

## 양전하 및 음전하 필터를 이용한 해수 중 Norovirus Surrogate의 회수

이희정\* · 오은경 · 유홍식 · 신순범 · 손명진 · 정진이 · 김영목<sup>1</sup> · 윤호동  
국립수산과학원 양식연구부 식품안전연구과, <sup>1</sup>부경대학교 식품공학과

### Recovery of Norovirus Surrogate in Seawater using an Electropositive and Electronegative Filter

Hee-Jung LEE\*, Eun-Gyoung OH, Hong-Sik YU, Soon-Bum SHIN,  
Myeong-Jin SON, Jin-Yi JUNG, Young-Mog KIM<sup>1</sup> and Ho-Dong YOON  
*\*Food Safety Research Division, National Fisheries Research & Development Institute,  
Busan 619-902, Korea*

*<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

Recently coastal seawater has been contaminated by enteric viruses such as the norovirus via untreated groundwater globally. Accordingly, the consumption of molluscan shellfish from seawater that has been contaminated with fecal material has become an important issues. The levels of enteric viruses in seawater are low and recovery and concentration of the virus from large volumes of water is difficult. We compared the effectiveness of two representative method of concentrating virus using negatively and positively charged filters. The mean retention of seeded FCV by HAMF and NCCF was 48% and 78%, respectively. Overall, the recovery of NCCF was 43.3±11% better than that of HAMF. However, the eluate obtained by using beef extract solution in the NCCF procedure caused an inhibitory effect on the RT-PCR; therefore, it was necessary to employ a PCR inhibitor removal procedure. The HAMF eluate contained no PCR inhibitors, but HAMF was not an effective method of concentrating the virus from large volumes of natural seawater due to clogging.

Key words: Norovirus, Enteric virus, PCR inhibitor, Negatively charged, Positively charged

### 서 론

인간의 장관에 침입하여 증식하는 바이러스를 장관계 바이러스라고 한다. 현재 140여종 이상의 장관계 바이러스가 알려져 있으며 여기에는 enterovirus, hepatitis A virus, norovirus 등이 속한다. 장관계 바이러스는 환자의 분변을 통하여 체외로 배출되며 자연계에서는 지표수와 해수를 통하여 널리 전파된다 (Abbaszadegan et al., 2003; Dahling, 2002; Fout et al., 2003; Kukkula et al., 1999). 1971년에서 2004년까지 미국에서 음용수로 인한 집단 감염이 789건이 발생하였으며 이중 8%가 장관계 바이러스에 의한 것으로 보고되었다 (Barwick et al., 2000; Liang et al., 2006). 또한 지표수의 영향을 받는 연안에 서식하는 패류와 같은 여과섭식성 수산생물은 지표수를 통하여 유입되는 각종 바이러스를 체내에 축적하여 굴과 같이 생식을 주로 하는 패류의 섭취로 인한 집단 감염의 매개체 역할을 하고 있다 (Lees, 2000).

한편, 지표수나 연안해수에 존재하는 장관계 바이러스의 농도는 대개 매우 낮아서 수계에 존재하는 장관계 바이러스에 의한 공중보건 위해의 평가를 위해서는 감도가 높고 적용성이 뛰어난 바이러스 회수와 농축법이 필요하다. 현재까지 IMDS

electropositive filter를 이용한 방법이 널리 사용되고 있으나 (APHA, 1995), 이 방법은 지하수, 강물이나 2차 처리된 하수 등 담수나 담수화된 물에는 유효하나 자연해수에 적용할 수 없는 단점을 가지고 있다 (Reynolds et al., 1993). Katayama et al. (2002)은 HA negative charge membrane filter를 사용하여 해수에서 노로바이러스를 비롯한 장관계 바이러스를 회수하는 방법을 개발하였으나 membrane filter의 특성상 대량의 자연해수시료의 처리가 어려운 단점을 가지고 있다.

