

총배양시험법에 의한 물 시료에서의 감염성 바이러스 측정과 분리 및 동정에 관한 연구

강원대학교 의과대학 미생물학교실¹, 고신대학교 의과대학 미생물학교실²

장석재¹ · 김상현¹ · 장명웅² · 신영오^{1*}

Study on Detection, Isolation and Identifications of Infectious Viruses in Various Water Samples

Seokjea Jang¹, Sang Hyun Kim¹, Myungwoong Jang² and Yungoh Shin^{1*},

¹Department of Microbiology, College of Medicine, Kangwon National University,
Chonchun, Kangwon-do 200-701, Korea, ²Department of Microbiology, College of Medicine,
Koshin University, Yungdo-Ku, Pusan, 606-701, Korea

Received : January 26, 2007

Accepted : March 20, 2007

Various factors using cell lines can effect kinds and frequencies of infectious viruses obtained in the detection tests on various water samples. We tried to find out technical problems for the maximum virus isolations from water samples and characterize the virus isolates from waters in nature and in various purification stages. Fourteen viruses were isolated from 169 water samples by virus monitoring protocol for the information collection requirements rule, US EPA. The morphological changes caused by viruses and mycoplasma infections were compared with for increasing the specificity of tests employed. Cytopathic effects of slow growing viruses were found very similar with those by toxic effects in water samples and mycoplasma infections. Five of 6 stream water samples tested (83.33%) showed virus contaminations with the range of 1.03 to 5.75 MPNs/100 liter. Eight of 24 source water samples (33.35%) showed viral contaminations. One water sample of 24 water samples during precipitation stages was shown to include infectious viruses. It was confirmed that infectious viruses were significantly decreased by purification stages from streams. The titers (TCID₅₀) of virus isolates were ranged as 10^{-6.8} ~ 10^{-6.925}/ml. The virus isolates were identified by immune fluorescent antibody (IFA) method using virus specific immune sera and serotyped using serotype specific reference sera. Of 14 virus isolates, 7 samples were identified as poliovirus and the other 7 were identified as coxsackie virus. Of 7 polioviruses, one was serotyped as type I, 3 viruses as type II and another 3 as type III. Conclusively, BGM cell lines must be free of mycoplasma for the strict examination of infectious viruses in water and highly sensitive for mainly enteroviruses. In addition, most of infectious viruses showing typical cytopathic effect from water samples were confirmed as coxsackie B and live attenuated vaccine strains of 3 polio types when BGM cells were used for virus isolations.

Key Words: Infectious viruses, Virus identification, Virus isolation

*교신저자: 신영오. 200-701, 강원도 춘천시 효자2동 192-1 강원대학교, 강원대학교 의과대학 미생물학교실
Phone: 033-250-8861, Fax: 033-252-2114, e-mail: yungoh@kangwon.ac.kr

**본 연구는 2004년도 강원대학교 학술연구조성비로 연구하였음 (This study is supported by Kangwon National University).

서 론

물에는 많은 종류의 바이러스가 일정 기간 동안 감염성을 가진 상태로 존재할 수 있다. 물에 감염성 상태로 존재하여 사람에게 전파 가능한 주요 바이러스로는 enterovirus (9,22,31), adenovirus (18,38), norovirus (18,25,46), astrovirus (30), rotaviruses (8,45,46) 등이 있다.

이들 바이러스들은 물을 통하여 인간에 감염 시 폴리오, 무균성 뇌수막염, 여행자 설사증, 여름감기, 유아설사증, 안염, 간염 등 다양한 질병을 유발한다 (6,31,37,46,53). 따라서 물에 있는 바이러스 오염에 의한 질병 유발에 대한 대응이 필요하다. 물에 존재하는 바이러스에 대한 대응조치들로서는 오염원으로부터 물에서의 바이러스 유입 차단, 적합한 처리와 함께 병원성 바이러스에 대한 지속적인 모니터링이 있다.

물에 존재하는 여러 종류의 바이러스 모니터링은 바이러스학적 기술 수준뿐만 아니라 효율성, 경제성 등 여러 가지 요인에 따라서 적용하는 방법이 달라질 수 있다 (4). 물에 존재하는 바이러스 양의 많고 적음을 지속적으로 비교하기 위해서는 시험지침서에 따른 동일한 방법에 의한 실험의 수행이 필요하게 된다. 이러한 목적으로 미국 Environment Protection Agency (EPA, 환경보호청)는 물에 존재하는 감염성 바이러스의 중요성을 인식하고 1980년에 하수로부터 감염성 바이러스의 분리방법을 정리한 바 있다 (55). 이어서 1995년에는 Information collection requirement rule (ICR)차원에서 물 시료 속의 감염성 바이러스에 대한 방법을 수립하였다 (56). EPA 방법은 물 시료 속의 감염성 바이러스 탐지에 대하여 대량의 채수 체계와 많은 세포접종수를 근거로 하여 최대 수의 감염성 바이러스 실태를 조사하고자 한 것이 특징이며 하나의 방법을 제시하고 있다. 또한 통계의 객관화를 위하여 이 사업에 참여하는 검사자와 실험기관에게 인정 제도를 도입함으로써 검사의 정확도를 높이고 통계를 객관화하고자 하였다. 이와는 대조적으로 일본의 경우, 일본수도협회 주관하에 상수시험방법의 일부로 바이러스 분리와 동정에 관하여 기술하고 있다 (1). 미국의 ICR rule의 방법보다는 상이하게 바이러스 흡착, 접종세포주의 선택, 바이러스의 관독 기준 등을 다양하게 기술하여 검사자가 여건에 따라서 택할 수 있도록 하고 있다. 이 두 개 나라와는 상이하게 호주 및 뉴질랜드에서는 물 관리지침에는 포함되지 않고 National water quality management strategy에서 지침으로 그 방법을 제시하고 있다. 구체적인 시험방법을 제시하고 있으며 바이러스검사의 원론적인 방법을 기술하고 있다. 이들 나라들의 표준시험방법들은 각기 그 나라의 여러 가지 실정에 부합한 방법을 택하고 있어 여러 면에서 차이가 있으며 특징

을 갖고 있다 (5).

본 연구에서는 원칙적으로 미국의 ICR rule 방법에 따라서 물에 있는 바이러스를 탐지하는 시험을 수행하였다. 이 방법에서 사용하는 바이러스 분리를 위한 세포는 BGM 세포로서 이 세포에서는 일상적인 장관계바이러스의 다수를 차지하는 엔테로바이러스가 잘 증식하는 것으로 알려져 있다 (48,56). 세포배양에서 잘 증식되지 않으면서 물을 통해 전파되는 중요바이러스로는 로타바이러스, norovirus (20)이 있다. 로타바이러스는 주로 소아에서 설사증을 유발하나 종류에 따라서는 성인에서도 질병을 유발한다 (10,20). 인체의 분변을 통하여 많은 양이 배출되기 때문에 하수를 통하여 전파될 가능성이 높다 (51,52). SA11주와 같은 여러 종류의 동물 로타바이러스는 세포배양에서 즉시 증식이 가능하나 사람 로타바이러스는 변이주나 트립신 등으로 처리하지 않는 경우에는 증식이 불가능하거나 감염성 바이러스 입자가 형성되지 않는다 (51,54). 세포배양에 적응된 로타바이러스주는 세포에서의 배양이 가능하다 (45). 그러나 자연계의 물 시료로부터 BGM 등 특정세포주를 사용하여 로타바이러스를 증식시키는 것은 어렵다 (45,51,54). 로타바이러스 이외의 Norwalk agent 혹은 small round structured viruses (SRSV)로 불리던 norovirus (24,30)는 모든 연령의 환자에서 후진국 혹은 선진국에 관계없이 비세균성 급성 위장관염을 일으킨다 (14). Norovirus는 세계적으로 위장관염의 약 90%를 차지하는 것으로 조사되고 있다 (44). 따라서 이들 물에서 배양되지 않은 바이러스의 탐지를 위해서는 polymerase chain reaction에 의한 핵산의 탐지, enzyme immuno adsorbent assay (ELISA) 방법에 의한 항원의 탐지 그리고 전자현미경에 의한 직접적인 바이러스 입자의 탐지방법 등을 사용하게 된다 (17,41).

세포배양을 사용한 감염성 바이러스의 배양에는 우선 가장 다양한 바이러스에 감수성이 있는 적합한 세포주의 선택이 중요하다. 일반적으로 1차 배양세포가 바이러스 배양 감수성이 높으나 1차 배양은 고가의 동물이 필요하며 한정된 계대수만 생존할 수 있어 관리하기에 어려운 점을 갖는다 (56). 따라서 바이러스 배양을 위한 세포주로는 가장 광범위한 바이러스에 감수성이 있으며 지속적으로 계대가 가능하고 증식이 잘되는 세포주가 요구된다 (56). 이러한 요건을 충족시키는 세포주로는 증식에 까다로운 조건이 필요하며 증식속도가 느린 사람 유래의 세포주는 적합하지 않다. 다수의 원숭이 신장기원의 세포주는 상대적 악조건에서도 잘 자라며 증식속도가 빠르고 광범위한 바이러스에 대하여 감수성을 갖는다 (43,56).

