

한국에서의 농산물 및 환경시료에서 노로바이러스와 위생지표세균의 모니터링

강지현 · 심혜미 · 김광엽*
충북대학교 식품생명공학과

Monitoring of norovirus and indicator microorganisms from agricultural products and environmental samples in Korea

Ji Hyun Kang, Hye Mee Shim, and Kwang Yup Kim*

Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University

Abstract Norovirus causes frequent epidemic viral gastroenteritis in Korea. The team for the control of noroviral foodborne outbreaks (NOROTECL) executed a project to trace the cause of norovirus contamination in agricultural products and environmental samples to reduce norovirus outbreaks in Korea. Between January and November in 2015, the contaminations by norovirus and indicator microorganisms such as coliforms, *Escherichia coli* and male specific coliphage (MSC) were examined in 80 agricultural products, 80 soil samples, 78 human feces samples, 3 animal feces samples, 80 agricultural water samples and 80 river water samples. Semi-nested PCR and DNA sequencing revealed 18 genogroup I and 3 genogroup II noroviruses in a total of 18 samples. These noroviruses were validated by real-time (RT)-PCR analysis. For indicator microorganisms, coliform and *E. coli* were respectively detected in agricultural products (68, 1%), soils (88, 7%), human feces (44, 12.8%), animal feces (67, 67%), agricultural waters (74, 30%) and river waters (96, 51%). The MSC results revealed 14 positive samples.

Keywords: norovirus, male-specific coliphage, semi-nested PCR, real-time RT-PCR

서 론

노로바이러스는 칼리시바이러스과(*Caliciviridae*)에 속하며 약 7.7 kb의 외피가 없는 외가닥(single stranded) RNA 바이러스이며 전 세계적으로 가장 많은 장염을 일으키는 병원성 미생물로 비세균성 장염의 약 90% 이상의 발병원인으로도 알려져 있다. 주 증상으로는 오심, 구토, 설사, 복통을 유발하나 대부분의 경우 증상은 경미하고 1-2일 지나면 자연 회복되며, 잠복기는 24-48시간이다(1-6).

노로바이러스는 유전학적 면역학적으로 매우 다양한 바이러스로 알려져 있다. 노로바이러스는 크게 5가지의 genogroup (GI-GV)으로 구분된다(7). 이중 GI, GII, GIV 유전자형은 인간에게 급성 장염을 일으키는 병원성 바이러스이며 분자생물학적, 역학적, 계통학적으로 매우 상의하여 유전자 염기서열에 따라 유전자형 GI은 14 아형, 유전자형 GII은 17 아형으로 모두 31가지의 유전자 타입(Genotype)으로 분류 되고 있다(8-12). 노로바이러스의 감염경로는 오염된 토양에서 유래되는 경우, 감염된 환자의 분변으로 직접 접촉적으로 노출되었을 경우, 공기 중에 오염되는 경우, 물, 사람간의 접촉에 의해 2차 감염되는 경우 등 매우 다양하다(13-15).

노로바이러스에 의한 식중독이 대체적으로 전국적으로 골고루 분포되어 있어 이를 차단하기 위해서는 지역별로 체계적인 조사가 필요하다. 미국 CDC (Center for Disease Control and Prevention) 에서 최근 10년간 발생한 노로바이러스가 발생한 것을 분석한 결과 열매류가 32%로 원인식품 중 가장 많은 발생원인이었고, 다음으로 과일/견과류 17%, 패류 13%로 밝혀져, 여태까지 패류가 가장 큰 원인 식품일 것이라는 결과와 다른 결과로 나왔다(16,17). 또한, 한국에서 글을 제외한 다른 식품을 대상으로 노로바이러스 오염 여부를 모니터링한 결과는 없었으며 원인식품에 대해 노로바이러스를 직접 분리 규명한 경우는 없었다. 그러므로 현재 한국의 경우 농산물에 오염된 노로바이러스의 오염원에 대한 기초자료가 없어(7) 노로바이러스의 근원적 예방, 저감화, 제어를 위한 정책수립 등에 어려움이 많아 관련 연구가 필요하다.

인간노로바이러스(human norovirus)는 심한 항원성 변이를 가지며 유행주가 지역별로 격차를 보여 각 지역에 유행하는 strain 유전자 정보를 기초로 진단을 수행하는 것이 가장 적합하므로(18) 한국에서 노로바이러스에 의해 오염될 것으로 예상되는 농산물 9가지를 대상으로 각 도별 생산량과 노로바이러스 발생 관련성을 고려하여 조사 대상을 지점 선정하여 시료를 채취하였다. 오염원으로 작용할 수 있는 생산지의 농산물에 노로바이러스가 어느 정도 감염되어 있는지와 주변 환경 요소로 시료채취 지역 반경 300 m 이내에 있는 재배지 토양, 인체분변, 가축분변, 농업용수, 하천수에 대해서 농산물과 함께 실험을 진행하였다. 주 생산지 농산물에 대한 노로바이러스와 주변 환경요인 식품위생에 있어서 가장 기초적인 지표위생미생물로 coliform, *Escherichia coli*, MSC (Male specific coliphage)에 대해 오염현황 조사 및 오염도

*Corresponding author: Kwang Yup Kim, Dept. of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, 28644, Korea
Tel: +82-43-261-2568
Fax: +82-43-271-4412
E-mail: kimky@chungbuk.ac.kr
Received September 22, 2016; revised November 12, 2016;
accepted November 14, 2016

정량적 평가를 함께 진행하였다. 또한, 노로바이러스 분포와 위생지표 세균 분포에 대한 지역별, 계절별, 대상별로 오염지도를 작성하여 각 시료별 오염현황에 대한 유행패턴을 비교분석하였다. 전체 실험 결과 환경적 영향 등 관련정보를 종합적으로 분석하여 유의성을 도출하기 위해 통계적 방법으로 주산지 농산물과 주변 환경의 노로바이러스 및 위생지표세균의 오염현황 상관성 분석을 함으로써 농산물의 노로바이러스 오염원인을 추적 조사하고, 이를 바탕으로 노로바이러스 저감화, 예방, 및 제어를 위한 방안을 제시하여 노로바이러스 확산을 방지하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

주요 농산물 생산량 통계와 식습관, 관계부처와 합의된 근거를 바탕으로 2015년에는 9개의 농산물(배추, 상추, 양배추, 무, 딸기, 오이, 부추, 파, 미나리) 시료를, 주위 환경시료는 인근지역(300 m 이내)의 토양, 분변(가축분변, 인체분변), 물(농업용수, 하천수)의 시료를 분석대상으로 하였다. 생산량을 고려하여 도별로 채취할 농산물을 결정하였으며 각 농산물 재배시기, 출하시기, 강우 전후, 동절기, 하절기를 고려하여 조사 주기를 결정하였다. 2015년 1월부터 11월까지 한국의 80지역 시료를 검사하였다.

