

# 세포배양기법을 이용한 수중 크립토스포리디움 감염성 평가

## Detection of Infectious *Cryptosporidium parvum* in Water samples by In Vitro Cell Culture

이목영\*, 조은주, 변승헌, 김태호, 오세종

Lee, Mok-young · Cho, Eun-ju · Byun, Seung-hun · Kim, Taeho · Oh, Sea-jong

서울특별시 상수도연구소

### 1. 서론

크립토스포리디움 파뮴(*Cryptosporidium parvum*)은 경구섭취시 설사, 복통 등을 일으키는 기생성 원충으로써, 그 환경배출형태인 오시스트(oocysts)의 강한 환경저항성과 소독저항성으로 인해 최근 미국, 영국 등에서 대규모 수인성 집단질병의 원인이 되었다. 따라서 자연환경과 상수계통에서 이들의 존재와 그로 인한 건강 위해성(health risk)을 이해하는 일은 적절한 상수원 보호 및 정수처리방안을 마련해 먹는물의 안전성을 확보하는 첫 출발점이 될 것이다.

수중 크립토스포리디움을 검출하는데 가장 일반적으로 사용되고 있고 우리나라에서도 최근 국가표준 방법으로 검토되고 있는 방법은 면역형광항체법(Immuno-fluorescence assay)이다. 수중 오시스트를 형광표지된 항체로 염색하여 형광성과 크기, 모양 등에 기초해 동정하는 이 방법은 1개의 오시스트도 검출 가능한 민감도 높은 방법이지만, 오시스트내 스포로조이트(sporozoites) 존재여부에 따라 활성(viability)을 간접 추정할 뿐 감염성(infectivity)을 판정할 수 없어 건강 위해성에 관한 직접적인 정보를 주지 못한다는 한계점을 안고 있다(Clancy et al., 1999). 우리나라에서도 최근 취수원, 하수, 정수처리공정 등에서 크립토스포리디움 분포에 관한 보고들이 있었지만(이 등, 2000; 이 등, 2003), 그 감염성여부를 결정하지 못해 건강 위해정도에 대한 정확한 진단은 아직까지 과제로 남아있다고 하겠다.

오시스트의 활성 측정만이 가능한 생염색법과 탈낭법 외에, 감염성을 평가하는데 가장 전통적으로 사용된 것은 동물 숙주를 이용하는 방법이었다. 그러나 동물감염법(animal infectivity)은 높은 비용, 긴 소요시간 등의 어려움이 있기 때문에, 이에 대한 대안으로 최근에는 실험실에서 배양된 세포에 크립토스포리디움을 감염시켜 PCR(polymerase chain reaction)이나 면역형광항체법으로 감염여부를 확인하는 시도들이 이루어져왔다(Rochelle et al., 2002; Slifko et al., 1997). 본 연구에서는 크립토스포리디움 파뮴 감염에 적합한 것으로 알려진 HCT-8 세포에 오시스트를 감염시키고 증식과정에서 나타나는 스포로조이트, 메로조이트(merozoite) 등을 형광항체로 염색하여 형광 DIC현미경으로 관찰함으로써 감염성 오시스트를 검출하고자 하였다. 다양한 환경시료에 이를 적용하고 비활성 오시스트까지 정량하는 1623방법에 의한 결과와 비교하였다.

### 2. 재료 및 방법

**세포 준비** 8개의 웰챔버(well chamber)를 가진 웰챔버슬라이드에 HCT-8 (Human illocecal adenocarcinoma cell, ATCC CCL-224; Americal Type Culture Collection) monolayer를 형성시켰다(배양온도 37°C, 습도 100%, 5% CO<sub>2</sub>). 세포 유지배지로는 5% Fetal Bovine Serum, 10%

\* 이 목 영 (E-mail : mylee9@hanmail.net)

Opti-MEM, 1% 200mM L-Glutamine, 2% 1M HEPES를 첨가한 RPMI-1640을 사용하였으며, 오시스트 감염시에는 Fetal Bovine Serum의 농도를 10%로 증가시킨 성장배지를 사용하였다.

