

应用 2 种 RT-PCR 方法检测和分析北京市市场销售牡蛎中诺如病毒基因特征

严寒秋¹ 王永全² 崔海洋² 靳博² 高志勇¹ 王全意¹

¹北京市疾病预防控制中心/北京市预防医学研究中心 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013; ²北京市西城区疾病预防控制中心, 北京 100120

通信作者: 王全意, Email: bjcdcxm@126.com

【摘要】 目的 应用实时荧光 RT-PCR 和半巢式 RT-PCR 方法检测和分析牡蛎中诺如病毒的基因特征。方法 应用实时荧光 RT-PCR 和半巢式 RT-PCR 方法, 对 2014 年 11 月至 2015 年 10 月北京市采集的新鲜市售牡蛎进行诺如病毒 G I / G II 组并联试验检测, 分析检出率, 应用符合率和一致性检验 (Kappa 值) 对半巢式 RT-PCR 方法进行可靠性评价, 应用半巢式 RT-PCR 方法扩增诺如病毒 G I / G II 衣壳蛋白区基因, 对阳性产物进行测序。采用 BioEdit 7.0.9.0 软件进行序列比对, Mega 6.0 软件构建进化树。结果 72 份样品中, 实时荧光 RT-PCR、半巢式 RT-PCR 和并联试验的诺如病毒检出率分别为 31.94% (23/72)、38.89% (28/72) 和 48.61% (35/72)。2 种方法符合率为 73.61%, 中度一致 (Kappa 值 = 0.43)。测序成功 13 株诺如病毒, 11 株 (7 株 G II .17、2 株 G II .4 Sydney_2012、1 株 G II .1 和 1 株 G II .21 基因型) 为 2 种 RT-PCR 方法检测诺如病毒阳性样本所得; 2 株 (G II .17 和 G II .3 基因型各 1 株) 为半巢式 RT-PCR 方法检测诺如病毒阳性样本、实时荧光 RT-PCR 方法检测诺如病毒阴性样本所得。这些毒株与腹泻患者、环境污水和贝类水产品参考株的相似性为 84.4%~100.0%。结论 用 2 种 RT-PCR 并联法检测牡蛎中诺如病毒, 不仅能提高检出率还能获得更多基因型; 牡蛎中诺如病毒毒株与人源、环境污水及贝类水产品参考毒株高度同源, 应对经常接触牡蛎的人群及相关环境进行诺如病毒监测和防控。

【关键词】 诺如病毒; 实时荧光反转录聚合酶链式反应; 半巢式反转录聚合酶链式反应; 基因特征; 牡蛎

基金项目: 首都卫生发展科研专项 (2020-2-1011)

Application of two RT-PCR methods for detection of norovirus in market-sold oysters and norovirus genetic characteristic analysis, a survey conducted in Beijing

Yan Hanqiu¹, Wang Yongquan², Cui Haiyang², Jin Bo², Gao Zhiyong¹, Wang Quanyi¹

¹Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Prevention and Control/Beijing Research Center for Preventive Medicine, Beijing 100013, China; ²Xicheng District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100120, China

Corresponding author: Wang Quanyi, Email: bjcdcxm@126.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the application of real-time RT-PCR and semi-nested RT-PCR in the detection of norovirus in oysters and analyzing the genetic characteristics of the isolates. **Methods** Real-time fluorescent RT-PCR and semi-nested RT-PCR were used to detect norovirus G I / G II in fresh oysters collected from the markets in Beijing from November 2014 to

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20210519-00411

收稿日期 2021-05-19 本文编辑 斗智

引用本文: 严寒秋, 王永全, 崔海洋, 等. 应用 2 种 RT-PCR 方法检测和分析北京市市场销售牡蛎中诺如病毒基因特征 [J]. 中华流行病学杂志, 2022, 43(1): 92-97. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20210519-00411.

Yan HQ, Wang YQ, Cui HY, et al. Application of two RT-PCR methods for detection of norovirus in market-sold oysters and norovirus genetic characteristic analysis, a survey conducted in Beijing [J]. Chin J Epidemiol, 2022, 43(1): 92-97. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20210519-00411.



