

# 直接螢光抗體法에 의한 畜産食品中の Salmonella 菌 檢出에 관한 實驗的 研究

全 茂 炯 車 演 浩

鄭 吉 澤

農村振興廳 家畜衛生研究所

서울大學校 農科大學 獸醫學科

## 緒 論

Salmonella 菌은 食中毒을 일으키게 하는 중요한 細菌이며 Salmonella 菌에 오염된 畜産食品에 의한 食中毒은 공중위생학적으로 매우 중요한 문제로 제시되고 있다<sup>29)</sup>.

Salmonella 菌의 검출은 일반적으로 人工培地에서의 培養法을 이용해 왔으나, 최근 畜産食品이 다양화됨에 따라 인해서 보다 신속하고 신빙도가 높은 細菌檢出方法이 요구되고 있다. 이에 따라서 畜産食品이나 動物飼料중에 오염된 Salmonella 菌을 신속히 검출해 내는 방법으로 螢光抗體法이 응용되고 있다.

螢光抗體法은 1941년에 Coons 등<sup>5,6)</sup>에 의하여 개발된 후 疾病診斷에 응용되어 왔다. Salmonella 菌檢出에 있어서 螢光抗體法의 응용은 1957년에 Thomason 등<sup>3,27)</sup>이 Salmonella typhi의 항원분석을 螢光抗體法과 凝集反應을 병행 실시한 바 그 결과가 일치됨을 보고한 이후 乳製品<sup>20,21)</sup>, 卵製品<sup>10,14)</sup>, 動物飼料<sup>1,15,18)</sup>, 肉製品과 畜産副産物<sup>8,15,25)</sup> 및 一般製品<sup>8,10,16,22,23)</sup> 등에 존재하는 Salmonella 菌을 검출하기 위한 螢光抗體法의 연구는 매우 활발히 진행되었다. 또한 螢光抗體法과 細菌培養法에 대한 細菌檢出比較試驗에서도 그 일치율이 매우 높은 것으로 보고되었다.<sup>10,15,18,22,23,25,28)</sup>

微生物檢出에서 螢光抗體法을 이용하는 가장 큰 목적은 신속성에 있다. 細菌培養法을 이용하여 畜産食品중에 존재하는 Salmonella 菌을 검출하는 데에는 최소한 4일이 소요되나,<sup>17)</sup> 螢光抗體法을 이용했을 때는 그렇지 않다. 즉 Georgala 및 Boothroyd<sup>11)</sup>는 食肉중에 존재하는 細菌을 18시간내에 검출할 수 있었다고 보고하였고 Haglund 등<sup>14)</sup>과 Reamer 등<sup>20)</sup>은 脫脂肪乳 및 乾燥鷄卵중에 존재하는 Salmonella 菌을 검출하는데 24시간이 소요된다고 보고하였다.

이와같이 Salmonella 菌 檢에 응용되는 螢光抗體法은 細菌培養法과의 細菌檢出率이 매우 일치하며 또한

신속히 菌體를 檢出해 낼 수 있는 유리한 점이 있기 때문에 이용가치가 높은 검출법으로 알려져 있다.

이 연구에서는 Salmonella paratyphi A, Salmonella paratyphi B 및 Salmonella thompson을 계란, 소세지 및 닭고기에 실험적으로 접종하고 접종된 細菌量에 따른 螢光抗體法과 細菌培養法과의 細菌檢出率을 비교시험하였고, 또한 增菌培地로서 Tetrathionate broth를 사용하여 螢光抗體法으로 세균검출을 실시할 때 培養時間에 따른 效果를 연구 검토하였다.

## 材料 및 方法

**供試細菌** : 실험에 사용한 Salmonella 菌은 프랑스의 Pasteur 연구소에서 분양 받아 가축위생연구소에서 繼代保管중인 Salmonella paratyphi A, Salmonella paratyphi B 및 Salmonella thompson을 선정하였다. 이밖에 다섯株의 Escherichia coli(055, 086, 0111, 0126, 0134)를 비롯하여 Sh. dysenteriae, Sh. flexineri, Sh. boydii, Sh. ssonnei, B. cereus, B. subtilis, L. arabinosus, L. leichmanii, Staph. aureus, Staph. albls, Staph. Epidermidis 및 Str. agalactiae를 가축위생연구소와 국립보건연구원에서 분양받아 실험에 사용하였다.

**免疫源** : Sal. paratyphi A, Sal. paratyphi B 및 Sal. thompson을 Edwards 및 Ewing<sup>7)</sup>의 방법에 따라 寒天平板培養하여 S型 集落을 선정하고 이것을 nutrient agar에 polypeptone 0.3%를 가한 大量培養用培地에 심고 37°C에서 24시간 배양하고 생리식염수로 集菌한 후 H 免疫原을 불활화시키기 위하여 100°C 水槽에서 2시간 가열처리하였다. 이것을 생리식염수로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 난 후 沈澱菌體를 無水 ethanol에 부유시키고 37°C 水槽에서 4시간 처리하였다. 이것을 다시 3,000 rpm에서 20분간 원심후 acetone으로 2회 세척했다. 마지막 원심후에 상청액을 버리고 沈澱菌體를 37°C 부란기에 넣고 건조시켰다. 免疫原의 최종농도는 最高吸收波長 525 nm에서 OD가 1.7이 되

도록 菌塊를 1 : 10,000농도의 머치오레이트 생리식염수에 부유시켜 만들었다.

