

# SNAP Test를 이용한 원유중의 베타락탐계 항생물질 검출에 대하여

## 최준표

### 역사주

지난 95년말에 국내에서 파문을 일으켰던 이른바 '고름우유 사건'을 겪으면서 이와 해결방법에 대한 연구를 진행하던중 집유현장 및 검사실에서 공히 항생제를 검출할 수 있는 획기적인 시험방법을 접하고 이를 소개하고자 한다. 다음은 Netherlands Milk & Dairy Journal 49(1995) 15~25에 게재되었던 "An evaluation of the IDEXX SNAP test for the detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in ex-farm raw milks"를 정리한 것이다.

### 요약

1,004개의 집유전 원유중의 항생물질 잔류량에 대하여 영국과 웨일즈의 우유마케팅위원회(MMB; Milk Marketing Board)의 유질지불기구(MQPS; Milk Quality Payment Sheme)가 채택한 방법인 Delvotest P법과 IDEXX사의 SNAP  $\beta$ -lactam test법을 비교 실험하였다. 매 검사마다 농도별로 3개의 penicillin G를 시험함으로써 SNAP 검사법의 재현성을 검사하였다.

MMB MQPS법에서 양성인 100개의 시료에 대하여 SNAP법으로 재시험한 후  $\beta$ -lactam의 존재여부를 확정시험법으로 확인하였다. 통상적인 집유전 원유에 대한 조사에서 SNAP test는 Delvotest P와 98% 이상의 상관관계를 나타냈고, 이 시료중의 대부분이 실제로  $\beta$ -lactam을 함유하고 있음이 확정시

험으로 입증되었다.

Delvotest P법에서 양성이 확인된 100개의 시료에 대한 평가에서 SNAP test는 확정시험과 95% 이상의 상관관계를 나타냈다. 즉, 98개의 양성시료중 2개만이 penicillinase 감수성이 있는  $\beta$ -lactam을 함유하지 않은 것으로 나타났다.

SNAP test는 10분내에  $\beta$ -lactam을 검출할 수 있고, 집유탱크내 및 집유전 원유에 대하여 정확하면서도 신속하며 사용하기 편한 방법이었다. 이 검사법은 목장 및 유업체 모두에서 우유내의  $\beta$ -lactam 함량에 대하여 유럽연합(EU, European Union)의 관계법령에서 규정한 최대 잔류허용치 이하인지를 보증하기 위한 방법으로 사용할 수 있다.

### 1. 서론

EU에서는 식품내의 특정한 수의학적 잔류물질함량을 제한하기 위하여 관계법규를 추가하였다. 우유도 이 법규에 포함되었으며 항생제 잔류량의 최대 허용치(최대 허용잔류량, MRLs, Maximum Residue Limits)를 위원회 규정 2377/90, 675/92 및 3093/92에 정의하였다. 여러가지 항생제들이 동물에 대한 예방적 치료 및 임상적 치료에 사용되고 있으며 그 중에서도  $\beta$ -lactam(penicillin과 penicillin 관련물질을 말함)을 낙농분야에 가장 널리 사용되고 있다.

$\beta$ -lactam을 비교적 간단하게 측정할 수 있는 방법들은 수년 전부터 판매되어 왔다. 영국과 웨일즈에

서는 MMB와 DTFCP(Dairy Trade Federation Code of Practice)가 연합한 위원회에서는 MMB technical division이 실시한 자료를 근거로 원유내 항생물질을 검출하는 방법으로 두 가지를 사용한다.

가장 널리 사용하는 방법은 미생물 성장 저해법으로 결과를 얻는데 수 시간이 소요된다. 이 시험법으로는 미생물 성장을 저해하는 물질은 어떤 것이라도 검출할 수 있기 때문에 비특이적인 시험법이다. 이 같은 비특이성은 스크리닝 목적에는 아주 적합하지만 목적하는 잔류물질을 확인하기 위해서는 좋은 방법이라고 할 수 없다.

EIA(Enzyme Immuno Assay)법은 근래에 특정물질을 검출할 때 사용하는 방법으로서 우유를 포함하여 식품내의 항생제 검출에도 적용한 사례가 있다.

이 논문에는 SNAP enzyme assay(IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA)가 집유전 원유에 존재하는  $\beta$ -lactam을 검출할 수 있는 방법인지 여부에 대한 평가를 보고하는 것으로서 영국과 웨일즈의 MMB MQPS에서 최근에 통상적으로 사용하는 방법과 비교 실험하였다.

