

수계 장바이러스의 효과적인 농축과 검출 방법의 개발

정은영 · 장경립*

부산대학교 자연과학대학 생명과학부

An Effective Method for the Concentration and Detection of Enteroviruses from Water Samples by Combined Cell Culture-Polymerase Chain Reaction

Eun-Young Jung, Kyung Lib Jang*

Division of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

Enteroviruses in the environment pose a public health risk because they can be transmitted via the fecal-oral route through contaminated water, and low numbers are able to initiate an infection in humans. Because the levels of viruses typically found in environmental water and drinking water are low, they must be concentrated from hundreds to thousands of liters of water. Therefore, the main goal of this study was the development of a rapid, simple and efficient procedure to concentrate, isolate and detect enteroviruses from environmental water samples. Viruses were first concentrated by adsorption to 1 MDS cartridge filter and then eluted with approximately 0.5 liter of 1.5% beef extract/0.05 M glycine(pH 9.4). In this study, several procedures to concentrate and purify intact viruses from beef extract obtained from the adsorbent filters were tested. Among them, organic flocculation was the best reliable method for reconcentration. Sample volume could be reduced to 200~400 folds and the efficiency of virus recovery through the procedure was over 72%. Finally, the samples were filtered through a membrane disk filter and then analyzed by either the plaque assay or combined cell culture-polymerase chain reaction.

Key words – Enterovirus, Adsorbent filters, Organic flocculation, CC-PCR

서 론

장관계 바이러스는 오래 전부터 수인성 질병의 주요 병인 중의 하나로 알려져 왔다. 이들 바이러스들은 바이러스에 감염된 환자의 배설물로부터 방출되어 하수를 거쳐 자연 수계에 널리 분포하며[1], 어패류 등에 축적된다[5]. 장관계 바이러스는 이들이 존재하는 물이나 어패류를 섭취하

는 과정에서 인체에 감염되어 위장염으로부터 뇌수막염에 이르기까지 다양한 질병의 원인이 될 수 있음이 보고되었다. 현재까지 알려진 수인성 장관계 바이러스(Enteric virus)만 하여도 장바이러스(enterovirus), A형 및 E형 간염 바이러스(hepatitis A/E viruses), 노르윅바이러스(Norwalk viruses), 리오바이러스(reoviruses), 아데노바이러스(adenoviruses), 로타바이러스(rotaviruses), 에스트로바이러스(astroviruses), 캘리시바이러스(caliciviruses) 등의 약 130여 종류이며[17], 앞으로도 새로운 종류가 더 발견될 전망이다. 이들의 형태, 구조, 화학적 조성 및 진화적 유연 관계는 매우

*To whom all correspondence should be addressed
Tel: +82-51-510-2178, Fax: +81-51-514-1778
E-mail: klijang@hyowon.cc.pusan.ac.kr

다양하여, 사람을 비롯하여 다양한 고등동물을 숙주로 이용할 수 있다.

수인성 장관계 바이러스는 세균보다 적은 농도로 분포하나, 세균에 비하여 환경에 오래 생존하고[11] 염소치리에 대하여 대장균보다 높은 저항성을 나타낸다[2]. 또한 일반적인 병원성 미생물은 대장균 등의 지표 세균을 이용하여 검출할 수 있으나 바이러스는 지표 세균이 없는 응용수에서도 검출될 수 있으므로 직접적인 바이러스 검출방법의 확립이 필수적으로 보여진다.

환경시료에서 장관계 바이러스의 검출을 위한 기본적인 방법으로 세포배양법[6], 면역학적 방법[18,25] 등이 이루어지고 있다. 그러나 이러한 방법들은 경제적, 시간적, 기술적 단점으로 인하여 수계 중에 분포하는 적은 수의 바이러스를 검출하는 데는 많은 어려움이 있음이 보고되었다. 최근 연구에서 환경 시료로부터 장관 바이러스의 검출은 민감도가 뛰어난 RT-PCR(Polymerase Chain Reaction)이 널리 사용되어지고 있는데, 이는 바이러스의 DNA를 주형으로 하여 단 시간 내에 장관계 바이러스를 검출할 수 있을 뿐만 아니라 아주 적은 수의 바이러스까지도 검출할 수 있는 장점을 가진다[1,15,23,24].

