

论著

北京市市售牡蛎中诺如病毒核酸检测及定量分析

江涛,韩春卉,张宏元,张靖,王佳慧,李楠,吕涵阳,李凤琴

(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

摘要:目的 针对北京市市售牡蛎样品中诺如病毒污染水平及污染浓度进行定量分析研究。方法 分离牡蛎消化腺,将消化腺匀浆处理,加入含有蛋白酶K的磷酸盐缓冲液,进行样品前处理,用试剂盒提取病毒RNA,用一步法实时荧光逆转录聚合酶链式反应(real time RT-PCR)检测诺如病毒RNA,并对阳性样品进行定量分析。结果 共检测牡蛎样品356份,其中GGI阳性样品12份,GGII阳性样品39份,GGI和GGII同时为阳性的样品6份。对阳性样品中的诺如病毒核酸定量分析,核酸浓度在 $3.7 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^5$ 基因拷贝/g(消化腺)之间。结论 北京市市售牡蛎中存在诺如病毒污染的情况,需要加强对牡蛎中诺如病毒的污染监测,并开展污染水平风险评估,保障消费者食用安全,降低由诺如病毒引起的腹泻病的疾病负担。

关键词:诺如病毒;牡蛎;实时荧光逆转录聚合酶链式反应;核酸;检测;食品安全;食品污染物

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)02-0126-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.02.002

The detection of *Noroviruses* in oysters sold in Beijing by using *Taqman*-based one-step reverse transcription-polymerase chain reaction assays and quantitative analysis

JIANG Tao, HAN Chun-hui, ZHANG Hong-yuan, ZHANG Jing, WANG Jia-hui,
LI Nan, LYU Han-yang, LI Feng-qin

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective The project was carried out to study the contamination levels of *Norovirus* in oysters in Beijing city. **Methods** The *Norovirus* was extracted from digestive glands by phosphate buffer containing proteinase K. The RNA was extracted and purified with virus RNA extraction kit. *Norovirus* RNA was detected using *Taqman*-based one-step real time reverse transcription-polymerase chain reaction (real time RT-PCR) and quantitative analysis was performed. **Results** Three hundred and fifty-six oyster samples were detected. Fifty-seven samples were positive, including twelve GGI positive samples alone, thirty-nine GGII positive samples alone and six samples of GGI and GGII positive both. The range of the quantity of *Norovirus* in positive samples was $3.7 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^5$ gene copies/g (digestive gland). **Conclusion** The oysters sold in Beijing were contaminated by *Norovirus*. The monitoring of *Norovirus* in oysters should be strengthened and risk assessment of *Norovirus* should be carried out to ensure safety and health of consumers and reduce the burden of disease caused by norovirus that causes diarrhea.

Key words: *Norovirus*; oyster; real time reverse transcription-polymerase chain reaction; nucleic acid; detection; food safety; food contaminants

诺如病毒是引起人类急性胃肠炎的主要病原体之一,可感染所有年龄阶段的人群^[1]。2014年AHMED等^[2]发表的一篇系统综述和Meta分析,纳入了48个国家报道的175篇文献,结果发现1/5的

急性胃肠炎病例是由诺如病毒感染引起的。美国和欧洲50%以上的急性胃肠炎暴发由诺如病毒所致^[3]。美国每年约有1900万~2100万诺如病毒胃肠炎病例,其中170万~190万病例在医院门诊就诊,40万病例在急诊室就诊,5.6万~7.1万例住院治疗,造成严重的疾病负担^[4]。我国是全球15个腹泻病高负担国家之一,腹泻病例中有11.6%检出诺如病毒,因此诺如病毒对我国人群健康的影响不容忽视^[5]。在我国,诺如病毒引起的急性胃肠炎病例呈逐年增长趋势^[6]。2012年以来,诺如病毒已成为我国

收稿日期:2017-01-13

基金项目:北京市自然科学基金(5141002)

作者简介:江涛 男 研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail:jiangtao001@cfsa.net.cn

