

研究报告

数字聚合酶链式反应法检测贝类和浆果中甲肝病毒

林盈池¹,王殿夫²,屈菲³,田卓³,朱金艳⁴,张宏伟⁵,麻丽丹⁶

(1. 中国医科大学,辽宁 沈阳 110004; 2. 辽东学院,辽宁 丹东 118000;

3. 大连海关,辽宁 大连 116000; 4. 庄河市市场监管事务服务中心,辽宁 大连 116400;

5. 天津海关,天津 300000; 6. 丹东海关,辽宁 丹东 118000)

摘要:目的 建立一种数字聚合酶链式反应(PCR)检测贝类和浆果中甲肝病毒的方法。方法 样品经蛋白酶K消化-聚乙二醇法进行甲肝病毒富集后,使用高纯度病毒核酸试剂盒进行RNA提取,之后对甲肝病毒进行数字PCR检测。结果 本方法对甲肝病毒有典型扩增,重复性和稳定性良好,对于草莓样品中甲肝病毒的检测灵敏度为25.30 CCID₅₀/20 g,树莓样品中甲肝病毒的检测灵敏度为6.32 CCID₅₀/20 g,贝类样品中甲肝病毒的检测灵敏度为12.54 CCID₅₀/2 g,表明其灵敏度高。结论 该方法快速、准确、灵敏,适合测定贝类和浆果食品中甲肝病毒。

关键词:甲肝病毒;数字聚合酶链式反应;贝类;浆果

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)04-0379-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.04.006

Detection of hepatitis A virus in shellfish and berries by digital polymerase chain reactionLIN Yingchi¹, WANG Dianfu², QU Fei³, TIAN Zhuo³, ZHU Jinyan⁴, ZHANG Hongwei⁵, MA Lidan⁶

(1. China Medical University, Liaoning Shenyang 110004, China; 2. Eastern Liaoning University, Liaoning Dandong 118000, China; 3. Dalian Customs, Liaoning Dalian 116000, China; 4. Zhuanghe Market Supervision Service Center, Liaoning Dalian 116400, China; 5. Tianjin Customs, Tianjin 300000, China; 6. Dandong Customs, Liaoning Dandong 118000, China)

Abstract: Objective To establish a digital polymerase chain reaction (PCR) method for hepatitis A virus (HAV) in shellfish and berry foods. **Methods** After sample enrichment by proteinase K digestion polyethylene glycol method, RNA was extracted by high purity virus nucleic acid kit, and then digital PCR was used to detect HAV. **Results** This method had typical amplification, good repeatability and stability for HAV. The sensitivity of HAV in strawberry, raspberry and shellfish samples was 25.30 CCID₅₀/20 g, 6.32 CCID₅₀/20 g and 12.54 CCID₅₀/2 g respectively, which means that the detection sensitivity of HAV was high. **Conclusion** This method is rapid, accurate, sensitive, and is suitable for the determination of HAV in shellfish and berry foods.

Key words: Hepatitis A virus; digital polymerase chain reaction; shellfish; berry

甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)是一种通过受污染的食物和水传播的RNA病毒^[1],甲型肝炎是一个全球性的公共卫生问题,影响着全球数百万人,造成数千人死于急性和持续感染、肝硬化和肝癌^[2]。据估计,全球每年有数以千万计的人感染HAV^[3]。我国最严重的一次事件为1988年上海30多万人食用毛蚶感染事件^[4],美国、加拿大、澳大利亚、欧盟等国也相继发生食源性胃肠炎和急性肝炎

疫情^[5]。目前对于HAV检测的新方法有多功能分子印记传感器^[6]、NucliSENS MiniMAG系统^[7]、快速逆转录隔离恒温聚合酶链式反应(reverse transcription-insulated isothermal PCR, RT-iiPCR)技术^[8]、无标记一步免疫分析法^[9]、巢式RT-PCR(reverse transcription-PCR)基因分型法^[10-11]、数字PCR(digital PCR, dPCR)^[12]等。

我国对于食品中HAV的研究相对滞后,许多研究针对贝类食品中HAV的检测,缺乏瓶装水、水果、蔬菜等其他食品基质中HAV的检测研究和标准方法。此外,目前食品中HAV病毒检测定量均为相对定量法,其检测相对于标准品进行定量,检测结果依赖于标准曲线以及PCR的扩增效率,PCR结果多以循环阈值(Ct值)或阈值差(ΔCt值)表示。

收稿日期:2020-06-02

基金项目:辽宁省自然科学基金资助计划(2019-MS-395)

作者简介:林盈池 女 本科生 研究方向为医学

E-mail: tianzhuo1113@163.com

通信作者:麻丽丹 女 高级工程师 研究方向为食品安全

E-mail: 2212097@163.com

dPCR 基于单分子模版 PCR 扩增,无需使用标准曲线方法,其检测结果不依赖于扩增效率,结果直接以拷贝/ μL 表示,实现对样品核酸的绝对定量,灵敏度相较实时荧光 RT-PCR 提高了 100 倍。

