

诺如病毒活病毒鉴别技术研究进展

高世珏¹ 陈嘉茵¹ 李晖² 吴希阳¹

¹暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广州 510632; ²广东省疾病预防控制中心病原微生物检验所, 广州 511430

通信作者: 吴希阳, Email: tkentwu@jnu.edu.cn, 电话: 020-85220225

【摘要】 诺如病毒(Noroviruses, NoVs)作为引起非细菌性肠胃炎的主要病原体之一,在全球范围内可造成严重的公共卫生问题与经济损失,近年来我国由该病毒引起的疫情也呈上升趋势。由于人 NoVs 的体外培养极其困难,现有的国家与国际检测标准均以无法分辨其死活的实时荧光-逆转录-聚合酶链式反应(Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-qPCR)扩增核酸的结果为依据,因此活病毒的确证一直是 NoVs 检测的瓶颈,严重影响食品安全的危害分析、风险评估和决策制定。本文从体内和体外培养模型、病毒基因组以及衣壳蛋白完整性 3 个方面切入,重点综述并讨论了近年来 NoVs 活病毒鉴别技术的研究进展及特点,同时对该技术的未来发展趋势进行展望。旨在进一步提高 NoVs 定量检测的精准性并为其在食品安全检测领域中的应用提供理论依据。

【关键词】 诺如病毒;活病毒;鉴别;组织-血型抗原;核酸嵌入剂

基金项目: 广东省科技计划项目(2015A030401042, 2015A050502030);广州市科技计划项目(201704030096)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.05.023

Research progress in the application of identification technology for infectious Norovirus

Gao Shijue¹, Chen Jiayin¹, Li Hui², Wu Xiyang¹

¹Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²Institute of Pathogenic Microorganism, Guangdong Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, China
Corresponding author: Wu Xiyang, Email: tkentwu@jnu.edu.cn, Tel: 0086-020-85220225

【Abstract】 Norovirus, as one of the main pathogens causing non-bacterial gastroenteritis, can cause serious public health problems and economic losses around the world. In recent years, the outbreaks caused by the virus in China are on the rise. Human Norovirus (HuNoV) can hardly be cultivated in-vitro. The nucleic acid detection method (such as RT-qPCR) has the highest sensitivity and specificity, but it was not established that the correlation between the detected viral genome and viral infectivity, which leads to inaccurate judgment of safety risks. Here, the in-vitro and in-vivo culture models, viral genome integrity and capsid protein integrity were cut into three aspects. The research progress and characteristics of infectious Norovirus identification technology in recent years were reviewed and discussed, and the future development trend of this technology was prospected. The aim is to further improve the accuracy of Norovirus quantitative detection and provide a theoretical basis for its application in the field of food safety testing.

【Key words】 Norovirus; Infectivity; Identification; Histo-blood group antigen; Nucleic acid intercalator

Fund programs: Guangdong Science and Technology Plan Project (2015A030401042, 2015A050502030); Guangzhou Science and Technology Plan Project(201704030096)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.05.023

诺如病毒(Noroviruses, NoVs)作为一种常见的非细菌性急性肠胃炎病原体,常在全球范围内导致食源性疾病的暴发。近年来,随着生物信息学与分子生物技术的蓬勃发展,人们对 NoVs 的研究逐渐深入至基因组、蛋白结构以及人体免疫机制等方面,为更好

地防控 NoVs 的传播,灵敏、特异的快速检测手段也被相继建立。其中,实时荧光-逆转录-聚合酶链式反应(Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-qPCR)技术具有灵敏度高、特异性强且操作简便的特性,已成为国内外快速检测 NoVs 的

标准方法。但是 RT-qPCR 技术可同时扩增病毒中的游离 RNA、部分受损或降解的 RNA 以及受损衣壳中的 RNA,其无法真正区分 NoVs 的死活从而导致活病毒检出率偏高^[1]。许多研究已经证实, NoVs 仅依靠少数具有感染活性的颗粒即可诱发肠胃炎,在食物或环境中留存的病毒基因组稳定性也远高于其相应的具有感染能力的活病毒^[2]。因此,优化检测方法以预测食物或环境中活 NoVs 数量对人类健康风险评估具有重要意义。本文通过总结 NoVs 活病毒鉴别技术的最新研究进展,以期为进一步创新研发新技术提供思路,使其能更好地应用于 NoVs 检测领域。

