

지표수로부터 세포배양-연계 PCR법에 의한 장바이러스의 검출

정은영 · 정종문¹ · 류재익¹ · 신판세¹ · 전홍기 · 장경립*

부산대학교 자연과학대학 생명과학부
¹부산시 상수도사업본부 수질연구소

Detection of Enteroviruses from Surface Water by Combined Cell Culture-PCR

Eun-Young Jung · Jong Mun Jung¹ · Jae Ick Ryoo¹ · Pan Se Shin¹ · Hong Ki Jun · Kyung Lib Jang*

Division of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
¹Pusan Institute of Water Quality, Waterworks Headquarter, Pusan 617-042, Korea

Abstract

Enteroviruses may cause gastrointestinal symptoms, cold, and fever, mainly in young children. They are also recognized as important agents in acute infections of the central nervous system such as meningitis and encephalitis, and in subacute and chronic infections of the cardiovascular system such as pericarditis, myocarditis and cardiomyopathy. They also can lead to postviral fatigue syndrome. For the detection of enteroviruses from the environmental samples, the combined cell culture-polymerase chain reaction (CC-PCR) technique was employed. In contrast to EPA standard method which mainly depends on the cell culture, it involved the use of cell culture, followed by PCR to improve the sensitivity and the accuracy of the test. According to the results of survey, from 1999 to 2000, for the presence of enteroviruses in the surface water samples from Nak-dong river, four out of twelve samples were positive for viruses. The titer of viruses per 100 liters of water was ranged from 25 to 250 MPN. All of the viruses isolated were poliovirus type I with 98% nucleotide sequence homology. The result also clearly suggests the seasonal difference in the distribution of the waterborne enteroviruses in surface water because most of the viruses were mainly detected from the summer through the early autumn.

Key Words — Enterovirus, CC-PCR, Poliovirus type 1, Surface water

서 론

인체의 소화관에서 증식하거나, 이들을 경유하여 대변과 함께 체외로 방출되는 것들을 총칭하여 장바이러스(enteroviruses)라 부른다. 이들은 공통적으로 강산성 조건하에 매

우 안정한 특징이 있어(pH 3-5에서 60분 처리하여도 감염성을 유지), 사람의 위와 같이 생물이 서식하기 힘든 조건에서 견뎌내어 생존한다[10,22]. 이러한 장내 바이러스는 이들이 존재하는 물이나 어패류를 섭취하면 인체에 감염되어 위장염으로부터 뇌수막염에 이르기까지 다양한 질병의 원인이 될 수 있음이 보고되었다. 수인성 장바이러스는 세균보다 적은 농도로 분포하지만, 세균에 비하여 환경에 오래 생존하고[9], 염소처리와 정수처리과정에서 제거되지 않

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

을 가능성이 높다[2]. 또한 바이러스는 대장균 등의 지표 세균이 검출되지 않는 음용수에서도 검출될 수도 있다 [5,7].

바이러스는 생체 밖에서는 증식이 불가능하고, 다량의 물에 희석되어 있으므로 자연 수계에서 검출될 수 있는 바이러스의 농도는 매우 낮다. 그러므로 많은 양의 물을 대상으로 검사를 실시하여야 하는데, 일반적으로 원수의 경우 200L 이상, 정수의 경우 1500L 이상의 물을 여과하여 사용해야 한다고 보고되었다. 환경시료에서 장바이러스의 검출을 위한 방법으로 세포 배양법[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 환경시료로부터 장내 바이러스의 검출은 민감도가 뛰어난 polymerase chain reaction (PCR) 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]. 반면에 이 방법으로는 바이러스의 감염성을 알 수 없다는 단점이 있다. 따라서 최근에는 세포배양법과 PCR법의 장점을 모두 이용한 combined cell culture-PCR (CC-PCR)법이 도입되어 이용되고 있다[12].