시료 추출 및 농축 과정

농산물, 토양, 분변(인체분변, 가축분변), 물(농업용수, 하천수)의 전처리방법은 각각 다르며 다음과 같다(Fig. 1, Table 1)(19). 분석용 시료에 MNV-1 (murine norovirus-1) 1,000 pfu (plaque forming units)을 인위적으로 오염시킨 후 process control로 사용

하였다. MNV-1이 음성으로 나온 경우 공정이 제대로 수행되지 않았다고 판단하고 재검사를 실시하였다.

농산물 시료

9개의 농산물(배추, 상추, 양배추, 무, 딸기, 오이, 부추, 파, 미나리)을 25 g씩 6개의 원심분리통에 담았다. 그 중 4개(100 g)의 원심분리통에는 MNV-1을 1,000 pfu를 접종하였고, 2개(50 g)에는 접종하지 않고 negative control로 사용하였다. 토마토, 오이, 무, 딸기의 경우 가능한 껍질을 얇게 잘라내어 검사하였다. 추출물은 딸기만 beef extract (pH 9.5, 100 mM, Tris-HCl (Bioneer, Daejeon, Korea), 50 mM Glycine (BioShop, Burlington, ON, Canada), 3% beef extract (BD, NJ, USA)를 사용하였으며, 나머지 농산물에 대해서는 0.25 M threonine (MB cell, Seoul, Korea) -0.3 M 염화소듐(NaCl) (Junsei, Tokyo, Japan) (pH 9.5)를 사용하였다. 각 농산물 25 g이 담긴 원심분리통에 추출액 90 mL 넣고 1시간 동안 진탕배양기(shaking incubator) (IS-971R, Jeio tech, Seoul, Korea)에서 5분마다 tumbling하여 1차 추출물을 얻었으며, 같은 방법으로 2차 추출물을 얻었다. 여기서 얻어진 탈리용액 중 각 3 mL을 대장균, 대장균, MSC 검사 시 사용하였으며, 9 mL은 콜로니 군집분석용으로 사용하였다. 농축은 얻어진 탈리액에 동량의 클로로폼(Chloroform) (OCI, Seoul, Korea): 아이소아밀알코올(Isoamylalcohol) (Junsei, Tokyo, Japan) (24:1)을 사용하여 약 30 분 이상 추출하여 정제 후 원심분리(SUPRA 30K, Hanil, Kimpo, Korea) (8,000×g, 4°C, 10분)하였으며, 경계선 위의 상층액을 새 튜브에 옮기되 이 과정에서 부피를 계산한 후(약 130-140 mL 근처) 추출량의 45%에 해당하는 40% 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol) 8,000 (PEG 8,000, Sigma, St. Louis, MO, USA)과 추출

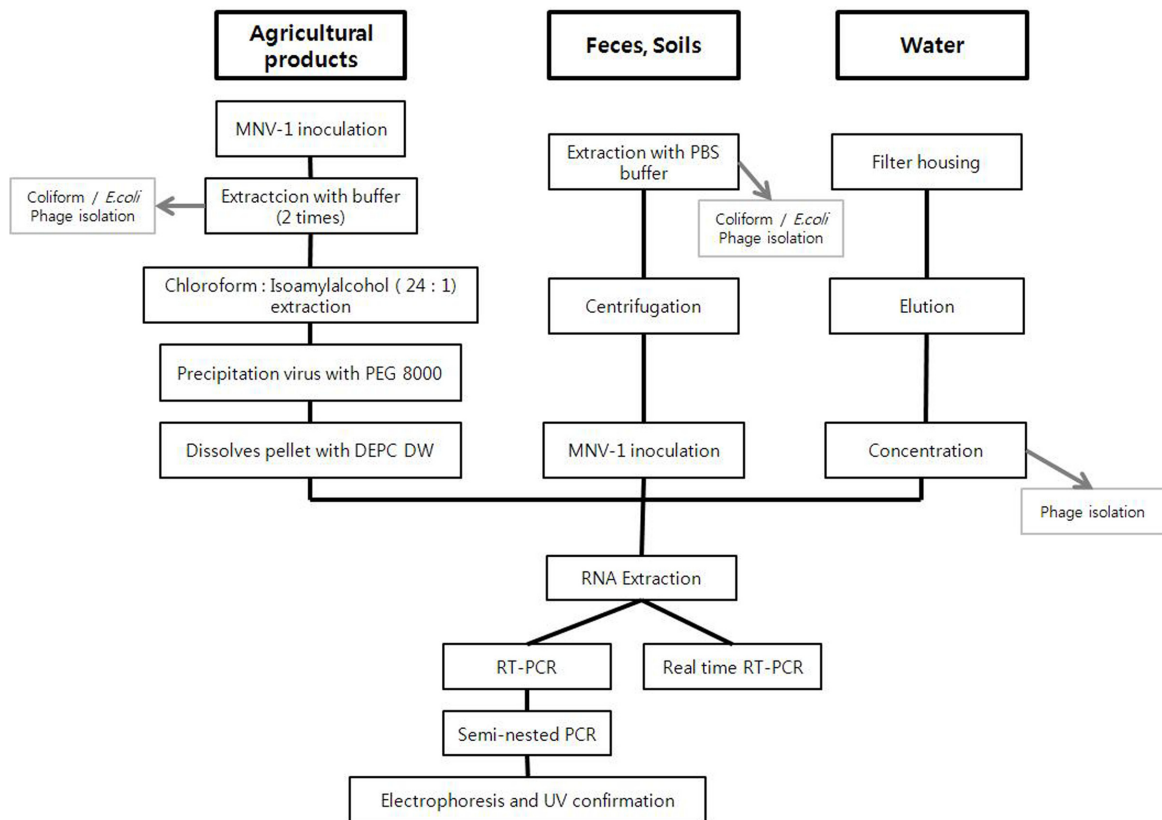


Fig 1. Schematic diagram of norovirus analysis. Flow sheet summarizing the procedure of one-step RT-PCR and semi-nested PCR and real-time RT-PCR for norovirus analysis of the agricultural products, feces, soils and waters.

Table 1. Overall processing steps and buffers for norovirus detection

Processing step		Buffer
Extraction	Agricultural produce	0.25 M Threonine-0.3 M NaCl (PH 9.5)
	Strawberry	Beef extract (pH 9.5, 100 mM Tris-HCl, 50 mM glycine, 3% beef extract)
	Soils, Feces	PBS (Phosphate Buffered Saline)
	Cartridge Filter housing	1.5% Beef Extract+0.05 M glycine (pH 9.5)
Removal of food components		Chloroform : Isoamylalcohol (24:1)
PEG precipitation		40% PEG 8000+15% 3 M NaCl
Elution		DEPC DW
Viral RNA extracion		QIAGEN Viral RNA Mini Kits
Virus Detection	Semi-nested PCR	Verso 1-step RT-PCR Reddy Mix kit, Taq DNA Polymerase
	Real time PCR	ABPath-IDTM One-step RT-PCR KIT

량의 15%에 해당하는 3 M NaCl (Junsei, Tokyo, Japan)을 잘 혼합한 후 4°C에서 3시간 이상 방치하였다. 원심분리 (24,100×g, 4°C, 20분)후 상층액을 버리고 남은 펠릿을 DEPC DW (Bioneer, Daejeon, Korea) 1 mL으로 녹여 농축하였다.

