

PCR 및 RT-PCR을 이용한 하천수 중 *Giardia lamblia* 검출

조은주[†], 이목영, 변승현, 한선희, 안승구*

서울특별시 상수도연구원 · *서울시립대학교 환경공학부

Detection of *Giardia lamblia* in River Water Samples Using PCR and RT-PCR

Cho, Eun-Ju[†] · Lee, Mok-Young · Byun, Seung-Heun · Han, Sun-hee · Ahn, Seoung-Koo*

Waterworks Research Institute, Seoul Metropolitan Government · Department of Environmental Engineering
University of Seoul

ABSTRACT : The protozoan pathogen *Giardia lamblia* has been major cause of waterborne enteric disease. In this study, we tried to identify *G. lamblia* of human infectious species and to detect viable *G. lamblia* in river water samples including three sites of Han River mainstream and an its creek using PCR and RT-PCR technique. The PCR/RT-PCR methods were performed by using giardin primer based on the giardin gene targeting ventral disk of *Giardia*. Sensitivity testing in the DNA/RNA extraction and PCR/RT-PCR amplification steps showed that it was possible to detect a single cyst of *G. lamblia* and viable *G. lamblia*. The PCR/RT-PCR methods were compared with immunofluorescence(IF) assay by analyzing 48 samples collected from the mainstream water and the creek water. The mean concentration of the total cysts were 6.3 cysts/10L(arithmetic mean, n=48) and the positive detection rate were 62.5 %(30/48). And the mean concentration of the cysts excluding empty cysts were 4.5 cysts/10L and the positive detection rate were 52.1 %(25/48). It resulted that 24 of 48 samples included *Giardia lamblia* by PCR assay and 10 of 48 samples included viable *G. lamblia* by RT-PCR assay. It resulted that the PCR/RT-PCR technique would be available to river water samples with low concentration of *Giardia* cysts. And it could support the Korean protozoan standard method, which provides useful information for species and viability.

Key words : *Giardia*, *G. lamblia*, PCR, RT-PCR, immunofluorescence assay

요약 : 병원성 원생동물인 지아디아 램블리아는 수인성 질병을 야기하는 주요 원인이 되고 있다. 본 연구는 PCR 및 RT-PCR 기법을 적용하여 한강본류 하천수 시료에서 사람감염성 종인 지아디아 램블리아를 동정하고, 활성 여부를 판별하여 현 표준시험방법을 보완하고자 하였다. PCR과 RT-PCR에는 지아디아의 복부 흡반 구성 유전자를 증폭하는 giardin primer를 사용하였으며, DNA/RNA 추출 및 PCR/RT-PCR 과정에서의 민감도 검사를 수행한 결과, 1포낭까지 검출가능한 것으로 나타났다. 또한 한강본류 및 유입지천 시료 48점에 적용하여 면역형광항체법과 PCR 및 RT-PCR 방법을 비교하였다. 면역형광항체법을 이용한 현미경관찰 결과 48개 시료의 지아디아 총포낭수의 평균 농도는 6.3 cysts/10L이었고 양성율은 62.5%였으며, 숙빈 포낭을 제외한 지아디아의 평균 농도는 4.5 cysts/10L이었고 양성율은 52.1%였다. PCR 수행결과 48개 시료 중 24개(50%)의 시료에서 지아디아 램블리아가 검출되었으며, RT-PCR 수행결과 10개(21%) 시료가 살아있는 *G. lamblia*를 포함한 것으로 나타났다. 본 연구를 통해 PCR/RT-PCR 기법이 지아디아 포낭을 저농도로 포함하고 있는 하천수 시료에 적용가능하며 원생동물 표준시험방법을 보완하여 종(species) 및 활성에 대한 정보를 제공할 수 있을 것으로 결과되었다.

주제어 : 지아디아, 지아디아 램블리아, PCR, RT-PCR, 면역형광항체법

[†] Corresponding author

E-mail : ejsea@seoul.go.kr

Tel : 02-2049-1181 Fax : 02-2049-1188

1. 서 론

지아디아는 사람 및 동물에게 설사를 일으키는 병원성 원생동물로서 환경 중에 포낭 형태로 존재하고 있어 차가운 물 속에서 수개월간 생존할 수 있고, 정수처리 시 소독제로 사용되는 염소에 내성을 가지고 있다. 또한 최소감염량이 10 포낭 미만으로 매우 낮아 먹는물에 처리되지 못한 지아디아 포낭이 소량 존재하여도 충분히 감염을 일으킬 수 있으며 상수 공급계통을 매개로 할 경우 대규모로 집단 질병이 발생할 수 있다¹⁾. 따라서 지아디아 처리의 중요성이 부각되면서 우리나라에서도 2004년 7월부터 지아디아에 대한 정수처리기준을 적용하여 여과 및 소독공정을 통해 99.9% 이상을 제거하도록 정하고 있다.