이에 대한 대안을 찾자 이 연구에서는 최근 nano alumina (AlOOH) fiber를 활성성분으로 하여 제작된 NanoCeram (Argonide, Sanford, FL) cartridge filter의 자연해수 중 norovirus surrogate (feline calicivirus) 회수능력을 HA negative charge membrane filter와 비교하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포배양 및 바이러스의 준비

FCV (feline calicivirus) 인공배양을 위한 cell line은 Crandall-Reese feline kidney (CrFK) cell (ATCC#CCL-94)을 이용하였다. 75 cm<sup>2</sup> 배양 플라스크 (Costar, Canada)에 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)을 적량 분주한 후 cell을 접종하고 37℃로

\*Corresponding author: ohdagu@nfrdi.go.kr

조정된 humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양 후 양호한 부착 성장이 확인되면 2일 간격으로 2차 배양을 실시하였다. 2차 배양은 (1) 상층의 배지를 제거하고, (2) 단일 세포층을 Dulbecco's phosphate buffered saline (pH 7.3) (PBS; GIBCO/BRL, Canada)로 세척한 후, (3) 0.05% trypsin-EDTA (GIBCO/BRL, Canada) 1 mL를 단일 세포층에 가하여 20초 방치했다가 제거하고, (4) 플라스크 바닥에서 세포의 탈리될 때까지 플라스크를 37°C에 배양한 다음, (5) 배양이 끝난 플라스크에 약 6 mL의 새로운 배지 (DMEM+10% serum)를 첨가하고 고무 섞은 후 3개의 75 cm<sup>2</sup> 배양 플라스크에 분주하고 처음과 동일한 조건으로 2일간 배양하는 요령으로 실시하였다.

노로바이러스 surrogate는 FCV (feline calicivirus) Strain F9 (ATCC#VR-782)을 사용하였다. 바이러스 풀을 얻기 위해 (1) CrFK 단일세포층이 잘 형성된 플라스크를 선택하여 상층의 배지를 흡입제거하고, (2) 바이러스 현탁액 200 µL를 플라스크에 접종한 후, (3) 37°C로 조정된 humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에 90분간 배양하여 바이러스가 흡착되도록 하였다. 그리고 (4) 7 mL의 maintenance media (DMEM+2% FBS)를 가하여 상기한 조건에서 배양하여 바이러스 작용으로 단일세포층이 90%가 파괴될 때까지 배양하였다.

각 바이러스 감염 플라스크를 냉동과 해동을 2회 반복한 후 1500×g에서 15분간 원심분리하여 세포 잔해를 제거하였다. 바이러스가 포함된 현탁액을 0.5 mL씩 분주하여 -80°C에 보관하였다.

### 해수 및 바이러스 접종

해수는 부산광역시 기장군 기장읍 시랑리 408-1번지 인접 연안에서 취수하여 여과와 UV 조사를 실시하여 이물질과 미생물을 제거한 자연해수를 사용하였다. 해수 10 L에 노로바이러스 surrogate인 FCV를 최종농도 10 TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infectious Dose<sub>50</sub>)/mL이 되도록 접종하였다.

### 바이러스의 회수

음전하 필터를 이용한 바이러스의 회수는 pore size 0.45 µm, 직경 47 mm의 HA type membrane filter (Nihon Millipore, Tokyo, Japan) (HAMF)을 사용하여 Katayama 등 (2002)의 방법을 응용하여 실시하였다. 그 과정을 요약하면, HAMF에 GF/C glass filter (Whatman, England)를 앞뒤로 배치시킨 뒤 FCV를 접종한 해수 시료 10 L를 여과하여 (유속: 1.5 L/min) MF에 바이러스 입자를 흡착시킨 후 0.5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200 mL을 이용해 여분의 양전하를 제거하였다. 이후 50 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 mL과 100 x TE buffer 0.1 mL이 들어있는 튜브로 교체 후에 10 mL의 1 mM NaOH로 바이러스를 용리하였다. 바이러스의 흡착율을 확인하기 위해 여과된 해수 중 100 mL을 취하여 4°C에 보관하였다.

음전하 필터를 이용한 바이러스의 회수는 NanoCeram (Argonide, Sanford, FL) electropositive cartridge filter (NCCF)를 사용하여 Karim et al. (2009)의 방법을 응용하여 실시하였다.

