

세포배양기법을 이용한 감염성 크립토스포리디움 정량 및 소독 불활성화율 평가

Quantitative Determination 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 파룸(*Cryptosporidium parvum*)은 경구섭취시 설사, 복통 등을 일으키는 기생성 원충으로써 최근 미국, 영국 등에서 대규모 수인성 집단질병의 원인이 되어왔다. 크립토스포리디움이 다른 병원성 미생물과 크게 구별되는 점은 우선 염소내성이 매우 강하다는 데 있다. 크립토스포리디움의 환경배출형태인 오시스트(oocysts)는 pH 7.0, 수온 25°C, 염소농도 80 mg/L에 90분동안 이상 노출되어야 99%가 불활성화되며 pH 6.0, 수온 22°C, 염소농도 78.2 mg/L에서 120분 접촉시 99.9%가 불활성화되었다는 보고가 있었다. 따라서 크립토스포리디움 오시스트는 상수처리에 사용되는 각종 소독제나 소독공정의 소독효율 평가에 있어 중요한 기준이라 하겠다.

크립토스포리디움 불활성화를 위한 소독실험에 있어 전제되어야 할 것은 감염성(infectivity) 또는 활성(viability)을 가진 오시스트의 계수(assay)방법이다. 과거 가장 흔히 사용되던 생염색법(vital dye)과 탈낭법(excystation)은 오시스트 활성을 민감하게 반영하지 못할 뿐 아니라 감염성의 변화를 알 수 없어 소독실험에 적합하지 않다는 지적이 많았다. 최근에는 전통적인 동물숙주 감염법이나 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 HCT-8 세포에 감염된 오시스트의 여러 증식단계(sporozoites, merozoites, meronts etc)를 형광항체염색법으로 검출하는 CC-IFA (Cell Culture-Immunofluorescence assay) (이 등, 2004)에 최적확수기법(Most-Probable Number technique)을 결합하여 감염성 오시스트를 정량 계수하고 5°C, pH 7.2의 조건에서 염소 또는 오존에 의한 크립토스포리디움 불활성화율 시험에서 그 적용성을 평가하였다.

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% CO₂). 세포 유지배지로는 5% Fetal Bovine Serum, 10% Opti-MEM, 1% 200mM L-Glutamine, 2% 1M HEPES를 첨가한 RPMI-1640을 사용하였으며, 오시스트

* 이 목 영 (E-mail : mylee9@hanmail.net)

감염시에는 Fetal Bovine Serum의 농도를 10%로 증가시킨 성장배지를 사용하였다.

오시스트 준비 오시스트는 30일령 이내의 *Cryptosporidium parvum*의 살아있는 오시스트(source : calf infected by Iowa strain, sterling parasitology Lab)을 구입하여 냉장 보관하면서 사용하였다. 구입한 오시스트는 미리 탈낭법(in vitro excystation)에 의해 활성을 측정하였는데, 탈낭율은 95.1~98.2%이었다. 매 감염시험마다 약 10⁶개의 오시스트를 취해 세포 감염 전 탈낭을 용이하게 하고 방해물질 제거를 위해 고농도의 차아염소산나트륨 처리(7분) 후 hemacytometer로 농도를 결정한 후 세포 감염에 사용하였다.

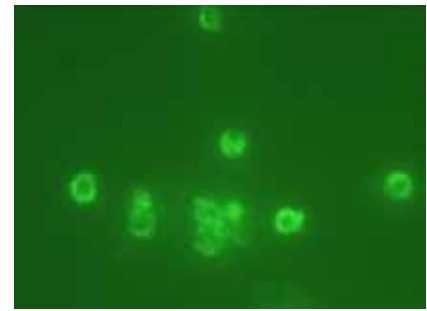


Fig.2 Photomicrograph of many foci in HCT-8 cell for positive control test by Fluorescence microscope

세포 감염, 염색 및 검출 준비된 시료에 세포성장배지를 넣어 1mL로 만든 후 세포성장배지를 사용해 1/5 희석을 단계적으로 여섯번 반복하여 6개의 튜브를 준비하였다. 각 희석단계별로 준비된 6개의 시료마다 8개의 웰 챔버에 나누어 감염시키고 37℃, 습도 100%, 5% CO₂의 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 담고 30분간 실온에서 정치하였다가 buffer를 흡인 제거하였다. 슬라이드를 일차 항체(polyclonal rat anti-sporozoite and -merozoite antiserum, A600FLR, Waterborne)용액에 담고 1시간동안, 2차 항체 (FITC-conjugated goat anti-rat antibody, sigma F6258)용액에 담고 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 웰은 양성으로 판정하였다.

