소량의 시료에서 노로바이러스 검출방법에 관한 연구(Ⅱ)

A Study on the Detection Method of Norovirus in a Small Water Sample (Ⅱ)

나문수 · 이석규 · 진찬문 · 김천현† · 손명옥 · 강미숙 · 임석춘 · 김현숙

Mun-Su Na · Seok-Kyu Lee · Chan-Mun Jin · Cheon-Hyeon Kim†
Meong-Ok Son · Mi-Suk Kang · Seok-Chun Lim · Hyung-Suk Kim

인수공통감염과

Division of Zoonosis

ABSTRACT

Norovirus are the major agents of acute gastroenteritis in patients of all age groups and frequently detected in various types of environmental water samples such as sewage, river water, well water and mineral withers. Therefore in this study virus concentration method using a

cation-coated filter with poly aluminum chloride was developed for small-volume water. Norovirus inoculated into water was adsorbed effectively to filter coated with poly aluminium chloride. The viral ribonucleic acid is extracted from the concentrate and tested for norovirus using RT-qPCR. 55 % ~ 58 % poliovirus recovery yields were obtained from 4 L Distilled water samples followed by TaqMan RT-qPCR

제1장 서 론

식중독을 유발하는 바이러스는 노로바이러스, 로타바이러스, 아스트로바이러스, 사포바이러스, A형 간염바이러스, 장관아데노바이러스 등이 대표적으로 알려져 있으며 그중 식중독 발생의 가장 많은 원인이 되고 있는 것은 노로바이러스이며, 인체 및 동물의 분변을 통해 환경 중으로 배출되어 하수 뿐 아니라 지표수와 지하수에도 존재하여,[1~6] 겨울철에 지하수에서 수개월동안 안정적으로 살아있으면서 바이러스성 집단식중독 사고를 일으키고 있다.[7~8]

바이러스를 농축하는 방법은 양이온필터법, PEG침전법, 유기산농축법, 양이온플록법, 초고속원심분리법 등이 있으며 대용량(1500 L)의 지하수에서 바이러스를 농축하는 시스템은 양이온필터법인 미국의 EPA 방법을 이용하여 분석하고 있다.[9]

일반적으로 유기, 무기 오염물질들은 이온화된 상태로 수중에 분포하고 있으며 바이러스와 같은 미생물들은 수중에서 음전하를 띠게 된다. 이러한 오염물질들의 정전기적 특징을 이용하여 Glass fiber, cellulose등에 양전하를 띠게 함으로써 음전하를 띠는 바이러스를 흡착시킨 후 pH를 이용하여 탈리하는 과정으로 바이러스를 농축하여 바이러스를 검출하게 된다.[10] 본 연구에서는 nitrocellulose에 양전하를 띠는 필터를 제작하여 기존의 방법과 비교하고자 하였다. 이러한 양전하를 띠는 필터는 필터의 기공사이즈보다 더 작은 바이러스나 내독소(endotoxin) 등을 분석하는데 이용되며 지하수나 하천수의 바이러스 오염이나 급성위장관염을 일으키는 바이러스성 식중독의 원인병원체를 규명하는데 이용된다.[11~12]

정수장 또는 지하수의 바이러스를 조사하기 위하여 국립환경과학원 및 식품의약품안전청에서는 양이온 필터인 1MDS 필터나 Nanoceram 필터를 이용하여 분석하고 있다. 바이러스성 식중독의 원인병원체는 대부분 노로바이러스이며 노로바이러스에 의한 집단발병 사례가 최근 들어 증가하는 추세에 있다. 대부분 오염된 지하수로 세척하거나 식품을 제조할 때 발생하며 어패류에 의한 원인으로 보고되고 있으며 G1 형과 G2형의 다양한 아형의 노로바이러스 들이 존재하여 감염을 유발하고 있는 것으로 확인되고 있다.[13~14]

노로바이러스는 오염된 식수와 굴 등 어패류의 생식을 통한 감염 사례가 많이 보고되어 있으나 사람사이의 전파도 잘 일어나고 있으며, 식품매개성, 수인성 등의 경로로도 전파된다. 또한 소아 뿐만 아니라 청소년과 성인에 이르기까지 전 연령층에서 설사를 유발하는 전염성이 매우 높은 바이러스로 선진국형 장염질환의 원인으로 알려져 있다. 미국의 경우 바이러스성 장염의 약 42 %, 네덜란드의 경우에는 90 % 이상이 노로바이러스에 의한 것으로 알려져 있다.