장바이러스는 하수 및 지표수가 매개체로 작용하는 수인성 바이러스로서, 주로 식수의 분변 오염으로 인하여 인체에 감염되어진다고 보고되면서[1,14], 전 세계적으로 바이러스에 대한 수질기준을 강화하고 있는 추세이다. 그러나 국내에서는 이러한 연구가 미비한 실정이다. 따라서 본 연구는 수계 바이러스를 효과적으로 검출할 수 있는 CC-PCR법으로, 1999년 8월부터 2000년 6월까지 환경 시료를 채취하여 바이러스 검사를 실시하였으며, 바이러스의 계절별 분포 등을 조사하였다.

재료 및 방법

시료의 여과 및 농축

지표수 200L를 1-MDS filter (Cuno사, USA)를 이용하여 흡착 여과를 실시하였다. 필터에 부착된 바이러스를 500 ml의 1.5% beef extract/0.05 M glycine (pH 9.4) 용출액으

로 약 10분 동안 가압 용출을 실시하였다[6].

시료의 재농축

앞서 용출된 시료를 유기 응집법(organic flocculation)을 사용하여 재농축을 실시하였다. 용출액에 1N HCl을 천천히 떨어뜨려 pH 3.5 ± 0.1 로 만들고, 4°C에서 30분간 천천히 교반하였다. 이후 4000 rpm, 4°C, 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 상등액만을 취하고 1N HCl로 pH 7.0-7.5로 맞추었다. 농축된 시료에 바이러스 검출을 저해하는 물질들이 포함되어 있을 수 있으므로 이를 제거하기 위하여 농축된 시료를 0.45 μ m membrane filter로 여과하거나 동량의 chloroform을 처리하여 박테리아, 불순물 등을 제거하였다.

세포배양

바이러스 감염 24시간 전에 원숭이 신장세포(BGM cell)를 5×10^5 cells / 60mm dish이 되도록 분주하여 10% FBS/DMEM 배지로 배양하였다. 최종 농축액의 일정량(400 μ l / 60 mm)을 세포에 감염시켰다. 1시간 동안 감염시킨 뒤, 10% FBS/DMEM 배지를 첨가하여 바이러스 감염효과(Cytopathic effect, CPE)가 나타날 때까지 5-7일간 배양하였다(1차 배양). 1차 배양액을 수거하여, 2차 및 3차 감염을 통하여 세포 병변 현상을 관찰하여 감염성이 있는 바이러스 존재 유무를 진단하였다.

RT-PCR

바이러스 검출을 위한 프라이머는 polioviruses 및 coxsackieviruses 등의 장바이러스를 특이적으로 검출할 수 있는 5' UTR 부분의 염기서열[10,19]을 사용하였다. 200 μ l의 최종 농축시료와 1, 2, 3차 세포배양액 각각 200 μ l씩을 500 μ l의 GT (5M guanidium thiocyanate, 50 mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 8% 2-mercaptoethanol)와 섞은 후, phenol/chloroform법으로 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 70°C에서 3분간 가열하여 변성시키고, 미리 준비한 cDNA 합성혼합물(5x 반응 완충액, 3 mM dNTP, 150 pmol reverse primer (PEN-R), 250U M-MLV 역전사효소(Promega사)를 넣어 37°C에서 1시간동안 합성하였다. 95°C에서 5분간 열

을 가하여 반응을 종결시킨 다음 PCR을 위한 주형으로 사용하였다. PCR 반응액은 총 100 μ l [cDNA, 10x 반응 완충액, 1.5 mM MgCl₂, PEN-F, PEN-R 각각 50 pmol/ μ l, 5 U/ μ l Taq polymerase (Takara사), H₂O]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.

바이러스의 동정

위에서 얻은 PCR 산물을 pT7-blue T Vector (Takara)사에 클로닝하고 plasmid DNA를 추출하여 DNA autosequencer ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열의 분석은 GenBank에 의뢰하여 기존에 알려진 바이러스들의 염기서열과 유사성을 비교하였다.