1 NoVs 活病毒鉴别技术

近年来体内或体外培养技术不断创新,但就目前而言,该技术在活 NoVs 鉴别领域中的应用依然受限且急需改进。为寻求突破,人们深入分子领域逐步开发出了一系列依赖于病毒基因组及衣壳蛋白完整性的鉴别技术,其在 NoVs 精准快速检测中具有更为广阔的应用前景。

1.1 基于体内或体外培养模型鉴别 NoVs 活病毒的检测技术

迄今为止,运用体外分离培养技术区分人 NoVs (human norovirus, HuNoV) 的死活仍未取得突破性进展,其关键原因是 HuNoV 难以实现体外培养。例如 2014 年 Jones 等^[3]首次报道了人类 B 细胞系可作为 HuNoV 的宿主实现病毒复制,但由于该培养体系的复制效率低且对无菌操作具有较高要求等原因而极大限制了它的应用。2016 年, Ettayebi 等^[4]从人肠道干细胞分化的肠道模拟体系中成功复制出 HuNoV,但肠道组织来源有限、检测成本高、培养时间长等缺陷仍阻碍了此方法在 NoVs 常规检测中的应用。此外,利用动物模型来探讨 NoVs 生物学特性的研究也从未间断。然而,大多数动物模型感染 NoVs 后很少出现严重的临床症状以至于观察困难,加之该模型建立成本高且常受到伦理道德的制约,因而此方法的应用局限性大。由于 HuNoV 缺乏可靠的体外分离培养模型及动物模型,使用可体外培养的 HuNoV 替代模型来预测 HuNoV 感染能力已成为近年来较为热门的研究课题。如鼠 NoVs (Murine norovirus, MNV)^[5]、猫杯状病毒 (Feline Calicivirus, FCV)^[6]、杜兰病毒 (Tulane virus, TV)^[7] 及 F-特异性 RNA 噬菌体 (F-specific RNA Bacteriophages)^[8] 等已作为 HuNoV 的替代模型被广

泛使用。但由于 HuNoV 替代模型的致病机制、宿主细胞及暴露于不同环境压力或消毒剂时所表现出的特性与 HuNoV 仍存在差异,使得 HuNoV 替代模型的结果无法完全应用于 HuNoV。

1.2 基于基因组完整性鉴别 NoVs 活病毒的检测技术

在早期人们就建立了基于分子水平鉴别活病毒的检测手段,该法是通过分析核酸扩增过程中所标靶的短或长基因区域内是否有完整基因组或可扩增的未损伤基因区域的存在来实现的。然而通过标靶短基因片段分析基因损伤并不能准确区分病毒死活,原因之一是衣壳蛋白破损后游离的病毒 RNA 可被后续核酸扩增过程所检测;其次是即使病毒基因组发生断裂后丧失感染活性,若扩增的目标区域保持完整也不能通过 RT-PCR 检测到其他的基因损伤,进而导致假阳性的出现。因此,标靶长基因区域确定使病毒感染能力下降或丧失的基因损伤从而区分病毒死活的方法被逐步建立起来。Simonet 等^[9]运用 Poly T 引物逆转录出 Poliovirus 1 的 cDNA 后再通过 PCR 扩增包含 5' NTR 在内的长基因片段 (6.989 Kb),结果显示经 5 mg/L ClO₂ 处理 30 min 后的 Poliovirus 1 基因滴度可下降 >3.5 log₁₀, 相比于 3C 样蛋白 (0.076 Kb, 基因滴度下降 1.2 log₁₀) 及 5' NTR (0.145 Kb, 基因滴度下降 1.6 log₁₀) 短标靶区域,长基因靶向具有更为显著的基因滴度下降优势。此外,该研究还发现长基因区域标靶的检测灵敏度与其所在位置有关,当包含最易受 ClO₂ 降解的 5' NTR 时可降低死病毒的阳性检出率,但仍可能低估样品中的活病毒数量且灵敏度 (<4.0 log₁₀) 较低。2011 年, Pecson 等^[10]通过设计 6 对 RT-PCR 引物对 F-specific RNA Bacteriophage MS2 经 UV₂₅₄ 照射后的基因受损情况进行了评估,结果表明该种基于多个小片段 (<320 bp) PCR 扩增来量化整个基因组损伤的多靶点检测方法对能引起病毒基因组任何区域都可能发生随机损伤的灭活方式 (如 UV₂₅₄ 处理) 较为适用,同时随着扩增标靶长度越接近于基因组全长,基因滴度的减少 (8.1 log₁₀) 将越接近于基因组损伤所造成的病毒感染滴度降低 (8.6 log₁₀) 的结果。

