

调查研究

2011—2012 年广东省市售牡蛎中诺如病毒污染调查分析

梁辉¹, 蒋琦², 戴光伟¹, 莫艳玲¹, 方苓¹, 李晖¹, 闻剑¹, 林协勤¹, 胡志坤¹, 邓小玲¹, 黄琼¹, 张永慧¹
(1. 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 511430; 2. 广东省公共卫生研究院, 广东 广州 511430)

摘要:目的 调查 2011—2012 年广东省市售牡蛎中诺如病毒的污染状况, 为采取有效措施减轻牡蛎中诺如病毒污染程度提供建议, 达到预防和控制食用牡蛎引起诺如病毒胃肠炎疾病的目的。方法 2011 年 3 月—2012 年 10 月, 在广东省部分沿海城市进行市售牡蛎的采样检测, 对其诺如病毒污染状况进行连续两年监测, 采用荧光 RT-PCR 检测诺如病毒阳性标本基因分型, 并对不同城市、季节及场所牡蛎中诺如病毒的污染情况及基因分型情况进行比较。结果 牡蛎中诺如病毒总检出率为 14.9% (41/275); 四个季节牡蛎中诺如病毒检出率依次为 4.4%、15.7%、18.2% 和 36.7%; 从基因分型分析, G I 型病毒株检出率为 4.0%, G II 型病毒株检出率为 6.2%, G I 和 G II 型病毒株同时检出率为 4.7%。结论 2011—2012 年广东省市售牡蛎的诺如病毒污染情况在市场、餐饮场所以及不同地区间比较差异无统计学意义, 其基因分型间比较差异无统计学意义, 但呈现明显季节性特点, 以冬季污染最严重。
关键词:广东省市售牡蛎; 诺如病毒; 污染调查; 基因分型; 食源性病原体
中图分类号: R155.3; TS201.3; TS201.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2013)04-0359-04

Survey on *Norovirus* contamination in commercial oysters in Guangdong province
from 2011 to 2012

LIANG Hui, JIANG Qi, DAI Guang-wei, MO Yan-ling, FANG Ling, LI Hui, WEN Jian,
LIN Xie-qin, HU Zhi-kun, DENG Xiao-ling, HUANG Qiong, ZHANG Yong-hui
(Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province,
Guangdong Guangzhou 511430, China)

Abstract: Objective To investigate the presence and contamination levels of *Norovirus* (NoV) in commercial oysters in Guangdong Province from 2011 to 2012, provide suggestions on reducing NoV contamination in oysters, and to prevent and control gastroenteritis outbreaks caused by NoV. **Methods** Between March 2011 and October 2012, oyster samples collected from several coastal cities in Guangdong Province were examined for NoV by real-time RT-PCR. The contamination levels and genotype of different cities, seasons and sampling sites were compared. **Results** The overall detection rate of NoV was 14.9% (41/275). In addition, the detection rate was 4.4%, 15.7%, 18.2% and 36.7% in spring, summer, autumn, and winter, respectively. Among 275 samples, 4.0% belonged to GI, 6.2% GII, and 4.7% both GI and GII. **Conclusion** No significant differences were found in NoV contamination levels and genotype among markets, restaurants, and various cities from 2011 to 2012. However, there were obvious differences in different seasons, especially in winter which had the highest NoV contamination level in oyster.
Key words: Commercial oysters; *norovirus*; contamination survey; genotyping; food-borne pathogen

牡蛎, 俗称蚝, 具较高的医疗保健作用, 素有“海底牛奶”之称。相关研究结果表明, 牡蛎在滤食时, 易在消化道内蓄积大量的致病因子, 如副溶血性弧菌、甲型肝炎病毒、诺如病毒(*Norovirus*)^[1]等。诺如病毒具有较强的基因变异性, 可通过食物、水以及人与人之间接触传播, 是引起人类急性非细菌性肠胃炎的主要病原之一^[2], 也是牡蛎中常见的致病因子。根据诺如病毒的抗原性和核苷酸序列的变异程度可将其基因型分成 5 个组 (Genogroup, G), G I、G II、G IV 可感染人, 其中 G I、G II 是感染人的主要遗传组。Hall 等人^[3]对 364 起食源性疾病暴发分析发现, 由海鲜引起的食源性疾病暴发比例达 13%, 在习惯生食海鲜的日本, 该比例甚至达到

