

风险监测

舟山市海产贝类和食源性腹泻病例中肠道腹泻病毒监测

王虹玲,张辉,吴昂

(舟山市疾病预防控制中心,浙江 舟山 316021)

摘要:目的 了解肠道腹泻病毒在舟山市海产贝类的分布和食源性腹泻病例中的感染特征以及两者相关联系,为预防和控制食源性疾病提供有效的对策和措施。**方法** 采用荧光定量聚合酶链式反应(PCR)方法对466份舟山市海产贝类和422份食源性腹泻标本中诺如病毒(NoV)GⅠ型/GⅡ型、轮状病毒(RV)、札如病毒(SPV)、星状病毒(AsV)和肠道腺病毒(AdV)5种主要肠道腹泻病毒核酸进行检测。**结果** 466份海产贝类样品病毒总阳性率为18.03%(84/466),其中NoV GⅡ型为4.08%(19/466),SPV为9.67%(45/466),AsV为2.79%(13/466),AdV为1.50%(7/466);春季和冬季病毒阳性率较高,农贸市场的牡蛎病毒阳性率最高(24.75%,25/101),养殖毛蚶病毒阳性率最低(10.12%,17/168),不同的病毒阳性率以及不同来源和不同季节贝类的病毒阳性率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。422例腹泻患者粪便标本总阳性率为15.64%(66/422),NoV为4.74%(20/422,以GⅡ为主),RV为4.74%(20/422),SPV为3.55%(15/422),NoV GⅡ型、RV和SPV的阳性率相对较高,春季和冬季病毒阳性率较高,不同病毒阳性率和不同季节病毒阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 舟山市海产贝类中肠道腹泻病毒的污染状况较为严重,与食源性腹泻病例中的病毒感染特征存在相关联系,其流行季节和优势病毒类型相同。

关键词:海产品;贝类;食源性腹泻;肠道腹泻病毒;监测;舟山

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2018)04-0415-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.04.016

Monitoring analysis of diarrhea virus from marine seashells
and foodborne diarrhea cases in Zhoushan City

WANG Hong-ling, ZHANG Hui, WU Bing

(Zhoushan Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Zhoushan 316021, China)

Abstract: Objective To understand the infection characteristics and the correlation of the intestinal diarrhea virus with the contamination distribution in marine shellfish and the cases of foodborne diarrhea in Zhoushan City, and provide effective suggestions and measures to prevent and control foodborne diseases. **Methods** Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to determine *Norovirus* (NoV) type I/II, *Rotavirus* (RV), *Sapovirus* (SPV), *Astrovirus* (AsV) and *Enteric adenovirus* (AdV) from 466 marine seashells and 422 foodborne diarrhea samples. **Results** About 18.03% (84/466) of 466 seashell samples were positive, among which 4.08% (19/466) were NoV GⅡ, 9.67% (45/466) were SPV, 2.79% (13/466) were AsV and 1.50% (7/466) were AdV. The most detected virus were NoV GⅡ and SPV, mainly, in spring and winter. The highest positive rate (24.75%, 25/101) was detected in oyster from retail markets and the lowest positive rate (10.12%, 17/168) was in blood clams from aquatic farm. There were statistically significant differences in the positive rates of different viruses and the positive rates of shellfish from different sources and seasons ($P < 0.05$). About 15.64% (66/422) of 422 seashell samples were identified positive, among which 4.74% were NoV (20/422, mainly GⅡ), 4.74% (20/422) were RV, 3.55% (15/422) were SPV. The most detected virus were NoV GⅡ, RV and SPV, mainly, in spring and winter. The positive detection rate of different viruses and the positive rate of virus in different seasons were statistically different ($P < 0.05$). **Conclusion** The pollution situation of intestinal diarrhea virus in marine seashells of Zhoushan was severe, which had correlation with the viral infection characteristics in the foodborne diarrhea cases, according to the same prevalence seasons and main virus types.

