creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

공학박사 학위논문

이매패류에 오염된 노로바이러스의 검출법 정립과 불활성화 연구

2009년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

李 熙 政

공학박사 학위논문

이매패류에 오염된 노로바이러스의 검출법 정립과 불활성화 연구

指導敎授 金 榮 穆

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함

2009년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 공 학 과

李 熙 政

李熙政의 工學博士 學位論文을 認准함

2009年 8月

主 審	工學博士	金 榮 萬	㊞
委 員	理學博士	李 明 淑	㊞
委 員	農學博士	金 善 奉	㊞
委 員	農學博士	梁 志 榮	㊞
委 員	藥學博士	金 榮 穆	㊞

목 차

Abstract ····· 1

서론 ····· 4

재료 및 방법 ····· 8

1. 시료 및 재료 ····· 8

1.1. 패류 ····· 8

1.2. 해수 ····· 8

1.3. 대체 바이러스(Feline calicivirus, FCV) ····· 12

1.4. 장치 ····· 12

2. 실험 방법 ····· 17

2.1. 패류 및 해수의 위생지표세균 분석 ····· 17

2.2. 패류 생산해역 해수의 이화학적 수질 분석 ····· 17

2.3. 대조구 노로바이러스 접종단위 결정 ····· 17

2.4. 노로바이러스 접종 패류의 전처리 ····· 18

2.5. 패류 중 노로바이러스의 농축법 비교 ····· 18

2.6. RNA 추출법 비교 ····· 19

2.7. 중합효소 연쇄반응 ····· 25

2.8. 노로바이러스의 계통학적 분석 ····· 36

2.9. 해수 중 노로바이러스 농축 ····· 37

2.10. Standard curve의 작성 ····· 39

2.11. 초고압 처리 ····· 41

2.12. 전기분해해수 처리 ····· 41
2.13. 광촉매 자외선 처리 ····· 42
2.14. FCV 감염력 측정 ····· 42
2.14. 굴의 품질분석 ····· 44

결과 및 고찰 ····· 46
1. 이매패류 중 노로바이러스 검출법 정립 ····· 46
1.1. 노로바이러스 농축방법 비교 ····· 47
1.2. RNA 추출방법 비교 ····· 49
1.3. Primer 적합성 비교 ····· 52

2. 이매패류의 노로바이러스 오염실태 ····· 55
2.1. 노로바이러스 검출율 ····· 56
2.2. 세균학적 품질과 노로바이러스 검출과의 관계 ····· 62
2.3. 검출된 노로바이러스의 계통학적 해석 ····· 65

3. 이매패류 생산해역 해수 중 노로바이러스 오염범위 조사 ·· 68
3.1. 검출한계 측정 및 standard curve 작성 ····· 68
3.2. 노로바이러스 농도 결정 ····· 68
3.3. 해수의 노로바이러스 검출 농도와의 상관성 ····· 73

4. 노로바이러스 불활성화 조건 구명 ····· 81
4.1. 초고압 처리에 의한 노로바이러스 불활성화 ····· 81
4.2. 초고압 처리에 따른 굴의 품질 변화 ····· 84
4.3. 전기분해해수 처리에 의한 노로바이러스 불활성화 ····· 90

4.4. 광촉매 자외선 처리에 의한 노로바이러스 불활성화 ····· 91

요약 ····· 95
감사의 글 ····· 98

참고문헌 ····· 99

List of Figures

Fig. 1. Sampling stations in the shellfish growing areas. ····· 10

Fig. 2. Sampling site of seawater at the shellfish growing areas in the western coast of Korea. ····· 11

Fig. 3. Diagrams of high pressure processor 215L-600 system. ····· 14

Fig. 4. Principle of seawater electrolyzation. ····· 15

Fig. 5. Schematic diagram of photocatalyst UV system. ····· 16

Fig. 6. Protocol C for concentration of norovirus from shellfish. ····· 21

Fig. 7. Protocol F for concentration of norovirus from shellfish. ····· 22

Fig. 8. Protocol U for concentration of norovirus from shellfish. ····· 23

Fig. 9. Comparison of the RNA extraction efficiency. ····· 51

····· 51

Fig. 10. Norovirus detection rate of shellfish collected at each sampling station from February to November in 2007. ····· 58

Fig. 11. Norovirus detection rate in shellfish according to collecting time at 15 stations in 2007. ····· 60

Fig. 12. Norovirus detection rate according to shellfish species collected at 15 stations from February to November in 2007. ····· 61

Fig. 13. Phylogenetic tree based on partial sequences of ORF2 gene of norovirus detected in this study. ····· 67

Fig. 14. Standard curve for relative norovirus quantification for genogroup GI (a) and GII (b). ····· 69

Fig. 15. Effect of high pressure treatment for 60 sec at 25℃ on oyster tissue. ····· 87

Fig. 16. Effect of high pressure treatment for 60 sec on (a) Hunter L, (b) a and (c) b value of oyster adductor muscle. ····· 89

Fig. 17. Inactivation of feline calicivirus by electrolyzed seawater exposure. ····· 92
Fig. 18. Inactivation of feline calicivirus by irradiation of photocatalyst UV. ····· 94

List of Tables

Table 1. Sampling stations and species of shellfish ····· 9

Table 2. Tested methods to compare norovirus concentration efficiency · ····· 20

Table 3. RT-PCR conditions and composition of reaction mixture ····· 26

Table 4. Primers used in RT-nested PCR ····· 27

Table 5. Reaction mixture for the first PCR ····· 32

Table 6. Reaction mixture for the nested PCR ····· 32

Table 7. Primers used in RT-nested PCR ····· 34

Table 8. Reaction mixture for the first PCR ····· 35

Table 9. Reaction mixture for the nested PCR ····· 35

Table 10. RT-PCR conditions and composition of reaction mixture ····· 38

Table 11. Primers for TaqMan Real-time RT-PCR and RT-PCR ····· 40

Table 12. Composition of reaction mixture for Real-time PCR ····· 40

Table 13. Detection rate of norovirus according to concentration protocol and RNA extraction method ····· 48

Table 14. Detection rate of norovirus according to concentration protocol and RNA extraction method (isopropanol overnight treatment during Trizol® extraction in Method C and D) ····· 50

Table 15. Norovirus detection rate according to primer sets ····· 53

Table. 16. Norovirus detection in shellfish collected at 15 stations from February to November in 2007 ····· 59

Table 17. Bacteriological water quality of shellfish collected at 15 stations from February to November in 2007 ····· 63

Table 18. Physio-chemical conditions of seawater at sampling stations of shellfish from February to November in 2007 ····· 64

Table 19. Threshold cycle (Ct) of norovirus detected from seawater samples ····· 71

Table 20. Estimated norovirus relative concentration in seawater (particle/8 L) by real-time PCR ····· 72

Table 21. Physio-chemical conditions and bacteriological water quality of seawater ····· 74

Table 22. Correlation coefficient between temperature coliform group, fecal coliform, norovirus GI & GII and DO ····· 80

Table 23. Inactivation of feline calicivirus by high pressure treatment 83

Table 24. Effect of high pressure treatment on the proximal composition of tissue and adductor muscle of oyster ····· 86

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

Norovirus Detection and Inactivation in Bivalve Molluscan Shellfish

Hee-Jung Lee

Department of Food Science and Technology, Graduate School, Pukyong National University

Abstract

While the fecal coliform is universally accepted as the criterion for the bacteriological water quality of shellfish harvesting waters, the scientific consensus is that these indicators do not reflect the occurrence of norovirus in the marine environment. Because of the absence of effective indicator systems, scientists have attempted the direct detection of viruses from shellfish and their harvesting waters. These virus concentration and detection steps are limited by the need for large sample sizes to detect the low virus levels. Therefore, it is necessary to investigate the efficient method for the concentration of human noroviruses and standardize the detection of human norovirus in bivalve shellfish.

When shellfish was contaminated with virus, there are limited post-harvest options for inactivating infectious virus within shellfish while retaining the raw characteristics and high market value of the

product. Therefore, in this study, the concentration and detection method was evaluated for monitoring human norovirus in shellfish and the contamination status in shellfish and seawater in the Korean coastal area was investigated. And also the effect of high pressure, photocatalyst UV irradiation and electrolyzed seawater on inactivation of norovirus using feline calicivirus as surrogate of norovirus was evaluated. The results of this study were as followed.

One of the concentration methods, including viral elution by glycine and threonine buffer, concentration by Vertrel XF, primary and secondary PEG precipitation, were more efficient than other concentration methods. Viral RNA was more efficiently extracted by Viral RNA Mini Kit than Trizol extraction. In addition, a clear bands were shown in a gel when QiaShredder Homogenization step was added. In genogroup 1, G1F1M/G1-F2/G1R1M primer set were more sensitive and specific than other primer sets for the detection of genogroup 1 in PCR amplification. In genogroup 2, G2F1M/G2-F3/G2R1M and NV2oF2/NV2oR/ G2-F3/G2SKR primer sets were more sensitive and specific than other primer sets in PCR amplification.

From February to November 2007, 140 shellfish samples were collected and were monitored for the noroviral contamination by RT-nested PCR. Norovirus-positive samples were detected in the samples collected during whole survey period. Overall detection rate was 22.1% and 71% of detected norovirus was classified into genogroup 2 (II). By sequence analysis, the norovirus-positive samples, which

were grouped with genotype 4 of norovirus genogroup 2 (GII/4), were closely related to strains recognized as a worldwide epidemic outbreak.

The contamination range of norovirus in shellfish growing area from pollution sources was investigated in Cheonsuman and high level norovirus was detected at the station closed to point pollution sources and non-point pollution was also observed.

Norovirus surrogate (feline calicivirus, FCV) was inactivated by treatment at 50,000 psi for 60 sec by 6.8 log · $TCID_{50} \cdot mL^{-1}$. Tissue of oyster (digestive gland, gill and mantle) was qualitatively destroyed and distorted by treatment over 5,000 psi for 60 sec. High pressure treatment induced progressive changes in proximal composition of oyster and color of oyster adductor muscle. High pressure treatment effectively reduced norovirus surrogate but induced conformational changes in tissue and color of oyster flesh. Electrolyzed seawater and photocatalyst UV also effectively inactivated FCV. FCV was totally inactivated after 10 minutes exposure to electrolyzed seawater and 3 minutes irradiation of photocatalyst UV.

서 론

위장염 발생 원인은 다양한 종류의 세균, 기생충 및 바이러스 감염에 의한 것으로 추정되어 왔으나 40~50%는 그 원인이 밝혀지지 않았다. 그러나 최근 분자생물학적 기법을 이용한 장관계 바이러스 검출법의 발달로 원인 불명의 많은 사례들이 바이러스에 의한 것으로 밝혀지고 있다(Amar et al., 2007; Parashar et al., 2004).

특히 human calicivirus의 일종인 norovirus(이하 노로바이러스) 속 바이러스가 전 세계적으로 설사성 위장염을 유발하는 가장 큰 원인인 것으로 드러나고 있다.

노로바이러스는 1972년 Kapikan에 의해 처음 그 존재가 확인되었다. 그는 1968년 미국의 노워크 초등학교에서 발생한 집단 위장염 환자의 검체에서 면역 전자현미경 검사를 통해 이 바이러스를 발견하였으며 그 지명을 따라 Norwalk-like virus(이하 노워크 바이러스)라고 명명하였다(Alder and Zickl, 1969).

그 후 1990년대에 들어 노워크 바이러스 게놈의 클로닝에 성공하면서 바이러스학적 특징과 역학적 특징이 밝혀져 분자생물학 기법을 이용한 검출법이 개발되었고 노로바이러스에 의한 감염증의 심각성이 알려지게 되었다(Xi et al., 1990). 노로바이러스를 인공 배양하는 방법이 아직 개발되지 못하여 혈청학적 방법을 이용한 직접적인 분류는 불가능하지만 역전사 중합효소반응(이하 RT-PCR)을 통한 게놈 염기서열 분석을 통해 다양한 유전형과 항원형이 존재함이 밝혀지고 있다(Zeng et al., 2006). 이를 바탕으로 최근 노로바이러스에 대한 새로운 분류가 실시되어 29개의 유전적 집단(genetic cluster)을 포함한 5개의 유전형(genogroup)으로 대별되었다(Zeng et al., 2006). 이 중 인체질병에 관여하는 대부분의 노로바이러스는 유전형 I과 II에 속한다.

노로바이러스의 전파는 일반적으로 분변-경구 확산(fecal-oral spread)을 통해 일어난다. 즉, 노로바이러스 전파의 주된 경로는 주변 매개물을 통한 사람 대 사람이다. 환자의 구토물이나 분변에 오염된 물체에 접촉한 손을 통해 감염되며, 연무질(aerosol)의 확산을 통해 병원이나 학교 등 폐쇄된 공간에서 신속하게 전파된다(Widdowson et al., 2005).

노로바이러스는 전파력이 매우 높아 학교, 양로원, 캠프, 순항선, 요양원, 군대, 지역사회에서 발생하는 비세균성 위장염의 주요 원인체로 소수로부터 수백 명에 이르기까지 다양한 규모의 집단발생을 일으킨다. 2005년 국내에서 발생한 집단 식중독 조사 자료에 의하면 2005년 한 해 동안 발생한 109건 (환자수 5711명) 중 노로바이러스로 인한 식중독의 경우 6건으로 전체 6%정도에 불과하지만 환자수의 경우 719명으로 13%를 차지하는 것으로 확인되어 다른 감염성 식중독에 비해 대규모 환자 발생을 보였다. 2003년 3월 서울, 경기지역에서 약 1200명의 환자 발생하였고 2006년에도 서울, 인천, 경기지역에서 집단급식과 관련하여 약 2000명의 환자가 발생하였다. 미국의 경우 음식물에 의한 위장염 환자가 매년 7천6백만 명이 발생하고 이중 325,000명이 입원하고, 5,000명이 사망하는 것으로 알려져 있으며, 노로바이러스와 식중독 세균이 주요 원인 병원체인 것으로 평가되고 있다(질병관리본부, 2007).

환자로부터 외계로 배설된 노로바이러스는 지표수와 지하수 오염을 통해 최종적으로 연안해역에 배출된다. 연안에 유입된 노로바이러스는 주변의 물과 함께 조류(algae)와 같은 입자를 흡입한 후 여과를 통해 섭식하는 이매패류에 농축된다(Lees, 2000). 현재 상업적으로 유통되는 대부분의 이매패류는 해안선과 인접한 기수나 갯벌 또는 간석지에서 수확되는데 이러한 지역은 영양 수준이 높고 물이 정체되기 쉬운 특성을 가지고 있으며 인분에 오염될 가능성이 높다.

오수오염에 의한 이매패류의 오염과 그 이매패류의 섭취로 인하여 19세기 말에서 20세기 초 유럽과 미국 등에서 장티푸스가 대량 발생하여 이매패류에 대한 국가차원의 위생관리가 시작되었다(Allen, 1899). 근년에 와서는 이매패류에 의한 장관계 바이러스의 감염이 가장 일반적인 병인요소가 되었다. 이매패류에 의해 전파되는 장관계 바이러스로는 노로바이러스 외에도 calicivirus, astrovirus, rotavirus, adenovirus, enterovirus 등이 있다(Lees, 2000).

현재 패류에 대해 바이러스 오염을 예방하고 제어하기 위한 가이드라인은 세계적으로 분변계 대장균 농도에 의존하고 있다. 그러나 여러 연구를 통해 이러한 세균들은 바이러스의 존재여부와 유의적인 상관관계가 없는 것으로 보고되고 있기 때문에 (Wait et al., 1983; Le Guyader et al., 2000) 효과적인 질병예방을 위해선 패류에 대한 병원성 바이러스 오염 여부를 직접 모니터링하는 것이 필요하다. 전술한 바와 같이 현재까지 노로바이러스를 인공 배양하는 방법이 개발되지 못하여 노로바이러스 검출은 분자생물학적 방법인 RT-PCR 기법을 응용하고 있다. 그러나 RT-PCR에 근거한 패류 중 노로바이러스 검출법은 그 절차가 복잡하고 세계적으로 표준화되어 있지 못하기 때문에 그 적용에 한계를 가지고 있다(Lees, 2000).

그래서 이매패류에서 노로바이러스 검출기법 정립과 표준화를 위해 최근 국내외 연구기관에서 수행해 온 굴 등에서의 노로바이러스 분석 방법을 비교하였으며, 정립된 이매패류 중 노로바이러스 검출법을 현장시료에 적용하여 우리나라 연안에 위치한 패류생산해역에서 노로바이러스의 존재유무를 파악하고 패류생산해역에서 노로바이러스 오염범위를 조사하여 식품위생안전의 확보를 위한 자료를 확보하고자 하였다. 그리고 장관계 바이러스에 오염된 이매패류의 안전화 식용화 방안을 확보하기 위해

노로바이러스 대체바이러스인 FCV (feline calicivirus)를 이용하여 패류 및 해수 중 노로바이러스 불활성화 조건을 구명하고자 하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

재료 및 방법

1. 시료 및 재료

1.1. 패류

시판 패류의 경우에는 수산시장에서 경남 통영산 참굴(*Crassostrea gigas*)을 구입하여 각고 8 ㎝, 각장 5 ㎝, 각폭 3 ㎝ 이상의 개체만을 선별하여 사용하였다.

채취 패류는 동, 서, 남해안에 소재하는 패류양식장을 대상으로 동해 4개소, 서해 6개소 및 남해 5개소 등 총 15개소에서 직접 채취 하였다. 대상패류로는 굴, 바지락, 홍합, 피조개, 키조개, 전복, 가리비 등 총 7종으로 시료채취 지역 및 패류종류는 Table 1에 제시하였다. 오염실태조사 기간 및 빈도는 2007년 2월부터 11월까지 매월 1회씩 모두 10회 채취하였다(Fig. 1). 채취된 시료는 아이스박스에 넣어 10℃ 이하로 유지하면서 연구실로 옮겨진 후 전 처리하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

1.2. 해수

충남 천수만 해역에서 2007년 2, 3, 4, 7, 8, 10월에 10군데 장소에서 실시하였다 (Fig. 2). 각 지점별로 시료는 수심 2~3 m와 수심 7~8m에서 각각 채취하였다. 시료 채취 장소는 천수만 일대의 조류도를 바탕으로 결정하였다.

1, 2, 4, 6번 시료 채취 장소는 방조제가 설치되어 있는 곳과 가까운 위치이며 인간의 분뇨에 오염될 가능성이 높은 하천의 육수가 방출되어 노로바이러스 오염이 일어날 가능성이 큰 지역이다. 7번 장소는 근처에 위락 시설이나 섬 등의 생활 지역이 분포하는 장소로서 역시 오염될 가능성이 큰 지역이며 9번 장소는 대천항 근처 장소이다.

Table 1. Sampling stations and species of shellfish

St.	City/Province	Local area	Shellfish species
W1	Incheon	Yeongheung Nae-ri	Oyster (*Crassostrea gigas*)
W2	Chungcheongnam-do	Dangjin Hanjinpo	Short-necked clam (*Tapes philippinarum*)
W3	Chungcheongnam-do	Taean Nam-myeon	Short-necked clam (*Tapes philippinarum*)
W4	Chungcheongnam-do	Seocheon Cheonsuman	Mussel (*Mytulis coruscus*)
W5	Chungcheongnam-do	Seocheon Beeinman	Oyster (*Crassostrea gigas*)
W6	Jeollabuk-do	Buan Gomsoman	Surf clam (*Mactra veneriformis*)
E1	Gangwon-do	Yangyang	Scallop (*Patinopecten yessoensis*)
E2	Gueongsangbuk-do	Uljin Pyeonghae	Mussel (*Mytulis coruscus*)
E3	Gueongsangbuk-do	Pohang Yeongil	Mussel (*Mytulis coruscus*)
E4	Ulsan	Ulsan Jinha	Oyster (*Crassostrea gigas*)
S1	Pusan	Pusan Haeundae	Oyster (*Crassostrea gigas*)
S2	Jeollanam-do	Suncheonman	Ark shell (*Scapharca subcrenata*)
S3	Gwangju	Deukryangman	Ark shell (*Scapharca subcrenata*)
S4	Jeollanam-do	Wando	Abalone (*Nordotis discus*)
S5	Jeollanam-do	Jindo	Oyster (*Crassostrea gigas*)

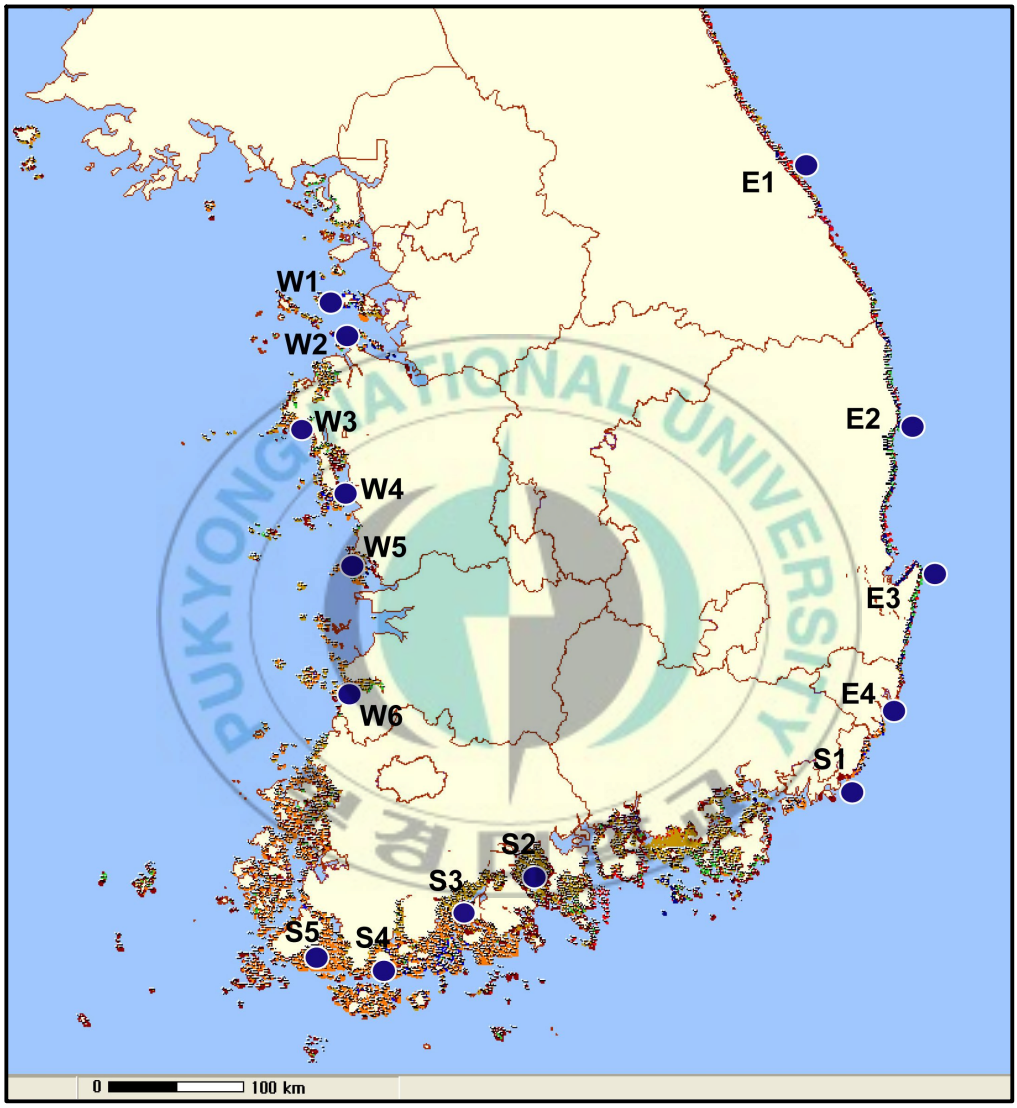


Fig. 1. Sampling stations in the shellfish growing areas.

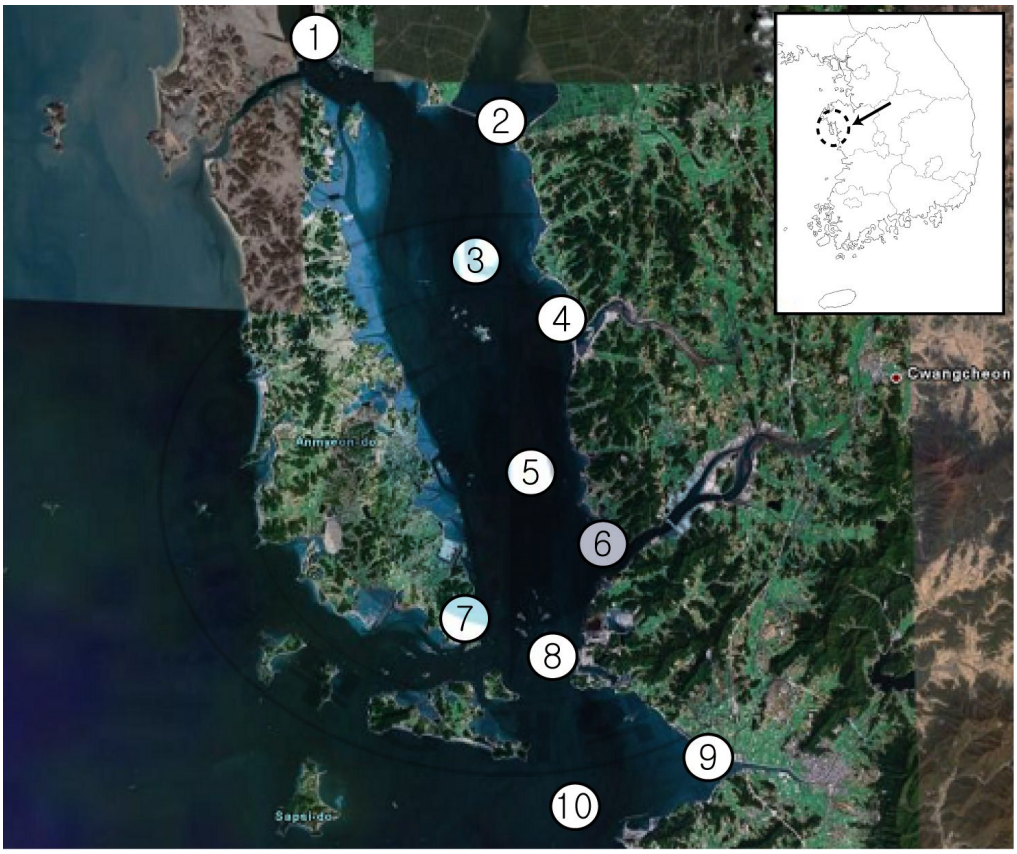


Fig. 2. Sampling site of seawater at the shellfish growing areas in the western coast of Korea.

