

환경수 중 크립토스포리디움 오시스트 및 지아디아 시스트 검출의 정확도 및 회수율 향상을 위한 연구

이목영* · 조은주 · 김도연 · 변승헌 · 이의광 · 오세종 · 안승구¹
서울특별시 수도기술연구소, ¹서울시립대학교 환경공학과

환경수 중 크립토스포리디움 및 지아디아 분석방법은 현재 어떤 방법도 만족할만한 민감도, 특이도, 재현성을 인정받지 못하고 있어, 다양한 형태의 정도관리 및 수행도 평가가 요구되고 있다. 본 연구는 1623방법(USEPA: Method 1623)을 사용해 한강 지표수에 대한 크립토스포리디움 및 지아디아 접종시험과 현장시료 동시분석시험에 기초하여, 환경수 중 이들의 존재여부와 농도를 측정함에 있어 분석결과의 정확도 및 신뢰도, 그리고 회수율에 미치는 영향요인을 검토하였다. 1623방법에 의한 결과, 평균적으로 한강 지표수시료에 존재하는 크립토스포리디움의 46%와 지아디아의 60%를 검출할 수 있는 것으로 나타났으나, 각각의 회수율 범위가 13~73% 및 28~84%로 변이가 매우 커서 실제 환경 중 두 원생동물의 농도를 결정하기 위해서는 반복 측정 및 통계학적인 접근이 수반되어야 할 것으로 나타났다. 또한 IMS (immunomagnetic separation) 중 산침가에 의한 해체·분리과정을 1 회 더 반복함으로써 지표수시료에서의 총회수율의 약 10%를 향상시킬 수 있었으며, flow cytometry로 계수·준비된 (오)시스트((oo)cysts)를 정도관리에 사용할 경우 보다 신뢰할만한 결과를 얻을 수 있었다. 형광항체 및 DAPI 염색은 현장시료특성이나 전처리과정에 따라 동일하지 않은 형광특징을 보인바, 접종된 현장시료 정제액에 대한 염색결과도 참조되어야 하며, 환경시료에는 다양한 비특이물질이 함유되어 있어 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색 및 DIC (Differential Interference Contrast)에 의한 내부구조 관찰이 최종 동정기준이 되어야 할 것으로 나타났다.

Key words □ *Cryptosporidium*, detection method, *giardia*, matrix spike, detection method, validity

크립토스포리디움 파브름(*Cryptosporidium parvum*)과 지아디아 람블리아(*Giardia lamblia*)는 포유류의 장관계에 기생하는 원생동물로, 심한 설사를 동반한 소화기계 질병을 일으킨다(27). 미국, 일본 등에서는 최근 이들에 의한 많은 수인성 집단발병이 보고되었는데(15,29), 이들의 오시스트(oocysts)와 시스트(cysts)는 염소 내성이 매우 강해 병원성 바이러스에 비해 정수처리에 의한 제거가 훨씬 어렵고, 10 개 미만의 소량으로도 감염을 일으켜 정수처리에서 주의를 요하는 병원체로 알려져있다(20).

우리나라에서는 아직 이들로 인한 수인성 집단발병사례가 보고된 적이 없지만, 감염환자나 가축의 감염상황은 이미 여러차례 언급되어왔다(2,6,10,11). 또한 우리나라 수계환경의 오염 가능성이 제기되면서, 하수처리장 방류수 오염실태(4) 뿐만 아니라 하천수 중 크립토스포리디움 등의 검출 보고도 잇따르고 있다(1,5).

상수원수에서 크립토스포리디움 등을 검출하기 위해서는 우선 10~100 L의 물시료를 여과농축한 후 포집된 입자들로부터 (오)시스트만을 순수분리하는 전처리과정이 선행되어야 한다. 전처리과정에서의 (오)시스트 손실은 매우 커서, 실타래형 카트리지를 사용하여 여과농축하여 percoll-sucrose 부상분리법으로 순수분리하는 ASTM방법(Standard Method 9711:B, "ICR Method") (8)의

경우, 크립토스포리디움의 평균회수율이 11%이고 접종된 오시스트를 한 개도 회수하지 못하는 사례도 있었다(17). 최종 동정(final identification)에는 계수가 가능한 면역형광항체법(immunofluorescence assay)이 가장 흔히 사용되어왔으나, 전처리과정에서 조류(algae)와 같은 방해물질들이 충분히 제거되지 못할 경우 거짓양성을 및 거짓음성율이 높아 동정결과에 대한 신뢰도가 매우 낮을 수 밖에 없었다(13).

1622방법(USEPA: Method 1622) (23)과 1623방법(USEPA: Method 1623) (24)은, 이러한 문제점들을 줄이기 위해, 캡슐필터를 사용하여 여과농축과정에서의 손실율을 낮추는 한편 순수분리과정에 면역자기분리법 (immuno-magnetic separation; IMS)을 적용함으로써 방해물질을 크게 줄여 경험있는 분석자의 경우 크립토스포리디움 회수율을 50~70%까지 향상시켰으며 FITC (fluorescein isothiocyanate)로 형광표지된 항체와 핵 염색제인 DAPI 염색을 병행하여 동정결과에 대한 신뢰도를 높였다고 평가되고 있다(14).

그러나 수중 원생동물 분석에 사용되는 방법은 아직까지 여러 가지 한계들을 내포하고 있다(13). 검출된 (오)시스트가 살아있는지 여부를 정확히 판정할 수 없으며 환경시료에 존재하는 실제 (오)시스트를 모두 검출하지 못한다는 기본적인 한계를 갖고 있다. 또한 비특이형광물질에 의한 위양성율이 여전히 존재하며, 탁도 등의 시료특성이나 분석자의 숙련도에 따라 회수율이 수시

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-2049-1086, Fax: 02-2049-1095
E-mail: mylee9@hanmail.net

로 변할 수 있다.

이러한 이유로 USEPA (US Environment Protection Agency)는 다양한 원생동물 검출방법을 평가하는 기술적인 기준과 통계학적인 평가방법 등을 제시하고 있다(25). 1998년 호주 시드니에서 실제 공급된 수도물 수질에 큰 이상이 없었음에도 불구하고 잘못된 검사결과에 의해 9 주 동안 끓여먹기경고가 내려졌던 사례는 정기적인 정도관리(quality control)가 무엇보다 중요함을 강조한 바 있다(12).

