분자생물학적 기술을 이용한 노로바이러스 생존성 평가법

Detection of Norovirus using Molecular Biological Method

이민화[1], 서동주[1], 서지나[1], 전수빈[1], 오혜진[1], 이정수[2], 주인선[2], 이희정[2], 최창순[1,3*]
Min Hwa Lee[1], Dong Joo Seo[1], Ji Na Seo[1], Su Been Jeon[1], Hye Jin Oh[1], Jeong-Su Lee[2], In-Sun Joo[2], Hee Jung Lee[2], and Changsun Choi[1,3*]

[1]중앙대학교 식품영양학과, [2]식품의약품안전처, [3]중앙대학교 식품공학부
[1]Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, Korea, [2]Ministry of Food and Drug Safety, Korea
[3]School of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Korea

1. 노로바이러스

노로바이러스는 caliciviridae과에 속하며, 바이러스성 급성 위장염의 주된 원인체로 알려져 있다 (16). 잠복기는 24-48시간이며, 복통, 설사, 열, 메스꺼움과 같은 전형적인 위장염 증상을 동반하면서 감염이 시작된다 (26). 노로바이러스는 약 10-100 virion으로도 감염이 되며, 사람 간 접촉이나 분변-구강 경로, 오염된 식수나 음식을 통하여 전염된다 (12)(19).

크기는 27-35 nm의 원형의 virion이며, 외피가 없는 단일가닥 positive-sense RNA 바이러스이다 (7). 특히, 그림.1과 같이 3개의 open reading frame(ORF)을 encoding한 7.4-7.7 kb의 polyadenylated RNA 유전자 구성을 갖고 있다 (3) (그림.1). 노로바이러스는 5개의 유전자 그룹으로 분류되며, genogroup I형과 II형,

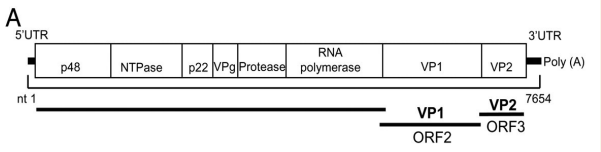

그림 1. 노로바이러스의 유전자 구성 (PNAS (2005) 102, 10327-10332).

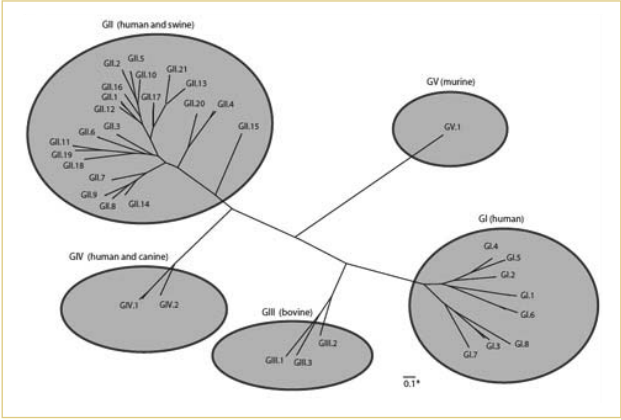

그림 2. 노로바이러스 5개 유전자그룹과 35개 유전자형 (MMWR (2011) 60, 1-15).

* Correspondence to: Changsun Choi
Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea
Tel: +82-31-670-4589, Fax: +82-31-676-8741 E-mail: cchoi@cau.ac.kr

IV형이 일반적으로 사람에게 감염을 일으키며, genogroup III형과 V형은 각각 소와 쥐에게 감염을 일으킨다 (44). genogroup I형과 II형, III형은 각각 14, 17, 2개의 유전자형으로 분류되며, genogroup IV형과 V형은 각각 1개의 유전형으로 분류된다 (2) (그림. 2).

2. 노로바이러스 검출법 동향 및 감염 모델

노로바이러스 배양법의 부재는 노로바이러스 생존성을 확인할 수 없다는 점에서 현재까지 큰 문제로 대두되고 있다 (34). 따라서, 식품 또는 분변 내 오염된 노로바이러스 검출은 Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qPCR), RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification), LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 방법과 같은 분자생물학적 검출방법이 이용되고 있다 (11)(19)(27). 이러한 분자생물학적 방법은 병원체의 유전자를 신속하면서도 민감도, 특이도 높게 검출하면서 유전자의 정량이 가능하다는 장점이 있으나, 병원체의 생존성 판단은 할 수 없기 때문에 노로바이러스처럼 배양이 불가능한 병원체의 감염력을 정확히 확인할 수 없다는 문제가 있다 (25).

