

資料

## 下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックス RT-PCR 法の アップデート Ver. 2.0

重本 直樹, 久常 有里\*, 谷澤 由枝

### Update Ver. 2.0 of multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers for detecting gastroenteritis viruses.

NAOKI SHIGEMOTO, YURI HISATSUNE\* and YUKIE TANIZAWA

(Received September 13, 2017)

我々が開発した下痢症ウイルスを対象とした蛍光マルチプレックスRT-PCR法 Ver. 1.0のPCR反応時間を短縮するため、マルチプレックスPCRのベースとなる試薬の変更、検査対象ウイルスと使用するプライマー及びその組み合わせの再度適性化により、アップデート版Ver.2.0を確立できた。

Ver. 2.0はVer. 1.0に対し1時間半程度の反応時間短縮効果を示すとともに、従来と変わらない検出感度と判別の容易性を示した。また、感染症発生动向調査事業のウイルス検査等に使用することで、感染性胃腸炎ウイルスの包括的検査が効率的に実施できた。

Key words : 下痢症ウイルス, 蛍光マルチプレックスRT-PCR法, 感染症発生动向調査事業, 包括的検査

## 緒 言

小児下痢症の原因として多くのウイルスが関与していることが知られており、これらを個別に診断することは、労力、時間、コストの面において負担である。この問題を解決するため、昨今は複数のウイルスを包括的に検査することができるマルチプレックスPCR法を利用した検査法が開発されてきている [1-4]。我々も下痢症ウイルスを対象とした蛍光マルチプレックスRT-PCR法 [5] を開発し、サーベイランス検査、食中毒や集団胃腸炎の事案検査に利用しているところである。我々が開発した蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 1.0 (以下Ver. 1.0) [6] の特徴は、10種類のウイルス (ノロウイルス GI (NoV GI), ノロウイルスGII (NoV GII), サポウイルス (SaV), アストロウイルス (HAstV), アイチウイルス (AiV), ボカウイルス (HBoV), パレコウイルス (HPeV), A群ロタウイルス (RVA), C群ロタウイルス (RVC), アデノウイルス (AdV)) を3セットの反応系で検出することが可能であること、検出対象ウイルスのそれぞれの遺伝子増幅産物を異なる蛍光で色付けす

ることにより、視認性・判別性が向上しているところである。しかしながら、現行の反応条件ではPCR反応に3時間半を要すことから時間短縮が課題となっている。今回、マルチプレックスPCRのベースとなる試薬を変更するとともに、検査対象ウイルス、使用するプライマー及びその組み合わせについても再度適性化を行うことにより、PCR反応時間の短縮が可能となったアップデート版2.0を確立できたので報告する。

## 材料および方法

### 1 供試サンプル

ウイルス検査済みで原因ウイルスが既知の糞便検体36検体及び、感染症発生动向調査事業において広島県の医療機関より2015年4月から2017年3月までに搬入されてきた糞便243検体を用いた。

### 2 RNA抽出と逆転写反応

10%糞便乳剤からQIAamp Viral RNA mini Kit (キアゲン) によりRNA抽出を行った。抽出したRNAは使用まで-80℃で保管した。

逆転写反応は5×buffer 4μl, 2mM dNTPs 4μl, 50μM Random primer pd(N)<sub>9</sub> (タカラバイオ) 1μl, RNase

\*元広島県立総合技術研究所保健環境センター

Inhibitor (40U/μl) (TOYOBO) 0.5μl, ReverTra Ace (100U/μl) (TOYOBO) 1μlを含む反応液に抽出RNA 9.5μlを加え, 30°C/10分, 42°C/60分, 99°C/5分の反応を行った(表1)。A群及びC群口タウウイルス検査用のcDNA合成の際には, 抽出RNAにDMSOを10%になるように加えた後, 97°Cで5分処理後に氷冷したものを使用した。

