·检验技术·

海水中诺如病毒富集与活病毒检测技术优化

李东蔚[1,2]，明红霞[1]，李嘉劼[3]，林建楠[1,4]，樊景凤[1]

1. 国家海洋环境监测中心 国家生态环境保护近岸海域生态环境重点实验室，大连 116023；
2. 传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所，北京 100052；
3. 悉尼大学理学院，悉尼 2007；
4. 上海海洋大学海洋生态与环境学院，上海 201306
通信作者：明红霞，E-mail：hxming@nmemc.org.cn；樊景凤，E-mail：jffan@nmemc.org.cn

【摘　要】目的　建立并优化一种针对贝类增养殖区海水样本的简单高效的诺如病毒富集和检测技术，以应对全球性食品安全隐患，并满足传染病精准防控的需求。**方法**　以鼠诺如病毒为实验对象，采用基于纳米氧化铝陶瓷滤芯的富集技术，结合新型叠氮溴化丙啶（PMAxx）核酸染色剂和实时定量 PCR（PMAxx-qPCR）技术检测活病毒。首先使用滤芯膜富集病毒，通过 Tralk 洗脱液初步浓缩，再利用 PEG 沉淀法二次浓缩。评价并比较本实验与传统的细胞培养技术检测效果。**结果**　本富集方法在浓缩体积 5 000 倍的情况下，回收率可达到 3.24%；PMAxx 染色剂浓度 50 μmol，避光孵育 15 min、光照 10 min 后进行实时定量 PCR 扩增，检测诺如病毒活病毒效果最佳。**结论**　本文建立并优化的诺如病毒富集和检测方法，显著提高了诺如病毒的回收率和检测准确性，对提升食品安全检测水平和传染病防控具有重要意义。

【关键词】 病毒富集；鼠诺如病毒；海水；叠氮溴化丙核酸染色剂；病毒活性检测；RT-qPCR

Optimization of norovirus concentration and infectivity detection methods in seawater

LI Dongwei[1,2], MING Hongxia[1], LI Jiajie[3], LIN Jiannan[1,4], FAN Jingfeng[1] (*1. State Environmental Protection Key Laboratory of Coastal Ecosystem*, *National Marine Environmental Monitoring Center*, *Dalian* 116023, *China*; *2. National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases*, *National Institute for Viral Disease Control and Prevention*, *Chinese Center for Disease Control and Prevention*, *Beijing* 100052, *China*; *3. Faculty of Science*, *University of Sydney*, *Sydney* 2007; *4. College of Marine Ecology and Environment*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*)
Corresponding authors: MING Hongxia, E-mail: hxming@nmemc.org.cn; FAN Jingfeng, E-mail: jffan@nmemc.org.cn

【Abstract】 **Objective** To establish and optimize a simple and efficient norovirus concentration and detection technique for seawater samples from shellfish farming areas to address global food safety hazards and meet the needs of precise infectious disease prevention and control. **Methods** Using murine norovirus as the experimental subject, a nano-alumina ceramic filter-based enrichment technique was combined with a novel azido bromide propidium (PMAxx) nucleic acid dye and real-time quantitative PCR (PMAxx-qPCR) to detect viable viruses. Viruses were first enriched using a filter membrane, initially concentrated with Tralk eluent, and then further concentrated using PEG precipitation. The detection efficacy of this method was evaluated and compared with traditional cell culture techniques. **Results** With a 5 000-fold concentration, the recovery rate of this enrichment method reached 3.24%. Optimal detection of viable norovirus was achieved with a PMAxx dye concentration of 50 μmol, followed by 15 minutes of incubation in the dark, 10 minutes of light exposure, and then real-time quantitative PCR amplification. **Conclusions** The norovirus concentration and detection method established and optimized in this study significantly improved the recovery rate and detection accuracy of norovirus, which is of great significance for improving food safety testing and infectious disease prevention and control.

【Keywords】 virus concentration; murine norovirus; seawater; propidium monoazide; virus viability assessment; RT-qPCR

诺如病毒是人类杯状病毒科（human calicivirus，HuCV）中诺如病毒属（*Norovirus*，NV）的一种无包膜单股正链 RNA 病毒，同时也是全球急性胃肠炎的最重要病因之一[1]，常在幼儿、老年人和免疫功能低下的人群中出现重症[2]。在世界范围内，每年约有 7 万～20 万名儿童死于诺如病毒感染，其中大部分疫情主要发生在发展中国家[3-4]。诺如病毒是美国、英国、澳大利亚、日本、中国等国家食源性病毒安全事故或突发公共卫生事件的主要病原体[5-10]，随生活污水进入近岸海洋环境，贝类是其重要的传播载体，其可通过滤食将其富集在体内。由贝类传播的诺如病毒疾病已成

