

수계바이러스검출에 PCR을 이용하기 위한 효과적인 농축기법

이승훈 · 김상종*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

수계에 분포하는 장바이러스를 검출하기 위해 민감도가 높고 검출시간이 빠른 PCR법을 이용하였다. 바이러스입자를 보다 순수하게 농축하기 위해 몇 가지 바이러스농축법을 비교조사하고 그것의 변형을 통하여 개선된 방법을 확립하였다. 비교한 농축방법중 흡탈착/Polyethyleneglycol(PEG) 침전법과 플록화/초고속원심분리법을 통해 10 PFU ml⁻¹까지 검출이 가능하여 다른 방법에 비해 효과적임이 판명되었다. Sephadex resin을 이용한 부가적인 시료정제 과정을 통해 시료의 순도를 높일 수 있어 검출한계를 10배 정도 낮추었다. 선정된 검출법을 통해 한강수계에서 장바이러스의 분포를 조사한 결과 조사한 시료중 한강의 지천에서는 75% (6/8), 본류에서는 20% (2/10)의 시료에서 바이러스가 검출되었다. 본조사결과 흡탈착/PEG침전법-PCR 검출기법이 수계의 바이러스 오염도를 간편하고 신속하게 검출하는데 매우 유용하였으며 국내 수계에도 바이러스 오염이 광범위함을 확인하였다.

KEY WORDS □ adsorption-elution/PEG precipitation, enterovirus, flocculation/ultracentrifugation, PCR

장내 바이러스는 수인성 질병의 중요 병원 중의 하나로 오래전부터 알려져 왔다. 이들 바이러스들은 바이러스에 감염된 환자의 배설물로부터 방출되어 하수를 거쳐 자연 수계에 널리 분포하게 되며(11) 어패류 등에도 축적된다(5). 따라서 바이러스에 오염된 물을 먹거나 어패류를 날것으로 먹게 될 경우 수인성 질병이 일어나게 된다. 수계의 바이러스는 세균보다 적은 농도로 분포하지만 세균에 비해 환경에서 오래 생존하고(12) 염소처리와 같은 정수처리 과정에서 제거되지 않을 가능성이 높으며(4) 적은 수로도 감염이 가능하다(11). 일반적으로 병원성 미생물의 수계 내 분포는 분변성 대장균 등의 지표 세균을 이용하여 간접적으로 확인할 수 있다. 그러나 지표 세균이 없는 물에서도 바이러스가 검출될 수 있어(8, 11) 지표 세균의 분포와 바이러스의 분포 사이에는 크나큰 연관성이 보이지 않아 지표 세균을 사용하여 바이러스 오염을 간접적으로 확인하기에는 문제점이 많다. 따라서 바이러스에 의한 수질오염을 파악하기 위해서는 수계의 바이러스를 직접 검출하는 것이 필요하다.

바이러스 검출과 종류 확인에 흔히 사용되는 세포 배양법(7)과 면역학적 방법(19)은 시간적, 경제적, 기술적 단점 때문에 적은 농도로 분포하는 수계의 바이러스를 검출하는데는 적합하지 않아 최근에는 민감도가 우수한 PCR을 수계 바이러스 검출에 널리 사용하고 있다(1, 17, 25).

환경내 바이러스 검출에 PCR을 이용할 경우 가짜음성반응의 문제가 야기되므로(16) 수계 바이러스 검출에 PCR을 이용하기 위해서는 다량의 시료를 최대한 적은 양으로 농축하는 것이 필요하며 동시에 시료를 순수하게 농축하는 것이 필요하다. 수계의 바이러스를 농축하는 방법은 여러 가지가 있지만 농축할 시료의 상태와 양, 그리고 실험자에 따라 다

른 농축법을 사용하는 등(9, 10) 아직까지 확립된 방법이 없다. 더욱이 최종 검출법으로 PCR을 적용하기 위해서 최대한 순수한 시료를 얻을 수 있는 농축법이 필요한데 이에 대해서도 보다 더 연구가 필요한 상황이다(23).