따라서 본 연구는 한강 지표수를 비롯한 다양한 물시료에 크립토스포리디움 및 지아디아를 접종하고 이를 1623방법에 의해 회수하는 시험을 통해, 환경수 중 원생동물 농도 측정시 분석결과의 정확도와 신뢰도, 회수율에 영향을 미치는 요인들을 검토하였다. 그리고 이에 기초하여 보다 정확하고 신뢰할만한 분석결과를 얻기 위해 필요한 일상적인 정도관리방법과, 보다 향상되고 안정된 회수율을 달성할 수 있는 몇가지 방안을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

접종할 (오)시스트용액 준비

접종할 (오)시스트용액(spiking suspension)은 2가지 방법으로 준비되었다. 첫 번째 방법은 5% Formalin 처리된 (오)시스트(Waterborne, USA)나 살아있는 (오)시스트(Iowa/H3 isolate, Waterborne, USA)를 구입한 후, 원하는 농도로 희석하고 웰슬라이드법이나 멤브레인필터법을 이용해 10 회 반복 계수하여 평균값을 접종량으로 하였으며, 필요시마다 조제하여 사용하였다. 두 번째 방법은 시판중인 표준접종용액("Easyseed100", BTF)을 구입하여 사용하였는데, 이는 flow cytometry로 100여 개씩의 오시스트와 시스트를 계수하여 PBS (phosphate buffer solution)에 부유시킨 후 보존기간 연장 및 취급시 안전을 위해 감마선을 조사한 것이었다. 접종용액은 4~8°C 상태로 유지보관하며 사용하였다.

연구방법

미처리된 환경시료에 일정량의 (오)시스트를 주입하여 분석의 전과정을 수행한 후 총회수율을 평가하고 정확도를 결정하는 주요 영향요인들을 검토하였다. 환경시료로는 1998년부터 2002년까지 매월 또는 분기별로 총 30 회에 걸쳐 한강 취수장 또는 지류천에서 채취된 지표수를 사용하였다. 초기 8 회의 크립토스포리디움 분석은 1622방법에 준하였으며, 나머지 22 회의 1623방법에 준하여 지아디아까지 분석하였다. 1623방법은 1622방법을 지아디아에까지 적용하여 크립토스포리디움과 지아디아를 동시 분석하는 방법으로 두 방법의 분석과정은 완전히 동일하며, 그 상세한 과정은 다음과 같다.

여과농축

한강 지표수시료 20 L를 채취하여 실험실로 운반한 후 먼저 탁도(HACH 2100AN Turbidimeter)를 측정하였다. 시료가 담겨있는 물통에 캡슐필터(polyether-sulfone 재질, 여과면적 1300 cm², 공극크기 1.0 μm, Gelman)와 연동펌프를 연결한 후 철저히 교반

하면서 10 L를 여과한 뒤, 남은 10 L가 들어있는 물통에 새로운 캡슐필터를 연결하고 준비된 (오)시스트 접종액을 주입한 후 철저히 교반하면서 여과하였다(여과속도 2 L/min 이하). 이후 캡슐필터에 추출용액 (Laureth-12 1 g, 1 M Tris solution 10 ml, 0.5 M EDTA solution 2 ml, Antifoam A 150 μl를 정제수에 용해시켜 1000 ml로 만든 용액)을 충분히 넣고 Whisk Shaker에 장착, 약 600 rpm으로 5 분동안 교반하되 장착방향을 0 도, 45 도, 90 도로 바꾸어 3 회 반복하였다. 추출된 용액은 175 ml 원심분리관에 나누어담아 1100×g로 15 분동안 원심분리하여 농축한 후 바닥에 형성된 최종펠렛량을 최대 0.3 ml를 초과하지 않도록 취한 다음, 증류수를 첨가해 10 ml 현탁액을 만들어 실험하였다.

시료의 정제

면역자기분리기법(immuno-magnetic separation; IMS)에 따라, 먼저 최종농축액 10 ml를 Leighton tube에 넣은 다음, anti-Cryptosporidium 또는 anti-Cryptosporidium and anti-Giardia magnetic bead와 buffer용액(Dynal 730-01 or 730-02)을 첨가하여 회전교반기에 장착, 18 rpm으로 1 시간동안 반응시켜 (오)시스트-자기체(magnetic bead)의 결합체를 형성시켰다. 이후 자석장치(magnetic particle concentrator-1)를 사용해 다른 탁질들로부터 결합체를 분리해 미세원심분리관으로 옮긴 후, 0.1 N HCl 50 μl를 넣어 결합체를 해체시키고, 다시 자석장치를 이용해 자기체만을 제거함으로써 정제된 (오)시스트용액을 얻었다. 정제액 50 μl를 1 N NaOH 5 μl가 미리 적용된 웰슬라이드(well slides, Dynal Spot-On)에 분주한 후 잘 섞어 공기건조시켰다.

한편 정제과정에서의 손실정도를 측정하기 위해, 정제수 10 ml에 일정량의 (오)시스트 접종용액을 주입한 후 시료농축액과 동일하게 IMS한 후 최종 정제액으로 별도의 슬라이드를 준비하였다. 또한 0.1 N HCl 재첨가에 의한 (오)시스트의 분리·회수정도를 확인하기 위해 최종 정제액을 취하고 남은 미세원심분리관에 다시 0.1 N HCl 50 μl를 첨가하여 2차로 정제된 (오)시스트용액을 얻은 후, 별도의 웰슬라이드를 준비하였다.

또한 실타래형 카트리지필터를 사용해 환경시료로부터 탁질들을 포집, 농축한 후 정제수를 첨가하여 10 NTU (nephelometric turbidity units), 100 NTU, 1000 NTU 탁도수를 조제하여, 일정량의 (오)시스트를 주입한 다음, IMS 및 형광염색을 거쳐 최종 회수량을 측정, 탁도별로 IMS 회수율을 비교하였다.