그 과정을 요약하면, FCV를 접종한 해수 시료 10 L를 여과하여 (유속: 1.5 L/min) NCCF에 바이러스 입자를 흡착시킨 후 1.5% beef extract 용액 (pH 9.0, 0.05 M glycine) 500 mL을 NCCF와 15분간 실온에서 접촉시킨 후 여과하여 용액을 회수하였다. 역시 바이러스의 흡착율을 확인하기 위해 여과된 해수 중 100 mL을 취하여 4°C에 보관하였다. 바이러스를 포함한 beef extract 용액의 pH를 4.0으로 조정하고 실온에서 30분간 교반한 후 0.5 g celite (Dahling and Wright, 1986)를 가하고 직경 75 cm prefilter (Millipore Co., England)에 감압 여과하였다. 바이러스가 흡착된 celite가 걸러진 prefilter에 0.15 M sodium phosphate (pH 9.0-9.5) 40 mL를 가하여 상압여과하여 바이러스를 용출하였다.

### 바이러스의 농축

바이러스 유전자의 분리가 용이하도록 얻어진 바이러스 용출액을 1 mL까지 농축하였다. 농축은 Centriprep Concentrator (YM-50, Millipore, USA)를 사용하여 3,000 x g에서 15분간 (4°C) 원심분리를 3-4회 반복하여 실시하였다. NCCF를 사용하여 회수한 시료의 농축액은 PCR 방해물질의 제거를 위해 Fout et al. (2003)의 방법에 따라 처리하였다.

### 바이러스 유전자의 추출

FCV의 유전자인 RNA의 추출은 Qiagen RNeasy kit (Qiagen Co., Holland)를 사용하여 제조사 지침을 따라 실시하였다.

### One step Real-time RT-PCR

FCV RNA 검출과 상대정량에 필요한 역전사 PCR은 one step으로 real-time PCR 기법을 사용하여 실시하였다. 역전사 PCR 반응의 정확성을 확인하고 바이러스의 회수와 농축에 사용된 beef extract와 같은 물질이 가지는 PCR 억제효과를 확인하기 위해 internal control 물질 (합성 RNA, USFDA, United States Patent Application #20060166232)을 매 반응구마다 1 µL씩 가하여 다중 채널 검출을 실시하였다. One step real-time PCR은 Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen Co., Holland)를 사용하여 Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio Inc., Japan)에서 역전사 50°C, 50분 그리고 효소활성화를 95°C, 15분 실시한 후 94°C-15초, 62°C-20초, 72°C-40초의 반응을 45회 반복하여 실시하였다. 반응에 사용된 FCV 및 internal control 검출에 사용된 primer와 probe 정보는 Table 1과 같다.

### 바이러스의 상대정량을 위한 표준 검량선의 작성

회수된 바이러스의 상대적 정량 (RT-PCR unit)을 위해 실험에 사용된 FCV 배양액 (8 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>mL<sup>-1</sup>)을 10<sup>0</sup>-10<sup>10</sup>까지 단계희석한 후 각 희석액을 상기한 조건과 동일 조건에서 one step real-time RT-PCR을 실시하여 표준 검량선 (standard curve)을 작성하였다. 표준 검량선의 작성을 위한 통계처리에는 Thermal Cycler Dice Real Time TP 800 Software (Ver. 2.10B, Takara Bio Inc., Japan)를 사용하였다.

Table 1. Oligonucleotides for feline calicivirus(FCV) real-time RT-PCR

Oligonucleotide	Sequence (5'-3')	Orientation	Location1)
FCVF	GCCAATCAGCATGTGGTAACC	+	2410-2430
FCVR	GCACATCATATGCGGCTCTG	-	2502-2521
FCV-P	FAM-TTAATTCGGTGTGGATTGGCCTGGG-TAMRA	+	2432-2458
IC-46F	GACATCGATATGGGTGCCG	+	* <sup>2)</sup>
IC-194R	AATATTCGCGAGACGATGCAG	-	*
IC-P	ROX TCTCATGCGTCTCCCTGGTGAATGTG 3' BHQ1	+	*

<sup>1)</sup> Nucleotide positions based on the FCV sequence (accession no. M86379).

<sup>2)</sup> Location of internal control primer was not open due to infringement of patent.

