J. Fd Hyg. Safety
Vol. 25, No. 2, pp. 153~161 (2010)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

충청지역 집단급식소의 노로바이러스 실태조사와 환경요인의 영향

정우영* · 엄준호 · 김병조 · 윤민호[1] · 주인선 · 김창수 · 김미라 · 변정아 · 박유경 · 손상혁 · 이은미 정래석 · 나미애 · 육동연 · 강지연 · 허옥순

대전지방식품의약품안전청 유해물질분석과, [1]충남대학교 생물환경화학과

Investigation of Norovirus Occurrence and Influence of Environmental Factors in Food Service Institutions of *ChungCheong* Area

Woo-Young Jung*, Joon-Ho Eom, Byeong-Jo Kim, Min-Ho Yun[1], In-Sun Ju, Chang-Soo Kim, Mi-Ra Kim, Jung-A Byun, You-Gyoung Park, Sang-Hyuck Son, Eun-Mi Lee, Rae-Seok Jung, Mi-Ae Na, Dong-Yeon Yuk, Ji-Yeon Gang, and Ok-Sun Heo

Hazardous Substances Analysis Division, Daejeon Regional Food and Drug Administration,
[1]Bio Environmental Chemistry, Chungnam National University

(Received January 28, 2010/Revised March 29, 2010/Accepted May 10, 2010)

ABSTRACT – The purpose of this study was to examine the appearance of norovirus in the water for food in food service institutions and the influence of physicochemical and microbial factors of norovirus in order to work out basic data to predict the detection of norovirus. Among 82 samples of water for food in food service institutions, norovirus appeared in 7 samples and the rate of appearance was 8.5%. As for the type of norovirus, one samples contained GI type (genotype GI-6) and six samples contained GII type (genotype GII-2, GII-4, GII-12). In the regression model of prediction of norovirus, the rate of appearance was correlated with NH_3-N, total solids and the consumption of $KMnO_4$, out of such variables as NH_3-N, total solids, the consumption of $KMnO_4$, depth, chloride and total colony counts, and its contribution rate for effectiveness was 78.60%. In order to examine the influential factor of environment upon the detection of norovirus, *Pearson's* correlation analysis was carried out. The predictable regression formula for appearance rate of norovirus was expressed as -1.818 + 42.677 [NH_3-N] + 0.023 [total solids] + 0.762 [consumption of $KMnO_4$] -0.009 [depth] -0.146 [chloride] + 0.007 [total colony counts] ($R = 0.904$, $R^2 = 0.818$, adjusted $R^2 = 0.786$, $p < 0.05$). The most influential factors upon the detection of norovirus were NH_3-N, total solids and the consumption of $KMnO_4$. In other words, when the measured values of NH_3-N, total solids and the consumption of $KMnO_4$ were higher, the possibility of appearance of norovirus increased.

Key words: Norovirus, physicochemical factor, microbial factor, one-step RT-PCR, semi-nested PCR.

우리나라의 식중독 발생에 의한 사회 · 경제적 직접손실 비용은 1조 3,107억원으로 추정되고 있으며, 2000년 이후 발생건당 52.4~69.9 명으로 대형화 되는 추세이다. 2000년부터 2005년 사이에 발생한 집단식중독의 현황을 발생건수로 살펴보면 살모넬라(*Salmonella typhimurium*) 12.6~32.1%, 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*) 9.1~16.3%, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 6.7~14.7% 이며, 원인불명의 비율도 23.8~57.0%에 이른다. 이러한 원인불명의 식중독 사례 중 대부분은 noroviruses (genus Norovirus, family *Caliciviridae*)에 의한 식중독으로 추정이 가능하다[1].

Norovirus는 국가적 관리대상으로 1~4군 법정 전염병 외의 지정 전염병으로 관리되고 있다.(보건복지부령 제 345호) 또한, 낮은 개체수가 인체에 감염되어도 급성질병을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다[2].

Norovirus는 단백질로 둘러싸인 표면 안에 한 줄의 RNA (ribonucleic acid)가 있고 정 20면체 구조, 양성 단일 RNA 게놈(7500~7700 nt) virus로 1968년 미국 오하이오주 Norwalk에 있는 학교에서 확인되어 small round structured viruses (SRSV.)로 불리다가 noroviruses (genus Norovirus, family *Caliciviridae*)로 명명되었다[3,4]. Norovirus는 총 5개의 group (group I, II, IV: human, group III: bovine, group V: mouse)

*Correspondence to: Woo Young Jung, Hazardous Substances Analysis Division, Daejeon Regional Food and Drug Administration, 925, Dunsan-dong, Seu-gu, Taejeon, 302-828, Korea
Tel: +82-42-480-8793, Fax: +82-42-480-8790
E-mail: wooyoungkfda@korea.kr

으로 분류되며, 인체에 병원성을 나타내는 group I은 14종, group II는 17종, 총 31 genotype 으로 구분할 수 있다[5]. Norovirus의 특성을 보면 급성 위장염의 원인체이며 오염된 식품을 섭취한 후 24~48시간 후 설사 등의 증상이 나타나는데, 전염력이 높아 사람 간에 퍼지며 분변과 구토물은 감염 후 1주부터 길게는 1개월간 virus 배설이 이루어져 높은 전염력을 가지고 있다[4].

우리나라의 경우 2006년 경인지역 집단급식소(영리를 목적으로 하지 아니하고 계속적으로 특정다수에게 음식물을 공급하는 기숙사·학교·병원 기타 후생기관 등의 급식시설로서 대통령령이 정하는 것-식품위생법 제2조)에서 3,000명의 집단식중독이 발생된 바 있으며, 발생원인은 norovirus로 지목된 바 있다[1]. 1971년에서 2004년까지 미국에서 음용수로 인한 집단 감염이 789건 발생하였으며 이중 8%가 장관계 바이러스에 의한 것으로 보고되었다[6,7]. Norovirus의 발생시기는 년 중 발생되며 집단생활을 하는 유치아 시설, 고령자 시설과 초·중학교 등에서는 이 시기를 중심으로 감염성위장염이 집단 발생하는 경향이 있다고 보고된 바 있다[8]. 식중독 환자의 분변이나 구토물 중의 바이러스 입자가 적절한 처리를 거치지 않고 하천이나 지하수에 유입되어 오염시킬 수 있으며, 이러한 바이러스는 어린이나 노인과 같은 면역체계가 약한 사람들에게 치명적일 수 있다[9,10].

