

FOOD & CHEMISTRY

# Development of diagnostic method for human *Astrovirus* with rapid, specific and high sensitivity using loop-mediated isothermal amplification method

Jin-Young Lee, Jae Young Rho\*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Dankook University, Cheonan 31116, Korea

\*Corresponding author: [jrho@dankook.ac.kr](mailto:jrho@dankook.ac.kr)

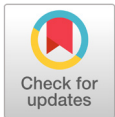
## Abstract

Human *Astrovirus* (HuAstV), known as a waterborne virus, is a group IV positive-sense single-stranded RNA that belongs to *Astroviridae*. The first outbreak of HuAstV was reported in England in 1975. HuAstV can exist not only among clinical patients but also in various water environments, such as water for agriculture and vegetables. For diagnosis of HuAstV from water samples, a polymerase chain reaction (PCR) system has been developed. However, the PCR-based diagnostic method has problems in field application, such as reaction time, sensitivity and specificity. For this reason, in this study we developed the loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP) system, aimed specifically at HuAstV. Three prepared LAMP primer sets were tested by specificity, non-specificity and sensitivity; one LAMP primer set was selected with optimum reaction temperature. The developed LAMP primer set reaction conditions were confirmed at 62°C, and detection sensitivity was 1 fg/μL. In addition, restriction enzyme *HaeIII* (GG/CC) was introduced to confirm that the LAMP reaction was positive. As a result, selected LAMP primer set was 100 - 1000 times more specific, rapid, and sensitive than conventional-nested PCR methods. For verification of the developed LAMP assay, twenty samples of cDNA from groundwater samples were tested. We expect that the developed LAMP assay will be used to diagnose HuAstV from various samples.

**Keywords:** human *Astrovirus* (HuAstV), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), water sample

## Introduction

Human *Astrovirus* (HuAstV)는 group IV (+) ssRNA, *Astroviridae*로 분류되는 인체 병원성 장바이러스로 감염 시 구토, 복통, 설사, 발열 등의 증상이 나타난다(Thongprachum et al., 2015; Cortez et al., 2017). HuAstV는 1975년 영국에서 장염증상을 가지고 있는 환자의 분변시료로부터 최초로 보고되었다(Madeley and Cosgrove, 1975). 1990년대 장염 환자 중 약 0.1 - 4.6% 수준으로 HuAstV가 보고되었으나, 미국, 인도, 네팔, 일본, 호주 등 전세계적으로 발생이 보고되었으며(Phan et al., 2005a; Phan et al., 2005b; Finkbeiner et al., 2008;



## OPEN ACCESS

**Citation:** Lee JY, Rho JY . 2020. Development of diagnostic method for human *Astrovirus* with rapid, specific and high sensitivity using loop-mediated isothermal amplification method. Korean Journal of Agricultural Science 47:173-182. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20200009>

**Received:** January 08, 2020

**Revised:** February 21, 2020

**Accepted:** February 25, 2020

**Copyright:** © 2020 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Jiang et al., 2013), 주로 2살 이하의 영유아에게 감염되는 것으로 알려져 있어 감염 시 위험 가능성이 높을 수 있다(Brown et al., 2008). 국내에서는 HuAstV의 감염은 2003년에 최초 보고되었으며, 2013년부터 2017년까지 전체 장염 환자 중 HuAstV가 1.0 - 1.9%로 보고되는 등 국내에서도 HuAstV가 보고되고 있다(Hwang and Lee, 2014; Ham et al., 2014; Kim et al., 2019). 한편, 장바이러스의 감염경로는 구강-분변 경로로 환자로부터 수계환경 등에서도 감염이 가능하다. HuAstV도 수인성바이러스로, 방류수 등을 통해 지하수 등 자연 수계에 존재 가능성이 높다(Fong and Lipp, 2005). 농업용수는 주로 지하수를 사용하며, 지하수에서 노로바이러스 등 수인성 바이러스의 오염 문제가 국내외 사회적으로 문제가 됨에 따라 음용 및 비 음용 지하수에서도 관련 항목에 대한 모니터링 필요성이 제기되었다(Kang et al., 2016). 지하수에서 HuAstV를 모니터링 하는 방법은 주로 특정 핵산 단편을 증폭하는 polymerase chain reaction (PCR)이 주로 사용되고 있으나(Tang et al., 2005; Finkbeiner et al., 2009), 지하수에서 병원성 바이러스 핵산을 검출하기 위해서는 증폭한 산물로 다시 한 번 증폭하는 nested PCR 수준의 검출민감도가 필요하며, 핵산 추출 이 후 바이러스 검사에 약 10시간 수준의 반응이 필요하다는 단점이 있다(Lee et al., 2019). 반면 등온증폭법(LAMP, loop-mediated isothermal amplification)은 nested PCR과 동등한 검출 민감도를 가지고 약 1 - 3시간 반응으로 신속한 모니터링이 가능하다는 장점을 가지고 있어 지하수에서 *Aichivirus A* 등 수인성바이러스 모니터링 방법으로 개발되고 있다(Lee et al., 2019). 또한 Suleman et al. (2016)에 의하면 LAMP 기법은 모니터링 기술로는 뛰어나지만 위양성(false positive) 등이 나타날 수도 있어 양성을 확정하기 위한 판정에 단점을 가지고 있다. 이것을 보완하기 위해 제한 효소를 활용하여 양성 시료에 대한 검증 시스템 장착으로 기술의 단점을 보완할 수 있다(Lee et al., 2019). 따라서 이번 연구에서는 LAMP 기법을 활용하여 농업용수 등 지하수에서 신속한 HuAstV 모니터링을 할 수 있는 방법 및 제한 효소를 활용하여 양성시료(positive samples)를 검증할 수 있는 방법을 개발하였다.

