

## 风险监测

北京市市售贝类、蔬菜、浆果、即食海产品中诺如病毒  
污染状况检测及检测方法探析骆海朋<sup>1</sup>,高飞<sup>1</sup>,于海瑶<sup>2</sup>,仝伟健<sup>3</sup>,任秀<sup>1</sup>,余文<sup>1</sup>,崔生辉<sup>1</sup>(1. 中国食品药品检定研究院,北京 100050; 2. 吉林省长春市食品药品检验中心,吉林 长春 130012;  
3. 甘肃省食品检验研究院,甘肃 兰州 730030)

**摘要:**目的 对北京市市售贝类(牡蛎、贻贝、扇贝、文蛤、毛蚶)、蔬菜(苗菜、生菜)、浆果(草莓、蓝莓)、即食海产品(三文鱼、即食虾)进行诺如病毒检测。方法 贝类、蔬菜、浆果类样品参照 ISO/TS 15216-1 方法进行前处理,虾类检测参照贝类、三文鱼参照蔬菜的方法并进行改良。病毒 RNA 提取参照罗氏 High pure viral RNA Kit 试剂盒方法对样品前处理后的提取液进行提取。实时荧光逆转录聚合酶链反应(实时荧光 RT-PCR)的检测使用罗氏 LightMix® norovirus GI-GII 于 Lightcycler® 480 II 进行检测,并进行 GI-GII 分型。诺如病毒阳性样品,参照 SN/T 2626—2010《国境口岸诺如病毒检测方法》,使用 JV12、JV13 进行扩增,将获得的 DNA 扩增片段进行测序并分型。结果 经罗氏试剂盒检测贝类食品 478 份(40 份阳性)、蔬菜 62 份(1 份阳性)、浆果 84 份(0 份阳性)和即食海产品 51 份(1 份阳性)。有 42 份为 GI-GII,其中 37 份为 GII 型,4 份为 GI 型。在 42 份阳性样品中,有 29 份 GII 型阳性样品对 RNA 聚合酶区域扩增成功,通过序列分析,27 份为 GII.17,1 份为 GII.12,1 份为 *Hawaii. calicivirus*。结论 通过对北京市市售食品样品中诺如病毒检测发现,贝类食品呈现较明显的季节分布,在冬季检出率较高,贝类食品是诺如病毒污染率最高的食品。

**关键词:**诺如病毒;贝类;浆果;即食海产品;实时荧光 RT-PCR;食品污染物;检测

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)02-0218-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.02.022

Survey on the contamination of *Norovirus* in shellfish, vegetable,  
fruit and ready-to-eat seafood from markets in BeijingLUO Hai-peng<sup>1</sup>, GAO Fei<sup>1</sup>, YU Hai-yao<sup>2</sup>, TONG Wei-jian<sup>3</sup>, REN Xiu<sup>1</sup>, YU Wen<sup>1</sup>, CUI Sheng-hui<sup>1</sup>(1. National Institute of Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Jilin Province  
Inspection Center for Food and Drug, Jilin Changchun 130012, China; 3. Gansu Province  
Food Inspection Institute, Gansu Lanzhou 730030, China)

**Abstract: Objective** To investigate the contamination of *Norovirus* in shellfish (oysters, mussels, scallops, clams, clam), vegetables (seedling vegetables, lettuce), berries (strawberries, blueberries), ready-to-eat seafood (salmon, shrimp) from markets in Beijing. **Methods** Pretreatment methods for shellfish, vegetables and berries samples were referred to ISO/TS 15216-1; pretreatment method for shrimp and shellfish was referred to shellfish method; pretreatment method for salmon was referred to improved vegetables method. Viral RNA extraction was referred to Roche High pure viral RNA Kit K methods. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction testing and GI-GII typing were carried out by Roche LightMix® norovirus GI-GII in Lightcycler® 480 II; *Norovirus* positive samples was amplified using the prime of JV12, JV13 and the amplified DNA fragments were sequenced for subtyping. **Results** 478 shellfish (40 positive), 62 vegetables (1 positive), 84 berries (0 positive) and 51 raw salmon (1 positive) were detected. 35 positive samples were successfully amplified by sequence analysis. 27 samples were GII.17, 1 sample was GII.12, and 1 sample was *Hawaii. calicivirus*. **Conclusion** Through the norovirus monitoring in Beijing market, shellfish presented obvious seasonal distribution and higher detection rate which suggested that the shellfish was the main sources of *Norovirus* in food.

