大韓獸醫學會誌(2005) 第45卷 第2號
Korean J Vet Res(2005) 45(2) : 191~197

면역크로마토그라피 기법을 이용한 *Salmonella* 속균 신속 검출킷트 개발

정병열* · 정석찬[1]
농림부 국립수의과학검역원 동물약품과
[1]축산물규격과
(게재승인: 2005년 5월 20일)

Development of the rapid detection kit for *Salmonella* spp. using immunochromatographic assay

Byeong-yeal Jung* and Suk-chan Jung[1]
Veterinary Pharmacology Division, [1]Livestock Products Standard Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, Ministry of Agriculture and Forestry, Anyang 430-824, Korea
(Accepted: May 20, 2005)

Abstract : An immunochromatographic (IC) strip for the rapid detection of *Salmonella* spp. in the enriched sample was developed. Affinity purified *Salmonella* polyclonal antibody was conjugated with 40 nm colloidal gold particles which were prepared by citrate method in our laboratory. The antigen-antibody-gold complex was captured by *Salmonella* antibody attached to test line of nitrocellulose membrane during the capillary migration of sample. Specificity of the IC strip was calculated to be 100% (12/12) and sensitivity was 97.6% (41/42) in the test with pure cultured bacteria. *Salmonella* was artificially inoculated into raw pork macerated with enrichment broth. And then it was 10-fold diluted from 5.2×10^8 CFU/m*l* to 5.2 CFU/m*l*. The IC strip could detect 5.2×10^6 CFU/m*l* before enrichment. However, the lowest limit of detection was 5.2 CFU/m*l* after overnight incubation. The results indicated that the IC assay was a rapid, economical and simple method with high specificity and sensitivity for the detection of *Salmonella* spp. without using any equipment.

Key words : *Salmonella*, immunochromatographic assay, colloidal gold

서 론

Salmonella(*S.*) 속균에는 특정 숙주에서만 감염을 일으키는 숙주 특이성 *Salmonella*와 숙주 범위가 넓은 숙주 비특이성 *Salmonella*로 나눠지며, 현재까지 약 2,400여 종 이상의 혈청형이 알려져 있다 [11].

사람의 *Salmonella* 식중독 중 약 15%는 돼지고기에서 기인하며 돼지고기 오염의 70%는 *Salmonella* 감염돈에서 비롯된다는 보고가 있으며 [6], 도계육을 판매하는 국내 대형 유통점 및 재래시장 50개소 중 34개소에서 *Salmonella* 속균이 검출된 바 있다 [4]. 따라서 축산물의 안전성 확보 측면에서 식육의 엄격한 위생관리가 요구되며, 공중보건학상 중요시 되고 있는 *Salmonella*를 효과적으로 검출하기 위해서 immunomagnetic separation, biochemical screening 등 다양한 기법들이 활용되고 있다 [21].

면역크로마토그라피 킷트는 immunoassay를 위하여 요구되는 모든 구성 성분이 이미 킷트내에 전처리되어 있

본 연구는 농림기술개발사업(관리번호 298014-3)에 의해서 수행되었음.
*Corresponding author: Byeong-yeal Jung
National Veterinary Research and Quarantine Service, MAF, Anyang 430-824, Korea
[Tel: +82-31-467-1733, Fax: +82-31-467-1740, E-mail: jungby@nvrqs.go.kr]

어 별도의 장비나 시약 등을 요구하지 않는다. 다만 시료를 킷트에 몇 방울 적하하는 것이 검사자가 해야 할 유일한 과정이며, 검사결과를 육안적으로 10분 이내에 확인할 수 있어 그 적용 범위가 점차 넓어지고 있다 [7, 16].

