



## 식중독 세균 검출에 있어서 리포솜의 이용 가능성

김명희\* · 김왕준 · 신원선 · 손동화 · 차성관  
한국식품개발연구원

### Feasibility Study on the Use of Liposomes for Detecting Food-borne Pathogenic Bacteria

Myunghee Kim\*, Wang June Kim, Weon-Sun Shin, Dong-Hwa Shon and Seong Kwan Cha  
Korea Food Research Institute

#### Abstract

Feasibility tests on using liposomes for detecting food-borne pathogenic bacteria were studied with *E. coli* O157:H7 as a model analyte. Immunoliposomes, whose surface was conjugated with anti-*E. coli* O157:H7 IgG and which encapsulated the marker dye, sulforhodamine B, were used for the detection label. Among the feasibility tests, the first test was to use a test-strip on which antibodies to anti-*E. coli* O157:H7 IgG were immobilized. In this format, immunoliposomes that did not bind to *E. coli* O157:H7 in sample were captured and then exhibited a visible signal which was inversely related with the number of *E. coli* O157:H7 in sample. The second test was a direct liposome assay followed by immunomagnetic separation. In this format, immunoliposomes which were bound to *E. coli* O157:H7 were lysed with detergent and produced a signal which was proportionally related with the number of *E. coli* O157:H7 in sample. The results from both formats indicate that liposomes can be utilized as a detection label.

**Key words** : liposome, test-strip, immunomagnetic bead, *E. coli* O157:H7, immunoassay, safety

#### 서 론

식품으로 인한 질병은 개인의 생명을 위협할 뿐 아니라 건전한 노동력의 상실로 생산성을 감소시키고 의료비를 증가시켜 국가 경제에 부담을 준다(Buzby et al., 1996; Mead et al., 2000). HACCP와 더불어 식품안전에 관한 여러 규제의 시행 등 많은 노력에도 불구하고 *Salmonella* serotypes, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, 병원성 *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*와 같은 식품기원 병원성 세균으로 인한 질병은 줄어들고 있지 않다. 외식과 집단 급식의 증가는 식품을 통한 이들 병원성 세균의 전파 가능성을 오히려 증가시키고

있다.

식품의 품질과 안전성을 확보하기 위해서 식품에 존재하는 세균을 검사하는 것은 기본적 과정이다. 식품 안에 살아 있는 세균을 분리하여 증식시키기 위해서 전통적인 세균 검사 방법은 선택적 배지에 의존해오고 있다. 그러나 특정 병원성 세균의 검사는 상당히 어려운 일이며 복잡하고 정교한 배양과정을 요구한다. 식품은 단백질, 탄수화물, 지질 등 다양하면서 동시에 비정형의 구성 성분들로 이루어져 있는데 어떤 구성 성분들은 분석 목표 세균의 검출을 방해할 수 있다. 식품의 물리적 조성 또한 액체, 고체, 반고체 등 다양하다. 점도의 차이 혹은 지질의 존재는 재현성 있는 실험 결과를 얻기 위해서는 필수적인 동일 수준의 세균분리 및 균일한 식품 균질액을 획득하는데 방해 요소가 될 수 있다. 이러한 다양한 matrices 문제 외에 식품에 본래 내재하는 정상 미생물이 높은 수준으로 존재할 때도 목표 세균의 분석에 문제가 될 수 있다. 식품에 자연스럽게 내재하는 일반 미생

\* Corresponding author : Myunghee Kim, Food Safety Lab, Korea Food Research Institute, San 46-1 Backhyun-Dong, Bundang-Gu, Sungnam, Kyunggi 463-746, Korea. Tel: 82-31-780-9026, Fax: 82-31-709-9876, E-mail: mk82@kfri.re.kr

