

# 果蔬食品中诺如病毒污染状况及检测研究进展

崔健<sup>1</sup>, 杨莉莉<sup>1</sup>, 邓婷婷<sup>2</sup>, 郑秋月<sup>1</sup>, 曹际娟<sup>1\*</sup>

(1. 大连民族大学生命科学院, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 大连 116600;

2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 322001)

**摘要:** 食源性疾病不但严重危害人们的健康, 而且造成大量的经济损失。在全球范围内与果蔬等农产品相关的诺如病毒(norovirus, NoV)污染事件持续暴发并呈增长态势。由于果蔬类食品中诺如病毒污染含量较低, 再加上食品基质成分的干扰, 使得果蔬制品中的NoV检测成为一项非常艰巨的任务。传统的检测技术存在许多缺点, 例如鉴定的特异性有待增强; 提取效率不够高, 检测敏感性尚需改进。这意味着需要转换视角, 开展食源性诺如病毒检测技术的创新研究。本文综述了果蔬食品中NoV污染流行状况及易受污染的、需加以关注的果蔬食品种类, 总结了果蔬食品中NoV洗脱及富集方法、介绍了基于组学的检测技术及发展趋势, 为不断提高果蔬食品中NoV检测防控能力提供参考。

**关键词:** 诺如病毒; 果蔬食品; 污染状况; 洗脱及富集; 组学检测技术

## Research progress on norovirus contamination status and detection technology in fruit and vegetable foods from a non-traditional perspective

CUI Jian<sup>1</sup>, YANG Li-Li<sup>1</sup>, DENG Ting-Ting<sup>2</sup>, ZHENG Qiu-Yue<sup>1</sup>, CAO Ji-Juan<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China; 2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 322001, China)

**ABSTRACT:** Foodborne virus diseases not only seriously endanger people's health, but also cause a lot of economic losses. Worldwide, norovirus (NoV) pollution incidents related to fruits and vegetables and other agricultural products continue to break out and show an increasing trend. Due to the low content of norovirus contamination in fruit and vegetable foods, coupled with the interference of food matrix components, NoV detection in fruit and vegetable products has become a very difficult task. The traditional detection technology exist many shortcomings, for instance, the specificity of identification needs to be enhanced; extraction efficiency is not high enough, and detection sensitivity needs to be continuously improved. This means that it is necessary to change the perspective and carry out innovative research on detection technology of foodborne norovirus. This paper summarized the prevalence of NoV pollution in fruit and vegetable foods and the types of fruit and vegetable foods that were vulnerable to pollution and need attention, summarized the methods of elution and enrichment of NoV in fruits and vegetables, and introduced the detection technology and development trend based on omics, in order to provide reference for continuously improving the detection and control ability of NoV in fruits and vegetables.

**基金项目:** 国家重点研发计划项目(2021YFF0601902)、辽宁省“兴辽英才计划”项目(XLYC2002106)

**Fund:** Supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFF0601902), and the Liaoning “Xingliao Talent Plan” (XLYC2002106)

\*通信作者: 曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物与食品安全。E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn

\*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Ph.D, Professor, Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, Dalian Minzu University, No.18, Liaohe West Road, Xindu New District, Dalian 116600, China. E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn

**KEY WORDS:** norovirus; fruit and vegetable foods; contamination status; elution and enrichment; omics detection technology

## 0 引言

诺如病毒(norovirus, NoV)是引起急性病毒性胃肠炎的主要原因,具有低剂量感染和传染性强等特点,对全世界的公共卫生安全造成了巨大的威胁<sup>[1]</sup>。NoV 属杯状病毒科(caliciviridae),是单股正链 RNA 病毒,无包膜,在引起人类疾病的 30 多种 NoV 基因型中,GI.4 型 NoV 引起了全世界大多数 NoV 感染<sup>[2]</sup>。NoV 可通过食品、饮用水和人员之间的密切接触等进行传播,在一场 NoV 引发的疫情中可能存在多种传播途径,而食源性传播是引发 NoV 疫情最主要的途径<sup>[3]</sup>。

水果和蔬菜是健康均衡饮食的重要组成部分,被认为是人类营养、维生素和纤维的重要来源<sup>[4]</sup>。世界各地果蔬交易频繁,无论作为原材料还是即食产品,伴随着贸易都有助于病毒的广泛传播<sup>[5]</sup>。有研究人员综合了 2014—2021 年 4 个数据库(PubMed/Medline, Scopus, Eurosurveillance Journal, Spingerlink electronic journal)和 1 个全球电子报告系统(ProMED)信息<sup>[4]</sup>,报道与冰鲜农产品有关的食源性疾病暴发 152 例,其中 NoV 占 48.7%。通常情况下,附着在果蔬上的病毒含量较低,但是 10~100 个诺如病毒粒子即可致病<sup>[6]</sup>。随着果蔬与其他食品基料混合加工食用呈现丰富多样化,实际发生的食品安全事件远高于所报道的数量,原因是有些病毒没有被检测确认或病毒含量低而未被检出。

本文综述了近年来全球 NoV 感染状况,梳理易受污染果蔬食品种类,阐述果蔬食品复杂基质的 NoV 洗脱及富集技术、基于组学的检测技术发展现状,旨在为进一步深入研究受污染果蔬食品中低剂量 NoV 的检测、预警和防控机制提供较为全面、系统的引导和借鉴。

## 1 NoV 流行状况与涉及果蔬食品种类

### 1.1 世界各地 NoV 流行状况

1968 年,美国诺瓦克镇一所学校爆发了急性肠胃炎事件,多数学生出现了腹泻、呕吐等症状。直到 1972 年,首次通过免疫电镜观察到了该病毒。2002 年,国际病毒分类委员会将其命名为 NoV<sup>[7]</sup>。NoV 在世界范围内广为流行,具有明显的季节性和地域性<sup>[8]</sup>,且变异速度极快<sup>[9]</sup>。ZHU 等<sup>[2]</sup>分析 2016—2020 年急性胃肠炎爆发病例的 NoV 基因型月度变化趋势,发现每隔几年就会出现新的变种,取代之前的优势毒株,引发新一波疫情。

从全球 NoV 疫情流行状况来看,南美洲是爆发流行率最高地区,其次为北美洲、欧洲和亚洲,非洲和大洋洲

的患病率最低<sup>[10]</sup>。在南美洲,巴西 NoV 感染率较高,SARMENTO 等<sup>[11]</sup>在两年时间里对巴西 10 个州 1546 份粪便样本进行分析发现,在各个年龄段中,受影响最严重的年龄组是 6 至 24 个月的儿童。在北美洲,NoV 在美国是引发急性肠胃炎的主要病原,每年导致 1900 万至 2100 万人患病<sup>[12]</sup>。在欧洲,PAVONI 等<sup>[13]</sup>对 2014—2019 年来自意大利不同产区的 6 类 9242 份食品样本进行分析,发现 NoV GI/GII 在所有 6 类食品中均占主导地位。在亚洲,NoV 疫情报道集中在中国、韩国和日本。中国 2006—2016 年间有 38.7% (12/31)省份上报了 132 起 NoV 疫情,涉及 8133 病例,40.5507 万人感染<sup>[14]</sup>;2016—2019 年,报告 1153 起 NoV 感染事件,主要集中在幼儿园及大中小学校<sup>[15]</sup>。韩国 2002—2017 年间食物中毒发生率为 4272 起,其中 NoV 感染排名第一<sup>[16]</sup>。在非洲,数据表明<sup>[17]</sup>,NoV 是非洲 5 岁以下儿童中度胃肠炎的常见病因,且由 NoV 引发的肠胃炎有着更为严重的症状<sup>[18]</sup>。在大洋洲,与 NoV 疫情有关的报告大多来自澳大利亚,集中在新南威尔士州和西澳洲<sup>[19]</sup>。