미국의 환경보호청에서는 이러한 목적의 세포주로서 아프리카 녹색원숭이 계통의 세포주인 BGM 세포주를 사용하고

있다. BGM 세포주를 사용하여 환경수로부터 물에 있는 인체 유래 바이러스를 증식시키는 방법으로 탐지되는 바이러스는 장내바이러스 (enteroviruses)와 레오바이러스 (reoviruses)가 대부분이다 (56).

물에 있는 증식성 바이러스를 분리하기 위하여 시료를 감수성 세포에 접종한 다음 세포병변을 관찰하는 방법은 가장 간단하며 용이한 방법이다. 이러한 방법에 있어 가장 중요한 점은 접종하는 세포자체의 성상이다 (56). 즉 바이러스 분리에 사용하는 세포가 마이코프라스마 등에 오염되었을 때 세포의 형태와 성상에 영향을 줄 수 있다 (3).

따라서 본 연구에서는 대상이 되는 물 시료를 사용하여 감염성 바이러스를 측정하고 분리하는 시험에서 마이코프라스마 등 세포병변의 해석에 영향을 끼칠 수 있는 인자를 규명하고자 하였다. 나아가 물 시료에서 분리한 병원성 바이러스에 대한 바이러스 종류와 혈청형을 규명하고자 연구를 수행하였다.

본 연구에서는 알려진 표준방법을 사용하여 2년간의 기간 동안 채취한 169건의 물 시료로부터 감염성 바이러스를 분리하였다. 물 시료에 따른 바이러스의 양적 상관관계를 분석하였다. 이들 바이러스를 분리하는 검사에서의 특성을 연구하였으며 면역형광시험으로 바이러스를 동정하였다. 또한 분리한 각각의 바이러스에 대하여 중화시험방법으로 혈청형을 분석하였다. BGM 세포주로부터 마이코프라스마를 분리하고 동정하였으며 배양하여 코로니 형태를 관찰하였다. 본 연구에서 물 시료를 사용하여 얻은 인체 병원성 바이러스는 모두 폴리오, 콕사키 등 엔테로바이러스에 속함을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 표준 바이러스주 및 역가측정

양성대조 및 역가측정 용으로 사용할 대조 바이러스는 폴리오바이러스 3 생 백신주를 사용하였다. US EPA의 Virus Laboratory에서 인증기관에 공급한 폴리오바이러스 3 혈청형으로써 아이오아 대학으로부터 분주받았다. 역가의 단위로 tissue culture infectious dose endpoint (TCID₅₀)는 Reed-Muench의 방법에 따라 계산하였다 (48). 96 well microplate (Falcon, Lincoln, NJ, USA)를 사용하여 BGM 세포주 단층세포배양법을 사용하였다 (38,39). Plaque forming unit (PFU)는 24 well microplate (Falcon)에 BGM 세포의 단층 배양층을 형성하여 측정하였다 (48). 바이러스의 희석을 gum tragacanth와 nutrient 배양액을 혼합시켜 5% CO₂ 인큐베이터가 포함된 36.5°C incubator에서 3~4일간 정치하였다. 50~85% 정도의 세포병변을 보일 때 overlay 배양액을 제거하고 각 well에

Table 1. Origins of virus isolated water samples

Kind of water samples	Number	Percentage to whole samples (%)
Stream waters	5	35.8
Source waters	8	57.1
Settled water	1	7.1
Total	14	100

The virus isolates were characterized and identified for elucidation of pathogenic virus distributions in various water flows. The most viruses were obtained from streams and source water for purification to tap water

1 ml crystal violet 고정염색을 15분간 작용시켰다. 흐르는 물로 세척한 다음에 공기 건조시켜서 판독하였다 (4,26).

2. 세포주 배양과 세포에의 시료 접종

물 시료나 기타 바이러스 분리를 위하여 준비된 시료를 미국의 아이오와대학에서 분양받은 아프리카 녹색원숭이 유래의 BGM 세포에 접종하였다. 세포주의 선택은 엔테로바이러스에 감수성이 높은 BGM 세포를 선택하였다. MEM과 동량의 L-15를 동일한 혼합 액에 2~10%의 혈청과 항생제를 추가한 배양액에서 증식시켰다. 바이러스 분리 물 시료의 접종방법은 미국 EPA가 시행하고 있는 방법을 따랐다 (56). 25 cm² 면적의 세포배양 용기 (Falcon)에 ml당 6.0 × 10⁴에서 1.5 × 10⁵사이의 세포수를 포함한 세포 부유액 5 ml를 가하여 2일 정도 배양한 다음 접종에 사용하였다. 시료의 접종량은 정량적으로 ICR의 방법에 따라서 계산하였다. 즉 접종량 S는 분석하고자 하는 시료량 (D)에 조정된 total adjusted sample volume (ATSV)를 나누고 이를 다시 FCSV로 곱하였다. S는 subsample 1과 2로 나누어서 접종하였으며 세포배양 플라스크 cm²당 0.04 ml이 초과되지 않도록 하였다 (23,56).

3. 바이러스 분석대상 물 및 시료의 채취

본 연구에서 분석대상으로 한 바이러스 시료는 총 14건이었다. 14건의 바이러스 시료의 물 종류 별 숫자와 구성비는 Table 1과 같다. 바이러스 분리에 사용한 물 시료의 수는 6건의 지류천수, 24건의 원수, 착수정 19건, 침전수 20건, 여과수 20건, 정수 40건 및 수도꼭지수 40건으로 총 169건의 시료로부터 분리한 것이다. 물 시료의 양은 원수는 200 l ~ 300 l, 그리고 처리수는 1,200 l ~ 1,500 l를 채취하였다.

바이러스 분리를 위한 물의 채수는 원칙적으로 미국 환경청의 ICR rule 차원의 바이러스검사 시험지침 (56)을 따랐다. 물의 온도, pH 및 탁도를 측정하였다. 호스에 1 MDS 바이러스 흡착용 필터를 설치하였다. 그리고 탁도가 75 NTU 이상

이 되는 경우 전필터 카트리지를 장착하고 물을 통과시켰다. 채수에 사용하는 모든 장비는 고압 멸균과 0.1% 염소로 멸균하였으며 2% thiosulfate 용액으로 염소를 중화하였다. 통과하는 물의 pH를 6.5 내지 7.5 범위에 들어가도록 조절하였다. 채수되는 물의 속도는 압력이 30 psi 이하로 하였으며 유량은 4 l/min 되도록 하였다 (12,16,21,56).

4. 바이러스 용출 (Elution) 및 침출

대체적인 시험 방법은 미국 ICR rule의 방법을 따랐다 (56). 원수와 정수 등의 시료를 통과시켜 바이러스를 흡착시킨 1 MDS 여과장치로부터 바이러스를 용출 (elution)하였다. 흡착시킨 시료는 채수 48시간 이내에 용출과 침출과정을 거쳐 세포에 접종하였다. 필터가 포함된 카트리지에 양압을 가하여 카트리지에 남아 있는 물을 제거하였다. 압력용기 (Millipore, Bedford, MA, USA)에 pH 9.5의 1.5% beef extract에 0.05 M glycine을 첨가한 액 1,000 l를 넣은 다음 양압을 가하여 액을 Cartridge로 이동하여 1분간 정지시켰다. 다시 양압을 가하여 beef extract액을 멸균된 비이커로 이동시켰다. 이러한 과정을 1회 더 반복하였다. 얻어진 용출액은 잘 섞어준 다음 pH를 7.0~7.5로 조정하였다. pH를 3.5 ± 0.1 로 조정된 다음 실온에서 30분간 섞어 주었다. 이어서 용출액을 2,500 x g의 속도로 4°C에서 15분간 원심한 다음 상층액을 제거하였다. 침전물이 들어 있는 원심분리 용기에 pH 9.0~9.5의 0.15 M Na-phosphate 30 ml를 첨가한 다음 10분간 충분히 섞었다. 용해된 침전물을 4,000~10,000 x g의 속도로 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 취하고 pH를 7.0~7.5로 조정하였으며 이를 final concentration sample volume (FCSV)으로 하였다.

