Journal of the Korean Chemical Society
2011, *Vol. 55, No. 2*
Printed in the Republic of Korea
DOI 10.5012/jkcs.2011.55.2.262

등온증폭반응법과 변성 고성능 액체 크로마토그래피를 이용한 B형 간염 바이러스의 검출

안영창 · 서재원 · 최재구[†] · 장원철*
단국대학교 첨단과학대학 화학과 및 기초과학연구소/조직재생공학연구소,
동남보건대학 바이오환경과
(접수 2010. 3. 2; 수정 2010. 3. 20; 게재확정 2011. 2. 24)

Detection of Hepatitis B Virus by LAMP and DHPLC

Young-Chang Ahn, Jae-Won Seo, Jae-Gu Choi[†], and Won-Cheoul Jang*
Department of Chemistry, School of Advanced Science and Basic Science Research Institute, Institute of Tissue and Regeneration Engineering(ITREN), Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
[†]Department of Bio & Environmental Science, Dongnam Health College, Korea
(Received March 2, 2010; Revised March 20, 2010; Accepted February 24, 2011)

요 약. 형광 검출기를 기반으로 한 변성 고성능 액체 크로마토그래피(DHPLC)분석법은 핵산검출에 유용하게 사용되고 있으며 또한 등온증폭 반응법은 병원성 미생물의 효과적인 검출방법으로 알려져 있다. 이 연구에서는 HBV의 조기 분석 방법으로써 사용되는 등온증폭반응법(LAMP)과 변성고성능 액체 크로마토그래피(DHPLC)의 검출한계와 특이성, 그리고 민감도를 평가하였다. 등온증폭 반응법의 검출 시간이 가장 빠른 장점을 보였으나, 변성 고성능 액체 크로마토그래피 분석법이 등온증폭반응법과 real-time PCR분석법과 비교한 결과, 10배 이상의 높은 민감도를 확인 할 수 있었다. 본 결과로서 B형 간염 바이러스의 진단을 위하여, 빠른 검출법으로써 등온증폭 반응법이 유용하게 쓰일 수 있을 것이며 변성 고성능 액체 크로마토그래피 분석법은 좀 더 낮은 병원균의 감염도 검출할 수 있어, 임상에서 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

주제어: HBV, DHPLC, LAMP, real-time PCR

ABSTRACT. The denaturing high performance liquid chromatography(DHPLC) with fluorescence detector assay is very useful tool for detecting nucleic acids. Furthermore, loop-mediated isothermal amplification(LAMP) constitutes a potentially valuable tool for rapid diagnosis of pathogenic microorganisms. In this study, we evaluated the specificity, detection limit, and sensitivity of a LAMP method and DHPLC method for rapid detection of the hepatitis b virus(HBV). As a result, the LAMP assay reported here has the advantage of rapid detection whereas, DHPLC assay has more sensitivity than other assays. These findings suggest that LAMP and DHPLC assay may be good tool for rapid diagnosis of clinical HBV infection.

Keywords: HBV, DHPLC, LAMP, real-time PCR

서 론

B형 간염은 세계적으로 공중 보건상 문제로 제기 되고 있는 대표 질환 중 하나이다. B형 간염을 일으키는 주원인은 B형 간염 바이러스로써 만성적 간염, 간암 등의 원인이 되는 바이러스이다. 임상에서는 혈청에 B형 바이러스 DNA가 1 ml 당 10^5 copy의 수만큼 존재 시에 B형 간염임을 진단한다. 진단 방법으로 가장 널리 쓰이는 방법은 면역학적 검사 방법이 쓰이고 있다. 기존 면역학적 검사 방법의 경우 HBsAg 또는 HBeAg의 유무를 검사한다. 하지만, 위 항원들은 환자의 상태에 따라 혈액 내에서 감소할 수 있으며 이에 따라 미량의 경우 검출하지 못하는 오류가 생길 수 있다. 따라서, 기존 면역학적 방법보다 민감도가 높은 검사 방법들이 제시되고 있다. 현재 임상이나 병원에서 시행 하고 있는 분자 진단 방법으로는 실시간 중합효소연쇄반응법(real-time PCR) 이나 nested PCR을 사용하고 있다. 위 두 분자 진단 방법 중에 real-time PCR이 보다 널리 사용 되고 있으며, 그 이유는 nested PCR 방법의 경우 민감도는 높으나 진단 시간이 실시간 중합효소연쇄반응법에 비하여 오래 걸린다는 단점 때문이다.

