

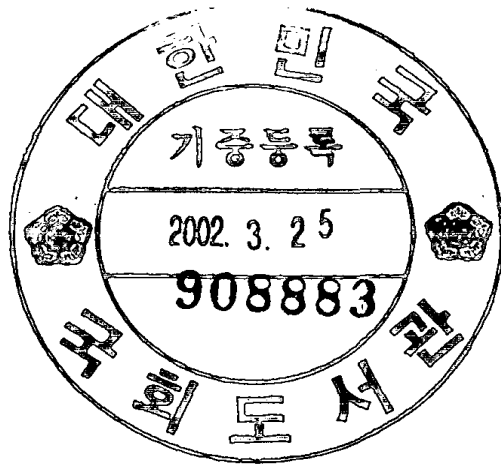
최종
연구보고서

면역학적 기법을 응용한 축산물중
주요 식중독 원인균 신속검출키트 개발

Development of the screening kits for the
rapid detection of food-borne pathogens
by using immunoassay

연구기관
국립수의과학검역원

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “면역학적 기법을 응용한 축산물중 주요 식중독 원인균 신속 검출 키트 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 11월 일

주관연구기관명 : 국립수의과학검역원

총괄연구책임자 : 김 종 만

제1세부연구책임자 : 김 종 만

연 구 원 : 주 이 석

연 구 원 : 조 광 현

연 구 원 : 박 흥 제

제2세부연구책임자 : 정 석 찬

연 구 원 : 정 병 열

연 구 원 : 허 문

연 구 원 : 김 현 용

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 국 윤 호

연 구 원 : 박 용 호

연 구 원 : 유 한 상

요 약 문

I. 제 목

면역학적 기법을 응용한 축산물중 주요 식중독 원인균 신속 검출
키트 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

대장균 0157을 포함하여 살모넬라균, 리스테리아균 등 주요 식중독
원인균에 대한 특이 항체를 이용하여 식중독균의 오염여부를 신속히
스크리닝할 수 있는 EIA 키트와 면역크로마토그래피법을 이용한
dip-stick 키트를 개발하여 개발된 키트의 특이성, 민감성 등을 확인
한 후 개발 키트의 산업화를 하고자 한다.

2. 연구개발의 중요성

국내에서는 축산물중 식중독 원인균의 검출은 균분리 및 동정법에
의존하고 있는 실정이고 현재 외국에서 사용하고 있는 효소면역법
(EIA)이나 면역크로마토그래피법(dip stick)에 의한 식중독 원인균에

대한 신속 키트는 개발이 미진한 실정이다. 하지만 국내에서도 이미 여러 동물 질병 병원체에 대한 단크론 항체 개발 기술이 확립되어 많은 질병진단에 활용되고 있는 실정이므로, 면역크로마토그래피법의 일부의 기술만 개발하면 국내 기술로 많은 산업화된 키트 개발이 가능할 것으로 생각한다.

따라서 현재 전량 수입에 의존하고 있는 EIA 및 Dip-stick 키트를 국산화하면 많은 수입대체 효과가 예상되며, 아울러 본 연구는 산.학.연 공동연구 협력체계를 구축하여 연구효율을 극대화함으로써 검출키트 개발에 성공하면 바로 산업계에 기술이전 및 제품화로 현장에 보급이 가능하며, 이러한 키트 개발의 기술축적으로 가축의 각종 전염병에 대한 진단키트의 개발이 가능할 것으로 예상된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

주요 식중독균 3종(대장균 0157, 살모넬라, 리스테리아)에 대해서 특이적인 단크론 및 다크론 항체를 제작, 정제하였으며, 정제된 항체는 효소를 부착하여 EIA 키트에 적용하였다. 개발된 식중독균 검출 EIA 키트는 증균전에 민감도는 10^5 cfu 정도이었으나, 증균후에는 수 개의 식중독균이 축산물에 오염되어 있더라도 증균과정후 충분히 검출이 가능하여 기존의 균분리 배양법을 실시하기 이전에 본 개발 키트로 스크리닝하면 많은 노동력과 단가를 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

면역크로마토그래피법을 이용한 dip-stick 키트에서는 전개 매개체로 약 40nm의 colloidal gold particle를 사용하였으며, 이를 제작할 수 있는 기술을 완전히 개발하므로서 산업화를 위하여 키트 제작 단가를 최대한 낮추었다. 특히 dip-stick 키트의 최대 장점은 식중독균

에 대한 아무런 사전교육을 받지 않은 사람도 충분히 적용가능하며, 장비없이 시료 적용후 10분이내에 결과를 판독할 수 있었다. 식중독균은 대부분 불검출이 원칙이므로 축산식품내에 단 1개라도 오염되어 있으면 안된다. 따라서 아주 적은 양의 오염도 검출하기 위해서는 반드시 증균과정을 거쳐야 한다. 개발된 3종 식중독균에 대한 dip-stick키트는 증균전에는 $10^5\sim 10^6$ cfu이었지만, 증균과정을 통하여 식중독균이 수 개라도 오염되어 있으면 검출 가능하였으며, 이러한 성적은 시판 외국산 키트와 성적이 유사하며, 충분히 외국산 키트를 대체하리라 본다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

본 연구에서는 주요 식중독 원인균인 대장균 0157, 리스테리아, 살모넬라균에 대한 특이적인 항체를 제작하였다. 그리고 이를 이용하여 각각의 식중독균에 대한 EIA 키트를 개발하였다. 한편 면역크로마토그래피법을 이용한 dip-stick 키트를 개발하기 위하여 전개매개체인 40nm colloidal gold particles의 제조 기법을 확립하였으며, 개발한 항체에 결합하여 현장에서 적용하기 간편하고 10분이내에 결과를 판독할 수 있는 dip-stick 키트를 각각의 식중독에 대해서 만들었다.

2. 활용에 대한 건의

개발된 대장균 0157 EIA 키트 및 면역크로마토그래피법을 이용한 dip-stick 키트에 대해서 산업화를 실시한다.

SUMMARY

E. coli 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp were the major food-borne pathogens in the world. Because it is laborous and time-consuming to isolate the pathogens, many laboratory have used the other methods (PCR, DNA probe) 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 equipments.

We developed two rapid screening kits (① EIA, ② dip-stick) for the detection of major food-borne pathogens, respectively. The sensitivity of the EIA kits are 10^0 cfu after enrichment of the samples. Because up to 95 samples were applied EIA kits at the same time, it is useful for the laboratory that treat the many samples. However, it is also needed additional 3 or 4 hours to get the results.

Dip-stick kits 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 5 ~ 6 drops of the enrichment samples onto the kits and get the results after 10 minutes. Dip-stick kits can also detect the meat samples after enrichment that contaminated with food-borne bacteria with 10^0 cfu. These rapid screening kits can be commercialized and available in many laboratories.

CONTENTS

CHAPTER 1. INTRODUCTION	9
Section 1. Subject and range of this project	9
Section 2. Necessity of this project	10
Section 3. Future trend of this project	16
 CHAPTER 2. DEVELOPMENT OF RAPID SCREENING KITS FOR LISTERIA	 19
Section 1. Isolation and identification of Listeria	19
Section 2. Development of the antibody	20
Section 3. Development of the EIA kits	25
Section 4. Development of the dip-stick kits	34
 CHAPTER 3. DEVELOPMENT OF RAPID SCREENING KITS FOR E. COLI 0157	 40
Section 1. Analysis of antigen and purification of the antibody of E. coli 0157	 40
Section 2. Development of the EIA kits	45
Section 3. Development of the dip-stick kits	50
 CHAPTER 4. DEVELOPMENT OF RAPID SCREENING KITS FOR SALMONELLA	 55
Section 1. Isolation and identification of Salmonella ...	55

Section 2. Development of polyclonal antibody	57
Section 3. Development of monoclonal antibody	59
Section 4. Development of the EIA kits	73
Section 5. Development of the dip-stick kits	84
CHAPTER 5. REFERENCES	89

목 차

제 1 장	서 론	9
제1절	연구개발의 목적과 범위	9
제2절	연구개발의 필요성	10
제3절	관련기술의 현황 및 전망	16
제 2 장	리스테리아균 신속검출키트 개발	19
제1절	리스테리아균 분리 및 동정	19
제2절	항체 제작	20
제3절	EIA 키트 제작	25
제4절	Dip-stick 키트 제작	34
제 3 장	대장균 0157 신속검출키트 개발	40
제1절	특이항원 분석 및 항체 정제	40
제2절	EIA 키트 제작	45
제3절	dip-stick 키트 제작	50
제 4 장	살모넬라 신속검출키트 개발	55
제1절	살모넬라 분리 및 동정	55
제2절	살모넬라그룹항혈청 생산	57
제3절	단크론항체의 생산	59
제4절	EIA 키트 제작	73
제5절	dip-stick 키트 제작	84
제 5 장	참고문헌	89

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 목적

식중독의 주요 원인균인 살모넬라속균(*Salmonella* spp.), 대장균 0157 및 리스테리아속균(*Listeria* spp)에 대한 신속 검출을 위하여 3종의 균종에 대한 특이항체를 제작한 후, 이를 이용하여 효소면역법을 이용한 키트(EIA)와 면역크로마토그래피법을 이용한 키트(dip-stick)를 각각 제작하였다. 제작된 각각의 키트에 대해서 특이성, 민감성, 표준화 등의 과정을 실시한 후 개발 키트의 산업화를 실시하였다.

2. 연구개발의 범위

가. 축산물중 주요 식중독균 검출을 위한 특이 항체 개발

축산물중에서 가장 중요한 3종의 식중독균인 살모넬라속균(*Salmonella* spp), 대장균(*E. coli*) 0157 및 리스테리아균(*Listeria* spp) 등에 대해서 항원 특성을 분석하고 정제하여 세포융합기법에 의한 단클론 항체(monoclonal antibody) 및 다클론 항체(polyclonal antibodies)를 생산하여 생산된 항체의 특이성을 조사한다.

나. 효소면역법(Enzyme immunoassay:EIA)이용 신속 검출 키트 개발

개발된 특이 항체를 이용하여 3종 식중독균(살모넬라균, 대장균 0157, 리스테리아균)에 대한 EIA 키트를 제작하여 항원 검출 조건을 확립하여 산업화를 위한 개발 키트의 특이성, 효율성, 표준화 등에 대해서 조사한다.

다. 면역크로마토그래피법을 이용한 dip-stick 키트 개발

약 40 nm 크기의 Gold 입자를 제작하여 개발된 3종 식중독균에 대한 특이항체를 부착시키고 nitrocellulose membrane에 항체고정을 위한 조건을 확립하여 dip-stick 키트를 제작하고 개발된 키트를 산업화하기 위하여 특이성, 효율성, 표준화 등에 대해서 조사한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적인 측면

식품을 통하여 사람에게 전파될 수 있는 질병은 약 250종 이상이 알려져 있으며, 이 중에서 축산식품 매개성 주요 병원체는 약 25종이며, 이들에 의해 발생하는 식중독의 대부분은 정확하고 신속한 진단을 요구하고 있다. 세계적으로 축산물에서 기인될 수 있는 주요 병원체는 *Salmonella spp*, *E. coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter coli/jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*

perfringens 등 세균성 식중독이 사람에서 문제시되고 있다. 이러한 식중독의 발생은 위생관리와 철저한 식중독 원인균의 검출에 의해 예방할 수 있음에도 불구하고 아직도 세계적으로 식중독으로 인한 인명 피해가 많고 높은 발생율을 보이고 있는 것은 식품 위생관리수준이 만족스럽지 못하다는 사실을 반증하는 것이다. 따라서 고품질 안전 축산물의 생산을 위해 신속한 식중독균 검출방법의 개발 등이 절실히 요청되고 있다.

식품중 병원성 세균의 검출을 위한 전통적인 방법으로서는 증균 및 선택배지 배양과 유사 집락에 대한 생화학적 특성검사로 이루어지고 있다. 그러나 표준미생물 검사방법은 매우 느리고 노동력이 많이 필요하며, 수행하는 데 수 주일이 소요된다. 사람에게 질병을 유발하는 세균이 식품에 적은 수로 오염되어 있을 경우 비병원성 세균의 과다 증식으로 인해 병원성 세균이 효율적으로 증균하지 못함으로써 검출하지 못하는 경우가 많고, 현장에서 모든 시료를 표준분리방법으로 검사하는 것은 많은 경비와 시간이 소요되어 사실상 불가능하다.

최근 식품중 미생물의 검출방법으로서 PCR 또는 nucleic acid를 이용한 probe방법이 개발되어 왔다. 유전자를 직접 검출하는 PCR이나 nucleic probe는 일반적으로 immunoassay보다 특이적이며, 믿을만한 방법으로 알려져 왔으나 gene probe는 식품매개 병원체의 target 유전자 $10^5 - 10^6$ copies를 요구하며 병원체의 적절한 copies 수를 얻기 위해서 몇 시간의 배양이 요구된다. 한편 식품 안전성을 모니터링 하는 새로운 기술로서 개발되고 있는 PCR기법은 식품중에 존재하는 병원체를 신속하고 특이적으로 검출하는 방법으로 알려지고 있다. 이 방법은 특이 primer의 사용으로 아주 미량의 식품매개 병원체를 신속하게 검출할 수 있을 뿐 만 아니라 식육중 직접 적용할 수 있는 장점

이 있으나 식품중에 존재하는 여러 가지 inhibitor에 대한 문제를 해결해야 할 과제를 가지고 있다. 이러한 유전자 검출방법은 수행방법이 까다로와 숙련된 기술이 필요하고, 고가의 장비가 필수적이기 때문에 축산업 현장에서 바로 사용하는 것은 불가능하다.

또한 면역학적인 방법으로 효소면역법(EIA: Enzyme immunoassay)이 선진국에서는 많이 개발되어 사용되고 있으며, 최근 선진국에서는 식중독균에 대한 면역크로마토그래피법을 이용한 dip-stick 키트를 개발하여 축산물중 식중독균 검출에 효율적으로 사용하고 있다. 국내에서도 식중독균에 대한 특이적인 단클론 항체를 개발하고, 이를 이용하여 현장에서 직접 적용할 수 있는 EIA 및 dip-stick키트를 개발하게 되면 고품질 안전축산물 생산에 직접적인 기여를 할 수 있을 것이다.

따라서 안전 축산물의 생산을 통한 농가의 소득증대와 안전한 식품을 소비자에게 제공하기 위해 축산물중 주요 식중독 원인균을 현장에서 직접 검출할 수 있는 키트 개발분야에 집중적인 연구가 요구되고 있는 실정이다.

2. 산업, 경제적인 측면

미국 질병통제 및 예방센터(Centers for Disease Control and Prevention)는 식품매개에 의한 질병발생이 연간 500만건으로서 약 4,000명이 사망하는 것으로 알려져 있고, 주로 *Salmonella*속균에 의한 식중독이 약 100만 - 400만명이 발생하여 이중 약 0.1%인 약 2,000여명이 사망하며, *E. coli* O157:H7식중독은 약 1만명이 발생하여 약 300명이 사망하며, *Listeria monocytogenes*는 약 1500명이 발

생하여 약 400명이 사망하는 것으로 알려져 있어 이들의 주요 병원성 세균에 의한 축산식품의 오염은 매우 심각한 문제가 대두되고 있으며, 이들 식중독의 피해액은 연간 살모넬라가 6억 - 35억\$, *E. coli* O157:H7이 2억 - 6억 \$, 리스테리아균이 약 2억 - 3억\$의 손실을 보고 있는 실정이다.

우리나라에서도 식중독발생에 의한 환자수 및 사망자수는 1990년 이후 증가추세이며, 1994년에는 1,764명이 발생하여 12명이 사망하였으며, 1996년에 2,676명이 발생한 것으로 보고되었다. 이러한 식중독 발생수의 증가는 식품위생상태의 악화에 기인한다기 보다는 소비자의 건강에 대한 관심의 고조와 신고의식의 향상 및 고품질 안전식품을 선호하기 때문으로 추측되고 있다. 그러나 현재로서도 우리나라의 식중독 발생건수는 위생수준이 높은 선진국에 비하면 낮은 것으로 집계되고 있으며, 원인은 근본적으로 식중독에 대한 사회의 인식도에 문제라고 생각한다. 또한 우리나라에서는 아직도 신속하고 정확한 식중독균 진단 키트 개발이 되어 있지 않아 식중독균의 원인체를 규명하는데 많은 시간과 경비가 소요되기 때문에 정확한 원인을 규명하지 못하고 있기 때문인 것으로 추정하고 있다. 우리나라의 원인식품별 식중독 발생현황은 육류 및 육가공품이 약 58%를 차지하고 있어 압도적으로 많으며, 원인물질별로는 원인불명이 가장 많은 비율을 차지하고 있으나 살모넬라균에 의한 식중독이 약 38%로 대부분을 차지하고 있다. 리스테리아균 및 *E. coli* O157에 대한 식중독 발생 가능성을 배제할 수 없으며, 따라서 이들 식중독균을 신속하고 정확히 검출할 수 있는 키트의 개발이 반드시 필요한 것으로 생각된다.

고품질의 저렴한 외국 축산물 수입 확대와 수입식품의 다변화에 따라 국민들의 식품에 대한 선택의 폭이 다양해지고, 경제성을 감안할

때 국내 산업에서도 경쟁력 강화를 위한 대등한 제품 생산이 절실히 요구되며, 특히 인체에 유해한 병원성 미생물 등이 오염된 축산물은 국민의 생명을 위협할 뿐 아니라, 생산업체 및 축산농가에 치명적인 영향을 줄 수 있다.

현재 우리나라에서는 이러한 식중독균에 대해 균분리 및 동정법에 의존하고 있기 때문에 식중독 원인규명과 안전축산물 생산에 매우 비경제적이고 비효율적이다. 특히 각종 식중독균에 대한 검출 키트가 전량 외국으로부터 수입되어 사용되고 있으므로 막대한 외화를 낭비하고 있다. 따라서 우리 나라 기술로 주요 식중독균에 대한 검출 키트의 개발은 오염된 축산식품으로 인한 경제적 손실을 경감시키는 데 크게 기여할 수 있을 뿐만 아니라 검출기술을 상품화하여 국내 및 국제적으로 시장성이 있을 것으로 예상된다.

따라서 축산물에 의한 주요 식중독 원인균인 *Salmonella*균, *E. coli* 0157 및 *Listeria spp*에 대한 특이 항체를 개발하고 이를 이용하여 EIA 및 dip-stick 키트 개발은 고품질 안전축산물을 생산에 기여할 수 있고, 경제성 및 산업화 가능성이 매우 높다고 볼 수 있다.

3. 사회, 문화적인 측면

오염된 식품에 의한 식중독은 일반적으로 산발적이지만 많은 사람이 이용하는 식당의 경우는 발생규모가 매우 크므로 공중위생학적인 측면에서 매우 중요시되고 있다. 국제적으로 고품질 안전한 축산식품의 생산, 유통 및 소비 등 매우 중요한 과제로 대두되고 있으나 현행의 각국 식품안전 규정은 별로 변화가 없어 현실적 요구와는 큰 격차

가 있는 것으로 인식하고 있다. 최근 세계적으로 문제시되고 있는 *E. coli* O157에 의한 식중독은 1982년 미국에서 처음 보고된 이래 세계적으로 발생되고 있으며, 1996년 일본에서 12,000여명의 환자와 12명이 사망하여 세계적으로 사회적 관심사가 되고 있다. 미국은 혈액성 설사와 용혈성 요독증후군을 일으키는 *E. coli* O157:H7에 의한 질병의 발생은 연간 8.0/100,000 명으로 추정되고 있다.

미국 식품안전검사국(Food Safety and Inspection Service : FSIS)은 1997년부터 작업장의 포괄적인 식품 유래 병원미생물의 감소방안을 위하여 *Salmonella* 및 *E. coli*와 관련한 검사프로그램을 실행하고 있다. 모든 작업장은 검사기준을 충족시킬 것을 요구받고, 동 실행기준을 충족시키지 못하는 작업장은 필요한 교정조치 및 개선사항을 만들거나 또는 작업중단을 요구받게 된다.

세계각국은 식품 수출과 수입문제로 대립되고 있는 실정이며, 수출입 식품에 대해 HACCP기준이나 이의 동등한 기준의 적용을 의무화하고 있다. HACCP는 식품 생산시 미생물 및 기타 위해들을 찾아내고 예방하기 위해 고안된 하나의 작업과정 위생 관리체계로써 가장 우선적으로 해결해야 할 선결 과제는 병원성 미생물을 모니터링하는 방법을 확립해야 하는 것이다. 이러한 모니터링 방법으로서 현장에서 바로 사용할 수 있는 사람에 치명적인 주요 식중독균 검출방법을 개발하는 것이 급선무이다.