5. 바이러스 분리시험

농축 시료를 BGM 세포주에 접종하여 바이러스를 배양하였다. 바이러스 감염에 감수성이 높은 144~165번의 세포계대 횡수로 3~6일간 배양한 세포를 사용하였다. DMEM 배양액에 10% fetal calf serum (FCS)이 포함된 증식용 배양액을 버리고 PBS로 세척하였다. 물 시료로부터 농축시킨 최종농축액을 세포배양 플라스크의 바닥면적 cm²당, 접종량을 0.04 ml이 넘지 않게 BGM 세포에 접종하였다 (26,39). 음성대조군은 접종량에 해당되는 만큼의 미리 조정된 pH 7.0~7.5의 0.15 M Na₂HPO₄ · 7H₂O 용액으로 접종하였다. 양성대조군은 0.15 M Na₂HPO₄ · 7H₂O 용액에 20 PFU/ml로 희석된 바이러스를 사용하였다. 양성대조군에서 바이러스에 의한 세포병변 현상을 확인한 다음에 관독하였다 (15,56).

바이러스 흡착을 위해 80~120분간 실온에서 정지하였고 20분 간격으로 흔들어서 주었다. 세포배양 플라스크에 2% FCS

가 함유된 DMEM 배지를 각 배양용기에 5 ml씩 분주하고 36.5°C 5% CO₂ 인큐베이터에 배양하면서 14일간 바이러스성 세포병변현상을 관찰하였다. 세포의 관찰은 도립현미경을 사용하였으며, 세포독성현상이 일어나는 지를 확인하기 위해 첫 3일간은 매일 관찰하였다 (56). 단일평판의 75% 이상 양성을 보이는 경우에 플라스크를 일단 -70°C에 보관하였다. 음성대조를 보이는 배양 시료는 같은 세포에 같은 조건으로 계대 배양하였다.

6. MPN (most probable number)의 산출

물 시료에 대한 바이러스 량의 측정은 EPA의 방법을 따랐다 (55,56). 시료 중에 존재하는 바이러스농도는 ICR의 방법에 따른 최적수 (most probable number, MPN)/ml를 계산하였다. 실제계산은 US EPA에서 공급한 MPN program을 사용하였다. 실제 계산에서의 대상 원수의 량은 100 l로 하였다.

$$MI = 100 \text{ Mm S/D,}$$

여기에서 S는 assay sample volume이며, D는 분석하고자 하는 original water sample의 양에 해당한다. 각각의 water sample에 대한 lower 95% confidence limit 100 l값 (CLI)은 다음의 공식에 의하여 산출하였다.

$$CLI = 100 \times CL_{lm} \text{ S/D}$$

여기에서 CL_{lm}은 ml당 lower 95% confidence limit이다. 한편, 100 l값에 대한 upper 95% limit는 다음의 공식에 따라서 산출하였다. $CL_u = 100 \times CL_{um} \text{ S/D}$, 여기에서 CL_{um}은 ml당 upper 95% confidence limit이다.

7. 면역형광시험

분리된 바이러스의 동정시험은 면역형광시험을 사용하여 수행하였다. 먼저 동정하고자 하는 분리 바이러스를 준비된 BGM 세포단일평판에 접종한 후 세포병변현상을 관찰하였다. 25% 이상 90% 이하의 세포병변현상을 보이면 배지를 비워내고 0.01 M PBS로 3번 헹구어주었다. 이때 PBS는 tween 20과 sodium azide를 사용하지 않았다. PBS를 0.5 ml를 첨가하여 세포평판을 잘 긁어내고 그 세포를 PBS로 다시 부유하였다. 실온에서 250 x g, 10분간 원심분리를 하여 세포침전물 층을 얻어 0.1~0.2 ml의 PBS로 부유하여 슬라이드에 6~8 mm 정도의 세포 spot을 만들고 완전하게 공기 중에 건조시켰다. 건조 후 2~8°C 아세톤에 10분간 슬라이드를 고정하였다. 만든 슬라이드에 탐지하고자 하는 바이러스에 대한 마우스단클론항체 (CHEMICON Cat. No. 3303, 3311, 3321, 3336)를 적정하였다. 습기가 충분한 챔버에 슬라이드를 넣고 37°C, 30분간 정지시켰다. 반응이 끝난 다음, 남은 단클론항체를 10~15초 동안 PBS를 이용하여 조심스럽게 씻어서 제거하

였다. 슬라이드를 PBS가 든 염색접시에 5~10분 정도 부드럽게 흔들면서 행구어준 후 슬라이드에 남은 시약을 잘 흔들어 제거한 후 fluorescein-conjugated rabbit anti-Mouse IgG (Jackson Immuno Research Laboratories INC. Code No. 315-095-003)를 충분히 세포에 덮어주었다. 단클론항체를 처리한 과정과 동일하게 습기가 충분한 챔버내에 슬라이드를 넣고 37°C, 30분간 배양하고 PBS로 10~15초간 씻어내었다. 염색 접시에 5~10분간 부드럽게 흔들면서 행구어준 다음 마운팅액을 사용하여 커버슬립을 덮은 후 검경하였다. 세포핵내 특이반응 항원의 여부를 관찰하였다 (2,19,34).

8. 중화시험

물 시료로부터 분리한 13개의 바이러스가검물에 대하여 세포배양 상에서의 중화시험을 실시하였다. 미국 Public Health Association의 방법을 따랐다 (48). 분리된 바이러스 시료를 100 TCID₅₀이 되도록 희석하여 항혈청군과 혼합하여 BGM 세포에 접종하였다.

Enterovirus typing을 위한 항혈청 (RIVM, A, B, C, D, E, F, G, PP, CBP 혈청군)을 DMEM media에 1:20으로 희석하여 사용하였다. 96 well plate에 희석된 바이러스 시료 100 TCID₅₀를 0.05 ml씩 넣어주었다. 1분간 조심스럽게 흔들어 준 후 37°C에서 1시간 방치한 후에 cell suspension 0.05 ml을 넣었다. Cell의 양은 1~2일 동안 monolayer가 형성될 수 있을 만큼 넣었다. Virus control은 항혈청 대신 배지 0.05 ml을 넣어주었으며 cell control은 배지 1 ml과 cell 0.05 ml을 넣어주었다. 37°C에서 세포를 배양하면서 현미경으로 CPE의 여부를 관찰하고 positive control이 완전히 CPE를 보이면 14일 후에 판정하였다.

9. BGM 세포주에 대한 마이코플라스마 검사

바이러스 분리에 사용한 BGM 세포의 마이코플라스마 오염 여부와 마이코플라스마에 의한 세포주의 세포형태 변이에 대하여 실험하기 위하여 6개의 세포주 (시료 No 1~6)를 사용하였다. 2개의 세포주 (시료 No 1, 2)는 액체질소 탱크에서 보관되어 거의 계대하지 않고 형태적 특이 변화가 관찰되지 않은 세포주인 반면, 나머지 4개의 세포주 (No 3~6)는 장기 계대 시에 형태적 변화를 보이는 세포들이었다. 이들 6종류의 세포배양 상층액에 대한 PCR 시험은 전체적으로 Wong-Lee의 방법을 따랐다 (57). Primer로는 Primer A, Primer B, Primer A-RI, 및 Primer B-RI를 포함한 4종류의 oligonucleotides를 사용하였다. 4종류 primer의 nucleotide sequence는 다음과 같다. Primer A는 5'-GGCGAATGGGTG-AGTAACACG-3'이었으며 Primer B는 5'-CGGATAACGCTT-GCGACCTATG-3'이었다. Primer A-RI는 5'-GAATTCGGCG-

GCGAATCCGTGAGTAACACG-3'이었다. Primer B-RI는 5'-CGGATAACGCTT-GCGACCTATGCTTAAG-3'이었다 (57).

증식성 바이러스 분리에 사용되는 BGM 세포주의 마이코플라스마 오염도와 세포의 변성과의 상관관계를 규명하기 위하여 마이코플라스마 배양 및 확인 검사를 수행하였다. 사용한 방법은 기본적으로 Schmidt의 방법을 사용하였다. 사용한 배양액은 3.5%의 peptone, 1.75%의 NaCl, beef extract 등이 포함된 완전 Mycoplasma broth M0660 (Sigma, St. Louis, MO, USA)에 한천, 말 (horse)혈청 및 penicillin G 등을 넣어 사용하였다. 마이코플라스마 오염 여부를 시험하고자 하는 세포 부유액 0.1 ml을 agar plate에 streak하고 37°C에서 3주간 배양하였다. 배양하면서 집락형성 여부와 면역효소분석법으로 마이코플라스마의 존재 여부를 시험하였다 (57).

