

Evaluation of Proposed Diagnostic System for Detection of Pan-enterovirus Using Reverse Transcription Nested PCR from Water Environment

Siwon Lee^{1,§,*}, Kyung Seon Bae^{2,**}, Jin-Ho Kim^{3,4,§,**}, Ji-Hyun Park^{2,***}, Ji Hye Kim^{2,**},
Ji-Yeon Park^{4,****}, Kyung-Jin Lee^{4,****}, Chae-Rin Jeon^{1,5,*****}, Jeong-Ki Yoon^{2,*****},
Soo-Hyung Lee^{2,*****} and Eung-Roh Park^{2,†,**}

¹R&D Team, LSLK Co. Ltd., Gimpo 10111, Korea

²Water Supply and Sewerage Research Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Korea

³Institute of Tissue Regeneration Engineering (ITREN), Dankook University, Chunam 31116, Korea

⁴Department of Chemistry, College of Science and Engineering, Dankook University, Chungnam 31116, Korea

⁵School of Biopharmaceutical and Medical Sciences, Health & Wellness College,
Sungshin Women's University, Seoul 01133, Korea

Pan-Enterovirus (Pan-EV) infects millions of children and infants worldwide every year. As severe infections have recently been reported, the need for monitoring has consequently intensified. Pan-EV is a categorical name for waterborne enteroviruses belonging to the Picornaviridae family, and includes a wide range of pathogens including Coxsackievirus (CoxV), Echovirus (EcoV) and Enterovirus (EV). In this study, we proposed an optimal RT-nested PCR method for diagnosis of various types of Pan-EV in an aquatic environment and developed a positive control. Considering detection sensitivity, specific reaction, and final identification, one condition capable of amplifying 478 bp among the four candidates in the 1st round PCR (RT-PCR) and one condition in the 2nd round PCR (nested PCR) were selected. Through the detection of nucleic acids extracted from 123 groundwater samples and the detection sensitivity test based on artificial spiking in the sample, the methods are optimal for non-disinfected water samples such as groundwater. We developed a positive control for Pan-EV detection that can be amplified to different sizes under the two conditions. Accuracy could be further improved by testing for contamination from the control group. The method proposed in this study and the positive control developed are expected to be used in monitoring Pan-EV in aquatic environments including groundwater through future research using more samples.

Key Words: Groundwater, Pan-enterovirus, Pan-EV, Picornaviridae, RT-nested PCR

서 론

수인성바이러스는 수계 환경 내 존재하는 잠재적 및 기회주의적 병원체로 약 150종이 보고되고 있다. 그리고

이 바이러스는 오염된 물, 음식, 사람 등을 통해 분변-구강 경로 전파하여 사람에게 위장염, 간염, 수막염, 발열, 발진 및 결막염 등 질병의 원인이 된다(Bosch, 1998; Leclerc et al., 2000; NIER, 2016, 2017). 따라서 수인성바이러스 감염 의심 증상 환자의 진단 이외에도 수인성바이

Received: March 29, 2023 / Revised: April 19, 2023 / Accepted: April 21, 2023

*Research director, **Researcher, ***Senior Researcher, ****Graduate student, *****Undergraduate student, *****Director.

§These two authors contributed equally to this work as co-first authors.

†Corresponding author: Eung-Roh Park. Water Supply and Sewerage Research Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Korea. Tel: +82-32-560-8347, Fax: +82-32-563-7085, e-mail: erpark@korea.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. The sequence of primer sets of RT-PCR and nested PCR for detection of Pan-enterovirus using in this study

