

PLANT&FOREST

Development of a diagnostic method for human enteric *Adenovirus-41* with rapid, specific and high sensitivity using the loop-mediated isothermal amplification assay

Jin-Young Lee, Jae Young Rho*

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

*Corresponding author: jyrho@dankook.ac.kr

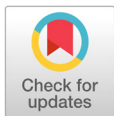
Abstract

Human enteric *Adenovirus 41* (HueAdV-41) is a major waterborne virus that causes human gastroenteritis and is classified as a viral group I double-strand DNA virus, *Adenoviridae*. HueAdV-41 has been detected with the polymerase chain reaction (PCR) in various samples such as ground water. However, the PCR-based diagnostic method has problems such as reaction time, sensitivity, and specificity. Thus, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay has emerged as an excellent method for field applications. In this study, we developed a LAMP system that can rapidly detect HueAdV-41 with high specificity and sensitivity. HueAdV-41 specific LAMP primer sets were tested through a specific, non-specific selection and sensitivity test for three prepared LAMP primer sets, of which only one primer set and optimum reaction temperature were selected. The developed LAMP primer set condition was confirmed as 63°C, and the sensitivity was 1 copy. In addition, to confirm the system, a LAMP positive reaction was developed with the restriction enzyme *Taq I* (T/GCC). The developed method in this study was more specific, rapid (typically within 2 - 3 hours), and highly sensitive than that of the conventional PCR method. To evaluate and verify the developed LAMP assay, an artificial infection test was done with five cDNAs from groundwater samples, and the results were compared to those of the conventional PCR method. We expect the developed LAMP primer set will be used to diagnose HueAdV-41 from various samples.

Keywords: *Adenovirus-41*, human enteric *Adenovirus*, loop-mediated isothermal amplification (LAMP), water sample

Introduction

Human enteric *Adenovirus 41* (HueAdV-41)는 Group I, dsDNA로 *Adenoviridae*과 *Mastadenovirus* 속에 속하는 인체 병원성 장바이러스이다(Ziros et al., 2015). 혈청형에 따라 A부터 G까지 분류가 되며(Ferreyra et al., 2015), 증상은 호흡기 감염, 급성 결막염, 방광염, 위장염, 전신감염을 포함한 다양한 임상적 증후가 나타난다(Berk, 2013; Wiczorek et al., 2015). HueAdV의 유전형 중 40과 41은 주로 급성 위장관염을 일으키는 것으로 알려져 있으며(Raboni et al., 2014), 주로 5세



OPEN ACCESS

Citation: Lee JY, Rho JY. 2020. Development of a diagnostic method for human enteric *Adenovirus-41* with rapid, specific and high sensitivity using the loop-mediated isothermal amplification assay. Korean Journal of Agricultural Science 47:673-681. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20200055>

Received: January 08, 2020

Revised: August 14, 2020

Accepted: August 24, 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.