등온증폭방법(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)은 2000년 Notomi에 의해알려진 증폭 방법으로 기존의 PCR법과 유사하지만 PCR이나 real-time PCR 반응 시에 DNA 변성(denaturation), 프라이머의 접합(annealing), 중합효소의 신장(extension)에 필요했던 온도 변화가 필요 없이 60 °C의 한 온도에서 증폭반응이 가능한 검출 방법으

로써 기존 검출 방법보다 검출 시간을 획기적으로 단축시킬 수 있는 검출 방법이다. 또한, 한 온도에서 반응이 진행되기 때문에 일정 온도의 유지가 가능한 오븐, 항온 수조 등의 저가의 장비에서도 증폭이 가능하며, 장소에 구애받지 않게 됨에 따라 임상진단 연구소와 현장 및 기타 어느 장소에서도 B형 간염 바이러스에 대한 진단이 가능한 강점을 가지고 있다.

변성 고성능 액체크로마토그래피(Denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)는 DNA나 RNA와 같은 핵산 분석에 특화된 액체크로마토그래피 기기장치로써, 핵산의 정량분석이나 DNA 상의 염기의 결실, 삽입 또는 치환에 의한 돌연변이를 검출하는 목적으로 사용되고 있다. 이 방법은 PCR 증폭산물의 크기가 200-1000bp에서 95~100%에 가까운 정확도를 나타낸다. 시료당 분석에 걸리는 시간이 변성 검출은 5-7분, DNA 크기에 따른 검출은 10-20분 내외로 다량의 시료를 분석하는데 유용한 방법이다. 검출기로는 UV 검출기를 일반적으로 사용하지만, 민감도를 증가시키기 위하여 형광 검출기를 적용시킬 수 있다.

상기 검출 방법들이 해외에서는 임상 적용성 및 응용 방법에 대한 연구가 활발이 진행되고 있지만, 현재 국내에서는 이에 대한 연구가 극히 드문 현실이다. 따라서 상기 검출 방법들이 B형 간염 바이러스의 검출에 유용하게 적용 할 수 있음을 보이고자 한다.

본 연구에서는, 실시간 중합효소연쇄반응법과 DHPLC 및 등온증폭반응법의 민감도와 분석 소요 시간을 확인 하기 위하여 10^5 copy/ml 농도의 B형 간염 바이러스 DNA를 10배위 정량 희석하여 실시간 중합효소연쇄반응법과 DHPLC분석법 및 등온증폭반응법을 비교 하였다.

실험 및 방법

시료

본 실험에서는 표준 B형 간염 바이러스로 ATCC 45020D를 사용 하였다. 임상 시료는 단국대학교 병원에서 확인된 B형 간염 환자 33명에게서 수집하여 본 실험에 사용하였다.

시약 및 기기

시약: B형 간염 환자의 혈청에서 B형 간염 바이러스 DNA 추출에는 DNA PrimePrep^{TM}-Genomic DNA Isolation Kit(Genet Bio, Korea)를 사용하였고, 전기영동의 agarose는 QA-Agarose^{TM}(Q-bio gene, USA)을 이용하였다. DHPLC의 이동상으로 0.1 M triethylammonium acetate(TEAA), pH 7 (완충용액 A, Transgenomic®, USA)와 0.1 M TEAA, 25% acetonitrile(완충용액 B, Transgenomic®, USA)를 사용하였으며, 형광 시약으로 WAVE Optomized® HS Staining Solution I을 사용하였다. Real-time PCR의 반응 시약으로 iQ^{TM} SYBR® Green Supermix(Bio-rad, USA)를 사용하였다.