우리나라 식약청 통계보고 자료에 의하면 바이러스성 식중독 중 대부분이 노로바이러스가 차지하고 있고 2002년부터 2005년에는 노로바이러스 발생율이 6.8 %에서 2006년부터 2010년 7월까지에는 18.2 %로 3배정도 증가하고 있으며 바이러스성 식중독발생이 중요하게 대두되고 있다. 그렇지만 환경시료에서의 원인 규명률이 2009년 32건 중 1건(3.1%)이 지하수에서 규명되었고 2010년에는 21건 중 2건(9.5 %)에서 지하수와 굴무침으로 인한 식중독으로 확인되었다. 바이러스성 원인으로 추정되는 지하수 및 식품에서는 원인불명인 경우가 대부분인 실정이며 환경 시료에서 원인 불명률이 높아 그에 대한 연구가 시급한실정이다.

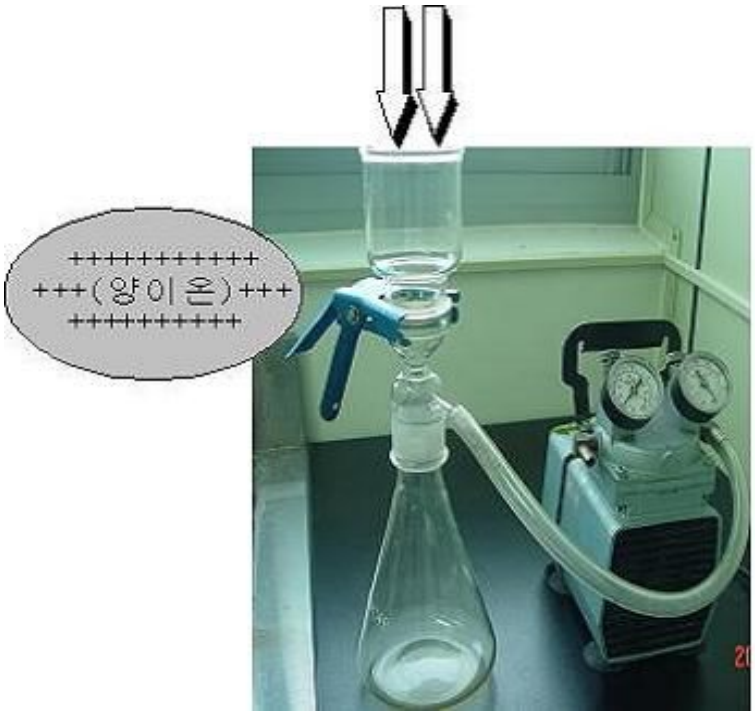
현재 환경부 및 식품의약품안전청에서 고시된 시험방법에는 상용화된 제품인 1 MDS나 Nanoceram 필터제품을 사용하여 (500 ~ 1,500) L의 지하수를 25 mL로 농축하여 PCR방법으로 분석하고 있으나 소량의 시료 (4 ~ 10) L에서는 아직 고시된 방법이 없어 연구를 해야 할 필요성이 있다. 본 연구는 소량의 시료에서 바이러스를 농축하는 방법을 개발하고자 수처리제로 사용하고 있는 양전하 부가물질인 폴리알루미늄 클로라이드(PAC)를 이용하여 Nitrocellulose membrane 필터에 Positive charge 기술을 적용, 필터에 전하를 띠게 함으로써 바이러스를 흡착시켜 검출할 수 있는 필터를 개발하여 바이러스성 집단식중독발병 시 환경시료에서 바이러스 농축하는 방법에 대한 연구를 통한 원인규명률 향상에 기여하고자 2010년도에 연구를 진행하여 연구원보에 발표하였으며 2011년도에 탈리하는 방법을 달리 적용하여 연구를 진행하여 발표하고자 한다.