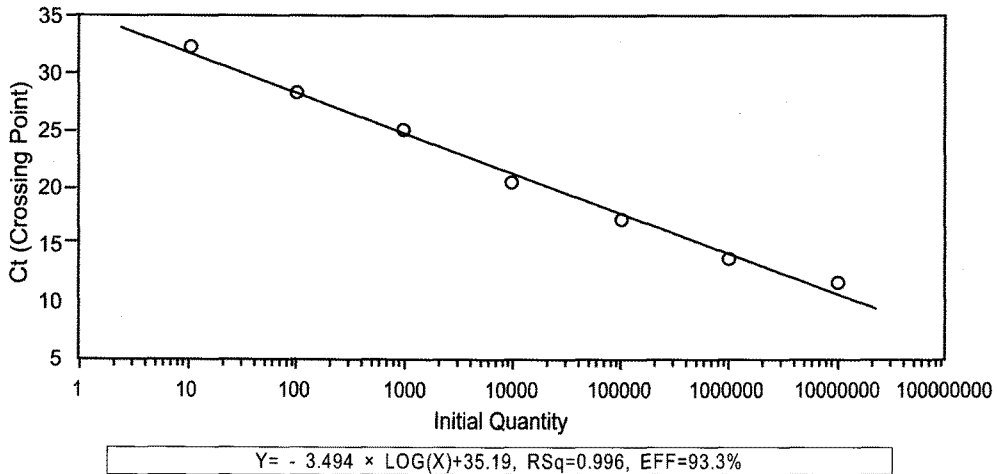


Fig. 1. Standard curves for feline calicivirus containing 1 to 10<sup>7</sup> virus per reaction.

**결과 및 고찰**

**바이러스 상대정량을 위한 표준곡선**

해수에 접종한 FCV의 회수를 계산과 이 실험에 사용한 one step real-time RT-PCR의 검출한계를 파악하기 위해 표준 곡선을 작성하였다 (Fig. 1). 검출한계는 <math>1 \times 10^1</math> virus였으며 RT-PCR의 효율은 93.3%로 나타나 모든 반응구에서 주형 RNA량과 검출 cycle (Ct 값) 사이에 적절한 상관관계를 얻을 수 있었다. 표준곡선에서 산출된 방정식을 사용하여 시료의 PCR 반응에서 얻어진 Ct값을 대입하여 바이러스의 농도를 역산하여 회수율을 산정하였다.

**Norovirus surrogate의 회수율**

접종한 FCV의 필터 부착율은 HAMF가 평균 48% 그리고 NCCF가 평균 78% 였다 (Table 2). 바이러스 부착율은 필터의 형태와 표면적을 고려하지 않은 것이므로 절대 비교는 어려울 것이나 대량의 시료처리에는 NCCF가 적합한 것으로 나타났다. 그리고 최종 평균 회수율은 NCCF가 43.3±11%로 HAMF 보다 우수하였다 (Table 2).

RT-PCR을 이용한 회수율의 계산에서는 100% RNA 회수와 cDNA 합성을 전제로 한다. 그러나 역전사 반응 중 유전자 손실 (genomic loss)이 발생할 수 있으므로 이 가정은 항상

Table 2. Retention and recovery of feline calicivirus by two type filter

Filter type	PCR inhibitor removal procedure	Virus retention (%)	Virus recovery (%) (±SD)
HAMF	No	48.0	25.9(±4.0)
	Yes		24.5(±5.0)
NCCF	No	78.0	19.3(±4.0)
	Yes		43.3(±11.0)

옳은 것은 아니다. 인공 배양이 불가능한 RNA 바이러스의 경우 RT-PCR에 의한 검출이 최선책이나 그 정량에 있어서는 다소의 부정확성을 고려하여야 한다 (Meleg et al., 2006).

이 연구에서는 바이러스 최종 회수를 계산은 real-time PCR로 얻어진 RT-PCR unit을 사용하였다. 그래서 무기시약을 사용하는 음전하 필터인 HAMF법과는 달리 양전하를 띠는 NCCF법에는 유기물인 beef extract가 사용되기 때문에 PCR 방해물질 제거 단계가 필요하지 확인하였다. 그 결과 PCR 방해물질을 제거한 경우에는 모든 반응구에서 양호한 PCR이 진행됨을 알 수 있었으며 (Fig. 2), 평균 회수율 방해물질 제거 유무에 따라 2배 이상의 차이를 나타내었다 (Table 2).