本研究针对 HAV 进行引物及探针的设计和筛选、通过在样品中添加裸露 RNA 或 HAV 减毒疫苗监控整个过程方法,对不同类型的食品基质进行病毒富集和核酸提取研究,最终建立贝类和浆果食品基质中 HAV 的 dPCR 检测方法,对这些食品中 HAV 的快速检测提供了参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

血清标本和病毒病料:共 218 份,来自丹东市传染病医院。实际丹东市市售样品 285 份(包括草莓 200 份、树莓 57 份、黑莓 10 份、蓝莓 8 份、混合莓 4 份、文蛤 6 份)。

1.1.2 主要仪器与试剂

QS7 实时荧光定量 PCR 系统、MagMax Express 核酸提取仪、QuantStudio 3D 数字 PCR 系统均购自美国 ABI,SK-1 快速混匀器,3-18 K 台式高速冷冻离心机,1300 系列 A2 型二级生物安全柜(美国赛默飞世尔)。

高纯度病毒核酸试剂盒(瑞士 Roche),QuantStudio 3D Digital PCR 20 K Chip Kit、QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix v2、SuperScript™ IV VILO™ Master Mix 均购自美国 ABI,阳性对照为 HAV 减毒疫苗(滴定度为 $106.5 \text{ CCID}_{50}/\text{mL}$,长春长生生物科技股份有限公司),引物、探针由美国 Invitrogen 合成。蛋白酶 K(20 U/mL,美国 Sigma);聚乙二醇(PEG)、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、三氯三氟乙烷、氢氧化钠、氯仿、正丁醇、果胶酶、盐酸均为分析纯,牛肉浸提物(北京陆桥公司),HAV 减毒疫苗(浙江普康生物技术有限公司),异硫酸氰胍(北京市百赛生物工程公司),磷酸缓冲盐溶液(PBS)。

1.2 方法

1.2.1 人工污染的食品样品制备

贝类样品:取 2~5 g 已知 HAV 阴性的贝类肠腺组织样品放至离心管中,接种 10 μL 的甲肝减毒疫苗(过程控制对照),二级生物安全柜中室温静置 20 min,使得病毒与贝类样品充分吸附。

浆果样品:剪取 20 g 已知 HAV 阴性的样品(切成 $2.5 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$ 的小块,小于该体积的样品可以不切)放至离心管中,接种 10 μL 的 HAV 减

毒疫苗(过程控制对照),于生物安全柜中室温静置 20 min,使得病毒与软质水果样品充分吸附。

1.2.2 病毒富集方法

贝类样品:按照 1.2.1 的方法制备贝类人工污染样品并取 2 g,加入 2.0 mL 蛋白酶 K 溶液,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$,320 r/min 孵育 60 min。将离心管放在水浴锅中,60 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 进行二次孵育。室温条件下,3 000 $\times g$ 离心 5 min,将上清液轻轻倒入一个干净管中,一定体积的 50 \times PEG/NaCl 溶液,使得溶液中 PEG 的终质量浓度为 8%,5 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。5 $^{\circ}\text{C}$,10 000 $\times g$ 离心 5 min,弃去上清液,加入 1 mL 6 mol/L 异硫酸氰胍溶液溶解沉淀,溶解好的病毒溶液用于提取 RNA。

浆果样品:按照 1.2.1 的方法制备浆果人工污染样品,分别加入 35 mL 4 种不同的洗脱缓冲液[蒸馏水,TGBE 缓冲液(0.1 mol/L Tris-0.05 mol/L 甘氨酸-1%牛肉浸提物,pH=9.5),0.1 mol/L 甘氨酸-0.3 mol/L NaCl (pH=9.5),3%牛肉浸提物 (pH=9.5)]及 30 U 的果胶酶,混匀,不要强烈震荡使样品中果汁和糖分大量溶出。同时以已知阴性的水果样品作为阴性对照。室温 100 r/min 孵育 10 min 后,如果水果样品存在酸性物质,则用 5 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 9.5,室温 100 r/min 孵育 20 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 $\times g$ 离心 30 min,将上清液转入干净的离心管中,并用 5 mol/L 盐酸溶液将 pH 值调节至(7.0 \pm 0.2),之后加入 0.25 mL 的 50 \times PEG/NaCl 溶液,振荡 60 s 混匀,5 $^{\circ}\text{C}$ 100 r/min 孵育 60 min。5 $^{\circ}\text{C}$,10 000 $\times g$ 离心 30 min,弃去上清液,再 5 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 $\times g$ 离心 5 min,以压实沉淀物;弃去上清液,加入 500 μL PBS 重悬沉淀;加入 500 μL 的氯仿-正丁醇,涡旋混合,在室温下孵育 5 min,再以 5 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 $\times g$ 离心 15 min,将上层水相小心地转移到一个新的离心管中,保留用于提取 RNA。

1.2.3 引物探针的筛选

对 218 份血清标本进行 HAV 检测,对 ISO 方法^[13]、美国食品和药物管理局(FDA)方法^[14]和我国 GB/T 22287—2008《贝类中甲型肝炎病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法》^[15]中 HAV 检测用引物和探针序列进行比较筛选。