제2장 연구방법

2.1. 양이온필터 제작 및 농축

양이온(Al^{3+}) 필터를 만들기 위하여 <그림 1>과 같이 밀리포아 여과기 세트에 Nitrocellulose membrane 필터(0.45 μL pore size, 47 mm, Millipore, Billerica, Ireland)를 장착한 후에 (15 ~ 20) PSI 로 감압여과하면서 5 mL의 500 mM $AlCl_3$을 통과시켜 필터에 양이온을 형성시켰다. 이후에 질병관리본부에서 제공받은 104 CCID(Cell culture infectious dose)의 표준주(Poliovirus 1) 3 mL을 500 mL의 멸균증류수에 넣고 균질화 시킨 다음 밀리포아 여과기 세트에 감압여과 하면서 통과시켜 양이온필터에 바이러스를 수집하였다. 또한 식중독바이러스인 노로바이러스 분리주로 동일한 방법으로 실험하였다.

필터에 있는 알루미늄 이온을 제거하기 위하여 50 mL의 0.5 mM H_2SO_4 (pH 3.0)용액으로 세척하였다. 필터에 결합되어 있는 바이러스를 탈리하기 위하여 0.05 M의 Glycin이 첨가된 1.5 % Beef extract (pH 9.5)용액을 첨가한 후에 1분간 정치한 후에 (15 ~ 20) PSI로 감압하면서 용출하였다. 필터 된 액을 중화시키기 위하여 100 mM H_2SO_4용액 5 μL을 첨가하여 실험용액으로 사용하였다. 또한 동일한 방법으로 노로바이러스도 실험하였다.



<그림 1> 양이온 필터 제작 및 바이러스 농축을 위한 그림.

2.2. RNA 추출 및 정량

RNA 추출은 QIAamp viral RNA minikit(QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)을 이용하였으며 표준주 Poliovirus 1 및 Norovirus G2-4를 제조자의 실험방법에 따라서 실험하였다. Buffer AVL (carrier RNA포함) 560 μL을 1.5 mL tube에 넣은 후 시료 140 μL을 넣고 15초 동안 혼합 (pulse-vortex)한다. 실온에서 10분 동안 정치한 후 Ethanol (96 ~ 100) % 560 μL을 넣고 15초 동안 혼합한 후 spin-down한다. 혼합된 시료 630 mL을 QIAamp Mini spin column에 넣은 후 6,000 x g에서 1분 동안 원심분리 한 후 필터된 액과 tube는 버린 후 QIAamp spin column을 새로운 2 μL tube에 옮긴다. 세척을 위하여 Buffer AW 1과 Buffer AW 2 를 순서대로 500 μL을 QIAamp spin column에 넣은 후 6,000 x g에서 1분 동안 원심분리한 후 QIAamp spin column을 새로운 2 mL tube에 옮긴다. 남아있는 알코올을 제거하기 위하여 20,000 x g에서 3분 동안 원심분리 한 후 1.5 mL tube에 QIAamp spin column을 장착한다. Buffer AVE 100 μL을 column에 주입하고 1분 동안 정치한 후 6,000 x g에서 1분 동안 원심분리하여 용출하였다. 용출된 여과액으로 정량을 위한 template RNA로 사용하였다. 이 RNA 용액을 형광측정원리를 이용하는 Qubit fluorometer (Invitrogen, Oregon, USA)장비로 Quant-iT RNA assay kit(Invitrogen, Oregon, USA)를 사용하여 정량하였다.

2.3. Real time RT-PCR 정량시험

폴리오바이러스 및 노로바이러스 정량시험을 위한 증폭은 Tecan 장비를 이용하여 EV Real time PCR kit(Bioneer Daejeon, Korea)로 증폭하였다.

Realtime PCR mixture 튜브에 RNA 용액 10 μL와 DEPC DW 40 μL를 넣고 cDNA 합성한 후 사이클이 끝날 때 마다 증폭이 될 때 증가되는 FAM dye 의 정량을 검출기로 측정하였다. 폴리오바이러스 및 노로바이러스 조건은 동일하게 47 ℃에서 30분으로, cDNA 합성한 후 94 ℃에서 10분으로 inactivation 한 다음, 94 ℃에서는 15초, 55 ℃에서는 1분으로 40 cycle 반응시켜 정량하였다.

