

농림수산검역검사본부 공고 제2011-93호

축산물위생관리법 제4조 제2항의 규정에 따라 “축산물의 가공기준 및 성분규격”을 다음과 같이 개정함에 있어 그 개정 내용과 취지를 국민에게 미리 알려 의견을 듣고자 그 주요내용을 행정절차법 제46조 규정에 의하여 다음과 같이 공고합니다.

2011년 10월 28일

농림수산검역검사본부장

축산물의가공기준및성분규격 개정안 행정예고

1. 개정이유

- 가. 축산물 일반규격의 식중독균 중 장염비브리오는 해산물이 함유된 축산물에 한다는 단서조항 추가
- 나. 축산물가공품의 성분규격 중 대장균군수와 대장균수의 기준이 정량화됨에 따라 검사의 효율성을 높이기 위해 자동화된 최확수법 (Automated MPN)을 일반세균수, 대장균군수, 대장균수 검사법에 추가
- 다. 축산물시험방법 중 브루셀라균, *Listeria monocytogenes* 등 미생물 균명의 한글 표기를 상위법(가축전염병 예방법) 및 축산물의 가공 기준 및 성분규격과 동일 표기
- 라. 결핵균, 탄저균, 브루셀라균의 병원성 확인시험법에 동물시험을 대체 할 수 있는 유전자검사법을 추가하고, 식약청의 식품공전 및 국제공인 미생물시험법과 조화를 이루기 위한 살모넬라균 시험법 등 개정

2. 주요내용

가. 해산물이 첨가되는 축산물가공품에 장염비브리오 기준 단서 조항 추가

- 제1. 축산물에 대한 공통기준 및 규격 6. 축산물의 성분규격 가. 일반규격 “(3)”항에 “다만 장염비브리오는 해산물이 함유된 축산물에 한한다” 단서조항 추가

나. 일반세균수, 대장균군수, 대장균수 시험법에 자동화된 최확수법 (Automated MPN) 추가

- 제3. 축산물 시험방법 III. 일반시험법 9. 미생물시험법 다.세균수 (1)일반세균수, 마. 대장균군수 (4) 시험방법 (나)정량시험 및 바. 대장균수 (3) 시험방법에 “자동화된 최확수법(Automated MPN)” 추가

다. 브루셀라균, 리스테리아균, 캠필로박터균의 미생물균명 한글표기 개정

- 제3. 축산물 시험방법 III. 일반시험법 9. 미생물시험법 “카. 브루셀라균, 하. 리스테리아균 및 거. 캠필로박터균”의 균명을 “브루셀라균, 리스테리아 모노사이토제네스, 캠필로박터 제주니/ 콜리”로 개정함

라. 일부 미생물시험법의 국제기구 및 국내·외 공인시험법과의 조화를 위한 개정

- 제3. 축산물 시험방법 III. 일반시험법 9. 미생물시험법 라. 세균 발육시험 (3) “시험용액의 준비”를 “가온보존시험”으로 하고 “(4)시험방법 (가) 가온보존시험 (나) 세균발육시험”을 “(4) 세균

- 발육시험 (가) 시험용액준비 (나) 시험방법”으로 개정
- 제3. 축산물 시험방법 III. 일반시험법 9. 미생물시험법 자. 탄저균 “(3) 시험방법”을 “(3) 시험방법 (가) 배양 및 균분리 (나) 동물접종시험 (다) PCR반응을 통한 병원성 확인시험”으로 개정
 - 제3. 축산물 시험방법 III. 일반시험법 9. 미생물시험법 차. 결핵균 “(3) 시험방법”을 “(3) 시험방법 (가) 배양 전 확인법 및 균 배양 후 균 분리 검사 (나) 확인검사 (다) 동물실험”으로 개정
 - 제3. 축산물 시험방법 III. 일반시험법 9. 미생물시험법 카. 부루세라균 “(3) 시험방법”을 “(3) 시험방법 (가) 배양 및 균분리 (나) 확인검사”로 개정
 - 제3. 축산물 시험방법 III. 일반시험법 9. 미생물시험법 파. 살모넬라균 (3) 시험방법 (가) 증균배양에서 “SC broth”을 “RVS broth”로 개정, (나) 분리배양에서 “BS Agar”를 “BG Sulfa Agar”로 개정
 - 제3. 축산물 시험방법 III. 일반시험법 9. 미생물시험법 너. 황색포도상구균 (3) 시험방법 “(가) 균수시험”을 “(나) 정량시험법”, “(나) 균 분리시험”을 “(가) 정성시험법”으로 개정하고 (나) 균 분리시험 2) 분리배양에 “Baird-Parker-RPF 배지” 추가
 - 제3. 축산물 시험방법 III. 일반시험법 9. 미생물시험법 더. 클로스트리디움 (1) 클로스트리디움 퍼프린젠스 (다) 시험방법 “1) 균수 측정을 2) 정량시험법”, “2) 균 분리시험을 1) 정성시험법”으로 개정하고 2) 균 분리시험 나) 분리배양에 “난황이 첨가된 TSC 배지” 추가

- 제3. 축산물 시험방법 III. 일반시험법 9. 미생물시험법 버. 바실러스 세레우스 (3) 시험방법 (가) 정성시험법 ② 확인시험에 “곤충독소단백질 생성확인 시험과 Rhizoid 집락 확인시험” 추가
- 마. 개정안은 농림수산물검역검사본부 홈페이지(www.qia.go.kr>알림마당-동축산물>법령/고시>검역검사본부 입법행정예고)에 등재되어 있으니 참고하여 주시기 바랍니다.

3. 의견제출

이 개정안에 대한 의견이 있는 단체 또는 개인은 2011년 11월 25일까지 다음 사항을 기재한 의견서를 농림수산물검역검사본부(경기도 안양시 만안구 안양로 175(안양6동 480), 전화 031-467-1991, 팩스 031-467-1989)에 제출하여 주시기 바랍니다.

가. 공고사항에 대한 항목별 의견(찬·반 여부와 그 사유)

나. 성명(단체의 경우에는 단체명, 대표자 성명), 전화번호 및 주소

신 · 구조문대비표

현 행	개 정 안
<p>제1. 축산물에 대한 공통기준 및 규격</p> <p>1~5. 생략</p> <p>6. 축산물의 성분규격</p> <p>가. 일반규격</p> <p>(1)~(2) 생략</p> <p>(3) 식육(제조, 가공용 원료를 제외한다), -----중략----- 식중독균이 검출되어서는 아니 된다.</p>	<p>제1. 축산물에 대한 공통기준 및 규격</p> <p>1~5. 현행 유지</p> <p>6. 축산물의 성분규격</p> <p>가. 일반규격</p> <p>(1)~(2) 현행 유지</p> <p>(3) 식육(제조, 가공용 원료를 제외한다), -----중략----- 식중독균이 검출되어서는 아니 된다. <u>다만, 장염비브리오</u>는 <u>해산물이 함유된 축산물에 한한다.</u></p>
<p>제3. 축산물 시험방법</p> <p>Ⅲ. 일반시험법</p> <p>9. 미생물시험법</p> <p>다. 세균수</p> <p>(1) 일반세균수</p> <p>(가) 표준평판배양법</p> <p>(나) 건조필름법</p> <p><신설></p>	<p>제3. 축산물 시험방법</p> <p>Ⅲ. 일반시험법</p> <p>9. 미생물시험법</p> <p>다. 세균수</p> <p>(1) 일반세균수</p> <p>(가) 표준평판배양법</p> <p>(나) 건조필름법</p> <p>(다) <u>자동화된 최확수법(Automated MFN)</u> (우유류, 저지방우유류, 유당분해우유, 가공우유류(유음료 제외), 조제우유류, 분유류에 한한다)</p>