1.2.4 dPCR 条件

反转录反应:反应体系:总体积 20 μL ,包括 SuperScript™ IV VILO™ Master Mix 4 μL ,模板 RNA 11 μL , H_2O 5 μL 。反应参数:20 $^{\circ}\text{C}$ 引物退火 10 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 10 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 酶失活 5 min。

dPCR 反应:反应体系:总体积 15 μL ,包括

cDNA 模板溶液 5 μL , 3D Digital PCR Master Mix 7.25 μL , 正向引物 0.375 μL 、反向引物 0.645 μL 、荧光探针 0.187 5 μL , H_2O 1.512 5 μL ; 其中各引物和探针的浓度均为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。HAV 减毒疫苗提取的 RNA 溶液作为阳性对照, 以水代替模板作为空白对照。反应参数: 98 $^\circ\text{C}$ 预变性 10 min; 50 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 60 $^\circ\text{C}$ 退火 2 min, 98 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 共 39 个循环; 60 $^\circ\text{C}$ 延伸 2 min, 10 $^\circ\text{C}$ 保存。每个模板重复 2 个平行检测。扩增结束后, 待芯片恢复到室温, 将芯片置入 QuantStudio™ 3D 数字 PCR 读取仪中读取并初步分析芯片结果, 再经由 QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™ Cloud Software 二次分析试验数据, 获得绝对定量结果。

1.2.5 结果分析

结果判定: 阳性样品的原倍和 10 倍稀释的拷贝数有倍比关系。阳性样品的荧光强度比阴性样品和空白对照的强, 通常在 8 000 AU 以上, 阴性样品和空白对照为 3 000~5 000 AU。

1.2.6 特异性试验

采用 1.2.4 的反应体系和参数检测 HAV、GI 型诺如病毒、GII 型诺如病毒、轮状病毒、星状病毒和腺病毒等食源性病毒, 对 dPCR 检测方法的特异性进行评估。

1.2.7 灵敏度试验

将滴定度为 106.5 CCID₅₀/mL 的 HAV 减毒疫苗病毒添加于食品样品后样品分别进行 5、25、125、625、1 250、2 500 系列稀释后, 按照 1.2.4 反应体系和参数进行多次 RT-PCR 反应, 确定其灵敏度。

1.3 统计学分析

采用 F 检验方法进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 病毒富集方法优化

2.1.1 贝类样品

贝类样品的病毒富集方法的建立, 通过对采用甘氨酸-PEG 沉淀法、蛋白酶 K 消化法和蛋白酶 K 消化-PEG 沉淀法对 50 份贝类样品进行处理和病毒富集, 经 PCR 检测, 结果表明蛋白酶 K 消化法和甘氨酸-PEG 沉淀法差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但是蛋白酶 K 消化-PEG 沉淀法与其他 2 种方法比较差异有统计学意义 (F 值分别为 121.991、118.606、26.802, $P < 0.05$), 表明蛋白酶 K 消化-PEG 沉淀法最优。

2.1.2 浆果样品

对浆果 HAV 的富集方法进行优化, 包括最佳样

品洗脱缓冲液、PEG 孵育时间和温度、抑制剂去除剂的优化等。

采用蒸馏水、TGBE 缓冲液 (0.1 mol/L Tris-0.05 mol/L 甘氨酸-1% 牛肉浸提物, pH = 9.5)、0.1 mol/L 甘氨酸-0.3 mol/L NaCl (pH = 9.5) 和 3% 牛肉浸提物 (pH = 9.5) 4 种缓冲液洗涤草莓样品时, 试样中大量的果汁会溶出, 整个试样液的体积明显增加, 果汁中的酸性物质会使溶液的 pH 值下降, 10 min 孵育后, TGBE (pH = 9.5) 缓冲液维持 pH 值的能力最强 (pH = 8.8 左右), 3% 牛肉浸提物 (pH = 9.5) 和 0.1 mol/L 甘氨酸-0.3 mol/L NaCl (pH = 9.5) 次之 (pH = 8.0 左右), 蒸馏水则维持 pH 值在 4.0 左右, 因此 TGBE 缓冲液更容易将病毒粒子与样品分开。

对 PEG8000 的孵育时间和温度分别进行了研究。PEG 5 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h、5 $^\circ\text{C}$ 孵育 4 h 和 5 $^\circ\text{C}$ 孵育 18 h 效果没有差别, 而室温孵育与 5 $^\circ\text{C}$ 孵育比较孵育效果较差, 其中顺序依次为室温孵育 4 h > 室温孵育 1 h > 室温孵育 18 h。综合以上结果, PEG 沉淀时间选取 1 h, 有利于降低整个检测时限, 故最佳 PEG 沉淀时间和温度为 5 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。