通信作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物学

E-mail:lifengqin@cfsa.net.cn

非细菌性感染性腹泻病暴发的优势病原体(60%~96%),尤其自2014年冬季起,诺如病毒感染暴发疫情大幅增加,2015年1~11月通过突发公共卫生事件管理系统已报告90起,明显高于历年水平^[7]。

诺如病毒传播途径主要为接触或经食物和水。美国疾病预防控制中心在1996—2000年发布的348次诺如病毒暴发事件中,食物污染、接触传播和饮用水污染导致的病毒感染分别占39%、12%和3%,表明食物污染是诺如病毒传播的最主要途径^[8]。2010年欧盟发生了84起有明显证据的食源性诺如病毒暴发事件,主要涉及到的食物有贝类水产品(25%)、自助餐(22.6%)和水果(9.5%)^[9]。2006—2008年日本和英国发生史上规模最大的诺如病毒疫情暴发,与生食被诺如病毒污染的贝类相关^[10],因此,贝类被认为是引起人类诺如病毒感染和腹泻病暴发的高危食品,其中牡蛎被认为是引起消费者感染诺如病毒最危险的食物之一。首先牡蛎本身特有的滤食作用,容易在体内大量富集环境中的诺如病毒,致使牡蛎体内的病毒浓度通常是周围养殖水体中的100~1000倍^[11],因此比较容易检测到牡蛎体内的诺如病毒;其次消费者生食牡蛎或食用时加热不彻底均极易感染诺如病毒,引发急性胃肠炎。例如欧盟食品和饲料快速预警系统2000—2010年有关病毒引发的疫情通报^[12]中,91.7%(33/36)的疫情是由诺如病毒引起,其中66.7%(22/33)的疫情是由食用诺如病毒污染的牡蛎引起的;因此,美国、英国、法国、日本等主要沿海国家均对牡蛎中诺如病毒的污染水平进行了系统研究。我国对牡蛎中诺如病毒检测及相关研究起步较晚,缺乏针对牡蛎中诺如病毒的污染水平及定量分析的系统研究及基础数据,无法开展牡蛎中诺如病毒的风险评估。

通过2015年9月—2016年9月开展北京市市售牡蛎样品中诺如病毒污染水平监测及定量分析,初步了解牡蛎中诺如病毒的污染水平,为开展牡蛎中诺如病毒风险评估及监测提供依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

2015年9月—2016年9月从北京某大型海鲜批发市场购买牡蛎样品。

1.1.2 主要仪器与试剂

CFX96 荧光 PCR 仪(美国 Bio-Rad)、恒温振荡器、电热恒温水浴箱、普通离心机、台式高速离心机、震荡混匀器。

蛋白酶 K(美国 Sigma),病毒提取试剂盒(德国 QIAGEN),RNA 一步定量荧光逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒(美国 Life Technologies),门果病毒提取控制试剂盒、诺如病毒 GGI 定量标准品(批号:140512501)、诺如病毒 GGII 定量标准品(批号:140512502)均购自法国 CeeramTooLs。引物和探针采用国际标准化组织 ISO/TS 15216-1《食品中甲肝病毒和诺如病毒 real-time RT-PCR 检测方法》^[13]推荐的诺如病毒 GGI 和 GGII 的引物和探针,其中 GGI 探针 5' 端标记六氯荧光素(HEX)荧光集团,3' 端标记 BHQ1 淬灭集团;GGII 探针 5' 端标记羧基荧光素(FAM)荧光集团,3' 端标记四甲基若丹明(TAMRA)淬灭集团。引物和探针均由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成^[11]。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

样品前处理方法在 ISO/TS 15216-1^[13]推荐的双壳贝类样品中诺如病毒提取方法的基础上稍有改动。具体步骤如下:取2~5份独立牡蛎样品的消化腺体,置于无菌平皿内,将消化腺剪碎后混匀,全部放入50 ml 离心管,研磨至均质,作为一份混合样品进行检测。称取其中2 g 消化腺,置于另一个干净的15 ml 离心管中,加入10 μ l 门果病毒(作为过程控制对照),同时加入2 ml 的磷酸盐缓冲液和10 μ l 20 mg/ml 的蛋白酶 K 溶液,37 $^{\circ}$ C 280 r/min 振荡60 min。取出离心管,60 $^{\circ}$ C 水浴15 min,室温下3000 r/min 离心5 min,取上清于EP管中,并记录上清液体积,立即提取病毒 RNA。

