



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](#)

이학박사 학위논문

우리나라 굴에서의 노로바이러스 검출과
유전적 특성분석, 그리고 Surrogate를
이용한 굴김치의 안전성 검증



2018년 2월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

신 순 범

이학박사 학위논문

우리나라 굴에서의 노로바이러스 검출과
유전적 특성분석, 그리고 Surrogate를
이용한 굴김치의 안전성 검증

지도교수 정 현 도

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함.

2018년 2월

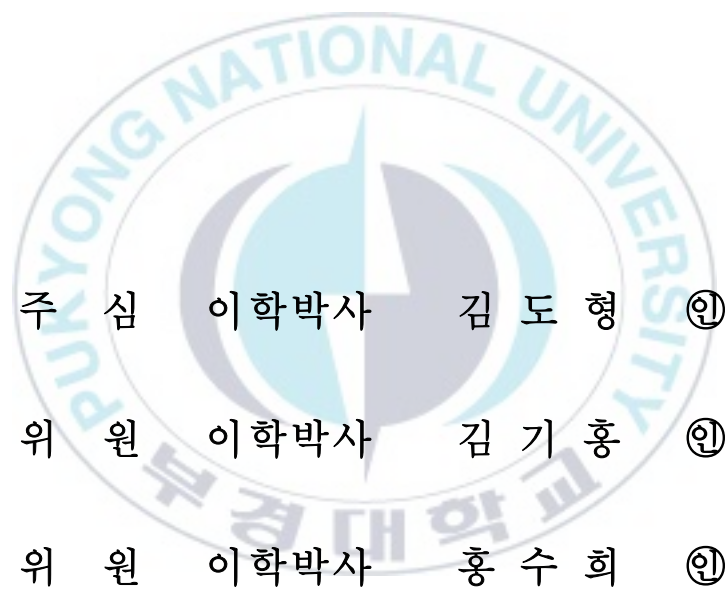
부경대학교 대학원

수산생명의학과

신 순 범

신준범의 이학박사 학위논문을 인준함.

2018년 2월 23일



주 심 이학박사 김 도 형 ㉠

위 원 이학박사 김 기 홍 ㉠

위 원 이학박사 홍 수 희 ㉠

위 원 이학박사 정 준 범 ㉠

위 원 이학박사 정 현 도 ㉠

목 차

Abstract

I. 서 론	1
II. 본 론	7
제 1장 우리나라 양식굴의 장관계 바이러스 오염현황 조사	7
1. 서론	7
2. 재료 및 방법	13
2.1. 시료 샘플링	13
2.2. Virus extraction	15
2.3. RNA extraction	17
2.4. RT-PCR	18
2.5. Real-time RT-PCR	20
3. 결과 및 고찰	23
3.1. 남해안 양식굴의 장관계 바이러스 오염현황	23
3.1.1. 노로바이러스	23
3.1.2. 엔테로, 로타, 아스트로 및 A형 간염 바이러스	30

제 2장 굴에서 검출되는 노로바이러스의 유전적 다양성 분석 ... 32

1. 서론	32
2. 재료 및 방법	38
2.1. 시료 샘플링	38
2.2. Cloning, sequencing and phylogenetic analysis	40
2.2.1. Gel elution	41
2.2.2. Transformation	42
2.2.3. Plasmid extraction	43
2.2.4. Sequencing 및 염기서열 분석	44
3. 결과 및 고찰	45

제 3장 굴에 축적되는 노로바이러스의 농도에 관한 고찰 54

1. 서론	54
2. 재료 및 방법	56
2.1. 시료 샘플링	56
2.2. 노로바이러스 인위감염 및 가열처리 조건	58
2.3. 위생지표세균 분석	59
2.4. 노로바이러스 분석	60
2.4.1. Virus extraction 및 RNA extraction	60

2.4.2. 표준곡선 산출	61
2.4.3. Real-time RT-PCR	62
3. 결과 및 고찰	65
3.1. 전처리법의 간소화 및 Real-time RT-PCR	65
3.2. Real-time RT-PCR을 이용한 노로바이러스 검출 및 정량분석 ..	69
3.3. 자연감염을 통한 노로바이러스의 농도변화	76
3.4. 가열처리에 따른 노로바이러스 농도 변화	83
 제 4장 대체 모델(Surrogate)를 이용한 식품에서의 노로바이러스 불활성화	 87
1. 서론	87
2. 재료 및 방법	90
2.1. Feline calicivirus의 배양	90
2.2. 김치 및 유기산	91
2.3. 시판 및 조제 김치, 부재료와 FCV의 혼합	92
2.4. Feline calicivirus 감염가 측정	95
3. 결과 및 고찰	96
3.1. 김치 숙성 과정에서의 FCV 감염력 변화	96
3.2. 유기산 및 양념류에 의한 FCV의 불활성화	104
 III. 요약	 109

IV. 감사의 글	112
-----------------	-----

VI. 참고 문헌	114
-----------------	-----



Detection and Molecular Characterization of Norovirus in cultured Oyster in Korea and Safety Verification of Oyster Kimchi using Norovirus Surrogate

Soon Bum Shin

Abstract

In this study, we investigated the enteric viruses (norovirus, enterovirus, rotavirus, astrovirus and hepatitis A virus) contamination status of oysters produced in southern coast of Korea. We also identified the genotypes of Norovirus (NoV) detected in oysters and confirmed the concentration of virus accumulated in oysters. In addition, we tried to verify the safety of NoV in oyster kimchi by using NoV surrogate, Feline calicivirus (FCV).

From January 2009 to December 2011, NoV was analyzed from 398 oysters from 9 stations in the south coast, and 91 samples were analyzed for enterovirus, rotavirus, astrovirus and hepatitis A virus.

As a result, the detection rate of NoV was 27.4% (109/398) and astrovirus was 1.1% (1/91). And enterovirus, rotavirus and hepatitis A virus were not detected.

In order to identify genotypes, 120 clones (5 clones per sample) from 24 NoV-positive samples were sequenced and evaluated. Based on the sequencing results, five genotypes (GI.1, GI.2, GI.5, GI.6, and GI.7) were identified in NoV Genogroup I, and seven genotypes (GII.2, GI.3, GI.4, GI.7, GI.12, GI.13, and GI.17) in NoV Genogroup II. GI.1 (52.6%; 10 of 19) and both GI.3 and GI.4 (30.0%; 6 of 20, respectively) were identified as the most prevalent Genogroup I and II strains in oyster during the investigation period.

NoVs were quantitatively analyzed from 21 oysters collected from January to December 2012, using real-time reverse transcription - polymerase chain reaction. and we assessed the NoVs concentration after naturally-contamination and heating to investigate the effects of heat treatment on NoV infected oysters.

In NoV-positive samples, viral concentrations were 8.97×10^2 to 2.24×10^2 and 3.05×10^2 to 7.47×10^1 copies/g for genogroup I and II, respectively. All samples were detected at concentrations below 10^3 copies/g and samples detected at concentrations lower than 10^2 copies/g were confirmed to be 9.5% (2/21). The results of the natural infection for 30 days showed that the concentrations of NoV detected in the oysters were 6.91×10^3 to 2.43×10^5 and 5.37×10^5 to 9.19×10^6 , respectively. After heat treatment, genogroup I decreased by 83.4%, 88.0%, 89.4% and 100% at 60°C, 68°C, 70°C, and 100°C, respectively, for 15 min, while genogroup II respectively decreased by 67.3%, 76.3%, 80.1%, and 89.8% under the same conditions.

In order to verify the safety of NoV in the oyster-kimchi, we investigated the changes of viral infectivity during Kimchi ripening using NoV surrogate, feline calicivirus (FCV).

As a result, it was confirmed that the FCV of 6.30 TCID₅₀ decreased to 2.30 TCID₅₀ after 4 days at 25°C, decreased

to 3.55 after 4 days at 18°C, and decreased to 4.05 after 5 days at 4 °C. And as a result of confirming the effect of organic acid and raw material related to kimchi, The main factor decreasing the infectivity of FCV in Kimchi was the high acidity caused by organic acids, regardless of the type, produced by ripening. Furthermore, it was confirmed that antiviral materials originating from raw material such as salt-fermented anchovies and garlic might contribute to the decreased infectivity of FCV.

List of Tables

Chapter I.

Table 1. Primers used to detected NoVs	19
Table 2. Primers used to detected enteric viruses	21
Table 3. Composition of reaction mixture and reaction condition for real-time PCR	22
Table 4. Status of NoVs detection in Korean oysters from January 2009 to December 2011	28
Table 5. Qualitative analysis of NoVs detected in Korean oysters from January 2009 to December 2011	29
Table 6. Qualitative analysis of enteric virus detected in Korean oysters from January 2011 to December 2011	31

Chapter II.

Table 1. Detection of NoVs in oysters collected at six sampling sites in Jinhae Bay, Korea	49
Table 2. Distribution of NoV genotypes in oysters collected at six sampling sites in Jinhae Bay, Korea	50
Table 3. Conforming of GII.4 variants identified in this study	51

Chapter III.

Table 1. Primers and probes used in this study	64
Table 2. Quantitative analysis of NoVs detected in Korean oysters in	

2012	73
Table 3. Bioaccumulation of total coliform and fecal coliform in the oyster (<i>Crassostrea gigas</i>) and Mussel (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) in contaminated seawater	80
Table 4. Bioaccumulation of in the oyster (<i>Crassostrea gigas</i>) and Mussel (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) in contaminated seawater	81
Table 5. Quantitative analysis of heat-treated NoVs in contaminated oysters	86
Chapter IV.	
Table 1. Composition of raw materials for <i>kimchi</i> preparation	93
Table 2. The FCV infective titer according to the time variation of the marketing <i>Kimchi</i>	99
Table 3. The FCV infective titer according to the time variation of lab-prepared <i>Kimchi</i>	101
Table 4. The FCV infective titer according to the reaction with the organic acid (4°C)	107
Table 5. The FCV infective titer according to the reaction with a spice used <i>Kimchi</i> (4°C)	108

List of Figures

Chapter I.

Fig. 1. Location of the sampling sites in this study	14
Fig. 2. Method of virus extraction	16
Fig. 3. Detection of VP 1 gene of NoV Genogroup I and II using RT-PCR and Nested RT-PCR in this study.	26
Fig. 4. Yearly detection rate of NoVs in Korean oysters	27

Chapter II.

Fig. 1. Human norovirus genome organization and virus encoded nonstructural and structural proteins	34
Fig. 2. Classification of noroviruses into 7 genogroups (GI to GVII) based on amino acid sequence diversity in the complete VP1 capsid protein	35
Fig. 3. Location of the sampling sites in this study	39
Fig. 4. Electrophoretic analysis of PCR products obtained by the amplification of Norovirus (Genogroup I and Genogroup II) in oysters	40
Fig. 5. Phylogenetic analysis of NoVs isolated form Korean oyster.	52

Chapter III.

Fig. 1. Location of the sampling sites in Tongyeong city, Korea	57
Fig. 2. Comparison results of two methods of detecting norovirus	68
Fig. 3. Standard curve amplification plots used realtime PCR	74

Fig. 4. Standard curves for GI and GII plasmid standards	75
Fig. 5. Results of realtime RT-PCR in naturally contaminated shellfish ...	79
Fig. 6. Bioaccumulation of in the oyster and Mussel in contaminated seawater	82

Chapter IV.

Fig. 1. Schematic diagram of Roller culture system	94
Fig. 2. The FCV infective titer change among the storage process of the marketing <i>Kimchi</i>	100
Fig. 3. The FCV infective titer change among the manufacture <i>Kimchi</i> fermentation process	102
Fig. 4. The FCV infective titer change among the storage process of the aging completion marketing <i>Kimchi</i> and neutralization <i>Kimchi</i>	103

I. 서 론

우리나라에서 한해 생산되는 패류의 양은 대략 40만톤 정도이며 생산금액으로는 8,000억에 이르고 있다. 품종별로는 굴이 300천톤 이상으로 전체 패류 생산량의 70%를 차지하고 있으며 우리나라에서 생산되는 굴은 통영시, 거제시 및 고성군을 포함하는 남해안에서 80% 이상이 생산된다. 굴 산업은 통영시, 거제시 및 고성군 일원에서 가장 큰 규모의 사업이 될 정도로 시장경제에 많은 영향을 주고 있으며 생산된 굴은 내수시장은 물론 일본, 미국 및 유럽으로도 수출되고 있다(MOF, 2016a).

굴을 포함하는 패류는 이동성이 거의 없고 여과섭식(Filter feeding)으로 먹이를 공급하기 때문에 서식하는 환경이 오염되었을 경우, 패류에 직접 영향을 미칠 수 있다. 즉 패류가 생산되는 해역이 주변의 육·해양오염원들의 영향으로 오염되었을 경우 패류는 먹이섭이 과정에서 이러한 오염물질을 농축할 가능성이 크다. 전 세계적으로 이러한 오염된 패류 섭취로 인한 식중독 사고 또한 빈번히 발생하고 있으며 노로바이러스와 같은 장관계 바이러스와 관련된 사고가 많이 보고되고 있다(Prato et al., 2004; Dubois et al., 2004; Iritani et al., 2014). 대부분 패

류는 가열조리 후 섭취되기 때문에 노로바이러스에 의한 식중독 발생에 대하여 우려할 필요가 으나 굴의 경우 우리나라에서는 70% 이상이 생굴의 형태로 소비되고 있는 실정이므로 장관계 바이러스의 전달 매개체 역할을 할 가능성이 높다.

100 종 이상의 바이러스가 인·축의 배변활동으로 배출되며 이러한 바이러스들은 하수처리장, 지하수, 하천 및 해수를 통하여 환경으로 유입될 수 있다(Lee and Kim, 2002; Lipp et al., 2002; Sobsey et al., 1986; Theng and Erin, 2005). 장관계 바이러스는 분변-구강(fecal-oral) 경로로 전염되며 주로 위장에서 감염되고 복제되기 때문에 감염된 환자의 대변 1 g에는 10^5 - 10^{11} 정도의 바이러스 입자가 존재한다고 알려져 있다(Farthing, 1989).

장관계 바이러스 중에서는 노로바이러스, 엔테로바이러스, 로타바이러스, 아스트로바이러스 및 A형 간염바이러스 등이 집중적으로 연구되고 있으며 최근 전 세계적으로 노로바이러스에 의한 식중독이 가장 문제가 되고 있다(Theng and Erin, 2005).

비세균성 장염의 90% 이상의 원인으로 알려진 노로바이러스는 미국의 경우 2009년부터 2012년까지 식품과 관련된 식중독의 48%가 노로바이러스에 의해 발병되는 것으로 보고되었으며, 일본의 경우에는 2001년부터 2007년까지 발생한 식중독 중 노

로바이러스로 기인한 환자수가 가장 많은 것으로 보고된 바 있다(Jo et al., 2009; Hall et al., 2014). 국내에서도 최근 원인물질별 식중독 발생현황을 살펴보면 2005년까지는 노로바이러스가 병원성대장균의 다음 순위를 차지하였으나, 2006년 이후 노로바이러스에 의한 식중독이 크게 급증하여 2002년부터 2013년까지 노로바이러스에 의한 식중독 발생건수가 전체 식중독 발생건수의 15% (437/2,858)로 원인물질들 중 가장 큰 비중을 차지하고 있다(MFDS, 2014).

노로바이러스는 분류학적으로 장관계 바이러스(Enteric virus) 중 *Caliciviridae*에 속하며 직경은 대략 27 nm 정도이며 외피(Envelope)를 가지고 있지 않다. 약 7.6 kb의 단일 구조 RNA를 가지고 있으며 이 RNA는 3개의 Open reading frames (ORFs)로 구성된다. ORF 1은 RNA dependent RNA polymerase (RdRp)를 포함하여 6개의 구조화 되지 않은 단백질을 암호화하고 있으며, ORF 2는 major capsid protein (VP1)을 암호화하고 있으며 VP1은 shell (S) 및 Protruding (P1, P2) domain으로 구성된다. ORF 3은 minor capsid protein (VP2)를 암호화하고 있으나 그 기능은 정확하게 밝혀지지 않았다(Fig. 1, Lopman, 2015). 노로바이러스는 세포배양 기술이 확립되지 않아 항원형(Serotype)에 따른 분류가 불가능하며 노로바이러스 RNA의 RdRp 및 VP1

유전자의 염기서열 차이에 따라 유전형(Genotype)이 분류된다. 현재까지 노로바이러스는 크게 7개의 Genogroup (GI-GVII)으로 분류되며 사람에게는 주로 GI, GII 및 GIV가 감염되며 나머지는 동물(소, 개, 양, 돼지 및 개)에게 감염된다고 알려져 있다(Zheng et al., 2006). 또한 이러한 Genogroup은 다수의 Genotype으로 분류 할 수 있으며 32개의 Genotype (GI 9개, GII 19개 및 GIV 1개)이 사람에게 감염된다고 알려져 있다(Fig. 2, Vinje, 2015).

현재까지 배양기술이 확보되지 않은 노로바이러스를 검출하는 방법에는 전자현미경(EM), 효소면역측정법(ELISA), RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction)을 이용한 방법이 있으며, 이 중에서 RT-PCR을 통해 바이러스 유전자를 검출하는 방법이 일반적으로 사용되고 있다(Gary et al., 2004; Kageyama et al., 2004). 하지만 이러한 유전자를 분석하는 방법은 감염력을 판단할 수 없어 식품에서의 정량기준을 설정하기 어렵다.

굴은 생굴의 형태로 소비되는 경향이 있고, 다양한 나라에서 소비가 이루어지기 때문에 굴과 관련된 노로바이러스 발생 사례가 일본 등의 여러나라에서 보고된 바 있다(Alfano-Sobsey et al., 2012; Iritani et al., 2014). 하지만 우리나라에서는 역학조사

가 부족하여 굴과 관련된 노로바이러스 감염 사례에 대한 보고가 없는 실정이다. 또한 시중에서 유통되는 굴에서 노로바이러스 및 A형 간염바이러스가 검출된 사례는 있지만(Moon et al., 2011; Park et al., 2015), 정기적이고 체계적인 모니터링을 통하여 굴이 생산되는 해역에서의 노로바이러스 오염현황을 파악한 보고는 없었다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 굴에 대한 장관계 바이러스 오염현황에 대한 조사를 위하여 굴이 주로 생산되고 있는 남해안의 굴 양식장을 대상으로 장관계 바이러스 중 노로바이러스, 엔테로바이러스, 로타바이러스, 아스트로바이러스 및 A형 간염바이러스를 분석하였다. 또한 노로바이러스가 검출된 시료로부터 염기서열 분석을 통하여 노로바이러스의 다양한 유전자형을 결정하였으며 Real-time RT-PCR을 이용하여 굴에서의 노로바이러스 축적 정도를 파악하고 가열처리 조건에 대한 바이러스의 농도변화를 구명하였다.

이러한 자료들은 노로바이러스 원인식품 구명을 위한 역학조사 및 노로바이러스 오염원 추적 조사에 대한 기초자료 및 노로바이러스의 정량기준 설정을 위한 참고자료로 활용될 수 있을 것이다. 아울러 본 연구에서는 배양이 불가능한 노로바이러스를 대신하여 대체모델(surrogate)를 활용하여 우리나라 전통식품인 김치

에서 숙성 중 일어나는 바이러스의 감염력 변화를 관찰하였으며 이러한 결과는 노로바이러스에 오염된 굴이 김치의 부재료로 사용되었을 경우 안전하게 김치를 섭취할 수 있는 가이드라인을 제공할 것이다.



II. 본 론

제 1장 우리나라 양식굴의 장관계 바이러스 오염현황 조사

1. 서론

전 세계적으로 매년 30억 명 이상의 설사환자가 발생하고 있으며, 200만 명 정도가 설사를 동반하는 장염질환으로 사망하고 있다(Flint et al., 2005). 또한 이러한 질환을 일으키는 병원체의 70% 이상이 장관계 바이러스(Enteric virus) 감염에 의한 것으로 알려져 있다(Nguyen et al., 2007).

장관계 바이러스는 수중환경에 자연적으로 존재하기도 하지만 일반적으로는 생활하수, 정화조 시스템, 농업용수 및 선박의 분변 유출 등 인간의 다양한 활동으로부터 유입된다(Melnick, 1984). 100 종 이상의 바이러스가 인·축의 배변활동으로 배출되며 이러한 바이러스들은 하수처리장, 지하수, 하천 및 해수를 통하여 환경으로 유입될 수 있다(Lee and Kim, 2002; Lipp et al., 2002; Sobsey et al., 1986; Theng and Erin, 2005). 장관계 바이러스는 분변-구강(fecal-oral) 경로로 전염되며 주로 위장에서 감염되고 복제되기 때문에 감염된 환자의 대변 1 g에는

10^5 - 10^{11} 정도의 바이러스 입자가 존재한다고 알려져 있다 (Farthing, 1989).

장관계 바이러스 중에서 *Picornaviridae*에 속하는 폴리오바이러스, 엔테로바이러스, 콕사키바이러스, A형 간염바이러스, 에코바이러스, *Adenoviridae*의 아데노바이러스, *Caliciviridae*의 노로바이러스, 칼리시바이러스, 아스트로바이러스, 소형구형바이러스, 및 *Reoviridae*에 속하는 레오바이러스, 로타바이러스의 연구가 일반적이며 수행되고 있으며 이들 바이러스 중 노로바이러스, 엔테로바이러스, 로타바이러스, 아스트로바이러스 및 A형 간염바이러스 등이 집중적으로 연구되고 있다(Theng and Erin, 2005).

노로바이러스(Norovirus, NoV)는 1968년 미국 오하이주 Norwalk 지방의 한 초등학교에서 최초로 발병하였으며 1972년에 전자현미경으로 처음 발견되었다. 전 세계적으로 비세균성 장염의 90% 이상의 원인으로 알려져 있으며, 연령이나 성별에 무관하게 가장 많이 장염을 일으키는 원인물질로 알려져 있다(Donlin et al., 1972; Fankhauser et al., 2002). 이 바이러스는 외피가 없고 ss-RNA를 가지며 7개의 Genogroup으로 분류된다. 이들 중 GI, GII 및 GIV genogroup이 사람에게 식중독을 일으킨다고 알려져 있으며 전형적인 위장염의 증상을 나타낸다(Lopman, 2015).

A형 간염바이러스(Hepatitis A virus, HAV)는 1973년 사람의 분변에서 전자현미경을 통해 처음 발견된 27nm 길이의 ss-RNA 바이러스이다(Feinstone et al., 1973). 혈청형은 하나이지만, 염기서열에 따라 IA, IB, II, IIIA, IIIB, IV, V, VI, VII 군으로 유전자형을 분류할 수 있으며, 전 세계적으로 I형이 가장 광범위하게 존재하는 것으로 알려져 있다(Robertson et al., 1992). 우리나라는 2000년대 초반에 IA형이 대부분 분리되었으나(Kim and Kim, 2001; Park et al., 2007), 이후에 발표된 연구에서는 IB 및 IIIA형이 증가하는 변화가 관찰되었다(Yun et al., 2008; Song et al., 2009; Yoo et al., 2008).

엔테로바이러스(human enteroviruses, HEV)는 외피가 없고 ss-RNA를 가지고 있는 바이러스로, Poliovirus, Coxsackieviruses A (CVA), Coxsackieviruses B (CVB), Echoviruses (ECV), enteroviruses (EVs) 등 약 70 종의 혈청형들로 분류된다(Hyypia et al., 2007). 최근에는 염기서열 상동성에 따라 Poliovirus, HEV-A, HEV-B, HEV-C 와 HEV-D로 분류하고 있다(Oberste et al., 1999; Park et al., 2012). HEV는 혈청형마다 유행하는 지역과 시기에 따라 다르지만 주로 여름철에 자주 발생하며, 호흡기계 및 소화기계를 통해 전파, 감염된다고 알려져 있다(Pallansch and Roos, 2007; Jee et al., 2004). 감염된 바

이러스의 혈청형과 환자의 상태에 따라 감기증상, 수족구병, 급성 출혈성 결막염, 소아마비 등과 같은 임상증상을 보이는 것으로 알려져 있다(KOHI, 2012).