**세포 감염, 염색 및 결과 판독** 준비된 시료에 PBS를 첨가해 970 $\mu$ l로 만든 후 차아염소산나트륨용액을 넣어 3% 용액이 되도록 한 다음 7분 동안 정치하였다. 12,000rpm으로 4분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 다시 PBS를 첨가하는 방식으로 2회 세척한 후 마지막으로 세포성장배지를 넣어 1mL로 만들었다. 이 중 330 $\mu$ l씩을 HCT-8 cell monolayer가 형성된 8개의 챔버 중 3개에 각각 감염시키고 37 $^{\circ}$ C, 습도 100%, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 48시간동안 배양하였다. 48시간 배양 후 슬라이드를 배양기에서 꺼내 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 100% 메탄올을 첨가해 10분간 고정시킨 다음 챔버를 제거하였다. 슬라이드를 blocking buffer(PBS 10mL, goat serum 0.2mL, 0.002% tween 20)에 담그고 30분간 실온에서 정치하였다가 buffer를 흡인 제거하였다. 슬라이드를 일차 항체 (polyclonal rat anti-sporozoite and -merozoite antiserum, A600FLR, Waterborne)용액에 담그어 1시간동안 부드럽게 흔들어주면서 염색하였다. PBS로 4회 반복 세정한 후 2차 항체 (FITC-conjugated goat anti-rat antibody, sigma F6258)용액에 담그어 다시 1시간동안 염색하였다. PBS로 4회 반복 세정한 후 커버슬립을 덮고 밀봉하였다. 400배율 이상의 형광DIC현미경으로 슬라이드의 각 웰을 관찰하여 초록형광점이 적어도 3개 이상 인접하게 무리지어 있는 경우 양성으로 판정하였다.

**대조군시험** 대조군시험을 위한 오시스트로는 60일령 이내의 *Cryptosporidium parvum*의 살아있는 오시스트(source : calf infected by Iowa strain, sterling parasitology Lab)을 구입하여 사용하였다. 구입한 오시스트는 미리 in vitro excystation에 의해 활성을 측정하였는데, 측정된 탈낭율은 98.2%이었다. 고농도의 오시스트 현탁액을 차아염소산나트륨으로 처리하고 혈구판으로 계수하여 농도를 결정한 후 여섯단계의 1/5 희석과정을 거쳐 마지막 희석단계의 오시스트갯수가 80개 이하가 되도록 하였다. 각 희석단계별로 준비된 6개의 시료 1ml씩을 각각 125 $\mu$ l씩 8개의 챔버에 나누어 감염시켜 감염여부를 관찰하였다. 총 3회 실시하였으며 매회 복수로 시험하였다. 또한 환경시료에 함유된 방해물질로 인한 영향을 보기 위해, 환경시료와 정제수에 각각 동량의 오시스트를 주입하여 동일한 방법으로 세포감염여부를 측정, 비교하는 매트릭스시험(matrix test)을 2회 수행하였다.

**환경시료 준비** 2003년 6월부터 9개월동안 한강 수계 취수원 6곳 및 지천에서 지표수시료 12점을, 유역 하수처리장에서 원하수시료 1점 및 방류수시료 3점을 채취하였다. 하천수 및 방류수시료는 먼저 캡슐황터(polyethersulfone, 1300cm<sup>2</sup>, 1 $\mu$ m, Gelman)로 여과농축하여 추출하였고, 원하수시료는 직접 원심분리하여 농축하였다. 이어 anti-*Cryptosporidium* bead (Dynal 730.01)를 시료 중 오시스트와 결합시키고 자석장치(MPC-1, Dynal)를 사용해 결합체만을 분리한 후, 0.1N HCl 50 $\mu$ l를 넣어 자기체로부터 오시스트를 탈착시키고 다시 자석장치(MPC-M, Dynal)를 이용해 자기체를 제거하는 과정을 2회 반복하여 정제액 100 $\mu$ l를 얻었다. 이 중 50 $\mu$ l을 세포 감염 직전 분취하여 차아염소산나트륨으로 처리하고 세포성장배지를 넣어 1mL로 만들어 세포 감염에 사용하였다. 매 감염시험마다 양성 및 음성대조군시험을 병행하였다.

**1623방법과의 비교** 한편 나머지 50 $\mu$ l는 1623방법(USEPA, 1999)에 따라 1N NaOH 5 $\mu$ l가 미리 적용된 웰슬라이드에 분주하여 공기 건조시킨 후 형광항체키트(Meridian Co.) 염색 및 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색을 실시하고 형광DIC현미경(Axioplan II, Zeiss)으로 관찰하여 직경 4~6 $\mu$ m의 구형에 전체가 밝은 초록 형광빛이되 테두리가 보다 선명하고 내부에 비전형적인 구조가 없을 경우 크립토스포리디움으로 동정, 계수한 후 세포감염 결과와 비교하였다.

