라 음성일 경우는 control line에만 반응이 나타난다 (표 5).

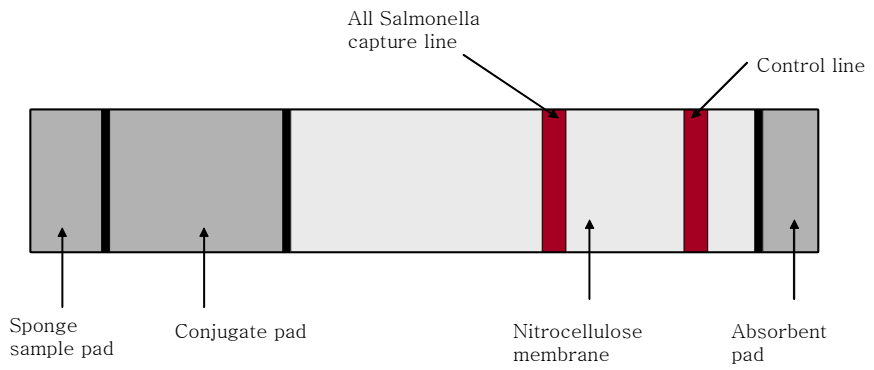


그림 2. 살모넬라 항원검출을 위한 dipstick 설계도

표 5. 살모넬라 항원검출을 위한 dipstick 진단 결과

결 과	<i>Salmonella</i> capture line	Control line
<i>Salmonella</i> 항원 음성	-	+
<i>Salmonella</i> 항원 양성	+	+

나. *Salmonella* group D 특이 항원검출을 위한 dipstick 진단키트 개발

S. pullorum, *S. gallinarum* 및 *S. enteritidis*는 양계산업에서 많은 문제를 유발하고 있는 살모넬라 균종으로 이들 균종은 모두 살모넬라 혈청형 group D에 포함된다. 따라서 본 키트는 *Salmonella* group D 항원만을 진단할 수 있도록 개발함으로 야외에서의 신속하고 정확하게 질병을 진단하는데 목적이 있다 (그림 3). 본 키트의 적용시 검체에 *Salmonella* group D 항원 양성일 경우 *Salmonella* group D capture line과 control line 모두에 반응이, 살모넬라 항원 음성이거나 살모넬라이더라도 group D에 속하는 항원이 아닐 경우에는 control line에만 반응이 나타난다 (표 6).

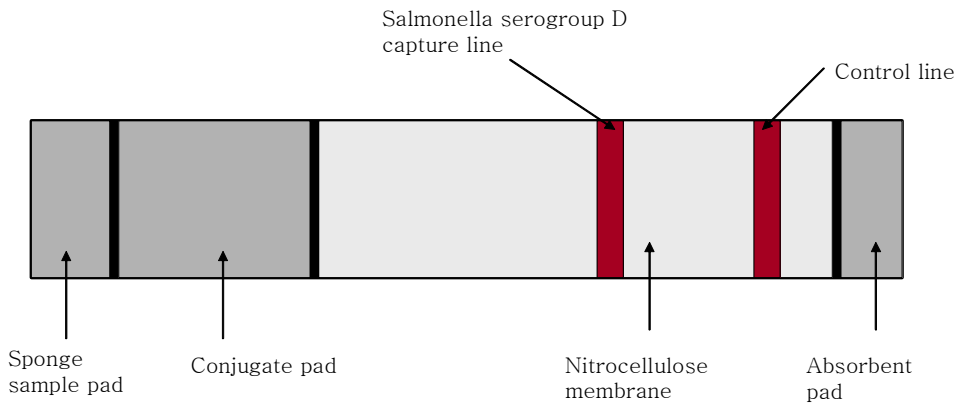


그림 3. *Salmonella* serogroup D 항원검출을 위한 dipstick 설계도

표 6. *Salmonella* serogroup D 항원검출을 위한 dipstick 진단 결과

결 과	<i>Salmonella</i> serogroup D capture line	Control line
<i>Salmonella</i> 항원 음성	-	+
<i>S. pullorum</i> 항원 양성	+	+
<i>S. gallinarum</i> 항원 양성	+	+
<i>S. enteritidis</i> 항원 양성	+	+
<i>Salmonella</i> group D 이외의 항원 양성	-	+

2. *Salmonella* 특이 항체 개발

S. pullorum-*S. gallinarum* 및 *S. enteritidis*가 포함된 *Salmonella* sero-group D의 특이항체와 모든 종류의 *Salmonella*들을 다 검출할 수 있는 다클론 항체 (polyclonal antibodies)를 각각 생산, 정제하고 항체의 특이성을 조사한다.

3. 면역크로마토그래피법을 이용한 dipstick 키트 개발

약 40 nm크기의 gold 입자를 제작하여 생산된 특이항체와 부착시키고 nitrocellulose membrane에 항체고정을 위한 조건을 확립하여 dipstick 키트를 제작하고 개발된 키트를 산업화하기 위하여 특이성, 효율성 및 표준화 대해서 조사한다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 기술 및 문제점

추백리-가금티푸스 및 *S. enteritidis* 감염증은 조류의 난계대전염병으로 종계의 발생시 그 후대병아리에까지 전염되어 실용계 농장에 큰 경제적 피해를 유발하며 특히 추백리-가금티푸스는 국내 제2종 법정전염병이다. 본 병의 근절을 위하여 전세계적으로 종계의 검색 및 살처분 정책을 실시하고 있으며, 따라서 양계선진국의 경우 80년대 이후 본 병의 발생을 근절하였으나 국내의 경우는 현재까지도 꾸준히 발생이 보고되어 양계산업에 큰 경제적 피해를 주고 있다.

추백리-가금티푸스의 원인균인 *Salmonella pullorum-S.gallinarum*은 세포내 기생균이기에 항생제나 면역세포에 영향을 받지 않아 효과적인 치료법이 없으며, 국내에서도 「추백리-가금티푸스 방역실시 요령」에 따라 종계의 검색 및 살처분 정책을 실시하고 있다. 현재에는 혈청검사만으로 본 병을 검색하고 있으나 선진국에서는 이미 본 병의 발생유무를 판단하기 위하여 최종 항원을 검색하여 진단함을 원칙으로 하고 있으며 따라서 국내에서도 빠른 시간내 항원검색을 통한 진단으로 감염유무의 정확성을 높여야 할 것이 예상된다. 따라서 전통적인 균분리·동정법을 이용시 최소 5-7일이상의 시간이 소요되는 것을 단축시킬 수 있는 신속·정확한 진단법의 개발이 요구된다.

「축산물위해요소중점관리기준」에 따른 식육의 모니터링 검사는 축종별 도축수수에 따라 기준수수에 대한 *Salmonella* 검사를 실시하여야 하며, 따라서 매일 동일한 검사가 계속해서 이루어지고 있다. 그러나 전세계적으로 분리·보고되고 있는 *Salmonella*균의 종류는 약 2,500여종 이상으로 최종 균종의 동정까지 실시하지 않는다하여도 *Salmonella* 유무를 판단하는데 수일이 소모되고 있다. 따라서 앞서 설명한 추백리-가금티푸스의 신속한 항원동정뿐만 아니라 식육의 모니터링에 응용될 수 있는 *Salmonella* 동정 키트의 개발

은 국내 축산물의 위생적인 생산을 위해서도 시급한 현실이다.

제 2 절 국내·외 개발 현황

국외에서 이미 개발된 살모넬라 항원동정용 키트는 수종에 이르고 있다. 이러한 키트는 생화학적 성상을 이용하거나 DNA 교잡반응, ELSIA를 이용한 항원항체반응과 아울러 미국의 2개 회사에서 dipstick을 이용한 살모넬라 항원진단 키트를 개발, 시판하고 있다 (표 7). 이들 키트의 민감도는 평균 3 CFU이상의 항원을 검출할 수 있는 것으로 보고되고 있으며 최종 검출시간은 24시간으로 기존의 항원동정법이 5-7일이상 소요되는데 반하여 빠른 시간내 항원검출을 가능하게 하였다. 그러나 이 두제품은 국내에서 하나의 샘플을 검사하는데 1만원 이상의 비용이 소요되는 고가의 진단법으로 국내에서 자체 생산하여 사용하지 않는 한, 국내 적용은 어려운 실정이다.

