

## 자연정화에 의한 양식굴(*Crassostrea gigas*) 중 노로바이러스 저감화

유흥식\* · 박용수<sup>1</sup> · 안세라 · 박큰바위<sup>1</sup> · 심길보<sup>1</sup> · 송기철 · 이태식<sup>1</sup>

국립수산과학원 서해수산연구소, <sup>1</sup>국립수산과학원 식품위생가공과

### Defecation of Norovirus from the Oyster *Crassostrea gigas* by Depuration Following Translocation of the Growing Area

Hongsik Yu\*, Yong Su Park<sup>1</sup>, Sera An, Kunbawui Park<sup>1</sup>, Kil Bo Shim<sup>1</sup>,  
Ki Cheol Song and Tae Seek Lee<sup>1</sup>

West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Incheon 22383, Korea

<sup>1</sup>Food Safety and Processing Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

The efficacy of depuration following growing area translocation for the defecation of norovirus was evaluated under experimental conditions using oysters *Crassostrea gigas* previously subjected to bioaccumulation of this virus at a waste treatment plant discharge site. Three trials were assayed in an open experimental system with a commercial oyster farm located in a shellfish growing area approved by the Korean Shellfish Sanitation Program. Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to quantify viruses in the digestive glands of oysters. The final viral loads in oysters after 12 days remained under the detection limit (10 copies/g digestive gland) of the real-time RT-PCR. This reduction trend showed two-phase removal kinetics, with an initial slow reduction or slight increase in viruses during the first 2 days of depuration and subsequent stabilization with 0.12 to 2.64 log unit norovirus copies/g digestive gland per 2 days of depuration for the remaining time.

Key words: Norovirus, *Crassostrea gigas*, Oyster, Translocation, Depuration

### 서론

이때패류(이하 패류)는 분변-경구 감염 환을 통한 세균성 및 바이러스성 장관계 질환의 주요 전파 매개체로 간주되고 있다(Butt et al., 2004). 이는 지역사회에서 장관계 질환이 유행하게 되면 해당 병원체가 하수 및 오수를 통하여 담수 및 기수 환경으로 배출되게 되고(Da Silva et al., 2007; Iwai et al., 2009), 패류는 여과섭식 작용을 통해 서식해역에 존재하는 미생물을 체내에 농축하여 사람이 섭취하는 경우 재감염을 유발하기 때문이다(Lees, 2000). 또한 전통적으로 패류를 생식하거나 살짝 익혀먹는 습관 때문에 오염된 패류에 의한 재감염의 위험성이 사라지지 않고 있다(Lees, 2000). 더욱이 70년대 이후 패류 냉동가공품이 국제적으로 유통되면서 오염된 제품에 의한 감염의 시공간적 범위가 확대되고 있다(Pintó et al., 2009; Polo et al., 2010).

이러한 패류에 의한 감염증 발생을 예방하고자 유럽 및 북미 대부분 국가와 남미 및 아시아 일부 국가에서는 엄격한 패류 위생 규정을 마련하였으며 유럽과 북미의 경우 그 역사가 백여년에 이르고 있다(Lees, 2000). 동 규정은 패류 생산해역의 분변계 대장균(fecal coliform) 농도 또는 패류 중의 대장균(*Escherichia coli*) 농도를 기준으로 패류 생산해역의 등급을 구분하고 그 등급에 따라 패류의 수확 전후 관리조건을 명시하고 있다(European Commission, 2004; US FDA, 2014). 그러나 이러한 노력에도 불구하고 패류 생식과 관련된 감염증이 지속적으로 발생하고 있으며(Butt et al., 2004), 특히 노로바이러스에 오염된 굴 섭취에 따른 장관계 질환이 세계적으로 유행하고 있다(Kroneman et al., 2008; Scallan et al., 2011).

오염된 활 패류 중 미생물의 농도를 저감화할 수 있는 방법 중 시설 내 정화 및 자연정화가 현재 상업적 이용되고 있는 대표적인 것들이다(Lees, 2000; Dore et al., 2010). 시설 내 정화는 패

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2016.0109>



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.

Korean J Fish Aquat Sci 49(2) 109-115, April 2016

Received 29 February 2016; Revised 29 March 2016; Accepted 30 March 2016

\*Corresponding author: Tel: +82. 32. 745. 0751 Fax: +82. 32. 745. 0619

E-mail address: yhspknu@gmail.com

류를 탱크에 담고 위생처리 용수에 최대 48시간 노출시키는 것을 말하며 자연정화는 오염된 해역에서 양성된 패류를 청정해역으로 이동시켜 수주에서 수개월 양성하는 것을 말한다. 이 방법들은 인위적 또는 자연 환경 하에서 패류의 여과작용을 유도하여 장내의 내용물과 함께 병원성 미생물이 배출되도록 하는 동일한 원리를 이용하고 있다(Lees, 2000; Nappier et al., 2008; Oh et al., 2012; Polo et al., 2014a).