최근 몇 년간 INT-407, Caco-2, Caco-2의 clone인 C2BBe1 cell line과 같은 소장상피세포에 3-D 배양법을 적용하여 노로바이러스 배양을 시도한 선행연구가 있었다 (30)(35)(36)(37). 바이러스 RNA 증가는 확인되었으나, 정확한 CPE 및 새로운 노로바이러스 virion을 확인 할 수 없다는 점에서 한계점이 있으며, 실험에 필요한 특정 장비 및 3D 배양을 유지하는데 실험자의 폭넓은 경험이 요구된다는 단점이 있다 (32)(37)(38)(39).

최근 침팬지, 돼지와 같은 동물을 이용한 노로바이러스 감염모델 개발이 보고되었다 (6)(8)(36). Human 노로바이러스에 감염된 침팬지에서 임상적인 위장염 징후는 나타나지 않았으나 분변 내 바이러스 분비와 혈청 항체반응이 확인되었으며, 분변에서 검출된 바이러스와 일치하는 바이러스 RNA가 간과 장에서 검출되어 감염 모델로써 가능성을 나타내고 있다 (6). 돼지는 위장관 구조나 면역체계, 생리학적으로 사람과 매우 비슷하기 때문에 무균돼지를 이용한 노로바이러스 연구는 현재까지 연구된 노로바이러스 감염 모델 중 가장 가능성 있는 모델로 알려져 있다 (40). 특히 신생아 무균돼지에 노로바이러스를 감염시켰을 경우, 설사, 바이러스 분비, 장의 immuno-cytopathic 변화, 일시적인 바이러스 혈증을 나타내는 것으로 확인되었다 (8)(36). 그러나, 이러한 동물감염모델은 분자생물학적 검출법과 달리 비용이 많이 들며, 실험실 수준의 연구와 달리 복잡하며, 전문가가 아니라면 다루기 힘들다는 한계점이 있다 (42).

이로 인해 노로바이러스를 대신하여 배양 가능한 human 노로바이러스 surrogate 인 feline calicivirus (FCV), murine norovirus (MNV), poliovirus, bacteriophage MS2 등을 이용하여 노로바이러스 복제와 병원성, 면역학적 측면을 이해하는 연구가 상당부분 진행되었다 (34)(40). 그러나, 노로바이러스와 임상적 징후, 숙주 수용체, 감염 세포 유형 차이뿐만 아니라 surrogate마다 노로바이러스와 물리 · 화학적 또는 유전적 성질 차이로 인해 연구에 한계점이 있다 (34)(40).

3. 분자생물학적 방법을 이용한 노로바이러스 생존성 평가

현재 세균성 병원체뿐만 아니라, 장바이러스에 의한 식중독이 식품안전에 있어서 점차적으로 중요하게 인식되고 있으며, World Health Organization (WHO)는 장바이러스에 의한 식중독 발생이 상승추세에 있다고 보고하였다 (10). 식품안전에 대한 지속적인 관심은 신속하면서 새로운 병원체 검출 기술에 관한 연구에 집중되었고, 다양한 검출방법이 미생물 특성과 식품에 따라 다르게 적용되고 있다 (10). 일반적으로 병원성 박테리아는 standard culture method을 통해 모니터링 되고 균의 특징이 결정된다. 바이러스의 병원성 및 생존성 판별은 조직배양을 통한 증식, 세

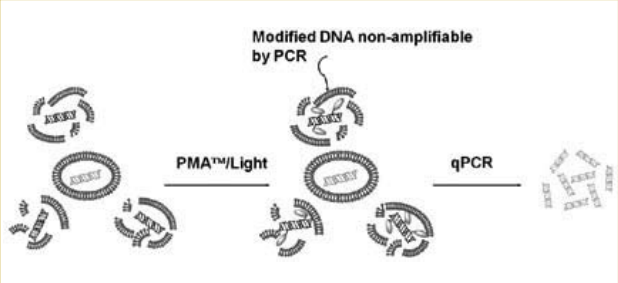

그림 3. PMA-PCR원리 (http://www.biotium.com)

포배양에 의한 cytopathic effects (CPE) 관찰을 통하여 감염력을 결정하게 된다 (10)(32). 이러한 배양기술에 기반한 바이러스의 생존성 평가는 식품의 정기적인 바이러스 오염 여부 검사 및 식중독 발생 검사에 있어서 많은 비용이 발생할 뿐만 아니라 시간이 많이 소요된다. 되어, 신속하고 정확하게 병원체를 검출할 수 있는 방법이 요구되고 있다 (10)(33).

