

技术与方法

人星状病毒和人札幌病毒双重荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用

林鹏^{1,2,3}, 吴毓薇^{1,2}, 赵昕宇^{1,2}, 蒋富凤^{1,2}, 万强², 薛亮⁴, 徐环¹, 蔡芷荷^{*1,2}, 吴清平^{*3,4}

1 广东环凯微生物科技有限公司, 广东 广州 510663

2 广东环凯生物科技有限公司, 广东 肇庆 526238

3 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510000

4 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省微生物安全与健康重点实验室
国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台, 广东 广州 510070

林鹏, 吴毓薇, 赵昕宇, 蒋富凤, 万强, 薛亮, 徐环, 蔡芷荷, 吴清平. 人星状病毒和人札幌病毒双重荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1810-1829.

LIN Peng, WU Yuwei, ZHAO Xinyu, JIANG Fufeng, WAN Qiang, XUE Liang, XU Huan, CAI Zhihe, WU Qingping. Development and application of a duplex fluorescence quantitative RT-PCR method for detecting human Astrovirus and human Sapovirus[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1810-1829.

摘要:【背景】人星状病毒(human Astrovirus, HAstV)和人札幌病毒(human Sapovirus, HuSaV)是引起人类急性胃肠炎的重要病原体, 尤其对婴幼儿、老年人和免疫力低下等人群造成严重的威胁。目前尚无疫苗和特异性手段防控病毒的感染与传播, 因此加强检测对防控病毒的传播具有重要的意义。【目的】建立能同时检测 HAstV 和 HuSaV 的双重荧光定量 RT-PCR 方法, 为 HAstV 和 HuSaV 的快速检测和流行病学调查提供技术支持。【方法】针对 HAstV 和 HuSaV 保守区域基因序列, 设计特异性检测引物和探针并优化反应体系, 建立 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法, 并分析其特异性、敏感性和重复性。【结果】HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法针对 HAstV 和 HuSaV 最低检测线分别为 15 copies/μL 和 2.1 copies/μL; 与其他常见的食源性病毒、致病菌和乳酸菌无交叉反应; 批内和批间重复性试验变异系数均小于 3.5%。采用人工模拟不同浓度的病毒污染牡蛎样品, 结果显示 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法能检测出所有受污染的牡蛎样品, 与阳性对照组检测结果差异不显著($P>0.05$); 利用所建立的 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法检测不同食品样品的 HAstV 和 HuSaV, 其阳性率分别为 10.83%和

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFF1101102)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1101102).

*Corresponding authors. E-mail: CAI Zhihe, caizhihe1971@163.com; WU Qingping, wuqp203@163.com

Received: 2024-07-03; Accepted: 2024-11-21; Published online: 2024-12-27

0%。【结论】本研究建立的 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法具有较好的敏感性、特异性和重复性,适用于食品样品中 HAsV 和 HuSaV 的快速检测及大规模流行病学调查。

关键词: 人星状病毒; 人札幌病毒; 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法

Development and application of a duplex fluorescence quantitative RT-PCR method for detecting human Astrovirus and human Sapovirus

LIN Peng^{1,2,3}, WU Yuwei^{1,2}, ZHAO Xinyu^{1,2}, JIANG Fufeng^{1,2}, WAN Qiang², XUE Liang⁴, XU Huan¹, CAI Zhihe^{*1,2}, WU Qingping^{*3,4}

1 Guangdong Huankai Microbial Sci & Tech. Co., Ltd., Guangzhou 510663, Guangdong, China

2 Guangdong Huankai Biologic Sci & Tech. Co., Ltd., Zhaoqing 526238, Guangdong, China

3 School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510000, Guangdong, China

4 State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

Abstract: [Background] Human Astrovirus (HAsV) and human Sapovirus (HuSaV) are currently the main pathogen of human acute gastroenteritis worldwide, posing a serious threat to human health, especially to infants, the elderly, and immunocompromised people. There is no vaccine or specific means that can prevent the infections and transmission of HAsV and HuSaV. Therefore, developing a rapid and accurate detection method is of great significance for the prevention of HAsV and HuSaV. **[Objective]** To establish a duplex fluorescence quantitative RT-PCR method for simultaneous detection of HAsV and HuSaV and thus facilitate rapid detection and epidemiological investigations. **[Methods]** Specific primers and probes were designed according to the conserved sequences of HAsV and HuSaV. The reaction system was optimized, and detection system was established under the optimal reaction conditions. The sensitivity, specificity, and repeatability of the duplex fluorescence quantitative RT-PCR method were evaluated. **[Results]** The established method had high sensitivity, with the limits of detection being 15 copies/ μ L and 2.1 copies/ μ L for HAsV and HuSaV, respectively. The method was able to specifically detect the targets from HAsV and HuSaV and had no cross-reaction with other foodborne viruses, pathogens, or lactic acid bacteria. The coefficients of variation of inner and intra-assay were both less than 3.5%, indicating high repeatability and stability. Furthermore, the established method was employed to detect oysters artificially contaminated with different concentrations of HAsV and HuSaV. The results showed that the method detected all the contaminated samples, with the detection result showcasing no significant difference compared with that in the positive control group ($P>0.05$). The positive rates of HAsV and HuSaV in the food samples detected by the established method were 10.83% and 0%, respectively. **[Conclusion]** The duplex fluorescence quantitative RT-PCR method was

highly sensitive, specific, and repetitive for the rapid detection of HAstV and HuSaV in food samples and large-scale epidemiological investigations.

Keywords: human Astrovirus; human Sapovirus; duplex fluorescence quantitative RT-PCR method

食品安全关系人民群众身体健康和生命安全, 关系中华民族未来。目前, 我国水产品和果蔬等食品总产量位于世界前列; 然而, 人星状病毒(human Astrovirus, HAstV)和人札幌病毒(human Sapovirus, HuSaV)等食源性病毒给人民群众的生命和健康构成严重威胁^[1-2]。HAstV 和 HuSaV 是仅次于诺如病毒(Norovirus, NoV)和轮状病毒(Rotavirus, RV)造成非细菌性胃肠炎的重要原因, 主要通过“粪-口”途径传播^[3]。尽管大多数感染者出现轻微的临床表现, 甚至无临床症状; 但对婴幼儿和免疫力偏低等人群会造成较为明显的临床表现, 如腹泻、呕吐、腹痛、低热等临床表现, 甚至可能出现脑膜炎等^[4-7]。目前, 由于缺乏成熟有效的 HAstV 和 HuSaV 细胞培养系统, 严重限制了对其致病机制、疫苗研发和特异性药物的研究。因此, 及时发现对防控病毒的感染、流行和保障人民群众健康具有重要意义。

HAstV 隶属于星状病毒科(Astroviridae)哺乳动物星状病毒属(Mamastrovirus), 其颗粒呈现二十面体对称结构且表面有 5 个或 6 个星状突起^[8]。HAstV 为无包膜单股正链 RNA 病毒, 包含 3 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 即 ORF1a、ORF1b 和 ORF2; ORF1a 和 ORF1b 主要编码调控病毒复制、转录等相关的非结构蛋白, ORF2 编码病毒结构蛋白^[9]。近年来, 在 HAstV 中发现了一个之前未被识别的蛋白, 即 X 蛋白; 该蛋白几乎在所有的 HAstV 中存在, 并且在病毒复制中后期起重要作用, 与甲型流感病毒 M2 蛋白、人类免疫缺陷病毒 I 型 Vpu 蛋白等病毒膜孔蛋白有相似功能^[10]。目前, 将 HAstV

ORF2 基因序列作为判定 HAstV 基因型的主要依据。ORF2 基因序列将 HAstV 分为 8 个经典基因型(HAstV 1-8 型), 分别对应 8 种血清型, 以及新型 HAstV (HAstV-MLB 和 HAstV-VA/HMO)^[11]。当前 HAstV-1 是全世界主要的流行基因型^[12-14]; 但在个别地区和年限可能出现其他类型基因型流行毒株, 并且 HAstV-5 基因型有取代 HAstV-1 基因型流行毒株的趋势^[15]。目前, 2%-9%非细菌性胃肠炎由经典型 HAstV 造成^[16]。随着新型 HAstV 不断地在全世界不同国家地区被发现, 未来是否会成为主流毒株需时刻监测。

HuSaV 属于杯状病毒科(Caliciviridae)札幌病毒属(Sapovirus)成员。HuSaV 为单股正链 RNA 病毒, 其基因组包含 2 个或 3 个 ORF; ORF1 编码一个多聚蛋白, 包括 7 个非结构蛋白和一个主要结构蛋白 VP1; ORF2 编码一个次要结构蛋白 VP2^[17]。研究发现, 某些 HuSaV 或蝙蝠札幌病毒序列还存在另外一个 ORF (即 ORF3), ORF3 位于 ORF1 的 N 端, 编码蛋白的功能未知^[18]。HuSaV 作为 RNA 病毒, 其基因组具有较高的突变率和基因重组, 导致其基因组出现复杂的遗传多样性^[19]。SaV 至少可以分为 19 个基因群(GI-GXIX), 其中 GI、GII、GIV 和 GV 基因群已经被报道可以感染人类^[18]。HuSaV 基因组进化速率较高, 可能随着时间的推移病毒流行毒株发生一定的改变^[18,20]。由 HuSaV 造成胃肠炎的病例占全世界非细菌性胃肠炎病例的 1%-5% (检出率 1%-22%); 在不同地区、不同环境和卫生条件下, 导致 HuSaV 主要流行毒株和病毒感染频率出现较大的差异^[21-24]。

由于 HAstV 和 HuSaV 对外界具有较高的

抵抗力,可以长期存在食品中且不失去感染性,少量病毒颗粒就可以造成人类感染。当前,HAstV 和 HuSaV 主要以混合感染出现,导致感染者临床症状更加严重^[25];并且 HAstV 和 HuSaV 感染人类造成临床症状与其他食源性病毒临床表现相似(如 NoV 和 RV)。鉴于此,亟须建立一种操作简便、敏感度高和特异性强且适用于推广检测 HAstV 和 HuSaV 的诊断方法,对防控病毒的流行和保障人民群众食品健康具有重要的技术保障。本研究旨在建立具有敏感度高、特异性强等特点的 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法,为监控病毒流行传播和大规模筛查提供技术保障。