이러한 지아디아를 하천수나 먹는물로부터 정량하기 위한 표준화된 시험법에는 대부분 면역형광항체 염색 후 현미경으로 관찰하여 동정하는 면역형광항체법(Immunofluorescence assay, 이하 IFA)이 적용되어 왔다. 그러나 이 방법은 사람 감염성 중인 *Giardia lamblia* 만을 구분하여 검출할 수 없으며, 생존 여부를 알 수 없고, 관찰 슬라이드 내에 지아디아 포낭 외에 방해물질이 많이 포함되어 있을 경우 발견되지 않을 수 있다는 한계점을 가지고 있다²⁾. 반면 PCR기법의 경우 지아디아속 뿐만 아니라 종수준까지 동정이 가능하여 사람에게 감염성을 나타내는 *G. lamblia*를 검출할 수 있으며, 동물시험방법의 경우 감염성 여부는 알 수 있으나 난이도가 높고 기간이 오래 걸리며 비용이 많이 드는 방법에 비해 RT-PCR을 적용할 경우 보다 신속하고 경제적으로 살아있는 지아디아를 검출할 수 있는 장점이 있다.

따라서 본 연구는 지아디아 포낭이 저농도로 존재하는 하천수 시료에 PCR 및 RT-PCR기법을 적용함으로써 표준시험방법을 보완하여 보건 위생학적으로 매우 중요한 의미를 갖는 활성 및 사람 감염성 중 여부를 평가하고자 하였다. 특히 우리나라 최대 상수원인 한강수계에서 사람 감염성 중인 *G. lamblia*에 의한 오염 정도를 파악하고 그 활성 여부까지 평가하여, 표준 시험법에 기초한 실태조사 결과를 보완하고, 향후 상수도 분야의 원생동물 대책 수립에 활용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 지아디아 포낭 표준 용액 준비

포르말린 처리되지 않은 살아있는 상태의 *Giardia lamblia* cysts(H3 isolate, Waterborne INC.)를 구매하여 단계별로 희석하여 정제일로부터 6주 이내의 것을 본 연구에 사용하였다.

2.2 현장 시료의 준비

한강수계 팔당 1지점 및 팔당 하류 2지점 그리고 한강으로 유입되는 대표적인 지류천 1지점에서 2005년 2월부터 2006년 12월까지 매월 채취하였으며, 2007년 1월에 추가로 1회 채취하여 1년간의 분포를 보고자 하였다(Fig. 1). 채취된 시료를 냉장 상태로 실험실에 운반하여 원생동물 표준시험방법에 따라 여과(공경 1 μ m Envirochek capsule filter, Gelman)한 후 추출 및 농축하고, 면역자기분리키트(Dynabeads GC-Combo kit, DYNAL Biotech)를 사용하여 분리한 정제액을 PCR 및 RT-PCR 시험용 시료로 사용하였다. 방법을 요약하면, 지표수 시료를 채취하여 캡슐필터로 여과하고, 캡슐필터용 추출용액을 사용하여 진탕·추출한 후 원심분리하여 재농축하였다. 이 농축액에 대해 면역자기분리(Immunomagnetic separation ; IMS)과정을 수행하여 다른 방해물질로부터 지아디아를 분리하여 정제하였다.

