

Sularda, İnsan Enfeksiyonları ile İlişkili Norovirus Genogruplarının Real-Time PCR Yöntemi ile Saptanması

Mehmet Demirci¹, Akın Yiğit², Nadire Eser³, Hikmet Dinç⁴

¹Beykent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul Türkiye.

²Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

³Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Kahramanmaraş, Türkiye

⁴Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 09.10.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 11.11.2018

Özet: İnsan norovirüsü (HNoV), çevresel etkenlere oldukça dirençli bir RNA virüsüdür ve akut viral gastroenteritin nedeni olan ana etkenlerden birisidir. Hızlı evrim yeteneği nedeniyle 7 genogrubu vardır ve bunlardan GI, GII ve GIV insan enfeksiyonları ile ilişkilidir. Sular HNoV için salgın aracı olarak tanımlanmaktadır. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, lokal kuyular ve derelerden alınan su numunelerinde özellikle insanlarda enfeksiyonları ile ilişkili HNoV genogrup (G)I, GII ve GIV varlığının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time PCR) ile tanımlanarak moleküler epidemiyolojik bir veri sağlanması amaçlanmıştır.

Çalışma için lokal kuyulardan ve derelerden, Ocak 2017 – Ocak 2018 döneminde toplanan 60 adet su numunesi çalışmamıza dahil edildi. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sonrası HNoV GI, GII ve GIV spesifik primer problemler ile LightCycler 480 sisteminde real-time PCR yöntemi ile çalışıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

Çalışmamıza dâhil edilen 60 numunede, HNoV GII'nin %10 düzeyinde saptandığı, bunu sırasıyla GI (%5) ve GIV (%1.67) varlığının takip ettiği tespit edildi. 10 numunede (%16.67) HNoV GI, GII ve GIV pozitifliği bulundu. Lokal kuyulardan 3 (%8.57) tanesinde ve derelerden alınan numunelerden de 7 (%28) tanesinde pozitiflik saptandı.

Sonuç olarak, ülkemizde ilk defa kuyu suları ve derelerden alınan sularla yaptığımız çalışmamızla, moleküler epidemiyolojik olarak HNoV varlığını saptadık. HNoV'lar arasında GII'nin ön planda tutulması gerektiğini ama GI ve GIV'ünde bulunduğunu tespit ettik. HNoV için salgınlarında sular göz önünde bulundurulmalı ve gelişen moleküler tekniklerle, sular gibi önemli enfeksiyon kaynaklarından epidemiyolojik veriler sağlanarak durum ortaya konabilir ve bu bilgiler ile bölgesel aşı geliştirme çalışmaları içinde ön veriler sağlanabileceği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Su, real-time PCR, Norovirus genogrupları

Determination of Norovirus Genogroups Associated with Human Infections in Water by Real-Time PCR Method

Abstract: Human norovirus (HNoV) is a RNA virus that is highly resistant to environmental conditions and is one of the main causes of acute viral gastroenteritis. It has 7 genogroups, due to ability of rapid evolution, and which genogrup (G)I, GII and GIV are associated with human infections. The waters describe HNoV as an epidemic source. Aim of this study was to provide molecular epidemiological data by using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) of HNoV GI, GII and GIV presence related to infections in water samples taken from local underground waters and creeks.

Sixty (60) water samples collected from local underground waters and creeks, between January 2017 and January 2018, were included in our study. After RNA isolation and cDNA synthesis, HNoV GI, GII and GIV specific primary and probes were used on LightCycler 480 system by real-time PCR method and the results were evaluated.

In the 60 samples included in our study, it was found that HNoV GII was detected at 10% level, followed by GI (5%) and GIV (1.67%) respectively. HNoV GI, GII and GIV positivity were found in 10 samples (16.67%). 3 (8.57%) of the local underground waters and 7 (28%) of the creeks water samples were found positive.