결 과

1. 물 시료로부터의 바이러스 증식

바이러스 시료 접종 후, 배양 10일 이상이 경과하였을 때

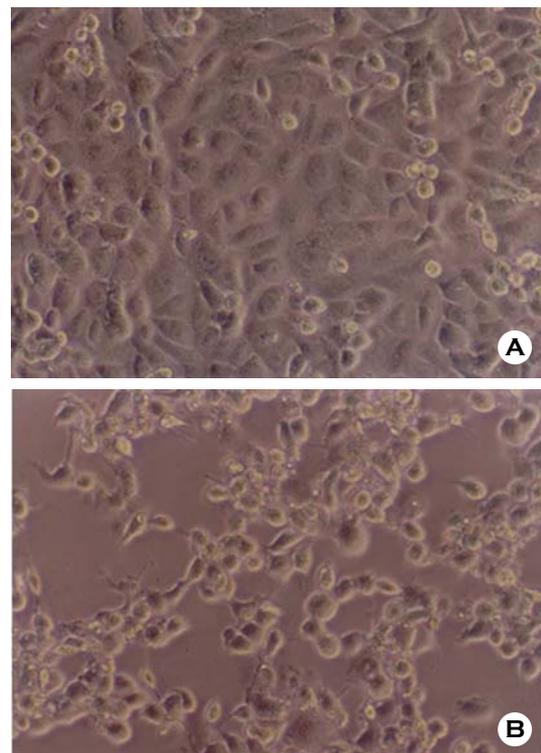


Figure 1. Cytopathic effects (CPE) shown by poliovirus type 1 isolate from a stream water. CPEs were usually appeared 3 or 4 days after the water samples were tried to inoculate to BGM cells for the first time. However, the CPEs were appeared more rapidly when the positive samples were passaged in BGM Cell line culture. The poliovirus showed typical CPE of round cells and separated from cell culture flask walls completely in few days.

에는 부유세포가 증가하여 세포의 상태가 나빠지는 것을 관찰할 수 있었으며 이러한 경우 새로운 유지배양액을 가하여 배양조건을 개선하였다. 양성대조로 20 PFU/ml의 약독화 폴리오바이러스 3형주를 접종하였을 때 전형적인 폴리오바이러스의 세포병변현상이 나타났다 (Fig. 1). 14일간 관찰 시 양성대조와 동일한 세포병변현상을 보이는 플라스크는 단일평판의 75% 이상이 세포병변을 보이면 즉시 냉동시키고 나머지 음성대조와 동일한 양상을 보이는 것은 관찰을 계속하고 14일 지난 후 냉동시켰다. 14일 후 양성반응을 보인 플라스크와 음성반응을 보인 플라스크를 모두 녹여서 양성 플라스크는 세포병변현상을 일으키는 세균성 오염과 구분, 확인하기 위하여 여과하여 계대하였으며, 음성반응을 보인 것은 아직 세포병변현상을 보이지 않은 바이러스의 존재 여부를 확인하기 위하여 계대하였다. 첫 번째 세포배양 때와 동일한 결

과를 보이는 경우에는 실험결과를 확인하였고 첫 번째 세포 배양의 결과와 계대 배양 시 결과가 다를 때는 플라스크를 세 번째 계대하여 확인시험을 거쳤다.

2. 물 시료에 따른 바이러스의 양

물 시료로부터 분리되는 바이러스의 양은 물 100 ℓ당 1.02에서 5.75 MPN의 수치를 보였다. 공정별로 배양성 바이러스의 시험결과는 처리단계에 따라 상이한 것으로 나타났다. 물 시료에 따른 분리 바이러스의 오염 정도는 물의 흐름에 따라 감소되는 현상을 보였다 (Fig. 2). 즉 검사 시료 169건에 대한 바이러스 분석율은 지류천에서 83.3%로 가장 높았다. 원수에서의 바이러스 분리율은 33.3% (8/24)이었다. 우선 시험대상이 된 10개 착수 정지점의 19개 채수 가검물은 모두 음성으로 확인되었다. 즉 원수의 바로 다음 단계인 착수 정에서부터 배양성 바이러스는 현저히 감소된 것으로 확인되었다. 침전수에 대한 바이러스 시험은 한 건에서 양성으로 확인되었으며 그 양도 0.34 MPN/100 ℓ로서 원수에서의 바이러스 량 보다 현저히 감소되었다. 이 시료의 채수일이 1999.

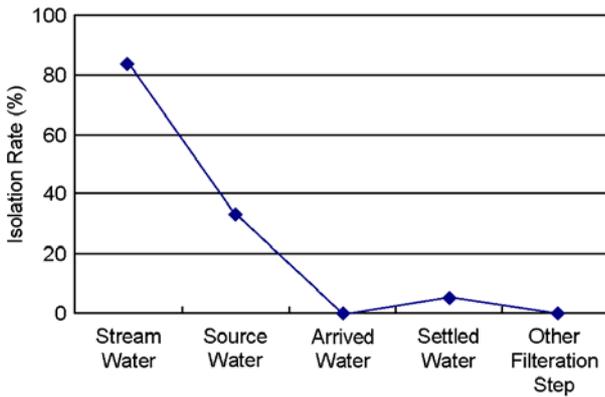


Figure 2. Decrease of virus isolation rates by water flow stages. One case of virus isolation from precipitation area is interpreted insignificant because of only one case in rainy season. The detailed numbers of isolates and water samples for virus isolations were described in the result section of the theses and table 2.

Table 2. Percentage of water samples to virus isolations from which was isolated

Kind of water samples	Numbers of virus tested	Numbers of virus Isolated	Percentage to whole samples (%)
Stream waters	6	5	83.3
Source waters	24	8	33.3
Settled water	20	1	5.0*
Total	50	14	28.0

* This percentage is interpreted insignificant statistically because of one isolates only in rainy season when viruses pollutions could be temperately increased.

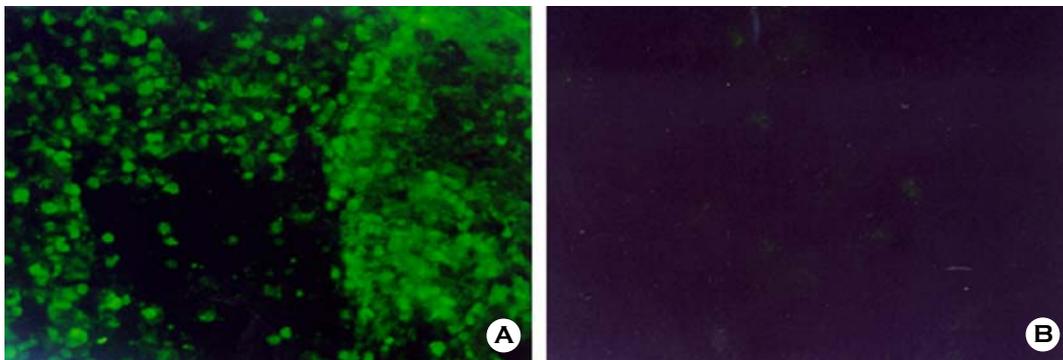


Figure 3. Results of virus identifications tests on virus isolate cultures by direct immuno fluorescence antibody (IFA) test using polio antibody labelled with fluorescein isothiocyanate conjugate. (A) shows typical intra-nuclear positive antigen presence of blue green colour by polio specific reference immune serum, whereas (B) shows no particular colour reaction by IFA on BGM cell culture not inoculated by virus isolate.

7. 22일로서 장마로 인한 상황이었다. 여과수는 모든 가검물에서 음성이었다 (Table 2).

한편 분리되는 바이러스의 역가는 분리 초기에 역가시험을 한 결과, 물 시료에 따라 다르나 배양 상층액 시료 ml당 $10^{-6.8} \sim 10^{-6.925}$ 의 다양한 수치를 보였다.

3. 분리 바이러스에 대한 바이러스 종의 동정

물 시료로부터 분리한 바이러스에 대하여 여러 가지 방법으로 바이러스를 동정하였다. 분리된 바이러스 시료로서 항-poliovirus type 3 혈청에 대한 혈청으로 면역형광시험의 결과는 Fig. 3에서와 같다. 분리된 14건의 시료에 대하여 면역형광시험을 수행한 결과 모든 시료에서 특이적인 핵내 항원의 양성반응을 보였다 (Fig. 3). 분리된 가검물에 대한 면역형광시험에서 14건의 바이러스동정시험의 결과, 7건이 콕사키바이러스 B이었으며 7건은 폴리오바이러스로 규명되었다.

Table 3. Serotypes of 14 virus isolated from water samples

Viruses	Sero type	Numbers
Poliovirus	type I	1
	type II	3
	type III	3
Coxsackievirus	type B3	1
	type B4	3
	type B	3
Total		14

The detailed methods of neutralization tests for serotypes were described in materials and methods section of the thesis. All the poliovirus isolates from waters in nature were confirmed as attenuated vaccine strains by the concerned laboratory of Korean National Institute of Health.

4. 분리 바이러스에 대한 바이러스 혈청형의 동정

분리된 바이러스에 대하여 중화시험으로 바이러스를 동정하였다. 알려진 enterovirus 표준혈청 coxs. B1 ~ 6, polio. 1 ~ 3, entero pool A ~ G를 갖고서 분리 바이러스와의 중화시험을 수행한 결과는 Table 3과 같았다. 바이러스 종에 대해서는 면역형광현미경시험 결과와 일치된 반응을 보였다. 동정된 바이러스 종에 이어 14건의 분리 바이러스에 대한 중화시험에서 7건 (50%)이 폴리오바이러스였으며, 나머지 7건 (50%)이 콕사키바이러스로 확인되었다. 한편 에코바이러스에 대해서는 모두 음성을 보였다.