계수 및 해석 감염성 오시스트의 MPN값은 미국 ICR(Information Collection Rule)용 MPN calculator program을 사용하여 결정하였다. 프로그램에 희석단계수, 반복접종횟수, 적용된 시료량 등을 입력하여 MPN값을 도출하고 이로부터 퍼센트 감염력(Percent Infectivity)을 구하였으며 그 식(1)은 다음과 같다.

$$\text{Percent Infectivity} = (\text{MPN per mL} / \text{oocyst counts per mL by hemacytometer}) \times 100 \dots(1)$$

또한 8개의 웰 중 50%를 감염시키는데 필요한 오시스트량(ID₅₀)도 구하였는데 logistic regression에 입각한 식(2)에 의해 각 주입농도별 response logits을 구해 양반응곡선(dose-response curve)를 그린 후 response logit = 0이 되는 주입농도(dose)를 ID₅₀으로 하였다. ID₅₀은 마우스감염 등 감염시험에서 감염력을 나타내는데 널리 사용되며 소독시험에서 감염력을 비교하는데도 적절히 사용될 수 있다.

$$\text{Response logit} = \log_e [P_{inf} / (1-P_{inf})] \dots\dots\dots(2)$$

(P_{inf} : the proportion of cell culture wells infected at each dose of oocysts)

염소 소독실험 차아염소산나트륨용액(유효염소 약 13%)을 PBS(Phosphate Buffer Solution)로 희석한 후 1일 이상 교반시켜 chlorine-free water를 만들어 약 1.2 mg/L의 염소수를 조제하였다. 유리 실린지에 염소수를 담고 약 10⁶개의 오시스트가 함유된 오시스트 현탁액 10μL를 주입한후 잔류염소를 측정하여 염소 초기농도로 하였다. 실린지 유출구를 클램프로 조여 밀봉한 후 5℃에

서 교반하면서 일정시간동안 염소와 접촉시킨 다음 잔류염소를 측정하여 최종 농도로 하고 나머지를 모두 취해 3% 티오황산나트륨용액을 첨가하여 염소를 중화시켰다. 50mL 원심분리관으로 옮겨 수차례의 원심분리(900×g, 20분)를 통해 농축한 후 최종 농축액을 1.5mL 미세원심분리관으로 옮겼다. 미세원심분리(12,000rpm, 4분)하여 바닥의 20μL만을 남긴 다음 세포성장용액을 넣어 시료 1mL를 만들고 10 μL씩 2번 취해 hemacytometer 계수를 하여 초기 오시스트농도를 결정하였다. 이어 1/5 희석을 단계적으로 실시하여 6개의 시료를 만들고 준비된 세포에 감염시켜 감염성 오시스트수를 정량하였으며, 각 소독조건별로 모두 복수의 세포감염시험을 수행하였다.

오존 소독실험 염소소독시험과 동일한 방법으로 수행하되, 오존은 오존발생장치(Ozonia CFS-1)에서 발생된 오존을 정제수에 포화시킨 다음 희석하여 사용하였으며, 초기 오존농도가 약 1~6 mg/L가 되도록 준비하였다. 실험은 5°C에서 수행되었으며, 오존 측정에는 Indigo Colorimetric Method (Standard Method 4500-O₃ B.)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

HCT-8 세포에 감염시킨 크립토스포리디움 파뮌이 탈낭 후 보이는 다양한 증식단계(sporozoites, trophozoites, type I/II, meronts, merozoites, macrogametocyte, micro-gametocyte)는 FITC로 표지된 anti-sporozoite and merozoite antibody와 결합하여 형광DIC현미경 하에서 2~5μm 크기의 크고 작은 초록색 형광점의 무리(cluster, 이하 클러스터)로 관찰되었다(Fig.1~2). 한 웰에서 3개 이상의 형광점이 발견되면 DIC에 의한 확인을 거쳐 양성으로 판정되었다.

