

水源性诺如病毒

寇晓霞^{1,2,3} 吴清平^{1,2,3*} 薛亮^{1,2,3}

- (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: 诺如病毒是导致人类病毒性急性腹泻的主要病原, 常常造成严重的公共卫生与食品安全事件, 而水体是诺如病毒传播的重要载体。对水源性诺如病毒的环境抗性、浓缩和检测方法、流行病学以及目前对于水体中诺如病毒检测存在的突出问题和未来的发展方向进行了综述和展望。

关键词: 水源性, 诺如病毒, 检测, 浓缩

Detection of waterborne norovirus

KOU Xiao-Xia^{1,2,3} WU Qing-Ping^{1,2,3*} XUE Liang^{1,2,3}

- (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)
(2. Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)
(3. State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), Guangzhou, Guangdong 510070, China)

Abstract: Norovirus is the major cause of acute non-bacterial gastroenteritis worldwide and often lead to sever food safety incidents. Water is one of the important vectors of norovirus transmission. The paper gives an overview about the environmental resistance, concentration, detection and epidemiology of norovirus in water. At the same time, the outstanding problem and developmental direction of norovirus detection is also enclosed.

基金项目: 广东省中国科学院全面战略合作项目(No. 2009B091300140); 广东省教育部产学研结合项目(No. 2008B090500214); 广东省科技计划项目(No. 2007A050100001)

*通讯作者: Tel: 86-20-87688132; 邮箱: wuqp203@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-10-13; 接受日期: 2012-01-06

Keywords: Waterborne, Norovirus, Detection, Concentration

诺如病毒(Norovirus, NoV)属于杯状病毒科, 诺如病毒属。根据诺如病毒的 RNA 聚合酶和衣壳蛋白编码基因序列的相似度, 将诺如病毒分为下列 5 个基因组(Genogroup): GI、GII、GIII、GIV、GV^[1]。感染人的诺如病毒包括 GI、GII 和 GIV。GI 型诺如病毒主要引起临床急性胃肠炎散发病例, 而 II 型诺如病毒常常引起疫情的大规模暴发流行^[2]。诺如病毒常引起急性胃肠炎感染症状, 其特点是对人类易感性高、感染剂量低, 10–100 个病毒粒子即可引发感染, 且传播范围广, 常常造成严重的公共卫生与食品安全事件, 被 WHO 定为 B 类病原^[3]。虽然诺如病毒引起的胃肠炎疾病大多是自限性的, 但对于老人和孩子仍是不小的健康威胁, 当同时感染多种病毒且没有及时的进行防脱水治疗时, 往往可导致长期且严重的胃肠炎甚至危及生命。

1 诺如病毒的环境抗性及其传播途径

诺如病毒可直接通过人接触(与患者的密切接触)传播, 也可以间接的通过被污染的气溶胶、水、食物(人体–粪便–水体–食物–人体途径)等途径传播。但在诺如病毒性疾病发生和流行过程中, 水是其传播的重要媒介^[4–5]。诺如病毒在环境中的稳定性很强, 对有机溶剂不敏感, 对乙醚、氯仿等都具有抵抗力, 在氯化铯溶液的浮力密度约为 1.39–1.40 g/cm³, 可在受污染的水、食物或环境中存活数天乃至数周, 而病毒粒子极小致使诺如病毒可以通过水体的流动性从污染源迁移传播至上百甚至上千米。因此, 对环境的强抗性、病毒粒子小、易迁移性及强传染性是导致水源性胃肠炎病毒高发病率的内在因素。目前由于缺乏细胞培养和动物感染模型, 限制了诺如病毒在环境中稳定性的分子机制研究。志愿者研究表明诺如病

毒对于一般的饮用水氯消毒存在抗性, 而且诺如病毒对氯的抗性比脊髓灰质炎病毒、人轮状病毒、猴轮状病毒和 f2 噬菌体更强; 将诺如病毒在室温、pH 2.7 的条件下处理 3 h, 或者在 4 °C、20% 的酒精中处理 18 h, 或者在 60 °C 下 30 min 都仍然具有感染性^[6]。

