

資料

## Fast PCR酵素を用いた蛍光RT-マルチプレックスPCR法による下痢症ウイルスの迅速検出

重本 直樹, 久常 有里, 東久保 靖, 谷澤 由枝, 福田 伸治\*, 松尾 健, 田中 智之\*\*, 野田 衛\*\*\*

### Rapid Detection of Diarrheal Viruses using a Reverse Transcription Fluorescent Multiplex PCR Assay with Fast PCR Enzyme

NAOKI SHIGEMOTO, YURI HISATSUNE, YASUSHI TOUKUBO, YUKIE TANIZAWA, SHINJI FUKUDA\*,

TAKESHI MATSUO, TOMOYUKI TANAKA\*\* and MAMORU NODA\*\*\*

(Received October 3, 2012)

蛍光RT-マルチプレックスPCR法における下痢症ウイルス4種（ノロウイルスG I, ノロウイルスG II, サボウイルス, アストロウイルス）の迅速検出を図るため, Fast PCR用の酵素の適用とPCR反応時間の短縮について検討した. Fast PCR用酵素の使用により, これまでの半分以下の反応時間（1.5時間）で, 同程度の検出限界を維持したまま4種の対象ウイルスを検出できることが確認された.

Key words : Fast PCR, 蛍光RT-マルチプレックスPCR法, 時間短縮, 下痢症ウイルス

#### 緒 言

下痢症の起因ウイルスは種々知られており [1-4], それぞれを個別に検査すると労力, コスト面ともに大きな負担となる. 一方, マルチプレックスPCR法は複数の対象を網羅的に検出できることから, 下痢症ウイルスについても多くの検査系が報告されている [5-11]. さらに我々は, マルチプレックスPCR法の発展系として, 蛍光標識プライマーを用いることにより増幅産物の色とサイズで下痢症ウイルス4種の識別ができる蛍光RT-マルチプレックスPCR法について報告している [12]. 最近の情勢としてはPCR反応時間を大幅に短縮できるFast PCR用の酵素が各メーカーから販売されており, 検査時間の迅速化が図られつつある.

そこで我々は検査時間の短縮を目的に, 下痢症ウイルス4種（ノロウイルスG I, ノロウイルスG II, サボウイルス, アストロウイルス）の蛍光RT-マルチプレックスPCR法にFast PCR用の酵素の適用を試み, これまでの方法との比較を行った.

#### 材料および方法

##### 1 供試サンプル

既知検体として食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生28事例, 75検体（2010/11年シーズン16事例, 39検体及び2010/11年シーズン以前12事例, 36検体）を用いた.

##### 2 RNA抽出と逆転写反応条件

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 $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した.

逆転写反応は $5\times$ buffer  $4\mu\text{l}$ ,  $10\text{mM}$  dNTPs  $4\mu\text{l}$ ,  $50\mu\text{M}$  Random primer pd(N)<sub>9</sub>（タカラバイオ） $1\mu\text{l}$ , RNase inhibitor ( $40\text{U}/\mu\text{l}$ )（TOYOBO） $0.5\mu\text{l}$ , ReverTra Ace ( $100\text{U}/\mu\text{l}$ )（TOYOBO） $1\mu\text{l}$ を含む反応液に抽出RNA $9.5\mu\text{l}$ を加え,  $30^{\circ}\text{C}\cdot 10\text{分}$ ,  $42^{\circ}\text{C}\cdot 60\text{分}$ ,  $99^{\circ}\text{C}\cdot 5\text{分}$ の条件で行った.

##### 3 マルチプレックスPCR反応条件

Fast PCR酵素としてマルチプレックスPCR反応にAmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP (Life Technologies) を用い, 表1に示す4色のAlexa蛍光 [13]

\*現広島文教女子大学 : Hiroshima Bunkyo Women's University

\*\*堺市衛生研究所 : Sakai City Institute of Public Health

\*\*\*国立医薬品食品衛生研究所 : National Institute of Health Sciences

で標識したプライマー [3, 7, 14, 15] を所定の終濃度 (濃度 I ~ III) になるよう加えた反応液18 $\mu$ lにcDNAを2 $\mu$ l加え, 95 $^{\circ}$ C・10分の熱変性後, 96 $^{\circ}$ C・3秒, 57 $^{\circ}$ C・3~30秒, 68 $^{\circ}$ C・5秒を40サイクル行い, 最後に72 $^{\circ}$ C・10分の最終伸長を行った. 比較対照には従来のPCR酵素

として, Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ) を用い, 表1に示すプライマー (濃度III) を含む反応液48 $\mu$ lにcDNAを2 $\mu$ l加え, 94 $^{\circ}$ C・1分の熱変性後, 94 $^{\circ}$ C・30秒, 57 $^{\circ}$ C・90秒, 72 $^{\circ}$ C・90秒を40サイクル行い, 最後に72 $^{\circ}$ C・10分の最終伸長を行った.