### 3. 결과 및 고찰

HCT-8 세포에 감염시킨 크립토스포리디움 파뭉이 탈낭 후 보이는 다양한 증식단계(sporozoites, trophozoites, type I and II meronts, merozoites, macrogametocyte, micro-gametocyte)는 FITC로 표시된 anti-sporozoit and -merozoite 항체와 결합하여 형광DIC현미경 하에서 2~5 $\mu$ m 크기의 크고 작은 초록색 형광점의 무리(cluster, 이하 클러스터)로 관찰되었다 (Fig. 1). 일부 방해물질이 염색되어 유사한 크기의 형광점으로 관찰되기도 하였으나 DIC 관찰 후 배제되었다. 반면 탈낭된 이후의 숙빈 오시스트나 탈낭되지 않은 죽은 오시스트는 염색되지 않았으며 DIC 하에서만 관찰 가능하였다. 한편 본 연구에서 수행된 모든 시험에서 세포 오염은 발생하지 않았다. 이는 세포 감염 전 수행된 차아염소산나트륨 처리가 탈낭을 용이하게 하는 동시에 시료에 함유된 세균, 바이러스 등의 방해미생물도 불활성화하는데 효과적이었음을 보여준다(Slifko et al., 1999).

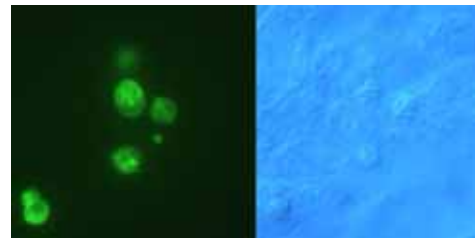


Fig. 2 Photomicrograph of foci in HCT-8 cell for positive control test by Fluorescence DIC microscope

고농도의 오시스트액을 다단계로 희석하여 감염시킨 양성대조군시험 결과는 <Table 1>과 같다. 감염 직전 수행된 탈낭시험(in vitro excystation)에서 탈낭율이 98.2%이었던 결과에 기초할 때, 세포에 적용된 오시스트는 대부분 살아있는(viable) 것으로 간주되었다. 웰당 접종된 오시스트수가 많을수록 많은 클러스터가 관찰되었으며 오시스트 접종농도가 수개~수십개인 웰에서는 최소 3개의 형광점으로 이루어진 1개의 클러스터만이 발견되었다. Slifko et al(1997)에 의하면, 세포 감염 후 대략 12시간 후부터 시작되는 자가감염(autoinfection cycle)의 결과로 48시간 경과 이후에 한 클러스터당 가장 많은 감염점이 관찰되며 1개의 클러스터는 1개의 감염성 오시스트로 간주될 수 있다. 본 연구에서는 접종오시스트수가 6~7개로 추정되는 웰 48개 중 23%가 감염성 크립토스포리디움 파뭉 양성이었으며, 32~38개로 추정되는 웰 중에서는 58%가 양성이었다. 이러한 결과는 본 방법이 1개의 감염성 오시스트도 검출 가능한 매우 민감도 높은 방법임을 보여준다. Slifko et al.(2002)는 세포배양법과 마우스감염법을 비교한 결과 평균 ID<sub>50</sub> (50% 감염량)이 각각 8과 107로 세포배양법이 감염성 크립토스포리디움 측정에 보다 민감하였지만 두 방법간에 높은 상관성이 있으므로 세포배양법은 마우스감염법을 대체하는 효과적인 감염성 측정법이라고 보고하였다. 또한 세포 배양 후 RT-PCR로 감염여부를 결정하는 방법과 마우스 감염법을 비교한 결과 ID<sub>50</sub>이 각각 27~106과 16~347로 크게 다르지 않았다는 보고도 있었다(Rochelle et al., 2002).

Table 1 Infectivity in HCT-8 cell monolayers inoculated with various concentration of *C.parvum* oocysts

Positive control test 1			Positive control test 2			Positive control test 3		
Presumptive number of spiked oocysts per well	Ratio of positive wells to total wells		Presumptive number of spiked oocysts per well	Ratio of positive wells to total wells		Presumptive number of spiked oocysts per well	Ratio of positive wells to total wells	
	#1	#2		#1	#2		#1	#2
23,700	8/8	8/8	21,000	8/8	8/8	20,000	8/8	8/8
4,740	8/8	8/8	4,200	8/8	8/8	4,000	8/8	8/8
948	8/8	8/8	840	8/8	8/8	800	8/8	8/8
190	8/8	8/8	168	8/8	8/8	160	6/8	6/8
38	7/8	5/8	34	5/8	4/8	32	4/8	3/8
7	4/8	3/8	6	0/8	4/8	6	0/8	0/8
*ID <sub>50</sub>	7	22		-	6		32	73