지난 10년 간 Polymerase chain reaction (PCR)과 Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qPCR)과 같은 분자생물학적 방법을 이용한 검출법에 propidium monoazide (PMA) 또는 ethidium monoazide (EMA)와 같은 Dye를 접목시켜 미생물 생존성을 판별하는 검사법이 소개되고 있는데, 이 검사법을 viability PCR (v-PCR)이라 명명하기도 한다 (28)(29). EMA와 PMA는 사멸된 세포의 세포막에 침투하여 긴 파장의 빛에 노출됨으로써 DNA와 covalent cross-links 되어 DNA 증폭을 막게 된다 (28) (그림 3). PMA와 EMA와 같은 Dye를 이용한 PCR검출법은 DNA genome을 가진 박테리아의 생존성평가에 주로 사용되었으나, 박테리아뿐만 아니라 바이러스와 진균류(fungi), 원생동물(protozoa)에도 널리 적용되고 있다 (10) (표 1, 2).

표 1. EMA와 PMA를 이용한 Virus 생존성 평가 연구

Dye	Target virus	Inactivation processing and detection	Reference
PMA	Enteric RNA viruses (Coxsackievirus, Poliovirus, Echovirus, Norwalk virus)	- 열처리(72°C, 37°C, 19°C), hypochlorite(차아염소산염)를 통한 불활성화. - PMA를 RT-PCR, qPCR과 결합시켜 생존성 시험 실시. 72°C, 37°C와 hypochlorite로 불활성 시킨 virus에 대한 PMA의 효용성 규명.	(32)
PMA	Bacteriophage T4	- 열처리(85°C), - 생존성 판별은 PMA 처리/비처리 cell culture titration과 real-time PCR로 진행함.	(14)
EMA	Avian influenza virus	- 28일 동안 reverse-osmosis water 또는 landfill leachate에서 21°C 또는 37°C에서 incubation. - real-time RT-PCR과 cell culture titration을 이용하여 RNA virions의 생존성 평가. 감별불가.	(17)
PMA	Virus (MS2, Murine norovirus), Bacteria (*Escherichia coli, Bacillus subtilis*)	-70% isopropanol에서 10분 (박테리아), 72°C에서 10분 처리 (MNV), 80°C에서 20분 처리(MS2). - 박테리아, 바이러스에 대한 생존성 평가를 위해 PMA-qPCR을 수행함. 바이러스의 불활성화는 배양법으로 확인.	(22)
PMA	HAV	- 열처리를 통한 불활성화. - PMA와 RNase를 Real-Time RT-PCR과 결합시켜 비교실험. PMA의 효용성 규명.	(35)

