

2014 年广西牡蛎诺如病毒污染状况调查

吕素玲, 谭冬梅, 曾献莹, 姚雪婷

广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西 南宁 530028

摘要: **目的** 调查广西养殖场、农贸市场、餐饮场所牡蛎中 G I 型、G II 型诺如病毒的污染状况, 了解广西牡蛎从养殖到餐桌各环节诺如病毒的污染情况。 **方法** 2014 年 1-12 月, 在广西北海市两个养殖场、南宁市农贸市场及餐饮场所连续采集牡蛎样本 480 份, 采用荧光 RT-PCR 法对样本中诺如病毒进行检测, 确定牡蛎中诺如病毒污染状况及基因型分布。

结果 480 份牡蛎样本诺如病毒总检出率为 11.04% (53/480), 餐饮场所牡蛎样本未检出诺如病毒, 养殖场及农贸市场牡蛎样本诺如病毒检出率分别为 15.83% (38/240)、12.50% (15/120), 检出的诺如病毒均为 G II 型; 春、夏、秋、冬四个季节牡蛎中诺如病毒检出率依次为 13.33%、6.67%、7.50%、16.67%。养殖场与农贸市场牡蛎诺如病毒检出率差异无统计学意义 ($P>0.05$), 养殖场及农贸市场牡蛎诺如病毒检出率显著高于餐饮场所 ($P<0.01$), 冬季牡蛎诺如病毒检出率显著高于夏、秋季 ($P<0.05$)。 **结论** 广西养殖场及农贸市场牡蛎诺如病毒污染情况较为严重, 污染的诺如病毒均为 G II 型, 诺如病毒污染呈明显的季节性特点, 以冬季污染最为严重。

关键词: 牡蛎; 诺如病毒; 污染; 基因分型

中图分类号: R155.5⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)03-0284-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.03.008

Prevalence of norovirus contamination in oysters in Guangxi, 2014

LYU Su-ling, TAN Dong-mei, ZENG Xian-ying, YAO Xue-ting

Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Prevention and Control, Nanning, Guangxi 530028, China

Abstract: **Objective** To investigate the prevalence of norovirus genogroups I and II in oysters from farms, markets and restaurants so as to know the contamination status of noroviruses in the entire consumption chain. **Methods** A total of 480 oyster samples were collected from 2 oyster farms in Beihai City and from seafood markets and restaurants in Nanning City from January to December, 2014. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to detect norovirus RNA and genogroups. **Results** The overall detection rate of noroviruses in the 480 oyster samples was 11.04% (53/480). No norovirus was detected in oyster samples from restaurants. The detection rates of noroviruses in oyster samples from farms and markets were 15.83% (38/240) and 12.50% (15/120) respectively, and all noroviruses detected belonged to genogroup II (GII). The detection rates of noroviruses in spring, summer, fall and winter were 13.33%, 6.67%, 7.50% and 16.67% respectively. The detection rates of noroviruses in oyster samples from farms and markets were not significantly different ($P>0.05$), but both were significantly higher than that of samples from restaurants ($P<0.01$). The detection rate of noroviruses was significantly higher in winter than in summer and autumn ($P<0.05$). **Conclusions** The results highlight a high prevalence of norovirus GII contamination in oysters from farms and markets in Guangxi. The norovirus contamination shows a distinct seasonality, with a peak in winter.

Key words: oyster; norovirus; contamination; genogroup

牡蛎, 俗称生蚝, 属贝类, 具有较高的医疗保健作用, 素有“海底牛奶”之称。相关研究结果表明, 牡蛎在滤食时, 其消化腺会富集大量的致病因子, 如副溶血性弧菌、甲型肝炎病毒、诺如病毒 (norovirus, NV) 等^[1]。NV 属人类杯状病毒科诺如病毒属, 其感染所需剂量非常低, ≥ 18 个病毒粒子即可引发感染^[2]。据报道人类各年龄段的非细菌性急性胃肠炎疾病中

95% 是由 NV 导致的^[3]。2001-2013 年在日本、美国、英国、澳大利亚均发生了由 NV 引起的大规模的急性胃肠炎暴发流行, 多起暴发经流行病学调查表明与消费者食用被 NV 污染的贝类有很大相关性^[4-7]。近年来, 我国也相继报道因食用被 NV 污染的牡蛎出现急性胃肠炎的暴发事件, 使牡蛎的食用安全问题倍受关注。广西南面临海, 建有很多大型牡蛎养殖场, 且牡蛎也是本地群众经常食用的海产品之一。已有研究证实 2007-2008 年广西南宁市成人腹泻散发病例中, NV 总阳性率为 26.30%^[8]。目前对广西牡蛎中 NV 污染状况进行调查研究的报道很少, 更缺乏对牡蛎从养殖到

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅科研课题 (Z2014154)

作者简介: 吕素玲 (1978-), 女, 苗族, 广西融水人, 硕士, 副主任技师, 主要从事卫生微生物检验工作。

餐桌全过程 NV 污染状况的调查。本研究在 2014 年 1-12 月分别从养殖场、农贸市场及餐饮场所采集牡蛎样本进行 NV 污染状况的监测,了解了不同来源、不同季节 NV 的污染水平及基因分型情况,为采取有效措施减轻牡蛎中 NV 的污染提出建议,达到预防和控制食用被 NV 污染的牡蛎引起胃肠炎暴发的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集 2014 年 1-12 月,在广西北海市两个养殖场、南宁市青秀区农贸市场及餐饮场所各采集牡蛎样本 10 份/月,全年共采集牡蛎样本 480 份。采样点的选择及样本采集方法为:依据养殖规模在广西北海市选择牡蛎年产量居前列的两个养殖场,在每个养殖场选择 10 个不同的养殖区域随机采集带壳牡蛎样本;选择人流量及消费量较大的广西南宁市青秀区一农贸市场及夜市烧烤街为农贸市场及餐饮场所采样点,在该农贸市场随机选择 10 家海鲜摊位采集带壳牡蛎样本,在夜市烧烤街随机选择 10 家摊位采集烤好上桌食用的牡蛎样本;每份样本约 500 g。

