pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 30, No. 2, pp. 150~158 (2015)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2015.30.2.150

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

다양한 매트릭스가 혼합된 식품을 대상으로 노로바이러스 신속검출을 위한 탈리 및 농축방법 확립

안재현 · 권영우 · 이정수[1] · 최원상*
동국대학교 생명공학과, [1]식품의약품안전평가원 미생물과

Establishment of Elution and Concentration Procedure for Rapid and Sensitive Detection of Norovirus in Foods of Diverse Matrices

Jaehyun Ahn, Youngwoo Kwon, Jeong-Su Lee[1], and Weon Sang Choi*
Department of Biotechnology, Dongguk University-Gyeongju
[1]Microbiology Division, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation
(Received January 23, 2015/Revised March 4, 2015/Accepted April 17, 2015)

ABSTRACT - This article reports the development of an effective test procedure for detection of norovirus (NoV) in foods of diverse matrices. In this study, target foods included fermented milk, soybean paste, powders made from uncooked grains and vegetables, sesame leaves preserved in soy sauce, pickled mooli, and mooli. Viral recovery varied depending on the food matrices or elution buffers tested. Buffers were compared to determine effective elution buffers from artificially virus-contaminated foods. The conventional test procedure for concentrating viruses from food (elution-polyethylene glycol(PEG) precipitation-chloroform-PEG precipitation) was modified to save time by eliminating one PEG precipitation step. The modified procedure (elution-chloroform-PEG precipitation) was able to concentrate viruses more effectively than the conventional procedure. It also removed RT-PCR inhibitors effectively. The modified procedure was applied to target food for genogroup II NoV detection. NoV RNA was detected at the initial inoculum levels 3.125-12.5 RT-PCR units per 10-25 g tested food. The use of this newly established procedure should facilitate detection of low levels of norovirus in diverse foods.

Key words: norovirus, detection procedure, food matrix, RT-PCR

노로바이러스는 사람의 장염을 유발하는 바이러스로 비세균성 장염의 주요 원인체이다. 노로바이러스는 연중 높은 비율로 보고가 되고 있으나 특히 기온이 낮은 겨울에 더 높은 빈도로 발생한다. 일반적으로 1-3일간 설사, 메스꺼움, 구토, 복통 등을 동반하는 급성장염으로 그치는 경우가 많으나, 면역력이 약한 노인이나 어린이에게는 치명적일 수도 있다. 미국의 경우 매년 약 2,300만명이 감염되고 전체 식중독에서 차지하는 비율은 최소한 32-42%로 추정된다[1]. 유럽의 경우도 1995년부터 2000년 사이에 발생한 바이러스성 급성장염 중 85% 이상이 노로바이러스에 의한 것으로 밝혀졌다[2]. 우리나라의 경우도 최근 5년간(2008년-2012년) 총 1,368건 중 213건으로 15.6%를 차지했고[3] 같은 기간 전체 식중독 중 원인물질이 규명되지 않은 43.8% 중 약 절반은 노로바이러스에 의한 것으로 추정된다.

노로바이러스에 의한 식중독은 오염된 식품이나, 물이 원인이 되며, 감염된 환자와의 접촉 등의 경로를 통해 전파된다. 모든 연령층에 감염이 가능하고 감염성이 매우 높아(10-100 바이러스 입자만으로도 감염이 가능) 학교, 요양소, 병원, 기숙사, 감옥, 유람선 등에서 집단으로 급격히 전파되는 특징이 있다[4,5]. 전체 환자 중 오염된 식품이 차지하는 비중은 알려진 바가 없으나[5] 다만 미국의 경우 최근 10년간 발생한 노로바이러스에 의한 outbreak을 분석한 결과 식품 중에는 엽채류가 32%로 원인 식품 중 가장 많은 발생 원인이었고, 다음으로 과일/견과류 17%, 패류 13%로 밝혀진 바 있다[6]. 발효식품이나 가공식품의 경우 상대적으로 안전할 것으로 판단되었으나 최근 몇 차례 학교급식 식중독 사고의 원인식품이 김치로 밝혀짐에 따라 해산물과 야채/과일 외에도 가열처리가 동반되지 않는 다

*Correspondence to: Weon Sang Choi, Department of Biotechnology, Dongguk University-Gyeongju, Gyeongju 780-714, Korea
Tel: 82-54-770-2227, Fax: 82-54-770-2386
E-mail: weonsang@dongguk.ac.kr

양한 식품들이 모두 원인이 될 수 있을 것으로 보인다.

현재까지 굴 등의 해산물[7-10], 채소류[11-18], 과일류[15,19,20,21] 외 다양한 식품[15,16,22-24]에서 오염된 바이러스를 검출하는 방법이 개발된 바 있으나 식품마다 매트릭스(matrix)가 달라 한 가지 방법으로 이를 효율적으로 검출할 수 있는 표준화된 검사법은 아직 없다. 일단 바이러스가 식품의 표면에서 건조되거나 흡수된 경우 효과적인 검출에 대한 가장 중요한 요인은 오염된 식품으로부터 바이러스를 탈리하고 농축하는 과정이다. 그 과정에서 식품시료의 량이 분자생물학적 기법을 이용할 수 있을 정도로 소량화 되어야 하고 검출에 방해가 되는 물질들은 충분히 제거되어야한다. 현행 식품의약품안전처가 제시하는 노로바이러스 검출시험법인 「식중독바이러스 검사법」[3]은 굴, 채소, 과일 등의 시료로부터 노로바이러스를 검출하는 데 유용한 방법이다. 그러나 식품마다 매트릭스가 다르고 바이러스의 탈리율은 각 식품의 매트릭스와 사용된 탈리용액에 따라 달라지므로 여러 다양한 매트릭스를 가진 식재료가 혼합된 식품에 대해 현행 탈리용액의 효용성에 대해서는 조사해 볼 필요성이 있다. 현재까지 phosphate buffered saline (PBS)[12,15,25], Beef extract[21,26], 아미노산 buffer[12,19,27], Tris buffer[28], 아미노산-NaCl buffer[12,15,17,18,29], Tris-glycine buffer[12,13] 또는 이들 buffer의 combination[14,29-31]이 시도된 바 있으나 굴, 상추, 샐러드가 주대상이고 여러 가지 식재료가 혼합된 식품에 대해서는 그 효용성이 제대로 평가된 바 없다. 또한 현행 식품의약품안전처의 「식중독바이러스검사법」[3]은 바이러스농축을 위해 polyethylene glycol (PEG) 침전을 2회 실시함으로써 시간이 많이 걸리는 단점이 있어 많은 시료를 한꺼번에 처리하는데 어려움이 있으므로 개선의 필요성이 있다.