开放获取：CC BY-NC-ND 4.0 DOI：10.11847/zgggws1146003
基金项目：辽宁省科学技术计划（2021JH2）
第一作者：李东蔚（1996—），博士在读，研究方向：海洋环境生态学、病原生物学。
收稿日期：2024-04-10　修回日期：2025-01-14　录用日期：2025-02-17
利益冲突：不存在　伦理审查：免除审查　出版授权：全体作者已与编辑部签署作者贡献声明及版权转让协议

为重要的公众健康问题。检测海水中诺如病毒的污染是疾病防控的重要手段。由于海水中诺如病毒含量较低且活性状态复杂，不仅需要高效的富集技术，还需要灵敏高效的活病毒筛选方法。然而，目前海水中病毒的主要富集技术，如膜吸附全身洗脱法[11]、絮凝沉淀法[12]、超速离心法[13] 等，存在样品富集倍数小、操作难度大、实验时间长等问题[14–17]。富集后病毒检测一直以逆转录–实时荧光聚合酶链式反应作为“金标准”，但无法有效区分具有感染能力的活病毒与对人体无害的死病毒颗粒，因而通常会高估活病毒数量并造成严重的假阳性检测结果。虽然近年来研发的 RT-ddPCR 技术、RT-LAMP 技术和 RT-NASBA 技术灵敏度可高达 100 ρg/1.5 g[18–20]，但始终无法有效解决环境样品活病毒检测的问题，甚至导致活病毒检出率误差增大[21]。此外，目前绝大多数关于水源性诺如病毒的研究报道，是在流行病学事件发生以后的溯源检测[22–23]，且检测结果与流行病学调查出入较大。鼠源诺如病毒（murine norovirus，MNV）是诺如病毒属的一种可体外培养的模型病毒，且与人类诺如病毒在生物学特性上具有一定的相似性，其培养和操作条件较为成熟，可有效用于开发和优化检测技术。基于上述背景和现有技术的不足，本研究以可体外培养的 MNV 作为研究对象，开发一种能够高效富集海水中诺如病毒的技术，并准确检测富集后的活病毒，旨在提供更加可靠的监测数据，以支持海洋环境的健康管理和公共卫生策略的制定，减少海水传播的诺如病毒引发的疫情风险，提高海洋环境中病毒污染的防控能力。

1 材料与方法

1.1 *海水中病毒富集方法*　将 1 mL MNV 病毒原液加入 50 L 高压蒸汽灭菌后的陈海水中，混合数分钟制备模拟水样。水体病毒浓缩前以含有次氯酸钠的蒸馏水进行采集器消毒 30 min，然后使用硫代硫酸钠去氯 15 min。采用 Biotroy 半自动微生物采集系统（北京创域源科技有限公司），调节水的流速为 5～7 L/min；将制备好的 50 L 模拟水样过滤到纳米氧化铝陶瓷滤芯（VS2.5-5，北京创域源科技有限公司）上，将滤芯放入密封的样品保存袋中。分别配置加拿大健康中心推荐的 TPB 洗脱液（pH 9.0）、欧盟标准 ISO/TS 15216-2[24] 推荐的 TGBE 洗脱液（pH 9.5）和 De KA[25]、Hamza I A 等[26] 报道的洗脱效果较好的 Tralk 洗脱液（pH 9.2），洗脱纳米氧化铝陶瓷滤芯上的病毒。连接洗脱装置，将 500 mL 洗脱液移入一个 1 L 烧杯中，对纳米氧化铝陶瓷滤芯进行第 1 次洗脱，静置 15 min 后颠倒过滤器 10 次，打开蠕动泵以洗脱液流动冲洗过滤器 30 min 后收集洗脱液，然后使用 500 mL 新的洗脱液重复洗脱。调节洗脱液的 pH 至 7.0。向已含病毒粒子的洗脱液中加入 PEG-6000，终浓度 13%。4 ℃ 过夜沉淀。之后，4 ℃、10 000 ×*g* 离心 30 min，轻倒并弃掉上清液，收集病毒沉淀。向每个离心管中添加 10 mL pH 7.2（±0.2）PBS 缓冲液。使用移液枪反复吹打沉淀物，使沉淀重悬。向重悬液中加入等体积三氯甲烷，振荡混匀 15 min，然后 4 ℃、10 000 ×*g* 离心 20 min。分离出水相（上清液）。将浓缩的水相经过孔径为 0.22 μm 的滤器过滤，以除去细菌等非病毒物，放入–80 ℃ 冰箱储藏待用。取 1 mL 病毒原液（MNV-1）与病毒浓缩液进行 RNA 提取和 RT-qPCR 反应，计算病毒浓缩方法回收率。