현재 대용량의 지하수원수나 식품용수로부터 농축된 시료에서 norovirus의 존재 유무를 확인하는 방법이 있고, norovirus 분석법으로는 총배양성 바이러스분석법, RT-PCR 분석법 등이 있으며, 두 방법간의 검사 소요시간, 바이러스가 살아 있는지의 여부 등 상호 단점을 보완한 방법이 알려져 있다[11,12]. 식중독바이러스 검출에 관한 연구는 효과적인 분리 및 농축방법, 바이러스 RNA(ribonucleic acid)를 효과적으로 추출, 정제하는 방법, norovirus와 광범위하게 반응할 수 있는 primer를 개발하는 연구가 진행되고 있다[13-15].

국내의 집단급식소에서는 지하수를 식품용수(식품의 제조, 가공 및 조리 시에 사용하는 물)로 사용하고 있으나 Norovirus 감염으로 집단 식중독 발생이 우려되는 유치아 및 초.중.고등학교에 대한 Norovirus 검사와 수질환경요인에 대한 체계적인 연구는 적으며, 연구결과 또한 소규모로 이루어져 이에 대한 체계적인 연구가 필요하다. 본 연구에서는 2008년 9월부터 2009년 10월까지 대전광역시, 충청남도 및 충청북도를 포함한 충청지역의 41개 집단급식소(초등학교, 중·고등학교) 식품용수 82시료의 norovirus 검출빈도와 물리·화학적, 생물학적 요소가 미치는 영향에 대한 연구를 통해 norovirus 검출과 환경요인과의 관계를 규명하고자 하였다. 이를 통해 식품용수로 인한 norovirus 식중독 발생을 예방하고, norovirus를 분석하기 위해 고비용과 높은 숙년도가 요구되는 검사방법(채수-RNA 추출-PCR-전기영동-sequencing)을 적용하기 전에 시험방법이 간단하고 편리한 물리.화학적 및 미생물학적 방법을 찾아 이를 norovirus 사전 모니터링에 활용하고자 본 연구를 수행 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

식품용수의 물리·화학적 분석을 위해 시안화칼륨(Tedia, Ohio, USA), 염화암모늄(Sigma Chemical, Steinheim, Germany), 28% 암모니아수(Wako, Tokyo, Japan), 에리오크롬블랙T (Sigma Chemical), 염산히드록실아민(Samchun, Pyeongtaek, Korea), 염화마그네슘·6수화물(Sigma Chemical), 메틸레드 (Yakuri, Osaka, Japan), 탄산칼슘(Sigma Chemical), 에틸렌다이아민테트라아세트산이나트륨(Sigma Chemical), 황산 (Duksan, Ansan, Korea), 옥살산나트륨(Kanto, Tokyo, Japan), 과망간산칼륨(Kanto), 염화코발트·6수화물(Wako), 헥사메틸렌디아민(Junsei, Tokyo, Japan), sodium thiosulfate (Wako), 인산수소이나트륨(Sigma Chemical), 크롬산칼륨(Hayashi, Osaka, Japan), 질산은(Kojima, Sayama, Japan) 시약을 사용하였고, 미생물 분석을 위해 standard plate count agar (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England), EC-MUG (Oxoid Ltd.), lactose broth (Oxoid Ltd.), BGLB배지(BD, Le pont de claix, France), EMB (Oxoid Ltd.), Bile esculin azide agar (Remel Ltd., Lenexa, USA), asparazine agar (Difco Ltd., Le Pont de Clax, France), acetamide slant agar medium (Difco Ltd.), trypcase soy broth (Millipore, Molsheim, France), selenite broth base (Oxoid Ltd.), bismuth sulphite agar (Oxoid Ltd.)를, 유전자분석을 위해 쇠고기엑기스(BD, Le Pont Claix, France), QIAGEN-Viral RNA Mini Kits (Qiagen, Hilden, Germany), 1-step RT-PCR enzyme mix, 1-step RT-PCR buffer mix 및 water DEPC treated (Gendepot, Texas, USA), G_1F_1M, G_2F_1M, G_1R_1M, G_2R_1M, G_1F_2M, G_2F_3M, G_1R_1M 및 G_2R_1M (Bioneer, Taejeon, Korea), Tag polymerase, 10× Tag buffer 및 dNTP-mix (Solgent, Taejeon, Korea)를 사용하였다.

식품용수

2008년 9월부터 2009년 10월까지 대전광역시, 충청남도 및 충청북도를 포함한 충청지역의 41개 집단급식소 식품용수 82시료를 채수하여 분석에 사용하였다(Fig. 1). 물리.화학 및 미생물학적 항목에 대한 시험용액으로 사용하기 위해서 채수 직전 76 L의 식품용수를 흐르게 한 후 2 L 멸균용기(Y&K, Ansung, Korea)에 포집하여 시험용액으로 하였으며, 식품용수 1,500~1,800 L를 1-MDS Cartridge(3M, Saint Paul, USA)에 포집하였다. 실험실로 운반하는 기간에는 아이스 박스와 냉매(Windex, Seoul, Korea)를 사용하여 미생물의 증식을 억제 하였다. 또한, 각 집단급식소의 norovirus 분포 및 특성을 조사하였고, 식품제조용수 등의 Norovirus 시험법[식품의약품안전청 고시 제2007-68호(2007. 10. 18)]에 따라 분석하였다[16].

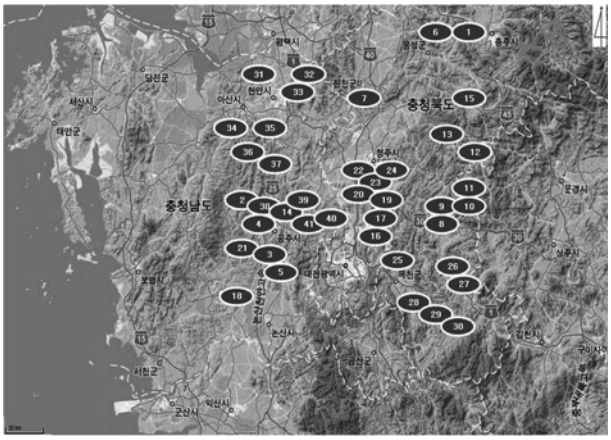

Fig 1. Sampling stations in *ChungCheong* area. The detection rate of norovirus in food service institutions, which using ground water in *Chungcheong* area (*Daejeon Metropolitan City*, *Chungchengnam-Do* and *Chungchengbuk-Do*), was examined over the period from September 2008 to October 2009.