아스트로바이러스(Astrovirus, AsV)는 1975년 소아 환자에서 처음으로 발견되었으며 영유아에서 발생하는 위장염의 가장 흔한 원인 바이러스 중 하나이다(Malasao et al., 2012). 이 바이러스는 외피가 없고 ss-RNA를 가지며 8개의 유전형으로 분류된다. 전 세계적으로 유전형 1(GI)이 가장 유행하고 있으며 개발도상국의 영유아에 발병하여 구토, 발열, 식욕부진 및 복통 등의 증상을 나타낸다(Maldonado et al., 1998; Aminu et al., 2008).

로타바이러스(Rotavirus, RoV)는 1973년 소아 환자에서 처음으로 발견되었으며, 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에 의하면 전 세계적으로 21만명의 소아환자가 사망한 것으로 보고하고 있다(Tate et al., 2016; Bioshop et al., 1973). 이 바이러스는 ds RNA 및 외피(Envelope)를 가지며 7개의 항원형(A-G)으로 분류되며 사람에게 가장 흔하게 감염되어 장염을 유발하는 것은 A형으로 개체에 따라 무증상에서 발열, 구토, 설사, 복통, 탈수 등과 같은 증상이 다양하게 나타난다(Matthijnssens et al., 2011; Seo et al., 2000)

이러한 장관계 바이러스는 음식, 물, (감염)매개물, 사람의 점

촉에 의해 전달될 수 있고, 적은 입자로도 급성질환을 일으키기 때문에 공중보건에 중요한 인자로 인식되고 있으며(Haas et al., 1993), 수중의 장관계 바이러스는 다양한 환경에서의 오염가능성이 있기 때문에 특히 중요한 인자이다. 환경의 바이러스 분야에서 상당한 발전을 이룬 1980년대 이래로, 장관계 바이러스는 많은 비세균성 위장염의 원인이 되는 인자로 인식되어져 왔으며(Bosch, 1998) 이러한 장관계 바이러스는 오염된 식수원, 수중 여가활동(수영장물, 카누, 서핑 등), 도시하천, 오염된 해역에서 수확한 패류에서 분리되고 있다(Cecuk et al., 1993; Dewailly et al., 1986; Jiang et al., 2001). 장관계 바이러스는 해양환경에서 장기간 생존이 가능하기 때문에 해수욕과 같은 여가 활동이나 오염된 패류를 섭취함으로써 사람에게 노출될 가능성이 크며 특히 패류는 여과섭식을 통하여 수중의 바이러스를 농축할 수 있으므로 오염된 해역에서 수확된 패류는 장관계 바이러스 감염의 매개체가 될 수 있다(Bosch et al., 1991 and 2001; Lipp et al., 1997). 또한 이들 패류 중 굴은 생굴의 형태로 소비되는 경향이 있고, 다양한 나라에서 소비가 이루어지기 때문에 굴과 관련된 장관계 바이러스 질병 발생 사례가 여러 나라에서 보고된 바 있다(Dubois et al., 2004; Iritani et al., 2014). 하지만 우리나라에서는 역학조사가 부족하여 굴과 관련된 장관계 바이러스의 감염

사례에 대한 보고는 드물다. 또한 시중에서 유통되는 굴에서 장관계 바이러스가 검출된 사례는 있지만(Moon et al., 2011; Park et al., 2015) 정기적이고 체계적인 모니터링을 통하여 굴이 생산되는 해역에서의 장관계 바이러스 오염현황을 파악한 보고는 없었다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 굴에 대한 장관계 바이러스 오염현황에 대한 조사를 실시하였으며 이를 위하여 굴이 주로 생산되고 있는 남해안의 굴 양식장을 대상으로 장관계 바이러스 중 노로바이러스, 엔테로바이러스, A형 간염 바이러스, 로타 바이러스 및 아스트로바이러스를 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 샘플링

우리나라에서 생산되는 굴은 통영시, 거제시 및 고성을 포함하는 남해안에 집중되어 있으며, 도심의 하수 등 오염원과 인접한 굴 양식장을 대상으로 샘플링을 실시하였다(Fig. 1). 2009년 1월에서 2011년 12월까지 남해안 인근 굴 양식장 9개 지점에서 398개의 참굴(*Crassostrea gigas*)을 샘플링 하였으며, 노로바이러스 분석을 위해 냉장상태로 실험실까지 운반하였다. 또한 샘플마다 10개체 이상의 각굴에서 중장선을 분리하였으며, 바이러스 분리 전까지 -20°C 이하에 보관하였다.

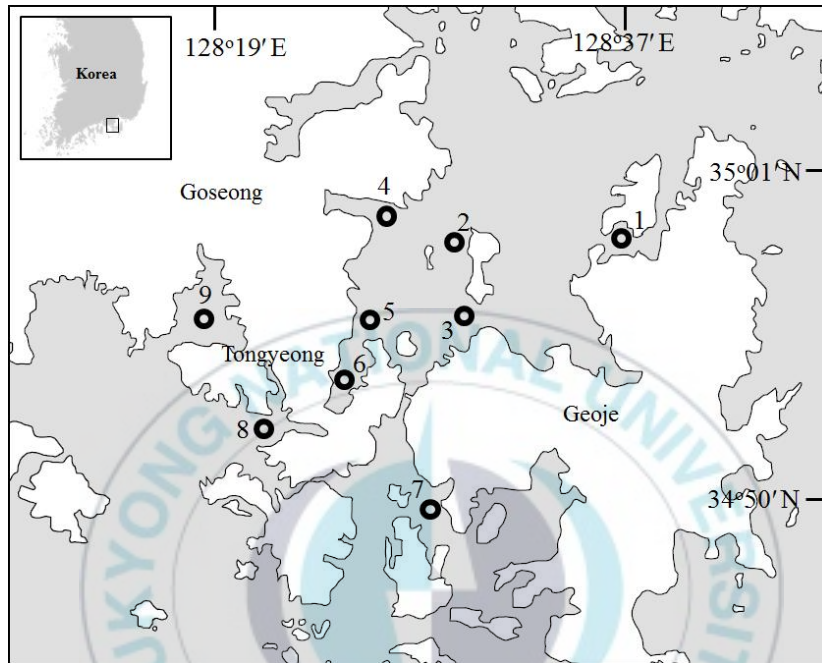


Fig. 1. Location of the sampling sites in this study

2.2. Virus extraction

쿨에서 노로바이러스 분리는 poliovirus를 이용하여 검증된 이전 연구의 방법에 따라 실시하였다 (Ha et al., 2009; Lee et al., 2010) (Fig. 2). 우선 증장선 10 g에 75 mL of glycine buffer (0.25 M Glycine, 0.14 M NaCl buffer, pH 7.5) 75 mL을 첨가한 후 호모게나이저를 사용하여 완전히 균질화하였다. 균질화된 샘플은 4°C에서 8,000 rpm로 30분간 원심분리 한 후 상등액과 침전물을 분리하였다. 침전물에 75 mL의 threonine buffer (0.25 M threonine - 0.14 M NaCl, pH 7.5)를 첨가하여 재현탁하였으며 4°C에서 8,000 rpm로 30분간 원심분리 한 후 상등액을 취하여 이전의 glycine buffer 상등액과 합하였다. 이 용액에 66 mL의 40% polyethylene glycol 6,000 (Sigma-Aldrich, USA) 및 24 mL의 3 M NaCl을 첨가한 후 4°C에서 3 시간 반응시켰다. 4°C에서 8,000 rpm으로 30분간 원심분리 하였으며 상등액을 제거한 후 10 mL의 멸균 증류수를 첨가하여 침전물을 재현탁하였다. 현탁액에 Tween-80 (final concentration, 0.04% Tween 80/10 mM Tris) 및 동량의 chloroform: isoamyl alcohol (24:1)을 첨가하여 20분간 교반하였다. 다음으로 4°C에서 12,000 rpm로 20 분간 원심분리하였으며 상등액을 옮긴 후

40% polyethylene glycol 6,000 및 3 M NaCl을 첨가하여(최종 농도, polyethylene glycol, NaCl 0.3 M) 4°C에서 3 시간 반응시켰다. 반응액을 동일한 조건으로 원심분리 한 후 상등액을 제거하였다. 침전물에 500 uL의 diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water를 첨가하여 재현탁하여 RNA 추출에 사용하였다.

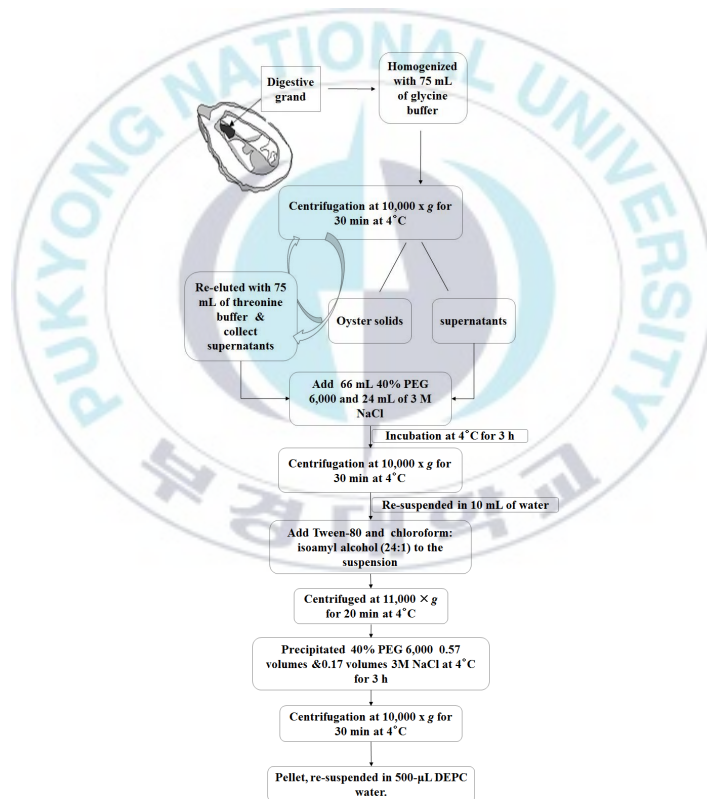


Fig. 2. Method of virus extraction

2.3. RNA extraction

RNA 추출에는 Viral RNA mini kit (QIAgen, USA)를 사용하였다. 즉 샘플 300 uL에 AVL buffer (Guanidine thiocyanate 함유) 1,120 uL를 첨가하여 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 반응액에 95~100% 에탄올 1,120 uL을 첨가하여 혼합하였으며, 혼합액을 630 uL를 spin column tube로 옮겨 8,000 rpm에서 1분간 원심 분리하였다. 남은 혼합액을 동일한 방법으로 처리한 후, 동일한 spin column tube에 AW1 buffer (Guanidine hydrochloride 함유) 500 uL를 첨가하여 8,000 rpm에서 1분간 원심 분리하였다. 또한 AW2 buffer (Sodium azide 함유) 500 uL를 각각 첨가하여 12,000 rpm에서 3분간 원심 분리하였으며, 원심분리 후 spin column에 걸러진 용액은 제거하였다. 다음으로 spin column을 새로운 tube로 옮긴 후 AVE buffer (sodium azide 및 poly A 함유)을 60 uL를 넣고 1분간 반응시켰다. 마지막으로 8,000 rpm로 1분간 원심 분리하여 용액을 PCR을 수행하기 위한 template로 사용하였다. 분리된 RNA는 PCR 수행 전까지 -20℃ 이하에 보관하였다.

2.4. RT-PCR

노로바이러스 유전자를 확인하기 위한 RT-PCR에 사용된 primer는 Table 1에 나타내었으며, Thermo-cycler Dice TP 600 (Takara, Japan)으로 반응을 수행하였다. RT-PCR에 사용된 시약은 Verso™ 1-Step RT-PCR Reddy Mix™ Kit (Thermo Scientific, UK)로, 2×1-step PCR Reddymix (a proprietary reaction buffer) 12.5 uL, 각 primer 200 nM, Verso enzyme mix (reverse transcriptase and RNase inhibitor) 0.5 uL, RT enhancer 1.25 uL 와 Template RNA를 25 uL로 반응액을 조성하였다. PCR 반응은 우선 45℃에서 50분간 역전사 시킨 후 94℃에서 5분간 denaturation시켰다. 그 후 94℃-30초, 55℃-30초, 72℃-60초간 반응을 1 cycle로 하여 35 cycle 반응시켰으며, 그 후 72℃에서 7분간 extention time을 주었다. 또한 Emerald Amp PCR master mix (Takara, Japan)를 사용하여 nested PCR을 실시하였으며 RT-PCR 산물 1 uL, 각 primer 10 pmole을 mixture에 첨가한 후 98℃-10초, 56℃-30초, 72℃-60초간 반응을 1 cycle로 하여 35 cycle 반응 시켰다. 최종적인 PCR 산물은 1.5% agarose gel로 전기영동 하여 확인하였다.

Table 1. Primers used to detected NoVs

Genogroup	Region	Name	Sequence(5'-3') ¹⁾	Location ²⁾
GI	Capsid (ORF2)	GIF1M ³⁾	CTGCCCCGAATTYGTAATGATGAT	5342-5365
		GIR1M ^{3,4)}	CCAACCCARCCATTTRTACATYTG	5671-5649
		GIF2 ³⁾	ATGATGATGGCGTCTAAGGACGC	5358-5380
GII	Capsid (ORF2)	GIIF1M ³⁾	GGGAGGGCGATCGCAATCT	5049-5067
		GIIR1M ^{3,4)}	CCRCCIGCATRICCRTTTRTACAT	5389-5367
		GIIF3 ³⁾	TTGTGAATGAAGATGGCGTCGA	5079-5100

¹⁾ Degenerate positions B:T/G/C, D:A/G/T, H:A/T/C, K:T/G, M:A/C, N:A/T/G/C, R:A/G, W:A/T, Y:T/C.

²⁾ Relative positions of primers in Norwalk/68/US (accession no. M87661) and Lordsdale/93/UK (accession no. X8655).

³⁾ Primers for the first PCR.

⁴⁾ Primer for the nested PCR.

2.5. Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR 반응을 위하여 RNA Ultrasense One-step qRT-PCR system (Invitrogen, USA) 시약을 사용하였다. 엔테로바이러스, 로타바이러스, 아스트로바이러스 및 A형 간염 바이러스 유전자를 확인하기 위해 사용된 primer 및 probe는 Table 2에 나타내었으며, PCR 반응액의 조성 및 반응 조건은 Table 3에 나타내었다.

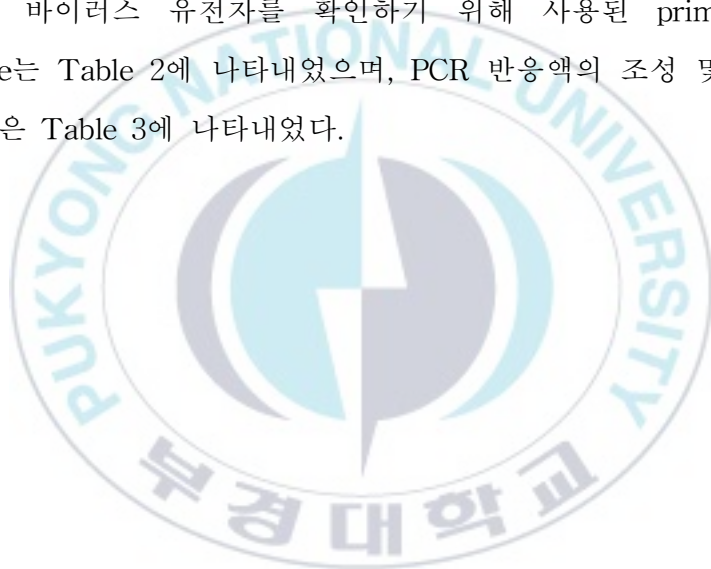


Table 2. Primers used to detected enteric viruses

Virus	Type	Sequence(5'-3') ¹⁾	Reference
Enterovirus	(+) primer	ACATGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCT	Dierssen et. al. 2008
	(-) primer	CCAAAGTAGTCGGTTCCGC	
	Probe	TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAAT	
Rotavirus	(+) primer	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCG	Feeney et al., 2011
	(-) primer	TATCAGAAAGATTAGAAT TGTGGTATATTC	
	Probe	CGGTTAGCTCCTTTTA	
Astrovirus	(+) primer	CCGAGTAGGATCGAGGGT	Feeney et al., 2011
	(-) primer	GCTTCTGATTAAATCAATTTTAA	
	Probe	CTTTTCTGTCTCTGTTTAGAT	
Hepatitis A virus	(+) primer	TCACCGCCGTTTGCCTAG	Feeney et al., 2011
	(-) primer	GGAGAGCCCTGGAAGAAAG	
	Probe	TTAATTCCTGCAGGTTTCAGG	

¹⁾ Degenerate positions B:T/G/C, D:A/G/T, H:A/T/C, K:T/G, M:A/C, N:A/T/G/C, R:A/G, W:A/T, Y:T/C.

Table 3. Composition of reaction mixture and reaction condition for real-time PCR

Mixture	Volume	Reaction condition
Template RNA	5 uL	
RNA Ultrasense Enzyme mix (Invitrogen)	1.25 uL	
5X Ultrasense reaction mix (Invitrogen)	5 uL	
Forward Primer	1 uL (10 pmole)	55°C 60 min, 95°C 5 min;
Reverse Primer	1 uL (10 pmole)	95°C 15 sec, 60°C 60 sec, 40 cycles
TaqMan Probe	0.5 uL (10 pmole)	
Distilled water	up to 25.0 uL	

3. 결 과 및 고찰

3.1. 남해안 양식굴의 장관계 바이러스 오염현황

3.1.1. 노로바이러스

2009년 1월에서 2011년 12월까지 남해안 인근 굴 양식장 9 지점에서 총 398개의 참굴을 샘플링 하여 노로바이러스를 분석하였다. 굴이 수확되는 11월에서 이듬해 4월 까지는 월 2회, 수확이 완료되는 5월부터 10월까지는 월 1회 샘플링을 실시하였다. 노로바이러스 분석결과는 RT-PCR 및 nested RT-PCR 결과, GI 314 bp, GII 311 bp의 유전자 단편이 확인된 샘플을 양성으로 판정하였으며(Fig 3), 총 398개의 시료 중 109개의 샘플에서 노로바이러스가 검출되어 27.4%의 검출율을 나타내었다(Table 4, 5). 연도별로는 2010년이 가장 높은 검출율(39.4%, 50/127)을 나타내었으며 2009년에 비해 3배 이상의 증가 추세를 나타내었다(Fig. 4, Table 4). 식품의약품안전처의 통계자료에 따르면 동 조사기간에 발생한 노로바이러스 식중독의 환자수는 2009년 568명에서 2010년 1,994명으로 증가한 것으로 나타났으며(MFDS, 2017), 본 연구결과 굴에서의 노로바이러스 검출율은

노로바이러스 식중독 환자수와 비례하는 결과를 나타내었다.

유전형별로는 GI형이 18.6% (74/398), GII형이 17.1% (68/398)의 검출율을 나타내었으며, 8.3% (33/398)의 샘플에서 GI형과 GII형이 동시에 검출되었다.

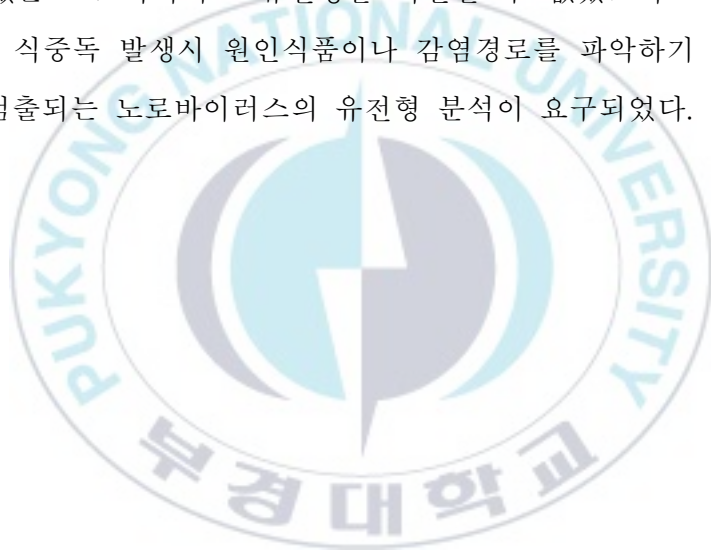
시기(계절)별로는 겨울철(11월~다음해 2월) 및 봄철(3월~5월)에 검출율이 36.9 (58/157) 및 31.2 (34/109)로 높았으며, 조사지점별로는 1 및 6번 조사지점의 경우 35% 이상의 높은 검출율을 나타낸 반면 9번 조사지점은 17.3%(9/52)로 비교적 낮은 검출율을 나타내었다(Table 5).

이전의 연구결과에 따르면 본 연구결과의 조사지점 인근에는 생활하수, 농경수 등의 육상 오염원과 해역을 향해하는 선박, 가두리 양식장 등의 해상 오염원이 산재해 있으며(Shim et al., 2012) 이러한 오염원을 통하여 환자분변이 해역으로 유입되어 해역에서 양식되는 굴이 노로바이러스가 감염된 것으로 사료된다. 2008년부터 2011년까지 영국의 39개 패류생산해역에 대한 노로바이러스 모니터링 결과 76.2 %의 검출율을 나타낸 바 있으며(FSA, 2012), 본 연구에서 또한 전체 조사기간 동안 27.4%의 굴 시료에서 노로바이러스가 검출되었다.

이러한 결과들은 노로바이러스의 오염이 우리나라를 포함하는 전세계의 패류 위생상 중요한 문제이며, 공중보건상의 잠재적인

위해요소임을 확인하는 결과이며, 환자나 보균자의 분변이 해역으로 유입되지 않도록 분변 오염원의 관리의 필요성에 대한 과학적인 근거를 제시하는 결과이다.

또한 본 장에서의 연구결과는 RT-PCR에 의한 부분적인 노로바이러스 유전자의 유·무를 확인한 결과로, 다양하게 보고되고 있는 노로바이러스 유전형을 확인할 수 없었으며 노로바이러스 식중독 발생시 원인식품이나 감염경로를 파악하기 위해서는 검출되는 노로바이러스의 유전형 분석이 요구되었다.