### 3 蛍光マルチプレックスPCR Ver. 2.0

マルチプレックスPCR反応にはMultiplex PCR Assay Kit Ver.2 (タカラバイオ) を用い, 表2に示すプライマー[7-15]及び濃度の反応液48μlにcDNAを2μl加えた。PCR反応は, 94°C/1分の熱変性後, 94°C/30秒, 57°C/30秒, 72°C/30秒を40サイクル行い, 最後に72°C/10分の最終伸長を行った(表1)。

### 4 電気泳動

電気泳動には2%アガロースゲルを用い, PCR反応済みの液10μlをアプライした。サイズマーカーには100bpラダー(GEヘルスケア)1.5μlに1μlのEzVISON (Amresco)を混合したものを用いた。電気泳動後のゲルは, UVトランスイルミネーター上で増幅産物の蛍光バンドと増幅長を確認した後, エチジウムブロマイド染色を行って再度増幅産物の確認を行った。

### 5 蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 2.0の検出限界試験

検出対象ウイルスの検出限界を明らかにするため,リアルタイムPCR法でウイルスコピー数定量済みの陽性検体由来cDNAをEASY Dilution (タカラバイオ)で希釈した10倍段階希釈シリーズをテンプレートとして用いた。

表1 蛍光マルチプレックスRT-PCR法Ver. 1.0とVer. 2.0の反応条件比較

		蛍光マルチプレックスRT-PCRVer.1.0	蛍光マルチプレックスRT-PCRVer.2.0
逆転写	試薬	ReverTra Ace (TOYOBO)	同左
	反応条件	30°C / 10min → 42°C / 60min → 99°C / 5min	同左
PCR	試薬	Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ)	Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 (タカラバイオ)
	反応条件	A, Cセット: 94°C/60sec → (94°C/30sec · 57°C/90sec · 72°C/90sec) × 40 → 72°C/10min Bセット: 94°C/60sec → (94°C/30sec · 55°C/90sec · 72°C/90sec) × 40 → 72°C/10min (約3時間半)	A, B, Cセット: 94°C/60sec → (94°C/30sec · 57°C/30sec · 72°C/30sec) × 40 → 72°C/10min (約2時間)
	プライマーセット	A NoV GI G1SKF/G1SKR 各0.4μM NoV GII GSKF/G2SKR, G2ALSKR 各0.4μM (G2ALSKRは0.2μM) SaV SV-F21/SV-R2 各0.2μM HAstV AC1/AC230 各0.2μM B AiV C(+)/6261/C(-)/6779 各0.4μM HBoV HBoV 01.2/HBoV 02.2 各0.2μM HPeV AN345/AN344 各0.4μM C RVA RotaA-fwd1, RotaA-fwd2 各0.4μM /RotaA rev1, RotaA rev2 RVC G8NS1/G8NA2 各0.4μM AdV Ad-Aml1/Ad-A2 各0.2μM	NoV GI G1SKF/G1SKR 各0.4μM NoV GII GSKF/G2SKR, G2ALSKR 各0.4μM (G2ALSKRは0.2μM) SaV SV-F21m1, SV-F21m2/SV-R2 各0.2μM HAstV AC1/AC230 各0.2μM AiV C(+)/6261/C(-)/6779 各0.4μM AdV Ad-Aml1/Ad-A2 各0.2μM HPeV AN345/AN344 各0.4μM RVA RotaA-fwd1, RotaA-fwd2 各0.4μM /RotaA rev1, RotaA rev2 RVC G8NS1/G8NA2 各0.4μM