회수한 바이러스가 배양이 가능하여 PCR을 사용하지 않고 바이러스를 검출하거나 정량할 수 있는 경우에는 문제가 되지

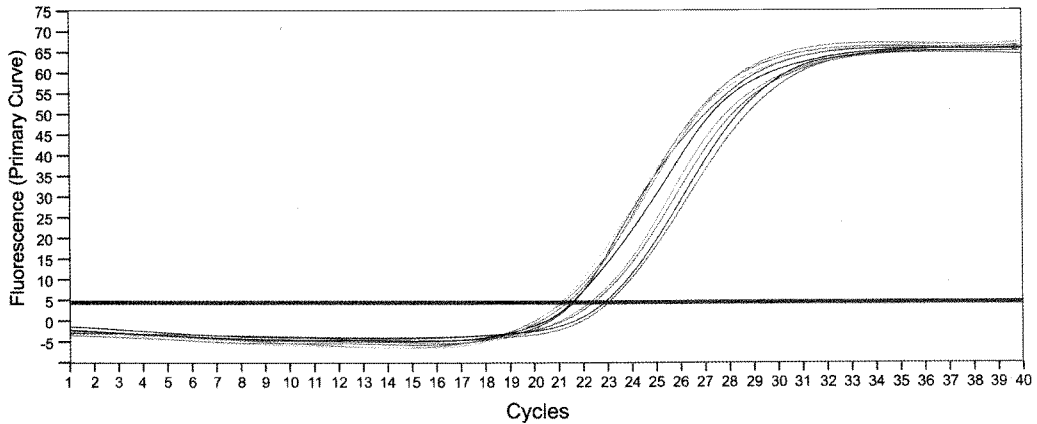


Fig. 2. Comparison of Ct values for internal control material determined by one step real-time PCR.

않으나 노로바이러스와 같이 배양이 불가능한 바이러스의 경우에는 PCR 방해물질 제거가 필수적임을 알 수 있었다 (Victoria et al., 2009). Fout et al. (2003)도 PCR 방해물질 제거 유무에 따라 회수율이 50% 이상 차이가 나타난다고 보고한 바 있다.

많은 연구자들이 담수 및 해수 시료로부터 바이러스를 회수, 농축하여 RT-PCR을 이용하여 검출하는 방법의 회수율을 개선하고자 많은 노력을 기울여 왔다. 이들 연구의 주요 관심사는 PCR 방해물질의 제거이며 시도된 방법으로는 resin treatment (Abbaszadegan et al., 1993), polyethylene glycol precipitation-resuspension technique (Jaykus et al., 1996), immunomagnetic capture (Jothikumar et al., 1998), glass purification (Ijzerman et al., 1997) 등을 들 수 있다. 그러나 이들 방법은 매우 복잡하고 많은 비용을 수반하는 문제점을 가지고 있다.

그래서 Katayama et al. (2002)은 HAMF와 같은 음전하 필터를 이용하고 산-알칼리와 같은 무기시약을 사용하여 유기물질을 사용하지 않고도 바이러스를 회수하는 방법을 제안하였다. 그러나 이 방법은 2L 해수를 기준으로 개발된 것으로 저 농도로 존재하는 바이러스를 검출을 위해 대량의 시료를 처리하는 경우에는 그 적용이 어려운 단점을 가지고 있다. 한편, NCCF는 새로운 소재로 제작되어 바이러스 부착율이 높고 100 L 이상의 자연해수를 여과하여도 여과속도가 저하되지 않는 장점을 가지고 있어 현장에서 대량의 시료를 즉시 처리하기에 적합할 것으로 보인다. 그러나 양전하 필터의 특성으로 인하여 다른 양전하 필터와 같이 beef extract와 같은 유기물질을 사용하기 때문에, 바이러스 검출에 PCR을 적용하는 경우에는 반드시 PCR 방해물질 제거가 필요한 약점을 가지고 있었다 (Table 2).

현재 세포배양을 위한 cell line의 개발이 이루어지지 않아 수계에 존재하는 노로바이러스를 정량은 분자생물학적 방법에 의존하고 있다 (Karim et al., 2009). 분자생물학적 방법에

의한 바이러스의 검출과 정량이 가지는 가장 큰 문제점은 농축 물 시료 중에 존재하는 부식물과 유기물에 의해 RT-PCR에 사용되는 효소의 작용이 억제될 수 있다는 것이다. 그러므로 PCR 방해물질을 효과적으로 제거하는 것이 전체 실험의 승패를 좌우한다고 할 수 있다.