### 1.2 涉及 NoV 污染的果蔬食品种类

对曾涉及 NoV 污染的果蔬类食品种类进行梳理<sup>[4,13,20-21]</sup>,主要包括:蔬菜、水果、种子蔬菜、芽菜、菌类、根和地下蔬菜以及草本植物等。此外,乳制品及甜点(如奶油、酸奶、冰沙、冰淇淋等)中也存在 NoV 风险,原因是为了追求更好的口感、外观和营养价值,在乳制品中添加一种或多种水果(果泥或果汁)。表 1 列举了曾报道 NoV 污染的果蔬种类。迄今为止,几乎没有针对奶油、酸奶、冰沙、冰淇淋等富含牛奶、酪蛋白、乳清蛋白、乳糖、脂肪等成分的牛奶甜点、含有一种或多种水果(果泥或果汁形式)的混合加工类食品的 NoV 污染状况调查。原因在于复杂的食物基质通常比水果和蔬菜含有更多的脂肪和蛋白质,因此更难分析,尚缺乏稳定的检测方法。

表 1 涉及 NoV 污染的果蔬食品种类  
Table 1 Types of fruit and vegetable foods involved in NoV contamination

类别	分类	涉及种类
水果	瓜果类	哈密瓜、西瓜
	仁果类	苹果、梨
	核果类	杏子、樱桃
	浆果类	蓝莓、草莓、树莓
	热带水果	香蕉、芒果
	亚热带水果	鳄梨、橙子
蔬菜	根茎类	甜菜、胡萝卜、土豆、山药、生姜、芋头、芦笋

表 1(续)

类别	分类	涉及种类
	叶菜类	生菜、菠菜、大蒜、洋葱、芹菜、罗勒、芫荽
	瓜茄类	黄瓜、南瓜、辣椒、西红柿、秋葵
	鲜豆类	利马豆、雪豌豆、甜玉米
	花芽类	洋蓟、西兰花
	芽菜类	苜蓿、绿豆芽
	菌类	纽扣蘑菇、波塔贝拉蘑菇
	藻类	裙带菜
其他	乳制品及甜点	奶油、酸奶、冰沙、冰淇淋等

## 2 果蔬类食品中 NoV 提取

### 2.1 病毒洗脱

食源性病毒的检测会历经病毒洗脱、富集等提取病毒以及测试分析病毒的过程。果蔬类食品中病毒含量较低,加之基质复杂而影响病毒提取效率,能够高效率地从食品基质中洗脱释放病毒是成功的第一步<sup>[22]</sup>。然而,基质表面的形态特征(如粗糙程度等)、基质的组成成分(如果胶、脂肪、酸碱度等)、基质中病毒存在的部位(如内部、外部等)、基质的存在状态(如冷冻、冻干等)等均会影响到病毒洗脱效果。不同的食品基质需要不同的洗脱方法。常见的洗脱液有:三(羟甲基)氨基甲烷盐酸-甘氨酸-牛肉浸膏洗脱液(Tris-glycine-beef extract, TGBE),磷酸二氢钾-氯化钠-聚乙二醇辛基苯基醚洗脱液(potassium dihydrogen phosphate-sodium chloride-polyethylene glycol octyl phenyl ether, TRALK),碳酸氢钠-大豆蛋白洗脱液(sodium bicarbonate-protein, SP)。这些洗脱液对蓝莓、草莓、生菜等冰鲜果蔬中 NoV 洗脱效果较好<sup>[23-25]</sup>。近几年,果蔬加工食品基质成为研究热点。适当的果胶酶消化处理可降低水果沙拉、蔬菜沙拉中果胶物质的抑制作用,显著提高病毒回收率<sup>[26]</sup>。在 TGBE 洗脱液中添加蛋白酶 K,有助于提高牛奶和白软干酪中 NoV 的回收率<sup>[21]</sup>。表 2 列举了一些果蔬类

食品中常用洗脱液类型。

### 2.2 病毒富集

洗脱后的病毒颗粒存在于大体积的洗脱液中,浓缩获取高浓度、高纯度的完整病毒颗粒极其重要<sup>[27]</sup>。常见的富集方法有:聚乙二醇沉淀法(polyethylene glycol, PEG)、免疫磁珠分离法(immunomagnetic beads separation techniques, IMB)<sup>[28-29]</sup>、磁性二氧化硅珠(magnetic Silica Beads, MSB)<sup>[30]</sup>、超滤法<sup>[26]</sup>、超速离心法<sup>[31]</sup>等。PEG 是指在一定浓度的盐溶液中加入亲水性较强的聚乙二醇,使得病毒粒子凝聚沉淀,从而达到富集和浓缩病毒的目的。IMB 是利用抗原抗体高度特异性的免疫反应和磁珠的磁响应性相结合的一项新技术,该技术具有极高的灵敏度与较强的特异性和抗干扰能力,可以更快更准确地将病毒从复杂基质中分离出来,从而达到富集的目的。超滤法的原理是借助一定的外界压力,利用了半透膜的微孔结构实现对病毒的分离与回收。靶向结合法是一种基于靶向结合的病毒富集和纯化的新技术,该技术包括免疫结合、受体结合、核酸适配体结合等方法。超离心法是指通过利用病毒粒子在离心场中的沉降行为不同对病毒进行非破坏性的分离、浓缩,沉降行为则取决于病毒粒子的沉降系数、形状、质量等。

目前最为普遍使用的是 PEG 沉淀法。高分子聚合物 PEG 具有强烈的吸水性和沉淀蛋白的作用,通过空间位置的排挤使溶液中的病毒粒子被迫聚集在一起<sup>[32-33]</sup>,对食源性病毒具有更好的富集效果。基于 PEG 沉淀浓缩对草莓、生菜、莴苣等冰鲜果蔬中 NoV 富集有较好的回收率<sup>[24,34-35]</sup>,这也是 ISO/TS 15216-1:2017 推荐使用的方法。然而,曾有研究者报道该方法并不适用于蛋糕、午餐肉等食品,而超离心法却成功回收该类食品中的病毒<sup>[35]</sup>,但是检出限并不令人满意且远高于冰鲜果蔬。基于 IMB 的特异性免疫反应与磁珠的磁响应性抗干扰能力相结合,可以更快更准地富集病毒,对草莓、葡萄和青葱等冰鲜果蔬中 NoV 的回收率要高于 PEG 法<sup>[28]</sup>。此外,超速离心法对草莓牛奶、冰淇淋中病毒富集效果比 PEG 法有更高的回收率<sup>[36]</sup>。表 3 列举了一些果蔬食品中常用的病毒浓缩富集方法。