1 材料与方 法

1.1 样 品

强阳性 HAstV、弱阳性 HAstV、强阳性 HuSaV、NoV GI 基因群、NoV GII 基因群、RV、甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)、戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV),广东省科学院微生物研究所华南应用微生物国家重点实验室。142 株致病菌[含大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等]和 7 株乳杆菌[植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、戊糖乳植杆菌(*Lactiplantibacillus pentosus*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)等],广东环凯微生物科技有限公司。

120 份贝类水产品(牡蛎、扇贝、文蛤)、蔬菜(生菜、菠菜)和水果(草莓、蓝莓)采自广州市、佛山市、肇庆市的农贸市场和超市,详细信息见表 1。

1.2 主要试剂和仪器

NovoScript[®] Multiplex Probe One Step qRT-PCR Kit, 苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; *E. coli* DH5 α 感受态细胞,北京索莱宝科技

有限公司; DNA 2000 marker, 宝日医生物技术(北京)有限公司; Trizol 试剂,英杰生命技术有限公司(Invitrogen 公司); EasyPure[®] HiPure Plasmid MiniPrep Kit, 北京全式金生物技术股份有限公司; pMD-18T 克隆载体,宝日医生物技术(北京)有限公司。超微量分光光度计,Implen 公司;实时荧光定量 PCR 仪,赛默飞世尔科技公司。

1.3 引物、探针的设计与合成

本研究针对主要流行毒株 HAstV-1 基因型和 HuSaV GI、GII、GIV 和 GV 基因型为检测目标,从 NCBI GenBank 数据库中下载检索获得 HAstV-1,以及 HuSaV GI、GII、GIV 和 GV 基因型全基因组序列(表 2)。利用 MEGA 7.0 软件分别对病毒进行序列比对分析,并结合文献报道 HAstV 和 HuSaV 保守区域设计特异性引物和探针^[12-13]。针对靶基因序列,HAstV-1 基因型设计引物 HAstV F 和 HAstV R 以及探针 HAstV P;由于 HuSaV 存在 4 个流行基因型(GI、GII、GIV 和 GV),设计 3 条上游引物(HuSaV 1F、HuSaV 5F、HuSaV 124F)、1 条下游引物序列(HuSaV 1245R)以及 2 条探针序列(HuSaV 124TP 和 HuSaV 5TP),检测 HAstV 和 HuSaV 引物和探针信息见表 3。检测 HAstV 和 HuSaV 的引物及探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 制备质粒标准品

针对目的片段(HAstV-1, GenBank 登录号为 AB000285.1, 30-247; HuSaV GI, GenBank 登录号为 AB614356.1, 5 077-5 177; HuSaV GII, GenBank 登录号为 LC504415.1, 5 066-5 169; HuSaV GIV, GenBank 登录号为 MN102395.1, 5 078-5 181; HuSaV GV, GenBank 登录号为 MG012434.1, 5 112-5 218)基因序列进行基因合成,连接到 pMD-18T 载体上构建重组质粒 pMD-18T-HAstV 和 pMD-18T-HuSaV。分别将

表 1 检测 HAsV 和 HuSaV 食品样品信息

Table 1 Food sample information of HAsV and HuSaV detection

样品名称	采集数量	采集地区	采样地点类型
Sample name	Sample number	Collecting place	The type of sampling site
牡蛎	34	广州(12), 佛山(8), 肇庆(14)	农贸市场(25)、超市(9)
Oyster		Guangzhou (12), Foshan (8), Zhaoqing (14)	Farmers' market (25), Supermarket (9)
扇贝	21	广州(6), 佛山(5), 肇庆(10)	农贸市场(16)、超市(5)
Scallop		Guangzhou (6), Foshan (5), Zhaoqing (10)	Farmers' market (16), Supermarket (5)
文蛤	20	广州(7), 佛山(6), 肇庆(7)	农贸市场(13)、超市(7)
Clam		Guangzhou (7), Foshan (6), Zhaoqing (7)	Farmers' market (13), Supermarket (7)
生菜	10	广州(4), 佛山(2), 肇庆(4)	农贸市场(7)、超市(3)
Lettuce		Guangzhou (4), Foshan (2), Zhaoqing (4)	Farmers' market (7), Supermarket (3)
菠菜	10	广州(4), 佛山(2), 肇庆(4)	农贸市场(7)、超市(3)
Spinach		Guangzhou (4), Foshan (2), Zhaoqing (4)	Farmers' market (7), Supermarket (3)
草莓	10	广州(5), 佛山(3), 肇庆(2)	农贸市场(2)、超市(8)
Strawberry		Guangzhou (5), Foshan (3), Zhaoqing (2)	Farmers' market (2), Supermarket (8)
蓝莓	15	广州(7), 佛山(3), 肇庆(5)	农贸市场(3)、超市(12)
Blueberry		Guangzhou (7), Foshan (3), Zhaoqing (5)	Farmers' market (3), Supermarket (12)

表 2 HAsV 和 HuSaV 参考毒株信息

Table 2 The strain information of the HAsV and HuSaV used in this study

病毒	基因型	登录号	病毒	基因型	登录号	病毒	基因型	登录号
Viruses	Genotype	Accession No.	Viruses	Genotype	Accession No.	Viruses	Genotype	Accession No.
HAsV	HAsV-1	NC001943.1	HAsV	HAsV-5	DQ028633.1	HAsV	AstV-VA3	JX857868.1
	HAsV-1	JN887820.1		HAsV-5	MK059953.1	HuSaV	GI	MK250988.1
	HAsV-1	MK059949.1		HAsV-5	ON571595.1		GI	MK250985.1
	HAsV-1	FJ375759.1		HAsV-6	MK059954.1		GI	LC504367.1
	HAsV-1	HQ398856.2		HAsV-6	HM237363.1		GI	LC504342.1
	HAsV-1	MT832893.1		HAsV-6	GQ495608.1		GI	MG012401.2
	HAsV-1	AY720892.1		HAsV-7	MK059955.1		GII	LC504404.1
	HAsV-2	MN433705.1		HAsV-8	AF260508.1		GII	LC715150.1
	HAsV-2	MW485042.1		HAsV-8	MK059956.1		GII	KX274477.1
	HAsV-2	MK059950.1		HAsV-MLB1	MK089434.1		GII	MK599471.1
	HAsV-3	MK059951.1		HAsV-MLB2	MK089435.1		GII	MH922773.1
	HAsV-3	OR792802.1		HAsV-MLB2	OP594725.1		GII	MH922772.1
	HAsV-3	MN444721.1		AstV-MLB3	NC019028.1		GIV	MG012463.1
	HAsV-4	OR371570.1		HAsV-MLB3	LC732125.1		GIV	MG012455.1
	HAsV-4	DQ344027.1		AstV-VA1	MT432184.1		GV	PP555252.1
	HAsV-4	AY720891.1		AstV-VA1	FJ973620.1		GV	MN161594.1
	HAsV-4	DQ070852.1		AstV-VA2	GQ502193.2		GV	MK296751.1
	HAsV-4	MK059952.1		AstV-VA3	NC019026.1		GV	LC504439.1

表 3 HAsV 和 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测引物和探针序列

Table 3 Primers and probes sequences of the duplex fluorescence quantitative RT-PCR method for detecting HAsV and HuSaV

病毒名称 Virus name	引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	荧光/淬灭基团 Fluorophore/ quencher	激发波长 Excitation wavelength (nm)	目的基因 Target gene	扩增长度 Amplification length (bp)
HAsV	HAsV F	TCTYATAGACCGYATTATTGG	FAM/BHQ1	492/517	ORF1a	114
	HAsV R	TCAAATTCTACATCATCACCAA				
	HAsV P	CCCCADCCATCATCATCTTCATCA				
HuSaV	HuSaV 124F	GAYCASGCTCTCGCYACCTAC	VIC/BHQ1	538/554	ORF1	101
	HuSaV 1F	TTGGCCCTCGCCACCTAC				104
	HuSaV 5F	TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC				107
	HuSaV 1245R	CCCTCCATYTCAAACACTA				
	HuSaV 124TP	CCRCCTATRAACCA				
	HuSaV 5TP	TGCCACCAATGTACCA				

pMD-18T-HAsV 和 pMD-18T-HuSaV 重组质粒转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 随机挑取 3 个单菌落, 37 °C 摇菌过夜培养, 对所得菌液进行提取重组质粒; 最后将提取的重组质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序鉴定。经鉴定正确的重组质粒超微量分光光度计测定其浓度并计算拷贝数[拷贝数(copies/ μ L)=质粒浓度(ng/ μ L) $\times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23} / (660 \times \text{质粒长度})$]; 分装重组质粒于 -80 °C 保存备用。

1.5 建立 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法

1.5.1 初步建立 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法

HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法反应体系(20 μ L): 5 $\times$ Multiplex qRT-PCR buffer 4 μ L, Multi RT Enzyme Mix II 1 μ L, 引物 HAsV F 和 HAsV R (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 探针 HAsV P (10 μ mol/L) 0.4 μ L, pMD-18T-HAsV 阳性质粒(3.0×10^5 copies/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 补足 20 μ L。同时以去离子水作为阴性对照。反应条件: 50 °C 反转录 10 min; 95 °C 1 min; 94 °C 10 s, 60 °C 20 s, 40 个循环; 在每个循环退火阶段收集荧光信号。

1.5.2 优化 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法

根据初步建立的 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法反应体系, 分别加入引物 HAsV F/R (10 μ mol/L) 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 μ L, 测定 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法最佳引物含量; 进一步根据优化后的引物含量确定最佳探针含量, 分别加入探针 HAsV P (10 μ mol/L) 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6 μ L, 测定 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法最佳探针含量。根据初步建立的 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法反应程序进行测定。

1.6 建立 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法

1.6.1 初步建立 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法

HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法反应体系(20 μ L): 5 $\times$ Multiplex qRT-PCR buffer 4 μ L, Multi RT Enzyme Mix II 1 μ L, 引物 HuSaV 124F (10 μ mol/L)、HuSaV 1F (10 μ mol/L)、HuSaV 5F (10 μ mol/L) 和 HuSaV 1245R (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 探针 HuSaV 124TP (10 μ mol/L) 和 HuSaV 5TP