**Key words:** *Norovirus*; shellfish; berry; instant seafood; real-time reverse transcription-polymerase chain reaction; food contaminant; test

收稿日期:2017-02-15

作者简介:骆海朋 男 副主任检验技师 研究方向为食品微生物学 E-mail:haipengluo123@sina.com

通信作者:崔生辉 男 研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail:cuishenghui@aliyun.com

诺如病毒是引起腹泻最常见的食源性病毒之一,每年感染人数远超沙门菌等常见致病菌。在美国估计每年由诺如病毒引起的胃肠炎住院人数达 56 000 ~ 71 000 人,死亡人数达 570 ~ 800 人<sup>[1]</sup>。诺如病毒为直径 27 nm、小圆形的病毒,属于杯状病毒科,诺瓦克病毒属。感染人类的主要为 GI 和 GII 型,引起的症状包括恶心、呕吐、腹泻、腹痛、头痛、发热等,年老体弱的患者症状可能更严重,也有无症状感染者<sup>[2-3]</sup>。

目前,诺如病毒检测方法主要有分子生物学和免疫学方法,其中实时荧光逆转录聚合酶链反应(实时荧光 RT-PCR)方法相对较灵敏、特异性高,在食品检测中应用较广泛<sup>[3]</sup>。国内常用的检测标准方法不多<sup>[4-6]</sup>,各个标准对食品样品前处理方法以及 RT-PCR 检测方法都有差异。在食品检测中,食品样品的前处理,病毒 RNA 的提取非常关键<sup>[7-8]</sup>。本文主要参考欧盟 ISO/TS 15216-1<sup>[6]</sup>方法对贝类、蔬菜、浆果、即食海产品等进行前处理,使用罗氏诺如病毒相关检测试剂盒进行病毒 RNA 提取及实时荧光 RT-PCR 检测分型。

虽然目前国内由诺如病毒引起的食物中毒报道很多,但国内有关食品中诺如病毒监测报道较少,并且主要是针对贝类样品的监测<sup>[9-10]</sup>。国外对贝类、蔬菜、草莓中诺如病毒的监测均有报道<sup>[11-13]</sup>。为保障我国食品安全监管工作的顺利实施,亟需开展针对食品中诺如病毒的主动监测,以阐明我国食品中诺如病毒的污染特征。根据诺如病毒暴发特点,并结合我国食品安全的实际情况,对北京市市场上销售的贝类、即食海产品、蔬菜、浆果进行抽样检测,共计 675 份,以了解北京市市售食品中诺如病毒的污染情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品采集

2014 年 9 月—2015 年 2 月,采集北京市市场销售的贝类食品(牡蛎、贻贝、扇贝、文蛤、毛蚶)、即食海产品(三文鱼、即食虾)、蔬菜(生菜、苗菜)、浆果(蓝莓、草莓)类食品共 675 份。详细信息见表 1。