Key words: Marine products; shellfish; foodborne diarrhea; diarrhea virus; monitoring analysis; Zhoushan

肠道腹泻病毒指以食物为载体,导致人类罹患

食源性腹泻的病原体。蚶、牡蛎等双壳贝类海产品携带病毒的能力较强^[1-3],是多种肠道腹泻病毒的主要传播者^[4],因生食或食用未充分煮熟的贝类而造成肠炎疾病的情况屡有发生,NISHIDA等^[5]对日本近几年发生的急性胃肠炎疫情进行分析检测发

收稿日期:2018-05-02

基金项目:舟山市科技计划项目(2014C31073)

作者简介:王虹玲 女 主任技师 研究方向为微生物检验

E-mai:whwillia@163.com

现,诺如病毒(NoV)污染的牡蛎等双壳贝类是引起疫情暴发的主要原因。日本和英国分别在 2006 和 2008 年暴发了一次史上规模最大的 NoV 感染事件,研究调查^[6-7]表明,此次疫情的暴发与生食含有 NoV 污染的贝类有很大关系。2000—2010 年欧盟食品和饲料快速报警系统(RASFF)有关病毒引发的疫情通知中,91.7% 由 NoV 引起,其中 22 起为食用 NoV 污染的牡蛎引发^[8]。中国香港卫生署卫生防护中心报告^[9]显示,2006—2009 年每年 10~12 月,分别有 57、22、16 和 78 起 NoV 暴发事件,其中提示贝类是重要的防范对象。舟山市地处海岛,海产贝类极其丰富,本研究开展针对 3 种海产贝类和食源性腹泻病例中 NoV G I 型/G II 型、轮状病毒(RV)、札如病毒(SPV)、星状病毒(AsV)和肠道腺病毒(AdV)等 5 种主要肠道腹泻病毒的主动监测,旨在了解肠道腹泻病毒在舟山市海产贝类的污染分布和食源性相关腹泻病例中的感染特征以及两者相关联系,对病毒性食源性疾病提出预警和干预,预防控制疾病暴发。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 贝类样品来源

2015 年 6 月至 2016 年 5 月,每月不定期采集舟山市 2 家水产养殖场养殖毛蚶以及水产农贸市场不同摊位上零售的舟山养殖毛蚶、贻贝和野生牡蛎,共采集养殖场毛蚶类样品 168 份以及农贸市场零售的毛蚶 94 份、牡蛎 101 份、贻贝 103 份,共计 466 份贝类样品,分别以 15~20 个毛蚶、8~10 个牡蛎、10~15 个贻贝为一份样品。同一养殖场采集的不同毛蚶类样品应在不同区域采集样品,尽量体现样品间的差异性。

1.1.2 腹泻病例标本来源

2015 年舟山医院肠道门诊食源性疾病监测病例共 422 例,其中男性 217 例,女性 205 例,年龄为 1~84 岁。收集病例的粪便标本于 5 ml 螺口塑料管中,置-70℃冰箱冷冻保存。

1.1.3 主要仪器与试剂

自动核酸提取仪、实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪均购自美国 ABI,电子天平,高速冷冻离心机,组织研磨仪。

1 mol/L 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)缓冲液、0.1 mol/L 甘氨酸缓冲液、16% 聚乙二醇(PEG)8000 沉降液均为本实验室自配,TaKaRa. one step Prime Script™ RT-PCR Kit(RR064A,大连宝生物有限公司),磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒(天根生化

