

调查研究

威海市海产贝类和水体中4种食源性病毒的污染调查

李楠¹, 苗婷婷², 张华宁³, 韩小敏¹, 张靖¹, 张宏元¹, 王佳慧¹, 白莉¹, 江涛¹

(1. 国家食品安全风险评估中心, 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 中国医学科学院创新单元 2019RU014, 北京 100022; 2. 威海市疾病预防控制中心, 山东威海 264200; 3. 山东省疾病预防控制中心, 山东济南 250014)

摘要:目的 调查山东省威海市海产贝类及水体中4种重要食源性病毒的污染情况。方法 2020—2021年在威海市水产养殖场、农贸市场和污水处理厂采集新鲜贝类、海水和污水样本共360份。样本中病毒颗粒经富集浓缩提取后,采用实时荧光逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法检测4种病毒,即诺如病毒(NoV)、札如病毒(SaV)、甲型肝炎病毒(HAV)和戊型肝炎病毒(HEV)。结果 威海市海产贝类和水体中4种病毒的整体检出率为31.67%(114/360)。病毒的污染情况因样本类型而异,病毒检出率从高到低依次为污水>养殖海水>养殖贝类>零售贝类。每类样本中诺如病毒均是优势污染毒株,总体检出率达到27.78%(100/360),其次为札如病毒8.33%(30/360),甲型肝炎病毒3.61%(13/360)和戊型肝炎病毒1.39%(5/360)。样本中病毒污染具有明显的季节性,养殖贝类、零售贝类和污水中病毒检出率夏季最高,分别为53.33%、30%和100%,冬季或秋季最低;养殖海水中病毒冬季检出率最高为60%,夏季最低为6.67%。此外,26.32%(30/114)的阳性样本为2种(26份)或3种(4份)病毒的混合污染,2种病毒组合的出现频率NoV-SaV>NoV-HAV>NoV-HEV>SaV-HAV/SaV-HEV,3种病毒组合均为NoV-SaV-HAV;病毒混合污染检出率污水>养殖海水>养殖贝类>零售贝类。结论 威海市海产贝类及水体中存在食源性病毒污染的风险,污染具有季节性,多种病毒混合污染的问题值得关注。此外,应加强夏季海产贝类中食源性病毒的监测。

关键词:诺如病毒;札如病毒;甲型肝炎病毒;戊型肝炎病毒;贝类;水

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)12-1359-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.12.008

Survey on contaminations of four foodborne viruses in marine shellfish and water bodies in Weihai City

LI Nan¹, MIAO Tingting², ZHANG Huaning³, HAN Xiaomin¹, ZHANG Jing¹, ZHANG Hongyuan¹,
WANG Jiahui¹, BAI Li¹, JIANG Tao¹

(1. China National Center for Food Safety Risk Assessment, NHC Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, Chinese Academy of Medical Science Research Unit (2019RU014), Beijing 100022, China;

2. Weihai Center for Disease Control and Prevention, Shandong Weihai 264200, China; 3. Shandong Center for Disease Control and Prevention, Shandong Ji'nan 250014, China)

Abstract: Objective To investigate the contamination of Norovirus (NoV), Sapovirus (SaV), hepatitis A virus (HAV) and hepatitis E virus (HEV) in marine shellfish and water bodies in Shandong Province, Weihai City. **Methods** From December 2020 to November 2021, a total of 360 samples including fresh shellfish, seawater and sewage were collected from local aquaculture farm, retail markets and sewage treatment plant. After virus particle concentration, nucleic acids were extracted and detected by real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) for determination of NoV, SaV, HAV and HEV. **Results** The total positive rate of four viruses was 31.67% (114/360). The level of four viruses contamination varied depending on samples types, and the rank of positive rate for different sample types was sewage, sea water, farmed shellfish and retail shellfish in descending order. NoV was the dominant contaminating virus with the total detected rate of 27.78% (100/360), followed by SaV 8.33% (30/360), HAV 3.61%

收稿日期:2024-08-26

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1602703)