물리.화학 및 미생물학적 분석

암모니아성질소(NH_3-N), 질산성질소(NO_3^--N), 과망간산칼륨소비량(consumption of $KMnO_4$), 총고형분(total solids), 탁도(turbidity), 색도(color), 경도(hardness), 염소이온(chloride), 수소이온농도(pH) 등은 먹는물 수질공정시험 방법[환경부 고시 제2007-146호(2007. 10. 01)]을 적용하였다. 즉시 검사가 필요한 항목인 수소이온농도, 수온, 탁도는 norovirus 검사를 위한 채수 과정에서 즉시 현장에서 측정하였다. 실험실적 분석이 필요한 암모니아성질소, 질산성질소, 과망간산칼륨소비량, 증발잔류물, 색도, 경도, 잔류염소 항목은 실험실에서 측정하여 기록하였으며, 생물학적 검사항목인 일반세균수(total colony counts), 분원성대장균(fecal coliforms), 대장균군(total coliforms), 분원성연쇄상구균(fecal Streptococcus), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라(*Salmonella typhimurium*) 항목은 멸균 채수병에 시료를 채취 후 냉장상태(0~10°C)로 운반하여 검사를 진행하였다. Norovirus 검출과 물리·화학적, 생물학적 인자가 미치는 영향을 알아보기 위해 norovirus 검출율과 환경요인에 대한 상관분석을 실시하여 *Pearson* 상관계수를 구하였고, 유의성 검정을 실시하였다. 또한, norovirus 검출을 예측하기 위하여 회귀분석을 실시하여 출현 예측모델을 구하였다.

유전자 분석

Fig. 2와 같은 과정으로 채수(Liquid filteration-1 MDS 2000, Saint Paul, USA), 원심분리(J-30I, Beckman coulter, Indienapols, USA), 유전자추출(Qiacube, Qiagen, Hilden, Switzerland), PCR (Thermocycler, Bioneer, Gottingen, Germany) 및 전기영동(MULTINA MCE-202, Shimadzu, Tokyo, Japan)의 과정을 거쳐 Norovirus를 검사하였다. 유전자분석을 위해 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)과 1차 PCR을 한 시험관에서 동시에 수행하는 one-step RT-PCR 방법을 사용하였고, 2차 PCR에서는 반응 프라이머를 바꿔 semi-nested PCR을 하였으며 primers와 sequences는 Table 1과 같다. One-step RT-PCR 및 semi-nested PCR을 수행한 후 반응액 5 μl 를 automatic DNA/RNA analyser (MULTINA MCE-202, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 사용하여 분석하였다. One-step RT-PCR의 반응조건은 GI과 GII 모두 45°C에서 30분, 94°C에서 5분 DNA를 변성시키고, 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분 30초를 1회로 하여 35회 반응시킨 후, 72°C에서 7분간 연장 반응하였으며, semi-nested PCR은 GI과 GII 모두 94°C에서 5분간 DNA를 변성시키고 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분 30초를 1회로 하여 25회를 반응시킨 후 72°C에서 7분간 연장 반응하였다. Agarose gel (Junsei, Tokyo, Japan)상에서 시료에 313 bp (base pair)의 밴드가 있을 경우 GI형 norovirus로, 310 bp (base pair)의 밴드가 있을 경우 GII형 norovirus로 확인하였다. Norovirus가 일차 확인된 경우 최종 확인을 위하여 agarose gel (Junsei, Tokyo, Japan) 상에서 해당부위를 절취하여 PCR 산물을 정제한 후 sequencing 반응기(3730XL, Applied biosystems, Lincoln Centre Drive Foster, USA)로 시험하여 최종 판정하였다.

Ultra-high resolution FE-SEM (Scanning Electron Microscopy) 측정

식품용수로부터 분리된 norovirus를 ultra-high resolution FE-SEM (Hitachi, S-4800, Minato-ku, Tokyo, Japan) 으로 관찰하기 위하여 지름 5 mm × 높이 7 mm의 틀을 준비한 후 norovirus를 증착하였다. Norovirus의 증착은 식품용수로부터 분리된 바이러스를 1-MDS 필터(3M, Saint Paul, USA)에 증착한 후 2차 전자의 발생을 촉진하기 위해 ion-coater (Coxem, KIC-1A, Daejeon, Korea)을 사용하여 3~5 nm로 gold coating 하였으며, 1차 전자의 빠른 전도를 위해 시편 주위에 전도성 테이프 (Nisshin, Toryo, Japan)를 부착하였다. Ultra-high resolution FE-SEM (Scanning Electron Microscopy)은 2차 전자를 검출함으로써 표면의 형태 연구에 이용되는 전계방사형 주사전자 현미경 (Hitachi, S-4800, Minato-ku, Tokyo, Japan)으로써 분해능 1.5 nm 수준으로 30 nm 내외의 norovirus를 측정하였다.

통계적 방법

집단급식소에 대한 norovirus 검출과 물리·화학적, 생물학적 인자가 미치는 영향을 알아보기 위해 norovirus 검출율과 환경요인항목에 대한 상관분석을 실시하여 *Pearson* 상관계수를 구하였고, 유의성 검정을 실시하였다. 또한, norovirus 검출을 예측하기 위하여 회귀분석을 실시하여 출현 예측모델을 구하였다. 통계처리는 SPSS ver. 17.0 (SPSS Inc., USA)에서 실시하였다.