2 水中诺如病毒的浓缩富集——膜吸附法

目前绝大多数关于水体中诺如病毒污染的研究报道均是在流行病学事件发生以后, 利用检测手段进行溯源, 发现与饮用水或者食物有关, 而很少有关于水或食物中诺如病毒污染状况监测的研究报道。究其原因主要在于自然环境中水的体积较大, 而病毒浓度较低, 现有检测方法的灵敏度无法实现不浓缩而直接检测水中的病毒。因此, 能否将大量水体中极其微量、但却足以使人发病的病毒粒子有效地浓缩成为水体病毒检测的首要工作。Block 和 Schwartzbrod^[7]认为理想的浓缩方法必须可以实际进行应用, 并对此做了如下一些标准定义: 技术水平上易于在短时间内完成, 具有高病毒回收率, 可以浓缩多种病毒, 浓缩终体积小, 不昂贵, 可以处理大体积的水样, 在实验室内和实验室间具有可重复性。但目前还没有任何单一的一种方法可以达到上述所有的要求。

国内外已报道了多种浓缩病毒的方法, 如 CaCl₂ 和 AlCl₃ 无机盐沉淀法、滑石粉–硅藻土浓缩法、过滤法、膜吸附洗脱法等^[8–9]。这些浓缩方法中, 对膜吸附洗脱法的研究颇多, 本文着重介绍膜吸附法在病毒回收中的应用。膜过滤法的主要原理是利用各种膜及病毒的电荷性, 通过静电吸附作用达到富集效果, 常用于水及液体的病毒富集, 包括正离子膜、负离子膜、硝酸纤维素膜

等。病毒的电荷性特点决定用于富集病毒的正离子膜、负离子膜及硝酸纤维素膜的方法原理各不相同。而水样的 pH 是使用不同的膜富集病毒的关键因素,直接影响到膜的富集效果。对于 pH 中性的水样,由于病毒和滤器材料均带负电荷,当使用正离子膜富集病毒时无需调节样本的 pH,水样中带负电荷的病毒能由于电荷的吸附作用被正离子膜吸附富集。但若使用负离子膜或硝酸纤维素膜富集病毒,必须把水样 pH 调节至 3.5,并加入一定量的阳离子(如 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 等),从而使水样的病毒带正电荷,被负离子膜或硝酸纤维素膜吸附富集。

近年来虽然有关膜吸附浓缩病毒的研究较多,但各种膜在不同实验室进行的实验效果也不尽相同,目前尚无定论哪种膜的病毒富集效果最好。但研究者发现,无论使用哪种膜,在水体浓缩过程中流程越短,对病毒回收影响越小,回收率越高。梁莎在膜吸附-洗脱法中还发现了一个引人注目的现象^[10]:回收病毒量通常大于实测病毒量,个别的甚至大于投入病毒量,经分析认为,这种现象实质是病毒粒子结成团块所致。由于团块大小不一,即使同一标本,多次测定也会得到不同结果,显然与病毒回收率不稳定密切相关。病毒的回收率还受操作者技术以及仪器、试剂等的影响。因此,如何检测环境水体中的病毒,就成为目前急需解决的一个难题。此外,浓缩方法的有效性取决于一系列因素,在浓缩过程中,用来浓缩的水样量体积和浓缩的程度往往取决于样本中可能存在的病毒数量以及样本的来源。而样本的最终浓缩体积受到浓缩方法所能达到的最小体积、检测方法所需求的体积的影响和限制。其中所能处理水样的体积和对不同水质类型的适应性,以及快速易于使用等都是衡量一个浓缩方法有效性的重要标志。另外,浓缩过程中所采用的条件还要保证不使病毒在浓缩过程中灭