作者简介:李楠 女 副研究员 研究方向为食源性病毒检测 E-mail:linan100041@cfssa.net.cn

通信作者:江涛 男 研究员 研究方向为食源性病毒检测 E-mail:jiangtao001@cfssa.net.cn

(13/360) and HEV 1.39% (5/360). The detection rate of the four foodborne viruses in samples varied with seasons, and it was the highest detection rate for farmed shellfish, retail shellfish and sewage in summer, with 53.33%, 30% and 100% respectively, and the lowest in autumn and winter. While for sea water, the highest detection rate for the four foodborne viruses was in winter (60%) and the lowest was in summer (6.67%). In addition, 26.32% (30/114) of the positive samples were mixed contamination with two (26 samples) or three (4 samples) viruses. The occurrence frequency of the two virus mixed combination was NoV-SaV, NoV-HAV, NoV-HEV, SaV-HAV and SaV-HEV in descending order, and the combination of three viruses was NOV-SaV-HAV. The rank of detection rate of viruses mixed contamination in different sample types was sewage, seawater, farmed shellfish and retail shellfish in descending order. **Conclusion** There was a risk of foodborne viruses contamination in marine shellfish and water bodies in Weihai, and the contamination was seasonal. The issue of viruses mixed contamination needs to be concerned. Additionally, monitoring of foodborne viruses in marine shellfish should be strengthened in Weihai in summer.

Key words: Norovirus; Sapovirus; hepatitis A virus; hepatitis E virus; shellfish; water

诺如病毒、札如病毒、甲型肝炎病毒和戊型肝炎病毒是4种重要的食源性病毒,主要经粪-口途径传播,是引起我国食源性疾病暴发或散发的重要病原体。感染人的诺如病毒(Norovirus, NoV)、札如病毒(Sapovirus, SaV)两种病毒同属人类杯状病毒科(Human calicivirus, HuCV),可导致全年龄人群急性胃肠炎发作。NoV因拥有理想的传染性病原体的所有属性,被称为“完美病毒”,是我国5岁以上年龄段人群病毒性急性腹泻的主要病因^[1-2]。不同于其他肝炎病毒通过母婴、血液和密切接触等传播方式,甲型肝炎病毒(Hepatitis A virus, HAV)和戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)。主要经消化道传播。近年来随着我国社会经济和卫生环境的极大改善以及甲肝疫苗的普遍应用,我国居民甲型肝炎的发病率明显下降,但在一些卫生条件较差的地区发病率仍然较高。戊型肝炎的报告发病率于2012年已超过甲型肝炎,HEV已经逐渐成为引发急性病毒性肝炎的主要病原体^[3-4]。

食源性传播是上述4种病毒的重要传播方式。牡蛎等滤食性贝类已证明是HAV、SaV和NoV的常见载体^[5-6],戊型肝炎亦被认为与食用贝类存在关联^[7-10]。我国是贝类生产、加工、出口和消费大国,海水贝类总产量居于世界首位,牡蛎作为第一大传统养殖品种其人均消费量(3.52 kg/人)更远高于世界平均水平的0.15 kg/人^[11]。由于牡蛎养成期位于浅海等开放水体,生长位置较为稳定,对环境中食源性病毒具有较强的富集能力,体内病毒浓度可达到周围水体的近百倍,因此是引起食源性疾病暴发的常见食品载体。据估计,贝类造成美国9%~34%食源性诺如病毒感染病例^[12],其质量安全直接与生长的水域环境相关。

国际上关于贝类产品安全控制的法律法规,最早可以追溯到1925年美国的《国家贝类卫生计划》(National Shellfish Sanitation Program, NSSP),欧盟、

加拿大、日本、韩国等国家或组织也制定了类似的法规、政策或指导方针^[13-15]。我国相关工作起步较晚,2017年国家食品安全风险监测计划将贝类中NoV的监测纳入其中,但迄今为止国家层面尚未建立系统性的贝类卫生管理和风险监测、评估、预警体系,现有水卫生标准中使用大肠菌群作为粪便污染指标在管理病毒风险方面并不十分有效,加之我国居民有生吃或稍微煮熟后食用贝类的习惯,导致贝类食源性病毒污染带来的食品安全问题较为严重^[12]。近年来,我国海产贝类中食源性病毒的检出屡见报道,但污水-养殖海水-贝类传播链中多种病毒混合污染的监测极为少见,且样本多来源于销售环节,有必要对贝类养殖、销售环节中食源性病毒的污染情况开展调查。本研究将采样地点设置在我国海洋贝类主产区之一的山东省,于2020年12月至2021年11月间,在威海市采集当地养殖贝类、零售贝类、养殖海水及污水样本,采用RT-PCR方法对样本中NoV、SaV、HAV和HEV进行检测,分析病毒的污染变化情况。不仅有助于确定NoV等可经贝类传播的病原体的流行情况,而且有助于发现新出现的可能通过贝类传播的病毒危害,为海产贝类中食源性病毒的风险监测、风险评估和标准制定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

