

## 综述

## 贝类中诺如病毒的研究进展

寇晓霞<sup>1,2,3</sup>, 吴清平<sup>1,2,3</sup>, 薛亮<sup>1,2,3</sup>, 张菊梅<sup>1,2,3</sup>

(1. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070; 2. 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070; 3. 广东省华南应用微生物重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 广东 广州 510070)

**摘要:** 从贝类中诺如病毒的污染现状、检测组织靶点、病毒浓缩方法及效率、检测方法有效性等多个方面评述贝类中诺如病毒的研究现状、进展、急需解决的问题和未来的发展方向, 以期为制定诺如病毒检测技术标准及我国贝类进出口贸易提供参考。

**关键词:** 诺如病毒; 贝类; 检测靶点; 病毒浓缩; 反转录-聚合酶链反应

**中图分类号:** R155; R373. 2; R446. 5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2014)02-0200-05

**DOI:** 10. 13590/j. cjfh. 2014. 02. 024

Research Progress of *norovirus* in shellfish

KOU Xiao-xia, WU Qing-ping, XUE Liang, ZHANG Ju-mei

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Guangzhou 510070, China)

**Abstract:** This paper gives an overview about contamination status, target tissue of detection, virus concentration and detection method, the urgent problem and development direction of *norovirus* in shellfish. The objective of the paper is to provide a reference for developing the norovirus detection standard and the shellfish import and export trade.

**Key words:** *Norovirus*; shellfish; detection target; virus concentration; reverse transcription-polymerase chain reaction

诺如病毒(*norovirus*, NVs)是引起世界范围内流行性胃肠炎暴发的主要原因。诺如病毒感染流行大多源于水或某种食物的污染<sup>[1-2]</sup>, 再因人与人传播而发展。在食物传播方面应特别关注牡蛎、蛤等贝类水产品。近年来, 每年都有多起因食用贝类而引起诺如病毒胃肠炎暴发的报道<sup>[3-4]</sup>。虽然诸多研究者建立了贝类中诺如病毒的检测方法, 但截至目前仍然缺乏应用于贝类中诺如病毒监测的统一高效的病毒浓缩、检测、确证等标准检测方法, 而实验室方法研究与实际应用脱离。本文从诺如病毒污染贝类的现状、污染率、检测组织靶点、病毒浓缩方法及效率、检测方法有效性等多个方面评述贝类中诺如病毒的研究现状、进展、急需解决的问题和未来的发展方向, 以期为贝类食用安全及控制食源性诺如病毒流行病学事件提供参考。

## 1 贝类中诺如病毒污染现状

通常在市场上能买到的贝类有牡蛎、贻贝、海扇、扇贝、文蛤等, 这些贝类大都养殖、收获于近海岸, 而近海岸的海水容易受到城市污水的污染, 滤食性软体贝类在滤食的同时会大量富集水体中的病毒, 致使贝类体内的病毒浓度通常是周围养殖水体中的 100 ~ 1 000 倍。近年来的研究表明, 牡蛎是诺如病毒传播的重要载体之一<sup>[5]</sup>。牡蛎的消化腺细胞存在着类似于诺如病毒受体的结构, 这说明诺如病毒可以被特异性地富集于牡蛎等贝类体内<sup>[6]</sup>。食用加工不当的污染牡蛎等贝类是导致诺如病毒胃肠炎暴发最常见的原因之一。

诺如病毒 RT-PCR 检测方法的建立是贝类中诺如病毒污染状况调查的技术前提。近年来, 世界范围内诸多学者对不同地区海产贝类中诺如病毒的污染状况进行了调查。Le Guyader 等<sup>[7]</sup>用 RT-PCR 和杂交的方法连续 3 年对环境中的致病性肠道病毒诺如病毒进行监测, 在 108 份牡蛎样品中, 诺如病毒的检出率为 23%, 而在污水经常流经的水域采集的贝类阳性率则高达 35%。Jothikumar 等<sup>[8]</sup>对诺如病毒阳性牡蛎样品进行分析发现, GI、GII 基因组的阳