活,以及不利于病毒存活的操作时间要尽可能短等因素都需要考虑。

3 水源性诺如病毒的检测方法

尽管诺如病毒已经发现 30 多年,但目前仍不能在实验室进行培养,严重地阻碍了该病毒的基本特性与环境监测控制研究。目前对于该病毒的主要检测方法有电镜法、免疫学方法(ELISA)、分子生物学方法。但是电镜法和免疫学方法由于检测灵敏度低,目前只能应用于血清、粪便等临床样本中,而在水体等环境样本中,由于病毒含量非常低,即使浓缩后也无法达到所要求的可检出浓度。虽然曾经有人尝试将免疫学方法应用于水、食品和贝类中病毒的检测,但是没有见到相关成功的研究报道。目前对水中诺如病毒的检测主要应用的仍是分子生物学方法,且主要集中于如 RT-PCR、实时荧光定量 RT-PCR、依赖核酸序列的恒温扩增法等。下面,本文就这些分子方法在水中诺如病毒检测的应用及目前存在的突出问题进行阐述分析。

3.1 RT-PCR 检测

RT-PCR 方法因其应用性强、特异性好等特点,被称为 NoV 检测的金标准,也是目前公认的检测水体、贝类及其他环境样本中诺如病毒最为行之有效的检测方法。研究者不断地对传统 RT-PCR 进行改进,建立了套式 RT-PCR、半套式 RT-PCR^[11]、多重引物 RT-PCR^[12]、内标定量 RT-PCR^[13-14]、荧光实时定量/半定量 RT-PCR 等方法^[15-16]。

Lodder 和 Roda Husman^[17]在 2005 年用 RT-PCR 方法调查了水源水和污水中诺如病毒、轮状病毒、肠道病毒和呼肠孤病毒的污染情况。他们将抽提所得的 RNA 进行 10 倍稀释后用定量,发现在河水中诺如病毒的检出限在 4-4 900 个 PCR 可检出单位,在污水中的检出限则比这个

数值更高。这个定量方法受到 2006 年 Westrell 等人的支持和拓展, 他们在 Meuse 河中检出诺如病毒的效价在 1 700 个 PCR 可检出单位。此外, RT-PCR 经常被用来溯源疾病暴发的原因^[18]。Parshionikar 等^[19]在 2003 年用 RT-PCR 方法分析了美国一个旅游沙龙暴发的胃肠炎, 在患者的粪便样品和饮水中同时发现了诺如病毒 GGI.3; Hoebe 等^[20]在 2004 年对喷泉处玩耍的孩子暴发了胃肠炎后进行流行病学和病毒学调查, 在粪便和水样中同时检出了相同的诺如病毒序列, 从而证明了疾病暴发是由受污染的水所引起的。Lee 等^[21]运用套式 RT-PCR 和多态性分析, 对韩国河水中的诺如病毒基因多样性进行了调查, 结果表明河水中污染的诺如病毒均属于 GI 及 GII 型。本文的作者及其研究团队建立了诺如病毒 RT-PCR 检测技术及可应用于水体和贝类等环境样本中同时检测 4 种食源性病毒(诺如病毒、轮状病毒、星状病毒和甲肝病毒)的多重 RT-PCR 检测方法, 已可检测到的病毒 RNA 量为检测限指标, 在单一 RT-PCR 中, 诺如病毒和星状病毒的最低检测限为 5 pg, 轮状病毒和甲肝病毒最低检测限为 10 pg; 在多重 RT-PCR 中, 轮状病毒、诺瓦克病毒和星状病毒的最低检测限为 50 pg, 甲肝病毒为 100 pg^[22]。

诺如病毒 RT-PCR 方法的引物序列是基于病毒基因组的保守序列设计的, 所用保守区有 RdRp、ORF1 3'端和 ORF2 的两端 4 个区域, 不过目前大多数的 RT-PCR 都是以多聚酶基因序列作为检测的靶点序列。必须不断挖掘新的分子检测靶位点和改进检测方法以更好的区分不同的病毒株, 对变异很强的诺如病毒更是如此。Bon 等^[23]在为期 6 年的杯状病毒分子流行病学和暴发研究中发现, 对于包括不止一种病毒株型感染的流行病学事件中, 同时以外壳蛋白基因区和多聚酶区为靶位点来区分不同的病毒株非常重