표 7. 국내·외 허가 살모넬라 항원동정용 키트

상품명	방법	민감도	검출시간		개발국 (회사)	AOAC#
			평균시간 (hr)	키트검사		
API-20E	Biochemical test	98%	48	24h	프랑스 (bioMerieux)	998.24
VITEK (GNI)	Biochemical test	98%	48	3h-6h	프랑스 (bioMerieux)	991.13
Biosign	Dipstick	5X10 ⁵ cell, 3-8CFU/25g	24	5분	미국 (PBM)	-
Reveal for Salmonella	Dipstick	1-5CFU/25g (99%)	20	15분	미국 (Neogene)	960801
Gene-QUENCE	DNA hybridization	1-5CFU/25g (98.9%)	40-48	90분	미국 (Neogene)	030201
Bioline Salmonella SELECTA	ELISA	1CFU/25g 10 ⁵ -10 ⁶ cell/ml (100%)	24	75분	덴마크 (Bioline)	AFNOR, NordVal 인증
Bioline Salmonella OPTIMA	ELISA	1CFU/25g 10 ⁵ -10 ⁶ cell/ml (100%)	40	75분	덴마크 (Bioline)	AFNOR, AOAC 인증

제 3 절 개발대상 기술의 개요

면역크로마토그래피법을 이용한 dipstick 진단키트는 검사소요 시간이 최소 10분에서 최대 18시간까지로 매우 짧으며 특별히 고가의 검사장비를 필요로 하지 않아 검사비용도 저렴하다는 장점을 가지고 있다. Dipstick 진단키트는 1 step으로 모든 실험이 완결되는 바, 검체를 진단키트의 검체 주입구에 소량 투여하면 전처리 여과용 필터를 통과한 후 양성의 경우 검체 중에 있는 항원이 1차적으로 특이 항체가 접합된 gold-conjugate와 반응하여 항원-항체결합체를 형성한다. 이후 이 항원-항체결합체는 연속적으로 진단시약 내부에 있는 여러 패드를 통과해서 nitrocellulose membrane까지 수평적으로 흘러가게 되면서 nitrocellulose membrane에 코팅되어 있는 항체와 반응하여 색상을 발현함으로써 항원의 존재여부를 육안으로 진단할 수 있도록 해준다.

본 개발대상 기술의 예는 임신진단키트로 수분이내에 임신여부를 감별할 수 있는 것으로 이미 잘 알려진 바 있다. 근년에 이르러 이러한 면역크로마토그래피법을 이용한 진단키트의 개발연구는 활발히 진행중이나 아직까지 수의분야에서의 그 연구가 충분히 이루어지지 못하고 있다. 따라서 본 기법을 이용한 진단키트 개발 연구는 앞으로 수의분야에 있어 중요한 연구성과를 낼 수 있을 것으로 판단된다.

제 4 절 개발대상기술에 대한 연구기관 잠재력

주관연구기관인 경북대학교 수의과대학은 2004년 개에 유산을 일으키면서 인수공통전염병의 주요 원인균으로 알려져 있는 *Brucella canis* 항원에 대한 dipstick개발 연구를 기 실시한 바 있으며, 또한 협력연구기관인 (주)에니젠은 현재 개파보항원, 항체 진단 키트, 개 디스토퍼 항원, 항체 진단 키트, 돼지 전염성위장염 항원 진단 키트, 돼지 유행성설사병 항원진단키트 등 30여가지의

dipstick 진단시약 및 효소면역측정법(ELISA) 진단시약을 세계최초로 자체 개발하여 국내를 포함한 전세계 40여개국에 수출하고 있는 국내 최고의 동물용 dipstick 및 ELISA 진단시약 전문회사로서 그 기술력을 인정받고 있다. 따라서 경북대학교 수의과대학과 (주)에니젠 및 국립수의과학검역원은 현재 보유하고 있는 dipstick 진단시약 개발 기술력을 바탕으로 「*Salmonella* 항원 검출을 위한 dipstick 진단키트 개발」 를 연구하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 기술개발 내용 및 범위

1. 시스템 구성도 및 구조

면역크로마토그래피(immunochromatographic assay) 원리를 이용한 개발품은 플라스틱 외부에 둥근 검체 주입 부위와 사각형의 표시창에 검사선(T)과 대조선(C)이 표시되게 하였다. 플라스틱 내부에는 검체 주입 부위부터 차례대로 검체 패드(Sample pad), gold입자가 살모넬라 항체와 결합되어 있는 골드 패드(gold conjugate pad), 멤브레인(membrane), 흡습 패드(adsorbent pad)가 중첩되어 있다. 멤브레인에는 검사선 위치에 살모넬라 항체가 흡착되어있다 (그림 4).

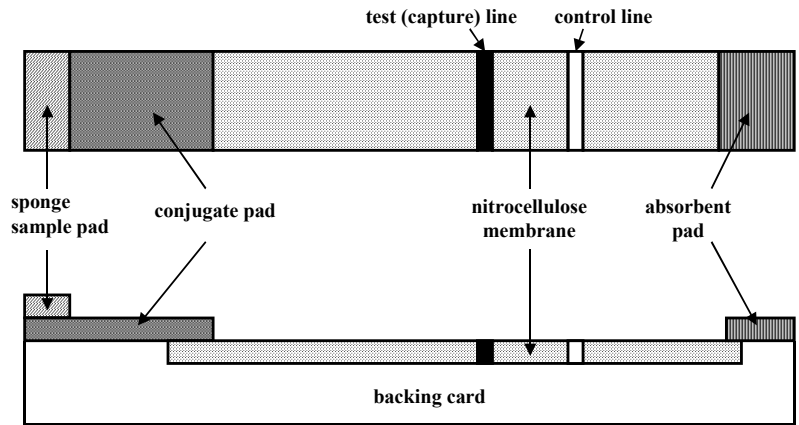


그림 4. Dipstick 진단키트의 일반 모식도

가. 반응 원리

살모넬라 항원 신속진단키트는 평균 24시간 이내 모든 실험을 완결하게 된다. 즉, 1차 배양된 검체를 검체 주입구에 소량 투입하면, 전처리 여과용 필터를 통과한 후 양성일 경우 검체중에 있는 살모넬라 항원이 1차적으로 살모넬라 항원에 특이적인 항체가 접합된 골드 콘쥬게이트와 반응하여 항원-항체 결합체를 형성한다. 이후 이 항원-항체 결합체는 연속적으로 진단시약 내부에 있는 여러 패드를 통과해서 나이트로셀룰로우스막까지 수평적으로 흘러가게 되면서 나이트로셀룰로우스막위에 코팅되어있는 단클론항체와 반응하여 색상을 발현, 감염여부를 육안으로 진단할 수 있도록 해준다 (그림 5, 그림 6) .

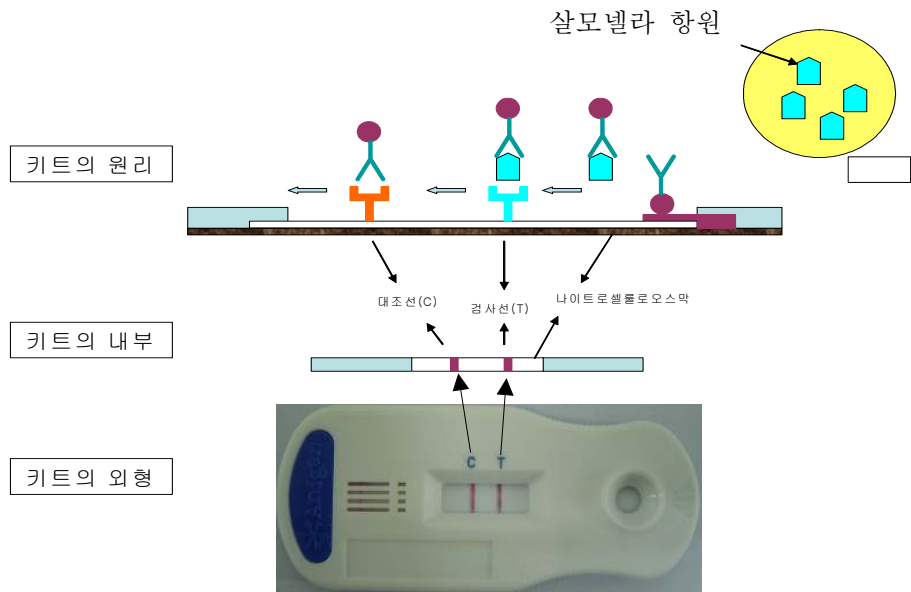


그림 5. 살모넬라 신속진단키트의 시스템 구성도 및 반응원리



[살모넬라 항원 양성]



[살모넬라 항원 음성]

그림 6. 살모넬라 신속진단키트의 결과 판정에

2. 연구개발 추진체계

모든 혈청형의 살모넬라를 검출하기 위한 dipstick (Pan Sal kit)과 *Salmonella* serogroup D 만을 특이적으로 검출하기 위한 dipstick (Sal group D kit)을 개발하기 위하여 각각의 특이 항체를 추출하고 항체의 특이성을 조사한다. 항체의 생산 후 immuno-gold, membrane 등의 조건을 설정하고 시제품을 생산하여 민감성 및 특이성 조사와 아울러 현장적용 시험을 실시한다 (그림 9).