물은 보통 인간의 건강에 심각한 영향을 주지 않으나 이들의 물리적 존재는 특정 목표 미생물의 선택적 분리 동정을 방해할 수 있다. 특히, 이러한 방해 요인은 아주 적은 수로 존재하면서 병을 일으키는 *Shigella*, *Salmonella*, enterohemorrhagic *E. coli*를 분석할 때 문제가 된다. 이때 분석하고자 하는 목표 세균이 손상을 입었다면 내재 미생물에 의한 방해 문제가 심각해질 수 있다. 식품가공과정 중에 사용되는 열, 냉각, 건조, 동결, 삼투압, 화학첨가제, 방부제 등의 다양한 처리는 미생물을 손상시킬 수 있다. 이렇게 손상되거나 스트레스를 받은 미생물은 선택배지 구성성분에 대해 매우 높은 감수성을 보이므로 표준 미생물학적 방법을 사용하여 검출할 때는 이렇게 감수성이 높은 균들을 분석 과정중에 쉽게 놓치는 결과를 초래하게 된다.

표준 미생물학적 방법 사용시 나타나는 문제점들을 극복하기 위해 전통적 미생물학적 방법 그리고 이에 사용되는 배지를 목표 세균 또는 목표 세균을 포함하는 식품의 특성에 적합하도록 변형시키는 노력이 이루어져왔다. 이 가운데 식품 분석을 위해 적용된 효과적인 방법은 식품 시료를 단계별로 강화배양하는 것이다. 일반적으로 이 과정은 preenrichment로 시작되는데 이 과정동안 식품 시료는 영양분이 풍부한 비선택적 배지에서 배양된다. 이때 손상받거나 스트레스를 받은 균들의 회복이 이루어진다. 이 시료는 다시 선택적 강화배양을 위해 조성된 배지로 옮겨지며 이때 목적균은 성장하는 반면 내재 미생물은 억제된다. 필요한 경우 postenrichment 단계가 수반되기도 하는데, 이는 선택적으로 강화배양된 목적 세균을 검출 용이한 수준으로 더 증폭하는데 목적이 있다. 이렇게 강화배양된 시료는 선택차별배지에도말되고 이때 생성된 균 집락의 특성을 기초로 세균의 정체 가 추정적으로 밝혀진다. 이들 분리균의 동정은 일련의 생화학적 검사를 거쳐 확인되며 균에 따라서는 혈청학적 방법에 의한 추가 확인이 필요하다. 이상의 전통적 방법은 효과적이어서 오랫동안 식품 병원성 세균을 분리, 동정하는데 이용되어 왔지만 그 과정은 매우 노동 집약적이다. 장시간이 소요되는 여러 강화배양 단계와 생화학적 특성을 밝혀야 하는 점은 수일에 걸친 분석시간을 요구한다. 이 결과 전통적인 방법은 식품에서 미생물학적 안전성을 시기적절하게 평가하는데 있어서 한계를 보여왔다.

항원-항체 반응의 특이성은 과거 수십년 동안 세균의 동정 및 subtyping에 이용되어 왔다. 세균의 표면 항원 또는 분비 독소를 이용하여 다양한 검출 방법들이 개발되고 있다. 항체 결합형의 형광물질을 이용하여 시료에서 세균을 직접 검출할 수 있다는 보고(Coons et al., 1942) 이후, 면역형광기술은 식품에서 특히 *Salmonella* serotype의 검출에 이용되어 왔다(Haglund et al., 1964; Swaminathan et al., 1978; Thoma-

