

风险监测

北京市市售扇贝中诺如病毒监测分析

严寒秋¹,王永全²,田祎¹,靳博²,崔海洋²,高志勇¹,王全意¹

(1. 北京市疾病预防控制中心 北京市医学研究中心 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013; 2. 北京市西城区疾病预防控制中心, 北京 100120)

摘要:目的 监测北京市市售扇贝中诺如病毒和 A 组轮状病毒污染状况,分析其基因特征。方法 2014 年 11 月至 2015 年 10 月,采集北京市 3 个水产品出售市场新鲜扇贝 72 份。取扇贝消化组织,用聚乙二醇(PEG)8000 沉淀法进行病毒富集后提取核酸,用实时荧光逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测诺如病毒和 A 组轮状病毒核酸。用半巢式 RT-PCR 方法扩增诺如病毒 G I /G II 组衣壳蛋白区基因,对 PCR 产物进行测序,用 BioEdit 7.0.9.0 软件进行序列比对,用 MEGA 6.06 软件构建进化树。结果 72 份扇贝样品均未检出 A 组轮状病毒;诺如病毒检出率为 27.8%(20/72),其中 G II 组 16 份,G I 组 2 份,G I 和 G II 组混合 2 份。冬季检出率最高,为 61.1%(11/18);夏季未检出。8 份诺如病毒核酸阳性样品测序结果为 G II.17 型,属于 G II.17 型 Cluster III b 分枝。有 6 株 G II.17 型毒株与 2015 年中国人源诺如病毒、2016 和 2017 年日本人源诺如病毒、2017 和 2018 年韩国水中诺如病毒以及 2015 年日本牡蛎中诺如病毒序列相似性为 100.0%。结论 北京市市售扇贝中存在诺如病毒污染,食用扇贝有引起病毒性急性胃肠炎的风险。

关键词:扇贝;诺如病毒;轮状病毒;基因型

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2020)04-0427-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.04.015

Surveillance of *Norovirus* contamination on scallops sold in BeijingYAN Hanqiu¹, WANG Yongquan¹, TIAN Yi¹, JIN Bo², CUI Haiyang²,
GAO Zhiyong¹, WANG Quanyi¹

(1. Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing Research Center for Preventive Medicine, Beijing 100013, China; 2. Xicheng District Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100120, China)

Abstract: Objective To monitor the contamination of *Norovirus* and *Rotavirus* in scallops sold in Beijing and analyze their genetic characteristics. **Methods** A total of 72 scallops were collected during November 2014 and October 2015. The digestive tissues of scallops were excised, *Norovirus* was enriched using the polyethylene glycol (PEG) 8000 precipitation method. The virus RNA were extracted and tested for *Norovirus* and *Rotavirus* using the real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The capsid gene of *Norovirus* was amplified by the semi-nested RT-PCR. PCR products were sequenced directly. Sequence alignment was performed using BioEdit 7.0.9.0 software and the phylogenetic tree was constructed by MEGA 6.06 software. **Results** Among 72 scallops, *Rotavirus* was detected negative, and the detection rate of *Norovirus* was 27.8% (20/72), including 16 strains of genogroup G II, 2 strains of genogroup G I, and 2 strains of mixed genogroups G I and G II. The highest detection rate of *Norovirus* (61.1%, 11/18) was found in winter, and none was detected in summer. A total of 8 strains were sequenced successfully and identified as G II.17 genotype. These strains all belonged to the Cluster III b branch of G II.17 genotype, among which 6 strains shared 100.0% sequence similarity with strains detected in Chinese people in 2015, in Japanese people in 2016 and 2017, in water samples in South Korea in 2017 and 2018, and in oysters in Japan in 2015. **Conclusion** *Norovirus* contamination

收稿日期:2020-04-18

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1602203-4)

作者简介:严寒秋 女 主任技师 研究方向为病原微生物检验 E-mail:13671113791@163.com

王永全 男 副主任技师 研究方向为食品卫生监测 E-mail:wangyq0730@sina.com

通信作者:高志勇 男 研究员 研究方向为传染病监测 E-mail:zhiyonggao1@163.com

严寒秋和王永全为共同第一作者。

existed in some scallops sold in Beijing, eating uncooked scallops would indicate a risk of viral acute gastroenteritis.

