

Mix LPS-ELISA법을 이용한 살모넬라균 복합감염항체 동시 모니터링

이희수 · 임숙경 · 우승룡 · 이유영 · 김종염 · 주이석 · 김종만

농림부 수의과학검역원
(1998년 6월 23일 접수)

Application of mix LPS-ELISA for monitoring of antibodies to major serogroups of *Salmonella* in animal

Hee-soo Lee, Suk-kyoung Im, Seng-ryong Woo, You-young Yi, Jong-yeom Kim,
Yi-seok Joo, Jong-man Kim

National Veterinary Research and Quarantine Services Republic of Korea

(Received Jun 23, 1998)

Abstract : Salmonellosis caused by a number of serotypes of *Salmonella* is an infectious, acute or chronic, zoonotic disease and characterized by enteritis and diarrhea, septicemia in animal.

In these studies we investigated the prevalent serotypes of *Salmonella* causing animal salmonellosis in Korea and the 71 strains of *Salmonella* spp. were isolated from materials such as mesenteric lymph nodes, fecal samples from slaughtered animal.

With the identification test results, the most prevalent serotypes were, in order, *S stanley* 31 strains (43.7%), *S typhimurium* 19 strains (26.8%) and *S montevideo* 11 strains (15.5%), respectively. And we could establish the method for detection of antibodies to broad variety of *Salmonella* serotypes. Lipopolysaccharide(LPS) antigen extracted from *Salmonella* was more sensitive and specific than outer membrane protein antigen from that for detection of *Salmonella* antibody by using an indirect ELISA. The optimal concentration of antigen was 100ng/ml of LPS, the dilutions of conjugate and serum were 1 : 1,000~2,000 and 1 : 200~400, respectively.

The mix LPS-ELISA which was used by mixing LPS from *S typhimurium* (group B), *S choleraesuis* (group C) and *S enteritidis* (group D) were more rapid and effective than that used LPS from individual strain for detection of *Salmonella* serogroup O4, O7 and O9 antibody at the same time. We could obtain the high values of optical density (0.73 ± 0.32) by mix LPS-ELISA on the farm which had occurred salmonellosis, but very low values of 0.17 ± 0.06 on the negative farm of salmonellosis. So, the mix LPS-ELISA may be used to monitor the serological

surveillance for the presence of infection with a number of serotypes of *Salmonella* and would be useful for prevention and control of salmonellosis in animal.

Key words : salmonellosis, lipopolysaccharide, ELISA, serological monitoring.

서 론

동물의 살모넬라균 감염증은 다양한 혈청형의 원인균에 의해 발생하는 급성 또는 만성적 소화기 전염병으로 장염과 설사 및 패혈증사 등을 나타내는 질병으로¹⁻³ 일부 원인균은 사람의 식중독 원인균으로써 중요시 되고 있다⁴⁻⁶.

살모넬라 감염증의 주요 원인균으로써 *Salmonella choleraesuis* 및 *Salmonella typhisuis*는 돼지에서¹⁻³, *Salmonella dublin*은 소에서^{7,8}, *Salmonella pullorum* 및 *Salmonella gallinarum*은 닭에서⁹ 각각 특징적으로 급성 패혈증을 유발하고, *Salmonella typhimurium* 및 *Salmonella enteritidis* 등은 축종에 관계없이 모든 동물에서 만성장염을 일으키고 특히 사람에서의 식중독을 일으키는 원인균으로 알려져 있으며^{4-6,10,11} 이들 균종들의 혈청형은 group B, C1 및 D그룹이 주를 이루고 있다¹².

이 질병의 진단을 위해서는 분변이나 가검물로부터 원인균을 분리함으로써 가능하겠으나 감염초기를 제외하고 균분리가 용이하지 않으면서 계속적으로 보건동물이 되어 중요한 감염원 역할을 하는 것으로 보고되고 있으며^{1,2,7,13-17} 또한 혈청학적으로도 감염시 항체형성의 미약 및 타 장내세균항체와의 비특이반응으로 인하여^{18,19} 신속한 검색이 이루어지지 못해왔다.

이러한 이유로 살모넬라균의 분리를 상습을 위한 선택적인 증균배지의 개발이나²⁰, 살모넬라에 대한 단클론 공통항체를 이용한 가검체로부터의 원인균을 직접 신속검출하고자 하는 연구들이 이루어져 왔으며^{4,10,21,22}, 혈청학적인 감염항체의 검출법으로 살모넬라균의 lipopolysaccharide(LPS) 항원을 이용한 ELISA법은 만성 또는 잠복감염의 살모넬라균 감염증을 효과적으로 검색할 수 있는 방법으로 보고되고 있다.^{2,3,6-8,11,13-17,23}

본 연구에서는 국내 농장에서 유행하는 살모넬라균 감염증의 주 원인균에 대한 혈청형을 알아보고 살모넬라균의 그룹별 특이항원인 LPS를 혼합이용한 ELISA법

을 확립하여 다양한 혈청형의 살모넬라균 복합감염항체를 동시에 신속하게 모니터링하는데 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

가검재료 : 도축돈 및 야외농장으로부터 분변, 장간막 입과절, 사료 등 가검재료를 채취하여 원인균 분리에 이용하였다.