表 2 常用的 NoV 洗脱缓冲液种类及适用基质

Table 2 Elution buffer types and applicable matrices of commonly used NoV

洗脱液名称	配方成分	基本原理	基质种类	参考文献
TGBE	0.1 mol/L 三(羟甲基)氨基甲烷盐酸, 0.05 mol/L 甘氨酸, 3%牛肉浸膏, pH 9.5	呈碱性, Tris 缓冲中和水果酸性物质, 甘氨酸减缓病毒对基质吸附	冰鲜果蔬	[24]
TRALK	0.05 mol/L 磷酸二氢钾, 1.0 mol/L 氯化钠, 0.1%聚乙二醇辛基苯基醚, pH 9.2	磷酸盐类, 呈碱性, 可打破阴(阳)离子膜作用	冰鲜果蔬	[23]
SP	1 mol/L 碳酸氢钠, 1%大豆蛋白, pH 8.0	碳酸盐类, 偏中性, 可在样品表面形成气泡, 有利于病毒洗脱	表面不光滑果蔬	[23]
TGBE+果胶酶	30 U 淀粉葡萄糖苷酶果胶酶, 或 1140 U 棘孢曲霉果胶酶	可水解降低基质中果胶物质	水果沙拉、蔬菜沙拉等	[26]
TGBE+蛋白酶 K	0.1 mg/mL 蛋白酶 K	消化包围靶核酸的蛋白质	牛奶、白软干酪	[21]

表 3 常用的病毒浓缩富集方法及适用基质  
Table 3 Enrichment methods and applicable matrices of commonly used virus

洗脱浓缩方法	基质种类	回收率/检出限	参考文献
TGBE 洗脱+PEG 富集	草莓	44.04%	[24]
TGBE 洗脱+PEG 富集	冷冻树莓	2.83%~15.28%	[37]
TRALK 洗脱+PEG 沉淀	生菜	$10^3$ Copies/10 g	[35]
TGBE+乙烯基丁内酰胺洗脱+超速离心	葡萄	18%	[31]
TGBE 洗脱+超滤法	草莓、生菜	$10^3$ Copies/10 g	[35]
TRALK 洗脱+超滤法	葡萄、洋葱	$10^4$ Copies/10 g	[35]
IMB	冰鲜果蔬	1.730%	[28]
MSB	冷冻树莓	2.6%	[30]
超速离心法	草莓牛奶、冰淇淋	13.4%、27.7%	[36]
直接 RNA 提取法	蛋糕、午餐肉	$10^5$ Copies/2 g	[35]

从常用的果蔬类食品中 NoV 洗脱浓缩富集方法来看, 每种方法都呈现出不同的回收率。果蔬食品中回收病毒取决于病毒种类及分析基质<sup>[38]</sup>。食品的成分会严重影响 NoV 的提取。目前, 很多果蔬混合加工类食品富含牛奶、酪蛋白、乳清蛋白、乳糖、脂肪等成分, 属于非常不同的有机化学结构类别, 表现出不同的吸附、沉淀和洗脱特性, 从而对回收率产生影响。探究复杂的食品基质中病毒洗脱富集方法, 并开发不具有感染性的装甲 RNA 等病毒样颗粒来质控检测的回收率, 对满足日益营养丰富多样化食品的开发及食品安全监控都有着重要的意义。

### 3 基于组学的 NoV 检测技术

#### 3.1 形态学电镜观察

电镜检测法包括了直接电镜法和免疫电镜法。直接电镜法只能用于患病早期病毒大量排出时采集的粪便样品的检测, 该方法对检测样品的病毒载量有一定要求, 检出率约为 10%~20%。免疫电镜法利用示踪标记的抗体进行捕捉病毒颗粒表面抗原, 然后用电子显微镜进行观察, 其检出率大大提高。方肇寅等<sup>[39]</sup>在国内首次通过电镜观察发现 NoV。电子显微镜主要基于颗粒的特征形态来量化病毒颗粒, 但是灵敏度与特异性相对较差, 对操作人员的专业性要求较高。显微镜观察受限于对技术技能和专业知识的高要求, 但特别适用于未知病毒的分析<sup>[40]</sup>。

#### 3.2 免疫蛋白质组学检测技术

免疫测定是利用抗原抗体特异结合的反应特性来确

定目标分析物存在浓度的生化试验<sup>[41]</sup>。常见方法包括酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>[42]</sup>、放射免疫测定法(radioimmunoassay, RIA)、胶体金免疫层析技术(colloidal gold immunochromatographic assay, GICA)<sup>[43-44]</sup>, 以此开发的 ELISA 和 RIA 试剂盒、GICA 测试条等, 已被用于检测 NoV, 在筛查食源性病毒中发挥了重要作用<sup>[43,45]</sup>。能否成功免疫测定食源性病毒取决于抗体的高亲和力和特异性<sup>[46]</sup>。但是免疫抗体通常对某些突变病毒的敏感性和特异性较低, 且极易受到食品复杂基质干扰的影响, 会限制目标病毒抗原的稳定表达, 进而影响到检测的准确性<sup>[47]</sup>; 此外因敏感性较差尚不能满足果蔬食品中微量 NoV 的检测<sup>[48]</sup>。

基于特异性抗原相对分子量的直接测定, 如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS), 可直接检测病毒特异性抗原的相对分子量, 并进行窗口期检查。与多重 PCR 结合检测病毒分子量的差异, 已用于 10 种诺如病毒的高通量诊断或基因分型<sup>[49]</sup>。该技术具有窗口期短、基因分型快捷的优势, 未来在食源性 NoV 分型的检测研究中将会有更加广阔的应用。

近几年, 基于表面增强拉曼光谱(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)结合的免疫层析法测定已成为研究新热点。该技术是借助金属纳米颗粒的表面增强特性, 利用 SERS 的超灵敏度和光谱选择性, 结合抗体/抗原的特异性吸附作用发展起来的一种新型免疫分析技术。已见相关申请发明制备出轮状病毒拉曼免疫层析试纸条, 灵敏度高、特异性强、使用方便快捷, 可大量用于临床早期快速诊断。开展该技术快速筛查 NoV 研究, 应用于水源、加工人员及器具、果蔬原料基地的 NoV 污染早期监测, 可极大地降低 NoV 引入果蔬食品加工链的风险, 具有广阔的应用前景。