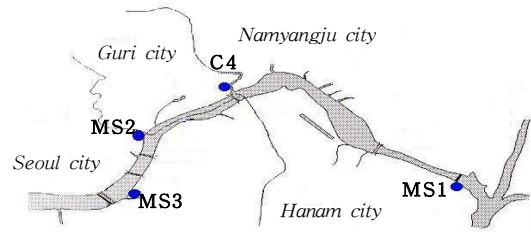


Fig. 1 Sampling sites (MS1 : Paldang, MS2 : Guui, MS3 : Pungnap, C4 : Wangsook creek)

2.3 면역형광항체법(IFA)에 의한 지아디아 포낭 검출

2.2절에서 얻어진 IMS 정제액의 일부를 슬라이드 글라스위에 적용하여 지아디아 항체가 표지된 면역형광항체 염색액(Merifluor Cryptosporidium / Giardia, Meridian Bioscience)으로 염색하고, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)용액으로 지아디아 포낭의 핵을 염색 시킨 후 형광DIC(Differential interference contrast)현미경으로 관찰하였다. 지아디아 포낭의 계수는 원생동물 표준시험방법에 의해 수행하였으며, DIC 관찰결과에 따라 다음과 같이 구분하여 계수하였다.

- ① 속빈 포낭, 즉 속이 비어있는 지아디아 포낭
- ② 무정형의 구조를 가진 지아디아 포낭
- ③ 내부구조를 가진 포낭, 즉 핵이 2~4개이거나, 내부 구조(핵, 중심체, 축삭돌기) 중 두 가지 이상을 가진 지아디아 포낭

IFA에 의한 결과값은 속빈 포낭, 무정형의 구조를 가진 포낭, 내부구조를 가진 포낭이 모두 포함된 총포낭수와 이 총포낭수에서 속빈포낭을 제외한 포낭수를 함께 기록하였으며, PCR 및 RT-PCR 결과와 비교할 때

의 IFA 결과값은 속빈 포낭의 경우 포낭 내부에 DNA 또는 RNA를 포함하지 않기 때문에 총포낭수에서 속빈 포낭을 제외한 포낭수를 사용하여 비교하였다.

2.4 DNA 추출 및 PCR 증폭

IMS 정제액 또는 살아있는 지아디아 포낭 부유액을 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 최종 약 10 µL로 농축하였다. 농축액 10 µL에 Chelex 수지(InstaGene Matrix, BIO-RAD) 50 µL를 첨가하여 56°C에서 30분간 배양하고, 액체질소 내에서 동결하고 95°C 열판 위에서 가열하는 과정을 각 2분씩 5회 수행한 후 12,000 rpm에서 3분 원심분리하고, 그의 상등액을 PCR 증폭에 사용하였다.

DNA 증폭에 사용된 프라이머는 지아디아의 복부 흡반을 구성하는 유전자를 증폭하는 giardin 프라이머³⁾이며, 이 프라이머의 증폭부위는 현미경 관찰시 혼란을 줄 우려가 많은 *G. muris*를 증폭하지 않고 *G. lamblia*에 특이적인 것으로 알려져 있다⁴⁾. DNA 증폭은 nested PCR기법을 사용하여 2단계로 증폭하였다. 1차 PCR 증폭은 시판되는 PCR premix(One Shot LA PCR mix, Takara) 25 µL, DNA 추출물 23 µL, forward primer 및 reverse primer(Table 1) 각 1 µL씩을 가한 것을 PCR증폭 반응액으로 사용하였다. PCR 증폭시마다 DNA 추출물 대신 멸균 정제수 23 µL를 첨가한 반응액을 같이 증폭하여 PCR 처리과정 중의 오염 발생 여부를 관찰하였으며, 모든 용액, DNA 시료 및 정제수를 분취할 때 발생하는 오염을 방지하기 위해 PCR 실험용의 필터 팁을 사용하였다. PCR 증폭조건은 Table 2와 같다. Nested PCR은 PCR premix 25 µL에 1차 PCR 증폭산물 1 µL, 멸균 정제수 22 µL, forward primer 및 reverse primer (Table 1) 각 1 µL를 첨가하여 PCR 증폭하였다. 증폭조건은 1차 PCR 조건과 같았다(Table2).

Table 1. Primers for the detection of *G. lamblia* by PCR/RT-PCR⁵⁾

Primers		Product size
1st	Forward ; GGP 405-433	218 bp
	5'CATAACGACGCCATCGCG GCTCTCAGGAA3'	
	Reverse ; GGR 592-622	
	5'TTTGTGAGCGCTTCTGTC GTGGCAGC GCTAA3'	
2nd	Forward ; GGP 510-537	112 bp
	5'AGCTCAACGAGAAGGTCG CAGAGGGCTT3'	
	Reverse ; GGR 592-622	
	5'TTTGTGAGCGCTTCTGTC GTGGCAGC GCTAA3'	