所有实验样本均来源于山东省威海市。从当地某水产养殖场以及农贸市场不同摊位采集本地新鲜海水养殖贝类样本,同时在该养殖场采集海水样本,在当地污水处理厂采集排放口污水样本。样本采集后置于塑料无菌采样袋中,加冰袋置于保温箱中运送至实验室。

病毒RNA提取试剂盒(凯杰生物技术(上海)有限公司);NoV(G I/G II)、SaV、HAV和HEV核

酸检测试剂盒(RT-PCR 探针法,含 MS2)、外加扩增控制 RNA(山东美正生物科技有限公司);蛋白酶 K(西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司);牛肉膏(上海麦克林生化科技股份有限公司);PEG8000(上海拜力生物公司);MS2 过程控制试剂盒(山东美正生物科技有限公司);中速滤纸(杭州特种纸业公司);硝酸纤维素膜(0.45 μm ,德国 Millipore)。

1.2 仪器与设备

CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);FE20 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);CR22E 型高速低温离心机(日本 HITACHI 公司);THZ-C-1 恒温摇床(苏州培英实验设备有限公司);TW12 型水浴箱(优莱博技术(北京)有限公司)。

1.3 实验样本

2020 年 12 月至 2021 年 11 月,每月在水产养殖场和农贸市场(包括水产市场、早市)各采集牡蛎及海虹样本 10 份,在水产养殖场采集海水样本 5 份,在当地污水处理厂采集处理后排放的污水样本 5 份。全年共采集养殖贝类样本 120 份,零售贝类样本 120 份,养殖海水样本 60 份,污水样本 60 份,共计 360 份样本。

1.4 实验方法

1.4.1 样本的前处理

取 10 个以上贝类消化腺体,置于无菌平皿内,将消化腺剪碎后放入 50 mL 离心管中,研磨杵仔细研磨至均质,作为一份检测样本。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 μL MS2 噬菌体和 2 mL 蛋白酶 K 溶液,涡旋振荡混匀。将离心管置于恒温摇床中,37 $^{\circ}\text{C}$,280 r/min 振荡 60 min。取出离心管,置于水浴箱中 60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,随后室温下 3 000 g 离心 15 min。吸取 1 mL 上清转移至 1.5 mL 无 RNase 离心管中,用于病毒 RNA 提取。

海水和污水用中速滤纸初滤后,量取 0.5 L 水样,加入 10 μL MS2 噬菌体,振荡混匀,调节 pH 至 3.0,加入 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 使其终浓度为 0.05 mol/L。负压下将样本通过硝酸纤维素膜,用干净剪刀将滤膜剪碎,转入 50 mL 离心管。向离心管中加入 20 mL TGBE 缓冲液,室温下摇床 250 r/min 振荡 20 min 洗脱病毒。用 6 mol/L HCL 调节 pH 值至 7.0,将液体转入 50 mL 高速离心管中,加入 0.25 倍提取液体积的 5 \times PEG 8 000/NaCl 溶液。涡旋振荡均质 60 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜沉淀病毒。4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 g 离心 30 min,弃去上清,再离心 5 min 使沉淀紧凑,用移液器吸出上清弃去。向离心管中加入 1 000 μL PBS,反复吹吸管底重悬沉淀,得到病毒富集液,用于病毒 RNA

提取。

1.4.2 病毒 RNA 提取

使用商品化的病毒 RNA 提取试剂盒(凯杰生物技术(上海)有限公司)进行病毒 RNA 的提取和纯化,按照试剂盒说明书操作。提取所得 RNA 溶液立即进行实时荧光 RT-PCR 检测,或于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4.3 实时荧光 RT-PCR 检测

使用商品化的核酸检测试剂盒(RT-PCR 探针法,含 MS2)(山东美正生物科技有限公司)进行 NoV、SaV、HAV 和 HEV 检测,按照试剂盒说明书操作。反应体系:19 μL 预混液,1 μL 酶混合液,5 μL RNA。反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 并采集荧光,65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环。每个反应设置两个平行。

1.4.4 质量控制

以无 RNase 超纯水作为空白对照,使用商品化的核酸检测试剂盒中提供的阴性对照和阳性对照,MS2 噬菌体作为病毒 RNA 提取的过程控制,通过外加扩增控制 RNA 作为扩增控制。

1.4.5 结果判定

检测有效性参照 GB 4789.42—2016^[16]中“6.1 检测有效性判定”规定。

检测有效的情况下,待测样本的 Ct 值 \geq 38 时,判定为样本中目标病毒阴性;待测样本有明显的扩增曲线且 Ct 值 \leq 35 时,判定为样本中目标病毒阳性;35<Ct 值<38 时,重新检测,Ct 值 \geq 38 判定为目标病毒阴性,否则为阳性。

