J. Fd Hyg. Safety 11(4), 307-314(1996)

EEC 4-Plate Test의 식육중 항균물질 검출감도와 항균물질 계열별 검출능 비교 조사

조병훈† · 진남섭 · 손성완 · 강환구 · 이혜숙 · 김재학 · 김봉환*
*농촌진흥청 수의과학연구소, *경북대학교 수의학과*

Evaluation of EEC 4-Plate Test for the Sensitivity and Identification of Families of Antimicrobial Drugs in Meat

Byung-Hoon Cho†, Nam-Seup Jin, Seong-Wan Son, Hwan-Goo Kang, Hye-Sook Lee, Jae-Hak Kim and Bong-Hwan Kim*
National Veterinary Research Institute, Rural Development Administration
**College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University*

ABSTRACT — The European Economic Community four plate test(EEC 4-plate test, FPT, EU) has been used for monitoring antimicrobial drug residues in meat by Local Veterinary Service Center in Korea. This study was performed to evaluate sensitivity and group specificity of some antimicrobial drugs in FPT and to compare FPT with Charm II test. The minimal detectable levels of targeted antimicrobial drugs tested with standard solutions were 0.025~1.0 ppm for 7 beta-lactams, 0.5~1.0 ppm for 4 aminoglycosides, 0.05~0.5 ppm for 5 macrolides, 0.05~0.25 ppm for 3 tetracyclines and 0.25~1.0 ppm for 6 sulfonamides. In identification of the families, five families of antimicrobial drugs were identified. In this case, beta-lactams, aminoglycosides, macrolides, tetracyclines and sulfonamides could be detectable. In comparison of FPT and Charm II test, the results of FPT were not accord with those of Charm II test having the group specificity of seven families of antimicrobial drugs in meat samples except some families like tetracyclines.

Key words □ EEC 4-plate test, Charm II test, Antimicrobial drug residues, Meat

축산식품내 항균물질의 잔류 유무를 스크리닝할 수 있는 간이검사법으로는 미생물 억제능을 이용하여 항균물질의 잔류여부를 검사하는 미생물학적 방법과 면역항체나 미생물수용체를 이용하여 개개의 잔류물질이나 계열별로 검출하는 면역화학적 방법[6,19] 등이 사용되고 있다. 이들중 미생물학적 방법은 면역화학적 방법에 비해 특정물질을 검출할 수 있는 특이성이 떨어지지만 오히려 광범위한 항균물질을 동시에 검출할 수 있는 특성때문에, *B. subtilis*를 비롯하여 *M. luteus, B. stearothermophilus, E. coli, B. cereus* 및 *B. megaterium* 등의 여러균주를 사용하여 근육이나 신장 등에서 항균물질을 검출할 수 있는 간이검사법으로 개발되어 널리 이용되어 오고 있다.[1,2,4,5]

식육중 항균물질의 미생물학적 간이검사법은 대부분 우유의 검사법을 기초로 개발되었으며, 디스크나 면봉 혹은 cylinder 등의 기구를 이용하여 동물의 육즙, 혈액 혹은 뇨를 흡수시키거나 추출액을 cylinder에 올려 미생물 발육억제대의 형성여부를 확인하는 방법, resazurin, brilliant black 등 산화환원 지시약을 이용하여 시험균의 대사과정에서 특정효소의 생성여부에 따라 각 색소가 환원되는지 여부로 항균물질의 잔류여부를 판정하는 방법, 그리고 한천평판 혹은 시험관 확산법 등을 기초로 bromcresol purple와 같은 수소이온농도 지시약을 이용하여 미생물이 발육함에 따라 생성되는 산(酸)에 의해 변화되는 색상으로 판정하는 방법 등이 소개되고 있다.[4]

우리나라에서 사용되고 있는 EEC 4-plate test(FPT)는 유럽연합에서 German Hemmstofftest 및 Dutch kidney test를 혼용하여 개발하였던 방법이다.[4-5,16,23] 최초의 이 방법은 pH를 달리하는 2종류의 *B. subtilis BGA* 평판, *M. luteus* 및 *E. coli* 평판을 사용하였으나 이들중 *E. coli* 평판에서 sulfamethazine을 비롯한 5종 설파제의 검출감도가 1~20

† Author to whom correspondence should be addressed.

ppm인데 비해 trimethoprim을 배지 m*l*당 0.05 μg을 첨가시킨 *B. subtilis* BGA(pH 7.2)평판에서는 모두 0.5 ppm까지 검출할 수 있는 것으로 보고됨으로써 FPT는 *E. coli* 평판 대신에 설파제의 검출감도를 매우 향상시킬 수 있는 방법으로 개선되었다. 그러나 FPT에 의한 항균물질의 검출능에 대해 부분적으로 조사 보고된 것[20-22] 이외에 실제 식육내 잔류하는 항균물질에 대한 검출능에 관한 근거자료나 식육내 잔류가능한 다양한 항균물질에 대한 검출감도 및 평판 조건별 검출양상에 관한 결과는 매우 부족한 실정이다.