表 1 诺如病毒检测采样信息

Table 1 Sample information for *Norovirus* detection

样品名称	采样量/份	产地(样品份数)	采样地点类型(样品份数)
牡蛎	281	山东(76)、广东(136)、广西(1)、辽宁(49)、海南(1)、中国台湾(6)、加拿大(6)、法国(6)	餐饮(7)、超市(1)、零售(48)、农贸市场(5)、批发市场(220)
贻贝	49	辽宁(9)、山东(40)	零售(4)、批发市场(45)
扇贝	66	辽宁(37)、山东(26)、未知(3)	零售(21)、农贸市场(3)、批发市场(42)
文蛤	52	辽宁(9)、山东(43)	零售(20)、批发市场(32)
毛蚶	30	辽宁(18)、山东(8)、河北(4)	批发市场(30)
生菜	31	—	超市(16)、餐饮(15)
苗菜	31	—	超市(16)、餐饮(15)
蓝莓	42	智利(42)	超市(21)、水果专卖店(21)
草莓	42	北京(27)、四川(6)、河北(3)、浙江(3)、未知(3)	超市(21)、水果专卖店(21)
三文鱼	27	—	超市(15)、餐饮(12)
即食虾	24	阿根廷(6)、厄瓜多尔(3)、广东(3)、泰国(3)、未知(9)	餐饮(12)、零售(12)

注:—表示产地不详。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

Lightcycler® 480II 荧光定量 PCR 仪(德国罗氏)、Bio-Bad C1000 热循环仪(美国伯乐)、生物安全柜、高速冷冻离心机、恒温混匀器、电子天平、电磨匀浆器、碎花制冰机。

蛋白酶 K PCR grade、High pure viral RNA Kit、Master Hydrolysis Probe、LightMix® Kit GI-GII 均购自德国罗氏,诺如病毒阳性性质控球(中国食品药品检定研究院提供),果胶酶(美国 Sigma),牛肉膏(国药集团),磷酸盐(PBS)缓冲液,聚乙二醇(PEG) 8000,Tris,NaCl,研磨杵。

## 1.2 方法

### 1.2.1 样品前处理

贝类食品样品前处理:取 5 份贝类样品进行解

剖,取其消化腺和肠道用于检测。如果一份样品的消化腺和肠道的总质量不够 2.0 g,应适当增加取样量,使得每份样品检验的总质量达到 2.0 g。将解剖下的消化腺和肠道放到 50 ml 小烧杯内,用电磨均质器将消化腺仔细打碎呈糊状。将均质的消化腺分别称取(2.0 ± 0.1)g,加入 15 ml 离心管中,每管加入 2 ml 的 PBS 缓冲液,加入 10 μl 20 mg/ml 蛋白酶 K 溶液进行消化,活力为 30 U。同批次的样品取 1 份样品加入诺如病毒阳性性质控球,作为外部质控阳性对照。将上述样品于 37 °C 摇床,320 r/min 振荡 1 h,恒温水浴 60 °C,保持 15 min。3 000 × g 离心 5 min,取 200 ng 用于 RNA 提取。

蔬菜样品前处理:将生菜和苗菜剪成 2.5 cm × 2.5 cm × 2.5 cm 大小,称量 25 g,放入带有滤膜均

质袋一侧,加入 40 ml TGBE buffer(Tris 碱 12.1 g, 甘氨酸 3.8 g, 牛肉膏 10 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH=9.5),其中 3 份平行加入诺如病毒阳性质控球,室温摇晃约 20 min。将均质袋滤膜一侧液体倾入 50 ml 离心管,4 °C 10 000 × g 离心 30 min,将上清转移至另一 50 ml 离心管中,加入 1/4 体积的 5 × PEG/NaCl(PEG8000 500 g, NaCl 87 g, 加入 450 ml 水加热溶解,然后定容至 1 000 ml)溶液,4 °C 摇晃 60 min。摇晃完毕,4 °C 10 000 × g 离心 30 min,弃上清,继续 4 °C 10 000 × g 离心 5 min 压实沉淀。向沉淀加入 500 μl PBS 缓冲液溶解沉淀。

