

바이러스의 정량법

강 정 옥

한양대학교 의과대학 구리병원 임상병리과

Quantitation of Virus

Jung Oak Kang, M.D.

Department of Clinical Pathology, Hanyang University College of Medicine, Kuri Hospital, Korea

서 론

최근 바이러스배양검사가 의료보험에 인정되는 검사법으로 자리잡았으므로, 향후 바이러스배양검사를 실시하는 임상병리과가 늘어날라 짐작된다. 그러나 바이러스배양검사는 많은 비용과 인력, 그리고 공간이 필요하므로 도입하기가 쉽지는 않을 것이다. 이에 비하여 분자생물학기법을 이용한 병원균의 검출은 그 비용 효과적인 문제점에도 불구하고 폭발적으로 늘어나고 있다. 특히 배양이 까다로운 균이나 바이러스의 검출에 가장 널리 이용되고 있으며 향후 점차 증가될 전망이다[1-3]. 각종 바이러스의 분자생물학적 검사를 도입하기 위하여, 배양이 가능한 바이러스의 경우, 새 검사법의 민감도, 특이도 측정, 양성대조군의 준비 및 정량검사 등을 위하여 바이러스의 정량검사가 가장 기본적으로 필요하다. 저자 역시 바이러스의 핵산증폭검사를 도입하기 위하여 그리고 새로이 도입되는 핵산증폭법 및 기기의 평가를 위하여 바이러스정량검사를 시도하였으며, 이 경험을 나누고자 배양이 가능한 바이러스를 중심으로 바이러스정량법을 정리하여 본 논문을 쓰게 되었다.

실험 대상 및 보관용 바이러스 부유액 내의 총 바이러스입자 수나 감염성이 있는 바이러스입자(infectious unit)의 농도를 정확하게 알아내는 것, 즉 바이러스 titer의 측정은 상기한 목적 이외에도 바이러스의 중화시험, 항바이러스제에 대한 감수성검사, 바이러스정제 시의 순수성 평가, 바이러스의 병원성 평가 시에도 가장 기본적이며 필수적인 실험이다[4]. 바이러스 titer

의 측정 시 실험대상 바이러스용액을 배수 희석하여 세포단층, chick embryo, 또는 동물에 접종하여 바이러스 증식 여부를 관찰하게 되며 이러한 방법은 바이러스의 감염능을 측정하는 것이다. 바이러스 감염에 대한 host의 반응은 정량적으로 측정될 수도 있고, 또는 감염의 유, 무로 판단하는 all-or-none 방법으로 판단할 수도 있다. 정량적인 측정법에는 plaques assay, fluorescent foci assay (FFA), infectious centers assay, transformation assay, 또는 pock assay 등이 있다(Table 1). Cytopathic effect (CPE)를 나타내는 바이러스의 정량에는 plaque assay가 가장 널리 쓰이고 있으며, CPE가 나타나지 않는 바이러스 정량에는 FFA법이, 그리고 persistent infection을 일으키는 바이러스 정량에는 infectious centers assay가, retrovirus의 정량에는 transformation assay가 이용된다[5]. 그 외에도 tissue culture infective dose₅₀ (TCID₅₀), Egg Infective Dose₅₀ (EID₅₀), Lethal Dose₅₀ (LD₅₀) 등과 같은 all-or-none 감염능 (infectivity) 측정법도 있다. 기타 haemadsorption, haemagglutination 등과 같은 생리화적인 방법이 있으며, 전자현미경을 이용한 직접적인 바이러스입자수 측정법도 있다[4].

실험대상 바이러스 부유액의 준비

바이러스 정량검사를 위해서는 먼저 실험대상 또는 양성대조 바이러스 부유액을 만들어야 한다. Enterovirus 핵산증폭검사를 도입하기 위하여 MRC-5 cell monolayer에 echovirus type 6을 감염시켜 보관용 바이러스용액을 준비한 과정을 예시하겠다[6].