Key words: Scallops; *Norovirus*; *Rotavirus*; genotype

诺如病毒(*Norovirus*, NoV)和轮状病毒(*Rotavirus*, RV)均为RNA病毒,是引起人类非细菌急性胃肠炎的主要病原体。诺如病毒依据衣壳蛋白基因特征,分为GI~GⅦ共7个基因组,引起人感染的主要是GI和GⅡ组^[1]。轮状病毒依据内壳蛋白VP6抗原性的不同,将轮状病毒分为10组(A~J),引起人致病的为A、B和C三个组,其中以A组轮状病毒引起的腹泻为主^[2]。诺如病毒和轮状病毒可以通过人、食品和水等多种方式传播。人或动物的排泄物在未处理或处理不彻底的情况下,因自然和人为因素(雨水、排污等)排入近海而污染海水。近海养殖的双壳滤食性动物贝类,通过鳃部滤取海水中大量浮游生物获取营养,同时也富集了海水中的有害病原体。有研究^[3-4]表明贝类消化组织可结合、富集诺如病毒和轮状病毒,病毒浓度高出海水几十倍到上千倍^[5],人食用了这种污染的贝类水产品,会引起急性胃肠炎。

扇贝是双壳滤食性动物贝类的一种,也是大众日常食用的海产品。为了解扇贝中诺如病毒和A组轮状病毒污染状况,2014年11月至2015年10月,在北京市3个水产品出售市场采集鲜活扇贝,进行诺如病毒和A组轮状病毒污染状况监测,分析基因特征,以期通过对扇贝中诺如病毒和A组轮状病毒监测,为评估食用扇贝可能引起病毒性急性胃肠炎的风险提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

于2014年11月至2015年10月,每月固定日期,在北京市3个水产品出售市场固定的摊位采集新鲜扇贝2次,每次采集5个扇贝为1份。每月采集6份,12个月共采集样品72份。-20℃以下保存待检。

1.1.2 主要仪器与试剂

7500 荧光定量 PCR 仪、9700 GeneAmp PCR System 均购自美国 ABI, QIAxcel 全自动毛细管电泳仪(德国 QIAGEN), ST 16R 台式冷冻离心机。

聚乙二醇(PEG)8000(美国 Sigma), 病毒核酸提取试剂盒 QIAamp Viral RNA Mini Kit 和 One Step RT-PCR Kit 均购自德国 QIAGEN, 诺如病毒 GI/GⅡ核酸荧光 PCR 检测试剂盒和轮状病毒(A组)核酸荧光 PCR 检测试剂盒均购自江苏硕世生物科技有限公司, AmpliTaq Gold® 360 Master Mix(美国 Life

Tech), 试剂均在有效期内按说明书使用。PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

用流动自来水洗净扇贝外壳污物,参照文献[6-7]打开扇贝双壳,用灭菌的剪子和镊子解剖鳃及肠内容物等消化组织,置无菌平皿中,另取一灭菌的剪子将5个扇贝样品尽可能剪碎并充分混匀。

1.2.2 病毒富集

参照文献[6-7]用 PEG8000 沉淀法,对扇贝消化组织进行病毒富集,所得沉淀立即进行核酸提取。

1.2.3 病毒核酸提取和检测

取 280 μL 磷酸盐缓冲液(PBS)将沉淀充分溶解,使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 进行病毒 RNA 的提取,操作按说明书进行,最终核酸洗脱体积为 60 μL。分别使用诺如病毒 GI/GⅡ组和轮状病毒(A组)实时荧光逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法核酸检测试剂盒进行病毒检测,设立阴性、阳性和空白对照。具体操作按说明书进行。循环阈值(Ct值)≤38且有典型的“S”形曲线判为阳性,表明样品检出诺如病毒和轮状病毒核酸。阳性的核酸于-80℃保存,用于后续试验。