5. 세포의 형태와 마이코프라스마 오염과의 상관관계

마이코프라스마로 확인된 세포주의 장기간 배양 중에 보인 세포의 형태 변화는 Fig. 4와 같았다. 세포를 새로이 계대한 이후 10여일 후에 방추형 혹은 세포의 위축, 괴사 등을 보이었다. 세포독성 혹은 대조로 사용한 레오바이러스와 형태적인 차이를 구분하기가 어려웠다. 세포의 형태 변화를 보이지 않은 2개 세포배양액 가검물 (No 1, 2)과 세포의 형태적 변화를 보이는 4개의 세포배양액 마이코프라스마 검사에 대한 PCR 시험 결과는 모두 1.6 kbp에서 양성 반응밴드를 보였다 (Fig. 5). 세포의 형태적 변화를 보이는 모든 세포배양 상층액은 10^4 배로 희석한 시료에서 양성으로 시험되었다 (Fig. 5). ELISA 시험에서는 세포배양 상층액의 10^{-2} 까지만 양성율을 보여 PCR 시험 보다 낮은 감도를 보였다. 동 실험에서 바이러스 분리에 사용하는 세포배양주는 세포 변화에 관계없이 마이코프라스마 오염을 보일 수 있으며 형태적 변화와 일치하지 않은 결과를 보였다.

양성으로 시험된 세포배양 상층액에 대하여 마이코프라스마 배양시험을 수행하고 동정시험을 수행한 결과 Fig. 6에서

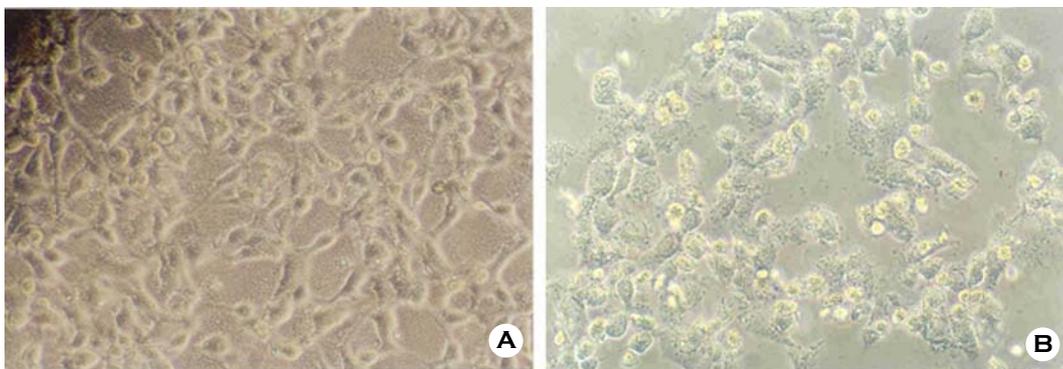


Figure 4. Cytopathic effect similar to morphological changes by mycoplasma infection on BGM cells and CPE by reovirus infection. CPE or morphological changes on BGM cells by mycoplasma and reovirus were appeared 6~14 days after inoculation of samples into cell culture. (A) showed morphological changes by mycoplasma strains, whereas (B) showed CPE by reovirus reference adapted strain.

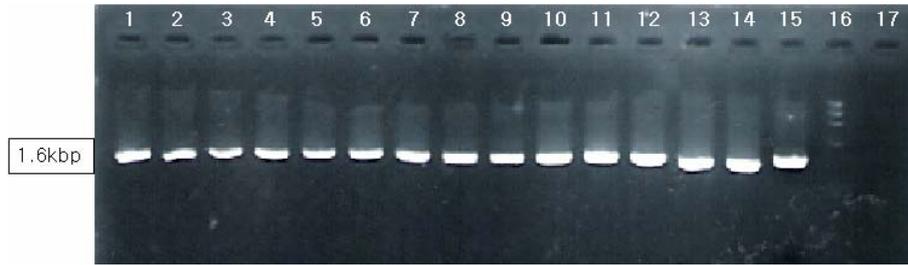


Figure 5. Results of universal PCR on 6 cell culture supernatants. The samples showed bands of 1.6 kbp in positive reaction. Lanes (1) to (2)s are undiluted sample of morphologically normal cell supernatants. (3) and (4) are 10^{-1} and 10^{-2} diluted PCR results of morphologically normal BGM cells. (5) and (6) are undiluted samples of positive samples No 1 and 2 respectively. (7) and (8) are 10^{-1} and 10^{-2} diluted PCR results of positive samples No 1 and 2, respectively. (9) and (10) are undiluted of positive samples 3 and 4, respectively. (11) and (12) are 10^{-1} and 10^{-2} diluted PCR results of positive samples 3 and 4, (13) and (14) are 10^{-4} diluted PCR results of positive samples 3 and 4, respectively. (15) is positive control by *M. pneumoniae*, whereas (16) and (17) are negative controls.

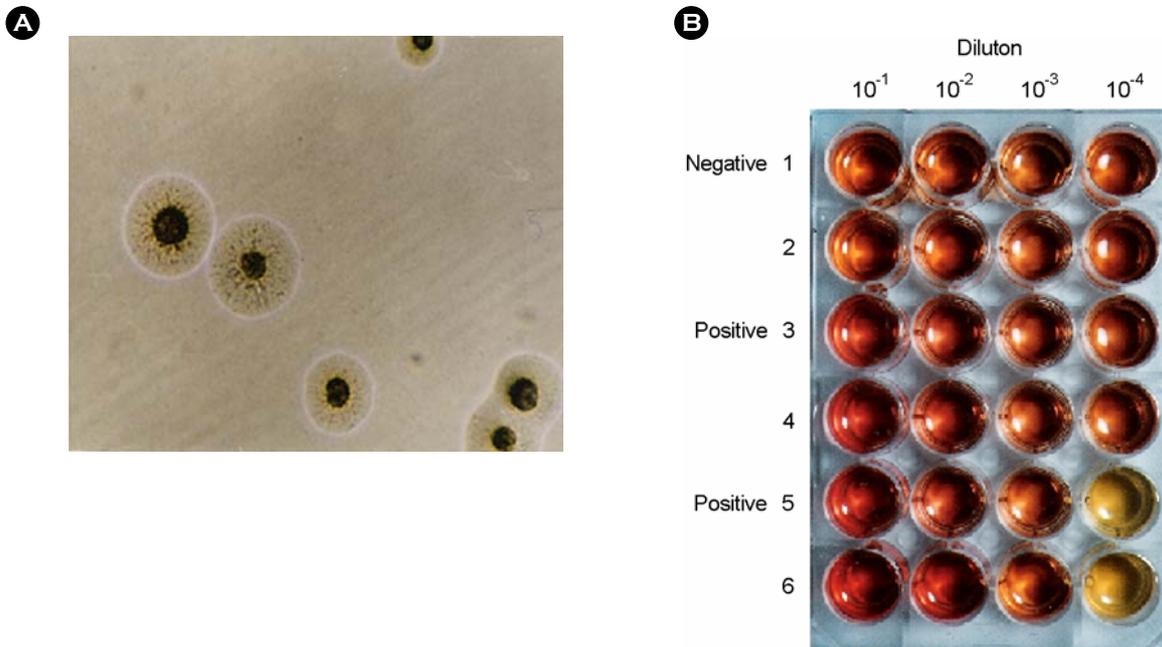


Figure 6. Culture and antigen tests on *Mycoplasma* isolates from BGM tissue culture supernatants: (A) shows the typical fried egg colony morphology of the strain identified as *Mycoplasma fermentans*. (B) shows the colour reactions of 6 cell culture supernatants by *Mycoplasma* specific ELISA tests. Negative 1 and 2 were culture supernatants morphological normal cells, whereas Positive 3, 4, 5 and 6 were morphologically abnormal cell samples.

와 같은 집락형태를 보였으며 *M. fermentans*로 동정되었다.

고 찰

본 연구에서는 국내의 물 시료에서 감염성 바이러스의 측정함은 물론 감염성 바이러스 시험의 감도와 특이도에서 영향을 끼치는 제반 인자를 규명하고자 하였다.