일반적으로 면역크로마토그라피 킷트는 sample pad, conjugate pad, nitrocellulose(NC) membrane, absorbent pad 순으로 서로 중첩되어 모세관이동 현상으로 시료가 전개되면서 항원항체반응이 일어난다. Sample pad는 시료중에 있는 큰 입자나 적혈구 등을 걸러주며, 시료의 pH 조절기능 뿐만 아니라 Tween 20, BSA 등으로 전처리되어 있어 시료의 원활한 전개를 유도한다 [13]. Conjugate pad는 시료내에 있는 검사 대상 항원과 colloidal gold particles에 부착된 항체가 서로 반응하여 1차 항원항체복합체를 형성하는 부분이다. Conjugate pad 전처리에 사용되는 buffer에는 sucrose나 trehalose 같은 sugar를 첨가하여 건조 상태에서도 gold particles를 선홍색으로 안정화시키며 원활하게 전개되도록 해준다 [7]. NC membrane에는 육안적으로 보이지는 않지만 test line과 control line이 분사되어 있다. Test line에는 검사 대상 항원에 대한 항체가 있어 1차 항원항체복합체에 대한 2차 항원항체반응이 일어난다. Control line에는 colloidal gold particles에 부착된 항체에 대한 2차 항체가 분사되어 있으며 test line의 반응과 무관하게 항상 일정한 반응을 나타내면서 사용된 킷트의 quality control로서 작용한다. 항체가 NC membrane에 부착하는 기전은 electrostatic interaction과 hydrophobic interaction에 의하며, low ionic strength의 buffer나 ethanol같은 co-precipitation agent를 사용하기도 한다 [16]. Absorbent pad는 NC membrane을 통과하여 반응이 종료된 시료를 흡수하는 역할을 하므로 전처리 과정은 필요가 없다. 다만 킷트에 적용할 시료의 양은 각 pad가 함유할 수 있는 액체의 총량을 초과해서는 안되며, 과도한 양의 시료를 적용하면 back flow가 유발되어 결과 판정에 혼동을 초래할 수도 있다.

특히 면역크로마토그라피 킷트 개발시 중요한 부분 중의 하나는 항체를 colloidal gold particles에 부착시키는 conjugation 단계이다. Conjugation시에는 항체의 Fc 부분이 gold particles에 부착하는데, 이는 Fc 부분에 lysine처럼 positive charge를 띤 amino acid가 많아서 gold particles 표면의 negative charge와 charge interaction으로 결합하거나 또는 Fc 부분의 tryptophan에 의한 hydrophobic interaction 등으로 결합한다. 한편, colloidal gold 용액의 pH에 따라서 conjugation 정도가 다양하므로 conjugation하기 전에 colloidal gold 용액의 pH를 조정하는 것이 필요하다. 즉, zwitterion form이 많아지고 interfacial tension이 커지는 isoelectric point(pI)에서 항체가 강한 conjugation을 형성하므로, colloidal gold 용액의 pH는 conjugation할 항체의 pI보다 약간 높게 만들어야 한다. 일반적으로 polyclonal antibody의 경우에는 pI가 광범위하여 pH 7.0으로 출발하는 것이 좋으며, monoclonal antibody는 pI가 다양하므로 정확한 pI를 측정한 후 colloidal gold 용액의 pH를 조정하여야 한다 [20].

원인체에 대한 특이 항원 또는 항체를 보유하고 킷트의 각 구성 성분에 대한 이해가 있으면 면역크로마토그라피 킷트 개발이 가능하다. 이러한 배경으로 본 연구에서는 식육 중 *Salmonella* 속균의 오염 유무를 신속히 검출하기 위해서 면역크로마토그라피 킷트 각 구성 성분에 대한 전처리 과정 및 제조 기법, colloidal gold 용액의 제조 기법 등을 소개하고, 개발 킷트의 특이도와 민감도 등을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 재료

Distilled water(DW)는 HPLC grade를, bovine serum albumin(BSA)는 ELISA용을 사용하였다. 그 외의 gold chloride, trisodium citrate, potassium carbonate, ethanol, sodium tetraborate decahydrate 등은 ACS reagents로 사용하였다. Colloidal gold에 부착시키는 antibody와 test line에 분사되는 antibody는 affinity purified *Salmonella* polyclonal antibody로써 각각 Kirkegaard & Perry Laboratories (KPL)와 British Biocell International(BBI)에서 구입하였으며, control line에는 anti goat-IgG(KPL)를 사용하였다. 각 membrane들은 Millipore사 제품을 사용하였으며, nitrocellulose(NC) membrane은 HF13504를 이용하였다. Selenite cystine broth는 Difco 제품을 사용하였다.