이에 본 시험은 식육내 검출가능한 여러 항균물질에 대한 FPT의 검출감도를 알아보고 평판 조건별 검출양상에 의한 계열별 검출능에 대해 항균물질 계열별 특이성이 뛰어난 미생물수용체분석법(Charm II test)과 일치여부를 비교하고자 수행하였다.

재료 및 방법

표준시약

실험에 사용한 표준항균물질중 penicillin G, ampicillin, streptomycin, dihydrostreptomycin, gentamicin, chlortetracycline(CTC), chloramphenicol 및 bacitracin은 Fluka 제품을 사용하였으며, amoxicillin, cloxacillin, nafcillin, cephalexin, cephazolin, sulfamethazine(SMZ), sulfamerazine (SMR), sulfadimethoxine(SDM), sulfamonomethoxine(SMM), sulfathiazole(STZ), sulfaquinoxaline(SQX), trimethoprim (TMP), oxytetracycline(OTC), neomycin, tylosin, erythromycin, oleandomycin(OM), spiramycin, oxolinic acid, norfloxacin, olaquindox, thiamphenicol 및 furazolidone 등은 Sigma 제품을 사용하였다.

이들 물질의 용매로는 amminoglycoside계 항생물질은 멸균증류수, furazolione은 10% dimethylsulfoxide, oxolinic acid 및 norfloxacin은 0.2% 1N NaOH 첨가 메탄올, virginiamycin은 0.05M 인산완충액과 메탄올(1:1, v/v), amoxicillin 및 monensin은 50% 메탄올, 그리고 기타 항균물질은 메탄올을 사용하였으며, 용해후 모든 희석용액은 멸균증류수를 사용하여 적절한 농도로 희석하여 사용하였다.

EEC 4-plate test(FPT)

시험균액의 조제 — *B. subtilis* BGA 균주의 아포액은 증류수 1 *l*에 해당하는 nutrient agar에 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 g 및 agar 5 g을 보충하여 Roux 병에 250 m*l*씩 분주하고 고압증기멸균하여 굳힌 후 nutrient agar 사면배지에 37°C에서 하룻밤 배양한 종균을 멸균증류수 2-3 m*l*으로 집균하여 Roux 병 평판에 이식하였다. 37°C에서 18-24시간 배양하여 실온에 6일간 방치한 후 유리구슬(직경 4 mm)과 멸균증류수 25 m*l*을 넣고 조심스럽게 흔들어 집균하여 멸균원침관에 옮긴 다음 항온수조 65°C에서 30분간 가열하였다. 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 다시 일정량의 멸균증류수를 넣어 vortex mixer로 부유시켜 원심분리에 의한 세척과정을 총 3회 반복하였다. 마지막으로 원심분리하여 상층액을 버리고 남은 침전물을 20 m*l*의 멸균 증류수로 재부유시켜 70°C에서 30분간 가열하였다. 이 아포액을 plate count agar(PCA)로 아포의 농도를 측정하여 멸균증류수로 $10^7 \sim 10^8$ CFU/m*l*이 되도록 조정하여 냉장보관하면서 사용하였다.

M. luteus ATCC 9341 균주의 배양액은 tryptic soy broth 20 m*l*에 계대한 균액을 직경 2 mm 백금이로 1 loopful을 접종하여 32°C, 항온수조에서 16시간 진탕배양(80 rpm)한 다음 이 균액 1 m*l*을 19 m*l*의 멸균증류수에 희석하여 냉장보관하면서 1주일간 사용하였다. 이때 균액농도는 약 2×10^7 CFU/m*l*이었다.