1.2.2 核酸提取

病毒 RNA 的提取参照试剂盒操作说明书进行。诺如病毒 RNA 提取后,应立即检测,或置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱3 d 内完成检测。

1.2.3 诺如病毒标准品制备

将诺如病毒 GGI 和 GGII 标准品用无 DNA 酶和 RNA 酶的水稀释,配成 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 和 1×10^1 基因拷贝/ μ l 的标准系列。

1.2.4 一步实时荧光定量 RT-PCR 法

使用 RNA 一步实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒,采用双重检测体系同时检测样品中的 GGI 和 GGII 基因组诺如病毒。每份样品反应体系为25 μ l,其中 $5 \times$ 反应预混液5 μ l,诺如病毒 GGI 和 GGII 上游引物分别加入1.25 μ l,GGI 和 GGII 下游引物分别加入2.25 μ l,GGI 和 GGII 探针分别加入0.625 μ l,酶混合液1.25 μ l,去除 DNA 酶和 RNA 酶的水5.5 μ l,模板 RNA 5 μ l。反应条件:55 $^{\circ}$ C 反转录60 min,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 预变性5 min,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性

15 s, 60 °C 退火 1 min, 65 °C 延伸 1 min, 45 个循环。

阳性样品判断标准: 在满足空白对照和阴性对照 Ct 值均大于 40、阳性对照 Ct 值小于 30 的条件下, 样品 Ct 值小于 35 判断为阳性, 样品 Ct 值大于或等于 40 判断为阴性, 样品 Ct 值在 35 ~ 40 之间 (包含 35) 判断为可疑样品, 需要重复检测, 如果 Ct 值仍然在 35 ~ 40 之间, 则判断为阳性样品。

1.2.5 阳性、阴性、空白和过程控制对照

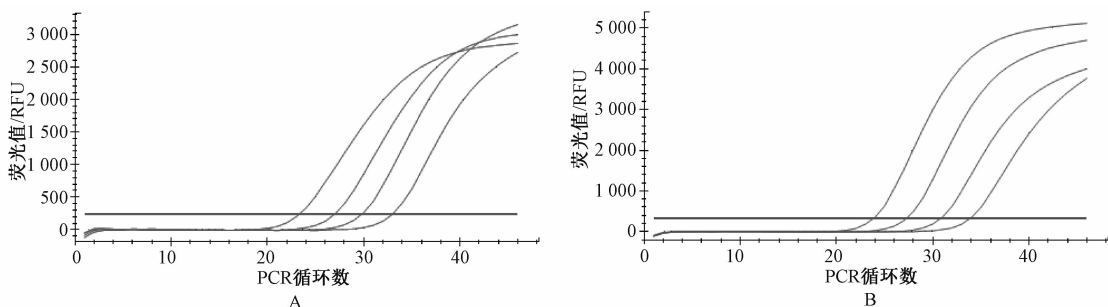
来自中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所提供的诺如病毒阳性粪便标本 (GGI 和 GGII) 为阳性对照。磷酸盐缓冲液为阴性对照, 按照病毒 RNA 提取试剂盒的方法, 与样品同时进行提取。去除 RNA 酶和 DNA 酶的水为空白对照。门果病毒作

为过程控制对照。

2 结果

2.1 诺如病毒标准曲线及检测灵敏度

诺如病毒 GGI 和 GGII 标准系列在 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^4$ 基因拷贝/ μl 的范围内有良好的线性关系, 最低定量浓度均为 1×10^1 基因拷贝/ μl , GGI 和 GGII 对应的 Ct 值分别为 33.04 和 33.94。GGI 标准品的荧光扩增曲线见图 1, 标准曲线方程为 $y = 36.288 - 3.193\lg(x)$, $R^2 = 0.997$, 扩增效率为 105.7%。GGII 标准品的荧光扩增曲线见图 1, 曲线方程为 $y = 37.434 - 3.376\lg(x)$, $R^2 = 0.999$, 扩增效率为 97.8%。其中 y 为 Ct 值, x 为标准品拷贝数。



