

## 세포배양법과 PCR 방법에 의한 물에서의 폴리오 바이러스 검출

조연희<sup>1</sup> · 이찬희<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>2</sup>충북대학교 바이오연구소

폴리오 바이러스는 전형적인 장관계 바이러스로 마비, 무균성 수막염, 뇌염 등을 유발한다. 폴리오 바이러스는 분변-구강 경로를 통해 전파되며, 오염된 물을 음용수로 사용할 시 공중 보건에 문제가 될 수 있으므로 먹는 물에서 폴리오 바이러스를 검출하는 것은 중요하다. 감염성이 있는 바이러스와 불활성화(열처리와 자외선 처리) 시킨 바이러스를 세포배양법, 역전사 중합효소 연쇄반응법(reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR) 그리고 세포배양-중합효소 연쇄반응 통합법(integrated cell culture-PCR: ICC-PCR)으로 검출 실험을 했다. 감염성이 있는 폴리오 바이러스는 세 가지 방법으로 모두 검출이 되었으며, 이 중에서 바이러스를 검출하는데 ICC-PCR 방법이 가장 민감했다. 세포배양법은 적은 수의 바이러스를 검출하는데 약 2주의 긴 시간이 걸렸다. 열처리나 자외선 처리로 불활성화된 바이러스는 세포배양과 ICC-PCR 방법으로는 검출이 되지 않았다. 자외선 처리한 바이러스는 RT-PCR 방법으로 검출되지 않았으나 열처리한 바이러스는 검출되었다. RT-PCR 방법은 감염성 바이러스뿐만 아니라 불활성화된 바이러스도 검출할 수 있으므로 감염성이 있는지 없는지를 구분할 수 없는 단점이 있다. 이와 같은 결과는 감염성 있는 바이러스를 가장 민감하고 효과적으로 검출하는 방법이 ICC-PCR 방법이라는 것을 제시하여 준다.

**Key words** □ cell culture, ICC-PCR, PCR, poliovirus, water

장관계 바이러스(enteric virus)는 사람의 장관에 감염하여 분변으로 배출되고 다시 사람의 소화기를 통하여 감염되는 바이러스를 통칭한다(3). 장관계 바이러스의 한 종류로 엔테로 바이러스(enterovirus)가 있는데 여기에는 폴리오 바이러스(poliovirus), 콕사키 바이러스(coxsackievirus) A와 B, 에코 바이러스(echovirus) 등이 포함되며 마비, 무균성 수막염, 호흡기 감염 등의 질병을 일으킬 수 있다(3,7). 특히 저항력이 약한 아주 어린아이들이나 노인들, 그리고 면역기능이 저하된 사람에게 감염되었을 때 큰 문제가 될 수 있다. 장관계 바이러스들은 환경에서 일반적인 세균보다 적은 수로 존재하지만 생존력이 높고, 염소처리에 대한 내성도 세균보다 강하며, 적은 수로도 감염이 가능하다(3,9,14). 따라서 장관계 바이러스의 검출은 공중 보건에서 매우 중요한 부분이다.

현재 먹는 물에서 바이러스를 검출하기 위해 사용하는 방법으로는 세포배양법과 유전자 탐침을 이용한 분자생물학적 방법이 있다. 세포배양법은 미국 환경청의 ICR (information collection rule)에서 권장하는 전통적인 방법으로 바이러스의 감염성 여부를 확인할 수 있다(11). 반면 적은 양의 바이러스가 존재할 때는 세포병변효과(cytopathic effect: CPE)를 보일 때까지 오랜 시간을 요구하고, 어떤 바이러스(예: Norwalk virus)는 아직까지 세포배양이 안되어서 CPE로는 관찰할 수 없는 경우도 있다. 또한 한

종류의 세포에서는 증식하는 바이러스가 다른 종류의 세포에서는 증식하지 않는 경우도 있으며 두 종류 이상의 바이러스가 존재해도 결과는 하나로 나오기 때문에 바이러스의 종류는 알 수 없고 바이러스가 존재한다는 것만 확인할 수 있다(8,10,16). 분자생물학적 방법으로 많이 사용되는 바이러스 검출법은 PCR (polymerase chain reaction) 방법이다. PCR 방법은 적은 양의 DNA나 RNA를 증폭시켜 결과를 보는 것이므로 시료가 적은 양이 있어도 검출이 가능하고, 바이러스의 종류도 확인할 수 있고 세포배양법에 비해 시간과 경비도 절약된다(2,3,7,8). 그러나 감염성이 있는 바이러스와 없는 바이러스의 구분이 불가능하고, 시료에 PCR을 저해할 수 있는 불순물이 있으면 검출이 불가능하다(3,12,13). 최근에는 세포배양법과 PCR 방법의 장점을 취하고 단점을 보완한 ICC (integrated cell culture)-PCR 방법이 개발되었다(19). ICC-PCR 방법은 세포에 바이러스를 감염시킨 후 최소 24 시간 이상 배양한 후에 배양세포의 DNA 또는 RNA를 추출하여 (RT-)PCR을 수행하는 방법으로 적은 양의 바이러스가 존재할 때 빠른 시간에 결과를 알 수 있다는 장점과 감염성이 있는 바이러스만 세포에 감염되므로 감염성 바이러스만을 검출해내는 장점을 가진다(19,20).