要。由于外壳蛋白基因和血清学有关, 很有可能这种方法, 将会在分子流行病学研究中越来越有用。

3.2 实时荧光定量 RT-PCR

实时 RT-PCR 为定量样品中存在的特异性序列数提供了可能, 已经被广泛应用于环境中病毒调查。Pusch 等^[24]在 2005 年在一个废水处理厂的下游工艺水样中检测出多种病毒, 其中诺如病毒的基因组数量为 1.8×10^4 – 9.7×10^5 拷贝, 星状病毒的基因组数量在 3.7×10^3 – 1.2×10^8 拷贝之间; Laverick 等^[25]2004 年设计了诺如病毒的定量 PCR, 并且将之应用于污水、养殖水和河岸娱乐水样中诺如病毒为期 14 个月的监测, 这些研究报告为直接从水中定量检测病毒提供了良好的技术借鉴。近五年来, 运用实时荧光定量 RT-PCR 方法检测水源性诺如病毒的报道呈逐年上升趋势, 并且目前在德国和意大利已经有商业化的检测试剂盒, Butot 等^[26]对不同试剂盒的检测效率进行了评价, 但结果表明目前市场上存在的试剂盒对 GII 型诺如病毒检测较为高效, 而对于绝大多数的 GI 型诺如病毒均不能检出, 因此, 在实际运用时极易造成漏检, 目前还不适宜于大规模的推广应用。此外, 由于荧光定量 RT-PCR 的易污染性, 在运用实时 RT-PCR 对环境水体中诺如病毒污染进行筛查之后, 仍然需要通过常规的 RT-PCR 扩增, 之后进行测序验证, 才能最终确定。

3.3 依赖核酸序列的恒温扩增方法(NASBA, Nucleic acid sequence-based amplification)

NASBA 反应中由于引物加有 T7 启动子序列及不需要高温变性步骤, 所以外来的其它核酸不会被扩增, 大大降低了外源污染, 尤其适用于 RNA 的研究。而且相比于 RT-PCR, 整个反应过程所需的时间大大减少, 尤其对于基层缺乏配备齐全的专业分子实验室的检测部门非常适用。Rutje 等^[27]2006 年建立了具有广反应性的 NASBA

反应体系用来检测水源性诺如病毒,发现其灵敏度比 RT-PCR 方法更高,而且更重要的是,这种方法不受样品中存在的抑制物干扰。寇晓霞等^[28] 2006 年建立了可以用于临床感染 NoV 的腹泻样本及贝类样本检测的 NASBA 方法,该方法可同时区分 GI 和 GII 型病毒,而且省时高效,其灵敏度与 RT-PCR 相同甚至更高。以该方法检测临床样本和人工模拟污染贝类样本,检测限分别为 5 pg/mL 和 100 pg/1.5 g,该方法在仅以目标核酸为模板或高浓度的非特异性核酸存在的混合模板中,均可产生清晰的目标带,表现出高特异性。

3.4 分子检测中存在的问题

上述这些成熟的分子生物学实验手段为水体及环境中诺如病毒的监测和分子流行病学调查提供了强有力的技术保证。但是在检测中仍然存在一些问题,比如检测结果不能表明病毒是否具有活性。由于 NoV 基因的易变异性,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 NoV 株。鉴于此,能否将 PCR 方法用于水及其它食品质量控制还存在争论。目前唯一可选择的方法是可用抗体捕捉 PCR 法,其优点是用抗体可使病毒粒子活化,可以保证检测到的是活的病毒。用抗体捕捉 PCR 在人工播毒贝类中对甲肝病毒进行检测,不仅体现了 PCR 法的灵敏性,而且去除了 PCR 抑制物。这个方法同样可以用于其他肠道病毒,但对诺如病毒的发展仍然不够,还不能投入普遍应用。在水体中病毒检测的另一个关键是,各种复杂的成分给 PCR 带来的抑制而导致检测结果的假阴性。文献报道,氯仿、三氯三氟乙烷、氯仿丁醇、果胶酶等,能除去各种 PCR 抑制物,目前尚无定论哪种物质效果最好。