## 2. 재료 및 방법

### SNAP test의 원리 및 사용방법

$\beta$ -lactam을 검출하는 IDEXX SNAP test는 enzyme-linked receptor-binding assay로서 플라스틱 모듈내에 있는 solid support absorbent matrix상에 붙어 있는 단백질에 의해  $\beta$ -lactam을 선택적으로 포착한다. 이 시험법으로 penicillin은 4ppb, amoxillin은 10ppb, cephalirin은 8ppb, ceftiofur는 50ppb까지 검출이 가능하다. 시료내에  $\beta$ -lactam이 존재하면 색깔을 띤 반점이 나타나고, 이 색깔의 정도를 표준농도로 생긴 대조군의 반점과 비교하여, 시료내의 농도가 MRL보다 많은지 적은지를 결정한다.

이 시험과정 중에는 heating block을 사용하는 2회의 incubation 과정이 있으며, 총시험기간은 시료당 약 10분이 소요된다. 결과판독은 육안으로도 가능하며 이 결과를 수치적으로 판독할 수 있는 기기(반사

도를 사용함)를 사용할 수도 있다.

본 시험은 모든 시료에 대하여 생산자의 사용방법에 따라 실시하였고, 시험결과는 육안 및 판독기 모두를 사용하였는데, 판독기는  $\beta$ -lactam이 EU의 최신 MRLs(penicillin의 경우 4ppb 또는 0.0067 iu/ml) 이하로 존재하는 경우 음성으로 나타나도록 만든 것이다.

판독기는 대조군과 시료의 반사도를 측정하여 대조군내 시료의 반사도 비율을 계산한다. 유럽에 공급되는 판독기의 경우 양성과 음성을 구분하는 값으로 0.97이 입력되어 있어서, 0.97보다 높은 경우는 양성으로 나타나 EU의 MRL과 동등 이상의  $\beta$ -lactam이 시료내에 존재하고 있음을 나타낸다. 시험의 중간중간에 색의 강도를 알고 있는 반점이 들어 있어서 양성인지 음성인지를 미리 알고 있는 'Chek sets'를 사용하여 판독기의 성능을 점검하였다.

### MMB MQPS(Milk Marketing Board Milk Quality Payment Scheme)

영국과 웨일즈의 MMB에서는 모든 목장의 집유 탱크에서 채취한 원유에 대해서 매주 시험한다. 통상적인 시료를 많은 량 스크리닝하기 위하여 *Bacillus thermophilus*를 이용해서 Penicillin G에 대하여 0.003~0.005 iu/ml 범위의 감도를 갖는 'in-house' microtitre plate microbial inhibition test를 사용한다. 양성결과를 나타낸 시료는 Penicillin G에 대해서 0.006 iu/ml과 동등 이상의 감도를 나타내는 Delvotest P-100(Gist-Brocades BSD-BV, Delft, Netherlands)로 재시험한다. 이 시험에 통과하지 못할 경우에는 해당 목장에 벌금이 부과된다.

'ex-farm'원유는 MQPS에서 시험한다. 시료를 채취하면 4℃에 보관하다가 48시간안에 시험한다. 시료는 각 목장에서 2회 시험분을 채취한다; 1회분에 대한 스크리닝 시험을 실시하는 동안 다른 1회분은 냉장고에 보관하다가 필요한 경우에 Delvotest P 시험에 쓰인다.

### 시험절차

시험절차는 3가지로 나누었다.

- 1) SNAP test의 재현성 : 각 농도별로 조제한

penicillin G 표준액 3개식을 12회 시험하였다.

2) SNAP test의  $\beta$ -lactam 검출능력은 무작위로 선정된 1,004개의 시료에 대하여 MMB MQPS의 방법과 비교시험하였다.

3) MMB MQPS법으로 양성결과를 나타낸 100개의 시료로 SNAP test를 확인하였다.

#### 항생제 표준액의 조제

1,000 iu/ml를 함유한 Benzyl-penicillin G sodium (시판중인 영국 Glaxo의 Crystapen을 사용)을 A등급의 volumetric flask로 만든 pH 6.0인 0.2M potassium phosphate buffer에 용해하여 농축액을 조제하였다. 이 용액을 deionized water로 희석하여 시험액을 1 iu/ml로 만든 후 5~10ml씩 소분하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 냉동보관하였다.