Colloidal gold 용액의 제조

약 40 nm 크기의 colloidal gold 용액은 다음과 같이 제조하였다. 세제와 유기용매 등으로 완전히 수세된 삼각플라스크에 DW 94 m*l*을 넣고 hot plate에서 교반하면서 약 50°C가 되면 1%(w/v) gold chloride 용액을 1 m*l* 첨가하였다. 약 95°C가 되면 0.2%(w/v) trisodium citrate 용액 5 m*l*을 신속히 혼합하였으며, 반응용액의 색깔이 노란색에서 검은색, 보라색 순으로 바뀌었다가 최종적으로 맑은 선홍색을 나타내면 실온에서 추가로 30분 교반시켰다. 반응이 종료되면 0.1 M potassium carbonate을 이용하여 pH 6.8~7.2로 조정한 후 spectrophotometer로 520~540 nm에서 흡광도를 측정하고, 전자현미경으로 colloidal gold particles의 크기 및 형태 등을 관찰하였다.

Table 1. Salt titration to determine the minimum concentration of antibody to stabilize colloidal gold solution

Reagents	Volume(μl) of reagents added into each tube									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Colloidal gold solution	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Antibody solution(0.2 mg/ml)	0	5	10	15	20	25	30	35	40	50
Deionized water	50	45	40	35	30	25	20	15	10	0

Salt titration

Colloidal gold particles는 제조시마다 크기나 형태에서 차이가 나타날 수 있어 이들을 안정화시키는데 필요한 최소량의 항체 농도를 결정하는 것이 필요하며, 본 연구에서는 Roth의 변법을 이용하여 salt titration으로 실시하였다 [17].

즉, colloidal gold 용액(OD 1 at 520 nm, pH 7.0)을 10개의 시험관에 각각 1 ml씩 분주한 후 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 희석된 *Salmonella* polyclonal antibody와 DW를 각각 5 μl씩 증가 또는 감소시키면서 시험관 내 총량이 1050 μl가 되도록 조정하였다(Table 1). 이를 tapping하여 30분 정치한 후 10%(w/v) NaCl 용액을 각 시험관에 40 μl씩 혼합하고 15분 후 육안적으로 colloidal gold 용액의 색깔 변화가 없는 최소 항체농도를 관찰하였다.

Conjugation

Antibody를 conjugation하기 위하여 colloidal gold 용액(OD 1 at 520 nm, pH 7.0) 40 ml에 *Salmonella* polyclonal antibody 용액(0.2 mg/ml in 2 mM borax) 0.8 ml을 한 방울씩 천천히 혼합한 후 30분 동안 invert shaking을 실시하였다. 0.1%(w/v) NaOH를 사용하여 conjugation 용액의 pH를 9.0으로 조정하고, 0.4 ml의 10%(w/v) BSA를 한 방울씩 적하하였다. 30분 동안 invert shaking한 후 0.1%(v/v) HCl을 이용하여 pH 7.2로 재조정 한 후 원심분리하여(10,000 rpm, 1 hr) 상층액을 제거하였다. Pellet을 2 mM borax 용액에 부유시켜 상기 조건으로 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 0.3 ml의 10% BSA, 3 ml의 1%(w/v) sodium azide, 26.7 ml의 2 mM borax(pH 7.2)가 혼합된 용액에 pellet을 완전히 부유시켜 냉장보관하면서 conjugate pad 전처리에 사용하였다.

Sample pad 및 conjugate pad 전처리

Sample pad의 전처리는 다음과 같이 실시하였다. 2.5 ml의 20X PBS, 5 ml의 10% BSA, 2.5 ml의 10%(v/v) Tween-20을 혼합하여 DW로 최종 50 ml가 되도록 조정하고 이를 sample pad(20×30 cm)에 적신 다음 37°C 항온실에서 하루동안 건조시켰다.

항체가 부착된 colloidal gold를 conjugate pad에 전처리하기 위해서 다음과 같이 실시하였다. 5 ml의 20 mM borax, 5 ml의 50%(w/v) trehalose, conjugation된 colloidal gold 용액(OD 10 at 520 nm) 12.5 ml, DW 27.5 ml를 혼합하여 conjugate pad(20×30 cm)를 적셨다. Conjugate pad 가장자리에 colloidal gold 농도가 높아지는 edge effect를 피하기 위하여 신속히 건조시켰다.

