

## Salmonella sp.의 신속한 동정을 위한 증진배양의 개선에 관한 연구

김기태\* · 김태우<sup>1</sup> · 육순학<sup>2</sup> · 이영호<sup>2</sup> · 백운화<sup>2</sup>

연세대학교 원주의과대학 기초의학연구소

<sup>1</sup>연세대학교 보건과학대학 임상병리학과, <sup>2</sup>두산인재기술개발원

### Studies on the Development of an Enrichment Method for Rapid Identification of *Salmonella* sp.

Kee-Tae Kim\*, Tae-Ue Kim<sup>1</sup>, Soon-Hak Yook<sup>2</sup> and Un-Hua Pek<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Department of Microbiology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju 220-050, Korea, <sup>2</sup>Department of Medical Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea, <sup>3</sup>Product Development Group, Doosan Training & Technology Center, Yongin 449-840, Korea - The development of an enrichment method for the rapid and effective identification of *Salmonella* spp. in sewage or food was studied. As a growth factor for *Salmonella*, 10 mM cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in trypticase soy broth with 0.6% yeast extract (TSBYE) increased cell number five-folds and 0.6% yeast extract in selenite broth increased cell number ten-folds of control. Bile salts in selenite broth was tested for the selection of *S. enteritidis* in a mixture with *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus plantarum* and *Escherichia coli*. The latter four strains were effectively inhibited at 0.1% bile salt. A two-step culture method was used to enrich *Salmonella* spp.; a primary-enrichment and secondary-enrichment culture. At a primary-enrichment step, selenite broth with 0.6% yeast extract and 10 mM cAMP was used, and at a secondary-enrichment step, 0.1% bile salt was additionally used. Culture times of a primary-enrichment and a secondary-enrichment step were 8 hr and 6 hr, respectively. In this procedure, cell number increased from  $10^{0.3}$  to  $10^{8.5}$  with inhibition of other strains within 14 hr. In the case of an initial cell concentration as low as  $10^{-2}$  cfu/ml, a cell number increased to  $10^7$  cfu/ml by using a 10 hr primary-enrichment and 6 hr secondary-enrichment procedure.

식품뿐만 아니라 가정생활폐수나 가축도살장 및 여러 식품산업에서 유래되는 폐수는 다른 산업의 폐수보다 탄수화물, 단백질, 지방 및 기타 생화학적 유기화합물의 농도가 높을 뿐만 아니라 적당한 pH와 용존산소의 존재여부에 따라 미생물의 번식에 좋은 환경을 이루고 있다.

*Salmonella* spp.는 Gram 음성의 간균으로 *Enterobacteriaceae* 부류에 속하는 세균이다. 이 균은 species의 대부분이 식수나 식품 등을 통하여 인체에 질병을 유발시키는 대표적인 것으로 이 중 *S. enteritidis*는 식중독균으로서, *S. typhi* 및 *S. paratyphi*는 전염성 병원균으로서 널리 알려져 있다(1,2). 가축인 경우에는 용수 및 사료를 통하여 1차 보균자가 되며 인간에게도 식수는 물론 야채나 균에 오염된 가축을 원료로 사용한 식품을 통하여 감염되는데 식품에서는 특히 닭이나 쇠고기에 의한 발병율이 높은 것으로 알려져 있다(3,4). 증상으로는 고열, 구토, 두통 및 설사 등을 나타내며 여러가지 식중독균 중 가장 발병빈도수 높은 것으로 이에 대한 감소방안의 연구가 국외에서는 널리 진행되어 왔다(5).