시설 내 정화는 유럽, 미국 및 일본 등에서 널리 상업적으로 이용되고 있으며 대장균 농도가 다소 높은 패류를 생식용으로 출하하기 전 반드시 거쳐야 하는 강제적 규제항목 중 하나이다(Lees, 2000; European Commission, 2004; US FDA, 2014). 한편 시설 내 정화는 인공적으로 조성된 환경에서 패류에 먹이를 공급하지 않고 이루어지기 때문에 수일 이상 실시할 경우 수질악화로 폐사가 발생하고 자가소화에 인한 중량 감소 등 패류의 상업적 가치가 하락되기 쉽다(Lees, 2000; Dore et al., 2010). 그래서 시설 내 정화는 대개 24시간 전후로 이루어지며 노로바이러스나 A형 간염바이러스 등과 같은 장관계 바이러스를 충분히 제거할 수 없어 바이러스 저감화 대책으로 활용하기 위해서는 개선의 여지가 많은 것으로 알려져 있다(Lees, 2000; Richards et al., 2010; Polo et al., 2014a; Polo et al., 2014b). 유럽에서 시설 내 정화 후 생식용 기준에 부합되는 패류에 의해 장관계 바이러스 감염증이 발생한 여러 사례들이 이를 뒷받침하고 있다(Chalmers and McMillan, 1995; Le Guyader et al., 2003, 2006; Pintó et al., 2009).

자연정화는 대상해역의 위생학적 상태에 따라 릴레이(relaying)와 트랜스로케이션(translocation)으로 그 개념이 대별된다(European Commission, 2004; US FDA, 2014; DAF, 2011). 릴레이는 등급이 지정되고 수확이 허가된 패류생산 해역 간의 이동을 말하며 트랜스로케이션은 등급 미지정 또는 수확이 금지된 해역에서 생산된 패류를 등급이 지정되고 수확이 허가된 해역으로 이동하는 것을 의미한다(European Commission, 2004; US FDA, 2014; DAF, 2011). 릴레이는 유럽, 미국 및 호주 등에서 공식적으로 활용되고 있으며 해역 이동 수주 후 상업적 목적의 패류 수확이 허용된다. 트랜스로케이션은 호주 등 일부 국가에서 채택되고 있는 위생처리 기법으로 상대적으로 오염도가 심한 패류를 대상으로 하고 있어 해역 이동 최소 2개월 경과 후 상업적 목적의 패류 수확이 허용된다(DAF, 2011). 자연정화는 시설 내 정화에 비하여 적지 선정의 어려움 등의 제한이 있으나 폐사율이 낮고 장기간 정화작용을 통한 바이러스 제거 가능성이 높아 주목을 받고 있다(Dore et al., 2010).

패류 중 바이러스의 생물축적과 배출은 패류와 바이러스의 생물학적 특성에 영향을 받는 복잡한 생리과정이다(Lees, 2000; Nappier et al., 2009; Oh et al., 2012; Polo et al., 2014b). 최근 연구결과에 따르면 특정 바이러스의 생물축적에는 패류 조직 중 특이 바이러스 수용체가 관여하며, 이로 인하여 패류와 바이러스의 종류에 따라 배출속도도 달라진다고 한다(Le Guyader

et al., 2006; Tian et al., 2006, 2007; Maalouf et al., 2011). 그러므로 새로운 패류 위생관리 방안의 강구 및 기존 정화공정의 개선과 관련 규정의 마련에는 바이러스-패류 상호작용과 정화 요구시간과 같은 기초정보가 필요하다. 이 연구에서는 최근 패류 위생 분야의 주요 위해 요소인 노로바이러스에 오염된 굴을 청정해역으로 이동시켜 양성하는 자연정화(translocation)를 통한 굴 중 노로바이러스 저감화 가능성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 대상 패류 및 노로바이러스 생물축적

자연정화 대상 패류는 생식을 위주로 소비되는 양식 굴(*Crassostrea gigas*)을 선정하였으며, 남해안(경남 통영시 자란만·사랑도 일원)에서 2014년 4월에 채취하였다. 채취해역 해수로 객과 외부를 세척하고 폐사하였거나 파손된 굴을 제외하였다. 선별된 패류를 채취 당일에 노로바이러스 생물축적을 위하여 부산시 환경공단 남부사업소 처리하수 최종 방류지점(부산시 남구 대연동 소재)으로 운반하였다. 운반된 패류를 현장에서 30개의 패류 양성망(원추형,  $\phi$  40 cm  $\times$  h 40 cm)에 약 30개체씩 나누어 담고 수심 약 2-4 m 중에 계류시켜 1개월 간 양성하면서 노로바이러스 축적을 유도하였다. 노로바이러스 축적 여부 및 그 농도 확인을 위하여 매주 20개체씩 무작위로 채취하여 분석을 실시하였다.