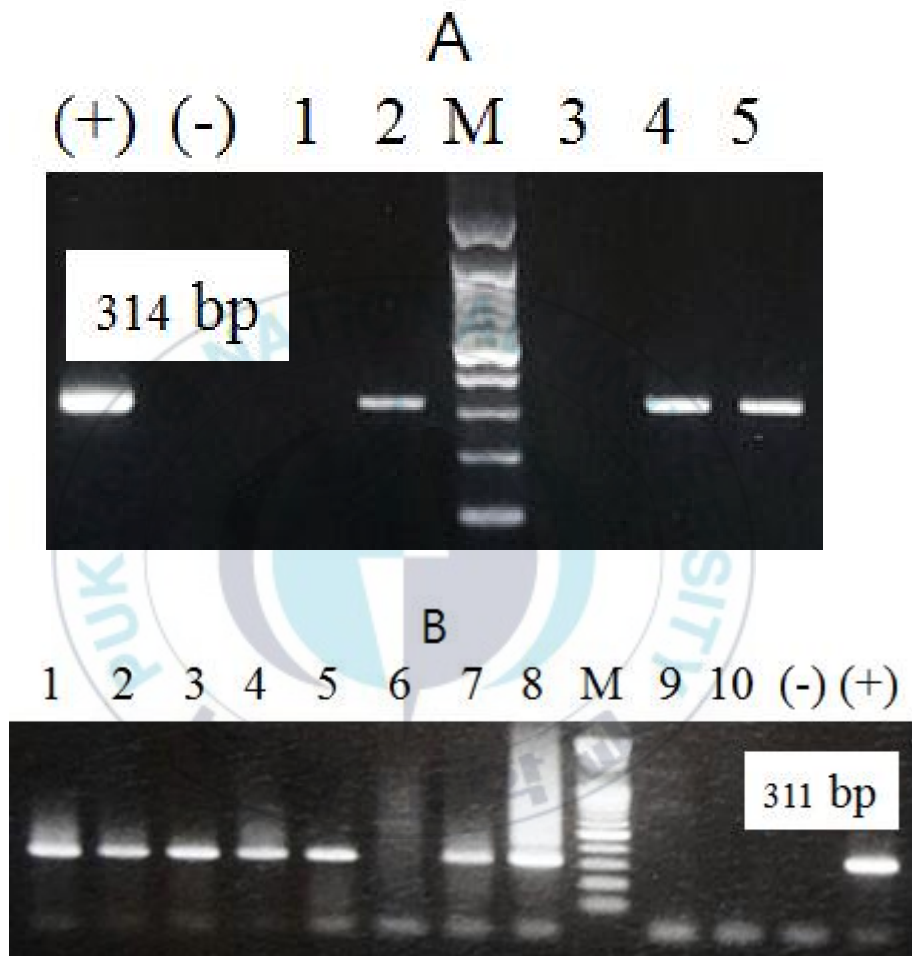


Fig. 3. Detection of VP 1 gene of NoV Genogroup I and II using RT-PCR and Nested RT-PCR in this study. A, NoV Genogroup I; B, NoV Genogroup II, (+), Positive control; (-), Negative control; M, 100 bp size maker

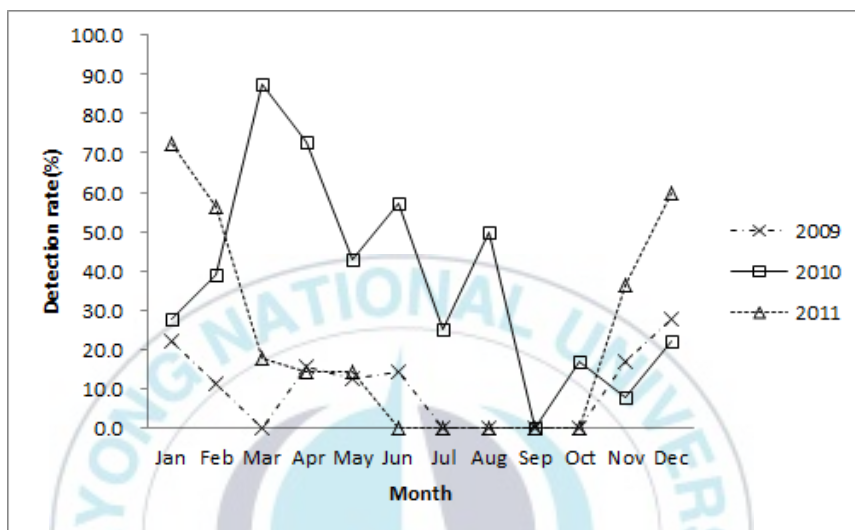


Fig. 4. Yearly detection rate of NoVs in Korean oysters

Table 4. Status of NoVs detection in Korean oysters from January 2009 to December 2011

Month	Detection Rate (%)			
	2009	2010	2011	2009-2010
Jan	22.2 (4/18) ¹⁾	27.8 (5/18)	72.7 (13/18)	40.7 (22/54)
Feb	11.1 (2/18)	38.9 (7/18)	56.3 (9/16)	34.6 (18/52)
Mar	0.0 (0/16)	87.5 (14/16)	17.6 (3/17)	34.7 (17/49)
Apr	15.4 (2/13)	72.7 (8/11)	14.3 (2/14)	31.6 (12/38)
May	12.5 (1/8)	42.9 (3/7)	14.3 (1/7)	22.7 (5/22)
Jun	14.3 (1/7)	57.1 (4/7)	0.0 (0/6)	25.0 (5/20)
Jul	0.0 (0/5)	25.0 (1/4)	0.0 (0/6)	6.7 (1/15)
Aug	0.0 (0/7)	50.0 (2/4)	0.0 (0/6)	11.8 (2/17)
Sep	0.0 (0/7)	0.0 (0/5)	0.0 (0/6)	0.0 (0/18)
Oct	0.0 (0/7)	16.7 (1/6)	0.0 (0/7)	5.0 (1/20)
Nov	16.7 (3/18)	7.7 (1/13)	36.4 (4/11)	19.0 (8/42)
Dec	27.8 (5/18)	22.2 (4/18)	60.0 (9/15)	35.3 (18/51)
Jan-Dec	12.7 (18/142)	39.4 (50/127)	31.8 (41/129)	27.4 (109/398)

¹⁾ Number of positive samples/Number of collected samples

Table 5. Qualitative analysis of NoVs detected in Korean oysters from January 2009 to December 2011

St. No	Spring (March-May)	Summer (Jun-August)	Autumn (September-November)	Winter (December-February)	Total
	Positive Rate ¹⁾	Positive Rate	Positive Rate	Positive Rate	Positive Rate
1	40.0(6/15)	- ²⁾	-	43.8(7/16)	37.1(13/35)
2	13.3(2/15)	37.5(3/8)	18.2(2/11)	35.3(6/17)	25.4(13/51)
3	40.0(6/15)	14.3(1/7)	11.1(1/9)	33.3(6/18)	28.6(14/49)
4	20.0(2/10)	-	-	44.4(8/18)	24.4(10/41)
5	42.9(3/7)	-	18.2(2/11)	27.8(5/18)	23.3(10/43)
6	60.0(3/5)	-	28.6(2/7)	38.9(7/18)	38.7(12/31)
7	27.3(3/11)	33.3(3/9)	9.1(1/11)	52.9(9/17)	33.3(16/48)
8	31.3(5/16)	16.7(1/6)	-	33.3(6/18)	25.0(12/48)
9	26.7(4/15)	-	9.1(1/11)	23.5(4/17)	17.3(9/52)
Total	31.2(34/109)	15.4(8/52)	11.25(9/80)	36.9(58/157)	27.4(109/398)

¹⁾ Positive Rate = positive samples number / corrected samples number x 100

²⁾ -, No samples

3.1.2. 엔테로, 로타, 아스트로 및 A형 간염 바이러스

2010년 1월에서 12월까지 남해안 인근 굴 양식장 9지점에서 총 91개의 참굴을 샘플링 하여 장관계 바이러스 4종(엔테로, 로타, 아스트로 및 A형 간염 바이러스)을 분석하였다. 아스트로바이러스의 경우 4월에 채취된 4번 조사지점의 시료에서만 검출되었으며 1.1% (1/91)의 검출율을 나타내었다. 엔테로, 로타 및 A형 간염 바이러스는 전 시료에서 검출되지 않았다(Table 6). 이러한 바이러스들은 대부분 백신이 개발되어 환자수가 많이 발생하고 있지 않지만 우리나라의 국립보건연구원의 조사결과에 따르면 최근 8년간 환자로부터 로타바이러스는 10.0~15.5%, 아스트로바이러스는 2.0% 미만으로 검출되었다고 보고한 바 있다(Jeng et al., 2017). 또한 굴과 관련된 장관계 바이러스 식중독은 세계 여러나라에서 보고된 바 있으며(Dubois et al., 2004), 우리나라에서는 2011-2012년 시중에 판매되는 굴에서 A형 간염 바이러스가 19.6% (11/56) 검출된 바 있다(Park et al., 2015).

본 연구결과 노로바이러스를 제외한 나머지 바이러스들은 굴에서 검출되지 않았거나 낮은 검출율을 보여 해역에서의 오염은 경미한 수준으로 평가되었지만 환자 발생 유행에 따라 분변이 해역으로 유입될 가능성이 있으므로 앞으로도 지속적인 모니터링이 필요할 것이다.

Table 6. Qualitative analysis of enteric virus detected in Korean oysters from January 2011 to December 2011

St. No	Results											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	ND ¹⁾	- ²⁾	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	<i>Astro</i> ³⁾	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND
6	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	-	-	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

¹⁾ ND, Not detected

²⁾ -, Not analysed

³⁾ Only Astrovirus was detected in a sample

제 2장 굴에서 검출되는 노로바이러스의 유전적 다양성 분석

1. 서론

노로바이러스는 1968년 미국 오하이주 Norwalk 지방의 한 초등학교에서 최초로 발병하였으며, 1972년에 Kapikian 등이 환자의 검체를 전자현미경으로 관찰하여 최초로 발견하였으며 최초 발병한 지방의 명칭을 따라 Nowalk-like virus로 명명되었다 (Donlin et al., 1972). 이 후 이와 유사한 바이러스가 다수 발견되었으며 발견된 지명에 따라 Hawaii virus (Thornhill et al, 1977), Snow mountain virus (Madore et al, 1986)등이 명명되었으며, 유전학적인 해석기술이 발전함에 따라 이러한 바이러스를 총칭하여 2002년에 노로바이러스로 명명하였다.

노로바이러스는 분류학적으로 장관계 바이러스 (Enteric virus) 중 *Caliciviridae*에 속하며 직경은 대략 27 nm 정도이며 외피(Envelope)를 가지고 있지 않다. 약 7.6 kb의 단일 가닥 RNA를 가지고 있으며 이 RNA는 3개의 Open reading frames (ORFs)로 구성된다. ORF 1은 RNA dependent RNA polymerase (RdRp)를 포함하여 6개의 비구조 단백질을 암호화하고 있으며, ORF 2는 major capsid protein (VP1)을 암호화

하고 있으며 VP1은 shell (S) 및 Protruding (P1, P2) domain으로 구성된다. ORF 3은 minor capsid protein (VP2)를 암호화하고 있으나 그 기능은 정확하게 밝혀지지 않았다(Fig. 1., Lopman, 2015).

노로바이러스는 세포배양 기술이 확립되지 않아 항원형 (Serotype)에 따른 분류가 불가능하며 노로바이러스 RNA의 RdRp 및 VP1 유전자의 염기서열 차이에 따라 유전형 (Genotype)이 분류된다. 현재까지 노로바이러스는 크게 7개의 Genogroup (GI-GVII)으로 분류되며 사람에게는 주로 GI, GII 및 GIV가 감염되며 나머지는 동물(소, 개, 양, 돼지 및 개)에게 감염된다고 알려져 있다(Zheng et al., 2006). 또한 이러한 Genogroup은 다수의 Genotype으로 분류 할 수 있으며 32개의 Genotype (GI 9개, GII 19개 및 GIV 1개)이 사람에게 감염된다고 알려져 있다(Fig. 2, Vinje, 2015).

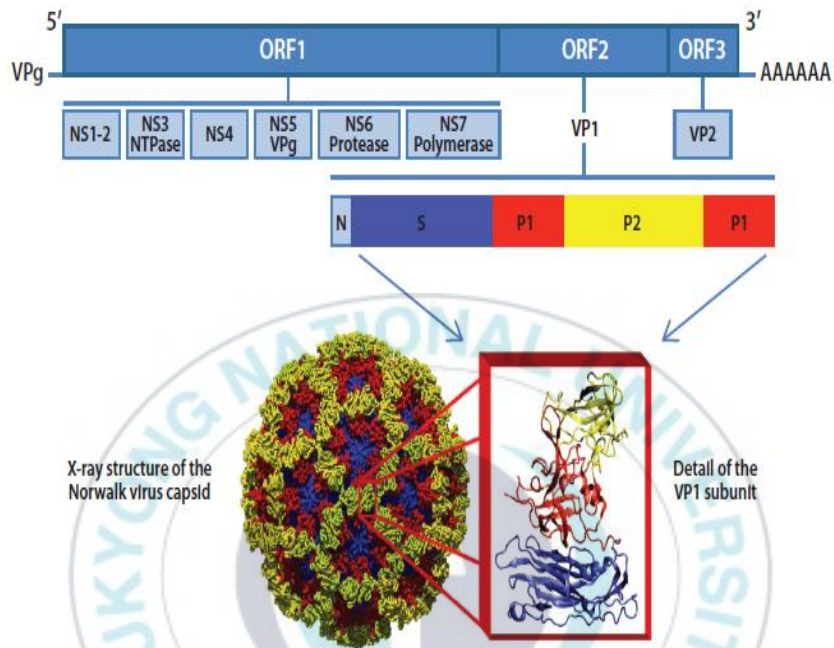


Fig. 1. Human norovirus genome organization and virus encoded nonstructural and structural proteins (Lopman, 2015)

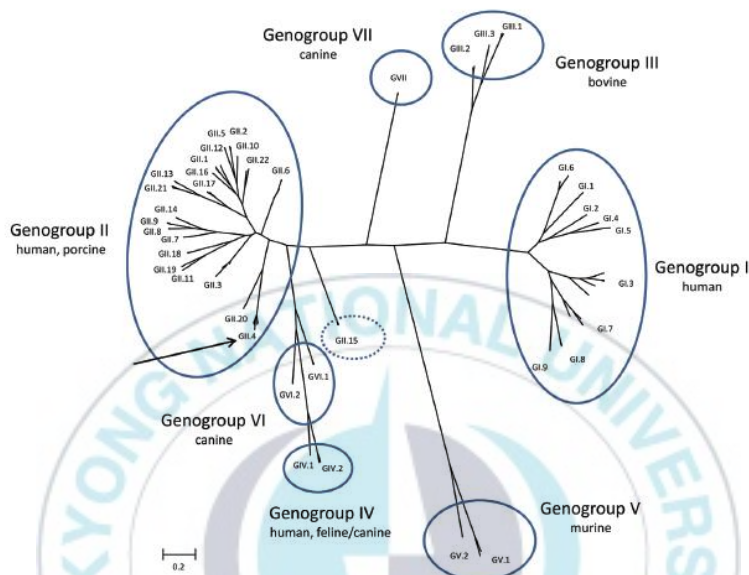


Fig 2. Classification of noroviruses into 7 genogroups (GI to GVII) based on amino acid sequence diversity in the complete VP1 capsid protein (Vinje, 2015).

노로바이러스는 소량의 입자로도 감염이 가능하며 주로 분변-구강(Fecal-oral) 경로로 인체에 감염된다. 또한 환자가 접촉한 매개물이나 오염된 식수 및 어패류 섭취를 통하여 인체에 감염되며, 특히 패류의 경우 서식하는 해역의 해수가 오염될 경우 여과섭식을 통하여 체내에 바이러스를 농축할 수 있다(Beuret et al., 2003).

이들 패류 중 굴은 생굴의 형태로 소비되는 경향이 있고, 다양한 나라에서 소비가 이루어지기 때문에 굴과 관련된 노로바이러스 발생 사례가 일본 등의 여러나라에서 보고된 바 있다(Alfano-Sobsey et al., 2012; Iritani et al., 2014).

우리나라에서는 지하수나 강물 등의 환경 및 유통되고 있는 생식용 굴에서의 노로바이러스 오염은 보고된 바 있으며(Lee and Kim, 2008; Lee et al., 2011; Moon et al., 2011), 본 연구의 제 1장에서는 정기적인 모니터링을 통하여 남해안 굴 생산해역의 노로바이러스 검출 현황을 최초로 보고하였다.

노로바이러스를 검출하는 방법에는 전자현미경(EM), 효소면역측정법(ELISA), RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction)를 이용한 방법이 있으며, 이 중에서 RT-PCR을 통해 바이러스 유전자를 검출하는 방법이 일반적으로 사용되고 있다(Gary et al., 2004; Kageyama et al., 2004).

식중독 발생시 원인 식품 등 오염원 경로를 파악하기 위해서는 검출되는 노로바이러스의 정확한 유전형의 파악이 중요하다. 하지만 RT-PCR을 통한 진단법은 GI 및 GII 등의 Genogroup은 결정할 수 있으나, 노로바이러스의 다양한 Genotype은 결정할 수 없고 정확한 Genotype을 동정하기 위해서는 PCR 산물로부터 Cloning을 통한 염기서열 분석이 수행되어야 한다.

따라서 본 장에서는 1장에서 노로바이러스가 검출된 시료로부터 염기서열 분석을 통하여 노로바이러스의 다양한 유전자형을 결정하였으며, 이러한 분석결과는 노로바이러스 원인식품 구명을 위한 역학조사 및 노로바이러스 오염원 추적 조사에 활용될 것이다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 샘플링

우리나라에서 생산되는 굴은 진해만을 포함하는 남해안에 집중되어 있으며, 도심의 하수가 해역으로 유입될 가능성이 있는 남해안 인근의 굴 양식장을 대상으로 샘플링을 실시하였다(Fig. 3). 2011년 1월에서 2012년 12월까지 남해안 진해만 인근 굴 양식장 6개 지점에서 총 161개의 참굴(*Crassostrea gigas*)을 샘플링 하였으며, 노로바이러스 분석을 위해 냉장상태로 실험실까지 운반하였다. 또한 샘플마다 10개체 이상의 각굴에서 중장선을 분리하였으며, 바이러스 분리 전까지 -20°C 이하에 보관하였다.

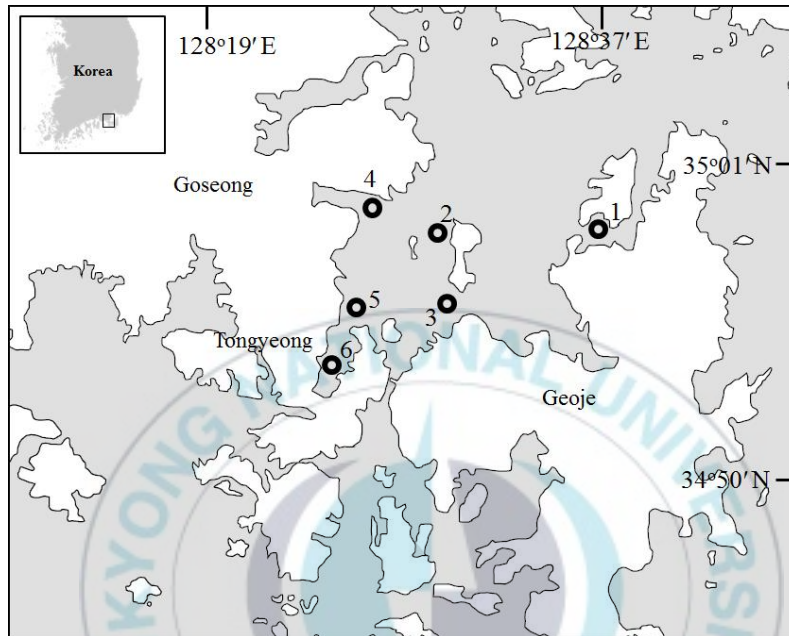


Fig. 3. Location of the sampling sites in this study

2.2. Cloning, sequencing and phylogenetic analysis

굴에서 검출된 노로바이러스의 유전형질을 결정하기 위하여 sequencing을 통한 염기서열 분석 및 계통수 분석을 실시하였다. 우선 본 연구의 1장 재료 및 방법에 따라 굴의 중장선으로부터 바이러스를 분리하고 RNA를 추출한 후 RT-PCR 및 nested PCR을 수행하였다. 최종 PCR 생성물은 1.5%의 Agarose gel상에서 전기영동하여 예상된 크기의 밴드(Fig. 4, GI 314 bp, GII 311 bp)를 확인 한 후 정제를 실시하였다.



Fig 4. Electrophoretic analysis of PCR products obtained by the amplification of Norovirus (Genogroup I and Genogroup II) in oysters. M, 100 bp size maker; (-), Negative control; (+), Positive control

2.1.1. Gel elution

PCR 생성물은 Expin™ Gel SV (Geneall, Korea)를 사용하여 agarose로부터 분리·정제하였다. 먼저 전기영동으로 확인된 gel의 band를 절단하여 새 microtube에 옮긴 후, 절단된 밴드 무게의 3배에 해당하는 binding buffer (GB buffer)를 첨가하였으며 50℃에서 10분간 반응시켜 PCR 생성물이 들어 있는 gel을 녹였다. 이 후 SV column에 반응액을 옮긴 후 8,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 침전된 용액은 제거하였다. 이 후 SV column에 Washing buffer (NW buffer)를 700 uL 첨가하고 30초간 원심 분리하여 침전된 용액을 제거하였다. SV column은 1분간 추가적으로 원심 분리하여 Washing buffer를 완전히 제거하였다. SV column은 새 microtube로 옮겨 elution buffer (EB buffer)를 50 uL 첨가하였으며 1분간 반응 후 원심 분리하여 침전된 용액을 Template로 사용하였다. 정제가 완료된 반응액은 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

2.2.2. Transformation

정제한 DNA는 TOPcloner™ TA Kit (Enzymonics, Korea)를 사용하여 형질전환(Transformation)하였다. 우선 정제한 DNA 4 uL를 새 microtube에 옮긴 후, 6X TOPcloner buffer (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂) 1 uL, TA vector 1 uL를 첨가하여 상온(25 °C)에서 5분간 반응시켰다. 그 뒤에 competent cell (*E. coli* DH5a) 100 uL를 첨가하여 ice에서 20분간 반응시키고, 42°C에서 30초간 heat-shock을 주었다. Heat-shock이 끝나고 즉시 ice에 2분간 옮겼다가 SOC 배지 400 uL를 첨가하여 37°C에서 60분간 진탕 배양하였다. 배양액은 X-Gal 40 uL/mL, ampicillin 50 uL/mL이 첨가된 LB plate에 도말하여 24시간 배양하여 blue와 white colonies가 자라는 것을 관찰하였다.

2.2.3. Plasmid extraction

형질전환된 clone은 Exprep™ plasmid SV (Geneall, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하였으며, 굴에 감염되는 노로바이러스의 유전형이 다양할 수 있으므로 양성 샘플 마다 5개의 clone을 선택하여 plasmid 분리하였다.

먼저 배양된 blue/white colonies 중에서 white colony를 취해, ampicillin 50 mL이 첨가된 LB broth에 접종한 뒤 37°C, 24시간 배양하였다. 배양액 1.5 mL을 microtube에 옮기고 10,000 xg로 10분간 원심 분리하여 균을 침전시킨 후, 상등액의 배지 성분을 제거하였다. 균이 침전된 pellet에 250 uL의 S1 buffer를 첨가하고 vortex하여 완전히 현탁시켰다. 균 현탁액에 250 uL의 S2 buffer를 첨가하고 4번 상하를 뒤집으며 혼합하였다. 이 후로 350 uL의 S3 buffer를 넣고 4~6번 상하를 뒤집으며 혼합하였다. 이 혼합액을 8,000 rpm, 10분간 원심 분리하여, 상정액의 plasmid용액을 SV column에 넣고 30초간 원심 분리하였다. column을 통과한 용액은 제거하였으며, plasmid가 흡착된 column은 500 uL의 AW buffer 및 700 uL의 PW buffer를 각각 첨가하고 원심 분리하여 Washing하였다. column에 남아있는 buffer 성분을 원심분리를 통하여 완전히 제거한 후, 50 uL

의 EB buffer (10 mM TrisCl, pH 8.5)를 첨가하고 1분간 실온에 반응 시킨 후, 1분간 원심 분리하여 column을 통과한 용액을 염기서열 분석을 위한 Plasmid로 사용하였다.