2 结果

2.1 4 种食源性病毒的污染情况

2.1.1 不同类型样本中 4 种食源性病毒的污染情况

如表 1 所示,样本中 4 种食源性病毒的整体检出率为 31.67%(114/360),具体检出率由高到低依次为污水(71.67%,43/60)>养殖海水(41.67%,25/60)>养殖贝类(25.00%,30/120)>零售贝类(13.33%,16/120)。由此可见,污水中食源性病毒的污染最为严重,分别是养殖海水、养殖贝类和零售贝类中病毒检出率的 1.72、2.87 和 5.38 倍,此外,4 种食源性病毒均可从污水样本中检出。

从病毒种类来看,4 种食源性病毒的污染情况从高到低依次为 NoV>SaV>HAV>HEV。每种类型样本中 NoV 都是优势污染病毒,27.78%(100/360)的样本中有检出。SaV 的污染次于 NoV 居第 2 位,检出率为 8.33%(30/360),每种类型样本中均有检出。HAV 检出率为 3.61%(13/360),主要在养殖海

表1 调查样本中4种食源性病毒整体污染情况

| 样本类型 | 样本量/份 | 阳性样本量/份 | | | | | 共计 | 检出率/% |
|------|-------|---------|-----|-----|-----|------|-----|-------|
| | | NoV | SaV | HAV | HEV | 混合污染 | | |
| 养殖贝类 | 120 | 26 | 6 | 0 | 0 | 2 | 30 | 25.00 |
| 零售贝类 | 120 | 13 | 2 | 1 | 0 | 0 | 16 | 13.33 |
| 养殖海水 | 60 | 20 | 5 | 7 | 0 | 5 | 25 | 41.67 |
| 污水 | 60 | 41 | 17 | 5 | 5 | 23 | 43 | 71.67 |
| 合计 | 360 | 100 | 30 | 13 | 5 | 30 | 114 | 31.67 |

水和污水中检出。HEV 检出率为 1.39%(5/360), 仅在污水中检出。

不同类型样本中4种食源性病毒的单一污染

表2 调查样本中4种食源性病毒单一/混合污染情况

| 样本类型 | 单一污染检出率/% | | | | 混合污染检出率/% |
|------|---------------|-------------|-------------|-----|--------------|
| | NoV | SaV | HAV | HEV | |
| 养殖贝类 | 20.00(24/120) | 3.33(4/120) | — | — | 1.67(2/120) |
| 零售贝类 | 10.83(13/120) | 1.67(2/120) | 0.83(1/120) | — | — |
| 养殖海水 | 25.00(15/60) | 5.00(3/60) | 3.33(2/60) | — | 8.33(5/60) |
| 污水 | 33.33(20/60) | — | — | — | 38.33(23/60) |
| 合计 | 20.00(72/360) | 2.50(9/360) | 0.83(3/360) | — | 8.33(30/360) |

表3 调查样本中4种食源性病毒污染的具体情况

| 样本类型 | 病毒组合 | 检出率/% |
|------|-------------|---------------|
| 养殖贝类 | NoV | 20.00(24/120) |
| | SaV | 3.33(4/120) |
| | NoV-SaV | 1.67(2/120) |
| 零售贝类 | NoV | 10.83(13/120) |
| | SaV | 1.67(2/120) |
| | HAV | 0.83(1/120) |
| 养殖海水 | NoV | 25.00(15/60) |
| | SaV | 5.00(3/60) |
| | HAV | 3.33(2/60) |
| | NoV-HAV | 5.00(3/60) |
| 污水 | NoV-SaV-HAV | 3.33(2/60) |
| | NoV | 33.33(20/60) |
| | NoV-SaV | 21.67(13/60) |
| | NoV-HEV | 6.67(4/60) |
| | NoV-HAV | 3.33(2/60) |
| | SaV-HAV | 1.67(1/60) |
| 污水 | SaV-HEV | 1.67(1/60) |
| | NoV-SaV-HAV | 3.33(2/60) |

除零售贝类外,在养殖贝类、养殖海水和污水样本中都出现了多种病毒混合污染的情况,病毒混合检出率污水>养殖海水>养殖贝类。污水中病毒混合污染的情况最为复杂,不同病毒的混合污染检出了6种组合,出现频率从高到低依次为 NoV-SaV>NoV-HEV>NoV-HAV/NoV-SaV-HAV>SaV-HAV/SaV-HEV。养殖海水中检出2种病毒组合,出现频率 NoV-HAV>NoV-SaV-HAV。养殖贝类中仅检出 NoV-SaV 组合。