#### 3.3 基因组学检测技术

基于直接检测的核酸杂交技术, 例如原位杂交<sup>[50]</sup>、点印迹杂交<sup>[51]</sup>等, 不受靶抗原的表型变异影响, 不依赖于宿主产生抗体, 已被用于检测病毒。但是, 核酸杂交不涉及核酸扩增, 其灵敏度会受到很大限制, 目前尚不适用于果蔬食品基质中微量 NoV 的检测。

基于变温扩增的核酸检测技术, 如最早发展起来的常规聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、多重定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR), 因特异性、灵敏度不够高, 易出现假性结果等问题, 已逐渐被荧光定量 PCR 所代替<sup>[48]</sup>。荧光定量 PCR 因其较高的特异性和灵敏度被认为是病毒检测的“金标准”<sup>[52-53]</sup>, 已广泛应用于果蔬食品中 NoV 检测<sup>[54]</sup>。基于变温扩增的核酸分析需要完善分区的 PCR 实验、昂贵的设备和经验丰富的操作人员, 在资源有限的情况下则限制了其在基层的应用。而小型化、成本低和便捷化的食源性病毒检测已成为发展新趋势。

基于恒温扩增的环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)的原理是利用 BstDNA 聚合酶和一组特异性引物,在恒温下进行靶基因扩增的技术,该技术因其设备简单、耗时短、成本低廉<sup>[55]</sup>,已被用于水产品中 NoV GII 检测<sup>[56-57]</sup>。近几年发展起来的重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)和重组酶介导的扩增技术(recombinase-aid amplification, RAA),借助于 3 种关键酶或蛋白(重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶)在 37°C 恒温下约 30 min 即可完成核酸快速扩增,具有明显的快捷优势,已用于病毒快速检测<sup>[58-59]</sup>。在 RPA/RRA 基础上开发的胶体层析法更极大地简化了检测仪器,可以更好地满足不具备分子检测条件的基层或者经济较为落后的地区<sup>[60-61]</sup>。

基于微滴式核酸定量的数字 PCR 技术(droplet digital real-time PCR, ddPCR)因其对 DNA 或 RNA 的绝对定量能力而变得越来越流行<sup>[62]</sup>,该技术的作用原理是将含有核酸的反应体系进行极限稀释,并通过一定手段将其分散成为体积可小至皮升级的反应单元,每个反应单元作为一个独立的 PCR 反应器,其中含有或不含待检测靶标分子,待 PCR 扩增结束之后,收集每个反应单元信号,最后根据泊松分布原理计算待检测靶标分子的浓度或拷贝数。与 qPCR 相比,ddPCR 对背景噪声的免疫能力更强,不受扩增效率的影响,尤其适用于低浓度病毒的定量检测<sup>[63]</sup>。陈嘉茵等<sup>[64]</sup>发现 RT-ddPCR 检测生菜中 NoV GII 时抑制物对回收率的影响较小。王雪晴等<sup>[65]</sup>发现 RT-ddPCR 检测冷冻草莓中 NoV GI、NoV GII,其灵敏度比 RT-qPCR 高出一个数量级且重复性良好,但在 NoV 浓度较低时则重复性不佳。徐蕾蕊等<sup>[66]</sup>采用 RT-ddPCR 监测市售食品(牡蛎、生菜、草莓、苹果),发现仅在贝类中检出 NoV,而在软质水果和蔬菜样品中均未检出 NoV,原因可能是贝类中 NoV 的污染水平较高,或者对微量污染 NoV 的软质水果和蔬菜的病毒洗脱富集效果有待改进。

第二代基因测序技术(next generation sequence, NGS)的核心思想是通过捕捉新合成末端的标记来确定 DNA 的序列,该技术突破了常规 PCR 的扩增片段小、探针引物依赖强等局限性,可直接对样品中的核酸进行检测,在生物学等领域被广泛应用<sup>[67]</sup>。BARTSCH 等<sup>[68]</sup>采用 NGS 分析发现从患者和疫情爆发的浆果中 NoV 的序列具有高度一致性。YANG 等<sup>[69]</sup>将 NGS 应用于低拷贝数或多株 NoV 的非扩增检测和鉴定,从芹菜中检出 NoV。NGS 技术在混合病毒及基因分型分析中具有更强的优势。

基于微流体芯片的核酸检测技术,具有微型化、高通量和自动化特点,极大地提高了检测效率。何雅青等<sup>[70]</sup>建立了一种液相芯片与多重 PCR 结合的检测技术,同时检测轮状病毒、NoV GI 和 GII。研究者将病毒洗脱、富集、核酸提取、RT-PCR 分析的不连续过程,利用物理、微电子、计

算机技术等手段,基于固体芯片表面微流体分析单元和系统为一体的高度交叉,发展起来的微流体芯片技术有巨大的发展潜力<sup>[71]</sup>,已用于食源性病毒监测<sup>[72]</sup>。几种微流体系统装备已被多次评价用于检测食源性病原体<sup>[73-75]</sup>,促进了微流体技术的突破性发展。基于微流体芯片的通量化,可进一步在果蔬食品中常见食源性病毒的监测中发挥作用。

### 3.4 单分子组学检测技术

基于 CRISPR-Cas 平台的单分子检测技术,聚集规则间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)与 CRISPR 相关蛋白 9 (CRISPR associated nuclease, Cas 9)一起被用作基因组编辑的工具,并像剪刀一样工作以剪切任何所需的 DNA 序列<sup>[76]</sup>。2017 年,GOOTENBERG 等<sup>[77]</sup>通过 CRISPR-Cas13a 超灵敏检测核酸,检测灵敏度为一个病毒拷贝/ $\mu\text{L}$  血清,达到单分子敏感性。CRISPR 技术超灵敏核酸检测成为研究热点。WU 等<sup>[78]</sup>基于 CRISPR-Cas12 快速鉴别清真食品,将食品真实性鉴别提升到单碱基分辨水平。ZHU 等<sup>[79]</sup>利用 CRISPR/Cas 系统直接识别转基因元件,构建转基因玉米的快速、高灵敏恒温检测新方法。ZHANG 等<sup>[80]</sup>特选病原微生物 RNA 为靶标分子,基于 CRISPR/Cas 系统和恒温扩增技术,构建了恒温、快速的食源性病原活菌定量新方法;通过引入开关型高信噪比核酸探针,非核酸扩增依赖的病原 RNA 直读技术,实现了病原微生物从总量检测到活菌检测的突破。基于该技术的超灵敏优势,结合 RPA/RRA 的恒温快捷优势,会更有利于对果蔬食品中微量 NoV 污染的高灵敏检测。

基于生物传感器的单分子检测技术具有举足轻重的地位,其具有传统技术所达不到的高敏感的检测能力,已在医学和药物发现中具有非常重要的潜在适用性<sup>[81]</sup>。AKKILIC 等<sup>[82]</sup>探讨单分子生物传感器用于体外和体内检测病原体目标物。单分子检测和单分子生物传感器满足了更高的实时性和更高的准确性,能实时监测群体中的单个生物分子,揭示单个分子的特性,可获取更多易被忽略的基因信息,得到更灵敏和更广泛的数据。深入研究该技术的应用,将会为 NoV 流行监测发挥巨大作用。