PCR type	Candidate set #	PCR primer information							Expected size of product (bp)	References
		Target gene	Name	Sequence (5'→3')	Length (nt)	Start	End	NCBI accession #		
RT-PCR	#1	5'UTR	Primer 1	CAAGCACTTCTGTTCCCGG	21	157	177		433	Zoll et al., 1992
			Primer 3	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	20	570	589			
	#2	5'UTR	Primer 1 (modified)	CAAGCACTTCTGTTWCCCGG	21	157	177	MH716256.1	478	Zoll et al., 1992 (Modified)
			EntR (EV-R)	ACCGGATGGCCAATCAA	18	617	634			US EPA, 2014
	#3	VP3	224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	20	1,927	1,946	U22521	972	Chiang et al., 2012
		VP1	222	CICIGGIGGIAYRWACAT	19	2,916	2,898			
	#4	VP1	AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	26	2,570	2,595		577	
			AN88	TACTGGACCACCTGGNGNAYRWACAT	27	3,116	3,146			
	Nested PCR [Based on RT-PCR candidate #2]	5'UTR	EntF (EV-L)	CCTCCGGCCCCTGAATG	17	439	455	MH716256.1	196	US EPA, 2014
			EntR (EV-R)	ACCGGATGGCCAATCAA	18	617	634			

Abbreviation: EPA, Environmental Protection Agency

리스 발생을 예방하기 위하여 음용 및 비음용 지하수, 소규모 수도시설 등 비 소독수 등을 중심으로 한 급수 취약시설의 지속적 감시 체계 운영 등 관리가 요구된다 (Moore, 1993; Lee and Jeong, 2004; NIER, 2017). 이 중 주로 여름과 초가을에 발생하는 Pan-Enterovirus (Pan-EV)는 매년 세계적으로 소아와 영유아에서 수백만명의 감염을 일으키며 최근에는 중증 감염증도 보고되어 적극적인 따라 모니터링의 필요성이 제기되고 있다(NIER, 2016). Pan-EV는 피코나바이러스(Family picornaviridae)로 분류되는 수인성 장바이러스의 범주적 명칭으로 *Coxsackievirus* (CoxV), *Echovirus* (EcoV) *Enterovirus* (EV) 등 넓은 범위 및 다양한 병원체 종류가 포함된다(ICTV, 2017, 2019). 그 동안 Pan-EV를 진단하기 위한 방법은 검출 민감도와 후속 염기서열 분석으로 원인 바이러스를 동정하는 reverse transcription (RT)-nested polymerase chain reaction (PCR)이 몇몇 연구자들에 의해 개발 및 활용되었으나, 각 방법들의 Pan-EV 내 넓은 범위의 종류에 대한 진단 가능성과 비교 및 지하수 등 비 소독수에서의 적용성에 대한 비교 연구는 미흡하였다(Zoll et al., 1992; Chiang et al., 2012; United States Environmental Protection Agency (US EPA, 2014)). 따라서 본 연구에서는 수계 환경으로부터 Pan-EV 진단을 위한 최적 RT-nested PCR 방법과 양성대조물질을 개발하였다.

재료 및 방법

수인성바이러스 *Coxsackievirus* (CoxV-A6, A24, B1 및 B5), *Echovirus* (EcoV-5, 11), EV-71 및 *Reovirus* (ReV)의 핵산들은 환경부 국립환경과학원을 통해 수집 후 ReverTra Ace- α -® (Toyobo, Japan)으로 cDNA 합성하였으며, *Norovirus*-GII (NoV-GII; KX356908 기준 939 nt), *Orthoreovirus* (OrV; NC_013231.1 기준 830 nt), *Parechovirus*-A (PeV-A; NC_001897.1 기준 1237 nt), *Poliovirus*-type3 (PV-type3; AY184221.1 기준 983 nt) 및 *Sapovirus* (SaV; KP298674.1 기준 2,000 nt)는 Macrogen Co. Ltd. (Seoul, Korea)에서 합성을 하였다.