## Materials and Methods

### Primer설계 및 재료수집

HuAstV 특이적 LAMP primer 설계를 위하여, HuAst를 포함한 수인성 바이러스 13종의 염기서열을 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 수집하였다. 수집한 염기서열은 primerExplorer (<http://primerexplorer.jp/e/index.html>)를 사용하여 HuAstV 특이적인 LAMP primer를 설계하였다(Table 1). Primer 설계 후, 종 특이적 반응을 확인하기 위해 HuAstV의 ORF1b/ORF2 유전자 염기서열 (JN\_887820; 4,047 - 5,789 nt)을 대상으로 Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하여 유전자 합성을 수행하였다. 합성한 유전자는 1 ng/μL로 조절하여 사용하였다. 설계한 primer의 비특이적 반응을 확인하기 위해, 참고바이러스 12종 (*enteric Adenovirus 41*, *Aichivirus A*, *Echovirus 5*, *Enterovirus 68*, *Enterovirus 71*, *Hepatitis A virus*, *Hepatitis E virus*, *Norovirus GII*, *Parechovirus A*, *Poliovirus*, *Rotavirus A*, *Sapovirus*)의 핵산 또는 플라스미드를 수집하였다. 또한 HuAstV 진단 시스템의 검증을 위하여, 바이러스가 미량 또는 극미량 감염이 예상되는 지하수 환경 시료의 총 핵산(RNA)을 수집하였다(NIER, 2017). 수집한 핵산은 cDNA로 합성하였다.

## LAMP primer 선발

HuAstV 특이적인 LAMP primer 선발을 위하여, 기존에 보고된 조성과 방법으로 LAMP 반응을 수행하였다(Lee et al., 2019). 합성한 HuAstV plasmid를 주형으로 LAMP 반응을 형성하는 조합을 1차로 선발하였고, 1차 선발된 primer 조합들을 대상 바이러스 및 참고바이러스 10종들과 반응하여 대상 바이러스 외에 비 특이 반응을 보이는 primer 조합을 제외하는 2차 선발을 진행하였다. 2차 선발된 primer 조합들을 대상으로 검출한계(detection limit) 실험을 수행하여 반응 강도가 가장 높은 primer 조합을 최종 선발하였다. *Bacillus stearothermophilus* (*Bst.*) polymerase의 경우, 80°C 이상의 온도에서는 불활성이 나타나므로, *Bst.* polymerase를 첨가하지 않은 반응액을 95°C에서 10분간 반응시켜 해리 후 따로 첨가하였다. 다음 LAMP 반응을 1시간동안 진행시켰다. LAMP 반응이 끝난 후 증폭 산물은 1.2% agarose gel을 이용한 전기영동 (150 V, 25분)간 진행시킨 뒤, UV illuminator (Seoulin Bioscience Inc., Seoul, Korea)를 통해 관찰하였다.

## 양성반응의 검증 시스템

LAMP 반응을 검증하기 위하여 LAMP outer primer (F3, B3)을 이용한 PCR 산물의 제한효소 처리를 수행하였다(Table 1). PCR 조성은 20  $\mu$ L를 기준으로, Hotstart RT-PCR premix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였으며, cDNA template (HuAstV plasmid) 1  $\mu$ L, F3, B3 primer 1  $\mu$ L (10 pmole), 멸균증류수 17  $\mu$ L로 반응하였다. 온도 조건은 94°C 5분 초기 변성 후 35반복으로 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 45초 증폭 후 최종적으로 72°C에서 3분간 반응하였다. PCR 산물은 전기영동을 통해 확인하였고, 제한효소 *Hae*III (GG/CC) (10 units)를 37°C에서 2시간 동안 PCR 산물과 반응하였다. 1.2% agarose gel을 이용한 전기영동 (150 V, 25분)간 진행시킨 뒤, UV illuminator를 통해 제한효소 절편을 확인하였다.

## 지하수 시료 실증실험

개발한 검사법을 시료에서 검증하기 위해 수도꼭지가 있는 지하수 시료 20점을 무작위로 채취하였다. 시료 채취, 탈리 및 농축, 핵산 추출은 국립환경과학원에 기재된 노로바이러스 시료 채취방법을 기준으로 하였으며, 나노세라믹 필터가 연결된 하우징에 500 L의 지하수를 흘려 실험실로 이동하였다. 소고기 추출(beef extract) 완충액을 사용하여 탈리 및 원심분리 방법으로 농축하였으며 최종 0.22  $\mu$ M 필터에 여과하였다. 바이러스 핵산 추출 및 cDNA 합성은 viral RNA mini kits (QIAGEN, Hilden, Germany) 및 ReverTraAce- $\alpha$ -<sup>®</sup> (TOYOBO, Oasaka, Japan)을 사용하여 제공된 프로토콜에 따라 수행하였다.