표준액이 필요한 경우에는 시험 당일 시험용액을  $45^{\circ}\text{C}$  항온수조에 넣고 완전히 용해될 때까지 자주 관찰하면서 해동하였다. 표준 원유액은 MQPS에서 입수한 bulk 원유에 각각 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007 및 0.008 iu/ml의 Crystapen이 함유되도록 만들었다. 표준원유액으로 사용한 모든 원유는 MMB 스크리닝 시험에 통과하였던 것이다.

#### 표준액의 시험

무작위로 선발한 원유의 시험 당일 원유 표준액을 농도별로 3개씩과 전혀 함유하지 않은 시료 3개씩을 사용하여 SNAP test의 수행능력을 검사하였다. 모든 SNAP test에서 유럽형 판독기를 사용하여 판독하였다.

#### 무작위로 선발한 통상시료의 시험

MMB MQPS의 통상적인 시료중에서 입수한 원유를 시험하였다. MMB Thames Ditton Central Testing Lab.에서 'in-house' 시험배지에 접종을 하자마자 곧바로 SNAP test를 실시하였다. 매일 70내지 100개의 시료를 두개의 6-place heating block(Lab-Line Instruments, Melrose Park, IL, USA)으로 한번에 12개씩 시험하였다.

스크리닝 시험에서 양성인 모든 시료에 대하여 2배수로 MMB MQPS의 Delvotest P를 한번 더 실시하였다. SNAP test와 Delvotest P에서 모두 양성

을 보인 시료에 대해서는 여러가지 확인시험을 2배수로 실시하였다.

#### 양성인 100개에 대한 시험

MMB Thames Ditton Central Testing Lab.에서 3개월여 동안에 100개의 시료가 MMB MQPS의 Delvotest P를 통과하지 못하므로 양성으로 판명되었다. 이 시료들을 2배수로 SNAP test와 확정시험을 실시하기 전까지  $0\sim 1^{\circ}\text{C}$ 에 24~48시간동안 보관하였다.

#### 확정시험

SNAP test와 MMB MQPS의 Delvotest P에 모두 양성인 모든 시료에 대하여 Delvotest P와 Lactek  $\beta$ -lactam test(Idetek Laboratories, Sunnyvale, CA, USA)로 시험하였다.

반복시험한 Delvotest P에서 양성을 나타낸 모든 시료에 대해 penicillinase(Condolidated Chemicals, Wrexham, UK의 penase)를 추가한 Delvotest P로 재시험하였다. Penase 용액은 500,000 iu/vial을 병째 5ml 증류수에 용해하여 조제하였다. 이 용액 0.1ml를 시료 2.5ml에 첨가하고 실온에서 15분간 정치하였다. Penase를 첨가한 시료를 Delvotest P의 사용법대로 시험하였다.

이 시험에서의 음성반응은 효소에 의해 불활화된  $\beta$ -lactam의 존재를, 양성반응은 비 $\beta$ -lactam 물질이나 penase에 저항성이 있는  $\beta$ -lactam의 존재를 각각 암시한다. 시료는 시험이 끝날 때까지  $0\sim 1^{\circ}\text{C}$ 에 보관하다가 그 이후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### SNAP test를 통한 penicillin G 표준액의 검출

12개 시험군에서 penicillin G 표준액의 검출한 결과는 표 1과 같다. 양성결과의 비율은 항생제 농도에 따라 증가하였다. Penicillin G가 없는 모든 시험군에서 음성을 나타냈고, 0.004 iu/ml의 경우 19%에서 양성인 반면 0.005 iu/ml에서 50%, 0.006 iu/ml에서 97% 및 0.007 iu/ml에서 100%의 양성을 나타냈다. 이 결과는 제조사가 다른  $\beta$ -lactam test

표 1. Detection of penicillin G in raw milk standards using the SNAP beta-lactam test with the European reader

Concentration (iu/ml)	Number positive/3 tested on (testing occasion); -												Total positives		Reflectance ratio	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Number	(%)	Mean	Range
0.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.761	0.58-0.90
0.003	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	0.846	0.74-1.04
0.004	1	1	0	0	0	1	2	1	1	0	0	0	7	19	0.906	0.80-1.06
0.005	2	1	1	1	1	1	2	2	2	0	2	3	18	50	0.981	0.84-1.17
0.006	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	35	97	1.087	0.93-1.36
0.007	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36	100	1.201	0.98-1.38
0.008	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36	100	1.29	1.06-1.80
Total	12	12	11	10	10	10	13	12	12	9	11	12	134			

Negative=reflectance<0.97  
Positive=reflectance ratio<0.97

kit의 결과와 일치한다.