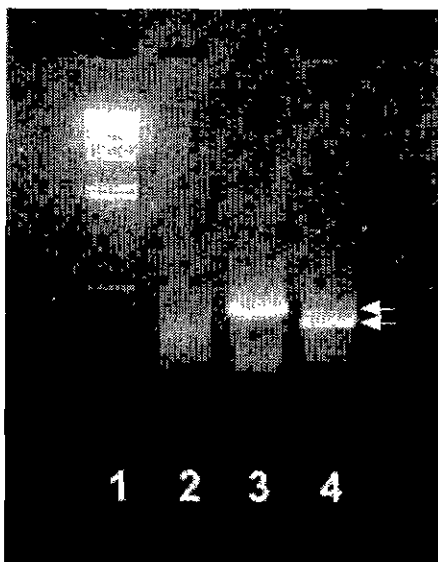


Fig. 1. Specific detection of poliovirus by RT-PCR.
 Arrows indicate the positions of PCR products
 Lane 1 : size marker, Lane 2 : negative control
 Lane 3 : RT-PCR by using PEN 1 Primers (394bp)
 Lane 4 : RT-PCR by using PEN 2 Primers (309bp)

수돗물의 안전성은 다수의 건강과도 직결되므로 원수 및 수돗물에서 장관 바이러스를 정확히 검사할 수 있는 방법을 확립하고, 이 방법에 따라서 정기적으로 검사를 실시하여 기초 자료를 확보하는 것이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 미국에서 EPA(Environment Protection Agency)[17]에서 실시하고 있는 바이러스 검출법을 토대로 하여 보다 간단하고 효과적인 바이러스 검사법을 개발하고자 하였다. 이를 위하여 표준 바이러스를 배양하고 이를 이용하여, 여과, 농축 과정을 거치면서 바이러스의 회수율과 생존율 등을 조사하여 가장 효과적으로 바이러스를 검출할 수 있는 방법을 연구하여 보았다.

재료 및 방법

표준 바이러스의 배양 및 정량

표준 바이러스는 poliovirus type I, II, III 형을 혼합하여 제조한 생 폴리오바이러스 백신(동산제약)을 원수가 신장세포(Vero)에 3일간 배양, 증폭하였다. Vero 세포는 Dulbecco's modified Eagl's medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum(FBS), 100 unit/ml의 페니실린 항생제와 100 µg/ml의 스트렙토마이신이 혼합된 배지를 사용하여 배양하였다. 증폭되어진 바이러스는 얼림-녹임 과정을 3회 반복하여 얻어졌고 plaque assay를 실시하여 바이러스의 수를 산출하였다.

시료의 여과 및 농축

200 L의 증류수에 1,000 pfu의 바이러스를 분주하여 잘 섞은 후 이를 1-MDS filter(Cuno사)를 이용, 흡착 여과를 실시하였다. 필터에 부착된 바이러스를 1.5% beef extract/0.05 M glycine(pH 9.4) 500 ml를 사용하여 5, 10, 15분 동안 시간별로 가압 용출을 실시하였다.

시료의 재농축

필터에서 용출된 시료를 다음의 세가지 방법을 사용하여 재농축을 실시하였다. 유기응집 농축법(organic flocculation)[8]은 용출액에 1N HCl을 천천히 떨어뜨려 pH 3.5±0.1로 만들고, 4℃에서 30분간 천천히 교반하였다. 이후 4000 rpm, 4℃, 15분간 원심 분리하여 침전물을 수거하였다. 침전물을 0.15 M sodium phosphate(pH 9.0-9.5) 혹은 PBS(phosphate buffered saline, pH 9.0-9.5) 10 ml에 녹인 후

8000 rpm, 4°C, 10분간 원심 분리하여 상등액 만을 취하고 1N HCl로 pH 7.0-7.5로 맞추었다.