son, 1981). 우유와 사과 주스를 대상으로 *E. coli* O157:H7을 직접 계수하는 방법도 개발되었는데 민감도는  $\sim 10^3$  cells/mL이었다(Tortorello and Gendel, 1993). 면역형광기술의 제한요인은 고가의 flow cytometer 또는 형광 현미경이 필요하며 이 분석기계 작동을 위해 숙련된 인력이 요구된다는 점과 식품 중에 형광성을 나타내는 성분들이 분석을 방해할 수 있다는 것이다. 면역 분석법 가운데 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)는 가장 널리 이용되는 방법이다(Clark and Engvall, 1980). ELISA 방법은 방사성 동위원소를 사용하는 방사성 면역측정법에서 방사성 동위원소를 대체할 표지 물질을 찾는 과정 중에 개발되었으며 일반적으로 sandwich ELISA라고 알려지는 two-site ELISA가 식품 내 세균 분석에 적합한 방법으로 알려진다(Pierson and Stern, 1986). 이 방법에서 solid-phase에 고정화된 포획용 항체는 항원인 세균과 결합한다. 결합되지 않은 항원은 몇 번의 수세 과정에서 제거된다. 이후 효소 결합형의 2차 항체를 첨가하고 이 효소에 대한 기질을 가하며 효소 반응이 종료되면 나타나는 색깔의 형성 정도를 육안으로 관찰하거나 흡광도를 이용해 정량화한다. ELISA 이외의 다양한 면역 분석법으로는 목표 분석원으로 또는 이에 대한 항체로 coating된 latex 입자를 이용하여 응집반응을 보는 latex agglutination과 immunodiffusion, 목표 분석원에 대한 항체가 coating된 dipstick을 이용하는 방법 등이 있다. 이들 분석법은 ELISA에서 필요한 plate washers나 ELISA readers와 같은 장비를 요구하지 않으므로 최소한의 장비를 가진 실험실에서도 수행할 수 있다.

새로운 표지 물질로써 인식되기 이전에 리포솜은 세포막의 성질을 연구하는 동안 발견되었다. 리포솜은 인지질이 수용액 상에 분산되어 있을 때 자발적으로 형성되는 1개 이상의 이중 인지질막으로 구성된 구형의 소포이다(Bangham et al., 1965). 수용액에 녹아있는 형광물질, 효소, 약물 등의 분자들은 리포솜을 합성하는 과정에서 리포솜 내부로 포집될 수 있다. 리포솜을 이용한 초기의 연구는 주로 세포막에 관한 것이었으나 최근에는 약물 전달 분야와 유전자를 운반하는 기능으로써 화학 치료법과 유전자 치료법에 응용되고 있다. 리포솜은 작은 항원 분자에 대한 항체 형성을 향상시키기 위해서도 이용되며 화장품의 구성성분으로써도 생산된다. 약물 전달에서 리포솜의 내부 수상계는 많은 수의 약물 분자를 포집하는 역할을 한다. 암세포의 세포막 단백질을 인식하는 항체를 리포솜 표면에 결합시켜 만들어진 면역리포솜은 암세포 표면에 특이적으로 결합하고 리포솜에 포집되어 있는 약물은 암세포 내부로 방출되게 된다. 리포솜을 의약 분야에 응용하는 동안 다양한 리포솜 합성 방법과 여러 분자와의 결합 방법이 활발하게 개발되었다. 이렇게 개발된 방법들

은 리포솜을 면역화학 분야에서 분석 도구로 이용 가능하게 하였다. 본 연구에서는 식중독 세균 검출에 있어서 리포솜의 이용 가능성을 알아보고자 대표적인 식중독 세균인 *E. coli* O157:H7을 대상으로 test-strip을 이용한 방법과 리포솜을 파괴시켜 형광도를 측정하는 두 종류의 분석 방법을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

Dipalmitoyl phosphatidylcholine(DPPC), dipalmitoyl phosphatidylethanolamine(DPPE), dipalmitoyl phosphatidylglycerol(DPPG)는 Avanti Polar Lipids(Alabaster, AL, USA)로부터 구입하였다. Cholesterol, triethylamine, chloroform, methanol, isopropyl ether, casein, polyvinylpyrrolidone, Sephadex G50-150, Sepharose CL-4B, Octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside(OG), trizma base, bovine serum albumin(BSA), Tween 20는 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 sulforhodamine B(SRB)는 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)로부터 구입하였다.

0.2, 0.4, 3  $\mu$ m의 구멍 크기를 갖는 polycarbonate syringe filters는 Poretics(Livermore, CA, USA), nitrocellulose membranes는 Sartorius(Goettingen, Germany)에서 구입하였다. *E. coli* O157:H7에 대한 항체는 Kirkegaard & Perry Laboratories(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하거나 뉴질랜드산 가토에서 생산하였다. *N*-Succinimidyl *S*-acetylthioacetate(SATA), *N*-[kappa-Maleimidoundecanoyloxy]-sulfo-succinimide ester(sulfo-KMUS), hydroxylamine hydrochloride는 Pierce(Rockford, IL, USA), Trypticase Soy Broth(TSB), Sorbitol MacConKey Agar(SMAC)는 Difco Laboratories(Detroit, MI, USA)에서 구입하였다. *E. coli* O157:H7(ATCC 43895)는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)으로부터 구입하였다.