시험용 평판의 조제 — 배지 성분으로 peptone 6.9 g, NaCl 5.1 g, KH_2PO_4 1.0 g 및 agar 13.0 g과 증류수 1 *l* 비율로 가열하여 녹인 후 4개의 삼각플라스크에 동량을 분주하여 고압증기멸균한 다음 배지온도를 항온수조에서 48-50°C로 조정하였다. 1N NaOH 혹은 1N HCl을 사용하여 배지의 pH를 6.0, 7.2, 8.0 및 8.0으로 조정한 후 전자의 3종류 배지에는 *B. sutilis(B.s)* 아포액을 65°C에서 30분간 가열하여 2×10^6 CFU/m*l* 농도로 희석한 용액을, 후자의 pH 8.0배지에는 *M. luteus(M.l)* 균배양액을 멸균증류수로 20배 희석한 균액(약 2×10^7 CFU/m*l*)을 각각 배지 100 m*l*당 희석균액 1 m*l*를 첨가하여 약 1분간 혼합하였다. 이와 동시에 pH 7.2 배지에는 *B.s* 아포희석액을 첨가할 때 10 mg의 TMP를 메탄올 10 m*l*에 녹여 10.0 μg/m*l*으로 희석한 TMP 용액을 배지 100 m*l*당 1 m*l*을 첨가하였다. 피펫으로 각 배지별 petri-dish(87×15 mm) 각 6 m*l*씩 분주하여 뚜껑을 약간 열어 둔 상태로 30분간 방치한 후 사용하였으며, 사용하고 남은 평판은 4°C 냉장보관하면서 2~3일내 사용하였다. 이때 제조한 *B.s* 평판(pH 6.0, 7.2, 8.0)의 균농도는 2×10^4 CFU/m*l*, M. l 평판(pH 8.0)이 2×10^5 CFU/m*l*이었으며, pH 7.2 평판의 TMP 농도는 배지 m*l*당 0.1 μg이었다.

조제한 시험용 평판에 각각 pH 6.0평판에는 penicillin G 0.5 μg/m*l*, pH 7.2 평판에는 SMZ 50 μg/m*l*, 그리고 pH 8.0 두 평판에는 streptomycin 50 μg/m*l* 용액으로 직경 6 mm 디스크(Schleicher & Schuell No.15100 혹은 Adventec No. 1995203)를 사용하여 각 표준용액을 10 μ*l*씩 흡습시킨 후 평판위에 올려 놓고 32°C, 16시간 배양하여 시험균의 발육

억제대를 관찰한 결과 모두 6 mm이상이었다.

Charm II test

FPT와 일치율을 조사하기 위해 미국 Charm Sci. 사의 Charm II test 매뉴얼에 따라 식육시료 20g을 전처리하여 각 항균물질의 계열별 시험방법에 따라 항균물질을 검사하였다.[19]

결과 및 고찰

배지 및 TMP에 따른 검출감도

1959년 Lange & Madekung[4]이 최초로 세균감염증에 대한 사후검사과정에서 항생물질이 잔류하게 되면 원인균의 분리를 방해할 것이라는데 착안하여 *M.l* 균주를 이용하는 잔류검사법을 개발하였다. 초기에는 시험용 평판에 조직을 직접 올려 검사하는 방법으로 하였으나 생리식염수에 간과 임파절과 같은 조직을 73℃에서 5분간 가열하여 얻은 추출액을 사용하는 cylinder plate 법이 효율적임을 발견하였다. 그러나 이러한 추출과정을 거치게 되면 대량의 시료를 검사해야하는 간이검사법으로서의 한계가 있기 때문에 대부분의 미생물학적 간이검사법은 10 mm 혹은 12.7 mm 디스크(여지)를 사용하거나 면봉을 이용하여 근육이나 신장 등의 시료를 절개한 후 체액을 흡착시켜 잔류 항균물질을 검사해 왔다.[5,7,10-14,16,18] 마찬가지로 FPT도 *B.s* 및 *M.l* 균주를 이용한 미생물학적 방법으로써 가검물에 10 mm 디스크를 삽입하여 체액을 흡수시킨 다음 4종류의 평판에 적용하는 disc plate 법이며, *B.s* pH 7.2 배지에 설파제와 복합적으로 상승작용을 나타내는 TMP를 첨가하여 설파제의 검출감도를 높이고자 한 간이검사법이다.

FPT의 시험용 배지조성에 따른 설파제의 검출감도를 알아보기 위해 Bogaerts & Brussels[9]에 의한 FPT의 배지조성으로 증류수 1 *l*당 peptone 6.9 g, NaCl 5.1 g, KH_2PO_4 1.0 g 및 agar 13.0 g을 조합한 배지(FPTA), nutrient agar(NA), 0.4% 포도당을 보충한 nutrient agar(NAG), Mueller-Hinton medium(MH) 및 0.4% 포도당을 보충한 MH(MHG)를 이용하여 SMZ, STZ 및 TMP에 대한 검출감도를 비교한 결과, 이들 모두 MH에서 검출감도가 가장 높게 나타났으며 FPTA, NA순으로 나타났다(Table 1). 또한 배지내 포도당을 첨가할 경우 설파제 및 TMP의 검출감도가 동시에 떨어지는 결과를 나타냈다. 따라서 설파제를 검출하기 위한 적절한 배지는 MH가 더 효과적이며, 다른 배지에 비해 TMP 첨가농도도 상대적으로 적은 량을 첨가하여야 함을 알 수 있었다. 그러나 본 실험에서는 기존의 FPTA와 MH에 의한 검출감도를 비교할 만한 충분한 자료가 없었기 때문에 MH를 사용하지 않고 기존의 FPTA를 사용하여 항균물질에 대한 검출능을 조사하였다.