收稿日期: 2013-06-03
基金项目: 广东省食品安全卫生应急技术研究中心基金 (粤科函社字[2011]733 号)
作者简介: 梁辉 男 主管医师 研究方向为食品安全风险监测
E-mail: 13925034528@139.com
通讯作者: 张永慧 男 主任医师 研究方向为食品安全风险监测
E-mail: zyh@cdcp.org.cn

70%。近年来我国相继报道因食用被诺如病毒污染的牡蛎后出现腹痛、腹泻、呕吐及发烧等食源性疾病暴发事件,使牡蛎的食用安全问题倍受关注。

已有文献分别对诺如病毒基因分型、诺如病毒污染牡蛎与其食源性疾病暴发的关系以及广东省牡蛎养殖场所诺如病毒污染状况等相关研究的报道^[4-6],尚未有对广东省市售环节,包括市场及餐饮场所牡蛎中诺如病毒的污染状况进行调查研究。因此,本研究在2011年3月—2012年10月期间,通过开展广东省部分沿海城市市售牡蛎的采样检测,对其诺如病毒污染状况进行了近2年的连续监测,分析了不同城市、季节及场所牡蛎中诺如病毒的污染情况及基因分型情况,为采取有效措施减轻牡蛎中诺如病毒污染程度提供建议,达到预防和控制食用牡蛎引起诺如病毒胃肠炎暴发的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集

2011年3月—2012年10月,每月在广东省广州市、深圳市、珠海市、汕头市、中山市、江门市及湛江市共7个市采集市售环节(农贸市场、超市、商店和批发市场以及大、中、小型餐饮场所)销售的牡蛎。根据牡蛎体形大小,每份样品采样规格分为3~6只/份(较大的牡蛎)和6~12只/份(较小的牡蛎),约250 g/份。

按计划要求,共采集了市售牡蛎275份(市场采集样本159份,餐饮场所采集样本116份),其中,2011年在7个城市采集样本85份,2012年采集样本190份。

1.1.2 仪器与试剂

ABI 7500 Fast Real-time PCR 仪、NucliSENS Lysis Buffer 和 NucliSENS ucliSENSfer 核酸提取试剂盒、AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit、G I、G II 型引物及探针(上海生工公司),甘氨酸-氯化钠溶液(0.05 mol/L Gly,0.15 mol/L NaCl,pH=9.3)、16% PEG6000 溶液(0.525 mol/L NaCl,16% PEG6000)、氯仿,均为分析纯级。

1.2 方法

1.2.1 样本的运输和保存

由于采样城市与检测实验室距离较远,如采集样品无法当天送检,必须保证样本储存和运输过程中温度维持在0~5℃;抵达检测实验室但无法当天立即检测的样本应保存在-70℃低温冰箱中,并确保牡蛎样品最多低温冷冻1次。

1.2.2 诺如病毒的富集

取3 g 牡蛎的消化组织,加入25 ml 甘氨酸-氯化钠溶液,置于匀浆器10 000 r/min 匀浆2 min,混合液37℃孵育30 min;加入5 ml 氯仿,剧烈振摇后静置10 min,期间振摇1次;10 000 r/min 离心30 min后吸出上清;取上清,加入等体积16% PEG6000 溶液,使终浓度为8%,剧烈振荡;将混合液4℃静置4 h以上,10 000 r/min 离心10 min;弃上清,沉淀,放4℃冰箱备用。