생활폐수인 경우는 계절 및 식품산업체의 특성에

따라 다소 차이가 있지만 *E. coli*, *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp. 등이 다양하게 검출되며 이러한 폐수를 1차 처리를 할지라도 *Salmonella* spp.의 경우는 균체수는  $2.0 \times 10$  cfu/ml 정도로 나타났다는 보고(6)가 있다. 그러나 *Salmonella*는 적은 균수로도 발병을 일으키므로 이에 대한 보다 정밀한 검출방법을 요하며 이를 위한 전처리 과정으로서 여러가지 증진배양법이 연구되어 왔다(7,8). 그러나 대부분의 기존의 방법은 24시간 또는 48시간의 장시간을 요할 뿐 아니라 시료내의 *Salmonella* 균수가 타균주에 비해 매우 적을 경우 배지의 선택성을 높이기 위한 과도한 농도의 항생제 사용으로 생육속도가 저해되어 검출이 어렵다. 따라서 *Salmonella*의 검출법에 대한 보다 효율적인 개선책이 요구되고 있다.

cAMP는 동물세포와 같은 진핵세포에서 뿐만 아니라 *E. coli*, *Salmonella* spp. 등과 같은 Gram음성 세균에 있어서 galactokinase, glycerol kinase, serine deaminase와 같은 탄수화물 또는 단백질의 대사에 관여되는 여러 효소의 합성을 촉진할 뿐 아니라 glucose에 의한  $\beta$ -galactosidase의 합성억제시에는 cAMP의 첨가로 회복될 수 있어 균의 성장촉진제로서 알려져 있다(9). Selenite는 *Salmonella*의 생육에 큰 영향을 미치지 않는 반면 *E. coli* 및 기타 다른 coliform bacilli를 저해하는

\*Corresponding author.

Key words: *Salmonella* sp. enrichment culture, cAMP, bile salts, yeast extract.

물질이며 bile salts는 *E. coli* 이외에도 Gram 양성 세균 및 *Shigella* spp.의 생육을 저해하는 물질로 알려져 있어 *Salmonella*의 선택배지에 널리 사용되어 왔다(10,11). 그러나 bile salts에 대한 조성은 과거의 배양액의 종류에 따라 다양할 뿐 아니라 selenite와 복합되어 사용된 예는 없었다.

따라서 본 연구에서는 *S. enteritidis*를 이용하여 selenite와 bile salts와 같은 *Salmonella* spp.에 영향이 적고 타균에 대한 증식을 억제할 수 있는 물질을 선택하여 그 조성을 확립하고 한편으로는 cAMP와 yeast extract와 같은 성장촉진물질에 의한 증식속도를 증가시켜 배양시간을 단축시킬 수 있는 배양조건을 개선함으로써 보건위생의 측면에서 문제해결에 보다 신속하고 정확한 원인 규명 및 처리방안에 기여하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주의 배양

*Salmonella enteritidis* KCCM12021는 한국중균협회에서 구입하였으며 *Lactobacillus plantarum* KCCM 11322 및 *Escherichia coli* 2XYT는 연세대 생물자원공학과에서 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 및 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923는 연세대 원주의대 미생물학교실에서 각각 분양받아 실험에 사용하였다. 각 균주는 일반배지로서 trypticase soy broth에 0.6% yeast extract(TSBYE)를 첨가한 배지를 사용하였으며 37°C에서 2일 동안 배양하였다.

균체수는 standard plate counting method를 사용하되 시료를 0.1% peptone solution에 적당비율로 희석하여 각각의 균주에 대한 선택배지를 사용하였다. 즉 *S. enteritidis*는 selenite agar(Difco, Co.), *L. plantarum*은 Lactobacillus MRS agar(Difco, Co.) *Staphylococcus aureus*는 Staphylococcus medium 110(Difco, Co.), *Escherichia coli*는 MacConkey agar(Difco, Co.), *Pseudomonas aeruginosa*는 Pseudomonas isolation agar media(Difco, Co.)를 각각 사용하였다.

### cAMP에 대한 효과

cAMP의 효과를 검토하기 위해 TSBYE배지 5 ml에 5, 10, 20 및 30 mM로 cAMP(Sigma, Co.)를 첨가한 후 각각의 배지에 *S. enteritidis*를 초기균수  $10^3$  colony forming unit(cfu)/ml로 조절하여 37°C에서 7시간 배양 후에 selenite agar를 사용하여 plate counting을 실시하였다.