세계각국이 HACCP제도와 병원성 미생물의 신속한 검출에 관한 노력을 강구하고 있는 시점에서 우리나라의 축산현장, 도축장 및 식품업체에서는 이에 대한 인식과 적용이 아직 미흡한 실정이다. 특히 우리나라는 소의 간, 천엽, 육회 등 날고기를 즐겨 먹는 식습관으로 식중독 발생가능성이 높으므로 이에 대한 충분한 대비 없이는 앞으로 국

내식품의 경쟁력이 떨어질 것이며, 또한 신속한 검출기법의 개발이 이루어지지 않으며 비위생적으로 생산된 외국 식품의 수입을 제대로 막지 못하는 결과를 초래하게 될 것이다.

따라서 축산물의 수입개방화가 진행되고 있는 현시점에서 위생적으로 안전한 축산식품의 생산 및 국제 경쟁력확보를 위해서는 주요 식중독균에 대한 신속한 검출키트의 개발에 따른 축산농가의 보호와 국내 축산식품에 대한 소비자의 신뢰확보가 시급한 실정이다.

제 3 절 관련기술의 현황 및 전망

1. 국내 연구결과 및 내용

국내 축산물에 대한 연구는 주로 오염 미생물의 분리 및 PCR기법에 의한 검출방법에 한정되어 왔다. 축산물중 병원성 미생물은 주로 살모넬라균, 황색포도상구균, 캄피로박터균 및 리스테리아균 등이 오염되어 있는 것으로 보고되고 있다.

진단 키트 연구로는 인의분야에서는 많은 연구가 되어 왔다. 즉, 사람의 임신진단용 dip - stick 키트, 간염 검사키트, 마약류 검사키트, 항생제 검출 키트, 알러지 검사키트 등 많은 제품이 시판되고 있으나 국내 수의분야에서는 아직까지는 EIA 나 dip-stick기법을 이용한 축산물중 식중독균의 검출키트 개발에 관한 연구는 수행되지 않고 있는 현실이다.

2. 국외 연구결과 및 내용

E. coli O157:H7을 포함하여 살모넬라균, 리스테리아균 등에 대한 각종 검출기법에 대해 다양하게 연구 및 개발되어 왔다. 특히 유전자를 검출하는 probe법 및 PCR법, ELISA법을 응용한 항체검출방법과 분리균을 신속히 확인하는 Latex Kit 등도 알려져 있다. 또한 식중독균에 대한 항체를 이용하여 균을 검출하는 EIA방법이 살모넬라균 등 각종 식중독균에 대해 개발되어 있다. 최근에는 면역크로마토그래피법을 이용한 dip-stick방법으로 살모넬라균과 대장균 O157에 대한 키트가 개발되어 상품화되고 있다.

3. 향후 전망

국내에서는 축산물중 식중독 원인균의 검출은 균분리 및 동정법에 의존하고 있는 실정이고 현재 외국에서 사용하고 있는 효소면역법(EIA)이나 면역크로마토그래피법(dip stick)에 의한 식중독 원인균에 대한 신속 키트는 개발이 전혀 이루어지지 않고 있는 실정이다. 하지만 국내에서도 이미 여러 동물 질병 병원체에 대한 단크론 항체 개발 기술이 확립되어 많은 질병진단에 활용되고 있는 실정이므로, 면역크로마토그래피법의 일부의 기술만 개발하면 국내 기술로 많은 산업화된 키트개발이 가능할 것으로 생각한다.

따라서 현재 전량 수입에 의존하고 있는 EIA 및 Dip-stick키트를 국산화하면 많은 수입대체 효과가 예상되며, 아울러 본 연구는 산.학.연 공동연구 협력체계를 구축하여 연구효율을 극대화함으로써 검출키트 개발에 성공하면 바로 산업계에 기술이전 및 제품화로 현장에 보급이

가능하며, 이러한 키트 개발의 기술축적으로 가축의 각종 전염병에 대한 진단키트의 개발이 가능할 것으로 예상된다.

고품질 안전 축산물 생산 뿐만 아니라 식중독 발생의 신속한 원인 규명과 예방을 위하여 병원미생물을 신속히 검출할 수 있는 검출 키트의 개발이 시급한 실정이다. WTO 출범에 따라 우리 나라 축산업도 무한 경쟁시대에 돌입했으며, 축산업의 국제 경쟁력 향상을 위해서는 고품질 안전축산물 생산이 필수적이다. 또한 우리나라는 IMF 위기로 국내산 축산물의 안전성 확보를 외국의 검출 키트에만 의존할 수 없게 되었다. 국내산 축산식품의 안전성 확보에 따른 농가 소득증대 및 키트의 산업화로 수입대체효과를 기대할 수 있을 것이며 아울러 앞으로 이러한 기술의 축적은 다른 질병의 진단이나 기술개발에 활용될 수 있을 것으로 전망된다.

제 2 장 리스테리아균 신속검출키트 개발

제 1 절 리스테리아균 분리 및 동정

1. 리스테리아 분리

리스트테리아속균의 분리는 USDA법에 따라 증균배양을 실시하였다. 즉, 시료를 10 ml UVM I broth에 접종하고, 27℃, 20~24시간 배양한 후에 배양액 0.1 ml을 9.9 ml fraser broth에 접종하여 2차 증균을 실시하였다. 아울러 증균 배양액을 리스테리아 선택배지인 Palcam agar, Oxford aga에 접종하여 esculin을 분해해 검은색을 띠는 균주를 선택하여 최대 10개의 리스테리아 유사집락을 택하여 순수배양 후 리스테리아속균의 동정을 실시하였다.

2. 리스테리아 동정

리스트테리아속을 동정하기 위하여 Table 1에서 보는 바와 같이 Gram 염색, Catalase test, Oxidase test, haemolysis test, *Staphylococcus aureus*와 *Rhabdococcus equi*를 이용한 CAMP test, Nitrate test, Rhamnose, Xylose, Mannitol에 대한 당발효시험 등을 실시하였다.

Table 1. 리스테리아속균을 동정하기 위한 생화학 시험

균종	β -용혈성	당분해능			CAMP		nitrate test
		mannitol	rhamnose	xylose	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+++	-	-	+	-	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+	+	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	V	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V	+	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	-	+	V	-	-	-	+

+: 90%이상 양성, -: 90%이상 음성, V: 10 - 90% 양성

제 2 절 항체 제작

1. 단클론항체의 생산

가. ELISA에 의한 항체의 검색

만들어진 단세포균 항체가 접종 균체에만 특이하게 반응하는지를 ELISA로 검색하였다. 1×10^8 cells/ml로 0.04M carbonate buffer (pH9.6)에 균체를 희석하여 Maxisorp plate(NUNC)에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 coating하였다. PBST로 2회 세척하고 0.5% BSA로 1시간 blocking을 실시한 후 2회 세척하고 배양상층액을 $50\mu\text{l}$ 씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척 후 HRP conjugated goat anti-mouse IgG + M(Biodesign)를 10,000배 희석하여 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 반응시키고 PBST로 4회 세척후 OPD(orthophenylenediamine)를 10ml phosphate citrate buffer(PH5.0)에 0.04%(w/v)되게 녹이고 여기에 30% H_2O_2 를 $8\mu\text{l}$ 첨가한 기질 용액을 만들어 well당 $100\mu\text{l}$ 씩 넣은

뒤 실온에서 발색시켰다. 적당히 발색된 후 2N H₂SO₄ 용액을 50 μ l 첨가하여 반응을 정지시키고 490nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 모든 ELSIA 기법은 3번씩 반복되어 측정되었으며, 그 평균 O.D 값을 실험에 사용하였다.

나. Monoclonal antibody(Ab)의 isotype 결정

Sandwich ELISA 방법으로 monoclonal Ab의 isotype를 결정하였다. PBS를 이용하여 토끼에서 생산된 anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA를 10 μ g/ml 이 되도록 희석하여 Maxisorp plate에 4시간 가량 coating하였다. 이를 PBST로 2회 세척하고 0.5% BSA로 1시간 Blocking 하였다. 다시 2회 세척 후 isotype을 알고자하는 monoclonal Ab를 각각 50 μ l씩 분주하여 1시간 반응시키고 PBST로 3회 세척하였다. 이 후 HRP conjugated goat anti-mouse IgG + M를 사용하여 위에서 제시된 방법으로 발색을 하였다.

다. 복수의 생산 및 정제

만들어진 융합세포를 10⁹ cells 이상 원심 집균하여 1ml의 RPMI 1640배지에 재부유하여 BALB/c 마우스의 복장에 접종하였다. 채취된 복수는 식염수로 1:2로 희석하고 포화 (NH₄)₂SO₄(pH7.2)를 40%가 될 때까지 저어주면서 서서히 반응시켰다. 이후 상온에서 30분간 더 반응시킨 뒤 1000xg에서 15분간 원심하여 침전물을 모으고 40% (NH₄)₂SO₄ 로 1회 세척한 뒤 2ml의 PBS에 녹인뒤 투석하였다. 투석은 Tris-saline buffer(Tris 50mM, NaCl 0.5M, NaN₃ 0.1%, PH8.0)가 담긴 flask에 dialysis tube를 담그고 4 $^{\circ}$ C에서 저어주면서 overnight시켰다. 투석하여 분리한 항체는 -20 $^{\circ}$ C에 보관하며 실험에 사용하였다.

Table 2. 제작한 다크론항체의 특이성 조사

Organism	O. D at 490nm
<i>Listeria grayi</i>	2.014
<i>Listeria monocytogenes</i> (1/2b)	1.987
<i>Listeria welshimeri</i>	1.789
<i>Listeria monocytogenes</i> (4d)	2.117
<i>Listeria monocytogenes</i> (3a)	1.995
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19115	1.875
<i>Listeria seerigeri</i>	2.321
<i>Listeria ivanovii</i>	1.998
<i>Listeria monocytogenes</i> (4e)	1.976
<i>Listeria monocytogenes</i> (1/2c)	2.014
<i>Listeria monocytogenes</i> (4a)	2.017
<i>Listeria murrayi</i>	1.875
<i>Listeria innocua</i>	1.758
<i>Listeria monocytogenes</i> (4b)	1.995
<i>Listeria monocytogenes</i> (1/2a)	1.948

2. 다크론항체 제작

토끼에서 생산된 polyclonal Ab로부터 IgG를 정제하기 위하여 protein A antibody purification kit을 사용하였다. 먼저 토끼에서 얻어진 15종의 다크론성 항체를 indirect ELISA기법을 이용하여 각각의 리스테리아균주와 반응성을 측정하고 리스테리아를 검출하기 위하여 5종의 다크론 항체를 선발하여 IgG를 분리하였다. 2ml 가량의 혈청을 protein A column에 적용시킨 후, elution buffer를 사용하여 0.5ml씩 tube에 분주하고 항체가를 측정하여 항체가가 높은 fraction의 항체를 EIA kit 제작에 사용하였다.

Table 3. 제작한 다크론항체의 특이성 조사

Organism	O.D at 490nm od indicated polyclonal Abs							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>L. grayi</i>	0.624	0.386	1.497	1.059	0.907	0.539	0.680	1.495
<i>L. mono</i> ¹ (1/2b)	1.301	1.806	0.949	0.943	1.073	0.730	1.543	0.563
<i>L. welshimeri</i>	1.274	0.313	2.325	1.025	0.862	0.697	0.668	0.556
<i>L. mono</i> (4d)	1.142	0.694	1.226	1.017	2.055	0.799	1.343	0.641
<i>L. mono</i> (3a)	1.223	0.384	1.799	1.321	1.023	0.985	0.959	0.762
<i>L. mono</i> ATCC19115	0.960	1.552	0.600	0.575	1.730	0.454	1.381	0.321
<i>L. seerigeri</i>	1.114	0.288	0.984	1.333	0.825	0.799	0.695	0.484
<i>L. ivanovii</i>	0.747	1.159	1.024	1.083	1.532	0.820	1.131	0.667
<i>L. mono</i> (4e)	1.340	0.347	2.009	1.553	1.109	1.242	0.957	0.713
<i>L. mono</i> (1/2c)	1.284	0.312	1.172	1.261	0.952	0.881	0.746	0.581
<i>L. mono</i> (4a)	0.458	0.225	0.606	0.517	0.442	0.471	0.339	0.337
<i>L. murrayi</i>	0.363	0.205	0.455	0.423	0.382	0.378	0.290	0.294
<i>L. innocua</i>	1.025	0.233	0.818	1.007	0.641	0.714	0.510	0.374
<i>L. mono</i> (4b)	0.634	0.234	0.591	0.646	0.640	0.519	0.508	0.389
<i>L. mono</i> (1/2a)	0.382	0.499	0.258	0.206	0.689	0.198	0.562	0.228
<i>S. aureus</i>	0.803	0.786	0.889	0.742	1.017	0.616	0.772	0.625
<i>Micrococcus leuteus</i>	0.312	0.214	0.187	0.452	0.196	0.320	0.124	0.176
<i>K. pneumoniae</i>	0.089	0.098	0.147	0.214	0.324	0.257	0.187	0.098
<i>E. feacalis</i>	0.098	0.098	0.217	0.324	0.257	0.246	0.185	0.148
<i>E. casseliflavus</i>	0.241	0.179	0.216	0.216	0.247	0.218	0.217	0.320

continued

Organisms	O.D at 490nm od indicated polyclonal Abs						
	9	10	11	12	13	14	15
<i>L. grayi</i>	0.429	0.354	0.602	0.503	0.541	0.455	0.751
<i>L. mono</i> ¹ (1/2b)	0.785	0.468	1.746	0.921	0.586	0.373	1.762
<i>L. welshimeri</i>	0.716	0.400	0.871	1.084	1.434	0.887	1.421
<i>L. mono</i> (4d)	0.841	1.123	1.116	0.832	0.672	0.447	1.920
<i>L. mono</i> (3a)	1.060	0.556	1.181	0.843	0.864	0.522	1.738
<i>L. mono</i> ATCC19115	0.441	0.779	1.637	0.780	0.637	0.191	1.676
<i>L. seerigeri</i>	0.639	0.390	0.989	1.172	1.041	0.421	1.334
<i>L. ivanovii</i>	0.853	0.758	1.742	0.827	0.632	0.441	1.946
<i>L. mono</i> (4e)	1.222	0.543	1.108	0.999	1.186	1.108	1.642
<i>L. mono</i> (1/2c)	0.770	0.439	1.093	1.435	1.276	0.042	1.604
<i>L. mono</i> (4a)	0.342	0.240	0.372	0.372	0.407	0.456	0.464
<i>L. murrayi</i>	0.281	0.228	0.267	0.321	0.321	0.321	0.275
<i>L. innocua</i>	0.487	0.319	0.698	1.226	1.015	0.352	0.807
<i>L. mono</i> (4b)	1.046	0.328	0.618	0.472	0.421	0.229	0.724
<i>L. mono</i> (1/2a)	0.223	0.308	0.589	0.322	0.293	0.192	0.633
<i>S. aureus</i>	0.963	0.560	1.053	0.972	0.867	0.595	0.817
<i>Micrococcus leuteus</i>	0.214	0.312	0.187	0.198	0.158	0.146	0.210
<i>K. pneumoniae</i>	0.158	0.098	0.087	0.087	0.217	0.158	0.147
<i>E. feacalis</i>	0.204	0.278	0.167	0.187	0.215	0.148	0.097
<i>E. casseliflavus</i>	0.087	0.217	0.347	0.420	0.352	0.217	0.148

3. HRP(horse raddish peroxidase) conjugation

Protein A column에 적용시켜 분리된 IgG에 HRP를 conjugation하기 위하여 정제된 항체 0.3ml을 1:3의 비율로 peroxidase와 실온에서 2시간

반응 시킨 후 냉장보관하여 overnight하였다. 40 μ l의 triethanolamine (2M, pH 8.0)과 50 μ l의 sodiumborohydride solution(200mM)을 잘 섞어주고 30분간 냉장보관하여 반응을 정지시킨 후 25 μ l의 triethanolamine을 첨가하여 2시간가량 냉장보관하였다. Glycine solution(1M, pH 7.0) 10 μ l를 첨가하여 잘 섞어주고 반응액을 dialysis tube에 넣은 후 2일 가량 투석을 하였다. HRP conjugation 이후 균체가 coating된 96 well plate를 이용하여 발색반응을 확인하였다.

제 3 절 EIA키트 제작

단크론 항체 및 고도면역된 정제 다크론항체의 plate 흡착능을 비교하기 위하여 brand별 plate에 항체를 coating하여 비교하였다. Coating buffer는 carbonate buffer(pH9.6)와 PBS를 비교하여 성능을 평가하였고 HRP conjugation된 토끼 항혈청을 이용하여 detecting antibody로 사용하였다.

1. microplate를 이용한 EIA 기법의 적용

Coating of Maxi-sorp™ plates with purified Monoclonal Ab(IgM)
⇒ wash with PBST ⇒ Incubation (RT, 2hrs) ⇒ wash with PBST
⇒ Blocking with 0.05% BSA (RT, 1hr) ⇒ wash with PBST ⇒
Reaction with bacterial strains (RT, 1hr) ⇒ wash with PBST
⇒ Reaction with HRP-conjugated purified rabbit IgG (RT, 45min) ⇒ Color development with substrate ⇒ Read optical density (490 nm) * RT: room temperature

2. 리스테리아 검출을 위한 HRP-conjugated IgG의 희석배수 결정

정제된 conjugated Ab의 최적 희석배수를 결정하기 위하여 다양한 농도의 conjugated Ab를 적용시켜 최적 희석배수를 결정하였다.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

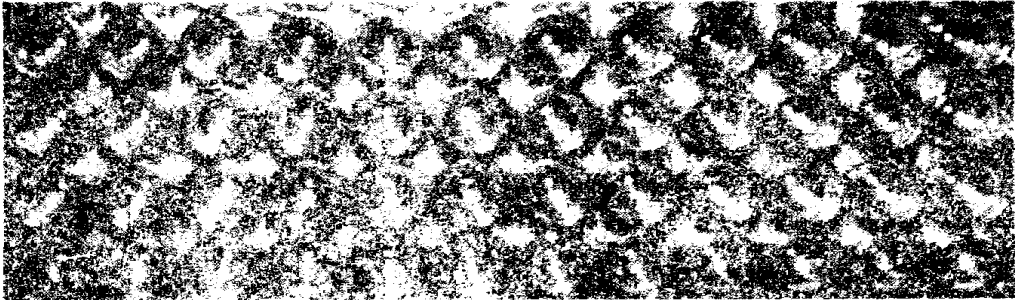


Fig. 1. 다크큰 항체 분리 IgG의 HRP conjugation후 희석배수 결정
1: *L. grayi*, 2: *L. monocytogenes*(1/2b), 3: *L. welshimeri*, 4: *L. monocytogenes*(4d), 5: *L. monocytogenes*, 6: *L. monocytogenes*, 7: *L. seerigeri*, 8: *L. ivanovii*, 9: *L. monocytogenes*(4e), 10: *L. monocytogenes*(1/2c), 11: *L. monocytogenes*(4a), 12: *L. murrayi*.
1st row: 1 : 500, 2nd row: 1 : 1,000, 3rd row: 1 : 2,000, 4th row: 1 : 4,000

3. 개발된 리스테리아 EIA 키트의 특이성 조사

개발된 리스테리아 EIA키트의 특이성을 조사하였던 바 모든 리스테리아속군에서는 강한 양성반응이 나타났으며, *E. casselifalvus*, *Micrococcus leuteus*,에서는 전혀 발색반응이 나타나지 않아 본 개발 리스테리아 EIA키트로 리스테리아 오염 유무를 신속히 스크리닝할 수 있었다.

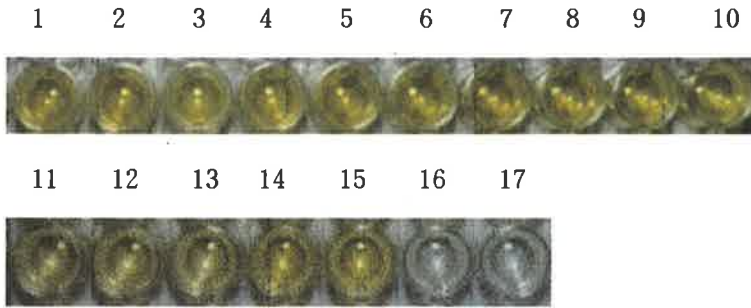


Fig. 3. 리스테리아 EIA 키트의 특이성 조사

1: *L. grayi*, 2: *L. monocytogenes*(1/2b), 3: *L. welshimeri*, 4: *L. monocytogenes*(4d), 5: *L. monocytogenes*, 6: *L. monocytogenes*, 7: *L. seerigeri*, 8: *L. ivanovii*, 9: *L. monocytogenes*(4e), 10: *L. monocytogenes*(1/2c), 11: *L. monocytogenes*(4a), 12: *L. murrayi*, 13: *L. innocua*, 14: *L. monocytogenes*(4b), 15: *L. monocytogenes*(1/2a), 16: *E. casselifalvus*, 17: *Micrococcus leuteus*

4. 리스테리아속균 검출을 위한 EIA 키트의 야외시료 적용

가. 리스테리아 EIA키트의 분변시료 적용

EIA 기법을 이용한 리스테리아 검출 키트를 축산물에 적용하기 위하여 Fig. 3.에서 보는 바와 같이 1×10^6 cfu의 *L. monocytogenes* (ATCC 19117) 균주를 10배씩 단계 희석하여 도체의 주요 오염원으로 추정되는 돼지 분변(Fig. 3. No. 1-5) 및 소 분변(Fig. 3. No. 6-10)에 접종하여 7시간 증균한 후 EIA에 적용한 바 10^2 cfu의 균체를 접종한 sample에서도 효과적인 검출이 가능하였다.