### 굴 중 노로바이러스 분리 및 RNA 추출

굴에서 노로바이러스 분리는 Jothikumar et al. (2005)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 탈각한 굴 20개 이상으로부터 분리된 소화맹랑(digestive gland)을 조직파쇄기로 균질화한 후 3 g을 취하여 동량의 300  $\mu$ g/mL Proteinase K solution (Promega, USA)을 첨가하고 완전히 혼합하였다. 혼합된 시료를 37°C, 320 rpm의 조건으로 1시간 진탕 반응시킨 후 Proteinase K의 불활성화 시키기 위하여 65°C에서 15분간 방치한 후 3,000 g에서 5분간 원심분리 하여 상정액을 취하여 노로바이러스 RNA 추출 시료로 사용하였다.

RNA 추출에는 Viral RNA mini kit (QIAGEN, USA)을 사용하였다. 상정액 300  $\mu$ L에 AVL buffer 1,120  $\mu$ L를 첨가하여 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 반응액에 95-100% 에탄올 1,120  $\mu$ L를 첨가하여 혼합하였으며, 혼합액을 630  $\mu$ L를 spin column tube로 옮겨 6,000 g에서 1분간 원심분리 하였다. 남은 혼합액을 동일한 방법으로 처리한 후, 동일한 spin column tube에 AW1 완충액 500  $\mu$ L를 첨가하여 6,000 g에서 1분간 원심분리 하였다. 또한 AW2 완충액 500  $\mu$ L를 각각 첨가하여 20,000 g에서 3분간 원심분리 하였으며, 원심분리 후 spin column에 걸러진 용액은 제거하였다. 다음으로 spin column을 새로운 tube로 옮긴 후 AVE 완충액(sodium azide 함유) 60  $\mu$ L를 넣고 1분간 반응시켰다. 마지막으로 6,000 g로 1분간 원

심분리하여 real time RT-PCR을 수행하기 위한 시료로 사용하였다.

Real time RT-PCR

Real time RT-PCR 반응을 위하여 OneStep RT-PCR kit (QIAGEN, USA) 및 RNase inhibitor (Ambion, USA) 시약을 사용하였다. 폴리오바이러스의 RNA를 internal control RNA (US FDA 제공)로 첨가하여 반응이 적절히 이루어지는지 확인하였다.

노로바이러스 유전자 검출을 위하여 Table 1의 primer와 probe를 이용하여 25×enzyme mix 0.5 μL, 5×buffer 5 μL, 10×dNTPs 1 μL, RNase inhibitor (5 units/ μL) 0.25 μL, 10 μM primer (Forward 및 Reverse) 1 μL, 10 μM IC primer (Forward 및 Reverse) 0.5 μL, 10 μM probe (노로바이러스 및 internal control RNA) 0.5 μL, IC RNA 1 μL, 추출한 RNA 5 μL로 반응액을 조성 한 후, 멸균증류수를 첨가하여 최종적으로 25 μL의 반응액을 조성하였으며, 유전자 증폭을 위해서는 Thermal cycler dice TP800 (Takara, Japan)를 이용하여 50℃에서 50분간 역전사를 수행하고, 95℃에서 15분간 DNA를 변성시켰다. 이 후 95℃에서 10초, 53℃에서 25초, 62℃에서 70초로 45 cycles를 반복하였다. 양성 대조군으로 노로바이러스 RNA (Takara, Japan)를 사용하고, 음성 대조군으로 멸균증류수를 사용 하였다. Real time RT-PCR 반응은 시료마다 3회 반복하였다.

표준곡선 산출 및 노로바이러스 정량

표준곡선 산출을 위한 realtime RT-PCR에는 pET30a vector에 해당 유전자의 sequence (GI형 96 bp, GII형 98 bp)를 삽입하여 제작된 plasmid DNA (Takara, Korea)를 이용하였다. Shin et al. (2014)에 따라 plasmid DNA GI형과 GII형 각각을

10<sup>6</sup>-10<sup>2</sup> copies/reaction 농도로 단계 희석한 후 realtime RT-PCR을 실시하고 Thermal cycler dice realtime software (Takara, Japan)를 이용하여 표준곡선을 산출하였다. 이 표준곡선을 근거로 반복구 3개의 노로바이러스 농도(copies/g)를 각각 계산하고 이를 평균하여 시료 당 노로바이러스 농도로 하였다.

자연정화

하수처리장 최종 방류지점에서 양성되어 노로바이러스가 축적된 굴을 재 수확하여 청정해역인 한국패류위생계획 수출용패류생산지정해역 2호(경남 통영시 자란만·사량도 해역)로 당일 운반하였다. 양성 및 운반 중 폐사한 개체를 제외한 노로바이러스 축적 굴을 24개의 새로운 패류 양성망(원추형, ø 40 cm×h 40 cm)에 30개체씩 나누어 담고 각 양성망을 4단으로 연결하였다. 4단 연결된 양성망 2세트(양성망 8개/굴 약 240개체)를 한 개의 시험구로 설정하고 기존 수하식 양식시설(굴수하식 수산업협동조합 제공)에 총 3개의 시험구(T1-T3)를 20 m 간격으로 설치하여 자연정화를 유도하였다(Fig. 1). 자연정화 기간 중 2 일 간격으로 시험구 별로 굴을 20개체씩 수심을 고려하지 않고 무작위 채취하여 노로바이러스 농도변화를 확인하였으며, 패류의 정화작용에 영향을 미칠 수 있는 해수의 수온 변화를 Tid-bit v2 water temp data logger (Onset Computer Co., U.S.A)를 이용하여 1시간 간격으로 모니터링 하였다.