### 3.5 不同组学检测技术的比较

基于组学的新型检测技术发展日益迅速,也有着各自优缺点(表 4)。显微镜观察因其对未知病毒的分析,仍是探究病毒特性的基础。免疫蛋白质组学检测技术虽依赖于抗体的高亲和力和特异性的限制,但其适于大批量样品的筛查。基因组学检测技术始终是食源性病毒检测核心技术,qPCR 仍是食源性病毒检测“金标准”;但是,RPA/RRA 以其低温恒温扩增快捷的优势,备受研究者的关注,可与单分子组学检测新技术相结合,突破果蔬食品中微量病毒高灵敏、快速检测的技术瓶颈。

表 4 基于组学的代表性检测技术比较  
Table 4 Comparison of representative detection techniques based on omics

组学	检测技术	优点	缺点	参考文献
形态学	电镜观察	对人员技能要求高, 特异性差	适用于未知病毒的分析	[40]
	ELISA	操作简便, 适于大批样品分析	依赖于抗体的高亲和力和特异性, 检测敏感性较差	[42]
免疫蛋白质组学	RIA	操作简便, 相比 ELISA 灵敏性高, 适于大批样品分析	依赖于抗体的高亲和力和特异性, 检测敏感性较差	[43]
	GICA	操作方便, 不依赖于仪器, 速度快, 5~10 min 即可肉眼判读	依赖于抗体的高亲和力和特异性, 基质干扰影响敏感性	[44]
	MALDI-TOF-MS 抗原测定	窗口期短, 基因分型快捷	操作烦琐, 依赖于抗原数据库	[49]
	拉曼免疫层析试纸条	灵敏度高, 特异性强, 方便快捷	依赖于抗体的高亲和力和特异性	[83]
	核酸杂交	不受靶抗原的表型变异限制, 不依赖于宿主产生抗体	不涉及核酸扩增, 其灵敏度受到很大限制	[50-51]
基因组学	实时荧光 qPCR	食源性病毒检测“金标准”, 特异性好, 灵敏度高	PCR 分区和操作人员要求高, 在基层应用受条件限制	[52-54]
	LAMP	63°C 恒温扩增, 设备简单, 耗时短, 30~60 min 即可完成	引物设计复杂, 非特异性扩增难以区分	[55-57]
	RPA/RRA	39°C 恒温扩增, 设备简单, 耗时短, 10~30 min 即可完成	引物设计复杂, 成本较高	[60-61]
	ddPCR	实现定量检测, 对背景噪声的免疫能力更强	仪器昂贵, 定量结果稳定性有待提高, 成本高	[62-63]
	NGS	高通量, 高精度, 适于混合病毒及基因分型分析	成本高, 是制约推广应用的瓶颈	[67]
	微流体基因芯片	微型化, 高通量, 自动化	成本高, 是制约推广应用的瓶颈	[70-75]
	CRISPR-Cas 系统	可达到单分子分析水平, 可对基因进行定点的精确编辑	稳定性有待提升, 是否有脱靶效应尚需进一步研究	[76-81]
单分子组学	单分子生物传感器	专一性强, 准确性高, 分析速度快, 可在 1 min 得到结果	灵敏度和稳定性有待提高	[81-82]

#### 4 结束语

果蔬类食品是人均消费量最大的食品, 消费持续增长。以往人们对食源性病毒检测研究多集中在冰鲜果蔬, 特别是小浆果和常见生蔬类。食品基质不同, 富集病毒和检测病毒的方法也不尽相同。现代食品工业发展迅猛, 日益丰富的饮食多样化, 既涉及种类繁多的跨境贸易果蔬, 又涉及动物源食品的混合基质, 现阶段, 应该加强对全球果蔬食品污染状况、涉及种类等研究, 更需要开展多元化、深入化的复杂食品基质中 NoV 检测技术研究, 有助于全面评估果蔬食品类 NoV 污染对人类健康带来的风险。

目前, 针对冰鲜果蔬中 NoV 污染检测监测的报道已经很多, 但针对含有一种或多种水果基料的混合加工类食品的 NoV 污染状况调查甚少, 特别是尚缺乏对牛奶甜点等青少年喜爱的快餐食物的检测方法研究和污染监测调查。为了进一步深入研究我国果蔬食品中 NoV 的整体污染情况, 未来可开展以下几方面的研究: (1) 探究个性化、基质多样化的果蔬食品中 NoV 洗脱、富集方法, 结合新型组学分析技术的各自优势, 创建高效率的检测新方法, 满足对某

些监测不足或缺乏的果蔬食品种类的检测。(2) 为评价所创建的方法检测效率, 研发基于装甲 RNA 等病毒样颗粒, 对复杂基质食品中 NoV 的洗脱、富集、核酸提取、RT-qPCR 的检测全过程进行质量控制, 用以评价方法的回收率、灵敏度等检测效率。(3) 开展多样化果蔬食品污染状况检测研究, 进一步完善食源性病毒监测预警体系, 从而对 NoV 带来的相关风险进行科学的评估。

#### 参考文献

- [1] 张超, 邓建军, 张瑞娟, 等. 诺如病毒分子生物学研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2017, 18(1): 49-53.  
ZHANG C, DENG JJ, ZHANG RJ, *et al.* Advances in molecular biology of norovirus [J]. Chin J Prev Med, 2017, 18(1): 49-53.
- [2] ZHU X, HE YQ, WEI XY, *et al.* Molecular epidemiological characteristics of gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.4 sydney [P31] strains-China, October 2016-December 2020 [J]. China CDC Weekly, 2021, 3(53): 1127-1132.
- [3] 刘江艺, 黄永翰, 李锋平, 等. 国内诺如病毒性胃肠炎暴发疫情影响因素的 Meta 分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2017, 28(6): 79-82.  
LIU JY, HUANG YH, LI FP, *et al.* A Meta-analysis of the influencing factors of the outbreak of noroviral gastroenteritis in China [J]. J Pub