본 연구에서는 여러 가지 수계바이러스 농축법을 비교함으로써 농축법에 따른 PCR법의 적합성 여부를 조사하고 검출법의 현장적용을 통해 신속하고 간편한 수계바이러스검출법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

바이러스 증식 및 세포배양

검출법 비교에 사용된 표준 바이러스시료는 Poliovirus type 1(CHAT strain, ATCC VR-192)이며 바이러스 배양에 사용한 세포주는 African green monkey kidney(BS-C-1) 세포주로 바이러스와 세포주는 모두 ATCC에서 구입하였다.

세포주를 25 cm² 배양용기에 3~4일 배양하여 단층을 형성하게 한 후 바이러스 시료를 1.0 ml씩 접종한 후 37°C에서 1시간 이상 방치한 다음 접종한 시료를 제거하고 유지배지를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 세포의 증식배지는 우태아혈청이 10%로 첨가된 minimal essential medium(MEM, Gibco BRL)을, 그리고 유지배지는 우태아혈청이 2%로 첨가된 MEM을 사용하였다.

3~4일 배양한 후 얼림-녹임을 세번 반복한 후 원심분리(4,000×g, 30 min, 4°C)하여 세포잔재물을 제거하였다. 상층액을 모아 freon(1,1,2-trichloro-1,2,2 trifluoroethane)으로 추출하여 바이러스를 수확한 후 사용전까지 -70°C에서 보관하였다(23). 수확한 바이러스의 농도는 plaque assay로 결정하였다(17).

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 02-880-6704, Fax: 02-889-9474
E-mail: sjkimm@plaza.snu.ac.kr

Polymerase Chain Reaction

PCR에 이용된 primer는 기존 문헌에서 참조한 것으로 장 바이러스의 5'말단부위(5'NTR)에 해당하며(upstream primer; 5'-CCTCCGGCCCTGAATG-3', downstream primer; 5'-AA-CCTAACCGGTAGGCCA-3') 여러 장바이러스(poliiovirus type 1, 2, 3, coxsackievirus type)에 공통된 부분이고 장내바이러스에 속하는 다른 바이러스(adenovirus, Norwalk virus, HAV 등)에는 특이성을 갖지 않는다고 보고되어 있다(22).

역전사반응은 반응용기에 바이러스 시료 10 µl를 넣고 99 °C에서 5분간 반응시킨 후 얼음에서 식히고 반응용액 5 µl (5X 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 375 mM KCl, 50 mM DTT), dNTPs 4 µl(최종농도 800 µM), downstream primer 1 µl(15 pmole), RNase inhibitor(RNasin, Promega Co.) 15 unit과 역전사효소(M-MLV, Promega Co.) 100 unit을 첨가하고 최종부피를 25 µl로 맞추었다. 이 혼합물을 42°C에서 1시간 반응시킨 후 99°C에서 5분간 반응시켜 효소활성을 억제한 후 얼음에서 식히고 PCR을 수행하였다.

PCR은 역전사반응이 끝난 혼합물에 Taq polymerase (Promega Co.) 2.5 unit, 반응용액 10 µl(10X, 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 15 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), upstream primer 1 µl(15 pmole)을 넣고 최종부피를 100 µl로 맞추고 후 DNA thermal cycler(Perkin Elmer Co.)를 사용하여 다음과 같은 조건으로(95°C 1분 30초, 55°C 1분 30초, 72°C 1분 30초) 30회 반복수행하였다. PCR로 증폭된 핵산시료는 agarose(1.5%, agarose LE, FMC Co.) gel 전기영동을 한 후 ethidium bromide 염색을 하여 확인하였다.

농축법 비교

비교조사를 수행한 바이러스 농축법은 흡탈착/PEG 침전법, 흡탈착/유기산 농축법, 양이온 플록법, 초고속 원심분리법, 동결건조기법으로 모두 5가지였다. 비교한 농축방법은 기존보고대로, 또는 이를 변형하여 사용하였다.