수계 환경에서 Pan-EV 진단을 위해 활용되는 일반 RT-PCR 4개 방법을 대상으로 하였다(Table 1). 합성 핵산 또는 cDNA를 활용하여 정성적 비교를 위한 검출 민감도 및 특이적 반응을 확인하기 위해 Pan-EV 핵산을 10배 단계 희석하였다. Pan-EV에 포함되지 않는 바이러스 핵산의 비 특이적 반응을 확인하기 위해서 각 핵산들의 원액으로부터 10^3 희석액(i.e. 합성한 핵산의 경우 1 ng/ μ L를 기준으로 1,000배 희석한 1 pg/ μ L)을 사용하였다. PCR 조성은 AccuPower® HotStart PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea) kit, 정방향 및 역방향 PCR 프라이머 각 25 p 1 μ L, 주형 핵산 1 μ L, 멸균 증류수 17 μ L로 총 20 μ L로 하였고,

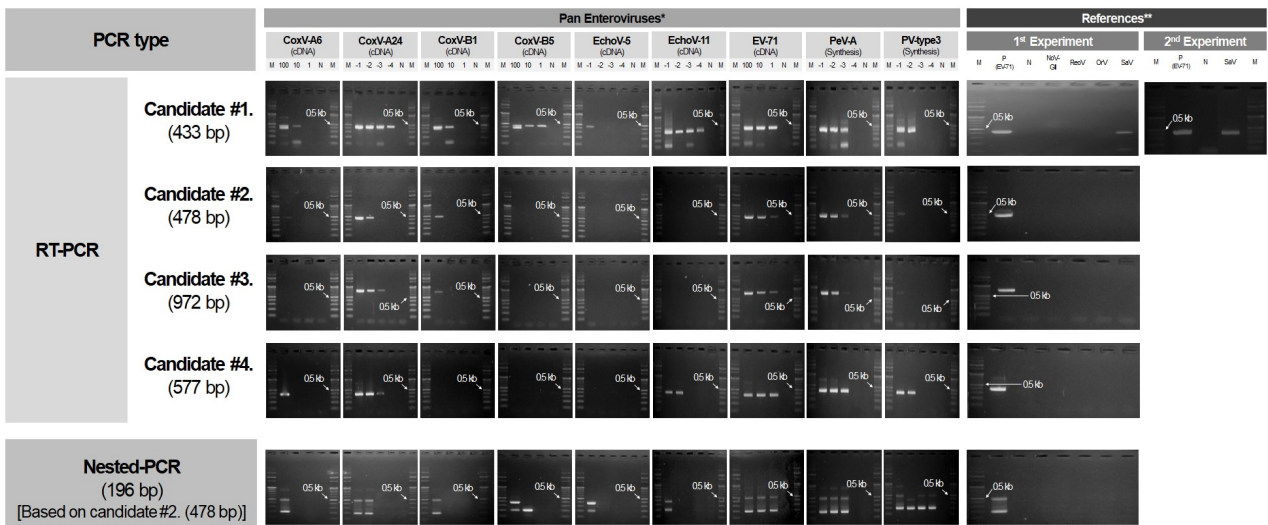


Fig. 1. Sensitivity based specific reaction of RT-PCR candidates and nested PCR methods. Abbreviations: CoxV, Coxsackievirus; EcoV, Echovirus; EV, Enterovirus; PeV-A, Parechovirus-A; PV-type3, Poliovirus-type3; NoV-GII, Norovirus-GII; ReoV, Reovirus OrV, Orthoreovirus; SaV, Sapovirus; M, 100 bp Ladder marker (Enzymomics, Korea); lane 100, 10 and 1, viral copies; -1 ~ -4; dilution rate based on 1 ng/μL; P, positive control; N, negative control.

PCR 조건은 각 참고문헌의 방법과 동일하게 하였으며, Zoll et al., 1992 (Modified)와 US. EPA, 2014 두 가지 논문을 참고하여 조합한 프라이머인 candidate #2만 95°C, 5분, 35회 반복(95°C 45초, 55°C 60초 및 72°C 60초) 및 72°C, 5분으로 하였다(Lee et al., 2021a).