로트번호가 다른 오시스트 3종에 대해 다단계 1/5 희석에 의해 감염성 오시스트의 MPN값을 구하고 이로부터 퍼센트 감염력 및 ID₅₀을 측정한 결과는 <Table 1>과 같다. In vitro excystation에서 모두 95% 이상의 탈낭율을 보인 오시스트이었지만, 세포감염시 퍼센트감염력은 0.7~6.3%로 결과되었는데, 이는 Slifko et al.(1999)의 0.97~73.80%과 크게 다르지 않았다. 50% 세포 감염에 필요한 주입량(ID₅₀)은 13~103이었는데, 세포감염법을 적용한 Slifko et al.(2002)의 5~50과 유사

Table 1. ID₅₀ and percent infectivity of oocysts with various lot numbers and storage ages

Exp. no.		Initial conc. of oocysts per mL by hemacytomer count	MPN of Infectious oocysts per mL by CC-IFA	Percent Infectivity(%) of oocysts		ID ₅₀ of oocysts		oocysts age (day)	Lot no. of oocysts
#1	1	1.1 × 10 ⁶	25,654	2.4	3.0	28	17	30	Lot #1
	2	1.1 × 10 ⁶	37,353	3.6		6			
#2	1	1.2 × 10 ⁶	79,575	6.7	5.1	7	15	37	
	2	1.2 × 10 ⁶	40,318	3.4		22			
#3		1.3 × 10 ⁶	20,030	1.6		45		44	
#4		1.2 × 10 ⁶	20,450	1.8		38		92	
#5	1	1.0 × 10 ⁶	11,065	1.1	1.0	32	53	47	
	2	1.0 × 10 ⁶	9,623	1.0		73			
#6	1	1.1 × 10 ⁶	8,315	0.8	0.7	105	103	61	
	2	1.0 × 10 ⁶	7,144	0.7		100			
#7	1	1.5 × 10 ⁶	100,953	6.6	6.3	13	13	65	
	2	1.0 × 10 ⁶	62,460	6.1		12			
#8		1.1 × 10 ⁶	15,710	1.5		64		128	Lot #3
#9		1.1 × 10 ⁶	24,819	2.1		59		135	
#10		1.2 × 10 ⁶	11,484	1.0		79		142	

하고 마우스감염에서의 ID₅₀ 15~377 보다는 다소 작았다. 이러한 결과는 세포배양법과 마우스감염법간에 강한 상관성이 있으므로 세포배양법이 마우스감염법을 대체하는 효과적인 감염성 측정법이라 연구결과(Slifko et al., 2002)와, 세포 배양 후 RT-PCR로 감염여부를 결정하는 방법과 마우스 감염법을 비교한 결과 ID₅₀이 각각 27~106과 16~347로 크게 다르지 않았다는 연구결과와 관련된다(Rochelle et al., 2002).

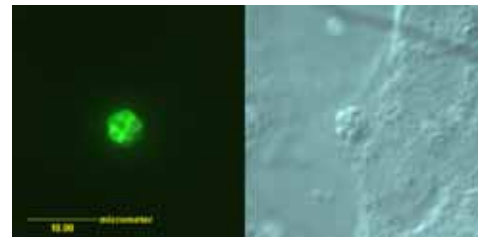


Fig.3 Epifluorescence and DIC photo-micrograph of a meront in HCT-8 cells

ID₅₀은 사용된 오시스트의 로트번호나 일령(age)에 따라 다소 차이를 보였으나, 경우에 따라 동일 조건의 2회 반복시험(#1, #2, #5)에서도 차이를 나타내 희석(dilution), 분주(dispersion)과정에서도 편차가 발생할 수 있으므로, 반복시험 후 통계학적인 해석이 필요할 것으로 판단되었다.

세포배양법을 염소 소독된 시료에 적용한 결과는 Fig. 3과 같다. 시험시 초기 염소농도는 1.14~1.21 mg/L로써 염소 소독을 하는 정수장에서 정수지 유출수의 통상적인 잔류염소농도인 약 1mg/L에서의 크립토스포리디움 제거율을 측정하는데 적합하였으며 960~5,400분의 접촉시간 후 최종 잔류염소농도는 0.67~0.84 mg/L로 접촉시간에 따라 염소감소량이 다소 달랐다.

