

발간등록번호
--------

11-1470550-000290-01
----------------------

# 식육, 식품용수 중 E형 간염바이러스 시험법 매뉴얼

2012. 10

# 목 차

## E형 간염바이러스 설명

E형 간염바이러스란? .....	1
E형 간염바이러스 식중독 증상 .....	4
E형 간염바이러스 주요 감염경로 .....	5
E형 간염바이러스 국내 발생현황 .....	6

## E형 간염바이러스 시험법

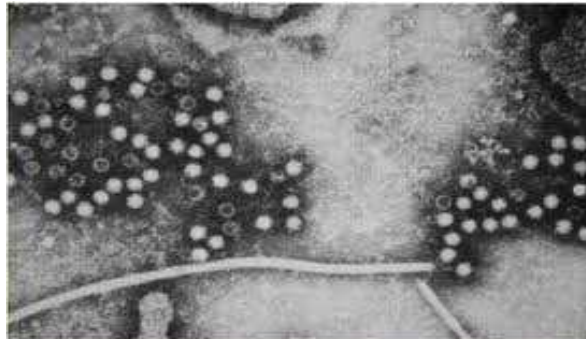
식육 중 E형 간염바이러스 시험법 .....	7
식품용수 중 E형 간염바이러스 시험법 .....	13

# E형 간염바이러스란

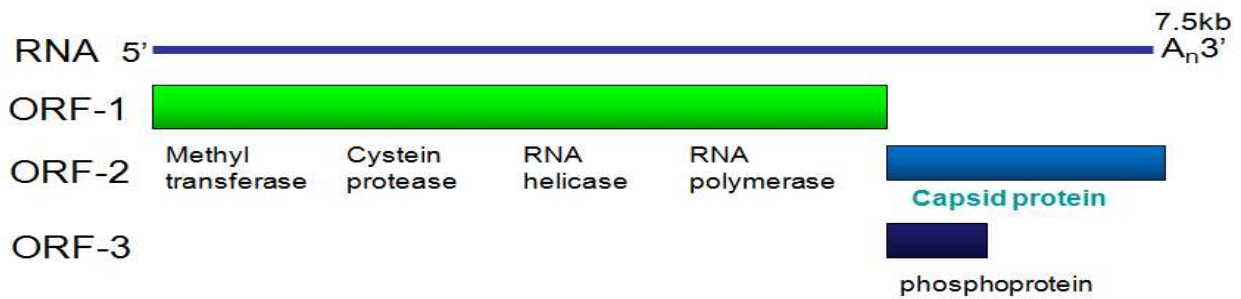
## 1. E형 간염바이러스

- 가. 주로 자가 회복(self-limited)되는 급성 질병으로, 개발도상국을 위주로 광범위하게 퍼져있음
- 나. Balayan 등에 의해 1983년 최초로 바이러스가 분리
- 다. Balayan은 간염 환자의 대변에서 분리한 바이러스를 원숭이에게 감염시키는데 성공하였으며 이 동물의 분변과 담즙에서 채취한 바이러스 모양의 입자를 전자현미경으로 증명라. 이후, 유전자의 염기서열을 규명하여 E형 간염 바이러스로 명명함

## 2. 형태 및 특성



- 가. E형 간염은 인도를 포함한 아시아와 아프리카, 중남미의 저개발 국가에서 집단적 발생
- 나. 선진국에서는 발병사례가 거의 없음
- 다. A형간염과 마찬가지로 만성화 및 보균자로는 전파가 진행 되지 않음
- 라. 임산부 감염 시 유산을 초래할 수 있음
- 마. 과 (family) : Hepeviridae, 속 (genus) : Hepevirus
- 바. 직경이 32-34 nm, nonenveloped, positive-sense, single-stranded virus 7.5kb의 직선형 RNA 유전자를 보유하며, 3개의 open reading frame (ORFs)로 구성됨.
  - ORF 1: 바이러스의 복제 등에 관여하는 비구조 단백질(non-structural protein)
  - ORF 2 & ORF 3: 바이러스의 외피를 구성하는 구조 단백질(structural protein)



사. 혈청형이 하나일 정도로 구조 단백질의 변이가 적으며, 이를 coding하는 ORF 2 또는 ORF 3의 유전자가 target sequence로 적합한 검출의 표적이 될 수 있음  
 아. 1개의 혈청형(serotype)이 존재하며, 크게 4개의 genotype이 알려져 있음