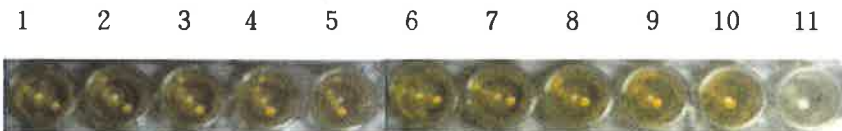


Fig. 3. 리스테리아 검출을 위한 EIA 키트의 야외분변 적용

1 to 5 : 1×10^6 cfu to 1×10^2 cfu of *L. monocytogenes* in pig feces

6 to 10 : 1×10^6 cfu to 1×10^2 cfu of *L. monocytogenes* in cattle

feces 11: negative control

나. 리스테리아 EIA 키트의 사료샘플 적용

Test Results	No. of Samples
Culture Positive/ EIA Positive	0
Culture Negative/ EIA Positive	5
Culture Negative/ EIA Negative	144
Culture Positive/ EIA Negative	0
Total	152

다. 리스테리아 EIA 키트의 소 분변샘플 적용

Test Results	No. of Samples
Culture Positive/ EIA Positive	1
Culture Negative/ EIA Positive	8
Culture Negative/ EIA Negative	139
Culture Positive/ EIA Negative	2
Total	150

라. 리스테리아 EIA 키트의 도계장 샘플 적용

Test Results	No. of Samples
Culture Positive/ EIA Positive	3
Culture Negative/ EIA Positive	2
Culture Negative/ EIA Negative	143
Culture Positive/ EIA Negative	2
Total	150

마. 리스테리아 EIA 키트의 돼지분변 샘플 적용

Test Results	No. of Samples
Culture Positive/ EIA Positive	1
Culture Negative/ EIA Positive	6
Culture Negative/ EIA Negative	153
Culture Positive/ EIA Negative	0
Total	150

5. Immuno-stick을 이용한 EIA 키트의 최적 조건 설정

NUNC-Immuno™ stick(Maxisorp-surface)을 이용하여, field나 소규모 샘플에 비교적 적용이 용이한 EIA 키트를 조사하였다 (Fig. 4).

- Coating of paddle surface : mixed MAbs (RT, 3hrs)
- Blocking : 0.1% BSA (RT, 30min)
- Detecting Ab : HRP-conjugated purified rabbit IgG
- Color development : 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, red color)
- Wash with tap water

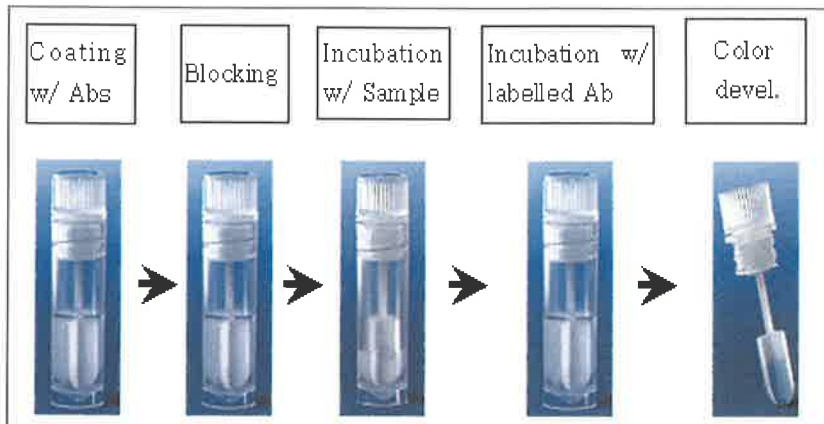


Fig. 4. Design of Immuno-stick EIA system

6. Immuno-stick 키트의 특이성 조사

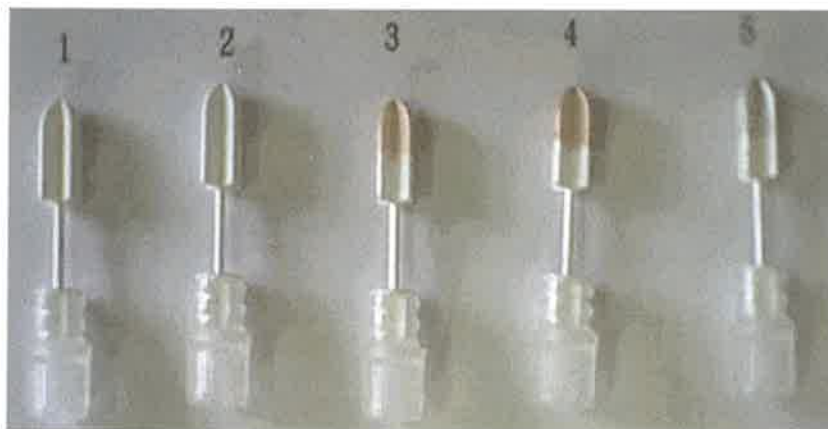


Fig. 5. Immuno-stick을 이용한 리스테리아속균의 특이적인 검출

1. *Bruceella abortus*(2×10^7 cfu/ml),
2. *Micrococcus leuteus*(2×10^7 cfu/ml),
3. *L. monocytogenes*(1.2×10^7 cfu/ml),
4. *L. welshimeri*(1.2×10^7 cfu/ml),
5. *L. monocytogenes*(1.2×10^7 cfu/ml, **color devel. with DAB**)

7. Immunostick 키트를 이용한 야외 시료적용

가. 닭고기를 이용한 리스테리아 immuno-stick 키트의 민감도 조사

1×10^9 cfu *L. monocytogenes* ATCC 19114를 1번 sample부터 시작하여 10배씩 희석하여 닭고기를 세척한 BPW(buffered peptone water) 10ml에 접종하고 7시간 배양 후, Immuno-stick에 적용한 결과, 약 10^2 cfu의 균체를 접종한 sample에서도 검출이 가능하였다 (Fig. 6).

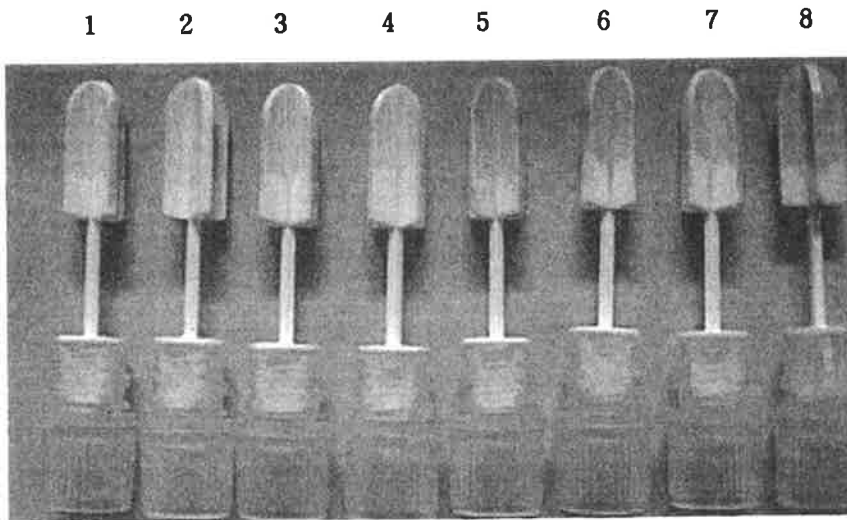


Fig. 6. 닭고기중 리스테리아 검출을 위한 Immuno-stick의 민감도 조사. 1 to 8 : 1×10^9 cfu를 10진 희석 실시 (1×10^9 to 1×10^2)

나. 닭분변을 이용한 리스테리아 immuno-stick 키트의 민감도 조사

1×10^9 cfu *L. monocytogenes* ATCC 19114를 1번 sample부터 시작하여 10배씩 희석하여 1g의 분변이 담긴 BPW(buffered peptone water) 10ml에 접종하고 7시간 배양 후, Immuno-stick에 적용한 결과, 닭고

기를 세척한 BPW보다 좀 더 미약한 반응을 보였으나, 약 10^2 cfu의 균체를 접종한 sample에서도 검출이 가능하였다 (Fig. 7).

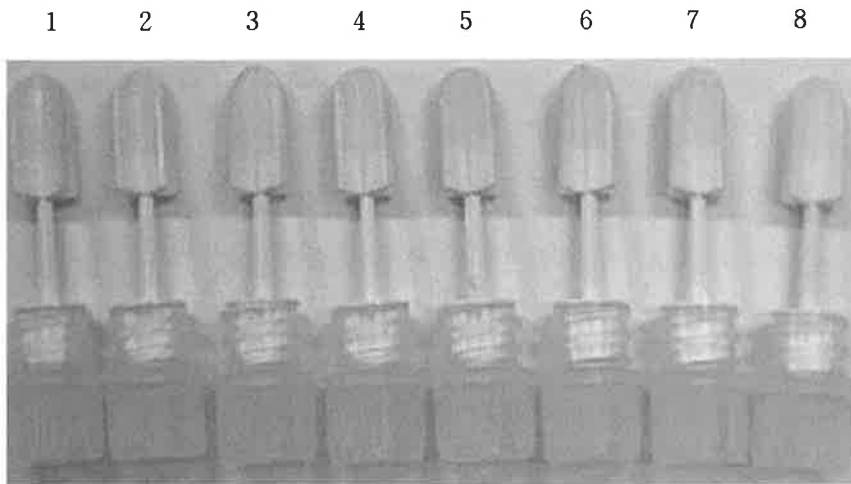


Fig. 7. 닭분변중 리스테리아 검출을 위한 Immuno-stick의 민감도 조사.
1 to 8 : 1×10^9 cfu를 10진 희석 실시 (1×10^9 to 1×10^2)

다. 리스테리아 Immuno-stick 키트의 사료샘플 적용

Test Results	No. of Samples
Culture Positive/ Immuno-stick Positive	0
Culture Negative/ Immuno-stick Positive	7
Culture Negative/ Immuno-stick Negative	145
Culture Positive/ Immuno-stick Negative	0
Total	152

라. 리스테리아 Immuno-stick 키트의 소 분변샘플 적용

Test Results	No. of Samples
Culture Positive/ Immuno-stick Positive	3
Culture Negative/ Immuno-stick Positive	7
Culture Negative/ Immuno-stick Negative	140
Culture Positive/ Immuno-stick Negative	0
Total	150

마. 리스테리아 Immuno-stick 키트의 도계장 샘플 적용

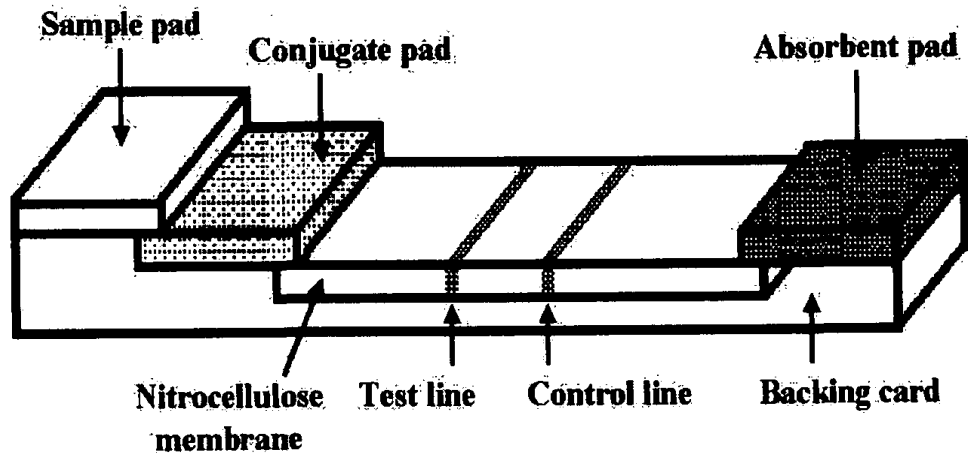
Test Results	No. of Samples
Culture Positive/ Immuno-stick Positive	5
Culture Negative/ Immuno-stick Positive	2
Culture Negative/ Immuno-stick Negative	143
Culture Positive/ Immuno-stick Negative	0
Total	150

바. 리스테리아 Immuno-stick 키트의 돼지분변 샘플 적용

Test Results	No. of Samples
Culture Positive/ Immuno-stick Positive	1
Culture Negative/ Immuno-stick Positive	4
Culture Negative/ Immuno-stick Negative	155
Culture Positive/ Immuno-stick Negative	0
Total	150

제 4 절 dip-stick 키트 제작

1. dip-stick 키트 모형 제작



Dip-stick kit는 sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane, absorbent pad, backing card로 구성되어 있으며, Conjugate pad는 리스테리아 항체가 부착된 colloidal gold가 뿌려져 있다. 따라서 sample pad에 시료를 적하하면 모세관이동현상으로 conjugate pad에 뿌려져 있는 immuno-gold particles이 nitrocellulose membrane으로 이동하며, test line과 control line에서 항원항체반응이 일어난다. Absorbent pad는 여분의 시료액을 빨아들이는 역할을 한다.

2. colloidal gold particle 제작

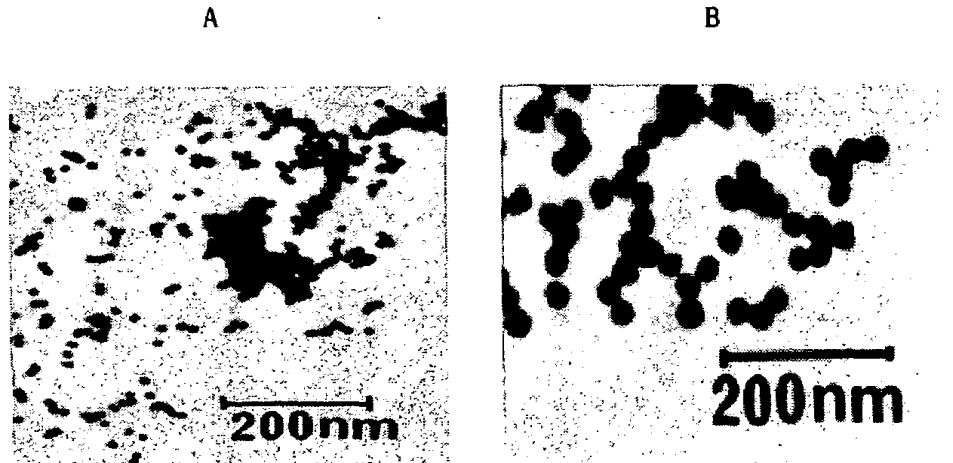


Fig. 8. 제작된 골드비드의 전자현미경적 소견 (50,000배 확대)
A: 약 20nm로 제작된 gold particle, B: 약 40nm로 제작된 gold particle

3. 컨쥬게이션을 위한 항체농도 및 완충액 조건 설정

항체를 conjugation buffer로 희석한 후 gold particle과 혼합하면
서 30분 동안 반응 ⇒ BSA를 넣고 10분간 blocking ⇒ half strip을
넣어 항체의 최적 희석배수 설정 ⇒ 여과와 원심후 다시 half strip
test 실시

4. 리스테리아 dip-stick 키트의 특이성 검사

제작된 키트에 대한 특이성을 알아보기 위하여 순수배양된 균액을
20분간 증탕한 후 약 150ul를 개발된 키트에 적용하여 반응 양상을
조사하였다.

Fig. 9과 Fig. 10-A에서 보는 바와 같이, 모든 리스테리아속균에서 동일한 양상의 반응결과가 나타났으며, 이는 개발 키트가 리스테리아 속균에 정확하게 반응함을 알 수 있었다.

한 편 Fig. 10-B에서는 Fig. 10-A에서 적용한 동일한 균을 27°C가 아닌 37°C에서 증균하여 키트와 반응시켰던 결과이며, Fig. 10-B에서 나타난 바와 같이 lane 4, 5를 제외하고는 다른 리스테리아균에서는 반응이 나타나지 않았다. 이는 개발된 단크론 항체가 리스테리아균의 편모를 대상으로 만들어졌으며, 리스테리아의 편모는 37°C에서는 발육이 거의 없고 27°C에서 가장 많이 나타난다는 것을 알 수 있었다.

따라서 본 개발 키트를 사용하기 위해서는 37°C 증균보다는 27°C에서 증균하여 사용하는 것이 유효하다는 것을 알 수 있었다.

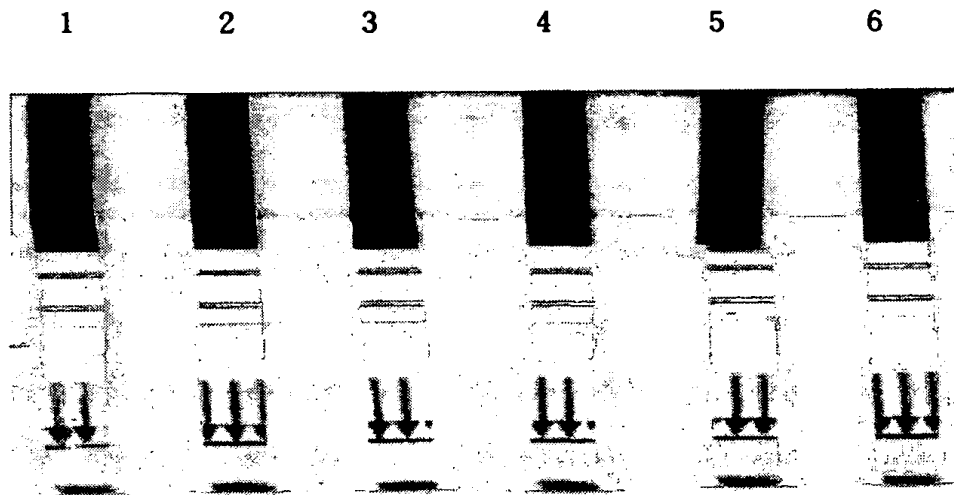


Fig. 9. 개발 dip-stick 키트의 특이성 조사

1: *L. monocytogenes* HPB12, 2: *L. monocytogenes* ATCC19113, 3: *L. monocytogenes* ATCC19114, 4: *L. innocua* ATCC33090, 5: *L. welshimeri* ATCC35897, 6: *L. ivanovii* ATCC19119,

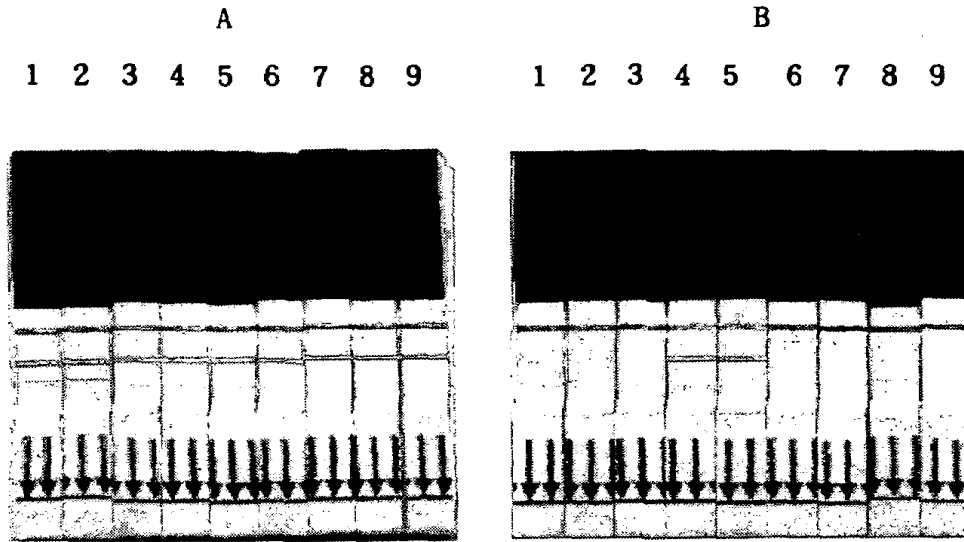


Fig. 10. 개발 dip-stick 키트의 증균온도에 따른 특이성 조사
 1: *L. seeligeri* ATCC35967, 2: *L. monocytogenes* ATCC19115, 3: *L. monocytogenes* ATCC19117, 4: *L. murrayi* ATCC25401, 5: *L. monocytogenes* ATCC19118, 6: *L. grayi* ATCC19120, 7: *L. monocytogenes* HPB3, 8: *L. monocytogenes* HPB503, 9: *L. monocytogenes* HPB410.