이하의 영유아에게 감염되는 것으로 알려져 있다(Filho et al., 2007). 전세계 급성 위장관염 중 20%가 HueAdV 혈청형 40 및 41에 의해서 나타나는 것으로 보고되었다(Reis et al., 2016). 국내에서도 2014년부터 2016년까지 전체 장염 환자 중 6.5%가 아데노바이러스 감염으로 보고되었으며, 그중 60%가 혈청형 41로 보고되는 등 HueAdV-41가 지속적으로 보고되고 있다(Kim et al., 2014; Kim et al., 2017). HueAdV-41 이 주로 검출되는 시료는 임상시료를 비롯하여, 식품 및 먹는 물, 농업용수 등의 수계 환경에서 보고되고 있다(Cheong et al., 2009; Banerjee et al., 2017). HueAdV-41의 검사방법으로는 주로 PCR (polymerase chain reaction) 방법과(Echavarría et al., 1998; Allard et al., 2001; Cho, 2018) real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)이(Choi and Jiang, 2005; Jothikumar et al., 2005) 사용되고 있다. PCR 방법은 특정 표적 유전물질을 단시간에 대량으로 증폭할 수 있어 전염병, 유전질환 등을 진단할 수 있는 방법으로 널리 사용되고 있다(Ha, 2018). RT-qPCR의 경우 실시간 검출 모니터링이 가능하고, 특이도와 검출민감도가 높아 활용성이 높지만, 염기서열 분석이 어렵고 PCR방법보다 고도의 기술을 요구하며, 경제적 부담이 크다는 단점이 있다(Cho, 2018; Ha, 2018). 때문에 이러한 기술들의 단점을 보완하는 LAMP (loop-mediated isothermal amplification)방법이 대안으로 떠올랐다(Lee et al., 2019). LAMP 방법은 DNA가닥 중 6개 부분을 선택하여 4개의 primer가 1개 set로 stem-loop 구조를 만들어 사슬 치환반응을 통해 DNA를 증폭하는 방법이다(Notomi et al., 2000). exonuclease 기능을 가지고 있는 *Bacillus stearothermophilus* (*Bst.*) Polymerase를 사용함으로써 DNA 이중나선 구조의 변성이 가능하여 단일 온도에서 표적 유전물질의 증폭이 가능하며, 민감도는 PCR 보다 동등 또는 10 - 100배 더 높게 나타나는 것이 특징이다(Hong et al., 2015). 이러한 장점들로 인해 PCR에서 구현하기 어려운 현장진단에 용이한 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2019; Lee and Rho, 2020). 또한 Schneider et al. (2019)에 의하면 LAMP 기법은 모니터링 기술로는 뛰어나지만 위양성(false positive) 반응이 나타날 수도 있어 양성을 확정하기 위한 판정에 단점을 가지고 있다. 이러한 단점은 제한효소를 활용한 양성시료(positive samples) 검증 시스템 장착으로 보완이 가능하다(Lee et al., 2019). 따라서 본 연구에서는 LAMP 기법을 활용하여 HueAdV-41를 특이적으로, 신속 정확하게 모니터링하기 위한 LAMP 방법 및 제한효소를 활용한 양성시료 검증 방법을 개발하였다.

Materials and Methods

HueAdV-41 특이적 LAMP primer 설계 및 핵산수집

대상 바이러스인 HueAdV-41의 특이적인 LAMP primer 설계를 하기 위해, 미국 국립생물정보센터(NCBI; National Center for Biotechnology Information)에서 대상바이러스(HueAdV-41), 분류학적으로 유사한 바이러스(HueAdV-40, HueAdV-52) 및 16종의 수인성 바이러스 염기서열을 수집하였다. 수집한 19종의 염기서열은 primerExplorer (<http://primerexplorer.jp/e/index.html>) 프로그램을 이용하여 HueAdV-41 특이적인 LAMP primer를 설계하였다. LAMP반응을 확인하기 위해, HueAdV-41의 핵산(AMPLIRUN® ADENOVIRUS 41 DNA CONTROL MBC001 [Vircell, Granada, Spain]) 및 참고바이러스 9종(*Sapovirus*, *Hepatitis A virus*, *Aichivirus-A*, *Rotavirus*, *Parvovirus*, *Coxsackievirus*, *Enterovirus*, *Norovirus*, *Echovirus*)의 핵산을 수집하였다. 또한 바이러스가 미량오염 또는 음성이 예상되는 지하수 시료 20개의 총 핵산(DNA)을 수집하였다(NIER, 2017).

HueAdV-41 LAMP primer 조합 선발

HueAdV-41 특이적인 LAMP primer 선발을 위하여, 다음과 같은 기준으로 LAMP 반응을 진행하였다. 1) HueAdV-41 DNA를 주형으로 LAMP 반응이 나타나는 조합을 1차로 선발하였고, 2) 1차 선발된 primer 조합들을 대상

으로 HueAdV-41 DNA 외에 참고바이러스에서 비특이적 반응을 보이는 LAMP primer 조합을 제외하는 2차 선별을 진행하였다. 3) 2차 선별된 primer 조합들 중 검출 민감도가 가장 높은 LAMP primer 조합을 최종적으로 선별하였다.

양성반응의 검증 시스템

최종적으로 선별된 LAMP primer의 반응을 검증하기 위하여, LAMP outer primer (F3, B3)을 이용한 PCR 산물의 제한효소 처리를 수행하였다. PCR 조성은 20 μ L를 기준으로, Hotstart RT-PCR premix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였으며, DNA template (HueAdV-41 DNA) 1 μ L, F3, B3 primer 1 μ L (10 pmole), 멸균3차 증류수 17 μ L로 반응하였다. 온도 조건은 94°C 5분 초기 변성 후 35 반복으로 94°C 30초, 63°C 30초, 72°C 45초 증폭 후 최종적으로 72°C에서 3분간 반응하였다. PCR 산물은 전기영동을 통해 확인하였고, 제한효소 Taq I (T/GCA) (10 units)를 37°C에서 2시간 동안 PCR 산물과 반응하여 제한효소 절편을 확인하였다.