Table 2. Conditions of PCR amplification³⁾

Amplification step	Conditions
1st PCR amplification	- 94°C, 3 min (initial denaturation) - 94°C 1 min (denaturation), 55 °C 1 min (annealing), 72°C 1 min (extension) ⇒ 30 cycles - 72 °C 10 min (final extension)
nested PCR amplification	- 94°C, 3 min (initial denaturation) - 94°C 1 min (denaturation), 55 °C 1 min (annealing), 72°C 1 min (extension) ⇒ 30 cycles - 72 °C 10 min (final extension)

2.5 RNA 추출 및 RT-PCR(Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) 과정

RNA 추출 과정에서의 모든 시약 및 초자는 RNase-free 제품으로 구매하거나 DEPC(Diethyl pyrocarbonate)로 처리하여 사용하였다. IMS 정제액 또는 살아있는 지아디아 포낭 부유액을 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 최종 약 10 µL로 농축하였다. 농축액 10 µL에 대해 동결 및 가열(액체질소와 65°C 열판에서 각 1분씩, 5사이클) 과정을 수행하여 깨진 포낭으로부터 방출된 RNA를 RNA 추출키트(NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel)로 추출·정제하여 RNA 추출물 50 µL를 얻었다.

RNA PCR 키트(One Step RNA PCR kit, Takara)를

사용하여 역전사(RT)와 PCR과정을 동시에 수행하였으며 RNA 추출물 25 μL , 25mM MgCl_2 10 μL , 10X RNA PCR buffer 5 μL , 10mM dNTP 5 μL , *RNase* inhibitor(40units/ μL) 1 μL , *RTase*(5units/ μL) 1 μL , *Taq* polymerase(5units/ μL) 1 μL 및 Table 1에 나타낸 1차 프라이머 각 1 μL 씩을 첨가하여 반응액으로 사용하였고, 매 번의 RT-PCR 마다 RNA 추출물 대신 DEPC 처리된 멸균 정제수 25 μL 를 첨가한 반응액을 함께 증폭하여 DNA 및 RNA에 의한 오염발생 여부를 확인하였으며, 모든 용액, RNA 시료 및 정제수를 분취할 때 발생하는 오염을 방지하기 위해 PCR 실험용의 필터 팁을 사용하였다. Nested PCR은 2.4절의 PCR premix 25 μL 에 1차 RT-PCR 증폭산물 1 μL , 멸균 정제수 22 μL , forward primer 및 reverse primer (Table 1) 각 1 μL 를 첨가하여 PCR 증폭하였다. RT-PCR 및 nested PCR 증폭과정은 Table 3에 나타낸 바와 같다.

Table 3. Conditions of RT-PCR amplification

Amplification step	Conditions
1st PCR amplification	- 50°C, 30 min (Reverse Transcription) - 94°C, 3 min (Inactivation of <i>RTase</i> and initial denaturation) - 94°C 1 min(denaturation), 55 °C 1 min(annealing), 72°C 1 min(extension) ⇒ 30 cycles - 72 °C 10min (final extension)
nested PCR amplification	- 94°C, 3 min (initial denaturation) - 94°C 1 min (denaturation), 55 °C 1 min (annealing), 72°C 1 min (extension) ⇒ 30 cycles - 72 °C 10 min (final extension)

2.6 증폭산물의 확인

DNA에 대한 PCR 및 RNA에 대한 RT-PCR 증폭으로부터 생산된 112bp의 PCR 증폭산물을 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에 전기영동하였으며, 결과 판독이 어려운 시료의 경우 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ethidium bromide가 포함된 2% metaphor agarose gel에 전기영동하여 UV하에서 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 *Giardia lamblia* 에 대한 민감도 검사

지아디아 100, 50, 10, 1 포낭을 DEPC처리된 멸균

PBS(Phosphate Buffered Saline) 1 mL에 부유시킨 후 2.3절 및 2.5절에 따라 RNA/DNA 추출부터 RT-PCR/PCR 증폭까지 수행하였다. 모든 시험은 2회 수행하였으며, 그 결과 1 포낭까지 증폭산물을 생산하였다(Fig. 2, Fig. 3, Table 4).

Table 4. Sensitivity of PCR / RT-PCR assay for the detection of *G. lamblia*.