水果样品前处理:称量草莓和蓝莓 25 g,剪成 2.5 cm × 2.5 cm × 2.5 cm 大小,蓝莓体积较小,不用剪碎。放入带有滤膜均质袋一侧,加入 40 ml TGBE 缓冲液。同批次的样品中,取 1 份样品加入诺如病毒阳性质控球作为阳性对照。同时加入 30 U 的果胶酶(黑曲霉)。室温振荡孵育 10 min,使用 pH 试纸,测量 pH 值。若 pH < 9.0,用 NaOH 调节至 9.5,再振荡孵育 10 min。每调节一次 pH 值后,孵育 10 min,直至 pH > 9.0;将流出液倒至离心管中(必要时使用 2 个离心管),(5 ± 3)°C 10 000 × g 离心(30 ± 5) min。上清移至新管或瓶,用 HCl 调节 pH = (7.0 ± 0.5)。加入 1/4 体积的 5 × PEG/NaCl 缓冲液,在 (5 ± 3)°C 条件下,于振荡孵育器孵育 (60 ± 5) min。4 °C 10 000 × g 离心(30 ± 5) min(必要时将液体分装于 2 只离心管)。弃去上层溶液,(5 ± 3)°C 10 000 × g 离心(5 ± 1) min 以使颗粒紧凑。弃去上层溶液,加入 (500 ± 10) μl PBS 缓冲液重悬沉淀。如果一份样品分两管离心,则用同样体积 PBS 缓冲液依次重悬。将重悬液移至新的 EP 管中,加入 (500 ± 10) μl 氯仿-丁醇溶液,涡旋混匀,室温孵育 5 min。(5 ± 3)°C 10 000 × g 离心(15 ± 1) min,小心将水相转移至新管待提取 RNA。

三文鱼样品前处理:参照 ISO/TS 15216-1<sup>[6]</sup> 中蔬菜的诺如病毒富集的方法,由于三文鱼中存在的大量蛋白质会对后续的实时荧光 RT-PCR 产生抑制,因此加入蛋白酶 K 去除抑制作用。具体操作过程如下:取样品 25 g,剪碎后放入无菌均质袋中(带滤网),加入 40 ml TGBE 缓冲液。同批次样品中取 1 份样品,加入诺如病毒阳性质控球,室温 60 r/min 振荡 20 min。将样品于冰上静置 30 min,4 °C 10 000 × g 离心 30 min。吸取上清液,避开脂肪和离心管底部的沉淀,转入新离心管。加入 20 μl 的蛋白酶 K 37 °C 750 r/min 离心 1 h,再 60 °C 750 r/min 离心 15 min。加入 1/4 体积的 5 × PEG 溶液,振荡 60 s 后,于 4 °C 60 r/min 振荡 60 min;

4 °C 10 000 × g 离心 30 min,倒掉上清;再于 4 °C 10 000 × g 离心 5 min;弃上清,加入 700 μl PBS 缓冲液重悬。

### 1.2.2 RNA 提取及实时荧光 RT-PCR 检测

参照 Roche High pure viral RNA Kit 试剂盒方法对样品进行提取。在本次检测中使用诺如病毒检测试剂盒及 Lightcycler® 480II 荧光定量 PCR 仪用于诺如病毒的检测。使用诺如病毒阳性质控球作为外部质控,对病毒 RNA 的提取过程进行检测,如外部质控没有检出,可能在 RNA 提取过程存在问题。

诺如病毒实时荧光 RT-PCR 反应体系(20 μl): 激活剂 1.3 μl,引物和探针 1 μl,内对照 1 μl,促进剂 1 μl,预混液 7.4 μl,模板 5 μl,水 3.3 μl。反应条件:61 °C 逆转录 3 min,95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 10 s,56 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 5 s,共 45 个循环,溶解曲线,95 °C 预变性 30 s,40 °C 变性 2 min,85 °C 退火 1 s,40 °C 降温 30 s。使用 PCR 仪对诺如病毒样品进行实时荧光 RT-PCR 扩增,并进行溶解曲线的观察。反应完毕使用 Lightcycler® 480SW1.5.1 进行分析,根据说明书对结果进行判读,判断标准见表 2。

表 2 Lightcycler® 480SW1.5.1 检测结果的判定标准  
Table 2 Determination criteria of the test result