Salmonella 속균의 분리 및 동정 : Ewing¹²의 방법에 준하였으며 증균 및 분리를 위해서는 Nielsen *et al*²의 방법에 따라 buffered pepton water(Merk) 9ml에 시료 1g(ml)의 비율로 혼합하여 37℃에서 24시간 증균배양하고 배양액 1ml 취하여 Rappaport-vassiliadis broth(Merk) 9ml에 다시 37℃에서 18시간 분리배양한 다음 루프를 이용하여 배양액을 Rambach agar(Merk)²⁰에 도말 배양하여 의심되는 red 또는 pink color colony를 선별하여 triple sugar iron agar, urease 및 lysine decarboxylase 등의 생화학 시험을 거쳐 *Salmonella* group 및 factor serum(seiken)을 이용하여 혈청형을 동정하였다.

LPS 추출 : 수의과학검역원에서 보유하고 있는 표준 균주 *Salmonella typhimurium* (B그룹), *S. choleraesuis*(C그룹) 및 *S. enteritidis*(D그룹)를 사용하였으며, Srinand *et al*³와 Hassan *et al*⁶의 방법에 준하여 추출하였다. 즉, 그룹별 균배양액을 원심하여 균을 모으고 식염수로 2회 세척하여 cold acetone(-20℃)으로 다시 세척한 다음 rotary evaporator에 의해 건조시킨 후 마쇄하여 LPS 추출에 이용하였다. 건조된 세균을 65℃ 증류수로 6%가 되게 현탁시키고 동량의 90% phenol(65℃)과 혼합하여 5분 동안 stirring 한 다음 4℃로 냉각시키고 원심(2,000g, 60분)하여 상층액을 수거하여 48시간 DW에 투석한 다음 polyethylene glycol 20,000(Sigma)으로 농축하고 동결건조시켜 4℃에 보존하면서 시험에 이용하였다. 한편 LPS 항원은 전기영동하여 silver 및 commassie brilliant blue 염색으로 단백질에 의한 오염여부 및 LPS를 확인하였다.

OMP : 이 등⁹의 방법에 준하여 추출정제하였으며 12% polyacryamide gel SDA-PAGE에 의해 확인하였다.

ELISA : 추출한 LPS 및 OMP를 ELISA 항원으로의 적합성 여부시험 및 최적농도를 결정하여 살모넬라 혈청형 B, C 및 D그룹 항체를 검출하는데 이용하고자 하였다. 즉, 항원종류별 적절농도를 coating buffer(0.1M Sodium carbonate, 1.0M NaCl, pH 9.6)에 녹인 용액 100ul를 plate에 가하고 4℃ 냉장실에서 하루밤 동안 반응시켜 coating 하였다. PBSS-0.05% tween 20(pH 7.2)으로 3회 세척하고 혈청 희석액(PBSS-0.05% tween 20, 1% BSA)으로 적절히 희석된 가검혈청(1 : 200~400) 100µl와 37℃에서 30분동안 반응시켰다. 다시 3회 세척하고 희석된 conjugate 용액(PBSS-0.05% tween 20, 1% BSA으로 1 : 1,000~2,000배 희석)100ml와 37℃에서 30분동안 다시 반응시킨 다음 3회 세척후 100µl substrate(5ul H₂O₂ 30%, 8mg 1,2 orthophenylenediamine dihydrochloride : OPD, 12ml 0.1M citrate, pH 5.0)를 가하고 10분간 반응시켜 발생시킨 다음 0.5M H₂SO₄ 100ul로 반응을 중지시킨 다음 450nm에서 흡광도(optical density : OD)를 측정하였다.

결 과

원인균 분리 및 혈청형 분포조사 : 국내유행 살모넬라 감염증의 주요 원인균에 대한 조사결과 도축장 돼지 장관막 임파절 등으로부터 71주의 원인균을 분리하였으며 이들 분리균주의 혈청형 분포는 B그룹 53주(74.6%), C1그룹 12주(16.9%)로 B 및 C1그룹이 대부분을 차지하였으며(Table 1), serotypes은 *S stanley* 31주(43.7%), *S typhimurium* 19주(26.8%) 및 *S montevideo* 11주(15.5%)의 순으로 동정되었다.

*S typhimurium*에 대한 ELISA법 :

1) 항원 및 농도결정 : 동물의 살모넬라 감염증의 주 원인균으로 알려진 *S typhimurium* (ST)에 의한 감염항체의 검출법으로써 ST로부터 LPS 및 OMP를 추출하여 ELISA 항원으로써의 특이성 및 민감성 비교시험에서 먼저 살모넬라 토끼항혈청을 이용한 경우 OMP는 25.6~3.2µg/ml에서 positive/negative(P/N)가 7~5으로 비교적 높게 나타났으나 LPS 항원은 600~12.5ng/ml까지 P/N비가 10이

Table 1. Serogroup and isolation of *Salmonella* from various materials in farm

Specimens examined	No. of isolates	Serogroup(%)		
		B	C1	E1
Mesenteric lymphnode	52	41(78.8)	10(19.2)	1(1.9)
Pig	Organs	3	-	-
	Faeces	2	1	-
Bovine	Specimens	8	-	-
	Feed	6	-	5
Total	71	53(74.6)	12(16.9)	6(8.5)

