

가정용 냉장고 내부 표면에서 로타바이러스의 검출과 유전형 분석

Detection of Rotavirus from the Inner Surfaces of Domestic Refrigerators

강고은 · 김현수 · 김한성 · 김재석 · 송원근 · 박지영 · 조현찬

Goeun Kang, M.D., Hyun Soo Kim, M.D., Han-Sung Kim, M.D., Jae-Seok Kim, M.D., Wonkeun Song, M.D., Ji-Young Park, M.D., Hyoun Chan Cho, M.D.

한림대학교 의과대학 진단검사의학교실

Department of Laboratory Medicine, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Rotavirus is the leading cause of acute viral gastroenteritis, particularly in children, and is transmitted through the fecal-to-oral route by contaminated food or the environment. This study examined the contamination of the inner surfaces of domestic refrigerators with pathogens causing gastroenteritis.

Methods: Swab specimens from shelf surfaces of freezers and refrigerators were collected from 10 domestic refrigerators. Multiplex PCR for bacterial and viral pathogens causing acute gastroenteritis was performed. The VP7 and VP4 genes of rotavirus were amplified and then analyzed by DNA sequencing.

Results: Rotavirus was detected in five domestic refrigerators in the same apartment complex. All rotavirus samples showed the G1 genotype and the same DNA sequences. No pathogens causing acute gastroenteritis were identified in the other five domestic refrigerators.

Conclusions: The inner surfaces of domestic refrigerators can be contaminated with pathogens causing acute gastroenteritis, such as rotavirus. Attention should be given to the hygiene of refrigerators. To estimate the contamination or hygienic status for food storage, testing for viral pathogens combined with ordinary bacterial cultures may be necessary.

Key Words: Gastroenteritis, Refrigerator, Contamination, Rotavirus, Foodborne disease, Waterborne disease

서론

Rotavirus는 급성위장관염을 일으키는 주요 원인 바이러스 중 하나로서, 주로 겨울에 유행하며 특히 5세 이하의 소아에서 심한 위장관염을 보인다. WHO rotavirus surveillance network에 따르면 2008년 전세계적으로 5세 이하의 소아에서 rotavirus에 의한 사망자는 453,000명이며, 설사로 인한 사망의 37%를 보여 전체 사망

원인의 5%를 차지한다고 한다[1]. 2011년부터 2012년까지 국내 급성위장관염 환자의 분변에서 rotavirus 양성률은 20.3%였다[2].

Rotavirus는 이중가닥 RNA 바이러스로서 전염 경로는 바이러스가 오염된 분변이나 음식, 물, 손 등을 통해 환자의 구강으로 전염되는 경로이다. Rotavirus는 환경에서 잘 살아남으며 물체의 표면에서 2개월 이상, 분변상태로는 10℃에서 32개월 동안 감염력을 유지한다고 한다[3]. 보육시설이나 소아과 병동의 장난감, 전화기, 화장실 문 손잡이, 싱크대, 체온계, 의류, 냉장고 손잡이 등에서 rotavirus가 검출되기도 한다[3-5]. Rotavirus는 환경 표면에서 손으로, 또는 환경 표면에서 입으로 쉽게 전파되어 식중독을 일으킬 수 있다[3, 6].

Rotavirus의 분자생물학적 역학조사를 위해서는 유전형 분석을 시행해야 하는데, 일반적으로 외피 단백질 중 VP7과 VP4의 유전형에 따라 G형과 P형의 아형으로 분류한다. 전세계적으로 G1-G4, G9이 가장 많은 질환을 일으키며 G1P [8], G2P [4], G3P [8], G4P [6], G9P [8] 등의 아형이 제일 흔히 분리되며[7, 8], 우리나라에서도 비슷한 양상을 보인다.

Corresponding author: Jae-Seok Kim

Department of Laboratory Medicine, Hallym University College of Medicine, 150 Seongan-ro, Gangdong-gu, Seoul 05355, Korea

Tel: +82-2-2224-2327, Fax: +82-2-2224-2214, Email: jaeseok@hallym.or.kr

Received: July 8, 2015

Revision received: August 16, 2015

Accepted: August 17, 2015

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2016, Laboratory Medicine Online

© 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.