최근 몇 년간 우리 나라에서는 먹는 물에서 바이러스가 검출되어 크게 논란이 되고 있다(1,6). 그 중에서도 가장 크게 논란이 되는 부분은 바이러스를 검출하는 방법인데, 그 이유는 아직까지 국제적으로 통일된 검사 방법이 존재하지 않으므로 사용하는 방법에 의해 그리고 실험한 사람에 따라서 그 결과와 해석이 달라

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 043-261-2304, Fax: 043-273-2451  
E-mail: chlee@cubucc.chungbuk.ac.kr

질 수 있기 때문이다. 본 연구에서는 바이러스를 검출하는 전통적인 방법인 세포 배양법과 분자생물학적 방법인 PCR 방법, 그리고 새롭게 시도되고 있는 ICC-PCR 방법으로 물 중의 폴리오 바이러스를 검출하는데 있어서의 민감도를 비교하고자 하였다. 또한 먹는 물에서는 감염성 바이러스의 존재 여부가 중요하므로 감염성 바이러스를 검출하기 위해서는 어떤 방법이 효과적인지 알아보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 세포배양

바이러스 배양에는 African green monkey kidney (Vero) 세포를 사용하였다. 세포는 Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM: Gibco BRL, Gaithersburg, USA)에 5% fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL)과 0.37%의 sodium bicarbonate (SBC: Sigma, St. Louis, USA), 그리고 100 U/ml의 penicillin (Sigma)과 100 µg/ml의 streptomycin (Sigma)을 넣어 배양하였으며, 세포 단층을 유지하기 위한 유지배지로는 2% FBS와 0.37% SBC가 함유된 DMEM을 사용하였다. 적절한 산성도를 유지시켜 주기 위해 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 대기하의 배양기에서 배양하였다.

### 바이러스

검출에 사용한 바이러스는 폴리오 바이러스 type 1의 경구용 백신주인 Sabin strain으로 배 용수 교수(한남대학교)로부터 분양 받았다. 바이러스를 얻기 위해 지름이 100 mm인 세포배양용 접시에 배양한 Vero 세포에 200 µl의 바이러스를 접종하여 세포가 마르지 않고 바이러스가 골고루 흡착될 수 있도록 15 분 간격으로 가볍게 흔들어 주며 37°C에서 1 시간 흡착시킨 후 유지배지를 첨가하였다. 바이러스를 감염시키고 3~4 일 배양하여 세포를 수확한 후 400×g에서 7 분간 원심분리하여 상층액은 따로 모으고 pellet은 재현탁하였다. 액체질소와 37°C 항온 수조에서 얼림과 녹임을 2 회 반복하여 초음파 분쇄한 후 다시 400×g에서 7 분간 원심분리하여 상층액을 얻고 이것을 처음의 상층액과 혼합하였다. 이렇게 얻은 바이러스 stock은 1 ml씩 나누어 -70°C에 보관하였다.

### 바이러스 정량

정량법은 가장 널리 사용되고 비교적 정확한 plaque assay를 이용하였다. 위에서 얻은 바이러스를 10 진 희석하여 10<sup>-4</sup>~10<sup>-6</sup>의 바이러스 희석액을 직경 35 mm 세포배양용 접시에서 3 일 정도 배양한 HeLa 세포 단층에 접종한 후 37°C에서 1 시간 동안 흡착시킨 다음 바이러스를 제거하고 overlay medium (2% FBS, 0.37% SBC, 0.25% gum agar, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1 µg/ml Fungizone이 함유된 DMEM)을 첨가하였다. 바이러스를 감염시키고 3 일 후에 10% formalin (Yakuri Pure Chemicals, Osaka, Tokyo, Japan)으로 2 시간 동안 세포를 고정하였다. Formalin과 overlay medium을 제거하고

0.03% methylene blue (Sigma)로 염색하여 해부현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 plaque의 수를 세었다.

### 세포배양법에 의한 바이러스 검출

세포배양용 6-well plate에 Vero 세포를 배양한 뒤 바이러스 희석 용액을 접종한 후 37°C에서 1 시간 동안 흡착시켰다. 접종액을 제거한 뒤 완충용액으로 두 차례 씻어 주고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 대기하의 배양기에서 배양하였다. 매일같이 현미경 하에서 세포가 동그랗게 되는 CPE를 관찰하여 그 결과를 기록하였다. 바이러스 감염 후 7 일이 되도록 CPE를 보이지 않을 때에는 세포를 계대배양하여 계속적으로 CPE를 관찰하였다.

### 역전사 종합효소 연쇄반응(RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction)

PCR에 이용된 primer는 기존 문헌(5)에서 참조한 것으로, 폴리오 바이러스의 VP1 부위에 해당한다(forward primer; 5'-GTC AAT GAT CAC AAC CCA C-3', reverse primer 5'-AAG AGG TCT CTA TTC CAC AT-3'). RT-PCR에 사용한 RNA는 희석된 바이러스를 Viral RNA extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 사용하여 얻었다. 역전사 반응은 Sensiscript RT-kit (Qiagen GmbH)를 이용하였는데 그 조성은 주형 RNA 4 µl, 0.5 mM dNTP, 0.1 µM VP1 primer pair (forward와 reverse), 20 U RNase inhibitor (Takara Shuzo Co., LTD, Otsu, Japan), 4 U Sensiscript RTase를 넣은 후 DEPC-treated water로 최종부피를 20 µl로 맞추었다. 이 혼합용액을 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨 후 93°C에서 5 분간 반응하여 RTase의 활성을 제거하고 얼음에서 10 분간 식힌 후에 PCR을 수행하였다.