科技有限公司)。NoV G I 型/G II 型、RV、SPV、AsV 和 AdV 的引物探针序列参考文献[10-11],均由上海生工生物公司合成,见表 1。

表 1 肠道腹泻病毒荧光定量 PCR 检测的引物和探针序列
Table 1 Primers and probes sequences for real-time

PCR detection		
病毒	引物或探针	序列(5'-3')
NoV G I 型	上游引物	CGC TGG ATG CGN TTC CAT
	下游引物	CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC
	探针	TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT
NoV G II 型	上游引物	ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA
	下游引物	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA
	探针	AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG
RV	上游引物	CGA TGG TTG ATG CTC AAG ATG GA
	下游引物	TCA TTG TAA TCA TAT TGA ATA CCC A
	探针	ACA ACT GCA GCT TCA AAA GAA GWG T
SPV	上游引物	ACC AGG CTC TCG CCA CCT A
	下游引物	GCC CTC CAT YTC AAA CAC TAW TTT
	探针	CTG TAC CAC CTA TGA ACC A
AsV	上游引物	TCA ACG TGT CCG TAA MAT TGT CA
	下游引物	TGC WGG TTT TGG TCC TGT GA
	探针	CAA CTC AGG AAA CAG G
AdV	上游引物	GGA CGC CTC GGA GTA CCT GAG
	下游引物	ACI GTG GGG GTT TCT GAA CTT GTT
	探针	CTG GTG CAG TTC GCC CGT GCC A

1.2 方法

1.2.1 贝类样品预处理

采用 PEG8000 沉淀法^[12],用自来水将贝类样品表面的污泥冲洗干净,打开贝类外壳后用无菌剪子和镊子取消化腺组织,在无菌平皿中剪碎。取每份贝类的消化腺组织 1~1.5 g,平均分成 2 管转移到 2 ml 离心管中。每管加入等体积的甘氨酸缓冲液和一颗钢珠,组织研磨仪于低温(4℃以下),25 次/s 匀浆 3 min。均质液于 4℃条件下 3 200×g 离心 15 min,转移全部上清至另一干净的 2 ml 离心管,加入等体积的 16% PEG 8000 溶液,上下颠倒离心管以充分混匀。4℃放置至少 1 h,于 4℃条件下 10 000×g 离心 30 min,弃去上清。将沉淀重悬于 600 μl 的 1 mol/L Na₂HPO₄,振荡混匀,3 000 r/min 离心 1 min,取上清用于核酸提取。

1.2.2 粪便标本预处理

取绿豆大小的粪便或 50~100 μl 的水样便,加生理盐水 500 μl 制成 10%~20% 的悬液,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液提取病毒总核酸。

1.2.3 核酸提取

核酸提取由磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒,配合自动核酸提取仪提取核酸,操作方法参照试剂盒说明书。

1.2.4 荧光定量 PCR

PCR 反应体系(25 μl):2×buffer 12.5 μl,Taq 酶 0.5 μl,Prime Script™ RT Enzyme Mix II 0.5 μl,

20 × 引物/探针 (上、下游引物各 0.6 μl, 探针 0.3 μl), RNase Free dH₂O 5.0 μl, 核酸抽提物 5.0 μl。反应条件:50 ℃ 逆转录 30 min;95 ℃ 变性 2 min;以 95 ℃ 10 s,58 ℃ 30 s 扩增 45 个循环,每循环在 58 ℃ 延伸后进行单点荧光检测。PCR 结果以循环阈值(Ct 值)表示,待测样品的 Ct 值 ≥45 判定为病毒阴性;Ct 值 ≤40 判定为病毒阳性;40 < Ct 值 <45 时重新进行测试,重测样品的 Ct 值 ≥45 则判定为病毒阴性,Ct 值 <45 则判定为病毒阳性。

1.3 统计学分析

监测数据资料采用 Excel 2007 建立数据库,采用 SPSS 20.0 软件统计分析。不同标本来源和检测时间病毒阳性率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 海产贝类病毒检测结果

2.1.1 总体检出情况

466 份海产贝类样品中有 84 份检出病毒,阳性率为 18.03% (84/466)。农贸市场的牡蛎病毒阳性率最高,为 24.75% (25/101),养殖毛蚶样品病毒阳性率最低,为 10.12% (17/168),见表 2,农贸市场 3 种不同贝类的病毒阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.452, P > 0.05$),而养殖毛蚶和农贸市场的毛蚶病毒阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.187, P < 0.05$)。