表2 蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 2.0 使用プライマー

セット	検出対象	プライマー	配列 (5'-3')	蛍光標識	濃度 (μM)	増幅産物 (bp)	出典
A	NoV GI	G1SKF	CTGCCCGAATTYGTAATGA	Alexa488 (緑)	0.4	330	[7]
		G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA		0.4		
	NoV GII	G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	Alexa594 (赤)	0.4	344	[7]
		G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT		0.4		
		G2ALSKR	CCACCAGCATATGAATTGTACAT		0.2		[8]
SaV	SV-F21m1 SV-F21m2 SV-R2	SV-F21m1	CAAAWTAGTGTGGATGGAGGG		0.2	435	本研究 本研究 [9]
		SV-F21m2	GCTATTAGTGTGGATGGAGGG		0.2		
		SV-R2	GWGGRTCAACMCCWGGTGG	Alexa532 (黄)	0.2		
HAstV	AC1 AC230	AC1	ATGGCTAGCAAGTCTGACAAG	Alexa350 (青)	0.2	230	[10]
		AC230	GGTTTTGGTCTGTGACACC		0.2		
B	AiV	C(+)/6261	ACACTCCCACCTCCGCCAGTA	Alexa488 (緑)	0.4	519	[11]
		C(-)/6779	GGAAGAGCTGGGTGCAAGA		0.4		
	HPeV	AN345 AN344	GTAACASWGCCTCTGGSCCAAAAAG GGCCCCWGRTCAGATCCAYAGT	Alexa594 (赤)	0.4	291	[12]
AdV	Ad-A1m Ad-A2	Ad-A1m	GCCGCARTGGTCTTACATGCACATC	Alexa546 (橙)	0.2	300	[13]
		Ad-A2	CAGCACGCCGGATGTCAAAGT		0.2		
C	RVA	RotaA-fwd1	GGATGTCCTGTACTCCTTGTCAAAA	Alexa488 (緑)	0.4	145	[14]
		RotaA-fwd2	GGAGGTTCTGTACTCATTGTCAAAA	Alexa488 (緑)	0.4		
		RotaA rev1	TCCAGTTTGGAACTCATTTCCA		0.4		
		RotaA rev2	TCCAGTTTGAAGTCATTTCCATT		0.4		
	RVC	G8NS1 G8NA2	ATTATGCACAGACTATGCCAC GTTTCTGTACTAGCTGGTGAAC	Alexa594 (赤)	0.4	351	[15]

## 結 果

### 1 蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 2.0の検出限界と評価

蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 2.0 (以下Ver. 2.0) の増幅産物を電気泳動後にUV照射下で確認したところ、表2の蛍光標識に示す各ウイルスが検出された際に想定される蛍光色とサイズのバンドが確認できた (図

1). PCR反応時間は表1に示すとおり、Ver. 1.0と比べ1時間半程度短縮された。

各ウイルス陽性検体由来cDNAの10倍段階希釈シリーズを用い、各ウイルスについて反応あたりの検出限界コピー数を調べたところ、対象ウイルスにより検出限界値に差はあるものの、反応あたり少なくとも $10^2$ オーダー程度のウイルス量があれば、PCRの増幅産物の標識蛍光で検出ウイルスを確認することが可能であった(表3)。さらにエチジウムプロマイド染色を行えば、1オーダー