1.3 基于衣壳蛋白完整性鉴别 NoVs 活病毒的检测技术

1.3.1 配体捕获 NoVs-核酸扩增:

由于 NoVs 特异性抗体与破损衣壳蛋白亲和力弱,因此抗体在免疫吸附过程中能去除部分不具有感染活性的病毒。Park 等^[11]利用 G I.1、G II.4 型 HuNoV 衣壳蛋白多

克隆抗体磁珠结合 RT-qPCR 技术成功定量检测了人工污染草莓中的 HuNoV, 研究发现检测灵敏度 (7.07 拷贝) 依赖于能够与病毒有效结合的多克隆抗体种类与数量, 这与不同基因型的 NoVs 抗原性差异较大有关。在抗体特异性捕获 NoVs 的过程中, 确定抗原-抗体结合位点是整个过程的关键所在。若结合位点不参与感染过程, 则 NoVs 感染能力的丧失可能不一定与抗体捕获能力的丧失相对应^[12]。就 HuNoV 而言, 其侵染细胞的特异性受体及辅助因子目前均尚未确定; 其次, 仍有许多抗体存在靶序列结合特性, 这使之能够与丧失感染活性病毒的变性衣壳蛋白相结合。以上缺陷均表明, 基于抗体捕获鉴别活 NoVs 的方法仍需进一步研究与优化。

人们在利用病毒样颗粒 (virus like particles, VLPs) 研究 NoVs 免疫原性及受体结合特性时发现其可特异性结合多种糖复合物 (如表 1), 例如人类组织-血型抗原 (HBGAs) 能以某种方式在 HuNoV 及 TV 侵染宿主的过程中起到关键作用, 而 MNV 则能与神经节苷脂 (GD1a) 上的唾液酸表位发生特异性识别。Leon 等^[13] 通过人体试验证明, 接种了 10^4 基因拷贝数 HuNoV G I .1 的牡蛎样品经 400 MPa 超高压处理后, 其感染率可降低至 21%, 而经 600 MPa 超高压处理则能达到完全灭活的效果。为证明 PGM-RT-qPCR 检测方法的可行性, Ye 等^[14] 采用与

之完全相同的实验条件处理牡蛎样品并利用 PGM 偶联磁珠 (PGM-MB) 捕获 HuNoV G I .1 与 G II .4 后进行 RT-qPCR 分析, 结果表明此方法的活病毒检出率与 Leon 等^[13] 研究结论显著相关, 且在 PGM-MB 捕获前使用 RNase 处理样品可极大提高结果准确度。但 Li 等^[15] 研究发现, 病毒处于一定压力 (200~450 MPa) 条件时, 衣壳蛋白中的非特异性结合位点遭到破坏即能丧失感染活性, 而未被破坏的特异性结合位点仍可与 PGM 结合, 这部分在受损衣壳保护下的 RNA 可被后续核酸扩增所检测进而导致病毒滴度的减少量不发生变化。Dancho 等^[16] 用高剂量紫外线 (1-2 mJ/cm² UV₂₅₄) 辐照 HuNoV G I .1 样品后通过 PGM-MB 捕获-RT-qPCR 检测所得的假阳性检出率却大幅度提升, 这也进一步说明超高压可使病毒衣壳蛋白解离或变性, 其不同于可对核酸造成直接损伤的 UV₂₅₄ 辐照。Wang 等^[17] 通过改进 HBGAs 共轭磁珠捕获 NoVs 的方法, 开发出了一种更为高效灵敏的酶联免疫吸附-PCR 杂交反应技术 (ISC), 证明了 ISC 能较为准确地预测暴露于热、氯和乙醇后病毒感染能力的丧失情况, 但对于 UV₂₅₄ 造成损伤的结果预测并不理想。由于 HuNoV 可有效结合分化的 Caco-2 细胞, Li 等^[18] 首次运用该特性报道了 Caco-2 细胞捕获-RT-qPCR 技术鉴别活 NoVs 的能力, 并证明病毒的非特异性结合是糖复合物捕获-核酸扩增技术的主要干扰因素。