현 행	개 정 안
<p>라. 세균발육시험 (1)~(2) 생략 (3) 시험용액준비 가온보존시험결과 음성인 검사시료는 개봉부의 표면을 70% 에칠알코올 탈지면으로 잘 씻고 멸균한 기구를 이용하여 개봉하고 내용물(내용물의 전부 또는 일부가 고형상인 경우는 멸균 균질기 등을 이용하여 잘게 자른다)의 전부를 무균적으로 혼합한 후 25g(또는 10g)을 무균적으로 채취하고 인산염완충희석액 225ml(또는 90ml)를 가하여 균질화시킨다. 이액의 1ml를 멸균 피펫을 이용하여 멸균시험관에 채취하고 희석액 9ml를 가한 후 잘 혼합하여 이것을 세균발육시험의 시험용액으로 한다.</p> <p>(4) 시험방법 (가) 가온보존시험 검사시료를 인큐베이터에서 35.0±1℃로 14일간 보존하는 동안 용기의 팽창 유무 또는 내용물이 새는가의 유무를 관찰한다. 이 경우 팽창유무는 약 20℃에서 1일간 방치한 후 관찰하고 용기 포장이 팽창 또는 새는 것은 세균발육 양성으로 한다. 가온보존시험에서 음성인 것은 세균발육시험을 실시한다.</p>	<p>라. 세균발육시험 (1)~(2) 현행 유지 (3) 가온보존시험 검사시료를 인큐베이터에서 35.0±1℃로 14일간 보존한 후, 관찰하여 용기·포장이 팽창 또는 내용물이 새는 것은 세균발육 양성으로 한다. 가온보존시험에서 음성인 것은 다음의 세균발육시험을 한다.</p> <p>(4) 세균발육시험 (가) 시험용액준비 가온보존시험 결과 음성인 검사시료는 개봉부의 표면을 70% 에칠알코올 탈지면으로 잘 씻고 멸균한 기구를 이용하여 개봉하고 내용물(내용물의 전부 또는 일부가 고형상인 경우는 멸균 균질기 등을 이용하여 잘게 자른다)의 전부를 무균적으로 혼합한 후 25g(또는 10g)을 무균적으로 채취하고 인산염완충희석액 225ml(또는 90ml)를 가하여 균질화 시킨다.</p>

현 행	개 정 안
<p>(나) 세균발육시험 생략</p> <p>마. 대장균군수(Total Coliform) (1)~(3) 생략 (4) 시험방법 (가) 정성시험 (나) 정량시험 1) 최확수법(MPN) 2) 평판배양법 3) 건조필름법</p> <p><신설></p>	<p>이 액의 1mℓ를 멸균 피펫을 이용하여 멸균시험관에 채취하고 희석액 9mℓ를 가한 후 잘 혼합하여 이것을 세균발육시험의 시험용액으로 한다.</p> <p>(나) 시험방법 현행 유지</p> <p>마. 대장균군수(Total Coliform) (1)~(3) 현행 유지 (4) 시험방법 (가) 정성시험 (나) 정량시험 1) 최확수법(MPN) 2) 평판배양법 3) 건조필름법 4) 자동화된 최확수법(Automated MPN) (우유류, 저지방우유류, 유당분해우유, 가공우유(유음료 제외), 발효우유, 가공치즈, 조제우유, 분유류, 건조저장우유, 식육추출가공품, 알가열성형제품, 염지란 검사에 한한다)</p>

현행	개정안
<p>바. 대장균수(Generic <i>E.coli</i>)</p> <p>(1)~(2) 생략</p> <p>(3) 시험방법</p> <p>(가) 최확수법(MPN)</p> <p>(나) 대장균 확인시험</p> <p>(다) 건조필름법</p> <p><신설></p>	<p>바. 대장균수(Generic <i>E.coli</i>)</p> <p>(1)~(2) 현행 유지</p> <p>(3) 시험방법</p> <p>(가) 최확수법(MPN)</p> <p>(나) 대장균 확인시험</p> <p>(다) 건조필름법</p> <p>(라) <u>자동화된 최확수법(Automated MPN)</u> (자연치즈, 식육추출가공품에 한한다)</p>
<p>자. 탄저균(<i>Bacillus anthracis</i>)</p> <p>(1) 기구 및 재료</p> <p>(가) ~ (아) 생략</p> <p>(자) <u>기니픽</u></p> <p><신설></p> <p>(2) 생략</p> <p>(3) 시험방법</p> <p>(가) <신설></p> <p>식육 및-----</p> <p>25g에 희석액 225ml을 가하여 유제액을 제조한 후 식염을 첨가하지 않는 Nutrient Agar(보통한천배지)에 도말하여 37℃에서 24시간 배양한다. ---</p> <p>-----중략-----</p>	<p>자. 탄저균(<i>Bacillus anthracis</i>)</p> <p>(1) 기구 및 재료</p> <p>(가) ~ (아) 현행 유지</p> <p>(자) <u>기니픽 또는 마우스</u></p> <p>(차) <u>중합효소연쇄반응장치 (PCR)</u></p> <p>(2) 현행 유지</p> <p>(3) 시험방법</p> <p>(가) <u>배양 및 균 분리</u></p> <p>식육 및-----</p> <p>25g(ℓ)에 희석액 50ml을 가하여 분쇄 혼합한 뒤, 62.5±0.5℃ 항온수조에서 30-60분간 가열처리한다. 배양된 유제를 10진 희석하여 각 희석액으로부터 100μl를 취하여 혈액한천배지에 도말하여 37℃에서 24시간 배양한다. -----중략-----</p>

현 행	개정안
<p>(나) <신설> 상기의 유제를 신선한 경우는 그대로, 그렇지 않은 경우는 80℃에서 30분간 가열한 후 guinea pig(250-300g 체중)의 복강내에 0.5 ~ 1.0ml를 접종하면 양성인 경우 24시간 후 접종부위에 부종이 생기고 점차 복부내에 퍼져 수일후에 폐사한다. ----- ----- 중략 -----</p>	<p>(나) 동물접종시험 다른 방법으로도 탄저균을 분리해내지 못 하는 경우, 동물접종시험을 고려할 수 있다. 62.5℃에서 15분간 가열한 후 다 자란 마우스의 피하에 0.05 ~ 0.1ml 접종한다. 기니픽의 양쪽 하퇴부 근육에 0.2ml씩 총 0.4ml을 접종한다. 양성인 경우 48-72시간 내에 폐사한다. ----- 중략 ----- - 폐사된 동물의 혈액으로부터 균을 분리배양 할 수 있다.</p>
<p>(다) <신설></p>	<p>(다) PCR반응을 통한 병원성 확인 시험 보통한천배지에서 배양한 탄저균 1 loop를 25μl의 증류수에 희석하여 95℃에서 20분간 가열한 다음, 4℃로 식혀 원심분리하여 상층액을 PCR 반응의 template로 사용한다. pX01 과 pX02 plasmid의 존재를 확인할 수 있는 primer는 아래와 같다.</p>

현 행

개 정 안

Target	프라이머	Sequence 5'-3'	크기	농도
Protective antigen (PA)	PA 5 3048-3029	TCC-TAA-CA C-TAA-CGA- AGT-CG	596 bp	1 mM
	PA 8 2452-2471	GAG-GTA-GA A-GGA-TAT- ACG-GT		
Capsule	1234 1411-1430	CTG-AGC-CA T-TAA-TCG-A TA-TG	846 bp	0.2 mM
	1301 2257-2238	TCC-CAC-TT A-CGT-AAT-C TG-AG		

PCR은 총 50 μ l로 실행하되, dATP, dCTP, dTTP, dGTP 각각 200 uM 씩, MgCl₂ 1.5mM, Taq DNA polymerase 2.5 unit, NH₄ buffer를 넣고 template DNA를 5ul 첨가한다. 전기영동은 2% agarose gel에서 가장 잘 확인할 수 있다. PCR 반응 조건은 아래와 같다.

