

간행물 발간등록번호

11-1471057-000036-14

# 2016년 식중독 원인조사 시험법

2016. 8.



식품의약품안전처  
식품위해평가부 미생물과

# CONTENTS

## I

### 식중독의 정의

1. 식중독의 정의 ..... 3
2. 식중독의 분류 ..... 3
3. 식중독의 종류 ..... 4

## II

### 시험원칙

1. 식중독 원인조사 시험원칙 ..... 43
2. 식중독 원인조사 주의사항 ..... 44

## III

### 식중독 원인조사 이동차량 시험법

1. 실시간 유전자 증폭장치(Real-time PCR) ..... 47
2. 위해 미생물 분석 ..... 51

## IV

### 식중독균 시험법

1. 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*) ..... 72
2. 리스테리아 모노사이토제네스 (*Listeria monocytogenes*) 84

# CONTENTS

3. 바실러스 세레우스 ( <i>Bacillus cereus</i> )	95
4. 살모넬라 ( <i>Salmonella</i> spp.)	104
5. 장염비브리오 ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> )	118
6. 캄필로박터 제주니/콜리 ( <i>Campylobacter jejuni/coli</i> )	129
7. 클로스트리디움 퍼프린젠스( <i>Clostridium perfringens</i> )	136
8. 예시니아 엔테로콜리티카 ( <i>Yersinia enterocolitica</i> )	146
9. 병원성 대장균 (Pathogenic <i>Escherichia coli</i> )	155
10. 쉬겔라 ( <i>Shigella</i> spp.)	166
11. 비브리오 콜레라 ( <i>Vibrio cholerae</i> )	171
12. 비브리오 불니피쿠스 ( <i>Vibrio vulnificus</i> )	177
13. 클로스트리디움 보툴리눔 ( <i>Clostridium botulinum</i> )	186

## V

### 식중독 바이러스 시험법

1. 검체별 전처리 방법	194
1-1. 식품용소 시험법	194
1-2. 어패류(굴) 시험법	199
1-3. 채소류, 과일류, 절임식품 시험법	202
1-4. 김치류 시험법	206
1-5. 식육 시험법	207
2. 유전자 추출법	210
2-1. 유전자 추출법(공통적용)	210

# CONTENTS

3. 유전자 증폭법 .....	212
3-1. 노로바이러스 (Norovirus) .....	212
3-2. A형 간염바이러스 (Hepatitis A virus) .....	218
3-3. 로타바이러스 (Rotavirus) .....	223
3-4. 아스트로바이러스 (Astrovirus) .....	229
3-5. 장관아데노바이러스 (Enteric Adenovirus) .....	233
3-6. 사포바이러스 (Sapovirus) .....	236
3-7. E형 간염바이러스 (Hepatitis E virus) .....	240

## VI

### 식중독 원충 시험법

1. 작은와포자충 ( <i>Cryptosporidium parvum</i> ) .....	249
2. 람블편모충 ( <i>Giardia lamblia</i> ) .....	270
3. 이질아메바 ( <i>Entamoeba histolytica</i> ) .....	283
4. 원포자충 ( <i>Cyclospora cayetanesis</i> ) .....	295
5. 쿠도아 ( <i>Kudoa septempunctata</i> ) .....	320
[참고] 톡소포자충 ( <i>Toxoplasma gondii</i> ) .....	329

2016년 식중독 원인조사 시험법



# 식중독의 정의

1. 식중독의 정의
2. 식중독의 분류
3. 식중독의 종류





## 1. 식중독의 정의

- ① “식중독”이란 식품 섭취로 인하여 인체에 유해한 미생물 또는 유독물질에 의하여 발생하였거나 발생한 것으로 판단되는 감염성 질환 또는 독소형 질환(식품위생법 제2조 제14항)
- ② “집단식중독”이란 역학조사 결과 식품 또는 물이 질병의 원인으로 확인된 경우로서 동일한 식품이나 동일한 공급원의 물을 섭취한 후 2인 이상의 사람이 유사한 질병을 경험한 사건(WHO)

## 2. 식중독의 분류

- ① 식중독은 미생물학적 식중독과 화학물질에 의한 식중독으로 분류
  - ※ 이 책자는 식중독을 일으키는 다양한 미생물에 대한 시험법을 수록하고 있음

### 2-1. 미생물학적 식중독의 분류

- ① 세균성 식중독
 

살모넬라(*Salmonella* spp.), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*) 등에 의한 식중독
- ① 바이러스성 식중독
 

노로바이러스(Norovirus)A형, 간염바이러스(Hepatitis A virus), 로타바이러스(Rotavirus) 등에 의한 식중독
- ① 원충성 식중독
 

이질아메바(*Entamoeba histolytica*), 람블편모충(*Giardia lamblia*), 작은외포자충(*Cryptosporidium parvum/hominis*) 등에 의한 식중독

## 2-2. 화학물질에 의한 식중독의 분류

### ◎ 자연독 식중독

동물성(복어독, 시가테라독 등), 식물성(감자독, 원추리, 여로 등), 곰팡이독소(황변미독, 맥가독, 아플라톡신 등) 등에 의한 식중독

### ◎ 화학적 식중독

고의 또는 오용으로 첨가되는 유해물질, 비의도적으로 잔류, 혼입되는 유해물질(잔류농약, 유해성 금속화합물 등), 조리기구·포장 유래 물질(녹청(구리), 납, 비소 등), 기타 물질(메탄올 등) 등에 의한 식중독

## 3. 식중독의 종류

### 3-1. 미생물학적 식중독

#### 1) 세균성 식중독

##### 황색포도상구균 식중독



### ◎ 증상

- 식품 중에 생성된 장독소(enterotoxin)에 의한 독소형 식중독을 나타냄
- 잠복기는 대략 1~6시간이며, 심한 두통, 구역, 구토, 복통, 발한, 허탈, 쇠약감 등을 동반한 증세를 갑자기 보임





## ◎ 병원체 특성

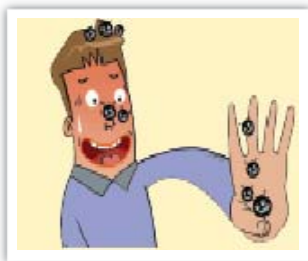
- 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)



- 전형적인 원형균으로 불규칙적인 포도송이 모양의 배열을 형성하는 비아포성 그람양성균임 (0.5~1.5 $\mu$ m)
- 대부분 장독소를 생산하며 이 독소가 식중독 원인으로 알려져 있음
- 균 자체는 열(78 $^{\circ}$ C 1분 혹은 64 $^{\circ}$ C 10분)에 의하여 사멸되나 독소는 열에 저항성이 강하여 100 $^{\circ}$ C에서 30분 정도 가열에는 독성을 잃지 않음

## ◎ 감염원

- 사람의 화농소, 건강인의 비강내, 분변 중에 많이 존재함
- 가축/동물도 보균하고 있어, 사람이나 동물에서의 식품오염 기회는 매우 높음
- 감염원은 사람의 감염된 손, 농양, 여드름, 가끔은 유두염을 앓는 젖소의 우유나 유가공품 등으로 보고됨
- 주요 원인식품은 김밥, 초밥, 도시락 등 즉석섭취식품, 우유, 유제품, 가공육(햄, 소시지 등), 어육제품, 생과자 및 만두 등으로 보고됨



## 리스테리아증

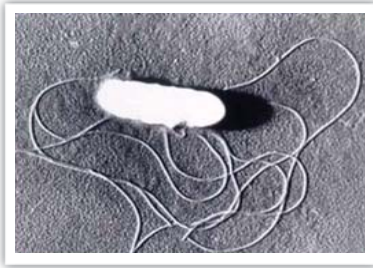


### 증상

- 수막염, 패혈증, 유산, 사산, 발열, 오한, 두통의 증상을 나타냄
- 노인과 임산부가 감수성이 높음

### 병원체 특성

- 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*)
- 저온에서도 천천히 발육·증식하는 특징이 있음
- 리스테리아 감염증은 미국의 경우 매년 십만명당 0.7명 정도이며 치사율은 20~40% 임
- 수막염, 패혈증이 동반된 경우는 치사율이 높음



## 바실러스 세레우스 식중독



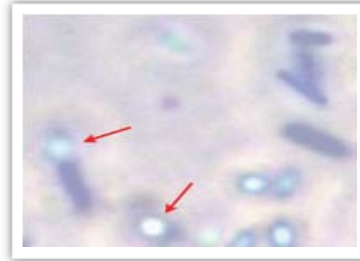
### 증상

- 설사형과 구토형의 두 가지형이 있으며, 이 균이 생산한 장독소에 의하여 식중독 발생
- 설사형은 열에 약하며 대략 12시간 잠복기 후에 설사 및 복통을 주증상으로 하는 장염을 일으킴
- 설사는 수양성이며 구역이 심하지 않음
- 구토형은 열, 산 및 단백질 분해효소에 대략 3시간 잠복기 후에 구역이나 구토를 주증상으로 하면서 발병됨
- 구토형 식중독은 황색포도상구균 식중독과 임상증상이 비슷함
- 대개는 경증으로 발열 없이 1~2일 내에 회복되나 드물게 급성 간 괴사를 유발함



## ◎ 병원체 특성

- 바실러스 세레우스균(*Bacillus cereus*)



- 바실러스 세레우스는 호기성의 그람양성균으로 아포를 형성하는 대형 간균임
- 흙 등 자연계에 널리 분포하며 아포를 형성함

## ◎ 감염원

- 설사형 식중독의 원인식품으로는 식육, 우유, 채소류, 수산물 등 다양함
- 조리과정에서 살아남은 아포가 발아 증식하여 섭취 후 장내에서 독소를 생산함으로써 설사를 일으키는 것으로 추정됨
- 구토형 식중독은 주로 쌀가공품이나 감자가 주요 감염원임
- 장독소는 식품 중에서 생산되어 이 독소를 함유한 음식을 섭취하면 짧은 잠복기내에 발병됨

## ◎ 감염원

- 리스테리아증은 인수공통의 감염증임
- 주요원인식품은 생유, 채소, 연성치즈, 아이스크림, 냉동만두, 냉동피자, 소시지, 훈제연어 등 수산물임

## 살모넬라 식중독



## ◎ 증상

- 급성 위장염 같은 증상을 나타냄
- 일반적으로 구역, 구토, 설사, 복통 또는 발열을 주 증상으로 하며 수양성 설사가 대부분이며

## I. 식중독의 정의

- 특별한 치료 없이 3~7일 정도면 호전됨
- 중증의 경우 경련과 의식 장애를 일으키는 경우도 있음
- 신생아나 영아는 특히 감수성이 높음

### 병원체 특성

- 살모넬라균(*Salmonella* spp.)



- 2,600개 이상의 혈청형이 알려져 있음(Frontiers in Microbiology vol. 5: 391, August 2014)
- 식중독 원인균으로는 *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* 등이 가장 흔히 분리됨

### 감염원

- 감염원은 사람 이외에 가축, 가금, 설치류, 애완동물, 야생동물 등임
- 주요 감염원은 닭고기이며 계란, 난가공품, 우유, 유가공품, 육류, 육가공품도 주요 원인식품임
- 영아의 감염원은 보균자일 경우가 많으며 오염된 침구, 의류, 우유병 등을 통하여 감염되기도 함

## 장염비브리오 식중독



### 증상

- 대략 2~48시간 잠복기를 가지며 상당수의 환자에서 다량의 수양성 설사를 하며 미열이 동반될 수는 있으나 고열을 보이는 경우는 드뭄
- 일반적으로 1~2일 내에 모든 증상은 회복되나 길게는 5일까지 가기도 함



## ◎ 병원체 특성

- 장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)



- 호염성 세균으로 8% NaCl 농도에서도 성장함
- 늦여름이나 가을에 주로 발생하는데 해산물 섭취와 관련이 있음

## ◎ 감염원

- 비브리오균은 연안이나 강하구에 많이 존재하므로 장염비브리오 식중독은 연안이나 강하구에서 서식하는 해산물을 섭취하고 발생하는 경우가 대부분임
- 바닷물, 가열하지 않거나 덜 조리된 수산물(생선회, 초밥, 생선무침), 굴 및 어패류가 주요 오염원임
- 여름철에 포획된 어패류에 다수 존재함

## ◎ 예방법

- 어패류의 취급을 위생적으로 하고 냉장상태에서 보관하고, 조리기구 등에 의하여 다른 식품으로의 2차 오염을 방지하고 위생적으로 처리하여야 함

## 비브리오 콜레라



## ◎ 증상

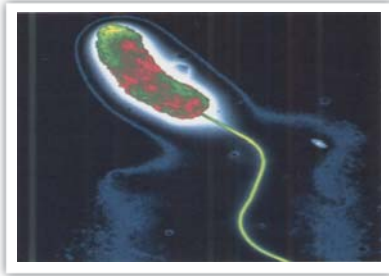
- 잠복기는 대략 6시간~5일이며 비브리오 콜레라균에 감염되어 발생하는 급성설사질환 증상을 나타냄

## I. 식중독의 정의

- 대부분 증상은 경미하지만 일부의 경우 심한 물 같은 설사, 구토 및 팔다리 저림 등의 심한 증상을 나타냄
- 적절히 치료하지 않으면 수 시간 내에 몸의 수분이 급속히 빠져나가는 탈수현상과 이로 인한 쇼크로 사망할 수 있음
- 또한 무증상 보균자가 많아 급속히 전파될 수 있음

### 병원체 특성

- 콜레라균(*Vibrio cholerae*)
- 항원성분에 따라 O1부터 O186까지 분류됨
- 콜레라 독소를 생성하는 대표적인 혈청형은 O1(Ogawa형, Inaba형 등), O139임



### 감염원

- 환자 분변이 주요 감염원이며 일반적으로 수양변 1ml 중에  $10^7$ 개 이상의 균을 함유하고 있음
- 보균자의 변, 드물게 환자의 구토물, 해안이나 하천주변에 콜레라균이 존재하여 감염원이 될 수 있음
- 오염된 식수 및 음식물, 과일, 채소 특히 연안에서 잡히는 어패류를 먹어 감염됨
- 오염의 기회는 홍수 후에 발생하기 쉽고 접촉감염의 가능성도 있음

### 대처법

- 제1군 법정감염병이므로 신속히 의사의 진단을 받아야 함(감염병 예방 및 관리에 관한 법률에 따라 감염병관리기관에서 입원치료를 받아야 함)



## 비브리오 패혈증



### 증상

- 패혈증 비브리오균에 의한 감염으로 일반적으로 잠복기는 1~2일이며 피부감염의 경우는 12시간임
- 패혈증
  - 기존 간질환을 가진 사람들이 오염된 해산물을 생식한 뒤 발생하는 원발성 패혈증, 급작스런 발열, 오한 등으로 시작하며 때로는 구토와 설사도 동반됨
  - 발병 전후에 대부분 환자에서 피부병소가 사지, 특히 하지에서 부종, 발적, 반상출혈, 수포형성, 궤양, 괴사 등이 나타남
  - 치명율은 40~50%로 높음
- 창상감염형
  - 해안에서 조개껍질이나 생선지느러미 등에 의해 생긴 창상으로 해수에 있던 균이 침입했을 때는 창상부위에 부종과 홍반이 발생하며 급격히 진행되어 대부분의 경우 수포성 괴사가 생김
  - 잠복기는 대략 12시간이며, 대부분 항생제 및 외과적 치료에 의해 회복됨

### 병원체 특성

- 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)
- 호염성세균으로 여름철에 뱀 내의 균 증식이 활발한 시기에 해수를 여과하여 균 농도를 높이는 연체동물이나 어패류는 높은 농도로 오염되어 있을 가능성이 있음



### 감염원

- 여름철 해산물의 생식이나 창상감염으로 발생됨
- 통상적으로 오염된 어패류의 불충분한 조리과 생식에 의하여 발생됨
- 국내에서는 간질환을 갖고 있는 고위험군으로부터 매년 20~40 환례가 발생됨

## I. 식중독의 정의

- 대부분 40세 이상 남자에서 발병됨
- 여름철 서남해안지역의 수온이 18~20℃이상 시 주로 발생됨

### 예방법

- 어패류의 취급은 위생적으로 처리 할것
- 여름철 서남 해안에서 잡은 어패류 및 갑각류의 생식을 금하고 조리하여 섭취함
- 만성질환과 당뇨병, 알코올 중독자는 생식을 금함

## 캠필로박터 식중독

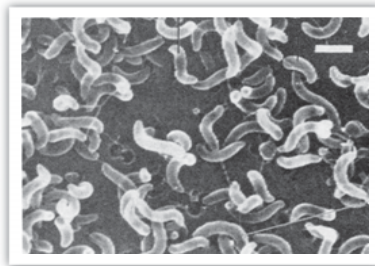


### 증상

- 복통, 권태감, 열, 구역, 구토가 주요 증상임
- 대부분 노출 후 2~5일 후 증상이 발현되며 대략 7-10일 이내에 치유됨
- 5세이하 어린이가 대표적인 민감군임

### 병원체 특성

- 캠필로박터균(*Campylobacter jejuni/coli*)
- 5~10% 산소가 존재하는 미 호기 환경에서 증식하는 특징이 있음



### 감염원

- 가금류, 소, 돼지, 설치류, 야생조류, 고양이, 개의 장관에 정상균종으로 존재함
- 우유, 햄버거, 치즈, 버섯, 패류, 난류, 돼지고기 등이 주요 원인식품임





## 클로스트리디움 퍼프린젠스 식중독

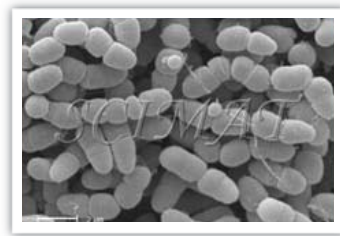
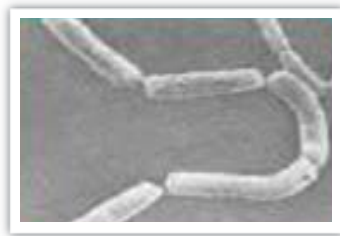


### 증상

- 설사와 복통을 주증상으로 하는 감염형 식중독으로 구역과 구토는 드물게 나타남
- 대부분 수양성 설사를 하며 일반적으로 발열은 없음
- 대개 1~2일 경과하면 증상이 호전됨
- 집단발병시 환자는 단시간에 집중하여 발생하는 특징이 있음

### 병원체 특성

- 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)



- 이 균은 아포를 형성하고 혐기적 조건하에서만 발육
- 통상적인 균은 90°C, 30분 또는 100°C, 5분의 가열로 사멸됨
- 병을 일으키는 병원균은 100°C, 1시간 혹은 그 이상의 가열에서는 사멸되지 않는 내열성균으로 장독소를 생산함
- 건강한 사람이나 동물의 장관내, 토양, 하수 및 먼지 등 자연계에 널리 상재함

### 감염원

- 사람, 가축, 쥐 및 토양 등 자연계에 광범위하게 분포함
- 기름에 튀긴 식품, 식육, 식육가공품, 가열조리식품이 주요 원인식품임

## 여시니아증

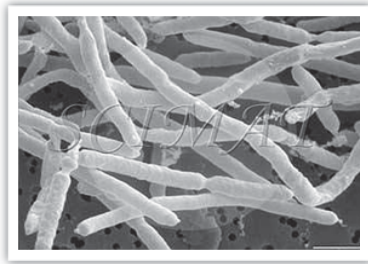


### 증상

- 소아에서 많이 발생됨
- 발열, 설사, 구토 및 복통 등의 위장염이 주요 증상임
- 발진, 안구충혈 및 감기증상을 보이며, 청소년 및 성인에서는 회장말단염, 장관막림프절염 및 충수염 등의 회맹부 병변의 증상을 주로 나타내는 경우와 결절성 홍반형, 관절염형 및 패혈증형 등의 병변으로 발병하는 경우가 많음
- 주로 영아에서 보이고 일반적으로 중증이며 임상상은 복잡 다양함
- 기본적인 증상은 복부증상을 동반한 발열성, 발진성 질환으로 관절통, 안구충혈, 결절성 홍반, 림프절 종대, 감기증상, 폐렴, 급성신부전 등이 나타남

### 병원체 특성

- 여시니아증은 *Yersinia enterocolitica*와 *Y. pseudotuberculosis*의 균종에 의한 감염증을 총칭



- 수중이나 토양 중에 존재하며, 사람 감염은 극히 드름
- 이 균은 저온에서도 증식하는 특징이 있음

### 감염원

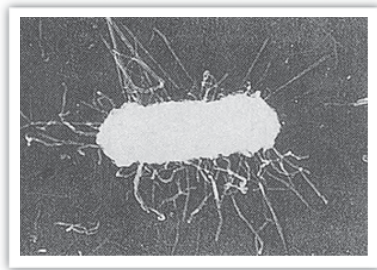
- 여시니아균은 인수공통전염병으로 돼지, 소, 쥐 등 동물과 접촉, 오염된 우유, 식육, 물 등이 주요 감염원임
- 주로 오염된 돼지고기를 매개로 하여 경구감염되며, 영아에서는 환자에서 다른 사람으로의 2차 감염도 있음



## 병원성대장균 식중독



- 병원성대장균은 장관에서의 발병 증상에 따라 5가지 형으로 분류됨



### 장독소성대장균 (Enterotoxigenic *E. coli*)

- 증상 : 소장상부에서 증식하여 균수가 1ml 당  $10^7 \sim 10^9$ 에 달하면 콜레라 같은 설사증을 유발하는데, 묽은 설사, 복통, 구토, 산성증, 피로, 탈수 등의 증상을 나타내며 열은 없거나 미열 증상을 나타냄
- 장염과 설사의 원인균으로 콜레라와 유사한 독소를 생성함
- 일반적으로 이열성독소(heat-labile enterotoxin)는  $60^\circ\text{C}$ 에서 10분간 가열시 독성을 소실하나 내열성독소(heat-stable enterotoxin)는  $100^\circ\text{C}$ 에서 30분간 가열하여도 독성을 유지함
- 잠복기: 대략 10-12시간
- 혈청형은 O6, O8, O15, O20, O78, O114 등이 포함

### 장병원성대장균 (Enteropathogenic *E. coli*)

- 증상 : 점액이 섞인 수양성 설사, 탈수증, 발열 등의 증상을 나타내며 감염부위는 소장임
- 대장균 중 가장 먼저 병원균으로 알려졌으며 유아에서 흔히 발병하며 과거 높은 치사율을 보였으나 의료수준의 발전으로 치사율이 크게 감소함
- 잠복기는 대략 9-12시간이며 독소는 생성하지 않음
- 혈청형은 O55, O86, O119, O125 등임
- 주요 원인식품은 마요네즈, 양상추, 피클 등임

### 장침입성대장균 (Enteroinvasive *E. coli*)

- 증상 : 이질과 유사한 증상, 복통, 설사, 점액이 섞인 변, 장과 점막에 염증, 대장에 궤양형성 등임
- 점막에 대해 침입성을 가지며 세포내에 침입 후 증식하여 세포를 사멸시킴
- 저개발국가에서 풍토병 형식으로 발생
- 잠복기는 대략 10-18시간
- O28ac, O29 등의 혈청형이 포함됨

### 장출혈성대장균 (Enterohemorrhagic *E. coli*)

- 증상 : 출혈성대장염, 용혈성요독증후군, 혈전성혈소판감소증 등임
- 1982년 미국에서 햄버거로 인한 식중독이 발생되면서 알려지기 시작됨
- O157:H7이 대표적인 혈청형이며 O26, O111, O104, O113 등도 포함됨
- 감염부위는 대장이며 베로독소(Verotoxin)를 생성하여 세포내 단백질 합성을 저해하고 세포 괴사를 일으킴
- 완전히 조리되지 않은 쇠고기, 원유, 사이다, 마요네즈 등이 원인식품이며, 소독하지 않은 물, 감염된 호수에서 수영, 사람에서 사람으로 전파가 가능함
- 소에서는 이질을 유발하고 돼지에서는 부종(edema)을 일으킴
- 대처법
  - 장출혈성대장균 감염은 재균 법정감염병이므로 신속히 의사의 진단을 받아야 함(재균 감염병의 경우 감염병 예방 및 관리에 관한 법률에 따라 감염병관리기관에서 입원치료를 받아야 함)
  - 예방법
  - 일반적인 식중독 예방법에 따르며, 특히 분쇄한 고기의 경우 내부까지 완전히 익혀 섭취함
  - 이 균은 사람에서 사람으로 전염이 가능하므로 유아원이나 양로원 등 보육시설과 보호시설 종사자 및 수용자에 대한 개인위생 수칙을 준수하도록 교육



## 장흡착성대장균 (EAEC, Enteroaggregative *E. coli*)

- 증상 : 대부분 발열이 없는 설사를 유발함
- 인도, 멕시코, 자메이카 등에서 설사 질환의 주요 원인균으로 보고되며 잠복기는 대략 8~18시간임

## 세균성 이질



### 증상

- 주요 병변이 대장에서 일어나는 급성세균 감염증임
- 고열과 구역질, 때로는 경련성 복통 등이 주요증상임
- 대개 대변에 혈액이나 고름이 동반되며 증상은 대략 4~7일이 지나면 회복됨

### 병원체 특성

- 이질균(*Shigella* spp.)
- 환자나 보균자에 의한 경구감염으로 전파됨



### 감염원

- 대략 10~100개의 세균도 감염을 일으키며 주로 불완전급수와 식품매개로 전파됨
- 주된 감염원은 사람이며, 환자 및 보균자의 분변 또는 그것에 의하여 오염된 손, 식품, 물건, 물, 파리 등도 감염원임
- 가끔 물을 통해 대규모 집단발생을 일으키며 음식물 오염에 의한 감염도 일어남
- 가구내 2차 발병율이 높아서 10~40%에 달하며 집단발생은 위생상태가 불량하고 밀집되어 거주하는 시설 등에서 많이 발생됨

## I. 식중독의 정의

### 대처법

- 제1군 법정감염병이므로 신속히 의사의 진단을 받아야 함(제1군 감염병의 경우 감염병 예방 및 관리에 관한 법률에 따라 감염병관리기관에서 입원치료를 받아야 함)

## 보툴리누스 식중독

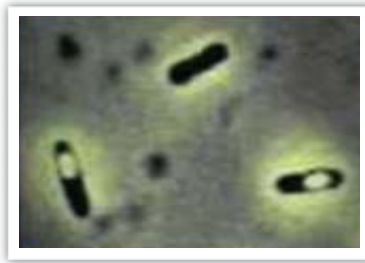


### 증상

- 신경마비를 일으키며 높은 치명율을 가지고 있는 독소형 식중독임
- 3가지 주요한 증상이 특징임
  - 눈 증상(약시, 백내장, 복시, 사시, 눈꺼풀 하수, 동공확대 등)
  - 마비증상(발음장애, 연하장애, 이명, 난청, 호흡곤란 등)
  - 분비장애(타액 등의 분비현상이 현저하고 눈물은 마르고 구강점막은 건조해지며 혀에 회백색의 설태가 낄)
- 높은 치사율을 보임

### 병원체 특성

- 보툴리누스균(*Clostridium botulinum*)이 생산하는 독소에 의한 급성 신경마비 질환임



- 균의 독소 처리가 불완전한 식품 중에서 혐기적 조건하에서만 생산됨
- 독소는 끓여서 쉽게 파괴되지만 아포는 고온이 아니면 사멸되지 않음  
(아포사멸 : 120°C 이상에서 4분 이상 열처리 필요)
- 치사량은 0.1~1 ng/kg 임



### ◎ 감염원

- 병원소는 토양, 물, 동물이나 어류의 장관임
- 독소는 식품 중에서 아포의 혐기성 발육에 의해 생산되어 이것이 직접 중독을 일으킴
- 식품 섭취에 의해 일어나기 때문에 보통은 끓이지 않고 먹는 경우나 부적절한 살균처리에 의한 통조림을 먹을 경우 발생됨

### ◎ 대처법

- 보툴리눔독소증은 생물테러 감염병으로 발생이 의심될 때는 보건기관(보건소 및 질병관리본부)에 즉시 신고함

## 탄저균



### ◎ 증상

- 동물 및 사람의 급성 세균성 감염증으로 피부탄저, 폐탄저 및 장탄저 등의 형이 보이지만 방치 해두면 급성패혈증으로 치명적이 될 수 있음
- 피부탄저는 감염국소의 발적, 부종으로 발병하며 중앙부에 수포를 형성하고 흑갈색의 가피를 만들며, 균은 결국 영역 림프절에서 혈류 중으로 들어가 패혈증을 일으킴
- 폐탄저는 아포의 흡입에 의하여 생기며 폐포에 도달한 아포는 종격림프절에 도달, 발아하여 급속히 증식하고 종격염을 일으킨 후 패혈증이 됨
- 초기에는 상기도감염과 비슷하여 인플루엔자 독감과 비슷하지만 수일 후에는 급격히 호흡곤란, 발한 등을 나타냄
- 자주 출혈성 수막염을 동반하며, 급선신부전 또는 뇌출혈로 진단되는 경우가 많으며 이 경우는 대략 24시간 이내에 거의 사망함
- 장탄저는 드물기는 하지만 출혈성 장염을 일으켜 혈변을 보임

### ◎ 병원체 특성

- 탄저균(*Bacillus anthracis*)
- 아포를 형성하는 그람양성 간균으로 아포가 토양 중에 존재함
- 주로 소, 말, 염소, 양 등 초식동물에 급성 패혈증을 일으킴

## I. 식중독의 정의



### ◉ 감염원

- 오염된 목초지에서 탄저균의 아포에 의해 동물(소, 양, 염소 등)이 감염됨
- 사람감염은 주로 감염된 동물이나 그 부산물에서 탄저균의 포자 흡입, 섭취에 의해 이루어짐

### ◉ 예방법

- 탄저균이 발견된 가축은 도살하여 처분하는 것으로 규정되어 있음

## 브루셀라증



### ◉ 증상

- 전신성의 만성 감염증이지만 사람에서는 급성기 증상이 현저히 나타남
- 오한, 발열, 두통, 발한, 관절, 근육통, 쇠약감을 나타냄

### ◉ 병원체 특성

- 브루셀라(*Brucella*) 속 중에 사람에게 병원성을 나타내는 종류
  - *Brucella melitensis* : 산양이 자연숙주
  - *Brucella abortus* : 소의 유산 원인균
  - *Brucella suis* : 돼지의 유산 원인균으로 산토끼 및 순록이 숙주
  - *Brucella canis* : 개의 유산 원인균





### ① 감염원

- 감염원은 감염동물의 장기, 혈액, 소변, 우유, 태반, 유산된 태자 등임
- 감염동물의 장기 등에 접촉하거나 미 살균된 우유나 유제품의 섭취 등에 의하여 사람에게 전파됨

### ① 예방법

- 젖소 농장의 원유 및 국내에서 사육되고 있는 생후 12개월 이상의 소, 거래되는 소 또는 가축 시장·도축장에 출하되는 소, 수출입 검역을 받은 소 및 정액에 대해서는 브루셀라 검사를 실시하고 검출 시 도살하여 처분함

## 2) 바이러스성 식중독

### A형 간염



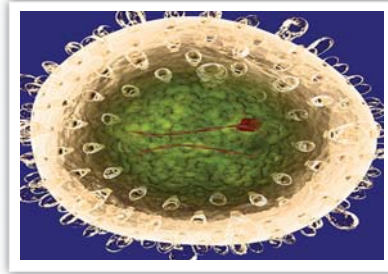
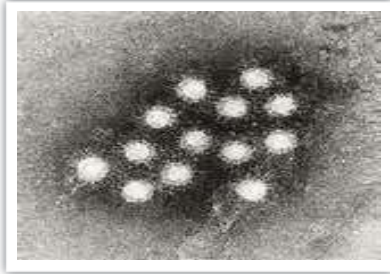
### ① 증상

- 5세이하 어린이의 경우 50~90%가 증상이 없고, 어른의 경우 70~95%가 증상을 나타냄
- A형 간염바이러스에 감염되면 15~50일(평균 약 28일) 잠복기 후에 피로, 무기력, 식욕부진, 열, 근육통, 복통, 오심, 구토 등 급작스런 증상이 시작됨
- 어린이의 경우 설사나 드물게 호흡기계 증상이 나타나기도 함
- 며칠~몇주 후에는 간염의 특징적인 증상인 짙은 소변과 황달 등이 나타남

## I. 식중독의 정의

### ◎ 병원체 특성

- 간염바이러스의 한 종류인 A형 간염 바이러스(hepatitis A virus)



### ◎ 감염원

- A형 간염은 바이러스에 오염된 음식이나 물을 섭취함으로써 전염됨
- 특히 개인위생 관리가 좋지 못한 저개발 국가에서 많이 발병되는데, 최근에는 위생적인 환경에서 자란 20~30대에서도 발병률이 급증하는 양상을 보임
- 주로 A형 간염 바이러스에 감염된 환자와 접촉한 경우에 감염되며, 직접적인 원인은 아니지만 A형 간염을 가지고 있는 모체가 출산하는 과정에서 태아에게 전염될 수 있음
- 대부분 감염자의 대변에 오염된 물이나 음식 등을 섭취하면 경구를 통해 감염됨
- 집단으로 발병하는 경우는 오염된 식수원이나 급식 등으로 인한 경우임

### ◎ 예방법

- A형 간염은 예방백신이 있음. 보통 한번 접종한 후 백신의 종류에 따라 6~12개월 후나 6~18개월 후 추가 접종을 함으로써 95% 이상의 간염예방 효과를 얻을 수 있음
- A형 간염은 대변으로부터 경구로 감염되는 질환이므로 개인위생 관리중요
- A형 간염바이러스는 85℃ 이상에서 1분만 가열하여도 죽기 때문에 끓인 물을 마시거나 음식물을 충분히 익힌 후 섭취함

### ◎ 대처법

- 제1군 법정감염병이므로 신속히 의사의 진단을 받아야 함(제1군 감염병의 경우 감염병 예방 및 관리에 관한 법률에 따라 감염병관리기관에서 입원치료를 받아야 함)



## 장바이러스 식중독



- 장염을 일으키는 바이러스는 노로바이러스(Norovirus)가 대표적이며 그 외 아데노바이러스 (Enteric adenovirus), 로타바이러스(Rotavirus), 사포바이러스(Sapovirus) 등이 있음

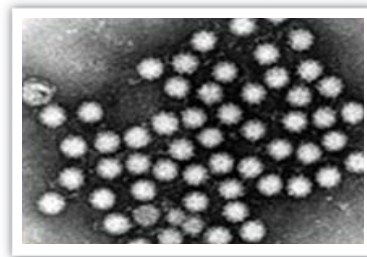
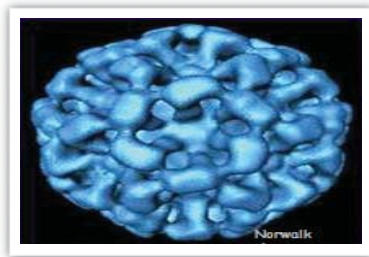
### □ 노로바이러스 식중독

#### ○ 증상

- 바이러스성 장염을 일으키며 바이러스가 오염된 식품섭취 24~48시간 후 발병
- 대부분의 사람은 1~2일내에 호전됨
- 주요증상은 설사, 복통, 구토 등으로 때로는 어린이, 노인과 면역력이 약한 사람에게는 탈수 증상이 일어날 수 있음

#### ○ 병원체 특성

- 노로바이러스(Norovirus)로 사람에게 장염을 일으키는 바이러스 그룹. 예전에는 Norwalk-like virus, calicivirus, small round structured virus 등으로 불리웠음
- 낮은 감염량(10~100 particles)으로 비말, 사람에서 사람으로 전파됨



- 감염자는 2주 이상 바이러스를 분변으로 배출하기 때문에 식품조리자에 의한 2차감염이 일어날 수 있어 특히 식품 조리자 관리가 중요함
- 식중독 발생율은 2006년 대규모 노로바이러스 식중독 발생 이후 감소 추세이나 병원성대장균과 함께 식중독 발생율은 가장 높음

# I. 식중독의 정의

## ① 감염원

- 노로바이러스가 오염된 물로 씻은 채소류 및 과일류, 굴 등 오염된 패류, 지하수 등임



〈노로바이러스 감염 경로〉

## ② 예방법

<p><b>손씻기와 개인 위생습관 성립을 하세요.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 화장실 사용 후</li> <li>• 조리하기 전</li> <li>• 외출 후</li> </ul>	<p>화수를 사용하되 흐르는 물에 20초 이상 씻어요</p>	<p><b>식품 조리 및 취급에 주의 하세요.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 설사증상자는 식품조리를 삼가며, 감염된 조리 종사자는 증상이 회복될 후 최소 1주일간 조리금지</li> </ul>	<p>가열을 하면 사멸되므로 조리할 때는 꼭 익히세요</p>
<p><b>식품은 충분히 익여 드세요.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 식품을 중심온도 85℃에서 1분이상 가열해 조리하세요</li> </ul>		<p><b>물은 끓여 드세요.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 노로바이러스를 예방하기 위해서 물을 끓여 드시는 것이 좋습니다.</li> </ul>	
<p><b>조리기구는 세척 및 소독에서 사용하세요.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 조리기구는 철저히 세척 및 소독합니다</li> <li>• 조리대와 개수대는 중성 세제와 200배 희석한 가정용 염소 소독제(락스)로 철저히 소독합니다.</li> </ul>	<p>인대 꼭 채운 락스</p> <p>소독이 끝난 후 물</p>	<p><b>주변 환경을 청결히 하세요.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 환자와 대변, 구토물이 취급이 주의입니다.</li> <li>• 화장실, 변기, 문 손잡이 등은 50배 희석한 염소 소독제(락스)로 확실의 소독합니다.</li> </ul>	<p>주변 환경을 청결히 하세요</p> <p>염소 소독제 락스</p>



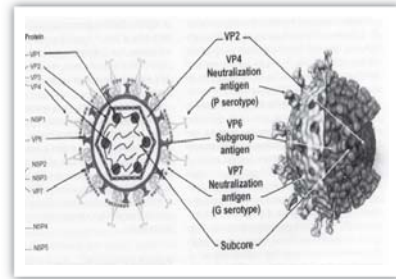
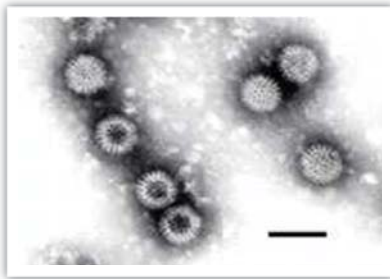
## 로타바이러스

### 증상

- 로타바이러스 감염의 주 증상은 발열, 구토 그리고 설사이며, 1-3일의 잠복기를 거쳐 경·중 정도의 발열과 구토가 그리고 복통이 하루정도 나타나고 이어 잦은 수양성 설사가 나타남
- 구토와 발열은 발병 2일째에 특징적으로 사라지고 복통과 설사가 4-8일간 지속됨
- 다른 바이러스성 설사에 비하여 로타바이러스 감염의 경우 구토가 빈번하여 이로 인한 수분의 손실이 큼

### 병원체 특성

- 로타바이러스(Rotavirus)는 capsid 단백질의 항원성에 따라 군 (group), 아군(subgroup) 그리고 혈청형 (serotype)으로 분류됨



### 감염원

- 어린이 보육시설 등에서 주로 어린이들 사이에서 감염이 일어나는 것으로 알려져 있으며 주로 오염된 물을 통해서 감염이 되는 것으로 알려져 있음
- 병원, 산후조리원 등에서 오염된 손, 표면이나 물체(젖병, 장난감 등) 등의 접촉을 통해서 많이 발병함
- 바이러스에 오염된 사람과의 접촉, 음식물, 식품 등을 통해서 전파되는 바이러스성 감염병임

### 대처법

- 로타바이러스를 치료하기 위한 antiviral 치료제는 없으며, 예방을 위해서는 영아에 예방접종 백신인 Rotateq, Rotarix가 개발되어 있음

## 1. 식중독의 정의

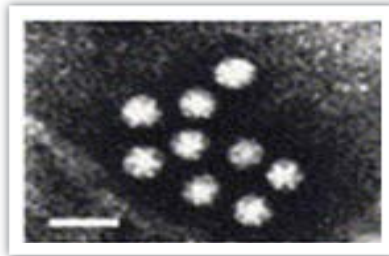
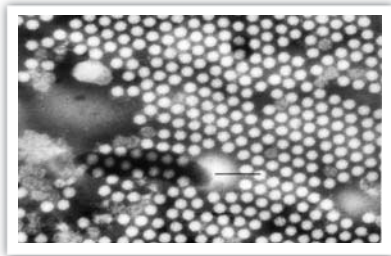
### ▣ 아스트로바이러스

#### ⦿ 증상

- 주로 면역력이 약한 어린이나 노인 등에게 장염을 유발함
- 일단 감염되면 3~4일의 잠복기를 거쳐 몸이 떨리고 설사와 두통, 구토, 복통, 발열 등을 동반하는 증상이 나타남

#### ⦿ 병원체 특성

- 아스트로바이러스(Astrovirus)로 8개의 유전형자형으로 나뉨



#### ⦿ 감염원

- 사람 간 바이러스 전파가 쉽게 발생할 수 있으며, 아스트로바이러스에 오염된 물이나 식품에 의해 감염될 수 있는 가능성이 있으므로 주의 하여야 함

#### ⦿ 대처법

- 위생수칙을 반드시 준수하고, 감염된 환자와 접촉을 피함

### ▣ 장관아데노바이러스

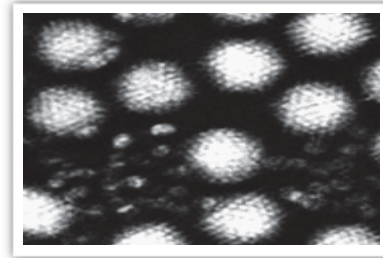
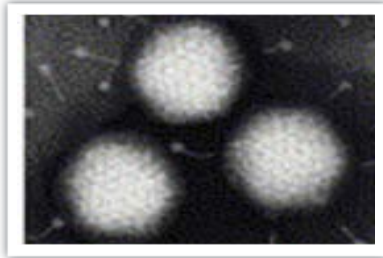
#### ⦿ 증상

- 설사가 주요 증상이며 발열, 구토와 상기도 염증을 수반함
- 만성 설사증, 영양실조 또는 면역 부전 등의 기초 질환을 나타낼 수 있음



### ◎ 병원체 특성

- A부터 F까지 6개의 아군(subgroup)으로 분류되는데 이 중 장관 아데노바이러스(Adenovirus)는 F군이며 혈청형은 40과 41이 포함됨



### ◎ 감염원

- 주로 영유아에게 감염을 유발하며, 분변-구강경로를 통하여 감염됨
- 오염된 물에 의해 식품이 오염 될 수 있는 가능성이 있으므로 주의 하여야함

### ◎ 대처법

- 사람 간 바이러스 전파가 발생할 수 있으므로 위생수칙을 준수 하여야함

## ▣ 사포바이러스

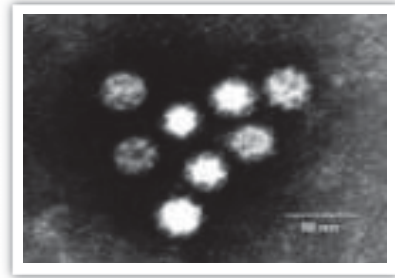
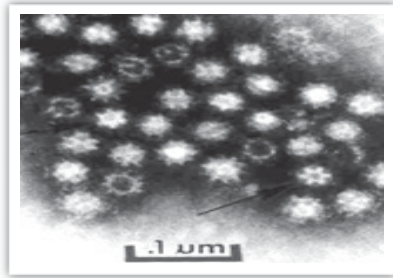
### ◎ 증상

- 모든 연령층에 급성 위장염을 발생할 수 있으며 특히 5세 이하의 영유아에서 발생빈도가 높은 것으로 알려져 있음
- 노로바이러스와 유사한 증상으로 설사, 메스꺼움, 구토, 복통 등을 동반함
- 잠복기는 노로바이러스와 동일하게 평균 1~2일 정도임

### ◎ 병원체 특성

- 5가지 group(I, II, III, IV, V)으로 분리되며, 사람의 질병과 관련한 사포바이러스(Sapovirus)는 I, II, IV, V에 속함

## I. 식중독의 정의



### ◉ 감염원

- 병원 내 감염이나 건강보호 시설에서의 집단 발생에 의해 빈도가 높음
- 노로바이러스와 유사하게 오염된 물이나 식품에 의해 식중독이 발생할 수 있음

### ◉ 대처법

- 항바이러스제는 없으며 충분한 수분과 영양을 공급하여야 하며 탈수 증상이 심한 경우에는 병원에서 수액치료를 함

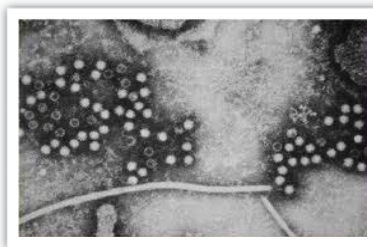
## ▣ E형 간염바이러스

### ◉ 증상

- 급성 E형 간염의 잠복기는 3~8주이며 무증상 감염(Asymptomatic infection)부터 전격성 간염(fulminant hepatitis)까지 다양한 임상 양상을 보일 수 있음
- E형 간염에 감염되면 황달, 메스꺼움, 구토, 복부통증, 관절통증, 발진, 설사, 가려움증 등 다른 타입의 간염 바이러스 증세와 비슷한 증세가 나타남

### ◉ 병원체 특성

- E형 간염바이러스(Hepatitis E virus)는 1개의 혈청형(serotype)이 존재하며, 크게 4개의 genotype이 알려져 있음







### ○ 감염원

- E형 간염 바이러스는 주로 분변-구강 경로를 통해 퍼짐
- 일반적으로 가장 많이 감염되는 경로는 분변을 통해 오염된 식수임

### ○ 대처법

- 백신은 아직까지 개발되어 있지 않음
- 환경이 개선되고 좋은 위생 시설의 공급 시 감염 발생을 감소시킬 수 있음
- 유행지역에서는 깨끗한 음료를 이용해야 함
- 채소나 과일, 식육의 생식을 피하며 손을 자주 씻는 습관을 갖도록 함

## 3) 기생충성 식중독

### 작은와포자충(*Cryptosporidium parvum*)

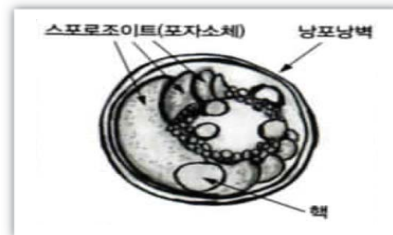


### ○ 증상

- 인체 감염자의 증상은 대부분의 경우 설사(양이 많은 것이 특징이며, 하루에 기회까지 설사한 경우와 하루에 총 7리터의 양을 배출한 경우도 보고되었고, 이런 환자에서는 심한 탈수와 체중 감소가 동반됨), 메스꺼움, 구토 또는 복통이고, 고열이 나는 경우 등임. 이밖에도 미각 소실, 무력증, 근육통, 전신쇠약 및 두통 등이 나타날 수 있음
- 증세의 강도는 환자의 면역상태와 밀접한 관계가 있으며, 특히 AIDS와 동반된 환자에서는 오랜 경과로 사망하는 수가 많으나, 정상인의 경우에는 1~2주일 정도의 설사 후 자연 치유됨

### ○ 병원체 특성

- 난포낭(oocyst)으로 직경 4~6 $\mu$ m크기의 공 모양으로, 배출된 포낭은 환경 중에서 증식하지 않으며, 매우 두꺼운 난포낭벽으로 둘러싸여 있기 때문에 난포낭 내의 내용물이 사라져도 환경에서 수개월까지 생존 가능함



## 1. 식중독의 정의

### ◉ 감염원

- 가축 등의 숙주와 환자 분변이 주요 감염원으로, 분변과 직·간접적인 접촉 즉 사람간 확산, 농장에서의 가축 접촉, 위락용수 및 수영장에서의 접촉, 오염된 수돗물 및 식품 등을 통해 감염됨

### ◉ 대처법

- 「감염병의 예방 및 관리에 관한 법률」은 감염병에 국가가 개입하기 위한 근거와 수단을 명시해 놓은 보건 분야의 특별법으로 이 법령에 열거하고 있는 법정감염병의 분류기준중 지정감염병 17종 중 장관감염증의 하나로 작은와포자충 감염증이 포함되어 관리되고 있음

## 람블편모충증

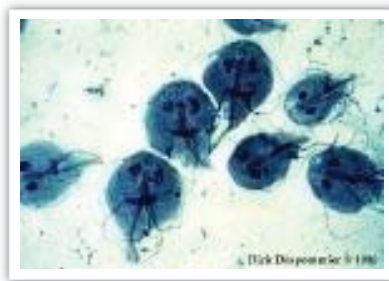
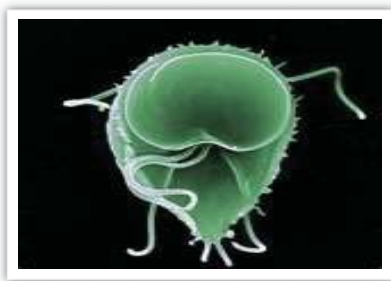


### ◉ 증상

- 소화관 기생 편모충류의 일종에 의한 원충감염증으로 장내에서 증상을 일으키는 유일한 편모충임
- 감염 총체수의 다소에 따라 무증상부터 식욕부진, 복부 불편감, 상복부 팽만감, 구토, 설사 등을 보임
- 설사는 수양변, 진흙모양, 지방성 설사 등을 일으킴
- 저감마글로브린 혈증이나 분비성 IgA 결손환자 이외에 각종 면역부전 환자에서는 중증인 감염이 생김

### ◉ 병원체 특성

- 람블편모충(*Giardia lamblia*)



- 영양형은 설사변에서 발견되는 것이 보통이고 대장으로 내려가면 피포되어 포낭이 되는데 이것을 사람, 원숭이, 돼지, 말 등이 경구적으로 흡수하여 감염됨



### ◎ 감염원

- 사람에서 사람으로의 전염은 감염된 사람의 대변에서 나온 포낭이 입을 통해 전파됨
- 양호시설이나 탁아소 등 배변 후 적절한 조치가 없는 곳에서 많이 발생됨
- 집단유행의 발생은 여과과정을 거치지 않은 수돗물을 매개하여 일어남
- 수돗물의 염소농도에서는 포낭을 살균할 수 없음
- 오염된 음식에 의한 감염도 드물게 일어나고 100개 정도의 포낭으로 감염을 일으킴

### ◎ 예방법

- 식사전이나 용변 후 손씻기를 습관화하고 음식물을 가열처리함
- 돼지 등이 포낭에 오염되지 않도록 하고 이를 운반하는 파리나 바퀴벌레 등 위생해충을 제거함
- 감염자는 조기 발견하고 조리에 참여하지 않도록 함

## 아메바증



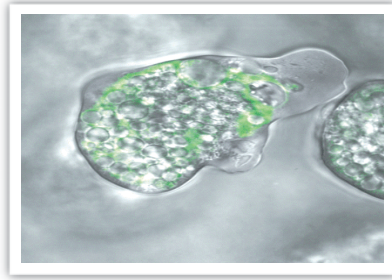
### ◎ 증상

- 인체 기생성 원충인 이질아메바(*Entamoeba histolytica*)에 의한 소화기 증상을 주증상으로 하는 감염증임
- 이질아메바증은 사람을 포함하여 다른 영장류와 일부동물의 대장내에 기생하는 가장 흔한 기생충임
- 장아메바성이질은 비교적 서서히 발병하는데 점액 혈변성 설사와 복통, 압통 등으로 나타남
- 설사는 1일 수십회하며, 방치할 경우 만성화되어 대장염이 될 수 있음
- 총체가 다른 기관으로 이행하여 장외 아메바증을 만들 수 있는데 가장 흔한 일차적인 부위가 간이며, 복막, 폐, 뇌, 피부 등에도 병변을 형성하기도 함

### ◎ 병원체 특성

- 아메바(*Entamoeba histolyca*)
- 생활환은 포낭(cyst)과 영양형(trophozotic)으로 구성되는데, 포낭은 물리화학적 환경에 저항력이 강하며 성숙포낭은 감염력을 가짐
- 영양형은 활발하게 아메바운동을 하며 조직에 침입하여 병원체로 작용함

## I. 식중독의 정의



### ◉ 감염원

- 아메바성이질은 사람뿐 아니라 원숭이 및 돼지 등에도 감염되는 인수공통 전염병임
- 분변중의 포낭에 의하여 음식물이나 음료가 오염되어 발생하는 경구감염, 오염된 손에 의해서도 경구감염이 일어날 수 있음
- 감염능력을 가지는 것은 피감염자의 분변 중에 있는 포낭 뿐이며 설사변 중의 영양형과 미성숙 포낭은 감염능력이 없음- 포낭은 수도의 염소농도에 비교적 저항성을 나타냄

### ◉ 예방법

- 포낭에 의한 환경오염 및 음식물 등의 오염을 막는 것이 중요하며, 이를 위하여 인분의 위생 처리가 필수임
- 음용수계의 정비 및 위생곤충을 제거함

## 조충증(Taeniasis)



### ◉ 증상

- 길이가 4~10m(무구조충) 또는 2~5m(유구조충)에 이르는 대형의 조충감염증임
- 충체가 큰데 비하여 증상은 가볍고 무증상의 것에서 편절 배출시의 불쾌감, 복통, 메스꺼움, 식욕부진, 권태감, 체중감소 등 여러 가지 소화기 증상 또는 두통, 불면증, 현기증 등의 신경 증상도 관찰됨
- 유구조충 유충의 기생부위는 피하, 심근, 근육, 뇌, 눈 등임
- 유구조충 유충 감염증의 경우 뇌 기생의 경우가 가장 중증이며, 눈에 기생하여 녹내장, 각막염, 홍채 모양체염 등 중증을 나타냄



### ◎ 병원체 특성

- 조충증(*Taeniasis*)의 병원체는 무구조충(*Taenia saginata*)과 유구조충(*T. solium*)임



### ◎ 감염원

- 무구조충은 사람의 소장에 기생함
- 총란이 수태편절과 함께 밖으로 배출되어 편절이 터져서 목초 등을 오염시키고 이를 중간숙주인 소가 먹으면 장에서 알 내부의 유구유충이 유출되고 장벽으로 침입하여 혈액과 림프액을 통해 전신 근육으로 퍼져 약 2개월째에는 구형(5~8mm)의 무구낭미충으로 됨
- 부위로는 요근이나 불기근육 등에 많아 사람이 고기와 함께 이 낭미충을 섭취하면 소장에 이르러 성충으로 성장함

### ◎ 예방법

- 소의 먹이인 목초의 비료로 인분을 사용하지 않음
- 식육가공 단계 검사와 도축과정의 위생을 철저히 하고 수원이나 음료수 등이 오염되지 않도록 함
- 소고기나 돼지고기는 완전히 익혀 섭취함
- 무구낭미충은 -10℃에서 10일 또는 25%의 소금물에 5일간 보관하면 사멸됨
- 유구낭미충은 돼지고기를 -10℃ 이하로 냉동하여도 4일 이상 생존하지만 유구낭미충 자신은 -2℃ 이하에 보존하면 사멸됨

## 선모충증



### ◎ 증상

- 임상적으로는 보통의 발열을 인지할 정도가 대부분이며 변화가 다양하여 무증상부터 심한 경우 심근, 폐, 중추신경계의 염증과 합병증으로 사망하는 예도 있음

## I. 식중독의 정의

### ◎ 병원체 특성

- 선모충류에 속하는 선충의 선모충(*Trichinella spiralis*)임
- 성충이 소장점막내에 기생하고 여기서 산출되는 유충이 몸 전체의 근육에 분포되어 기생함으로써 생기는 질환임

### ◎ 감염원

- 선모충은 전세계에 분포되어 있지만 인체에서의 발병 예는 북미와 유럽 등에 많은데, 이 지역에서는 집에서 돼지고기로 제조한 소시지가 주된 감염원이며 국내의 경우 오소리, 멧돼지 고기 섭취에 의한 집단 감염보고가 있음

### ◎ 예방법

- 돼지고기 또는 이를 이용하여 만든 식품은 충분히 가열하여 먹고 곰이나 사슴고기 등은 생식을 금함
- 돼지고기를 식용으로 시판이나 유통시키기 전에 반드시 냉동시킴.  $-27^{\circ}\text{C}$  이하에서 36시간 이상,  $0^{\circ}\text{C}$ 에서는 20일 이상 보존하면 피포유충을 죽이기에 충분함

## 독소포자충증



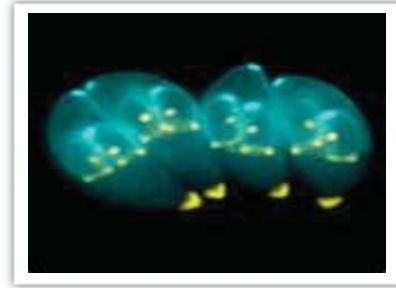
### ◎ 증상

- 대표적인 인수공통 기생충증에 속하는 원충 감염증
- 발병은 선천성 감염아에서 많이 보임
- 선천성 감염은 모체에서 태반을 경유한 증식형 총체가 태아에서 이행되어 생기며 임상초기에 처음 감염된 경우의 발생률이 높음
- 전형적인 예에서는 유산, 조산 또는 사산하거나, 출산아에서는 강맥락염, 뇌수종, 뇌내 석회화, 정신·운동기능 지연 등의 증상을 나타냄
- 성인의 후천성 감염에서도 면역능의 저하가 보일 경우 발열, 빈혈, 발진, 림프절종대, 간종대, 폐렴, 수뇌막염 등의 증상을 나타내는 경우도 있음



## ◎ 병원체 특성

- 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)



- 고양이과 동물을 종숙주로 하여 소장 상피세포내에서 유성생식을 하고 포낭체(cyst, oocyst)를 형성하는 Coccidium의 일종으로 사람을 포함한 포유동물, 조류에 광범위하게 불현성 감염을 일으킴

## ◎ 감염원

- 병원소는 고양이, 돼지, 염소, 양, 개, 쥐 등의 포유류와 조류 등임
- 인체감염경로는 돼지, 조류 등의 날고기를 섭취하거나 고양이 대변에 오염된 포낭체의 섭취, 태반 내 감염, 수혈, 장기이식, 실험실 감염 등이 있음

## ◎ 예방법

- 태아의 선천성 감염이 가장 심각한 문제이므로 임신 전에 항톡소플라즈마 항체를 측정하고 감염되지 않도록 주의함
- 식육중의 총체 또는 고양이에서 배출되는 포낭체에 의한 식품이나 손의 오염으로 경구감염 위험을 피함
- 식육은 완전히 조리하며 생식을 피하고 조리기구의 오염방지에 노력함

## 쿠도아(*Kudoa septempunctata*)

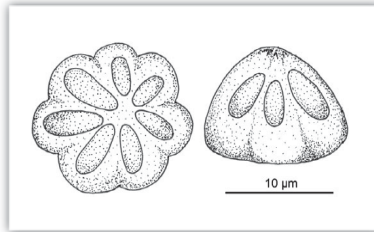
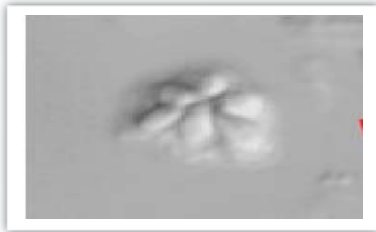


### 증상

- 식중독 증상은 매우 가벼운 설사 증세를 보이며 이후 즉시 개선됨.
- 선어 식문화로 인해 일본에서 식중독 원인으로 파악됨
- 대부분은 해산어류의 근육에 기생하여 상품가치를 저하시킴

### 병원체 특성

- 극낭 6~7개 존재하는 포자(약 10  $\mu$ m)임



### 감염원

- 어류의 생식으로 식중독을 일으킬 수 있다는 증거는 있지만 이의 병원성(감염성, toxin 여부 등)은 아직 모르는 상태이고, 어느 정도의 양이 질병을 일으키는지에 대한 것들은 추후 연구 필요함

### 대처법

- 쿠도아에 의한 국내 식중독 발생보고 없음
- 냉장 검체에서 구토 독성 설사원인으로 확인됨(현미경 및 PCR법)
- 생산단계(양식)에서 기생충 감염이 없도록 안전관리 필요함
- 어류는 바로 섭취하지 않을 경우 냉동 보관하며, 섭취 시 완전히 익혀먹을 것을 권장함





## 3-2. 화학적 식중독

### 1) 자연독 식중독

#### 광대버섯 중독



##### ◎ 증상

- 6~24시간의 잠복기를 거쳐 구토 및 설사가 나기 시작함
- 간과 신장의 장애를 일으키고 경련과 혼수상태가 오며 사망률은 70%로 높음

##### ◎ 감염원

- 알광대버섯, 흰알광대버섯, 독우산광대버섯 무리가 원인임
- 유독성분은 아마니톡신(Amanitoxin)으로 단백질의 생리활성이 저지되어 간 등의 조직파괴가 일어나 사망한다고 알려져 있음



#### 독버섯중독(Muscaria type)



- 독버섯의 일종인 *Amanita muscaria*를 섭취하였을 때 일어나는 중독임
- 버섯중독의 원인은 *Amanita muscaria*에 포함되어 있는 무스카린(Muscarine)에 의함
- 심장박동의 억제, 말초혈관 확장에 의한 혈압하강, 중추작용에 의해 착란, 환각 등을 일으킴

# I. 식중독의 정의



## 패류독소



- 유독 플랑크톤이 발생할 경우 플랑크톤을 먹이로 하는 이매패류들의 체내에 독소가 축적되는데 패류 자신에게는 특별한 해가 없으나,
- 조류 및 포유류 등의 고등동물이 유독한 패류를 섭취하는 경우에는 중독이 되고 심하면 사망하기도 함
- 패류독소에는 마비성패독(PSP, Paralytic Shellfish Poisoning), 설사성패독(DSP, Diarrhetic Shellfish Poisoning), 기억상실성 패독(ASP, Amnestic Shellfish Poisoning), 신경성 패독(NSP, Neurotoxic Shellfish Poisoning) 등이 있음

### (a) 마비성패독

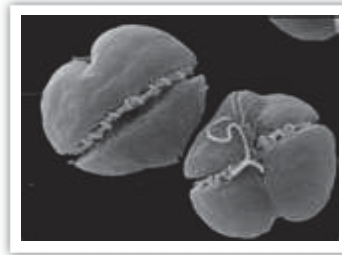
- 유독성 플랑크톤(Alexandrium sp.)을 먹고 자란 조개(진주담치, 백합, 굴, 바지락, 피조개 등)를 사람이 먹어 나타나는 중독임
- 식후 30분경부터 마비성 중독 증상이 나타남
- 유독성 플랑크톤인 알렉산드륨은 3~5월경 진해만 등 남해 동부수역에 발생됨



### (b) 신경독소성 패독



- *Gymnodium breve* 등과 같은 적조생물이 생성하는 패류독임
- 독성성분(brevetoxin)은 신경계의 이상을 초래함
- 입안이 짜릿해지고 술 취한 것처럼 되면서 동공확산과 설사를 수반증상이 나타남



#### (c) 설사성패독

- 설사, 메스꺼움, 복통 등 소화기계 이상이 주증상
- 패류 섭취 후 수시간 이내에 발생되며 대부분이 경과하면 회복됨
- 주로 4~6월에 발생하고 우리나라에서는 진해만 등 남해 동부수역에서 출현함



#### (d) 기억상실증 패독

- 니치시마(*Nitzschia pungens*)라는 플랑크톤을 섭취한 패류에 생기는 독성분
- 기억상실성 패독을 섭취하면 망각성 패독(Domoic acid)으로 인한 기억상실이 생길 수 있음
- 이 패독에 의한 식중독 사고는 아직까지 우리나라에서 발생하지 않았음
- 니치시마는 3~6월에 가장 왕성하고 낙동강 하구와 남해 내만수역에 출현함



### 복어독



- 복어독(Globefish toxin)은 복어의 장기, 주로 난소 및 간에 많이 함유되어 있는 독소로 식용으로 공급하는 복어에 많이 함유되어 있으나 청복에는 거의 독성이 없음
- 독성분은 테트로도톡신(Tetrodotoxin)
  - 피부, 장 등에 독이 있는 것도 있으나 혈액은 거의 무독임
  - 치사량은 쥐가 0.6~8.5ug/kg임
  - 독작용은 세포막의 Na 활성화 기구의 저해에 의한 것이고 중독사고는 호흡마비 때문임
  - 그 외 근육이완, 감각마비, 구토, 신경절 차단작용(혈압하강, 장관운동억제) 등이 있음
- 치료법은 아직 확립되지 않았음





## 시가테라



- 열대, 아열대 해역의 산호초 주변에 서식하는 유독 어류에 의해서 일어나는 치사율이 낮은 식중독의 총칭으로 1949년 일본 동경에서 처음 보고되었음
- 시가테라 독소는 물고기의 고유한 독이 아니라 유독 해초류 등의 독성분이 먹이연쇄를 통하여 어체 내에 축적되는 것으로, 주로 어류의 생식소와 그 생산물에 들어있음
- 주된 증상은 구토, 설사, 마비, 관절통, 권태감 등이며, 중증의 경우는 의식불명, 호흡곤란, 보행곤란, 언어장애 등이며 치사율은 낮음



2016년 식중독 원인조사 시험법



## 시험원칙

1. 식중독 원인조사 시험원칙
2. 식중독 원인조사 주의사항







## 1. 식중독 원인조사 시험원칙

- ① 식중독 원인조사는 미생물학적, 혈청학적, 생물학적, 이화학적 및 그 외의 필요한 다양한 시험법을 이용할 수 있음
  - 식중독 원인조사는 신속하게 원인식품과 그 발생경로를 차단하는 것이 목적이기 때문에 이용 가능한 모든 시험법들을 사용하여 원인규명 할 수 있음
    - ※ 본 지침의 시험법 이외에도 「수인성·식품매개질환 진단실무지침」(질병관리본부), 국제공인시험법 (ISO, AOAC, BAM 등) 등 본 지침과 동등이상의 시험법 활용 가능함
    - ※ 미생물 분석 및 확인에는 생화학적 특성과 유전적 특성 분석이 활용되며 Chromogenic agar, API kit, VITEK, 프라이머 및 프로브 등 상용화된 제품을 사용할 수 있다.
    - ※ 균별 상동성 분석에는 PFGE, rep-PCR 및 Sequencing 기술을 활용할 수 있음
- ② 시험은 최대한 정밀하게 수행해야 하며, 이를 위해서는 충분한 지식, 기능을 갖춘 전문가와 충분한 시설, 장비, 문헌류(Reference)가 필요함
  - 시험의 한계(소량의 검체, 신속검출장비 및 kit 미보유)가 있을 수 있으나 식중독 사고 발생 원인을 규명하기 위한 시험자의 적극성과 노력이 필요함
- ③ 식중독 발생 관련 원인규명에는 충분한 시료량 확보가 중요하므로 가능한 많은 시료를 확보하는 것이 중요함
- ④ 미량의 식중독균 분석을 위해 농축 등 다양한 전처리 방법을 사용할 수 있음
- ⑤ 식중독균 정량규격 있는 검체는 정량시험도 병행하여 실시

### 2. 식중독 원인조사 주의사항

- ① 식중독 원인식품은 식중독균이 고농도로 존재할 수 있는 가능성이 있기 때문에 통상적인 시험법과 병행하여 증균 전의 시료에서 직접 선택배지에 도말하여 확인하는 방법도 검출 시간을 줄여줄 수 있음
- ② 증균배양 시 식품에 존재하는 다른 미생물들의 급격한 성장으로 원하는 식중독균의 분리가 어려울 수 있어 균의 특성들을 고려한 증균 시간 준수
  - 잡균들이 많이 함유될 경우 가능한 한 선택성이 높은 선택배지 사용
- ③ 실험에 사용되는 검체는 재실험, 확인 등을 위하여 균의 오염이나 증식이 일어나지 않게 시료 채취 후 가능한 한 빨리 냉장고 등에 보관함
  - 특히, 부패, 발효 등이 진행될 수 있는 식품은 식품에서의 균총(microbial flora)이 변할 수 있어 주의 필요함
- ④ 분리/영양배지에서는 의심되는 집락을 가능한 한 많이 분리하여 실험함
  - 식중독 원인균의 최종확인에는 인체시료에서 분리된 식중독균과 환경검체 분리균간의 표현형, 유전자형, 병원성인자 등의 확인이 필요할 수 있고,
  - 분리된 균이 동일한 종이라도 식중독을 일으킨 균주(major type)가 아닐 수 있기 때문에 많은 균주를 분리하여 실험 할 필요가 있음
    - ※ 분변, 토양, 인체환경 등에 상존할 수 있는 식중독균들은 특히 많이 분리 필요
- ⑤ 단기간에 많은 식품에서 수많은 균을 분리해야 하기 때문에 시료와 분리균들의 명칭을 정확히 기재하여, 혼돈이 일어나지 않도록 주의함
- ⑥ 비브리오속 병원균들은 저온(0~5℃)에서 사멸하기 쉽고, 냉동온도에서는 일반적으로 1-2 log<sub>10</sub> 감소한다고 알려져 있으므로 이들 균들에 의한 식중독이라고 의심되는 검체는 가능한 냉장 보관을 피하여 신속하게 처리하도록 하고, 분리된 균들은 실험이 종료될 때까지는 냉장하지 않고 상온에서 보관하면서 실험함
- ⑦ 분리된 균주 중 보존할 가치가 있다고 판단되는 균주는 초저온냉동, 동결건조 등 균주별로 적절한 보존방법에 따라 보관하도록 함
  - ※ 예시 : 캄필로박터는 동결보호제로 글리세롤, fetal bovine serum 사용하고, 초저온냉동고에 넣기 전에 pre-cooling 실시

2016년 식중독 원인조사 시험법



# 식중독 원인조사 이동차량 시험법

1. 실시간 유전자 증폭장치
2. 위해미생물 분석





# 1.

## 실시간 유전자 증폭장치(Real-time PCR)

### 1-1. 원리

- PCR(Polymerase Chain Reaction)법은 중합효소연쇄반응으로 분자 생물학은 물론 기초 생물학, 의학을 비롯한 생물과학 전체에 널리 적용되고 있으며 현재 식품, 환경, 위생동식물 검사 등의 분야에도 간편하고 신속한 방법으로 그 범위를 넓혀가고 있음
- Real-time PCR법은 PCR반응에 의해 증폭되는 DNA를 실시간으로 확인하면서 전기영동 없이 샘플 내의 target DNA 유무 뿐 아니라 DNA의 양까지 정량 분석 가능한 방법이다. 따라서 Real-time PCR을 위해서는 thermal cycler와 분광형광광도계를 일체화한 장치가 필요함
- PCR 반응에 target DNA와 상보적인 서열을 가지고 있는 forward와 reverse primer 외에 5' 말단에 형광물질(reporter dye)을 3'말단에는 quencher물질(quencher dye)을 부착된 probe를 첨가한다. Probe는 annealing step에서 주형 DNA에 특이적으로 결합하지만 quencher에 의해 형광발생이 억제된다. extension 반응 시에 Taq DNA polymerase의 5' to 3' exonuclease 활성으로 인해 주형에 결합한 probe가 분해되어 reporter와 quencher가 분리되면서 reporter의 형광이 발현 됨
- 이 때 발현된 형광의 수치가 real-time PCR의 형광 감도계에서 컴퓨터 모니터로 전달되며 이 결과를 기준으로 적당한 위치에 역치(threshold, 그림 2의 초록색 직선)를 설정하고 그 threshold에 도달하게 되는 cycle값인 Ct(threshold cycle)값을 구한다. Ct 값이 낮다는 것 즉, 역치에 도달하는 cycle수가 적다는 것은 처음 샘플에 존재한 DNA의 양이 많다는 것을 의미하므로 샘플간의 상대 정량 또는 절대 정량이 가능함

### III. 식중독 원인조사 이동차량 시험법

#### 1-2. 시약 및 초자

① 멸균백



② 저울



③ 메스실린더



④ Stomacher



⑤ 1.5ml microcentrifuge tube, PCR tube



⑥ 원심분리기 (Centrifuge)



⑦ Pipet 및 tips



⑧ Loop





⑨ Vortexer



⑩ Hot Plate



⑪ 유전자 추출 전처리 장비



⑫ 유전자 추출 전처리 시약



⑬ 유전자 추출 자동화 장비



⑭ 96-well plate



⑮ Optical adhesive film



⑯ Real-time PCR기



### III. 식중독 원인조사 이동차량 시험법

⑰ 유전자 추출 키트



⑱ Real-time PCR 키트

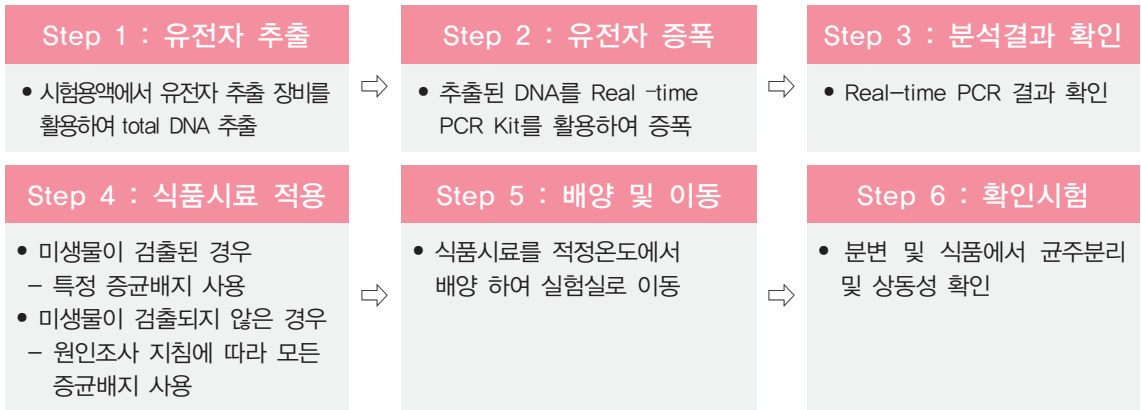






## 2. 위해 미생물 분석

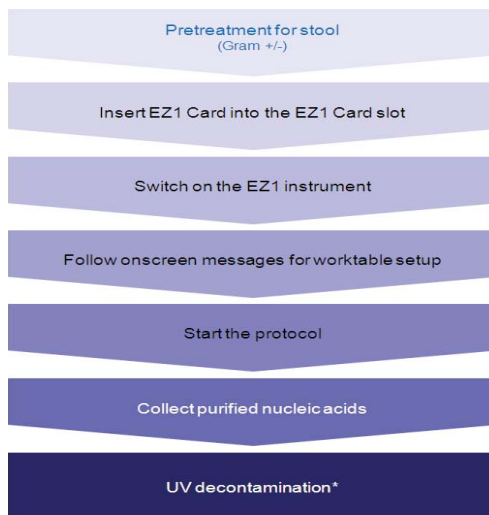
### 2-1. 업무 Flow Chart



- ※ 시험 절차는 식중독 원인조사 및 검식지원 등 업무 특성에 따라 탄력적으로 운영 가능함
- ※ 검체는 분변, 식품 및 음용수 등을 포함함
- ※ 균과 식품의 특성에 따라 4시간 이상 증균 배양 후 유전자 분석 가능함
- ※ (음)용수의 경우 막여과법에 따라 시험할 수 있음

### 2-2. Step 1 : 유전자 추출

#### ④ 자동화 장비를 사용한 유전자 추출방법



### III. 식중독 원인조사 이동차량 시험법

#### ① 전처리

- ① 별도의 2ml tube에 분변(stool)/식품 200 mg을 넣는다.
- ② 800  $\mu$ l buffer ASL을 시료에 분주한 후, 교반한다.
- ③ 70°C에서 5분간 반응시킨다.
- ④ 100 x g에서 1분간 원심분리 한다.
- ⑤ 상층액 400  $\mu$ l를 분리하여 EZ1 Virus Mini Kit v2.0에 포함된 2ml samples tube에 옮겨 담는다.
- ⑥ EZ1 Advanced XL에 시료를 넣고 protocol을 작동시킨다.