- Health Prev Med, 2017, 28(6): 79–82.
- [4] CHATZIPRODROMIDOU IP, BELLOU M, VANTARAKIS G, *et al.* Viral outbreaks linked to fresh produce consumption: A systematic review [J]. *J Appl Microbiol*, 2018, 124(4): 932–942.
- [5] CARTER MJ. Enterically infecting viruses: Pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection [J]. *J Appl Microbiol*, 2005, 98(6): 1354–1380.
- [6] World Health Organization. Fact sheet. Food-safety [EB/OL]. WHO. [2020-04-30]. <https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> [2022-02-25].
- [7] 王大鹏. 诺如病毒研究进展[J]. *食品安全导刊*, 2017, (7): 26–27.  
WANG DP. Advances in norovirus research [J]. *China Food Saf Magaz*, 2017, (7): 26–27.
- [8] 练莲. 我国诺如病毒感染暴发疫情流行特征及防控策略研究[J]. *应用预防医学*, 2021, 27(4): 378–381.  
LIAN L. Epidemiological characteristics and prevention and control strategies of norovirus infection outbreak in China [J]. *J Appl Prev Med*, 2021, 27(4): 378–381.
- [9] 廖巧红, 冉陆, 靳森, 等. 诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南(2015版)[J]. *中华预防医学杂志*, 2016, 50(1): 7–16.  
LIAO QH, RAN L, JIN M, *et al.* Technical guidelines for investigation and prevention and control of outbreaks of norovirus infection (2015 edition) [J]. *Chin J Prev Med*, 2016, 50(1): 7–16.
- [10] LIAO YY, HONG XJ, WU AW, *et al.* Global prevalence of norovirus in cases of acute gastroenteritis from 1997 to 2021: An updated systematic review and meta-analysis [J]. *Microb Pathog*, 2021, 161(PA): 105259.
- [11] SARMENTO SK, ANDRADE JSR, MIAGOSTOVICH MP, *et al.* Virological and epidemiological features of norovirus infections in Brazil, 2017–2018 [J]. *Viruses*, 2021, 13(9): 1724–1724.
- [12] PARIKH MP, VANDEKAR S, MOORE C, *et al.* Temporal and genotypic associations of sporadic norovirus gastroenteritis and reported norovirus outbreaks in middle tennessee, 2012–2016 [J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 71(9): 2398–2404.
- [13] PAVONI E, BERTASI B, GALUPPINI E, *et al.* Detection of hepatitis A virus and norovirus in different food categories: A 6-year survey in Italy [J]. *Food Environ Virol*, 2021. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12560-021-09503-y>
- [14] QIN SW, CHAN TC, CAI J, *et al.* Genotypic and epidemiological trends of acute gastroenteritis associated with noroviruses in China from 2006 to 2016 [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14(11): 1341.
- [15] 朱曦, 孔翔羽, 章青, 等. 2016—2019年我国诺如病毒暴发疫情的分子流行病学特征分析[J]. *疾病监测*, 2021, 36(8): 774–779.  
ZHU X, KONG XY, ZHANG Q, *et al.* Molecular epidemiological characteristics of norovirus outbreaks in China from 2016 to 2019 [J]. *Dis Surveill*, 2021, 36(8): 774–779.
- [16] KIM JG, KIM JS, KIM JG. Characteristics of norovirus food poisoning outbreaks in Korea in the 2000s [J]. *J Food Protect*, 2021, 84(3): 472–480.
- [17] KABUE JP, MEADER E, HUNTER PR, *et al.* Human norovirus prevalence in Africa: A review of studies from 1990 to 2013 [J]. *Trop Med Int Health*, 2016, 21(1): 2–17.
- [18] ROSSOUW E, BRAUER M, MEYER P, *et al.* Virus etiology, diversity and clinical characteristics in south African children hospitalised with gastroenteritis [J]. *Viruses*, 2021, 13(2): 215–215.
- [19] LIM KL, HEWITT J, SITABKHAN A, *et al.* A multi-site study of norovirus molecular epidemiology in Australia and New Zealand, 2013–2014 [J]. *PLoS One*, 2017, 11(4): e0145254.
- [20] BENNETT SD, SODHA SV, AYERS TL, *et al.* Produce-associated foodborne disease outbreaks, USA, 1998–2013 [J]. *Epidemiol Infect*, 2018, 146(11): 1397–1406.
- [21] HENNECHART-COLLETTE C, MARTIN-LATIL S, FRAISSE A, *et al.* Comparison of three extraction methods to detect noroviruses in dairy products [J]. *Food Microbiol*, 2017, 61: 113–119.
- [22] 章国宝, 应丽红, 雷永良. 食源性诺如病毒的研究进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(20): 3036–3040.  
ZHANG GB, YING LH, LEI YL. Research advances in foodborne norovirus [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 27(20): 3036–3040.
- [23] 施晓峰, 程东庆, 章荣华, 等. 蓝莓中诺如病毒检测方法的优化及其在果蔬中的应用[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(12): 232–239.  
SHI XF, CHENG DQ, ZHANG RH, *et al.* Optimization of norovirus detection method in blueberries and its application in fruits and vegetables [J]. *Chin J Food Hyg*, 2018, 18(12): 232–239.
- [24] 王飞, 李慧莹, 靳森, 等. 草莓中诺如病毒不同洗脱和富集方法的评估[J]. *病毒学报*, 2018, 34(1): 94–100.  
WANG F, LI HY, JIN M, *et al.* Evaluation of different elution and enrichment methods of norovirus in strawberries [J]. *Chin J Virol*, 2018, 34(1): 94–100.
- [25] 管锦绣, 许喜林, 翁文川, 等. 西生菜中低污染量 GII型诺如病毒的富集与定量检测研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(9): 3536–3542.  
GUAN JX, XU XL, WENG WC, *et al.* Enrichment and quantitative detection of norovirus GII in low pollution in lettuce [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(9): 3536–3542.
- [26] CHENG DQ, ZOU SY, LIAO NB, *et al.* Evaluation of an extraction method for the detection of GI and GII noroviruses in fruit and vegetable salads [J]. *J Food Sci*, 2018, 83(2): 393–400.
- [27] 冯华伟, 艾海新, 杨天舟, 等. 小浆果中食源性甲型肝炎病毒和诺如病毒流行状况及检测方法的研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(19): 307–317.  
FENG HW, AI HX, YANG TZ, *et al.* Research progress on the prevalence and detection methods of foodborne hepatitis A virus and norovirus in small berries [J]. *Food Sci*, 2019, 40(19): 307–317.
- [28] 李楠, 王佳慧, 李凤琴, 等. 检测鲜草莓中 GII型诺如病毒的两种富集方法比较[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(3): 242–246.  
LI N, WANG JH, LI FQ, *et al.* Comparison of two enrichment methods for the detection of norovirus GII in fresh strawberries [J]. *Chin J Food Hyg*, 2015, 27(3): 242–246.
- [29] SURESH M, HARLOW J, NASHERI N. Evaluation of porcine gastric mucin assay for detection and quantification of human norovirus in fresh herbs and leafy vegetables [J]. *Food Microbiol*, 2019, 84: 103254.
- [30] RAYMOND P, PAUL S, PERRON A, *et al.* Norovirus extraction from frozen raspberries using magnetic silica beads [J]. *Food Environ Virol*, 2021, 13(2): 1–11.
- [31] HIDA K, PAPAFRAGKOU E, KULKA M. Testing for human norovirus and recovery of process control in outbreak-associated produce items [J]. *J Food Protect*, 2018, 81(1): 105–114.
- [32] CHEN H, LI N, XIE Y, *et al.* Purification of inclusion bodies using PEG precipitation under denaturing conditions to produce recombinant therapeutic proteins from *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2017, 101(13): 5267–5278.
- [33] SAPULA SA, WHITTALL JJ, PANDOPULOS AJ, *et al.* An optimized and robust PEG precipitation method for detection of SARS-CoV-2 in