(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL , pMD-18T-HuSaV 阳性质粒(4.2×10^5 copies/ μL) 1 μL , ddH₂O 补足 20 μL 。同时以去离子水为作为阴性对照。反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 40 个循环; 在每个循环退火阶段收集荧光信号。

1.6.2 优化 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法

根据初步建立的 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法反应体系, 分别加入引物 HuSaV 1F/5F/124F/1245R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 μL , 测定 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法最佳引物含量; 进一步根据优化后的引物含量确定最佳探针含量, 分别加入探针 HuSaV 5TP/124TP (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6 μL , 测定 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法最佳探针含量。根据初步建立的 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法反应程序进行测定, 每个反应重复 3 次。

1.7 建立 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 标准曲线

为建立 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法标准曲线, 将浓度为 3.0×10^6 copies/ μL 的 pMD-18T-HAstV 重组质粒与 4.2×10^6 copies/ μL 的 pMD-18T-HuSaV 重组质粒等体积混合后以 10 倍比例稀释作为模板, 利用优化的各反应体系经 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法扩增, 试验结果以实时荧光定量 PCR 仪匹配软件进行分析并绘制标准曲线。

1.8 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 灵敏度试验

为确定 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法的灵敏度, 分别将 pMD-18T-HAstV 和 pMD-18T-HuSaV 重组质粒标准品进行 10 倍倍比稀释, 同时以去离子水作为阴性对照; 采用上述

所优化后的反应体系和程序对不同浓度的标准品进行荧光定量 RT-PCR 检测。

1.9 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 特异性试验

以 NoV GI、NoV GII、HAV、HEV、RV, 以及 142 株致病菌(含 *E. coli*、*V. parahaemolyticus*、*S. aureus* 等)和 7 株乳杆菌(*L. plantarum*、*L. pentosus*、*B. longum* 等)核酸作为模板, 同时用去离子水作为阴性对照, 进行 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测, 分析所建立荧光定量 RT-PCR 检测方法的特异性。

1.10 重复性试验

取 HAstV 和 HuSaV 3 个不同浓度的阳性质粒为模板, 利用所建立的 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法进行 3 次批内和批间重复性试验。统计分析批内和批间重复性试验的平均值、标准差(standard deviation, SD)以及变异系数(coefficient variation, CV), 评价所建立的 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法的重复性。

1.11 人工模拟病毒污染食品试验

HAstV 和 HuSaV 不能在食品中复制繁殖, 但能长期存在食品中并保持良好的感染性。因此, 本研究采用模拟病毒污染食品, 分别将强阳性 HAstV 和 HuSaV 溶液进行 10 倍比例稀释, 设计 3 个浓度梯度; 向每 10 g 不含病毒的牡蛎体内注射 50 μL 病毒稀释液, 室温孵育 1 h, 同时设未被污染的牡蛎样品作为阴性对照, 病毒稀释液作为阳性对照。随后采用 Trizol 方法分别提取组织和病毒稀释液中的总 RNA^[14]; 再利用所建立的 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法进行检测分析。

1.12 食品样品检测

在本地区所购买的 120 份食品样品, 包含牡蛎 34 份、扇贝 21 份、文蛤 20 份、生菜 10 份、

菠菜 10 份、草莓 10 份和蓝莓 15 份。采用 Trizol 方法提取不同食品样品总 RNA, 利用所建立的 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法对每份食品样品的 HAstV 和 HuSaV 进行检测分析, 同时用去离子水作为阴性对照, 每份样品做 3 次重复试验。

2 结果与分析

2.1 检测引物和探针序列及质粒标准品的制备

分别采用 MEGA 7.0 软件对 HAstV 和 HuSaV 不同基因型全基因组序列进行比对分

析。结果如图 1 所示, HAstV-1 基因型 ORF1a 基因和不同基因型 HuSaV ORF1 基因各含有一段相对保守基因序列并符合设计实时荧光定量 PCR 引物探针设计原理。

针对 HAstV-1 基因型和 HuSaV GI、GII、GIV 与 GV 基因型保守基因序列构建重组质粒 pMD-18T-HAstV 和 pMD-18T-HuSaV, 经测序无误后测定重组质粒浓度并换算成拷贝数。所制备的重组质粒 pMD-18T-HAstV 和 pMD-18T-HuSaV 拷贝数分别为 3.0×10^{10} copies/ μL 和 4.2×10^{10} copies/ μL , 重组质粒作为检测 HAstV 和 HuSaV 的阳性质粒对照。

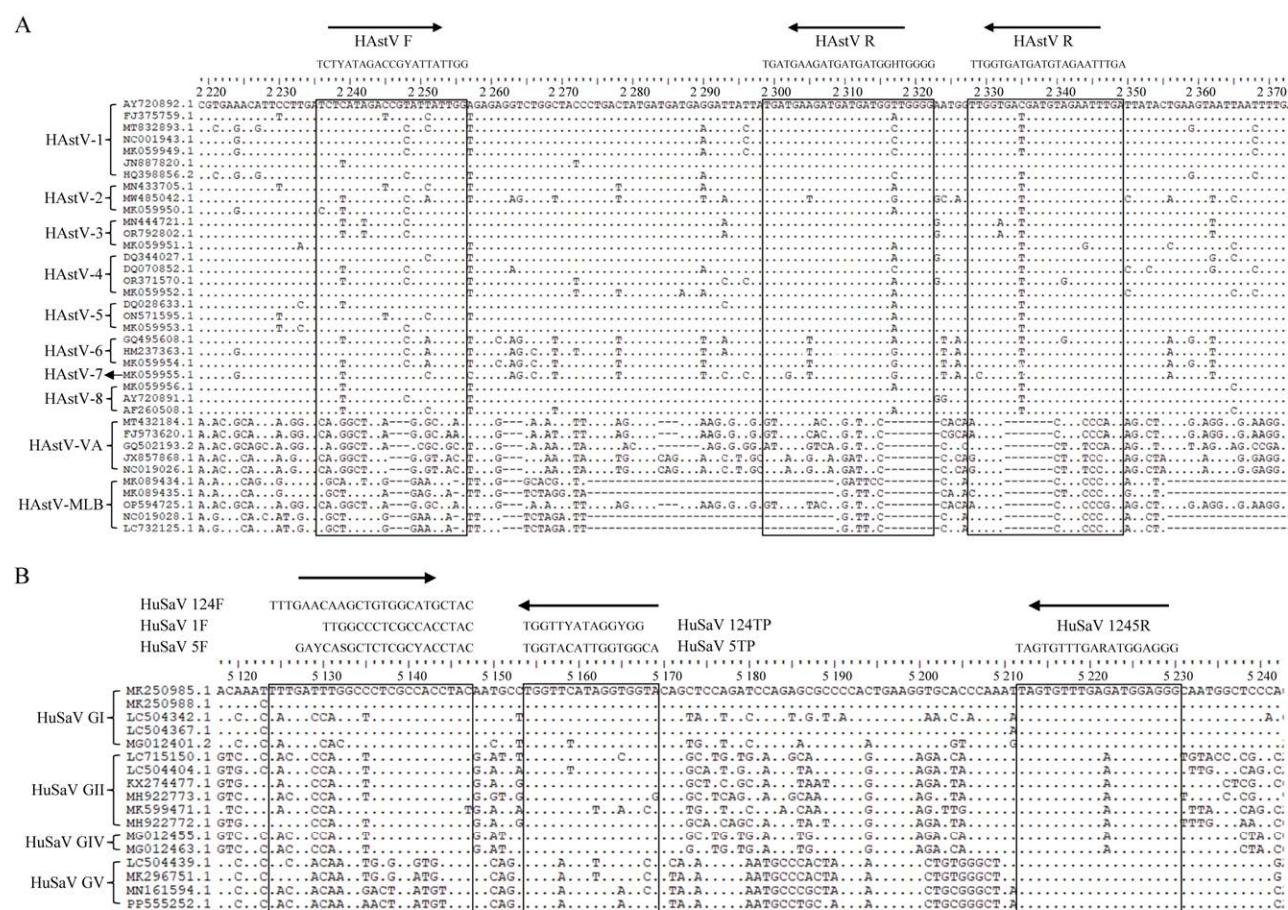


图 1 HAstV (A)和 HuSaV (B)参考毒株序列比对及其设计检测引物和探针

Figure 1 Multiple sequence alignments of HAstV (A) and HuSaV (B) reference strain sequences used to design of primers and probes for detection.

2.2 优化 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法反应体系

2.2.1 优化 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法引物含量

为了分析 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法引物最佳含量, 将 3.0×10^5 copies/ μL 的 pMD-18T-HAsV 重组质粒作为模板, 分别添加不同体积的引物 HAsV F/R (10 $\mu\text{mol/L}$), 测定 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法最佳引物含量。结果如图 2, 随着引物浓度不断地提高, 检测 HAsV 的 C_t 值没有明显的变化, 并且考虑后续检测敏感性和成本, 因此选择 HAsV F/R 0.6 μL 为最佳引物含量。

2.2.2 优化 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法探针含量

分析 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法探针最佳含量, 将 3.0×10^5 copies/ μL 的 pMD-18T-HAsV 重组质粒作为模板, 分别添加不同体积的探针 HAsV P (10 $\mu\text{mol/L}$), 测定 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法最佳探针含量。结果见图 3,

随着探针浓度不断地提高, 检测 HAsV 的 C_t 值没有明显的变化, 然而荧光值不断地提高。因此根据扩增曲线中荧光值高低, 选择 HAsV P 0.4 μL 为最佳探针含量。

2.2.3 优化 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法引物含量

为了分析 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法引物最佳含量, 将 4.2×10^5 copies/ μL 的 pMD-18T-HuSaV 重组质粒作为模板, 分别添加不同体积的引物 HuSaV 124F/1F/5F/1245R (10 $\mu\text{mol/L}$), 测定 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法最佳引物含量。结果见图 4, 随着引物浓度不断地提高, 检测 HuSaV 的 C_t 值没有明显的变化, 并且考虑后续检测敏感性和成本, 因此选择 HuSaV 124F/1F/5F/1245R (10 $\mu\text{mol/L}$) 引物添加量 0.6 μL 为最佳引物添加量。

2.2.4 优化 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法探针含量

分析 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法探针最佳含量, 将 4.2×10^5 copies/ μL 的 pMD-18T-HuSaV