우선 감염성 바이러스의 분리시험에서 감도에 영향을 끼치는 인자들에 대하여 검토하고자 하였다. 감도에 영향을 끼치는 첫 번째 요인으로 대상으로하는 시료량은 현재 수 l로

부터 1,000 l 이상까지의 다양한 차이를 나타낸다 (7,27,28, 32,33,56). 물 시료의 양을 증가시키에 따라서 바이러스의 분리 가능성은 높아지게 된다. 본 시험에서는 물 시료의 채수량을 원수 200 l, 정수 1,000 l로 하여 채수량을 극대화하였다 (56). 일본에서의 시료량이 20~40 l임을 감안할 때 (1), 시료의 양을 극대화함으로써 바이러스 분리의 가능성을 증가시켰다. 따라서 본 연구에서 다량의 물 시료를 사용함으로써 시료에 의한 바이러스 분리는 최대화된 것으로 추정된다. 바이러스에 영향을 끼치는 두 번째 인자로서 바이러스에 맞는 여과지의 선택이다. 물에 있는 바이러스를 흡착하기 위

하여 본 연구에서는 1 MDS 여과지를 사용하였으나 (56), 일본에서는 시료에 DEAE cellulose를 직접 첨가하여 수중 바이러스를 흡착시키는 방법을 제시하고 있다 (1). 물 시료로부터 바이러스를 흡착시킨 여과지 혹은 시료로부터 바이러스를 용출시키고 농축시키는 방법은 연구자와 표준시험방법에 따라서 차이를 보이고 있다 (USEPA, 일본수도협회, Australia National Health and Medical Research Council). 바이러스의 용출 및 농축은 polyethylene glycol (PEG), beef extract 처리에 의한 organic flocculation 등의 여러 가지 방법이 있으며 본 연구에서는 organic flocculation 방법을 사용하였다 (40,55,56). 이 방법에서는 pH의 관리 등 검사담당자의 시험수행 능력에 따라서 회수율에 큰 차이를 보이는 것으로 알려져 있다 (55). 바이러스 회수율과 대상에 결정적 영향을 끼치는 인자로서 집중하는 세포의 종류이다. 본 연구에서는 African green monkey 유래의 BGM 세포를 사용하였으며 이 세포는 인간의 장 분비 바이러스의 다수를 차지하는 엔테로바이러스에 대한 증식성이 극히 높은 것으로 알려져 있다 (55). 그러나 인간 유래 바이러스에 대한 증식성은 인간 혹은 원숭이 기관의 1차 배양세포 (primary cell)가 원숭이 신장 계통의 불멸 세포주보다 높은 것으로 알려져 있다 (48). 또한 이론적으로는 BGM 세포주 하나만을 사용하는 것보다 집중하는 세포 종류의 수를 증가시키기에 따라서 바이러스 분리의 확률을 높게 된다. 원숭이 유래의 세포주에서 증식하지 않는 바이러스도 인간 유래의 1차세포에서 증식하는 바이러스가 다양하기 때문이다. 또한 집중하는 세포배양 플라스크의 수는 본 시험에서 20개 이상을 사용함으로써 집중 세포수를 증가시켜, 다수 배양플라스크에 집중함으로써 바이러스 분리의 가능성을 높였다. 또한 1차 집중하여 배양한 상층액 시료를 다시 계대 배양함으로써 새로운 세포에서의 증식 및 세포병변 현상이 늦어진 바이러스에 대한 세포병변의 가능성을 높였다.

본 연구에서 세포의 마이크로프라스마 오염은 여러 가지 문제를 야기할 수 있는 것으로 판명되었다. 항생제가 배양액에 포함되어 마이크로프라스마의 증식이 부분적으로 억제된 상태에서는 마이크로프라스마에 의한 직접적인 세포의 형태 변화가 없을 수 있다 (Fig. 4). 이러한 마이크로프라스마에 의한 세포의 형태 변화는 현미경적 관찰이 불가능한 상태에서 현저한 형태적 변화 (Fig. 4)에까지 다양한 변화를 보였다. 마이크로프라스마 오염에 의한 세포의 변화는 레오바이러스에 의한 세포병변과 유사한 양상을 보여 세포병변에 대한 해석에 차이를 초래할 수 있다. 마이크로프라스마에 의한 BGM 세포의 형태적 변화는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 장시간에 걸쳐서 증식하는 일부 바이러스들에 의한 세포병변효과와 유사하였다. 이러한 형태적 변화는 오염된 마이크로프라스마의 양과 상

태에 따라서 차이가 많은 것으로 추정되며 감염성 바이러스 증식 여부의 판정에 혼선을 가져 올 수 있는 것으로 생각된다.

본 연구에서 계대 배양해 온 BGM 세포주의 경우 형태와 증식성에서 이상을 보이지 않은 세포에서도 PCR 시험에서 마이크로프라스마가 확인되기 때문이다 (Fig. 4, 5). 마이크로프라스마에 의한 형태적 변화가 없는 세포에서도 세포의 정상적인 기능과 바이러스의 증식성에 변화를 초래할 수 있는 것이다 (Fig. 5). 나아가 특이한 형태적 비정상 상태를 보이지 않는 세포로부터 전형적인 집락 형태를 보이는 마이크로프라스마 증식을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 따라서 세포에 물 시료를 접종하여 나타나는 세포병변으로 바이러스의 증식 여부를 판독하는 시험에서는 바이러스에 의한 특이적인 병변 현상과 마이크로프라스마에 의한 세포 변화를 구분하는 것이 중요하다.

물 시료로부터 바이러스를 분리하는 시험에서 농축된 시료 자체로부터 세포에 독성현상을 보이는 경우가 많았다. 특히 물 시료에 탁도가 높은 경우 세포에 시료를 접종한 초기에 심한 세포의 독성현상을 보였다. 이는 여과지에 흡착된 독성물질이 바이러스 흡착 시에 농축된 상태로 작용하여 초래되는 현상으로 보인다. 독성물질에 의한 세포형태 변화는 PBS 등으로 세척하는 경우, 소실되는 경우가 많으나 (58) 본 시험에서는 제거되지 않는 시료도 때때로 관찰되었다. 시료에 의한 세포독성은 접종량의 감소, 새로운 세포에 집중하는 방법, 관찰 기간의 경과에 따라 세포병변 양 형태를 보이는 세포의 증가 여부에 대한 관찰 등의 방법으로 독성을 제거하고 세포병변과 구분할 수 있다.

본 연구에 사용한 BGM 세포의 각 종 병원성 바이러스에 대한 증식성은 상대적으로 수종의 바이러스에 한정되고 있다. BGM 세포주는 엔테로바이러스에 대해서는 감수성이 극히 높은 것으로 알려져 있다 (4). 이번 실험에서 BGM 세포에서 세포독성이나 다른 원인에 의한 세포병변 양 세포 변화는 세포에 급속히 병변을 보이는 바이러스와는 구분되거나 (48) 천천히 자라는 바이러스의 세포병변과는 구분하기가 어려운 경우가 많았다. 이와는 대조적으로 레오바이러스는 BGM 세포에서 보다 Macaca 신장세포배양에서 잘 증식하는 것으로 보고되었다 (44). 원형을 이루고 급격하게 세포배양 벽면으로부터 떨어지는 폴리오바이러스와는 상이하게 레오바이러스는 Macaca 신장세포배양에서 입자 상태를 보이나 배양벽면으로부터 떨어져 나가지 않고 그 상태를 상당 기간 유지한다. 따라서 본 연구에서 사용한 BGM 세포에서는 Macaca 신장세포에 비하여 레오바이러스 분리의 감도가 낮을 가능성을 제시하고 있다. 집중하는 세포의 종류 이외 세포의 계대수 (56), 새로이 배양한 세포의 수와 계대 일자 등

도 증식성의 감도에 차이가 나타날 수 있을 것으로 평가된다.

물에 있는 병원성 바이러스의 다수는 BGM 세포주로부터 분리하지 못한다. 로타바이러스는 물이나 기포 등으로서 전파가 이루어지며 특히 영아 및 소아에게 위중한 설사증을 유발하고 방출된 바이러스는 물을 오염시키는 경우가 많다 (6). 그러나 SA11 같은 동물 로타바이러스와는 대조적으로 사람 로타바이러스는 특수 처리하거나 특이 세포에 적응된 경우에만 배양이 가능하며 wild virus로부터 직접적인 배양은 불가능하다 (45,54). 따라서 물 시료로부터 전파 위험성이 큰 로타바이러스를 감염성 상태로 탐지하는 것은 현재로서는 어려운 실태이다. 물로부터 전파되는 주요바이러스로서 A형 간염바이러스는 말모셋 (marmoset)의 간 (liver) 1차 배양과 rhesus 원숭이 태아세포주에서 배양하였을 때 세포병변 없이 증식한다 (35). 근래 물의 오염으로 문제가 되는 사람 노로바이러스는 원숭이를 포함한 세포배양에서나 사람 기원의 태아 장기관에서도 전혀 증식되지 않는다 (11,14,24). E형 간염 바이러스는 일부 cynomolgus 원숭이간 (liver) 장기 1차 배양세포에서 증식된다는 보고가 있으며 (49), 세포배양에서 세포병변은 보이지 않으나 면역형광시험으로 증식한 항원의 존재는 증명할 수 있다.