시료의 형광염색 및 DAPI 염색

현장시료 1 점당 6 개씩 준비된 웰슬라이드에 대해 형광항체키트(Direct labeling kit, Meridian)를 사용해 제조사의 지시대로 형광 염색하였으며 그 과정은 대략 다음과 같다. FITC-labeled anti-Cryptosporidium & anti-Giardia monoclonal antibody용액과 역염색시약 한방울 씩을 웰슬라이드에 떨어뜨린 후 빛이 차단된 humid chamber에 넣고 37°C 배양기에서 30 분 동안 배양한 다음, 세척하였다. 이어 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 용액(150 mM PBS 50 ml에 2 mg/ml DAPI 10 μl를 첨가하여 만든

1/5,000 희석액) 50 μ l를 각 well에 분주한 다음, 실온에서 약 1 분동안 정치한 후 세척하였다. 마지막으로 anti-fadant (2% DABCO)가 함유된 mounting medium 10 μ l을 넣고 커버글라스로 덮어 밀봉하였다.

한편 형광항체염색 및 DAPI 염색 수행도를 측정하기 위해 매 시험마다 표준 (오)시스트용액 및 정제수를 각각 슬라이드에 접종하여 시료와 동일한 형광염색과정을 수행, 양성대조군과 음성대조군으로 써 판정에 참고하였다.

동정 및 계수

Blue filter (excitation wavelength, 490 nm; emission wavelength, 510 nm)가 장착된 형광현미경(Zeiss Axioskop)으로 웰 전체를 관찰하였다. 먼저 크립토스포리디움은, Blue filter 하에서 직경 4~6 μ m의 구형 또는 타원형 모양에 전체가 밝은 초록(apple-green) 형광빛이 되, 테두리가 보다 선명하고, DIC (differential interference contrast)로 보아 내부에 비전형적인 물체(돌출물, 구멍, 세포 전체를 차지하는 한두개의 핵, 붉은 형광빛의 엽록체, 결정체나 포자)를 포함하지 않을 경우, ① 1~4 개의 스포로조이트(sporozoites)와 같은 선명한 내부구조를 갖거나(I) ② 스포로조이트인지 확인할 수는 없지만, UV filter (excitation wavelength, 400 nm; emission wavelength, 420 nm)하에서 DAPI 양성이거나 봉합선(縫合線)이 관찰되는 경우(A) ③ 내부구조물이 없이 껍데기만 남아있는 속빈 형태(E)로 구분하여 계수하였다. 지아디아는 테두리가 보다 선명한 초록(apple-green) 형광빛을 띄워, 길이 8~18 μ m, 폭 5~15 μ m 정도의 럭비공모양 또는 구형인 물체에 대하여, DIC로 보아 비전형적인 물체를 내부에 포함하지 않을 경우, 역시 3 가지로 구분하여 계수하였다.

현장시료 관찰에 앞서 먼저 양성대조군 및 음성대조군 슬라이드를 먼저 관찰하여 초록형광 염색정도 및 DAPI에 의한 하늘색 형광정도를 확인하고 그 결과를 사진으로 저장하여 현장시료 관찰시 참고하였다. 또한 현장시료 슬라이드, 접종한 현장시료 슬라이드, IMS 슬라이드에서 발견된 (오)시스트의 염색결과도 상호 비교하였다.

회수율 계산

접종된 현장시료에서의 회수량과 미접종시료 회수량과의 차이로 회수율(%)을 구하여 총회수율(RT)로 하였고 그 상대표준편차(relative standard deviation; RSD)를 구하여 정밀도(precision)로 하였다. IMS 회수율(R_{IMS})은 1, 2 차 해체(dissociation)에서 얻은(오)시스트량으로 계산하되, 2 차 해체과정에 의한 회수율도 별도로 기록하였다.

$$R_T = 100 \times \frac{N_{sp} - N_s}{T}$$

R_T : 퍼센트 회수율

N_{sp} : 접종된 현장시료에서 회수된 (오)시스트량

N_s : 미접종된 현장시료에서 검출된, 즉 현장시료 자체에 들어있던 (오)시스트량

T : 접종된 (오)시스트량

$$R_{IMS} = 100 \times \frac{N}{T}$$

R_{IMS} : IMS과정에서의 회수율

N : 회수된 (오)시스트량

T : 접종된 (오)시스트량

결과 및 고찰

고탁도 환경시료에서 원생동물 회수율

1998년부터 3년동안 한강 수계 취수장 및 지류천 등에서 시료를 채취하여, 88~1,135 개의 오시스트와 83~149 개의 시스트를 접종한 후 회수율시험을 수행한 결과, 접종된 오시스트의 평균 46%와 접종된 시스트의 평균 60%가 회수되었다(Table 1). 이때 접종되지 않은 한강 지표수시료에서 발견된 크립토스포리디움 및 지아디아 농도범위는 0~2 oocysts/10 L과 0~38 cysts/10 L이었으며, 시료 중 두 원생동물의 검출농도와 회수율간에는 통계학적으로 유의성이 관찰되지 않았다.

이러한 회수율은 1623방법 개발과정에서 미국의 11 개 실험실이 참여해 얻은 크립토스포리디움 회수율 37.7% (RSD 61%)와 지아디아 회수율 42.1% (RSD 30%)보다는 다소 높았으며(26), 1623방법이 미국 전국실태조사(Information Collection Rule Supplement Survey)에 사용되면서 6 개 기관이 공동시험하여 얻은 크립토스포리디움 평균회수율 43% (RSD 47%)와는 비슷하였다(24).

그러나 크립토스포리디움 회수율은 중앙집중적이며 좌우대칭적인 분포를 보였는데, 그 범위가 13~73%로 매우 넓고 상대표준편차도 35%로 컸다(Fig. 1). 지아디아 회수율은 오른쪽으로 치우친 분포형태에 상대표준편차가 26%로써, 크립토스포리디움에 비해 다소 높고 안정적이었지만, 역시 28~84%까지 광범위하였다(Fig. 2). 이러한 결과에 기초할 때, 환경수 중 두 원생동물, 특히 크립토스포리디움의 분포에 대한 신뢰할 만한 정보를 얻기 위해서는, 동일 지점에 대한 반복 측정과 통계학적인 해석을 병행하여야 할 것으로 판단되었다.