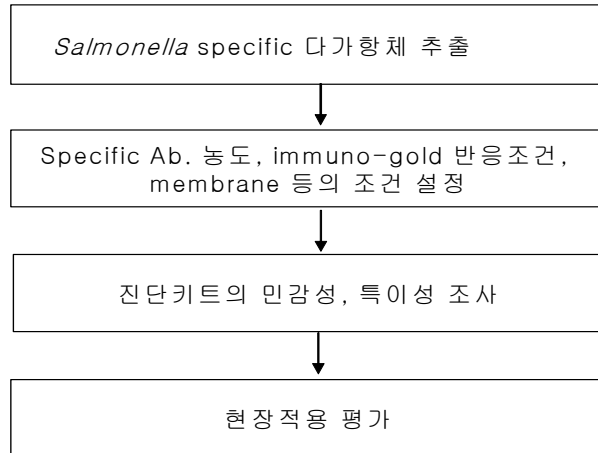


그림 6. 연구개발 추진단계

제 2 절 연구방법

1. 시험균주

살모넬라 항체 생산과 진단키트의 민감성 및 특이성 조사를 위해 사용된 시험균주는 살모넬라 23종 및 기타 균주 5주이었다 (표 9)

표 9. Dipstick 진단키트 개발을 위해 사용된 시험균주

Salmonella spp.			Other organisms	
Serogroup	Strains	Origin	Escherichi coli	EC58-3
B	<i>S. typhimurium</i>	ATCC 14028	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC BAA1427
	<i>S. helderberg</i>	S743-3	<i>Staphylococcus aureus</i>	SA13-2
	<i>S. indiana</i>	S779-3	<i>Enterococcus faecalis</i>	FA2-2
	<i>S. essen</i>	69D-1 (from NVRQS)	<i>Enterococcus faecium</i>	M4105SS
	<i>S. agona</i>	8E-1 (from NVRQS)		
C1	<i>S. montevideo</i>	S724-1		
	<i>S. bareilly</i>	42E-2 (from NVRQS)		
	<i>S. tennessee</i>	S590-1		
	<i>S. virchow</i>	S7-1		
D	<i>S. enteritidis</i>	ATCC13076		
	<i>S. enteritidis</i>	S752-2		
	<i>S. gallinarum</i>	ATCC 9184		
	<i>S. pullorum</i>	ATCC 9120		
E1	<i>S. regent</i>	S728-1		
E2	<i>S. halmstad</i>	78D-3 (from NVRQS)		
	<i>S. newbrunswick</i>	15D-1 (from NVRQS)		
E4	<i>S. senftenberg</i>	S119-1		
C2	<i>S. blockley</i>	S768-4		
	<i>S. hadar</i>	S782-2		
	<i>S. kottbus</i>	5E-1 (from NVRQS)		
	<i>S. chincol</i>	S72-1 (from NVRQS)		
	<i>S. newport</i>	14E-1 (from NVRQS)		
	<i>S. muenchen</i>	S616-1		

2. 살모넬라 특이항체 생산

가. 면역원 제조

Pan sal kit용 항체 (Pan *Salmonella* 항체) 및 *Salmonella* group D kit용 항체 (Sal group D 항체) 생산을 위해 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU로 농축된 살모넬라 항원의 lipopolysaccharide (LPS)를 분리하여 Freund's adjuvant로 emulsion을 만든다. LPS는 modified hot phenol-water method를 이용하였다. 즉, BHI agar에 살모넬라균을 37°C에서 24시간 배양 후 생리식염수를 이용하여 집균하였다. 이를 멸균생리식염수로 4,500rpm에서 3회 세척하고 10ml 멸균생리식염수로 재부유시킨 후, 75°C waterbath에 30분간 방치하고 75°C로 가열된 saturated phenol 10ml을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 반응액을 실온에서 식히고 upper aqueous layer를 조심스럽게 분리하고, phenol phase와 interphase는 다시 75°C로 가열하고 aqueous phase를 다시 한번 분리하였다. 두 번에 걸쳐 분리한 aqueous phase를 4°C 증류수에서 phenol이 모두 제거될 때까지 dialysis tube를 이용하여 dialysis하였으며, 이를 7.5% sodium acetate를 함유한 95% acetone을 이용하여 침전시키고, 12,000rpm에서 원심분리하여 pellet을 이용하였다. Pan *Salmonella* 항체생산을 위해서는 *Salmonella* group B, C1, C2, D, E1, E2, E4에 해당되는 각각의 균주농도 10^9 CFU되게 맞추어 합하였으며, Sal group D 항체생산을 위해서는 group D에 해당되는 *S. enteritidis* 만은 10^{10} CFU되게 사용하였다 (표 10).

표 10. Pan *Salmonella* 항체 및 Sal group D 항체생산을 위한 살모넬라 균주

균주명	혈청형	O항원 구조	균수함량 (CFU)	
			Pan Salmonella	Salmonella group D
<i>S. typhimurium</i>	B	1, 4, 5, 12	10^9	
<i>S. montevideo</i>	C1	6, 7	10^9	
<i>S. blockley</i>	C2	6, 8	10^9	
<i>S. enteritidis</i>	D	1, 9, 12	10^9	10^{10}
<i>S. regent</i>	E1	3, 10	10^9	
<i>S. halmstad</i>	E2	3, 15	10^9	
<i>S. senftenberg</i>	E4	1, 3, 19	10^9	
최종 균수농도			$10^9 \sim 10^{10}$	10^{10}

나. 면역

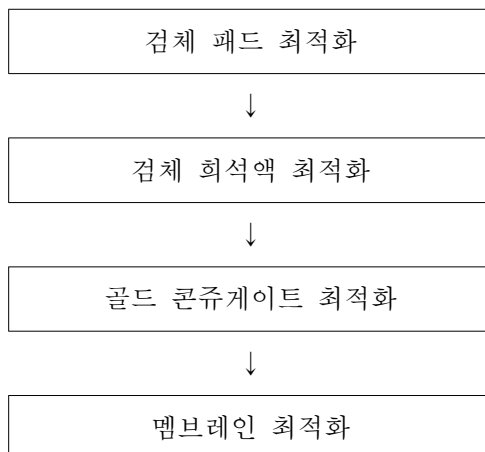
분리된 살모넬라균의 LPS를 4일 간격으로 6회 8주령 토끼의 이정맥에 접종한 후 혈중 살모넬라 항체를 측정하여 전혈을 채취한다. 채취된 혈액은 4℃에 24시간 보관하여 혈청을 분리하고 0.45u syringe filter로 여과하고 항체정제후 -20℃에 보관한다.

다. 항체 정제

Pan Salmonella 항체 및 Sal group D 항체를 다가항혈청으로 affinity column (Protein A/G 크로마토그래피 겔)을 이용하여 정제한다.

3. 제 제 화

가. 살모넬라 항원 신속 진단 키트의 제제화 체계



나. 멤브레인 코팅공정

나이트로셀룰로스 멤브레인의 검사선(T)에 살모넬라 항원에 특이적인 토끼 다크론항체를 코팅한다.

다. 골드 콘쥬게이트 및 패드 제조 공정

살모넬라 항원에 특이적인 토끼 다크론항체를 금 콜로이드(gold colloid)와 결합시켜 패드에 분주하여 건조한 후 절단하여 골드 패드를 제조한다. 즉 염화금을 시트로산 나트륨 용액으로 환원시켜 40nm 크기의 골드 입자를 532nm에서 흡광도가 10 ± 1 이 되게 제조한다. 여기에 정제된 살모넬라 항체를 부착시키는데 Pan *Salmonella* 항체는 25 ug/ml로, *Salmonella* group D 항체는 18 ug/ml로 부착시키고 PEG 용액으로 골드 입자를 안정화시킨다. 제조된 골드접합체는 폴리에스테르 또는 유리섬유와 같은 매트릭스에 적셔 건조시킨다.

라. 검체 패드 제조

검체 패드를 검액이 잘 흡수될 수 있는 50mM 인산염 용액(pH 8.0) 용액으로 전처리하여 건조한다.

마. 흡습 패드 제조

반응용액이 잘 흡수될 수 있도록 건조하여 제조한다.

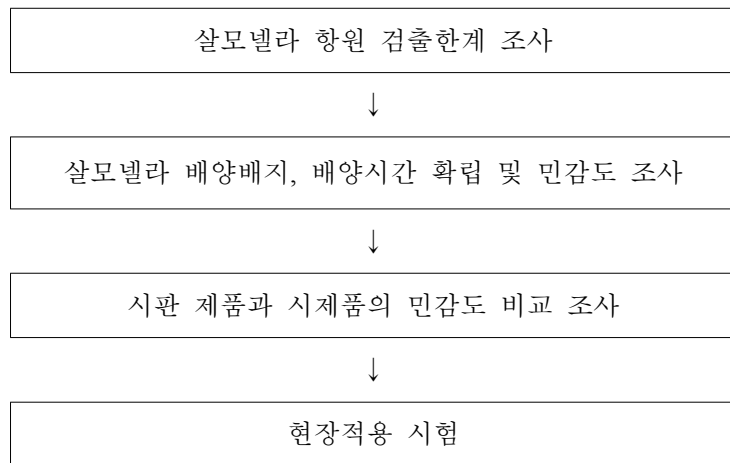
바. 카세트 조립

항체가 코팅된 나이트로셀룰로오스 멤브레인이 부착되어 있는 PVC카

드의 왼쪽에는 흡습패드를 오른쪽에는 골드 패드 및 검체 패드를 각각의 위치에 부착한 후 검체 패드 위쪽으로 검체 적용홀이 가도록 카세트를 조립한다.