表1 蛍光RT-マルチプレックスPCRに用いるプライマーと反応液中の濃度

対象ウイルス	プライマー名	標識蛍光	引用	反応液中のプライマー濃度 ( $\mu$ M)		
				I	II	III
Norovirus G I	G1SKF	Alexa Fluor 488	Kojima et al. (2002)	0.4	0.2	0.4
	G1SKR			0.4	0.2	0.4
Norovirus G II	G2SKF	Alexa Fluor 594	Kojima et al. (2002)	0.4	0.2	0.4
	G2SKR			0.4	0.2	0.4
	G2ALSKR		Nishida et al. (2007)	0.4	0.2	0.2
Sapovirus	SV-F21	Alexa Fluor 532	Okada et al. (2002)	0.4	0.2	0.2
	SV-R2			0.4	0.2	0.2
Astrovirus	AC1 <sup>†</sup>	Alexa Fluor 350	Sakon et al. (2000)	0.4	0.2	0.2
	AC230			0.4	0.2	0.2

#### 4 電気泳動方法

電気泳動には2%アガロースゲルを用い, マルチプレックスPCR反応液10 $\mu$ l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) に1 $\mu$ lのEzVISION (Amresco) を混合したものを使用した. 電気泳動後にUVトランスイルミネーター上でUV (312nm) を照射して増幅産物の蛍光バンドを観察後, エチジウムブロマイド染色して再度確認した.

#### 5 検出限界の比較

検出限界の比較は, 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.

## 結 果

#### 1 アニーリング時間の検討

各ウイルスの陽性検体由来cDNAの10倍段階希釈シリーズをテンプレートとして, アニーリング時間を変えて蛍光RT-マルチプレックスPCRを実施後, 電気泳動, エチジウムブロマイド染色により増幅産物を確認した. ノロウイルスG IおよびG IIのcDNAの10倍段階希釈シリーズについてアニーリング時間を3, 6, 10, 20, 30秒で比較したところ, 時間が長くなるほどバンドが濃くなり, 検出限界が向上する傾向が認められた (図1). 時間短縮の観点からアニーリング時間3秒と10秒について, サポウイルスとアストロウイルスの陽性検体由来cDNAの10倍希釈段階シリーズで比較したところ, ア

ニーリング時間10秒でバンドが濃く, 一部の検体で検出限界が向上した (図1).

#### 2 最適プライマー濃度の検討

マルチプレックスPCR反応のアニーリング時間を10秒とし, プライマー濃度を各0.4 $\mu$ M (濃度 I), 各0.2 $\mu$ M (濃度 II), アストロウイルス, サポウイルスのプライマー及びノロウイルスG IIのG2ALSKRのみを0.2 $\mu$ Mでその他を0.4 $\mu$ M (濃度 III) にした条件で比較した (表2). 濃度 II では, 濃度 I に比べノロウイルスG IIおよびサポウイルスの検出限界コピー数が1オーダー上がった. 一方, 濃度 III では, ノロウイルスG IおよびG IIの検出限界コピー数が1オーダー下がった. 希釈前のcDNA中に含まれるウイルスゲノムコピー数から各ウイルスの検出限界値を推定すると, 濃度 I で $10^2 \sim 10^3$ コピー/反応, 濃度 II で $10^2 \sim 10^4$ コピー/反応, 濃度 III で $10^2 \sim 10^3$ コピー/反応であった. 比較対照としてMultiplex PCR Assay Kit (濃度 III) での蛍光RT-マルチプレックスPCR法の検出限界は,  $10^1 \sim 10^3$ コピー/反応であった (表2).