表 2 海产贝类中肠道腹泻病毒检测结果

Table 2 Monitoring results of intestinal diarrhea virus in shellfish products								
样品类型	样品份数	阳性样品份数 (阳性率/%)	不同病毒类型阳性样品份数					
			NoV G I 型	NoV G II 型	SPV	AsV	RV	AdV
养殖毛蚶	168	17 (10.12)	0	3	14	0	0	0
农贸毛蚶	94	20 (21.28)	0	6	9	5	0	0
农贸牡蛎	101	25 (24.75)	0	4	13	5	0	3
农贸贻贝	103	22 (21.36)	0	6	9	3	0	4
合计	466	84 (18.03)	0	19	45	13	0	7

2.1.2 各季节检出情况

根据我国的农历,一般四季的划分为:3~5 月为春季,6~8 月为夏季,9~11 月为秋季,12~次年 2 月为冬季,四个季节贝类病毒阳性率分别为 20.35% (23/113)、11.02% (13/118)、10.53% (12/114) 和 29.75% (36/121),不同季节贝类中病毒阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 13.511, P < 0.01$),主要集中在春

季和冬季。夏季和冬季、秋季和冬季贝类中病毒阳性率差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 12.866, P < 0.01; \chi^2 = 11.123, P < 0.01$)。对养殖毛蚶和农贸毛蚶四个季节的病毒阳性率进行比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);农贸牡蛎四季病毒阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而农贸贻贝四季病毒阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 9.336, P < 0.05$),见表 3。

表 3 贝类海产品中肠道腹泻病毒在不同季节的检出情况

Table 3 Positive rate of intestinal diarrhea virus in shellfish products from different seasons								
样品类型	春季		夏季		秋季		冬季	
	检测样品 份数	阳性样品份数 (阳性率/%)	检测样品 份数	阳性样品份数 (阳性率/%)	检测样品 份数	阳性样品份数 (阳性率/%)	检测样品 份数	阳性样品份数 (阳性率/%)
养殖毛蚶	38	3 (7.89)	40	2 (5.00)	45	3 (6.67)	45	9 (20.00)
农贸毛蚶	20	6 (30.00)	25	4 (16.00)	21	2 (9.52)	28	8 (28.57)
农贸牡蛎	27	8 (29.63)	26	5 (19.23)	24	3 (12.50)	24	9 (37.50)
农贸贻贝	28	6 (21.43)	27	2 (7.41)	24	4 (16.67)	24	10 (41.67)
合计	113	23 (20.35)	118	13 (11.02)	114	12 (10.53)	121	36 (29.75)

2.1.3 不同病毒类型检出情况

NoV G II 型阳性率为 4.08% (19/466),SPV 阳性率为 9.67% (45/466),AsV 阳性率为 2.79% (13/466),AdV 阳性率为 1.50% (7/466),4 种病毒阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 41.888, P < 0.001$),均未检出 NoV G I 型和 RV,SPV 阳性率最高。各种肠道腹泻病毒的检出主要集中在春季和冬季,其中 NoV G II 型和 SPV 在春季和冬季阳性率均较高,AsV 和 AdV 在各季节均有检出,差异均无

统计学意义 ($P > 0.05$),见表 4。

2.2 食源性病例监测结果

2.2.1 总体感染情况

422 例腹泻患者粪便标本病毒总阳性率为 15.64% (66/422),其中混合感染 2 例,1 例混合感染 NoV G I 型和 G II 型,1 例病例混合感染 RV 和 AsV。NoV、RV、SPV、AsV 和 AdV 的阳性率分别为 4.74% (20/422)、4.74% (20/422)、3.55% (15/422)、1.66% (7/422) 和 1.18% (5/422),不同