**免疫血清** : 2주간의 관찰기간 동안 임상적조건을 보이지 않는 체중 약 2.5 kg의 건강한 白色家兔 9마리를 사용하였다. 이것을 공시된 Salmonella 菌당 3마리로 구성되도록 실험구를 설정하였다. 免疫原의 접종은 0.5 ml, 1 ml, 2 ml, 4 ml씩 각각 4일 간격으로 공시동물의 耳靜脈에 주사하였다. 최종 접종후 4일 후에 약 1 ml의 혈액을 部分採血하여 凝集反應으로 血清의 力抗體力價를 확인한후 7일째 全採血하여 혈청을 분리하였다.<sup>7, 28, 30</sup>.

**家兔免疫  $\gamma$ -Globulin** : Kawamura<sup>17)</sup> 및 安田 등<sup>30)</sup>의 방법에 따라 免疫血清 30 ml에 pH 7.0인 0.005 M 磷酸緩衝食鹽水 (0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2용량에 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1용량을 합한 것을 증류수로 20배 희석후 0.1 M NaCl을 가해서 만들었고 이하 0.005 M PBS라 한다) 30 ml를 가하고 2~4°C 냉실에서 磁石攪拌器로 교반하면서 飽和유산암모니아 60 ml를 가하여 충분히 혼합한 후 고속냉동원심분리기를 사용, 9,000 rpm에서 15분간 원심침전시킨 후 상층액을 제거하고 0.005 M PBS 30 ml를 가하면서 다시 교반혼합하였다. 이와같은 조작을 3회 반복 실시한후 최종 沈澱蛋白質에 약 3배가 되도록 0.005 M PBS를 가하여 용해시킨 후 암모니아와 황산염을 제거하기 위해서 0.005 M PBS에서 cellophane tube를 사용하여 투석하였고 염화바륨용액 ( $\text{BaCl}_2$  12 g, 증류수 100 ml)으로 음성이 될 때까지 계속하였다. 이렇게 해서 얻은 globulin의 단백질측정은 蛋白屈折計를 사용하였다. 단백질은 *Sal. paratyphi A*: 21 mg/ml, *Sal. paratyphi B*: 23 mg/ml, 그리고 *Sal. thompson*에서는 27 mg/ml가 얻어졌다. 免疫  $\gamma$ -globulin의 성장을 검사하기 위하여 면역전기영동을 실시하였으며  $\gamma$ -globulin 이외의 陰性荷電蛋白質成分이 없음을 확인하였다.

**螢光標識抗體** : 螢光標識抗體를 만들기 위하여 우선 Kawamura<sup>17)</sup>의 방법에 의하여 0.000 M PBS의 랑, FITC (fluorescein isothiocyanate, N.B. Co. U.S.A.)의 랑 및 0.5 M carbonate-bicarbonate 緩衝液 (0.5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 용액 1용량에 0.5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 용액 3용량을 혼합, pH 9.5, 이하 0.5 M C-B buffer)의 랑을 결정하였다. 免疫  $\gamma$ -globulin을 7~9°C에서 磁石攪拌器를 이용하여 서서히 교반하면서 적당량의 0.005 M PBS를 가하고, 냉실에서 총단백량의 1 : 100비율로 FITC를 0.5 M C-B buffer에 용해시켜, 교반중인 단백질용액에 서서히 가하여 6시간 동안 결합시켰다. 다음 遊離色素를 제거

하기 위해서 sephadex G-25 column으로 여과하였으며, 遊離非特異蛋白質을 제거하기 위하여 Goldman<sup>13)</sup>의 방법에 따라 DEAE cellulose column으로 여과 및 정제했으며, 이때 分割 I, II, III중에 分割 I과 II를 혼합하여 Seitz 여과기로 여과한 후 cellophane tube에 넣고 飽和 polyethylene glycol (20,000) 용액 (Fisher Scientific Co. U.S.A.)중에서 4시간 동안 磁石攪拌器로 교반하면서  $\frac{1}{3}$ 로 농축하였다<sup>12)</sup>. 이것을 시험관응집반응에 의해 응집역가를 조사하고 螢光染色價를 측정한다. 다음 0.5 ml씩 초자병에 분주하여 -20°C 냉장고에 보존하였고 실험에서는 4單位の 抗體價를 함유하도록 pH 7.0인 0.005 M PBS로 희석하여 사용하였다.

**螢光抗體染色** : Kawamura<sup>17)</sup> 및 安田 등<sup>30)</sup>의 直接法을 이용하였으며 可檢材料를 slide glass에 도말한 후 風乾하고 acetone중에서 5분간 고정한후 다시 風乾후 螢光標識抗體 0.05 ml를 가하고 물에 적신 여과지를 plastic chamber에 넣었다. 이것을 38°C 부탄기에서 45분간 염색시켰다. 그리고 pH 7.0인 0.005 M PBS를 3~4회 갈아주면서 20분간 진탕세척한 다음 다시 風乾하고 pH 8.5인 glycerol 緩衝液 (0.5 M C-B buffer 1용량에 glycerin 9용량을 혼합한 것)을 놓고 cover glass를 덮은 다음 경검하였다.

**계란 可檢物** : Salmonella 屬菌에 감염되지 않은 鷄群에서 생산된 신선한 계란의 노른자와 흰자를 잘 혼합시킨 50 ml를 0.005 M PBS 1 ml에 부유시킨 일정량의 細菌數와 초자구를 가한 후 2~4°C 냉실에서 震盪機 (300회/분)로 1시간 진탕 혼합하였다. 이것을 4°C에 보존하고 24시간내에 실험에 사용했다.

**소세지 및 닭고기 可檢物** : Salmonella 屬菌에 오염되지 않은 신선한 소세지(오리온 햄소세지, Let 6007) 및 닭고기 50 g을 2~4°C 냉실에서 무균적으로 칼로 잘게 썰고 5 ml의 0.005 M PBS와 1 ml에 부유된 일정량의 세균수를 넣고 초자약질구로 약 30분간 충분히 혼합시킨 후 4°C에 보존하고 24시간 내에 공시하였다<sup>19, 24)</sup>.