As a result, we determined the presence of HNoV by molecular epidemiology in our country for the first time in our study with water taken from underground waters and creeks. We found that GII should be in the forefront of HNoVs, but it was found in GI and GIV. For HNoV, water should be considered in outbreaks, and epidemiological data can be obtained from important sources of infection, such as water, by developing molecular techniques, and we believe that data in this study can be important epidemiologically and can be used for regional vaccine development studies.

Key words: Water, real-time PCR, Norovirus genogroups

Giriş

İnsan norovirüsü (HNoV), Caliciviridae ailesi içinde bulunan pozitif polariteli bir RNA virüsüdür ve akut viral gastroenteritin nedeni olan ana etkenlerden birisidir [12]. Çevresel etkenlere oldukça dirençli olan HNoV, dünya çapında sporadik ve epidemik bakteriyel olmayan (viral) gastroenteritlere neden olur (15). HNoV esas olarak fekal-oral yoldan yayılır. Bulaşması, doğrudan (kişiden kişiye geçişle), dolaylı (kontamine ürünlere temas yoluyla) ve kontamine yiyecek veya suların sindirimi yoluyla olabilir [17]. Hızlı moleküler evrim yeteneği nedeniyle, virüsün yeni genotipleri ve varyantları sıklıkla bildirilmektedir. Hatta nükleik asitinde bu hızlı değişim yeteneği nedeniyle fantastik bir canavara (“şekil değiştiren”) benzetilmektedir. Şu ana kadar viral protein genomu (VP1) aminoasit dizisinin incelenmesi ile 7 genogrup ([G]I – GVII) ve 40’ın üzerinde norovirus genotipi tanımlanmıştır [19]. Bunlardan üçü GI, GII ve GIV insanlarda hastalığa neden olabilir [1]. GII genogrup, klinik vakalarda GI’den daha sık saptanırken, GIV’ün daha nadir vakalarda tespit edildiği bildirilmiştir [10]. GII.4 dünya çapında en yaygın olan genotiptir ve 1990’ların ortasından beri moleküler tanı tekniklerinin, aktif sürveyans için kullanımının başlamasından beri, pek çok küresel salgınla ilişkilendirilmiştir [19]. Norovirus enfeksiyonları, 12-48 saat inkübasyon süresine sahiptir ve semptomlar tipik olarak bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı ve ateşi içerir. Norovirus enfeksiyonları genellikle hafif ve orta semptomlarla kendini sınırlandırır, ancak immün sistemi baskılanmış hastalarda ve yaşlılarda ciddi enfeksiyonlar görülebilir. Semptomlar genellikle 1-3 gün sürer, ancak genç, yaşlı ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda daha uzun sürebilir [5]. İlk defa 1980 yılında küçük bir kasabada su kaynaklı norovirus salgını olduğu rapor edilmiştir [8] ve bu bilgi sonrası epidemiyolojik veriler bu etkenin suları salgın aracı olarak kullandığını tanımlamıştır. Özellikle, su kaynaklı, büyük ölçekli salgınlarda norovirus türleri saptandığında, içme sularının, insan dışkı kaynağı tarafından kontaminasyonu da düşünülmelidir [6]. HNoV’un genotipik değişkenliği nedeniyle yapılacak olan moleküler epidemiyolojik çalışmalar, salgınlarda gözlemlenebilecek durumu açıklaması açısından ve ayrıca aşı çalışmaları içinde önemli