Dynabeads anti-*E. coli* O157 immunomagnetic beads(IMB), magnetic particle concentrator(MPC)는 Dynal Inc. (Lake Success, NY, USA)에서 구입하였다.

### 방 법

리포솜은 reverse-phase evaporation 방법(Siebert et al., 1993; Szoka et al., 1980)을 변형하여 다음과 같이 합성하였다.

#### DPPE-ATA 합성

DPPE 5 mg과 SATA 3.5 mg을 반응 플라스크에 넣고 1 mL의 chloroform에 녹인 triethylamine 용액(0.7%, v/v)을 가해 질소 가스 아래 45°C의 항온 수조에서 1 분간 초음파 처

리하면서 녹인다. 초음파 처리 후, 0.5 mL의 0.7% triethylamine 용액을 다시 넣고 45°C 항온 수조에 1 분간 방치한다. Platform shaker로 옮겨 20 분간 약하게 교반한다. Chloroform 2 mL를 가하고 회전식 진공 증발기로 45°C에서 triethylamine을 제거한다. 이를 두 번 더 반복한다. 약 0.1 mL의 DPPE-ATA가 얻어지게 되며 여기에 1 mL의 chloroform을 가한다.

#### 리포솜의 합성

DPPC 29.6 mg, DPPG 3 mg, cholesterol 15.8 mg을 반응 플라스크에 넣는다. Chloroform 3 mL와 methanol 0.5 mL를 가해 45°C 항온 수조에서 지질을 녹인다. 이 지질 혼합물에 0.5 mL의 DPPE-ATA를 가한다. Isopropyl ether 3 mL를 가한 후 지질액을 잘 섞는다. 지질 혼합액이 든 플라스크를 45°C 항온 수조에 넣고 질소 가스 아래에서 1 분간 초음파 처리한다. 150 mM SRB 용액 2 mL를 질소 가스 아래에서 초음파 처리하면서 지질 혼합액에 가한다. 유기용매를 45°C에서 회전식 진공 증발기로 제거한다. 나머지 2 mL의 150 mM SRB 용액을 가하고 1 분간 초음파 처리를 한다. 다시 회전식 진공 증발기로 잔존하는 유기용매를 제거한다. 균일한 액을 얻을 때까지 초음파 처리와 농축을 반복한다. 세 가지 다른 구멍 크기의 polycarbonate syringe filter를 5 mL의 플라스틱 syringe에 구멍 크기 3, 0.4, 0.2  $\mu$ m순서로 연결한 후 리포솜액을 통과시킨다. 통과된 액을 Sephadex G-50-150 column에 통과시켜 SRB가 포집된 리포솜 분획만을 모아 0.15 M NaCl을 포함하는 0.02 M trizma base(0.02 M TBS), pH 7.0, 완충액으로 투석한다.

#### Maleimide-derivatized IgG의 형성

항 *E. coli* O157:H7 IgG 용액을 1 mM EDTA와 0.01% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>가 녹아있는 0.05 M potassium phosphate 완충액(pH 7.8)으로 투석한다. Sulfo-KMUS 2 mg을 0.1 mL의 DMSO에 녹인다. Sulfo-KMUS 용액을 투석한 IgG 용액과 섞는다. 2~3 시간 동안 상온에서 반응시킨다. 반응액을 0.15 M NaCl을 포함하는 0.02 M potassium phosphate 완충액(pH 7.0)으로 투석한다.

#### 리포솜 SH groups의 Deprotection

DPPE-ATA 리포솜에 0.5 M hydroxylamine hydrochloride를 10:1의 비율(v/v)로 가한 후 1분간 N<sub>2</sub> 가스를 통과해 주고 2시간 동안 상온의 암실에서 반응시킨다.