**培養方法** : 가검체로 5 g(ml)을 增菌培地 tetrathionate broth (Difco) 30 ml에 넣고 37°C에서 24시간 증균시킨 배양액 약 0.03 ml를 螢光抗體法에 사용하였다. 한편 이 細菌을 同定하기 위해서 Edwards 및 Ewing<sup>7)</sup>와 Thomason 등<sup>28)</sup>의 방법에 따라 선택배지로 brilliant green agar (Difco)를 사용하였다. 배양은 37°C에서 24시간 하였고 Salmonella 균으로 의심나는 集落을 따서 triple sugar iron agar (Difco)에 이식하여 확인하였다. 필요에 따라서는 血清學的 檢査와 더 많은 生化學的 檢査를 실시하였다.

螢光顯微鏡 및 寫眞 : 실험에 사용한 螢光顯微鏡은 Olympus fluorescence microscope (Model FLM)이며, 光源은 type USH-202 A super press mercury burner 200 W (Ushio Electric Inc.)였다.

필타는 BV exciter filters (50 mm diam×2 mm) system 을 사용하였다. 염색한 표본은 가능한 한 염색 당일에 경검하였다.

螢光抗原抗體結合物의 判定基準 : 螢光抗體顯微鏡의 1,000배 배율로 표본 20視野를 경검했을때 특이형광을 발하는 세균체를 인정할 수 있으면 陽性, 전혀 인정할 수 없는 것을 陰性으로 하였다. 陽性例는 螢光의 강도에 따라서 卍, 卍, +, 소의 4단계로 하여 판정하였다.

### 結 果

免疫血清과 螢光標識抗體의 凝集力價 비교 : 精製하기전의 家兔免疫血清과 螢光標識을 한 globulin 을 시험관응집반응으로 응집역가를 測定하였던 바 고 성적은 表 1과 같았다. 즉 同種抗原에 대한 免疫血清의 응집가는 *Sal. paratyphi A* 에서 3,200배, *Sal. paratyphi B* 및 *Sal. thompson* 에서 6,400배의 역가를 나타냈고, *Sal. paratyphi A* 와 *Sal. paratyphi B* 간에는 200~400배의 交叉凝集反應이 나타났다. 螢光標識抗體의 同種抗原에 대한 응집가는 *Sal. paratyphi A* 에서 160배, *Sal. paratyphi B* 에서 320배, *Sal. thompson* 에서 640배로 免疫血清보다 역가하락이 있었다.

螢光抗體의 染色價 測定 : 제조된 3種의 螢光抗體에 대한 최고 染色價를 구하기 위해서 螢光抗體를 0.005M PBS 로 2배 連續稀釋하고 nutrient broth 에서 24시간 배양한 세균액을 抗原으로 하여 染色價를 측정하였던

Table 1. Comparison of Agglutinin Titers before and after Labelling of Fluorescein Isothiocyanate on Samonella Immunized Rabbit Sera

Antisera	Antigens		
	<i>Sal. paratyphia A</i>	<i>Sal. paratyphi B</i>	<i>Sal. thompson</i>
<i>Sal. paratyphi A</i>	3,200* (160)**	400 (10)	0 (0)
<i>Sal. paratyphi B</i>	200 (10)	6,400 (320)	10 (0)
<i>Sal. thompson</i>	10 (0)	100 (10)	6,400 (640)

\* Agglutinin titer measured by tube test without fluorescein labelled

\*\* Agglutinin titer of fluorescein labelled antisera by tube test.

Table 3. Staining Specificity of Fluorescein Labelled Antisera

Organisms	Fluorescein Labelled Antisera		
	<i>Sal. paratyphi A</i>	<i>Sal. paratyphi B</i>	<i>Sal. thompson</i>
<i>Sal. paratyphi A</i>	卍	-	-
<i>Sal. paratyphi B</i>	-	卍	-
<i>Sal. thompson</i>	-	-	卍
<i>E. coli</i>	-	--~±	--~±
<i>Shigella spp.</i>	-	-	-
<i>Bacillus spp.</i>	-	-	-
<i>Lactobacillus spp.</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus spp.</i>	-	-	-
<i>Streptococcus</i>	-	-	-

바 表 2와 같은 성적을 얻었다. 즉 *Sal. paratyphi A* 螢光抗體는 同種抗原에 대해서 32배, *Sal. paratyphi*

Table 2. Fluorescent Antibody Titers of Three Salmonella Organisms in Homologous and Heterologous Systems

Fluorescein Labelled Antisera	Antigen	Fluorescent Antiserum Dilution						
		2	4	8	16	32	64	128
<i>Sal. paratyphi A</i>	<i>Sal. paratyphi A</i>	卍	卍	卍	卍	+	-	-
	<i>Sal. paratyphi B</i>	+	--	-	-	-	-	-
	<i>Sal. thompson</i>	-	--	-	-	-	-	-
<i>Sal. paratyphi B</i>	<i>Sal. paratyphi A</i>	+	±	-	-	-	-	-
	<i>Sal. paratyphi B</i>	卍	卍	卍	卍	+	+	-
	<i>Sal. thompson</i>	±	--	-	-	-	-	-
<i>Sal. thompson</i>	<i>Sal. paratyphi A</i>	-	--	-	-	-	-	-
	<i>Sal. paratyphi B</i>	±	--	-	-	-	-	-
	<i>Sal. thompson</i>	卍	卍	卍	卍	卍	+	-

B 및 *Sal. thompson* 螢光抗體는 64배의 染色價를 나타냈다. 3種의 螢光抗體가 모두 同種抗原에 대해서는 특이하게 染色價가 높았으며 異種抗原 間에는 2배 이하에서 交叉反應을 보였다.