시험 결과, 접촉시간 증가 즉 CT값 상승에 따라 크립토스포리디움의 ID₅₀은 증가하고 퍼센트 감염력은 감소하였다. 그러나 176~520 mg·min/L에서의 ID₅₀은 오히려 1,138 mg·min/L의 ID₅₀보다 컸는데, 이는 스포로조이트 탈낭에 필요한 충분한 CT값이 확보되지 못해 탈낭이 충분히 일어나지 못했기 때문이라 여겨진다. 176~520 mg·min/L를 제외할 경우, 소독처리하지 않은 시료의 ID₅₀ 또는 퍼센트 감염력과 비교하여 계산된 로그제거율은 CT값과 상관성을 가졌다($r=0.8316$, $p=0.0046$). 이 때 소독 전후의 감염성 오시스트량을 ID₅₀으로 비교한 결과는 퍼센트 감염력으로 비교한 것과 거의 유사하였다.

잔류염소농도를 기준으로 계산할 때 수온 5°C, pH 7.0에서 크립토스포리디움 1로그 불활성화에는 1,250 mg·min/L가 필요한 것으로 나타났다. 志村有通 등(2001)은 마우스감염법을 사용한 연구에서 잔류염소 0.94 mg/L(수온 20°C, pH 7.0)일 때 크립토스포리디움 1로그 불활성화에 필요한 CT값이 790 mg·min/L이었다고 보고한 바 있다. 마우스감염법에 의해 측정된 ID₅₀이 세포감염법보다 다소 크며, 수온이 낮을수록 소독효과가 감소되는 특성을 고려한다면 두 연구결과는 비교 가능하다고 여겨진다. 한편 志村有通 등(2001)은 잔류염소농도 100 mg/L에서 크립토스포리디움 1로그 불활성화에 필요한 CT값은 2,910 mg/L로, 염소농도가 높을수록 소독효율이 저하됨을 지적한 바 있다.

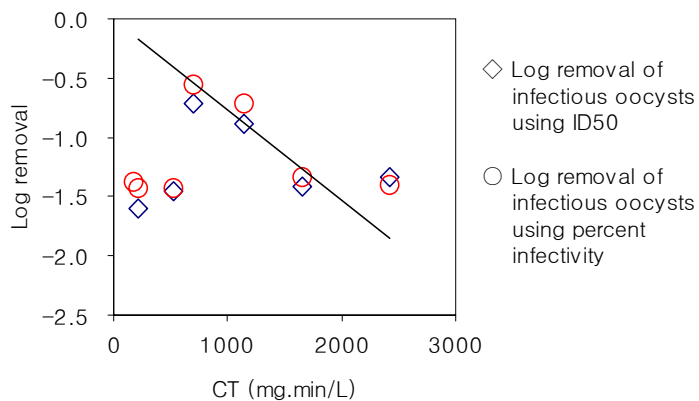


Fig. 4 Chlorine inactivation (5°C, pH 7.0) of *C.parvum* oocysts assessed by cell culture (CT values were calculated by final residual chlorine concentration)

또한 세포배양법을 오존 소독된 시료에 적용한 결과는 Fig. 4와 같다. 시험시 초기오존농도는 0.91~6.00 mg/L이었으나, 10~44분의 접촉시간 경과 후 잔류오존 농도는 0.17~3.31 mg/L로 감소량이 다양하였다.

시험 결과, 소독중 오존농도 감소에 대한 고려하지 않고 잔류오존농도에 기초하여 CT값을 계산할 경우, CT값 상승에 따라 크립토스포리디움의 ID₅₀은 증가하고 퍼센트 감염력은 감소하였다. 즉 소독처리하지 않은 시료의 ID₅₀과 비교하여 계산된 로그제거율은 CT값과 상관성을 가졌으며($r=0.8550$, $p=0.0007$), 퍼센트감염력으로 비교될 경우에도 로그제거율과 CT값은 관련성을 나타내었지만($r=0.7756$, $p=0.0015$), ID₅₀에 비해서는 상관계수가 다소 낮았다.