2.1.2 NoV 基因型分布情况

NoV 的污染具有多样性,不同基因群检出情况如表4所示,单一 G II 基因群检出率>G I -G II 基因

和混合污染情况如表2和表3所示。可以看出,病毒的单一污染和混合污染检出率分别是 23.33%(84/360)和 8.33%(30/360),不同病毒的混合污染在所有阳性样本中占比 26.32%(30/114)。2种病毒混合污染的出现频率是 22.81%(26/114),高于3种病毒的出现频率 3.51%(4/114)。被2种病毒混合污染的样本共26份,以 NoV-SaV 占比最高 57.69%(15/26),其次是 NoV-HAV 19.23%(5/26)、NoV-HEV 15.38%(4/26),SaV-HAV 和 SaV-HEV 均为 3.85%(1/26)。3种病毒混合污染的样本共4份,均为 NoV-SaV-HAV。

群混合检出率>单一 G I 基因群检出率。G I -G II 基因群混合检出率在污水中最高,达到 38.33%;其次是养殖贝类为 9.16%,是零售贝类中 G I -G II 基因群混合检出率的 11 倍;养殖海水中所有 NoV 阳性样本均为单一 G II 基因群。

表4 调查样本中不同基因群 NoV 的检出情况

| 样本类型 | 检出率/% | | |
|------|-------------|---------------|--------------|
| | G I | G II | G I -G II |
| 养殖贝类 | 0.83(1/120) | 11.67(14/120) | 9.16(11/120) |
| 零售贝类 | 1.67(2/120) | 8.33(10/120) | 0.83(1/120) |
| 养殖海水 | — | 33.33(20/60) | — |
| 污水 | — | 30.00(18/60) | 38.33(23/60) |
| 合计 | 0.83(3/360) | 17.22(62/360) | 9.72(35/360) |

2.2 季节因素对4种食源性病毒污染影响

2.2.1 不同季节4种食源性病毒的整体污染情况

按照冬季(12月~次年2月)、春季(3月~5月)、夏季(6月~8月)和秋季(9月~11月)将采样时间分为4个季节,4种病毒在不同采样季节的污染情况如表5所示。整体看来,病毒污染呈现先升高后降低的变化趋势,冬季和秋季检出率最低,均为 25.56%;夏季最高,为 45.56%。

养殖贝类、零售贝类和污水中病毒的污染变化趋势相似,从冬季起逐渐升高至夏季达到顶峰,病毒检出率在 30%~100%,秋季逐渐降低。养殖海水中病毒污染变化趋势正相反,冬季检出率最高,为 60.00%;夏季最低,为 6.67%。

2.2.2 不同季节4种食源性病毒的污染情况

样本中食源性病毒在4个季节的污染情况如

表5所示,污染病毒的种类夏季>秋季/冬季>春季,分别为4种、3种和2种。各季节每类样本中均有NoV检出。除此以外,冬季未检出SaV污染,4份HAV和1份HEV阳性样本均来自养殖海水和污水。春季未检出HAV和HEV污染,9份SaV阳性样本同样来自养殖海水和污水。夏季检出的11份

SaV、1份HAV和4份HEV分布在养殖贝类、零售贝类和污水中。秋季未检出HEV污染,10份SaV和8份HAV来自养殖贝类、养殖海水及污水中。综合来看,夏秋两季的SaV污染、秋冬两季的HAV污染较为突出,阳性样本分别占全年检出总量的70%(21/30)和92.31%(12/13)。

表5 不同季节采集样本中4种食源性病毒的检出率(%)
Table 5 Detection rate of 4 foodborne viruses in each season (%)