Test line과 control line의 제작

Test line과 control line의 제작을 위하여 Hi-flow Plus Mylar-backed NC membrane을 사용하였으며 8 mm 부위에 test line을, 그리고 13 mm 부위에는 control line을 분사하였다. Test line에 분사되는 *Salmonella* polyclonal antibody는 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.2)에 녹여서 2.5 mg/ml의 농도로 사용하였으며, control line에 분사되는 anti goat-IgG는 3%(v/v) ethanol이 첨가된 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.2)에 녹여서 0.7 mg/ml로 조정하여 사용하였다. 항체의 분사는 Matrix 1600 (Kinematic Automation, USA)을 이용하여 1 μl/cm로 분사하여 신속히 건조시켰다.

면역크로마토그라피 킷트의 조립

전처리가 완료된 각각의 membrane들은 서로 겹쳐지도록 조립하여 backing card로 각 membrane들을 지지하였다(Fig. 1). 조립된 membrane은 폭 4 mm로 절단하여 제습기에 넣어 실온에 보관하면서 제작된 킷트의 특이도와 민감도 조사 등에 사용하였다.

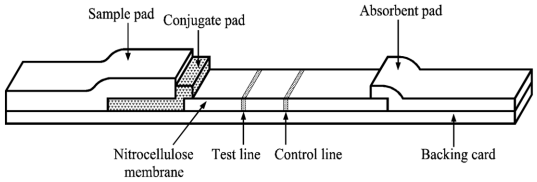

Fig. 1. Assembly of immunochromatographic strip. The strip consisted of four membranes: sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane, absorbent pad. The sample was moved from sample pad to absorbent pad by capillary migration.

Table 2. Specificity and sensitivity of the *Salmonella* immunochromatographic strip tested with pure-cultured bacteria

Organisms	Results
paratyphi A*, *paratyphi* B, *reading, chester, sandiego, derby, essen, california, typhimurium, typhimurium* var. *copenhagen, bredeney, choleraesuis, montevideo, oranienburg, thompson, virchow, bareilly, tennessee, lille, newport, bonariensis, tallahassee, glostrup, virginia, berta, enteritidis, dublin, rostock, moscow, panama, daressalaam, javiana, anatum, london, uganda, illinois, senftenberg, aberdeen, rubislaw, grumpensis**, *hvittingfoss*	+
*ibadan****, *E. coli*, *Citrobacter amalonaticus*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas salmonicida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*	−
Specificity 100% Sensitivity 97.6%	

*Serotype of *Salmonella*, **weak positive, ***$Salmonella$ sp. not yielded a positive signal in the strip test

특이도와 민감도 조사

개발된 킷트의 특이도와 민감도 조사는 국립수의과학검역원에서 보유중인 *Salmonella* 표준균주 중 12종의 O 항원그룹으로 구성된 42개의 혈청형과 *E. coli* 등 총 54주를 사용하여(Table 2) 다음과 같이 실시하였다. 각 균종별로 최적 발육조건으로 액체배지에서 정지기까지 순수 배양하여 10분간 중탕한 후 120 μ*l*를 킷트에 적하하고 10분 후에 test line과 control line의 형성유무를 관찰하였다. 개발 킷트의 특이도는 진음성/(가양성+진음성)×100, 민감도는 진양성/(가음성+진양성)×100으로 계산하였다 [8].

증균에 따른 검출 민감도 조사

돈육 25 g을 selenite cystine broth 225 m*l*과 혼합하여 균질화한 후 10개의 시험관에 9 m*l* 씩 분주하였다. 하루 배양된 *S. enteritidis*(5.2×10^9 CFU/m*l*) 1 m*l*을 1번째 시험관에 분주하고(5.2×10^8 CFU/m*l*) 이후 9번째 시험관까지(5.2 CFU/m*l*) 각각 10진 단계희석을 실시하였다. 증균배양 전에 각 시험관에서 200 μ*l*를 취하여 10분 중탕한 후 120 μ*l*를 킷트에 적용하여 증균 전의 검출 민감도를 조사하였으며, 하루동안 증균 배양하여 동일한 방법으로 증균 후의 검출 민감도를 조사하였다.