기기: DHPLC분석 전 PCR 반응은 GeneAmp PCR System 2700(Applied Biosystems, USA)을사용하였으며, real-time PCR 반응은 Chromo4^{TM}(Bio-rad, USA)를 사용하였다. 등온증폭반응은 T-garadient(Biometra®, Germany)를 사용하였으며, 등온증폭반응 산물 확인은 Mupid-α(Advance, Japan)을 사용하였다. DHPLC 분석은 WAVE^{TM} 4500 System (Transgenomic, USA)을 사용하였다.

실험 방법

혈청에서 HBV DNA 추출: 임상 B형 간염 환자의 혈청 200 uL를 1.5 mL 원심분리 튜브(tube)에 넣고 동량의 결합 완충용액(binding buffer), Proteinase K (20 mg/ml) 10 uL를 넣고 섞은 후 항온 수조에서 60 ºC로 1 시간 동안 반응시켰다. 수집 컬럼(collection column)과 결합 컬럼(binding column)을 결합시키고, 반응물을 결합 컬럼으로 옮긴 후에 12,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하였다. 수집 컬럼에 모아진 여과물을 모두 버린 뒤 500 uL의 세척 완충용액 1(Washing buffer 1)으로 세척하고, 12,000 rpm에서 1 분간 원심 분리하였다. 수집 컬럼에 모아진 여과물을 모두 버린 뒤 500 uL의 세척 완충용액 2(Washing buffer 2)로 반복 하였다. 수집 컬럼에 모아진 여과물을 모두 버린 뒤 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 결합 컬럼을 건조 시킨 후 결합 컬럼을 새 1.5 mL 튜브에 옮겼다. 50 uL의 용리완충용액(elution buffer)를 넣고 실온에서 5 분간 반응 시킨 후 12,000 rpm에서 1 분간 원심분리하고 모아진 용액은 -20 ºC에서 보관하였다.

중합효소연쇄반응(PCR): *Table* 1의 LAMP primer set중 HBV B3와 HBV F3를 이용하여 각 시료의 증폭 산물을 얻었다. 10 uL Reaction buffer(10 mM Tris-HCl; pH 8.3, 50 mM KCl), 10 mM dNTP mix(2.5 mM ea.), 25 mM $MgCl_2$, *Taq*. polymerase (1 U/ul), template DNA(25 ng/ml)를 25 uL PCR 반응용액으로 사용하였다. 각각 25 uL의 반응 용액을 0.2 mL 반응 튜브에 넣은 후, DNA thermal cycler(Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 2700, USA)를 이용해 DNA를 증폭하였다. DNA 증폭 반응 시 초기 5 분간 94 ºC에서 제놈 DNA를 완전히 변성 시켰고, 94 ºC에서 30 초간 DNA 변성, 60 ºC에서 30 초간 프라이머 접합, 72 ºC에서 45 초간 DNA 중합 효소에 의한 DNA 신장 반응을 35회 반복 하였다. 최종적으로 72 ºC에서 3 분간 신장반응을 추가적으로 진행하였다.

DHPLC 분석: 10 uL의 시료를 변성 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 0.75 mL/min의 유속으로 20 분 동

***Table* 1.** Primer sequence sets used to amplify precore gene for PCR, real-time PCR and LAMP

Primer name	Sequence of primers (5'3')	Size of amplicon (bp)
HBV F3	GGCCTAAAGTTCAGGCAACT	203
HBV B3	GGAGTTCTTCTTCTAGGGGAC	
HBV FIP	CCACACTCCGAAAGACACCAAA GGTTTCACATTTCTTGTCTCAC	-
HBV BIP	TCGCACTCCTCCAGCTTATAGA GCCTCGTCGTCTAACAACAG	

안 분석하였다. DHPLC의 gradient solution으로 0.1 M TEAA (pH 7.0)와 0.1M TEAA, 25% Acetonitrile을 사용하였고, washing solution으로 8% acetonitrile (syringe washing solution), 75% acetonitrile(DNASep® Cartridge Ultra Clean and Storage Solution)을 사용하였다. Column은 alkylated nonporous poly(styren-divinylbenzene)형태의 DNASep® Cartridge(Transgenomic, U.S.A.)을 사용하였다.