表 1 基于糖复合物捕获-RT-qPCR 鉴定诺如病毒活病毒技术比较

Tab.1 Comparison of infectious norovirus identification techniques based on carbohydrate complex capture-RT-qPCR

捕获方式	检测对象	灭活方式	基因滴度减少量	感染滴度减少量	参考文献	
PGM-MB	HuNoV G I .1	300-600 MPa	0.45-4.7 log ₁₀	/	Dancho 等 ^[16]	
	TV	1-2 mJ/cm ² UV ₂₅₄	1.8-3.8 log ₁₀	/		
	MNV-1	64-72 °C	0.9-3.1 log ₁₀	/		
			100-200 MPa	0-2.0 log ₁₀	0-2.0 log ₁₀	Li 等 ^[15]
			200-300 MPa	2.0 log ₁₀	2.0-3.5 log ₁₀	
		250-350 MPa	0-1.5 log ₁₀	0-1.5 log ₁₀		
		350-450 MPa	1.5-2.0 log ₁₀	2.0-5.5 log ₁₀		
RNase- PGM-MB	HuNoV G I .1	300-600 MPa	0.4-1.3 log ₁₀	/	Ye 等 ^[14]	
	HuNoV G II .4	100-600 MPa	1.7->4.0 log ₁₀	/		
	HuNoV G I .1		0.3->3.0 log ₁₀	/	Sido 等 ^[19]	
	HuNoV G II .4		1.0->3.8 log ₁₀	/		
人唾液 HBGAs (ISC)	TV	56 °C	97.6%	84.2%	Wang 等 ^[17]	
		300 ppm 氯	99.4%	99.7%		
		40%乙醇	94.8%	81.9%		
		30 mJ/cm ² UV ₂₅₄	57.6%	99.8%		
GD1a	MNV-1	2.1% H ₂ O ₂	≤0.5 log ₁₀	6.0 log ₁₀		
RAW 264.7	HuNoV G I .8	70 °C	≤0.5 log ₁₀	6.0 log ₁₀	Li 等 ^[18]	
PGM	HuNoV G II .4	2.1% H ₂ O ₂	>1 log ₁₀	/		
Caco-2		70 °C	>1 log ₁₀	/		

2015 年, Moore 等^[20]利用指数富集的配体系统进化技术筛选并纯化了 G II.4 型 NoVs P 结构域的核酸适配体(Aptamer) M6-2。Moore 等^[1]通过评估单克隆抗体 NS14、核酸适配体 M6-2 及多糖复合物 HBGAs 捕获经热处理后 HuNoV G II.4 的能力证明, M6-2 仅结合完整的靶蛋白并显示出高度的构象依赖性;相比于单克隆抗体 NS14(26.4%±3.9%), M6-2(2.0%±1.3%)及 HBGAs(0.5%±1.2%)具有相似的且较小的靶序列依赖性。尽管核酸适配体在许多方面优于传统配体,但仍存在一些缺陷,如对缓冲条件的高灵敏度和对阳离子基质组分可能存在非特异性结合。除此之外,核酸适配体捕获 NoVs 的研究仍局限于热处理,而对经其他灭活处理后的捕获能力还未进行评价,因此基于核酸适配体捕获鉴别 NoVs 活病毒的技术还需进一步完善与开发。