3, 5, 8, 10번 채취 장소는 조류의 흐름에 따른 해수의 이동이 일어나는 장소이며 다른 시료 채취 장소에서 오염된 노로바이러스가 확산되어 오염이 일어날 수 있는 장소이다. 특히 10번 채취 장소의 경우 아래쪽에 대천해수욕장이 위치하고 있다. 시료 채취는 선정된 각 지점에서 2~3 m 깊이(s)와 7~8 m 깊이(d)에서 각각 해수 8 L 정도를 채취하였다.

1.3. 대체 바이러스(Feline calicivirus, FCV)

노로바이러스 surrogate는 FCV Strain F9 (ATCC VR-782)을 사용하였다. FCV 인공배양을 위한 cell line은 Crandall-Reese feline kidney (CrFK) cell (ATCC CCL-94)을 이용하였다.

1.4. 장치

압력 처리는 해진물산(주)에 설치된 215L-600 system (Avure Technologies Inc., USA)을 사용하였다.

HPP는 주 압력장치(1)와 압력강화장치(2)(3), 물 공급장치(4), 공기 공급장치(5)로 구성되며, 주 압력장치 내부의 고압실에 초고수압이 형성된다. 초고압력 물을 물 공급라인을 통하여 주 압력장치에 공급되도록 구성되어 있으며, 공기 공급장치에서 발생되는 공기를 공기공급라인을 지나 주 압력장치에 연결되도록 구성된다.

압력강화장치에서 주압력장치의 작동을 위해 기름을 공급하는 라인(F)을 통하여 기름이 공급되며, 압력장치는 밀폐 가능함은 물론 초고수압에 견딜 수 있도록 구성되어 있을 뿐 아니라 가공 및 살균하고자 하는 원료와 가공물을 외부에서 용이하게 넣고 빼낼 수 있도록 구성되어 있다. 모든 작동과정은 프로그램 조작 컴퓨터를 이용하여 사전에 입력한 자료에 의하여 작동스크린을 통하여 자동으로 작동가능하게 구성되어있다 (Fig.3).

전기분해 시스템은 국립 수산과학원에서 개발하여 특허등록(특허 제 0491985호, 2005. 05. 19, 무격막 전해조를 이용한 활어패류 수조의 위생처리 방법 및 장치)한 전기분해 장치를 이용하였다.

전기분해해수 장치의 일반적인 원리는 해수를 직류로 전기분해하면 해수의 구성성분인 NaCl이 분해되어 살균성분인 NaClO(차아염소나트륨)이 발생하게 된다(Fig. 4)(Kim et al., 2000). 그래서 전기분해해수는 병원미생물, 바이러스 등에 대하여 직·간접적으로 광범위한 살균효과를 나타낸다.

해수 전기분해장치에서 전극판의 크기는 1시간에 1 A 전류를 1 m^2 극판에 흘릴 경우 1.323 g/Ah 염소가 발생되는 점과 염분농도 32~35 ‰, 전기분해 효율 90%가 된다는 점(Nernst식, Denora)에 근거하여 13×14 cm의 백금 도금판에 5 V, 5 A의 전류를 흘려 최종 발생되는 염소량을 0~25 ppm (13 L/min)으로 제어할 수 있도록 하였다.

광촉매장치는 광주과학기술원(특허등록 제10-0671311호, 2007. 1.12)에서 제공한 광촉매 살균정화장치를 이용하였다.

광촉매를 이용한 살균방법은 광촉매의 OH 라디칼의 강력한 산화력을 이용한 살균과 자외선의 살균력이 동시에 작용하여 해수 내의 미생물을 살균하는 해수 살균장치이다. 이 장치는 세균 및 각종 유기물질로 오염된 물을 광촉매 반응에 의해 살균정화 처리 시, 그 오염된 물을 유입시켜 증대시켜 광촉매 코팅 담체에 고르게 분산되도록 하여 광촉매 반응성을 향상시킴으로써, 효과적으로 살균정화 처리될 수 있도록 되어있으며 자외선램프들이 서로 동일한 간격으로 이격된 사각형 단면 배열구조를 갖고 있어 적은 수로도 최대의 광촉매 효율성을 얻을 수 있도록 되어있다(Fig. 5).

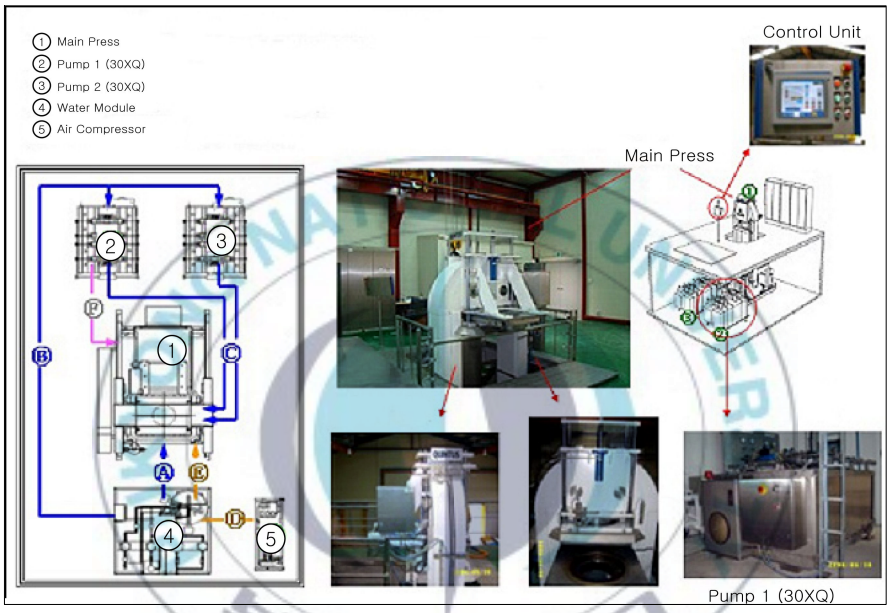


Fig. 3. Diagrams of high pressure processor 215L-600 system.

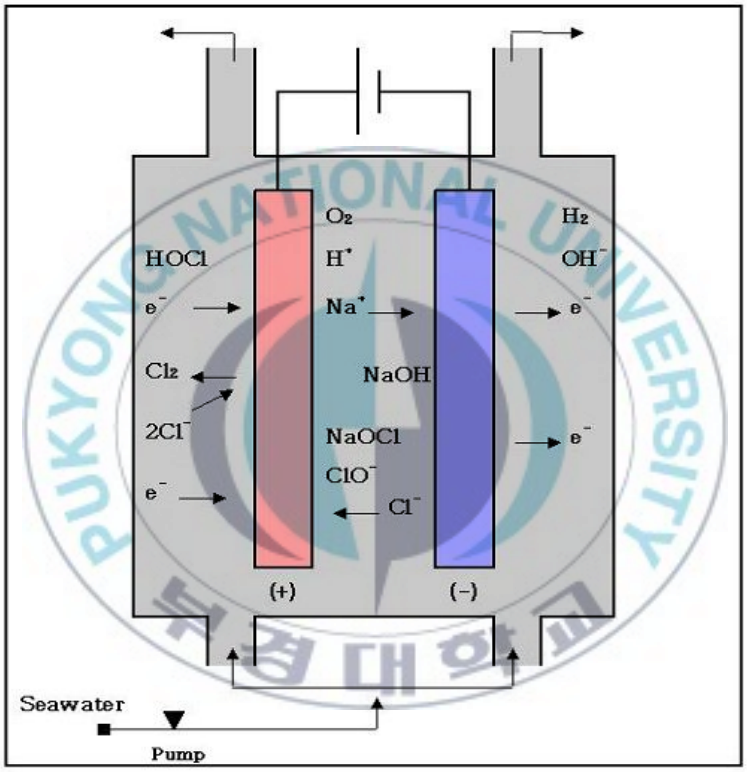


Fig. 4. Principle of seawater electrolyzation.

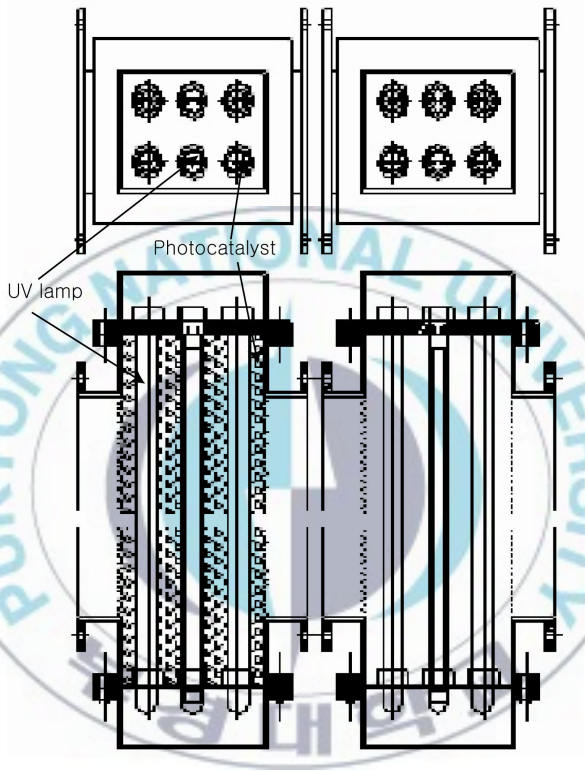


Fig. 5. Schematic diagram of photocatalyst UV system.

2. 실험 방법

2.1. 패류 및 해수의 위생지표세균 분석

대장균군 및 분변계대장균은 Recommended Procedures for the Examination of Sea water and Shellfish (APHA, 1970) 방법에 따라 시험하였다. 대장균군 실험은 5개 시험관법에 의하였고, 추정시험에는 Lauryl tryptose broth를, 확정시험에는 Brilliant green lactose bile (2%) Broth를 사용하여 35℃±0.5℃에서 24~48시간 배양하였고, 분변계대장균의 확정시험은 EC배지를 사용하여 44.5℃±0.2℃의 항온수조에서 24시간 배양하였다.

대장균군 및 분변계대장균의 수는 패류 100 g당 그리고 해수 100 mL의 최확수(Most probable number, MPN)로 표시하였다. 배지는 모두 미국의 Difco사 제품을 사용하였다.

2.2. 패류 생산해역 해수의 이화학적 수질 분석

패류가 생산되는 각 해역에 대한 수온, pH, 염분 등의 이화학적요인은 YSI 556 Multi-Probe System (YSI incorporated, USA)를 이용하여 현장에서 직접 측정하였다.

2.3. 대조구 노로바이러스 접종단위 결정

노로바이러스 검출방법을 정립하기 위하여 접종할 노로바이러스의 단위 결정은 Kim et al. (2005)의 방법을 사용하였다. 즉, nested PCR을 통해 PCR이 되는 최소 농도를 MPN법으로 계산해 검출이 되는 최소농도를 1 MPN nested PCR detection unit (1 MNePDU)로 결정하여 실험에 사용하였다. Unit 결정과 genotype 확인을 위해 실시된 nested PCR에 사용한 primer는 genogroup 1의 경우 first PCR은 G1F1M/G1R1M, nested PCR은 G1-F2/G1R1M, genogroup 2의 경우 first PCR은 G2F1M/G2R1M,

nested PCR은 G2-F3/G2R1M primer를 사용하였으며 실험조건은 Kim et al.(2005)의 방법을 따랐다.

노로바이러스 양성 시료는 10배씩으로 희석하여 PCR을 통해 양성을 보이는 최소 농도를 구하여 "Standard methods for the examination of water and wastewater (APHA, 1995)"에 수록된 MPN table을 통해 MPN을 계산하여 MPN PCR detection unit (MPDU)를 결정하였다

사용한 노로바이러스 양성 시료는 환자의 분변에서 분리된 것으로 Kageyama et al.(2004)의 방법에 따라 분석한 결과, norovirus genogroup 1과 2가 포함되어 있었다. Genogroup 1은 genotype 6로 확인되었으며 genogroup 2는 genotype 6 및 16으로 확인되었다.

또한 노로바이러스 오염실태 조사에서 nested PCR의 성공 여부를 판단하기 위하여 사용한 노로바이러스 양성시료는 질병관리본부에서 분양받은 genogroup 1 (GI), genogroup 2 (GII)를 각각 사용하였다. GI, GII의 genotype은 염기서열분석 결과 각각 GI.6, GII.3이었다.

2.4. 노로바이러스 접종 패류의 전처리

구입한 생굴 20개체 이상에서 중장선만을 채취하여 시험구 당 25 g (± 0.1 g) 씩 분리하였다. 분리된 중장선은 사용될 때까지 -70℃에 보관하였다.

2.5. 패류 중 노로바이러스의 농축법 비교

패류 중 노로바이러스 검출방법 정립을 위한 시료의 농축방법을 비교하기 위하여 굴의 중장선 25 g 당 노로바이러스 양성시료 100 MPDU를 접종하고 농축 효율을 비교하였다. 농축법은 Mullendore et al. (2001), Dubois et al. (2006) 및 APHA (1995) 그리고 Lees et al. (1994)의

방법을 선택하여 상호 비교하였다(Table 2, Fig. 6~8). 결과의 유의성을 위해 각 시험구를 triplicate로 구성하고 전체 과정을 3회 반복하여 시험구당 9번의 반복실험을 실시하였다.

2.6. RNA 추출법 비교

패류 중 노로바이러스 검출을 위한 RNA 추출방법을 정립하기 위하여 현재 가장 널리 이용되고 있는 다음의 네 가지 핵산 추출법을 사용하여 RNA를 추출하고 그 효율성을 비교하였다.

Method A: QiaAmp® Viral RNA Mini Kit
Method B: QiaShredder™ Homogenizer + QiaAmp® Viral RNA Mini Kit
Method C: Trizol® 추출법
Method D: QiaShredder™ Homogenizer + Trizol® 추출법

QiaShredder™ Homogenizer (Qiagen, US)의 경우 각 25 g의 굴 중장선으로부터 농축된 1 g 분량의 시료를 넣고 2분 동안 14,000 rpm으로 원심분리 이후 용해액(lysate)을 각 RNA 추출법에 사용하였다.

QiaAmp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, US)를 사용한 경우는 1 g 분량의 농축시료를 멸균 증류수 등으로 560 μL로 맞춘 후, kit 내의 buffer AVL 2,440 μL를 넣어 15초간 vortexing 했다. 10분 동안 상온(15℃~25℃)에서 배양한 후 100% 에탄올 2,440 μL를 넣고 15초간 vortexing하였다. 630 μL씩을 spin column에 넣고 8,000 rpm으로 1분 동안 원심분리하고 시료를 모두 사용할 때 까지 반복하였다. Kit 내의 buffer AW1 500 μL를 column에 넣고 1분 동안 8,000 rpm으로 원심분리하여 세척한 후 kit 내의 buffer AW2 500 μL를 column에 넣고 3분 동안 14,000 rpm으로 원심분리하여 2차 세척하고 잔여물을 완전히 제거하였다.

Table 2. Tested methods to compare norovirus concentration efficiency

	Key step	Reference
Protocol C	Elution: glycine buffer and threonine Precipitation and concentration: PEG Clearing: vertrel XF	Mullendore et al., 2001
Protocol F	Filtration instead the 2nd PEG precipitation in Method C	Dubois et al., 2006 and APHA, 1995
Protocol U	Elution: tryptose phosphate-glycine buffer Precipitation and concentration: PEG and ultracentrifugation	Lees et al., 1994

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Add 7 volumes of ultrapure water into 25 g of digestive gland

↓

Homogenize for 60 sec with omni mixer by two times

↓

Adjust pH to 5.0 with 1 N HCl and stir gently for 5 min

↓

Centrifuge at 2,000 x g for 20 min at 4℃

↓

Remove supernatant and add 7 volumes of 0.05 M glycine-0.14 M NaCl (pH 7.5) into pellet and stir gently for 15 min

↓

Centrifuge at 5,000 x g for 20 min at 4℃

↓

Collect supernatant and add 0.5 M threonine-0.14 M NaCl (pH 7.5) into pellet

↓

Vortex for 1 min and centrifuge at 5,000 x g for 20 min at 4℃

↓

Mix supernatant and centrifuge at 5,000 x g for 20 min at 4℃

↓

Add PEG8000-NaCl (8%, W/V) into supernatant and stir for 2 hr at 4℃

↓

Centrifuge at 6,700 x g for 30 min at 4℃

↓

Resuspend pellet with 15 mL PBS (pH 7.5)

↓

Add 15 mL vertrel XF and vortex for 1 min

↓

Centrifuge at 2,000 x g for 30 min at 4℃

↓

Add PEG8000-NaCl (8%, W/V) into supernatant and stir for 2 hr at 4℃

↓

Centrifuge at 14,000 x g for 15 min at 4℃

↓

Resuspend pellet with 2.5 mL phosphate buffered saline (PBS)

Fig. 6. Protocol C for concentration of norovirus from shellfish (Mullendore et al., 2001).

Add 7 volumes of ultrapure water into 25 g of digestive gland
↓
Homogenize for 60 sec with omni mixer by two times
↓
Adjust pH to 5.0 with 1 N HCl and stir gently for 5 min
↓
Centrifuge at 2,000 x g for 20 min at 4℃
↓
Remove supernatant and add 7 volumes of 0.05 M glycine-0.14 M NaCl (pH 7.5) into pellet and stir gently for 15 min
↓
Centrifuge at 5,000 x g for 20 min at 4℃
↓
Collect supernatant and add 0.5 M threonine-0.14 M NaCl (pH 7.5) into pellet
↓
Vortex for 1 min and centrifuge at 5,000 x g for 20 min at 4℃
↓
Mix supernatant and centrifuge at 5,000 x g for 20 min at 4℃
↓
Add PEG8000-NaCl (8%, W/V) into supernatant and stir for 2 hr at 4℃
↓
Centrifuge at 6,700 x g for 30 min at 4℃
↓
Resuspend pellet with 15 mL PBS (pH 7.5)
↓
Add 15 mL vertrel XF and vortex for 1 min
↓
Centrifuge at 2,000 x g for 30 min at 4℃
↓
Adjust pH of supernatant to 3.0～3.5
↓
Filter with SVLP and SSWP (47 mm, Millipore, USA)
↓
Resuspend 1.5 mL 3% beef extract-0.05 M glycine buffer

Fig. 7. Protocol F for concentration of norovirus from shellfish (Dubois et al., 2006 and APHA, 1995).

Dilute 25 g of digestive gland 1: 10 in 10% tryptose phosphate broth-0.05 M glycine buffer (pH 9.0~9.5)

↓

Homogenize for 60 sec with omni mixer

↓

Shake homogenate (100 rpm) for 5 min at room temp.

↓

Sonicate with 10-mm probe for 2 min at level 6 (100W)

↓

Centrifuge at 3,000 x g for 30 min at 4℃

↓

Adjust pH of supernatant to 7.2~7.4

↓

Add PEG 6000 (8%, W/V) and stir for 2 hr at 4℃

↓

Centrifuge at 3,000 x g for 30 min at 4℃

↓

Resuspend pellet with 30 mL 0.15M $NaHPO_4$ (pH 9.0~9.5)

↓

Resonicate with 10-mm probe for 30 sec at level 6 (100W)

↓

Shake (100 rpm) for 20 min at room temp.

↓

Resonicate with 10-mm probe for 30 sec at level 6 (100W)

↓

Centrifuge at 10,000 x g for 30 min at 4℃

↓

Ultracentrifuge supernatant at 100,000 x g for 3 hr at 4℃)

↓

Resuspend pellet with 2.5 mL DEPC (diethyl pyrocarbonate) water

Fig. 8. Protocol U for concentration of norovirus from shellfish (Lees et al., 1994).

Kit 내의 buffer 50 μL를 spin column에 넣고 1분 동안 배양 후 1분, 8,000 rpm으로 원심분리하여 용출 (elution) 하였다.

Trizol® (Invitrogen, USA)을 사용한 경우 각 1 g 분량의 농축시료를 3배 분량의 Trizol®을 넣고 30초간 vortexing 하고 상온에 10분 배양하였다. 농축시료와 같은 분량의 chloroform을 넣고 30초간 vortexing하여 상온에서 10분간 배양한 후 4℃에서 30분간 14,000 rpm으로 원심분리하였다. 상청액(supernatant)을 얻고 다시 동량의 chloroform을 넣고 30초간 vortexing하고 상온에 10분 배양 후 4℃에서 30분간 14,000 rpm으로 원심분리 하였다. 다시 상청액을 취한 후 동량의 isopropyl alcohol을 넣고 30초 vortexing 후 -20℃에 10분간 방치하였다. 시료를 4℃에서 30분간 14,000 rpm으로 원심분리하고 상청액을 제거한 이후 ice cold 75% 에탄올 1 mL을 가하고 가볍게 흔들어준 후 다시 4℃에서 5분간 10,000 rpm으로 원심분리하였다. 상청액을 버리고 침전물(pellet)을 완전히 마르지 않게 air dry한 이 후, diethylpyrocarbonate (Takara, Japan)로 처리한 멸균 증류수 50 μL를 가하고 60℃에서 10분 동안 배양하여 침전물이 완전히 녹도록 하였다. PCR 실험을 하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

연안해역 노로바이러스 오염실태 조사를 위한 RNA 추출방법은 검출방법 정립과정에서 가장 적합한 방법을 선택하였으며 그 방법은 다음과 같았다. 농축된 시료는 QiaShredder™ Homogenizer를 사용하여 2분 동안 14,000 rpm으로 원심분리 이후 용해액을 각 RNA 추출법에 사용하였다. QiaAmp® Viral RNA Mini Kit를 사용하여 농축 시료에 4배 분량의 buffer AVL을 넣어 주고 15초 vortexing 했다. 10분 동안 상온(15℃～25℃)에서 배양 후 농축시료 4배 분량의 100% 에탄올을 넣고 15초 vortexing하였다. 630 μL씩을 spin column에 넣고 8,000 rpm으로 1분 동안

원심분리하고 시료를 모두 사용할 때 까지 반복하였다. Buffer AW1 500 µL를 column에 넣고 1분 동안 8,000 rpm으로 원심분리하여 세척한 후 buffer AW2 500 µL를 column에 넣고 3분 동안 14,000 rpm으로 원심분리하여 2차 세척하고 잔여물이 남지 않도록 하였다. Buffer AVE를 spin column에 넣고 1분 동안 배양 후 8,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 용출하여 최종 30 µL가 되도록 하였다.

2.7. 중합효소 연쇄반응

패류 중 노로바이러스 검출방법 정립을 위한 cDNA 합성을 위하여 각 농축법과 RNA 추출법을 통해 얻어진 시료에서 30 MNePDU (추출시료 3 µL 상당), 1 MNePDU (추출시료 0.3 µL 상당) 접종 분량을 역전사하여 RT-nested PCR에 적용하여 고 효율을 비교하였다. 역전사 방법의 상세한 조건은 Table 3와 같았다.

인위적으로 굴에 노로바이러스를 접종시킨 시료를 역전사하여 상호 농축법간 효율을 비교하였으며 농도가 결정된 노로바이러스 양성시료를 바탕으로 primer의 민감도 및 적합성을 비교하였다. RT-nested PCR을 위해 사용한 primer는 Table 4에 제시하였다.

농축법의 비교에는 G1F1M/G1-F2/G1R1M primer set와 G2F1M/G2-F3/G2R1M primer set를 사용하였다. Primer 간의 비교 역시 10배씩 희석한 시료에서 G1F1M/G1-F2/G1R1M primer set와 G2F1M/G2-F3/G2R1M primer set에서 검출된 농도를 기준으로 primer에 따른 민감도 및 적합성 효율을 비교하였다(1 unit, 0.1 unit; 역전사 방법은 접종시료 역전사와 같은 방법으로 함). First PCR과 nested PCR 반응액 조성은 Table 5와 Table 6에 각각 나타내었으며 first PCR은 10 unit 접종량과 1 unit 접종량을 triplicate로 하였다.