3.5 水源性诺如病毒研究发展方向

目前国内外对于水源性诺如病毒的绝大多数

研究仅局限于检测方法的建立,而对于诺如病毒在水体中的分布状况、变异规律、传播机制均没有系统的研究,比如在外环境因素的压力、胁迫下,诺如病毒在基因组水平究竟有没有发生变化,发生了什么样的变化,诺如病毒的进化机制究竟是什么等。究其根本原因在于目前缺乏稳定且标准化的检测方法,因此,高效、灵敏、特异的检测方法是开展水源性诺如病毒研究的技术基础。本文作者结合国内外现有的研究现状和自身团队从事的工作认为,目前对于水源性诺如病毒的研究应该首先着重于建立高效的样本前处理及标准化的检测方法;并在此基础上,进行水源性诺如病毒的污染调查,明晰其分布变化规律;同时收集诺如病毒株,鉴定分型并监测重组及变异株,从而掌握其基因多样性,确定水源性诺如病毒的主要流行型别并构建起基因组资源库。只有将上述各个方面做系统的研究,才可以为水源性诺如病毒研究提供全面的技术保障及信息基础。

4 水源性诺如病毒流行病学事件

近年来每年都有有关市政废水、河水、娱乐用水、甚至饮用水中诺如病毒检出的报道。还有多次的暴发病例和用污染的水清洗过的食物有关。在污染的食品中,贝类由于能从污染的水中富集病毒以及煮熟不彻底,常成为首要的危险食品。被病毒污染的水灌溉的蔬菜及水果也是主要污染食品,在美国空军军事学院曾有 1 500 名学生和工作人员受感染,而病情暴发的原因正是用了清除厨房下水管道软管中流出来的水浸泡过的芹菜所致^[29]。

对诺如病毒引起的胃肠炎流行病事件的原因进行分析表明,在我国诺如病毒胃肠炎暴发原因中,食品占 38.9%,水源污染占 22.2%,生活接触占 16.7%,原因不详占 22.2%,构成比例与美国

CDC 报道基本一致^[30]。在我国,近年来发生多起因饮用水或水源水污染而引起的诺如病毒感染事件,尤其是我国南方地区地处亚热带,适宜微生物生长和传播,容易引起水源性疾病的暴发。2010 年 12 月,广州从化发生一起因水污染引起的诺如病毒感染事件,429 名农民发病;随后的 12 月 27 日,在广东江门五邑大学发生 52 名学生集体感染诺如病毒;2011 年 2 月,广东阳江又发生 478 名学生集体感染诺如病毒的事件。2009 年,深圳宝安区发生两起大规模的水源性诺如病毒疫情^[31]。2008 年,杭州市余杭区境内发生一起由饮用被污染的桶装水引起的诺如病毒胃肠炎暴发疫情,有 7 所学校的 332 名学生感染^[32]。而以上几次诺如病毒感染事件的暴发流行均由于病毒直接或间接污染饮用水引起,但这些流行病学事件无一例外的都是在疫情发生后进行的报道,而在感染事件发生前,由于缺乏水体中病毒污染全面系统的监测数据,从而无法建立水中病毒完善系统的检测及控制的综合技术体系。但近两年来,国外已有一些学者逐渐将环境水体中诺如病毒的监测和筛查作为研究的重点,2011 年 Jones 等^[33]在意大利、德国、波兰、荷兰、西班牙和法国等多个国家采集的浴池水中发现诺如病毒的污染率达 9.4%;2010 年 Lee 等^[34]对韩国 71 个市政地下水点进行诺如病毒的监测结果发现,在夏季和冬季两个采样时期,分别有 28 个和 18 个采样点呈诺如病毒阳性,此项研究表明诺如病毒在韩国首尔地区的地下水污染非常严重。但是目前国内对于各种水体中诺如病毒污染状况的调查研究还较少。我们研究团队自 2006 年起就开展了以广东省为重点的南方四省(区)贝类中诺如病毒污染状况的调查研究,调查了珠江广州段广州市内河涌水中细菌及诺如病毒、轮状病毒、星状病毒和甲肝病毒指标污染状况和程度,其