## 검출민감도 비교실험

선발된 LAMP primer와 비교실험을 위해, 설계된 outer primer에서 conventional PCR과 nested PCR이 가능한 조합을 설계하였다(Table 2). 설계된 3개의 조합들을 대상으로 검출민감도 한계 실험을 수행하여 반응 강도를 선발된 LAMP primer의 검출민감도 한계와 비교하였다. PCR 반응은 조성은 20  $\mu$ L를 기준으로, Hotstart RT-PCR premix를 사용하였으며, cDNA template (HuAstV plasmid) 1  $\mu$ L, F3, B3 primer 1  $\mu$ L (10 pmole), 멸균증류수 17  $\mu$ L로 반응하였다. 온도 조건은 94°C 5분 초기 변성 후 35반복으로 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 45초 증폭 후 최종적으로 72°C에서 3분간 반응하였다. 1.2% agarose gel을 이용한 전기영동 (150 V, 25분)간 진행시킨 뒤, UV illuminator를 통해 제한효소 절편을 확인하였다.

**Table 1.** Lists of developed human *Astrovirus* (HuAstV) loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primer sets.

Set	Primer		Sequence	Length (mer)	Product size (nt)
	Location	Name			
1	Outer	HuAstV1-F3	AGGACCAAAGAAGTGTGAT	19	194
		HuAstV1-B3	TTGAGAAGATTGACGTTTGT	20	
	Inner	HuAstV1-FIP	TTGCGGCCATTGTTACTGAAACAAGCAGGTAAGTGTGA	39	
		HuAstV1-BIP	TTCACAATCTAGGGGCCGAGACTGTAATCTTGACTGATTTGTC	43	
2	Outer	HuAstV2-F3	ACAACTCAGGAAACAAGGT	19	205
		HuAstV2-B3	CCACATGGAATACTGAGCA	19	
	Inner	HuAstV2-FIP	GTAGTGCCACTGGTGTGGATATGTCAGAGAGCAACAGC	39	
		HuAstV2-BIP	AGATTGAGGCGTGTATTCTCTCTGTAGCGTCTTAACAAGGA	41	
3 <sup>z</sup>	Outer	HuAstV3-F3	GTAAGCACCTTGATGTTACA	20	223
		HuAstV3-B3	CACTCTGAAGCAAGTTCAA	19	
	Inner	HuAstV3-FIP	GTCAGATGCATTGTCATTGGTGTAAATTGAAACCCTCTGACCT	42	
		HuAstV2-BIP	CAAGAACCAACGCATTCCCCTGAAACGATCTCAGGTATGTGAGC	44	

<sup>z</sup> Finally selected LAMP primer set.