#### ② 유전자 추출(유전자 추출장비 : EZ1 advanced XL)

- ① EZ1 Advanced XL의 전원이 꺼져 있는지 확인(switch off)한다.
- ② 사용할 protocol이 내장된 EZ1 Advanced XL card를 slot에 장착합니다.  
※ 전원이 켜진 상태에서 card를 장착하실 경우, card에 문제가 생길 수 있음.



- ③ EZ1 Advanced XL의 전원을 연결(switch on) 하고 채워져 있는 cartridge를 꺼내어 3회 가량 아래위로 뒤집어 교반(inverting)한 후, tube 벽면에 시약을 털어 내려준 후 기기 상단의 START 버튼을 누른다.
- ④ virus protocol을 사용하며, 최초 시료량(sample volume)은 400 $\mu$ l로 설정한 후 Display 창에 나타나는 것과 같이 번호를 차례로 눌러준다.
- ⑤ 추출량(elution volume)은 90 $\mu$ l로 설정한 후 설정내용을 재확인한다.  
※ 최대 150 $\mu$ l까지 가능

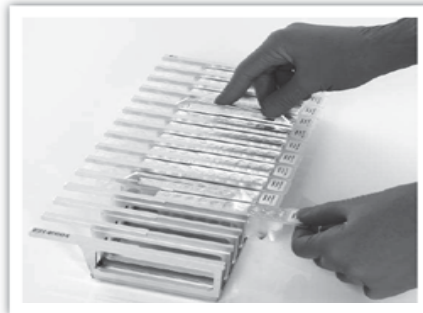


⑥ 기기 우측 전면의 door를 열어 준다.



⑦ 내부에 장착된 2 종(Cartridge & Tip)의 rack을 기기 외부로 꺼낸다.

⑧ 준비된 reagent cartridge를 손가락으로 쳐서 벽면에 묻어있을 시약을 제거한 후 Reagent cartridge를 '딸깍' 소리가 날 때까지 rack에 밀어 장착한다.

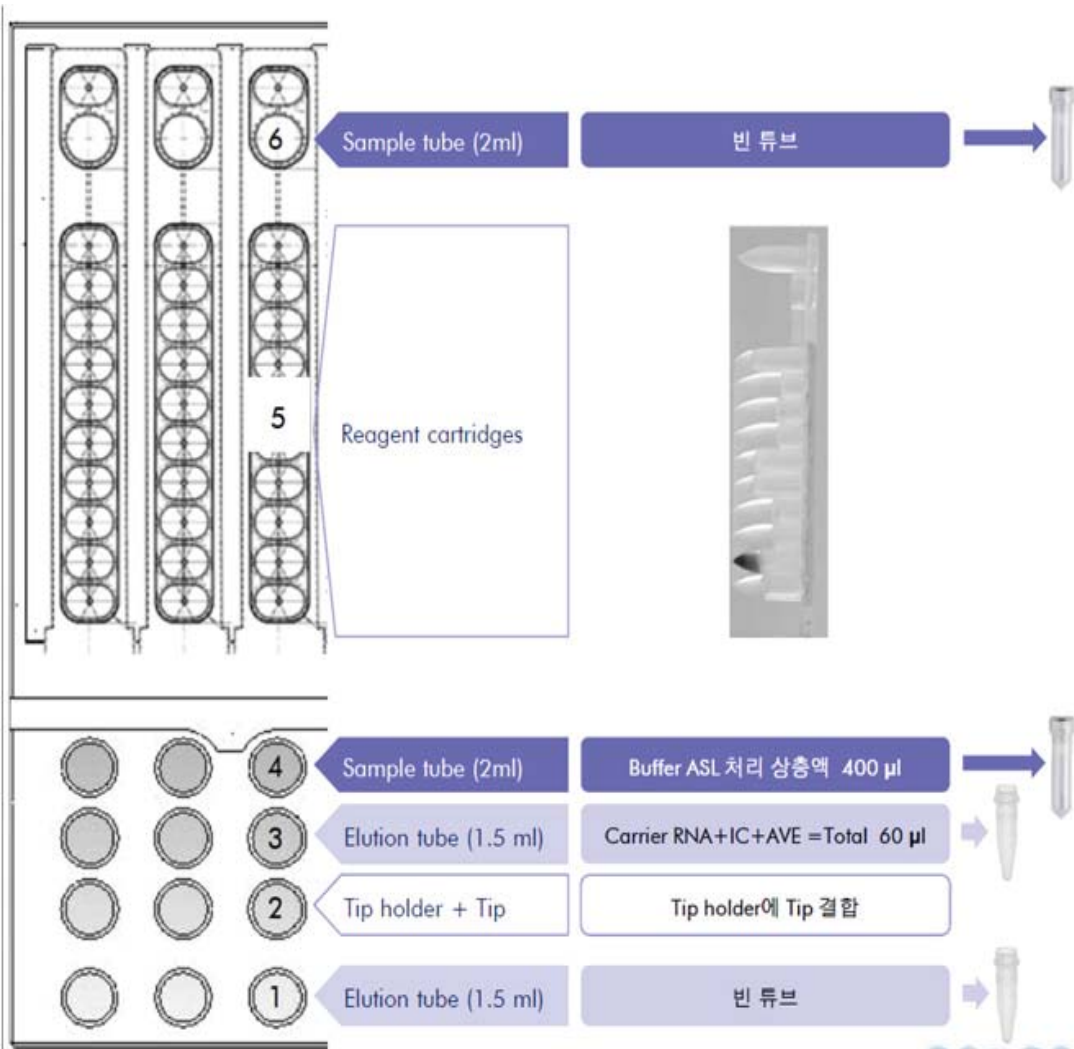


⑨ 준비가 완료된 cartridge rack을 기기에 장착한다.



### III. 식중독 원인조사 이동차량 시험법

⑩ Tube와 tip을 kit handbook에 명시된 것과 같이 장착한다.



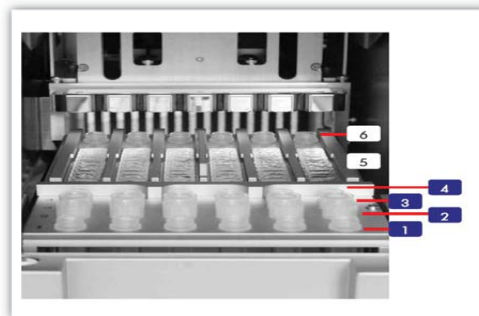


- 1번 열 : Kit의 1.5 ml elution tube를 장착(뚜껑 제거).
- 2번 열 : Kit의 tip holder와 tip을 장착.
- 3번 열 : Kit의 1.5 ml elution tube에 carrier RNA + internal control을 첨가하여 장착  
(IC가 없는 경우 total 60  $\mu$ l = carrier RNA시약 3.6 $\mu$ l + AVE buffer 56.4 $\mu$ l).  
※ carrier RNA 시약은 RNA 310 $\mu$ g을 AVE buffer 310 $\mu$ l에 녹여 사용
- 4번 열 : Kit의 2ml sample tube에 시료 400 $\mu$ l를 첨가하여 장착(뚜껑 제거).
- 5번 열 : Kit에 포함된 reagent cartridge를 장착.
- 6번 열 : Kit에 포함된 2ml non-skirted tube(빈 sample tube)를 장착.

⑪ 준비가 완료된 tube/tip rack 을 기기에 장착한 후, door를 닫는다.



⑫ 소모품의 정상적 장착 상태를 확인한 후, START 버튼을 누른다.



⑬ 작동이 완료된 후, elution tube를 기기에서 분리하여 냉장 보관한다.

⑭ 사용된 소모품을 제거하고 기기 내부를 청소한 후 전원을 끈다.

※ 기기 하단부의 사용된 시약이 모이는 tray는 사용 후 분리하여 청소한다.

## 2-3. Step 2 : 유전자 증폭

### Real-time PCR 반응액 조제

- PCR Kit를 개봉하고 제품에 포함된 시약 및 효소들의 activity가 영향을 받지 않도록 ice나 lap top cooler를 이용하여 준비하고 원심분리(spin-down)하여 시약이 튜브 아래로 모이게 한다.
- Kit의 strip tube 뚜껑을 조심스레 열고 추출된 template DNA 5 $\mu$ l를 첨가하여 PCR 반응액을 제조한다.
- 전용 cap으로 strip tube의 뚜껑을 닫고 시약과 DNA가 잘 혼합될 수 있도록 튜브를 vortexing 한 후 원심분리(spin-down)하여 혼합액이 밑으로 모이게 하며, 이때 기포가 생기지 않도록 주의한다.

Composition	Volume
Real-time PCR Mixture (튜브에 담겨 있음)	15 $\mu$ l
Template DNA or Control DNA	5 $\mu$ l
Total volume	20 $\mu$ l

※ 양성대조균(Kit의 "Control DNA ")과 음성대조균(멸균증류수) 사용

### Real-time PCR Kit components

- PCR Kit I (PowerCheck™ 20 pathogen Multiplex PCR kit)

Label	Volume	Pathogen	Target gene	Dye
Real-time PCR Mixture(P1)	8-strip tube X 2 (16 tubes, 15 $\mu$ l/each)	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>hipO</i>	FAM
		<i>Campylobacter coli</i>	<i>glyA</i>	VIC
		<i>Clostridium perfringens</i>	<i>alpha-toxin</i>	NED
		<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	Cy5
Real-time PCR Mixture(P2)	8-strip tube X 2 (16 tubes, 15 $\mu$ l/each)	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>hly</i>	FAM
		<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>vvh</i>	VIC
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>toxR</i>	NED
Real-time PCR Mixture(P3)	8-strip tube X 2 (16 tubes, 15 $\mu$ l/each)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>prfA</i>	FAM
		<i>Salmonella spp.</i>	<i>invA</i>	VIC
Real-time PCR Mixture(P4)	8-strip tube X 2 (16 tubes, 15 $\mu$ l/each)	<i>Bacillus cereus</i>	<i>groEL</i>	FAM
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>inv</i>	VIC
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femA</i>	NED



Label	Volume	Pathogen	Target gene	Dye
Real-time PCR Mixture(P5)	8-strip tube X 2 (16 tubes, 15 µl/each)	EHEC	<i>VT1</i>	FAM
		EHEC	<i>VT2</i>	NED
		ETEC	<i>LT</i>	Cy5
		ETEC	<i>ST</i>	VIC
Real-time PCR Mixture(P6)	8-strip tube X 2 (16 tubes, 15 µl/each)	EAEC	<i>aggR</i>	FAM
		EPEC	<i>bfpA</i>	VIC
		EPEC	<i>eeA</i>	NED
		EIEC( <i>Shigella</i> )	<i>ipaH</i>	Cy5

※ EAEC는 수인성 식품 매개질환 감시사업에서는 제외되나, 식중독 원인조사 시에는 포함하여 시험함

- PCR Kit II (PowerCheck™ 15 pathogen Multiplex PCR kit)

Label	Volume	Pathogen	Target gene	Dye
Real-time PCR Mixture(R1)	8-strip tube X 2 (16 tubes, 15 µl/each)	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>mapA</i>	FAM
		<i>Campylobacter coli</i>	<i>ceuE</i>	JOE
		<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	Cy5
Real-time PCR Mixture(R2)	8-strip tube X 2 (16 tubes, 15 µl/each)	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ctx</i>	FAM
		<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>glnA</i>	JOE
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	Cy5
Real-time PCR Mixture(R3)	8-strip tube X 2 (16 tubes, 15 µl/each)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>iap</i>	JOE
		<i>Salmonella spp.</i>	<i>his</i>	FAM
Real-time PCR Mixture(R4)	8-strip tube X 2 (16 tubes, 15 µl/each)	<i>Bacillus cereus</i>	<i>bceT</i>	FAM
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Ail</i>	JOE
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>coa</i>	Cy5
Real-time PCR Mixture(R5)	8-strip tube X 2 (16 tubes, 15 µl/each)	EHEC	VT1-1	FAM
		EHEC	VT2-1	JOE
Real-time PCR Mixture(R6)	8-strip tube X 2 (16 tubes, 15 µl/each)	ETEC	<i>Sth</i>	FAM
		ETEC	<i>Stp</i>	JOE

### III. 식중독 원인조사 이동차량 시험법

#### Real-time PCR 반응 조건

Temp. (°C)	Time	Cycle
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	

※ 대상 식중독균의 PCR 반응조건은 동일

#### Real-time PCR 사용법

##### ▶ 장비작동

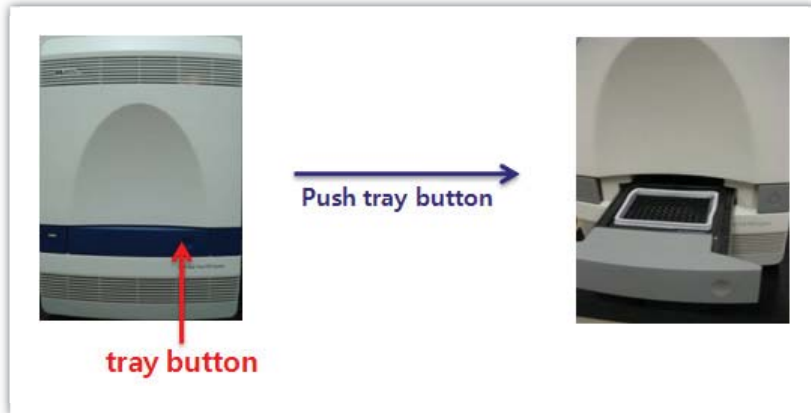
- ① 컴퓨터 전원을 켜다.
- ② Real-Time PCR 장비 전원을 켜다. (Computer booting 후 작동시킨다)





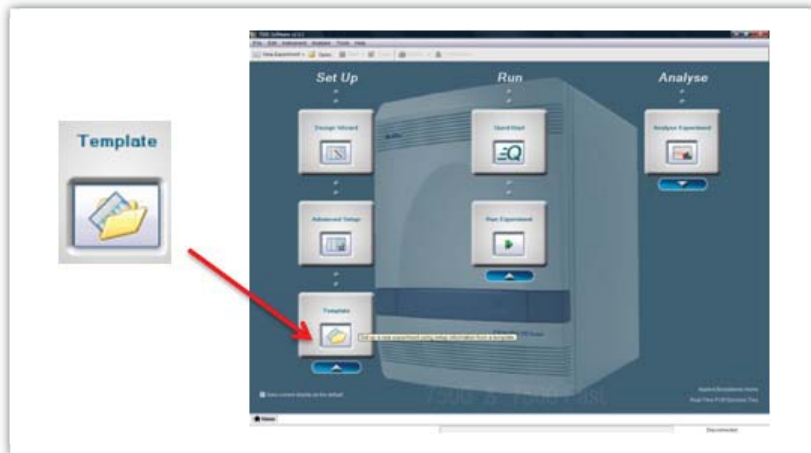


- ③ Tray button을 누른다.
- ④ 반응한 tube (strip or plate)를 tray에 넣는다.  
※ strip용 tray와 plate용 tray를 잘 구별하여야 한다.



▶ Sample Run

- ① 7500 system software를 클릭한다.
- ② “Template” 아이콘을 클릭한다.

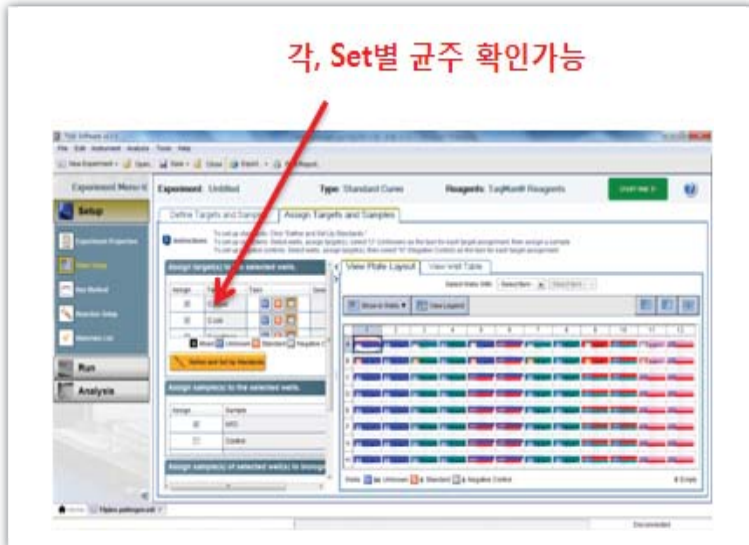


### III. 식중독 원인조사 이동차량 시험법

③ Open 창이 뜨면 template file을 선택한다.

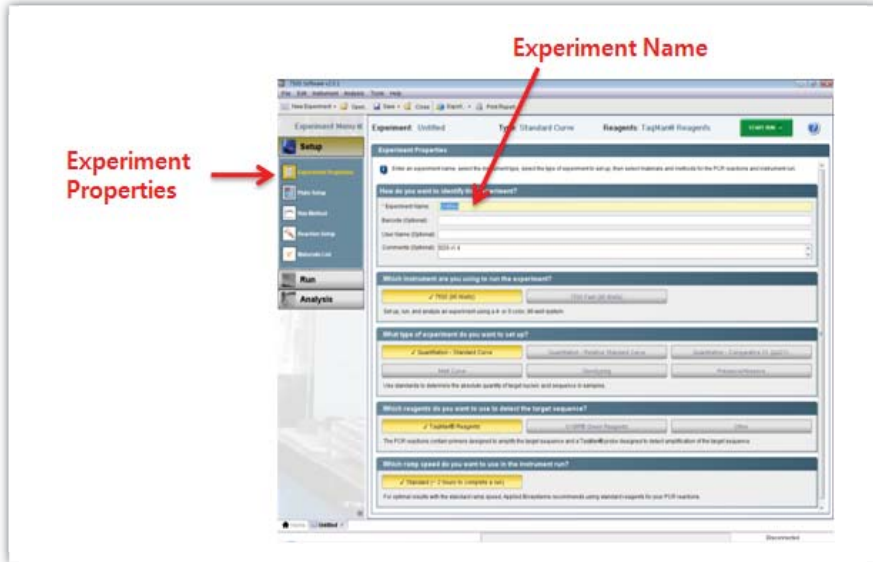


④ Template file을 열면 다음과 같이 Plate Set up을 확인할 수 있다.

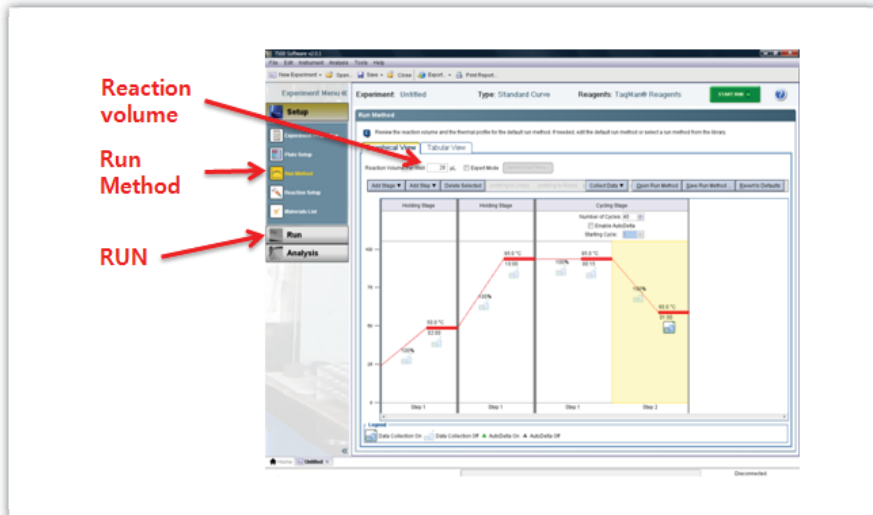




- ⑤ Setup의 Experiment Properties를 click한다.
- ⑥ 화면이 전환되면 Experiment Name을 기록한다.



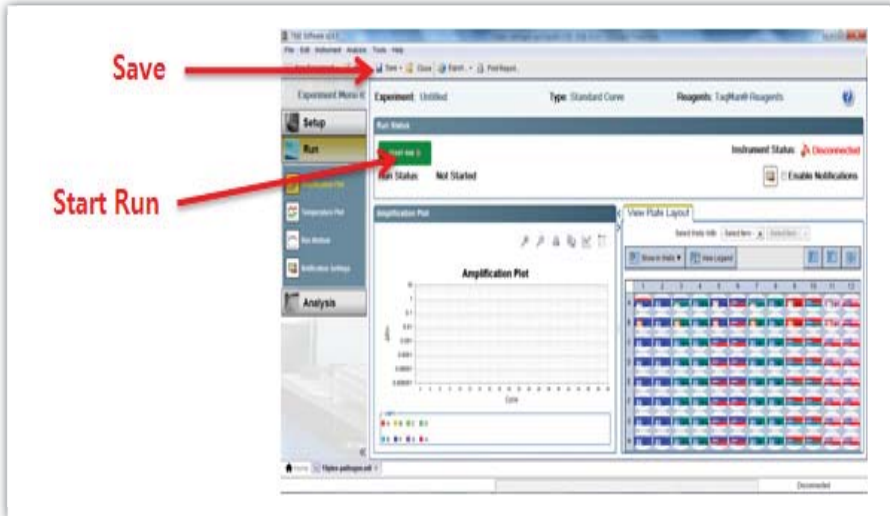
- ⑦ Run Method를 click하여 PCR 조건과 반응 Volume을 확인한다.



- ⑧ Run을 click하여 run page로 이동한다.

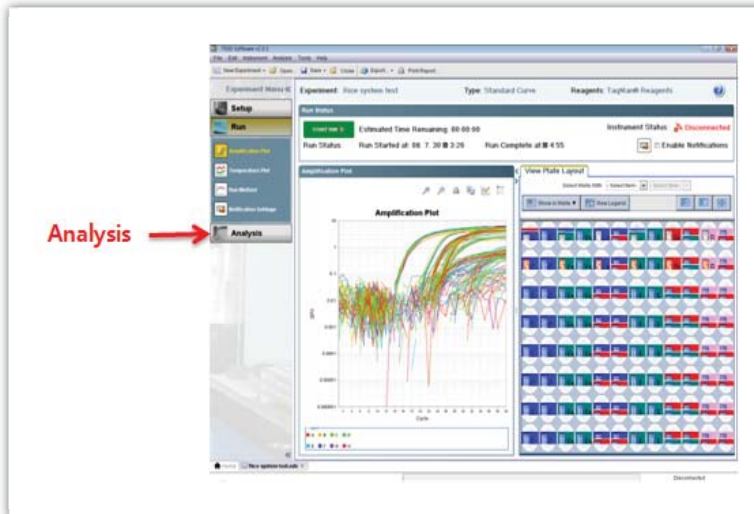
### III. 식중독 원인조사 이동차량 시험법

⑨ Save(💾)를 click하여 저장하고 Start Run을 click하여 실행한다.



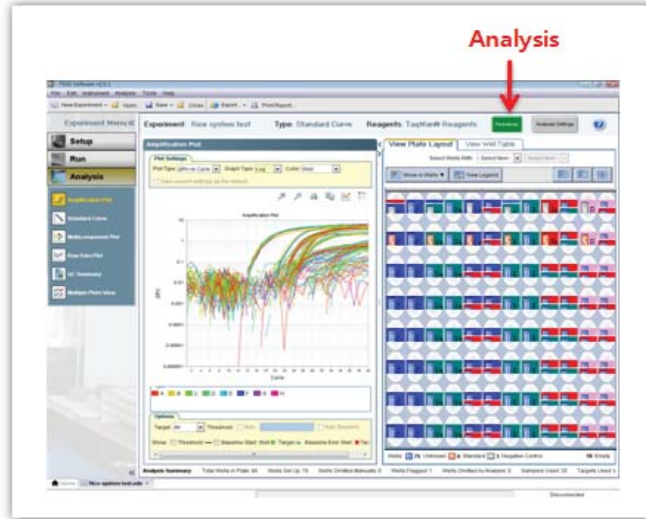
▶ Analysis

① Real-Time PCR이 끝나면 아래와 같이 보이며 Analysis를 click하여 Analysis page로 이동한다.

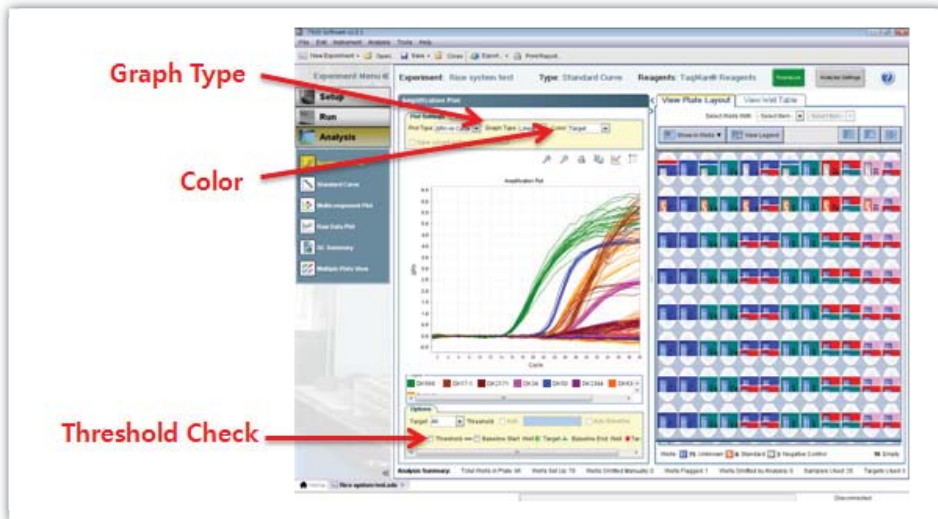




② Analyze를 click하여 분석한다.

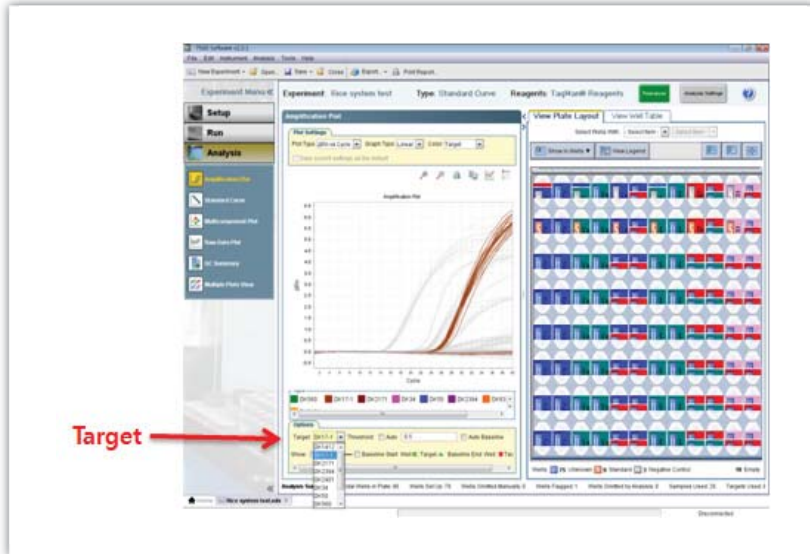


③ Plot settings의 Graph Type (Linear)과 Color (Target) 변경하여 확인한다(Threshold Check).

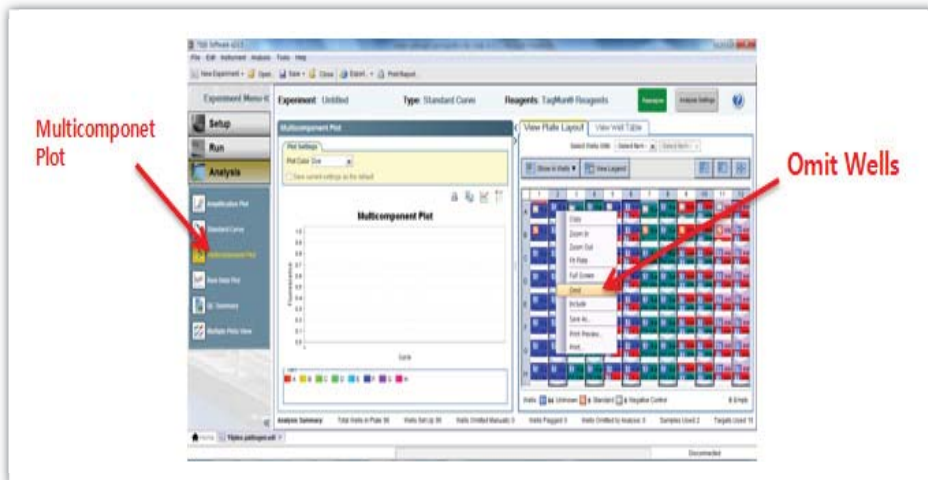


### III. 식중독 원인조사 이동차량 시험법

- ④ Option의 Target을 조정하여 Marker 별로 Plot를 확인한다.

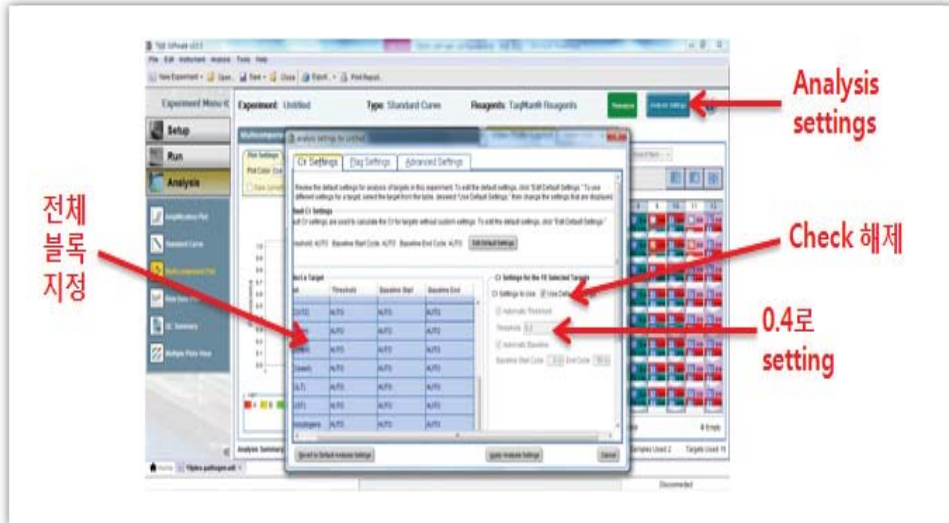


- ⑤ 각 Set 별 대상 시료의 개수가 미리 지정된 template file의 수보다 적을 때, 실험을 하지 않은 곳은 별도로 “Omit wells” 클릭 후 “Reanalysis” → “Save” 버튼을 누른 후 분석한다.





- ⑥ 결과분석 및 확인 시 “analysis settings” 버튼을 누른 후 Threshold 값을 0.4로 지정한다 (Auto check 해제).



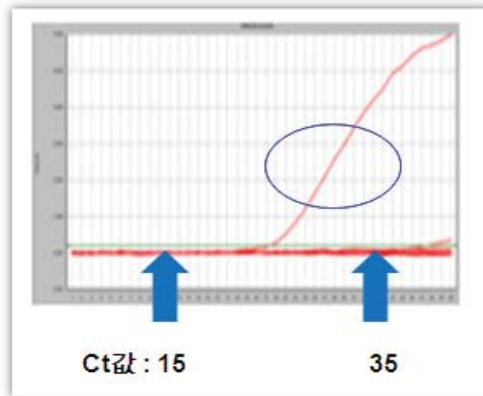
Threshold 값은 다음과 같이 정한다.

- NTC 보다 높게 설정한다.
- 정상적인 증폭 곡선인 부분만을 선택 할 수 있게 한다.
- Threshold는 0.4를 통상 사용 한다(변경가능).
- 가검물 시료의 경우 Ct값 30이 넘으면 균을 확인하기 어렵다.
- ※ 식품의 경우는 Ct값 30~35은 1~10 cfu 수준이다.

### 2-4. Step 3 : 분석결과 확인

④ Real-time PCR 분석결과 확인

- 음성대조군은 PCR 증폭이 일어나지 않고, 양성대조군은 증폭이 일어난 분석에서 분석시료의 PCR 증폭 Ct값이 15 ~ 35사이에 threshold value(0.4)에있을 경우, 해당 시료는 미생물 검출로 판단한다.



- 음성대조군에서 증폭이 일어난 경우 “오염”으로 간주하고 재분석 하고 양성대조군에서 증폭이 일어나지 않을 경우도 재분석 한다.

### 2-5. Step 4 : 식품시료에 적용

④ 식품시료에 적합한 증균배지 선정

Real-time PCR 분석결과 ▶ 특정균으로 확인된 경우	Real-time PCR 분석결과 ▶ 특정균이 확인되지 않은 경우
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 식품 25g을 확인된 균의 증균배지 225ml에 배양</li> <li>예) 분변시료의 PCR 결과에서, 황색포도상구균으로 검출될 경우는 식품시료 25g을 TSB 배지 225ml에 넣어 증균</li> </ul> <div data-bbox="354 1544 471 1681" style="text-align: center;"> </div>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 식품 25g을 증균배지(4종) 225ml에 각각 배양</li> <li>예) 분변시료의 PCR 결과에서 균이 확인되지 않은 경우, 식품시료 25g 씩을 4종의 증균배지(TSB, LEB, Preston or Bolton, Cook meat) 225ml에 각각 넣어 증균</li> </ul> <div data-bbox="728 1577 1213 1701" style="text-align: center;"> </div>





## 2-6. Step 5 : 배양 및 이동

### 증균배지

TSB (35°C 24시간)	LEB (35°C 48시간)	Prestone/Bolton (42°C 24시간, 미호기)	Cook meat (37°C 24시간, 혐기)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 살모넬라균(XLD)</li> <li>- 황색포도상구균(BP)</li> <li>- 비브리오균(TCBS)</li> <li>- 병원성대장균(SMAC)</li> <li>- 바실러스 세레우스(MYP)</li> <li>- 슈켈라(XLD)</li> <li>- 여시니아(MAC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 리스테리아 모노사이토제네스 (OXFORD)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 캄필로박터균(CFDA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 클로스트리디움균(TSC)</li> </ul>

## 2-7. Step 6 : 확인시험

### 선택배지

균주	분리배양	
	선택배지	배양시간
<i>Salmonella</i> spp.	MacConkey agar, Desoxycholate citrate agar, XLD	35~37°C/24±2시간
Pathogenic <i>Escherichia coli</i>	TC-MacConkey sorbitol agar	35~37°C/18시간
<i>Listeria monocytogenes</i>	Oxford agar, LPM agar, PALCAM agar	30°C/24~48시간
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mannitol salt agar (egg yolk), Baird-parker agar	35~37°C/18~24시간
<i>Vibrio</i> spp.	TCBS agar	35~37°C/18~24시간
<i>Campylobacter</i> spp.	mCCDA, Abeyta-Hunt agar	42°C/24~48시간
<i>Clostridium perfringens</i>	Clostridium perfringens agar, TSC agar	35~37°C/18~24시간
<i>Bacillus cereus</i>	MYP agar	30°C/24±2시간
<i>Shigella</i> spp.	MacConkey agar, SS agar, XLD agar	35~37°C/18~24시간
<i>Yersinia enterocolitica</i>	MacConkey agar, CIN agar	30°C/24±2시간
<i>Clostridium botulinum</i>	Liver-Veal 난황한천배지 등	35~37°C/48±3시간

※ 식중독 원인조사 시 유전자 증폭장치를 이용해 스크리닝 한 분변 시료는, 필수적으로 배지를 이용한 분리 및 확인 시험을 수행하여야 함

MINISTRY OF FOOD AND DRUG SAFETY

2016년 식중독 원인조사 시험법



# IV

## 식중독균 시험법

1. 황색포도상구균
2. 리스테리아 모노사이토제네스
3. 바실러스 세레우스
4. 살모넬라
5. 장염비브리오균
6. 캄필로박터
7. 클로스트리디움 퍼프린젠스
8. 예시니아 엔테로콜리티카
9. 병원성 대장균
10. 쉬겔라
11. 비브리오 콜레라
12. 비브리오 불리피쿠스
13. 클로스트리디움 보툴리눔





### 〈식중독 원인조사 시험법〉

- ※ 시험 절차는 업무 특성에 따라 탄력적으로 운영 가능함
- ※ 검체는 식품과 (음)용수 등을 포함함
- ※ (음)용수는 시료(250ml x 4ea) 채취 후 막여과법에 따라 시험함
- ※ 균과 식품의 특성에 따라 4시간 이상 증균 배양 후 유전자 분석 가능 함
- ※ 유전자 검사법으로 이동차량 real-time PCR법 등에 따라 시험함
- ※ 분리된 식중독균이 기준규격 항목일 경우, 현행 식품공전 방법에 따라 확인함

1.

황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)

1-1. PCR에 의한 유전자 확인법

가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
  - 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.
- ※ 양성대조균으로는 16S rRNA 유전자를 사용하여 실시한다.

나. Enterotoxin 유전자 확인을 위한 PCR법

1) 프라이머 염기서열

대 상 유전자	프라이머 염기서열 (5'→3')	산물크기 (bp)	비고
<i>sea1</i>	TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA	120	
<i>seb1</i>	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	478	
<i>sec1</i>	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	257	
<i>sed1</i>	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	317	
<i>see1</i>	TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	170	
<i>rRNA2</i>	GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC CGC ACA TCA GCG TCA G	228	



## 2) PCR 반응액 조제

성분	최종농도	Stock용액농도	1회용량	비고
완충액	1×	10 x	2.5 $\mu$ l	
MgCl <sub>2</sub>	2.5mM	25mM	2.5 $\mu$ l	
dNTPs	200 $\mu$ M	2.5mM	2 $\mu$ l	
프라이머(F)	100pmole/tube	100pmole/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	
프라이머(R)	100pmole/tube	100pmole/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	
주형DNA	25~50ng 또는 5 $\mu$ l	-	5 $\mu$ l	
Taq	1U/tube	5U/ $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	
증류수	-	-	10.8 $\mu$ l	
전체량	-	-	25 $\mu$ l	

## 3) PCR 반응조건

🕒 PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수	비고
초기 변성	94 °C	4 분	1 cycle	
변성 (denaturation)	94 °C	2 분	30 cycles	
결합 (annealing)	55 °C	2 분		
신장 (extension)	72 °C	1 분		
최종신장 (elongation)	72 °C	7 분	1 cycle	
보존	4 °C	-	-	

## IV. 식중독균 시험법

### 4) PCR 산물 확인

- PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5 $\mu$ L를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1 $\mu$ L/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

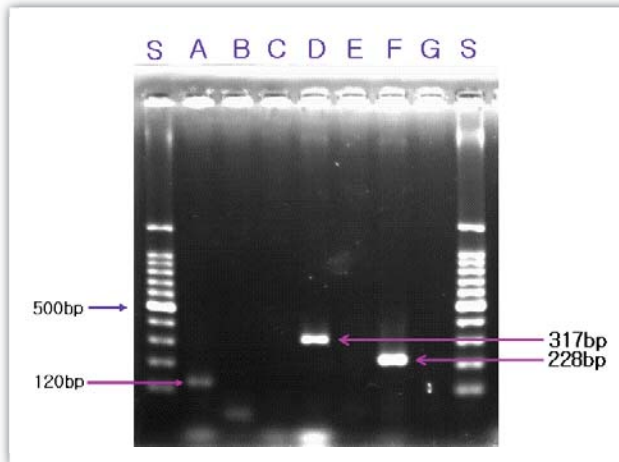


그림 1. *S. aureus*에 특이적인 프라이머를 이용한 PCR 결과(사용균주 *S. aureus* ATCC13565).  
lane A~F : *sea1*, *seb1*, *sec1*, *sed1*, *see1* 및 *rRNA2*, lane G : 음성대조군(no template),  
lane S : 100 bp Ladder.

## 나. Enterotoxin 유전자 확인을 위한 Multiplex PCR법

### 1) 프라이머 염기서열

대 상 유전자	프라이머 염기서열 (5'→3')	산물크기 (bp)	비고
<i>sea2</i>	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	127	
<i>seb2</i>	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	477	
<i>sec2</i>	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	271	
<i>sed2</i>	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG TTA ATA CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	319	
<i>see2</i>	CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	178	
<i>rRNA2</i>	GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC CGC ACA TCA GCG TCA G	228	





## 2) PCR 반응액 조제

성 분	최종농도	Stock용액농도	1회용량	비고
완충액	1×	10 x	5 $\mu$ l	
MgCl <sub>2</sub>	2.5mM	25mM	5 $\mu$ l	
dNTPs	200 $\mu$ M	2.5mM	4 $\mu$ l	
프라이머(F)	100pmole/tube	100pmole/ $\mu$ l	6 $\mu$ l	각 1 $\mu$ l
프라이머(R)	100pmole/tube	100pmole/ $\mu$ l	6 $\mu$ l	각 1 $\mu$ l
주형DNA	25~50ng 또는 5 $\mu$ L	-	5 $\mu$ l	
Taq	1U/tube	5U/ $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	
증류수	-	-	18.8 $\mu$ l	
전체량	-	-	50 $\mu$ l	

## 3) PCR 반응조건

👁️ PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구 분	온도	시간	cycle 수	비고
초기 변성	94 °C	4 분	1 cycle	
변성 (denaturation)	94 °C	2 분	30 cycle	
결합 (annealing)	55 °C	2 분		
신장 (extension)	72 °C	2 분		
최종신장 (elongation)	72 °C	7 분	1 cycle	
보존	4 °C	-	-	

## IV. 식중독균 시험법

### 4) PCR 산물 확인

- PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5 $\mu$ l를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1 $\mu$ l/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

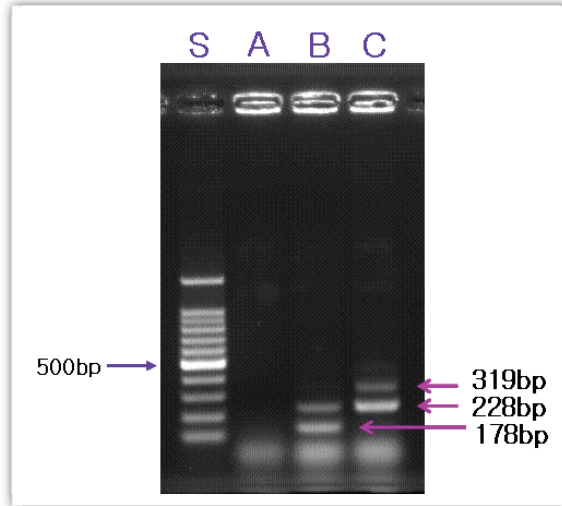


그림 2. *S. aureus*에 특이적인 프라이머(*sea2~see2* 및 *rRNA2*)를 이용한 multiplexPCR 결과.  
lane A : 음성대조군(no template), lane B : *S. aureus* ATCC13565,  
lane C : *S. aureus* ATCC27664, lane S : 100 bp Ladder

## 1-2. Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

### 나. 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence	최종농도	용량
<i>femA</i>	forward	AAT AAT AAC GAG GTC ATT GCA GCT T	900nM	2.5 $\mu$ l
	reverse	TGG ACC GCG ATT TGA ATA AAA	900nM	2.5 $\mu$ l
	probe	FAM-CTT ACT TAC TGC TGT ACC TGT T-MGB	250nM	2.5 $\mu$ l



- ⑥ 반응액 전체 용량이 25 $\mu$ L 이므로 주문된 primer 또는 probe를 각각의 최종 농도 900nM, 250nM의 10배인 9 $\mu$ M, 2.5 $\mu$ M로 희석하여 Working solution으로 -20 $^{\circ}$ C에 보관한다.

#### 다. Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Universal Master mix	12.5 $\mu$ l
Forward Primer	2.5 $\mu$ l
Reverse primer	2.5 $\mu$ l
Probe	2.5 $\mu$ l
Sample(DNA)	5 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

※ 각 균의 Primer 및 Probe 염기서열과 농도는 식중독균별 Real-time PCR 시험법에 세부적으로 명시하였고, 모든 시료와 반응액은 얼음 중에서 실시

#### 라. Real-time PCR 반응조건

1 cycle		40 cycle	
50 $^{\circ}$ C, 2분	95 $^{\circ}$ C, 10분	95 $^{\circ}$ C, 15초	60 $^{\circ}$ C, 60초

- ① F/R 프라이머 및 프로브를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 만든다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.
- ② 각각의 well에 반응액 20 $\mu$ l를 분주 한 후 추출 DNA 5 $\mu$ L 분주한다. 이 때 양성 대조군은 분석 대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 Prepman ultrareagent를 각각 동량 넣는다.
- ③ Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 bubble이 남지 않도록 spin down 시킨다.
- ④ 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 내용을 저장 하고 반응을 시작한다.

#### 마. Real-time PCR 결과 해석

- 1) 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- 2) 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정

### 1-3. Fast Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

#### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 2 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

#### 나. Fast Real-time PCR을 위한 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence(5'→3')	최종농도	용량
femA	forward	GGT ACA TCA AAT GCT TTC CGC CA	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	AAC GGT CAA TGC CAT GAT TTA ATG C	500nM	
	probe	TGC CGG AAG TTA TGC AGT GCA ATG GG	200nM	
sea	forward	TGT TCA GGA GTT GGA TCT TCA AGC AA	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	CTG TCC TTG AGC ACC AAA TAA ATC GT	500nM	
	probe	TGT TTT TGA TGG GAA GGT TCA GAG GGG	200nM	
seb	forward	TTT AGC ATT AAC CCC TTG TTG CCA	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	TTG ACG CAA ATG ATG CAT GGA A	500nM	
	probe	TCA CCA ACT TTA GCT GAA ATT GGG GGA	200nM	

#### 다. 프라이머와 프로브 준비

- ① 반응액 전체 용량이 9 $\mu$ l이므로 프라이머와 프로브를 각각 최종 농도 500nM, 200nM의 9배인 4.5 $\mu$ M, 1.8 $\mu$ M가 되게 희석한 후 이를 혼합하여 1 $\mu$ l 취해 Primer/Probe mixture로 사용한다.



## 라. Fast Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Master mix	5 $\mu$ l
TaqMan probe & primer mixture	1 $\mu$ l
DNase-RNase free water	1 $\mu$ l
Sample(DNA)	2 $\mu$ l
Total	9 $\mu$ l

※ 모든 시료와 반응액 준비는 Ice 또는 Ice cooler에서 실시하고, 반응액 조성 시 잘 혼합되도록 vortex한다.

## 마. Real-time PCR 반응조건 및 시간(UltraFast Real-time PCR G2-4 system, Nanobiosys)

1 cycle	39 cycle		반응시간
95 $^{\circ}$ C 12초	95 $^{\circ}$ C 4초	56 $^{\circ}$ C 15초	약 20분

- 1) F/R 프라이머 및 프로브를 농도에 맞게 희석하여 반응액(Reaction mixture)을 제조한다. 실험 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수의 양을 제조한다.
- 2) PCR 튜브에 반응액 7 $\mu$ l와 샘플 DNA 2 $\mu$ l를 분주하여 잘 혼합해준다. 이 때 양성 대조군은 분석대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 DNase-RNase free water를 각각 동량 넣는다.
  - ※ femA, sea 유전자에 대한 양성 대조군으로 ATCC 13565 및 femA, seb 유전자에 대한 양성 대조군으로 ATCC 14458 균주를 사용할 수 있다.
- 3) 각 혼합물을 칩(LabChip)의 각 채널(Channel)에 8 $\mu$ l씩 주입한다.
  - ※ 주입 시 팁(Tip)을 수직으로 세워 hole에 꼭 맞춰 주입하고 채널 내에 공기 방울(bubble)이 생기지 않도록 주의한다.
- 4) 준비된 칩을 Ultrafast Real-time PCR G2-4 system에 삽입하고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 데이터를 저장하고 반응을 시작한다.

## 바. Real-time PCR 결과 해석

- 1) 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- 2) 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정

## IV. 식중독균 시험법

### 1-4. 식품공전 시험법(황색포도상구균)

#### 증균 배양

- 식품(검체) 25g 또는 25mL을 비선택성 증균배지(10% NaCl을 첨가한 TSB배지) 225mL에 가하여 250mL로 만든 후 증균배양 (35~37°C, 18~24시간)

#### 분리 배양

- 증균배양액을 난황첨가 만니톨 식염한천배지 또는 Baird-Parker 한천배지 또는 Baird-Parker (RPF) 한천배지에 획선 접종(35~37°C, 18~24시간)

난황첨가 만니톨 식염한천배지



〈황색 불투명, 주변에 혼탁한 백색환〉

- 난황첨가 만니톨 식염한천배지에서 황색 불투명 집락을 나타내고 주변에 혼탁한 백색환이 있는 집락 또는 Baird-Parker 한천배지에서 투명한 띠로 둘러싸인 광택이 있는 검정색 집락 또는 Baird-Parker (RPF) 한천배지에서 불투명한 환으로 둘러싸인 검정색 집락을 보일 경우 보통한천배지에 획선접종하여 아래 단계 (생화학적 및 혈청학적 확인시험)를 실시

#### 확인시험

##### I. 생화학적 시험

- 특성확인 : 그람염색 Gram(+) 구균, Coagulase 시험 양성 등

그람염색



〈그람양성의 구균〉

##### II. 혈청형 분석

- 생화학적 확인시험이 완료된 집락을 대상으로 H 혼합혈청과 O 혼합혈청을 사용한 응집반응을 수행하여 양성이면 S. aureus로 확인

\* 식품공전 시험법은 최신의 고시 방법에 따름

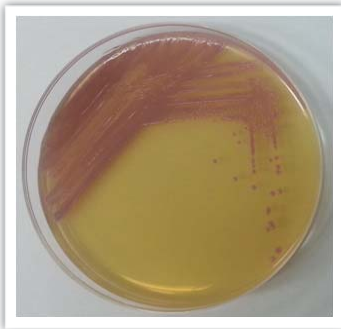


## ▶ 분리 및 확인 시험

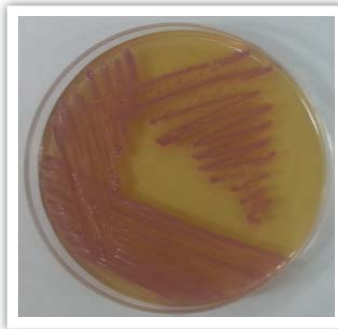
① 식중독 원인조사에는 아래와 같은 배지, 키트 및 장비 등을 사용 할 수 있다.

### ① CHROM agar™ Staph aureus

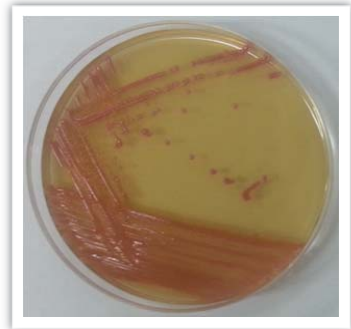
- 성상 : *S. aureus* → Rose to mauve / other → colorless, blue or inhibited



*Staphylococcus aureus*  
NCCP 10220



*Staphylococcus aureus*  
NCCP 11470



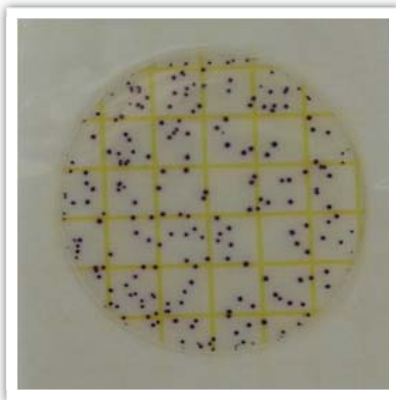
*Staphylococcus aureus*  
ATCC 13565

### ② 3M™ Petrifilm™ Staph Express Plates (STX)

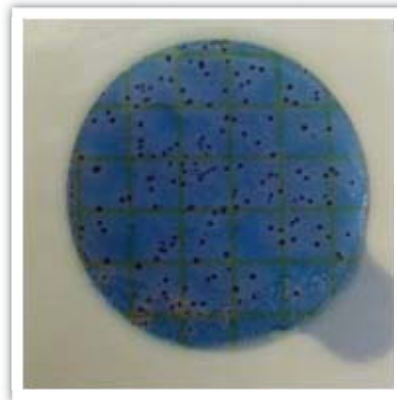
- 성상 : 추정시험 → (+): 적자색 / 확정시험 → (+): 적자색

추정시험

확정시험 (Disc 삽입)



*S. aureus* NCCP 10220



*S. aureus* NCCP 10220

## IV. 식중독균 시험법

### ③ Microgen Latex\_staphy kit

– 성상 : 응집반응



### ④ Food System–Staphylococcus aureus

– 성상 : well의 색깔변화



*S.aureus* NCCP 10220



*S.aureus* NCCP 11470



*S.aureus* NCCP 11472

### ⑤ Microbact Staph 12S

– 성상 : well의 색깔변화

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MAL	MAN	MNS	SUC	TRE	NAG	ARG	URE	β-GL	PHO	β-GN	β-GD
—	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	White	White	White	White
	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Green	Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Orange
+	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Pink	Yellow	Yellow	Yellow	Red
							Blue	Pink				





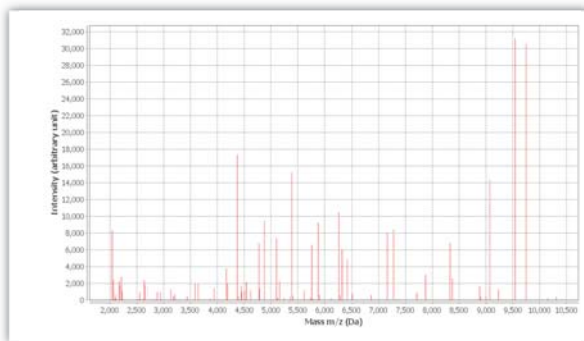
### ⑥ Microgen™ STAPH -ID System

- 성상 : well의 색깔변화

Well no.	1 to 6	7	8	9	9a	10	11	12
Positive	Yellow/Yellow Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Deep Pink	Green/blue, Blue	Red/ Deep pink
Negative	Red	Colourless	Colourless	Colourless	Yellow	Straw to pale salmon pink color	Yellow, Yellow/ Green	Colorless/V ery pale pink

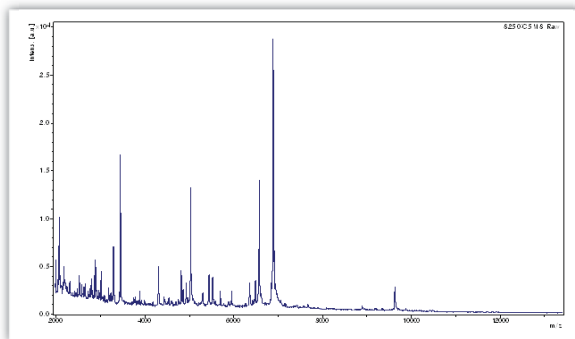
### ⑦ Vitek MS

- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정



### ⑥ Biotyper

- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정



## 2. 리스테리아 모노사이토제네스 (*Listeria monocytogenes*)

### 2-1. PCR을 사용한 유전자 확인법

「Multiplex PCR을 이용한 hemolysin 및 internalin 분석(PCR법)」



#### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

※ *hly* (hemolysin 생산 유전자), *inl* (internalin 생산유전자)

#### 나. PCR을 위한 프라이머 염기서열

대 상 유전자	프라이머 염기서열 (5'→3')	산물크기 (bp)	비고
<i>hly</i>	GAC CTT CCA GAT TTT TCG GC CAC ACG TGG TAA GTT CCG	719	
<i>inl</i>	AGT AAC ATC AGT CCC CTA GC GGT TCT GCG TAA CTA CCG CC	446	

#### 다. multiplex PCR 반응액 조제

성 분	최종농도	Stock용액농도	1회용량	비고
완충액	1×	10 x	5 $\mu$ l	
MgCl <sub>2</sub>	2,5mM	25mM	5 $\mu$ l	
dNTPs	200 $\mu$ M	2,5mM	4 $\mu$ l	
프라이머(F)	100pmole/tube	100pmole/ $\mu$ l	6 $\mu$ l×2	
프라이머(R)	100pmole/tube	100pmole/ $\mu$ l	6 $\mu$ l×2	
주형DNA	25~50ng 또는 5 $\mu$ l	-	5 $\mu$ l	
Taq	1U/tube	5U/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	
증류수		-	6,8 $\mu$ l	
전체량			50 $\mu$ l	



## 라. PCR 반응조건

PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수	비고
초기 변성	95 ℃	5 분	1 cycle	
변성 (denaturation)	94 ℃	1 분	35 cycle	
결합 (annealing)	56 ℃	1 분		
신장 (extension)	72 ℃	1 분		
최종신장 (elongation)	72 ℃	10 분	1 cycle	
보존	4 ℃	-	-	

## 마. PCR 산물 확인

- PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5 $\mu$ l를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1 $\mu$ l/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

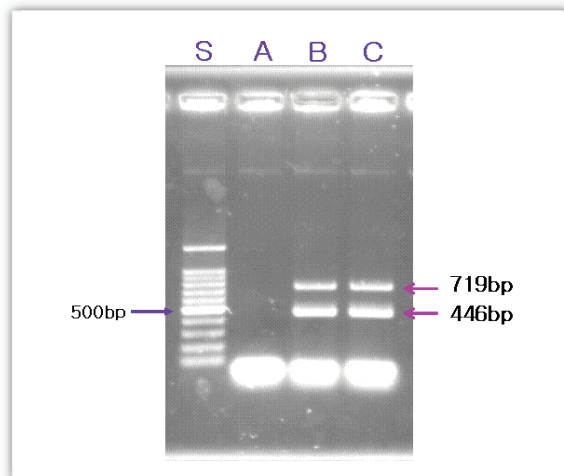


그림 1. *L. monocytogenes*에 특이적인 프라이머(*hly* 및 *inl*)를 이용한 multiplex PCR 결과.  
 lane A : 음성대조군(no template), lane B : *L. monocytogenes* ATCC19111,  
 lane C : *L. monocytogenes* ATCC19114, lane S : 100 bp Ladder

### 2-2. Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

#### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

#### 나. Taqman Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

##### 1) 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence (5'→3')	최종농도	용량
<i>iap</i>	forward	CTA AAG CGG GAA TCT CCC TT	300nM	2.5 $\mu$ l
	reverse	CCA TTG TCT TGC GCG TTA AT	300nM	2.5 $\mu$ l
	probe	FAM-CCT CTG GCG CAC AAT ACG CTA GCA CT-TAMRA	300nM	2.5 $\mu$ l

##### 2) 프라이머 또는 프로브 준비

- ▶ 반응액 전체 용량이 25 $\mu$ l 이므로 주문된 프라이머 또는 프로브를 각각의 최종 농도 300nM의 10배인 3 $\mu$ M로 희석하여 Working solution으로 -20 $^{\circ}$ C에 보관한다.

##### 3) Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Universal Master mix	12.5 $\mu$ l
Forward Primer	2.5 $\mu$ l
Reverse primer	2.5 $\mu$ l
Probe	2.5 $\mu$ l
Sample(DNA)	5 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

※ 각 균의 Primer 및 Probe 염기서열과 농도는 식중독균별 Real-time PCR 시험법에 세부적으로 명시하였고, 모든 시료와 반응액은 얼음 중에서 실시



#### 4) Real-time PCR 반응

1 cycle		40 cycle	
50°C 2분	95°C 10분	95°C 15초	60°C 60초

- ① F/R 프라이머 및 프로브를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 만든다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.
- ② 각각의 well에 반응액 20µl를 분주 한 후 추출 DNA 5µl 분주한다. 이 때 양성 대조군은 분석대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 Prepman ultrareagent를 각각 동량 넣는다.
- ③ Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 bubble이 남지 않도록 spin down 시킨다.
- ④ 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.

#### 5) Real-time PCR 결과 해석

- ① 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- ② 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정

### 다. SYBR Green Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

#### 1) 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Primer sequences(5'→3')
<i>iap</i>	LMO_F3(Forward)	CGA AGC TGG TGA TAC TCT T
	LMO_B3(Reverse)	CGT AAT AAT ACT GTT ATC AAC ACC

#### 2) 프라이머 또는 프로브 준비

- ① 주문된 프라이머 또는 프로브를 10µM(10pmol/µl)로 희석하여 Working solution으로 -20°C에 보관한다.

## IV. 식중독균 시험법

### 3) Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Power SYBR Green PCR Master Mix (applied biosystems, UK)	10 $\mu$ l
Forward Primer (10pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Reverse primer (10pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
Template DNA	5 $\mu$ l
D.W.	4 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

### 4) Real-time PCR 반응

Steps	Temp.( $^{\circ}$ C)	Times
Polymerase activation	95	15 min
Cycling Stage 40 cycles	95	15 s
	60	20 s
	72	30 s

※ 각 장비의 사용 매뉴얼에 따라 melting curve 분석 모드를 추가하여 분석한다. 예) LifeTech 7500fast 장비의 경우 melting curve를 default mode로 추가하여 반응을 시작한다.

- ① F/R 프라이머 및 프로브를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 만든다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.
- ② 각각의 well에 반응액 15 $\mu$ l를 분주 한 후 추출 DNA 5 $\mu$ l 분주한다. 이 때 양성 대조군은 분석대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 D.W.를 각각 동량 넣는다.
- ③ Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 bubble이 남지 않도록 spin down 시킨다.
- ④ 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.

### 5) Real-time PCR 결과 해석

- ① 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- ② 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정



## 2-3. 식품공전 시험법(리스테리아 모노사이토제네스)

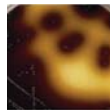
### 증균 배양

- 식품검체(우유, 가공식품 등) 25g 또는 25mL을 선택성 증균배지(Listeria 증균배지) 225mL에 가하여 250mL로 만든 후 증균배양(30°C, 48시간)
- 식육 및 가공류의 경우에는 25g 또는 25mL을 1차 선택성 증균배지(UVM-modified Listeria 증균배지) 225mL에 가하여 250mL로 만든 후 증균배양하고(30°C, 24±2시간), 배양액 0.1mL를 취하여 Fraser Listeria 배지 10mL에 접종하여 2차 증균배양 (35~37°C, 24±2시간)

### 분리 배양

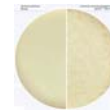
- 증균배양액을 멸균된 면봉을 이용하여 Oxford agar 또는 Lithium chloride- phenylethanol -moxalactam(LPM) 한천배지 또는 PALCAM 한천배지에 접종(30°C, 24~48시간)

Oxford agar



〈녹갈색, 주변에 검정색 환〉

LPM 한천배지



〈집락은 회색이며 투명함〉

- 의심집락이 확인되면 0.6% yeast extract가 포함된 Tryptic Soy 한천배지에 접종 배양하여 아래단계(생화학적 및 혈청학적 확인시험) 실시(30°C, 24~48시간)

### 확인 시험

#### I. 생화학적 시험

- 특성확인 : 그람염색 Gram(+) 간균, β-hemolysis, motility 양성, catalase 양성, CAMP test결과 *S. aureus*(ATCC 25923)에서 양성, *Rhodococcus equi*(ATCC 6939)에서 음성, mannitol 비분해, rhamnose 분해, xylose 비분해 등의 결과를 보일 경우 *L. monocytogenes* 양성으로 판정

그람염색



〈그람음성의 간균〉

\* 식품공전 시험법은 최신의 고시 방법에 따름

## IV. 식중독균 시험법

### ▶ 분리 및 확인 시험

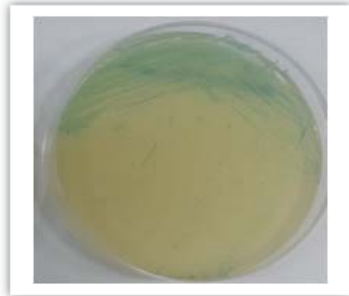
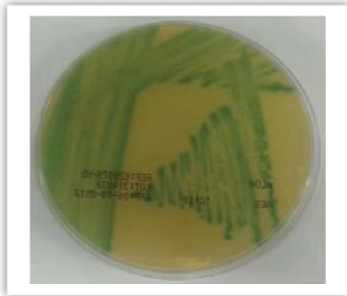
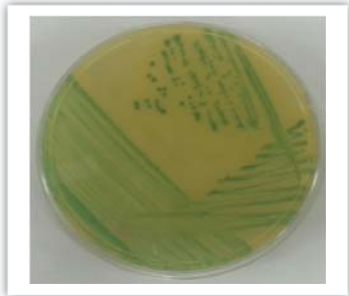
⑥ 식중독 원인조사에는 아래와 같은 배지, 키트 및 장비 등을 사용 할 수 있다.

- ① Ottaviani Agosti agar
- ② ALOA® GELOSE (20 BT 90)
- ③ CHROM agar™ Listeria
  - 성상 : Listeria → green

Ottaviani Agosti agar

ALOA® GELOSE (20 BT 90)

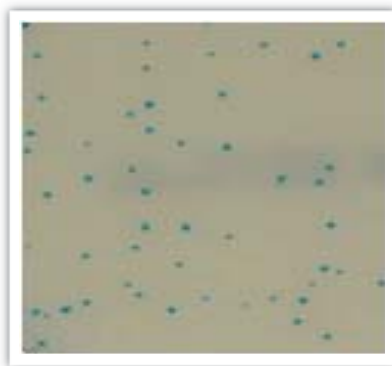
CHROM agar™ Listeria



*Listeria monocytogenes* ATTC 19113

- ④ chromID™ L.mono

- 성상 : Listeria mono → blue



*Listeria monocytogenes* ATTC 19113





⑤ Path-check Hygiene Pathogen Detection- *Listeria, spp.*

- 성상 : 검정색으로 변화



*L. monocytogenes*  
NCCP 10805



*L. monocytogenes*  
NCCP 10807



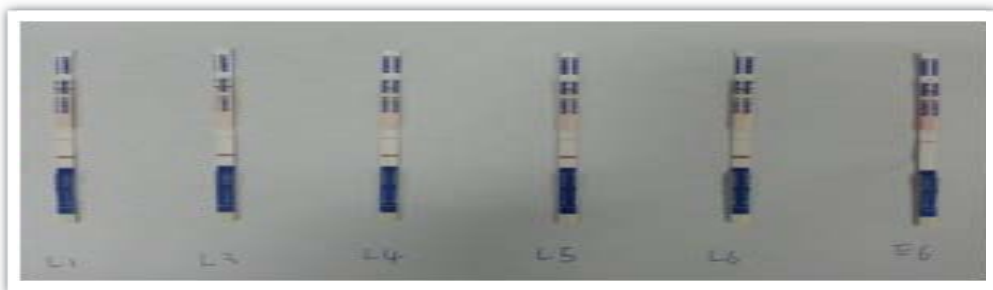
*L. monocytogenes*  
NCCP 10965



*L. monocytogenes*  
ATCC 19113

⑥ Reveal 2.0 for Listeria

- 성상 : 두 줄 양성



⑦ Microgen Latex\_listeria kit

- 성상 : 응집반응



## IV. 식중독균 시험법

### ⑧ 3M™ Tecra™ Listeria Visual Immunoassay, 48well kit

- 성상 : well의 색변화

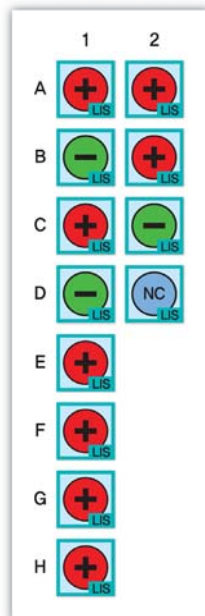


### ⑨ ANSR – Listeria

- 성상 : 그래프 확인



### ⑩ 3M Molecular Detection Assay Listeria mono





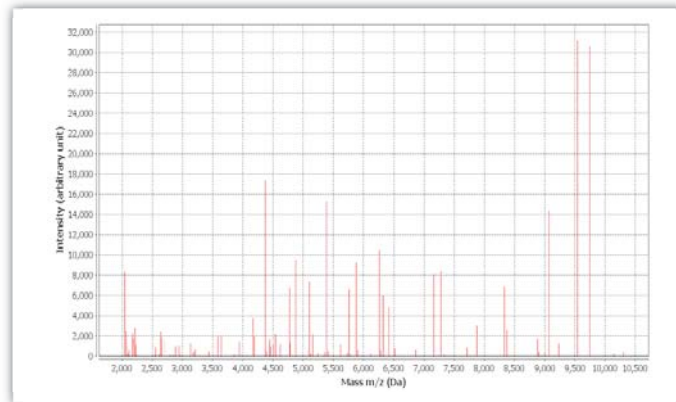
### ⑪ Microgen™ LISTERIA -ID System

- 성상 : well의 색변화

Well no.	1	2 to 11	12
Positive	Black	Yellow	갈색
Negative	Straw color	Purple	Red cell 용해 안됨

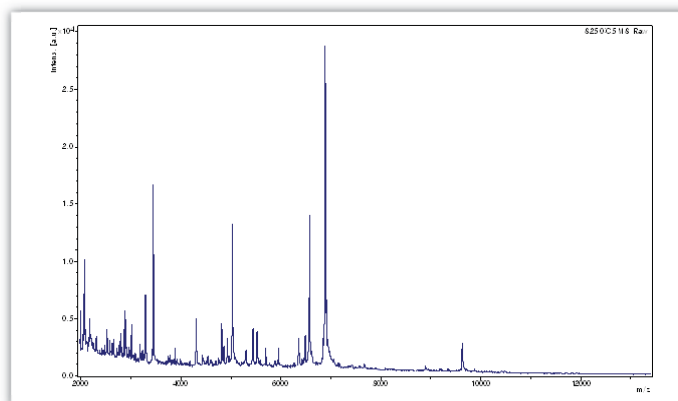
### ⑫ Vitek MS

- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정

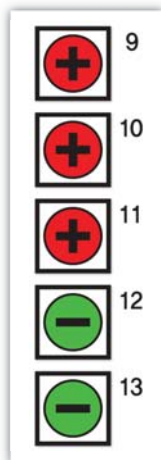


### ⑬ Biotyper

- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정



⑭ BAX<sup>®</sup> system





### 3.

## 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*)

### 3-1. PCR에 의한 독소 유전자 확인법

#### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

※ *hblD*(Hemolysin BL D), *bceT*(enterotoxin T)

#### 나. PCR을 위한 프라이머 염기서열

대 상 유전자	프라이머 염기서열 (5'→3')	산물크기 (bp)	비고
<i>hblD</i>	ACC GGT AAC ACT ATT CAT GC GAG TCC ATA TGC TTA GAT GC	829	
<i>bceT</i>	CGT ATC GGT CGT TCA CTC GG GTT GAT TTT CCG TAG CCT GGG	661	

#### 다. PCR 반응액 조제

성 분	최종농도	Stock용액농도	1회용량	비고
완충액	1×	10 x	5 $\mu$ l	
MgCl <sub>2</sub>	2.5mM	25mM	5 $\mu$ l	
dNTPs	200 $\mu$ M	2.5mM	4 $\mu$ l	
프라이머(F)	100pmole/tube	100pmole/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	
프라이머(R)	100pmole/tube	100pmole/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	
주형DNA	25~50ng 또는 5 $\mu$ l	-	5 $\mu$ l	
<i>Taq</i>	1U/tube	5U/ $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	
증류수		-	28.8 $\mu$ l	
전체량			50 $\mu$ l	

## IV. 식중독균 시험법

### 라. PCR 반응조건

PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수	비고
초기 변성	94 °C	2 분	1 cycle	
변성 (denaturation)	94 °C	1 분	35 cycle	
결합 (annealing)	58 °C	1 분		
신장 (extension)	72 °C	2 분		
최종신장 (elongation)	72 °C	5 분	1 cycle	
보존	4 °C	-	-	

※ 단, *bceT*의 경우 결합 (annealing)은 55°C에서 수행함

### 마. PCR 산물 확인

- PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5μl를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1μl/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

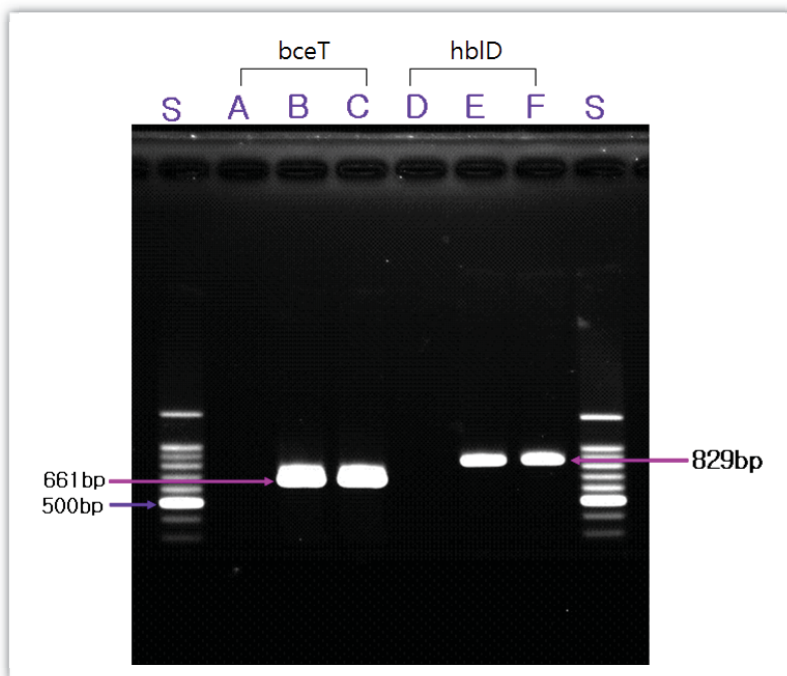


그림 1. *B. cereus*에 특이적인 프라이머(*hbID* 및 *bceT*)를 이용한 PCR 결과  
 lane A 및 D : 음성대조군(no template), lane B 및 E : *B. cereus* ATCC 11778,  
 lane C 및 F : *B. cereus* ATCC 14579, S : 100bp Ladder



## 3-2 Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

### 나. 16S rRNA 유전자 확인을 위한 Real-time PCR법

#### 1) 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence	최종농도	용량
16s rRNA	forward	GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC	300nM	2.5 $\mu$ l
	reverse	CTC AGG TCG GCT ACG CAT CG	300nM	2.5 $\mu$ l
	probe	FAM-TCG AGC GAA TGG ATT AAG AGC TTG C-BHQ1	250nM	2.5 $\mu$ l

#### 2) 프라이머 또는 프로브 준비

- ④ 반응액 전체 용량이 25 $\mu$ l이므로 주문된 프라이머 또는 프로브를 각각의 최종 농도 300nM, 250nM의 10배인 3 $\mu$ M, 2.5 $\mu$ M로 희석하여 Working solution으로 -20 $^{\circ}$ C에 보관한다.