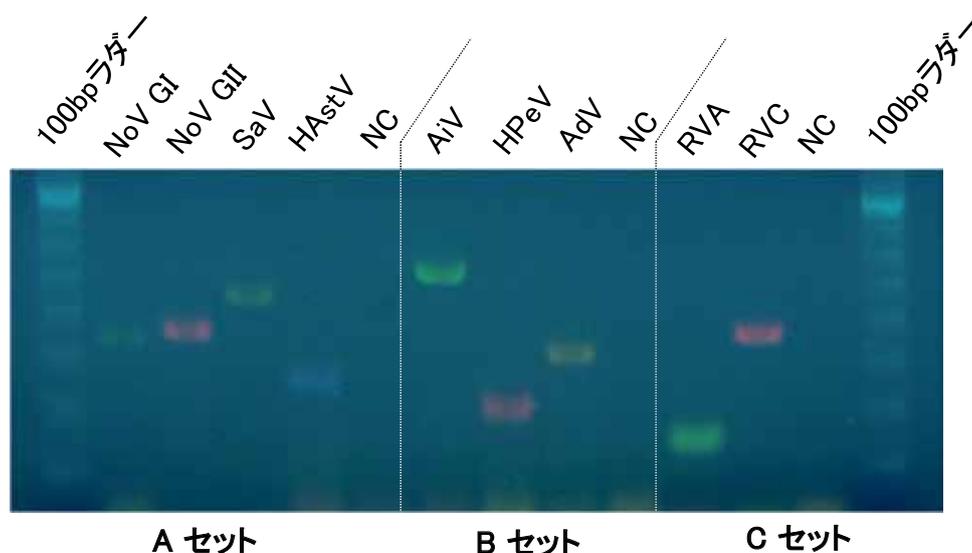


図1 下痢症ウイルスを対象とした蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver.2.0の増幅産物

表3 蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 2.0 の検出限界

検体番号	含有ウイルス	検体中のウイルス量 (コピー/μl)	希釈率/検出の有無 <sup>*1</sup>				検出限界 (コピー数/反応)
1522	NoV GI	$3.0 \times 10^4$	$10^{-2}$ ○	$10^{-3}$ ×	$10^{-4}$ ×	$10^{-5}$ ×	$6.0 \times 10^2$
1423	NoVG II	$2.9 \times 10^4$	$10^{-1}$ ○	$10^{-2}$ ○	$10^{-3}$ ×	$10^{-4}$ ×	$5.8 \times 10^2$
315-1	SaV	$4.4 \times 10^6$	$10^{-3}$ ○	$10^{-4}$ ○	$10^{-5}$ ○	$10^{-6}$ ×	$8.8 \times 10^1$
1388	HAstV	$4.0 \times 10^4$	$10^{-2}$ ○	$10^{-3}$ ×	$10^{-4}$ ×	$10^{-5}$ ×	$8.0 \times 10^2$
215-2	AiV	$2.9 \times 10^5$	$10^{-3}$ ○	$10^{-4}$ ○	$10^{-5}$ ○	$10^{-6}$ ×	$5.8 \times 10^0$
1198	HPeV	$8.3 \times 10^4$	$10^{-2}$ ○	$10^{-3}$ ○	$10^{-4}$ ×	$10^{-5}$ ×	$1.7 \times 10^2$
1212	AdV	$1.6 \times 10^5$	$10^{-2}$ ○	$10^{-3}$ ○	$10^{-4}$ ○	$10^{-5}$ ×	$3.2 \times 10^1$
1327	RVA	$6.7 \times 10^4$	$10^{-2}$ ○	$10^{-3}$ ○	$10^{-4}$ ×	$10^{-5}$ ×	$1.3 \times 10^2$
1148	RVC	$1.7 \times 10^4$	$10^{-2}$ ○	$10^{-3}$ ×	$10^{-4}$ ×	$10^{-5}$ ×	$3.4 \times 10^2$

\*1 ○: 検出可, ×: 検出不可

少ないウイルス量でも検出可能となるケースがあった(データ略)。

ウイルス検査済みでウイルス既知の36検体を用い、Ver. 2.0の妥当性について検証した。表4にあるように36検体中、32検体で結果が一致した。残り4検体については、検体中のウイルス量が少ないためか、PCR増幅産物の標識蛍光での検出はできなかったが、エチジウムブロマイド染色後に所定の長さの増幅産物が確認でき、検体中に含まれるウイルスと検査結果が一致した。