이 연구는 일부 가정용 냉장고에서 급성위장관염을 유발할 수 있는 세균 및 바이러스의 오염 여부를 multiplex PCR을 이용하여 검출하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 및 검체

2015년 2, 3월 경기도지역 한 아파트 단지 내에서 서로 교류가 없는 다른 동에 위치한 5가구와, 이 지역이 아닌 수도권 지역의 5가구를 대상으로 하였다. 검체는 생리식염수에 적신 면봉 2개를 사용하여 1가구당 냉장실 1칸과 냉동실 1칸의 선반 부위 전체를 각각 도말하여 채취하였으며 면봉 1개는 universal transport media (Copan, Brescia, Italy)에, 나머지 하나는 Amies transport media (Copan)로 운반하였다.

2. 위장관염 유발 세균 및 바이러스 검출

QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)와 QIAcube (Qiagen) 기기로 universal transport media 140 µL를 사용하여 핵산을 추출하였으며, Seeplex Diarrhea ACE detection kit (Seegene, Seoul, Korea)를 사용하여 rotavirus, norovirus, enteric adenovirus, astrovirus 등의 바이러스와, *Vibrio* spp., *Clostridium difficile* toxin B, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157, *Aeromonas* spp., verotoxin-producing *E. coli*에 대한 multiplex PCR 검사를 실시하였다. 또한 경기도지역의 한 아파트 단지 내

다섯 가구의 냉장고에서는 CampyFood agar (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)를 이용하여 campylobacter 배양을 시행하였고, 다른 수도권지역 다섯 가구의 냉장고에서는 MacConkey 배지로 그람음성 간균 배양을 시행하였다.

3. Rotavirus PCR 및 sequencing

Seeplex Diarrhea ACE detection kit를 사용한 multiplex PCR에서 검출된 rotavirus를 대상으로 아형 분석을 하였다. Rotavirus G (VP7)와 P (VP4) 아형 분석을 위한 PCR 검사는 WHO의 검사법에 따라 시행하였다[9]. VP7 유전자는 VP7-F/VP7-R 시발체로 검출하였다. VP4 유전자는 VP4-F/VP4-R와 Con3/Con2 시발체로 각각 PCR을 시행하였고, 음성을 보인 경우 Con3와 1T-1, 2T-1, 3T-1, 4T-1, 5T-1 시발체로 multiplex PCR 검사를 추가로 시행하였다. PCR 양성을 보인 검체는 유전자염기서열분석을 시행하였으며, NCBI BLAST로 검색하여 rotavirus 유전형을 확인하였다.

결 과

가정용 냉장고에서 급성위장관염의 원인 바이러스와 세균 오염 여부를 알아보기 위해 multiplex PCR을 시행한 결과, 한 아파트 단지 내 5가구에서 모두 rotavirus가 검출되었다. 냉동실, 냉장실에서 모두 검출된 경우는 3가구였으며, 냉장실에서만 검출된 가구는 2가구였다. 냉동실, 냉장실에서 모두 검출된 경우는 PCR 반응물의 전기영동에서 상대적으로 강한 band를 보였다(Fig. 1). 다른 지역의 5가구에서 채취한 10개 검체에서는 multiplex PCR 음성을 보였다.

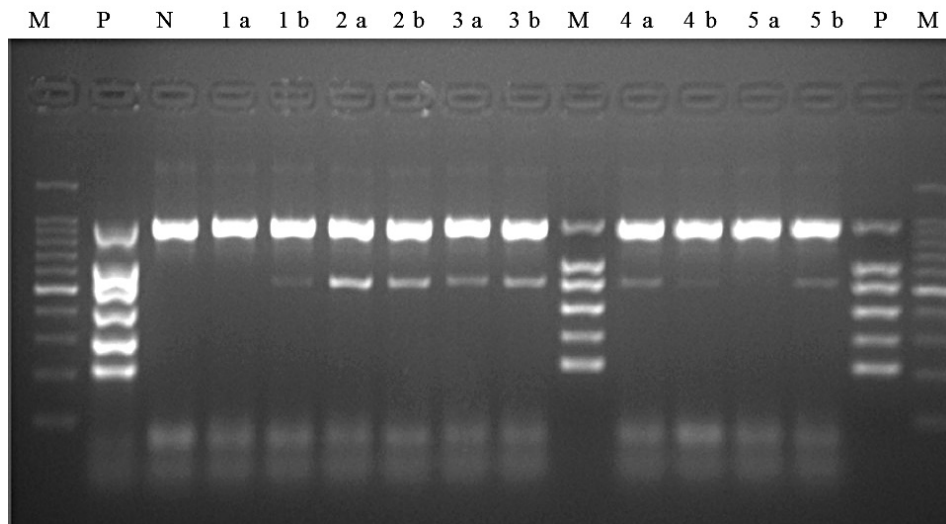


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis results of multiplex PCR for viruses causing acute gastroenteritis. Lanes 1–5 represent each of five domestic refrigerators. Lowercase a and b represent freezer shelf and refrigerator shelf, respectively. Bands in lanes 2, 3, and 4 show positive results for rotavirus. The uppermost bands are internal controls. Abbreviations: M, marker; P, positive control; N, negative control.