Table 3. RT-PCR conditions and composition of reaction mixture

Ingredient	RNA unit 30 unit	RNA unit 3 unit	Reaction condition
Template (RNA)	3.0 μL	0.3 μL	1. Add Distilled water, dNTP, Random primer into RNA extract and incubate 5 min at 65℃ then cool down on ice
5 x first-strand buffer	3.0 μL	3.0 μL	
DTT	1.5 μL	1.5 μL	
10 x dNTP (10 mM)	1.5 μL	1.5 μL	
RNasin® Ribonuclease inhibitor(40 u/μL, Promega)	0.5 μL	0.5 μL	2. Add 5 x first-strand buffer, DTT, RNasin® Ribonuclease inhibitor and incubate 2 min at 25℃
SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (200 u/μL, Invitrogen)	1.0 μL	1.0 μL	
Random Primer (100 pmole/μL, Takara)	1.0 μL	1.0 μL	3. Add SuperScriptTM II Reverse Transcriptase and incubate 10 min at 25℃, 50 min at 42℃, then 15min at 70℃ for enzyme inactivation
Distilled water	up to 15 μL	up to 15 μL	
Total	15 μL	15 μL	

Table 4. Primers used in RT-nested PCR

Region	Name	sequence 5′→3′	Polarity	Position[c]	Reaction condition	Reference
ORF 1 (RNA polymerase region)	**GI, GII**					
	NV36[a]	ATAAAAGTTGGCATGAACA	Sense	4487-4505	94℃ 3 min; 94℃ 1 min 30 sec, 52℃ 1 min 30 sec, 72℃ 1 min 30 sec, 35 cycles; 72℃ 7 min	Naitou and Morita (2001)
	NV35[a]	CTTGTTGGTTTGAGGCCCATA	Antisense	4956-4936		
	NV82[b]	TCATTTTGATGCAGATTA	Sense	4555-4572	94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles; 72℃ 7 min	
	SM82[b]	CCACTATGATGCAGATTA	Sense	4555-4572		
	NV81[b]	ACAATCTCATCATCACCATA	Antisense	4884-4865		
	Yuri52F[a]	CAATCAGAGTTGGCATGAA	Sense	4485-4954	94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 45℃ 2 min, 60℃ 4min, 5 cycles; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min 20 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles; 72℃ 10 min	Saito et al. (1998)
	Yuri52R[a]	.TGTTGGGATCAGCCCGTA	Antisense	4485-4954		
	MR3[a]	CCGTCAGAGTGGGTATGAA	Sense	4485-4954		
	MR4[a]	AGTGGGTTTGAGGCCGTA	Antisense	4485-4954		
	Yuri22F[b]	ATGAATGAGGATGGACCCAT	Sense	4505-4877	94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min 20 sec, 72℃ 1 min, 35 cycles; 72℃ 10 min	
	Yuri22R[b]	CATCATCCCCGTAGAAAGAT	Antisense	4505-4877		
	GI					
	JV12Y[a]	TCATCATCACCATAGAAIGAG	Sense	4552-4572	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 37℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles; 72℃ 7 min	Green et al. (1995)
	JV13I[ab]	ATACCACTATGATGCAGAYTA	Antisense	4878-4858		
	G1[b]	TCNGAAATGGATGTTGG	Sense	4691-4707	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 37℃ 1 min, 72℃ 1min, 35 cycles; 72℃ 7 min	

Table 4. Continued

Region	Name	sequence 5′→3′	Polarity	Position[c]	Reaction condition	Reference
ORF 1 (RNA polymerase region)	GII					
	GLPSG2[ab]	GARGGICTICCITCKGGIGTICC	Sense	4715-4737	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 55℃ 30 sec, 72℃ 30 sec, 35 cycles; 72℃ 7 min	Green et al. (1995)
	YGDD1[ab]	ACIATYTCRTCATCICCRTARAA	Antisense	4869-4847		
	SRII-1[a]	CGCCATCTTCATTCACAAA	Antisense	5096-5078	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles; 72℃ 7 min	Häfliger et al. (1997)
	SRII-2[ab]	TWCTCYTTYTATGGTGATGATGA	Sense	4583-4605		
	SRII-3[b]	TTWCCAAACCAACCWGCTG	Antisense	4767-4785	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles; 72℃ 7 min	
	JV13I[a]	ATACCACTATGATGCAGAYTA	Antisense	4605-4585	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 37℃ 1min, 72℃ 1 min, 35 cycles; 72℃ 7 min	Vennema et al. (2002)
	JV12Y[ab]	TCATCATCACCATAGAAIGAG	Sense	4279-4299		
	NoroII-R[b]	AGCCAGTGGGCGATGGAATTC	Antisense	4515-4495	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 37℃ 1 min, 72℃ 1min, 35 cycles; 72℃ 7 min	
ORF2 (Capsid region)	GI					
	SRI-1[a]	CGCCATCTTCATTCACAAA	Antisense	5671-5652	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles; 72℃ 7 min	Häfliger et al. (1997)
	SRI-2[ab]	AAATGATGATGGCGTCTA	Sense	5356-5373		
	SRI-3[b]	AAAAYRTCACCGGGKGTAT	Antisense	5596-5578	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 cycles; 72℃ 7min	

Table 4. Continued

Region	Name	sequence 5′→3′	Polarity	Position[c]	Reaction condition	Reference
ORF2 (Capsid region)	GI					
	COG1F[a]	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	Sense	5291-5310	94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 cycles; 72℃ 15 min	Nishida et al. (2003)
	G1SKR[ab]	CCAACCCARCCATTRTACA	Antisense	5671-5653		
	G1SKF[b]	CTGCCCGAATTYGTAAATGA	Sense	5342-5365	94℃ min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 cycles; 72℃ 15 min	
	G1FF-1[a]	ATHGAACGYCAAATYTTCTGGAC	Sense	5075-5097	95℃ 2min; 94℃ 30 sec, 48℃ 30 sec, 72℃ 2 min, 35 cycles; 72℃ 5 min	Gallimore et al. (2005)
	G1FF-2[a]	ATHGAAAGACAAATCTACTGGAC	Sense	5075-5097		
	G1FF-3[a]	ATHGARAGRCARCTNTGGTGGAC	Sense	5075-5097		
	G1SKR[ab]	CCAACCCARCCATTRTACA	Antisense	5671-5653		
	G1FFN[b]	GGAGATCGCAATCTCCTGCCC	Sense	5313-5330	95℃ 2 min; 94℃ 30 sec, 48℃ 30 sec, 72℃ 2 min, 35 cycles; 72℃ 5 min	
	G1-F1M[a]	CTGCCCGAATTYGTAAATGATGAT	Sense	5342-5365	94℃ 3min; 94℃ 30 sec, 54℃ 30 sec, 72℃ 45 sec, 35 cycles; 72℃ 7 min	Kim et al. (2005)
	G1-R1M[ab]	CCAACCCARCCATTRTACATYTG	Antisense	5671-5649		
	G1-F2[b]	ATGATGATGGCGTCTAAGGACGC	Sense	5358-5380	94℃ 3 min; 94℃ 3 0sec, 56℃ 30 sec, 72℃ 45 sec, 35 cycles; 72℃ 7 min	

Table 4. Continued

Region	Name	sequence 5′→3′	Polarity	Position[c]	Reaction condition	Reference
	GII					
ORF2 (Capsid region)	COG2F[a]	CCARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	Sense	5003-5028	94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 cycles; 72℃ 15 min	Nishida et al. (2003)
	G2SKR[ab]	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	Antisense	5389-5367		
	G2SKF[b]	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	Sense	5047-5065	94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 cycles; 72℃ 15 min	
	G2FB-1[a]	GGHCCMBMDTTYTACAGCAA	Sense	4922-4941	95℃ 2 min; 95℃ 30 sec, 48℃ 30 sec, 72℃ 2 min, 35 cycles; 72℃ 5 min	Gallimore et al. (2005)
	G2FB-2[a]	GGHCCMBMDTTYTACAAGAA	Sense	4922-4941		
	G2FB-3[a]	GGHCCMBMDTTYTACARNAA	Sense	4922-4941		
	G2SKR[ab]	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	Antisense	5389-5367	95℃ 2 min; 95℃ 30 sec, 48℃ 30 sec, 72℃ 2 min, 35 cycles; 72℃ 5 min	
	G2FBN[b]	TGGGAGGGCGATCGCAATCT	Sense	5048-5067		
	G2-F1M[a]	GGGAGGGCGATCGCAATCT	Sense	5049-5067	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 54℃ 30 sec, 72℃ 45 sec, 35 cycles; 72℃ 7 min	Kim et al. (2005)
	G2-R1M[ab]	CCRCCIGCATRICCRTTRTACAT	Antisense	5389-5367		
	G2-F3[b]	TTGTGAATGAAGATGGCGTCGA	Sense	5079-5100	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 56℃ 30 sec, 72℃ 45 sec, 35 cycles; 72℃ 7 min	

Table 4. Continued

Region	Name	sequence 5′→3′	Polarity	Position[c]	Reaction condition	Reference
	GII					
ORF2 (Capsid region)	NV2oF2[a]	GGAGGGCGATCGCAATC	Sense	5050-5066	95℃ 5 min; 95℃ 30 sec, 48℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 35 cycles; 72℃ 7 min	Bull et al. (2006)
	NV2oR[a]	GTRAACGCRTTY CCMGC	Antisense	5428-5412		
	G2-F3[b]	TTGTGAATGAAGATGGCGTCGA	Sense	5079-5100	95℃ 5 min; 95℃ 30 sec, 48℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 35 cycles; 72℃ 7 min	
	G2SKR[b]	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	Antisense	5389-5367		

[a]first PCR primer; [b]nested PCR primer; [c]Degenerate positions I: deoxyinosine, R: A/G, H: A/C/T, Y: C/T, B: C/G/T, M: A/C, V: A/C/G, K: G/T, D: A/G/T, S: C/G, N: A/C/G/T, W: A/T; [d]GI: Norwalk/68/US (Accession no. M87661), GI: Lordsdale/93/UK (Accession no. X86557).

Table 5. Reaction mixture for the first PCR

cDNA	5 μL
10 x buffer	2 μL
10 x dNTP (10 mM)	2 μL
First PCR Primers	10 pmole
Taq polymerase (5 U/μL)	1 μL
Distilled water	up to 20 μL
Total	20 μL

Table 6. Reaction mixture for the nested PCR

First PCR product	1 μL
10 x buffer	2 μL
10 x dNTP (10 mM)	2 μL
Nested PCR Primers	10 pmole
Taq polymerase (5 U/μL)	1 μL
Distilled water	up to 20 μL
Total	20 μL

Nested PCR에서 얻어진 산물 5 μL를 1 μL 6 x loading dye에 섞은 후 1.5% SeaKem LE agarose gel을 통해 전기영동(0.5 x TBE buffer 사용)하고 ethidium bromide로 염색하여 밴드를 확인하였으며, NanoVue (4282. Version 1.7.3., Healthcare Bio-Science, Sweden)를 이용하며 PCR 산물의 DNA양을 측정하였다.

패류의 노로바이러스 오염실태조사를 위한 시료의 농축은 앞에서 정립된 절차를 따랐다. 먼저 25 g씩 (또는 10 g씩)의 duplicate 시료에 7배의 멸균된 3차 증류수를 첨가하고 60초 동안 두 번 조직파쇄기(Omni Mixer)로 균질화 하였다. 1 N HCl 로 pH 5.0으로 맞춘 후 5분 동안 gentle stirring을 하고 원심분리 (2,000 x g, 20분, 4℃)하였다. 상청액 제거 후 pellet은 7배의 0.05 M glycine-0.14 M NaCl (pH 7.5)로 elution하고 15분 동안 gentle stirring을 하였다. 원심분리 (5,000 x g, 20분, 4℃)하여 상청액을 모은 후 남은 pellet은 7배의 0.5 M threonine-0.14 M NaCl (pH 7.5) 첨가하고 vortexing 1분하여 완전히 현탁 하였다. 이후 다시 원심분리 (5,000 x g, 20분, 4℃)하고 상청액을 이전 상청액과 합쳤으며 불순물이 많을 경우 원심분리 (5000 x g, 20분, 4℃)하여 불순물을 제거하는 단계를 추가하였다. 상청액에 PEG 8000-NaCl(최종농도 8%) 첨가하여 incubation (4℃, 2시간)하였다. 이후 원심분리(6,700 x g, 4℃ 30분)하여 상청액을 분리, 제거한 후에 15 mL phosphate buffered saline(PBS, pH 7.5)에 재현탁하고 여기에 15 mL vertrel XF를 첨가하고 vortexing한 후 재차 원심분리 (2,000 x g, 4℃, 30분)했다. 상청액에 PEG 8000-NaCl (최종농도 8%) 첨가하여 침전(4℃, 2시간)한 후에 원심분리(14,000 x g, 4℃, 15분)를 통해 pellet을 얻고 이 pellet을 침전 정도에 따라 PBS량을 조절하면서 0.5 mL~2.5 mL 정도의 PBS에 녹였다. 농축의 성공 여부는 MPN unit가 결정된 콕사키바이러스 B5를 10,000 MPDU씩 각 시료에 넣어 확인하였다.

Table 7. Primers used in RT-nested PCR

Virus	Region	Name	sequence 5′→3′[c]	Polarity	Position[d]	Reaction condition	Reference
Coxsackie-virus B5 (CB5)	5′NTR	E1[a]	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	Sense	164-184	94℃ 4 min; 95℃ 30 sec, 50℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles; 72℃ 7 min	Allard et al. (1992)
		E2[a]	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	Antisense	599-578		
Norovirus GI	ORF2 (Capsid region)	G1-F1M[a]	CTGCCCGAATTYGTAAATGATGAT	Sense	5342-5365	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 54℃ 30 sec, 72℃ 45 sec, 35 cycles; 72℃ 7 min	Kim et al. (2005)
		G1-R1M[ab]	CCAACCCARCCATTRTACATYTG	Antisense	5671-5649		
		G1-F2[b]	ATGATGATGGCGTCTAAGGACGC	Sense	5358-5380	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 56℃ 30 sec, 72℃ 45 sec, 35 cycles; 72℃ 7 min	
		COG1F1	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	Sense	5291-5310	94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 cycles; 72℃ 15 min	Nishida et al. (2003)
		G1-SKR[ab]	CCAACCCARCCATTRTACA	Antisense	5671-5653		
		G1-SKF[b]	CTGCCCGAATTYGTAAATGA	Sense	5342-5365	94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1min, 72℃ 2 min, 35 cycles; 72℃ 15 min	
Norovirus GII	ORF2 (Capsid region)	G2-F1M[a]	GGGAGGGCGATCGCAATCT	Sense	5049-5067	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 54℃ 30 sec, 72℃ 45 sec, 35 cycles; 72℃ 7 min	Kim et al. (2005)
		G2-R1M[ab]	CCRCCIGCATRICCRTTRTACAT	Antisense	5389-5367		
		G2-F3[b]	TTGTGAATGAAGATGGCGTCGA	Sense	5079-5100	94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 56℃ 30 sec, 72℃ 45 sec, 35 cycles; 72℃ 7 min	

[a]first PCR primer; [b]nested PCR primer; [c]Degenerate positions I: deoxyinosine, R: A/G, H: A/C/T, Y: C/T, B: C/G/T, M: A/C, V: A/C/G, K: G/T, D: A/G/T, S: C/G, N: A/C/G/T, W: A/T; [d]GI: Norwalk/68/US (Accession no. M87661), GI: Lordsdale/93/UK (Accession no. X86557).

Table 8. Reaction mixture for the first PCR

cDNA	12.0 μL
10 x buffer	5.0 μL
10 x dNTP (10 mM)	5.0 μL
First PCR Primers	25 pmole
Taq polymerase (5 U/μL)	0.25 μL
Distilled water	up to 50.0 μL
Total	50.0 μL

Table 9. Reaction mixture for the nested PCR

First PCR product	1.0 μL
10 x buffer	2.0 μL
10 x dNTP (10 mM)	2.0 μL
Nested PCR Primers	10 pmole
Taq polymerase (5 U/μL)	0.1 μL
Distilled water	up to 20.0 μL
Total	20.0 μL

바이러스 유전자 증폭을 위한 First PCR 및 nested PCR에 사용할 primer의 종류 및 반응 조건은 Table 7, first PCR 반응조성은 Table 8, nested PCR 반응조성은 Table 9에 제시하였다. First PCR의 경우 콕사키바이러스도 함께 증폭 (전체 시료의 1/5 분량)하여 농축의 오류 여부를 확인하였다.

각 시료에서 genogroup 당 duplicate (genogroup 1 (GI), genogroup 2 (GII) 각 2개씩; 각각 전체 시료의 1/5 분량)로 PCR을 증폭하였다.

GI의 경우 2월에서 6월까지의 시료는 G1-F1M/G1-R1M/G1-F2 primer를 사용하여 증폭하였으며 7월 이후의 시료에서는 duplicate에 G1-F1M/G1-R1M/ G1-F2 primer와 COG1F/G1-SKR/G1-SKF primer를 각각 하나씩 적용하여 증폭하였다. GII의 경우는 duplicate 모두를 G2-F1M/G2-R1M/ G2-F3 primer를 사용하여 증폭하였다. 또한 각 단계마다 negative control을 삽입하고 100 MPDU의 노로바이러스 양성 시료를 삽입하여 PCR 증폭의 오류 여부를 확인하였다. PCR 증폭은 PTC-100 (BioRad, US) PCR 증폭기를 통해 실시하였고 결과는 1.5% agarose gel을 통해 확인하였다.

2.8. 노로바이러스의 계통학적 분석

PCR 증폭 결과 양성으로 판정된 시료는 염기서열분석을 통해 가짜양성 여부를 확인함과 동시에 genotype을 판정하였다. PCR 산물을 정제한 후 GI의 경우 G1-F2, GII의 경우 G2-F3을 사용하여 ABI 3730 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA)에서 BigDyeTM법으로 염기서열을 분석하였다. 확보된 염기서열은 EMBL/GenBank database를 통해 등록된 염기서열과 비교하여 근연 genotype을 파악하였다. DNA 염기서열은 우선 Clustal X (version 1.8; Thomson et al., 1997)를

이용하여 정렬한 후 primer 부위를 제거하였다.

노로바이러스의 각 양성 시료에 대한 계통도는 PHYLIP version 3.57 을 사용하여 Kimura 2-parameter distance와 neighbor-joining methods로 작성하였으며 (Felsenstein, 1995), TreeView version 1.6.1. (Page, 1996)을 통해 나타내었다. Outgroup은 사포바이러스를 사용하였고 사용된 표준 노로바이러스 염기서열은 accession number를 표기하였다.

2.9. 해수 중 노로바이러스 농축

시료의 농축은 직경 90 mm HA type 0.45 μL membrane filter (Millipore)에 GF/C glass filter를 앞뒤로 배치시킨 뒤 해수 시료 8 L를 걸러서 HA type filter에 바이러스 입자를 붙인 후 0.5 mM H_2SO_4 200 mL을 이용해 여분의 양전하를 제거하였다.

이후 50 mM H_2SO_4 0.1 mL과 100 x TE buffer 0.1 mL이 들어있는 튜브로 교체 후에 10 mL의 1 mM NaOH로 바이러스를 용출하였다.

이 시료를 Centriprep Concentrator (YM-50, Millipore, USA)를 사용하여 1,500 x g에서 15분간 원심분리를 3~4회 실시하여 최종 부피를 450 μL까지 농축하였다(Katayama et al., 2002; Rose et al., 2006).

농축된 시료는 QiaAmp® Viral RNA Mini Kit를 사용하여 농축시료에 4배 분량의 buffer AVL을 넣어 주고 15초 vortexing 했다. 10분 동안 상온 (15℃~25℃)에서 배양 후 농축시료 4배 분량의 100% 에탄올 넣고 15초간 vortexing하였다. 630 μL씩을 spin column에 넣고 8,000 rpm으로 1분간 원심분리하고 시료를 모두 사용할 때 까지 반복하였다. Buffer AW1 500 μL를 column에 넣고 1분 동안 8,000 rpm으로 원심분리하여 세척한 후 buffer AW2 500 μL를 column에 넣고 3분 동안 14,000 rpm으로 원심분리하여 2차 세척하고 잔여물이 안남아 있도록 하였다.

Table 10. RT-PCR conditions and composition of reaction mixture

a. GI

Ingredient	Unit	Reaction condition
RNA template	12.5 μL	1. Add Distilled water, dNTP, Random primer into RNA extract and incubate 5 min at 65℃ then cool down on ice
5 x first-strand buffer	5.0 μL	
DTT	2.5 μL	
10 x dNTP (10 mM)	1.25 μL	
RNasin® Ribonuclease inhibitor (40 u/μL, Promega)	1.25 μL	2. Add 5 x first-strand buffer, DTT, RNasin® Ribonuclease inhibitor and incubate 2 min at 42℃
SuperScript^{TM} II Reverse Transcriptase (200 u/μL, Invitrogen)	1.25 μL	
JJV1R primer	2.5 pmole	3. Add SuperScriptTM II Reverse Transcriptase and incubate 50 min at 42℃, then 15min at 70℃ for enzyme inactivation
Distilled water	up to 25.0 μL	
Total	25.0 μL	

b. GII

Ingredient	Unit	Reaction condition
RNA template	12.5 μL	1. Add Distilled water, dNTP, Random primer into RNA extract and incubate 5 min at 65℃ then cool down on ice
5 x first-strand buffer	5.0 μL	
DTT	2.5 μL	
10 x dNTP (10 mM)	1.25 μL	
RNasin® Ribonuclease inhibitor (40 u/μL, Promega)	1.25 μL	2. Add 5 x first-strand buffer, DTT, RNasin® Ribonuclease inhibitor and incubate 2 min at 42℃
SuperScript^{TM} II Reverse Transcriptase (200 u/μL, Invitrogen)	1.25 μL	
COG2R primer	2.5 pmole	3. Add SuperScriptTM II Reverse Transcriptase and incubate 50 min at 42℃, then 15min at 70℃ for enzyme inactivation
Distilled water	up to 25.0 μL	
Total	25.0 μL	

Buffer AVE spin column에 넣고 1분 동안 배양 후 1분, 8,000 rpm으로 원심분리하여 용출하였다 (최종 25 μL가 되도록 buffer AVE를 사용).

핵산 추출에서 얻어진 RNA 시료를 Table 10과 같은 방법으로 역전사하여 cDNA를 얻었다.

2.10. Standard curve의 작성

Standard curve를 작성하기 위한 양성 플라스미드를 제작은 질병관리본부에서 분양받은 GI/6, GII/3로 genotying된 분변 시료에서 앞과 같은 방법으로 RNA를 추출하고 역전사를 한 후 각각 JJV1F/JJV1R, JJV2F/COG2R primer set (Table 11)로 PCR 증폭하였다 (조건: 94℃, 3분; 94℃, 30초, 48℃, 30초, 72℃, 1분-35 cycle; 72℃, 7분).

증폭된 PCR 산물을 정제한 후 T&A cloning vector (Real Biotech Corporation)에 클로닝하였다. 클로닝된 플라스미드는 분광광도계를 사용해 260 nm 파장을 측정해 농도를 확정하고 플라스미드의 copy number를 계산하였으며, 일련의 1/10 희석을 통해 standard curve 측정에 사용하였다. 사용한 primer의 종류는 Table 12에 제시하였다. 또한 PCR 반응액 조성은 Table 12에 제시하였다. Primer 및 증폭조건은 Jothikumar et al. (2005)의 보고를 참조하였다. standard curve 측정과 해수 시료 분석 시 negative control을 삽입하여 real-time PCR 증폭의 오류 여부를 확인하였다. PCR 증폭은 ABI 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems)을 통해 실시하였고 결과는 1.5% agarose gel을 통해 확인하였다. 해수 시료는 1 L 분량의 시료를 genogroup 당 duplicate로 분석하였다. standard curve를 측정하기 위한 플라스미드 증폭 연구시 오류를 방지하기 위해 각 시료 당 triplicate로 분석하여 오류를 최소화하였다.

Table 11. Primers for TaqMan Real-time RT-PCR and RT-PCR

Genogroup	Primer	Sequence(5′-3′)	Polarity	Location	Reference[a]
GI	JJV1F	CGC ATG TTC CGI TGG ATG	+	5282-5299	Jothikumar et al., 2005
	JJV1R	TCC TTA GAC GCC ATC ATC AT	-	5377-5358	
	JJV1P	FAM-TGT GGA CAG GAG ATC GCA ATC TC-TAMRA	+	5319-5341	
GII	JJV2F	CAA GAG TCA ATG TTT AGG TGG ATG AG	+	5003-5028	
	COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	-	5100-5080	
	RING2-TP	FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-TAMRA	+	5048-5067	

[a]GI, Norwalk/68/US (Accession no. M87661); GII, Lordsdale/93/UK (Accession no. X86557).

Table 12. Composition of reaction mixture for Real-time PCR

Template (cDNA) or	12.5 μL
plasmids	10.0 μL
2X TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems)	5.0 μL
Primers	12.5 pmole
TaqMan probe	5.0 pmole
Distilled water	up to 50.0 μL
Total	50.0 μL

플라스미드 농도에 따른 threshold cycle (Ct)의 변화량에 대한 standard curve는 EXCEL program (Microsoft Office 2003, Microsoft Co., USA)을 통해 구하였다. 해수 시료에서 얻어진 Ct값 역시 EXCEL program을 통해 평균과 표준편차를 얻고 standard curve를 통해 노로바이러스 농도가 결정되고 표준편차도 결정하였다.

2.11. 초고압 처리

압력처리에 의한 굴 중의 FCV의 불활성화 조건을 구명하기 위하여 6.8 log · $TCID_{50} \cdot mL^{-1}$의 FCV 배양액 약 2 mL를 cryotube (Nalgene, USA)에 기포가 생기지 않도록 채운 후 5개 단위로 진공 포장하였다.

굴은 탈각 과정 중의 오염 방지를 위해 패각 표면을 흐르는 수돗물에서 청동솔로 문질러 이물질을 제거고 탈각하였다. 현재 시판되는 생식용 봉지굴의 포장법과 동일한 방법으로 패육 중량을 기준으로 150 g씩 자연해수와 함께 폴리프로필렌 봉지(300 mL)에 기포가 혼입되지 않도록 포장하였다.

포장된 굴과 FCV 시험구를 각각 5,000 psi, 10,000 psi, 20,000 psi, 30,000 psi, 40,000 psi, 50,000 psi 및 60,000 psi의 압력조건으로 25℃에서 60초간 처리하였다. 압력 처리 후 처리 압력 조건별 FCV의 사멸율과 굴의 변화를 관찰하였다.