유럽형 판독기의 결과, 평균 반사율은 항생제 농도에 따라 증가하였다. 항생제가 없는 경우의 평균 반사율이 0.761인 반면 0.008 iu/ml인 경우 1.290이었다.

무작위로 추출한 집유전 원유에 대해 SNAP 'check sets'로 실시한 유럽형 판독기에 대한 보정자료를 기록해 두었다. 기록된 모든 값은 생산자의 규격 이내였다(음성표준액의 경우  $0.65 \pm 0.15$ 였고, 양성표준액의 경우 반사율이  $2.00 \pm 0.45$ 였다). 그러므로 유럽형 판독기는 규격이내에서 제대로 작동된 것으로 간주하였다.

이같은 결과로 부터 EU MRL 및 그 이상 농도가 함유되도록 인위적으로 조제한 bulk 원유의 penicillin G에 대하여 SNAP  $\beta$ -lactam test는 검출능력이 있음을 알 수 있다.

무작위로 선발한 원유의  $\beta$ -lactam 검출에 대한 SNAP test와 Delvotest P 실시결과

무작위로 선발한 1,004개의 원유 시료에 대한 시험결과는 표 2와 같다. SNAP test 결과를 육안으로 판정한 경우 998개(99.4%)의 시료가 SNAP test와 Delvotest 모두에서 음성을 나타냈고, 2개(0.2%)만이 두 시험법 모두에서 양성을 나타냈다. SNAP test로 양성을 보인 4개(0.4%)의 경우 Delvotest P로

표 2. Comparison of the SNAP test with the Delvotest P test for the detection of  $\beta$ -lactams in randomly selected, ex-farm raw milks

			Number (%) of samples classified as :-		Total(%)
			Delvotest P positive	Delvotest P negative	
Visual	SNAP	positive	2(0.2)	4(0.4)	6(0.6)
	SNAP	negative	0(0.0)	998(99.4)	998(99.4)
	Total		2(0.2)	1002(99.8)	1004(100)
Reader	SNAP	positive	2(0.2)	12*(1.2)	14(1.4)
	SNAP	negative	0(0.0)	990(98.6)	990(98.6)
	Total		2(0.2)	1002(99.8)	1004(100)

\* Six of the 12 SNAP reader positive/Delvotest P negative samples were twice in the reader: 5/6 gave a positive result twice 1/6, initially positive (reflectance ratio  $\geq 0.96$ ) gave a negative result (reflectance ratio  $< 0.96$ ) on the second reading.

<sup>§</sup> Same samples

<sup>§</sup> Also positive in the European reader

는 음성을 나타냈다. SNAP test에서 음성인 시료가 Delvotest P에서는 양성을 나타내는 가성 음성반응은 SNAP test에서 하나도 발견할 수 없었다.

유럽형 판독기를 사용한 경우 2개(0.2%)가 두 시험법 모두에서 공히 양성을 나타냈고, 가성음성은 없었다. 이 결과는 같은 시료에 대한 육안판정과 일치한다. 12개(1.2%)의 시료는 가성양성 즉, Delvotest P음성/SNAP test 양성을 나타냈는데 여기에는 육안으로 판정했을 때 같은 결과를 보인 4개가 포함되어 있다. 나머지 990개(98.6%)는 두가지 모두에서 음성이었다. 이 시료들의 반사율은 0.50~0.95로서 표 1에 나타난 36개 음성대조군의 결과와 비슷하였다.

이같은 결과로 부터 집유전 원유에 대하여 SNAP test와 Delvotest P는 매우 우수한 상관관계가 있음을 알 수 있다. SNAP test의 경우 비록 Delvotest P보다 높은 양성비율을 나타냈지만, 양성을 나타낸 경우 결과를 확실하게 기록하기 전에 통상적으로 재

시험을 실시하기 때문에 크게 문제가 되지는 않을 것으로 판단된다.

**SNAP에서 양성인 시료의 특징**

SNAP test에서 양성인 14시료에 대한 확정시험 결과는 표 3과 같다.

2개의 시료만이 MMB 'in-house' test에 양성이고(표 3, 4), 이 결과는 확정적인 Delvotest P로 확인하였다. 이 두 시료에 대한 penase 음성시험 결과 penicillinase에 감수성이 있는  $\beta$ -lactam의 존재를 확인하였다. 이중 한 시료만이 Lacktek  $\beta$ -lactam test에 양성으로 나타났다.

나머지 12개 시료는 유럽형 판독기를 사용한 확정적인 SNAP test에서 양성으로 분류된 반면에 육안 검사로는 12개중 4개만이 양성으로 기록되었다. 이 12개의 시료의 경우 확정적인 Delvotest P와 Lacktek  $\beta$ -lactam test에서 양성인 시료는 하나도 없었다.

