

## 调查研究

## 福建省养殖环节牡蛎中诺如病毒污染状况分析

刘雪杰,李闽真,叶玲清,傅祎欣,陈伟伟

(福建省疾病预防控制中心 福建省人兽共患病研究重点实验室,福建 福州 350001)

**摘要:**目的 了解福建省养殖环节牡蛎中诺如病毒(*Norovirus*)污染状况及基因分型,进一步定量分析诺如病毒污染水平,为食品中诺如病毒污染监测及安全风险评估提供数据支持。方法 2017年8月—2018年9月,于福建省某养殖基地采集牡蛎样品共244份,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)法对样品中诺如病毒进行检测,确定其污染情况及基因分型。结果 211份有效样品中诺如病毒阳性率为30.33%(64/211),GI和GII组诺如病毒均有检出。GI组诺如病毒阳性率为16.59%(35/211),GII组阳性率为24.17%(51/211),GI和GII组同时为阳性的比例为10.43%(22/211)。诺如病毒含量在 $1.05 \times 10^2 \sim 1.68 \times 10^4$ 基因拷贝/g(消化腺)之间。结论 福建省养殖环节牡蛎样品中存在诺如病毒污染,冬季阳性率较高,提示有关部门需在冬季采取更多针对性的风险管理干预措施,以降低食源性诺如病毒感染风险。

**关键词:**牡蛎;养殖环节;诺如病毒;基因分型;定量分析;实时荧光定量聚合酶链式反应

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)01-0053-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.01.011

### Survey of *Norovirus* in oysters collected from commercial harvesting farm in Fujian Province

LIU Xuejie, LI Minzhen, YE Lingqing, FU Yixin, CHEN Weiwei

(Key Laboratory of Fujian for Zoonotic Disease Research, Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fujian Fuzhou 350001, China)

**Abstract: Objective** The contamination rate and gene groups of *Norovirus* (NoV) in oyster collected from harvesting farm in Fujian Province was investigated, and the contamination concentration was quantitatively analyzed, so as to provide data support for surveillance and risk assessment of *Norovirus* in food. **Methods** 244 oyster samples from oyster culture bed in Fujian Province were collected from August 2017 to September 2018. *Norovirus* nucleic acid was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) to monitor *Norovirus* contamination in oyster production farm. **Results** The positive rate of *Norovirus* in 211 valid samples was 30.33% (64/211). *Norovirus* was detected in both GI and GII groups. 16.59% (35/211) of the samples were GI positive, 24.17% (51/211) of the samples were GII positive, and 10.43% (22/211) of the samples were both GI and GII positive. The range of the quantity of *Norovirus* in positive samples was from  $1.05 \times 10^2 \sim 1.68 \times 10^4$  gene copies/g (digestive gland). **Conclusion** The oysters collected from commercial harvesting farm in Fujian Province were partly contaminated by *Norovirus*. A marked winter seasonality of contamination by both prevalence and quantity was observed. It is necessary to take more targeted risk management interventions in winter to reduce the risk of human illness resulting from *Norovirus* contamination of oysters.

**Key words:** Oyster; harvesting farm; *Norovirus*; genotyping; quantitative analyze; real-time reverse transcription polymerase chain reaction

诺如病毒(*Norovirus*)是引起人类非细菌性急性胃肠炎的主要病原体,包括7个基因组(GI~GVII),其中GI组和GII组主要感染人类,分别分为9个和22个基因型<sup>[1-2]</sup>。诺如病毒具有极强的致病性,感

染高峰一般出现在冬季,通过受诺如病毒污染的食物、水、人与人的接触等传播<sup>[3]</sup>。诺如病毒引发的胃肠炎往往具有发病急、传播速度快、涉及范围广等特点,其暴发流行常出现在如游轮、医院、学校等人群聚集的封闭或半封闭场所。诺如病毒感染会给医疗卫生系统造成一定的疾病负担,2014—2018年我国突发公共卫生事件报告系统(突发网)共报告诺如病毒疫情832起,整体呈现上升趋势,年均增长率为58%<sup>[4-5]</sup>。目前我国已将诺如病毒纳入丙类

收稿日期:2020-10-20

基金项目:福建省卫生计生青年科研课题(2017-1-23)