### Yeast extract에 대한 효과

Yeast extract(Difco Co.)의 효과를 검토하기 위하여 10 ml의 selenite broth에 0, 0.3, 0.6 및 1.0%로 첨가

하여 100°C에서 1분간 살균시킨 후 냉각하고 *S. enteritidis*를 초기균수  $10^3$  cfu/ml로 하여 접종하였다. 37°C에서 배양하여 7시간 후에 selenite agar를 사용하여 plate counting을 실시하였다.

### Bile salts에 대한 효과

Selenite broth에 bile salts(Sigma Co.)를 0.01, 0.05, 0.1 및 0.5 mg/ml로 조절하였으며 이때 사용되는 균주는 *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*로서 각각의 초기균수를  $10^3$  cfu/ml로 하여 조절하였다. 각 균주는 접종 후 12시간 후에 spectrophotometer(Spectronic® 20, Milton Roy Co.)로 620 nm에서 배양액의 탁도를 측정하여 저해효과를 비교하였다. 이때 optical density(O.D.)값이 0.3인 경우 균수는 약  $2.0 \times 10^9$  cfu/ml에 해당되었다.

### 개선된 배양액(modified salmonella media, MSB)에 의한 증진배양법

증진 배양법은 1차(primary-enrichment)와 2차(secondary-enrichment)로 나누어 실시하였다. 1차 증진 배양에서는 10 ml의 selenite broth에 20 mM의 cAMP와 0.6%의 yeast extract를 첨가한 배양액으로, 2차 증진배양에는 1차와 동일한 조성에 bile salts를 0.1%로 첨가한 것으로 사용하였다. 1차 배양은 37°C에서 8시간으로 하고 배양액 1 ml를 9 ml의 2차 배양액에 이식접종한 후 2, 4 또는 6시간 후에 각각 균수를 측정하였다. 이때 균주들은 혼합하여 사용하였으며 초기균수는 *Salmonella enteritidis*는 2, *Lactobacillus plantarum*는  $2.0 \times 10^5$ , *Escherichia coli*는  $2.6 \times 10^3$ , *Staphylococcus aureus*는  $3.5 \times 10^3$ , *Pseudomonas aeruginosa*는 6 cfu/ml로 하였다. 균수의 측정에서는 위의 '균주의 배양'에서 서술한 바와 같이 실시하였고 control은 *Salmonella enteritidis*만을 배양한 것으로 하였다.

### 균체수가 낮은 경우의 증진배양에 대한 효과

시료 중에는 *Salmonella*의 균체수가 매우 낮은 경우 일 때의 본 연구에서 개선된 배양액(Modified Salmonella Broth; MSB)의 적합성을 검토하였다. 이 때에는 균체수를 낮추어 본 MSB 배양액 250 ml에 *Salmonella enteritidis*의 초기균수를 4 cfu/100 ml로 하고 타균주와 혼합하여 증진배양을 실시하였다. 이때 타균주의 균체수는 *Lactobacillus plantarum*는  $1.3 \times 10^5$ , *Escherichia coli*는  $1.8 \times 10^2$ , *Staphylococcus aureus*는  $3.5 \times 10^3$ , *Pseudomonas aeruginosa*는  $1.0 \times 10^4$  cfu/ml이었다. 증진배양법은 위와 동일한 방법으로 실시하되 1차 증진배양액에서는 cAMP의 상당한 양의 사용으로 첨가는 생략하고 *Salmonella*의 균수가 초기에 매우 낮으므로 인하여 1차 증진배양시간은 10시간으로 연장하여 실행하였다.

Table 1. Effects of cAMP concentration on the growth of *Salmonella enteritidis*.

Cell count	cAMP concentration (mM)				
	Control	5	10	20	30
Cell number (cfu/ml) after 7 h incubation	$4.0 \times 10^8$	$7.5 \times 10^8$	$2.5 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$	$2.5 \times 10^9$

cAMP was added to the TSBYE medium as indicated concentrations and cells were cultivated at 37°C for 7 hr.