등온증폭반응(LAMP): *Table* 1의 LAMP primer set를 이용하여 각 시료의 증폭 산물을 얻었다. *Bst*. 10X reaction buffer(10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM Mg SO_4), 10 mM dNTP mix(2.5 mM each.), HBV F3 primer (10 pmole/uL), HBV B3 primer(10 pmole/uL), HBV FIP primer (10 pmole/uL), HBV BIP primer(10 pmole/uL), *Bst.* Polymerase(5 U/uL), Template DNA (10^5~10 copy/mL)를 20 uL 등온증폭 반응용액으로 사용하였다. 각각 20 uL의 반응 용액을 0.2 mL 반응 튜브에 넣은 후, T-garadient(Biometra®, Germany)를 이용해 60 °C에서 1 시간 동안 증폭하였다.

Agarose gel 전기영동에 의한 증폭산물의 확인: 2%(w/v) agarose gel을 이용하여 Mupid-α(Advance, Japan) 전기영동장치로 multiplex-PCR 산물을 분석하였다. Agarose 2 g을 삼각플라스크(250 mL)에 넣고, 0.5X TBE(tris boric acid EDTA) 완충용액 100 mL을 채운 후에 전자레인지에서 3 분 동안 녹인 후 용액을 gel 용기에 부어서 30 분 동안 굳혔다. Gel이 완전히 굳은 후에 comb을 뽑고 gel을 수거하였다. Gel을 전기 영동장치에 넣고 0.5X TBE 완충용액으로 채운 뒤 증폭산물 4 uL과 6X loading dye 0.8 uL을 섞어서 4 uL씩 loading하고 100 V에서 30 분 동안 전기영동하였다. 그 후에 gel을 전기영동장치에서 꺼낸 뒤 EtBr (ethidium bromide)로 15 분간 염색하고 다시 15 분간 증류수로 DNA 결합하지 못한 EtBr을 씻어냈다. 마지막으로 UV transilluminator 위에 gel을 올려놓고 DNA의 증폭여부를 확인하였다.

실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR): *Table* 1의 LAMP primer set중 HBV B3와 HBV F3를 이용하여 각 시료의 증폭 산물을 얻었다. 2X master mix, HBV F3 primer (10 pmole/uL), HBV B3 primer(10 pmole/uL), Template DNA (10^5~10 copy/mL)를 반응용액으로 사용하였다. 각각 20 uL의 반응 용액을 0.2 mL 반응 튜브에 넣은 후, Chromo4™ (Bio-rad, USA)를 이용해 실시간으로 DNA의 증폭 반응을 확인하였다. 실시간 DNA 증폭 반응 시 초기 10 분간 94 °C에서 제놈 DNA를 완전히 변성 시켰고, 94 °C에서 30 초간 DNA 변성, 60 °C에서 30 초간 프라이머 접합, 72 °C에서 45 초간 DNA 중합 효소에 의한 DNA 신장 반응, 신장 반응 후 형광 검출 1초를 1회로 하여 35회 반복 하였다. 증폭반응 후 54 °C에서 94 °C까지 0.5 °C/초의 간격으로 온도를 증가 시켜 melting curve 분석을 시행하여 B형 간염 바이러스 precore gene 부위만을 특이적으로 증폭 하였음을 확인하였다.

DNA 염기서열분석법에 의한 유전자 판별: HBV B3와 HBV F3 primer set만을 이용해 얻은 DNA증폭산물을 염기서열분석법(ABI 3730XL DNA analyzer, Applied Biosystem, USA)으로 분석하여 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 비교 후 B형 간염 바이러스의 precore gene 만을 증폭 하였음을 확인하였다.

결과 및 고찰

DHPLC 결과

HBV F3 primer와 HBV B3 primer를 이용하여 증폭한 PCR 산물(*Fig*. 1)을 UV 및 형광 검출기를 기반으로 한 DHPLC 기기로 확인 하였다(*Fig*. 2). UV 검출기와 형광 검출기를 비교 하였을 시에, 검출 한계 수치는 동일 하였다.