October 2015. The detection rate of the parallel test was also analyzed. In addition, the reliability of semi-nested RT-PCR was evaluated by agreement rate and consistency test (Kappa value). The positive products of norovirus G I /G II capsid protein region gene by semi-nested RT-PCR were sequenced. Software BioEdit 7.0.9.0 was used for sequence alignment, and software Mega 6.0 was used to construct the evolutionary tree. **Results** In 72 samples, the detection rate of norovirus was 31.94% (23/72) by real-time RT-PCR, 38.89% (28/72) by semi-nested RT-PCR and 48.61% (35/72) by parallel test. The coincidence rate of the two methods was 73.61%, a moderate degree (Kappa value =0.43). A total of 13 norovirus strains were successfully sequenced, and 11 strains (7 G II .17 strains, 2 G II .4 Sydney_2012 strains, 1 G II .1 strain and 1 G II .21 strain) were obtained from norovirus positive samples by two RT-PCR methods, two strains (1 G II .17 strain and 1 G II .3 strain) were obtained from real-time RT-PCR negative samples which were positive for norovirus by semi-nested RT-PCR. The similarity between these strains and reference strains from diarrhea patients, environmental sewage, and shellfish products were 84.4% - 100.0%. **Conclusions** The parallel test of norovirus in oysters by two RT-PCR methods can improve the detection rate and detect more genotypes. Norovirus strains in oysters were highly homologous with reference strains from diarrheal patients, environmental sewage, and shellfish products. Therefore, surveillance, prevention and control for norovirus should be carried out in people who have frequent contacts with oysters and related environments.

【Key words】 Norovirus; Real-time RT-PCR; Semi-nested RT-PCR; Genetic characteristics; Oyster

Fund program: Capital's Funds for Health Improvement and Research (2020-2-1011)

诺如病毒共有 3 个开放阅读框(ORF1~ORF3), 其中 ORF2 编码主要结构蛋白 VP1。依据 VP1 基因特征, 共分 12 个基因组, 其中有 10 个已明确分类的基因组(G I ~G X), 有 2 个暂定的基因组(GNA1~GNA2)。引起人感染的基因组主要是 G II 和 G I^[1]。牡蛎在滤食海水中的微型海藻生物和有机碎屑时, 也过滤海水中微量的诺如病毒。10~100 个诺如病毒粒子就可引起人体感染。牡蛎是引起诺如病毒急性胃肠炎的高风险食品之一, 在欧洲等地区暴发的 36 起病毒性急性胃肠炎中, 其中 22 起与食用被诺如病毒污染的牡蛎有关^[2]。2018 年报道实时荧光 RT-PCR 方法检测诺如病毒 G I /G II 组, 其阳性标本用半巢式 RT-PCR 方法扩增诺如病毒 G I /G II 组衣壳蛋白区基因, 对 PCR 阳性产物测序, 分析其基因特征^[3]。本研究应用实时荧光 RT-PCR 和半巢式 RT-PCR 方法对 2014 年 11 月至 2015 年 10 月北京市的市售牡蛎同时进行诺如病毒检测, 以实时荧光 RT-PCR 方法为标准, 用符合率和一致性检验(Kappa 值)对半巢式 RT-PCR 方法进行可靠性评价, 并对半巢式 RT-PCR 阳性产物进行测序, 分析其基因特征, 为诺如病毒防控工作提供参考依据。

材料与方 法

1. 样品来源: 2014 年 11 月至 2015 年 10 月, 在北京市某出售水产品市场的固定摊位, 每月固定日

期采集新鲜牡蛎 2 次, 每次采 5~7 只牡蛎为 1 份。每月 6 份, 12 个月共 72 份。4 ℃~8 ℃运送至实验室, -20 ℃及以下保存待检。

2. 样品前处理和病毒富集^[4-5]: 将冷冻的牡蛎提前放 4 ℃~8 ℃过夜解冻, 用流动自来水清洗牡蛎外壳污物, 打开牡蛎, 用灭菌剪子和镊子解剖牡蛎, 剪取肠内容物和肠腺等消化组织放无菌平皿中。另取一灭菌的剪子将其充分剪碎并混匀, 立即进行病毒富集。取(3.0±0.1)g 剪碎物放均质袋中, 加入 21 ml 甘氨酸/氯化钠溶液, 用均质器以 9 次/s 速度拍打 2 min。取出组织匀浆物放入 50 ml 离心管中, 加入 5 ml 氯仿充分振荡 2 min。采用冷冻离心机 10 000 r/min, 离心半径 7.5 cm, 4 ℃离心 30 min, 取上清液放入 50 ml 离心管中, 加等体积的聚乙二醇 PEG8000 (美国 Sigma-Aldrich 公司) 充分振荡 2 min, 终浓度为 8%。4 ℃ 16~20 h, 使样本中病毒颗粒集聚发生沉淀。用冷冻离心机 10 000 r/min, 离心半径 7.5 cm, 4 ℃离心 15 min, 留沉淀立即进行核酸提取。