4. 적용시험

가. 살모넬라 항원 신속 진단 키트의 적용시험 체계



나. 제제화 시험을 통하여 개발된 시제품을 살모넬라 항원 음양성 검체로 임상 시험을 실시하여 본 개발품의 효능 및 성능을 평가한다.

다. 민감도 검사는 기 동정된 살모넬라 균주를 대상으로 실시한다.

라. 특이도 검사는 살모넬라 균주 기타 병원성 균주를 대상으로 실시한다.

제 3 절 연구결과

1. 살모넬라 특이 항체 개발

가. Pan *Salmonella* 항체

Salmonella serogroup B, C1, C2, D1, E1, E2 및 E4에 해당되는 살모넬라 균주와 기타 병원성 세균을 각각 75X MacFarland tube No.1되게 농축한 다음 항원 30ul와 혈청 30ul을 사용한 평판응집반응법으로 특이성을 관찰하였다 (그림 7 및 표 11). 그 결과, 생산된 Pan *Salmonella* 항체는 살모넬라 시험균주와 특이적인 평판응집반응 양성을 나타내었다.



<항체양성>

<항체음성>

그림 7. 살모넬라 평판응집반응법

표 11. Pan *Salmonella* 항체의 평판응집반응 결과

Organisms	Serotype	O-antigen type	SPA*
<i>S. typhimurum</i>	B	1,4,5,12	+
<i>S. montevideo</i>	C1	6,7	+
<i>S. blockley</i>	C2	6,8	+
<i>S. Enteritidis</i>	D	1,9,12	+
<i>S. Pullorum</i>	D	9,12	+
<i>S. Gallinarum</i>	D	9,12	+
<i>S. Regent</i>	E1	3,10	+
<i>S. Halmstad</i>	E2	3,15	+
<i>S. senftenberg</i>	E4	1,3,19	+
<i>Escherichi coli</i>	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-

*SPA, serum plate agglutination test

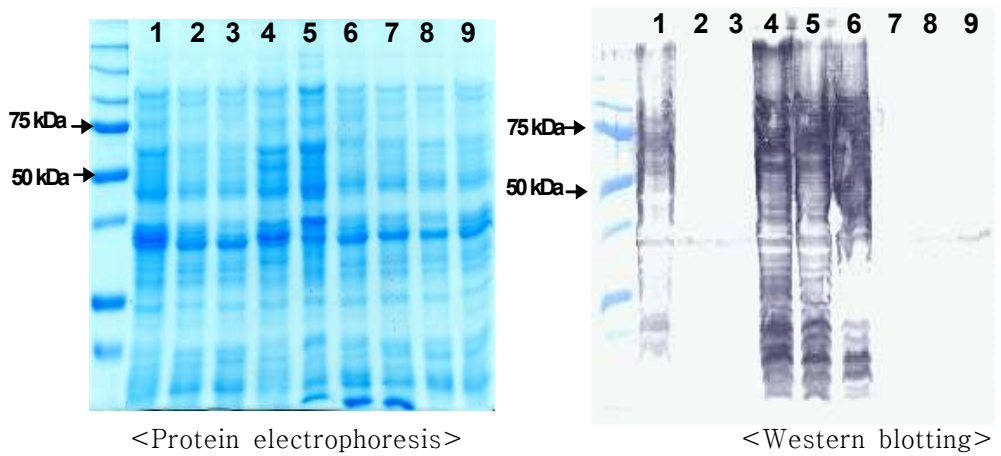
나. Sal group D 항체

Salmonella serogroup B, C1, C2, D1, E1, E2 및 E4에 해당되는 살모넬라 균주와 기타 병원성 세균을 각각 75X MacFarland tube No.1되게 농축한 다음 항원 30ul와 혈청 30ul을 사용한 평판응집반응법으로 특이성을 관찰하였다 (표 12). 그 결과 serogroup D에 속하는 *S. pullorum*, *S. gallinarum* 및 *S. enteritidis*와만 특이적인 평판응집양성반응을 나타내었다. 또한 살모넬라 균주의 단백질 전기영동과 western blotting을 실시하여 생산된 항체의 특이성을 관찰하였던 바, serogroup D에 속하는 세균과 더불어 serogroup B에 속하는 *S. typhimurium*과도 반응을 나타내었으며 이는 O 항원구조인 1, 4, 5, 12중 serogroup D와 동일한 12의 항원구조때문인 것으로 판단된다 (그림 8)

표 12. Sal group D 항체의 평판응집반응 결과

Organisms	Serotype	O-antigen type	SPA*
<i>S. typhimurum</i>	B	1,4,5,12	-
<i>S. montevideo</i>	C1	6,7	-
<i>S. blockley</i>	C2	6,8	-
<i>S. enteritidis</i>	D	1,9,12	+
<i>S. pullorum</i>	D	9,12	+
<i>S. gallinarum</i>	D	9,12	+
<i>S. regent</i>	E1	3,10	-
<i>S. halmstad</i>	E2	3,15	-
<i>S. senftenberg</i>	E4	1,3,19	-
<i>Escherichi coli</i>	-		-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-		-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-		-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-		-
<i>Enterococcus faecium</i>	-		-

*SPA, serum plate agglutination test



Lane 1. *S. typhimurium*; 2. *S. montevideo*; 3. *S. blockley*; 4. *S. enteritidis*;
 5. *S. pullorum*; 6. *S. gallinarium*; 7. *S. regent*; 8. *S. halmstad*; 9. *S. senftenberg*.

그림 8. *Salmonella* serogroup D 항체를 이용한 western blotting

다. Matching test

신속진단키트에 적합한 항체임을 확인하기 위하여 matching test를 실시하였다. 특히 항체에 대해 신속진단키트용 금접합체(gold conjugate/detector)를 제조하고 또한 membrane에 coating(Capture)한 후, 양성 검체 및 음성검체를 사용하여 신속진단키트에 적합한 항체임을 확인하였다 (그림 9).

Detector Clone No.	2133		1425		2325	
	+	-	+	-	+	-
Capture Clone No.	Sample					
2133	+	-	+	-	+	-
2325					+	-

그림 9. Matching test

2. 시제품 제제화

가. 검체 패드 최적화

살모넬라 항원이 함유된 검체를 키트내에서 최초로 수용하는 검체 패드는 검체의 이동속도와 이물질 여과를 최적으로 할 수 있는 조건을 찾고자 하였다. 각 제조회사별로 제품 형태로 나오는 검체 패드에 2.5 ml의 20X PBS, 5 ml의 10%BSA, 2.5 ml의 10% tween 20을 혼합하여 DW로 최종 50 ml가 되도록 조정하고 이를 검체 패드(2x30cm)에 적신 다음 37°C 항온실에서 하루동안 건조시켜 검체 패드를 준비하였다. 건조된 검체 패드, 골드 패드, 나이트로셀룰로오스 멤브레인, 흡습 패드를 중첩하여 임시로 시제품을 제작하였다. 검체 시료는 살모넬라 항원을 10^7 CFU되게 하여 각 키트에 150 μ l씩 첨가하여 검체 패드 최적화 시험을 실시하였으며 10회 반복시험하여 그 평균을 산출하였다.

그 결과, 시험에 이용된 검체 패드중 Whatman사의 903 패드가 최초 전개 시간이 21초, 전개 완료 시간이 1분 53초, background clear시간이 6분 21초로 가장 우수하게 확인되었다 (표 13).

표 13. 검체 패드 선정

검체 패드* 종류	903	Fusion 5	Glass fiber (2겹)	Cytosep 1662	FR1	FR2
제조회사	Whatman	Whatman	Millipore	Millipore	MDI	MDI
전개 시작 시간	21초	121초	30초	96초	54초	46초
전개 완료 시간	1분 53초	8분 03초	2분 21초	4분 05초	3분 45초	3분 10초
Background clear 시간	6분 21초	21분 28초	8분 30초	15분17초	12분29초	10분51초

* 검체 패드의 전처리 조건 : 2.5ml의 20X PBS, 5ml의 10%BSA, 2.5ml의 10% tween 20을 혼합하여 DW로 최종 50ml가 되도록 조정하고 이를 검체 패드 (20x30cm)에 적셔 37℃에서 overnight하여 건조시킴

나. 골드 콘주게이트(gold conjugate) 최적화

(1) Colloidal gold 용액 제조

약 40 nm크기의 colloidal gold를 제조하기 위하여 완전히 수세된 삼각플라스크에 증류수 94 ml을 넣고 열교반기에서 교반하면서 50°C가 되었을 때 1%(w/v) gold chloride용액을 1 ml첨가하였다. 그리고 다시 90°C가 되었을 때 0.2%(w/v) trisodium citrate용액 5 ml을 신속하게 첨가하여 반응용액의 색상이 노란색, 검은색, 보라색으로 바뀌다가 최종적으로 맑은 선홍색을 나타내면 실온에서 추가로 30분간 교반하였다. 반응이 종료되면 0.1M potassium carbonate를 이용하여 pH 7.2로 조정하고 538 nm에서 흡광도를 측정하여 10 ± 1 이 되게 함으로서 colloidal gold를 제조하였다.