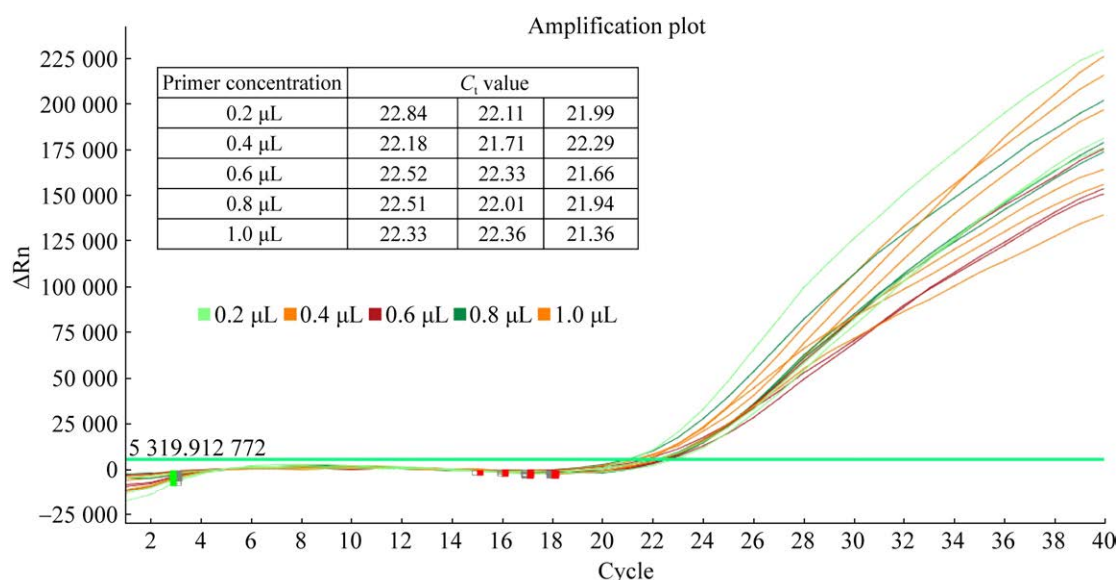


图 2 优化 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法最佳引物含量

Figure 2 Optimization of primer concentration for fluorescence quantitative RT-PCR detection of HAsV.

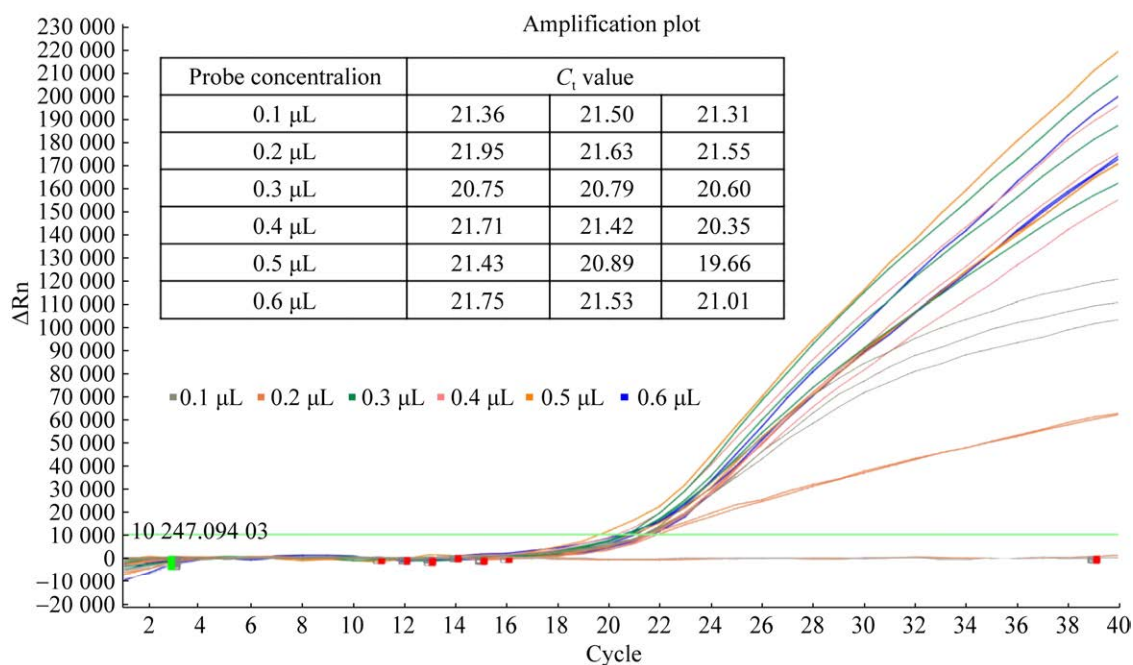


图3 优化 HAsV 荧光定量 RT-PCR 检测方法最佳探针含量

Figure 3 Optimization of probe concentration for fluorescence quantitative RT-PCR detection of HAsV.

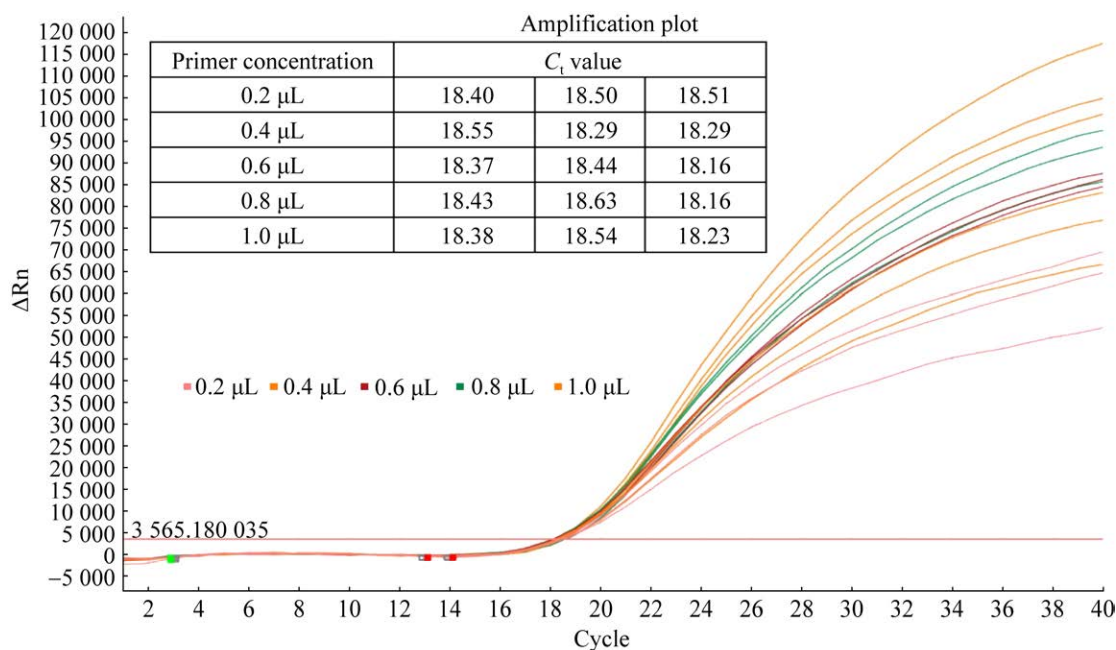


图4 优化 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法最佳引物含量

Figure 4 Optimization of primer concentration for fluorescence quantitative RT-PCR detection of HuSaV.

重组质粒作为模板，分别添加不同体积的探针 HuSaV 124TP/5TP (10 $\mu\text{mol/L}$)，测定 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法最佳探针含量。结果见

图 5，随着探针浓度不断地提高，检测 HuSaV 的 C_t 值没有明显的变化，然而荧光值不断地提高。因此根据扩增曲线中荧光值高低，选择

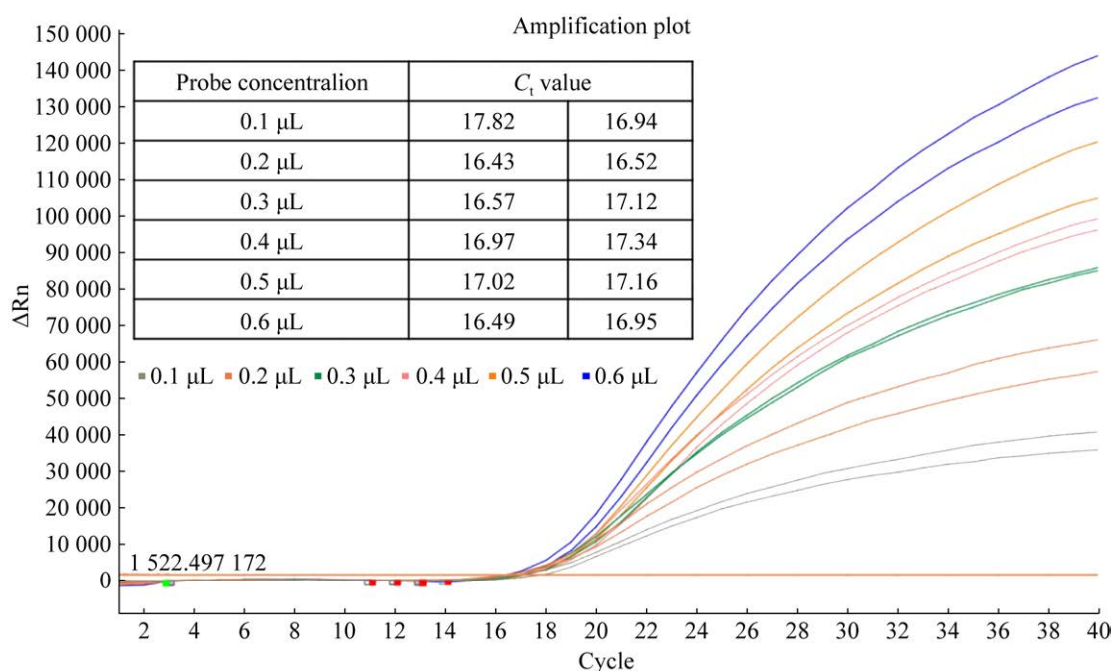


图5 优化 HuSaV 荧光定量 RT-PCR 检测方法最佳探针含量

Figure 5 Optimization of probe concentration for fluorescence quantitative RT-PCR detection of HuSaV.