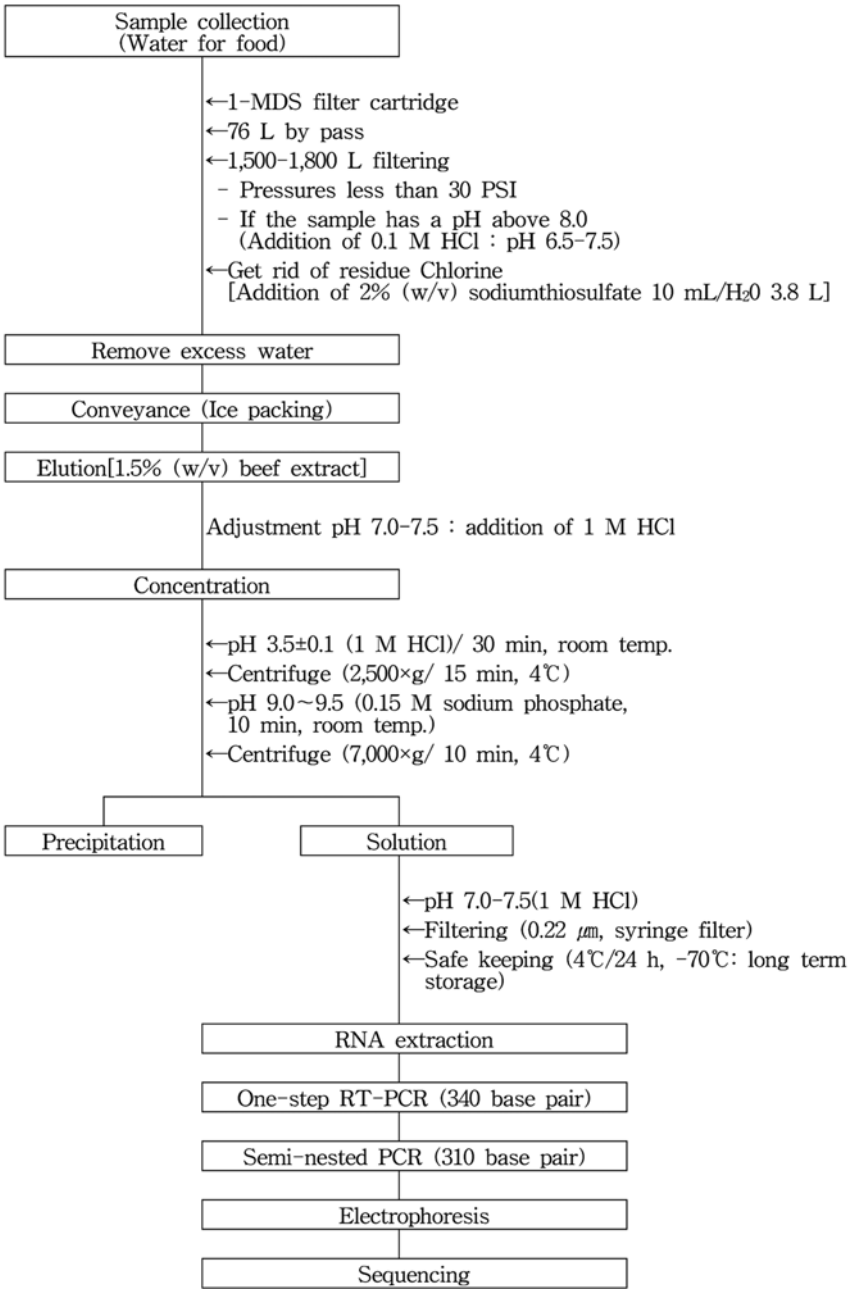

Fig. 2. Schematic diagram of norovirus analysis. Flow sheet summarizing the procedure of one-step RT-PCR and semi-nested PCR for norovirus analysis of the water.

Table 1. Primers and sequences

Genogroup	Primer	Sequence (5' → 3')	Application
I	GI-F1M	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GAT GAT	One-step RT PCR
	GI-R1M	CCA ACC CAR CCA TTR TAC ATY TG	One-step RT PCR / Semi-nested PCR/ Sequencing
	GI-F2	ATG ATG ATG GCG TCT AAG GAC GC	Semi-nested PCR / Sequencing
II	GII-F1M	GGG AGG GCG ATC GCA ATC T	One-step RT PCR
	GII-R1M	CCR CCI GCA TRI CCR TTR TAC AT	One-step RT PCR / Semi-nested PCR/ Sequencing
	GII-F3M	TTG TGA ATG AAG ATG GCG TCG ART	Semi-nested PCR / Sequencing

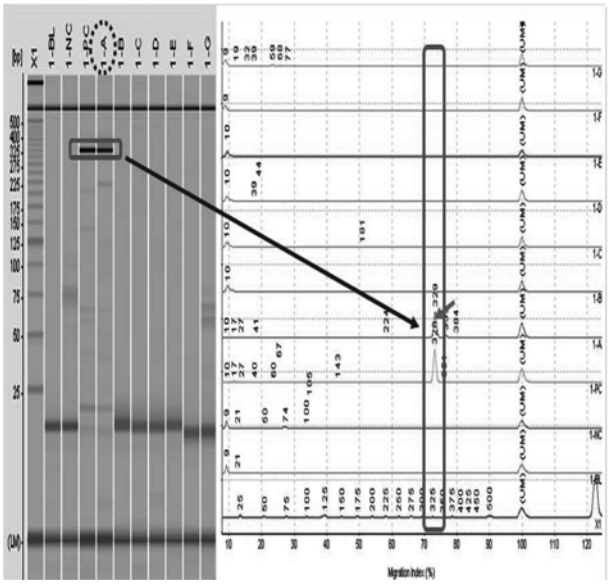

Fig. 3. Result of one-step RT-PCR and semi-nested PCR. (GI type of norovirus). Lane X1: marker, Lane 1-NC: negative control, Lane 1-PC: positive control (Type: GI-6), Lane 1-BL: blank, Lane 1-A: detected sample (red dotted circle), Lanes 1-B.C.D.E.F.G: not detected samples.
<Left> Electrophoresis of norovirus. <Right> Rf of electrophoresis.

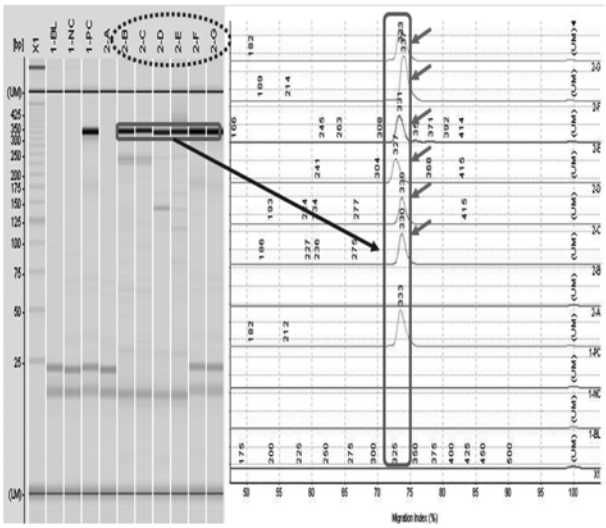

Fig. 4. Result of One-step RT-PCR and Semi-nested PCR. (GII type of norovirus). Lane X1: marker, Lane 1-NC: negative control, Lane 1-PC: positive control (Type: GII-4), Lane 1-BL: blank, Lane 2-A: not detected sample, Lanes 2-B.C.D.E.F.G: detected samples (dotted circle).
<Left> Electrophoresis of norovirus. <Right> Rf of electrophoresis.