한편 Fig. 11에서는 리스테리아 이외의 균종에서의 반응 유무를 관찰하기 위하여 *Staphylococcus aureus* 등 12종의 균에 대해서 적용을 실시하였던 바 control line을 제외하고는 전혀 test line이 형성되지 않아 본 개발 키트가 리스테리아를 특이적으로 검출할 수 있는 유효한 키트임을 알 수 있었다.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

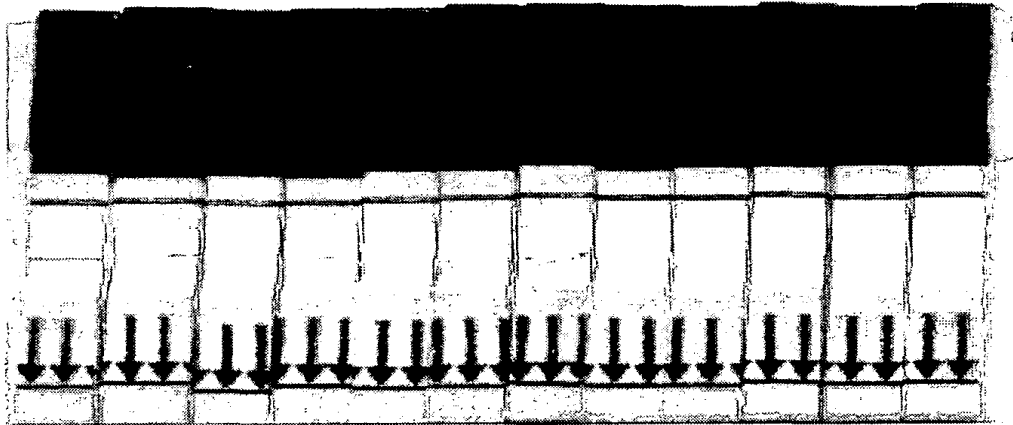


Fig. 11. dip-stick 키트 특이성 조사

1: *Str. agalactiae*, 2: *Str. dysgalactiae*, 3: *Str. pneumoniae*, 4: *Str. uberis*, 5: *Str. pyogenes*, 6: *E. seriolicida*, 7: *Sta. aureus*, 8: *Actinomyces pyogenes*, 9: *K. pneumoniae*, 10: *Bacillus subtilis*, 11: *Pseudomonas aeruginosa*, 12: *Rhodococcus equi*

5. 식육 증균액에서의 민감도조사

개발된 키트를 이용하여 식육에서의 적용가능성을 알아보기 위하여 소고기에 인위적으로 *L. monocytogenes* ATCC19115를 오염시켜 각 오염배수별, 증균시간별 검출민감도를 조사하였다.

즉, 식육 25g을 리스테리아 증균배지 225ml과 혼합하여 균질화한 후 일야증균된 리스테리아균을 1번 시료에 접종한 후 이하 10진 희석하여 증균전 반응민감도를 조사하였던 바 Fig. 12-A에서 나타난 바와 같이 증균전에는 lane 2까지 즉, 8.7×10^5 CFU/ml까지 검출이 가능하

였다. Fig. 12-B 에서는 Fig. 12-A에서 적용하였던 시료를 27°C에서 1일 증균한 후 반응시켰던 결과이며, lane 5까지 즉 8.7×10^2 CFU/ml 까지 검출이 가능하였다. Fig. 12-C에서는 Fig. 12-B에서 적용하였던 시료를 다시 신선한 배지 9ml에 1ml접종하여 2차 증균을 실시한 후 작용하였던 결과이며, 반응결과 lane 7까지 즉 8.7×10^0 CFU/ml까지 검출이 가능하였다.

이러한 결과로 미루어 본 개발 리스테리아 dip-stick 키트는 시료를 27°C에서 2차 증균을 실시한 후 적용할 경우 8.7×10^0 CFU/ml이 오염되어 있어도 검출이 가능한 아주 민감한 키트로 사료되었다.

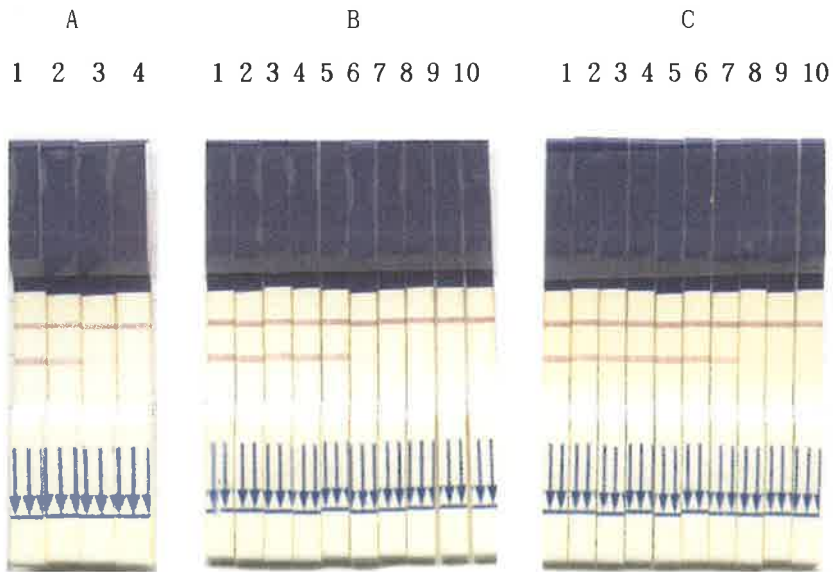


Fig. 12. 증균에 따른 dip-stick 키트 민감도 조사

제 3 장 대장균 0157 신속검출키트 개발

제 1 절 특이항원 분석 및 항체 정제

1. 대장균 0157의 생화학 성상 시험

Table 1. 대장균 0157:H7에 대한 생화학 성상검사

시 험	결 과	
	<i>E. coli</i> 0157:H7	일반 대장균
TSI	A/A	A/A
oxidase test	-	-
Lactose	+	+
Indole	+	+
Citrate	-	-
VP	-	-
MR	+	+
운동성	+/-	+/-
Sorbitol 분해능	-	+
MUG test	-	+
44.5℃ 성장능	-	+
enterohemolysin	+	-
KCN	-	-
Cellobiose	-	-
Glucose, gas	+	+
Lysine decarboxylase	+	80% +

2. 단크론 항체 제작을 위한 대장균 O157:H7 특이항원 분석

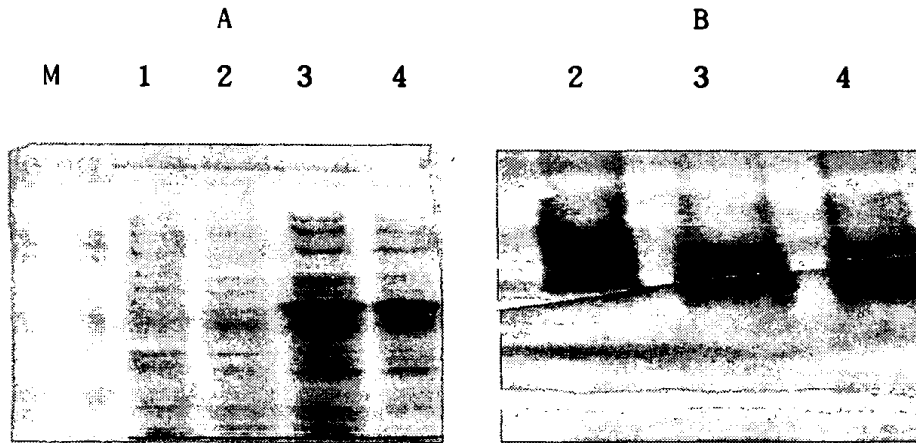


Fig. 1. A: SDS-PAGE profile, B: western blot profile.

1: 대장균 O149:H10, 2: 대장균 O157:H-(sorbitol positive), 3: 대장균 O157:H7 분리주, 4: 대장균 O157:H7 ATCC43894

3. 대장균 O157:H7 단크론 항체의 ELISA 반응 결과

균종	B36	B20
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.386	0.397
대장균 분리주 1	0.333	0.387
대장균 분리주 2	0.219	0.247
<i>S. typhimurium</i>	0.174	0.261
<i>S. enteritidis</i>	0.169	0.281
대장균 O111:H-	0.221	0.379
대장균 O149:H10	0.244	0.359
대장균 O78:H-	0.319	0.563
대장균 O157:H7	0.976	1.847

4. 대장균 0157 항혈청 제조

- 가. brain heart infusion agar plate에서 16시간 배양
- 나. 0.85% 멸균 식염수로 집균 및 2회 원심수세
- 다. 100℃에서 2시간 30분동안 가열(H, L 항원을 불활화)
- 라. 1회 원심수세한 후 550nm, 흡광도 1로 탁도조정
- 마. 토끼 이정맥에 4일간격으로 5회접종
- 바. 최종접종 1주일 후 전채혈 및 혈청 분리
- 사. 항체역가 측정 및 소분하여 -70℃에 보관

5. H7 항혈청 제조

- 가. GI motility medium에 5회 계대배양하여 편모항원 발현
- 나. infusion broth에 접종하여 37C, 18시간동안 배양
- 다. formalin 0.5% 첨가하여 2시간동안 실온에 불활화
- 라. 토끼 이정맥에 4일간격으로 5회접종
- 마. 최종접종 1주일 후 전채혈 및 혈청 분리
- 바. 항체역가 측정 및 소분하여 -70℃에 보관

6. Protein A column이용 순수항체 정제

Fast Performance Liquid Chromatography를 이용한 순수 항체만 정제

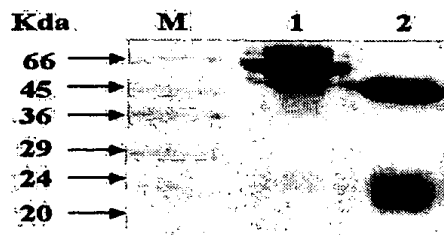


Fig. 2. 정제된 항체의 SDS-PAGE 양상. 1: 정제전 항체, 2: 정제후 항체

7. 특이항체 정제 (immuno-affinity chromatography)

가. 불일 항원의 단백질농도 측정

나. 항원 전처리

sonicated Ag을 pH8.3으로 맞춘 후 → dialysis tube에 넣어
수분제거 → carbonate buffer(pH8.3)에 담구어 투석을 실시

다. gel swelling

CNBr-activated Sepharose 4B를 1mM HCl로 15분동안 swelling
시키고 column에 장착하여 1mM HCl로 충분히 washing 실시

라. gel과 항원의 결합

1mM HCl(pH3.0) 10ml에 gel을 부유시킨 뒤 pH8.3으로 처리된
항원과 혼합하여 실온에서 2시간 혼든 후 4C에서 일야정치

마. gel blocking

0.2M lysin pH8.0 2ml을 라.에서 준비된 gel에 넣어 2시간 반응

바. gel packing 및 washing

반응 완료된 gel을 column에 충전한 후 coupling buffer로 20
분정도 washing

사. 비특이적으로 결합한 항원제거

3M NaSCN(chaos buffer)을 column에 약 20분간 흘려주어 비특이반응을
제거한 후 → coupling buffer로 3회 washing → 3M NaSCN을
column에 다시 20분 washing → 마지막 단계에서는 NaCl에
함유되지 않은 phosphate buffer로 washing

아. 혈청 전처리

면역혈청을 PBS로 동량 희석하여 2500 rpm X 10분 원심하여

상층액 수거

자. 항체 부착 및 elution

전처리된 혈청을 사.에서 준비된 column에 적용 → PBS로 2회 washing
→ 3M NaSCN으로 특이 Ab를 elution → 2ml씩 collection →
protein assay후 4C에서 일야 투석

차. 정제된 특이항체 농도측정후 냉동보관

8. 정제항체에 HRP conjugation (Two-step glutaraldehyde conjugation)

가. HRP와 glutaraldehyde를 불임. (0.2ml의 1.25% glutaraldehyde
in 100mM sodium phosphate (pH6.8)에 HRP 10mg을 녹인 후 실온에서
18시간 정치)

나. 반응하지 않고 남아있는 glutaraldehyde는 column을 이용하여 제거
(PD-10 desalting column을 이용하여 반응하지 않고 남아있는
glutaraldehyde는 column을 이용하여 제거)

다. Ab를 desalting (가.에서 처리된 protein A purified-anti rabbit
0157 antibody를 PD-10 desalting column으로 처리하여
collection한 후 protein assay)

라. HRP-glutaraldehyde에 항체를 부착 (나.에서 제조된
HRP-glutaraldehyde 용액 + 다.에서 만들어진 항체 1ml + 1M
sodium carbonate-bicarbonate buffer(pH9.6) 100ul --->
혼합하여 4C, 1일간 정치배양)

마. HRP-glutaraldehyde의 여분의 반응기를 blocking (0.2M lysin을
100ul 첨가하여 실온에서 2시간 정치)

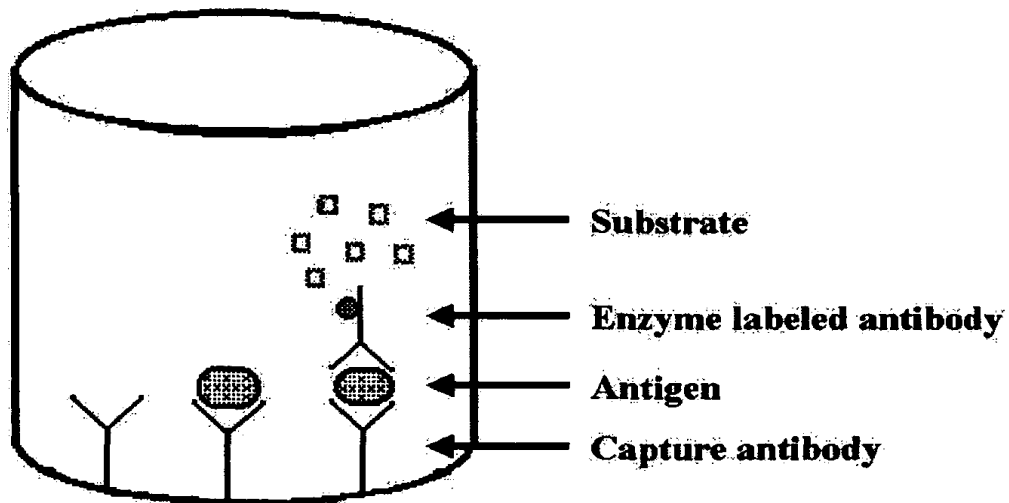
바. ConA column제작 (column에 gel을 넣고 PBS 100ml로 washing한

후 마.에서 얻어진 용액을 천천히 ConA column에 분주)

사. 실험을 끝낸 후 0.1M acetate buffer(pH 6) containing 1M NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 0.02% merthiolate를 약 100ml정도로 washing하고 sealing하여 냉장보관함.

제 2 절 EIA 키트 제작

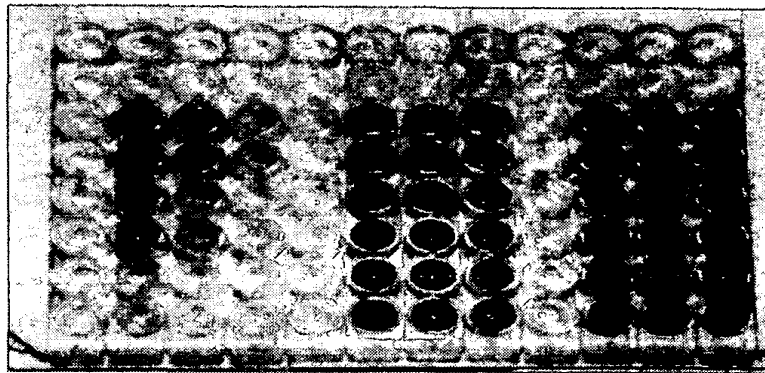
1. EIA 키트의 모형도



well에 부착된 capture antibody는 시료내에 있는 항원을 포획하며, 포획된 항원에 특이적인 enzyme-labeled antibody가 2차로 부착하며 이후 발색제를 첨가하여 발색시킨다.

2. EIA기법에 의한 대장균 0157검출을 위한 최적 조건 설정

- 가. 최적 capture 항체 농도 : 0.5ug/well
- 나. Blocking buffer : 2% Skim milk
- 다. 최적 컨쥬게이트 항체 농도 : 10ng/well



3. 개발된 대장균 0157 EIA 키트의 특이도 조사

순수배양된 균들을 이용하여 개발된 대장균 0157 EIA 키트에 적용하여 개발 키트의 특이성을 조사하였다. Table 2.에서 보는 바와 같이 개발된 EIA 키트는 편모항원과 상관없이 균체항원이 0157이면 모두 양성을 나타내었으며, 대장균 0157과 공통항원을 가지고 있다고 알려진 Citrobacter와도 일부 교차반응이 인정되었다.

그러나 본 키트는 최종 동정을 위한 키트가 아니라 축산식품중 대장균 0157 오염유무를 신속하게 스크리닝하는 키트이므로 음성시료는 더 이상의 실험을 진행할 필요가 없으며, 일부 양성반응이 나타난 시료는 균분리배양법으로 최종 균분리동정을 실시하여야 한다.

비록 *Citrobacter*가 개발 EIA키트에서 양성반응을 유발하더라도 대장균 0157 선택배지로 널리 사용되는 CT-SMAC에서 *Citrobacter*가 발육이 매우 억제될 뿐만 아니라 sorbitol을 분해하므로, 대장균 0157과는 쉽게 구별될 수가 있다.

따라서 개발 대장균 0157 EIA 키트를 이용하여 축산물중 대장균 0157 오염유무를 신속히 스크리닝할 수 있을 것으로 사료되었다.

Table 2. Specificity of the *E coli* 0157 EIA kit

Organisms*	Serotype	EIA results**	Organisms*	Serotype	EIA results**
<i>E coli</i>	03:H31	-	<i>E coli</i>	0137:H41	-
	04:NM***	-		0139:H1	-
	06:NM	-		0141:H4	-
	08:NM	-		0149:H10	-
	014:NM	-		0150:H6	-
	015:H25	-		0157:H19	+
	016:H48	-		0157:H7	+
	038:H30	-		0157:NM	+
	045:H23	-	<i>Aeromonas salmonicida</i>		-
	051:H24	-	<i>Bacillus subtilis</i>		-
	055:NM	-	<i>Cit. amalonaticus</i>		+
	078:NM	-	<i>Edwardsiella tarda</i>		-
	0101:NM	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		-
	0111:NM	-	<i>L. monocytogenes</i>		-
	0114:H32	-	<i>L. innocua</i>		-
	0116:H10	-	<i>L. ivanovii</i>		-
	0117:H4	-	<i>L. murrayi</i>		-
	0118:NM	-	<i>S. typhimurium</i>		-
	0119:H27	-	<i>S. choleraesuis</i>		-
	0120:H6	-	<i>S. enteritidis</i>		-
	0123:H16	-	<i>S. paratyphi A</i>		-
	0131:H26	-	<i>Sta. aureus</i>		-
	0132:H28	-	<i>Str. agalactiae</i>		-
	0133:H29	-	<i>Str. dysgalactiae</i>		-

* The results of EIA were expressed as negative (<0.3), positive (≥0.3) on the basis of the cutoff value calculated from the negative controls at 650 nm. ** nonmotile

4. 증균배지 성분에 의한 대장균 0157 EIA 키트의 반응성 조사

개발 대장균 0157 EIA 키트는 증균배지를 직접 이용하기 때문에 증균배지내에 함유된 성분들에 의한 비특이 반응성 유무를 조사하였다. 대장균 증균을 위하여 많이 사용되고 있는 TSB, EC를 대상으로 시험한 결과, 0157을 원심수세하고 PBS에 부유시킨 결과와 거의 유사하여 증균배지는 본 키트에 전혀 영향을 미치지 않음을 알았다.

Table 3. Influence of the ingredients of enrichment broth in *E coli* 0157 EIA

<i>E coli</i> 0157:H7 (CFU/ml)	Range of OD ₆₅₀ (score) of EIA reacted with indicated diluents		
	TSB	EC	PBS
1.3×10^7	1.57 ~ 2.32 (+)	2.05 ~ 2.25 (+)	1.99 ~ 2.01 (+)
1.3×10^6	1.06 ~ 1.64 (+)	1.35 ~ 1.63 (+)	1.58 ~ 1.75 (+)
1.3×10^5	0.33 ~ 0.65 (+)	0.48 ~ 0.55 (+)	0.51 ~ 0.83 (+)
1.3×10^4	0.13 ~ 0.27 (—)	0.13 ~ 0.21 (—)	0.14 ~ 0.24 (—)
1.3×10^3	0.11 ~ 0.21 (—)	0.10 ~ 0.15 (—)	0.09 ~ 0.12 (—)
1.3×10^2	0.08 ~ 0.09 (—)	0.06 ~ 0.09 (—)	0.07 ~ 0.10 (—)
1.3×10^1	0.04 ~ 0.09 (—)	0.03 ~ 0.09 (—)	0.03 ~ 0.09 (—)
1.3×10^0	0.03 ~ 0.09 (—)	0.03 ~ 0.09 (—)	0.03 ~ 0.09 (—)
Negative control	0.03 ~ 0.09 (—)	0.03 ~ 0.09 (—)	0.03 ~ 0.09 (—)

5. 식육중 대장균 0157 검출을 위한 개발 EIA 키트의 민감도 검사

식육에 인위적으로 다양한 균수의 대장균 0157을 접종하여 증균시간대별로 개발된 대장균 0157 EIA키트에 적용한 바 10시간 증균후에는 식육 g당 1.8개가 오염된 시료에서도 충분히 개발 EIA 키트로 검출이 가능하였다.