Table 2. *Salmonella* serovar isolated from various specimens

Serovar	Serogroup	No. of strains(%)			
		Swine(n = 57)	Bovine(n = 8)	Feed(n = 6)	Total(n = 71)
<i>S stanley</i>	B	29(50.9)	2(28.0)	-	31(43.7)
<i>S typhimurium</i>	B	13(22.8)	6(75.0)	-	19(26.8)
<i>S derby</i>	B	1(1.8)	-	-	1(1.4)
<i>S montevideo</i>	C1	11(19.3)	-	-	11(15.5)
Untypable	B, C1, E1	3(5.3)	-	6	9(12.7)

상으로 OMP보다 민감하게 반응하였다. 또한 살모넬라 돼지 양성혈청에 대한 시험에서 LPS 항원은 10ng/ml까지 P/N비가 5이상을 나타내었으며 최적농도를 100ng/ml으로 결정할 수 있었다. 반면 OMP 항원은 시험한 모든 농도조건에서 P/N비가 2이하를 보여 ELISA 항원으로써 부적절하였다.

2) Conjugate의 적정농도 결정 : 토끼 살모넬라 항혈청을 위한 HRP-anti-Rabbit IgG(Sigma)는 1:2,000~3,

000배에서 P/N가 5.7로 높게 나타났으며, 돼지 혈청시험용 HRP-anti-Pig IgG(Sigma)의 경우는 1:1,000에서 P/N비가 15.2로써 가장 높게 나타났다.

3) 혈청희석배수 결정 : 토끼혈청의 경우 희석배수 1:200~800배에서 P/N비가 16.7~14.4로서 1:100 및 1:1,600의 각각 9.8 및 8.1 보다 높게 나타났으며 특히 1:400에서 22.3으로 가장 높은 P/N값을 나타내었다. 반면 돼지 항혈청의 경우 1:100 및 1:200의 경우에서 큰 차

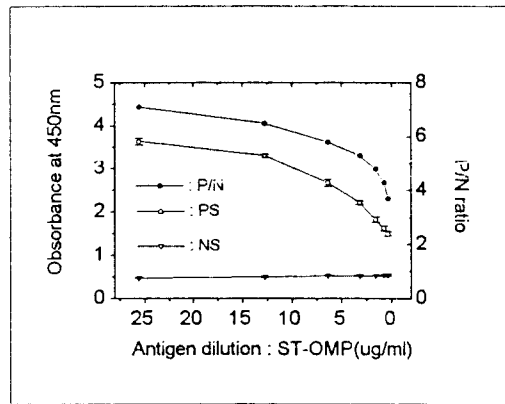
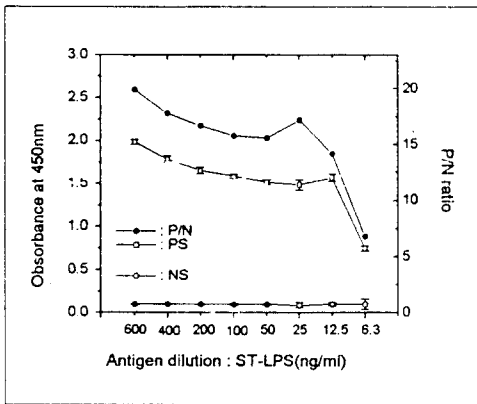


Fig 1. Determination of optimal antigen concentration.

Dilution of conjugate : $\times 2,000$

PS : rabbit anti-*S typhimurium* positive serum, NS : negative serum,

P/N : positive/negative ratio.

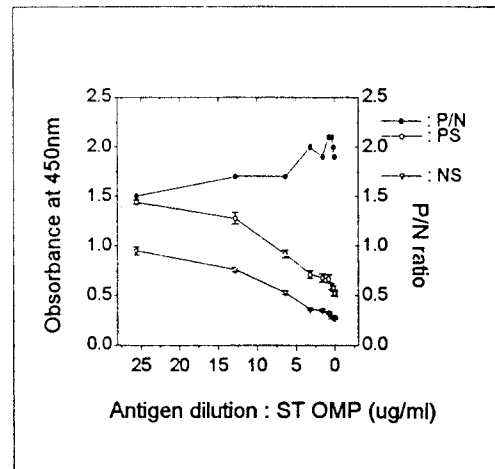
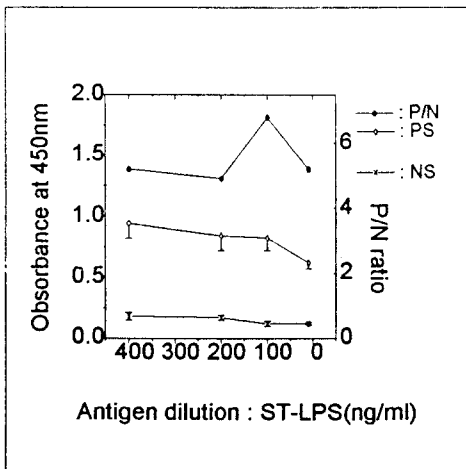