bir veri sağlamaktadır [19]. Bunun yanında bulaşık suların kullanılması ağır metal toksikasyonu ya da bakteriyel kaynaklı gastroinstestinal enfeksiyonlar ile karışabildiği için bu virüsün durumunun ortaya konması önemli hale gelmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, lokal kuyular ve derelerden alınan su numunelerinde özellikle insanlarda enfeksiyonlar ile ilişkili HNoV genogrup (G)I, GII ve GIV varlığının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time PCR) ile tanımlanarak moleküler epidemiyolojik bir veri sağlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma için Mardin, Gaziantep, Şanlıurfa ve Kahramanmaraş il, ilçe ve köylerinde bulunan lokal kuyulardan ve derelerden, Ocak 2017 – Ocak 2018 döneminde 5 ml olarak steril plastik kaplara toplanan 60 adet su numunesi çalışmamıza dahil edildi. Numuneler soğuk zincir koşullarında hızlıca laboratuvara transfer edildi ve RNA izolasyonları 24 saat içinde tamamlandı. Schultz ve ark. [18], 2010 yılında tanımladıkları protokol izlenerek, su numunelerinden RNA izolasyonu için ultrafiltrasyonla numuneler işleme alındı. Ultrafiltrasyon sonrası bu numunelerin 200 mikrolitre miktarları ile, QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda RNA izolasyonları gerçekleştirildi. RNA’lar, komplementer DNA (cDNA) sentezi işlemlerine kadar -80°C’de saklandı. cDNA’lar First Strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda oluşturuldu. cDNA’lar real-time PCR aşamasına kadar -20°C’de saklandı. İnsanlarda enfeksiyonlarla ilişkili olan HNoV GI, GII ve GIV genogruplarını saptayabilmek için Tablo 1’de verilen spesifik primer ve probalar kullanıldı [3, 16]. RNA izolasyonlarının doğruluğunu kontrol etmek için çalışmada RNA process control kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) üretici direktifleri doğrultusunda kullanıldı.

cDNA’lar, primer ve proba birlikte, LightCycler 480 Probe Master kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) üretici direktifleri doğrultusunda kullanılarak, real-time PCR işlemleri, LightCycler 480 sisteminde gerçekleştirildi. Her bir reaksiyonda 5 ul cDNA kullanıldı ve PCR profili başlangıç akti-

stasyon aşaması olarak; 95°C’de 10 dakika, takiben 45 siklus, denaturasyon, uzama ve çoğaltma aşaması olarak sırasıyla 95°C’de 10sn, 60°C’de 30 sn ve 72°C’de 1 sn şeklinde gerçekleştirildi.

Tablo 1: Genogrup I, GII ve GIV saptanması için real-time PCR’da kullanılan primer dizileri

Genogrup	Primer Adı	Oligonukleotid dizisi (5’ > 3’)	Referans
GI	QNIF4	CGCTGGATGCGNTTCCAT	11
	NV1LCR	CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	11
	NV1LCpr	FAM- TGGACAGGAGAYCGCRATCT-TAMRA	11
GII	QNIF2d	ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA	11
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	11
	QNIFS	FAM- AGCACGTGGGAGGGGATCG-TAMRA	11
GIV	NIFG4F	ATGTACAAGTGGATGCGRTTC	12
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	12
	NIFG4P	FAM-AGCACTTGGGAGGGGATCG-TAMRA	12

Bulgular

Çalışmamıza dahil edilen 60 numunede saptanan genogrupların dağılımı Tablo 2’de verilmiştir. 60 numuneden, 10 tanesinde (%16.67) HNoV GI, GII ve GIV pozitifliği bulundu. Lokal kuyulardan 3

(%8.57) tanesinde ve derelerden alınan numunelerden de 7 (%28) tanesinde pozitiflik saptandı. HNoV genogrupları incelendiğinde, 6 (%10) numunede GII, 3 (%5) numunede GI ve 1 (%1.67) numunede GIV olduğu saptandı.

Tablo 2: Genogrupların dağılımı

	Norovirüs Genogrup			
	GI	GII	GIV	Toplam
Lokal Kuyular n:35	1 (2.86)	2 (5.71)	0 (0)	3 (8.57)
Dereler n:25	2 (8.00)	4 (16.00)	1 (4.00)	7 (28.00)
Toplam: 60	3 (5.00)	6 (10.00)	1 (1.67)	10 (16.67)

Derelerden alınan sularda özellikle GII %16 olarak en yüksek düzeyde saptanırken, derelerden alınan sularda GI, GII ve GIV pozitifliği %28 oranında bulundu. Lokal kuyularda ise GI %2.86 ve GII %5.71 oranında saptanırken, GIV pozitifliği bulunmadı. GIV sadece 1 numunede derelerden alınan numuneler arasından saptandı. Derelerde, kuyulardan alınan numunelere göre daha yüksek sayıda HNoV pozitifliği saptandığı tespit edildi.