Table 2. Effects of yeast extract concentration on the growth of *Salmonella enteritidis*

Yeast extract con.(%)	Cell count			
	0	0.3	0.6	1.0
cfu/ml	$2.0 \times 10^8$	$4.0 \times 10^8$	$1.9 \times 10^9$	$2.2 \times 10^9$

Yeast extract was added to the TSBYE medium as indicated concentrations and  $10^3$  cfu/ml of cells were inoculated and cultivated at 37°C for 7 hr.

Table 3. Effects of bile salts on various strains after 12 hr incubation in Selenite broth at 37°C.

Strains	Bile salts conc. (mg/ml)			
	0.01	0.05	0.1	0.5
<i>S. enteritidis</i>	++	++	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	++	+	-	-
<i>E. coli</i>	++	+	-	-
<i>S. aureus</i>	+	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	+	-	-	-

Bile salts was added to the selenite broth medium as indicated concentrations. After cells were cultivated at 37°C for 12 hr, the turbidities of cultures were detected at 620 nm; ++ : above 0.3, + : 0.1~0.3, - : below 0.1.

## 결과 및 고찰

### cAMP의 효과

cAMP는 *E. coli* 등과같은 Gram 음성균에 대하여 성장촉진제로 알려져 있으나(9) 본 연구에 있어서도 *Salmonella enteritidis*인 경우 cAMP 농도에 따르는 영향을 확인하여 보았다. Table 1에서 보는 바와 같이 초기균수를  $10^3$  cfu/ml로 하여 37°C에서 7시간 배양 후 colony를 측정하여 본 결과 10 mM 농도에서 control보다 약 5배의 균수증가를 볼 수 있었다.

### Yeast extract의 효과

Yeast extract는 미생물의 대사에 필요한 조효소로서의 Vit. B group이 풍부하여 일반 배지에서 생육인자(growth factor)로서 널리 사용되어 왔다. 본 연구에서도 증진배양액에 0.3, 0.6 및 1.0%로 첨가한 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 농도가 증가할수록 균체수의 증가를 볼 수 있으나 0.6% 이상에서는 시료사이에 큰 차이가 없었다. 따라서 yeast extract의 적정 사용 농도는 0.6%인 것으로 사료되며 이때 균체의 초기농도를  $10^3$  cfu/ml로 하여 7시간 배양 후의 균체 수는 control에 비해 약 10배의 균체수 증가를 보였다.

### Selenite 및 bile salts의 효과

Selenite는 *Salmonella*에 대한 선택배지에 이용되어 왔으나 본 연구에서는 선택성을 보다 높이기 위하여 bile salts를 첨가하고 이에 따르는 효과를 Gram 양성인 *S. aureus*, *L. plantarum*와 Gram 음성인 *P. aeruginosa*, *E. coli*를 사용하여 검토한 결과 Table 3과 같이 나타내었다. Gram 음성인 *P. aeruginosa* 및 *E. coli*보다 Gram 양성인 *S. aureus*와 *L. plantarum*에 있어서 생육 저해 효과가 큰 것으로 나타났는데 bile salts의 농도가

0.1% 이상일 때 모든 균의 생육에 저해작용을 가져왔다. Bile salts는 *E. coli*에서 lag phase을 연장하는 효과가 있는데 8시간 이상의 배양시에는 *E. coli*가 대수증식단계가 시작하는 것으로 알려져(12) *E. coli*가 존재하는 시료에서 장시간의 사용은 *Salmonella*를 위한 배지의 선택성을 저하시킬 우려가 있다고 사료된다.

### 증진배양법

일반적으로 목적으로 하는 균체의 수가 존재하는 타균주보다 매우 적을 경우 타균주에 의하여 성장의 저해를 받거나 균체수 측정시에도 plate agar상에 타균주의 존재로 인한 오류를 범하기 쉽다. 따라서 측정전 타균의 증식을 억제하면서 *Salmonella* spp.의 균체 수를 증가시키기 위하여서는 증식배양의 단계를 거쳐야 할 것이다.