등온증폭반응(LAMP)산물의 확인

Table 1의 등온증폭 반응 primer set를 이용하여 사다리

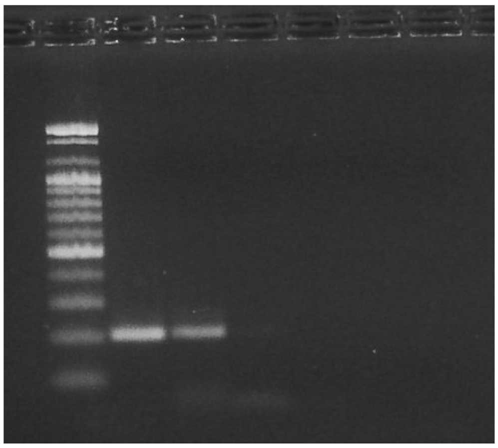

***Fig*. 1.** Identification of PCR products by 2% agarose gel electrophoresis. Lane 1: DNA size marker, Lane 2~6: Template HBV DNA 10^5~10 copys/mL, Lane 7: negative.

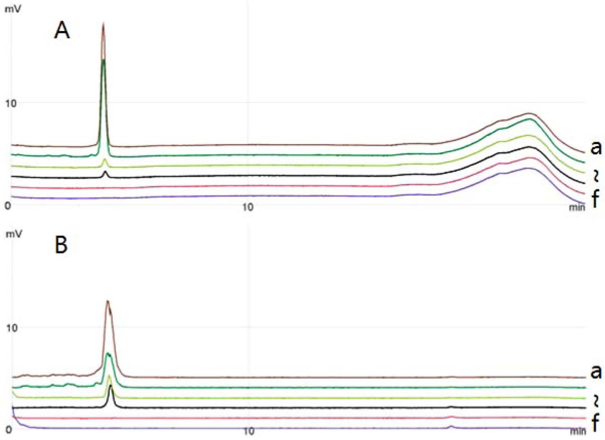

***Fig*. 2.** Detection limit of HBV precore gene using UV and fluorescence - DHPLC assay varying dilutions of the genomic DNA ranging undiluted DNA to 10^0 were used for the reactions. A: UV - DHPLC chromatograms, B: fluorescence - DHPLC chromatograms. The template HBV DNA concentrations were a : 10^5 copy/mL, b : 10^4 copy/mL, c : 10^3 copy/mL, d : 10^2 copy/mL, e : 10 copy/mL, f : no DNA.

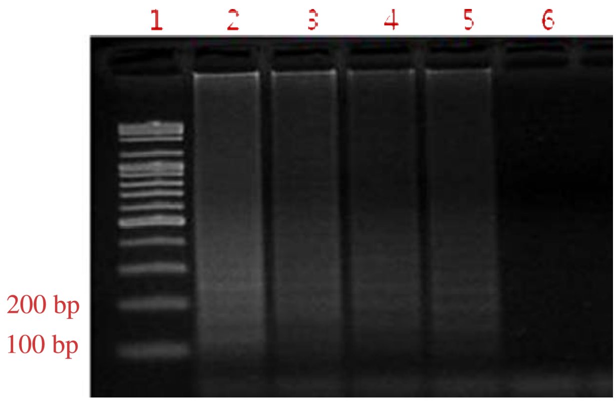

***Fig*. 3.** Detection limit of LAMP assay. Lane 1: DNA size marker, Lane 2~6: HBV DNA 10^5~10 copys/mL, Lane 7: negative.

형태의 증폭산물을 얻었다(*Fig*. 3).

검출 한계 수치는 10^2 copy/mL까지 검출이 가능 하였으며, 이 수치는 DHPLC의 검출 한계 수치와 동일하였다.