中广州市河涌水中食源性病毒污染的总阳性率为 37.8%^[35]。

5 结语与展望

诺如病毒极易发生变异和重组,可导致全球流行^[36]。在 1995–2001 年间,基因变异株 95/96 US 曾在 7 个国家造成急性胃肠炎的流行^[37];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、台湾和香港都有引起疫情报道,且逐渐成为流行的优势株^[38–39]。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的要求。由于诺如病毒至今不能在实验室进行培养,致使很多研究者在研究过程中,碰到最大的问题就是缺乏阳性诺如病毒样品,没有实体的诺如病毒基因资源。因此,从环境样本中收集和分离阳性样本,构建诺如病毒的基因资源库,对解决阳性样品短缺,研究诺如病毒的重组变异规律、系统的了解病毒的变异情况和分子流行病学研究具有重要意义。此外,现今大多数应用 PCR 的检测研究报道仅限于在实验室进行,直接对环境中所取的样本进行检测的报道仍然很少。目前仅有美国、加拿大等极少数国家在其饮用水标准中对病毒作出明确规定,但发展趋势和意义不容忽视。随着水源污染形势的加剧,各国对饮用水水质的要求将越来越严格,微生物指标作为其中一个重要的方面,病毒指标的引入以及针对病毒消毒工艺的发展对饮用水标准的完善和保障各国人民健康具有重大意义。因此,进一步的研究重点应该放在具体的应用方面。开展更简便灵敏的食源性及水源性诺如病毒检测技术研究,并且在条件成熟时予以标准化,同时加强病毒人工培养研究,才能更有效预防和处理水源性及食源性诺如病毒引起的重大疫情爆发。

参 考 文 献

- [1] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature[J]. *Virology*, 2006, 346(2): 312–323.
- [2] Karst SM, Wobus CE, Lay M, et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus[J]. *Science*, 2003, 299(5612): 1575–1578.
- [3] Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection[J]. *Gastroenterology Clinics of North America*, 2006, 35(2): 275–290.
- [4] Schwab K. Waterborne gastroenteritis viruses[J]. *Perspectives in Medical Virology*, 2007, 17: 27–38.
- [5] Wyn-Jones P. The detection of waterborne viruses[J]. *Perspectives in Medical Virology*, 2007, 17: 177–204.
- [6] Wetz JJ, Lipp EK, Griffin DW, et al. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2004, 48(7/8): 698–704.
- [7] Block JC, Schwartzbrod L. *Viruses in Water Systems: Detection and Identification*[M]. New York: VCH Publishers, Inc, 1989.
- [8] 寇晓霞, 吴清平, 姚琳, 等. 水体中病毒浓缩方法及其条件优化[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(1): 25–30.
- [9] Victoria M, Guimãrs F, Fumian T, et al. Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 156(1/2): 73–76.
- [10] 梁莎, 谢广成, 徐子乾, 等. 环境水体中 GII 型诺如病毒浓缩研究[J]. *病毒学报*, 2011, 27(1): 58–63.
- [11] Ratcliff RM, Doherty JC, Higgins GD. Sensitive detection of RNA viruses associated with gastroenteritis by a hanging-drop single-tube nested reverse transcription-PCR method[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(11): 4091–4099.
- [12] Yuen LKW, Catton MG, Cox BJ, et al. Heminested multiplex reverse transcription-PCR for detection and differentiation of Norwalk-Like virus genogroups I and II in fecal samples[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(7): 2690–2694.
- [13] Tong HI, Connell C, Boehm AB, et al. Effective detection of human noroviruses in Hawaiian waters using enhanced RT-PCR methods[J]. *Water Research*, 2011, 45(18): 5837–5848.
- [14] Gregory JB, Webster LF, Griffith JF, et al. Improved detection and quantitation of norovirus from water[J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 172(1/2): 38–45.
- [15] 寇晓霞, 吴清平, 范宏英, 等. 水体中诺瓦克病毒 RT-PCR 检测研究[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 650–653.
- [16] Mohamed N, Belák S, Hedlund KO, et al. Experience from the development of a diagnostic single tube real-time PCR for human caliciviruses, Norovirus genogroups I and II[J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 132(1/2): 69–76.
- [17] Lodder WJ, de Roda Husman AM. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3): 1453–1461.
- [18] Westrell T, Teunis P, van den Berg H, et al. Short- and long-term variations of norovirus concentrations in the Meuse river during a 2-year study period[J]. *Water Research*, 2006, 40(14): 2613–2620.
- [19] Parshionikar SU, Willian-True S, Fout GS, et al. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a norovirus[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5263–5268.
- [20] Hoebe CJP, Vennema H, de Roda Husman AM, et al. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2004, 189(4): 699–705.
- [21] Lee C, Kim SJ. The genetic diversity of human noroviruses detected in river water in Korea[J]. *Water Research*, 2008, 42(17): 4477–4484.
- [22] 寇晓霞, 吴清平, 姚琳, 等. 四种食源性病毒多重反转录-聚合酶链反应检测研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(6): 590–593.