2.2.4. Sequencing 및 염기서열 분석

BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 및 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 및 를 사용하여 분리된 plasmid내에 insertion된 염기 서열을 밝힌 후, 결정된 각 염기서열은 미국 국립생물공학정보센터 (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록된 노로바이러스의 유전자 정보를 참고하여 RIVM (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) (Kronneman et. al., 2011)을 통하여 상동성을 비교하였다. 또한 상동성 분석을 통한 dendrogram은 Mega4 software (version 4.0)을 이용하여 디자인 하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 1장의 노로바이러스가 검출된 109개의 시료 중 24개의 샘플을 Cloning하였으며, 샘플 당 5개의 clone (총 120)을 Sequencing하여 염기서열을 분석하였다.

염기서열 분석결과, 노로바이러스 GI에서는 5개의 유전형 (GI.1, GI.2, GI.5, GI.6, GI.7)이 동정되었으며, GII에서는 7개의 유전형(GII.2, GII.3, GII.4, GII.7, GII.12, GII.13, GII.17)이 동정되었다. 또한, GI에서는 GI.1형(52.6%, 10/19), GII에서는 GII.3 및 GII.4형(각각 30.0%, 6/20)이 가장 유행하는 유전형으로 확인되었다(Tables 1, 2, Fig. 5).

최근 보고에 따르면 GII.4형을 비롯한 GII형이 빈번히 검출되고 있으나(Zheng et al., 2010), 본 조사결과에서는 특이하게 GI.1형이 가장 유행하는 유전형으로 확인되었다.

이러한 결과와 유사하게 패류와 패류와 관련된 감염사례에서 GI형의 유행이 보고된 바 있으며 생활하수나 환경수에서도 GI형의 검출은 보고된 바 있다(Roda et al., 2007; Nishida et al., 2007). 이러한 환경에서의 GI형의 유행은 감염환자의 유행에 따른 오염의 확산이나 패류의 특이적인 결합 성질에 기인한다고 할 수 있다.

Uhrbrand 등은 굴에서 노로바이러스 GI.3이 GII.4보다 많이 축적되는데 이는 이러한 바이러스 유전형이 가지는 광범위한 histo-blood group antigen (HBGA)의 결합 능력에 기인한다고 판단하였다(Uhrbrand et al., 2010).

1990년 중반 이후로 GII.4형이 전 세계적으로 가장 많은 감염증을 유발하였으며, 변이주들 또한 지속적으로 보고되고 있다(Lopman, 2015). 우리나라에서도 GII.4의 변이주들이 출현한 2012년 환자수가 급증한 바 있으며(Jung et al., 2017) 본 연구에서 분석된 굴 샘플에서도 30.0%(6/20) 검출된 바 있다.

본 연구에서 검출된 노로바이러스 GII.4는 RIVM typing tool (Kronneman et al., 2011)을 통하여 특이적인 변이를 재확인하였으며 이들은 우리나라, 미국, 호주 등에서 기존에 보고된 GII.4의 변이주들과 95% 이상의 상동성을 나타내었다(Table 3).

흥미롭게도, 모든 샘플링 사이트의 일부 샘플에서 여러 가지의 노로바이러스 유전자형이 검출되었다. 이처럼 환경에서 노로바이러스의 복합적인 유전형 유행은 일본(Katayama et al., 2002), 한국 (Lee and Kim, 2008) 및 중국(Liu et al., 2010) 등과 같은 아시아 국가에서 보고된 바 있으며 복합적인 유전형의 노로바이러스에 오염된 패류를 섭취함에 따라 질병을 유발한 사례도 보고된 바 있다(Lees, 2000).

본 연구결과 굴에서 검출된 노로바이러스의 유전형을 환자나 자연환경에서 검출된 유전형과 비교한 결과, 굴과 환자 또는 굴과 강물이나 지하수에서 검출되는 유전형이 95% 이상의 상동성을 나타내었으며 이는 도심이나 상업지역에서 패류와 물이 바이러스 전염을 위한 잠재적 매개물이 될 수 있음을 나타낸다. 또한 본 연구에서 동정된 GII.7 및 GII.17의 염기서열은 우리나라의 환경에서 검출된 유전형들과는 상동성이 다소 낮았지만, 일본이나 중국에서 보고된 유전형보다는 높은 상동성을 나타내었다(Katayama et al., 2002; Liu et al., 2010).

아울러 다양한 유전형의 노로바이러스의 유행이 우리나라에서 보고된 바 있으며(Kim et al., 2010) 이러한 노로바이러스 유전형 유행의 변화 때문에 노로바이러스 감염 환자의 치료와 해역이나 환경으로 바이러스의 배출을 예방하기가 어려운 실정이다. 굴을 포함하는 패류에서 노로바이러스를 제거하거나 불활성화시키는 방법은 여러 가지 제안되었지만 세포배양이 불가능하여 이를 증명하기는 어려운 실정이다(Koopmans and Duizer, 2004). 굴 소비로 인한 노로바이러스 감염에 대한 가장 효과적인 조절은 굴 생산해역에서 분변 오염을 방지하거나 오염된 해역에서의 굴 수확을 제한하는 것이며(European Food Safety Authority, 2012), 분변 오염을 방지하기 위해서는 노로바이러스

의 오염경로를 파악하여 해역으로의 노로바이러스 배출을 감소시켜야 하며 이를 위해서는 검출되는 바이러스의 정량분석이 요구된다.

본 연구결과는 우리나라 남해안 패류생산해역의 노로바이러스 오염현황에 대한 최초의 보고이며, 이러한 결과들은 굴과 관련된 환자발생의 위해를 평가하는 자료로 활용될 수 있을 것이다.



Table 1. Detection of NoVs in oysters collected at six sampling sites in Jinhae Bay, Korea

No	Name	Date	Site	PCR results	Sequencing results
1	JBP1-1	19/APR/2010	1	GI	GI.1
2	JBP1-2	19/APR/2010	1	GI	GI.6
3	JBP1-3	19/APR/2010	1	GI	GI.5
4	JBP1-4	3/MAY/2010	1	GI	GI.1
5	JBP1-5	3/MAY/2010	1	GI	GI.5
6	JBP1-6	10/JAN/2011	1	GII	GII.3
7	JBP1-7	24/JAN/2011	1	GI	GI.1
8	JBP1-8	24/JAN/2011	1	GII	GII.3
9	JBP1-9	24/JAN/2011	1	GII	GII.13
10	JBP2-1	5/APR/2010	2	GII	GII.7
11	JBP2-2	19/APR/2010	2	GI	GI.7
12	JBP2-3	22/JUN/2010	2	GI	GI.6
13	JBP2-4	21/FEB/2011	2	GI	GI.1
14	JBP2-5	21/FEB/2011	2	GII	GII.2
15	JBP2-6	21/FEB/2011	2	GII	GII.12
16	JBP3-1	5/APR/2010	3	GII	GII.4
17	JBP3-2	19/APR/2010	3	GII	GII.4
18	JBP3-3	3/MAY/2010	3	GI	GI.1
19	JBP3-4	22/JUN/2010	3	GII	GII.4
20	JBP3-5	10/JAN/2011	3	GII	GII.4
21	JBP3-6	10/JAN/2011	3	GII	GII.17
22	JBP3-7	24/JAN/2011	3	GII	GII.3
23	JBP4-1	8/FEB/2010	4	GI	GI.1
24	JBP4-2	8/FEB/2010	4	GI	GI.2
25	JBP4-3	10/JAN/2011	4	GI	GI.1
26	JBP4-4	10/JAN/2011	4	GII	GII.4
27	JBP4-5	10/JAN/2011	4	GII	GII.12
28	JBP4-6	24/JAN/2011	4	GI	GI.7
29	JBP4-7	24/JAN/2011	4	GI	GI.5
30	JBP4-8	21/FEB/2011	4	GII	GII.3

Table 1. Continued

No	Name	Date	Site	PCR results	Sequencing results
31	JBP5-1	8/FEB/2010	5	GI	GI.1
32	JBP5-2	8/FEB/2010	5	GI	GI.2
33	JBP5-3	24/JAN/2011	5	GI	GI.1
34	JBP5-4	24/JAN/2011	5	GII	GII.3
35	JBP5-5	7/FEB/2011	5	GII	GII.12
36	JBP6-1	22/MAR/2010	6	GII	GII.12
37	JBP6-2	15/DEC/2010	6	GII	GII.3
38	JBP6-3	24/JAN/2011	6	GI	GI.1
39	JBP6-4	24/JAN/2011	6	GII	GII.4

Table 2. Distribution of NoV genotypes in oysters collected at six sampling sites in Jinhae Bay, Korea

Sampling sites(S) ^a	NoV Genotype(S) ^a
1(7)	GI.1(1), GII.3(1), GII.4(4), GII.11(1)
2(9)	GI.1(3), GI.8(1), GI.9(2), GII.3(2), GII.14(1)
3(6)	GI.1(1), GI.7(1), GI.8(1), GII.2(1), GII.7(1), GII.12(1)
4(8)	GI.1(2), GI.2(1), GI.7(1), GI.9(1), GII.3(1), GII.4(1), GII.12(1)
5(5)	GI.1(2), GI.2(1), GII.3(1), GII.12(1)
6(4)	GI.1(1), GII.3(1), GII.4(1), GII.12(1)
Total(39)	GI.1(10), GI.2(2), GI.7(2), GI.8(1), GI.9(3) GII.2(1), GII.3(6), GII.4(6), GII.7(1), GII.11(1), GII.12(4), GII.14(1), GII.17(1)

¹⁾ The number of PCR clones obtained for a particular genotype.

Table 3. Conforming of GII.4 variants identified in this study

Sample name	Identity(%)	Reference ¹⁾
JBP3-2	97.0	2009/JN595867
JBP3-5	96.6	2009/JN595867
JBP6-4	96.6	2009/JN595867
JBP3-1	98.1	2007EU/HQ009513
JBP3-4	98.9	2006b/EF684915
JBP4-4	98.1	2009/JN400623

¹⁾ Genbank accession number (National Center for Biotechnology Information)

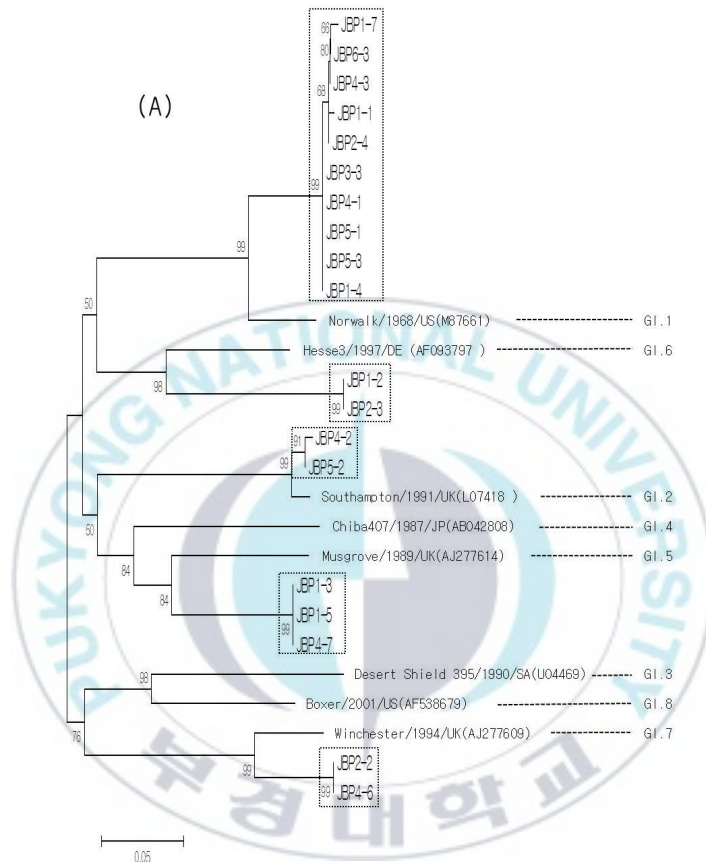


Fig. 5. Phylogenetic analysis of NoVs isolated from Korean oyster. Phylograms based on partial sequences of the VP1 genes (within ORF2, encoding the capsid protein) of GI NoV strains (A) and GII NoV strains (B). The tree was constructed using the neighbor-joining method with the Kimura 2-parameter correction implemented in the Mega4 program. Statistical support was obtained by bootstrap analysis (1000 replicates).

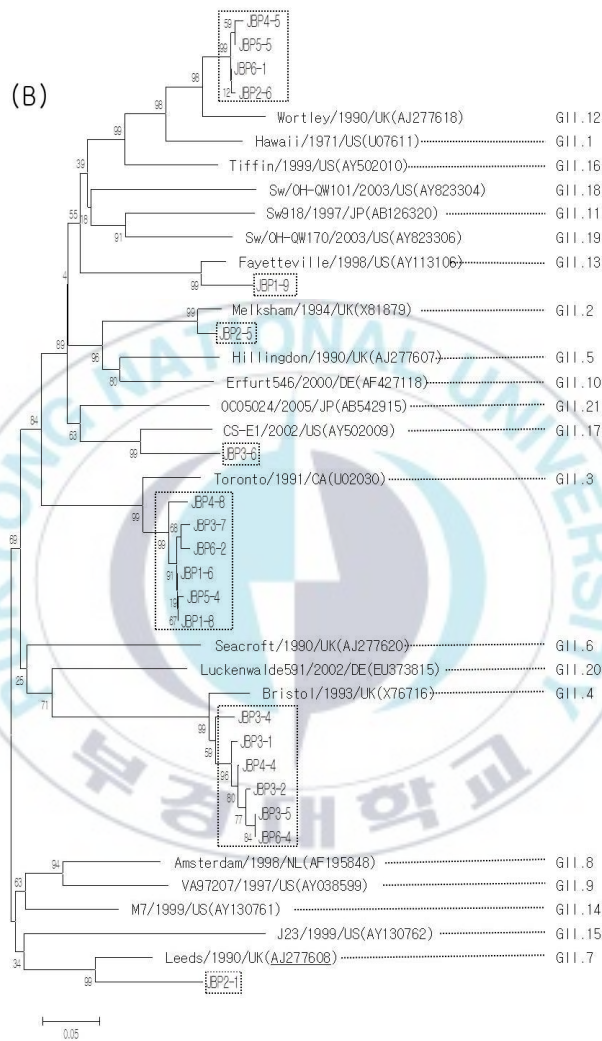


Fig. 5. Continued

제 3장 굴에 축적되는 노로바이러스의 농도에 관한 고찰

1. 서론

우리나라에서는 식중독 발생의 역학조사가 부족하여 굴 섭취로 인한 노로바이러스 식중독 발생 사례는 아직 보고된 바 없지만, 해역에서 생산·유통되는 굴에 대한 노로바이러스 검출 사례는 보고된 바 있다(Moon et al., 2011). 하지만 이러한 보고들은 RT-PCR을 이용하여 바이러스 유전자를 검출한 결과로 노로바이러스의 정성분석만을 보고하였다. 노로바이러스는 숙주세포를 이용한 배양기술이 개발되지 않아 RT-PCR을 이용한 유전자 검사법이 일반적인 방법이지만, 시간 소모가 많고 정량분석이 불가능하다는 단점이 있어 최근에는 형광물질을 이용하여 유전자 증폭과정을 실시간으로 모니터 하는 real-time RT-PCR이 많이 사용되고 있다(Patel et al., 2009).

본 연구에서는 우리나라 굴의 주 생산지인 남해안에서 분변오염 정도가 높은 것으로 확인된 통영시 인평동 인근의 굴 양식장을 대상으로 2012년 1월부터 12월까지 1년간 노로바이러스에 대한 모니터링을 실시하였으며, real-time RT-PCR을 이용하여 바이러스 유전자를 정량적으로 분석하였다.

또한 분변오염 정도가 높은 지역에 자연감염을 통하여 굴에 축

적되는 노로바이러스의 농도변화를 관찰하였으며 노로바이러스가 감염된 굴의 가열처리 조건을 구명하고자 가열처리 조건에 따른 바이러스 감소율을 측정하였다.

이러한 연구결과들은 노로바이러스 위해평가 및 식품에서의 노로바이러스 정량기준 설정에 관한 기초자료로 활용될 것이다.



2. 재료 및 방법

2.1. 시료 샘플링

우리나라에서 생산되는 굴은 남해안에 집중되어 있으며, 도심의 하수가 해역으로 유입될 가능성이 큰 통영시 인근의 굴 양식장을 대상으로 샘플링을 실시하였다(Fig. 1). 2012년 1월에서 12월까지 경상남도 통영시 인평동 인근 굴 양식장 1지점에서 총 21개의 참굴(*Crassostrea gigas*)을 샘플링 하였으며, 노로바이러스 분석을 위해 냉장상태로 실험실까지 운반하였다. 또한 샘플마다 10개체 이상의 각굴에서 중장선을 분리하였으며, 바이러스 분리전까지 -20°C 이하에 보관하였다.

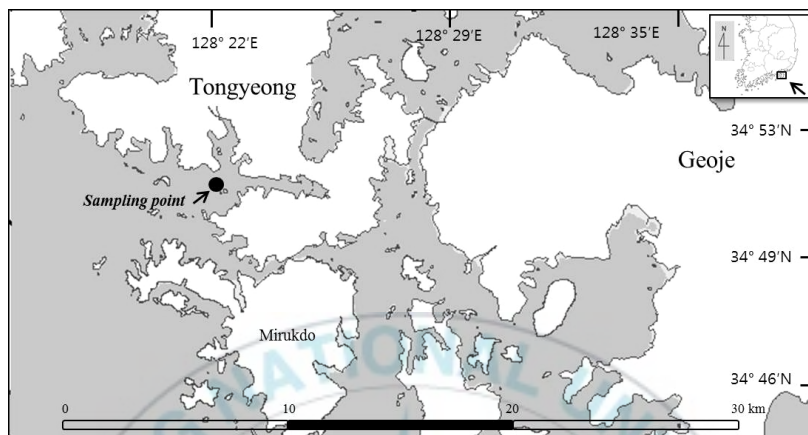


Fig. 1. Location of the sampling sites in Tongyeong city, Korea

2.2. 굴의 인위감염 및 가열처리에 따른 노로바이러스 농도변화

오염물질에 노출된 패류의 바이러스 축적정도를 파악하기 위하여 Naturally-contamination 방법을 이용하여 인위적으로 감염시켰다(Oh et al., 2012).

즉, 경남 통영시 일원에서 채취한 참굴(*Crassostrea gigas*) 및 지중해 담치(*Mytilus galloprovincialis*)을 사각 채룽에 일정량씩 넣고 분변지표 생물인 분변계대장균의 농도가 높은 것으로 확인된 부산시 용호동 해상구조물에 시설하여 30일 동안 24시간 마다 위생지표세균 및 노로바이러스의 농도를 분석하였다.

가열처리는 굴을 가열하여 섭취할 경우 굴에 미칠 수 있는 온도 및 바이러스의 외피단백질에 손상을 미칠 수 있는 온도 등을 고려하여 60, 68, 70 및 100℃의 4개의 구간으로 설정하였으며, 각각 15분간 항온수조에 오염된 굴을 반응시켰다(Alfano-Sobsey et al., 2012; Nuanualsuwan et al., 2002). 오염된 굴은 패각을 분리하여 알굴 상태로 가열처리를 실시하였으며, 처리 후 즉시 노로바이러스 분석을 실시하였다.

2.3. 위생지표세균 분석

패류의 대장균군, 분변계대장균 및 일반세균수 분석은 Recommended Procedures for the Examination of Sea water and Shellfish (APHA, 1970)에 따라서 실험하였다. 우선 12개체 이상의 패류에서 200 g 이상의 패액을 포함한 패육을 분리하여 동량의 PBS (Merck, Germany)를 첨가한 후 마쇄하였다. 2 mL의 마쇄액 (시료 1.0 g)을 Lauryl tryptose broth (Difco, USA)가 함유된 5개 시험관에 접종하였으며 단계희석을 통하여 0.1 g과 0.01 g의 시료를 각각 5개의 시험관에 접종하였다. 접종된 시험관은 $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 24 ± 2 및 48 ± 3 시간 배양 후 양성으로 판정된 시험관을 선택하여 확정시험을 실시하였다. 즉 가스 생성이 확인된 시험관을 대장균군 확인용 배지인 Brilliant Green Bile (2%) broth (Difco, USA) 및 분변계대장균 확인용 배지인 EC broth (Difco, USA)에 일회용 Loop를 사용하여 재접종하여 $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 24~48시간 및 $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 각각 배양하였다. 가스 생성이 확인된 시험관을 최종적으로 대장균군 및 분변계대장균의 양성으로 확인하였으며 결과는 100 g당 최확수(Most Probable Number, MPN)로 표시하였다.

2.4. 노로바이러스 분석

2.4.1. Virus extraction 및 RNA extraction

굴에서 노로바이러스 분리는 Jothikumar et al. (2005)을 일부 변형하여 사용하였다. 즉 분리된 중장선에 3 g에 동량의 300 ug/mL Proteinase K solution (Promega, USA)을 첨가하였으며, 호모게나이저를 사용하여 완전히 균질화하였다. 균질화된 샘플은 37℃, 320 rpm의 조건으로 1시간 반응시킨 후 Proteinase K의 불활성화를 위하여 65℃에서 15분간 추가로 반응시켰다. 반응액은 6,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액을 RNA 추출에 사용하였다. 자연감염을 통해 노로바이러스가 검출된 샘플을 양성 대조군으로 사용하여 실험의 신뢰성을 확보하였다.

RNA 추출에는 Vial RNA mini kit (QIAgen, USA)을 사용하였다. 샘플 300 uL에 AVL buffer (Guanidine thiocyanate 함유) 1,120 uL를 첨가하여 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 반응액에 95~100% 에탄올 1,120 uL을 첨가하여 혼합하였으며, 혼합액을 630 uL를 spin column tube로 옮겨 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 남은 혼합액을 동일한 방법으로 처리한 후, 동일한 spin column tube에 AW1 buffer (Guanidine

hydrochloride 함유) 500 uL를 첨가하여 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 또한 AW2 buffer (Sodium azide 함유) 500 uL를 각각 첨가하여 12,000 g에서 3분간 원심분리하였으며, 원심분리 후 spin column에 걸러진 용액은 제거하였다. 다음으로 spin column을 새로운 tube로 옮긴 후 AVE buffer (sodium azide 및 poly A 함유)을 60 uL를 넣고 1분간 반응시켰다. 마지막으로 8,000 rpm로 1분간 원심분리하여 realtime RT-PCR을 수행하기 위한 template로 사용하였다.

2.4.2. 표준곡선 산출

노로바이러스 유전자의 정량분석을 위한 표준곡선은 pET30a vector에 해당 유전자의 sequence (GI형 96 bp, GII형 98 bp)를 삽입하여 제작된 plasmid DNA (Tarara, Korea)를 이용하였다. plasmid DNA는 GI형과 GII형 각각 $10^6 \sim 10^2$ copies/reaction 농도로 희석한 후 realtime RT-PCR을 실시하였으며, Thermal cycler dice realtime software (Takara, Japan)을 이용하여 표준곡선을 산출하였다.

2.4.3. Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR 반응을 위하여 OneStep RT-PCR kit (QIAGEN, USA) 및 RNase inhibitor (Ambion, USA) 시약을 사용하였다. 폴리오마바이러스의 RNA를 Internal control RNA (IC, US FDA)로 첨가하여 반응이 적절히 이루어지는지 확인하였으며 음성대조군으로 RNase-free water를 사용하여 실험의 신뢰성을 확보하였다.