#### 3) Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Universal Master mix	12.5 $\mu$ l
Forward Primer	2.5 $\mu$ l
Reverse primer	2.5 $\mu$ l
Probe	2.5 $\mu$ l
Sample(DNA)	5 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

※ 각 균의 Primer 및 Probe 염기서열과 농도는 식중독균별 Real-time PCR 시험법에 세부적으로 명시하였고, 모든 시료와 반응액은 얼음 중에서 실시

## IV. 식중독균 시험법

### 4) Real-time PCR 반응조건

1 cycle		40 cycle	
50℃ 2분	95℃ 10분	95℃ 15초	60℃ 60초

- ① F/R 프라이머 및 프로브를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 만든다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.
- ② 각각의 well에 반응액 20 $\mu$ l를 분주한 후 추출 DNA 5 $\mu$ L 분주한다. 이 때 양성 대조군은 분석대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 Prepman ultrareagent를 각각 동량 넣는다.
- ③ Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 bubble이 남지 않도록 spin down 시킨다.
- ④ 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.

### 5) Real-time PCR 결과 해석

- ① 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- ② 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정

## 다. lipoprotein 유전자 확인을 위한 Real-time PCR법

### 1) 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence	최종농도	용량
Lipoprotein	forward	ATC AAG ACT TTC AAC GGA CTG T	250nM	0.5 $\mu$ l
	reverse	TAA AAA CGG GTA TTG CCA TCA C	250nM	0.5 $\mu$ l

### 2) 프라이머 또는 프로브 준비

- ④ 반응액 전체 용량이 20 $\mu$ l이므로 주문된 프라이머의 최종 농도 250nM의 10배인 2.5 $\mu$ M로 희석하여 Working solution으로 -20℃에 보관한다.





### 3) Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
HRM Master mix	10.0 $\mu$ l
Forward Primer	0.5 $\mu$ l
Reverse primer	0.5 $\mu$ l
Sample(DNA)	2.0 $\mu$ l
Distilled water	7.0 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

### 4) Real-time PCR 반응조건

1 cycle	40 cycle	
95 $^{\circ}$ C 10분	95 $^{\circ}$ C 15초	60 $^{\circ}$ C 60초

- ① F/R 프라이머를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 만든다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.
- ② 각각의 well에 반응액 18 $\mu$ l를 분주한 후 추출 DNA 2 $\mu$ l 분주한다. 이 때 양성 대조군은 분석 대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 Prepman ultrareagent를 각각 동량 넣는다.
- ③ Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 bubble이 남지 않도록 spin down 시킨다.
- ④ 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.

### 5) Real-time PCR 결과 해석

- ① 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- ② 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정

## IV. 식중독균 시험법

### 3-3. 식품공전 시험법(바실러스 세레우스)

#### 시료 전처리

- 식품(검체) 25g 또는 25mL을 희석액 225mL에 가하여 250mL로 만들어 균질화

#### 분리 배양

- 균질화된 검액을 MYP 한천배지에 접종(30°C, 24시간)

MYP 한천배지



〈혼탁한 환을 갖는 분홍색 집락〉

- 배양 후 혼탁한 환을 갖는 분홍색 집락을 선별, 이 때 명확하지 않을 경우 24시간 더 배양하여 관찰

#### 확인시험

##### I. 생화학적 시험

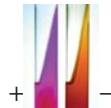
- 보통한천배지에서 전형적인 집락을 선별하여 보통한천배지에 접종(30°C, 18~24시간)
  - 특성확인 : 그람염색 Gram(+), Urease 양성, Lysine decarboxylase 양성, 곤충독소단백질 생성 확인시험

그람염색



〈그람양성의 간균〉

Urease 시험



+ 〈양성〉

Lysine decarboxylase 시험



- 〈양성〉

- 포자를 갖는 Gram 양성, 긴 형태의 간균으로 확인된 균은 운동성, nitrate 환원능, VP,  $\beta$ -hemolysis, 혐기배양 시 포도당 이용 등의 생화학시험 실시
  - nitrate 환원능 양성, VP 양성이면 *B. cereus* 확인, 곤충독소단백질이 확인되면 *Bacillus thuringiensis*로 판정

\* 식품공전 시험법은 최신의 고시 방법에 따름

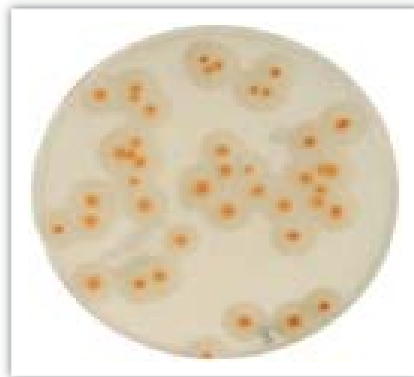


## ▶ 분리 및 확인 시험

① 식중독 원인조사에는 아래와 같은 배지, 키트 및 장비 등을 사용 할 수 있다.

### ① BACARA agar

- 성상 : 주황색 집락에 불투명한 환



*Bacillus cereus* NCCP 10623

### ② Food System—Bacillus cereus

- 성상 : well의 색변화



*B.cereus* NCCP 10715



*B.cereus* NCCP 14579

## IV. 식중독균 시험법

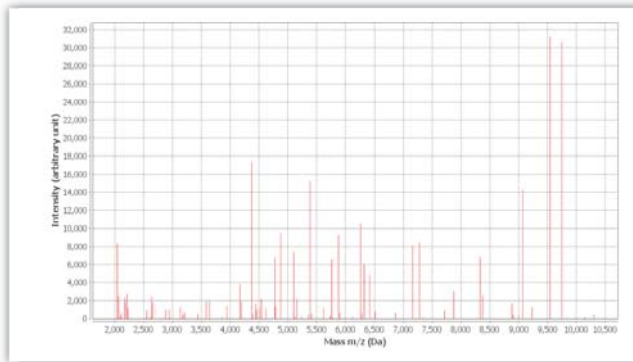
### ③ Microgen™ BACILLUS -ID System

– 성상 : well의 색변화

Well no.	1 to 11	12 to 18	19	20	20 plus reag	21	22	23	24
Positive	Yellow	Yellow	Pink/Red	Yellow	Red	Green/Blue	Blue	Pink/Red	Red
Negative	Red	Red	Colorless Yellow	colorless	colorless	Yellow, Yellow/Green	Yellow/ Light Green	Straw color	Red

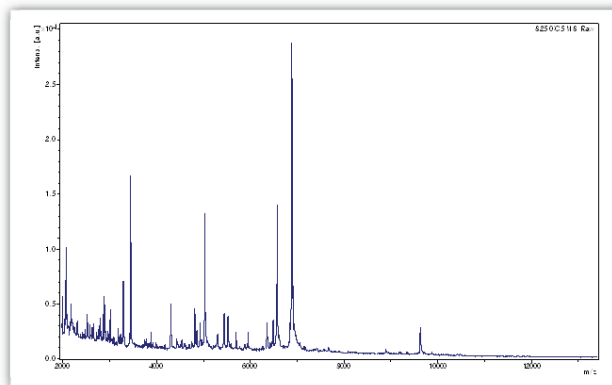
### ④ Vitek MS

– 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정

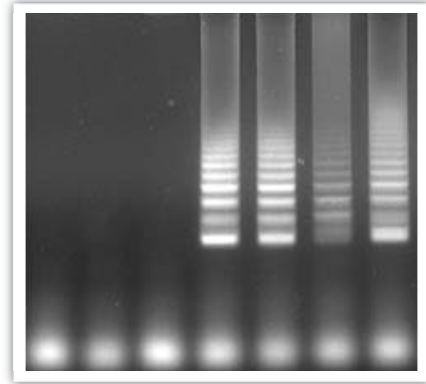
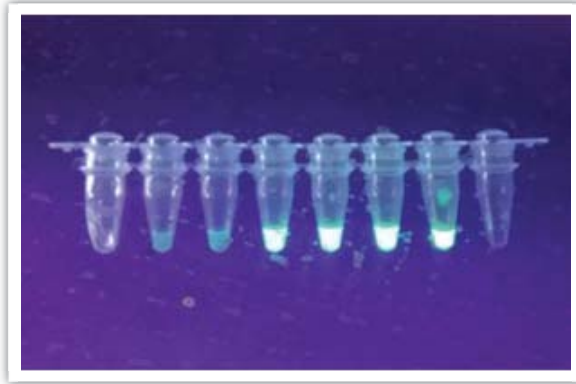


### ⑤ Biotyper

– 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정



## ⑥ 등온증폭법



1. Negative control; 2. *S. aureus* ATCC 25923; 3. *B. thuringiensis* ATCC 10729; 4. Positive control (*B. cereus* ATCC 13061); 5. Wide type *B. cereus* 1; 6. Wide type *B. cereus* 2; 7. Wide type *B. cereus* 3; 8. DW

## 4. 살모넬라 (*Salmonella* spp.)

### 4-1. PCR에 의한 유전자 확인법

#### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

#### 나. PCR법

##### 1) PCR을 위한 프라이머 염기서열

대 상 유전자	프라이머 염기서열 (5'→3')	산물크기 (bp)
<i>salm</i>	GCT GCG CGC GAA CGG CGA AG TCC CGG CAG AGT TCC CAT T	389

##### 2) PCR 반응액 조제

성 분	최종농도	Stock용액농도	1회용량	비고
완충액	1×	10 x	5 $\mu$ l	
MgCl <sub>2</sub>	3mM	25mM	6 $\mu$ l	
dNTPs	200 $\mu$ M	2.5mM	4 $\mu$ l	
프라이머(F)	100pmole/tube	100pmole/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	
프라이머(R)	100pmole/tube	100pmole/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	
주형DNA	25~50ng 또는 5 $\mu$ l	-	5 $\mu$ l	
<i>Taq</i>	1.25U/tube	5U/ $\mu$ l	0.25 $\mu$ l	
증류수	-	-	27.75 $\mu$ l	
전체량	-	-	50 $\mu$ l	



### 3) PCR 반응조건

- PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수	비고
초기 변성	95 °C	5 분	1 cycle	
변성 (denaturation)	95 °C	90 초	35 cycle	
결합 (annealing)	62 °C	60 초		
신장 (extension)	72 °C	1.5 분		
최종신장 (elongation)	72 °C	7 분	1 cycle	
보존	4 °C	-	-	

### 4) PCR 산물 확인

- PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5 $\mu$ l를 취하여 1.6% SeaKEM LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1 $\mu$ l/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

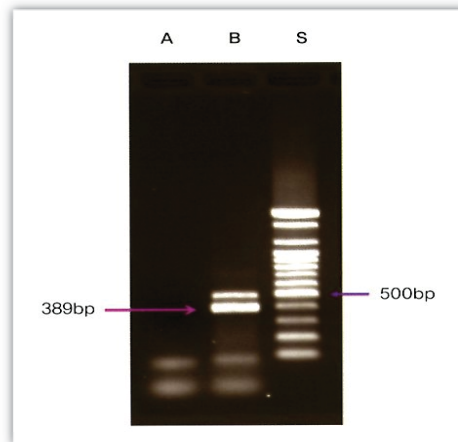


그림 1. *Salmonella* spp.에 특이적인 프라이머(salm)를 이용한 PCR 결과.  
 lane A : 음성대조군(no template), lane B : *S. Enteritidis* ATCC 13076,  
 lane S : 100 bp ladder.

## IV. 식중독균 시험법

### 나. Multiplex PCR법

#### 1) PCR을 위한 프라이머 염기서열

대 상 유전자	프라이머 염기서열 (5'→3')	산물크기 (bp)	비고
<i>ent</i>	TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG TGA ACT ACG TTC GTT CTT CTG G	304	<i>S. Enteritidis</i>
<i>typh</i>	TTG TTC ACT TTT TAC CCC TGA A CCC TGA CAG CCG TTA GAT ATT	401	<i>S. Typhimurium</i>
<i>had</i>	ACC GAG CCA ACG ATT ATC AA AAT AGG CCG AAA CAA CAT CG	502	<i>Sal. serogroup C2</i>

#### 2) PCR 반응액 조제

성 분	최종농도	Stock용액농도	1회용량	비고
완충액	1×	10 x	5μl	
MgCl <sub>2</sub>	2.5mM	25mM	5μl	
dNTPs	200μM	2.5mM	4μl	
프라이머(F)	100pmole/tube	100pmole/μl	3μl	각 1μl
프라이머(R)	100pmole/tube	100pmole/μl	3μl	각 1μl
주형DNA	25~50ng 또는 5μl	-	5μl	
<i>Taq</i>	1U/tube	5U/μl	0.2μl	
증류수	-	-	24.8μl	
전체량	-	-	50μl	

#### 3) PCR 반응조건

▶ PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구 분	온도	시간	cycle 수	비고
초기 변성	95 °C	2 분	1 cycle	
변성 (denaturation)	95 °C	1 분	30 cycle	
결합 (annealing)	57 °C	1 분		
신장 (extension)	72 °C	2 분		
최종신장 (elongation)	72 °C	5 분	1 cycle	
보존	4 °C	-	-	





#### 4) PCR 산물 확인

- PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5 $\mu$ l를 취하여 1.6% SeaKEM LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1 $\mu$ l/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

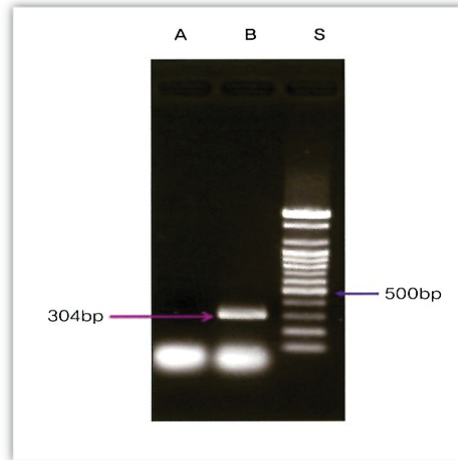


그림 2. *Salmonella* spp.에 특이적인 프라이머(ent, typh 및 had)를 이용한 multiplex PCR 결과.  
lane A : 음성대조군(no template), lane B : *S. Enteritidis* ATCC 13076,  
lane S : 100 bp ladder.

## 4-2. Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

### 나. Real-time PCR을 위한 프라이머와 프로브 염기서열

target gene	primer	Sequence	최종농도	용량
<i>ttr</i>	forward	CTC ACC AGG AGA TTA CAA CAT GG	300nM	2.5 $\mu$ l
	reverse	AGC TCA GAC CAA AAG TGA CCA TC	900nM	2.5 $\mu$ l
	probe	Cy3-CAC CGA CGG CGA GAC CGA CTT T-BHQ3	200nM	2.5 $\mu$ l

## IV. 식중독균 시험법

### 다. 프라이머 또는 프로브 준비

- 반응액 전체 용량이 25 $\mu$ l 이므로 주문된 primer 또는 probe를 각각의 최종 농도 300nM, 900nM, 200nM의 10배인 3 $\mu$ M, 9 $\mu$ M, 2 $\mu$ M로 희석하여 Working solution으로 -20 $^{\circ}$ C에 보관한다.

### 라. Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Universal Master mix	12.5 $\mu$ l
Forward Primer	2.5 $\mu$ l
Reverse primer	2.5 $\mu$ l
Probe	2.5 $\mu$ l
Sample(DNA)	5 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

※ 각 균의 Primer 및 Probe 염기서열과 농도는 식중독균별 Real-time PCR 시험법에 세부적으로 명시하였고, 모든 시료와 반응액은 얼음 중에서 실시

### 마. Real-time PCR 반응조건

1 cycle		40 cycle	
50 $^{\circ}$ C 2분	95 $^{\circ}$ C 10분	95 $^{\circ}$ C 15초	60 $^{\circ}$ C 60초

- F/R 프라이머 및 프로브를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 만든다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.
- 각각의 well에 반응액 20 $\mu$ l를 분주 한 후 추출 DNA 5 $\mu$ l 분주한다. 이 때 양성 대조군은 분석 대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 Prepman ultrareagent를 각각 동량 넣는다.
- Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 bubble이 남지 않도록 spin down 시킨다.
- 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.



## 바. Real-time PCR 결과 해석

- 1) 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- 2) 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정

## 4-3. Fast Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 2 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

### 나. Fast Real-time PCR을 위한 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence(5'→3')	최종농도	용량
invA	forward	GCG CGC GAA CGA CGA AGC GT	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	GGC GGG TCA TCC CCA CCG AA	500nM	
	probe	TCA AAG GTG ACG CCA TTG CCG GCA TCA	200nM	
his	forward	CAA GCG CGT CGG CGT GCT ACA	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	TCC CTT TCG GCG CCC AGT GC	500nM	
	probe	GGG GAC GAC GCA GGA GAC CTT CGG CA	200nM	
stn	forward	GCC CCA GGC CTG TCC CGT CA	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	CGA TTG GCC GCC AGG GAA CG	500nM	
	probe	TCG CCT CCA GCT GAT CCG GGG CGA	200nM	

### 다. 프라이머와 프로브 준비

- ④ 반응액 전체 용량이 9 $\mu$ l이므로 프라이머와 프로브를 각각 최종 농도 500nM, 200nM의 9배인 4.5 $\mu$ M, 1.8 $\mu$ M가 되게 희석한 후 이를 혼합하여 1 $\mu$ l 취해 Primer/Probe mixture로 사용한다.

## IV. 식중독균 시험법

### 라. Fast Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Master mix	5 $\mu$ l
TaqMan probe & primer mixture	1 $\mu$ l
DNase-RNase free water	1 $\mu$ l
Sample(DNA)	2 $\mu$ l
Total	9 $\mu$ l

※ 모든 시료와 반응액 준비는 Ice 또는 Ice block에서 실시하고, 반응액 조성 시 잘 혼합되도록 vortex하여 제조한다.

### 마. Real-time PCR 반응조건 및 시간(UltraFast Real-time PCR G2-4 system, Nanobiosys)

1 cycle	39 cycle		반응시간
95 $^{\circ}$ C 12초	95 $^{\circ}$ C 4초	56 $^{\circ}$ C 15초	약 20분

- 1) F/R 프라이머 및 프로브를 농도에 맞게 희석하여 반응액(Reaction mixture)을 제조한다. 실험 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수의 양을 제조한다.
- 2) PCR 튜브에 반응액 7 $\mu$ l와 샘플 DNA 2 $\mu$ l를 분주하여 잘 혼합해준다. 이 때 양성 대조군은 분석 대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 DNase-RNase free water를 각각 동량 넣는다.  
※ 양성대조군으로 ATCC 13076 등의 균주를 사용할 수 있다.
- 3) 각 혼합물을 칩(LabChip)의 각 채널(Channel)에 8 $\mu$ l씩 주입한다.  
※ 주입 시 팁(Tip)을 수직으로 세워 hole에 꼭 맞춰 주입하고 채널 내에 공기 방울(bubble)이 생기지 않도록 주의한다.
- 4) 준비된 칩을 Ultrafast Real-time PCR에 삽입하고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 데이터를 저장하고 반응을 시작한다.  
※ 기기의 사용법은 “사. Ultrafast Real-time PCR 사용법”에 따른다.

### 바. Real-time PCR 결과 해석

- 1) 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- 2) 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정



## 4-4. 식품공전 시험법(살모넬라)

### 중균 배양 (1차)

- 식품(검체) 25g 또는 25mL을 펩톤식염완충액(Buffered Peptone water) 225mL에 가하여 250mL로 만든 후 중균 배양(36±1℃, 18~24시간)

### 중균 배양 (2차)

- 중균 배양액 1 mL을 Tetrathionate 배지 10 mL에 접종함과 동시에 10 mL의 RV 배지 또는 RVS에 0.1 mL를 첨가하여 중균 배양(42±0.5℃, 20~24시간)

### 분리 배양

- 중균 배양액을 XLD Agar 및 BG Sulfa 한천배지(또는 Bismuth Sulfite 한천배지, Desoxycholate Citrate 한천배지, HE 한천배지, XLT4 한천배지)에 희선접종(36±1℃, 20~24시간)

XLD 한천배지



〈중심에 검은색무색집락〉

Desoxycholat Citrate 한천배지



〈무색 집락〉

- Bismuth sulfite 한천배지(중심이 검은 녹색집락), 균 집락이 명확한 경우와 의심스러운 집락을 보일 경우 보통한천배지에 희선 접종하여 아래 단계(생화학적 및 혈청학적 확인시험)를 실시

### 확인시험

#### I. 생화학적 시험

- TSI 사면배지에 고층부와 사면부 접종, 배양(35℃, 18~24시간)
  - 유당/서당 비분해(사면부 적색), 가스생성(균열 발생)

#### II. 혈청형 분석

- 생화학적 확인시험이 완료된 집락을 대상으로 H 혼합혈청과 O 혼합혈청을 사용한 응집반응을 수행하여 양성이면 *Salmonella*로 확인

\* 식품공전 시험법은 최신의 고시 방법에 따름

## IV. 식중독균 시험법

### ▶ 분리 및 확인 시험

② 식중독 원인조사에는 아래와 같은 배지, 키트 및 장비 등을 사용 할 수 있다.

#### ① 3M™ Petrifilm™ Salmonella Plates

- 성상 : 추정시험 → (+): Colony color-Brown, Colony Metabolism-Yellow zone or Gas Bubble/확정시험 → (+): Colony color-Green/Deepgreen/Blue /Black

추정시험



*Sal. dublin* NCCP 10860

확정시험 (Disc 삽입)



*Sal. dublin* NCCP 10860

#### ② IBISA®

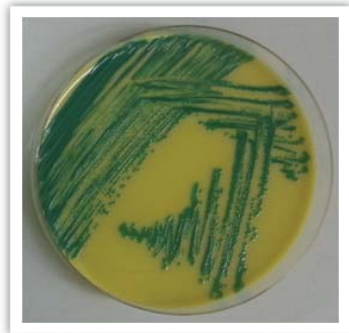
- 성상 : *Salmonella* → green / others → inhibited



*Salmonella* Typhimurium NCCP 10812



*Salmonella* Braenderup ATCC BAA-664

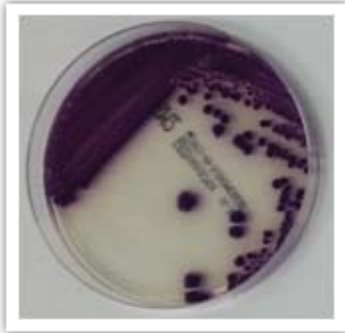


*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076



### ③ chromID™ Salmonella Agar

- 성장 : *Salmonella* → Pale pink to mauve / other → Pale blue to colourless



*Salmonella* Typhimurium NCCP  
10812



*Salmonella* Braenderup ATCC  
BAA-664



*Salmonella* Enteritidis ATCC  
13076

### ④ Rambach™ agar

- 성장 : *Salmonella* → red / *E.coli* → blue, small



*Salmonella* Typhimurium  
NCCP 10812



*Salmonella* Braenderup  
ATCC BAA-664



*Salmonella* Enteritidis  
ATCC 13076

## IV. 식중독균 시험법

### ⑤ CHROM agar™ Salmonella

- 성상 : *Salmonella* → mauve / others → blue, colourless, or inhibited



*Salmonella* Typhimurium  
NCCP 10812



*Salmonella* Braenderup ATCC  
BAA-664



*Salmonella* Enteritidis ATCC  
13076

### ⑥ Path-check Hygiene Pathogen Detection- *Salmonella* spp.

- 성상 : 검정색으로 변화



*Salmonella* Dublin-  
NCCP 12232



*Salmonella* heidelberg-  
NCCP 10322





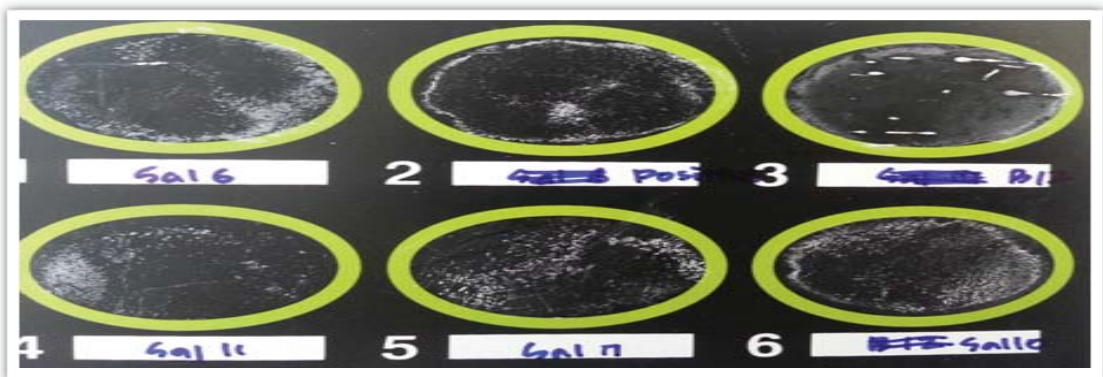
⑦ Reveal 2.0 for Salmonella

- 성상 : 두 줄 양성



⑧ Microgen Latex\_salmonella kit

- 성상 : 응집반응



⑨ ANSR - Salmonella

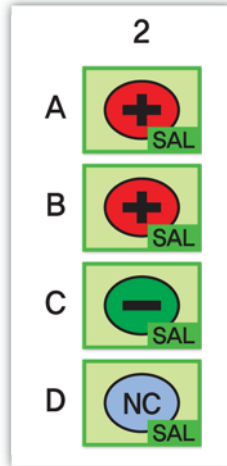
- 성상 : 그래프 확인



## IV. 식중독균 시험법

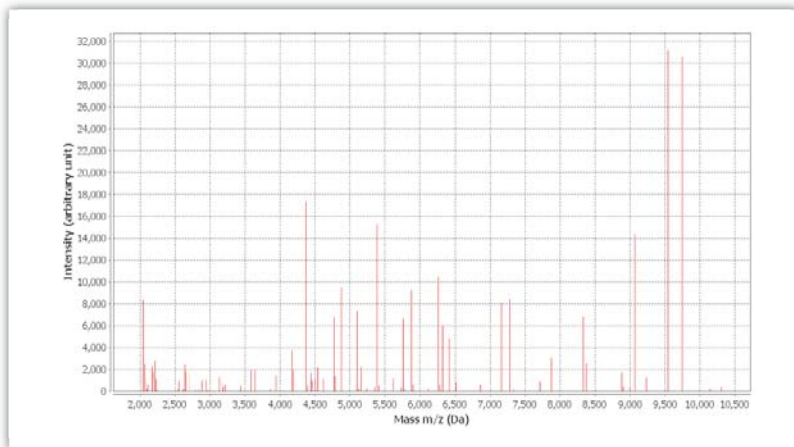
### ⑩ 3M Molecular Detection Assay Salmonella

- 성상 : 그래프 확인



### ⑪ Vitek MS

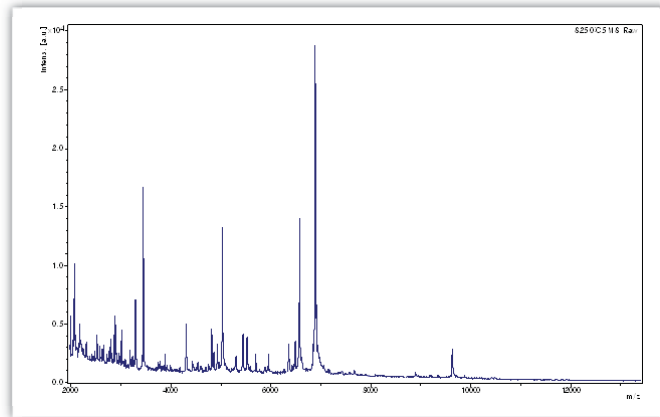
- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정



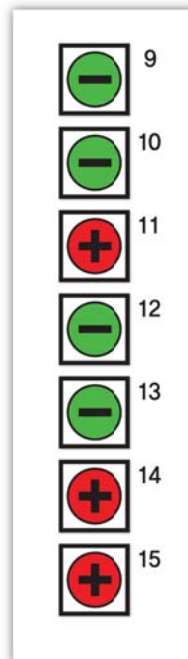


## ⑫ Biotyper

- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정



## ⑬ BAX<sup>®</sup> system



5.

장염비브리오 (*Vibrio parahaemolyticus*)

5-1. PCR을 사용한 유전자 확인법

가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

나. *toxR*(독소 오페론 조절 유전자) 유전자 검출을 위한 PCR법

- 1) PCR을 위한 프라이머 염기서열

대 상 유전자	프라이머 염기서열 (5'→3')	산물크기 (bp)
<i>toxR</i>	AGC CGC CTT TCT TCA GAC TC AAC GAG TCT TCT GCA TGG TG	399

- 2) PCR 반응액 조제

- ▶ PCR을 위한 반응액 조제는 총 50 $\mu$ l를 기준으로 조제하며 최종농도는 DNA polymerase(1 unit), 완충용액(1 $\times$ ), MgCl<sub>2</sub>(2.5mM), dNTPs(0.2mM), 프라이머(각 100pmole/tube), 주형 DNA(50ng 또는 5 $\mu$ l)되게 조제 후 사용한다.

- 3) PCR 반응조건

- ▶ PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수	비고
초기 변성	94 $^{\circ}$ C	5 분	1 cycle	
변성 (denaturation)	94 $^{\circ}$ C	1 분	20 cycle	
결합 (annealing)	55 $^{\circ}$ C	1.5 분		
신장 (extension)	72 $^{\circ}$ C	1 분		
최종신장 (elongation)	72 $^{\circ}$ C	10 분	1 cycle	
보존	4 $^{\circ}$ C	-	-	



#### 4) PCR 산물 확인

- PCR 반응후 최종산물의 확인은 반응액 5μl를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동후 EtBR로 염색(1μl/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

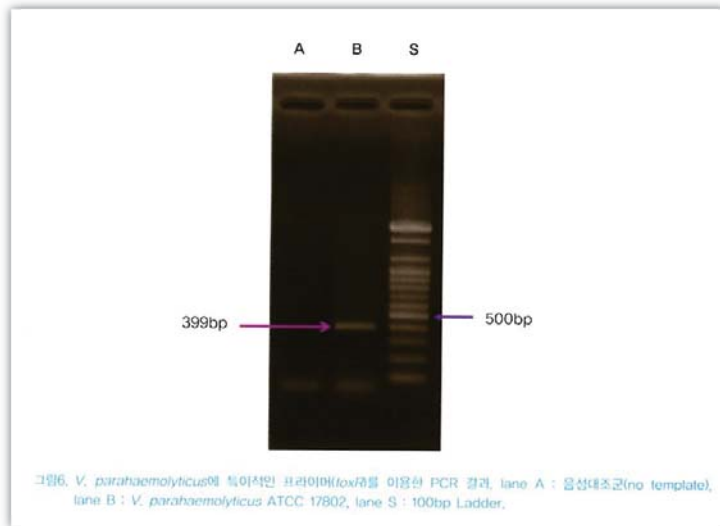


그림 1. *V. parahaemolyticus*에 특이적인 프라이머(toxR)를 이용한 PCR 결과  
 lane A : 음성대조군(no template),  
 lane B : *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, lane S : 100 bp ladder

### 다. tdh(thermostable direct hemolysin) 유전자 검출을 위한 PCR법

#### 1) PCR을 위한 프라이머 염기서열

대 상 유전자	프라이머 염기서열 (5'→3')	산물크기 (bp)	비고
<i>tdh</i>	TGG TTG ACA TCC TAC ATG ACT GTG GGG GAT CCC TCA GTA CAA AGC CTT	400	

#### 2) PCR 반응액 조제

- PCR을 위한 반응액 조제는 총 50μl를 기준으로 조제하며 최종농도는 DNA polymerase (1unit), 완충용액(1×), MgCl<sub>2</sub>(2.5mM), dNTPs(0.2mM), 프라이머, 주형DNA(50ng 또는 5μl) 되게 조제후 사용한다.

## IV. 식중독균 시험법

### 3) PCR 반응조건

▶ PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수	비고
초기 변성	94 ℃	5 분	1 cycle	
변성 (denaturation)	94 ℃	1 분	30 cycle	
결합 (annealing)	60 ℃	1 분		
신장 (extension)	72 ℃	1 분		
최종신장 (elongation)	72 ℃	10 분	1 cycle	
보존	4 ℃	-	-	

### 4) PCR 산물 확인

▶ PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5 $\mu$ l를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1 $\mu$ l/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

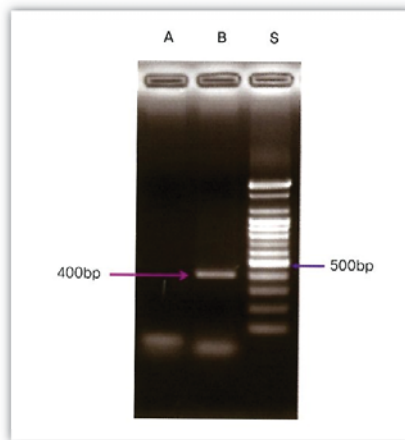


그림 2. *V. parahaemolyticus*에 특이적인 프라이머(*tdh*)를 이용한 PCR 결과  
 lane A : 음성대조군(no template),  
 lane B : *V. parahaemolyticus* ATCC 33844, lane S : 100 bp ladder



## 라. *trh*(thermostable-related hemolysin) 유전자 검출을 위한 PCR법

### 1) PCR을 위한 프라이머 염기서열

대 상 유전자	프라이머 염기서열 (5'→3')	산물크기 (bp)	비고
<i>trh</i>	GGC TCA AAA TGG TTA AGC G CAT TTC CGC TCT CAT ATG C	250	

### 2) PCR 반응액 조제

- PCR을 위한 반응액 조제는 총 50 $\mu$ l를 기준으로 조제하며 최종농도는 DNA polymerase (1unit), 완충용액(1 $\times$ ), MgCl<sub>2</sub>(2.5mM), dNTPs(0.2mM), 프라이머, 주형DNA(50ng 또는 5 $\mu$ l) 되게 조제 후 사용한다.

### 3) PCR 반응조건

- PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수	비고
초기 변성	94 °C	5 분	1 cycle	
변성 (denaturation)	94 °C	1 분	30 cycle	
결합 (annealing)	60 °C	1 분		
신장 (extension)	72 °C	1 분		
최종신장 (elongation)	72 °C	10 분	1 cycle	
보존	4 °C	-	-	

## IV. 식중독균 시험법

### 4) PCR 산물 확인

- ▶ PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5 $\mu$ l를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1 $\mu$ l/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

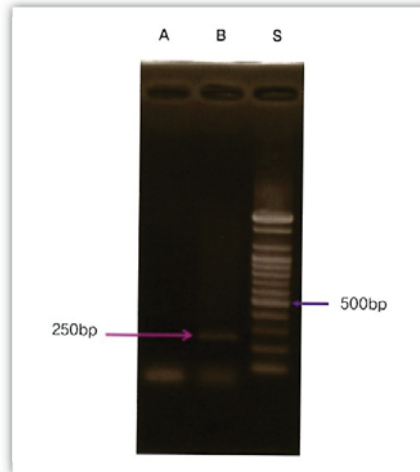


그림 3. *V. parahaemolyticus*에 특이적인 프라이머(*trh*)를 이용한 PCR 결과  
lane A : 음성대조군(no template),  
lane B : *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, lane S : 100 bp ladder

## 5-2. Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

### 나. Real-time PCR을 위한 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence	최종농도	용량
<i>toxR</i>	forward	GAG CCA GCT TCT GAT AAC AAT GAC	900nM	2.5 $\mu$ l
	reverse	CTT CTG GTT CAA CGA TTG CG	900nM	2.5 $\mu$ l
	probe	FAM TAC TAA TGA GGT AGA AAC GAT MGBNFQ	250nM	2.5 $\mu$ l





## 다. 프라이머 또는 프로브 준비

- 반응액 전체 용량이 25 $\mu$ l 이므로 주문된 프라이머 또는 프로브를 각각의 최종 농도 900nM, 250nM의 10배인 9 $\mu$ M, 2.5 $\mu$ M로 희석하여 Working solution으로 -20 $^{\circ}$ C에 보관한다.

## 라. Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Universal Master mix	12,5 $\mu$ l
Forward Primer	2,5 $\mu$ l
Reverse primer	2,5 $\mu$ l
Probe	2,5 $\mu$ l
Sample(DNA)	5 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

※ 각 균의 Primer 및 Probe 염기서열과 농도는 식중독균별 Real-time PCR 시험법에 세부적으로 명시하였고, 모든 시료와 반응액은 얼음 중에서 실시

## 마. Real-time PCR 반응조건

1 cycle		40 cycle	
50 $^{\circ}$ C 2분	95 $^{\circ}$ C 10분	95 $^{\circ}$ C 15초	60 $^{\circ}$ C 60초

- F/R 프라이머 및 프로브를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 만든다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.
- 각각의 well에 반응액 20 $\mu$ l를 분주 한 후 추출 DNA 5 $\mu$ l 분주한다. 이 때 양성 대조군은 분석 대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 Prepman ultrareagent를 각각 동량 넣는다.
- Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 bubble이 남지 않도록 spin down 시킨다.
- 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.

## IV. 식중독균 시험법

### 바. Real-time PCR 결과 해석

- 1) 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- 2) 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정

## 5-3. Fast Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 2 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

### 나. Fast Real-time PCR을 위한 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence(5'→3')	최종농도	용량
toxR	forward	TGC CAG ACG ATA CCG TAG GCC CG	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	CAG CCG TCG AGC CTT GTG CGA A	500nM	
	probe	GCC GAA TGG CGA TTA CAT TCG CGT GGC	200nM	
tdh	forward	GCC TTT GAG CTT CCA TCT GTC CC	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	CAT TGA CCG GTG CAT TGG TAT TAA A	500nM	
	probe	TTC CTG CCC CCG GTT CTG ATG AGA	200nM	
trh	forward	ACC ATG TTT CAA TCG TCG AGT TTC	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	GAA TCT CAA ACA AAA ATA GCC CAT GA	500nM	
	probe	CAC CTG AAT AAC GAC TCG CAA AAG CCG	200nM	
tlh	forward	TTC TGC GCC CGA AGA GCA CGG	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	CGG TGA GTT GCT GTT GTT GGA TGC G	500nM	
	probe	CAC GCA TTG CGC TCT GAG TGT GCA GCG	200nM	

### 다. 프라이머와 프로브 준비

- ① 반응액 전체 용량이 9 $\mu$ l이므로 프라이머와 프로브를 각각 최종 농도 500nM, 200nM의 9배인 4.5 $\mu$ M, 1.8 $\mu$ M가 되게 희석한 후 이를 혼합하여 1 $\mu$ l 취해 Primer/Probe mixture로 사용한다.



## 라. Fast Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Master mix	5 $\mu$ l
TaqMan probe & primer mixture	1 $\mu$ l
DNase-RNase free water	1 $\mu$ l
Sample(DNA)	2 $\mu$ l
Total	9 $\mu$ l

※ 모든 시료와 반응액 준비는 Ice 또는 Ice block에서 실시하고, 반응액 조성 시 잘 혼합되도록 vortex하여 제조한다.

## 마. Real-time PCR 반응조건 및 시간(UltraFast Real-time PCR G2-4 system, Nanobiosys)

1 cycle	39 cycle		반응시간
95°C 12초	95°C 4초	56°C 15초	약 20분

- 1) F/R 프라이머 및 프로브를 농도에 맞게 희석하여 반응액(Reaction mixture)을 제조한다. 실험 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수의 양을 제조한다.
- 2) PCR 튜브에 반응액 7 $\mu$ l와 샘플 DNA 2 $\mu$ l를 분주하여 잘 혼합해준다. 이 때 양성 대조군은 분석 대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 DNase-RNase free water를 각각 동량 넣는다.  
 ※ toxR, tdh, tlh 유전자에 대한 양성 대조군으로 ATCC 33846 균주 및 toxR, tlh, trh 유전자에 대한 양성 대조군으로 KCTC 2729 균주를 사용할 수 있다.
- 3) 각 혼합물을 칩(LabChip)의 각 채널(Channel)에 8 $\mu$ l씩 주입한다.  
 ※ 주입 시 팁(Tip)을 수직으로 세워 hole에 꼭 맞춰 주입하고 채널 내에 공기 방울(bubble)이 생기지 않도록 주의한다.
- 4) 준비된 칩을 Ultrafast Real-time PCR에 삽입하고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 데이터를 저장하고 반응을 시작한다.  
 ※ 기기의 사용법은 “황색포도상구균 1-3. Fast real-time PCR에 의한 유전자 확인법 사. Ultrafast Real-time PCR G2-4 system 사용법”에 따른다.

## 바. Real-time PCR 결과 해석

- 1) 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- 2) 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정

## IV. 식중독균 시험법

### 5-4. 식품공전 시험법(장염비브리오)

#### 증균 배양

- 식품(검체) 25g 또는 25mL을 취하여 225mL의 alkaline peptone water에 가하여 증균배양 (35~37°C, 18~24시간)

#### 분리 배양

- 증균배양액을 TCBS 한천배지에 접종(35~37°C, 18~24시간)

TCBS 한천배지



<청록색>

- 직경 2~4mm인 청록색의 서당 비분해 집락에 대하여 확인시험 실시

#### 확인시험

##### I. 생화학적 시험

- 분리 배양된 집락을 TSI사면배지, LIM 반유동배지, 2% NaCl을 첨가한 보통한천배지에 각각 접종, 배양(35°C, 18~24시간)
  - TSI사면배지 : 사면부가 적색(유당, 서당 비분해), 고층부는 황색(포도당 발효), 가스 비생성, 황화수소 비생성 (고층부가 흑색화되지 않음)
  - LIM배지 : Lysine Decarboxylase 양성, Indole 생성, 운동성 양성, Oxidase 시험 양성
- 위 시험에서 장염비브리오로 추정된 균은 0, 3, 8, 10% NaCl을 첨가한 Alkaline Peptone수에 의한 내염성 시험, VP시험, Mannitol 이용성시험, Arginine 및 Ornithine 분해시험, ONPG시험 등 실시
  - 0, 10% NaCl을 가한 Peptone수에서 발육 음성, 3, 8% NaCl을 가한 Peptone수에서 발육 양성, VP 음성, 만니톨에서 산생성 양성, Ornithine 분해 양성, Arginine 분해 음성, ONPG 시험 음성, 3% NaCl을 가한 Nutrient broth, 42°C에서 발육 양성 등 이면 *V. parahaemolyticus*로 확인

\* 식품공전 시험법은 최신의 고시 방법에 따름

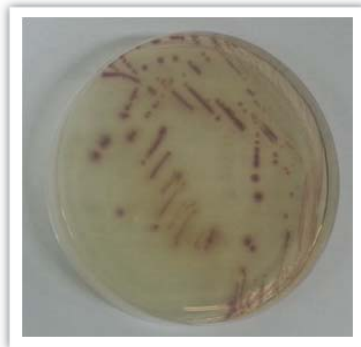


## ▶ 분리 및 확인 시험

④ 식중독 원인조사에는 아래와 같은 배지, 키트 및 장비 등을 사용 할 수 있다.

### ① CHROM agar™ Vibrio

- 성상 : *V. para* → mauve



*Vibrio parahaemolyticus*  
ATCC 10511



*Vibrio parahaemolyticus*  
ATCC 17802

### ② chromID™ Vibrio Agar

- 성상 : *V. para* → pink



*Vibrio parahaemolyticus*  
ATCC 10511

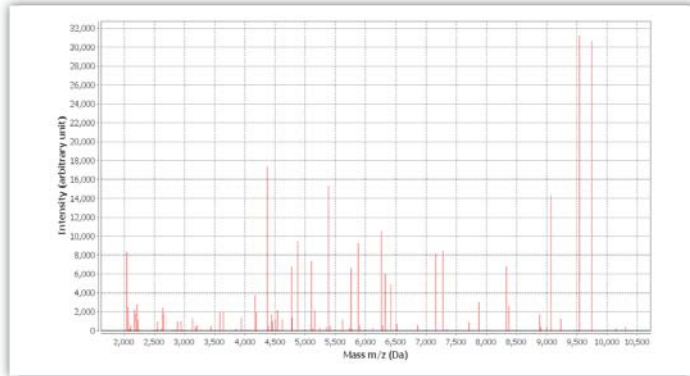


*Vibrio parahaemolyticus*  
ATCC 17802

## IV. 식중독균 시험법

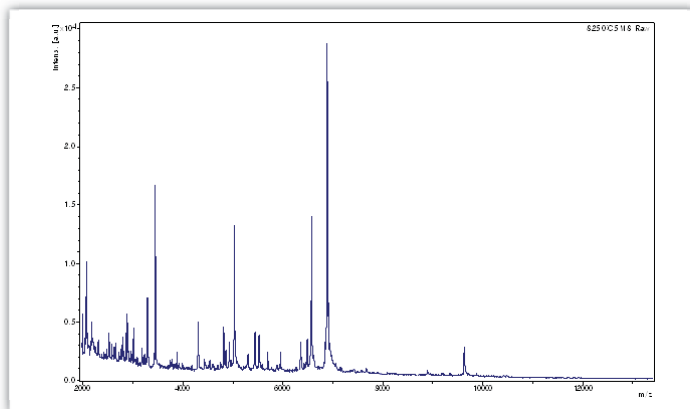
### ③ Vitek MS

- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정



### ④ Biotyper

- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정





## 6.

### 캠필로박터 제주니/콜리 (*Campylobacter jejuni / coli*)

#### 6-1. PCR에 의한 유전자 확인법

##### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200μl에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 10μl를 취하여 사용가능하다.

단, 시험균주는 5% citrated bovine blood를 함유하는 Mueller-Hinton 배지(MH-blood)에서 37°C, 11.5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하여 준비한다.

##### 나. PCR을 위한 프라이머 염기서열

구분	대 상 유전자		프라이머 염기서열 (5'→3')	산물크기 (bp)
<i>C. jejuni</i>	<i>cadF</i>	F R	TTG AAG GTA ATT TAG ATA TG CTA ATA CCT AAA GTT GAA AC	400
<i>C. coli</i>	<i>asp</i>	F R	GGT ATG ATT TCT ACA AAG CGA G ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG	500

##### 다. PCR 반응액 조제

- ▶ PCR을 위한 반응액 조제는 총 100μl를 기준으로 조제하며 최종농도는 DNA polymerase (2.5unit), 완충용액(1×), MgCl<sub>2</sub>(1.5mM), dNTPs(2mM), 프라이머, 주형DNA(50ng 또는 10μl) 되게 조제 후 사용한다.

## IV. 식중독균 시험법

### 라. PCR 반응조건

- PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수
초기 변성	94 °C	5 분	1 cycle
변성 (denaturation)	94 °C	1 분	30 cycle
결합 (annealing)	45°C( <i>C. jejuni</i> ), 60°C( <i>C. coli</i> )	1 분	
신장 (extension)	72 °C	3 분	
최종신장 (elongation)	72 °C	7 분	1 cycle
보존	4 °C	-	-

### 마. PCR 산물 확인

- PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 15μl를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1μl/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

## 6-2. Real time PCR 유전자 확인법

### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200μl에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5μl를 취하여 사용가능하다.

### 나. Real-time PCR을 위한 프라이머와 프로브 염기서열

- 캠필로박터 제주니

Target gene	Primer	Sequence(5'→3')	최종농도	용량
<i>mapA</i>	forward	CTG GTG GTT TTG AAG CAA AGA TT	300nM	2.5μl
	reverse	CAA TAC CAG TGT CTA AAG TGC GTT TAT	300nM	2.5μl
	probe	FAM-TTG AAT TCC AAC ATC GCT AAT GTA TAA AAG CCC TTT-TAMRA	250nM	2.5μl





## 2) 캠�필로박터 콜리

Target gene	Primer	Sequence(5'→3')	최종농도	용량
<i>ceuE</i>	forward	AAG CTC TTA TTG TTC TAA CCA ATT CTA ACA	300nM	2.5µl
	reverse	TCA TCC ACA GCA TTG ATT CCT AA	300nM	2.5µl
	probe	VIC-TTG GAC CTC AAT CTC GCT TTG GAA TCA TT-TAMRA	250nM	2.5µl

### 다. 프라이머 또는 프로브 준비

- ▶ 반응액 전체 용량이 25µl 이므로 주문된 primer 또는 probe를 각각의 최종 농도 900nM, 250nM의 10배인 9µM, 2.5µM로 희석하여 Working solution으로 -20°C에 보관한다.

### 라. Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Universal Master mix	12.5µl
Forward Primer	2.5µl
Reverse primer	2.5µl
Probe	2.5µl
Sample(DNA)	5µl
Total	25µl

※ 각 균의 Primer 및 Probe 염기서열과 농도는 식중독균별 Real-time PCR 시험법에 세부적으로 명시하였고, 모든 시료와 반응액은 얼음 중에서 실시

### 마. Real-time PCR 반응조건

1 cycle		40 cycle	
50°C 2분	95°C 10분	95°C 15초	60°C 60초

## IV. 식중독균 시험법

- 1) F/R 프라이머 및 프로브를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 만든다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.
- 2) 각각의 well에 반응액 20 $\mu$ l를 분주 한 후 추출 DNA 5 $\mu$ l 분주한다. 이 때 양성 대조균은 분석 대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조균은 Prepman ultrareagent를 각각 동량 넣는다.
- 3) Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 bubble이 남지 않도록 spin down 시킨다.
- 4) 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.

### 바. Real-time PCR 결과 해석

- 1) 음성대조균의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- 2) 음성대조균의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조균의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정



### 6-3. 식품공전 시험법(캠필로박터 제주니/콜리)

#### 증균배양(1차)

- 식품(검체) 25g 또는 25mL를 Supplement A가 첨가된 HUNT배지 또는 Bolton 배지 또는 Preston 배지 100mL에 넣고 균질화한 후 미호기적(5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) 상태에서 1차 증균배양(35~37°C, 4~5시간) · Supplement A : Sodium Cefoperazone 0.032g, Trimethoprim Lactate 0.015g, Vancomycin 0.01g, Amphotericin B 0.002g

#### 증균배양(2차)

- HUNT 배지를 사용할 경우 Cefoperazone 용액(0.8g/100mL) 0.4mL를 첨가하고 미호기적으로 2차 증균배양(42°C, 24~48시간), Bolton 배지 또는 Preston 배지는 미호기적으로 2차 증균배양(42°C, 24~48시간)
  - 단, 유제품의 경우에는 1차 증균시 Supplement B를 사용, 2차 증균시에는 rifampicin 용액 (0.125g/100mL) 0.4mL를 첨가하여 배양
  - Supplement B : Sodium Cefoperazone 0.032g, Trimethoprim Lactate 0.015g, Vancomycin 0.01g, Rifampicin 0.005g

#### 분리 배양

- 증균배양액을 modified Campy blood free 한천배지 또는 Abeyta-Hunt 한천배지 또는 Preston 한천배지 또는 CCA 한천배지 또는 BCA 한천배지에 접종하여 미호기적으로 암소에서 배양(42°C, 24~48시간)
  - Modified Campy blood free 한천배지에서 원형 또는 불규칙한 형태로서 반투명한 흰색 또는 투명한 집락, Abeyta-Hunt 한천배지상에서 무지개빛 광택 집락, CCA 및 BCA 한천배지에서는 불규칙한 가장자리를 가지고 점액이 있으며 회색인 평평한 집락(24~48시간 배양 후 용혈은 나타나지 않으며 분홍색이나 노란-회색집락이 나타나기도 한다), Preston 한천배지에서는 부드러운 모서리를 가진 불규칙한 원모양을 형성하는 반투명의 흰색집락(일부 균주는 황갈색 또는 약한 핑크색 집락을 형성)을 선별하여 항생제를 넣지 않은 Abeyta-Hunt 한천배지에 신속히 접종하여 배양(42°C, 24~48시간)

#### 확인시험

##### I. 생화학적 시험

- 배양된 집락을 취하여 암시아 또는 위상차 현미경으로 검경, 대비 염색하여 지그재그 모양 관찰
  - 대비염색은 10mL 식염수에 2방울의 crystal violet을 혼합한 용액을 이용
  - 특성확인 : catalase 및 oxidase 양성, hippurate분해 양성(캠필로박터 제주니) 또는 음성(캠필로박터 콜리), 황화수소 비생성(캠필로박터 제주니), Nalidixic acid 감수성, cephalothin 내성, 25°C에서 비생육, 42°C에서 생육 등

\* 식품공전 시험법은 최신의 고시 방법에 따름

## IV. 식중독균 시험법

### ▶ 분리 및 확인 시험

⑥ 식중독 원인조사에는 아래와 같은 배지, 키트 및 장비 등을 사용 할 수 있다.

#### ① CASA

- 성상 : 붉은색 집락



*Camphylobacrer jejuni* ATCC 43486

#### ② Campy food agar

- 성상 : 짙은 붉은색 혹은 오렌지색 집락

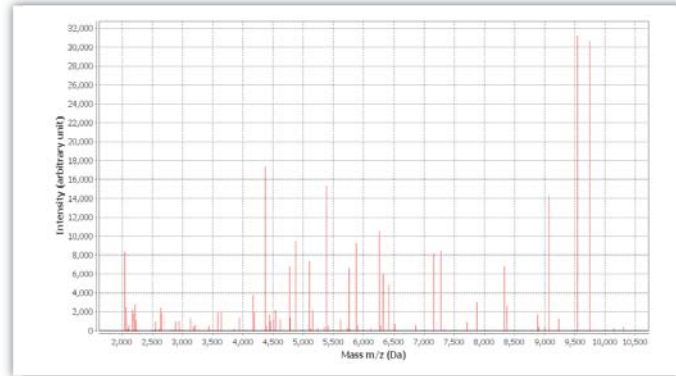


*Camphylobacrer jejuni* ATCC 43486



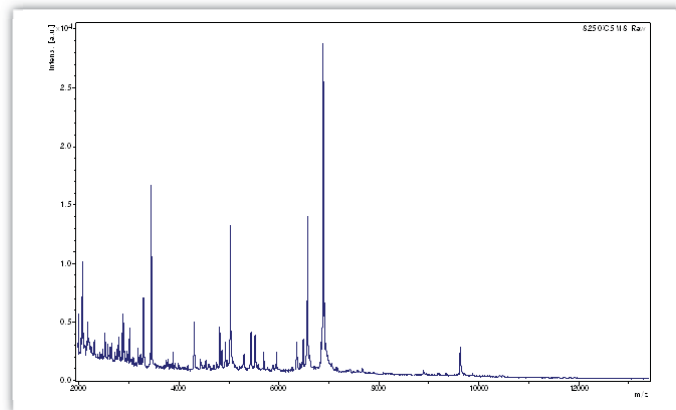
### ③ Vitek MS

- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정



### ④ Biotyper

- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정



7.

클로스트리디움 퍼프린젠스 (*Clostridium perfringens*)

7-1. PCR에 의한 유전자 확인법

가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 30μl의 lysis buffer(10mM Tris HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 10μg/mL proteinase K)에 현탁하고 65℃에서 15분, 80℃에서 15분 가열한 후, 4℃에서 14,000g로 10분간 원심분리하여 상층액 10μl를 90μl의 증류수에 가하여 주형유전자로 사용가능하다.

나. cpe 유전자 확인을 위한 PCR법

1) 프라이머 염기서열

대상유전자	프라이머 염기서열(5'→3')	산물크기(bp)
<i>cpe</i>	ATC CAA TGG TGT TCG AAA AT ATT TCC TAA GCT ATC TGC AG	500

2) PCR 반응액 조제

- ▶ PCR을 위한 반응액 조제는 총 50μl를 기준으로 조제하며 최종농도는 Taq DNA polymerase (2.5 unit), 완충용액(1×), MgCl<sub>2</sub>(2mM), dNTPs(0.2mM), 프라이머, 주형DNA(50ng 또는 10μl) 되게 조제 후 사용한다.

3) PCR 반응조건

- ▶ PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수
초기 변성	95 ℃	5 분	1 cycle
변성 (denaturation)	95 ℃	30 초	30 cycle
결합 (annealing)	50 ℃	30 초	
신장 (extension)	72 ℃	1 분	
최종신장 (elongation)	72 ℃	10 분	1 cycle
보존	4 ℃	-	-



#### 4) PCR 산물 확인

- PCR 반응후 최종산물의 확인은 반응액 5 $\mu$ l를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1 $\mu$ l/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.



그림 1. *C. perfringens*에 특이적인 프라이머(cpe)를 이용한 PCR 결과.

- lane A : 음성대조군(no template),
- lane B : *C. perfringens* ATCC 3624(Enterotoxin 비생성주),
- lane C : *C. perfringens* ATCC 13124(Enterotoxin 비생성주),
- lane D : *C. perfringens* ATCC 14810(Enterotoxin 생성주),
- lane S : 100 bp ladder

### 다. cpa 유전자 확인을 위한 PCR법

#### 1) 프라이머 염기서열

대상 유전자	프라이머 염기서열 (5'→3')	산물크기 (bp)
<i>cpa</i>	TGC TAA TGT TAC TGC CGT TGA TAG ATA ATC CCA ATC ATC CCA ACT ATG	247

#### 2) PCR 반응액 조제

- PCR을 위한 반응액 조제는 총 50 $\mu$ l를 기준으로 조제하며 최종농도는 Taq DNA polymerase (2.5unit), 완충용액(1 $\times$ ), MgCl<sub>2</sub>(2mM), dNTPs(0.2mM), 프라이머, 주형 DNA(50ng 또는 10 $\mu$ l)되게 조제 후 사용한다.

## IV. 식중독균 시험법

### 3) PCR 반응조건

- PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수
초기 변성	95 °C	5 분	1 cycle
변성 (denaturation)	95 °C	30 초	30 cycle
결합 (annealing)	50 °C	30 초	
신장 (extension)	72 °C	30 초	
최종신장 (elongation)	72 °C	10 분	1 cycle
보존	4 °C	-	-

### 2) PCR 산물 확인

- PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5 $\mu$ l를 취하여 1.6% SeaKEM LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1 $\mu$ l/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

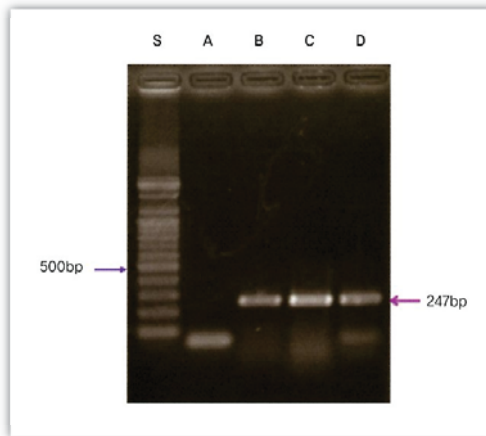


그림 2. *C. perfringens*에 특이적인 프라이머(*cpa*)를 이용한 PCR 결과.

lane A : 음성대조군(no template), lane B : *C. perfringens* ATCC 3624,  
 lane C : *C. perfringens* ATCC 13124, lane D : *C. perfringens* ATCC 14810,  
 lane S : 100 bp ladder





## 7-2. Real time PCR에 의한 유전자 확인법

### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

### 나. Real-time PCR을 위한 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence	최종농도	용량
<i>cpa</i>	forward	AAA AGA AAG ATT TGT AAG GCG CTT AT	900nM	2.5 $\mu$ l
	reverse	CCC AAG CGT AGA CTT TAG TTG ATG	900nM	2.5 $\mu$ l
	probe	FAM TGC CGC GCT AGC AAC TAG CCT ATG G TAMRA	250nM	2.5 $\mu$ l

### 다. 프라이머 또는 프로브 준비

- ① 반응액 전체 용량이 25 $\mu$ l이므로 주문된 primer 또는 probe를 각각의 최종농도 900nM, 250nM의 10배인 9 $\mu$ M, 2.5 $\mu$ M로 희석하여 Working solution으로 -20 $^{\circ}$ C에 보관한다.

### 라. Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Universal Master mix	12.5 $\mu$ l
Forward Primer	2.5 $\mu$ l
Reverse primer	2.5 $\mu$ l
Probe	2.5 $\mu$ l
Sample(DNA)	5 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

※ 각 균의 Primer 및 Probe 서열과 농도는 식중독균별 Real-time PCR 시험법에 세부적으로 명시하였고, 모든 시료와 반응액은 얼음 중에서 실시

## IV. 식중독균 시험법

### 마. Real-time PCR 반응조건

1 cycle		40 cycle	
50°C 2분	95°C 10분	95°C 15초	60°C 60초

- 1) F/R 프라이머 및 프로브를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 만든다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.
- 2) 각각의 well에 반응액 20 $\mu$ l를 분주 한 후 추출 DNA 5 $\mu$ l 분주한다. 이 때 양성 대조균은 분석 대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조균은 Prepman ultrareagent를 각각 동량 넣는다.
- 3) Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 bubble이 남지 않도록 spin down 시킨다.
- 4) 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.

### 바. Real-time PCR 결과 해석

- 1) 음성대조균의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- 2) 음성대조균의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조균의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정

## 7-3. Fast Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 2 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.



#### 나. Fast Real-time PCR을 위한 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence(5'→3')	최종농도	용량
cpa	forward	AAG GCG CTT ATT TGT GCT GCG	500nM	1μl
	reverse	CAT CAA TTT TTC CAT CCC AAG CG	500nM	
	probe	CGA ACT AGC CTA TGG GCT GGG GCA	200nM	
cpb	forward	AGT TAA AAT GGA GCG TGA AAG AAA CTG	500nM	1μl
	reverse	TGG GGT ATC AAA AGC TAG CCT GG	500nM	
	probe	TGG AAT GGT GCT AAC TGG GTA GGA CAA	200nM	
cpe	forward	TCC AAT GGT GTT CGA AAA TGC TAA A	500nM	1μl
	reverse	TGG CTA AAG GTA CCT GTT TCA TTA GGA	500nM	
	probe	GGA GAT GGT TGG ATA TTA GGG GAA CCC	200nM	

#### 다. 프라이머와 프로브 준비

- ▶ 반응액 전체 용량이 9μl이므로 프라이머와 프로브를 각각 최종 농도 500nM, 200nM의 9배인 4.5μM, 1.8μM가 되게 희석한 후 이를 혼합하여 1μl 취해 Primer/Probe mixture로 사용한다.

#### 라. Fast Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Master mix	5μl
TaqMan probe & primer mixture	1μl
DNase-RNase free water	1μl
Sample(DNA)	2μl
Total	9μl

※ 모든 시료와 반응액 준비는 Ice 또는 Ice block에서 실시하고, 반응액 조성 시 잘 혼합되도록 vortex 하여 제조한다.

## IV. 식중독균 시험법

### 마. Real-time PCR 반응조건 및 시간(UltraFast Real-time PCR G2-4 system, Nanobiosys)

1 cycle	39 cycle		반응시간
95°C 12초	95°C 4초	56°C 15초	약 20분

- 1) F/R 프라이머 및 프로브를 농도에 맞게 희석하여 반응액(Reaction mixture)을 제조한다. 실험 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수의 양을 제조한다.
- 2) PCR 튜브에 반응액 7μl와 샘플 DNA 2μl를 분주하여 잘 혼합해준다. 이 때 양성 대조균은 분석 대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조균은 DNase-RNase free water를 각각 동량 넣는다.
  - ※ cpa, cpb 유전자에 대한 양성 대조균으로 KCCM 40947 균주 및 cpa, cpe 유전자에 대한 양성 대조균으로 KCTC 5101 균주를 사용할 수 있다.
- 3) 각 혼합물을 칩(LabChip)의 각 채널(Channel)에 8μl씩 주입한다.
  - ※ 주입 시 팁(Tip)을 수직으로 세워 hole에 꼭 맞춰 주입하고 채널 내에 공기 방울(bubble)이 생기지 않도록 주의한다.
- 4) 준비된 칩을 Ultrafast Real-time PCR에 삽입하고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 데이터를 저장하고 반응을 시작한다.
  - ※ 기기의 사용법은 “황색포도상구균 1-3, Fast real-time PCR에 의한 유전자 확인법 사. Ultrafast Real-time PCR G2-4 system 사용법”에 따른다.

### 바. Real-time PCR 결과 해석

- 1) 음성대조균의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- 2) 음성대조균의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조균의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정



## 7-4. 식품공전 시험법(클로스트리디움 퍼프린젠스)

### 중균 배양

- 식품(검체) 25g 또는 25mL을 멸균생리식염수 225mL에 가하여 250mL로 균질화하여 시험용액을 제조하고 Cooked Meat Medium의 배지 아래 부분에 접종(35~37°C, 18~24시간, 혐기상태)

### 분리 배양

- 난황첨가 Clostridium perfringens 한천배지(카나마이신 200µg/mL) 또는 난황첨가 TSC 한천배지에 증균액을 도말(35°C, 18~24시간, 혐기상태)
  - 직경 2mm정도의 약간 동기된 유향색으로 주변에 혼탁한 백색환이 있는 집락 선발

### 확인 시험

#### I. 생화학적 시험

- 전형적인 집락을 보통한천배지에 배양(37°C, 18~24시간, 혐기상태)
  - 특성확인 : 그람염색 Gram(+) 간균
  - 보통한천배지에 배양(37°C, 18~24시간, 호기상태)하여 비발육 확인
- Glucose, lactose, inositol, raffinose를 1% 가한 4종의 GAM 당분해용 반유동배지에 옮겨 37°C, 3일간 배양후 BTB-MR 지시약을 가해 붉은색으로 변하는 것을 양성으로 판정
- GAM당분해용 반유동배지에서 37°C에서 1~2일간 배양 후 운동성 확인
- Lecithinase 억제시험
- 난황 포함된 TSC배지에서의 투명한 환을 가지는 황회색 집락 확인 등

TSC 배지(난황 미첨가)



〈검은색〉

\* 식품공전 시험법은 최신의 고시 방법에 따름

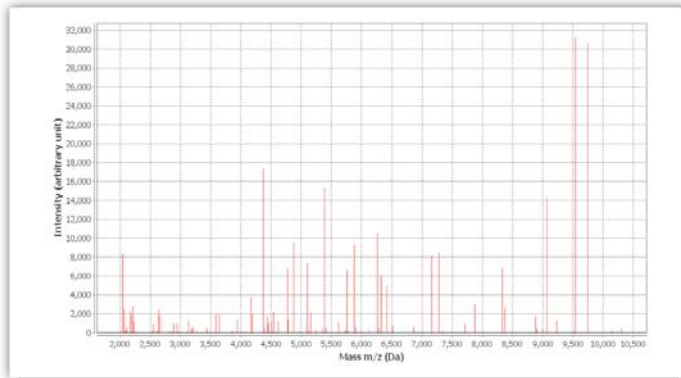
## IV. 식중독균 시험법

### ▶ 분리 및 확인 시험

① 식중독 원인조사에는 아래와 같은 배지, 키트 및 장비 등을 사용 할 수 있다.

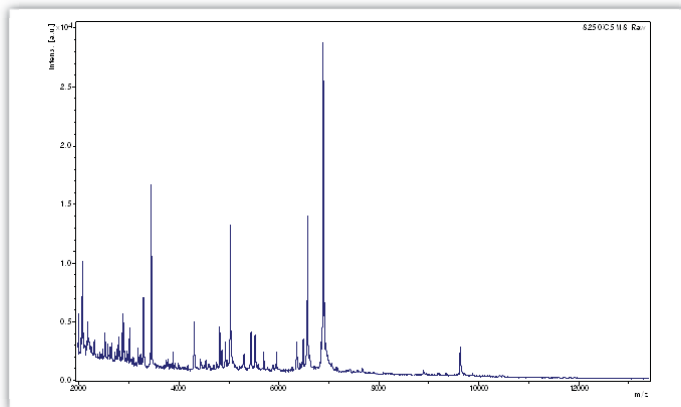
#### ① Vitek MS

- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정

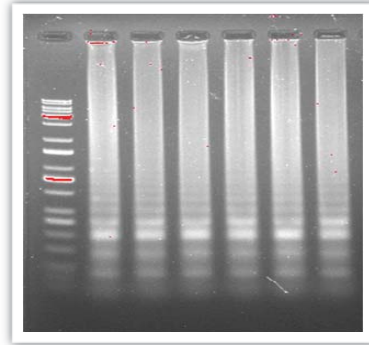
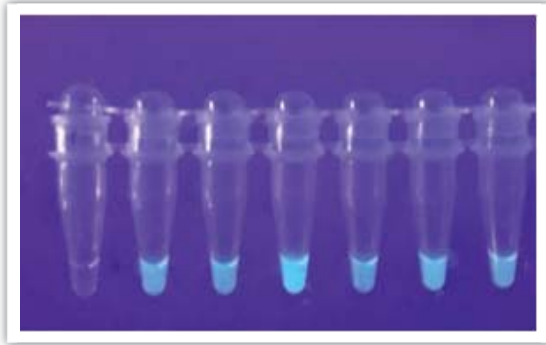


#### ② Biotyper

- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정



### ③ 등온증폭법



1. Negative control; 2. *C. perfringens* ATCC 3629; 3. CP wild type 1, 4. CP wild type 2;  
5. CP wild type 3; 6. CP wild type 4; 7. CP wide type 5

8.

여시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*)

8-1. PCR에 의한 유전자 확인법

가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200μl에 현탁 후 10분간 끓인 후 원심분리하여 상층액 5μl를 취하여 사용가능하다.

나. 여시니아 엔테로콜리티카 확인을 위한 프라이머 염기서열

대 상 유전자	프라이머 염기서열 (5'→3')	산물크기 (bp)
<i>ail</i>	TAA TGT GTA CGC TGC GAG GAC GTC TTA CTT GCA CTG	351
<i>ystA</i>	ATC GAC ACC AAT AAC CGC TGA G CCA ATC ACT ACT GAC TTC GGC T	79
<i>ystB</i>	GTA CAT TAG GCC AAG AGA CG GCA ACA TAC CTC ACA ACA CC	146

※ *ail*(흡착관련 유전자), *ystA*(내열성 엔테로 독소), *ystB*(biotype 1A 균주의 엔테로 독소)

다. PCR 반응액 조제

- ① PCR을 위한 반응액 조제는 총 50μl를 기준으로 조제하며 최종농도는 DNA polymerase (1.25unit), 완충용액(1×), MgCl<sub>2</sub>(3mM), dNTPs(0.2mM), 프라이머, 주형DNA(50ng 또는 5μl), 2% Tween 20되게 조제 후 사용한다.





## 라. PCR 반응조건

PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수
초기 변성	95 °C	10 분	1 cycle
변성 (denaturation)	95 °C	15 초	25 cycle
결합 (annealing)	57 °C	30 초	
신장 (extension)	72 °C	30 초	
최종신장 (elongation)	72 °C	10 분	1 cycle
보존	4 °C	-	-

※ 단, *ystA* 및 *ystB*의 경우 결합 (annealing)은 61°C에서 수행함

## 마. PCR 산물 확인

PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5μl를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1μg/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

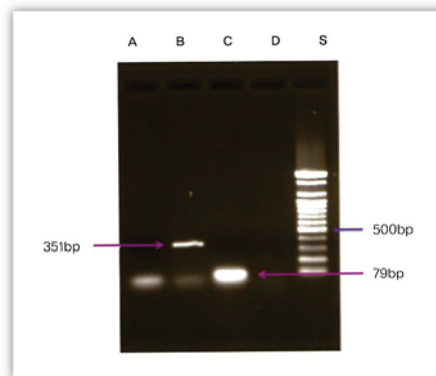


그림 1. *Y. enterocolitica*에 특이적인 프라이머를 이용한 PCR 결과.  
 (사용균주 *Y. enterocolitica* ATCC 23715) lane A : 음성대조군(no template),  
 lane B~D : *ail*, *ystA* 및 *ystB*, lane S : 100 bp ladder

## 8-2. Real time PCR에 의한 유전자 확인법

### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

### 나. 여시니아 엔테로콜리티카 16S rRNA 유전자 확인을 위한 Real-time PCR법

#### 1) 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence	최종농도	용량
16s rRNA	forward	CGG CAG CGG GAA GTA GTT T	900nM	2.5 $\mu$ l
	reverse	GCC ATT ACC CCA CCT ACT AGC TAA	900nM	2.5 $\mu$ l
	probe	FAM-AAG GTC CCC CAC TTT GGT CCG AAG -TAMRA	250nM	2.5 $\mu$ l

#### 2) 프라이머 또는 프로브 준비

- ④ 반응액 전체 용량이 25 $\mu$ l 이므로 주문된 프라이머 또는 프로브를 각각의 최종농도 900nM, 250nM의 10배인 9 $\mu$ M, 2.5 $\mu$ M로 희석하여 Working solution으로 -20 $^{\circ}$ C에 보관한다.