对三氯三氟乙烷、氯仿-正丁醇两种抑制剂去除剂在软质水果病毒富集的抑制剂去除效果进行优化。氯仿-正丁醇的 Ct 值大于三氯三氟乙烷, 但统计学分析差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而根据环保要求, 氯仿-正丁醇优于三氯三氟乙烷。采用氯仿-正丁醇和三氯三氟乙烷两种抑制剂去除剂对 5 份草莓样品和 5 份树莓样品病毒富集效果进行试验, 10 份样品中添加抑制剂去除剂后 HAV 的阳性检出率为 100%, 而不添加抑制剂去除剂的 HAV 阳性检出率为 70%。由此可见, 添加抑制剂去除剂能提高检测灵敏度。

2.2 引物探针的筛选

采用 ISO 方法、美国 FDA 方法和 GB/T 22287—2008 方法的引物和探针对 218 名体检人员血清标本进行 HAV 检测, 引物和探针序列见表 1。218 份标本中 211 份标本检测结果为阴性, 7 份标本检测结果为阳性, 阳性检测结果见表 2。对于 17、18、23 号标本, ISO 方法检测结果均为阳性; 而 FDA 方法对于 17 和 18 号标本为阴性, 23 号标本结果为阳性; GB/T 22287—2008 方法对于 3 份标本的检测结果均为阴性, 表明 FDA 方法和 GB/T 22287—2008 方法均存在漏检现象。FDA 方法和 GB/T 22287—2008 方法 Ct 值比 ISO 方法高, Ct 值高表明扩增效果差, 因此本研究选用 ISO 方法的引物和探针进行 HAV 检测。

表 1 HAV RT-PCR 检测的引物及探针序列

Table 1 Primers and probe sequences for HAV detection

方法	引物/探针	序列 (5'-3')
ISO	正向引物	TCACCGCCGTTTGCTAG
	反向引物	GGAGAGCCCTGGAAGAAAG
	探针	FAM-CCTGAACCTGCAGGAATTA-MGBNFQ
GB/T 22287—2008	正向引物	TTTCCGGAGCCCCTCTTG
	反向引物	AAAGGGAAATTTAGCCTATAGCC
	反向引物	AAAGGGAAATTTAGCCTATAGCC
	探针	FAM-ACTTGATACCTCACCGCCGTTTGCT-TAMRA
FDA	正向引物	ATAGGGTAACAGCGGGGATAT
	反向引物	CTCAATGCATCCACTGGATGA
	探针	Cy5-AGACAAAAACCATTCACGCGGAG-IB-RQ

表 2 3种方法检测人血清标本中 HAV 结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Detection of HAV in human serum samples by 3 methods

标本序号	采样日期	Ct 值		
		ISO	FDA	GB/T 22287—2008
17	08/19/2014	36.98±0.27	—	—
18	08/20/2014	35.40±0.33	—	—
23	08/20/2014	30.31±0.57	37.55±0.69	—
32	08/30/2014	29.08±0.11	33.19±0.51	37.03±0.14
87	10/25/2014	22.31±0.45	26.07±0.22	28.07±0.33
89	10/26/2014	32.11±0.09	34.68±0.32	36.56±0.29
201	11/05/2014	29.66±0.12	32.01±0.22	34.59±0.20
HAV 阳性对照	—	23.38±0.08	27.61±0.18	28.08±0.17

注:—表示无采样日期或 Ct 值>40

2.3 检测结果

2.3.1 特异性试验结果

进行 HAV 的 dPCR 特异性试验,特异性结果见图 1,图中横坐标表示 VIC 荧光通道的信号强度,纵坐标表示羧基荧光素 (FAM) 荧光通道的信号强度。结果表明,HAV 有典型扩增,阴性对照、GI 型诺如病毒、GII 型诺如病毒、轮状病毒、星状病毒、腺病毒无典型扩增,表明本研究建立的 dPCR 方法用于检测 HAV 具有良好的特异性。

2.3.2 灵敏度试验结果

dPCR 检测贝类样品中 HAV 的结果见图 2。结果表明,当贝类样品中 HAV RNA 稀释倍数为 2×10^{-3} 倍时具有典型扩增,说明 dPCR 检测方法对于贝类样品中 HAV 的检测灵敏度为 $12.54 \text{ CCID}_{50}/2 \text{ g}$,表明方法在检测低水平拷贝数样品时灵敏度较高。

dPCR 检测草莓样品中 HAV 的试验结果见图 3。结果表明当草莓样品中 HAV RNA 稀释倍数为 1.25×10^{-3} 时,芯片中 FAM 标记有典型扩增,且重复性和稳定性良好,稀释倍数大于 1.25×10^{-3} 倍时无典型扩增,表明 dPCR 检测方法对于草莓样品中 HAV 的检测灵敏度为 $25.30 \text{ CCID}_{50}/20 \text{ g}$,灵敏度较好。