(2) Gold conjugate 제조

Pan *Salmonella* 항체 및 *Salmonella* group D 항체에 대한 conjugation은 다음과 같이 실시하였다. 즉, colloidal gold 1 ml에 항체농도가 Pan *Salmonella* 항체는 25 $\mu\text{g/ml}$ 로, Sal group D 항체는 18 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가하여 10분 동안 stirring 하면서 pH를 NaOH용액으로 pH 9.0으로 조정하여 conjugation되게 하였다. 최종 conjugation이 완료된 후에는 1%(w/v)의 BSA를 첨가하여 blocking시키고, HCl로 pH 7.0으로 재조정하였다. 이렇게 conjugation된 항체는 원심분리(10,000 rpm, 1시간)하여 상층액을 제거하고 2 mM borax용액에 재 부유시켜 다시 재 원심분리하고, pellet을 0.3 ml의 10% BSA, 3 ml의 1% (w/v) sodium azide, 26.7 ml의 2 mM borax (pH7.2)가 혼합된 용액으로 완전히 부유시켜 골드 패드 처리에 이용하였다.

다. 멤브레인 최적화

(1) 멤브레인 종류 결정

Nitrocellulose membrane의 종류에 따라 음, 양성 구별 및 검체의 전개 속도를 확인하여 신속하면서도 가장 음, 양성 구별이 뚜렷한 membrane을 선정하고자 하였다. 각 멤브레인에 1 mg/ml되게 PBS로 희석한 후 Bio-Dot (USA)을 이용하여 1 μ l/cm로 분사하여 37°C에서 2시간 건조하였다. 임시로 검체 패드, 골드 패드 및 흡습패드를 중첩하여 키트를 제작한 후 각 멤브레인 최적화 시험을 실시하였다. 시험에 이용된 양성 검체용 항원은 *S. typhimurium*과 *S. enteritidis*를 이용하였으며, 음성 검체는 *E. coli*를 이용하였다. 각 음, 양성 검체를 1:10으로 검체희석액과 혼합한 후 검체 적용홀에 120 μ l씩 (dropper를 이용시 4 drops)점적하여 10분내에 가장 음, 양성 구별이 큰 membrane을 선정하고자 하였다. 그 결과, MDI 10 membrane이 10분내에 음, 양성 구별이 가장 우수하였다(표 14).

표 14. 멤브레인 최적화 시험 결과

멤브레인 종류	MDI 8	MDI 10	135	180	230
제조회사	MDI	MDI	Millipore	Millipore	Millipore
음성 band 강도(%*)	0	0	0	0	0
양성 band 강도(%)	85	95	93	90	88

* 밴드 강도의 %는 가장 진하게 발색되었을 경우 100%, 중간정도 발색되었을 경우 50%, 발색이 없을 경우 0%로 표시되는 것으로서 color scale에 따라 reading함

(2) 멤브레인 코팅공정

각 검사 키트당 MDI 10 nitrocellulose membrane (0.45 cm width)의 검사선 (T) 위치에는 Pan salmonella 항체는 2.1 ug, Sal group D 항체는 1.3 ug을, 그리고 대조선(C) 위치에는 산양 항마우스 항체를 2 ug되게 coating되도록 PBS로 희석하여 coating하였다.

각 항체의 coating은 Bio-Dot(USA)을 이용하여 신속히 분사하고 건조한 후 제품 생산 전까지 제습된 상태(습도 10%이하)에 보관하였다.

라. 각 패드 제조

(1) 검체 패드 제조

903을 검체 패드 (2x30 cm)로 하여 검체 패드 처리 용액 (2.5 ml의 20X PBS, 5 ml의 10% BSA, 2.5 ml의 10% tween 20을 혼합하여 DW로 최종 50 ml가 되도록 조정)에 처리하여 건조 시켜 lamination (각 패드 중첩 공정)전까지 제습상태로 보관하였다.

(2) 골드 패드 제조

Gold conjugate를 540 nm에서 흡광도 10 ± 1.0 으로 조정하여 polyester (MDI, 0.7x30 cm)에 적신후 완전히 건조시키고 lamination전까지 제습상태로 보관하였다. 이때 각 검사 키트당 (0.7x0.45 mm)에 8.3 ± 1.6 μ l의 gold conjugate가 포함되었다.

(3) 흡습 패드 제조

흡습패드는 SM-18150 (Millipore, 1.8x30 cm)를 37°C에서 하룻밤 완전히 건조한 후 lamination전까지 제습상태로 보관하였다.

(4) 멤브레인 제조

BioDot으로 살모넬라 항체 (검사선 위치)와 산양 항 마우스 항체

(대조선 위치)를 코팅한 MDI 10 (MDI, Indo)을 37°C에서 2시간 완전히 건조한 후 lamination전까지 제습상태로 보관하였다.

마. 시제품 제조

(가) 디바이스 제조 (카세트 조립)

검체 패드, 골드 패드, 멤브레인 및 흡습 패드를 오른쪽부터 왼쪽으로 차례대로 서로 중첩하였으며 총 길이는 6.0 5cm가 되게 하여 플라스틱 카드에 조립하였다. 이렇게 조립된 것을 cutter기 (Bio-Dot, USA)로 0.45 cm되게 정확하게 cutting하여 strip을 제조하였다. 각각의 strip을 디바이스 하판에 넣고 상판을 완전히 눌러 검사용 디바이스를 조립하였다.

(나) 드롭퍼

검체를 점적할 dropper는 4-5방울 점적하였을 때 120-150 µl가 점적될 수 있는 것으로 하였다.

바. 시제품의 판정 시간 설정

본 시제품의 최적 용법, 및 용량을 설정하기 위하여 음성 및 양성 표준 검체를 이용하여 각각 5분, 10분, 15분, 20분 및 30분 경과시 결과를 판정하였으며, 반응 후 시간 경과에 따라 양성 표준검체를 양성으로, 음성 표준검체를 음성으로 정확하게 판정하면서 주변의 background와 대조선, 검사선이 명확해지는 시점을 본 제품의 반응시간으로 정하였다. 양성 및 음성 표준검체는 다음과 같이 제조하여 시험에 공시하였다. 즉, Salmonella 항원을 희석하여 단 단계별로 검사한 후 육안 밴드 강도로서 구분하여 저역가 (RP 5301), 중역가 (RP 5302), 고역가 (RP 5303) 농도의 표준 검체를 설정하였으며 표준 음성 검체(RP 5304)는 검체 희석액을 음성 표준 검체

로 하였다.

그 결과, 검체 점적후 5분 경과 시부터 양성 및 음성 표준 검체의 판정이 가능하였으나 저역가 시제품의 판정강도는 10분경과시 보다 뚜렷해 짐을 알 수 있었다. 또한 10분 경과시에는 주변 background 와 반응선의 구분이 명확해졌으며 15분 및 20분 경과시에도 양성 및 음성 표준 검체의 판정을 정확히 하였으나 판독 시간의 신속함을 위해 상기의 결과를 근거로 하여 본 제제를 용법 용량에 따라 시험할 때의 판정 시간을 10분으로 설정하였다 (표 15).

표 15. 시제품의 검사시간 설정 시험

시제품	세균접종농도 (CFU)	검 사 결 과				
		5분	10분	15분	20분	30분
RP 5301	10^6	0.5+	1+	1+	1+	1+
RP 5302	10^7	1.5+	2+	2+	2+	2+
RP 5303	10^8	2.5+	3+	3+	3+	3+
RP 5304	10^8	-	-	-	-	-

3. 시제품의 살모넬라 검출한계

23종의 살모넬라 시험균주와 5종의 기타 병원성 세균을 10진희석하여 단계별로 본 제제의 용법, 용량에 따라 시험하고 (4방울 점적, 10분후 판정) 본 제제의 판정 방법에 따라 양성으로 판정하는 최고의 희석배수와 역가를 정하였다. 그 결과 살모넬라 혈청형에 따라 약간의 차이가 있었으나 Pan *Salmonella* 항원검출용 키트 (Pan Sal kit) 및 *Salmonella* serogroup D 항원검출용 키트 (Sal group D kit) 모두 검출한계는 평균 10^4 CFU 이상임을 알 수 있었다 (그림 10, 표 16).



그림 10. 살모넬라 및 병원성 세균에 대한 검출한계 시험과정

표 16. 살모넬라 항원 진단 키트의 검출한계.