결과 및 고찰

식품용수의 Norovirus 분석

2008년 9월부터 2009년 10월까지 대전광역시, 충청남도 및 충청북도를 포함한 충청지역권에서 집단급식소 (초등학교, 중.고등학교) 식품용수 82시료를 확보하여 norovirus 검출빈도를 조사한 결과 7시료에서 norovirus가 검출되었으며, 이는 조사대상 중 8.5%에 해당 되었다. 검출된 norovirus는 1시료(Fig. 3)에서는 GI type (genotype GI-6), 6시료(Fig. 4)는 GII type (genotype GII-2, GII-4, GII-12)로 판명되었다. Gong 등[5]은 norovirus의 유전형 분포양상을 분석하기 위하여 2005년부터 2007년까지 인천지역에서 발생한 norovirus 양성검체 중 320건을 대상으로 유전자형을 분석한 결과 GI 형이 2종류, GII 형이 14 종으로 총 16 종의 유전자형이 검출 되었다고 하였다. Norovirus 유전자 genotype은 GI 14 type, GII 17 type 으로 총 31 genotype으로 분류되며, norovirus의 genotype은 국내의 연구결과[5] GI과 GII genotype의 발생 비율은 GI 형이 0.6%, GII 형이 99.4%로 주로 GII genotype이 주요한 원인 병원체로 확인되었다. 이는 국내발생과[17] 1999~2004년 일본 Chiba 현[18], 미국[19]에서 나타난 바와 같이 GII genotype이 주요한 병원체로 나타난 결과와 일치한다. 충청지역 집단급식소에서 사용하는 식품용수의 norovirus 분석결과 검출된 norovirus genotype은 GI genotype이 14.3%, GII genotype이 85.7%로 나타났다.

식품용수로부터 검출된 norovirus의 형태학적 특성을 파악하기 위하여 ultra-high resolution FE-SEM (Hitachi, S-4800, Minato-ku, Tokyo, Japan)으로 1-MDS 필터(3M, Saint Paul, USA)에 증착시킨 norovirus 측정한 결과, norovirus 입자의 크기는 30 nm 내외로 나타났다(Fig. 5). 이는 norovirus가 정 20면체 구조로 small round structured viruses (SRSV) 형태의 크기가 30 nm 수준인 결과와 일치한다[3,4]. 이를 통하여 norovirus를 포집하는 과정에 사용된 1-MDS 필터(3M, Saint Paul, USA)에 Norovirus 입자가 부착되는 형태를 확인할 수 있었다.

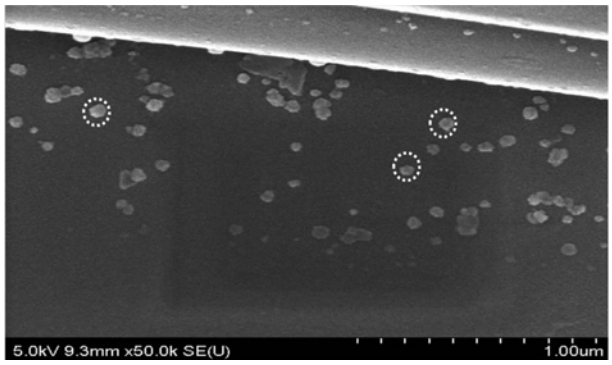

Fig. 5. Norovirus (red dotted circle) cling to the surface of 1-MDS filter (HM mode 50,000×). Ultra-high Resolution FE-SEM (Hitachi, S-4800, Minato-ku, Tokyo, Japan). Resolution: 2.0 nm (1 kV, WD = 1.5 mm, normal mode). Magnification: HM mode 50,000×. Speciman stage (type I): X = 0-50 mm, Y = 0-50 mm, Z = 1.5-30 mm, T = -5 to + 70°, R = 360°
Maximum sample size = 100 mm dia.

본 연구에서는 식품용수에서 norovirus가 검출됨에 따라

Table 2. Physicochemical results of drinking water in food service institutions

Item	Standard[1)]	Unit	Min.	Max.	Mean ± S.D.[3)]	Exceedances (%)
NH_3-N	Not more than 0.5	mg/mL	ND[2)]	0.12	0.02 ± 0.04	0.00
NO_3^--N	Not more than 10	mg/mL	0.30	15.80	4.41 ± 2.98	0.00
Consumption of $KMnO_4$	Not more than 10	mg/mL	ND	3.79	0.72 ± 0.88	0.00
Total solids	Not more than 500	mg/mL	44.00	320.00	189.20 ± 66.80	0.00
Turbidity	Not more than 1	NTU	ND	5.18	0.40 ± 0.81	2.40
Color	Not more than 5	Degree	1.00	25.00	1.70 ± 3.80	2.40
Hardness	Not more than 300	mg/mL	43.70	213.00	94.40 ± 39.50	0.00
pH	5.8~8.5	-	6.00	8.30	6.90 ± 0.50	0.00
Chloride	Not more than 250	mg/mL	ND	32.00	13.00 ± 8.00	0.00

Value are Min., Max. and Mean ± S.D., n=82.
[1)]Standard: NIER (National Institute of Environmental Research) standard of drinking water.
[2)]ND: Not detected.
[3)]S.D.: Standard deviation.

Table 3. Microbial results of drinking water in food service institutions

Item	Standard[1)]	Unit	Min.	Max.	Mean ± S.D.[3)]	Exceedances (%)
Total colony counts	Not more than 100	CFU/mL	NG[2)]	230.00	37.00 ± 49.00	7.30
Total coliforms	Negative	CFU/100 mL	NG	-	-	0.00
Fecal coliforms	Negative	CFU/100 mL	NG	-	-	0.00
Fecal Streptococcus	Negative	CFU	NG	-	-	0.00
P. aeruginosa	Negative	CFU	NG	-	-	0.00
S. typhimurium	Negative	CFU	NG	-	-	0.00

Bacterial counts were presented as CFU/mL. Value are Min., Max. and Mean ± S.D., n = 82.
[1)]Standard: NIER (National Institute of Environmental Research) standard of drinking water.
[2)]NG: Negative, [3)]S.D.: Standard deviation.

집단급식소에서 사용하는 식품용수의 관리 필요성이 있음을 알 수 있고, 잠재되어 있는 norovirus로 인한 집단식중독의 발생을 예방하기 위해서는 정기적인 물탱크 청소, 중형관정의 보급 및 장기적으로는 상수도의 보급이 필요할 것으로 보인다. USEPA (united states environmental protection agency)는 바이러스를 비롯한 병원성 미생물을 제어하기 위하여 pilot scale 등의 여과과정에서 입자제거의 필요성을 제시하였다[20)].