1.2.4 半巢式 RT-PCR 检测诺如病毒

对诺如病毒阳性的核酸,参照文献[8-9]使用半巢式 RT-PCR 反应分别扩增诺如病毒 GI 和 GⅡ组衣壳蛋白 VP1 区基因,使用 One Step RT-PCR Kit 进行一轮扩增,AmpliTaq Gold® 360 Master Mix 进行二轮扩增,引物序列见表1。第一轮扩增体系(50 μL): 5×Buffer 10.0 μL, 10 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 上下游引物(33 μmol/L)各 1.0 μL, Enzyme Mix 2.0 μL, RNase-free water 29.0 μL, 模板 5.0 μL。第一轮反应条件:50℃逆转录 30 min;95℃预变性 15 min;94℃变性 30 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共30个循环;72℃延伸 7 min, 4℃保存。第二轮扩增体系(50 μL): 2×Mix 25.0 μL, 上下游引物(33 μmol/L)各 1.0 μL, RNase-free water 21.0 μL, 一轮产物 2.0 μL。第二轮反应条件:95℃预变性 10 min;95℃变性 30 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 共35个循环;72℃延伸 7 min, 4℃保存。用全自动毛细管电泳仪电泳, GI 和 GⅡ组诺如病毒目的片段分别为 330 和 344 bp。

1.2.5 基因序列分析

将 PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份

表1 诺如病毒半巢式 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of *Norovirus* in semi-nested RT-PCR

引物	第一轮序列(5'-3')	第二轮序列(5'-3')
诺如病毒 G I 组	COG1F:CGYTGGATGCGHTTYCATGA	G1SKF:CTGCCCGAATTYGTAAATGA
	G1SKR:CCAACCCARCCATTRTACA	G1SKR:CCAACCCARCCATTRTACA
诺如病毒 G II 组	COG2F:CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	G2SKF:CNTGGGAGGGCGATCGCAA
	G2SKR:CCRCNCGCATRHCCRTTRTACAT	G2SKR:CCRCNCGCATRHCCRTTRTACAT

有限公司测序。采用 BioEdit 7.0.9.0 对序列进行编辑和比对。采用 MEGA 6.06 邻接法 (neighbor-joining) 构建进化树, bootstrap 值设置 1 000 次。诺如病毒参考序列选自 GenBank。

2 结果

2.1 扇贝中诺如病毒和 A 组轮状病毒核酸检测结果

72 份样品中, 未检出 A 组轮状病毒, 诺如病毒核酸阳性 20 份, 其中 16 份为 G II 组, 2 份为 G I 组, 2 份为 G I/G II 组混合, 诺如病毒检出率为 27.8% (20/72)。

2.2 扇贝中诺如病毒检出时间

72 份样品中, 12 月和 1 月诺如病毒检出率最高, 均为 83.3% (5/6); 6~10 月未检出诺如病毒。春季 (3~5 月)、夏季 (6~8 月)、秋季 (9~11 月) 和冬季 (12 月~次年 2 月) 诺如病毒检出率分别为 33.3% (6/18)、0.0% (0/18)、16.7% (3/18) 和 61.1% (11/18), 见表 2。

表2 72 份扇贝诺如病毒检出时间分布

Table 2 Time distribution of *Norovirus* detection in 72 scallops

季节	月份	诺如病毒阳性样品份数			检出率/%
		G I 组	G II 组	G I/G II 组混合	
春季	3	0	2	0	33.3 (2/6)
	4	2	1	0	50.0 (3/6)
	5	0	0	1	16.7 (1/6)
夏季	6	0	0	0	0.0 (0/6)
	7	0	0	0	0.0 (0/6)
	8	0	0	0	0.0 (0/6)
秋季	9	0	0	0	0.0 (0/6)
	10	0	0	0	0.0 (0/6)
	11	0	3	0	50.0 (3/6)
冬季	12	0	5	0	83.3 (5/6)
	1	0	4	1	83.3 (5/6)
	2	0	1	0	16.7 (1/6)
合计		2	16	2	27.8 (20/72)