| 采样季节 | 病毒 | 养殖贝类 | 零售贝类 | 养殖海水 | 污水 | 所有样本 |
|------|-----|--------------|-------------|-------------|---------------|--------------|
| 冬季 | NoV | 6.67(2/30) | 3.33(1/30) | 53.33(8/15) | 73.33(11/15) | |
| | SaV | — | — | — | — | |
| | HAV | — | — | 20.00(3/15) | 6.67(1/15) | |
| | HEV | — | — | — | 6.67(1/15) | |
| | 合计 | 6.67(2/30) | 3.33(1/30) | 60.00(9/15) | 73.33(11/15) | 25.56(23/90) |
| 春季 | NoV | 23.33(7/30) | 10.00(3/30) | 33.33(5/15) | 66.67(10/15) | |
| | SaV | — | — | 13.30(2/15) | 46.67(7/15) | |
| | HAV | — | — | — | — | |
| | HEV | — | — | — | — | |
| | 合计 | 23.33(7/30) | 10.00(3/30) | 46.67(7/15) | 66.67(10/15) | 30.00(27/90) |
| 夏季 | NoV | 46.67(14/30) | 20.00(6/30) | 6.67(1/15) | 93.33(14/15) | |
| | SaV | 13.33(4/30) | 6.67(2/30) | — | 33.33(5/15) | |
| | HAV | — | 3.33(1/30) | — | — | |
| | HEV | — | — | — | 26.67(4/15) | |
| | 合计 | 53.33(16/30) | 30.00(9/30) | 6.67(1/15) | 100.00(15/15) | 45.56(41/90) |
| 秋季 | NoV | 10.00(3/30) | 10.00(3/30) | 40.00(6/15) | 40.00(6/15) | |
| | SaV | 6.67(2/30) | — | 20.00(3/15) | 33.33(5/15) | |
| | HAV | — | — | 26.67(4/15) | 26.67(4/15) | |
| | HEV | — | — | — | — | |
| | 合计 | 16.67(5/30) | 10.00(3/30) | 53.33(8/15) | 46.67(7/15) | 25.56(23/90) |

3 讨论

贝类产品安全与其产地环境状况密切相关。对贝类及其养殖水环境中食源性病毒污染情况进行监测,了解不同季节、不同贝类中食源性病毒的污染差异,是我国开展贝类产品的食品安全风险评估、预测和预警工作必不可少的基础。本研究对山东省威海市海产贝类及其水体中的4种食源性病毒开展为期一年的污染调查,分析每种类型样本中病毒污染的情况和季节分布特征,为海产贝类的食品安全管理补充基础数据。本次调查显示,2020—2021年在威海市采集的360份当地养殖贝类、零售贝类、养殖海水和污水样本中,NoV、SaV、HAV和HEV均有检出。

首先,无论在何种类型样本中,NoV均为主要污染的毒株,G II为优势基因群,且在贝类、养殖水和污水中呈现一致的结果。这与国内以往的研究结果基本相符^[17-21],为病毒在人群-环境-食品中存在循环传播路径的推测提供了佐证^[22]。值得关注的是,本次调查的养殖贝类中NoV检出率约是零售贝类的2倍,这种差距主要由养殖贝类中检出更多的G I-G II基因群混合阳性样本所造成。分析其原因,除样本本身来源差异以及不同基因群与贝类结

合能力差异等因素外^[23],推测与贝类采捕后到上市销售期间经清洗分级、暂养等处理使病毒部分去除有关,由此提示贝类采捕后暂养净化处理的重要性。

本次调查中SaV的污染虽然次于NoV居第2位,但检出率并不高,尤其是在零售贝类中检出率仅为1.67%,这与国内外一些地区贝类中SaV的阳性率很高,可以达到与NoV相同甚至更高的水平的报道有较大差异^[24-25]。此外,虽然此次调查贝类中仅1份样本检出HAV、未检出HEV,但是这两种病毒在养殖海水和污水中的检出率达到8.33%~11.67%,提示肝炎病毒通过贝类传播的可能性不容忽视,特别是国内外研究已证实海产贝类中存在着相关污染并可能对消费者造成健康风险,以及1988年上海毛蚶引起30万人甲肝大暴发的前车之鉴^[7-8,26]。

其次,本次调查所有贝类中病毒污染在秋冬季处在低谷,夏季达到顶峰,这与以往报道中通常在冬春季的贝类中检测到更多病毒截然不同^[27-28]。结合养殖海水和污水的调查结果分析,因贝类可在体内不断蓄积病毒,是一定时间段内病毒累积的反映,冬季和春季养殖海水中病毒污染较为严重,贝类经过一段时间蓄积在夏季达到污染高峰。此外,由于当地人群食源性病毒感染暴发的数据较少,因

此尚无法探知贝类消费与疫情暴发间是否存在季节性关联,但此次调查结果提示夏季海产贝类导致食源性病毒传播的风险不容忽视。

本次调查还发现,样本中多种食源性病毒的混合污染较为常见,尤其是污水和养殖海水样本共检出6种不同的病毒组合。宋旭岩等^[23]和明红霞等^[29]的报告也证实我国海产贝类中存在不同程度的食源性病毒混合污染。虽然目前的研究无法确定病毒混合污染是否会对消费者产生更严重的健康后果,但鉴于对人类健康存在的潜在风险,应加强暴发事件和贝类养殖环境食源性病毒的动态监测,做好食源性疾病暴发预警工作。