**螢光抗體의 特異性**: 제조된 螢光抗體의 특이성을 검사하기 위해서 表 3에서와 같이 3種의 *Salmonella* 菌과 對照菌種으로 *Escherichia coli* 와 *Shigella* 菌에 대한 交叉反應의 유무를 조사하였다. 그밖에 그람양성구균 및 그람양성간균에 대해서도 조사하였던 바, *Salmonella* 菌 間에는 顯저한 특이성이 있었다. *Sal. paratyphi A* 및 *Sal. thompson* 螢光抗體는 *E. coli* 에 대해서 미약한 交叉反應이 있었으나 *Salmonella* 菌과는 螢光強度에서

顯저한 차이를 인정할 수 있었다. 그밖에 對照菌으로 사용된 4種의 *Shigella* 菌, 2種의 *Bacillus* 菌, 2種의 *Lactobacillus* 菌, 3種의 *Staphylococcus* 菌 및 *Streptococcus* 菌과는 전혀 交叉反應이 인정되지 않았다.

**接種菌量에 따른 *Salmonella* 菌 檢出비교**: 可檢材料를 직접 slide glass 에 도말하여 螢光抗體法으로 세균검출을 시도한 直接塗抹螢光抗體法과 增菌培養塗抹螢光抗體法으로 細菌培養法과의 세균검출을 비교했다. 계란, 소세지 및 닭고기 50 g(ml)에 약  $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^3$  및  $5 \times 10^4$ 의 *Sal. paratyphi A* 와 *Sal. thompson* 을 접종하고 同種螢光抗體로 세균검출 실험을 하고 동시에 細菌培養法으로 細菌檢출을 실시한 바 表 4와 같

Table 4. Detection of Salmonellae by Fluorescent Antibody Technique and Culture Method from Specimens Inoculated with Various Quantities of *Sal. paratyphi A* and *Sal. thompson*

Specimens	Organisms	Size of Inoculum (approximate)	FAT								Culture Method			
			Direct Smear				Enriched & Smear				Trial Number			
			Trial Number				Trial Number							
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Egg	<i>Sal. paratyphi A</i>	$5 \times 10^1$	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
		$5 \times 10^2$	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		$5 \times 10^3$	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		$5 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Sal. thompson</i>	$5 \times 10^1$	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
		$5 \times 10^2$	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		$5 \times 10^3$	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		$5 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sausage	<i>Sal. paratyphi A</i>	$5 \times 10^1$	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
		$5 \times 10^2$	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
		$5 \times 10^3$	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		$5 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Sal. thompson</i>	$5 \times 10^1$	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
		$5 \times 10^2$	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		$5 \times 10^3$	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		$5 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chicken	<i>Sal. paratyphi A</i>	$5 \times 10^1$	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
		$5 \times 10^2$	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		$5 \times 10^3$	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		$5 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	<i>Sal. thompson</i>	$5 \times 10^1$	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
		$5 \times 10^2$	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
		$5 \times 10^3$	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		$5 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

은 결과를 얻었다. 즉 增菌培養塗抹螢光體法과 細菌培養法에서 세균검출을 계란, 소세지 및 닭고기 可檢材料에서 집중된 균량에 관계없이 거의 일치하였으며, 直接塗抹螢光抗體法은  $5 \times 10^4$ 이상의 균량이 집중된 可檢材料에서는 增菌培養塗抹螢光抗體法 및 細菌培養法과 세균검출이 일치하였으나  $5 \times 10^3$ 의 균량이 존재하는 可檢材料에서는 增菌培養塗抹螢光抗體法과 細菌培養法에 비하여 검출율이 매우 떨어졌다.  $5 \times 10^2$ 이하의 균량이 존재하는 可檢材料에서는 거의 검출되지 않았다. 또한 螢光抗體法 및 細菌培養法에서 계란재료의 경우 세균검출이 가장 잘 되었고, 소세지 재료에서는 검출이 잘되지 않는 경향이 있었다.

위의 실험성적을 보고 계란, 소세지 및 닭고기 可檢材料에서 얻어진 성적을 이용하여 可檢材料에 집중된 두 菌種 별로 細菌檢出 結果를 정리한 바, 表 5와 같은 결과를 얻었다. 즉 直接塗抹螢光抗體法의 경우  $5 \times 10^2$ 의 균량이 존재하는 가검재료에서 *Sal. paratyphi*

A는 전혀 검출되지 않고 *Sal. thompson*은 8.8% 검출됐다. 또한 增菌培養塗抹螢光抗體法 및 細菌培養에서도 *Sal. thomson*이 *Sal. paratyphi* A보다 검출율이 높은 경향이 있었다.

**螢光抗體法에 의한 細菌檢出에서 增菌培養時間이 미치는 영향:** 增菌培養塗抹螢光抗體法에 의한 *Salmonella* 菌 검출에서 tetrathionate broth에서의 增菌培養時間에 따른 檢出效果를 측정하였다. 즉 50g(ml)의 계란, 소세지 및 닭고기에 약  $5 \times 10^3$ 의 3개 *Salmonella* 菌種이 집중된 可檢材料 5g(ml)을 tetrathionate broth 30 ml에 넣고 37°C에서 배양하면서 1, 5, 8, 11 및 13시간 별로 同種螢光抗體를 이용하여 細菌檢出率을 시험했다. 그 결과 表 6에서와 같이 培養開始後 1시간에는 모든 가검재료에서 전혀 검출되지 않았다. 5시간에는 *Sal. paratyphi* A가 집중된 가검물에서 40~80%, *Sal. paratyphi* B가 집중된 가검물에서 40~100%, *Sal. thompson*의 경우는 80~100%가 검출됐다. 배양개시 후 8시간에는 *Sal. paratyphi* A가 접정된 가검물에서는 80~100%, *Sal. paratyphi* B가 집중된 검물에서는 86.7~100%, *Sal. thompson*이 집중된 가검물에서는 93.3~100%가 검출됐다. 배양개시 후 11시간에는 모든 가검물에서 100% 검출됐다.