2.3 扇贝中诺如病毒基因分型和进化分析

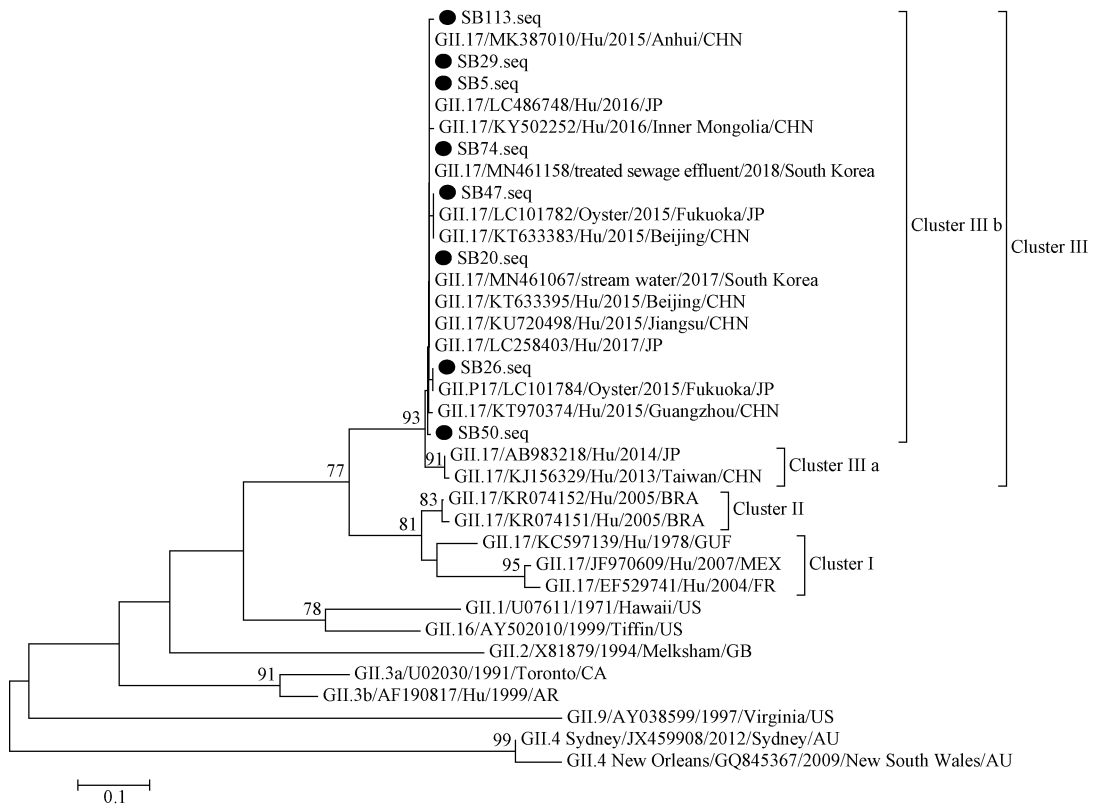
对诺如病毒核酸阳性样品进行衣壳蛋白 VP1 区基因扩增, 共得到 8 份阳性样品测序结果。将这些基因序列提交至 GenBank 数据库, 获得序列号为 MN904957~MN904964。在 GenBank 对基因序列进行 BLAST 比对, 构建进化树鉴定基因型。8 株均为 G II. 17 型, 序列间相似性为 99.3%~100.0%, 其中 4 株相似性为 100.0%。8 株 G II. 17 型试验株与

19 株 G II. 17 型参考株相似性为 83.7%~100.0%。这 27 株 G II. 17 型分为 3 个基因群 (Cluster I~III), 其中 Cluster III 又分为 Cluster III a 和 Cluster III b。8 株 G II. 17 型试验株与 12 株参考株同处于 Cluster III b, 相似性为 98.3%~100.0%, 其中 4 株 G II. 17 型试验株 (SB5、SB20、SB29 和 SB74) 与 2015 年中国北京 KT633395 (人源)、2015 年中国江苏 KU720498 (人源)、2015 年中国安徽 MK387010 (人源)、2016 年日本 LC486748 (人源)、2017 年日本 LC258403 (人源)、2017 年韩国 MN461067 (水源) 和 2018 年韩国 MN461158 (污水) 相似性均为 100.0%; 1 株 G II. 17 型试验株 (SB47) 与 2015 年日本 LC101782 (牡蛎) 和 2015 年中国北京 KT633383 (人源) 相似性均为 100.0%; 1 株 G II. 17 型试验株 (SB26) 与 2015 年日本 LC101784 (牡蛎) 相似性为 100.0%; 其他 2 株 G II. 17 型试验株 (SB113 和 SB50) 与 12 株参考株相似性为 98.3%~99.6%。8 株 G II. 17 型试验株与位于 Cluster III a 的毒株 AB983218 和 KJ156329 相似性介于 96.0%~97.0%, 见图 1。