95 $^{\circ}$ C	5분	
95 $^{\circ}$ C	0.5분	30cycle
55 $^{\circ}$ C	0.5분	
72 $^{\circ}$ C	0.5분	
72 $^{\circ}$ C	5분	이후 냉장

현행	개정안
<p>차. 결핵균</p> <p>(1) 기구 및 재료 (가) ~ (차) 생략 <신설></p> <p>(2) 배지 및 시액 (가) 3% Okawa 배지(3% KH₂PO₄ 배지) (나) ~ (다) 생략 <신설></p> <p>3) 시험방법 (가) <신설></p> <p>우유와 같은 액상의 시료는 그대로 -----중략-----</p> <p>상청부에는 동량의 8% NaOH액을, 침전물에는 그의 약 10배량의 4% NaOH액을 가하여 잘 혼합한 후 각각 0.1ml씩을 3% Okawa배지에 적하하고 37℃의 부란기내에서 배지를 옆으로 눕혀놓고 대부분의 검액이 흡수되기를 기다렸다가 배지의 시험관을 밀봉하여 2개월간 배양을 계속하면서 때때로 균집락의 발생을 관찰한다. 또한 시료 5ml에 1% HPC용액 15ml을 가하여 실온에서 1일간 방치한 다음 상층액을 4,000g에서 10분간 원심침전시켜 결핵균을 분리하는 방법을 사용할 수 있다.</p>	<p>차. 결핵균</p> <p>(1) 기구 및 재료 (가) ~ (차) 현행 유지 (카) <u>중합효소연쇄반응장치 (PCR)</u></p> <p>(2) 배지 및 시액 (가) <u>Lowenstein-Jensen 배지</u> (나) ~ (다) 현행 유지 (라) <u>7H10 배지</u></p> <p>3) 시험방법 (가) <u>배양전 확인법 및 균배양후 균분리검사</u></p> <p>우유와 같은 액상의 시료는 그대로 -----중략-----</p> <p>또한 원심 침전물을 LJ (Lowenstein-Jensen) 배지 또는 7H10 배지에 접종한 후 37℃에서 8주간 배양한다. 배지표면은 배양기간 동안 배양유무를 육안으로 관찰한다. 배양이 육안으로 관찰되면, slide glass에 균를 도말하여 Ziehl-Neelsen법으로 항산성염색을 실시하여 항산성균을 검경으로 확인한다. 또한 원심 침전물을 LJ (Lowenstein-Jensen) 배지 또는 7H10 배지에 접종한 후 37℃에서 8주간 배양한다. 배지표면은 배양기간 동안 배양유무를 육안으로 관찰한다. 배양이 육안으로 관찰되면, slide glass에 균를 도말하여</p>

현 행	개 정 안
<p>(나) <신설></p>	<p>Ziehl-Neelsen법으로 항산성염색을 실시하여 항산성균을 검경으로 확인한다. 결핵균의 성장은 일반적으로 3~6주 배양동안 관찰된다. 특징적인 느린 성장패턴과 균 모양으로 결핵균을 잠정적으로 진단할 수 있다.</p> <p>(나) 확인검사</p> <p>1) 생화학적 검사</p> <p>모든 분리균주는 결핵균 동정을 위해 생화학적 검사 (나이아신 생산과 나이트레이트 환원) 또는 특이유전자 동정에 의한 확인이 필요하다. 적절한 피루베이트 고형배지 (pyruvate-based solid medium)에서 결핵균의 균은 담황색이다. 결핵균은 37℃에서 느리게 성장하며, 22℃ 또는 45℃에서는 성장하지 않는다.</p> <p>2) PCR 검사</p> <p>가) 시료의 전처리</p> <p>① DNA 추출은 다음의 방법이나 이와 동등한 방법을 따른다.</p> <p>② Lysis buffer^{*1} 900μl와 silicon dioxide용액^{*2} 40μl를 섞고 진탕시킨다. 여기에 50μl 시료를 첨가한 후, 5초간 진탕시킨다.</p> <p>③ 10분간 실온에 정치시킨 다음, 5초간 진탕시킨다.</p> <p>④ 12,000Xg에서 15초간 원심침전한 다음, 상층액을 제거한다.</p>

현 행	개 정 안												
	<p>⑤ Silica-nucleic acid 침전물을 washing buffer^{*3} 로 2번 세척한 다음, 70% 에탄올로 2번 세척한다.</p> <p>⑥ 아세톤으로 1번 세척한 다음, 아세톤을 버리고 56℃, 10분 간 건조시킨다.</p> <p>⑦ TE buffer (pH 8.0)^{*4}를 100μl 넣고, 3초간 원심한 후, 56℃, 10분간 DNA를 용출시킨다.</p> <p>⑧ 12,000Xg에서 2분 간 원심침전한 다음, 상층액을 DNA 추출액으로 사용한다.</p> <p><u>*1. Lysis buffer 제조방법</u></p> <table border="0"> <tr> <td>GuSCN (guanidium thiocyanate)</td> <td>120 g</td> </tr> <tr> <td>0.1M Tris-HCl (pH 6.4)</td> <td>100 ml</td> </tr> <tr> <td>0.2M EDTA sol (pH 8.0)</td> <td>22 ml</td> </tr> <tr> <td>Triton X-100</td> <td>26 g</td> </tr> </table> <p><u>*2. Silicon dioxide sol. 제조방법</u></p> <p>Silicon dioxide (SiO₂) 60g에 증류수 500 ml를 넣고 24시간 실온에서 침전시키고 상층 액 430ml을 버린다. 총 부피가 500 ml 되게 D.W. 첨가 후 혼합하고 5시간동안 실온에서 침전시킨다. 440ml의 상층액을 버린다. HCl을 600μl첨가하여 pH 2.0으로 맞춘다. 4ml 유리병에 넣고 마개를 꼭 잠근 후, 121℃, 20분간 멸균한다. 6개월 간 어두운 실온에서 안정시킨다.</p> <p><u>*3. Washing buffer 제조방법</u></p> <table border="0"> <tr> <td>GuSCN</td> <td>120 g</td> </tr> <tr> <td>0.1M Tris-HCl (pH 6.4)</td> <td>100 ml</td> </tr> </table>	GuSCN (guanidium thiocyanate)	120 g	0.1M Tris-HCl (pH 6.4)	100 ml	0.2M EDTA sol (pH 8.0)	22 ml	Triton X-100	26 g	GuSCN	120 g	0.1M Tris-HCl (pH 6.4)	100 ml
GuSCN (guanidium thiocyanate)	120 g												
0.1M Tris-HCl (pH 6.4)	100 ml												
0.2M EDTA sol (pH 8.0)	22 ml												
Triton X-100	26 g												
GuSCN	120 g												
0.1M Tris-HCl (pH 6.4)	100 ml												

현 행

개 정 안

*4. 10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA

나) 시험 방법

표1의 primer set와 표2의 PCR 조건에 따라 PCR을 실시한다. 공통적으로 DNA 농도는 10ng이상, primer forward 및 reverse는 각각 20 pmol씩 넣고, 상업적 시약인 20 μ 용 또는 50 μ 용 PCR premix를 이용하여 PCR을 수행한다.