PCR은 위에서 합성된 cDNA를 3 µl를 넣고 10×Buffer 5 µl (최종농도: 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl and 2 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.3 µM의 primer pair (forward와 reverse), 0.2 mM의 각각의 dNTP, 2.5 U Taq polymerase (Takara, Shiga, Japan)를 넣은 후에 최종부피를 50 µl로 맞추는 후 Primus96 Plus thermocycler (MWG Biotech, Ebersberg, Germany)를 사용하여 다음의 조건으로 PCR을 반복 수행했다. 우선 95°C에서 3 분 동안 denaturation 시킨 후에 95°C 30 초, 56°C 45 초, 72°C 1 분의 조건으로 35 cycle을 반복 수행한 후 72°C에서 7 분간 최종 반응시켰다. 증폭된 시료는 1% agarose gel에서 전기영동을 한 후 ethidium bromide 염색을 하여 UV transilluminator로 확인하였다.

### ICC-PCR (Integrated cell culture-PCR)

세포배양용 6-well plate에 Vero 세포를 배양한 뒤 바이러스 희석 용액을 접종한 후 37°C에서 1 시간 동안 흡착시켰다. 바이러스 접종액을 제거한 뒤 완충용액으로 두 차례 씻어 주고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 대기하의 배양기에서 배양하였다. 배양 24 시간이 경과한 뒤 세포를 수확하고 Viral RNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 세포의 전체 RNA를 추출하였다. 이렇게 얻은 RNA를 주형으로 RT-PCR 방법을 수행하였고, 그 방법은 앞서 기술한 바와 같다.

**바이러스의 불활성화**

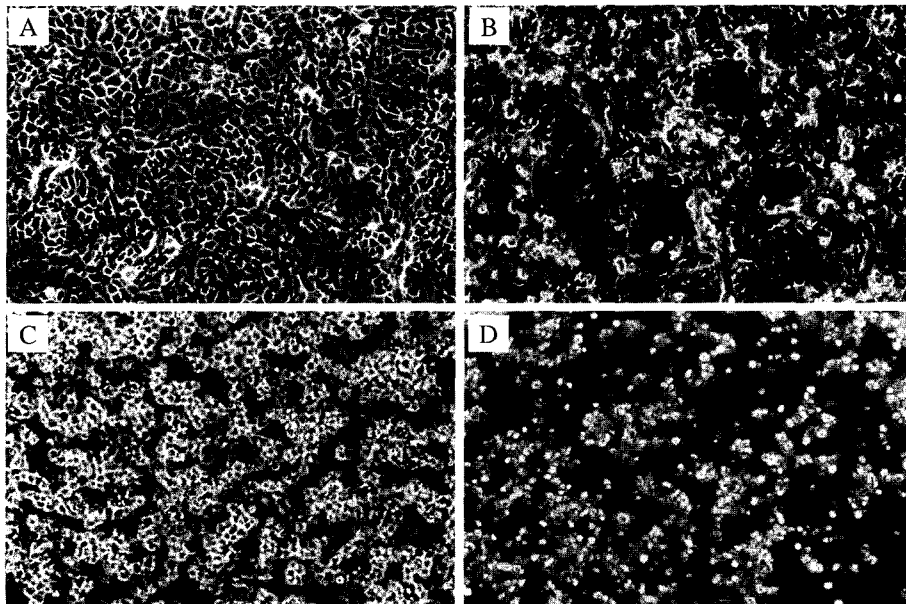
바이러스를 불활성화시키기 전에 바이러스를 회석하였는데 PBS 용액에  $5 \times 10^3$  PFU(palque forming unit)/ml이 되도록 하였다. 바이러스를 불활성화시키는 방법으로는 UV 조사와 열처리를 이용하였다. UV는 바이러스의 RNA를 파괴시키기 위한 것으로 0.2, 0.6, 1, 2 J/cm<sup>2</sup>를 조사하였다. 열처리는 외막을 파괴하기 위한 것으로 60°C에서 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 분 또는 100°C에서 1, 3, 5, 10 분 동안 처리하였다.