지하수 시료 실증실험

개발한 검사법을 시료에서 검증하기 위해 수도꼭지를 통해 공급되는 지하수 시료 20점을 무작위로 채취하였다. 시료의 채취, 탈리 및 농축, 핵산추출 과정은 국립환경과학원에 기재된 노로바이러스 시료 채취방법을 기준으로 수행하였다. 나노세라믹 필터를 연결한 하우징에 500 L의 지하수 원수를 흘려 실험실로 이동하였다. 소고기 추출(beef extract) 완충액을 사용하여 탈리 및 원심분리방법으로 농축하였고, 최종적으로 0.22 μ M 필터에 여과하였다. 바이러스의 핵산 추출은 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 제품을 사용하며 제공된 프로토콜에 따라 수행하였다. PCR과의 민감도 비교를 위하여, Cho (2018)에서 보고된 primer 조합을 사용하여 민감도를 비교하였다.

Results and Discussion

HueAdV-41 특이적 primer 선별

HueAdV-41 특이적 primer 12개(F3, B3, FIP, BIP primer 각각 3개씩)가 설계되었으며, 303 - 396 nt 증폭이 가능한 3개 set를 구성하였다(Table 1). 이 3개의 set을 이용하여 HueAdV-41 특이적 LAMP 반응을 수행한 결과 set 3은 negative 반응이 확인되었고, set 2에서만 최적 온도 63°C로 특이적 반응이 확인되었다(Fig. 1A). 1차 선별된 set 2를 대상으로 HueAdV-41와 참고 수인성 바이러스 9종의 비특이적 분석을 수행한 결과, 양성대조군으로 사용한 HueAdV-41 DNA를 제외하고 음성대조군을 포함하여 비특이적 현상이 확인되지 않아 HueAdV-41 특이적인 LAMP 반응을 확인하였다(Fig. 1B). 특이적 및 비특이적 반응을 고려하여 LAMP set 2를 선정하였으며, set 2는 HueAdV-41 희석배율 10^{-3} (1 copy) 까지 검출민감도가 확인(Fig. 1C) 되어 HueAdV-41의 특이적 진단에 적합한 LAMP primer 조합으로 선별되었다.

양성반응의 검증

LAMP의 단점으로 나타나는 위양성을 구분하고, LAMP 특이적 반응을 검증하기 위하여, 특이적, 비특이적, 검출민감도 반응 후 최종적으로 선별된 HueAdV-41 LAMP set 2의 outer primer (F3, B3) (10 pmole) primer를 이용하여 outer primer PCR 반응을 진행한 결과, 310 nt의 PCR 증폭이 확인되었으며(data not shown), 제한효소 Taq I (T/CGA) (10 units)를 사용하여 37°C, 2 시간동안 반응 후 전기 영동으로 확인한 결과 108 + 202 nt의 제한효소 절편이 확인되었다(Fig. 2).