#### 3) Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Universal Master mix	12.5 $\mu$ l
Forward Primer	2.5 $\mu$ l
Reverse primer	2.5 $\mu$ l
Probe	2.5 $\mu$ l
Sample(DNA)	5 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

※ 각 균의 Primer 및 Probe 서열과 농도는 식중독균별 Real-time PCR 시험법에 세부적으로 명시하였고, 모든 시료와 반응액은 얼음 중에서 실시



#### 4) Real-time PCR 반응조건

1 cycle		40 cycle	
50°C 2분	95°C 10분	95°C 15초	60°C 60초

- ① F/R 프라이머 및 프로브를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 만든다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.
- ② 각각의 well에 반응액 20 $\mu$ l를 분주 한 후 추출 DNA 5 $\mu$ l 분주한다. 이 때 양성 대조군은 분석 대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 Prepman ultrareagent를 각각 동량 넣는다.
- ③ Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 bubble이 남지 않도록 spin down 시킨다.
- ④ 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.

#### 5) Real-time PCR 결과 해석

- ① 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- ② 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정

### 다. 여시니아 엔테로콜리티카 ail 유전자 확인을 위한 real-time PCR법

#### 1) 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence(5'→3')	PCR 산물 크기
ail	forward_YE	ATGATAACTGGGGAGTAATAGGTTTCG	163bp
	reverse_YE	CCCAGTAATCCATAAAGGCTAACATAT	
	Probe_YE	FAM-TCTATGGCAGTAATAAGTTTGGTCACGGTGATCT-TAMRA	

## IV. 식중독균 시험법

### 2) Real-time PCR 반응액 조성

구성성분(Stock 농도)	최종농도	용량(μl)
10×TaqMan buffer A	1×	2.5
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	3.5 mmol/L	3.5
dNTPs(50 mmol/L)	200 μmol/L	0.1
AmpliTaqGold(5 U/μl)	0.02 U/μl	0.25
Forward Primer(10 μmol/L)	300 nmol/L	0.75
Reverse Primer(10 μmol/L)	300 nmol/L	0.75
Probe(20 μmol/L)	200 nmol/L	0.25
Sample(DNA)		5
DNase free water		11.9
Total		25

※ 모든 시료와 반응액 준비는 Ice 또는 Ice cooler에서 실시하고, 반응액 조성 시 잘 혼합되도록 vortex한다.

### 3) Real-time PCR 반응조건

1 cycle	45 cycle	
95°C 10분	95°C 15초	60°C 1분

- ① F/R 프라이머 및 프로브를 농도에 맞게 희석하여 반응액(Reaction mixture)을 제조한다. 실험 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수의 양을 제조한다.
- ② PCR 튜브에 반응액 20μl와 샘플 DNA 5μl를 분주하여 잘 혼합해준다. 이 때 양성 대조군은 분석대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 DNase free water를 각각 동량 넣는다.
- ③ Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 bubble 남지 않도록 spin down 시킨다.
- ④ 준비된 well plate에 real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.



#### 4) Real-time PCR 결과 해석

- ① 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- ② 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정

[참고] 여시니아 슈도튜버쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*)

#### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200μl에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 5μl를 취하여 사용가능하다.

#### 나. 여시니아 슈도튜버쿨로시스 ail 유전자 확인을 위한 Real-time PCR법

##### 1) 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence(5'→3')	PCR 산물 크기
ail	forward_YP	CGTCTGTTAATGTGTATGCCGAAG	157bp
	reverse_YP	GAACCTATCACTCCCCAGTCATTATT	
	Probe_YP	VIC-CGTGTCAAGGACGATGGGTACAAGTTGG-T AMRA	

##### 2) Real-time PCR 반응액 조성

구성성분(Stock 농도)	최종농도	용량(μl)
TaqMan 2×Universal PCR	1×	12.5
Forward Primer(10 μmol/L)	300 nmol/L	0.75
Reverse Primer(10 μmol/L)	300 nmol/L	0.75
Probe(20 μmol/L)	200 nmol/L	0.25
Sample(DNA)		5
DNase free water		5.75
Total		25

※ 모든 시료와 반응액 준비는 Ice 또는 Ice cooler에서 실시하고, 반응액 조성 시 잘 혼합되도록 vortex한다.

## IV. 식중독균 시험법

### 3) Real-time PCR 반응조건

1 cycle	45 cycle	
95°C 10분	95°C 15초	60°C 1분

- ① F/R 프라이머 및 프로브를 농도에 맞게 희석하여 반응액(Reaction mixture)을 제조한다. 실험 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수의 양을 제조한다.
- ② PCR 튜브에 반응액 20 $\mu$ l와 샘플 DNA 5 $\mu$ l를 분주하여 잘 혼합해준다. 이 때 양성 대조군은 분석대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 DNase free water를 각각 동량 넣는다.
- ③ Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 bubble 남지 않도록 spin down 시킨다.
- ④ 준비된 well plate에 real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.

### 4) Real-time PCR 결과 해석

- ① 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- ② 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정



### 8-3. 식품공전 시험법(여시니아 엔테로콜리티카)

#### 중균배양

- 식품(검체) 25g 또는 25mL을 취하여 225mL의 PSBB 배지에 가한 후 배양(10°C, 10일)

#### 분리 배양

- 중균배양액 0.1mL를 0.5% KOH가 함유된 0.5% 식염수 1mL에 가하여 수초간 섞은 후 MacConkey 한천배지와 CIN 한천배지에 각각 접종하여 배양(30°C, 24시간)

MacConkey 한천배지



〈무색집락〉

CIN 한천배지



〈무색집락, 가운데 짙은 분홍색의 침전물〉

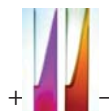
- MacConkey 한천배지에서 유당을 비분해하는 집락, CIN배지에서 중심부가 짙은 적색을 보이는 집락을 골라 각각 TSI 사면배지의 사면과 고층부에 접종

#### 확인시험

##### I. 생화학적 시험

- TSI 사면배지의 고층부와 사면이 노랑고 gas와 황화수소 발생하지 않은 균주를 선택하여 25°C, 37°C에서 운동성 시험 및 urea, citrate시험
  - 37°C(비 운동성), 25°C(운동성)
  - Urea시험 양성, Citrate시험 음성, 그람음성 간균일 때 양성으로 판정

Urease 시험



〈양성〉

그람염색



〈그람음성의 간균〉

\* 식품공전 시험법은 최신의 고시 방법에 따름

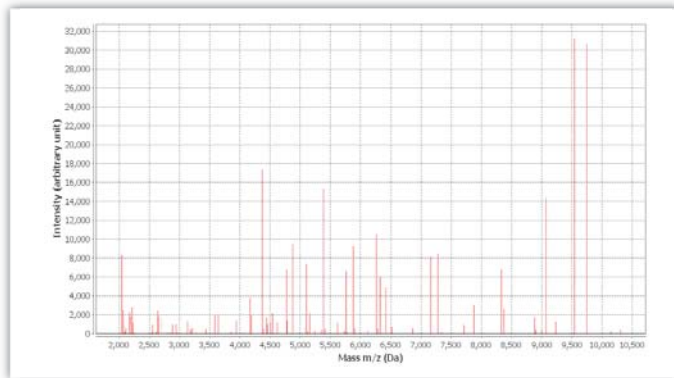
## IV. 식중독균 시험법

### ▶ 분리 및 확인 시험

④ 식중독 원인조사에는 아래와 같은 배지, 키트 및 장비 등을 사용 할 수 있다.

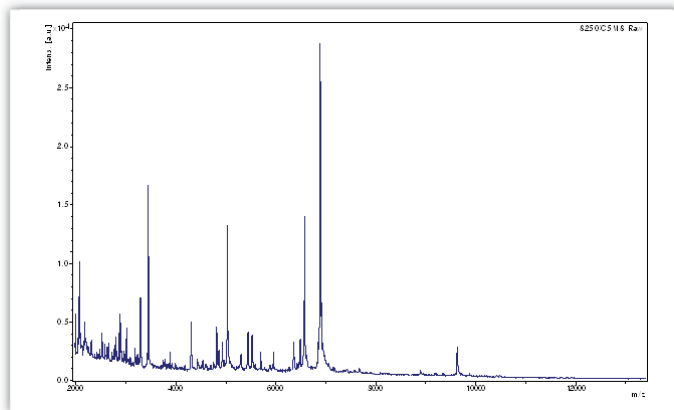
#### ① Vitek MS

– 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정



#### ② Biotyper

– 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정







## 9.

# 병원성 대장균 (Pathogenic *Escherichia coli*)

## 9-1. 시험방법

- 병원성대장균 검출은 배양을 통한 분리동정법을 원칙으로 하고 신속하게 검출하기 위하여 공인된 kit를 이용한 PCR법 등을 병행할 수도 있다. 신속선별시험 시료는 식중독원인규명 절차의 신속성과 검체의 효율적 활용을 위하여 통합 증균배양액(TSB 배지)을 검체로 하여 수행하고 병원성인자(VT1, VT2, heat-stable toxin, heat-labile toxin, intimin, invasive plasmid antigen 등)의 유전자가 확인되었을 경우 아래의 분리배양 과정을 진행한다.

### 가. 장출혈성대장균

본 시험법은 대장균 O157:H7과 대장균 O157:H7이 아닌 베로독소 생성 대장균(VTEC)을 모두 검출하는 시험법이다. 장출혈성대장균의 낮은 최소감염량을 고려하여 검출 민감도 증가와 신속 검사를 위한 스크리닝 목적으로 증균 배양 후 배양액(1~2 mL)에서 베로독소 유전자 확인시험을 우선 실시한다. 베로독소(VT1 그리고/또는 VT2) 유전자가 확인되지 않을 경우 불검출로 판정할 수 있으나, 베로독소 유전자가 확인된 경우에는 반드시 순수 분리하여 분리된 균의 베로독소 유전자 보유 유무를 재확인한다. 베로독소가 확인된 집락에 대하여 생화학적 검사를 통하여 대장균으로 동정된 경우 장출혈성대장균으로 판정한다.

#### 1) 증균배양

검체 25g 또는 25ml을 취하여 225ml의 mTSB(novobiosin 8 $\mu$ g/mL)에 가한 후 37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C에서 24 $\pm$ 2 시간 증균배양한다.

#### 2) 분리배양

증균배양액을 CT-SMAC과 BCIG 한천배지에 각각 접종하여 36 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C에서 18~24시간 배양한다. 배양 결과 CT-SMAC에서 Sorbitol을 분해하지 않는 무색투명한 집락, BCIG 한천배지에서 청록색 집락을 전형적 집락으로 판단한다.

## IV. 식중독균 시험법

### 3) 확인시험

장출혈성대장균의 전형적인 집락 5개 이상을 취하여 보통한천배지에 도말하여 37±1℃에서 18~24시간 배양한 후 집락에 대하여 다음의 베로독소 유전자 PCR 확인 시험을 수행한 후 베로독소 양성 집락을 대상으로 그람음성간균을 확인하고 생화학시험을 실시하여 대장균으로 확인된 경우 장출혈성대장균으로 판정한다.

### 4) 베로독소 유전자 확인시험

베로독소 유전자는 다음의 PCR법에 따라 수행한다.

#### ① 주형유전자 준비

전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 100 µl에 현탁한 후, 10분간 끓여 원심분리하고, 상층액 10 µl를 취하여 시료로 사용한다.

#### ② PCR 프라이머 염기서열

분류	유전자	염기서열(5'→3')	결과확인
EHEC	VT1	(F) ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC (R) AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	180bp
	VT2	(F) GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC (R) TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	255bp

#### ③ PCR 반응액 조제

성분	최종농도	Stock용액 농도	1회 용량
완충액	1×	10×	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	1,2mM	12mM	5 µL
dNTPs	0,2mM	2,5mM	4 µL
VT1 프라이머(F)	50 pmol/tube	50 pmol/µL	1 µL
VT1 프라이머(R)	50 pmol/tube	50 pmol/µL	1 µL
VT2 프라이머(F)	50 pmol/tube	50 pmol/µL	1 µL
VT2 프라이머(R)	50 pmol/tube	50 pmol/µL	1 µL
주형 DNA	25~50ng 또는 10µL	-	10 µL
Taq	2,5U/tube	5U/µL	0,5 µL
증류수	-	-	21,5 µL
총량	-	-	50 µL



#### ④ PCR 반응조건

반응 단계	구분	온도	시간	반응회수
1	변성(denaturation)	95℃	60초	10회
	결합(annealing)	65℃	120초	
	신장(extension)	72℃	90초	
2	변성(denaturation)	95℃	60초	5회
	결합(annealing)	64℃→60℃ 1℃/회 감소	120초	
	신장(extension)	72℃	90초	
3	변성(denaturation)	95℃	60초	10회
	결합(annealing)	60℃	120초	
	신장(extension)	72℃	90초	
4	변성(denaturation)	95℃	60초	10회
	결합(annealing)	60℃	120초	
	신장(extension)	72℃	150초	
5	보존(store)	4℃	-	-

#### ⑤ 결과 확인

최종산물의 반응액 5 μl를 취하여 2.0% agarose로 100V에서 25분간 전기영동하고 EtBr (1ug/mL) 또는 동등한 기능의 염색시약으로 염색한후 UV를 이용하여 반응생성물을 확인한다. 이때, DNA 크기를 알 수 있도록 100bp Ladder를 동시에 전기영동 한다. VT1 유전자는 180bp, VT2 유전자는 255bp에서 반응생성물을 확인할 수 있다. VT1 또는 VT2 유전자가 확인된 것은 장출혈성대장균이 검출된 것으로 판정한다.

#### 5) 혈청학적 시험

장출혈성대장균 중 대장균 O157:H7의 확정이 필요할 경우 분리배양 시 TC-SMAC 배지를 사용하여 sorbitol을 분해하지 않는 무색집락에 대하여 최종적으로 베로독소 보유 및 대장균 동정 확인한다. 양성균주에 대하여 O157과 H7 혈청형의 결정은 제조사가 제시하는 방법에 따라 시험한다. 최종적으로 베로독소 유전자(VT1 또는/그리고 VT2) 양성, O157 및 H7 혈청 확인, 대장균으로 확인되었을 때 O157:H7으로 판정한다.

### 나. 그 외 병원성대장균

병원성대장균은 장병원성대장균(Enteropathogenic *E. coli*; EPEC, *eaeA* 유전자 보유), 장독소 원성대장균(Enterotoxigenic *E. coli*; ETEC, ST, LT 보유), 장침입성대장균(Enteroinvasive *E. coli*; EIEC, *inV* 유전자 보유), 장흡착성대장균(Enterocoagulative *E. coli*; EAEC, *aggR* 유전자 보유) 등 여러 가지로 분류하고 있다. 병원성대장균의 분리는 장출혈성대장균 시험법과 동일하게 실시한다. 다만, BCIG 한천 배지를 사용하고 청록색의 전형적인 대장균 집락 5개 이상에 대해서 생화학적 검사를 실시하여 대장균임을 확인한다. 병원성대장균은 일반대장균과 구별이 용이하지 않기 때문에 가능한 많은 수의 집락을 확인하는 것을 권장한다. 필요 시 O항혈청과 H항혈청을 이용하여 혈청형을 확인할 수 있다.

#### 1) 확인시험

병원성대장균의 전형적인 집락 5개 이상을 취하여 보통한천배지에 도말하여  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 18~24 시간 배양한 후 병원성유전자 또는 독소 등 병원성 인자를 확인한다. 병원성유전자는 본 지침의 시험절차 등에 따라 수행할 수 있으며 독소 생성여부를 확인하기 위하여 시판되는 독소 확인 키트 등을 사용할 수 있다.

#### 2) 병원성 유전자 확인시험법

유전자는 각각 ETEC의 경우 heat-labile toxin(LT), heat-stable toxin(ST) 유전자, EPEC의 경우 *eaeA*, EIEC의 경우 *inV*, EAEC의 경우 *aggR*을 확인하는 시험법으로 다음의 PCR법에 따라 수행한다.

※ EAEC의 경우 수인성 식품매개 질환 감시사업에서는 제외되었으나, 식중독 원인조사 시에는 포함하여 수행

##### ① 주형유전자 준비

전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200  $\mu\text{l}$ 에 현탁한 후, 10분간 끓여 원심분리하고, 상층액 5  $\mu\text{l}$ 를 취하여 시료로 사용한다.



## ② PCR 프라이머 염기서열

– EPEC, EIEC, EAEC, ETEC

분류	유전자	염기서열(5'→3')	결과확인
EPEC	eaeA	(F) CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AAC (R) CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G	881bp
EIEC	inV	(F) TTT CCC TCT TGC CTG CAT ATG CGC (R) CTC ACC ATA CCA TCC AGA AAG AAG	465bp
EAEC	aggR	(F) CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA (R) AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG	457bp
ETEC	LT	(F) GCA CAC GGA GCT CCT CAG TC (R) TCC TTC ATC CTT TCA ATG GCT TT	218bp
	ST	(F) TCA CCT TTC CCT CAG GAT GC (R) ATA TTA TTA ATA GCA CCC GG	179bp
ETEC(STp)	<i>Sta</i>	TCC GTG AAA CAA CAT GAC GG ATA ACA TCC AGC ACA GGC AG	244 bp

## ③ PCR 반응액 조제

– EPEC, EIEC, ETEC (Multiplex)

성분	최종농도	Stock용액 농도	1회 용량
완충액	1×	10×	5.0μl
MgCl <sub>2</sub>	2.5mM	25mM	5.0μl
dNTPs	200uM	2.5mM	4.0μl
*프라이머(F)	5, 15, 20 pmol/tube	5, 15, 20 pmol/μl	1.0μl
*프라이머(R)	5, 15, 20 pmol/tube	5, 15, 20 pmol/μl	1.0μl
주형 DNA	25~50ng 또는 5μl	–	5.0 μl
<i>Taq</i>	2.5U/tube	5U/μl	0.5 μl
증류수	–	–	28.5 μl
총량	–	–	50.0 μl

※ eaeA, inV, 16S rRNA는 5 pmole/μl, LT는 15 pmole/μl, ST는 20 pmole/μl

## IV. 식중독균 시험법

### - EAEC

성분	최종농도	Stock용액 농도	1회 용량
완충액	1×	10×	2.5μl
MgCl <sub>2</sub>	3.0mM	30mM	2.5 μl
dNTPs	400uM	4mM	2.5 μl
프라이머(F)	10 pmol/tube	10 pmol/μL	1 μl
프라이머(R)	10 pmol/tube	10 pmol/μl	1 μl
주형 DNA	25~50ng 또는 1μL	-	1 μl
<i>Taq</i>	2.5U/tube	5U/μL	0.5 μl
증류수	-	-	14μl
총량	-	-	25 μl

### - ETEC(STp)

성분	최종농도	Stock용액 농도	1회 용량
완충액	1×	10×	5.0μl
MgCl <sub>2</sub>	3.0mM	25mM	6.0μl
dNTPs	200uM	2.5mM	4.0μl
프라이머(F)	100 pmol/tube	100 pmol/μl	1.0μl
프라이머(R)	100 pmol/tube	100 pmol/μl	1.0 μl
주형 DNA	25~50ng 또는 5μl	-	5.0μl
<i>Taq</i>	4.0U/tube	5U/μl	0.4μl
증류수	-	-	27.6μl
총량	-	-	50μl



#### ④ PCR 반응조건

##### – EPEC, EIEC, ETEC(Multiplex)

구분	온도	시간	반응회수
초기변성	95℃	5분	1회
변성(denaturation)	95℃	30초	35회
결합(annealing)	50℃	40초	
신장(extension)	72℃	1분	
최종신장(elongation)	72℃	10분	1회
보존(store)	4℃	-	-

##### – EAEC

구분	온도	시간	반응회수
초기변성	95℃	15분	1회
변성(denaturation)	94℃	1분	30회
결합(annealing)	55℃	1분	
신장(extension)	72℃	1분	
최종신장(elongation)	72℃	10분	1회
보존(store)	4℃	-	-

##### – ETEC(STp)

구분	온도	시간	반응회수
초기변성	94℃	7분	1회
변성(denaturation)	94℃	1분	35회
결합(annealing)	58℃	1분	
신장(extension)	72℃	1분	
최종신장(elongation)	72℃	10분	1회
보존(store)	4℃	-	-

## IV. 식중독균 시험법

### ⑤ 결과 확인

최종산물의 반응액 5 µl를 취하여 2.0% agarose로 100V에서 25분간 전기영동하고 EtBr (1ug/mL) 또는 동등한 기능의 염색시약으로 염색한후 UV를 이용하여 반응생성물을 확인한다. 이때, DNA 크기를 알 수 있도록 100bp Ladder를 동시에 전기영동 한다.

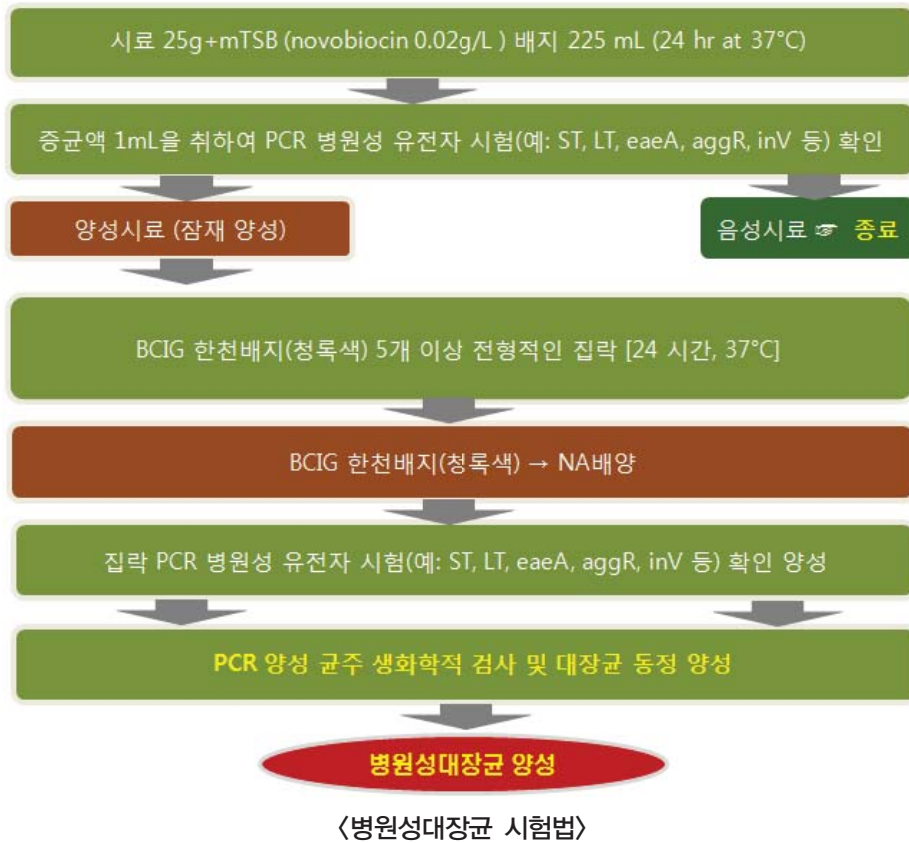
### 3) 혈청학적 시험

장출혈성대장균으로 확인된 균주는 필요시 O항혈청과의 응집반응 실시 후 양성균주에 대하여 H혈청형과의 응집반응을 실시하여 판정한다.



〈장출혈성대장균 시험법〉





## IV. 식중독균 시험법

### ▶ 분리 및 확인 시험

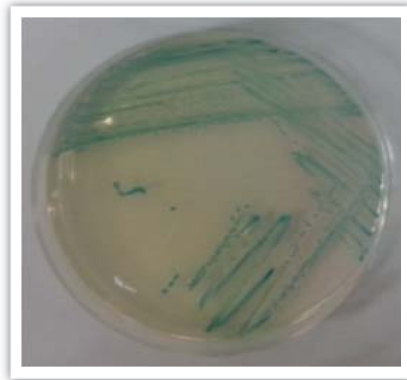
① 식중독 원인조사에는 아래와 같은 배지, 키트 및 장비 등을 사용 할 수 있다.

#### ① CHROM agar™ TBX(BCIG)

- 성상 : green and blue



*E. coli* O157 ATCC 43888



*E. coli* (VT2) ATCC 13721

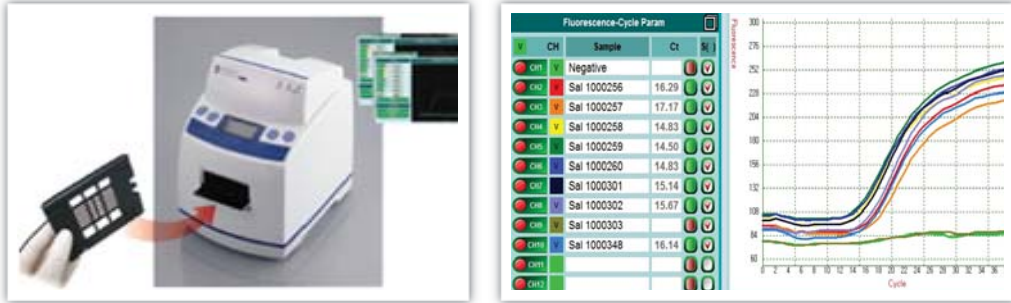
#### ② Ultrafast Labchip realtime PCR

- 검출가능 유전자

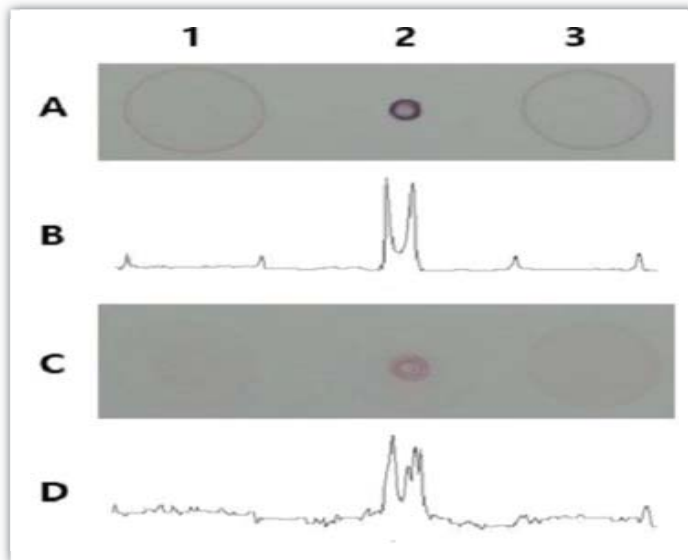
구분	검출 유전자
EHEC	<i>vtx1, vtx2, hlyA, hlyB, hlyC</i>
EPEC	<i>eaeA, bfpA</i>
ETEC	LT, STh, STp
EAEC	aggR
EIEC	ipaH, icsA



- 기기(running time : 약 20분)



### ③ Polydiacetylene visicle sensor 법



A,B : Stx 1b, C,D : Stx 2b RC결과 및 image J 분석 결과 (1: HEPES, 2: 식중독 유발인자, 3: BSA)

## 10. 쉬겔라 (*Shigella* spp.)

### 10-1. 증균배양

- 검체 25g 또는 25ml을 취하여 225ml의 Shigella broth(novobiocin 0.5 $\mu$ g/ml)에 가한 후 42 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C에서 16~20 시간 혐기배양한다. 배양액 1~2mL을 원심분리하여 상층액을 제거하고 멸균 완충액으로 세척 후 유전자를 추출하여 PCR template로 사용한다. PCR을 수행하여 유전자가 확인된 경우 분리배양 과정을 진행한다. PCR 반응은 이동차량 쉬겔라 real-time PCR법 또는 10-4. PCR법 또는 10-5. real-time PCR법을 참고한다.

▶ 쉬겔라속 시험에 사용하는 배지는 식품공전 3. 미생물시험법 3.4 배지 및 시액을 참고로 하며, 등재되지 않은 배지는 다음을 참고한다.

▶ Shigella Broth (0.5 $\mu$ g/ml novobiocin)

- 위의 성분을 증류수 1000ml에 녹여 pH 7.0 $\pm$ 0.2으로 조정후 121 $^{\circ}$ C에서 15분간 멸균하여 50 $^{\circ}$ C로 식힌 후 다음의 Supplement\*를 여과 멸균하여 가한다.

Enzymatic digest of casein	20.0 g
Potassium hydrogen phosphate	2.0 g
Potassium dihydrogen phosphate	2.0 g
Sodium chloride	5.0 g
D(+)-Glucose	1.0 g
Polyoxyethylenesorbitan monooleate (Tween 80)	1.5 ml

\* Supplement: Novobiocin Sodium 5.0mg을 증류수 100ml 에 녹여 여과 멸균한 후 2.5ml을 Shigella broth 225ml에 가하여 Novobiocin 최종농도 0.5 $\mu$ g/ml을 제조한다.

### 10-2. 분리배양

- 증균배양액을 MacConkey(식품공전 배지 43) 또는 XLD(식품공전 배지 58) 또는 SS(식품공전 배지 29) 한천배지 2장에 접종하여 37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C에서 20~24시간 호기배양한다. 배양결과 MacConkey 에서 무색투명 또는 엷은 분홍 또는 XLD에서 투명한 분홍 또는 적색 집락 또는 SS 한천배지에서 무색 집락은 확인시험을 실시한다. 집락형태가 판정이 곤란한 경우 24시간 추가 배양하여 확인한다.



### 10-3. 확인시험

- ① 쉬겔라 속으로 의심되는 집락 5개 이상을 취하여 보통한천배지(식품공전 배지 8)에 도말하여 37±1℃에서 18~24시간 호기배양한 후 그람염색을 실시한다. 그람음성 간균임을 확인하고 KIA 배지(식품공전 배지 18)에 접종하여 35~37℃에서 18~24시간 배양 한다. KIA 배지 고층부가 황색, 사면부는 적색, 가스와 황화수소가 발생하지 않은 균주를 선택하여 운동성 시험 및 urea, citrate 시험 등을 한다. 이때, 운동성 음성, Urea 시험 음성, citrate 시험 음성일 경우 쉬겔라 속 양성으로 판정한다. 생화학성상시험은 시판되는 동정 kit나 미생물동정기를 이용하여 판정할 수 있다.

### 10-4. PCR에 의한 유전자 확인법

- ① PCR 반응은 *Shigella* spp. 4종을 한 번에 증폭시켜 각각을 구분 할 수 있도록 하기 위하여 Multiplex PCR을 다음과 같이 수행한다.

#### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- ① 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- ② 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200μl에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 10μl를 취하여 사용가능하다.

#### 나. PCR을 위한 프라이머 염기서열

Species	Primer	sequence(5'-3')	Size
Shigellae	F255 R413	F: TCGCATTCTCTCCCCACCACG R: CCGGATGTGTCTCGGGCAATC	159 bp
<i>Shigella flexneri</i>	F50 R181	F: CTGAACTGGATGGAATGCCTGGG R: GCATAGCCGGTATTGCCGGG	132 bp
<i>Shigella dysenteriae</i>	F46 R235	F: GTCAGCGGGTGCCCGTGGCT R: CCCCCGTCGACTGCAACCGT	190 bp
<i>Shigella boydii</i>	F589 R828	F: GAGCACGAAACAGAGAGCGCC R: GGTGCGTTCTCCGGTGTCTG	240 bp
<i>Shigella sonnei</i>	F421 R809	F: GCAGCACTCTTTGATGCCGGG R: CCCGTCGGTCCTCTCCCAA	389 bp

## IV. 식중독균 시험법

### 다. PCR 반응액 조제

- ④ Multiplex PCR을 위한 혼합액의 총량은 최종 25  $\mu$ l이 되도록 하고, 혼합액에는 DNA template 25 ng, 10 $\times$ buffer (MgCl<sub>2</sub> plus), 0.1mM dNTP, Takara EX $Taq$  DNA polymerase(Takara, Japan)1unit, 각 target에 따른 primer 쌍을 첨가하여 PCR을 진행한다.

Species	Primer	PM
Shigellae	F255 / R413	3 pmole
<i>Shigella flexneri</i>	F50 / R181	6 pmole
<i>Shigella dysenteriae</i>	F46 / R235	25 pmole
<i>Shigella boydii</i>	F589 / R828	2 pmole
<i>Shigella sonnei</i>	F421 / R809	7 pmole

### 라. PCR 반응조건

- ④ PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수	비고
초기 변성	94 $^{\circ}$ C	5 분	1 cycle	
변성 (denaturation)	94 $^{\circ}$ C	30 초	25 cycle	
결합 (annealing)	63 $^{\circ}$ C	30 초		
신장 (extension)	72 $^{\circ}$ C	30 초		
최종신장 (elongation)	72 $^{\circ}$ C	10 분	1 cycle	
보존	4 $^{\circ}$ C	-	-	



## 마. PCR 산물 확인

- PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5μl를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1μg/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

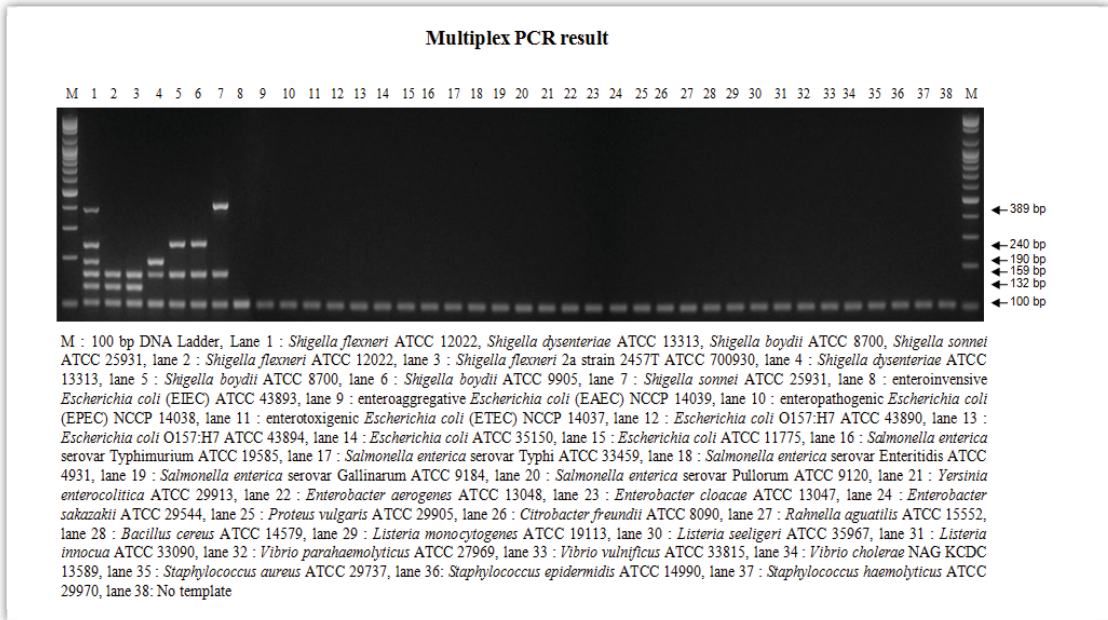


그림 1. *Shigella* 4종 및 기타 식중독균 multiplex PCR 반응 결과

## 10-5. Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

### 가. PCR을 위한 주형 유전자의 준비

- 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200μl에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 10μl를 취하여 사용가능하다.

### 나. Real-time PCR을 위한 Primer와 probe 염기서열

Target species	Primer	Sequence	최종농도
<i>S. flexneri</i> <i>S. sonnei</i> <i>S. boydii</i> <i>S. dysenteriae</i>	Forward	TCGCA TTTCT CTCCC CACCA CG	400nM
	Reverse	CCGGA TGTGT CTCGG GCAAT C	400nM
	Probe	CCAGG ACAAT TGCAG CACAG	200nM

## IV. 식중독균 시험법

### 다. Real-time PCR 반응액의 조성

성분	1회 용량
Universal Master mix	12.5 $\mu$ l
Forward Primer	1 $\mu$ l
Reverse Primer	1 $\mu$ l
Probe	0.05 $\mu$ l
Sample DNA	1 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

### 라. Real-time PCR 반응조건

PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

1 cycle		40 cycle	
50°C, 2분	95°C, 10분	95°C, 15초	60°C, 60초

- ① Forward, Reverse Primer 및 Probe를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 제조한다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1-2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.
- ② 각 각의 well에 반응액 24 $\mu$ l를 분주한 후 추출 DNA를 1 $\mu$ l를 분주한다. 이 때 양성 대조균은 분석대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조균은 Shigella species 외의 병원성 균 DNA를 각각 동량 분주한다.
- ③ Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 기포가 남지 않도록 2000rpm에서 3분간 spin down 시킨다.
- ④ 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.

## 10-6. 혈청학적 시험

- ④ 쉬겔라 속으로 확인된 균주는 필요시 항혈청과의 응집반응을 실시한다.





## 11.

# 비브리오 콜레라 (*Vibrio cholerae*)

### 11-1. 증균배양

검체 25 g 또는 25 mL를 취하여 225 mL의 Alkaline 펩톤수(식품공전 배지 16)를 가한 후 35~37°C에서 18~24시간 증균 배양한다. 배양액 1~2mL을 원심분리하여 상층액을 제거하고 멸균완충액으로 세척 후 유전자를 추출하여 PCR template로 사용한다. PCR을 수행하여 유전자가 확인된 경우 분리배양 과정을 진행한다. PCR 반응은 이동차량 비브리오 real-time PCR법 또는 11-4. PCR 법 또는 11-5. real-time PCR 법을 참고한다.

### 11-2. 분리배양

증균배양액을 TCBS 한천배지(배지 17) 또는 CC 한천배지(또는 mCPC 한천배지 또는 비브리오 chromogenic 배지)에 접종하여 35~37°C에서 18~24시간 배양한다. 배양결과 TCBS에서 직경 2~4 mm인 황색의 자당 분해 집락, CC 배지(또는 mCPC 배지)에서 청자색 집락에 대하여 확인시험을 실시한다.

구별	비브리오 콜레라
TCBS	황색의 자당 분해 집락
CC	청자색 집락(녹색-보라색)
mCPC	청자색 집락(녹색-보라색)

※ CC: Cellobiose colistin agar, mCPC: modified Cellobiose-Polymyxin-B-Colistin

### 11-3. 확인시험

분리배양된 평판배지상의 집락을 2% NaCl을 첨가한 보통한천배지(식품공전 배지 8)에 접종한 후 35~37°C에서 18~24시간 배양한다. 생화학적 검사(API 20E, VITEK 등 키트 사용 가능)를 실시하여 비브리오 콜레라 양성유무를 판정하고 비브리오 콜레라용 항혈청을 사용한 응집반응검사를 실시하여 혈청형을 결정한다.

### 11-4. PCR에 의한 유전자 확인법

병원성비브리오의 PCR 방법은 *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* 등 비브리오속 5종의 Multiplex PCR 반응법이다.

#### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 10 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

#### 나. PCR을 위한 프라이머 염기서열

Species	Primer	sequence(5'-3')	Size
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1155272	F: AGCTTATTGGCGGTTTCTGTCCGG R: CKCAAGACCAAGAAAAGCCGTC	297 bp
<i>Vibrio cholerae</i>	C6340002	F: CAAGCTCCGCATGTCCAGAAGC R: GGGGCGTGACGCGAATGATT	154 bp
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1198230	F: ACGGCATTGGAAATTGCGACTG R: TACCCGTCTCACGAGCCCAAG	199 bp
<i>Vibrio mimicus</i>	727581	F: ATAAAGCGGGCTTGCGTGCA R: GATTTGGRAAAATCCKTCGTGC	249 bp
<i>Vibrio vulnificus</i>	2055918	F: CAGCCGGACGTCGTCCATTTTG R: ATGAGTAAGCGTCCGACGCGT	484 bp
<i>Vibrio speices</i>	C2694352	F: GTCARATTGAAAARCARTTYGGTAAAGG R: ACYTTRATRCGNGTTTCRTRCC	688 bp

#### 다. PCR 반응액 조제

Multiplex PCR을 위한 혼합액의 총량은 최종 25  $\mu$ l이 되도록 하였고, 혼합액에는 DNA template 25 ng, 10 $\times$ buffer (MgCl<sub>2</sub> plus), 0.1mM dNTP, Takara EX*Taq* DNA polymerase (Takara, Japan)1unit, 각 target에 따른 primer 쌍을 첨가하여 PCR을 진행한다.



Species	Primer	PM
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1155272	9pmole
<i>Vibrio cholerae</i>	C6340002	8 pmole
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1198230	2.5 pmole
<i>Vibrio mimicus</i>	727581	28 pmole
<i>Vibrio vulnificus</i>	2055918	10 pmole
<i>Vibrio</i> species	C2694352	25 pmole

## 라. PCR 반응조건

PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수	비고
초기 변성	94 ℃	5 분	1 cycle	
변성 (denaturation)	94 ℃	30 초	25 cycle	
결합 (annealing)	63 ℃	30 초		
신장 (extension)	72 ℃	30 초		
최종신장 (elongation)	72 ℃	10 분	1 cycle	
보존	4 ℃	-	-	

## 마. PCR 산물 확인

PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5μl를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1μg/mL)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

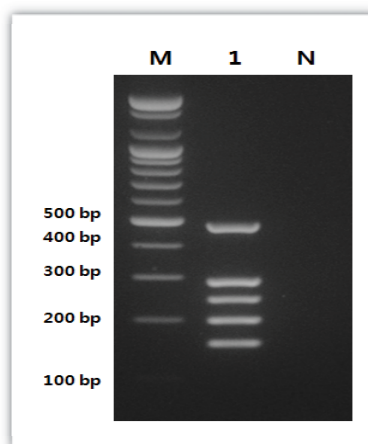


그림. *Vibrio* 5종 multiplex PCR 반응 결과

### 11-5. Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

#### 가. PCR을 위한 주형 유전자의 준비

- ① 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- ② 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200μl에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 10μl를 취하여 사용가능하다.

#### 나. Real-time PCR을 위한 Primer와 probe 염기서열

Target gene	Primer	Sequence	최종 농도
<i>ctx A</i>	Forward	TTTGT TAGGC ACGAT GATGG AT	250 nM
	Reverse	ACCAG ACAAT ATAGT TTGAC CCACT AAG	250 nM
	Probe	TGTTT CCACC TCAAT TAGTT TGAGA AGTGC CC	100 nM

#### 다. Real-time PCR 반응액의 조성

성 분	1회 용량
Universal Master mix	12.5μl
Forward Primer	1μl
Reverse Primer	1μl
Probe	0.05μl
Sample DNA	1μl
<b>Total</b>	<b>25μl</b>

#### 라. Real-time PCR 반응조건

- 1) PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

1 cycle	45 cycle	
94°C, 2분	94°C, 10초	63°C, 30초

- ① Forward, Reverse Primer 및 Probe를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 제조한다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1-2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.

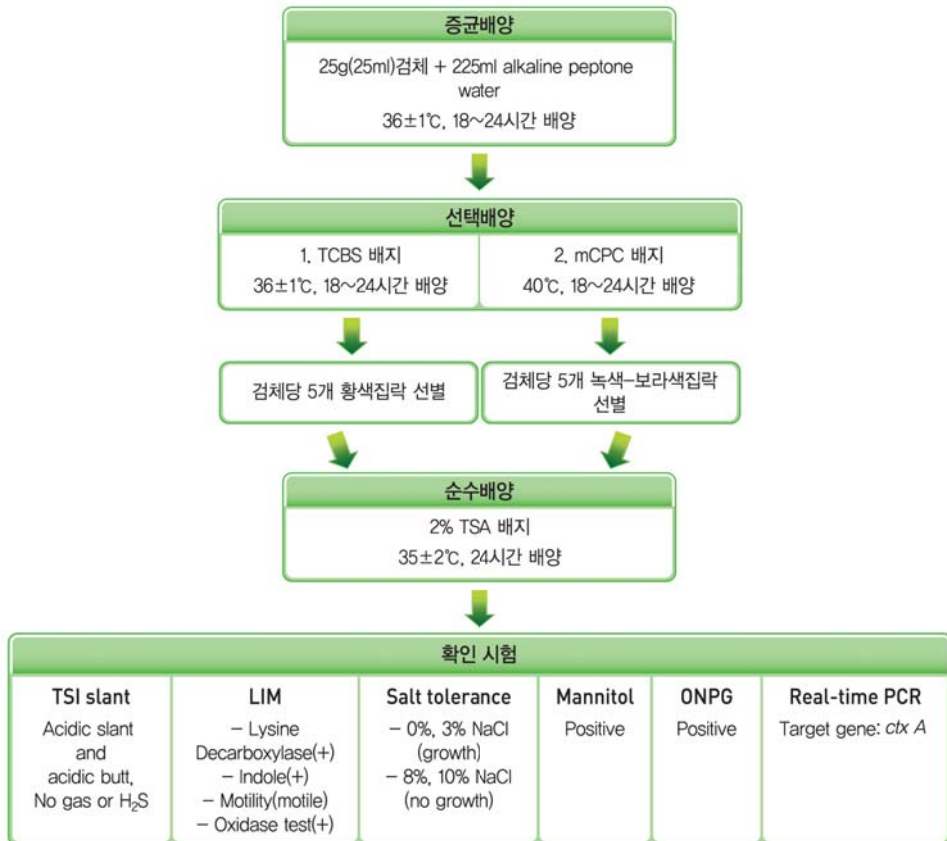


- ② 각 각의 well에 반응액 24 $\mu$ l를 분주한 후 추출 DNA를 1 $\mu$ l를 분주한다. 이 때 양성 대조군은 분석대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 *Vibrio* 외의 병원성 균 DNA를 각 각 동량 분주한다.
- ③ Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 기포가 남지 않도록 2000rpm에서 3분간 spin down 시킨다.
- ④ 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.

#### 마. Real-time PCR 결과확인

- ① 음성대조균의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정.
- ② 음성대조균의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조균의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정.

#### Ⓞ 비브리오 콜레라 검출법 모식도



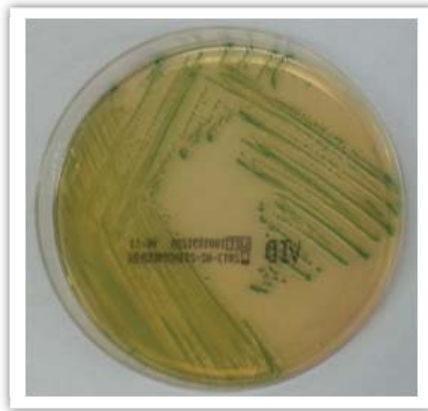
## IV. 식중독균 시험법

### ▶ 분리 및 확인 시험

④ 식중독 원인조사에는 아래와 같은 배지, 키트 및 장비 등을 사용 할 수 있다.

#### ① chromID™ Vibrio Agar

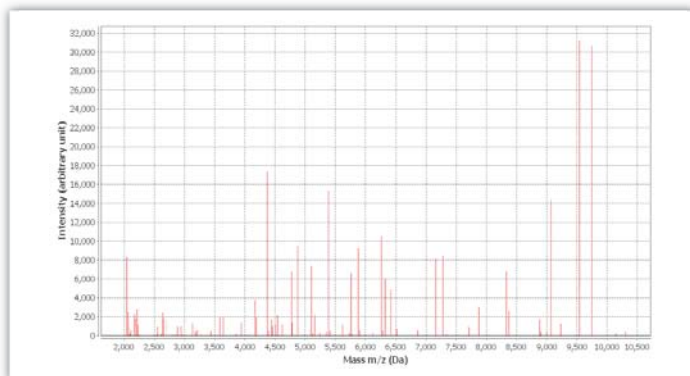
– 성상 : *V. cholerae* → blue-green



*Vibrio cholerae* NCCP 13589

#### ② Vitek MS

– 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정





## 12.

# 비브리오 볼니피쿠스 (*Vibrio vulnificus*)

### 12-1. 증균배양

검체 25 g 또는 25 mL를 취하여 225 mL의 Alkaline 펩톤수(식품공전 배지 16)를 가한 후 35~37°C에서 18~24시간 증균 배양한다. 배양액 1~2mL을 원심분리하여 상층액을 제거하고 멸균완충액으로 세척 후 유전자를 추출하여 PCR template로 사용한다. PCR을 수행하여 유전자가 확인된 경우 분리 배양 과정을 진행한다. PCR 반응은 이동차량 비브리오 real-time PCR법 또는 12-4. PCR법 또는 12-5. real-time PCR법을 참고한다.

### 12-2. 분리배양

증균배양액을 TCBS 한천배지(배지 17) 또는 mCPC 배지(또는 비브리오 chromogenic 배지 또는 SPS 배지)에 접종하여 35~37°C에서 18~24시간 배양한다. 배양결과 TCBS에서는 직경 2~4 mm인 청록색의 서당 비분해 집락, mCPC 배지에서는 황색 집락, SPS 배지에서는 불투명한 환을 갖는 황색 집락에 대하여 확인시험을 실시한다.

구별	비브리오 볼니피쿠스
TCBS	청록색의 서당 비분해 집락
mCPC	황색 집락
SPS	불투명한 환을 갖는 황색집락

※ mCPC: Modified cellobiose-polymyxin B- colistin agar

SPS: Sodium dodecyl sulfate-polymyxin B-sucrose agar

### 12-3. 확인시험

분리배양된 평판배지상의 집락을 2% NaCl을 첨가한 보통한천배지(식품공전 배지 8)에 접종한 후 35~37°C에서 18~24시간 배양한다. 생화학적 검사(API 20E, VITEK 등 키트 사용 가능)를 실시하여 비브리오 패혈증균 양성유무를 판정한다.

### 12-4. PCR에 의한 유전자 확인법

병원성비브리오의 PCR 방법은 *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* 등 비브리오속 5종의 Multiplex PCR 반응법이다.

#### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- ① 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- ② 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 10 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

#### 나. PCR을 위한 프라이머 염기서열

Species	Primer	sequence(5'-3')	Size
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1155272	F: AGCTTATTGGCGGTTTCTGTCCGG R: CKCAAGACCAAGAAAAGCCGTC	297 bp
<i>Vibrio cholerae</i>	C6340002	F: CAAGCTCCGCATGTCCAGAAGC R: GGGGCGTGACGCGAATGATT	154 bp
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1198230	F: ACGGCATTGGAAAATTGCGACTG R: TACCCGTCTCACGAGCCCAAG	199 bp
<i>Vibrio mimicus</i>	727581	F: ATAAAGCGGGCTTGCCTGCA R: GATTTGGRAAAATCCKTCGTGC	249 bp
<i>Vibrio vulnificus</i>	2055918	F79: CAGCCGGACGTCCATTTTG R: ATGAGTAAGCGTCCGACGCGT	484 bp
<i>Vibrio speices</i>	C2694352	F46: GTCARATTGAAAARCARTTYGGTAAAGG R734: ACYTTRATRCGNGTTTCRTTRCC	688 bp

#### 다. PCR 반응액 조제

Multiplex PCR을 위한 혼합액의 총량은 최종 25  $\mu$ l이 되도록 하였고, 혼합액에는 DNA template 25 ng, 10 $\times$ buffer (MgCl<sub>2</sub> plus), 0.1mM dNTP, Takara EX7aq DNA polymerase (Takara, Japan)1unit, 각 target에 따른 primer 쌍을 첨가하여 PCR을 진행한다.





Species	Primer	PM
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1155272	9pmole
<i>Vibrio cholerae</i>	C6340002	8 pmole
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1198230	2.5 pmole
<i>Vibrio mimicus</i>	727581	28 pmole
<i>Vibrio vulnificus</i>	2055918	10 pmole
<i>Vibrio</i> species	C2694352	25 pmole
-	IAC	3pg

## 라. PCR 반응조건

PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

구분	온도	시간	cycle 수	비고
초기 변성	94 °C	5 분	1 cycle	
변성 (denaturation)	94 °C	30 초	25 cycle	
결합 (annealing)	63 °C	30 초		
신장 (extension)	72 °C	30 초		
최종신장 (elongation)	72 °C	10 분	1 cycle	
보존	4 °C	-	-	

## 마. PCR 산물 확인

PCR 반응 후 최종산물의 확인은 반응액 5 $\mu$ l를 취하여 1.6% SeaKem LE agarose로 100V, 25분간 전기영동 후 EtBR로 염색(1 $\mu$ g/ml)한 후 UV 투영기를 이용하여 확인한다.

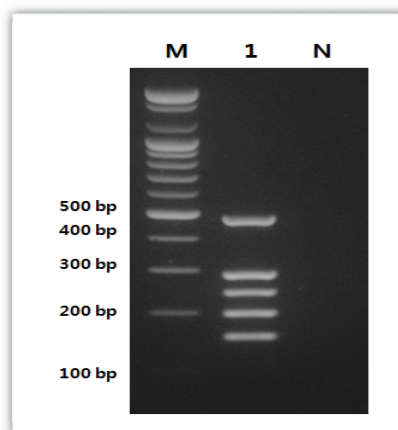


그림 1. *Vibrio* 5종 multiplex PCR 반응 결과

### 12-5. Real-time PCR에 의한 유전자 확인법

#### 가. PCR을 위한 주형 유전자의 준비

- ① TSB+NaCl 10%에 35±1℃ shaking incubator에서 18-24시간 배양한다.
- ② 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 DNA를 추출한다.

#### 나. Real-time PCR을 위한 Primer와 probe 염기서열

Target gene	Primer	Sequence	최종 농도
tox R	Forward	TGTTC GGTTG AGCGC ATTA	900 nM
	Reverse	GCTTC AGAAG CTGCG TCATT C	900 nM
	Probe	CGCTC CTGTC AGATT CAACC AACAA CG	250 nM

#### 다. Real-time PCR 반응액의 조성

성분	1회 용량
Universal Master mix	25 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Probe	1 µl
Sample DNA	5 µl
Total	50 µl

#### 라. Real-time PCR 반응조건

PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

1 cycle		45 cycle	
50℃, 2분	95℃, 10분	95℃, 15초	60℃, 60초

- ① Forward, Reverse Primer 및 Probe를 원하는 농도에 맞게 희석하고 반응액 조성에 맞게 샘플 수를 고려하여 premix를 제조한다. 분주 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1-2개 많은 수에 해당하는 양을 제조한다.
- ② 각 각의 well에 반응액 45µl를 분주한 후 추출 DNA를 5µl를 분주한다. 이 때 양성 대조군은 분석대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 Vibrio외의 병원성 균 DNA를 각각 동량 분주한다.



- ③ Optical adhesive film을 붙이고 원심분리기를 이용해 아래쪽에 기포가 남지 않도록 2000rpm에서 3분간 spin down 시킨다.
- ④ 준비된 well plate를 Real-time PCR에 넣고 소프트웨어 프로그램을 실행시켜 내용을 저장하고 반응을 시작한다.

### 마. Real-time PCR 결과확인

- ① 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정한다.
- ② 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정한다.

## 12-6. Fast real-time PCR에 의한 유전자 확인법

### 가. PCR을 위한 주형유전자의 준비

- 1) 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.
- 2) 전형적인 집락을 취하여 멸균증류수 200 $\mu$ l에 현탁 후 10분간 끓여 원심분리 후 상층액 2 $\mu$ l를 취하여 사용가능하다.

### 나. Fast Real-time PCR을 위한 프라이머와 프로브 염기서열

Target gene	Primer	Sequence(5'→3')	최종농도	용량
vvh	forward	CCG TTT CAC CGT CGA TGC CG	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	GCG GCG GTT TGC CCA ACT CT	500nM	
	probe	CAA GCC TGG CAC GGG TAT TCA TTT GG	200nM	
glnA	forward	CGT CCA GGC GTG AAG GGT GG	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	TGC GAT CTC GTT TTG ACC CGC	500nM	
	probe	TGG GCC TTG TTG TTG AAG CGC ACC A	200nM	
rtxA	forward	AGC GCA GCA AAC GAC GCG CA	500nM	1 $\mu$ l
	reverse	AGG CCG CTG CCA GTC ACG CC	500nM	
	probe	TGA AGG CGA TCG CCC TGA CCG CGA	200nM	

## IV. 식중독균 시험법

### 다. 프라이머와 프로브 준비

반응액 전체 용량이 9 $\mu$ l이므로 프라이머와 프로브를 각각 최종 농도 500nM, 200nM의 9배인 4.5 $\mu$ M, 1.8 $\mu$ M가 되게 희석한 후 이를 혼합하여 1 $\mu$ l 취해 Primer/Probe mixture로 사용한다.

### 라. Fast Real-time PCR 반응액 조성

구성성분	용량
Master mix	5 $\mu$ l
TaqMan probe & primer mixture	1 $\mu$ l
DNase-RNase free water	1 $\mu$ l
Sample(DNA)	2 $\mu$ l
Total	9 $\mu$ l

※ 모든 시료와 반응액 준비는 Ice 또는 Ice block에서 실시하고, 반응액 조성 시 잘 혼합되도록 vortex하여 제조한다.

### 마. Real-time PCR 반응조건 및 시간(UltraFast Real-time PCR G2-4 system, Nanobiosys)

1 cycle	39 cycle		반응시간
95 $^{\circ}$ C 12초	95 $^{\circ}$ C 4초	56 $^{\circ}$ C 15초	약 20분

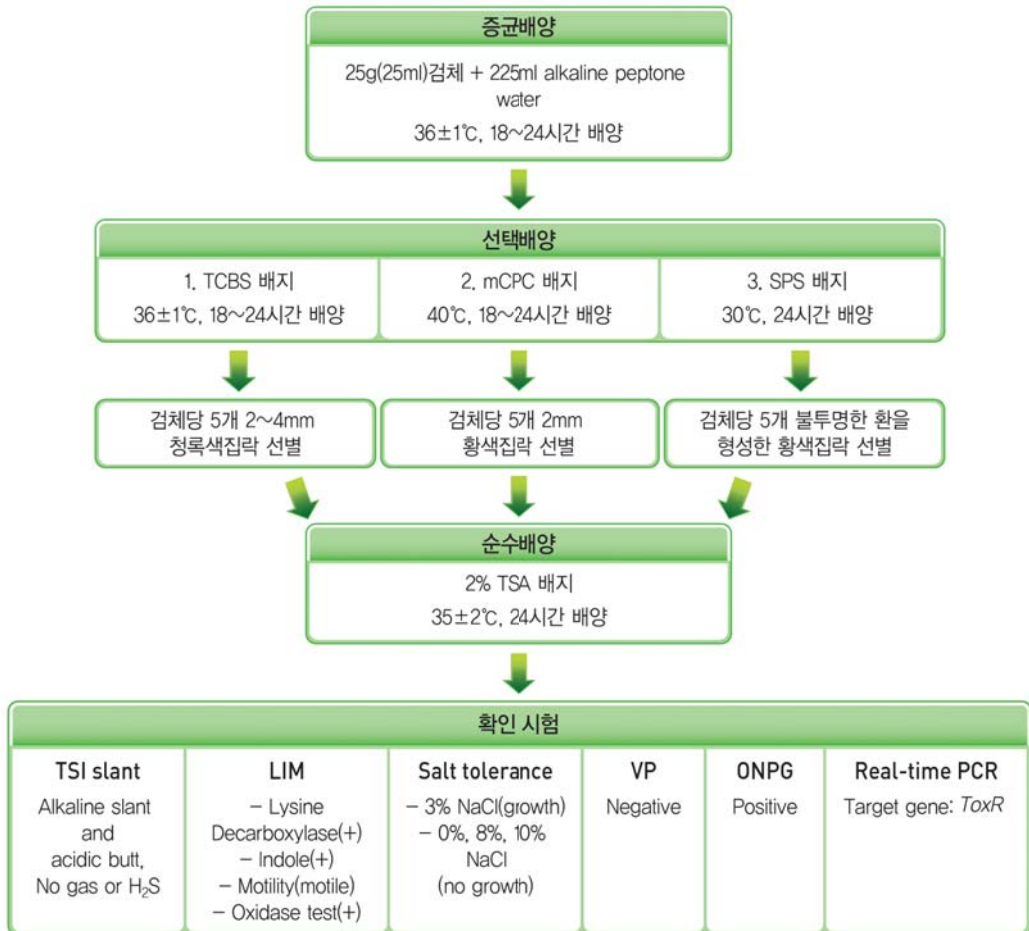
- 1) F/R 프라이머 및 프로브를 농도에 맞게 희석하여 반응액(Reaction mixture)을 제조한다. 실험 시 부족할 것을 대비하여 실제 샘플의 수보다 1~2개 많은 수의 양을 제조한다.
- 2) PCR 튜브에 반응액 7 $\mu$ l와 샘플 DNA 2 $\mu$ l를 분주하여 잘 혼합해준다. 이 때 양성 대조군은 분석대상 식중독균의 추출 DNA, 음성 대조군은 DNase-RNase free water를 각각 동량 넣는다.  
※ 양성 대조군으로 ATCC 27562 균주를 사용할 수 있다.
- 3) 각 혼합물을 칩(LabChip)의 각 채널(Channel)에 8 $\mu$ l씩 주입한다.  
※ 주입 시 팁(Tip)을 수직으로 세워 hole에 꼭 맞춰 주입하고 채널 내에 공기 방울(bubble)이 생기지 않도록 주의한다.
- 4) 준비된 칩을 Ultrafast Real-time PCR에 삽입하고 소프트웨어 프로그램을 실행 시켜 데이터를 저장하고 반응을 시작한다.  
※ 기기의 사용법은 “황색포도상구균 1-3, Fast real-time PCR에 의한 유전자 확인법 사, Ultrafast Real-time PCR G2-4 system 사용법”에 따른다.



## 바. Real-time PCR 결과 해석

- 1) 음성대조군에서 증폭이 일어난 경우 오염으로 간주하여 재분석을 하고, 양성대조군에서 증폭이 일어나지 않은 경우도 재분석을 실시
- 2) 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정

### 비브리오 불리피쿠스 검출법 모식도



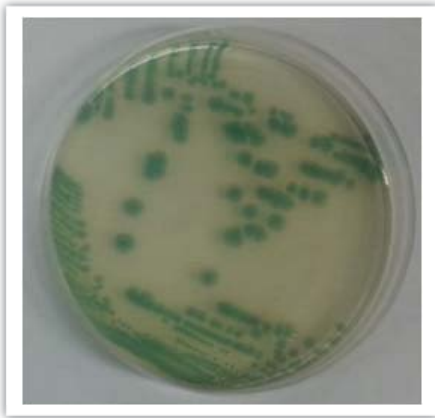
## IV. 식중독균 시험법

### ▶ 분리 및 확인 시험

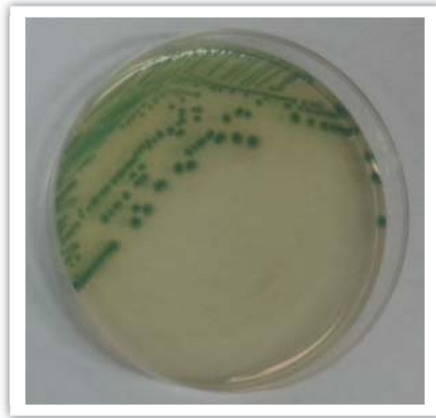
⑥ 식중독 원인조사에는 아래와 같은 배지, 키트 및 장비 등을 사용 할 수 있다.

#### ① CHROM agar™ Vibrio

– 성상 : *V. vulnificus* → green



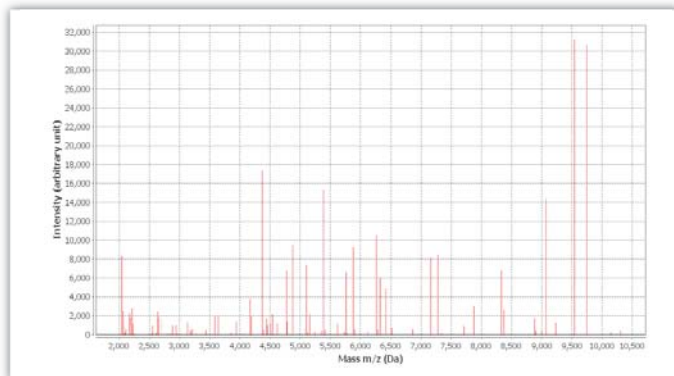
*Vibrio vulnificus* ATCC 27562



*Vibrio vulnificus* ATCC 11887

#### ② Vitek MS

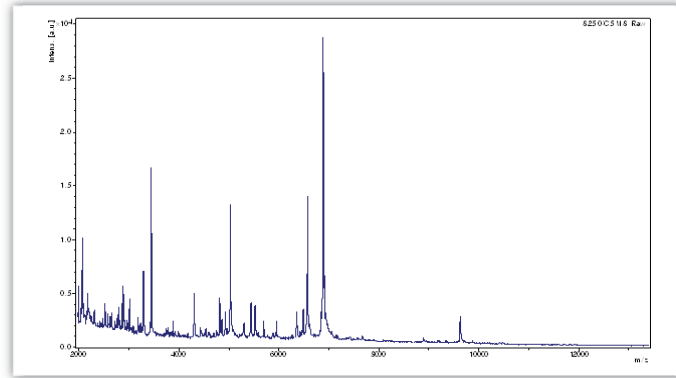
– 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정





### ③ Biotyper

- 성상 : DB를 이용한 미생물 자동동정



### 13.

### 클로스트리디움 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*)

#### 13-1. 증균배양

고형 또는 반고형물 검체는 동량의 젤라틴 인산완충액(시액 5)을 첨가하고 균질화하여 시험용액으로 하며, 액상 검체는 그대로 사용한다. 1~2 g 또는 1~2 mL의 검체를 2개의 Cooked Meat 배지(배지 33) 15 mL에 접종하여 35~37°C에서 7일간 배양하고 또 2개의 TPGY배지(배지 50)에 같은 방법으로 접종하여 26°C에서 7일간 배양한다. 다만, 접종 전 각 배지는 10~15분간 중탕하여 탈산소한 후 신속히 냉각하여 사용하며, 검체는 배지 아래부분에 천천히 접종하고 교반하지 않는다. 배양 7일후 검경하여 전형적인 클로스트리디움이 관찰되면 다음의 분리배양을 실시하고, 관찰되지 않는 경우에는 추가적으로 10일간 더 배양한다.

#### 13-2. 분리배양

증균배양액 1~2 mL와 동량의 여과 제균한 알코올을 잘 혼합하여 실온에서 1시간 방치한 후, Liver-Veal 난황한천배지(배지 51) 또는 혐기성 난황한천배지(배지 52)에 접종하여 35~37°C에서 48±3시간 혐기적으로 배양한다. 배양 후 움기되거나 평평하며, 표면이 매끈하거나 거친 집락으로, 약간 퍼져 있거나 불규칙한 것을 선택하여 약 10개를 취한다. 경우에 따라서는 집락 주위에 혼탁한 환이 생긴다.

#### 13-3. 확인시험

분리균에 대하여 Gram 양성의 간균과 균체 말단에 아포가 형성되는 것을 관찰하고, 호기조건으로 35~37°C에서 2~3일간 배양하였을 경우 균이 발육되지 않는 것을 확인한다. 0.1%의 glucose를 첨가한 GAM 배지(배지 34)에 접종하여 35~37°C에서 1~4일간 배양하여 운동성이 있는 것을 양성으로 판정하며, 질산염환원능이 없으므로 glucose 0.1%, KNO<sub>3</sub> 0.3%를 가한 GAM 배지(배지 34)에 접종하여 35~37°C에서 2일간 배양한 후 Nitrite 지시액(시액 6)을 가하였을 경우 색의 변화가 없어야 한다. 우유를 pH 6.8되도록 조정하여, FeSO<sub>4</sub> 0.05~0.1 g을 첨가한 배지에 균을 접종하여 35~37°C에서 배양한 후 우유를 분해하는 것을 양성으로 판정(각 독소 type에 따라 분해능이 다름)한다.





## 13-4. 독소확인시험

### 가. 시험방법

시험용액을 4°C, 10,000 G로 20분간 원심분리하여 그 상층액을 pH 6.0으로 조정하고, 동량의 2% trypsin용액을 가하여 35~37°C에서 30~60분간 반응시킨 후, 이 용액 1 mL당 100U의 penicillin과 100 µg의 chloramphenicol을 첨가한다. 중량 15~20 g의 ICR계 마우스 5군(1군당 2~3수)을 준비하여 위의 검체액을 다음과 같은 5가지 방법으로 복강내 주사한다.

1군: 시험용액 0.5 mL를 그대로 주사한다.

2군: 시험용액을 100°C로 10분간 가열한 후 0.5 mL씩 주사한다.

3군: 시험용액에 A형 항독소혈청(1~2 unit/mL)을 시험관 내에서 동량으로 혼합한 후 35~37°C에서 15분간 반응시킨 후 0.5 mL씩 주사한다.

4군: 3군과 같은 방법으로 B형 항독소혈청을 혼합하여 반응시킨 후, 0.5 mL씩 주사한다.

5군: 3군과 같은 방법으로 E형 항독소혈청을 혼합하여 반응시킨 후, 0.5 mL씩 주사한다.

### 나. 판정

1~5군의 마우스를 1주간 관찰한 후 다음에 의해서 판정한다.

(1) 1군의 마우스가 사망하지 않았다면 음성으로 판정한다.

(2) 1군 마우스가 특정한 중독증상(복벽함몰, 사지마비, 호흡곤란)을 보이면서 사망하고 2군은 생존하였을 경우,

(가) 3~5군 중 한군이 생존하였다면 생존군에 사용한 항혈청유형의 독소를 양성으로 판정한다.

(나) 3~5군 모두 또는 각 군의 일부가 사망하였다면 시험용액을 희석하여 재시험하고 기타 유형(C1, C2, D, F, G형)의 항독소혈청을 사용하여 중화시험을 실시한다.

## 13-5. PCR 확인시험

### 가. PCR법(A)<sup>1)</sup>

#### ① 주형유전자 준비

전형적인 집락을 취하여 TE buffer 등으로 세척, 멸균증류수 100 µl에 현탁한 후, 10분간 끓여 원심분리하고, 상층액을 취하여 시료로 사용한다. 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용해도 무방하다.

1) 참조: FDA Bacteriological Analytical Manual, accessed in April, 2015.

## IV. 식중독균 시험법

### PCR을 위한 프라이머 염기서열

Neurotoxin type		Sequences	Product sizes(bp)
A	A <sub>f</sub>	GTG ATA CAA CCA GAT GGT AGT TAT AG	983
	A <sub>r</sub>	AAA AAA CAA GTC CCA ATT ATT AAC TTT	
B	B <sub>f</sub>	GAG ATG TTT GTG AAT ATT ATG ATC CAG	492
	B <sub>r</sub>	GTT CAT GCA TTA ATA TCA AGG CTG G	
E	E <sub>f</sub>	CCA GGC GGT TGT CAA GAA TTT TAT	410
	E <sub>r</sub>	TCA AAT AAA TCA GGC TCT GCT CCC	
F	F <sub>f</sub>	GCT TCA TTA AAG AAC GGA AGC AGT GCT	1137
	F <sub>r</sub>	GTG GCG CCT TTG TAC CTT TTC TAG G	

- PCR을 위한 혼합액의 총량은 최종 100  $\mu$ l이 되도록 하였고, 혼합액에는 DNA template 2 $\mu$ l, 1 $\times$ PCR buffer, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, *Taq* DNA polymerase 2.5 unit, 각 target에 따른 primer(0.5 $\mu$ M) 를 첨가하여 PCR을 진행한다. Multiplex PCR로는 수행하지 않는다.

### PCR 반응조건

구분	온도 및 시간	cycle 수
pre-denaturation	95 $^{\circ}$ C, 5m	
denaturation	94 $^{\circ}$ C, 1m	30 cycle
annealing	60 $^{\circ}$ C, 1m	
extention	72 $^{\circ}$ C, 1m	
final extention	72 $^{\circ}$ C, 10m	
	4 $^{\circ}$ C, $\infty$	

### PCR 산물 확인

- 최종산물의 반응액 5  $\mu$ l를 취하여 1.2% ~ 1.5% agarose로 100V에서 25분간 전기영동하고 EtBr(1 $\mu$ g/mL) 또는 동등한 기능의 염색시약으로 염색한 후 UV를 이용하여 반응생성물을 확인한다. 이때, DNA 크기를 알 수 있도록 100bp Ladder를 동시에 전기영동 한다.



## 나. PCR법(B)<sup>2)</sup>

### ① 주형유전자 준비

전형적인 집락을 취하여 TE buffer 등으로 세척, 멸균증류수 100  $\mu$ l에 현탁한 후, 10분간 끓여 원심분리하고, 상층액을 취하여 시료로 사용한다. 시중에 판매되는 유전자추출키트를 이용하여 추출 후 사용가능하다.

### ② PCR을 위한 프라이머 염기서열

Neurotoxin type		Sequences	Product size(bp)
A	A <sub>f</sub>	AGC TAC GGA GGC AGC TAT GTT	782
	A <sub>r</sub>	CGT ATT TGG AAA GCT GAA AAG G	
B	B <sub>f</sub>	CAG GAG AAG TGG AGC GAA AA	205
	B <sub>r</sub>	CTT GCG CCT TTG TTT TCT TG	
E	E <sub>f</sub>	CCA AGA TTT TCA TCC GCC TA	389
	E <sub>r</sub>	GCT ATT GAT CCA AAA CGG TGA	
F	F <sub>f</sub>	CGG CTT CAT TAG AGA ACG GA	543
	F <sub>r</sub>	TAA CTC CCC TAG CCC CGT AT	

③ PCR을 위한 혼합액의 총량은 최종 50  $\mu$ l이 되도록 하였고, 혼합액에는 DNA template 1 $\mu$ l, 1 $\times$ PCR buffer, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, *Taq* DNA polymerase 2 unit, 각 target에 따른 primer(0.3 $\mu$ M) 를 첨가하여 PCR을 진행한다.