잔류오존농도를 기준으로 계산할 때 수온 5°C, pH 7.0에서 크립토스포리디움 1로그 불활성화에는 16 mg·min/L가 필요한 것으로 나타났다. 이러한 본 연구결과는 미국 EPA의 장기2단계강화 지표수처리법(Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule)의 CT table에서 수온 5°C 일 때 크립토스포리디움 1로그 불활성화에 필요한 CT값 16 mg·min/L과 동일한 것이다. 또한 in vitro excystation을 사용한 Rennecker et al(1999)는 1로그 불활성화에 18.4 mg·min/L(수온 5°C)가, 마우스감염법을 사용한 Finch et al(1993)는 2로그 불활성화에 7 mg·min/L(수온 7°C)가 필요하다는 연구보고도 있었다.

소독효율이나 소독제 성능을 평가하는데 있어 가장 민감한 지표는 감염성(infectivity)이다. 본 연구에서는 세포배양법에 최적확수기법 결합시킴으로써 크립토스포리디움 오시스트의 감염성을 정량할 수 있었으며, 그 민감도는 마우스감염법과 유사하거나 보다 민감한 것으로 추정되었다. 그러나 사용된 오시스트 일령, 로트번호, 희석조작의 숙련도, 배양세포 계대번호 등이 감염성 측정 결과에 영향을 줄 수 있으므로 이에 대한 신중한 고려가 필요할 것으로 판단되었다. 이러한 측정 방법을 실험실차원의 염소 및 오존실험에 적용한 결과, CT값 증가에 따라 감염성 오시스트의 ID₅₀도 증가하였으며 두 소독제에서 모두 CT값과 로그제거율이 선형 관계를 가짐을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 최적확수법과 결합된 세포배양법은 염소, 오존 등의 소독시험에 효과적으로 적용될 수 있다고 판단되며 이러한 방법을 적용할 때 수온 5°C, pH 7.0 조건에서 PBS 중 감염성 오시스트 1로그 불활성화에 필요한 CT값은 염소의 경우 1,250 mg·min/L, 오존의 경우 16 mg·min/L 수준으로 나타났다.

4. 참고문헌

이목영, 조은주, 변승현, 김태호, 오세종, 세포배양기법을 이용한 수중 크립토스포리디움 감염성 평가, 2004년 대한상하수도학회·한국물환경학회 공동추계학술대회 (2004)

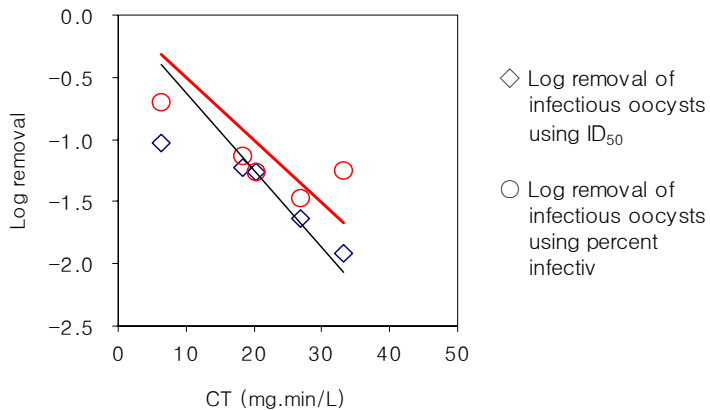


Fig. 5 Ozone inactivation (5°C, pH 7.0) of *C.parvum* oocysts assessed by cell culture (CT values were calculated by final residual ozone concentration)

- 志村有通, 竹馬大介, 森田重光, 平田強, 鹽素のCryptosporidium parvum 오오시스 오 오活化效果とその濃度依存性, 일본수도협회잡지, 70(1), pp. 26~33 (2001)
- Finch, G.R., Black, E.K., Gyurda, L., Belosevic, M., Ozone Inactivation of Cryptosporidium parvum in Demand-Free Phosphate buffer Determined by In vitro Excystation and Animal Infectivity, *Appl. Env. Microbiol.*, 59(12), pp. 4203-4210 (1993)
- 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., A Most-Probable-Number Assay for Enumeration of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts, *Appl. Env. Microbiol.*, 69(9), pp. 3936-3941(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)
- Rennecker, J.L., Marinas, B.J., Owens, J.H., Rice, E.W., Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with Ozone, *Wat. Res.*, 33(11) pp. 2481-2488 (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)
- USEPA, National Primary Drinking Water Regulations : Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule ; Proposed Rule, Federal Register 68(154) (2003.8.11)