토양 시료

토양은 10 g을 원심분리통에 넣고 100 mL의 1X Phosphate Buffered Saline (PBS, Biosesang, Sungnam, Korea) buffer을 사용하여 희석하였으며 진탕배양기(IS-971R, Jeio tech, Seoul, Korea) (150 rpm, 2시간)에서 진탕배양하고, 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 상층액만 취해 얻었다(20-22). 얻어진 상층액은 농축과정 없이, 상층액 1 mL은 위생지표세균(Coliform, *E. coli*)으로써 MSC 검사 시 사용하였으며, 나머지 상층액에 2 mL의 MNV-1을 1,000 pfu를 인위적으로 오염시킨 후 노로바이러스 검사에 사용하였다.

분변 시료(가축분변, 인체분변)

가축분변과 인체분변의 1 g을 1X 인산완충용액(Phosphate Buffered Saline) buffer 30 mL을 사용하여 상온에서 20분 동안 방치하여 부유시킨 후 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 상층액만 취해 얻었다(20-22). 여기서 원심분리 하지 않은 10 mL은 대장균, 대장균 검사에 사용하였고 원심분리 후 얻은 탈리액 10 mL은 농축과정 없이 MSC 검사에 사용하였으며, 나머지 약 10 mL 중 2 mL에 MNV-1을 1,000 pfu를 인위적으로 오염시킨 후 노로바이러스 검사에 사용하였다.

물 시료(농업용수, 하천수)

1-MDS filter의 카트리지가 하우징형태 채수된 하천수와 농업용수는 채수 시작 시간으로부터 72시간 내에 탈리를 실시하였다. 탈리용 주입구에 연동정량펌프 호수를 연결한 후 연동정량펌프와 1.5% beef extract (BD, NJ, USA)와 0.05 M glycine (Bio-Shop, Burlington, ON, Canada) (pH 9.5)이 혼합된 용액 1 L가 채워져 있는 병에 호수로 연결시키고, 탈리액 유출구에 유출용 호스를 연결하여 1.5% beef extract와 0.05 M glycine (pH 9.5)이 혼합된 용액이 들어있는 유리병에 넣고 탈리액 유출구를 닫는다. 연동정량펌프를 가동하여 카트리지가 필터 하우징 안으로 추출용액이 양전하 카트리지가 필터 내에 완전히 차면 멈춘 후 5분간 정치한다. 탈리액을 회수할 때는 거품이 없도록 주의했으며 이 과정을 총 3회 반복하였다 최종탈리액은 1 M HCl으로 pH 7.0-7.5 사

이로 조절하였다. 농축은 최종 탈리액을 교반기에서 혼합하면서 1 M HCl으로 pH 3.5±0.1로 조절 후, 실온에서 30분간 천천히 쉰다. 침전물이 생기면 탈리액을 멸균한 원심분리용기에 옮겨 원심분리(2,500×g, 4°C, 15분)하였다. 상층액을 제거하고 남은 침전물에 0.15M sodium phosphate (Sigma, St. Louis, MO, USA) 완충액(pH 9.0-9.5)을 20 mL 가해 완전히 부유시키고, 실온에 10분간 방치 후 원심분리(7,000×g, 4°C, 10분)하였다. 상층액을 취해 1 M HCl을 pH 7.0±7.5로 조절하고 0.22 µm syringe 여과시켜 농축하였다. 탈리액 3 mL은 MSC 검사에 사용하였고, 남은 17 mL에 MNV-1 1,000 pfu를 인위적으로 오염시킨 후 노로바이러스 검사에 사용하였다.

Viral RNA 추출

RNA추출은 QIAGEN Viral RNA Mini Kits (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였다. 토양, 분변, 물의 경우 140 µL를 사용하였고 농산물만 2배의 양인 280 µL를 사용하여 각 시료별 RNA를 추출하였다. 음성대조군으로 멸균증류수를 사용하였고 같은 방법으로 2개의 RNA를 추출하였다.

One step RT-PCR와 Semi-nested PCR

노로바이러스의 유전자형(GI형, GII형)을 확인하기 위해 one step RT-PCR에서는 각 시료별 추출된 RNA 중 5 µL와 Verso 1-step RT-PCR Reddy Mix kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하였다. 유전자증폭기(Mastecycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하였고 반응조건은 45°C에서 30분 cDNA 합성 후, 94°C에서 5분 초기변성 거치고, 94°C에서 30초 변성, 55°C에서 30초 결합, 72°C에서 1분 30초 확장과정을 1회로 하여 35cycle을 거치고, 그 후 72°C에 7분을 최종신장을 거쳐 연장반응 시켰다. Semi-nested PCR에서는 One-step PCR product를 주형으로 하여 생성된 product 2 µL에 Taq DNA Polymerase (Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하여 혼합하여 사용하였다. 반응조건은 94°C에서 5분 초기변성후, 94°C에서 30초 변성, 55°C에서 30초 결합, 72°C에서 1분 30초 확장을 1회로 하여 25cycle을 거치고, 72°C에서 7분 최종 신장하여 연장반응을 시켰다. 여기서 GI형과 GII형의 양성대조군에 대하여도 동일한 방법으로 semi-nested RT-PCR을 진행하였다(Table 2). 1.5% 아가로스 (agarose) gel (SeaKem, Rockland, ME, USA)에서 시료에 GI형은 313 bp, GII형 은 310 bp을 1차 확인하되 양성대조군의 GI형은

Table 2. Nucleotide sequences of the primers

Genogroup	Primer	Sequence (5'→3')	Location
GI	GI-F1M ⁽¹⁾	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GAT GAT	5342-5365
	GI-R1M ⁽¹⁾⁽²⁾	CCA ACC CAR CCA TTR TAC ATY TG	5649-5671
	GI-F2 ⁽²⁾	ATG ATG ATG GCG TCT AAG GAC GC	5358-5380
GII	GII-F1M ⁽¹⁾	GGG AGG GCG ATC GCA ATC T	5049-5067
	GII-R1M ⁽¹⁾⁽²⁾	CCR CCI GCA TRI CCR TTR TAC AT	5367-5389
	GII-F3M ⁽²⁾	TTG TGA ATG AAG ATG GCG TCG ART	5079-5102
MNV	DG224 ⁽¹⁾	CAG GAA CGC TCA GCA GTC TTT GFG A	5031-5055
	DG228 ⁽¹⁾⁽²⁾	TCC CAA CCC AGC CGG TGT ACA TGG C	5344-5368
	DG227 ⁽²⁾	TGA ATG GGG ACG GCC TGT TCA ACG GCG G	5126-5153

Table 3. Real-time RT-PCR primer

Genogroup	primer and probe	Sequence (5'→3')	Station
GI	COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	5291
	COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	5375
	RING1(a)-TP	FAM-AGATYGCATCYCCTGTCCA-TAMRA	5340
GII	BPO-13	AICCIATGTTYAGITGGATGAG	5007
	BPO-13N	AGTCAATGTTAGGTGGATGAG	
	BPO-14	TCGACGCCATCTTCATTCACA	5101
	BPO-18	VIC-CACRTGGGAGGGCGATCGCAATC-TAMRA	5044

689 bp, GII형은 686 bp으로 확인하였다. 최종 검출 판정으로 DNA sequencing하고 NCBI의 Blast search를 통하여 최종 노로바이러스를 확정하였다.