5 units/uL Enzyme Mix 1 uL, 5X RT buffer 5 uL, 10 mM dNTP 1 uL, 25 mM MgCl 20.75 uL, 5units/uL RNase inhibitor 0.25 uL, 10 μ M primer 1uL, 10 μ M IC primer 0.5 uL, 10 μ M probe 0.5 uL, IC RNA 1 uL 및 template RNA 5 uL로 반응액을 조성한 후, DW를 첨가하여 최종적으로 25 uL의 반응액을 조성하였다. 반응조건으로 50°C 50분간 역전사 반응 후, 95°C에서 15분간 DNA를 변성하였다. 이 후 95°C 10초, 53°C 25초 및 62°C 70초간 반응을 45 cycle 반응시켰으며, PCR 반응은 Thermal cycler dice TP800 (Takara, Japan)를 이용하였다. 본 연구에 사용된 primer 및 probe는 Kageyama et al. (2003) (Table 1)을 참고로 하였으며 probe는 노로바이러스 및 IC에 FAM-TAMRA detector와 ROX-BHQ2 detector 적용하였다.

GI형 및 GII형 각각에 IC를 첨가하여 duplex real-time RT-PCR을 실시하였으며 샘플마다 3회의 PCR 반응을 실시하였다.



Table 1. Primers and probes used in this study

Genogroup	Type	Name	Sequence(5'-3') ¹⁾	Location ²⁾
GI	(+) primer	COG1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	5287-5306
	(-) primer	COG1R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C	5371-5350
	Probe	RING1(a)-TP	AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA	5325-5344
GII	(+) primer	COG2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	4999-5024
	(-) primer	COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	5096-5076
	Probe	RING2(a)-TP	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT	5044-5063

¹⁾ Degenerate positions B:T/G/C, D:A/G/T, H:A/T/C, K:T/G, M:A/C, N:A/T/G/C, R:A/G, W:A/T, Y:T/C.

²⁾ Relative positions of primers and probes in Norwalk/68/US (accession no. M87661) and Lordsdale/93/UK (accession no. X8655).

3. 결과 및 고찰

3.1. 전처리법의 간소화 및 Real-time RT-PCR

노로바이러스는 숙주세포에 의한 인공배양법이 개발되지 않아, 현재 널리 이용되는 검출방법은 일반적 RT-PCR을 이용한 유전자 분석법이다. RT-PCR법에 따른 노로바이러스 검출법은 2회 이상의 PCR 반응 및 agarose를 이용한 전기영동을 수행해야 하는 번거로움이 따르고 정량분석이 불가능하다는 단점이 있다. Realtime RT-PCR은 이러한 단점을 보완하기에 적합한 분석법으로 기존의 RT-PCR에 형광물질의 probe를 적용하여 단 시간에 결과를 모니터링할 수 있고, 정량분석이 가능한 장점이 있어 최근 Realtime RT-PCR을 적용한 노로바이러스 분석법이 유럽의 국제표준(International Organization for standardization, ISO)으로 등재된 바 있다(ISO/TS 15216-1, 2013).

또한 10~25 g의 패류의 중장선으로부터 threonine, glycine, PEG 6000이용하여 바이러스를 분리하는 기존의 방법은 시간이 많이 소모될 뿐 아니라 교차오염의 가능성이 높아 본 연구에서는 중장선 3 g에 동량의 300 µg/mL Proteinase K solution을 첨가하는 방식으로 개선하였으며, 이는 ISO 및 한국의 식품의

약품안전처에도 적용하고 있다. 따라서 이러한 개선된 방법을 정량분석에 적용하기에 앞서 기존의 전처리를 통한 일반적 RT-PCR과 개선된 전처리 방법을 통한 Real-time PCR 방법을 비교하였다. 총 34개의 패류 샘플(굴 13, 지중해 담치 11)에서 분석방법을 비교한 결과는 Table 2와 Fig. 2에 나타내었다.

기존의 방법은 44.1 % (15/34)의 검출율을 나타낸 반면 개선된 방법은 70.6% (24/34)의 검출율을 나타내었다. 굴과 지중해 담치 모두 개선된 방법에 따른 검출율이 높게 나타났으며, 노로 바이러스 GI과 GII 모두 개선된 방법에 따른 검출율이 높게 나타났다.

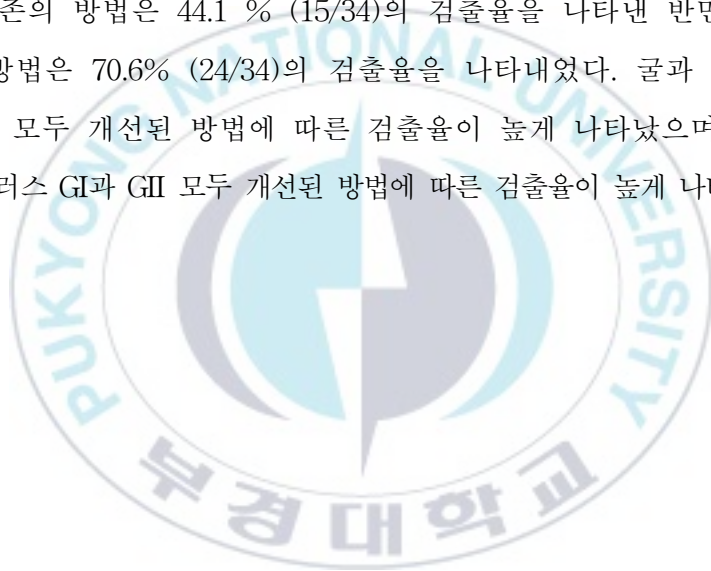
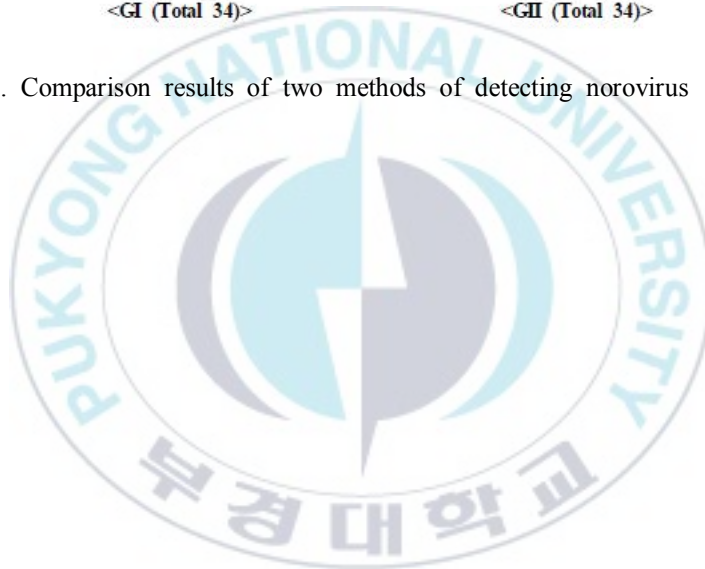


Table 2. Comparison results of two methods of detecting norovirus

No.	Shellfish	Results	
		RT-nested PCR	Realtime RT-PCR
O-1	Oyster	ND	G1/G2
O-2	Oyster	ND	G2
O-3	Oyster	G2	ND
O-4	Oyster	G2	G2
O-5	Oyster	G2	G2
O-6	Oyster	ND	ND
O-7	Oyster	G2	G2
O-8	Oyster	G2	ND
O-9	Oyster	G1	G1/G2
O-10	Oyster	ND	ND
O-11	Oyster	G1	G1/G2
O-12	Oyster	G1	G2
O-13	Oyster	ND	ND
O-14	Oyster	G1	ND
O-15	Oyster	ND	G1/G2
O-16	Oyster	G1	ND
O-17	Oyster	ND	ND
O-18	Oyster	ND	G2
O-19	Oyster	ND	G1
O-20	Oyster	ND	G1/G2
O-21	Oyster	ND	G2
O-22	Oyster	ND	G1/G2
O-23	Oyster	ND	G2
M-1	Mussel	G2	G1/G2
M-2	Mussel	G2	G1/G2
M-3	Mussel	G1/G2	G1/G2
M-4	Mussel	ND	G1/G2
M-5	Mussel	ND	G1/G2
M-6	Mussel	G2	G1/G2
M-7	Mussel	ND	ND
M-8	Mussel	ND	G1/G2
M-9	Mussel	ND	ND
M-10	Mussel	ND	G1/G2
Detecti on rate	Oyster	10/23(43.5%)	15/23(65.2%)
	Mussel	5/11(45.5%)	9/11(81.8%)
	Total	15/34(44.1%)	24/34(70.6%)

		Real time	
		+	-
RT-nested	+	3	3
	-	13	15
<GI (Total 34)>			
		Real time	
		+	-
RT-nested	+	7	3
	-	15	9
<GII (Total 34)>			

Fig 2. Comparison results of two methods of detecting norovirus



3.2. Realtime RT-PCR을 이용한 노로바이러스 검출 및 정량분석

본 연구에서는 선행연구의 정성분석 결과를 보완하고자 realtime RT-PCR을 적용하였으며, 통영시 인평동 인근의 양식장 1지점에서 2012년 1월부터 12월까지 21회에 걸쳐 굴을 샘플링하여 노로바이러스를 분석하였다. 대상지점은 연중 분변오염 정도가 높은 것으로 확인되어(Shim et al., 2009; Oh et al., 2012), 인체의 분변에 기인하는 노로바이러스 또한 오염될 가능성이 클 것으로 판단되었다.

모니터링 결과, 2012년 1월에서 12월까지 총 21개의 샘플 중 8개의 샘플에서 노로바이러스가 검출되어 38% (8/21)의 검출율을 나타내었다. 유전형별로는 GI형이 24% (5/21), GII형이 29% (6/21)의 검출율을 나타내었으며, 14% (3/21)의 샘플에서 GI형과 GII형이 동시에 검출되었다. 시기별로는 1~5월, 12월에 집중적으로 검출되는 경향을 나타내었다(Table 3).

노로바이러스 정량분석을 위한 표준곡선은 GI 및 GII형 plasmid DNA를 각각 $10^6 \sim 10^2$ copies/reaction로 희석하여 분석하였다. 표준곡선의 선형분석 결과, GI형은 상관계수(R²) 0.999, 기울기가 -3.286으로 나타났으며, GII형의 경우 상관계수(R²)

0.998, 기울기는 - 3.348로 나타났다(Fig. 3, 4). 표준곡선에 realtime RT-PCR 결과의 Ct value를 대입하여 샘플의 노로바이러스 농도를 정량하였으며, 분석된 샘플의 최종 결과 값은 샘플당 3회 실험결과의 평균으로 나타내었다.

분석결과 노로바이러스가 검출된 샘플의 Ct value는 GI형이 37.43~39.41, GII형이 36.77~39.30로 나타났으며, 이를 표준곡선에 대입하여 계산된 노로바이러스의 농도는 GI형이 $8.97 \times 10^2 \sim 2.24 \times 10^2$, GII형이 $3.05 \times 10^2 \sim 7.47 \times 10^1$ copies/g으로 나타났다. 가장 높은 농도로 검출된 샘플은 GI형이 8.97×10^2 copies/g으로 검출되었으며 가장 낮은 농도로 검출된 샘플은 GII형이 7.47×10^1 copies/g으로 검출되었다. 모든 샘플이 10^3 copies/g이하의 농도에서 검출되었으며, 10^2 copies/g보다 낮은 농도로 검출된 샘플이 9.5% (2/21)로 확인되었다. (Table 2).

이와 유사한 연구로 영국의 자료에 따르면 2009년부터 3년간 영국에서 생산된 굴의 76% (643/844)가 노로바이러스에 오염된 것으로 나타났으며, 바이러스의 농도는 10^2 copies/g이상이 36.5%이며 10^3 copies/g이상이 24.9%로 보고한 바 있다(EFSA, 2012). 노로바이러스 식중독은 감염환자의 분변이 환경이나 식품 등을 오염시키고, 오염된 환경이나 식품을 통하여 환자가 발생하는 순환고리를 형성하고 있다. 이러한 원인들 중 인축의 분변에 오

염된 해역에서 생산된 패류는 노로바이러스 식중독의 매개체 역할을 할 가능성이 크며, 패류 중에서도 생굴섭취가 많은 굴에 의한 노로바이러스 식중독 사고가 일본을 포함한 여러나라에서 보고된 바 있다(Alfano-Sobsey et al., 2012; Iritani et al., 2014). 우리나라에서는 노로바이러스 식중독과 원인식품과의 상관관계에 대한 역학조사에 대한 보고가 부족하여 굴 섭취로 인한 노로바이러스 식중독 또한 보고된 바가 없다. 하지만 최근 오염된 해역에서 생산된 파래(*Enteromorpha* spp)에 의한 노로바이러스 식중독 사고가 보고된 바 있으며, 우리나라 해역에서 생산·유통되는 굴에서 노로바이러스가 검출된 사례가 있으므로 우리나라에서도 굴이 노로바이러스 식중독의 매개체 역할을 가능성이 크다(Moon et al., 2011; Park et al., 2014).

이전 보고에 따르면 굴과 관련된 노로바이러스 감염증 발생 시 굴에서 대다수 복합적인 유전형이 검출되었으며 확인된 노로바이러스의 농도 또한 다양하다. GI.1형이 85-237 copies/g으로 검출된 굴 및 GII.4형이 25-125 copies/g으로 검출된 굴 등 다양한 농도의 단일 또는 복합적인 유전형이 감염된 굴을 섭취함으로써 환자 발생이 보고된 바 있다(Le Guyader et al., 2006; ESFA, 2012). 이러한 결과들은 굴과 같은 식품에서 노로바이러스의 정량기준 설정에 필수적인 데이터들이며 본 연구 결과 또

한 이러한 정량기준 설정에 기초적인 자료로 활용 될 수 있을 것이다.

또한 본 연구에서의 샘플링 지점은 분변오염정도가 높은 곳임을 고려하면 검출된 노로바이러스의 농도가 높지 않은 것으로 판단할 수 있으나, 이러한 결과는 단기간의 국소적인 결과이므로 우리나라에서 굴이 생산되는 해역에 대한 집중적인 조사가 필요할 것으로 판단된다.



Table 2. Quantitative analysis of NoVs detected in Korean oysters in 2012

Sampling Date	Genogroup I		Genogroup II	
	Ct value	Avg Concn ²⁾ (Copies/g)	Ct value	Avg Concn (Copies/g)
2/Jan/2012	37.43 ± 0.00	8.97 x 10 ²	ND	ND
9/Jan/2012	ND ¹⁾	ND	ND	ND
30/Jan/2012	ND	ND	ND	ND
13/Feb/2012	ND	ND	39.30 ± 2.12	7.47 x 10 ¹
20/Feb/2012	ND	ND	ND	ND
27/Feb/2012	ND	ND	ND	ND
12/Mar/2012	ND	ND	38.62 ± 0.35	8.53 x 10 ¹
09/Apr/2012	ND	ND	ND	ND
16/Apr/2012	38.93 ± 0.00	3.14 x 10 ²	38.10 ± 0.48	1.23 x 10 ²
23/Apr/2012	39.40 ± 0.71	2.38 x 10 ²	36.77 ± 0.21	3.05 x 10 ²
30/Apr/2012	39.41 ± 0.00	2.24 x 10 ²	ND	ND
16/May/2012	37.91 ± 0.00	6.41 x 10 ²	38.07 ± 0.20	1.26 x 10 ²
12/Jun/2012	ND	ND	ND	ND
10/Jul/2012	ND	ND	ND	ND
21/Aug/2012	ND	ND	ND	ND
04/Sep/2012	ND	ND	ND	ND
23/Oct/2012	ND	ND	ND	ND
15/Nov/2012	ND	ND	ND	ND
04/Dec/2012	ND	ND	ND	ND
24/Dec/2012	ND	ND	ND	ND
30/Dec/2012	ND	ND	37.12 ± 0.44	2.55 x 10 ²

¹⁾ ND, Not detected

²⁾ Avg Concn, Average concentration of 3 times results

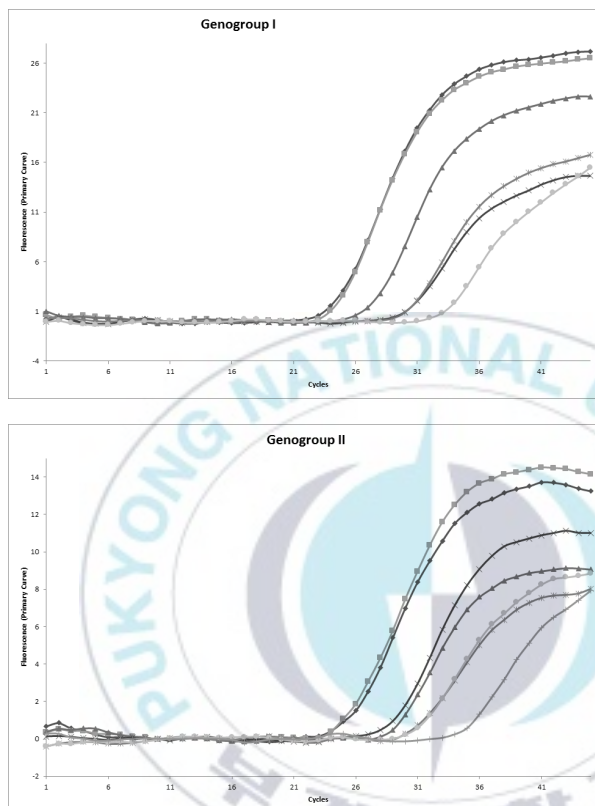


Fig. 3. Standard curve amplification plots used realtime PCR ($10^6 \sim 10^2$ copies/reaction)

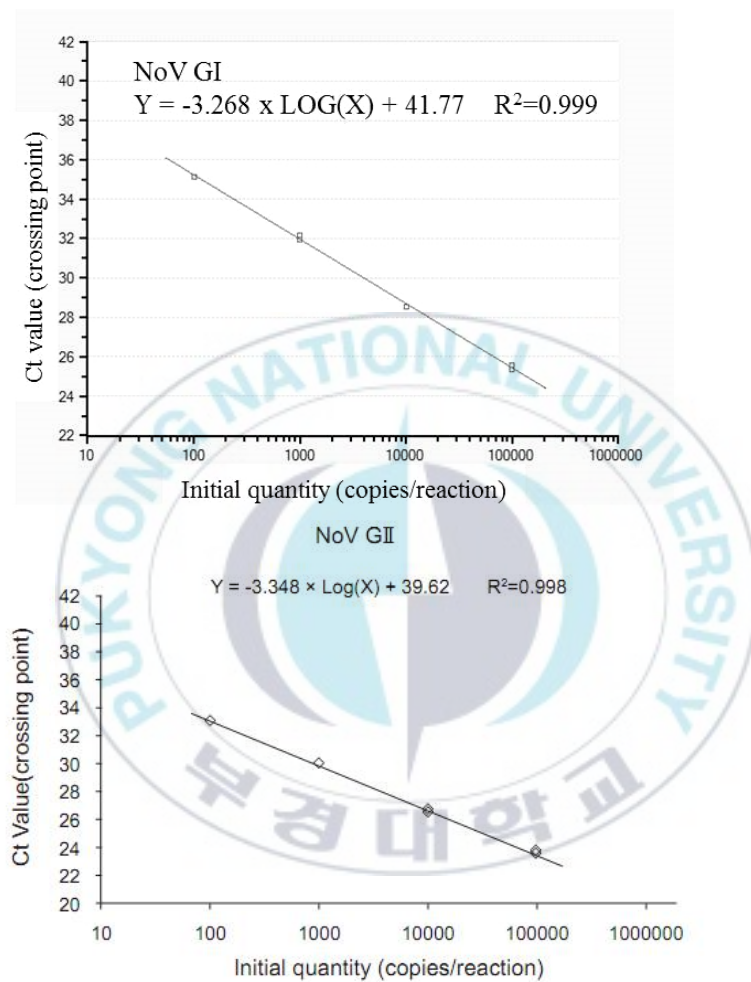


Fig. 5. Standard curves for GI and GII plasmid standards ($10^6 \sim 10^2$ copies/reaction).

3.3. 자연감염을 통한 노로바이러스의 농도변화

오염물질에 노출된 패류의 바이러스 축적정도를 파악하기 위하여 Naturally-contamination 방법을 이용하여 인위적으로 감염시켰으며, 30일 동안 바이러스 농도를 측정하였다. 아울러 분변 오염의 측정 지표로 대장균군 및 분변계대장균 농도를 함께 측정하였다.

자연감염을 유도한 지역 해수의 대장균군 및 분변계대장균의 농도는 490~13,000 및 490~7,900 MPN/100 mL로 분변 오염물질이 지속적으로 유입되는 것으로 확인되었다. 굴과 지중해 담치는 이러한 오염물질에 지속적으로 노출됨에 따라 조사 기간 중 대장균군 및 분변계대장균이 굴에서 3,300~49,000, 1,300~13,000, 지중해 담치에서 3300~170,000, 2,400~13,000 MPN/100 g로 검출되었다. 즉 굴은 해수의 대장균을 0.7~71.4배, 분변계대장균을 0.7~56.4배 정도로 축적하였으며, 지중해 담치는 대장균을 0.7~346.9배, 분변계대장균을 0.4~23.6배 정도로 축적하였다(Table 3). 이는 이전에 보고된 자료와 유사한 결과로 이전의 보고에 따르면 패류에서 세균축적농도가 3-5시간에 최고치를 나타내었으며 해수 농도의 50-100배 정도의 양을 축적하였다고 한다(Bella et al., 2000). 또한 Dore and Lees (1995)는 패류를

1-3주의 단기간과 6개월 이상의 장기간 패류를 오염물질에 노출시킨 결과, 기간에 관계없이 초기에 세균함량이 급격하게 증가하였으며 지속적으로 세균함량이 유지되어지는 것으로 보고하였다.

하지만 본 연구결과 굴과 지중해 담치 모두 분변오염 물질에 노출됨에 따라 대장균 및 분변계대장균의 농도가 지속적으로 증가한 것이 아니라 감소와 증가를 반복하였다. Oh 등(2012)에 따르면 굴과 바지락을 이용한 자연정화(relaying) 시험결과, 초기 분변계대장균의 값이 약 2,000 MPN/100 g 정도로 오염된 패류의 경우 위생학적으로 양호한 수질을 나타내는 해역에서 1일 이상 정화처리를 하면 약 94%정도 제거(배출)된다고 보고하였으며, 본 연구결과에서처럼 위생지표세균이 증가와 감소를 반복하는 것은 오염물질의 축적과 동시에 배출이 동시에 진행됨을 나타내는 결과라고 할 수 있다.

자연감염을 통한 노로바이러스의 농도변화는 Real-time RT-PCR을 통하여 정량적분석하였다(Fig 3). 굴에서의 검출된 노로바이러스 농도는 GI, $6.91 \times 10^3 \sim 2.43 \times 10^5$ 및 GII, $5.37 \times 10^5 \sim 9.19 \times 10^6$ 이었으며, 자연감염 후 1일 동안 10^3 및 10^5 정도의 바이러스를 농축하는 것으로 나타났다. 지중해 담치는 GI, $9.82 \times 10^3 \sim 2.41 \times 10^5$ 및 GII, $9.94 \times 10^5 \sim 6.98 \times$

10^6 로 검출되었으며, 굴과 마찬가지로 자연감염 후 1일 동안 10^3 및 10^5 정도의 바이러스를 농축하는 것으로 확인되었다. 굴과 지중해 담치 바이러스 농도가 소량의 변화를 나타내었지만 Log 1 이상의 감소는 나타내지 않았고 전체적으로 지속적인 증가 추세를 나타내었다(Table 4, Fig. 5, 6).