본 연구에서는 1차 증식배양에서는 *Salmonella*의 선택적 증진을 위하여 selenite broth를 사용함과 동시에 배양액에 대한 적응성을 높인 후 2차 증진배양액에 bile salts를 첨가시켜 더욱 선택성을 높이는 방법을 이용하여 *S. enteritidis*의 성장곡선을 Fig. 1에 나타내었다. 1차 증진배양인 경우 타균주의 존재로 인하여 증식속도가 *S. enteritidis* 단독으로 배양시킨 control에 비하여 약간 낮은 것으로 나타나 타균체의 수가 많은 경우에는 증식에 영향을 받음을 시사하고 있다. 2차 증진배양시에서는  $10^{3.7}$ 에서  $10^{8.5}$ 의 증가를 보였으나 증식속도는 control과 유사하게 나타났다. Fig. 2는 이때의 타균주들에 대한 증식곡선을 나타낸 것으로 1차 증진배양에는 *L. plantarum* 이외에 *S. aureus*, *E. coli* 및 *P. aerugi-*

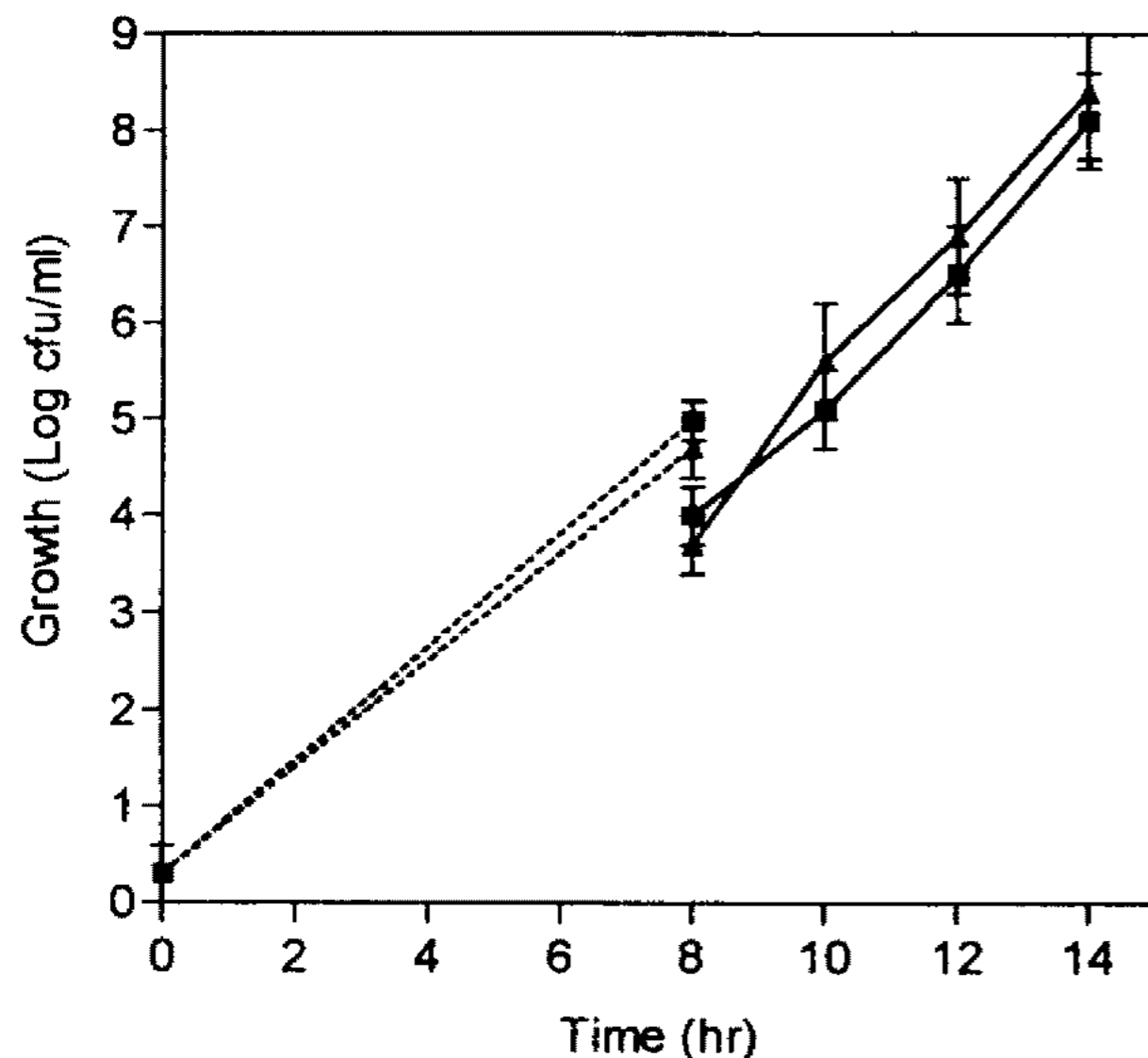


Fig. 1. Effects of the two-step enrichment culture method on the growth of *Salmonella enteritidis*.

■ : *S. enteritidis* pure culture; ▲ : *S. enteritidis* in mixed culture; ---- : primary enrichment; — : secondary enrichment Two cfu/ml of cells were cultured to primary enrichment media at 37°C. After 8 hr of incubation, one ml of a culture broth was transferred to 9 ml of secondary enrichment media. Data are means (log cfu/ml) ± S.D. (standard deviation) of three determinations.