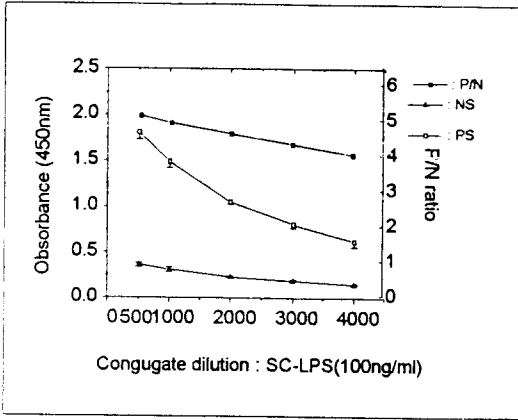
Fig 2. Determination of optimal antigen concentration.

Dilution of conjugate : $\times 1,000$

PS : Pig anti-*S typhimurium* positive serum, NS : negative serum,

P/N : positive/negative ratio.

< A >



< B >

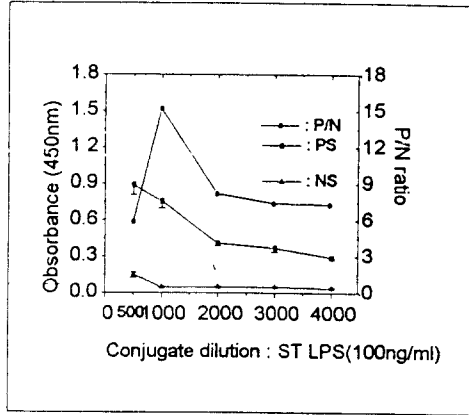
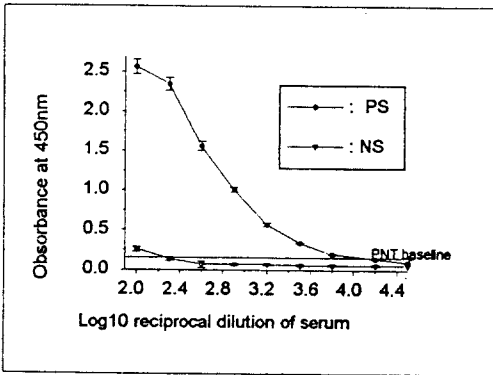


Fig 3. Determination of optimal conjugate concentration.

A : HRP-anti-Rabbit IgG. B : HRP-anti-Pig IgG.

< A >



< B >

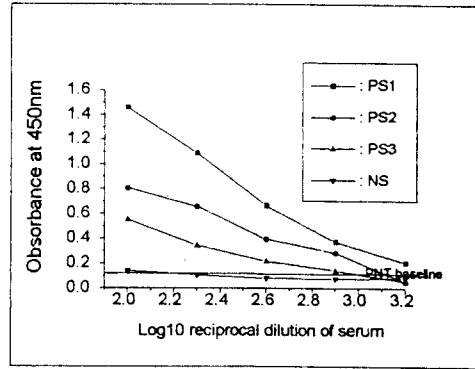


Fig 4. Determination of positive negative threshold(PNT) baseline by standard serial dilution method.

A : Rabbit anti-*S typhimurium* positive serum

B : Pig anti-*S typhimurium* positive serum.

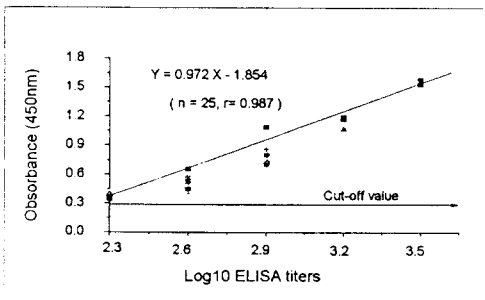


Fig 5. Relationships between optical density(OD) and observed ELISA titer.

이없이 가장 높은 P/N값을 나타내었다.

4) ELISA 흡광도에 따른 혈청희석 역가추정 및 상관 회귀방정식 산출 : 확립된 ELISA법을 이용한 야외 돼지 혈청에 대한 *S typhimurium* (ST) 감염항체 검출시험 결과 평판응집 양성혈청 26건의 평균 OD값은 0.728 ± 0.415 로 음성혈청 17건의 평균 0.157 ± 0.034 에 비해 특이성이 인정되었으며, ELISA 역가와 흡광도 사이에는 $Y = 0.972X - 1.854 (n = 25, r = 0.987)$ 의 상관방정식을 산출할 수 있었다.

Mix-ELISA를 이용한 살모넬라군 복합항체 동시검출법 : ST에 대한 ELISA시험 조건을 이용하여 살모넬라

그룹 B, C 및 D에 대한 LPS 항원 100ng/ml의 농도를 혼합한 mixLPS-ELISA법은 각 그룹별 특이 항혈청인 04, 07, 09 및 이들 3개 그룹 혼합혈청과의 반응에서 그룹별 각각의 LPS 항원에 비해 높은 흡광도(OD)치로 강한 민감성을 나타내었으며 또한 mix LPS-ELISA법은 대장균 등 타 그람음성 항혈청과의 반응에서 특이성을 인정할 수 있었다.