2.4. $CCID_{50}$(Cell culture infectious dose) 시험

여과농축된 바이러스 용액의 생존력을 확인하기 위하여 Karber 방법에 따라서 시험을 하였다. 즉 96웰 마이크로 플레이트에 RD(human rhabdomyosarcoma)cell를 monolayer가 형성될때 까지 5 % CO_2 Incubator에서 키운 다음 표준주 폴리오바이러스 용액과 필터 통

과시킨 바이러스 용액을 x 10단계씩 희석하면서 각각 플레이트에 50 μL씩 분주한 후 5 % CO_2 인큐베이터에 넣어서 CPE(Cytopathogenic effect)를 매일 관찰하였으며 Cell control과 Virus control을 대조로 사용하면서 아래의 Kärber 공식에 따라서 비교 분석하였다.

$$\text{Log } CCID_{50} = L - d\ (S - 0.5)$$

L = log of lowest dilution used in the test;

d = difference between log dilution steps;

S = sum of proportion of "positive" tests

제3장 결과 및 고찰

3.1. 폴리오 및 노로바이러스 농도 분석

표준주바이러스인 10^4 CCID polio virus 100 uL의 시료를 QIAamp Viral RNA kit를 이용하여 추출한 후 최종적으로 100 μL의 핵산을 얻어 형광분석 핵산측정장비인 Qubit fluorometer로 RNA 농도를 측정하였다. 측정한 결과 0.918 ug/ml ± 20 %의 RNA 농도값을 얻었으며 표준주바이러스를 양이온필터에 여과농축하여 얻어진 RNA 농도값은 0.537 ug/mL ± 20 %으로 측정되었다. 또한 양성시료인 Norovirus G2-4를 이용하여 동일한 방법으로 측정한 결과 표준시료는 5.18 μg/mL 이었으며, 여과 농축한 시료에서는 3.19 μg/mL 이었다.

3.2. Real time RT-PCR 정량 비교시험

10^4 CCID 폴리오바이러스 100 μL를 가지고 Qiagen Viral mini kit를 가지고 추출하였으며 100 μL 로 용출하여 real time PCR kit 50 μL volume에 RNA 용액 10 μL와 DEPC DW 40 μL 를 넣고 실시간으로 형광을 측정하였다. 표준시료원액으로 <그림 2>와 같이 Standard curve를 이용하여 viral copy number를 계산하였다. 폴리오바이러스 1 의 NCR gene에 대해 Real time PCR 정량시험으로 비교분석한 결과 CT(cycle threshold) 값은 25.1 ± 20이었다. 동일한 농도로 양이온 제작필터에 여과 농축한 바이러스용액을 추출한 실험에서는 CT value는 26.8 ± 20 로 약 60 % ~ 62 %의 회수율을 보여주었다.

양성시료인 노로바이러스 G2-4 에 대한 시험결과는 CT(cycle threshold) 값은 28.5 ± 20이었으며 동일한 농도로 양이온 제작필터에 여과 농축한 바이러스용액을 추출한 실험에서는 CT value는 29.9 ± 20 로 약 55 % ~ 58 %의 회수율을 보여주었다.

3.3. 고 찰

노로바이러스는 전 세계적으로 소아뿐 아니라 청소년 연령층과 성인에 이르기까지 설사를 유발하는 바이러스로 선진국형 설사 질환의 원인으로 알려져 있으며 감염된 환자의 배설물에서 감염 후 1주부터 1개월간 바이러스가 방출되어 하수를 거쳐 환경 수계에 널리 분포하게 되며 바다로 들어가 여기에 사는 어패류를 오염시키는데 어패류의 중장선이 필터역할을 하여 바이러스가 농축되어진다. 식중독바이러스들은 세균보다 적은 농도로 분포하지만 세균에 비하여 환경에서 수개월 생존하고 적은 수로도 감염이 가능한 것으로 보고되고 있다 이러한 바이러스에 오염된 물을 먹거나 어패류를 날것으로 먹게 될 경우 집단식중독을 일으키는 것으로 보고되고 있다.