2.12. 전기분해해수 처리

전기분해해수처리에 의하여 FCV 바이러스가 불활성화 되는지를 검토하기 위하여 여과 멸균된 해수 300 mL에 FCV 배양액(6.8 log · $TCID_{50} \cdot mL^{-1}$)을 최종농도가 4.8 log · $TCID_{50} \cdot mL^{-1}$가 되도록 첨가하여 염소농도 1 ppm로 조절한 전기분해해수를 7 L/min의 유속으로

순환하였다.

0, 30초, 1분, 3분, 5분, 10분 시간간격으로 일정량의 시료를 취하여 단계 희석한 후 숙주세포(Crandall-Reese feline kidney, CrFK)에 감염시켜 감염가를 측정하였다. 감염가 측정에는 $TCID_{50}$(Tissue culture infections dose)값으로 산출하였다. 대조구로는 일반 멸균 해수에 바이러스 배양액을 넣고 전기분해해수장치와 같은 조건으로 시험하였다.

2.13. 광촉매 자외선 처리

광촉매처리에 의하여 FCV 바이러스가 불활성화 되는지를 검토하기 위하여 여과멸균된 해수 300 mL에 FCV 배양액(6.8 log · $TCID_{50} \cdot mL^{-1}$)을 적당량 첨가하여 광촉매살균시스템($10^4 \mu W \cdot sec/cm^2$)으로 조사시키며 순환하였다. 0 초, 30 초, 1 분, 3 분, 5 분, 10 분 시간간격으로 일정량의 시료를 취하여 단계 희석한 후 숙주세포(Crandall-Reese feline kidney, CrFK)에 감염시켰으며, 감염가 측정에는 $TCID_{50}$ (Tissue culture infections dose)값으로 산출하였다. 대조구로는 광촉매에 노출시키지 않은 멸균 해수에 바이러스 배양액을 넣고 같은 광촉매 시험구와 같은 시간별로 검사하였다.

2.14. FCV 감염력 측정

대체 바이러스로 사용된 FCV의 배양 및 감염력 측정을 위한 세포의 준비는 다음과 같이 요령으로 실시하였다. 먼저 75 ㎠ 배양 플라스크(Costar, Canada)에 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)을 적량 분주한 후 숙주세포인 CrFK cell을 접종하고 37℃로 조정된 humidified 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양 후 양호한 부착 성장이 확인되면 2일 간격으로 2차

배양을 실시하였다. 2차 배양은 (1) 상청의 배지를 제거하고, (2) 단일 세포층을 Dulbecco's phosphate buffered saline (pH 7.3) (PBS; GIBCO/BRL, Cat. No. 21300-082, Canada)로 세척한 후, (3) 0.05% trypsin-EDTA (GIBCO/BRL, Cat. No. 25300-054, Canada) 1 mL를 단일 세포층에 가하여 20초 방치했다가 제거하고, (4) 플라스크 바닥에서 세포가 탈리될 때까지 플라스크를 37℃에 배양한 다음, (5) 배양이 끝난 플라스크에 약 6 mL의 새로운 배지(DMEM+10% serum)를 첨가하고 고루 섞은 후 3개의 75 ㎠ 배양 플라스크에 분주하고 처음과 동일한 조건으로 2일간 배양하였다.

바이러스 풀을 얻기 위해 (1) CrFK 단일세포층이 잘 형성된 플라스크를 선택하여 상청의 배지를 흡입제거하고, (2) 바이러스 현탁액 200 μL를 플라스크에 접종한 후, (3) 37℃로 조정된 humidified 5% CO_2 incubator에 90분간 배양하여 바이러스가 흡착되도록 하였다. 그리고 (4) 7 mL의 maintenance media (DMEM+2% FBS)를 가하여 상기한 조건에서 배양하여 바이러스 작용으로 단일세포층이 90%가 파괴될 때까지 배양하였다.

각 바이러스 감염 플라스크를 냉동과 해동을 2회 반복한 후 1500 ×g에서 15분간 원심분리하여 세포 잔해를 제거하였다. 바이러스가 포함된 현탁액을 0.5 mL씩 분주하여 -80℃에 보관하였다.

FCV의 감염가를 정량적으로 평가하기 위해 50% 조직배양 감염량(tissue culture infectious dose50, $TCID_{50}$)을 측정하였다. $TCID_{50}$은 일정량의 세포배양액 50%를 감염시키는데 필요한 바이러스 희석 배수를 나타낸다. 이 분석은 바이러스 입자의 CPE (cytopathic effect, 세포병변) 여부를 확인하는 것이다. 이 연구에서는 Payment and Trudel (1993)의 방법을 변형하여 $TCID_{50}$을 측정하였다. 먼저 (1) 96-well cell culture plate에 well

당 약 10^4/100 μL의 CrFK cell을 접종하고 37℃로 조정된 humidified 5% CO_2 incubator에서 하룻밤 배양하였다. (2) 다음날 maintenance media에 10배수로 희석한 바이러스 현탁액을 조제하고, (3) 96-well plate 각 well의 상청 배지를 흡입제거한 후 피검액(바이러스 현탁액)을 희석단계별로 8 well에 25 μL씩 접종한 다음 37℃로 조정된 humidified 5% CO_2 incubator에서 90분간 배양하였다. (4) 배양이 끝나면 maintenance media를 각 well에 0.1 mL씩 분주하였다. 각 plate 마다 maintenance media만 첨가한 대조구를 두었으며, 3일간 매일 CPE 여부를 관찰하였다. 3일 후 35% formalin을 각 well에 적량 분주하고 1분간 처리하고 수세하여 사멸 세포를 제거한 후 1% (w/v) crystal violet으로 1분간 염색하고 육안으로 관찰하여 세포파괴가 일어난 well의 수를 최종적으로 결정하였다. 바이러스 역가는 Reed-Muench 법으로 계산하였다(Payment and Trudel, 1993).

2.15. 굴의 품질변화 분석

초고압 처리 후 굴의 일반성분 변화를 관찰하기 위하여 압력처리 조건별로 포장된 굴을 꺼내어 10분간 수절한 후 전 개체를 stomacher filter bag (Sward, London, UK)에 넣고 완전히 파쇄 혼합하였다. 그리고 일부에서는 패각근만을 분리하여 패각근의 일반성분 변화를 조사하였다. 그리고 대조구 굴은 층류후드에서 수동 박신하여 동일한 조건으로 처리하였다. 전 조직과 패각근의 일반성분은 AOAC (1995)법을 따라 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 semimicro Kjeldahl법, 조회분은 건식회화법 그리고 조지방은 Soxhlet법으로 각각 측정하였다. 분석항목 당 6개의 굴 개체를 사용하여 3회 반복하여 측정을 실시하였다.

그리고 조직학적 변화를 관찰하기 위해 압력 처리된 굴을

빙장(<4℃)하여 실험실로 운반하여 중장선, 좌외투막, 좌아가미의 안쪽 아가미판(outer demibranch)등으로 해부하여 5개체씩 적출하였다. 광학현미경 표본을 위해 절취한 시료들은 Drury and Wallington (1980)의 방법에 따라 Bouin's solution에 24시간 동안 고정하고, 24~36시간 동안 흐르는 물에서 수세한 다음 70%~100% 에탄올을 이용하여 단계적으로 탈수하였다. 이후 paraplast (McCormick, USA)을 이용하여 포매하고, microtome (RM2235, Leica, Germany)을 이용하여 두께 4~6 ㎛의 횡단면과 종단면의 연속 절편을 제작하였다. 이들 조직 절편들은 구조와 세포형태를 관찰하기 위해 Mayer's hematoxylin-eosin (H-E) 비교염색과 산성 및 중성 당점액 성분을 관찰하기 위해 alcian blue-periodic acid and Schiff's solution (AB-PAS, pH 2.5) 반응을 실시하여 광학현미경 (BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

압력 처리 후 패육의 색 변화를 관찰하기 위해 패각근을 대상으로 Hunter *L*, *a*, 및 *b* scale [*L*: lightness, 0 (dark)-100 (white); +*a*: redness; -*a*: greenness; +*b*: yellowness; and -*b*: blueness]을 측정하였다. 색차의 측정은 Spectrum Color Meter JC-810 (Color Techno System Co., Tokyo, Japan)을 사용하였으며, 측정 전 ceramic plate (*L*=93.73, *a*=-0.12, *b*=0.11)를 사용하여 보정하였다. 측정 대상은 조직구성이 비교적 일정한 패각근으로 하였다. 압력 처리구 당 4개체에서 적출한 패각근을 측정대상으로 하였고 매 측정 시 5회 측정하여 처리구 당 20회의 반복구를 두었다.

결과 및 고찰

1. 이매패류 중 노로바이러스 검출법 정립

이매패류에서 노로바이러스 검출기법 정립과 표준화를 위해 최근 국내외 연구기관에서 수행해 온 굴 등에서의 노로바이러스 분석 방법 및 결과에 대해 조사한 결과, 굴 등 이매패류에서 대표되는 농축법은 크게 extraction-concentration법과 adsorption-elution-concentration법으로 대별되는 것으로 나타났다(Lees, 2000). 이들 모두 glycine buffer를 통해 virus를 어패류에서 분리하고 일련의 원심분리와 polyethylene glycol (PEG) 처리를 통해 침전시키는 방법으로 완충용액의 조성과 과정의 차이가 있다. PCR 분석을 위해 농축된 시료에서 효과적으로 핵산 (RNA)을 얻는 방법으로는 spin column을 이용한 방법과 Trizol®을 이용한 방법이 있었다(Arnal et al., 1999).

추출된 핵산을 증폭하여 노로바이러스의 존재유무를 분석하기 위해서는 노로바이러스에 특이적인 primer를 이용해야 하였다. 노로바이러스는 5 genotype으로 구성되어 있으며, 이 중에서 genotype 1, 2가 인간에 위험한 종류로 보고되어 있다(Katayama et al., 2002). PCR법이 개발된 이후 여러 다양한 연구진에 의해 노로바이러스 특이적인 primer가 제작되고 개량되고 있다. Genotype 1과 2는 진화적으로 밀접하게 가까우나 공통적으로 진화적으로 보존된 유전정보가 많지 않아 공통적인 primer 설계가 쉽지 않다. 따라서 genotype 1, 2 각각에 특이적인 primer가 여러 연구진에 의해 설계된 것들이 주를 이루고 있다. 초기에는 RNA polymerase (ORF1)의 보존된 염기서열을 중심으로 primer가 많이 제작되어 왔으나 계통학적 보존과 다양성을 담보하고 있는 capsid (ORF2)의 보존된 염기서열을 중심으로 다양한 primer가 제작되고 있는 실정이다. 어패류 등의 식품과

환자 시료 등에서 다양하고 광범위하게 사용되고 있는 primer를 검색하였으며 적합한 PCR 조건 역시 탐색하였다.

1.1. 노로바이러스 농축방법 비교

세 가지 바이러스 농축법을 교차 적용한 경우의 노로바이러스 검출율을 Table 13과 14에 제시하였다.

GII 접종시료 세 번의 실험결과와 GI 접종시료 한 번의 실험결과 모두 Protocol C가 다른 두 농축법에 비해 우수한 것으로 나타났다. 모든 실험에서 10 MNePDU 접종량에서 절반 이상의 시료가 PCR을 통해 검출이 되었으며 1 MNePDU 접종량에서도 타 농축법에 비해 검출 빈도가 높음을 확인할 수 있었다. Protocol C가 타 방법에 비해 우수한 것은 glycine을 통한 용출에 이은 threonine에 의한 2차 용출 과정이 더해진 것과 더불어 Vertrel XF의 세정과정과 2차 PEG 침전을 통해 불순물을 제거하여 PCR 방해물질을 효과적으로 제거하였기 때문이라 추정된다.

Protocol F의 경우 마지막 2차 PEG 침전 대신 membrane filter를 사용하여 불순물을 제거하는데 효율적이었고 시간을 단축시킨다는 장점이 있으나 filter의 정전기적 특성을 이용해 노로바이러스를 농축하는데 효율이 낮고 불순물에 섞여 있는 노로바이러스를 회수하기 어렵다는 단점이 있어서 효율이 낮아졌다고 추정된다. Protocol U의 경우 위의 두 방법보다 농축이 간단하다는 장점과 더 높은 원심력의 초고속원심분리기를 사용할 경우 시간도 단축될 수 있다는 장점이 있으나 별도의 세정 과정 없이 초고속 원심분리를 하여 불순물이 많아 PCR 방해물질이 많다는 단점에 의해 효율이 낮아졌다고 추정된다. 이러한 결과로 볼 때 Protocol C를 사용하는 것이 어패류에서 노로바이러스를 농축하는데 가장 효율적이고 안정적인 결과를 얻을 수 있다고 판단된다.

Table 13. Detection rate of norovirus according to concentration protocol and RNA extraction method

1st trial (GII 6 & 16)		Protocol C[a]		Protocol F		Protocol U		Total (%)
		Total	Triplicate	Total	Triplicate	Total	Triplicate	
Method A[b]	10 U	8/9	3/3 3/3 2/3	3/9	1/3 2/3 0/3	3/9	2/3 0/3 1/3	14/27(51.9)
	1 U	3/9	1/3 1/3 1/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	3/27(11.1)
Method B	10 U	8/9	2/3 3/3 3/3	3/9	1/3 1/3 1/3	3/9	2/3 1/3 0/3	14/27(51.9)
	1 U	3/9	2/3 1/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	3/27(11.1)
Method C	10 U	2/9	1/3 1/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	2/9	1/3 1/3 0/3	5/27(18.5)
	1 U	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/27(0.0)
Method D	10 U	1/9	0/3 1/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	1/27(3.7)
	1 U	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/27(0.0)
Total (%)	10 U	19/36(52.8)		6/36(16.7)		8/36(22.2)		
	1 U	6/36(16.7)		0/36(0.0)		0/36(0.0)		

2nd trial (GII 6 & 16)		Protocol C[a]		Protocol F		Protocol U		Total (%)
		Total	Triplicate	Total	Triplicate	Total	Triplicate	
Method A[b]	10 U	8/9	3/3 3/3 2/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	8/27(29.6)
	1 U	5/9	1/3 1/3 3/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	5/27(18.5)
Method B	10 U	8/9	3/3 3/3 2/3	0/9	0/3 0/3 0/3	2/9	0/3 2/3 0/3	10/27(37.0)
	1 U	5/9	1/3 2/3 2/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	5/27(18.5)
Method C	10 U	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	2/9	1/3 1/3 0/3	2/27(7.4)
	1 U	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/27(0.0)
Method D	10 U	2/9	0/3 1/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	2/27(7.4)
	1 U	3/9	0/3 3/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	3/27(11.1)
Total (%)	10 U	18/36(50.0)		0/36(0.0)		4/36(11.1)		
	1 U	13/36(36.1)		0/36(0.0)		0/36(0.0)		

[ab]See 2.5 and 2.6.

1.2. RNA 추출방법 비교

노로바이러스의 검출방법을 정립하기 위하여 네가지 RNA 추출방법을 비교하여 시험하였을때의 검출율을 Table 14에 제시하였다.

Table 14의 결과로 볼 때 QiaAmp® Viral RNA Mini Kit를 사용하는 핵산 추출법이 Trizol® 추출법보다 더 나은 효율을 가지고 있음을 알 수 있다. 비교적 고가라는 장점을 제외하고는 kit를 통한 핵산의 추출이 Trizol® 보다 안정적이고 효율적인 결과를 보여주었다.

추출에 필요한 시간도 Trizol® 추출법보다 훨씬 간편하며 시약 사용 역시 간편하여 초보자도 쉽게 할 수 있다는 장점 역시 지니고 있었다. Trizol® 추출법에서 isopropanol 처리 후 overnight를 할 경우 효율이 높아졌지만 시간이 많이 걸린다는 단점이 여전히 남아 있다. 따라서 spin column을 사용하는 핵산 추출법을 사용하는 것이 검출의 효율성을 높여줄 것으로 여겨진다. QiaShredder Homogenizer를 사용할 경우 검출 효율은 네 번째 실험을 제외하고는 큰 차이를 보이지 않았지만 PCR product를 전기영동 하였을 때 더욱더 선명하고 뚜렷한 band를 보이는 것을 확인할 수 있었으며 PCR 산물의 DNA 정량결과 또한 가장 높은 농도를 나타내었다(Fig. 9).

Fig. 9의 결과로 볼 때 QiaShredder를 사용하는 것이 더욱 명확한 결과를 얻는데 효과적인 것으로 판단된다. Sair et al.(2002)의 논문에서도 QiaShredder가 효율적으로 PCR 방해물질을 제거한다는 보고가 이를 뒷받침한다. 결론적으로 QiaAmp® Viral RNA Mini Kit 등과 같은 spin column을 사용하여 핵산을 추출하는 것이 노로바이러스 검출에 효율적이다.

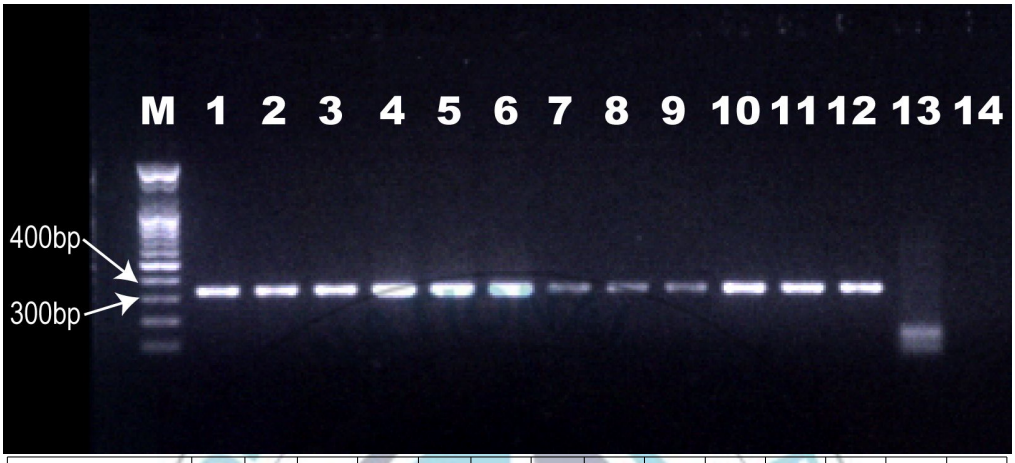
경우에 따라서 더욱 선명한 band를 얻어야 할 필요성이 있을 경우에는 QiaShredder Homogenizer의 사용도 고려될 수 있다.

Table 14. Detection rate of norovirus according to concentration protocol and RNA extraction method (isopropanol overnight treatment during Trizol® extraction in Method C and D)

3rd Trial (GII 6 & 16)		Protocol C[a]		Protocol F		Protocol U		Total (%)
		Total	Triplicate	Total	Triplicate	Total	Triplicate	
Method A[b]	10 U	5/9	2/3 0/3 3/3	8/9	3/3 3/3 2/3	5/9	3/3 2/3 0/3	18/27(66.7)
	1 U	2/9	2/3 0/3 3/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	2/27(7.4)
Method B	10 U	6/9	2/3 1/3 3/3	6/9	2/3 1/3 3/3	5/9	2/3 0/3 3/3	17/27(51.8)
	1 U	3/9	0/3 1/3 2/3	0/9	0/3 0/3 0/3	3/9	3/3 0/3 0/3	6/27(22.2)
Method C	10 U	7/9	3/3 1/3 3/3	0/9	0/3 0/3 0/3	1/9	0/3 1/3 0/3	8/27(29.6)
	1 U	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/27(0.0)
Method D	10 U	9/9	3/3 3/3 3/3	8/9	3/3 3/3 2/3	3/9	2/3 1/3 0/3	20/27(74.0)
	1 U	0/9	0/3 3/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/27(0.0)
Total (%)	10 U	27/36(75.0)		22/36(61.1)		14/36(38.9)		
	1 U	5/36(13.9)		0/36(0.0)		3/36(8.3)		

4th Trial (GI 6)		Protocol C[a]		Protocol F		Protocol U		Total (%)
		Total	Triplicate	Total	Triplicate	Total	Triplicate	
Method A[b]	10 U	8/9	3/3 2/3 3/3	5/9	2/3 1/3 2/3	1/9	0/3 0/3 1/3	14/27(51.9)
	1 U	1/9	1/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	1/27(3.7)
Method B	10 U	9/9	3/3 3/3 2/3	8/9	2/3 3/3 2/3	5/9	0/3 2/3 3/3	23/27(85.2)
	1 U	2/9	1/3 1/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	2/27(7.4)
Method C	10 U	6/9	0/3 3/3 3/3	3/9	1/3 1/3 1/3	6/9	0/3 3/3 3/3	15/27(55.6)
	1 U	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/27(0.0)
Method D	10 U	6/9	0/3 3/3 3/3	0/9	0/3 0/3 0/3	6/9	0/3 3/3 3/3	12/27(44.4)
	1 U	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	0/9	0/3 0/3 0/3	3/27(11.1)
Total (%)	10 U	31/36(86.1)		16/36(44.4)		18/36(50.0)		
	1 U	3/36(8.3)		0/36(0.0)		0/36(0.0)		

[ab]See 2.5 and 2.6.



Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
DNA conc. (μg/mL)	66.0	64.0	74.5	132.5	133.0	133.0	33.5	31.0	35.0	67.5	68.5	66.0	11.7	9.7
Relative intensity (%)	49.6	48.1	56.0	99.6	100.0	100.0	25.2	23.3	26.3	50.8	51.5	49.6	87.9	7.3

Fig. 9. Comparison of the RNA extraction efficiency. Lane: (1-3) QiaAmp® Viral RNA Mini Kit; (4-6) QiaAmp® Viral RNA Mini Kit and QiaShredder; (7-9) Trizol®; (10-12) Trizol® and QiaShredder; (13) negative control with un-spiked oyster; (14) negative control with Distilled water; (M) DNA molecular size markers. DNA concentration in each lane was measured. Relative intensity (%) was estimated by percentage DNA concentration of each lane to lane 5 and 6.

1.3. Primer 적합성 비교

노로바이러스의 검출방법을 정립하기 위하여 다양하게 사용되고 있는 primer들의 적합성 및 PCR 조건을 구명하였다.

노로바이러스 GI의 경우 GI genotype 6, GII의 경우 genotype 6, 16 mix를 사용하였다. 각각 G1F1M/G1-F2/G1R1M primer set와 G2F1M/G2-F3/G2R1M primer set를 기준으로 하여 pentaplicate 모두 검출이 되는 최소 농도를 구하고 이를 10배 희석한 바이러스 농도도 함께 실험하여 가장 민감도가 높고 비특이적 band가 적은 primer를 탐색하였다. GI, GII의 primer 민감도 및 적합성 연구 결과 Table 15과 같은 결과를 얻었다.

GI의 경우 기준이 G1F1M/G1-F2/G1R1M primer set이 가장 민감도가 높았으며 비특이적 밴드를 보이지 않는 안정성을 지녔다. NV36/NV35/NV82/SM82/NV81 역시 비슷한 민감도를 보였으나 G1F1M/G1-F2/G1R1M primer set보다 옅은 밴드를 보여주었다. Yuri52F/Yuri52R/MR3/MR4/Yuri22F/Yuri22R, JV13I/JV12Y/G1 역시 높은 민감도를 보여주었으나 다수의 비특이적 밴드를 보여 안정성을 보여주지는 못하였다. 다른 primer들은 낮은 민감도와 많은 수의 비특이적 밴드를 발생시켜 효율적인 primer로 보기는 힘들었다. 특히 SRI-1/SRI-2/SRI-3의 경우 모든 시료에 예측된 지역에서 밴드가 확인되었으나 음성 시료 역시 밴드가 확인되어 양성의 진위를 파악할 수 없었다.

GII의 경우 G2F1M/G2-F3/G2R1M을 제외한 모든 primer들이 기준 primer 보다 낮은 민감도를 보였다. 최소농도에서 모두 양성의 결과를 얻은 primer는 NV2oF2/NV2oR/G2-F3/G2SKR 뿐이고 나머지는 전혀 검출이 되지 않았거나 2~3개의 시료에서 양성 반응을 보였다. 또한 대부분의 primer에서 비특이적 밴드가 많아 가짜 양성으로 판단할 가능성을 배제하기 힘들었다.

Table 15. Norovirus detection rate according to primer sets

GI	Primer	Minimal concentration[a]	10 fold dilution[b]
ORF2 (capsid)	G1F1M/G1-F2/G1R1M	5/5	2/5
ORF1 (RNA polymerase)	NV36/NV35/NV82/SM82/NV81	4/5	1/5
	Yuri52F/Yuri52R/MR3/MR4/Yuri22F/Yuri22R	5/5	0/5
	SR1-1/SR1-2/SR1-3	5/5	5/5
	JV13I/JV12Y/G1	5/5	1/5
ORF2 (capsid)	COG1F/G1SKF/G1SKR	0/5	0/5
	G1FF/G2FFN/G1SKR	3/5	0/5

GII	Primer	Minimal concentration	10 fold dilution
ORF2 (capsid)	G2F1M/G2-F3/G2R1M	5/5	2/5
ORF1 (RNA polymerase)	NV35/NV35/NV82/SM82/NV81	3/5	1/5
	Yuri52F/Yuri52R/MR3/MR4/Yuri22F/Yuri22R	1/5	2/5
	GLPSG2/YGDD1	2/5	0/5
	SRII-1/SRII-2/SRII-3	3/5	3/5
	JV13I/JV12Y/NoroII-R	2/5	0/5
ORF2 (capsid)	COG2F/G2SKF/G2SKR	0/5	0/5
	G2FB/G2FBN/G2SKR	3/5	1/5
	NV2oF2/NV2oR/G2-F3/G2SKR	5/5	0/5

[a]Minimal RT-PCR unit; [b]10-fold dilution of minimal RT-PCR unit.

NV2oF2/NV2oR/G2-F3/G2SKR primer의 경우 G2F1M/G2-F3/G2R1M보다 민감도가 조금 낮았지만 최소농도에서도 뚜렷한 밴드를 보여 육안으로 판단하기 수월하고 가짜 양성의 위험이 상대적으로 아주 낮은 primer라 판단된다.