3 讨论

2000—2010 年欧洲等地发生了 36 起暴发的病毒性急性胃肠炎, 其中 22 起与食用被病毒污染的贝类有关^[10]。2016 年广东省报道了对 75 份急性胃肠炎病例粪便、331 份贝类水产品、110 份养殖水样品进行诺如病毒检测, 3 类样品检出的诺如病毒基因型一致, 诺如病毒毒株序列具有较高的相似性 (95.8%~99.7%)^[11]。2016 年北京市报道了在牡蛎样品中, 检出 3 株轮状病毒 VP7 基因和 1 株轮状病毒 VP4 基因, 测序后进化分析显示与近年我国流行的人源轮状病毒 G9/P [8] 型同源性相近^[12]。2014 年 2 月至 2015 年 3 月在北京市牡蛎样品中检出的 G II. 17 型诺如病毒, 与我国和日本 2014—2015 年人群间流行毒株最为相似 (99.2%~100.0%), 检出的 G II. 3 型与北京市 2015 年人源毒株相似性为 96.7%, 检出的 G II. 4 Sydney 2012 型与世界各地毒株的相似性均为 100.0%^[13]。贝类是引起病毒性急性胃肠炎的一种高风险食品, 监测贝类中诺如病毒和轮状病毒是非常必要的。

本研究中采用 PEG8000 沉淀法进行病毒富集。



注：●为本研究基因序列

图1 扇贝中诺如病毒毒株部分衣壳蛋白 VP1 区基因 (302 bp) 进化分析

Figure 1 Phylogenetic analysis based on partial VP1 gene (302 bp) of NoV strains in scallops

一种检测方法的假阴性、假阳性结果受多因素影响,如样品前处理、富集、核酸提取、检测方法特异性等。本研究在核酸 PCR 法检测中设置了阴性对照、阳性对照和空白对照,但是受限于当时研究条件和认知,病毒富集和提取没有设置过程控制对照,无法说明检测结果是否会有假阴性的现象。在将来的监测或调查研究中需要加入过程控制对照,进一步完善检测方法。本研究中对诺如病毒核酸阳性样品进行衣壳蛋白 VP1 区基因扩增,8 份阳性样品的测序结果证实北京市市售扇贝中存在诺如病毒污染。另外,本研究所采集的市售扇贝中,诺如病毒检出率冬季最高,夏季最低,以 G II 组为主。本研究结果与人类诺如病毒感染的时间分布特征(冬季为检出高峰)^[14-15]、病原学特征(以 G II 组为主)一致^[16-19],表明本研究采用的检测方法有一定的可靠性。

自 1995 年以来,G II . 4 型和其变异株(G II . 4 Sydney 2012)在全球范围引起了多次流行,然而 2014 年 G II . 17 型取代 G II . 4 型在以中国和日本为主的亚洲国家暴发流行。G II . 17 型是 1978 年首次报道的,目前根据核苷酸序列的不同,分为三个基因群(Cluster I ~ III)。Cluster I 代表株为 1978 年发现的 G II . 17 型毒株 KC597139,Cluster II 主要是由 2005—2009 年发现的 G II . 17 型毒株组成,之后

报道的 G II . 17 型毒株组成 Cluster III。Cluster III 又分为 Cluster III a 和 Cluster III b,Cluster III a 代表株为 2013 年的中国台湾株(AB983218)和 2014 年的日本株(KJ156329),Cluster III b 则主要由 2014 年以后在中国及日本等地区引起暴发流行的 G II . 17 型毒株组成^[20]。本研究中完成测序的 8 株 G II . 17 型毒株均属于 Cluster III b 分枝,与文献报道^[20]一致。本研究采集北京市 3 个水产品市场出售的扇贝,其具体的流通环节不详,但结果表明市售扇贝中检出的诺如病毒毒株型,不仅与 GenBank 数据库中人感染诺如病毒参考株基因序列一致,而且与 GenBank 数据库中外环境样品(水和牡蛎)诺如病毒参考株基因序列一致,这提示诺如病毒在人群、环境和贝类食品中可能循环传播,监测贝类中诺如病毒污染可对人类感染有预警作用。目前国内相关研究不多,而本研究对既往采集的样品进行了检测和分析,对海鲜产品诺如病毒污染风险评估仍有参考意义。

诺如病毒具有感染剂量低(10~100 个病毒粒子)、潜伏期短(一般是 12~48 h)、排毒时间长(2~3 周)、易变异免疫保护时间短、环境抵抗力强、各类人群普遍易感等特点,所以其感染性强、传播力快。建议对市场销售人员进行病原科普教育,提高其食品安全意识;加强市场销售环境的清洁治理,防止