결 과

Pan-EV로 분류되는 9종에 특이적 반응 결과, candidate #1 (Zoll et al., 1992)은 모든 바이러스를 우수한 민감도로 검출할 수 있었으나, 크기의 대상 크기보다는 작지만 유사 수준의 SaV의 경우 비 특이적 반응이 나타났다(Fig. 1). Candidate #2 [Zoll et al., 1992 (Modified)]; US EPA, 2014]와 #4 (Chiang et al., 2012)는 9종 중 6종의 특이적 반응, Candidate #3 (Chiang et al., 2012)은 5종, Candidate #3 (Chiang et al., 2012)은 5종에서 각각 특이적 반응이 나타났으며 비 Pan-EV에서는 반응이 나타나지 않았다(Fig. 1). 한편, 비 소독수로부터 수인성바이러스 검출을 위해서는 일반 PCR을 이용할 경우 높은 민감도가 요구되므로 nested PCR을 적용하였다(Lee et al., 2021a, 2021b). 수계 환경에서 검출된 Pan-EV 단편을 활용한 중 동정 등 비교 연구를 위해서는 기존 US-EPA에서 활용 중인 프라이머의 적용을 우선 고려하였으며 이에 따라 RT-PCR로 활용

이 가능한 candidate #2가 선택되었다. Candidate #2 산물들을 주형으로 PCR과 동일한 조건으로 Pan-EV의 5'UTR을 증폭할 수 있는 nested PCR을 수행하였다(US EPA, 2014) (Table 1). 그 결과 Pan-EV 9종이 모두 증폭 및 비 특이적 반응은 나타나지 않았다(Fig. 1).

한편, candidate #2 (1st round PCR)와 US-EPA nested PCR (2nd round PCR)이 반응할 수 있으며, 위 양성에 대한 검정이 가능한 양성대조군을 개발하였다(Lee et al., 2021a). 1st round PCR 반응 시 산물의 길이는 400 bp, 2nd round PCR 시 374 bp를 증폭할 수 있을 것으로 추정되었다(Fig. 2). 합성한 핵산과 수인성바이러스를 이용하여 실험실 간 벨리데이션을 수행하였다. 합성한 양성 핵산을 1 ng/μL를 기준으로 10⁹배 희석하여 검출 민감도를 분석하였고, 9개 비공개 시료(CoxV-A24, EchoV-11, NoV-GII, PV-type3, ReV, EV-71, OrV, SaV 및 증류수 순)에 대한 특이적 및 비 특이적 반응을 검정하였으며, PCR 조성 및 조건은 1st round 및 2nd round PCR 모두 동일하게 하였다. 그 결과, 검출 민감도는 1st round 시약 1 pg/μL ~ 100 fg/μL, 2nd round PCR 시약 100 fg/μL ~ 10 fg/μL로 나타났고 모두 기대 크기의 산물이 확인되었으며, 또한 모든 기관에서 Pan-EV 포함되는 바이러스들만을 증폭하였다(Fig. 3).

Pan-EV 모니터링용 RT-nested 방법을 검증하기 위하여, 국립환경과학원 고시 제 2017-50에 따라서 지하수 시료

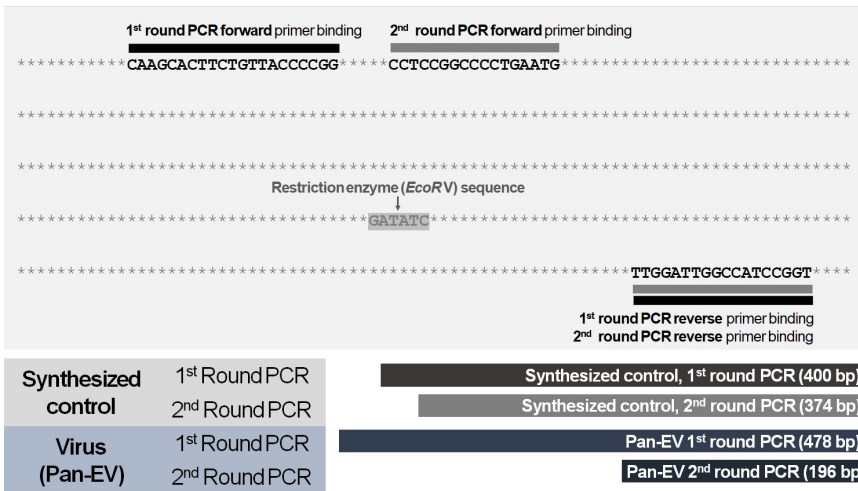


Fig. 2. A positive control map developed for the detection of Pan-Enterovirus. *, any sequences (A or G or C or T).