Real-time RT-PCR

앞서 확정된 양성시료에 한에 정량분석하기 위해 CFX 96 Real-time System software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 실시하였으며 식품공전의 방법을 사용하였다(Table 3). ABPath-IDTM One-step RT-PCR KIT (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하였으며, 증폭과정의 오류점검을 위해 노로바이러스의 표준곡선(Standard curve)을 AccuPower Norovirus Real-Time RT-PCR Kit Positive Control (bioneer, Daejeon, Korea) (농도 20000/μL)을 10배 희석법으로 희석하여 사용하였고 각 RNA 당 3개의 well에 첨가하였다. GI형과 GII형을 각각 잡았으며, Standard curve는 매 PCR 반응마다 만들었다. 유전자 추출과정을 거친 음성대조군의 시료와 함께 증폭반응 하였다. 반응조건은 45°C에서 30분, 95°C에서 10분 반응 후, 95°C 15초, 56°C 60초를 1회로 하여 45cycle을 반응시킨 후 증폭곡선을 확인하였다.

대장균군(Coliform)과 대장균(*E. coli*) 검사

Coliart 시약과 농산물 농축액 1 mL, 분변 농축액 10 mL, 토양 농축액 10 mL, 물 100 mL을 사용하였으며 부족한 나머지 양을 0.85% NaCl을 사용하여 총 부피를 100 mL로 맞춰주었다. Coliart 시약이 전부 녹을 때 까지 섞어준 후 Quanti-tray 2,000에 기포가 생기지 않게 부은 뒤 sealer (Idexx lab, ME, USA)에 넣어 봉합한 후 37°C에 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 Quanti-tray 2,000의 색의 수를 통해 최적확수시험법(Most Probable Number, MPN) 표를 참조하여 결과를 판독하였다.

Male Specific Coliphage (MSC) 검사

Famp Host를 Single Agar Layer (SAL)방법으로 각 시료별 대

장균파지(coliphage) 검사를 진행하였다(12). TSA 1X로 농산물 추출물 1 mL, 분변 추출물 10 mL, 토양 추출물 10 mL, 물의 경우 3 mL을 사용하여 37°C incubator에서 16-24시간 배양하여 plaque 계수하고 파지정제(phage purification)하여 sequencing을 받아 phage인 것을 확정하였다.

농산물과 환경시료의 노로바이러스 오염과 위생지표세균 오염 간의 상관성 통계분석

오염도에 대한 대표적인 위생지표미생물로 대장균군과 대장균이 있다. 하지만 바이러스 경우 세균보다 크기가 작고 형성기관이나 증식 과정 등 모든 면에서 세균과 다르기 때문에 부적합하므로 바이러스에 대한 지표미생물로 coliphage도 함께 실험하였으며, 노로바이러스 실험법의 유전자 검사법으로 semi-nested PCR, real-time RT-PCR을 병행하여 오염도를 검사하였다(23,24). 한국의 총 80지역 농산물과 환경시료를 대상으로 노로바이러스 결과와 위생지표 미생물 결과를 통틀어서 두 번수간의 관련성, 상관관계 통계분석하기위해 SPSS를 사용하였다(18). 농산물, 토양, 인체분변, 가축분변은 MPN/g으로 나타내는 반면 농업용수와 하천수는 MPN/100 mL로 나타내어 따로 상관성 분석을 하였다.

결과 및 고찰

한국의 각 지역별로 2015년 1월부터 11월까지 노로바이러스가 존재할 것으로 추정되는 지역에서 수집한 농산물 80건, 토양 80건, 인체분변 78건, 가축분변 3건, 농업용수 80건, 하천수 80건을 검사하였다.

노로바이러스 오염현황 및 오염도 정량적 평가

노로바이러스 검출 결과 양성 반응은 총 18건이었으며(Table 4) 농산물 80건 중 노로바이러스 양성으로 판정된 시료는 3건으로(3.75%), 양배추 2건, 오이 1건에서 양성 반응이 나타났다. 토

Table 4. Genotypes and other characteristics of norovirus positive samples

Month	Sample	Sample sources	Region	Coliform (MPN/g, MPN/100 mL)	<i>Escherichia coli</i> (MPN/g, MPN/100 mL)	Genotype	GI (copy/g, copy/L)	GII (copy/g, copy/L)	MSC (PFU/L)
1	20150126A1H2	River waters	Kyung nam	1.5*10 ²	1	GI-3	236.97	-	0
	20150126B1H1	Agricultural waters	Chung buk	5.2	<1	GI-4	434.48	-	0
	20150126B1H2	River waters	Chung buk	9.6*10 ²	8.7*10 ²	G1-4	213.67	-	0
2	20150225B2H1	Agricultural waters	Jeon nam	1.6*10	<1	GI-9	102.56	-	0
	20150225B2H2	River waters	Jeon nam	3.8*10	<1	GI-4	268.52	-	0
3	20150325A1H2	River waters	Chung buk	3.1	<1	GI-9 GII-17	182.69	317.57	0
	20150325B1H2	River waters	Chung buk	9.6*10 ²	1.8*10 ²	GI-5	301.48	-	0
	20150325B2H1	Agricultural waters	Chung buk	7.8*10	<1	GI-5	818.98	-	0
	20150325B2H2	River waters	Chung buk	2.3*10	<1	GI-5	370.25	-	0
4	20150403B1H1	Agricultural waters	Chung nam	9.6*10 ²	9.6*10 ²	GI-9	108.81	-	0
	20150408A1H2	River waters	Kyong gi	4.1*10	<1	GI-9 GII-17	755.32	196.65	0
	20150416A1H2	River waters	Kyung nam	9.6*10 ²	2	G1-4	222.67	-	0
5	20150528A2V8-3	Cabbage	Kyung nam	2.3*10	<1	GI-3	3.52	-	0
	20150528B2V3-3	Cabbage	Kyong gi	6.4*10 ³	<1	G1-1	5.97	-	0
	20150528B1H1	Agricultural waters	Jeon nam	1.0*10 ³	<1	G1-5	360.08	-	0
	20150528B1H2	River waters	Chung buk	1	<1	GI-9 GII-17	317.79	315.75	0
7	20150717B1H1	Agricultural waters	Chung buk	6.9*10 ²	5.2	GI-14	201.74	-	330
9	20150914A2V6-2	Cucumber	Jeon nam	7.3*10	<1	GI-5	4.48	-	0

양 80건, 가축분변 3건, 인체분변 78건 에서는 노로바이러스 양성반응이 나타나지 않았다. 농업용수 80건 중 6건이 노로바이러스 양성으로 나타났다. 하천수 80건 중 9건이 노로바이러스 양성으로 나타났다.