#### Maleimide-derivatized IgG와 SH-tagged liposomes의 공유결합

SH-tagged liposomes를 0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 사용하여 pH 7.0으로 조절한다. Maleimide-derivatized IgG와 섞은 후 1분간 N<sub>2</sub> 가스를 통과해 주고 상온에서 4시간 동안 반응시킨다. 4°C 저온실로 옮겨 18시간 동안 반응시킨다. 반응이 안된 SH groups을 quenching하기 위해 ethylmaleimide을 가하여 상온에서 30분간 반응시킨다. Sepharose CL-4B column(1.5 cm×18 cm)을 통과시켜 면역리포솜 분획을 얻는다. 이때 column chromatography를 위해 0.01% NaN<sub>3</sub>를 포함하는 0.02 M TBS(pH 7.0) 완충액을 사용하며 면역리포솜 분획을 모아 0.11 M sucrose를 포함하는 위의 완충액으로 투석하고 냉장고에 보관하면서 사용한다.

**Test-strip을 이용한 분석**

75 mm × 12 mm(높이×외경) 크기의 시험관에 분석하고자 하는 시료와 적당히 희석한 리포솜 용액을 섞어 총액이 70 μL가 되도록 한다. 30 분 동안 상기 용액을 부드럽게 교반한다. 교반과정동안 시료를 SMAC 평판배지에 도말하고 37°C 배양기에서 배양하여 다음 날 생균수를 측정한다. 시험관 안에 면역리포솜을 인식하는 항체가 도포된 test-strip을 넣는다. 모세관 현상에 의하여 수용액이 test-strip의 상단부에 이를 때까지 기다린다. Test-strip의 capture zone에 나타난 분석 신호를 육안으로 관찰한다.

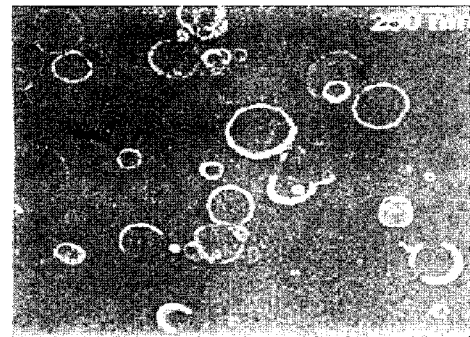
**Immunomagnetic separation(IMS)를 이용한 분석**

75 mm × 12 mm(높이×외경) 크기의 시험관에 IMS를 위해 IMB 20 μL를 첨가한다. 시료당 세 개의 시험관에 negative control로써 살균된 TSB 1 mL과 시료로써 *E. coli* O157:H7 배양액 1 mL를 가한다. Platform shaker위에서 60 분 동안 상온에서 130 rpm의 회전수로 교반한다. 이 사이에 배양액을 적당히 희석하여 SMAC 평판배지에 도말하고 37°C 배양기에서 배양하여 다음 날 생균수를 측정한다. MPC 안에 시험관을 넣고 IMB의 수거를 위해 적어도 3분 동안 시험관을 정지한 후 상등액을 제거한다. MPC에서 시험관을 꺼내고 1 mL의 0.01 M PBS-0.05% Tween 20 용액으로 IMB를 3번 씻어준다. 1 mL의 0.02 M TBS-0.13 M sucrose-0.5% BSA로 IMB를 씻는다. 면역리포솜 용액 70 μL를 첨가하고 15 분 동안 시험관을 platform shaker 위에서 교반한다. 1 mL의 0.02 M TBS-0.13 M sucrose-0.5% BSA로 IMB를 3번 washing 한다. 시험관에 0.02 M TBS로 녹인 30 mM의 OG 200 μL를 첨가하고 강하게 혼합한다. 상등액을 희석하여 여기파장은 543 nm, 방출파장은 596 nm에서 형광도를 측정한다.