식품용수의 물리.화학적 분석

식품용수의 물리.화학적 결과의 평균값을 보면 수소이온농도 6.90, 색도 1.70, 탁도 0.40 NTU (nepthelometric turbidity unit), 암모니아성질소 0.02 mg/mL, 질산성질소 4.41 mg/mL, 과망간산칼륨 소비량 0.72 mg/mL, 총고형분 189.20 mg/mL, 경도 94.40 mg/mL, 염소이온 13.00 mg/mL로 수준으로 음용수 수질기준을 초과한 항목은 색도, 탁도로써 각각 2.40%로 나타났다(Table 2). 색도, 탁도가 음용수 수질기준을 초과하는 경우에는 수처리 시설(filter 등)이 필요할 것으로 보인다[20)].

Song 등[21)]은 지하수 관정 깊이에 따른 특성연구에서 수소이온농도는 평균 6.90로써 깊이별 차이가 없었으며, 암모니아성질소와 질산성질소는 깊이가 얕을수록 높게 나타난다고 하였다. 이는 지표수가 지하로 깊이 스며드는 과정에서 흡착, 분해 등과 같은 과정을 거치면서 정제되기 때문인 것으로 보고 하였다. 식품용수의 물리.화학적 분석결과, 암모니아성질소, 질산성질소, 일반세균수, 과망간산칼륨소비량은 깊이가 얕을수록 높게 나타났다. 이는 암모니아성질소, 질산성질소의 경우 앞서 기술한 Song 등[21)]의 결과와 일치하였다.

식품용수의 미생물학적 분석

Chung 등[22)]은 대장균군, 분원성대장균군, 대장균은 서로 높은 양의 상관관계를 보였고 일반세균, 대장균군 상호간에 양의 상관관계를 보인다고 하였다. 또한, 장관계 바이러스의 생리특성상 환경에서 증식이 불가능한 반면, 5°C 이하의 낮은 온도에서 생존율이 높아지는 특성이 있다고 하였으며, 장관계 바이러스의 세균과 차이점은 강우시기에 저니(sediment)에서 일시적으로 재용출 가능성은 있으나 세균과 달리 온도가 높은 여름에 환경에서 증식 또는 재성장 하지 않는다고 하였다.

식품용수의 미생물학적 분석결과 대장균군, 분원성연쇄구균, 녹농균, 살모넬라는 검출되지 않았으며 일반세균수

Table 4. Comparison of positive samples and negative samples identified by KFDA method with norovirus water quality factors

Item	Unit	Positive Samples(n=7)			Negative Samples(n=75)		
		Min.	Max.	Mean ± S.D.[1)]	Min.	Max.	Mean ± S.D.[1)]
pH	-	7.00	7.50	7.30 ± 0.20	6.00	8.30	6.90 ± 0.50
Color	Degree	1.00	2.00	1.10 ± 0.40	1.00	25.00	1.90 ± 4.20
Turbidity	NTU	0.58	0.86	0.69 ± 0.12	ND[3)]	5.18	0.34 ± 0.89
NH_3-N	mg/mL	0.05	0.10	0.08 ± 0.02	ND	0.12	0.01 ± 0.03
NO_3^--N	mg/mL	0.30	6.90	4.54 ± 2.81	0.90	15.80	4.39 ± 3.05
Consumption of $KMnO_4$	mg/mL	1.25	1.71	0.51 ± 0.16	ND	3.79	0.55 ± 0.88
Total solids	mg/mL	250.70	320.00	287.20 ± 23.80	44.00	292.00	169.00 ± 53.40
Hardness	mg/mL	43.70	193.00	90.80 ± 48.90	48.00	213.00	97.30 ± 35.00
Chloride	mg/mL	4.00	13.00	6.10 ± 3.10	ND	32.00	14.20 ± 8.00
Total colony counts	CFU/mL	30.00	125.00	73.00 ± 30.00	NG[2)]	230.00	30.00 ± 49.00
Fecal coliforms	CFU/100 mL	NG	-	-	NG	-	-
Total coliforms	CFU/100 mL	NG	-	-	NG	-	-
Fecal Streptococcus	CFU	NG	-	-	NG	-	-
P. aeruginosa	CFU	NG	-	-	NG	-	-
S. typhimurium	CFU	NG	-	-	NG	-	-

[1)]S.D.: Standard deviation, [2)]NG: Negative, [3)]ND: Not detected.

는 불검출 내지 최대 230.00 CFU/mL 수준으로 음용수 수질기준 초과율은 7.30%로 나타났다(Table 3). 위생지표를 평가하는 대장균군, 분원성연쇄구균 및 녹농균, 살모넬라가 검출되지 않는 점으로 볼 때 식품용수는 병원성세균이 오염되지 않는 것으로 조사되었다. 본 연구에서와 같이 일반세균수가 음용수 수질기준을 초과한 경우, 지하수 오염방지를 위하여 지하수 폐공(abandoned well) 관리, 오염원 유입차단 등의 조치 필요성이 제기된 바 있다[23)].

Norovirus 검출여부에 따른 환경요인 분석

Ko 등[20)]은 장관계 바이러스 양성시료(5 ea)와 음성시료(81 ea)의 물리화학적 특성을 조사한 결과 수소이온농도는 큰 차이가 없었으나 일반세균수, 총고형분은 양성시료의 평균값이 음성시료의 평균값 보다 높은 값을 보였다.

Table 4와 같이 본 연구에서는 norovirus 양성시료(7 ea)와 음성시료(75 ea)의 물리화학적 특성을 조사한 결과 수소이온농도는 큰 차이가 없었고, 일반세균수, 총고형분은 양성시료 사이의 평균값이 음성시료 사이의 평균값 보다 높은 값을 보였으며, 이는 Ko 등[20)]의 장관계 바이러스 연구결과와 일치 하였다.

또한, 탁도, 암모니아성질소 항목의 경우 norovirus 양성시료군 평균이 음성시료군 평균보다 높았다. Norovirus 양성시료의 평균값을 보면 수소이온농도 7.30, 색도 1.10, 탁도 0.69 NTU, 암모니아성질소 0.08 mg/mL, 질산성질소 4.54 mg/mL, 과망간산칼륨소비량 0.51 mg/mL, 총고형분 287.20 mg/mL, 경도 90.80 mg/mL, 염소이온 6.10 mg/mL, 일반세균수 73.00 CFU/mL 및 대장균군, 분원성대장균군, 분원성연쇄상구균, 녹농균, 살모넬라균은 음성을 나타내었다. Norovirus 음성시료의 평균값을 보면 수소이온농도 6.90, 색도 1.90, 탁도 0.34 NTU, 암모니아성질소 0.01 mg/mL, 질산성질소 4.39 mg/mL, 과망간산칼륨소비량 0.55 mg/mL, 총고형분 169.00 mg/mL, 경도 97.30 mg/mL, 염소이온 14.20 mg/mL, 일반세균수 30.00 CFU/mL 및 대장균군, 분원성대장균, 분원성연쇄상구균, 녹농균, 살모넬라는 음성을 나타내었다.