위생지표미생물 오염현황 및 오염도 정량적 평가

대장균군의 정성검사 결과 검출량은 농산물 68%, 토양 88%, 인체분변 44%, 가축분변 67%, 농업용수 74%, 하천수 96%로 나타났다. 농산물과 농산물 반경 300 m 이내에 있는 주변 환경시료를 채취해본 결과 전체적으로 대장균군에 의한 오염이 높은 양상을 나타냈다. 대장균군 정량검사 결과로 0에서 10⁵까지 5단계로 농도별로 비교해 보았을 때(Table 5) 분변시료에서 가장 낮은 수치인 0-10에서 인체분변은 56%, 가축분변 33%에서 가장 높은 수치를 나타내었고, 가장 높은 수치인 10⁴-10⁵에서 그 다음으로 수치가 높게 나타났다. 이것은 시료 채취 방법에 있어 분변을 g 단위로 채취하거나 swab으로 채취하는 두가지 방법으로 채취한 것으로 낮은 농도는 swab으로 채취한 시료에서 나타나고 높은 농도는 g단위로 채취한 경우에서 나타난 것으로 예상되었다.

대장균의 정성검사 결과 검출량은 농산물 1%, 토양 7.5%, 인체분변 12.8%, 가축분변 67%, 농업용수 30%, 하천수 51%로 조사되었다. 농산물과 농산물 채취 반경 300 m 이내에 있는 주변 환경시료는 대장균에 의한 오염이 낮은 양상을 나타냈다. 대장균 정량검사 결과 0에서 10⁵까지 5단계로 농도별로 비교해 보았을 때 농산물과 토양에서는 낮은 수치를 나타냈으며, 분변인 인체분변과 가축분변에서만 대장균 수치가 높게 검출 되었다. 특히 가축분변의 오염도는 가장 높은 수치인 67%로 시료의 수가 적어 높은 것으로 예상되었다.

MSC는 coliform 세균을 숙주로 하는 바이러스로, 환경에서 박테리아 지표미생물보다 높은 안정성을 보이고 있어 바이러스 오염의 지표미생물로 제안되었고, microbial source tracking 방법에

서 중요하게 여겨지고 있다(9,25-27). MSC 시험결과 전체시료에 대해 농산물 1건, 농업용수 6건, 하천수 7건에서 검출되어 총 14건이 양성으로 검출되었다. 노로바이러스 양성으로 검출된 시료 18건과 비교하여 볼 때, 바이러스의 지표미생물로 이용되는 coliphage가 노로바이러스 양성 시료에 비해 총 14건으로 더 낮은 검출율을 나타냈다. 이것은 coliphage와 노로바이러스 검출 시 사용한 시료와 실험방법이 기존 연구와 다르기 때문에 나타난 결과로 판단되었다. F+ coliphage는 주로 숙주로 *E. coli*를 사용하지만 다른 대장균과 장내세균들도 공격하고 증식하기도 하며, 높은 분변성 오염물에서는 오히려 검출되지 않고, 낮은 온도의 하수와 지하수에서의 복제는 한계가 있는 것으로 알려져 있다. 장관계 바이러스 때문에 발병하는 질병에서 대장균 파지의 회수가 없었다는 점과 지하수에서 장관계 바이러스 발생에 관한 전염병학적 데이터베이스도 매우 적기 때문으로 판단되었다(23). 또한, 노로바이러스, 대장균군/대장균, MSC 파지는 분변오염과 관련이 있다고 하여 실험한 결과, coliphage 실험 결과 양성반응이 나타난 시료에 대해 대장균군과 대장균의 농도가 일정하게 나타나지 않았고, 양성으로 나타난 시료가 MSC 실험 결과에서는 음성으로 나타났으며, 농도와는 연관성이 없다는 것을 나타내었다.

지역별 노로바이러스 양성 결과

2015년 1월부터 11월까지 충청북도 12곳, 충청북도 11곳, 경기도 15곳, 전라남도 14곳, 전라북도 3곳, 경상남도 14곳, 경상북도 3곳, 강원도 8곳 등 국내의 다양한 지역에서 수집한 시료를 대상으로 노로바이러스 양성 유무를 검사하였다. 노로바이러스 양성 총 18건 중에 충청남도 1곳, 충청북도 7곳, 경상남도 3곳, 전라남도 5곳, 경기도 2곳으로 분포하였다. 노로바이러스 양성으로 검출된 지역 중 충청북도가 가장 높은 양성비율인 44.4%를 나타냈다. 시료채취 시 노로바이러스가 오염됐을거라 추정되는 지역에서의 농산물과 주변 환경시료를 함께 채취하였는데, 노로바이러스

Table 5. Levels of indicator bacteria in agricultural products, feces, soils and waters

Coliform													
Coliform (MPN/g)	Agricultural		Soil		Human fece		Animals fece		Total coliform (MPN/L)	Agricultural water		River water	
	Count of sample	%	Count of sample	%	Count of sample	%	Count of sample	%		Count of sample	%	Count of sample	%
0~10	152	31	10	13	44	56	1	33	0-10	21	26	3	4
10~10 ²	42	8	14	17	4	5	0	0	10-10 ²	14	18	6	7
10 ² ~10 ³	62	12	29	36	5	6	0	0	10 ² -10 ³	39	49	63	79
10 ³ ~10 ⁴	224	46	27	34	5	6	0	0	10 ³ -10 ⁴	6	7	8	10
10 ⁴ ~10 ⁵	0	0	0	0	20	26	2	67	10 ⁴ -10 ⁵	0	0	0	0
Total	480	100	80	100	78	100	3	100	Total	80	100	80	100

Escherichia coli													
Escherichia coli (MPN/g)	Agricultural		Soil		Human fece		Animals fece		Escherichia coli (MPN/g)	Agricultural water		River water	
	Count of sample	%	Count of sample	%	Count of sample	%	Count of sample	%		Count of sample	%	Count of sample	%
0~10	475	99	74	93	68	88	1	33	0-10	56	70	39	49
10~10 ²	5	1	6	7	0	0	0	0	10-10 ²	7	9	15	19
10 ² ~10 ³	0	0	0	0	1	1	0	0	10 ² -10 ³	17	21	25	31
10 ³ ~10 ⁴	0	0	0	0	1	1	0	0	10 ³ -10 ⁴	0	0	1	1
10 ⁴ ~10 ⁵	0	0	0	0	8	10	2	67	10 ⁴ -10 ⁵	0	0	0	0
Total	480	100	80	100	78	100	3	100	Total	80	100	80	100

스 양성을 나타낸 농산물 시료들과 농산물 시료를 수집한 지역의 물 시료들이 동시에 노로바이러스 양성을 나타내는 경향을 보인 것으로 보아 농산물의 오염 원인 추적이 가능하였다. 2015년 시료 중 총 18건에서 노로바이러스 양성을 나타내었는데 1월에 충청북도에서 2건, 2월에 전라남도에서 2건, 3월에 충청북도에서 4건, 5월에 전라남도에서 3건으로 총 11건이 같은 날짜에 같은 지역에서 발견되었다. 연구결과 노로바이러스는 같은 지역이라도 매해 검출되는 유전자형이 다르다고 하였으므로(28) 장기간의 모니터링이 필요할 것으로 여겨진다.