Table 4. Enrichment-EIA for detection of *E. coli* 0157 in raw beef

<i>E. coli</i> 0157:H7 (CFU/g)*	Range of OD ₆₅₀ (score) of enrichment culture-EIA			
	in indicated incubation time (h)			
	0	5	10	15
1.8×10^7	0.79~1.25 (+)	0.86~1.04 (+)	0.80~1.06 (+)	1.19~1.39 (+)
1.8×10^6	0.53~0.68 (+)	0.86~0.98 (+)	0.76~1.04 (+)	1.24~1.34 (+)
1.8×10^5	0.30~0.52 (+)	0.73~0.75 (+)	0.74~1.06 (+)	1.27~1.37 (+)
1.8×10^4	0.12~0.24 (-)	0.44~0.46 (+)	0.80~1.12 (+)	1.31~1.36 (+)
1.8×10^3	0.07~0.09 (-)	0.23~0.25 (-)	0.78~1.11 (+)	0.87~1.15 (+)
1.8×10^2	0.07~0.08 (-)	0.13~0.15 (-)	0.79~1.04 (+)	0.64~0.86 (+)
1.8×10^1	0.07~0.08 (-)	0.08~0.09 (-)	0.66~0.67 (+)	0.63~0.79 (+)
1.8×10^0	0.03~0.06 (-)	0.08~0.09 (-)	0.44~0.56 (+)	0.66~0.83 (+)
Negative control**	0.03~0.04 (-)	0.08~0.09 (-)	0.09~0.10 (-)	0.07~0.08 (-)

* No of *E. coli* 0157:H7 inoculated in raw beef ** Negative control was used with enriched-raw beef that was not inoculated *E. coli* 0157:H7

6. 개발 대장균 0157 EIA 키트의 야외 시료 적용

개발 키트를 이용하여 소 분변 및 지육을 대상으로 스크리닝을 실시하여 균분리 성적과 비교하였으며 그 성적은 Table 5.에 나타난 바와 같다.

Table 5. Comparison *E coli* 0157 EIA with *E coli* 0157:H7 culture method

Samples (n)	No of samples with indicated result			
	<i>E coli</i> 0157 EIA		<i>E coli</i> 0157:H7 culture method	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Raw beef (85)	2	83	0	85
Bovine feces (100)	11	89	0	100

제 3 절 dip-stick 키트 제작

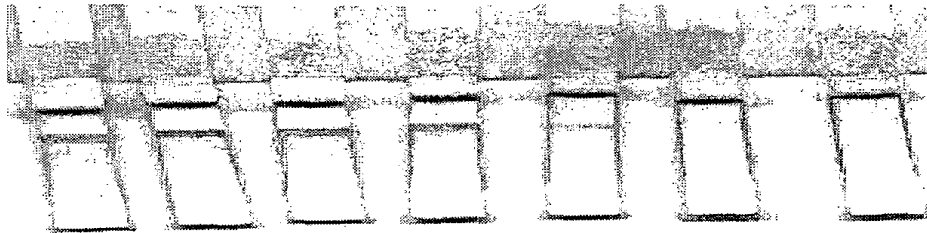
1. gold bead에 특이항체 부착을 위한 최적 항체농도 설정

- 가. 특이항체를 10진 단계희석 실시한다.
- 나. 항체에 colloidal gold와 conjugation buffer를 혼합
- 다. 30분 conjugation을 실시
- 라. blocking을 실시
- 마. 4℃에서 일야 방치

바. 원심후 gold pellet을 재부유

사. 적정농도로 조정 후 control line만 제작된 strip과 반응시켜 유효한
항체농도를 선발

1 2 3 4 5 6 7



2. buffer에 따른 line 양상 비교

가. 정제항원을 control line에 분사

나. buffer와 면역골드를 혼합하여 전개

다. 실험결과 : 동일한 strip도 buffer에 따라 band양상이 다양함.
따라서 각 항체마다 최적의 buffer 조건을 설정.

3. 대장균 0157 EIA 키트의 특이도 조사

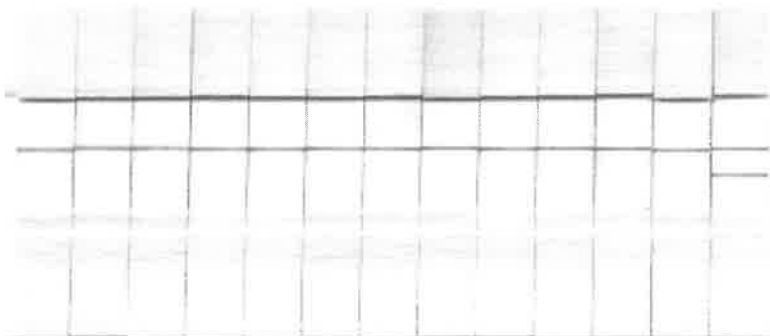
개발 키트가 대장균 0157에만 특이적으로 반응하는지를 알아보기
위하여 순수 배양된 균액을 이용하여 제작된 키트에 적용한 결과
0157에만 특이적인 양성반응(test line과 control line 동시 형성)을
나타내었고, 그 이외의 균종에서는 음성반응(control line만 형성)을
나타내었다.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



1: *E. coli* 015:H25, 2: *E. coli* 016:H48, 3: *E. coli* 038:H30, 4:
E. coli 045:H23 5: *E. coli* 051:H24, 6: *E. coli* 055:NM, 7: *S.*
typhimurium, 8: *S. choleraesuis*, 9: *S. enteritidis*, 10: *E. coli* 0157:H7

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



1: *Str. agalactiae*, 2: *Str. dysgalactiae*, 3: *Str. pneumoniae*, 4:
Str. uberis, 5: *Str. pyogenes*, 6: *E. seriolicida*, 7: *Sta. aureus*,
8: *Actinomyces pyogenes*, 9: *K. pneumoniae*, 10: *Bacillus subtilis*, 11:
Pseudomonas aeruginosa, 12: *Rhodococcus equi*, 13: *E. coli* 0157:H7

4. 개발 dip-stick 키트를 이용한 축산물에서 0157 검출 민감성 조사

- 가. 식육 25g과 0157 증균배지 225ml을 혼합하여 stomach 실시
- 나. 분쇄액 9ml에 일야증균된 대장균 0157 (10^9 CFU/ml)을 1ml을 혼합한 후 이하 식육 분쇄액으로 10진단계희석을 실시하여, 최종 대장균 0157이 10^8 CFU/ml부터 1CFU/ml이 되도록 조정
- 다. 대장균 0157이 접종된 각 시험관을 37C, 일야 증균배양
- 라. 시료 200ul를 취하여 dip-stick 키트에 적용
- 마. 시험결과, 대장균 0157이 식육 분쇄액 1ml에 1개라도 오염되어 있으면 증균과정후 5분이내에 오염된 시료를 확인할 수 있었다. 즉 오염된 식육에서는 모두 특이적인 test line의 양성밴드를 확인할 수 있었으며, 키트가 적절히 작용하는지를 알기 위한 control line도 확인할 수 있었다. 한편 음성시료에서는 control line만 형성되어 본 키트가 대장균 0157을 검출하기 위한 특이적인 키트로 사료되었다.

No. of <i>E. coli</i> 0157 /g of raw beef	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0	negative control	uninoculated
Five drops of enrichment broth and then read the results after 5 minutes											
Results											

- ★ Do not need the machine
- ★ Only 5 minutes to get the results

5. 개발 dip-stick 키트와 외국산 키트와의 검출 민감도 비교

가. 비교 조사한 외국산 제품 : 미국산 0157 dip-stick 키트

나. 개발 키트와 시판 외국산 키트의 민감도를 비교 조사한 결과 2종류의 키트의 평균전, 후 성적은 동일하였으며, 반응강도나 반응시간 등에도 유의성이 있는 차이를 관찰할 수 없었다.

제 4 장 살모넬라 신속검출키트 개발

제 1 절 살모넬라 분리 및 동정

1. 살모넬라균주

살모넬라균의 특이 항원 분석 및 정제에 사용된 살모넬라균주는 Table 1과 같다.

Table 1. 사용된 살모넬라균주

Strain	Group	O-Antigen	H Phase I	H Phase II
<i>S. paratyphi A</i>	A	1, 2, 12		
<i>S. paratyphi A var. durazzo</i>	A	2, 12		
<i>S. scohottmuelleri</i>	B	1, 4, 5, 12	b	1, 2
<i>S. typhimurium</i>	B	1, 4, 5, 12	i	1, 2
<i>S. derby</i>	B	1, 4, 5, 12	f, g	(1, 2)
<i>S. thomson</i>	C1	6, 7, 14	k	1, 5
<i>S. choleraesuis</i>	C1	6, 7	c	1, 5
<i>S. hadar</i>	C2	6, 8	z10	e, n, x
<i>S. newport</i>	C2	6, 8	e, h	1, 2
<i>S. dublin</i>	D	1, 9, 12, (vi)	d	
<i>S. gallinarum</i>	D	1, 9, 12		
<i>S. enteritidis</i>	D	1, 9, 12	g, m	1, 7
<i>S. typhi 0901W</i>	D	9, 12, vi		
<i>S. pullorum</i>	D	1, 9, 12		
<i>S. yeerongpilly</i>	E1	3, 10	i	z6
<i>S. london</i>	E1	3, 10	1, v	1, 6

2. 살모넬라균 O항원의 제조

Alcohol and Acetone extract method를 이용하였다. 즉, BHI agar plate에 균을 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양된 균체를 생리식염수를 이용하여 50ml tube에 담아서 H antigen을 불활화하기 위하여 100℃에서 2시간 가열하였다. 2,000 rpm에서 30분간 원심하고, 95% alcohol로 재부유하여 4시간 가량 37℃ waterbath에서 반응시켰다. 이를 원심하여 집균하고 acetone으로 2회 세척한 후 다시 alcohol로 3회 세척하였다. 37℃ incubator에서 overnight하여 말리고 항원 접종을 위하여 525nm에서 O.D 값을 측정하여 1.7 - 2.0의 O.D로 희석하였다.

3. 살모넬라균 H항원의 제조

Semisolid agar에 균주를 접종하여 2회 계대배양을 하여 편모항원의 활력을 최대로 증가시키고 H broth(Beef extract 3g, peptone 5g, dextrose 1g, dipotassium phosphate 2.5g, NaCl 5g, and tryptone 5g in 1000ml distilled water)에 접종하여 37℃에서 6시간 배양하였다. 이를 0.6% formalin을 함유한 생리식염수(0.85% NaCl)로 희석하여 접종하였다.

4. 살모넬라균의 LPS(lipopolisaccharide)분리

Modified hot phenol-water method와 Slauch 등의 방법을 이용하여 LPS를 분리하였다. 즉, hot phenol water method의 경우 BHI agar에

서 살모넬라균을 37℃에서 24시간 배양 후 생리식염수를 이용하여 집균하였다. 이를 멸균생리식염수로 4,500 rpm에서 3회 세척하고 10ml 멸균생리식염수로 재부유시킨 후 75℃ waterbath에 30분간 방치하고 75℃로 가열된 saturated phenol 10ml을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 반응액을 실온에서 식히고 upper aqueous layer를 조심스럽게 분리하고, phenol phase 와 interphase는 다시 75℃로 가열하고 aqueous phase를 다시 한 번 분리한다. 두 번에 걸쳐 분리한 aqueous phase를 4℃ 증류수에서 phenol이 모두 제거될 때까지 dialysis tube를 이용하여 dialysis한다. 이를 7.5% sodium acetate를 함유한 95% ethanol을 이용하여 침전시키고, 12000 rpm에서 원심분리하여 pellet을 분리하였다.

Slauch 등의 방법의 경우, 증류수에 부유된 균액을 100℃에서 30분간 처리하고 동량의 lysis buffer(4%(w/v) SDS, 10%(v/v) 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.625M Tris(pH6.8) and 0.005% bromophenol blue)와 섞어 10분간 100℃에서 반응시켰다. 이를 실온으로 식히고 proteinase K(1mg/ml)를 첨가하여 60℃에서 1시간 반응시키고 원심하여 LPS를 침전시킨다. 침전된 LPS를 95% ethanol을 이용하여 2회 세척하고 건조시킨 후 증류수로 부유시켜 -20℃에 보관하였다.

제 2 절 살모넬라그룹항혈청 생산

1. 토끼면역

Alcohol and acetone extract method와 H broth를 이용하여 분리된

살모넬라균의 O-antigen과 H-antigen을 4일 간격으로 6회 토끼(8주령 female Newzealand White)의 이정맥에 접종한 후 혈중 접종 살모넬라 항체를 측정하여 전혈을 채취하였다. 채취된 혈액은 4℃에 24시간 보관하여 혈청을 분리하고 0.45 um syringe fillter로 여과하여 -20℃에 보관되었다. 그룹혈청의 제조에 사용된 균주는 A, B, C, D, E serogroup에 속하는 *S. paratyphi* A, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. lodon*을 사용하였다.

2. 면역토끼의 혈중 항체가 측정

토끼의 경우 5번의 접종으로 1:12,800 희석배수에서 0.9이상의 OD 값을 나타내었다. (Fig. 1).

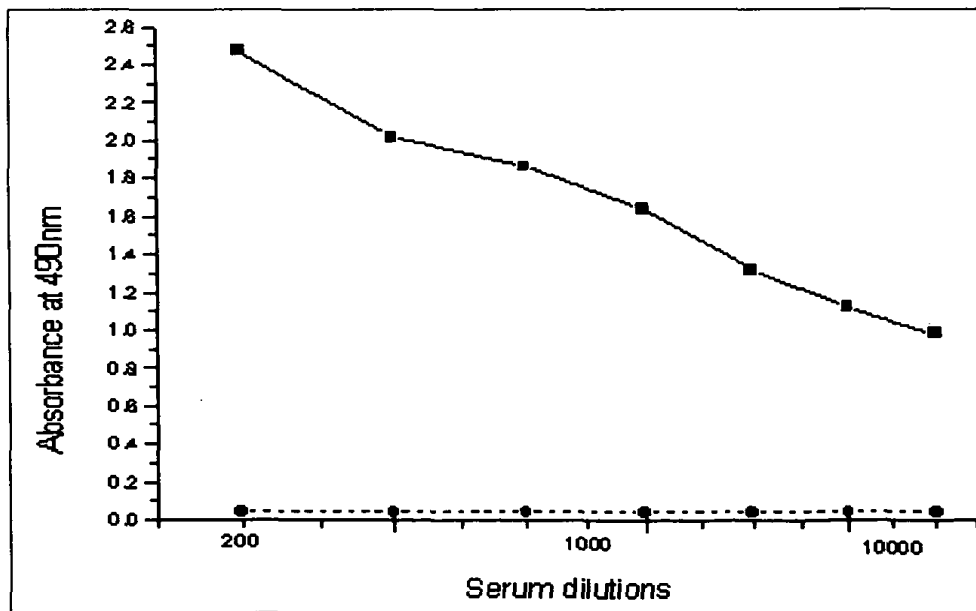


Fig. 1. Serum antibody titers determined by indirect ELISA in

rabbits immunized with O-antigen of *S. typhimurium* DT104. The sera were collected at 5 days after final injection(■). The serum collected before injection of *S. typhimurium* DT104 is represented as ●.

제 3 절 단크론항체의 생산

1. 마우스의 면역

준비된 살모넬라 O-antigen과 whole cell antigen을 5×10^8 cells/ml 의 농도로 희석하여 4주령 female BALB/c 마우스의 복강에 $100 \mu\text{l}$ 씩 일주일 간격으로 4회 접종하였다. 최종 5회 접종은 마우스의 미정맥에 균체 항원을 직접 주입하여 3일 이후에 cell fusion에 사용되었다. 첫 번째 접종이후 매주 마우스의 혈액을 안구 정맥총으로부터 채취하여 접종 살모넬라균에 대한 항체를 indirect ELISA 기법을 이용하여 측정하였다. 즉, 5×10^8 cells/ml의 균체를 PBS(pH7.2)에 희석하여 96 well plate(Maxisorp™)에 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 24시간 동안 4℃에서 coating하고 0.5% BSA로 1시간 동안 blocking을 하였다. PBST(PBS-tween 20(0.05%))로 2회 세척 후 분리된 혈청을 2 fold dilution하여 1시간 반응시켰다. 3회 PBST로 wash하고 HRP conjugated goat anti-mouse IgG + M(Biodesign)을 1:10,000 배로 희석하여 1시간 반응 후 OPD(0.4mg/ml)와 30% H_2O_2 ($4 \mu\text{l}/10\text{ml}$)와 citrate buffer(pH 5.0)를 이용하여 발색시키고 490nm에서 O.D값을 측정하였다.

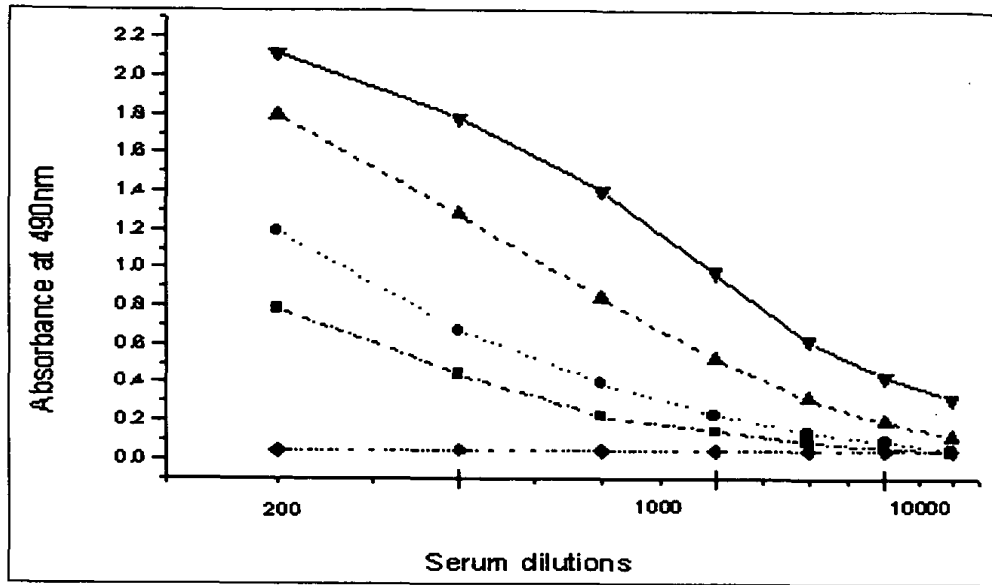


Fig. 2. Serum antibody titers determined by indirect ELISA in mice immunized with 0-antigen of *S. typhimurium* DT104. Each sera was collected at day 7(■), at day 14(●), at day 21(▲), and at day 28(▼) after primary immunization. The serum collected before injection of *S. typhimurium* DT104 0-antigen is represented as ◆.

2. Myeloma cell과 feeder cell의 배양

Washington State University에서 분양받아 계대 배양된 P3-X63Ag8.653 cell line과 수의과학검역원으로부터 분양된 SP2/0 cell line을 계대배양하여 이후 세포융합에 사용하였다. 위의 두 세포주는 RPMI 1640(100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.25 μ g/ml amphotericin B, 0.1 mM MEM non-essential aminoacids, 1mM sodium pyruvate, and 10% fetal bovine serum, Sigma)배지에서

계대배양 되었다.

Mouse peritoneal macrophage가 마우스의 복강으로부터 RPMI 1640 배지를 이용한 peritoneal lavage 기법으로 분리되어 feeder cell(3×10^3 cells/ml)로 사용되었다. 모든 세포주의 배양은 37°C , 5% CO_2 incubator에서 실시되었다.

3. 세포 융합 조작

1×10^7 myeloma cell과 1×10^8 면역림프구를 50ml 시험관에서 섞은 뒤 RPMI 1640으로 350xg에서 5분간 3회 세척하였다. 마지막 세척 후 상청액을 제거하고 얻은 침전세포에 37°C 에서 50%(w/v) polyethyleneglycol 1000 1ml을 1분간에 걸쳐한 방울씩 떨어뜨려 잘 흔들어 섞어 주었다. 여기에 5분간 15ml의 RPMI 1640 배지를 첨가하여 polyethyleneglycol 을 희석하면서 융합반응을 지속시켰다. 융합이 끝난 세포를 400xg에서 10분간 원심한 뒤 20% FBS-RPMI 1640 배지에 재부유시킨 후 96 well plate에 well당 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한 뒤 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하였다.