表 4 海产贝类中肠道腹泻病毒的季节分布

Table 4 Prevalence of intestinal diarrhea virus in shellfish products from different seasons								
病毒类型	春季 (n = 113)		夏季 (n = 118)		秋季 (n = 114)		冬季 (n = 121)	
	阳性份数	阳性率/%	阳性份数	阳性率/%	阳性份数	阳性率/%	阳性份数	阳性率/%
NoV G II 型	8	7.08	1	0.85	1	0.88	9	7.44
SPV	11	9.73	6	5.08	6	5.26	22	18.18
AsV	2	1.77	4	3.39	3	2.63	4	3.31
AdV	2	1.77	2	1.69	2	1.75	1	0.83

病毒的阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 15.507, P < 0.05$), NoV、RV 和 SPV 的阳性率相对较高, NoV 主要以 G II 型为主, NoV G I 型和 G II 型阳性率分别为 0.95% (4/422) 和 4.03% (17/422), 两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.954, P < 0.05$)。1 ~ 12 月均有病毒性腹泻病例发生, 四个季节病毒的阳性率分别为 21.84% (19/87)、8.15% (11/135)、12.00%

(15/125) 和 28.00% (21/75), 不同季节病毒阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 18.217, P < 0.01$), 冬春季明显高于夏秋季。422 例腹泻患者中, 男女性别比为 1.06: 1 (217/205), 男性病毒性腹泻阳性率为 14.29% (31/217), 女性阳性率为 17.07% (35/205), 男女性别间病毒阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.621, P > 0.05$)。见表 5。

表 5 食源性腹泻病例中肠道腹泻病毒感染情况

Table 5 Prevalence of intestinal diarrhea virus in foodborne diarrhea cases									
病毒类型	春季 (n = 87)		夏季 (n = 135)		秋季 (n = 125)		冬季 (n = 75)		总阳性病例数 (阳性率/%)
	阳性病例数	阳性率/%	阳性病例数	阳性率/%	阳性病例数	阳性率/%	阳性病例数	阳性率/%	
NoV I	1	1.15	1	0.74	1	0.80	1	1.33	4(0.95)
NoV II	6	6.90	1	0.74	3	2.40	7	9.33	17(4.03)
RV	6	6.90	2	1.48	6	4.80	6	8.00	20(4.74)
SPV	5	5.75	3	2.22	3	2.40	4	5.33	15(3.55)
AsV	2	2.30	2	1.48	0	0.00	3	4.00	7(1.66)
AdV	1	1.15	2	1.48	2	1.60	0	0.00	5(1.18)
合计	19	21.84	11	8.15	15	12.00	21	28.00	66(15.64)

注:总阳性病例数 66 例,检出病毒阳性标本数为 68 份,其中春季混合感染 2 例,1 例混合感染 NoV G I 型和 G II 型,1 例混合感染 RV 和 AsV

2.2.2 不同年龄组病毒感染情况

不同年龄组间病毒性腹泻阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 3.34, P > 0.05$),除了 AdV 外,其他 4 种病毒阳性率在不同年龄组组间差异均无

统计学意义 ($P > 0.05$), 1 ~ 19 岁年龄组的 RV 阳性率最高 (8.62%, 10/116), 而 SPV 和 NoV 在 20 ~ 39 和 40 ~ 59 岁年龄组的阳性率相对较高, 见表 6。

表 6 不同年龄组肠道腹泻病毒感染情况

Table 6 Prevalence of intestinal diarrhea virus in foodborne diarrhea cases of different ages							
年龄组/岁	检测病例数	阳性病例数(阳性率/%)					总阳性病例数 (阳性率/%)
		NoV	RV	SPV	AsV	AdV	
1 ~ 19	116	5(4.31)	10(8.62)	2(1.72)	3(2.59)	4(3.45)	24(20.69)
20 ~ 39	123	6(4.88)	3(2.44)	9(7.32)	1(0.81)	0(0.00)	18(14.63)
40 ~ 59	108	7(6.48)	4(3.70)	3(2.78)	1(0.93)	0(0.00)	15(13.89)
≥60	75	2(2.67)	3(4.00)	1(1.33)	2(2.67)	1(1.33)	9(12.00)