월별 노로바이러스 양성 결과

2015년 1월부터 11월까지 국내의 다양한 지역에서 수집한 시료에 대해 월별 분석양상을 조사한 결과, 양성 반응 18건에 대하여 1월 16.7%, 2월 11.1%, 3월 22.2%, 4월 16.7%, 5월 22.2%, 6월 0%, 7월 5.6%, 8월 0%, 9월 5.6%, 10월 0%, 11월 0%로 나타났다. 노로바이러스 양성비율에 대해 년별로, 월별로 연구한 자료가 많으며, 대체적으로 겨울철에 노로바이러스가 많이 검출되고 여름철에는 검출 빈도가 감소한다고 하였다(29-31). 노로바이러스 식중독 발생은 항상 1월부터 4월 사이에 가장 발생빈도가 높고 뚜렷한 계절성을 보이는데(14) 실험결과로부터 1월부터 5월까지 양성이 꾸준히 나타났다. 특히 5월에 노로바이러스 발생률이 높았는데, 이와 유사하게 더운 계절에 2006년 홍콩 사례에서도 노로바이러스가 유행하였고(31), 서울지역 집단식중독에서도 늦봄까지는 노로바이러스가 발생하였다(32). 보통 5월부터 11월까지의 노로바이러스의 빈도율이 감소하는데(13) 본 실험에서도 6월경에 노로바이러스 양성 반응이 나타나지 않았고, 여름을 지나면서 노로바이러스가 검출되는 경향을 나타냈다(Table 4). 노로바이러스는 환경에 대한 생존력이 강해 계절에 상관없이 1년 내내 발생한다는 보고(14)처럼, 7월과 9월에도 1건씩 발견되는 경향을 보였다.

대상별 노로바이러스 양성 결과

2015년 1월부터 11월까지 국내의 다양한 지역에서 수집한 농산물 80건, 토양 80건, 인체분변 78건, 가축분변 3건, 농업용수 80건, 하천수 80건의 시료에 대해 노로바이러스 양성반응을 검사하였다. 노로바이러스 양성으로 검출된 시료는 농산물 3건, 농업용수 6건, 하천수 9건으로 나타났으며 하천수의 3건은 같은 시료에 한해서 유전자형 GI과 GII가 동시에 검출되었다. 각 시료별 유전자형 GI과 GII에 대한 노로바이러스 양성반응 결과는 시료종류(GI, GII)로 나타내었으며, 그 결과는 농산물(3.75, 0%), 토양(0, 0%), 인체분변(0, 0%), 가축분변(0, 0%), 농업용수(7.5, 0%), 하천수(11.25, 3.75%)의 결과로 나타났다. 노로바이러스에 감염된 환자의 분변에 대해 양성 반응을 분석한 결과를 보면 양성비율이 99%정도 된다고 보고했지만(33,34), 실험결과에서는 분변에 대한 노로바이러스 양성 반응이 나타나지 않았다. 이는 노로바이러스에 감염되었을 것으로 예상되는 농산물을 중심으로 하여 주변 환경시료인 토양, 인체분변, 가축분변, 지하수, 농업용수를 검사하였기 때문에, 기존 결과와 다른 것으로 생각된다. 식품매개 바이러스는 다른 병원성 바이러스보다 수치가 낮게 나온다는 결과(35,36)와 마찬가지로 총 80건의 분석결과 중에 3건만 양성인 것으로 보아 기존 연구결과와 일치하였다. 또한, 분변의 경우 분변을 swab으로 채취하였기 때문에 시료양이 적어 나온 결과라 생각된다.

유전자형별 노로바이러스 양성 결과

2015년 1월부터 11월까지 한국에서 산발적인 시료 대상으로 분석한 결과에 대해 유전자형 GI과 GII이 발견된 시료는 18개 시료로 2.3%(18/801)의 검출율을 나타내었다. 유전자형별 결과 GI이 2.3%(18/801), GII가 0.37%(3/801) 검출율을 나타냈으며 0.37%(3/801) 시료에서는 유전자형 GI과 GII가 동시에 검출되었다. 전체적으로 유전자형 GI이 유전자형 GII에 비해 월등히 높게 검출

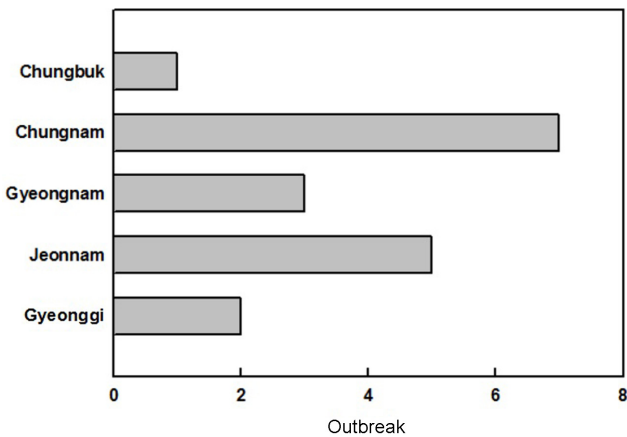


Fig 2. Number of norovirus positive cases in area.

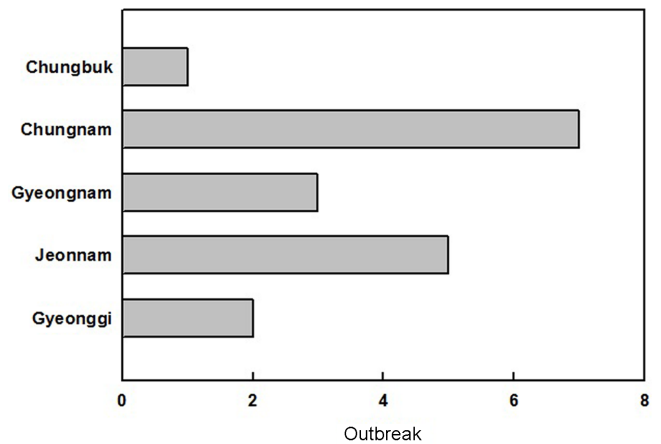


Fig 3. Percentage of norovirus positive cases from January 2015 to November 2015.