4. 융합 세포의 선택

융합된 세포만을 선택하기 위해 HAT 배지를 이용하였다. 0.05mM hypoxanthine, 0.4 μM aminopterin, 16 μM thymidine이 섞인 배지를 융합 실시 후 제 1, 3, 5, 7일에 well 당 $50\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 제 10일에는 $150\mu\text{l}$ 씩 배지를 교환한 후 제 14일까지 배양을 계속하면서 융합 세포만이 증식되는 well을 선별하였다. 배양 14일 이후에는 HT배지를

100 μ l씩 교환하여 배양하였고 융합세포 집락의 크기가 1mm 이상이 되고 상태가 좋은 well의 배양상청액을 100 μ l씩 사용하여 indirect ELISA기법으로 접종 균체에 대한 항체 생산여부를 측정하였다. 선발된 융합세포집락은 1ml당 10개의 세포로 희석하여 100 μ l씩 96 well에 분주하여 limiting dilution 기법으로 단일 clone을 선별하였다. 선발된 clone은 각각의 살모넬라 serogroup과 장내세균과의 반응성을 ELISA기법으로 측정하여 특이성을 결정하였다.

5. ELISA에 의한 항체의 검색

만들어진 단세포균 항체가 접종균체에만 특이하게 반응하는지를 ELISA로 검색하였다. 1×10^8 cells/ml로 0.04M carbonate buffer (pH9.6)에 균체를 희석하여 Maxisorp plate에 100 μ l씩 분주하여 coating하였다. PBST로 2회 세척하고 0.5% BSA로 1시간 blocking을 실시한 후 2회 세척하고 배양상청액을 50 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척 후 HRP conjugated goat anti-mouse IgG + M(Biodesign)를 10,000배 희석하여 100 μ l씩 분주하여 반응시키고 PBST로 4회 세척후 OPD(orthophenylenediamine)를 10ml phosphate citrate buffer(pH5.0)에 0.04%(w/v)되게 녹이고 여기에 30% H₂O₂를 8 μ l 첨가한 기질 용액을 만들어 well당 100 μ l씩 넣은 뒤 실온에서 발색시켰다. 적당히 발색된 후 2N H₂SO₄용액을 50 μ l첨가하여 반응을 정지시키고 490nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6. Monoclonal antibody(Ab)의 isotype 결정

Sandwich ELISA 방법으로 monoclonal Ab의 isotype를 결정하였다. PBS를 이용하여 토끼에서 생산된 anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA를 10 μ g/ml이 되도록 희석하여 Maxisorp plate에 4시간 가량 coating하였다. 이를 PBST로 2회 세척하고 0.5% BSA로 1시간 Blocking 하였다. 다시 2회 세척 후 isotype을 알고자하는 monoclonal Ab를 각각 50 μ l씩 분주하여 1시간 반응시키고 PBST로 3회 세척하였다. 이후 HRP conjugated goat anti-mouse IgG+M (Biodesign)을 사용하여 위에서 제시된 방법으로 발색을 하였다.

7. 복수의 생산 및 정제

만들어진 융합세포를 10⁹ cells 이상 원심집균하여 1ml의 RPMI 1640 배지에 재부유하여 BALB/c 마우스의 복장에 접종하였다. 채취된 복수는 식염수로 1:2로 희석하고 포화 (NH₄)₂SO₄(pH7.2)를 40%가 될 때까지 저어주면서 서서히 반응시켰다. 이후 상온에서 30분간 더 반응시킨 뒤 1000 \times g에서 15분간 원심하여 침전물을 모으고 40% (NH₄)₂SO₄로 1회 세척한 뒤 2ml의 PBS에 녹인뒤 투석하였다. 투석은 Tris-saline buffer(Tris 50mM, NaCl 0.5M, NaN₃ 0.1%, PH8.0)가 담긴 flask에 dialysis tube를 담그고 4 $^{\circ}$ C에서 저어주면서 overnight시켰다. 투석하여 분리한 항체는 -20 $^{\circ}$ C에 보관하며 실험에 사용하였다.

8. SDS PAGE 및 silver staining

10^9 cells/ml 의 농도로 부유된 균체를 sonication시킨 후 분리된 LPS와 함께 SDS PAGE에 사용하였다. Running gel은 12% acrylamide, 0.4% bisacrylamide, 0.1% SDS 와 375mM Tris-hydrochloride(pH8.8) 로 제작되었고 stacking gel은 4% acrylamide, 0.1% bisacrylamide, 0.1% SDS 와 125mM Tris-hydrochloride(pH6.8)로 제작되었다. $50\mu\text{l}$ 의 sample을 같은 량의 sample buffer(2%(w/v) SDS, 10% saccharose, 5% 2-mercaptoethanol, 62mM Tris(pH6.8), 0.003% phenol red)와 섞어서 60mA per gel의 current로 1시간 30분가량 전기영동을 실시하였다. 전기영동이후 하나의 gel은 silver nitrate를 이용하여 염색하였다. 즉, 40% methanol-5%acetic acid에 30분간 gel을 반응시키고 5% methanol-7% acetic acid에 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 50ml의 10% glutaraldehyde를 첨가하여 2시간 가량 실온에 방치하였다. gel을 3차 증류수가 담긴 용기에 담아 약 3시간 가량 wash를 하고 $5\mu\text{g}$ /ml의 DTT(Dithiothreitol) solution에 30분간 반응시키고 silver nitrate solution(0.1% w/v silver nitrate)에 1시간 가량 반응시켰다. 이 후 500ml의 3차 증류수로 gel을 5번 가량 헹구고 developing solution(3% sodium carbonate, 0.019% formaldehyde)을 사용하여 발색을 유도하였다.

가. Silver stained Whole cell lysates of *Salmonella* spp.

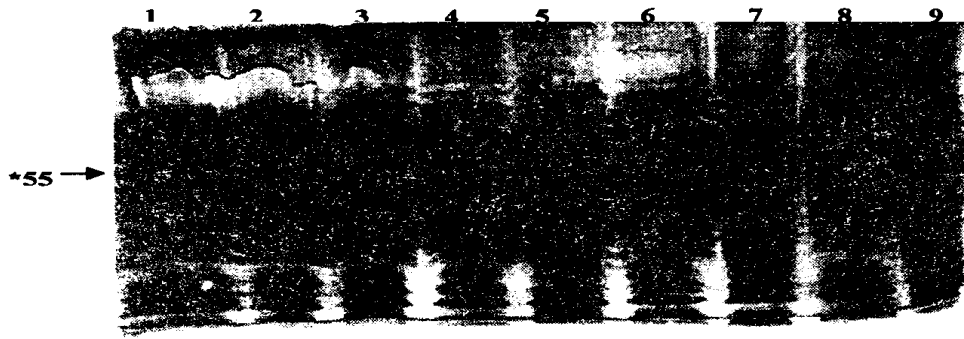


Fig. 3. Silver stained whole cell lysates of each serogroup of *Salmonella*. Lanes 1 and 2: *S. typhimurium* DT104, lane 3: *S. paratyphi* A, lane 4: *S. choleraesuis*, lane 5: *S. enteritidis*, lane 6: *S. london*, lane 7: *S. newport*, lane 8: *S. typhi* 0901W lane 9: *Proteus mirabilis* * kDa

나. Silver stained *Salmonella* LPS antigen

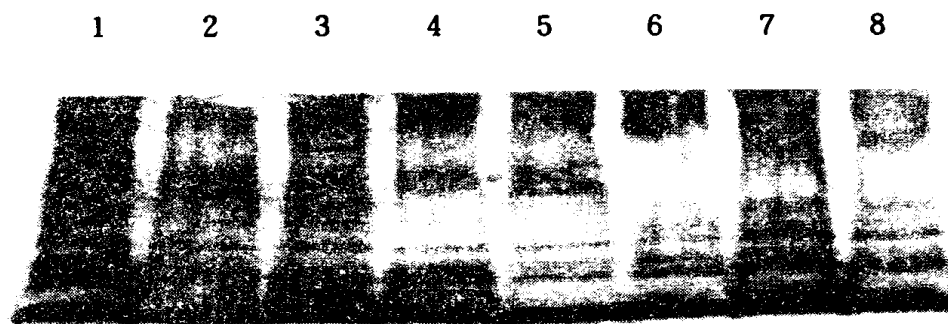


Fig. 4. Typical ladder patterns of purified LPS from *Salmonella* spp. Lane 1: *S. choleraesuis*, lane 2: *S. london*, lane 3: *S. gallinarum*, lane 4: *S. paratyphi* A var. durazzo, lane 5: *S. paratyphi* A, lane 6: *S. typhimurium*, lane 7: *S. typhi*, lane 8: *S. newport*

9. Western blot

SDS-PAGE에 의해 분리된 sample을 polyvinylidene difluoride (PVDF) transfer membrane(Polyscreen, MEN Life Science)에 Trans-Blot electrophoretic cell(Bio-Rad)을 사용하여 30V에서 17시간 동안 전기영동을 하였다. 전기영동 이후 PVDF membrane을 3% gelatin solution(20mM-Tris/HCl, 0.5M-NaCl)에 1시간 가량 blocking 시키고 primary antibody와 2시간 가량 반응을 시켰다. PVDF membrane을 PBST로 3회 세척하고 HRP conjugated goat anti-mouse IgG + M(Biodesign)를 2000배 희석하여 1시간 반응시켰다. 이 후 membrane을 20분씩 5번 세척하고 ECL solution(Amersham Life Science)을 사용하여 발색하고 Hyperfilm(Amersham Life Science)에 감작시켰다.

가. 토끼생산 항혈청의 Western blot profiles

토끼로부터 생산된 다크론항체의 Western blot 결과, 사용된 8가지의 serogroup 살모넬라와 높은 반응성을 나타내었다. 반면에 *Proteus mirabilis* 와도 반응성을 보이고 있으나 살모넬라균주보다는 좀 더 약한 반응성을 보였다 (Fig. 5).

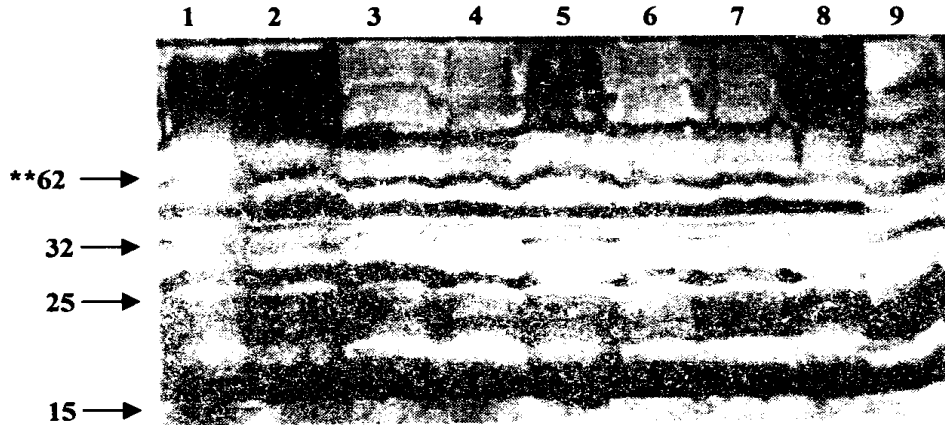


Fig. 5. Western-blot profiles with the polyclonal antibodies to each serogroup of *Salmonella*. Lanes 1 and 2: *S. typhimurium* DT104, lane 3: *S. paratyphi* A, lane 4: *S. choleraesuis*, lane 5: *S. enteritidis*, lane 6: *S. london*, lane 7: *S. newport*, lane 8: *S. typhi* 0901W, lane 9: *Proteus mirabilis*
 Arrows indicate high or specific reactive bands at 15, 26, and 62 kDa, respectively. **kDa

나. Monoclonal Ab SDM29

단클론항체 SDM29의 Western blot 결과, *S. typhi* 0901W 와 높은 반응성을 보였으며, *S. paratyphi* A 와 *S. paratyphi* A var. *durazzo* 와도 반응성을 나타내었다 (Fig. 6).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 BSA

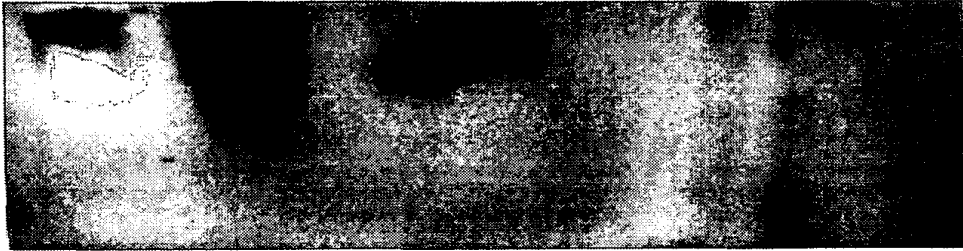


Fig. 6. Monoclonal Ab SDM29의 Salmonella Serogroup에 대한 특이성 조사. Lane 1: *S. Newport*, lane 2: *S. typhi* 0901W, lane 3: *S. typhimurium*, lane 4: *S. paratyphi* A, lane 5: *S. paratyphi* A var. durazzo, lane 6: *S. galinarum*, lane 7: *S. london*, lane 8: *S. cholerae-suis*, BSA: Bovine serum albumin, M: Rainbow marker

다. Monoclonal Ab SDM65

단클론항체 SDM 65의 Western blot 결과, *S. typhi* 0901W와 가장 강한 반응성을 보였고, *S. paratyphi* A 와 *S. paratyphi* A var. durazzo, *S. choleraesuis*와도 약간의 반응성을 보였다 (Fig. 7).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 BSA



Fig. 7. Monoclonal Ab SDM65의 Salmonella Serogroup에 대한 특이성 조사. Lane 1: *S. Newport*, lane 2: *S. typhi* 0901W, lane 3: *S.*

typhimurium, lane 4: *S. paratyphi* A, lane 5: *S. paratyphi* A var. durazzo, lane 6: *S. galinarum*, lane 7: *S. london*, lane 8: *S. cholerae-suis*, BSA: Bovine serum albumin, M: Rainbow marker

라. Monoclonal Ab SAM

단크론항체 SAM의 Western blot 결과, 매우 특이적으로 *S. paratyphi* A에만 반응하는 것을 확인하였다 (Fig. 8).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 BSA

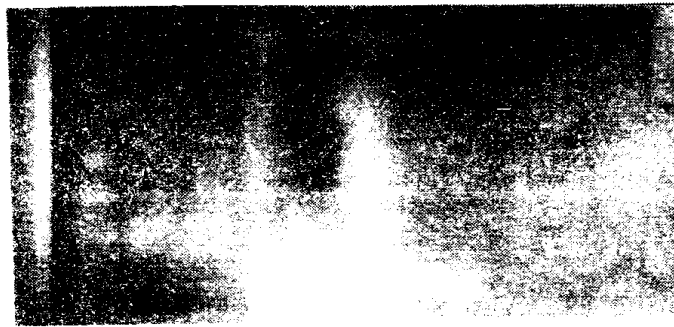


Fig. 8. Monoclonal Ab SAM의 Salmonella Serogroup에 대한 특이성 조사. Lane 1: *S. Newport*, lane 2: *S. typhi* 0901W, lane 3: *S. typhimurium*, lane 4: *S. paratyphi* A, lane 5: *S. paratyphi* A var. durazzo, lane 6: *S. galinarum*, lane 7: *S. london*, lane 8: *S. cholerae-suis*, BSA: Bovine serum albumin, M: Rainbow marker

마. Monoclonal Ab DTP2.4

단크론항체 DTP2.4의 Western blot 결과, *S. typhi* 0901W를 제외한 모든 *Salmonella* 균주와 반응성을 보였다. 특히, *S. typhimurium*과 좀 더 강한 반응성을 나타내었다 (Fig. 9).

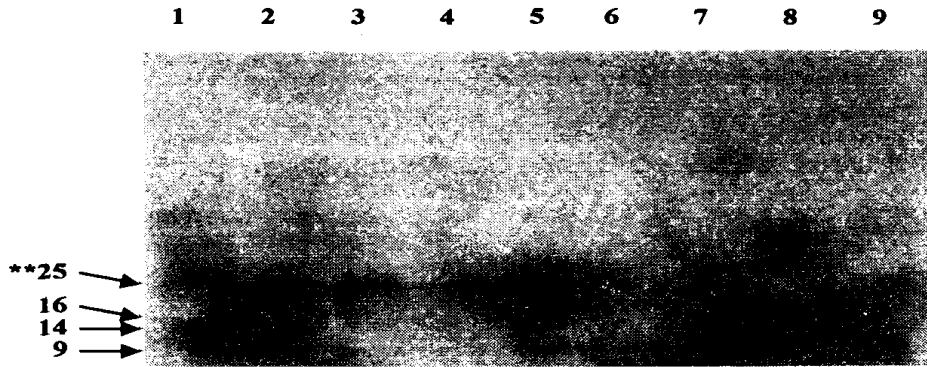


Fig. 9. Western-blot profile with the monoclonal antibody DTP2.4 to each serogroup of *Salmonella*. Lanes 1 and 2: *S. typhimurium* DT104, lane 3: *S. paratyphi* A, lane 4: *S. choleraesuis*, lane 5: *S. enteritidis*, lane 6: *S. london*, lane 7: *S. newport*, lane 8: *S. typhi* 0901W, lane 9: *Proteus mirabilis*

Arrows indicate specific binding band and common binding *Salmonella* component at 15, 20, and 25 kDa, respectively. **kDa

바. Monoclonal Ab DTP8

단클론항체 DTP8의 Western blot 결과, *S. typhimurium*과 *S. enteritidis*와 반응성을 나타내었다 (Fig. 10).

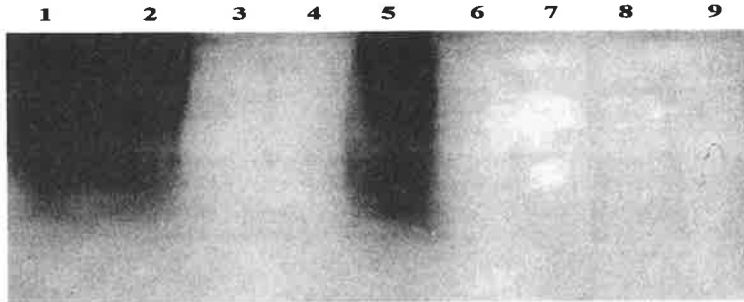


Fig. 10. Western-blot profile with the monoclonal antibody DTP8 to each serogroup of *Salmonella*. Lanes 1 and 2: *S. typhimurium* DT104, lane 3: *S. paratyphi* A, lane 4: *S. choleraesuis*, lane 5: *S. enteritidis*, lane 6: *S. london*, lane 7: *S. newport*, lane 8: *S. typhi* 0901W, lane 9: *Proteus mirabilis*

사. Monoclonal Ab DTB5.6

단클론항체 DTB5.6의 Western blot 결과, 여러 Serogroup에 속하는 살모넬라균들과 미약한 반응성을 나타내었으나 *S. typhimurium* 균주와 약 51 kDa 크기의 band를 나타내며 특이적으로 강한 반응성을 보였다 (Fig. 11).

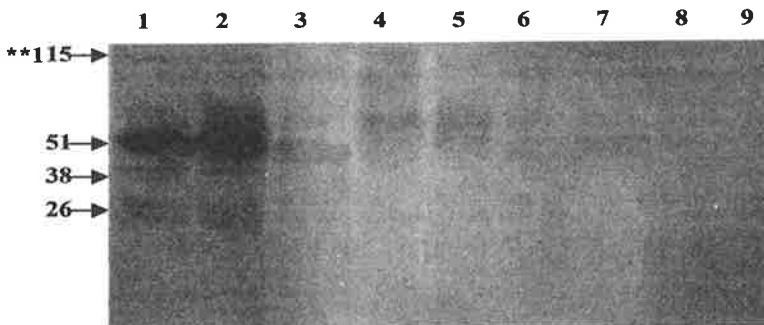


Fig. 11. Western-blot profile with the monoclonal antibody DTB5.6 to each serogroup of *Salmonella*. Lanes 1 and 2: *S. typhimurium* DT104, lane 3: *S. paratyphi* A, lane 4: *S. choleraesuis*, lane 5: *S. enteritidis*, lane 6: *S. london*, lane 7: *S. newport*, lane 8: *S. typhi* 0901W, lane 9: *Proteus mirabilis*. Arrows indicate major reactive bands at 51 kDa and minor bands at 26, 38, and 115 kDa, respectively. **kDa

10. 항체의 정제

토끼에서 생산된 polyclonal Ab로부터 IgG를 정제하기 위하여 protein A antibody purification kit를 사용하였다. 2ml 가량의 혈청을 protein A column에 적용시킨 후, elution buffer를 사용하여 0.5ml씩 tube에 분주하고 항체가를 측정하여 항체가가 높은 fraction의 항체를 ELISA kit의 제작에 사용하였다.