바이러스 분리에 사용하는 세포의 마이코프라스마 감염은 세포의 정상 변화로 바이러스 증식의 감도를 낮출 수 있다. 또한 마이코프라스마에 의한 형태 변화 (Fig. 4)는 바이러스로 인한 세포병변과 구분하기 어렵다. 특히 바이러스 분리를 위하여 물 시료를 여과지에 통과시킨 다음 바이러스를 용출시키고 농축시키는 과정에서 사용하게 되는 beef extract 성분이 용출되는 바이러스 성분에 잔존할 가능성이 있으며 이 시료를 접종한 다음 장시간 마이코프라스마에 오염된 세포에 시료를 접종하는 경우, 마이코프라스마의 급속한 증식을 가져오는 것으로 추정된다. 마이코프라스마 오염은 대부분의 경우, 어떠한 세포의 변화도 가져오지 않으며 본 연구에서 확인된 바와 같이 형태적 비정상인 없는 세포에서도 마이코프라스마 오염을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 특히 감도가 높은 PCR 방법을 적용하였을 때 BGM 세포주에서의 마이코프라스마 오염율은 더욱 높았다. 따라서 물 시료의 감염성 바이러스를 탐지하는 시험에서는 사용하는 BGM 세포에 대한 마이코프라스마시험의 중요성을 다시 확인하였다.

감염성 바이러스를 분리하기 위한 실험에서 바이러스의 증식의 판단 기준으로 세포병변의 여부는 바이러스를 확인하기 위한 하나의 기준에 지나지 않으며 이 기준도 바이러스 특이성 여부에 대한 엄격한 검사가 요구된다. 특히 본 연구에서는 전형적인 세포병변을 보이는 경우에 바이러스에 의한 세포병변으로 판정하였다. 169건의 물 시료 중에서 전형적인 세포병변을 보이는 시료 14건에 대하여 면역형광검

사 방법으로 바이러스의 종류를 검사하였다 (Fig. 3). 이들에 대한 동정시험에서 폴리오바이러스와 콕삭키바이러스가 각각 50%이었다. 이러한 결과의 일부는 사용한 세포 (BGM)의 엔테로바이러스에 대한 높은 감도와 엔테로바이러스의 현저한 세포병변을 기준으로 한 검사방법에 기인할 수 있는 것으로 해석된다. 즉 본 시험에서는 느리게 자라며 세포병변 형태가 마이코프라스마와 같은 레오바이러스의 존재 가능성을 완전히 배제하기는 어려운 것으로 해석된다. 그러나 바이러스 분리물에 대한 종류와 비율은 대체적으로 외국의 결과와 유사한 결과를 보였다 (29,47).

또한 분리된 바이러스 중 50%를 차지하는 폴리오바이러스의 경우 국립보건원의 담당부서 (지영미팀)와의 비공식 시험에서 모두 폴리오 약독화백신주로 확인되었다. 즉 본 연구에서 확인된 폴리오바이러스는 환경으로부터 분리되는 폴리오바이러스의 경우 약독화생백신을 투여 받은 사람으로부터 환경물로 배출된 것이 확인되었다. 면역형광시험은 분리 바이러스주를 세포에 접종한 다음 비교적 단시간에 검사가 가능한 장점을 보였다. 그러나 형광면역시험은 실제적으로 바이러스 중 특이 혹은 혈청형 특이 면역혈청을 확보해야 하거나 면역혈청에 특이형광물질이 표식된 혼합물을 구매해야 하는 어려운 점이 있다. 또한 면역형광현미경의 확보로 바이러스에 의한 특이 항원을 주관적으로 정확히 판독할 수 있는 검사능력이 요구된다.

본 연구에서 분리한 바이러스 분리주에 대하여 바이러스형 특이 표준혈청을 사용한 중화시험으로 면역형광시험과 일치된 결과를 보였으며 혈청형의 동정이 가능하였다. 이는 BGM 세포에서 상대적으로 짧은 기간에 대부분의 세포가 전형적인 세포병변을 보이는 경우, 대부분이 엔테로 바이러스임을 뜻하고 있다. 즉 본 연구에서는 세포병변의 형태가 세포독성 혹은 마이코프라스마 오염 형태의 세포 상태를 보일 때 모두 바이러스성 세포병변 대상에서 제외하였다. BGM 세포에서 장기간에 걸쳐 세포독성 및 마이코프라스마 오염 형태의 세포 형태를 유발하는 바이러스로는 레오바이러스가 있으나 레오바이러스에 대한 동정이 이루어지지 않는 한 바이러스로 확정하기 어려운 문제점을 갖는다. 이는 세포에 적응된 레오바이러스인 경우 Mouse L929 fibroblast (ATCC1 L), Madin-Darby bovine kidney (MDBK), rhesus monkey kidney (LLC-MK2), human embryonic intestinal (intestinal 407) 등의 세포에서 감도 높은 바이러스 증식을 보이거나 BGM에서는 감도가 낮았다 (53). 한편 레오바이러스 wild strain의 BGM에서의 감도는 확인이 되지 않았다. 또한 레오바이러스는 인체에 현저한 질병을 가져주지 않으며 대부분이 동물 기원으로서 질병 예방을 목적으로 한 검사에서는 그 중요성이 감소되고 있다 (53).

물 시료에 따라 감염성 바이러스의 분리율에 차이가 있었으며 지류천이 가장 높았던 반면, 원수에서는 낮았다. 이는 자연 정화 등 다른 요인도 있겠으나 인간 오염원으로부터 배출된 이후 원수 지점까지 흐르는 과정에서의 기간 경과에 따른 바이러스의 불활화 과정이 주요한 원인으로 추정된다. 침전수 20건 중에서 1건에서 바이러스가 분리되었다. 이는 물 흐름의 전 단계인 19건의 착수정에서 모두 음성으로 검사된 사실을 감안할 때, 특이 현상으로 추정된다. 그러나 침전수에서 양성으로 검사된 1건의 시료채취가 장마 중에 일어난 사실을 감안할 때, 장마 중에 많은 오염물의 폐기와 지류천변의 침수에 의한 일시적인 바이러스의 양적 증가가 있는 것으로 추정된다.

물에 있는 감염성 바이러스를 탐지하기 위하여 본 연구에서는 African green monkey 신장 유래의 BGM 세포 등이 포함된 미국 EPA의 ICR rule 방법에 따라 감염성 바이러스 탐지검사를 수행하였다. 본 연구의 수행을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다. BGM 세포를 통하여 분리할 수 있는 인체 유행성 바이러스는 엔테로바이러스가 대부분이다. 장기간에 걸쳐서 증식하고 세포벽면으로부터 분리되지 않는 세포병변은 세포에 오염된 마이코플라스마오염에 의한 세포형태 변화 및 시료독성에 의한 세포독성과의 차별이 극히 어려워 분리 바이러스 시료에 대한 확인시험이 필요하다. 면역형광시험 방법의 적용은 상대적으로 접종 후 짧은 기간에 바이러스의 동정뿐만 아니라 현저한 세포병변을 보이지 않는 바이러스의 탐지에 유용하다. 특정 감염성 바이러스가 의심되는 경우, 면역형광시험은 가장 짧은 기간에 감염성 바이러스의 탐지를 위한 검사에 적용이 가능함을 확인하였다. 본 연구에서 사용한 물 시료에서는 바이러스 오염 정도가 하천수와 원수에서는 폴리오바이러스와 콕사키바이러스 등의 오염을 확인할 수 있었으나 침전수 이후의 단계에서는 감염성 바이러스의 존재를 확인할 수 없었다. 본 연구에서 시험대상이 된 침전수 이외의 단계의 시료에서 바이러스가 확인되지 않았으나 이 사실로서 침전수 이외의 모든 물 시료에 언제나 바이러스가 존재할 수 없다는 것을 뜻하지는 않는다.

이상으로 국내 물에서의 감염성 바이러스 양과 종류와 혈청형에 대한 결과를 보고하고 감염성 바이러스의 분리에 미치는 주요 인자에 대하여 시험하고 얻어진 결과를 검토하였다.