되었으며, 대부분 유전자형 GII의 결과가 더 월등이 높다는 보고와는 상반된 결과이다(29,37). 이것은 분변시료 위주로만 검사한 것이며 아직 농산물 위주로 검사된 보고가 없기 때문에 GII형이 무조건적으로 높다고는 할 수 없을 것으로 생각된다.

1999-2004년보다 2004-2006년에 노로바이러스는 변이가 심해 한국에 유행하는 노로바이러스 유전자군 아형분포가 다양해졌는데, 유전자형 GI은 1, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 14 type, 유전자형 GII는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 type 이 발견되었다(28). 본 실험에서는 이에 해당되는 유전자형이 검출이 되었는데 유전자형 GI은 GI-1, 3, 4, 5, 9, 14 type로 6종류의 type, 유전자형 GII은 GII-17 type로 1종의 type으로 총 7종의 type이 검출되었다. 유전자형 GI에서도 GI-5 type과 GI-9 type이 각각 27.8%(5/18)이 가장 많이 발생하였으며, 그 다음으로는 GI-4 type 22.2%(4/18), GI-3 type 11.1%(2/18), GI-1 type과 GI-14 type은 5.6%(1/18)로 나타나 유전자형이 다양하게 유행하는 것을 확인할 수 있었다. 유전자형 GII에서는 GII-17 type이 100%(3/3)로 나타났다. 유럽과 여러 나라뿐만 아니라 한국에 유행하는 변이주인 GII-4 type은 전혀 발견되지 않았다. 노로바이러스 유전자형 유행 현황은 시기적, 지역적 차이가 있는 것으로 보인다(37).

정량검사로 RT-PCR 결과 유전자형 GI의 상관계수는 0.987, 기울기가 -3.4264로 나타났으며, 유전자형 GII의 상관계수는 0.9437, 기울기는 -2.5135로 나타났다. 표준식에 유전자형 GI과 GII가 나온 Ct값을 대입하여 각 시료 당 노로바이러스 농도를 정량하였다. 노로바이러스가 검출된 농산물의 경우 3.519 copy/g와 5.974 copy/g로 다른 노로바이러스가 검출된 물시료에 비해 농도가 낮았으며, 물시료의 경우 102.56 copy/L부터 높은 농도인 818.958 copy/L까지 수치가 다양하게 검출되었다.

농산물과 환경시료의 노로바이러스 오염과 위생지표세균 오염 간의 상관성 통계분석

본 연구에서는 한국의 총 80지역의 농산물과 환경시료를 대상으로 노로바이러스 결과와 위생지표 미생물결과를 통틀어서 두 변수간의 관련성, 상관관계로써 Statistical Package for the Social Sciences Program (SPSS)을 사용하여 농산물, 토양, 인체분변, 가축분변은 MPN/g로 나타냈으며, 농업용수와 하천수는 MPN/100 mL로 나타내어 따로 상관성 분석을 하였다.

농산물, 토양, 인체분변, 가축분변 간에 노로바이러스 오염과 위생지표세균간의 상관관계 결과 대장균군과 대장균간의 관계는 0.638(p<0.001)로 관계가 높은 것으로 나타났다. 하지만 대장균군

과 노로바이러스 오염간의 관계는 0.001로 관계가 없는 것으로 나타났으며, 대장균과 노로바이러스 오염간의 관계는 -0.24로 대장균이 높아질 때 노로바이러스 오염은 낮아지는 것으로 나타났다. 여기서 농산물은 한 개의 시료 당 6개가 나오므로 6개를 평균한 값으로 하였다.

농업용수, 하천수의 노로바이러스 오염과 위생지표세균간의 상관관계 결과 대장균군과 대장균간의 관계는 마찬가지로 0.409(p<0.001)로 관계가 높은 것으로 나타났다. 하지만 대장균군과 노로바이러스 오염간의 관계는 -0.157로 대장균군이 높아질수록 노로바이러스 오염이 매우 낮아지는 것으로 나타났으며, 대장균과 노로바이러스 오염간의 관계는 -0.010로 대장균이 높아질 때 노로바이러스 오염은 낮아지는 것으로 나타났다.

여기서 분변시료의 경우 시료채취에 있어서 g단위가 아닌 먼 봉으로 채취하게 되어 대장균군과 대장균의 수치가 낮은 것이 많았으며 가축분변의 경우 시료가 3개밖에 되지 않아 오차가 있을 것으로 판단된다. 노로바이러스, 위생지표미생물과 MSC간의 연관성에 관하여 서로 상반되는 분석들이 있으나(38,39), 본 연구결과에서는 연관성이 없는 것으로 나타났다.

요 약

노로바이러스는 국내에서도 지속적으로 유행성 바이러스성 위장염을 일으키고 있다. 노로바이러스 저감화사업단(NOROTECL)의 1중 2세부과제에서는 농산물의 노로바이러스 오염 원인을 추적조사하여 노로바이러스 전파를 예방하고 저감화하기 위한 과제를 수행하였다. 2015년 1월부터 11월 사이에 노로바이러스와 관련이 있을 것으로 추정되는 80개 농산물, 80개 토양, 78개 인체분변, 3개 가축분변, 80개 농업용수, 80개 하천수 시료를 대상으로 노로바이러스, Male specific coliphage (MSC), 위생지표세균(Coliform, *E. coli*) 세 가지 검사를 통해 오염현황을 조사하였다. Semi-nested PCR과 DNA sequencing을 통해 18개의 Genogroup I과 3개의 Genogroup II 노로바이러스가 총 18개의 시료에서 발견되었다. Genogroup이 확정된 노로바이러스에 대하여 RT-PCR을 진행하였다. 대장균군과 대장균은 농산물에서 68%와 1%, 토양에서 88%와 7.5%, 인체분변에서 44%와 12.8%, 가축 분변에서 67%와 67%, 농업용수에서 74%와 30%, 하천수에서 96%와 51%의 검출율을 각각 나타냈다. MSC 결과에서는 14개의 시료가 양성으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 대한민국 식품의약품안전처의 2015년 NOROTECL (Team for the control of noroviral foodborne outbreaks)의 주산지 농산물의 노로바이러스 오염원 추적연구에 1중 2세부 충북대학교로 참여한 결과이며 이에 감사드립니다.