1.2 *活病毒 PMAxx 染色方法*　参照增强型叠氮溴化丙啶（PMA）染色剂（PMAxx，美国 Biotium 公司）说明书建议的微生物通用染色方法为 25 μmol、避光孵育 10 min，PMA-Lite 仪器光照 15 min，分别对浓度、避光孵育时间和光触摸时间设置梯度，以 MNV-1 病毒为研究对象，探索诺如病毒感染性病毒颗粒染色法的最佳条件。避光条件下，向 500 μL 海水样品中加入 PMAxx（设置浓度梯度），同时加入 2.5 μL Triton X-100（0.5%，北京索莱宝科技有限公司），振荡混匀，锡纸包裹避光孵育（设置时间梯度），放置在 465～475 nm 光照下（设置时间梯度，注意温度需维持在 37 ℃ 以下），将处理后实验组样品分别测定滴度（$TCID_{50}$）和丰度（RT-qPCR），对热灭活对照组进行 RT-qPCR。具体梯度如下：配置浓度分别为 0、20、50、100、200、300 μmol 的 PMAxx-MNV 病毒样品，比较各浓度核酸染料对 MNV-1 RNA 扩增的抑制效果，确定最佳的核酸染料浓度；设置避光孵育时间分别为 0、10、15 和 20 min，比较各避光孵育时间对 MNV-1 RNA 扩增的抑制效果，确定最佳的避光孵育时间；设置光照时间分别为 0、10、15 和 20 min，比较光接触时间对 MNV-1 RNA 扩增的抑制效果，确定最佳的光接触时间。每一实验组需设置病毒热灭活对照组，以辅助筛选最佳染色条件。病毒热灭活流程为：将添加 Triton X-100 并振荡混匀后的病毒原液放入 90 ℃ 水浴锅中灭活 2 min 后，将离心管快速放入冰盒中降温待用。

1.3 *病毒的细胞培养*　采用 RAW 264.7 细胞培养鼠诺如病毒（MNV-1）。在 37 ℃ 含 5%CO_2 条件下，于无菌 T25 细胞培养瓶中，使用 DMEM 高糖细胞生长液（包含 10% 胎牛血清 BAS 和 1% 的青链霉素抗生素，美国 thermo 公司）传代培养 RAW 264.7（ATCC TIB-71）细胞。将 MNV-1 病毒接种于 RAW 264.7 细胞中，在 37 ℃ 含 5% CO_2 的细胞培

养箱内培养病毒。待 RAW 264.7 细胞病变（CPE）达 90% 时，将细胞培养瓶冻存于–80 ℃ 超低温冰箱，次日取出细胞培养瓶于室温融化，反复冻融 3 次后以 5 mL 移液管反复吹打细胞维持液，采用 0.22 μm 无菌滤膜（德国 Meck 公司）将细胞维持液过滤至 50 mL 离心管中备用。将生长状态良好的 RAW 264.7 细胞接种在 96 孔板中，接种病毒前在 37 ℃ 5%CO_2 条件下培养至少 2 h。连续制备 10 个梯度的 MNV-1 病毒稀释液，并分别纵向接种 8 个孔中（100 μL/孔），放置于 37 ℃ 5% CO_2 细胞孵箱内培养，每 24 h 观察各稀释度的病变孔数并记录。根据 Reed-Muench 公式计算 MNV-1 的病毒滴度（$TCID_{50}$）。

1.4 病毒的 RNA 提取与 RT-qPCR 检测 使用试剂盒 QIAamp MinElute Virus Spin（德国 Qiagen 公司）提取鼠诺如病毒 RNA，具体操作方法参照 QIAGEN 试剂盒说明书；使用试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit（Perfect Real Time)（日本 Takara 公司）反转录鼠诺如病毒 RNA，具体操作方法参照 Takara 试剂盒说明书，用于鼠诺如病毒的 RT-qPCR 检测。鼠诺如病毒的特异性引物为 MNV F：5′-AACGCTAGCTACAGGCTT-3′，MNV R：5′-CAATCGGAGTTCTTCGTG-3′，探针为 MNV P：FAM-CAGTCTGCGACGCCATTGAGAA-BHQ，目的片段约为 159 bp[27]。提取鼠诺如病毒质粒，将提取的质粒以 10 倍梯度稀释，每个梯度设置 3 个平行，同时设置阴性对照，构建 qPCR 标准曲线。鼠诺如病毒的质粒浓度为 3.20×10^2～3.20×10^8 copies/μL，线性关系良好，鼠诺如病毒的标准曲线为 $y=-3.438x+40.558$（$R^2=0.997$）。经优化，qPCR 的反应体系为 20 μL，包括 10 μL Premix Ex Taq™（Probe qPCR、6.8 μL RNase-free Water、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物、0.4 μL 探针（日本 Takara 公司）。鼠诺如病毒的反应条件为 95 ℃ 5 min，95 ℃ 15 s，>60 ℃ 40 s（荧光信号收集）；重复 40 个循环。取 1 mL 病毒原液与病毒浓缩液，使用 PMAxx 最适终浓度和光接触处理，同时提取 RNA，进行 RT-qPCR 反应，计算病毒浓缩方法回收率，同时做病毒滴度实验。