1.2.3 诺如病毒核酸提取

应用核酸提取试剂盒提取核糖核酸,核酸洗脱体积为50 μl。

1.2.4 诺如病毒核酸检测

采用荧光 RT-PCR 方法,以诺如病毒 RNA 为阳性对照,以不含诺如病毒样品 RNA 作为阴性对照,以水代替模板作为空白对照。G I 型反应体系(25 μl):RT-PCR 反应液 12.5 μl、RT-酶 Mix 1 μl、引物 2.5 μl、RNA 5 μl、探针 2 μl、去离子水 2 μl, G II 型反应体系(25 μl):RT-PCR 反应液 12.5 μl、RT-酶 Mix 1 μl、引物 2.5 μl、RNA 5 μl、探针 0.5 μl、去离子水 3.5 μl。反应条件:50℃ 30 min,95℃ 15 min,95℃ 20 s,52℃ 20 s,72℃ 30 s,40个循环;72℃ 收集荧光信号,判定样本中诺如病毒是否阳性及其 G I、G II 基因分型。

1.3 统计学分析

将原始资料统一录入 EXCEL 数据库,应用 SPSS 13.0 软件对各变量进行描述性统计;分类变量的单因素分析应用 χ^2 检验进行独立多组二分类资料比较,当存在20%理论频数<5时用 Fisher 确切概率法判断;整项研究应用双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同城市间牡蛎中诺如病毒污染情况

根据广东省牡蛎养殖与消费情况,共选择了广东省7个沿海城市作为采样城市,分别为:广州市、深圳市、珠海市、汕头市、中山市、江门市及湛江市。从调查结果可知:共采集了275份牡蛎样本,牡蛎中诺如病毒总检出率为14.9%(41/275);2011与2012年7个城市的牡蛎中诺如病毒总检出率分别是15.3%(13/85)、14.7%(28/190),经 Fisher 确切概率统计法检验,两年间7个城市间的诺如病毒检出率比较差异无统计学意义(2011年: $\chi^2=8.382$, $P=0.138$;2012年: $\chi^2=10.538$, $P=0.087$);2011年,在江门市与汕头市采集的牡蛎样本中未检出诺如病毒,2012年,在中山市采集的牡蛎样本中未检出诺如病毒,两

年间在广州市采集的牡蛎样本诺如病毒检出率均最高(见表1)。

表1 2011—2012 年广东省不同城市牡蛎中诺如病毒污染情况

地区	检出率/%	
	2011 年	2012 年
珠海	20.8(5/24)	16.7(4/24)
中山	22.2(2/9)	—
江门	—	21.1(4/19)
广州	33.3(4/12)	23.3(7/30)
汕头	—	20.0(6/30)
深圳	16.7(1/6)	10.3(3/29)
湛江	11.1(1/9)	14.3(4/28)
合计	15.3(13/85)	14.7(28/190)

注:—表示未检出。

2.2 不同季节间牡蛎中诺如病毒污染情况及其基因分型

根据气象部门资料,将广东省一年四季划分如下:春季(3~5月),夏季(6~8月),秋季(9~11月)和冬季(12~2月)。从调查结果可知:四个季节牡蛎中诺如病毒检出率依次分别是4.4%、15.7%、18.2%和36.7%,通过统计学方法进行季节间两两比较,夏、秋季的诺如病毒检出率比较差异无统计学意义;按基因分型分析,G I型病毒株检出率为4.0%,G II型病毒株检出率为6.2%,G I和G II型病毒株同时检出率为4.7%,主要以G II型病毒株为主,经统计学检验分析,三者差异无统计学意义($\chi^2=1.437,P=0.487$),见表2。

表2 不同季节广东省牡蛎中诺如病毒污染情况及其基因分型

Table 2 The NoV contamination level and genotyping according to different seasons in Guangdong Province					
季节	诺如病毒污染情况 (n = 份, %)				P 值
	阴性	阳性			
		G I 型	G II 型	G I + G II 型	
春季*	86(95.6)	3(3.3)	0(0.0)	1(1.1)	0.012
夏季**	75(84.3)	3(3.4)	5(5.6)	6(6.7)	0.686
秋季***	54(81.8)	0(0.0)	9(13.6)	3(4.6)	0.049
冬季	19(63.3)	5(16.7)	3(10.0)	3(10.0)	
合计#	234(85.1)	11(4.0)	17(6.2)	13(4.7)	<0.001