### ④ PCR 반응조건

구분	온도 및 시간	cycle 수
denaturation	95°C, 30s	
annealing	60°C, 25s	
extention	72°C, 1m 25s	
final extention	72°C, 3m	
	4°C, $\infty$	

2) 참조: Milla Lindström et. al., Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material, Applied and Environmental Microbiology, 67(12), pp5694–5699, 2001

## IV. 식중독균 시험법

### PCR 산물 확인

- 최종산물의 반응액 5  $\mu$ l를 취하여 2% agarose로 100V에서 25분간 전기영동하고 EtBr(1 $\mu$ g/mL) 또는 동등한 기능의 염색시약으로 염색한 후 UV를 이용하여 반응생성물을 확인한다. 이때, DNA 크기를 알 수 있도록 100bp Ladder를 동시에 전기영동 한다.

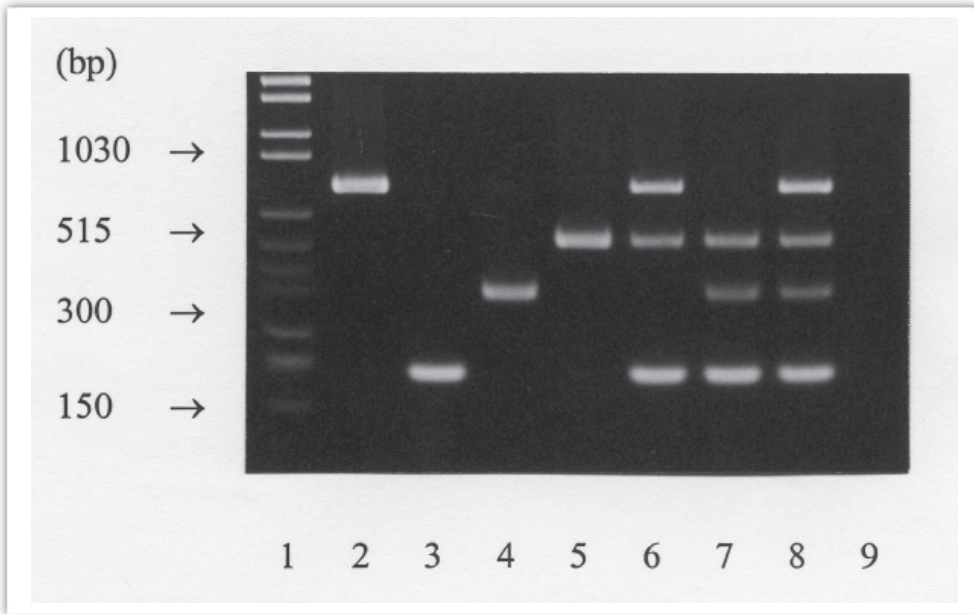


그림 1. Multiplex PCR detection of *C. botulinum*. Lanes: 1, molecular weight marker; 2, *C. botulinum* type A; 3, *C. botulinum* type B; 4, *C. botulinum* type E; 5, *C. botulinum* type F; 6, proteolytic *C. botulinum* types A, B, and F; 7, nonproteolytic *C. botulinum* types B, E, and F; 8, *C. botulinum* types A, B, E, and F; and 9, negative control.

2016년 식중독 원인조사 시험법



# 식중독 바이러스 시험법

1. 검체별 전처리 방법
2. 유전자 추출법
3. 유전자 증폭법





식품용수

어패류(굴)

채소류

과일류

절임식품

김치류

식육

①

검체 별 전처리 (바이러스 회수 및 농축)



②

유전자 추출 (시료 당 4개 이상 추출)



③

유전자 증폭



Realtime PCR

검출시

Conventional PCR



④

염기서열분석 (Sequencing reaction)



⑤

최종판정

### 대상 바이러스

- ◆ 노로바이러스
- ◆ A형 간염바이러스
- ◆ 로타바이러스
- ◆ 아스트로바이러스
- ◆ 장관아데노바이러스
- ◆ 사포바이러스
- ◆ E형 간염바이러스

❖ Realtime RT-PCR은 선택적으로 사용할 수 있으며, 본 검사법과 차이가 있을 경우 Conventional PCR을 동시에 수행하여 교차확인

〈식중독 바이러스 시험법〉

### 1. 검체별 전처리 방법

#### 1-1. 식품용수 시험법

##### 1) 시약 및 시액

- 가) 2% 티오황산나트륨(Sodium thiosulfate:  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 용액  
4,800 mL의 증류수에 티오황산나트륨 100 g을 녹여 최종 5,000 mL의 용액을 제조하고 121°C, 15분간 고압증기 멸균한다.
- 나) 1M 염산(HCl) 용액  
1M 염산(HCl) 용액은 식품용수 채수 시 검체의 pH를 조정하는데 사용한다.
- 다) 1.5% Beef extract(desiccated powder)용액  
1,900 mL의 증류수에 Beef extract 분말 30 g과 glycine 7.5 g(최종농도 = 0.05 M)을 넣고 1M NaOH를 이용하여 pH 9.5로 조정된 후 최종 2 L로 제조하고 121°C, 15분간 고압증기 멸균한다. Beef extract 용액은 4°C에서 일주일간 혹은 -20°C에서 장기간동안 보관할 수 있다.
- 라) 0.15 M 인산일수소나트륨, 7수화물(Sodium phosphate, dibasic, ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )) 용액  
950 mL의 증류수에 Sodium phosphate 40.2 g을 넣고 1M NaOH를 이용하여 pH 9.5로 조정된 후 최종 1 L로 제조하고 121°C, 15분간 고압증기 멸균한다.
- 마) 1M 수산화나트륨(NaOH) 용액  
400 mL의 증류수에 20 g의 수산화나트륨을 넣고 최종 500 mL로 제조하여 수산화나트륨 용액을 준비한다. 수산화나트륨 용액은 상온에서 수개월 동안 보관할 수 있다.
- 바) 유전자 추출 키트(Viral RNA Mini Kits)
- (1) RNA가 유전자인 바이러스는 시판되는 바이러스 RNA 추출 키트(kit)를 사용한다.  
※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 QIAGEN-Viral RNA Mini Kits 또는 동등 이상의 제품사용 가능
  - (2) DNA가 유전자인 바이러스는 시판되는 바이러스 DNA 추출 키트(kit)를 사용한다.  
※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 AUTOPREP Viral Nucleic Acid Prep Kit 또는 동등 이상의 제품사용 가능





## 사) 유전자 증폭 용액

### (1) RT-PCR 증폭 용액

- ① OPC (Oligo Nucleotide Purification Cartridge)로 정제된 프라이머를 사용한다.
- ② RT-PCR에 사용되는 One-step RT-PCR mix는 본 시험법에서 제시한 제품(1-Step RT-PCR ReddyMix Kit) 또는 동등 이상의 제품을 사용할 수 있다.
- ③ 2차 PCR(Semi-nested PCR)에 사용되는 Taq DNA polymerase, 10X buffer(MgCl<sub>2</sub> 포함), 10 mM dNTPs(each dNTP 2.5 mM)의 필요한 시약을 갖추어 PCR을 실시한다(이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 DNA polymerase, buffer, dNTPs도 사용할 수 있다).
- ④ 증류수는 역삼투압 정제 등에 의해 17 MΩ/cm까지 정제한 초순수로 DNA, DNase 등의 오염이 없는 것을 사용한다.

### (2) Realtime PCR 증폭 용액

- ① 프라이머와 프로브는 합성하여 사용한다.
- ② PCR에 사용되는 Realtime PCR mix는 본 시험법에서 제시한 제품(Agpath ID one-step RT-PCR reagent) 또는 동등 이상의 제품을 사용할 수 있다.  
※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 동등 이상의 제품사용 가능
- ③ 증류수는 역삼투압 정제 등에 의해 17 MΩ/cm까지 정제한 초순수로 DNA, DNase 등의 오염이 없는 것을 사용한다.

## 2) 장치 및 기구

### 가) 검체 채수과정

#### (1) 표준필터장치 : 식품용수 1,500~1,800 L을 채수하는 장치

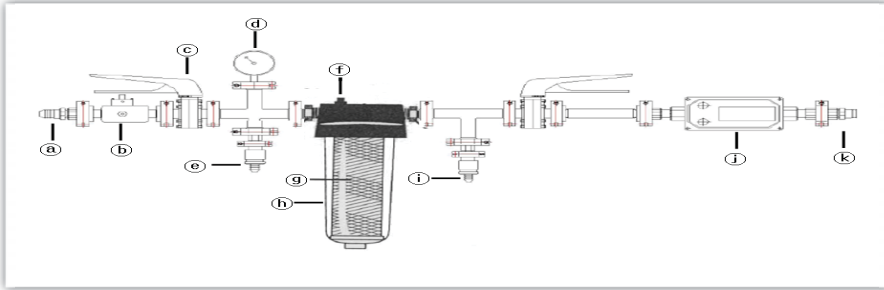
구성 : 용수 유입구, 단일주입기, 유량조절밸브, 압력게이지, 탈리액 주입구, 양전하 카트리리지 필터(positive cartridge filter), 카트리리지 하우징(cartridge housing), 탈리액 유출구, 유량계, 용수 유출구

※ 양전하 카트리리지 필터 : 1-MDS, NanoCeram 또는 이와 동등한 것

- (2) 휴대용 pH 측정기 : 식품용수의 수소이온농도를 측정한다.
- (3) 휴대용 탁도 측정기 : 식품용수의 혼탁도를 측정한다.
- (4) 휴대용 염소 농도 측정기 : 식품용수의 잔류염소농도를 측정한다.
- (5) 휴대용 아이스박스 : 식품용수 채수 후 양전하 카트리리지 필터(positive cartridge filter)를 운반하기 위해 사용한다.

## V. 식중독 바이러스 시험법

- (6) 상업용 얼음팩 : 양전하 카트리지 필터(positive cartridge filter) 운반 시 냉장상태 유지용으로 사용한다.
- (7) 기타 : 공구상자, 2 L 멸균 비커, 멸균된 알루미늄박, 클램프, 바이러스시료 검체기록부, 멸균장갑, 수은온도계, 멸균 메스실린더, 채수용 호스



- Ⓐ용수 유입구 Ⓑ단일주입기 Ⓒ유량조절밸브 Ⓓ압력계이지 Ⓔ탈리액 주입구
- Ⓕ감압단추 Ⓖ양전하 카트리지 필터 Ⓗ카트리지 하우징 Ⓖ탈리액 유출구
- Ⓖ유량계 Ⓖ용수 유출구

《표준필터장치》

### 나) 바이러스 탈리과정

- (1) 연동정량펌프 : 1.5% Beef extract 용액을 양전하 카트리지 필터로 유입시켜 흡착된 바이러스를 탈리하기 위한 장치
- (2) 연동정량펌프 탈리액 유입용 호스, 탈리액 유출용 호스
- (3) 자석교반기 및 자석교반 막대
- (4) 하우징 거치대, 탈리액 유입구, 탈리액 유출구, 압력계이지

### 다) 바이러스 농축과정

- (1) 원심분리기(4 ℃, 2,500~10,000 G)
- (2) 원심분리용기(50~500 mL 용량)
- (3) 0.22 μm 주사기 필터(30 mL 용량)

### 라) 유전자증폭과정

- (1) 유전자 증폭기(PCR machine)
- (2) 실시간 유전자 증폭기(Realtime PCR machine)



### 3) 시험방법

#### 가) 채수과정

채수할 때는 멸균된 장갑을 착용하여 바이러스가 오염되지 않게 주의하고 오염이 될 수 있는 환경요인들을 피하여야 한다. 멸균된 장갑이 사람의 피부나 오염 가능성이 있는 장치, 부품에 접촉이 되었을 경우 장갑을 바꿔 착용한다(예 : 수도꼭지나 다른 환경요소 표면).

- (1) 채수하려는 검체의 배출구(수도꼭지 등)를 2~3분 정도 열고 식품용수를 흘려보낸다. 배출구에 채수호스를 장착 시 누수가 되지 않도록 클램프를 이용하여 단단히 연결하고 탁도가 균일할 때까지 흘려보낸 후 배출구를 잠근다.
- (2) 염소(Chlorine, HOCl)나 불꽃버너를 이용하여 배출구(수도꼭지 등)를 가열 또는 살균한다.
- (3) 채수용 호스의 알루미늄박을 제거한 후 채수 할 배출구에 연결하고 표준필터장치 용수 유입구(㉑)에 호스를 연결한다. 이 단계에서 양전하 카트리지 필터(㉒)는 연결하지 않는다.
- (4) 천천히 배출구를 열어 압력게이지가 30 PSI가 넘지 않도록 배출구를 조절하고 76 L(20 gal)의 식품용수를 흘려보낸다.
- (5) 식품용수 76 L를 흘려 보낸 후 일부를 2 L 멸균 비커에 받아 용수의 탁도, pH, 온도, 염소 농도를 각 각 측정하여 검체번호, 채수위치, 채수자의 이름과 함께 바이러스 검체채수기록부에 기록한다. pH 측정기는 사용 전 보정(calibration) 한다.
- (6) 용수 배출구(수도꼭지 등)를 잠그고 검체가 다음의 조건에 해당되어 부가장치의 연결이 필요한지의 여부를 결정하여 연결한다.
  - (가) pH 8이상일 경우 멸균된 튜브로 단일주입기(㉓)와 1 M 염산 용액이 담긴 메스실린더를 연결하고, 배출구(수도꼭지 등)를 다시 열어 용수의 pH가 6.5~7.5가 되도록 단일 주입기를 통해 1 M 염산 용액을 흘려보낸다. 용수유출구(㉔)로 흘러나온 용수의 pH를 측정해 바이러스 검체 채수기록부에 기록한다.
  - (나) 잔류염소 제거를 위해 위와 같이 단일주입기를 연결하여 식품용수 3.8 L(1 gal) 당 2% 티오황산나트륨 용액 10 mL이 주입되도록 한다.

※ (가)와 (나)번이 모두 해당할 경우 이중주입기를 연결하여 사용한다.
- (7) 바이러스검체 채수기록부에 검체 채취일, 시작 시간, 유량계의 초기 수치를 기록한다.
- (8) 알루미늄박을 제거한 양전하 카트리지 필터를 탈리액 주입구(㉕)와 유출구(㉖) 사이에 연결한다.
- (9) 용수를 천천히 흐르게 하면서 카트리지 하우징 상단의 감압단추(㉗, vent button)를 눌러 내부공기가 완전히 빠지도록 한 후, 수도꼭지를 완전히 열어 준다.
- (10) 압력게이지가 30 PSI 이하로 유지되도록 유량조절 밸브를 조정하고 식품용수 1,500~1,800 L를 통과시킨 후, 용수 배출구(수도꼭지 등)를 잠근다.

## V. 식중독 바이러스 시험법

- 정상적 채수가 어려운 갈수기 등의 경우, 현장 상황 등을 고려하여 500L 이상으로 채수량을 조절하여 실시 할 수 있음

- (11) 바이러스 검체 채수기록부에 검체채취 종료일, 종료 시간, 유량계의 최종 수치 등을 기록한다.
- (12) 표준필터장치로부터 카트리지 하우스(㉑)를 분리하고 양전하 카트리지 필터를 거꾸로 하여 남은 물을 버린 후 하우스 양끝의 연결된 개구부를 멸균된 알루미늄박으로 쓴다.
- (13) 양전하 카트리지 필터를 아이스박스에 담고 얼음팩 등을 사용하여 냉장상태(냉동시켜서는 아니 된다)로 유지하여 즉시 실험실로 운반한다.

### 나) 탈리과정

- (1) 냉장 보관하여 운반한 필터는 채수 시작 시간부터 24시간 내에 실험실에서 바이러스 탈리 시험을 실시하여야 한다. 다만, 부득이한 경우로 인해 24시간 내에 탈리시험이 불가할 경우 최대 72시간이 넘지 않도록 한다.
- (2) 탈리용 거치대에 카트리지 하우스를 장착한 후 유량조절 밸브를 모두 닫는다.
- (3) 탈리액 주입구에 연동정량펌프 호스를 연결한 후 연동정량펌프와 1.5% Beef extract 용액이 채워져 있는 유리병에 호스를 차례로 연결하되 1-MDS 필터는 1 L, NanoCeram 필터에는 0.5L의 1.5% Beef extract 용액을 사용한다.
- (4) 탈리액 유출구에 유출용 호스를 연결하여 1.5% Beef extract 용액이 들어 있는 유리병에 넣고 탈리액 유출구를 닫는다.
- (5) 연동정량펌프를 가동하여 양전하 카트리지 필터 하우스 안으로 1.5% Beef extract 용액이 양전하 카트리지 필터 내에 완전히 차도록 한 후 감압단추를 통해 1.5% Beef extract 용액이 넘쳐 흘러나오기 시작하면 감압단추에서 손을 떼고, 연동정량펌프 가동을 멈춘 후 5분간 정치한다.  
※ 감압단추는 탈리액이 양전하 카트리지 필터 안으로 가득 채워질 때까지 눌러준다.
- (6) 탈리액 유출구를 열고 연동정량펌프를 다시 가동한 후 하우스에 채워져 있는 1.5% Beef extract 용액이 서서히 필터를 통과하도록 한다. 통과한 완충액은 1.5% Beef extract 용액이 들어있던 유리병에 수집한다. 탈리액을 회수할 때는 거품이 없도록 주의하여야 한다.  
※ 연동정량펌프 대신 양압펌프와 압력통을 사용하여 탈리과정을 진행할 수도 있다.
- (7) 유리병에 수집된 탈리액은 4)~6)의 과정을 2회 반복한다.
- (8) 최종 탈리액은 1M 염산 용액으로 pH를 7.0~7.5 사이로 조절하고 멸균된 메스실린더를 사용하여 부피를 기록한다.
- (9) 탈리액은 24시간 이내에 농축시험이 가능할 경우 4℃에서 보관하며, 농축 시험을 즉시 시행하기 어려울 때에는 -70℃에서 보관한다.



#### 다) 농축과정

- (1) 최종 탈리액을 교반기에서 혼합하면서 1 M 염산용액으로 pH를  $3.5 \pm 0.1$ 로 조절한 후, 실온에서 30분간 천천히 섞는다.
- (2) 침전물이 생기면 탈리액을 멸균한 원심분리용기에 옮겨 원심분리한다(2,500 G 15분, 4°C).
- (3) 원심분리 후, 상층액을 제거하고 남은 침전물에 0.15M sodium phosphate 완충액(pH 9.0~9.5)을 20~30mL 넣어 완전히 부유 시킨 후 실온에 10분간 방치한다.
- (4) 부유시킨 용액을 원심분리한다(7,000G, 10분, 4°C).
- (5) 상층액을 취해 1M 염산용액으로 pH 7.0~7.5로 조절한다.
- (6) 미생물오염을 방지하기 위해 30mL 주사기를 이용하여 상층액을 0.22 $\mu$ m 주사기 필터로 여과한다. 검체 중의 바이러스가 필터에 흡착되는 것을 방지하기 위하여 사전에 0.22 $\mu$ m 주사기 필터에 10~20mL의 1.5% Beef extract 용액(pH 7.0~7.5)을 통과시킨다.
- (7) 최종 농축 검체량(FCSV=final concentrated sample volume)을 기록하고 검체를 24시간 이내에 분석할 경우는 4°C에 보관하고 나머지는 분석 전까지 -70°C에 보관한다.
- (8) 최종 농축검체 20~30mL는 유전자 추출을 위한 검체로 사용한다.

## 1-2. 어패류(굴) 시험법

### 1) 시약 및 시액

#### 가) Proteinase K

200 mL의 멸균 증류수에 Proteinase K(30U/mg) 60 mg을 넣고 천천히 섞어 녹여 준 후 사용할 용량(3ml)으로 분주하여 -20°C에서 보관하여 사용한다.

#### 나) 유전자 추출 키트(Viral RNA Mini Kits)

- (1) RNA가 유전자인 바이러스는 시판되는 바이러스 RNA 추출 키트(kit)를 사용한다.

※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 QIAGEN-Viral RNA Mini Kits 또는 동등 이상의 제품사용 가능

- (2) DNA가 유전자인 바이러스는 시판되는 바이러스 DNA 추출 키트(kit)를 사용한다.

※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 AUTOPREP Viral Nucleic Acid Prep Kit 또는 동등 이상의 제품사용 가능

#### 다) 유전자 증폭 용액

- (1) RT-PCR 증폭 용액

① OPC (Oligo Nucleotide Purification Cartridge)로 정제된 프라이머를 사용한다.

## V. 식중독 바이러스 시험법

- ② RT-PCR에 사용되는 One-step RT-PCR mix는 본 시험법에서 제시한 제품(1-Step RT-PCR ReddyMix Kit) 또는 동등 이상의 제품을 사용할 수 있다.
- ③ 2차 PCR(Semi-nested PCR)에 사용되는 *Taq* DNA polymerase, 10X buffer(MgCl<sub>2</sub> 포함), 10mM dNTPs(each dNTP 2.5 mM)의 필요한 시약을 갖추어 PCR을 실시한다(이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 *Taq* DNA polymerase, buffer, dNTPs도 사용할 수 있다).
- ④ 증류수는 역삼투압 정제 등에 의해 17 MΩ/cm까지 정제한 초순수로 DNA, DNase 등의 오염이 없는 것을 사용한다.

### (2) Realtime PCR 증폭 용액

- ① 프라이머와 프로브는 합성하여 사용한다.
- ② PCR에 사용되는 Realtime PCR mix는 본 시험법에서 제시한 제품(Agpath ID one-step RT-PCR reagent) 또는 동등 이상의 제품을 사용할 수 있다.  
※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 동등 이상의 제품사용 가능
- ③ 증류수는 역삼투압 정제 등에 의해 17 MΩ/cm까지 정제한 초순수로 DNA, DNase 등의 오염이 없는 것을 사용한다.

## 2) 장치 및 기구

- 가) 혼합용 배양기(shaking incubator) : 최대 원심력 0~330rpm 이상 또는 동등 이상인 것
- 나) 항온수조(Water bath)
- 다) 대용량원심분리기 : 최대원심력 35,000G 이상 또는 동등 이상인 것으로 50mL, 250mL, 500mL의 용액을 처리할 수 있는 로터를 사용하며 -20℃ ~ 40℃까지 조절 가능한 것을 사용한다.
- 라) 호모게나이저(Homogenizer)
- 마) 무균 작업대(Bio Safety Cabinet)
- 바) 유전자 증폭기(PCR machine)
- 사) 실시간 유전자 증폭기(Realtime PCR machine)



### 3) 검체 채취의 일반사항

#### 가) 검체의 전처리

- (1) 굴은 채취 전 조직이 손상되지 않았는지 확인하고, 깨끗한 물로 씻어 모래나 진흙이 제거된 상태여야 한다.
- (2) 플라스틱 백 등에 얼음이나 아이스 팩을 넣은 후 검체를 채취하며, 얼음 녹은 물 등이 검체에 오염되지 않도록 별도의 포장을 하여야 한다.
- (3) 채취 후 냉장상태를 유지하면서 4시간~24시간 이내에 분석 의뢰하여야 한다.
- (4) 냉동 굴의 채취에는 검체가 녹지 않도록 냉동 상태를 유지하여 운반하여야 한다.

#### 나) 검체의 보관

- (1) 냉장상태로 보관하며, 24시간 내에 실험을 진행한다.
- (2) 냉동 굴은  $-15^{\circ}\text{C}$  이하의 온도에서 실험 전까지 보관한다.

#### 다) 검체의 준비

- (1) 냉동상태의 검체는 실온에서 녹여 검체를 준비한다.
- (2) 흐르는 물에 조심스럽게 검체를 헹구어 검체에 남아있는 진흙이나 모래를 제거한다.
- (3) 칼을 양쪽 겹질 사이로 삽입하여 패각을 개봉한 후 가위를 이용하여 한쪽 면에 남아있는 패각근을 제거한다.
- (4) 패각이 제거된 검체로부터 다음의 시험방법에 의하여 중장선을 분리하여 검체로 사용한다.  
※ 검체의 채취장소와 계절에 따라 중장선의 크기나 무게는 차이가 날수 있다.

#### 라) 주의 사항

검체 취급 시 공기에 의한 검체의 교차 오염에 특별히 주의하여야 한다.

### 4) 추출과정

※ 실험자가 실험과정의 오류점검을 하고자 할 경우에는 노로바이러스 surrogate(뮤린 노로바이러스 등)를 추출단계부터 해당식품에 인위적으로 첨가하여 확인할 수 있다.

가) 가위 또는 수술용 칼과 핀셋 등을 사용하여 굴 연체부의 내부에서 중장선(그림 1)을 분리한다.

나) 중장선(검은색을 띠고 있어 쉽게 판별 가능함) 주위에 붙어 있는 조직을 가능한 조심스럽게 제거한 후, 중장선 3g을 50mL 튜브에 모은다.

다) 3 mL의 Proteinase K를 첨가하고 호모게나이저를 사용하여 중장선 3 g을 완전히 균질화한다.

## V. 식중독 바이러스 시험법

- 라) 37°C shaking incubator에서 320rpm, 60분 동안 반응시킨다.
- 마) 60±2.0°C의 항온수조에서 15분 동안 반응하고 4,000×g에서 5분 동안 원심분리를 한 후 상층액 1mL을 조심스럽게 취한 후 상층액은 다시 한번 원심분리(4,000xg, 2분)한다. 최종 상층액은 유전자 추출을 위한 시료로 사용한다.

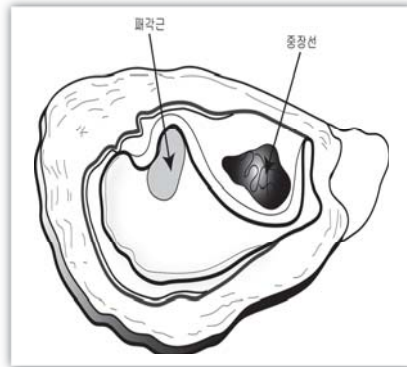


그림 1. 굴의 중장선 위치

### 1-3. 채소류, 과일류, 절임식품 시험법

#### 1) 시약 및 시액

##### 가) 채소류 바이러스 추출용액

- 0.25M Threonine-0.3M NaCl(pH 9.5) 용액  
Threonine 29.8g와 NaCl 17.53 g를 증류수에 녹여 1,000mL의 용액을 조제하고 pH 9.5로 조정한 후 121°C에서 15분간 고압증기 멸균한다.

##### 나) 과일류 바이러스 추출용액

- Beef Extract(100 mM Tris-HCl, 50 mM glycine, 3% Beef Extract (pH 9.5)) 용액  
Beef Extract 30g, Tris 15.76g, Glycine 3.75g을 증류수에 녹여 1,000mL의 용액을 제조하고 pH 9.5로 조정한 후 121°C에서 15분간 고압증기 멸균한다.

##### 다) 절임식품 바이러스 추출용액

- 0.25M Glycine-0.3M NaCl(pH 7.5) 용액  
Glycine 18.76g과 NaCl 17.53g을 증류수에 녹여 1,000mL의 용액을 제조하고 pH 7.5로 조정한 후 121°C에서 15분간 고압증기 멸균한다.





라) 40% PEG(polyethylene glycol) 8,000 용액

PEG 8,000 400g을 증류수에 녹여 최종적으로 1,000mL의 용액을 조제하고 121°C에서 15분간 고압증기 멸균한다.

마) 3M NaCl 용액

염화나트륨 175.3g을 1,000mL의 증류수에 녹여 121°C, 15분간 고압증기 멸균한다.

바) 1M NaOH 용액

수산화나트륨 40g을 증류수에 녹여 1,000mL의 용액을 조제한다.

사) DEPC 처리 증류수

증류수 500mL에 Diethylpyrocarbonate(DEPC) 0.5mL을 가한 후 강하게 흔들어주고 정치하는 것을 여러 차례 반복한 후, 적어도 16시간 이상 방치한 다음 121°C에서 15분간 고압증기멸균 후 사용한다.

아) 유전자 추출 키트(Viral RNA Mini Kits)

(1) RNA가 유전자인 바이러스는 시판되는 바이러스 RNA 추출 키트(kit)를 사용한다.

※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 QIAGEN-Viral RNA Mini Kits 또는 동등 이상의 제품사용 가능

(2) DNA가 유전자인 바이러스는 시판되는 바이러스 DNA 추출 키트(kit)를 사용한다.

※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 AUTOPREP Viral Nucleic Acid Prep Kit 또는 동등 이상의 제품사용 가능

자) 유전자 증폭 용액

(1) RT-PCR 증폭 용액

① OPC (Oligo Nucleotide Purification Cartridge)로 정제된 프라이머를 사용한다.

② RT-PCR에 사용되는 One-step RT-PCR mix는 본 시험법에서 제시한 제품(1-Step RT-PCR ReddyMix Kit) 또는 동등 이상의 제품을 사용할 수 있다.

③ 2차 PCR(Semi-nested PCR)에 사용되는 Taq DNA polymerase, 10X buffer(MgCl<sub>2</sub> 포함), 10mM dNTPs(each dNTP 2.5mM)의 필요한 시약을 갖추어 PCR을 실시한다(이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 DNA polymerase, buffer, dNTPs도 사용할 수 있다).

④ 증류수는 역삼투압 정제 등에 의해 17 MΩ/cm까지 정제한 초순수로 DNA, DNase 등의 오염이 없는 것을 사용한다.

(2) Realtime RT-PCR 증폭 용액

① 프라이머와 프로브는 합성하여 사용한다.

## V. 식중독 바이러스 시험법

- ② PCR에 사용되는 Realtime PCR mix는 본 시험법에서 제시한 제품(Agpath ID one-step RT-PCR reagent) 또는 동등 이상의 제품을 사용할 수 있다.
  - ※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 동등 이상의 제품사용 가능
- ③ 증류수는 역삼투압 정제 등에 의해 17 MS/cm까지 정제한 초순수로 DNA, DNase 등의 오염이 없는 것을 사용한다.

### 2) 장치 및 기구

- 가) 3방향 혼합기(3D-shaker) : 최대 원심력 0~150rpm 이상 또는 동등 이상인 것
- 나) 대용량원심분리기 : 최대원심력 35,000G 이상 또는 동등 이상인 것으로 50mL, 250mL, 500mL의 용액을 처리할 수 있는 로터를 사용하며 -20℃ ~ 40℃까지 조절 가능한 것을 사용한다.
- 다) 자석교반기 : 냉장상태에서 부식이 되지 않는 재질의 교반기를 사용한다.
- 라) 실험용 냉장고 : 2~23℃까지 조절 가능한 것을 사용하며, 자석교반기 사용을 위해 전력 공급이 가능하도록 전기선 유입구가 있는 것을 사용한다.
- 마) 미량냉장원심분리기 : 1.5mL 튜브 전용 로터가 장착된 것으로 최대원심력 20,000G 또는 동등 이상인 것을 사용한다.
- 바) 무균 작업대(Bio Safety Cabinet)
- 사) pH 측정기(pH meter)
- 아) 자외선 조사기(UV transilluminator)
- 자) 유전자 증폭기(PCR machine)
- 차) 실시간 유전자 증폭기(PCR machine)

### 3) 검체의 전처리

시료 100g을 세절기(칼날 등)를 이용해 무균 작업대 안에서 일정 간격(약 2cm x 3cm)으로 세절하고 핀셋으로 1 L 유리병에 넣은 후 바이러스 분석시료로 사용한다.

- ※ 전처리에 사용되는 기구는 고압증기 멸균된 것을 사용하여야 하며 시료를 칭량할 때에는 오염 방지를 위해 저울 본체와 주변을 70% 에탄올로 깨끗이 닦은 후 사용한다.
- ※ 식중독 사고 원인조사 시 필요에 따라 다량의 검체를 사용하는 경우, 추출과정과 농축과정에 사용 되는 시액은 추출량에 맞춰 사용량을 조절한다(추출과정 예시 참조).



#### 4) 추출과정

가) 각 시료에 해당하는 추출용액을 조심스럽게 첨가하여 유리병마개를 닫은 후 3방향 혼합기(3D-shaker)에 장착한다.

※ 추출용액

- 엽경채류 : 0.25M Threonine-0.3M NaCl(pH 9.5)
- 과실류 : Beef Extract(100 mM Tris-HCl, 50 mM glycine, 3% Beef Extract (pH 9.5))
- 절임식품 : 0.25M Glycine-0.3M NaCl(pH 7.5)

① 추출 용액 사용량은 시료량의 9.5배를 첨가(예시)

시료량	100g	200g
추출 용액 사용량	950ml	1,900ml

② 시료량이 다량일 경우 1,000mL의 추출용액에 시료를 넣고, 1시간 동안 혼합기(shaker)에서 교반한다. 이 후 교반과정(회수)이 끝난 최초 시료를 제거한 후 남은 추출용액에 잔여시료를 넣고 동일한 방법으로 모두 교반하여 아래 다)의 과정을 진행한다.

나) 3방향 혼합기(3D-shaker)에서 150rpm으로 1시간동안 교반하여 시료 표면에 흡착된 바이러스를 탈리한 후 생성된 거품을 제거하기 위해 냉장고에서 1시간 동안 방치한다.

다) 탈리된 채소류 시료를 제외하고 탈리용액을 모두 취해 500mL 멸균 원심분리용기에 옮긴다.

라) 원심분리기에서 6,000G로 4 °C에서 20분간 원심 분리한 다음 상층액(탈리액)을 모두 조심스럽게 취하여 마그네틱 바(magnetic bar)가 들어 있는 1,000mL 멸균 비이커에 옮긴다.

#### 5) 농축과정

가) 상기 4), 라)에서 얻어진 상층액에 바이러스의 농축을 위해 40% PEG 8,000용액 427mL과 3M NaCl용액 142mL을 탈리액이 들어 있는 비이커에 넣어 혼합한 후 멸균호일로 비이커를 덮고 4°C 냉장고에서 16시간동안 교반하면서 1차 침전한다.

나) 1차 침전 후 농축액 전체를 500mL 멸균 원심분리 용기에 나누어 넣고 16,000G로 4°C에서 20분간 원심분리한다.

※ 추출 시료량에 따른 1차 농축 용액 사용량

PEG 8,000	추출량의 45% 첨가
3 M NaCl	추출량의 15% 첨가

## V. 식중독 바이러스 시험법

- 다) 원심분리 후 상층액 30mL 정도를 별도의 50mL 튜브에 옮긴 후 남아 있는 상층액은 기벽의 침전물이 떨어지지 않도록 조심하면서 완전히 제거한다.
- 라) 별도로 옮겨 놓은 상층액 30mL 중 20mL을 정확히 취하여 침전물이 있는 원심분리 용기에 다시 넣고 피펫을 이용하여 기벽에 있는 침전물을 녹인 다음 클로르포름 20mL을 넣어 침전물을 완전히 녹여 부유한다.
- 마) 부유된 침전물은 모두 멸균 50mL 원심분리 용기에 넣고 10,000G로 4°C에서 30분간 원심분리한다.
- 바) 원심분리 후 하층액과 상층액 경계선을 확인하고 경계선 위의 상층액을 모두 취해 마그네틱 바가 들어 있는 200mL 멸균비이커에 넣은 후 40% PEG 8,000용액 14mL과 3M NaCl 4mL를 첨가하여 4°C 냉장고에서 3시간 동안 교반하면서 2차 침전시킨다.
- 사) 2차 침전 후 무균대에서 침전액 전체를 50mL 멸균 원심분리 용기에 넣고 35,000G로 4°C에서 20분간 원심분리 한다.
- 아) 원심분리 후 상층액을 모두 버리고 침전물에 DEPC 처리증류수 3mL을 넣어 강하게 진탕하여 부유시킨 후 유전자 추출을 위한 시료로 사용한다.

### 1-4. 김치류 시험법

#### 1) 공통적용(포기김치, 백김치, 동치미, 총각김치 등 모든 김치류 포함)

- 가) 멸균된 비커를 이용해 김치액 100ml을 취한 후, 250ml의 원심분리용기에 옮긴다.
- 나) 원심분리기에서 6,000G로 4°C에서 10분간 원심 분리한 다음 상층액 40ml을 취해 새로운 50ml의 원심분리용기에 옮기고, 6,000G로 4 °C에서 10분간 원심분리 한다.
- 다) 원심분리 후 상층액 280μl를 4개 이상 취해 유전자 추출을 위한 시료로 사용한다.
  - \* 유전자 추출과정과 PCR 증폭과정에서 검출이 확인될 경우 아래의 검출과정은 진행하지 않는다.
- 라) 남아 있는 상층액은 마그네틱 바가 들어 있는 200mL 멸균비이커에 넣은 후 PEG 8,000(40%)용액을 상층액의 45%로 해당되도록 첨가하고 3M NaCl은 상층액 15% 되도록 첨가하여 4°C 냉장고에서 3시간 동안 교반하며 침전시킨다.
- 마) 침전 후 전체액 중에 40mL을 멸균 원심분리 용기에 넣고 35,000G로 4°C에서 20분간 원심분리 한다.



바) 원심분리 후 상층액을 모두 버리고 침전물에 DEPC 처리증류수 2mL을 넣어 강하게 진탕하여 부유시킨 후 유전자 추출을 위한 시료로 사용한다.

사) 원심분리 후 상층액 280μl를 4개 이상 취해 유전자 추출을 위한 시료로 사용한다.

## 2) 개별적용(포기김치, 총각김치 등 김치액이 적거나 양념의 점성이 강한 경우)

가) 멸균된 비커를 이용해 김치 50g을 취한 후, 250ml의 원심분리용기에 옮긴다.

나) 0.25M Glycine-0.3M NaCl(pH 7.5) 50ml을 첨가하여 강하게 혼합한다.

다) 이 후 과정은 1)의 나)의 과정과 동일하다.

## 1-5. 식육 시험법

### 1) 시약 및 시액

가) Phosphate-Buffer saline (pH 7.4)

나) 유전자 추출 키트(Viral RNA Mini Kits)

재현성 및 검출효율 등을 고려하여 QIAGEN-Viral RNA Mini Kits 또는 동등 이상의 제품사용 가능

다) 유전자 증폭 용액

(1) RT-PCR 증폭 용액

- ① OPC (Oligo Nucleotide Purification Cartridge)로 정제된 프라이머를 사용한다.
- ② RT-PCR에 사용되는 One-step RT-PCR mix는 본 시험법에서 제시한 제품(1-Step RT-PCR ReddyMix Kit) 또는 동등 이상의 제품을 사용할 수 있다.
- ③ 2차 PCR(Semi-nested PCR)에 사용되는 *Taq* DNA polymerase, 10X buffer(MgCl<sub>2</sub> 포함), 10mM dNTPs(each dNTP 2.5 mM)의 필요한 시약을 갖추어 PCR을 실시한다(이와 동등한 결과를 얻을 수 있는 DNA polymerase, buffer, dNTPs도 사용할 수 있다).
- ④ 증류수는 역삼투압 정제 등에 의해 17 MΩ/cm까지 정제한 초순수로 DNA, DNase 등의 오염이 없는 것을 사용한다.

(2) Realtime PCR 증폭 용액

- ① 프라이머와 프로브는 합성하여 사용한다.
- ② PCR에 사용되는 Realtime PCR mix는 본 시험법에서 제시한 제품(Agpath ID one-step RT-PCR reagent) 또는 동등 이상의 제품을 사용할 수 있다.

## V. 식중독 바이러스 시험법

- ③ 증류수는 역삼투압 정제 등에 의해 17 MΩ/cm까지 정제한 초순수로 DNA, DNase 등의 오염이 없는 것을 사용한다.

### 2) 장치 및 기구

- 가) 호모게나이저(Homogenizer)
- 나) 스톱마커(Stomacher)
- 다) 원심분리기(Centrifuge)
- 라) 자외선조사기(UV Transilluminator)
- 마) 혼합기(Vortex mixer)
- 바) 수소이온 측정기(pH meter)
- 사) 전기영동장치(Gel Electrophoresis)
- 아) 유전자증폭장치(PCR machine)
- 자) 실시간유전자증폭장치(RealtimeRT-PCR machine)
- 차) 울트라 막 필터(Ultrafiltration membrane filter tube)

### 3) 검체 채취의 일반사항

#### 가) 검체의 채취

- ① 검체 간의 교차오염이 되지 않도록 한 검체 당 하나의 채취도구를 사용한다.
- ② 주변 환경과 시설에 의해 검체가 오염되지 않도록 주의한다.
- ③ 준비한 플라스틱 백이나 시료 용기 등에 검체를 채취한다.
- ④ 얼음이나 아이스 팩을 넣은 후 별도의 포장을 하여야 한다.
- ⑤ 채취 후 냉장상태를 유지하면서 24시간 이내에 분석한다.
- ⑥ 검체가 과사되지 않도록 냉장 상태를 유지하여 운반하여야 한다.

#### 나) 검체의 보관

- ① 냉장상태로 보관하며, 24시간 내에 실험을 진행한다.
- ② 실험하고 남은 검체는 -75℃ 이하의 온도에서 보관한다.
- ③ 냉동과 냉장상태의 반복을 피하기 위해 다음 실험 시 필요한 중량만큼 나누어 각각의 용기에 보관한다.



④ 검체를 구분할 수 있는 채취 날짜 및 라벨링을 한다.

다) 검체의 준비

① 냉장상태의 검체를 준비한다.

② 검체 간의 교차 오염을 방지하기 위하여 검체의 개수에 맞게 필요한 도구를 준비한다.

③ 멸균된 가위 또는 수술용 칼과 핀셋을 이용하여 100g 중량으로 검체를 나눈다.

④ 멸균된 가위 또는 수술용 칼과 핀셋을 이용하여 검체를 잘게 다진 후 기계를 이용한 2차 균질화를 준비한다.

※ 검체 취급 시 공기에 의한 검체의 교차 오염에 특별히 주의하여야 한다.

#### 4) 회수과정

가) 멸균 된 가위 또는 수술용 칼과 핀셋 등을 사용하여 검체를 100g 중량으로 절단한 후 잘게 다져서 1차 균질화 한다.

나) Phosphate-Buffer saline (pH 7.4) 100mL을 첨가하고 조직파쇄기로 2차 균질화 한다.

다) 균질화된 검체를 원심분리용 튜브에 옮겨 10,000 x g로 30분간 4°C에서 원심분리 한다.

라) 위의 과정을 거쳐 얻어진 용액으로 바이러스 농축 과정을 시행한다.

마) Vivaspin 20 UF membrane filter에 탈리용액 7mL을 옮겨 담은 후 8,000rpm, 15분간 원심 분리 한다.

바) 원심분리를 통해 모아진 탈리용액은 다시 새로운 UF membrane filter에 옮긴 후 8,000rpm 에서 15분간 원심분리 한다.

사) Membrane filter에 걸러지고 모아진 탈리용액을 취한다.

아) 최종 농축용액은 RNA 추출을 위한 시료로 사용한다.

### 2.

### 유전자 추출법

#### 2-1. 유전자 추출법(공통적용)

##### 1) RNA 바이러스 유전자 추출법

※ 적용 : 노로바이러스, A형 간염바이러스, 로타바이러스, 아스트로바이러스, 사포바이러스, E형 간염바이러스

※ 시판되는 바이러스 RNA 추출 키트(kit)를 사용하며, 제조사가 제시하는 적절한 실험법에 따라서 실시한다.

※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 QIAGEN-Viral RNA Mini Kits 또는 동등 이상의 제품 사용이 가능하며, 또한 자동유전자 추출장치를 사용할 경우에도 바이러스 RNA 추출 키트를 사용하여 유전자를 추출 할 수 있다.

가) 바이러스 유전자 추출 시 검체와 동일한 과정으로 음성대조군(negative control)을 사용하여 유전자를 추출하며 검체의 경우 시험 진행 중 오염 확인과 위해 4개의 RNA를 추출한다.

※ 음성대조군으로는 멸균증류수를 사용한다.

나) 검체 농축액과 음성대조군 각 280 $\mu$ l에 AVL buffer(guanidine thiocyanate 함유) 1,120 $\mu$ l를 각각 혼합하여 실온에서 10분 동안 방치한 후 가볍게 원심분리기를 이용하여 원심분리 (spin-down)한다.

다) 여기에 95~100% 에탄올 1,120 $\mu$ l을 넣어 혼합한 후 가볍게 원심분리 (spin-down)한다.

라) 혼합액 630 $\mu$ l을 소량 원심(Mini-spin) 컬럼으로 옮겨 6,000G에서 1분간 원심분리하고 컬럼을 새로운 회수용(collection) 튜브로 옮긴 다음 남은 혼합액을 630 $\mu$ l씩 동일한 방법으로 컬럼에 첨가하여 원심분리한다.

마) 소량 원심(Mini-spin) 컬럼을 새로운 회수용(collection) 튜브로 옮겨 AW1 완충액(guanidine hydrochloride 함유) 500 $\mu$ l을 넣고 6,000 G로 1분간 원심분리 후 컬럼을 새로운 회수용 (collection) 튜브로 옮긴다.

바) AW2 완충액 500 $\mu$ l을 넣고 20,000 G로 3분간 원심분리한 후 컬럼을 새로운 1.5mL 회수용 (collection) 튜브로 옮긴다.





사) AVE 완충액(sodium azide 함유) 60 $\mu$ l를 넣고 6,000 G로 1분간 원심분리하여 PCR을 수행하기 위한 주형(template)으로 사용한다.

※ 로타바이러스 PCR을 위한 RNA는 97 $^{\circ}$ C, 5분 동안 열처리를 한 후 얼음에서 10분간 방치하고 사용한다.

## 2) DNA 바이러스 유전자 추출법

※ 적용 : 장관아데노바이러스

※ 시판되는 바이러스 DNA 추출 키트(kit)를 사용하며, 제조사가 제시하는 적절한 실험법에 따라서 실시한다.

※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 AUTOPREP Viral Nucleic Acid Prep Kit 또는 동등 이상의 제품 사용이 가능하며, 또한 자동유전자 추출장치를 사용할 경우에도 바이러스 DNA 추출 키트를 사용하여 유전자를 추출 할 수 있다.

가) 바이러스 유전자 추출 시 음성대조군(negative control)을 포함하여 유전자를 추출하며 시료는 시험 진행 중 오염 여부를 확인하기 위해 4개의 DNA를 추출한다.

나) 검체 농축액, 양성대조군 및 음성대조군 각 300 $\mu$ l에 Lysis-Binding solution buffer 600 $\mu$ l을 넣어 혼합하고 가볍게 원심분리한 후 실온에서 5분 동안 방치한다.

다) 여기에 Magnetic bead를 40 $\mu$ l를 넣어 혼합한 후 상온에서 10분간 방치한다.

라) Magnetic trapper에 튜브를 장착한 후 상층액을 모두 제거한다.

마) Magnetic trapper에서 튜브를 꺼내 Washing 1 solution 600 $\mu$ l을 넣고 세척한 후 다시 trapper에 장착하여 상층액을 모두 제거한다.

바) trapper에서 튜브를 꺼내어 Washing 2 solution 600 $\mu$ l을 첨가하여 세척하고 다시 trapper에 장착하여 상층액을 모두 제거한다.

사) trapper에서 튜브를 꺼내어 Washing 3 solution 600 $\mu$ l을 첨가하여 세척하고 다시 trapper에 장착하여 상층액을 모두 제거한다.

아) Elution buffer 160 $\mu$ l를 넣고 5분간 실온 방치한다.

자) trapper에서 튜브를 꺼내어 60 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치한 후 다시 trapper에 장착하여 상층액을 취하며 PCR을 수행하기 위한 주형(template)으로 사용한다.

### 3. 유전자 증폭법

#### 3-1. 노로바이러스 (Norovirus)

##### 가) Duplex Realtime RT-PCR

- (1) Duplex Realtime RT-PCR 증폭을 위한 혼합액의 조성은 RT-PCR buffer 12 $\mu$ L(2X), Enzyme mix 0.5 $\mu$ L(25X), Enhancer 1.5 $\mu$ L, GI 프라이머(COG1R, COG1F) 각 1 $\mu$ L(10 pmol), GII 프라이머(BPO-13, BPO-13N, BPO-14) 각 1 $\mu$ L(10 pmol), GI 프로브(RING1(a)-TP) 0.5  $\mu$ L(10 pmol), GII 프로브(BPO-18) 0.5 $\mu$ L(10 pmol)을 하나의 튜브에 혼합하고 Real-time PCR plate에 20 $\mu$ L씩 분주한다.
  - ※ 증폭과정의 오류점검을 위해 노로바이러스 Realtime PCR 양성대조군과 유전자 추출과정을 거친 음성대조군을 시료와 함께 증폭반응 한다.
  - ※ Realtime PCR well에 혼합액 분주 시 거품이 발생하지 않도록 주의한다.
- (2) 유전자 추출과정에서 4개로 추출된 시료의 RNA는 Real-time PCR 증폭액이 분주되어 있는 plate의 well에 5 $\mu$ L를 첨가하되 각 RNA 당 3개의 well에 첨가한다.
- (3) Duplex Real-time RT-PCR 반응조건은 45 $^{\circ}$ C에서 30분, 95 $^{\circ}$ C에서 10분 반응 후, 95 $^{\circ}$ C 15초, 56 $^{\circ}$ C 60초를 1회로 하여 45회 반응시킨 후 증폭 곡선을 확인한다.
- (4) 노로바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 2와 같다.

표 1. 노로바이러스 Duplex Realtime RT-PCR

Component	Volume	노로바이러스	
		GI	GI
2X RT-PCR buffer	12 $\mu$ L		
Forward Primer(10pmol)	각 1 $\mu$ L	COG1F	BPO-13 BPO-13N
Reverse Primer(10pmol)	각 1 $\mu$ L	COG1R	BPO-14
Probe(10pmol)	각 0.5 $\mu$ L	RING1(a)-TP	BPO-18
Enhancer	1.5 $\mu$ L		
25X Enzyme mix	0.5		
RNA	5 $\mu$ L		
Total	25 $\mu$ L		

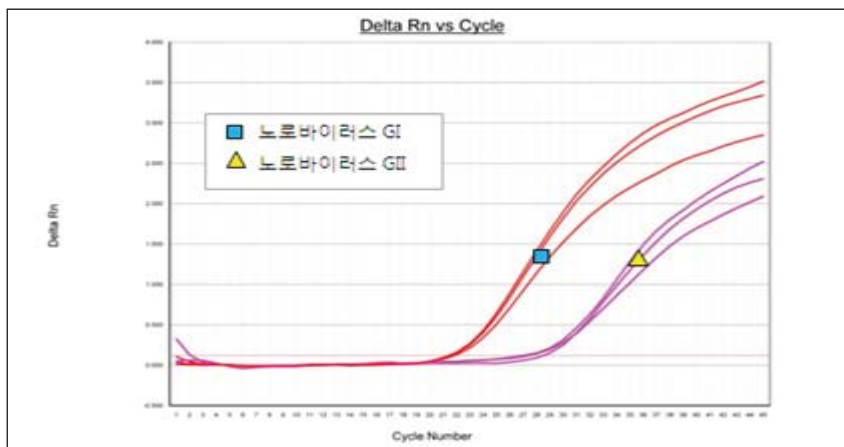


표 2. 노로바이러스 Duplex Real-time RT-PCR의 프라이머와 프로브의 염기서열

유전형	primer 및 probe	염기서열 (5' → 3')	위 치
GI	COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	5291
	COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	5375
	RING1(a)-TP	FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA	5340
GII	BPO-13	AIC CIA TGT TYA GIT GGA TGA G	5007
	BPO-13N	AGT CAA TGT TTA GGT GGA TGA G	
	BPO-14	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	5101
	BPO-18	VIC-CAC RTG GGA GGG CGA TCG CAA TC-TAMRA	5044

(5) 결과 확인

- ① PCR 반응이 종료 후 FAM-TAMRA detector를 적용한 경우의 증폭곡선이 확인되는 경우 노로바이러스 GI, VIC-TAMRA detector를 적용한 경우의 증폭곡선이 확인된 경우는 노로바이러스 GII로 검출을 확인한다.



- ② 만일 음성대조군(negative control)에서 증폭곡선이 확인되거나 또는 양성대조군에서 확인이 되지 않을 경우 등은 유전자 추출과정 부터 재시험을 실시해야한다.
- ③ Duplex Realtime RT-PCR에서 노로바이러스로 확인된 RNA 시료는 Conventional RT-PCR을 수행하여 노로바이러스의 유전자형을 결정한다.

나) Conventional RT-PCR

※ PCR로 노로바이러스의 유전자형(GI과 GII)을 각각 확인하기 위하여 유전자형에 따라 프라이머를 바꿔 Semi-nested PCR을 한다. RT-PCR(Reverse transcription-Polymerase chain reaction) 과정에서는 노로바이러스 유전자와 로타바이러스 유전자를 조합하여 합성한 RNA(GI, GII)를 PCR 양성대조군으로 사용한다.

(1) One-step RT-PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

- ① PCR 조성 조건은 RT-PCR pre-mix 10μl(Reverse transcriptase 0.5μl 포함), 프라이머는 GI과 GII 형(type)별로 달리하여 GI 형(type)(GI-F1M, GI-R1M), GII 형(type)(GII-F1M, GII-R1M) 각 2μl, 추출 RNA 5μl를 첨가하여 증류수로 총 25 μl로 맞추고 양성대조군의 경우 검체의 RT-PCR 혼합 조성물과 동일하게 한 후 GI과 GII 양성대조군 RNA 5μl를 각각 넣어 총 25μl로 반응시킨다.
- ② PCR 반응조건은 GI과 GII 모두 45°C에서 30분, 94°C에서 5분 DNA를 변성시키고, 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분 30초를 1회로 하여 35회 반응시킨 후, 72°C에서 7분간 연장 반응시킨다. 상기 반응 종료 후 PCR 생성물에 대하여 Semi-nested PCR을 실시한다.

표 1. 노로바이러스 One-step RT-PCR 반응액 조성

Component	Volume	Genogroup	
		GI primers	GII primers
Mastermix(2X)	9.5μl	-	-
Reverse transcriptase (50unit/μL)	0.5μl	-	-
D.W.	6μl	-	-
Forward primer(20pmol)	2μl	GI-F1M	GII-F1M
Reverse primer(20pmol)	2μl	GI-R1M	GII-R1M
Extracted RNA, PCR control	5μl	-	-
Total	25μl		

표 2. 노로바이러스 One-step RT-PCR 반응조건 및 온도

	온도	시간	Cycle
cDNA 합성 (cDNA synthesis)	45°C	30 min	1 cycle
초기 변성(predenaturation)	94°C	5 min	
변성(denaturation)	94°C	30 sec	35 cycle
결합 (annealing)	55°C	30 sec	
확장 (extension)	72°C	1 min 30 sec	
최종신장 (post-elongation)	72°C	7 min	1 cycle
보관	4°C	∞	∞



(2) Semi-nested PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

- ① One-step RT-PCR 산물을 주형으로 하여 Semi-nested PCR을 실시한다. 1차 PCR산물 2 $\mu$ l, 10x 완충액(MgCl<sub>2</sub> 포함) 5 $\mu$ l, dNTPs (10 mM) 4 $\mu$ l, *Taq* DNA polymerase (5 unit/ $\mu$ L) 1 $\mu$ l, 프라이머는 GI과 GII 형(type)별로 달리하여 GI 형(type)(GI-F2, GI-R1M), GII 형(type) (GII-F3M, GII-R1M) 각 2.5 $\mu$ l 첨가한 다음 최종 증류수로 총 50 $\mu$ l로 맞춘 후 Semi-nested PCR을 실시한다.
- ② PCR 반응조건은 GI과 GII 모두 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 DNA를 변성시키고 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분 30초를 1회로 하여 25회를 반응시킨 후 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 연장 반응한다.

표 3. 노로바이러스 Semi-nested PCR 반응액 조성

Component	Volume	Genogroup	
		GI primers	GI primers
dNTPs(10mM)	4 $\mu$ l	-	-
10x Buffer(with MgCl <sub>2</sub> )	5 $\mu$ l	-	-
D.W.	33 $\mu$ l	-	-
Forward primer(20 pmol)	2.5 $\mu$ l	GI-F2	GII-F3M
Reverse primer(20 pmol)	2.5 $\mu$ l	GI-R1M	GII-R1M
<i>Taq</i> DNA polymerase(5 unit/ $\mu$ L)	1 $\mu$ l	-	-
1st PCR Product	2 $\mu$ l	-	-
Total	50 $\mu$ l		

표 4. 노로바이러스 Semi-nested PCR 반응조건 및 온도

	온도	시간	cycle
초기 변성 (pre-denaturation)	94 $^{\circ}$ C	5 min	1 cycle
변성(denaturation)	94 $^{\circ}$ C	30 sec	25 cycle
결합 (annealing)	55 $^{\circ}$ C	30 sec	
확장 (extension)	72 $^{\circ}$ C	1 min 30 sec	
최종신장 (post-elongation)	72 $^{\circ}$ C	7 min	1 cycle
보관	4 $^{\circ}$ C	$\infty$	$\infty$

- ③ PCR 반응종료 후 PCR 증폭 반응액 5 $\mu$ l를 전기영동 완충액(gel loading buffer) 1 $\mu$ l와 혼합한 다음 젤(gel)의 각 홈에 검체를 조심스럽게 넣고 나머지 한 홈에 PCR 증폭산물의 크기를 식별하기에 적당한 표식 DNA(marker DNA) 7  $\mu$ l를 넣는다. 1.5% 아가로스 젤(agarose

## V. 식중독 바이러스 시험법

gel) 상에서 100V로 전기영동한 후 Ethidium Bromide(EtBr) 염색액(10mg/mL)으로 30분간 염색한 후 증류수로 10분간 탈색하고 자외선 조사기(UV transilluminator)로 조사하여 증폭된 DNA 밴드를 관찰한다.

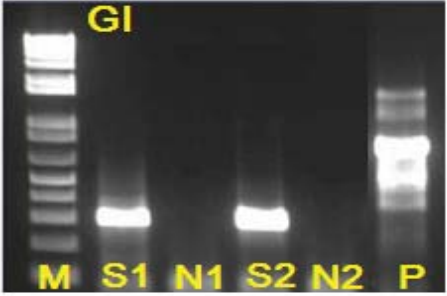
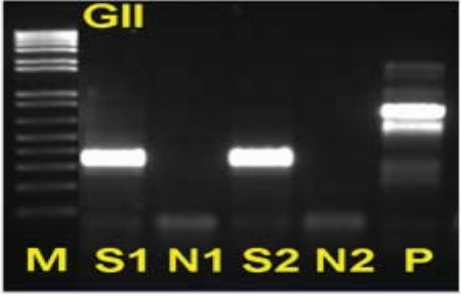
④ 노로바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 5와 같다.

표 5. 노로바이러스 PCR 프라이머 염기서열

Genogroup	Primer	Sequence (5'→3')	Application
I	GI-F1M	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GAT GAT	One-step RT PCR
	GI-R1M	CCA ACC CAR CCA TTR TAC ATY TG	One-step RT PCR/ Semi-nested PCR/ Sequencing
	GI-F2	ATG ATG ATG GCG TCT AAG GAC GC	Semi-nested PCR/ Sequencing
II	GII-F1M	GGG AGG GCG ATC GCA ATC T	One-step RT PCR
	GII-R1M	CCR CCI GCA TRI CCR TTR TAC AT	One-step RT PCR/ Semi-nested PCR/ Sequencing
	GII-F3M	TTG TGA ATG AAG ATG GCG TCG ART	Semi-nested PCR/ Sequencing

(3) 1차 결과 확인

① 아가로스 젤(agarose gel)상에서 시료에 313bp의 밴드가 있을 경우 GI형 노로바이러스로, 310bp의 밴드가 있을 경우 GII형 노로바이러스로 일차 확인하되, 양성대조군 GI 형은 689 bp, GII 형은 686 bp로 확인되어야 한다.

GI PCR 검출	GII PCR 검출
	
<p>M : 1kb plus marker; S1 : sample 1; N1 : gene extraction negative 1 P : PCR positive control</p>	<p>M : 1kb plus marker; S1 : sample 1; N1 : gene extraction negative 1 P : PCR positive control</p>



- ② 만일 음성대조군(negative control)이나 검체에서 양성대조군(positive control)과 같은 크기의 밴드가 확인되거나 또는 양성대조군에서 밴드가 확인이 되지 않을 경우 등은 재시험을 실시해야한다(표 6참고).
- ③ 노로바이러스가 일차 확인된 경우 최종 확인을 위하여 아가로즈 젤(agarose gel)상에서 해당 부위를 절취하여 PCR 산물을 정제한 후 염기서열(DNA sequencing)을 분석하여 판정한다.

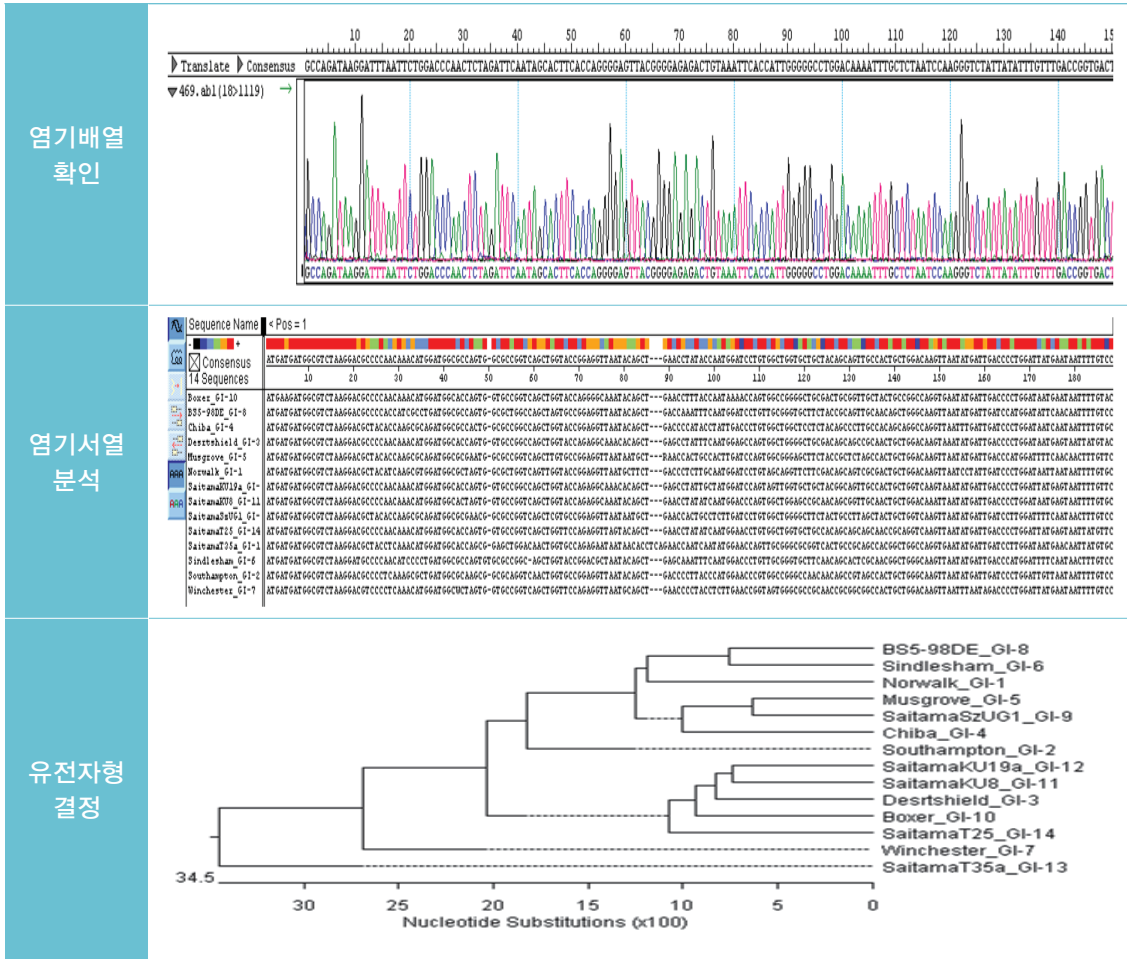
표 6. 노로바이러스 PCR 결과판정 (예시)

	추출 RNA(시료)	양성대조군	음성대조군	1차 판정
1	+	+	-	PCR 검출
	+			
2	+	+	-	PCR 검출
	-			
3	+	+	+	재 실험
	+			
4	+	-	-	재 실험
	-			
5	-	+	-	PCR 불검출
	-			

(4) 최종 검출 판정

- ① 염기서열 분석(DNA sequencing)을 위하여 (3)의 ③에서 정제된 DNA 1 μL를 주형으로 바이러스 유전형 및 진행방향에 따라 GI의 경우 GI-F2 및 GI-R1M, GII의 경우 GII-F3M 및 GII-R1M의 프라이머(primer)를 사용한다.
- ② 염기서열 분석(sequencing) 반응을 위한 혼합 조건은 각 유전자형 Semi-nested 프라이머 (primer, 1 pmol)를 독립된 각각의 튜브에 2 μL, dye-terminator 2 μL, 정제 DNA 2 μL를 첨가하여 증류수로 최종 10 μL가 되도록 하고 96°C에서 1분간 DNA를 변성시킨 후, 96°C에서 10초간, 50°C에서 5초간, 60°C에서 4분간을 1회로 하여 25회 반응시킨 다음 60°C에서 10분간 연장반응을 시킨다.
- ③ PCR 산물은 직접 염기서열 분석(DNA sequencing)하되, 2종 이상의 유전자가 혼합되어 있는 경우에는 클로닝 염기서열 분석(Cloning DNA Sequencing)을 재실시 한다. 염기서열 분석(DNA Sequencing)에 의해 결정된 염기서열은 노로바이러스 유전자 데이터베이스(GI, GII Reference sequence 및 NCBI blast 교차비교)와 비교하여 노로바이러스로 확인되었을 경우 검출된 것으로 최종 확인한다.

## V. 식중독 바이러스 시험법



### 3-2. A형 간염바이러스 (Hepatitis A virus)

#### 가) Realtime RT-PCR

(1) Realtime RT-PCR 증폭을 위한 혼합액의 조성은 RT-PCR buffer 12.5μl(2X), Enzyme mix 0.5μl(25X), Enhancer 1.5μl, Reverse 프라이머 1μl(10pmol), Forward 프라이머 1μl(10pmol), 프로브 0.5μl(10 pmol), 멸균 증류수 3μl를 하나의 튜브에 혼합하고 Realtime PCR plate에 20μl씩 분주한다.

- ※ 증폭과정의 오류점검을 위해 A형 간염바이러스 Realtime PCR 양성대조군과 유전자 추출 과정에서 추출된 음성대조군을 시료와 함께 증폭반응 한다.
- ※ 혼합액은 분석 시료 수에 따라 조절하여 제조한다.
- ※ Realtime PCR well에 혼합액 분주 시 거품이 발생하지 않도록 주의한다.





- (2) 유전자 추출과정에서 4개로 추출된 시료의 RNA는 Realtime PCR 증폭액이 분주되어 있는 plate의 well에 5 $\mu$ L를 첨가하되 각 RNA 당 3개의 well에 첨가한다.
- (3) Realtime RT-PCR 반응조건은 42 $^{\circ}$ C에서 30분, 95 $^{\circ}$ C에서 10분 반응 후, 95 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 60초를 1회로 하여 45회 반응시킨 후 증폭 곡선을 확인한다.
- (4) A형 간염바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 2와 같다.

표 1. A형 간염 바이러스의 Realtime one-step RT-PCR 조성

Component	Volume	Primer 및 probe
2X RT-PCR buffer	12,5 $\mu$ L	
Enhancer	1,5 $\mu$ L	
25X Enzyme Mix	0,5 $\mu$ L	
Probe(10pmol)	0,5 $\mu$ L	probe
Forward primer(10pmol)	1 $\mu$ L	primer forward
Reverse primer(10pmol)	1 $\mu$ L	primer reverse
D.W.	3 $\mu$ L	
RNA	5 $\mu$ L	
Total	25 $\mu$ L	

표 2. A형 간염바이러스 Realtime one-step RT-PCR 프라이머와 프로브의 염기서열

primers/probe	Sequence(5'→3')	위치
Primer forward	GCG GCG GAT ATT GGT GAG	458-476
Primer reverse	CAA TGC ATC CAC TGG ATG AGA	535-515
Probe	FAM-TTA AGA CAA AAA CCA TTC AAC GCC GGA G-TAMRA	480-507

(5) 결과 확인

- ① Realtime PCR 반응 종료 후 FAM-TAMRA detector로 증폭곡선이 확인되는 경우 A형 바이러스가 검출을 확인한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control)에서 증폭곡선이 확인되거나 또는 양성대조군에서 확인이 되지 않을 경우 등은 유전자 추출과정 부터 재시험을 실시해야한다.
- ③ Reaitime PCR에서 A형 간염바이러스로 확인 된 RNA 시료는 Conventional RT-PCR을 수행하여 A형 간염바이러스의 최종 검출을 결정한다.

## V. 식중독 바이러스 시험법

### 나) Conventional RT-PCR

※ PCR로 A형 간염바이러스 유전자의 확인을 위해 캡시드 유전자를 암호화하는 부위(VP3/VP1 및 VP1/P2A)를 PCR로 증폭하고 해당부위의 프라이머를 사용한다. PCR은 총 2회를 실시하되 One-step RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase chain reaction) 방법을 사용하여 1차 PCR을 수행하고 2차 PCR에서는 새로운 프라이머를 사용하여 nested PCR을 실시한다. RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase chain reaction) 과정에서는 A형 간염바이러스 유전자와 장관아데노바이러스 유전자를 조합하여 합성한 RNA를 RT-PCR 양성대조군으로 사용한다.

(1) One-step RT-PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

① 표 1의 PCR 조성으로 표 2의 PCR 반응조건에서 One-step RT-PCR을 실시한다.

표 1. A형 간염바이러스 One-step RT-PCR 반응액 조성

Component	Volume (μl)	캡시드 유전자	
		VP3/VP1primer	VP1/P2Aprimer
2X PCR 반응액(mastermix)	25	-	-
역전사 효소 (50unit/μL)	1	-	-
멸균수(D.W.)	15	-	-
Forward primer, 20pmol	2	HAV1	BR5
reverse primer, 20pmol	2	HAV2	BR9
추출 RNA	5	-	-
총계	50		

표 2. A형 간염바이러스 One-step RT-PCR 반응조건 및 온도

	온도	시간	반복수
cDNA 합성(cDNA synthesis)	48℃	40 min	1 cycle
초기 변성(predenaturation)	95℃	4 min	
변성(denaturation)	95℃	30 sec	30 cycles
결합(annealing)	55℃	30 sec	
확장(extension)	72℃	30 sec	
최종신장(post-elongation)	72℃	7 min	1 cycle
보관	4℃	∞	∞

(2) nested PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

① 표 3의 PCR 조성으로 표 4의 PCR 반응조건에서 nested PCR을 실시한다.



표 3. A형 간염바이러스 nested PCR 반응액 조성

Component	Volume (μl)	캡시드 유전자	
		VP3/VP1 primer	VP1/P2A primer
dNTPs(10mM)	4	-	-
10x 완충액 (with MgCl <sub>2</sub> )	5	-	-
증류수(D.W.)	31	-	-
Forward primer, 20pmol	2	HAV3	RJ3
reverse primer, 20pmol	2	HAV4	BR6
<i>Taq</i> DNA polymerase(5 unit/μl)	1	-	-
1차 PCR 산물	5	-	-
총계	50		

표 4. A형 간염바이러스 nested PCR 반응 조건 및 온도

구분	온도	시간	반복수
초기 변성 (pre-denaturation)	95°C	4 min	1 cycle
변성(denaturation)	95°C	30 sec	30 cycles
결합 (annealing)	55°C	30 sec	
확장 (extension)	72°C	30 sec	
최종신장 (post-elongation)	72°C	7 min	1 cycle
보관	4°C	∞	∞

- ② PCR 반응 종료 후 PCR 증폭 반응액 5μl를 전기영동 완충액(gel loading buffer) 1μl와 혼합한 다음 젤(gel)의 각 홈에 시료를 조심스럽게 넣고, 나머지 한 홈에 PCR 증폭산물의 크기를 식별하기 위해 적당한 표식 DNA(marker DNA) 7μl를 넣는다. 1.5% 아가로스 젤 (agarose gel) 상에서 100V로 전기영동한 후, ethidium bromide(EtBr) 염색액(10 mg/mL)으로 30분간 염색한 후 증류수로 10분간 탈색하고 자외선 조사기(UV transilluminator)로 조사하여 증폭된 DNA 밴드를 관찰한다.

## V. 식중독 바이러스 시험법

(3) A형 간염바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 5와 같다.

표 5. A형 간염바이러스 프라이머 염기서열

캡시드	프라이머	염기서열(5'→3')	적용	예상크기 (bp)
VP3/ VP1	HAV1	GCT CCT CTT TAT CAT GCT ATG GAT	One-step RT PCR	244
	HAV2	CAG GAA ATG TCT CAG GTA CTT TCT	One-step RT PCR/	
	HAV3	ATG TTA CTA CAC AAG TTG GAG AT	nested PCR/ sequencing	186 (또는 244)
	HAV4	GAT CCT CAA TTG TTG TGA TAG CT	nested PCR/ sequencing	
VP1/ P2A	BR5	TTG TCT GTC ACA GAA CAA TCA G	One-step RT PCR	361
	BR9	AGT CAC ACC TCT CCA GGA AAA CTT	One-step RT PCR/	
	RJ3	TCC CAG AGC TCC ATT GAA	nested PCR/ sequencing	234
	BR6	AGG AGG TGG AAG CAC TTC ATT TGA	nested PCR/ sequencing	

### (4) 결과 확인

- ① 아가로즈 젤(agarose gel)상에서 시료에 VP3/VP1 부위의 증폭산물이 186bp 또는 244bp, VP1/P2A 부위는 234bp의 밴드가 있을 경우 A형 간염 바이러스로 일차 확인하되, VP3/VP1 부위 양성대조군은 473 bp, VP1/P2A 부위는 381 bp로 확인 되어야 한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control) 중에서 양성대조군(positive control)과 같은 크기의 밴드가 확인되거나 또는 양성대조군에서 밴드가 확인이 되지 않을 경우 등은 재시험을 실시해야 한다(표 6참고).
- ③ A형 간염바이러스가 일차 확인된 경우 최종 확인을 위하여 아가로즈 젤(agarose gel)상에서 해당부위를 절취하여 PCR 산물을 정제한 후 염기서열(DNA sequencing)을 분석하여 최종 판정한다.