## 2 2015～2016年度の感染症発生动向調査における小児胃腸炎患者からの検出ウイルス

2015年4月から2017年3月までに感染症発生动向調査事業において当センターに搬入されてきた小児の胃腸炎

患者の糞便243検体について、Ver. 2.0によるウイルス検査を実施した。243検体中134検体(55.1%)で1つ以上のウイルスが検出された。検出ウイルスで最も多く検出されたウイルスはNoV GIIで全体の37.9%であった。以下、HPeVとAdVが7.4%、SaVが3.7%、RVAが3.3%、HAstVが2.9%であった(表5)。NoV GIIは各年齢層で広く検出されていたが、他のウイルスは概ね就学前の年齢に偏って認められた。検出月別では、NoV GIIが11月をピークに秋口から冬に流行があるものの、一年を通して検出された(図2)。ウイルス陽性の検体の中には2つ以上のウイルスによる複合感染例が17例あった(表6)。特にHPeVは18検体から検出されているが、そのうち15検体は他のウイルスとの複合感染例で、NoV GIIとHPeVによる複合感染が最も多かった。

表4 既知検体を用いた蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 2.0の妥当性評価

検体番号	含有ウイルス	蛍光マルチプレックスRT-PCR Ver. 2.0検査結果 <sup>1</sup>			判定
		Aセット	Bセット	Cセット	
1501	HPeV	-	HPeV	-	○
1502	-	-	-	-	○
1504	AdV5	-	AdV	-	○
1505	HPeV	-	HPeV	-	○
1506	-	-	-	-	○
1510	RVA	-	-	RVA	○
1511	SaV	SaV	-	-	○
1512	-	-	-	-	○
1513	-	-	-	-	○
1514	NoVGII, AdV41	(NoVGII)	AdV	-	○
1515	NoVGII	NoVGII	-	-	○
1497	NoVGI	NoVGI	-	-	○
1496	-	-	-	-	○
1495	AdV	-	AdV	-	○
1494	RVA	-	-	(RVA)	○
1493	-	-	-	-	○
1492	RVA	-	-	RVA	○
1491	RVA	-	-	RVA	○
1490	RVA	-	-	RVA	○
1489	RVA	-	-	RVA	○
1488	NoVGII, AdV	NoVGII	AdV	-	○
1487	NoVGII, AdV	NoVGII	AdV	-	○
1486	-	-	-	-	○
1485	Echo30	-	-	-	○
1480	HPeV	-	HPeV	-	○
1459	AstV, RVA	AstV	-	RVA	○
1432	Echo6	-	-	-	○
1428	HPeV	-	(HPeV)	-	○
1392	SaV	SaV	-	-	○
1380	HPeV, RVA	-	HPeV	(RVA)	○
1377	NoVGII	NoVGII	-	-	○
1365	AstV	AstV	-	-	○
1364	AstV	AstV	-	-	○
168-6	NoVGI	NoVGI	-	RVC	○
215-2	AiV	-	AiV	-	○
1148	RVC	-	-	-	○

<sup>1</sup> 検出されたウイルス名を表記。

( )内表記はエチジウムブロマイド染色により判定が可能であったケース、-は陰性を示す。

表5 感染性胃腸炎患者由来糞便検体からのウイルス検出状況 (2015-16年度)

	患者の年齢 (歳)					検出率 (n=243)
	0	1	2-5	6-15	計	
患者数	29	72	105	37	243	
NoVGII	9	38	38	7	92	37.9
SaV	1	0	8	0	9	3.7
HAstV	0	1	4	2	7	2.9
HPeV	3	12	3	0	18	7.4
AdV	3	10	5	0	18	7.4
RVA	0	1	5	2	8	3.3

表6 感染性胃腸炎患者由来糞便検体からの重複感染検出例 (2015-16年度)

複合感染例	患者の年齢 (歳)					計
	0	1	2-5	6-15		
NoV GII, HPeV	0	7	2	0	9	
NoV GII, RVA	0	0	2	0	2	
HPeV, AdV	1	1	0	0	2	
SaV, HPeV	1	0	0	0	1	
HAstV, HPeV	0	1	0	0	1	
NoV GII, HPeV, AdV	0	1	0	0	1	
NoV GII, HAstV, HPeV	0	0	1	0	1	
計	2	10	5	0	17	