3. 病毒核酸提取和保存: 取 280 μl 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.0)将沉淀充分溶解, 按 QIAamp Viral RNA Mini Kit 说明书进行病毒 RNA 提取, 最终核酸洗脱体积为 60 μl。在 -70 ℃以下保存, 用于诺如病毒检测。

4. 实时荧光 RT-PCR 和半巢式 RT-PCR 方法检测诺如病毒^[4,6-7]: 使用诺如病毒 G I /G II 组核酸检测试剂盒(江苏硕世生物科技有限公司生产)和

7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)对 72 份样品进行诺如病毒核酸检测,具体操作和结果判断按说明书进行。阳性表明检出诺如病毒。使用半巢式 RT-PCR 方法对 72 份样品分别扩增诺如病毒 G I 和 G II 组衣壳蛋白 VP1 区基因,使用 One Step RT-PCR Kit[德国凯杰(QIAgen)生物公司生产]进行一轮扩增,AmpliTaq Gold®360 Master Mix(美国生命技术公司)进行二轮扩增,引物序列和扩增参数见表 1。用 QIAxcel 全自动毛细管电泳仪[德国凯杰(QIAgen)生物公司生产]电泳,G I 和 G II 组诺如病毒目的片段为 330 bp 和 344 bp。

5. 半巢式 RT-PCR 方法可靠性评价^[8]:以实时荧光 RT-PCR 为标准,采用符合率与 Kappa 值作为指标,对半巢式 RT-PCR 方法进行可靠性评价。

6. 基因型鉴定和进化分析:将半巢式 RT-PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序成功后,采用诺如病毒在线分型工具 Norovirus Typing Tool Version 2.0 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus>)进行基因分型和鉴定。采用 BioEdit 7.0.9.0 软件对序列进行编辑和比对。采用 Mega 6.0 软件的最大似然法(maximum likelihood)构建衣壳蛋白 VP1 区进化树,bootstrap 值设置 1 000 次,诺如病毒 G II 核酸替代模型选择 K2+G。诺如病毒参考序列选自 GenBank。

结 果

1. 诺如病毒检出情况:72 份样品中,实时荧光 RT-PCR、半巢式 RT-PCR 和并联试验的诺如病毒检出率分别为 31.94% (23/72)、38.89% (28/72) 和 48.61% (35/72)。见表 2。

2. 半巢式 RT-PCR 方法可靠性:以实时荧光 RT-PCR 为标准,半巢式 RT-PCR 的符合率为 73.61%

(53/72),中度一致(Kappa 值=0.43)。见表 2。

3. 诺如病毒基因组检出时间分布:72 份样品检出诺如病毒 35 份,1 和 12 月诺如病毒检出最多,各 5 份;春、夏、秋、冬季各检出 7、7、8、13 份。在检出的样品中,G II 15 份,12 月检出 4 份;春、夏、秋、冬季各检出 2、4、2、7 份。G I 7 份,9 月检出 3 份;春、夏、秋、冬季各检出 0、2、3、2 份。G I /G II 混合 13 份,5 月检出 4 份;春、夏、秋、冬季各检出 5、1、3、4 份。见图 1。

4. 诺如病毒测序及分型鉴定:对 28 株半巢式 RT-PCR 阳性产物进行衣壳蛋白 VP1 区基因测序,共 13 株测序成功,用诺如病毒在线分型工具进行分型鉴定,同时将该序列在 GenBank 上进行 BLAST 序列比对,再次鉴定基因型。其中 11 株为 2 种 RT-PCR 方法检测诺如病毒阳性样本所得,7 株 G II .17、2 株 G II .4 Sydney_2012、1 株 G II .1 和 1 株 G II .21 基因型;2 株为半巢式 RT-PCR 方法检测诺如病毒阳性样本、实时荧光 RT-PCR 方法检测诺如病毒阴性样本所得,包括 1 株 G II .17 和 1 株 G II .3 基因型。将这些基因序列提交至 GenBank 数据库,获得序列号为 MZ227509~MZ227521。

