

Prevalence of Noroviruses Detected from Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Busan, Korea

Hee Soo Koo¹, Pyeong Tae Ku¹, Mi Ok Lee¹ and Hyung Suk Baik^{2*}

¹Busan Metropolitan Government Research Institute of Public Health & Environment, Busan 46616, Korea

²Department of Microbiology, Pusan National University, Geumjeong-gu, Busan 46241, Korea

Received June 30, 2016 / Revised August 12, 2016 / Accepted August 12, 2016

Norovirus is the most common causative agent of acute gastroenteritis. This study was carried out to investigate molecular epidemiology of norovirus infections from outbreaks in Busan from 2012 to 2015. Total of 581 stool specimens were collected from diarrhea patients in outbreaks in Busan, 71 samples were resulted in positive to norovirus. The data were analyzed according to seasonality, patient, age and gender. Noroviruses were detected most frequently during the winter season from November (25.4%) to February (28.2%). The age group from teens was the most susceptible to norovirus infections. To obtain the molecular genetic information of norovirus, we performed sequencing analyses of the strains detected. Norovirus genotypes have been reported to show high genetic diversity. Four kinds of GI genotypes (GI-1, GI-2, GI-3, GI-5) and five kinds of GII genotypes (GII-1, GII-4, GII-5, GII-6, GII-17) were indentified in outbreaks in Busan. Other previous studies have shown that GII-4 is the most predominant circulating in Korea and worldwide. The most prevalent norovirus genotypes of each year were GII-6 in 2012, GII-6 in 2013, GII-4 in 2014 and GII-6 in 2015. Except for 2014, GII-6 genotype was the most prevalent and predominant in Busan. We described the epidemiological analysis of the noroviruses in outbreaks in Busan. The result of this study will contribute to update the epidemiological data and improve hygiene and public health via sustainable surveillance.

Key words : Gastroenteritis, genotype, norovirus, outbreaks

서 론

설사를 일으키는 바이러스성 질환의 주요 병원체로는 Norovirus를 비롯해 Rotavirus, Enteric Adenovirus, Astrovirus, Sapovirus의 5종이 알려져 있는데 이들 중에도 특히 Norovirus는 영·유아뿐만 아니라 성인에 이르기까지 감염력이 매우 높고 집단 식중독 발생의 주요한 원인 병원체로 알려져 있다 [3, 31]. Norovirus는 미국 오하이오주 Norwalk 지방의 어느 초등학교에서 발생한 집단 설사 환자의 분변에서 분리되어 그 지명을 따서 Norwalk virus로 불렸다[1, 17]. 국제 바이러스 명명위원회(International Committee on Taxonomy of Viruses)에서 바이러스의 유전자의 구성, 유전자 염기서열 등의 분석을 통한 분류법에 의거하여 Norwalk-like virus는 Norovirus로 명명되었다[26].

Norovirus는 Caliciviridae family에 속하는 27~40 nm크기의 7.5 kb의 single stranded RNA 바이러스로서 5가지의 gen-

ogroup GI~GV형이 존재하며 GI, GII, GIV는 사람에게서 검출되며, GIII, GV는 소와 생쥐에서 감염되는데 대부분의 인체 감염은 주로 GI형과 GII형에 의한 것으로 알려져 있다[5, 10, 12, 18]. 그리고 Norovirus의 GI형과 GII형은 분자생물학적, 계통학적으로 매우 다르며 capsid 부위와 RNA polymerase의 조성에 따른 capsid 유전자의 염기서열에 따라 유전자형(genotype)을 분류를 하였으나, 최근 연구에서는 GI형은 9개, GII형은 22개의 유전자형으로 분류가 되고 있다[21]. Norovirus에 의한 식중독 발생시 주요 특성 및 증상으로는 12~48시간의 잠복기를 거쳐 설사, 복통, 구토, 메스꺼움을 나타내며 드물게 오한, 두통 및 근육통을 유발한다고 보고된다. 증상은 대개 1~2일 정도로 나타나지만, 하루에도 수 차례의 설사 및 구토를 하는 의학적 주의가 필요한 증상을 보이기도 한다[29]. 그리고 Norovirus 감염은 분변-경구 전파 경로를 거쳐 감염될 뿐만 아니라 오염된 물, 식품을 섭취하거나, 사람간 사람의 전파로 집단 발병의 경로로 이어진다[2, 4, 6, 8, 24, 32]. 또한 전염성이 강하고 전 연령층에서 감염될 수 있는 부분이 사회적인 문제가 되고 있다[9, 11, 13].

외국 사례의 경우 미국 Center for Disease Control and Prevention(CDC)에 의하면 전체 식중독 발생 원인 병원체 중 약 50%가 Norovirus 원인이었으며, 바이러스성 장염의 96%가 Norovirus가 원인이라고 보고한 바 있고[35], 2001년부터

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2271, Fax : +82-43-514-1778

E-mail : hsubaik@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2007년까지 일본에서 발생한 식중독 중 Norovirus에 의한 식중독 환자의 수가 가장 많았으며, 2006년 겨울시즌에 41명, 2012년 겨울시즌에는 8명의 사망자가 발생하여 식품위생 분야의 중요한 연구 주제가 되기도 하였다. 유럽의 경우 Britain's Health Protection Agency에서는 2013년 Norovirus에 의한 식중독 발생은 2012년과 비교할 때 72% 이상 증가되어 약 110만명의 환자가 발생되었다고 보고되어, 이는 전 세계적으로 Norovirus 원인 식중독의 발생이 더 높아질 수 있음을 시사하였다[23].