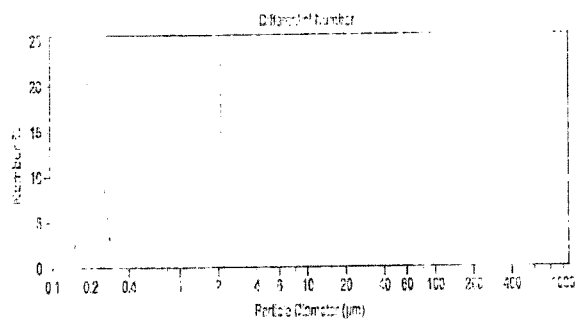
**결과 및 고찰**

**리포솜의 특징**

표지 물질로써 형광물질이 포집된 리포솜 용액은 외형적으로 일반 형광물질 용액과 구별하기 힘들다. Reverse-phase evaporation 방법에 의해 합성한 리포솜이 실제 어떤 모양을 가지고 있는지 확인하기 위해 투과전자현미경하에서 관찰한 결과 구형의 소포임을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 대략 직경 250 nm를 중심으로 다양한 크기의 소포가 분포되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 2). 단일 크기의 진단용 시약 분자는 분석 결과의 재현성을 높이고 정량적 분석방법을 설정하는데 중요하다. 리포솜은 리포솜 내부 및 외부의 친수성 수용액 환경 아래에서 열역학적으로 안정한 상태를 이루기 위해 자발적으로 형성된 소포이다. 따라서 엄격한 실험 조건 아래에서도 리포솜 합성시 다양한 크기의 소포가 생기게 된다. 단일 크기의 입자를 얻기 어려운 점을 개선시키고자 Szoka 등 (1980)이 보고한 자료를 참고로 하여 리포솜 제조 과정 단계에서 일정 크기의 구멍 크기를 갖는 syringe filter를 통과시켰다. Fig. 2에 나타난 크기 분포의 측정 결과는 최종적으로 0.2 μm의 syringe filter를 통과한 리포솜으로써 0.2 μm를 중심으로 균일한 크기 분포를 보여주고 있다. 입자 크기의 균일한 분포는 리포솜을 정성 분석법은 물론 정량 분석법 개발을 위한 진단 시약으로써의 가능성을 제시한다고 할 수 있다.



**Fig. 1. Liposomes visualized under transmission electron microscope.**



**Fig. 2. Size distribution of liposome preparation.**

**Test-strip을 이용한 분석**

본 분석 방법은 *E. coli* O157:H7을 면역리포솜과 반응시킨 후 비반응 면역리포솜을 test-strip 상에서 포획함으로써 분석 신호를 얻는 것이다(Fig. 3). 따라서 분석 신호의 강도는 시료 내 균수와 반비례 관계를 나타내며 전형적인 분석 결과의 예는 Fig. 4와 같다.

**IMS를 이용한 분석**

IMS를 이용하여 목표 균을 배지로부터 분리하고 여기에

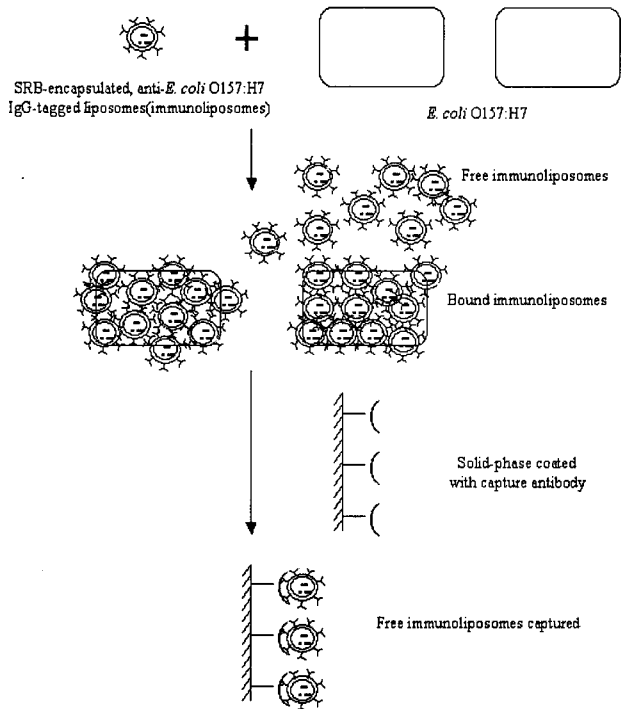


Fig. 3. Principle of test-strip assay.