표 6. A형 간염바이러스 PCR 결과 확인

구분	추출 RNA(시료)	양성대조군	음성대조군	비고
1	+	+	-	PCR 검출
	+		-	
2	+	+	-	PCR 검출
	-		-	
3	+	+	+	재 실험
	+		-	
4	+	-	-	재 실험
	-		-	
5	-	+	-	PCR 불검출
	-		-	



- ④ 염기서열분석(DNA sequencing)을 위하여 ③에서 정제된 DNA 1 uL를 주형으로 바이러스 유전형 및 진행방향에 따라 VP3/VP1의 경우 HAV3 및 HAV4, VP1/P2A의 경우 RJ3 및 BR6의 프라이머를 사용하여 염기서열 분석한다. 염기서열 분석을 위한 혼합 조건은 각 유전자형 nested 프라이머(1 pmol)를 독립된 각각의 튜브에 2 uL, dye-terminator 2 uL, 정제 DNA 2 uL를 첨가하여 증류수로 최종 10 uL가 되도록 하여 96°C/1분 DNA를 변성시킨 후, 96°C/10초, 50°C/5초, 60°C/4분을 1회로 하여 총 25회 반응시킨 다음 60°C/10분 연장반응을 시킨다.
- ⑤ PCR 산물은 직접 염기서열분석(DNA Sequencing)하되 2종 이상의 유전자가 혼합되어 있는 경우에는 클로닝 염기서열분석(Cloning DNA sequencing)을 재 실시한다. 염기서열 분석에 의해 결정된 염기서열은 A형 간염바이러스 유전자 데이터베이스와 비교하여 A형 간염바이러스로 확인되었을 경우 검출된 것으로 최종 확인한다. 단, 시료와 양성대조군의 염기서열 일치 등으로 교차오염이 의심될 경우 유전자 추출 과정부터 재 실시한다.

### 3-3. 로타바이러스 (Rotavirus)

#### 가) Realtime RT-PCR

※ PCR을 위한 RNA는 97°C, 5분간 열처리 한 후 얼음에서 10분간 방치 후 사용한다.

- (1) Realtime RT-PCR 증폭을 위한 혼합액의 조성은 RT-PCR buffer 12.5μl(2X), Enzyme mix 0.5μl(25X), Enhancer 1.5μl, Reverse 프라이머 1μl(10pmol), Forward 프라이머 1μl(10pmol), 프로브 0.5μl(10 pmol), 멸균 증류수 3μl를 하나의 튜브에 혼합하고 Realtime PCR plate에 20μl씩 분주한다.

※ 증폭과정의 오류점검을 위해 로타바이러스 Realtime PCR 양성대조군과 유전자 추출과정을 거친 음성대조군을 시료와 함께 증폭반응 한다.

- (2) 유전자 추출과정에서 4개로 추출된 시료의 RNA는 Realtime PCR 증폭액이 분주되어 있는 plate의 well에 5μl를 첨가하되 각 RNA 당 3개의 well에 첨가한다.
- (3) Realtime RT-PCR 반응조건은 48°C에서 30분, 95°C에서 10분 반응 후, 95°C 15초, 56°C 60초를 1회로 하여 40회 반응시킨 후 증폭 곡선을 확인한다.

## V. 식중독 바이러스 시험법

표 1. 로타바이러스 Realtime RT-PCR 조성

Component	Volume (μl)	Primer 및 probe
2X RT-PCR buffer	12.5μl	
Enhancer	1.5μl	
25X Enzyme Mix	0.5μl	
Probe(10pmol)	0.5μl	NVP3-Probe
Forward primer(10pmol)	1μl	NVP3-FDeg
Reverse primer(10pmol)	1μl	NVP3-R1
D.W.	3μl	
RNA	5μl	
Total	25μl	

(4) 로타바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 2와 같다.

표 2. 로타바이러스 Duplex Realtime RT-PCR의 프라이머와 프로브의 염기서열

primers/probe	Sequence(5'→3')	위치
NVP3-FDeg	ACC ATC TWaC ACR TRbA CCC TC	963-982
NVP3-R1	GGT CAC ATA ACG CCC CTA TA	1034-1053
NVP3-Probe	FAM-ATG AGC ACA ATA GTT AAA AGC TAA CAC TGT CAA-BHQ	984-1026

※ W=A or T; R=A or G; B=C or G or T

### (5) 결과 확인

- ① PCR 반응이 종료 후 FAM-BHQ detector를 적용하여 증폭곡선이 확인되는 경우 로타바이러스 검출을 확인한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control)에서 증폭곡선이 확인되거나 또는 양성대조군에서 확인이 되지 않을 경우 등은 유전자 추출과정 부터 재시험을 실시해야한다.
- ③ Realtime RT-PCR에서 로타바이러스로 확인 된 RNA 시료는 Conventional RT-PCR을 수행하여 검출을 최종 검출을 결정한다.

### 나) Conventional RT-PCR

※ RT-PCR로 로타바이러스 유전자의 확인을 위해 VP 7 유전자 부위를 PCR로 증폭하고 해당 부위의 프라이머를 사용한다. PCR은 총 2회를 실시하되 One-step RT-PCR(Reverse



Transcription-Polymerase chain reaction) 방법을 사용하여 1차 PCR을 수행하고 2차 PCR에서는 새로운 프라이머를 사용하여 Semi-nested PCR을 실시한다. RT-PCR(Reverse transcription-Polymerase chain reaction) 과정에서는 로타바이러스 유전자(VP7)를 인위적으로 조합하여 합성한 RNA를 RT-PCR 양성대조군으로 사용한다.

(1) One-step RT-PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

① 표 1의 PCR 조성으로 표 2의 PCR 반응조건에서 One-step RT-PCR을 실시한다.

표 1. 로타바이러스 One-step RT-PCR 반응액 조성

Component	Volume (μL)	VP 7 부위	
		Primer	PCR 크기(bp)
RT-PCR Premix	동결건조 Kit	-	
증류수(D.W)	16μl	-	
Forward primer(10pmol)	1μl	VP7-F	881
Reverse primer(10pmol)	1μl	VP7-R	
Extracted RNA	2μl	-	
총계	20μl		

표 2. 로타바이러스 One-step RT-PCR 반응조건 및 온도

	온도	시간	반복수
cDNA 합성(cDNA synthesis)	42°C	40 min	1 cycle
초기 변성(predenaturation)	94°C	2 min	
변성(denaturation)	94°C	1 min	35 cycles
결합(annealing)	50°C	1 min	
확장(extension)	72°C	1 min	
최종신장(post-elongation)	72°C	7 min	1 cycle
보관	4°C	∞	∞

## V. 식중독 바이러스 시험법

(2) Semi-nested PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

① 표 3의 PCR 조성으로 표 4의 PCR 반응조건에서 Semi-nested PCR을 실시한다.

표 3. 로타바이러스 Semi-nested PCR 반응액 조성

Component	Volume (μl)	VP 7	
		Primer	PCR 크기(bp)
PCR Premix	동결건조 kit		
증류수(D.W)	10	-	-
G1 primer(10pmole)	1	aBT1	618
G2 primer(10pmole)	1	aCT2	521
G3 primer(10pmole)	1	aET3	682
G4 primer(10pmole)	1	aDT4	452
G8 primer(10pmole)	1	aAT8	754
G9 primer(10pmole)	1	aFT9	179
G10 primer(10pmole)	1	G10	266
Reverse primer(10pmole)	1	VP7-R	-
1차 PCR 산물	2	-	-
총계	20 μl		





표 4. 로타바이러스 Semi-nested PCR 반응 조건 및 온도

구분	온도	시간	반복수
초기 변성 (pre-denaturation)	94°C	4 min	1 cycle
변성(denaturation) 결합 (annealing) 확장 (extension)	94°C 50°C 72°C	1 min 2 min 1 min	30 cycles
최종신장 (post-elongation)	72°C	7 min	1 cycle
보관	4°C	∞	∞

② PCR 반응 종료 후 PCR 증폭 반응액 5μl를 전기영동 완충액(gel loading buffer) 1μl와 혼합한 다음 젤(gel)의 각 홈에 시료를 조심스럽게 넣고, 나머지 한 홈에 PCR 증폭산물의 크기를 식별하기 위해 적당한 표식 DNA(marker DNA) 7μl를 넣는다. 1.5% 아가로스 젤 (agarose gel) 상에서 100V로 전기영동한 후, ethidium bromide(EtBr) 염색액(10 mg/mL)으로 30분간 염색한 후 증류수로 10분간 탈색하고 자외선 조사기(UV transilluminator)로 조사하여 증폭된 DNA 밴드를 관찰한다.

(3) 로타바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 5와 같다.

표 5. 로타바이러스 프라이머 염기서열

primer	Sequence(5'→3')	G-typing	위치
VP7-F	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	-	51-71
VP7-R	AACCTGCCACCATTTTTTCC	-	914-932
aBT1	CAAGTAATAAAATCAATGATG	G1	314-335
aCT2	CAATGATATTAACACATTTTCTGT G	G2	411-435
aET3	ACGAACTCAACACGAGAG G	G3	250-269
aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTT G	G4	480-499
aAT8	GTCACACCATTTGTAAATTCG	G8	178-198
aFT9	CTTGATGTGACTAYAAATAC	G9	757-776
G10	ATGTCAGACTACARATACTGG	G10	666-687

## V. 식중독 바이러스 시험법

### (4) 결과 확인

- ① 아가로즈 젤(agarose gel)상에서 시료에 PCR 밴드의 크기가 표 5의 7개의 PCR 밴드 크기 중 동일한 크기의 PCR 밴드가 확인될 경우 로타바이러스로 일차 확인하되, 양성대조군은 885 bp로 확인되어야 한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control) 중에서 양성대조군(positive control)과 같은 크기의 밴드가 확인되거나 또는 양성대조군에서 밴드가 확인이 되지 않을 경우 등은 재시험을 실시해야 한다(표 6참고).
- ③ 로타바이러스가 일차 확인된 경우 최종 확인을 위하여 아가로즈 젤(agarose gel)상에서 해당부위를 절취하여 PCR 산물을 정제한 후 염기서열(DNA sequencing)을 분석하여 최종 판정한다.

표 6. 로타바이러스 PCR 결과 확인

구분	추출 RNA(시료)	양성대조군	음성대조군	비고
1	+	+	-	PCR 검출
	+		-	
2	+	+	-	PCR 검출
	-		-	
3	+	+	+	재 실험
	+		-	
4	+	-	-	재 실험
	-		-	
5	-	+	-	PCR 불검출
	-		-	

※ + : 로타바이러스 PCR 증폭 산물 확인, - : 밴드가 확인되지 않음

- ④ 염기서열분석(DNA sequencing)을 위하여 ③에서 정제된 DNA 1 uL를 주형으로 PCR 증폭에 사용되었던 역방향과 정방향 프라이머를 이용하여 염기서열 분석한다. 염기서열 분석을 위한 혼합 조건은 각 유전자형 nested 프라이머(1 pmol)를 독립된 각각의 튜브에 2 uL, dye-terminator 2 uL, 정제 DNA 2 uL를 첨가하여 증류수로 최종 10 uL가 되도록 하여 96°C/1분 DNA를 변성시킨 후, 96°C/10초, 50°C/5초, 60°C/4분을 1회로 하여 총 25회 반응시킨 다음 60°C/10분 연장반응을 시킨다.



- ⑤ PCR 산물은 직접 염기서열분석(DNA Sequencing)하되 2종 이상의 유전자가 혼합되어 있는 경우에는 클로닝 염기서열분석(Cloning DNA sequencing)을 재 실시한다. 염기서열 분석에 의해 결정된 염기서열은 로타바이러스 유전자 데이터베이스와 비교하여 로타바이러스로 확인되었을 경우 검출된 것으로 최종 확인한다. 단, 시료와 양성대조군의 염기서열 일치 등으로 교차오염이 의심될 경우 유전자 추출 과정부터 재 실시한다.

### 3-4. 아스트로바이러스 (Astrovirus)

#### 가) Realtime RT-PCR

- (1) Realtime RT-PCR 증폭을 위한 혼합액의 조성은 RT-PCR buffer 12.5 $\mu$ l(2X), Enzyme mix 0.5 $\mu$ l(25X), Enhancer 1.5 $\mu$ l, Reverse 프라이머 1 $\mu$ l(10pmol), Forward 프라이머 1 $\mu$ l(10pmol), 프로브 0.5 $\mu$ l(10 pmol), 멸균 증류수 3 $\mu$ l를 하나의 튜브에 혼합하고 Realtime PCR plate에 20 $\mu$ l씩 분주한다.
  - ※ 증폭과정의 오류점검을 위해 아스트로바이러스 Realtime PCR 양성대조군과 유전자 추출과정에서 추출된 음성대조군을 시료와 함께 증폭반응 한다.
  - ※ 혼합액은 분석 시료 수에 따라 조절하여 제조한다.
  - ※ Realtime PCR well에 혼합액 분주 시 거품이 발생하지 않도록 주의한다.
- (2) 유전자 추출과정에서 2개로 추출된 시료의 RNA는 Realtime PCR 증폭액이 분주되어 있는 plate의 well에 5 $\mu$ l를 첨가하되 각 RNA 당 3개의 well에 첨가한다.
- (3) Realtime RT-PCR 반응조건은 42 $^{\circ}$ C에서 30분, 95 $^{\circ}$ C에서 10분 반응 후, 94 $^{\circ}$ C 15초, 55 $^{\circ}$ C 60초를 1회로 하여 45회 반응시킨 후 증폭 곡선을 확인한다.

표 1. 아스트로바이러스의 Realtime RT-PCR 조성

Component	Volume( $\mu$ l)	Primer 및 probe
2X RT-PCR buffer	12.5 $\mu$ l	
Enhancer	1.5 $\mu$ l	
25X Enzyme Mix	0.5 $\mu$ l	
Probe(10pmol)	0.5 $\mu$ l	AstV Probe
Forward primer(10pmol)	1 $\mu$ l	AstV F
Reverse primer(10pmol)	1 $\mu$ l	AstV R
D.W.	3 $\mu$ l	
RNA	5 $\mu$ l	
Total	25 $\mu$ l	

## V. 식중독 바이러스 시험법

(4) 아스트로바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 2와 같다.

표 2. 아스트로바이러스 Realtime RT-PCR 프라이머와 프로브의 염기서열

primers/probe	Sequence(5'→3')	위치
AstV F	CCDGCCAGRCTCACAGAAGAG	4264-4284
AstV R	GACTTGCTAGCCATCACACTYC	4318-4339
AstV Probe	FAM-ACTCCATCGCATTTGGAGGGGAGGACC-TAMRA	4287-4314

(5) 결과 확인

- ① Realtime PCR 반응 종료 후 FAM-TAMRA detector로 증폭곡선이 확인되는 경우 아스트로 바이러스가 검출을 확인한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control)에서 증폭곡선이 확인되거나 또는 양성대조군에서 확인이 되지 않을 경우 등은 유전자 추출과정 부터 재시험을 실시해야한다.
- ③ Reaitime PCR에서 아스트로바이러스로 확인 된 RNA 시료는 Conventional RT-PCR을 수행하여 아스트로바이러스의 유전자형을 결정한다.

### 나) Conventional RT-PCR

※ RT-PCR로 아스트로바이러스 유전자의 확인을 위해 ORF 2 부위를 PCR로 증폭하고 해당부위의 프라이머를 사용한다. PCR은 One-step RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase chain reaction) 방법을 사용하여 PCR을 실시한다. RT-PCR(Reverse transcription-Polymerase chain reaction) 과정에서는 아스트로바이러스 유전자와 장관아데노바이러스 유전자를 조합하여 합성한 RNA를 RT-PCR 양성대조군으로 사용한다.

(1) One-step RT-PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

- ① 표 3의 PCR 조성으로 표 4의 PCR 반응조건에서 One-step RT-PCR을 실시한다.

표 3. 아스트로바이러스 One-step RT-PCR 반응액 조성

Component	Volume (μl)	Primer
Mastermix	12.5μl	-
Reverse transcriptase(50unit/μL)	0.5μl	-
D.W.	6μl	-
Forward primer(10 pmol)	2μl	Mon 269
Reverse primer(10 pmol)	2μl	Mon 270
Extracted RNA	2μl	-
Total	25μl	



표 4. 아스트로바이러스 One-step RT-PCR 반응조건 및 온도

	온도	시간	반복수
cDNA 합성(cDNA synthesis) 초기 변성(predenaturation)	48°C 94°C	40 min 3 min	1 cycle
변성(denaturation) 결합(annealing) 확장(extension)	94°C 52°C 72°C	30 sec 30 sec 1 min 30sec	35 cycles
최종신장(post-elongation)	68°C	5 min	1 cycle
보관	4°C	∞	∞

② PCR 반응 종료 후 PCR 증폭 반응액 5μl를 전기영동 완충액(gel loading buffer) 1μl와 혼합한 다음 젤(gel)의 각 홈에 시료를 조심스럽게 넣고, 나머지 한 홈에 PCR 증폭산물의 크기를 식별하기 위해 적당한 표식 DNA(marker DNA) 7μl를 넣는다. 1.5% 아가로스 젤 (agarose gel) 상에서 100V로 전기영동한 후, ethidium bromide(EtBr) 염색액(10 mg/mL)으로 30분간 염색한 후 증류수로 10분간 탈색하고 자외선 조사기(UV transilluminator)로 조사하여 증폭된 DNA 밴드를 관찰한다.

(2) 아스트로바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 5와 같다.

표 5. 아스트로바이러스 프라이머 염기서열

primer	Sequence(5'→3')	위치	size(bp)
Mon 269	CAACTCAGGAAACAGGGTGT	4526-4545	449
Mon 270	TCAGATGCATTGTCATTGGT	4955-4974	

(3) 결과 확인

- ① 아가로스 젤(agarose gel)상에서 시료에 PCR 밴드의 크기가 449 bp로 확인 될 경우 아스트로바이러스로 일차 확인하되, 양성대조군은 234 bp로 확인 되어야 한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control) 중에서 양성대조군(positive control)과 같은 크기의 밴드가 확인되거나 또는 양성대조군에서 밴드가 확인이 되지 않을 경우 등은 재시험을 실시해야 한다(표 6참고).

## V. 식중독 바이러스 시험법

- ③ 아스트로바이러스가 일차 확인된 경우 최종 확인을 위하여 아가로즈 젤(agarose gel)상에서 해당부위를 절취하여 PCR 산물을 정제한 후 염기서열(DNA sequencing)을 분석하여 최종 판정한다.

표 6. 아스트로바이러스 PCR 결과 확인

구분	추출 RNA(시료)	양성대조군	음성대조군	비고
1	+	+	-	PCR 검출
	+		-	
2	+	+	-	PCR 검출
	-		-	
3	+	+	+	재 실험
	+		-	
4	+	-	-	재 실험
	-		-	
5	-	+	-	PCR 불검출
	-		-	

- ④ 염기서열분석(DNA sequencing)을 위하여 ③에서 정제된 DNA 1 $\mu$ l를 주형으로 Mon 269와 Mon 270 프라이머를 이용하여 염기서열 분석반응을 실시한다. 염기서열 분석을 위한 혼합 조건은 각 프라이머(1 pmol)를 독립된 각각의 튜브에 2 $\mu$ l, dye-terminator 2 $\mu$ l, 정제 DNA 2 $\mu$ l를 첨가하여 증류수로 최종 10 $\mu$ l가 되도록 하여 96 $^{\circ}$ C/1분 DNA를 변성시킨 후, 96 $^{\circ}$ C/10초, 50 $^{\circ}$ C/5초, 60 $^{\circ}$ C/4분을 1회로 하여 총 25회 반응시킨 다음 60 $^{\circ}$ C/10분 연장반응을 시킨다.
- ⑤ PCR 산물은 직접 염기서열분석(DNA Sequencing)하되 2종 이상의 유전자가 혼합되어 있는 경우에는 클로닝 염기서열분석(Cloning DNA sequencing)을 재 실시한다. 염기서열 분석에 의해 결정된 염기서열은 아스트로바이러스 유전자 데이터베이스와 비교하여 아스트로 바이러스로 확인되었을 경우 검출된 것으로 최종 확인한다. 단, 시료와 양성대조군의 염기서열 일치 등으로 교차오염이 의심될 경우 유전자 추출 과정부터 재 실시한다.



### 3-5. 장관아데노바이러스 (Enteric Adenovirus)

#### 가) Realtime PCR

- (1) Realtime PCR 증폭을 위한 혼합액의 조성은 RT-PCR buffer 12.5 $\mu$ l(2X), Enzyme mix 0.5 $\mu$ l (25X), Enhancer 1.5 $\mu$ l, Reverse 프라이머 1 $\mu$ l(10pmol), Forward 프라이머 1 $\mu$ l(10pmol), 프로브 0.5 $\mu$ l(10 pmol), 멸균 증류수 3 $\mu$ l를 하나의 튜브에 혼합하고 Realtime PCR plate에 20 $\mu$ l씩 분주한다.
  - ※ 증폭과정의 오류점검을 위해 장관아데노바이러스 Realtime PCR 양성대조군과 유전자 추출 과정을 거친 음성대조군을 시료와 함께 증폭반응 한다.
  - ※ 혼합액은 분석 시료 수에 따라 제조하여 사용한다.
  - ※ Realtime PCR well에 혼합액 분주 시 거품이 발생하지 않도록 주의한다.
- (2) 유전자 추출과정에서 4개로 추출된 시료의 RNA는 Realtime PCR 증폭액이 분주되어 있는 plate의 well에 5 $\mu$ l를 첨가하되 각 RNA 당 3개의 well에 첨가한다.
- (3) Realtime PCR 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 15분 반응 후, 95 $^{\circ}$ C 10초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 27초를 1회로 하여 45회 반응시킨 후 증폭 곡선을 확인한다.

표 1. 장관아데노바이러스 Realtime PCR 조성

Component	Volume ( $\mu$ l)	Primer 및 probe
2X RT-PCR buffer	12.5 $\mu$ l	
Enhancer	1.5 $\mu$ l	
25X Enzyme Mix	0.5 $\mu$ l	
Probe(10pmol)	0.5 $\mu$ l	JTVFAP
Forward primer(10pmol)	1 $\mu$ l	JTVFF
Reverse primer(10pmol)	1 $\mu$ l	JTVFR
D.W.	3 $\mu$ l	
RNA	5 $\mu$ l	
Total	25 $\mu$ l	

## V. 식중독 바이러스 시험법

(4) 장관아데노바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 2와 같다.

표 2. 장관아데노바이러스 Duplex Realtime RT-PCR의 프라이머와 프로브의 염기서열

primers/probe	Sequence(5'→3')	위치
JTVFF	AAC TTT CTC TCT TAA TAG ACG CC	619-641
JTVFR	AGG GGG CTA GAA AAC AAA A	736-718
JTVFAP	FAM-CGA AGA GTG CCC GTG TCA GC-BHQ	671-652

(5) 결과 확인

- ① PCR 반응이 종료 후 FAM-BHQ detector를 적용하여 증폭곡선이 확인되는 경우 장관아데노바이러스 검출을 확인한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control)에서 증폭곡선이 확인되거나 또는 양성대조군에서 확인이 되지 않을 경우 등은 유전자 추출과정 부터 재시험을 실시해야한다.
- ③ Realtime PCR에서 장관아데노바이러스로 확인 된 RNA 시료는 Conventional RT-PCR을 수행하여 검출을 최종 검출을 결정한다.

### 나) Conventional PCR

※ PCR로 장관아데노바이러스 유전자의 확인을 위해 Hexon 유전자 부위를 PCR로 증폭하고 해당 부위의 프라이머를 사용한다. PCR(Polymerase chain reaction) 과정에서는 장관아데노바이러스를 인위적으로 조합하여 합성한 DNA를 PCR 양성대조군으로 사용한다.

(1) 장관아데노바이러스 PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

- ① 표 1의 PCR 조성으로 표 2의 PCR 반응조건에서 PCR을 실시한다.

표 1. 장관아데노바이러스 PCR 반응액 조성

Component	Volume (uL)	Primer
10x buffer	5	-
dNTPs	4	-
D.W.	33	-
Forward primer(10pmol)	1	AD1
Reverse primer(10pmol)	1	AD2
DNA	5	-
<i>Taq</i> DNA polymerase	1	-
Total	50	





표 2. 장관아데노바이러스 PCR 반응조건 및 온도

	온도	시간	반복수
초기 변성(predenaturation)	94℃	3 min	1 cycle
변성(denaturation)	94℃	30 sec	35 cycles
결합(annealing)	50℃	30 sec	
확장(extension)	72℃	1 min	
최종신장(post-elongation)	72℃	5 min	1 cycle
보관	4℃	∞	∞

② PCR 반응 종료 후 PCR 증폭 반응액 5μl를 전기영동 완충액(gel loading buffer) 1μl와 혼합한 다음 젤(gel)의 각 홈에 시료를 조심스럽게 넣고, 나머지 한 홈에 PCR 증폭산물의 크기를 식별하기 위해 적당한 표식 DNA(marker DNA) 7μl를 넣는다. 1.5% 아가로스 젤(agarose gel) 상에서 100V로 전기영동한 후, ethidium bromide(EtBr) 염색액(10 mg/mL)으로 30분간 염색한 후 증류수로 10분간 탈색하고 자외선 조사기(UV transilluminator)로 조사하여 증폭된 DNA 밴드를 관찰한다.

(2) 장관아데노바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 3과 같다.

표 3. 장관아데노바이러스 프라이머 염기서열

primer	Sequence(5'→3')	위치	size(bp)
AD1	TTCCCCATGGCICAYAACAC	1834-1853	482
AD2	CCCTGGTAKCCRTRTTGTA	2315-2296	

(3) 결과 확인

- ① 아가로스 젤(agarose gel)상에서 시료에 PCR 밴드의 크기가 482 bp로 확인 될 경우 아데노바이러스로 일차 확인하되, 양성대조군은 235 bp로 확인 되어야 한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control) 중에서 양성대조군(positive control)과 같은 크기의 밴드가 확인되거나 또는 양성대조군에서 밴드가 확인이 되지 않을 경우 등은 재시험을 실시해야 한다(표 4참고).
- ③ 장관아데노바이러스가 일차 확인된 경우 최종 확인을 위하여 아가로스 젤(agarose gel)상에서 해당부위를 절취하여 PCR 산물을 정제한 후 염기서열(DNA sequencing)을 분석하여 최종 판정한다.

## V. 식중독 바이러스 시험법

표 4. 장관아데노바이러스 PCR 결과 확인

구분	추출 RNA(시료)	양성대조군	음성대조군	비고
1	+	+	-	PCR 검출
	+		-	
2	+	+	-	PCR 검출
	-		-	
3	+	+	+	재 실험
	+		-	
4	+	-	-	재 실험
	-		-	
5	-	+	-	PCR 불검출
	-		-	

- ④ 염기서열분석(DNA sequencing)을 위하여 ③에서 정제된 DNA 1 $\mu$ l를 주형으로 AD1과 AD2 프라이머를 이용하여 염기서열 분석반응을 실시한다. 염기서열 분석을 위한 혼합 조건은 각 프라이머(1 pmol)를 독립된 각각의 튜브에 2 $\mu$ l, dye-terminator 2 $\mu$ l, 정제 DNA 2 $\mu$ l를 첨가하여 증류수로 최종 10 $\mu$ l가 되도록 하여 96 $^{\circ}$ C/1분 DNA를 변성시킨 후, 96 $^{\circ}$ C/10초, 50 $^{\circ}$ C/5초, 60 $^{\circ}$ C/4분을 1회로 하여 총 25회 반응시킨 다음 60 $^{\circ}$ C/10분 연장반응을 시킨다.
- ⑤ PCR 산물은 직접 염기서열분석(DNA Sequencing)하되 2종 이상의 유전자가 혼합되어 있는 경우에는 클로닝 염기서열분석(Cloning DNA sequencing)을 재 실시한다. 염기서열 분석에 의해 결정된 염기서열은 장관아데노바이러스 유전자 데이터베이스와 비교하여 아데노바이러스로 확인되었을 경우 검출된 것으로 최종 확인한다. 단, 시료와 양성대조군의 염기서열 일치 등으로 교차오염이 의심될 경우 유전자 추출 과정부터 재 실시한다.

### 3-6. 사포바이러스 (Sapovirus)

#### 가) Conventional RT-PCR

(1) 사포바이러스 RT-PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

- ① 표 1의 PCR 조성으로 표 2의 PCR 반응조건에서 1차 PCR(cDNA 합성)을 실시한다.

※ RT-PCR로 사포바이러스 유전자의 확인을 위해 Capsid 부위를 PCR로 증폭하고 해당부위의 프라이머를 사용한다.



표 1. 사포바이러스 1차 PCR 반응액 조성

Component	Volume (μl)
5x MMLV buffer	4
Oligo d(T)16	1
Reverse transcriptase	1
dNTPs	4
RNase Inhibitor	1
D.W.	4
Extracted RNA	5
Total	20

표 2. 사포바이러스 1차 PCR 반응조건 및 온도

온도	시간
20°C	10 min
42°C	90 min
95°C	5 min
4°C	∞

② 표 3의 PCR 조성으로 표 4의 PCR 반응조건에서 2차 PCR(DNA 합성)을 실시한다.

표 3. 사포바이러스 2차 PCR PCR 반응액 조성

Component	Volume (μl)	Primer
10X buffer	5μl	-
dNTPs	1μl	-
D.W.	34μl	-
Forward primer(10 pmol)	2.5μl	SV-F11
Reverse primer(10 pmol)	2.5μl	SV-R1
cDNA	5μl	-
<i>Taq</i> DNA polymerase	1μl	
Total	50μl	

## V. 식중독 바이러스 시험법

표 4. 사포바이러스 PCR 반응조건 및 온도

	온도	시간	cycle
초기 변성 (pre-denaturation)	94℃	5 min	1 cycle
변성(denaturation)	94℃	30 sec	25 cycle
결합 (annealing)	58℃	30 sec	
확장 (extension)	72℃	1 min	
최종신장 (post-elongation)	72℃	7 min	1 cycle
보관	4℃	∞	∞

③ 표 5의 PCR 조성으로 표 6의 PCR 반응조건에서 3차 PCR(nested PCR)을 실시한다.

표 5. 사포바이러스 3차 PCR 반응액 조성

Component	Volume (μl)	Primer
10X buffer	5μl	-
dNTPs	4μl	-
D.W.	34.5μl	-
Forward primer(10 pmol)	2.5μl	SV-F21
Reverse primer(10 pmol)	2.5μl	SV-R2
<i>Taq</i> DNA polymerase	1μl	
1st PCR product	0.5μl	-
Total	50μl	

표 6. 사포바이러스 3차 PCR 반응조건 및 온도

	온도	시간	cycle
초기 변성 (pre-denaturation)	95℃	5 min	1 cycle
변성(denaturation)	94℃	1 min	25 cycle
결합 (annealing)	48℃	1 min	
확장 (extension)	72℃	1 min 30 sec	
최종신장 (post-elongation)	72℃	10 min	1 cycle
보관	4℃	∞	∞



④ PCR 반응 종료 후 PCR 증폭 반응액 5 $\mu$ l를 전기영동 완충액(gel loading buffer) 1 $\mu$ l와 혼합한 다음 젤(gel)의 각 홈에 시료를 조심스럽게 넣고, 나머지 한 홈에 PCR 증폭산물의 크기를 식별하기 위해 적당한 표식 DNA(marker DNA) 7 $\mu$ l를 넣는다. 1.5% 아가로스 젤(agarose gel) 상에서 100V로 전기영동한 후, ethidium bromide(EtBr) 염색액(10 mg/mL)으로 30분간 염색한 후 증류수로 10분간 탈색하고 자외선 조사기(UV transilluminator)로 조사하여 증폭된 DNA 밴드를 관찰한다.

(2) 사포바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 7과 같다.

표 7. 사포바이러스 프라이머 염기서열

primer	Sequence(5'→3')	위치
SV-F11	GCY TGG TTY ATA GGT GGT AC	5098-5117
SV-R1	CWG GTG AMA CMC CAT TKT CCA T	5878-5857
SV-F21	ANT AGT GTT TGA RAT GGA GGG	5157-5177
SV-R2	GWG GGR TCA ACM CCW GGT GG	5591-5572

### (3) 결과 확인

- ① 아가로스 젤(agarose gel)상에서 시료에 PCR 밴드의 크기가 415 bp로 확인 될 경우 사포 바이러스로 일차 확인한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control) 중에서 양성대조군(positive control)과 같은 크기의 밴드가 확인되거나 또는 양성대조군에서 밴드가 확인이 되지 않을 경우 등은 재시험을 실시해야 한다(표 8참고).
- ③ 사포바이러스가 일차 확인된 경우 최종 확인을 위하여 아가로스 젤(agarose gel)상에서 해당부위를 절취하여 PCR 산물을 정제한 후 염기서열(DNA sequencing)을 분석하여 최종 판정한다.

## V. 식중독 바이러스 시험법

표 8. 사포바이러스 PCR 결과 확인

구분	추출 RNA(시료)	양성대조군	음성대조군	비고
1	+	+	-	PCR 검출
	+		-	
2	+	+	-	PCR 검출
	-		-	
3	+	+	+	재 실험
	+		-	
4	+	-	-	재 실험
	-		-	
5	-	+	-	PCR 불검출
	-		-	

- ④ 염기서열분석(DNA sequencing)을 위하여 ③에서 정제된 DNA 1 $\mu$ 를 주형으로 SV-F21와 SV-R2 프라이머를 이용하여 염기서열 분석반응을 실시한다. 염기서열 분석을 위한 혼합 조건은 각 프라이머(1 pmol)를 독립된 각각의 튜브에 2 $\mu$ l, dye-terminator 2 $\mu$ l, 정제 DNA 2 $\mu$ l를 첨가하여 증류수로 최종 10 $\mu$ l가 되도록 하여 96 $^{\circ}$ C/1분 DNA를 변성시킨 후, 96 $^{\circ}$ C/10초, 50 $^{\circ}$ C/5초, 60 $^{\circ}$ C/4분을 1회로 하여 총 25회 반응시킨 다음 60 $^{\circ}$ C/10분 연장반응을 시킨다.
- ⑤ PCR 산물은 직접 염기서열분석(DNA Sequencing)하되 2종 이상의 유전자가 혼합되어 있는 경우에는 클로닝 염기서열분석(Cloning DNA sequencing)을 재 실시한다. 염기서열 분석에 의해 결정된 염기서열은 사포바이러스 유전자 데이터베이스와 비교하여 사포바이러스로 확인되었을 경우 검출된 것으로 최종 확인한다. 단, 시료와 양성대조군의 염기서열 일치 등으로 교차오염이 의심될 경우 유전자 추출 과정부터 재 실시한다.

### 3-7. E형 간염바이러스 (Hepatitis E virus)

#### 가) Realtime RT-PCR

- (1) Realtime RT-PCR 증폭을 위한 혼합액의 조성은 RT-PCR buffer 12.5 $\mu$ l(2X), Enzyme mix 0.5 $\mu$ l(25X), Enhancer 1.5 $\mu$ l, 정방향 프라이머 1 $\mu$ l(10 pmol), 역방향 프라이머 1 $\mu$ l(10 pmol),



프로브 0.5 $\mu$ l(10 pmol), D.W 3 $\mu$ l를 하나의 튜브에 혼합하고 Realtime PCR plate에 20  $\mu$ l씩 분주한다.

- ※ 증폭과정의 오류점검을 위해 E형 간염바이러스 Realtime PCR 양성대조군과 음성대조군은 분석시료와 함께 증폭반응 한다.
- ※ 혼합액은 분석 시료 수에 따라 제조하여 사용한다.
- ※ Realtime PCR well에 혼합액 분주 시 거품이 발생하지 않도록 주의한다.

(2) 유전자 추출과정에서 4개로 추출된 시료의 RNA는 Realtime PCR 증폭액이 분주되어 있는 plate의 well에 5 $\mu$ l를 첨가하되 추출 RNA 당 3개의 well에 첨가한다.

(3) Realtime RT-PCR 반응조건은 42 $^{\circ}$ C에서 30분, 95 $^{\circ}$ C에서 10분 반응 후, 95 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 60초를 1회로 하여 45회 반응시킨 후 증폭 곡선을 확인한다.

표 1. E형 간염바이러스 Realtime RT-PCR 조성

Component	Volume
2X RT-PCR buffer	12.5 $\mu$ l
25X Enzyme mix	0.5 $\mu$ l
Enhancer	1.5 $\mu$ l
Forward Primer(10pmol)	1 $\mu$ l
Reverse Primer(10pmol)	1 $\mu$ l
Probe(10pmol)	0.5 $\mu$ l
D.W	3 $\mu$ l
RNA	5 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

(4) E형 간염바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 2와 같다.

표 2. E형 간염바이러스 Realtime RT-PCR의 프라이머와 프로브의 염기서열

primers/probe	Sequence(5'→3')	위 치
정방향 primer	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	5256-5274
역방향 primer	CGAAGGGGTTGGTTGGATG	5332-5351
프로브	VIC-ATTCTCAGCCCTTCGCAATCCCCT-TAMRA	5284-5308

## V. 식중독 바이러스 시험법

### (5) 결과 확인

- ① PCR 반응이 종료 후 VIC-TAMRA detector로 Realtime 증폭곡선이 확인되면 E형 간염 바이러스 검출을 확인한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control)에서 증폭곡선이 확인되거나 또는 양성대조군에서 확인이 되지 않을 경우 등은 유전자 추출과정부터 재시험을 실시해야한다.
- ③ Realtime RT-PCR에서 E형 간염바이러스로 확인 된 RNA 시료는 Conventional RT-PCR을 수행하여 유전자형을 결정한다.

### 나) Conventional RT-PCR

(1) One-step RT-PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

- ① PCR 조성조건은 RT-PCR pre-mix(2X) 25 $\mu$ l, Reverse transcriptase 1 $\mu$ l, 정방향 프라이머 (3156N) 1 $\mu$ l, 역방향 프라이머(3157N) 1 $\mu$ l, Enhancer 2.5 $\mu$ l, D.W 14.5 $\mu$ l, 추출 RNA 5 $\mu$ l를 첨가하여 총 50 $\mu$ l로 맞춘다.
- ② PCR 반응조건은 50 $^{\circ}$ C에서 15분, 95 $^{\circ}$ C에서 2분 DNA를 변성시키고, 95 $^{\circ}$ C 20초, 52 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분을 1회로 하여 35회 반응시킨 후, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 연장 반응시킨다. 상기 반응 종료 후 PCR 생성물에 대하여 Nested PCR을 실시한다.

표 3. E형 간염바이러스 One-step RT-PCR 반응액 조성

Component	Volume	Primer
Mastermix(2X)	25 $\mu$ l	-
Reverse transcriptase (50unit/ $\mu$ L)	1 $\mu$ l	-
D.W.	14.5 $\mu$ l	-
Forward primer(20pmol)	1 $\mu$ l	3156N
Reverse primer(20pmol)	1 $\mu$ l	3157N
Enhancer	2.5 $\mu$ l	-
Extracted RNA, PCR control	5 $\mu$ l	-
Total	50 $\mu$ l	-





표 4. E형 간염바이러스 One-step RT-PCR 반응조건 및 온도

	온도	시간	반복 횟수
cDNA 합성 (cDNA synthesis)	50°C	15 min	1 cycle
초기 변성(predenaturation)	95°C	2 min	
변성(denaturation)	95°C	20 sec	35 cycle
결합 (annealing)	52°C	30 sec	
확장 (extension)	72°C	1 min	
최종신장 (post-elongation)	72°C	5 min	1 cycle
보관	4°C	∞	∞

(2) Nested PCR 방법은 아래와 같이 수행한다.

- ① One-step RT-PCR 산물을 주형으로 하여 Nested PCR을 실시한다. 1차 PCR 산물 2 $\mu$ l, 10x 완충액(MgCl<sub>2</sub> 포함) 2 $\mu$ l, dNTPs (10 mM) 2 $\mu$ l, *Taq* DNA polymerase (1 unit/ $\mu$ L) 1 $\mu$ l, 정방향(10 pmol) 및 역방향(10 pmol) 프라이머는 각 1 $\mu$ l 첨가한 다음 최종 증류수로 총 20  $\mu$ l로 맞추고 후 Nested PCR을 실시한다.
- ② PCR 반응조건은 94°C에서 5분간 DNA를 변성시키고 94°C 30초, 52°C 30초, 72°C 30초를 1회로 하여 35회를 반응시킨 후 72°C에서 10분간 연장 반응한다.

표 5. E형 간염바이러스 Nested PCR 반응액 조성

Component	Volume	Primer
dNTPs(10mM)	2 $\mu$ l	-
10x Buffer(with MgCl <sub>2</sub> )	2 $\mu$ l	-
D.W.	11 $\mu$ l	-
Forward primer(10 pmol)	1 $\mu$ l	3158N
Reverse primer(10 pmol)	1 $\mu$ l	3159N
<i>Taq</i> DNA polymerase(1 unit/ $\mu$ L)	1 $\mu$ l	-
1st PCR Product	2 $\mu$ l	-
Total	20 $\mu$ l	-

## V. 식중독 바이러스 시험법

표 6. E형 간염바이러스 Nested PCR 반응조건 및 온도

	온도	시간	반복 횟수
초기 변성 (predenaturation)	94℃	5 min	1 cycle
변성(denaturation)	94℃	30 sec	35 cycle
결합 (annealing)	52℃	30 sec	
확장 (extension)	72℃	30 sec	
최종신장 (post-elongation)	72℃	10 min	1 cycle
보관	4℃	∞	∞

- ③ PCR 반응종료 후 PCR 증폭 반응액 5μl를 전기영동 완충액(gel loading buffer) 1μl와 혼합한 다음 젤(gel)의 각 홈에 검체를 조심스럽게 넣고 나머지 한 홈에 PCR 증폭산물의 크기를 식별하기에 적당한 표식 DNA(marker DNA) 7 μl를 넣는다. 1.5% 아가로즈 젤(agarose gel) 상에서 100V로 전기영동한 후 Ethidium Bromide(EtBr) 염색액으로 30분간 염색하고 증류수로 10분간 탈색하고 자외선 조사기(UV transilluminator)로 조사하여 증폭된 DNA 밴드를 관찰한다.
- ④ E형 간염바이러스 유전자 증폭에 사용하는 프라이머는 표 7과 같다.

표 7. E형 간염바이러스 PCR 프라이머 염기서열

단계	Primer	Sequence (5'→3')	위치	Size
1st	Forward 3156N	5'-AATTATGCCAGTACCGGGTTG-3'	5663-5684	731bp
	Reverse 3157N	5'-CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC-3'	6371-6393	
2nd	Forward 3158N	5'-GTTATGCTTTGCATACATGGCT-3'	5948-5969	348bp
	Reverse 3159N	5'-AGCCGACGAAATCAATTCTGTC-3'	6274-6295	

### (3) 1차 결과 확인

- ① 아가로즈 젤(agarose gel)상에서 시료에 348 bp의 밴드가 있을 경우 E형 간염바이러스로 일차 확인한다.
- ② 만일 음성대조군(negative control)에서 양성대조군(positive control)과 같은 크기의 PCR 밴드가 확인되거나 또는 양성대조군에서 밴드가 확인이 되지 않을 경우 등은 재시험을 실시해야한다(표 8 참고).



- ③ E형 간염바이러스가 일차 확인된 경우 최종 확인을 위하여 아가로즈 젤(agarose gel)상에서 해당부위를 절취하여 PCR 산물을 정제한 후 염기서열(DNA sequencing)을 분석하여 판정한다.

표 8. E형 간염바이러스 PCR 결과판정 (예시)

	추출 RNA(시료)	양성대조군	음성대조군	1차 판정
1	+	+	-	PCR 검출
	+			
2	+	+	-	PCR 검출
	-			
3	+	+	+	재 실험
	+			
4	+	-	-	재 실험
	-			
5	-	+	-	PCR 불검출
	-			

(4) 최종 검출 판정

- ① 염기서열 분석(DNA sequencing)을 위하여 (3)의 ③에서 정제된 DNA 1μl를 주형으로 3158N과 3159N 프라이머를 사용한다.
- ② 염기서열 분석(sequencing) 반응을 위한 혼합 조건은 각 유전자형 nested 프라이머(1 pmol)를 독립된 각각의 튜브에 2μl, dye-terminator 2μl, 정제 DNA 2μl를 첨가하여 증류수로 최종 10μl가 되도록 하고 96°C에서 1분간 DNA를 변성시킨 후, 96°C에서 10초간, 50°C에서 5초간, 60°C에서 4분간을 1회로 하여 25회 반응시킨 다음 60°C에서 10분간 연장 반응을 시킨다.
- ③ PCR 산물은 직접 염기서열 분석(DNA sequencing)하되, 2종 이상의 유전자가 혼합되어 있는 경우에는 클로닝 염기서열 분석(Cloning DNA Sequencing)을 재 실시 한다. 염기서열 분석(DNA Sequencing)에 의해 결정된 염기서열은 E형 간염바이러스 유전자 데이터베이스와 비교하여 E형 간염바이러스로 확인되었을 경우 검출된 것으로 최종 확인한다.

MINISTRY OF FOOD AND DRUG SAFETY

2016년 식중독 원인조사 시험법



# 식중독 원충 시험법

1. 작은와포자충
2. 람블편모충
3. 이질아메바
4. 원포자충
5. 쿠도아

[참고] 독소포자충





# 1.

## 작은와포자충 (*Cryptosporidium parvum*)

### 1-1. 시험법

#### 1) 시약 및 시액

가) 0.1M Phosphate buffered saline(0.1M PBS, pH 7.4) : NaCl 40g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g를 450ml 증류수에 용해시켜 NaOH로 pH 7.4로 맞춘다. 3차 증류수로 최종 용량을 500ml로 맞춘 후 0.22 $\mu$ m 필터 (Millipore filter, 그림 1)로 여과한다.

나) 0.01M PBS : 0.1M PBS 100ml에 3차 증류수 900ml를 가한다.

다) 0.1% liquinox : 0.1M PBS 100ml에 liquinox(세척제) 1ml을 혼합하여 증류수로 1,000ml이 되게 맞춘다.

※ 거품이 생기지 않도록 조심해서 교반한다.

#### 2) 기구 및 소모품

가) 3M 지퍼백(가로 약 30cm x 세로 약 30cm)

나) Filter 장치 : 깔대기, filter membrane 삽입부, 진공펌프 연결부, 플라스크를 멸균하여 사용하도록 한다(그림 1).

- ① Filter membrane(0.22 $\mu$ m)를 삽입하여 집게로 고정시킨 후 진공펌프를 연결하고 용액을 깔대기 안에 붓는다.
- ② 여과가 끝나면 진공펌프 연결 부위를 해체하고 여과된 용액을 멸균된 시약병에 옮겨 담는다.



그림 1. Millipore 여과 장치 및 filter membrane(0.22 $\mu$ m filter)

## VI. 식중독 원충 시험법

다) Orbital shaker



그림 2. Orbital shaker

라) Ultracentrifuge(초고속원심분리기)

마) Centrifuge(원심분리기)

바) Vacuum suction(진공흡입장치)



그림 3. 진공흡입장치(Vacuum suction)





### 3) 검체 전처리

#### 가) 잎채소류

- ① 검체의 속잎만 50~150g 취하여 두 겹의 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 500~1,000ml)의 0.1% liquinox 용액을 가한다.



그림 4. 지퍼백에 담은 채소류

- ② 지퍼백이 터지지 않도록 잘 봉합하여 orbital shaker로(세기 : 범위 10 중에서 6 정도의 중간 세기) 실온에서 15분간 흔들어 준다.



그림 5. 세척액을 사용하여 세척중인 검체

- ③ 검체를 뒤집어 다시 15분간 흔들어 준다.
- ④ 세척액을 비커에 따르고 250ml 원심분리용병에 분배한다.
  - ※ 건더기가 많으면 200~250 $\mu$ m 크기의 체에 걸러 사용한다.
  - ※ 회수율을 높이기 위해 지퍼백 안의 검체를 손으로 툭툭 쳐서 마지막 한 방울까지 모두 수거한다.

## VI. 식중독 원충 시험법

- ⑤ ④에서 회수한 용액을 8,000rpm에서 20분간 원심 분리한다. 원심분리 후 상층액을 진공 흡입장치를 사용하여 조심스럽게 제거한다.

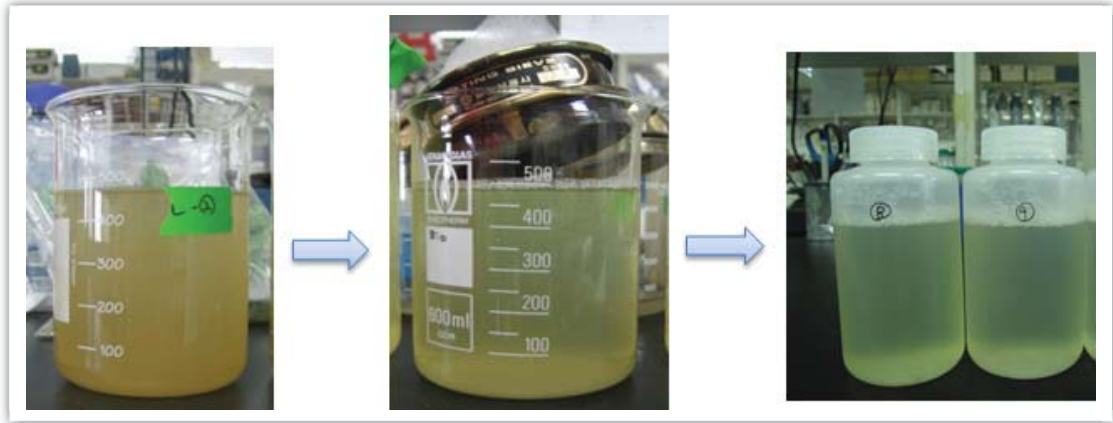


그림 6. 세척용액을 원심 분리한 침전물 수거 과정



그림 7. 진공흡입장치를 사용하여 상층액을 제거하는 과정



- ⑥ ⑤를 원심 분리하는 동안 ④번 과정을 거친 검체를 2~3배 용량(약 500~1,000ml)의 0.01M PBS를 넣고 15분간 다시 세척한다.
- ⑦ ⑥의 세척액을 ⑤번 과정의 250ml 원심분리용병에 다시 넣고 8,000rpm에서 원심 분리한 후 상층액을 진공흡입장치로 조심스럽게 제거한다.
- ⑧ ⑦의 침전물에 0.01M PBS 40ml을 넣어 부유시켜 50ml tube에 옮긴다. 2,500rpm에서 20분간 원심 분리한 다음 진공흡입장치로 상층액을 조심스럽게 제거한다.



그림 8. 50ml 튜브에 옮겨 원심분리된 침전물

- ⑨ ⑧의 최종 침전물에 0.01M PBS 1ml을 넣어 부유시켜 1.5ml tube에 옮긴다. 5,000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 진공흡입장치로 상층액을 제거한다.

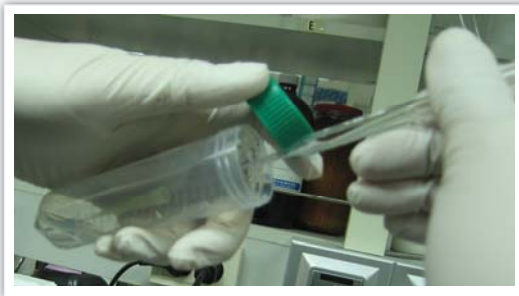


그림 9. 진공흡입장치로 상층액 제거 후 원심 분리하여 생긴 침전물

- ⑩ ⑨의 침전물에 0.01M PBS 200ul을 넣은 후 1.5ml tube에 옮긴다.
- ⑪ Immunomagnetic separation(IMS)을 거친 후 DNA 추출 kit로 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행한다.
  - 이 중 100 ul는 현미경 검경을 위해 남기고, 나머지를 취하여 DNA 추출한다.
  - ※ IMS 시행법은 “면역자기 분리법(Immunomagnetic separation (IMS))” 참조한다.

## VI. 식중독 원충 시험법

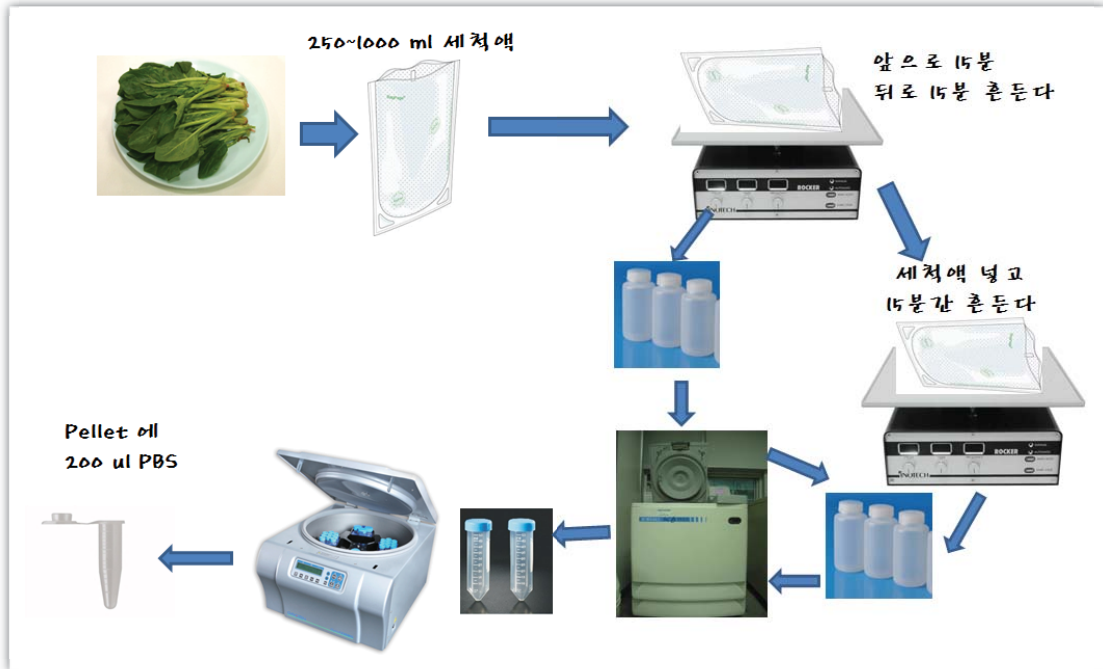


그림 10. 채소류 세척 과정

### 나) 뿌리채소류(당근, 감자 등)

- ① 검체(당근 200~250g, 감자 150~200g, 고구마 150~200g)를 두 겹의 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 500~1,000ml)의 0.1% liquinox 용액을 넣는다.

※ 뿌리채소류는 무게 차이가 크기 때문에 세척액을 2~3배 용량 넣는다.

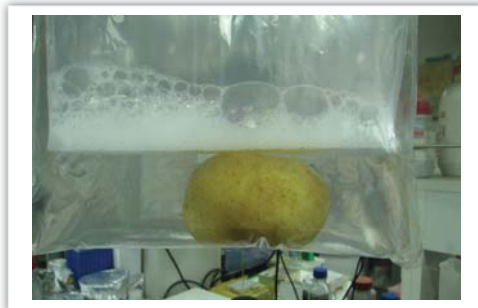


그림 11. 지퍼백에 담은 채소류

- ② 이후 과정은 “잎채소류 실험 방법”의 ②~⑪번과 같게 수행한다.

#### 다) 허브류(로즈마리, 바질, 민트 등)

- ① 검체 25g을 두 겹의 작은 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 200~250ml)의 0.1% liquinox 용액을 넣는다.
- ② 이후 과정은 “잎채소류 실험 방법”의 ②~①번과 같게 수행한다.

#### 라) 과일류

- ① 검체 50~100g을 두 겹의 작은 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 250~500 ml)의 0.1% liquinox 용액을 넣는다.



그림 12. 지퍼백에 담은 과일류

- ② 이후 과정은 “잎채소류 실험 방법”의 ②~①번과 같게 수행한다.

#### 마) 음료류

- ① 검체 200ml을 50ml tube에 분배하여 2,500rpm (1300xg)에서 20분간 원심분리 한다.  
 ※ 건더기가 있는 경우 200~250 $\mu$ l 크기의 체에 거른 후 걸러진 건더기의 용액을 잘 짜서 아래 내려온 용액을 검체로 사용한다.



그림 13. 토마토 쥬스의 건더기를 체에 거른 검체

## VI. 식중독 원충 시험법

- ② 원심 분리가 완료되면 상층액을 버리고 침전물을 1.5ml tube에 옮겨 담는다.
- ③ Immunomagnetic separation(IMS)를 거친 후 DNA 추출 kit로 DNA를 추출한 후 real-time PCR을 수행한다.
  - 이 중 100 ul는 현미경 검경을 위해 남기고, 나머지를 취하여 DNA 추출한다.
  - ※ IMS 시행법은 “면역자기 분리법(Immunomagnetic separation(IMS))” 참조한다.

### ※ 면역자기 분리법(Immunomagnetic separation (IMS))

#### (1) 시약 및 시액

- ① Bead : Dynabeads® Anti-Cryptosporidium Kit  
(Invitrogen™, Cat # 73001or73011)
- ② Buffer Preparation
  - 3차 증류수 : 0.22 $\mu$ m filter에 여과하여 사용한다.
  - 10X SL-Buffer A, 10X SL-Buffer B(Kit에 포함)
  - 1X SL-Buffer A : 10X SL-Buffer A 100 $\mu$ l에 3차 증류수 900 $\mu$ l를 첨가



그림 14. Dynabeads kit 내 포함되어 있는 시약

- 0.1N 염산(Hydrochloric acid) : 증류수 99.17ml에 HCl 0.83ml을 한 방울씩 조심스럽게 섞어 최종 100 ml로 맞춘다. 주사기로 Millipore syringe filter(Millipore, Cat.# SLHVR04NL)로 여과하여 병에 넣어 사용한다.
- 액체 질소
- 1N 수산화나트륨(Sodium hydroxide solution) : NaOH 4g을 증류수에 녹여 최종 100 ml로 맞춘다. 주사기로 Millipore syringe filter(Millipore, Cat.# SLHVR04NL)로 여과하여 tube에 넣어 사용한다.



그림 15. 주사기를 사용하여 filter 할 수 있는 syringe filter

(2) 기구 및 소모품

- ① Magnets : MPC<sup>TM</sup>-6(Cat# 12002D), MPC<sup>TM</sup>-1(Cat# 120.01D), MPC<sup>TM</sup>-S (Cat# A120.20D)

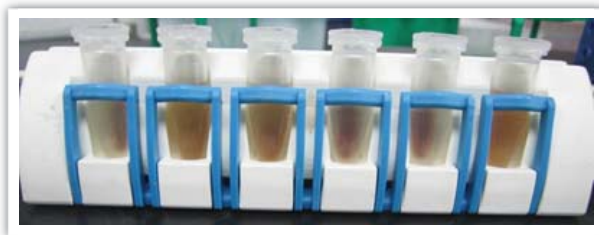


그림 16. Magnetic concentrator(MPC-S, MPC<sup>TM</sup>-6와 L-10 tube)

- ② 회전 믹서(Dynabeads<sup>®</sup>MX1 (Invitrogen) 또는 동일 사양)



그림 17. 샘플 회전 믹서

## VI. 식중독 원충 시험법

- ③ 시험관 : 1.5 ml, 15 ml, 50 ml tubes, Dynal L-10 tube(Cat #740,03)
- ④ Microcentrifuge(미량원심분리기), Centrifuges(원심분리기)
- ⑤ Vortex mixer(진탕기)
- ⑥ Water bath : 50°C

### (3) 과정

- ① 1.5ml tube에 담긴 침전물의 양에 따라 10X SL-Buffer A와 B를 넣는다.
  - ※ 침전물의 양이 50 $\mu$ l 이하인 경우(small scale)
    - 10X SL-Buffer A와 10X SL-Buffer B를 각각 150 $\mu$ l씩 넣는다.
  - ※ 침전물 양이 50~500 $\mu$ l 일 경우(large scale)
    - 샘플에 0.01M PBS 10ml를 분주한 후 L-10 tube에 넣는다.
    - 10X SL-Buffer A와 10X SL-Buffer B를 각각 1ml씩 넣는다.
  - ※ 침전물의 양이 500 $\mu$ l 보다 많은 경우는 샘플을 여러 개로 나누어 실험한다.
- ② Dynabeads anti-Cryptosporidium vial을 10초 동안 vortex하여 완전히 섞일 때까지 inverting 한다.
  - ※ Dynabeads anti-Cryptosporidium을 small scale은 15 $\mu$ l, large scale은 100 $\mu$ l를 넣는다.
- ③ 회전 믹서에 고정한 후 15~20rpm로 실온에서 1시간 동안 회전시킨다.
- ④ 믹서에서 tube를 뺀 후 magnetic particle concentrator(MPC) 자석에 tube의 편평한 면이 향하게 꽂는다.

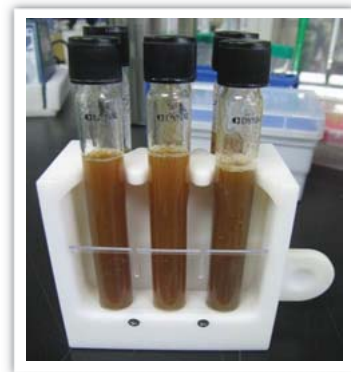
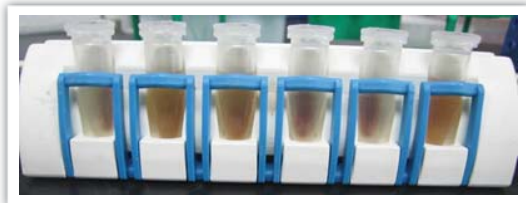


그림 18. magnetic particle concentrator(MPC)에 꽂혀진 샘플





- ⑤ MPC에서 2분간 방치 후 tube를 위아래로 천천히 뒤집어가며 inverting한다.
- ⑥ Tube를 똑바로 세우고 MPC에 고정된 상태에서 상층액을 모두 제거한다.

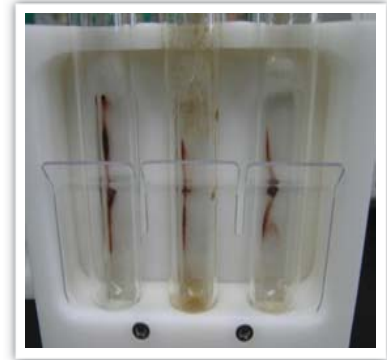
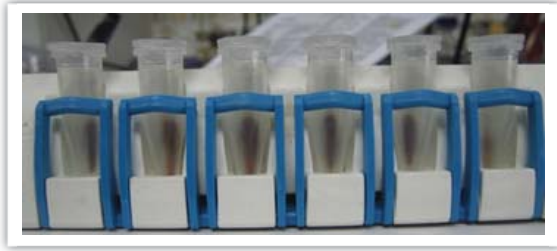


그림 19. MPC에서 상층액 제거 후 tube면에 부착된 bead 입자

- ⑦ Tube를 MPC에서 내려놓고 1X SL-Buffer A(small scale : 200 $\mu$ l, large scale : 1ml)를 넣고 조심스럽게 혼합한다. 이때 L-10 tube를 사용했던 검체는 1.5ml tube로 옮겨준다.
  - ※ 혼합 시 vortex 사용을 피한다.
- ⑧ MPC에 다시 고정시킨 후 1분간 위 아래로 뒤집어 가며 섞어준다.
  - ※ Tube 뒷면에 동그랗게 뭉쳐있는 beads를 확인할 수 있다.
- ⑨ Tube에 붙어있는 beads가 떨어지지 않도록 주의하며 상층액을 제거한다.
- ⑩ MPC에서 tube를 빼내어 0.1N HCl 90 $\mu$ l를 넣고 10초 동안 vortex 한 뒤 10분간 실온에 방치한다.
- ⑪ 10초간 vortex 한 후 tube를 MPC에 끼우고, 10초간 방치한 후 상층액을 조심스럽게 새 1.5ml tube에 옮긴다.
- ⑫ 1N NaOH 10 $\mu$ l를 넣어 중화시킨 다음 3차 멸균증류수 900 $\mu$ l를 넣는다.
- ⑬ 5,000rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 멸균증류수 100 $\mu$ l를 넣는다.
- ⑭ 잘 교반한 뒤 10 $\mu$ l를 취해 형광 염색을 10 $\mu$ l는 항산성염색을 한다.
- ⑮ 나머지 80 $\mu$ l는 5,000 rpm에서 5분간 원심 분리 후 상층액을 조심스럽게 빼내어 제거한다.
- ⑯ 침전물을 액체질소와 50 $^{\circ}$ C를 각각 2분씩 왔다 갔다 3번 반복한다 (Freeze-thawing).
- ⑰ DNA 추출용 키트(kit)를 사용하여 DNA 추출 한다.

### 4) 시험방법

- ④ 원충 확인시험법은 분자생물학적 시험법(real-time-PCR), 현미경 검사법(항산성염색 또는 직접형광항체염색)을 사용할 수 있다.

#### 가) 분자생물학적 시험법(real-time-PCR)

##### (1) 유전자 추출 과정

- 검체 침전물에 시판되는 DNA추출용 키트(kit)를 사용하며, 제조사가 제시하는 적절한 실험법에 따라서 실시한다.

- ※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 DNA 추출 Prep Kit 또는 동등 이상의 제품 사용이 가능하다.

※ QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Cat# 51306) 사용 전 준비

- ✓ Buffer AW1과 Buffer AW2를 label에 적힌 대로 AW1에는 25ml의 ethanol을 넣어 기존에 들어있는 Buffer 19ml과 합쳐서 44ml이 되게 만든다. AW2에는 30ml의 ethanol을 넣어 기존에 들어있는 buffer 13ml과 합쳐서 43ml이 되게 만든다.

- ✓ 모든 buffer는 사용하기 전에 흔든다.

- ✓ Buffer ASL과 Buffer AL에 침전물이 생기면 실험 전에 70°C incubator에 넣어 둔다.

- ① IMS를 처리한 검체에 Buffer ATL 180μl와 proteinase K 20μl를 넣고 vortexing 한 후, 56°C에서 1시간 30분간 incubation한다.
- ② Buffer AL 200 μl 넣고 15초간 vortexing 한 후 70°C에서 10분간 incubation한다.
- ③ Ethanol 200μl 넣고 15초간 vortexing한다.
- ④ 2,000rpm에서 1분간 원심 분리하여 상층액만 column에 옮긴다.
- ⑤ 8,000rpm에서 1분간 원심 분리한 후 collection tube를 새것으로 교체한다.
- ⑥ Buffer AW1 500μl 넣고 8,000rpm에서 1분간 원심분리한 후 collection tube를 새것으로 교체한다.
- ⑦ Buffer AW2 500μl 넣고 13,000rpm에서 3분간 원심분리한 후 collection tube를 새것으로 교체한다.
- ⑧ 한 번 더 13,000rpm에서 1분간 원심분리한 후 collection tube를 새것으로 교체한다.
- ⑨ Buffer AE 100μl 넣고 실온에서 1분간 반응시켜 8,000 rpm에서 1분간 원심분리 한다.
- ⑩ Zymo-Spin™ IV-HRC Column(green tops, OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit(D6030,



ZYMO RESEARCH, USA))를 준비하여 컬럼 아랫부분과 뚜껑을 제거한 후 collection tube에 장착후 이를 8,000rpm에서 3분간 원심분리 한다.



그림 20. Zymo-Spin™ IV-HRC Column

⑪ 원심 분리된 ⑩번의 Column을 새로운 1.5ml tube에 옮긴 후 ⑨에서 준비한 DNA를 넣고 8000 rpm에서 1분간 원심분리 한다. 순수 분리된 DNA 용액은 real-time PCR을 수행하기 위한 주형 (template)으로 사용한다.

※ 증폭과정의 오류점검을 위해 작은와포자충 Realtime PCR 양성대조군과 유전자 추출과정을 거친 음성대조군을 시료와 함께 증폭반응 한다.

(2) Real-time PCR 반응액 조성

Reaction Component	volume (μl)	final concentration
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	10	1X
10 uM primer forward	0.9	450nM
10 uM primer reverse	0.9	
5 uM Probe	0.5	125nM
BSA (10 mg/ml)	0.5	0.025%
DNase-Rnase free water	5.2	
Sample DNA	2	
Total	20	

## VI. 식중독 원충 시험법

### (3) Real-time PCR을 위한 Primer와 probe 염기서열

Gene	Probe/Primer	Sequence	size (bp)	Annealing
<i>C. parvum</i>	Probe	CAGGGCATCCAAGAAC	88bp	60°C
	Forward primer	TTGATACAGAAGGTGAACAAACAATGAGA		
	Reverse primer	GAAACTTTATTAATAATCAATTGTAAGAGGTACA TAGCAA		

※ 작은와포자충 양성 시료 염기서열 (Rad16 유전자, 242 bp)

CTCCCCAGGAAGACGAAATAATTACTGATT TTGATACAGAAGGTGAACAAACAATGAGAGGGA

*Forward primer*

GTTCTTGGATGCCCTGTTTGCTATGTACCTCTTACAATTGATTTTAATAAAGTTTCGAATTTAA

*Probe*

*Reverse primer*

ATAAGAAAATAAAAAAGATTAAATCCGGATATGATGAAATGAATGACGAAGAAAATGATACAAATGAC

AATATGGAGTCTGAACAAATGCAAGAGCAAATTGAAAGAGAGCTTGAA

### (4) Real-time PCR 반응 조건

PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

Step	UDG Incubation	Ampli Taq Gold, UP Enzyme Activation	PCR	
			Cycle(40 cycles)	
			Denature	Anneal/Extend
Temp	50°C	95°C	95°C	60°C
Time	2min	10min	15sec	1min

### (5) Real-time PCR 결과 확인

① PCR 반응이 종료 후 증폭곡선이 확인되는 경우, 현미경 검사를 수행해야한다.

☞ 만일 음성대조군(negative control)에서 증폭곡선이 확인되거나 또는 양성대조군에서 확인이 되지 않을 경우 등은 유전자 추출과정 부터 재시험을 실시해야한다.



## 나) 현미경 검사법

### (1) 항산성염색법

#### ① 시약 및 소모품

##### - Carbol fuchsin

Phenol Crystal(melted) 50ml

Absolute alcohol 100ml

Basic fuchsin 10g

DW make 100ml

Filter : 사용 전에 여과지를 증류수에 적셔 깔대기에 얹어 놓고 여과한다.

##### - 3% Acid alcohol 용액

70 % alcohol 970ml

HCl 30ml

##### - Methylene blue

Stock solution Methylene blue 14g

95% alcohol 100ml

Working solution Stock sol 20ml

증류수 180ml

##### - Permout (xylene과 1:1로 섞어 준비)

#### ② 기구 및 소모품

##### - 광학현미경

##### - Heating plate 70℃

##### - 슬라이드 및 커버슬라이드

##### - 염색 Jar

##### - 슬라이드 rack

## VI. 식중독 원충 시험법

### ③ 실험 방법

ㄱ. 침전물 10 $\mu$ l를 슬라이드글라스에 도말하여 실온에서 15분간 건조한다.



그림 21. 슬라이드 도말 표본

ㄴ. 건조된 슬라이스를 rack에 꽂고 methanol에 담가 1분간 고정한 다음 heating plate (70 $^{\circ}$ C) 위에서 10분간 건조시킨다.



그림 22. 건조된 슬라이드를 methanol에 담가 heating plate에서 건조 과정

ㄷ. Carbol-fuchsin에 10분간 염색한 다음 흐르는 물로 5분간 세척한다.



그림 23. Carbol fuchsin 염색 과정



르. 3% acid alcohol에서 1분간 두어 붉은 색을 빠지게 한 다음 흐르는 수돗물에 1분간 세척한다.

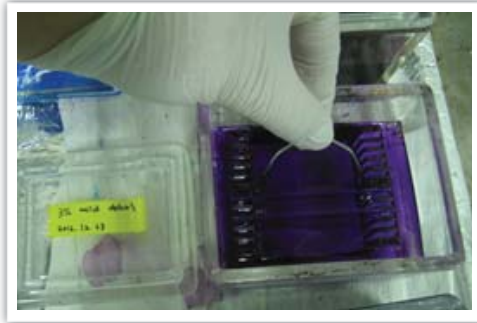


그림 24. 3% acid alcohol 처리 후 세척 과정

마. Methylene blue에 1분간 염색한 다음 흐르는 수돗물에 1분간 세척한다.

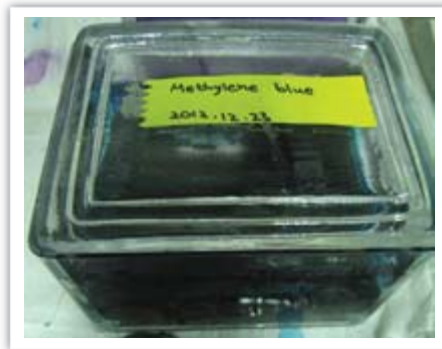


그림 25. Methylene blue 염색 후 세척 과정

바. Heating plate 위에서 10분간 건조 후 Permout를 사용하여 커버글라스를 덮고 광학현미경으로 관찰한다.

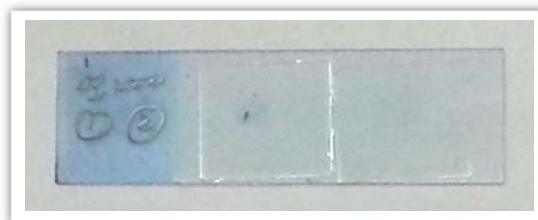


그림 26. 완성된 항산성 염색 표본

※ 참고 : 작은와포자충 항산성염색 시, 붉게 염색된 것이 작은와포자충 난포낭으로 크기가 약 5 um 정도이며 난포낭 내부에 공포와 포자소체가 검은 점 같이 보일 수 있다.