Real-time PCR 결과

Table 1의 LAMP primer set중 HBV B3와 HBV F3를 이용하여 각 시료의 증폭 산물을 얻었다. Chromo4^{TM}(Bio-rad, USA)를 이용해 실시간으로 DNA의 증폭 반응을 확인하였다. 검출 한계 수치는 10^3 copy/mL까지 검출이 가능하였다(*Fig*. 4). 증폭 반응 후 54 °C에서 94 °C까지 0.5 °C/초의 간격으로 온도를 증가 시켜 melting curve 분석을 시행한 결과 B형 간염 바이러스 precore gene 부위만을 특이적으로 증폭 하였음을 확인하였다(Tm=79.5 °C±0.2 °C, *Fig*. 5).

***Fig*. 5.** Melting curve analysis of real-time PCR.
***Fig*. 6.** Sequencing analysis for HBV precore gene genomic DNA.

DNA **염기서열 분석 결과**

Table 1의 LAMP primer set중 HBV B3와 HBV F3를 이용하여 얻은 증폭 산물을 정제하여 염기서열 분석 결과 B형 간염 바이러스 임을 확인 하였다(*Fig*. 6).

결 론

DHPLC기기는 기존의 HPLC기기에 기초하여 핵산 분석에 특화된 분석 기기이다. 핵산 검출에 특화된 컬럼을 사용하여, 핵산의 존재 유무 및 DNA 염기의 치환, 결실 또는 삽입의 유무를 분석하는 목적으로 사용되고 있다. 기존 DHPLC의 핵산 검출 시에는 주로 UV 검출기를 사용하여 260 nm에서 검출하였는데, 본 논문에서는 보다 높은 민감도의 결과를 얻기 위하여 형광 검출기를 사용하여 연구를 시행하였다.

등온증폭반응법은 한 온도 조건 하에서 증폭반응이 일어나기 때문에 검출 시간이 짧은 장점(30~60분, 최대 90분)이 있으며, 특별한 장비 없이 일정 온도를 유지 할 수 있는

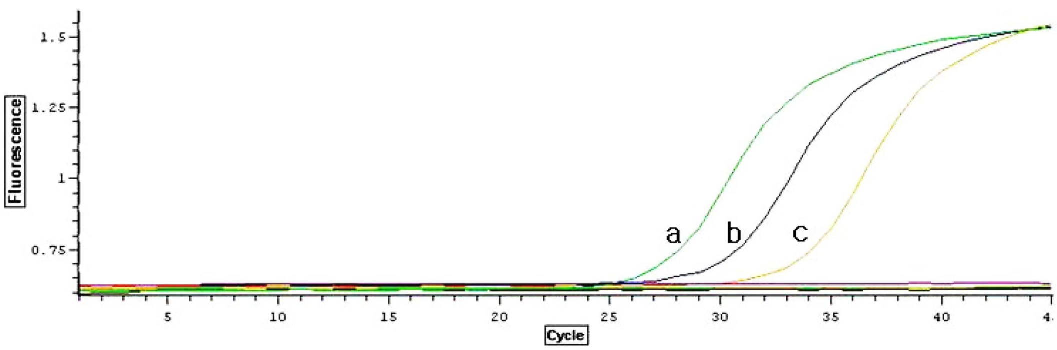

***Fig*. 4.** Detection limit of HBV precore gene using real-time PCR assay varying dilutions of the genomic DNA ranging undiluted DNA to 10^0 were used for the reactions. The template HBV DNA concentrations were a : 10^5 copy/mL, b : 10^4 copy/mL, c : 10^3 copy/mL.