**결 과**

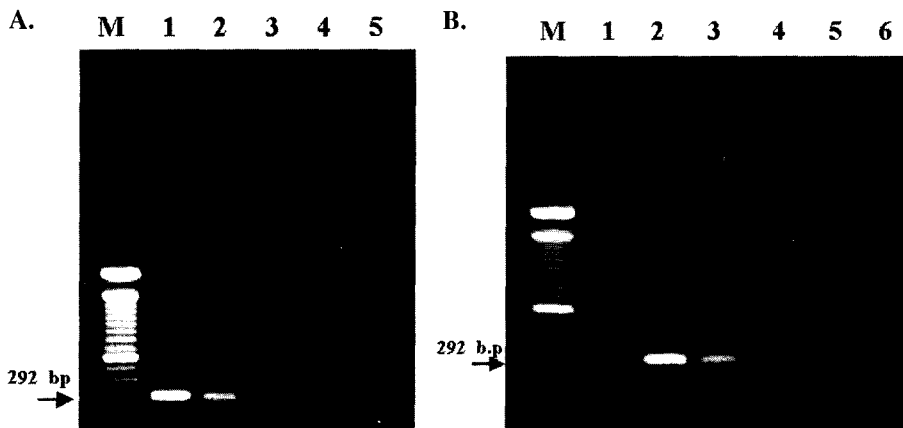
**바이러스 검출법의 민감성 비교**

세포배양법, PCR, ICC-PCR 방법들의 바이러스 검출 민감도를

비교하기 위하여 바이러스를 500 PFU/ml부터 0.05 PFU/ml까지 회석하여 세 가지 방법으로 검출을 했다. 먼저 세포배양법에 의해 바이러스를 감염시키고 2 일째와 4 일째에 배지를 새 것으로 교환 해주면서 일주일 동안 관찰하였다. 그 결과 500 PFU/ml의 바이러스를 감염시켰을 때는 이틀째부터 CPE가 보이기 시작해서(Fig. 1B). 감염 후 6일이 지나면 거의 모든 세포가 죽는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1D). 50 PFU/ml의 바이러스를 감염시켰을 때는 3 일째에 CPE가 보이기 시작했으며 5 PFU/ml의 바이러스를 감염시켰을 때는 감염 4 일째에 CPE가 보였다. 그러나 0.5 PFU/ml과 0.05 PFU/ml의 바이러스를 감염시켰을 때는 일주일 동안 배양을 해도 CPE를 관찰할 수 없었다. 그래서 세포배양액을 얻어서 다시 세포에 감염시키고 처음과 같은 방법으로 관찰하였다. 두 번째 배양에서 0.5 PFU/ml의 바이러스를 감염시켰을 때는 2 일째부터



**Fig. 1.** Development of cytopathic effect (CPE) in Vero cells infected with poliovirus at 500 PFU/ml. A, mock-infected cell; B, 2 days after infection; C, 4 days after infection; D, 6 days after infection.



**Fig. 2.** Detection of poliovirus by molecular techniques. Poliovirus RNA was extracted and cDNA was synthesized using Senscript RT kit (Qiagen). PCR reaction was performed using a primer set specific for VP1 region of poliovirus (see Materials and Methods). The PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis. The size of PCR product is 292 bp. (A) by RT-PCR. lane 1, 500 PFU/ml; lane 2, 50 PFU/ml; lane 3, 5 PFU/ml; lane 4, 0.5 PFU/ml; lane 5, 0.05 PFU/ml; lane M, size marker, 100 bp ladder. (B) by ICC-PCR. Lane 1, mock-infected cells; lane 2, 500 PFU/ml; lane 3, 50 PFU/ml; lane 4, 5 PFU/ml; lane 5, 0.5 PFU/ml; lane 6, 0.05 PFU/ml; lane M, size marker, 100 bp ladder.

CPE를 관찰할 수 있었다. 그러나 0.05 PFU/ml의 바이러스를 감염시켰을 때는 두 번째 배양에서도 CPE를 볼 수 없었다.

다음으로 RT-PCR 방법으로 검출실험을 수행하였다. 바이러스를 회석한 후에 같은 부피의 시료를 가지고 RNA를 추출하고 같은 양의 RNA에서 RT-PCR을 하였다. 이 방법에서는 500 PFU/ml와 50 PFU/ml의 바이러스를 포함하는 시료에서는 292 bp의 PCR산물이 검출되었고(Fig 2A. lanes 1, 2), 5 PFU/ml의 바이러스를 포함하는 시료에서는 아주 희미한 band가 관찰되었다(Fig. 2A. lane 3). 그러나 0.5 PFU/ml과 0.05 PFU/ml의 바이러스를 포함하는 시료에서는 PCR 산물이 전혀 검출되지 않았다(Fig. 2A. lanes 4, 5). PCR 방법은 primer에 따라서 그 민감도가 달라지는데 VP1 primer 외에 5' noncoding region의 primer도 사용하였는데 민감도가 떨어지고 비 특이적인 band가 많아서(data not shown) 사용하기에 부적당하다고 판단하여 VP1 primer를 가지고 모든 실험을 수행하였다.

ICC-PCR은 다양한 농도의 폴리오 바이러스를 포함하는 시료를 Vero 세포에 감염시키고 24 시간째에 수확하여 total RNA를 추출한 것을 사용하였다. 그 결과 500 PFU/ml, 50 PFU/ml, 5 PFU/ml의 바이러스를 포함하는 시료에서는 뚜렷한 band가 관찰되었고(Fig. 2B. lanes 2, 3, 4), 0.5 PFU/ml의 바이러스를 포함하는 시료에서도 희미하지만 band를 관찰할 수 있었다(Fig. 2B. lane 5). 그러나 0.05 PFU/ml의 바이러스를 포함하는 시료에서는 band를 관찰할 수 없었다(Fig. 2B. lane 6).