CampyFood agar 배양으로는 5개 냉장고 중 1개에서 10개의 균집락이 관찰되었으나 *Acinetobacter* spp.로 동정되었으며, MacConkey 배지로 검사한 5가구의 냉장고에서는 세균이 관찰되지 않았다.

Rotavirus의 G형 (VP7), P형 (VP4) 분석을 시행한 결과 VP7 유전자가 검출되었다. VP7 부위의 755 bp의 유전자염기서열 분석 결과 모두 동일한 염기서열을 보였으며, BLAST 검색 결과 2014년 국내에서 보고한[10] rotavirus G1형과 100% 동일한 염기서열을 보였다(Accession number; KF812576, HM130939).

그러나, VP4 유전자는 공통 시발체인 VP4-F/VP4-R와 Con3/Con2에 대한 반응이 음성이었고, 아형분석에 사용하는 Con3와 1T-1, 2T-1, 3T-1, 4T-1, 5T-1 시발체로 시행한 multiplex PCR에서도 음성을 보였다.

고 찰

수인성, 식품매개성 질환을 예방하기 위해서는 원인병원균의 오염 및 전염을 방지해야 한다. 대부분의 바이러스는 감염된 사람과 밀접한 접촉, 호흡기 분비물, 식품 등에 의해 감염되지만, 손이나 바이러스에 오염된 매개물로도 전파될 수 있다. 바이러스 오염은 병원 내 환경에서도 나타나지만, 대부분 지역사회의 실내 환경에서 흔히 발생한다[4, 11, 12]. 수인성, 식품매개성 질환을 흔히 일으키는 rotavirus는 분변 혹은 분변에 오염된 음식에 의해 주로 감염이 되나, 환자가 있는 경우 실내의 다양한 환경표면에서 rotavirus가 검출된다[5, 13]. Rotavirus의 경우 환자 분변에서 1 g당 1,000억 개의 바이러스가 검출되기도 하며, 성인 자원자를 대상으로 한 연구에서는 10개의 rotavirus만으로도 감염증을 일으킬 수 있었다[13]. 따라서, 환자의 분변이 미량이라도 식품에 오염되는 경우 가열하지 않은 채로 섭취한다면 rotavirus 감염증 발생이 가능하다. 다만, rotavirus는 이미 감염된 적이 있거나 rotavirus 백신을 접종한 사람은 이에 대한 면역이 있으므로, 실제로 감염증을 일으키지 못할 수도 있다.

Rotavirus나 norovirus는 주로 분변이 중요한 오염원이지만 지하수 또는 식품에서 검출되기도 한다. 국내에서도 다양한 조사가 있었는데, 경기지역 강물 표본 58개에서는 4개(6.9%)에서 rotavirus가 검출된 보고[14]가 있으며, 서울지역 지하수 62검체 중 3검체(4.8%)에서 rotavirus가 검출[15]되기도 하였다. 반면 경기지역 지하수 29곳 중 5곳(17%)과 야채 30개 중 3개(10%)에서 adenovirus 등의 enterovirus가 검출되었으나, rotavirus는 검출되지 않았으며[16], 2011년 국내 패류에서 norovirus group II, norovirus group I, hepatitis A virus는 21.7%, 5.9%, 0.7%에서 각각 검출되었으나, rotavirus는 검출되지 않았다고 한다.

수인성, 식품매개성 질환을 예방하기 위해 UNICEF/WHO에서

는 rotavirus 백신, 비누로 손씻기, 식수 공급 시설의 개선, 지역사회 의 위생향상을 중요한 전염방지책으로 제시하고 있다[9]. 또한, 음식물 조리 시 손위생에 주의해야 하며, 도마, 칼 등의 조리구기는 날 것과 조리 후의 음식 간에 교차감염이 일어나지 않도록 해야 하며, 음식이 닿게 되는 모든 표면의 청소와 세척이 중요하다[17, 18].

음식 보관용 냉장고에 대한 수인성, 식품매개성 세균이나 바이러스 오염에 대한 보고는 많지 않으나, 일반적으로 가정용 냉장고는 상대적으로 식중독 위험이 낮을 것으로 생각한다. 아일랜드에서 342개 가정용 냉장고의 세균 오염 여부를 조사한 연구에서는 *Staphylococcus aureus* 6.4%, *Listeria monocytogenes* 1.2%, *Yersinia enterocolitica* 0.6%가 검출되었으나, *E. coli* O157, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp.는 검출되지 않았다고 한다[19].