초여과법(ultrafiltration)은 초여과장치(100,000 MWCO : Amicon사)를 이용하여 시료를 농축하였다. 질소압을 이용하여 여과장치에 500 ml의 시료를 넣어 막을 통과시킴으로써 바이러스를 농축시켰다. 여과하는데 12시간 정도가 소요되었다. 초여과법을 통하여 얻어진 용출액은 10 ml 정도로 농축되었다.

PEG 침전법(PEG precipitation)[16] 용출액의 pH를 7.2-7.4로 맞춘 후 1/10 부피의 13% PEG(MWS, 000)/0.5M NaCl을 시료와 섞고 4°C에서 6시간 이상 방치하였다. 침전된 바이러스를 12,000 rpm, 20분간 원심분리를 실시하여 수거하였고 이를 일정량의 PBS(pH 7.4)로 현탁하였다.

시료의 정제

농축된 시료에 바이러스 검출을 저해하는 물질들이 포함되어 있을 수 있으므로 이를 제거하기 위한 정제를 실시하였다. 위에서 농축된 시료를 최종적으로 0.45 μm membrane filter로 여과하였고 필요에 따라 동량의 chloroform을 처리하여 세균과 불순물을 제거하였다.

바이러스의 검출과 정량

바이러스 감염 24시간 전에 원숭이 신장세포(BGM 혹은 Vero cell)를 1x10⁶ cells/well 이 되도록 분주한 뒤 10% FBS/DMEM 배지를 첨가하여 세포가 배양접시 표면에 거의 차도록 키웠다. 농축 정제된 시료에서 400 μl를 취하여 dish에 접종하고 1시간 동안 37°C에서 배양, 감염시킨 후 2% carboxy methyl cellulose (CMC)/1% FBS/DMEM을 첨가하여 바이러스 감염을 진행시켰다. 7일간 배양 한 뒤, 생성된 plaque의 개수를 세어 ml당 virus의 수를 계산하였다.

바이러스 검출을 위한 primer쌍은 장바이러스 중 poli-ovirus. type 1을 특이적으로 검출할 수 있는 5' UTR 부분의 염기서열을 사용하였다(Table 1)[21,22]. 200 μl의 최종 농축시료와 500 μl의 GT (5M guanidium thiocyanate, 50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 8% 2-mercaptoethanol)를 섞은 후, phenol/chloroform법으로 RNA를 추출하였다. 앞서 추출한 RNA를 70 °C에서 3분간 가열하여 변성시키고, 미리 준비한 cDNA synthesis mixture {5x reaction buffer, 3 mM dNTP, 150 pmol Reverse primer (PEN-R), 250 U

Table 1. Primer pairs used for the detection of entroviruses

Taget	Panenterovirus 5'NCR
Sequence (5'-3')	PEN - 1F acggacacccaaagta
	PEN - 1R agcacttctgtttccc
	PEN - 2NF caagcacttctgtttccc
	PEN - 2NR ggattagccgcattcaggg
viruses detected	Polioviruses, types 1-3 Coxsachiviruses A1 Coxsachiviruses B1, 2, 3, 5, 6 Ecoviruses, types 7, 17, 19, 21, 24

M-MLV Reverse transcriptase (Promega사))를 넣어 37°C에서 1시간동안 합성하였다. 95°C에서 5분간 열을 가하여 반응을 종결시킨 다음 PCR을 위한 주형으로 사용하였다. PCR 반응액은 총 100 μl volume(cDNA (1-100ng), 10x reaction buffer, 1.5mM MgCl₂, primers (PEN-F, PEN-R 각각 50 pmol/μl), 5 U/μl Taq polymerase (Takara사))이 되도록 하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR은 95°C에서 30초, 56°C에서 45초, 72°C에서 45초 동안 40번을 반복시켜 PCR 산물을 얻었다. PCR 반응 결과 생겨난 산물을 1.2% agarose gel에 전기영동하여 394 bp의 PCR산물의 형성 유무를 확인하였다. 이를 주형으로 한 nested PCR을 실시하여 304 bp의 PCR산물을 얻어 PCR의 정확성을 확인하였다.

결과 및 고찰

시료의 여과 및 농축

200 L의 시료를 필터에 흡착여과 하여 강염기 용출액[1.5% beef extract/0.05M glycine (pH 9.4)]을 사용하여 용출하였다. 바이러스는 강염기 용액에 의하여 실효될 수 있으므로 시간에 따른 수거율과 실효 정도를 조사하였다. 5분, 10분, 15분간 용출을 실시하였을 때의 결과를 Table 2에 나타내었다. 바이러스는 5분에서 10분사이에 가장 많은 양을 수거할 수 있었으며 15분 이상 방치했을 경우 수거율이 50%미만으로 떨어지는 것을 확인하였다. 이는 15분 이상 알카리 용출액에 바이러스를 방치하면 바이러스의 활성이 급격히 감소됨을 제시한다.

시료의 재농축

필터를 통하여 1차 농축과정을 거친 시료를 재농축하였

Table 2. Efficiency of poliovirus recovery depending on the elution time

Time	virus		% Recovery ^a (mean ± SD)
	virus	detected	
5min	1000	720	72% ± 5
10min	1000	661	66% ± 13
15min	1000	450	45% ± 2

^aValues represent the mean standard deviation for three different trials.

다. 재료 및 방법에 제시된 세가지 방법을 사용하였으며 실험 방법에 따른 수거율을 조사하였다(Table 3). 사용한 방법에 따라 차이가 있었으며 유기응집법을 통하여 가장 많은 바이러스를 수거 할 수 있었다. 그러나 유기응집법으로 농축을 실시하였을 때에도 바이러스가 산과 염기에 노출되어지는 시간이 클수록 바이러스의 실활율이 높아지는 것을 볼 수 있었다. 또한 유기응집에 의하여 많은 불순물들이 같이 농축되어져서 회수율이 낮아질 수 있으므로 바이러스 정제 과정이 추가로 필요하였다.

바이러스의 검출

바이러스의 검출은 세포배양을 통한 Plaque assay와 RT-PCR을 병행하여 확인하였다. RT-PCR을 통하여 확인을 할 때에는 감염성이 없는 실활된 바이러스도 검출이 되지만 세포배양과 연계하여 PCR을 실시할 경우(Combined Cell culture-Polymerase Chain Reaction : CC-PCR)에는 감염성이 있는 바이러스만이 검출되는 장점을 가진다. PCR 결과 예상되는 크기의 산물을 얻을 수가 있었다.

수계 장바이러스 검사법

지금까지의 실험결과를 토대로 하여 하나의 실험방법을

Table 3. Recovery efficiency comparison of virus re-concentration methods

	virus(pfu)		% Recovery ^a (mean ± SD)
	input	detected	
Organic flocculation	1000	997	100 ± 2%
Ultrafiltration	1000	828.6	83 ± 7%
PEG precipitation	1000	70	7 ± 10%

^aValues represent the mean standard deviation for three different trials.

정립하였다(Fig 2). 필터로부터의 용출 시간은 10분으로 정하였으며 이를 농축하는 방법은 유기응집법을 택하였다. 그리고 바이러스를 검출하기 위한 방법으로 세포배양법을 실시하면서 이들에 대한 PCR을 연계하여 실시하였다. 세포배양법만을 실시 할 경우 시간적 손실이나 바이러스의 존재유무를 정확하게 확인할 수 없는 문제점이 있으므로 RT-PCR법을 연계하여 감염성을 가지는 바이러스만을 빠른 시간내에 검출할 수 있다. 이러한 바이러스 검사방법을 환경내의 시료에 적용하여 원수, 정수, 수돗물 등에 분포하고 있는 바이러스에 대한 정기적인 검사를 실시하면 감염성이 있는 바이러스에 의한 불의의 사고를 막고 안전한 물을 보급하는데 큰 기여를 할 것으로 보여진다.

요 약

환경에 존재하는 장바이러스는 오염된 물을 통하여 경구경로로 전염이 가능하고, 바이러스는 적은 양으로도 인

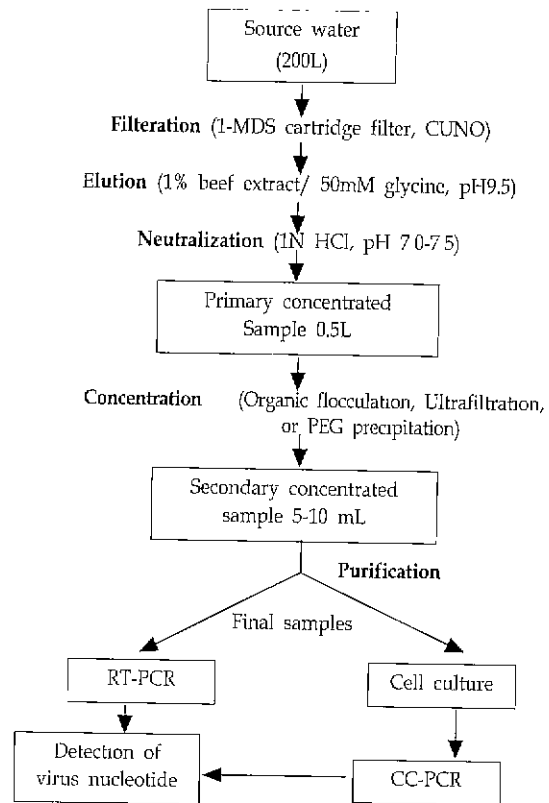


Fig 2. Schematic view of virus detection from water samples

체에 감염이 가능하므로 인간의 건강을 위협할 수 있다. 환경 수계 및 음용수에서 발견되는 바이러스의 수치는 비교적 낮으므로 수백에서 수천 리터의 물을 농축시킬 필요가 있다. 따라서 이 연구의 주요 목적은 수계 시료로부터 장바이러스를 농축, 정제, 및 검출할 수 있는 신속, 간편하고 효과적인 방법을 개발하는 것이다. 먼저 바이러스를 1 MDS 카트리지 필터에 흡착시켜 농축시키고 약 500 μ l의 1.5% beef extract/0.05 M glycine(pH 9.4)으로 용출시킨다. 이 연구에서는 흡착필터로부터 얻은 바이러스 1차 용출액을 더욱 농축시키고 정제하기 위하여 세가지 방법을 시도하였다. 이들 가운데서 유기 응집법이 바이러스 재농축에 가장 효과적인 방법이었다. 이 방법으로 시료 부피를 200에서 400배까지 감소시킬 수 있었으며 최종 바이러스 수거율은 72% 이상이었다. 마지막으로 시료를 막 디스크 필터로 여과시키고 plaque assay 혹은 CC-PCR법으로 분석하였다.

참 고 문 헌

- Atmar, R. L., F. H. Neill, J. L. Romalde, Le Guyader, C. M. F. Woodley, T. G. Metcalf and M. K. Estes. 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3014-3018.
- Bitton, G., S. R. Farrah, C. L. Momtague and E. W. Akin. 1986. Viruses in drinking water. *Environ. Sci. Tech.* **20**, 216-222.
- Carol, S. Y. S., S. B. Ralph and D. S. Mark. 1997. Detection of low levels of Enteric Viruses in Metropolitan and Airplane Sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4401-4407.
- Chapman, N. M., S. Tracy, C. J. Gauntt and Fortmueller. 1990. Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 843-850.
- Chung, H. 1993. PH. D. Thesis. The University of North Carolina at Chapel Hill. North Carolina
- Dahling, D. R. and B. A. Wright. 1986. Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 790-812.
- EPA. 1993. Drinking water regulations and health advisories.
- Eaton, A. D., L. S. Clesceri and A. E. Greenberg. 1995. *Standard methods for the examination of water and waste water*. 19th ed., American Public Health Association, Baltimore, Maryland
- Gilgen, M., B. Wegmuller, P. Burkhalter, H. P. Burkhalter, H. P. Buhler, U. Muller, J. Luthy and U. Candrian. 1995. Reverse Transcription PCR to detect Enteroviruses in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1226-1231.
- Gow, J. W., W. M. H. Behan, G. B. Clements, C. Woodall, M. Riding and P. O. Behan. 1991. Enteroviral RNA sequences detected by polymerase chain reaction in muscle of patients with postviral fatigue syndrome. *Br. Med. J.* **302**, 692-696.
- Grabow, W. O. K., P. Coubrough, C. Hilner and B. W. Bateman. 1984. Inactivation of hepatitis A virus, other enteric viruses and indicator organism in water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **46(3)**, 619-624.
- Jothikumar, N., D. Aparna and P. Khanna. 1990. A simple elution and reconcentration technique for viruses concentrated on membrane filter from drinking water samples. *Water Res.* **24**, 367-372.
- Kelly, A. R., P. G. Charles and L. P. Ian. 1996. Detection of Infectious Enteroviruses by an integrated cell culture - PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1424-1427.
- Kopecka, H., S. Dubrou, J. Prevot, J. Marechal and J. M. Lopez - pila. 1993. Detection of Naturally Occurring Enteroviruses in Waters by Reverse Transcription, Polymerase Chain Reaction, and Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1213-1219.
- Lees, D. N., K. Henshilwood and W. J. Dore. 1994. Development of a method for selection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2999-3005.
- Lewis, G. D. and T. G. Metcalf. 1998. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus from oyster, water sediment sample. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1983-1988.
- Miller, M. J. 1993. Viral taxonomy. *Clin. Infect. Dis.* **16**, 612-613.
- Nasser, A. M., Y. Elkana and L. Goldstein. 1993. A nylon filter A-ELISA for detecting viruses in water. *Wat. Sci. Tech.* **27(7/8)**, 135-141.
- Orteza A., S. H. Mary, P. G. Charles and L. P. Lan. 1993. Detection of enteroviruses in Groundwater with the Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*

- 59, 1318-1324.
20. Ousmane T., A. Charlotte, M. Berengere, M. Arnal, L. Henri, B. Sylviane and S. Louis. 1998. Reverse Transcriptase PCR detection of Astrovirus, Hepatitis A Virus, and Poliovirus in Experimentally Contaminated Mussels : Comparison of Several Extraction and Concentration Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3118-3122.
21. Romero, J. R. and H. A. Rotbart. 1993. PCR detection of the human enteroviruses, p. 401-406, *In Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. ASM Press, Washington, D.C.
22. Schwab, K. J., R. De Leon and M. D. Sobey. 1993. Development of PCR methods for enteric virus detection in water. *Wat. Sci. Tech.* **27(314)**, 211-217.
23. Schwab, K. J., R. De Leon and M. D. Sobey. 1995. Concentration and purification of beef extract mock elutes from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus and Nowalk virus by reverse transcription PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 531-537.
24. Tsai, Y-L., B. Tran, L. R. Sangermano and C. J. Palmer. 1994. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcripase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2400-2407.
25. Yolken, R. H. and V. M. Torsch. 1980. Enzyme-linked immunosobant assay for detection and identification of coxachie B antigen in tissue cultures and clinical specimens. *J. Med. Virol.* **6**, 45-52.