水产品发生交叉污染;监管水产品流通环节,保证市场销售货物溯源清晰;建议市民食用贝类海鲜时去除鳃和肠等消化组织,彻底煮熟。

参考文献

- [1] VINJÉ J, DOERN G V. Advances in laboratory methods for detection and typing of *Norovirus*[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(2):373-381.
- [2] 蔡莎, 朱庆雄. 轮状病毒感染的研究进展[J]. *中国临床研究*, 2019, 32(3): 1132-1134.
- [3] 周德庆, 苏来金, 赵峰, 等. 诺如病毒在贝类中的富集特性与机制研究进展[J]. *病毒学报*, 2015, 31(3): 313-317.
- [4] TAN M, JIANG X. Histo-blood group antigens: a common niche for *Norovirus* and *Rotavirus*[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2014, 16(2): e5.
- [5] LEES D. Viruses and bivalve shellfish[J]. *Int J Food Microbiol*, 2000, 59(1/2):81-116.
- [6] 严寒秋, 霍达, 刘白薇, 等. 牡蛎中诺如病毒检测的前处理方法比较及应用[J]. *国际病毒学杂志*, 2015, 22(3): 153-157.
- [7] International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feed—horizontal method for determination of hepatitis A virus and *Norovirus* in food using real-time RT-PCR—part 2: method for qualitative detection; ISO/TS 15216-2:2013(E) [S]. 2013.
- [8] KOJIMA S, KAGEYAMA T, FUKUSHI S, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses[J]. *J Virol Methods*, 2002, 100(1/2):107-114.
- [9] KAGEYAMA T, KOJIMA S, SHINOHARA M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4):1548-1557.
- [10] LE GUYADER F S, ATMAR R L, LE PENDU J. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play [J]. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(1): 103-110.
- [11] 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.
- [12] 高志勇, 严寒秋, 刘白薇, 等. 北京地区市售牡蛎轮状病毒感染调查[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2016, 30(1): 41-44.
- [13] 严寒秋, 高志勇, 刘白薇, 等. 北京市市售牡蛎诺如病毒污染状况调查分析[J]. *国际病毒学杂志*, 2018, 25(6):386-388.
- [14] GAO Z Y, LI X T, YAN H Q, et al. Human calicivirus occurrence among outpatients with diarrhea in Beijing, China, between April 2011 and March 2013[J]. *J Med Virol*, 2015, 87(12): 2040-2047.
- [15] 孙冰洁, 张海艳, 高志勇, 等. 北京市东城区 2013—2018 年诺如病毒感染疫情流行特征分析[J]. *国际病毒学杂志*, 2019, 26(2):112-115.
- [16] 王宇, 任莉娜, 杜溪乔, 等. 2014—2016 年哈尔滨市诺如病毒感染腹泻分子流行病学特征分析[J]. *国际病毒学杂志*, 2019, 26(2):116-119.
- [17] 李响, 杨尧, 肖霞, 等. 吉林省 2015 年成人腹泻散发病例诺如病毒流行病学和基因特征分析[J]. *国际病毒学杂志*, 2019, 26(4):237-241.
- [18] 白雪, 张淑红, 申志新. 河北省散发腹泻病例诺如病毒基因特征分析[J]. *国际病毒学杂志*, 2020, 27(1):44-47.
- [19] 闫玉晓, 周永康, 张会芳, 等. 2015—2018 年兰州市 5 岁以下住院腹泻儿童诺如病毒分子流行病学分析[J]. *国际病毒学杂志*, 2020, 27(1):53-56.
- [20] 张会芳, 靳森, 李宇宁, 等. G II. 17 型诺如病毒流行及进化特征的研究进展[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2017, 40(2): 136-140.

· 公告 ·

关于蛋白质谷氨酰胺酶等 21 种“三新食品”的公告

2020 年第 6 号

根据《食品安全法》规定,审评机构组织专家对蛋白质谷氨酰胺酶等 5 种食品添加剂新品种、微纤化纤维素纸浆等 16 种食品相关产品新品种的安全性评估材料审查并通过。

特此公告。

附件:蛋白质谷氨酰胺酶等 5 种食品添加剂新品种、微纤化纤维素纸浆等 16 种食品相关产品新品种公告文本

国家卫生健康委

二〇二〇年七月三十日

(相关链接:<http://www.nhc.gov.cn/sps/s7890/202008/093a12a711a04ff98bfd2b10be90f2db.shtml>)