

贝类中 GI、GII 诺如病毒快速检测与分群方法的建立

苏来金^{1,2,3}, 赵 峰¹, 马丽萍¹, 周德庆¹

摘要:目的 建立贝类中 GI、GII 诺如病毒快速检测与分群方法。方法 对比分析 6 株主要流行的 GI、GII 诺如病毒及参考诺如病毒的基因序列,筛选保守区域引物,优化建立 SYBR Green I 荧光定量检测与熔解曲线快速分群方法,并对实际样品检测验证。结果 引物 P289/290 可同时检测 GI、GII 诺如病毒,SYBR Green I 荧光定量检测方法在病毒浓度 $10^3 \sim 10^9$ copies 之间呈现良好的线性关系 ($R^2 = 0.993, P < 0.01$), 熔解曲线 Tm 值可区分 GI 和 GII 不同基因群的诺如病毒 ($F = 7507.60, P < 0.05$)。120 份贝类样品阳性检出率 5.83%, 其中阳性结果测序鉴定与快速分群方法结论一致。结论 该方法成本低、检测快速、分群准确,具有良好重复性,适用于贝类中 GI、GII 诺如病毒的快速检测与分群。

关键词:贝类; 诺如病毒; SYBR Green I; 快速检测; 分群

中图分类号:R373.2 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2019)10-0909-06

Establishment of the rapid detection and gene grouping method for genogroup I and genogroup II Noroviruses in shellfish

SU Lai-jin^{1,2,3}, ZHAO Feng¹, MA Li-ping¹, ZHOU De-qing¹

(1. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao),
Laboratory for Marine Drugs and Biological Products, Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Wenzhou Academy of Agricultural Science, Wenzhou 325006, China;
3. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To establish a rapid method for the detection and classification of genogroup I(GI) and genogroup II(GII) Norovirus(NoVs) in shellfish. Gene sequence of six major prevalent GI and IIGII NoVs strains and international general reference NoVs were analyzed and one pair of primers in conservative region was selected to establish a rapid detection and gene grouping method for GI and GII NoVs in shellfish. The real samples were also tested and validated. The results showed that the P289/290 primers could simultaneously detect GI and GII NoVs at the same time, and the fluorescence quantitative detection method had a good linear relationship with virus concentration in the range of $10^3 \sim 10^9$ copies ($R^2 = 0.993, P < 0.01$), and the Tm value of melting curve could distinguish the GI and GII NoVs ($F = 7507.60, P < 0.05$). The positive detection rate of 120 shellfish samples was 5.83%, and the sequencing gene grouping result in the positive sample was consistent with those of rapid gene grouping in the study. The method has the benefits of low cost, quick testing, good accuracy, and good repeatability. It is suitable for rapid detection and clustering of GI and GII NoVs in shellfish.

Keywords: shellfish; Noroviruses; SYBR Green I; rapid detection; gene grouping

国家自然科学基金项目(No.31471663)

通讯作者:周德庆,Email: zhoudq@ysfri.ac.cn;

ORCID: 0000-0002-9035-5440

作者单位:1.青岛海洋科学与技术试点国家实验室,海洋药物与生物制品功能实验室,中国水产科学研究院黄海水产研究所,青岛 266071;

2.温州市农业科学研究院,温州 325006;

3.上海海洋大学食品学院,上海 201306

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31471663)

Corresponding author: Zhou De-qing, Email: zhoudq@ysfri.ac.cn

诺如病毒(Noroviruses, NoVs)属于杯状病毒科(Caliciviridae), 诺如病毒属(Norovirus), 是一种

重要的食源性病原菌,引发了许多传播与暴发^[1-3]。NoVs 可分为 5 个遗传组(genogroups, G),分别被命名为 GI 到 GVII,其中 GI、GII 和 GIV 感染人类^[4-5]。贝类通过滤食作用可将诺如病毒持续富集在体内,成为 NoVs 传播的重要载体^[6],在贝类中经常污染到 GI、GII 2 种基因群的 NoVs^[7-10],目前检测 NoVs 的分子生物学方法包括:RT-PCR^[11],巢式 RT-PCR^[12],荧光定量 RT-PCR^[13]等方法,也有同时检测 GI、GII NoVs 的检测方法^[14-16],然而不同基因群的 NoVs 鉴定一般需要有多对引物分别检测,甚至还需要对扩增产物回收、测序鉴定、操作繁琐、耗时较长。