综上所述,本次威海市海产贝类及水体中4种食源性病毒污染调查,以下结果值得强调。第一,不同食源性病毒的污染分布不同, NoV在每类样本中均是污染情况最为严重的病毒, G II为优势基因群。第二,食源性病毒污染具有明显的季节性差异,贝类中污染高峰出现在夏季而非冬季,并且存在多种病毒混合污染。提示在加强冬季监测的同时,也不能忽视夏季海产贝类的监测。第三,本次调查贝类中未检出HEV,但在污水中有检出,考虑到有些贝类对HEV偶发污染更为敏感可短时间快速生物积累^[30],应加强当地人群戊型肝炎暴发和贝类HEV的联动监测。

本研究还存在一定不足,如所采集的贝类样本种类覆盖不够全面,未能同期收集当地病毒性腹泻病人的临床样本,仅获得病毒污染的定性数据,检测周期短等。未来的工作中应尽力弥补以上不足,完善食源性病毒的快速、精准检测技术体系,获取“人-环-食”循环链中食源性病毒污染水平的定量数据,为贝类产品中食源性病毒的风险评估及标准制定提供数据支撑。

参考文献

- [1] ARON J HALL. Noroviruses: the perfect human pathogens? [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2012, 205(11): 1622-1624.
- [2] WANG L P, ZHOU S X, WANG X, et al. Etiological, epidemiological, and clinical features of acute diarrhea in China [J]. *Nature communications*, 2021, 12(1): 1-12.
- [3] 中华医学会肝病学会. 戊型肝炎防治共识 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2022, 30(8): 820-831. Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association. Consensus on prevention and treatment of hepatitis E [J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2022, 30(8): 820-831.
- [4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 2012年度全国法定传染病疫情概况. [EB/OL]. [2013-03-15]. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3578/201304/b540269c8e5141e6bb2d00ca539bb9f7.shtml>. [2024-06-08].
- [5] National Health Commission of the People's Republic of China. Prevalence of the notifiable infectious diseases nationwide in 2012. [EB/OL]. [2013-03-15]. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3578/201304/b540269c8e5141e6bb2d00ca539bb9f7.shtml>. [2024-06-08].
- [6] SETSUKO HIZUKA, TOMOICHIRO OKA, KENJI TABARA, et al. Detection of Sapoviruses and Noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish [J]. *Journal of Medical Virology*, 2010, 82(7): 1247-1254.
- [7] WANG Y, ZHANG J N, SHEN Z. The impact of calicivirus mixed infection in an oyster-associated outbreak during a food festival [J]. *Journal of Clinical Virology*, 2015, 73: 55-63.
- [8] GAO S Y, LI D L, ZHA E H, et al. Surveillance of hepatitis E virus contamination in shellfish in China [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2015, 12(2): 2026-2036.
- [9] TAN M T H, HO S X, CHU J J H, et al. Application of virome capture sequencing in shellfish sold at retail level in Singapore [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2021, 73(4): 486-494.
- [10] 王安娜, 钟贤武, 覃霖, 等. 诺如病毒在沿海地区人群和环境中的循环传播路径研究 [J]. *华南预防医学*, 2016, 42(2): 101-107. WANG A N, ZHONG X W, QIN L, et al. Circulation routes of norovirus among population and environment in coastal area [J]. *South China Journal of Preventive Medicine*, 2016, 42(2): 101-107.
- [11] KOIZUMI Y, ISODA N, SATO Y, et al. Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis e virus while traveling in Vietnam [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(8): 3883-3885.
- [12] 国家贝类产业技术体系. 中国牡蛎产业发展报告 [J]. *中国水产*, 2021(6): 20-31. National Shellfish Industry Technology System. Report on the development of China oyster industry [J]. *China Fisheries*, 2021(6): 20-31.
- [13] HUNT K, DOR' E B, KEAVENEY S, et al. A quantitative exposure assessment model for norovirus in oysters harvested from a classified production area [J]. *Microbial Risk Analysis*, 2023, 23: 1-14.
- [14] U.S. Food and Drug Administration. National Shellfish Sanitation Program (NSSP) [EB/OL]. (2020-10-29) [2024-06-08]. <https://www.fda.gov/food/federalstate-food-programs/national-shellfish-sanitation-program-nssp>.
- [15] European Union. Regulation (EC) No 853/2004 the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs [EB/OL]. (2023-02-15) [2024-06-08]. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2004/853/oj>.
- [16] Government of Canada. Canadian Shellfish Sanitation Program (CSSP) [EB/OL]. (2021-04-28) [2024-06-08]. <https://inspection.canada.ca/en/preventive-controls/fish/cssp>.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品微生物学检验诺如病毒检验: GB 4789.42—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. National Health and Family Planning Commission of the People's