바이러스를 농축하는 방법에는 양이온필터법, PEG침전법, 유기산농축법, 양이온플록법, 초고속원심분리법 등이 있으며 PEG농축법과 양이온필터법에 우수한 민감도를 보여주고 있으며 초고속원심분리법에는 많은 양(4 L)을 하기에는 적합하지 않은 것으로 보고되고 있다. 바이러스를 농축하는 방법은 여러 가지가 있지만 농축할 시료의 상태와 양, 실험자에 따라 다른 농축법을 사용하는 등 확립된 방법은 없다. 이중에서 민감도가 우수하고 농축하는 시간이 빠른 양이온필터법을 변형하여 사용하였다. 본 연구에서는 Nictrocellulose filter에 여과장치를 이용하여 poly aluminium chloride(PAC)용액으로 양이온을 코팅하여 바이러스를 농축하는 방법을 개선하고자 하였다. 이번 연구에서는 2010년 연구사업에서 60 %의 회수율로 유의성 있는 결과를 나타내어 회수율을 높이기 위해 계속해서 연구를 진행하였으나 2011년 결과에서도 55 % ~ 62 %의 비슷한 회수율을 보여주었다.

환경시료에서 핵산을 추출할 때 추출 방법에 따라서 검출감도가 차이가 발생하는데 다양한 종류의 물질이 많이 존재하거나 부식산이나 다당류 등이 혼합되어 있는 경우 효소반응이 억제되어 증폭반응을 저해하게 되며 특히 부식산은 10 μg/mL 농도만으로 PCR 반응을 저해하며, 다당류의 경우에는 12.5 % 정도만 있으면 심각히 저해한다는 보고가 있다.[15] 따라서 표준시료와 달리 환경가검물에서 유전자를 추출할 때 컬럼방법보다는 비특이물질을 많이 제거하는 Magnetic bead 방법으로 추출을 해야 할 필요성이 있으며 비특이물질이 많이 들어있는 대변에서의 추출방법도 Magnetic bead 방법으로 표준화되어 있다. 노로바이러스는 Caliciviridae에 속하는 27 nm 크기의 RNA 바이러스로 유전자의 다양성이 매우 심하게 나타나며 다양한 바이러스가 전 세계적으로 급성바이러스성 위장관염을 일으키는 주요한 원인병원체로 알려져 있으며[16,17,19] 모든 연령층의 환자에서 발생하며[18] Genogroup Ⅰ과 Ⅱ로 구성되어 있다.[20] 위장관염을 일으키는 바이러스에는 로

타바이러스, 노로바이러스, 장아데노바이러스, 아스트로바이러스 사포바이러스등이 있다.[18] 이중에서 노로바이러스와 같은 바이러스성 병원체가 차지하는 비중이 증가하고 있으며 학교급식이 증가하면서 노로바이러스에 의한 집단 장염발생사례가 계속 보고되고 있다. [20]

식약청 노로바이러스 실태조사 보고 자료에 따르면 12월부터 2월까지 겨울철식중독 발생비율은 2007년 36.1 %, 2008년 27.5 %, 2009년 37.5 %, 2010년 45.2 %로 노로바이러스로 인한 식중독 발생이 겨울철에 많고 점차 증가하는 추세이며 유전자 분석결과 G1과 G2형 유전자형의 바이러스들이 다양하게 존재하여 다양한 아형의 노로바이러스가 국내에서 많은 감염을 유발하고 있는 것으로 확인되고 있다. 이러한 다양한 집단발병사례들 중 원인병원체를 환경 가검물에서 규명하는 건수가 거의 전무한 상황이기 때문에 원인병원체를 규명하는데 도움을 주고자 한다.