HuSaV 124TP/5TP (10 μmol/L) 探针添加量为 0.4 μL 为最佳探针添加量。

2.3 建立 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法

根据已优化的检测 HAstV 和 HuSaV 的引物和探针浓度建立 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法。分别以 3.0×10^5 copies/μL 的 pMD-18T-HAstV 和 4.2×10^5 copies/μL 的 pMD-18T-HuSaV 重组质粒作为模板，分析 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法。结果显示，双重荧光定量 RT-PCR 检测方法检测 HAstV 和 HuSaV 的 C_t 值与单重荧光定量 RT-PCR 检测方法 C_t 值无显著差异(图 6)，初步建成 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法。

2.4 标准曲线的建立及敏感性试验结果

将所制备的重组质粒 pMD-18T-HAstV (3.0×10^5 copies/μL) 和 pMD-18T-HuSaV

(4.2×10^5 copies/μL) 等体积混合后 10 倍比例稀释 5 个梯度为模板，建立 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法标准曲线。由建立标准曲线的扩增曲线可知(图 7A)，随着病毒重组质粒拷贝数降低，其检测病毒 C_t 值逐渐增加且两者之间呈现良好线性关系(图 7B)。HAstV 的直线方程： $Y = -3.55X + 5.12$ ，相关系数 $R^2 = 0.99$ ，HuSaV 的直线方程： $Y = -3.63X + 5.25$ ，相关系数 $R^2 = 0.99$ ，其中 Y 代表检测 C_t 值，X 代表样品浓度，表明建立 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法具有良好的线性关系。

进一步选取浓度为 3.0×10^5 、 3.0×10^4 、 3.0×10^3 、 3.0×10^2 、 3.0×10^1 、 3.0×10^0 copies/μL 的 HAstV 重组质粒和 4.2×10^5 、 4.2×10^4 、 4.2×10^3 、 4.2×10^2 、 4.2×10^1 、 4.2×10^0 copies/μL 的 HuSaV 重组质粒作为模板，采用已优化后的反应条件和体系进行灵敏度试验。本试验建立的 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法结果显示，当

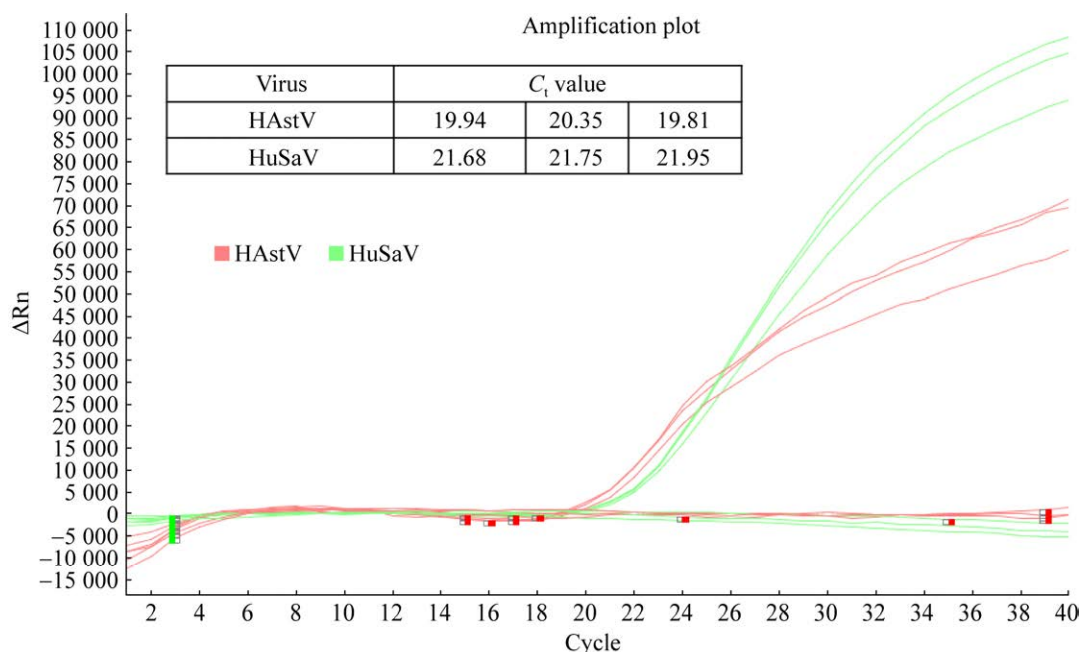


图 6 建立 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法

Figure 6 Establishment of a duplex fluorescence quantitative RT-PCR method for detecting HAsV and HuSaV.

HAsV 重组质粒标准样品向反应孔加入浓度为 3.0×10^2 copies/ μ L 时, 达到检测 HAsV 最低检测限, 即 HAsV 样品浓度为 15 copies/ μ L (图 8A); 当 HuSaV 重组质粒标准样品向反应孔加入浓度为 4.2×10^1 copies/ μ L 时, 达到检测 HuSaV 最低检测限, 即 HuSaV 浓度为 2.1 copies/ μ L (图 8B); 结果表明, 本研究建立的 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法敏感性较高。

2.5 特异性试验结果

以实验室保存的食源性病毒 HAsV (强阳、弱阳) 和 HuSaV (弱阳)、NoV GI、NoV GII、HAV、HEV、RV, 以及 142 株致病菌 (含 *E. coli*、*V. parahaemolyticus*、*S. aureus* 等) 和 7 株乳杆菌 (*L. plantarum*、*L. pentosus*、*B. longum* 等) 的核酸作为模板, 进行特异性分析。结果显示, 本检测方法仅有 HAsV 和 HuSaV 有扩增曲线, 其他食源性病毒、致病菌和乳杆菌无扩增曲线 (图 9)。表明所建立的 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量

RT-PCR 方法具有良好的特异性。

2.6 重复性试验结果

选择 HAsV 和 HuSaV 标准品的 3 个稀释度进行重复性试验分析。结果显示, 批内重复性试验变异系数为 0.46%–1.50%, 批间重复性试验变异系数为 0.53%–3.04%, 均小于 3.5% (表 4)。结果表明, 本研究建立的 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法的重复性较好。

2.7 人工模拟病毒污染食品试验结果

利用本研究建立的 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法对人工病毒污染牡蛎样品进行检测分析。采用不同浓度的单一病毒和混合病毒人工污染牡蛎, 通过 Trizol 方法提取样品总 RNA。结果显示, 利用 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法能特异性检测经人工污染食品中的 HAsV 和 HuSaV, 与阳性对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$); 单一病毒与混合病毒污染牡蛎样品检测病毒 C_t 值

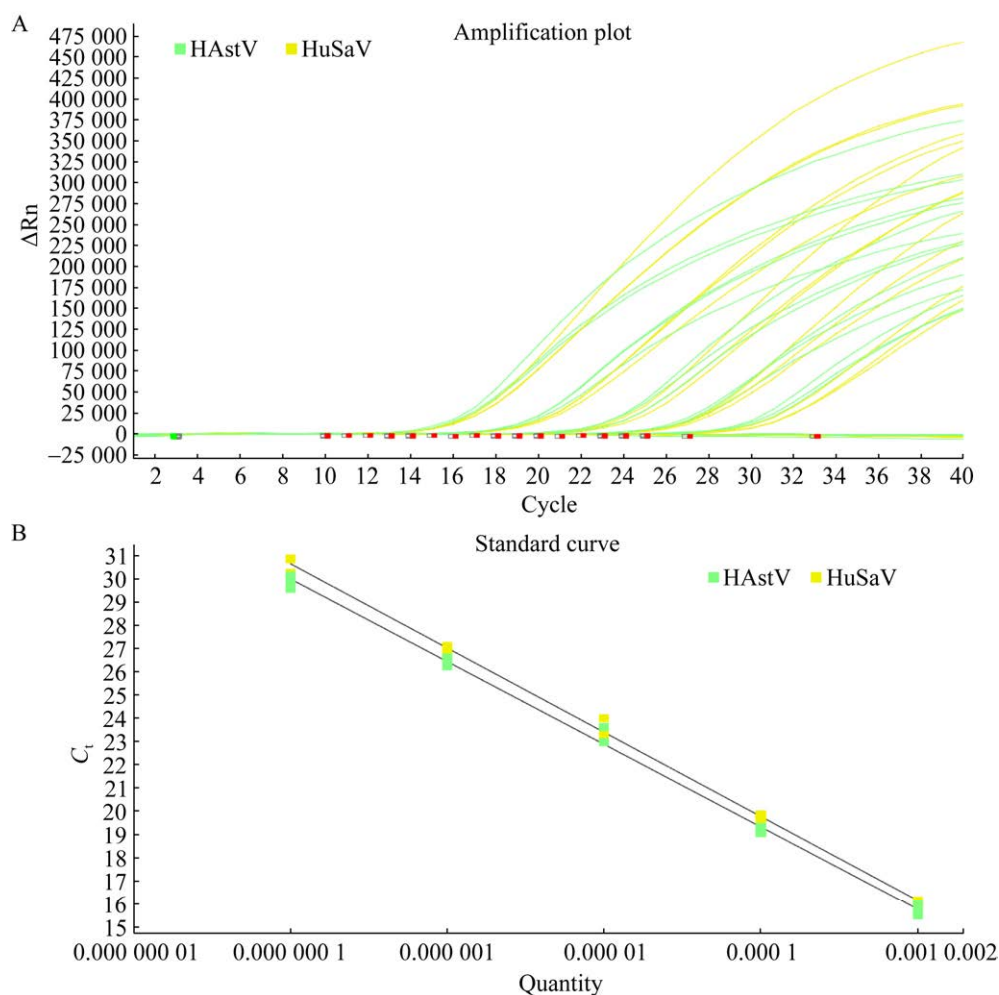


图 7 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 方法标准扩增曲线和标准曲线 A: 扩增曲线; B: 标准曲线。

Figure 7 The duplex fluorescence quantitative RT-PCR amplification curve and standard curve for the standard of HAsV and HuSaV. A: Amplification curve of HAsV and HuSaV; B: Standard curve of HAsV and HuSaV.