2 结 果

2.1 海水中诺如病毒富集方法优化（表 1） 模拟海水样本富集后，使用 RT-qPCR 检测浓缩样品中 MNV-1 的基因载量并计算回收率。Tralk 洗脱液得到的 MNV-1 最佳回收率为 3.24%，明显高于其他 2 种洗脱液，而 TPB 的 MNV-1 洗脱效果与 TGBE 的基本相同，回收率均仅有 0.01%。在抑制剂去除方面，三氯甲烷有显著效果，3 种洗脱液经三氯甲烷处理后均可提升回收率。

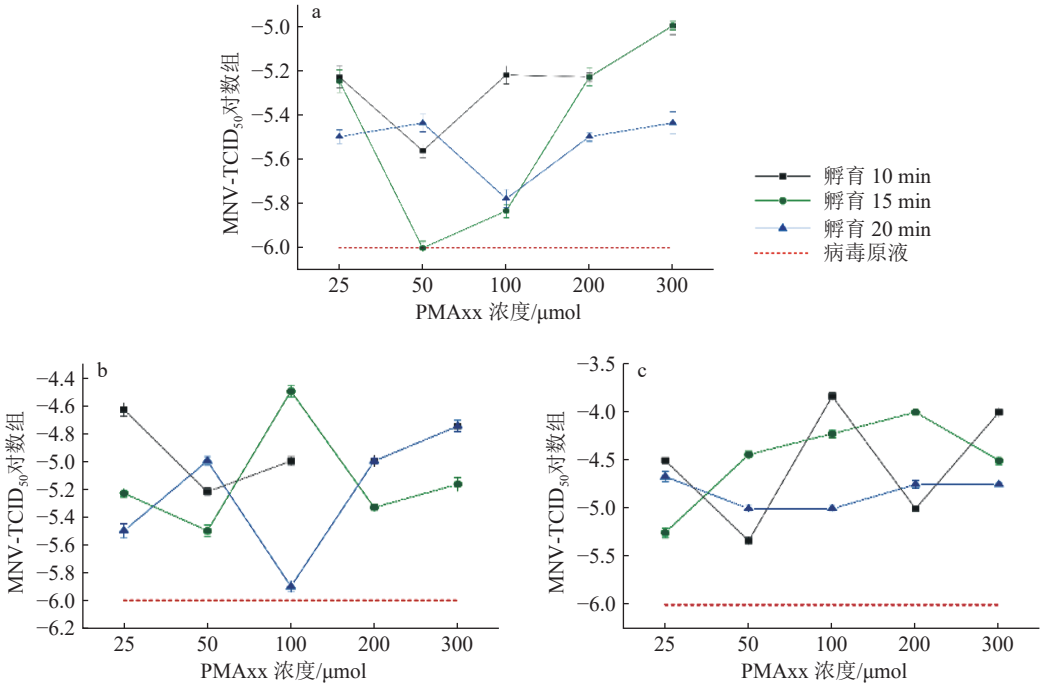
表 1 海水中不同诺如病毒富集方法比较
Table 1 Comparison of concentration methods different norovirus of in seawater

洗脱液+抑制剂去除	浓缩倍数	拷贝数/μL	方法回收率/%
TPB	5 000	1.15	0.01±0.00
TPB+三氯甲烷	5 000	2.05	0.01±0.00
TGBE	5 000	2.05	0.01±0.00
TGBE+三氯甲烷	5 000	2.63	0.01±0.00
Tralk	5 000	553.81	1.97±0.01
Tralk+三氯甲烷	5 000	910.38	3.24±0.00