현재까지 인간노로바이러스(human norovirus)는 세포배양이 어려워 plaque assay가 불가하므로 노로바이러스의 검출법 개발을 위해 뮤린노로바이러스(murine norovirus), A형간염바이러스, 폴리오바이러스 등의 surrogate가 많이 이용되어왔다. 이중에서도 폴리오바이러스는 노로바이러스와 유사한 크기와 형태를 가진 다른 바이러스들에 비해 plaque이 명확하고 실험이 용이하여 검출법 개발에 이용하기에 적합하여 많이 이용되어왔다[10,12,17,19,23]. 따라서 본 연구에서는 여러 가지 식품에 적용이 가능한 표준화된 검사법을 확립하기 위한 연구의 일환으로 폴리오바이러스를 사용하여 여러 가지 매트릭스가 혼재된 발효식품(농후발효유, 된장)과 절임식품(깻잎장아찌, 단무지) 그리고 생식제품을 대상으로 식품에 오염된 바이러스를 효율적으로 탈리하는 조건을 규명하고 빠른 시간에 검출이 가능하게 하기위해 개선된 검출법을 개발한 후 이 검출법의 효용성은 인간노로바이러스에 적용하여 확인하였다.

Materials and Methods

세포 및 바이러스

본 연구에 사용된 폴리오바이러스 type 1 Sabin strain은 full-length cDNA를 COS-1 세포에 transfection하여 얻은 것을 HeLa 세포를 사용하여 계대한 것이다. 바이러스의 titer는 HeLa 세포를 이용하여 plaque assay로 측정하였다[17]. 본 연구에 사용된 노로바이러스 genotype II (GII)는 국립보건연구원 소화기바이러스과로부터 PBS에 희석된 환자의 분변 상태로 얻어 사용하였다. RT-PCR unit는 추출한 노로바이러스 RNA를 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)으로 증폭한 후 ethidium bromide가 함유된 1.5% 아가로스 젤을 이용하여 전기영동한 후 자외선하에서 육안으로 band를 확인할 수 있는 최대 희석배율에 해당하는 RNA량으로 정의하였다[17,32]. 노로바이러스 GII stock의 titer는 종말희석법에 의해 결정하였고 128 RT-PCR units/mL이었다.

식품재료

본 연구에 사용된 식품재료인 유산균 발효유(딸기첨가발효유, A사, 경기도 남양주), 된장(재래식된장, B사, 충남, 공주), 장아찌(깻잎장아찌, C사, 경북, 포항), 단무지(김밥용단무지, D사, 충남, 청양군)와 무는 경주소재 대형할인매장에서, 생식제품(E사, 현재 생산 및 판매중단)은 경주소재 유기농제품 판매 매장에서 각각 2008년 6월부터 2009년 4월까지 구입하여 사용하였다. 제조사에 따르면 사용된 A사 딸기첨가발효유 제품의 경우 원유(71.6%) 이외에도 딸기, 백설탕, 변성전분, 합성착향료(딸기향), 프락토올리고당으로 구성된 딸기시럽(17%), 백설탕, 변성전분, 탈지분유, 정제수, 변성전분, 아미드펙틴, 포도당, 해바라기유로 구성된 혼합제제와 유산균 등이 함유된 제품이었다. 사용된 B사 된장 제품의 경우 대두, 소맥분, 정제소금, 한식메주분말, 밀쌀, 정제수를 함유한 된장(90.5%)과 대두, 정제수, 정제소금, 주정, 알파대두분, 알파탈지대두분, 겨자분, L-글루타민산나트륨을 함유한 한식메주된장이 혼합된 제품이었다. 사용된 C사 깻잎장아찌의 경우 깻잎(약 67%) 외에도 간장, 정제수, 고추장, 정백당, 마늘, 고추분, 참깨, 고추씨기름, 식초, 복합조미식품 등이 함유된 제품이었다. 사용된 D사 단무지의 경우 절임무(60%) 외에도 정제수, 식초, 정제염, 조미액베이스, 치자황색소 등이 함유된 제품이었다. 사용된 E사 생식제품은 재료로 현미, 보리, 발아현미, 옥수수, 참깨, 당근, 호박, 다시마 등을 함유한 제품 이었다.

바이러스 inoculation 및 탈리

사용된 식품들은 바이러스 검사 시에 매번 plaque assay, RT-PCR, Semi-nested PCR 등을 이용하여 해당 바이러스

의 오염여부를 확인하고 음성대조군으로 사용하였다. 바이러스의 접종을 위해 생식(20 g), 깻잎장아찌(10 g; 1 × 1 cm로 절단), 단무지(25 g; 1.5 × 1.5 cm로 절단), 농후발효유(20 g), 된장(25 g) 또는 무(20 g)를 폴리오바이러스(10^5 또는 10^7 plaque forming unit, pfu) 또는 노로바이러스 GII (25-50 RT-PCR unit)로 오염시킨 후 clean bench내에서 2시간 동안 방치하였다. 탈리(elution)에 사용된 L-threonine과 L-glycine은 Bioshop사(Burlington, ON, Canada)제품을 사용하였고 beef extract는 Becton Dickinson사(Sparks, MD, USA)제품을 사용하였다. 탈리를 위해서는 인위적으로 바이러스를 오염시킨 식품들을 250 mL 원심분리 튜브에 옮겨 담고 탈리용액 75 mL을 넣고 shaking incubator (20-21ºC, 180 rpm)에서 1시간 탈리시킨 후 10,800 × g(4ºC, 10분)에서 원심분리하였다. 탈리액(eluent)을 새 튜브에 옮겨 담고 남아 있는 식품에 다시 탈리용액 75 mL을 넣어 1시간 탈리하고 원심분리한 후 얻어진 탈리액을 앞의 것과 합하였다. 합쳐진 탈리액을 교반시킨 후 이중 일부는 주사기필터(0.45 μm porosity; Pall Corportion, USA)로 여과한 후 plaque assay를 사용하여 회수율을 비교하고 나머지는 바이러스 농축 및 검출 실험을 행하였다. 바이러스의 회수율은 접종할 때마다 매번 측정한 폴리오바이러스의 양을 100%라고 가정하여 계산하였다.

Elution-PEG-chloroform-PEG (EPCP)공정

탈리시킨 시료를 최종농도 11% PEG 8000 (Bioshop사, Burlington, ON, Canada)과 0.3 M NaCl이 되도록 맞춰주고 4ºC에서 3시간 방치한 후 10,800 × g(4ºC, 20분)로 원심분리를 행하였다. 이후 상등액을 버리고 남은 pellet을 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 증류수 10 mL로 현탁시킨 후 동량의 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)을 가하여 30분간 추출하고, 24,100 × g(4ºC, 20분)로 원심분리하였다. 상층액을 회수한 후 PEG 8000과 NaCl을 가하여 11% PEG 8000과 0.3 M NaCl로 다시 맞춰주고 4ºC에서 3시간 방치한 후 24,100 × g(4ºC, 20분)로 원심분리하여 얻은 pellet을 DEPC 처리한 증류수 1-3 mL로 녹여 이중 일부를 이용하여 plaque assay로 회수율을 비교하고 RNA를 추출한 후 RT-PCR로 분석하였다.