1. Enterovirus isolate 또는 ATCC culture 20uL를 2mL의 유지배지에 가하여 잘 섞어 바이러스 부유액을 만든다.

2. MRC-5 cell (75 cm²) 세포단층의 성장배지를 제거한다.

접수번호 : CM 4-1-10

교신저자 : 강정옥

471-701 경기도 구리시 교문동 249-1

한양대학교 구리병원 임상병리과

Table 1. Methods for quantitation of viruses

I. Infectivity assay	
Focal assay; Quantitative	Plaque assay (PFU/mL) Fluorescent foci assay (FFU/mL) Infectious centers assay Transformation assay Pock assay
Quantal assay; Qualitative	Tissue culture infective dose ₅₀ (TCID ₅₀) Egg Infective Dose ₅₀ (EID ₅₀) Lethal Dose ₅₀ (LD ₅₀)
II. Biological	Haemagglutination Haemadsorption
III. Particle counting	Electron microscopy

3. 바이러스 부유액 2mL를 가한 다음 35-37℃ 배양기에 넣고 1-2 시간 흡착시킨다.

4. 유지배지 20mL를 가한다.

5. 세포단층의 80-90% CPE가 생길 때까지 플라스크를 35-37℃에 배양한다.

6. 세포단층을 긁어내어 세포를 수거한 후 50mL tube로 옮긴 다음 -70℃에 얼린다.

7. 37℃ 수조에서 신속하게 녹인다.

8. 600-800 xg에서 15분간 원심하여 cell debris를 침전시킨다.

9. 상층액을 성장배지 80mL가 든 멸균된 용기에 넣는다.

10. 희석시킨 상층액 0.5mL씩을 200개의 냉동 바이알에 넣고 -70℃이하에 보관한다.

상술한 보관용 바이러스용액의 바이러스 titer를 정확하게 측정해야, 새로이 도입하고자 하는 핵산증폭법의 민감도와 특이도를 분석할 수 있고, 양성 대조(wild type)로 사용할 바이러스 용액의 가장 적절한 희석배수를 찾아낼 수도 있다.

감염능 측정법 (Infectivity assays)

바이러스의 가장 큰 특징은 세포 내에서 증식하는 것이며, 바이러스에 감염된 세포는 일련의 생화학적인, 형태적인 변화를 거쳐 대개의 경우 죽게 된다. 바이러스에 감염된 세포에 나타나는 형태적인 변화를 cytopathic effect (CPE)라 하며 cell rounding, 세포융합 (cell fusion; syncytia formation), 세포 용해 (cell lysis) 등의 형태로 나타난다.

A. Plaque assay

1952년 Renato Dulbecco는 plaque assay를 응용하여

bacterial virus stock의 titer를 측정하는 방법을 최초로 개발하였다[5]. Plaque란 바이러스감염에 의하여 세포 변성을 일으킨 단층세포부위로서, plaque 주위의 감염되지 않은 정상세포는 vital dye로 염색되므로 구별된다. 각 세균마다 특징적인 colony가 만들어지듯이 각 바이러스마다 크기와 모양이 다른 특징적인 plaque가 생성된다. 한 개의 감염성이 있는 바이러스입자는 하나의 plaque를 형성한다는 이론 하에 plaque counting은 각종 바이러스의 정량에 응용되었으며, Dulbecco는 1975년 노벨 생리학상을 받음으로서 plaque assay의 중요성이 입증되기도 하였다. 그러나 plaque assay는 CPE를 나타내는 바이러스의 정량에만 사용될 수 있다.

세포단층을 준비한 다음, 정량 하고자 하는 바이러스 부유액을 10⁻¹에서 10⁻⁶까지 10배수 희석시킨다. 희석액을 0.1mL 내지 0.5mL씩 접종시킨다. 1-2 시간 정도 바이러스를 흡착시킨 후 overlay media를 가한다. Overlay media는 영양을 공급함과 동시에, 최초의 감염 세포에서 증식된 바이러스가 배지를 통하여 퍼져나가 주위 세포를 이차 감염시키는 것을 방지하는 역할을 하도록 gel 상태가 되도록 배지를 만든다. Plaque는 바이러스에 감염되지 않은 주위의 건강한 세포단층과 대조되어 무색의 뚜렷한 foci로 나타난다. Plaque counting을 보다 용이하게 하기 위해서 neutral red나 crystal violet 같은 vital dye로 세포단층을 염색하기도 한다. 건강한 세포는 dye를 흡수하여 염색이 되고, 감염된 세포 즉 plaque 부위는 염색되지 않고 무색으로 남아 있게 된다. Plaque 수를 세고 접종량과 희석배수를 감안하여 바이러스 stock의 titer는 plaque forming units per milliliter (PFU/mL)로 나타낸다[7].