- [23] Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, et al. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(9): 4659–4664.
- [24] Pusch D, Oh DY, Wolf S, et al. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters[J]. *Archives of Virology*, 2005, 150(5): 929–947.
- [25] Laverick MA, Wyn-Jones AP, Carter MJ. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39(2): 127–136.
- [26] Butot S, Le Guyader FS, Krol J, et al. Evaluation of various real-time RT-PCR assays for the detection and quantitation of human norovirus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 167(1): 90–94.
- [27] Rutjes SA, van den Berg HHJL, Lodder WJ, et al. Real-time detection of noroviruses in surface water by use of a broadly reactive nucleic acid sequence-based amplification assay[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5349–5358.
- [28] Kou XX, Wu QP, Zhang JM, et al. Rapid detection of noroviruses in fecal samples and shellfish by nucleic acid sequence-based amplification[J]. *The Journal of Microbiology*, 2006, 44(4): 403–408.
- [29] Warner RD, Carr RW, McCleskey FK, et al. A large nontypical outbreak of Norwalk virus. Gastroenteritis associated with exposing celery to nonpotable water and with *Citrobacter freundii*[J]. *Archives of Internal Medicine*, 1991, 151(12): 2419–2424.
- [30] Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis[J]. *Disaster Management and Response*, 2004, 2(1): 4–9.
- [31] 肖锦晖, 雷蕾, 余光清, 等. 水及水产品诺如病毒快速检测技术研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(6): 1324–1326.
- [32] 赵金锁. 一起由桶装饮用水引起诺如病毒胃肠炎暴发调查分析[J]. *中国农村卫生事业管理*, 2010, 30(11): 960–962.
- [33] Wyn-Jones P, Carducci A, Cook N, et al. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters[J]. *Water Research*, 2011, 45(3): 1025–1038.
- [34] Lee H, Kim M, Lee JE, et al. Investigation of norovirus occurrence in groundwater in metropolitan Seoul, Korea[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(11): 2078–2084.
- [35] 寇晓霞. 水体和贝类中食源性病毒分子检测研究及污染调查[D]. 武汉: 中国科学院武汉病毒研究所博士学位论文, 2007.
- [36] Lindell A T, Grillner L, Svensson L, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in Stockholm, Sweden, during the years 2000 to 2003: association of the GGIIb genetic cluster with infection in children[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(3): 1086–1092.
- [37] Reuter G, Vennema H, Koopmans M, et al. Epidemic spread of recombinant noroviruses with four capsid types in Hungary[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2006, 35(1): 84–88.
- [38] O'Neill HJ, McCaughey C, Coyle PV, et al. Clinical utility of nested multiplex RT-PCR for group F adenovirus, rotavirus and norwalk-like viruses in acute viral gastroenteritis in children and adults[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2002, 25(3): 335–343.
- [39] Lau CS, Wong DA, Tong LKL, et al. High rate and changing molecular epidemiology pattern of norovirus infections in sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis in Hong[J]. *Journal of Medical Virology*, 2004, 73(1): 113–117.