Table 1에서 볼 수 있듯이 세 가지 방법을 비교해 보면 시료에 0.05 PFU/ml의 바이러스가 존재할 경우에는 어떠한 방법으로도 검출되지 않았고, 5 PFU/ml의 바이러스가 존재할 경우에는 모든 방법으로 검출되는 것을 알 수 있다. 그 중간 농도인 0.5 PFU/ml인 경우에는 RT-PCR 방법으로는 검출되지 않은 반면 세포배양법과 ICC-PCR 방법으로는 검출되었다. 그러나 바이러스를 검출하는데 있어서의 시간이 차이가 나는데 세포배양법의 경우에는 두 번째 계대배양에서 결과를 알 수 있었고 이 때까지는 적어도 9일 이상의 시간이 필요하지만, ICC-PCR 방법에서는 더 짧은 시간에 같은 결과를 얻을 수 있었다.

**불활성화된 바이러스의 검출법 비교**

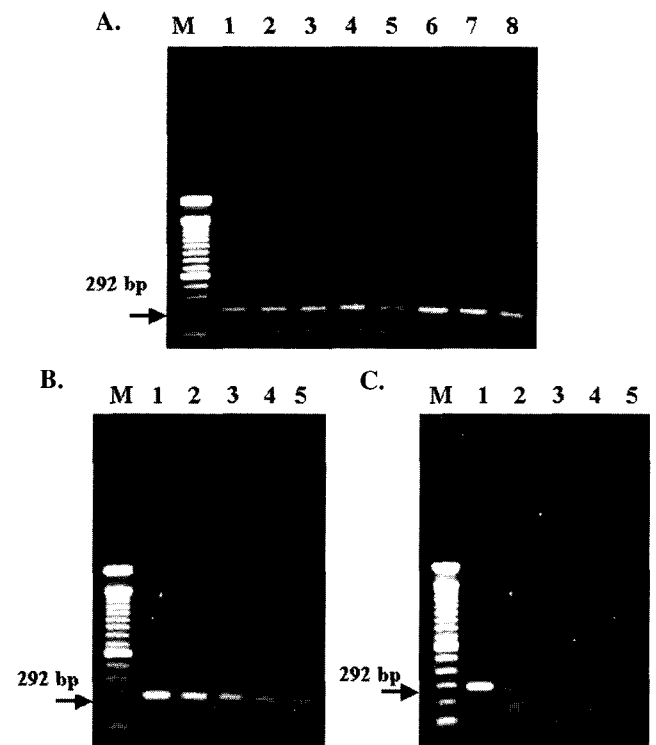
바이러스 검출에 사용하는 세 가지 방법이 감염성 바이러스와

**Table 1.** Comparison of the methods for the detection of poliovirus by cell culture, RT-PCR, and ICC-PCR

Dose of poliovirus (PFU/ml)	Cell culture		RT-PCR	ICC-PCR
	First passage	Second passage		
500	+	+	+	+
50	+	+	+	+
5	+	+	+	+
0.5	-	+	-	+
0.05	-	-	-	-
Mock	-	-	-	-

비감염성 바이러스를 구분할 수 있는지 알아보기 위하여 불활성화시킨 바이러스를 가지고 검출방법을 비교하였다. 바이러스를 불활성화시키는 방법은 열처리와 UV를 이용하였다. 열처리는 60°C에서 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 분 또는 100°C에서 1, 3, 5, 10 분 수행하였고, UV는 0.2, 0.6, 1, 2 J/cm<sup>2</sup>를 조사하였다. 각 방법으로 불활성화시킨 바이러스의 일부를 세포에 감염시켜서 세포배양법과 ICC-PCR 방법으로 검출하였고, 일부는 직접 RT-PCR 방법으로 바이러스 검출을 시도하였다.

불활성화시키지 않은 감염성 바이러스를 감염시킨 경우에는 24 시간이 지나면 CPE가 보이기 시작하며 감염 후 3일에서 4일이 지나면 거의 모든 세포가 죽는데 비해 60°C, 100°C, UV로 불활성화시킨 바이러스를 감염시킨 세포에서는 두 번째 계대배양에서도 CPE가 보이지 않는 것을 관찰하였다. RT-PCR 방법으로 바이러스를 검출하고자하였을 때에는 불활성화 방법에 따라 결과가 다르게 나오는 것을 알 수 있었다. 열처리에 의해 불활성화한 바이러스를 포함하는 시료에서는 열처리 시간에 관계없이 바이러스를 검출할 수 있었지만(Fig. 3. A, B), UV로 불활성화시



**Fig. 3.** RT-PCR analysis of inactivated poliovirus. Inactivated poliovirus RNA was extracted and cDNA was synthesized using Sensiscript RT kit (Qiagen). PCR reaction was performed using a primer set specific for VP1 region of poliovirus (see Materials and Methods). The PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis. The size of PCR product is 292 bp. (A) Poliovirus treated at 60°C. lane 1, not treated; lane 2, 5 min; lane 3, 10 min; lane 4, 20 min; lane 5, 30 min; lane 6, 40 min; lane 7, 50 min; lane 8, 60 min. (B) Poliovirus treated at 100°C. lane 1, not treated; lane 2, 1 min; lane 3, 3 min; lane 4, 5 min; lane 5, 10 min. (C) UV treated poliovirus. lane 1, not treated; lane 2, 0.2 J/cm<sup>2</sup>; lane 3, 0.6 J/cm<sup>2</sup>; lane 4, 1 J/cm<sup>2</sup>; lane 5, 2 J/cm<sup>2</sup>; lane M, size marker, 100 bp ladder.