흡탈착법은 Standard Method(10)에 나온 방법을 변형하였다. 시료에 MgCl₂를 최종농도 0.1 N이 되도록 첨가한후 pH를 5.0으로 맞추고 여과막(cellulose acetate, 0.45 µm, 47 mm, Nucleopore)으로 시료를 여과하였다. 그후 여과막에 흡착된 물질을 탈착용액(1.5% beef extract/0.05 M glycine(pH 9.0))으로 탈착시킨 후 pH를 중성으로 맞추었다. 흡탈착법의 2차 농축법으로 사용되는 PEG 침전법의 경우 탈착된 용액의 pH를 7.2~7.4로 맞추고 후 NaCl(최종농도 0.5 M)과 PEG6000(최종농도 10%)을 넣고 4°C에서 12시간 이상 방치한 후 8,000×g로 4°C에서 30분 동안 원심분리하여 상층액은 버리고 pellet을 모아 Tris-EDTA 완충용액에 녹여 사용하였다(18).

유기산 농축법의 경우 1 N HCl로 탈착된 용액을 pH 3.5로 맞추고 후 30분 가량 섞고 10,000×g로 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물을 0.15 M Na₂HPO₄ (pH 9.0) 용액으로 완전히 녹인 다음 pH를 중성으로 맞추고 사용하였다(15).

양이온 플록법의 경우 Standard Method(10)의 방법을 변형하여 사용하였는데 먼저 시료에 AlCl₃ 용액을 최종농도 0.009 N이 되도록 첨가하고 1 M Na₂CO₃ 용액으로 pH를 6.3 정도로 맞춰 플록을 만든 후 7,000×g로 10분 동안 원심분

리하였다. 상층액은 버리고 침전물을 1.5% beef extract/0.05 M glycine(pH 9.0) 용액으로 녹임과 동시에 상온에서 15분 동안 교반하여 바이러스를 탈착시킨 후 14,000×g로 10분 동안 원심분리하여 beef extract를 제거한 후 상층액을 모아 1 N HCl로 pH를 중성으로 맞추고 후 사용하였다.

초고속 원심분리의 경우 30 ml 정도의 시료를 50,000×g로 4°C에서 4시간 가량 원심분리(Beckman L7 ultracentrifuge, SW28 rotor)하여 상층액은 버리고 침전물에 5 ml의 glycine buffer(0.25 N, pH 9.5)를 첨가하여 0°C에서 30분 동안 섞어 주었다. 그후 25 ml의 PBS를 다시 첨가하고 12,000×g로 15분간 원심분리한 후 상층액을 모아 180,000×g로 4°C에서 1시간 동안 초고속 원심분리하였다(Beckman L7 ultracentrifuge, SW50.1 rotor). 상층액은 버리고 침전물을 모아 0.5 ml의 PBS로 녹인 후 사용하였다(21).

동결건조기법의 경우 30 ml 정도의 시료를 동결건조시킨 후 건조시료를 멸균된 증류수로 녹인 후 사용하였다. 모든 농축된 시료는 사용전까지 -70°C에서 보관하였으며 PCR을 하기전에 Sephadex G-50 resin(Pharmacia Co.) spun chromatography로 시료를 최종정제한 후 PCR을 수행하였다(35). 농축법에 따른 검출효율을 비교하기 위해 멸균된 증류수에 일정한 농도의 바이러스 시료를 첨가한 후 각각의 농축법을 사용하여 시료를 농축한 후 PCR로 바이러스를 검출하였다.

현장조사

한강수계의 분류와 지천의 시료를 대상으로 농축법 비교조사를 통해 가장 효과적으로 판명된 방법을 이용하여 시료를 농축하고 PCR을 이용하여 바이러스를 검출하였다. 시료채취는 1995년 9월에서 10월에 걸쳐 수행하였으며, 조사정점은 한강의 본류 7개 정점과 탄천, 중앙천의 지천 2개 정점으로 본류 7개 정점에서 총 10개의 시료, 지천 2개 정점에서 총 8개의 시료를 채취하여 바이러스 오염정도를 조사하였다(Fig. 1).