이러한 분포경향은 미국 전역에서 채취된 크립토스포리디움 MS (Matrix spike)시료 430 점 및 지아디아 MS시료 270 점으로부터 얻은 회수율 분포와도 대체로 비슷하였는데, 본 연구 결과가 보다 중앙집중적인 분포를 보인 것은 분석기관간의 편차가 배제되었기 때문으로 사료되었다.

분석된 시료의 탁도는 0.8~13.4 NTU의 범위로, 지아디아 회수율은 탁도와 관련성을 보이지 않은 반면(Fig. 3), 크립토스포리디움 회수율과는 음의 상관관계 ($r = -0.486$, $P < 0.01$)를 나타내어(Fig. 4), 분석 시료의 탁도에 따라 회수율에 영향을 미칠 가능성을 시사하였다. 그러나 분석시료 중 최고 탁도가 13.4 NTU에 불과해 앞으로 고탁도시료에 대한 데이터가 좀더 축적, 보완되어야 할 것이다.

정제과정에서의 회수율 및 단계별 손실율

정제수 10 ml에 88~1,135 개의 오시스트와 83~149 개의 시스

Table 1. Spiked raw water samples analysis results for *Cryptosporidium* & *Giardia*

No.	<i>Cryptosporidium</i>					<i>Giardia</i>			Turbidity of Raw water (NTU)	Spiked oocysts Type
	Spike level*	Oocysts detected in unspiked sample	Recovery of spikes samples	IMS Recovery	Spike level*	Cysts detected in unspiked sample	Recovery of spikes samples	IMS Recovery		
1	1135±133	0	35	82	–	–	–	–	8.2	M**
2	227±27	0	44	75	–	–	–	–	3.8	M
3	227±27	0	40	75	–	–	–	–	4.8	M
4	227±27	0	39	75	–	–	–	–	5.1	M
5	227±27	0	56	75	–	–	–	–	0.9	M
6	227±27	0	50	75	–	–	–	–	1.8	M
7	214±80	2	73	110	–	–	–	–	1.5	M
8	214±80	0	26	110	–	–	–	–	5.4	M
9	91±10	0	55	111	83±24	37	41	73	3.5	M
10	91±10	1	45	111	83±24	3	45	73	2.7	M
11	91±10	1	63	111	83±24	3	69	73	2.7	M
12	91±10	0	24	111	83±24	0	73	73	3.0	M
13	140±12	2	36	103	125±17	3	46	98	7.5	M
14	88±11	0	56	106	97±24	5	78	60	1.6	M
15	122±16	1	60	77	149±9	26	28	35	1.8	M
16	104±20	1	73	73	128±7	19	41	80	4.6	M
17	99±2	0	34	63	98±2	4	76	85	3.7	C***
18	99±2	0	26	88	98±2	1	70	89	13.4	C
19	99±1	1	13	90	98±1	6	57	71	6.9	C
20	98±1	2	73	90	99±1	31	82	64	2.2	C
21	98±1	0	41	73	99±1	11	72	87	1.9	C
22	99±1	0	60	73	99±1	1	58	77	2.1	C
23	99±1	0	41	71	99±1	0	49	65	0.8	C
24	99±1	0	21	55	99±1	19	59	48	2.5	C
25	99±1	0	37	–	99±0	1	75	–	3.5	C
26	98±1	0	46	74	99±1	2	42	74	4.6	C
27	98±1	0	46	82	99±1	0	40	81	4.9	C
28	98±1	1	58	85	99±1	1	54	83	2.8	C
29	98±1	0	48	83	98±1	6	84	65	2.5	C
30	99±1	0	36	82	100±1	38	70	75	3.3	C
Mean (RSD)	–	–	46 (35)	83(18)	–	–	60 (26)	73(21)	–	–

*Mean ± standard deviation

**M: Spiking suspension prepared by manual enumeration using live or formalin-fixed oocysts and cysts (Waterborne)

***C: Commercial spiking suspension enumerated by flow cytometry, sterilized by Gamma irradiation (“Easysed100”, BTF)

트를 집중하여 IMS과정부터 수행한 결과, 평균 83% (range 55~111%, RSD 18%)의 크립토스포리디움과 평균 73% (range 35~98%, RSD 21%)의 지아디아가 회수되었다. 이러한 결과는 Bukhari 등(9)이 비슷한 방법으로 집중된 증류수로부터 크립토스포리디움 회수율을 구한 결과인 68~83%와 대체로 비슷한 수준이었다. 특히 이번 결과는 IMS kit, 0.1 N HCl 등 모든 시약이 각 시험마다 새롭게 조제 또는 구입되었고 시험시기도 3년에

걸쳐 다양함에도 불구하고 상대표준편차가 약 20% 정도로 나타나, IMS (Dynabeads IMS kit 사용)에 의한 (오)시스템 회수가 매우 안정적임을 보여주었다.

또한 10, 100, 1,000 NTU로 조제된 탁도수에 대한 집중시험에서도 크립토스포리디움 회수율은 68~107%, 지아디아는 53~94%로 (Table 2) 본 증류수에서의 회수율 범위와 크게 다르지 않아 시료 탁도로 인한 회수율 감소는 크지 않다고 여겨진다. 이

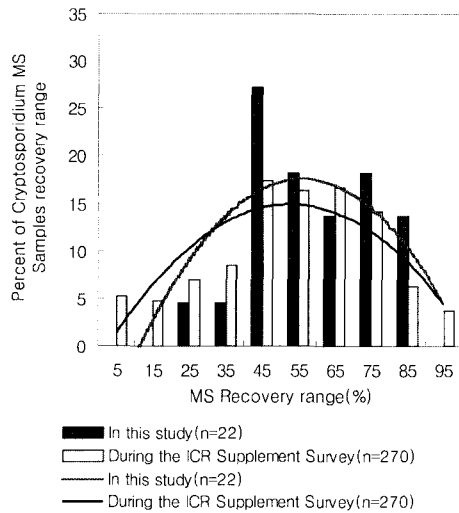


Fig. 1. Distribution of *Cryptosporidium* MS recoveries.