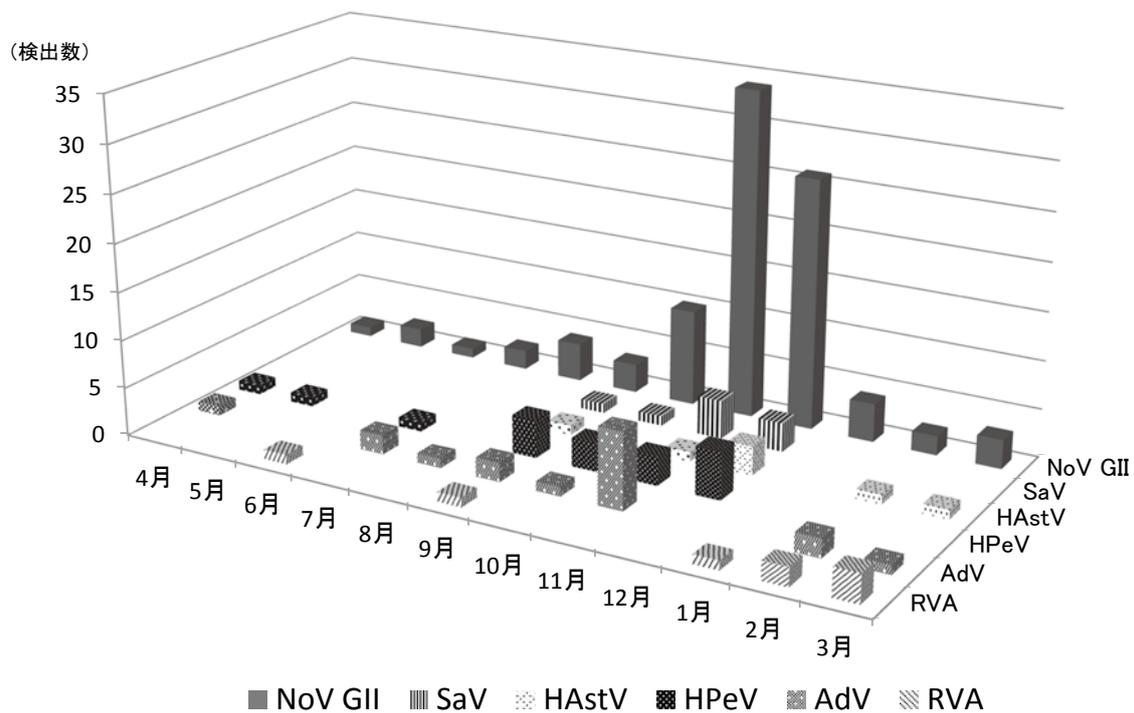


図2 感染性胃腸炎患者由来糞便検体からの月別ウイルス検出状況 (2015-16年度)

### 考 察

現行のVer. 1.0のPCR反応時間短縮が課題となっていることから、より短時間で反応が完了するマルチプレックスPCR試薬への変更によるアップデートを試みた。あわせて検査対象ウイルスと使用するプライマー及びその組み合わせについても修正を行った (表1)。Ver. 1.0ではHBoVも検査対象としているが、近々の報告ではHBoVが胃腸炎に積極的に関与していない報告 [16-18] がなされていることから、Ver. 2.0では検査対象ウイルスから外すこととした。次にVer. 1.0では、CセットにAdVを組み入れていたが、同時に検査するRVA及びRVCのために進んでいた逆転写反応時の抽出RNAへのDMSO添加とその後の熱変性処理がAdVの検出感度を

下げていることが分かったため、Ver. 2.0ではAdVの検査をBセットへ移した。さらにマルチプレックスPCRの試薬をMultiplex PCR Assay Kit Ver.2へ変更したことにより、SaVの検出感度が悪化したため、SaVのフォワードプライマー配列を5'側に3塩基伸長させ、2種類のプライマーで対応する等の変更を加えた。