本研究通过对比分析 GI、GII NoVs 流行株的基因序列,筛选一对引物对 GI、GII NoVs 同时检测,根据 Synergy brands(SYBR) Green I 荧光定量中熔解曲线特性^[17-18],建立了基于 SYBR Green I 荧光定量熔解曲线分析的快速分群方法,旨在为贝类中单基因群或混合型基因群 NoVs 的快速检测与分群分型提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料 6 株阳性 NoVs 分别为 57397 毒株(GI.1 型,GenBank: M87661.2),54108 毒株(GI.3 型,GenBank: GQ856470.1),55063 毒株(GI.6 型,GenBank: GQ856464.),57395 毒株(GII.4 型,GenBank: KC752514),F278 毒株(GII.12 型,GenBank NO: JQ899442),GZ2013-L20 毒株(GII.17 型,KR869038)为中国疾病预防控制中心提供,为感染病人的粪便样品,经浓缩冷冻保存,基因型别均经过扩增测序后,使用美国 CaliciNet 诺如病毒在线分型工具(<https://norovirus.phirearchlab.org/>)进行分型确认;轮状病毒(Rotavirus, RV)、星状病毒(Astrovirus, AstV)为实验室保存的病毒 cDNA,由青岛市疾控中心提供。用于人工污染的贝类样品为青岛城阳水产品批发市场采集的鲜活牡蛎,经过检测未发现 NoVs 检出。贝类检测样品为 2015 年 1—12 月从青岛城阳水产品批发市场采集的牡蛎、扇贝、毛蚶、菲律宾蛤仔、中国蛤等 5 种贝类,每月采集 2 次,全年共采集 120 份样品。

1.2 设备与试剂 NanoPhotometerTM 微量核酸蛋白测定仪,购自德国 IMPLEN 公司;罗氏 Light Cycler® 2.0 全自动荧光定量 PCR 仪,购自德国 Roche 公司;Sigma 1-14 冷冻离心机,购自德国 SIGMA 公司;Biometra PCR 仪,购自德国 Biometra 公司;DYCP-31E 型电泳仪,购自北京六一仪器

厂;凝胶成像系统,购自法国 Vilber Lourmat 公司;High Pure Viral RNA Kit、蛋白酶 K 购自德国罗氏(Roche)公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒等购自北京天根(TIANGEN)公司,DNaseI (RNase Free)、SYBR® Premix Ex TaqTM II 试剂盒等购于大连宝生物(TaKaRa)公司。

1.3 引物筛选 从 GenBank 下载目前用于分群分型的主要毒株 GI(GenBank NO: M87661,L07418, AB447414, AB042808, KJ402295, AB081723, MH130046, AF538679, KF586507, M0127530),GII (GeneBank NO. U07611, DQ366347, JQ751034, AB220924, AB220921, AY032605, EF126965, HM802544, AB294779, AB933767, AB434770, JX459908, DQ078829, AY682550, AB684664, JX846926, AB039780, AY038599, AB126320, AJ277618, JN899242, GU017903, AY502010, LC037415, AY823304, AY823306, EU275779, JN899245, AB233471, MG495080, MG495085, GQ856469, KU306738) NoVs 的基因序列,利用 DNA star 进行序列比对,筛选 GI、GII 同时保守区域的引物,最终选择同时检测 GI、GII NoVs 的引物为:上游引物 P290: 5'-GATTACTCCAGGTGG-GAYTCMAC-3'(引物位置:4568-4 590),下游引物 P289: 5'-TGACGATTTCATCATCACCRTM-3'(引物位置:4865-4886),扩增片段大小 319 bp。

1.4 实验方法

1.4.1 病毒人工污染、回收、RNA 提取 取 2 g 牡蛎消化道样品,加入 10 μL 的病毒原液,加入 2 mL PBS 缓冲液,匀浆 2 min; NoVs 回收按照实验室前期建立的方法^[19],RNA 提取使用 High Pure Viral RNA Kit(Roche)试剂盒说明方法进行。

1.4.2 普通 RT-PCR 与荧光定量反应体系优化 cDNA 合成扩增体系为 50 μL, 5 μL 10×Buffer, 8 μL 25 mmol/L MgCl₂, 2.5 μL 10 mmol/L dNTPs, 2 μL P289 引物, 0.7 μL 10 U/μL AMV-RT 反转录酶, 0.2 μL 50 U/μL RNasin, 2 μL 病毒 RNA 模板, 补足去离子水, 42 °C 反应 1 h。