결과 및 고찰

PCR법의 적합성

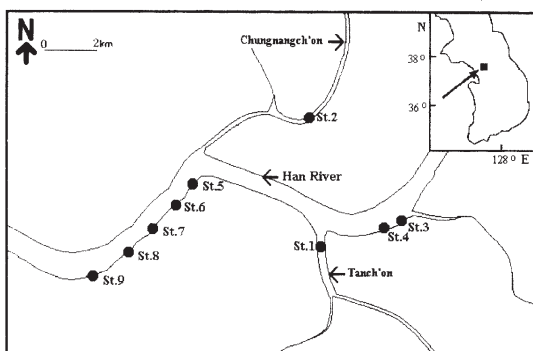


Fig. 1. Sampling sites for surveying of virus concentration in Han river.

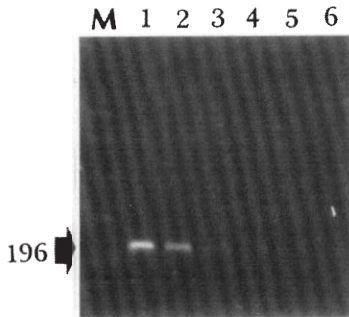


Fig. 2. Limit of detection of poliovirus RNA by using RT-PCR (1: 10^3 pfu/ml, 2: 10^2 pfu/ml, 3: 10 pfu/ml, 4: 1 pfu/ml, 5: 0.1 pfu/ml, 6: negative control (sterilized water), M: size marker (1000, 750, 500, 300, 150, 50 bp, respectively).

문헌을 참조로 설정한 바이러스의 primer 특이성여부와 PCR 반응조건을 탐색하기 위해 표준바이러스용액을 시료로 하여 PCR을 수행한 결과 예상된 크기의 증폭된 DNA 절편 (197 bp)을 얻을 수 있었다(자료 미제출). PCR법의 검출한계를 조사하기 위해 바이러스 표준시료(1×10^6 PFU ml^{-1})를 연속적으로 10배 희석하여 PCR을 수행한 결과, 1 PFU ml^{-1} 시료에서까지 증폭된 핵산을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 본 연구조사에서의 PCR 민감도는 바이러스 표준시료를 가지고 PCR을 수행하여 1~100 PFU ml^{-1} 까지 검출이 가능하다고 한 기존 보고(2, 20)와 비슷한 수준을 나타내었다. 더욱이 본 연구에서 PCR을 하는데 쓰인 시료의 양이 10 μl 이고 세포 배양을 통해 수확한 바이러스중 감염성 바이러스 입자와 전체바이러스 입자의 비율이 대략 1:100~200 정도라는 기존 보고(20)로 미루어 볼 때 PCR을 통해 10개 미만의 바이러스 입자까지 검출이 가능하다고 생각된다. 이러한 PCR 검출법의 높은 민감도는 적은 농도의 수계내 바이러스의 검출에 PCR이 적합함을 보여준다.

바이러스 농축법 비교

PCR법을 이용하는데 적합한 농축법을 비교한 결과에서는 흡탈착/PEG 침전법이 가장 효과적임을 알 수 있었다. 흡탈착/PEG 침전법을 사용했을 때 1 PFU ml^{-1} 까지 핵산 증폭이 가능하였다. 흡탈착/유기산 농축법, 초고속 원심분리법, 양이온 플록큘법을 사용했을 때는 10 PFU ml^{-1} 까지 핵산 증폭이 가능하였다. 동결건조법을 사용했을 때는 PCR 생성물이 나타나지 않았다(Fig. 3, Table 1).