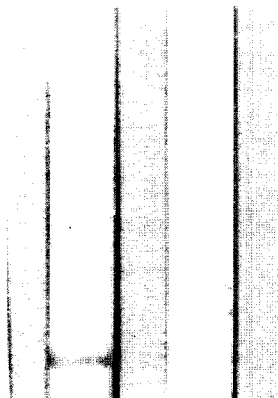


Fig. 4. A typical example of test-strip assay. (left: absence of *E. coli* O157:H7, right: presence of *E. coli* O157:H7)

면역리포솜을 반응시켜 분석 신호를 얻는 방법의 원리는 Fig. 5와 같다. *E. coli* O157:H7 순수 배양액으로 실험을 실시한 결과,  $10^4$  CFU/mL에서 negative control(즉 0 CFU/mL)과 구별되는 분석 신호의 증가가 나타나기 시작하여 생균수가  $10^6$  CFU/mL 이상의 경우는 뚜렷한 분석 신호의 증가가 나타나는 것으로 보아 이 범위의 오염도에서는 *E. coli* O157:H7를 쉽게 검출할 수 있을 것이다(Fig. 6). 이 결과는 적은 수의 균이 시료에 오염되어 있을 경우, 어느 정도의 강화배양을 통하여 균수를 증폭시킨 후 목적균을 분석해야 함을 의미한다.

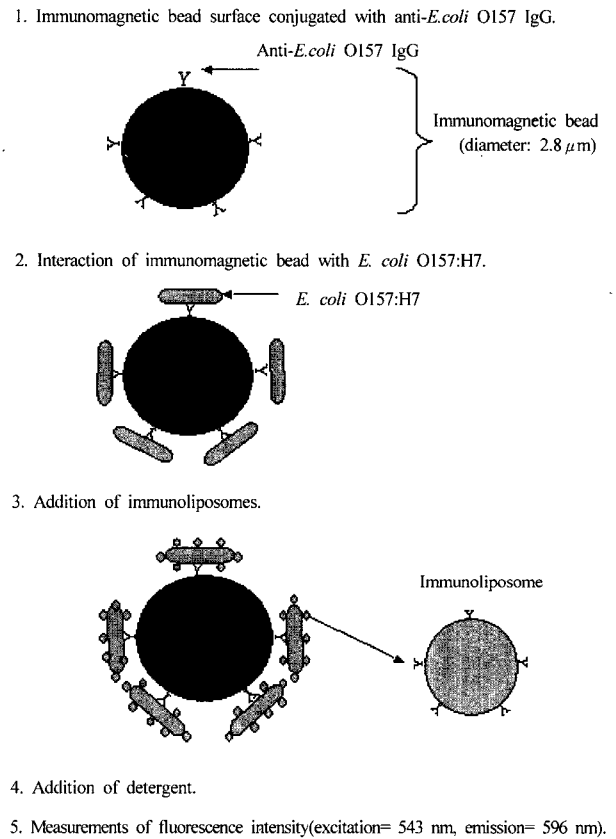


Fig. 5. Principle of direct liposome assay involving IMS.

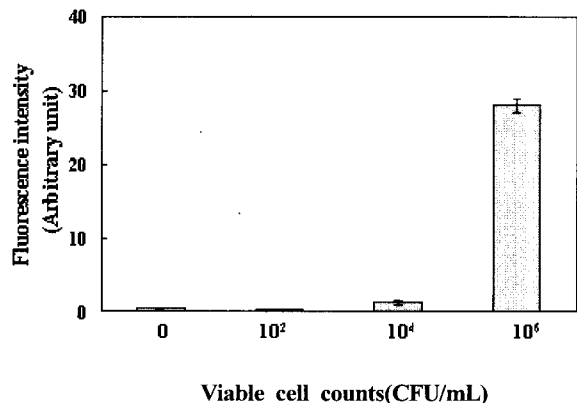


Fig. 6. A typical example of direct liposome assay.