Tüm numunelerde durum incelendiğinde, Numunelerde, HNoV GII’nin %10 düzeyinde saptandığı, bunu sırasıyla GI (%5) ve GIV (%1.67) varlığının takip ettiği tespit edildi.

Pozitiflik saptanan sularda Norovirüs ve genogrupların dağılımı incelendiğinde, Ocak aylarında en yüksek pozitiflik saptandığı, bunu Şubat ayının izlediği görülmektedir (Tablo 3).

Tablo 3: Norovirüs ve genogruplarının mevsimsel dağılımı

Ay	Norovirüs			Toplam
	GI	GII	GIV	
Ocak 17	1	1	0	2
Şubat 17	1	1	0	2
Mart 17	0	0	0	0
Nisan 17	0	0	0	0
Mayıs 17	0	0	0	0
Haziran 17	0	0	0	0
Temmuz 17	0	0	0	0
Ağustos 17	0	0	0	0
Eylül 17	0	1	0	1
Ekim 17	0	1	0	1
Kasım 17	0	1	0	1
Aralık 17	1	0	0	1
Ocak 18	0	1	1	2
Toplam	3	6	1	10

Tartışma ve Sonuç

Su kaynaklı virüslerin saptanması, özellikle içilebilir suyun az olduğu yerlerde halk sağlığı açısından önemlidir. Su kaynaklı enfeksiyonlarda norovirüs yaygın olarak bildirilmektedir. Doğası gereği, bu kontaminasyon sıklıkla biyolojik atıklarla ilişkilidir [4]. Çevre koşullarında uzun süre yaşama şansı olduğu için bu Norovirüslerin önemini arttırmaktadır [9]. Yenilenme yeteneği hızlı olan ve farklı pek çok genogrup, genotip ve varyantları bulunan norovirüslerin moleküler epidemiyolojik olarak sularda incelenerek durumunun bilinmesi, hem epidemiyolojik veri sunması, hem de ulusal aşı çalışmalarında da kullanılabilmesi açısından değerlidir [4].

Uluslararası çalışmalar incelendiğinde; Kuyular gibi yer altı sularında yapılan çalışmalarda, Joung ve ark, 2013 yılında, Güney Kore'de yer altı sularında sadece %0.5 oranında GII pozitifliği saptamışlardır [7]. Lee ve ark, 2013 yılında Güney Kore'de yaptıkları çalışmada yer altı sularını incelediklerinde, HNoV için %0.64 pozitiflik saptamışlar ve bu pozitif numunelerden sadece 1 tanesinde GI, 6 tanesinde GII olduğunu bildirmişlerdir [13]. Bizde çalışmamızda kuyu numunelerimizden sadece 3 tanesinde pozitiflik saptadık, verilen oranlara benzer şekilde kuyu numunelerinde dere gibi kontaminasyona daha açık numunelere göre daha düşük se-

viyede HNoV varlığı olduğu anlaşılmaktadır. Tüm çalışmalarda GII varlığının bizim çalışmamızdaki-ne benzer şekilde yüksek olduğu görülmektedir.