표 3. Confirmation of SNAP positive randomly selected ex-farm raw milks

Sample	MMB in-house test	MMB Delvotest P	Confirmatory SNAP test		Confirmatory Delvotest P	Delvotest P +Penase	Lacktek beta-lactam test
			European reader*	Visual			
1	Negative	NT	Positive 1.00	Negative	Negative	NT	Negative
2	Negative	NT	Positive 1.06	Negative	Negative	NT	Negative
3	Positive	Positive	Positive 1.67	Positive	Positive	Negative	Negative
4	Negative	NT	Positive 0.99	Negative	Negative	NT	Negative
5	Negative	NT	Positive 1.02	Negative	Negative	NT	Negative
6	Negative	NT	Positive 1.04	Negative	Negative	NT	Negative
7	Positive	Positive	Positive 1.12	Positive	Positive	Negative	Positive
8	Negative	NT	Positive 0.97	Negative	Negative	NT	Negative
9	Negative	NT	Positive 1.04	Negative	Negative	NT	Negative
10	Negative	NT	Positive 1.08	Negative	Negative	NT	Negative
11	Negative	NT	Positive 0.99	Positive	Negative	NT	Negative
12	Negative	NT	Positive 0.97	Negative	Negative	NT	Negative
13	Negative	NT	Positive 1.08	Negative	Negative	NT	Negative
14	Negative	NT	Positive 0.98	Negative	Negative	NT	Negative
Total	2/14	2/2	14/14	6/14	2/14	0/2	1/14

\* SNAP test positive(reflectance ratio>0.97)

NT=Not tested

표 4. Confirmation of 100 positive samples

Number of samples	SNAP test				Confirmatory Delvotest P	Delvotest P + Penase	Lacktek $\beta$ -lactam test
	Test 1		Test 2				
	European reader	Visual	European reader	Visual			
83	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	Positive
2	Positive	Positive	Negative	Negative	Positive	Negative	Positive
2	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative
1	Positive	Positive	Negative	Negative	Positive	Negative	Negative
7	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
1	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	Positive
1	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	Positive
1	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative
1	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	NT	Positive
1	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	NT	Negative
100	98*	98*	95*	95*	98*	95*	

NT=Not tested

\* Number of positive results

100개 양성시료에 대한 SNAP test와 Delvotest P 비교

100개 양성시료의 시험결과는 표 4와 같다. SNAP test 결과는 확정적인 Delvotest P 및 Lacktek  $\beta$ -lactam test 결과와 아주 일치한다.

MMB Delvotest P로 양성으로 분류한 100개의 시료중 98개는 확정적인 Delvotest P로도 양성으로 분류되었고 이 시료들은 2회의 SNAP test에서 98개중 95개는 2회 모두에서 양성이었다고 적어도 1회 이상에서 양성으로 나타났다. Lacktek  $\beta$ -lactam test의 경우는 100개중 95개에서 양성으로 나타났으며 이중 한 시료는 SNAP test 및 Delvotest P 모두에서 음성으로 분류된 것이다.

Penase 시험의 결과로 100개중 90시료는 penicillinase를 파괴하는 항생제를 함유하고 있음을 알 수 있다.

결론

이상의 시험결과 집유전 원유의 항생물질검사에 상관관계는 유럽형 판독기를 사용하는 경우는 98.8%이고, 육안판정시는 99.6%로서, SNAP  $\beta$ -lactam test와 Delvotest P간에는 매우 유의성이 높은 것으로 나타났다. SNAP test는 매우 우수한 반복성을 가졌으며 확정적인 시험으로 부터 SNAP test 반응이 이론과 일치함이 입증되었다.

SNAP test는 유럽 우유업체의 표준시험법인 Delvotest P보다 약간 높은 양성비율을 나타냈다. 1,004개 시료중 Delvotest P에서는 2개만이 양성인 반면, SNAP test에서는 육안으로는 6개가 유럽형 판독기에는 14개가 각각 양성을 나타냈다. 이들 시료는 물론이고 Delvotest P에서 양성으로 분류되었던 시료에서조차 가성음성은 없었다.

SNAP test는 시험결과를 10분 이내에 알 수 있으므로 신속하고 사용이 간편한 방법으로서 목장 및 유가공업체에서  $\beta$ -lactam이 EU MRL 이하로 존재하는 것을 보증하는 목적으로 사용될 수 있다.