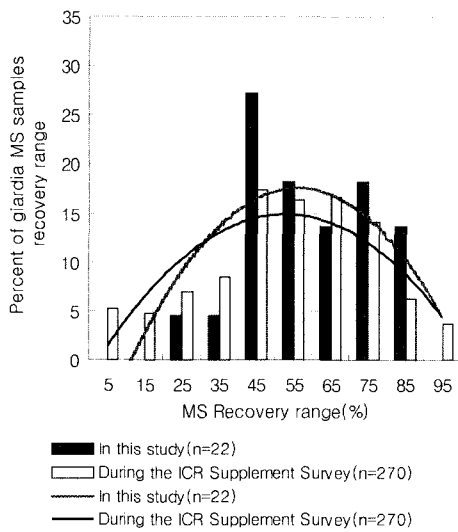


Fig. 2. Distribution of *Giardia* MS recoveries.

와 관련하여, Rochelle 등(21)은 탁도 0.45~8.3 NTU인 환경시료의 농축액에 크립토스포리디움을 접종하여 회수율 62~100% (평균 79%)을 얻었으며, Bukhari 등(9)은 환경시료 농축액(50~5,000 NTU)과 정제수에 대해 IMS 회수율을 비교한 결과, 큰 차이를 볼 수 없었다고 보고한 바 있다.

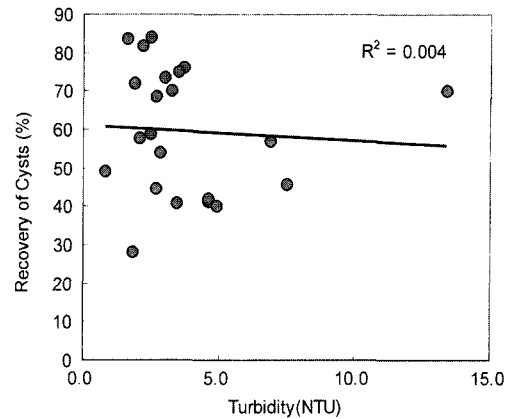


Fig. 3. Recovery of *Giardia* and turbidity in MS with spiked surface water samples.

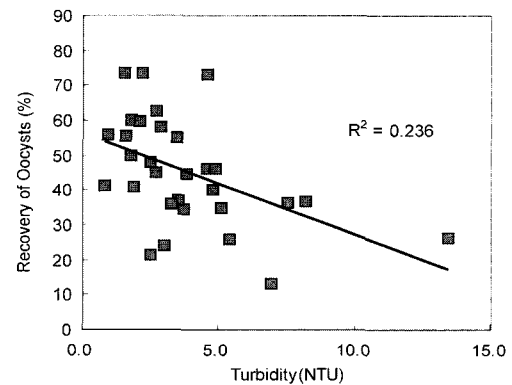


Fig. 4. Recovery of *Cryptosporidium* and turbidity in MS with spiked surface water samples.

한편 flow cytometry로 계수된 (오)시스트를 접종한 IMS에서 HCl 첨가에 의한 해체단계를 1 회 수행한 경우의 크립토스포리디움 회수율은 평균 71%이었으며, 해체과정을 반복함으로써 회수율을 평균 6% (range 1~28%) 높일 수 있었다(Table 3). 지아디아 또한 1 차 해체에 의한 평균회수율은 70%이지만, 2 차 해체를 추가함으로써 평균 5% (range 1~13%)를 더 회수할 수 있었다. 이러한 회수율 향상은 현장시료 분석에서도 확인되었는 바, 회수된 총량의 약 10%가 2 차 해체로 만들어진 슬라이드에서 관찰되었다.

크립토스포리디움 총회수율이 평균 46%이고 IMS 정제 이후 과정의 회수율이 평균 83%로 결과되었으므로, 여과농축과정에서

Table 2. Percent recovery by IMS from spiked surface water samples prepared with various turbidities

Turbidity (NTU)	% Oocysts recovery				% Cysts recovery			
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Replicate 4	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Replicate 4
0.05	89	90	78	107	78	78	74	81
10	98	85	96	ND*	55	94	72	ND
100	85	96	70	ND	66	53	76	ND
1000	77	68	98	ND	74	53	66	ND

*ND, not done

Table 3. Percent recovery of (oo)cysts by 1st and 2nd dissociation of (oo)cysts-bead complex in IMS

No.	<i>Cryptosporidium</i> oocysts				<i>Giardia</i> cysts			
	IMS recovery (%)		MS recovery (%)		IMS recovery (%)		MS recovery (%)	
	1st dissociation	2nd dissociation	1st dissociation	2nd dissociation	1st dissociation	2nd dissociation	1st dissociation	2nd dissociation
1	56	7	26	8	76	9	73	3
2	81	7	22	4	88	1	64	6
3	62	28	11	2	58	13	54	3
4	88	2	71	2	62	2	75	7
5	71	2	39	2	81	6	67	5
6	68	5	60	0	69	8	58	0
7	67	4	38	3	60	5	44	5
8	47	8	10	11	39	9	58	1
9	-	-	36	1	-	-	70	5
10	71	3	41	5	70	4	38	4
11	81	1	65	4	78	3	52	5
12	81	4	56	2	79	4	51	3
13	77	6	45	3	63	2	80	4
14	79	3	33	3	72	3	65	5
Mean	71	6	40	4	69	5	61	4

손실은 약 37%, IMS 정제 이후과정에서의 손실은 17% 수준으로 추정된다. 이로써 크립토스포리디움의 경우, 여과농축 및 추출과정에서 보다 많이 손실되며 탁도에 의한 영향도 더 큼을 알 수 있다(3). 이에 비해, 총회수율이 평균 60%이었던 지아디아는 IMS 이후과정에서 약 27% 정도가 손실되는 것으로 나타나 여과농축과정보다는 IMS과정이 회수율에 더 큰 영향을 미치는 것으로 예상되었다.