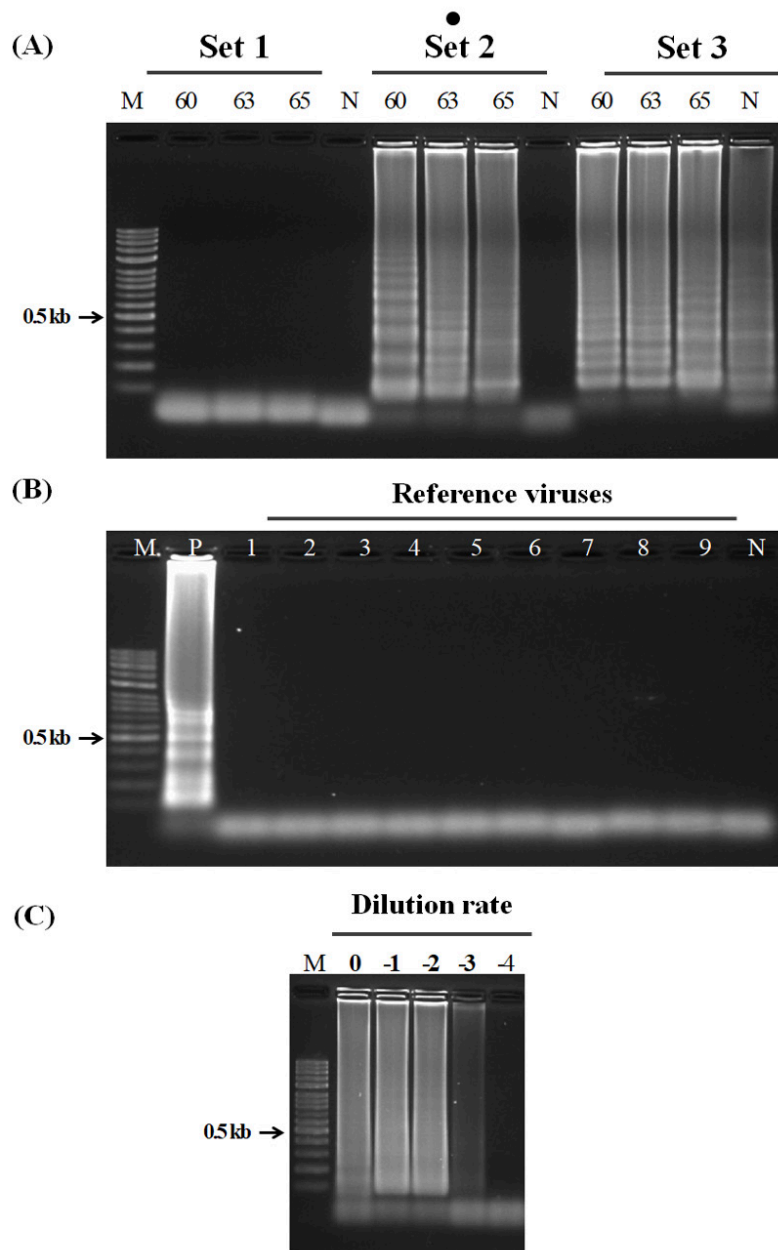


Fig. 1. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction results of human enteric *Adenovirus* (HueAdV)-41. (A) Specific test of HueAdV-41. M, 100 bp DNA Ladder marker (Enzymomics); 60,63,65, LAMP reaction temperature; Set 1 - 3, LAMP primer set; N, negative control; dot (●), finally selected LAMP primer set. (B) non-Specific test of HueAdV-41. M, 100 bp DNA Ladder marker (Enzymomics); P, HueAdV-41 DNA (100 copies); N, negative control; 1, *Sapovirus*; 2, *Hepatitis A virus*; 3, *Aichivirus-A*; 4, *Rotavirus-A*; 5, *Parvovirus B19*; 6, *CoxsackieVirus*; 7, *Enterovirus*; 8, *Norovirus GI & GII*; 9, *Echovirus*. (C) Dillution test of HueAdV-41. M, 100 bp DNA Ladder marker (enzynomics); 0 to -4, dilution rates of HueAdV-41 DNA (1000 to 1 copies); N, negative control.

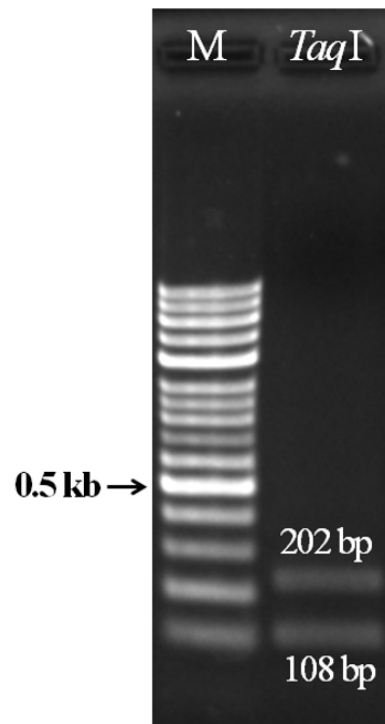


Fig. 2. Restriction results of human enteric *Adenovirus* (HueAdV)-41 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for verifying positive reaction. M, 100 bp DNA ladder marker (Enzynomics); *TaqI*, restriction enzyme results of HueAdV-41 LAMP outer primer polymerase chain reaction (PCR).