표1. 결핵균 PCR용 primer set

Target	Primer sequence	
IS6110	Forward	5'GGACAACGCCGAATTGCG3'
	Reverse	5'TAGGCGTCGGTGACA AAGGCCAC3'
IS1081	Forward	5'CTGCTCTCGACGTTTCATCGCCG3'
	Reverse	5'GGCACGGGTGTCGAAATCACG3'
MPB70	Forward	5'AAAGAATTCGGACGGCT CCGAAGAAATC3'
	Reverse	5'CCCGGATCCITACGCCGG AGGCATTAGCAC3'
16S-r RNA	Forward	5'GTTCGAACGGGTGAGT AACACGTG3'
	Reverse	5'TGTTAACATTCACGA CACGAGCT3'

표2 결핵균 PCR 조건

	IS6110	IS1081	MPB70	16s-rRNA
pre-denaturation	95 $^{\circ}$ C, 5분	95 $^{\circ}$ C, 8분	95 $^{\circ}$ C, 5분	94 $^{\circ}$ C, 5분
cycle	95 $^{\circ}$ C, 45초	95 $^{\circ}$ C, 10초	95 $^{\circ}$ C, 1분	94 $^{\circ}$ C, 30초
	60 $^{\circ}$ C, 45초	58 $^{\circ}$ C, 30초	55 $^{\circ}$ C, 2분	58 $^{\circ}$ C, 30초
	72 $^{\circ}$ C, 45초	72 $^{\circ}$ C, 20초	72 $^{\circ}$ C, 1분	72 $^{\circ}$ C, 40초
extention	72 $^{\circ}$ C, 10분	72 $^{\circ}$ C, 2분	72 $^{\circ}$ C, 5분	72 $^{\circ}$ C, 5분

(다) <신설>

배양하고 남은 시료는 Bromthymol blue(0.2%)를 가한 염산수용액을 적하하여 중화시킨 후 1~2ml씩을 guinea pig의 피내에 접종한다.

중략

-- 1% Okawa배지

중략

(다) 동물실험

배양하고 남은 시료는 Bromthymol blue(0.2%)를 가한 염산수용액을 적하하여 중화시킨 후 1~2ml씩을 기니픽의 뒷다리 허벅지 중앙부위에 근육주사한다.

중략

LJ (Lowenstein-Jensen) 배지 또는 7H10 배지에

중략

현 행	개 정 안
<p>카. 브루셀라균(<i>Brucella</i> spp.)</p> <p>(1) 생략</p> <p>(2) 배지 및 시액 (가)~(마) 생략</p> <p><신설></p> <p><신설></p> <p><신설></p> <p><신설></p> <p>(3) 시험방법</p> <p>(가) <신설></p> <p>우유의 -----중략----- 복강내에, 세 마리 이상의 마우스 (12~15g)의 피하에 0.25 ~ 0.5ml씩을 주사한다. -----중략-----</p>	<p>카. 브루셀라균(<i>Brucella</i> spp.)</p> <p>(1) 현행 유지</p> <p>(2) 배지 및 시액 (가)~(마) 현행유지</p> <p>(바) Serum dextrose broth</p> <p>(사) Brucella broth</p> <p>(아) TSB배지</p> <p>(자) Brucella agar</p> <p>(3) 시험방법</p> <p>(가) 배양 및 균분리</p> <p>액체시료 및 고체시료 25 ml(g)을 amphotericin B 1µg/ml, vancomycin 20µg/ml가 첨가된 serum dextrose broth, tryptose broth(또는 trypticase)-soy broth (TSB) 또는 Brucella broth 225ml에 넣은 후 균질 화 한 다음 5-10%의 CO₂ 가스 주입이 되는 37°C 배양기에서 6주 동안 배양하 면서 주마다 배지에 도달하여 확인한 다. 다만, 시료가 심하게 오염되었거 나 브루셀라 균체가 매우 낮은 농 도로 오염되었을 가능성이 클 경우 에 동물실험을 할 수 있다.</p> <p>우유의 -----중략----- 피하 또는 찰과상을 입은 피부에, 세 마리 이상의 마우스(12~15g)의 정맥 또는 복강 내에 0.25~0.5ml씩을 주사한다. ---중략-----</p>

현 행	개 정 안
<p>(나) <신설> <u>브루셀라균의 분리용 배지는 Serum Dextrose Agar(또는 Liver Agar)배지를</u> 사용하여 10% 탄산가스 조건하에 ---- <u>중략</u>----- <u>urease 음성, citrate 음성이다. 또한</u> <u>최종확인을 위하여 표준항혈청으로</u> <u>응집반응을 실시하여 확인한다.</u></p>	<p>(나) 확인검사 <u>브루셀라균의 분리용 배지는 Serum Dextrose Agar(또는 Liver Agar),</u> <u>Brucella agar를 사용하여 5-10% 탄</u> <u>산가스 조건 하에-----중략-----</u> <u>urease 양성, oxidase 양성, catalase</u> <u>양성 등 생화학적 시험 결과로 최</u> <u>종 판정한다.</u></p>
<p>파. 살모넬라균(<i>Salmonella</i> spp.)</p>	<p>파. 살모넬라균(<i>Salmonella</i> spp.)</p>
<p>(1) 생략</p>	<p>(1) 현행유지</p>
<p>(2) 배지 및 시액</p>	<p>(2) 배지 및 시액</p>
<p>(가) <u>Selenite Cystine(SC) Broth</u></p>	<p>(가) <u>Rappaport-Vassiliadis soya peptone(RVS) broth</u></p>
<p>(나)~(다) 생략</p>	<p>(나)~(다) 현행 유지</p>
<p>(라) <u>Bismuth Sulfite(BS) Agar</u></p>	<p>(라) <u>Brilliant Green Sulfa (BG Sulfa) Agar</u></p>
<p>(마)~(카) 생략</p>	<p>(마)~(카) 현행 유지</p>
<p><신설></p>	<p>(차) <u>XLT4 Agar</u></p>
<p>(3) 시험방법</p>	<p>(3) 시험방법</p>
<p>(가) 증균배양</p>	<p>(가) 증균배양</p>
<p>-----중략-----</p>	<p>-----중략-----</p>
<p>즉 10ml의 TT broth 또는 SC broth에 1ml를 첨가함과 동시에 10ml의 RV broth에 0.1ml를 첨가하여----중략-----</p>	<p>즉 10ml의 TT broth에 1ml를 첨가함과 동시에 10ml의 RV 또는 RVS broth에 0.1ml를 첨가하여 ----중략-----</p>
<p>(나) 분리배양</p>	<p>(나) 분리배양</p>
<p>각각의 증균배양액을 <u>BS Agar</u> 및 <u>XLD Agar (또는 DCA, HE Agar, BS</u> <u>Agar)배지에 ----중략-----</u></p>	<p>각각의 증균배양액을 <u>BG Sulfa Agar</u> 및 <u>XLD Agar (또는 DCA, HE Agar,</u> <u>XLT4 Agar) ----중략-----</u></p>

현 행	개 정 안
<p>(다) 확인시험 ---중략---</p> <p>생화학적 검사를 실시한다. <u>생화학적으로 확인된 살모넬라균은 혈청학적 검사(O 항원 및 H 항원 응집반응)를 실시한다.</u></p> <p>(라) <신설> <u>살모넬라진단용 항혈청을 사용한</u> ----- ---중략---</p> <p>하. 리스테리아균(<i>Listeria monocytogenes</i>) 거. 캄필로박터균 (<i>Campylobacter jejuni/coli</i>) 너. 황색포도상구균 (<i>Staphylococcus aureus</i>)</p> <p>(1) 생략 (2) 배지 및 시액 (가) ~ (마) 생략</p> <p><신설> (3) 시험방법 (나) 균 분리시험 1) 증균배양 <u>증균배양이 필요하다고 인정될 경우에는</u> <u>시료 10ml를 90ml의 -----18시간</u> -----</p>	<p>(다) 확인시험 ---중략---</p> <p>생화학검사를 실시하여 <u>살모넬라 양성 유무를 판정한다.</u></p> <p>(라) 응집시험 <u>균종 확인이 필요한 경우 살모넬라</u> <u>진단용 항혈청을 -----중략-----</u></p> <p>하 리스테리아 모노사이토제네스(<i>Listeria monocytogenes</i>) 거 캄필로박터 제주니/콜리(<i>Campylobacter jejuni/coli</i>) 너. 황색포도상구균 (<i>Staphylococcus aureus</i>)</p> <p>(1) 현행 유지 (2) 배지 및 시액 (가) ~ (마) 현행 유지 (바) Baird-Parker RPF agar</p> <p>(3) 시험방법 (가) 정성시험법 1) 증균배양 <u>시료액 25ml(g)를 225ml의-----</u> <u>-----24시간</u> -----</p>
<p>2) 분리배양 <u>시료를 직접 또는 증균 배양액을</u> <u>Baird-Parker배지 또는 난황침가 만니톨</u> <u>식염한천배지에 도말하여-----중략-----</u> -----<u>백색환(난</u> <u>황반응 양성)이 있는 집락을 나타</u> <u>낸다.</u></p>	<p>2) 분리배양 <u>증균 배양액을 Baird-Parker 배지,</u> <u>난황침가 만니톨 식염한천배지 또는</u> <u>Baird-Parker-RPF 배지에 도말하여</u> <u>-----중략-----백색환(난</u> <u>황반응 양성)이 있는 집락을 나타낸다.</u> <u>Baird-Parker RPF 배지에서는 집락의</u></p>