Table 1. Effect of medium on the sensitivity for detection of some antimicrobial drugs

Assay media[1]	Minimum detectable levels(μg/m*l*)		
	Sulfamethazine	Sulfathiazole	Trimethoprim
FPTA, pH 7.2	10	5	2.5
NA, pH 7.0	>100	>100	10
NAG, pH 7.0	>100	>100	25
MH, pH 7.2	0.5	0.25	0.5
MHG, pH 7.2	>1	>1	1

[1] FPTA: Peptone 6.9 g, NaCl 5.1 g, KH_2PO_4 1.0 g, Agar 13.0 g/liter DW, NA: nutrient agar, NAG: nutrient agar supplemented with 0.4% glucose, MH: Mueller-Hinton medium, MHG: Mueller-Hinton medium supplemented with 0.4% glucose

Corry 등[4]은 FPTA를 사용한 *B.s* pH 7.2 평판에 TMP를 배지 m*l*당 0.05 μg 농도로 첨가하였을 때 SMZ, SMR, STZ, sulfadiazine(SDZ) 및 sulfadoxine 등 5종 설파제의 검출감도가 0.5 ppm이라고 하였으며, Nouws[14]는 0.4% 포도당, 1% NaCl를 보충한 NA(pH 7.0)를 사용하였을 경우 TMP를 m*l*당 0.15 μg을 첨가하였을 때 SMZ, SMR, sulfanilamide 및 sulfapyridine의 검출감도가 0.3 ppm, SDZ이 0.2 ppm이었다고 하였다. 본 실험에서도 FPTA를 사용하여 TMP 첨가농도별 검출감도를 시험하였을 경우 이와 유사한 결과를 나타냈으며, *B.s* pH 7.2 평판의 배지내 TMP 첨가농도가 0.15 μg/m*l*를 초과하면 오히려 시험균의 발육이 억제되는 경향이 있었고 TMP를 배지m*l*당 0.1~0.15 μg수준으로 높이더라도 SMZ, STZ 및 SMM 등 3종 설파제의 검출감도는 0.1~1.0 μg/m*l* 수준으로, 특히 대내외적로 중요시되는 SMZ의 국내 허용기준 0.1 ppm에는 다소 미치지 못하는 결과를 나타냈다.

항균물질별 최저검출한계

FPT에 의한 항균물질별 최저검출감도를 알아보기위해 평판조건별 검출감도를 측정한 결과 항균물질에 따라 다양한 결과를 나타냈다(Table 2). CTC, OM 등의 물질은 검출감도가 각각 0.05 μg/m*l* 및 0.1 μg/m*l*으로서 국내에서 설정된 식육중 잔류허용기준[25]을 충족시키기도 하는 반면 olaquindox와 같은 물질은 약제첨가사료 첨가수준인 100 μg/m*l*의 검출감도를 나타내어 실제 잔류수준을 감안할 때 FPT에 의한 검출이 어려울 것으로 나타났다.

Table 2. Minimal detectable levels(μg/ml) of 33 antimicrobial drug standard solutions in EEC 4-plate test

Antimicrobial drugs	*B.s*[1] pH 6.0 plate	*B.s* pH 7.2 plate[3]	*B.s* pH 8.0 plate	*M.l*[2] pH 8.0 plate
β-Lactams				
Penicillin G	0.025	0.05	0.05	0.025
Ampicillin	0.1	0.05	0.05	0.025
Amoxicillin	0.25	0.1	0.25	0.05
Cloxacillin	1	1	2.5	2.5
Nafcillin	1	2.5	2.5	0.05
Cephalexin	1	5	10	2.5
Cephazolin	1	2.5	2.5	100
Aminoglycosides				
Streptomycin	5	1	0.5	2.5
Dihydrostreptomycin	5	1	0.5	2.5
Gentamicin	10	0.5	0.5	5
Neomycin	50	2.5	1	5
Macrolides				
Erythromycin	2.5	0.1	0.05	0.05
Spiramycin	2.5	0.5	0.5	0.5
Tylosin	2.5	0.5	0.5	0.5
Oleandomycin	10	0.25	0.5	0.1
Lincomycin	100	1	25	0.1
Tetracyclines				
Tetracycline	0.25	1	5	10
Chlortetracycline	0.05	0.25	2.5	10
Oxytetracycline	0.25	0.5	2.5	10
Sulfonamides				
Sulfamethazine	25	1	100	>100
Sulfamerazine	10	0.5	100	>100
Sulfadimethoxine	1	0.25	50	>100
Sulfamonomethoxine	0.5	0.25	100	100
Sulfaquinoxaline	2.5	0.5	50	>100
Sulfathiazole	10	0.25	50	>100
Polypeptides				
Bacitracin	100	>100	>100	10
Polyethers				
Monensin	5	5	5	10
Nitrofurans				
Furazolidone	0.25	0.1	0.1	>100
Quinolones				
Oxolinic acid	0.5	1	1	>100
Others				
Spectinomycin	50	25	25	50
Chloramphenicol	5	2.5	2.5	2.5
Trimethoprim	5	2.5	2.5	25