**Table 2.** Lists of conventional and nested polymerase chain reaction (PCR) primer set of human *Astrovirus* (HuAstV).

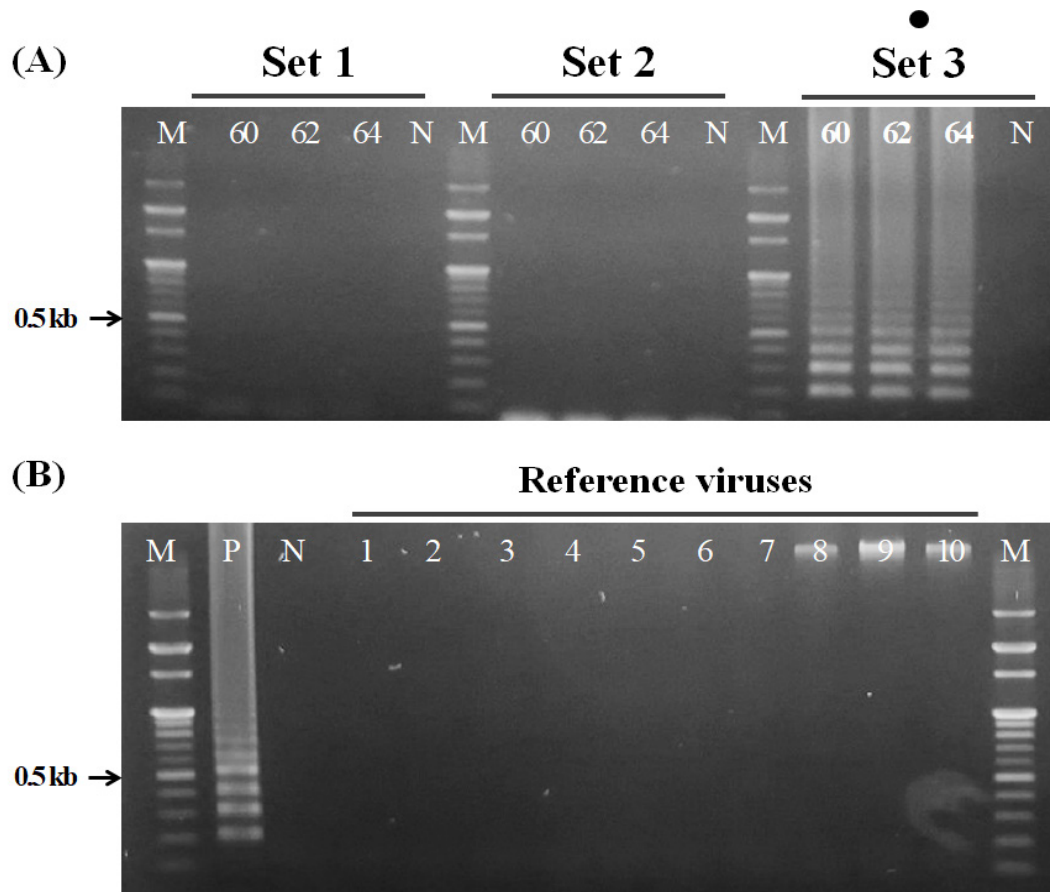
Set	PCR primer set				Nested PCR primer set			
	Primer Name	Sequence (5' - 3')	Length (nt)	Sensitivity <sup>z</sup> (Conc.)	Primer Name	Sequence (5' - 3')	Length (nt)	Sensitivity (Conc.)
A	HuAstV1-F3	AGGACCAAAGAAGTGTGAT	775	1 pg/μL	HuAstV3-F3	GTAAGCACCTTGATGTTACA	223	100 fg/μL
	HuAstV3-B3	CACTCTGAAGCAAGTTCAA			HuAstV3-B3	CACTCTGAAGCAAGTTCAA		
B	HuAstV2-F3	ACAACTCAGGAAACAAGGT	558	1 pg/μL	HuAstV3-F3	GTAAGCACCTTGATGTTACA	223	100 fg/μL
	HuAstV3-B3	CACTCTGAAGCAAGTTCAA			HuAstV3-B3	CACTCTGAAGCAAGTTCAA		
C	HuAstV3-F3	GTAAGCACCTTGATGTTACA	223	1 pg/μL		None		
	HuAstV3-B3	CACTCTGAAGCAAGTTCAA						

<sup>z</sup> Selected loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primer set 3 sensitivity was 1 fg/μL.

## Results and Discussion

### HuAstV 특이적 primer 선발

HuAstV 특이적 primer 12개(F3, B3, FIP, BIP primer 각각 3개씩)가 설계되었으며, 194 - 223 nt 증폭이 가능한 3개 조합을 구성하였다(Table 1). 이 3개의 조합을 이용하여 HuAstV 특이적 LAMP 반응을 수행한 결과 조합1과 조합2에서는 LAMP 반응이 확인되지 않고, 조합 3에서만 LAMP 양성 반응이 확인되었으며, 최적 반응 온도는 62°C로 확인되었다(Fig. 1A). HuAstV에 특이적 밴드를 형성한 1개의 LAMP primer 조합을 대상으로 HuAstV와 참고 수인성 바이러스 10종의 비특이적 분석을 수행한 결과, 양성대조구로 사용한 HuAstV plasmid를 제외하고 음성대조구를 포함하여 참고바이러스 10종 모두 반응이 나오지 않아 조합3이 HuAstV 특이적인 LAMP 반응이 가능한 것이 확인되었다(Fig. 1B). 특이적 및 비특이적 결과를 종합하여 LAMP 조합 3를 HuAstV의 특이적 진단에 적합한 LAMP primer 조합으로 선발되었다.



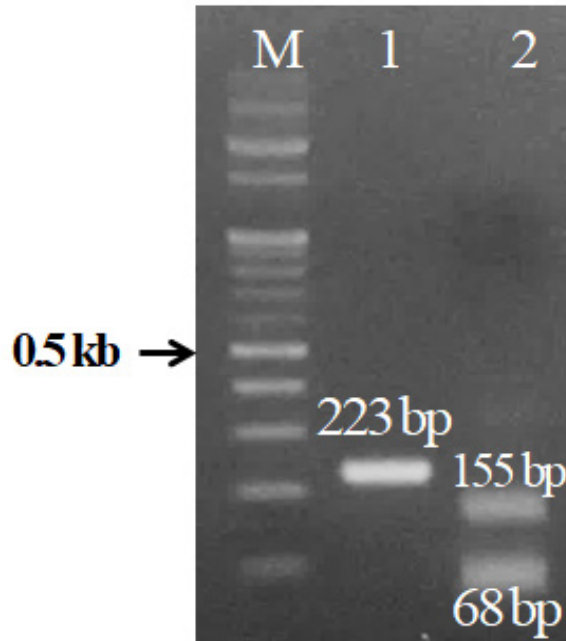
**Fig. 1.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction results of human *Astrovirus* (HuAstV). (A) Specific test of HuAstV. M, 100 bp DNA Ladder marker (Enzynomics); 60, 62, 64, LAMP reaction temperature; Set 1 - 3, LAMP primer set; N, negative control; dot (●), finally selected LAMP primer set. (B) non-Specific test of HuAstV. M, 100 bp DNA ladder marker (enzynomics); P, HuAstV plasmid (1fg/uL); N, negative control; 1, *Aichivirus-A*; 2, *Rotavirus-A*; 3, enteric *Adenovirus 41*; 4, *Hepatitis A virus*; 5, *Sapovirus*; 6, *Enterovirus*; 7, *Hepatitis E virus*; 8, *Parechovirus-A*; 9, *Norovirus-GII*; 10, *Poliovirus*.