Ver. 2.0のPCR反応は2時間程度で完了し、Ver. 1.0と比べPCR反応時間だけで1時間半程度の時間短縮が図れた。各ウイルスの検出は、Ver. 1.0と同様に増幅産物の色と長さを指標として容易に判定することが可能であった。各ウイルス陽性検体由来cDNAの10倍段階希釈シリーズを用いた反応あたりの検出限界コピー数は、ウイルスにより多少の差はあるが、概ね10<sup>2</sup>オーダーコピー程度のウイルス量があれば検出が可能であることが確認され (表3)、Ver. 1.0の検出限界 [5, 6] と同程度で

あることから使用上問題ないと判断された。懸念されていたSaVについてもVer. 1.0と同等の検出感度を担保することができた。Ver. 1.0ではA, Cセット用とBセット用でアニーリング温度が異なる2種類の反応条件で実施しているため、グラージェント機能のないサーマルサイクラーでは検査に2台使用する必要があった。Ver. 2.0では、A, B, Cすべてのセットの反応条件を統一したため、1台のサーマルサイクラーでの対応が可能になった。

ウイルス検査済みでウイルス既知の36検体を用いたVer. 2.0の妥当性評価試験では、36検体中32検体については、検体中のウイルスに該当する蛍光色と長さの増幅産物が観察され、結果が一致した(表4)。残り4検体については、PCR増幅産物の標識蛍光での検出はできなかったが、電気泳動後にエチジウムブロマイド染色を追加して行えば、含有するウイルスに対応する長さの増幅産物が認められた(表4)。このことから、Ver. 2.0の妥当性について確認することができた。しかしながら、Ver. 1.0と比べてVer. 2.0ではAセットで非特異バンドが生じやすい傾向があり(データ略)、エチジウムブロマイド染色を追加して行った際に判断が難しい場合も生じる可能性が考えられる。その時は、別の検査方法により再度確認するケースも考慮する必要がある。

Ver. 2.0を使用し、2015年4月から2017年3月までに感染症発生動向調査事業で当センターに搬入されてきた小児の胃腸炎患者の糞便243検体についてウイルス検出を行った。134検体で1つ以上のウイルスが検出され、NoV GIIが最も多い原因ウイルスであった(表5)。さらにNoV GIIは各年齢で広く検出されており、就学前に検出が偏る他のウイルスとはこの点で異なっていた(表5)。NoVは、頻繁に抗原性を変異させて集団免疫を回避していると言われており[19-24]、このため一度感染しても頻繁に再度感染することから幅広い年齢層で検出されるのかもしれない。また、NoV GIIは秋口から冬に流行があるものの、今回の結果では通年で検出されており、小児については一年を通して注意が必要であると言える。Ver. 2.0の検査で得られたこれらの特徴は、2006年～2013年の収集検体をVer. 1.0で検査した時に得られた結果[6]と概ね同様である。特に、複合感染例においてNoV GIIとHPEVの組み合わせによる検出が最も多い点が一致していたことは興味深いと言える。HPEVについては小児の胃腸炎患者便から他のウイルスと異様に検出されることが多いとする報告[25]もあるが、一方でHPEVの胃腸炎症状への関与については疑わしいとする報告[18]もあり、今後、詳細な検討が必要であると言える。