[1] *B. s: B. sutilis* BGA.

[2] *M. l: M. luteus* ATCC 9341.

[3] The plate was added 0.1 μg trimethoprim/ml agar to EEC 4-plate agar.

계열별 항균물질의 최저검출감도는 7종의 β-lactam계 항생물질이 0.025-1.0 μg/ml이었으며, 4종의 aminoglycoside계가 0.5-1.0 μg/ml, 5종의 macrolide계가 0.05-0.5 μg/ml, 3종의 tetracycline계가 0.05-0.25 μg/ml, 6종의 설파제가 0.25~1.0 μg/ml 등의 수준이었다. 이를 Korsrud 등[13]의 STOP 및 CAST 등의 간이검사법에 의한 22종 항생물질의 검출감도 결과와 비교할 때 사용한 배지별로 다소 차이는 있지만 FPT가 STOP보다 전반적으로 검출감도가 높았으며, CAST와는 β-lactam계의 0.0062-1.0 μg/ml, aminoglycoside계의 0.062-6.2 μg/ml, macrolide계의 0.05~0.4 μg/ml, tetracycline계의 0.2~0.8 μg/ml에 비해 유사하거나 물질에 따라 다소 차이가 인정되었다. 이러한 검출감도의 차이는 이들 간이검사법에 사용되는 미생물 균주, 배지조성, pH 및 디스크 혹은 면봉 등의 여러 요인이 작용할 것으로 여겨진다.[1]

FPT의 계열별 검출능

FPT는 2종의 미생물을 사용하여 항균물질의 검출범위를 넓힘과 동시에 pH에 따른 각 항균물질의 활성도의 차이를 고려하여 잔류 항균물질의 계열추정이 어느정도 가능하도록 고안된 방법이다. 특정계열의 단일 항균물질이 동물체내에 잔류할 경우를 토대로 잔류 항균물질의 계열별 추정여부를 확인하기 위하여 항균물질 계열별 대표물질에 대해 4종류의 평판 조건별 검출양상을 조사한 결과, Table 3에서와 같이 β-lactam계 항생물질로서 penicillin계는 4가지 조건에서 전반적으로 검출되는 양상을 나타냈고(Ia형), cephalosporin계는 *B.s* pH 6.0 혹은 *M.l* pH 8.0 평판에서(Ib형), gentamicin 등 aminoglycoside계 항생물질은 주로 *B.s* pH 8.0 평판과 *B.s* pH 7.2 평판에서(II형), erythromycin 등 macrolide계는 *M.l* pH 8.0 > *B.s* pH 8.0 > *B.s* pH 7.2 평판 순으로(III형), chlortetracycline 등 tetracycline계는 주로 *B.s* pH 6.0 평판과 *B.s* pH 7.2 평판에서 검출되는 양상을 나타냈으며(IV형), sulfamethazine 등 설파제의 경우 상대적으로 낮은 농도에서는 *B.s* pH 7.2 평판에서만 검출되는 양상을 나타냈지만 *B.s* pH 6.0 평판에서도 설파제 종류에 따라 0.5~25 μg/ml 농도에서 검출될 수 있는 것으로 나타났다(V형).

이와 같은 항균물질의 계열추정을 위한 미생물학적 방법으로 Jinbo 등[9]은 C18 cartridge를 이용한 전처리법으로 추출한 분획의 용출액을 디스크에 흡착시켜 *B. cereus, B.s* 및 *M.l* 균주의 억제양상으로 항균물질의 계열을 추정할 수 있는 것으로 보고한 바 있지만 시료의 추출과정을 동반하기 때문에 항균물질의 검출감도가 높은 반면에 많은 시료를 동시에 처리하기에는 한계가 있을 것으로 생각된다.