국내 Norovirus의 식중독 발생 동향을 살펴보면 1999년 Norovirus에 의한 식중독이 처음으로 보고되었고, 2003년 Norovirus에 의한 집단 식중독 발생, 2006년 31개 학교의 집단 급식소에서 식중독 대형 사고로 전국의 2,400여명 환자가 발생하면서 사회적으로는 Norovirus 식중독 예방의 중요성이 매우 부각되었다[23]. 외식산업과 급식문화가 점점 증가하고 그에 따라 식중독 발생도 증가하는 시점에서, 본 연구는 2012년부터 2015년까지 4년간 부산지역에서 발생한 식중독 사례를 대상으로 원인 병원체인 Norovirus를 검출하여 유전자의 염기서열 분석을 통해 유전자형의 분포에 관한 분석을 수행함으로써, 부산지역의 발생한 식중독의 Norovirus 유행 양상을 파악하여 Norovirus 식중독의 확산 방지 및 예방 대책 수립을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

검체 수집 및 전처리

본 연구에서는 2012년부터 2015년까지 부산지역에서 2인 이상 발생한 식중독으로 16개 보건소로부터 의뢰된 분변 검체 총 581건(환자 472건, 조리종사자 109건)을 사용하였다. 대변 검체는 1 g을 취해 멸균된 PBS (Sigma, USA) 9 ml에 희석하고 직장도말의 경우 1 ml의 PBS에 분변을 풀어주고 3분간 vortexing 강하게 한 후 4℃, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 사용하였다.

바이러스 RNA 추출

Viral nucleic acid extraction kit (Green Mate Biotech, Korea)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 분변부유액 150 ul에 Lysis & Binding buffer 300 ul를 넣고 vortex하여 실온에서 5분간 incubation시킨 후 Magnetic bead 20 ul를 넣고 진탕한 후 10분간 incubation시킨다. Magnetic stand에서 30초간 정체시키고 상층액을 제거한 후 Wash solution I 400 ul를 넣고 10초간 진탕하여 섞어준다. Wash solution II, Wash solution III으로 각각 동일한 방법으로 진행한 후 Magnetic stand에서 정체시켜 상층액을 완전히 제거한 후 Elution buffer 100 ul를 넣는다. 5분간 incubation시킨 후 60℃ Hot block에서 10분간 정체시키고, Magnetic stand에서 30초간 정체시킨 후 상층액을 수거하여 cDNA 합성을 위한 Real-Time RT-PCR과 RT-PCR 단계를 위한 RNA로 사용하였다.

Real-time RT-PCR

추출된 RNA 10 ul를 실시간중합효소연쇄반응 기법을 이용한 검출을 위하여 Norovirus Real-Time RT-PCR kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 45℃ 30분간 reverse transcription을 수행하고, 95℃ 10분 반응 후, 95℃ 15초 45 cycles로 Denaturation 후 56℃ 1분 Annealing & Extension하였다.

One step RT-PCR

Norovirus 유전자 분석을 위한 primer는 Table 1과 같다. 추출된 RNA를 20 ul취하여 특이적인 primer 첨가 후 Veriti thermal cycler (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 47℃에서 40분간 reverse transcription을 수행하여 cDNA를 합성하였다. 이를 94℃ 15분간 denaturation시킨 후, 94℃ 30초, 54℃ 30초, 72℃ 45초를 1회로 35 cycle을 반복한 후 72℃에서 7분간 유지 반응시켰다.

Semi-nested PCR

First PCR product 2 ul를 이용해 특이적인 primer 첨가한 후 Semi nested PCR을 수행하였으며 94℃에서 5분간 denaturation시킨 후 94℃ 30초, 56℃ 30초, 72℃ 45초를 1회로 25 cy-

Table 1. The sequence of oligonucleotides used for the detection of norovirus

Virus	Primer	Sequences (5'-3')	Position	Size (bp)	Application
GI	GI-F1M	CTGCCCGAATTYGTAATGATGAT	5342	314	Onestep RT-PCR
	GI-R1M	CCAACCCARCCATTRTACATYTG	5671		Onestep RT-PCR Semi-nested PCR
	GI-F2	ATGATGATGGCGTCTAAGGACGC	5357		Semi-nested PCR
GII	GII-F1M	GGGAGGGCGATCGCAATCT	5058	313	Onestep RT-PCR
	GII-R1M	CCRCCIGCATRICCRTRTACAT	5401		Onestep RT-PCR Semi-nested PCR
	GII-F3	TTGTGAATGAAGATGGCGTCGART	5088		Semi-nested PCR

cle을 반복한 후 72°C에서 7분간 유지 반응시켰다.

최종 PCR product를 SYBR safe (Invitrogen, USA)를 넣은 1.5% agarose gel (TaKaRa, Japan)에 loading한 후 전기영동하여 Image analyzer (BIO-RAD, USA)로 band를 확인하였다.

Sequence Analysis

증폭된 PCR product는 ExoSAP-IT Kit (Affymetrix, USA)를 이용하여 정제하였고 이를 template으로 하여 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)와 ABI 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용해 sequencing 분석을 하였다. 분석된 염기서열은 DNASTar (Madison, USA)를 통해 Align하여, Kroneman A 등이 제안한 Norovirus Genotyping Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>)을 통하여 Norovirus의 genotype을 결정하였다[22].

Statistical Analysis

Norovirus 검출된 결과에서 시사점을 제시하기 위해 ANOVA 통계분석을 실시하였다. 데이터들의 다중비교분석을 위하여 Scheffe 검정을 추가적으로 실행하였다. 이러한 통계적인 분석

을 위하여 SPSS (ver. 22.0) software를 활용하였다.