1.3.2 生物试剂预处理-核酸扩增:由于 RNA 受热后可形成不易被 RNase 降解的 RNA-蛋白质复合物(RNA-protein complexes, RNP),因此 RNase 单独预处理病毒并不能有效消除 RT-PCR 的假阳性信号,这导致 RNase-RT-PCR 技术在活病毒鉴别领域的应用与发展受限^[21]。2002 年, Nuanualsuwan 等^[22]首次在该技术体系的基础上引入 Proteinase K,利用该酶对破损衣壳蛋白具有高亲和力的特性极大克服了上述问题的出现。Pecson 等^[23]在应用此方法的基础上,利用能覆盖全基因组的 12 组引物对 RNA 进行 RT-qPCR 扩增后成功评价了 Bacteriophage MS2 经 72 °C 加热、单线态氧及 UV₂₅₄ 处理后的死活情况。二者研究表明,相比于单独使用 RNase A, Proteinase K 与 RNase A 的联用可有效降低(高达 5.2 log₁₀)但不能完全消除 RT-qPCR 的假阳性信号^[22-23]。在应用 MNV-1 研究复合酶预处理-RT-qPCR 技术降低假阳性检出率的效果时发现,超高压处理(2.15±0.06 log₁₀)相比于加热(0.56±0.05 log₁₀)及 UV₂₅₄(0.37±0.02 log₁₀)处理所减少的 RT-qPCR 信号更显著,但 3 种不同灭活方式的复合酶预处理-RT-qPCR 结果与其相对应的 TCID₅₀ 试验结果(3.54->6 log₁₀)相差较大^[24]。近年来,研究者们开始尝试将复合酶预处理与恒温扩增技术相结合,例如利用复合酶预处理与实时核酸序列依赖性扩增技术(nuclear acid sequence-based amplification, NASBA)相结合可用于检测评估临床样本中的 HuNoV G II,此法(阳性检出率 88.54%)相比于普通 RT-PCR(阳性检出率 86.46%)及 RT-qPCR(阳性检出率 81.25%)具有更

好的降低假阳性检出率的效果^[25]。

目前除运用酶进行样品预处理以区分 NoVs 死活的方法被频繁报道外,通过叠氮溴化乙锭(Ethidium monoazide, EMA)、叠氮溴化丙锭(Propidium monoazide, PMA)及 PMA_{xx} 等核酸嵌入剂更为高效快速地鉴别 NoVs 活病毒的技术也是近年的研究热点。利用核酸嵌入剂预处理-核酸扩增技术已成功定量了 Poliovirus 1^[26]、MNV-1^[27]及 HuNoV 等^[28]等经超高压、UV₂₅₄ 辐照及氯等多种灭活方式处理后的活病毒数量。此外,将核酸嵌入剂与表面活性剂联用可增强核酸嵌入剂的使用效果,例如 PMA 与 0.5% Triton X-100 联用时可在含有 6×10⁴ TCID₅₀ 接种量甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)的热处理蔬菜样品中完全避免 RT-qPCR 假阳性信号(基因滴度下降>3.4 log₁₀)的产生,但其并不适用于贝类浓缩液等基质更为复杂的样品检测^[29]。2018 年, Fraisse 等^[28]对 PtCl₄ 预处理-RT-qPCR 技术进行了较为全面的评估,通过对比 PtCl₄ 与其他类型核酸嵌入剂预处理效果后不仅证明 PtCl₄ 无须经过光活化步骤可极大缩短检测时间,其在降低假阳性信号方面也具有比其他核酸嵌入剂更为突出的性能。然而, PtCl₄ 与表面活性剂联用进行预处理时将不表现与其他核酸嵌入剂相似的增强特性^[28]。随后, Randazzo 等^[30]也应用 PtCl₄ 预处理-RT-qPCR 技术成功量化了经热或超高压处理后的感染性戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)。尽管基于核酸嵌入剂鉴别活病毒的技术较为简便有效,但核酸嵌入剂需要结合双链区域而 NoVs RNA 多为单链,同时根据其高度保守的二级结构域设计引物与探针时难度较大。

1.3.3 生物素标记-核酸扩增:2010 年 Sano 等^[31]以 Astrovirus 作为 HuNoV 的替代模型进行研究,将其衣壳蛋白上因氧化应激损伤产生的羰基通过生物素标记后再利用抗生物素蛋白凝胶柱实现了受损(生物素化)与完整(非生物素化)病毒颗粒的分离,该实验证明经 0.05~0.5 ppm 游离氯处理 5~15 min 后造成 Astrovirus 的羰基积累量(29.8%~54.7%)与其噬菌斑试验结果(感染滴度减少量 0.43~2.53 log₁₀)显著相关。在经 1.0 ppm 游离氯处理 5~15 min 后的 HuNoV G II.4 上运用该技术(生物素化病毒回收率 21.4%~49.9%)后也表现出比长基因区域靶向核酸扩增(基因滴度减少量 2.03~2.27 log₁₀)更为优越的鉴别活病毒能力。但其作为一种