Methods	Cyst concentrations in tested samples				
	100	50	10	1	negative control
PCR	+/+ ¹⁾	NA ²⁾	+/+	+/+	-/-
RT-PCR	+/+	+/+	NA	+/+	-/-

¹⁾ Results for duplicate samples

²⁾ NA : Not analyzed

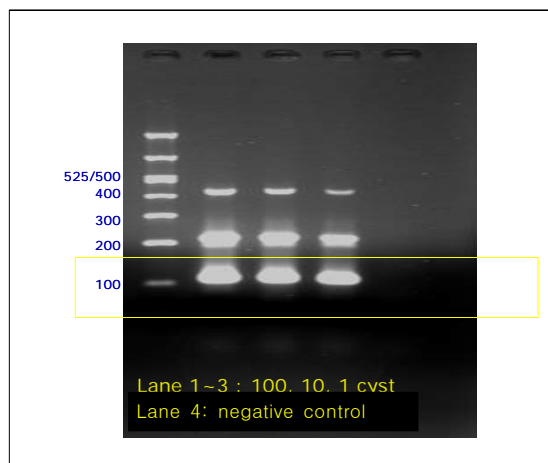


Fig. 2 Sensitivity of PCR assay for the detection of *G. lamblia*

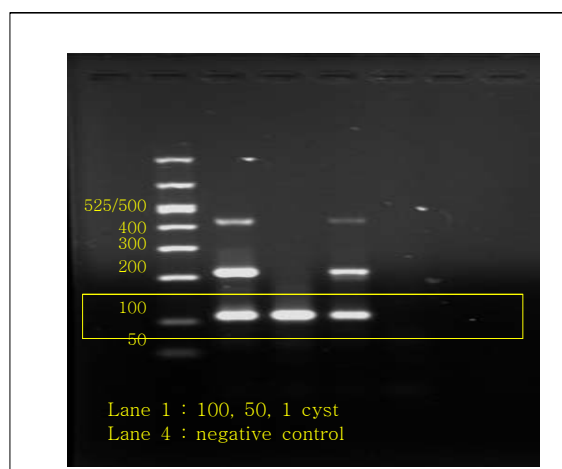


Fig. 3 Sensitivity of RT- PCR assay for the detection of viable *G. lamblia*

3.2 하천수 시료에의 적용

3.2.1 표준시험방법에 의한 지아디아 검출

48개 하천수 시료의 지아디아 총포낭수의 평균 농도는 6.3 cysts/10L (범위 : 0~54 cysts/10L)이었고, 양성율은 62.5 %(30/48)였으며, 숙빈 포낭을 제외한 지아디아의 평균 농도는 4.5 cysts/10L(범위 : 0~45 cysts/10L)이었고, 양성율은 52.1 %(25/48)이었다.

또한 36개 한강 본류의 지아디아 총포낭수는 1.1 cysts/10L(0~6)이었고, 양성율은 50.0 %(18/36)이었으며, 숙빈 포낭을 제외한 지아디아 포낭은 평균 0.5 cysts/10L(0~4), 양성율은 36.1 %(13/36)이었다.

그리고 12개 지류천수의 지아디아 총포낭수는 평균 21.8 cysts/10L(3~54), 양성율은 100 %였고, 숙빈 포낭을 제외한 지아디아 포낭은 평균 16.6 cysts/10L(1~45)이었고, 양성율은 100 %를 나타내었다.

총 포낭수에 대한 숙빈 포낭을 제외한 포낭수의 비율이 한강본류는 45 %, 지류천수는 76 %로 지류천수가 유전정보를 가지고 있을 가능성이 많은 지아디아 포낭을 더 많이 포함하고 있는 것으로 나타났으며, 양성율 또한 한강본류보다 2.8배(숙빈 포낭을 제외한 포낭수 기준) 높아 PCR 검출율이 더 높을 것으로 예상되었다.

3.2.2 PCR에 의한 *Giardia lamblia* 검출

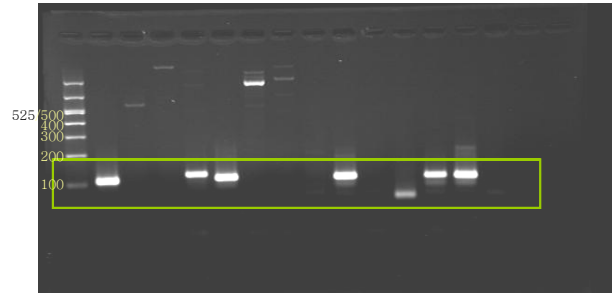
하천수 시료 48점에 대해 *G. lamblia* 동정을 위해 PCR을 적용한 결과, 전체 양성율은 50 %(24/48)이었고, 이 가운데 한강본류 시료는 33.3 %(12/36), 지류천 시료는 100 %(12/12)의 양성율을 나타내었다. 또한 IFA 양성(숙빈 포낭 제외)이면서 PCR 양성인 시료는 23개였고, IFA 음성이면서 PCR 음성인 시료는 20개로 시험된 시료의 89.6 %(43/48)에서 현미경 관찰결과와 PCR 결과가 일치하였다(Fig. 4).