PCR 反应: 5 μL 10×Buffer, 4 μL 25 mmol/L MgCl₂, 1 μL 10 mmol/L dNTPs, 上下游引物各 1 μL, 0.5 μL 5 U/μL Taq 酶, 8 μL cDNA, 补足去离子水, 反应条件: 94 °C 3 min, 然后 94 °C 1 min, 49 °C 1 min 20 s, 72 °C 1 min, 40 个循环, 最后 72 °C 10 min。产物电泳后经测序进行鉴定。

荧光定量的 PCR 采用 20 μL 的体系进行扩增, SYBR® premix Ex TaqTM II (2×) 15 μL, 2 条引

物($10 \mu\text{mol/L}$)各 1 μL , cDNA 模板 100 ng 左右, 补足去离子水。荧光定量 PCR 扩增: 95 °C 预变性 30 s, 1 个循环; 然后 95 °C 变性 5 s, 49 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 10 s, 35 个循环。

1.4.3 荧光定量标准品制备 使用 GII.4 型 NoV 的 RNA 为扩增对象, RT-PCR 产物电泳切取特异性条带, 用胶回收试剂盒回收后, 根据实验室方法制备质粒^[20], 并提取 DNA, 用生物分光光度计测定质粒 DNA 的浓度和纯度, 换算成拷贝数, 并进行梯度稀释, 作为系列标准品进行方法建立。

1.4.4 SYBR Green I 荧光定量 PCR 的 TM 曲线 熔解曲线分析按照荧光定量试剂盒说明书中推荐的程序, 以 0.1 °C/s 变化速度从 65 °C 升高至 95 °C 绘制熔解曲线。

1.4.5 特异性与准确性试验 使用 GI.1、GI.3、GI.6、GII.4、GII.12、GII.17 等 6 株阳性 NoVs, 以轮状病毒(RV)、星状病毒(AsTV)为阴性对照, 以二次水为空白对照, 对建立的方法进行验证, 确定检测方法的特异性和准确性。

1.4.6 稳定性与重复性 将不同型别的 NoVs, 人工污染贝类后, 分 3 个时间批次利用荧光定量 PCR 熔解曲线法测定 Tm 值, 然后, 计算 3 个批次样品的 Tm 平均值、标准偏差、变异系数以及对 Tm 值进行方差分析, 确定方法的稳定性和重复性。

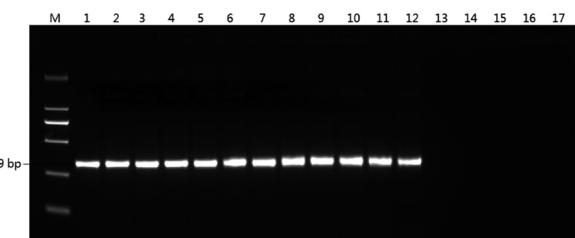
1.4.7 验证性试验 对采集的 120 个贝类样品, 利用建立的方法, 结合普通 RT-PCR, 对检测出的阳性 NoVs, 进行 PCR 扩增, 片段回收、测序分析, 与熔解曲线检测结果对比, 验证方法的实用性。

1.5 数据处理 所有实验重复 3 次, 数据结果用平均值±标准误差表示, 数据处理使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析, 采用 LSD 法进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。荧光定量标准曲线、扩增、熔解曲线使用罗氏 Light Cycler® 2.0 全自动荧光定量 PCR 仪自带软件自动生成。

2 结果

2.1 普通 RT-PCR 结果 使用 P289 和 P290 引物, 对 6 株 NoVs 阳性样品进行普通 RT-PCR 扩增。由图 1 扩增产物电泳图可知: P289/P290 引物可以特异性扩增 GI 和 GII NoVs 阳性毒株, 不能扩增 RV 和 AstV, 说明引物特异性良好, RT-PCR 扩增产物大小与预期 319 bp 相符, 反应干扰少, 说明扩增反应准确。