각 방법마다 나타난 차이는 크게 두 가지 이유 때문인 것으로 생각되었다. 첫 번째 이유로 각 농축법의 회수능의 차이를 들 수 있다. 회수능의 문제는 2차농축과정에서 뚜렷이 나타남을 알 수 있었다. 2차 농축을 위해 채택한 유기산농축법과 PEG 침전법의 결과를 비교했을 때, PEG 침전법이 상대적으로 우수한 결과를 나타냈다. 본 연구결과와는 2차 농축법의 하나로 흔히 사용되고 있는 유기산 농축법의 경우, 급격한 pH 변화를 수반하는 실험과정의 포함으로 바이러스가 활성을 잃어버릴 가능성이 높아 바이러스 회수능이 상대적으로 떨어진다(6)는 기존의 보고와 일치한다고 볼 수 있었

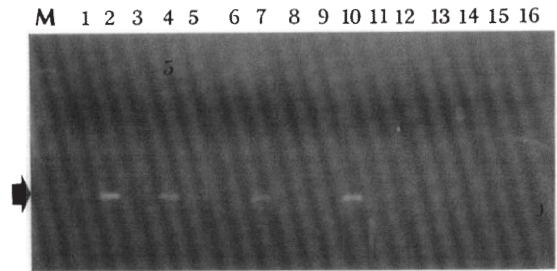


Fig. 3. Detection of seeded poliovirus in sterilized water by using RT-PCR processed by five concentration procedure (1-3: Adsorption-Elution/PEG precipitation method, 4-6: Adsorption-Elution/Organic flocculation method, 7-9: AlCl_3 flocculation method, 10-12: Ultracentrifugation method, 13-15: Lyophilization method, 16: negative control; 1, 4, 7, 10, 13: 100 pfu/ml; 2, 5, 8, 11, 14: 10 pfu/ml; 3, 6, 9, 12, 15: 1 pfu/ml).

다. 동결건조법의 결과가 좋지 않은 것 또한 동결건조과정 중 바이러스의 표면 단백질의 손상가능성이 있어(20) 낮은 회수능의 기능성에 기인한다고 생각된다. 반면 동결건조법과 마찬가지로 적은 양(30 ml)의 시료를 사용한 초고속 원심 분리법이 상대적으로 우수한 결과를 보였던 것은 초고속 원심분리법의 높은 회수능(10, 21)을 반영한다고 볼 수 있었다.

농축법간의 차이를 가져온 두 번째 점으로 불순물에 의한 효소반응의 억제를 들 수 있다. 효소반응억제 물질의 존재의 경우 환경시료를 대상으로 한 연구에서 반드시 고려되어야 할 사항이다. 환경내에는 PCR을 저해할 수 있는 다양한 종류의 물질이 많이 존재하는데 대표적인 것들로 부식산이나 다당류를 들 수 있다. 부식산의 경우 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도만으로도 PCR을 방해하고 다당류는 12.5% 정도에서 PCR을 심각히 저해한다는 보고가 있다(2). 본 연구결과 동결건조법이 가장 좋지 않은 결과를 나타냈는데 이는 동결건조법이 낮은 회수능의 문제와 더불어 농축된 시료에서 제거되지 못한 저해물질들의 작용으로 효소반응이 억제되었을 가능성이 높음에서 기인한다고 생각되었다. 2차 농축과정에서도 반응억제 물질에 의한 영향이 나타난 것으로 생각되었다. 유기산농축법의 경우 효율적인 침전을 위해 beef extract나 skim milk와 같은 단백질 성분을 첨가하기 때문에 시료의 순도가 떨어지게 되며 그 결과로 효소반응의 저해를 가져올 수 있다(18). 유기산농축법은 바이러스 농도가 낮은 경우, PCR을 이용한 검출법에 적합하지 않다는 보고(22)와 PEG

Table 1. Comparison of virus concentration methods by determination of detection limit

Method/Virus(pfu/ml)	100	10	1
A-E/PEG ppt ^a	+	+	+
A-E/OF ^b	+	+	+
AlCl_3 flocculation	±	—	—
Ultracentrifugation	+	±	—
Lyophilization	—	—	—

^aAdsorption-elution/polyethylene glycol precipitation.