Elution-chloroform-PEG (ECP)공정

탈리시킨 시료에 동량의 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)을 가하여 30분간 추출한 후 10,800 × g(4ºC, 10분)로 원심분리하였다. 이후 상층액을 새 튜브에 옮기고 PEG 8000과 NaCl을 가하여 최종 농도 11% PEG 8000과 0.3 M NaCl이 되도록 맞춰준 후 4ºC에서 3시간 방치하였다. 24,100 × g(4ºC, 20분)로 원심분리한 후 상등액은 버리고 남은 pellet에 DEPC처리한 증류수 1-3 mL로 현탁시킨 후 이중 일부를 이용하여 plaque assay로 회수율을 비교하고 RNA를 추출하여 RT-PCR로 분석하였다.

RT-PCR과 RT/semi-nested PCR

RNA 추출을 위해서는 QIAamp® Viral RNA mini kit (QIAGEN사, Hilden, Germany)를 사용하되 280 μL를 사용하였다. RT-PCR 방해물질 제거공정이 추가로 필요한지를 확인하기 위해 QIAshredder™ Homogenizer (QIAGEN사, Hilden, Germany)와 Centricon (Centricon YM-100, Millipore사, Bedford, MA, USA), Zeba™ desalt spin column (Thermo사, Rockford, IL, USA)을 처리할 경우 제품설명에 지시된 대로 실행한 후 사용하였다. RT-PCR과 RT/semi-nested PCR을 위한 반응조건과 사용된 primer (DG172, DG173, DG213, DG214, GII-F1M, GII-R1M, GII-F3M)는 이미 보고된 바 있다[10,17]. GII 노로바이러스와 폴리오바이러스의 RT-PCR 산물은 각각 340 bp와 524 bp band였고 RT/semi-nested PCR의 최종산물은 각각 310 bp와 506 bp band였다. Ethidium bromide가 함유된 1.5% 아가로스 젤에서 전기영동으로 분리한 후 자외선하에서 band를 확인하였다. PCR은 MyCycler™ thermal cycler (Bio-Rad사, USA)를 사용하였다. 전기영동은 Mupid-2 (Takara Korea Biomedical사, Korea)를 사용하였고, SL-20 DNA image visualizer (서린과학, Korea)를 사용하여 band를 확인하였다.

검출한계

본 연구에 사용된 5가지 식품 외에 무를 추가한 6가지 식품을 대상으로 ECP 공정을 이용하여 노로바이러스의 검출한계를 확인하였다. 검출한계를 확인하기 위해 농후발효유(20 g), 단무지(25 g), 생식제품(20 g)은 노로바이러스 GII 50, 25, 12.5, 6.25 RT-PCR unit를, 된장(20 g), 깻잎장아찌(10 g), 무(25 g)은 25, 12.5, 6.25, 3.125 RT-PCR unit를 각각 인위적으로 접종한 후 ECP 공정에 따라 검출여부를 확인하였다. 각 과정이 제대로 이행되었는지를 확인하기 위해 각 식품에 폴리오바이러스 1,000 pfu를 인위적으로 접종하여 공정이 제대로 수행되었는지 확인하기 위한 양성대조군으로 사용하였다. 노로바이러스 또는 폴리오바이러스를 인위적으로 접종하지 않은 시료를 음성대조군으로 사용하였다. 검출여부는 RT/semi-nested PCR을 이용하여 확인하되 교차오염에 의한 위양성 가능성을 배제하기 위해 2개의 음성대조군을 사용하였다. PCR 수행여부를 확인하기 위해 1개의 노로바이러스 GII cDNA와 poliovirus cDNA (Sabin type 1)를 양성대조군으로 사용하였다.

통계분석

본 연구에서 얻어진 결과는 Origin 8을 사용하여 One-way ANOVA로 분석하였고 *P*값 0.05를 유의수준으로 고

려하였다.

Results and Discussion

탈리용액별 회수율비교

오염된 식품으로부터 바이러스의 탈리는 효과적인 바이러스의 검출을 위한 가장 중요한 과정이다. 식품의 매트릭스, 바이러스 표면단백질의 등전점, 바이러스와 식품표면의 상호작용, 바이러스의 식품표면에서의 저항성 등 여러 요인이 탈리에 영향을 준다[16,29,33-35]. PBS는 상추, 양배추, 딸기 등에 시도된 바 있고[12,15,25,26], 3% beef extract는 과일, 무, 당근[18,21,26] 등에서 검사에 사용되거나 효과적인 탈리용액으로 보고된 바 있다. glycine-NaCl buffer나 threonine-NaCl buffer의 경우 NaCl 농도가 0.14 M 보다는 0.3 M일때 더 높은 회수율을 보이는 경향이 있었다. Threonine buffer 간에는 대체로 pH 7.5보다는 pH 9.5가 더 높은 회수율을 보였다. 이 같은 경향은 양배추, 상추, 깻잎, 당근 등을 대상으로한 선행연구에서도 확인된 바 있다[17,18]. 본 연구에서 발효식품 2종(농후발효유, 된장), 절임식품 2종(깻잎장아찌, 단무지)과 1가지 생식제품(다양한 곡물과 야채로 구성)에 폴리오바이러스 10^5 pfu를 인위적으로 접종시킨 후 11가지 탈리용액(PBS, 3% beef extract, 2가지 glycine-NaCl buffer, 7가지 threonine-NaCl buffer)을 사용하여 탈리율을 비교해 본 결과는 Table 1과 같다. 실험결과는 예상대로 식품의 매트릭스 차이에 의해 식품마다 효과적인 탈리용액이 달랐다. PBS는 농후발효유와 깻잎장아찌에 효과적인 반면 된장, 생식, 단무지에서 효과적인 탈리작용을 못했다. 반면 3% beef extract (pH 9.5)가 농후발효유, 생식, 단무지에서 효과적이었으나 된장과 깻잎장아찌에서는 상대적으로 효율성이 낮았다. 아미노산-NaCl buffer 중에는 0.05 M threonine-0.3 M NaCl (pH 9.5)가 조사해 본 5가지 식품 중 4가지에서 높은 탈리율을 보였다. 이는 과거 조사해 본 대부분의 야채에서 0.25 M threonine-0.3 M NaCl (pH 9.5)가 가장 높은 탈리율을 보인 것과는 대조된다[17,18].

식품별 회수율 비교

농후발효유(fermented milk)의 경우 탈리용액에 따라 큰 차이를 보여 4.6-54.2%의 회수율을 확인할 수 있었다(Table 1). PBS와 3% beef extract가 glycine-NaCl buffer나 threonine-NaCl buffer보다 더 나은 회수율을 보였다. 11개 buffer들 간에는 탈리율에 있어 큰 차이를 보였으나 35% 이상의 회수율을 보인 PBS, 3% beef extract (pH 9.5), 0.25 M threonine-0.3 M NaCl (pH 9.5), 0.05 M threonine-0.3 M NaCl (pH 9.5)간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($P = 0.3711 > 0.05$).