注: A 为诺如病毒 GGI 荧光扩增曲线; B 为诺如病毒 GGII 荧光扩增曲线。

图 1 诺如病毒 GGI 和 GGII 荧光扩增曲线

Figure 1 PCR amplification curve of Norovirus GGI and GGII

2.2 牡蛎中诺如病毒的污染情况

2.2.1 牡蛎中诺如病毒总体污染水平

总共检测 356 份混合样品 (2 ~ 5 个牡蛎消化腺混合后即为一混合样品), 诺如病毒阳性样品数为 57 份, 阳性率为 16.0%。其中仅检出诺如病毒 GGI 型的阳性样品数为 12 份, 阳性率为 3.4%; GGII 型的阳性样品数 39 份, 阳性率为 11.0%; 另外, 有 6 份样品检测到同时携带 GGI 和 GGII 型诺如病毒, 占样品总数的 1.7%, 结果见图 2 和表 1。

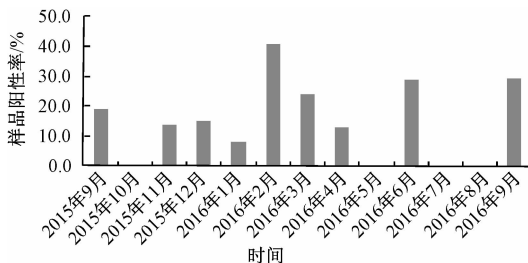


图 2 不同时间牡蛎中诺如病毒的污染情况

Figure 2 Pollution of the Norovirus in oyster in different months

表 1 不同时间检测的牡蛎样品中诺如病毒污染情况

Table 1 Pollution of the Norovirus in oyster in different months

时间	样品份数	阳性样品份数 (%)	GGI 型 阳性样品份数 (%)	GGII 型 阳性样品份数 (%)	GGI 与 GGII 均 阳性样品份数 (%)
2015 年 9 月	21	4 (19.0)	0 (0.0)	4 (19.0)	0 (0.0)
2015 年 10 月	25	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2015 年 11 月	22	3 (13.6)	0 (0.0)	2 (9.1)	1 (4.5)
2015 年 12 月	20	3 (15.0)	0 (0.0)	3 (15.0)	0 (0.0)
2016 年 1 月	25	2 (8.0)	2 (8.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2016 年 2 月	49	20 (40.8)	0 (0.0)	20 (40.8)	0 (0.0)
2016 年 3 月	25	6 (24.0)	0 (0.0)	1 (4.0)	5 (20.0)
2016 年 4 月	47	6 (12.8)	6 (12.8)	0 (0.0)	0 (0.0)
2016 年 5 月	24	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2016 年 6 月	21	6 (28.6)	4 (19.0)	2 (9.5)	0 (0.0)
2016 年 7 月	24	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2016 年 8 月	29	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2016 年 9 月	24	7 (29.2)	0 (0.0)	7 (29.2)	0 (0.0)
合计	356	57 (16.0)	12 (3.4)	39 (11.0)	6 (1.7)

由图2和表1可见,不同月份采集的牡蛎样品,诺如病毒的检出率存在差异。另外,牡蛎中GGII型的总体检出率高于GGI型的总体检出率。

2.2.2 牡蛎中诺如病毒污染浓度

对诺如病毒阳性、门果病毒的回收效率在10%以上的样品进一步定量分析,根据诺如病毒标准曲线计算出每克消化腺携带的诺如病毒基因拷贝数。共对21份诺如病毒阳性样品进行定量分析,其中包括3份GGI型阳性样品和18份GGII型阳性样品,污染浓度在 $3.7 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^5$ 基因拷贝/g(消化腺)之间,结果见表2。

表2 牡蛎中诺如病毒污染浓度[基因拷贝/g(消化腺)]