结果判读	定量检测用水解探针 FAM (465 ~ 510 nm)	内对照检测用水解探针 ROX (533 ~ 610 nm)	分型用杂交探针 LC670 (498 ~ 660 nm)	阴性对照
GI	有扩增	有无扩增均可	无信号	无扩增
GII	有扩增	有无扩增均可	溶解峰在 50 ~ 60 °C	无扩增
阴性	无扩增	有扩增	无信号	无扩增
PCR 抑制	无扩增	无扩增	无信号	无扩增
污染	有扩增	有扩增	有无信号均可	有扩增

### 1.2.3 诺如病毒的分型

诺如病毒的分型参照罗氏检测方法中的结果判读。同时将诺如病毒阳性样品,使用 SN/T 2626—2010《国境口岸诺如病毒检测方法》<sup>[4]</sup> 对 RNA 聚合酶区域进行扩增,对获得序列进行测序,根据参考文献[14]于 National institute for public health and environment 网站使用软件对测序结果进行分析,不能够分析的与美国国家生物技术信息中心(NCBI)的权威序列进行分型比对。

## 2 结果

### 2.1 贝类检测

从 2014 年 9 月—2015 年 2 月共对 478 份贝类样品进行检测,包括 281 份牡蛎、49 份贻贝、30 份毛蚶、66 份扇贝、52 份文蛤,具体检测结果详见表 3。

表3 贝类样品的诺如病毒检测结果(%)

Table 3 Results of shellfish samples

时间	牡蛎	贻贝	毛蚶	扇贝	文蛤
2014.9	0.0(0/14)	—	—	—	—
2014.10	0.0(0/37)	—	—	0.0(0/3)	0.0(0/1)
2014.11	1.4(1/72)	—	0.0(0/30)	0.0(0/27)	—
2014.12	3.1(3/98)	40.7(11/27)	—	6.7(1/15)	0.0(0/32)
2015.1	19.4(7/36)	20.0(2/10)	—	0.0(0/18)	7.7(1/13)
2015.2	20.8(5/24)	75.0(9/12)	—	0.0(0/3)	0.0(0/6)
合计	5.7(16/281)	44.9(22/49)	0.0(0/30)	1.5(1/66)	1.9(1/52)

注:—表示未检测。

## 2.2 蔬菜、浆果检测

从2014年12月—2015年2月,共对62份蔬菜、84份浆果进行诺如病毒的检测,具体检测结果详见表4。

表4 蔬菜、浆果样品的诺如病毒检测结果(%)

Table 4 Vegetable, berries sample *Norovirus* test results

时间	生菜	苗菜	草莓	蓝莓
2014.12	0.0(0/1)	0.0(0/1)	—	—
2015.1	3.3(1/30)	0.0(0/30)	0.0(0/3)	0.0(0/3)
2015.2	—	—	0.0(0/39)	0.0(0/39)
合计	3.2(1/31)	0.0(0/31)	0.0(0/42)	0.0(0/42)

注:—表示未检测。

## 2.3 即食海产品检测

从2015年1~2月,共对27份三文鱼和24份即食虾进行诺如病毒检测,具体检测结果详见表5。

表5 即食海产品诺如病毒检测结果(%)

Table 5 Ready-to-eat seafood *Norovirus* test results

时间	三文鱼	虾
2015.1	3.7(1/27)	—
2015.2	—	0.0(0/24)
合计	3.7(1/27)	0.0(0/24)

注:—表示未检测。

## 2.4 诺如病毒阳性样品的地域分布

本次诺如病毒的监测贝类阳性样品的区域分布见表6。在本次监测中,阳性样品种类包括:牡蛎、贻贝、扇贝、文蛤、生菜、三文鱼。蔬菜和即食海产品阳性样品的采样地点为北京超市或餐饮企业,由于商家保密原因,部分样品产地不能够确定。其中,2家不同的餐饮单位的1份生菜和1份三文鱼样品检测结果为阳性,但产地不详(见表1)。

表6 贝类阳性样品的地域分布(%)