注:20 ~ 39 岁年龄组有 2 例混合感染,1 例混合感染 NoV G I 型和 G II 型,1 例混合感染 RV 和 AsV,合计阳性病例数为 18 例,阳性病毒标本为 20 份

3 讨论

3 种舟山市当地海产贝类中多种肠道腹泻病毒污染状况监测情况显示,其肠道腹泻病毒的污染状况不容乐观。采集的养殖场养殖毛蚶以及水产农贸市场零售的本地养殖毛蚶、贻贝和牡蛎共 466 份海产贝类样品中, NoV G II 型、SPV、AsV、AdV 均有检出,不同肠道腹泻病毒在海产贝类中的阳性率各有差异,SPV 阳性率最高 (9.67%),其

次为 NoV G II 型 (4.08%), 所有贝类均未检出 NoV G I 型和 RV。在农贸市场采集的 3 种不同贝类的病毒污染状况差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与明红霞等^[13]报道的有关我国沿海主要经济贝类中典型人类肠道病毒的污染情况有差异,这可能与不同贝类养殖的地理环境不同其携带病毒的能力也有所不同有关^[9-10]。从采样的时间看,肠道腹泻病毒在全年均有检出,冬春季的海产贝类中肠道腹泻病毒的阳性率明显高于夏秋季节, NoV G II 型和

SPV 存在明显的季节性,阳性检出以冬春季为主,其他肠道腹泻病毒的检出无明显的季节区别,农贸市场零售的不同种类的贝类样品病毒阳性率有明显的季节性,冬春季明显高于夏秋季,这与国内外相关文献^[14-15]的报道相符,但养殖场毛蚶的病毒阳性率无季节性差异。本次监测发现,农贸市场采集的毛蚶样品肠道腹泻病毒的阳性率高于养殖场毛蚶,可能由于本次调查的两家毛蚶养殖场属于开放式围海养殖,周围无居民生活区,流动的海水使养殖场的养殖环境一直在改变,工作人员到养殖场采样后立即低温运送实验室进行检测,采样的运送过程中被污染的可能性较小,而本次监测农贸市场售卖的毛蚶,虽属舟山市养殖的,但并不一定全部来源于这两家养殖场,采样随机性较大,且从养殖场捕获到农贸市场售卖的环节存在运送方式、时间、温度等不确定因素,被污染的几率也相对较高,再加上农贸市场的环境存在交叉污染,因此农贸市场售卖的毛蚶中病毒污染较为严重。贻贝属于舟山市当地养殖贝类,养殖基地主要在舟山市嵊泗县,由于位置较为偏僻,所以本次监测仅采集了农贸市场零售的贻贝,各季节的阳性率也不全相同,主要以 SPV 和 NoV 为主,阳性率均较高,但该类贝类不同于毛蚶和牡蛎,除了舟山人喜爱食用外,多数销往全国各地,甚至制成干货出口国外,因此建议进一步开展舟山市养殖场中贻贝的肠道腹泻病毒污染状况调查。

2015 年舟山医院食源性疾病主动监测的422 例腹泻病例中 5 种食源性腹泻病毒的监测结果显示,引起腹泻的主要病原依次是 RV、NoV、SPV、AsV 和 AdV,幼儿以 RV 和 NoV 为主,而成人以 NoV 和 SPV 为主,从监测数据中可见病毒性腹泻患者中,NoV、SPV 为优势流行的腹泻病毒,这 2 种腹泻病毒也是其他感染性腹泻突发公共卫生事件的主要致病病原体^[16]。在流行季节上,病毒性腹泻全年均有发病,但肠道腹泻病毒的发病率冬春季明显高于夏秋季,尤其是 NoV 的阳性率在冬春季明显高于夏秋季,RV、SPV 和 AsV 也是冬春季略高,由此可见,病毒引起的感染性腹泻的流行高峰主要在冬春季。从 2015 年食源性疾病监测网病例报告信息中显示,422 例病例中共有 358 例病例注有可疑食物暴露信息,可疑食物中海产贝类占 23.18%,其中 66 例腹泻病毒感染病例中有 7 例病例自述可疑食物为海产贝类,均为成人病例,占腹泻病毒感染病例数的 10.61%,其中 5 例为 NoV 感染者,2 例为 SPV 感染者,提示食用海产贝类不当有感染病毒罹患食源性疾病的风险。