作者简介:刘雪杰 女 初级技师 研究方向为食源性疾病监测及食品中致病微生物检验 E-mail:tianjieyese@outlook.com

传染病中“其他感染性腹泻病”进行通报和管理。

牡蛎为一种双壳贝类滤食性生物,体内含有与人类同源的诺如病毒配体<sup>[6]</sup>。当牡蛎生长的水域受污水排放影响时,其在滤食时能够选择性地富集诺如病毒。若生食或食用加工不当的牡蛎,有可能引发诺如病毒感染<sup>[7]</sup>。本研究选择福建省某个具有代表性的牡蛎养殖基地,采集养殖环节牡蛎样品,对诺如病毒污染情况及污染水平进行监测分析,初步了解养殖环节牡蛎中诺如病毒的污染状况,为食源性诺如病毒感染防控及风险评估提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品采集

2017年8月—2018年9月,选择福建省某牡蛎养殖基地,依据每月收获情况采集牡蛎样品共244份。牡蛎样品从养殖基地不同养殖区域随机抽取,于4℃状态下运送至实验室,24h内完成前处理及病毒提取。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

CFX96实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国伯乐)、高压灭菌锅、恒温震荡摇床、普通离心机、高速冷冻离心机、震荡混匀器。

无水乙醇(分析纯),蛋白酶K(美国Sigma),0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS,pH=7.2),噬菌体MS2试剂盒(过程控制)、诺如病毒GI/GII外加扩增控制RNA、诺如病毒GI/GII质粒标准系列均购自北京良润生物科技有限公司, RNA提取试剂盒(QIAamp Viral RNA Mini kit 52904)、RNA Ultrasense One-step Quantitative RT-PCR System(invitrogen)均购自美国赛默飞,所用试剂及耗材均在有效期内。引物探针由美国赛默飞合成,其中GGI与GGII探针5'端分别标记六氯荧光素(HEX)荧光基团与羧基荧光素(FAM)荧光基团,3'端皆标记BHQ1淬灭基团。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品前处理

约20个牡蛎为一份样品,取开壳后牡蛎的消化腺体于无菌均质袋中,研磨均匀,再取其中2g置于25 mL离心管中;向离心管中加入10 μL噬菌体MS2(作为过程控制对照)、10 μL蛋白酶K溶液(20 mg/mL)、2 mL PBS溶液,于37℃恒温震荡培养箱中剧烈震荡60 min;将离心管置于60℃水浴15 min以灭活蛋白酶K;将水浴后的离心管于室温下3 000 r/min离心5 min(离心半径13.5 cm),静置取离心后的上清液,备用。

#### 1.2.2 病毒核酸提取

病毒核酸提取采用RNA提取试剂盒,PBS溶液或阴性牡蛎样品(不含有诺如病毒)作为阴性对照,按照RNA提取试剂盒的方法,与样品同时进行提取。

#### 1.2.3 标准曲线建立

按照试剂盒说明书建立标准曲线。GI和GII组诺如病毒标准品未稀释的浓度为 $1.0 \times 10^6$  基因拷贝/ $\mu\text{L}$ ,采用无核酸酶的无菌水将其分别稀释为 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 及 $1 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 的标准系列,以梯度稀释的标准品浓度的lg值为x轴,其循环阈值(Ct值)为y轴,绘制GI和GII组标准曲线;取20 μL MS2过程控制病毒,于95℃加热5 min后迅速冷却至室温。未稀释过程控制病毒RNA浓度为1,用无核酸酶的无菌水梯度稀释成 $1 \times 10^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-2}$ 及 $1 \times 10^{-3}$ ,以梯度MS2浓度的lg值为x轴,以其Ct值为y轴,制作MS2标准曲线。

#### 1.2.4 病毒核酸检测

病毒核酸检测采用一步法实时荧光定量PCR试剂盒,采用双通道同时检测GI及GII组诺如病毒。扩增反应体系为25 μL:RNA模板5 μL,上游引物1.25 μL(10 μmol/L),下游引物2.25 μL(10 μmol/L),探针0.625 μL(10 μmol/L),RT-PCR Enzyme Mix 1 μL,2×RT-Buffer 12.5 μL,无RNase超纯水2.375 μL。反应程序:55℃反转录60 min;95℃预变性5 min;95℃变性15 s,60℃退火1 min,65℃延伸1 min,共45个循环。试验中同时设置阳性对照、阴性对照、空白对照,在对照试验均符合标准的条件下,依据样品所得Ct值及扩增曲线判断检测结果,Ct值<35为阳性,Ct值 $\geq 40$ 为阴性,Ct值在35~40之间(不含40)需再次检测,若结果在35~40之间(不含40),则为阳性样品。