시험균주	혈정형	O-항원구조	검출한계 (CFU)	
			Pan sal kit	Sal group D kit
<i>Salmonella spp.</i>	B	1, 4, 5, 12	10^5-10^6	불검출
	C1	6, 7	10^5-10^6	불검출
	C2	6, 8	10^4-10^7	불검출
	D	1, 9, 12	10^4-10^5	10^4-10^5
	E1	3, 10	10^5	불검출
	E2	3, 15	10^5	불검출
	E4	1, 3, 19	10^5	불검출
<i>Escherichia coli</i>	-	-	불검출	불검출
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	불검출	불검출
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	불검출	불검출
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	불검출	불검출
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	불검출	불검출

4. 살모넬라 증균조건 설정

가. 선택배지 선발

시제품의 살모넬라 검출한계가 평균 10^4 CFU이상임에 따라 1차 증균이 필요하다고 판단되어 적절한 증균조건을 설정하기 위하여 5수의 도계육을 대상으로 조건을 설정하였다. 「축산물 가공기준 및 성분규격」을 참고하여 실시하였으며 방법을 요약하면, 멸균 buffered peptone water (BPW) 400 ml을 5개의 멸균시료백에 붓고 각각의 도체를 넣은 후 50회 이상 좌우로 흔들어 도체를 제거하고 세척액 25 ml을 225 ml의 BPW에 넣었다. 하나의 도체에 대하여 25 ml 세척액이 들어간 225 ml BPW를 최종 8병씩 제조하였으며 이 용액에 *S. enteritidis*를 $10^0 \sim 10^6$ CFU되게 임의로 첨가하였다. 임의의 *S. enteritidis*가 첨가된 BPW를 37°C에서 18시간 배양하고 10 ml Rappaport vasiliadis broth (RV broth)와, 10 ml selenite cystein broth에 각각 배양액 1 ml씩을 첨가하여 42°C에서 18시간 배양 후 시제품의 용법 및 용량에 따라 점적하여 결과를 관찰하였다. 검사결과 Pan sal kit 및 Sal group D kit 모두 RV broth보다 SC broth에서의 민감성이 높게 나타났으며 SC broth에서는 10^0 CFU 접종시 두 kit 모두 5개 도체 중 1개 도체에서만 양성을 보였으며 10^1 CFU 접종시 5개 도체 모두에서 양성을 나타내었다 (표 17). 이때 각 도체별 *S. enteritidis*를 접종하지 않은 1개의 배양병은 최종 살모넬라균 분리를 실시하여 시험샘플의 살모넬라 오염여부를 확인하였으며, 살모넬라가 검출된 도체의 경우에는 시험성적에서 제외시켰다.

표 17. 선택배지에 따른 살모넬라 검출한계

시제품 kit	선택배지*	접종 <i>S. enteritidis</i> (CFU)			
		10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³
Pan sal kit	RV broth	0/5*	1/5	5/5	5/5
	SC broth	1/5	5/5	5/5	5/5
Sal group D kit	RV broth	0/5	1/5	5/5	5/5
	SC broth	1/5	5/5	5/5	5/5

* RV broth, Rappaport vasiliadis broth; SC broth, selenite cystein broth

** 양성개체수/검사개체수

나. 배양시간 선발

BPW에서의 최적 배양시간을 선발하기 위하여 선택배지 선발과 동일한 방법으로 5수의 도계를 사용하였다. 25 ml 세척액이 포함된 225 ml BPW를 도계별로 최종 9병씩 제조하여 *S. enteritidis*를 $10^0 \sim 10^3$ CFU되게 2병씩 임의로 첨가하였다. 임의로 *S. enteritidis*가 첨가된 BPW를 37°C에서 6시간 또는 18시간 배양하고 배양액 1 ml을 10 ml SC broth에 첨가하여 42°C에서 18시간 배양 후 시제품에 점적하여 결과를 관찰하였다. 검사결과 Pan sal kit 및 Sal group D kit 모두 6시간 배양보다 18시간 배양에서 민감성이 높게 나타났으며 6시간 배양에서는 10^0 CFU 접종시 두 kit 모두 5개 도체 모두에서 양성을 나타내지 않았으나 18시간 배양에서는 10^0 CFU 접종시 2개의 개체에서, 10^1 CFU 접종시 5개 도체 모두에서 양성을 나타내었다. 각 도체별 *S. enteritidis*를 접종하지 않은 1개의 배양병은 최종 살모넬라균 분리를 실시하여 시험샘플의 살모넬라 오염여부를 확인하였으며, 살모넬라가 검출된 도계의 경우에는 시험성적에서 제외시켰다 (표 18).

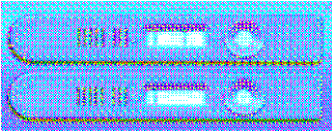
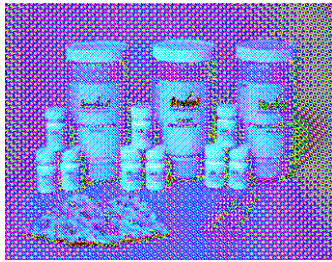
표 18. BPW배양시간에 따른 살모넬라 검출한계

시제품 kit	BPW 배양시간	접종 <i>S. enteritidis</i> (CFU)			
		10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³
Pan sal kit	6시간	0/5*	1/5	5/5	5/5
	18시간	2/5	5/5	5/5	5/5
Sal group D kit	6시간	0/5	1/5	5/5	5/5
	18시간	2/5	5/5	5/5	5/5

* 양성개체수/검사개체수

5. Reveal kit (미국, Neogene)과 시제품의 비교 조사 시

Reveal kit의 용법 및 용량은 시제품의 용법과 거의 유사하였으나 (그림 11) pre-enrichment media인 BPW에서의 시간이 2-4시간으로 시제품보다 짧게 설정되어 있었다. 그러나 본 시험에서는 앞서의 증균조건 설정시험과 유사하게 5개의 도체를 사용하여 하나의 도체에 대하여 25 ml BPW 세척액이 들어간 225 ml의 BPW를 9병씩 제조하여 *S. enteritidis*를 $10^0 \sim 10^3$ CFU되게 2병씩 임의로 첨가하였다. 임의로 *S. enteritidis*가 첨가된 BPW를 37°C에서 6시간 또는 18시간 배양하고 배양액 1 ml을 10 ml SC broth에 첨가하여 42°C에서 18시간 배양 후 Reveal kit과 시제품에 점적하여 결과를 관찰하였다. 검사결과 Reveal kit 및 시제품 Pan sal kit 및 Sal group D kit 모두 동일한 성적을 나타내었으며 6시간 배양보다 18시간 배양에서 민감성이 높게 나타났다. 6시간 배양에서는 10^0 CFU 접종시 세 kit 모두 5개 도체 모두에서 양성을 나타내지 않았으나 10^1 CFU 접종시 1개의 도체에서 양성을 보인 반면, 18시간 배양에서는 10^0 CFU 접종시 2개의 개체에서, 10^1 CFU 접종시 5개 도체 모두에서 양성을 나타내었다 (표 19). 각 도체별 *S. enteritidis*를 접종하지 않은 1개의 배양병은 최종 살모넬라균 분리를 실시하여 시험샘플의 살모넬라 오염여부를 확인하였으며, 살모넬라가 검출된 도체의 경우에는 시험성적에서 제외시켰다.



The Procedure

1. Rehydrate REVIVE pre-enrichment media.
2. Add sample. Incubate at $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ for 2-4 hours.
3. Rehydrate selective enrichment.
4. Add selective enrichment to pre-enriched sample. Incubate at $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ for 16-18 hours.
5. Remove liquid sample from bag following enrichment and cool to room temperature.
6. Place 5 free falling drops (120 μL) in sample port of the test device
7. Read and record results after 15 minutes.

그림 11. Reveal kit (미국, Neogene)의 제품 및 용법

표 19. Reveal kit (미국, Neogene) 및 시제품 비교시험

배양시간	사용 kit	접종균량 (CFU)			
		10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³
6 시간	Reveal kit	0/5*	1/5	5/5	5/5
	Pan Sal kit	0/5	1/5	5/5	5/5
	Sal group D kit	0/5	1/5	5/5	5/5
18 시간	Reveal kit	2/5	5/5	5/5	5/5
	Pan Sal kit	2/5	5/5	5/5	5/5
	Sal group D kit	2/5	5/5	5/5	5/5

* 양성개체수/검사개체수

6. 현장적용

가. 도계장 적용 시험

「축산물 가공기준 및 성분규격」에 따라 15수의 도계육을 대상으로 실시하였다. 멸균 BPW 400 ml을 5개의 멸균시료백에 붓고 각각의 도체를 넣은 후 50회 이상 좌우로 흔들어 도체를 제거하고 세척액 25 ml을 225 ml의 BPW에 넣어 6시간 배양하고 10 ml SC broth에 각각 배양액 1 ml씩을 첨가하여 18시간 배양 후 시제품에 점적과 함께 Rambach agar에 도말하였으면 의심되는 집락에 대해서 Difco사 (미국)의 O 및 H 항혈청으로 최종 균동정을 실시하였다.