2.2 诺如病毒 $TCID_{50}$ 病毒滴度测定（图 1） 分别设置 PMAxx 浓度梯度、避光孵育时间梯度和光接触时间梯度后，使用 $TCID_{50}$ 方法共检测 46 组 MNV-1 活病毒滴度。45 组实验样品均检出鼠诺如病毒，病毒原液滴度为 6 log $TCID_{50}$，鼠诺如病毒的滴度范围为 3.83～6.00 log $TCID_{50}$，其中预处理条件为 PMAxx 浓度 50 μmol，避光孵育时间 15 min、光接触 10 min；PMAxx 浓度 100 μmol，避光孵育时间 15 min、光接触 10 min；PMAxx 浓度 100 μmol，避光孵育时间 20 min、光接触 15 min 的 3 个样本受 PMAxx 的毒性影响较小。

2.3 诺如病毒实时荧光定量（图 2） 为筛选诺如病毒活病毒 PMAxx 染色法的最适条件，将 MNV-1 活病毒实验组设置了 MNV-1 热灭活对照组。使用 RT-qPCR 方法共检测了 MNV-1 活病毒实验组和 MNV-1 热灭活对照组的 92 组结果，包含了所设梯度的所有组合条件。实验所用的 MNV-1 活病毒原液定量丰度对数值为 6.07。在 90 组实验样品中共检出鼠诺如病毒阳性样品 60 个，鼠诺如病毒的丰度范围为（1.26×100～1.01×10^6）copies/μl，其中预处理条件为 PMAxx 浓度 50 μmol，避光孵育时间 10 min、光接触 10 min；PMAxx 浓度 50 μmol，避光孵育时间 15 min、光接触 10 min；PMAxx 浓度 100 μmol，避光孵育时间 15 min、光接触 15 min；PMAxx 浓度 200 μmol，避光孵育时间 10 min、光接触 20 min 的 4 种条件下 PMAxx 结合效果较好。

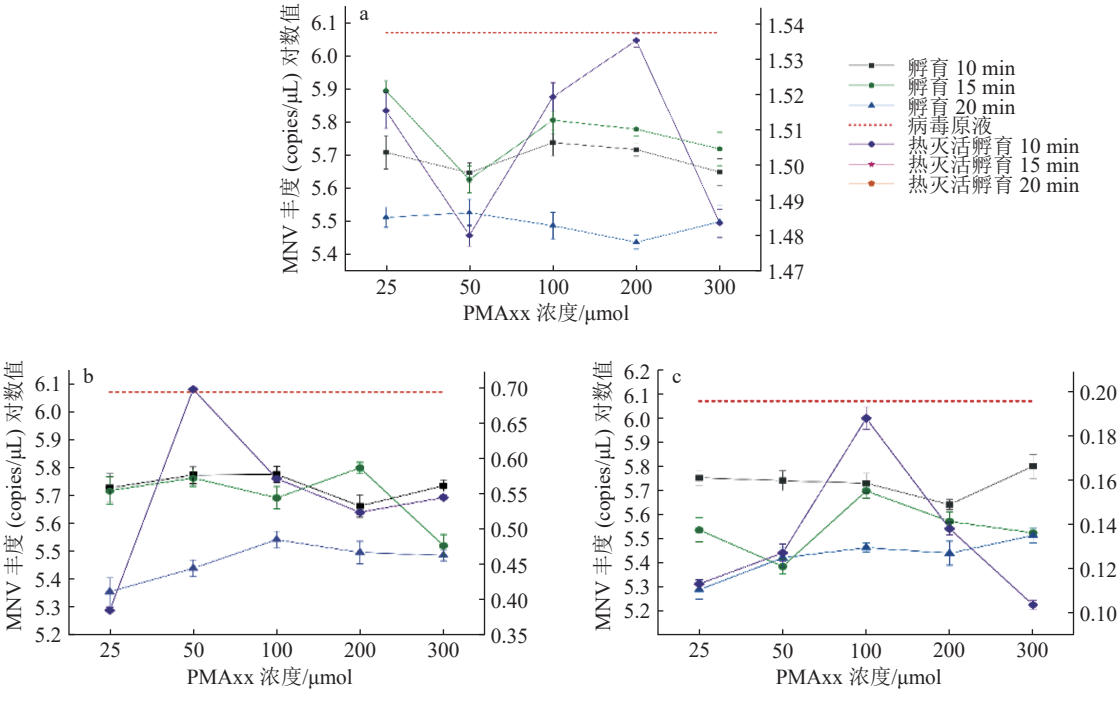
2.4 与其他海水中诺如病毒富集和活病毒检测方法比较（表 2） 依据实时荧光定量结果计算了方法的诺如病毒回收率，并与其他文献中的方法回收率比较。其中本海水中诺如病毒富集方法中仅使用 Tralk 洗脱液的最终回收率为 1.97%，而同时使用 Tralk 洗脱液与三氯甲烷的最终回收率为 3.24%。此外，本方法富集浓缩倍数为 5 000 倍，远高于大部分参考文献方法，而在同等浓缩倍数方法中回收效果最好。与实验室常用的活病毒检测方法——病毒滴度法比较，本研究使用的 PMAxx-RT-qPCR 法实验时间仅需 2 h，且一次最多可处理 24 个样本。