收稿日期: 2013-04-12

作者简介: 寇晓霞 女 副研究员 研究方向为食品微生物安全

E-mail: kouxiaoxia79@yahoo.com.cn

通讯作者: 吴清平 男 研究员 研究方向为食品微生物安全

E-mail: wuqp203@yahoo.com.cn

性率分别为 47% 和 53%。Myrme 等<sup>[9]</sup>于 2000 年 6 月至 2003 年 6 月,在挪威沿海地区选择不同的捕获时间和不同的销售地点采集不同品种的牡蛎,采用 RT-PCR 方法检测诺如病毒,结果 681 份样品中诺如病毒的阳性率为 6.8%。从以上研究报道可以看出,牡蛎中诺如病毒的污染情况十分普遍,到目前为止,欧美主要临海国家如美国、加拿大、法国、英国、意大利、挪威、荷兰以及亚洲的日本、韩国等均有因不当食用了受诺如病毒污染的牡蛎而引起急性胃肠炎的报道<sup>[10-13]</sup>。

在我国,苏来金等<sup>[14]</sup>应用常规 RT-PCR 与实时荧光定量 RT-PCR 对山东半岛地区贝类中诺如病毒污染状况进行调查,结果 186 份样品中检出 5 份诺如病毒阳性,检出率为 2.67%,诺如病毒含量为  $>10^2$  拷贝 RNA,序列分析与遗传进化树显示 5 份诺如病毒阳性株均为 GII 型诺如病毒,与国内报道的 GII 型毒株同源性达到 98% 以上。柳淑芳等<sup>[15]</sup>对青岛市 3 个城区 5 个主要水产品批发市场进行为期 12 个月的调研表明,太平洋牡蛎和毛蚶样品中诺如病毒检出率分别为 10.1% 和 5.3%,而杂色蛤未检出,诺如病毒流行的季节是 11 月至次年 3 月,感染部位主要分布于贝类的消化道。李海波等<sup>[16]</sup>从 2010 年 11 月到 2011 年 4 月间,采用荧光定量 PCR 方法调查南通地区沿海贝类中诺如病毒携带情况,结果显示,仅从南通地区沿海贝类的毛蚶中检出诺如病毒,检出率为 6.25%,而其他被测贝类均未检出。

虽然据研究报道我国贝类中诺如病毒的污染率不高,但值得重视的是贝类均受到诺如病毒不同程度的污染,这对贝类的食用安全仍然存在很大威胁。诺如病毒的检出类型和临床检出基因型相同,可以推断浅海贝类养殖区的确受到粪便和生活污水的污染。因此,开展海产贝类中诺如病毒的监测,掌握其污染状况并进行风险评估十分必要。

## 2 由贝类引起的诺如病毒胃肠炎流行病事件

流行病学资料表明,诺如病毒是美国最普遍的食源性病毒<sup>[17-18]</sup>。据 Glatzer 等<sup>[19]</sup>报道,1991—1998 年间美国因食用生牡蛎或半生牡蛎感染诺如病毒而引起的疾病超过 1 266 起,其中 78% 的发病时间为 11 月份到次年 1 月份之间的牡蛎收获季节。2006 年在日本以及 2008 年在英国分别发生了由于生食贝类海鲜引起的有史以来最严重的传染性胃肠炎疫情,造成疫情暴发的“元凶”正是诺如病毒<sup>[20-21]</sup>。2007 年 9~10 月,短短一个月时间内,中国香港共有 20 起诺如病毒引起的急性胃肠炎疫情暴发;同年 11 月份,一艘由罗马开往

美国佛罗里达州的超级邮轮上,有 700 多名乘客感染诺如病毒。据统计,在所有非细菌性腹泻暴发中有 60%~80% 的病例由诺如病毒引起。此外,诺如病毒极易发生变异和重组,可导致全球流行<sup>[22]</sup>,近年来诺如病毒变异株 GII-4 在芬兰、挪威、荷兰、澳大利亚、日本、中国台湾和中国香港都有引起疫情的报道<sup>[23-24]</sup>,且逐渐成为流行的优势株;一些国家和地区还发现诺如病毒的重组株。这些变异株、重组株的不断出现,给诺如病毒的监测、预警与防控提出了更高要求。