살모넬라 양성 농장에 대한 mix LPS-ELISA법의 적용 : 농장 및 도축장 가검물로부터 살모넬라균이 분리된

농장폐지의 혈청에 대한 mix LPS-ELISA법의 적용결과 는 B, C 및 D그룹 특이 단일 LPS을 이용한 ELISA 보다 모든 농장에서 가장 높게 나타내었으며 특히 B농장의 경우 평균 0.73 ± 0.32 로 음성인 C농장 이유자돈의 0.17 ± 0.06 비해 높은 차로 민감성을 확인할 수 있었다.

Mix LPS-ELISA법과 기존의 혈청학적 응집반응과의 비교 : 기존의 시험법과의 비교시험 결과 양성수에 있어서 mixLPS-ELISA법은 농장별 다소 차이가 있었으나 전체적으로 기존의 평판응집반응에 비해서는 높게, 마이

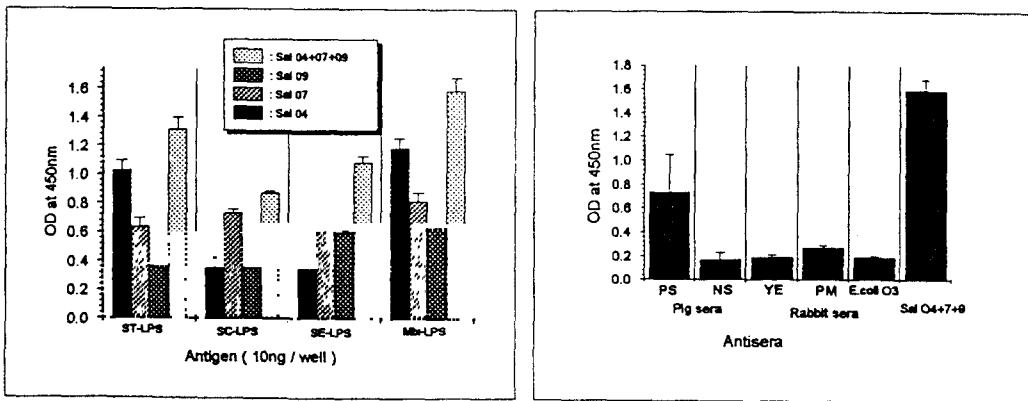


Fig 6. Sensitive and specificity of mix LPS-ELISA for detection of *Salmonella* antibody in animal.

- PS : *Salmonella* positive serum(from pig)
 NS : *Salmonella* negative serum(from pig),
 YE : *Yersinia enterocolitica* positive serum(from rabbit)
 PM : *Pasteurella multocida* positive serum(from rabbit),
 Sal 04+7+9 : *Salmonella* polyvalent O antisera(from rabbit)

Table 3. Comparison of optical densities(OD) to *Salmonella* by ELISA using various LPS of pigs from different farms

Farms	No. of sample tested	OD Values ^A			
		Mix-LPS	ST-LPS	SC-LPS	SE-LPS
A(slaughtered)	9	0.57 ± 0.32	0.36 ± 0.20	0.30 ± 0.12	0.34 ± 0.13
B(slaughtered)	10	0.73 ± 0.32	0.58 ± 0.33	0.35 ± 0.14	0.38 ± 0.14
C(young)	19	0.39 ± 0.12	0.29 ± 0.09	0.31 ± 0.10	0.33 ± 0.09
(weanlings)	6	0.17 ± 0.06	0.12 ± 0.06	0.12 ± 0.04	0.13 ± 0.05
D(young)	8	0.61 ± 0.24	0.51 ± 0.30	0.31 ± 0.07	0.40 ± 0.13
(neonates)	5	0.42 ± 0.09	0.27 ± 0.07	0.28 ± 0.07	0.32 ± 0.13

^APlates were coated with 10ng of LPS from ST, SC and SE, respectively.
 Mix-LPS was coated by mixing LPS(10ngST+10ngSC+10ngSE/well).

Table 4. Comparison of positive reactors to *Salmonella* by ELISA, plate and microplate agglutination tests of pigs different farms

Farms ^A	No. of samples tested	Positive reactors to <i>Salmonella</i>									
		Plate agglu.			Microplate agglu. ^C			ELISA ^D			
		ST	SC	SE	ST	SC	SE	ST	SC	SE	Mix
A	9	9	4	4 ^B	9	8	9	6	5	7	6
B	10	9	7	6	10	10	10	9	8	8	8
C(young)	19	10	9	7	11	10	11	12	14	16	11
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D(young)	8	6	3	2	6	4	5	5	5	7	7
	5	2	1	1	2	1	2	3	3	4	5
Total	57	36	24	20	38	33	37	35	35	42	37

^A *Salmonella* was isolated from all farms.

^B No. of positive reactors.

^C Antibody titers of 3(data transformed to log₂ base) above was considered positive.

^D Positive interpretation : ≥ 2.0 of P/N ratio at 450nm.

크로오집반응과는 차이가 없이 나타내었다.