注：a 光接触 10 min 实验组；b 光接触 15 min 实验组；c 光接触 20 min 实验组。

图 1　MNV-1 活病毒实验组的 $TCID_{50}$ 病毒滴度结果

Fig. 1　$TCID_{50}$ results of the *Murine norovirus 1* (MNV-1) live virus experimental group



注：a 光接触 10 min 实验组；b 光接触 15 min 实验组；c 光接触 20 min 实验组。

图 2　MNV-1 活病毒染色实验的病毒定量结果图

Fig. 2　Quantitative results of the MNV-1 live virus staining experiment

表 2　海水中诺如病毒富集方法回收率对比结果

Table 2　Comparison of recovery rates of concentration methods norovirus of in seawater

洗脱液+抑制剂去除	浓缩倍数	方法回收率/%
Tralk	5 000	1.97 ±0.001
Tralk+三氯甲烷	5 000	3.24 ±0.00
	500	21.3（Hamza I A等[26]）
	2 500	4.80（De K A等[25]）
	5 000	0.70 ±0.17（李慧莹[28]）

3 讨 论

本研究在纳米氧化铝陶瓷滤芯对病毒粒子高效截留的基础上（截留率 99.9%），分别使用不同标准和文献推荐的病毒洗脱液配合聚乙二醇（PEG）沉淀法优化海水中诺如病毒的富集方法，结果表明，TPB 和 TGBE 两种有机洗脱液与 PEG 沉淀法结合的病毒富集方法，其效果远低于 Tralk 洗脱液与 PEG 沉淀结合的方法。此外，以三氯甲烷作为 PCR 抑制去除剂可有效提高病毒的富集效率。在李慧莹等人[28] 的研究基础上，通过将 PEG-6000 的用药剂量增加 3%[29]，将回收率提高了 2.54%。国内外已报道过的病毒富集方法种类繁多，大致可分为沉淀法、聚乙二醇脱水透析法、聚合电解质法、膜吸附洗脱法和超滤法[30–32]。本方法是膜吸附–洗脱–絮凝沉淀–高速离心–抑制剂去除的组合方法，相对于单一的沉淀法、聚乙二醇脱水透析法和膜吸附洗脱法，本研究的富集方法可现场采集超大体积海水样品，无须搬运海水样品，单人即可完成样品的采集任务；相对于聚合电解质法，本法收集效率稳定，而聚合电解质法常因聚合物易分解干扰收集效率；相对于超滤法，本研究的富集方法利用电性捕获病毒粒子，不易堵塞，更适合野外复杂海水环境和大体积海水的病毒采集。此外，方法富集倍数高达 5 000 倍，使样品结果可靠性更高、更具有代表性。

PMAxx 染色法是一种微生物活性筛选方法，多用于检测细菌和古菌[33–34]，近年来已与 RT-qPCR 等多种分子生物学手段结合，逐步应用于活病原体的快速检测领域[35–38]。PMAxx 是一种光反应染料，可以高度亲和力结合核酸[39–40]，在可见光下光解后，PMAxx 染料共价结合到核酸上[41]，这种修饰的核酸不能通过 PCR 扩增[42–43]。PMAxx™ 染料会被活细胞的细胞膜排斥，无法穿透细胞膜[44]。因此，在活细胞和死细胞群中，只有细胞膜受损的死细胞对 DNA 修饰敏感[36,45]，并在随后的 PCR 反应中发挥作用。与通过细胞培养确定活病毒滴度的方法相比，该方法具有检测时间短、效率高的优势；与传统的 RT-qPCR 技术相比，核酸嵌入剂的加入可极大降低来自死病毒的假阳性扩增信号，从而提高活病毒检测结果的准确度。

在诺如病毒活性筛选方法最适条件的研究中发现，46 组 MNV 病毒实验组样品的 $TCID_{50}$ 病毒滴定结果中，PMAxx 50 μmol、避光孵育 15 min、光接触 10 min 的染色条件对 MNV 活病毒具有最低限度的损伤。在定量结果中，热灭活处理 MNV（90 ℃、2 min）及其活病毒经不同浓度 PMAxx 预处理的结果显示，PMAxx 预处理对活病毒的影响较小（△丰度对数值<1），但抑制死病毒扩增信号的效果显著。比较各浓度核酸嵌入剂在降低假阳性信号方面的能力后，本实验选取 50 μmol 作为 PMAxx 的最佳预处理浓度。另外，热灭活对照组的数据表明，避光孵育时间超过 10 min 即可完全避免死病毒的检出（copies 值未检出）。光活化 PMAxx 10 min 就能大幅抑制热灭活 MNV 的核酸扩增，这足够使体系内的游离 PMAxx 光解并与水形成羟胺，进而不影响活病毒的检测。综合以上结果，考虑到检测效率，将 PMAxx 浓度 50 μmol 室温下避光孵育病毒样品 15 min、再光接触 10 min 作为 PMAxx 的最佳预处理条件。