결론적으로 PCR을 이용해 노로바이러스 GI을 검출할 때에 가장 적합한 primer는 G2F1M/G2-F3/G2R1M primer set인 것을 확인할 수 있었고 NV36/NV35/NV82/ SM82/NV81, Yuri52F/Yuri52R/MR3/MR4/Yuri22F/Yuri22R, JV13I/JV12Y/G1 primer들의 경우 비슷한 민감도를 보이고 있으나 비특이적 밴드가 많아 가짜 양성 등의 혼란이 있을 수 있어 주의해서 사용해야 할 것이다. GII를 검출할 때에는 G2F1M/G2-F3/G2R1M과 NV2oF2/NV2oR/G2-F3/G2SKR primer set를 사용하는 것이 가짜 양성을 줄이고 가장 민감도를 높게 할 수 있을 것으로 판단되었다.

위의 결과로부터 패류에서 노로바이러스를 효율적으로 검출하기 위해서는 glycine, threonine에 의한 용출, 두 차례의 PEG 침전, Vertrel XF에 의한 세정 등의 과정이 있는 Method C가 가장 적합한 농축법으로 판단되었다. 이렇게 농축된 시료는 QiaAmp® Viral RNA Mini Kit 등의 spin column을 이용해서 RNA를 추출하는 것이 효율적이다. 경우에 따라 PCR 증폭에 의한 밴드 확인 시 QiaShredder Homogenizer를 사용하는 것이 더욱 효과적일 수 있다.

GI 및 GII를 PCR을 통해 검출함에 있어서 가장 효율적인 primer는 GI의 경우는 G1F1M/G1-F2/G1R1M primer set, GII의 경우는 G2/F1M/G2-F3/G2R1M primer set이다. GI의 경우 NV36/NV35/NV82/SM82/NV81, Yuri52F/Yuri52R/MR3/MR4/Yuri22F/Yuri22R, JV13I/JV12Y/G1 primer들도 민감도가 높으나 비특이적 밴드가 많이 발견되므로 사용 시에 주의가 필요하며, GII의 경우 민감도가 조금 낮지만 명확한 밴드를 보여주고 있는

NV2oF2/NV2oR/G2-F3/G2SKR primer set를 함께 사용하는 것도 검출 결과의 안정성과 적합성에 있어 도움을 줄 수 있을 것이다.

2. 이매패류의 노로바이러스 오염실태

노로바이러스를 포함한 장관계 바이러스는 환자의 분변을 통해 자연계에 배출된 후 장기간 생존하면서 연안해역에 유입되어 이매패류와 같은 식품을 매개로 경구를 통해 재 감염된다. 특히 노로바이러스와 같이 배양이 불가능한 바이러스의 경우에는 식품 중에 존재하는 바이러스가 감염력을 지니고 있는지 확인이 불가능하며, 유전자 검출법으로 정성 및 정량평가 되고 있다. 그래서 많은 연구사례에 근거하여 이매패류에 바이러스 유전자가 검출되는 경우 원인식품으로 판정하기 때문에 관련 업계에 과도한 피해가 발생할 가능성도 있다.

이러한 배경에서 볼 때 이매패류를 매개로 하는 장관계 바이러스 감염증 발생을 예방하기 위해서는 원천적으로 연안해역이 오염되는 것을 막아야 하며, 오염된 패류가 유통되지 않도록 하고, 오염패류를 정화 처리하는 등 광범위하고 체계적인 관리가 필요하다. 패류에 대해 바이러스 오염을 예방하고 제어하기 위해서 현재는 분변계 대장균에 대한 가이드라인만이 주로 사용되고 있다. 그러나 여러 연구를 통해 이러한 세균들은 바이러스의 존재여부와 유의적인 상관관계가 없는 것으로 보고되고 있기 때문에 (Wait et al., 1983; Le Guyader et al., 2000) 효과적인 질병예방을 위해선 어패류에 대한 병원성 바이러스 오염 여부를 직접 모니터링하는 것이 필요하다. 패류생산해역에서 직접 패류를 모니터링하여 바이러스의 오염 여부를 파악함으로써 식품위생안전 확보 및 바이러스 관리 체제를 만드는데 기초 자료로 제공되어야 한다. 특히 국내외 노로바이러스에 의한 식중독 등의 집단 감염이 급증하고 있기 때문에 패류에서 노로바이러스의

오염 여부를 파악함으로써 집단 감염을 예방하고 그 정보를 파악하는 것이 필요하다.

정립된 이매패류 중 노로바이러스 검출법을 현장시료에 적용하여 우리나라 동서남해안에 위치한 패류생산해역에서 노로바이러스의 존재유무를 파악함으로써 식품위생안전의 확보를 위한 자료를 확보하고자 하였다.

2.1. 노로바이러스 검출율

패류 중의 노로바이러스를 검출하기 위하여 우선 패류 중의 바이러스의 농축효율을 확인하였다. 패류 시료를 농축하고 콕사키바이러스를 양성 시료로 삽입 후 농축을 진행하고 핵산을 추출 RT-PCR을 하였다. 그 결과 실험이 진행된 모든 시료에서 콕사키바이러스 양성 결과를 얻을 수 있었다. 이 결과는 농축된 모든 패류 시료에서 접종된 콕사키바이러스가 회수되는 것을 의미하는 것이며 따라서 패류 속에 노로바이러스가 존재할 경우 마찬가지로 농축 시에 회수가 될 수 있는 것을 의미하며 농축 단계에서의 오류가 없는 것을 증명하게 되었다.

지역에 따른 검출율은 서천 비인만이 가장 높았고(50.0%, 5/10), 태안 남면에서는 검출되지 않았다. 하지만 이 두 시료 채취 장소를 제외한 다른 곳에서 10~40% 정도의 비율로 꾸준히 검출되고 있으며 검출되지 않은 태안 남면 시료가 모두 바지락인 것으로 볼 때 지역적 차이보다는 시료별 검출율 차이에 기인한 것으로 사료된다(Fig. 10). 향후 보다 세분화된 시료채취와 장기간의 모니터링을 실시하여 지역적 오염실태를 파악하고 패종별 계절별 오염정도를 확인할 필요가 있을 것이다.

2007년 2월부터 11월까지 채취한 패류 시료를 대상으로 전술한 바와 같은 전처리를 통하여 노로바이러스 오염여부를 조사하였다. 양성의

판정은 RT-nested PCR 산물을 agarose gel 상에서 전기영동으로 확인하여 양성밴드 여부를 통하여 실시하였으며, 양성으로 확인된 RT-nested PCR 산물을 대상으로 염기서열을 분석하여 최종 확정하였다.

그 결과, 총 140개의 시료 중 31개의 시료에서 노로바이러스 유전형 GI 또는 GII가 검출되어 22.1%의 검출율을 나타내었다. GI은 9개 시료에서 검출되었으며 GII는 22개 시료에서 검출되어 유전형의 비율은 각각 29%와 71%를 차지하였다(Table 16). 월별로는 수온이 높은 7월과 8월 그리고 10월에 각각 14.3%, 7.1% 그리고 8.3%로 다소 낮은 검출율을 보였으며 조사기간 중 40%~20%의 검출율을 나타내어 유의할만한 계절적 차이는 발견할 수 없었다.

1929년 Zahorsky가 노로바이러스에 의한 질환을 최초로 보고하면서 “winter vomiting disease"라고 명명한 바 있다(Manish et al., 2009). 이는 동절기로 자연환경에서 생존기간이 증가하는 노로바이러스의 특징에 기인하는 것으로 통상 winter virus로 불리어 왔다. 그러나 최근 전 세계적으로 발생하는 장염의 40~50%가 노로바이러스 감염에 의한 것으로 알려질 만큼 환자수가 급증함에 따라 연중 검출되는 경향을 보이고 있다(Bryce et al., 2005). 이 연구의 결과에서도 전 세계적인 추세와 같이 우리나라 연안에서 노로바이러스를 포함한 분변에 의한 지속적인 오염이 발생하고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 11).

검출율을 패종별로 살펴보면 동죽 시료에서 40.0% (4/10), 피조개 시료에서 36.3% (4/11), 홍합 시료에서는 24.1% (7/29), 굴 시료에서는 24.0% (12/50)로 검출되어 상대적으로 높은 검출율을 나타내었다 (Fig. 12). 그리고 바지락의 경우에는 5.0% (1/20)로 가장 낮은 검출율을 나타내었다. 그리고 패종별 검출율 역시 계절 변화와 유의할 만한 상관관계를 찾을 수 없었다(Table 16, Fig. 12).

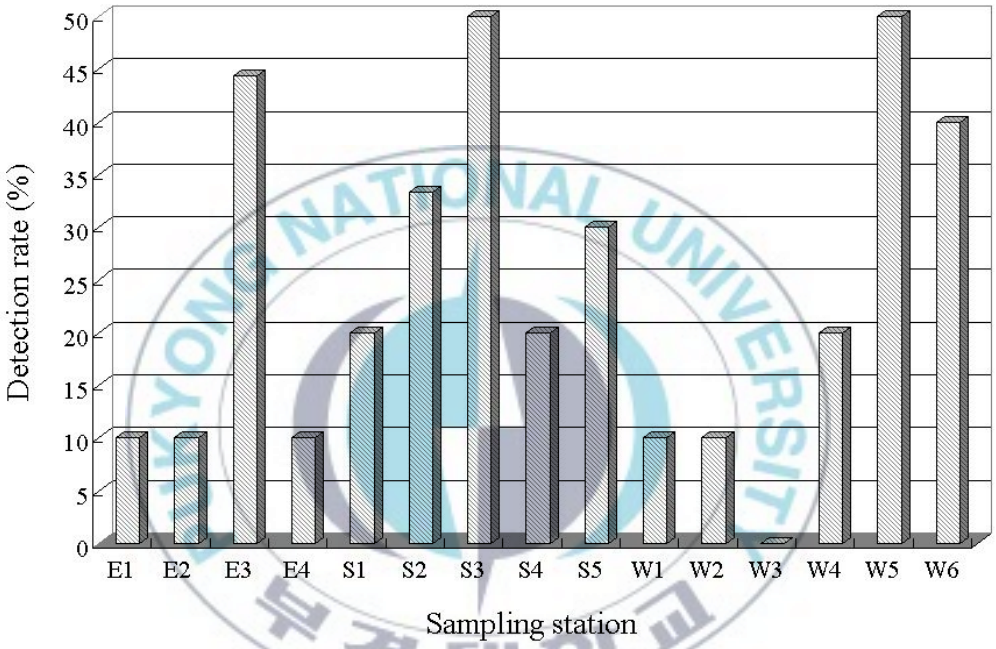


Fig. 10. Norovirus detection rate of shellfish collected at each sampling station from February to November in 2007. Sampling stations were shown in Table 1.

Table. 16. Norovirus detection in shellfish collected at 15 stations from February to November in 2007

St.	Area	Shellfish	Month										Detection rate by station (%)
			2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
E1[a]	Yangyang	Scallop[b]	–[c]	–	–	–	–	–	–	GII	–	–	1/10 (10.0)
E2	Uljin Pyeonghae	Mussel	–	–	GI[d]	–	–	–	–	–	–	–	1/10 (10.0)
E3	Pohang Yeongil	Mussel	GII[e]	–	GI	GII	–	–	–	GII	NS	–	4/ 9 (44.4)
E4	Ulsan Jinha	Oyster	–	–	–	–	–	–	–	–	GI	–	1/10 (10.0)
S1	Pusan Haeundae	Oyster	GI	GI	–	–	–	–	–	–	–	–	2/10 (20.0)
S2	Suncheonman	Ark shell	GI	GI	–	–	–	–	–	GI	NS	–	3/ 9 (33.3)
S3	Deukryangman	Ark shell	GII	NS[f]	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	–	1/ 2 (50.0)
S4	Wando	Abalone	–	GII	GI	–	–	–	–	–	–	–	2/10 (20.0)
S5	Jindo	Oyster	–	–	GII	–	GII	–	–	–	–	GII	3/10 (30.0)
W1	Yeongheung Nae-ri	Oyster	–	–	–	–	–	–	–	–	–	GII	1/10 (10.0)
W2	Dangjin Hanjinpo	Short-necked clam	–	–	–	GII	–	–	–	–	–	–	1/10 (10.0)
W3	Taean Nam-myeon	Short-necked clam	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0/10 (0.0)
W4	Seocheon Cheonsuman	Mussel	–	–	GII	–	GII	–	–	–	–	–	2/10 (20.0)
W5	Seocheon Beeinman	Oyster	GII	–	GII	–	GII	GII	GII	–	–	–	5/10 (50.0)
W6	Buan Gomsoman	Surf clam	GII	–	–	GII	–	GII	–	–	–	GII	4/10 (40.0)
Detection rate by month (%)			6/15 (40.0)	3/14 (21.4)	6/14 (42.8)	3/14 (21.4)	3/14 (21.4)	2/14 (14.3)	1/14 (7.1)	3/14 (21.4)	1/12 (8.3)	3/15 (20.0)	
Overall detection rate (%)			31/140 (22.1) GI: 9/31 (29.0); GII: 22/31 (71.0)										

[ab]See Table 1. [c]Not detected; [d]Norovirus genotype I; [e]Norovirus genotype II; [f]No sample.

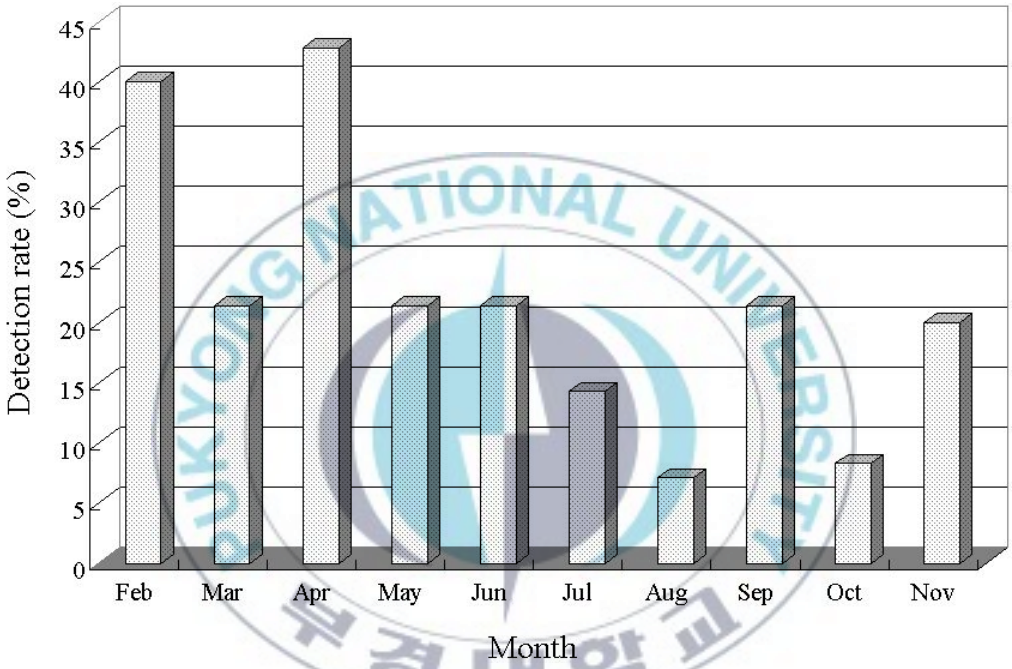


Fig. 11. Norovirus detection rate in shellfish according to collecting time at 15 sampling stations in 2007.

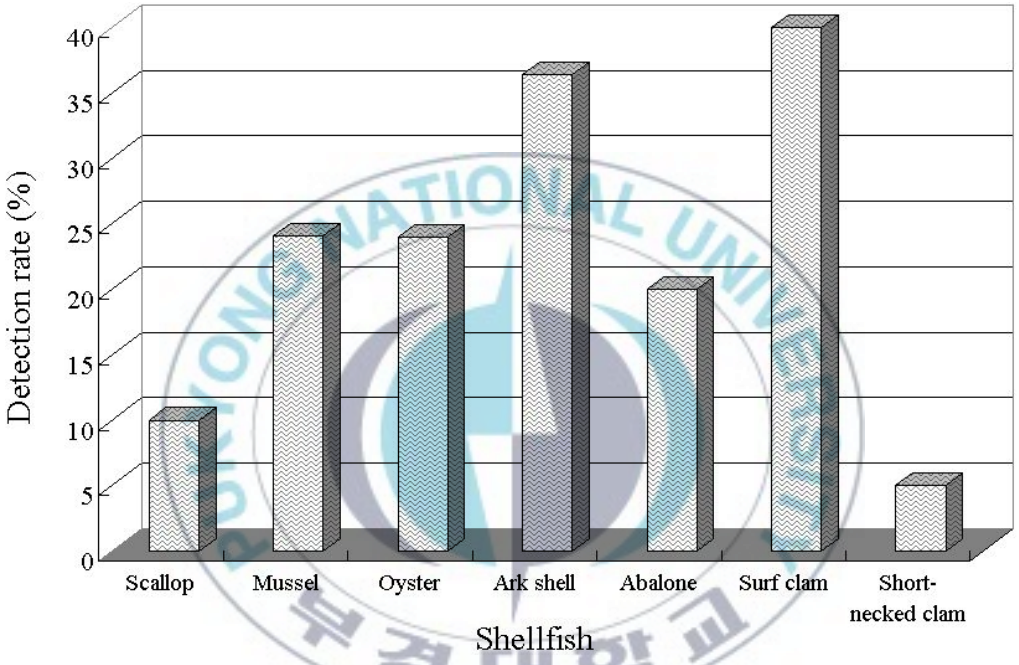


Fig. 12. Norovirus detection rate according to shellfish species collected at 15 stations from February to November in 2007.

2.2. 세균학적 품질과 노로바이러스 검출과의 관계

노로바이러스는 인간의 분변에서 유래하는 장관계 바이러스이기 때문에 전통적으로 패류생산해역의 분류 기준으로 세계적으로 사용되고 있는 분변계 대장균의 오염도와의 상관관계를 살펴보고자 패류 채취지점의 위생지표세균 농도를 조사하였다(Table 17).

현재 United States Food and Drug Administration 패류생산해역 기준(<230 E.coli/100g shellfish)(Lees, 2000)을 근거로 하는 경우 E3, E4, S1, W3, W4 및 W6 지점은 패류생산에 부적합 해역으로 나타났으며, 그 외 지점은 모두 패류생산에 적합한 분변오염 수준을 나타내었다. 그러나 노로바이러스 검출경향(Table 16)과 비교하는 경우, 이 연구결과에서는 위생지표세균이 나타내는 분변오염도와 노로바이러스 검출경향에 아무런 상관관계가 없는 것으로 추정되었다. 특히 노로바이러스가 전혀 검출되지 않은 W3(태안 남면) 지점의 경우 분변계 대장균의 기하학적 평균이 574.4 MPM/100g으로 분변오염도가 높은 것으로 나타나 위생지표세균을 기준으로 장관계 바이러스 오염을 예측하기 어려운 것으로 사료되었다. 이 이유에 대해서는 정확히 밝혀진 바 없으나 인간의 장관에서 배출된 바이러스가 대장균에 비하여 강한 환경내성을 가지기 때문인 것으로 보이며 특히 노로바이러스는 winter virus라고 불릴 만큼 수온이 낮은 동절기에 해수 중에서 장기간 생존하는 것으로 알려져 있다(Lees, 2000).

한편 수온, 염분농도, pH와 같은 해수의 이화학적인 특성 역시 노로바이러스 검출과 뚜렷한 상관관계를 찾을 수 없었다(Table 18). 다만 전반적으로 수온인 높은 하절기에 다소 노로바이러스 검출율이 낮은 것으로 나타나 노로바이러스의 외계 생존과 수온의 역비례적 관계가 추정되었다.

Table 17. Bacteriological water quality of shellfish collected at 15 stations from February to November in 2007

St.	Area	Shellfish	Coliform(MPN/100g)		Fecal coliformMPN/100g)	
			Range	GM[a]	Range	GM
E1[b]	Yangyang	Scallop[c]	<18 ~ 490	62.6	<18~130	55.9
E2	Uljin Pyeonghae	Mussel	45~4900	786.9	<18 ~ 130	62.9
E3	Pohang Yeongil	Mussel	<18 ~ 33000	260.4	<18 ~ 7900	706.2
E4	Ulsan Jinha	Oyster	45~350000	1185.7	<18 ~ 35000	4630.9
S1	Pusan Haeundae	Oyster	1100~>16000	3555	45~2400	1422
S2	Suncheonman	Ark shell	68~790	242.7	<18 ~ 78	77.8
S3	Deukryangman	Ark shell	78~950	254.6	<18 ~ 78	75
S4	Wando	Abalone	20~4900	372	<18 ~ 330	105.5
S5	Jindo	Oyster	<18 ~ 79000	501.5	<18 ~ 230	128
W1	Yeongheung Nae-ri	Oyster	<18 ~ 1300	183.3	<18 ~ 200	109.1
W2	Dangjin Hanjinpo	Short-necked clam	<18 ~2200	152.7	<18 ~200	103.7
W3	Taean Nam-myeon	Short-necked clam	230~3300	1289.6	20~1300	574.4
W4	Seocheon Cheonsuman	Mussel	45~4900	751.5	<18 ~ 790	305.4
W5	Seocheon Beeinman	Oyster	<18 ~490	69	<18 ~20	20.1
W6	Buan Gomsoman	Surf clam	20~13000	641.3	<18 ~ 1700	927.3

[a]Geometric mean; [bc]See Table 1.

Table 18. Physiochemical conditions of seawater at sampling stations of shellfish from February to November in 2007

St.	Area	Shellfish	Temp(℃)	Salinity	pH
E1[a]	Yangyang	Scallop[b]	7.2~24.3	30.9~33.8	6.7~8.4
E2	Uljin Pyeonghae	Mussel	11.4~23.2	32.4~34.7	7.8~8.6
E3	Pohang Yeongil	Mussel	12.7~24.1	31.2~34.7	7.9~8.4
E4	Ulsan Jinha	Oyster	11.6~26.5	29.1~39.2	8.0~8.5
S1	Pusan Haeundae	Oyster	12.5~25.4	31.7~33.3	8.0~8.3
S2	Suncheonman	Ark shell	5.0~28.2	13.4~31.4	7.7~8.2
S3	Deukryangman	Ark shell	6.0~28.3	27.2~32.5	7.9~8.2
S4	Wando	Abalone	8.0~26.3	29.6~33.4	7.4~8.2
S5	Jindo	Oyster	9.8~28.6	31.9~33.6	7.9~8.2
W1	Yeongheung Nae-ri	Oyster	4.7~24.4	25.5~29.1	6.9~8.2
W2	Dangjin Hanjinpo	Short-necked clam	5.2~23.8	27.7~29.3	7.2~7.9
W3	Taean Nam-myeon	Short-necked clam	6.3~24.0	27.2~32.8	7.4~8.1
W4	Seocheon Cheonsuman	Mussel	5.2~25.5	27.5~31.7	7.9~8.5
W5	Seocheon Beeinman	Oyster	7.1~26.2	26.6~30.8	7.9~8.1
W6	Buan Gomsoman	Surf clam	5.1~26.2	27.5~31.3	8.0~8.3

[ab]See Table 1.

이러한 경향은 외국에서 패류섭취로 인한 노로바이러스 감염사례에서도 찾아볼 수 있다. 유럽의 분변계 대장균 기준(Catagory A, Anon, 1991)에 부합되는 스칸디나비아 해역에서 생산된 굴의 섭취로 인하여 356건의 발병사례가 보고되었다(Christensen et al., 1998). 이와 같은 일련의 발병사례에 근거하여 유럽연합과 미국 등 패류생산국에서는 바이러스 오염을 감시할 수 있는 보다 체계적인 관리시스템을 구축하고자 많은 노력을 하고 있다. 이 관리시스템 구축에서는 이 연구에서 사용한 PCR에 근거한 검출법을 사용하고 있으나 아직 PCR에 근거한 검출법은 그 절차가 복잡하고 세계적으로 표준화되어 있지 못하기 때문에 그 적용에 한계를 가지고 있다(Lees, 2000). Male specific RNA (F+) bacteriophage (Havelaar, 1987)와 기타 박테리오파지와 같은 대체 지표생물을 이용한 모니터링 기법에 대한 연구가 진행되고 있으나 그 효용성에 대해서는 합의점에 이르지 못하고 있다. 결국 여러 나라에서는 패류에서 직접 노로바이러스와 같은 장관계 바이러스를 모니터링하고 있으나 PCR 기법이 가지는 한계(false negative, false positive)를 극복해야 하는 어려움에 직면하고 있는 것으로 보인다.

2.3. 검출된 노로바이러스의 계통학적 분석

검출된 노로바이러스 유전형을 살펴보면 서해안(W1~W6)에서는 모두 GII형이었으며, 동해안(E1~E4)과 남해안(S1~S5)에서는 GI과 GII가 나타났다. 검출된 GII형은 모두 genotype 4로 확인되었다. 최근 GII genotype 4가 전 세계적인 노로바이러스 감염의 주된 요인이라는 보고되고 있고(Bull et al., 2006), 국내에서도 GII genotype 4가 노로바이러스에 의한 집단 식중독의 주요 원인바이러스로 분석되고 있다. 이러한 결과는 환자의 분변에 의한 연안해역 오염과 바이러스에 오염된 패류와 같은 수산식품 섭취에 의한 재감염이 발생하고

있다는 것을 보여주는 사례라고 생각된다(질병관리본부, 감염병 발생정보 2007).