*nosa*는 약간의 증식이 있었고 6시간의 2차 증진배양에서는 *L. plantarum*는 약간의 증가를, *S. aureus* 및 *E. coli*는 정균효과를 나타내었다. *P. aeruginosa*인 경우는  $10^{1.8}$ 에서  $10^{5.7}$ 의 증가추세를 보였는데 이는 Fig. 1에 나타난 *S. enteritidis*의 증식속도에 비해 적게 나타나 증진배양의 시간이 연장될 경우는 그 차이가 더욱 두드러질 것으로 예상된다.

#### 균체수가 낮은 경우의 증진배양에 대한 효과

Table 4에서 나타난 바와 같이 초기의 균수가 매우 적을 경우 *Salmonella*의 증식효과는 전체적인 초기농도의 균수가 적음에도 불구하고 증식속도가 크게 나타났다. 이는 다른 균주들의 낮은 농도에 의한 영향을 보다 적게 받는 것으로 사료된다. 이를 감안하면 실제 식품이나 생활폐수에서 시료 25 g당 *Salmonella*의 균체수가 10개 이하일지라도 본 배양액을 사용하여 37°C에서 10시간의 1차 증진배양후 6시간의 2차 증진배양을 할때 균체수를  $10^7$  cfu/ml로 증식이 가능함을 보이고 있다.

이 방법은 최종적인 증진배양후, *Salmonella*의 균수가 타균에 비하여 월등히 많게 되므로 *Salmonella*의 선택 배지를 이용한 직접 colony count로써 검출이 가능하고 보다 신속한 동정법인 immuno assay나 DNA probe를 이용하는 방법에 있어서도 보다 효율적인 증진배양법으로써 적용시킬 수 있다고 사료된다.