회귀분석을 통한 norovirus 출현 예측

Lee 등[24)]은 수인성 바이러스 검출에 대한 연구에서 탁도가 높아질수록 수인성 바이러스 검출율도 증가하며, 수소이온농도의 경우 바이러스 검출빈도에 영향을 미치지 않는다고 하였고, Stetler 등[25)]이 보고한 탁도와 바이러스 검출이 밀접한 상관관계가 있다고 하였으며, Keswick 등[26)]도 우기에 탁도가 증가함에 따라 바이러스 검출빈도도 증가한다고 하였다.

Norovirus의 검출에 영향을 주는 환경인자를 조사하기 위해 *Pearson* 상관분석을 실시한 결과, norovirus 검출에 가장 영향을 미치는 인자는 암모니아성질소, 총고형분, 과망간산칼륨 소비량과 상관성을 보였고, 암모니아성질소, 총고형분, 과망간산칼륨소비량이 높을수록 norovirus 검출 가능성이 증가 되는 경향을 나타내었다. 회귀분석을 통한 norovirus 출현 예측 모델은 아래식과 같이 도출되었다 (Table 5).

Norovirus = -1.818 + 42.677 [NH_3-N] + 0.023 [total solids] + 0.762 [consumption of $KMnO_4$] - 0.009 [depth] - 0.146 [chloride] + 0.007 [total colony counts] ($R = 0.904$, $R^2 = 0.818$, adjusted $R^2 = 0.786$, $p < 0.05$).

Norovirus의 출현율은 변수로 선택된 암모니아성질소, 총

Table 5. *Pearson* correlation between norovirus, total colony counts and water parameters

Item	Depth	NH_3-N	NO_3^--N	C.Mn[2]	T.S[1]	T.b[4]	Color	Hard[5]	pH	T.C.C[3]	Chloride
Depth	1.000										
NH_3-N	-0.314	1.000									
NO_3^--N	0.020	0.355**	1.000								
C.Mn[2]	-0.101	0.228	-0.116	1.000							
T.S[1]	-0.197	0.509**	0.139	0.310*	1.000						
T.b[4]	-0.208	0.055	0.020	-0.009	0.098	1.000					
Color	-0.097	-0.106	0.048	-0.081	-0.012	0.978**	1.000				
Hard[5]	0.092	-0.029	-0.092	-0.055	0.452**	0.255	0.322*	1.000			
pH	-0.100	0.030	-0.461**	0.392*	0.196	0.007	-0.023	0.175	1.000		
T.C.C[3]	-0.129	0.402**	0.219	0.015	0.046	0.236	0.072	-0.325*	-0.107	1.000	
Chloride	0.204	-0.115	0.317*	-0.045	0.018	-0.116	0.009	0.230	-0.227	-0.154	1.000
N.V[6]	-0.379*	0.739**	0.020	0.415**	0.674**	0.166	-0.072	-0.042	0.306	0.332*	-0.385**

[1]T.S: total solids, [2]C.Mn: consumption of $KMnO_4$, [3]T.C.C, total colony counts, [4]T.b: turbidity, [5]Hard: hardness, [6]N.V: norovirus.
*Marked correlations are significant at $p < 0.05$.
**Marked correlations are significant at $p < 0.01$.

Table 6. Regression summary for dependent variable

Item		Unstandardized coefficients		Standardized coefficients	t	*p*-value	R^2	adjusted R^2
		B	Std. error of B	Beta				
N.V[4]	Constant	-1.818	1.191	-	-1.526	0.136	0.818	0.786
	NH_3-N	42.677	10.528	0.394	4.053	0.000	-	-
	T.S[1]	0.023	0.005	0.402	4.498	0.000	-	-
	C.Mn[2]	0.762	0.336	0.176	2.271	0.030	-	-
	Depth	-0.009	0.008	-0.088	-1.128	0.267	-	-
	Chloride	-0.146	0.036	-0.306	-4.040	0.000	-	-
	T.C.C[3]	0.007	0.006	0.094	1.145	0.260	-	-

[1]T.S: total solids, [2]C.Mn: consumption of $KMnO_4$, [3]T.C.C: total colony counts. [4]N.V: norovirus. The predictable regression formula for appearance rate of norovirus was expressed as -1.818 + 42.677 [NH_3-N] + 0.023 [T.S[1]] + 0.762 [C.Mn[2]] - 0.009 [depth] - 0.146 [chloride] + 0.007 [T.C.C[3]] ($R = 0.904$, $R^2 = 0.818$, adjusted $R^2 = 0.786$, $p < 0.05$).

고형분, 과망간산칼륨소비량, 관정깊이(depth), 염소이온, 일반세균수 항목 중 암모니아성질소, 과망간산칼륨소비량과 상관성을 보였고 회기식의 유효성을 나타내는 기여율은 78.60%로 평가 되었다(Table 6).

Norovirus에 의한 위해발생은 국가적 관리대상으로 1~4군 법정 전염병 외의 지정 점염병으로 관리되고 있으며(보건복지부령 제 345호) 낮은 개체수가 인체에 감염되어도 급성질병을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있음[13-15,27-28]에 따라 지속적인 관리가 필요하다.

요 약

충청지역권내 지하수를 사용하는 집단급식소의 식품용수 82시료의 norovirus 검출빈도를 조사한 결과 7시료에서 검출 되었으며, 이는 8.5%에 해당 하였다. Norovirus가 검출된 집단급식소에 대해서는 식중독 발생이 우려됨에 따라 소독, 관정개발, 오염원제거 및 상수도 보급 등의 위생환경 개선과 유지관리가 필요하다. Norovirus의 검출에 영향을 주는 요인으로는 암모니아성질소, 총고형분, 과망간산칼륨소비량으로 나타났다. Norovirus 양성 검출군과 음성 검출군의 수질특성을 비교한 결과 수소이온농도는 큰 차이가 없었고, 탁도, 암모니아성질소, 일반세균수, 총고형분 항목에 있어서 norovirus 양성 검출군 평균값이 음성 검출군 평균값 보다 높은 값을 나타내었다. Norovirus 검출과 관련성이 높은 환경인자의 지속적인 모니터링을 통해 집단급식소 식중독예방에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Choi, W.S., Go, G.P., Park, G.J., Moon, A.R., Lee, H.J., Kim, M.S. and Kim, H.Y.: Development of norovirus detection method from food. *The Annual Report of KFDA,* **11,** (2007).

2. Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C. and Regli, S.: Risk assessment of viruses in drinking water. *Risk Anal,* **13**, 545-552 (1993).
3. Sarbelio, M., Espinosa, M., Farkas, T. and Jiang, X.: Human caliciviruses and pediatic gastroenteritis. *Semin Pediatr Infect Dis,* **15**, 237-245 (2004).
4. Woo, G.J., Hwang, I.G., Kwak, H.S., Kim, M.G., Park, J.S., Lee, G.Y. and Koh, Y.H.: Apply of detection method and evaluation for foodborne virus. *The Annual Report of KFDA,* **8-1**, 569-575 (2004).
5. Gong, Y.W., Oh, B.Y., Kim, H.Y., Lee, M.Y., Kim, Y.H., Go, J.M., Lee, J.M., Jeong, H.S. and Cheon, D.S.: Molecular epidemiologic investigation of norovirus infections in Incheon city, Korea, from 2005 to 2007. *J Bacteriol and Virol,* **38**, 249-257 (2008).
6. Barwick, R.S., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J. and Calderon, R.L.: Surveillance of waterborne-disease outbreaks-United States, 1997-1998. *MMWR Surveill Summ,* **49**, 1-35 (2000).
7. Liang, J.L., Dziuban, E.J., Craun, G.F., Hill, V., Moore, M.R., Gelting, R.J., Calderon, R.L., Beach, M.J. and Roy, S.L.: Surveillance of waterborne disease outbreaks-United States, 2003-2004. *MMWR Surveill Summ,* **55**, 31-58 (2006).
8. Choi, C.U., Ha, S.D., Kim, G.H., Jo, S.D., Lee, M.H., Ra, Y.S. and Park, G.B.: Development of educational content for the prevention of food poisoning caused by norovirus. *The Annual Report of KFDA,* **11**, (2007).
9. Beller, M., Ellis, A., Lee, S.H., Drebot, M.A., Jenkerson, S.A., Funk, E., Sobsey, M.D., Simmons III, O.D., Monroe, S.S., Ando, T., Noel, J., Petric, M., Middaugh, J.P. and Spika, J.S.: Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well international consequences. *JAMA,* **278**, 563-568 (1997).
10. Fout, G.S., Martinson, B.C., Moyer, M.W. and Dahling, D.R.: A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Appl Environ Microbiol,* **69**, 3158-3164 (2003).
11. Greening, G.E., Hewitt, J., Lewis, G.D.: Evaluation of integrated cell culture-PCR (ICC-PCR) for virological analysis of environmental samples. *J Appl Microbiol,* **93**, 745-750 (2002).
12. Reynolds, K.A., Gerba, C.P. and Pepper, IL.: Detection of infectius enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl Environ Microbiol,* **62**, 1424-1427 (1996).
13. Koopmans, M,, von Bonsdorff, C., Vinje, J., de Medici, D. and Monroe, S.: Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev.,* **26**, 187-205 (2002).
14. Koopmans, M. and Duizer, E.: Foodborne viruses: an emerging problem. *International J Food Microbiol,* **90**, 23-41 (2004).
15. Lees D. Viruses and bivalve shellfish. *International J Food Microbiol,* **59**, 81-116. (2000).
16. Food Code. Korea Food and Drug Administration, Eunpyeong-gu, Seoul, Korea. 64-76, (2007).
17. Kim, J.Y., Cheon, D.S., Park, J.K., Kang, Y.H., Chung, Y.S., Go, U., Shin, Y.H. and Yoon, J.D.: Sequence analysis of small round structured viruses (SRSV) isolated from a diarrheal patient in Wonju. *J Korean Soc Virol,* **29**, 247-259 (1999).
18. Okada, M., Ogawa, T., Kaiho, I. and Shinozaki, K.: Genetic analysis of noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. *J Clin Microbiol,* **43**, 4391-4401 (2005).
19. Blanton, L.H., Adams, S.M., Beard, R.S., Wei, G., Bulens, S.N., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Monroe, S.S.: Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000~2004. *J Infect Dis,* **193**, 413-421 (2006).
20. Ko, E.M., Jang, S.J., Kim, H.J., Hong, E.S., Shin, Y.O., Kim, S.H.: Characterization and detection of enteric viruses in surface water, finished water, tap water by total culturable virus assay (TCVA) method. *J Bacteriol and Virol,* **34**, 137-145 (2004).
21. Song, S.S., Park, B.Y. and Lee, B.Y.: A study on the characteristics of groundwaters in Gyeongsan city. *J Environ Sci,* **16**, 677-682 (2007).
22. Chung, H.M., Oh, S.H., Park, J.W.: Seasonal variation of total culturable viruses and indicator bacteria in drinking water sources. *J Korean Society on Water Quality,* **19**, 329-338 (2003).
23. Lee, S.M.: Efficient management for abandoned well of ground water. *Magazine of Korea Water Resources Association,* **29**, 37-41 (1996).
24. Lee, G.C., Jee, Y.S., Lee, C.H., Lee, S.T.: Influence of physicochemical environmental factors on the occurrence of waterborne viruses in Korean surface water. *J Bacteriol and Virol,* **36**, 279-285 (2006).
25. Stetler, R.E., Ward, R.L., Waltrip, S.C.: Enteric virus and indicator bacteria levels in a water treatment system modified to reduce trihalomethane production. *Appl Environ Microbiol,* **47**, 319-324 (1984).
26. Keswick, B.H., Gerba, C.P., DuPont, H.L. and Rose, J.B.: Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Appl Environ Microbiol,* **47**, 1290-1294 (1984).
27. Lopman, B.A., Reacher, M.H., VAN Duijnhoven, Y., Hanon, F-X., Brown, D. and Koopmans, M.: Viral gastroenteritis outbreaks in Europe 1995-2000. *Emerging Infectious Diseases,* **9**, 90-96 (2003).
28. Jaykus, L.A.: Enteric viruses as emerging agents of foodborne disease. *Irish J Agric Food Res,* **39**, 245-255 (2000).