**Table 2.** Comparison of the detection methods for inactivated poliovirus by cell culture, RT-PCR and ICC-PCR.

Treatment	Cell culture	RT-PCR	ICC-PCR
Mock	-	-	-
Virus	+	+	+
<b>60°C</b>			
5 min	-	+	-
10 min	-	+	-
20 min	-	+	-
30 min	-	+	-
40 min	-	+	-
50 min	-	+	-
60 min	-	+	-
<b>100°C</b>			
1 min	-	+	-
3 min	-	+	-
5 min	-	+	-
10 min	-	+	-
<b>UV</b>			
0.2 J/cm <sup>2</sup>	-	-	-
0.4 J/cm <sup>2</sup>	-	-	-
1 J/cm <sup>2</sup>	-	-	-
2 J/cm <sup>2</sup>	-	-	-

킨 바이러스를 포함하는 시료에서는 band가 나타나지 않는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3, C). ICC-PCR 방법으로 실험한 결과 불활성화시키지 않은 바이러스에서는 band가 나오고 열처리한 바이러스와 UV로 처리한 바이러스에서는 모두 band가 나오지 않았다(Fig. 4). 불활성화시킨 바이러스를 사용하였을 때 세 가지 검출방법을 비교한 것을 Table 2에 정리하였다.

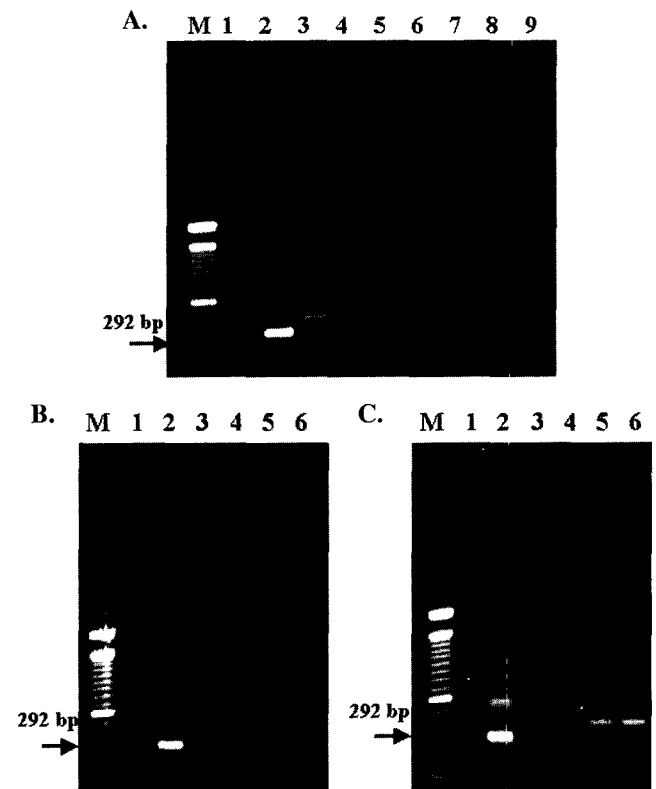
## 고 찰

본 연구에서는 먹는 물에 존재하는 바이러스를 효과적으로 검사하는 방법을 알아보고자 하여 가장 많이 사용되는 세포배양법과 PCR 방법 그리고 최근에 사용되기 시작한 ICC-PCR 방법을 이용하여 poliovirus에 대한 검출 민감도를 비교하였고 감염성이 있는 바이러스만을 빠른 시간에 검출하는 방법을 알아보고자 하였다. 이 실험의 목적이 검출방법의 민감도를 비교하는 것이므로 인위적으로 바이러스의 수를 계산하여 실험하였다.

앞의 결과에서 알 수 있듯이 세포배양법은 500 PFU/ml이나 50 PFU/ml과 같이 많은 수의 바이러스가 존재할 때에는 결과를 보일 때까지의 시간이 2 일에서 3 일로 비교적 적게 걸리지만 0.5 PFU/ml과 같이 바이러스의 수가 적을 때에는 CPE를 관찰할 때까지의 기간이 상당히 오래 걸리는 것을 알 수 있었다(19). 그리고 여러 번의 실험을 반복해 본 결과 때로는 CPE가 보이고 어떤 때에는 CPE가 보이지 않을 때도 있었는데 같은 실험에서 두 개 중에 하나는 보이고 나머지 하나는 안 보이는 경우도 있었고 또는 같은 종류의 실험에서는 두 개 모두 CPE가 보이는데 다른 종류의 실험에서는 두 개 모두 안 보일 때도 있었다. 이것은 확

률적으로 계산해 보았을 때 감염시키는 시료 안에 바이러스가 있을 수도 있고 없을 수도 있기 때문이다.