## VI. 식중독 원충 시험법

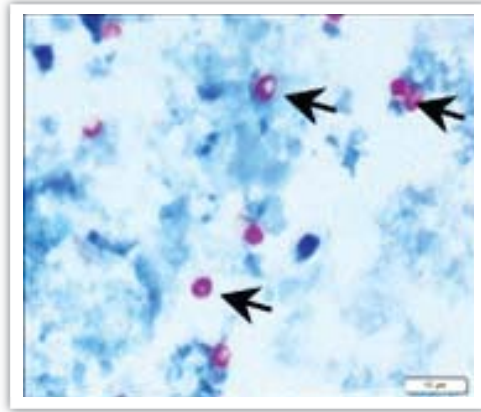


그림 27. 작은와포자충 난포낭(Bar, 10 um)

### (2) 직접형광항체염색법

#### ① 시약 및 소모품

- Aqua-Glo G/C Direct Comprehensive kit(Waterborne Inc, Cat no. A100FLK)
- Methanol
- Humid chamber
- 투명 매니큐어
- 커버글라스



그림 28. 직접형광항체 염색 kit





② 기구 및 소모품

- 형광현미경
- 배양기(Incubator) : 37°C

③ 실험 방법

- ㄱ. 침전물 10μl를 형광염색용키트에 포함된 슬라이드글라스에 직경 약 0.5cm 정도로 도말하여 37°C에서 15분간 건조한다. 양성 대조군과 음성 대조군을 포함시켜 준비한다.



그림 29. 형광염색용 슬라이드글라스와 humid chamber

- ㄴ. Absolute methanol 45μl를 슬라이드 글라스에 떨어뜨린 후 37°C에서 30분간 완전히 건조한다.
- ㄷ. 1X DAPI 50μl를 각 well에 떨어뜨린 후 실온에서 1분간 방치한다.
- ㄹ. SureRinse™ wash buffer 50~100μl를 슬라이드에 떨어뜨린 후 1분 동안 방치한다. 슬라이드를 기울여 여분의 용액을 흘려버린다.
- ㅁ. Aqua-Glo™ G/C를 한 방울씩 각 well에 떨어뜨린 후 humid chamber에 넣고 37°C incubator에서 30분 동안 반응한다.
- ㅂ. SureRinse™ wash buffer 50~100μl를 슬라이드에 떨어뜨리고 1분 동안 방치한다. 슬라이드를 기울여 여분의 용액을 흘려버린다.
- ㅅ. BlockOut™ counterstain을 한 방울씩 각 well에 떨어뜨린 후 1분간 실온에서 반응한다.

## VI. 식중독 원충 시험법

- . SureRinse™ wash buffer 50~100 $\mu$ l를 슬라이드에 떨어뜨린 후 1분 동안 방치한다. 슬라이드를 기울여 여분의 용액을 흘려버린다.
- ㄷ. 완전히 건조시킨 후 No-Fade™ mounting medium을 떨어뜨린 후 커버글라스 덮고 매니큐어로 가장자리를 봉합한 다음 10분간 건조한다.

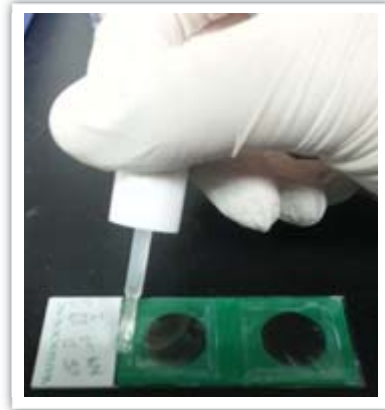
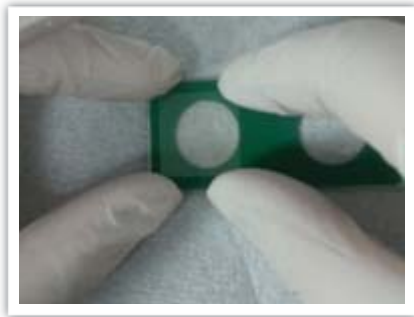
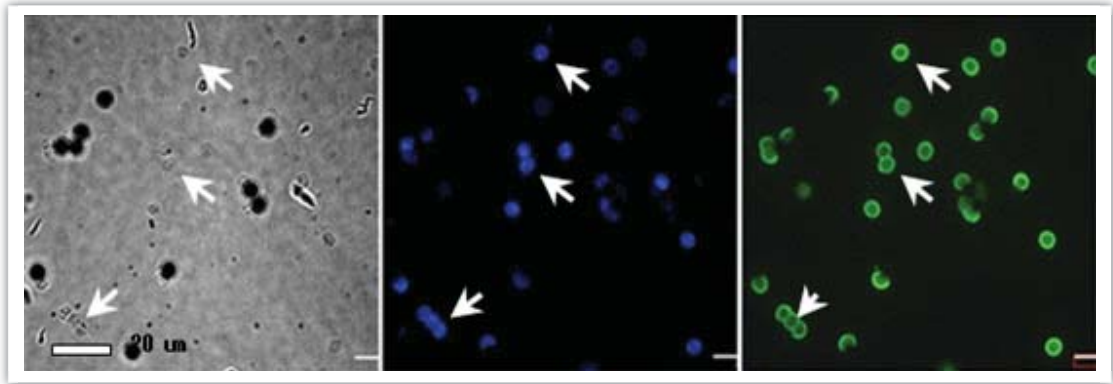


그림 30. 커버글라스를 덮고 매니큐어를 칠하는 과정

- ㄸ. 슬라이드는 400X 또는 600X 배율로 520nm 파장(FITC)과 자외선 필터 (DAPI) 하에 관찰한다. 의심되는 포낭이 보일 경우 1,000X 배율로 확대하여 사진을 찍는다. DIC로도 동시에 관찰하여 사진을 찍는다. 완성된 슬라이드는 슬라이드 박스에 넣어 냉장 보관한다.

※ 참고



(A)

(B)

(C)

그림 31. 작은와포자충 직접형광항체염색 사진.

A : DIC 관찰사진으로 흰색의 화살표가 난포낭을 가리킨다.

B : DAPI 염색된 작은와포자충 난포낭으로 내부에 핵이 파란색으로 관찰된다.

C : 형광항체로 염색된 난포낭 (약 5 μm).

## 2. 람블편모충 (*Giardia lamblia*)

### 2-1. 시험법

#### 1) 시약 및 시액

- 가) 0.1M Phosphate buffered saline(0.1M PBS, pH 7.4) : NaCl 40g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g를 450ml 증류수에 용해시켜 NaOH로 pH 7.4로 맞춘다. 3차 증류수로 최종 용량을 500ml로 맞춘 후 0.22 $\mu$ m 필터 (Millipore filter, 그림 1)로 여과한다.
- 나) 0.01M PBS : 0.1M PBS 100ml에 3차 증류수 900ml를 가한다.
- 다) 0.1% liquinox : 0.1M PBS 100ml에 liquinox(세척제) 1ml을 혼합하여 증류수로 1,000ml이 되게 맞춘다.
- ※ 거품이 생기지 않도록 조심해서 교반한다.

#### 2) 기구 및 소모품

- 가) 3M 지퍼백(가로 약 30cm x 세로 약 30cm)
- 나) Filter 장치 : 깔대기, filter membrane 삽입부, 진공펌프 연결부, 플라스크를 멸균하여 사용하도록 한다(그림 1).
- ① Filter membrane(0.22 $\mu$ m)를 삽입하여 집게로 고정시킨 후 진공펌프를 연결하고 용액을 깔대기 안에 붓는다.
  - ② 여과가 끝나면 진공펌프 연결 부위를 해체하고 여과된 용액을 멸균된 시약병에 옮겨 담는다.



그림 1. Millipore 여과 장치 및 filter membrane(0.22 $\mu$ m filter)

다) Orbital shaker



그림 2. Orbital shaker

라) Ultracentrifuge(초고속원심분리기)

마) Centrifuge(원심분리기)

바) Vacuum suction(진공흡입장치)



그림 3. 진공흡입장치 (Vacuum suction)

### 3) 검체 전처리

#### 가) 잎채소류

- ① 검체의 속잎만 50~150g 취하여 두 겹의 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 500~1,000ml)의 0.1% liquinox 용액을 가한다.



그림 4. 지퍼백에 담은 채소류

- ② 지퍼백이 터지지 않도록 잘 봉합하여 orbital shaker로(세기 : 범위 10 중에서 6 정도의 중간 세기) 실온에서 15분간 흔들어 준다.



그림 5. 세척액을 사용하여 세척중인 검체

- ③ 검체를 뒤집어 다시 15분간 흔들어 준다.
- ④ 세척액을 비커에 따르고 250ml 원심분리용병에 분배한다.
  - ※ 건더기가 많으면 200~250 $\mu$ m 크기의 체에 걸러 사용한다.
  - ※ 회수율을 높이기 위해 지퍼백 안의 검체를 손으로 툭툭 쳐서 마지막 한 방울까지 모두 수거한다.



⑤ ④에서 회수한 용액을 8,000rpm에서 20분간 원심 분리한다. 원심분리 후 상층액을 진공 흡입장치를 사용하여 조심스럽게 제거한다.

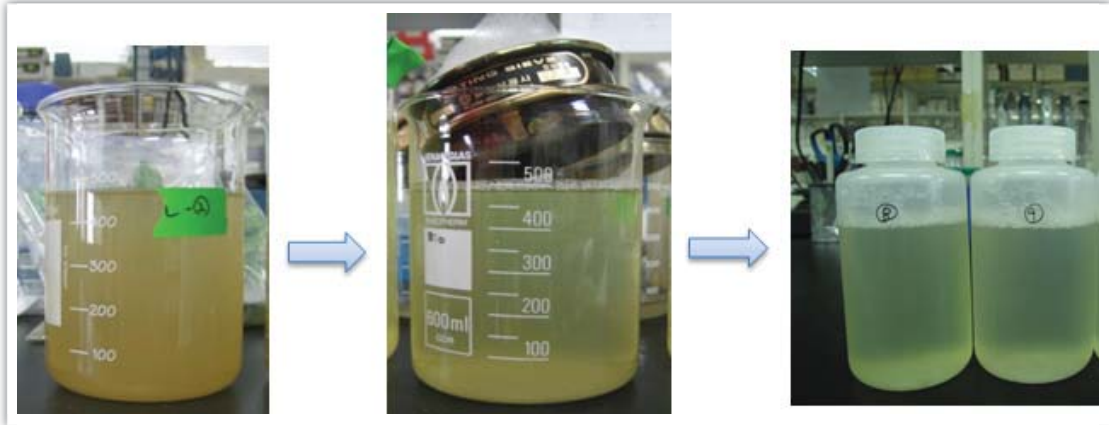


그림 6. 세척용액을 원심 분리한 침전물 수거 과정



그림 7. 진공흡입장치를 사용하여 상층액을 제거하는 과정

## VI. 식중독 원충 시험법

- ⑥ ⑤를 원심 분리하는 동안 ④번 과정을 거친 검체를 2~3배 용량(약 500~1,000ml)의 0.01M PBS를 넣고 15분간 다시 세척한다.
- ⑦ ⑥의 세척액을 ⑤번 과정의 250ml 원심분리용병에 다시 넣고 8,000rpm에서 원심 분리한 후 상층액을 진공흡입장치로 조심스럽게 제거한다.
- ⑧ ⑦의 침전물에 0.01M PBS 40ml을 넣어 부유시켜 50ml tube에 옮긴다. 2,500rpm에서 20분간 원심 분리한 다음 진공흡입장치로 상층액을 조심스럽게 제거한다.



그림 8. 50ml 튜브에 옮겨 원심분리된 침전물

- ⑨ ⑧의 최종 침전물에 0.01M PBS 1ml을 넣어 부유시켜 1.5ml tube에 옮긴다. 5,000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 진공흡입장치로 상층액을 제거한다.



그림 9. 진공흡입장치로 상층액 제거 후 원심 분리하여 생긴 침전물

- ⑩ ⑨의 침전물에 0.01M PBS 200ul을 넣은 후 1.5ml tube에 옮겨 담아 DNA 추출 kit로 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행한다.

※ 이 중 50μl는 현미경 검경을 위해 남기고, 나머지를 취하여 DNA 추출한다.



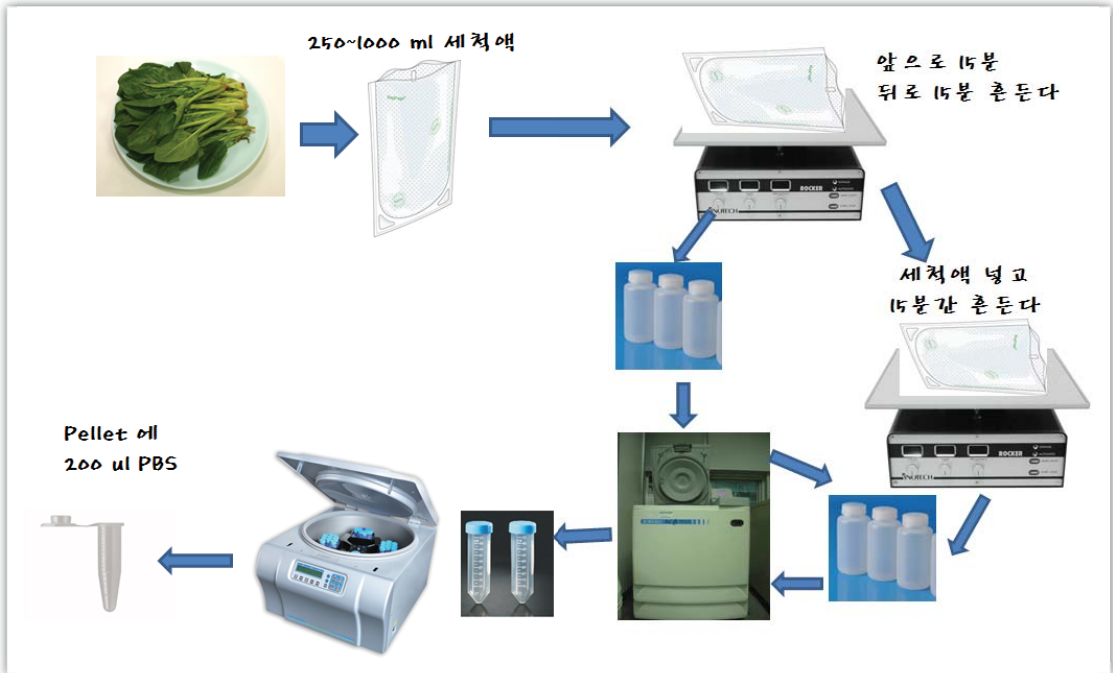


그림 10. 채소류 세척 과정

#### 나) 뿌리채소류(당근, 감자 등)

- ① 검체(당근 200~250g, 감자 150~200g, 고구마 150~200g)를 두 겹의 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 500~1,000ml)의 0.1% liquinox 용액을 넣는다.

※ 뿌리채소류는 무게 차이가 크기 때문에 세척액을 2~3배 용량 넣는다.



그림 11. 지퍼백에 담은 채소류

## VI. 식중독 원충 시험법

② 이후 과정은 “잎채소류 실험 방법”의 ②~⑩번과 같게 수행한다.

### 다) 허브류(로즈마리, 바질, 민트 등)

- ① 검체 25g을 두 겹의 작은 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 200~250ml)의 0.1% liquinox 용액을 넣는다.
- ② 이후 과정은 “잎채소류 실험 방법”의 ②~⑩번과 같게 수행한다.

### 라) 과일류

- ① 검체 50~100g을 두 겹의 작은 지퍼백에 넣고 2~3배 용량 (약 250~500 ml)의 0.1% liquinox 용액을 넣는다.



그림 12. 지퍼백에 담은 과일류

② 이후 과정은 “잎채소류 실험 방법”의 ②~⑩번과 같게 수행한다.

## 마) 음료류

① 검체 200ml을 50ml tube에 분배하여 2,500rpm(1300xg)에서 20분간 원심분리 한다.

※ 건더기가 있는 경우 200~250 $\mu$ l 크기의 체에 거른 후 걸러진 건더기의 용액을 잘 짜고 아래 내려온 용액을 검체에 사용한다.

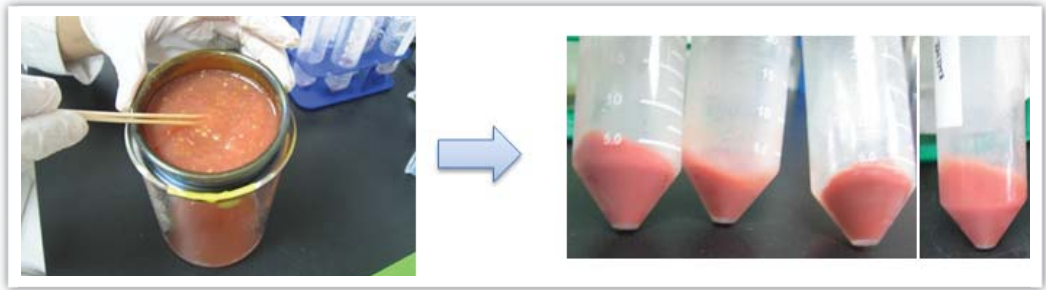


그림 13. 토마토 쥬스의 건더기를 체에 거른 검체

② 상층액을 버리고 침전물을 1.5ml tube에 옮겨 담아 DNA 추출 kit로 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행한다.

※ 이 중 50 $\mu$ l는 현미경 검경을 위해 남기고, 나머지를 취하여 DNA 추출한다.

## 4) 시험방법

④ 원충 확인 시험법은 분자생물학적 시험법(real-time-PCR), 현미경 검사법 (항산성염색 또는 직접형광항체염색)을 사용할 수 있다.

### 가) 분자생물학적 시험법(real-time-PCR)

#### (1) 유전자 추출 과정

- 검체 침전물에 시판되는 DNA추출용 키트(kit)를 사용하며, 제조사가 제시하는 적절한 실험법에 따라서 실시한다.

※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 DNA 추출 Prep Kit 또는 동등 이상의 제품 사용이 가능하다.

※ QIAamp DNA Mini kit(Qiagen, Cat# 51306) 사용 전 준비

✓ Buffer AW1과 Buffer AW2를 label에 적힌 대로 AW1에는 25ml의 ethanol을 넣어 기존에 들어있는 Buffer 19ml과 합쳐서 44ml이 되게 만든다. AW2에는 30ml의 ethanol을 넣어 기존에 들어있는 buffer 13ml과 합쳐서 43ml이 되게 만든다.

## VI. 식중독 원충 시험법

- √ 모든 buffer는 사용하기 전에 흔든다.
- √ Buffer ASL과 Buffer AL에 침전물이 생기면 실험 전에 70°C incubator에 넣어 둔다.
  - ① 1.5ml에 담겨진 침전물에 Buffer ATL 180μl와 proteinase K 20μl를 넣고 vortexing한 후, 56°C에서 1시간 30분간 incubation한다.
  - ② Buffer AL 200 μl 넣고 15초간 vortexing 한 후 70°C에서 10분간 incubation한다.
  - ③ Ethanol 200μl 넣고 15초간 vortexing한다.
  - ④ 2,000rpm, 1분 원심분리 후 상층액만 column에 옮긴다.
  - ⑤ 8,000rpm에서 1분 원심분리한 후 새로운 collection tube로 교체한다.
  - ⑥ Buffer AW1 500μl 넣고 8,000rpm에서 1분 원심분리한 후 새로운 collection tube로 교체한다.
  - ⑦ Buffer AW2 500μl 넣고 13,000rpm에서 3분 원심분리한 후 새로운 collection tube로 교체한다.
  - ⑧ 한 번 더 13,000rpm에서 1분 원심 분리한다.
  - ⑨ Buffer AE 100μl 넣고 실온에서 1분 동안 반응 후 8,000 rpm에서 1분 원심분리 한다.
  - ⑩ Zymo-Spin™ IV-HRC Column(green tops, OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit(D6030, ZYMO RESEARCH, USA))의 컬럼 아랫부분을 떼어낸 후 뚜껑을 제거하고 collection tube에 끼운 다음 8,000rpm에서 3분간 원심 분리한다.



그림 14. Zymo-Spin™ IV-HRC Column

- ⑪ Column을 새로운 1.5ml tube에 옮긴 후 10번에서 준비한 DNA를 넣고 8000rpm에서 1분간 원심분리 한다. 추출액은 real-time PCR을 수행하기 위한 주형(template)으로 사용한다.
  - ※ 증폭과정의 오류점검을 위해 람블편모충 Realtime PCR 양성대조군과 유전자 추출과정을 거친 음성대조군을 시료와 함께 증폭반응 한다.



(2) Real-time PCR 반응액 조성

Reaction Component	volume (μl)	final concentration
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	10	1X
10 uM primer forward	0.9	450nM
10 uM primer reverse	0.9	
5 uM Probe	0.5	125nM
BSA (10 mg/ml)	0.5	0.025%
DNase-Rnase free water	5.2	
Sample DNA	2	
Total	20	

(3) Real-time PCR을 위한 Primer와 Probe 염기서열

Gene	Primer/Probe	Sequence	size (bp)	Annealing
<i>G. lamblia</i>	Probe	CAAGCCCCGACGACCTC	56bp	60°C
	Forward primer	GCTCACCCAGACGATGGA		
	Reverse primer	CCGTCTCGGTCGCACTG		

※ 람블편모충 양성시료 염기서열 (β-giardin 유전자, 819 bp)

ATGTCTATGTTACCTCCACCCGTAC **GCTCACCCAGACGATGGA** **CAAGCCCCGACGACCTC** ACCCG  
*Forward primer* *Probe*

**CAGTGC** **GACCGAGACGG** CCGTCAAGCTCAGCAACATGAACCAGCGCGTCAGCAGGTTCCACGAC  
*Reverse primer*

AAGATGGAGAACGAGATCGAGGTCCGCCGCGTCGACGACGACACGCGCGTGAAGATGATCAAGG  
 ACGCCATCGCACACCTCGACAGGCTCATCCAGACGGAGTCGAGGAAGCGCCAGGCCTCGTTCTGA  
 GGACATCCGCGAGGAGGTCAAGAAGTCCGCCGACAACATGTACCTAACGATCAAGGAGGAGATCG  
 ACACCATGGCTGCAAACCTCCGCAAGTCCCTTGCGGAGATGGGCGACACACTCAACAACGTTGAG  
 ACAAATCTCCAGAACCAGATCGCCATCCATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAAGGAGGCCCT  
 CAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAGAAAGGAAGAAGATGTACG  
 ACCAGCTCAACGAGAAGGTGCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCGAGAAGGAGAC  
 GATCGCCCGCGAGAGGGCCGTTAGCGCTGCCACGACAGAAGCGCTCACAAACACGAAGCTCGTGC  
 AGAAGTGCGTCAACGAGCAGCTCGAGAACGTGCCTCGGAGATCCGCGCTATCCAGGAGGAGATC  
 GACCGCGAGAAGGCCGAACGCAAGGAGGCAGAGGACAAGATCGTCAACACTCTCGAGGACGTCGT  
 CTCGAAGATCCAGGGCGGCCTCTCGATGGTCACAAAGCACTAA

## VI. 식중독 원충 시험법

### (4) Real-time PCR 반응 조건

PCR 반응조건은 하단의 표에 따라 실시한다.

Step	UDG Incubation	Ampli Taq Gold, UP Enzyme Activation	PCR	
			Cycle(40 cycles)	
			Denature	Anneal/Extend
Temp	50℃	95℃	95℃	60℃
Time	2min	10min	15sec	1min

### (5) 결과 확인

- ① PCR 반응이 종료 후 FAM-TAMRA detector를 적용한 경우의 증폭곡선이 확인되는 경우, 현미경 검사를 수행해야한다.
- ☞ 만일 음성대조군(negative control)에서 증폭곡선이 확인되거나 또는 양성대조군에서 확인이 되지 않을 경우 등은 유전자 추출과정 부터 재시험을 실시해야한다.

## 나) 현미경 검사법

### (1) 직접형광항체염색법

- ① 시약 및 소모품
  - Aqua-Glo G/C Direct Comprehensive kit(Waterborne Inc, Cat no. A100FLK)
  - Methanol
  - Humid chamber
  - 투명 매니큐어
  - 커버글라스



그림 15. 직접형광항체 염색 kit



② 기구 및 소모품

- 형광현미경
- 배양기(Incubator) : 37°C

③ 실험 방법

- ㄱ. 침전물 10 $\mu$ l를 형광염색용키트에 포함된 슬라이드글라스에 직경 약 0.5cm 정도로 도말하여 37°C에서 15분간 건조한다. 양성 대조군과 음성 대조군을 포함시켜 준비한다.



그림 16. 형광염색용 슬라이드글라스와 humid chamber

- ㄴ. Absolute methanol 45 $\mu$ l를 슬라이드 글라스에 떨어뜨린 후 37°C에서 30분간 완전히 건조한다.
- ㄷ. 1X DAPI 50 $\mu$ l를 각 well에 떨어뜨린 후 실온에서 1분간 방치한다.
- ㄹ. SureRinse™ wash buffer 50~100 $\mu$ l를 슬라이드에 떨어뜨린 후 1분 동안 방치한다. 슬라이드를 기울여 여분의 용액을 흘려버린다.
- ㅁ. Aqua-Glo™ G/C를 한 방울씩 각 well에 떨어뜨린 후 humid chamber에 넣고 37°C incubator에서 30분 동안 반응한다.
- ㅂ. SureRinse™ wash buffer 50~100 $\mu$ l를 슬라이드에 떨어뜨리고 1분 동안 방치한다. 슬라이드를 기울여 여분의 용액을 흘려버린다.
- ㅅ. BlockOut™ counterstain을 한 방울씩 각 well에 떨어뜨린 후 1분간 실온에서 반응한다.
- ㅇ. SureRinse™ wash buffer 50~100 $\mu$ l를 슬라이드에 떨어뜨린 후 1분 동안 방치한다. 슬라이드를 기울여 여분의 용액을 흘려버린다.

## VI. 식중독 원충 시험법

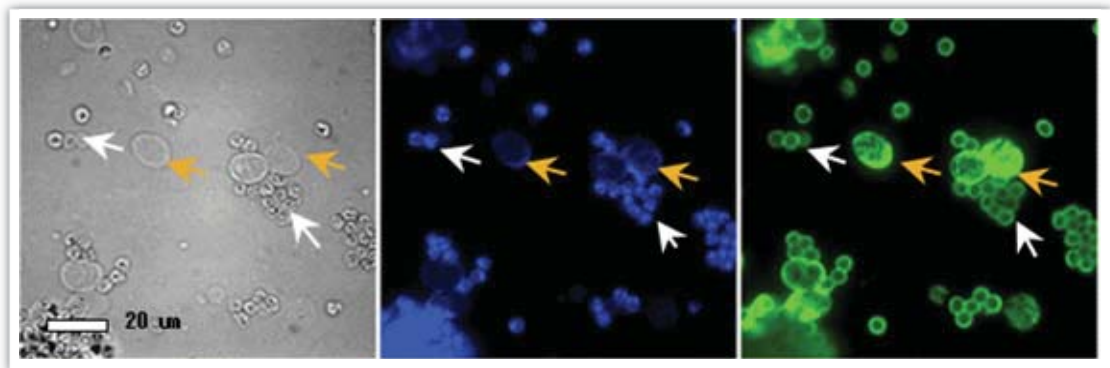
ㄷ. 완전히 건조시킨 후 No-Fade™ mounting medium을 떨어뜨린 후 커버글라스 덮고 매니큐어로 가장자리를 봉합한 다음 10분간 건조한다.



그림 17. 커버글라스를 덮고 매니큐어를 칠하는 과정

ㄸ. 슬라이드는 400X 또는 600X 배율로 520nm 파장(FITC)과 자외선 필터 (DAPI) 하에 관찰한다. 의심되는 포낭이 보일 경우 1,000X 배율로 확대하여 사진을 찍는다. DIC로도 동시에 관찰하여 사진을 찍는다. 완성된 슬라이드는 슬라이드 박스에 넣어 냉장 보관한다.

### ※ 참고



(A)

(B)

(C)

그림 18. 람블편모충 직접형광항체염색.

A : DIC 관찰사진으로 흰색의 화살표가 포낭을 가리킨다.

B : DAPI 염색된 포낭으로 내부에 핵이 파란색으로 관찰된다.

C : 형광항체로 염색된 포낭(약 8~12 μm).





### 3.

## 이질아메바 (*Entamoeba histolytica*)

### 3-1. 시험법

#### 1) 시약 및 시액

가) 0.1M Phosphate buffered saline(0.1M PBS, pH 7.4) : NaCl 40g, KCl 0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.44g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24g를 450ml 증류수에 용해시켜 NaOH로 pH 7.4로 맞춘다. 3차 증류수로 최종 용량을 500ml로 맞춘 후 0.22 $\mu\text{m}$  필터 (Millipore filter, 그림 1)로 여과한다.

나) 0.01M PBS : 0.1M PBS 100ml에 3차 증류수 900ml를 가한다.

다) 0.1% liquinox : 0.1M PBS 100ml에 liquinox(세척제) 1ml을 섞은 후 증류수로 1,000ml이 되게 맞춘다.

※ 거품이 생기지 않도록 조심해서 교반한다.

#### 2) 기구 및 소모품

가) 3M 지퍼백(가로 약 30cm x 세로 약 30cm)

나) Filter 장치 : 깔대기, filter membrane 삽입부, 진공펌프 연결부, 플라스크를 멸균하여 사용하도록 한다(그림 1).

① Filter membrane(0.22 $\mu\text{m}$ )를 삽입하여 집게로 고정시킨 후 진공펌프를 연결하고 용액을 깔대기 안에 붓는다.

② 여과가 끝나면 진공펌프 연결 부위를 해체하고 여과된 용액을 멸균된 시약병에 옮겨 담는다.



그림 1. Millipore 여과 장치 및 filter membrane(0.22 $\mu\text{m}$  filter)

## VI. 식중독 원충 시험법

다) Orbital shaker



그림 2. Orbital shaker

라) Ultracentrifuge(초고속원심분리기)

마) Centrifuge(원심분리기)

바) Vacuum suction(진공흡입장치)



그림 3. 진공흡입장치(Vacuum suction)



### 3) 검체 전처리

#### 가) 잎채소류

- ① 검체의 속잎만 50~150g 취하여 두 겹의 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 500~1,000ml)의 0.1% liquinox 용액을 가한다.



그림 4. 지퍼백에 담은 채소류

- ② 지퍼백이 터지지 않도록 잘 봉합하여 orbital shaker로(세기 : 범위 10 중에서 6 정도의 중간 세기) 실온에서 15분간 흔들어 준다.



그림 5. 세척액을 사용하여 세척중인 검체

- ③ 검체를 뒤집어 다시 15분간 흔들어 준다.
- ④ 세척액을 비커에 따르고 250ml 원심분리용병에 분배한다.
  - ※ 건더기가 많으면 200~250 $\mu$ m 크기의 체에 걸러 사용한다.
  - ※ 회수율을 높이기 위해 지퍼백 안의 검체를 손으로 툭툭 쳐서 마지막 한 방울까지 모두 수거한다.

## VI. 식중독 원충 시험법

- ⑤ ④에서 회수한 용액을 8,000rpm에서 20분간 원심 분리한다. 원심분리 후 상층액을 진공 흡입장치를 사용하여 조심스럽게 제거한다.

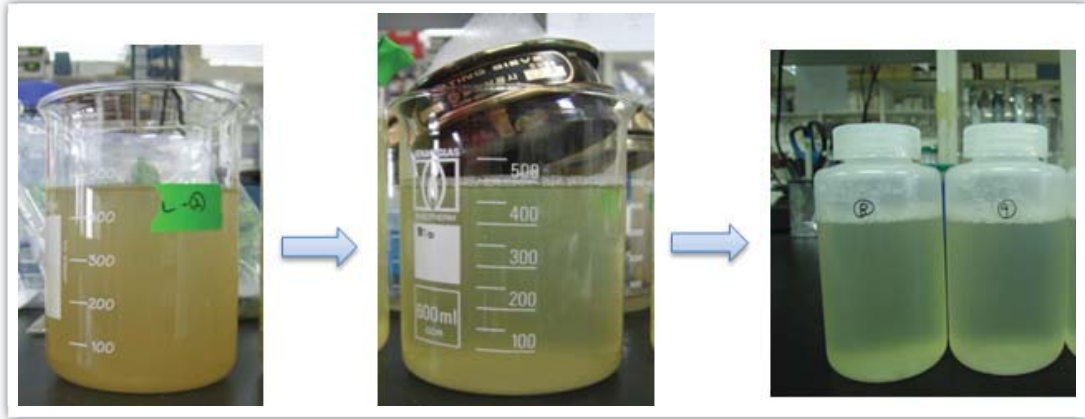


그림 6. 세척용액을 원심 분리한 침전물 수거 과정



그림 7. 진공흡입장치를 사용하여 상층액을 제거하는 과정



- ⑥ ⑤를 원심 분리하는 동안 ④번 과정을 거친 검체를 2~3배 용량(약 500~1,000ml)의 0.01M PBS를 넣고 15분간 다시 세척한다.
- ⑦ ⑥의 세척액을 ⑤번 과정의 250ml 원심분리용병에 다시 넣고 8,000rpm에서 원심 분리한 후 상층액을 진공흡입장치로 조심스럽게 제거한다.
- ⑧ ⑦의 침전물에 0.01M PBS 40ml을 넣어 부유시켜 50ml tube에 옮긴다. 2,500rpm에서 20분간 원심 분리한 다음 진공흡입장치로 상층액을 조심스럽게 제거한다.



그림 8. 50ml 튜브에 옮겨 원심분리된 침전물

- ⑨ ⑧의 최종 침전물에 0.01M PBS 1ml을 넣어 부유시켜 1.5ml tube에 옮긴다. 5,000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 진공흡입장치로 상층액을 제거한다.

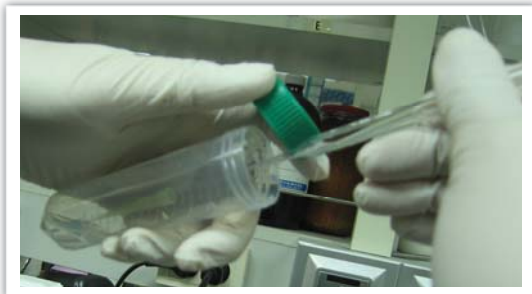


그림 9. 진공흡입장치로 상층액 제거 후 원심 분리하여 생긴 침전물

- ⑩ ⑨의 침전물에 0.01M PBS 200ul을 넣은 후 1.5ml tube에 옮겨 담아 DNA 추출 kit로 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행한다.
- ※ 이 중 100피는 현미경 검경을 위해 남기고, 나머지를 취하여 DNA 추출한다.

## VI. 식중독 원충 시험법

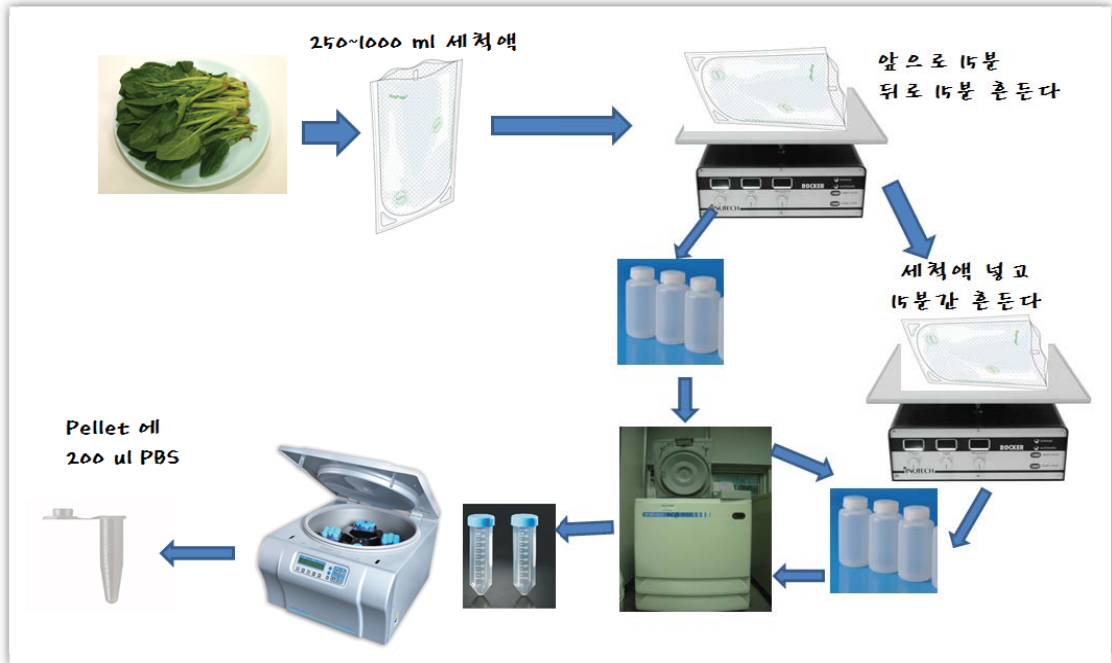


그림 10. 채소류 세척 과정

### 나) 뿌리채소류(당근, 감자 등)

- ① 검체(당근 200~250g, 감자 150~200g, 고구마 150~200g)를 두 겹의 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 500~1,000ml)의 0.1% liquinox 용액을 넣는다.

※ 뿌리채소류는 무게 차이가 크기 때문에 세척액을 2~3배 용량 넣는다.



그림 11. 지퍼백에 담은 채소류

- ② 이후 과정은 “잎채소류 실험 방법”의 ②~⑩번과 같게 수행한다.



#### 다) 허브류(로즈마리, 바질, 민트 등)

- ① 검체 25g을 두 겹의 작은 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 200~250ml)의 0.1% liquinox 용액을 넣는다.
- ② 이후 과정은 “잎채소류 실험 방법”의 ②~⑩번과 같게 수행한다.

#### 라) 과일류

- ① 검체 50~100g을 두 겹의 작은 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 250~500 ml)의 0.1% liquinox 용액을 넣는다.



그림 12. 지퍼백에 담은 과일류

- ② 이후 과정은 “잎채소류 실험 방법”의 ②~⑩번과 같게 수행한다.

## VI. 식중독 원충 시험법

### 마) 음료류

- ① 검체 200ml을 50ml tube에 분배하여 2,500rpm(1300xg)에서 20분간 원심분리 한다.  
※ 건더기가 있는 경우 200~250 $\mu$  크기의 체에 거른 후 걸러진 건더기의 용액을 잘 짜고 아래 내려온 용액을 검체로 사용한다.

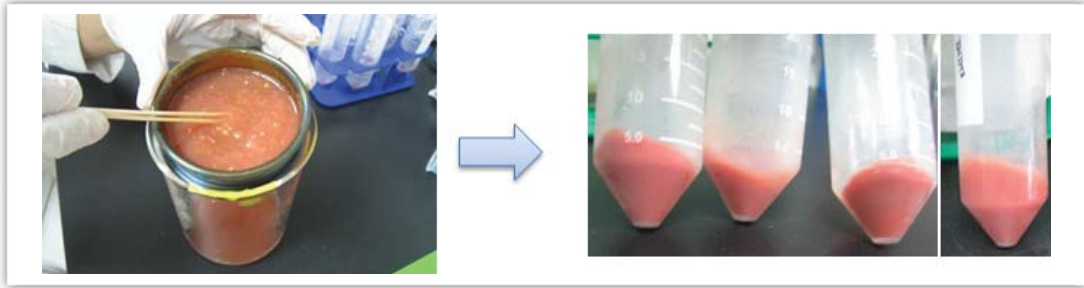


그림 13. 토마토 쥬스의 건더기를 체에 거른 검체

- ② 상층액을 버리고 침전물을 1.5ml tube에 옮겨 담아 DNA 추출 kit로 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행한다.  
※ 이 중 50 $\mu$ 는 현미경 검경을 위해 남기고, 나머지를 취하여 DNA 추출한다.

### 4) 시험방법

- ④ 원충 확인 시험법은 분자생물학적 시험법(real-time PCR), 현미경 검사법(요오드 염색)을 사용할 수 있다.

#### 가) 분자생물학적 시험법(real-time PCR)

##### (1) 유전자 추출 과정

- 검체 침전물에 시판되는 DNA추출용 키트(kit)를 사용하며, 제조사가 제시하는 적절한 실험법에 따라서 실시한다.

※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 DNA 추출 Prep Kit 또는 동등 이상의 제품 사용이 가능하다.

※ QIAamp DNA Mini kit(Qiagen, Cat# 51306) 사용 전 준비

- ✓ Buffer AW1과 Buffer AW2를 label에 적힌 대로 AW1에는 25ml의 ethanol을 넣어 기존에 들어 있는 Buffer 19ml과 합쳐서 44ml이 되게 만든다. AW2에는 30ml의 ethanol을 넣어 기존에 들어있는 buffer 13ml과 합쳐서 43ml이 되게 만든다.





- ✓ 모든 buffer는 사용하기 전에 흔든다.
- ✓ Buffer ASL과 Buffer AL에 침전물이 생기면 실험 전에 70°C incubator에 넣어 둔다.
  - ① 1.5ml에 담겨진 침전물에 Buffer ATL 180μl와 proteinase K 20μl를 넣고 vortexing한 후, 56°C에서 1시간 30분간 incubation한다.
  - ② Buffer AL 200 μl 넣고 15초간 vortexing 한 후 70°C에서 10분간 incubation한다.
  - ③ Ethanol 200μl를 넣고 15초간 vortexing한다.
  - ④ 2,000rpm, 1분 원심분리 후 상층액만 column에 옮긴다.
  - ⑤ 8,000rpm에서 1분 원심분리한 후 새로운 collection tube로 교체한다.
  - ⑥ Buffer AW1 500μl 넣고 8,000rpm에서 1분 원심분리한 후 새로운 collection tube로 교체한다.
  - ⑦ Buffer AW2 500μl 넣고 13,000rpm에서 3분 원심분리한 후 새로운 collection tube로 교체한다.
  - ⑧ 한 번 더 13,000rpm에서 1분 원심 분리한다.
  - ⑨ Buffer AE 100 μl 넣고 실온에서 1분 동안 반응 후 8,000 rpm에서 1분 원심분리 한다.
  - ⑩ Zymo-Spin™ IV-HRC Column(green tops, OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit(D6030, ZYMO RESEARCH, USA))을 준비하여 컬럼 아랫부분을 떼어낸 후 뚜껑을 제거하고 collection tube에 끼운 다음 8,000rpm에서 3분간 원심분리 한다.



그림 14. Zymo-Spin™ IV-HRC Column

- ⑪ Column을 새로운 1.5ml tube에 옮긴 후 10번에서 준비한 DNA를 넣고 8000 rpm에서 1분간 원심분리 한다. 추출액은 real-time PCR을 수행하기 위한 주형(template)으로 사용한다.
  - ※ 증폭과정의 오류점검을 위해 이질아메바 Realtime PCR 양성대조군과 유전자 추출과정을 거친 음성대조군을 시료와 함께 증폭반응 한다.

## VI. 식중독 원충 시험법

### (2) Real-time PCR 반응액 조성

Reaction Component	volume (μl)	final concentration
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	10	1X
10 uM primer forward	0,9	450nM
10 uM primer reverse	0,9	
5 uM Probe	0,5	125nM
BSA (10 mg/ml)	0,5	0.025%
DNase-Rnase free water	5,2	
Sample DNA	2	
Total	20	

### (3) Real-time PCR을 위한 Primer와 Probe 염기서열

Gene	Primer/Probe	Sequence	size (bp)	Annealing
<i>E. histolytica</i>	Probe	TGTCATTCTTCTACTGTTCCGGTCTTGG	88bp	57°C
	Forward primer	AAGGCTGAAACTTAAAGGAA		
	Reverse primer	CACCACTACCCAATAAATCA		

※ 이질아메바 양성시료 염기서열 (18s rRNA 유전자, 701 bp)

CATGATCGCTATAAGATGCACGAGAGCGAAAGCATTTCACTCAACTGTGTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGA  
TCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACTATAAACGATGTCAACCAAGGATTGGATGAAATTCAGATGTACAA  
AGATAGAGAAGCATTGTTTCTAGATCTGAGTATATCAATATTACCTTGTTCCAGAACTTAAAGAGAAATCTTGAGTTTATG  
GACTTCAGGGGGAGTATGGTCAC AAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACACCAGGAGTGGAGCCTGC

**Forward primer**

GGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTA CCAAGACCGAACAGTAGAAGGAATGACAGATTAAGAGTTCTTTCA

**Probe**

TGATTTATTGGGTAGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCAGGTTAATCCGGTAACGAACGAGA

**Reverse primer**

CTGAAACCTATTAATTAGTTTTCTGCCTATAAGACAGAAATGTTCCGAAGAACAGGTGCGTAAGTACCACTTCTTAAAG  
GGACACATTTCAATTGTCCTATTTAATTGTAGTTATCTAATTTCCGTTAGACCTCTTTAACGTGGGAAAAAGAAAAAG  
GAAGCATTACGAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACATCTTGGGCCGCACGCGCGCTACAATGGAGTTACTAG



(4) Real-time PCR 반응 조건

Step	UDG Incubation	Ampli Taq Gold, UP Enzyme Activation	PCR	
			Cycle(40 cycles)	
			Denature	Anneal/Extend
Temp	50°C	95°C	95°C	57°C
Time	2min	10min	15sec	1min

(5) Real-time 결과 확인

- ① PCR 반응이 종료 후 FAM-TAMRA detector를 적용한 경우의 증폭곡선이 확인되는 경우, 현미경 검사를 수행해야한다.
  - ☞ 만일 음성대조군(negative control)에서 증폭곡선이 확인되거나 또는 양성대조군에서 확인이 되지 않을 경우 등은 유전자 추출과정 부터 재시험을 실시해야한다.

나) 현미경 검사법

(1) Iodine 염색

① 시약 및 소모품

- Iodine stain

Potassium iodide(KI)	20g
iodine crystal	1g
DW	50ml

☞ Potassium iodide(KI)과 DW를 먼저 합해 용해시킨 후 iodine crystal를 가해서 용해시킨다.

Filter : 사용 전에 여과지를 증류수에 적셔 깔대기에 얹어 놓고 여과한다.

※ 염색시 iodine 용액: 증류수를 7:3 으로 섞어서 사용한다.

② 기구 및 소모품

- 광학현미경
- 슬라이드 및 커버슬라이드

③ 실험 방법

1. 침전물 10μl를 슬라이드글라스에 도말하여 요오드용액을 한 방울 떨어뜨려 잘 혼합하여 염색하고 커버글라스를 덮어서 검경한다.

※ 참고

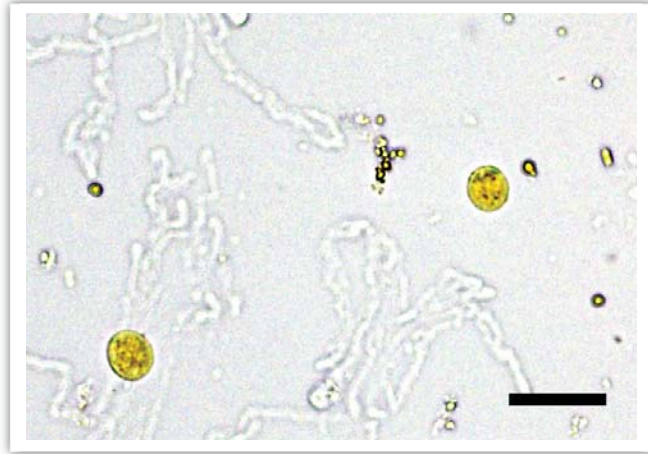


그림 15. 이질아메바의 포낭형(cyst).

요오드에 염색되어 노란색을 띠며 내부에 핵이 4개 관찰된다. 크기는 약 12  $\mu\text{m}$  정도이다.(Bar, 20  $\mu\text{m}$ )



## 4.

### 원포자충 (*Cyclospora cayetanesis*)

#### 4-1. 시험법

##### 1) 시약 및 시액

- 가) 0.1M Phosphate buffered saline(0.1M PBS, pH 7.4) : NaCl 40g, KCl 0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.44g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24g를 450ml 증류수에 용해시켜 NaOH로 pH 7.4로 맞춘다. 3차 증류수로 최종 용량을 500ml로 맞춘 후 0.22 $\mu\text{m}$  필터 (Millipore filter, 그림 1)로 여과한다.
- 나) 0.01M PBS : 0.1M PBS 100ml에 3차 증류수 900ml를 가한다.
- 다) 0.1% liquinox : 0.1M PBS 100ml에 liquinox(세척제) 1ml을 섞은 후 증류수로 1,000ml이 되게 맞춘다.
- ※ 거품이 생기지 않도록 조심해서 교반한다.

##### 2) 기구 및 소모품

- 가) 3M 지퍼백(가로 약 30cm x 세로 약 30cm)
- 나) Filter 장치 : 깔대기, filter membrane 삽입부, 진공펌프 연결부, 플라스크를 멸균하여 사용하도록 한다(그림 1).
- ① Filter membrane(0.22 $\mu\text{m}$ )를 삽입하여 집게로 고정시킨 후 진공펌프를 연결하고 용액을 깔대기 안에 붓는다.
  - ② 여과가 끝나면 진공펌프 연결 부위를 해체하고 여과된 용액을 멸균된 시약병에 옮겨 담는다.



그림 1. Millipore 여과 장치 및 filter membrane(0.22 $\mu\text{m}$  filter)

다) Orbital shaker



그림 2. Orbital shaker

라) Ultracentrifuge(초고속원심분리기)

마) Centrifuge(원심분리기)

바) Vacuum suction(진공흡입장치)



그림 3. 진공흡입장치(Vacuum suction)



### 3) 검체 전처리

#### 가) 잎채소류

- ① 검체의 속잎만 50~150g 취하여 두 겹의 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 500~1,000ml)의 0.1% liquinox 용액을 가한다.



그림 4. 지퍼백에 담은 채소류

- ② 지퍼백이 터지지 않도록 잘 봉합하여 orbital shaker로(세기 : 범위 10 중에서 6 정도의 중간 세기) 실온에서 15분간 흔들어 준다.



그림 5. 세척액을 사용하여 세척중인 검체

- ③ 검체를 뒤집어 다시 15분간 흔들어 준다.
- ④ 세척액을 비커에 따르고 250ml 원심분리용병에 분배한다.
  - ※ 건더기가 많으면 200~250 $\mu$ m 크기의 체에 걸러 사용한다.
  - ※ 회수율을 높이기 위해 지퍼백 안의 검체를 손으로 툭툭 쳐서 마지막 한 방울까지 모두 수거한다.

## VI. 식중독 원충 시험법

- ⑤ ④에서 회수한 용액을 8,000rpm에서 20분간 원심 분리한다. 원심분리 후 상층액을 진공 흡입장치를 사용하여 조심스럽게 제거한다.

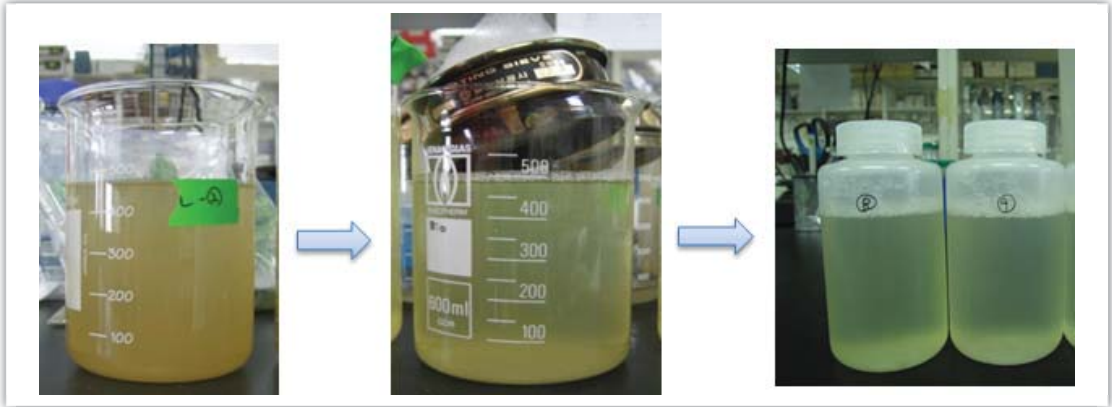


그림 6. 세척용액을 원심 분리한 침전물 수거 과정



그림 7. 진공흡입장치를 사용하여 상층액을 제거하는 과정





- ⑥ ⑤를 원심 분리하는 동안 ④번 과정을 거친 검체를 2~3배 용량(약 500~1,000ml)의 0.01M PBS를 넣고 15분간 다시 세척한다.
- ⑦ ⑥의 세척액을 ⑤번 과정의 250ml 원심분리용병에 다시 넣고 8,000rpm에서 원심 분리한 후 상층액을 진공흡입장치로 조심스럽게 제거한다.
- ⑧ ⑦의 침전물에 0.01M PBS 40ml을 넣어 부유시켜 50ml tube에 옮긴다. 2,500rpm에서 20분간 원심 분리한 다음 진공흡입장치로 상층액을 조심스럽게 제거한다.



그림 8. 50ml 튜브에 옮겨 원심분리된 침전물

- ⑨ ⑧의 최종 침전물에 0.01M PBS 1ml을 넣어 부유시켜 1.5ml tube에 옮긴다. 5,000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 진공흡입장치로 상층액을 제거한다.



그림 9. 진공흡입장치로 상층액 제거 후 원심 분리하여 생긴 침전물

- ⑩ ⑨의 침전물에 0.01M PBS 200ul을 넣은 후 1.5ml tube에 옮겨 담아 DNA 추출 kit로 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행한다.

※ 이 중 100μl는 현미경 검경을 위해 남기고, 나머지를 취하여 DNA 추출한다.

## VI. 식중독 원충 시험법

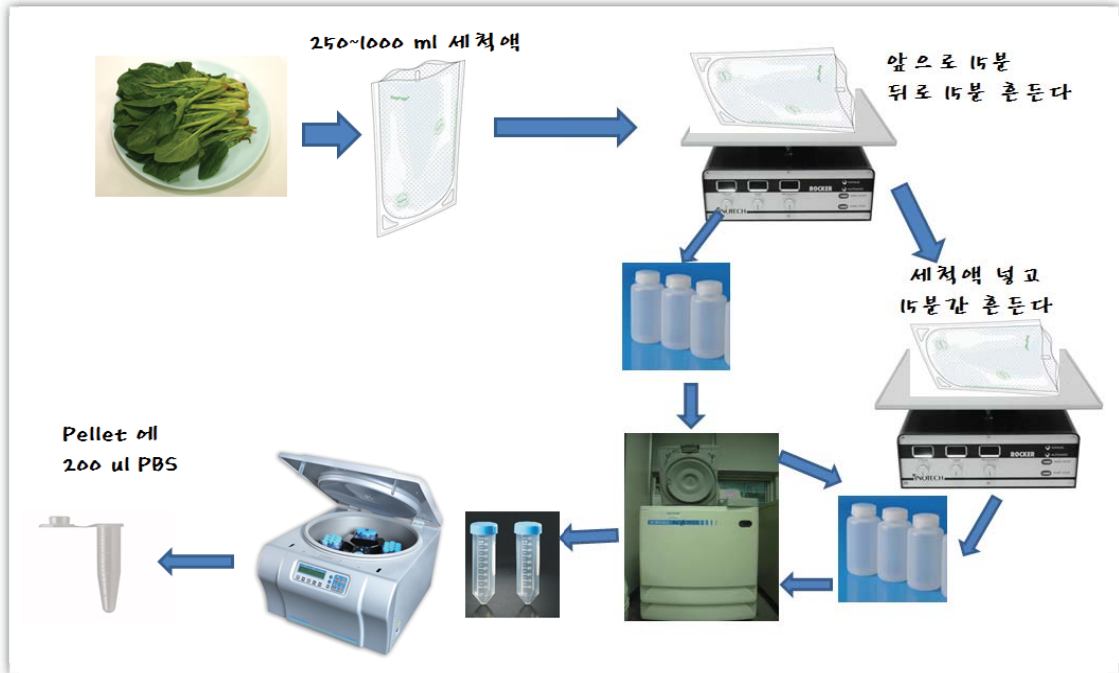


그림 10. 채소류 세척 과정

### 나) 뿌리채소류 (당근, 감자 등)

- ① 검체(당근 200~250g, 감자 150~200g, 고구마 150~200g)를 두 겹의 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 500~1,000ml)의 0.1% liquinox 용액을 넣는다.  
※ 뿌리채소류는 무게 차이가 크기 때문에 세척액을 2~3배 용량 넣는다.



그림 11. 지퍼백에 담은 채소류

- ② 이후 과정은 “잎채소류 실험 방법”의 ②~⑩번과 같게 수행한다.

#### 다) 허브류(로즈마리, 바질, 민트 등)

- ① 검체 25g을 두 겹의 작은 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 200~250ml)의 0.1% liquinox 용액을 넣는다.
- ② 이후 과정은 “잎채소류 실험 방법”의 ②~⑩번과 같게 수행한다.

#### 라) 과일류

- ① 검체 50~100g을 두 겹의 작은 지퍼백에 넣고 2~3배 용량(약 250~500 ml)의 0.1% liquinox 용액을 넣는다.



그림 12. 지퍼백에 담은 과일류

- ② 이후 과정은 “잎채소류 실험 방법”의 ②~⑩번과 같게 수행한다.

#### 마) 음료류

- ① 검체 200ml을 50ml tube에 분배하여 2,500rpm(1300xg)에서 20분간 원심분리 한다.  
 ※ 건더기가 있는 경우 200~250 $\mu$ l 크기의 체에 거른 후 걸러진 건더기의 용액을 잘 짜고 아래 내려온 용액을 검체로 사용한다.

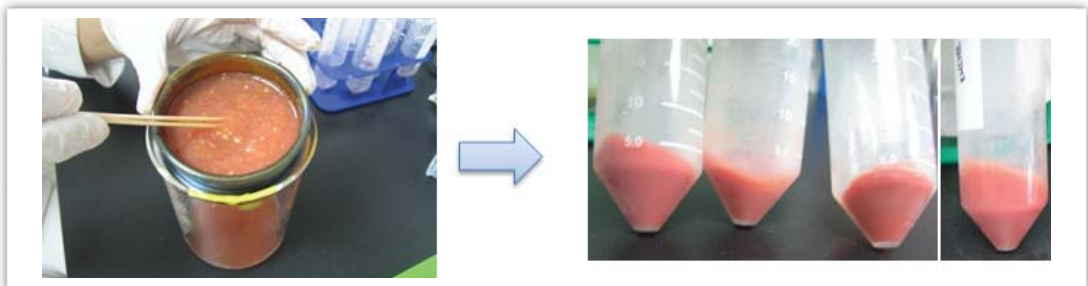


그림 13. 토마토 주스의 건더기를 체에 거른 검체

## VI. 식중독 원충 시험법

- ② 상층액을 버리고 침전물을 1.5ml tube에 옮겨 담아 DNA 추출 kit로 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행한다.

※ 이 중 50ul는 현미경 검경을 위해 남기고, 나머지를 취하여 DNA 추출한다.

### 4) 시험방법

※ 원충 확인 시험법은 분자생물학적 시험법(real-time PCR), 현미경 검사법 (요오드 염색)을 사용할 수 있다.

#### 가) 분자생물학적 시험법(real-time PCR)

##### (1) 유전자 추출 과정

- 검체 침전물에 시판되는 DNA추출용 키트(kit)를 사용하며, 제조사가 제시하는 적절한 실험법에 따라서 실시한다.

※ 재현성 및 검출효율 등을 고려하여 DNA 추출 Prep Kit 또는 동등 이상의 제품 사용이 가능하다.

※ QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Cat# 51306) 사용 전 준비

√ Buffer AW1과 Buffer AW2를 label에 적힌 대로 AW1에는 25ml의 ethanol을 넣어 기존에 들어있는 Buffer 19ml과 합쳐서 44ml이 되게 만든다. AW2에는 30ml의 ethanol을 넣어 기존에 들어있는 buffer 13ml과 합쳐서 43ml이 되게 만든다.

√ 모든 buffer는 사용하기 전에 흔든다.

√ Buffer ASL과 Buffer AL에 침전물이 생기면 실험 전에 70°C incubator에 넣어 둔다.

① 1.5ml에 담겨진 침전물에 Buffer ATL 180μl와 proteinase K 20μl를 넣고 vortexing한 후, 56°C에서 1시간 30분간 incubation한다.

② Buffer AL 200μl를 넣고 15초간 vortexing 한 후 70°C에서 10분간 incubation한다.

③ Ethanol 200μl를 넣고 15초간 vortexing한다.

④ 2,000rpm, 1분 원심분리 후 상층액만 column에 옮긴다.

⑤ 8,000rpm에서 1분 원심분리한 후 새로운 collection tube로 교체한다.

⑥ Buffer AW1 500μl 넣고 8,000rpm에서 1분 원심분리한 후 새로운 collection tube로 교체한다.

⑦ Buffer AW2 500μl 넣고 13,000rpm에서 3분 원심분리한 후 새로운 collection tube로 교체한다.

⑧ 한 번 더 13,000rpm에서 1분 원심 분리한다.

⑨ Buffer AE 100μl 넣고 실온에서 1분 동안 반응 후 8,000 rpm에서 1분 원심분리 한다.

⑩ Zymo-Spin™ IV-HRC Column(green tops, OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit(D6030,

ZYMO RESEARCH, USA))을 준비하여 컬럼 아랫부분을 떼어낸 후 뚜껑을 제거하고 collection tube에 끼운 다음 8,000rpm에서 3분간 원심분리 한다.

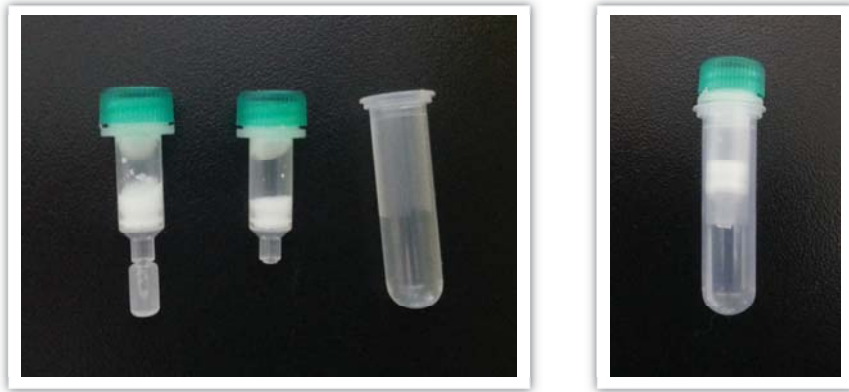


그림 14. Zymo-Spin™ IV-HRC Column

- ① Column을 새로운 1.5ml tube에 옮긴 후 10번에서 준비한 DNA를 넣고 8000 rpm에서 1분간 원심분리 한다. 추출액은 real-time PCR을 수행하기 위한 주형(template)으로 사용한다.

(2) Real-time PCR 반응액 조성

Reaction Component	volume (μl)	final concentration
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	10	1X
10 uM primer forward	0.9	450nM
10 uM primer reverse	0.9	
5 uM Probe	0.5	125nM
BSA (10 mg/ml)	0.5	0.025%
DNase-Rnase free water	5.2	
Sample DNA	2	
Total	20	

(3) Real-time PCR원포자충 프라이머 염기서열

Gene	Primer/Probe	Sequence	size (bp)	Annealing
<i>C. cayetanesis</i>	Probe	ACCTCTGACAGTTAAATACGAATGCC	137bp	57°C
	Forward primer	GCAGCATGGAATAATAAGA		
	Reverse primer	GTTTCGTCTTTAACAAATCTAAG		

## VI. 식중독 원충 시험법

※ 원포자충 양성시료 염기서열 (18s rRNA 유전자, 456 bp)

gtagttggatttctgctggtgcatccggccttgcccgtaggggtgctgctgggttggccgcggctttctccggtagcctt  
 ccgcgcttcgctgctgctgctggtggttccggaactttactttgagaaaaatagagtgttcaagcaggcttgcgcctgaatact  
gcagcatggaataataagataggaccttggttctattttgttggttctaggaccgaggaatgattaatagggacagttgg  
**Forward primer**  
gggcattcgtatttaactgtcagaggtgaaatt**cttagattgttaagacgaac**tactgcaaagcatttgccaaggatgttt  
**Probe** **Reverse primer**  
 callaatcaagaacgacagtagggggttgaagacgattagataccgtcgtaatctctaccataaactatgccgactagag  
 atagggaaatgcctacctgaggtattctacctgagaa

### (4) Real-time PCR 반응 조건

Step	UDG Incubation	Ampli Taq Gold, UP Enzyme Activation	PCR	
			Cycle (40 cycles)	
			Denature	Anneal/Extend
Temp	50℃	95℃	95℃	57℃
Time	2min	10min	15sec	1min

### (5) Real-time PCR 결과 확인

- ① PCR 반응 종료 후 FAM-TAMRA detector를 적용한 경우의 증폭곡선이 확인되는 경우, 현미경 검사를 수행해야 한다.
  - ☞ 만일 음성대조군(negative control)에서 증폭곡선이 확인되거나 또는 양성대조군에서 확인이 되지 않을 경우 등은 유전자 추출과정 부터 재시험을 실시해야한다.



## 나) 현미경 검사법

### (1) 항산성염색법

#### ① 시약 및 소모품

##### - Carbol fuchsin

Phenol Crystal(melted) 50ml

Absolute alcohol 100ml

Basic fuchsin 10g

DW make 100ml

Filter : 사용 전에 watmann paper를 증류수에 적셔 깔대기에 얹어 놓고 여과한다.

##### - 3% Acid alcohol 용액

70 % alcohol 970ml

HCl 30ml

##### - Methylene blue

Stock solution Methylene blue 14g

95% alcohol 100ml

Working solution Stock so 20ml

증류수 180ml

##### - Permout (xylene과 1:1로 섞어 준비)

#### ② 기구 및 소모품

##### - 광학현미경

##### - Heating plate 70°C

##### - 슬라이드 및 커버슬라이드

##### - 염색 Jar

##### - 슬라이드 rack

## VI. 식중독 원충 시험법

### ③ 실험 방법

ㄱ. 침전물 10 $\mu$ l를 슬라이드글라스에 도말하여 실온에서 15분간 건조한다.



그림 15. 슬라이드 도말 표본

ㄴ. 건조된 슬라이드를 rack에 꽂고 methanol에 담가 1분간 고정된 다음 heating plate (70 $^{\circ}$ C) 위에서 10분간 건조시킨다.



그림 16. 건조된 슬라이드를 methanol에 담가 heating plate에서 건조 과정

ㄷ. Carbol-fuchsin에 10분간 염색한 다음 흐르는 물로 5분간 세척한다.

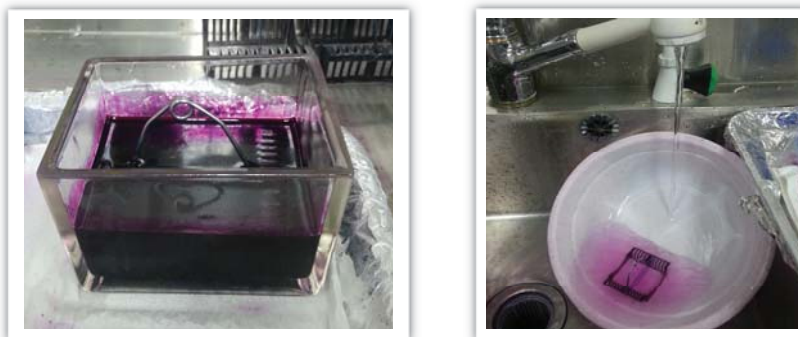


그림 17. Carbol fuchsin 염색 과정



르. 3% acid alcohol에서 1분간 두어 붉은 색을 빠지게 한 다음 흐르는 수돗물에 1분간 세척한다.

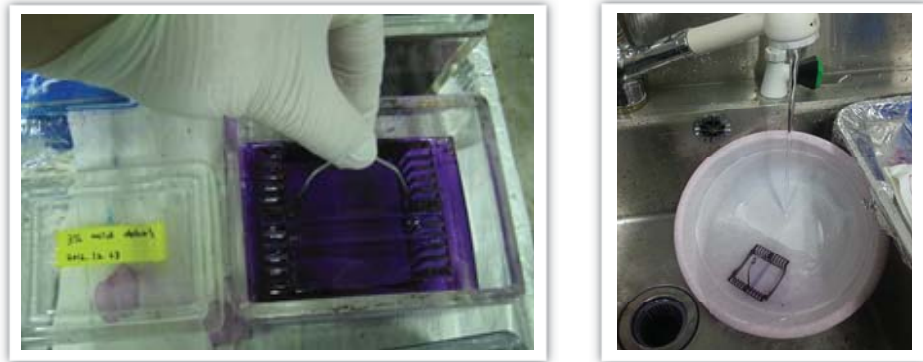


그림 18. 3% acid alcohol 처리 후 세척 과정

마. Methylene blue에 1분간 염색한 다음 흐르는 수돗물에 1분간 세척한다.

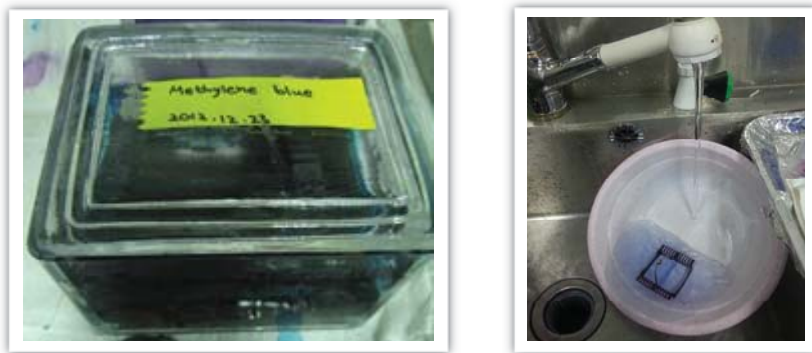


그림 19. Methylene blue 염색 후 세척 과정

바. Heating plate 위에서 10분간 건조 후 Permount를 사용하여 커버글라스를 덮고 광학 현미경으로 관찰한다.

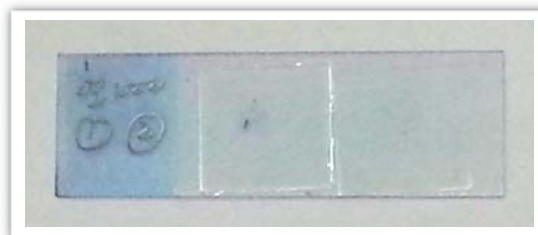


그림 20. 완성된 항산성 염색 표본

※ 참고

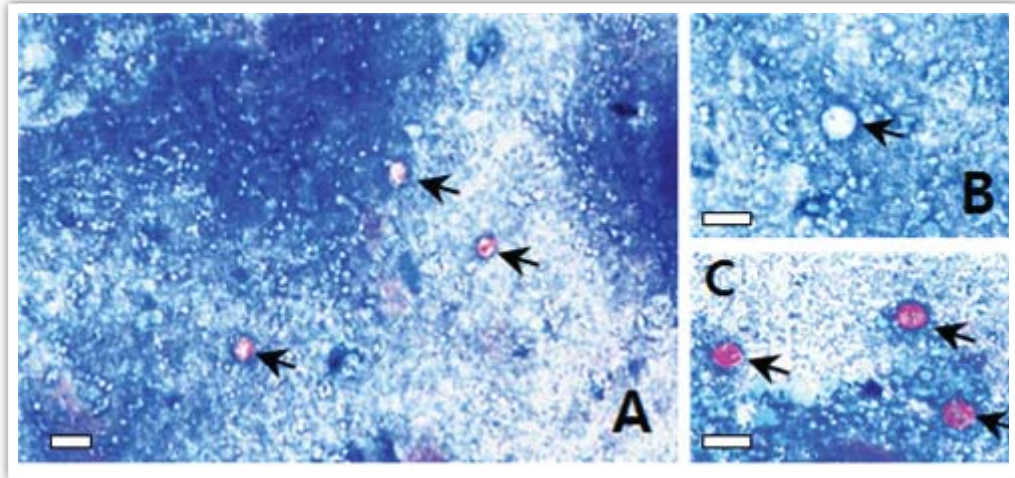


그림 21. 항산성 염색된 원포자충.

A와 C의 화살표와 같이 붉게 잡힌 것처럼 관찰되고 크기는 약 8 um 로 작은와포자충에 비해 큰 편이다.

(2) 자가형광 관찰법

- ① 시약 소모품 및 장비
  - 형광현미경



그림 22. 형광현미경



- Micropipet
- 슬라이드글라스
- 커버글라스

② 실험 방법

: 원포자충의 경우 자외선을 받으면 형광을 띠는 성질이 있어 검출 시 이용한다.

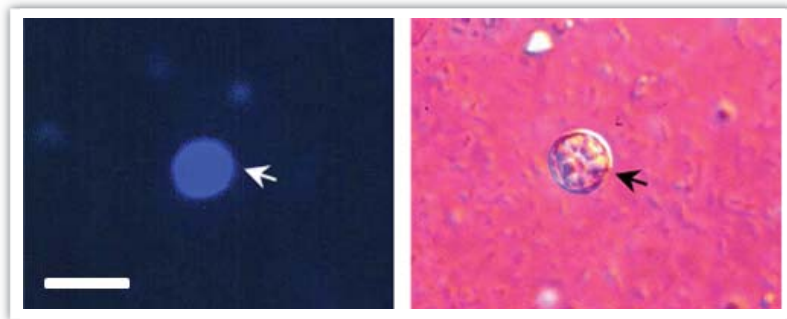
ㄱ. 검체의 침전물 10 $\mu$ l를 일반 슬라이드 글라스에 떨어뜨리고 커버글라스를 덮는다.