注: * 为春季与夏季间比较, $P=0.012$; * * 为夏季与秋季间比较, $P=0.686$; * * * 为秋季与冬季间比较, $P=0.049$; #为春、夏、秋、冬四个季节间比较, $P<0.001$ 。

2.3 不同场所间牡蛎中诺如病毒污染情况

调查中的市售环节包括市场和餐饮场所,市场包括各种农贸(集贸)市场、超市、商店和批发市场,餐饮场所包括大、中、小型餐馆。从调查结果可知,市场与餐饮场所的牡蛎样本中诺如病毒检出率分

别是16.4%(26/159)和12.9%(15/116),二者比较差异无统计学意义($\chi^2=0.619,P=0.432$)。

2.4 牡蛎中诺如病毒阳性样本基因分型情况

本次调查的41份诺如病毒阳性标本中,从基因分型分析,共分离到24株G I型病毒株和30株G II型病毒株,珠海市、广州市与中山市以G II型病毒株为主,江门市的两种型别病毒株各占50%,其余3个城市的G I型病毒株数均大于G II型病毒株数(见图1)。

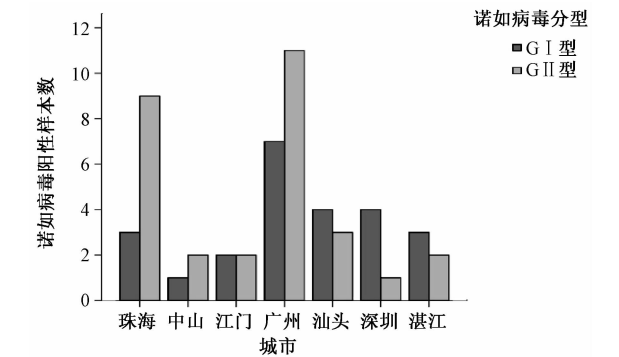


图1 2011—2012 年广东省不同地区牡蛎中诺如病毒阳性标本基因分型情况

Figure 1 The NoV genotyping in oyster according to various cities in Guangdong Province from 2011 to 2012

3 讨论

对广东省2011—2012年市售牡蛎样本进行连续两年的诺如病毒监测,结果牡蛎中诺如病毒总检出率为14.9%(41/275),其中G I型病毒株检出率为4.0%,G II型病毒株检出率为6.2%,G I和G II型病毒株同时检出率为4.7%。2012年Ma Liping等^[7]对中国黄河和渤海附近7个城市840份贝类进行诺如病毒检测,诺如病毒检出率为19.35%,该结果与本研究一致($P=0.103$)。在本次研究中,G II型与G I型病毒株的检出率比较差异无统计学意义,这似乎与G II型诺如病毒株是引起大部分诺如病毒食源性疾病暴发的现象不一致,但水源或食源性的诺如病毒食源性疾病暴发以G I型诺如病毒株为主^[8],这与牡蛎中G I型诺如病毒株的高检出率是一致的。

本研究中市场与餐饮场所销售的牡蛎中诺如病毒检出率比较差异无统计学意义,柯丹枫等^[4]在2012年对广东省牡蛎养殖场所进行诺如病毒监测,诺如病毒检出率为10.0%,该结果和本研究的结果基本一致。牡蛎的食品供应链包括养殖、销售和烹饪3个环节,无须复杂的加工处理,工序相对简单。因此,为减少牡蛎中诺如病毒引起食源性疾病的危害,市场应建立完善的食物准入制度,同时相关部