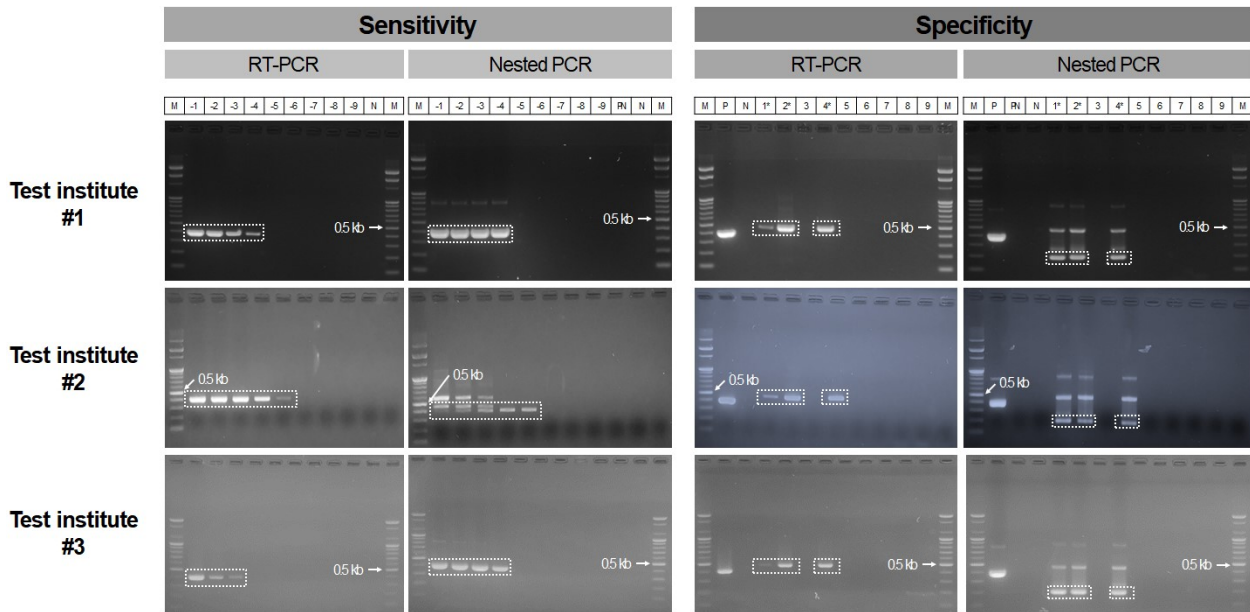


Fig. 3. The result of three interlaboratory validation tests of RT-PCR and nested PCR for Pan-enterovirus. M, 100 bp Ladder marker (Enzygnomics); -1 ~ -4; dilution rate based on positive control (1 ng/μL); PN, PCR negative; N, negative; P, positive control; 1, CoXV-A24; 2, EcoV-11; 3, NoV-GII; 4, PV-type3; 5, ReV; 6, EV-71; 7, OrV; 8, SaV; 9, environmental sample # 4; *, virus included in Pan-enterovirus.

123점을 채취 후 탈리 및 농축(Elution and Concentration) 하였고, 최종 농축액으로부터 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany)의 매뉴얼에 따라 총 RNA를 추출하였으며, RT-nested PCR 조성 및 조건은 이전의 연구와 동일하게 수행하였다(Lee et al., 2021b). RT-PCR에서는 양성대조군을 제외한 모든 시료에서 증폭산물이 관찰되지 않았으나, nested PCR 결과, 타겟 크기와 유사한 밴드 1개가 증폭되었으나 (Fig. 4), 염기서열 분석 결과 비 특이적 증폭으로 확인되

었다(Data not shown). 이에 따라, 시료 핵산 내 CoXV-A24를 인위적 첨가하였고, 바이러스 농도가 10^5 (10 fg/μL)까지 10배 단계 희석하여 RT-nested PCR로 확인하였다. 그 결과, 1st round PCR에서는 기존 보다 약 10배 수준 검출 민감도가 낮아졌으나, 2 round PCR에서는 동등 성능으로 나타나 해당 방법의 비 소독수에서의 적용성이 확인되었다(Fig. 5).