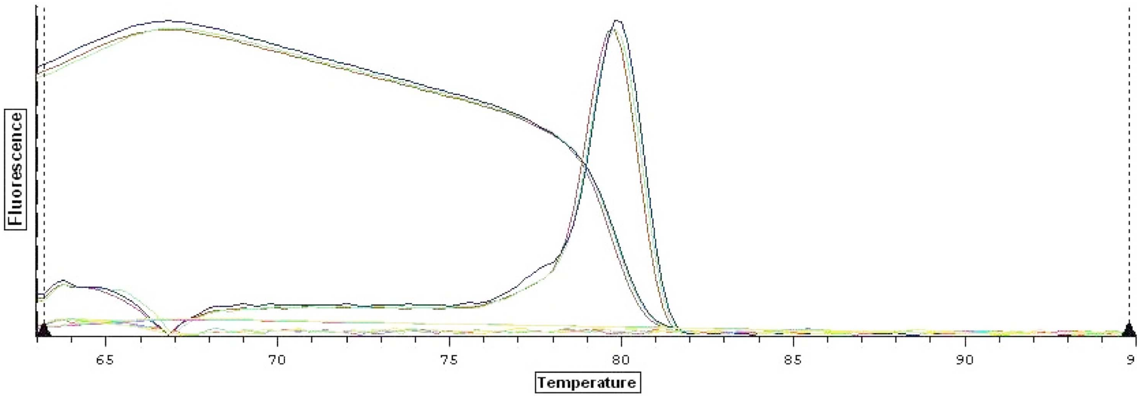

Fig. 5. Melting curve analysis of real-time PCR.

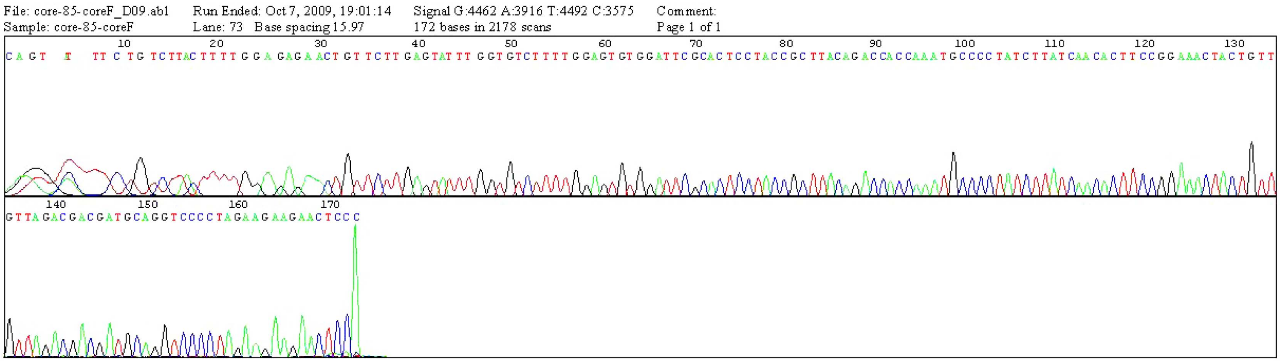

Fig. 6. Sequencing analysis for HBV precore gene genomic DNA.

환경에서는 쉽게 적용이 가능하다.

따라서 본 논문에서는 DHPLC를 이용한 검출법과 등온증폭반응법의 임상 적용 가능성을 판단 하기 위하여, 기존 임상에서 적용 하고 있는 B형 간염 바이러스의 검출방법 중 real-time PCR과 DHPLC 그리고 등온증폭반응법을 비교 분석 하였다.

본 연구의 결과, UV 검출기를 사용한 DHPLC 분석법과 형광 검출기를 사용한 DHPLC의 결과 사이에는 두드러진 민감도의 차이를 보이지 않았다. 또한, 등온증폭반응법의 검출 결과는 DHPLC법과 동일한 민감도를 보였다. 하지만 위 두 가지 검출 방법은 기존 임상에서 사용하고 있는 real-time PCR 방법보다 10배 정도 높은 민감도를 보였다. DHPLC법과 등온증폭반응법의 결과(*Fig.* 2, 3)를 보았을 때, 임상에서 B형 간염 바이러스의 감염을 판단하는 기준치인 10^5 copy/ml을 충분히 검출 할 수 있는 검사 방법임을 알 수 있다. 따라서, 위 두 검출 방법이 임상에서 B형 간염 바이러스의 검출에 유용하게 사용될 수 있음을 밝혔다.

현 시점에서는 B형 간염 바이러스의 감염 여부의 판별도 중요하지만, 항바이러스제 내성 B형 간염 바이러스의 검출에 관한 연구가 진행 되고 있다. B형 간염의 경우 오랜 기간 약물 치료를 받는 동안 환자의 체내에서 항바이러스제 내성 B형 간염 바이러스의 생성됨이 밝혀졌다. 따라서 차후 연구에서는 DHPLC를 이용한 항바이러스제 내성 B형 간염 바이러스의 검출법에 관한 연구를 진행 할 예정이다.