### 양성반응의 검증시스템

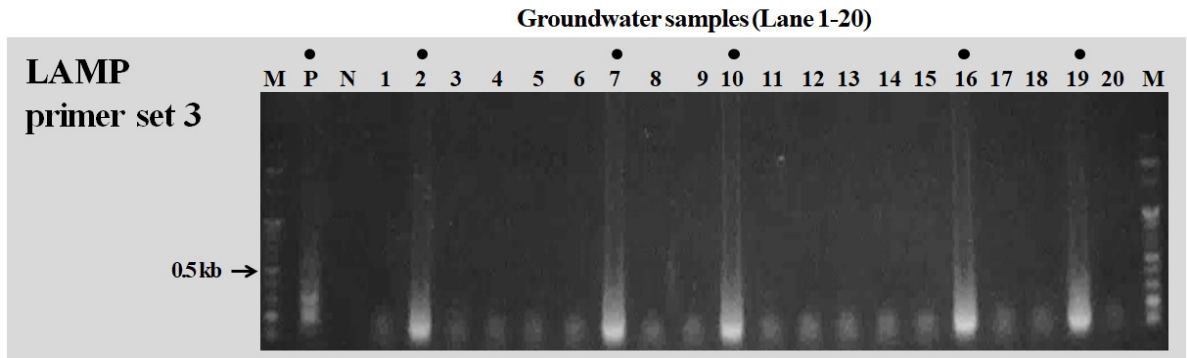
LAMP의 단점으로 나타나는 위양성을 구분하고, LAMP 양성 반응을 검증하기 위하여, 특이적, 비특이적, 검출민감도 반응 후 최종적으로 선발된 선발된 LAMP primer 조합 3의 F3, B3 (10 pmole) primer를 이용하여 outer primer PCR 반응을 진행한 결과, 223 nt의 PCR 증폭이 확인되었으며, 제한효소 *HaeIII* (GG/CC) (10 units)를 사용하여 37°C, 2시간 반응 후 양성반응을 전기 영동으로 확인한 결과 155 + 68 nt의 제한효소 절편이 확인되었다(Fig. 2).

### 지하수 시료 실증시험

지하수에서 추출한 핵산(cDNA)로 20개 중 5개에서 HuAstV 양성 반응이 나타났다(Fig. 3). 양성 반응 검정을 위해 시료에서 LAMP outer primer를 사용하여 양성대조구, 음성대조구, 양성시료 5개에 대해서 outer primer PCR 결과 양성대조구에서만 약 223 nt를 증폭이 확인되었으며, 양성시료 5개는 PCR반응이 확인되지 않았다 (data not shown). 이러한 결과는 지하수에서 추출한 핵산에서 LAMP outer primer를 이용한 PCR 수준의 검출 민감도로는 PCR 반응이 확인되지 않는 것으로 보인다.