Charm II test는 1982년 Charm[3]이 penicillin G에 대해 특이적인 친화력을 갖는 특정수용체가 세균의 세포벽에 존재한다는 사실에 착안하여 항균물질에 대한 세균의 수용체를 이용한 방법으로 미생물의 수용체나 항체에 방사성 동위원소인 탄소-14(^{14}C) 혹은 삼중수소(^{3}H)를 표지시킨 항균물질을 연속적으로 혹은 경쟁적으로 반응시켜 표지항균물질의 방사능을 측정하여 시료중의 잔류 항균물질 계열을 확인할 수 있기 때문에 HPLC 등 기기분석을 통한 확인정량검사를 효율적으로 수행할 수 있는 것으로 알려져 있다.[4,19]

Charm II test와 FPT의 일치율을 조사하기 위해 Table 4에 나타낸 바와 같이 돼지 및 소의 근육시료에서 Charm II test에 의해 양성으로 검출된 동일 개체의 근육과 신장 시료에서 FPT의 검출능을 조사한 결과, Charm II test 양성시료 총 38점에서 FPT에 의해 양성으로 검출된 시료는 근육 9점(23.7%), 신장 25점(65.8%)에서 각각 양성으로 검출되었다. 이들 중 β-lactam계로 추정된 시료 1점은 FPT에서 근육 및 신장에서 모두 검출되었으며, tetracycline계로 추정된 시료 18점은 근육에서 8점, 신장에서 17점이, 설파제로 추정된 시료에서는 신장에서만 8점이, 그리고 aminoglycoside계로 추정된 2점에서는 근육 및 신장에서 공히 검출되지 않았다.

이와 반대로 근육 및 신장에서 FPT 양성으로 검출된 시료에 대해 Table 3에서 정립한 검출양상을 기준으로하여 임의로 추정되는 항균물질의 계열별로 구분한 후 Charm II

Table 3. Identification of antimicrobial drug families in EEC 4-plate test

Famillies	*B.s* pH 6.0 plate	*B.s* pH 7.2 plate	*B.s* pH 8.0 plate	*M.l* pH 8.0 plate	Detection pattern
β-lactams					I
Penicillins	+	+	+	+	Ia
Cephalosporins	+	-	-	±	Ib
Aminoglycosides	-	+	+	-	II
Macrolides	-	±	+	+	III
Tetracyclines	+	+	±	-	IV
Sulfonamides	±	+	-	-	V

test 결과와 비교한 결과, FPT에 의해 양성으로 검출된 근육시료 10점에서 9점(90%)이 Charm II test에서 일치하였으며, 신장시료에서 양성으로 검출된 총 49점에서는 18점(37.5%)이 일치하였다. 이들중 근육에서 양성으로 검출된 시료는 모두 tetracycline계로 추정되었으며, 10점에서 9점이 Charm II test에서도 양성으로 검출되었다. FPT에 의해 양성으로 검출된 신장시료에서는 21점이 tetracycline계로 추정되어 12점이 Charm II test에 의해 근육에서 검출되었으며, 설파제로 추정된 신장 14점에서 6점이 Charm II test와 일치한 반면 aminoglycoside계로 추정된 14점에서는 Charm II test에서 모두 음성으로 검출되었다(Table 5).

이상의 결과와 같이 Charm II test 및 FPT 결과를 비교할 때 tetracycline계 등 일부 계열을 제외하고 두 방법간 일치율이 낮은 것으로 나타났다. 이러한 요인으로는 미생물수용체분석법과 미생물학적 방법이라는 측정원리가 다르기 때문에 항균물질별로 검출감도가 서로 다르며, 항균물질이 체내대사과정에서 장기별로 상대적인 분포량의 차이[8,15]에 따라 근육시료의 일치율이 떨어지거나 신장내 항균물질외의 natural inhibitor에 의한 비특이반응[5,17] 등 이들의 복합적인 원인이 있을 것으로 사료된다.

Table 4. Comparison of EEC 4-plate test and Charm II test in muscle and kidney samples

Famillies	Charm II test	EEC 4-plate test	
		in muscle	in kidney
β-lactams	1	1	1
Aminoglycosides	2	-	-
Macrolides	-	-	-
Tetracyclines	18	8	17
Sulfonamides	17	-	8
Total	38	9	25

Table 5. Agreement of EEC 4-plate test(FPT) with Charm II test in muscle and kidney samples

Famillies	FPT		Charm II test[1]	
	in muscle	in kidney	FPT(+) muscle	FPT(+) kindney
β-lactams	-	-	-	-
Aminoglycosides	-	14	-	-
Macrolides	-	-	-	-
Tetracyclines	10	21	9	12
Sulfonamides	-	14	-	6
Total	10	49	9	18