본 연구는 2008년도 동남보건대학 연구비 지원에 의하여 수행 된 것임.

REFERENCES

1. Zimmermann, B.; El-Sheikhah, A.; Nicolaides, K.; Holzgreve, W.; Hahn, S. *Clinical Chemistry* **2005**, *519*, 1598.
2. Osipova, G. R.; Karmanov, M. E.; Kozlova, S. I.; Evgrafov, O. V. *American Journal of Medical Genetics* **1998**, *76*, 283.
3. Sivakumaran, T. A.; Kucheria, K.; Oefner, P. J. *CURRENT SCIENCE*. **2003**, *3*, 84.
4. Underhill, P. A.; Jin, L.; Lin, A. A. *Genome Res*. **1997**, *7*, 996.
5. Chen, C.; Cui, S. *Journal of Virological Methods*. **2009**, *155*, 122.
6. Salih, D. A.; Luo, J.; Yin, H.; Ahmed, J. S.; Seitzer, U. *Parasitol Res*. **2008**, *103*, 1407.
7. Komiyama, C.; Suzuki, K.; Miura, Y.; Sentsui, H.; *Jour-*

nal of Virological Methods. **2009**, *157*, 175.
8. Qiao, Y. M.; Guo, Y. C.; Zhang, X. E.; Zhou, Y. F.; Zhang, Z. P.; Wei, H. P.; Yang, R. F.; Wang, D. B. *Biotechnol Lett*. **2007**, *29*, 1939.
9. Goto, M.; Hayashidani, H.; Takatori, K.; Hara-Kudo, Y. *The Society for Applied Microbiology* **2007**, *45*, 100.
10. Qiao, Y. M.; Guo, Y. C.; Zhang, X. E.; Zhou, Y. F.; Zhang, Z. P.; Wei, H. P.; Yang, R. F.; Wang, D. B. *Biotechnol Lett.* **2007**, *29*, 1939.
11. Preiss, S.; Littlejohn, M.; Angus, P.; Thompson, A.; Desmond, P.; Lewin, S. R.; Sasadeusz, J.; Matthews, G.; Dore, G. J.; Shaw, T.; Sozzi, V.; Yuen, L.; Lau, G.; Ayres, A.; Thio, C.; Avihingsanon, A.; Ruxrungtham, K.; Locarnini, S.; Revill, P. A. *Hepatology* **2008**, *48*, 741.
12. Leb, V.; Stöcher, M.; Thon, E. V.; Hölzl, G.; Kessler, H.; Stekel, H.; Berg, J. *Journal of Clinical Microbiology* **2004**, *42*, 585.
13. Allice, T.; Cerutti, F.; Pittaluga, F.; Varetto, S.; Gabella, S.; Marzano, A.; Franchello, A.; Colucci, G.; Ghisetti, V. *Journal of Clinical Microbiology* **2007**, *45,* 828.
14. Oropeza, C. E.; Li, L.; McLachlan, A. *Journal of Virology* **2008**, *82*, 3814.
15. Ronsin, C.; Pillet, A.; Bali, C.; Denoyel, G. A. *Journal of Clinical Microbiology* **2006**, *44*, 1390.
16. Shih, H. H.; Jeng, K. S.; Syu, W. J.; Huang, Y. H.; Su, C. W.; Peng, W. L.; Sheen, I. J.;. Wu, J. C. *Journal of Virology* **2008**, *82*, 2250.
17. Lu, Y. P.; Guo, T.; Wang, B. J.; Dong, J. H.; Zhu, J. F.; Liu, Z.; Lu, M. J.; Yang, D. L. *World J Gastroenterol*. **2008**, *14*, 3490.
18. Liu, Y.; Hussain, M.; Wong, S.; Fung, S. K.; Yim, H. J.; Lok, A. S. F. *Journal of Clinical Microbiology* **2007**, *45*, 553.
19. Kim, J. H.; Choi, K. S. *Bio Wave* **2003**, *5*(2).