^bAdsorption-elution/organic flocculation.

침전법을 사용할 경우, 상당수의 작은 입자들과 용해성물질들을 제거할 수 있기 때문에 PCR에 적합한 순도 높은 시료를 얻을 수 있다는 기존의 보고(14)는 흡탈착법의 2차 농축법으로 PEG 침전법을 사용했을 때가 유기산 농축법을 사용했을 때보다 우수한 결과를 보인 본 연구결과에서도 다시 한번 확인되었다. 본 조사에서 가장 좋은 결과를 보인 흡탈착/PEG 침전법 또한 표준시료를 사용했을 때와는 달리 항상 검출한계치에 접근하지는 못하였다. 이는 앞에서도 밝혔듯이 바이러스의 흡착율과 회수율이 100%가 아니고 침전과 재부유를 반복하는 농축과정을 고려할 때 농축과정에서 바이러스입자의 손실이 많이 일어났기 때문이라 생각되었다.

현장시료에서 바이러스 검출

농축법 비교실험을 통해 흡탈착/PEG 침전법과 플록화/초고속 원심분리법을, PCR을 이용하여 바이러스를 검출할 때 가장 적합한 농축방법으로 선정하였고, 이 두 방법을 병행 이용하여 현장시료에서 바이러스를 검출하였다. 그 결과 한강의 지천시료에서는 8개중 6개에서, 본류에서는 10개중 2개의 시료에서 장바이러스의 핵산이 검출되었다(Fig. 4, Table 2).

기존보고에 의하면 수중생태계 내에 분포하는 병원성 바이러스의 농도는 하수에서 평균 $10^2 \sim 10^3$ particles l^{-1} 정도라고 하며 저수지나 강물과 같은 표층수에는 이보다 낮은 수의 바이러스가 분포하며 바이러스의 검출빈도 또한 50%를 넘지 않는다고 알려져 있다(3, 21, 26). 지역에 따라서는 강물에서도 꽤 높은 농도의 바이러스가 존재한다는 보고도 있는데 이 지역들은 주로 인구가 많은 대도시 주변의 강물이었

Table 2. Detection of enterovirus in Han river during 1995 by using RT-PCR

(a) Tributary areas

Site	Sampling date	Sample No.	PCR reaction
st. 1	Sept. 11	T-1	+
	Sept. 20	T-2	+
	Sept. 27	T-3	-
	Oct. 1	T-4	+
	Oct. 5	T-5	+
st. 2	Sept. 13	T-6	-
	Sept. 25	T-7	+
	Oct. 8	T-8	+

(b) Main tract

Site	Sampling date	Sample No.	PCR reaction
st. 3	Sept. 27	M-1	-
	Oct. 13	M-2	+
st. 4	Oct. 11	M-3	-
st. 5	Oct. 11	M-4	-
st. 6	Oct. 11	M-5	-
st. 7	Oct. 13	M-6	-
st. 8	Sept. 27	M-7	-
	Oct. 19	M-8	-
st. 9	Oct. 9	M-9	-
	Oct. 19	M-10	+

다. 이는 대부분의 바이러스의 수계유입이 하수를 통해 이루어지고 있음을 의미한다고 볼 수 있다. 본 연구결과 또한 지천에서 바이러스 검출빈도가 높았는데, 이는 조사대상지역이 대도시를 가로지르는 강이었다는 점으로 미루어 보아 하수를 통해 많은 바이러스가 한강수계로 유입되고 있음을 시사하였다. 그리고 지천시료의 채취장소가 하수처리장 하류였다는 사실은 하수처리를 통해 바이러스가 충분히 제거되지 않고 있다는 짐작도 가능하게 하였다. 또한 시료채취 기간중 수온이 낮았다는 점 또한 높은 바이러스 검출빈도를 가져온 이유의 하나로 생각되었다(13).