결과 및 고찰

연도별 부산지역 집단식중독 발생양상

2012년부터 2015년까지 부산지역의 식중독 발생 양상 가운데 연도별 검사건수, 양성건수 등은 Table 2와 같다. 식중독 검사 건수는 2012년 164건, 2013년 107건, 2014년 75건, 2015년 235건으로 총 581건이었다. 이들 중 Real-time RT-PCR 분석 결과 78건 양성(13.4%)이었고, RT-PCR에서는 71건 양성(12.2%)이었다. 연도별 양성율은 2012년 18.3%(30/164건), 2013년 5.6%(6/107건), 2014년 8.0%(6/75건), 2015년 12.3%(29/235)으로 2012년과 2015년이 Norovirus 식중독에 의한 유병률이 가장 높았다.

월별 부산지역 집단식중독 발생양상

월별 발생양상을 살펴보면 2월에 20건(28.2%)으로 가장 많이 발생했으며, 그 다음으로 11월 18건(25.4%), 12월 12건(16.9%), 3월 9건(12.7%), 4월 9건(12.7%) 순으로 발생하였고, 1월 2건(2.8%), 9월 1건(1.4%)이었다(Table 3). 이처럼 겨울에

Table 2. The incidences of norovirus infection in outbreaks from 2012 to 2015 in Busan

Year	Virus	No. of tested specimens	No. of positive specimens (%)		No. of strains	
			Real-time RT-PCR	RT-PCR	GI genogroup	GII genogroup
2012		164	35	30 (18.3)	10	20
2013		107	6	6 (5.6)	1	5
2014		75	6	6 (8.0)	0	6
2015		235	31	29 (12.3)	9	20
Total		581	78	71	20	51

Table 3. The monthly number of detected norovirus from outbreaks from 2012 to 2015

Year	No. of tested specimens	No. of positive specimens (%)	2012		2013		2014		2015	
			No. of tested	No. of positive	No. of tested	No. of positive	No. of tested	No. of positive	No. of tested	No. of positive
Jan	4	2 (2.8)					2	2	2	
Feb	60	20 (28.2)	60	20						
Mar	30	9 (12.7)	13	1	2	2	10	4	5	2
Apr	74	9 (12.7)	23	9	10		6		35	
May	61	0 (0.0)	2				22		37	
Jun	15	0 (0.0)			13		2			
Jul	53	0 (0.0)			2				51	
Aug	36	0 (0.0)	21		4		9		2	
Sep	73	1 (1.4)	34		28	1			11	
Oct	28	0 (0.0)	8				17		3	
Nov	72	18 (25.4)	3		28		1		40	18
Dec	75	12 (16.9)			20	3	6		49	9
Total	581	71 (12.2)	164	30(18.3)	107	6 (5.6)	75	6 (8.0)	235	29 (12.3)

가장 많이 발생했고 봄, 가을에도 산발적으로 발생하였으나, 하절기 5월~8월에는 Norovirus 원인인 식중독 발생은 보고가 없었다. 이는 Norovirus 검출의 계절적인 특징인 비교적 추운 계절에 높은 검출율을 보이면서, 50% 이상이 겨울철에 발생한다고 보고한 기존 연구들과도 동일한 결과였다[14, 28].

발생규모별, 유형별, 성별, 연령별 발생양상

식중독의 발생규모별로는 설사, 구토 등의 증상을 나타내는 사람이 2~10명이 발생하는 소규모 발생이 178건, 11~50명의 유증상자가 발생하는 중간 규모 발생이 403건이었고 51명 이상의 유증상자가 발생하는 대형 발생은 한 건도 없었다(Table 4). 식중독 의뢰된 검체는 환자 검체 472건과 조리업에 참여한 직원 검체 109건이 각각 포함되었으며, 남성 286건(49.2%), 여성 295(50.8%)로 성별 차이는 크게 없는 비율로 발생하였다. 연령별 분포는 11세~20세의 검체가 2012년 73건, 2013년 48건, 2014년 38건, 2015년 110건의 총 269건으로 10대의 초, 중, 고등 학생의 검체가 전체의 46.3%를 차지하였다.

연령대간의 유의한 정도를 파악하기 위하여 ANOVA 분석 방법을 실시하였다. ANOVA 분석의 결과 Table 5를 참조해보

면, 유의수준 *p*-value값이 0.000이었다. 즉 연령대별 Norovirus 감염은 오차 범위를 넘는 확연한 차이를 나타낸다고 할 수 있다.

ANOVA의 Scheffe 검정을 통하여 연령대간의 다중 비교분석을 실시하였다. Table 6에 결과를 보면, 11~20세 인원과 다른 모든 연령대들과의 다중비교에서 유의수준 *p*-value 값이 0.05보다 낮으므로, 11~20세 연령대는 다른 연령대들과는 확실히 두드러진 차이를 보인다고 할 수 있다. 반면에 10대를 제외한 다른 연령대 사이의 다중 비교에서는 유의수준 *p*-value가 1.000에 가까움으로써, 연령대간의 유의미한 차이가 없음을 통계적으로 확인할 수 있었다. 이러한 연령별 분석 결과로 볼 때, 10대를 위한 위생에 대한 기본 교육 및 식중독 예방 교육을 더욱 철저히 실시한다면 Norovirus에 의한 식중독의 확산 방지에 도움이 될 것이다.

Norovirus 검출 양상

최근 4년간 Norovirus가 원인인 식중독 사례들 중 Norovirus 감염 환자가 가장 많이 발생한 것은 2012년 2월 발생한 식중독 검체 60건 중 20건이 Norovirus 검출, 2015년 11월에

Table 4. The characteristics of cases in Busan from 2012 to 2015

characteristics	No. of specimens (%)	Year			
		2012	2013	2014	2015
Scale					
Small (2-10)	178 (30.6)	36	44	53	45
Medium (11-50)	403 (69.4)	128	63	22	190
Large (50<)	0 (0.0)	0	0	0	0
Type of person					
Patient	472 (81.2)	122	94	65	191
Food service employee	109 (18.8)	42	13	10	44
Gender					
Males	286 (49.2)	95	41	48	102
Females	295 (50.8)	69	66	27	133
Age					
0~10	47 (8.1)	16	6	1	24
11~20	269 (46.3)	73	48	38	110
21~30	40 (6.9)	4	2	7	27
31~40	55 (9.5)	21	5	6	23
41~50	81 (13.9)	27	14	12	28
51~60	64 (11.0)	17	25	9	13
61~70	22 (3.8)	6	7	2	7
71~80	3 (0.5)	-	-	-	3

Table 5. The test results from the ANOVA analysis

	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F statistics	<i>p</i> -value
Between Groups	10652.429	6	1775.405	8.386	0.000
Within Groups	4446.000	21	211.714		
Total	15098.429	27			

Table 6. The p-values from the multiple comparison analysis by the Scheffe test

Age	0~10	11~20	21~30	31~40	41~50	51~60	61~70
0~10		0.003*	1.000	1.000	0.994	1.000	0.999
11~20	0.003*		0.002*	0.004*	0.015*	0.007*	0.001*
21~30	1.000	0.002*		1.000	0.983	0.999	1.000
31~40	1.000	0.004*	1.000		0.999	1.000	0.995
41~50	0.994	0.015*	0.983	0.999		1.000	0.906
51~60	1.000	0.007*	0.999	1.000	1.000		0.981
61~70	0.999	0.001*	1.000	0.995	0.906	0.981	

* The mean difference is significant at the 0.05 level.

Table 7. Norovirus positive cases by GI, GII genogroup from 2012 to 2015

	No. of positive by year	Month	No. of tested specimens	No. of positive by month	No. of outbreaks according to genogroups (%)			
					GI genogroup		GII genogroup	
					Patient	FSE**	Patient	FSE**
2012	30	Feb	60	20	8	2	8	2
		Mar	13	1	-	-	1	-
		Apr	23	9	-	-	9	-
2013	6	Mar	2	2	-	-	2	-
		Sep	28	1	1	-	-	-
		Dec	20	3	-	-	3	-
2014	6	Jan	2	2	-	-	2	-
		Mar	10	4	-	-	4	-
2015	29	Mar	5	2	-	-	2	-
		Nov	40	18	-	-	18	-
		Dec	49	9	8	1	-	-
Total	71				17	3	49	2
					20 (28.2)		51 (71.8)	

**FSE : Food service employee

발생 식중독 검체 40건 중 18건이 Norovirus 검출된 사례였다 (Table 7).

식중독 검체 총 581건 중 12.2%인 71건이 Norovirus 검출되었고, 이 중 66건이 환자에서 검출되었고, 5건이 조리종사자에서 검출되었다. 본 연구 대상 중 109건이 조리종사자 검체로써, 역학조사 당시 조사대상 전체 조리종사자들은 장염, 복통, 구토 등의 증세가 없어 현장에서 음식 조리에 참여하고 있었다. 따라서 조리종사자의 Norovirus 양성 5건은 무증상 조리종사자의 Norovirus 검출 사례라 할 수 있다.

Norovirus genogroup별로 볼 때, GI genogroup 20건 (28.2%), GII genogroup 51건(71.8%)으로 GII genogroup의 발생이 월등히 높았다. 이는 부산지역의 급성설사질환 감시 사업 결과인 GI genogroup 21.8%, GII genogroup 78.2%로 GII genogroup이 우세하였던 결과와 유사하였다[20]. 또한 2000년대 이후 Norovirus에 대한 분자역학적 연구가 전세계적으로 진행된 보고에서도 GII genogroup이 많이 확인되는 결과와 비슷하며[25], 세계적으로도 GII genogroup이 80% 이상의 Norovirus 집단 식중독에 관여하는 것으로 보고되었다[37].

발생장소별 발생양상

식중독 발생장소별 현황은 Fig. 1과 같이 식중독이 가장 많이 발생하는 장소는 43%(250/581)로 일반 식당(횃집, 뷔페 등)이었고, 고등학교에서 25%(144/581건), 초등학교에서 13%(78/581건) 순으로 발생했으며, 그 외 수련원 6%(34/581건), 유치원 4%(21/581건), 중학교 3%(17/581건), 회사 급식소 3%(15/581건) 등으로 다양한 장소에서 산발적으로 발생하였다. 이는 외식 산업이 비약적으로 성장하여 그 규모가 대형화되었고, 초·중·고등학교에서의 단체급식 뿐만아니라 유치원, 어린이집에서도 단체 급식을 하면서 집단 식중독 사고 발생이 증가된 것으로 추정된다.

원인 추정 식품별 Norovirus 발생양상

역학조사시 환자가 응답한 결과, Norovirus 감염 환자가 섭취한 식품은 대부분 급식이었다. 원인 추정 식품을 환자의 분변에서 검출된 Norovirus 유전형과 매치한 현황은 Table 8과 같다. 일부 식품과 지하수 사용 업소의 지하수에 대해서는 Norovirus에 대한 유전자 검사 결과는 Norovirus 불검출로

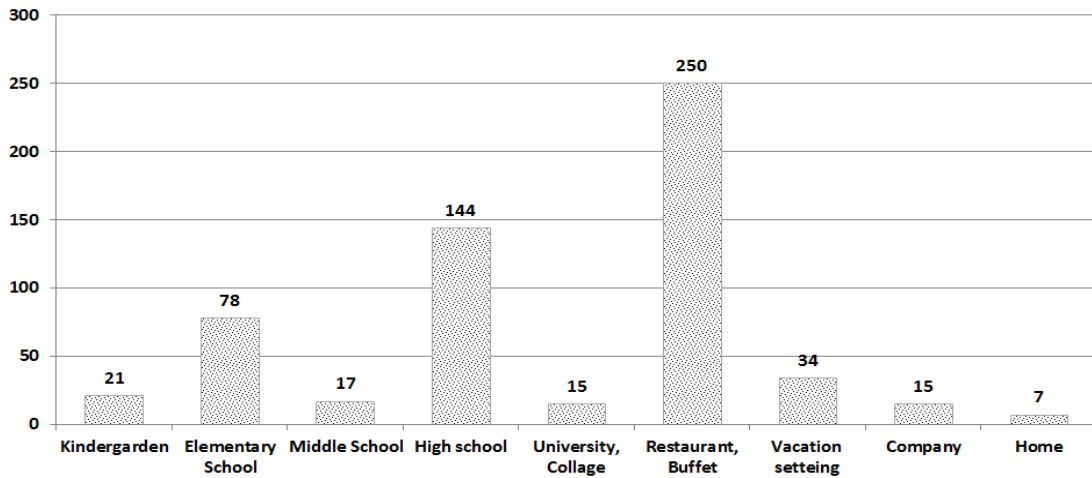


Fig. 1. Setting of norovirus outbreaks in Busan.

Table 8. The suspected source of norovirus infections from outbreaks in Busan

Genotype	suspected food					
	School catering	Hamburger	Bakery	Pizza	Seafood	
GI	GI-1	1	-	-	-	-
	GI-2	2	-	-	-	-
	GI-3	15	-	-	-	-
	GI-5	2	-	-	-	-
GII	GII-1	1	-	-	-	-
	GII-4	1	4	-	2	1
	GII-5	1	-	-	-	1
	GII-6	37	-	1	-	-
	GII-17	2	-	-	-	-
Total	62	4	1	2	2	

나타났다. 기존 연구들에서는 굴과 같은 해산물이 Norovirus 매개된 식중독을 일으키는 주요 식품으로 알려져 왔다. 그래서 일부 식중독 예방 교육자료에는 굴을 포함한 해산물을 Norovirus 감염원으로 한정함으로써 다양한 원인 식품을 인지하지 못하거나, 학교 단체급식에서 특정 식품만을 배제시키는 문제점이 있었다. 스웨덴의 식중독 사례에서는 원인 식품이 라즈베리(15%), 케이크 및 페스츄리(10%), 음용수(8%) 등으로 집계되었다. 또한 미국, 영국 등에서 Norovirus 식중독을 일으키는 주요 원인 식품으로 샐러드, 과일, 야채와 같은 신선 식품과 햄버거, 케익, 파이, 육류, 아이스크림 등의 다양한 식품이 보고되었다[7]. 본 연구에서 추정되는 주요 원인 음식은 급식이었으며, 그 외 식품으로는 모듬회, 햄버거, 피자, 베이커리로 해산물 외에 다양한 식품군도 Norovirus 식중독 원인으로 추정되는 식품임을 확인하였다.

지역별 Norovirus 발생양상

4년간 발생한 14개 지역에서 식중독으로 신고된 사례중 Norovirus 발생현황은 Fig. 2와 같다. 식중독 발생 신고 건수

는 부산진구(26.1%), 동래구(24.6%), 해운대구(14.1%) 순이었다. 또한 Norovirus의 양성 검출율이 높은 곳은 부산진구와 해운대구였다. 이들 지역은 부산의 대표적인 관광지인 서면과 해운대가 있는 지역으로 유동인구가 많으며 일반음식점도 밀집되어 있는 지역이라는 특징이 있다.

Norovirus 분자유전학적 특성 분포

Norovirus의 감염된 식중독 환자 및 조리종사자의 검체에서 분리된 유전자 염기서열분석을 실시하여 Norovirus GI, GII의 genotypes을 확인하고 그 분포양상을 Table 9에 나타내었다.

Genotype 분석 결과, 71건의 양성 검체 중 GI genogroup에서는 4가지 genotype (GI-1, GI-2, GI-3, GI-5), GII genogroup에서는 5가지 genotype (GII-1, GII-4, GII-5, GII-6, GII-17)으로 부산지역 Norovirus 원인 식중독에서는 다양한 유전자형이 검출되었다.

무증상 조리종사자의 Norovirus 검출 5건은 2012년의 4건, 2015년의 1건이었다. 2012년 2월 초등학교 급식 후 발생한 식

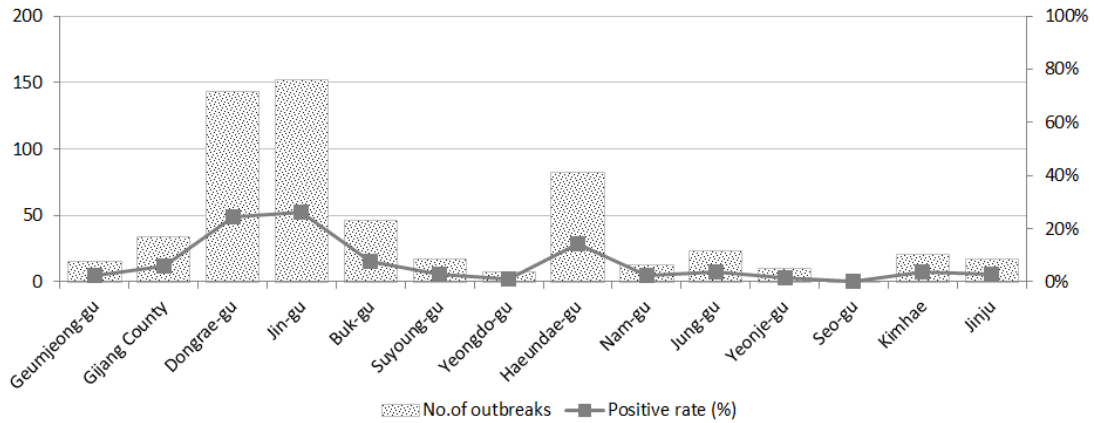


Fig. 2. The distribution by administrative districts in outbreaks from 2012 to 2015.

Table 9. The norovirus genotypes in outbreaks from 2012 to 2015

Geno group	Geno types	No. of outbreaks (%)	No. of outbreaks according to year							
			2012		2013		2014		2015	
			patient	FSE**	patient	FSE**	patient	FSE**	patient	FSE**
GI	GI-1	1 (1.4%)	1	-	-	-	-	-	-	-
	GI-2	2 (2.8%)	1	-	1	-	-	-	-	-
	GI-3	15 (21.1%)	4	2	-	-	-	-	8	1
	GI-5	2 (2.8%)	2	-	-	-	-	-	-	-
GII	GII-1	1 (1.4%)	1	-	-	-	5	-	-	-
	GII-4	8 (11.3%)	1	-	2	-	1	-	-	-
	GII-5	2 (2.8%)	0	1	-	-	-	-	-	-
	GII-6	38 (53.5%)	16	1	3	-	-	-	18	-
	GII-17	2 (2.8%)	-	-	-	-	-	-	2	-
Total		71	26	4	6	0	6	0	28	1

** FSE : Food service employee

중독 사례는 환자에서는 GI-1, GI-2, GI-3, GI-5, GII-1, GII-4, GII-6으로 다양한 유전자형의 발생이 있었으며, 조리종사자 2명은 GI-3, GII-5, GII-6가 검출되어 환자와 유사한 유전자형도 있었고, GII-5형은 환자에서는 검출되지 않았으나 조리종사자는 감염되어 있었다. 또한 GI, GII의 복합 감염은 환자 뿐만 아니라 조리종사자에서도 확인되었다. 2015년 12월 유치원에서 발생한 식중독 사례에서도 8명의 환자에서 검출된 GI-3형이 조리종사자 1명과 같은 GI-3형으로 나타났다. 하지만 이들 모두 환경 검체에서 Norovirus가 검출되지 않았기 때문에, 명확하게 조리종사자가 매개한 식중독 사례였다고는 단언 할 수 없었다. 그러나, 무증상 조리종사자의 노로바이러스 감염이 전파 매개체가 되었을 수도 있는 가능성을 배제할 수도 없는 결과이다. 국내외 보고에서 무증상 조리종사자가 매개한 Norovirus 집단 발생이 종종 보고되고 있는 만큼[16, 19, 33] Norovirus에 무증상 감염된 조리종사자는 임상적 자각 증세는 없지만 Norovirus의 감염원이 될 수 있으므로, 평소 개인 위생 관리를 철저히 할 필요가 있다[34]. 향후, 조리종사자에 대한 기본적인 위생, 식품 조리 및 급식 위생 등의 식중독 예방

교육이 더욱 필요할 것으로 생각된다.

연도별로 유전형의 분포양상을 살펴보면 2012년은 GII-6형이 65.4%(17건/26건), 2013년도에는 GII-6형이 50.0%(3건/6건), 2014년도에는 GII-4형이 83.3%(5건/6건), 2015년도에는 GII-6형 64.3%(18건/28건)으로 각각 가장 많은 발생빈도를 나타내었다. 최근 4년간 합계로 보면, GII-6형이 38건(53.5%), GI-3형이 15건(21.1%), GII-4형이 8건(11.3%) 순으로 나타나 부산지역의 식중독에서는 GII-6형이 가장 우세한 유전형으로 확인되었다. 하지만, 2010년부터 2013년 4월까지 서울지역에서 발생한 식중독 유전자형 분석결과 GII-4형이 54.1%, GII-2형이 13.3%를 차지하는 결과와는 대조를 이루는 결과였다[27]. 다른 연구에서도 우리나라 뿐 아니라 전 세계적으로 GII-4형이 가장 유행하는 유전형이라는 보고가 있다[30]. 특히, GII의 다양한 유전자형 중 GII-4형이 약 62%의 Norovirus 집단 식중독에 관여할 정도로 압도적으로 유행하고 있으며, 주기적으로 variant 발생이 계속 출현한다는 보고가 있다[37]. 특히 1996년 변이주 시작으로 현재 10개 이상의 변이주가 보고되었으며, 이는 집단 발생의 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되

었다[37]. 최근에는 2012년 11월 2012-Sydney 변이주가 전세계적으로 출현하여 Norovirus 관련 식중독의 발생 증가를 야기하였다[15, 36]. 본 연구에서는 GII-4형이 원인이 된 식중독 사례는 4사례가 있었는데, 2012년도 1사례 1건 검출, 2013년 1사례에서 2건, 2014년 2사례 중 각각 1건, 4건이 검출된 바 있지만, 환자가 속출하는 대유행은 없었다. 특히, 2015년도 부산지역에서는 GII-4형이 원인이 된 집단 발생은 단 한 건도 없었으며, 2012~2013년에 유행했던 GII-6형이 다시 우세한 분포양상을 나타냈다.

이처럼 부산지역에서는 국내 다른 지역 및 전세계적으로 집단 발생의 많은 원인이었던 GII-4형이 아닌, 꾸준히 GII-6형이 우세한 유전자형이라는 점이 매우 특징적이라 할 수 있다. 이 GII-6형이 부산지역에서는 어떠한 요인으로 꾸준히 우세한 유전자형이 되었는지는 여러 환경적 요인에 대한 다각적인 연구가 필요할 것으로 생각되며, 앞으로 부산지역의 Norovirus 대한 예방 대책 수립에 있어서 GII-6형에 대한 우선적 고려가 되어야 할 것으로 사료된다. 이제까지 부산지역 식중독 발생 사례에 대한 Norovirus의 역학 자료가 미비한 실정이었다.

따라서 본 연구를 통해 2012년부터 2015년까지 최근 4년 동안 부산지역의 집단 식중독 발생에 대한 Norovirus 감염 실태와 그 유전자형 유행 분포 양상을 분석할 수 있었다. 또한 앞으로의 식중독 예방 및 관리에 대한 기초적인 역학적 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료되며, 향후 부산지역에서 발생하는 식중독의 원인 바이러스와 유전자형의 분포 양상에 대한 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 판단되며 이를 통해 새로운 Norovirus 유전자형에 의한 대형 식중독 발생을 조기에 탐지하고 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Adler, J. L. and Zickl, R. 1969. Winter vomiting disease. *J. Infect. Dis.* **119**, 668-673.
- Anderson, A. D., Heryford, A. G., Sarisky, J. P., Higgins, C., Monroe, S. S., Beard, S., Newport, C. M., Cashdollar, J. L., Fout, G. S., Robbins, D. E., Seys, S. A., Musgrave, K. J., Medus, C., Vinj, J., Bresee, J. S., Mainzer, H. M. and Glass, R.I. 2003. A waterborne outbreak of Norwalk-like virus among snowmobilers-Wyoming, 2001. *J. Infect. Dis.* **187**, 303-306.
- Ando, T., Mulders, M. N., Lewis, D. C., Estes, M. K., Monroe, S. S. and Glass, R. I. 2003. A waterborne outbreak of Norwalk-like virus among snowmobilers-Wyoming, 2001. *J. Infect. Dis.* **187**, 303-306.
- Beller, M., Ellis, A., Lee, S. H., Drebot, M. A., Jenkerson, S. A., Funk, E., Sobsey, M. D., Simmons, O. D., Monroe, S. S., Ando, T., Noel, F., Petric, M., Middaugh, J. P. and Spika, J. S. 1997. Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. International consequences. *JAMA.* **278**, 563-568.
- Belliot, G., Noel, J. S., Li, J. F., Seto, Y., Humphrey, C. D., Ando, T., Class, R. I. and Monroe, S. S. 2001. Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of Norwalk-like viruses. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4288-4295.
- Boccia, D., Tozzi, A. E., Cotter, B., Cotter, C., Russo, T., Buttinelli, G., Caprioli, A., Marziano, M. L. and Ruggeri, F. M. 2002. Water-borne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 563-568.
- Cater, M. J. 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 1354-1380.
- Chikhi-Brachet, R., Bon, F., Toubiana, L., Pothier, P., Nicolas, J. C., Flahault, A. and Kohli, E. 2002. Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4266-4272.
- Dey, S. K., Nguyen, T., ANishio, O., Salim, A. F., Rahman, M., Yagyu, F., Okitsu, S. and Ushijima, H. 2007. Molecular and epidemiological trend of norovirus associated gastroenteritis in Dhaka city, Bangladesh. *J. Clin. Virol.* **40**, 218-223.
- Green, J., Wright, P. A., Gallimore, C. I., Mitchell, O., Morgan Capner, P. and Brown, D. W. 1998. The role of environmental contamination with small round structured viruses in a hospital outbreak investigated by reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay. *J. Hosp. Infect.* **39**, 39-45.
- Green, K. Y. 2007. Caliciviridae : The noroviruse, In *Fields Virology*. pp. 949-979, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Green, K. Y., Ando, T., Balayan, M. S., Berke, T., Clarke, I. N., Estes, M. K., Matson, D. O., Nakata, S., Neill, J. D., Studert, M. J. and Thiel, H. J. 2000. Taxonomy of the caliciviruses, *J. Infect. Dis.* **18**, 322-330.
- Guntapong, R., Hansman, G. S., Oka, T., Ogawa, S., Kageyama, T., Pongsuwanna, Y. and Kateyama, K. 2004. Norovirus and sapovirus infections in Thailand. *J. Infect. Dis.* **57**, 276-278.
- Hall, A. J., Vinjé, J., Lopman, B., Park, G. W., Yen, C., Gregoricus, N. and Parashar, U. 2011. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recomm. Rep.* **60**, 1-15.
- Huh, J. W., Kim, W. H., Moon, S. G., Lee, J. B. and Lim, Y. H. 2009. Viral etiology and incidence associated with acute gastroenteritis in a 5-year survey in gyeonggi province, South Korea. *J. Clin. Virol.* **44**, 152-156.
- Jeong, A. Y., Jeong, H. S., Lee, J. S., Park, Y. C., Lee, S. H., Hwang, I. G., Kim, Y. J., Kim, Y. J., Jung, S. Y. and Cheon, D.S. 2012. Occurrence of norovirus infections in asymptomatic food handlers in South Korea. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 598-600.
- Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S.,

- Kalica, A. R. and Chanock, R. M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* **10**, 1075-1081.
18. Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J. and Virgin, H. W. 4th. 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* **299**, 1575-1578.
 19. Kazuhiro, O., Tomoichiro, O., Naokazu, T. and Grant, S. H. 2007. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food-handlers in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3996-4005.
 20. Kim, N. H., Min, S. K., Park, E. H. and Park, Y. 2010. Study on gastroenteric norovirus genotypes in busan, Korea 2008 to 2010. *Rep. Busan Inst.* **20**, 9-17.
 21. Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinje, J., White, P. A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K. and Koopmans, M. 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* **158**, 2059-2068.
 22. Kroneman, A., Vennema, H., Deforche, K., v d Avoort, H., Peñaranda, S., Oberste, M. S., Vinjé, J. and Koopmans, M. 2011. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J. Clin. Virol.* **51**, 121-125.
 23. Lee, M. H., Seo, D. T., Seo, J., Wang, X., Lee, J. S., Joo, I. S., Lee, S. H., Park, G. S., Ha, S. D. and Choi, C. 2013. Trends and epidemiology of norovirus outbreaks. *J. Fd Hyg. Safety.* **8**, 3-11.
 24. Lopman, B. A., Reacher, M. H., Vipond, I. B., Sarangi, J. and Brown, D. W. 2003. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis health care setting. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 318-324.
 25. Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Potjier, P., Sanchez, A., Negrodo, A., Buesa, J., Schreier, E., Reacher, M., Brown, D., Gray, J., Iturriza, M., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K. O., Torven, M., von Bonsdorff, C. H., Maunula, L., Poljsk-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szux, G., Melegh, B., Svensson, L., van Duynhoven, Y. and Koopmans, M. 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* **363**, 682-688.
 26. Mayo, M. A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.* **147**, 655-663.
 27. Oh, S. A., Park, S. H., Ham, H. J., Seung, H. J., Jang, J. I., Duh, S. W., Jo, S. J., Choi, S. M. and Jeong, H. S. 2013. Molecular characterization of norovirus and rotavirus in outbreak of acute gastroenteritis in Seoul. *J. Bacteriol. Virol.* **43**, 307-316.
 28. Okame, M., Akihara, S., Hansman, G., Hainian, Y., Tran, H. T., Phan, T. G., Yagyu, F., Okitus, S. and Ushijima, H. 2006. Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan. *J. Med. Virol.* **78**, 1318-1324.
 29. Parashar, U., Quiroz, E. S., Mounts, A. W., Monroe, S. S., Fankhauser, R. L., Ando, T., Noel, T., Noel, J. S., Bulens, S. N., Beard, S. R., Li, J. F., Bresee, J. S. and Glass, R. I. 2001. Norwalk-like virus, Public health consequences and outbreak management, *MMWR Recomm Rep.* **50**, 1-17.
 30. Park, K. S., Jeong, H. S., Baek, K. A., Lee, C. G., Park, S. M., Park, J. S., Choi, H. U. and Cheon, D. S. 2010. Genetic analysis of norovirus GII.4 variants circulating in Korea in 2008. *Arch. Virol.* **155**, 635-641.
 31. Patel, M. M., Hall, A. J., Vinje, J. and Parashar, U. D. 2009. Noroviruses a comprehensive review. *J. Clin. Virol.* **44**, 1-8.
 32. Svraaka, S., Duizer, E., Vennema, H., de Bruin, E., van der Veer, B., Dorresteyn, B. and Koopmans, M. 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1389-1394.
 33. Tamaki, O., Shin-ichi, Y., Yasuo, O., Hironori, O., Yasuhiro, Y., Masayuko, K., Koichi, Y. and Nobuhiro, F. 2008. Occurrence of norovirus infections unrelated to norovirus outbreaks in an asymptomatic food handler population. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1985-1988.
 34. Tokyo welfare health center, norovirus corresponding standard manual for social welfare providers, Social welfare council of social welfare in Tokyo, Japan.
 35. Tuan Zaianzar, C., Hidayah, M. S., Chai, L. C., Tunung, R., Ghazali, F. M. and Son, R. 2010. The scenario of norovirus contamination in food and food handlers. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 229-237.
 36. Van Beek, J., Ambert-Balay, K., Bottledoom, N., Eden, J. S., Fonager, J., Hewitt, J., Iritani, N., Kroneman, A., Vennema, H., Vinjé, J., White, P. A. and Koopmans, M. 2013. Indication for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype GII.4 late 2013. *Euro. Surveill.* **18**, 8-9.
 37. Zheng, D. P., Widdowson, M. A., Glass, R. I. and Vinje, J. 2010. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 168-177.

초록 : 부산지역 집단 식중독 발생에서 검출된 노로바이러스의 유행양상

구희수¹ · 구평태¹ · 이미옥¹ · 백형석^{2*}

(¹부산광역시 보건환경연구원, ²부산대학교 미생물학과)

최근 4년 동안 부산지역에서 2인 이상 발생된 식중독 사례를 대상으로 급성 위장관염 증상을 보인 환자 472건 와 조리종사자 109건을 대상으로 유전자 분석을 한 결과 총 581건 중 71건(12.2%)에서 노로바이러스를 확인하였다. 연도별 검출현황은 2012년 18.3%(30/164건), 2013년 5.6%(6/107건), 2014년 8.0%(6/75건), 2015년 12.3%(29/235)으로 2012년과 2015년이 Norovirus 식중독에 의한 유병률이 가장 높았다. 월별 발생양상은 2월에 20건(28.2%)으로 가장 많이 발생했으며, 11월 18건(25.4%), 12월 12건(16.9%) 순이었고, 5월~8월에는 노로바이러스 환자 발생이 없어, 비교적 추운 계절에 높은 검출율을 보이는 계절적인 특징을 나타내었다. 연령별 분포는 11세~20세의 검체가 269건으로 10대의 초, 중, 고등학생의 검체가 전체의 46.3%를 차지하였다. ANOVA Scheffe 검정 결과를 통해, Norovirus의 예방 및 확산 방지를 위해 10대를 위한 위생 교육 및 식중독 예방교육을 더욱 철저히 실시해야 할 시사점을 얻었다. Norovirus genotype 분석 결과, GI genogroup은 GI-1형, GI-2형, GI-3형, GI-5형, GII genogroup은 GII-1형, GII-4형, GII-5형, GII-6형, GII-17형으로 다양한 genotype이 분포되었다. 연도별 유행하는 유전형은 2012년 GII-6형(17건), 2013년 GII-6형(3건), 2014년 GII-4형(5건), 2015년 GII-6형(18건)이 가장 우세했다. 그러나 최근 국내 뿐 아니라 전 세계적으로 GII-4형이 매우 유행하고 있으나, 부산지역은 2014년을 제외하고는 GII-6형이 우세한 genotype이라는 매우 특징적 결과를 얻었다.