Table 2 Comparison of *Norovirus* concentration of GGI and GGII in oysters

基因组	最高值	最低值	均值
GGI	2.8×10^5	3.7×10^3	4.3×10^4
GGII	1.8×10^5	1.1×10^4	7.3×10^4

3 讨论

诺如病毒是一种重要的食源性病毒,食品中诺如病毒污染水平低,食品组成复杂,含有大量抑制检测的干扰因子,严重影响了食品中诺如病毒检测的灵敏度,因此食品中诺如病毒的检测一直是诺如病毒研究的重点和难点。目前诺如病毒的检测方法主要有电镜法、免疫学法和RT-PCR法。RT-PCR检测方法因其灵敏度高、特异性强,是检测食品中诺如病毒的良好方法^[14]。虽然各个实验室都建立了有效的诺如病毒RT-PCR检测方法,但在病毒核酸提取、引物设计、RT-PCR体系及反应条件等方面没有统一的标准,由此限制了实验室之间方法和结果的通用性和可比性。本研究采用了国际标准化组织推荐的方法^[13],检测北京市市售牡蛎样品中诺如病毒的污染水平,使检测结果与国际上相关实验室之间的结果具有一定的可比性。

本研究中,北京市市售牡蛎样品的平均污染水平为16.0%,不同月份牡蛎中诺如病毒检出率存在差异,这与国内外部分研究者的调查结果相符合。SCHAEFFER等^[15]2010—2011年对法国市场上的牡蛎样品进行了调查,从超市购买的82份牡蛎样品中,有14份检出诺如病毒,阳性率为17.1%,其中2010年2月和3月牡蛎样品中诺如病毒阳性率最高。柳淑芳等^[16]对青岛地区3种共546份贝类样品进行检测,牡蛎样品中诺如病毒的检出率为10.1%,白颡等^[17]对东海地区市场内2955份零售贝类样品进行检测,牡蛎样品的阳性率为11.0%,冬季的检出率明显高于夏季。本研究在筛选阳性样品进行定量分析时,参考了SCHAEFFER等^[15]提

出的样品回收效率大于10%,并且 Ct 值小于39的条件对符合要求的阳性样品进行定量分析。诺如病毒浓度范围在 $3.7 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^5$ 基因拷贝/g(消化腺)之间,这个浓度明显高于LOWTHER等^[18]报道的英国牡蛎中诺如病毒浓度50~2243基因拷贝/g(消化腺),原因主要有两点,第一是由于本研究所用方法与LOWTHER等所用方法存在差异,最终影响到检测方法的灵敏度。首先是GGI引物和探针存在差异,可能影响到GGI诺如病毒检测的灵敏度。其次是诺如病毒RNA的提取纯化方式不同。本研究所用QIAamp病毒RNA提取试剂盒提取病毒RNA;LOWTHER等^[18]采用NucliSENS小型磁力萃取仪,并配套使用NucliSENS磁性萃取试剂提取病毒RNA。不同的提取方法可能会影响病毒RNA的提取效率及对干扰物质的去除效果,最终影响检测的灵敏度。最后,本研究采用双重检测体系,可同时检测样品中GGI和GGII型诺如病毒,提高了检测效率,但也降低了方法的灵敏度。第二个原因是由于牡蛎养殖环境的不同,本身携带的诺如病毒浓度就存在很大差异。有研究^[19-20]报道,诺如病毒感染剂量为18~2800个病毒粒子,因此本次检测的牡蛎阳性样品如果加工不当或者生食,引起消费者诺如病毒感染的可能性较高。但是,由于RT-PCR方法不能区分病毒粒子是否具有感染性,所以仅从检测结果分析,可能存在对牡蛎样品中诺如病毒危害性的过高估计。

本研究对北京市市售牡蛎中诺如病毒的污染率及污染水平进行了初步调查,在试验过程中也存在一些问题,如忽略了每个月采样量的均衡性,因此无法准确反映牡蛎中诺如病毒检出率随时间或季节变化的趋势。在本研究的基础上,还将开展牡蛎中诺如病毒的连续动态污染水平监测,统一每个月的采样量,准确掌握诺如病毒污染水平随季节变化的趋势,及时发布预测预警公告,保障消费者食用安全及身体健康,降低由诺如病毒引起的感染性腹泻和疾病负担。