## 3 贝类检测靶点

在运用 RT-PCR 检测贝类中诺如病毒时,靶向性地选取诺如病毒含量高的贝类组织,对后续的样品处理以及病毒的浓缩富集有很大影响。Le Guyader 等<sup>[25]</sup>研究发现在牡蛎消化道有诺如病毒分布。而 Tian 等<sup>[6]</sup>发现在牡蛎消化腺中含有类似人类肠道中诺如病毒的吸附受体,这是牡蛎消化腺具有吸附诺如病毒能力的有力证据。所以到目前为止,牡蛎中诺如病毒的检测研究大都以消化腺为主要研究对象<sup>[26-27]</sup>,而对牡蛎不同组织中诺如病毒的累积分布状况并不清晰,也缺乏直接的试验数据证实贝类的哪个组织器官适合于食源性病毒的实际样本检测,从而导致对贝类体内病毒采样部位失去靶向性。而且有研究表明,消化腺由于含有 RT-PCR 检测的抑制物,从而导致检测阳性率较低<sup>[28]</sup>。

本研究团队以 VP1 的单克隆抗体为标记物对诺如病毒在牡蛎体内不同组织的分布情况进行免疫组织化学分析发现,在牡蛎的鳃、胃肠、消化盲囊和外套膜上前纤毛等组织中均有诺如病毒的累积分布,利用 RT-PCR 方法对诺如病毒、甲型肝炎病毒和轮状病毒在市售牡蛎样本不同组织中的分布进行进一步试验验证发现,在牡蛎实际样本中同样得到与人工污染试验相同的结果,且检出阳性率分别是鳃 14.71%、胃肠 13.97%、消化盲囊 13.24% 和外套膜上前纤毛 2.21%。因此得出结论,鳃是牡蛎中诺如病毒等食源性病毒检测最理想的靶位点<sup>[29]</sup>。

## 4 病毒浓集方法

相比于临床样本,贝类中诺如病毒的含量很低,所以能运用于临床样本的检测方法无法直接用于检测贝类中的诺如病毒;另外,贝类组织中的蛋白质等物质在后续的 PCR 过程中会抑制 *Taq* 酶的活性,降低扩增效率。众多研究报道指出,冬季是牡蛎污染诺如病毒的高峰期,而在冬季牡蛎自身会储存更多的糖原,这就导致牡蛎会富集更多的抑制因子。因此,病毒提取与浓集是成功检测的前提。

目前为止,从贝类中提取纯化诺如病毒的方法大都相似,主要采用洗脱—浓缩的流程。

#### 4.1 病毒洗提与浓缩

一般从贝类组织中洗提病毒包括直接的碱性洗提以及酸性吸附洗提。常用的洗提液有甘氨酸、牛肉膏抽提物和其他物质。由于牛肉膏提取物被认为是一种 PCR 抑制物,会降低 PCR 反应灵敏度,因此碱性洗提液是目前从贝类组织中分离病毒粒子的主要方法。甘氨酸缓冲液是一类能改变吸附特性的洗脱剂,在碱性条件下(pH = 9 ~ 10)能减少病毒和吸附物之间的静电作用,但在使用甘氨酸缓冲液作为洗脱液时,溶液的 pH 值对洗脱效果的影响很大。

由于贝类中病毒的污染量很低,有必要加入聚乙二醇(PEG)沉淀或用超速离心等方法浓缩病毒并去除 PCR 抑制物。李振等<sup>[30]</sup>的研究表明,在经过 PEG 沉淀及 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 重悬之后,无论是酸吸附还是碱洗脱,两种方法的回收率基本相当(酸吸附洗脱 10.3%;碱洗脱 10.5%)。经过 RT-PCR 扩增并通过比较扩增结果发现,两种提取方法的灵敏度不同,酸吸附法比碱吸附法的检测灵敏度高且特异性强。Mark 等<sup>[31]</sup>利用 pH 值的改变使病毒吸附在贝肉微粒上(pH < 5),通过离心把病毒粒子沉淀下来,再用碱性缓冲液洗脱及 PEG 浓缩病毒,此方法可降低 RT-PCR 反应抑制因子。Robert 等<sup>[32]</sup>利用甘氨酸-PEG 沉淀浓缩贝类中的诺如病毒,样品只取富含病毒的胃肠组织,总体积控制在 50 ml 以内,节省了提取试剂,简化了操作程序。David 等<sup>[33]</sup>也用 16% 的 PEG8000 成功地浓缩并检出贝类样品中的诺如病毒和甲型肝炎病毒。李振<sup>[30]</sup>利用 pH = 9.5 的甘氨酸缓冲液洗脱,12% 的 PEG6000 沉淀两次,使添加在贝样中的噬菌体得到有效的浓缩回收,最高回收率可达 95.4%。