현 행	개 정 안
<p>(3) 확인시험 ----- 중략-----coagulase test를 실시한다. 토끼혈청(신선혈청은 5%, 건조혈청의 용액은 10%)을 가한 멸균생리식염수를 멸균한 시험관에 0.5~1ml씩 무균적으로 분주한다. 여기에 분리배지상의 집락에서 직접 또는 보통한천배지에서 순수배양시킨 균 1백균이를 접종하여 37℃에서 배양한다. 배양 후 3, 6, 24시간의 각 시간에 응고의 유무를 판정하여 어느시간 후에도 응고 또는 섬유소(fibrin)가 석출된 것은 모두 coagulase 양성으로 하며 이상과 같이 확인된 것은 황색포도상구균 양성으로 판정한다. 혈장은 멸균된 5% 구연산나트륨용액 1용량에 건강한 토끼에서 채혈한 혈액 4용량의 비율로 혼합하고, 즉시 1,500rpm에서 10분간 원심하여 무균적으로 분리시킨 것 또는 시판 건조혈장을 이용한다. 또 토끼혈장을 이용하는 것이 좋지만 부득이한 경우는 사람의 혈장을 대용할 수도 있다. 이외의 생화학검사로-----중략-----</p>	<p>형태가 Baird-Parker와 동일하나, 불투명한 환으로 둘러싸여 있다 (3) 확인시험 ----- 중략----- Rabbit plasm을 이용하여 coagulase 시험을 실시하며 24시간 이내에 응고 유무를 판정한다. Baird-ParkerRPF 한천배지에서 전형적인 집락으로 확인된 것은 coagulase 시험을 생략할 수 있다. Coagulase 양성으로 확인된 것은 생화학시험을 실시하여 양성유무를 판정한다. 이외의 생화학검사로 -----중략-----</p>

현 행	개 정 안
<p>(가) 균수시험</p> <p>1) <신설></p> <p>황색포도상구균수 시험은 다.세균수 (1)일반세균수 시험에 따르며, 배지는 Baird-Parker배지를 사용하고, 35~37℃에서 48시간 배양한 다음 직경 1.0~1.5mm 크기의 black, shiny, convex한 집락주위에 약 2~5mm의 opaque region이 관찰되는 것을 계수한다. 집락수는 평판당 20~200개가 적정하다. 의심되는 집락 5개 이상에 대해 그람양성 구균 및 catalase양성임을 확인하고 coagulase검사를 실시한다</p> <p>2) <신설></p> <p>3) <신설></p>	<p>(나) 정량시험법</p> <p>1) 균수측정</p> <p>검체 25 g 또는 25ml를 취한 후, 225ml의 희석액을 가하여 2분간 균 질화하여 시험용액으로 하여 10배 단계 희석액을 만든 다음 각 단계 별 희석액을 Baird-Parker 배지 3장에 0.3ml, 0.4 ml, 0.3ml씩 총 접종액이 1ml이 되게 도말한다. 사용된 배지는 완전히 건조시켜 사용하고 접종액이 배지에 완전히 흡수되도록 도말한 후 10분간 실내에서 방치시킨 후 35~37℃에서 48±3시간 배양한 다음 투명한 띠로 둘러싸인 광택의 검정색 집락을 계수한다.</p> <p>2) 확인시험</p> <p>계수한 평판에서 5개 이상의 의심 집락을 선별하여 영양배지에서 계대한 후, 35~37℃에서 18~24시간 배양한 후 황색포도상구균 정성시험에 기재된 방법에 따라 확인시험을 실시한다.</p> <p>3) 균수계산</p> <p>확인 동정된 균수에 희석배수를 곱하여 계산한다. 예를 들어 10⁻¹ 희석용액을 0.3ml, 0.3ml, 0.4ml씩 3장의 선택배지에 도말 배양하고, 3장의 집락을 합한 결과 100개의 전형적인 집락이 계수되었고 5개의 집락을 확인한 결과 3개의 집락이 황색포도상구균으로 확인되었을 경우 시험용액 1ml에는 황색포도상구균의 수는 10×100×(3/5)=600이다. 시험용액은 시료를 10배 희석하였으므로 1g 당 6,000개의 황색포도상구균이 있다고 할 수 있다.</p>

현 행	개 정 안
<p>더. 클로스트리디움 (1) 클로스트리디움 퍼프린젠스 (<i>Clostridium perfringens</i>) (가) 생략 (나) 배지 및 시액 1) ~ 4) 생략 <신설> (다) 시험방법 2) 균 분리시험 가) 증균배양 <u>검사시료액 25ml(g)를 225ml의 Cooked Meat Medium의 배지 아래부분에 접종하여 35℃에서 18 ~ 24시간 -----</u></p> <p>나) 분리배양 증균된 균액을 ----- ----- 도말하여 37℃에서 18~24시간 혐기배양한다</p>	<p>더. 클로스트리디움 (1) 클로스트리디움 퍼프린젠스 (<i>Clostridium perfringens</i>) (가) 현행 유지 (나) 배지 및 시액 1) ~ 4) 현행유지 5) TSC 한천배지 (다) 시험방법 1) 정성 시험법 가) 증균배양 <u>시료 25ml(g)를 225ml의 0.1% Peptone water에 균질화 한 후, 제조된 시험용액 1ml을 10ml의 Cooked Meat Medium의 배지 아래부분에 접종하여 36±1℃에서 20±2시간 -----</u></p> <p>나) 분리배양 증균된 균액을 ----- 또는 난황이 첨가된 TSC agar에 도말하여 36±1℃에서 20±2시간 혐기배양한다. <i>Clostridium perfringens</i> Agar에서는 직경 2mm 정도의 약간 돌기된 유향색으로 주변에 불투명한 백색환이 있는 집락이, 난황이 첨가된 TSC agar에서는 불투명한 환을 가지는 황회색 집락은 확인시험을 실시한다.</p>