dPCR 检测灵敏度试验见图 4,结果表明当树莓样品中 HAV RNA 稀释倍数为 2×10^{-4} 倍时具有典

型扩增,表明 dPCR 检测方法对于树莓样品中 HAV 的检测灵敏度为 $6.32 \text{ CCID}_{50}/20 \text{ g}$,灵敏度较好。

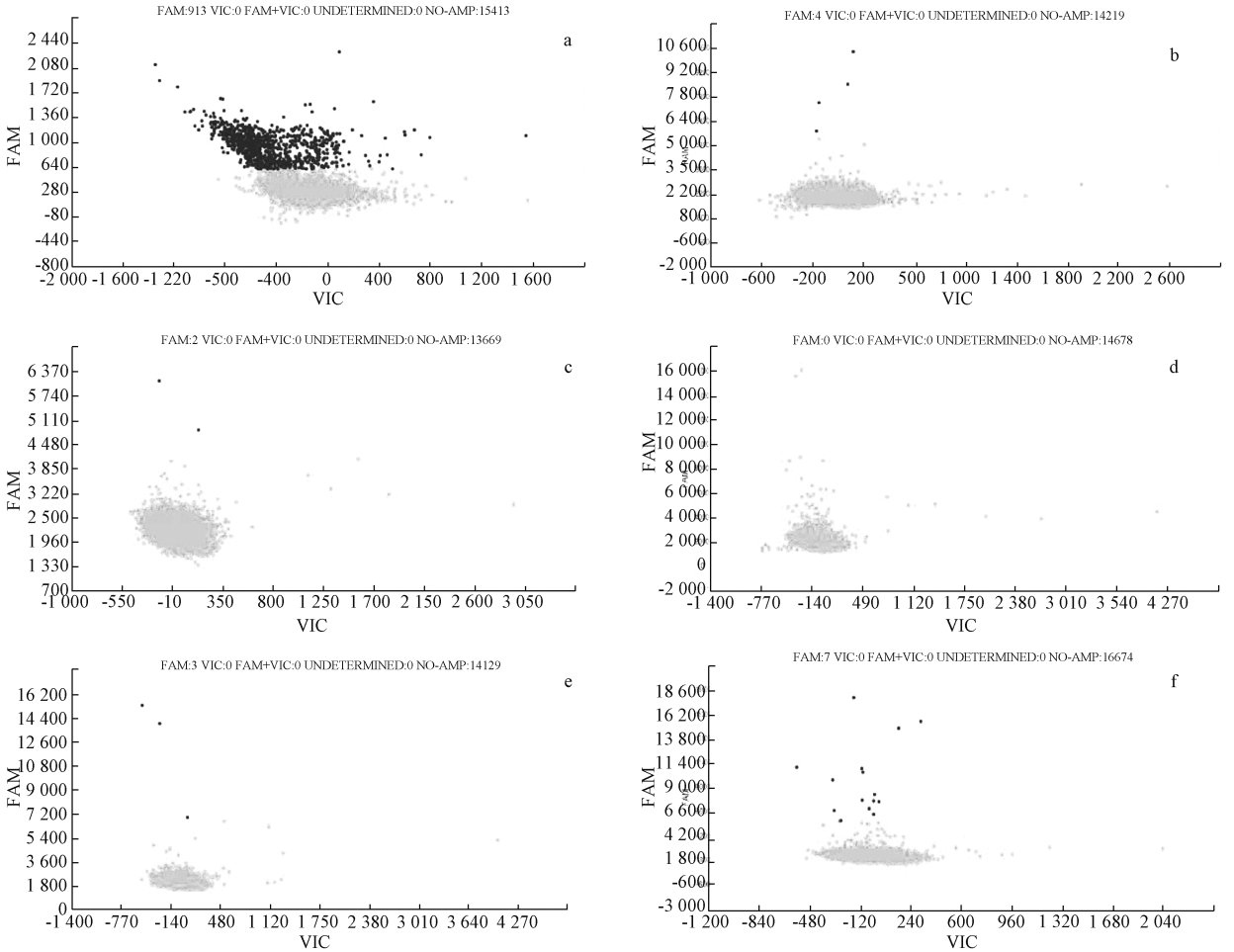
2.4 实际样品测定

对市售的 285 份食品样品,提取和纯化病毒核酸,设立阳性对照、阴性对照、空白对照和过程控制对照,分别进行实时荧光 RT-PCR 检测和 dPCR 检测,以检验本方法的试验效果。检测结果阳性对照和阴性对照均正常,结果为从 1 份草莓样品和 1 份蓝莓果样品中检出 HAV,其余样品中均未检出 HAV,2 份样品的检测拷贝数分别为 203.6 和 109.6 拷贝数/20 g 样品,见图 5。对检出的 HAV RNA 进行基因测序,通过基因比对确认测序结果为 HAV。

3 讨论

本研究建立了贝类与浆果样品中 HAV 的 dPCR 检测方法,首先优化和筛选了食品中 HAV 的富集方法,对于软质水果和沙拉蔬菜的病毒富集,使用 TGBE 缓冲液 (pH=9.5) 维持 pH 值的能力最强、最佳 PEG 沉淀时间和温度为 $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。对于贝类样品的病毒富集,甘氨酸-PEG 沉淀法和蛋白酶 K 消化法之间差异无统计学意义 ($P>0.05$),但是蛋白酶 K 消化-PEG 沉淀法比其他两种方法操作简单、方便和快捷。