된장(soybean paste)의 경우 탈리용액에 따라 회수율에 큰 차이를 보여 2.6-52.4%의 회수율을 확인할 수 있었다. Threonine buffer 간에는 아미노산 농도와 NaCl 농도가 같을 경우 pH 9.5인 buffer가 pH 7.5인 buffer보다 탈리율에 있어 대체로 나은 경향을 보였다. 바이러스의 평균회수율이 35% 이상인 PBS, 0.25 M Glycine-0.14 M NaCl (pH 7.5), 0.25 M glycine-0.3 M NaCl (pH 7.5), 0.25 M threonine-0.14 M NaCl (pH 7.5), 0.25 M threonine-0.14 M NaCl (pH 9.5), 0.25 M threonine-0.3 M NaCl (pH 9.5), 0.05 M threonine-0.14 M NaCl (pH 9.5), 0.05 M threonine-0.3 M NaCl (pH 9.5)간에는 회수율에 있어 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P = 0.0927 > 0.05$). 특히 평균회수율이 41% 이상인 PBS, 0.25M glycine-0.14M NaCl (pH 7.5), 0.25M glycine-0.3M NaCl (pH 7.5), 0.05 M threonine-0.14 M

Table 1. Recoveries of poliovirus from foods using different buffers for elution (%)[1)]

Buffer numbers	Elution buffers	pH	Fermented milk (n = 6)	Soybean paste (n = 7)	Powders made from uncooked grains and vegetables (n = 12)	Sesame leaves preserved in soy sauce (n = 10)	Pickled Mooli (n = 12)
1	PBS	7.4	46.2 ± 5.4	43.5 ± 9.7	25.2 ± 11.5	58.1 ± 24.6	23.2 ± 8.9
2	3% Beef extract	9.5	54.2 ± 9.5	33.2 ± 2.5	40.2 ± 20.6	34.7 ± 13.1	38.6 ± 14.0
3	0.25M Gly-0.14M NaCl	7.5	19.8 ± 4.4	47.2 ± 13.8	19.1 ± 10.5	47.0 ± 17.9	7.2 ± 4.2
4	0.25M Gly-0.3M NaCl	7.5	25.3 ± 3.6	41.4 ± 7.9	22.8 ± 8.0	49.3 ± 18.8	24.6 ± 7.6
5	0.25M Thr-0.14M NaCl	7.5	20.2 ± 4.4	35.6 ± 1.9	22.1 ± 7.5	43.3 ± 14.2	19.8 ± 5.7
6	0.25M Thr-0.14M NaCl	9.5	32.7 ± 8.0	36.9 ± 2.3	29.2 ± 10.0	28.5 ± 8.8	37.7 ± 16.8
7	0.25M Thr-0.3M NaCl	7.5	34.1 ± 10.3	6.5 ± 1.7	24.0 ± 7.8	32.7 ± 20.4	32.4 ± 12.3
8	0.25M Thr-0.3M NaCl	9.5	36.7 ± 14.9	38.7 ± 3.4	13.8 ± 5.2	26.7 ± 6.5	25.9 ± 11.0
9	0.05M Thr-0.14M NaCl	7.5	4.6 ± 1.6	2.6 ± 0.8	14.5 ± 10.1	30.3 ± 9.7	3.2 ± 0.7
10	0.05M Thr-0.14M NaCl	9.5	28.4 ± 11.3	52.4 ± 6.7	22.1 ± 8.7	40.2 ± 15.0	32.0 ± 13.4
11	0.05M Thr-0.3M NaCl	9.5	39.1 ± 25.1	42.6 ± 13.8	33.7 ± 16.7	28.8 ± 10.3	32.0 ± 9.4

[1)]Recoveries were calculated based on the titer of added poliovirus stock (set as 100%) counted every trial (Mean ± Standard deviation).

NaCl (pH 9.5), 0.05 M threonine-0.3 M NaCl (pH 9.5)간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P = 0.4825 > 0.05$).

생식(powders made from uncooked grains and vegetables)의 경우 탈리용액에 따라 13.8-40.2%의 탈리율을 보였다. 검사해 본 11가지 전체 buffer들 간에는 회수율에 많은 차이를 보였으나 상대적으로 높은 효율 (평균회수율 33% 이상)을 보인 3% beef extract (pH 9.5)와 0.05 M threonine-0.3 M NaCl (pH 9.5)간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P = 0.5622 > 0.05$).

깻잎장아찌(sesame leaves preserved in soy sauce)의 경우 탈리용액에 따라 탈리율에 많은 차이(26.7-58.1%)를 보였다($P = 0.0127 < 0.05$). 깻잎장아찌의 경우는 glycine buffer가 threonine buffer보다 회수율이 대체로 높은 경향을 보였다. 그러나 조사해 본 탈리용액 중 평균회수율 40% 이상인 PBS, 0.25 M glycine-0.14 M NaCl (pH 7.5), 0.25 M glycine-0.3 M NaCl (pH 7.5), 0.25 M threonine-0.14 M NaCl (pH 7.5), 0.05 M threonine-0.14 M NaCl (pH 9.5)간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P = 0.5249 > 0.05$).

단무지(pickled mooli)의 경우 탈리용액에 따라 회수율에 큰 차이를 보여 3.2-38.6%의 회수율을 보였다. 그러나 평균회수율 32% 이상인 3% beef extract (pH 9.5), 0.25 M threonine-0.14 M NaCl (pH 9.5), 0.25 M threonine-0.3 M NaCl (pH 7.5), 0.05M threonine-0.14 M NaCl (pH 9.5), 0.05 M threonine-0.3 M NaCl (pH 9.5)간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P = 0.8374 > 0.05$).

Process간 바이러스 농축율 비교

식품에 인위적으로 폴리오바이러스를 각 식품 일정량 당 10^7 pfu만큼 접종시킨 뒤 두 공정간의 효율성을 비교하기 위해 동일한 탈리액을 절반씩 나누어 분석하였다. 각 식품별 탈리용액으로는 조사한 탈리용액들 중 상대적으로 높은 회수율을 보인 용액 (농후발효유: 3% beef extract (pH 9.5), 된장: 0.05 M threonine-0.14 M NaCl (pH 9.5), 생식: 3% beef extract (pH 9.5), 깻잎장아찌: 0.25 M glycine-0.3 M NaCl (pH 7.5), 단무지: 3% beef extract (pH 9.5))을 각각 사용하였다(Table 1). 무의 경우는 3% beef extract (pH 9.5), 0.05 M glycine-0.3 M NaCl (pH 9.5), 0.25 M glycine-0.14 M NaCl (pH9.5)가 가장 나은 탈리용액으로 보고된 바 있어[18] 본 연구에서는 3% beef extract (pH 9.5) 용액을 사용하였다.