바이러스성 감염질환이 증가일로 있는 최근의 상황에 비추어볼 때, 해수나 담수 중에 노로바이러스와 같은 장관계 바이러스가 검출되는 경우, 공중보건학적인 측면에서 그 결과가 적절한 절차를 거쳐 공개되고 보건 시책에 반영되어야 하는지를 신중히 검토할 필요가 있다. 진술한 바와 같은 분자생물학적 방법이 가지는 한계성을 감안할 때, PCR에 의해 도출된 결과의 신뢰성을 확보하기 위해서는 PCR 방해물질 제거절차와 사용된 양성 및 음성 대조구의 객관성 입증을 위한 방법 검증 (method validation)과 불확도 측정과 같은 통계학적 접근이 선행되어야 할 것으로 사료된다.

## 사 사

이 연구는 국립수산과학원 (RP-2009-FS-008)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- Abbaszadegan, M., M. S. Huber, C. P. Gerba, and I. L. Pepper. 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1318-1324.
- Abbaszadegan, M., P. W. Stewart, M. W. LeChevallier, J. S. Rosen, and C. P. Gerba. 2003. Occurrence of viruses in U.S. groundwaters. *J. Am. Water Works Assoc.*, 95, 107-120.
- American Public Health Association. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association,

- Washington, D.C. 9-141~9-153 pp.
- Barwick, R. S., D. A. Levy, G. F. Craun, M. J. Beach, and R. L. Calderon. 2000. Surveillance of waterborne-disease outbreaks-United States, 1997-1998. *MMWR Surveill. Summ.*, 49, 1-35.
- Dahling, D. R. 2002. An improved filter elution and cell culture assay procedure for evaluating public groundwater systems for culturable enteroviruses. *Water Environ. Res.*, 74, 564-568.
- Fout, G. S., B. C. Martinson, M. W. Moyer, and D. R. Dahling. 2003. A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3158-3164.
- Ijzerman, M. M., D. R. Dahling, and G. S. Fout. 1997. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcriptase-PCR. *J. Virol. Methods*, 63, 145-153.
- Jaykus, L. A., R. De Leon, and M. D. Sobsey. 1996. A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2074-2080.
- Jothikumar, N., D. O. Cliver, and T. W. Mariam. 1998. Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration and detection of hepatitis A virus from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 504-508.
- Karim, M.R., E.R. Rhodes, N. Brinkman, L. Wymer and G.S. Fout. 2009. New electropositive filter for concentrating enteroviruses and noroviruses from large volume of water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 2393-2399.
- Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S., 2002. Development of a Virus Concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1033-1039.
- Kukkula, M., L. Maunula, E. Silvennoinen, and C. H. von Bonsdorff. 1999. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J. Infect. Dis.*, 180, 1771-1776.
- Lees, D. 2000. Viruses and bivalve shellfish. *Intern. J. Food Microbiol.*, 59, 81-116.
- Liang, J. L., E. J. Dziuban, G. F. Craun, V. Hill, M. R. Moore, R. J. Gelting, R. L. Calderon, M. J. Beach, and S. L. Roy. 2006. Surveillance of waterborne disease outbreaks-United States, 2003-2004. *MMWR Surveill. Summ.*, 55, 31-58.
- Meleg, E., F. Jakab, B. Kocsics, K. Banyai, B. Melegh, G. Szucs. 2006. Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. *J. Appl. Microbiol.*, 101, 1123-1129.
- Reynolds, K. A., J. B. Rose, and A. T. Giordano. 1993. Comparison of methods for the recovery and quantification of coliphage and indigenous bacteriophage from marine water and sediments. *Water Sci. Technol.*, 27, 115-117.
- Victoria, M., F. Guimaraes, T. Fumian, F. Ferreira, C. Vieira, J.P. Leite and M. Miagostovich. 2009. Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. *J. Virol. Methods*, 156, 73-76.

---

2009년 4월 21일 접수

2009년 5월 1일 수정

2009년 6월 8일 수리