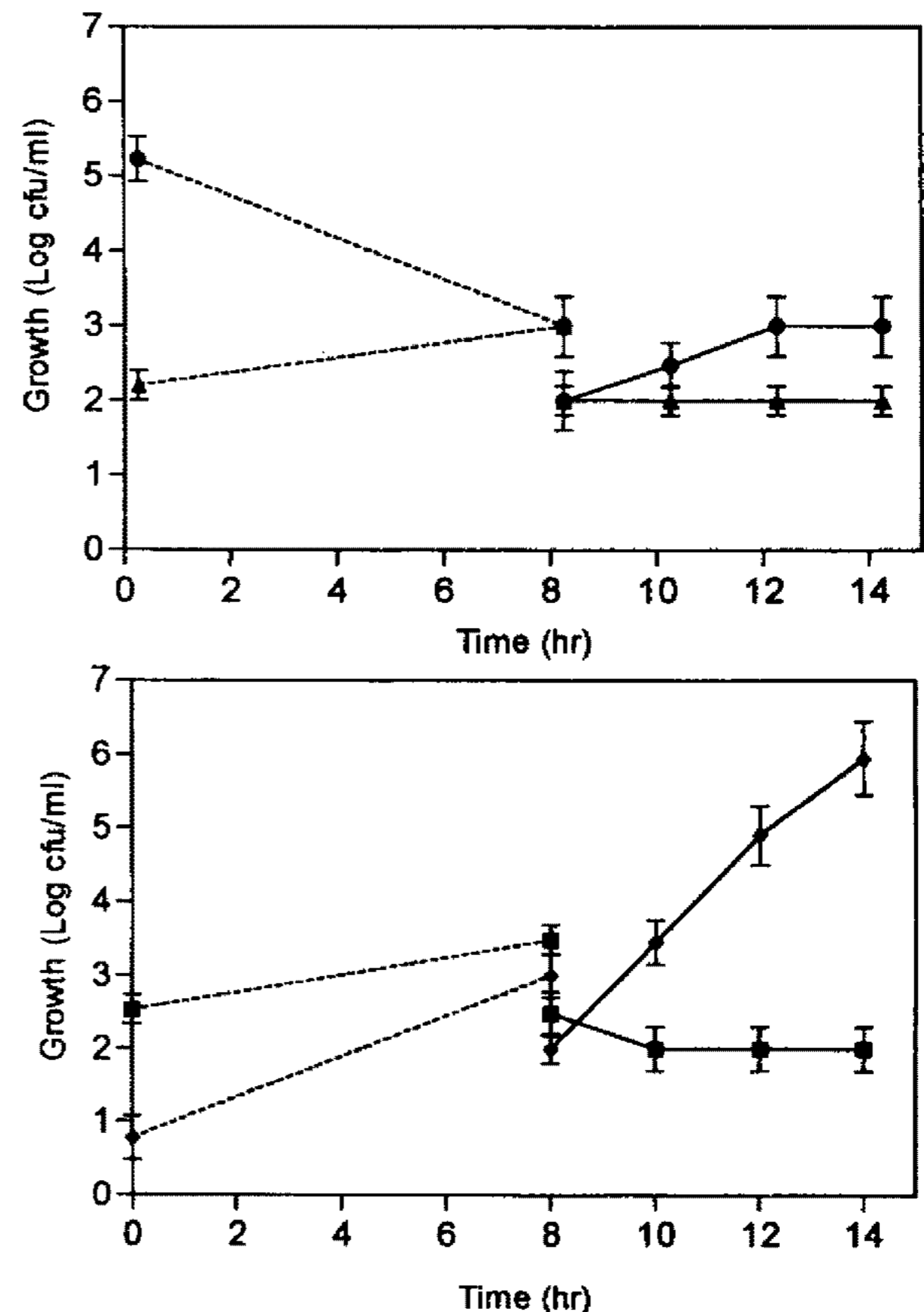


Fig. 2. Effects of the two-step enrichment on the bacterial growths.

● : *Lac. plantarum*, ▲ : *S. aeruginosa*; ■ : *E. coli*; ◆ : *P. aeruginosa*; ---- : primary enrichment; — : secondary enrichment Four strains were cultured to primary enrichment media at 37°C. After 8 hr of incubation, one ml of a culture broth was transferred to 9 ml of secondary enrichment media. Data are means (log cfu/ml) ± S.D. (standard deviation) of three determinations.

Table 4. Effect of MSB media on growth of various strains at 37°C (unit: cfu/ml)

Strains	Cultivation time (hr)		
	0 h	10 h	16 h
<i>S. enteritidis</i>	$4.0 \times 10^{-2}$	$1.8 \times 10^6$	$1.3 \times 10^7$
<i>L. plantarum</i>	$1.3 \times 10^2$	$1.0 \times 10$	$1.0 \times 10$
<i>S. aureus</i>	$2.6 \times 10$	$1.0 \times 10$	$1.0 \times 10$
<i>E. coli</i>	$1.8 \times 10^2$	$6.0 \times 10^5$	$4.6 \times 10^4$
<i>P. aeruginosa</i>	$1.0 \times 10$	$1.8 \times 10^4$	$7.8 \times 10^5$

Four strains were cultured to primary enrichment media at 37°C. After 10 hr of incubation, one ml of a culture broth was transferred to 9 ml of secondary enrichment media.