ㄴ. 형광현미경의 자외선 필터를 사용하여 400X 또는 600X 배율로 검경한다.

ㄷ. 형광을 띠는 약 8 $\mu$ l 크기의 난포낭이 나오면 1,000X 배율로 사진을 찍는다.

☞ 자가 형광이 짧은 시간 내 없어지므로 재빨리 사진을 찍는다. 화면에서 DIC 관찰을 동시에 하여 사진을 찍는다. 검체 표본을 오래 보관하기는 어렵다.

※ 참고



(A)

(B)

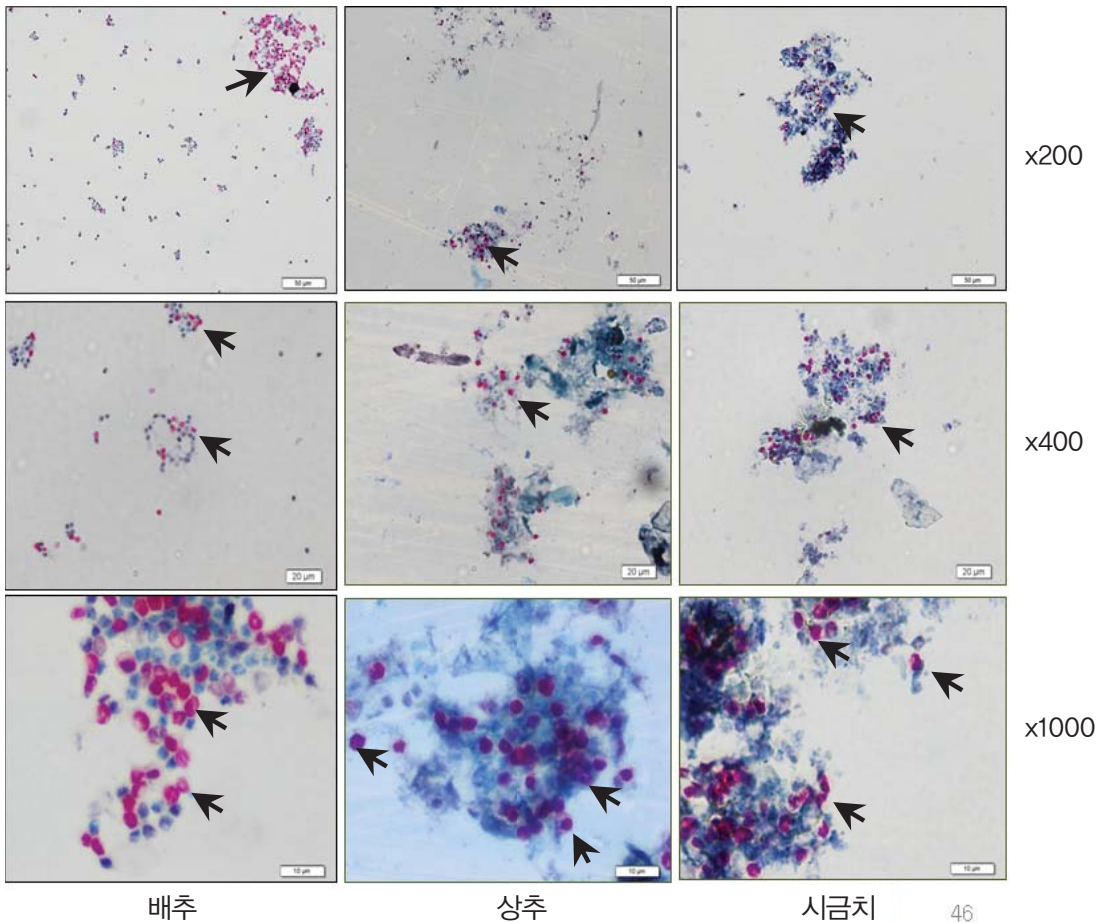
그림 23. A : 자가형광을 띠는 원포자충 난포낭(약 8 $\mu$ m)

B : DIC 관찰 사진으로 내부 포자소체가 관찰(Bar, 10 $\mu$ m)

〈현미경 검경시 참고 사진〉

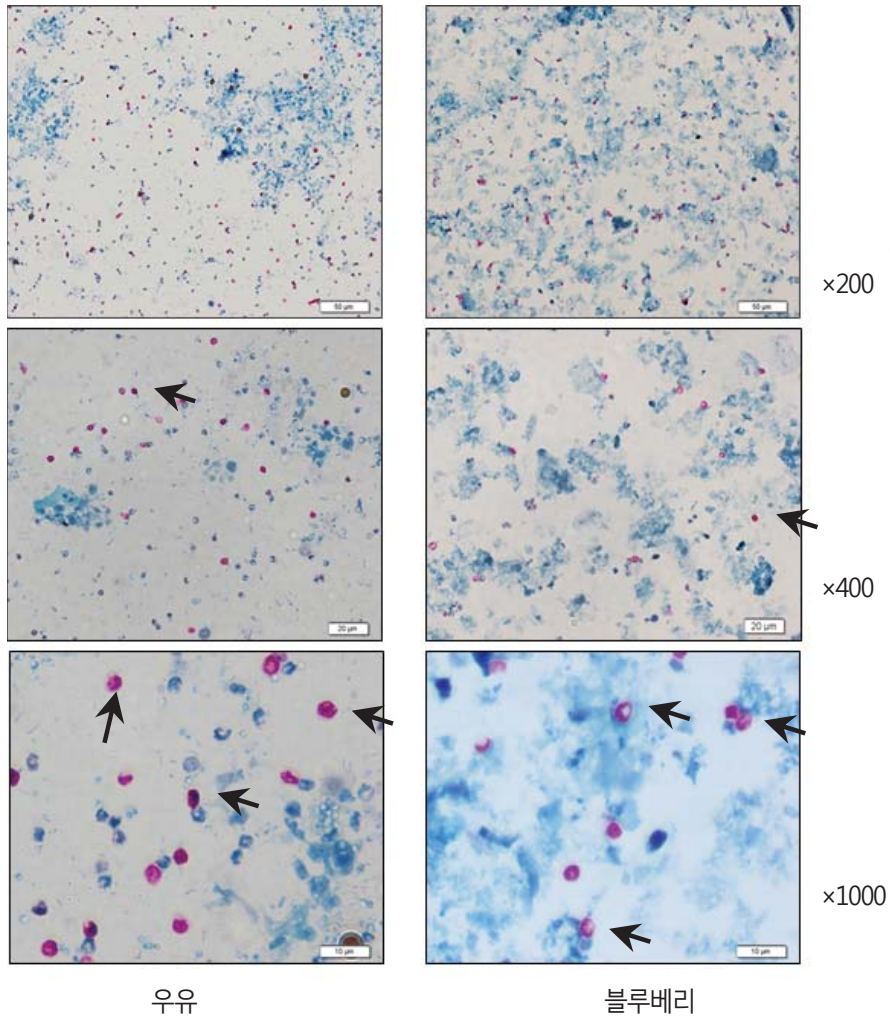
1. 항산성 염색

가) 채소류에 원충(작은와포자충  $4 \times 10^6$ , 람블편모충  $4 \times 10^5$ ) 접종 및 전처리후 사진



※ 화살표로 표시한 붉게 염색된 것들이 작은와포자충 난포낭(5~6um)

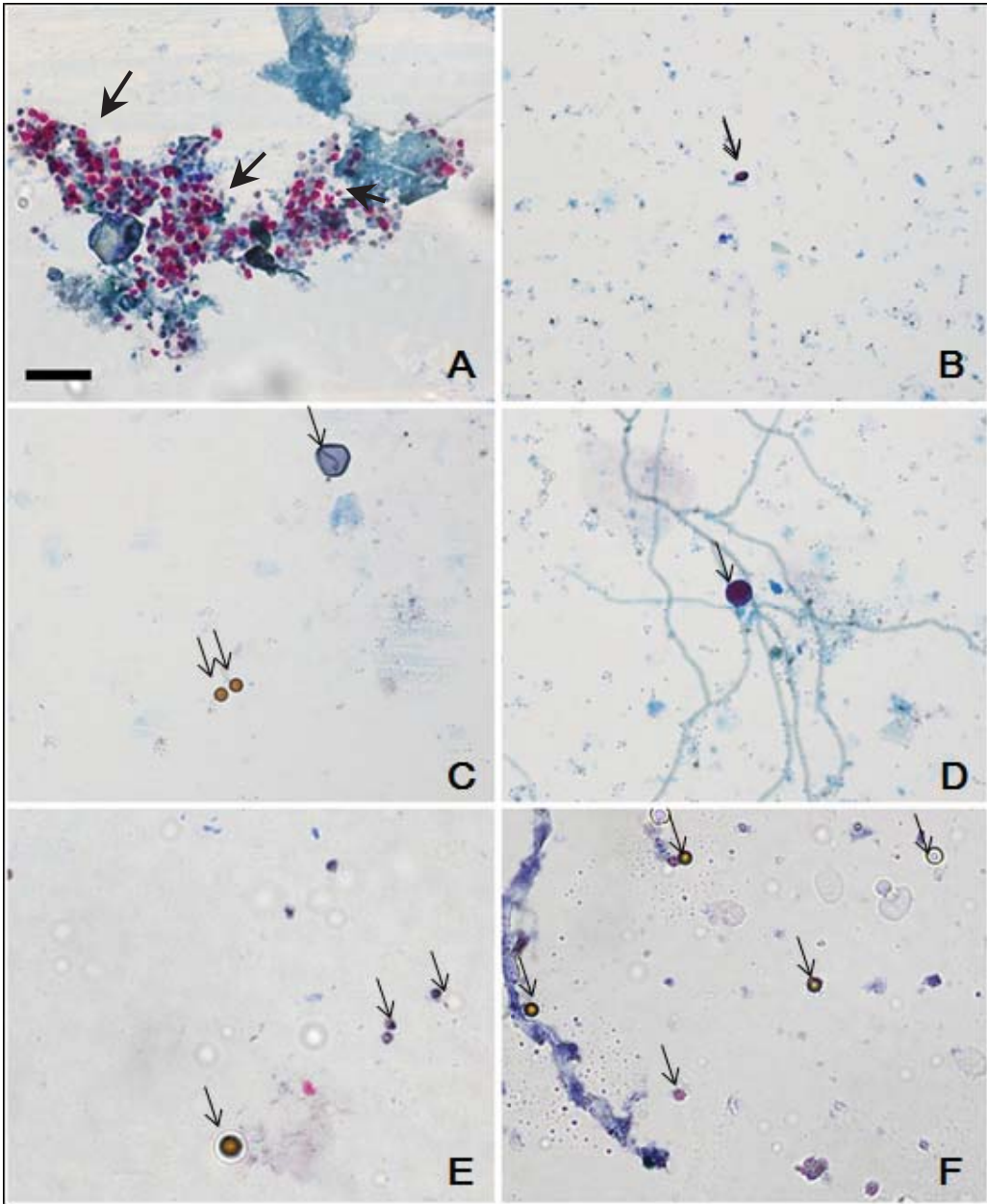
나) 우유, 블루베리주스에 원충(작은와포자충  $4 \times 10^6$ , 람블편모충  $4 \times 10^5$ ) 접종 후 사진



※ 화살표로 표시한 붉게 염색된 것들이 작은와포자충 난포낭(5~6um)

## VI. 식중독 원충 시험법

다) 작은와포자충으로 오인할 수 있는 물체



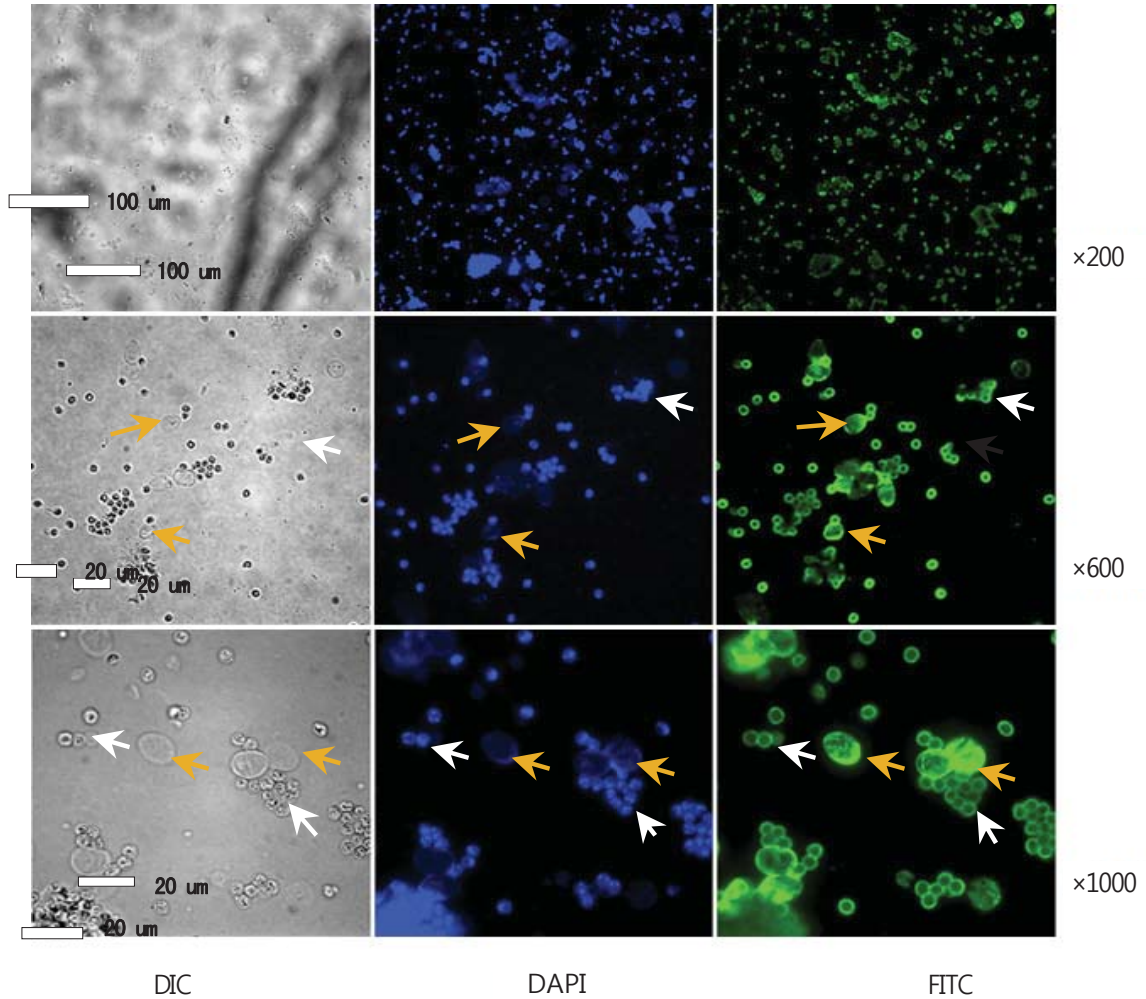
※ A : 붉게 염색된 동그란 모양의 것이 작은와포자충, Bar는 20um

※ B~F : 화살표로 표시한 것이 크기와 모양이 유사하여 작은와포자충으로 오인할 수 있는 것들

## 2. 직접형광염색

### 가) 배추

- 작은와포자충  $4 \times 10^6$ , 람블편모충  $4 \times 10^5$  접종

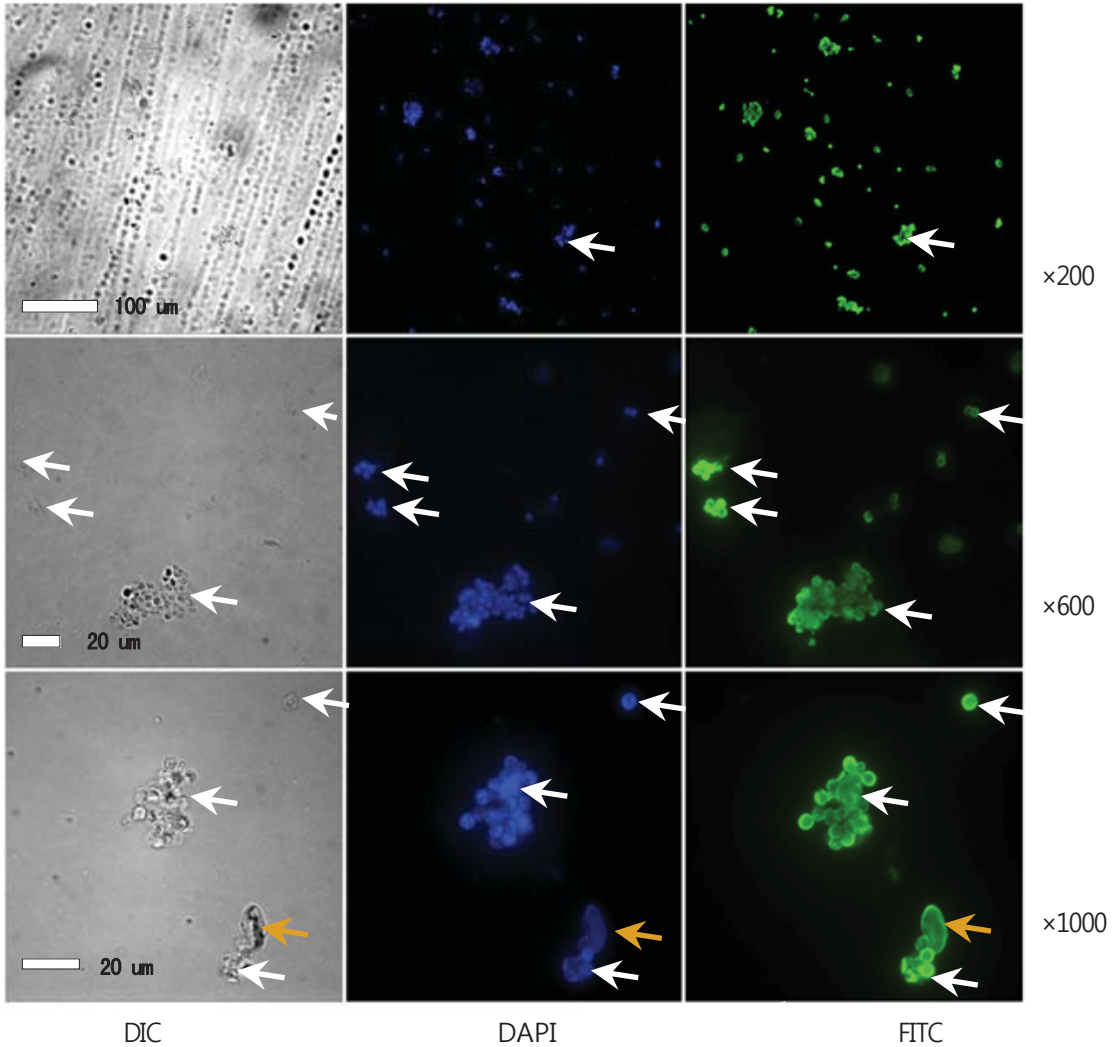


- 흰색 화살표로 가리킨 크기 5~6 $\mu$ m의 원형 난포낭이 작은와포자충
- 노란색 화살표로 가리킨 크기 약 12 $\mu$ m의 타원형 포낭이 람블편모충
- DIC(위상차 현미경) 사진에서는 난포낭과 포낭의 입체적 형태를 구분할 수 있고, DAPI 염색시에는 파란색 형광을 띠는 핵을 난포낭과 포낭 내부에서 관찰할 수 있다.
- 난포낭과 포낭이 깨져 포자소체가 빠져나간 경우는 내부의 핵이 관찰되지 않는다.
- FITC 형광염색 시에는 난포낭과 포낭벽이 염색되어 녹색의 원형과 타원형으로 관찰된다.

## VI. 식중독 원충 시험법

### 나) 상추

- 작은와포자충  $4 \times 10^6$ , 람블편모충  $4 \times 10^5$  접종

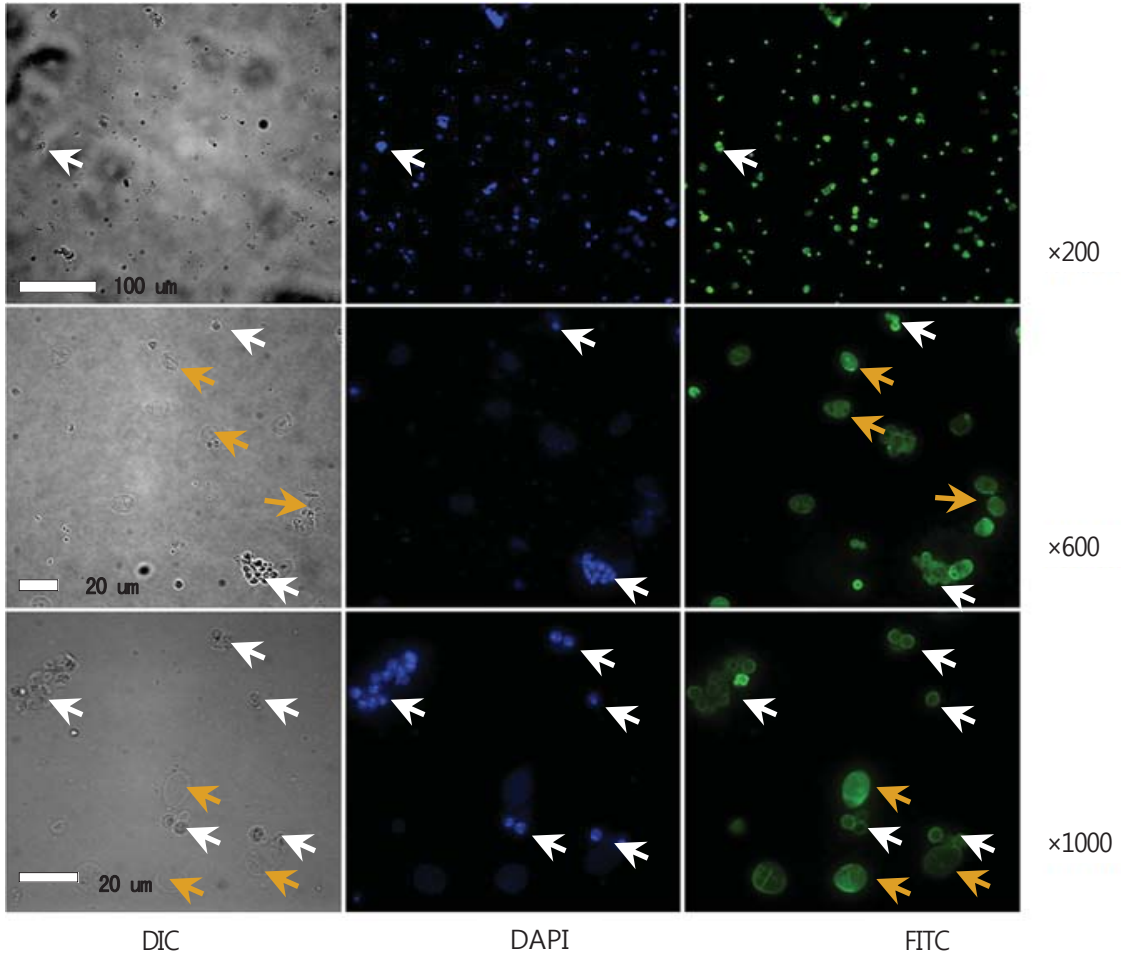


- 흰색 화살표로 가리킨 크기 5~6 $\mu\text{m}$ 의 원형 난포낭이 작은와포자충
- 노란색 화살표로 가리킨 크기 약 12 $\mu\text{m}$ 의 타원형 포낭이 람블편모충
- DIC (위상차 현미경) 사진에서는 난포낭과 포낭의 입체적 형태를 구분할 수 있고, DAPI 염색시에는 파란색 형광을 띠는 핵을 난포낭과 포낭 내부에서 관찰할 수 있다.
- 난포낭과 포낭이 깨져 포자소체가 빠져나간 경우는 내부의 핵이 관찰되지 않는다.
- FITC 형광염색 시에는 난포낭과 포낭벽이 염색되어 녹색의 원형과 타원형으로 관찰된다.



## 다) 시금치

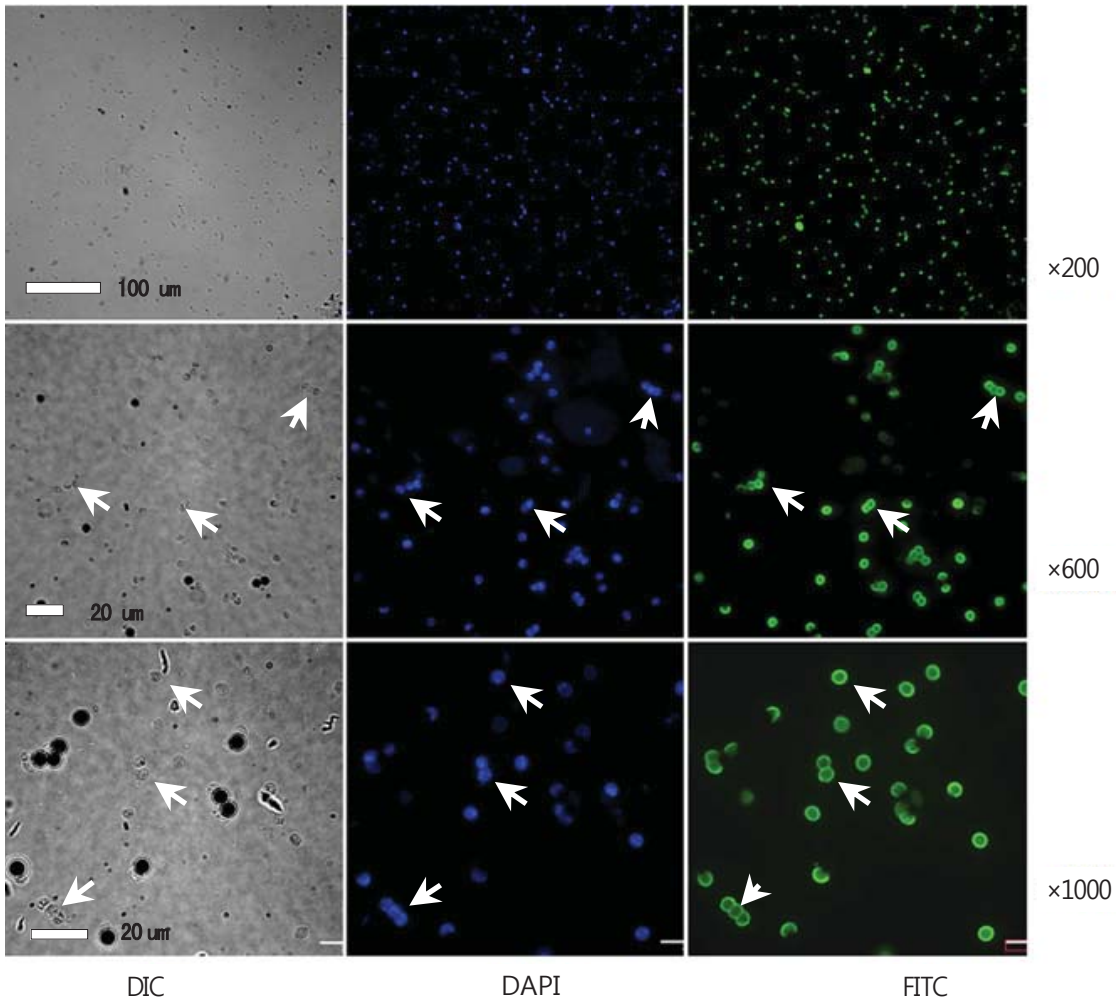
- 작은와포자충  $4 \times 10^6$ , 램블편모충  $4 \times 10^5$  접종



- 흰색 화살표로 가리킨 크기 5~6 $\mu\text{m}$ 의 원형 난포낭이 작은와포자충
- 노란색 화살표로 가리킨 크기 약 12 $\mu\text{m}$ 의 타원형 포낭이 램블편모충
- DIC(위상차 현미경) 사진에서는 난포낭과 포낭의 입체적 형태를 구분할 수 있고, DAPI 염색시에는 파란색 형광을 띠는 핵을 난포낭과 포낭 내부에서 관찰할 수 있다. 램블편모충의 포낭이 DAPI 염색에서 보이지 않는 경우는 포낭의 탈낭에 의해 내부물질이 빠져나가 빈포낭만 남아 있기 때문이다.
- 난포낭과 포낭이 깨져 포자소체가 빠져나간 경우는 내부의 핵이 관찰되지 않는다.
- FITC 형광염색 시에는 난포낭과 포낭벽이 염색되어 녹색의 원형과 타원형으로 관찰된다.

라) 산딸기

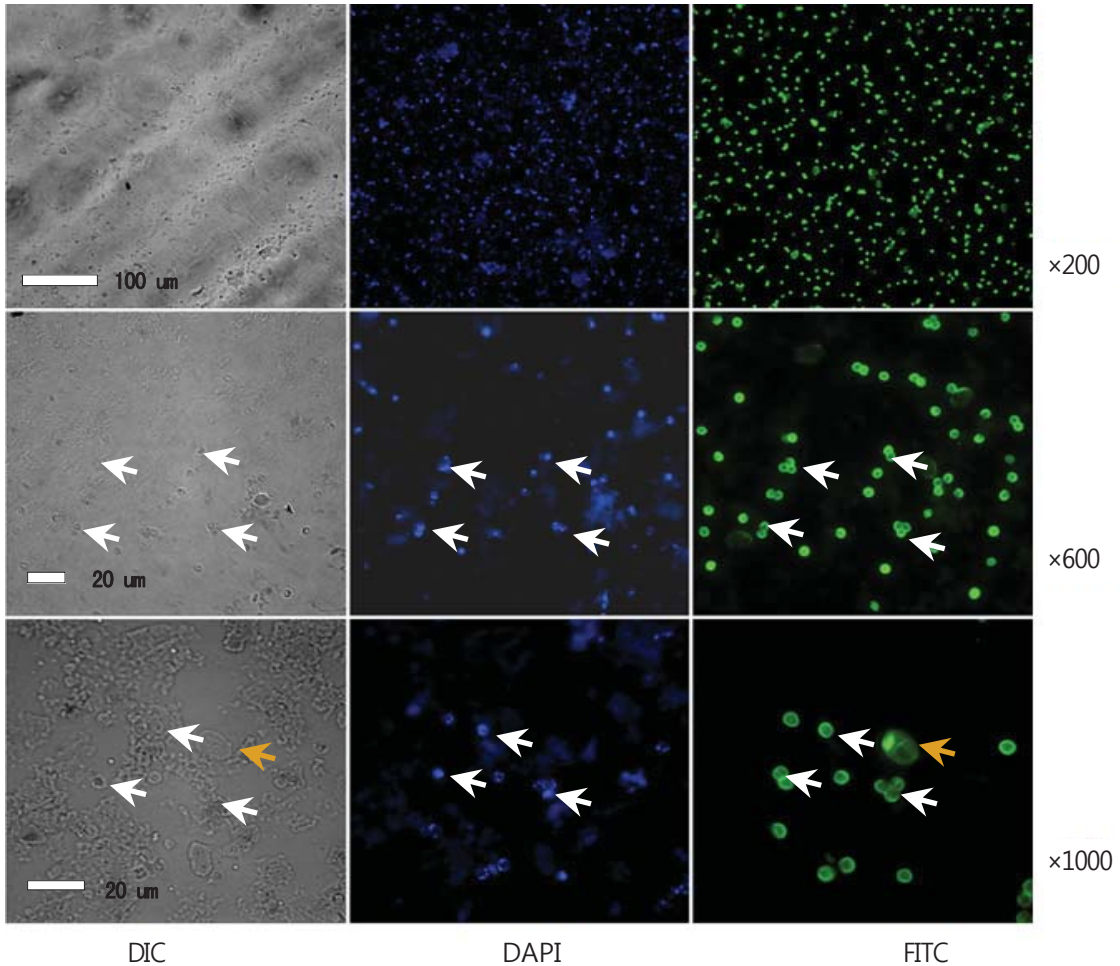
- 작은와포자충  $4 \times 10^6$ , 람블편모충  $4 \times 10^5$  접종



- 흰색 화살표로 가리킨 크기 5~6um 의 원형 난포낭이 작은와포자충
- DIC(위상차 현미경) 사진에서는 난포낭의 입체적 형태를 구분할 수 있고, DAPI 염색시에는 파란색 형광을 띠는 핵을 난포낭 내부에서 관찰할 수 있다.
- 난포낭이 깨져 포자소체가 빠져나간 경우는 내부의 핵이 관찰되지 않는다.
- FITC 형광염색 시에는 난포낭벽이 염색되어 녹색의 원형으로 관찰된다. 너무 저배율에서는 확인이 어렵고 적어도 400~600배 이상의 고배율로 관찰하는 것이 좋다.

## 마) 블루베리 주스

- 작은와포자충  $4 \times 10^6$ , 람블편모충  $4 \times 10^5$  접종

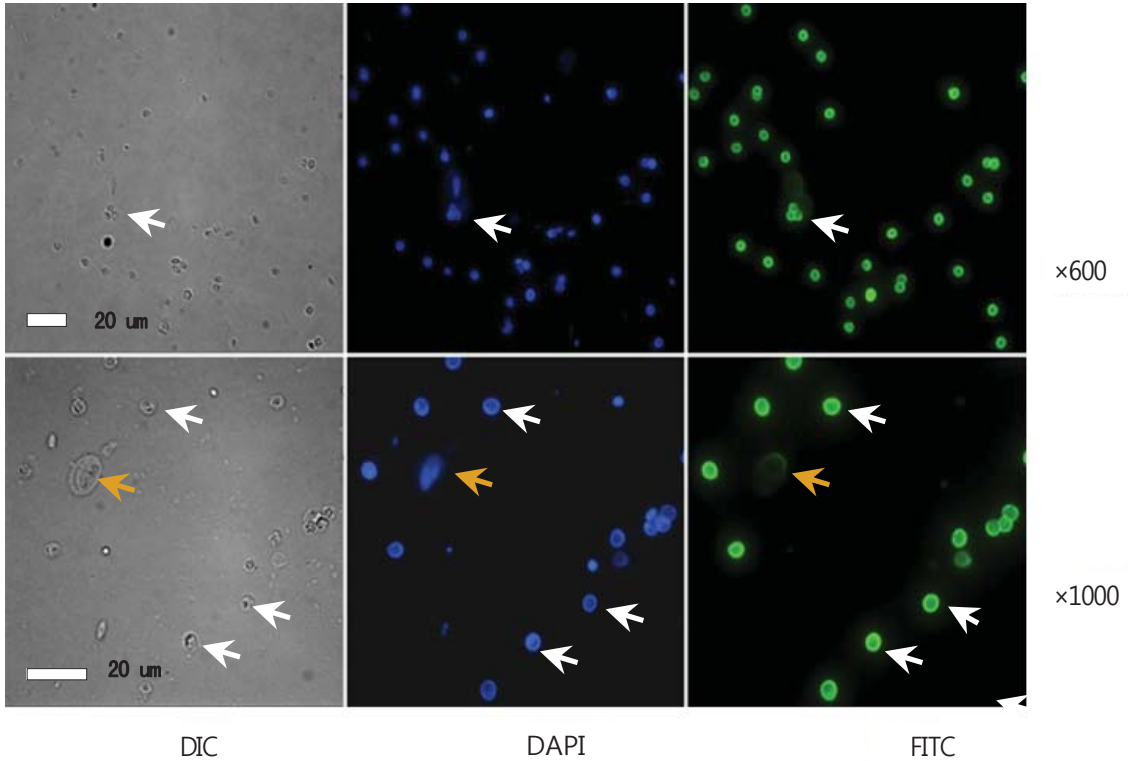


- 흰색 화살표로 가리킨 크기 5~6μm 의 원형 난포낭이 작은와포자충
- 노란색 화살표로 가리킨 크기 약 12μm 의 타원형 포낭이 람블편모충
- DIC(위상차 현미경) 사진에서는 난포낭과 포낭의 입체적 형태를 구분할 수 있고, DAPI 염색시에는 파란색 형광을 띠는 핵을 난포낭과 포낭 내부에서 관찰할 수 있다. 람블편모충의 포낭이 DAPI 염색에서 보이지 않는 경우는 포낭의 탈낭에 의해 내부물질이 빠져나가 빈포낭만 남아 있기 때문이다.
- 난포낭과 포낭이 깨져 포자소체가 빠져나간 경우는 내부의 핵이 관찰되지 않는다.
- FITC 형광염색 시에는 난포낭과 포낭벽이 염색되어 녹색의 원형과 타원형으로 관찰된다.

## VI. 식중독 원충 시험법

### 바) 토마토 주스

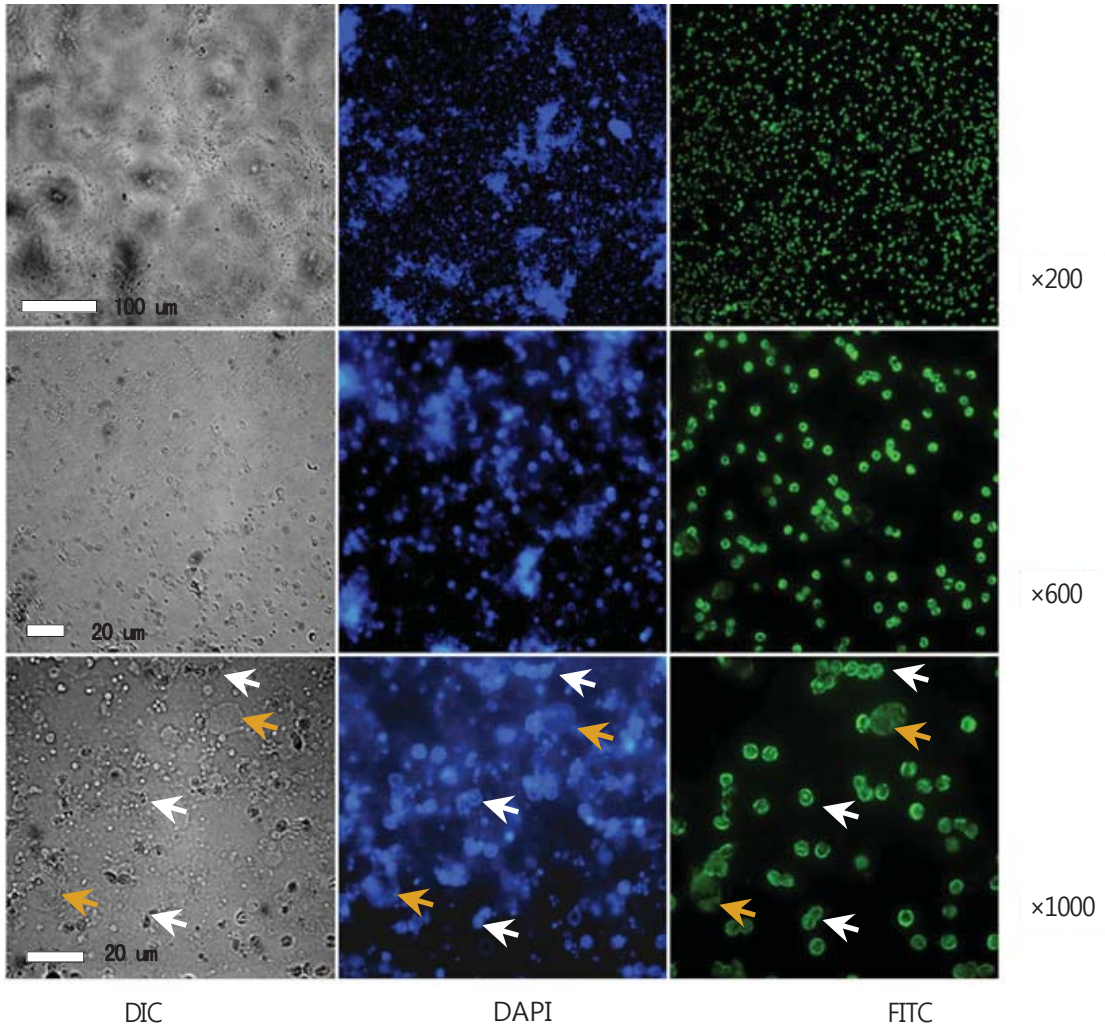
- 작은와포자충  $4 \times 10^6$ , 람블편모충  $4 \times 10^5$  접종



- 흰색 화살표로 가리킨 크기 5~6 $\mu$ m의 원형 난포낭이 작은와포자충
- 노란색 화살표로 가리킨 크기 약 12 $\mu$ m의 타원형 포낭이 람블편모충
- DIC(위상차 현미경) 사진에서는 난포낭과 포낭의 입체적 형태를 구분할 수 있고, DAPI 염색시에는 파란색 형광을 띠는 핵을 난포낭과 포낭 내부에서 관찰할 수 있다.
- 난포낭과 포낭이 깨져 포자소체가 빠져나간 경우는 내부의 핵이 관찰되지 않는다.
- FITC 형광염색 시에는 난포낭과 포낭벽이 염색되어 녹색의 원형과 타원형으로 관찰된다.

## 사) 우유

- 작은와포자충  $4 \times 10^6$ , 람블편모충  $4 \times 10^5$  접종



- 흰색 화살표로 가리킨 크기 5~6 $\mu$ m의 원형 난포낭이 작은와포자충
- 노란색 화살표로 가리킨 크기 약 12 $\mu$ m의 타원형 포낭이 람블편모충
- DIC(위상차 현미경) 사진에서는 난포낭과 포낭의 입체적 형태를 구분할 수 있고, DAPI 염색시에는 파란색 형광을 띠는 핵을 난포낭과 포낭 내부에서 관찰할 수 있다.
- 난포낭과 포낭이 깨져 포자소체가 빠져나간 경우는 내부의 핵이 관찰되지 않는다.
- FITC 형광염색 시에는 난포낭과 포낭벽이 염색되어 녹색의 원형과 타원형으로 관찰된다.

## 5. 쿠도아 (*Kudoa septempunctata*)

### 5-1. 시험법

- ④ 식중독 원인을 판단하기 위한 넙치에서의 쿠도아 시험법은 유전자 분석으로 스크리닝 후 현미경으로 확인 검사하는 시험법과 현미경 검사만으로 검사하는 시험법이 있다.

#### 1) 유전자분석법(real-time PCR법)

##### 가) DNA 추출

##### (1) 기구 및 시약

1.5 mL의 Eppendorf tube를 사용할 수 있는 원심분리 장치, 56°C와 70°C에서 사용할 수 있는 Heat Block 또는 Water Bath 2대, Micropipette(20, 200, 1000 $\mu$ l, Vortex Mixer, 가위, Eppendorf tube, 에탄올(96-100%), 자동 DNA 추출장치 (EasyMag, Biomerieux, France 또는 이와 동등한 장치), DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) 등이 필요하다.

##### (2) DNA 추출

##### ① Mesh법

넙치에서 쿠도아 DNA를 추출하기 위해서는 넙치 살의 표면을 긁거나 5곳 이상에서 검체를 떼어 1 g을 취한다(A). 페트리접시(petri dish)에 200  $\mu$ m 정도의 mesh를 놓고 검체를 올려놓은 후 PBS용액 약 3mL를 가한 후 핀셋이나 주사기 바닥으로 가볍게 으깬다(B). 200 $\mu$ m mesh를 통과한 용액을 다시 100 $\mu$ m mesh에 통과시켜 그 여과액을 원심분리용 튜브에 회수한다. 이것을 4°C에서 1,500 xg/15분 원심분리하여 상등액은 버리고, 침전물을 PBS용액 1 mL에 현탁한다(C). 균질화된 샘플 200 $\mu$ l를 DNeasy Blood & Tissue Kit (또는 동등 이상의 kit)에서 제공되는 매뉴얼을 따라 DNA를 추출한다(D). 자동 DNA 추출 장비를 사용할 경우, 기기 매뉴얼에 의해 200 $\mu$ l 이상의 샘플을 채취하여 DNA를 추출한다(E).



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)

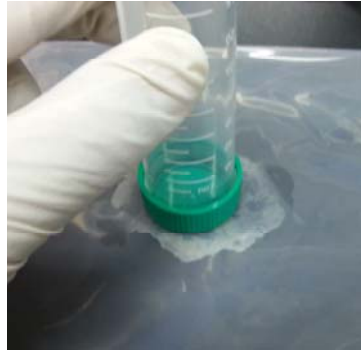
## ② Bead법

냅치 살의 표면을 메스로 긁어 모아 1 g 이상의 검체를 취한다(A). 검체를 지퍼백에 넣고 50 mL 팔콘튜브의 뚜껑부분을 이용하여 문지르면서 근육을 균질화 해준다(B). 200 mg의 균질화된 검체를 취하여 비드(bead)가 포함되어 있는 바이알에 넣고 800  $\mu$ l의 PBS용액을 첨가한 후 손으로 또는 기기를 이용하여 균질화 해준다(C). 균질화된 샘플 200 $\mu$ l를 DNeasy Blood & Tissue Kit(또는 동등 이상의 kit)에서 제공되는 매뉴얼을 따라 DNA를 추출한다(D). 자동 DNA 추출장비를 사용할 경우, 기기 매뉴얼에 의해 200 $\mu$ l 이상의 샘플을 채취하여 DNA를 추출한다(E).

## VI. 식중독 원충 시험법



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)

### 나) Realtime PCR

#### (1) 기구 및 시약

Realtime PCR 장치(ABI사 제품 또는 동등품), PCR 반응 튜브, TaqMan Universal Master Mix(ABI사), 프라이머·프로브 혼합용액, TE buffer

#### (2) 프라이머·프로브 혼합용액

프라이머·프로브의 서열은 다음과 같다.

Kudoa-F(sense): CATGGGATTAGCCCGGTTTA  
Kudoa-R(antisense): ACTCTCCCCAAAGCCGAAA  
Kudoa-P(probe): FAM-TCCAGGTTGGGCCCTCAGTGAAAA-TAMRA

10 × Primer/Probe Mix는 프라이머 각각이 4 μM, 프로브가 2.5 μM 되도록 한다.

※ 반응액 중에서의 최종농도는 프라이머 0.4 μM, 프로브 0.25 μM





(3) 검량선 작성용 표준액

*Kudoa septempunctata* 18S rDNA가 담긴 플라스미드 표준용액  $2.5 \times 10^7/\mu\text{l}$ ,  $2.5 \times 10^5/\mu\text{l}$ ,  $2.5 \times 10^3/\mu\text{l}$ ,  $2.5 \times 10^1/\mu\text{l}$ 의 용액을 만든다.

※ PCR 반응액에 4 $\mu\text{l}$ 를 사용하므로 반응액에서의 최종 copy수는 각각  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^2$ 가 된다.

(4) PCR

〈표 1〉에 따라 Realtime PCR 반응액을 만든다. 〈표 1〉의 1, 2, 3, 4, 6을 혼합하여 각 well에 분주한다. 여기에 시료 DNA 용액, 검량선 작성용 표준액, 음성 대조군(증류수 사용) 중 하나를 4 $\mu\text{l}$ 씩 가한다. Vortex Mixer 등으로 혼합한 후 가볍게 원심분리하여 〈표 2〉의 조건으로 real-time PCR에서 반응시킨다. 형광은 FAM, quencher는 TAMRA를 사용한다.

표 1. Real-time PCR 반응액

조 성	용 량
TaqMan 2x Universal Master Mix	10 $\mu\text{l}$
Forward Primer(10pmol)	1 $\mu\text{l}$
Reverse Primer(10pmol)	1 $\mu\text{l}$
Probe(10pmol)	0.5 $\mu\text{l}$
시료 DNA용액 또는 표준액	4 $\mu\text{l}$
D.W	3.5 $\mu\text{l}$
Total	20 $\mu\text{l}$

표 2. Real time PCR 반응조건

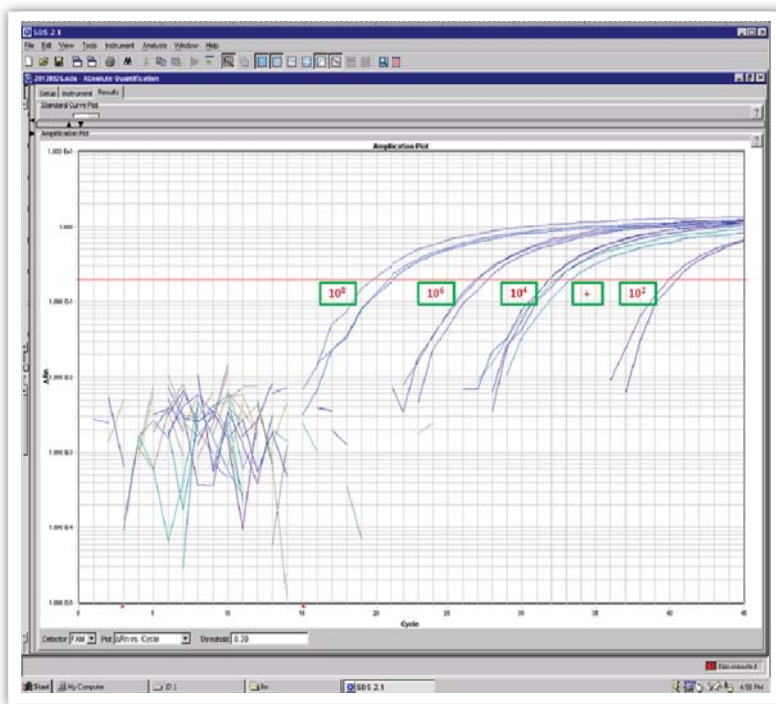
온도	시간	Cycle수
95 °C	10 분	1 cycle
95 °C	15 초	45 cycle
60 °C	60 초	

## VI. 식중독 원충 시험법

### (5) 정량

표준시료 copy수(로그값)를 세로축, PCR 반응에서 얻은 Ct값을 가로축으로 차트를 작성하여 검량선을 작성한다. 이 때 표준시료는 3개 이상의 농도를 사용한다. 이를 통해 PCR에 이용한 DNA 용액 4 $\mu$ l 중 copy수를 구한다. 최종적으로 다음 식을 이용하여 넘치 1 g당 Kudoa rDNA의 copy수를 산출한다. 검량선의 R<sup>2</sup>값이 0.99이상임을 확인한다.

### (6) 실험 예



- ※ 예시) 검량선에서 구한 DNA 용액 4 $\mu$ l의 copy 수가 200인 경우 계산은  
 $200 \times 50^* \div 0.2g(\text{시료의 중량}) \times 1(\text{희석배수})^{**} = 5.0 \times 10^4$  Kudoa rDNA의 copy수/ 시료 1g
- \* 최종 DNA elution 용액 200 $\mu$ l 중 4 $\mu$ l 를 real-time PCR 반응에 사용하여 환산한 수치
- \*\* 희석배수: Mesh법의 경우 1, Bead법의 경우 5

### 다) 결과 판정

10<sup>7</sup> Kudoa rDNA의 copy수/g 이상 검출된 경우, 유전자검사 스크리닝 양성으로 한다.



## 2) 현미경 검사법

### 가) 시약 및 방법

#### (1) 시약

- PBS(1X Phosphate buffered Saline)
- Trypan blue solution

---

① Trypan blue dye	0.4 g
Sodium chloride	0.81 g
Potassium phosphate	0.06 g
DW	100 ml

pH 7.2

0.45 $\mu$ m membrane filter로 여과하여 사용

- ② Trypan blue를 0.4%되도록 PBS용액에 용해하고,  
0.45 $\mu$ m membrane filter로 여과하여 사용
- 

#### (2) 실험방법

##### ① 정성시험법

정량시험법을 실행하기 전 신속한 쿠도아 포자 확인이 필요할 경우 사용한다. Mesh법 또는 Bead법을 이용하여 균질화된 검체를 필터가 있는 Whirl-pak bag에 넣고(A,B), 필터 반대편에 있는 액상검체 10 $\mu$ l를 취하여 슬라이드글라스에 넓게 퍼서 도말한다. 이 때 필터백의 아래 쪽 한 귀퉁이를 대각선으로 잘라 사용하면 편리하게 사용할 수 있다. 검체가 도말된 슬라이드를 상온에 자연건조한 후 에탄올 1 mL을 가하여 1~2분간 고정하고, 슬라이드를 기울여 에탄올을 제거한다. 메틸렌블루 염색액 1 mL을 가하고 1~2분간 염색한 후 증류수 또는 수돗물을 이용하여 슬라이드의 반대편을 세척한다. 광학현미경으로 200배 이상 배율로 관찰하여 6~7개의 극낭을 지닌 쿠도아 포자를 확인한다.

## VI. 식중독 원충 시험법



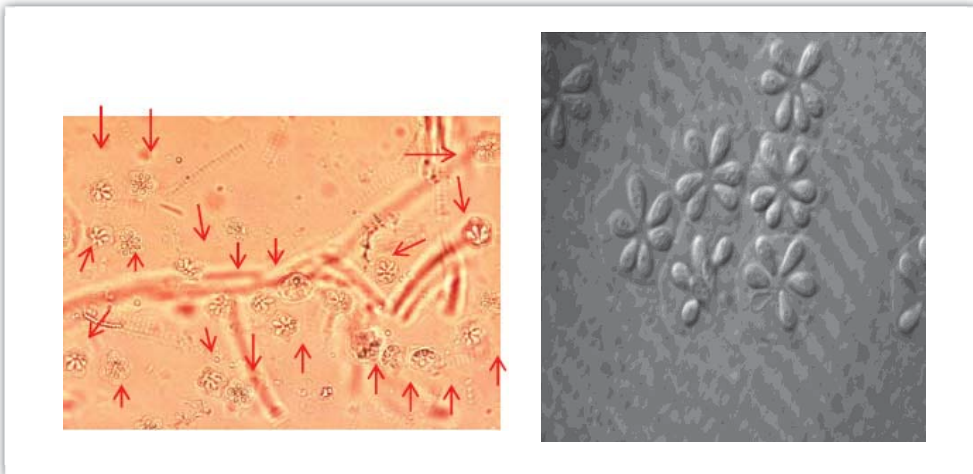
(A)



(B)

### ② 정량시험법

Mesh법 또는 Bead법을 이용하여 균질화된 검체를 필터가 있는 Whirl-pak bag에 넣고, 필터 반대편에 있는 액상검체 10 $\mu$ l를 파라필름(Parafilm) 등에 취하여 여기에 동량의 trypan blue 용액을 가하여 혼합한다. Burker-Turk형 등의 백혈구용 혈구계산판에서 10  $\mu$ l씩 두 개를 주입한 후 6~7개 극낭을 지닌 kudoa 포자를 현미경으로 계측한다. 계측 시 1구획 당 5~200개가 되도록 적절히 PBS로 희석하여 검경한다.



〈6~개의 극낭을 가진 쿠도아〉

※ 좌측: trypan blue 염색 현미경사진(400배), 우측: 전자현미경사진



## 나) 결과의 판정

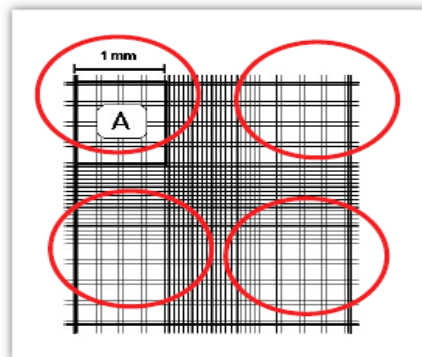
혈구계산판의 1 mm X 1 mm X 0.1 mm 구획 4곳을 계측하여 평균치(n)를 산정한다. 이 평균치가 5 이상인 경우를 유효숫자로 처리한다. 아래 계산방법에 의하면 이 시험법의 정량한계는 100,000 포자수/g(Mesh법으로 검체를 균질화한 경우) 및 500,000 포자수/g(Bead법으로 검체를 균질화한 경우) 이다.

### 〈계산방법〉

$$(n \times 10^4) \times 2 \times \text{희석배수} = \text{g당 } Kudoa \text{ septempunctata} \text{ 포자수}$$

### 〈계산방법 예〉

아래 그림의 A 및 붉은 원으로 표시된 4구획 모두 쿠도아를 측정하여 4로 나눈다. 이 값이 5 이상인 경우를 유효숫자로 처리한다. 희석배수 5배(Bead법), n=100인 경우, 계산은  $(100 \times 10^4) \times 2 \times 5 = 1.0 \times 10^7$  포자수/넙치 1g 이다.



〈Burker-Turk 혈구계산판 측정방법〉

## 5-2. 판정방법

Real-time PCR을 사용한 유전자시험법으로 스크리닝하여 음성인 검체는 음성으로 판정하고,  $10^7$  Kudoa rDNA의 copy수/g 이상으로 검출된 것은 양성으로 판정하여 추가 현미경검사를 실시한다. 현미경검사서서  $10^6$  포자수/g 이상 검출된 시료는 양성 판정하고 최종 식중독의 원인으로 판단한다. 다만,  $10^6$  포자수/g 미만으로 검출된 경우는 음성으로 판정하고, 식중독의 원인으로서는 판단하지 않는다. 현미경검사만으로 판정하는 경우에도  $10^6$  포자수/g 이상 검출된 시료를 양성 판정하고 식중독의 원인으로 판단한다.

〈쿠도아 시험법 모식도〉



※ 종합판정의 양성 : 식중독 원인으로 판단



## 참고

# 톡소포자충 (*Toxoplasma gondii*)

## 1. 시험법

- ④ 육류에서의 톡소포자충 검출은 유전자 분석으로 검사하는 시험법이 있다.

### 1) 유전자분석법(real-time PCR법)

#### 가) DNA 추출

##### (1) 기구 및 시약

1.5 mL의 Eppendorf tube를 사용할 수 있는 원심분리 장치, 56°C와 70°C에서 사용할 수 있는 Heat Block 또는 Water Bath 2대, Micropipette (20, 200, 1000 $\mu$ l, Vortex Mixer, 가위, Eppendorf tube, 에탄올 (96–100%), DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany 또는 이와 동등한 키트), 자동 DNA 추출장치 (EasyMag, Biomerieux, France 또는 이와 동등한 장치) 등이 필요하다.

##### (2) 샘플 추출

###### ① Bead법

실험은 <그림 1>과 같은 과정으로 진행하며, 먼저 1 g 이상의 검체를 취한다 (A). 검체를 지퍼백에 넣고 50 mL 팔콘튜브의 뚜껑부분을 이용하여 문지르면서 근육을 균질화 해준다 (B). 200 mg의 균질화된 검체를 취하여 비드 (bead)가 포함되어 있는 바이알에 넣고 800  $\mu$ l의 PBS용액을 첨가한 후 손으로 또는 기기를 이용하여 균질화 해준다 (C). 균질화된 샘플 200 $\mu$ l를 DNeasy Blood & Tissue Kit(또는 동등 이상의 kit)에서 제공되는 매뉴얼을 따라 DNA를 추출한다 (D). 자동 DNA 추출장비를 사용할 경우, 기기 매뉴얼에 의해 200 $\mu$ l 이상의 샘플을 채취하여 DNA를 추출한다 (E).

## VI. 식중독 원충 시험법

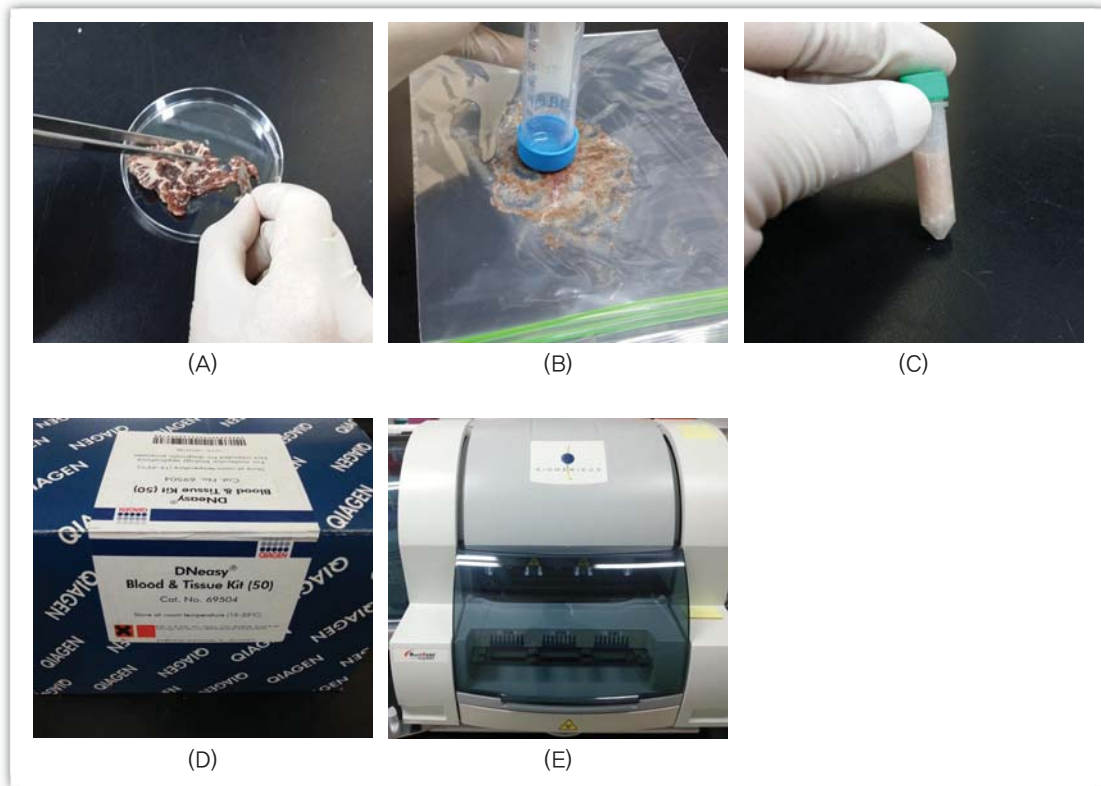


그림 1. 육류 샘플 DNA 추출 과정 (Bead법)

### (3) DNA 추출

#### ① DNA 추출 키트 (DNeasy Blood & Tissue Kit)

Bead법으로 균질화된 샘플 200 $\mu$ l에 proteinase K 20 $\mu$ l를 넣고 vortexing한 후, 56 $^{\circ}$ C에서 1~3시간 incubation 한다. Buffer AL 200 $\mu$ l를 넣고 15초간 vortexing한 다음 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 incubation한다. Ethanol 200 $\mu$ l를 넣고 15초간 vortexing한 다음 column에 옮긴다. 8,000rpm에서 1분 원심분리한 후 새로운 collection tube로 교체하고, Buffer AW1 500 $\mu$ l를 넣은 다음 8,000rpm에서 1분간 원심분리 한다. 새로운 collection tube로 교체하고, Buffer AW2 500 $\mu$ l를 넣은 다음 13,000rpm에서 3분간 원심분리 한다. 새로운 collection tube로 교체해주고 한번 더 13,000rpm에서 1분간 원심분리 한다. collection tube를 1.5ml tube로 교체해준 다음 Buffer AE 200 $\mu$ l을 넣고 실온에서 1분 동안 반응 후 8,000rpm으로 1분간 원심분리 한다. 1.5ml tube에 모인 샘플은 실험에 사용하거나, -20 $^{\circ}$ C에 냉동 보관한다.





## ② 자동화 DNA 추출 장비 (EasyMag)

자동 DNA 추출장비 전원을 켜 다음 Vessel을 장비에 장착하고, bead vial에서 균질화가 완료된 시료를 넣는다. Lysis buffer를 첨가하여 30분 가량 Lysis 시킨 다음 magnetic silica 70 $\mu$ l를 Vessel의 각각의 well에 넣고 멀티 피펫으로 잘 섞어 준다. Elution 양을 200 $\mu$ l로 매뉴얼에 따라 기기를 설정하여 추출 시작하고, 끝난 후 추출된 샘플을 tube에 옮겨 실험에 사용하거나, -20 $^{\circ}$ C에 냉동 보관한다.

## 나) Realtime PCR

### (1) 기구 및 시약

Realtime PCR 장치(ABI사 제품 또는 동등품), PCR 반응 튜브, TaqMan Universal Master Mix(ABI사), 프라이머·프로브 혼합용액, TE buffer

### (2) 프라이머·프로브 혼합용액

프라이머·프로브의 서열은 다음과 같다.

Toxo-F(sense): ATGAGCTCGCCTGTGCTTG

Toxo-R(antisense): TAAGCTGGAGGAGCGGCA

Toxo-P(probe): FAM-AGCCACAGAAGGGACAGAAGTCGAAGG-BHQ 1

※ 반응액 중에서의 최종농도는 프라이머 0.5  $\mu$ M, 프로브 0.1  $\mu$ M

### (3) 검량선 작성용 표준액

*Toxoplasma gondii* 유전자 증폭 부위 (529 repeat region)를 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) 장비로 클로닝한 플라스미드 표준용액을  $2 \times 10^7/\mu$ l,  $2.5 \times 10^5/\mu$ l,  $2.5 \times 10^3/\mu$ l,  $2.5 \times 10^1/\mu$ l의 농도로 각각 만든다.

※ PCR 반응액에 5 $\mu$ l를 사용하므로 반응액에서의 최종 copy수는 각각  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^2$ 가 된다.

### (4) PCR

〈표 1〉에 따라 Realtime PCR 반응액을 만든다. 〈표 1〉의 1번부터 5번까지 혼합하여 각 well에 분주한다. 여기에 시료 DNA 용액, 검량선 작성용 표준액, 음성 대조군(증류수 사용) 중 하나를 5 $\mu$ l씩 가한다. Vortex Mixer 등으로 혼합한 후 가볍게 원심분리하여 〈표 2〉의

## VI. 식중독 원충 시험법

조건으로 real-time PCR에서 반응시킨다. 형광은 FAM, quencher는 Black Hole Quencher 1(BHQ-1)을 사용한다.

표 1. Real-time PCR 반응액

조 성	용 량
2x Real-time PCR Master Mix	10 $\mu$ l
Forward Primer(10pmol)	1 $\mu$ l
Reverse Primer(10pmol)	1 $\mu$ l
Probe(4pmol)	1 $\mu$ l
D.W	2 $\mu$ l
시료 DNA용액 또는 표준액	5 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

표 2. Real time PCR 반응조건

온도	시간	Cycle수
95 $^{\circ}$ C	10 분	1 cycle
95 $^{\circ}$ C	15 초	40 cycle
60 $^{\circ}$ C	60 초	



(5) 정량

표준시료 copy수(로그값)를 세로축, PCR 반응에서 얻은 Ct값을 가로축으로 차트를 작성하여 검량선을 작성한다. 이 때 표준시료는 3개 이상의 농도를 사용한다. 이를 통해 PCR에 이용한 DNA 용액 5 $\mu$ l 중 copy수를 구한다. 최종적으로 다음 식을 이용하여 육류 1 g당 *Toxoplasma gondii* rDNA의 copy수를 산출한다. 검량선의 R<sup>2</sup>값이 0.99이상임을 확인한다 (그림 2).

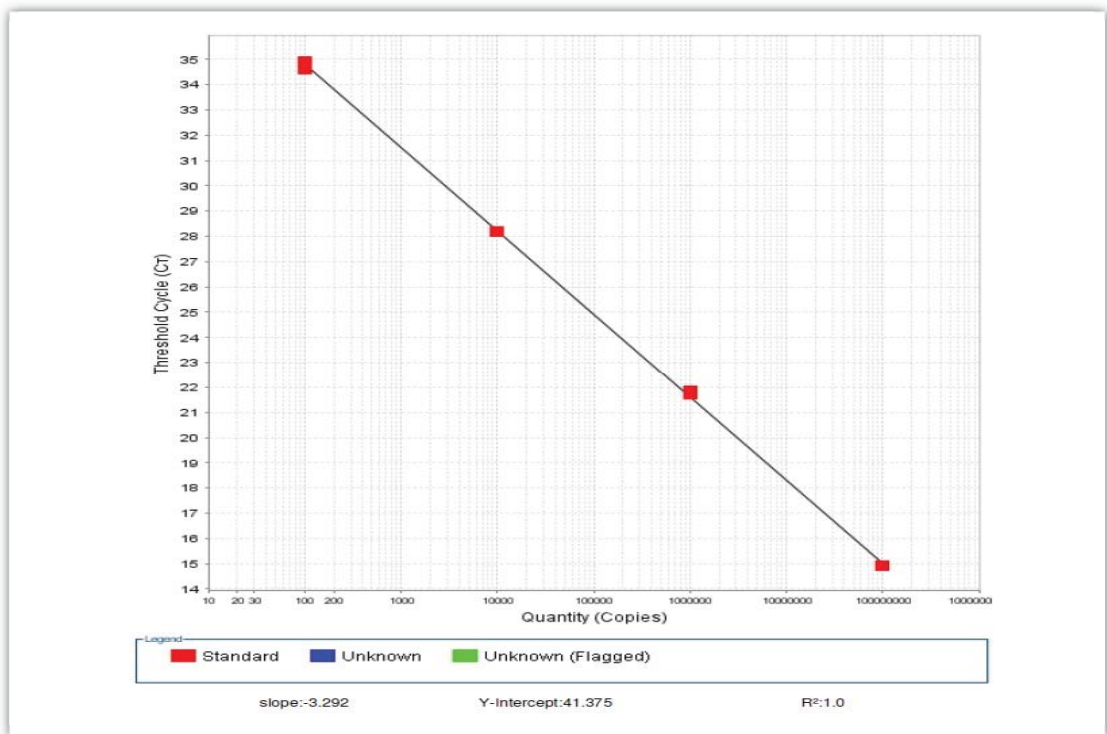
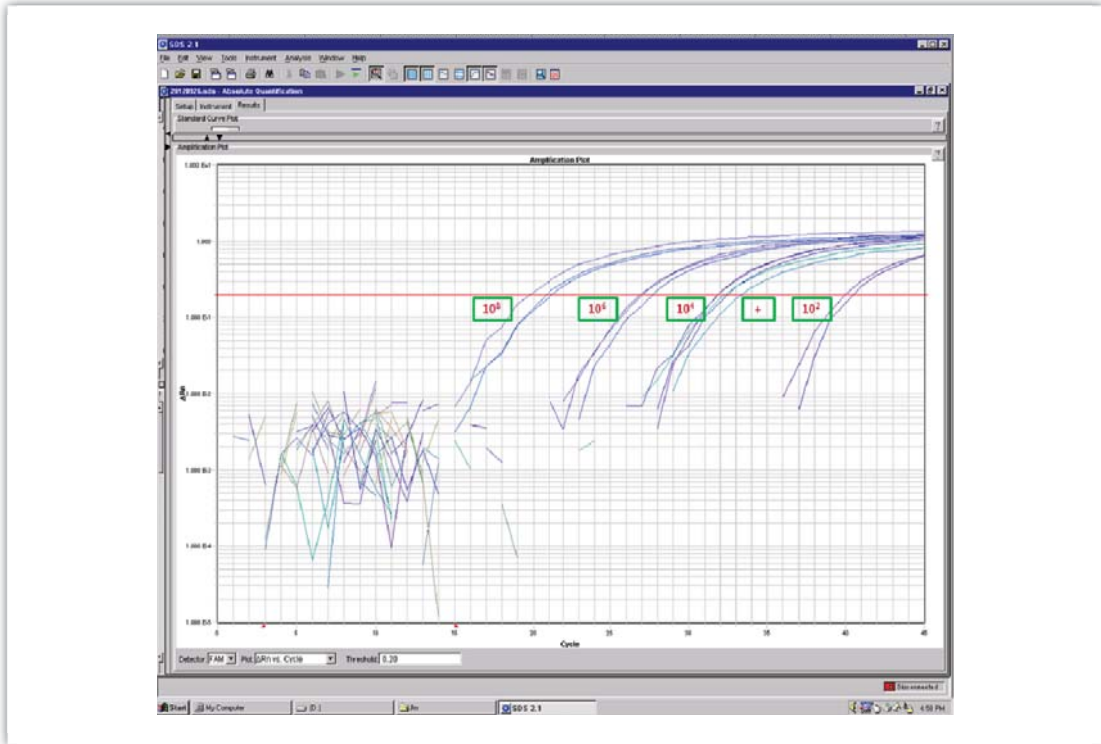


그림 2. 표준곡선

## VI. 식중독 원충 시험법

### (6) 실험 예



※ 예시)

균질화 작업에 사용된 시료 : 0.2g / 희석수 0.8ml

DNA 추출에 사용한 균질화 시료양 : 200 $\mu$ l

최종 DNA elution 양 : 200 $\mu$ l

Real time PCR에 사용된 DNA 양 : 5 $\mu$ l

이때 검량선에서 구한 DNA 용액 5 $\mu$ l의 copy 수가 200인 경우 계산은

$$200 \times 40^{(1)} \times 5^{(2)} \div 0.2g^{(3)} = 2.0 \times 10^5 \text{ Toxoplasma gondii rDNA의 copy수/ 시료 1g}$$

- 1) 최종 DNA elution 용액 200 $\mu$ l 중 5 $\mu$ l 를 real-time PCR 반응에 사용
- 2) 균질화된 샘플 1ml 중 200 $\mu$ l를 유전자 추출에 사용
- 3) 균질화 작업에 사용된 시료 (0.2g)에 희석수 (0.8ml)을 가하여 균질화

### 다) 결과 판정

- (1) 음성대조군의 곡선이 역가직선의 아래에 존재하는 경우 역가직선 위에 있는 시료는 양성으로 판정
- (2) 음성대조군의 곡선과 역가직선이 만나는 경우는 음성대조군의 Ct값보다 낮은 시료에 대해서 양성으로 판정

## **2016년 식중독 원인조사 시험법**

---

발 행 일 : 2016년 8월

발 행 인 : 손 여 원

편집위원장 : 홍 진 환

편 집 위 원 : 정경태, 김순한, 주인선, 한정아, 허은정, 조성학, 이정수, 김석환, 서수환, 이우정

발 행 처 : 식품의약품안전처 식품위해평가부

연 락 처 : 식품의약품안전처 식품위해평가부 미생물과

(우) 363-700 충청북도 청주시 오송읍 오송생명 2로 187번지

TEL : 043-719-4301 FAX : 043-719-4300

홈 페이지 : [www.mfds.go.kr](http://www.mfds.go.kr)