계산시의 오류를 최소화하기 위하여 여러 희석 배수를 사용하며, plaque가 20-100개정도 형성되는 plate로 count하여 titer를 계산한다.

Plaque수 × 희석배수 × mL로 환산한 접종량 = () PFU/mL

예) 10^{-6} 희석액 0.1mL에서 50개의 plaque가 관찰되었다면, stock 용액내의 바이러스 역가는 $50 \times 10^6 \times 10 = 5 \times 10^8$ PFU/mL

이렇게 바이러스 titer가 측정되면, 핵산증폭검사의 민감도를 측정하기 위하여, 일정량의 용액(핵산 추출을 위하여 일반적으로 처리하는 검체량) 속에 2, 4, 8, 16, 32, 64 PFU 또는 1, 10, 100, 1000 PFU가 포함되도록 바이러스 stock 용액을 적절하게 희석하여 새로이 도입되는 핵산증폭검사의 민감도를 측정할 수 있으며, 또한 원하는 농도의 양성대조군을 만들 수도 있다.

B. Fluorescent-Focus Assay

Fluorescent-Focus Assay (FFA)는 plaque assay의 변형으로 세포를 죽이지 못하는 또는 CPE가 뚜렷하지 않은 바이러스의 정량에 이용된다. 세포단층 만들기, 바이러스 접종, overlay media 첨가 등의 과정은 동일하나, 육안으로 볼 수 있는 세포변화가 없으므로, 일정기간 후 methanol 또는 acetone으로 세포단층을 고정시킨 후 면역형광염색을 시행한다. 형광현미경 하에서 fluorescent foci를 계산하여 plaque assay와 같은 방식으로 fluorescent-focus-forming unit per milliliter (FFU/mL)를 계산한다.

C. Tissue culture infective dose₅₀ (TCID₅₀)

이 방법은 endpoint dilution assay라고도 하며 plaque

assay법이 개발되기 이전에 널리 쓰였던 바이러스 정량법이다. 그러나 plaque를 형성하지 않는 바이러스나, 특정 바이러스의 egg 및 동물에 대한 virulence를 측정하기 위하여 현재까지도 사용되고 있으며, plaque assay는 정량검사이나 이 방법은 'all-or-none식(감염-비감염)으로 표현하는 quantal assay(정성검사에 해당)에 해당한다.

TCID₅₀이란 대개는 10배수로 희석시킨 바이러스 부유액을 각 배수별로 5개 이상(대개 8-10 test units)의 세포단층, egg, 동물 등에 접종시켜 50%를 감염시키는 바이러스 희석배수를 titer로 나타낸 것이다. 각 배수별로 바이러스를 접종시킨 세포단층을 관찰하여 CPE 유무를 판정하여 감염된 well의 %를 계산한다. 50% endpoint는 Reed-Muench법이나 Spearman-Kärber법을 사용하여 계산한다(Table 2에 상세하게 설명)[4, 7].

혈구응집법(Haemagglutination)

인플루엔자바이러스에는 envelope glycoprotein인 hemagglutinin (HA)이 있으며, HA는 적혈구의 N-acetylneuraminic acid를 함유한 glycoprotein과 결합하여 적혈구응집을 일으킨다. 인플루엔자바이러스의 이러한 특성을 이용하여 정량검사를 할 수 있다.

바이러스 stock을 96-well plate에서 2배수 희석한 후 일정량의 적혈구용액을 가한다. 약 30분간 반응시키면, 응집이 일어나지 않은 well의 적혈구는 가라앉아서 뚜렷한 작은 점(button)의 형태로 나타나며, 응집이 일

Table 2. Data used to calculate TCID₅₀ using Reed-Muench or Spearman-Kärber method

Log of virus dilution	Infected test unit	Cumulative infected (A)	Cumulative non-infected (B)	A/(A+B)	% infected
-5	5/5	9	0	9/9	100.0
-6	3/5	4	2	4/6	66.7
-7	1/5	1	6	1/7	14.3
-8	0/5	0	11	0/11	00.0