#### 3 Fast PCR酵素を用いた蛍光RT-マルチプレックスPCR法による検出結果と評価

食中毒疑いまたは感染性胃腸炎集団発生事例の28事例 (75検体) を用い, AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UPとこれまで用いてきたMultiplex PCR Assay Kitで蛍光RT-マルチプレックスPCR法でウイルス検出を行い, 結果を比較した. 検体毎の検出結果の比較では, ノロウイルスG I及びG IIの重感染1検体においてMultiplex

対象ウイルス	検体番号	アニーリング時間				
		3秒	6秒	10秒	20秒	30秒
Norovirus G I	希釈率	10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup>
	1522					
Norovirus G II	希釈率	10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup>
	1411					
	希釈率	10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-1</sup> 10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup>		
	1294					
Sapovirus	希釈率	10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup> 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-6</sup>		10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup> 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-6</sup>		
	790					
	希釈率	10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup> 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-6</sup>		10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup> 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-6</sup>		
	792					
Astrovirus	希釈率	10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup> 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-6</sup>		10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup> 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-6</sup>		
	1387					
	希釈率	10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup> 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-6</sup>		10 <sup>-3</sup> 10 <sup>-4</sup> 10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-6</sup>		
	1388					

図1 Fast PCR酵素を用いた蛍光RT-マルチプレックスPCR反応時のアニーリング時間と検出限界

表2 Fast PCR酵素を用いた蛍光RT-マルチプレックスPCRのプライマー濃度と検出限界

対象ウイルス	検体 No.	ウイルス濃度 (copy/μl)	試薬	プライマー濃度	検体希釈率						検出限界 反応液中の コピー数
					10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	
Norovirus G I	1522	3.0 × 10 <sup>4</sup>	AmpliTaq Gold Fast PCR	I	+	-	-	-	-	-	6.0 × 10 <sup>3</sup>
				II	(+)	-	-	-	-	6.0 × 10 <sup>3</sup>	
				III	+	(+)	-	-	-	6.0 × 10 <sup>2</sup>	
				Multiplex PCR Assay Kit	III		+	-	-	-	6.0 × 10 <sup>2</sup>
Norovirus G II	1411	1.8 × 10 <sup>6</sup>	AmpliTaq Gold Fast PCR	I		+	(+)	-	-	3.6 × 10 <sup>3</sup>	
				II		+	(+)	-	-	3.6 × 10 <sup>3</sup>	
				III		+	(+)	(+)	-	3.6 × 10 <sup>2</sup>	
				Multiplex PCR Assay Kit	III		+	(+)	-	-	3.6 × 10 <sup>3</sup>
Norovirus G II	1294	6.5 × 10 <sup>4</sup>	AmpliTaq Gold Fast PCR	I	+	(+)	-	-	-	1.3 × 10 <sup>3</sup>	
				II	+	-	-	-	-	1.3 × 10 <sup>4</sup>	
				III	+	(+)	-	-	-	1.3 × 10 <sup>3</sup>	
				Multiplex PCR Assay Kit	III	+	(+)	-	-	-	1.3 × 10 <sup>3</sup>
Sapovirus	790	4.1 × 10 <sup>6</sup>	AmpliTaq Gold Fast PCR	I			+	-	-	-	8.2 × 10 <sup>3</sup>
				II			(+)	-	-	-	8.2 × 10 <sup>3</sup>
				III			(+)	-	-	-	8.2 × 10 <sup>3</sup>
				Multiplex PCR Assay Kit	III			+	-	-	-
Sapovirus	792	2.6 × 10 <sup>6</sup>	AmpliTaq Gold Fast PCR	I			(+)	-	-	-	5.2 × 10 <sup>3</sup>
				II			(+)	-	-	-	5.2 × 10 <sup>3</sup>
				III			(+)	-	-	-	5.2 × 10 <sup>3</sup>
				Multiplex PCR Assay Kit	III			+	(+)	-	-
Astrovirus	1387	1.2 × 10 <sup>6</sup>	AmpliTaq Gold Fast PCR	I			+	(+)	-	-	2.4 × 10 <sup>2</sup>
				II			+	(+)	-	-	2.4 × 10 <sup>2</sup>
				III			+	(+)	-	-	2.4 × 10 <sup>2</sup>
				Multiplex PCR Assay Kit	III				(+)	-	-
Astrovirus	1388	4.0 × 10 <sup>4</sup>	AmpliTaq Gold Fast PCR	I			(+)	-	-	-	8.0 × 10 <sup>2</sup>
				II			(+)	-	-	-	8.0 × 10 <sup>2</sup>
				III			(+)	-	-	-	8.0 × 10 <sup>2</sup>
				Multiplex PCR Assay Kit	III				+	-	-

バンドの濃さ：+明瞭，(+)弱い，-なし

PCR Assay Kitでは両者が検出されたのに対し, AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UPではノロウイルスG Iのみが検出された. 他の74検体については両者とも同一結果となった (表3). 事例毎での検査結果では両者とも同

じ結果になった. PCRの反応時間は, Multiplex PCR Assay Kitが約3.5時間に対し, AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UPは1.5時間であった.