Table 1. Lists of developed human enteric *Adenovirus* (HueAdV)-41 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primer sets.

Primer			Sequence	Length (mer)	Product size (nt)
Set	Location	Name			
1	Outer	HueAdV1-F3	TTTCACCTACTCTGGCTC	18	303
		HueAdV1-B3	TGGAAGTTTCGGAAAAAGG	19	
	Inner	HueAdV1-FIP	GCTCACAGAGGAGTCGAACACGTCCCATACTTGGATGG	39	
		HueAdV1-BIP	TACAACGTGGCTCAATGTAACATGAGAAACCCTGGTAGCCAAT	43	
2	Outer	HueAdV2-F3	CGCCATTAATAATCTCCTGC	20	310
		HueAdV2-B3	TCGCGAAGGAATAGAAATGG	20	
	Inner	HueAdV2-FIP	ACCTGACGCTGGCTCCATGAGTGGAACCTCCGGAAGGA	38	
		HueAdV2-BIP	CCCATGGCTCACAACACCGAGCGCAGAGGTAGTCGTT	37	
3 ^z	Outer	HueAdV3-F3	ACTATTTGGGAGGGGAGG	20	396
		HueAdV3-B3	CCTTGCCAAGACCTTCAAAA	19	
	Inner	HueAdV3-FIP	AATTCCTCCACCGTCAGCGGCGACAGAGCACCATTGT	42	
		HueAdV2-BIP	CAAGAACCAACGCATTCCTGAAACGATCTCAGGTATGTGAGC	44	

^z Finally selected LAMP primer set.

지하수 시료 실증실험

지하수 시료에서 HueAdV-41의 분석 결과 양성대조군을 제외한 모든 실험군에서 LAMP 반응이 확인되지 않았다 (Fig. 3A). HueAdV-41 DNA (100 copies)를 지하수 DNA 시료에 1/10으로 희석하여 인위감염 후, LAMP 실험을 진행한 결과, 5개 지하수 시료 중 4개 시료에서 LAMP 반응이 확인되었다(Fig. 4A). LAMP 반응이 확인되지 않은 시료 1개에 대해 70, 50, 25, 10 copies로 조절하여 희석 후, LAMP 반응을 진행한 결과 50 copies까지 LAMP 반응이 확인되었다 (Fig. 4A). 인위감염 시료를 기존에 보고된 HueAdV-41 nested-PCR과 비교한 결과, 양성대조군을 포함한 시료 2개에서 PCR 반응이 확인되었다(Fig. 4B).

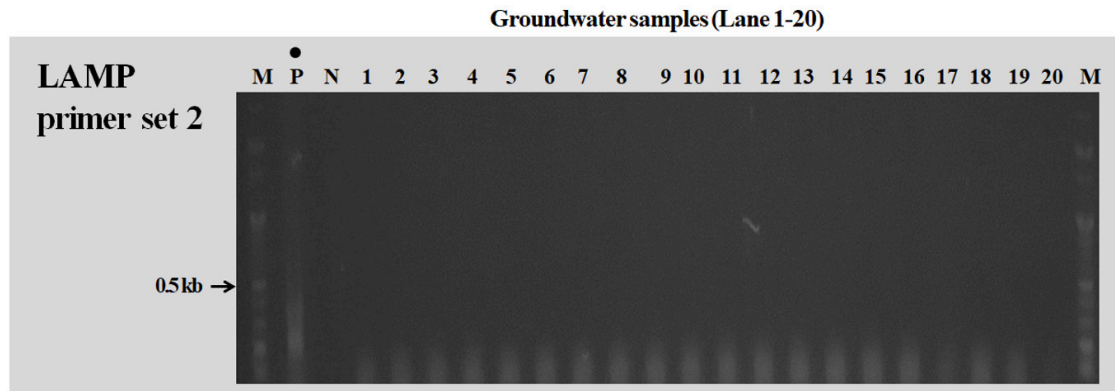


Fig. 3. Sample tests of human enteric *Adenovirus* (HueAdV)-41 loop-mediated isothermal amplification (LAMP). M, 100 bp DNA Ladder marker (Enzynomics); P, positive control, HueAdV-41 DNA (100 copies); N, negative control; Lane 1 - 20, groundwater samples.