#### 1.2.5 对照体系

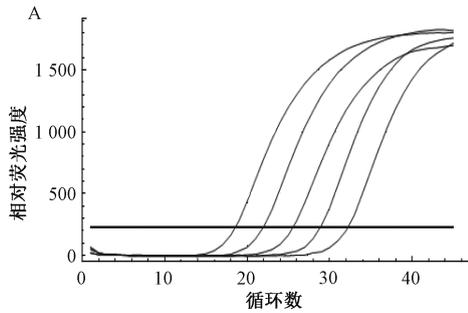
阳性对照为GI和GII组诺如病毒阳性的粪便标本,阴性对照为与样品同时进行核酸提取的PBS溶液,空白对照为无核酸酶的无菌水。病毒提取效率通过添加过程控制噬菌体MS2计算获得,提取效率 $\geq 1.00\%$ 为合格;扩增抑制指数通过外加扩增控制RNA计算获得,核酸扩增抑制指数=(牡蛎样品RNA+外加扩增控制RNA)Ct值-(纯水+外加扩增控制RNA)Ct值,抑制指数<2.00为合格。

## 2 结果

### 2.1 诺如病毒检出情况

2017年8月—2018年9月,在某牡蛎养殖基地共采集养殖环节牡蛎样品244份,其中211份样品的病毒核酸提取效率及核酸扩增抑制指数均符合

试验要求,检测结果为有效结果。211份样品中诺如病毒阳性样品为64份,阳性率为30.33%。阳性



样品扩增曲线见图1, Ct值主要集中在36~38范围内。

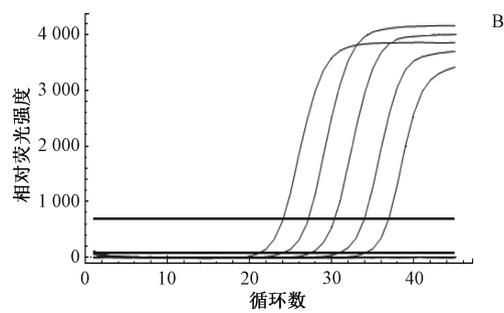


图1 GI(A)及GII(B)组诺如病毒扩增曲线

Figure 1 PCR amplification curve of *Norovirus* GI(A) and GII(B)

## 2.2 诺如病毒基因分型

211份样品中GI组诺如病毒检出35份,阳性率为16.59%,GII组诺如病毒检出51份,阳性率为24.17%。在22份样品中同时检出GI组及GII组诺如病毒,占总样品份数的10.43%,见

表1。诺如病毒每月检出情况不同,2018年1月及2月具有较高的阳性率,分别为92.86% (13/14)和63.64% (14/22),而2017年8、10月及2018年6、8、9月份均未在牡蛎样品中检出诺如病毒,见图2。

表1 牡蛎中诺如病毒检出情况

Table 1 *Norovirus* results in oysters

采样时间	样品份数	总检出份数 (%)	阳性份数 (%)		
			GI组	GII组	GI,GII组混合
2017年8月	20	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
2017年10月	9	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
2017年11月	16	4 (25.00)	3 (18.75)	1 (6.25)	0 (0.00)
2018年1月	14	13 (92.86)	3 (21.43)	13 (92.86)	3 (21.43)
2018年2月	22	14 (63.64)	10 (45.45)	10 (45.45)	6 (27.27)
2018年3月	22	9 (40.91)	6 (27.27)	7 (31.82)	4 (18.18)
2018年4月	23	8 (34.78)	5 (21.74)	7 (30.43)	4 (17.39)
2018年5月	16	11 (68.75)	6 (37.50)	8 (50.00)	3 (18.75)
2018年6月	20	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
2018年7月	24	5 (20.83)	2 (8.33)	5 (20.83)	2 (8.33)
2018年8月	14	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
2018年9月	11	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
合计	211	64 (30.33)	35 (16.59)	51 (24.17)	22 (10.43)