#### 4.2 免疫磁珠吸附法

近年来,免疫磁珠法(IMS)逐渐应用于贝类中诺如病毒的富集。本研究团队的研究表明:单克隆抗体免疫磁珠结合 RT-PCR 法(Mab-beads/RT-PCR)可以检测到 10<sup>-7</sup> 稀释度的样本,而多克隆抗体免疫磁珠结合 RT-PCR 法(Pab-beads/RT-PCR)只能检测到 10<sup>-5</sup> 稀释度的样本,前者的灵敏度比后者高 100 倍,表明了单克隆抗体包被免疫磁珠进行诺如病毒富集检测具有更好的优势<sup>[34]</sup>。但目前限制 IMS 在诺如病毒检测方面应用的主要原因是诺如病毒的抗原变异性,很难用一种或少数几种抗体富集所有的诺如病毒。如果能够详尽分析所有诺如病毒的抗原决定簇,从中发现其保守的抗原位点,针对这一位点制备高亲和力的抗体将有助于富集、分

离具有不同抗原性的诺如病毒,进而加速 IMS 在诺如病毒检测领域的应用。

## 5 检测方法

### 5.1 不同检测方法比较

目前诺如病毒的检测方法主要有电镜观察、免疫学和 RT-PCR 分子检测方法。电镜法包括常规电镜法(EM)和免疫电镜法(IEM)。常规电镜法的灵敏度较低,要求克/每毫升(g/ml)样品不低于 10<sup>6</sup> 个病毒粒子,且诺如病毒在电镜下的结构特征不明显,这给诊断工作带来很大困难。虽然免疫电镜法可提高电镜的敏感度 10 ~ 100 倍,但利用免疫电镜法检测诺如病毒的成功与否完全取决于操作者的技能和经验,而且必须找到与之相匹配的血清。另外,电镜法因技术要求高、劳动强度大和检测费用高等缺点,应用受到很大的制约<sup>[35]</sup>。

诺如病毒的免疫学检测发展较快,目前至少有 3 种免疫学检测试剂盒进入市场:德国的 RIDASCREEN 试剂盒、英国的 IDEIA 试剂盒与日本的 SRSV(II)-AD 试剂盒。有学者对三者的灵敏度、特异性等方面进行了详细的比较。Castriciano 等<sup>[36]</sup>通过 228 份诺如病毒阳性腹泻样本分析了 RIDASCREEN 试剂盒、IDEIA 试剂盒、常规电镜法、RT-PCR 法各自的灵敏性与特异性,结果发现,RIDASCREEN 试剂盒的检出率为 80.3%,IDEIA 的检出率为 60.6%,EM 的灵敏性和特异性为 36.4% 和 96.9%,而 RT-PCR 的灵敏度和特异性分别为 98.5% 和 100%。Dimitriadis 等<sup>[37]</sup>发现,与 RT-PCR 相比,RIDASCREEN 试剂盒的灵敏度与特异性分别为 47% 和 71%。Richards 等<sup>[38]</sup>利用电镜、IDEIA 试剂盒和 RT-PCR 检测收集到的诺如病毒疫情中的 531 份腹泻样本,IDEIA 的灵敏度与特异性分别为 55.5% 和 98.3%,常规电镜法的灵敏度与特异性分别为 23.9% 和 99.2%。虽然不同研究者的试验结果不同程度上存在一定差异,但不难发现,目前电镜观察和免疫学检测试剂盒的灵敏度和检出率远远低于 RT-PCR 检测方法。因此,电镜观察和免疫学方法还无法运用到病毒浓度很低的贝类中诺如病毒的检测。