**Table 5.** Comparison of *Salmonella* Detection Rates by Direct Smear FAT, Enriched-smear FAT and Culture Method

Organisms	Size of Inoculum (approximate)	FAT		Culture Method
		Direct Smear	Enriched & Smear	
<i>Sal. paratyphi</i> A	$5 \times 10^1$	0	50	58.3
	$5 \times 10^2$	0	91.7	83.3
	$5 \times 10^3$	33.3	100	100
	$5 \times 10^4$	100	100	100
<i>Sal. thompson</i>	$5 \times 10^1$	0	66.7	66.7
	$5 \times 10^2$	8.3	100	41.7
	$5 \times 10^3$	41.7	100	100
	$5 \times 10^4$	100	100	100

## 考 察

*Salmonella* 菌 檢出에 일반적으로 사용되고 있는 細菌培養法은 정확성은 있으나 檢出所要期間이 4일 내지 5일이나 걸려서 신속하게 많은 양의 가검재료를 시험하기에는 부적합하다. 그러나 螢光抗體法을 이용하면 다소의 交叉反應은 있으나 짧은 시간내에 菌體를 검출할 수 있는 유리한 점을 가지고 있어서 *Salmonella* 菌 검출에 螢光抗體法을 응용하려는 연구는 부단히 계속

**Table 6.** Effect of Enrichment Time in Tetrathionate Broth on Detection of *Salmonellae* in Various Specimens by Fluorescent Antibody Technique\*

Enrichment Time (hours)	Number of Specimens Tested	Detection Rate (%)								
		<i>Sal. paratyphi</i> A			<i>Sal. paratyphi</i> B			<i>Sal. thompson</i>		
		Egg	Sausage	Chicken	Egg	Sausage	Chicken	Egg	Sausage	Chicken
1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	10	80	40	40	100	40	80	100	80	80
8	15	100	80	86.7	93.3	100	93.3	100	93.3	100
11	15	100	100	100	100	100	100	100	100	100
13	15	100	100	100	100	100	100	100	100	100

\* Tetrathionate broth was inoculated with approximately 500 organism.

되어 왔다. 細菌培養法과 螢光抗體法과의 비교에서 細菌檢出率은 Laramore 등<sup>18)</sup>, Geopfert 등<sup>10)</sup>, Thomason 등<sup>26, 28)</sup> 및 Smyser 등<sup>25)</sup>에 의해 매우 일치한다고 보고됐고, Silliker 등<sup>23)</sup>은 液狀鵝囊腫에 존재하는 Salmonella 菌의 검출에는 細菌培養法보다 螢光抗體法이 더욱 검출율이 높았다고 보고했으며, Harrington 등<sup>15)</sup>은 動物飼料 및 豚肉중에 존재하는 菌體檢出에서 두 방법을 비교한 바 螢光抗體法이 더욱 신속하고 신빙성이 높았다고 보고했다.

그와같은 결과는 이 실험중 表 4와 5에서 일정량의 細菌을 접종한 계란, 소세지 및 닭고기를 增菌培養塗抹螢光抗體法과 細菌培養法으로 細菌檢出率을 비교 시험하여 얻어진 결과와 일치하였다. 그리고 塗抹螢光抗體法으로 균체검출을 시도해 본 결과  $5 \times 10^4$  이상의 균량이 존재하는 가검재료에서는 細菌培養法과 성격이 일치된 것으로 보아 심하게 오염된 가검물의 경우는 直接塗抹螢光抗體法을 응용하므로써 검출시간을 크게 단축시킬 수 있다. 또한 表 4에서의 增菌培養塗抹螢光抗體法 및 細菌培養法에서 계란의 경우 가장 검출이 잘됐고, 소세지에서는 검출이 잘되지 않은 것은 소세지중에 防腐劑로써 sorbic acid 약 0.1%, nitroflurylacrylamide (AF<sub>2</sub>) 0.002% 이하가 들어 있고 發色劑로써 亞硝酸鹽類가 0.01%이하 들었으며 그밖에 포함되어 있는 添加色素 등에 의해 細菌發育이 억제당하였기 때문이라 思料된다.

Salmonella 菌 검출에 사용되는 證균배지로는 selenite broth, tetrathionate broth, Gram-negative broth 및 lactose broth 등이 사용되어지고 있으며 미국농림성<sup>1)</sup>에서는 Salmonella 螢光抗體用 證균배지로써 Gram-negative broth의 사용을 추천했으며 많은 학자들<sup>15, 25)</sup>이 이것을 證균배지로 사용하였으며, 일부 학자들<sup>4, 18, 19, 23)</sup>은 tetrathionate broth를 證균배지로 사용하였다. 그러나 Smyser 등<sup>25)</sup>은 證균배지로써 Gram-negative broth, selenite brilliant-green sulfapyridine 및 tetrathionate brilliant-green을 사용하여 螢光抗體法으로 細菌檢出比較試驗을 했을때 차이가 인정되지 않았다고 보고했다. Chung (1969)<sup>4)</sup>은 細菌培養法으로 돼지의 腸間膜淋巴線에서 Salmonella 菌을 검출할때 證균배지로써 tetrathionate broth가 selenite broth보다 세균검출율이 높았다고 보고한 바도 있었다. 이 실험에서는 Tetrathionate broth (Difco)를 證균배지로 이용하여 계란, 소세지 및 닭고기 가검재료에 대해서 螢光抗體法으로 培養時間에 따른 細菌檢出初果를 실험한 결과 3종의 Salmonella 균으로 제조된 螢光抗體가 모두 11시