Bogaerts 등[2]에 의하면 FPT는 원칙적으로 식육에만 적용할 목적으로 고안되었으나 비특이적 반응을 고려할 경우 신장이나 간장에도 적용할 수 있을 것으로 제시하였다. 돼지 신장의 경우 냉동시켰던 상태에서 *B.s* 평판에 적용할 경우 의양성반응이 일어나기때문에 얼지않은 신선육에서만 적용할 수 있는 반면에 냉동시켰던 상태라도 반투석막을 이용하면 의양성 반응을 배제시킬 수 있다고 하였다. 이와 같이 항균물질이 아니면서 비특이반응을 나타낼 수 있는 물질로는 신장내 C_{14}-C_{20} 포화 및 불포화지방산, long chain aliphatic 및 cholesterol-like compound, 젖산 및 lysozyme 등이 있으며. 이외에 식육부패균인 *Pseudomonas* spp. 등이 오염되는 경우에도 *B.s* BGA를 비롯한 여러 *Bacillus* spp.의 발육을 억제시키는 것으로 알려져있다.[4,15]

FPT에 의한 양성시료와 Charm II test 결과와의 일치율이 근육에 비해 신장에서 낮은 요인도 이미 언급되었던 바와 같이 체내장기별 항균물질의 분포량의 차이나 비특이반응 등의 요인이 작용되었을 것으로 사료된다. 특히 Charm II test에 의해 설파제 양성으로 검출된 근육시료 17점중 신장에서만 8점이 FPT에 의해 검출되었고, FPT에 의해 근육에서 검출되지 않고 신장에서만 양성으로 검출되어 설파제로 추정되었던 14시료중 6시료에서만 Charm II test의 근육에서 양성으로 검출된 결과는 FPT의 감도가 근육에서 설파제의 검출능이 낮음을 시사한다. 또한 신장에서 aminoglycoside계로 추정된 시료가 Charm II test에서 모두 음성이었던 것은 Charm II test의 검출감도가 streptomycin으로서 0.5 ppm이며, 근육과 신장의 체내분포량 혹은 비특이반응 등의 요인이 작용하였을 것으로 생각된다.

이외에 FPT에 의한 항균물질 계열추정의 또다른 방해요인으로는 시료육즙의 디스크당 흡착량의 차이, 항균물질의 잔류농도 등에 따라 상당한 차이가 있을 것으로 예상된다. 특히 대부분의 항균물질에 있어서 체내 잔류량이 상당히 높을 경우에는 4종류의 평판조건에서 모두 양성으로 검출될 수 있으며, 여러 항균물질이 복합적으로 잔류할 경우 잔류물질의 계열추정은 더욱 어렵게 될 것으로 생각된다.

우리나라에서는 규제검사 대상시료로서 가축의 근육을 사용하기 때문에 신장에서 발생하기 쉬운 비특이반응의 발생율은 낮을 것으로 예상되지만 FPT의 설파제 이외의 항균물질에 대한 비교적 높은 검출감도를 최대한 유지시키면서 시험용 배지로서 MH를 이용하는 방법[23] 등으로 설파제의 감도를 높일 수 있는 방법으로의 보완이 필요할 것으로 여겨지며, FPT에 의해 양성으로 검출된 시료는 FPT의 검출양상과 동시에 Charm II test와 같은 계열별 시험법을 병행하여 최종 원인물질을 확인하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