위의 표를 보면 50% end point는 10^{-7} 과 10^{-6} 사이에 있다는 것을 알 수 있다. 두 희석배수 간의 비례거리를 다음과 같이 계산한다.

$$\frac{(\% \text{ positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positive above } 50\%) - (\% \text{ positive below } 50\%)} = \text{비례거리 (proportionate distance)}$$

$$\frac{66.7\% - 50\%}{66.7\% - 14.3\%} = 0.3187 \rightarrow 0.3$$

(log dilution above 50%) + (비례거리 x log 희석배수) = log ID₅₀

$(-6) + (0.3 \times -1.0) = -6.3 \therefore \text{ID}_{50} = 10^{-6.3}$ 즉 세포단층 50%를 감염시키는 희석배수이다.

만약 바이러스 부유액을 0.1mL 접종했다면, 바이러스 titer는 $10^{7.3}$ TCID₅₀/mL이다.

어난 well의 적혈구는 lattice를 형성하여 가라앉지 않으므로 전체적으로 붉은 색의 용액으로 보인다. 응집이 일어난 가장 높은 희석배수를 HA titer로 정한다[4, 8]. 이 방법은 바이러스 입자의 양을 간접적으로 알 수 있는 신속한 분석법이지만 민감도가 높지 않아서 소량의 바이러스입자를 측정하기에는 부적절하다.

바이러스 입자수 측정

바이러스입자수의 측정은 전자현미경과 표준입자(크기와 농도를 알고 있는 polystyrene latex particles)를 이용하여 이루어진다. 먼저 전자현미경용 grid를 plastic film (0.1-0.5% Formvar 또는 0.5-1.5% collodion)으로 coating한 후 다시 carbon-coating, ion-coating을 시행한다. 표준입자용액을 희석하여 10^8 particles/mL 농도가 되도록 한다. Latex particle 용액과 측정하고자 하는 바이러스용액을 동량 섞고, negative stain 용액(1-3% phosphotungstate 또는 1-2% uranyl acetate)도 동량 섞어서 coated grid에 점종한다. Grid를 공기 중에서 건조시킨 후 전자현미경으로 관찰한다. Negative stain을 하면 바이러스의 특징적인 구조가 관찰되어 표준입자와 구별이 되므로 전자현미경 하에서 표준입자와 바이러스 입자의 ratio를 알아낸 다음, 알고 있는 표준입자의 농도로부터 바이러스입자의 농도를 계산해 낼 수 있다[9, 10].

참 고 문 헌

1. Limberger RJ, Biega R, Evancoe A, McCarthy L, Slivinski L, Kirkwood M. *Evaluation of culture and the Gen-Probe PACE 2 assay for detection of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis in*
2. Eisenach KD, Sifford MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. *Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction.* *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1160-3.
3. Wilber JC, Johnson PJ, Urdea MS. *Reverse transcriptase-PCR for hepatitis C virus RNA.* In: Persing DH, Smith TF, et al. eds. *Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications.* 1st ed. Washington DC: American society for microbiology, 1993:327-31.
4. Quantitation of virus. In: Mahy BWJ and Kangro HO, eds. *Virology methods manual.* 1st ed. San Diego: Academic press, 1996:35-46.
5. Virus cultivation, detection, and genetics. In: Flint SJ, Enquist LW, et al eds. *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control.* 1st ed. Washington DC: ASM press, 2000:25-56.
6. Enteroviruses. In: Wiedbrauk DL and Hohnston SLG, eds. *Manual of clinical virology.* 1st ed. New York: Raven press, 1993:92-7.
7. Virus assay and neutralization test. In: Hsiung GD, ed. *Diagnostic virology.* 3rd ed. Yale university, 1982:25-34.
8. Hemagglutination and the hemagglutination-inhibition test In: Hsiung GD, ed. *Diagnostic virology.* 3rd ed. Yale university, 1982:35-41
9. Electron microscopy. In: Hsiung GD, ed. *Diagnostic virology.* 3rd ed. Yale university, 1982:68-76.
10. Electron microscopy. In: Mahy BWJ and Kangro HO, eds. *Virology methods manual.* 1st ed. San Diego: Academic press, 1996:91-106.