계통학적 분석결과 패류에서 검출된 노로바이러스의 염기서열이 2006년 국내에서 집단 감염증을 유발했던 노로바이러스 염기서열과 매우 유사한 것으로 분석되었다(Fig. 13). 이러한 결과는 노로바이러스에 감염된 환자의 분변에 의해 패류가 오염되며 오염된 패류를 섭취함으로써 다시 바이러스에 감염되는 fecal-oral route를 통한 순환감염의 가능성이 제기될 수 있는 근거가 된다고 사료되며, 외국에서도 장관계 바이러스에 오염된 굴에 의한 집단 감염이 보고되고 있어 이러한 추정을 뒷받침하고 있다(Berg et al., 2000). 또한 연안산 패류에서 확인된 노로바이러스의 염기서열이 국내 뿐 아니라 일본, 미국, 네덜란드 등의 외국에서 보고된 노로바이러스 염기서열과 매우 유사한 것으로 나타나(Fig. 13), 노로바이러스에 의한 집단 식중독을 예방하고 관리하기 위해서는 전 세계적으로 유행하는 노로바이러스 변이주의 특성을 파악하는 것이 중요할 것으로 여겨진다. 그리고 궁극적으로는 육상에서 발생한 환자의 분변이 적절한 처리를 거치지 않고 호소와 연안해역에 유입되지 않도록 하는 국가차원의 대책마련이 시급하다고 사료된다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

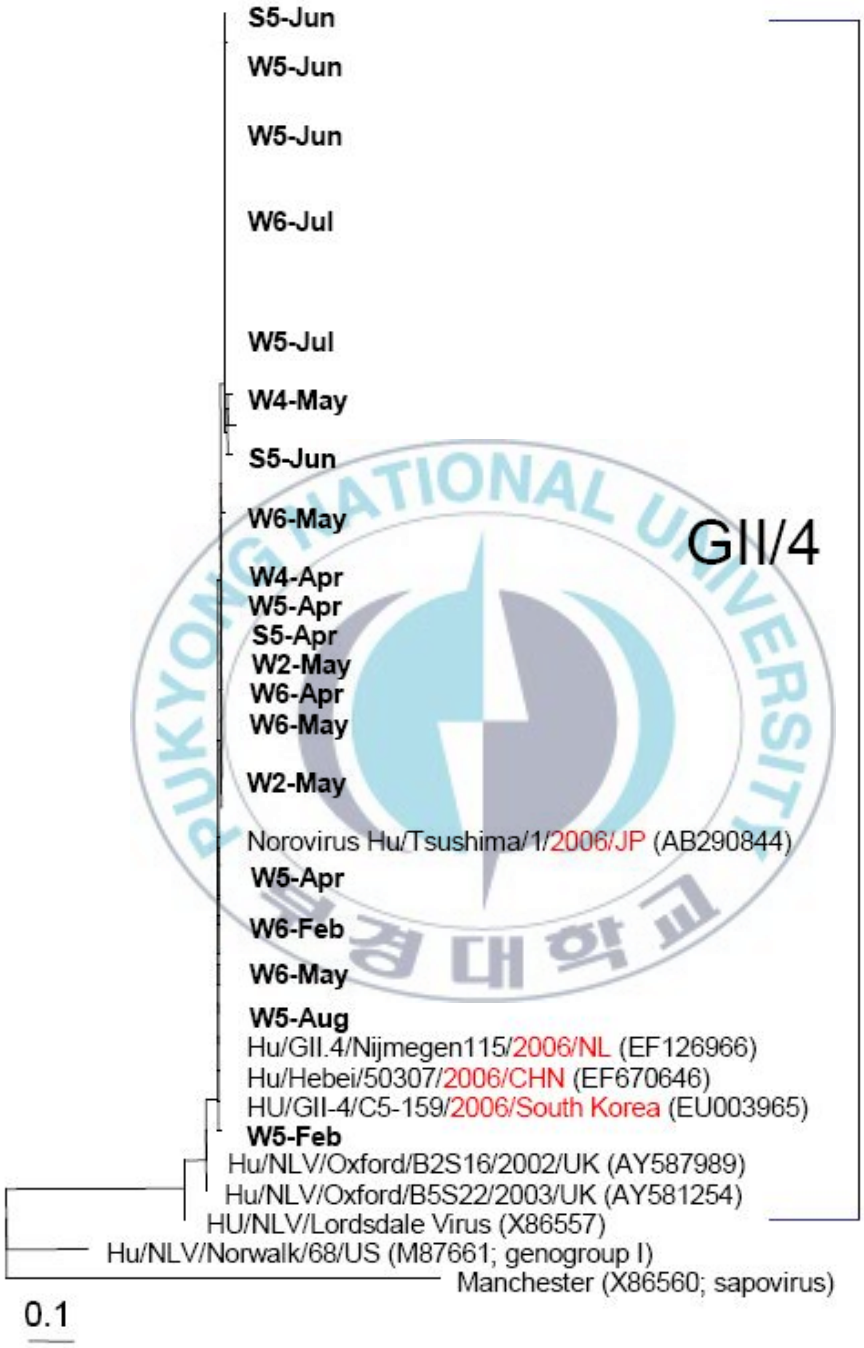


Fig. 13. Phylogenetic tree based on partial sequences of ORF2 gene of norovirus detected in this study.

3. 이매패류 생산해역 해수 중 노로바이러스 오염범위 조사

3.1. 검출한계 측정 및 standard curve 작성

검출한계 측정과 해수 시료에서 노로바이러스 농도를 결정하기 위한 standard curve 제작을 위해 GI 및 GII plasmid를 10배씩 희석하여 real-time PCR을 실시하였다(Fig. 14).

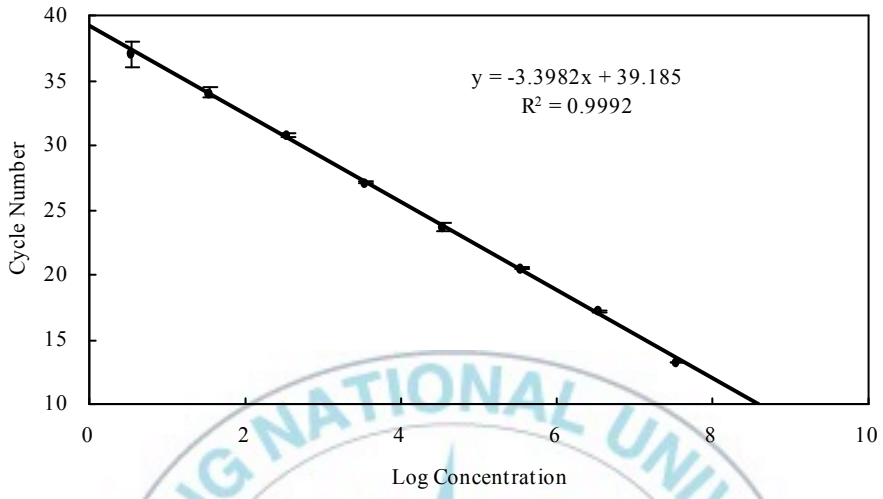
C_t (threshold cycle) 값과 copy number간의 standard curve는 GI plasmid [3.5×10^7 ~ 3.5×10^{-1} (7.0×10^7 ~ 7.0×10^{-1} 노로바이러스 농도에 상응)] 시료와 GII plasmid [3.6×10^7 ~ 3.6×10^{-1} (7.2×10^7 ~ 7.2×10^{-1} 노로바이러스 농도에 상응)] 시료를 사용하여 각각 triplicate로 분석하였다. 10^{-1} 농도의 시료를 제외하고는 모두 C_t값을 나타내었으며 농도와 C_t값 사이에 신뢰할만한 수준의 상관관계가 있었다(Fig. 14). GI 및 GII 모두 10^0 농도까지 C_t값이 측정되므로 검출 한계를 GI은 10^0에서 측정된 C_t값의 평균인 37.02, GII는 38.21로 설정하고 해수 시료 중 노로바이러스 농도 산출에 사용하였다.

3.2. 노로바이러스 농도 결정

해수 시료의 real-time PCR 결과를 Table 19에 나타내었다. GI (15.7%; 16/102)보다 GII (20.6%; 21/102)의 검출 비율이 높았으며 2월에 가장 많은 지점에서 검출된 후 점차 감소되는 경향을 보이다가 7월부터 다시 증가하는 양상을 보였다.

2월에는 GI, GII 모두 7개소 검출되었으며 수심에 따라 세분화하면 GI은 8개 시료에서 GII는 10개 시료에서 검출되었다. 3월에는 7번 지점에서만 GI, GII가 검출되었을 뿐 다른 지점에는 검출되지 않았으며 4월에는 모든 시료에서 검출이 되지 않았다. 7월부터는 GI, GII가 검출되는 빈도가 증가하였다.

a. GI



b. GII

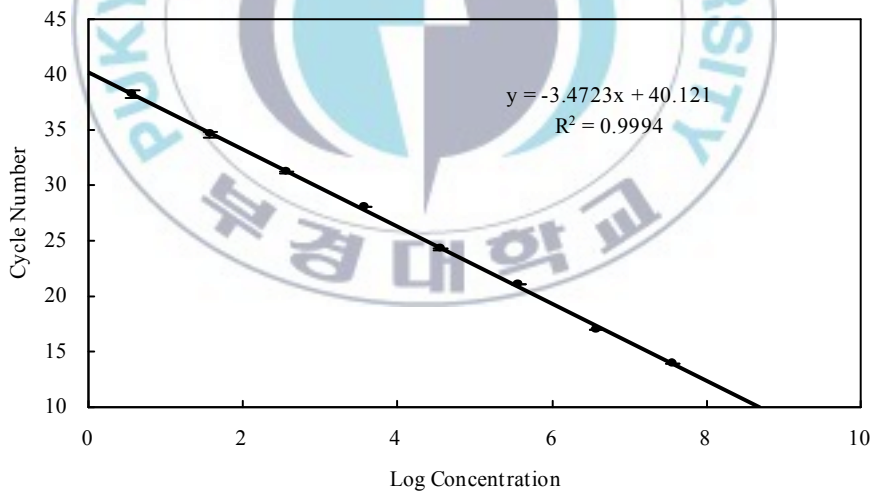


Fig. 14. Standard curve for relative norovirus quantification for genogroup GI (a) and GII (b).

GI은 7, 8, 10월 각각 1, 2 및 2 개소에서 검출되었으며 GII는 7, 8, 10월 각각 1, 2 및 4개소에서 검출되었다. 7~8 m의 깊이에서 채취한 시료가 2~3 m에서 채취한 시료보다 GI, GII 모두 검출 비율은 높았다(GI: 17% > 15%; GII: 26% > 18%). 이러한 결과로 볼 때 노로바이러스는 계절에 따라 급격한 농도 변화를 보이며 해수의 수심에 따른 농도 변화는 크지 않은 것으로 사료된다.

Table 19에 나타낸 C_t 값을 standard curve을 기준으로 역산하여 노로바이러스의 농도와 그 표준편차를 추정하였다(Table 20). 방조제와 인접한 2번 지점에서 GI 및 GII 모두 다른 장소보다 높은 빈도로 검출되었다. 특히 1~5번 지점이 6~10번 지점보다 검출되는 빈도가 높았는데, 이는 노로바이러스가 오염된 담수의 유입이 일어날 수 있는 방조제가 많고 그 유출 수량 또한 많기 때문으로 추정된다. 특이한 점은 담수의 직접 유입이 없는 5번 지점에서 GII의 검출 빈도가 높고 그 농도도 높았는데(Table 20), 주요 오염원인 1번 지점에 인접한 B지구 방조제의 배수갑문이 시료 채취 전날 작동하였음에도 불구하고 1번 지점에서 노로바이러스가 검출되지 않았지만 5번 지점에서 노로바이러스가 고농도로 검출되는 것으로 보아 유입된 담수가 원인이 된 것이라기보다는 시간적으로 타 채취 장소와 다른 시기에 오염된 노로바이러스가 해수의 흐름에 따라 오염시켰거나 비점오염원에 의한 오염에 기인하는 것으로 추측된다. 시료 채취지점 인접 도시인 보령시의 강수량 자료(기상청, http://www.kma.go.kr)에 의하면, 7월의 경우 시료 채취 전 2~3일간 60 mm 이상의 많은 비가 내렸다. 따라서 강우에 의한 유출(runoff)이 생겨서 비점오염원에 의해 노로바이러스 오염이 일어났을 가능성을 고려할 수 있다. 또한 파악하지 못한 비점오염원이나 인근 어민의 활동에 의해 오염이 일어났을 가능성도 배제할 수 없을 것으로 생각된다.

Table 19. Threshold cycle (Ct) of norovirus detected from seawater samples

St.	1-s[a]		1-d[b]		2-s		2-d		3-s		3-d		4-s		4-d		5-s		5-d		6-s		7-s		7-d		8-s		8-d		9-s		10-s		10-d	
	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII
Feb	36.48	35.93	33.06	32.43	32.81	33.93	-[c]	34.62	-	-	35.33	34.26	-	-	NS[d]	NS	35.27	33.23	-	34.16	31.34	31.17	-	-	32.35	31.82	-	-	-	-	-	-	-	-	33.38	33.21
	36.53	36.00	33.28	32.47	31.69	34.13	-	35.17	-	-	34.43	35.42	-	-	NS	NS	36.45	33.76	-	35.00	31.16	31.62	-	-	31.66	32.04	-	-	-	-	-	-	-	-	32.75	33.33
Mar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35.71	35.71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36.41	36.41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jul	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	NS	-	-	31.09	34.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	NS	-	-	31.11	34.83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aug	-	-	-	-	37.00	35.56	36.50	34.58	-	-	-	-	33.84	33.67	NS	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	36.23	35.59	36.18	34.89	-	-	-	-	34.49	34.09	NS	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oct	-	37.29	-	-	35.00	33.82	35.98	34.27	-	-	-	-	-	-	NS	-	-	-	-	33.06	-	-	-	33.75	-	-	-	-	-	-	-	-	35.60	34.78	NS	NS
	-	37.61	-	-	35.09	34.14	35.17	35.93	-	-	-	-	-	-	NS	-	-	-	-	33.01	-	-	-	33.16	-	-	-	-	-	-	-	-	35.32	34.54	NS	NS

[a]Sample at 2~3 m water depth; [b]Sample at 7~8 m water depth; [c]Not detected; [d]No Sample.

Table 20. Estimated norovirus relative concentration in seawater (particle/8 L) by real-time PCR

	1-s		1-d		2-s		2-d		3-s		3-d		4-s		4-d		5-s		5-d		6-s		7-s		7-d		8-s		8-d		9-s		10-s		10-d	
	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII
Feb	12.30[a] ±0.29[b]	17.73 ±0.59	118.11 ±12.43	191.87 ±3.68	235.70 ±120.74	65.92 ±6.31	- [a]	37.24 ±9.70	-	-	38.70 ±16.19	40.96 ±21.66	-	-	NS[b]	NS	20.57 ±11.05	96.03 ±24.13	-	47.15 ±18.48	433.41 ±37.33	396.69 ±84.87	-	-	266.49 ±86.53	273.65 ±28.79	-	-	-	-	-	-	-	-	129.36 ±38.47	110.16 ±6.33
Mar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						17.09 ±5.63	46.15 ±17.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jul	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS	NS	-	-	478.90 ±4.59	42.09 ±5.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aug	-	-	-	-	11.80 ±4.26	23.09 ±0.33	13.83 ±2.11	41.01 ±6.07	-	-	-	-	61.48 ±18.84	73.54 ±14.70	NS	NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oct	-	6.52 ±1.00	-	-	33.08 ±1.43	68.43 ±10.45	23.96 ±9.07	37.02 ±26.69	-	-	-	-	-	-	NS	-	-	-	-	129.08 ±3.09	-	-	-	99.05 ±27.63	-	-	-	-	-	-	-	-	25.07 ±3.35	43.06 ±4.94	NS	NS

[a] Not detected; [b] No Sample.

3.3. 해수의 노로바이러스 검출 농도와의 상관성

해수 시료의 물리화학적 요인과 대장균군, 분변계 대장균 농도를 Table 21에 나타내었다. 온도는 6~30℃ 사이의 값을 보이며 2월부터 8월까지 점점 증가하다가 10월 이후에는 감소하였다.

용존산소량은 온도와 반대로 2월부터 8월까지 감소하다가 10월 이후에는 증가하였다. 반면에 pH나 염도는 큰 변화를 보여주지 않았다.

MPN법으로 측정된 대장균군이나 분변계 대장균 농도는 대다수 음성의 결과를 나타내 최고치도 13 MPN/100 mL 정도의 낮은 값으로 확인되었다.

온도, 분변계 대장균군, 대장균, 노로바이러스 GI, GII 농도, 용존산소량 간의 상관관계를 스피어만 비모수 상관분석을 통해 분석한 결과를 Table 22에 제시하였다.

온도와 대장균군 및 분변계 대장균은 통계적으로 0.05 이하의 유의 수준으로 낮은 양의 상관관계를 보였으며, 온도와 노로바이러스 GII도 0.01 이하의 유의 수준으로 낮은 음의 상관관계를 보였다.

온도는 용존산소량과도 음의 상관관계를 보였다. 분변계 대장균과 대장균 사이, 노로바이러스 GI, GII 농도 사이에는 아주 높은 양의 상관관계를 보여주고 있다.

이와 달리 위생지표세균인 대장균군, 분변계 대장균의 농도와 노로바이러스 농도는 어떠한 상관관계를 보이지 않았다. 이러한 결과를 볼 때 노로바이러스 오염 정도를 위생지표세균을 측정하여 추정하기는 어려우며 장관계 바이러스의 오염 유무를 알기위해서는 직접 모니터링을 하여 오염 정도를 파악하는 것이 필요하다는 것을 시사하였다.

Table 21. Physio-chemical conditions and bacteriological water quality of seawater

Month-St.	Depth (m)	Temp. (℃)	pH	DO (mg/L)	Salinity (‰)	Fecal coliforms (MPN/100 mL)	*E. coli* (MPN/100 mL)
Feb-1s[a]	2.5	6.5	8.1	9.7	32.65	ND	ND
Feb-1d[b]	7.5	6.6	8.3	9.8	32.80	ND	ND
Feb-2s	2.5	7.0	8.3	10.8	32.60	ND	ND
Feb-2d	7.5	6.3	7.9	10.6	32.70	ND	ND
Feb-3s	2.5	6.8	8.2	11.3	32.75	ND	ND
Feb-3d	7.5	6.3	8.3	9.8	32.65	ND	ND
Feb-4s	2.5	7.4	8.2	9.9	32.50	ND	ND
Feb-5s	2.5	6.8	8.1	8.3	32.80	ND	ND
Feb-5d	7.5	6.9	8.0	8.2	32.90	ND	ND
Feb-6s	2.5	7.2	7.8	8.4	32.80	ND	ND
Feb-7s	2.5	6.8	7.9	8.2	32.90	ND	ND
Feb-7d	7.5	6.8	8.0	8.4	33.10	ND	ND
Feb-8s	2.5	7.1	8.0	8.1	32.95	ND	ND
Feb-8d	7.5	7.0	8.1	8.3	33.00	ND	ND
Feb-9s	1.0	7.2	7.9	7.8	32.50	ND	ND
Feb-10s	2.5	6.8	8.1	8.4	33.00	ND	ND
Feb-10d	7.5	6.8	8.1	8.4	33.05	ND	ND

[a]Sample at 2~3 m water depth; [b]Sample at 7~8 m water depth.

Table 21. Continued

Month-St.	Depth (m)	Temp. (℃)	pH	DO (mg/L)	Salinity (‰)	Fecal coliforms (MPN/100 mL)	*E. coli* (MPN/100 mL)
Mar-1s[a]	2.5	8.7	8.0	8.3	32.20	ND	ND
Mar-1d[b]	7.5	8.6	8.2	11.8	32.20	ND	ND
Mar-2s	2.5	8.8	8.2	7.7	32.20	2	2
Mar-2d	7.5	8.5	8.2	8.8	32.50	ND	ND
Mar-3s	2.5	8.1	8.2	9.0	32.80	ND	ND
Mar-3d	7.5	8.1	8.2	10.3	33.00	ND	ND
Mar-4s	2.5	7.9	8.3	9.2	33.00	ND	ND
Mar-4d	7.5	7.8	8.2	9.6	33.10	ND	ND
Mar-5s	2.5	8.0	8.1	8.2	33.10	ND	ND
Mar-5d	7.5	7.8	8.2	7.7	33.20	ND	ND
Mar-6s	2.5	8.2	8.2	7.3	33.20	ND	ND
Mar-7s	2.5	7.7	8.1	9.6	33.20	ND	ND
Mar-7d	7.5	7.7	8.1	7.4	33.30	ND	ND
Mar-8s	2.5	8.4	8.2	8.5	33.20	ND	ND
Mar-8d	7.5	8.2	8.2	7.9	33.30	ND	ND
Mar-9s	2.5	7.8	8.1	12.6	32.80	ND	ND
Mar-10s	2.5	7.7	8.2	8.2	33.25	ND	ND
Mar-10d	7.5	7.6	8.3	9.2	33.40	ND	ND

[a]Sample at 2~3 m water depth; [b]Sample at 7~8 m water depth.

Table 21. Continued

Month-St.	Depth (m)	Temp. (℃)	pH	DO (mg/L)	Salinity (‰)	Fecal coliforms (MPN/100 mL)	*E. coli* (MPN/100 mL)
Apr-1s[a]	2.5	12.0	8.2	7.5	33.05	2	2
Apr-1d[b]	7.5	12.0	8.2	7.8	33.10	ND	ND
Apr-2s	2.5	11.9	8.2	7.4	33.10	ND	ND
Apr-2d	7.5	11.9	8.2	6.4	33.10	ND	ND
Apr-3s	2.5	11.6	8.2	12.9	33.20	ND	ND
Apr-3d	7.5	11.6	8.2	8.8	33.10	ND	ND
Apr-4s	2.5	11.7	8.2	11.9	32.00	ND	ND
Apr-5s	2.5	11.2	8.1	7.8	33.15	ND	ND
Apr-5d	7.5	11.2	8.3	8.5	33.30	ND	ND
Apr-6s	2.5	11.5	8.3	7.3	33.20	ND	ND
Apr-7s	2.5	10.9	8.3	7.7	33.25	ND	ND
Apr-7d	7.5	10.9	8.3	7.7	33.30	ND	ND
Apr-8s	2.5	11.0	8.3	7.2	33.30	ND	ND
Apr-8d	7.5	11.0	8.2	7.5	33.30	ND	ND
Apr-9s	2.5	11.1	8.2	8.4	33.00	ND	ND
Apr-10s	2.5	11.1	8.2	7.7	33.25	ND	ND
Apr-10d	7.5	11.8	8.2	8.2	33.30	ND	ND

[a]Sample at 2~3 m water depth; [b]Sample at 7~8 m water depth.

Table 21. Continued

Month-St.	Depth (m)	Temp. (℃)	pH	DO (mg/L)	Salinity (‰)	Fecal coliforms (MPN/100 mL)	*E. coli* (MPN/100 mL)
Jul-1s[a]	2.5	23.8	8.2	5.6	31.80	ND	ND
Jul-1d[b]	7.5	23.6	8.2	5.1	31.90	ND	ND
Jul-2s	2.5	23.9	8.3	5.9	31.90	4	4
Jul-2d	7.5	23.5	8.2	4.6	32.20	ND	ND
Jul-3s	2.5	23.3	8.4	7.3	32.00	ND	ND
Jul-3d	7.5	23.2	8.3	6.2	32.40	ND	ND
Jul-4s	2.5	23.7	8.5	6.3	32.30	ND	ND
Jul-5s	2.5	23.0	8.2	7.0	32.20	ND	ND
Jul-5d	7.5	22.7	8.4	6.3	32.30	ND	ND
Jul-6s	2.5	23.2	8.4	5.4	32.70	2	2
Jul-7s	2.5	22.1	8.4	6.6	32.50	ND	ND
Jul-7d	7.5	22.2	8.4	7.0	32.45	4	4
Jul-8s	2.5	22.5	8.5	6.0	32.50	ND	ND
Jul-8d	7.5	22.6	8.5	5.7	32.90	ND	ND
Jul-9s	2.5	23.9	8.3	6.0	32.30	ND	ND
Jul-10s	2.5	22.6	8.5	6.2	32.40	ND	ND
Jul-10d	7.5	22.7	8.4	6.1	32.50	2	2

[a]Sample at 2~3 m water depth; [b]Sample at 7~8 m water depth.

Table 21. Continued

Month-St.	Depth (m)	Temp. (℃)	pH	DO (mg/L)	Salinity (‰)	Fecal coliforms (MPN/100 mL)	*E. coli* (MPN/100 mL)
Aug-1s[a]	2.5	27.5	8.0	3.7	32.80	4	4
Aug-1d[b]	7.5	26.5	7.9	3.8	31.20	ND	ND
Aug-2s	2.5	29.9	8.0	4.1	32.80	2	2
Aug-2d	7.5	27.5	8.0	3.2	32.80	ND	ND
Aug-3s	2.5	27.9	8.3	4.5	33.20	ND	ND
Aug-3d	7.5	27.5	8.2	4.0	33.20	ND	ND
Aug-4s	2.5	28.7	8.3	4.2	33.10	ND	ND
Aug-5s	2.5	27.4	8.0	4.6	33.10	ND	ND
Aug-5d	7.5	27.2	8.0	4.8	33.40	ND	ND
Aug-6s	2.5	28.8	8.2	3.9	33.00	ND	ND
Aug-7s	2.5	26.8	8.0	4.0	33.40	ND	ND
Aug-7d	7.5	27.0	7.9	4.4	33.60	ND	ND
Aug-8s	2.5	27.2	7.9	4.2	33.10	ND	ND
Aug-8d	7.5	27.3	8.0	4.6	33.00	ND	ND
Aug-9s	2.5	27.7	7.9	4.1	33.60	ND	ND
Aug-10s	2.5	27.2	8.1	4.4	33.80	ND	ND
Aug-10d	7.5	27.2	8.1	4.8	33.70	ND	ND

[a]Sample at 2~3 m water depth; [b]Sample at 7~8 m water depth.