Yine uluslararası çalışmalarda, derelerdeki durum incelendiğinde, Aw ve ark, 2009 yılında Singapur'da derelerde yaptıkları çalışmalarında 60 numuneden 4 tanesinde (%9.3) GI, 16 tanesinde (%37.2) GII ve 23 tanesinde (%53.5) GI ve GII birlikteliği olmak üzere toplam 43 (%71.7) HNoV pozitifliği bildirmişlerdir (2). Lodder ve ark, 2005 yılında Hollanda'da yaptıkları çalışmalarında derelerde 7 pozitiflik saptamışlar ve bunların 2 tanesini GI ve 5 tanesini GII olarak tespit etmişlerdir [14]. Kim ve ark, 2016 yılında Güney Kore'de yaptıkları çalışmalarında, GI için %13.3 ve GII için %16.6 pozitiflik bildirmişlerdir [11]. Vantarakis ve ark, 2011 yılında Yunanistan'da yaptıkları çalışmalarında derelerden aldıkları su numunelerinde, %56.8 oranında HNoV bildirmişler ve bunların tamamının GII olduğunu rapor etmişlerdir [21]. Dere gibi biyolojik kontaminasyona kuyulara göre daha açık sularda HNoV kontaminasyonunun daha yüksek seviyelerde olduğu ve ülkeden ülkeye hatta bölgeden bölgeye değişiklik gösterdiği görülmektedir. Bizim çalışmamızda saptadığımız %28'lik pozitifliğin bu anlamda çalışmalarla benzerlik gösterdiğini söyleyebiliriz. Ayrıca çalışmamızdaki-ne benzer şekilde GII varlığı, diğer genogruplara göre ağırlık göstermektedir.

Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde, sıklıkla salgınlarla ilişkili olarak dışkı numunelerinden incelemeler yapıldığı ve literatürde bizim çalışmamıza benzer şekilde sular ile yapılmış bir çalışmaya rastlamadık. Her ne kadar aynı numune üzerinden olmasada Timurkan ve ark [20], dışkı numunelerinde yaptıkları çalışmalarında, GII'yi en yüksek düzeyde saptadıklarını, 1'er numunede de GI ve GIV varlığı bulduklarını bildirmişlerdir. Bu veride, yine çalışmamız verilerine benzer şekilde GII varlığının ülkemizde diğer ülkelere de benzer şekilde yüksek olduğunu ama GI ve GIV'ünde olabileceğini bize düşündürmüştür.

Norovirüs genotiplerinin mevsimsel dağılımının incelendiği çalışmalara bakıldığında, Kim ve ark [11], Güney Kore'de sularda saptadıkları Norovirüs pozitifliklerini bizim çalışmamızdaki-ne benzer şekilde kış aylarında arttığını bildirmişlerdir. Delgado-Gardea ve ark [4] 2017 yılında Meksika'da yap-

tıkları çalışmada, sularda Ekim ayında daha yüksek konsantrasyonda Norovirüs pozitifliği saptadıklarını bildirmişlerdir. Jalava ve ark [6], 2014 yılında Finlandiya'daki salgınlar sırasında suları incelediklerinde Temmuz ayında sularda Norovirüs pozitifliği saptamışlardır. Ülkemiz ve Finlandiya arasında ısı farklılığı göz önüne alındığında, ısı farklılığının çalışmamız sonuçlarına göre fark yarattığını bize düşündürmüştür. Kauppinen ve Miettinen [9], 2017 yılında yaptıkları çalışmada bu düşüncemizi desteklemişlerdir. 3°C, 21°C ve 36°C'da sularda Norovirüs kantitatif durumunu incelediklerinde 36°C'da Norovirüs kantitatif miktarların en düşük seviyede olduğunu ve ısı artışı ile düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir. İncelediğimiz çalışmalardaki Norovirüs'ün mevsimsel dağılımı sonuçları çalışmalarımız sonuçları ile benzer saptanmıştır.

Sonuç olarak, ülkemizde ilk defa kuyu suları ve derelerden alınan sularla yaptığımız çalışmamızla, moleküler epidemiyolojik olarak HNoV varlığının sularımızda olabileceğini, derelerde, kuyu sularına göre kirliliğin daha fazla düzeyde olabileceğini saptadık. HNoV'lar arasında GII'nin ön planda tutulması gerektiği ama GI ve GIV'ünde varlığının olduğunu gözlemledik. Halk sağlığı problemi oluşturmaması açısından, HNoV salgınlarında sular göz önünde bulundurulmalı ve yeni moleküler tekniklerle sular gibi önemli enfeksiyon kaynaklarından epidemiyolojik veriler elde edilerek durum ortaya konabilir ve bu bilgiler ile bölgesel aşı geliştirme çalışmaları içinde ön veriler sağlanabileceği kanaatindeyiz.