탈리를 통해 회수한 바이러스를 1:1로 나누어 식품의약품안전처에서 「식중독바이러스검사법」[3]으로 제시한 EPCP와 2번의 PEG precipitation을 1번으로 줄인 개선공정 ECP의 바이러스의 회수율을 비교해 보았다. 6가지 식품을 대상으로 단순 결과치만 비교하면 ECP공정이 EPCP공정보다 전반적으로 높은 회수율을 보였다(Table 2). 된장($P = 0.0034 < 0.05$)과 생식($P = 0.0385 < 0.05$)은 ECP공정이 EPCP보다 훨씬 나은 회수율을 보인 반면, 농후발효유($P = 0.9439 > 0.05$), 깻잎장아찌($P = 0.2738 > 0.05$), 단무지($P = 0.7620 > 0.05$), 무($P = 0.3847 > 0.05$)는 두 공정 간에 사실상 차이가 없었다. 따라서 ECP공정이 EPCP공정보다 시간도 절약되면서 효율적이므로 기존의 공정을 대체할 수 있다고 결론 내렸다.

PCR 방해물질 제거

RT-PCR을 이용한 분석 방법은 PCR 방해물질로 인해 가끔 위음성(false positive)으로 판명될 가능성을 내포하고 있다. 따라서 다양한 매트릭스를 가진 식품이 혼합될 경

Table 2. Recoveries of poliovirus from two concentration procedures (%)[1]

Food	Process[2]	Recovery (%) (Mean ± SD)[1]		
		Elution	PEG	Chloroform / PEG
Fermented milk (n = 4)	EPCP	56.6 ± 8.0	48.1 ± 8.6	33.9 ± 13.1
	ECP		-	34.5 ± 8.9
Soybean paste (n = 4)	EPCP	55.6 ± 8.9	35.0 ± 13.9	21.0 ± 2.9
	ECP		-	31.6 ± 3.5
Powders made from uncooked grains and vegetables (n = 4)	EPCP	34.2 ± 4.4	25.1 ± 3.7	15.5 ± 1.3
	ECP		-	20.9 ± 3.8
Sesame leaves preserved in soy sauce (n = 4)	EPCP	45.9 ± 10.8	37.3 ± 4.7	18.1 ± 3.6
	ECP		-	22.3 ± 6.0
Pickled mooli (n = 4)	EPCP	36.7 ± 2.7	29.8 ± 3.4	18.9 ± 1.3
	ECP		-	18.8 ± 6.0
Mooli (n = 4)	EPCP	55.9 ± 13.0	40.9 ± 9.3	26.3 ± 9.0
	ECP		-	33.1 ± 11.4

[1]Recoveries (%; Mean ± Standard deviation) were calculated based on poliovirus plaque assay count of the initial seeding as 100%.
[2]EPCP procedure; elution-PEG precipitation-chloroform-PEG precipitation. ECP procedure; elution-chloroform-PEG precipitation.

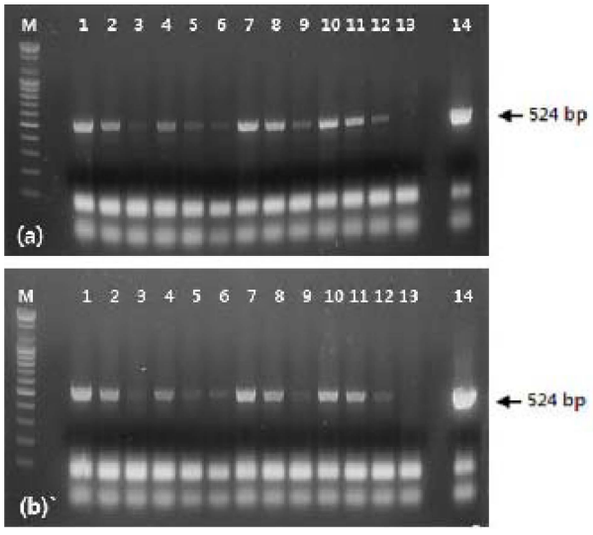

Fig. 1. Comparison of procedures to detect poliovirus contaminated in Fermented milk using RT-PCR. RNAs were extracted using a QIAamp® Viral RNA Mini Kit. (a): EPCP procedure, (b): ECP procedure; lane M, molecular weight marker (100bp ladder); lanes 1-3, desalting column passage before RNA extraction, serial 5-fold dilution of RNA; lanes 4-6, desalting column passage after RNA extraction, serial 5-fold dilution of RNA; lanes 7-9, QIAshredder™ Homogenizer before RNA extraction, serial 5-fold dilution of RNA; lanes 10-12, control (no more treatment), serial 5-fold dilution of RNA; lane 13, negative control (distilled water was used); lane 14, positive control (poliovirus cDNA was amplified).

우 특히 이 점이 염려된다. PCR 방해물질로는 1) 농후발효유의 경우 유지성분, 유당 등, 2) 된장의 경우 콩단백질, 콩지질 분해성분 등, 3) 깻잎장아찌의 경우 간장, 고추장, 마늘, 고추씨기름 등에서 유래한 성분 등, 4) 단무지의 경우 단무지조미베이스에서 유래하는 성분 등, 5) 생식의 경우 각종 곡물에서 유래하는 다당류 등이 예상된다.