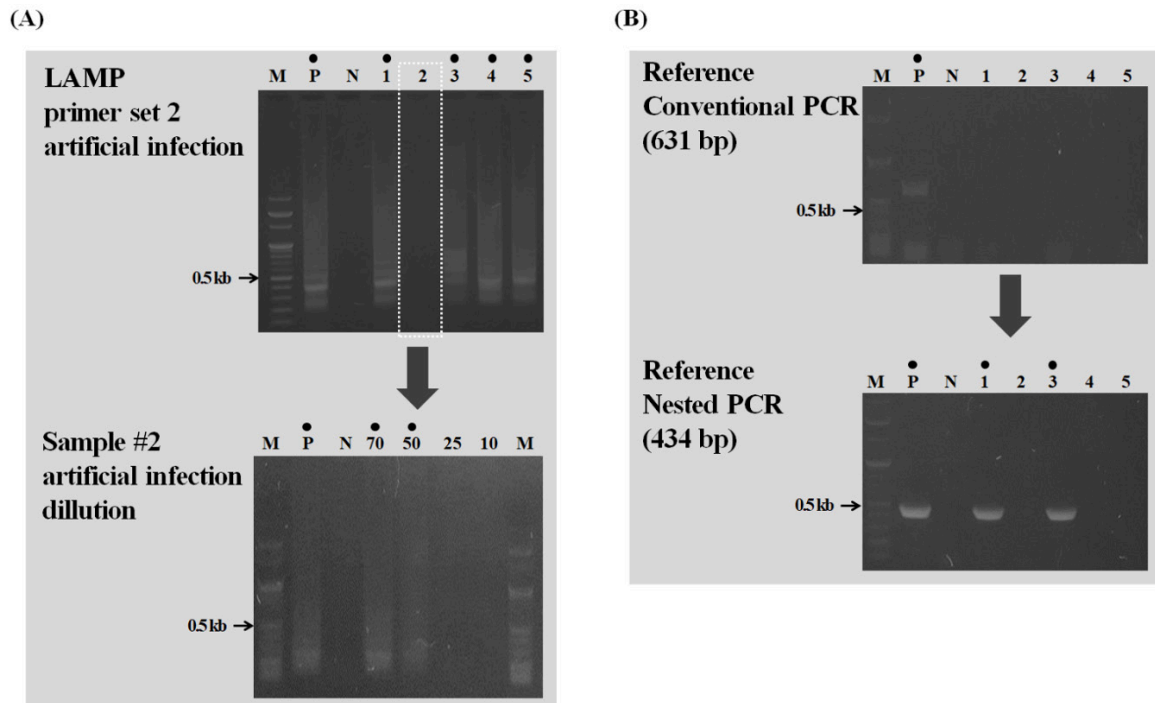


Fig. 4. Compare test of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and polymerase chain reaction (PCR) with artificial infection samples of human enteric *Adenovirus* (HueAdV)-41. (A) LAMP test of HueAdV-41 artificial infection samples. M, 100 bp DNA Ladder marker (Enzynomics); P, positive control, HueAdV-41 DNA (100 copies); N, negative control; Lane 1 - 5, ground water samples; Lane 70 - 10, dilution copy numbers of HueAdV-41 artificial infection samples. (B) PCR test of HueAdV-41 artificial infection samples. M, 100 bp DNA Ladder marker (Enzynomics); P, Positive control, HueAdV-41 DNA (100 copies); N, negative control; Lane 1 - 5, ground water samples; Dot (●), LAMP positive reaction samples.