Kaynaklar

- Atmar RL, (2010). *Noroviruses – State of the Art*. Food and environmental virology. 2(3), 117-126. doi:10.1007/s12560-010-9038-1.
- Aw TG, Gin KY-H, Ean Oon LL, Chen EX, Woo CH, (2009). *Prevalence and Genotypes of Human Noroviruses in Tropical Urban Surface Waters and Clinical Samples in Singapore*. Applied and Environmental Microbiology. 75(15), 4984-4992. doi:10.1128/AEM.00489-09.
- Da Silva AK, Le Saux J-C, Parnaudeau S, Pommepuy M, Elimelech M, Le Guyader FS, (2007). *Evaluation of Removal of Noroviruses during Wastewater Treatment, Using Real-Time Reverse Transcription-PCR: Different Behaviors of Genogroups I and II*. Applied and Environmental Microbiology. 73(24), 7891-7897. doi:10.1128/AEM.01428-07.
- Delgado-Gardea MCE, Tamez-Guerra P, Gomez-Flores R, Mendieta-Mendoza A, Zavala-Díaz de la Serna FJ, Contreras-Cordero JF, Erosa-de la Vega G, Pérez-Recoder MC, Sánchez-Ramírez B, González-Horta C, Infante-Ramírez R, (2017). *Prevalence of Rotavirus Genogroup A and Norovirus Genogroup II in Bassaseachic Falls National Park Surface Waters in Chihuahua, Mexico*. International Journal of Environmental Research and Public Health. 14(5), 482. doi:10.3390/ijerph14050482.
- Huang X-Y, Su J, Lu Q-C, Li SZ, Zhao JY, Li ML, Li Y, Shen X-J, Zhang B-F, Wang H-F, Mu Y-J, Wu S-Y, Du Y-H, Liu L-C, Chen W-J, Klena JD, Xu B-L, (2017). *A large outbreak of acute gastroenteritis caused by the human norovirus GII.17 strain at a university in Henan Province, China*. Infectious Diseases of Poverty. 6, 6. doi:10.1186/s40249-017-0236-z.
- Jalava K, Rintala H, Ollgren J, Maunula L, Gomez-Alvarez V, Revez J, Palander M, Antikainen J, Kauppinen A, Räsänen P, Siponen S, Nyholm O, Kyyhkynen A, Hakkarainen S, Merentie J, Pärnänen M, Loginov R, Ryu H, Kuusi M, Siitonen A, Miettinen I, Santo Domingo JW, Hänninen M-L & Pitkänen T, (2014). *Novel Microbiological and Spatial Statistical Methods to Improve Strength of Epidemiological Evidence in a Community-Wide Waterborne Outbreak*. PLoS ONE. 9(8), e104713. doi:10.1371/journal.pone.0104713.
- Joung HK, Han SH, Park S-J, Jheong WH, Ahn TS, Lee JB, Jeong Y-S, Jang KL, Lee G-C, Rhee O-J, Park J-W, Paik SY, (2013). *Nationwide Surveillance for Pathogenic Microorganisms in Groundwater near Carcass Burials Constructed in South Korea in 2010*. International Journal of Environmental Research and Public Health. 10(12), 7126-7143. doi:10.3390/ijerph10127126.
- Kaplan JE, Goodman RA, Schonberger LB, Lippy EC, Gary GW, (1982). *Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system*. J Infect Dis. 146(2), 190-197.
- Kauppinen A, Miettinen IT, (2017). *Persistence of Norovirus GII Genome in Drinking Water and Wastewater at Different Temperatures*. Pathogens. 6(4), 48. doi:10.3390/pathogens6040048.
- Kazama S, Miura T, Masago Y, Konta Y, Tohma K, Manaka T, Liu X, Nakayama D, Tanno T, Saito M, Oshitani H, Omura T, (2017). *Environmental Surveillance of Norovirus Genogroups I and II for Sensitive Detection of Epidemic Variants*. Applied and Environmental Microbiology. 83(9), e03406-16. doi:10.1128/AEM.03406-16.
- Kim MS, Koo ES, Choi YS, Kim JY, Yoo CH, Yoon HJ, Kim T-O, Choi HB, Kim JH, Choi JD, Park K-S, Shin Y, Kim Y-M, Ko GP, Jeong YS, (2016). *Distribution of Human Norovirus in the Coastal Waters of South Korea*. PLoS ONE. 11(9), e0163800. doi:10.1371/journal.pone.0163800.
- Koo ES, Kim MS, Choi YS, Park K-S, Jeong YS. (2017). *Occurrence of novel GII.17 and GII.21 norovirus variants in the coastal environment of South Korea in 2015*. PLoS ONE. 12(2), e0172237. doi:10.1371/journal.pone.0172237.
- Lee B-R, Lee S-G, Park J-H, Kim KY, Ryu SR, Rhee OJ, Park J-W, Lee J-S, Paik S-Y, (2013). *Norovirus Contamination Levels in Ground Water Treatment Systems*