고 찰

동물에 발생하는 *Salmonellosis*는 다양한 혈청형의 원인균에 의해서 발생되며, 질병발생시 원인균의 배출이 발병기간에 국한되고, 회복되는 경우 계속적으로 전염원 역할을 하면서도 균분리가 용이하지 않아 진단에 어려움이 있어 왔다^{1-3,7,13-16}. 더욱이 *S typhimurium* (ST) 및 *S enteritidis* 등은 동물의 질병발생은 물론 사람의 식중독 발생의 원인균으로서 중요하다^{4,5,10,22}. 이러한 이유로 Brigmon *et al*⁴과 Debby *et al*²²은 *Salmoella* specific monoclonal antibodies를 이용한 sandwich capture ELISA법으로 축산물이나 가검재료로부터 *Salmonella* 균을 신속하게 검출하고자 하였고, 농장에서의 신속한 검색을 위해서는 *Salmonella* 특이항원을 이용한 혈청학적 ELISA법이 효과적으로 보고하였다^{2,3,6-8,10,11,17,18}.

국내유행 살모넬라 감염증의 주 원인균에 대한 혈청형 분포조사에서 B 그룹(74.6%) 및 C1 그룹(16.9%)이 대부분을 차지하였고, serotypes으로써 모든 동물에 병원성이 강한 것으로 알려진 ST가 26.8%으로 비교적 높은 비율로 동정되어 국내에서 사육중인 소 및 돼지 *salmonellosis*의 주 원인균으로 생각되었다. 한편으로 비교

적 병원성이 약한 것으로 알려진 *S stanley* (43.7%) 및 *S montevideo* (15.5%)가 많이 분리된 것은 가검물중 건강 도축돈이 주를 이루었기 때문으로 사료되며 이와같은 분포는 선인들의 보고²⁶⁻²⁹와는 다소 차이가 있는 것이나, 장간막 임파절에서 높은 분리율을 보인 것은 이 장기가 보균동물의 *Salmonella* reservoirs^{16,26}으로써의 역할을 하기 때문으로 생각되었다.

혈청학적으로 주요 *Salmonella* 감염항체의 검출목적으로 Srinand *et al*³은 *S choleraesuis*의 인공감염항체검출에 LPS 및 OMP 항원을 이용한 indirect ELISA법 비교시험에서 민감도 및 특이성에 있어서 별 차이없이 효과적이었으나 OMP의 경우 cutoff value가 LPS보다 2배이상 높게 보고하였고, Nielsen *et al*²은 *S infantis*의 LPS는 ELISA 항원으로 부적합을 보고한 바 있으나 일반적으로 OMP보다는 LPS가 민감도 및 특이성이 우수한 것으로 보고되고 있다^{7,8,10,11,13,17}. ELISA를 위한 적정 항원 및 농도결정을 위한 본 시험에서 ST의 LPS는 살모넬라 토끼 항혈청의 경우 12.5ng/ml까지 P/N비가 10이상을, 살모넬라 돼지 양성혈청의 경우 10ng/ml까지 P/N비가 5이상을 각각 나타낸 반면, OMP는 토끼항혈청의 경우 25.6-3.2lug/ml에서 7.0-5.0으로 비교적 높게 나타났으나 돼지 항혈청에서는 시험한 모든 농도조건에서 P/N비가 2이하를 보여 LPS가 OMP 보다 민감성 및 특이성이 우수하게

나타나 선인들의 결과와 일치하게 나타났다. 한편으로 적정혈청희석배수는 토끼혈청의 경우 1:400에서 22.3으로 가장 높은 P/N값을 나타내었으나 돼지혈청은 1:100 및 1:200에서 별 차이없이 높은 P/N값을 나타내어, Nielsen *et al*² 및 Srinand *et al*³의 1:400보다 낮은 경향이었으나 축종 및 시료의 조건에 따라 조정이 필요한 것으로 사료되었다. ST-LPS이용 ELISA법에 의한 야외돼지혈청에 대한 항체검출시험에서 양성혈청은 평균 OD값이 0.728 ± 0.415 으로 음성혈청의 평균 OD값 0.157 ± 0.034 비해 큰 차이로 민감도 있게 검출할 수 있었다. 또한 OD값과 혈청희석배수와의 상관식이 $Y = 0.972X - 1.854$ 으로써 측정된 OD값을 통해서 혈청역가를 알아낼 수 있었다.