11. HRP(horse raddish peroxidase) conjugation

Protein A column에 적용시켜 분리된 IgG에 HRP를 conjugation하기 위하여 정제된 항체 0.3ml을 1:3의 비율로 peroxidase(Sigma)와 실온에서 2시간 반응 시킨 후 냉장보관하여 overnight하였다. 40 μ l의 triethanolamine(2M, pH 8.0)과 50 μ l의 sodiumborohydride solution (200mM)을 잘 섞어주고 30분간 냉장보관하여 반응을 정지시킨 후 25 μ l의 triethanolamine을 첨가하여 2시간가량 냉장보관하였다. Glycine solution(1M, pH 7.0) 10 μ l를 첨가하여 잘 섞어주고 반응액

을 dialysis tube에 넣은 후 2일 가량 투석을 하였다. HRP conjugation 이후 균체가 coating된 96 well plate를 이용하여 발색 반응을 확인하였다.

제 4 절 EIA 키트 제작

단크론 항체 및 고도면역항체의 plate 흡착능을 비교하기 위하여 brand 별 plate에 항체를 coating하여 비교하였다. Coating buffer는 carbonate buffer(pH9.6) 와 PBS를 비교하여 성능을 평가하였고 HRP conjugation 된 토끼 항혈청을 이용하여 detecting antibody로 사용하였다. EIA 기법에 사용한 균주는 Table 2와 같다.

Table 2. EIA 기법에 사용한 균주(총 33주)

Strain	Group	O-Antigen	H Phase I	H phase II
<i>S. paratyphi A</i>	A	1, 2, 12		
<i>S. paratyphi A var. durazzo</i>	A	2, 12		
<i>S. scohottmuelleri</i>	B	1, 4, 5, 12	b	1, 2
<i>S. typhimurium</i> DT104 8주(WSU)	B	1, 4, 5, 12	i	1, 2
<i>S. bredeney</i>	B	1, 4, 5, 12	f, g	(1, 2)
<i>S. thomson</i>	C1	6, 7, 14	k	1, 5
<i>S. choleraesuis</i>	C1	6, 7	c	1, 5
<i>S. hadar</i>	C2	6, 8	z10	e, n, x
<i>S. newport</i>	C2	6, 8	e, h	1, 2
<i>S. dublin</i>	D	1, 9, 12, (vi)	d	
<i>S. gallinarum</i>	D	1, 9, 12		
<i>S. enteritidis</i>	D	1, 9, 12	g, m	1, 7
<i>S. typhi</i> 0901W	D	9, 12, vi		
<i>S. pullorum</i>	D	1, 9, 12		
<i>S. yeerongpilly</i>	E1	3, 10	i	z6
<i>S. london</i>	E1	3, 10	1, v	1, 6
<i>Proteus mirabilis</i>				
<i>Klepsiella pneumoniae</i>				
<i>Yersinia enterocolitica</i>				
<i>E. coli</i> 026:H46				
<i>E. coli</i> 04:H-				
<i>E. coli</i> 020:H-				
<i>E. coli</i> 0111:H-				
<i>E. coli</i> 0114:H32				
<i>E. coli</i> 0157:H7				
<i>E. coli</i> 0119:H27				

1. 살모넬라균 검출을 위한 EIA 기법 확립

Coating of Maxi-sorp™ plates with purified MAbs \Rightarrow wash with PBST \Rightarrow Incubation (RT, 2hrs) \Rightarrow wash with PBST \Rightarrow Blocking with 0.05% BSA (RT, 1hr) \Rightarrow wash with PBST \Rightarrow Reaction with bacterial strains (RT, 1hr) \Rightarrow wash with PBST \Rightarrow Reaction with HRP-conjugated purified rabbit IgG (RT, 45min) \Rightarrow Color development with substrate \Rightarrow Read optical density (490 nm)

* RT: room temperature

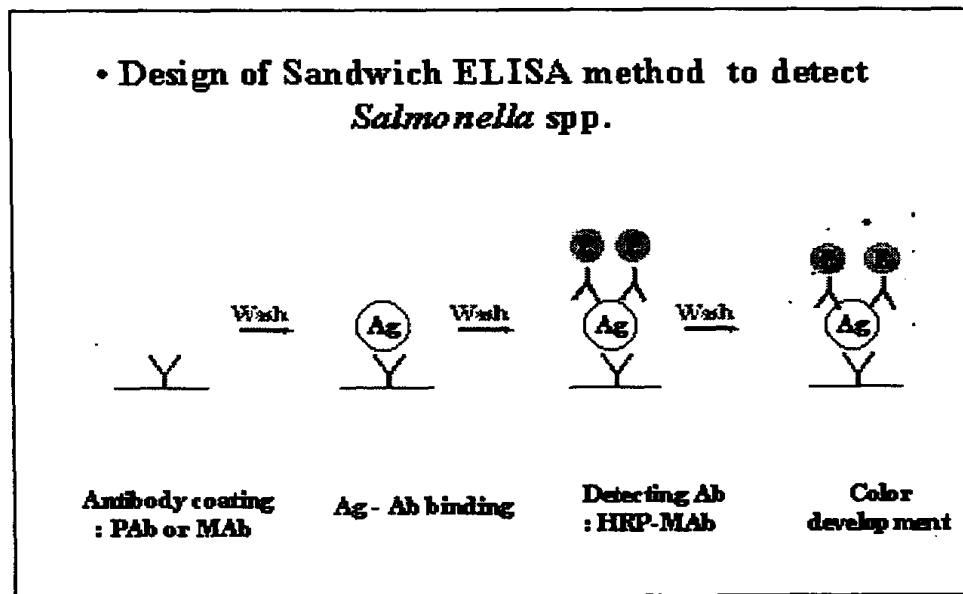


Fig. 12. 살모넬라균 검출을 위한 EIA법

2. 단크론 및 다크론 항체의 반응 양상 조사

Bacterium	MAbs Serogroup	SC1D1 (IgG3)	SC1D3 (IgG3)	SC1D2 (IgG3)	SB4 (IgG3)	DTP8 (IgM)	PAb ^a
<i>S. paratyphi A</i>	A	+	+	+	-	-	+
<i>S. paratyphi A var. durazzo</i>	A	±	±	+	-	-	+
<i>S. scohottmuelleri</i>	B	-	-	-	-	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2501	B	-	-	-	-	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2505	B	-	-	-	-	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2308	B	-	-	-	-	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2490	B	-	-	-	-	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2581	B	-	-	-	-	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2486	B	-	-	-	-	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2498	B	-	-	-	-	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2502	B	-	-	-	-	+	+
<i>S. bredeney</i>	B	+	+	+	-	-	+
<i>S. thomson</i>	C1	+	+	+	-	-	-
<i>S. choleraesuis</i>	C1	-	-	-	-	-	+
<i>S. hadar</i>	C2	-	-	+	-	-	-
<i>S. newport</i>	C2	-	-	+	-	-	+
<i>S. dublin</i>	D	-	-	-	-	-	+
<i>S. gallinarum</i>	D	-	-	±	-	±	+
<i>S. enteritidis</i>	D	-	-	-	+	+	+
<i>S. typhi</i> O901W	D	-	-	±	-	-	+
<i>S. pullorum</i>	D	-	-	-	-	-	+
<i>S. yeerongpilly</i>	E1	-	-	-	-	-	+
<i>S. london</i>	E1	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>		-	-	-	-	-	±
<i>Klepsiella pneumoniae</i>		-	-	-	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>		-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O26:H46		-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O4:H-		-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O20:H-		-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O111:H-		-	-	±	-	-	-
<i>E. coli</i> O114:H32		-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O157:H7		-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O119:H27		-	-	-	-	-	-

3. *Salmonella* spp. 검출을 위한 단크론 항체의 반응양상

Bacterium	MAbs	Serogroup	SAM (IgM)	SA1D5E4 (IgM)	SA1D5B5 (IgM)	SAA1 (IgM)	SB6 (IgM)	SE3G10 (IgM)
<i>S. paratyphi A</i>		A	+ ^a	- ^b	-	± ^c	-	-
<i>S. paratyphi A</i> var. durazzo		A	+	+	+	+	-	-
<i>S. scottmuelleri</i>		B	-	-	-	-	+	-
<i>S. typhimurium</i> DT2501		B	-	-	-	-	+	-
<i>S. typhimurium</i> DT2505		B	-	-	-	-	+	-
<i>S. typhimurium</i> DT2308		B	-	-	-	-	+	-
<i>S. typhimurium</i> DT2490		B	-	-	-	-	+	-
<i>S. typhimurium</i> DT2581		B	-	-	-	-	+	-
<i>S. typhimurium</i> DT2486		B	-	-	-	-	+	-
<i>S. typhimurium</i> DT2498		B	-	-	-	-	+	-
<i>S. typhimurium</i> DT2502		B	-	-	-	-	+	-
<i>S. bredeney</i>		B	-	-	-	-	-	-
<i>S. thomson</i>		C1	-	-	±	-	-	-
<i>S. choleraesuis</i>		C1	-	+	+	+	-	-
<i>S. hadar</i>		C2	-	-	+	-	-	-
<i>S. newport</i>		C2	-	-	-	-	-	-
<i>S. dublin</i>		D	-	±	-	±	-	-
<i>S. gallinarum</i>		D	-	-	-	-	±	-
<i>S. enteritidis</i>		D	-	-	-	±	+	-
<i>S. typhi</i> 0901W		D	-	+	+	+	-	-
<i>S. pullorum</i>		D	-	-	-	-	-	-
<i>S. yeerongpilly</i>		E1	-	-	-	-	-	+
<i>S. london</i>		E1	-	-	-	-	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>			-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>			-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 026:H46			-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 04:H-			-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 020:H-			-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 0111:H-			-	-	±	-	-	-
<i>E. coli</i> 0114:H32			-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 0157:H7			-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 0119:H27			-	-	-	-	-	-

^a+ : > 0.5, ^b- : < 0.2, ^c± : 0.2-0.5,

4. *Salmonella* spp. 검출을 위한 sandwich-ELISA 기법의 특이성 조사

Bacterium	MAbs (isotype)	Sero group	SDM29(IgM)+SB9(IgM)+SAA1(IgM)+SC1D2(IgG3)+SA1D5E4(IgM)+SE3G10(IgM)	affinity purified PAbs
<i>S. paratyphi A</i>		A	+	+
<i>S. paratyphi A var. durazzo</i>		A	+	+
<i>S. scohottmuelleri</i>		B	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2501		B	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2505		B	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2308		B	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2490		B	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2581		B	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2486		B	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2498		B	+	+
<i>S. typhimurium</i> DT2502		B	+	+
<i>S. bredeney</i>		B	+	+
<i>S. thomson</i>		C1	+	+
<i>S. choleraesuis</i>		C1	+	+
<i>S. hadar</i>		C2	+	+
<i>S. newport</i>		C2	+	+
<i>S. dublin</i>		D	+	+
<i>S. gallinarum</i>		D	+	+
<i>S. enteritidis</i>		D	+	+
<i>S. typhi</i> 0901W		D	+	+
<i>S. pullorum</i>		D	+	+
<i>S. yeerongpilly</i>		E1	+	-
<i>S. london</i>		E1	+	-
<i>Proteus mirabilis</i>			±	±
<i>Klepsiella pneumoniae</i>			-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>			-	-
<i>E. coli</i> 026:H46			-	-
<i>E. coli</i> 04:H-			-	-
<i>E. coli</i> 020:H-			-	-
<i>E. coli</i> 0111:H-			+	+
<i>E. coli</i> 0114:H32			-	-
<i>E. coli</i> 0157:H7			-	±
<i>E. coli</i> 0119:H27			+	+
<i>B. abortus</i>			-	-
<i>Ent. gallinarum</i>			-	-
<i>Ent. faecalis</i>			-	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19113			-	-
<i>S. aureus</i>			-	-

* +: > 0.5; ±: 0.5 - 0.3; -: < 0.3

5. *Salmonella* spp. EIA 기법의 민감도 조사

EIA기법을 응용한 *Salmonella* spp. 검출키트 민감성 측정 결과, 5종의 *Salmonella*균에 대하여 $10^4 - 10^5$ cells/ml의 민감도를 가진 것으로 나타났다. 즉, $10^4 - 10^5$ cells/ml의 농도로 부유된 균체에서 0.5 이상의 0.D값을 나타내었다 (Fig. 13).

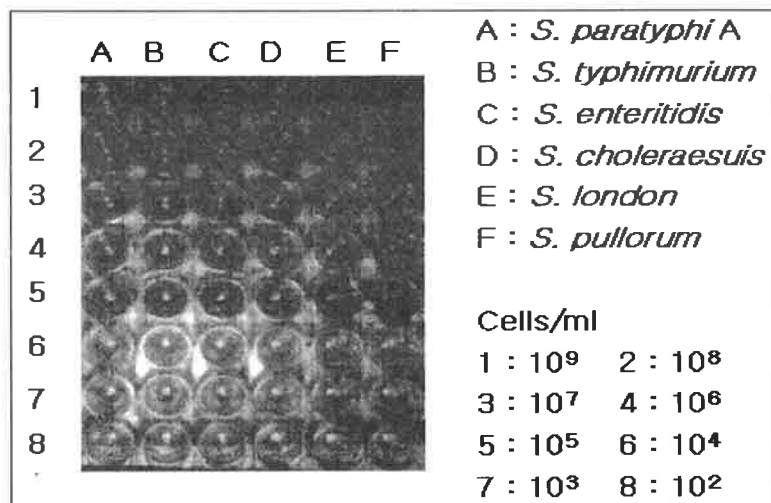


Fig. 13. EIA 기법을 이용한 *Salmonella* spp. 검출 민감도

6. EIA 기법을 이용한 *Salmonella* spp. 검출법의 축산물에 적용

Salmonella typhimurium(5×10^9 cfu/ml) 균주를 1번부터 시작하여 10배씩 희석하여 닭고기를 세척한 BPW(buffered peptone water)에 접종한 후, 37°C에서 6-7시간 배양하고 배양액을 이용하여 EIA기법을 적용하였다. 실험결과 $10^0 - 10^1$ cfu의 균을 접종한 Sample에서도 1.0

이상의 0.D값을 나타내었다 (Fig. 14).

Salmonella typhimurium(5×10^9 cfu/ml) 균주를 1번부터 시작하여 10배씩 희석하여 분변샘플 1g을 함유한 10ml의 BPW에 접종하고 37°C에서 6-7시간 배양 후, EIA기법을 적용하였다. 실험결과 $10^0 - 10^1$ cfu의 균이 접종된 sample에서도 0.7이상의 0.D값을 나타내었다 (Fig. 15).

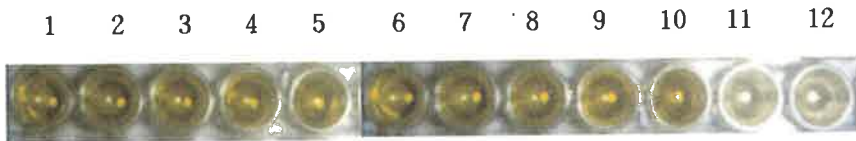


Fig. 14. EIA 기법을 이용한 *Salmonella* spp. 검출법의 닭고기에 적용
Lane 1 - 10: *S. typhimurium*(5×10^9 cfu/ml) 균주를 1번부터 시작하여 10배씩 희석, 11 and 12: negative control

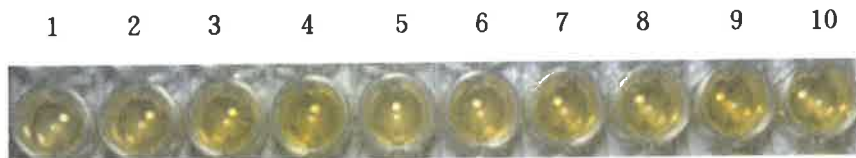


Fig. 15. EIA 기법을 이용한 *Salmonella* spp. 검출법의 분변샘플에 적용
Lane 1 - 10: *S. typhimurium*(5×10^9 cfu/ml) 균주를 1번부터 시작하여 10배씩 희석

7. 살모넬라 진단 키트의 축산샘플 적용

가. 소 분변샘플 적용

Test Results	No. of Samples
Culture Positive/ EIA Positive	2
Culture Negative/ EIA Positive	11
Culture Negative/ EIA Negative	137
Culture Positive/ EIA Negative	0
Total	150

나. 사료샘플 적용

Test Results	No. of Samples
Culture Positive/ EIA Positive	0
Culture Negative/ EIA Positive	7
Culture Negative/ EIA Negative	143
Culture Positive/ EIA Negative	0
Total	150

다. 돼지분변 적용

Test Results	No. of Samples
Culture Positive/ EIA Positive	3
Culture Negative/ EIA Positive	9
Culture Negative/ EIA Negative	136
Culture Positive/ EIA Negative	2
Total	150

라. 닭 샘플의 적용

Test Results	No. of Samples
Culture Positive/ EIA Positive	2
Culture Negative/ EIA Positive	4
Culture Negative/ EIA Negative	190
Culture Positive/ EIA Negative	4
Total	200

8. Immuno-stick을 이용한 EIA 기법의 적용

NUNC-Immuno™stick(Maxisorp-surface)을 이용하여, field나 소규모 샘플에 비교적 적용이 용이한 ELISA 기법을 조사하였다.

- Coating of paddle surface : mixed MAbs (RT, 3hrs)
- Blocking : 0.1% BSA (RT, 30min)
- Detecting Ab : HRP-conjugated purified rabbit IgG
- Color development : 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, red color)
- Wash with tap water

가. *Salmonella* spp. 검출을 위한 Immuno-stick기법의 적용

Salmonella typhimurium(5×10^8 cfu/ml) 균주를 10배씩 희석하여 닭고기를 세척한 BPW 10ml에 접종하고 37℃에서 7시간 배양 후, Immuno-stick을 적용하였다. 실험결과 10^1 - 10^2 cfu의 균을 접종한 sample에서도 양성반응을 나타내었다 (Fig. 16).

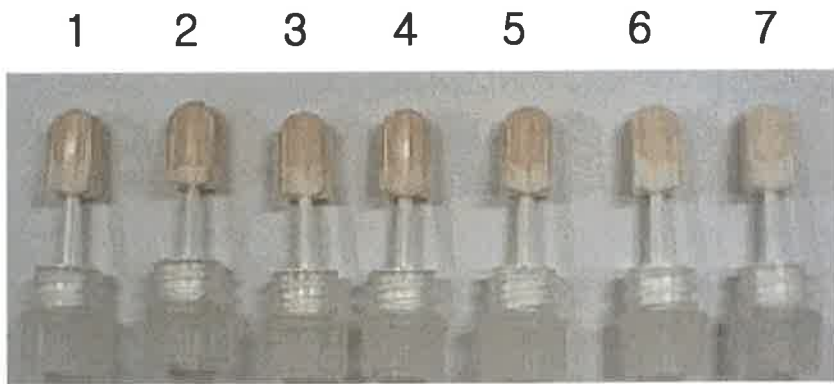


Fig. 16. 닭고기중 살모넬라균을 검출하기 위한 immuno-stick의 민감도 조사. 1 to 7: 10^7 cfu/ml to 10^1 cfu/ml

살모넬라 여러 그룹에서의 검출 가능성을 알아보기 위하여 다양한 그룹에 속하는 살모넬라를 대상으로 immuno-stick을 실시하였던 바 Fig. 17에서 보는 바와 같이 모든 살모넬라 그룹에서 강한 양성반응을 확인할 수 있었다.

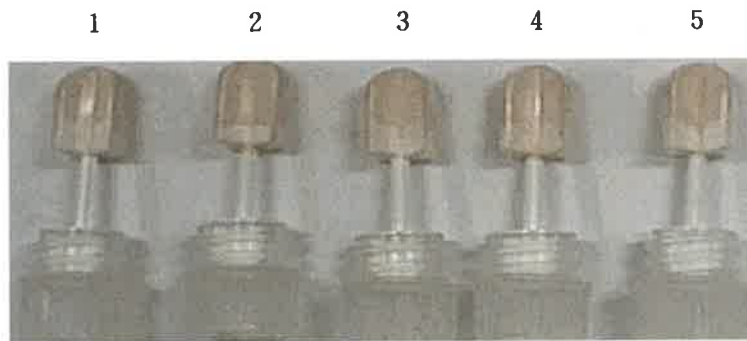


Fig. 17. *Salmonella* spp. 검출을 위한 Immuno-stick의 적용
1: *S. paratyphi* A, 2: *S. typhimurium*, 3: *S. enteritidis*, 4: *S. pullorum*, 5: *S. london*

제 5 절 dip- stick 키트 제작

Conjugate, conjugate pad 및 완충액 조건 조사하고 40 nm 골드비드를 이용한 colloidal gold solution을 제조하였다. 골드 비드의 최적활성을 위한 항체농도 설정 및 골드 콘쥬게이션 완충액의 조건 설정하였다. Immuno-bead의 최적 pH 설정하고 항체고정 매체를 조사하여 NC membrane에서의 sample pad, conjugation pad, test line 및 control line의 각각의 조합과 최적화를 위한 distance 결정하였다.