통계처리

굴 중 노로바이러스 농도 감소에 대한 자연정화 효율을 평가하기 위한 통계 처리는 SAS프로그램을 이용한 분산분석표를 작성하였으며, Duncan의 다중범위검정(Duncan's multiple range test)으로 P<0.05에서 결과 간의 유의성을 검정하였다 (Steel and Torries, 1980). 또한 노로바이러스 감소경향은 회귀 방정식으로 구현하였다.

Table 1. Primers and probes for realtime RT-PCR to quantitate norovirus

Genogroup	Type	Name	Sequence (5'-3')
GI	(+) primer	COG1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA
	(-) primer	COG1R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C
	Probe	RING1(a)-TP	ROX-AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA-BHQ2
GII	(+) primer	COG2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG
	(-) primer	COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA
	Probe	RING2(a)-TP	ROX-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-BHQ2
Internal Control	(+) primer	ICF	GAC ATC GAT ATG GGT GCC G
	(-) primer	ICR	AAT ATT CGC GAG ACG ATG CAG
	Probe	ICP	FAM-TCT CAT GCG TCT CCC TGG TGAATG TG-TAMRA

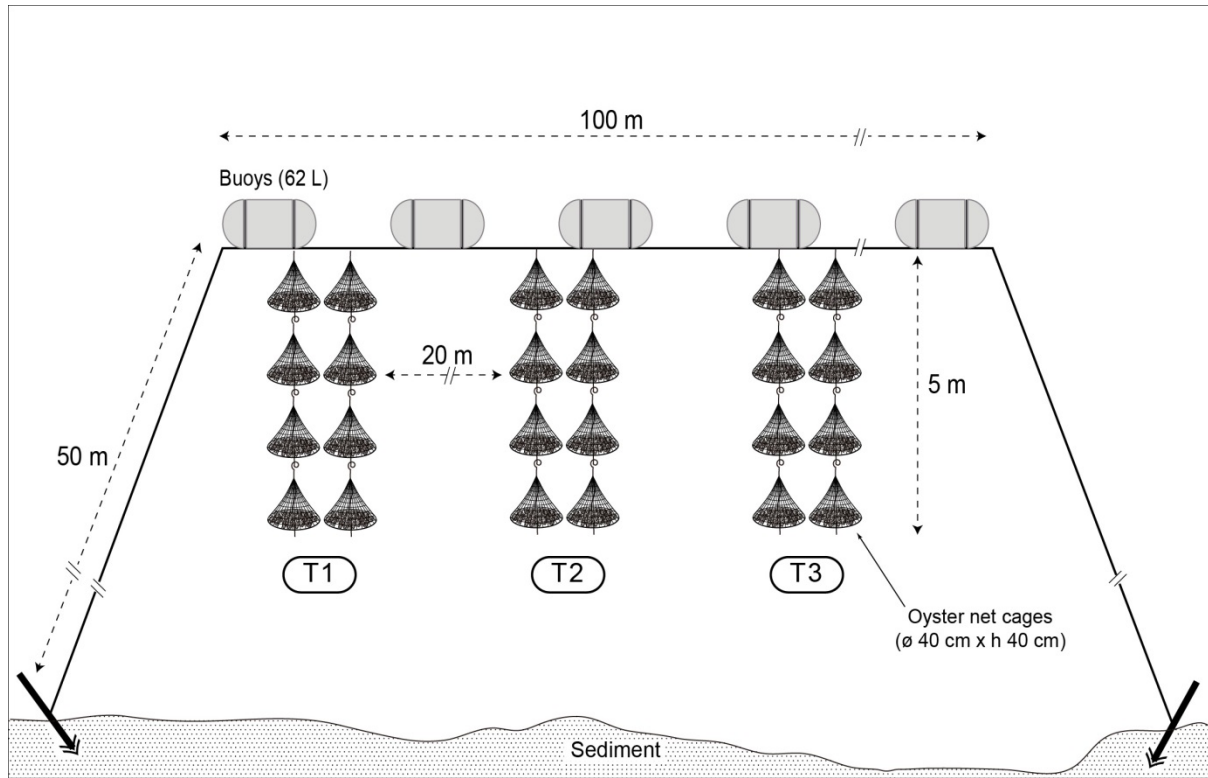


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental depuration facility for defecation of norovirus from oyster *Crassostrea gigas* following translocation of the growing area. T1-T3, experimental depuration trial.