以上のことから、Ver. 2.0はVer. 1.0に対し1時間半程度の反応時間短縮効果を示すとともに、従来と変わらな

い検出感度と判別の容易性を示した。また、感染症発生動向調査事業のウイルス検査等に使用することで、感染性胃腸炎ウイルスの包括的検査が効率的に実施できる。

## 文 献

- [1] Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods*. 2003;114:37-44.
- [2] Yan H, Nguyen TA, Phan TG, Okitsu S, Li Y, Ushijima H. Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens from children in China. *Kansenshogaku Zasshi*. 2004;78:699-709.
- [3] Rohayem J, Berger S, Juretzek 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 Virol Methods*. 2004;118:49-59.
- [4] Pham NT, Trinh QD, Chan-It W, Khamrin P, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. A novel RT-multiplex PCR for detection of Aichi virus, human parechovirus, enteroviruses, and human bocavirus among infants and children with acute gastroenteritis. *J Virol Methods*. 2010;169:193-197.
- [5] Shigemoto N, Fukuda S, Tanizawa Y, Kuwayama M, Ohara S, Seno M. Detection of norovirus, sapovirus, and human astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol*. 2011;55:369-372.
- [6] Shigemoto N, Hisatsune Y, Toukubo Y, Tanizawa Y, Shimazu Y, Takao S, Tanaka T, Noda M, Fukuda S. Detection of gastroenteritis viruses among pediatric patients in Hiroshima prefecture, Japan, between 2006 and 2013 using multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers. *J Virol Methods*. 2017;89:791-800.
- [7] Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods*.

- 2002;100:107-114.
- [ 8 ] Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol.* 2007;51:177-184.
- [ 9 ] Okada M, Shinozaki K, Ogawa T, Kaiho I. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch Virol.* 2002;147:1445-1451.
- [10] Sakon N, Yamazaki K, Utagawa E, Okuno Y, Oishi I. Genomic characterization of human astrovirus type 6 katano virus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. *J Med Virol.* 2000;61:125-131.
- [11] Yamashita T, Sugiyama M, Tsuzuki H, Sakae K, Suzuki Y, Miyazaki Y. Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2955-2961.
- [12] Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, Oberste MS. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2519-2524.
- [13] Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1992;37:149-157.
- [14] Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3189-3195.
- [15] 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉肇. 教育研修施設で発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例. *感染症学雑誌.* 2003;77:53-59.
- [16] Cheng WX, Jin Y, Duan ZJ, Xu ZQ, Qi HM, Zhang Q, Yu JM, Zhu L, Jin M, Liu N, Cui SX, Li HY, Fang ZY. Human bocavirus in children hospitalized for acute gastroenteritis: a case-control study. *Clin Infect Dis.* 2008;47:161-167.
- [17] Nawaz S, Allen DJ, Aladin F, Gallimore C, Iturriza-Gómara M. Human bocaviruses are not significantly associated with gastroenteritis: results of retesting archive DNA from a case control study in the UK. *PLoS One.* 2012;7:e41346.
- [18] Chhabra P, Payne DC, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Shirley SH, Wikswa M, Nix WA, Lu X, Parashar UD, Vinjé J. Etiology of viral gastroenteritis in children <5 years of age in the United States, 2008-2009. *J Infect Dis.* 2013;208:790-800.
- [19] Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, Koopmans M. Epochal evolution of GII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol.* 2007;81:9932-9941.
- [20] Allen DJ, Gray JJ, Gallimore CI, Xerry J, Iturriza-Gómara M. Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS One.* 2008;3:e1485.
- [21] Lindesmith LC, Donaldson EF, LoBue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, Baric RS. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* 2008;5:e31.
- [22] Shanker S, Choi JM, Sankaran B, Atmar RL, Estes MK, Prasad BV. Structural analysis of histo-blood group antigen binding specificity in a norovirus GII.4 epidemic variant: implications for epochal evolution. *J Virol.* 2011;85:8635-8645.
- [23] Debbink K, Donaldson EF, Lindesmith LC, Baric RS. Genetic mapping of a highly variable norovirus GII.4 blockade epitope: Potential role in escape from human herd immunity. *J Virol.* 2012;86:1214-1226.
- [24] Zakikhany K, Allen DJ, Brown D, Iturriza-Gómara M. Molecular evolution of GII-4 norovirus strains. *PLoS One.* 2012;7:e41625.
- [25] Zhang DL, Jin Y, Li DD, Cheng WX, Xu ZQ, Yu JM, Jin M, Yang SH, Zhang Q, Cui SX, Liu N, Duan ZJ. Prevalence of human parechovirus in Chinese children hospitalized for acute gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1563-1569.