Nielsen *et al*²은 ST으로부터의 0:1,4,5,12 LPS와 *S choleraesuis*로부터의 0:6,7 LPS를 혼합한 mix LPS-ELISA(0:1,4,5,6,7,12)를 이용하여 ST 및 *S infantis* 감염항체를 동시에 민감도 있게 특이적으로 검출하였다. 본 연구에서의 살모넬라 각 그룹별 B, C 및 D의 LPS 항원 100ng/ml의 농도를 혼합한 mix LPS-ELISA(0:1,4,5,6,7,9,12)은 각 그룹별 특이 항혈청인 04, 07, 09 및 이들의 혼합혈청과의 반응시험에서 그룹별 각각의 LPS 항원에 비해 높은 OD값으로서 강한 민감성을 나타내었으며 또한 mix LPS-ELISA법은 대장균 등 타그람음성항혈청과의 반응에서 특이성이 인정되어 동물에서 문제되는 주요 살모넬라 그룹 B, C 및 D에 대한 감염항체의 동시검출법으로 효과적이었다. 이렇게 확립된 mix LPS-ELISA법은 농장 및 도축장 가검물로부터 살모넬라균이 분리된 농장돼지의 혈청과의 반응결과 B, C 및 D그룹 개별적 LPS-ELISA보다 모든 농장에서 가장 높게 나타내었으며, 특히 B농장의 경우 평균 0.73 ± 0.32 으로 음성인 C농장 이주자돈의 0.17 ± 0.06 비해 큰 차이로 반응치를 나타내었다. 따라서 P/N ratio 2 이상 즉, C농장 이주자돈의 OD값을 음성으로 간주하고 이 치수의 2배인 OD값 0.34 이상의 개체를 양성으로 계산하여 기존의 혈청학적 응집반응에 의한 양성수와의 비교에서 mix LPS-ELISA법은 농장별로 다소 차이가 있었으나 전체적으로 기존의 평판응집반응에 비해서는 높게, 마이크로 응집반응과는 차이가 없이 나타내어 앞으로 이 방법은 도축장 연계 또는 대규모 시료에 대한 주요 살모넬라균 감염여부를 특히 무중상의 보균가축을 혈청학적으로 신속히 동시에 모니터링하는데 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 생

각되었다.

결론

동물의 살모넬라균 감염증은 다양한 혈청형의 원인균에 의해 발생되며, 감염시 항체형성이 미약하고 다른 장내세균항체와의 비특이반응으로 신속한 검색이 이루어지지 못해왔다. 본 연구에서는 국내의 농장에서 유행하는 살모넬라균 혈청형을 파악하고 이들 주요 원인균에 대한 감염항체의 신속한 검출법으로서 mix LPS-ELISA법을 시험한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 국내유행 살모넬라 감염증의 주요 원인균 조사결과 도축장 돼지 장간막임파절 등으로부터 71주의 원인균을 분리하였으며 이들 균주의 혈청형 분포는 B그룹 53주(74.6%) 및 C1 그룹 12주(16.9%)로 B 및 C1 그룹이 대부분을 차지하였으며, serotypes은 *S stanley* 31주(43.7%), *S typhimurium* 19주(26.8%) 및 *S montevideo* 11주(15.5%)의 순으로 동정되었다.

2. 살모넬라 특이항원으로 LPS는 OMP보다 특이성 및 민감성이 우수하였으며, LPS 항원의 최적농도는 100ng/ml, conjugate 희석배수는 1:1,000~2,000 및 혈청 희석배수는 1:200~400으로 각각 결정할 수 있었다.

3. ELISA법을 이용한 야외 돼지혈청에 대한 *S typhimurium* (ST) 감염 항체검출시험 결과 평판응집 양성혈청 26건의 평균 OD값은 0.728 ± 0.415 으로 음성혈청 17건의 평균 0.157 ± 0.034 에 비해 큰 차이로 특이성이 인정되었으며, ELISA 역가와 흡광도 사이에는 $Y = 0.972X - 1.854$ ($n = 25, r = 0.987$)의 상관방정식을 산출할 수 있었다.

4. 그룹별 특이 LPS 항원을 혼합한 mix LPS-ELISA법은 개별적 항원에 비해 각각의 특이 항혈청 및 혼합혈청과의 반응에서 높은 OD값으로 강한 민감성을 나타내었으며, 대장균 등 타그람음성균 항혈청과의 반응에서 특이성을 인정할 수 있었다.

5. 살모넬라균 양성농장에 대한 mix LPS-ELISA법의 적용결과 B, C 및 D그룹 개별 LPS-ELISA 보다 모든 농장에서 가장 높게 나타내었으며, 양성인 B농장의 경우 평균 0.73 ± 0.32 으로 음성인 D농장 이주자돈의 0.17 ± 0.06 비해 높은 차이로 민감성을 확인할 수 있었다.

6. 기존의 시험법과의 비교시험 결과 mix LPS-ELISA법은 양성수에 있어서 기존의 평판응집반응에 비해서는 높게, 마이크로응집반응과는 차이가 없이 나타내었으며,