## New Hepatitis E Virus in Animals

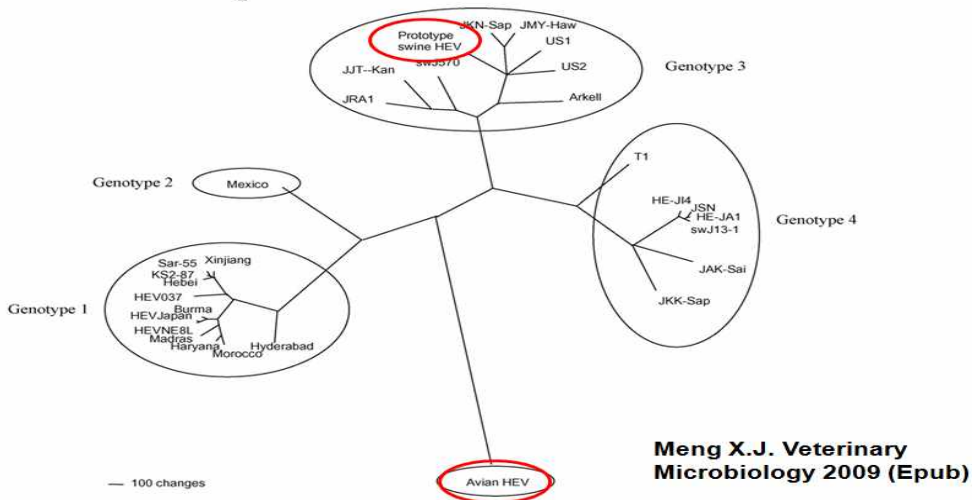


표. E형 간염바이러스 Genotype의 종류

HEV strains	Natural hosts	Experimental hosts
Genotype 1	Humans	Non-human primates, rats, lambs
Genotype 2	Humans	Non-human primates
Genotype 3	Humans, pigs, deer, mongoose, horse(?)	Non-human primates, pigs
Genotype 4	Humans, pigs	Non-human primates, pigs
Avian HEV	Chickens	Turkey, chickens

### 3. 검출방법

가. 혈청에서 IgM이나 IgG 항체 검색을 위한 EIA kit 검사방법

나. 면역조직화학법(Immunohistochemistry)

다. PCR 진단법

- RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)
- Realtime RT-PCR (Real-time Reverse transcription polymerase chain reaction)
- Nested RT-PCR (Nested Reverse transcription polymerase chain reaction)

### 4. 예방 및 관리

가. 생활환경이 개선되고 좋은 위생 시설의 공급 시 E형 간염 발생을 감소시킬 수 있음

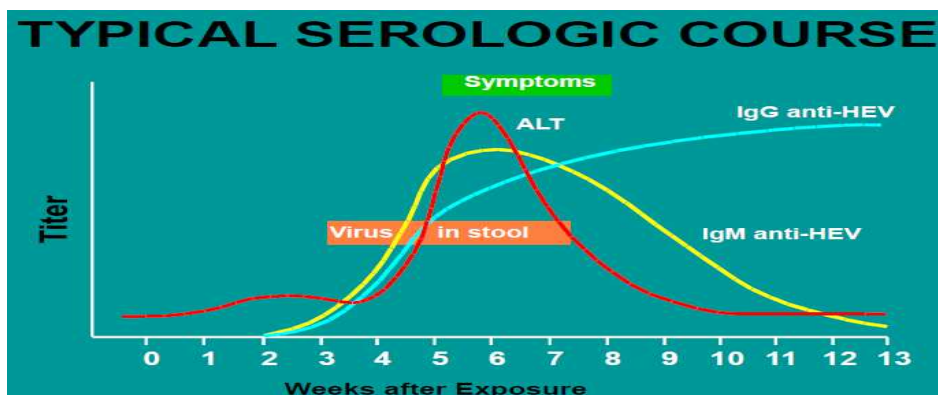
나. 유행지역에서는 깨끗한 음료를 이용해야 함

다. 채소나 과일, 식육의 생식을 피하며 손을 자주 씻는 습관을 갖도록 함

라. 백신은 아직까지 개발되어 있지 않음

## E형 간염바이러스 식중독 증상

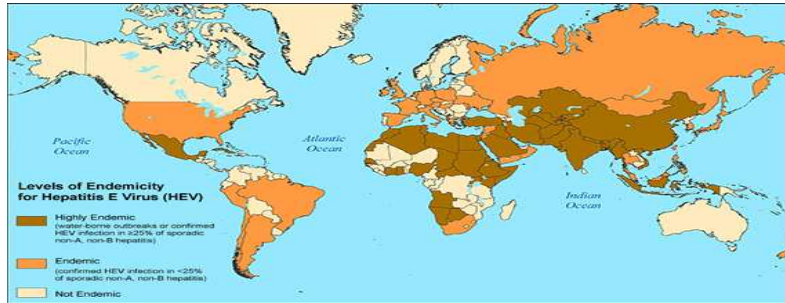
1. 급성 E형 간염의 잠복기는 3~8주이며 무증상 감염(Asymptomatic infection)부터 전격성 간염(fulminant hepatitis)까지 다양한 임상 양상을 보일 수 있다.
2. E형 간염에 감염되면 황달/ 메스꺼움/ 구토/ 복부통증/ 흑뇨/ 관절통증/ 발진/ 설사/ 가려움증 등 다른 타입의 간염 바이러스 증세와 비슷한 증세가 나타난다.
3. 가장 흔한 임상 증상은 발열, 오심, 근육통 등의 증상이 2주일 정도 지속되다가 황달을 동반한 급성 간염이며 자연치유(self-limited)되는 경향을 보인다.
4. 혈청 AST/ALT치의 상승은 임상 증상 발생 후 약 1주일 정도 경과한 후부터 나타나며 최고치는 황달의 시작과 대개 일치하며 정상 수치로 회복하는데 약 1주-6주가 소요된다.



5. 급성 E형 간염은 만성화 되지 않는 질환으로 젊은 성인층에 많이 감염되며 비교적 양호한 예후를 지니고 있다.

## E형 간염바이러스 주요 감염경로

1. E형 간염은 개발도상국에서 가장 빈번하게 발병되고 있으며 위생 환경이 열악한 국가에서 주로 발병하고 있다.

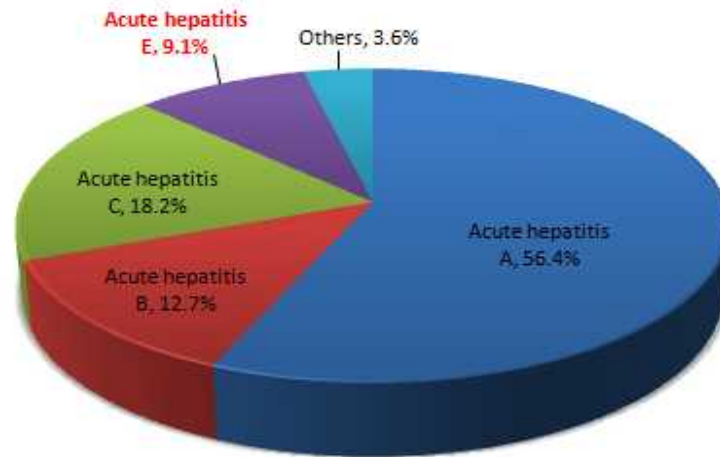


2. E형 간염 바이러스는 주로 분변-구강 경로를 통해 퍼진다. 일반적으로 가장 많이 감염되는 경로는 분변을 통해 오염된 식수이다.



3. 동물을 통해서 전파 가능한 바이러스이며 돼지와 사람을 제외한 영장류를 통해서 감염이 가능하다.
4. 현재 개발도상국을 여행한 이력이 없는 사람의 산발성 E형 간염 사례들이 점점 더 증가하고 있는 실정이다.
  - 최근 5년간 미국, 일본 외 스페인, 이탈리아, 영국, 프랑스, 네덜란드 등 유럽 국가에서 E형 간염 증례보고 및 식품관련 연구 증가 추세이다.
  - 간장 이식환자와 같은 면역억제환자에서 E형 간염의 발생 증례가 독일, 프랑스 등에서 보고되었다.
  - 수혈을 위한 혈액을 통한 E형 간염바이러스의 감염사례가 보고되고 있다.

## E형 간염바이러스 국내발생현황



국내 간염 발병 현황

(자료 출처: The Korean Journal of Hepatology 2007; 13: 495-502)

1. 2004년 대한소화기학회지에 의하면 1건의 증례가 보고되었으며, 이는 아시아권 국가를 여행한 이후 발생하여 국내 감염 질병이 아닌 외국에서 유입된 질병으로 추정된다. 2007년 대한간학회지에 보고에 의하면 국내에서 2002년과 2006년에 각각 1건과 9건의 증례가 보고되었다.
2. 대한간학회지 2007년 조사 결과에 따르면 간염 발병의 대다수가 A형 간염이며 B형 간염, C형 간염이 각각 12.7%, 18.2%를 차지하고, E형 간염도 9.1% 차지하는 것으로 보고하고 있다.



# 식육 중 E형 간염바이러스 시험법

## 1. 검체의 채취 및 취급

### 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 검사 한다.
- 6) 검체가 괴사되지 않도록 냉장 상태를 유지하여 운반하여야 한다.

### 나. 검체의 보관

- 1) 냉장상태로 보관하며, 24시간 내에 실험을 진행한다.
- 2) 실험하고 남은 검체는  $-75^{\circ}\text{C}$  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) 검체끼리의 교차 오염을 방지하기 위하여 검체의 개수에 맞게 필요한 도구를 준비한다.
- 3) 멸균된 가위 또는 수술용 칼과 핀셋을 이용하여 10g 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.

## 2. 시약 및 장비

### 가. 시약

- 1) Phosphate-Buffer saline (pH 7.4)
- 2) 유전자 추출 키트(Viral RNA Mini Kits)
- 3) One-step RT-PCR premix
- 4) *Taq* DNA polymerase, dNTPs(10mM), 10x Buffer(with MgCl<sub>2</sub>), DEPC Water
- 5) Primers & Probe

(Conventional RT-PCR primer)

step	Primer	Sequence (5'→3')	size
1st	Forward 3156N	5'-AATTATGCCCAGTACCGGGTTG-3'	731bp
	Reverse 3157N	5'-CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC-3'	
2nd	Forward 3158N	5'-GTTATGCTTTGCATACATGGCT-3'	348bp
	Reverse 3159N	5'-AGCCGACGAAATCAATTCTGTC-3'	

(Realtime RT-PCR primer & probe)

primers/probe	Sequence(5'→3')
Forward	GGTGGTTTCTGGGGTGAC
Reverse	CGAAGGGGTTGGTTGGATG
Probe	VIC-ATTCTCAGCCCTTCGCAATCCCCT-TAMRA

### 나. 장비

- 1) 호모게나이저(Homogenizer)
- 2) 스토마커(Stomacher)
- 3) 원심분리기(Centrifuge)
- 4) 자외선조사기(UV Transilluminator)
- 5) 혼합기(Vortex mixer)
- 6) 수소이온 측정기(pH meter)
- 7) 전기영동장치(Gel Electrophoresis)
- 8) 유전자증폭장치(PCR machine)
- 9) 실시간유전자증폭장치(RealtimeRT-PCR machine)
- 10) 울트라 막 필터(Ultrafiltration membrane filter tube)

### 3. 바이러스 추출 및 농축

#### 가. 바이러스 추출

- 1) 멸균 된 가위 또는 수술용 칼과 핀셋 등을 사용하여 검체를 10g 중량으로 절단한 후 잘게 다져서 1차 균질화 한다.



- 2) Phosphate-Buffer saline (pH 7.4) 90ml을 첨가하고 조직파쇄기로 2차 균질화 한다.
- 3) 균질화된 검체를 원심분리용 튜브에 옮겨 10,000 x g로 30분간 4°C에서 원심분리 한다.
- 4) 위의 과정을 거쳐 얻어진 용액으로 바이러스 농축 과정을 시행한다.

#### 나. 바이러스 농축 - Ultrafiltration 농축법

- 1) Vivaspin 20 UF membrane filter에 탈리용액 7ml을 옮겨 담은 후 8,000 rpm, 15분간 원심분리 한다.
- 2) 원심분리를 통해 모아진 탈리용액은 다시 새로운 UF membrane filter에 옮긴 후 8,000rpm에서 15분간 원심분리 한다.
- 3) membrane filter에 걸러지고 남은 탈리용액을 취한다.



- 4) 최종 농축용액은 RNA 추출을 위한 시료로 사용한다.

## 4. 유전자 추출 및 확인과정

### 가. 유전자 추출과정

- ※ 시판되는 바이러스 RNA 추출 키트(kit)를 사용하며, 제조사가 제시하는 적절한 시험법에 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.
- 1) 바이러스 유전자 추출 시 검체와 동일한 과정으로 음성대조군(negative control)과 양성대조군(positive control)을 사용하여 유전자를 추출하며 검체의 경우 시험 진행 중 오염 여부를 확인하기 위해 2개의 RNA를 추출한다.
    - ※ 음성대조군으로는 멸균증류수를 사용한다.
  - 2) 검체 농축액, 양성대조군 및 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.
  - 3) 여기에 95~100% 에탄올 1,120  $\mu$ L을 넣어 혼합한 후 가볍게 원심분리(spin-down)한다.
  - 4) 혼합액 630  $\mu$ L을 소량 원심(Mini-spin) 컬럼으로 옮겨 6,000 G에서 1분간 원심 분리하고 컬럼을 새로운 회수용(collection) 튜브로 옮긴 다음 남은 혼합액을 630  $\mu$ L씩 동일한 방법으로 컬럼에 첨가하여 원심분리한다.
  - 5) 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.
  - 6) AW2 완충액 500  $\mu$ L을 넣고 20,000 G로 3분간 원심분리한 후 컬럼을 새로운 1.5 mL 회수용(collection) 튜브로 옮긴다.
  - 7) AVE 완충액(sodium azide 함유) 60  $\mu$ L를 넣고 6,000 G로 1분간 원심분리하여 PCR을 수행하기 위한 주형(template)으로 사용한다.

## 나. 유전자 증폭과정

### 1) Realtime RT-PCR

Component	Volume	반응온도																							
RT-PCR buffer	12.5 $\mu$ L	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>온도</th> <th>시간</th> <th>Cycle</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>역전사 (reverse transcription)</td> <td>42<math>^{\circ}</math>C</td> <td>30min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>초기변성 (pre-denaturation)</td> <td>95<math>^{\circ}</math>C</td> <td>10min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>변성(denaturation)</td> <td>95<math>^{\circ}</math>C</td> <td>15 sec</td> <td rowspan="2">45</td> </tr> <tr> <td>결합(annealing)</td> <td>60<math>^{\circ}</math>C</td> <td>1 min</td> </tr> <tr> <td>scan</td> <td><math>\infty</math></td> <td><math>\infty</math></td> <td><math>\infty</math></td> </tr> </tbody> </table>		온도	시간	Cycle	역전사 (reverse transcription)	42 $^{\circ}$ C	30min	1	초기변성 (pre-denaturation)	95 $^{\circ}$ C	10min	1	변성(denaturation)	95 $^{\circ}$ C	15 sec	45	결합(annealing)	60 $^{\circ}$ C	1 min	scan	$\infty$	$\infty$	$\infty$
	온도		시간	Cycle																					
역전사 (reverse transcription)	42 $^{\circ}$ C		30min	1																					
초기변성 (pre-denaturation)	95 $^{\circ}$ C		10min	1																					
변성(denaturation)	95 $^{\circ}$ C		15 sec	45																					
결합(annealing)	60 $^{\circ}$ C		1 min																						
scan	$\infty$		$\infty$	$\infty$																					
Enzyme mix	0.5 $\mu$ L																								
Enhancer	1.5 $\mu$ L																								
Probe(10 pmol)	0.5 $\mu$ L																								
Forward primer(10 pmol)	1 $\mu$ L																								
Reverse primer(10 pmol)	1 $\mu$ L																								
D.W.	3 $\mu$ L																								
RNA	5 $\mu$ L																								
Total	25 $\mu$ L																								

### 2) Conventional RT-PCR

#### 가) conventional RT-PCR

Component	Volume	반응온도																														
RT-PCR pre-mix(2X)	25 $\mu$ L	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>온도</th> <th>시간</th> <th>Cycle</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>cDNA 합성(cDNA Synthesis)</td> <td>50<math>^{\circ}</math>C</td> <td>15 min</td> <td>1 cycle</td> </tr> <tr> <td>초기변성(predenaturation)</td> <td>95<math>^{\circ}</math>C</td> <td>2 min</td> <td>1 cycle</td> </tr> <tr> <td>변성(denaturation)</td> <td>95<math>^{\circ}</math>C</td> <td>20 sec</td> <td rowspan="3">35 cycle</td> </tr> <tr> <td>결합(annealing)</td> <td>52<math>^{\circ}</math>C</td> <td>30 sec</td> </tr> <tr> <td>확장(extension)</td> <td>72<math>^{\circ}</math>C</td> <td>1 min</td> </tr> <tr> <td>최종신장 (post-elongation)</td> <td>72<math>^{\circ}</math>C</td> <td>5 min</td> <td>1 cycle</td> </tr> <tr> <td>보관</td> <td>4<math>^{\circ}</math>C</td> <td><math>\infty</math></td> <td><math>\infty</math></td> </tr> </tbody> </table>		온도	시간	Cycle	cDNA 합성(cDNA Synthesis)	50 $^{\circ}$ C	15 min	1 cycle	초기변성(predenaturation)	95 $^{\circ}$ C	2 min	1 cycle	변성(denaturation)	95 $^{\circ}$ C	20 sec	35 cycle	결합(annealing)	52 $^{\circ}$ C	30 sec	확장(extension)	72 $^{\circ}$ C	1 min	최종신장 (post-elongation)	72 $^{\circ}$ C	5 min	1 cycle	보관	4 $^{\circ}$ C	$\infty$	$\infty$
	온도		시간	Cycle																												
cDNA 합성(cDNA Synthesis)	50 $^{\circ}$ C		15 min	1 cycle																												
초기변성(predenaturation)	95 $^{\circ}$ C		2 min	1 cycle																												
변성(denaturation)	95 $^{\circ}$ C		20 sec	35 cycle																												
결합(annealing)	52 $^{\circ}$ C		30 sec																													
확장(extension)	72 $^{\circ}$ C		1 min																													
최종신장 (post-elongation)	72 $^{\circ}$ C		5 min	1 cycle																												
보관	4 $^{\circ}$ C	$\infty$	$\infty$																													
Reverse transcriptase	1 $\mu$ L																															
Forward primer (20 pmol)	1 $\mu$ L																															
Reverse primer (20 pmol)	1 $\mu$ L																															
Enhancer	2.5 $\mu$ L																															
D.W.	14.5 $\mu$ L																															
Template (RNA)	5 $\mu$ L																															
Total	50 $\mu$ L																															

#### 나) Nested PCR(2nd)

Component	Volume	반응온도																										
dNTPs(10mM)	2 $\mu$ L	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>온도</th> <th>시간</th> <th>Cycle</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>초기변성(predenaturation)</td> <td>94<math>^{\circ}</math>C</td> <td>5 min</td> <td>1 cycle</td> </tr> <tr> <td>변성(denaturation)</td> <td>94<math>^{\circ}</math>C</td> <td>30 sec</td> <td rowspan="3">35 cycle</td> </tr> <tr> <td>결합(annealing)</td> <td>52<math>^{\circ}</math>C</td> <td>30 sec</td> </tr> <tr> <td>확장(extension)</td> <td>72<math>^{\circ}</math>C</td> <td>30 sec</td> </tr> <tr> <td>최종신장 (post-elongation)</td> <td>72<math>^{\circ}</math>C</td> <td>10 min</td> <td>1 cycle</td> </tr> <tr> <td>보관</td> <td>4<math>^{\circ}</math>C</td> <td><math>\infty</math></td> <td><math>\infty</math></td> </tr> </tbody> </table>		온도	시간	Cycle	초기변성(predenaturation)	94 $^{\circ}$ C	5 min	1 cycle	변성(denaturation)	94 $^{\circ}$ C	30 sec	35 cycle	결합(annealing)	52 $^{\circ}$ C	30 sec	확장(extension)	72 $^{\circ}$ C	30 sec	최종신장 (post-elongation)	72 $^{\circ}$ C	10 min	1 cycle	보관	4 $^{\circ}$ C	$\infty$	$\infty$
	온도		시간	Cycle																								
초기변성(predenaturation)	94 $^{\circ}$ C		5 min	1 cycle																								
변성(denaturation)	94 $^{\circ}$ C		30 sec	35 cycle																								
결합(annealing)	52 $^{\circ}$ C		30 sec																									
확장(extension)	72 $^{\circ}$ C		30 sec																									
최종신장 (post-elongation)	72 $^{\circ}$ C		10 min	1 cycle																								
보관	4 $^{\circ}$ C		$\infty$	$\infty$																								
10x Buffer(with MgCl <sub>2</sub> )	2 $\mu$ L																											
D.W.	11 $\mu$ L																											
Forward primer(10 pmol)	1 $\mu$ L																											
Reverse primer(10 pmol)	1 $\mu$ L																											
Taq polymerase(1unit/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L																											
1 <sup>st</sup> PCR Product	2 $\mu$ L																											
Total	20 $\mu$ L																											

## 다. 결과 분석 방법

### 1) Realtime RT-PCR

- 가) Realtime RT-PCR 반응 종료 후 VIC-TAMRA detector로 증폭곡선이 확인되는 경우 E형 바이러스 검출을 확인한다.
- 나) Realtime RT-PCR 음성대조군 (negative control)에서 증폭곡선이 확인되거나 또는 양성대조군에서 확인이 되지 않을 경우 등은 유전자 추출과정부터 재시험을 실시해야 한다.

### 2) Conventional RT-PCR

- 가) Conventional RT-PCR 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.
- 나) 1.5% 아가로즈 젤(agarose 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.
- 다) 아가로즈 젤(agarose gel)상에서 시료에 348bp의 밴드가 있을 경우 E형 간염바이러스로 일차 확인한다.
  - ※ 만일 PCR 음성대조군 (negative control)에서 증폭곡선이 확인되거나 또는 양성대조군에서 확인이 되지 않을 경우 등은 유전자 추출과정부터 재시험을 실시해야 한다.
- 라) E형 간염 바이러스가 일차 확인된 경우 최종 확인을 위하여 아가로즈 젤(agarose gel)상에서 해당부위를 절취하여 PCR 산물을 정제한 후 염기서열(DNA sequencing)을 분석하여 판정한다.

# 식품용수 중 E형 간염바이러스 시험법

## 1. 시약 및 장비

### 가. 시약

- 1) 2% 티오황산나트륨(Sodium thiosulfate:  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 용액
- 2) 1M 염산(HCl) 용액
- 3) 1.5% Beef extract(desiccated powder)용액
- 4) 0.15 M 인산일수소나트륨, 7수화물(Sodium phosphate, dibasic, ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )) 용액
- 5) 1M 수산화나트륨(NaOH) 용액
- 6) 유전자 추출 키트(Viral RNA Mini Kits)
- 7) One-step RT-PCR premix
- 8) *Taq* DNA polymerase, dNTPs(10mM), 10x Buffer(with  $\text{MgCl}_2$ ), DEPC Water
- 9) Primers & Probe : 식육 E형 간염시험법의 sequence와 동일

### 나. 장비(초자포함)

- 1) 표준필터장치
- 2) 휴대용 pH 측정기
- 3) 휴대용 탁도 측정기
- 4) 휴대용 염소 농도 측정기
- 5) 휴대용 아이스박스
- 6) 양전하필터(positive charge filter)
- 7) 연동정량펌프
- 8) 원심분리기(4 °C, 2,500~10,000 G)
- 9) 전기영동장치(Gel Electrophoresis)
- 10) 유전자증폭장치(PCR machine)
- 11) 실시간유전자증폭장치(RealttimeRT-PCR machine)

## 2. 식품용수 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).
- 가. 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.
- 나. 염소(Chlorine, HOCl)나 불꽃버너를 이용하여 배출구(수도꼭지 등)를 가열 또는 살균한다.
- 다. 채수용 호스의 알루미늄박을 제거한 후 채수 할 배출구에 연결하고 표준필터장치 용수 유입구에 호스를 연결한다. 이 단계에서 양전하 카트리지가 필터는 연결하지 않는다.
- 라. 천천히 배출구를 열어 압력계이지가 30 PSI가 넘지 않도록 배출구를 조절하고 76 L(20 gal)의 식품용수를 흘려보낸다.
- 마. 식품용수 76 L를 흘려 보낸 후 일부를 2 L 멸균 비커에 받아 용수의 탁도, pH, 온도, 염소농도를 각 각 측정하여 검체번호, 채수위치, 채수자의 이름과 함께 바이러스 검체채수 기록부에 기록한다. pH 측정기는 사용 전 보정(calibration) 한다.
- 바. 용수 배출구(수도꼭지 등)를 잠그고 검체가 다음의 조건에 해당되어 부가장치의 연결이 필요한지의 여부를 결정하여 연결한다.
  - ☞ pH 8이상일 경우 멸균된 튜브로 단일주입기와 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. 용수유출구로 흘러나온 용수의 pH를 측정해 바이러스 검체 채수 기록부에 기록한다.
  - ☞ 잔류염소 제거를 위해 위와 같이 단일주입기를 연결하여 식품용수 3.8 L(1 gal) 당 2% 티오황산나트륨 용액 10 mL이 주입되도록 한다.
- ※ 상기내용이 모두 해당할 경우 이중주입기를 연결하여 사용한다.
- 사. 바이러스검체 채수기록부에 검체 채취일, 시작 시간, 유량계의 초기 수치를 기록한다.
- 아. 알루미늄박을 제거한 양전하 카트리지가 필터를 탈리액 주입구와 유출구 사이에 연결한다.