### 5.2 RT-PCR 检测方法

RT-PCR 等分子诊断技术被认为是目前检测贝类、水体及其他非临床样本中诺如病毒污染最有效的方法。为提高检测敏感性和特异性,许多研究者在 RT-PCR 方法的基础上进行了一系列改进,建立了套式、半套式 RT-PCR、多重引物 RT-PCR、内标定量 RT-PCR、实时荧光定量 RT-PCR 等方法。Hfliger 等<sup>[39]</sup>建立了水产品中诺如病毒的半巢式 RT-PCR(Semi-nested RT-PCR)检测方法。Green 等<sup>[40]</sup>将巢

式 RT-PCR (Nested-RT-PCR) 方法应用到贝类样品诺如病毒检测中, 结果发现 Nested RT-PCR 方法检测水产品中的诺如病毒比单轮 RT-PCR 方法灵敏度提高 10 ~ 1 000 倍。Le Guyader 等<sup>[41]</sup> 利用 MPN-RT-PCR (Most-Probable-Number-RT-PCR) 法对牡蛎中诺如病毒进行了半定量的评价, 发现收获季节牡蛎中诺如病毒的污染可达到 1 000 RT-PCR 单位以上。Losiy 等<sup>[42]</sup> 利用质粒作为标准品, 建立了检测贝类中诺如病毒的一步法实时荧光定量 RT-PCR 方法, 并且比较了一步法与两步法 RT-PCR, 结果表明两种方法具有相同的灵敏度, 但一步法方便快捷, 而且降低了反应中的交叉污染风险。Losiy 等<sup>[42]</sup> 同时使用了建立的实时荧光定量方法和常规 RT-PCR 方法对 150 份贝类样品进行检测, 结果常规 RT-PCR 方法检出 53 份阳性样品, 而实时荧光定量 RT-PCR 方法检出 61 份阳性样品, 说明实时荧光定量 RT-PCR 法灵敏度更高。潘良文等<sup>[43]</sup> 建立 TaqMan 实时荧光 RT-PCR 的定性检测, 并利用荧光定量 RT-PCR 技术, 通过对一系列梯度浓度诺如病毒克隆质粒或 RNA 的检测, 作出标准曲线, 从而对初始诺如病毒核酸量进行绝对定量。但由于受标准品制备的限制, 诺如病毒的绝对定量方法尚不统一。

### 5.3 RT-PCR 检测方法影响因素

虽然 RT-PCR 被认为是目前检测贝类中诺如病毒的金标准, 但 RT-PCR 检测法也存在很多缺点和难点。许多因素可能影响 RT-PCR 检测的灵敏度和特异性, 如样本的种类、病毒核酸的提取方法、引物的设计、扩增结果的进一步确认与解读等。病毒核酸的提取方法需要注意两个要素, 一是病毒核酸的回收效率及去除或灭活抑制物的能力; 二是操作步骤简单, 能及时处理大量样本。近年来报道了许多从样本中提取纯化病毒核酸、减少抑制物影响的方法。这些方案包括稀释样本、扩增之前在样品中添加目标核酸、使用另一对引物扩增样本中可能存在的第二靶标(如看家基因, Housekeeping Gene)、添加内部标准对照等。此外, 引物的设计和选择也是一个至关重要的限制性因素, 如诺如病毒基因的易变异性会导致不同毒株序列差别较大, 目前还没有任何一对引物可以检出所有的诺如病毒株。VPg 是诺如病毒基因组 RNA 具有感染性的必要条件, 所以该区具有相对的高保守性, 可以参考该区核苷酸序列设计特异性引物用于诺如病毒的检测, 还可以针对不同类型诺如病毒设计不同的引物以区别感染病毒的类属。