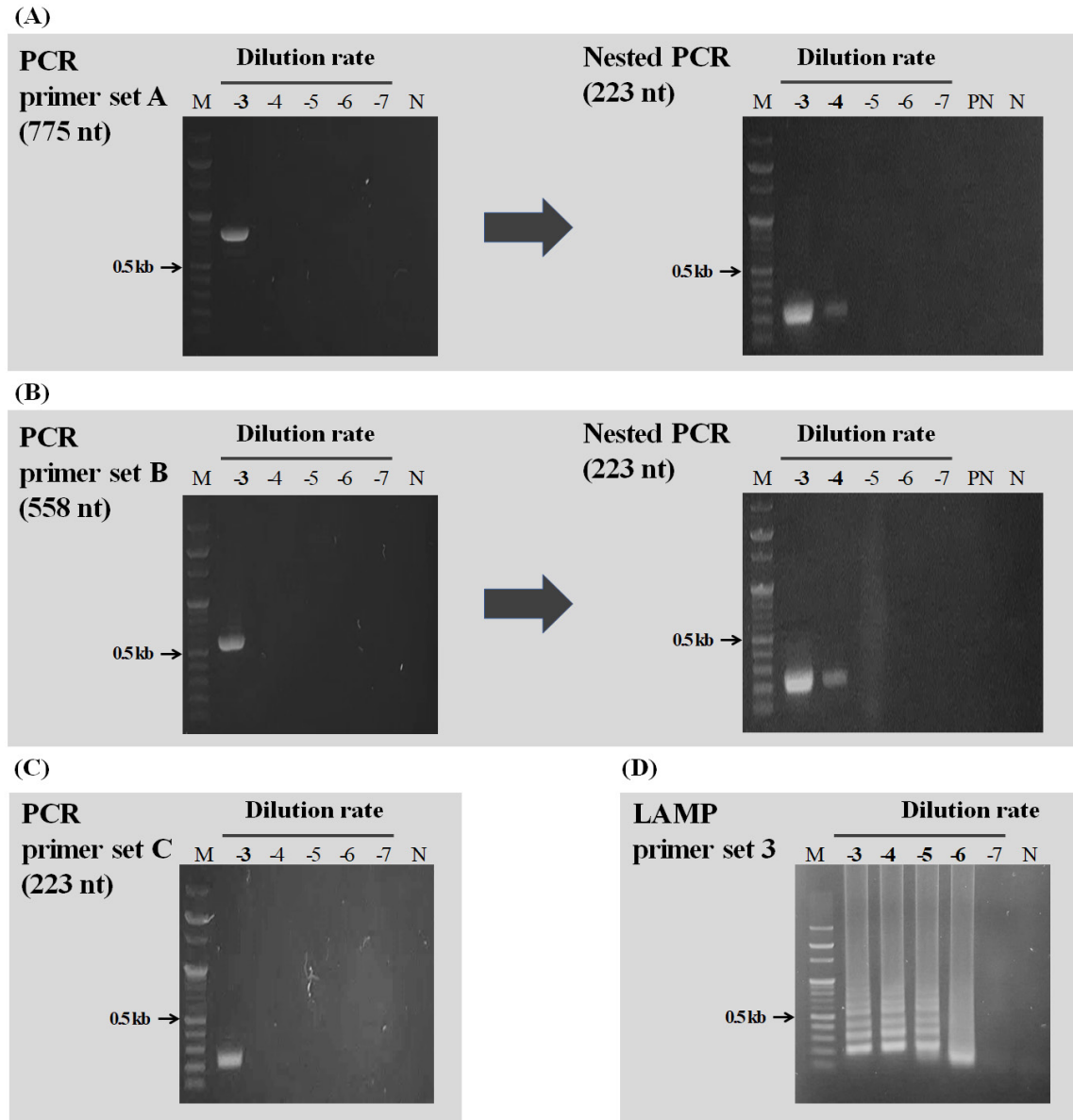
**Fig. 2.** Restriction results of human *Astrovirus* (HuAstV) loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for verifying positive reaction. M, 100 bp DNA Ladder marker (Enzynomics); 1, polymerase chain reaction (PCR) results of HuAstV LAMP outer primer; 2, restriction enzyme results of HuAstV LAMP outer primer PCR.



**Fig. 3.** Sample tests of human *Astrovirus* (HuAstV) loop-mediated isothermal amplification (LAMP). M, 100 bp DNA Ladder marker (enzynomics); P, positive control (HuAstV plasmid); N, negative control; Lane 1 - 20, groundwater samples; Dot (●), LAMP positive reaction samples.

### 검출민감도 비교실험

선발된 LAMP primer 조합과 outer primer PCR조합의 검출민감도 한계를 비교한 결과, outer primer PCR 조합A와 B의 경우, nested PCR이 희석배율  $10^{-4}$  ( $100 \text{ fg}/\mu\text{L}$ )으로 확인되었으며(Fig. 4A and 4B), 조합 C의 경우 희석배율  $10^{-3}$  ( $1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ )로 확인되었다(Fig. 4C). 반면 선발된 LAMP primer조합 3의 검출민감도 분석 결과 조합 3은 HuAstV의 plasmid 희석배율  $10^{-6}$  ( $1 \text{ fg}/\mu\text{L}$ )로 검출민감도가 분석(Fig. 4D)되어, PCR 반응보다 LAMP반응이 약 100 - 1000배 높게 나타나는 것을 확인하였다(Table 2).



**Fig. 4.** human *Astrovirus* (HuAstV) ensitivity test compare with outer primer conventional-nested polymerase chain reaction (PCR) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). (A) conventional and nested PCR results of HuAstV PCR set A. (B) conventional and nested PCR results of HuAstV PCR set B. (C) conventional and nested PCR results of HuAstV PCR set C. (D) LAMP results of HuAstV set 3. M, 100 bp DNA ladder marker (enzymomics); Lane -3 to -7, dilution rates of HuAstV plasmid (1ng/uL); N, negative; PN, PCR-negative.