노로바이러스 G2-4를 양이온 필터 여과장치에 통과시켜 3 mL로 농축하여 대해 Real time PCR 정량시험 결과 표준바이러스로 실험한 결과와 비교 시 약 55 % ~ 58 %의 회수율을 보여주었고, 따라서 이번 실험결과 소량의 시료인 4 L의 물에서 식중독바이러스인 노로바이러스 등을 농축하는데 효과적인 방법으로 확인되었다. 전 세계적으로 지하수에서 바이러스를 확인하기 위한 농축방법으로는 미국의 EPA 검사법인 500 L ~ 1,500 L의 지하수를 양이온필터에 통과하면서 흡착시켜 농축하는 방법을 채택하여 확인하고 있다. 우리나라에서도 노로바이러스 식중독 발생시 원인규명을 위하여 1,500 L의 지하수를 농축하여 검사하고 있지만 식당이나 급식소 등 현장의 경우 정수기 등 4 L의 물이나 환경가검물 중에서 양이온필터를 이용한 농축방법을 이용하면 환경가검물에서 원인규명을 할 때 지하수를 검사할 뿐만 아니라 음식물 조리 시 사용하는 물이나 정수기 등의 물 등 중간 매개체 검사 시 원인규명률 향상에 도움이 될 것으로 생각된다. 또한 빠르게 농축할 수 있어서 환자발생시 역학조사에 유용한 자료로 이용할 수 있고, 환자 확산방지에도 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 2010년도에 이어 2011년도의 경우 1.5 % Beef extract를 넣어 탈리하여 실험하여 본 결과 비슷한 회수율을 보여주었다.

제4장 결 론

소량의 지하수(약 4 L)에서 바이러스를 농축하기 위하여 양이온필터를 제작한 후 질병관리본부에서 분양받은 Poliovirus 1 및 Norovirus G2-4를 이용한 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 형광분석 측정 장비인 Qubit fluorometer 로 RNA 농도를 측정한 결과 폴리오바이러스를 양이온필터에 통과하기 전에 핵산을 추출하여 정량한 결과 0.918 μg/mL ± 20 %이었으며 양이온필터 여과장치에 농축하여 얻어진 RNA 농도값은 0.537 μg/mL ± 20 %으로 측정되었다. 양성시료인 Norovirus G2-4를 이용하여 동일한 방법으로 측정한 결과 표준시료는 5.18 μg/mL 이었으며 여과농축한 시료는 3.19 μg/mL 이었다.

2. 10^4 CCID Poliovirus 1의 NCR gene에 대해 Real time PCR 정량시험으로 비교분석한 결과 CT(cycle threshold) 값은 25.1 ± 20이었다. 동일한 농도로 양이온 제작필터에 여과 농축한 바이러스용액을 추출한 실험에서는 CT value는 26.8 ± 20 로 약 60 % ~ 62 %의 회수율을 보여, 2010년도의 약 60%의 회수율과 비슷한 결과를 보여주었다.

3. 노로바이러스 G2-4 에 대한 시험결과 CT(cycle threshold) 값은 28.5 ± 20 이었으며 동일한 농도로 양이온 제작필터에 여과 농축한 바이러스용액을 추출한 실험에서는 CT value는 29.9 ± 20로 약 55 % ~ 58 %의 회수율을 보여, 2010년도의 약 60% 회수율과 비슷한 결과를 보여주었다.

4. 식중독 규명 시 환경가검물인 음식물을 조리에 사용하는 물이나 정수기의 물 등 소량의 시료에서 중간 매개체를 검사하면 원인규명를 향상에 도움이 될 것으로 사료된다.