접종용액이 회수율에 미치는 영향

IMS 회수율 측정에서는 100%를 초과하는 경우가 간혹 발생하였는데, 이는 접종된 (오)시스트용액에 기인하였다. 실험실에서 희석한 후 웰슬라이드법 또는 멤브레인필터법으로 10 회 반복계수하여 준비된 (오)시스트용액은 각 상대표준편차가 8~27%로써 (Table 1), 매회 접종된 (오)시스트량의 95% 신뢰구간을 적용할 경우, IMS 회수율은 최소 3%에서 최대 19%까지의 격차를 내포하였다. 즉 오시스트 접종량이 88개인 경우, 95% 신뢰구간은 81~95 개로, 이때의 IMS 회수율은 98~115%의 범위 안에 존재하였다. 이와 같은 편차는 희석 및 계수과정에서 (오)시스트가 완전히 균일하게 존재하기 어렵고 특히 (오)시스트의 뭉침현상 (clumping)으로 불균일성이 더욱 심해지기 때문이다(19). 따라서 매번 접종액을 새로 조제해야 하는 정기 정도관리에서는 이러한 접종량 자체의 변이성 때문에 결과된 회수율에 대한 신뢰도가 낮을 수 밖에 없었다.

이에 비해 flow cytometry로 계수, 준비된 시판접종액은 오시스트와 시스트가 각각 99 ± 1 개 범위내로 항상 일정하고 각각의 RSD도 항상 2% 이내이었다. 따라서 flow cytometry로 계수된 접종액을 사용할 경우 수행도 평가시 접종용액에 의한

영향을 상당부분 배제함으로써 분석과정에 대한 보다 신뢰도 높은 정보를 얻을 수 있으며 특히 분석방법 비교나 실험실간의 정도관리(inter-laboratory validation)에 보다 적합할 것으로 판단되었다.

형광염색 및 최종동정단계에서 정확도 결정요인

최종 동정을 위한 형광항체염색 및 DAPI 염색은 항상 동일한 정도의 형광성을 결과하지 않았는데, 이는 IMS의 마지막 단계인 산처리와 슬라이드에서의 중화처리로부터 이어지는 pH 변화가 한 원인으로 추정된다. Yakub과 Stadterman (28)은 철을 고농도로 함유한 시료에서 회수된 지아디아 시스트내부가 흐린 적자색 이면서 테두리 염색이 얇은 염색특징을 보여 시료 자체의 영향이 경우도 있다고 보고하였다.

따라서 표준 (오)시스트를 슬라이드에 직접 접종하여 염색 수행도를 평가하는 양성·음성대조군 슬라이드에서 양호한 염색결과를 확인하였지만, 현장시료로 준비된 슬라이드에서는 동일한 염색결과를 보이지 않는 경우도 발생하였다. 이 경우, IMS 정제액을 염색한 슬라이드나 MS시험에 의한 슬라이드가 참조되었으며, 특히 MS 슬라이드는 접종(오)시스트의 전형적인 염색상태를 관찰하여 염색 수행도를 확인하는 동시에 시료에 함유된 다양한 비특이 형광물체와의 상호비교도 가능해 동정의 정확도를 높이는 데 큰 도움이 되었다.

다양하게 준비된 슬라이드에서 관찰되는 전형적·비전형적 물체들은 모두 각각 3 개씩의 이미지로 저장, 보관되었는데, 일차적으로 blue filter하에서의 관찰된 FITC 염색결과를, 두 번째로 DAPI에 의한 핵 염색 결과를, 그리고 마지막으로 DIC 관찰결과를 촬영, 보관하였다(Fig. 6, Fig. 7)

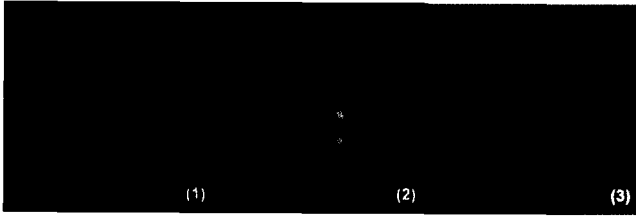


Fig. 5. Micrograph of typical *Cryptosporidium* oocyst confirmed by fluorescence microscopy using DIC, found in Pungnap intake water sample from the Han River: (1) brilliant apple-green fluorescing ovoid, 5 μm in diameter under Blue filter (2) 1 to 4 blue points by DAPI nuclei staining under UV filter (3) 1 to 4 sporozoites by DIC.

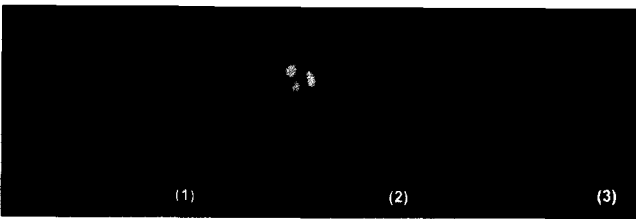


Fig. 6. Micrograph of typical *Giardia* cyst confirmed by fluorescence microscopy using DIC, found in Pungnap intake water sample from the Han River: (1) brilliant apple-green fluorescing oval, 8~12 μm in diameter under Blue filter (2) 1 to 4 blue points by DAPI nuclei staining under UV filter (3) internal structure (nuclei, axoneme etc) by DIC.

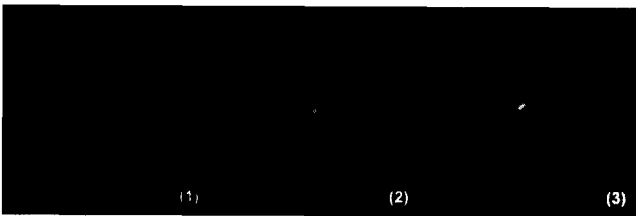


Fig. 7. Micrograph of empty *Cryptosporidium* oocyst observed by fluorescence microscopy using DIC, found in Kuu intake water sample of the Han River: Despite of typical apple-green fluorescence, shape and size (1), it showed neither DAPI stained nuclei (2) nor internal structures (3).