결 과

Colloidal gold particles의 전자현미경적 소견

본 연구에서 제작된 colloidal gold 용액은 맑은 선홍색을 나타냈으며 520 nm~540 nm 사이에서 흡광도를 측정한 결과, 529 nm에서 OD 0.963으로 가장 높은 흡광도를 나타내었다. 한편, 전자현미경으로 관찰한 결과, 약 40 nm 크기의 colloidal gold particles를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

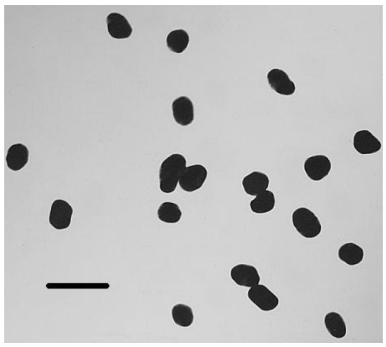

Fig. 2. Transmission electron microscopy of colloidal gold particles (Hitachi 7100FA). The accelerating voltage was 75 kV and the colloidal gold solution was absorbed between thin carbon sheets embedded with 2.0% uranyl acetate for viewing at ×120,000 magnification (bar = 100 nm). Approximately 40 nm of of colloidal gold particles were formed.

특이도 및 민감도

개발된 면역크로마토그라피 킷트의 특이도와 민감도를 조사하기 위하여 총 54종의 순수 배양된 균주를 킷트에 적용하였던 결과, 42종의 *Salmonella* 혈청형 중에서 G1 그룹의 *S. ibadan*을 제외하고는 모든 *Salmonella* 속균이 양성반응을 나타내었으며, *E. coli* 등 12종의 non-*Salmonella*에서는 모두 음성을 나타내었다. 따라서 개발된 킷트의 특이도는 100%(12/12)이었으며, 민감도는 97.6%(41/42)로 나타났다(Table 2).

증균과정에 따른 검출 민감도

증균에 따른 면역크로마토그라피 킷트의 검출 민감도를 알아보기 위해 돈육에 인위적으로 *S. enteritidis*를 접종하여 개발 킷트에 적용한 결과, 증균 전에서 5.2×10^6

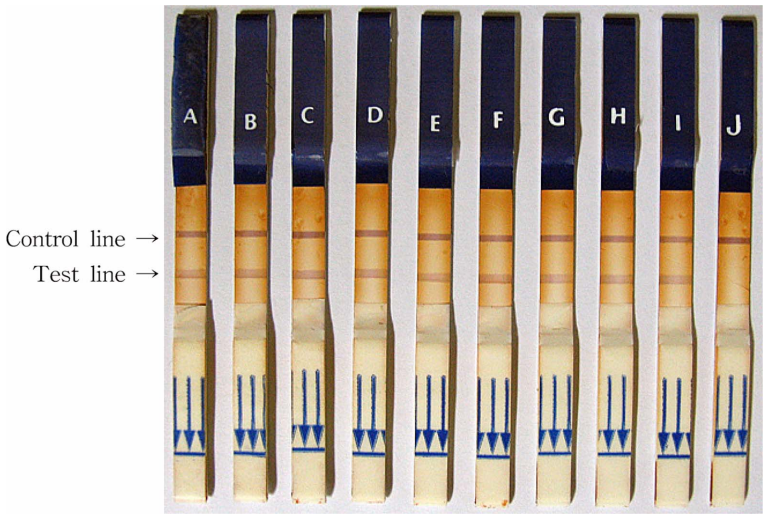

Fig. 3. Rapid detection of *Salmonella* spp. using immunochromatographic (IC) strip. *S. enteritidis* was spiked in raw pork, and then 10-fold diluted from 5.2×10^8 CFU/m*l* (strip A) to 5.2 CFU/m*l* (strip I). Strip J was a negative control. After enrichment, 120 μ*l* of heat-treated sample was dropped into the IC strip. The sample was considered positive when two red bands at the test line and control line were observed at 10 min later, and negative when only the control line was observed. The IC strip could detect 5.2 CFU/m*l* after enrichment.