无显著性差异($P>0.05$) (表 5)。试验结果表明, 本研究建立的 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法适用于食品中 HAsV 和 HuSaV 的检测。

2.8 实际食品样品的检测结果

采集 120 份不同种类食品样品常规处理后, 经 Trizol 方法提取样品总 RNA 作为模板, 采用本研究建立的 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法进行病毒检测。结果显示,

有 13 份为 HAsV 阳性(10.83%); 0 份 HuSaV 阳性(0%), 其中没有发现共感染情况(表 6)。结果表明, 所建立的 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法可用于检测食品中的 HAsV 和 HuSaV。

3 讨论

HAsV 和 HuSaV 是仅次于 NoV 和 RV 造成人类急性胃肠炎的食源性病毒, 具有流行广泛、

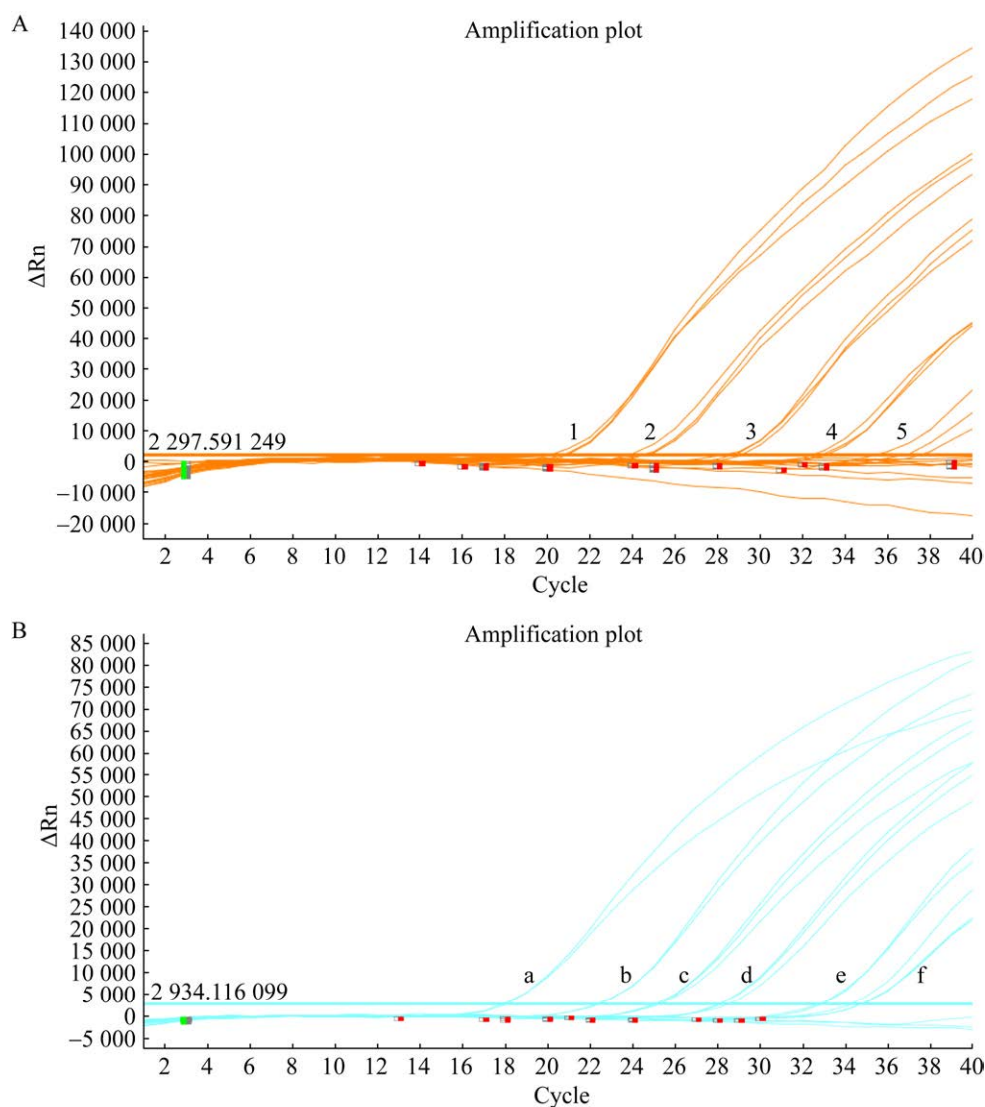


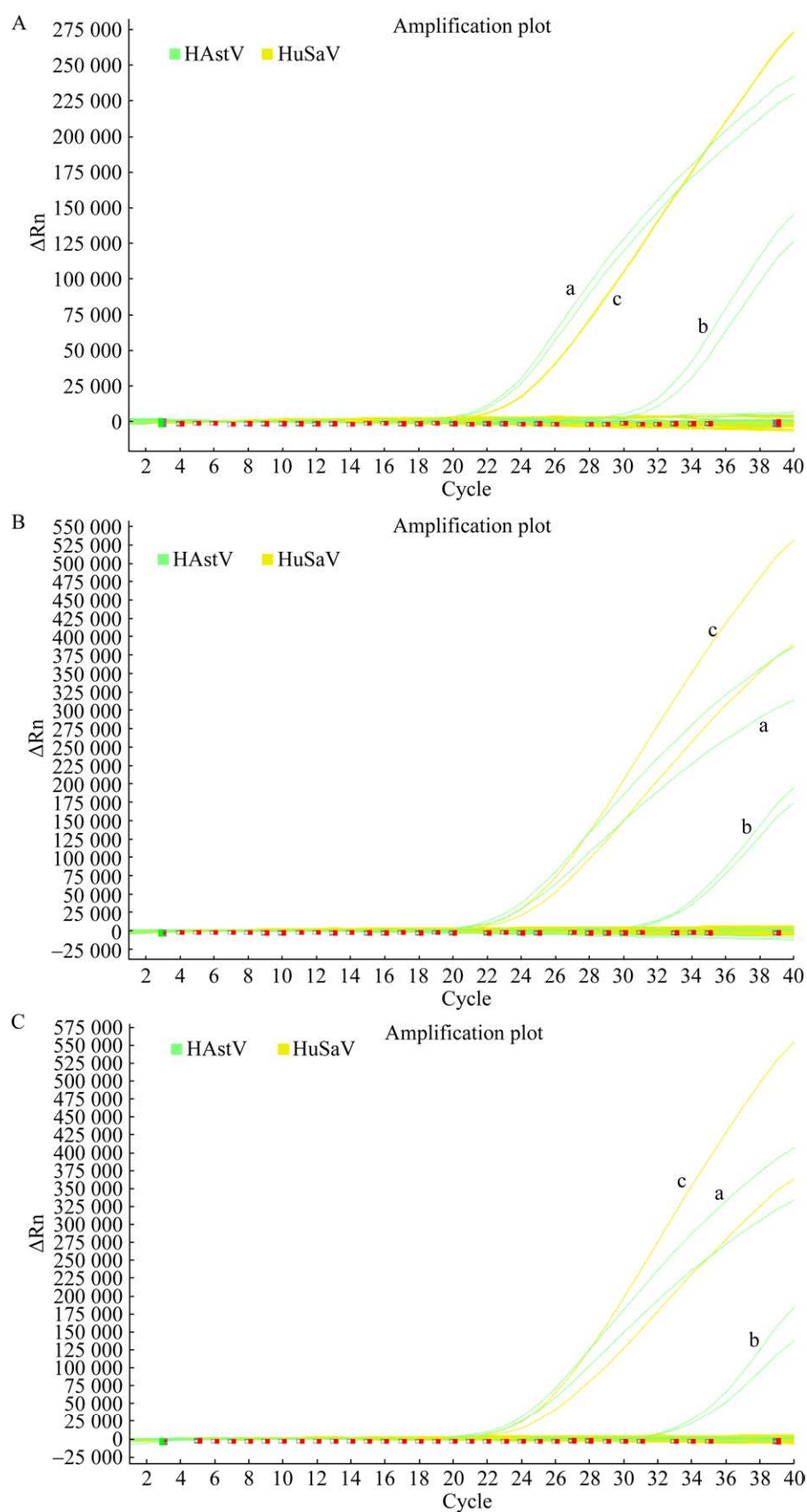
图8 HAstV和HuSaV双重荧光定量RT-PCR检测方法敏感性试验 A: HAstV敏感性扩增曲线。1-5: 3.0×10^5 – 3.0×10^1 copies/ μ L的HAstV重组质粒。B: HuSaV敏感性扩增曲线。a-f: 4.2×10^5 – 4.2×10^0 copies/ μ L的HuSaV重组质粒。

Figure 8 Sensitivity test for duplex fluorescence quantitative RT-PCR for detection of HAstV and HuSaV. A: Sensibility amplification curve of HAstV. 1–5: 3.0×10^5 – 3.0×10^1 copies/ μ L recombinant plasmid of HAstV. B: Sensibility amplification curve of HuSaV. a–f: 4.2×10^5 – 4.2×10^0 copies/ μ L recombinant plasmid of HuSaV.

感染性强、感染剂量低(10–200个病毒颗粒)、传播速度快等特点,以聚集性和散发性流行^[26–27]。HAstV和HuSaV广泛存在于水产品、水果与蔬菜等食品中,对人们食品安全和健康带来巨大的威胁,尤其对卫生环境较差、经济水平较低

地区流行范围广和危害程度高^[28]。因此,及时发现和诊断对防控HAstV和HuSaV的流行及传播具有重要指导意义。

当前,针对HAstV和HuSaV的检测方法主要包括电子显微镜方法、分子生物学和免疫



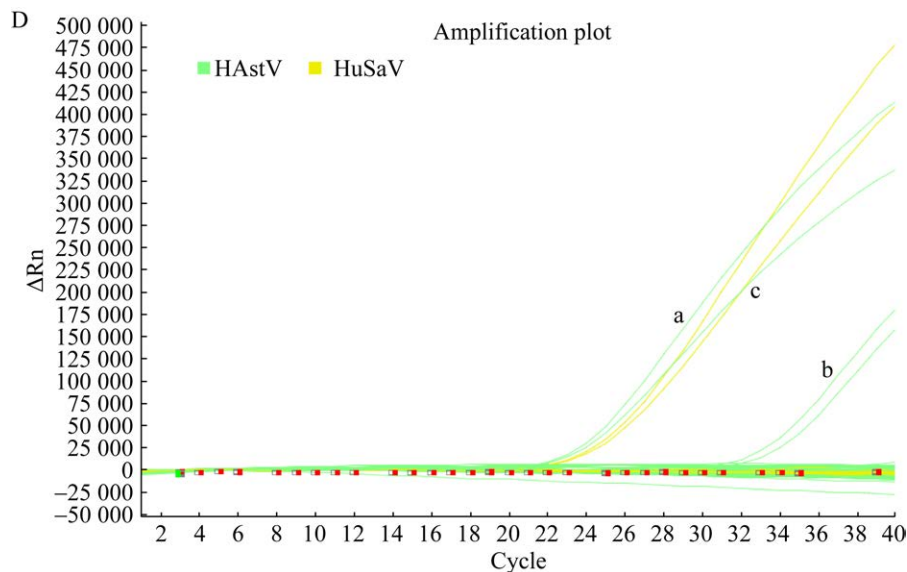


图 9 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法特异性检测 A–D：检测实验室保存的食源性病毒、致病菌和乳杆菌所有样品。a：HAstV 强阳性毒株；b：HAstV 弱阳性毒株；c：HuSaV 强阳性毒株。

Figure 9 Specificity test for duplex fluorescence quantitative RT-PCR for detection of HAstV and HuSaV. A–D: Detection all samples of foodborne viruses, pathogenic bacteria and lactobacilli preserved in the laboratory. a: Strong strain of HAstV; b: Weak strain of HAstV; c: Strong strain of HuSaV.