간내에 100% 검출할 수 있었다. 이는 螢光抗本標本作成時間 약 3시간을 더해서 14시간 만에 螢光抗體法에 의한 Salmonella 菌 검출이 가능해진다는 암시가 될 수 있다. Georgala 및 Boothroyd<sup>11)</sup>는 食肉중에 존재하는 균체검출에 18시간이 소요되었다. 또한 Reamer 등<sup>20)</sup>은 탈지분유중에 있는 균체검출에는 24시간이 소요되었으며 Haglund 등<sup>14)</sup>은 건조계란중에 존재하는 균체를 24시간 내에 검출할 수 있었다고 하였는데 이상과 같은 성적은 본실험 성적과 유사한 것으로 思料된다.

螢光抗體의 염색과정중 slide glass에 도말된 가검물의 고정 및 세척과정은 매우 중요하며 安田<sup>30)</sup>는 고정액으로서 10% formalin, 無水 ethanol, 無水 methanol, acetone의 10여종을 소개하였다. 미국농림성<sup>1)</sup>에서는 ethanol-chloroform-formalin (60 : 30 : 10) 혼합액에 3분간 고정하는 방법을 추천하였다. 일부 학자들<sup>3, 21, 20, 28)</sup>은 이 고정방법을 이용하였으며, 그밖에 無水 Ethanol<sup>28)</sup>, formalin<sup>18, 22)</sup>, methanol<sup>9)</sup> 및 acetone<sup>17, 30)</sup>을 사용한 학자들도 있다. 이 실험에서는 無水 ethanol, 10% formalin 및 acetone으로 고정하여 예비적으로 螢光抗體染色을 실시해본 바 acetone이 slide glass에 도말된 가검물을 잘 고정시켜 주고 非特異的 要因을 잘 제거해 주는것 같아 acetone 고정법을 이용하였다.

실험에 사용된 가검재료의 調製는 주로 Smyser 등<sup>24)</sup> 및 Liu 등<sup>19)</sup>의 방법을 참고하였으며 계란의 경우는 液狀材料이므로 일정량의 세균을 균등히 접종하는데 어려운 점이 없었다. 그러나 고품질인 소세지와 닭고기의 경우에는 세균을 균등히 접종하는데 어려운 점이 많아서 세심한 주의를 기울여야 했다. 많은 학자들<sup>3, 10, 18, 28)</sup>은 Salmonella 菌 螢光抗體의 사용상의 문제점으로써 다른 腸內細菌과의 交叉反應에 의한 假陽性的 출혈을 지적하였다. 그리고 이 交叉反應을 없애기 위하여 螢光標識抗體를 다른 腸內細菌抗原에 吸着시킴으로써 交叉反應을 줄일려고 노력했다.<sup>18, 20, 22)</sup> 이 실험에서는 吸着過程중에 螢光抗體의 力價損失이 우려되어 흡수시키지 않고 그대로 사용하였다. 그 결과 表 2, 3에서의 같이 E. Coli 및 Salmonella 菌간에 다소의 交叉反應이 나타났으나 本實驗에서 사용한 농도(4單位)로 회석하였던 바 Salmonella 균간의 交叉反應은 제거할 수 있었다. 또한 E. coli와는 미약한 반응을 나타냈으나 그 반응의 강도로 Salmonella 菌과의 구별이 가능하였다. 螢光抗體의 力價를 높이면서 交叉反應을 완전 제거할 수 있는 방법에 대해서는 더 많은 연구가 필요하겠다.

이상 실험에서 얻어진 성격으로 보아 Salmonella 균

의 신속한 검출을 위하여 增菌培養塗抹螢光抗體法의 사용은 바람직하며 심하게 오염된 것으로 예상되는 可檢材料는 直接塗抹螢光抗體法을 적용하므로써 檢出時間을 더욱 단축시킬 수 있었다. *Salmonella* 菌 검출에 있어서 螢光抗體法의 응용성은 높은 것으로 思料된다.

## 結 論

*Sal. paratyphi A*, *Sal. paratyphi B*, *Sal thompson*의 세 菌種을 계란, 소세지 및 닭고기에 여러 菌量을 접종하고 直接塗抹螢光抗體法, 增菌培養塗抹螢光抗體法 및 細菌培養法으로 위의 *Salmonella* 菌의 檢出比較試驗을 하였다. 또한 螢光抗體法에 의해 *Salmonella* 菌을 tetrathionate broth에 增菌시켜 검출할 때 培養時間에 따른 檢出效果를 실험하였던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. *Salmonella* 菌 檢出에 있어서 增菌培養塗抹螢光體法은 細菌培養法 만큼 檢出이 높았다.

2. 直接塗抹螢光抗體法은 50 g(ml)의 可檢材料중에  $5 \times 10^4$ 이상의 菌量이 존재할 때는 增菌培養塗抹螢光抗體法이나 細菌培養法만치 效果의으로 檢出할 수 있었다. 그러나  $5 \times 10^2$  이하의 菌量이 존재할 때는 實用性이 없었다.

3. 可檢材料간에는 계란이 소세지나 닭고기에서 보다 細菌檢出率이 높았다.

4. 直接塗抹螢光抗體法, 增菌培養塗抹螢光抗體法 및 細菌培養法에서 *Sal. thompson*의 檢出率은 *Sal. paratyphi A*보다 높았다.