2.2 荧光定量检测 从图 2 可以看出, 在病毒标准品为 $10^2 \sim 10^9$ copies 范围内, 荧光定量扩增曲线具

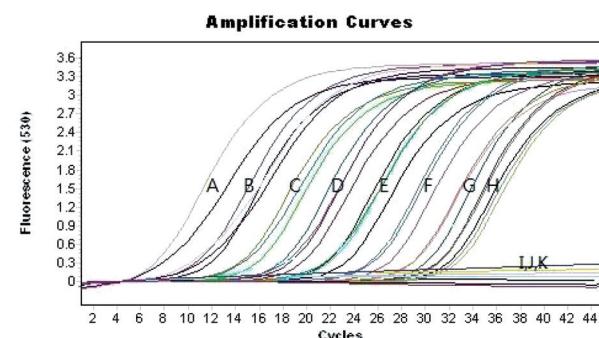


备注: 从左到右 M 为 DL2000 maker, 1-2 为 GI.1; 3-4 为 GI.3; 5-6 为 GI.6; 7-8 为 GII.4; 9-10 为 GII.12; 11-12 为 GII.17; 13-14 为 RV; 15-16 为 AstV; 17 为白色对照

图 1 不同型别诺如病毒的普通 RT-PCR 结果

Fig.1 RT-PCR results of different genotype NoVs

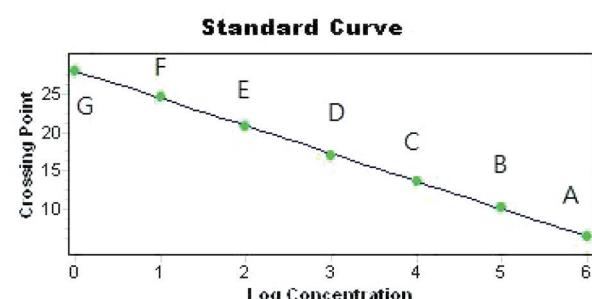
有良好的扩增, RV、AstV 和空白对照均没有扩增, 说明反应特异性良好; 从图 3 可以看出, 在病毒标准品为 $10^3 \sim 10^9$ copies 范围内的标准曲线性关系良好 ($R^2 = 0.993, P < 0.01$), 说明定量反应准确。



从左到右 A-H 分别为 $3.5 \times 10^9, 3.5 \times 10^8, 3.5 \times 10^7, 3.5 \times 10^6, 3.5 \times 10^5, 3.5 \times 10^4, 3.5 \times 10^3, 3.5 \times 10^2$ copies 的诺如病毒质粒标准品, I,J,K 分别为 RV, AstV 和空白对照

图 2 荧光定量反应扩增曲线

Fig.2 Amplification curve of fluorescence quantitative reaction



从左到右 A-G 分别为 $3.5 \times 10^9, 3.5 \times 10^8, 3.5 \times 10^7, 3.5 \times 10^6, 3.5 \times 10^5, 3.5 \times 10^4, 3.5 \times 10^3$ copies 的 NoVs 质粒标准品

图 3 荧光定量标准曲线

Fig.3 Standard curve of fluorescence quantitative

2.3 准确性和特异性 6 株不同型别的 NoVs 阳性样品经过 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 扩增后,

进行熔解曲线分析。由图 4 可以看出, GI 诺如病毒和 GII 诺如病毒扩增曲线可以明显区分, 其中 GI 诺如病毒对应的 Tm 值在 85 ℃左右, GII 诺如病毒对应的 Tm 值在 86 ℃左右, 区分度明显, 型别鉴别与实际样品型别相符, 轮状病毒、星状病毒和空白对照均无扩增曲线, 也无 Tm 值, 说明反应特异性良好。6 株不同型别的 NoVs 阳性样品的熔解曲线 Tm 值与区分度情况见表 1。可以看出, GI 诺如病毒的 Tm 值两两比较, 差异无统计学意义($t_1=0.35, t_2=0.59, t_3=0.23, P>0.05$), GII 诺如病毒的 Tm 值两两比较, 差异无统计学意义($t_1=0.35, t_2=0.18, t_3=0.18, P>0.05$), GI 诺如病毒的 Tm 值为 85.15 ± 0.02 , GII 诺如病毒的 Tm 值为 86.06 ± 0.01 , 两组基因群之间进行方差分析, 差异有统计学意义($F=7507.60, P<0.05$), 因此, 通过 Tm 值不能区分 GI 或 GII 同一基因群内的不同型别, 但可以用来区分 GI 和 GII 基因群间的 NoVs。