表3 Fast PCR酵素を用いた蛍光RT-マルチプレックスPCR法による食中毒・感染症事例検体での検出結果

PCR酵素	検出ウイルス					
	Norovirus G I	Norovirus G II	Norovirus G I & G II	Sapovirus	Astrovirus	陰性
検体別 (75検体)						
AmpliTaQ Gold Fast PCR	6	54	2	3	1	9
Multiplex PCR Assay Kit (対照)	5	54	3	3	1	9
事例別 (27事例)						
AmpliTaQ Gold Fast PCR	2	18	3	1	1	2
Multiplex PCR Assay Kit (対照)	2	18	3	1	1	2

## 考 察

Fast PCR用の酵素を用いた蛍光RT-マルチプレックスPCR法の反応条件として, アニール時間について検討した. AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UPの使用に際しては, アニール時間が3秒に設定されているが, マルチプレックスPCR法では, 複数のプライマーが増幅に関与するため, 熱変性や伸長反応に比べるとアニール時間は重要な要因になると思われる. ノロウイルスG IおよびG IIのcDNA10倍段階希釈シリーズを用い, アニール時間を3, 6, 10, 20, 30秒に設定して反応を行った結果では, いずれも時間が長くなるにつれて検出限界の向上や増幅産物のバンドが濃くなる傾向であった. また, 3秒と10秒のみについてノロウイルスG II, サポウイルスとアストロウイルスのcDNA10倍段階希釈シリーズを用い比較した結果では, 3秒に比べ10秒において同様な傾向が認められた. 時間短縮の観点からアニール時間を長く設定することは時間短縮の目的に反することと, Fast PCRの特性を活かすためにアニール時間は10秒での使用が適切であると思われた.

マルチプレックスPCR法においては, それぞれの検出対象に対応したプライマーセットが反応液中に含まれるため, PCR増幅反応中にお互いのプライマーが競合する可能性があり, 適正な濃度に設定することが必要である. 今回各プライマー0.4 $\mu$ M (濃度I)を基本に, 濃度II, IIIで比較したところ, 濃度IIIでノロウイルスの検出限界が向上した. サポウイルス, アストロウイルスの検出プライマーを半量にすることで, プライマー間の競合作用を抑え, 結果としてノロウイルスG IとG IIの検出限界が向上したように思われる. Multiplex PCR Assay Kitを使用した場合 (濃度III)での検出限界と比較した場合, 検体毎で比較すると多少の優劣はあるが, 両者は同

等程度の検出限界であると判断された.

これまでの条件検討の結果から, AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UPでの蛍光RT-マルチプレックスPCR反応条件をアニール時間10秒, プライマー濃度IIIに設定した. 本条件で, 食中毒疑いまたは感染性胃腸炎集団発生事例の28事例 (75検体)を用いてMultiplex PCR Assay Kitでの蛍光RT-マルチプレックスPCRとの結果を比較したところ, ノロウイルスG I及びG IIの重感染1検体の結果を除き, 他は同一の結果となった. 重感染の場合, 増幅効率の高いほうのウイルスが検出されることから, 両試薬の特性により各ウイルスの増幅効率に差が生じたものと思われる. 特に二枚貝の喫食が関係した食中毒では複数のウイルスが検出されることがあり [16, 17], マルチプレックスPCR法でこのような事例を検査する場合は留意しなければならない. しかし, 事例別での検査結果に違いは認められなかったことから, 十分な数の検体数が確保できるのであれば, Fast PCR用の酵素を使用しても問題がないと考えられた. しかしながら, Fast PCRは各ステップの反応時間が短いことから, 利用に際しては使用するサーマルサイクラーとの相性を事前に見極め, 各検査所で反応条件の適正化を図っておく必要があると思われる.