CFU/m*l*의 *S. enteritidis*가 있어야 검출이 가능하였으나, 증균한 후에는 5.2 CFU/m*l*의 *S. enteritidis*까지도 검출이 가능하였다(Fig. 3).

고 찰

면역크로마토그라피 킷트는 기본적으로 항원항체반응을 이용한다는 점에서 ELISA와 유사하나, ELISA는 효소로 발색을 유도하는 반면에 면역크로마토그라피 킷트는 colloidal gold, latex 등 색깔을 가진 bead를 이용하여 항원항체반응 결과를 판정한다. Latex particles는 여러 가지 색깔이 있으므로 multi test가 가능할 뿐만 아니라 화학적으로 다양한 물질을 부착시킬 수 있는 장점이 있다 [15]. 그러나, 대부분의 면역크로마토그라피 킷트에서는 colloidal gold particles를 사용하는데 이는 실험실에서 쉽게 제조 가능할 뿐만 아니라 1 g의 tetrachloroauric acid로 10 liter의 colloidal gold 용액을 제조할 수 있어 경제적이기 때문이다. Colloidal gold 용액은 particles의 평균 크기에 따라서 흡광도 곡선의 위치와 모양이 달라지는데 평균 크기가 증가할수록 흡광도 곡선은 장파장으로 이동한다. 일반적으로 20 nm의 particles는 약 520 nm에서 최고의 흡광도를 나타내지만, 40 nm의 particles는 약 528 nm에서 가장 높은 흡광도를 나타낸다 [9, 10]. 이러한 보고들과 유사하게 본 연구에서 제조된 colloidal gold 용액은 529 nm에서 OD 0.963으로 가장 높은 흡광도를 나타내었으며, 이를 전자현미경으로 관찰한 결과 약 40 nm 크기를 확인할 수 있었다.

Colloidal gold particles는 제조 과정 중 이온의 흡수 및 해리를 통하여 negative charge를 띄며, 수용성 상태에서는 서로 electrostatic charge에 의해 repulsion상태로 안정화되어 있고 hydrophobic한 특성을 지니고 있다. High ionic strength에서는 gold particles의 zeta potential이 줄어 들어 aggregation이 나타날 수 있으나, 일단 gold particles에 단백질이 부착하면 안정화되어 aggregation이 일어나지 않는다 [18]. 항체가 부착하여 안정화된 colloidal gold 용액은 색깔의 변화가 없으나, 항체의 양이 부족하거나 불완전하게 conjugation되면 NaCl 첨가시 aggregation이 일어나서 colloidal gold 용액이 선홍색에서 푸른색으로 변하게 된다. 본 연구에서는 색깔의 변화가 없는 시험관중 최소 항체 농도인 5번 시험관에서 conjugation을 위한 항체 농도를 설정하였다.

개발된 킷트의 특이도와 민감도를 조사하기 위하여 순수 배양된 균주를 적용하였던 결과, 42종의 *Salmonella* 속균 중에서 G1 그룹인 *S. ibadan*을 제외하고는 나머지 모든 *Salmonella* 속균들이 양성반응을 보였으며, *E. coli* 등 12종에서는 모두 음성으로 나타나 특이도는 100%, 민감도는 97.6% 이었다. *Salmonella* 속균 중에서 일부 균종을 본 킷트가 검출하지 못한 이유는 사용한 polyclonal antibody가 일부 혈청형에 반응하지 못하기 때문인 것으로 생각되었다. 이러한 결과는 현재 시판되고

있는 *Salmonella* 면역크로마토그라피 킷트에서도 일부 혈청형의 *Salmonella* 속균을 검출하지 못한다는 보고와 유사하였다 [5]. 그러나 국내에서 분리 보고된 *Salmonella* 혈청형은 대부분 B, C1, D1에 속하며 [1, 2], 본 킷트는 이들 혈청형의 *Salmonella*를 원활히 검출하였으므로 국내 적용에 무리가 없을 것으로 생각되었다.