현 행	개 정 안
<p>다) 확인시험 의심되는 집락에 대해 그람염색, Lecithinase test, Lactose 이용능 등을 검사하고 키트를 이용하여 toxin type을 확인한다. <i>Cl. perfringens</i>는 EY-free TSC Agar에서 H₂S를 생성하여 흑색을 나타내며, 유당으로 부터 가스와 산을 생성하고, 짧고 굵은 아포형성의 그람양성 간균이다. 이러한 균에 대해 Lactose Gelatine Medium, Motility-Nitrate(MN) Agar 등의 배지에 접종하여 37℃ 일반 인큐베이터에서 20시간 배양한다. <i>Cl. perfringens</i>는 비운동성균으로 접종한 곳에만 자라며, gelatin의 액화는 44시간내 일어나며, nitrate 환원능력 있다.</p> <p>1) 균수 측정 가)~다) <신설> 시료 중 클로스트리디움균(<i>Cl. perfringens</i>)의 균수를 측정하고자</p>	<p>다) 확인시험 분리배양된 평판배지상의 집락을 보통한천배지에 옮겨 36±1℃에서 20±2시간 혐기배양한 후 그람염색을 실시하여 짧고 굵은 아포형성의 그람양성 간균을 관찰한다. 또 동시에 보통한천배지를 36±1℃ 20±2시간 호기배양하여 균의 비발육을 확인한다. 이러한 균을 Lactose Gelatine Medium에 접종하여 36±1℃에서 48시간 배양하여 유당의 분해로 생성된 가스와 산으로 배지에 버블이 생기고 배지색이 붉은색에서 노란색으로 변한지 여부를 관찰한다. 배양 후 배지를 1시간동안 5℃로 냉각시킨 후 gelatin 액화여부도 관찰한다. 또한 의심집락에 대하여 Motility-Nitrate(MN) Agar에 접종하여 36±1℃에서 20±2시간 배양한 후 운동성여부와 nitrate 환원 여부를 배지색이 붉은색으로 변한지를 보고 관찰한다. 그리고 키트 이용하여 toxin type을 확인할 수 있다.</p> <p>2) 정량시험법 가) 균수 측정 검체 25 g 또는 25ml를 취하여 225ml의 0.1% pepton water를 가한 후</p>

현 행	개정안
<p>할 경우는 시료를 70℃에서 20분간 처리한 다음 Clostridium perfringens Agar에서 35℃에서 48시간 배양하여 균수를 측정한다. (삭제) 무균적으로 시료를 0.1% Peptone Water를 사용하여 10¹부터 10⁵까지 공기유압이 적게 잘 희석한다. Clostridium perfringens Agar배지 6 ~ 7ml씩을 샤테에 붓고 균화 후 희석한 시료 1ml를 배지표면에 골고루 분산되게 한다. 이때 한 희석 배율에 대해 2개의 평판을 사용한다. 다시 15 ml의 Clostridium perfringens Agar (45~46℃)를 증충한다. 배지가 굳은 후 샤테를 뒤집지 않은 채 혐기배양기내에 넣는다. gas pack을 사용할 때는 밀봉 후 37℃항온기에서 24시간 배양하며, 이때 혐기배양기내의 혐기상태를 알기 위해 methylene blue 용액을 넣어 탈색이 되는가를 확인한다. 배양 후 집락을 계산한 후 이중 5~10개의 집락을 확정검사(confirmatory test)를 하기 위해 Fluid Thioglycollate Medium에 각각 접종 후 일반 인큐베이터에서 37℃, 20시간 배양한 다음 그람양성 간균임을 확인한다.</p>	<p>2분간 균질화 한 후 10배 단계 희석액을 만든다. 시험용액 및 단계별 희석액 1ml씩을 멸균 페트리접시 2매 이상씩에 무균적으로 취하고 43~45℃로 유지한 egg-yolk free TSC agar 10~15ml를 가하여 좌우로 돌리면서 잘 혼합한 후 응고시킨다. 응고된 배지 위에 다시 동일한 배지 10ml를 가하여 중첩시킨 후 36℃에서 20±2시간 혐기 배양한다. 150개 이하의 전형적인 검은색 집락이 확인된 평판을 선별하여 각 집락수를 계수한다.</p> <p>나) 확인시험 계수한 평판에서 5개 이상의 전형적인 집락을 선별하여 보통한천배지에 접종하고 36±1℃에서 20±2시간 혐기배양한 후 정성시험법 3) 확인시험에 따라 실시한다.</p> <p>다) 균수계산 확인 동정된 균수에 희석배수를 곱하여 계산한다. 예로 10⁻⁴에서 85개의 전형적인 집락이 계수되었고, 이중 5개의 집락을 확인한 결과 4개의 집락이 클로스트리디움 퍼프린젠스로 동정되었을 경우 85 × (4/5) × 10,000 = 680,000으로 계산한다.</p>

현 행	개 정 안
<p>버. 바실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)</p> <p>(1) 생략 (2) 생략 (3) 시험방법 (가) 정성시험법</p> <p>① 분리배양 생략</p> <p>② 확인시험</p> <p>-----중략-----</p> <p>생화학시험을 실시한다.</p>	<p>버. 바실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)</p> <p>(1) 현행유지 (2) 현행유지 (3) 시험방법 (가) 정성시험법</p> <p>① 분리배양 현행유지</p> <p>② 확인시험</p> <p>-----중략-----</p> <p>생화학 시험을 실시하며, 추가로 24~48시간 배양하여 곤충독소단백질 (Insecticidal crystal protein) 생성 확인시험^{주1)}을 실시한다. 다만 <i>B. cereus</i> 중 운동성이 없는 균주에 대해서는 Rhizoid 집락 확인시험^{주2)}을 실시한다.</p> <p>주1) 이 시험법은 <i>Bacillus cereus</i>와 <i>Bacillus thuringiensis</i>를 구분하는 시험법으로, 보통 한천배지에 30℃, 24~48시간 배양한 후 직접 또는 염색하여 현미경 관찰결과 (×1000배), 곤충독소단백질이 확인되면 <i>Bacillus thuringiensis</i>로 한다.</p> <p>주2) 이 실험은 <i>Bacillus cereus</i>와 <i>Bacillus mycoides</i>를 구분하는 시험법으로 의심집락을 24시간 증균한 증균액을 보통한천배지 중양에 접종한 후 30℃, 48~72시간 배양하여 긴머리나 뿌리 같은 구조를 가진 집락이 확인되면 <i>Bacillus mycoides</i>이다.</p>

현 행	개 정 안
<p>VIII. 미생물시험용 시액 및 배지</p> <p>1. 시액 가 ~ 너 생략</p> <p>2. 배지 가 생략</p> <p>나. <u>Bismuth Sulfate(BS) Agar</u></p> <p>Beef Extract 5.0 g</p> <p>Peptone 10.0 g</p> <p>dextrose 5.0 g</p> <p>Bsmuth green 8.0 g</p> <p>Na₂HPO₄ 4.0 g</p> <p>FeSO₄ 0.3 g</p> <p>Brilliant green 0.025 g</p> <p>Agar 20.0 g</p> <p>위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml을 만들고 1분간 끓여 녹인 후 PH 7.6으로 조정하여 사용한다.</p> <p>다 ~ 조 생략</p> <p>초. <u>3% Okawa 배지(3% KH₂PO₄)</u></p> <p>Monopotassium phosphate 3g</p> <p>Sodium glutamate 1g</p> <p>위의 성분에 증류수를 가하여 100ml로 만들고 100℃에서 30분간 끓인다.</p> <p>이 기초액에 전란액 20ml, Glycerol</p>	<p>VIII. 미생물시험용 시액 및 배지</p> <p>1. 시액 가 ~ 너 생략</p> <p>2. 배지 가 생략</p> <p>나. <u>Brilliant Green Sulfa (BG Sulfa) Agar</u></p> <p>Yeast extract 3g</p> <p>Protease Peptone No.3 10g</p> <p>Lactose 10g</p> <p>Saccharose 10g</p> <p>Sodium Sulfapyridine 1.0g</p> <p>Sodium chloride 5.0g</p> <p>Agar 20g</p> <p>Brilliant Green 0.0125g</p> <p>Phenol Red 0.08g</p> <p>위의 성분 59g을 증류수 1,000ml에 넣고 pH6.9로 조정하고 분말이 완전히 용해되도록 1분가량 끓인다. 과도히 가열하면 선택성이 떨어지므로 주의한다. 고압증기멸균하여 사용한다.</p> <p>다 ~ 조 현행유지</p> <p>초. <u>Lowenstein-Jensen Agar</u></p> <p>Asparagine 3.6 g</p> <p>Monopotassium Phosphate 2.4 g</p> <p>Magnesium Sulfate 0.24 g</p> <p>Magnesium Citrate 0.6 g</p> <p>Potato Flour 30.0 g</p>