综上所述,舟山市海产贝类中肠道腹泻病毒的

污染较为严重,与食源性病例中病毒的感染特征存在一定联系,其流行季节和优势病毒类型相同。建议有关部门对海洋贝类中的食源性腹泻病毒开展长期连续性监测,加强食品安全风险监测中食源性病毒监测体系,为预防和控制病毒性食源性疾病提供有效的对策和措施。

参考文献

[1] PROVOST K, DANCHO B A, OZBAY G, et al. Hemocytes are sites of enteric virus persistence within oysters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(23): 8360-8369.

[2] 苏来金,马丽萍,徐仰丽,等. 山东半岛地区贝类中诺如病毒污染状况与病毒鉴定初报[J]. 中国人兽共患病杂志,2010, 26(5): 451-454.

[3] NAPPIER S P, GRACZYK T K, SCHWAB K J. Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* oysters [J]. Applied Microbiology, 2008, 74 (22): 6825-6831.

[4] ATMAR R L, NEILL F H, ROMALDE J L, et al. Detection of norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61 (8):3014-3018.

[5] NISHIDA T, KIMURA H, SAITOH M, et al. Detection, quantitation and phylogenetic analysis of *Noroviruses* in Japanese oysters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69 (10):5782-5786.

[6] IJIMA Y, TANAKA S, OHISHI H. Multiple outbreaks of gastroenteritis due to a single strain of genotype GII/4 *Norovirus* in Kobe, Japan, 2006: risk factors for *Norovirus* spread in health care settings[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2008, 61(5):419-422.

[7] HUPPATZ C, MUNNOCH S A, WORQAN T, et al. A *Norovirus* outbreak associated with consumption of NSW oysters: implications for quality assurance systems [J]. Communicable Diseases Intelligence, 2008, 32(1):88-91.

[8] LE G F, ATMAR R L, LE P J. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play [J]. Current Opinion in Virology, 2012, 2(1):103-110.

[9] 香港特别行政区卫生署. 卫生防护中心提醒市民对诺如病毒导致的肠胃炎提高警觉 [EB/OL]. (2010-01-07) [2018-04-08]. <http://www.dh.gov.hk/chs/press/2010/100107.html>.

[10] MARTINS A A, UCHECHUKWU U N, EZEKIEL G, et al. Quantitative PCR detection and characterisation of human *Adenovirus*, *Rotavirus* and *Hepatitis A virus* in discharged effluents of two wastewater treatment facilities in the Eastern Cape, South Africa[J]. Food Environ Virol, 2016, 8(4):262-274.

[11] LOGAN C, O'LEARY J J, O'SULLIVAN N. Real-time reverse transcription PCR detection of *Norovirus*, *Sapovirus* and *Astrovirus* as causative agents of acute viral gastroenteritis [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 146(1/2):36-44.

[12] 高见, 龚黎明, 陈寅, 等. 贝类中诺如病毒污染状况调查 [J]. 浙江预防医学, 2013, 25(9):59-61.

[13] 明红霞, 樊景凤, 吴利军, 等. 我国沿海主要经济贝类中典型人类肠道病毒的污染分布 [J]. 微生物学报, 2014, 54

(1):69-79.

[14] 柯丹枫,张永慧. 广东养殖牡蛎的诺如病毒污染状况的调查 [J]. 中华疾病控制杂志,2012,16(10):881-884.