시험결과, 15수 도계중 Pan sal kit에는 9수가, Sal group D kit에는 7수가 양성반응을 보였으며 시제품에 양성반응을 보인 총 9수중 7수에서는 *S. enteritidis* 및 *S. blockley*가 분리되었다. Pan sal kit에는 양성반응을 나타내었으나 균분리가 되지 않은 2수의 개체는 본 성적에서는 제시되지 않았으나 SC broth에서 48시간 배양 후 Rambach agar에 도말하였을 때 *Salmonella* 균이 분리되어 kit의 비특이 반응은 아님을 알 수 있었다. 따라서 본 성적으로 보아 Pan sal kit 및 Sal group D kit의 도계장 적용시 키트의 민감성이 균분리 동정과 비교하였을 때 상당히 높음을 알 수 있었다 (표 20).

표 20. 도계장 적용 시험

샘플 번호	시제품 dipstick		균분리유무	분리균명
	Pan sal kit	Sal group D kit		
1	+	+	+	<i>S. enteritidis</i>
2	+	+	+	<i>S. enteritidis</i>
3	-	-	-	-
4	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	+	+	<i>S. enteritidis</i>
7	-	-	-	-
8	+	-	+	<i>S. blockley</i>
9	-	-	-	-
10	+	+	+	<i>S. enteritidis</i>
11	-	-	-	-
12	+	+	+	<i>S. enteritidis</i>
13	+	+	+	<i>S. enteritidis</i>
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-

나. 소도축장 적용 시험

「축산물 가공기준 및 성분규격」에 따라, 15수의 소지육을 대상으로 실시하였다. 도체의 표면 (10cm X 10cm)의 3개 부위를 거어즈로 닦아내어 225 ml의 BPW에 넣어 6시간 배양하고 10 ml SC broth에 각각 배양액 1 ml씩을 첨가하여 18시간 배양 후 시제품에 점적과 함께 Rambach agar에 도말하였으며 의심되는 집락에 대해서 Difco사 (미국)의 O 및 H 항혈청으로 최종 균동정을 실시하였다.

시험결과 소도체에는 살모넬라 분리가 전혀 이루어지지 않았으며 또한 시제품 Pan sal kit 및 Sal group D kit 모두 음성을 나타내었다 (표 21).

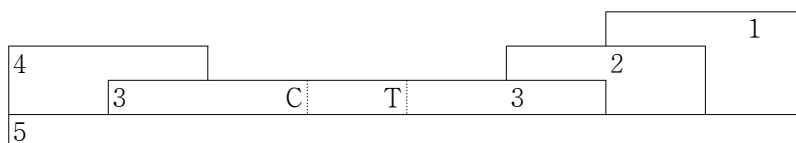
표 21. 소도측장 적용 시험

샘플 번호	시제품 dipstick		균분리유무	분리균명
	Pan sal kit	Sal group D kit		
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-

제 4 절 최종 제품

1. 도면

가. 검사용 디바이스의 구조



1. 검체 패드 2. 골드 패드 3. 멤브레인 T. 검사선 위치
 C. 대조선 위치 4. 흡습 패드 5. 플라스틱 카드

나. 1회 검사용 디바이스 내용

골드 : 다클론 살모넬라 항체-접합 골드 콜로이드 (OD 10:540nm)

Pan Sal kit -----25±1.6µl

Sal group D kit -----18±1.6µl

검사선 : 다클론 살모넬라 항체

Pan Sal kit ----- 21±0.15µg

Sal group D kit ----- 13±0.15µg

대조선 : 산양 항 마우스 항체 ----- 0.75±0.15µg

나이트로셀룰로스 막 ----- 25±5x45±0.9mm

콘주게이트 패드 ----- 7±14x45±0.9mm

검체패드 ----- 20±4x45±0.9mm

흡습패드 ----- 20±5x45±0.9mm

플라스틱 카세트 ----- 1 개

2. 용법

가. 검체를 BPW에 37℃에서 6시간 배양한다.

나. 배양액 1 ml을 SC broth에 접종하고 42℃에서 18시간 이상 배양한다.

다. 배양액을 dropper를 이용하여 채취하고 검사판넬에 4방울 (120 ul) 점적한다.

라. 10분후에 결과를 판독한다.

3. 사진

가. 실물사진



나. 양성 및 음성 판정 기준



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 계획대비 실적 및 성과

1. 개발 목표

식육 중 *Salmonella* spp. 모니터링을 위한 Pan *Salmonella* 항원검출 키트와 야외농장에서 문제시 되고 있는 *Salmonella* group D 항원검출 키트의 개발

2. 계획 대비 실적

가. 살모넬라 특이 항체 개발

(1) 계획

Pan *Salmonella* 항체와 *Salmonella* group D 특이 항체를 제조하고자 하였다.

(2) 실적

Pan *Salmonella* 항체와 Sal group D 항체의 생산을 위하여 각각 5수의 토끼에 항체생산에 맞는 항원을 선발하여 면역시켰으며 최종 생산된 항체는 항원항체 결합반응과 western blotting을 통해 그 특이성이 확인되었다.

나. 제제화

(1) 계획

신속진단 키트를 제작하기 위하여 검체 패드, 골드 패드, 멤브레인, 흡습패드 등을 최적화 시키는 제제화 실험을 실시하고자 하였다.

(2) 실적

(가) 제제화를 위한 최적화 시험을 실시한 결과, 검체 패드는 whatman 903, 골드 패드는 OD10, polyester pad, 멤브레인은 MDI 10 nitrocellulose membrane, 흡습 패드는 SM-18150이 가장 적합하였으며, 골드콘주게이트 접합을 위한 살모넬라 항체는 Pan sal kit를 위해서는 25 $\mu\text{g/ml}$ 을, Sal group D를 위해서는 18 $\mu\text{g/ml}$ 코팅하였으며, 검사선(T)에는 Pan sal kit용 살모넬라 다크론항체 2.1 $\mu\text{g/ml}$, Sal group D kit용 항체 1.3 $\mu\text{g/ml}$ 을, 대조선(C)에는 산양 항 마우스 항체 2 $\mu\text{g/ml}$ 이 코팅되도록 하는 것이 가장 우수하였다.

(나) 시제품의 검사방법은 검체를 BPW와 SC broth에 배양한 후 이것을 검체 주입구에 4~5방울 (120 μl ~ 150 μl) 점적하고 10분 경과후에 판정하는 것이 가장 우수하였다.

(다) Pan *Salmonella* kit은 살모넬라 이외의 세균에, Sal group D kit는 *Salmonella* serogroup D 이외의 살모넬라나 기타 세균과 교차반응성이 없었다.

다. 적용시험

(1) 계획

시제품 키트의 항원검출 한계와 민감성을 높이기 위한 적절한 선택 배지 선정, 시판제품과의 비교조사 및 야외적용 시험을 실시하고자 하

였다.

(2) 실적

(가) Pan sal kit 및 Sal group D kit의 살모넬라 검출한계는 10^4 CFU 이상으로 검체에 대한 일차 증균이 필요함을 알 수 있었다. 따라서 BPW의 선증균 6시간과 SC broth에서의 18시간 배양 후 kit의 적용시 10^0 CFU이상의 검출한계를 알 수 있었으며 이는 미국의 Reveal kit제품과 동일한 결과이었다. 또한 닭도체와 소지육을 대상으로 직접 본 키트와 균분리를 비교조사하였을 때, 높은 민감도와 특이도가 있음을 확인할 수 있었다.

제 2 절 관련분야의 기여도

살모넬라는 현재까지 2,500여종의 균종이 보고되고 있을 만큼 다양한 혈청형이 보여지고 있다. 살모넬라는 대표적인 식중독 원인균으로 해마다 많은 나라에서 발생이 보고되고 있고 또한 근년에 이르러는 HACCP의 도입으로 닭 및 다른 축산물의 위생을 강화하기 위한 지표로 살모넬라를 검사하고 있다. 그러나 이들 살모넬라의 검사는 앞서 말한 바와 같이 수많은 혈청형이 있기에 그 분리가 쉽지 않다.

본 연구에서는 이들 살모넬라를 손쉽게 진단할 수 있는 키트를 개발하였는 바, 이는 기존의 ELISA와 생화학적 성상을 이용한 검사법이 여러 고가의 장비와 시간이 많이 소요되는 단점을 가진 것에 반하여 굉장히 빠른 시간내에 항원항체 반응을 이용하여 항원의 진단을 가능하도록 하였다.