- Used for Food-Catering Facilities in South Korea. *Viruses*. 5(7), 1646-1654. doi:10.3390/v5071646.
14. Lodder WJ, de Roda Husman AM, (2005). *Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses in Sewage and Surface Waters in The Netherlands*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(3), 1453-1461. doi:10.1128/AEM.71.3.1453-1461.2005.
 15. Masago Y, Konta Y, Kazama S, Inaba M, Imagawa T, Tohma K, Saito M, Suzuki A, Oshitani H, Omura T, (2016). *Comparative Evaluation of Real-Time PCR Methods for Human Noroviruses in Wastewater and Human Stool*. *PLoS ONE*. 11(8), e0160825. doi:10.1371/journal.pone.0160825.
 16. Miura T, Parnaudeau S, Grodzki M, Okabe S, Atmar RL, Le Guyader FS (2013). *Environmental Detection of Genogroup I, II, and IV Noroviruses by Using a Generic Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(21), 6585-6592. doi:10.1128/AEM.02112-13.
 17. Pouillot R, Van Doren JM, Woods J, Plante D, Smith M, Goblick G, Roberts C, Locas A, Hajen W, Stobo J, (2015). *Meta-Analysis of the Reduction of Norovirus and Male-Specific Coliphage Concentrations in Wastewater Treatment Plants*. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(14), 4669-4681. doi:10.1128/AEM.00509-15.
 18. Schultz AC, Perelle S, Di Pasquale S, Kovac K, De Medici D, Fach P, Sommer HM, Hoorfar J, (2011). *Collaborative validation of a rapid method for efficient virus concentration in bottled water*. *Int J Food Microbiol*. 1;145 Suppl 1:S158-66. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.030.
 19. Siqueira JAM, Bandeira R da S, Oliveira D de S, dos Santos LFP, Gabbay YB (2017). *Genotype diversity and molecular evolution of noroviruses: A 30-year (1982-2011) comprehensive study with children from Northern Brazil*. *PLoS ONE*. 12(6), e0178909. doi:10.1371/journal.pone.0178909.
 20. Timurkan MÖ, Aydın H, Aktaş O, (2017). *Frequency and molecular characterization of human norovirus in Erzurum, Turkey*. *Turk J Med Sci*. 12;47(3), 960-966. doi: 10.3906/sag-1509-87.
 21. Vantarakis A, Mellou K, Spala G, Kokkinos P, Alamanos Y, (2011). *A Gastroenteritis Outbreak Caused by Noroviruses in Greece*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2011;8(8), 3468-3478. doi:10.3390/ijerph8083468.