표 2. EMA와 PMA를 이용한 bacteria, parasite, fungi 생존성 평가 연구

Dye	Target bacteria, parasite, and fungi	Inactivation processing and detection	Reference
PMA EMA	*Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas syringae*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*	- Isopropanol과 열처리로 사멸. - PMA, EMA를 처리 하여 qPCR, microarray 실시. PMA 효용성 규명.	(28)
PMA	*Vibrio parahaemolyticus*	- 수산물 (굴, 가리비, 새우, 게)에 살아있는 *Vibrio parahaemolyticus*를 판별. - PMA-qPCR 결과는 qPCR, plate counts와 함께 비교됨.	(46)
PMA	Lactic acid bacteria, Bifidobacteria	- 발효유에 살아있는 lactic acid bacteria와 bifidobacteria의 정량적 검출. - PMA real-time PCR 결과는 plate counts와 함께 비교됨.	(15)
EMA PMA	Bacterial flora (mixed bacterial cultures of fish origin)	- 대구포에서 추출한 bacterial flora의 생존성 판별. 45~95°C에서 5분간 열처리. - EMA, PMA 처리 후 real-time PCR과 plate counts 비교. EMA 효용성 규명.	(24)
EMA PMA	*Listeria monocytogenes*	- 5, 15, 25, 37°C 2시간 동안 incubation. - Real-Time PCR에 PMA 또는 EMA를 결합시켜 생존성 판별.	(31)
PMA	*Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*	- 열처리 및 ultraviolet (UV)처리. - 생존성 판별을 위해 PMA-qPCR, PMA-PCR을 실시함.	(5)
PMA	*Legionella pneumophila*	- 열처리 (72°C, 5분), 환경샘플 내 *Legionella pneumophila* 생존성 판별. - PMA-qPCR 결과는 quantitative PCR, plate counts와 함께 비교됨. EMA의 세포독성 확인	(45)
PMA, EMA	*Candida albicans*	- drugs (clotrimazole,fluconazole), aessential oils (Thymus vulgaris, Matricaria chamomilla) 처리. - 생존성 판별을 위해 PMA, EMA를 처리 후 qPCR, Plate counts와 비교	(1)
PMA	*Acanthamoeba castellani*	- contact lens solution (polyhexamethylene biguanide, hydrogen peroxide), 열처리(121°C 15분). - 생존성 판별을 위해 PMA 처리 후 qPCR	(13)
PMA	*Escherichia coli*	- Biosolids와 같은 환경샘플에 인위적으로 처리한 *Escherichia coli* 생존성 판별. - PMA-qPCR을 이용하여 검출.	(41)

바이러스 생존성을 판별하는 또 다른 방법으로 최근 proteinase K와 RNase A를 이용한 감별법이 선행되었다 (4)(30). 감염성이 없는 viral capsid protein은 proteinase에 의한 변형에 민감하고, viral RNA는 RNase에 의한 변성이 쉽기 때문에 이 두 가지 enzyme을 PCR에 적용하여 활성을 띠는 바이러스 유전자만을 검출하는 것이다. Nuanualsuwan and Cliver (2002)는 HAV (Hepatitis A virus), vaccine poliovirus 1, feline calicivirus를 자외선, 차아염소산염(hypochlorite), 72°C 열처리를 통하여 불활성화 시킨 뒤, proteinase K와 RNase A를 처리하여 RT-PCR을 수행하였다. 그러나 RT-PCR은 qPCR을 이용한 방법보다 감도가 낮기 때문에 정확한 바이러스의 생존성 감별을 위해서 정량이 가능한 qPCR방법을 적용한 연구가 수행되어야 할 것이다 (8). Baert *et al*. 2008은 murine norovirus를 80°C 열처리 후 qPCR과 plaque assay에 proteinase K와 RNase A를 적용하여 생존성을 판별하였다. 그러나, 열처리 전 후 바이러스 titer는 약 6.5 $\log_{10}$PFU/ml 감소가 관찰되었으나, qPCR에서는 0.2 $\log_{10}$ genome copy 차이로 qPCR을 활용한 바이러스 생존성 판별은 불가능한 것으로 확인되었다.

이 밖에 porcine gastric mucin에 노로바이러스가 binding되는 특징을 활용하여 magnetic beads에 porcine gastric mucin을 결합시킨 porcine gastric mucin-conjugated magnetic beads (PGM-MBs)를 이용한 노로바이러스 감별법이 선행되었다 (9). 활성을 띠는 노로바이러스가 PGM-MBs에 선택적으로 부착되면 magnetic 탈착에 의해 바이러스가 농축되는 원리이다 (43). 그러나 현재 GI.1, GII.4와 같은 몇몇 바이러스 유전자형에 대한 감별법 연구가 진행되어 있기 때문에 다양한 노로바이러스 유전자형, 특히 식중독을 일으키는 특정 유전자형의 생존성을 판별하는데 적절한 방법이 되기 위해서는 앞으로 연구가 더욱 진행되어야 할 것이다. 또한, 식품 적용 시 pH와 같은 가혹조건이 PGM-MBs에 바이러스가 부착되는 것을 방해할 가능성이 있기 때문에 최적화 될 필요가 있다 (9)(43).