결과 및 고찰

낙동강 원수로부터 감염성 바이러스의 검출

시료는 낙동강 수계 원수(원동, 매리 및 해동수원지) 3곳을 지정하여 총 12차례에 걸쳐 시료를 채취하였다(Fig. 1). 재료 및 방법에 설명된 방법에 따라서 200 L의 시료를 10 ml로 최종 농축하였다. 각 시료들은 먼저 세포배양 과정을

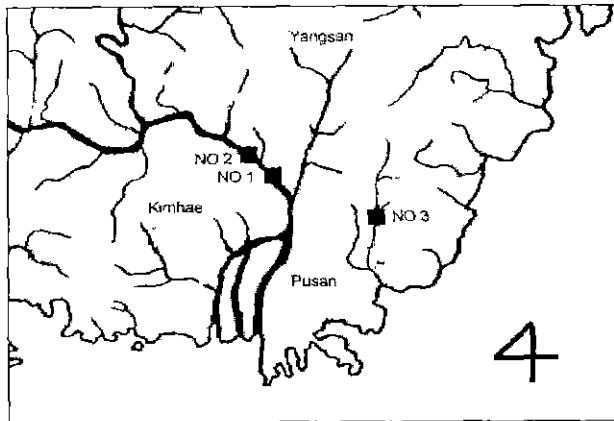


Fig. 1. Sampling positions for surveying of viruses in surface water. The positions of sampling sites are as follows; No 1: Maeri, No 2: Mulgum, and No 3: Heidong

거쳐서 감염성이 있는 바이러스의 존재유무를 조사하였고 모든 시료는 2차 배양 과정을 거쳤다. 1차 세포배양에서는 대부분의 시료들이 시료 자체에 함유된 세포독성물질에 의하여 비특이적인 세포 독성효과 및 세포 병변 현상을 나타내었다. 그러나 2차 배양과정에서는 4개의 시료를 제외하고는, 바이러스에 의한 특이적인 세포 병변 현상은 관찰되지 않았다(Fig. 2A).

RT-PCR법에 의한 바이러스 게놈의 검출

바이러스의 종류에 따라서 세포 병변 현상이 뚜렷하지 않는 경우도 있으므로 세포 병변 현상의 관찰만으로는 바이러스의 존재유무를 정확하게 판정하기가 어렵다. 따라서 보다 민감한 RT-PCR에 의하여 바이러스의 게놈을 검출함으로써 세포 배양액 내의 바이러스 존재 유무를 재확인하였다. 이러한 CC-PCR (combined cell culture-polymerase chain reaction) 결과에 의하면 세포배양법에서 세포 병변 현상을 나타내었던 시료에서만 특이적인 PCR 산물이 검출되었다(Fig. 2B와 Table 1). Sample 12의 경우에는 농축시료를 직접 PCR을 하였을 때에는 바이러스가 검출되었는데

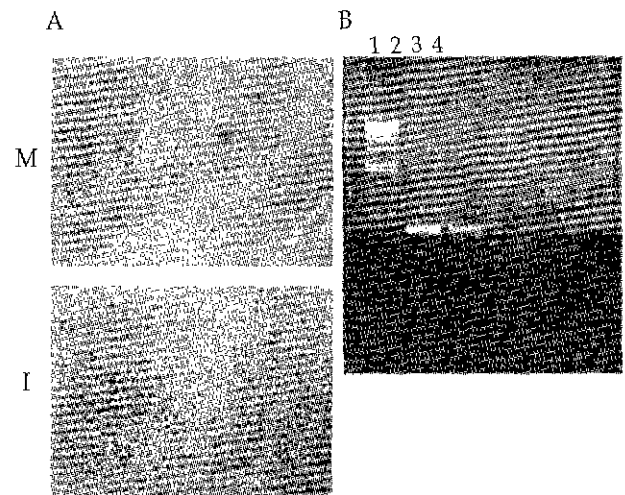


Fig. 2. Detection of enteroviruses from surface water. (A) BGM cells were either mock-infected (M) or infected with sample 1 derived from No 1 position (I). (B) The cell culture supernatants were examined for the presence of the enteroviruses by RT-PCR. The PCR templates were prepared from poliovirus type I (lane 2) and cell culture supernatants from either sample 1-treated (lane 3) or mock-infected (lane 4) BGM cells. Lane 1 shows the positions of size markers

Table 1. Summary of enterovirus survey in surface water during 1999-2000.

Sample number	Sampling date (date-month-year)	Sampling sites ¹	PCR reaction		MPN/100L ³
			RT-PCR	CC-PCR	
1	18-08-1999	No.1	+	+	250
2	31-08-1999	No.3	+	+	250
3	30-09-1999	No.2	+	+	100
4	19-10-1999	No.1	+	+	25
5	30-11-1999	No.2	-	-	ND ²
6	29-12-1999	No.3	-	-	ND
7	27-01-2000	No.1	-	-	ND
8	23-02-2000	No.2	-	-	ND
9	21-03-2000	No.3	-	-	ND
10	23-05-2000	No.2	-	-	ND
11	08-06-2000	No.3	+	-	ND
12	15-06-2000	No.1	-	-	ND
Total(%)			41.67%	33.3%	

¹The positions of the sampling sites are indicated in Fig. 1

²ND : not detected

³The number of virions was calculated as the most probable number of infectious units per 100 liters of water

CC-PCR을 통해서는 검출되지 않아 사멸되어 감염성을 상실한 바이러스가 존재하는 것 같다.

바이러스의 정량

농축 시료내 존재하는 바이러스의 양은 plaque assay 및 말단회석법에 의하여 결정되었으며 100리터 당 25-250 마리로 나타났습니다(Table 1). 바이러스의 양은 여름에 최대치를 나타내었으며 가을이 접어들면서 점차 감소되는 경향을 나타내었다.

바이러스의 동정

PCR에 의하여 얻어진 산물의 염기서열을 결정한 후 그 결과를 GenBank에 의뢰하여 상동성을 조사한 결과, 검출된 모든 바이러스들이 human poliovirus type 1 (accession number g332889)과 가장 높은 98%의 상동성을 나타내므로 human poliovirus type 1으로 동정되었다(Fig 3, Table 2).

요약

장바이러스(enterovirus)는 주로 어린아이에서 위장염, 감기, 고열의 주요 병인이다. 이들은 중추신경계의 급성 감염인 뇌수막염, 뇌염, 심근계의 만성감염인 심낭염, 심근염,

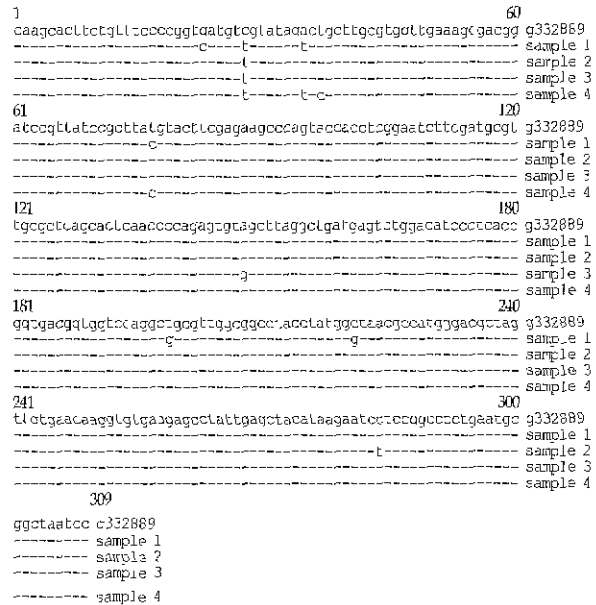


Fig. 3. Alignment of the nucleotide sequences of the enteroviruses isolated from the surface water. Sequence of the poliovirus type 1 (g332889) is shown as a reference. Matched nucleotides are represented by the dash and the nucleotide substitutions are indicated. Sample 1 and 4, sample 2, sample 3 are derived from No 1, No 3, and No 2, respectively.