References

- Emerging Infectious Diseases. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. Available form: www.cdc.gov/eid. Accessed Jan. 2005;11(1):95-102.
- Ho ZJM, Vithia G, Ng CG, Maurer-Stroh S, Tan CM, Loh J, Lin TPR, Lee JMV. Emergence of norovirus GI.2 outbreaks in military camps in Singapore. *Int. J. Infect Dis.* 31: 21-30 (2015)
- Green J, Henshilwood K, Gallimore CI, Brown DWG, Lees DN. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small roundstructured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 858-863 (1998)
- Brugha R, Vipond IB, Evans MR, Sandifer QD, Roberts RJ, Salmon RL, Caul EO, Mukerjee A. A community outbreak of food-borne small round-structured virus gastroenteritis caused by a contaminated water supply. *Epidemiol. Infect.* 122: 145-154 (1999)
- Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, Ando T, Glass RI. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United State. *J. Infect. Dis.* 186: 1-7 (2002)
- Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, Monroe SS. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: A reassessment using new diagnostics. *J. Infect. Dis.* 181: 254-261 (2000)
- Shin SB, Oh EG, Lee HJ, Kim YK, Lee TS, Kim JH. Norovirus quantification in oysters *crassostrea gigas* collected from Tongyeong, Korea. *Korean J. Fish Aquat. Sci.* 47: 501-507 (2014)
- Vinje J, Green J, Lewis DC, Gallimore CI, Brown DWG, Koopmans MPG. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Arch. Virol.* 145: 223-241 (2000)
- Paik SY. Research on the contamination levels of norovirus in food catering facilities. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Osong, Korea. pp. 1-150 (2009)
- Wollants E, Coster SD, Van Ranst MV, Maes P. A decade of norovirus genetic diversity in Belgium. *Infect. Genet. Evol.* 30: 37-44 (2015)
- Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2988-2995 (2004)
- Kim NH, Park EH, Park YK, Min SK, Jin SH, Park SH. Study on norovirus genotypes in Busan, Korea. *J. Life Sci.* 21: 845-850 (2011)
- Shin SB, Oh EG, Yu HS, Lee HJ, Kim JH, Park KBW, Kwon JY, Yun HD, Son KT. Inactivation of a norovirus surrogate (Feline calicivirus) during the ripening of oyster kimch. *Korean J. Fish Aquat. Sci.* 43: 415-420 (2010)
- Kim KY. Research on the contamination levels of norovirus in food catering facilities. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Osong, Korea. pp. 1-98 (2009)
- Ha JH, Lee JS, Joo IS, Lee HJ, Ha SD. Comparison Study on Viabilities of Human Norovirus and Norovirus Surrogates. *Safe food*, Seoul, Korea. pp. 19-25 (2014)
- Gould LH, Walsh KA, Vieira AR, Herman K, Williams IT, Hall AJ, Cole D. Surveillance for foodborne disease outbreaks- United States, 1998-2008. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 62: 1-34 (2013)
- Eric CM, Peter KC, Angela WLL, Ann HW, Wilina WLL. Atypical norovirus epidemic in Hong Kong during summer of 2006 caused by a new genogroup II/4 variant. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2205-2011 (2007)
- Kim BJ. Correlation between norovirus detection and indicator organisms presence in agricultural produce, growing soil, feces, agricultural water, and river water. MS thesis, University of Dongguk, Gyeongju, Korea (2015)
- Choi WS. Development of protocol for the detection of food-borne virus in food. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Osong, Korea. pp. 1-90 (2004)
- Lu QB, Huang DD, Zhao J, Wang HY, Zhang XA, Xu HM, Qu F, Liu W, Cao WC. An increasing prevalence of recombinant GI norovirus in pediatric patients with diarrhea during 2010-2013 in China. *Infect. Genet. Evol.* 31: 48-52 (2015)
- Mathijs E, Denayer S, Palmeira L, Botteldoorn N, Scipioni A, Vanderplasschen A, Dierick K. Novel norovirus recombinants and of GI. 4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. *Viol. J.* 8: 1 (2011)
- Hoa-Tran TN, Nakagomi T, Sano D, Sherchand JB, Pandey BD, Cunliffe NA, Nakagomi O. Molecular epidemiology of noroviruses detected in Nepalese children with acute diarrhea between 2005 and 2011: Increase and predominance of minor genotype GI.13. *Infect. Genet. Evol.* 30: 27-36 (2015)
- Shin CS. A study on the technology for enhancing water hygiene in water pipe and supplying. *Kwater*, Daejeon, Korea. pp. 1-82 (2014)
- Jheong WH, Kim JM, Jang SJ, Park JY, Oh JH, Choi HJ, Yang SY, Park SJ, Seo EY. A study on the bacteriophages as indicators of viruses in water environment. National Institute of Environmental Research, Incheon, Korea. pp. 1-98 (2008)
- Alderisio KA, Wait DA, Sobsey MD. "Detection and characterization of male-specific RNA coliphages in a New York City reservoir." *Watershed Restoration Management New York City Water Supply Studies.* JJ McDonnell, DL Leopold, JB Stribling & LR Neville. 133-142 (1996)
- Lee HT, Kim HY, Park HJ, Cho YE, Ryu SY, Lee KJ, Jung JS, Ko GP. Evaluation of Influent Water Quality Using Indicator Microorganisms in Lake Shiwha. *J. Environ. Health Sci.* 34: 86-94 (2008)
- Leclerc H, Edberg S, Pierzo V, Delattre JM. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *J. Appl. Microbiol.* 88: 5-21 (2000)
- Fonager J, Hindbaek LS, Fischer TK. Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012. *Euro Surveill.* 18: 1-24 (2013)
- Ham HJ, Oh SA, Kim CK, Jang JI, Jo SJ, Choi SM. Molecular characteristics of human noroviruses genogroup I and genogroup II detected in acute gastroenteritis patients in Seoul. *J. Environ. Health Sci.* 38: 57-65 (2012)
- Hedlund KO, Rubilar-Abreu E, Svensson L. Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. *J. Infect. Dis.* 181: 275-280 (2000)
- Ho ECM, Cheng PKC, Lau AWL, Wong AH, Lim WWL. Atypical norovirus epidemic in Hong Kong during summer of 2006 caused by a new genogroup II/4 variant. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2205-2011 (2007)
- Kim EJ, Kim MS, Chae YZ, Cheon DS. Prevalence of human noroviruses detected from outbreaks of gastroenteritis patients in Seoul, Korea. *Korean J. Microbiol.* 48: 102-108 (2012)
- Oh SA, Park SH, Ham HJ, Seung HJ, Jang JI, Suh SW, Jo SJ, Choi SM, Jeong HS. Molecular characterization of norovirus and rotavirus in outbreak of acute gastroenteritis in Seoul. *J. Bacteriol.* 43: 307-316 (2013)
- Kim NH, Park EH, Park YK, Min SK, Jin SH, Park SH. Study on Norovirus Genotypes in Busan, Korea. *J. Life Sci.* 21: 845-850 (2011)
- Lopman BA, Adak GK, Reacher MH, Brown DW. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreak; surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 71-77 (2003)
- Hedlund KO, Rubilar-Abreu E, Svensson L. Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. *J. Infect. Dis.* 181:

- 275-280 (2000)
37. Kim YJ, Lee MG, Kam SK. Characteristics of norovirus occurrence in Jeju. *J. Env. Sci. Intern.* 23: 219-229 (2014)
38. Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW. Murine norovirus: A model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol.* 80: 5104-5112 (2006)
39. Moon A, Ahn J, Choi WS. Elution buffers for human enteric viruses in vegetables with applications to norovirus detection. *J. Food Hyg. Saf.* 28: 1229-1153 (2013)