[15] BURKHARDT W, CALCI K R. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness [J]. Applied and Environmental Microbiology,2000,66(4):1375-1378.

[16] 陈玲霞,姬莉莉,孙建飞. 2013—2015 年北京市怀柔区病毒性腹泻病原及流行病学分析[J]. 实用预防医学,2016,23(5):603-605.

风险监测

顺义区市售双壳贝类中副溶血性弧菌和诺如病毒的耐药性及分型研究

王园园,李颖,杨杰,王苗
(北京市顺义区疾病预防控制中心,北京 101300)

摘要:目的 了解北京市顺义区部分市售双壳贝类中副溶血性弧菌及诺如病毒的污染情况,为相关感染性腹泻的防治提供依据。方法 2017 年 7~10 月采集顺义区市场的双壳贝类,取适量样品分离其消化腺,进行样品前处理,提取病毒 RNA 后采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测诺如病毒。剩余样品按照 GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》进行副溶血性弧菌的分离鉴定。对检出的副溶血性弧菌进行毒力基因(*tlh*,*tdh*,*trh*)检测、耐药性分析和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型。结果 50 份双壳贝类样品中有 18 份检出副溶血性弧菌(18 株),检出率为 36.0%;有 8 份样品携带诺如病毒。分离的副溶血性弧菌 17 株为 *tlh*+*tdh*-*trh*-型,1 株为 *tlh*-*tdh*-*trh*-型;所有副溶血性弧菌均对氨苄西林耐药,对其他抗生素均敏感;PFGE 图谱聚类后呈现多态性,存在多个克隆群。诺如病毒只在 10 月份检出,分布于牡蛎、蛏子和扇贝中,均为 GⅡ型核酸阳性。结论 顺义区市售双壳贝类中存在副溶血性弧菌和 GⅡ型诺如病毒,需警惕感染风险。分离的副溶血性弧菌呈现多态性,但毒力基因携带率较低,对大多数抗生素敏感。

关键词:副溶血性弧菌;诺如病毒;贝类;毒力基因;脉冲场凝胶电泳;耐药性;分型;检出率;顺义

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2018)04-0420-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.04.017

Study on drug resistance and typing of *Vibrio parahaemolyticus* and *Norovirus*
in bivalve shellfish sold in Shunyi District
WANG Yuan-yuan, LI Ying, YANG Jie, WANG Miao
(Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101300, China)

Abstract: Objective To study the pollution condition of *Vibrio parahaemolyticus* and *Norovirus* in some of bivalve mollusks sold in the market in Shunyi District and provide evidence for the prevention and treatment of infectious diarrhea.

Methods The bivalve molluscs in the market of Shunyi District were collected from July to October of 2017. The appropriate samples were taken to separate the digestive glands, and virus RNA was extracted and real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect *Noroviruses*. The *Vibrio parahaemolyticus* was examined in the remaining samples following the national food safety standard GB 4789.7-2013. The genetic testing of virulence gene, drug resistance analysis and pulse field gel electrophoresis (PFGE) test were carried out on the isolated *Vibrio parahaemolyticus*.

Results A total of 18 strains of *Vibrio parahaemolyticus* were detected among 50 samples of shellfish with the positive rate of 36.0%. Eight samples contained *Norovirus*. The virulence genotype of one isolate was *tlh*-*tdh*-*trh*- and the others were *tlh*+*tdh*-*trh*-. All isolates were resistant to ampicillin and sensitive to some other antibiotics. The PFGE patterns of different strains were polymorphic and belong to different clones. *Norovirus* was detected only in October and distributed in oysters, scorpions, and scallops, which are GⅡ-type nucleic acid positive.

Conclusion The *Vibrio parahaemolyticus* and *Norovirus* of GⅡ were present in commercially available bivalve molluscs in Shunyi District. The isolated *Vibrio parahaemolyticus* was polymorphic, but the virulence genes had a low rate and were sensitive to most antibiotics.