- 자. 용수를 천천히 흐르게 하면서 카트리지 하우징 상단의 감압단추(vent button)를 눌러 내부 공기가 완전히 빠지도록 한 후, 수도꼭지를 완전히 열어 준다.
- 차. 압력게이지가 30 PSI 이하로 유지되도록 유량조절 밸브를 조정하고 식품용수 1,500~1,800 L를 통과 시킨 후, 용수 배출구(수도꼭지 등)를 잠근다.
- 카. 바이러스 검체 채수기록부에 검체채취 종료일, 종료 시간, 유량계의 최종 수치 등을 기록한다.
- 타. 표준필터장치로부터 카트리지 하우징을 분리하고 양전하 카트리지 필터를 거꾸로 하여 남은 물을 버린 후 하우징 양끝의 연결된 개구부를 멸균된 알루미늄박으로 쓴다.
- 파. 양전하 카트리지 필터를 아이스박스에 담고 얼음팩 등을 사용하여 냉장상태(냉동시켜서는 아니 된다)로 유지하여 즉시 실험실로 운반한다.

### 3. 탈리과정

- 가. 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.
  - 나. 탈리용 거치대에 카트리지 하우징을 장착한 후 유량조절 밸브를 모두 닫는다.
  - 다. 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 0.5 L의 1.5% Beef extract 용액(1.5%)을 사용한다.
  - 라. 탈리액 유출구에 유출용 호스를 연결하여 1.5% Beef extract 용액이 들어 있는 유리병에 넣고 탈리액 유출구를 닫는다.
  - 마. 연동정량펌프를 가동하여 양전하 카트리지 필터 하우징 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.

바. 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 들어 있던 유리병에 수집한다. 탈리액을 회수할 때는 거품이 없도록 주의하여야 한다.

※ 연동정량펌프 대신 양압펌프와 압력통을 사용하여 탈리과정을 진행할 수도 있다.

사. 유리병에 수집된 탈리액은 라~바의 과정을 2회 반복한다.

아. 최종 탈리액은 1 M 염산 용액으로 pH를 7.0~7.5 사이로 조절하고 멸균된 메스실린더를 사용하여 부피를 기록한다.

자. 탈리액은 24시간 이내에 농축시험이 가능할 경우 4°C에서 보관하며, 농축 시험을 즉시 시행하기 어려울 때에는 -70°C에서 보관한다.

#### 4. 농축과정

가. 최종 탈리액을 교반기에서 혼합하면서 1 M 염산용액으로 pH를  $3.5 \pm 0.1$ 로 조절한 후, 실온에서 30분간 천천히 섞는다.

나. 침전물이 생기면 탈리액을 멸균한 원심분리용기에 옮겨 원심분리한다(2,500 G 15분, 4°C).

다. 원심분리 후, 상등액을 제거하고 남은 침전물에 0.15 M sodium phosphate 완충액 (pH 9.0~9.5)을 20~30 mL 넣어 완전히 부유 시킨 후 실온에 10분간 방치한다.

라. 부유시킨 용액을 원심분리한다(7,000 G, 10분, 4°C).

마. 상등액을 취해 1 M 염산용액으로 pH 7.0~7.5로 조절한다.

바. 미생물오염을 방지하기 위해 30 mL 주사기를 이용하여 상등액을 0.22  $\mu$ m 주사기 필터로 여과한다. 검체 중의 바이러스가 필터에 흡착되는 것을 방지하기 위하여 사전에 0.22  $\mu$ m 주사기 필터에 10~20 mL의 1.5% Beef extract 용액(pH 7.0~7.5)을 통과시킨다.

사. 최종 농축 검체량(FCSV=final concentrated sample volume)을 기록하고 검체를 24시간 이내에 분석할 경우는 4°C에 보관하고 나머지는 분석 전까지 -70°C에 보관한다.

아. 최종 농축검체 20~30 mL는 유전자 추출을 위한 검체로 사용한다.

## 5. 유전자 추출 및 확인과정

※ 식육 중 E형 간염바이러스 시험법과 동일

# 식육, 식품용수 중 E형 간염바이러스 시험법 매뉴얼

발 행 일 : 2012년 10월

발 행 인 : 이 광 호

편집의원장 : 이 상 재

편 집 위 원 : 박건상, 황인균, 이순호, 주인선, 고영호, 김용훈,  
조준일, 조정화, 이정수

발 행 처 : 식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 미생물과

연 락 처 : 충청북도 청원군 강외면 오송읍 오송생명2로 187 오송

보건의료행정타운 식품의약품안전청 미생물과

Tel : 043-719-4301~8, Fax : 043-719-4300

홈 페이지 : [www.kfda.go.kr](http://www.kfda.go.kr)