表 4 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法重复性试验结果

Table 4 The repeatability of the result of duplex fluorescence quantitative RT-PCR method for detecting HAstV and HuSaV

病毒名称 Virus name	浓度 Concentration (copies/μL)	批内重复性 Intra-repeatability		批间重复性 Inter-repeatability	
		平均值±标准差	变异系数	平均值±标准差	变异系数
		Mean±SD	Coefficient variation (%)	Mean±SD	Coefficient variation (%)
HAstV	3.0×10 ⁶	18.41±0.09	0.46	18.33±0.15	0.82
	3.0×10 ⁵	20.88±0.12	0.57	20.86±0.11	0.53
	3.0×10 ⁴	23.96±0.26	1.08	23.91±0.18	0.75
HuSaV	4.2×10 ⁶	17.79±0.27	1.50	17.93±0.55	3.04
	4.2×10 ⁵	20.68±0.18	0.88	20.95±0.48	2.27
	4.2×10 ⁴	24.13±0.34	1.41	24.34±0.58	2.38

学方法等^[29]。早在 20 世纪 70 年代，科学家通过电子显微镜观察到 HAstV 和 HuSaV 颗粒形态；然而由于其灵敏度较低(最低 10⁷ 个/g)、操作相对烦琐且仪器设备昂贵，并且无法明确病毒种类，因此没有得到广泛使用^[30]。免疫学方法利用抗原-抗体结合对病毒特异性进行检测，

由于免疫学方法敏感性偏低、HAstV 和 HuSaV 存在较多基因型且在食品含量偏低，不能准确地检测食品中的 HAstV 和 HuSaV^[31]。RT-PCR 方法通过扩增目标病毒基因，从而确定样品中是否含有目标病毒，由于其检测方法敏感性偏低，无法准确检测食品中含量极低的 HAstV 和

表 5 HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测人工感染样品

Table 5 Detection of HAsV and HuSaV in artificially infected samples by the duplex fluorescence quantitative RT-PCR method

组别 Group	病毒名称 Virus name	稀释倍数 Dilution factor	检测对象 Detecting target	HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法 Method of duplex fluorescence quantitative RT-PCR for detection of HAsV and HuSaV				
				C _t 值 C _t value	平均值±标准差 Mean±SD		变异系数 Coefficient variation (%)	
阳性对照 Positive control	HAsV	10 ⁰	HAsV	21.26	21.32	21.45	21.34±0.10	0.46
		10 ¹	HAsV	25.17	25.14	25.57	25.29±0.24	0.95
		10 ²	HAsV	28.48	28.45	28.68	28.54±0.13	0.44
	HuSaV	10 ⁰	HuSaV	22.91	22.49	22.84	22.75±0.23	0.99
		10 ¹	HuSaV	26.12	25.87	26.04	26.01±0.13	0.49
		10 ²	HuSaV	29.57	29.38	29.64	29.53±0.13	0.46
	HAsV+ HuSaV	10 ⁰	HAsV	21.80	21.85	21.48	21.71±0.20	0.93
			HuSaV	22.73	22.62	22.48	22.61±0.13	0.55
		10 ¹	HAsV	25.00	25.20	24.70	24.97±0.25	1.01
			HuSaV	26.03	26.04	25.93	26.00±0.06	0.23
		10 ²	HAsV	28.41	28.55	28.55	28.50±0.08	0.28
			HuSaV	29.56	29.81	29.33	29.57±0.24	0.81
人工模拟 实验 Artificial simulated infection samples	HAsV	10 ⁰	HAsV	21.36	21.85	21.55	21.59±0.25	1.14
		10 ¹	HAsV	25.48	25.14	24.78	25.13±0.35	1.39
		10 ²	HAsV	28.25	28.55	28.52	28.44±0.17	0.58
	HuSaV	10 ⁰	HuSaV	22.82	23.06	23.08	22.99±0.14	0.63
		10 ¹	HuSaV	26.18	26.58	26.51	26.42±0.21	0.81
		10 ²	HuSaV	29.46	29.71	29.80	29.66±0.18	0.59
	HAsV+ HuSaV	10 ⁰	HAsV	21.57	21.55	21.91	21.68±0.20	0.93
			HuSaV	22.77	22.67	23.15	22.86±0.25	1.11
		10 ¹	HAsV	25.07	25.41	25.20	25.23±0.17	0.68
			HuSaV	26.45	26.65	26.53	26.54±0.10	0.38
		10 ²	HAsV	28.56	28.05	28.09	28.23±0.28	1.01
			HuSaV	29.49	29.27	29.20	29.32±0.15	0.52

表 6 食品样品检测结果

Table 6 The results of food sample test

样品名称 Sample name	HAsV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法 Method of duplex fluorescence quantitative RT-PCR for detection of HAsV and HuSaV			
	HAsV		HuSaV	
	数量 Number	阳性率 Positive rate (%)	数量 Number	阳性率 Positive rate (%)
牡蛎 Oyster	4	3.33	—	—
扇贝 Scallop	2	1.67	—	—
文蛤 Clam	2	1.67	—	—
生菜 Lettuce	1	0.83	—	—
菠菜 Spinach	1	0.83	—	—
草莓 Strawberry	2	1.67	—	—
蓝莓 Blueberry	1	0.83	—	—

—: No data.

HuSaV, 导致出现漏检情况^[32-33]。微滴式数字 PCR 检测方法具有特异性强、敏感性高等优点, 对样品中极低浓度的病毒也能准确检测, 然而其仪器设备和耗材比较昂贵, 不适用于批量食品样品检测分析^[34]。近年来, 微流控芯片技术作为一种新兴的检测方法, 具有体积小、集成化、敏感性高、高通量等特点, 已经在多种病毒检测中得到广泛的应用, 而微流控芯片成本较高且属于一次性耗材, 导致检测成本增加, 同时仪器操作难度较大, 导致该技术没有在食品大规模病毒筛查中得到应用^[35]。

实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 是一种广泛应用于检测各种病原体检测方法, 具有较高的敏感性和特异性、操作简便、检测时间短, 并且可大批量样品分析检测。多重 qPCR 检测方法具有更高的应用推广价值, 在一个反应体系中可以同时扩增多种病毒核酸片段, 从而容易对多种病原体同时检测分析, 缩短了检测时间^[36]。目前, 双重实时荧光定量 RT-PCR 检测方法已经被应用检测各种病原体中, 如鹅星状病毒基因 I 型与 II 型、禽流感病毒与传染性支气管炎病毒、马泰勒虫与弩巴贝斯虫等^[37-39]; 该检测方法为病原体的检测和防控提供了可靠的检测技术。本研究针对 HAstV 流行毒株 HAstV-1 血清型和 HuSaV 流行毒株 HuSaV GI/GII/GIV/GV 基因型保守序列建立 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法; 所构建的检测方法标准曲线具有良好的线性关系, HAstV 和 HuSaV 最低检测限分别为 15 copies/ μ L 和 2.1 copies/ μ L; 并且不与其他食源性病毒、致病菌和乳杆菌发生特异性反应; 在对人工污染的牡蛎样品进行检测时, 检测结果与阳性对照结果一致且差异不显著。

4 结论

本研究建立的 HAstV 和 HuSaV 双重荧光定量 RT-PCR 检测方法具有敏感性高、特异性强、稳定性好和操作简便等优点, 可以检测水产品、果蔬等不同种类食品中低载量 HAstV 和 HuSaV 样品。该方法的建立为 HAstV 和 HuSaV 的流行性调查、控制病毒的传播及保障人类食品安全提供了技术保障。

REFERENCES

- [1] DOAN YH, YAMASHITA Y, SHINOMIYA H, MOTOYA T, SAKON N, SUZUKI R, SHIMIZU H, SHIGEMOTO N, HARADA S, YAHIRO S, TOMIOKA K, SAKAGAMI A, UEKI Y, KOMAGOME R, SAKA K, OKAMOTO-NAKAGAWA R, SHIRABE K, MIZUKOSHI F, ARITA Y, HAGA K, et al. Distribution of human Sapovirus strain genotypes over the last four decades in Japan: a global perspective[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2023, 76(4): 255-258.
- [2] IJEOMAH IM, TEMITOPE FOC, LANDER DC, SHERIFF AT, UWEM GE, BERNARD OA, OLUSEYI OA, ELIJAH OI, TOLUWANI AG, ARTHUR OO, TOLUWANIMI AE, BOLUTIFE PO, DAMILOLA OG, TITILOLA OO, OLUWADAMILOLA GA, MUHAMMAD AI, OMOTOSHO KI, JOHNSON AA, JELLE M, OLUBUSUYI AM. Classic human Astrovirus 4, 8, MLB-3, and likely new genotype 5 sublineage in stool samples of children in Nigeria[J]. Journal of Medical Virology, 2024, 96(3): e29489.
- [3] PÉREZ-RODRIGUEZ FJ, VIEILLE G, TURIN L, YILDIZ S, TAPPAREL C, KAISER L. Fecal components modulate human Astrovirus infectivity in cells and reconstituted intestinal tissues[J]. mSphere, 2019, 4(6): e00568-19.
- [4] BURKE RM, MATTISON CP, MARSH Z, SHIODA K, DONALD J, SALAS SB, NALEWAY AL, BIGGS C, SCHMIDT MA, HALL AJ. Norovirus and other viral causes of medically attended acute gastroenteritis across the age spectrum: results from the medically attended acute gastroenteritis study in the United States[J]. Clinical Infectious Diseases, 2021, 73(4): e913-e920.
- [5] LI JJ, SHEN Q, ZHANG W, ZHAO TT, LI Y, JIANG J, YU XQ, GUO ZB, CUI L, HUA XG. Genomic organization and recombination analysis of a porcine Sapovirus identified from a piglet with diarrhea in China[J]. Virology Journal, 2017, 14(1): 57.
- [6] LU LJ, ZHONG HQ, XU MH, SU LY, CAO LF, JIA R, XU J. Molecular and epidemiological characterization of human Adenovirus and classic human Astrovirus in