ECP공정과 conventional한 시험법(EPCP)의 PCR 방해물질의 제거상태를 비교해 보았다. 두 가지 공정을 통해 농축된 바이러스를 QIAamp® Viral RNA Mini kit를 사용하여 바이러스 RNA를 추출한 뒤 RT-PCR을 행하여 band의 강도를 비교해 보았다. RT-PCR 결과 6가지 식품 모두 두 공정 간에 차이가 없었다(Fig. 1(a,b). lanes 10-12; lanes 10-12는 5배 단위로 연속적으로 희석한 바이러스 RNA를 이용하여 RT-PCR을 행한 결과임; 나머지 5가지 식품에 대한 것은 지면관계로 제시하지 않음). 두 가지 공정 모두 바이러스 RNA 검출에 문제가 없었고 희석비율에 비례해서 band의 강도가 약해지므로 RT-PCR 방해물질은 공정 중 행한 chloroform 처리와 QIAamp® Viral RNA Mini kit의 column에 내장된 silica gel-base membrane의 선택적 binding 및 washing 과정에서 대부분 제거된 때문으로 추정된다. 그러나 식품에 따라 PCR 방해물질의 제거가 충분하지 않을 수도 있고 된장, 깻잎장아찌, 단무지의 경우 식품에 함유된 많은 량의 salt가 PCR을 방해할 수도 있으므로 PCR 방해물질의 추가제거작업이 필요할 지를 검사해 보기로 하였다. 이를 위해 기존에 햄버거와 상추 등에서 PCR 방해물질 제거에 효과가 있다고 보고된 QIAshredder™ Homogenizer[32]와 Centricon, Zeba™ desalt spin column을 추가로 처리해보기로 하였다. 하지만 Centricon의 경우 예비실험에서 식품에서 유래하는 하는 미세입자들에 의해 column이 막혀 검사해 본 모든 식품에서 실험을 진행시키기 어려워 추가실험대상에서 제외되었다. 따라서 Zeba™ desalt spin column 또는 QIAshredder™ Homogenizer를 이용하여 시료를 처리한 후 QIAamp® Viral RNA Mini kit로 RNA를 추출하거나(Fig. 1(a,b); lanes 1-3, lanes 7-9) 또는 QIAamp® Viral RNA Mini kit로 RNA를 추출한 후 Zeba™ desalt spin column을 처리한 후 RT-PCR을 행하여 band(Fig. 1(a,b); lanes 4-6)를 비교함으로써 추가처리의 효과여부를 test해 보았다. 그 결과 ECPC공정(Fig. 1(a))과 ECP공정(Fig. 1(b)) 둘 다 QIAamp® Viral RNA Mini kit만을 사용한 경우의 band 강도(lanes 10-12; 각 lane은 5배단위로 연속적으로 희석한 RNA를 사용한 결과임)와 Zeba™ desalt spin column (lanes 1-3; 각 lane은 5배단위로 연속적으로 희석한 RNA를 사용한 결과임) 또는 QIAshredder™ Homogenizer (lanes 7-9: 각 lane은 5배단위로 연속적으로 희석한 RNA를 사용한 결과임)를 처리한 후 RNA 추출을 한 경우의 band 강도가 비슷한 결과를 보였다(농후발효유의 경우를 대표적으로 제시함. 나머지 5가지 식품도 유사한 경향을 보여 지면 관계로 data제시하지 않음). QIAamp® Viral RNA Mini kit로 추출한 RNA를 Zeba™ desalt spin column으로 다시 처리할 경우(Fig. 1, lanes 4-6; 각 lane은 5배단위로 연속적으로 희석한 RNA를 사용한 결과임) 오히려 band가 약해지는 경우가 많았는데(이는 다른 식품도 유사한 결과를 보임; 지면관계로 결과 제시하지 않음) 이는 추가 처리로 인해 RNA를 손실했기 때문으로 보인다. 또 각각 RNA를 물로 5배 단위로 희석할 경우 PCR 방해물질이 제대로 제거되지 않은 경우 band가 더 강해진다고 보고된 바 있으나[36,37], 본 연구의 결과는 EPCP와 ECP 공정 모두 희석으로 인해 band 강도가 희석배율에 비례해서 약해지므로 RT-PCR 방해물질은 이미 충분히 제거된 것으로 추정된다. 결론적으로 기존의 EPCP나 새로 개발된 ECP를 사용할 경우 PCR 방해물질 제거를 위한 추가공정은 필요하지 않다고 판단되었다.

검출한계

재료 및 방법의 검출한계 부분에 서술한 방법에 따라 검출한계를 확인해 보았다.

실험결과 각 식품별 검출한계는 농후발효유 20 g당 6.25 RT-PCR unit, 된장 25 g 당 12.5 RT-PCR unit, 깻잎장아찌 10 g당 6.25 RT-PCR unit, 단무지 25 g 당 6.25 RT-PCR

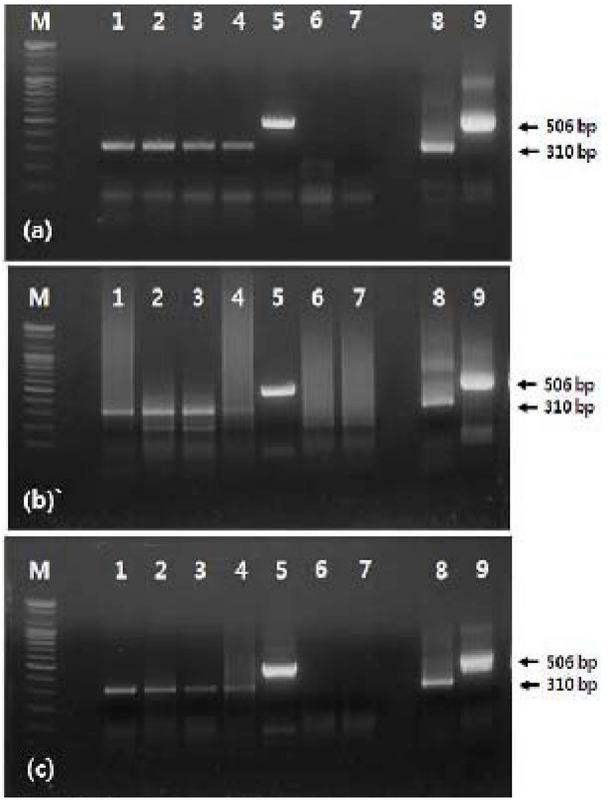

Fig. 2. Detection of norovirus contaminated in Fermented milk, Powders made from uncooked grains and vegetables, Pickled mooli by RT-PCR combined with semi-nested PCR. (a) Twenty grams of fermented milk, (b) twenty grams of powders made from uncooked grains and vegetables, or (c) twenty-five grams of pickled mooli was artificially contaminated with GII NoV and eluted with 3% beef extract (pH 9.5). Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); lane 1, 50 RT-PCR unit; lane 2, 25 RT-PCR unit; lane 3, 12.5 RT-PCR unit; lane 4, 6.25 RT-PCR unit; lane 5, 1,000 pfu of poliovirus; lanes 6 and 7, negative control (distilled water); lane 8, positive control (NoV GII cDNA was amplified); lane 9, positive control (poliovirus cDNA was amplified).