本研究通过优化海水中诺如病毒的富集方法，并结合活病毒检测技术 PMAxx 染色法，成功建立了一套高效的环境海水诺如病毒检测技术。研究中发现，采用 Tralk 洗脱液洗脱纳米氧化铝陶瓷滤芯，配合 PEG 沉淀法，能够有效地从大体积海水样本中回收诺如病毒颗粒，实现高达 5 000 倍的浓缩，有效地解决了超大体积海水中诺如病毒检测的难题。此外，PMAxx 染色法在优化的预处理条件下，即 PMAxx 浓度为 50 μmol，避光孵育 15 min 后进行 10 min 的光接触，能够显著提高有感染活性诺如病毒的检测准确率。本研究结果可为海产品安全风险分析及评估提供更准确的数据支持，对于提高食品安全检测水平和传染病防控具有重要意义。

参考文献

[1] Cannon J L, Bonifacio J, Bucardo F, et al. Global trends in norovirus genotype distribution among children with acute gastroenteritis[J]. Emerging Infectious Diseases, 2021, 27(5): 1438-1445.

[2] Burke R M, Shah M P, Wikswo M E, et al. The Norovirus epidemiologic triad: predictors of severe outcomes in US Norovirus outbreaks, 2009–2016[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2019, 219(9): 1364-1372.

[3] Pires S M, Fischer-Walker C L, Lanata C F, et al. Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0142927.

[4] Cannon J L, Lopman B A, Payne D C, et al. Birth cohort studies assessing norovirus infection and immunity in young children: a review[J]. Clinical Infectious Diseases, 2019, 69(2): 357-365.

[5] Carlson K B, Dilley A, O'Grady T, et al. A narrative review of norovirus epidemiology, biology, and challenges to vaccine development[J]. NPJ Vaccines, 2024, 9(1): 94.

[6] Zhang Y T, Simpson R B, Sallade L E, et al. Evaluating completeness of foodborne outbreak reporting in the United States, 1998–2019[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2022, 19(5): 2898.

[7] Harris J P, Iturriza-Gomara M, O'Brien S J. Re-assessing the total burden of norovirus circulating in the United Kingdom population[J]. Vaccine, 2017, 35(6): 853-855.

[8] Bruggink L. Changes in norovirus incidence in Victoria, Australia, during the COVID-19 pandemic, 2020–2021[J]. Communicable Diseases Intelligence, 2022, 46: 1-6.

[9] Pham N I K, NishimurA S, Shimizu-Onda Y, et al. Emerging norovirus GII. 4 Sydney[P31] causing acute gastroenteritis outbreak in children in Japan, during COVID-19, 2021[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2022, 28(9): 1347-1351.