- wastewater [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 785: 147270.
- [34] 阮佳, 张薇薇, 刘鑫, 等. 蔬菜中食源性病毒富集方法研究[J]. *中国测试*, 2020, 46(10): 11-17.  
RUAN J, ZHANG WW, LIU X, *et al.* Study on foodborne virus enrichment methods in vegetables [J]. *China Mea Test*, 2020, 46(10): 11-17.
- [35] 王宏, 盖婧璇, 靳森, 等. 不同食物中诺如病毒检测方法的优化与评估[J]. *病毒学报*, 2019, 35(3): 505-511.  
WANG H, GE JX, JIN M, *et al.* Optimization and evaluation of norovirus detection methods in different foods [J]. *Chin J Virol*, 2019, 35(3): 505-511.
- [36] BATTISTINI R, ROSSINI I, LISTORTI V, *et al.* HAV detection from milk-based products containing soft fruits: Comparison between four different extraction methods [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 328: 108661.
- [37] BARTSCH C, SZABO K, DINH-THANH M, *et al.* Comparison and optimization of detection methods for noroviruses in frozen strawberries containing different amounts of RT-PCR inhibitors [J]. *Food Microbiol*, 2016, 60: 124-130.
- [38] DASILVA-LUZ I, MIAGOSTOVICH MP. Comparison of viral elution-concentration methods for recovering noroviruses from deli meats [J]. *J Virol Methods*, 2018, 260: 49-55.
- [39] 方肇寅, 温乐英, 晋圣瑾, 等. 在我国腹泻患儿中发现诺瓦克样病毒感染[J]. *病毒学报*, 1995, (3): 215-219.  
FANG ZY, WEN LY, JIN SJ, *et al.* Novak-like mold infection was found in children with diarrhea in China [J]. *Chin J Virol*, 1995, (3): 215-219.
- [40] REBOUD J, XU G, GARRETT A, *et al.* Paper-based microfluidics for DNA diagnostics of malaria in low resource underserved rural communities [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(11): 4834-4842.
- [41] LI F, YOU ML, LI SX, *et al.* Paper-based point-of-care immunoassays: Recent advances and emerging trends [J]. *Biotechnol Adv*, 2020, 39: 107442.
- [42] 万鑫, 霍玉奇, 凌同, 等. GII.4 诺如病毒抗原 ELISA 定量检测方法的建立及其应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2016, 29(8): 875-880.  
WAN X, HUO YQ, LING T, *et al.* Establishment of norovirus GII.4 antigen ELISA quantitative detection method and its application [J]. *Chin J Biol*, 2016, 29(8): 875-880.
- [43] 左月婷, 薛亮, 吴清平, 等. 诺如病毒感染宿主免疫应答机制及疫苗研究进展[J]. *微生物学报*, 2020, 60(11): 2391-2398.  
ZUO YT, XUE L, WU QP, *et al.* Mechanism of host immune response to norovirus infection and research progress of vaccines [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2020, 60(11): 2391-2398.
- [44] 赵琢, 高欣, 张捷, 等. 食源性病毒免疫检测方法研究概述[J]. *广东化工*, 2017, 44(15): 196-197.  
ZHAO Z, GAO X, ZHANG J, *et al.* An overview of the study of foodborne viral immunoassay methods [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2017, 44(15): 196-197.
- [45] BATTAGLIOLI G, NAZARIAN EJ, LAMSON D, *et al.* Evaluation of the RIDA quick norovirus immunochromatographic test kit [J]. *J Clin Virol*, 2012, 53(3): 262-264.
- [46] MANGAL M, BANSAL S, SHARMA SK, *et al.* Molecular detection of foodborne pathogens: A rapid and accurate answer to food safety [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2016, 56(9): 1568-1584.
- [47] SU WT, LIANG D, TAN MQ. Nucleic acid-based detection for foodborne virus utilizing microfluidic systems [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2021, 113: 97-109.
- [48] 廖小艳, 陈丽丽, 白亚龙. 食品中诺如病毒检测技术研究进展[J]. *食品与机械*, 2021, 37(4): 200-206.  
LIAO XY, CHEN LL, BAI YL. Research progress on norovirus detection technology in food [J]. *Food Mach*, 2021, 37(4): 200-206.
- [49] 刘宁, 王禹贺, 李运涛, 等. 基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱的鸭病毒病致病病原同时检测方法的建立[C]. 2018年中国质谱学术大会(CMSC 2018)论文集, 2018.  
LIU N, WANG YH, LI YT, *et al.* Establishment of simultaneous detection method for pathogenic pathogens of duck virus disease based on matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry [C]. *Proceedings of the 2018 China Conference on Mass Spectrometry (CMSC 2018)*, 2018.
- [50] ZHAO K, LIU A, XIA YC. Insights into hepatitis B virus DNA integration-55 years after virus discovery [J]. *Innovation*, 2020, 1(2): 100034.
- [51] ZHANG LH, DAI YB, CHEN JH, *et al.* Comparison of the performance in detection of HPV infections between the high-risk HPV genotyping real time PCR and the PCR-reverse dot blot assays [J]. *J Med Virol*, 2018, 90(1): 177-183.
- [52] 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.
- [53] CORMIER J, JANES M. Concentration and detection of hepatitis A virus and its indicator from artificial seawater using zeolite [J]. *J Virol Methods*, 2016, 235: 1-8.
- [54] XU DS, WU XF, HAN JK, *et al.* Detection of GI and GII noroviruses in drinking water and vegetables using filtration and real-time RT-PCR [J]. *Eur Food Res Technol*, 2014, 239(5): 795-801.
- [55] KOU XX, FAN HY, WU QP, *et al.* Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay on rapid and sensitive detection of rotavirus in fecal samples and artificially seeded oysters [J]. *Food Control*, 2014, 41: 151-157.
- [56] 朱金艳, 于思梦, 吕敬章, 等. 果蔬中诺如病毒检测技术研究进展[J]. *中国果菜*, 2021, 41(3): 41-47.  
ZHU JY, YU SM, LV JZ, *et al.* Research progress on norovirus detection technology in fruits and vegetables [J]. *China Fruit Veget*, 2021, 41(3): 41-47.
- [57] 魏海燕, 曾静, 马丹, 等. 实时 RT-LAMP 与实时荧光 RT-PCR 检测贝类中 GII型诺如病毒的研究[J]. *检验检疫学刊*, 2013, 23(3): 49-53.  
WEI HY, ZENG J, MA D, *et al.* A study of real-time RT-LAMP and real-time fluorescent RT-PCR for the detection of norovirus GII in shellfish [J]. *J Inspect Quarant*, 2013, 23(3): 49-53.
- [58] 陈玲, 段续伟, 张开春, 等. 基于重组酶聚合酶扩增(RPA)技术的樱桃桃病毒 A (CVA)的检测方法[J]. *园艺学报*, 2020, 47(2): 390-398.  
CHEN L, DUAN XW, ZHANG KC, *et al.* Detection method of cherry virus A (CVA) based on recombinant enzyme polymerase amplification (RPA) technology [J]. *Acta Horti Sin*, 2020, 47(2): 390-398.
- [59] 马巧妮, 王萌, 朱兴全. 重组酶介导扩增技术及其在病原微生物快速检测中的应用进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2021, 41(6): 45-49.  
MA QN, WANG M, ZHU XQ. Progress of recombinant enzyme-mediated amplification technology and its application in the rapid detection of pathogenic microorganisms [J]. *Chin Biotechnol*, 2021, 41(6): 45-49.
- [60] 陈淑丹, 罗鹏, 吴亦斐, 等. 核酸试纸条法检测结核分枝杆菌的初步研究[J]. *中国口岸科学技术*, 2021, 3(5): 45-50.