IFA와 PCR 결과에서 일치되지 않는 부분에 대하여 Cynthial. Mayer *et al.*(1996)은 다음과 같이 설명하였다. IFA는 양성이고, PCR에서 음성결과를 낸 경우 IFA의 교차반응 가능성과 휴민산등의 방해물질에 의한 PCR 효소의 영향 등을 들고 있으며, IFA는 음성 결과를 나타내었는데 PCR이 양성으로 나타난 경우 PCR의 고민감도와 IFA에 의한 현미경 관찰의 어려움을 들고 있다⁶⁾

한강본류 3지점에 대한 조사 결과, IFA에 의해 지아디아 포낭이 관찰된 시료의 50 %(9/18)가 *G. lamblia*를 함유한 것으로 나타났으며, 숙빈 포낭을 제외한 경우 69 %(9/13)가 *G. lamblia* 양성으로 결과되어 표준시험방법에 의해 지아디아가 발견된 시료의 절반 이상이 *G. lamblia*를 함유한 것으로 추정되었다.

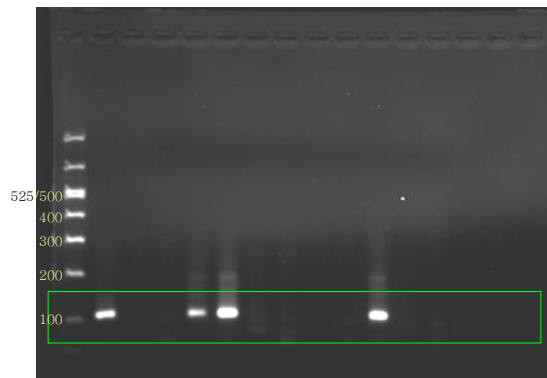
유입지천의 경우에는 모든 시료에서 지아디아 포낭이 관찰되었는데 PCR에 의해서도 모두 양성으로 결과되어 모든 시료가 연중 *G. lamblia*를 함유하고 있는 것으로

나타났다.



Lane 1 : positive control
Lane 2~13 : s33~s44
Lane 14 : negative control

Fig. 4 Results of PCR detection for *G. lamblia* in river water samples



Lane 1 : positive control
Lane 2~9 : s9~16
Lane 10 : negative control

Fig. 5 Results of RT-PCR detection for viable *G. lamblia* in river water samples

3.2.3 RT-PCR에 의한 살아있는 *G. lamblia* 검출

하천수 시료 48점에 대해 살아있는 *G. lamblia* 동정을 위해 RT-PCR을 적용하였다. 채취된 하천수 시료 48개 중 10개 시료가 RT-PCR 양성으로, 21 %가 살아있는 *G. lamblia*를 포함하고 있는 것으로 나타났으며, 이 가운데 한강본류 3지점은 11 %(4/36), 지류천수는 50 %(6/12)의 양성율을 나타내었다(Fig. 5). 이러한 결과에 기초할 때, 한강 본류의 약 11 %가 살아있는 *G. lamblia*를 함유하고 있어, 정수처리시 이들의 불활성화 또는 제거에 유의해야 할 것으로 나타났다. 또한 유입지천은 약 50 %가 살아있는 *G. lamblia*를 함유해 상수원 관리시 유입지천의 관리가 중요함을 시사하였다.

또한 PCR 양성시료(24개) 중에서는 43.5 %가 살아있는 *G. lamblia*를 포함하고 있는 것으로 나타났으며, 이때 IFA에서는 0~45 cysts/10L(숙빈 포낭 제외)이 관찰된 바, 본 연구에서 사용된 방법이 2 포낭 미만의 시료

에도 적용가능한 매우 민감한 방법임이 확인되었다.