## 6 展望

目前绝大多数有关贝类中有毒有害物质的研

究主要集中于重金属、致病菌及其贝类自身产生的神经毒素等, 对以其为载体, 但并不在其体内进行繁殖的食源性病毒均没有较为成熟的技术标准可以执行。因此, 迫切需要发展有效的贝类中病毒的快速检测方法, 并制定相关检测标准, 以保障人类健康和发展海产经济。尽管目前 RT-PCR 方法的应用还存在诸多不足, 能否将其用于贝类的质量控制也存在争论, 但 RT-PCR 检测方法的建立的确对贝类中病毒的检测研究大大推进了一步。现今大多数应用 PCR 的检测研究报告仅限于在实验室进行, 规模化的推广应用还难以实现, 致使实验室研究与实际应用脱离, 主要原因在于目前仍然缺乏统一的 RT-PCR 检测标准, 虽然各个实验室都建立了有效的诺如病毒 RT-PCR 检测方法, 但在病毒核酸提取、引物设计、RT-PCR 体系及条件、假阳性及假阴性控制、抑制物去除等方面均没有统一的标准执行, 致使实验室之间方法的可比性和通用性不佳, 因而导致了可重复性和稳定性的差异。因此, 下一步的研究重点应该放在具体的应用方面, 同时要加快诺如病毒 RT-PCR 检测技术标准的制定, 以期有效地检测病毒, 实现对诺如病毒疾病暴发的预防和控制。

## 参考文献

- [1] KOU X X, WU Q P, XUE L, et al. Detection of waterborne viruses using RT-PCR method in urban river of Guangzhou, China[J]. Fresen Environ Bull, 2013, 22(1a): 293-298.
- [2] Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 90: 23-41.
- [3] KOU X X, WU Q P, ZHANG J M, et al. Rapid detection of noroviruses in fecal samples and shellfish by nucleic acid sequence-based amplification[J]. J Microbiol, 2006, 44(4): 403-408.
- [4] KOU X X, WU Q P, WANG D P, et al. Simultaneous detection of norovirus and rotavirus in Oysters by multiplex RT-PCR[J]. Food Control, 2008, 19(7): 722-726.
- [5] CHENG P K, WONG D K, CHUNG T W, et al. Norovirus contamination found in Oysters worldwide[J]. J Med Microbiol, 2005, 76: 593-597.
- [6] Tian P, Bates A H, Jensen H M, et al. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells [J]. Lett Appl Microbiol, 2006, 43: 645-651.
- [7] Le Guyader F, Haugarreau L, Miossec L, et al. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 3241-3248.
- [8] Jothikumar N, Lowther J A, Henshilwood K, et al. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 1870-1875.
- [9] Myrnel M, Berg E M, Rimstad E, et al. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 2678-2684.