본 조사결과를 환경시료에 적절한 농축법을 사용하여 순수한 바이러스시료를 얻는다면 PCR을 이용하여 수계환경에 분포하는 병원성 바이러스에 대한 지속적이고 즉각적인 조사가 가능함을 보여 주었다. 또한 본 연구결과를 통해 한강수계에 바이러스가 광범위하게 분포하고 있으며 여러 경로를 통하여 바이러스 입자가 한강본류까지 유입되고 있음을 알 수 있었다. 더욱이 본 조사에서는 현장실험에 따르는 어려움 때문에 극히 적은 양의 시료만을 사용하였기에 본 조사에서 바이러스가 검출되지 않은 곳에서도 바이러스의 존재가능성을 배제할 수 없을 것이다. 따라서 이후 상수원을 중심으로 한 광범위한 한국의 수계를 대상으로 바이러스의 오염정도를 조사할 필요가 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는 교육부 기초과학연구소 학술연구조성연구과제(과제번호: BSRI 95-4414)의 연구비지원으로 수행되었습니다.

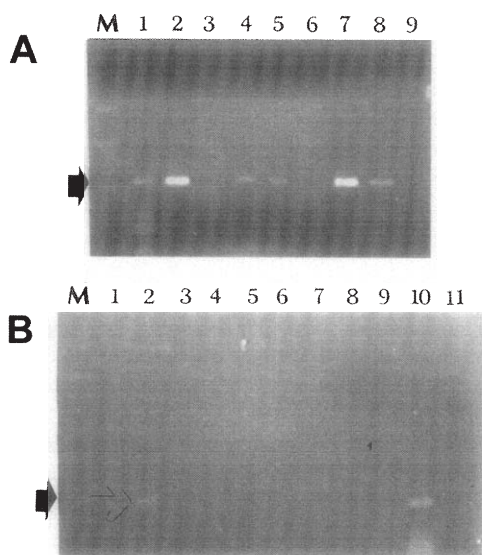


Fig. 4. Detection of enterovirus by PCR in Han river by PCR. (A) tributary areas; 1-8: same order of sample No. in table 2, 9: negative control, M: size marker. (B) main tract; 1-10: same order of sample No. in Table 2, 11: negative control, M: size marker.