- CHEN SD, LUO P, WU YF, *et al.* Preliminary study on the detection of *Mycobacterium tuberculosis* by nucleic acid dipstick method [J]. *China Port Sci Technol*, 2021, 3(5): 45–50.
- [61] 苗春, 李伟, 杨思成, 等. 非洲猪瘟诊断技术研究进展[J]. *中国动物检疫*, 2022, 39(1): 82–89.
- MIAO C, LI W, YANG SC, *et al.* Research progress on diagnostic technology of African swine fever [J]. *China Anim Health Inspect*, 2022, 39(1): 82–89.
- [62] 冯秀晶, 易红梅, 任星旭, 等. 数字 PCR 技术及其在检测领域的应用[J]. *遗传*, 2020, 42(4): 363–373.
- FENG XJ, YI HM, REN XX, *et al.* Digital PCR technology and its application in the field of detection [J]. *Hereditas*, 2020, 42(4): 363–373.
- [63] MARTINEZ-HERNANDEZ F, GARCIA-HEREDIA I, LLUESMA GOMEZ M, *et al.* Droplet digital PCR for estimating absolute abundances of widespread pelagibacter viruses [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1226.
- [64] 陈嘉茵, 方琴, 吴诗微, 等. 一步法微滴数字 PCR 检测生菜中 GII 型诺如病毒[J]. *食品科学*, 2019, 40(4): 332–337.
- CHEN JY, FANG L, WU SW, *et al.* One-step microdroplet digital PCR for norovirus GII in lettuce [J]. *Food Sci*, 2019, 40(4): 332–337.
- [65] 王雪晴, 王群, 房保海, 等. 微滴式数字 PCR 检测冷冻草莓中 GI、GII 型诺如病毒[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(2): 89–94.
- WANG XQ, WANG Q, FANG BH, *et al.* Droplet digital PCR detects norovirus GI and GII in frozen strawberries [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(2): 89–94.
- [66] 徐蕾蕊, 李丹, 汪琦, 等. 基于数字 PCR 技术的食品中诺如病毒定量检测方法[J/OL]. *食品科学*: 1-14. [2022-03-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20211109.1356.052.html>
- XU LR, LI D, WANG Q, *et al.* Quantitative detection method of norovirus in food based on digital PCR technology [J/OL]. *Food Sci*: 1-14. [2022-03-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20211109.1356.052.html>
- [67] 王素梅, 张健东, 刘树业. 二代测序技术在感染性疾病诊断中的应用进展[J]. *吉林医学*, 2021, 42(1): 210–213.
- WANG SM, ZHANG JD, LIU SY. Progress in the application of second-generation sequencing technology in the diagnosis of infectious diseases [J]. *Jilin Med J*, 2021, 42(1): 210–213.
- [68] BARTSCH C, HÖPER D, MÄDE D, *et al.* Analysis of frozen strawberries involved in a large norovirus gastroenteritis outbreak using next generation sequencing and digital PCR [J]. *Food Microbiol*, 2018, 76: 390–395.
- [69] YANG ZH, MAMMEL M, PAPAFRAGKOU E, *et al.* Application of next generation sequencing toward sensitive detection of enteric viruses isolated from celery samples as an example of produce [J]. *Int J Food Microbiol*, 2017, 261: 73–81.
- [70] 何雅青, 胡春凌, 汪朝晖, 等. 液相芯片检测轮状病毒和诺如病毒方法的建立[J]. *中国病毒病杂志*, 2011, 1(5): 376–381.
- HE YQ, HU CL, WANG CH, *et al.* Establishment of methods for liquid phase chip detection of rotavirus and norovirus [J]. *Chin J Viral Dis*, 2011, 1(5): 376–381.
- [71] 郑辉. 病原微生物检测技术应用及展望分析[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(18): 25–26.
- ZHENG H. Application and prospect analysis of pathogenic microorganism detection technology [J]. *Digest World Latest Med Inform*, 2017, 17(18): 25–26.
- [72] ZHANG HQ, XU Y, FOHLEROVA Z, *et al.* LAMP-on-a-chip: Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification [J]. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2019, 113: 44–53.
- [73] KANT K, SHAHBAZI MA, DAVE VP, *et al.* Microfluidic devices for sample preparation and rapid detection of foodborne pathogens [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(4): 1003–1024.
- [74] PUIU M, BALA C. Microfluidics-integrated biosensing platforms as emergency tools for on-site field detection of foodborne pathogens [J]. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2020, 125(C): 115831–115831.
- [75] SU WT, GAO XH, JIANG L, *et al.* Microfluidic platform towards point-of-care diagnostics in infectious diseases [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1377: 13–26.
- [76] 赵东东, 宗媛, 尹蕾, 等. 基因组编辑技术及未来发展[J]. *生命科学*, 2021, 33(12): 1462–1468.
- ZHAO DD, ZONG Y, YIN L, *et al.* Genome editing technology and future developments [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2021, 33(12): 1462–1468.
- [77] GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, LEE JW, *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438–442.
- [78] WU YH, DONG Y, SHI YC, *et al.* CRISPR-Cas12-based rapid authentication of halal food [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(35): 10321–10328.
- [79] ZHU XY, YANG H, WANG M, *et al.* Label-free detection of transgenic crops using an isothermal amplification reporting CRISPR/Cas12 assay [Z]. 2021.
- [80] ZHANG T, LI HT, XIA XH, *et al.* Direct detection of foodborne pathogens via a proximal DNA probe-based CRISPR-Cas12 assay [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(43): 12828–12836.
- [81] RUSLING JF, FORSTER RJ. Biosensors designed for clinical applications [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(7): 702.
- [82] AKKILIC N, GESCHWINDNER S, HÖÖK F. Single-molecule biosensors: Recent advances and applications [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 151(C): 111944.
- [83] 史巧巧. 表面增强拉曼散射结合免疫层析技术检测牛奶中抗生素残留的方法研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- SHI QQ. A study on the method of detecting antibiotic residues in milk by surface-enhanced Raman scattering combined with immunochromatography technology [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

## 作者简介



崔健, 硕士研究生, 主要研究方向为生物与食品安全。

E-mail: 2820845715@qq.com



曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物与食品安全。

E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn