

Original article

지하수 중 *Aichivirus A* 모니터링을 위한 특이적 및 고감도 이중 역전사 중합효소연쇄반응 검출법 개발 및 평가

배경선^{1,†} · 김진호^{2,3,†} · 이시원⁴ · 이진영⁴ · 유경아^{1,*}

¹국립환경과학원 상하수도연구과, ²단국대학교 조직재생공학연구원
³단국대학교 과학기술대학 화학과, ⁴랩슬리코리아 R&D팀

Development and Assessment of Specific and High Sensitivity Reverse Transcription Nested Polymerase Chain Reaction Method for the Detection of *Aichivirus A* Monitoring in Groundwater. Kyung Seon Bae^{1,†} (0000-0001-6784-461X), Jin-Ho Kim^{2,3,†} (0000-0002-8775-9102), Siwon Lee⁴ (0000-0001-7552-7681), Jin-Young Lee⁴ (0000-0001-7736-2497) and Kyung-A You^{1,*} (0000-0002-2733-6829) (¹Water Supply and Sewerage Research Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Republic of Korea; ²Institute of Tissue Regeneration Engineering, Dankook University, Cheonan-Si, Chungnam 31116, Republic of Korea; ³Department of Chemistry, College of Science & Technology, Dankook University, Cheonan-Si, Chungnam 31116, Republic of Korea; ⁴R&D Team, LSLK Co., Gimpo, Gyeonggi 10111, Republic of Korea)

Abstract Human *Aichivirus A* (*Aichivirus A*; AiV-A) is a positive-sense single-strand RNA non-enveloped virus that has been detected worldwide in various water environments including sewage, river, surface, and ground over the past decade. To develop a method with excellent sensitivity and specificity for AiV-A diagnosis from water environments such as groundwater, a combination capable of reverse transcription (RT)-nested polymerase chain reaction (PCR) was developed based on existing reported and newly designed primers. A selective method was applied to evaluate domestic drinking groundwater samples. Thus, a procedure was devised to select and subsequently identify RT-nested PCR primer sets that can successfully detect and identify AiV-A from groundwater samples. The findings will contribute to developing a better monitoring system to detect AiV-A contamination in water environments such as groundwater.

Key words: RT-nested PCR, human *Aichivirus A*, AiV-A, groundwater

서 론

사람 아이치바이러스 (Human *Aichivirus A*; AiV-A)는 피코르나바이러스과에 속하는 비피막 및 단일 양성가닥

RNA 바이러스로, 1989년 일본에서 최초 보고된 후 아시아, 아프리카, 유럽 및 남아메리카 등 전 세계적으로 발생이 보고되고 있다 (Gerba *et al.*, 1996; Yamashita *et al.*, 2000; Tapparel *et al.*, 2013; Enserink *et al.*, 2015; Patil *et al.*, 2015). AiV-A는 조개류 및 음식물의 섭취, 오염된 물을 통해 분변-구강 경로로 사람에게 감염될 수 있고, 3~7일 정도의 잠복기를 가질 수 있으며, 급성위장염, 메스꺼움, 구토, 설사, 복통 및 열 등의 증상이 보고된 바 있다

[†]These two authors contributed equally to this work as co-first authors. Manuscript received 26 August 2021, revised 15 September 2021, revision accepted 16 September 2021
* Corresponding author: Tel: +82-32-560-8353, Fax: +82-32-563-7085
E-mail: angelka@korea.kr

(Yamashita *et al.*, 2001; Reuter *et al.*, 2009; Prevost *et al.*, 2015). Bergallo *et al.* (2017)에 따르면, 유관 증상 환자에서 AiV-A의 검출률은 유럽 약 0.5~0.9%, 아시아와 아프리카 약 4%로 보고되었고, 이것은 노로바이러스, 장아데노바이러스 등 다른 식품매개 수인성 장 바이러스에 비해 상대적으로 낮은 수준이었다(Kitajima and Gerba, 2015). 그러나 개발도상국뿐만 아니라 선진국까지 나타나는 전 세계적 발생 범위, 면역력이 약한 영유아, 노인 및 환자에게서 상대적으로 높은 감염률, 다른 식품매개 수인성 장 바이러스와의 높은 중복 감염률 등이 나타나는 AiV-A 특성과 함께 최근 하천, 호수, 지하수 등 물환경에서 보고가 이어짐에 따라 임상적 진단을 위한 검사법이 개발되고 있으며, 국내에서도 AiV-A 모니터링이 시도되고 있다.

바이러스를 모니터링 또는 진단하는데 사용되는 방법은 시료에서 추출한 total DNA 또는 RNA 등 핵산으로부터 병원체의 특정 핵산을 증폭하는 분자생물학적 기법이 적용되고 있다. 특히 환경 중 노로바이러스 등 수인성 바이러스 모니터링은 conventional polymerase chain reaction (C-PCR) 기반 RNA 바이러스의 경우 역전사-PCR (reverse transcription-PCR; RT-PCR), 장아데노바이러스 등 DNA 바이러스의 경우 PCR, 검출 민감도가 중요할 경우 nested PCR 등의 방법이 적용되고 있으며(NIER, 2016), A형 간염바이러스 등 일부 병원체는 real-time quantitative PCR (qPCR)도 함께 활용되고 있다. 최근 임상 등을 중심으로 real-time qPCR, 등온증폭반응법(loop mediated isothermal amplification), 차세대 염기서열 분석법(next generation sequencing) 등의 기법을 기반한 검사 기술이 연구개발 및 보고된 반면, C-PCR 기반의 RT-PCR 및 nested PCR은 상대적 오랜 기간 동안의 활용으로 사용자의 범위가 넓고, 실험의 재현성 등 안정성이 우수하며, 가격 경쟁력이 있는 등 지금까지도 널리 활용되고 있다(Pallen, 2014; Mohammad *et al.*, 2020). C-PCR 기반의 RT-PCR 또는 RT-nested PCR을 이용한 AiV-A 검사법은 기존 몇몇 연구자에 의해 보고된 바 있으나, 각 방법에 대한 검출 민감도와 특이도에 관한 비교, 환경으로의 적용성 등의 연구가 미흡한 상황이다. 특히 다양한 오염 및 저해물질이 포함된 환경 시료를 분석 시 우수한 검출 민감도 및 특이도가 요구되며, 표준 모니터링 기술로 활용 시 시료에 대한 적용성, 다른 병원체와의 검사법 통일로 인한 검사자에게 친화적 환경, 현장 진단 적용성(point-of-care diagnostics) 등이 고려되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 이러한 상황을 고려 및 문제점들을 보완하여 지하수 등 물환경에서 AiV-A 모니터링을 위해 적합한 방법을 개발 및 평가하였다.

재료 및 방법

1. 기존 시험법 및 새로운 프라이머 조합 제작

AiV-A를 특이적으로 검출하기 위한 RT-PCR 및 nested PCR 프라이머의 조합은 기존에 보고된 논문을 참고하여 선택하였다. 또한, AiV-A의 다양한 종을 검출할 수 있을 것이라 예상되는 새로운 프라이머를 연구자들이 널리 사용하는 Primer3 프로그램과 single letter code를 활용하여 설계하였다(Rozen and Skaletsky, 2000; Yamashita *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2006; Saikruang *et al.*, 2014; Yip *et al.*, 2014). 기존 프라이머의 선택과 새로운 프라이머 설계의 기준은 annealing 온도를 55°C로 일정하게 설정하기 위하여 Oligo Calculator version 3.27로 dimer, self annealing, potential hairpin formation 등을 활용하여 점검하였다(NIER, 2016).

2. 주형 핵산, 참고 바이러스 주 수집

특이도 시험에 사용될 AiV-A 주형 핵산은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공하는 NC_001918.1 3CD (6,038~8,011 [1,974 base pair; bp]) 유전정보를 마크로젠(Seoul, South Korea)에 의뢰하여 plasmid 형태로 유전자를 합성하였다. 비특이적 반응 연구에 활용할 참고 바이러스 주 핵산(DNA, RNA 또는 cDNA [virvell, Spain]; *Hepatitisvirus-A*, *Sapovirus*, *Parechovirus A*, enteric *Adenovirus 41*, *Rotavirus A*, *Enterovirus-71*, *Coxsackievirus-A6*, *Coxsackievirus-B1*, *Coxsackievirus-B5*, *Poliovirus*, *Echovirus 5* 및 *Echovirus 11*)과 linear 형태의 유전자(*Astrovirus* [JN887820; 3,800~6,685] 및 *Hepatitisvirus-E* [FJ763142.1; 5,293~6,460])를 수집하였다. RNA 형태로 수집된 바이러스 주는 ReverTra Ace- α -[®] (TOYOBO, Osaka, Japan)을 사용하여 cDNA로 합성하였다.

3. 프라이머 선발, PCR 반응 조성 및 조건

본 연구에서 특이적 증폭이 가능할 것으로 추정되는 PCR 프라이머 조합을 이용하여, 특이도 및 비특이도 분석과 검출 민감도 분석을 수행하였다. 검출 민감도 분석은 plasmid 형태로 합성된 AiV-A 3CD 유전자 1 ng μL^{-1} 를 원액(10^0)으로 사용하여 10배 단계로 10^{-8} 까지 희석한 후, 10^{-3} (1 pg μL^{-1})부터 10^{-8} (10 ag μL^{-1})의 농도로 희석된 주형을 1차 PCR 반응에 사용하였다. 1차 PCR은 실제 시료

를 사용할 경우 추출된 total RNA를 반응시키는 RT-PCR 과정이지만 프라이머 선발, 검출 민감도 및 특이도 분석에 사용할 주형의 경우 합성된 DNA를 사용하므로 1차 PCR 및 2차 PCR 반응 모두 AccuPower® HotStart PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였다. 1차 PCR 반응 후 합성된 DNA와 비특이 반응이 없는 프라이머 조합을 선 발하였고, 선발된 프라이머 조합의 1차 PCR 반응의 증폭 산물을 1/100으로 희석하여 2차 PCR (nested PCR) 반응의 주형으로 사용하였다. 1차와 2차 PCR의 반응 조성은 25 µM 농도의 PCR 프라이머 (정방향 및 역방향)를 각각 2 µL, 멸균증류수 17 µL를 kit에 첨가하였다. 그리고 합성된 DNA와 1차 PCR 증폭산물 1 µL를 각각의 PCR 반응에 사용하여 총 20 µL로 반응하였다. 1차와 2차 PCR 반응 조건은 95°C에서 5분 동안 초기 변성단계를 진행한 후, 95°C에서 45초간 변성, 55°C에서 1분간 결합, 72°C에서 1분간 신장하는 단계를 35회 반복하였으며, 최종 신장단계를 72°C에서 5분간 진행하였다.

4. 시료 채취 및 검정

국내 지하수에서의 AiV-A 검사를 위해 전국 소규모급수 시설과 마을상수도로 이용되는 지하수 시료(자료 미제공) 32개를 채취, 탈리 및 농축하였다. 시료 채취에 사용되는 하우스, 필터, 호스, 호일 등 모든 장비는 사전 멸균 후 사용하였으며, 현장에서도 토치를 이용 수도꼭지를 화염 멸균하고 염소를 이용하여 주변 소독을 실시하였다. 약 10분 이상 물을 흘려 안정화 후 pH, 온도, 탁도 및 잔류염소 등을 측정하였다. 이때 pH 8.0 이상일 경우 모듈에 0.1 M 염산 실린더를 연결하였고, 잔류염소가 측정될 경우 2% 티오황산나트륨을 물 3.8L당 10mL가 포함 될 수 있도록 하였으며, 탁도가 75 NTU 이상일 경우 하우스 필터 전에 전처리 필터를 연결하였다. 수압 30 psi 수준으로 약 500리터 이상의 지하수가 하우스 내 양전하 필터를 통과할 수 있게 하였다. 하우스에 물을 제거하고 별도 멸균된 호일과 비닐 등으로 감싸 시료별로 오염이 없도록 하며 아이스 박스에 담아 실험실로 이동하였다. 정압펌프, 쇠고기액기스 (beef extract, desiccated powder) 용액, 5 M 염화수소 용액, 염소 소독수, 2% 티오황산나트륨 용액, 0.15 M 인산나트륨 용액, 1 M 염산, 0.05 M 글라이신 등을 사용하여 하우스에서 바이러스를 탈리 및 농축하였으며, 최종 농축액은 20 mL로 하였으며 cryovial에 1 mL 씩 3개와 conical tube에 2개로 나누어 담아 -70°C 딥프리지에서 보관하였다. 그 밖의 내용은 국립환경과학원 고시 제 2017-50에 따라 수행하였다. 농축액 140 µL로부터 total RNA를 추출하기

위해 QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Germany)를 사용 및 메뉴얼에 따라 수행하였다. RT-PCR은 AccuPower® RT/PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea), nested PCR은 AccuPower® HotStart PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였다. 환경시료에서 나타나는 비특이적 반응을 억제하기 위해 SL® Non-specific reaction inhibitor (LSLK, Gyeonggi, Korea) 3 µL를 본 연구에서 프라이머 선발을 위해 사용된 반응 조성에 포함하여 최종 20 µL volume으로 반응하였다. One-step RT-PCR 반응 조건은 42°C에서 60분 동안 역전사 반응을 진행한 후, 프라이머 선발을 위해 사용된 반응 조건을 수행하였다.

5. 전기영동 및 염기서열분석

모든 PCR 증폭산물은 2.0% agarose gel을 사용하여 100 V에서 35분간 전기영동 후, Gel documentation system (Bio-Rad, California, USA)에서 확인하였다. 양성으로 추정되는 증폭 산물은 MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification kit를 사용하여 gel purification (iNtRON Biotechnology, Gyeonggi, Korea)을 수행한 후, 마크로젠 (Seoul, Korea)에 ABI 3730XL capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용한 염기서열 분석을 의뢰하여 결과를 확인하였다. 또한, 분석된 염기서열을 기초로 NCBI에서 제공하는 basic local alignment search tool (BLAST)로 유사성을 확인 및 계통수를 구축하여 최종 동정하였다 (Kitajima and Gerba, 2015; Kumthip *et al.*, 2020). 계통수 구축을 위해 AiV-A, B, C 및 아웃그룹으로 사용할 human *Norovirus* GII.17 염기서열을 NCBI로부터 수집하였고, BioEdit version 7.1.3 (Hall, 1999)을 사용하여 다중 염기서열 정렬하였다. MEGA software version 6.03을 이용하여 Maximum likelihood 및 Neighbor-joining tree를 구축하였으며 각각의 distance model로는 Tamura-Nei 및 Jukes-Cantor를 사용하였다 (Tamura *et al.*, 2013).

결 과

1. 프라이머 선발 및 제작

AiV-A에 특이적이며, hairpin 구조, dimer 및 self annealing 등의 문제가 나타나지 않고, 55°C annealing 온도에 부합하는 RT-PCR 및 nested PCR에 사용될 프라이머를 정방향 8개 및 역방향 5개의 PCR 프라이머를 각각 선발 및 제작하였다 (Table 1). 제작된 프라이머를 사용하여 RT-PCR

Table 1. Information of selected and newly designed primers for the detection of Aichivirus A.

Name	Sequence (5'→3')	Length (bp)	Location (Accession #: NC001918.1)		Reference
			Start	End	
FP1	ACACYCMACYTCMCGYCARTA	22	6,261	6,282	This study
FP2	RTACAAGGAYATGCGGCG	18	6,280	6,297	This study
FP3	ACTGGNMTACTGGTYTCT	18	6,323	6,340	This study
FP4	GACTTYCCMGGCTTNGTCGTBTG	23	6,398	6,420	This study
FP5	GACTTCCCCGGAGTYGTCGTCT	22	6,398	6,419	This study
FP6	ACACTCCCACCTCCCGCCAGTA	22	6,261	6,282	Yamashita <i>et al.</i> , 2000
FP7	GCCAGTACAAGGACATGCGG	20	6,276	6,295	Yip <i>et al.</i> , 2014
FP8	GACTTCCCCGGAGTCGTCT	22	6,437	6,459	Saikruang <i>et al.</i> , 2014
RP1	GACATCCGGTTGAYGTTGAC	20	6,644	6,663	This study
RP2	AGGATGGGGTGGATRGGGGCAGAG	24	6,550	6,573	Oh <i>et al.</i> , 2006
RP3	CGGTTGACGTTGACGCCAGG	20	6,638	6,657	Yip <i>et al.</i> , 2014
RP4	GACATCCGGTTGACGTTGAC	20	6,644	6,663	Saikruang <i>et al.</i> , 2014
RP5	GGAAGAGCTGGGTGTCAAGA	20	6,760	6,779	Yamashita <i>et al.</i> , 2000

Table 2. Combination of RT- and nested PCR primer sets for the detection of Aichivirus A.

Division	PCR type	Primer combination	Product size (bp)
RT-PCR primer set #1	RT-PCR	FP1 + RP1	403
RT-PCR primer set #2	RT-PCR	FP6 + RP5	519
Nested PCR primer set #1-1	Nested PCR	FP2 + RP1	384
Nested PCR primer set #1-2	Nested PCR	FP3 + RP1	341
Nested PCR primer set #1-3	Nested PCR	FP4 + RP1	266
Nested PCR primer set #1-4	Nested PCR	FP5 + RP1	266
Nested PCR primer set #1-5	Nested PCR	FP6 + RP2	313
Nested PCR primer set #2-1	Nested PCR	FP7 + RP3	382
Nested PCR primer set #2-2	Nested PCR	FP8 + RP4	266

용 프라이머 조합 2개와 nested PCR용 프라이머 조합 7개를 각각 구성하였다(Table 2).

2. RT-PCR 및 nested PCR 프라이머 선발

RT-PCR 프라이머의 조합 #1과 #2의 민감도를 분석하기 위해 10^{-3} ($1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$)부터 10^{-8} ($10 \text{ ag } \mu\text{L}^{-1}$)의 농도로 희석된 주형 유전자를 반응에 사용하였다. 그 결과 #1과 #2에 대하여 403 bp와 519 bp로 각각 예상된 크기의 증폭 산물이 전기영동으로 확인되었으며, 두 조합 모두 10^{-4} 까지의 검출 민감도를 보였다(Fig. 1A). 그 후 두 조합의 프라이머를 14종의 참고 바이러스를 이용하여 특이도를 검증하였

다. 그 결과 모든 참고 바이러스 중에서 반응이 일어나지 않았으므로 AiV-A에 특이적이라 추정하고 #1과 #2의 조합을 RT-PCR 프라이머로 선발하였다(Fig. 1B).

RT-PCR 프라이머 #1의 증폭 산물을 사용하여 nested PCR이 가능한 프라이머 조합 5개(#1-1, #1-2, #1-3, #1-4 및 #1-5)와 RT-PCR 프라이머 #2 증폭 산물의 사용이 가능한 nested PCR 조합 2개(#2-1 및 #2-2)를 구성하였고, 1/100로 희석된 RT-PCR 증폭 산물을 각각 사용하여 실험을 수행하였다. 그 결과 #1의 증폭 산물을 이용한 nested PCR은 모든 조합에서 민감도 및 특이도 실험에서 비특이 반응을 보이는 증폭 산물이 확인되었다(Fig. 2A). 따라서, RT-PCR #1 증폭 산물을 사용하는 nested PCR 프라이

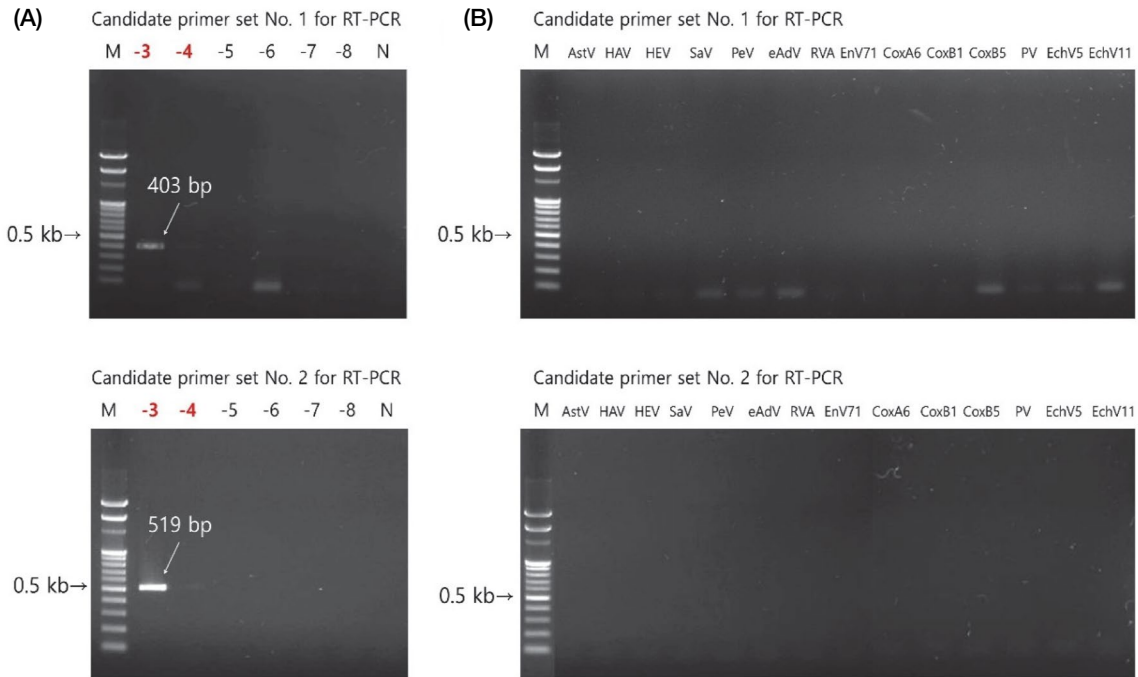


Fig. 1. Sensitivity and specificity test of candidate RT-PCR primer sets for detection of Aichi virus. (A) Results of sensitivity test using 10-fold serially diluted template. (B) Results of specificity test using reference viruses. M, 100 bp Ladder marker (Enzymomics, Korea); -3~-8, 10-fold serially diluted template from 1 ng μL^{-1} AiV plasmid; N, negative control; AstV, *Astrovirus*; HAV, *Hepatitisvirus A*; HEV, *Hepatitisvirus E*; SaV, *Sapovirus*; PeV, *Parechovirus*; eAdV, enteric *Adenovirus 41*; RVA, *Rotavirus*; EnV71, *Enterovirus 71*; CoxA6, *Coxsackie A6*; CoxB1, *Coxsackie B1*; CoxB5, *Coxsackie B5*; PV, *Poliovirus*; EchV5, *Echovirus 5*; EchV11, *Echovirus 11*.

며 조합은 모두 제외하였다. 하지만 RT-PCR #2와 조합된 nested PCR의 경우 1개의 프라이머 조합(#2-2, 266 bp)에서 참고 바이러스 종과 비특이 반응이 없으며, 10^{-4} 까지 민감도를 보인 조합을 선발할 수 있었다(Fig. 2B).

3. 음용 지하수 시료를 이용한 검사법 검증

음용 지하수 시료 32개의 최종 농축액으로부터 추출된 total RNA를 사용하여 선발된 RT-nested PCR 프라이머 조합 #2-2를 검증하였다. 그 결과, RT-PCR에서는 양성 대조구를 포함한 모든 시료가 증폭되지 않았으며, nested PCR에서 증폭 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 3A, B).

비특이 반응을 보이는 시료는 2개(1과 23번)가 확인되었고, 양성으로 추정되는 시료는 총 3개(3, 5 및 16번)가 확인되었다(Fig. 3B). 하지만 양성 추정 시료 중 2개 시료(3 및 16번)의 경우 증폭 산물의 농도가 높지 않아 염기서열분석을 진행하지 못하였다. 따라서, 1개의 양성 추정 시료, 2개의 비특이 반응 시료 및 양성대조구의 증폭 산물은 생어 염기서열분석법(Sanger sequencing)을 통해 최종적으로 염기서열을 확인하였다. 그 결과, 비특이 반응을 보인 2

개의 시료는 RT- 및 nested PCR primer로 염기서열분석이 되지 않아 음성으로 판정할 수 있었다. 하지만, 5번 시료의 경우 nested PCR의 정방향 프라이머에 의해 염기서열을 분석할 수 있었다. 분석된 염기서열은 총 249 bp로 NCBI BLAST 결과 *Aichivirus* isolate 1149 (JN584164.1) 등 7개의 종과 Max Score 394, Query Cover 88, Per. Identity 99.09%로 나타나 *Aichivirus A*로 동정 될 수 있었다. 마지막으로, Phylogenetic analysis 결과는 *Aichivirus A*로 확정 동정 되었으며, 그중 세부 유전자형은 Genogroup A로 확인되었다(Fig. 4).

고 찰

본 연구에서는 물환경에서 AiV-A의 고감도 특이적인 검출을 위한 분자생물학적 검사법을 평가 및 개발하여 음용 지하수에서 모니터링하는 방법을 모색하고자 RT-nested PCR을 적용하였다. Pham *et al.* (2007)과 Yamashita *et al.* (1998)의 보고와 같이 AiV-A의 3CD 유전자 지역은 환경 시료에서의 모니터링에 활용 및 유전자형 분석 등을 하기

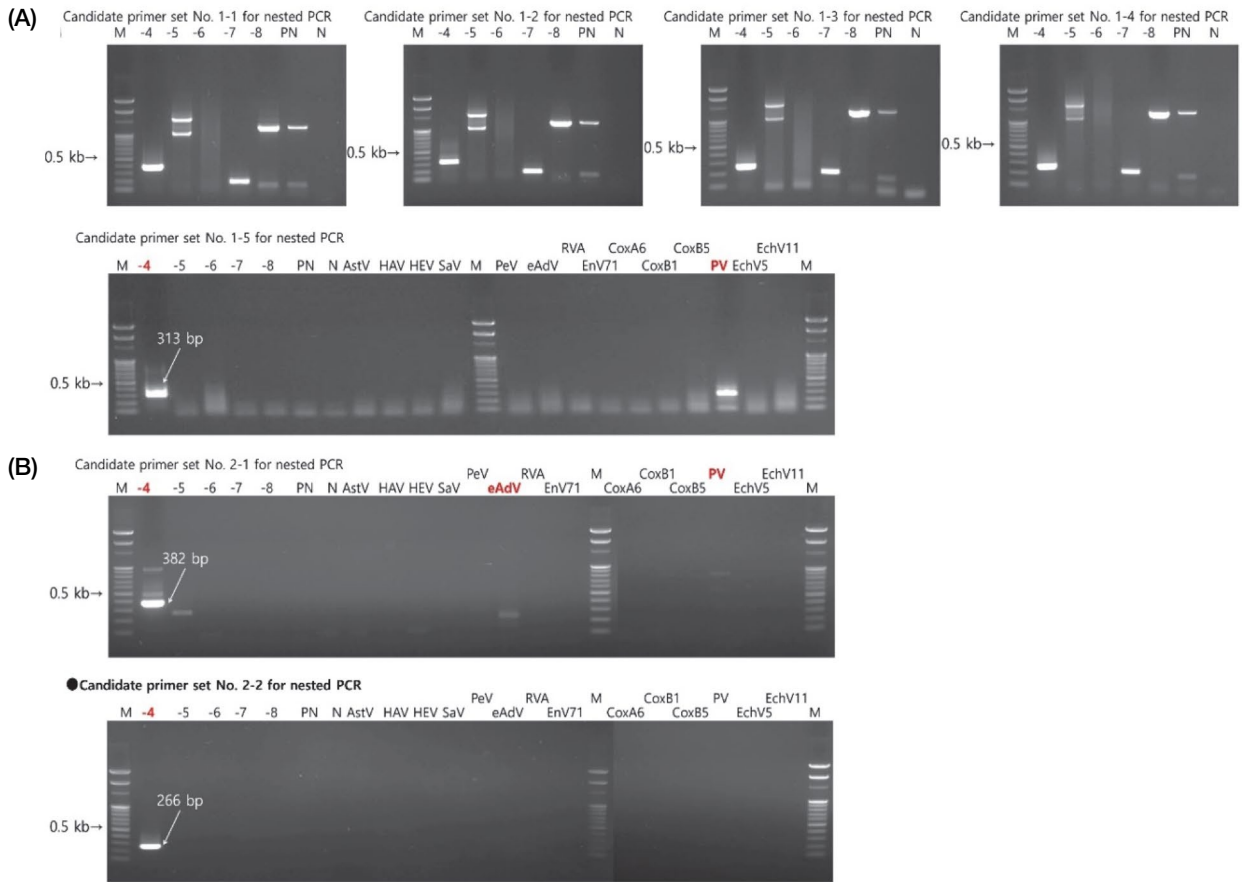


Fig. 2. Results of sensitivity and/or specificity test of candidate nested PCR primer sets for detection of Aichi virus using RT-PCR products from 10^{-4} to 10^{-8} and/or references of candidate primer set 1 or set 2. M, 100 bp Ladder marker (Enzygnomics, Korea); -3~-8, 10-fold serially diluted template from $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ AiV plasmid; PN, RT-PCR negative control; N, negative control; AstV, *Astrovirus*; HAV, *Hepatitisvirus A*; HEV, *Hepatitisvirus E*; SaV, *Sapovirus*; PeV, *Parechovirus*; eAdV, enteric *Adenovirus 41*; RVA, *Rotavirus*; EnV71, *Enterovirus 71*; CoxA6, *Coxsackie A6*; CoxB1, *Coxsackie B1*; CoxB5, *Coxsackie B5*; PV, *Poliovirus*; EchV5, *Echovirus 5*; EchV11, *Echovirus 11*.

에 적합하며, 본 연구에서도 해당 부분을 대상으로 하였다. 검사법 개발을 위해 기존 보고된 연구와 새롭게 개발된 프라이머를 사용하여 디자인 및 재조합하여 총 7개 조합 중 최종 1개의 조합을 선발하였으며, 선발된 프라이머 조합은 Saikruang *et al.* (2014)이 보고한 조합과 같다. 새롭게 디자인한 프라이머 등 연구에서 활용된 몇몇 프라이머는 환경 내 잠재적으로 존재하는 AiV-A 내에서도 다수의 하위 strains를 검출하기 위해 letter code를 적용하였으나 알 수 없는 비 특이적 반응이 다수 나타남에 따라 적용 및 활용 측면에서 불리하다고 판단하였다. 그러나 이번 연구에서는 보고된 프라이머 조합들을 포함한 조성물을 조절하여 고감도 특이적으로 지하수 시료에서 AiV-A를 성공적으로 검사 및 동정할 수 있었고, 이는 최근 Bergallo *et al.* (2017)의 논문에서도 보고 하였듯이 4% 이내의 검사율을 보였다. 추정 밴드의 유사성 및 계통수 구축 등으로 지하수에

서 AiV-A 모니터링을 위한 최종 동정 과정을 검증하였다. 또한 다른 식품매개 수인성 장 바이러스 검출 방법(NIER, 2016)과 동일한 RT-PCR 및 nested PCR 조건을 사용함에 따라 검사자 등 사용자가 동일 시료에서 여러 병원체 검출에 대한 편리함을 제공하였다.

AiV-A는 하수, 강, 지표수 및 지하수에서 검출되고 있으며, 미국, 유럽, 아시아를 포함하여 전 세계적으로 보고되고 있다(Rivadulla and Romalde, 2020). 특히 일본에서는 조개 시료 26개 중 19개에서 *Aichivirus A*가 검출(약 73%)되었으며, 강물 시료 60개 중 36개에서 A와 B형의 *Aichivirus*가 검출(약 60%)이 되었다(Hansman *et al.*, 2008; Kitajima *et al.*, 2011). 이와 같이 바이러스 출현과 감염사례의 보고들은 물환경에서 AiV-A 등의 식품매개 수인성 장 바이러스에 대한 모니터링 필요성을 시사하며, 이에 대응하여 환경에 적용될 수 있는 표준 검사법 마련이 필요

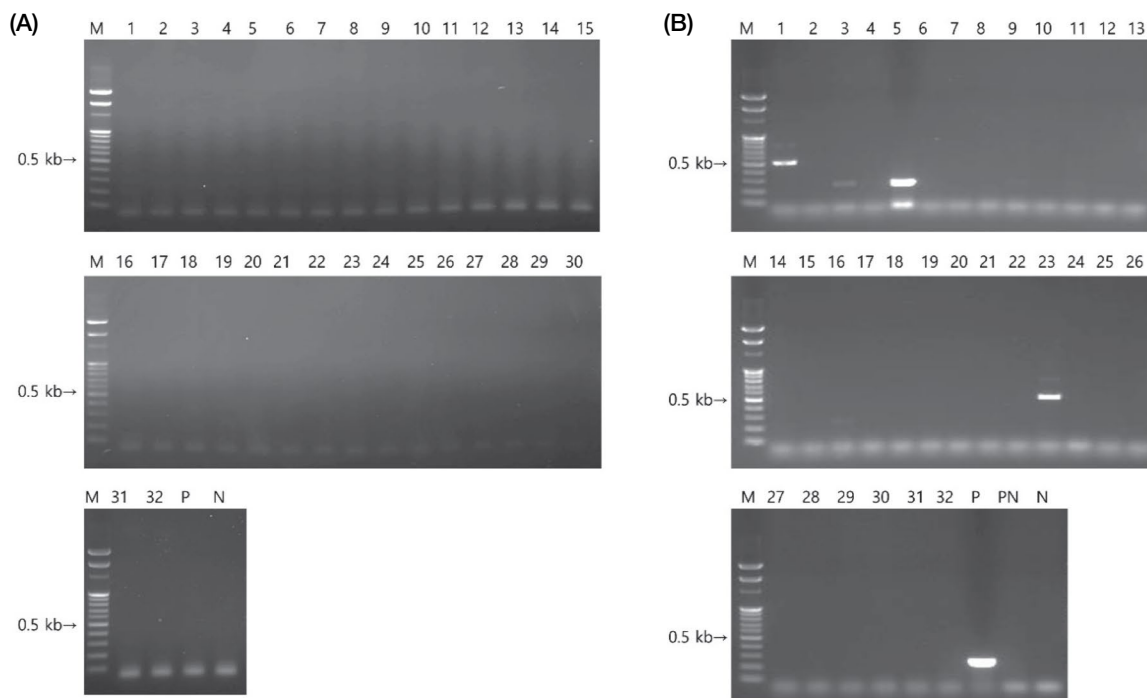


Fig. 3. Result of groundwater sample tests by using developed RT-nested PCR method in this study. (A) RT-PCR result by using candidate primer set 2 for RT-PCR. (B) Nested PCR result by using candidate primer set 2-2 for nested PCR. 1~32, number of groundwater samples; M, 100 bp Ladder marker (Enzymomics, Korea); P, 10 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ Aichi virus plasmid; PN, RT-PCR negative control; N, negative control.

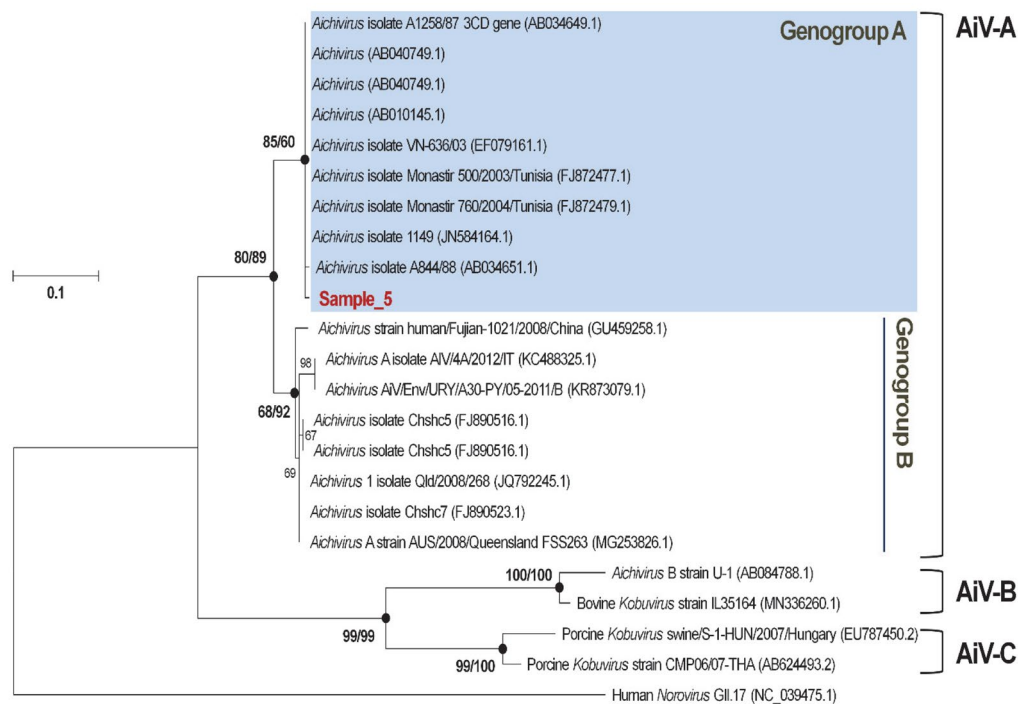


Fig. 4. Maximum likelihood (using the Tamura-Nei distance model) tree showing the phylogenetic position of sample #5 (presumed to *Aichivirus A*) based on a nucleotide sequences from RT-nested PCR product. Closed circle represents that the corresponding branches were also recovered in the Maximum likelihood and Neighbor-joining (using the Jukes-Cantor distance model) trees. Bootstrap values are less than 50 based on 1,000 replications are shown. Human *Norovirus* GII.17 (NC_039475.1) was used as an out group. Bar, 0.1 nucleotide substitutions.

해 보인다. 본 연구를 통해 지하수에서 AiV-A 모니터링을 위한 효과적 프라이머 선별 및 검사법을 개발 및 평가하였다. 그러나 향후 활용과 정확한 검사율을 확인하기 위해서는 더 많은 지하수 시료에서 다양한 계절 및 지역 별로 모니터링 해볼 필요성이 있다. 이번 연구에서 평가한 검사법은 향후 해당 연구 분야에서 효과적인 검사법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

사람 아이치바이러스(Aichivirus A; AiV-A)는 positive-sense single-strand RNA 비외피 바이러스로 지난 10년 동안 하수, 강, 지표 및 지상의 다양한 물환경에서 전 세계적으로 검출이 보고되고 있다. 지하수 등 물환경에서 AiV-A 진단을 위한 고감도 및 특이성이 우수한 방법의 개발이 요구됨에 따라, 본 연구에서는 기존 및 신규 설계된 프라이머 세트를 기초로 역전사(RT) 및 이중 중합효소연쇄반응이 가능한 조합을 개발하였다. 개발한 방법을 국내 음용 지하수 시료에 적용 및 평가하였으며, 그 결과 지하수 시료에서 AiV-A를 성공적으로 검출 및 동정할 수 있는 RT-nested PCR primer sets가 선정되었고 후속적으로 동정할 수 있는 절차가 고안되었다. 본 연구 결과는 지하수 등 물환경에서 AiV-A 오염을 탐지하기 위한 모니터링 시스템 마련에 기여할 것으로 기대된다.

저자정보 배경선(국립환경과학원 상하수도연구과 전문연구원), 김진호(단국대학교 조직재생공학연구원 및 과학기술대학 화학과 박사후연구원), 이시원(랩슬리코리아 연구소장), 이진영(랩슬리코리아 선임연구원), 유경아(국립환경과학원 상하수도연구과 환경연구원)

저자기여도 개념설정: 유경아, 방법론: 유경아, 분석: 배경선, 김진호, 이진영, 자료제공: 유경아, 이시원, 자료관리: 유경아, 이시원, 원고 초안작성: 유경아, 배경선, 김진호, 이시원, 이진영, 원고 교정: 유경아, 배경선, 김진호, 이시원, 원고 편집: 유경아, 배경선, 김진호, 이시원, 과제관리: 유경아, 연구비 수주: 유경아

이해관계 이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

연구비 본 연구는 환경부의 재원으로 국립환경과학원의 지원을 받아 수행하였습니다(NIER-2020-01-01-003).

REFERENCES

Bergallo, M., L. Galliano, P. Montanari, M. Rassa and V. Daprà.

2017. Aichivirus in children with diarrhea in Northern Italy. *Intervirology* **60**: 196-200.

- Enserink, R., C. van den Vijngaard, P. Bruijning-Verhagen, L. van Asten, L. Mughini-Gras, E. Duizer, T. Kortbeek, R. Sxholts, N. Nagelkerke, H.A. Smit, M. Kooistra-Smid and W. van Pelt. 2015. Gastroenteritis attributable to 16 enteropathogens in children attending day care: significant effects of rotavirus, norovirus, astrovirus, Cryptosporidium and Giardia. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **34**: 5-10.
- Gerba, C.P., J.B. Rose and C.N. Hass. 1996. Sensitive population: who is at the greatest risk? *International Journal of Food Microbiology* **30**: 113-123.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hansman, G.S., T. Oka, T.C. Li, O. Nishio, M. Noda and N. Takeda. 2008. Detection of human enteric viruses in Japanese clams. *Journal of Food Protection* **71**: 1689-1695.
- Kitajima, M., E. Haramoto, C. Phanuwat and H. Katayama. 2011. Prevalence and genetic diversity of aichi viruses in wastewater and river water in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 2184-2187.
- Kitajima, M. and C. Gerba. 2015. Aichi virus 1: environmental occurrence and behavior. *Pathogens* **4**: 256-268.
- Kumthip, K., P. Khamrin, A. Yodmeeklin and N. Mannekarn. 2020. Prevalence and genetic characterization of aichivirus in environmental waters in Thailand. *Food Environmental Virology* **12**: 342-349.
- Mohammad, H.A., N.M. Madi and W. Al-Nakib. 2020. Analysis of viral diversity in stool samples from infants and children with acute gastroenteritis in Kuwait using Metagenomics approach. *Virology Journal* **17**: 10.
- NIER. 2016. Development and verification of genetically diagnostic method for the detection of non-regulated viruses from water environment (I). National Institute of Environmental Research, Incheon, Korea. p. 1-21.
- Oh, D.-Y., P.A. Silva, B. Hauroeder, S. Diedrich, D.D.P. Cardoso and E. Schreier. 2006. Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. *Archives of Virology* **151**: 1199-1206.
- Pallen, M.J. 2014. Diagnostic metagenomics: potential applications to bacterial, viral and parasitic infections. *Parasitology* **141**: 1856-1862.
- Patil, P.R., S.D. Chitambar and V. Gopalkrishna. 2015. Molecular surveillance of non-polio enterovirus infections in patients with acute gastroenteritis in Western India: 2004-2009. *Journal of Medical Virology* **87**: 154-161.
- Pham, N.T., P. Khamrin, T.A. Nguyen, D.S. Kanti, T.G. Phan, S. Okitsu and H. Ushijima. 2007. Isolation and molecular characterization of aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand and Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2287-2288.
- Prevost, B., F.S. Lucas, A. Goncalves, F. Richard, L. Moulin and

- S. Wurtzer. 2015. Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environment International* **79**: 42-50.
- Reuter, G., A. Boldizsar, G. Papp and P. Pankovics. 2009. Detection of aichi virus shedding in a child with enteric and extraintestinal symptoms in Hungary. *Archives of Virology* **154**: 1529-1532.
- Rivadulla, E. and J.L. Romalde. 2020. A comprehensive review on human aichi virus. *Virologica Sinica* **35**: 501-516.
- Rozen, S. and H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* **132**: 365-386.
- Saikruang, W., P. Khamrin, B. Suantai, H. Ushijima and N. Maneekarn. 2014. Molecular detection and characterization of Aichivirus A in adult patients with diarrhea in Thailand. *Journal of Medical Virology* **86**: 983-987.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.
- Tapparel, C., F. Siegrist, T.J. Petty and L. Kaiser. 2013. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human disease. *Infection, Genetics and Evolution* **14**: 282-293.
- Yamashita, T., K. Sakae, H. Tsuzuki, Y. Suzuki, N. Ishikawa, N. Takeda, T. Miyamura and S. Yamazaki. 1998. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. *Journal of Virology* **72**: 8408-8412.
- Yamashita, T., M. Sugiyama, H. Tsuzuki, K. Sakae, Y. Suzuki, and Y. Miyazaki. 2000. Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of aichi virus, a new member of the Picornaviridae family associated with gastroenteritis in humans. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 2955-2961.
- Yamashita, T., M. Ito, H. Tsuzuki and K. Sakae. 2001. Identification of Aichi virus infection by measurement of immunoglobulin responses in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 4178-4180.
- Yip, C.C.Y., K.L. Lo, T.L. Que, R.A. Lee, K.H. Chan, K.Y. Yuen, P.C.Y. Woo and S.K.P. Lau. 2014. Epidemiology of human parechovirus, Aichi virus and salivirus in fecal samples from hospitalized children with gastroenteritis in Hong Kong. *Virology Journal* **11**: 182.