## 요 약

식중독 세균 검출에 있어서 리포솜의 이용 가능성을 병원성 식중독 세균인 *E. coli* O157:H7을 대상으로 검토하였다. 리포솜의 표면에 *E. coli* O157:H7을 인식하는 항체를 공유결합시키고 리포솜의 내부 수용액상에는 형광 표지물질인 sulforhodamine B를 포집시켰다. 이렇게 합성된 면역리포솜이 진단 시약으로써의 기능을 하는지 알아보기 위해 두 가지 분석 방법을 적용하였다. 첫번째 방법으로, test-strip을 이용한 분석은 *E. coli* O157:H7의 존재 유무를 test-strip 상에 나타난 분석 신호를 육안으로 관찰하는 것으로서 *E. coli* O157:H7 존재시 분석 신호가 저하되는 것을 원리화하였다. 이 방법은 고가의 실험 장비가 필요하지 않아 현장 적용성이 용이한 장점이 있다. 두번째 방법은, IMS 후 목표 세균에 결합되어 있는 리포솜을 파괴시켜 나오는 형광도의 세기를 측정하는 방법으로 이때는 형광도의 강도와 *E. coli* O157:H7 세균 수와 비례적 관계가 나타났다. 상기의 두 방법에서 얻은 결과는, 리포솜을 *E. coli* O157:H7 검출에 응용할 수 있는 가능성을 제시하며 추후에 식품 적용 실험이 요구된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부(HMP 01-PJ1-PG3-21200-0043)와 국무조정실 산하 산업기술연구회에서 지원받은 연구비(E02203, E031005)로 행한 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Bangham, A. D., Standish, M. M., and Watkis, J. C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238-252.
2. Buzby, J. C., Roberts, T., Lin, C. T. J., and MacDonald, J. M. (1996) Bacterial foodborne disease: medical costs and productivity losses. Agricultural Economics Report No. 741: 100. Washington, DC, USDA Economic Research Service.
3. Clark, B. R. and Engvall, E. (1980) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): theoretical and practical

- aspects. In *Enzyme Immunoassay*, Maggio, E. T.(ed.), CRC, Boca Raton, pp. 167-180.
4. Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N., and Berliner, E. (1942) The demonstration of pneumococcal antigen in tissue by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* **45**, 159-170.
5. Haglund, J. R., Ayres, J. C., Paton, A. M., Kraft, A. A., and Quinn, L. Y. (1964) Detection of salmonellae in eggs and egg products with fluorescent antibody. *Appl. Microbiol.* **12**, 447-450.
6. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresce, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., and Tauxe, R. V. (2000) Food-related illness and death in the United States, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
7. Pierson, M. D. and Stern, N. J.(eds.) (1986) *Food-borne Pathogens and Their Toxins: Developing Methodology*, Marcel Dekker, New York.
8. Siebert, S. T. A., Reeves, S. G. and Durst, R. A. (1993) Liposome immunomigration field assay device foralachlor determination. *Anal. Chim. Acta.* **282**, 297-305.
9. Swaminathan, B., Ayres, J. C., and Williams, J. E. (1978) Control of non-specific staining in the fluorescent antibody technique for the detection of salmonellae in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 911-919.
10. Szoka, F., Olson, F., Heath, T., Vail, W., and Mayhew, E. (1980) Preparation of unilamella liposomes of intermediate size(0.1-0.2  $\mu$ m) by a combination of reverse phase evaporation and extrusions through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **601**, 559-571.
11. Thomason, B. M. (1981) Current status of immunofluorescent methodology for salmonellae. *J. Food Prot.* **44**, 381-384.
12. Tortorello, M. L. and Gendel, S. M. 1993. Fluorescent antibodies applied to direct epifluorescent filter technique for microscopic enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 in milk and juice. *J. Food Prot.* **56**, 672-677.