노로바이러스의 경우, 대장균군과 분변계대장균의 결과와는 다르게 축적된 바이러스가 쉽게 배출되지 않았다. 이전 보고에 따르면 노로바이러스는 패류의 소화과정 중 식균작용을 하는 혈구(hematocytes)와 산소화(acidic digestion)에 대한 저항성이 세균이나 다른 장관계 바이러스에 비해 높고 바이러스가 굴의 소화맹랑 내강에 존재하고 장관세포에 특이 수용체에 결합되어 있어 대사 후 배출에 대한 저항력이 높다고 보고 한 바 있다 (McLeod et al., 2009a and 2009b; Provost et al., 2011).

현재까지 미국, EU 및 우리나라에서는 패류가 생산되는 해역을 대장균군, 분변계대장균, *Escherichia coli* 등과 같은 위생지표세균 농도에 기초하여 평가 및 분류하고 있다(US FDA, 2015; European Commission, 2015; MOF, 2016b). 위생지표세균은 해역의 사람과 동물의 장에서 증식하기 때문에 분변오염에 대한 지표로 활용되고 있지만 본 연구결과에서와 같이 노로바이러스와 같은 장관계 바이러스 질병과는 상관관계가 부족하다. 따라

서 분변오염에 대한 해역평가시 위생지표세균과 더불어 패류에서 검출되는 노로바이러스의 농도 함께 고려되어야 하며 이를 위해서는 노로바이러스의 정량 기준 설정이 필요하다.

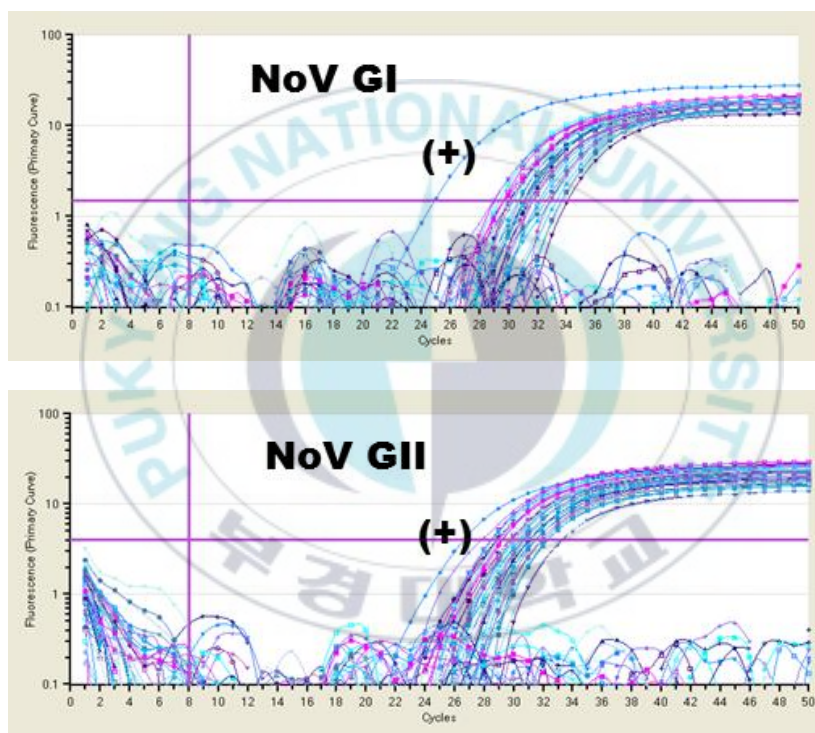


Fig. 5. Results of realtime RT-PCR in naturally contaminated shellfish (Oyster and Mussel). (+), Positive control

Table 3. Bioaccumulation of total coliform and fecal coliform in the oyster (*Crassostrea gigas*) and Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in contaminated seawater

Date	Results, MPN ¹⁾ /100 mL(g)					
	Seawater		Oyster (<i>Crassostrea gigas</i>)		Mussel (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	
	Total coliform	Fecal coliform	Total coliform	Fecal coliform	Total coliform	Fecal coliform
0	13,000	7,900	330	20	130	<18
1	3,300	3,300	13,000	7,900	24,000	13,000
2	4,900	4,900	13,000	3,300	17,000	7,000
3	490	140	35,000	7,900	92,000	3,300
4	2,400	2,400	3,300	2,400	7,900	3,300
5	4,900	3,300	3,300	1,300	3,300	2,400
10	490	490	7,900	1,300	170,000	9,500
15	9,200	5,400	33,000	13,000	33,000	2,200
20	7,000	2,100	49,000	4,900	33,000	4,900
25	1,100	790	3,300	1,300	-	-
30	24,000	3,500	33,000	13,000	-	-

¹⁾ MPN, Most probable number

Table 4. Bioaccumulation of in the oyster (*Crassostrea gigas*) and Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in contaminated seawater

Date	Oyster				Mussel			
	NoV GI ¹⁾		NoV GII ²⁾		NoV GI		NoV GII	
	Ct value	Mean Copies/g ³⁾	Ct value	Mean Copies/g	Ct value	Mean Copies/g	Ct value	Mean Copies/g
1	34.33 ± 0.45	6.91 x 10 ³	31.38 ± 0.53	5.37 x 10 ⁵	33.88 ± 0.64	9.82 x 10 ³	32.19 ± 0.13	9.94 x 10 ⁵
2	32.04 ± 0.45	3.39 x 10 ⁴	31.19 ± 0.50	1.12 x 10 ⁶	29.73 ± 0.01	1.65 x 10 ⁵	28.56 ± 0.11	6.98 x 10 ⁶
3	31.75 ± 0.06	4.05 x 10 ⁴	30.71 ± 0.05	1.53 x 10 ⁶	30.05 ± 0.37	1.32 x 10 ⁵	28.89 ± 0.02	5.54 x 10 ⁶
4	32.77 ± 0.19	1.99 x 10 ⁴	31.65 ± 0.54	8.12 x 10 ⁵	30.05 ± 0.37	1.35 x 10 ⁵	29.66 ± 0.53	3.33 x 10 ⁶
5	31.67 ± 0.06	4.28 x 10 ⁴	30.19 ± 0.10	2.20 x 10 ⁶	31.10 ± 0.04	6.35 x 10 ⁴	29.40 ± 0.52	3.99 x 10 ⁶
10	31.23 ± 0.10	5.81 x 10 ⁴	30.50 ± 0.17	1.77 x 10 ⁶	29.81 ± 0.18	1.58 x 10 ⁵	28.78 ± 0.36	6.08 x 10 ⁶
15	32.97 ± 0.07	1.72 x 10 ⁴	31.87 ± 0.01	6.70 x 10 ⁵	30.26 ± 0.16	1.15 x 10 ⁵	29.09 ± 0.25	4.84 x 10 ⁶
20	30.59 ± 0.32	9.21 x 10 ⁴	29.97 ± 0.06	2.58 x 10 ⁶	29.20 ± 0.19	2.41 x 10 ⁵	29.16 ± 0.06	4.58 x 10 ⁶
25	30.24 ± 0.08	1.16 x 10 ⁵	29.76 ± 0.15	3.00 x 10 ⁶	-	-	-	-
30	29.20 ± 0.29	2.43 x 10 ⁵	28.21 ± 0.48	9.19 x 10 ⁶	-	-	-	-

¹⁾ GI, Norovirus Genogroup I

²⁾ GII, Norovirus Genogroup II

³⁾ Avg Concn : Average concentration of 3 times results

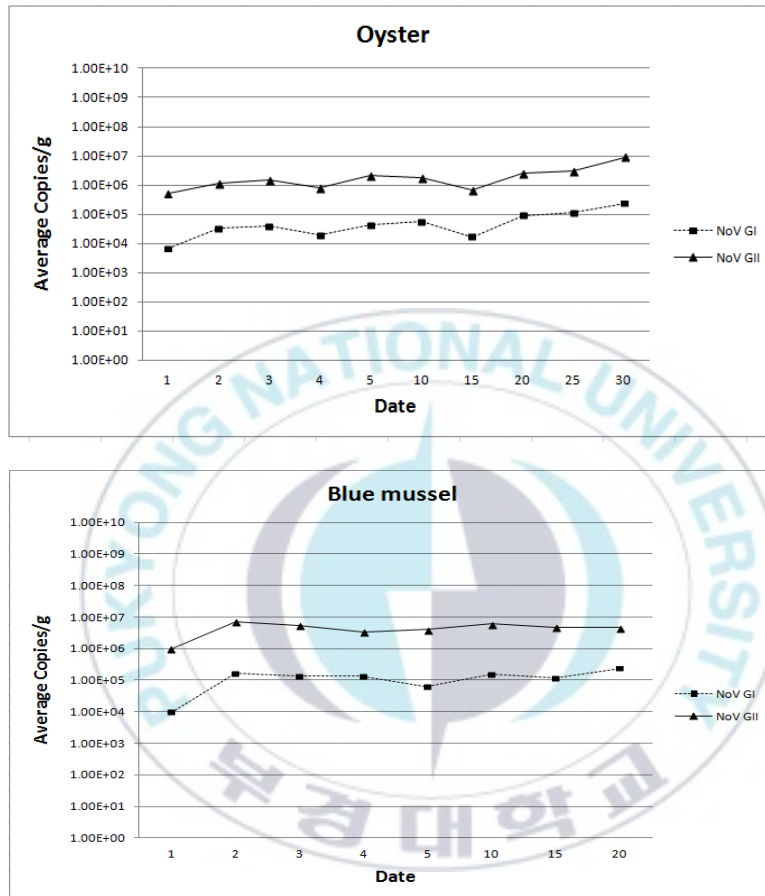


Fig. 6. Bioaccumulation of in the oyster (*Crassostrea gigas*) and Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in contaminated seawater.

3.4. 가열처리에 따른 노로바이러스 농도 변화

가열처리에 따른 노로바이러스 농도변화를 관찰하기 위하여 굴을 사각채롱에 넣어 하수의 유입이 많은 연안에 수하한 후 자연적으로 노로바이러스에 감염시켰다. 7일간 하수에 노출된 굴에서 노로바이러스 GI형과 GII형이 각각 7.22×10^3 및 2.43×10^3 copies/g 농도 감염된 것으로 확인되었으며, 이를 각 가열조건에 따라 처리하였다.

노로바이러스에 감염된 굴을 각 구간별로 가열처리하여 realtime RT-PCR로 분석한 결과 Ct value는 GI형이 37.07~37.71, GII형이 35.46~37.07로 나타났으며, 이를 표준곡선에 대입하여 계산된 노로바이러스의 농도는 GI형이 $1.18 \times 10^3 \sim 7.42 \times 10^2$, GII형이 $7.94 \times 10^2 \sim 2.48 \times 10^1$ copies/g으로 나타났다. 노로바이러스의 농도는 60, 68, 70℃에서 15분간 처리한 결과 GI형이 각각 83.4, 88.0, 89.4% 감소되었으며, GII형은 60, 68, 70, 100℃에서 각각 67.3, 76.3, 80.1, 89.8% 감소되는 것으로 나타났다. GI 및 GII형 모두 높은 온도에서 처리할 경우 더 높은 감소효과를 나타내는 것으로 확인되었지만, 100℃에서 처리한 GI형의 경우를 제외하고는 가열처리 후에도 일부 유전자가 검출되는 것으로 나타났다(Table 5).

바이러스는 72℃ 이상의 온도로 처리할 경우 외피단백질이 파괴된다고 알려져 있으나, 본 연구에서는 100℃에서 15분 처리 시에도 바이러스의 유전자가 검출되는 것으로 나타났다. 이는 굴의 지방질과 같은 성분들이 노로바이러스의 외피단백질이 파괴되는 것을 보호한 결과로 판단된다(Nuanualsuwan et al., 2002). 노로바이러스는 감염가를 판단할 수 있는 숙주세포가 개발되지 않아 가열처리 등에 의한 불활성화 연구는 murine calicivirus (MCV)나 feline calicivirus (FCV)와 같은 대체바이러스에 집중되어 있다(Bozkurt et al., 2013; Nims and Plavsic, 2013). 이러한 연구들에서 MCV나 FCV를 65℃에서 2분 또는 72℃ 1분간 가열하였을 경우 감염가가 6.7 Log10 이상 감소한다는 보고가 있어 본 연구의 가열처리 후 검출된 노로바이러스들도 상당수는 감염력을 상실했을 것으로 판단된다. 또한 본 연구에서 가열처리에 사용된 굴은 자연감염을 통해 다소 높은 농도의 바이러스가 감염된 굴이므로 실제 해역에서 분리되는 농도와 같이 초기농도가 낮은 샘플은 가열처리에 따라 그 감소율이 더 높아질 수 있을 것이다. 따라서 바이러스의 감염농도를 조절하여 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

본 연구는 대체바이러스가 아닌 노로바이러스에 대한 직접적인 연구결과로서 감염된 굴의 가열처리 조건에 대한 농도변화

를 보고하였다. 이러한 연구결과는 식품에서의 노로바이러스 처리에 관한 기초적인 결과로 모니터링에 의한 정량분석 결과와 함께 노로바이러스의 위해평가 자료에 활용될 것으로 판단된다.

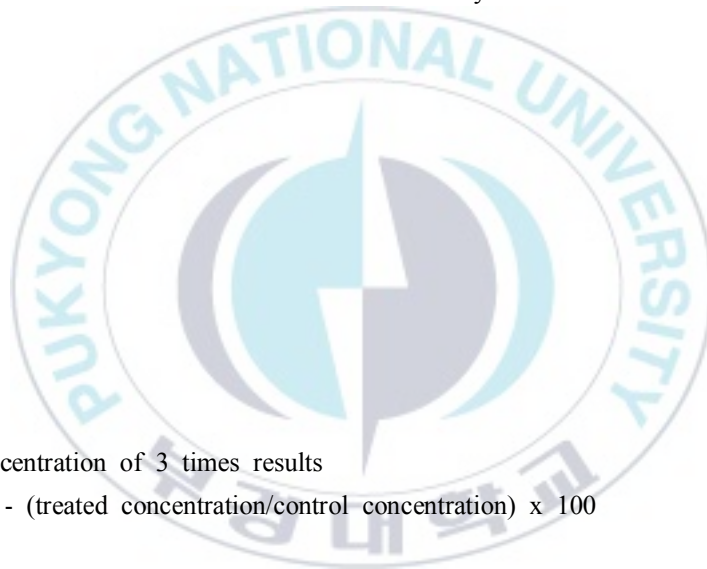


Table 5. Quantitative analysis of heat-treated NoVs in contaminated oysters

¹⁾ ND: Not detected

²⁾ Avg Concn : Average concentration of 3 times results

³⁾ Reductive rate (%) = $100 - (\text{treated concentration} / \text{control concentration}) \times 100$



제 4장 대체 모델(Surrogate)를 이용한 식품에서의 노로바이러스 불활성화

1. 서론

일반적으로 노로바이러스에 대한 항체는 인체에서 흔히 발견되고 있지만 노로바이러스에 대한 면역학적 저항성은 나타나지 않는 것으로 알려져 있는데, 그 이유는 노로바이러스에 대한 인체의 면역학적 저항성은 바이러스의 유전자 형태에 따라 다르고 그 종류가 매우 다양하기 때문이다(Atmar and Estes, 2001).

이러한 이유에서 현재까지 노로바이러스의 인공배양은 불가능하며 식품에서 검출된 노로바이러스의 감염력을 판단할 수 없다. 때문에 식품에서의 노로바이러스 감염증을 일으킬 수 있는 정량 기준의 설정이 필요하며 이를 위해서는 역학조사를 통한 많은 양의 데이터가 수집되어야 한다. 하지만 우리나라는 설사환자의 신고건수 및 역학조사가 부족하여 정량기준의 설정에는 많은 시간이 소요될 것이며, 그 이전에는 murine calicivirus (MCV)나 feline calicivirus (FCV)와 같은 대체바이러스 (Surrogate)를 이용하여 불활성화 조건이나 식품 섭취 가이드라인이 제시되어야 한다(Bozkurt et al., 2013; Nims and Plavsic, 2013).

한편 김치는 우리나라의 전통적인 채소발효식품이며 2001년 국제식품규격(CODEX) 목록에 등록되어 있을 정도로 대표적인 식품이다(KREI, 2009). 김치는 배추와 여러 부재료들이 적당한 온도에서 젖산 발효를 통하여 숙성과정을 거치게 되는데, 이 때 생성된 산과 젖산균이 생성하는 특수한 향균성 물질인 박테리 오신 등에 의해서 다른 균의 증식이 크게 억제된다(Choi and Beuchat, 1994; Park et al., 1999). 예를 들면 대표적인 식중독 세균인 *Staphylococcus*나 *Salmonella*를 김치에 첨가하였을 때 초기에는 생존하였으나 발효가 진행되면서 그 수가 급격히 감소하였으며(Inatsu et al., 2004), 위에 염증을 유발시키는 *Helicobacter pylori*도 김치에서 분리된 젖산균에 의해 근절되었다는 보고도 있다(Lee and Lee, 2006). 이 외에도 김치를 섭취하게 되면 혈청 콜레스테롤의 양을 감소시켜 동맥경화를 예방하는 효과 등 김치의 우수한 생리기능성들에 관한 연구들이 많이 보고되어 있다(Choi, 2005; Lee and Jeong, 1999; Park et al., 2000).

이처럼 영양학적으로나 면역학적으로 다양한 장점을 가진 김치는 우리나라 국민들이 1인당 거의 매일 90.3g (2005년 기준) 정도를 섭취하고 있는 것으로 보고되고 있다(MOH, 2006). 이처럼 한국인에게는 필수 음식인 김치를 제조함에 있어서 사람들은 기호특성에 따라 팽이버섯, 녹차, 미더덕 등 다양한 부

재료를 첨가하기도 하는데(Park et al., 2001a; Park et al., 2001b; Bae and Lee, 2008), 특히 굴은 특유의 향과 맛이 탁월하여 생굴로 섭취할 뿐 아니라, 겨울철이 주 생산시기로 김장시기와 부합하므로 많은 사람들이 김치에 부재료로 첨가하여 소비하고 있다.

그러나 김치에 첨가된 굴의 섭취에 기인한 장관계 바이러스 감염질환의 발생은 보고된 바 없으며, 장관계 바이러스 집단 발생 후 보건당국에서 실시한 역학조사에서도 김치가 매개식품으로 의심받거나 확인된 경우도 없다. 이는 김치발효 중 노로바이러스를 비롯한 장관계 바이러스가 분해되거나 감염력을 상실한 결과로 추정되어 그 상관관계를 구명할 필요가 있을 것으로 사료되었다. 그래서 세포배양 기술이 확보되지 않아 실험실에서 감염력을 판별할 수 없는 노로바이러스를 대신하여 feline calicivirus (이하 FCV)를 굴이 함유된 시판 김치와 실험실에서 조제한 김치에 반응시켜 김치 숙성과 부재료의 작용에 따른 FCV의 감염력 변화를 파악하였다.

이러한 연구결과를 토대로 노로바이러스가 오염된 굴을 김치 부재료로 사용했을 경우, 안전하게 김치를 섭취할 수 있는 가이드라인을 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. Feline calicivirus의 배양

Feline calicivirus (FCV) VR-782 및 FCV의 숙주세포인 crandell-reese feline kidney (CRFK) CCL-94TM 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양받아 사용하였다. FCV를 배양하기 위한 CRFK 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Hyclone, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, USA), 1% 10 mM non-essential amino acids (Gibco, USA)을 넣어 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고, 세포가 90% 이상 단일층을 형성하면 계대배양하여 사용하였다(Park et al., 2006; Chi et al., 2006). 그리고 FCV는 배양한 CRFK 세포에 접종하여 1시간 반응 후 세포유지 배지 (DMEM, 5% FBS, 1% NEAA)를 넣어준 뒤 37℃에서 배양하였고, 3-4일 배양한 후 세포병변효과 (cytopathic effects)가 일어나 부착된 세포들이 떨어지면 15 mL tube (Corning, USA)에 회수하여 액체질소로 급속냉동시킨 후 37℃ 항온수조에 녹인 다음 vortex하여 세포를 파쇄하였다. 위의 과정을 2회 추가 반복한 후 2,000 rpm에서 8분간 원심분

리하고 상등액을 1 mL씩 나누어 cryogenic vial (Nalgene, USA)에 담고 액체 질소에 보관하여 사용하였다.

2.2. 김치 및 유기산

실험에 사용된 시판 배추김치(P사 포기김치; 순중량 2 kg)와 김치 조제를 위한 생굴 및 각종 부재료들은 대형할인점에서 구입하여 사용하였다. 시판 배추김치에 FCV를 반응시 시료 김치는 Kang and Han (2005)의 방법을 일부 변경하여 조제하였는데, 배추를 등분하여 수세한 후 10% (W/V) NaCl 용액에 약 10시간 절인 다음 수도수로 3회 세척한 후 30분간 체에 담아 물기를 제거하였다. 그리고 등분한 배추를 다시 이등분하여 Table 1과 같은 비율로 김치를 조제한 다음 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 유기산은 비휘발성 유기산(lactic acid, succinic acid), 휘발성 유기산(acetic acid, propionic acid) 및 무기산인 HCl(염산)을 사용하였으며(Sigma, USA), 김치가 완전히 숙성된 pH인 3.5 농도에서 FCV와 반응시킨 후 감염가를 비교하였다.

2.3. 시판 및 조제 김치, 부재료와 FCV의 혼합

실험은 시판 배추김치에 FCV를 반응시켜 결과를 도출한 후 김치를 직접 조제한 후 결과를 도출하였으며, 이 후 1N NaOH (Merck, Germany)를 첨가하여 pH 7로 중화된 김치에 FCV를 반응시켜 결과를 도출하였다.

FCV의 감염력 측정을 위하여 시판 및 조제된 김치를 blender로 균질화 하였고, 부재료는 Table 1에 제시된 김치 제조시 혼합된 비율에 맞도록 phosphate buffer (pH 7.2, Bioneer, Korea)에 각 부재료별로 첨가하여 균질화하였으며, 이 때 각 균질액들은 glass roller bottle (NUNC, Japan)에 headspace가 50% 정도 되도록 충전하였다. 그리고 마쇄한 김치 및 각 부재료 균질액들로부터 FCV의 분리를 용이하게 하기 위하여 DMEM에 배양한 FCV를 투석막(50,000 dalton MWCO, ϕ 28 mm)에 5 mL씩 나누어 충전한 다음 각 glass roller bottle에 10 개씩 넣고 roller culture apparatus (Bellco Biotechnology, USA)에 분당 2회전하면서 온도구간별로 저장하면서 FCV의 감염력 변화를 측정하였으며 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

Table 1. Composition of raw materials for *kimchi* preparation

Ingredients	Amount (g)
Cabbage	88.0
Garlic	1.6
Ginger	0.9
Green onion	3.0
Red pepper powder	4.5
Salt-fermented anchovy	2.0
Oyster	5.0
Total	105.0

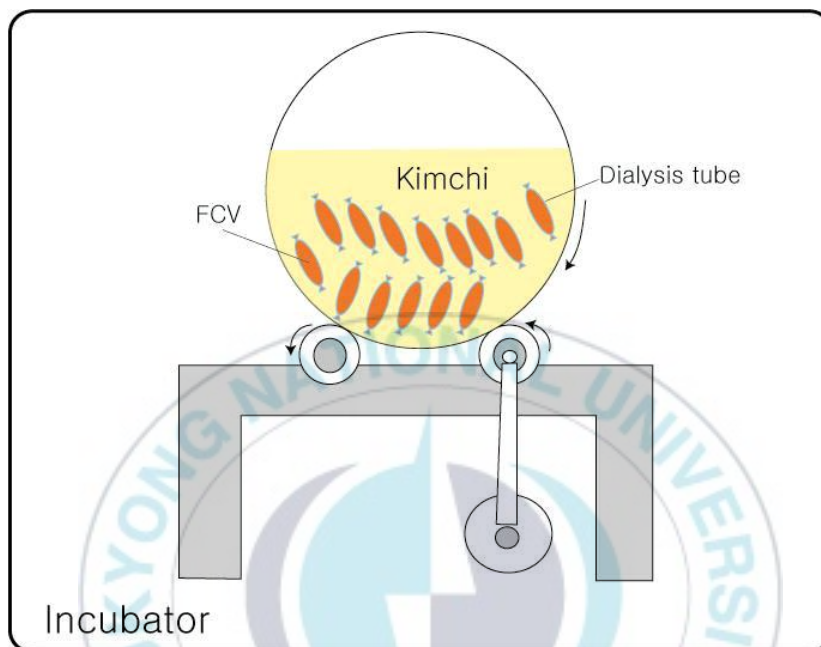


Fig. 1. Schematic diagram of Roller culture system

2.4. Feline calicivirus 감염가 측정

김치 및 각 부재료 성분의 숙성기간에 따른 FCV의 감염력 변화는 Jang et al. (2004)의 방법을 일부 변경하여 TCID₅₀ (50% tissue culture infection dose)으로 측정하였다. 즉, 96 well 조직 배양판의 각 well에 $10^5 \sim 10^6$ cell/mL 농도로 CRFK 세포 100 μ L를 접종하여 2-3일 동안 37°C로 조정된 5% CO₂ 조건하에서 배양한 다음 각 well에 단층 배양시켰다. 여기에 김치 및 부재료 추출액과 반응한 FCV를 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ cell/mL의 농도가 되도록 10배수로 단계희석한 후 각 희석액을 50 μ L씩 접종하고, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 3~4일간 배양한 다음 세포 병변효과를 관찰하여 TCID₅₀을 산출하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 김치 숙성 과정에서의 FCV 감염력 변화

김치발효 산물이 FCV의 감염력에 미치는 영향을 조사하고자 시판 숙성 배추김치에 FCV를 가하고 시간경과에 따른 FCV 감염가의 변화를 조사하였다. 사용된 시판 김치의 초기 pH는 4.55로 최적의 발효단계에 있는 것으로 확인되었다(Mheen and Kwon 1984). 이 시판 김치를 앞에서 설명한 바와 같이 균질화한 후 FCV (감염가 9.30 TCID₅₀)를 가하였다. 그리고 4℃ 및 25℃에 각각 보관하면서 FCV 감염가 변화를 조사하였으며 발효 진행의 지표로서 pH를 측정하였다.

25℃ 반응구간에서는 12시간 마다 약 2 log 정도씩 FCV 감염가가 감소하여 48시간째에는 검출한계인 2.30 TCID₅₀ 이하로 감소하였다. 4℃ 반응구간에서는 24시간 까지는 25℃ 반응구간과 유사한 양상을 나타내었으나 48시간째에는 FCV 감염가가 5.00 TCID₅₀ 으로 감소율이 25℃ 반응구간 보다 낮은 것으로 나타났다(Table 2).

pH의 변화는 25℃ 반응구간에서는 숙성이 지속적으로 촉진되어 48시간 후에 3.64로 하강하였는데 이 단계는 김치발효 중 젖산

균이 생존할 수 없는 과숙성 단계로 급격한 화학적 변화가 일어났다고 볼 수 있다(Lee et al., 1992). FCV가 pH 5.0 이하의 조건에서 쉽게 불활성화 된다는 보고를 볼 때 25℃ 반응구간에서 일어나는 급격한 pH 하강이 FCV의 감염력 변화에 영향을 미치는 중요인자라고 생각되었다(Erwin et al., 2004).

김치발효 중 유기산의 생성으로 인한 pH의 변화가 FCV의 감염력 감소를 유발하는 중요 인자라는 것을 확인하기 위해 Table 1과 같은 조성으로 김치를 제조한 후 미 발효 상태에서 FCV와 반응시키고 각기 다른 온도(4℃, 18℃, 25℃)에 저장하면서 FCV의 감염력 변화와 pH 변화를 조사하였다.

초기 pH가 5.50로 확인된 조제 김치와 초기 감염가가 6.30 TCID₅₀인 FCV를 앞에서 설명한 방법으로 반응시켰다. 25℃ 반응구간에서는 FCV의 감염력이 시간의 경과와 더불어 점차 감소하여 96시간째에는 검출한계인 2.30 TCID₅₀로 나타났다. 이때 pH는 김치의 숙성과 더불어 3.54까지 하강하였다. 18℃ 반응구간에서는 96시간 후 pH는 3.91로, FCV 감염가는 3.55로 감소되었고, 4℃ 반응구간에서는 120시간 후에도 pH의 변화가 거의 일어나지 않아 발효가 지연되는 것으로 확인되었으며, FCV 감염가는 2 log 정도 감소하였다(Table 3).

김치발효는 생 원료에 존재하는 미생물의 작용으로 진행되기

때문에 발효의 속도에 영향을 미치는 가장 중요한 인자는 온도이다. 발효의 진행속도 뿐만 아니라 유기산의 최대 생성량도 발효온도에 따라 달라지는데 20℃에서는 총 유기산량이 1.6%에 달하나 10℃에서는 1.2%를 초과하지 않는다는 보고도 있다 (Mheen and Kwon, 1984). 즉, 미생물 발효가 원활히 일어나는 20℃ 부근의 온도조건에서는 유기산의 생성이 급속히 일어나며 수일 후에는 FCV가 사멸하는 것으로 확인되었다. FCV를 충분히 불활성화하기 위해서는 pH가 4.00 이하의 산도에 도달하여야 하며 산도 도달에 필요한 시간은 발효온도에 좌우되는 것으로 사료되었다.

한편, pH의 변화가 거의 없이 발효의 진행이 120시간까지 지연된 4℃ 반응구의 경우에도 FCV의 감염력이 2 log 정도 감소한 것으로 나타나 유기산외에 항 바이러스성 물질이 존재하는 것으로 추정되었다. 이를 확인하기 위해 충분히 숙성된 김치 (pH 3.75)를 균질화한 후 1N NaOH를 이용하여 pH를 7로 중화시키고 FCV를 가한 후 4℃에 저장하면서 FCV 감염가 변화를 관찰하였다. 그 결과, 중화된 김치 중의 FCV 감염력은 72시간 만에 검출 한계인 2.30 TCID₅₀ 이하로 감소하였는데 대조구인 충분히 숙성된 김치 중의 FCV 감염력은 48시간 만에 검출 한계치 이하로 감소하였다(Fig. 1). 즉, 생성된 유기산과 이로 인

해 유도된 낮은 pH 조건을 배제하여도 여전히 충분히 숙성된 김치에는 FCV의 감염력을 감소시키는 항 바이러스 작용력을 가진 물질이 존재하는 것으로 확인되었다.

Table 2. The FCV infective titer according to the time variation of the marketing *Kimchi*

Time	25°C		4°C	
	pH	Log(TCID ₅₀) ¹⁾	pH	Log(TCID ₅₀)
0	4.55	9.30	4.55	9.30
6	4.15	7.30	4.59	6.30
12	4.00	7.03	4.40	5.80
24	3.74	5.80	4.32	5.30
48	3.64	2.30	4.20	5.00

¹⁾ TCID₅₀, 50% tissue culture infection dose

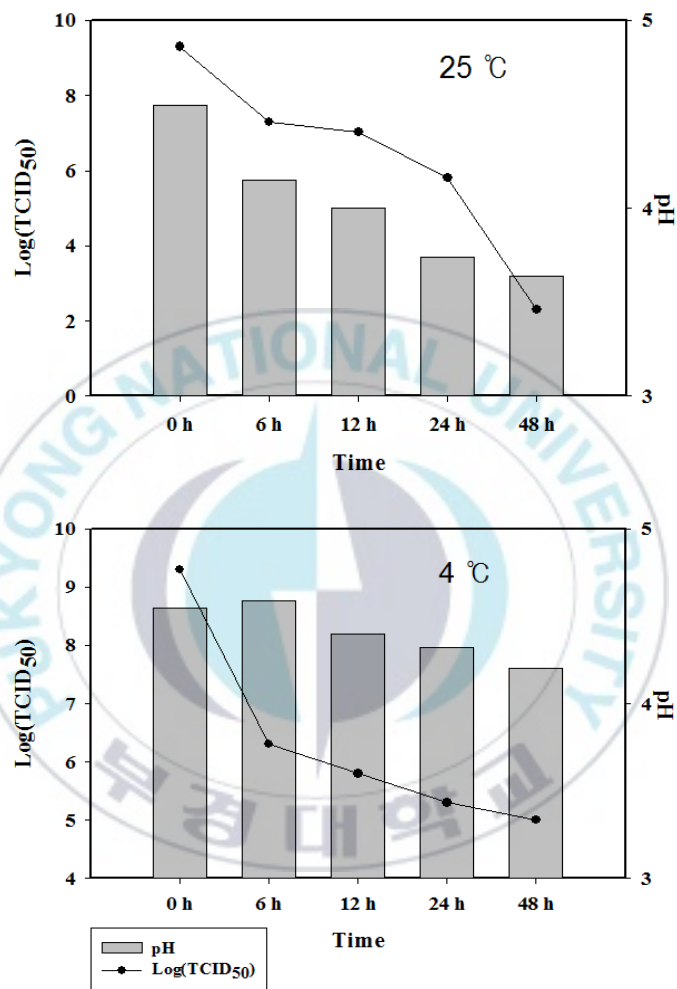


Fig 2. The FCV infective titer change among the storage process of the marketing *Kimchi*

Table 3. The FCV infective titer according to the time variation of lab-prepared *Kimchi*

Time	25°C		18°C		4°C	
	pH	Log(TCID ₅₀) ¹⁾	pH	Log(TCID ₅₀)	pH	Log(TCID ₅₀)
0 hr	5.50	6.30	5.50	6.30	5.50	6.30
12 hr	5.30	4.80	5.35	5.05	5.38	5.30
24 hr	4.52	3.30	5.37	4.05	5.41	4.80
48 hr	4.04	3.05	4.22	3.80	5.40	4.80
72 hr	3.72	3.05	4.06	-	5.39	-
96 hr	3.54	2.3	3.91	3.55	5.42	-
120 hr	3.45	-	3.77	-	5.40	4.05

¹⁾ TCID₅₀, 50% tissue culture infection dose

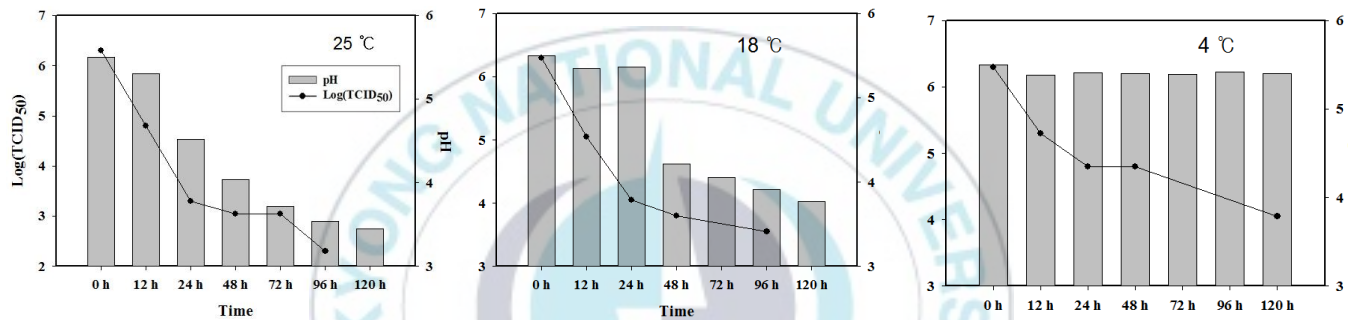


Fig. 3. The FCV infective titer change among the manufacture *Kimchi* fermentation process

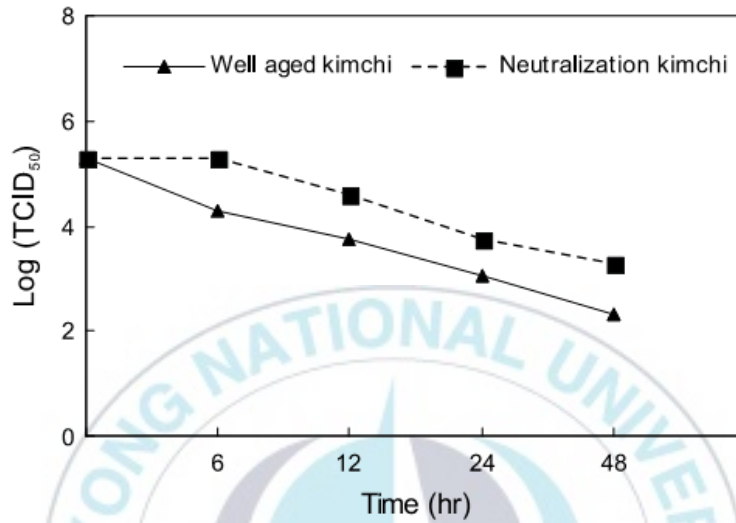


Fig. 4. The FCV infective titer change among the storage process of the aging completion marketing *Kimchi* and neutralization *Kimchi*

3.2. 유기산 및 양념류에 의한 FCV의 불활성화

배추김치에서 생성되는 비휘발성 유기산에는 malic acid, fumaric acid, lactic acid, succinic acid, malonic acid, oxalic acid, glycolic acid, citric acid 및 tartaric acid등이 있으며 이중에 lactic acid와 succinic acid가 대표적 비휘발성 유기산으로 알려져 있다. 또한 휘발성 유기산에는 formic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid, caproic acid와 heptanoic acid등이 있으며 이중에 acetic acid과 propionic acid가 대표적 휘발성 유기산으로 알려져 있다(Pusan national university Kimchi research institute, 2010).

본 연구에서는 김치발효 중 생성되는 대표적 유기산이 FCV의 감염력에 미치는 영향을 파악하고 김치 제조 시 사용되는 부원료가 FCV의 감염력에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 유기산으로는 비휘발성 유기산인 lactic acid, succinic acid 및 휘발성 유기산인 acetic acid, propionic acid 등 4가지 유기산을 이용하였고 대조구로서 HCl(염산)를 추가하여 FCV와 반응시킨 후 감염가를 비교하였다. 그 결과, 김치가 완전히 숙성되어 pH가 3.5에 도달하는 경우에는 산의 종류와 상관없이 12시간 이후 바이러스 감염가가 2~3 log 이상 감소하는 것으로

나타났다(Table 4).

또한, 김치를 담그는 과정에서 사용되는 양념원료인 마늘, 고춧가루, 파, 멸치 젓갈 및 생강의 FCV 불활성화 작용력을 확인하고자 하였다. 김치 부원료 성분의 고유 pH에 의한 영향과 부패에 의한 미생물 증식과 같은 부영향을 배제하기 위하여 4℃ 조건에서 실험하였다. 그 결과, 72시간 경과 후 마늘과 젓갈에서 FCV의 감염력이 3 log 이상이 감소하여 우수한 바이러스 억제 효과를 나타내었다(Table 5).

마늘은 오랫동안 그 가치가 높이 평가되고 있으며 약용, 향균 및 살균효과적인 특성으로 인해 실제로 질병의 치료나 예방에 사용되고 있다. 특히 강력한 살균효과를 나타내는 알리신이 존재하여 바이러스에도 억제 효과도 있는 것으로 판단된다. 또한 *E. coli*, *S. typhimurium*, *V. parahemolyticus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*와 같은 식중독균에 대해서도 감수성 또는 중등도의 감수성을 나타내었다는 보고도 있다(Kim et al., 2003; Yoon, 2009; Goncagul and Ayaz, 2010). 그리고 멸치 젓갈은 재료에 따라 차이가 있지만 호염성 미생물이 존재하는 식품으로 이러한 미생물의 직접작용과 이들이 생성하는 2차 대사산물의 영향에 의해 FCV 활성이 억제되는 것으로 사료되었다.

김치는 유산균에 의해서 발효가 진행되면서 생성된 젖산을 비

롯한 대사산물이 포함하게 되어 재료의 단순 혼합체와 뚜렷이 구별되는 특징을 가지게 된다. 유기산은 채소 중에 함유된 효소나 숙성에 관여하는 미생물이 재료 중 당질에 작용하여 생성되는데 배합원료의 종류, 숙성온도, 소금농도 및 시간에 따라 그 생성량과 생성되는 유기산의 종류에 차이가 나타나게 된다 (Mheen, 1998). 발효가 완료된 김치에 존재하는 성분 중 FCV와 같은 바이러스의 감염력 감소에 영향을 미치는 주요 인자는 유기산의 종류에 상관없이 유기산으로 유도된 낮은 pH 환경이며, 더불어 주재료 및 부재료에서 유래하는 항 바이러스성 물질과 발효에 관여하는 미생물의 2차 대사산물의 복합 작용도 일부 기여하는 것으로 확인되었다.

이상의 결과로 미루어 보아 김치 숙성에 따른 낮은 pH 환경과 각종 대사산물의 복합작용으로 부원료를 통하여 김치에 혼입된 노로바이러스가 감염을 유발하지 못하는 수준으로 불활성화 될 것으로 판단되었다. 즉, 충분히 숙성된 김치의 경우 부원료로 사용된 굴에서 유래하는 노로바이러스에 의한 2차 감염의 가능성은 매우 낮다고 판단된다.

Table 4. The FCV infective titer according to the reaction with the organic acid (4°C)

Time	TCID ₅₀ ¹⁾					Control
	Latic acid	Succinic acid	Acetic acid	Propionic acid	HCl	
0 hr	7.30	7.30	7.30	7.30	7.30	7.30
6 hr	4.05	5.30	5.80	4.80	5.05	7.05
12 hr	3.55	3.55	3.80	3.80	3.30	6.80

¹⁾ TCID₅₀, 50% tissue culture infection dose

Table 5. The FCV infective titer according to the reaction with a spice used *Kimchi* (4°C)

Time	TCID ₅₀ ¹⁾						Control
	Garlic (1.6%)	Red pepper powder (4.5%)	Green onion (3.0%)	Salt-fermented anchovy(2.0%)	Ginger (0.9%)	Mixture (8.3%)	
0 hr	7.30	7.30	7.30	7.30	7.30	7.30	7.30
24 hr	4.80	5.55	7.30	6.05	7.80	6.05	6.55
72 hr	4.05	6.05	6.05	5.30	8.05	6.30	6.05

¹⁾ TCID₅₀, 50% tissue culture infection dose

III. 요약

본 주제는 최근 전 세계적으로 패류(굴) 위생에 있어 가장 큰 문제로 부각되고 있는 노로바이러스에 관한 연구 결과이다.

본 연구에서는 우리나라 남해안에서 생산되는 굴을 대상으로 장관계바이러스 5종(노로바이러스, 엔테로바이러스, 로타바이러스, 아스트로바이러스 및 A형 간염 바이러스)의 오염현황을 파악하였다. 또한 굴에서 검출되는 노로바이러스의 유전형을 동정하고 굴에서 축적되는 바이러스의 농도를 확인하였으며 노로바이러스의 대체모델(surrogate)를 활용하여 굴이 부재료로 첨가된 김치에서의 노로바이러스 안전성을 검증하고자 하였다.

2009년 1월에서 2011년 12월까지 남해안 인근 굴 양식장 9지점에서 총 398개의 참굴을 대상으로 노로바이러스를 분석하였으며, 그 중 91개 시료로부터 엔테로바이러스, 로타바이러스, 아스트로바이러스 및 A형 간염 바이러스를 분석하였다. 그 결과, 노로바이러스는 27.4%(109/398), 아스트로바이러스는 1.1%(1/91)의 검출율을 나타내었으며 엔테로바이러스, 로타바이러스, 아스트로바이러스 및 A형 간염 바이러스는 검출되지 않았다.

노로바이러스가 검출된 24개 시료로부터 유전형을 동정하기 위하여 샘플 당 5개의 clone (총 120)을 sequencing하여 염기서열을

분석하였다. 그 결과, 노로바이러스 GI에서는 5개의 유전형 (GI.1, GI.2, GI.5, GI.6, GI.7)이 동정되었으며, GII에서는 7개의 유전형(GII.2, GII.3, GII.4, GII.7, GII.12, GII.13, GII.17)이 동정되었다. 조사기간 중 GI에서는 GI.1형(52.6%, 10/19), GII에서는 GII.3 및 GII.4형(각각 30.0%, 6/20)이 가장 유행하는 유전형으로 확인되었다.

2012년 1월부터 12월까지 채취된 21개의 굴 샘플에서 real-time RT-PCR을 이용하여 바이러스 유전자를 정량적으로 분석하였으며, 노로바이러스가 검출된 샘플의 농도는 $8.97 \times 10^2 \sim 7.47 \times 10^1$ copies/g으로 나타났다. GI형이 $8.97 \times 10^2 \sim 2.24 \times 10^2$, GII형이 $3.05 \times 10^2 \sim 7.47 \times 10^1$ copies/g으로 모든 샘플이 10^3 copies/g이하의 농도에서 검출되었으며, 10^2 copies/g보다 낮은 농도로 검출된 샘플이 9.5% (2/21)로 확인되었다.

그리고 30일간의 자연감염을 통하여 굴에서의 검출된 노로바이러스 농도는 GI, $6.91 \times 10^3 \sim 2.43 \times 10^5$ 및 GII, $5.37 \times 10^5 \sim 9.19 \times 10^6$ 이었으며, 노로바이러스에 자연감염된 굴을 각 구간별로 가열처리 한 결과, 60, 68, 70℃에서 처리한 결과 GI형이 각각 83.4, 88.0, 89.4% 감소되었으며, GII형은 60, 68, 70, 100℃에서 각각 67.3, 76.3, 80.1, 89.8% 감소되는 것으로 확인되었다.

굴김치에서 노로바이러스의 안전성을 검증하기 위하여 노로 바이러스 대체모델(Surrogate)인 Feline calicivirus (FCV)를 이용하여 김치 숙성 중 일어나는 바이러스의 감염가의 변화를 확인하였다. 그 결과, 6.30 TCID₅₀인 FCV는 25℃에서 4일 후에 2.30 TCID₅₀으로 감소하였고 18℃에서 4일 후에 3.55 TCID₅₀으로 감소하였으며, 4℃에서는 5일 후에 4.05로 감소되는 것이 확인되었다.

또한 김치와 관련된 유기산 및 김치 양념원료의 FCV 불활성화 작용력을 확인 한 결과, 바이러스의 감염력 감소에 영향을 미치는 주요 인자는 유기산의 종류에 상관없이 숙성과정 중 유도된 낮은 pH 환경이며, 더불어 주재료 및 부재료에서 유래하는 항 바이러스성 물질의 작용도 일부 기여하는 것으로 확인되었다. 즉 충분히 숙성된 김치(상온에 2일 이상 숙성)의 경우 부원료로 사용된 굴에서 유래하는 노로바이러스에 의한 2차 감염의 가능성은 매우 낮은 것으로 확인되었다.

이러한 결과들은 노로바이러스 원인이 되는 분변 오염원의 관리, 질병 발생시 역학조사, 식품에서의 노로바이러스 정량 기준 설정 및 위해평가를 위한 기초자료이며 노로바이러스 오염이 의심되는 식품에서의 섭취 가이드라인을 제시한 결과라 할 수 있다.

V. 감사의 글

논문을 마무리 하면서 너무나 많은 시간을 허비한 제 자신을 돌아보며 지금까지 도와주신 분들에게 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저, 학부부터 박사과정까지 긴 세월 부족한 제자를 언제나 걱정해주시고 진심어린 충고를 아끼지 않으셨던 정현도 지도교수님께 가슴 깊이 감사의 인사를 올립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 저의 논문에 관심을 가지고 검토해 주셨던 김도형, 김기홍, 홍수희, 정준범 교수님께도 가슴 깊이 감사함을 전합니다.

논문에 도움을 주셨던 국립수산물품질관리원 선·후배님들의 도움도 잊지 않겠습니다. 연구에 대한 열정을 주셨던 이희정, 김지희 과장님 감사합니다. 언제나 버팀목이 되어주셨던 오은경, 목종수, 유홍식, 손광태 연구관님의 은혜도 잊지 않겠습니다. 그리고 연구사 선·후배님들 모두 모두 너무 감사합니다.

멀리 있는 선배를 누구보다 잘 챙겨준 영철이, 우주 등 우리 수산생명의학과 진단방 실험실 후배님들께도 감사한 마음을 전합니다.

아들을 자랑스럽게 든든히 지켜주신 주신 아버님, 어머님, 그리고 장인어른, 장모님 언제나 도움을 주셔서 감사합니다.

마지막으로 우리 가족들. 영경아! 재원아! 효준아! 너희가 있어
얼마나 다행인지 모르겠다. 고맙고 사랑해.

이밖에도 감사함을 글로 표현하지 못했던 모든 분들께 머리 숙
여 인사드립니다.

이제부터가 시작이라는 마음으로 더 전진할 것을 다짐하여 글
을 마칩니다.



VI. 참고 문헌

- Alfano-Sobsey E., Sweat D., Hall A., Breedlove F., Rodriguez R., Greene S., Pierce A., Sobsey M., Davies M., Ledford S.L. (2012). Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiol Infect.* 140, 276-282.
- Aminu M., Esona M.D., Geyer A., Steele A.D. (2008). Epidemiology of rotavirus and astrovirus infections in children in northwestern Nigeria. *Ann Afr Med.* 7, 168-174.
- APHA. (1970). Recommended procedures for the examination of seawater and shellfish. 4th Ed. American Public Health Association, Washington DC, USA, 1-47.
- Atmar R.L and Estes M.K. (2001). Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev.* 14, 15-37.

- Bae M.S and Lee S.C. (2008). Preparation and characteristics of kimchi with added *Styela clava*. *Korean J Food Cookery Sci.* 24, 573-579.
- Bella S., Ho W., Tam T.Y. (2000). Natural depuration of shellfish for human consumption: a note of caution, *Water Res.* 34, 1401-1406.
- Beuret, C., Baumagrtner, A., Schluep, J. (2003). Virus-contaminated oyster; A three-month monitoring of oyster imported to Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology.* 69, 2292-2297.
- Bioshop P.F., Davidson G.P., Homes I.H., Ruck B.J. (1973). Virus particle in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet.* 2, 1281-3.
- Bosch A. (1998). Human enteric viruses in the water environment. *Int. Microbiol.* 1, 191 - 196.

- Bosch, A., Lucena F., Diez J.M., Gajardo R., Blasi M., Jofre J. (1991). Waterborne viruses associated with hepatitis outbreak. *J. Am. Water Works Assoc.* 83, 80-83.
- Bosch, A., Sanchez G., Le Guyader F., Vanaclocha H., Haugarreau L., Pinto R.M. (2001). Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Sci. Technol.* 43, 61 - 65.
- Bozkurt H., D'Souza D., Davidson P.M. (2013). Determination of the thermal inactivation kinetics of the human norovirus surrogates, murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Prot.* 76, 79 - 84.
- Cecuk, D., Kruzic V., Turkovic B., Gree M. (1993). Human viruses in the coastal environment of a Croatian harbor. *Rev. Epidemiol. Sante'* 41, 487 - 493.
- Choi H.S. (2005). Physiological components and health function of Kimchi. *Food Preserv Proces Indus* 4, 2-10.

- Choi S.Y and Beuchat L.R. (1994). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocin of *Pediococcus acidilactici* M during fermentation of Kimchi. *Food Microbiol.* 11, 301-307.
- Dewailly, E., Poirier C., Meyer F.M. (1986). Health hazards associated with windsurfing on polluted waters. *Am. J. Public Health* 76, 690 - 691.
- Dierssen U., Rehren F., Henke-Gendo C., Harste G., Heim A. (2008). Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol.* 42(1), 58-64.
- Dolin R., Blacklow N.R., DuPont H., Buscho R.F., Wyatt R.G., Kasel J.A., Hornick R., Chanock R.M. (1972). Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 140(2), 578-583.

- Dore W.J and Lees D.N. (1995). Behavior of *Escherichia coli* and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. *Appl Environ Microbiol.* 61, 2830–2834.
- Dubois E., Merle G., Roquier C., Trompette A., Gutader F.L., Cruciere C., Chomel J.J. (2004). Diversity of enterovirus sequences detected in oysters by RT- heminested PCR. *International Journal of Food Microbiology* 92(1), 35–43
- Erwin D., Paul B., Barry R., Astrid de G., Fleur T., Marion K. (2004). Inactivation of Caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 70, 4538–4543.
- European Commission. (2015) Commission Regulation(EU) 2015/2285 amending Annex II to Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption as regards certain requirements for live

bivalve molluscs, echinoderms, tunicates and marine gastropods and Annex I to Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. 9.12.

European Food Safety Authority. (2012). Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. available from: www.efsa.europa.eu/efsajournal. Accessed Jul. 10, 2012.

Fankhauser R.L., Monroe S.S., Noel J.S., Humphrey C.D., Bresee J.S., Parashar U.D., Ando T., Glass R.I. (2002). Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 186, 1-7.

Farthing, M.J.G. (1989). Viruses and the gut. Smith Kline & French, Walwyn Garden City, Hertfordshire, United Kingdom.

- Feeney S.A., Armstrong V.J., Mitchell S.J., Crawford L., McCaughey C., Coyle P.V. (2011). Development and Clinical Validation of Multiplex TaqMan Assays for Rapid Diagnosis of Viral Gastroenteritis. *Journal of Medical Virology* 83, 1650 - 1656.
- Feinstone S.M., Kapikian A.Z., Purcell R.H. (1973). Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science* 182, 1026-1028.
- Flint J.A, Van Duynhoven Y.T, Angulo F.J, DeLong S.M. (2005). Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: an international review. 2005. *Clin Infect Dis.* 41(5), 698-704.
- Food Standards Agency UK. (2012). Investigation into the prevalence, distribution and levels of norovirus titre in oyster harvesting areas in the UK. Available from: <http://www.foodbase.org.uk>. Accessed Jul.10, 2012.

- Gary P.R., Michael A.W., Rebecca L.F., Stephan S. M. (2004).
Genogroup I and II Noroviruses Detected in Stool Samples
by Real-Time Reverse Transcription-PCR Using Highly
Degenerate Universal Primer. *Applied and Environmental
Microbiology*. 70, 7179-7184.
- Goncagul G and Ayaz E. (2010). Antimicrobial effect of garlic
(*Allium sativum*). *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 5, 91-3.
- Haas C.N., Rose J.B., Gerba C.P., Regli R. (1993). Risk
assessment of viruses in drinking water. *Risk Anal*. 13,
545 - 552.
- Hall A.J., Wikswo M.E., Pringle K., Gould L.H., Prashar U.D.
(2014). Vital signs: Foodborne norovirus outbreaks-
United States, 2009-2012. *CDC morbidity and mortality
weekly report* 63, 491-495.
- Ha S., Woo G.J, Hwang I.G, Choi W.S. (2009). Development
of a virus elution and concentration procedure for detecting
norovirus in oyster, *Food Sci. Biotechnol*. 18, 1150-1154.

- Hyypia T., Hoi T., Knowles N.J., Stanway G. (2007)
Classification of enteriviruses based on molecular and
biological properties. *J Gen virol.* 78, 1-11.
- Inatsu Y., Bari M.L., Kawasaki S., Isshiki K. (2004). Survival
of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus*
aureus, and *Listeria monocytogenes* in Kimchi. *J Food*
Prot. 67, 1497-1500.
- Iritani N., Kaide A., Abe N., Kubo H., Sekiguchi J.I, Yamamoto
S.P, Goto K., Tanaka T., Noda M. (2014). Detection and
genetic characterization of human enteric viruses in oyster
associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in
Osaka City, Japan. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com>
on July 23. [http:// dx.doi.org /doi/10.1002/jmv.23883](http://dx.doi.org/doi/10.1002/jmv.23883).
- ISO/TS 15216-1. (2013). Microbiology of food and animal
feed-Horizontal method for determination of hepatitis A
virus and norovirus in food using real-time RT-PCR-
Part 1: Method for quantification.

- Jang H.O., Lee J.A., Kim N.H., Chung E.H., Lee H.J. (2004).
Prevalence of antibodies against adenoviruses in Korean
children and adults. *Korean J Pediatr.* 47, 1300-1305.
- Jee Y.M., Cheon D.S., Choi W.Y., Ahn J.B., Kim K.S., Chung
Y.S. (2004). Updates on enterovirus surveillance in
Korea. *Infect Chemother.* 36, 294-303.
- Jeong H.J., Hwang B.M., Lee D.Y., Kwak H.S. (2017).
Laboratory Surveillance of Viral Acute Gastroenteritis in
Korea, 2015. *Weekly health and disease.* 10(20)
- Jiang S., Noble R., Chui W.P. (2001). Human adenoviruses
and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters
of Southern California. *Appl. Environ. Microbiol.* 67,
179-184.
- Jo S.H., Kim H.J., Choi E.J., Ha S.D. (2009). Trends analysis
of food-borne outbreaks in United States of America,
Japan and Korea. *Safe Food.* 4, 3-14.

- Jothikumar N., Lowther J.A., Henshilwood K., Lees D.N., Hill V.R., Vinjé J. (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., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino, F.B., Kojima S., Takai R., Oka T., Takeda N., Katayama K. (2004). Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *Journal of Clinical Microbiology.* 42, 2988 - 2995.
- Kang S.Y and Han M.J. (2005). Effect of kimchi ingredients on the growth of pathogenic and lactic acid bacteria. *Korean J Food Cookery.* 21, 838-843.
- Katayama H., Shimasaki A., Ohgaki S. (2002). Development of a virus concentration method and its application to

- detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1033-1039.
- Kim J.S. and Kim. S.H. (2001). Molecular epidemiology of an outbreak of hepatitis A in Korea. *Korean J Clin Pathol.* 21, 114-118
- Kim M., Kim S.Y., Shin W.S., Lee J. (2003). Antimicrobial activity of garlic juice against *Escherichia coli* O157:H7. *Korean J Food Sci Technol.* 35, 752-755.
- Kim N.H., Min S.K., Park E.H., Park Y.K., Jin S.H., Ryu B.S. (2010). Study on gastroenteric norovirus genotypes in Busan, Korea, from 2008 to 2010. *The annual report of Busan Metropolitan city Institute of Health & Environment* 20, 9-17.
- Koopmans M. and Duizer E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 23 - 41.
- KOHI. (2012). Lecture manual on Enterovirus genetic Test Education. Yearly manual of Korean Human Resource Development Institute for Health and Welfare. 15-32.

- KREI. (2009). Quartely agriculture rural economic trend.
Korea rural economic institute Winter. 1-108.
- Kronneman A., Vennema H., Deforche K., Avoort H.,
Penaranda S. (2011). An automated genotyping tool for
enterovirus and norovirus. *J. Clin. Virol.* 51, 121-125.
- Lee C. and Kim S.J. (2008). The genetic diversity of human noroviruses
detected in river water in Korea. *Water Res.* 42, 4477-4484.
- Lee C.H., Cheong S.R., Lee H.J., Kwon M.Y., Kang I.N., Oh
E.G., Yu H.S., Shin S.B., Kim S.J. (2010). Evaluation of
the sensitivity and specificity of primer pairs and the
efficiency of RNA extraction procedures to improve noroviral
setection from oysters by nested reverse transcription-
polymerase chain reaction. *J. Microbiol.* 48, 586-593.
- Lee C.W., Ko C.Y., Ha D.M. (1992). Microfloral changes of
the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and
identification of the isolates. *Kor J Appl Microbiol
Biotechnol.* 20, 102-109.

- Lee H.M. and Lee Y.H. (2006). Isolation of *Lactobacillus plantarum* from Kimchi and its inhibitory activity on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. *J Microbiol Biotechnol.* 16, 1513-1517.
- Lee J.J and Jeong Y.K. (1999). Cholesterol-lowering effect and anticancer activity of Kimchi and Kimchi ingredients. *Korean J Life Science.* 9, 743-752.
- Lee S.G., Jheong W.H., Suh C.I., Kim S.H., Lee J.B., Jeong Y.S., Ko G., Jang K.L., Lee G.C., Paik S.Y. (2011). Nationwide groundwater surveillance of noroviruses in South Korea, 2008. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1466-1474.
- Lee S.H., and Kim S.J. (2002). Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res.* 36, 248 - 256.
- Lees D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 81-116.

- Le Guyader F.S., Bon F., De Medici D., Parnaudeau S., Bertone A., Crudeli S., Doyle A., Zidane M., Suffredini E., Kohli E., Maddalo F., Monini M., Gallay A., Pommepuy M., Pothier P., Ruggeri F.M. (2006). Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J Clin Microbiol.* 44, 3878-3882.
- Lipp E.K. and Rose J.B. (1997). The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev. Sci. Tech. Office Int. Epizooties.* 16, 620 - 640.
- Lipp E.K., Jarrell J.L., Griffin D.W., Lukasik J., Jacukiewicz J., Rose J.B. (2002). Preliminary evidence for human fecal contamination in corals of the Florida Keys, USA. *Mar. Poll. Bull.* 44, 666 - 670.
- Liu L.J., Liu W., Liu Y.X., Xiao H.J., Jia N., Liu G., Tong Y.G., Cao W.C. (2010). Identification of norovirus as the top enteric viruses detected in adult cases with acute gastroenteritis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 717-722.

- Lopman B. (2015). Global Burden of Norovirus and Prospects for Vaccine Development. *Centers for Disease Control and Prevention*. 1-44.
- Madore H.P., Treanor J.J., Pray K.A., Dolin R. (1986). Enzyme-linked immunosorbent assays for Snow Mountain and Norwalk agents of viral gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 24, 225-231.
- Malasao R., Khamrin .P, Chaimongkol N., Ushijima H., Maneekarn N. (2012) Diversity of human astrovirus genotypes circulating in children with acute gastroenteritis in Thailand during 2000-2011. *J Med Virol.* 84, 1751-1756.
- Maldonado Y., Cantwell M., Old M., Hill D., Sanchez M.L. (1998) Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J Infect Dis.* 178, 334-339.
- Matthijnssens J., Ciarlet M., McDonald S.M., Attoui H., Báyai K., Brister J.R. (2011). Uniformity of rotavirus strain

- nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 156, 1397-413.
- Mcleod C., Hay B., Grant C., Greening G., Day D. (2009a). Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters. *J Appl Microbiol*. 106, 1220-1230.
- Mcleod C., Hay B., Grant C., Greening G., Day D. (2009b). Inactivation and elimination of human enteric viruses by Pacific oysters. *J Appl Microbiol*. 107, 1809-1818.
- Melnick J.L. (1984). Etiologic agents and their potential for causing waterborne virus diseases. In J. L. Melnick (ed.), Enteric viruses in water. Karger, Basel, Switzerland. In 15, 1-16.
- MFDS. Present condition of food-borne. Retrieved from <http://www.mfds.go.kr> on July 23.
- Mheen T.I. (1998). Kimchi, in microorganisms and industry, *Mheen ed, Hanlimwon TI. Pub Co Kimchi*. 454-480.
- Mheen T.I, and Kwon T.W. (1984). Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. *Kor J*

- Food Sci Technol.* 16, 443–450.
- MOF. (2016a). Major statistics of oceans and fisheries. Oceans and fisheries report, Ministry of Oceans and Fisheries. 1–429.
- MOF. (2016b). Korean Shellfish Sanitation Program. The Notification of Ministry of Oceans and Fisheries. 1–106.
- MOHW. (2006). The Korea national health and nutrition examination survey. Ministry of health & welfare. 394–424.
- Moon A., Hwang I.G., Choi W.S. (2011). Prevalence of noroviruses in oyster in Korea. *Food Sci Biotechnol.* 20, 1151–1154.
- Nguyen T.A., Yagyu F., Okame M., Phan T.G. (2007). Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Med Virol.* 79, 582–590.
- Nims R. and Plavsic M. (2013). Inactivation of caliciviruses. *Pharmaceuticals* 6, 358–392. <http://dx.doi.org/doi/10.3390/ph6030358>.

- Nishida T., Nishio O., Kato M., Chuma T., Kato H., Iwata H., Kimura H. (2007) Genotyping and quantitation of noroviruses in oyster from distinct sea areas in Japan. *Microbio. Immunol.* 51, 177-184.
- Nuanualsuwan S. and Cliver D.O. (2002). Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J Viral Methods.* 104, 217-225.
- Oberste M.S., Maheer K., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A. (1999). Molecular Evolution of the Human Enteroviruses : Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *J Virol.* 73(3), 1941-1948.
- Oh E.G., Yoo H.D., Yu H.S., Ha K.S., Shin S.B., Lee T.S., Lee H.J., Kim J.H., Son K.T. (2012). Removal of fecal indicator bacteria from bivalves under natural and electrolyzed water. *Kor J Fish Aquat Sci.* 45, 11-16.
- Pallansch, M.A. and Roos R.P. (2007). Enteroviruses: poliovirus, coxsackievirus, echoviruses, and newer enteroviruses. 5th

eds, pp. 839–893, In Knipe, D. M., P. M. Howley, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (eds.), Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Park D.C., Park J.H., Gu Y.S., Han J.H., Byun D.S., Kim E.M., Kim Y.M., Kim S.B. (2000). Effect of salted-fermented fish products and their alternatives on angiotensin converting enzyme inhibitory activity of kimchi during fermentation. *Korean J Food Sci Technol.* 37, 920–927.

Park E.J., Han H.E., Min B.H. (1999). Isolation of Lactococci inhibiting *Listeria monocytogenes* from Kimchi habitat and its identification by 16S rDNA analysis. *Korean Soc Ecol.* 22, 45–50.

Park J.H., Jeong H.S., Lee J.S., Lee S.W., Choi Y.H., Choi S.J., Joo I.S., Kim Y.R., Park Y.K., Youn S.K. (2014). First norovirus outbreaks associated with consumption of

- green seaweed (*Enteromorpha* spp.) in South Korea. *Epidemiol Infect.* 27, 1-7.
- Park J.Y., Lee J.B., Jeong S.Y., Lee S.H., Lee, M.A., Choi H.J. (2007). Molecular characterization of an acute hepatitis A outbreak among healthcare workers at a Korean hospital. *Hosp Infect.* 67, 175-81.
- Park K.S., Choi Y.J., and Park J.S. (2012). Enterovirus infection in Korean children and antienteroviral potential candidate agents. *Korean J. Pediatr.* 55(10), 359-366.
- Park M.J., Jeon Y.S., Han J.S. (2001a). Antioxidative activity of mustard leaf kimchi added green tea and pumpkin powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 30, 1053-1059.
- Park S.H., Jeong H.W., Jung J.H., Kim K.S., Park S.K., Kim M.S., Kim Y.S., Oh Y.H., Jung K. (2015). Monitoring the Hepatitis A Virus in Oyster from Korea. *Advances in Microbiology.* 5, 825-831.
- Park W.P., Lee S.C., Bae S.M., Kim J.H., Lee M.J. (2001b).

- Effect of enoki mushroom (*Flammulina velutipes*) addition on the quality of kimchi during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 30, 210–214.
- Patel M.M., Hall A.J., Vinjé J., Parashar U.D. (2009). Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol.* 44, 1–8.
- Prato R., Lopalco P.H., Chironna M., Barbuti G., Germinario C., Quarto M. (2004). Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in South Italy. *BMC Infectious diseases.* 4, 37
- Provost K., Ozbay G., Anderson R., Richards G.P., Kingsley D.H. (2011). Hemocytes are sites of enteric virus persistence within oysters. *Appl Environ Microbiol.* 77, 8360–8369.
- Pusan national university Kimchi research institute. (2010). Database for Kimchi nutrition. Retrieved from <http://www.kimchiresearch.com> on July 12.
- Robertson B.H., Jansen R.W., Khanna B., Totsuka A., Nainan O.V., Siegl G., Widell A., Margolis H.S., Isomura S., Ito K.

- (1992). Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol.* 73, 1365-77.
- Roda Husman A.M., Lodder-Verschoor F., Berg H.H.J.L., Le Guyader F.S., Pelt H., Poel W.H.M., Rutjes S.A. (2007). Rapid virus detection procedure for molecular tracing of shellfish associated with disease outbreak. *J. Food Prot.* 70, 967-974.
- Seo J.K. and Sim J.G. (2000). Overview of rotavirus infections in Korea. *Pediatrics International.* 42, 406-10.
- Shim K.B., Ha K.S., Yoo H.D., Kim J.H., Lee T.S. (2009). Evaluation of the bacteriological safety for the shellfish growing area in Jaranman-Saryangdo area, Korea. *Kor J Fish Aquat Sci.* 42, 442-448.
- Shim, K.B., Ha, K.S., Yoo, H.D., Lee, T.S., Kim, J.H. (2012). Impact of Pollution Sources on the Bacteriological Water Quality in the Yongnam-Gwangdo Shellfish Growing Area of Western Jinhae Bay, Korea. *Kor J Fish Aquat*

Sci. 45(6), 561-569.

- Sobsey, M.D., Shields P.A., Hauchman F.S., Hazard R.L., Caton L.W. (1986). Survival and transport of hepatitis A virus in soils, groundwater and wastewater. *Water Sci. Technol.* 18, 97-106.
- Song H.U., Hwang S.G., Kwon C.I., Lee J.E., Ko K.H., Hong S.P., Park P.W., Rim K.S. (2009). Molecular epidemiology of hepatitis A virus in the south-east are of Gyeonggi-do in Korea. *Yonsei Med J.* 50, 512-6.
- Tate J.E., Burton A.H., Boschi-Pinto C., Parashar U.D. (2016). World Health Organization - Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clin Infect Dis.* 62, S96-S105.
- Theng T.F. and Erin K.L. (2005). Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiology and Molecular reviews.* 69(2), 357 - 371.

- Thornhill T.S., Wyatt R.G., Kalica A.R., Dolin R., Chanock R.M., Kapikian A.Z. (1977). Detection by immuno electron microscopy of 26 to 27 nm virus like particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 135, 20-27.
- Uhrbrand K., Byrmel M., Maunula L., Vainio K., Trebbien R., Norrung B., Schultz A.C. (2010). Evaluation of a rapid method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oyster and blue mussels. *J. Virol.* 169, 70-78
- U.S. FDA. (2015) National Shellfish Sanitation Program, Guide for the control of molluscan shellfish. U.S. Food and Drug Administration. Retrieved from <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FederalStateFoodPrograms/ucm2006754.htm> on May 5, 2017.
- Vinje J. (2015). Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J Clin Microbiol.* 53(2), 373-381.

- Yoo S.J., Seo D.D., Choi W.C., Kwon O.J., Park J.C., Shin B.M. (2008). Co-circulation of two genotypes of hepatitis A virus from sporadic cases in northeastern area of Seoul, Korea. *Korean J Lab Med.* 28, 371-7.
- Yoon I.S. (2009). Sensitivity test on the food poisoning bacteria of the garlic extract. *Korean J Contents.* 9, 339-349.
- Yun H., Kim S., Lee H., Byun K.S., Kwon S.Y., Yim H.J. (2008). Genetic analysis of HAV strains isolated from patients with acute hepatitis in Korea, 2005-2006. *J Med Virol.* 80, 777-784.
- Zheng D.P. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 346(2), 312-323.
- Zheng D.P., Widdowson M.A., Glass R.I., Vinje J. (2010). Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J. Clin. Virol.* 48, 168-177.