Table 2. The comparison of the nucleotide sequence homology (%) of the isolated enterovirus (sample 1) with other known enteroviruses.

Compared viruses	Nucleotide sequence homology(%)
Human poliovirus type 1	98
Enterovirus 70 RNA	92
Coxsackievirus A21	90
Poliovirus type 2	89
Poliovirus type 3	88
Coxsackievirus A24	87

심막염의 주요인자로 알려져 있다. 환경 시료로부터 장바이러스를 검출하기 위해서 세포배양법에만 의존하는 EPA 법과는 달리 CC-PCR은 세포배양을 거친 시료를 대상으로 PCR을 실시함으로써 실험의 민감성과 정확성을 증진시켰다. 1999년부터 2000까지의 낙동원수에서 장바이러스 조사 결과에 따르면 12개의 시료중 4개의 시료에서 바이러스가 검출되었다. 원수 100 L당 바이러스의 수는 25~250 MPN 정도이고, 검출된 모든 바이러스는 poliovirus type I으로 동정되었다. 대부분의 바이러스가 주로 여름부터 초가을까지 검출되었기 때문에 수계 장바이러스의 분포가 계절적으로 차이가 있음을 보여주었다.

참 고 문 헌

1. Berg, G., H. Bodily, E. H. Lennette, J. L. Melnick, T. G. Metcalf. 1976. *Viruses in water*. American Public Health Association.
2. Bitton, G., S. R. Farrah, C. L. Momtague and E. W. Akin. 1986. Viruses in drinking water. *Environ. Sci. Tech.* **20**, 216-222.
3. 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.
4. 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.
5. Deetz, T. R., E. M. Smith, S. M. Goyal, C. P. Gerba, J. J. Vollet, L. Tsai, H. L. Dupont and B. H. Keswick. 1984. Occurrence of rota-and enterovirus in drinking

- water and environmental water in a developing nation. *Wat. Res.* **18**, 567-571.
6. Eaton, A. D., L. S. Clesceri and A. E. Greenberg. 1995. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19th ed., American Public Health Association, Baltimore, Maryland.
7. Gerba, C. P. and J. B. Rose. 1990. Viruses in source and drinking water, p385-401, In *Drinking Water Microbiology* (edited by McFeters, G. A.).
8. 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.
9. 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
10. Joseph L. Melnick *Virology*. 1996.
11. 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.
12. Kelly, A. R., P. G. Charles and L. P. Jan. 1996. Detection of Infectious Enteroviruses by an integrated cell culture - PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1424-1427.
13. 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.
14. Moore, M. 1982. From the centers for disease control : enteroviral disease in the United States, 1970-1979. *J. Infect. Dis.* **146**, 103-108.
15. Morteza 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.
16. 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.

17. Romero, J. R. and H. A. Rotbart. 1993. PCR detection of the human enteroviruses. In *Diagnostic Molecular Microbiology : Principles and Applications*. ASM Press, Washington, D.C. p401-406.
18. 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.
19. 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.
20. Sobsey, M. D. and B. L. Jones. 1979. Concentration of poliovirus from tapwater using positively charged microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 588
21. 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 transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2400-2407.
22. Wallis, C. and J. L. Melnick. 1960. Cationic stabilization a new property of enteroviruses. *Virology.* **16**, 683-700.
23. Zoll, G. J., M. J. G. Melchers, H. Kopecka, G. Jambroes, D. P. Van, H. J. A. and J. M. D. Galama. 1992. General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: amplification for diagnostic routine and persistent infections. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 160-165.