表 2 诺如病毒活病毒鉴别技术总结

Tab.2 Summary of infectious norovirus identification techniques

鉴别技术	分析方法	优点	缺点
基于体内和体外培养模型鉴别	细胞模型 动物模型 HuNoV 替代病毒模型	可直观呈现结果、适用于多种灭活方式	无菌操作要求高、耗费时间长 受伦理道德制约 检测结果不能完全应用于 HuNoV
基于基因组完整性鉴别	标靶短或长基因区域核酸扩增	检测速度快、操作简单	假阳性高、灵敏度低
基于衣壳蛋白完整性鉴别	配体捕获-核酸扩增 抗体捕获-核酸扩增 糖复合物捕获-核酸扩增 核酸适配体捕获-核酸扩增 生物试剂预处理-核酸扩增 酶预处理-核酸扩增 核酸嵌入剂预处理-核酸扩增 生物素标记-核酸扩增	灵敏、检测成本低 操作简单、检测速度快 灵敏、特异性高 操作简单、检测速度快 灵敏、高效	假阳性高 存在非特异性结合 仅限于对热灭活方式的评价阶段 酶消化难以控制 引物与探针设计难度高 仅限于对可造成衣壳氧化应激损伤的药剂的评价阶段

新兴技术,该方法目前仅限于对可造成病毒衣壳蛋白氧化应激损伤的药剂的研究阶段,因此还需对不同灭活方法进行更为全面地验证。

2 总结与展望

NoVs 的精准定量检测技术是预防感染与保障食品安全的重要前提,表 2 就上述应用于 NoVs 活病毒鉴别方面的技术进行了对比总结。未来, NoVs 活病毒鉴别技术的研究还可从以下几个方面深入: (1) 在现有技术的基础上优化检测水平使之更适用于复杂样品的检验; (2) 综合使用检测方法并评估鉴别能力,从中筛选出适用范围广、效率精度高及抗干扰能力强的鉴别方式; (3) 将现有技术与其他先进核酸扩增技术联用,如 NASBA、RPA 等核酸等温扩增技术,以缩短检测周期、提高特异性与灵敏度,同时使之更适用于野外现场检测。此外, NoVs 死活鉴别技术的未来发展方向还应迎合食品安全检测的要求,实现高效率、低成本的方式进行在线监控,使检测朝着微型化、便携化以及智能化的方向发展。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 高世珏:文献收集、论文撰写、论文修改;陈嘉茵、李晖、吴希阳:论文指导、经费支持

参考文献

[1] Moore MD, Bobay BG, Mertens B, et al. Human norovirus aptamer exhibits high degree of target conformation-dependent binding similar to that of receptors and discriminates particle functionality[J]. Msphere, 2016,1(6):e216-e298.
[2] Cook N, Knight A, Richards G P. Persistence and elimination of human norovirus in food and on food contact surfaces: a critical review[J]. J Food Prot, 2016, 79 (7): 1273-1294. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-570.

[3] Jones MK, Makiko W, Shu Z, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells[J]. Science, 2014,346(6210):755-759.
[4] Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids[J]. Science, 2016, 353 (6306): 1387-1393. DOI: 10.1126/science.aaf5211.
[5] Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis[J]. J Virol, 2006,80 (11):5104.
[6] Liu D, Deng J, Joshi S, et al. Monomeric catechin and dimeric procyanidin B2 against human norovirus surrogates and their physicochemical interactions[J]. Food Microbiol, 2018,76:346-353. DOI:10.1016/j.fm.2018.06.009.
[7] Li X, Ye M, Neetoo H, et al. Pressure inactivation of Tulane virus, a candidate surrogate for human norovirus and its potential application in food industry[J]. Int J Food Microbiol, 2013,162 (1):37-42. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.016.
[8] Kniel KE. The makings of a good human norovirus surrogate[J]. Curr Opin Virol, 2014, 4: 85-90. DOI: 10.1016/j.coviro.2014.01.002.
[9] Simonet J, Gantzer C. Degradation of the Poliovirus 1 genome by chlorine dioxide[J]. J Appl Microbiol, 2006,100(4):862-870.
[10] Pecson BM, Ackermann M, Kohn T. Framework for using quantitative PCR as a nonculture based method to estimate virus infectivity[J]. Environ Sci Technol, 2011,45 (6):2257-2263. DOI:10.1021/es103488e.
[11] Park Y, Cho YH, Jee Y, et al. Immunomagnetic separation combined with real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of norovirus in contaminated food[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74 (13): 4226-4230. DOI: 10.1128/AEM.00013-08.Epub 2008 Apr 25.
[12] Nuanualsuwan S, Cliver DO. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus[J]. Appl Environ Microbiol, 2003,69(1):350.
[13] Leon JS, Kingsley DH, Montes JS, et al. Randomized, double-blinded clinical trial for human norovirus inactivation in oysters by high hydrostatic pressure processing [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77 (15): 5476-5482. DOI: 10.1128/AEM.02801-10.
[14] Ye M, Li X, Kingsley DH, et al. Inactivation of human norovirus