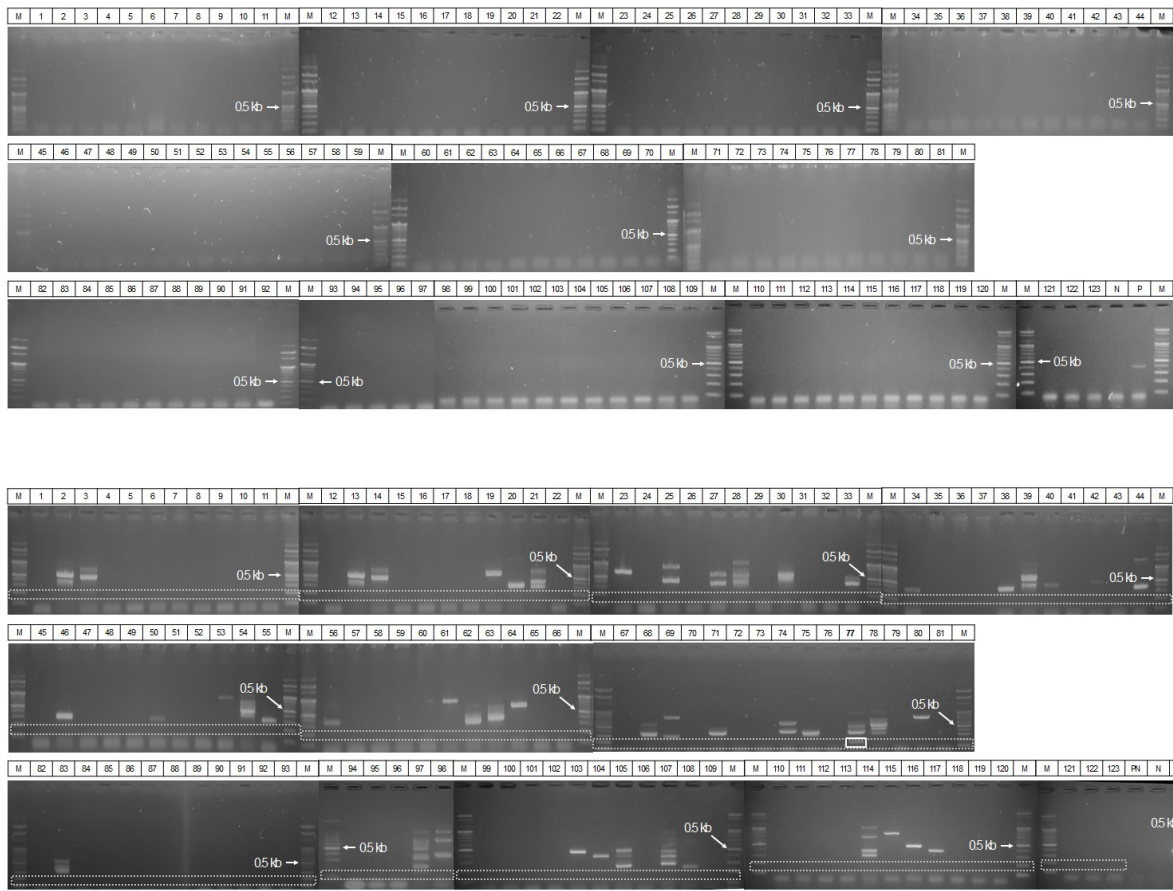


Fig. 4. Detection of Pan-enterovirus from groundwater samples using RT-nested PCR. M, 100 bp Ladder marker (Enzyomics); lane #1-123, sample number; N, negative; P, positive control; PN, PCR negative.