\* ID<sub>50</sub> were calculated by solving the logistic regression of each dose-response curve for a logit response 0, using percentages of infectivity for each oocysts and then performing the logit transformation

Table 2 Comparison on IFA counts by method 1623 and infectivity by cell culture in environmental water samples

Sample	Number of total oocysts by Method 1623	Infectivity by Cell culture	Sample volume tested	
River water	1	0	negative	10L
	2	3	negative	10L
	3	0	negative	10L
	4	0	negative	10L
	5	1	negative	10L
	6	0	negative	10L
	7	0	negative	10L
	8	0	negative	10L
	9	0	negative	10L
	10	0	negative	10L
	11	0	negative	10L
	12	1	negative	10L
raw sewage water	6	positive	29mL	
treated sewage water	1	0	negative	1L
	2	0	negative	1.8L
	3	2	negative	4L

한편 환경시료 16점 중 세포배양에 의해 감염성 오시스트가 검출된 것은 1점뿐이었다(Table 2). 이는 속빈 오시스트까지 계수하는 1623방법에 의해서도 시료의 69%에서 오시스트가 불검출되었고 검출 시 농도도 1~6개로 매우 낮았기 때문이라 생각된다. 그러나 오시스트농도가 6 oocysts/10L이었던 원하수시료가 세포배양시험에서 감염성 크립토스포리디움 양성이었던 결과는 앞서 대조군시험 결과와 함께 세포배양법의 높은 민감도를 시사한다. 각각의 환경시료 분석과 병행된 양성 대조군시험은 모두 양성 결과를, 음성대조군시험은 모두 음성결과를 보였다. 또한 정제수와 환경시료 정제액에 동량의 오시스트를 접종하여 세포에 감염시킨 결과 2회 모두 두 시료에서 동일하게 양성으로 결과되어, 환경시료 정제액에 남아있는 여

러 가지 방해물질이 세포배양 및 감염에 미치는 영향은 없는 것으로 나타났다.

이러한 연구결과는 수환경의 감염성 크립토스포리디움 오시스트의 존재와 그 위험정도 평가에 세포배양기법이 효과적으로 사용될 수 있음을 시사하며, 향후 다양한 환경시료와 크립토스포리디움 소독저항성시험에 대해서도 그 적용성이 평가될 필요가 있다고 판단된다.

#### 4. 참고문헌

이목영, 김도연, 조은주, 이의광, 오세종, 이채근, 하영철, 1623방법에 의한 서울시 상수도계통의 지아디아 및 크립토스포리디움 검출, 한국물환경학회지, 14(5), pp. 595-608 (2000)

이목영, 조은주, 변승현, 김도연, 이의광, 오세종, 안승구, 표준정수처리 실플랜트에서 크립토스포리디움 및 지아디아 제거율 평가, 대한환경공학회 추계학술대회 (2003)

Clancy J.L., Zia Bukhari, Randi M. mcuin, Zoe matheson, Colin R. Fricker, USEPA method 1622, *J. AWWA*, 91(9), pp. 60-68 (1999)

Rochelle, P.A., Marshall, M.M., Mead, J.R., Johnson, A.M., Korich, D.G., Rosen, J.S., Leon, R.D., Comparison of In Vitro Cell Culture and a Mouse Assay for Measuring Infectivity of *Cryptosporidium parvum*, *Appl. Env. Microbiol.*, 68(8), pp. 3809-3817 (2002)

Slifko, T.R., Friedman, D., Rose, J.B., An In Vitro Method for Detecting Infectious *Cryptosporidium* Oocysts with Cell Culture, *Appl. Env. Microbiol.*, 63(9), pp. 3669-3675 (1997)

Slifko, T.R., Huffman, C.A., Rose, J.B., Impact of Purification Procedure on the viability and Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts, In Proceedings of Water Science Technology Conference, Paris, France (1999)

Slifko, T.R., Huffman, C.A., Dussert, B., Owens, J.H., Jakubowski, W., Hass, C.N., Rose, J.B., Comparison of tissue culture and animal models for assessment of *Cryptosporidium parvum* infection, *Experimental Parasitology*, 101, pp. 97-106 (2002)

USEPA, Method 1623 : *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA, EPA 821-R-99-006, Office of Water, Washington, D.C (1999)