Table 6 Geographical distribution and detection rate of shellfish positive samples

样品种类	广东	山东	辽宁
牡蛎	2.9(4/136)	1.3(1/79)	2.0(1/49)
贻贝	—	50.0(20/40)	22.2(2/9)
扇贝	—	3.8(1/26)	0.0(0/37)
文蛤	—	2.3(1/43)	0.0(0/9)

注:—表示未检测。

## 2.5 诺如病毒阳性样品的分型结果

### 2.5.1 贝类诺如病毒分型结果

贝类样品中有4份检测为GI型,36份检测为GII型,其中牡蛎中2份GI型,14份GII型;贻贝中1份GI型,21份GII型;扇贝中1份GI型;文蛤1份GII型。

应用SN/T 2626—2010方法对42份罗氏检测方法为阳性的样品进行扩增,其中罗氏检测方法为GI型样品没有扩增成功;在罗氏检测方法为GII型的样品中有28份样品应用SN/T 2626—2010方法扩增且测序成功。对测得的序列,使用National institute for public health and environment网站的软件,同时与NCBIblast中权威序列进行比对,最终确认有27份为GII.17,1份为GII.12。

### 2.5.2 蔬菜诺如病毒分型结果

生菜中有1份经罗氏试剂盒方法检出GII型诺如病毒,经SN/T 2626—2010方法扩增后测序成功,于NCBI网站使用Blast软件,与存在的序列进行比对鉴定为*Hawaii. calicivirus*。

### 2.5.3 即食海产品诺如病毒分型结果

有1份经罗氏试剂盒方法检出GII型诺如病毒,而使用SN/T 2626—2010方法进行扩增没有成功。

## 3 讨论

2014年9月—2015年2月,共监测675份样品,样品涉及到贝类、即食海产品、浆果、蔬菜等,共有42份阳性样品,总检出率为6.2%。虽然已有报道<sup>[15]</sup>诺如病毒的成功培养,但对绝大部分实验室诺如病毒的培养仍然不能实现。目前诺如病毒检测中比较认可的金标准是荧光定量PCR方法。而在实际食品检测中,由于诺如病毒的含量较低,在一些样品中的回收率很低,例如在德国草莓中诺如病毒的调查,病毒的回收率很低在0%~1%之间<sup>[16]</sup>,导致诺如病毒检测过程不能保证所有的阳性样品均能检测出诺如病毒。在最终PCR检测中,对假阴性的判断有一定的困难,所以需要在检测时合理的设计检测方法。在本次监测的方法建立时,添加诺如病毒阳性质控球作为外部质控,判断检测方法是

否为假阴性,添加空白对照控制假阳性,以保证检测方法可信。

在所有的检测食品中,牡蛎、贻贝、文蛤、扇贝、生菜及即食海产品中的三文鱼检出诺如病毒,浆果中未检出。其中,生菜样品虽然经罗氏试剂盒方法检出GII型诺如病毒,但是经SN/T 2626—2010方法扩增后测序,于NCBI网站使用Blast软件,与存在的序列进行比对鉴定为*Hawaii. calicivirus*。贝类食品是诺如病毒污染的主要类型,检出率达8.4%(40/478),即食海产品的检出率为2.0%(1/51),蔬菜的检出率为1.6%(1/62),浆果食品未检出,但是也存在污染的可能性需要加强重视。

本次监测中诺如病毒的检出以海产品为主,通过对牡蛎的6个月的检测表明,其与季节的关系非常紧密,1、2月份的检出率最高,与文献报道<sup>[17]</sup>相符,在贻贝样品中检出率较高。有文献报道<sup>[18]</sup>在市场销售的海产品的产地以山东、广东、辽宁为主,此次监测这些产地均有诺如病毒样品检出,表明在近海均存在有诺如病毒污染的情况。