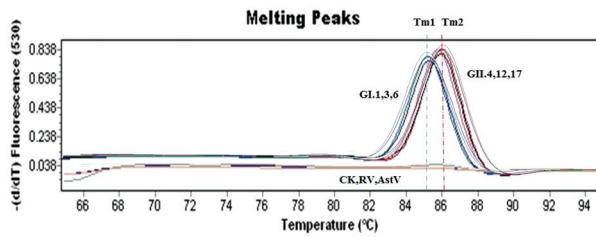


图 4 不同型别诺如病毒的熔解曲线分析

Fig.4 Analysis of dissolution curve of Norovirus different genotype NoVs

表 1 不同型别诺如病毒 Tm 值分析

Tab.1 Analysis of Tm value of different genotype NoVs

基因型	Tm 值
GI.1	85.13 ± 0.11^a
GI.3	85.15 ± 0.08^a
GI.6	85.16 ± 0.05^a
GII.4	86.07 ± 0.04^b
GII.12	86.05 ± 0.06^b
GII.17	86.06 ± 0.05^b

注:Tm 值两两比较, 同列数字后字母不同表示比较有统计学差异($P<0.05$), 字母相同表示比较后无统计学差异($P>0.05$)。

2.4 方法的稳定性 将 6 株不同型别的阳性 NoVs 人工污染牡蛎后, 分 3 个时间批次利用荧光定量 PCR 熔解曲线法测定 Tm 值, 计算 3 个批次样品的 Tm 平均值、标准偏差、变异系数。从表 2 中可以看

出, 对 3 个检验批次 NoVs 的 Tm 值均没有较大变化, RSD 均小于 0.1%, GI 和 GII NoVs 的 Tm 平均值方差分析, 差异有统计学意义($F=2162.25, P<0.05$), GI.1 组内不同批次的 Tm 值两两比较, 差异无统计学意义($t_1=0.08, t_2=0.40, t_3=0.32, P<0.05$), GI.3 组内不同批次的 Tm 值两两比较, 差异无统计学意义($t_1=0.34, t_2=1.80, t_3=1.46, P<0.05$), GI.6 组内不同批次的 Tm 值两两比较, 差异无统计学意义($t_1=0.43, t_2=0.22, t_3=0.22, P<0.05$), GII.4 组内不同批次的 Tm 值两两比较, 差异无统计学意义($t_1=0.81, t_2=2.00, t_3=0.49, P<0.05$), GII.12 组内不同批次的 Tm 值两两比较, 差异无统计学意义($t_1=0.10, t_2=0.28, t_3=0.38, P<0.05$), GII.17 组内不同批次的 Tm 值两两比较, 差异无统计学意义($t_1=0.59, t_2=1.33, t_3=0.74, P<0.05$), 上述结果表明建立的鉴别方法稳定性强, 具有良好的重现性。

2.5 样品中诺如病毒检测与鉴定 对 2015 年 1-12 月采集的不同贝类样品中 NoVs 的检测, 并利用本研究建立的方法、RT-PCR 扩增后测序鉴定方法进行比较。从表 3 中可以看出, 120 份贝类样品中共有 7 个样品检出了 NoVs 阳性结果, 检出率为 5.83%, 其中有 2 份样品(牡蛎和毛蚶)中出现了 2 个 Tm 值, 说明这两份样品同时存在 GI 和 GII NoVs, 其他样品均出现 1 个 Tm 值, 说明这些样品存在单一类型的 NoVs。经过测序鉴定与本方法的结论进行比对, 7 个样品的判定结论均一致, 说明本研究建立的方法适合贝类中 GI 和 GII NoVs 的快速检测与鉴定分群。

3 讨 论

国际上按照 NoVs 基因组聚合酶区和衣壳蛋白区的序列, 将 NoVs 被分为 5 个基因组(Groups)^[21], 其中 GI 和 GII 以及 GIV NoVs 感染人类^[22-23]。根据 NoVs 的核苷酸序列, GI 和 GII NoVs 可进一步分为 8 和 17 个基因型(Genetic Cluster 或 Genotype)^[24]。近年来, NoVs 的基因重组和变异的不断出现, GI 和 GII NoVs 进一步分为 9 个和 29 个基因型。对几个 NoVs 全长基因组序列的分析表明, 同一基因群内不同病毒株的核苷酸序列同源性为 69%~97%, 而不同基因群的病毒株核苷酸序列同源性只有 51%~56%^[25], 这为本研究利用核苷酸序列开展不同基因群间的快速鉴定奠定了基础。