[10] Jin M, Wu S Y, Kong X Y, et al. Norovirus outbreak surveillance, China, 2016–2018[J]. Emerging Infectious Diseases, 2020, 26(3): 437-445.
[11] 冯微宏, 肖勇, 钱燕华, 等. 两种水源性诺如病毒富集方法的比较 [J]. 环境科学研究, 2020, 33(6): 1549-1554.
[12] 王建, 陈秋霞, 宋曼丹, 等. 水中诺如病毒切向流超滤富集方法的研究 [J]. 中国卫生标准管理, 2020, 11(18): 9-12.
[13] Hida K, Papafragkou E, Kulka M. Testing for human norovirus and recovery of process control in outbreak-associated produce items[J]. Journal of Food Protection, 2018, 81(1): 105-114.
[14] Shuval H, Cymbalista S, Fatal B, et al. Concentration of enteric viruses in water by hydro-extraction and two phase separation[M]// Berg G. Transmission of Viruses by the Water Route. London: Interscience, 1967: 45-55.
[15] Shuval H, Cymbalista B, Goldblum N. The phase-separation method for the concentration and detection of viruses in water[J]. Water Research, 1969, 3(4): 225-226, IN1, 227-240.
[16] Gaertner H. Retention and recovery of polioviruses on a soluble ultrafilter[M]//Berg G. Transmission of Viruses by the Water Route. London: Interscience, 1967: 121-127.
[17] Nupen E M. Virus studies on the Windhoek waste-water reclamation plant (South-West Africa)[J]. Water Research, 1970, 4(10): 661-672.
[18] 陈嘉茵. 逆转录微滴数字 PCR 技术检测蔬果中 GI 型及 GII 型诺如病毒 [D]. 广州: 暨南大学, 2018.
[19] Luo J M, Xu Z Q, Nie K, et al. Visual detection of norovirus genogroup Ⅱ by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye[J]. Food and Environmental Virology, 2014, 6(3): 196-201.
[20] 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]. Journal of Microbiology, 2006, 44(4): 403-408.
[21] Moore M, Bobay B G, 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.
[22] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses[J]. EFSA Journal, 2011, 7(9): 2190.
[23] Ding Z Y, Zhai Y J, Wu C, et al. Infectious diarrheal disease caused by contaminated well water in Chinese schools: a systematic review and meta-analysis[J]. Journal of Epidemiology, 2017, 27(6): 274-281.
[24] ISO. Microbiology of food and animal feed horizontal method for determination of hepatitis a virus and norovirus in food using real-time RT-PCR, in Part 2: Method for qualitative detection[S]. Geneva: ISO, 2019, 1-40.
[25] De K A, Baert L, Duarte A, et al. Evaluation of viral concentration methods from irrigation and processing water[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 187(2): 294-303.
[26] Hamza I A, Jurzik L, Stang A, et al. Detection of human viruses in rivers of a densly-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses[J]. Water Research, 2009, 43(10): 2657-2668.
[27] Dienus O, Sokolova E, Nyström F, et al. Norovirus dynamics in wastewater discharges and in the recipient drinking water source: Long-term monitoring and hydrodynamic modeling[J]. Environmental Science and Technology, 2016, 50(20): 10851-10858.
[28] 李慧莹. 水及食品中诺如病毒检测方法的研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2018.
[29] 冯微宏, 肖勇. 水体中诺如病毒富集技术的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(20): 3419-3422.
[30] 白靖宇. 水体中甲肝病毒的富集和实时荧光定量 PCR 检测 [D]. 大连: 大连理工大学, 2018.
[31] Ikner L A, Soto-Beltran M, Bright K R. New method using a positively charged microporous filter and ultrafiltration for concentration of viruses from tap water[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(10): 3500-3506.
[32] Morales-Morales H A, Vidal G, Olszewski J, et al. Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4098-4102.
[33] Shehata H R, Hassane B, Newmaster S G. Real-time polymerase chain reaction methods for strain specific identification and enumeration of *strain Lacticaseibacillus paracasei* 8700:2[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 13: 1076631.
[34] Kallastu A, Malv E, Aro V, et al. Absolute quantification of viable bacteria abundances in food by next-generation sequencing: quantitative NGS of viable microbes[J]. Current Research in Food Science, 2023, 6: 100443.
[35] Leifels M, Jurzik L, Wilhelm M, et al. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2015, 218(8): 686-693.
[36] Randazzo W, Piqueras J, Rodríguez-Díaz J, et al. Improving efficiency of viability-qPCR for selective detection of infectious HAV in food and water samples[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(4): 958-964.
[37] Kim K H, Kang G, Woo W S, et al. Development of a propidium monoazide-based viability quantitative PCR assay for red sea bream iridovirus detection[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(4): 3426.
[38] Liu H, Meng F, Nyaruaba R, et al. A triton X-100 assisted PMAxx-qPCR assay for rapid assessment of infectious African swine fever virus[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1062544.
[39] Randazzo W, Piqueras J, Evtoski Z, et al. Interlaboratory comparative study to detect potentially infectious human enteric viruses in influent and effluent waters[J]. Food and Environmental Virology, 2019, 11(4): 350-363.
[40] Randazzo W, Vasquez-García A, Aznar R, et al. Viability RT-qPCR to distinguish between HEV and HAV with intact and altered capsids [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1973.
[41] Randazzo W, Khezri M, Ollivier J, et al. Optimization of PMAxx pretreatment to distinguish between human norovirus with intact and altered capsids in shellfish and sewage samples[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 266: 1-7.
[42] López-Gálvez F, Randazzo W, Vásquez A, et al. Irrigating lettuce with wastewater effluent: does disinfection with chlorine dioxide inactivate viruses?[J]. Journal of Environmental Quality, 2018, 47(5): 1139-1145.
[43] Han S N, Jiang N, Lv Q Y, et al. Detection of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in viable but nonculturable state from tomato seed using improved qPCR[J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0196525.
[44] 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]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 269: 64-74.
[45] Emerson J B, Adams R I, Román C M B, et al. Schrödinger's microbes: tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems[J]. Microbiome, 2017, 5(1): 86.