### PCR 기술과 비교 및 활용성

Yang et al. (2014) 에 따르면, LAMP법을 이용하여 간수(reclaimed water)시료 12개 중 5개에서 HuAstV 양성이 나타났고, RT-PCR의 경우 4개에서 나타났다. 이것은 LAMP 기법이 PCR 양성 결과를 포함하였고, PCR에서 검출하지 못한 HuAstV를 검출할 수 있어 기존 PCR 기법에 비해 신속 및 높은 검출 민감도로 병원성 바이러스를 검출할 수 있는 예이다. 또한, Yang et al. (2014)에서 개발한 LAMP 방법은 *in vitro*에서 HuAstV를 약 36 copies/ $\mu$ L 수준으로 검출할 수 있었다. 본 연구에서 개발한 방법의 검출 민감도는 *in vitro*에서 합성한

plasmid (1,743 nt) 1 ng/ $\mu$ L를 기준으로 약 1 fg/ $\mu$ L 수준으로 검출이 가능하였다. 두 주형의 분자량은 약 3.84배 차이이므로 본 연구에서 사용한 주형 plasmid 1 fg/ $\mu$ L는 1 copy 단위로 환산하면 약 3.84 fg/ $\mu$ L이며, HuAstV (JN887820)를 기준으로 1 copy의 분자량인 약 2.07 fg/ $\mu$ L를 나누면 약 1.86 copies가 된다. 따라서 이번 연구에서 개발한 방법은 *in vitro*에서 약 2 copies/ $\mu$ L 수준으로, 기존 HuAstV 등온증폭법에 비해 약 20배 우수한 검출 민감도가 나타났다. Hong and Heo (2015)에 따르면, LAMP 기법은 기존 PCR에 비해 LAMP 기법이 약 100배 정도의 높은 민감도가 나타나는 것으로 보고되고 있으며, Lin et al. (2012)에 따르면, RT-qPCR에 비해 LAMP 기법이 10배 정도의 높은 민감도가 나타나는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서 개발한 방법은 기존 PCR 및 HuAstV용 등온증폭법(LAMP) 보다 신속 및 우수한 검출 민감도를 보였다. 또한, LAMP의 일반적 반응시간은 1 - 3시간이지만, Synergy Brands (SYBR)그린이나 hydroxynaphthol blue를 사용하여 시간을 단축할 수도 있다는 장점도 가지고 있다(Lee et al., 2019). 이것은 기존 RT-PCR 방법의 약 10시간 반응에 비해 약 8시간 수준 이상을 단축할 수 있어 검사자의 편리성 및 활용성이 높다는 장점이 있다. 또한 PCR은 고가의 thermocycler가 필요한 반면 LAMP 기법은 단일 온도에서 반응이 가능하다는 장점과 함께 현장 모니터링 기술로 활용성이 높다는 장점도 가지고 있다(Ha, 2018). 한편, 우리나라에서는 지하수를 생활, 공업 및 농업용수로 활용하고 있는데 농업용수의 경우 작물 외 농작물 세척에서 활용되고 있다. 미국 Centers for Disease Control and Prevention (CDC)에 따르면, 엽채류 32%, 과일 및 견과류 17%에서 노로바이러스 양성이 보고되었고(Eric et al., 2007; Gould et al., 2013), 농업용수 중 관개수 시료에서 RT-PCR 기술로 3.1% (3/96시료) 수준의 검출률이 보고된 바 있어(Wang, 2019), 국내 지하수 등 농업용수의 수인성 바이러스 오염에 대한 잠재적 가능성이 있을 것으로 보인다.

본 연구에서 개발한 LAMP 기법 및 검증시스템은 향후 농업 용수 등 지하수에서 신속 및 높은 검출 민감도로 HuAstV를 모니터링 할 수 있는 기술로 활용될 수 있을 것으로 전망된다.

## Conclusion

HuAstV의 신속, 특이적 진단을 위한 LAMP 방법을 구축하였다. 개발된 LAMP primer 조합의 반응온도는 62°C 검출민감도는  $10^{-6}$  (1 fg/ $\mu$ L)로 확인되며, 참고바이러스 10종과 비 특이적 반응을 보이지 않았다. 위양성 반응을 검증하기 위하여 제한효소 처리 시스템을 추가로 구축하였으며, *Hae*III (GG/CC) 제한효소를 통해 155 + 68 nt의 양성 제한효소 절편을 확인하였다(Lee and Rho, 2019). 지하수 시료 실증 실험 결과 20개 시료 중 5개의 시료에서 양성반응이 나왔으나, PCR 수준에서는 양성반응이 나오지 않았다. conventional-nested PCR과 검출 민감도를 비교하기 위하여 설계된 LAMP outer primer의 조합과 검출 민감도를 비교한 결과, 약 100 - 1000 배 높은 수준의 검출 민감도를 확인하였다. 본 연구에서 개발된 LAMP 기반 HuAstV 진단 시스템은 PCR 또는 real-time qPCR 보다 신속하고 높은 검출 민감도로 진단이 가능할 것으로 예상되며, 농업용수를 비롯한 다양한 수계환경에서 HuAstV의 검출이 가능할 것으로 예상된다.

## Acknowledgements

본 연구는 2019년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2017R1A2B1009303).