전형적인 형광을 띄면서도 내부구조를 결여한 ‘속빈(empty)’ 물체의 동정은 특히 어려웠는데(Fig. 8, Fig. 9), Judith (18)는 이를 ‘양성도 음성도 아닌, 유사체(cyst-like objects)’라 불렀다. 그 간의 몇몇 연구에서는 방해입자 때문에 DIC에 의한 확정 판정이 불가능한 (오)시스트가 다수 포함되어 있다는 점을 감안하여 속빈 형태까지 계수, 추정 (오)시스트로 보고하기도 하였다(16,30). 그러나 1623방법에서는 IMS의 도입으로 탁질의 방해가 현저히 감소하였고 슬라이드상의 염색으로 내부구조 관찰도 보다 명확해졌으며, DAPI에 의한 핵염색도 병행하여 내부구조 여부에 대한 보다 신뢰성 있는 판단이 가능해졌다(7). 따라서 속빈 (오)시스트는 이미 사멸된 것이므로 환경위생학적 측면에서는 (오)시스트 판정에서 제외함(30)이 타당하다고 여겨진다.

실제로 우리나라 한 지류천에서 검출된 지아디아 시스트 중 1/2~9/10가 ‘속빈’ 시스트였다는 보고도 있어(5), DIC에 의한 내부

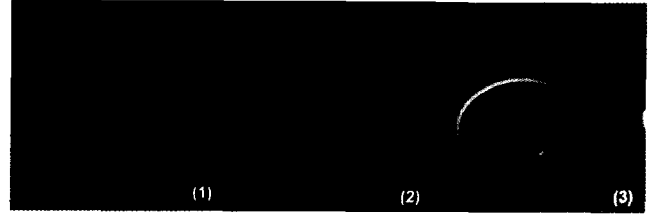


Fig. 8. Micrograph of empty *Giardia* cyst by fluorescence microscopy using DIC, found in Kuu intake sample of the Han River : Despite of typical apple-green fluorescence, shape and size(1), it showed neither DAPI-stained nuclei (2) nor internal structures (3).



Fig. 9. Micrograph of two oocyst-like, non-oocyst objects found in the surface water samples of the Han River: Despite of typical fluorescence but they showed atypical DAPI staining (1) or internal structures (1,2).

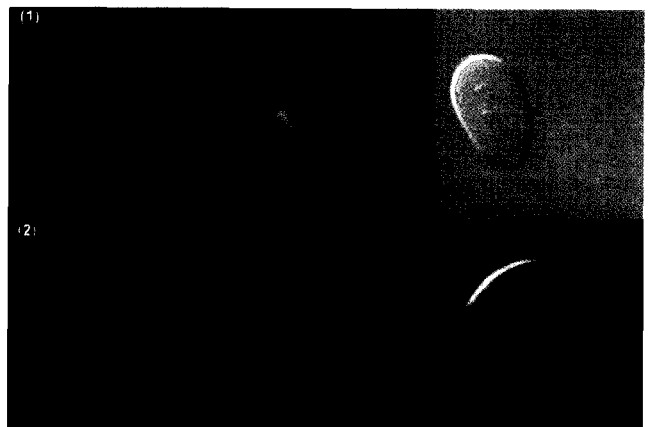


Fig. 10. Micrograph of two cyst-like, non-oocyst objects found in the surface water samples of the Han River : Despite of typical size and fluorescence, they showed atypical DAPI staining (2) or internal structures (1,2)

구조 관찰 및 DAPI 염색 결과를 최종판정기준으로 하지 않을 경우 의양성 가능성이 높고 실제 오염수준보다 과대평가될 가능성이 클 것으로 예상되었다.

지표수시료에 대한 현미경 관찰에서는, 전형적인 형광성과 형태를 가진 많은 유사체들이 관찰되었다. 두 번의 항원항체반응에

도 불구하고 슬라이드에서 조류와 같은 물체들이 다수 관찰되었으며, 이 중 유사한 크기와 모양에, 초록형광을 띄는 물체도 종종 발견되었다(Fig. 8-11). 54종의 조류를 면역형광항체법에 따라 관찰한 Rodgers 등(22)은 *Navicula minima*와 같은 규조류가 지아디아와 유사한 형태적 특징과 초록형광을, 남조류의 일종인 *Synechococcus elongatus*가 크립토스포리디움과 유사한 초록형광을 보인다고 지적한 바 있다(22). 따라서 FITC 형광염색 및 크기, 모양의 관찰만으로는 이들 조류를 (오)시스트와 구분짓기 어려웠으며, DIC하에서 관찰되는 내부구조와 DAPI에 의한 핵 염색결과를 최종적인 판정기준으로 할 때, 환경의 실제 오염수준에 대한 정확하고 신뢰할만한 접근이 가능할 것으로 생각되었다.

수중 원생동물 분석방법은 아직도 개발 중이며 계속 보완되고 있다. Allen 등(7)은 현재까지 알려진 어떠한 물 분석방법도 만족할만한 민감도, 특이도, 재현성을 얻지 못하고 있다고 지적하였다. 따라서 현 방법의 한계에 대한 이해와 고려, 그리고 철저한 정도관리를 통해서만 의미있고 신뢰할만한 결과를 얻을 수 있는 만큼, 우리 수환경에서 발견된 전형·비전형 물체들의 관찰 결과 보관 및 상호비교판정 등을 통해 위양성을·위음성을 감소시키는 노력도 필요할 것으로 판단된다.