면역크로마토그라피 킷트의 검출 민감도를 조사하기 위하여 돈육에 인위적으로 *S. enteritidis*를 접종한 후 10진 단계희석하여 증균 전과 증균 후에 각각 킷트에 적용한 결과, 증균 전에는 약 5.2×10^6 CFU/m*l* 이상의 *Salmonella*가 있어야 검출이 가능하였으며, 이는 2.0×10^7 CFU/m*l* 이상 있어야 검출이 가능한 시판 *Salmonella* enzyme immunoassay 킷트보다 더 민감하였다 [12]. 한편 증균한 후에는 5.2 CFU/m*l*의 *Salmonella*가 있던 시료도 면역크로마토그라피 킷트에서 양성반응을 나타내었다. 이러한 결과로 시료 중에 수 개의 *Salmonella*만 존재하여도 증균과정을 통하여 본 킷트의 검출한계인 5.2×10^6 CFU/m*l* 이상으로 증균된다는 것을 알 수 있었으며, 이는 2.1 CFU/m*l*의 *E. coli* O157:H7이 18시간의 증균과정을 통하여 5.4×10^8 CFU/m*l* 까지 증균된다는 정 등의 보고와 유사하였다 [3].

대부분의 *Salmonella* 초대분리 평판배지는 lactose 비분해능와 H_2S 산생능을 이용하고 있으나, lactose를 분해하는 *Salmonella*와 H_2S를 산생하지 않는 *Salmonella* [14, 19] 및 시료 중에 있는 다른 세균들의 과도한 발육 등은 *Salmonella* 속균의 분리를 어렵게 만든다. 그러나, 본 킷트는 생화학 성상이 아니라 항원항체반응을 이용하고 특이도가 높으므로 식육 뿐만 아니라 환경, 분변 등 다양한 시료에도 적용이 가능하고, 초대분리 평판배지에서 *Salmonella* 유사집락을 직접 킷트에 적용하여 *Salmonella* 유무를 신속히 확인할 수 있을 것으로 생각되었다.

시료 중에 *Salmonella* 속균의 오염유무를 균분리 동정법에만 의존한다면 많은 시간과 노력이 소요된다. 그러나 면역크로마토그라피 킷트를 사용하여 먼저 스크리닝한 다음 양성반응을 보인 시료에 대해서만 *Salmonella* 속균의 분리를 시도한다면 분리의 효율성과 경제성을 높일 수 있을 것으로 생각된다. 특히 개발 킷트는 증균 시료에서 10분 이내에 결과 판독이 가능할 뿐만 아니라 부수적인 장비없이 손쉽게 사용이 가능하여 향후 축산물 안전성 확보 측면에서 많은 활용이 있을 것으로 기대된다.

결 론

Salmonella 속균을 신속하게 검출하기 위하여 면역크로마토그라피 킷트를 개발하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) Citrate를 이용하여 맑은 선홍색의 colloidal gold 용액을 제조하였다. 이 용액의 흡광도는 529 nm에서 OD 0.963으로 최고치를 나타내었으며, 전자현미경으로 약 40 nm 크기의 colloidal gold particles를 확인할 수 있었다.

(2) *Salmonella* 속균 42종과 *E. coli* 등 non-*Salmonella* 12종 등 총 54종을 개발된 킷트에 적용한 결과, 특이도 100%(12/12)와 민감도 97.6%(41/42)의 성적을 얻었다.

(3) 개발 킷트의 검출 민감도를 조사하기 위하여 돈육에 *S. enteritidis*를 접종하여 증균하였다. 증균 전에는 5.2×10^6 CFU/m*l* 이상 되어야 검출이 가능하였으나, 증균 후에는 5.2 CFU/m*l* 까지도 검출되었다.