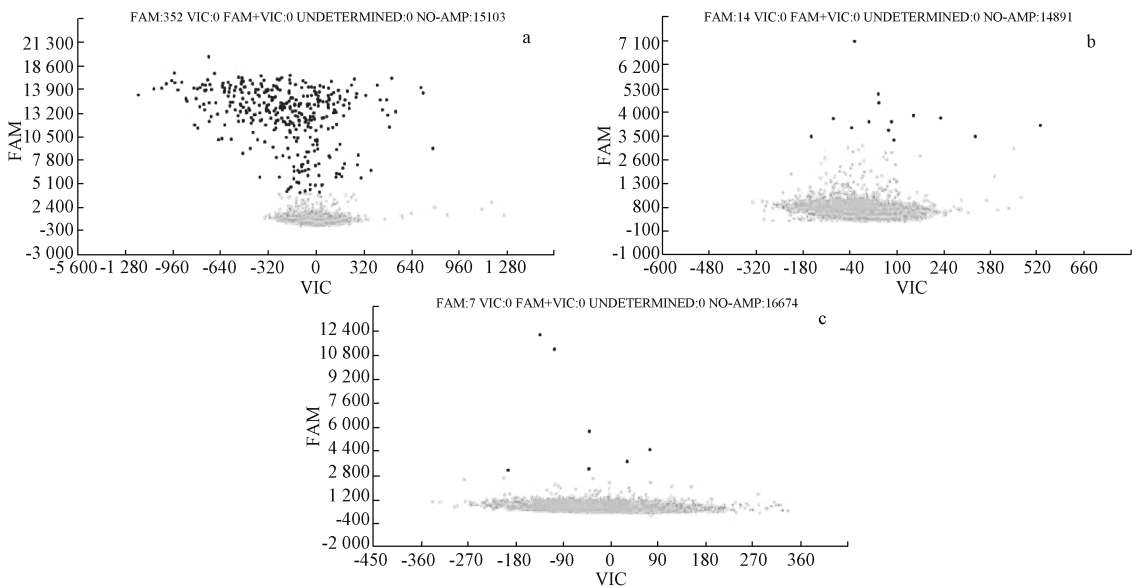
HAV 虽然能在寄主细胞内繁殖,利用寄主细胞进行复制,但由于 HAV 在细胞中生长缓慢,需要