### 결 과

자연정화가 실시된 해역의 수질은 시험기간 중 특이한 변동은 관찰되지 않았다. 평균 수온은 18.8℃이었고 수온변화는 ±0.8℃이었다. 염분농도, pH 및 용존산소는 시료 채취 시마다 (2일 간격) 측정되었으며 그 범위는 각각 31.4-33.7 psu, 7.11-8.1 및 6.11-9.17 mg/L이었다.

RT-PCR의 신뢰성이 확인을 위해 첨가한 internal control RNA의 사용농도와 RT-PCR에서 얻어진 cycle threshold (CT) 값을 표준곡선에 대입하여 산출된 바이러스 농도를 비교한 결과, 117건의 모든 RT-PCR 반응(39개 시료×3회 반복)에서 얻어진 바이러스 회수율이 모두 90% 이상으로 나타나 바이러스 추출과 RT-PCR 반응이 적절히 수행되었음을 알 수 있었다.

양식 굴을 채취하여 오염된 해역에 양성한지 3주 후 굴 중 노로바이러스 농도는 평균  $3.2 \times 10^3$  copies/g이었으며 그 범위는  $2.0 \times 10^3$ - $4.3 \times 10^3$  copies/g이었다. 그리고 유전형은 모두 GII로 밝혀졌다. 노로바이러스가 축적된 동 양식굴을 청정해역으로 이동시켜 노로바이러스 배출을 유도한 2차일에 3개의 시험구 중 2개의 시험구(T1 및 T3)에서 노로바이러스 농도가 0.11 및 0.14 log units 정도로 소폭 증가하였다가 이후 감소하는 경향을 보였고, 시험구 T2는 2일차에 거의 노로바이러스 농도가

거의 일정하였으며(0.06 log units 감소), 이후 빠른 감소 경향을 나타내었다(Table 2, Fig. 2). 이후 자연정화 12일차에 모든 시험구에서 노로바이러스 농도가 검출 한계(10 copies/g) 이하로 낮아져 축적된 노로바이러스가 거의 모두 배출된 것으로 판단되었다. 자연정화 기간 중 2일 간격으로 분석된 시험구 별 노로바이러스 농도 감소는 T1에서 0.13-1.56 log units, T2에서

Table 2. Results for the 3 depuration trials with norovirus expressed as number of RNA copies/g digestive gland

Sampling time	Trial		
	T1	T2	T3
t0 <sup>1</sup>	$3.3 \times 10^3$	$2.9 \times 10^3$	$4.3 \times 10^3$
t2 <sup>2</sup>	$4.5 \times 10^3$	$2.5 \times 10^3$	$5.6 \times 10^3$
t4	$2.5 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$
t6	$6.2 \times 10^2$	$7.5 \times 10^2$	$2.5 \times 10^3$
t8	$3.7 \times 10^2$	$1.2 \times 10^2$	$1.2 \times 10^3$
t10	ND <sup>3</sup>	ND	$4.4 \times 10^2$
t12	ND	ND	ND

<sup>1</sup>t0 is sampling at translocation of oyster from bioaccumulation site to depuration site. <sup>2</sup>t2-t12 is sampling every 2 days during depuration process; <sup>3</sup>not detected (below detection limit, 10 copies/g).

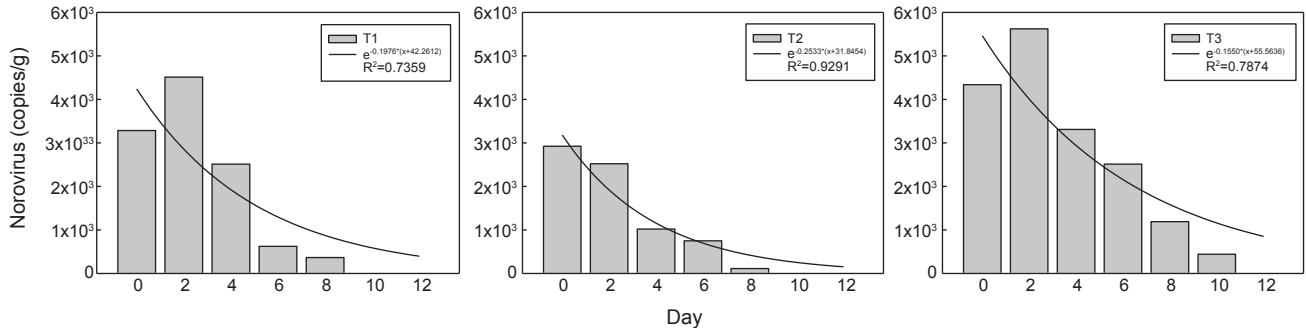


Fig. 2. Depuration kinetics of norovirus and its corresponding trend line for each experimental depuration trial (T1-T3). Results are expressed as copies/g digestive gland. Day 0, sampling at translocation of oyster *Crassostrea gigas* from bioaccumulation site to depuration site; Day 2-12, sampling during depuration process.