이 연구에서는 multiplex PCR을 이용하여 rotavirus, norovirus, adenovirus, astrovirus 등의 바이러스와 함께 주요 수인성, 식품매개성 세균에 대한 검출을 시도하였다. 이번 연구에서는 급성 위장관염을 유발할 수 있는 세균은 10가구 모두에서 검출되지 않았는데, 연구 대상이 소규모여서 이번 연구에서는 검출되지 않았을 가능성이 있으므로 가정용 냉장고에서 급성 위장관염 유발 세균의 위험에 대해서는 추가적인 조사가 필요할 것으로 생각한다. 다만, 세균 배양으로 1곳에서 CampyFood 배지에서 *Acinetobacter* spp.가 10집락 정도 관찰되었으며, MacConkey 배지로 일반적인 그림 음성간균을 검출하려고 하였으나 세균은 배양할 수 없었다.

사실상 바이러스는 배양이 어렵기에 일반적으로 분자진단법으로 검출하고 있으나, 이번 연구에서는 배양을 하지 않았으므로 실제 감염력이 있는 바이러스인지 여부를 확인하기는 어렵다. 또한, 냉장 또는 냉동온도에서는 rotavirus가 오랜 기간 동안 보존될 수 있으므로, 이번 연구에서 검출된 rotavirus가 현재 감염력이 있는지 감염력을 상실한 바이러스인지 여부는 확인할 수는 없었다.

Rotavirus 검출에 사용한 multiplex PCR kit의 대상 유전자는 VP4 유전자이다[20]. 그러나, 유전형 분석을 위한 여러 종류의 VP4 유전자에 대한 PCR 시발체에는 음성을 보였으며, 이 시발체 부위에 유전자 변이가 있는 것으로 추정된다. VP7 유전형 분석을 위해 시행한 PCR은 양성을 보였으며, 모두 동일한 유전자염기서열을 보였으므로 냉장고 표면에서 검출된 rotavirus는 유전적으로 동일한 바이러스에 의한 공통적인 오염원이 있는 것으로 추정된다.

이 연구는 급성 위장관염을 유발하는 세균 및 바이러스에 대한 multiplex PCR을 이용하여 가정용 냉장고의 오염 여부를 알아보고자 시행하였으며, 일부 가정용 냉장고에서 rotavirus가 검출되었고 G1형의 유전형을 확인하였다. Rotavirus가 가정용 냉장고에 오염될 가능성은 일반적으로 낮을 것으로 생각하지만, 환경 표면에서 오래 살아남을 수 있으며 냉장이나 냉동 조건에서는 상당히 오래 전염력을 지닐 수 있으므로 식품이나 신선식품을 보관하는 냉

장고가 rotavirus에 오염되면 오염된 식품이나 손을 통하여 rotavirus에 의한 급성 위장관염이 발생할 가능성이 있다. 따라서, rotavirus에 대한 면역력이 없는 가족이 있는 경우, 주의해야 할 필요가 있으며, 음식물을 잘 조리해야 한다. 또한, 미생물에 오염될 수 있는 음식은 적절한 용기에 보관하며, 냉장고 표면은 주기적으로 세척할 필요가 있을 것으로 생각한다.

이 연구는 일부 가정을 대상으로 시행한 소규모 연구이므로 rotavirus 오염의 위해도를 말하기는 어렵다. 또한 급성 위장관염을 일으킨 환자의 냉장고를 대상으로 조사한 것은 아니므로 냉장고 내부 표면의 rotavirus 오염이 감염증의 직접적인 위험요인이라고 제시한 것은 아니다. 향후 수인성, 식품매개성 질환 혹은 식중독의 위험을 추정하거나 위생상태를 파악하기 위해서 세균 배양 검사 이외에도 필요 시 바이러스 검출도 고려해야 한다고 생각한다.

감사의 글

이 연구는 산업통상자원부의 산업기술혁신사업 연구비(10047748) 지원에 의해 수행되었음.

요 약

배경: Rotavirus는 주로 소아에서 장염을 일으키는 바이러스로 식품이나 환경과의 접촉을 통해 분변-구강 경로로 전염된다. Rotavirus가 생활 환경에 오염 되는 경우에도 감염원이 될 가능성이 있다. 이 연구는 분자진단법을 사용하여 가정용 냉장고 내부 표면에서 급성위장관염을 유발할 수 있는 미생물의 오염 여부를 확인하기 위하여 시행하였다.