5. 诺如病毒 G II 基因组序列进化分析:

(1) G II .17 型进化分析:GenBank 下载 G II .17 型参考株序列,与 8 株 G II .17 型试验株序列进行同源性和进化分析。8 株 G II .17 型相似性为 97.3%~99.6%,8 株 G II .17 型试验株与 14 株 G II .17 型参考株相似性为 84.4%~100.0%。这 22 株 G II .17 型分为 3 个基因簇(Cluster I ~ III)。8 株 G II .17 型试验株与 10 株参考株同处于 Cluster III,相似性为 97.3%~100.0%,其中 XCML-46 试验株与 KT633395/Hu/2015/Beijing/CHN 和 MN461104/2016/Sewage/ROK 相似性均为 100.0%,与其他 8 株 G II .17 型参考株相似性均为 99.3%~99.6%;

表 1 半巢式 RT-PCR 方法检测诺如病毒引物序列、反应体系和扩增条件

引物序列、 反应体系及 扩增条件	第一轮	第二轮
G I 组	COG1F:5'-CGYTGGATGCGITTYCATGA-3' G1SKR:5'-CCAACCCARCCATRTTACA-3'	G1SKF:5'-CTGCCCGAATTYGTAAATGA-3' G1SKR:5'-CCAACCCARCCATRTTACA-3'
G II 组	COG2F:5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3' G2SKR:5'-CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT-3'	G2SKF:5'-CNTGGGAGGGCGATCGCAA-3' G2SKR:5'-CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT-3'
反应体系	5×Buffer 10.0 μl, 10 mmol/L dNTPs 2.0 μl, 正反向引物(33 μmol/L)各 1.0 μl, Enzyme Mix 2.0 μl, RNase-free water 29.0 μl, 模板 5.0 μl	2×Mix 25.0 μl, 正反向引物(33 μmol/L)各 1.0 μl, RNase-free water 21.0 μl, 一轮产物 2.0 μl
扩增条件	50 °C 反转录 30 min; 95 °C 预变性 15 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存	95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存

表 2 半巢式 RT-PCR 法评价指标

半巢式 RT-PCR	实时荧光 RT-PCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	16	12	28
阴性	7	37	44
合计	23	49	72

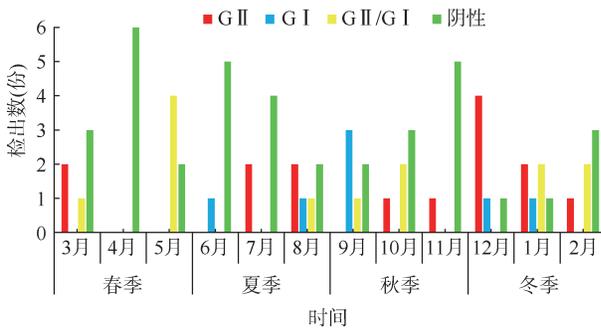


图 1 北京市市场销售牡蛎中诺如病毒基因组检出时间分布

XCML-58 试验株与 MT344181/Hu/2015/USA、LC433723/Hu/2015/JP、MN045200/Hu/2016/BRA、MK907791/Sewage/2014/FRA 和 MN461108/Sewage/2016/ROK 相似性均为 100.0%，与其他 5 株 G II .17 型参考株相似性为 99.3%~99.6%；XCML-82 试验株与 KU557790/Hu/2014/Guangdong/CHN、MN904959/Scallop/2014/Beijing/CHN 和 LC101784/Oyster/2015/JP 相似性均为 100.0%，与其他 7 株 G II .17 型参考株相似性均为 99.6%；其他 5 株试验株 (XCML-121、XCML-85、XCML-55、XCML-52 和 XCML-43) 与 10 株参考株相似性为 97.3%~99.6%。8 株 G II .17 型试验株与位于 Cluster I 的毒株 JF970609 和 EF529741 相似性介于 84.4%~85.7%，与位于 Cluster II 的毒株 KR074152 和 KR074151 相似性介于 87.4%~89.0%。见图 2。