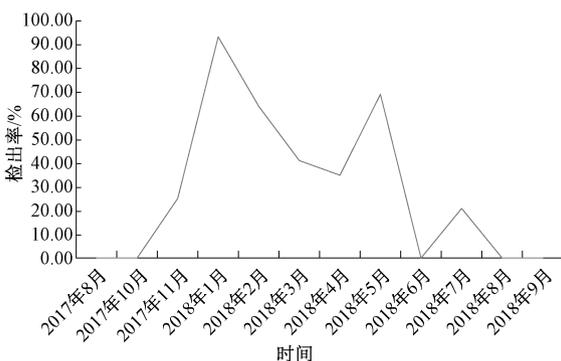


图2 不同时间牡蛎中诺如病毒检出情况

Figure 2 *Norovirus* results in oysters in different months

## 2.3 GI组和GII组标准曲线

在 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ 基因拷贝/ $\mu\text{L}$ 的范围内,GI组及GII组诺如病毒标准系列有良好的线性关系。GI

组标准品的标准曲线方程为 $y = -3.543x + 35.487$ ,相关系数( $R^2$ )=0.9959。GII组标准品的标准曲线方程为 $y = -4.117x + 39.733$ , $R^2 = 0.9969$ 。其中 $y$ 为Ct值, $x$ 为诺如病毒标准系列基因拷贝数。GI组和GII组的最低定量浓度均为 $1 \times 10^1$ 基因拷贝/ $\mu\text{L}$ ,曲线的线性范围在 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ 基因拷贝/ $\mu\text{L}$ 之间。

## 2.4 诺如病毒定量检测结果

阳性样品中诺如病毒粒子定量数据显示,不同样品中诺如病毒含量水平差异较大。阳性样品中GI组诺如病毒最大含量为 $5.03 \times 10^3$ 基因拷贝/g(消化腺),最小含量为 $5.30 \times 10^1$ 基因拷贝/g(消化腺),均值为 $1.09 \times 10^3$ 基因拷贝/g(消化腺)。对于GII组诺如病毒,阳性样品中最大含量为 $1.56 \times 10^4$ 基因拷贝/g(消化腺),最小含量为 $1.30 \times 10^2$ 基因

拷贝/g(消化腺),均值为  $2.94 \times 10^3$  基因拷贝/g(消化腺)。诺如病毒(GI组+GII组)含量在  $1.05 \times 10^2 \sim 1.68 \times 10^4$  基因拷贝/g(消化腺)范围内,峰值出现在11月至次年5月之间,最低水平在6~10月之间。阳性样品中诺如病毒(GI组+GII组)含量在不同数量范围内占比见图3。

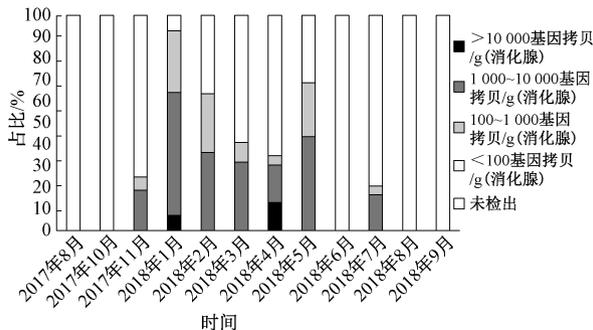


图3 样品中诺如病毒含量在不同数量范围内占比

Figure 3 Monthly proportion of samples giving total *Norovirus* results in different quantity ranges

### 3 讨论

目前诺如病毒剂量-反应模型仍然存在很大的不确定性,很难确定可能的疾病结果与食品中病毒基因拷贝数之间的剂量-反应关系。此外食品中诺如病毒的检测方法为实时荧光定量PCR法,该方法只能检测病毒的基因拷贝数,不能区分病毒是否具有传染性,进一步增加了诺如病毒基因拷贝数与疾病结果之间的不确定性<sup>[8]</sup>。生食或食用加工不当的牡蛎是引发诺如病毒感染的重要原因,相关感染事件也有较多报道,加拿大在5个月内发现449例诺如病毒引发的急性胃肠炎与食用牡蛎有关<sup>[9-11]</sup>。目前实验室检测方法一般针对贝类消化腺(1.5~2 g)中的诺如病毒进行定性或定量分析,病毒核酸中存在的潜在抑制剂、检测方法的特异性及灵敏度是分析低污染食品或环境样品时的重要因素<sup>[12]</sup>。