0.13-1.05 log units 그리고 T3에서 0.12-2.64 log units의 범위로 나타났으며, 감소 추세선의  $R^2$ 값은 0.74-0.93이었다(Table 2, Fig. 2). 노로바이러스 농도 감소가 가장 급격히 일어난 구간은 T1 및 T2 시험구에서 정화 8-10일차(각각 1.56 log units 감소 및 1.05 log units 감소) 이었고 T3 시험구에서는 정화 10-12일차(2.64 log units 감소)이었다(Table 2, Fig. 2).

## 고 찰

이 연구의 주목적은 RT-PCR 정량 기법을 기반으로 실험적으로 구성된 굴 자연정화 과정의 효율성을 평가하여 양식해역 이동(translocation)을 통한 굴 자연정화 유도가 노로바이러스 저감화 기법으로 활용 가능성이 있는지 확인하는데 있다. 이를 위하여 대조구 바이러스를 이용한 노로바이러스 회수율 검증을 실시하고 복잡한 패류 매트릭스에 의한 PCR 반응 억제 여부를 확인할 수 있도록 하여 적절하고 일관성 있는 굴 중 노로바이러스 농도가 산출되도록 하였다. 그리고 굴 중 노로바이러스 배출과 수심과의 상관성은 적지 선정과 시설물 설계를 위한 예비 시험에서 수심 2 m, 7 m 및 12 m로 구분하여 조사하였는데, 노로바이러스 배출과 수심과의 유의할 만한 상관성은 발견되지 않았다(data not shown).

자연정화 2일차에 3개의 시험구 중 2개의 시험구에서 노로바이러스 농도가 소폭 증가하였으며 이후 안정된 감소 경향을 보였고, 나머지 1개 시험구에서는 2일차까지 거의 노로바이러스 농도가 거의 일정하게 유지되다가 4일차 이후 빨리 감소하였다. 그리고 12일차에 모든 시험구에서 노로바이러스 농도가 검출 한계 이하로 낮아졌다.

일반적으로 대장균(*Escherichia coli*)을 대상으로 한 시설 내 정화 및 자연정화에서는 이러한 초기 농도증가 경향이 보고된 바 없으며 단일 상 정화 동태(one-phase depuration kinetics)가 관찰된다(Dore et al., 2010; Oh et al., 2012; Polo et al., 2014a; Lees, 2000; Nappier et al., 2009). 이는 패류 소화맹랑에서 대장

균 농도 감소는 소화맹랑으로부터 배출되는 속도에만 의존적이기 때문인 것으로 알려져 있다(Polo et al., 2014a). 그러나 굴 중 노로바이러스 정화에서 관찰된 복합 상 정화 동태(multi-phase depuration kinetics)는 단순한 배출 외에 다른 인자가 영향을 미치고 있음을 나타낸다. 많은 연구자들이 패류 중 대부분 바이러스 입자가 소화맹랑 내강에 존재하며 장관세포에 존재하는 특이 수용체에 결합되어 있다고 보고하고 있으며(Le Guyader et al., 2006; Mcleod et al., 2009a, 2009b; Tian et al., 2006; Wang et al., 2008), 바이러스 정화 효율이 세균에 비하여 매우 낮은 것은 바이러스가 이들 특이 수용체에 결합하여 세포 내 대사에 저항력이 높기 때문으로 보고하고 있다(Maalouf et al., 2010; Nappier et al., 2008). 또한 Provost et al. (2011)은 패류 소화과정의 최종단계에 관여하여 세균과 바이러스의 식균작용을 담당하는 혈구(hematocytes)의 산 소화(acidic digestion)에 대한 저항성이 노로바이러스가 세균뿐만 아니라 다른 장관계 바이러스에 비해서도 상대적으로 높다고 보고한 바 있다. 이러한 이유로 인공배양이 불가능한 노로바이러스 대신 feline calicivirus 나 murine norovirus 등을 대체 바이러스로 이용하여 정화실험을 실시한 경우 패류 장관계 세포와의 친화력 차이로 정화효율이 과대평가될 수 있다는 주장도 있다(Mcleod et al., 2009b; Nappier et al., 2008; Provost et al., 2011; Ueki et al., 2007). 이상의 여러 연구사례로 미루어 보아 자연정화 초기에 나타난 노로바이러스 지연 배출은 굴의 장관세포 수용체에 특이적으로 부착된 노로바이러스의 이탈과 소화에 일정시간이 소요되었기 때문으로 추정된다. 그리고 초기에 일시적으로 노로바이러스 농도가 높아지는 것은 소화맹랑 전 단계(pre-gland system)에서 존재하던 일부 노로바이러스가 소화맹랑 단계로 넘어온 후 RT-PCR에 의해 검출되었기 때문으로 사료된다. McMenemy (2014)에 의하면 굴에서 노로바이러스 정화효율은 노로바이러스가 소화맹랑 전 단계에서 소화맹랑으로 들어가는 대사 속도와 소화맹랑에서 배출되는 정화속도에 지배된다고 한다.