1. 증균에 따른 개발된 살모넬라 dip-stick 키트의 민감도 조사

식육 25g을 살모넬라 증균액인 selenite cystein broth 225ml과 혼합하여 균질화한 후 일야증균된 *S. enteritidis*를 인위적으로 접종하여 1번 시료(10^8 cfu/g of meat)부터 9번 시료(10^0 cfu/g of meat)까지 각각 10진 희석한 후 증균 전 후 각각 개발된 살모넬라 dip-stick 키트의 반응 민감도를 조사하였다. Fig. 18에서 보는 바와 같이 개발된 살모넬라 dip-stick 키트로 시료의 증균전에는 10^6 cfu/g of meat 까지 검출이 가능하였다. 그러나 Fig. 19.에서 나타난 바와 같이 37℃, 일야 증균후에는 10^0 cfu/g of meat까지 검출이 가능하여 본 개발된 dip-stick 키트는 식육중에 극소량의 살모넬라가 오염되어 있어도 증균과정을 통한 후 충분히 검출이 가능함을 알 수 있었다.

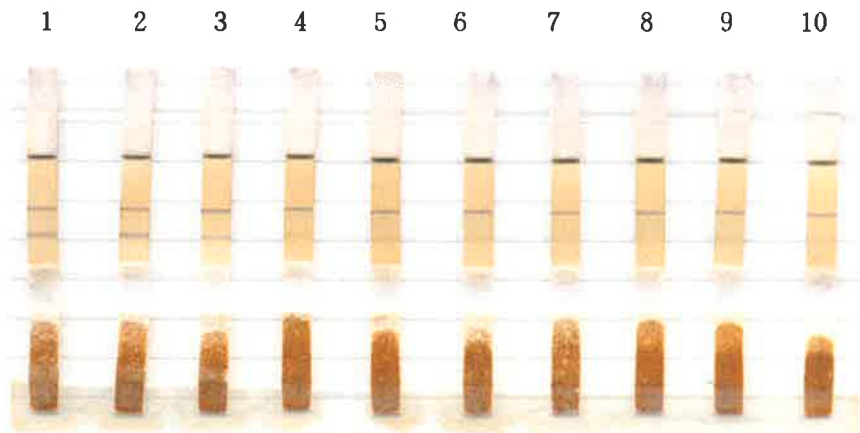


Fig. 18. 개발된 살모넬라 dip-stick키트의 증균전 민감도
 1부터 9; 10^8 cfu/g of meat부터 10^0 cfu/g of meat. 10; 살모넬라균을
 접종하지 않은 음성 대조군

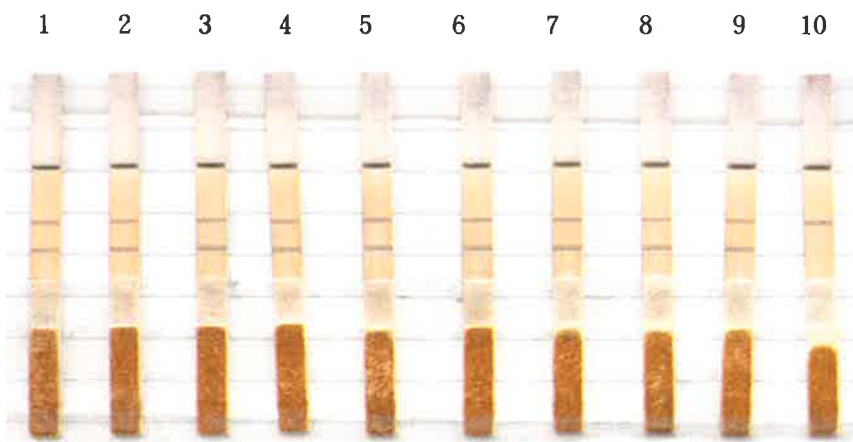


Fig. 19. 개발된 살모넬라 dip-stick키트의 증균후 민감도
 1부터 9; 10^8 cfu/g of meat부터 10^0 cfu/g of meat. 10; 살모넬라균을
 접종하지 않은 음성 대조군

2. 개발 살모넬라 dip-stick 키트의 특이성 조사

살모넬라이외의 세균들에 대해서 순수배양한 후 각각 개발된 살모넬라 dip-stick 키트에 적용하여 반응 양상을 조사하였다. Fig. 20-A 와 20-B에서 나타난 바와 같이 살모넬라이외의 균종에 대해서는 control line을 제외한 test line은 형성되지 않아 본 키트로 살모넬라를 특이적으로 검출할 수 있었다.

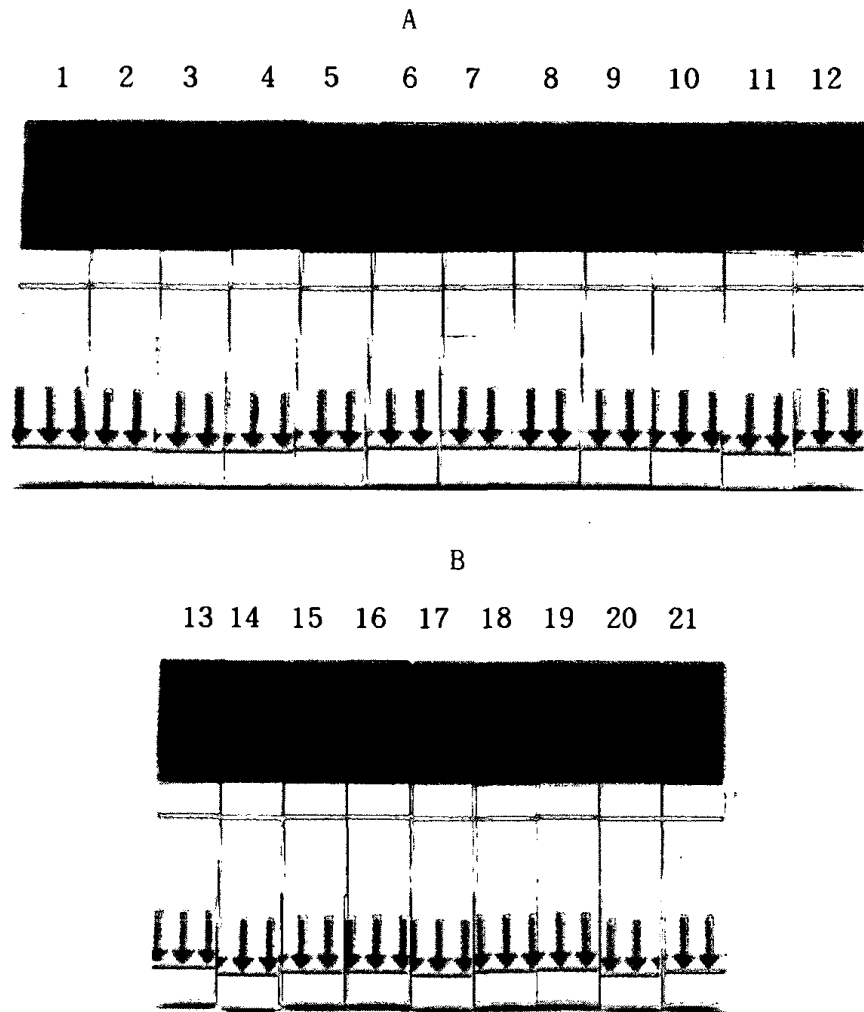


Fig. 20. 개발된 살모넬라 dip-stick 키트 특이성 조사

1: *S. enteritidis*, 2: *Str. dysgalactiae*, 3: *Str. pneumoniae*, 4: *Str. uberis*, 5: *Str. pyogenes*, 6: *E. seriolicida*, 7: *Sta. aureus*, 8: *A. pyogenes*, 9: *K. pneumoniae*, 10: *B. subtilis*, 11: *P. aeruginosa*, 12: *Rh. equi*, 13: *L. seeligeri* ATCC35967, 14: *L. monocytogenes* ATCC19115, 15: *L. monocytogenes* ATCC19117, 16: *L. murrayi* ATCC25401, 17: *L. monocytogenes* ATCC19118, 18: *L. grayi* ATCC19120, 19: *L. monocytogenes* HPB3, 20: *L. monocytogenes* HPB503, 21: *L. monocytogenes* HPB410.

3. 살모넬라속균에의 적용 가능성 조사

개발된 키트로 어느 특정한 살모넬라가 아닌 살모넬라속의 모든 균을 검출할 수 있는지를 확인하기 위하여 각각 specise가 다른 39종의 살모넬라를 적용하였던 바 Fig 21에서 나타난 바와 같이 No. 28(S. duesseldorf)에서 약한 반응을 제외하고는 대부분의 살모넬라에서 양성반응을 확인 할 수 있어 본 키트로 살모넬라속균을 검출할 수 있었다.

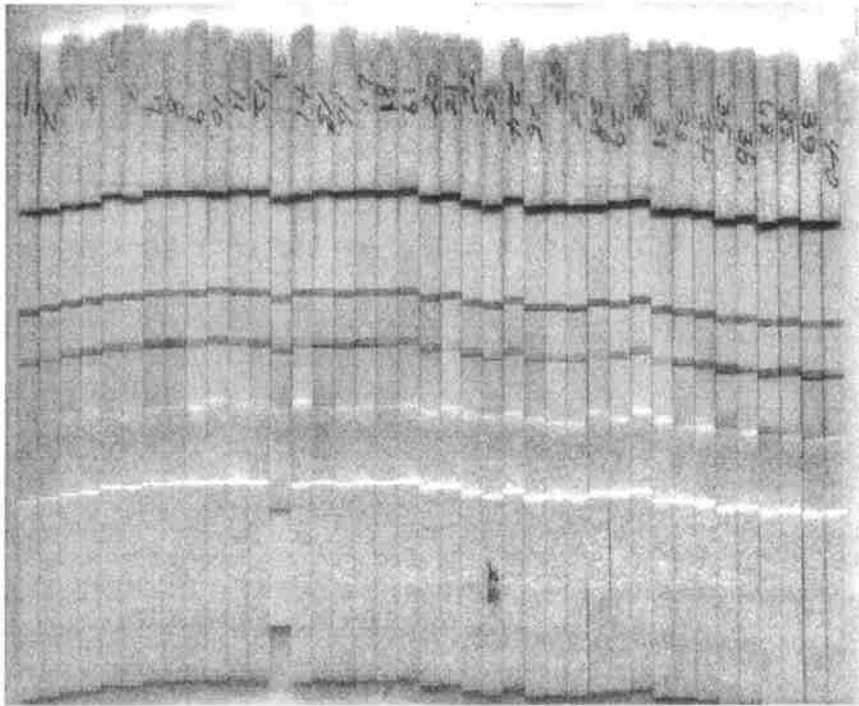


Fig. 21. 개발된 살모넬라 sip-stick을 이용한 살모넬라속균의 검출

제 5 장 참고문헌

1. Beumer RR, Giffel MC et al. 1996. Confirmation and identification of *Listeria spp.* *Lett Appl Microbiol* 22:448-452.
2. Beumer RR, Giffel MC, Cox LJ. 1997. Optimazation of haemolysis in enhanced haemolysis agar (EHA)- a selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 24:421-425.
3. Bille J. 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak, p.71-74. In A.J.Miller, J.L.Smith, and G.A. Somkuti (ed.), Foodborne listeriosis. Elsevier, Amsterdam.
4. Cantoni C, Valenti M, Comi G. 1988. *Listeria* in formaggi, salami. *Industria Alimentaria* 27:859-861.
5. Curiale MS, Lewus C. 1994. Detection of *Listeria monocytogenes* in sample containing *Listeria innocua*. *J Food Prot* 57:1048-1051.
6. Datta AR, Wentz BA, Russell J. 1990. Cloning of the listeriolysin O gene and development of specific gene probes for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 56(12):3874-3877.
7. D'Errico MM, Villari P, Grasso GM, Romano F, Angelillo IF. 1990. Isolation of *Listeria spp.* from milk and cheese. *Dairy Science Abstracts* 52(11):929.
8. Dolye MP, Schoeni JL. 1987. Comparision of procedures for isolating *Listeria monocytogenes* in soft, surface-ripened

cheese. *J Food Prot* 50(1):4-6.

9. Donnelly CW, Baigent GJ. 1986. Method of flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Appl Environ Microbiol* 52:689-695.

10. Duarte G, Vaz-Velho M, Capell C, Gibbs P. 1999. Efficiency of four secondary enrichment protocols in differentiation and isolation of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* from smoked fish processing chains. *Int J Food Microbiol* 52:163-168.

11. Duh YH, Schaffner DW. 1993. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 56(3):205-210.

12. Evanson DJ, Klatt MJ, Donlevy TP. 1991. Agar-based 24h method for presumptive identification of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 54:370-371.

13. Farber JM, Peterkin PI. 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol Rev* 55(3):476-511.

14. Farber JM, Sanders GW, Johnston MA. 1989. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *J Food Prot* 52(7):456-458.

15. Husu, JR. 1990. Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *J Vet Med Series B* 37:276.

16. Iida T, Kanzaki M, Maruyama T *et al.* 1991. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. *J Vet Med Sci* 53(5):873-5

17. In't Veld PH, Notermans SHW. 1995. Potential use of microbiological reference materials for the evaluation of detection methods for *Listeria monocytogenes* and the effect of competitors: a collaborative study. *Food Microbiol* 12:125-134.
18. Johansson T. 1998. Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. *Int J Food Microbiol* 40:77-85.
19. Jones D, Seelinger HPR. 1986. International Committee on Systemic Bacteriology - Subcommittee on the Taxonomy of *Listeria*, *Brochothrix*, and *Erysipelothrix*. *Int J Syst Bacteriol* 37:176.
20. Kerr KG, Rotowa NA *et al.* 1990. Incidence of *Listeria spp.* in precooked, chilled chicken products as determined by culture and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). *J Food Prot* 53:606-620.
21. Doyle MP. *Escherichia coli* 0157:H7 and its significance in foods. *Intern J Food Microbiol*, 12:289-302, 1991.
22. Doyle MP, Schoeni JL. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol*, 48:855-856, 1984.
23. Doyle MP, Zhao T, Meng J, *et al.* *Escherichia coli* 0157:H7. *Food Microbiology*. Washington, DC: ASM Press:171-191, 1997.
24. Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. Elsevier Science Publishing Co. 4th ed, New York, p93-136, 1986.

25. Fields PI, Blom K, Hughes HJ, *et al.* Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E coli* O157:H7 and O157:NM. *J Clin Microbiol*, 35:1066-1070, 1997.
26. Flint SH, Hartley NJ. Evaluation of the TECRA *Escherichia coli* O157 visual immunoassay for tests on dairy products. *Letters Appl Microbiol*, 21:79-82, 1995.
27. Gautam RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol*, 35:2977-2980, 1997.
28. Goering RV. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 14:595-600, 1993.
29. Gunzer F, Bohm H, Russmann H, *et al.* Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol*, 30:1807-1810, 1992.
30. Gyles CL, DeGrandis SA, Mackenzie C, *et al.* Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining verocytotoxin production in a porcine edema disease isolate of *Escherichia coli*. *Microbiol Pathol*, 5:419-426, 1988.
31. Hayes PS, Blom K, Feng P, *et al.* Isolation and characterization of β -D-glucuronidase-producing strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in the United states. *J Clin*

Microbiol, 33:3347-3348, 1995.

32. Hockin J, Lior H. Hemorrhagic colitis and hemorrhagic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Canada. *Can Dis Weekly Rep*, 13:203-204, 1987.

33. Ito H, Terai A, Kurazono H, *et al*. Cloning and nucleotide sequencing of verotoxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microbiol Pathol*, 8:47-60, 1990.

34. Izumiya H, Terajima J, Wada A, *et al*. Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 35:1675-1680, 1997.

35. Johnson WM, Pollard DR, Lior H, *et al*. Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTe) by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 28:2351-2353, 1990.

36. Johnson RP, Durham RJ, Johnson ST, *et al*. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay, EHEC-Tek. *Appl Environ Microbiol*, 61:386-388, 1995.

37. Keene WE, Hoesly FC, Williams LP, *et al*. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *New Engl J Med*, 331:579-584, 1994.

38. Keene WE, Sazie E, Kok J, *et al*. An outbreak of *Escherichia*

coli O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *J Am Med Ass*, 277:1229-1231, 1997.

39. Krieg NR. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Williams and Wilkins. Baltimore, 1984.

40. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E coli* serotypes isolated from sheep. *J Clin Microbiol*, 35:892-899, 1997.

41. Allan hogue, Reginald Johnson, and Wayne Schlosser : *Salmonella typhimurium* DT104, Situation Assessment, Food Safety and Infsection Service, 1997.

42. Ann M. Roering, John B. Luchansky, Anne M. Ihnot, Susan E. Ansay, Charles W. Kaspar, Steven C. Ingham : Comparative survival of *Salmonella typhimurium* DT104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. *Int. J. Food Microbiol.*, 46:263-269, 1999.

43. Anne M. Ihnot, Ann M. Roering, Rachel K. Wierzba, Nancy G. Faith, and John B. Lunchansky : Behavior of *Salmonella typhimurium* DT104 during the manufacture and storage of pepperoni. *Int. J. Food Microbiol.*, 40:117-121, 1998.

44. Baay, M. F. D. and J. H. J. Huis : Alternative antigens reduce cross-reactions in an ELISA for the detection of *Salmonella enteritidis* in poultry, 74:243-247, 1993.

45. Barrow, P. and others : Detection of *Salmonella* infection by ELISA, The veterinary record, short communications, december 2, p586, 1989.

46. Barry H. Pyle, Susan C. Broadaway, and Gordon A. McFeters :

A rapid, direct method for enumerating respiring Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:2614-2619, 1995.

47. Carlson, S. A., L. F. Bolton, C. E. Briggs, H. S. Hurd, V. K. Sharma, P. J. Fedorka-Cray, and B. D. Jones : Detection of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 using multiplex and fluorogenic PCR, *Molecular and Cellular Probes*, 13:213-222, 1999.

48. Casin I., Breuil J., Brisabois A, Moury F., Grimont F., and Collatz E : Multidrug-resistant human and animal *Salmonella typhimurium* isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and integron-encoded beta-lactamase PSE-1, *J. Infect. Dis.*, 179(5):1173-1182, 1999.

49. Chao-Ming Tsai and Carl E. Frasch : A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide Gels, *Analytical Biochemistry*, 119:115-119, 1982.

50. Christian huet : Production of Polyclonal Antibodies in Rabbits, *Cell biology, a laboratory handbook*, 2nd ed., vol. 2, 1998.

51. Christina A. Cherrington and J. H. J. Huis : Development of a 24h screen to detect viable salmonellas in feces, *J. Appl. Bacteriol.*, 75:58-64, 1993.

52. Choi, D., R. S. W. Tsang, and M. H. Ng : Sandwich capture ELISA by a murine monoclonal antibody against a genus-specific LPS epitope for the detection of different common serotypes of salmonellas, *J. Appl. Bacteriol.*, 72:134-138, 1992.

53. Dagmar Jurgens and Franz-J. Fehrenbach : Identification of *Legionella* species by lipopolysaccharide antigen pattern, *J. Clinical Microbiol.*, 35(12)3054-3057, 1997.

54. Edwards and Ewing : Identification of enterobacteriaceae, Elsevier, 4th ed., chapter 9, 10, 11, 1986.

55. Evans S. J., A case control study of multiple resistant *Salmonella typhimurium* DT104 infection of cattle in Great Britain, Cattle Practice, British Cattle Veterinary Association. 4, no. part3, 1997.
56. Fred G. van Zijderveld, Ank M. van Zijderveld-van Bommel, and Julius Anakotta : Comparison of four different Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in experimentally infected chickens, *J. Clinical Microbiol.*, 30:2560-2566, 1992.
57. George F. Ibrahim, Graham H. Fleet, Mary J. Lyons, and Reta A. Walker : Method for the isolation of highly purified *Salmonella* Flagellins, *J. Clinical Microbiol.*, 22(6):1040-1044, 1985.
58. Gosek G., Leschinsky D, and Irons S : Multidrug-resistant *Salmonella* serotype United States, *MMWR*, 46:308-310, 1996.
59. Hassan, J. O., P. A. Barrow, A. P. A. Mockett, S. Mcleod : Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA, *Vet. Rec.*, 126:519-522, 1990.
60. Hideaki Yokoyama, Kouji Umeda, Robert C. Peralta, Tomomi Hashi, Faustino C. Icatlo Jr, Masahiko Kuroki, Yutaka Ikemori and Yoshikatsu Kodama : Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium*, *Vaccine*, 16(4):388-393, 1998.