참 고 문 헌

- 1) 日本上水道協會: 上水試験方法2001年版-追補版. **222**: 1-222, 2006.
- 2) Alberto CA, Barbara SC, Edith CS, Peter FW: Diagnostic tests for poliovirus infection: a comparison of neutralization and immunofluorescence for the identification and typing of stool isolates. *Journal of Virological Methods* **52(1-2)**: 35-39, 1995.
- 3) Anne VN, Richard D, Gerard C, Freddy H: Interaction between turkey monocytes and avian Chlamydia psittaci in the presence of Mycoplasma sp.: the importance of nitric oxide. *Developmental & Comparative Immunology* **24(4)**: 417-432, 2000.
- 4) APHA-AWWA-AEF: Detection of enteric viruses, Standard methods for the examination of water and waste water, 19th edition. 1998.
- 5) Australia National Health and Medical Research Council: Australia Drinking Water Guidelines, 2004.
- 6) Bern C, Martines J, DeZoyasa I, Glasses RI: The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: A ten-year update. *Bull, World Health Organ* **70**: 705-714, 1992.
- 7) Berg G, Dahling DR, Berman D: Recovery of small quantities of viruses from clean waters on cellulose nitrate membrane filters. *Appl Microbiol* **22(4)**: 608-614, 1971.
- 8) Bishop RE, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* **2**: 1281-1283, 1970.
- 9) Craun GF, McCabe LJ: Review of causes of waterborne diseases outbreaks. *J Amer Water Works Ass* **65**: 74-84, 1973.
- 10) Cubitt WD, Caliciviruses: In Kapikian AZ, ed. Virus Infections of the Gastrointestinal Tract. New York: Marcel Dekker 549-568, 1994.
- 11) Cubitt WD, Holzel H: An outbreak of rotavirus infection in a long-stay ward of a geriatric hospital. *J Clin Pathol* **33**: 306-308, 1980.
- 12) Dahling DR, Wright BA: Processing and transport of environmental virus samples. *Appl Environ Microbiol* **47(6)**: 1272-1276, 1984.
- 13) Dahling DR, Wright BA: Recovery of viruses from water by a modified flocculation procedure for second-step concentration. *Appl Environ Microbiol* **51(6)**: 1326-1331, 1986.
- 14) Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RE, Wyatt RG, Kasel JA, Hornick R, Chanock RM: Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* **140**: 178-583, 1972.
- 15) Enrquez CE, Abbaszadegan M, Pepper IL, Richardson KJ, Gerba CP: Poliovirus detection in water by cell culture and

- nucleic acid hybridization. *Wat Res* **27(7)**: 1113-1118, 1993.
- 16) **Enriquez CE, Gerba CP**: Concentration of enteric adenovirus 40 from tap, sea waste water. *Wat Res* **29(11)**: 2554-2560, 1995.
 - 17) **Erwin DB, Erwin D, Harry V, Marion PGK**: Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *Journal of Virological Methods* **137(2)**: 259-264, 2006.
 - 18) **Fox JP, Brandt CD**: Wassermann FE: The Virus Watch Program: a continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. VI. Observations of adenovirus infections: virus excretion patterns, antibody response, efficiency of surveillance, patterns of infection and relation to illness. *Am J Epidemiol* **89**: 25-50, 1969.
 - 19) **Gardner PS, McQuillin J**: Rapid Virus Diagnosis Application of immunofluorescence 1st ed. *Butterworths* 1974.
 - 20) **Green KY, Chanock RM, Kapikian**: Human calicivirus, in Fields. *Virology* 841-867, 2001.
 - 21) **Hill WF, Jr, Jakubowski W, Akin EW, Clarke NA**: Detection of virus in water: sensitivity of the tentative standard method for drinking water. *Appl Environ Microbiol* **31(2)**: 254-261, 1976.
 - 22) **Jackson GG, Muldoon RL, Cooper RS**: Reovirus type 1 as an etiologic agent of the common cold. *J Clin Invest* **40**: 1051, 1961.
 - 23) **John P**: Cell and Tissue Culture 5th ed. *Churchill Livingstone*, 1975.
 - 24) **Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Chanock RM, Kalica, AR**: Visualizilization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. 10:1, *J Virol* **10**: 1075-1081, 1972.
 - 25) **Kapikian AZ, Yolken RH, Greenberg HB**: Gastroenteritis viruses, In: Lennette EH, Schmidt NJ, eds, Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections, 5th ed. Washington, DC: *American Public Health Association* 927-995, 1979.
 - 26) **Lennette EH, Schmidt NS**: Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infection (5th edition). *American Public Health Association*, 1979.
 - 27) **Li JW**: A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *J Virol Methods* **74(1)**: 99-1081, 1998.
 - 28) **Logan KB, Scott GE, Seeley ND, Primrose SB**: A portable device for the rapid concentration of viruses from large volumes of natural freshwater. *J Virol Methods* **3(4)**: 241-249, 1981.
 - 29) **Lund E**: Disposal of Sludges, in Virus in Water, Interdisciplinary Books, *Washington D.C.* 1976.
 - 30) **Madley CR, Cosgrove BP**: 28 nm in infantile gastroenteritis. *Lancet* 451-452, 1975.
 - 31) **Melnick JL, Dow RP**: Poliomyelitis in Hidalgo County, Texas, 1948. Poliomyelitis and coxsackie viruses from flflies. *Am J Hyg* **58**: 288-309, 1953.
 - 32) **Nestor I**: Investigations on the presence of enterovirus in drinking water. *Viology* **29(3)**: 203-207, 1978.
 - 33) **Pallin R, Wyn-Jones AP, Place BM, Lightfoot NF**: The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **67(1)**: 57-67, 1997.
 - 34) **Pertschuk LP, Broome JD, Brigati DJ, Cook AW, Vuletin JC, Rainford EA, Gupta JK, Kim DS, Nidgorski F**: Jejunal immunopathology in amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis identification of viral intigens by immunofluorescence. *The Lancet* **309(8022)**: 1119-1123, 1977.
 - 35) **Provost PJ, Hilleman MR**: Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* **160**: 213-221, 1979.
 - 36) **Payment P**: Evaluation of the efficiency of the adsorption elution technic for poliovirus 1 on fiber glass filters: application in the virological analysis of 100 ml to 1000 ml of water. *Can J Microbiol* **24(11)**: 1413-1416, 1978.
 - 37) **Price WH**: The isolation of a new virus associated with respiratory clinical disease in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **42**: 892-896, 1956.
 - 38) **Quignon F, Kiene L, Levi Y, Sardin M, Schwartzbrod L**: Virus behaviour within a distribution system. *Wat Sci Tech* **35(11-12)**: 311-318, 1997.
 - 39) **Quignon F, Senwartzbrod L**: Influence of salts and montmorillonite upon heat inactivation of poliovirus in sterile water. *Wat Sci Technol* **31(5-6)**: 177-180, 1995.
 - 40) **Ramia S**: Second-step concentration of viruses in drinking and surface waters using polyethylene glycol hydroextraction. *Can J Microbiol* **25(5)**: 587-592, 1979.
 - 41) **Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H, Ratcliffe S, Jenkins M, Appleton H, Gallimore CI**: Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *Journal of Clinical Virology* **26(1)**: 109-115, 2003.
 - 42) **Robert LA, Mary KE**: The Epidemiologic and Clinical Importance of Norovirus Infection. *Gastroenterology Clinics of North America* **35(2)**: 275-290, 2006.

- 43) **Rosemary CS, Gwen C, Erick B, Janine L, Cathy AP:** Comparison of multiple shell vial cell lines for isolation of enteroviruses: A national perspective. *Journal of Clinical Virology* **37(3)**: 151-155, 2006.
- 44) **Rosen L:** Reoviruses, Diagnostic Procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, Edwin H. Lennette. 5th edith, 577-584, 1980.
- 45) **Sato K, Inaba Y, Shinozaki T:** Isolation of human rotavirus in cell cultures. *Arch Virol* **69**: 155-160, 1981.
- 46) **Schaffer FL, Bachrach HL, Brown F:** Caliciviridae. *Inter-virology* 14-16, 1980.
- 47) **Shaub SA, Sorber CA:** Viruses on Solids in water, in *Virus in Water*, Interdisciplinary Books, Washington D.C. 1976.
- 48) **Schmidt N:** cell culture techniques for diagnostic virology, Diagnostic Procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, Edwin H. Lennette. 5th edith, 116-120, 1980.
- 49) **Tam AW, White R, Yarbough PO, Murphy BJ, McAtee CP, Lanford RE, Fuerst TR:** In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* **238**: 94-102, 1997.
- 50) **Taylor JW, Gary GW, Jr, Greenberg HB:** Norwalk-related viral gastroenteritis due to contaminated drinking water. *Am J Epidemiol* **114(4)**: 584-592, 1981.
- 51) **Toranzos GA, Gerba CP:** An improved method for the concentration of rotaviruses from large volumes of water. *J Virol Methods* **24(1-2)**: 131-140, 1989.
- 52) **Tsai YL, Tran B, Sangermano LR, Palmer CJ:** Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water y triplex reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ Microbiol* **60(7)**: 2400-2407, 1994.
- 53) **Tyler, Kenneth L:** Mammalina reoviruses, in *Virology. Lippincott Williams & Wilkins* 1729-1745, 2001.
- 54) **Urasawa T, Urasawa S, Taniguchi K:** Sequential passages of human rotavirus in MA 104 cells. *Microbiol Immunol* **25**: 1025-1035, 1981.
- 55) **US EPA:** The US EPA Maual of Methods for Virology, 1984.
- 56) **US EPA:** Virus monitoring protocol for the information collection requirements rule, EPA/814/B/95B002, 1995.
- 57) **Wong-Lee JG, Lovett M:** Rapid and sensitive PRC method for identification of *Mycoplasma* species in tissue culture, in *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications*, Amecican Society for Microbiology, Washington, D.C. 257-265, 1993.