PCR 및 기존에 보고된 LAMP 기술과의 비교 및 활용성

Ziros et al. (2015) 에 따르면, LAMP 기법을 이용하여 50 - 100 copies 하수 시료 28개 시료 중 15개 시료에서 양성 이 나타났으나, 이는 하수 시료에 포함된 바이러스 비율이 높기 때문인 것으로 추정된다. 반면 본 연구에서 구축 된 LAMP 기법은 순수한 DNA상태로 1 copies까지 양성반응이 나타나며, 지하수 시료 인위감염 실험 결과 10 - 50 copies까지 양성 반응이 나타나, 기존의 HueAdV-41용 등온증폭법 보다 우수한 검출 민감도를 보였다. PCR과 비교 하기 위하여 Cho (2018)에서 보고된 HueAdV-41 primer set와 지하수 시료 인위감염 비교실험 결과, LAMP 반응에서 는 5개 시료 중 4개 시료에서 양성반응, PCR은 5개 시료 중 2개 시료에서 양성반응이 확인되었다. 환경시료의 경우 시료내 존재하는 PCR 반응 저해물질 등으로 인해 특이도 및 검출 민감도에 변화가 있을 수도 있다고 보고되어 있 다(Cho, 2018). 또한 LAMP 반응과 PCR 반응의 차이는 LAMP 반응이 PCR 반응보다 검출 민감도가 높게 나타나기 때문으로 보이며, Hong et al. (2015)에 따르면, 기존 PCR에 비해 LAMP 기법이 약 100배 정도 높은 민감도를 나타내 는 것으로 보고되고 있다. LAMP의 일반적 반응 시간은 1 - 3 시간으로, PCR에 소모되는 약 10 시간의 반응에 비해 약 8 시간 수준 이상을 단축할 수 있고, 단일온도에서 반응이 가능 및 현장 모니터링 기술로 활용성이 높다는 장점 을 가지고 있다(Ha, 2018). 한편, 식품 중 야채, 과일들은 다양한 장바이러스에 감염될 수 있으며, 이들의 감염 경로 는 농업용수, 분변 등의 오염 등으로 나타날 수 있다(Papafraqkou et al., 2008). 이에따라 농업용수 및 야채, 과일등에 서 장바이러스의 모니터링을 RT-PCR로 진행한 결과 29시료중 5개 시료에서 양성 반응이 확인되었으며, 그중 2개 의 양성시료가 염기서열 분석 결과 HueAdV의 subgenus F 양성반응이 확인되었다(Cheong et al., 2009). 농업용수의 수질은 사용되는 물의 종류에 따라 다르며, 현재 국내에서 농업용수에 관한 미생물학 검사는 세균 검사만 이뤄진 다고 보고되었다(Steele and Odumeru, 2004). 하지만, 농업용수로 사용되는 지하수 시료에서 장바이러스의 검출 보 고가 지속됨에 따라(Steele and Odumeru, 2004; Cheong et al., 2009; Cho, 2018), 국내 지하수 등 농업용수에 장바이러 스 오염에 대한 잠재적 가능성이 있을 것으로 보인다.

본 연구에서 개발한 LAMP 기법 및 위 양성 검증 시스템을 향후 농업용수를 비롯한 수계 환경에서 높은 검출 민 감도와 신속한 진단으로 HueAdV-41를 모니터링 할 수 있는 기술로 활용될 수 있을 것으로 전망된다.

Conclusion

HueAdV-41을 신속, 특이적으로 진단하기 위한 LAMP 방법을 구축하였다. 개발된 LAMP primer는 반응온도 63°C, 검출민감도는 1 copy 수준으로 확인되며, 참고바이러스 9종과 비 특이적 반응을 보이지 않았다. 위양성 반 응을 확인하기 위한 제한효소 처리 시스템을 추가로 구축하였으며, *Taq I* (T/GCC) 제한효소를 통해 108 + 202 nt의 양성 제한효소 절편을 확인하였다(Lee and Rho, 2018). 인위감염 실증 실험 결과 5개중 4개의 시료에서 양성반응이 나왔으며, 음성반응이 나오지 않은 1개 시료는 50 copies에서 LAMP 양성반응이 확인되었다. 본 연구에서 개발한 LAMP 기반 진단 시스템은 PCR 또는 real-time qPCR 보다 신속하게 진단이 가능하고, 높은 검출 민감도를 가지며, 식품, 임상 및 환경 등 다양한 시료에서 HueAdV-41의 검출이 가능할 것으로 예상된다.

Acknowledgement

본 연구는 2019년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2017R 1A2B1009303).