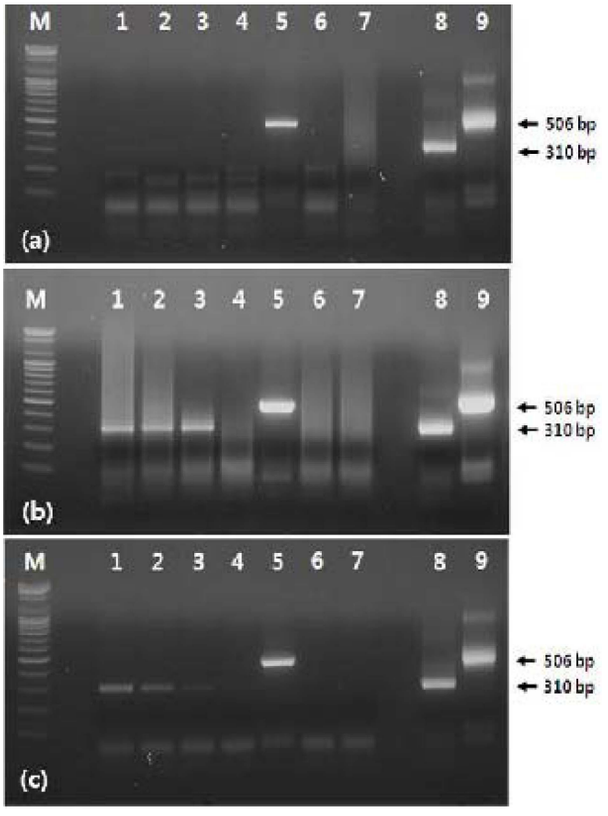

Fig. 3. Detection of norovirus contaminated in Soybean paste, Sesame leaves, Mooli by RT-PCR combined with semi-nested PCR. (a) Twenty grams of soybean paste was eluted with 0.05 M threonine-0.14M NaCl (pH 9.5). (b) Ten grams of sesame leaves preserved in soy sauce was eluted with 0.25M glycine-0.3M NaCl (pH 7.5). (c) Twenty-five grams of mooli was eluted with 3% beef extract (pH 9.5). Samples were artificially contaminated with GII NoV. Lane M, molecular weight marker (100 bp ladder); lane 1, 25 RT-PCR unit; lane 2, 12.5 RT-PCR unit; lane 3, 6.25 RT-PCR unit; lane 4, 3.125 RT-PCR unit; lane 5, 1,000 PFU of poliovirus; lanes 6 and 7, negative control (distilled water); lane 8, positive control (NoV GII cDNA was amplified); lane 9, positive control (poliovirus cDNA was amplified).

unit, 생식 20 g 당 6.25 RT-PCR unit, 무 25 g 당 3.125 RT-PCR unit였다(Fig. 2, Fig. 3). 식품에 존재하는 바이러스의 검출한계는 분석방법 (예로 RT-PCR, RT-PCR후 nested PCR 또는 real-time PCR), 식품의 매트릭스 차이, 시료의 양, 분석하고자하는 바이러스의 strain, 사용된 primer 등에 의해 달라질 수 있으므로 검출방법 간의 직접비교는 힘들다[19,31]. 하지만 본 연구를 통해 개발된 검출방법의 검출한계(10-25 g 식품당 3.125-12.5 RT-PCR unit)는 보고된 검출한계(6-50 g 식품당 10-1500 RT-PCR units)[13,14,22,29,32,38]와 비슷하거나 더 나았다. RT-PCR unit당의 노로바이러스 게놈 copy의 수는 약 10-42로 보고된 바 있다.[22,39,40] 본 연구에서 폴리오바이러스를 이용하여 RT-PCR unit와 pfu간의 상관성을 비교해 본 결과 1 RT-PCR unit는 약 0.25 pfu였고(data not shown) 폴리오바이러스 1 pfu 당 30-300(평균 약 200) 입자라고 추정되므로[41,42] 이를 토대로 폴리오바이러스의 경우 1 RT-PCR unit당 게놈 copy수는 약 7.5-75에 해당한다. 따라서 노로바이러스 1 RT-PCR unit당 약 7.5-75입자라고 가정하면 본 연구에서 얻은 대상식품 10-25 g당 검출한계인 3.125-12.5 RT-PCR unit는 약 23-937개 입자에 해당한다고 추정할 수 있다.

본 연구를 통해 복잡한 matrix를 가진 가공식품들 즉 발효식품 2종(농후발효유, 된장)과 시판중인 생식 1종, 절임식품 2종(깻잎장아찌, 단무지)를 대상으로 효과적인 바이러스 탈리용액을 확인하였다. 바이러스 농축을 위해 현재 국내에서 널리 사용 중인 식품의약품안전처의 「식중독바이러스 검사법」을 다소 수정하여 검출시간을 단축시키고 효능을 높일 수 있었다. 새로운 노로바이러스 검출방법은 다양한 매트릭스의 식품들에 적용되어 바이러스의 검출을

용이하게 해 줄 수 있을 것이다.

Acknowledgement

이 논문은 식품의약품안전처 식품안전관리연구(08072식품안062)와 노로바이러스 식중독 근원적 예방 연구(14162식중독973)의 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다. 이 논문은 또한 동국대학교(경주캠퍼스)의 논문게재장려금의 지원을 받아 수행되었습니다.

국문요약

본 연구는 다양한 식재료가 섞여있는 식품으로부터 노로바이러스를 효과적으로 검출하기 위한 시험법 개발에 관한 것이다. 각 식품이 가진 매트릭스가 매우 다르므로 모든 식품에 공통적으로 적용할 수 있는 표준화된 검출법이 현재로서는 없다. 본 연구에서는 발효식품(농후발효유, 된장), 절임식품(깻잎장아찌, 단무지)과 생식제품을 대상으로 실험을 진행하였다. PBS, beef extract, 아미노산-NaCl 용액 등을 이용하여 바이러스에 오염된 대상식품들로 부터 바이러스의 탈리율을 비교하였다. 이로부터 다양한 매트릭스가 혼합된 식품들에 적용 가능한 탈리용액을 선별하였다. 식품의약품안전처가 제안하여 현재 국내에서 굴, 야채, 과일 등을 대상으로 바이러스 농축에 널리 사용되고 있는 식중독 바이러스 검출법인 EPCP공정(탈리-PEG 침전-클로르포름 처리-PEG 침전)과 PEG 침전과정을 한번으로 줄인 수정된 ECP공정(탈리-클로르포름 처리-PEG침전)의 효능을 비교해 본 결과 ECP공정은 EPCP공정과 비슷하거나 나은 효율로 바이러스를 농축할 수 있었다. 또 바이러스 농축 후 QIAamp® Viral RNA Mini kit를 이용하여 RNA를 추출할 경우 식품에 존재하는 RT-PCR방해물질들이 효과적으로 제거되어 추가적인 처리가 더 필요하지 않음을 알 수 있었다. 수정된 공정을 이용하여 무를 추가한 6가지 식품을 대상으로 검출한계를 조사해 본 바 10-25 g 식품으로부터 3.125-12.5 RT-PCR unit까지 검출이 가능하였다. 이는 기존에 보고된 방법들의 검출한계보다 더 우수한 것으로 장차 다양한 식품을 대상으로 효과적인 바이러스 검출이 가능할 것으로 기대된다.