#### 요 약

식품 및 생활폐수내의 존재하는 *Salmonella* spp.에 대한 효율적이고 신속한 동정을 위한 증진배양법을 개

발하고자 하였다. 본 연구에 사용된 균주인 *S. enteritidis* 생육을 촉진시키기 위한 방법으로 cAMP 및 yeast extract를 사용하였는데 전자인 경우는 배지내의 농도가 10 mM 이상일 때  $10^3$  cfu/ml의 균수로 7시간 배양후 균체수가 control보다 약 5배의 증가를 보였으며 후자인 경우는 0.6% 첨가시 10배의 증가를 보였다. 다른 균주들에 대한 선택적인 성장효과를 보기위하여 selenite broth와 bile salts를 사용하였고 이때 사용된 균주는 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus plantarum* 및 *Escherichia coli*이었고 bile salts의 농도가 0.1%일때 네 가지 균주의 증식에 대한 억제 효과가 있었다. 두 단계의 증진배양법으로서 1차 증진배양에서는 selenite broth에 0.6% yeast extract를 첨가한 것으로 2차 증진배양에서는 0.1% bile salts를 첨가한 것으로 하였는데 타균과의 혼합배양에서 *Salmonella*의 초기균수가  $10^{0.3}$ 일 때 14시간 증진배양으로  $10^{8.5}$  cfu/ml까지 증식을 보였으며 초기균수가 1 cfu/100 ml인 경우는 10시간의 1차 증진배양과 6시간의 증진배양으로 약  $10^7$ 의 증식속도를 나타내었다.

### 감사의 말

본 연구는 두산인재기술개발원의 연구비지원에 의해 이루어졌기에 이에 감사를 드립니다.

### 참고문헌

1. Baron, E.J., L.R. Peterson and S.M. Finegold. 1994. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. pp. 362-385. 9th ed. Mosby Inc., St. Louis.
2. Pelczar, L.R., M.J. Chan and N.R. Krieg. 1993. *Micro-*

- biology: Concepts and Application*, pp. 687-691, International ed. McGraw Hill Inc., New York, New York.
3. Jay, J.M. 1992. *Modern Food Microbiology*, pp. 553-582. 4th ed. Avi pub., New York, New York.
4. Bean, N.H., P.M. Griffin, J.S. Goulding and C.B. Ivey. 1990. Foodborne disease outbreaks, a 5-year summary, 1983-1987. *J. Food Protect.* **53**: 711-728.
5. Bean, N.H. and P.M. Griffin. 1990. Foodborne disease outbreaks, 1973-1987: Pathogens, vehicles, and trends. *J. Food Protect.* **53**: 804-817.
6. Watkins, J. and K.P. Sleath. 1981. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* 23 from sewage, sewage sludge and river water. *J. of Appl. Bacteriol.* **50**: 1-9.
7. Pignato, S., A.M. Marino, M.C. Emanuel, V. Iannotta, S. Caracappa, and Giammanco. 1995. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of salmonellae in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1996-1999.
8. Hammack, T.S., F.B. Satchell, W.H. Andrews, R.M. Amaguana, G.A. June, P.S. Sherrod and L. Koopman. 1993. Abbreviated preenrichment period for recovery of *Salmonella* spp. from selected low-moisture dairy foods. *J. Food Prot.* **56**: 210-204.
9. Pastan, I. and R. Perlman. 1970. Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. *Science*, **169**: 339-344.
10. Lane, L. A. 1985. *Difco Manual; Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology*. pp. 839-841. 10th ed. Difco Lab. Detroit, Michican.
11. Lane, L.A. 1985. *Difco Manual; Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology*. pp. 131-132. 10th ed. Difco Lab. Detroit, Michican.
12. Koneman, E.W., W.M. Janda, S.D. Allen, H.M. Sommers, V.R. Dowell, Jr. and W.C. Winner, Jr. 1988. *Diagnostic Microbiology*, pp. 97-104. 3rd ed. J. B. Lippincott Company. Philadelphia.

(Received 30 July 1996)