采用实时荧光定量PCR的方法,依据试验中设置的对照试验、病毒提取效率、核酸扩增抑制指数,在244份养殖环节牡蛎样品中,获得211份有效结果,其中阳性样品64份,阳性率为30.33%。这一结果较2014年广西壮族自治区北海市养殖环节牡蛎中诺如病毒的检出率(15.83%)<sup>[13]</sup>高,低于其他国家养殖环节牡蛎中诺如病毒检测率,如英国检出率为76.2%、爱尔兰为37.1%、意大利为51.5%、西班牙为52.4%<sup>[14-17]</sup>,差异可能归因于牡蛎养殖区域污染状况不同或不同实验室检测手段的不同。牡蛎中诺如病毒的检出情况呈明显的季节趋势,冬季(11月~次年3月)阳性率较高,而在6、8、9月则均

未检出。以往研究<sup>[13,18]</sup>表明诺如病毒总检出率随养殖基地水温降低而升高,欧洲在养殖环节及零售环节牡蛎调查中均发现冬季诺如病毒检出率及污染水平有所增加。诺如病毒感染暴发事件在冬季呈现高发态势,2014—2018年我国突发网报告的诺如病毒疫情多发生于每年的3~5月及11~12月,提醒相关工作者需在冬季对高风险食品采取更多有针对性的风险管理干预措施,以减少食源性诺如病毒感染事件发生。

一项基于人体的暴露试验结果<sup>[19]</sup>显示,诺如病毒感染剂量较低,GII组诺如病毒半数感染剂量在18~1 015个病毒粒子之间。也有报道<sup>[20]</sup>显示<100基因拷贝/g的生蚝即可引发诺如病毒暴发。本研究阳性样品中病毒粒子含量在  $1.05 \times 10^2 \sim 1.68 \times 10^4$  基因拷贝/g(消化腺)间,如若消费者生食或进食加工不当的牡蛎时,引起诺如病毒感染的可能性较大。此外研究<sup>[18,21]</sup>发现零售市场牡蛎中诺如病毒总体含量水平低于养殖环节含量水平。相关研究<sup>[8]</sup>发现,捕捞时的牡蛎与捕捞后经过净化后的牡蛎相比,诺如病毒核酸浓度降低,净化后大多数牡蛎样品诺如病毒核酸浓度<100基因拷贝/g(消化腺)。提示可在销售加工环节采取风险干预措施,以降低牡蛎中诺如病毒的风险水平。

本研究调查福建省养殖环节牡蛎中诺如病毒的污染情况,为诺如病毒感染防控及食品安全风险评估提供基础数据支持,以期降低诺如病毒引起的食源性疾病负担。结果显示养殖环节牡蛎样品中存在诺如病毒污染,冬季污染率及污染水平较高,建议相关工作者在冬季采取更多有针对性的风险管理干预措施,以减少食源性诺如病毒感染事件发生。

### 参考文献

- [1] MELHEM N M. *Norovirus* vaccines: correlates of protection, challenges and limitations [J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2016, 12(7): 1-17.
- [2] HOA TRAN T N, TRAINOR E, NAKAGOMI T, et al. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII. 4 variants [J]. *Journal of Clinical Virology*, 2013, 56(3): 269-277.
- [3] VERHOEF L, HEWITT J, BARCLAY L, et al. *Norovirus* genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999-2012 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(4): 592-599.
- [4] ZHOU H L, WANG S M, VON SEIDLEIN L, et al. The epidemiology of *Norovirus* gastroenteritis in China: disease burden and distribution of genotypes [J]. *Frontiers of Medicine*, 2020, 14