Table 21. Continued

Month-St.	Depth (m)	Temp. (℃)	pH	DO (mg/L)	Salinity (‰)	Fecal coliforms (MPN/100 mL)	*E. coli* (MPN/100 mL)
Oct-1s[a]	2.5	18.5	8.0	5.3	31.55	8	8
Oct-1d[b]	7.5	18.7	8.2	5.8	31.50	13	13
Oct-2s	2.5	18.6	8.0	6.4	31.60	2	2
Oct-2d	7.5	18.7	8.1	6.0	31.50	ND	ND
Oct-3s	2.5	18.3	8.2	6.6	31.50	ND	ND
Oct-3d	7.5	18.5	7.9	7.1	31.60	2	2
Oct-4s	2.5	18.7	8.0	6.7	31.60	ND	ND
Oct-5s	2.5	18.4	8.0	7.2	31.60	ND	ND
Oct-5d	7.5	18.6	7.9	7.3	31.55	ND	ND
Oct-6s	2.5	18.9	8.0	6.9	31.70	ND	ND
Oct-7s	2.5	18.1	7.9	7.2	31.75	ND	ND
Oct-7d	7.5	17.9	7.9	7.8	31.80	ND	ND
Oct-8s	2.5	18.3	8.1	6.9	31.65	ND	ND
Oct-8d	7.5	18.4	8.1	7.0	31.70	2	ND
Oct-9s	2.5	18.7	8.1	7.6	31.70	ND	ND
Oct-10s	2.5	18.7	8.0	7.5	31.90	ND	ND

[a]Sample at 2~3 m water depth; [b]Sample at 7~8 m water depth.

Table 22. Correlation coefficient between temperature coliform group, fecal coliform, norovirus GI & GII and DO

	Temp.	Coliform group	Fecal coliform	NV GI	NV GII	DO
Temp.	–	0.226[a]	0.227[a]	-0.179	-0.224[b]	-0.466[b]
Coliform group		–	0.960[b]	-0.023	0.000	-0.141
Fecal coliform			–	-0.011	0.014	-0.160
NV GI				–	0.848[b]	0.044
NV GII					–	0.073
DO						–

[a]Significant level 0.05 (both sides); [b]Significant level 0.01 (both sides).

4. 노로바이러스 불활성화 조건 구명

노로바이러스의 불활성화 조건에 대해서는 노로바이러스를 배양할 수 있는 기술이 개발되지 못하여 매우 제한적으로 알려져 왔으나, feline calicivirus (FCV)가 노로바이러스 대체 바이러스로 소개되면서 노로바이러스의 안정성과 불활성화 조건에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Doultree et al., 1999). 그러나 패류 중 노로바이러스 불활성화 조건 구명에 관한 연구는 미미한 실정이다. 그래서 연구에서는 FCV를 이용하여 패류와 해수 중 노로바이러스 불활성화 조건을 구명하고자 초고압 처리기술과 전기분해수 및 광촉매 자외선 처리기술을 응용하여 연구를 진행하였다.

4.1. 초고압 처리에 의한 노로바이러스 불활성화

고압처리기술(high pressure processing)은 식품 중에 존재하는 미생물의 농도를 줄이면서 식품의 관능적 변화를 최소화 할 수 있는 살균처리 기술로서 전 세계적으로 상업적으로 생산된 다양한 식품에 적용되고 있다(Stewart and Cole, 2001; Grove et al., 2006). 최근 기술의 발달로 고압처리 장치가 상업적으로 양산되어 보급되고 있으며, 미국에서는 오염된 패류의 섭취로 인하여 빈번히 발생하고 있는 비브리오 집단 감염증을 줄이기 위하여 고압처리 기술을 사용하고 있다(Styles et al., 1991; Cook, 2003; Koo et al., 2006). 그리고 고압처리기술을 적용하여 굴의 냉장유통기간을 연장시킬 수 있다는 보고가 이어지고 있으며(Styles et al., 1991; Cook, 2003; Koo et al., 2006), 고압처리로 패각근의 변성이 유도되어 저절로 탈각이 이루어진다는(Cruz-Romero et al., 2004; He et al., 2002) 점이 알려짐에 따라 소매 수산가공품, 특히 패류 가공품 등에 그 적용 분야가 확대되고 있다.

한편, 오염된 패류의 섭취로 인한 노로바이러스(norovirus)와 A형 간염바이러스(HAV) 같은 장관계 바이러스(enteric virus)의 집단 감염증 발생은 오랜 역사를 가지고 있으며, 가공설비에 HACCP과 같은 위생관리체제가 도입된 현재에도 끝임 없이 발생하고 있다(Murphy et al., 1979; Halliday et al., 1991; Grohmann et al., 1981; Conaty et al., 2000; Bosch et al., 2001). 그 이유는 장관계 바이러스가 환자의 분변을 통하여 자연계에 배출되어 오염된 기수나 연안에 서식하는 이매패류 등을 통하여 재감염이 이루어진다. 현재 노로바이러스를 포함한 대다수의 바이러스는 인공배양이 불가능하여 치료제나 백신이 개발되지 못하여 연속적인 감염환이 형성되어 지속적인 재감염이 이루어지기 때문이다. 그래서 초고압처리 기술을 응용하여 패류 중 노로바이러스 사멸조건을 구명하고자 하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

노로바이러스 대체바이러스로 사용된 FCV는 50,000 psi에서 60초(25℃)의 압력처리로 6.8 log · $TCID_{50} \cdot mL^{-1}$의 감소를 보여 실험에 사용된 모든 바이러스가 감염력을 상실한 것으로 나타났다(Table 23). 압력처리 후에는 2~3℃ 정도의 온도상승이 있었다. 30,000 psi에서는 60초의 처리로 5 log · $TCID_{50} \cdot mL^{-1}$의 감소가 나타나 동일 압력처리 조건에서부터 바이러스에 비가역적인 변화가 발생하는 것으로 추정되었다. 즉, 50,000 psi에서 단시간(60초) 처리로 패류 중에 존재하는 노로바이러스와 같은 장관계 바이러스와 일부 병원성 미생물을 대부분을 처리할 수 있을 것으로 판단된다. Kingsley et al. (2002)도 이 연구와 유사한 결과를 보고한 바 있는데 FCV를 40,000 psi에서 5분간 처리로 plaque forming unit (PFU)를 측정한 결과 7 log PFU · mL^{-1}의 감소효과를 얻었다고 한다.

Table 23. Inactivation of feline calicivirus by high pressure treatment

Pressure (psi)	Average log · $TCID_{50}$ · mL^{-1}
0	6.8
5,000	6.8
10,000	5.8
20,000	5.7
30,000	1.8
40,000	1.4
50,000	NG[a]
60,000	NG

[a]No growth.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

압력처리에 의한 바이러스 실활에 대한 여러 연구사례를 종합해 본 결과, 압력처리 시간보다는 압력의 세기가 더 중요한 인자로 작용함을 알 수 있었다(Chen et al., 2005; Calci et al., 2005; Kingsley et al., 2002, 2005). 한편 소아마비바이러스(poliovirus)의 경우에는 압력처리에 대한 강한 내성을 가지고 있어 87,000 psi에서 60분간 처리하여도 감염력을 유지한다고 한다(Wilkinson et al., 2001). 그 이유는 정확히 밝혀지지 않았으나 바이러스의 크기와 형태 또는 열역학적 안정성이 압력처리에 대한 저항성에 영향을 미치는 것으로 추정되고 있다(Oliveria et al., 1999).

고압에 의한 바이러스의 실활 기작에 대해서는 완전히 밝혀지지 않았으나 압력처리에 의한 바이러스 입자의 가역적 혹은 비가역적 변화와 연관이 있다(Gasper et al., 1997). 예를 들어 T4 박테리오파지는 압력처리 후 단백질 외막과 DNA가 분리되어 감염력을 상실하며, ΦX 파지는 압력처리에 의해 구조가 변형되었다가 복원되나 감염력은 상실된다(Brauch et al., 1990). 피코나바이러스(piconavirus)는 압력처리에 인해 receptor-binding protein (VP4)이 소실되며(Oliveira et al., 1999), 로타바이러스는 스파이크를 형성하는 hemagglutin (VP4)의 구조변화가 유발되어 감염력을 상실한다(Pontes et al., 2001). 즉, 식품 중에서 제거를 목적으로 하는 위해요소인 바이러스의 종류와 농도 그리고 대상 식품의 소비량 및 감수성 집단 등 위해분석을 결과를 바탕으로 상업적 처리조건을 설정할 필요가 있을 것으로 사료되어 초고압 처리 후의 굴의 일반성분 및 조직변화에 대한 조사를 실시하였다.

4.2. 초고압 처리에 따른 굴의 품질 변화

패류에 상업적으로 적용되는 고압처리 기술의 효과에 대한 연구는 대부분 장관계 바이러스나 세균을 사멸속도와 압력처리 시간 및 온도의

상관관계를 구명하는데 그치고 있으며, 대상 처리 식품인 패류의 생화학적 변화나 관능적 변화에 관한 연구는 미미한 실정이다(Murchie et al., 2005). 그래서 초고압처리가 굴의 품질변화에 미치는 영향을 고찰하였다.

초고압 처리 후 굴의 일반성분의 변화를 관찰하였다(Table 24). 무처리구 굴의 일반성분 조성은 기존에 보고된 자연산 굴이나 양식굴과 큰 차이를 나타내지 않았다(Chai et al., 1984; Chellappan, 1991; Linehan et al., 1999; Lopez-Caballero et al., 2000). 그러나 압력 처리 후의 굴은 Lopez-Caballero et al. (2000)이 보고한 바와 같이 그 형태는 유지되었으나 대조구에 비해 체적이 약간 증가하였으며 육즙량이 증가하였다.

굴 전개체의 수분함량은 대조구에 비하여 처리 압력증가에 따라 증가하였으며 그에 따라 단백질 함량이 감소하였다. 수분함량의 증가는 단백질의 수화도가 증가한 것에 기인한 것으로 추정된다. 압력처리에 따른 단백질의 수화도 증가는 많은 연구자들에 의해 보고된 바 있다(Cioni and Strambini, 1994; Vidugiris et al., 1995; Silva et al., 2001). 그러나 지방함량은 뚜렷한 증가양상이 나타나지 않았다. Cruze-Romero et al. (2004)에 의하면 압력 처리 후 염용성 단백질의 유출로 이하여 육즙의 점도가 증가하였으며 총단백질 함량의 감소가 일어나는 한 원인이라고 보고하였다. 패각근의 경우도 유사한 경향을 나타내었다.

5,000 psi와 20,000 psi 압력 처리에 따른 굴의 조직학적 변화를 대조구와 비교하여 관찰하였다(Fig. 15). 5,000 psi 압력 처리된 중장선(Fig. 15, D)에서는 상피세포 이상, 호염기성 감소, 일부 소화선세관의 붕괴가 일어났다.

Table 24. Effect of high pressure treatment on the proximal composition of tissue and adductor muscle of oyster[a]

Pressure (psi)	Whole oyster tissue				Adductor muscle	
	Moisture (%)	Protein (%)	Fat (%)	Ash (%)	Moisture (%)	Protein (%)
Control	76.6±0.7	11.6±1.0	2.1±0.5	2.9±0.2	77.7±0.5	20.9±0.2
5,000	77.1±0.5	11.5±1.2	2.3±0.3	2.2±0.3	77.9±0.2	20.0±0.3
20,000	79.0±0.3	10.0±0.1	1.7±0.2	1.9±0.1	78.5±0.3	19.3±0.6
30,000	80.3±0.3	9.4±1.0	2.0±0.3	1.8±0.1	79.5±0.5	18.5±0.4
50,000	80.6±0.1	8.8±1.1	2.5±0.0	1.7±0.1	79.8±0.2	18.2±0.6

[a]All values are means±SD of triplicate analysis of pooled whole tissue or adductor muscle form 6 untreated or treated oyster.

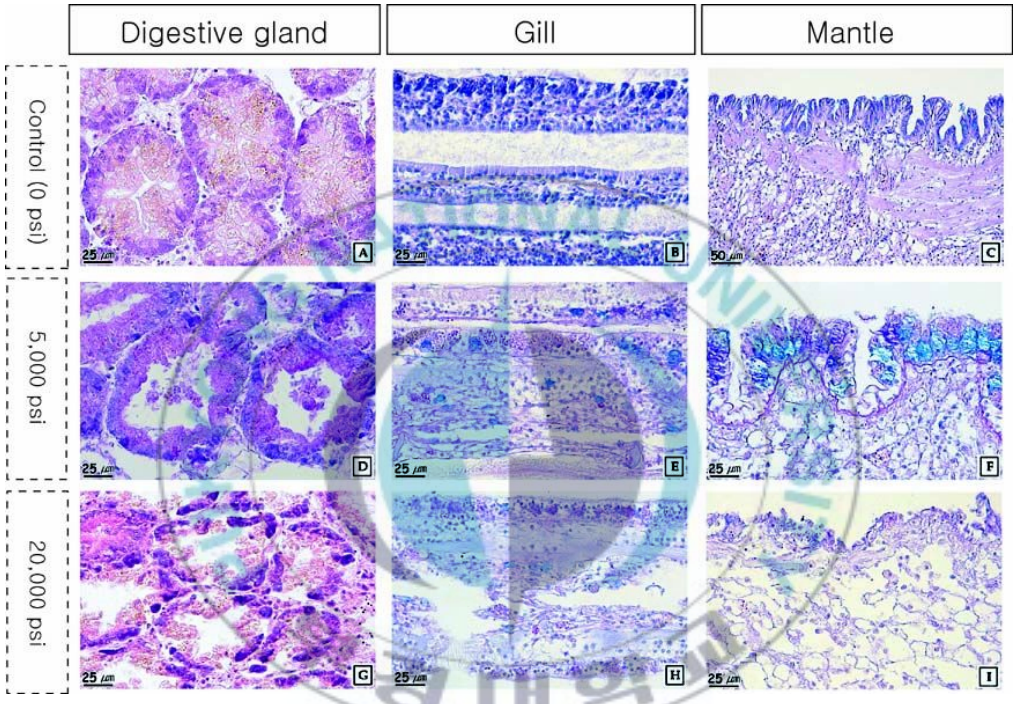


Fig. 15. Effect of high pressure treatment for 60 sec at 25℃ on oyster tissue.

아가미(Fig. 15, E)에서는 혈구의 증가, 점액세포 감소가 관찰되었으며 외투막(Fig. 15, F)에서는 점액세포의 활성화 및 점액물질의 산성화가 일어났다. 그리고 20,000 psi로 처리된 중장선(Fig. 15, G)에서는 소화선세관의 괴사, 소화선세관 사이의 간질조직에서 혈구의 증가가 관찰되었고 아가미(Fig. 15, H)에서는 아가미 새엽의 부분적인 붕괴, 점액물질의 산성화가 일어났다. 그리고 외투막(Fig. 15, I)에서는 교원섬유 배열의 이상, 망상조직의 팽창이 발생하였다.

각 처리구 사이에 정량적인 조직학적 분석은 실시하지 않아 조직학적 변화양상의 정도는 정확히 평가할 수 없으나 대조구와 처리구(5,000 psi 이상) 사이의 정성적인 조직학적 변화양상은 뚜렷하였다.

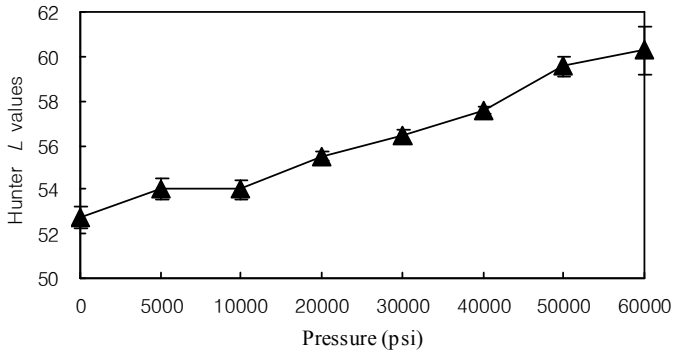
패육 중 비교적 성상이 균일하고 일정한 두께를 가진 패각근을 대상으로 하여 압력처리에 따라 육색의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 5,000 psi 압력처리구에서는 유의할만한 색의 변화가 나타나지 않았다(Fig. 16).

하지만 10,000 psi 처리구에서는 압력의 증가와 더불어 백색도(*L* 값)가 증가하였고, 30,000 psi 이상의 압력 처리구는 육안으로도 투명도가 감소하여 가열조리에 의한 백색화와 같은 변화가 관찰되었다. 10,000 psi 이상의 처리구에서는 Hunter *a* 값은 압력의 증가와 더불어 감소하였다.

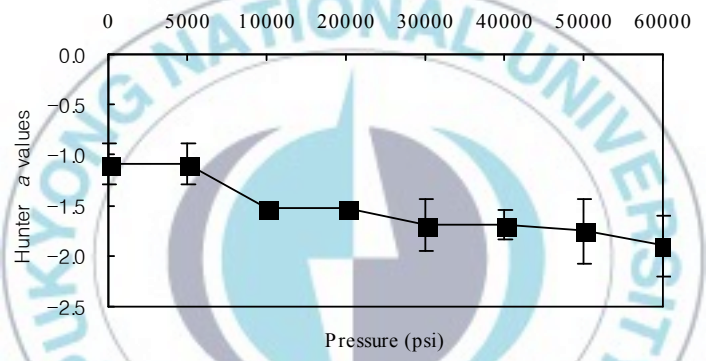
녹색도도 증가하였는데 이러한 변화는 myofibrillar protein과 sarcoplasmic protein의 변성과, myosin의 변성이 원인인 것으로 알려져 있다(Angsupanich and Ledward, 1998). 황색과 청색의 지표(Hunter *b* 값)는 압력의 증가와 더불어 증가하였다.

확인된 압력처리에 의한 굴 패각근에서의 *L, a, b*값의 변화 경향은 오징어(Nagashima et al., 1993), 대구 및 고등어 근육(Ohshima et al., 1993), 연어(Amanatidou et al., 2000)에서의 변화와 일치하는 경향을 나타내었다.

(a)



(b)



(c)

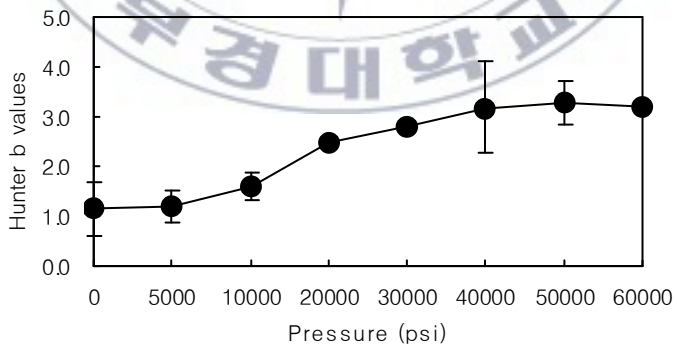


Fig. 16. Effect of high pressure treatment for 60 sec on (a) Hunter *L*, (b) *a* and (c) *b* value of oyster adductor muscle. Error bars represent standard deviation of analysis.

수산물에서 색의 변화는 지방산화에 기인하는 경우가 많은데 astaxanthin과 같은 불포화 carotenoid계의 분해로 인한 것이 대표적인 예이다(Rodriguez-Amaya, 1993). Angsupanich and Ledward (1998)는 60,000 psi 이상에서는 어육에서 급격히 지방산화가 촉진된다고 보고하였다. 또한 고압력 하에서는 근육 중에 유리 금속이온의 함량이 증가하여 지방산화가 더욱 가속된다는 보고도 있다(Cheah and Leward, 1997). 굴 패각근에서의 색 변화도 지방산화와 연관성이 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면 FCV를 불활성화 시킬 수 있는 초고압 처리조건(30,000 psi, 60초, 25℃)에서 굴의 식품학적 가치는 전반적으로 손상된다고 할 수 있다. 단백질의 수화도가 증가하여 체적이 증가하고 육즙이 많아지는 이점도 있으나 염용성 단백질이 유출되고 색택이 변화되어 생굴 고유의 특성을 잃는 단점이 두드러졌다. 이러한 변화는 조직학적 관찰에서 확실히 알 수 있는데 5,000 psi 이상의 압력에서 처리된 굴의 모든 조직에서는 괴사가 관찰되었다. 특히 20,000 psi 이상의 압력에서 처리된 굴은 염용성 단백질의 용출로 밀봉 용기 내부의 해수가 혼탁되어 생식용 생굴 제품으로는 기호도가 상실되었다. 그러나 IQF (individual quick freezing) 제품과 같이 탈각 후 수 시간 이내에 냉동되는 패류 가공품에는 적용 가능성이 높을 것으로 생각되었다.

4.3. 전기분해해수 처리에 의한 노로바이러스 불활성화

전기분해해수처리에 의하여 FCV 바이러스가 불활성화 되는지를 검토하기 위하여 여과 멸균된 해수 300 mL에 FCV 배양액(6.8 log · $TCID_{50} \cdot mL^{-1}$)을 첨가하여 최종농도가 4.8 log · $TCID_{50} \cdot mL^{-1}$가 되도록 조장한 후 염소농도 1 ppm로 조절한 전기분해해수로 처리하면서

0, 30초, 1분, 3분, 5분, 10분 간격으로 일정량의 시료를 취하여 단계 희석한 후 숙주세포에 감염시켜 감염가를 측정하였다.

전기분해수 처리 3분 후부터 FCV의 감염가가 1 log 감소하기 시작하여 5분에 2 log정도 감소하였으며 10분 후에는 측정한계치인 1.8 log · $TCID_{50} \cdot mL^{-1}$으로 감염력을 대부분 상실한 것으로 나타났다(Fig. 17).

이러한 연구결과는 전기분해해수에 의한 FCV의 세포감염가의 변화를 시험한 Yoshimizu (2007)의 결과와 유사한 것으로 나타났는데, 0.3~0.4 mg/L의 염소농도로 충분히 바이러스를 불활성화 시킬 수 있다고 보고하였다.

전기분해해수는 FCV뿐만 아니라 세균 및 어류질병바이러스에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 특히 어병 바이러스의 경우 0.49~0.58 mg/L의 염소농도에서 1분간 처리하면 99.99% 이상 불활성화 된다고 한다(Kasai et al., 2001).

한편 일부 연구자들은 굴 중에 들어있는 바이러스를 제거하기 위하여 전기분해해수를 이용한 정화 처리는 바이러스가 제거에 효과적이지 않았다고 보고하였다(Yamaki et al., 2004). 따라서 전기분해해수처리는 굴 중에 들어있는 바이러스를 단시간에 사멸시킬 수는 없지만 해수 중 바이러스의 사멸에는 효과적인 것으로 판단된다.

4.4. 광촉매 자외선 처리에 의한 노로바이러스 불활성화

광촉매의 OH^- 라디칼의 강력한 산화력을 이용한 살균과 자외선의 살균력이 동시에 작용하여 미생물을 살균하는 광촉매를 이용한 자외선 해수 살균장치가 개발되었다. 그래서 광촉매 자외선 해수 살균장치를 노로바이러스의 불활성화에 응용 할 수 있는지를 검토하였다.

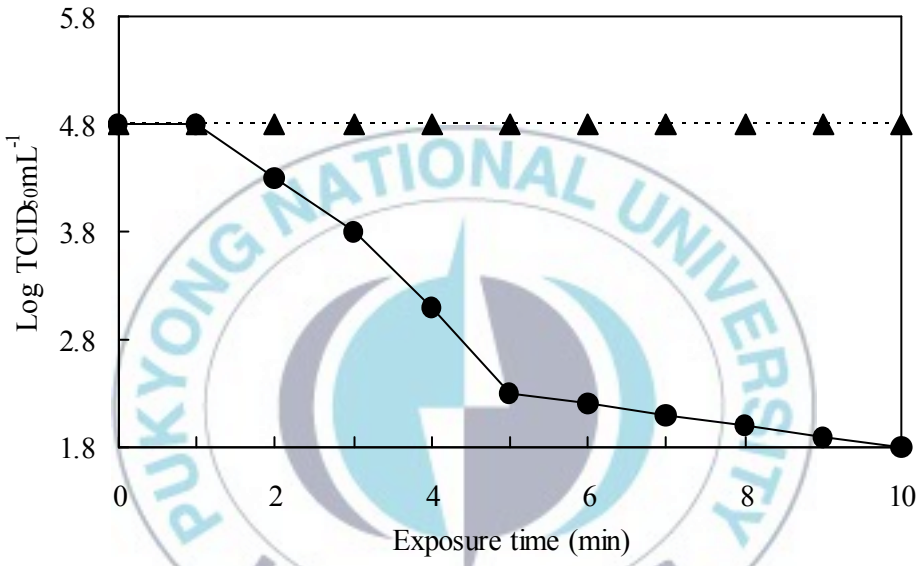


Fig. 17. Inactivation of feline calicivirus by electrolyzed seawater exposure. ▲, control seawater; ●, electrolyzed seawater.

광촉매 자외선 살균장치를 이용하여 FCV의 세포감염력을 검토한 결과, 처리 30초 이후부터 감염가가 떨어지기 시작하여 3분 후에는 FCV가 불활성화 되었다. 반면 대조구인 일반해수는 바이러스의 감염가가 10분이 경과하여도 그대로 유지되었다(Fig. 18).