국문요약

식육중 잔류 항균물질의 간이검사법으로 사용되고 있는 EEC 4-plate test(FPT)의 항균물질에 대한 검출감도, 4종류의 평판 조건에 따른 계열별 검출양상 및 Charm II test와의 일치율을 비교 조사하였다. FPT에서 설파제 검출이 용이한 배지로는 MH, FPTA, NA순이었으며, *B. sutilis*, pH 7.2 평판의 TMP 첨가농도는 기존의 배지 ml당 0.05 μg 보다 높은 0.1~0.15 μg를 첨가하는 것이 설파제 검출에 더 효과적인 것으로 나타났다. 항균물질에 대한 검출감도는 항균물질에 따라 다양한 결과를 나타냈으며, CTC, OM 등과 같은 항생물질에 민감한 결과를 나타낸 반면 설파제를 비롯한 합성항균제는 비교적 낮은 검출감도를 나타냈다. 항균물질 계열에 따라 서로 다른 여러 형태의 억제유형으로 구분할 수 있었지만 Charm II test의 계열별 검출법과의 일치율은 tetracycline계 등 일부 계열의 항균물질을 제외한 다른 계열은 일치율이 낮게 나타났다. 따라서 FPT에 의해 양성으로 검출된 시료는 FPT의 검출양상과 동시에 Charm II test와 같은 계열별 특이성이 높은 시험법을 병행하여 최종 잔류원인물질을 확인하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Biellecka, M., Baldock, J.D. and Kotula, A.W.: Determination of antibiotics in meat using *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Food Prot.*, **44**, 194-200 (1981).
2. Bogaerts, R. and Brussels, F.W.: A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtsch.*, **60**, 672-673 (1980).
3. Charm, S.E.: Mirobial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem..*, **71**, 304-316 (1988).
4. Corry, J.E.L. and Sharma, M.R.: Detection of Antibiotic residues in milk and animal tissues. U.S. ed. Academic Press Inc., New York. p349 (1983).
5. Davis, W.W. and Stout, T.R.: Disc plate method of microbiological antibiotic assay: I. Factors influencing variability and error. *Applied Microbiol.*, **22**, 659-665 (1971).
6. Dixon-Holland, D.E. and Katz, S.E.: Competitive direct Enzyme-linked immunoassay for detection of sulfamethazine residues in swine and muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 1137-1140 (1988).
7. Huber, W.G., Carlson, M.B., Lepper, M.H.: Penicillin and antimicrobial residues in domestic animals at slaughter, *J.A.V.M.A.*, **154**, 1590-1595 (1969).
8. Li, T., Qiao, G.L., Hu, G.Z., Meng, F.D., Qiu, Y.S., Zhang, X.Y., Guo, W.X., Yie, H.L., Li, S.F. and Li, Y.S.: Comparative plasma and tissue phamacokinetics and drug residue profiles of different chemotherapeutants in fowls and rabbits. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **18**, 260-273, (1995).
9. Jinbo, K., Monma, C., Maruyama, T. and Matsumoto, M.: Simplified Classification method for residual antibacterial agents in meat by microbiological assay. *食衛誌*, **32**, 86-92 (1991).
10. Johnston, R.W.: Problem calves kidney sulfonamide test. Laboratory Communication No. 33, FSIS/USDA (1982.)
11. Johnston, R.W.: Serum and urine sulfonamide residue preslaughter test. Laboratory Communication No. 34, FSIS/USDA (1982).
12. Johnston, R.W., Reamer, R.H., Hariss, E.W., Fugate, H. G. and Schwab, B.: A new screening method for the detection of antibiotic residues in meat and poultry tissues. *J. Food Prot.*, **44**, 828-831 (1981).
13. Korsrud, G.O. and Macneil, J.D.: Evaluation of the swab test on premises, the calf antibiotic and sulfa test, and a microbial inhibitor test with standard solutions of 22 antibiotics. *J. Food Prot.*, **51**, 43-46 (1988).
14. Nouws, J.F.M.: Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **32**, 103-110 (1981).
15. Randecker, V.W., Reagan, J.A., Engel, R.E., Soderberg, D.L. and McNeal, J.E.: Serum and urine as predictors of sulfamethazine levels in swine muscle, liver and kidney. *J. Food Prot.*, **50**, 115-122 (1987).
16. Smither, R.: Evaluation of two simple assay methods for detecting antibiotic residues in chicken and pig muscle. *J. Appl. Bact.*, **38**, 235-243 (1975).
17. Smither, R.: Bacterial inhibitors formed during the adventitious growth of micro-organisms in chicken liver and pig kidney. *J. Appl. Bact.*, **45**, 267-277 (1978).

18. Smither, R., Lott, A.F., Daiziel, R.W. and Ostler, D.C.: Antibiotic residues in meat in the United Kingdom; an assessment of specific tests to detect and identify antibiotic residues. *J. Hyg. Camb.*, **85**, 359-369 (1980).
19. Anonymous: Charm II test for antimicrobial durgs in tissue. Operator's manual., MSU03, Charm Sciences Inc., MA (1993).
20. 박종명, 손성완, 조태행, 조준형, 남궁선, 박근식, 이문한: 국내산 돈육 및 계육중의 항생물질 잔류 조사. 한국수의공중보건학회지, **14**, 61-68 (1990).
21. 손성완, 진남섭, 조병훈, 심영화, 김인천, 박종명: 축산물중 잔류항균물질의 계열별 동시다제분석법 개발에 관한 연구. 가축위생연구소 시험연구보고서, p427 (1993).
22. 장기윤, 김순재, 박종명: 돼지에 잔류된 설파제의 미생물학적 스크리닝법에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지, **15**, 49-61 (1991).
23. 농림수산부편: 축산물내 유해잔류물질 검사사업(공공계획). 농림수산사업통합실시요령(제3권), p208 (1995).
24. 보건사회부편: 항균성물질 간이시험법. 보건사회부 공고 제 1994-110호 (1994).
25. 보건복지부편: 식육중 잔류물질 허용기준. 보건사회부 고시 제 1996-10호 (1996).