한강 본류의 경우 IFA에 의해 지아디아가 관찰된 시료의 17 % (3/18)가 살아있는 *G. lamblia*를 함유한 것으로 나타났으며, 속빈 포낭을 제외할 경우 23 % (3/13)가 활성을 가진 *G. lamblia*를 함유한 것으로 결과되어, 표준시험방법에 의해 지아디아가 발견된 시료의 대략 20 % 정도가 살아있는 *G. lamblia*일 것으로 추정된다.

지천의 경우에는 모든 시료에서 IFA에 의해 지아디아가 관찰되었는데 RT-PCR에서는 이 중 50 % (6/12)가 양성으로 나타나 연간 50 %의 시료가 살아있는 *G. lamblia*를 함유하고 있는 것으로 추정된다.

4. 결론

본 연구에서 Giardin primer를 이용하여 *G. lamblia*에 대하여 PCR 및 RT-PCR을 수행한 결과 1 포낭까지 검출이 가능하였다. 또한 저농도의 지아디아 포낭을 포함하고 있는 하천수 시료에 적용한 결과, 89.6 % 시료에서 현미경 관찰법인 IFA 결과와 PCR 결과가 일치하였으며, 현미경 관찰시 2 포낭 미만이 발견된 시료에서도 사람 감염성 종인 *G. lamblia*는 물론 살아있는 *G. lamblia* 양성인 경우가 발견되어 본 연구에서 사용된 방법의 높은 민감도를 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 사용된 분석방법은 공중보건학적으로 보다 의미있는 데이터를 제공하는데 적용될 수 있다고 판단되며, 특히 건강에 보다 직접적인 영향을 미치는 수돗물, 지하수 등의 먹는물에 적용할 경우 검출된 지아디아 포낭의 사람 감염가능성 중의 여부 및 생사여부에 대한 정보를 줄 수 있으므로 대응방안 마련에도 활용 가능할 것으로 판단된다.

조사된 한강 본류 시료의 50 %에서 지아디아가 검출되었으며, 33 % 시료가 *G. lamblia*를 함유하고 11% 시료가 살아있는 *G. lamblia*를 함유하고 있는 것으로 결과되었다. 특히 지천의 경우, 조사시료 모두에서 지아디아 및 *G. lamblia*가 확인되었으며, 50 %의 시료에서 살아있는 *G. lamblia*가 확인되어 상수원 관리에서 유입지천의 중요성을 시사하였다. 또한 우리나라 표준시험방법인 면역형광항체에 의해 지아디아가 발견된 한강 본류 시료의 절반 이상이 *G. lamblia*를 함유하고, 대략 20 % 정도가 살아있는 *G. lamblia*를 포함하였으며 표준시험방법에 의해 지아디아가 발견된 지천 시료의 50 %가 살아있는 *G. lamblia*를 함유하고 있음을 확인하여 PCR 및 RT-PCR을 이용해 표준시험방법을 보완하는 추가 정보를 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. WHO Home page, http://www.who.int/water_

- sanitation_health/dwq/gdwq0506_11.pdf(2006)
2. Morteza Abbaszadegan, Mary S. Huber, Dharles P. Gerba, Ian L. Pepper, "Detection of Viable *Giardia* Cysts by Amplification of Heat Shock-Induced mRNA", *Appl. Envir. Microbiol.*, **63**, 324~328(1997)
 3. Meena H. Mahbubani, Bej, A, K, Perlin M, Schaefer III F. W., Jakubowski W. Atlas R. M, "Detection of *Giardia* Cysts by Using the Polymerase Chain Reaction and Distinguishing Live from Dead Cysts", *Appl. Envir. Microbiol.*, **57**, 3456~3461(1991)
 4. Paul A Rochelle, Ricardo de Leon, MIC H. Stewart, Roy L. Wolfe, "Comparison of Primers and Optimization of PCR Conditions for Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in Water", *Appl. Envir. Microbiol.*, **63**, 106~114(1997)
 5. M. Maux, I. Bertrand, C Gantzer and J. Schwartzbrod, "Estimating *Giardia* cyst viability using RT-PCR", *Water Science and Technology : Water Supply*, **2**(3), 107~115(2002)
 6. Cynthial. Mayer and Carol J. PalMer, Evaluation of PCR, "Nested PCR and Fluorescent Antibodies for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in Wastewater", *Appl. Envir. Microbiol.*, **62**, 2081~2085(1996)