4. 결론

국내에서는 1995년부터 식중독 발병이 꾸준히 증가하였고, 그중에서도 노로바이러스에 의한 바이러스성 식중독 발병은 1999년 이후 보고가 되었다 (21)(23). 이에 노로바이러스에 의한 식중독을 사전에 예방하기 위하여 2004년부터 질병관리본부는 노로바이러스 검출 키트를 개발하여 지역 내 검출율을 높일 뿐만 아니라, 식중독 발병의 조기 검출을 가능하게 하였다 (21)(23). 또한, 전국적인 실험실 감시망을 구축하여 노로바이러스 유전자형 분포 및 변이주를 조기에 검출하여 2차 감염 및 대규모 집단발병, 유행의 조기 차단 효과를 가져왔다.

그러나, 배양이 불가능한 노로바이러스의 기존 검출법은 PCR에 의존한 분자생물학적 유전자 분석 및 단순 병원체 검출이므로 정확한 노로바이러스의 생존성을 판별할 수 없다는 큰 문제점이 있다. 이러한 한계점은 위에서 언급한 EMA, PMA와 같이 불활성화 된 유전자에 cross-link되어 검출을 막는 dye나, human histo-blood group antigens (HBGAs)와 화학적으로 비슷한 porcine gastric mucin, 불활성화 된 바이러스의 capsid protein 및 viral RNA에 민감하게 반응하는 proteinase K와 RNase A 같은 효소 등을 접목한 검출법 개발을 요구하고 있다. 그 중에서도 EMA와 PMA는 현재까지 바이러스의 생존성을 판별하는데 가장 전망 있는 물질로 상당부분 선행연구되었으며, 이를 활용한 검출법이 개발된다면 배양이 불가능한 노로바이러스의 생존성을 단시간에 감별해낼 수 있는 대체 시험법으로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전처의 2014년 용역연구사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다 (14162식중독973).

참고 문헌

1. Agusti G, Fittipaldi M, Morató J, Codony F. Viable quantitative PCR for assessing the response of candida albicans to antifungal treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(1):341-349.

2. Ambert-Balay K, Bon F, Le Guyader F, Pothier P, Kohli E. Characterization of new recombinant noroviruses. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5179-5186.

3. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivatable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(1):15-37.

4. Baert L, Wobus CE, Van Coillie E, Thackray LB, Debevere J, Uyttendaele M. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(2):543-546.

5. Banihashemi A, Dyke M, Huck P. Long-amplicon propidium monoazide-PCR enumeration assay to detect viable campylobacter and salmonella. *J Appl Microbiol*. 2012;113(4):863-873.

6. Bok K, Parra GI, Mitra T, et al. Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(1):325-330.

7. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerging Infect Dis*. 2005;11(7):1079-1085.

8. Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol*. 2006;80(21):10372-10381.

9. Dancho BA, Chen H, Kingsley DH. Discrimination between infectious and non-infectious human norovirus using porcine gastric mucin. *Int J Food Microbiol*. 2012;155(3):222-226.

10. Elizaquivel P, Aznar R, Sánchez G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *J Appl Microbiol*. 2014;116(1):1-13.

11. El-Senousy WM, Costafreda MI, Pinto RM, Bosch A. Method validation for norovirus detection in naturally contaminated irrigation water and fresh produce. *Int J Food Microbiol*. 2013;167(1):74-79.

12. Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular epidemiology of "norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the united states. *J Infect Dis*. 1998;178(6):1571-1578.

13. Fittipaldi M, Pino Rodriguez NJ, Adrados B, et al. Discrimination of viable *acanthamoeba castellani* trophozoites and cysts by propidium monoazide Real-Time polymerase chain reaction. *J Eukaryot Microbiol*. 2011;58(4):359-364.

14. Fittipaldi M, Rodriguez NJP, Codony F, Adrados B, Peñuela GA, Morató J. Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. *J Virol Methods*. 2010;168(1):228-232.

15. Garcia-Cayuela T, Tabasco R, Peláez C, Requena T. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. *Int Dairy J*. 2009;19(6):405-409.

16. Glass RI, Noel J, Ando T, et al. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: A reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis*. 2000;181 Suppl 2:S254-61.

17. Graiver DA, Saunders SE, Topliff CL, Kelling CL, Bartelt-Hunt SL. Ethidium monoazide does not inhibit RT-PCR amplification of nonviable avian influenza RNA. *J Virol Methods*. 2010;164(1):51-54.