참고문헌

1. Atmar, R.L., F.H. Neill, J.L. Romalde, F. Le Guyader, C.M. Woodley, T.G. Metcalf, and M.K. Estes. 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3014-3018.
2. Atmar, R.L., T.G. Metcalf, F.H. Neill, and M.K. Estes. 1993. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 631-635.
3. Berg, G. and T.G. Metcalf. 1978. Indicators of viruses in waters, p. 267-296. In G. Berg (ed.), Indicators of viruses in water and food. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan.
4. Bitton, G., S.R. Farrah, C.L. Montague, and E.W. Akin. 1986. Viruses in drinking water. *Environ. Sci. Tech.* **20**, 216-222.
5. Chung, H. 1993. Ph.D. Thesis. The University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina.
6. Croci, L., D. De Medici, M. Divizia, R. Gabrieli, L. Toti, and A. Pana. 1993. Recovery of poliovirus type 1 from experimentally contaminated shellfish: evaluation of different methods. *Wat. Sci. Tech.* **27**(3/4), 105-109.
7. Dahling, D.R. and B.A. Wright. 1986. Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 790-812.
8. Deetz, T.R., E.M. Smith, S.M. Goyal, C.P. Gerba, J.J. Vollet, L. Tsai, H.L. Dupont, and B.H. Keswick. 1984. Occurrence of rota- and enterovirus in drinking water and environmental water in a developing nation. *Wat. Res.* **18**, 567-571.
9. Dizer H., J. Durkop, A. Grohmann, H. Kopecka and J. M. Lopez-Pila. 1993. Viruses and water: problems, detection and control. *Wat. Sci. Tech.* **27**(7/8), 127-133.
10. Eaton, A.D., L.S. Clesceri, and A.E. Greenberg. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed., American Public Health Association, Baltimore, Maryland.
11. Gerba, C.P., and J.B. Rose. 1990. Viruses in source and drinking water, p. 380-396. In McFeters, G.A. (ed.), Drinking water microbiology. Springer-Verlag New York Inc., New York.
12. Grabow, W.O.K., P. Coubrough, C. Hilner, and B.W. Bateman. 1984. Inactivation of hepatitis A virus, other enteric viruses and indicator organisms in water by chlorine. *Wat. Sci. Tech.* **17**, 657-664.
13. Irving, L.G. and F.A. Smith. 1981. One-year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 51-59.
14. Jiang, X., M.K. Estes, and T.G. Metcalf. 1987. Detection of hepatitis A virus by hybridization with single-stranded RNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2487-2495.
15. Katzenelson, E., B. Fattal, and T. Hostovsky. 1976. Organic flocculation; an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 638-639.
16. Kopecka, H., S. Dubrou, J. Prevot, J. Marechal, and J. M. Lopez-Pila. 1993. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1213-1219.
17. Lees, D.N., K. Henshilwood, and W.J. Dore. 1994. Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2999-3005.
18. Lewis, G.D. and T.G. Metcalf. 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1983-1988.
19. Nasser, A.M., Y. Elkana, and L. Goldstein. 1993. A nylon filter A-ELISA for detecting viruses in water. *Wat. Sci. Tech.* **27**(7/8), 135-141.
20. Prevot, J., Dubrou, S. and Marechal, J. 1993. Detection of Human Hepatitis A Virus in environmental water by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Wat. Sci. Tech.* **27**, 227-233.
21. Puig, M., J. Jofre, F. Lucena, A. Allard, G. Wadell, and R. Girones. 1994. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2963-2970.
22. Schwab, K.J., R. De Leon and M.D. Sobsey. 1993. Development of PCR methods for enteric virus detection in water. *Wat. Sci. Tech.* **27**(3/4), 211-218.
23. Schwab, K.J., R. De Leon, and M.D. Sobsey. 1995. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 531-537.
24. Straub, T.M., I.L. Pepper, and C.P. Gerba. 1994. Detection of naturally occurring enteroviruses and hepatitis A virus in undigested and anaerobically digested sludge using the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* **40**, 884-888.
25. Tsai, Y-L., B. Tran, L.R. Sangermano, and C.J. Palmer. 1994. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2400-2407.
26. Walter, R., H. Kaupa, M. Johl, J. Durkop, U. Kramer, and W. Macht. 1989. Viruses in river water and health risk assessment. *Wat. Sci. Tech.* **21**(3), 21-26.

(Received September 16, 1998/Accepted December 26, 1998)

ABSTRACT: Effective Concentration Method for Applying PCR to Detect Viruses in Water

Seung-Hoon Lee and Sang-Jong Kim* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

In detecting pathogenic viruses in water sample, polymerase-chain-reaction (PCR) amplification was used. In order to obtain the intact viral particle, five concentration techniques were compared and an improved procedure was developed with some modifications. Among them, adsorption-elution/PEG precipitation and flocculation/ultracentrifugation were more efficient than others with the detection limit of 10 PFU ml⁻¹. By the additional step removing inhibitory compounds for PCR reaction, the purity of the concentrated sample was improved and the detection limit was lowered by one order (to 1 PFU ml⁻¹). To examine the availability of the optimized procedure for field surveys, the distributions of enterovirus in Han River were estimated using the novel procedure. Seventy-five percentage (6/8) of sewage samples and twenty percentage (2/10) of river water samples were positive for enterovirus. These results indicate that adsorption-elution/PEG precipitation by PCR method is useful for the prompt and handy monitoring of viral contamination in water environment and pathogenic viruses are widely distributed in water environments of Seoul.