주요 살모넬라균 감염여부의 신속한 모니터링에 유용할 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. Wilcock BP, Schwartz KJ. Salmonellosis. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WE, *et al*, eds. *Disease of swine*. 7th ed. Ames, Iowa : Iowa State University press, pp. 570-583, 1992.
2. Nielsen B, Baggesen D, Bager F, *et al*. The serological response to *Salmonella serovars typhimurium* and *infantis* in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Veterinary Microbiology*, 47:205-218, 1995.
3. Srinand S, Robinson RA, Collins JE, *et al*. Serologic studies of experimentally induced *Salmonella choleraesuis* var *kunzendorf* infection in pigs. *Am J Vet Res*, 56(9):1163-1168, 1995.
4. Brigmon RL, Zam SG, Bitton G, *et al*. Detection of *Salmonella enteritidis* in environmental samples by monoclonal antibody-based ELISA. *J Immunological Methods*, 152:135-142, 1992.
5. Cooper GL, Thorns CL. Evaluation of SEF 14 fimbrial dot blot and flagella western blot tests as indicator of *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *The Veterinary Record*, 17:149-153, 1996.
6. Hassan JO, Barrow PA, Mockett APA, *et al*. Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA. *The Veterinary Record*, 26:519-522, 1990.
7. House JK, Smith BF, Dilling GW. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological detection of *Salmonella dublin* carriers on a large dairy. *Am J Vet Res*, 54:1391-1399, 1993.
8. Hoorfar J, Feld NC, Schirmer AL, *et al*. Serodiagnosis of *Salmonella dublin* infection in Danish dairy herds using 0-antigen based enzyme-linked immunosorbent assay. *Can J Vet Res*, 57:268-274, 1993.
9. 이회수, 김순재, 김기석 등. 국내분리주 *Salmonella gallinarum* 의 닭에 대한 병원성. 대한수의학회지, 37(3):569-576, 1997.
10. Hoorfar J, Wedderkopp A. Enzyme-linked immunosorbent assay for screening of milk samples for *Salmonella typhimurium* in dairy herds. *Am J Vet Res*, 56:1549-1554, 1995.
11. Nicholas RAJ, Cullen GA. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella enteritidis* in chicken flocks. *The Veterinary Record*, 26:74-76, 1991.
12. Ewing WH. Edward,s and Ewing,s identification of enterobacteriae. 4th ed New Yock : Elsevier Sci Pub Co, pp.181-245, 1986.
13. Spier SJ, Smith BP, Tyler JW, *et al*. Use of ELISA for detection of immunoglobulins G and M that recognize *Salmonella dublin* lipopolysaccharide for prediction of carrier status in cattle. *Am J Vet Res*, 51:1900-1904, 1990.
14. Nielsen B, Baggesen DL, Lind P, *et al*. Serological surveillance of *Salmonella infection* in swine herds by use of an indirect LPS ELISA. *Proceeding of the 14th IPVS Congress, Bologna Italy, 7~10 July*, p169, 1996.
15. Dahl J, Wingstrand A, Baggesen DL, *et al*. Eradication of *Salmonella typhimurium* by straregic removal of pigs in infected herds. *Proceeding of the 14th IPVS Congress, Bologna Italy, 7~10 July*, p173, 1996.
16. Wood RL, Rose R. Populations of *Salmonella typhimurium* in internal organs of experimentally infected carrier swine. *Am J Vet Res*, 53:653-658, 1992.
17. Hoorfar J, Bitsch V. Evaluation of an O-antigen ELISA for screening cattle herds for *Salmonella typhimurium*. *The Veterinary Record*, 137:374-379, 1995.
18. Paeregaard A, Shand GH, Gaardslev K, *et al*. Comparison of crossed immunoelectrophoresis, enzyme-linked immunosorbent assay, and tube agglutination for serodiagnosis of *Yersinia enterocolitica* serotype O : 3 infection. *J Clin Microbiol*, 29:302-309, 1991.
19. Thomas LV, Gross RJ, Cheasty T, *et al*. Antigenic relationships among type strains of *Yersinia enterocolitica* and those of *E coli*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp. *J Clinical Microbiology*, 17:109-111, 1983.

20. Rambach A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:301-303, 1990.
21. John MCL, Nnalue NA, Lindberg AA. Efficient production of mouse and rat monoclonal antibodies against the O antigens of *Salmonella* serogroup C1, using LPS-coated bacteria as immunogen. *J Immunological Methods*, 129:243-250, 1990.
22. Debby C, Tsang RSW, Ng MH. Sandwich capture ELISA by a murine monoclonal antibody against a genus-specific LPS epitope for the detection of different common serotypes of *Samonella*. *J Applied Bacteriology*, 72:134-138, 1992.
23. van Zijderveld FG, van Zijderveld AM, Anakotta J. Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in experimentally infected chickens. *J Clinical Microbiology*, 30:2560-2566, 1992.
24. Konrad H, Smith BP, Dilling GW, *et al.* Production of *Salmonella* serogroup D (O9)-specific enzyme-linked immunosorbent assay antigen. *Am J Vet Res*, 55:1647-1651, 1994.
25. Gray JT, Stabel TJ, Fedorka-Cray PJ. Effect of dose on immune response and persistence of *Salmonella choleraesuis* infection in swine. *Am J Vet Res*, 57: 313-319, 1996.
26. Paturkar AM, Sherikar AT, Murugkar HV. Isolation of *Salmonella* from meat, blood, faeces, bile and lymphnodes of different species of animals. *Indian J Animal Sciences*, 65:393-395, 1995.
27. 강신명, 최성민, 김은정 등. 돼지분변에서 분리한 살모넬라속균의 생물혈청학적 특성 및 항균제 감수성. *한국공중보건학회지*, 18(1):15-22, 1994.
28. 정석찬, 최원필. 우 유래 *Salmonella* 속균에 대하여. *대한수의학회지*, 26(1):79-85, 1986.
29. 최원필, 이희석, 구상건 등. 양돈장에 있어서 *Salmonella* 감염증의 역학적 연구 : 1. 발생 및 오염상황, 혈청형과 *Salmonella typhimurium* 의 생물형. *대한수의학회지*, 26(1):49-59, 1986.