5. 螢光抗體法에 의한 *Salmonella* 菌 檢出에 있어서 약 500개의 細菌을 tetrathionate broth에 접종하고 增菌시킬 때 培養開始後 11시간에 모든 可檢材料에서 細菌檢出이 가장 가능하였다.

## Legends for Figures

Fig. 1. Fluorescent staining of *Sal. paratyphi A* cultured in tetrathionate broth homologous fluorescent antibody,  $\times 1,000$ .

Fig. 2. Fluorescent staining of *Sal. thompson* cultured in tetrathionate broth with homologous fluorescent antibody,  $\times 1,000$ .

Fig. 3. Fluorescent staining of *Sal. paratyphi B* in egg with homologous fluorescent antibody,  $\times 1,000$ .

Fig. 4. Fluorescent staining of *Sal. thompson* in sausage with homologous fluorescent antibody,  $\times 1,000$ .

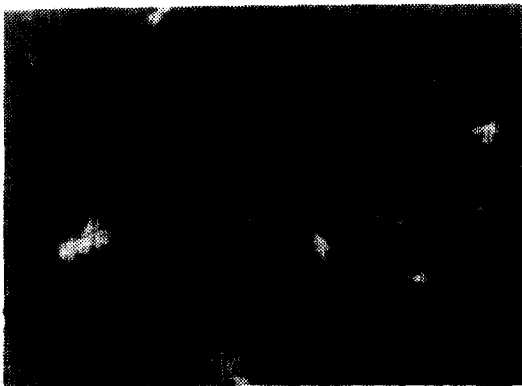


Fig. 1.

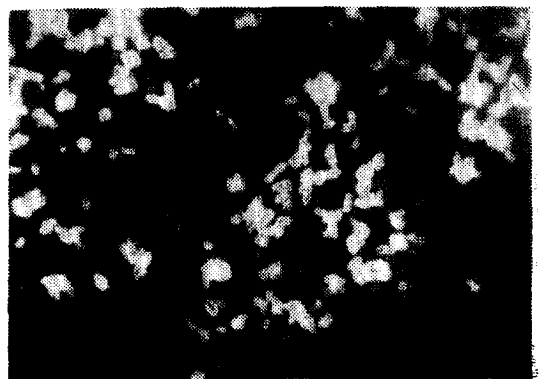


Fig. 2.

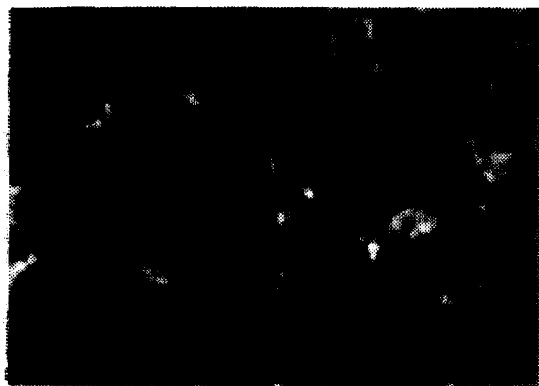


Fig. 3.

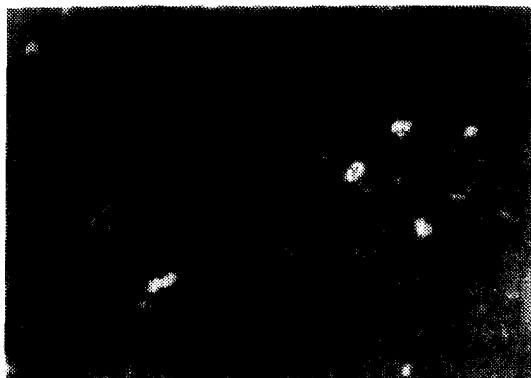


Fig. 4.

### 参 考 文 献

1. Agricultural research service, U.S.D.A.: Recommended procedure for the isolation of Salmonella organisms from animal feeds and feed ingredients. ARS-91-68-1, July (1971) p. 3.
2. Bisett, M.L., Powres, C. and Wood, R.M.: Immunofluorescent identification of *Salmonella typhi* during a typhoid outbreak. Appl. Microbiol. (1969) 17 : 507.
3. Cherry, W.B. and Moody, M.D.: Fluorescent antibody techniques in diagnostic bacteriology. Bacteriol. Rev. (1965) 29 : 222.
4. Chung, G.T.: Studies on the methods for the isolation of salmonella from pigs. Korean J. Vet. Res. (1969) 9 : 63.
5. Coson, A.H., Creech, H.J. and Jones, R.N.: Immunological properties of antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1941) 47 : 200.
6. Coons, A.H. and Kaplan, M.H.: Localization of antigen in tissue cells, II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med. (1950) 91 : 1.
7. Edwards, P.R. and Ewang, W.H.: Identification of enterobacterales. Burgess publ. Co. Minneapolis (1962) p. 16.
8. Fantasia, L.D.: Accelerated immunofluorescence procedure for the detection of salmonellae in foods and animal byproducts. Appl. Microbiol. (1969) 18 : 708.
9. Geopfert, J.M. and Hicks, R.: Immunofluorescent staining of Salmonella species with flagella sera. Appl. Microbiol. (1969) 18 : 612.
10. Geopfert, J.M., Mann, M.E. and Hicks, R.: One-day fluorescent-antibody procedure for detecting salmonellae in frozen and dried foods. Appl. Microbiol. (1970) 20 : 977.
11. Georgala, D.L. and Boothroyd, M.: Further evaluation of a rapid immunofluorescence technique for detecting salmonellae in raw meat and poultry. J. Appl. Bacteriol. (1965) 28 : 421.
12. Georgala, D.L. and Boothroyd, M.: Preparation of fluorescent polyvalent Salmonella antisera. Nature (1965) 205 : 521.
13. Goldman, M.: Applications, Fluorescent antibody methods. Academic press, New York and London (1968) p. 97.
14. Haglund, J.R., Ayres, J.C., Paton, A.M., Kraft, A.A. and Quinn, L.Y.: Detection of Salmonella in eggs and egg products with fluorescent antibody. Appl. Microbiol. (1964) 12 : 447.
15. Harrington, Jr. R., Ells, E.M., Mallison E.T., Ranck, M. and Solee, R.E.: An evaluation of a fluorescent antibody technique for the detection of salmonellae in animal byproducts, feeds and tissues. J. Am. Vet. Med. Ass. (1970) 157 : 1898.
16. Insalata, N.F., Schulte, S.J. and Berman, J.H.: Immunofluorescence technique for detection of Salmonella in various foods. Appl. Microbiol. (1967) 15 : 1145.
17. Kawamura, Jr. A.: Fluorescent antibody techniques and their applications. University of Tokyo Press