한편 대체 바이러스를 이용하지 않고 노로바이러스를 직접 이

용한 릴레이에 관한 보고는 매우 드물지만, Dore et al. (2010)은 릴레이와 시설 내 정화를 순차적으로 실시하여 그 효과를 보고한 바 있다. 동 연구에서 노로바이러스에 오염된 굴(초기농도  $1.1 \times 10^3$ - $2.9 \times 10^3$  copies/g)을 수확하여 수온 3-4°C의 조건에서 릴레이를 실시한 결과, 노로바이러스 농도가 1 log unit 감소하는데 17일이 소요되었어 굴을 수확한 후 수온을 상승시켜 (15-17°C) 시설 내 정화를 추가로 실시하였는데 4일만에 노로바이러스 농도가 1 log unit 추가로 감소되었다고 하였다. Dore et al. (2010)은 굴의 생육환경을 벗어나지 않는 범위 내에서 수온이 높을수록 굴의 여과섭식 활동과 장내 분해세균의 활성이 증가하여 노로바이러스 배출이 촉진된 것으로 추측하였다.

이상의 연구결과를 종합하면 노로바이러스에 오염된 해역에서 양식되어 생식에 부적합 굴이라도 청정해역에 옮겨 12일 이상 양성되는 경우 생식에 따른 노로바이러스 감염증 발생 가능성을 상당히 낮출 수 있을 것이라고 판단되며 동 결과는 굴에서 노로바이러스 저감화 대책 마련과 정확효율 개선 연구에 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 수온이 패류 중 바이러스의 배출에 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있어 향후 수온 등 환경인자와 굴 성장 주기 등 생리적 요소를 포함한 다양한 잠재 영향 인자를 종합적으로 해석한 추가 연구가 필요할 것이며, 나아가 패류수확, 해역이동과 분망 작업 등에 소요되는 제반 비용에 대한 경제성 평가도 있어야 할 것으로 사료된다.

## 사 사

이 논문은 2016년도 국립수산물과학원 수산과학연구사업 (R2016059)의 지원으로 수행된 연구이며 연구비 지원에 감사드립니다.

## References

- Butt AA, Aldridge KE and Sanders CV. 2004. Infections related to the ingestion of seafood. Part I: viral and bacterial infections. *Lancet Infect Dis* 4, 201-212. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00969-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00969-7).
- Chalmers JWT and McMillan JH. 1995. An outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters. *Epidemiol Infect* 115, 163-167. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268800058222>.
- DAF. 2011. Health protocol for the translocation and movement of live bivalve molluscus. Retrieve form <https://www.daf.qld.gov.au/fisheries/aquaculture/management-and-policies/fampr003-movement-of-live-bivalve-molluscs> on January 2016.
- Da Silva AK, Le Saux JC, Parnaudeau S, Pommepuy M, Eimelech M and Le Guyader FS. 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl Environ Microbiol* 24, 7891-7897. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01428-07>.
- Dore B, Keaveney I S, Flannery I J and Rajko-Nenow I P. 2010. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010. *Euro Surveill* 15, 1-4.
- European Commission. 2004. Regulation (EC) no 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. L226. *Off J Eur Communities*, 83-127.
- Iwai M, Hasegawa S, Obara M, Nakamura K, Horimoto E, Takizawa T, Kurata T, Sogen S and Shiraki K. 2009. Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyoma, Japan (2006 to 2008). *Appl Environ Microbiol* 75, 1264-1270. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01166-08>.
- Jothikumar N, Lowther JA, Henshilwood K, Lees DN, Hill VR and Vinj 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. <http://dx.doi.org/doi/10.1128/AEM.71.4.1870-1875.2005>.
- Kroneman A, Verhoef L, Harris J, Vennema H, Duzier E, van Duynhoven Y, Gray J, Iturriza M, Böttiger B, Falkenhörst G, Johnsen C, von Bonsdorff CH, Maunula L, Kuusi M, Pothier P, Galloway A, Schreier E, Höhne M, Koch J, Szűcs G, Reuter G, Krisztalovics K, Lynch M, McKeown P, Foley B, Coughlan S, Ruggeri FM, Di Bartolo I, Vainio K, Isakbaeva E, Poljsak-Prijatelj M, Grom AH, Mijovski JZ, Bosch A, Buesa J, Fauquier AS, Hernández-Pezzi G, Hedlund KO and Koopmans M. 2008. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clinical Microbiol* 46, 2959-2965. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00499-08>.
- Le Guyader FS, Loisy F, Atmar RL, Hutson AM, Estes MK, Ruvoen-Clouet N, Pommepuy M and Le Pendu J. 2006. Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis* 12, 931-936. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1206.051519>.
- Le Guyader FS, Neil FH, Dubois E, Bon F, Loisy F, Kohli E, Pommepuy M and Atmar RL. 2003. A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *Int J Food Microbiol* 87, 107-112. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00058-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00058-8).
- Lees DN. 2000. Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol* 59, 81-116. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00248-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00248-8).
- Maalouf H, Schaeffer J, Parnaudeau S, Le Pendu J, Atmar RL, Crawford SE and Le Guyader FS. 2011. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl Environ Microbiol* 77, 3189-3196. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03010-11>.