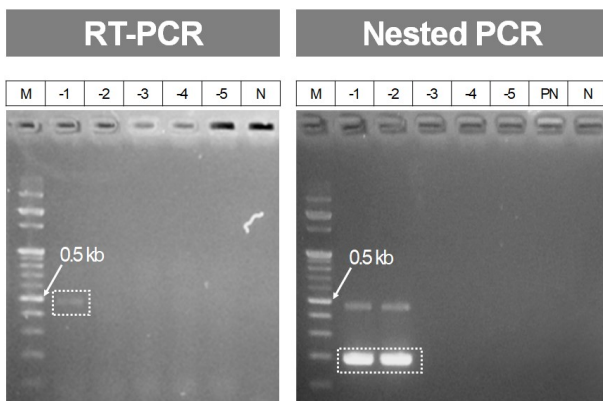


Fig. 5. Detection sensitivity of RT-PCR and nested PCR for detection of Enterovirus 71. M, 100 bp Ladder marker (Enzyomics); lane -1 ~ -5, 10-fold serially diluted nucleic acid (NC) OF CoXV-A24 from undiluted (1 ng/ μ L) CoXV-A24 NC; N, negative control; PN, PCR negative.

고 찰

이번 연구에서는 지하수 등 수계 환경에서 Pan-EV를 진단할 수 있는 RT-nested PCR 방법 제안과 위 양성 검정이 가능한 양성대조군을 개발하였다. 결론적으로 진단 과정은 i) 국립환경과학원 고시 제 2017-50에 따라 지하수 등 시료를 채취하여 실험실로 이동하고, ii) 탈리 및 농축한 후, iii) 농축액 140 μ L로 부터 QIAamp[®] DNA Mini kit (Qiagen)로 총 핵산(RNA)를 추출하여 회수한 핵산의 농도를 확인한다. iv) PCR은 1st round PCR (RT-PCR)과 2nd round PCR (nested PCR)로 두 단계로 수행하며, 대조군으로는 이번 연구에서 개발한 Pan-EV 양성대조군을 양성대조군으로, 멸균 증류수를 음성대조군으로 사용하고 각 시료에서 추출한 총 핵산(RNA)를 주형으로 진단을 실시한다. 1st round PCR (RT-PCR) 수행 시; 조성은 AccuPower[®] RT/PCR PreMix (Bioneer), 이번 연구에서 제안한 Primer 1 [Zoll