注:a:HAV;b:GI型诺如病毒扩增结果;c:GII型诺如病毒扩增结果;d:轮状病毒扩增结果;e:星状病毒扩增结果;f:腺病毒扩增结果

图1 HAV dPCR 特异性结果

Figure 1 Specific results of HAV digital PCR

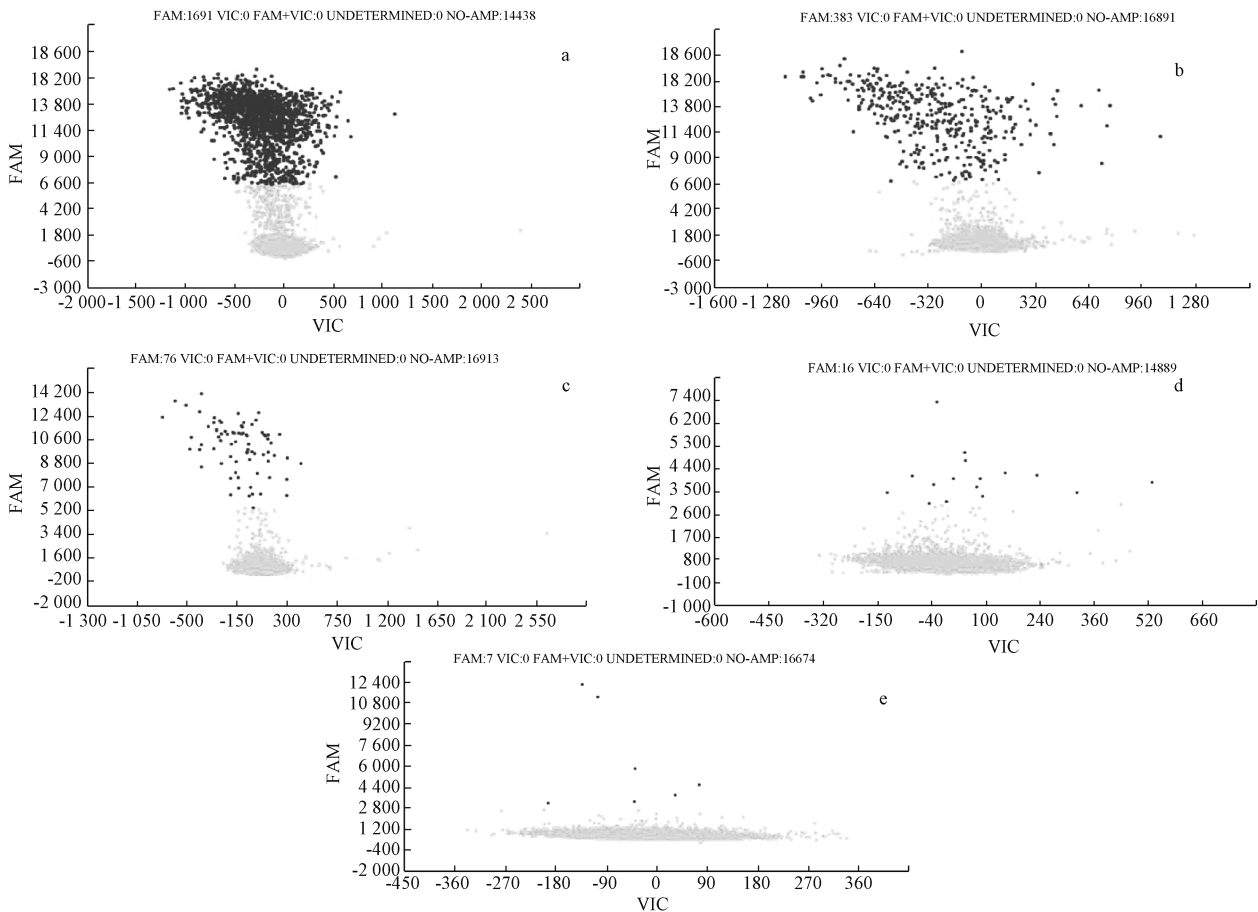


注:a: 1×10^{-2} 倍稀释度;b: 1×10^{-3} 倍稀释度;c: 2×10^{-3} 倍稀释度

图2 dPCR 方法检测贝类样品中 HAV 的稀释度试验结果

Figure 2 Results of dilution test of HAV of shellfish samples by digital PCR

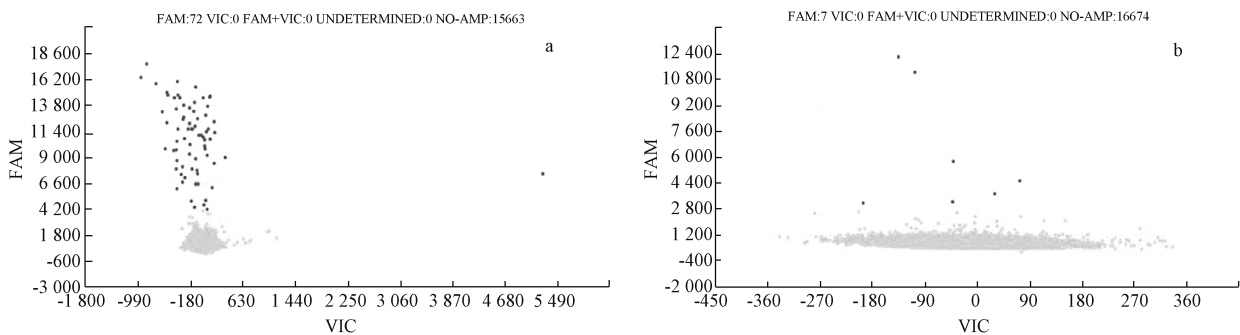
培养 3~4 代才能出现可见病变,并且食品中往往病毒含量很低,因此,用培养法往往需要 30~60 d 才



注:a:0.5×10⁰ 倍稀释度;b:2.5×10⁻¹ 倍稀释度;c:1.25×10⁻² 倍稀释度;d:6.25×10⁻² 倍稀释度;e:1.25×10⁻³ 倍稀释度

图3 dPCR方法检测草莓样品中HAV的稀释度试验结果

Figure 3 Results of dilution test of hepatitis a virus in strawberry samples by digital PCR



注:a:2×10⁻³ 倍稀释度;b:2×10⁻⁴ 倍稀释度

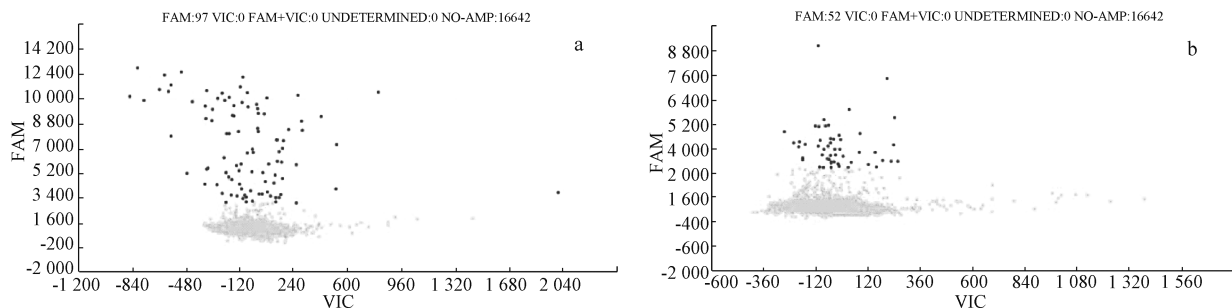
图4 dPCR方法检测树莓样品中HAV稀释度试验结果

Figure 4 Results of dilution test of hepatitis a virus in raspberry samples by digital PCR