- in contaminated oysters and clams by high hydrostatic pressure [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80 (7):2248-2253. DOI: 10.1128/AEM.04260-13.
- [15] Li X, Chen H. Evaluation of the porcine gastric mucin binding assay for high-pressure-inactivation studies using murine norovirus and tulane virus[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81 (2):515-521. DOI:10.1128/AEM.02971-14.
- [16] Dancho B A, Chen H, Kingsley D H. Discrimination between infectious and non-infectious human norovirus using porcine gastric mucin[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 155(3):222-226. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.010.
- [17] Wang D, Xu S, Yang D, et al. New in situ capture quantitative (Real-Time) reverse transcription-pcr method as an alternative approach for determining inactivation of tulane virus[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80 (7):2120-2124. DOI:10.1128/AEM.04036-13.
- [18] Li D, Baert L, Van Coillie E, et al. Critical studies on binding-based RT-PCR detection of infectious Noroviruses [J]. *J Virol Methods*, 2011, 177 (2):153-159. DOI:10.1016/j.jviromet.2011.07.013.
- [19] Sido R F, Huang R, Liu C, et al. High hydrostatic pressure inactivation of murine norovirus and human noroviruses on green onions and in salsa[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 242;1-6. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.003.
- [20] Moore M D, Escudero-Abarca B I, Suh S H, et al. Generation and characterization of nucleic acid aptamers targeting the capsid P domain of a human norovirus GI.4 strain[J]. *J Biotechnol*, 2015, 209;41-49. DOI:10.1016/j.jbiotec.2015.06.389.
- [21] Mcgregor S, Mayer H D. Biophysical studies on rhinovirus and poliovirus. I. Morphology of viral ribonucleoprotein[J]. *J Virol*, 1968, 2(2):149.
- [22] Nuannualsuwan S, Cliver D O. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses[J]. *J Virol Methods*, 2002, 104(2):217-225.
- [23] Pecson B M, Martin L V, Kohn T. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(17):5544-5554. DOI:10.1128/AEM.00425-09.
- [24] Diezvalcarce M, Kovač K, Raspor P, et al. Virus genome quantification does not predict norovirus infectivity after application of food inactivation processing technologies[J]. *Food Environ Virol*, 2011, 3(3-4):141-146.
- [25] Lamhoujeb S, Charest H, Fliss I, et al. Real-time molecular beacon NASBA for rapid and sensitive detection of norovirus GI in clinical samples[J]. *Can J Microbiol*, 2009, 55(12):1375-1380. DOI:10.1139/W09-105.
- [26] Parshionikar S, Laseke I, Fout G S. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76 (13):4318-4326. DOI:10.1128/AEM.02800-09.
- [27] Kim S Y, Ko G. Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2012, 55(3):182-188. DOI:10.1111/j.1472-765X.2012.03276.x.
- [28] Fraisse A, Niveau F, Hennechart-Collette C, et al. Discrimination of infectious and heat-treated norovirus by combining platinum compounds and real-time RT-PCR[J]. *Int J Food Microbiol*, 2018, 269;64-74. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.015.
- [29] Moreno L, Aznar R, Sanchez G. Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis A virus in food samples [J]. *Int J Food Microbiol*, 2015, 201;1-6. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.012.
- [30] Randazzo W, Vasquez-Garcia A, Aznar R, et al. Viability RT-qPCR to distinguish between HEV and HAV with intact and altered capsids [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9:1973. DOI:10.3389/fmicb.2018.01973.
- [31] Sano D, Pinto R M, Omura T, et al. Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus [J]. *Environ Sci Technol*, 2010, 44(2):808-812. DOI:10.1021/es9018964.

(收稿日期:2019-04-06)

(本文编辑:吕新军)