今回, 蛍光RT-マルチプレックスPCR法にFast PCR酵素を用いることで, これまでとほぼ同等の検出限界を維持しながらPCR反応時間を従来の3.5時間から半分以下の1.5時間に短縮することが可能であった. 呼吸器系ウイルスでは, Fast PCR用酵素を用いたマルチプレックスnested-PCR法が報告されているが, こちらも同様にFast PCR用酵素を使用することでPCR反応時間が1/5以下に大幅短縮されている [18]. 核酸抽出などの検体の前処理, 増幅産物の電気泳動時間については現行では改善の余地はそれほどないが, Fast PCR用の酵素を用いることでマルチプレックスPCRの反応時間を短縮でき, 検査の迅速化が図れる. このことは, 他の検査系についてもFast

PCR用酵素を適用すれば検査時間の短縮が図れることを意味している。特に食中毒や集団感染症事件等の発生時には的確な行政対応、蔓延防止のための迅速な原因究明が求められる。しかしながら広範なエリアを有する自治体では、検体の収集から搬入までに時間を要するため、検体搬入が遅れれば検査結果を即日返すことが難しいケースも生じる。そのような時に今回のようにFast PCR用の酵素をマルチプレックスPCR法に使用することで、労務の軽減、効率化、迅速化が図れる。さらに正確な検査結果を即日返すことができれば、行政対応の面からも非常に有用であると言える。

## 結 語

蛍光RT-マルチプレックスPCR法の反応酵素にFast PCR用の酵素を用いることで、反応時間を半分以下(1.5時間)に短縮することが可能になった。また、各ウイルスの検出限界は従来のマルチプレックス用PCR酵素を用いた場合とほぼ同等であった。今後、食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生事例の検査の迅速化が期待できる。

## 謝 辞

本研究は、平成22~24年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」により実施された。関係者各位に深謝します。

## 文 献

[ 1 ] Mitchell DK, Matson DO, Jiang X, Berke T, Monroe SS, Carter MJ, Willcocks MM, Pickering LK. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J Infect Dis.* 1999;180:514-517.

[ 2 ] Nakata S, Honma S, Kinoshita-Numata K, Kogawa K, Ukae S, Morita Y, Adachi N, Chiba S. Member of the family Caliciviridae (Norwalk virus and Sapporo virus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infant in Japan. *J Infect Dis.* 2000;181:2029-2032.

[ 3 ] Okada M, Shinozaki K, Ogawa T, Kaiho I. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch Virol.* 2002;147:1445-1451.

[ 4 ] Pang XL, Honma S, Nakata, Vesikari T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis.* 2000;181:S228-S294.

[ 5 ] Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Okitsu S, Ushijima H. A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis

A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. *Arch Virol.* 2005;150:1175-1185.

[ 6 ] 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.

[ 7 ] 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.

[ 8 ] Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Detection of norovirus (G I, G II), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods.* 2003;114:37-44.

[ 9 ] Yan H, Hguyen TA, Phan TG, Okitsu S, Li Y, Ushijima H. Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and group C rotaviruses in diarrheal fecal specimens from children in China. *Kansenshogaku Zasshi.* 2004;78:699-709.

[10] Yuen LKW, Catton MG, Cox BJ, Wright PJ, Marshall JA. Heminested multiplex reverse transcription-PCR for detection and differentiation of Norwalk-like virus genogroups 1 and 2 in fecal samples. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2690-2694.

[11] 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.

[12] Shigemoto N, Fukuda S, Tanizawa Y, Kuwayama M, Ohara S, Seno M. Detection of norovirus, sapovirus, and astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol.* 2011;55:369-372.

[13] Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, Bhalgat MK, Millard PJ, Mao F, Leung WY, Haugland RP. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem.* 1999;47:1179-1188.

[14] 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.
- [15] 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.
- [16] Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Takeda N, Oka T. Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks. *Jpn J Infect Dis*. 2009; 62:63-66.
- [17] Le Guyader FS, Le Saux JC, Ambert-Balay K, Krol J, Serais O, Paraudeau S, Giraudon H, Delmas G, Pommepuy M, Pothier P, Atmar RL. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J Clin Microbiol*. 2008;46:4011-4017.
- [18] Lam WY, Yeung ACM, Tang JW, Ip M, Chan EWC, Hui M, Chan PKS. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3631-3640.