

GB

중화인민공화국 국가표준

GB 4789.31-2013

식품안전 국가표준
식품 미생물학 검사
살모넬라균·이질균·설사원성 대장균의
장내세균과 박테리오파지 진단검사

2013-11-29 발표

2014-06-01 실시

중화인민공화국
국가위생및가족계획위원회 발표

서 문

본 표준은 GB/t 4789.31-2003 「식품위생 미생물학 검사 살모넬라균·이질균·설사원성 대장균의 장내세균과 박테리오파지 검사 방법」을 대체한다.

GB/T 4789.31-2003과 비교하여 본 표준의 주요 개정사항은 다음과 같다.

- 조작 과정을 수정하였다.
- 부록B를 추가하였다.

식품안전 국가표준
식품 미생물학 검사
살모넬라균·이질균·설사원성 대장균의
장내세균과 박테리오파지 진단검사

1 범위

본 표준은 장내세균과 박테리오파지 진단을 통한 식품 속 살모넬라균·이질균·설사원성 대장균의 검사 방법을 규정하고 있다.

본 표준은 각종 식품 및 식중독 사건 샘플 속 살모넬라균·이질균·설사원성 대장균 검사에 적용된다.

본 표준은 식품업계 종사자의 장내 살모넬라균 및 이질균 보균 검사에 적용된다.

2 설비 및 재료

미생물 실험실의 일반 멸균·배양 설비 외에 기타 설비 및 재료는 아래와 같다.

- a) 항온 인큐베이터: $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $42^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $50^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$
- b) 혐기성 배양장치: $41.5^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- c) 현미경: 10~100배
- d) 수평계: 박테리오파지 시험 작업대는 수평을 맞춰야 한다.
- e) 멸균된 1mL 일회용 주사기(플라스틱 재질이어야 함), 니들 번호는 없고 사용하기 전에 5~10 μL (1mL당 100~200 방울)를 측정 후 사용한다.
- f) 마이크로 피펫 및 팁(10 μL 및 5 μL)
- g) 정량 피펫 및 팁(100 μL 및 50 μL)
- h) 멸균 피펫: 10mL, 5mL, 1mL
- i) 멸균 모세관
- j) 멸균 페트리 접시: 90mm
- k) 멸균 면봉
- l) 마개 달린 멸균 소형 시험관: 8mm \times 50mm
- m) 검경관

3 배지 및 시약

3.1 SC 증균액: 부록A의 A.1 참고

3.2 TTB 증균액: 부록A의 A.2 참고

3.3 이질균(BCT) 증균액: 부록A의 A.3 참고

3.4 영양배지(NB): 부록A의 A.4 참고

3.5 영양한천(NA): 부록A의 A.5 참고

3.6 영양반고체한천(NSA): 부록A의 A.6 참고

3.7 TSI: 부록A의 A.7 참고

3.8 글루코사민 한천: 부록A의 A.8 참고

3.9 장내세균과 진단용 박테리오파지 7종과 3종, 필요 시, 대장균 형별 박테리오파지(6종) 1세트를 다시 구입할 수 있다. 앰플 개봉 후 멸균 모세관을 사용해 멸균 소형 시험관으로 옮긴다. 매번 사용량이 적은 경우 2~3개 시험관에 나눠 담아 5℃에 냉장 보관할 수 있다.

3.10 살모넬라균 인자혈청, 이질균 형별 인자혈청, 설사원성 대장균 형별 인자혈청, 인자혈청 종류는 수요에 따라 결정된다.

4 검사 절차

4.1 살모넬라균 검사 절차

살모넬라균 검사 절차는 그림1과 같다.



그림1 살모넬라균 검사 절차

4.2 이질균 검사 절차

이질균 검사 절차는 그림2와 같다.

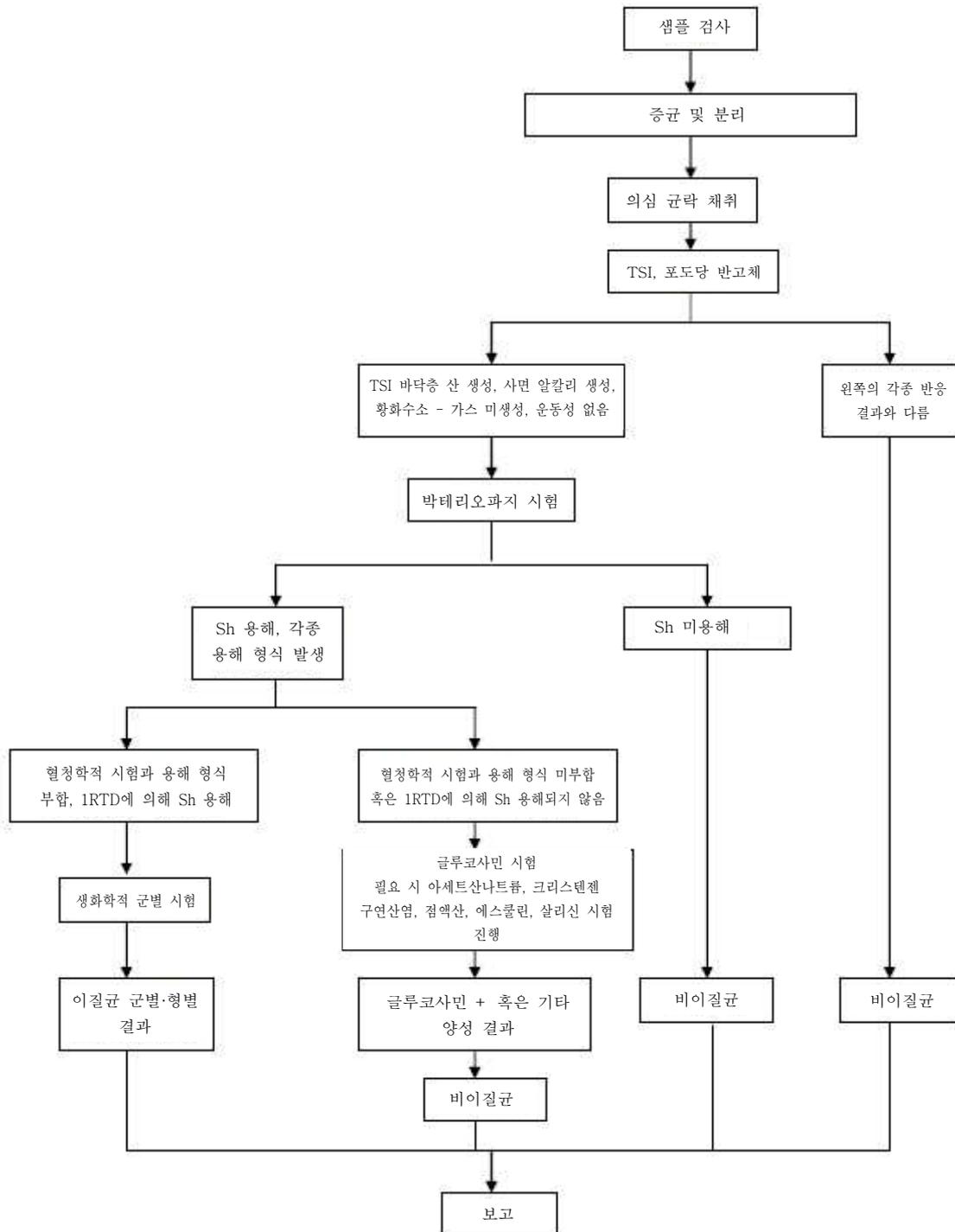


그림2 이질균 검사 절차

4.3 설사원성 대장균 검사 절차

설사원성 대장균 검사 절차는 그림3과 같다.

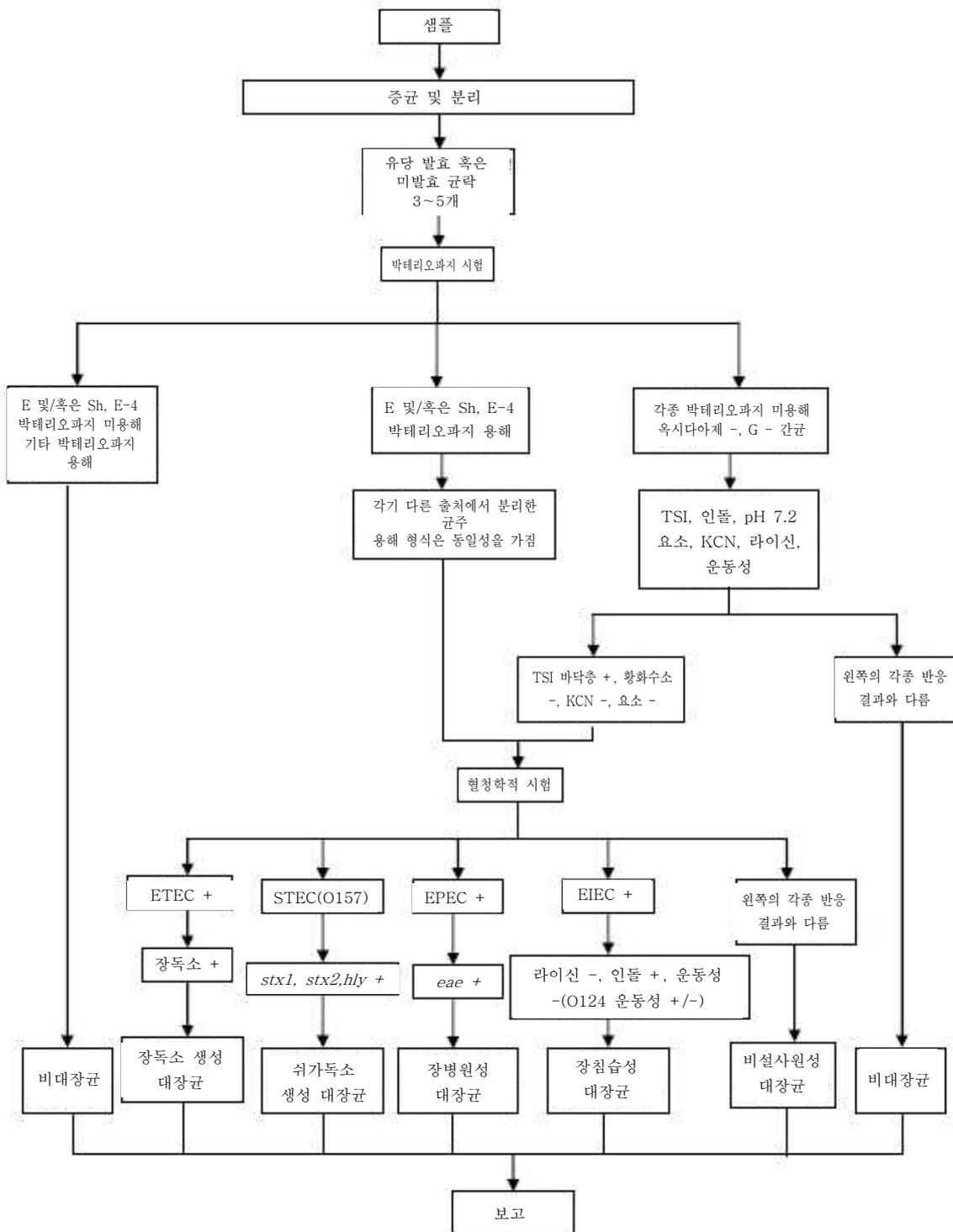


그림3 설사원성 대장균 검사 절차

5 조작 절차

5.1 전증균, 증균, 분리

5.1.1 살모넬라균의 전증균, 증균, 분리는 GB 4789.4를 따른다. 살모넬라균 증균액 민감도 측정은 부록B를 참조한다. 식품업계 종사자의 장내 살모넬라균 보균 검사 시, 채집한 샘플은 전증균이 아닌 증균을 해야 한다. 식중독 샘플은 전증균을 해서는 안 되며 채집한 샘플은 동시에 증균과 미증균을 한다.

5.1.2 이질균 증균 및 분리는 GB 4789.5를 따른다. 혐기성 배양 조건이 없는 실험실은 부록A의 BCT 증균액을 사용할 수 있다. 식중독 환자의 분변 샘플은 동시에 증균과 미증균을 한다.

5.1.3 설사원성 대장균 증균 및 분리는 GB 4789.6, GB 4789.36을 따른다. 식중독 샘플은 동시에 증균과 미증균을 한다.

5.2 박테리오파지 시험

5.2.1 배지 준비

영양한천평판(한천 1~1.5% 함유, 변형 간균의 광범위한 생장을 막기 위해 0.02%로 도데실벤젠 황산나트륨을 첨가할 수 있음), 영양한천을 가열해 녹인 후 9cm 평판마다 약 20~25mL씩 넣고 응고될 때까지 수평 작업대에 둔다. 평판을 뒤집어 반쯤 열고 36°C±1°C 인큐베이터에서 약 1h 동안 방치하거나, 50°C±1°C 인큐베이터에서 약 30min간 방치해 배지 표면 수면을 말린다.

5.2.2 시험균액 준비

5.2.2.1 선택적 한천평판에서 각각 전형적인 균락 혹은 의심 균락 2개 이상을 취해 살모넬라균 검사 시, 유당 음성 황화수소 생성 혹은 미생성 균락과 유당 양성 황화수소 생성 균락을 취하고, 대장균 검사 시, 유당 양성 혹은 유당 음성 균락을 취한다. 이질균 검사 시 전형적인 균락 혹은 의심 균락을 취해 각각 TSI, 반고체·영양한천 사면에 접종하고 36°C±1°C에서 20~24h 배양한다. TSI 바닥층에 산을 생성하고 사면에 알칼리를 생성하며, 황화수소와 가스를 생성하지 않는 비운동성 균락을 취한다. 아래 2가지 방법으로 시험균액 제조에 사용될 수 있다.

5.2.2.2 방법1: 검사 균락을 영양배지관에 접종하고 36°C±1°C에서 14~24h 배양한다. 배지 배양물 1백금이(약 5μL)를 1~2mL 들어 있는 영양배지관에 희석해 균 함유량 1*10⁶CFU/mL의 1:200~1:400 희석 균액을 만든다.

5.2.2.3 방법2: 접종용 니들로 검사 평판에서 의심 균락을 취해 1~2mL 들어 있는 영양배지관에 희석한다. 균 함유량은 약 1*10⁶CFU/mL다.

5.2.3 도말검사 균액

5.2.3.1 반점 도말법: 영양한천 표면을 원심에서부터 3등분 혹은 2등분하고 등분별로 세균 배양물 1개를 취해 도말한다. 시험균액 1백금을 취해 직경 1cm의

용균반을 도말한다. 배양물별로 바깥쪽에 5개, 안쪽에 2개 총 7개의 용균반을 도말한다.

5.2.3.2 면봉 도말법: 멸균 면봉으로 시험균액을 묻혀 정돈하고 위와 같이 한천 평판 표면의 1/3 구역에 도말한다. 3개 도말 구역은 적당한 거리를 유지해야 하며 균액이 마를 때까지 가만히 둔다.

5.2.4 박테리오파지 첨가

정량 1mL 일회용 주사기(니들은 번호가 없으며 1mL는 약 100~200 방울로 1방울은 5~10 μ L다)로 용균반에 박테리오파지를 떨어뜨리거나, 정량 10 μ L 혹은 5 μ L 마이크로 피펫으로 용균반에 박테리오파지를 떨어뜨린다. 박테리오파지 종별로 새로운 주사기 혹은 팁을 사용해야 하지만, 주사기 혹은 팁 1개로 세균별 동일 박테리오파지를 모두 첨가할 수 있다. 첨가한 박테리오파지는 순서대로 O-I, C, Sh, E, CE, E-4, Ent다. 박테리오파지 첨가 시, 한천평판은 수평 작업대에 놓고 균액은 공중에서 떨어뜨려야 하며, 니들이나 팁을 오염시켜서는 안 된다. 7가지 박테리오파지를 모두 첨가한 후 박테리오파지가 마를 때까지 몇 분간 기다린다. 평판을 뒤집어 36 $^{\circ}$ C에서 5~6h, 14~24h 배양하고 각각 결과를 관찰한다.

몇 개 세균만 박테리오파지 시험을 하는 경우, 직경 3mm 접종용 백금이로 박테리오파지 5 μ L씩 취해 순서대로 용균반에 첨가할 수 있으며, 실온 방치 시간을 최소화한다.

5.2.5 시험 결과 판정

필요 시(완전한 혈청학을 측정할 수 없는 경우 등), 잔여 펩톤수 배양물 소량을 취해 인돌 시험을 할 수 있다. 대장균은 일반적으로 인돌 양성, 살모넬라균은 인돌 음성이며, 박테리오파지 시험 결과는 표1을 참조한다.

표1 박테리오파지 시험 결과

No.	박테리오파지 용해 형식							판정 결과
	O-I	C	Sh	E	CE	E-4	Ent	
1	CL	-	-	-	-	-	-	살모넬라균
2	CL	-	-	-	-	CL	-	살모넬라균(인돌 -), 대장균(인돌 +)
3	-	CL	-	-	(-)	(-)	-	시트로박터 프룬디균 ^a
4	-	-	CL	v	v	v	-	이질균 ^b , 대장균
5	CL	-	CL	v	v	v	-	대장균

6	v	-	-	CL	v	v	-	대장균
7	-	-	-	-	CL	v	-	시트로박터 프룬디균, 대장균
8	-	-	-	-	-	CL	-	대장균
9	-	(-)	v	-	-	-	CL	엔테로박터 클로아케
0	-	-	-	-	-	-	-	박테리오파지 미용해 배양물, 생화학적 시험으로 검사
주: CL은 융합성 용해, -는 미용해, (-)는 균주 소량 용해, v는 용해 혹은 미용해를 나타낸다.								
^a 시트로박터 프룬디 <i>Citrobacter freundii</i> , 시트로박터 영개 <i>Citrobacter youngae</i> , 시트로박터 블라키 <i>Citrobacter braakii</i> , 시트로박터 워커마니 <i>Citrobacter werkmanii</i> , 시트로박터 질레니 <i>Citrobacter gillenii</i> 를 포함한다. ^b 표3에 따라 확인, 혈청학적 형별 시험을 한다.								

5.2.6 살모넬라균 박테리오파지 고속 검사 간이 진단법

살모넬라균 O-I 박테리오파지, E와 Sh를 함유한 E 다가박테리오파지, C와 CE, Ent를 함유한 C 다가박테리오파지를 사용한다. 배지 및 시험균액 준비는 위 방법과 동일하다.

도말검사 균액: 반점 도말법은 한천평판 표면을 각각 4등분 혹은 6등분하고, 등분별로 1개 세균 배양물을 취해 도말한다. 배양물별로 바깥쪽에 2개, 안쪽에 1개 총 3개의 용균반을 도말한다. 면봉 도말법은 시험균액을 한천평판에 띠 모양으로 도말할 수 있다. 평판에 약 5줄씩 도말하고 용균반이 마를 때까지 몇 분간 그대로 둔다.

순서대로 위 3가지 박테리오파지를 첨가한다. 반점 도말법은 일반적으로 O-I 박테리오파지를 안쪽 용균반에 첨가할 수 있으며, 대상(帶狀) 도말법은 O-I 박테리오파지를 균띠 왼쪽에 첨가할 수 있다. 박테리오파지가 마르면 평판을 뒤집어 36°C에서 5~6h, 14~24h 배양하고 각각 결과를 관찰한다. 표2에 따라 결과를 판정한다.

표2 박테리오파지 시험 간이 진단법

O-I	E 다가	C 다가	판정 결과
CL	-	-	살모넬라균
v	CL	v	대장균
-	-	CL	시트로박터 프룬디균 ^a

-	-	-	박테리오파지 미용해 배양물
주: CL은 융합성 용해, -는 미용해, v는 용해 혹은 미용해를 나타낸다.			
°표1 주석 외에 엔테로박터 클로아케와 소수 대장균을 포함한다.			

5.3 박테리오파지 미용해 배양물의 보충 생화학적 시험

소수 살모넬라균 배양물이 O-I 박테리오파지에 의해 용해되지 않고, 소수 대장균 배양물이 상응하는 박테리오파지에 의해 용해되지 않는다. 각종 박테리오파지로 용해되지 않는 배양물을 TSI에 접종하고 GB 4789.4에 따라 5가지 생화학적 시험과 혈청학적 형별검사를 한 후 결과를 판정한다.

5.4 혈청학적 형별검사 및 기타 보충 시험

5.4.1 살모넬라균 형별검사

GB 4789.4를 따른다. 살모넬라균으로 판정된 경우 완전한 혈청학적 형별 검사 결과를 얻어야 한다.

5.4.2 설사원성 대장균 검사

5.4.2.1 GB 4789.6과 GB 4789.36을 따른다. 분리된 균주는 동시에 동일한 몇 개 박테리오파지로 용해한 후 대장균 형별 박테리오파지를 사용해 시험한다. 균주는 동일한 용해 형식을 가져야 하며 동시에 1RTD 박테리오파지 용해 상황을 측정한다.

5.4.2.2 장독소생성 대장균은 장독소 시험 확인을 해야 한다.

5.4.2.3 침습성대장균의 전형적인 생화학적 특성은 다음과 같다. 라이신 탈탄산 효소 양성이고 비운동성이며, 가스를 생성 혹은 생성하지 않고(O124 혈청형은 운동성이며 가스를 생성하지 않을 수도 있다) 인돌 시험 양성이다. 기니피그 각막시험을 할 수 있으며 결과는 양성이어야 한다. 플라스미드 전기영동은 120~140Mdal의 큰 플라스미드를 증명하고 PCR 시험은 *ipaC* 혹은 *ipaH* 유전자를 증명해야 한다.

5.4.2.4 쉬가독소생성 대장균 O157:H7의 전형적인 생화학적 특성은 다음과 같다. 유당과 자당이 산을 생성하고 포도당이 산을 생성하며 다수가 가스를 생성한다. 황화수소 음성, 인돌 양성이며 소르비톨은 서서히 발효된다. PCR 시험은 쉬가독소생성 유전자 *stx1*, *stx2*, 용혈독소 유전자 *hly*를 증명해야 한다. 1RTD의 E-2 박테리오파지 용해 시험은 1RTD E-2 박테리오파지에 의해 용해될 수 있다(용해 정도는 CL에서 소수 용균반까지 포함한다). 쉬가독소 및 용혈독소를 생성하는 기타 혈청형의 대장균은 5.4.2.3의 절차에 따라 검사한다.

5.4.2.5 장병원성 대장균은 대장균의 전형적인 생화학적 특성을 갖는다. *eae* 유전자(부착성 차폐 유전자)의 PCR 시험은 양성이며, 쉬가독소생성 대장균의 *eae* 시험도 양성이다. *EAF*(부착성 인자 플라스미드 유전자) 혹은 *bfp*(선모가 묶어 유전자 형성)의 PCR 시험은 확인 시험을 할 수 있다.

5.4.3 이질균 형별검사

5.4.3.1 TSI 배양물을 취해 박테리오파지 용해 형식에 따라 상응하는 이질균 형별 인자혈청을 사용해 슬라이드 응집 검사를 한다. 혈청학적 형별검사 결과는 표3을 참조한다.

표3 박테리오파지 시험 결과와 이질균 혈청학적 형별 검사 결과

No.	박테리오파지 용해 형식							이질균 혈청학적 형별검사 결과
	O-I	C	Sh	E	CE	E-4	Ent	
1	-	-	CL	CL	CL	CL	-	시겔라 플렉스너리 1-5, (시겔라 보이디 11)
2	-	-	CL	CL	CL	-	-	시겔라 플렉스너리 1, 4, 시겔라 디센테리 2, 시겔라 보이디 5, 7, 11, 16, 17, (시겔라 소네이균 I)
3	-	-	CL	CL	-	-	-	시겔라 소네이균 I, 시겔라 디센테리 2, 시겔라 플렉스너리 4, 시겔라 보이디 5, 16
4	-	-	CL	CL	-	CL	-	시겔라 소네이균 II, 시겔라 플렉스너리 3
5	-	-	CL	-	-	-	-	시겔라 플렉스너리 6, 시겔라 보이디 1~4, 짝수형 6~18(16 제외), 시겔라 디센테리 3~12
6	-	-	CL	-	CL	-	-	시겔라 보이디 9, 15
7	-	-	CL	-	-	CL	-	시겔라 디센테리 1, (시겔라 소네이균 II)
8	CL	-	CL	-	-	-	-	시겔라 보이디 13 ^a

주: CL은 융합성 용해, -는 미용해를 나타낸다.

^a시겔라 보이디 13형 DNA 상동성 측정은 이질균에 부합하지 않는다.

5.4.3.2 박테리오파지 용해 형식에 따른 결과가 시겔라 플렉스너리 이질균 1~5 형인 경우 먼저 시겔라 플렉스너리 다가혈청을 사용해 응집 검사를 한다. 응집을 보이면 다시 형별·군별 인자혈청을 사용해 검사함으로써 속해 있는 혈청형 및 아형을 확인한다(GB 4789.5 참고).

5.4.3.3 박테리오파지 용해 형식에 따른 결과가 시겔라 플렉스너리 6형, 시겔라

보이디 각 형 혹은 시겔라 디센테리 3~12형인 경우 먼저 시겔라 플렉스너리 6형 혈청을 사용해 응집 검사를 한다. 시겔라 플렉스너리 6형 혈청이 응집하지 않는다면 시겔라 보이디 다가혈청 혹은 시겔라 디센테리 3~12형 다가혈청을 사용해 응집검사를 한다. 응집을 보이면 다시 각각 형별 인자혈청을 사용해 검사한다.

5.4.3.4 박테리오파지 용해 형식에 따른 결과가 시겔라 소네이균 II상균이고 시겔라 소네이균 혈청에 의해 응집되지 않는다면, 박테리오파지 용해 형식과 거친 집락 특징에 따라 직접 판정할 수 있다.

5.4.3.5 박테리오파지 용해 형식 결과에 따라 혈청학적 시험을 한 결과 응집하지 않거나 특정 형별 인자혈청에 의해 응집되지만 박테리오파지 용해 형식에 부합하지 않는 경우, 혹은 박테리오파지 용해 형식에는 부합하지만 1RTD의 Sh 박테리오파지에 의해 용해되지 않는 경우는 모두 글루코사민 시험을 함으로써 대장균과 구별해야 한다. 글루코사민 시험 양성은 대장균이다. 필요 시 초산염·크리스텐젠 구연산염·점액산 이용 시험, 라이신 및 오르니틴 탈카르복실화효소 시험, 에스쿨린 용해 시험 등 생화학적 시험을 할 수 있다. 시겔라 소네이균 시겔라 보이디 13형이 오르니틴 탈카르복실화효소 양성이고 소수 시겔라 소네이균 균주가 점액산을 이용할 수 있는 것 외에 이질균속 배양물은 모두 양성이다. 위 시험에서 양성 결과는 모두 대장균이다(GB 4789.5를 따름).

5.4.3.6 검출된 이질균 배양물은 해당 균의 생화학적 특성에 부합해야 한다. 시겔라 플렉스너리 6형은 시겔라 보이디 특성에 부합한다. 인돌 양성의 이질균 혈청은 시겔라 디센테리 2·7·8형, 시겔라 보이디 5·7·9·11·13·15·16·17형이며, 시겔라 플렉스너리 1~5형의 인돌 반응은 약한 편이다. 인돌 음성의 이질균 혈청형은 시겔라 디센테리 1형, 3~6형, 9~12형, 시겔라 플렉스너리 6형, 시겔라 보이디 1~4, 6·8·10·12·14·18형, 시겔라 소네이균이다.

5.4.3.7 시겔라 보이디 13형은 유일하게 살모넬라균 O-I에 의해 용해될 수 있는 균주이며, 고역가의 Sh 박테리오파지에 의해서만 용해될 수 있다.

5.5 결과 보고

5.5.1 살모넬라균 검사 결과 보고

5.5.1.1 O-I 박테리오파지는 용해하고 기타 박테리오파지는 모두 용해하지 않는 경우 살모넬라균 혈청혈별을 한 후에 보고한다.

5.5.1.2 각종 박테리오파지가 용해하지 않고 생화학적 시험 결과 살모넬라균인 경우 살모넬라균 혈청혈별을 한 후에 보고한다. '모름'으로 보고해서는 안 된다.

5.5.2 이질균 검사 결과 보고

5.5.2.1 Sh 박테리오파지가 용해하고 각종 용해 형식을 보이며 혈청학 시험과 용해 형식이 부합하는 경우 이질균 혈청형을 보고할 수 있다. 희귀한 혈청형은 1RTD Sh 박테리오파지에 의해 용해되고 이질균 생화학적 균별 결과에 부합해야 한다.

5.5.2.2 5.5.2.1의 시험 결과와 다른 경우 비이질균으로 보고한다.

5.5.3 설사원성 대장균 검사 결과 보고

5.5.3.1 E 및/혹은 Sh, E-4 박테리오파지가 용해하고 유래가 다른 균주의 용해 형식이 동일성을 갖거나, 각종 박테리오파지가 모두 용해하지 않고 혈청학적 형별을 통해 확인한 경우, 각각 장독소생성 대장균(장독소 시험 결과 양성), 침습성 대장균(라이신 음성, 운동성 음성, O124는 운동성 양성일 수 있음), 쉬가독소생성 대장균(O157:H7 및 O157:NM, *stx1*, *stx2*, *hly* 시험 양성) 혹은 장병원성 대장균(*eae* 시험 양성)으로 보고할 수 있다.

5.5.3.2 5.5.3.1 결과와 다른 경우 비대장균 혹은 비설사원성 대장균으로 보고한다.

부록A 배지 및 시약

A.1 SC 증균액

A.1.1 성분

펩톤	5.0g
유당	4.0g
중아셀렌산나트륨	4.0g
1% L-시스틴 용액	1.0mL
인산수소이나트륨(무수)	4.5g
인산이수소나트륨(무수)	5.5g
증류수	1000.0mL

A.1.2 제조 방법

L-시스틴 0.1g(혹은 DL-시스틴 0.2g)을 취해 1mol/L 수산화나트륨 용액 1.5mL를 넣고 시스틴을 녹인 후, 다시 증류수 8.5mL를 넣으면 1% L-시스틴 용액이다.

펩톤, 유당, 시스틴을 증류수 800mL에 넣으면 기초 용액이다.

중아셀렌산나트륨을 증류수 100mL에 넣으면 A 용액이다.

인산수소이나트륨과 인산이수소나트륨을 증류수 100mL에 넣으면 B 용액이다.

기초 용액 4.0mL, A 용액 0.5mL, B 용액 0.5mL를 혼합하고 pH를 측정한다. pH를 7.0~7.1까지 조절하고 세 용액을 각각 포장한 후 121°C에서 15min간 고압 멸균한다(고압 멸균기 가열에서부터 추출까지 1h 이내). 상온까지 식으면 5°C에 냉장 보관한다. 사용하기 바로 전에 세 용액을 비율에 따라 혼합해 시험관에 나눠 담는다. 세 용액을 혼합한 후 pH 값이 7.0 미만이면 인산수소이나트륨, 인산이수소나트륨 용량과 중아셀렌산나트륨 용량을 조절해야 한다. 사용하기 전에 증균 민감도를 측정해야 하며 방법은 부록B를 참고할 수 있다.

표A.1 아셀렌산염과 인산염 용량

아셀렌산염 종류 및 용량 g		인산염 종류 및 용량 g	
주요 종류	용량	인산이수소나트륨 (무수)	인산수소이나트륨 (무수)
아셀렌산나트륨·H ₂ O (100%)	5.0	8.6	0.8

아셀렌산나트륨·H ₂ O (75%)	4.75	7.8	1.25
아셀렌산나트륨·H ₂ O (50%)	4.5	7.0	2.65
중아셀렌산나트륨 (75%)	4.25	6.25	3.58
중아셀렌산나트륨 (100%)	4.0	5.5	4.5
중아셀렌산나트륨 (75%)	3.85	4.7	5.4
중아셀렌산나트륨 (50%)	3.7	3.9	6.35
아셀렌산(75%)	3.55	3.1	7.28
아셀렌산(100%)	3.4	2.3	8.2
주: 위는 증균액 1,000mL당 용량이다.			

A.2 TTB 증균액

A.2.1 성분

A.2.1.1 기초 용액

폴리펩톤 혹은 펩톤	3.0g
담즙산염	1.0g
탄산칼슘	10.0g
티오황산나트륨	30.0g
0.1% 브릴리언트 그린 수용액	10.0mL
증류수	1000.0mL

A.2.1.2 요오드액

요오드	6.0g
요오드화칼륨	5.0g
증류수	20.0mL

A.2.2 제조 방법

A.2.2.1 기초 용액 제조: 기초 용액 성분을 순서대로 증류수 800mL에 넣는다. 성분이 녹으면 증류수를 1000mL까지 넣고 pH를 7.0±0.1까지 조절한다. 121℃에

서 15min간 고압 멸균한 후 식혀서 보관한다.

A.2.2.2 요오드액 제조: 요오드화칼륨을 증류수에 녹인 후, 다시 요오드 결정을 넣고 완전히 녹을 때까지 흔들어서 준다. 갈색병에 마개를 꼭 막아 보관한다. 사용하기 바로 전에 기초 용액과 요오드액을 혼합해 시험관에 나눠 담는다. 사용하기 전에 증균 민감도를 측정해야 하며 방법은 부록B를 참고할 수 있다.

주: 변형 증균의 과도한 생장을 막기 위해 1,000mL에 설과메톡사졸 1.25mg을 첨가할 수 있다.

A.3 이질균(BCT) 증균액

A.3.1 성분

펩톤	20.0g
복합아미노산	2.0g
육추출물	5.0g
담즙산염 3호	4.5g
구연산나트륨	4.5g
티오황산나트륨	4.5g
증류수	1000.0mL

A.3.2 제조 방법

A.3.1의 성분을 혼합해 가열, 용해하고 25℃까지 식힌다. pH를 7.2±0.1까지 조절하고 121℃에서 15min간 고압 멸균한다. 식힌 후 시험관에 나눠 담아 보관한다.

A.4 영양배지(NB)

A.4.1 성분

펩톤	15.0g
육추출물	3.0g
염화나트륨	5.0g
증류수	1000.0mL

A.4.2 제조 방법

A.4.1의 성분을 혼합해 가열, 용해하고 25℃까지 식힌다. pH를 7.2±0.2까지 조절하고 121℃에서 15min간 고압 멸균한다.

A.5 영양한천(NA)

성분 및 제조 방법: 영양배지(NB) 1,000mL에 한천 15g(박테리오파지 시험에 사용되는 경우 한천을 10g만 넣음)을 넣고 120℃에서 15min간 고압 멸균한다.

A.6 영양반고체 한천(NSA)

성분 및 제조 방법: 영양배지(NB) 1,000mL에 한천 3g을 넣고 120℃에서 15min간 고압 멸균한다.

A.7 TSI(TSI)

A.7.1 성분

펩톤	20.0g
육추출물	3.0g
유당	10.0g
자당	10.0g
포도당	1.0g
황산암모늄철(6개 결정수 함유)	0.5g
페놀 레드	0.025g 혹은 5g/L 용액 5mL
염화나트륨	5.0g
티오황산나트륨	0.5g
한천	12.0g
증류수	1000.0mL

A.7.2 제조 방법

페놀 레드와 한천 외 기타 성분을 증류수 400mL에 넣고 골고루 섞는다. 10min간 가만히 두었다가 가열해 완전히 녹을 때까지 끓이고 pH를 7.4±0.1까지 조절한다. 한천을 증류수 600mL에 넣고 골고루 섞는다. 10min간 가만히 두었다가 가열해 완전히 녹을 때까지 끓인다. 위 두 용액을 혼합한 후 페놀 레드 지시약을 넣고 골고루 섞어 다시 시험관(12mm*100mm)에 약 2~4mL씩 나눠 담는다. 121℃에서 10min간 혹은 115℃에서 15min간 고압 멸균한다. 고층 사면이 생기도록 두며 적황색을 띤다.

A.8 글루코사민 한천

A.8.1 성분

염화나트륨	5.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0g
인산수소이칼륨(무수)	1.0g
포도당	5.0g

한천	20.0g
0.2% BTB	40.0mL
증류수	1000.0mL

A.8.2 제조 방법

A.8.1의 성분을 혼합해 가열, 용해하고 25℃까지 식힌다. pH를 6.8±0.1까지 조절하고 121℃에서 15min간 고압 멸균한다. 사면이 생기도록 두고 식은 후 보관한다.

A.8.3 시험 방법

접종용 니들로 배양물 표면을 살살 건드려 염수관에 매우 묽은 현탁액을 만든다. 육안으로는 혼탁함이 관찰되지 않는다. 백금이당 균수 20~100CFU가 가장 좋다. 접종용 백금을 멸균해 균액을 접종하는 동시에 같은 방법으로 보통 사면에 접종해 대조균으로 삼는다. 36℃±1℃에서 24h 배양한다. 양성인 경우 글루코사민 사면에 정상 크기의 균락이 성장하고, 음성인 경우에는 성장하지 않는다. 단, 대조균 배지에서는 잘 성장한다. 글루코사민 사면에 미세한 균락이 성장하면 음성 결과로 볼 수 있다.

부록B
증균액 민감도 측정 방법

B.1 살모넬라균 증균액 민감도 측정 방법

B.1.1 시험 균주는 쥐장티푸스균 혈청형, 장염균 혈청형이다.

B.1.2 간섭 균주는 대장균이다.

B.1.3 시험 균주와 간섭 균주를 영양배지관에 접종하고 36°C±1°C에서 18~24h 배양한다. 균액 농도는 약 10⁹CFU/mL다. 대장균 균액 농도는 측정하지 않아도 되며 쥐장티푸스균과 장염균 혈청형의 균액 농도를 측정해야 한다.

B.1.4 15mm*150mm 시험관 8개가 1세트이며 번호를 매긴다. 홀수 번호 시험관에 멸균 생리식염수 4.5mL씩 넣고, 짝수 번호 시험관에는 5.0mL씩 넣는다.

B.1.5 1번 시험관에 살모넬라균 영양배지 배양액 0.5mL를 넣고 2번 시험관에는 0.05mL를 넣는다. 다시 2번 시험관에서 살모넬라균 희석 균액을 취해 3번 시험관에 0.5mL, 4번 시험관에 0.05mL를 넣는다. 이와 같은 방법으로 8번 시험관까지 희석하며, 희석할 때마다 피펫을 교체해 줘야 한다.

B.1.6 6번 시험관의 희석 균액을 0.1mL씩 취해 각각 2개 영양한천평판에 점파하고 구부러진 접종용 백금으로 골고루 도포한다. 평판 표면의 균액이 건조되면 36°C±1°C에서 14~24h 배양한다. 평판에 성장한 살모넬라균 균락수를 계수해 평균값을 계산하면 약 100CFU다.

B.1.7 B.1.5에 이어 10개가 1세트인 시험 증균액 몇 세트를 배열하고 8번~10번 시험관에 8번 희석관의 희석 균액을 각각 0.1mL씩 넣고, 7번~1번 시험관까지 역순으로 위 희석도의 희석 균액을 각각 0.1mL씩 넣는다.

B.1.8 역순으로 시험관에 희석하지 않은 대장균 균액을 0.1mL씩 넣고 시험관을 흔들어 골고루 섞어 준다. 36°C±1°C에서 18~24h 배양한다.

B.1.9 시험관을 흔들어 배양물을 골고루 섞어 준 후, 배양물을 취해 검사 배지에 희선접종하고 단일 균락이 생기도록 한다. 36°C±1°C에서 18~24h 배양한다.

B.1.10 검사 배지의 살모넬라균과 대장균 균락의 성장 상황을 관찰한다. 표B.1에 따라 증균 배양 결과를 기록한다.

표B.1 증균 배양 결과

증균 배양 결과	기록
살모넬라균 균락수가 90% 이상이며 대장균 균락은 매우 드물다.	++++
살모넬라균 균락수가 80%를 차지한다.	+++

살모넬라균과 대장균 균락수가 각각 50%를 차지한다.	++
대장균 균락 위주이며 살모넬라균 균락이 몇 개 보인다.	+
대장균 균락이 성장하였으며 살모넬라균 균락은 보이지 않는다.	-
주: 증균액 민감도 판정은 ++++와 +++ 결과를 기준으로 한다. 8~10번의 3개 시험관 중 1개 이상이 ++++ 혹은 +++ 증균 효과에 달한 경우 시험관의 민감도(약 1CFU)에 도달한 것으로 판정할 수 있다. ++와 + 결과는 검출이 되더라도 간과한다.	

B.2 살모넬라균 증균액 민감도 간이 측정 방법

B.2.1 측정을 마친 증균액의 민감도 확인에 사용된다.

B.2.2 시험 균주, 간접 균주, 균주의 영양배지 접종·배양 방법은 B.1.1~B.1.3과 같다.

B.2.3 15mm*150mm 멸균 시험관 2개를 준비해 각각 멸균 생리식염수 5mL를 넣는다. 직경 3mm 접종용 백금이로 시험 균주의 영양배지 배양물 1백금이(5 μ L)를 취해 생리식염수 5mL에 희석한다. 이는 1:10³으로 희석한 것과 같다. 희석액 1백금을 취해 다른 생리식염수관 5mL에 희석하며 이는 1:10⁶으로 희석한 것과 같다. 위 희석액 0.1mL를 영양한천평판에 접종해 균락 계수에 사용한다. 균락수는 약 80~100CFU다. 다시 희석액을 1:10과 1:100으로 희석한다.

B.2.4 2~4개 증균액 시험관에 각각 희석하지 않은 대장균 배지 배양물을 0.1mL씩 넣는다. 그중 1개 관에는 1:10으로 희석한 시험균액(B.2.3) 0.1mL를 넣고, 나머지 1~3개 관에는 1:100으로 희석한 시험균액(B.2.3) 0.1mL씩을 넣는다. 시험관을 흔들어 액체가 골고루 섞이도록 한 후 36 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 14~24h 배양한다. 검사 배지에 희선접종하고 36 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 14~24h 배양한 후 결과를 관찰한다. 1:10으로 희석한 시험균액(B.2.3)을 접종한 시험관은 B.1 시험 방법의 7번 시험관과 같으며 뒤의 시험관은 8~10번 시험관과 같다.

B.3 이질균 증균액 민감도 측정 방법

B.3.1 시험 균주는 시겔라 플렉스너리 2a형, 시겔라 보이디 4형, 시겔라 디센테리 2형, 시겔라 소나이균 각 1개다.

B.3.2 간접 균주는 대장균 10개다.

B.3.3 GN 배지를 비교 증균액으로 삼아 측정한 증균액이 GN 배지보다 나은지 판정한다.