贝类引起的 NoVs 疫情暴发中, 有 1 个显著的

表 2 不同检验批次诺如病毒的 Tm 值
Tab.2 Results of different test batches for Norovirus' Tm

样品	Tm 值					
	GI.1	GI.3	GI.6	GII.4	GII.12	GII.17
A1	85.23	85.09	85.22	86.04	86.03	86.08
A2	85.12	85.12	85.01	86.03	86.06	86.05
A3	85.15	85.14	85.19	86.09	86.05	86.13
B1	85.09	85.11	85.08	86.11	86.02	86.08
B2	85.21	85.08	85.12	86.08	86.05	86.09
B3	85.19	85.19	85.14	86.12	86.08	86.05
C1	85.13	85.18	85.19	86.01	85.98	86.04
C2	85.15	85.16	85.11	86.13	86.02	86.06
C3	85.17	85.11	85.08	86.26	86.11	86.07
平均值	85.16 ^b	85.13 ^b	85.13 ^b	86.10 ^a	86.04 ^a	86.07 ^a
标准差	0.08	0.05	0.04	0.07	0.04	0.03
相对标准偏差(%)	0.09	0.05	0.05	0.08	0.04	0.03

注:A、B、C 分别代表不同的检验批次,对不同型别 NoVs 的 Tm 值的平均值进行两两比较,同行数字后字母不同表示差异有统计学意义($P<0.05$),字母相同表示比较后差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 阳性样品的检测与基因群鉴定
Tab.3 Detection and genogroups identification of positive samples

月份	样品	Tm1	Tm2	本方法	测序方法	一致性
1月	牡蛎	85.14	86.09	GI,GII	GI,GII	是
2月	扇贝	85.12	—	GI	GI	是
2月	牡蛎	—	86.07	GII	GII	是
3月	毛蚶	85.11	86.07	GI,GII	GI,GII	是
11月	菲律宾蛤仔	—	86.08	GII	GII	是
12月	牡蛎	85.16	—	GI	GI	是
12月	扇贝	—	86.07	GII	GII	是

备注:—表示未检出。

特点是在感染者和受污染的贝类中可以检测出多个型别的 NoVs,尽管针对混合基因型 NoVs 的多重检测方法已经建立^[26-27],但却无法快速分群分型,传统的分群分型方法仍然以基因扩增、测序、比对分析为主,耗时较长,尤其在贝类中 NoVs 含量低、型别复杂、存在样品成分干扰等情况下, NoVs 快速检测和分群分型就显得尤为迫切。因此,如何快速地确定贝类中 NoVs 污染的基因群类别,对于追溯污染的贝类、发布 NoVs 疫情预警等具有重要的意义。本研究探索分析了目前流行的 NoVs 毒株及参考分群分型毒株的基因序列,筛选了可以同时检测 GI、GII 基因群的引物,建立了基于 SYBR Green I 荧光

定量检测及扩增熔解曲线分析方法,用阳性样品和实际贝类样品进行检测验证,均与测序方法得到的分型结果一致,该方法既可以实现定量检测,又可以快速分群,为贝类中 NoVs 快速检测和分群分型提供了技术支撑。

利益冲突:无

引用本文格式:苏来金,赵峰,马丽萍,等.贝类中 GI、GII 诺如病毒快速检测与分群方法的建立[J].中国人兽共患病学报,2019,35(10):909-914.
DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.145

参考文献:

- [1] Cho HG, Lee SG, Lee MY, et al. An outbreak of norovirus infection associated with fermented oyster consumption in South Korea, 2013[J]. *Epidemiol Infect*, 2016, 144(13): 2759-2764. DOI:10.1017/S0950268816000170
- [2] Loury P, Le Guyader FS, Le Saux JC, et al. A norovirus oyster-related outbreak in a nursing home in France, January 2012 [J]. *Epidemiol Infect*, 2015, 143(12): 2486-2493. DOI:10.1017/S0950268814003628
- [3] Rajko-Nenow P, Keaveney S, Flannery J, et al. Norovirus genotypes implicated in two oyster-related illness outbreaks in Ireland[J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142(10): 2096-2104. DOI:10.1017/S0950268813003014
- [4] Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(2): 373-381. DOI:10.1128/JCM.01535-14
- [5] Martella V, Decaro N, Lorusso E, et al. Genetic heterogeneity and recombination in canine noroviruses[J]. *J Virol*, 2009, 83(21): 11391-11396. DOI:10.1128/JVI.01385-09
- [6] 周德庆, 苏来金, 赵峰, 等. 诺如病毒在贝类中的富集特性与机制研究进展[J]. 病毒学报, 2015, 31(3): 313-317. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002702
- [7] Lowmoung T, Pombubpa K, Duangdee T, et al. Distribution of naturally occurring norovirus genogroups I, II, and IV in Oyster Tissues[J]. *Food Environ Virol*, 2017, 9(4): 415-422. DOI: 10.1007/s12560-017-9305-5
- [8] Benabbes L, Ollivier J, Schaeffer J, et al. Norovirus and other human enteric viruses in moroccan shellfish[J]. *Food Environ Virol*, 2013, 5(1): 35-40. DOI:10.1007/s12560-012-9095-8
- [9] Schaeffer J, Le Saux JC, Lora M, et al. Norovirus contamination on French marketed oysters[J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 166(2): 244-248. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.022
- [10] 苏来金, 马丽萍, 刘慧, 等. 人工污染 GII.4 型诺如病毒在太平洋牡蛎中的蓄积与分布特性[J]. 食品科学, 2018, 39(23): 16-21. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201823003
- [11] Hellberg RS, Li F, Sampath R, et al. Rapid detection and differentiation of human noroviruses using RT-PCR coupled to electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Food Microbiol*, 2014, 44: 71-80. DOI:10.1016/j.fm.2014.05.017
- [12] Kitajima M, Oka T, Tohya Y, et al. Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan[J]. *Microbiol Immunol*, 2009, 53(9): 531-534. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2009.00152.x
- [13] Suffredini E, Lanni L, Arcangeli G, et al. Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve molluscs harvested in Italy[J]. *Int J Food Microbiol*, 2014, 184: 21-26. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.026
- [14] 张濛, 邱正勇, 张广伟, 等. 双重实时荧光定量 PCR 法检测腹泻患者粪便中诺如病毒(G I +G II)的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2017(6): 802-803.
- [15] 纪蕾, 韩建康, 吴晓芳, 等. 多重荧光 RT-PCR 同时检测 G I 型和 G II 型诺如病毒方法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2011(4): 311-315. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2011.04.011
- [16] Farkas T, Singh A, Le Guyader FS, et al. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of GI, GII and GIV noroviruses[J]. *J Virol Methods*, 2015, 223: 109-114. DOI:10.1016/j.jviromet.2015.07.020
- [17] Hara M, Yano K, Utagawa E. Rapid high-throughput development on high-resolution melting (HRM) analysis for noroviruses[J]. *Kansenshogaku Zasshi*, 2010, 84(3): 315-316. DOI: 10.11150/kansenshogakuzasshi.84.315
- [18] Tajiri-Utagawa E, Hara M, Takahashi K, et al. Development of a rapid high-throughput method for high-resolution melting analysis for routine detection and genotyping of noroviruses[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(2): 435-440. DOI: 10.1128/JCM.01247-08
- [19] Ma L, Zhao F, Yao L, et al. The presence of Genogroup II norovirus in retail shellfish from seven coastal cities in China[J]. *Food Environ Virol*, 2013, 5(2): 81-86. DOI:10.1007/s12560-013-9102-8
- [20] 苏来金, 周德庆, 马丽萍, 等. 贝类中诺如病毒 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 检测方法研究[J]. 中国食品学报, 2009(6): 157-163. DOI:10.3969/j.issn.1009-7848.2009.06.026
- [21] Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses" [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181 Suppl 2: S336-S348. DOI: 10.1086/315589
- [22] Karst SM, Wobus CE, Lay M, et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus [J]. *Science*, 2003, 299(5612): 1575-1578. DOI: 10.1126/science.1077905
- [23] Mossel D A, Struijk C B. Outbreaks of viral gastroenteritis, in particular due to the Norwalk virus: an underestimated problem[J]. *Ned Tijdschr Geneeskd*, 2003, 147(22): 1091.
- [24] Zheng D, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature[J]. *Virology*, 2006, 346(2): 312-323. DOI:10.1016/j.virol.2005.11.015
- [25] Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses[J]. *J Virol Methods*, 2002, 100(1/2): 107-114. DOI:10.1016/s0166-0934(01)00404-9
- [26] Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, et al. Use of Taq-Man real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(4): 1405-1412. DOI: 10.1128/JCM.44.4.1405-1412.2006
- [27] Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR[J]. *J Clin microbiol*, 2003, 41(4): 1548-1557. DOI: 10.1128/jcm.41.4.1548-1557.2003