- Republic of China, China Food and Drug Administration. National Food Safety Standards, food microbiological analysis, determination of norovirus: GB 4789.42—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [17] 王建, 陈秋霞, 王海燕, 等. 广州市市售牡蛎诺如病毒污染情况分析[J]. 华南预防医学, 2022, 48(8): 981-984.
WANG J, CHEN Q X, WANG H Y, et al. Surveillance of Norovirus contamination on oysters sold in Guangzhou[J]. South China Journal of Preventive Medicine, 2022, 48(8): 981-984.
- [18] JIANG T, HAN C H, SEAMUS FANNING, et al. Norovirus contamination in retail oysters from Beijing and Qingdao, China [J]. Food Control, 2018, 86: 415-419.
- [19] 时沙沙, 贾添慧, 杨明树, 等. 枸杞岛养殖贻贝中诺如病毒污染情况调查与分析[J]. 微生物学杂志, 2020, 40(5): 73-81.
SHI S S, JIA T H, YANG M S, et al. Investigation and Analysis of Norovirus Pollution in Mussel Cultured in Gouqi Island [J]. Journal of Microbiology, 2020, 40(5): 73-81.
- [20] 刘永华. 辽东湾近海双壳贝类主要生物和重金属污染现状调查及生态风险评估[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020.
LIU Y H. Investigation on Main Biological and Heavy Metal Pollution of Bivalve and Evaluation on Ecological Risk in Liaodong Bay[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2020.
- [21] ZHANG H N, LIU D L, ZHANG Z L, et al. Surveillance of human norovirus in oysters collected from production area in Shandong Province, China during 2017—2018[J]. Food Control, 2021, 121, 107649.
- [22] 蔡淑珍, 李贻静, 薛亮, 等. 我国贝类中诺如病毒检出状况的荟萃分析[J]. 渔业科学进展, 2023, 44(6): 177-189.
CAI S Z, LI Y J, XUE L, et al. Detection of human noroviruses in shellfish in China: A meta-analysis [J]. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(6): 177-189.
- [23] 宋旭岩, 叶兵, 林滢, 等. 山东省沿海地区市场销售贝类诺如病毒、甲肝病毒、轮状病毒和星状病毒污染状况调查[J]. 中国初级卫生保健, 2024, 38(5): 65-68.
SONG X Y, YE B, LIN Y, et al. Investigation on contamination of shellfish Norovirus, Hepatitis A Virus, Rotavirus and Astrovirus in coastal Area of Shandong province [J]. Chinese Primary Health Care, 2024, 38(5): 65-68.
- [24] 张辉. 舟山市海产贝类常见食源性病毒监测分析[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
ZHANG H. Monitoring and analysis of main foodborne viruses in marine shellfish in Zhoushan city [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019.
- [25] VARELA MF, HOOPER AS, RIVADULLA E, et al. Human sapovirus in mussels from Ría do Burgo, A Coruña (Spain) [J]. Food Environ Virol, 2016, 8(3): 187-193.
- [26] 焦永真, 韩剑秋, 王宪明, 等. 1988年上海甲型肝炎暴发流行中从毛蚶分离到甲型肝炎病毒[J]. 病毒学报, 1990, 6(4): 187-193.
JIAO Y Z, HAN J Q, WANG X M, et al. Isolation of hepatitis A virus from clams during the 1988 outbreak in Shanghai [J]. Chinese Journal of Virology, 1990, 6(4): 187-193.
- [27] 吴立梦, 滕峥, 崔晓青, 等. 上海市贝类水产品诺如病毒污染状况及基因分型[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(8): 888-893.
WU L M, TENG Z, CUI X Q, et al. Norovirus contamination and genotypes in shellfish in Shanghai [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(8): 888-893.
- [28] 严寒秋, 王永全, 田祎, 等. 北京市市售扇贝中诺如病毒监测分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(4): 427-431.
YAN H Q, WANG Y Q, TIAN Y, et al. Surveillance of Norovirus contamination on scallops sold in Beijing [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2020, 32(4): 427-431.
- [29] 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.
MING H H, FAN J F, WU L J, et al. Contamination of typical human enteric viruses in economic shellfish along the Chinese coast [J]. Acta microbiologica Sinica, 2014, 54(1): 69-79.
- [30] GRODZKI M, SCHAEFFER J, PIQUET JC, et al. Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(14): 4269-4276.