RT-PCR 방법에 의해 바이러스를 검출했을 때에는 5 PFU/ml까지 band가 나오는데 같은 시료의 RNA로 RT-PCR을 수행해도 band가 보이지 않을 때도 있었다. 그 이유는 실제로 RNA를 추출하기 위한 시료 안에는 바이러스 입자가 한 개 보다 적게 들어갈 수 있는데, RNA를 추출하는 시료의 양이 200 µl도 되지 않기 때문이다. 또한 추출한 RNA의 일부만을 사용하기 때문에 어떤 경우에는 band가 나오고 또 다른 경우에는 나오지 않을 수도 있다. 그렇다고 해서 PCR의 민감도가 떨어지는 것은 아닌 것은 50 PFU/ml에서는 항상 band가 나오는 것으로 알 수 있다. 이 경우에는 역전사 반응을 수행하는 반응 용기 안에 한 개 이상의 바이러스의 RNA가 존재한다고 할 수 있으므로 항상 양성



**Fig. 4.** ICC-PCR analysis of inactivated poliovirus. Vero cells were infected with poliovirus. Twenty-four hours later poliovirus RNA was extracted and cDNA was synthesized using Sensiscript RT kit (Qiagen). PCR reaction was performed using a primer set specific for VP1 region of poliovirus (see Materials and Methods). The PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis. The size of PCR product is 292 bp. (A) Poliovirus treated at 60°C. lane 1, mock-infected cell; lane 2, not treated; lane 3, 5 min; lane 4, 10 min; lane 5, 20 min; lane 6, 30 min; lane 7, 40 min; lane 8, 50 min; lane 9, 60 min. (B) Poliovirus treated at 100°C. lane 1, mock-infected cell; lane 2, not treated; lane 3, 1 min; lane 4, 3 min; lane 5, 5 min; lane 6, 10 min. (C) UV treated poliovirus. lane 1, mock-infected cell; lane 2, not treated; lane 3, 0.2 J/cm<sup>2</sup>; lane 4, 0.6 J/cm<sup>2</sup>; lane 5, 1 J/cm<sup>2</sup>; lane 6, 2 J/cm<sup>2</sup>; lane M, size marker, 100 bp ladder.

결과가 나온다고 생각할 수 있다. 반응용기 안에 바이러스가 존재하면 바이러스를 검출해 낼 수 있다고 할 수 있으며 이것은 기존의 보고와 유사한 결과이다(4). 게다가 5 PFU/ml에서도 band가 나오는 것은 기존의 결과보다 민감도가 높다고 할 수 있다.

적은 양의 바이러스가 존재할 때(0.5 PFU/ml)에는 RT-PCR 방법으로 검출이 불가능한데 비해, 세포배양법으로는 검출이 가능하지만 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. ICC-PCR 방법으로 바이러스를 검출하고자 할 때 적은 수의 바이러스 즉 5 PFU/ml뿐 아니라 0.5 PFU/ml에서도 희미한 band가 나오는 것을 알 수 있는데 그 이유는 바이러스가 세포 안에서 증식이 일어나기 때문이다. 이 결과로 보면 ICC-PCR 방법은 세포배양법과 비교하였을 때 동일한 민감성 결과를 얻으면서도 시간을 절약할 수 있으며, RT-PCR 방법과 비교하였을 때에는 더 적은 수의 바이러스도 검출할 수 있다는 것이다. 이상의 결과들을 종합해보면 세 가지 방법의 같은 시간대, 즉 바이러스 감염 후 이틀째의 민감도를 비교할 수 있는데 세포배양법보다 RT-PCR 방법이, 그리고 RT-PCR 방법보다 ICC-PCR 방법이 각각 10 배 더 민감하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1, Table 1).

이렇게 해서 세 가지 방법의 민감도를 결정 한 후에는 감염성 바이러스만을 효과적으로 검출하는 방법을 알아보고자 하여 바이러스를 인위적으로 불활성화시킨 후에 앞의 실험을 반복 수행하였다. 불활성화시키기 위해서 우선 바이러스를 5,000 PFU/ml로 희석하였는데 그 이유는 불활성화되지 않은 바이러스의 경우에는 RT-PCR 방법뿐만 아니라 세포배양법에 의한 결과도 빠른 시간에 알 수 있도록 하기 위해서이다. 불활성화시키는 방법은 바이러스의 외막을 파괴하기 위하여 열처리를 하였는데 60°C와 (15) 100°C에서 불활성화시켰으며, 핵산을(본 논문에서는 RNA) 파괴하기 위해서 UV를 사용하였다(13). 불활성화시킨 바이러스를 세포에 감염시키고 CPE를 관찰한 결과 불활성화시키지 않은 바이러스는 하루만에 CPE가 보이는데 반해서 불활성화된 바이러스에서는 두 번째 배양이 끝나도록 CPE가 보이지 않는 것을 알 수 있었다. RT-PCR 결과를 보면 열처리한 모든 시료에서 band가 나오는데 그 이유는 바이러스의 외막이 파괴되었을 뿐 RNA는 손상을 받지 않고 그대로 존재하기 때문이다. 그러나 UV를 조사한 바이러스로부터 RT-PCR을 수행하였을 때에는 뚜렷한 band를 관찰할 수 없었는데, 그 이유는 UV에 의해서 바이러스의 RNA가 파괴되었기 때문이라고 생각한다. ICC-PCR 방법을 사용하였을 때에는 세포배양법에서와 마찬가지로 불활성화된 바이러스는 전혀 검출할 수 없는 것을 알 수 있었다. 이상에서 RT-PCR은 감염성이 없어도 RNA만 존재하면 검출하는데 비해서 세포배양법과 ICC-PCR은 감염성이 없는 바이러스는 검출하지 못하는 것을 알 수 있다. 하지만 같은 결과를 얻는데 걸리는 시간이 세포배양법은 2 주가 걸리는데 비하여 ICC-PCR은 수 일 내에 결과를 알 수 있으므로 감염성이 있는 바이러스만을 빠른 시간에 검출하는 데는 ICC-PCR 방법이 좀 더 나은 방법이라고 할 수 있다.