(2) 5 株诺如病毒 G II 其他型毒株的进化分析：从 GenBank 下载 G II .4 Sydney_2012、G II .1、G II .3 和 G II .21 型参考株序列进行同源性和进化分析。XCML-190 和 XCML-208 试验株为 G II .4 Sydney_2012，二者序列相似性为 98.0%，与 5 株 G II .4 Sydney_2012 型参考株相似性为 97.6%~100.0%，其中 XCML-190 试验株与 KX657737/Hu/2016/Taiwan/CHN 相似性为 100.0%。XCML-31 试验株与 4 株 G II .1 型参考株相似性为 94.0%~98.0%，与其中的参考株 MG572182/Hu/2017/Shandong/CHN 相似性最高为 98.0%。XCML-205 试验株与 9 株 G II .3 型参考株相似性为 91.0%~99.3%，这 10 株 G II .3 型分为 3 个基因簇

(Cluster I ~ III)。该试验株与 4 株参考株同处于 Cluster II，相似性 99.0%~99.3%，与其中的参考株 MK779290/Hu/2018/Shandong/CHN 相似性最高为 99.3%。该试验株与位于 Cluster I 的毒株 AY588132、AF190817 和 AB231341 相似性介于 95.3%~95.6%，与位于 Cluster III 的毒株 U02030 和 U22498 相似性介于 91.0%~92.0%。XCML-124 试验株与 4 株 G II .21 型参考株相似性为 99.3%~99.6%，与其中的参考株 KR107727/Sewage/2013/Shandong/CHN 相似性最高为 99.6%。见图 2。

讨 论

目前分子生物学检测法已广泛应用于病毒检测^[9-11]，在诺如病毒的多种检测方法中^[12-13]，特别是 RT-PCR 方法是诺如病毒最常用的方法^[14-17]。2002-2003 年报道了用半巢式 RT-PCR 方法检测诺如病毒 G I 和 G II，该方法比普通 RT-PCR 方法更为灵敏，特别适用于诺如病毒含量较低的样品检测^[6-7]。随着科技的发展，实时荧光 RT-PCR 技术能更加快速准确检测诺如病毒核酸。实时荧光 RT-PCR 方法于 2017 年列入我国食品安全国家标准，是目前公认的诺如病毒金标准检测方法^[4]。但是实时荧光 RT-PCR 阳性产物片段小，无法测序。

本研究发现，半巢式 RT-PCR 检出率 (38.89%) 高于实时荧光 RT-PCR 检出率 (31.94%)，但是对半巢式 RT-PCR 进行可靠性评价，符合率 < 80.00%，中度一致 (Kappa 值 = 0.43)，说明在检测牡蛎中诺如病毒时，半巢式 RT-PCR 不能代替荧光 RT-PCR 方法。但是 2 种方法并联检出率 (48.61%)，分别比半巢式 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 方法的检出率高了 9.72% 和 16.67%。另外本研究共 13 株测序成功，11 株为实时荧光 RT-PCR 和半巢式 RT-PCR 方法检测诺如病毒阳性样本所得，有 G II .17、G II .4 Sydney_2012、G II .21 和 G II .1 的 4 个基因型；2 株为半巢式 RT-PCR 方法检测诺如病毒阳性而实时荧光 RT-PCR 方法检测阴性样本所得，有 G II .17 和 G II .3 的 2 个基因型。表明用 2 种 RT-PCR 同时对样品进行诺如病毒检测，任一种 RT-PCR 阳性说明检出诺如病毒，并联试验方法不仅提高了阳性检出率，还能获得更多基因型和序列。