18. Hall AJ, Vinjé J, Lopman B, et al. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2011.

19. Hamza IA, Jurzik L, Überla K, Wilhelm M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *Int J Hyg Environ Health*. 2011;214(6):424-436.

20. http://www.biotium.com

21. Jee YM. Norovirus Food Poisoning and Laboratory Surveillance for Viral Gastroenteritis in Korea. 보건복지포럼. 2006;제 118호:26-34.

22. Kim S, Ko G. Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus. *Lett Appl Microbiol*. 2012;55(3):182-188.

23. Kwun JW, Lee CH. Trends of recent food-borne disease outbreaks in Korea. *J Korean Med Assoc* 2007;50(7):573-581.

24. Lee J, Levin RE. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets. *J Microbiol Methods*. 2009;76(1):93-96.

25. Malorny B, Tassios PT, Rådström P, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol*. 2003;83(1):39-48.

26. Medici MC, Martinelli M, Abelli LA, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in sporadic cases of viral gastroenteritis among children in northern italy. *J Med Virol.* 2006;78(11):1486-1492.

27. Myrmel M, Rimstad E, Wasteson Y. Immunomagnetic separation of a norwalk-like virus (genogroup I) in artificially contaminated environmental water samples. *Int J Food Microbiol.* 2000;62(1):17-26.

28. Nocker A, Cheung C, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods.* 2006;67(2):310-320.

29. Nogva HK, Dromtorp S, Nissen H, Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques.* 2003;34(4):804-813.

30. Nuanualsuwan S, Cliver DO. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J Virol Methods*. 2002;104(2):217-225.

31. Pan Y, Breidt F,Jr. Enumeration of viable *listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(24):8028-8031.

32. Parshionikar S, Laseke I, Fout GS. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(13):4318-4326.

33. Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of shiga toxin-encoding escherichia coli O26, O103, O111, O145 and O157. *Int J Food Microbiol*. 2007;113(3):284-288.

34. Richards GP. Critical review of norovirus surrogates in food safety research: Rationale for considering volunteer studies. *Food and environmental virology*. 2012;4(1):6-13.

35. Sánchez G, Elizaquivel P, Aznar R. Discrimination of infectious hepatitis A viruses by propidium monoazide real-time RT-PCR. *Food and environmental virology*. 2012;4(1):21-25.

36. Souza M, Cheetham SM, Azevedo MS, Costantini V, Saif LJ. Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain). *J Virol.* 2007;81(17):9183-9192.

37. Straub T, Bartholomew R, Valdez C, et al. Human norovirus infection of caco-2 cells grown as a three-dimensional tissue structure. *Journal of water and health*. 2011;9(2):225-240.

38. Straub TM, Hutchison JR, Bartholomew RA, et al. Defining cell culture conditions to improve human norovirus infectivity assays. *Water Science & Technology*. 2013;67(4):863-868.

39. Straub TM, Honer zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, et al. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(3):396-403.

40. Tan M, Jiang X. Norovirus gastroenteritis, carbohydrate receptors, and animal models. *PLoS pathogens*. 2010;6(8):e1000983.

41. Taskin B, Gozen AG, Duran M. Selective quantification of viable *escherichia coli* bacteria in biosolids by quantitative PCR with propidium monoazide modification. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(13):4329-4335.

42. Taube S, Kolawole AO, Hohne M, et al. A mouse model for human norovirus. *MBio*. 2013;4(4):10.1128/mBio.00450-13.

43. Tian P, Yang D, Jiang X, et al. Specificity and kinetics of norovirus binding to magnetic bead-conjugated histo-blood group antigens. *J Appl Microbiol*. 2010;109(5):1753-1762.

44. Vinjé J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods*. 2004;116(2):109-117.

45. Yáñez MA, Nocker A, Soria-Soria E, Múrtula R, Martinez L, Catalán V. Quantification of viable legionella pneumophila cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J Microbiol Methods*. 2011;85(2):124-130.

46. Zhu R, Li T, Jia Y, Song L. Quantitative study of viable vibrio parahaemolyticus cells in raw seafood using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J Microbiol Methods*. 2012;90(3):262-266.