- (1969) p. 1.
18. Laramore, C.R. and Moritz, C.W.: Fluorescent antibody technique in detection of salmonellae in animal feed and feed ingredients. *Appl. Microbiol.* (1969) 17 : 352. 19.
  - Liu, T.S., Snoeyenbos, G.H. and Carlson, V.L.: Thermal resistance of *Salmonella senftenberg 775 W* in dry animal feeds. *Avian Diseases* (1969) 13 : 611.
  20. Reamer, R.H. and Hargrov, R.E.: Twenty-four-hour immunofluorescence technique for the detection of salmonellae in nonfat dry milk. *Appl. Microbiol.* (1972) 23 : 78.
  21. Reamer, R.H., Hargrove, R.E. and McDounough, F.E.: Increased sensitivity of immunofluorescent assay for *Salmonella* in nonfat dry milk. *Appl. Microbiol.* (1969) 18 : 328.
  22. Schulte, S.J., Witzeman, J.S. and Hall, W.H.: Immunofluorescent screening for *Salmonella* in foods, Comparison with culture methods. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* (1968) 51 : 1334.
  23. Siliker, J.H., Schmall, A. and Chiu, J.Y.: The fluorescent antibody technique as a means of detecting salmonellae in foods. *J. Food Sci.* (1966) 31 : 240.
  24. Smyser, J. and Rockel, H.V.: Detection of *Salmonella typhimurium* from artificially contaminated poultry feed and animal by-products. *Avian Diseases* (1963) 7 : 423.
  25. Smyser, C.F., and Snoeyenbos, G.H.: Fluorescent antibody methods for detecting salmonellae in animal by-products. *Avian Diseases* (1963) 17 : 99.
  26. Thomason, B.M., Cherry, W.B. and Edwards, P. R.: Staining bacterial smears with fluorescent antibody, V. Identification of salmonellae in fecal specimens. *J. Bact.* (1959) 77 : 478.
  27. Thomason, B.M., Cherry, W.B. and Moody, M. D.: Staining bacterial smears with fluorescent antibody, III. Antigenic analysis of *Salmonella typhosa* by means of fluorescent antibody and agglutination reaction. *J. Bact.* (1957) 74 : 525.
  28. Thomason, B.M. and Wells, J.G.: Preparation and testing of polyvalent conjugates for fluorescent antibody detection of salmonellae. *Appl. Microbiol.* (1971) 22 : 876.
  29. U.S. Department of Health, Education and Welfare: Foodborne outbreaks. Annual summary (1972) p. 97.
  30. 安田健次郎, 豊島滋, 秋山武久: 螢光抗體法手技 (I)(II)(III) (1963) p. 16.

**Experimental Studies on Detection of Salmonellae in Animal-origin  
Foods by Means of Direct Fluorescent Antibody Technique**

Moo Hyeong Jeon, D.V.M., M.S. and Youn Ho Cha, D.V.M.

*Institute of Veterinary Research, Office of Rural Development*

Gill Taik Chung, D.V.M., M.S., Ph.D.

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture  
Seoul National University*

**Abstract**

The experiment was performed in order to investigate the applicability of the rapid detection of

salmonellae in various animal-origin foods by means of the direct fluorescent antibody technique.

Egg, sausage and chicken were inoculated with various concentrations of *Sal. paratyphi A*, *Sal. paratyphi B* and *Sal thompson*, and the fluorescent antibody technique was applied and compared with the conventional cultura method for the sensitivity of detection of the organisms. Two methods were employed in the fluorescent antibody technique; the direct smear method in which the smear being made directly from the specimens, and the enrichment smear method in which the smear being made from the enrichment broth.

The effect of various enrichment time (1, 5, 8, 11 and 13 hours) in tetrathionate broth on the detection of salmonellae in the fluorescent antibody technique was also studied.

The results obtained were summarized as followings;

1. Of the three methods, the enrichment smear method of fluorescent antibody technique was highly effective as cultural method for the detection of salmonella organisms.
2. Direct smear method of fluorescent antibody technique was effective as two other methods  $5 \times 10^4$  organisms presented in 50 g(ml) of specimens. This method may not be applicable when the specimens contained  $5 \times 10^2$  or less organisms.
3. Of the three specimens, the recovery rate of Salmonella organisms from egg was slightly higher than that of sausage and chicken.
4. In fluorescent antibody technique and cultural method, the specimens inoculated with *Sal. thompson* were found to be higher detection rate than the specimens inoculated with *Sal. paratyphi A*,
5. The optimum enrichment time of Salmonella organisms in tetrathionate broth on the detection by fluorescent antibody technique was found to be 11 hours or longer when the specimens of egg, sausage and chicken were inoculated with approximately 500 organisms. The longer enrichment time was the higher detection rate up to 11 hours tested.