References

1. Koopmans M., von Bonsdorff C., Vinjé J., de Medici D., Monroe S.: Foodborne viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 187-205 (2002).
2. Lopman B.A., Reacher M.H., Duijnhoven Y., Hanon F., Brown D., Koopmans M.: Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerging Infect. Dis.* **9**, 90-96 (2003).
3. http://www.mfds.go.kr/
4. Koopmans M., Duizer E.: Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* **90**, 23-41 (2004).
5. Patel M.M., Hall A.J., Vinjé J., Parashar U.D.: Noroviruses: A comprehensive review. *J. Clin. Virol.* **44**, 1-8 (2009).
6. CDC Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1998-2008. MMWR, **62** (2) (2013).
7. Kingsley D.H.: An RNA extraction protocol for shellfish-borne viruses. *J. Virol. Methods* **141**, 58-62 (2007).
8. Schultz A.C., Saadbye P., Hoorfar J., Nørrung B.: Comparison of methods for detection of norovirus in oysters. *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 352-356 (2007).
9. Comelli H.L.,Rimstad E., Larsen S., Myrmel M.: Detection of norovirus genotype I.3b and II.4 in bioaccumulated blue mussels using different virus recovery methods. *Int J. Food Microbiol.* **127**, 53-59 (2008).
10. Ha S.H., Woo G.J., Hwang I.K., Choi W.S.: Development of a virus elution and concentration procedure for detecting norovirus in oysters. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 1150-1154 (2009).
11. Bidawid S., Farber J.M., Sattar S.A.: Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries. *J. Virol. Methods.* **88**, 175-185 (2000).
12. Dubois E., Hennechart C., Deboosēre N., Merle G., Legeay O., Burger B., Le Calvé M., Lombard B., Ferré V., Traoré O.: Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. *Int J. Food Microbiol.* **108**, 164-171 (2006).
13. Dubois E., Hennechart C., Merle G., Burger C., Hmila N., Ruelle S., Perelle S., Ferré V.: Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: Characterization of the method performances. *Int J. Food Microbiol.* **117**, 141-149 (2007).
14. Butot S., Putallaz T., Sānchez G.: Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 186-192 (2007).
15. Papafragkou E., Plante M., Mattison K., Bidawid S., Karthikeyan K., Farber J.M., Jaykus L.A.: Rapid and sensitive detection of hepatitis A virus in representative food matrices. *J. Virol. Methods.* **147**, 177-187 (2008).
16. Fumian T.M., G. Leite J.P.G., Marin V.A., Miagostovich M.P.: A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. *J. Virol. Methods.* **155**, 39-43 (2009).
17. Moon A., Hwang I.G., Choi W.S.: Development of a virus elution and concentration procedure for detecting norovirus in cabbage and lettuce. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 407-412 (2009).
18. Moon A., Ahn J., Choi W.S.: Elution buffers for human enteric viruses in vegetables with applications to norovirus detection. *J. Fd Hyg. Safety* **28**, 287-292 (2013).
19. Le Guyader F.S., Mittelholzer C., Haugarreau L., Hedlund K., Alsterlund R., Pommepuy M., Svensson L.: Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis

outbreak. *Int. J. Food Microbiol.* **97**, 179-186 (2004).
20. Rzeżutka A., D'Agostino M., Cook N.: An ultracentrifugation-based approach to the detection of hepatitis A virus in soft fruits. *Int. J. Food Microbiol.* **108**, 315-320 (2006).
21. Kim H.Y., Kwak I.S., Hwang I.K., Ko G.P.: Optimization of methods for detecting norovirus on various fruit. *J. Virol. Methods.* **153**, 104-110 (2008).
22. Schwab K.J., Neill F.H., Fankhauser R.L., Daniels N.A., Monroe S.S., Bergmire-Sweat D.A., Estes M.K., Atmar R.L.: Development of Methods To Detect "Norwalk-Like Viruses" (NLVs) and Hepatitis A Virus in Delicatessen Foods: Application to a Food-Borne NLV Outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 213-218 (2000).
23. Love D.C., Casteel M.J., Meschke J.S., Sobsey M.D.: Methods for recovery of hepatitis A virus (HAV) and other viruses from processed foods and detection of HAV by nested RT-PCR and TaqMan RT-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 221-226 (2008).
24. Kim S.R., Kim D., kwon K., Hwang I., Oh M.: Detection of norovirus in contaminated ham by RT-PCR and nested PCR. *Food Sci. Biotechnol.* **17**, 651-654 (2008).
25. Shinohara M, Uchida K., Shimada S., Tonioka K., Suzuki N., Minegishi T., Kawahashi S., Yoshikawa Y., Ohashi N.: Application of simple method using minute particles of amorphorus calcium phosphate for recovery of norovirus from cabbage, lettuce, and ham. *J. Virol. Methods* **187**, 153-158 (2013).
26. Croci L., De Medici D., Scalfaro C., Fiore A., Toti L.: The survival of Hepatitis A virus in fresh produce. *Int. J. Food Microbiol.* **73**, 29-34 (2002).
27. Summa M., von Bonsdorff C., Maunula L.: Evaluation of four virus recovery methods for detecting norovirus on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries. *J. Virol. Methods* **183**, 154-160 (2012).
28. Morales-Rayas R, Wolffs P.F.G., Griffiths M.W.: Simultaneous separation and detection of hepatitis A virus and norovirus in produce. *Int. J. Food Microbiol.* **139**, 48-55 (2010).
29. Vega E., Smith J., Garland J., Matos A., Pillaii S.D.: Variability of virus attachment patterns to butterhead lettuce. *J. Food Prot.* **68**, 2112-2117 (2005).
30. Dubois E., Agier C., Traoré O., Hennechart C., Merle G., Crucière C., Laveran H.: Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *J. Food Prot.* **65**, 1962-1969 (2002).
31. Scherer K., Johne R., Schrader C., Ellerbroek L., Schulenburg K., Klein G.: Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak. *J. Virol. Methods* **169**, 22-27 (2010).
32. Sair A.I., D'Souza D.H., Moe C.L., Jaykus L.A.: Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J. Virol. Methods.* **100**, 57-69 (2002).
33. Abad F.X., Pinto R.M., Bosch A.: Survival of enteric viruses on environmental formites. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3704-3710 (1994).
34. Kurdziel A.S., Wilkinson N., Langton S., Cook N.: Survival of poliovirus on soft fruit and salad vegetables. *J. Food Prot.* **64**, 706-709 (2001).
35. Baert L., Uyttendaele M., Debevere J.: Evaluation of viral extraction methods on a broad range of ready-to-eat foods with conventional and real-time RT-PCR for norovirus GII detection. *Int. J. Food Microbiol.* **123**, 101-108 (2008).
36. Lees D.N., Henshilwood K., Dore W.J.: Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2999-3005 (1994).
37. Jaykus L.A., Leon R.D., Sobsey M.D.: A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2074-2080 (1996).
38. Leggitt P.R., Jaykus L.A.: Detection methods for human enteric viruses in the representative foods. *J. Food Prot.* **63**, 1738-1744 (2000).
39. Atmar R.L., Neill F.H., Romalde J.L., Le Guyader O.L., Woodley C.M., Metcalf T.G., Estes M.K.:Detection of Norwalk virus and Hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3014-3018 (1995).
40. Schwab K.J., Estes M.K., Neill F.H., Atmar R.L.: Use of heat release and an internal RNA standard control in reverse transcription-PCR detection of Norwalk virus from stool samples. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 511-514 (1997).
41. Dulbecco R. : The nature of viruses. *In Virology,* 2nd Ed. (Dulbecco R., and Ginsberg H.S. eds.) J.B. Lippincott Company, Philadelphia, pp. 1-26 (1988).
42. Rueckert R.R. : Picornaviridae: The viruses and their replication. *In Fields Virology,* 3rd Ed. (Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P., and Roizman B. eds.) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia · New York, pp. 609-654 (1996).