Authors Information

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

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

References

- Allard A, Albinsson B, Wadell G. 2001. Rapid typing of human *adenoviruses* by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 39:498-505.
- Banerjee A, De P, Manna B, Chawla-sarkar M. 2017. Molecular characterization of enteric *adenovirus* genotypes 40 and 41 identified in children with acute gastroenteritis in Kolkata, India during 2013-2014. *Journal of Medical Virology* 89:606-614.
- Berk AJ. 2013. *Adenoviridae*. In *Fields virology* (6th) edited by Knipe DM, Howley PM. pp. 1704-1731. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
- Cheong S, Lee C, Song SW, Choi WC, Lee CH, Kim SJ. 2009. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Applied and Environmental Microbiology* 75:7745-7751.
- Cho KB. 2018. Construction of improved PCR primer set for the detection of human enteric *adenovirus* 41. *Biomedical Science Letters* 24:230-238. [in Korean]
- Choi S, Jiang SC. 2005. Real-Time PCR quantification of human *adenovirus* in urban rivers indicates genome prevalence but Low Infectivity. *Applied and Environmental Microbiology* 71:7426-7433.
- Echavarría M, Forman M, Ticehurst J, Dumler JS, Charache P. 1998. PCR method for detection of *adenovirus* in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals. *Journal of Clinical Microbiology* 36:3323-3326.
- Ferreira LJ, Giordano MO, Martínez LC, Barril PA, Masachessi G, Isa MB, Poma R, Rajal V, Biganzoli P, Nates SV, Pavan JV. 2015. Tracking novel *adenovirus* in environmental and human clinical samples: No evidence of endemic human *adenovirus* type 58 circulation in Córdoba city, Argentina. *Epidemiology Infect* 28:1-5.
- Filho EP, da Costa Faria NR, Fialho AM, de Assis RS, Almeida MMS, Rocha M, Galvao M, dos Santos FB, Barreto ML, Leite JPG. 2007. *Adenoviruses* associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 56:313-319.
- Ha TH. 2018. The latest trend in isothermal amplification. *BioChip Letters* 13:10-14. [in Korean]
- 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]
- Jothikumar N, Cromeans TL, Hill VR, Lu X, Sobesey M, Erdman D. 2005. Quantitative real-time PCR assays for detection of human *adenoviruses* and identification of serotypes 40 and 41. *Applied and Environmental Microbiology* 71:3131-3136.
- Kim J, Kim HS, Kim HS, Kim JS, Song W, Lee KM, Lee S, Park KU, Lee W, Hong YJ. 2014. Evaluation of an immunochromatographic assay for the rapid and simultaneous detection of rotavirus and *adenovirus* in stool samples. *Annals of Laboratory Medicine* 34:216-222.
- Kim JS, Lee SK, Ko DH, Hyun J, Kim HS, Song W, Kim HS. 2017. Associations of *adenovirus* genotypes in Korean acute gastroenteritis patients with respiratory symptoms and intussusception. *BioMed Research International* 2017:1-6.
- 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. 2018. Primer set for loop-mediated isothermal amplification reaction for detecting human enteric *adenovirus* 41, and use thereof. Korean Patent 10-2018-0173040. [in Korean]
- 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. [in Korean]

- NIER (National Institute of Environmental Research). 2017. National institute of environmental research notice No. 2017-50. NIER, Incheon, Korea. [in Korean]
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yoneawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28:e63.
- Papafraqkou E, Plante M, Mattison K, Bidawid S, Karthikeyan K, Farber JM, Jaykus LA. 2008. Rapid and sensitive detection of *hepatitis A virus* in representative food matrices. *Journal of Virological Methods* 147:177-187.
- Raboni SM, Damasio GA, Ferreira CEO, Pereira LA, Nogueira MB, Vidal LR, Cruz CR, Almeida SM. 2014. Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: Aetiology, seasonality and clinical outcomes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 109:428-435.
- Reis TAV, Assis ASF, do Valle DA, Barletta VH, de Carvalho IP, Rose TL, Portes SAR, Leite JPG, Silva MLR. 2016. The role of human *adenoviruses* type 41 in acute diarrheal disease in Minas Gerais after rotavirus vaccination. *Brazilian Journal of Microbiology* 47:243-250.
- Schneider L, Blakely H, Tripathi A. 2019. Mathematical model to reduce loop mediated isothermal amplification (LAMP) false - positive diagnosis. *Electrophoresis* 40:2706-2717.
- Steele M, Odumeru J. 2004. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *Journal of Food Protection* 67:2839-2849.
- Wieczorek M, Krzysztozek A, Witek A. 2015. Species-specific identification of human *adenoviruses* in sewage. *Polish Journal of Microbiology* 64:23-28.
- Ziros PG, Kokkinos PA, Allard A, Vantarakis A. 2015. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *adenovirus* 40 and 41. *Food and Environmental Virology* 7:276-285.