현 행	개 정 안
<p>6ml, 2% Malachite green 수용액 6ml을 취하여 충분히 혼합한 후 5~6ml씩 멸균시험관 또는 시험병에 분주한 다음 85~90℃에서 60분간 가열 멸균한다</p>	<p>Malachite Green 0.4 g 증류수를 600ml을 가하고 배지가 끓기 직전까지 열을 가하면서 완 전히 녹인 후 121℃에서 15분간 멸균한 후 50℃정도가 되도록 식 힌다. 이 때 1,000ml의 오염되지 않은 전란(whole egg)을 준비하여 거품이 생기지 않도록 잘 섞은 후 위의 배지에 거품이 생기지 않도 록 잘 섞어준다. 뚜껑이 있는 튜브 (screw-capped tube)에 섞은 배지 를 분주한 후 사면배지가 되도록 잘 고정시켜 응고시킨 후 85℃에 서 45분간 농축시킨다. 열) bovine serum을 5-10% 되도록 첨가한다.</p>
<p>코 ~ 누 (생략)</p>	<p>코 ~ 누 현행유지</p>
<p>두. Selenite Cystine broth</p>	<p>두. RVS(Rappaport-Vassiliadis soya peptone) broth</p>
<p>Tryptone or polypeptone 5g</p>	<p>Soya peptone 4.5 g</p>
<p>Lactose 4g</p>	<p>Sodium Chloride 7.2 g</p>
<p>Sodium acid selenite(NaHSeO3) 4g</p>	<p>Potassium Dihydrogen Phosphate 1.26 g</p>
<p>Na₂HPO 10g</p>	<p>Di-Potassium Dihydrogen Phosphate 0.18g</p>
<p>L-cystine 0.01g</p>	<p>Magnesium Chloride, Anhydrous 13.58 g</p>
<p>Distilled water 1 l</p>	<p>Malachite Green Oxalate 0.036 g</p>
<p>완전히 녹이기 위해 가열 한 뒤 16x150mm의 멸균된 시험관에 10 ml씩 분주하고 고압증기멸균은 급 할것이며 흐르는 증기에서 10분동 안 가열한다. 최종 pH는 7.0±0.2가 되도록 한다. 제조한 당일 바로</p>	<p>위의 성분을 증류수 1,000ml에 녹여 pH5.6±0.2로 조정하고 잘 섞어 배지가 녹을 때까지 끓인 후 10ml씩 분주 하여 115℃에서 15분간 멸균한다.</p>

현 행	개정안																																
<p>사용하며 보관해 놓고 사용하지 않는다.</p> <p>루 ~ 추 생략</p> <p>쿠 Xylose Lysin Desoxycholate (XLD) Agar -----중략-----</p> <p>위의 성분을 증류수 1,000ml에 녹여 pH7.4로 조정하고 <u>고압증기멸균</u>한 후 사용한다.</p> <p>투 ~나' 생략 <u><신설></u></p>	<p>루 ~ 추 현행 유지</p> <p>쿠 Xylose Lysin Desoxycholate (XLD) Agar -----중략-----</p> <p>잘 섞어 배지가 녹을 때까지 끓인 후 사용한다. 과도하게 끓이거나 고압멸균해서는 안된다.</p> <p>투 ~나' 현행 유지</p> <p>다. 7H10 배지</p> <table border="0"> <tr><td>Ammonium Sulfate</td><td>0.5 g</td></tr> <tr><td>Monopotassium Phosphate</td><td>1.5 g</td></tr> <tr><td>Disodium Phosphate</td><td>1.5 g</td></tr> <tr><td>Sodium Citrate</td><td>0.4 g</td></tr> <tr><td>Magnesium Sulfate</td><td>25.0 mg</td></tr> <tr><td>Calcium Chloride</td><td>0.5 mg</td></tr> <tr><td>Zinc Sulfate</td><td>1.0 mg</td></tr> <tr><td>Copper Sulfate</td><td>1.0 mg</td></tr> <tr><td>L-Glutamic Acid (sodium salt)</td><td>0.5 g</td></tr> <tr><td>Ferric Ammonium Citrate</td><td>0.04 g</td></tr> <tr><td>Pyridoxine Hydrochloride</td><td>1.0 mg</td></tr> <tr><td>Biotin</td><td>0.5 mg</td></tr> <tr><td>Malachite Green</td><td>250.0 µg</td></tr> <tr><td>Agar</td><td>15.0 g</td></tr> </table> <p>* BBL Middlebrook OADC Enrichment</p> <table border="0"> <tr><td>Sodium Chloride</td><td>8.5 g</td></tr> <tr><td>Dextrose</td><td>20.0 g</td></tr> </table>	Ammonium Sulfate	0.5 g	Monopotassium Phosphate	1.5 g	Disodium Phosphate	1.5 g	Sodium Citrate	0.4 g	Magnesium Sulfate	25.0 mg	Calcium Chloride	0.5 mg	Zinc Sulfate	1.0 mg	Copper Sulfate	1.0 mg	L-Glutamic Acid (sodium salt)	0.5 g	Ferric Ammonium Citrate	0.04 g	Pyridoxine Hydrochloride	1.0 mg	Biotin	0.5 mg	Malachite Green	250.0 µg	Agar	15.0 g	Sodium Chloride	8.5 g	Dextrose	20.0 g
Ammonium Sulfate	0.5 g																																
Monopotassium Phosphate	1.5 g																																
Disodium Phosphate	1.5 g																																
Sodium Citrate	0.4 g																																
Magnesium Sulfate	25.0 mg																																
Calcium Chloride	0.5 mg																																
Zinc Sulfate	1.0 mg																																
Copper Sulfate	1.0 mg																																
L-Glutamic Acid (sodium salt)	0.5 g																																
Ferric Ammonium Citrate	0.04 g																																
Pyridoxine Hydrochloride	1.0 mg																																
Biotin	0.5 mg																																
Malachite Green	250.0 µg																																
Agar	15.0 g																																
Sodium Chloride	8.5 g																																
Dextrose	20.0 g																																

현 행	개 정 안
<p data-bbox="167 1400 295 1444"><신설></p>	<p data-bbox="837 336 1428 380">Bovine Albumin (Fraction V) 50.0 g</p> <p data-bbox="837 392 1428 436">Catalase 0.03 g</p> <p data-bbox="837 448 1428 492">Oleic Acid 0.6 mL</p> <p data-bbox="837 504 1428 1377"> <u>증류수를 900ml과 glycerol 5ml을 가하고 잘 섞은 후 완전히 녹이기 위하여 1분간 끓인 다음 121℃에서 10분간 멸균한다. 무균적으로 Middlebrook OADC Enrichment를 섞은 후 50-55℃까지 식힌다. 이 때 1,000ml의 오염되지 않은 전란(whole egg)을 준비하여 거품이 생기지 않도록 잘 섞은 후 위의 배지에 거품이 생기지 않도록 잘 섞어준다. 뚜껑이 있는 튜브(screw-capped tube)에 섞은 배지를 분주한 후 사면배지가 되도록 잘 고정시켜 응고시킨 후 85℃에서 45분간 농축시킨다.</u> </p>
	<p data-bbox="837 1400 1428 1444">마'. Serum dextrose broth</p> <p data-bbox="837 1456 1428 1500">Tryptose 10 g</p> <p data-bbox="837 1512 1428 1556">Beef extract 3 g</p> <p data-bbox="837 1568 1428 1612">NaCl 5 g</p> <p data-bbox="837 1635 1428 1870"> <u>증류수 950 ml을 가하고 121℃에서 15분간 멸균한 후 56℃에서 30분간 비동화한 horse serum 과 dextrose 50g을 첨가한다.</u> </p>