## Authors Information

Jin-Young Lee, <https://orcid.org/0000-0001-7736-2497>

Jae Young Rho, <https://orcid.org/0000-0002-2753-231X>

## References

- Brown DW, Gunning KB, Henry DM, Awdeh ZL, Brinker JP, Tzipori S, Herrmann JE. 2008. A DNA oligonucleotide microarray for detecting human *astrovirus* serotypes. *Journal of Virological Methods* 147:86-92.
- Cortez V, Meliopoulos VA, Karlsson EA, Hargest V, Johnson C, Schultz-Cherry S. 2017. *Astrovirus* biology and pathogenesis. *Annual Review of Virology* 4:327-348.
- Eric CM, Peter KC, Angela WLL, Ann HW, Wilina WLL. 2007. A typical *norovirus* epidemic in Hong Kong during summer of 2006 caused by a new genogroup II/4 variant. *Journal of Clinical Microbiology* 45:2205-2011.
- Finkbeiner SR, Holtz LR, Jiang Y, Rajendran P, Franz CJ, Zhao G, Kang G, Wang D. 2009. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel *astroviruses*. *Virology Journal* 6:161.
- Finkbeiner SR, Kirkwood CD, Wang D. 2008. Complete genome sequence of a highly divergent *astrovirus* isolated from a child with acute diarrhea. *Virology Journal* 5:117.
- Fong TT, Lipp EK. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69:357-371.
- Gould LH, Walsh KA, Vieira AR, Herman K, Williams IT, Hall AJ, Cole D. 2013. Surveillance for foodborne disease outbreaks United States, 1998-2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 62:1-34.
- Ha TH. 2018. The latest trend in isothermal amplification. *BioChip Letters* 13:10-14. [in Korean]
- Ham H, Oh S, Jang J, Jo S, Choi S, Pak S. 2014. Prevalence of human *astrovirus* in patients with acute gastroenteritis. *Clinical Microbiology* 34:145-147.
- Hong SH, Heo MS. 2015. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for Detection of *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Life Science* 25:903-909. [in Korean]
- Hwang B, Lee DY. 2014. Laboratory surveillance of viral acute gastroenteritis in Korea, 2013. *KCDC Public Health Weekly Report* 7:48:1065-1070. KCDC, Cheongju, Korea. [in Korean]
- Jiang H, Holtz LR, Bauer I, Franz CJ, Zhao G, Bodhidatta L, Shrestha SK, Kang G, Wang D. 2013. Comparison of novel MLB-clade, VA-clade and classic human *astroviruses* highlights constrained evolution of the classic human *astrovirus* nonstructural genes. *Virology* 436:8-14.
- Kang JH, Shim HM, Kim KY. 2016. Monitoring of *norovirus* and indicator microorganisms from agricultural products and environmental samples in Korea. *Korean Journal of Food Science and Technology* 49:123-131. [in Korean]
- Kim JS, Lee WJ, Lee SK, Lee EJ, Hyun J, Kim HS, Song W, Kim HS. 2019. Molecular epidemiology of human *astrovirus* in stool samples from patients with acute gastroenteritis in Korea, 2013-2017. *Clinical Microbiology* 39:367-372.
- Lee JY, Kim JH, Rho JY. 2019. Development of rapid and specific detection for the human *Aichivirus* A using the loop-mediated isothermal amplification from water samples. *Indian Journal of Microbiology* 59:375-378.
- Lee JY, Rho JY. 2019. Primer set for loop-mediated isothermal amplification reaction for detecting *Human Astrovirus*, and use thereof. *Korean Patent* 10-2019-0131633. [in Korean]
- Lin Z, Zhang Y, Zhang H, Zhou Y, Cao J, Zhou J. 2012. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR method targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Veterinary Parasitology* 185:296-300.
- Madeley CR, Cosgrove BP. 1975. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2:451-452.
- NIER (National Institute of Environmental Research). 2017. National Institute of Environmental Research Notice No. 2017-50. NIER, Incheon, Korea. [in Korean]
- Phan TG, Nguyen TA, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S,

- Ushijima H. 2005a. Viral diarrhea in Japanese children: Results from a oneyear epidemiologic study. *Clinical Laboratory* 51:183-191.
- Phan TG, Nguyen TA, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, Ushijima H. 2005b. Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: Virus diversity and genetic analysis of *sapovirus*. *Archives of Virology* 150:1415-1424.
- Suleman E, Mtshali MS, Lane E. 2016. Investigation of false positives associated with loop-mediated isothermal amplification assays for detection of *Toxoplasma gondii* in archived tissue samples of captive felids. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 28:536-542.
- Tang Y, Ismail MM, Saif YM. 2005. Development of antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR for detection of turkey *astroviruses*. *Avian Diseases* 49:182-188.
- Thongprachum A, Khamrin P, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. 2015. Epidemiology of gastroenteritis viruses in Japan: Prevalence, seasonality, and outbreak. *Journal of Medical Virology* 88:551-570.
- Wang JG. 2019. Influence of environmental and weather factors on seasonal surveillance of foodborne virus in irrigation water in Gyeonggi province. Master dissertation, Chungang Univ., Seoul, Korea.
- Yang BY, Liu XL, Wei YM, Wang JQ, He XQ, Jin Y, Wang ZJ. 2014. Rapid and sensitive detection of human *astrovirus* in water samples by loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *BMC Microbiology* 14:38.