- [10] Fukuda S, Takao S, Shigemoto N, et al. Transition of genotypes associated with *norovirus* gastroenteritis outbreaks in a limited area of Japan, Hiroshima prefecture, during eight epidemic seasons [J]. *Arch Virol*, 2010, 155(1): 111-115.
- [11] Lopman B, Zambon M, Brown D W. The evolution of *norovirus*, the “gastric flu” [J]. *Plos Med*, 2008, 5(2): e42.
- [12] Phillips G, Tam C C, Rodrigues L C, et al. Prevalence and characteristics of asymptomatic *norovirus* infection in the community in England [J]. *Epidemiol Infect*, 2010, 138(10): 1454-1458.
- [13] Lindesmith L C, Donaldson E F, Lobue A D, et al. Mechanisms of G II. 4 *norovirus* persistence in human populations [J]. *Plos Med*, 2008, 5(2): e31.
- [14] 苏来金. 贝类中诺如病毒检测方法建立及优化 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [15] 柳淑芳, 李振, 周德庆. 青岛地区贝类产品中诺如病毒的感染和流行初探 [J]. *渔业科学*, 2009, 30(1): 61-66.
- [16] 李海波, 许建军, 邵亚萍, 等. 南通沿海毛蚶携带诺瓦克病毒初步研究 [J]. *实用预防医学*, 2011, 18(8): 1395-1396.
- [17] Blanton L H, Adams S M, Beard R S, et al. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004 [J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(3): 413-421.
- [18] Tseng F C, Leon J S, Maccormack J N, et al. Molecular epidemiology of *norovirus* gastroenteritis outbreaks in North Carolina, United States: 1995-2000 [J]. *J Med Virol*, 2007, 79(1): 84-91.
- [19] Glatzer M B. Internal reports on shellfish-borne disease outbreaks, 1992-1998 [M]. Atlanta: US Food and Drug Administration, Southeast Regional Office, 1998.
- [20] Iijima Y, Tanaka S, Ohishi H. Multiple outbreaks of gastroenteritis due to a single strain of genotype GII/4 *norovirus* in Kobe, Japan, 2006; risk factors for *norovirus* spread in health care settings, 2008 [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2008, 61: 419-422.
- [21] Huppertz C, Munnoch S A, Worqan T, et al. A *norovirus* outbreak associated with consumption of NSW *Oysters*: implications for quality assurance systems [J]. *Commun Dis Intell*, 2008, 32: 88-91.
- [22] Reuter G, Vennema H, Koopmans M, et al. Epidemic spread of recombinant *noroviruses* with four capsid types in Hungary [J]. *J Clin Virol*, 2006, 35: 84-88.
- [23] Bull R A, Tu E T, Mciver C J, et al. Emergence of a new *norovirus* genotype II. 4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 327-333.
- [24] HO E C, CHENG P K, WONG D A, et al. Correlation of *norovirus* variants with epidemics of acute viral gastroenteritis in Hong Kong [J]. *J Med Virol*, 2006, 78: 1473-1479.
- [25] Le Guyader F S, Loisy F, Atmar R L, et al. Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(6): 931-936.
- [26] Le Guyader F S, Neill F H, Dubois E, et al. A semiquantitative approach to estimate *norwalk*-like virus contamination of *Oysters* implicated in an outbreak [J]. *Int J Food Microbiol*, 2003, 87(1-2): 107-112.
- [27] Nishida T, Kimura H, Saitoh M, et al. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of *noroviruses* in Japanese *Oysters* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(10): 5782-5786.
- [28] Abolmaaty A, GUO W, Witkowsky R, et al. The use of activated charcoal for the removal of PCR inhibitors from *Oyster* samples [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 68(2): 349-352.
- [29] WANG D P, WU Q P, KOU X X, et al. Distribution of *norovirus* in *Oyster* tissues [J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 105(6): 1966-1972.
- [30] 李振. 青岛地区贝类中诺瓦克样病毒污染状况调查与风险评估初探 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [31] Mark D S, Lee-ann J, Bruin E, et al. Rational optimization of generic primers used for *norwalk*-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction [J]. *J Clin Virol*, 2001, 25: 233-235.
- [32] Robert L, Atmar F H, Neill C M, et al. Collaborative evaluation of a method for the detection of *norwalk* virus in shellfish tissues by PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996(1): 254-257.
- [33] David H K, Richards G P. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and *norwalk*-like virus in shellfish [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001(9): 4157-4157.
- [34] YAO L, WU Q P, WANG D P, et al. Development of monoclonal antibody-coated immunomagnetic beads for separation and detection of *norovirus* (genogroup II) in fecal extract samples [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2009(49): 173-178.
- [35] Richards A F, Lopman B, Gunn A, et al. Evaluation of a commercial ELISA for detecting *norwalk*-like virus antigen in faeces [J]. *J Clin Virol*, 2003, 26(1): 109-115.
- [36] Castriciano S, Luinstra K, Petrich A, et al. Comparison of the RIDASCREEN *norovirus* enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy [J]. *J Virol Meth*, 2007, 141: 216-219.
- [37] Dimitriadis A, Marshall J A. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for detection of *norovirus* in outbreak specimens [J]. *Eur J Clin Microbiol*, 2005, 24: 615-618.
- [38] Richards A F, Lopman B, Gunn A, et al. Evaluation of a commercial ELISA for detecting *norwalk*-like virus antigen in faeces [J]. *J Clin Virol*, 2003, 26: 109-115.
- [39] Hafliger D, Gilgen M, Luthy J, et al. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood [J]. *Int J Food Microbiol*, 1997, 37: 27-36.
- [40] Green J, Henshiwood K, Gallimore C I, et al. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 858-863.
- [41] Le Guyader F S, Neill F H, Dubois E, et al. A semiquantitative approach to estimate *norwalk*-like virus contamination of *Oysters* implicated in an outbreak [J]. *Int J Food Microbiol*, 2003, 87: 107-112.
- [42] Loisy F, Atmar R L, Guillon P, et al. Real-time RT-PCR for *norovirus* screening in shellfish [J]. *J Virol Methods*, 2005, 123(1): 1-7.
- [43] 潘良文, 张舒亚, 李晓虹, 等. 贝类产品中诺瓦克病毒的实时荧光 RT-PCR 检测方法研究 [J]. *检验检疫科学*, 2004, 14(5): 1-3.