현 행	개 정 안														
<p data-bbox="204 338 328 376"><신설></p>	<p data-bbox="842 338 1158 376"><u>바'. Brucella Agar</u></p> <table data-bbox="842 398 1437 795"> <tr> <td>Pancreatic Digest of Casein</td> <td>10.0 g</td> </tr> <tr> <td>Peptic Digest of Animal Tissue</td> <td>10.0 g</td> </tr> <tr> <td>Dextrose</td> <td>1.0 g</td> </tr> <tr> <td>Yeast Extract</td> <td>2.0 g</td> </tr> <tr> <td>Sodium Chloride</td> <td>5.0 g</td> </tr> <tr> <td>Sodium Bisulfite</td> <td>0.1 g</td> </tr> <tr> <td>Agar</td> <td>15.0 g</td> </tr> </table> <p data-bbox="842 813 1437 1144">증류수를 1,000ml 가하고, 완전히 녹이기 위해 1분간 가열한 뒤 121℃에서 15분간 멸균한 후 fibrin을 제거한 (비동화: 56℃, 30분동안 가열) bovine serum을 5-10% 되도록 첨가한다.</p>	Pancreatic Digest of Casein	10.0 g	Peptic Digest of Animal Tissue	10.0 g	Dextrose	1.0 g	Yeast Extract	2.0 g	Sodium Chloride	5.0 g	Sodium Bisulfite	0.1 g	Agar	15.0 g
Pancreatic Digest of Casein	10.0 g														
Peptic Digest of Animal Tissue	10.0 g														
Dextrose	1.0 g														
Yeast Extract	2.0 g														
Sodium Chloride	5.0 g														
Sodium Bisulfite	0.1 g														
Agar	15.0 g														
<p data-bbox="185 1171 309 1209"><신설></p>	<p data-bbox="831 1171 1150 1209"><u>샤'. Brucella broth</u></p> <table data-bbox="842 1232 1437 1568"> <tr> <td>Pancreatic Digest of Casein</td> <td>10.0 g</td> </tr> <tr> <td>Peptic Digest of Animal Tissue</td> <td>10.0 g</td> </tr> <tr> <td>Dextrose</td> <td>1.0 g</td> </tr> <tr> <td>Yeast Extract</td> <td>2.0 g</td> </tr> <tr> <td>Sodium Chloride</td> <td>5.0 g</td> </tr> <tr> <td>Sodium Bisulfite</td> <td>0.1 g</td> </tr> </table> <p data-bbox="842 1585 1437 1865">증류수를 1,000ml 가하고, 끓여서 녹인 뒤 121℃에서 15분간 멸균한 후 fibrin을 제거한 (비동화: 56℃, 30분동안 가열) bovine serum을 5-10% 되도록 첨가한다.</p>	Pancreatic Digest of Casein	10.0 g	Peptic Digest of Animal Tissue	10.0 g	Dextrose	1.0 g	Yeast Extract	2.0 g	Sodium Chloride	5.0 g	Sodium Bisulfite	0.1 g		
Pancreatic Digest of Casein	10.0 g														
Peptic Digest of Animal Tissue	10.0 g														
Dextrose	1.0 g														
Yeast Extract	2.0 g														
Sodium Chloride	5.0 g														
Sodium Bisulfite	0.1 g														

현 행	개 정 안	
<u><신설></u>	<u>아'. XLT4 Agar</u>	
	<u>Proteose Peptone No.3</u> 1.6g	
	<u>Yeast Extract</u> 3.0g	
	<u>L-Lysine</u> 5.0g	
	<u>Xylose</u> 3.75g	
	<u>Lactose</u> 7.5g	
	<u>Saccharose</u> 7.5g	
	<u>Ferric Ammonium Citrate</u> 0.8g	
	<u>Sodium Thiosulfate</u> 6.8g	
	<u>Sodium Chloride</u> 5.0g	
	<u>Agar</u> 18.0g	
	<u>Phenol Red</u> 0.08g	
	위의 성분 59g을 증류수 1,000ml에 넣고 여기에 4.6ml XLT Agar supplement를 넣고 분말이 완전히 용해되도록 1분가량 끓인다. 마지막 pH는 7.4±0.2로 맞추고 고압증기멸균은 하지 않는다.	
	<u><신설></u>	<u>자'. Baird-Parker RPF agar</u>
		<u>Tryptone</u> 1 g
<u>Beef Extract</u> 0.5 g		
<u>Yeast Extract</u> 0.1 g		
<u>Sodium Pyruvate</u> 1 g		
<u>Glycine</u> 1.2 g		
<u>Lithium Chloride 6H₂O</u> 0.5 g		
<u>Agar</u> 2 g		
위의 성분을 증류수 90ml에 녹이고 pH를 7.2 로 조정 한 후 121℃ 15분		

현 행	개 정 안											
<p data-bbox="204 869 328 913"><신설></p>	<p data-bbox="820 338 1436 443">간 멸균하여 50℃정도로 식힌 다음 RPF Supplement를 첨가한다.</p> <table data-bbox="820 454 1436 678"> <tr> <td data-bbox="820 454 1299 499">Bovine Fibrinogen</td> <td data-bbox="1299 454 1436 499">0.375 g</td> </tr> <tr> <td data-bbox="820 510 1299 555">Trypsin Inhibitor</td> <td data-bbox="1299 510 1436 555">2.5 mg</td> </tr> <tr> <td data-bbox="820 566 1299 611">Rabbit Plasma</td> <td data-bbox="1299 566 1436 611">2.5 mL</td> </tr> <tr> <td data-bbox="820 622 1299 667">Potassium Tellurite</td> <td data-bbox="1299 622 1436 667">2.5 mg</td> </tr> </table> <p data-bbox="820 689 1436 795">위의 성분을 멸균증류수 10ml에 녹인다</p>	Bovine Fibrinogen	0.375 g	Trypsin Inhibitor	2.5 mg	Rabbit Plasma	2.5 mL	Potassium Tellurite	2.5 mg			
	Bovine Fibrinogen	0.375 g										
Trypsin Inhibitor	2.5 mg											
Rabbit Plasma	2.5 mL											
Potassium Tellurite	2.5 mg											
<p data-bbox="820 869 1422 913">차. TSC 한천배지(Tryptose Sulfite Cycloserine Agar)</p> <table data-bbox="820 925 1436 1272"> <tr> <td data-bbox="820 925 1353 969">Tryptose</td> <td data-bbox="1353 925 1436 969">15 g</td> </tr> <tr> <td data-bbox="820 981 1353 1025">Yeast Extract</td> <td data-bbox="1353 981 1436 1025">5 g</td> </tr> <tr> <td data-bbox="820 1037 1353 1081">Soytone</td> <td data-bbox="1353 1037 1436 1081">5 g</td> </tr> <tr> <td data-bbox="820 1093 1353 1137">Ferric Ammonium Citrate</td> <td data-bbox="1353 1093 1436 1137">1 g</td> </tr> <tr> <td data-bbox="820 1149 1353 1193">Sodium Metabisulfite</td> <td data-bbox="1353 1149 1436 1193">1 g</td> </tr> <tr> <td data-bbox="820 1205 1353 1249">Agar</td> <td data-bbox="1353 1205 1436 1249">20 g</td> </tr> </table> <p data-bbox="820 1272 1436 1865">위의 성분에 증류수 900ml를 가하여 녹인 후 pH 7.6±0.2로 조정한다. 이를 500ml Flask에 250ml씩 분주한 후 121℃에서 15분간 멸균한다. 이를 50℃정도로 식힌 후 D-cycloserine solution 20 ml와 난황액을 10%가 되도록 첨가한다. D-cycloserine solution은 D-cycloserine 1g을 200 ml의 증류수로 용해한 후 여과멸균하여 4℃로 보관하여 사용한다.</p>	Tryptose	15 g	Yeast Extract	5 g	Soytone	5 g	Ferric Ammonium Citrate	1 g	Sodium Metabisulfite	1 g	Agar	20 g
Tryptose	15 g											
Yeast Extract	5 g											
Soytone	5 g											
Ferric Ammonium Citrate	1 g											
Sodium Metabisulfite	1 g											
Agar	20 g											