et al., 1992 (Modified); CAAGCACTTCTGTWCCCCGGJ 25 p 1 μ L와 EntR (EV-R) (US EPA, 2014; ACCGGATGG-CCAATCCAA) 25 p 1 μ L, SL[®] Non-specific reaction inhibitor (LSLK, Gyeonggi, Korea) 3 μ L, 주형 핵산 1 μ L, 멸균 증류수 14 μ L로 총 20 μ L로하며, 역전사 과정으로 42°C, 60분 후 나머지 과정은 위에서 기술한 Lee et al. (2021a)과 같다. v) 2.0% agarose gel에서 전기영동 후 Pan-EV 양성대조군에서는 400 bp에서 증폭산물이 관찰되고, 시료에서 양성 이 있다면 478 bp에 증폭산물이 관찰된다. 개발한 양성대조군은 증폭산물의 크기가 다르므로 오염 시 겔 내 육안으로 확인이 가능하다. vi) 1st round PCR (RT-PCR) 산물을 주형으로 2nd round PCR (nested PCR)을 시행한다. 대조군은 총 3개로 Pan-EV 양성대조군을 양성대조군 1st round PCR의 멸균 증류수를 주형으로 사용한 RT-PCR 산물을 RT-PCR 음성대조군으로 하며, 멸균 증류수를 음성대조군으로 한다. 조성은 이번 연구에서 제안한 EntF (EV-L) CCTCCGGCCCCCTGAATG와 EntR (EV-R) ACCGGATGGC-CAATCCAA를 사용하며, 다른 조성물 및 조건은 위에서 기술했던 Lee et al. (2021a)과 동일하다. vii) 2.0% 아가로스 겔에서 전기영동 후 Pan-EV 양성대조군에서는 374 bp의 밴드가 형성, 시료에서 양성 이 있다면 196 bp에 밴드가 형성된다. 개발한 양성대조군은 증폭산물의 크기가 다르므로 오염 시 겔 내 육안으로 확인이 가능하다. 2nd round PCR 산물의 경우, 개발한 양성대조군으로부터 오염이 있더라도 시료로부터 증폭된 Pan-EV는 196 bp이므로 gel-purification 할 수 있다. viii) 2nd round PCR 결과, 시료에서 양성 이 추정되면 시퀀싱을 수행하여 NCBI BLAST를 통해 similarity를 확인 및 정리된 염기서열들을 기초로 계통수를 구축하여 최종 Pan-EV 양성을 확정 및 동정할 수 있다(Lee et al., 2021a). 이번 연구에서 제안한 방법과 개발한 Pan-EV 양성대조군은 더욱 많은 시료로부터 충분한 모니터링 검사를 통해 향후 지하수 등 비 소독수를 중심으로 수계 환경 중 Pan-EV 모니터링을 위한 방법으로 활용이 기대된다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the National Institute of Environmental Research (NIER), funded by the Ministry of Environment (ME) of the Republic of Korea (NIER-2023-01-01-155). In addition, we would like to thank the three institutes (K-water, DK-EcoV and Shinhan University) for assisting with the validation of the methods.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Bosch A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol.* 1998. 1: 191-196.
- Chiang PS, Huang ML, Luo ST, Lin TY, Tsao KC, Lee MS. Comparing molecular methods for early detection and serotyping of enteroviruses in throat swabs of pediatric patients. *PLoS One.* 2012. 7: e48269.
- International committee on taxonomy of viruses (ICTV). 2017. Master Species List 2018 (10th Report). Retrieved 2018-07-29.
- International committee on taxonomy of viruses (ICTV). 2019. Master Species List 2018 (10th Report). Retrieved 2019-02-19.
- Leclerc H, Edberg S, Pierzo V, Delattre JM. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *J Appl Microbiol.* 2000. 88: 5-21.
- Lee HK, Jeong YS. Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl Environ Microbiol.* 2004. 70: 3632-3636.
- Lee S, Bae KS, Lee JY, et al. Development of molecular diagnostic system with high sensitivity for the detection of human sapovirus from water environments. *Biomed Sci Letters.* 2021a. 27: 35-43.
- Lee S, Bae KS, Park J, et al. Monitoring and identification of human astrovirus from groundwater in Korea based on highly sensitive RT-nested PCR primer sets. *Biomed Sci Letters.* 2021b. 27: 255-263.
- Moore BE. Survival of human immunodeficiency virus (HIV), HIV-infected lymphocytes, and poliovirus in water. *Appl Environ Microbiol.* 1993. 59: 1437-1443.
- National Institute of Environmental Research (NIER). Development and Verification of Genetically Diagnostic Method for the Detection of Non-regulated Viruses from Water Environment (I). 2016. NIER.
- NIER. Development and Verification of Genetically Diagnostic Method for the Detection of Non-regulated Viruses from Water Environment. 2017. NIER
- US EPA, 2014. Method 1693: Cryptosporidium and Giardia in dis-

infected wastewater by concentration/IMS/IFA, EPA 821-R-14-013, Washington, D.C.

Zoll GJ, Melchers WJ, H, et al. General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol.* 1992. 30: 160-165.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2023.29.2.81>

Cite this article as: Lee S, Bae KS, Kim JH, Park JH, Kim JH, Park JY, Lee KJ, Jeon CR, Yoon JK, Lee SH, Park ER. Evaluation of Proposed Diagnostic System for Detection of Pan-enterovirus Using Reverse Transcription Nested PCR from Water Environment. *Biomedical Science Letters.* 2023. 29: 81-87.