Yoshimizu(2007)의 연구결과에 의하면 자외선조사에 의한 바이러스 감염가를 측정한 결과, FCV는 1.0×10^4 μW · sec/㎠의 자외선 조사에서 1 log 정도의 감염가가 감소되는 것으로 나타났으며 1.0×10^5 μW · sec/㎠의 자외선조사에 의해서 완전히 불활성화 되었다고 보고하였다. 또한 바이러스를 불활성화 하기 위해서는 일반적으로 사용하고 있는 자외선 램프보다는 고성능 중압 자외선 램프가 필요하다고 보고하였다. 이 연구에서 사용된 광촉매 자외선 살균 처리기술은 OH^- 라디칼의 산화력과 자외선의 살균력을 복합적으로 이용한 것으로 자외선 조사 단독으로 바이러스를 불활성화시키는 처리법에 비해 효과가 큰 것으로 나타났다. 이러한 살균처리 기법을 이용하여 활선어 및 패류를 보관하는 수조 등의 용수를 살균한다면 어획 후 바이러스 재감염을 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 사료되었다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

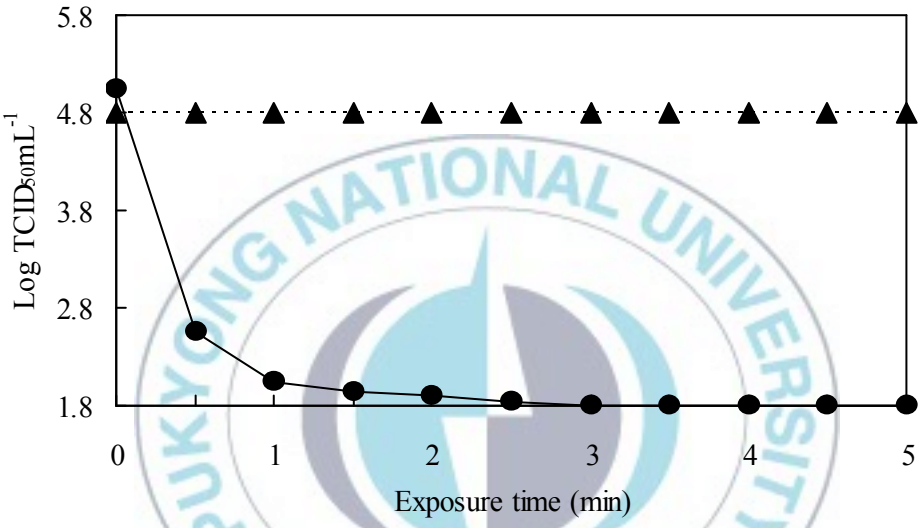


Fig. 18. Inactivation of feline calicivirus by irradiation of photocatalyst UV. ▲, control; ●, photocatalyst UV.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

요 약

최근 국내외 연구기관에서 수행해 온 굴 등에서의 노로바이러스 분석 방법을 비교하여 이매패류에서 노로바이러스 검출기법 정립과 표준화를 시도하고, 정립된 노로바이러스 검출법을 현장시료에 적용하여 우리나라 연안의 패류생산해역에서 노로바이러스의 오염실태를 파악함으로써 식품위생안전 대책을 수립하기 위한 자료를 확보하고자 하였다. 그리고 대체바이러스인 FCV를 이용하여 패류와 해수 중 노로바이러스 불활성화 조건을 구명하고자 초고압 처리기술과 전기분해수 및 광촉매 자외선 처리에 의한 노로바이러스 불활성화 효과를 구명하고자 하였다.

이매패류 중 노로바이러스 최적 검출법을 정립하기 위해 바이러스 농축법과 핵산 추출법을 교차 적용한 결과, glycine 처리를 통한 1차 용출과 threonine 처리를 통한 2차 용출 후 Vertrel XF의 세정과정과 2차 PEG 침전을 통해 PCR 방해물질을 효과적으로 제거할 수 있는 Protocol C가 타 방법에 비해 우수하였으며 QiaAmp® Viral RNA Mini Kit를 사용하는 핵산 추출법이 Trizol® 추출법보다 더 나은 효율을 가지고 있음을 알 수 있었고 QiaShredder를 사용하는 것이 더욱 명확한 결과를 얻는데 효과적인 것으로 판단된다. 한편, RT-nested PCR에 사용되는 primer의 민감도 및 적합성을 고찰한 결과, 노로바이러스 GI의 경우는 G2F1M/G2-F3/G2R1M primer set가 그리고 GII의 경우는G2F1M/G2-F3/G2R1M과 NV2oF2/NV2oR/G2-F3/G2SKR primer set가 우수한 것으로 판단되었다.

2007년 2월부터 11월까지 우리나라 연안 15개소에서 채집된 총 140개의 시료를 대상으로 노로바이러스 오염실태를 조사한 결과, 31개의 시료에서 노로바이러스 유전형 GI 또는 GII가 검출되어 22.1%의 검출율을 나타내었다. 계절적 차이는 발견할 수 없었으며 패종별 검출율 역시 계절

변화와 유의할 만한 상관관계를 찾을 수 없었다. 지역에 따른 검출율은 지역적 차이보다는 시료별 검출율 차이에 기인한 것으로 사료되었다. 검출된 GII형은 모두 genotype 4로 환자의 분변에 의한 생태계 오염과 패류와 같은 수산식품을 매개로한 재감염이 발생하고 있는 것으로 추정되었다.

패류생산해역 해수 중 노로바이러스 오염범위 조사를 위해 충남 천수만을 대상으로 2007년 2월부터 10월까지 해수 중 노로바이러스 농도 변화를 주요 오염원을 중심으로 조사한 결과, 노로바이러스는 계절에 따라 급격한 농도 변화를 보이며 해수의 수심에 따른 농도 변화는 크지 않은 것으로 사료되었다. 조사지점에 따라 노로바이러스가 점 오염원과 비점 오염원으로부터 동시에 유입되는 것으로 확인되었다. 조사결과 해수의 물리화학적 및 세균학적 수질과 노로바이러스 검출 농도와 어떠한 상관관계도 보이지 않았다.

노로바이러스를 제어할 수 있는 고압처리 조건과 압력처리 조건에 따른 조직변화와 관능적 품질변화를 조사한 결과, FCV는 50,000 psi에서 60초(25℃)의 압력처리로 6.8 log · $TCID_{50} \cdot mL^{-1}$의 감소를 보여 실험에 사용된 모든 바이러스가 감염력을 상실한 것으로 나타났다. 5,000 psi와 20,000 psi 압력 처리에 따른 굴의 조직학적 변화를 대조구와 비교할 때 대조구와 처리구(5,000 psi 이상) 사이의 정성적인 조직학적 변화와 색차 변화의 양상이 뚜렷하였다.

전기분해수의 경우에는 처리 10분 후에는 측정한계치인 1.8 log · $TCID_{50} \cdot mL^{-1}$으로 감염력을 대부분 상실한 것으로 나타났으며, 광촉매 자외선 살균장치를 이용하여 FCV의 세포감염력을 검토한 결과, 처리 30초 이후부터 감염가가 떨어지기 시작하여 3분 후에는 FCV가 불활성화 되었다. 사용된 광촉매 자외선 살균 처리기술은 OH^- 라디칼의

산화력과 자외선의 살균력을 복합적으로 이용한 것으로 자외선 조사 단독으로 바이러스를 불활성화시키는 처리법에 비해 효과가 큰 것으로 나타났다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

감사의 글

부산수산대학교 식품공학과에 입학하여 장동석 교수님의 문하에서 석사 학위까지 하고 수산식품 위생관련 일을 한지도 20년 세월이 흘렀습니다. 아직도 못난 저를 걱정하여 주시고 가르침을 주시는 장동석 교수님과 본 연구가 마무리 될 수 있도록 많은 지도와 편달을 해주신 김영목 교수님께 누구보다 먼저 감사를 드립니다.

아울러 부족한 연구논문에 면밀한 검토와 조언을 해주신 동의대학교 김영만 교수님과 부경대학교 이명숙 교수님, 김선봉 교수님, 양지영 교수님께 머리 숙여 감사를 드립니다.

또한 지난 2년 동안 함께 연구해온 서울대학교 김상종 교수님께도 감사의 마음을 전합니다. 특히 이 연구를 위하여 많은 시간과 노력을 보여준 국립수산과학원 식품안전연구단 미생물실의 유홍식 박사, 오은경 박사, 신순범 연구사를 비롯한 모든 연구원들에게 더 큰 감사의 마음과 미안함을 전합니다. 또한 늘 저를 지켜봐주고 함께하시는 수미회 선후배님들과 이 조금만 기쁨을 함께하고자 합니다.

변함없는 사랑과 희생으로 함께해 주시는 나의 장모님께 깊이 머리 숙여 죄송하고 감사한 마음을 드립니다. 오랜 시간 묵묵히 지켜봐준 아내 현진에게 이 작은 기쁨을 바칩니다. 내 사랑스런 아들 장원, 장민 앞날에 아버지란 이름의 조그만 등불이 되길 기원하며…… 형님, 누나 가족, 처남 가족들에게 감사의 마음 전합니다.

참고문헌

Adler, J.L. and R. Zickl. 1969. Winter vomiting disease. J. Infect. Dis., 119(6), 668-673.

Allard, A., B. Albinsson, and G. Wadell. 1992. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. J. Med. Virol., 37, 149-157.

Allen, K. 1899. The transmission of typhoid by sewage polluted oyster. Rep. Am. Public Health Assoc. 25, 154-165.

Amanatidou, A., O. Schlueter, K. Lemkau, L.G.M. Gorris, E.J. Smid and D. Knorr. 2000. Effect of combined application of high pressure treatment and modified atmospheres on the shelf life of fresh Atlantic salmon. Innovative Food Sci. and Emerg. Technol., 1, 87-98.

Amar, C.F., C.L. East, J. Gray, M. Iturriza-Gomara, E.A. Maclure and J. McLauchlin. 2007. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case.control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 26(5), 311-323.

American Public Health Association. 1970. Recommended procedures for the examination of sea water and shellfish. 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

American Public Health Association. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Angsupanich, K., and D.A. Ledward. 1998. High pressure treatment effects on cod (Gadus morhua) muscle. Food Chem., 63, 39-50.

Anon, 1991. Council Directive of 15th July 1991 laying down the health conditions for the production and placing on the market of live bivalve molluscs (91/492/EEC). Off. J. Eur. Communities.

Arnal, C., V. Ferre-Aubineau, B. Besse, B. Mignotte, L. Schwartzbrod

and S. Billaudel. 1999. Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification. J. Virol. Method, 77, 17-26.

Berg, D.E., M.A. Kohn, T. A. Farley, and L.M. McFarland. 2000. Multistate outbreaks of gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana. J. Infect. Dis., 181, 381-S386.

Berthelin, C., K. Kellner and M. Mathieu. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast France). Comparative Biochemistry and Physiology B, 125, 359 .369.

Bosch, A., G. Sanchez, F. Le Guyader, H. Vanaclocha, L. Haugarreau and R.M. Pinto. 2001. Water Sci. and Technol., 43, 61-65.

Brauch, G., U. Haesler and H. Ludwig. 1990. The effect of pressure on bacteriophage. High Pressure Research, 5, 767-769.

Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, and Black RE. 2005. WHO estimates of the causes of death in children. Lancet, 365(9465), 1147-1152.

Bryce, J., C. Boschi-Pinto, K. Shibuya and R.E. Black. 2005. WHO estimates of the causes of death in children. Lancet., 365(9465), 1147-1152.

Bull, R.A., E.T. V. Tu, C.J. McIver, W.D. Rawlinson, and P.A. White. 2006. Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. J. Clin. Microbiol., 44, 327-333.

Calci, K.R., G.K. Meade, R.C. Tezloff and D.H. Kingsley. 2005. High pressure inactivation of hepatitis A virus within oysters. Appl. and Environ. Microbiol., 71, 339-343.

Chai, T., Pace, J., and T. Cossaboom. 1984. Extension of shelf-life of oysters by pasteurisation in flexible pouches. Journal of Food Science, 49, 331 .333.

Cheah, P.B. and D.A. Ledward 1997. Catalytic mechanism of lipid oxidation following high pressure treatment in pork fat and meat. J. of Food Sci., 62, 1135-1138.

Chellappan, N. J. 1991. Processing of Oyster Meat for freezing. Fishery Technology, 28, 122 .124.

Chen, H., D.G. Hoover and D.H. Kingsley. 2005. Temperature and treatment time influence high hydrostatic pressure inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate. J. of Food Protec., 68, 2389-2394.

Christensen, B.F., Lees, D.,Wood, K.H., Bjergskov, T., Green, J., 1998. Human enteric viruses in oysters causing a large outbreak of human food borne infection in 1996/ 97. J. Debartolomeis, J., Cabelli, V.J., 1991. Evaluation of an escherichShellfish Res. 17, 1633-1635.

Cioni, P., and G.B. Strambini. 1994. Pressure effects on protein flexibility monomeric proteins. Journal of Molecular Biology, 242, 291 .301.

Conaty, S., P. Bird, G. Bell, E. Kraa, G. Grohmann and J.M. McAnulty. 2000. Hepatitis A in New South Wales, Australia, from consumption of oysters: the first reported outbreak. Epidemiol. and Infect., 124, 121-130.

Cook, D. W. 2003. Sensitivity of Vibrio species in phosphate-buffered saline and in oysters to high-pressure processing. J. Food Prot., 66, 2276-2282.

Cruz-Romero, M., M. Smiddy, C. Hill, J.P. Kerry and A.L. Kelly. 2004. Effects of high pressure treatment on physicochemical characteristics of fresh oysters (Crassostrea gigas). Innov. Food Sci. and Emerg. Technol., 5, 161-169.

Doultree, J.C., J.D. Druce, C.J. Birch, D.S. Bowden and J.A. Marshall. 1999. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk vi견 surrogate. J. Hosp. Infect. 41, 51-57.

Drury R.A.B. and E.A. Wallington. 1980. Carleton's histological technique. Oxford University Press, Oxford, U.K., 520.

Feltenstein, J. 1995. PHYLIP, phylogeny inference package. Seattle, WA, University of Washington, Version 3.57c.

Gallimore, C. I., J. S. Cheesbrough, K. Lamden, C. Bingham, and J. J. Gray. 2005. Multiple norovirus genotypes characterised from an oyster-associated outbreak of gastroenteritis. Int. J. Food Microbiol. 103, 323-330.

Gaspar, L.P., J.E. Johnson, J.L. Silva and A.T. Da Poian. 1997. Partially folded states of the capsid protein of cowpea severe mosaic virus in the disassembly pathway. J. of Mol. Microbiol. and Biotech., 273, 456-466.

Gauntzer, C., E. Dubois, J. M. Crance, S. Billaudel, H. Kopecka, L. Schwartzbrod, M. Pommepuy, and F. le Guyader. 1998. Influence of environmental factors on the survival of enteric viruses in seawater. Oceanologica Acta, 21, 983-992.

Green, S. M., P. R. Lambden, Y. Deng, A. Lowes, S. Lineham, J. Bushell, J. Rogers, E. O. Caul, C. R. Ashley, and I. N. Clarke. 1995. Polymerase chain reaction detection of small round-structured viruses from two related hospital outbreaks of gastroenteritis using inosine-containing primers. J. Med. Virol. 45, 197-202.

Grohmann, G.S., A.M. Murphy, P.J. Christopher, E. Auty, and H.B. Greenberg. 1981. Norwalk virus gastroenteritis in volunteers consuming depurated oysters. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 59, 219-228.

Grove, S.F., A. Lee, T. Lewis, C.M. Stewart, H. Chen and D.L. Hoover. 2006. Inactivation of foodborne viruses of significance by high pressure and other processes. J. of Food Protec., 69, 957-968.

Häfliger, D., M. Gilgen, J. Luthy, and P. Hubner. 1997. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. Int. J. Food. Microbiol. 37, 27-36.

Halliday, M.L., L.Y. Kang, T.K. Zhou, M.D. Hu, Q.C. Pan and T.Y. Fu. 1991. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. J. of Infec. Dis., 164, 852-859.

Havelaar, A.H., 1987. Bacteriophages as model organisms in water treatment. Microbiol. Sci. 4, 362-364.

He, H., R.M. Adams, D.F. Farkas and M.T. Morrissey. 2002. Use of high pressure processing for oyster shucking and shelf-life extension. J. of Food Sci., 67, 640-645.

Jothikumar, N., J. A. Lowther, K. Henshilwood, D. N. Lees, V. R. Hill, and J. Vinjé. 2005. Rapid and Sensitive Detection of Noroviruses by Using TaqMan-Based One-Step Reverse Transcription-PCR Assays and Application to Naturally Contaminated Shellfish Samples. Appl. Environ. Microbiol. 71, 1870-1875.

Kageyama, T., M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, S. Kojima, R. Takai, T. Oka, N. Takeda, and K. Katayama. 2004. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. J. Clin. Microbiol., 42, 2988-2995.

Kasai, H., K. Watanabe and M. Yoshimizu. 2001. Disinfectant Effects of Hypochlorite Produced by Batch Electrolytic System on Fish Pathogenic Bacteria and Virus, 49(2). 237-241.

Katayama, K., H.S. Horikoshi, S. Kojima, T. Kageyama, T. Oka, F. Hoshino, S. Fukushi, M. Shinohara, K. Uchida, Y. Suzuki, T. Gojobori, and N. Takeda. 2002. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. Virology, 299, 225-239.

Kim, C., Y.C. Hung and R.E. Brackett. 2000. Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogen. Int. J. Food. Microbiol., 61, 199-207.

Kim, S.H., D.S. Cheon, J.H. Kim, D.H. Lee, W.H. Jheong, Y.J. Heo, H.M. Chung, Y. Jee, and J.S. Lee. 2005. Outbreaks of Gastroenteritis That Occurred during School Excursions in Korea

Were Associated with Several Waterborne Strains of Norovirus. J. Clin. Microbiol., 43, 4836-4839.

Kingsley, D.H., D. Guan and D.G. Hoover. 2005. Pressure inactivation of hepatitis A virus in strawberry puree and sliced green onions. J. of Food Protec., 68, 1748-1751.

Kingsley, D.H., D.G. Hoover, E. Papafragkou and G.P. Richards. 2002. Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. J. of Food Protec., 65, 1605-1609.

Kirkwood, C.D., R. Clark, N. Bogdanovic-Sakran and R.F. Bishop. 2005. A 5-year study of the prevalence and genetic diversity of human caliciviruses associated with sporadic cases of acute gastroenteritis in young children admitted to hospital in Melbourne, Australia (1998-2002). J. Med. Virol., 77(1), 96-101.

Koo, J., M.L. Jahnck., P.W. Reno, X. Hu and P. Mallikarjunan. 2006. Inactivation of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus in phosphatebuffered saline and in inoculated whole oysters by high-pressure processing. J. of Food Protec., 69, 596-601.

Lau, C.S., D.A. Wong, L.K. Tong, J.Y. Lo, A.M. Ma and P.K. Cheng. 2004. High rate and changing molecular epidemiology pattern of norovirus infections in sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis in Hong Kong. J. Med. Virol., 73(1), 113-117.

Le Guyader, F., L. Haugarreau, L. Miossec, E. Dubois, and M. Pommepuy. 2000. Three year study to assess human enteric viruses in shellfish. Appl. Environ. Microbiol., 66, 4152-4157.

Lees, D. 2000. Viruses and bivalve shellfish. Int. J. Food Microbiol., 59, 81-116.

Linehan, L. G., T.P. O'Connor and G. Burnell. 1999. Seasonal variation in the chemical composition and fatty acid profile of oysters (Crassostrea gigas). Food Chemistry, 64, 211 .214.

Lopez-Caballero, M. E., M. Pe´rez-Mateos, P. Montero and A.J.

Bonder´ıas. 2000. Oyster preservation by high-pressure treatment. Journal of Food Protection, 63, 196 .201.

Lopman, B., H. Vennema, E. Kohli, P. Pothier, A. Sanchez and A. Negredo. 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. Lancet, 363(9410), 682-688.

Manish, M.P., A.J. Hall, J, Vinde and U,D, Parashar. 2009. Norovirus: A comprehensive review. J. Clin. Virol., 44, 1-8.

Murchie, L.W., M. Cruz-Romero, J.P. Kerry, M. Linton, M.F. Patterson and M. Smiddy. 2005. High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. Innov. Food Sci. and Emerg. Technol., 6, 257-270.

Murphy, A.M., G.S. Grohmann, P.J. Christopher, W.A. Lopez, G.R. Davey and R.H. Millsom. 1979. An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus. Med. J. of Australia, 2, 329-333.

Nagashima, Y., H. Ebina, M. Tanaka and T. Taguchi. 1993. Effect of high hydrostatic pressure on the thermal gelation of squid mantle meat. Food Research Intern., 26, 119-123.

Naitou, H., and T. Morita. 2001. Selection of more appropriate PCR primer pairs for improved efficiency in detecting Norwalk-like virus (NLV) RNA. J. Gen. Appl. Microbiol. 47:241-246.

Nasser, A.M. 1994. Prevalence and fate of hepatitis A virus in water. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 24, 281-323.

Nishida, T., H. Kimura, M. Saitoh, M. Shinohara, M. Kato, S. Fukuda, T. Munemura, T. Mikami, A. Kawamoto, M. Akiyama, Y. Kato, K. Nishi, K. Kozawa, and O. Nishio. 2003. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5782-5786.

Oliveira, A.C., D. Ishimaru, R.B. Goncalves, T.J. Smith, P. Mason and

D. Sa-Carvalho. 1999. Low temperature and pressure stability of picornaviruses: implications for virus uncoating. Biophysical Journal, 76, 1270-1279.

Oshima, T., H. Ushio and C. Koizumi 1993. High-pressure processing of fish and fish products. Trends in Food Sci. and Technol., 4, 370-375.

Page, R.D. 1996. Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Compu. Applic. Biosci., 23, 357-358.

Parashar, U.D., J.F. Li, R. Cama, M. DeZalia, S.S. Monroe and D.N. Taylor. 2004. Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. J. Infect. Dis., 190(6), 1088-1092.

Patel, M.M., M.A. Widdowson, R.I. Glass, K. Akazawa, J. Vinje and U.D. Parashar. 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. Emerg. Infect. Dis., 14(8), 1224-1231.

Payment and Trudel, 1993. Isolation and identification of viruses: titration of viruses in cell culture by cytopathic effect. In: Methods and Techniques in Virology. Payment, P., M. Trudel, eds. Marcel Dekker, New York, USA, 32-33.

Pontes, L., Y. Cordeiro, V. Giongo, M. Villas-Boas, A. Barreto and J.R. Araujo 2001. Pressure-induced formation of inactive tripleshelled rotavirus particles is associated with changes in the spike protein VP4. J. of Molecul. Biol., 307, 1171-1179.

Rodriguez-Amaya, D.B. 1993. Stability of carotenoids during the storage of foods. In: G. Charalambous, Shelf life studies of foods and beverages: chemical, biological, physical and nutritional aspects. Rodriguez-Amaya, D. B., ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holland, 591-628.

Rose, M. A., A. K. Dhar, H. A. Brooks, F. Zecchini, and R. M. Gersberg. 2006. Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus

levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR. Water Res. 40, 2387-2396.

Saito, H., S. Saito, K. Kamada, S. Harata, H. Sato, M. Morita, and Y. Miyajima. 1998. Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV strain to the screening in viral gastroenteritis outbreaks. Microbiol Immunol. 42, 439-46.

Silva, J. L., D. Foguel and C.A. Royer. 2001. Review: Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. Trends in Biochemical Sciences, 26, 612 .618.

Sobsey, M.D. 1987. Methods for recovering viruses from shellfish, seawater, and sediments, In G. Berg (ed.), Methods for recovering viruses from the environment. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 77-108.

Stewart, C.M. and M.B. Cole. 2001. Preservation by the application of nonthermal processing. In: Spoilage of processed foods. Moir, C.J., C. Andrew-Kabilafkas, G. Arnold, B. M. Cox, A. D. Hocking, and I. Jenson, eds. Australian Institute of Food Science and Technology Incorporated, Waterloo DC, Australia, 53-61.

Styles, M.F., D.G. Hoover and D.F. Farkas. 1991. Response of Listeria monocytogenes and Vibrio parahaemolyticus to high hydrostatic pressure. J. of Food Sci., 56, 1404-1407.

Vennema, H., E. de Bruin, and M. Koopmans. 2002. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction, J. Clin. Virol. 25, 233 - 235.

Vidugiris, G. J., J.L. Markley and C.A. Royer. 1995. Evidence of a molten globule-like transition state in protein folding from determination of activation volumes. Biochemistry, 34, 4909 .4912.

Wait, D.A., C.R. Hackney, R.J. Carrick, G. Lovelace, and M.D. Sobsey. 1983. Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hardshell clams. J. Food Prot., 46, 493-496.

Widdowson, M.A., A. Sulka, S.N. Bulens, R.S. Beard, S.S. Chaves, and R. Hammond. 2000. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. Emerg. Infect. Dis., 11(1), 95-102.

Wilkinson, N., A.S. Kurdziel, S. Langton, E. Needs and N. Cook. 2001. Resistance of poliovirus to inactivation by high hydrostatic pressures. Innov. Food Sci. and Emerg. Technol., 2, 95-98.

Xi, J.N., D.Y. Graham, K.N. Wang and M.K. Estes. 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. Science, 250(4987), 1580-1583.

Yamaki, N., Y. Ueki, D, ITO, T, Bunya, N. Kikuti, I. Goto, Y. Okimura and K. Akiyama. 2004. Oyster purification test in sand filtration sea water and electrolysis sea water. Ann. Report of Miyagi Pref. Inst. of Pub. Health and Envorin., 26, 50-53.

Yoshimizu, M. 2007. Survival of Feline Calicivirus(FCV), a NV surrogate, in marine environments and under inactivation Elimination of norovirus(NV) from oyster. Proceedings of the 7th Japan-Korea Joint Seminar on Fisheries Sciences, August 27-28. Kwanju-Yeosu, Korea.

Zheng, D.P., T. Ando, R.L. Fankhauser, R.S. Beard, R.I. Glass and S.S. Monroe. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology, 346(2), 312-323.

질병관리본부. 2007. 감염병발생정보. Retrieved from http://dic.cdc.go.krp://dic.cdc.go.kr