결론적으로 폴리오 바이러스를 사용하여 물에서 바이러스를 검출하는 방법을 비교해 본 결과 짧은 시간에 감염성 바이러스만

검출하는 방법으로는 ICC-PCR이 가장 좋은 것으로 생각한다.

## 참고문헌

1. 이승훈, 김상중. 1999. 수계바이러스 검출에 PCR을 이용하기 위한 효과적인 농축기법. *Kor. J. Microbiol.* 35, 41-46.
2. Abbaszadegan, M., M.S. Huber, C.P. Gerba, and I.L. Pepper. 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1318-1324.
3. Abbaszadegan, M., P. Stewart, and M. LeChevallier. 1999. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 444-449.
4. Atmar, R.L., T.G. Metcalf, F.H. Neill, and M.K. Estes. 1993. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 631-635.
5. Chezzi C. 1996. Rapid diagnosis of poliovirus infection by PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1722-1725.
6. Cho, H.B., S.H. Lee, J.C. Cho, and S.J. Kim. 2000. Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Can. J. Microbiol.* 46, 417-424.
7. Gilgen, M., B. Wegmuller, 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.
8. Greening, G.E., L. Woodfield, and G.D. Lewis. 1999 RT-PCR and chemiluminescent ELISA for detection of enteroviruses. *J. Virol. Methods* 82, 157-166.
9. Grabow, W.O., V. Gauss-Muller, O.W. Prozesky, and F. Deinhard. 1993. Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 619-624.
10. Hurst, C.J., W.H. Benton, and R.E. Steller. 1989. Detecting viruses in water. *J. Am. Water Works Assoc.* 81, 71-80.
11. Keswick, B.H., C.P. Gerba, H.L. DuPont, and J.B. Rose. 1984. Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1290-1294.
12. Lewis, G.D., S.L. Molloy, G.E. Greening, and J. Dawson. 2000. Influence of environmental factors on virus detection by RT-PCR and cell culture. *J. Appl. Microbiol.* 88, 633-640.
13. Ma, J., T.M. Straub, I.L. Pepper, and C.P. Gerba. 1994. Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4203-4206.
14. Moore, B.E. 1993. Survival of human immunodeficiency virus (HIV), HIV-infected lymphocytes and poliovirus in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1437-1443.
15. Nissen, E., P. Konig, S.M. Feinstone, and G. Pauli. 1996. Inactivation of hepatitis A and other enteroviruses during heat treatment (pasteurization). *Biologicals.* 24, 339-341.
16. Payment, P. and M. Trudel. 1987. Detection and quantitation of human enteric viruses in wastewaters: increased sensitivity using human immune serum globulin-immunoperoxidase assay on MA-104 cells. *Can. J. Microbiol.* 33, 568-570.
17. Petit, F., S. Craquelin, J. Guespin-Michel, and C. Buffet-Janvresse. 1999. Nucleic acid extraction from polluted estuarine water for detection of viruses and bacteria by PCR and RT-PCR analysis. *Res. Microbiol.* 150, 143-151.
18. Puig, M., J. Jofre, F. Lucena, A. Allard, G. Wadell, and R. Girones.

1994. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2963-1970.
19. Reynolds, K.A., C.P. Gerba, and I.L. Pepper. 1996. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1424-1427.
20. Reynolds, K.A., C.P. Gerba, M. Abbaszadegan, and I.L. Pepper. 2001. ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Can. J. Microbiol.* 47, 153-157.

(Received July 24, 2002/Accepted September 11, 2002)

---

**ABSTRACT: Detection of Poliovirus in Water by Cell Culture and PCR Methods**

**Yeon-Hee Cho<sup>1</sup> and Chan-Hee Lee<sup>1,2\*</sup>** (<sup>1</sup>Division of Life Sciences, College of Natural Sciences and <sup>2</sup>Institute for Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Poliovirus is a member of enterovirus which causes paralytic poliomyelitis, encephalitis and aseptic meningitis. Since poliovirus is spread by the fecal-oral route and poliovirus-contaminated water could be a potential threat for public health, detection of poliovirus in drinking water resource is important. Infectious poliovirus and poliovirus inactivated by heat or UV were used to test three detection methods such as cell culture method, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and integrated cell culture (ICC)-PCR. Infectious poliovirus was detected by all three methods and ICC-PCR was the most sensitive and fast in detecting poliovirus. Inactivated polioviruses could not be detected by cell culture or ICC-PCR methods. On the other hand, heat-inactivated viruses could be detected by RT-PCR. Thus it is suggested that ICC-PCR method is the most sensitive and effective in detecting infectious polioviruses in water sample.