应用实时荧光 RT-PCR 方法首先检测样品诺如病毒，其阳性再用半巢式 RT-PCR 方法扩增 VP1 区基因，阳性产物进行测序后获得基因型^[3]。

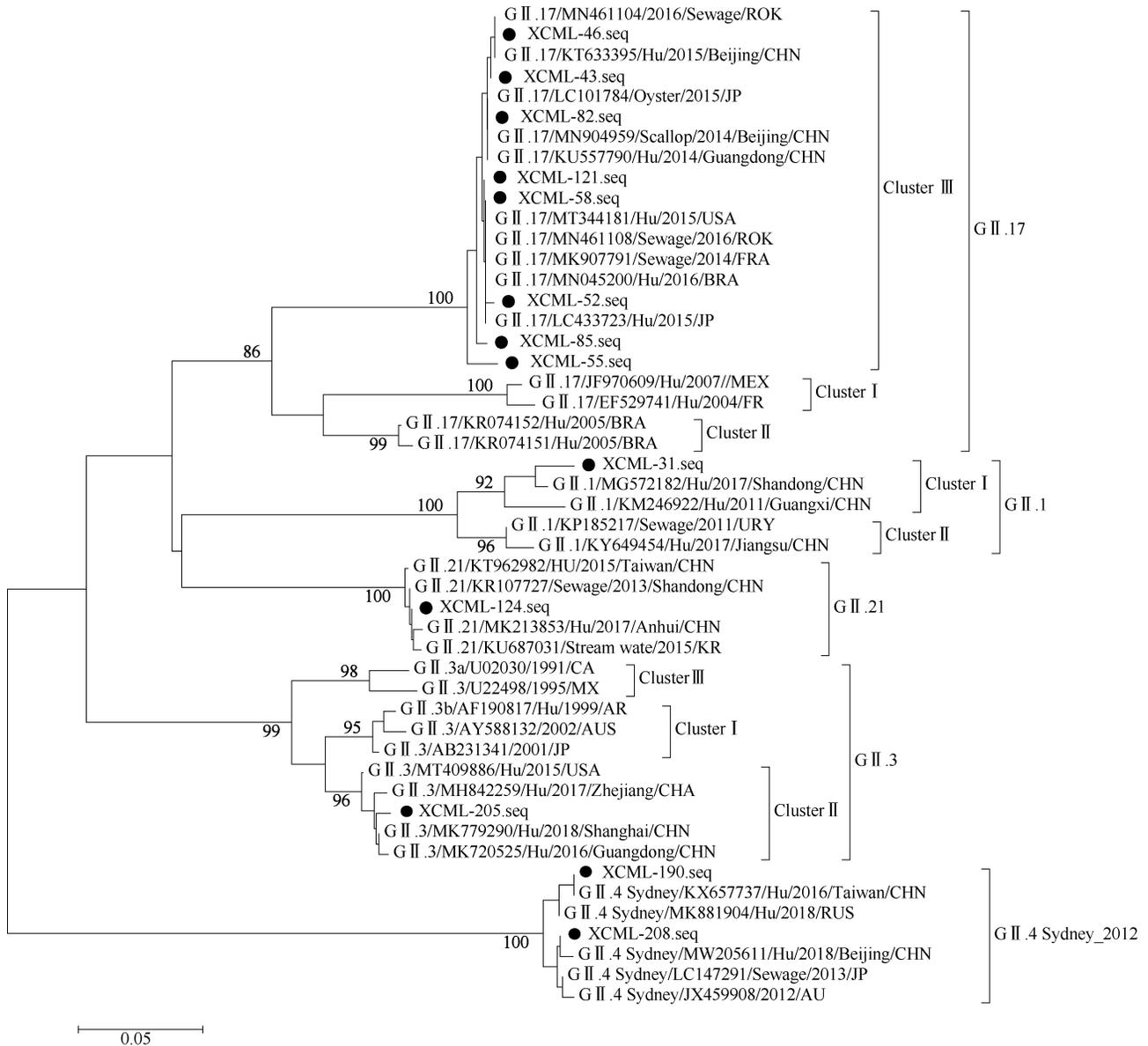


图2 北京市市场销售牡蛎中诺如病毒 G II 组部分 VP1 区基因(302 bp)进化分析

这一检测过程工作量少,试剂耗材的用量节省。应用 2 种 RT-PCR 方法同时对样品进行诺如病毒检测,工作量大,试剂耗材的用量较多。操作时间两者接近。建议根据实验室条件和样品来源选择检测方法:对病毒载量低的食物或水样品进行日常监督检测时,采用实时荧光 RT-PCR 方法。对病毒性急性胃肠炎疫情中病毒载量低的可疑食品或水等样品进行疫情溯源检测时,采用半巢式 RT-PCR 方法。