能分离出 HAV,不适用于食品中 HAV 的检测。由于食品中病毒污染程度较低、病毒提取效率低和缺乏有效病毒富集方法等原因使得所涉及食品中病毒的检测极其困难。上述因素要求分离的病毒必须足够浓缩,这样才能从污染的食品中检测出病毒粒子,因此,优化病毒富集方法和 RNA 提取方法对于食品中轮状病毒、诺如病毒和 HAV 的检测具有重要意义。

本研究对 HAV 在果蔬样品和贝类样品中病毒

富集进行了优化和筛选。在进行果蔬类样品的病毒富集时,所使用的 4 种洗脱缓冲液中,TGBE 缓冲液对于 HAV 的洗脱效率最高,可能是其具有高浓缩蛋白、甘氨酸以及 Tris 盐等造成的;PEG 沉淀作为一种快速和温和的方法用于浓缩病毒,它能够在中性 pH 值和不含其他化学物质的高离子浓度的溶液中进行作用,本研究对 PEG 孵育时间和孵育温度对 HAV 富集影响进行了研究,结果表明 5℃ 孵育对于病毒的沉淀效果优于室温孵育,且延长 PEG 的孵育



注:a:蓝靛果样品;b:草莓样品

图5 不同样品中检出 HAV dPCR 试验结果

Figure 5 Digital PCR results of the detection of hepatitis a virus in different samples

时间对于提高病毒回收率毫无意义。

试验结果表明,dPCR 检测方法有以下优点:一、无需标准物质便可实现定量检测;二、避免了因样品与标准品之间 DNA 提取效率和扩增效率不一致而引起的偏差;三、由于 dPCR 是在 PCR 终点进行荧光信号的检测和计数统计,对样品基质中的 PCR 反应抑制物的忍耐程度更高,对样品 DNA 纯度的要求更低;四、检测灵敏度更高,在检测低水平拷贝数样品时精确度和重复性更优,对草莓样品、树莓样品和贝类样品中的 HAV 的检测灵敏度分别为 25.30 CCID₅₀/20 g、6.32 CCID₅₀/20 g 和 12.54 CCID₅₀/2 g,说明此方法适合用于检测贝类与浆果样品中的 HAV。

参考文献

- [1] MAKI Y, KIMIZUKA Y, SASAKI H, et al. Hepatitis A virus-associated fulminant hepatitis with human immunodeficiency virus coinfection [J]. *J Infect Chemother*, 2020, 26(2): 282-285.
- [2] BEHZADI M A, LEYVA-GRADO V H, NAMAYANDEH M, et al. Seroprevalence of viral hepatitis A, B, C, D and E viruses in the Hormozgan province southern Iran [J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1): 1186-1190.
- [3] KIM H, RYU J, LEE Y K, et al. Seropositive rate of the anti-hepatitis A immunoglobulin G antibody in maintenance hemodialysis subjects from two hospitals in Korea [J]. *Korean J Intern Med*, 2019, 34(6): 1297-1303.
- [4] 王艺博, 孙小雨, 徐艳玲, 等. 甲肝病毒及其疫苗研究现状 [J]. *中国生物制品学*, 2018, 31(3): 315-318.
- [5] ABOUBAKR H, GOYL S. Involvement of Egyptian foods in foodborne viral illnesses; the burden on public health and related environmental risk factors: an overview [J]. *Food Environ Virol*, 2019, 11(4): 315-339.
- [6] LUO L H, ZHANG F, CHEN C Y, et al. Visual simultaneous detection of hepatitis A and B viruses based on a multifunctional

molecularly imprinted fluorescence sensor [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(24): 15748-15756.

- [7] PERSSON S, NYBOGARD L, SIMONSSON M, et al. Optimisation and evaluation of an automated system for extraction of viral RNA from oysters [J]. *Int J Food Microbiol*, 2019, 315(10): 315-320.
- [8] REN Y P, YUE H, ZHU L, et al. Development and evaluation of reverse transcription-insulated isothermal PCR assay to detect duck hepatitis A virus type A in liver samples using the POCKIT™ system [J]. *J Vet Med Sci*, 2019, 81(10): 1533-1539.
- [9] KWON J H, KIM H H, CHE H B, et al. Viral antigen nanoparticles for discriminated and quantitative detection of different subtypes of anti-virus immunoglobulins [J]. *Nanoscale*, 2019, 11(39): 18282-18289.
- [10] PROBERT W S, HACKER J K. New subgenotyping and consensus real-time reverse transcription-PCR assays for hepatitis A outbreak surveillance [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(9): 1128-1131.
- [11] 文兴建. 鸭甲肝病毒 1 和 3 型一步法双重 RT-PCR 检测方法的建立及应用[D]. 成都: 四川农业大学, 2015.
- [12] SUN B J, BOSCH A, MYRMEL M. Extended direct lysis method for virus detection on berries including droplet digital RT-PCR or real time RT-PCR with reduced influence from inhibitors [J]. *J Virol Methods*, 2019, 271(4): 1016-1020.
- [13] 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 [S]. The Swiss; DE-DIN, 2013.
- [14] Food and Drug Administration. BAM 26B: Detection of hepatitis A virus in foods [S]. USA; FDA, 2015.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 贝类中甲型肝炎病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法; GB/T 22287—2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.