- children with acute diarrhea in Shanghai, 2017–2018[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2021, 21(1): 713.
- [7] LANAVE G, LOCONSOLE D, CENTRONE F, CATELLA C, CAPOZZA P, DIAKOUDI G, PARISI A, SUFFREDINI E, BUONAVOGLIA A, CAMERO M, CHIRONNA M, MARTELLA V. Astrovirus VA1 in patients with acute gastroenteritis[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(2): 864-869.
- [8] MADELEY CR, COSGROVE BP. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis[J]. *The Lancet*, 1975, 2(7932): 451-452.
- [9] GHOSH A, DELGADO-CUNNINGHAM K, LÓPEZ T, GREEN K, ARIAS CF, DuBOIS RM. Structure and antigenicity of the divergent human Astrovirus VA1 capsid spike[J]. *PLoS Pathogens*, 2024, 20(2): e1012028.
- [10] LULLA V, FIRTH AE. A hidden gene in Astroviruses encodes a viroporin[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4070.
- [11] WILDI N, SEUBERLICH T. The roles of the 5' and 3' untranslated regions in human Astrovirus replication[J]. *Viruses*, 2023, 15(6): 1402.
- [12] van MAARSEVEEN NM, WESSELS E, de BROUWER CS, VOSSEN ACTM, CLAAS ECJ. Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus group A, Norovirus genogroups I and II, and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2010, 49(3): 205-210.
- [13] NIWA S, TSUKAGOSHI H, ISHIOKA T, SASAKI Y, YOSHIZUMI M, MORITA Y, KIMURA H, KOZAWA K. Triplex real-time polymerase chain reaction assay for detection and quantification of norovirus (GI and GII) and Sapovirus[J]. *Microbiology and Immunology*, 2014, 58(1): 68-71.
- [14] VASQUEZ-GARCÍA A, MEJIA-BALLESTEROS JE, de GODOY SHS, BARBIERI E, de SOUSA RLM, FERNANDES AM. Norovirus GII and Astrovirus in shellfish from a mangrove region in Cananéia, Brazil: molecular detection and characterization[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2022, 53(1): 317-326.
- [15] 周楠. 环境污水中轮状病毒、诺如病毒和星状病毒的监测与分子流行病学研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2018.
- ZHOU N. Surveillance and molecular epidemiology of Rotavirus, Norovirus and human Astrovirus in environmental raw sewage[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2018 (in Chinese).
- [16] OKITSU S, KHAMRIN P, HIKITA T, SHIMIZU-ONDA Y, THONGPRACHUM A, HAYAKAWA S, MANEEKARN N, USHIJIMA H. Molecular epidemiology of classic, MLB, and VA astroviruses in children with acute gastroenteritis, 2014-2021: emergence of MLB3 strain in Japan[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(3): e00700-23.
- [17] MIYAZAKI N, SONG CH, OKA T, MIKI M, MURAKAMI K, IWASAKI K, KATAYAMA K, MURATA K. Atomic structure of the human Sapovirus capsid reveals a unique capsid protein conformation in caliciviruses[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(9): e0029822.
- [18] OKA T, WANG QH, KATAYAMA K, SAIF LJ. Comprehensive review of human Sapoviruses[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(1): 32-53.
- [19] 孟洛冰, 薛亮, 高珺珊, 张菊梅, 吴清平. 人源札幌病毒抗原多样性及遗传进化研究进展[J]. *微生物学报*, 2023, 63(9): 3350-3359.
- MENG LB, XUE L, GAO JS, ZHANG JM, WU QP. Research progress in antigenic diversity and genetic evolution of human Sapoviruses[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(9): 3350-3359 (in Chinese).
- [20] ZHUO R, DING XF, FREEDMAN SB, LEE BE, ALI S, LUONG J, XIE JL, CHUI LD, WU Y, PANG XL. Molecular epidemiology of human Sapovirus among children with acute gastroenteritis in western Canada[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(10): e0098621.
- [21] MAKHAOLA K, MOYO S, KEBABETSWE LP. Distribution and genetic variability of Sapoviruses in Africa[J]. *Viruses*, 2020, 12(5): 490.
- [22] HANAFUSA T, ARIKAWA K, TANIMOTO Y. Prevalence of Sapovirus and Astrovirus in pediatric infectious gastroenteritis surveillance in Kobe city, Japan, 2016–2019[J]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2023, 76(4): 246-250.
- [23] MAGWALIVHA M, KABUE JP, TRAORE AN, POTGIETER N. Prevalence of human Sapovirus in low and middle income countries[J]. *Advances in Virology*, 2018: 5986549.
- [24] BECKER-DREPS S, BUCARDO F, VINJÉ J. Sapovirus: an important cause of acute gastroenteritis in children[J]. *Lancet Child & Adolescent Health*, 2019, 3(11): 758-759.
- [25] HOQUE SA, NISHIMURA K, THONGPRACHUM A, KHAMRIN P, THI KIM PHAM N, ISLAM MT, KHANDOKER N, OKITSU S, ONDA-SHIMIZU Y, DEY SK, MANEEKARN N, KOBAYASHI T, HAYAKAWA S, USHIJIMA H. An increasing trend of human Sapovirus infection in Japan, 2009 to 2019: an emerging public health concern[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2022, 15(3): 315-320.
- [26] RIPPL M, BURKHARD-MEIER A, SCHÖNERMARCK U, FISCHEREDER M. Sapovirus: an emerging pathogen in kidney transplant recipients?[J]. *Infection*, 2024, 52(5): 1831-1838.
- [27] MAGWALIVHA M, NGANDU JP K, TRAORE AN, POTGIETER N. Prevalence and genetic characterisation of human Sapovirus from children with diarrhoea in the rural areas of vhembe district, South Africa, 2017-2020[J]. *Viruses*, 2021, 13(3): 393.
- [28] ABOUBAKR H, GOYAL S. Involvement of Egyptian foods in foodborne viral illnesses: the burden on public

- health and related environmental risk factors: an overview[J]. Food and Environmental Virology, 2019, 11(4): 315-339.
- [29] 寇晓霞, 吴清平, 王大鹏, 郭伟鹏, 邓梅清. 多重 RT-PCR 用于临床检测三种胃肠炎病毒的研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 401-405.
- KOU XX, WU QP, WANG DP, GUO WP, DENG MQ. Studies on simultaneous detection of three gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex RT-PCR[J]. Microbiology China, 2007, 34(3): 401-405 (in Chinese).
- [30] BRIDGER JC. Detection by electron microscopy of Caliciviruses, Astroviruses and Rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea[J]. Veterinary Record, 1980, 107(23): 532-533.
- [31] RODRIGUEZ-BAEZ N, O'BRIEN R, QIU SQ, BASS DM. Astrovirus, Adenovirus, and Rotavirus in hospitalized children: prevalence and association with gastroenteritis[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2002, 35(1): 64-68.
- [32] ROHAYEM J, BERGER S, JURETZKE T, HERCHENRÖDER O, MOGEL M, POPPE M, HENKER J, RETHWILM A. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples[J]. Journal of Virological Methods, 2004, 118(1): 49-59.
- [33] BERGALLO M, GALLIANO I, DAPRÀ V, RASSU M, MONTANARI P, TOVO PA. Molecular detection of human Astrovirus in children with gastroenteritis, northern Italy[J]. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2018, 37(8): 738-742.
- [34] KOJABAD AA, FARZANEHPOUR M, GALEH HEG, DOROSTKAR R, JAFARPOUR A, BOLANDIAN M, NODOOSHAN MM. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives[J]. Journal of Medical Virology, 2021, 93(7): 4182-4197.
- [35] ZHUANG JJ, YIN JX, LV SW, WANG B, MU Y. Advanced "lab-on-a-chip" to detect viruses-current challenges and future perspectives[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 163: 112291.
- [36] OLORTEGUI MP, ROUHANI S, YORI PP, SALAS MS, TRIGOSO DR, MONDAL D, BODHIDATTA L, PLATTS-MILLS J, SAMIE A, KABIR F, LIMA A, BABJI S, SHRESTHA SK, MASON CJ, KALAM A, BESSONG P, AHMED T, MDUMA E, BHUTTA ZA, LIMA I, et al. Astrovirus infection and diarrhea in 8 countries[J]. Pediatrics, 2018, 141(1): e20171326.
- [37] YI ZW, DING R, CAO RB, SUN WD, SUN MZ, DONG YY, REHANA B, BAO ED, LV YJ. Development of a duplex TaqMan real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of goose Astrovirus genotypes 1 and 2[J]. Journal of Virological Methods, 2022, 306: 114542.
- [38] ZHOU WT, MAO QY, ZHOU SN, LI TT, TIAN J, LI XQ, LIU S, PENG C, HU ZB, LI JP, HOU GY, SONG HH, JIANG WM, LIU HL. Establishment and application of a duplex fluorescent quantitative PCR assay for H9N2 subtype avian influenza virus and infectious bronchitis virus[J]. Virus Genes, 2025, 61(1): 64.
- [39] CHEN KW, HU Z, YANG GP, GUO W, QI T, LIU DQ, WANG YX, DU C, WANG XJ. Development of a duplex real-time PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Theileria equi* and *Babesia caballi*[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(5): e1338-e1349.