방법: 10가구의 가정용 냉장고에서 냉장실과 냉동실 표면의 도말 검체를 얻었고, multiplex PCR을 이용하여 급성위장관염을 유발할 수 있는 세균과 바이러스 검출을 시행하였다. Rotavirus가 검출된 경우 VP7, VP4 유전자에 대한 PCR과 유전자염기서열분석을 시행하여 G 유형과 P 유형을 분석하였다.

결과: 동일한 아파트 단지에 위치한 5가구의 냉장고에서 rotavirus가 검출되었다. Rotavirus 유형은 G1이었으며 모두 동일한 염기서열을 보였다. 다른 도시에 위치한 5가구에서는 급성위장관염을 유발하는 미생물이 검출되지 않았다.

결론: 가정용 냉장고 내부는 급성위장관염을 유발하는 미생물이 오염될 수 있으며, 일부 냉장고에서 rotavirus가 검출되어 위생상 주의가 필요하다. 식품보관장소의 오염이나 위생상태를 추정하기 위해서는 일반적인 세균배양법 외에도 급성위장관염을 유발하는 바이러스를 검사할 필요가 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012;12:136-41.
2. Kim J, Kim HS, Kim HS, Kim JS, Song W, Lee KM, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the rapid and simultaneous detection of rotavirus and adenovirus in stool samples. *Ann Lab Med* 2014; 34:216-22.
3. Boone SA and Gerba CP. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. *Appl Environ Microbiol* 2007;73: 1687-96.
4. Barker J, Stevens D, Bloomfield SF. Spread and prevention of some common viral infections in community facilities and domestic homes. *J Appl Microbiol* 2001;91:7-21.
5. Butz AM, Fosarelli P, Dick J, Cusack T, Yolken R. Prevalence of rotavirus on high-risk fomites in day-care facilities. *Pediatrics* 1993;92:202-5.
6. Bloomfield SF and Scott E. Cross-contamination and infection in the domestic environment and the role of chemical disinfectants. *J Appl Microbiol* 1997;83:1-9.
7. Kim JS, Kim HS, Hyun J, Kim HS, Song W, Lee KM, et al. Analysis of rotavirus genotypes in Korea during 2013: an increase in the G2P[4] genotype after the introduction of rotavirus vaccines. *Vaccine* 2014;32: 6396-402.
8. Agócs MM, Serhan F, Yen C, Mwenda JM, de Oliveira LH, Teleb N, et al. WHO global rotavirus surveillance network: a strategic review of the first 5 years, 2008-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014;63:634-7.
9. WHO. Manual of rotavirus detection and characterization methods. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2009.
10. Han TH, Kim SC, Kim ST, Chung CH, Chung JY. Detection of norovirus genogroup IV, klassevirus, and pepper mild mottle virus in sewage samples in South Korea. *Arch Virol* 2014;159:457-63.
11. Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Xerry J, et al. Contamination of the hospital environment with gastroenteric viruses: comparison of two pediatric wards over a winter season. *J Clin Microbiol* 2008;46:3112-5.
12. Carducci A, Verani M, Lombardi R, Casini B, Privitera G. Environmental survey to assess viral contamination of air and surfaces in hospital settings. *J Hosp Infect* 2011;77:242-7.
13. Dennehy PH. Transmission of rotavirus and other enteric pathogens

- in the home. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:S103-5.
14. Lee C and Kim SJ. Molecular detection of human enteric viruses in urban rivers in Korea. *J Microbiol Biotechnol* 2008;18:1156-63.
 15. Park SH, Kim EJ, Yun TH, Lee JH, Kim CK, Seo YH, et al. Human enteric viruses in groundwater. *Food Environ Virol* 2010;2:69-73.
 16. Cheong S, Lee C, Song SW, Choi WC, Lee CH, Kim SJ. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:7745-51.
 17. WHO. Five keys to safer food manual. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2006.
 18. Miko BA, Cohen B, Haxall K, Conway L, Kelly N, Stare D, et al. Personal and household hygiene, environmental contamination, and health in undergraduate residence halls in New York City, 2011. *PLoS One* 2013;8:e81460.
 19. Jackson V, Blair IS, McDowell DA, Kennedy J, Bolton DJ. The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. *Food Control* 2007;18:346-51.
 20. Lee S, Park YJ, Lee HK, Kim SY, Kim JY, Lee SY, et al. Detection of 13 enteric bacteria and 5 viruses causing acute infectious diarrhea using multiplex PCR from direct stool specimens. *Ann Clin Microbiol* 2013;16:33-8.