参考文献

- [1] PARRINO T A, SCHREIBER D, TRIER J, et al. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent[J]. *N Engl J Med*, 1977, 297(2): 86-89.
- [2] AHMED S M, HALL A J, ROBINSON A E, et al. Global prevalence of *Norovirus* in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(8): 725-730.
- [3] ARON J H, JAN V, BENJAMIN L, et al. Updated *Norovirus* outbreak management and disease prevention guidelines[J].

- MMWR Recomm Rep, 2011, 60(3):1-18.
- [4] HALL A J, LOPMAN B A, PAYNE D C, et al. *Norovirus* disease in the United States [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(8):1198-1205.
- [5] 谢雅晶, 刘贤金. 食源性诺如病毒在果蔬农产品中的污染及检测研究[J]. *病毒学报*, 2015, 31(6):685-692.
- [6] 孔翔翔, 靳森, 段招军. 诺如病毒与食源性疾病[J]. *中国临床医学杂志*, 2015, 43(7):21-23.
- [7] 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.
- [8] THORNTON A C, JENNINGS-CONKLIN K S, MCCORMICK M I. *Noroviruses*: agents in outbreaks of acute gastroenteritis [J]. *Disaster Manag Response*, 2004, 2(1):4-9.
- [9] BELLIO G, LOPMAN B A, AMBERT-BALAY K, et al. The burden of *Norovirus* gastroenteritis: an important foodborne and healthcare-related infection [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(8):724-730.
- [10] BERNARD H, FABER M, WILKING H, et al. Large multistate outbreak of *Norovirus* gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012 [J]. *Euro Surveill*, 2014, 19(8):20719.
- [11] 寇晓霞, 吴清平, 薛亮, 等. 贝类中诺如病毒的研究进展[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(2):200-204.
- [12] LE G S, 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.
- [13] International Organization for Standardization. Microbiology of food chain-horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR-Part1: method for quantification: ISO/TS 15216-1 [S]. 2013.
- [14] 潘秀珍. 诺如病毒相关研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2015, 28(3):225-228.
- [15] SCHAEFFER J, LE S J C, LORA M, et al. *Norovirus* contamination on French marketed oysters [J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 166(2):244-248.
- [16] 柳淑芳, 李振, 周德庆. 青岛地区贝类产品中诺如病毒的感染和流行初探[J]. *渔业科学进展*, 2009, 30(1):61-66.
- [17] 白颀, 李孝军, 王泽, 等. 贝类中诺如病毒实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(16):2285-2287.
- [18] LOWTHER J A, GUSTAR N E, POWELL A L, et al. Two-year systematic study to assess *Norovirus* contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(16):5812-5817.
- [19] TEUNIS P F, MOE C L, LIU P B, et al. Norwalk virus: how infectious is it? [J]. *J Med Virol*, 2008, 80(8):1468-1476.
- [20] ATMAR R L, OPEKUN A R, GILGER M A, et al. Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus [J]. *J Infect Dis*, 2014, 209(7):1016-1022.

· 公告 ·

关于食品添加剂新品种氨基乙酸(羟基乙腈法)等的公告

2017年第3号

根据《食品安全法》规定, 审评机构组织专家对食品添加剂新品种氨基乙酸(羟基乙腈法)、食品用香料新品种乙基芳樟基醚和食品添加剂 β -胡萝卜素扩大使用范围的安全性评估材料审查并通过。

特此公告。

附件: 1. 食品添加剂新品种氨基乙酸(羟基乙腈法)

2. 食品用香料新品种乙基芳樟基醚

3. 食品添加剂 β -胡萝卜素扩大使用范围

国家卫生计生委

二〇一七年三月八日

(相关链接: <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7890/201703/a93d8e2583414a84a4527fe6c43bbbd0.shtml>)