제5장 참고문헌

1. 지영미, 김기순, 천두성, 박정구, 강영화, 정윤석, 고운영, 신영학, 윤재득.1999a, "원주지역 설사환자에서 분리한 Small Round Structured Viruses (SRSV) 염기서열 분석," 대한바이러스학회지, 29(4):247~259(1999).
2. 지영미, 김기순, 천두성, 안정배, 박정구, 강영화, 정윤석, 윤재득. 1999b. "바이러스성 설사질환의 역학조사 및 원인체 분석을 통한 예방대책 수립에 관한 연구", 국립보건원보, 36:94~105(1999).
3. 지영미, 김기순, 천두성, 안정배, 강영화, 정윤석, 이선화, 김운호, 윤재득.. "바이러스성 설사 질환의 역학조사 및 원인체 분석을 통한 예방대책수립에 관한 연구", 국립보건원보, 37:96~112(2000).
4. 지영미, 안정배, 천두성, 최우영, 김운호, 이정수, 이강범, 이회규, 윤재득 "국내 유행 바이러스성 장염의 역학", 소아감염. 11(1):S7~S19(2004).
5 .Gerba, C.P., and J.B.Rose, "Viruses in source and drinking water, p.. In McFeters, G.A. (ed.), Drinking water microbiology", Springer-Verlag New York Inc., New York, 380~396(1990).
6. Rockx B, Wit M de, Vennema H, vinje J, Bruin E de, van Duynhoven Y, "Koopmans M. Natural history of Human Calicivirus infection": a prospective cohort study, *Clin. Infect. Dis.,* 35, 246~253(2002).
7. Parshionikar SU, S Willian-True, GS Fout, DE Robbins, SA. Seys, JD Cassady, and R Harris, "Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with norovirus," *App. Environ. Microbiol.,* 69: 5263~5268(2003).
8. Sung-Han Kim,Odd-sung Cheon, Jin-Hyeun Kim, dong-Han Lee, Won-hwa Jheong, Young-Joo Heo, Hyeon-Mi Chung, Youngmee Jee, and Joo-Shil Lee, "Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursions in Korea were associated with several waterborne strains of norovirus," *J. Clin. Micro.*, 43(9): 4836~4839(2005).
9. UESPA manual of methods for virology , EPA 600/4-84/013(N14)(2001).
10. Kenneth Hou et al., "Capture of latex Beads, Bacteria, Endotoxin, and Viruses by Charge-Modified Filters," *App. Environ. Microbiol,.* 5(40), 892~896(1980).
11. Georgios T. P., Laura M, ChristinaG.C, Francisco L, Dina A, Eleni I, "A simple methodological approach for counting and identifying culturable viruses adsorbed to cellulose nitrate membrane filters," *App. environ. Microbiol.*,

66(1): 194~198(2000).

12. Mohammad R.K., Eric R.R., Nichole B., Larry W., "New electropositive filter for concentrating enteroviruses and noroviruses from large volumes of water," *App. Environ. Microbiol.*, 75(8): 2393~2399 (2009).
13. Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, and Glsss RI., "Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States," *J. Infect. Dis.*, 178:1571~1578(1998).
14. Gallimore CI, Green J, Richards AF, Cotterill H, Broun DWG, and Gray JJ. 2004c.,"Methods for the detection and characterization of noroviruses associated with outbreaks of gastroenteritis : Outbreaks occurring in the north-west of England during two norovirus seasons," *J. Med. Virol.*, 73:280~288(2004).
15. Atmar, R.L., T.G. Metcalf, F.H. Neil, and M.K. Estes., "Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction," *App. Environ. Microbiol.*, 59, 631~635(1993).
16. Seto Y, Iritani N, Kubo H, Kaida A, Murakami T, Haruki K, Nishio O,Ayata M, and Ogura H., "Genotyping of Norovirus Strains Detected in Outbreaks between April 2002 and March 2003 in Osaka City, Japan," *Microbiol Immunol.*, 49(3):275~283(2005).
17. Mayo MA., "A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV," *Arch Virol*,, 147:1655~1663(2002).
18. Artines J, Phililllips M and Feachem RG., "*Diarrheal diseases. In: Jamison DT, Mosely WH, Measham AR, Bobadilla JL, editors. Disease control priorities in developing countries*," Oxford Univ. Press, 91~116(1993).
19. Inouye K, Yamashita K, Yamadera S, Yoshikawa M, Kato N, and Okabe N., "Surveliiance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents," *J. Infect. Dis.,* 181:S270~S274(2000).
20. Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, and von Bonsdorff CH., "Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viuses," *J. Infect. Dis.*, 180:1771~1776(1999).
21. P. W. Huang, D. Laborde, V. R. Land, D. O. Matson, A. W. Smith, and X. Jiang., "Concentration and Detection of Caliciviruses in Water Samples by Reverse Transcription-PCR," *Appl. Envir. Microbiol.*, Vol. 66(10), 4383~4388(2000).

22. D R Preston, T V Vasudevan, G Bitton, S R Farrah, and J. L. Morel Novel, "approach for modifying microporous filters for virus concentration from water," *Appl. Envir. Microbiol.*, 54: 1325~1329(1988).