- (1):1-7.
- [ 5 ] 连怡遥,骆洪梅,冉陆,等. 中国 2014—2018 年学校和托幼机构诺如病毒疫情流行病学分析[J]. 中国学校卫生,2019,40(3):406-410.
- [ 6 ] DE GRAAF M, VAN BEEK J, KOOPMANS M P G. Human *Norovirus* transmission and evolution in a changing world[J]. *Nature Reviews Microbiology*,2016,14(7):421-433.
- [ 7 ] CAMPOS C J A, GOBLICK G, LEE R, et al. Determining the zone of impact of *Norovirus* contamination in shellfish production areas through microbiological monitoring and hydrographic analysis[J]. *Water Research*,2017,124(1):556-565.
- [ 8 ] RUPNIK A, KEAVENEY S, DEVILLY L, et al. The impact of winter relocation and depuration on *Norovirus* concentrations in Pacific oysters harvested from a commercial production site[J]. *Food and Environmental Virology*,2018,10(3):288-296.
- [ 9 ] BELLOU M, KOKKINOS P, VANTARAKIS A. Shellfish-borne viral outbreaks; a systematic review[J]. *Food and Environmental Virology*,2013,5(1):13-23.
- [ 10 ] ALFANO-SOBSEY E, SWEAT D, HALL A, et al. *Norovirus* outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission [J]. *Epidemiology and Infection*, 2012, 140(2):276-282.
- [ 11 ] MEGHNATH K, TEAM O, HASSELBACK P, et al. Outbreaks of *Norovirus* and acute gastroenteritis associated with British Columbia oysters, 2016-2017 [J]. *Food and Environmental Virology*,2019,11(2):138-148.
- [ 12 ] WOODS J W, BURKHARDT W III. Occurrence of *Norovirus* and hepatitis A virus in U. S. oysters [J]. *Food and Environmental Virology*,2010,2(3):176-182.
- [ 13 ] 吕素玲,李秀桂,姚雪婷,等. 2014 年广西北海市养殖环境与牡蛎中诺如病毒污染相关性调查[J]. *实用预防医学*,2017,24(7):767-772.
- [ 14 ] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*,2012,78(16):5812-5817.
- [ 15 ] SUFFREDINI E, LANNI L, ARCANGELI G, et al. Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve molluscs harvested in Italy[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014,184:21-26.
- [ 16 ] FLANNERY J, KEAVENEY S, DORE W. Use of FRNA bacteriophages to indicate the risk of *Norovirus* contamination in Irish oysters [J]. *Journal of Food Protection*, 2009, 72(11):2358-2362.
- [ 17 ] POLO D, VARELA M F, ROMALDE J L. Detection and quantification of hepatitis A virus and *Norovirus* in Spanish authorized shellfish harvesting areas [J]. *International Journal of Food Microbiology*,2015,193:43-50.
- [ 18 ] SCHAEFFER J, LE SAUX J C, LORA M, et al. *Norovirus* contamination on French marketed oysters [J]. *International Journal of Food Microbiology*,2013,166(2):244-248.
- [ 19 ] TEUNIS P F M, MOE C L, LIU P, et al. Norwalk virus: how infectious is it [J]. *Journal of Medical Virology*, 2008, 80(8):1468-1476.
- [ 20 ] THEBAULT A, TEUNIS P F M, LE PENDU J, et al. Infectivity of GI and GII noroviruses established from oyster related outbreaks [J]. *Epidemics*,2013,5(2):98-110.
- [ 21 ] LOWTHER J A, GUSTAR N E, POWELL A L, et al. A one-year survey of *Norovirus* in UK oysters collected at the point of sale [J]. *Food and Environmental Virology*,2018,10(3):278-287.

## · 资讯 ·

### 新加坡修订鸡蛋中尼卡巴嗪的最大残留限量

2020 年 12 月 4 日,新加坡食品局(SFA)发布消息,修订鸡蛋中尼卡巴嗪的最大残留限量。

新加坡食品局评估了鸡蛋中低浓度尼卡巴嗪存在的风险,并根据主要发达国家的监管标准确定了鸡蛋中尼卡巴嗪的最大残留限量为 300 ppb。

新加坡食品局将自 2021 年 1 月 4 日起对鸡蛋中尼卡巴嗪的最大残留限量进行管理,并提醒所有贸易商,确保在 2021 年 1 月 4 日或之后出售的鸡蛋符合该要求。

(转自食品伙伴网 <http://news.foodmate.net/2020/12/578998.html>)