2014年12月—2015年3月,北京市感染性腹泻比前一年多35.6%,达到10 626例,其中29.8%是由诺如病毒引起,比前一年增加了12.9%。在22起暴发事件中有20起是由GII.17引起<sup>[19]</sup>。而在本次监测的食品中检测出的诺如病毒也是以GII.17为主。提示食品中GII.17诺如病毒的大量检出与GII.17诺如病毒引起的集中暴发,可能存在一定的相关性。

贝类食品是造成诺如病毒感染腹泻高风险的食品,由于近海污水污染的可能性较大,同时牡蛎、文蛤等贝类食品具有富集诺如病毒的特点,所以建议在贝类生产区域的选择上,优先选择洁净的海域进行生产。而非合格区域生产的海产品不能作为即食海产品食用。加强对餐饮业食品安全监控,防止交叉污染。

## 参考文献

- [1] HALL A J, LOPMAN B A, PAYNE D C, et al. *Norovirus* disease in the United States[J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(8):1198-1205.
- [2] MURRAY P R, BARON E J, JORGENSEN J H, et al. *Manual of clinical microbiology*[M]. 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 2003: 1439.
- [3] VINJE J. Advances in laboratory methods for detection and typing of *Norovirus*[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(2): 373-381.
- [4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 国境口岸诺如病毒检测方法:SN/T 2626—2010[S]. 北京:中国标准出版

社,2010.

- [5] HOUDE A, LEBLANC D, POITRAS E, et al. Detection of *Norovirus* genogroups I and II using the conventional and real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction [J]. Ottawa, Ontario: Microbiological Methods Committee Evaluation Division Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate, 2010.
- [6] ISO/TS 15216-1 Microbiology of food and animal feed-horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time PCR[S]. 2013.
- [7] STALS A, BAERT L, COILLIE E V, et al. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 153(1/2): 1-9.
- [8] BUTOT S, ZUBER S, BAERT L. Sample preparation prior to molecular amplification: complexities and opportunities[J]. *Curr Opin Virol*, 2014, 4(2): 66-70.
- [9] 梁辉, 琦琦, 戴光伟, 等. 2011—2012年广东省市售牡蛎中诺如病毒污染调查分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2013, 25(4): 359-362.
- [10] 苏来金, 马丽萍, 徐仰丽, 等. 山东半岛地区贝类中诺如病毒污染状况与病毒鉴定初报[J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(5):451-454.
- [11] BELLOU M, KOKKINOS P, VANTARAKIS A. Shellfish-borne viral outbreaks: a systematic review[J]. *Food Environ Virol*, 2013, 5(1): 13-23.
- [12] BRASSARD J, GAGNÉ M J, GÉNÉREUX M, et al. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(10): 3763-3766.
- [13] CALLEJON R M, RODRÍGUEZ-NARANJO M I, UBEDA C, et al. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2015, 12(1): 32-38.
- [14] KRONEMAN A, VENNEMA H, DEFORCHE K, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses[J]. *J Clin Virol*, 2011, 51(2): 121-125.
- [15] ETTAYEBI K, CRAWFORD S E, MURAKAMI K, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids[J]. *Science*, 2016, 353(230): 1387-1393.
- [16] MÄDE D, TRÜBNER K, NEUBERT E, et al. Detection and typing of *Norovirus* from frozen strawberries involved in a large-scale gastroenteritis outbreak in Germany [J]. *Food Environ Virol*, 2013, 5(3):162-168.
- [17] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on *Norovirus* (NoV) in oysters: methods, limits and control options[J]. *EFSA Journal*, 2012, 10(1):2500.
- [18] MANSO C F, ROMALDE J L. Detection and characterization of hepatitis A virus and *Norovirus* in mussels from Galicia (NW Spain) [J]. *Food Environ Virol*, 2013, 5(2): 110-118.
- [19] GAO Z Y, LIU B W, HUO D, et al. Increased *Norovirus* activity was associated with a novel *Norovirus* GII.17 variant in Beijing, China during winter 2014-2015 [J]. *BMC Infectious Diseases*, 2015, 15(1):574.