참고문헌

- 김혜선, 윤제용, 염철민, 2000. 국내 상수원수 및 하수에서 *Cryptosporidium*과 *Giardia* 포낭 검출. 한국물환경학회지 16, 585-594.
- 위성환, 강영배, 주후돈, 조동희, 김용수. 1996. 국내 설사 송아지의 크립토스포리디움 발생 실태조사. 농업과학논문집 38, 729-733.
- 이목영, 조은주, 김도연, 정문호. 1999. 캡슐휠터 및 멤브레인휠터에 의한 물속의 크립토스포리디움 검출효율 평가, 대한상하수도학회 1999년 춘계학술발표논문집, 서울, 71-75.
- 이목영, 조은주, 김도연, 이의광, 오세종. 2000. 지아디아, 크립토스포리디움 및 분변오염 지표세균의 하수처리장 배출실태, 대한상하수도학회·한국물환경학회 2000년 추계공동학술발표논문집, 대전, 73-76.
- 이목영, 조은주, 김도연, 이의광, 오세종, 하영칠, 1623방법에 의한 서울시 상수도계통의 지아디아 및 크립토스포리디움 검출. 한국물환경학회지 16, 595-608.
- 이재구, 서영석. 1991. 돼지에 있어서 크립토스포리디움의 감염상황. 축산개발 연구보고 4, 85-93.
- Allen M.J., J.L. Clancy, and E.W. Rice. 2000. The plain, hard truth about pathogen monitoring. *J. Am. Water Works Assoc.* 92, 64-76.
- AWWA, APHA, and WEF. 1995. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 19 ed. 9-110-9-117.
- Bukhari Z. R.M. McCuin, C.R. Fricker, and J.L. Clancy. 1998. Immunomagnetic Separation of *Cryptosporidium parvum* from Source Water Samples of Various Turbidities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4495-4499.
- Choi J.Y., S.H. Lee, S.M. Guk, and S.H. Lee. 1996. An Epidemiological survey of *Cryptosporidium parvum* infection in randomly selected inhabitants of Seoul and Chollanam-do. *K. J. Parasitology* 34, 113-119.
- Cho M.H., A.K. Kim, and K.L. Im. 1993. Detection of *Cryptosporidium* oocysts from out-patients of the Severance Hospital. *Korea.K. J. Parasitol.* 31, 193-199.
- Clancy J.L. 2000. Sydney's 1998 water quality crisis. *J. Am. Water Works Assoc.* 92, 55-66.
- Clancy J.L. and Hansen Judi. 1999. Uses of Protozoan monitoring data. *J. Am. Water Works Assoc.* 91, 51-65.
- Clancy J.L., Bukhari Zia, McCuin Randi M., Matheson Zoe, and Fricker Colin R. 1999. USEPA method 1622. *J. Am. Water Works Assoc.* 91, 60-68.
- Craun G.F., A. Hubbs Stephen, Frost Floyd, L. Calderon Rebecca, and H. Via Steve, 1998. Waterborne Outbreaks of Cryptosporidiosis. *J. Am. Water Works Assoc.* 90, 81-91.
- Fredrick P.W. 1998. Communicating ICR Data on *Cryptosporidium*. *J. Am. Water Works Assoc.* 90, 20-24.
- Jakubowski W., S. Boutros, W. Faber, R. Fayer, W. Ghiorse, and M. LeChevallier. 1996. Environmental methods for *Cryptosporidium*. *J. Am. Water Works Assoc.* 88, 107-121.
- Judith F.S. 1985. Use of Immunofluorescence and Phase-Contrast Microscopy for Detection and Identification of *Giardia* Cysts in Water Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1434-1438.
- Kuhn R.C., C.M. Rock, and K.H. Oshima. 2002. Effects of pH and Magnetic Material on Immunomagnetic Separation of *Cryptosporidium* Oocysts from Concentrated Water Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2066-2070.
- Patricia L.M., D.P. Casemore, and K.B. Miller. 1996. Epidemiological Aspects of Human *Cryptosporidium* and the Role of Waterborne Transmission, *Epidemiol. Rev.* 18, 118-136.
- Rochelle P.A., D.L. Richard, A. Johnson, M.H. Stewart, and R.L. Wolfe. 1999. Evaluation of Immunomagnetic Separation for Recovery of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts from Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 841-845.
- Rodgers M.R. and J.F. Debbie. 1995. Identification of algae which interfere with the detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* Oocysts and a method for alleviating this interference. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3759-3763.
- USEPA. 1997. Method 1622: *Cryptosporidium* in Water by Filtration/IMS/FA. EPA 821-R-97-023, Office of Water, Washington, D.C.
- USEPA. 1999. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA, EPA 821-R-99-006. Office of Water, Washington, D.C.
- USEPA. 1999. Criteria for Evaluation of Proposed Protozoan Detection Methods. Office of Water, Washington, D.C.
- USEPA. 2001. Results of the Interlaboratory Method Validation Study for Determination of *Cryptosporidium* and *Giardia* Using U.S.EPA Method 1623. EPA-821-R-01-028. Office of Water, Washington, D.C.
- WHO. 1996. Guidelines for drinking water quality Vol. 2. Health criteria and other supporting information. 2nd ed., p. 56-58.
- Yakub G.P. and K.L. Stadterman-Knauer. 2000. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3628-3631.
- 金子光美. 1998. 原虫類やその他の病原性微生物の検出とその除去技術, 用手と廢水 40, 32-46.
- 北澤弘美, 玉包章一, 眞柄泰基. 1999. 水道水源におけるクリプトスポリジウム及びジアルジア實態調査結果の解析, 水道協會雜誌 68, 22-31.

(Received: September 28, 2002/Accepted: December 4, 2002)

ABSTRACT : Improvement of Validity and Efficiency for Detection of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts in Environmental Water Samples

Mok-Young Lee*, Eun-Ju Cho, Do-Yeon Kim, Eu-Kwang Lee, Se-Jong Oh, Seung-Ku Ahn¹ (Seoul Water Technology Research Institute, Seoul 143-202, Korea, ¹Department of Environmental Engineering, Seoul City University, Seoul 130-743, Korea)

No currently available methods to monitor pathogenic protozoa, *Cryptosporidium* and *Giardia* in environmental water come close to acceptable sensitivity, specificity and reproducibility, and so it has to be accompanied by thorough quality control and performance evaluation to credibly predict the distribution of them. We collected surface water samples from the Han River and spiked our prepared (oo)cysts, determined Matrix Spike recoveries using USEPA Method 1623 and considered what factors influence MS recovery and validity. As a result, average 46% of spiked oocysts and 60% of spike cysts were recovered, but repetitive sampling and statistical approach seemed to be necessary to determine the environmental pollution level of two protozoa as their variation coefficients was so much as 35% and 26%. And MS recoveries with two acid dissociations during immunomagnetic separation were improved more 10% than that with one dissociations and the use of spiked suspension enumerated by flow cytometry instead of manual preparation enhanced the validity and reliability in spiking tests. Because fluorescence characteristics of (oo)cysts stained on well slides with FITC-labeled monoclonal antibodies and DAPI was not always same, well slides from spiked field samples were helpful to evaluate the performance of staining. We found many (oo)cyst-like objects with typical fluorescence, not (oo)cysts, from the Han River water samples, and then it was concluded that nuclei staining by DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and examination by Differential Interference Contrast Microscope should be critical for valid identification.