면역크로마토그래피법을 이용한 진단기술은 근년에 이르러 활발히 질병의 진단에 응용되고 있다. 특히 가장 잘 알려져있는 것이 사람에서의 임신진단키트로서 단시간에 임신호르몬을 판별할 수 있는 방법이다. 동물용 신속진단키트 제품은 최근에 국내·외 여런 진단키트 전문 업체들이 생산에 들어갔으며 광견병바이러스 신속진단키트, 개 파보바이러스 신속진단키트, 개 디스토펜바이러스 신속진단키트, 개 심장사상충 진단키트뿐만 아니라 최근 세계적으로 관심을 모으고

있는 조류인플루엔자바이러스 신속진단키트가 생산, 판매되고 있다. 그러나 현재 까지 국내에서는 세균에 대한 진단키트에 대한 연구는 진행되고 있으나 생산품은 보고되지 않고 있으며 본 연구 결과는 가장 많은 혈청형을 가지고 있는 살모넬라에 대한 진단키트를 확립한 결과로 추후 산업화와 아울러 캄필로박터, 리스테이라 등 여러 식중독 유발 주요세균에 대한 진단키트 생산의 기틀을 마련할 수 있을 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

- 본 연구는 최초 3년차 시험으로 시작되었으나 연구결과를 도출하는데 있어 반복적인 부분이 있어 조기완료하는 사업으로 몇가지 부분에 대해서는 추가연구가 되어야 한다.
- 살모넬라키트 현장적용에 추가 적용으로 본 키트의 단점을 보다 구체적으로 파악함과 아울러 시판키트와의 비교 조사로 민감성 및 특이성에 대한 보완이 필요하다.
- 축산물을 이용한 본 진단키트의 적용법은 기 확립되었으나 기타, 야외농장에 직접 적용시 필요하다고 판단되는 검체 즉, 실질장기와 분변등의 이용시 본 키트를 좀 더 효과적으로 사용할 수 있는 배지의 선택 등 조건의 추가 확립이 요구된다.

2. 타 연구에의 응용

가. 기술적 측면

본 개발품은 국내 최초의 살모넬라 항원 신속진단키트로서 기존의 ELISA를 비롯한 항원 진단 키트들의 장단점을 상호 보완할 것이며, 현재 국내에서 판매되고 있는 개 파보바이러스, 개 디스토펜바이러스, 개 심장사상충 항원 신속진단 키트처럼 임상평가실험을 통한 성능 및 효능 검증을 거친 후 국내의 살모넬라의 신속한 검사에 크게 기여할 것으로 예상된다. 또한 이 연구에 이용된 원리 및 경험은 동물유래의 인수공통전염병 (zoonosis)들에 대한 신속진단키트 개발로 이어질 것으로 예상된다.

나. 경제 산업적 측면

현재까지 전량 외국에서 수입되고 있는 항원, 항체 진단용 ELISA키트 및 dipstick 키트들에 대한 수입대체효과가 있을 것으로 예상되며, 살모넬라 진단에 어려움을 겪었던 도축장과 동물병원을 대상으로 한 새로운 진단키트 시장이 창출될 것으로 예상된다.

3. 기업화 추진방안

본 연구는 (주) 에니젠이 협동과제기업으로 참여하였으며, 본 기업은 현재 개파보항원, 항체 진단 키트, 개 디스토퍼 항원, 항체 진단 키트, 돼지전염성위장염 항원 진단 키트, 돼지 유행성설사병 항원진단키트 등 30여가지의 dipstick 진단시약 및 효소면역측정법(ELISA) 진단시약을 세계최초로 자체 개발하여 국내를 포함한 전세계 40여개국에 수출하고 있는 국내 최고의 동물용 dipstick 및 ELISA 진단시약 전문회사로서 그 기술력을 인정받고 있다. 따라서 본 연구과제 결과는 앞서 말한 추가연구 결과를 보완하여 미국의 Reveal kit 제품과 같이 국내에서 저렴하게 사용될 수 있도록 국립수의과학검역원에 기술검토를 의뢰하여 최종 산업화할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

현재까지 살모넬라 항원검사를 위한 AOAC 공인 방법은 앞서 설명한 면역 크로마토그래피법을 이용한 dipstick 진단키트와 아울러 앞서 설명한 생화학적 성장, DNA hybridization, ELISA법과 함께 Hydrophobic grid membrane filter (ISO-GRID), DNA hybridization (Gene-Trak), Fluorogenic and Colorimetric enzyme immunoassay를 이용하는 방법으로는 TECRA visual immunoassay(Bioenterprises Pty Ltd.), *Salmonella*-Tek (Organon Teknika Corp.), Assurance *Salmonella* EIA kit (Biocontrol systems Inc.), Automated conductance (Mathus system)등. 이외에도 Q-Trol *Salmonella* Detection kit (Dynatech Laboratories Inc.) Immunodifusion (Biocontrol 1-2 test), PCR (polymerase chain reaction)등이 보고되고 있다.

제 7 장 참고문헌

- Angulo, F. *Samonella* infection in people, In Research on Salmonellosis in Food Safety Consortium. 1996, United States Animal Health Association, Arkansas, October 17
- Bang LB. 1998. Immunochromatographic, lateral flow or strip test—development ideas. TechNote #25, pp. 1–15, Bangs Laboratories, Inc. USA
- Beesley JE. 1989. Colloidal Gold: A new perspective for cytochemical marking. Microscopy Handbooks 17, pp. 5–12, Royal Microscopical Society. UK.
- Bhaskar S., Singh S, Sharma M. 1996. A single—step immunochromatographic test for the detection of *Entamoeba histolytica* antigen in stool samples. *J. Immunol. Methods.* 196:193–198.
- Centers for Disease Control and Prevention. Standardization of pulsed—field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* of PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*, 3:59–67, 2006.
- Cole RA, Lu HM, Shi YZ, *et al.* 1996. Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic assay based on the 38 kDa antigen of tuberculosis in China. *Tuber. Lung Dis.* 77:363–368.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N.and Ginsberg, H.S. 1990, Microbiology, 4th ed., Harpes&Row Publishers, 576–579

- Faulk, W.P., Taylor, G.M. 1971. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*. 8:1081–1083.
- Ehrlich TP, Schwartz RH, Wientzen R, *et al.* 1993. Comparison of an immunochromatographic method for rapid identification of group A streptococcal antigen with culture method. *Arch. Fam. Med.* 2:866–869.
- Eleni G, Danilo MA, Wong LF, Mary EP, Norma B, Anna C, Thongchai C, Awa AK, Andrea E, Frederick JA, Henrik CW. 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerg Infect Dis*, 12:381–388.
- Gomez TM, Motarjemi Y, Miyagawa S, Kaferstein FK, Stohr K. 1997. Foodborne salmonellosis. *World Health Stat Q*, 50:81–89.
- Gribnau T, Roeles F, van der Biezen FJ, *et al.* 1982. The application of colloidal dye particles as label in immunoassays: disperse dye immunoassay(DIA). In: Gribnau TCJ, Visser J, Nivard RJF, eds. Affinity chromatography and related techniques. Amsterdam: Elsevier, 411–424.
- Gribnau T, Someren A, van Dinther F. DIA–disperse dye immunoassay. In: Chaiken IM, Wilchek M, Parikh I, eds. Affinity chromatography and biological recognition. Orlando, Florida: Academic Press, 275–280.
- Horisberger, M., 1979. Evaluation of colloidal gold as a cytochemical marker for transmission and scanning electron microscopy. *Biol. Cell.* 36: 253.
- Horisberger, M., Vauthey, M., 1984. Labeling of colloidal gold with protein a

quantitative study using β -lactoglobulin. *Histochemistry*. 80:13–19.

Jennifer GW, Leslie AT, Kirk ES, Jeff BB, Rodney KF, John HG, Daniel HR, Ann MBT, Catherine JG, Sumathi S, Timothy JB, Thomas EB, Dale DH, Frederick JA. 2005. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium in four animal facilities. *Emerg Infect Dis*, 11:1235–1241.

Kaferstein FK, Motarjemi Y, Bettcher DW. 1997. Foodborne disease control: a transnational challenge. *Emerg Infect Dis*, 3:503–510.

Orduna A, Almaraz A, Prado A, *et al.* 2000. Evaluation of an immunocapture–agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 38:4000–4005.

Paek, S.H., Lee, C. W., Yook, S.H., Kwon, O. H., Park, Y.N., 1999. Performance control strategies of one-step immuno-chromatographic assay system for *Salmonella typhimurium*. *Anal. Lett.* 32:335–360.

Philippe V, Axel C, Paul B. 2005. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res*, 36:267–288.

Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. 2003. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. *Res Microbiol*, 154:173–174.

Richars, G. D., 1996. Preparation of colloidal gold particles of various using sodium borohydride and sodium cyanoborohydride. *Anal. Biochem.* 236, 168–170.

- Sato K, Ichiyama S, Iinuma Y, *et al.* 1996. Evaluation of immuno-chromatographic assay systems for rapid detection of hepatitis B surface antigen and antibody Dainascreen HBsAg and Dainascreen Ausab. *J. Clin. Microbiol.* 34:1420–1422.
- Smits HL, Basahi MA, Diaz R, *et al.* 1999. Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 37: 4179–4182.
- Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scoot, F.W. and Barlough, J.E. Hagens and Bruner's Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animals. 8th ed., Cornell University Press, Ithaca and London, 1988, 74–88
- Todd ECD. 1997. Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review. *World Health Stat Q*, 50:30–50.
- Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, Cieslak PR, Deneen VC, Tauxe RV. 2004. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis*, 38:S127–S134.
- Ward, L.R., Rowe, B. 1987. A phage typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol. Inft*, 99:291–294.