门应加强监管力度,采取各种有效措施降低牡蛎中诺如病毒引起食源性疾病的风险。

不同地区牡蛎中诺如病毒污染情况比较差异无统计学意义,但按不同季节分析,广东省牡蛎中诺如病毒污染情况呈现季节性特点。冬季是牡蛎中诺如病毒污染程度最严重的季节,而春季是污染程度最轻的季节,这可能与牡蛎体内黏多糖在冬季合成较多从而利于体内的生物富集作用有关^[9]。Burkhardt^[10]对 1991—1998 年间美国 1 266 例诺如病毒感染牡蛎引起的胃肠炎发病季节性研究发现,78% 诺如病毒引发的贝类相关疾病与 11 月到次年 1 月牡蛎消费相关。李晖等^[5]调查发现 2005—2008 年广东省诺如病毒胃肠炎暴发主要集中在每年的 10 月至次年 2 月。然而,与既往类似研究不同的是,在广东省,夏季和秋季诺如病毒的污染情况同样不容忽视。可能的原因有:首先,夏季是广东省各地区雨季时期,大量生活污水随雨水排入沿海海湾,增加了牡蛎富集诺如病毒的风险;其次,牡蛎作为海上养殖贝类品种,通过滤食水体中浮游生物或有机物为生,而夏秋季是我国赤潮高发季^[11],该现象同样也增加了诺如病毒污染牡蛎的风险。

综上所述,2011—2012 年广东省市售牡蛎的诺如病毒污染情况在市场、餐饮场所以及不同地区间比较差异无统计学意义,其基因分型间比较差异无统计学意义,但呈现明显季节性特点,以冬季污染最严重。影响牡蛎中诺如病毒污染情况的因素很多,其中,建立完善的市场准入制度、加强相关部门的监管力度对减轻市场与餐饮场所的诺如病毒污染情况有重要作用;改善城市生活污水排放、维持良好的养殖环境可以减轻牡蛎在养殖场所受诺如

病毒的污染程度,从源头上减少牡蛎中诺如病毒的污染,达到预防和控制食用牡蛎引起诺如病毒胃肠炎疾病的目的。

参考文献

[1] Metcalf T G, Melnick J L, Estes M K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years [J]. Annu Rev Microbiol, 1995, 49: 461-487.

[2] Lees D. Viruses and bivalve shellfish [J]. Int J Food Microbiol, 2000, 59(1-2): 81-116.

[3] Aron J H, Valerie G E, Amy Lehman Etingüe, et al. Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001-2008 [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(10): 1566-1573.

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

[5] 李晖, 莫艳玲, 柯昌文, 等. 2005 ~ 2008 年广东省诺如病毒胃肠炎暴发的分子流行病学特征 [J]. 病毒学报, 2010, 3: 202-220.

[6] 吴微, 张宏斌, 张海龙, 等. 2010 年深圳地区诺如病毒的基因分型 [J]. 病毒学报, 2012(03): 219-223.

[7] MA L P, ZHAO F, YAO L, et al. The presence of Genogroup II Norovirus in Retail Shellfish from Seven Coastal Cities in China [J]. Food Environ Virol, 2013, 5(2): 81-86.

[8] Manish M P, Marc-Alain Widdowson, Roger I G, et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(8): 1224-1231.

[9] Christian B, Andreas B, Jakob S. Virus-contaminated oysters; a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(4): 2292-2297.

[10] William B, Kevin R C. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(4): 1375-1378.

[11] 黄晓英. 珠江河口赤潮研究进展与防治对策 [J]. 中国科技信息, 2009(10): 19-20, 25.

· 请示批复 ·

国家卫生和计划生育委员会关于香辛料标准适用有关问题的批复

卫计生函〔2013〕113 号

浙江省卫生厅:

你厅《关于豆蔻等食品香辛料标准适用有关问题的请示》(浙卫〔2012〕33 号)收悉。经研究,现批复如下:

一、列入《香辛料和调味品名称》(GB/T 12729.1—2008)的物质(罂粟种子除外),可继续作为香辛料和调味品使用。

二、列入《卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知》(卫法监发〔2002〕51 号)规定的可用于保健食品的物品名单、尚未列入《香辛料和调味品名称》(GB/T 12729.1—2008)的物品,如需作为香辛料和调味品使用,应当按照《食品安全法》第四十四条有关规定执行。

此复。

国家卫生和计划生育委员会
二〇一三年五月三日