10. Maalouf H, Zakhour M, Le Pendu J, Le Saux JC, Atmar RL and Le Guyader FS. 2010. Norovirus genogroup I and II ligands in oysters: tissue distribution and seasonal variations. *Appl Environ Microbiol* 76, 5621-5630. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00148-10>.
- McMenemy P. 2014. Depuration dynamics of norovirus in oysters. Ph.D. Thesis, University of Stirling, Stirling, U.K.
- McLeod C, Hay B, Grant C, Greening G and Day D. 2009a. Localization of norovirus and poliovirus in Pacific oysters. *J Appl Microbiol* 106, 1220-1230. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04091.x>.
- McLeod C, Hay B, Grant C, Greening G and Day D. 2009b. Inactivation and elimination of human enteric viruses by Pacific oysters. *J Appl Microbiol* 107, 1809-1818. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04373.x>.
- Nappier SP, Graczyk TK and Schwab KJ. 2008. Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* oysters. *Appl Environ Microbiol* 74, 6825-6831. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01000-08>.
- Nappier SP, Graczyk TK, Tamang L and Schwab KJ. 2010. Co-localized *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* Oysters differ in bioaccumulation, retention and depuration of microbial indicators and human enteropathogens. *J Appl Microbiol* 108, 736-744. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04480.x>.
- Oh EG, Yoo HD, Yu HS, Ha KS, Shin SB, Lee TS, Lee HJ, Kim JH and Son KT. 2012. Removal of fecal indicator bacteria from bivalves under natural and electrolyzed water. *Korean J Fish Aquat Sci* 45, 11-16. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0011>.
- Pint RM, Costafreda MI and Bosch A. 2009. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl Environ Microbiol* 75, 7350-7355. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01177-09>.
- Polo D, Álvarez C, Longa A and Romalde JL. 2014a. Depuration effectiveness for hepatitis A virus removal from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int J Food Microbiol* 180, 24-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.001>.
- Polo D, Álvarez C, Vilariño ML, Longa A and Romalde JL. 2014b. Depuration kinetics of hepatitis A virus in clams. *Food Microbiol* 39, 103-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.011>.
- Polo D, Vilariño ML, Manso CF and Romalde JL. 2010. Imported mollusks and dissemination of human enteric viruses. *Emerg Infect Dis* 16, 1036-1038. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1606.091748>.
- Provost K, Ozbay G, Anderson R, Richards GP and Kingsley DH. 2011. Hemocytes are sites of enteric virus persistence within oysters. *Appl Environ Microbiol* 77, 8360-8369. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.06887-11>.
- Richards GP, McLeod C and Le Guyader FS. 2010. Processing strategies to inactivate viruses in shellfish. *Food Environ Virol* 2, 183-193. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-010-9045-2>.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ and Tauxe RV. 2011. Food-borne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17, 7-15. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1701.P11101>.
- Shin SB, Oh EG, Lee HJ, Kim YK, Lee TS and Kim JH. 2014. Norovirus quantification in oysters *Crassostrea gigas* collected from Tongyeong, Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 47, 501-507. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0501>.
- Steel RGD and Torrie JH. 1980. Principle and procedure of statistics; a biometrical approach (2nd ed.). Mitchell GJ and Mitchell JH, eds. MacGraw-Hill Book Company, New York, U.S.A., 121-165.
- Tian P, Bates AH, Jensen HM and Mandrell RE. 2006. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Lett Appl Microbiol* 43, 645-651. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02010.x>.
- Ueki Y, Shoji M, Suto A, Tanabe T, Okimura Y, Kikuchi Y, Saito N, Sano D and Omura T. 2007. Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. *Appl Environ Microbiol* 73, 5698-5701. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00290-07>.
- US FDA (Food and Drug Administration). 2013. National Shellfish Sanitation Program, Guide for the Control of Molluscan Shellfish, Model ordinance. Retrieved from [http://www.fda.gov/Food/Food Safety/Product-Specific Information/Seafood/Federal State Programs/National Shellfish Sanitation Program/default.htm](http://www.fda.gov/Food/Food%20Safety/Product-Specific%20Information/Seafood/Federal%20State%20Programs/National%20Shellfish%20Sanitation%20Program/default.htm) on January 18, 2016.
- Wang D, Wu Q, Kou X, Yao L and Zhang J. 2008. Distribution of norovirus in oyster tissues. *J Appl Microbiol* 105, 1966-1972. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03970.x>.