이상과 같이, 개발된 *Salmonella* 면역크로마토그라피 킷트는 특이도와 민감도가 우수할 뿐만 아니라 10분 이내에 결과를 판정할 수 있었으며, 사용이 용이하고 부대장비가 필요없어 *Salmonella* 속균 신속 검출에 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. **국립보건원.** 배양확인 살모넬라 분리 현황, 1996~2002년. 감염병발생정보. 제13권 제12호, pp. 203, 2002.
2. **김규태, 정병열, 김봉환.** 경북지역 가축에서 분리한 *Salmonella* 속균의 혈청형 분포 및 약제 감수성. 한국수의공중보건학회지 2003, **27**, 47-52.
3. **정병열, 정석찬, 조동희, 김종염, 박용호, 신쌍재, 김성국, 김봉환.** 식육중 *Escherichia coli* O157 검출을 위한 enzyme immunoassay 기법 개발. 대한수의학회지 1998, **38**, 745-750.
4. **정윤희, 오승건**. 생닭: 50개소중 34개소의 생닭에서 식중독균 검출. pp. 52-55, 소비자시대. 한국소비자보호원, 11월호, 1998.
5. **Bautista DA, Elankumaran S, Arking JA, Heckert RA.** Evaluation of an immunochromatography strip assay for the detection of *Salmonella* sp. from poultry. J Vet Diagn Invest 2002, **14**, 427-430.
6. **Borch E, Nesbakken T, Christensen H.** Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. Int J Food Microbiol 1996, **30**, 9-25.
7. **Chiao DJ, Shyu RH, Hu CS, Chiang HY, Tang SS.** Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B. J Chromatogr 2004, **809**, 37-41.
8. **de Boer E, Beumer RR.** Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. Int J Food Microbiol 1999, **50**, 119-130.

9. **DiScipio RG.** Preparation of colloidal gold particles of various sizes using sodium borohydride and sodium cyanoborohydride. Anal Biochem 1996, **236**, 168-170.
10. **Geoghegan WD, Ambegaonkar S, Calvanico NJ.** Passive gold agglutination. An alternative to passive hemagglutination. J Immunol Methods 1980, **34**, 11-21.
11. **Grimont PAD, Grimont F, Bouvet P.** Taxonomy of the genus *Salmonella*. *In:* Wray C, Wray A(eds.). *Salmonella* in Domestic Animals. pp. 1-17, CABI Publishing, 2000.
12. **June GA, Sherrod PS, Andrews WH.** Comparison of two enzyme immunoassay for recovery of *Salmonella* spp. from four low-moisture foods. J Food Prot 1992, **55**, 601-604.
13. **Kenna JG, Major GN, Williams RS.** Methods for reducing non-specific antibody binding in enzyme-linked immunosorbent assays. J Immunol Methods 1985, **85**, 409-419.
14. **Mallinson ET, Miller RG, de Rezende CE, Ferris KE, deGraft-Hanson J, Joseph SW.** Improved plating media for the detection of *Salmonella* species with typical and atypical hydrogen sulfide production. J Vet Diagn Invest 2000, **12**, 83-87.
15. **Nakamura T, Otaki Y, Lin Z, Kato A.** Rapid and quantitative assay system for measuring anti-infectious bursal disease virus antibody using monoclonal antibody bound to polystyrene latex microspheres. Avian Dis 1993, **37**, 786-792.
16. **Paek SH, Lee SH, Cho JH, Kim YS.** Development of rapid one-step immunochromatographic assay. Methods 2000, **22**, 53-60.
17. **Roth J.** The protein A-gold (pAg) technique: a qualitative and quantitative approach for antigen localization on thin sections. *In:* Bullock GR, Petrusz P(eds.). Techniques in Immunocytochemistry. Vol. 1, pp. 107-133, Academic Press, London, 1982.
18. **Roth J.** The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry. *In:* Bullock GR, Petrusz P(eds.). Techniques in Immunocytochemistry. Vol. 2, pp. 216-284, Academic Press, London, 1983.
19. **Ruiz J, Nunez ML, Diaz J, Sempere MA, Gomez J, Usera MA.** Note: comparison of media for the isolation of lactose-positive *Salmonella*. J Appl Bacteriol 1996, **81**, 571-574.
20. **Slot JW, Geuze HJ.** Gold markers for single and double immunolabelling of ultrathin cryosections. *In:* Polak JM, Varndell IM(eds.). Immunolabelling for electron microscopy. pp. 129-142, Elsevier, Amsterdam, 1984.
21. **Wilson G.** Rapid and economical method for biochemical screening of stool isolates for *Salmonella* and *Shigella* species. J Clin Microbiol 2004, **42**, 4821-4823.