本研究中 72 份样品检出 35 份诺如病毒,测序成功 13 株诺如病毒,3 株 G II .17 型试验株(XCML-46、XCML-58 和 XCML-82)及 1 株 G II .4 Sydney_2012 型(XCML-190)与不同国家不同年份

的人源参考株、环境污水参考株和贝类水产品参考株(共 10 株)相似性 100.0%,其他的 9 株试验株与人源、环境污水和贝类水产品的参考株相似性≥ 84.4%。在自然界中,诺如病毒在人群、环境及食品之间形成了一个闭环传播链,这与 2020 年的研究结论相似^[18]。2020 年在北京市开展的专项研究中,宾馆厨师的诺如病毒隐性感染率为 0.99%,其环境污染阳性率为 0.16%^[19]。

综上所述,应用 2 种 RT-PCR 并联法检测牡蛎中诺如病毒,不仅能提高检出率还能获得更多基因型。牡蛎中诺如病毒毒株与人源、环境污水及贝类水产品参考毒株高度同源。因此,对引起诺如病毒急性胃肠炎的高风险食品监测时,还要对其生产、

销售和加工等人群及相关环境进行诺如病毒监测和防控。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 严寒秋: 研究设计、样品检测、论文撰写、试验数据分析、论文修改; 王永全、崔海洋、靳博: 现场实施采样、样品检测; 高志勇: 研究设计; 王全意: 研究设计、经费支持

参 考 文 献

- [1] 沈玲羽, 姜博, 严寒秋, 等. 诺如病毒基因分型研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(11): 1927-1932. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20200302-00234.
- [2] Shen LY, Jiang B, Yan HQ, et al. Progress on genotyping of norovirus[J]. Chin J Epidemiol, 2020, 41(11): 1927-1932. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20200302-00234.
- [3] Le Guyader FS, Atmar RL, Le Pendu J. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play[J]. Curr Opin Virol, 2012, 2(1): 103-110. DOI: 10.1016/j.coviro.2011.10.029.
- [4] 严寒秋, 高志勇, 刘白薇, 等. 北京市市售牡蛎诺如病毒污染状况调查[J]. 国际病毒学杂志, 2018, 25(6): 386-388. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2018.06.007.
- [5] Yan HQ, Gao ZY, Liu BW, et al. Investigation of norovirus contamination in commercial oysters in Beijing[J]. Int J Virol, 2018, 25(6): 386-388. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2018.06.007.
- [6] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验(GB 4789.42-2016) [EB/OL]. [2016-12-23] [2021-04-01]. <http://down.foodmate.net/standard/sort/3/50379.html>. National Health and Family Planning Commission, State Administration for Food and Drug. National standard for food safety examination of food, microbiology, examination of norovirus (GB 4789.42-2016) [EB/OL]. [2016-12-23] [2021-04-01]. <http://down.foodmate.net/standard/sort/3/50379.html>.
- [7] 严寒秋, 霍达, 刘白薇, 等. 牡蛎中诺如病毒检测的前处理方法比较及应用[J]. 国际病毒学杂志, 2015, 22(3): 386-388. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2015.03.003.
- [8] Yan HQ, Huo D, Liu BW, et al. Comparison and application of pretreatment methods for norovirus detection in oysters[J]. Int J Virol, 2015, 22(3): 386-388. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2015.03.003.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 詹思延, 叶冬青, 谭红专. 流行病学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 108-113.
- [12] Zhang SY, Ye DQ, Tan HZ. Epidemiology[M]. 8th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2014: 108-113.
- [13] 车荣飞, 白茹, 孙聪, 等. 呼吸道感染多病原检测试剂盒 Luminex NxTAGTM RPP 与一代测序性能对比[J]. 国际病毒学杂志, 2021, 28(1): 57-61. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2021.01.013.
- [14] Che RF, Bai R, Sun C, et al. Comparison of the performance of Luminex NxTAGTM RPP and first-generation sequencing kit for multi-pathogen detection of respiratory infections[J]. Int J Virol, 2021, 28(1): 57-61. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2021.01.013.
- [15] 鲁飞凤, 吕陈昂, 石镇涛, 等. A 组轮状病毒原位捕获 RT-qPCR 检测体系的建立及评估[J]. 国际病毒学杂志, 2021, 28(2): 98-102. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2021.02.013.
- [16] Lu FF, Lyu CA, Shi ZT, et al. Development and evaluation of in situ capture RT-qPCR for detection of group A rotavirus[J]. Int J Virol, 2021, 28(2): 98-102. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2021.02.013.
- [17] Tian Y, Gao ZY, Li WH, et al. Group A rotavirus prevalence and genotypes among adult outpatients with diarrhea in Beijing, China, 2011-2018[J]. J Med Virol, 2021. DOI: 10.1002/JMV.27100.
- [18] 孙志强, 黄志成, 王修, 等. 诺如病毒检测技术的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(10): 1750-1752. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2020.10.052.
- [19] Sun ZQ, Huang ZC, Wang X, et al. Research progress of norovirus detection technology[J]. Chin J Lab Diag, 2020, 24(10): 1750-1752. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2020.10.052.
- [20] 高志勇, 严寒秋, 刘白薇, 等. 一种快检试剂对不同基因型诺如病毒的检测评价[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2015, 29(6): 547-550. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2015.06.020.
- [21] Gao ZY, Yan HQ, Liu BW, et al. Evaluation of a rapid test kit for noroviruses of different genotypes[J]. Chin J Exp Clin Virol, 2015, 29(6): 547-550. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2015.06.020.
- [22] 纪蕾, 刘光涛, 沈月华, 等. 2013-2019 年浙江省湖州市急性胃肠炎病例 G II .P7-G II .6 型诺如病毒基因特征分析[J]. 疾病监测, 2021, 36(1): 53-58. DOI: 10.3784/jbjc.202006180218.
- [23] Ji L, Liu GT, Shen YH, et al. Genetic characteristics of norovirus G II .P7-G II .6 isolated from acute gastroenteritis cases in Huzhou of Zhejiang, 2013-2019[J]. Dis Surveill, 2021, 36(1): 53-58. DOI: 10.3784/jbjc.202006180218.
- [24] 李伟红, 高志勇, 严寒秋, 等. 2016-2019 年北京市 G II .2[P16] 型诺如病毒全长基因组系统进化分析[J]. 国际病毒学杂志, 2020, 27(2): 97-101. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2020.02.003.
- [25] Li WH, Gao ZY, Yan HQ, et al. Phylogenetic analysis of complete genomes of G II .2[P16] noroviruses in Beijing, 2016-2019[J]. Int J Virol, 2020, 27(2): 97-101. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2020.02.003.
- [26] 蒋翠莲, 曹雪, 艾静, 等. 诺如病毒 G I .6[P11] 与 G II .13[P16] 共感染的分子特征分析[J]. 国际病毒学杂志, 2020, 27(2): 102-106. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2020.02.004.
- [27] Jiang CL, Cao X, Ai J, et al. Analysis on molecular characteristics of co-infection with G I .6[P11] and G II .13[P16] noroviruses[J]. Int J Virol, 2020, 27(2): 102-106. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2020.02.004.
- [28] 傅忠燕, 刘莉, 孔翔羽, 等. 诺如病毒 G IX .1[G II .P15] 型山东株 SD20191568 全基因组序列特征分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(12): 1365-1369. DOI: 10.13350/j.cjpb.201201.
- [29] Fu ZY, Liu L, Kong XY, et al. The complete genomic sequencings of the Shandong Norovirus strain SD 20191568[J]. J Path Biol, 2020, 15(12): 1365-1369. DOI: 10.13350/j.cjpb.201201.
- [30] 严寒秋, 王永全, 田祎, 等. 北京市市售扇贝中诺如病毒监测分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(4): 427-431. DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.04.015.
- [31] Yan HQ, Wang YQ, Tian Y, et al. Surveillance of Norovirus contamination on scallops sold in Beijing[J]. Chin J Food Hyg, 2020, 32(4): 427-431. DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.04.015.
- [32] 郑阳, 贾蕾, 刘白薇, 等. 北京市宾馆住宿场所和旅游交通工具诺如病毒污染状况研究[J]. 国际病毒学杂志, 2020, 27(2): 120-123. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2020.02.008.
- [33] Zheng Y, Jia L, Liu BW, et al. Investigation on contamination by norovirus in hotels and tourist buses in Beijing[J]. Int J Virol, 2020, 27(2): 120-123. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2020.02.008.