1.1.2 仪器与试剂 CFX96 荧光定量 PCR 仪(新加坡 BIO-RAD 公司)、5810R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)、全自动核酸提取仪(美国 Life Technologies)、ambion RNA 提取试剂盒(美国 Life Technologies)、诺如病毒 G I/G II 核酸检测试剂盒(江苏硕世生物科技有限公司)、甘氨酸缓冲液(配方含 0.1 mol/L 甘氨酸,0.3 mol/L NaCl,pH 9.5)、16% PEG8000 溶液(配方含 16% PEG8000,0.525 mol/L NaCl)、异丙醇(AR 级,天津市光复精细化工研究所)、氯仿(AR 级,西陇化工股份有限公司)、无水乙醇(AR 级,广州新建精细化工厂),所有试剂均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 样本运输与保存 样品运输过程温度维持在 0℃~5℃,抵达实验室后无法当天检测的样本保存在-80℃冰箱,并确保样本最多冻融 1 次。

1.2.2 NV 的富集 牡蛎开壳后取消化腺 5 g,剪碎后加入 35 ml 甘氨酸缓冲液,组织匀浆器中速匀浆 1~3 min;置涡旋振荡器剧烈振荡 30 min;4℃ 10 000 g 离心 30 min;取上清至 50 ml 离心管中,加入 15 ml 氯仿,置涡旋振荡器剧烈振荡 10 min;4℃ 10 000 g 离心 30 min;取上清至 50 ml 离心管中,加入等体积的 16% PEG8000 溶液,充分混匀后调节 pH 值至 7.0~7.2,于 4℃ 沉淀 4 h;4℃ 10 000 g 离心 5 min;弃上清,沉淀用 200 μl 0.2 mol/L Na₂HPO₄ 溶液重悬,置涡旋振荡器

剧烈振荡 5 min;4℃ 10 000 g 离心 5 min,取上清进行病毒 RNA 提取。

1.2.3 NV RNA 提取 使用全自动核酸提取仪按照 ambion RNA 提取试剂盒的操作步骤进行 NV RNA 的提取,提取好的 RNA 最后洗脱至洗脱缓冲液中,RNA 洗脱缓冲液可置于-80℃冰箱保存。

1.2.4 NV 核酸检测 采用荧光 RT-PCR 法,使用江苏硕世生物科技有限公司的诺如病毒 G I/G II 核酸检测试剂盒,按试剂盒要求配制反应体系。反应条件:①50℃ 30 min;②95℃ 5 min;③95℃ 10 s,55℃ 40 s 收集荧光,45 个循环;检测通道为 FAM、VIC。扩增结果及基因型别检出与否按以下规则判定:FAM 通道为 G I 型,VIC 通道为 G II 型;结合扩增曲线,Ct 值≤35 且曲线呈 S 型为阳性;Ct 值>38 判定为阴性;Ct 值为 35<Ct<38 时为可疑值,需重新检测。

1.3 统计学分析 采用 SPSS20 软件进行数据分析,率的比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牡蛎样本 NV 检出率总体情况 480 份牡蛎样本中,53 份检出 NV,总检出率为 11.04%,检出的 NV 均为 G II 型。

2.2 不同来源牡蛎中 NV 污染状况 餐饮场所牡蛎样本未检出 NV,养殖场及农贸市场牡蛎样本 NV 检出率分别为 15.83%、12.50%,养殖场与农贸市场牡蛎 NV 检出率差异无统计学意义($P>0.05$),而养殖场及农贸市场牡蛎 NV 检出率显著高于餐饮场所($P<0.01$)。见表 1。

表 1 不同来源牡蛎样本 NV 检出率

样本来源	样本数(n)	检出数(n)	检出率(%)	χ^2 值	P 值
养殖场	240	38	15.83	21.242 *	0.000 *
农贸市场	120	15	12.50	0.708 **	0.400 **
餐饮场所	120	0	0.00	16.000 ***	0.000 ***
合计	480	53	11.03	20.764#	0.000#

注:* 养殖场来源与餐饮场来源间比较;** 养殖场与农贸市场来源间比较;*** 农贸市场与餐饮场来源间比较;#为三种来源间比较。

2.3 不同季节牡蛎样本 NV 污染状况 依据气象部门资料,将广西一年四季划分如下:春季(3-5 月)、夏季(6-8 月)、秋季(9-11 月)、冬季(12-2 月)。春、夏、秋、冬四个季节牡蛎样本 NV 检出率分别为 13.33%、6.67%、7.50%、16.67%,冬季牡蛎 NV 检出率显著高于夏、秋季($P<0.05$)。见表 2。

表 2 不同季节牡蛎样本 NV 检出率

样本来源	样本数(n)	检出数(n)	检出率(%)	χ^2 值	P 值
春季	120	16	13.33	2.963 *	0.085 *
夏季	120	8	6.67	5.822 **	0.016 **
秋季	120	9	7.50	2.188 ***	0.139 ***
冬季	120	20	16.67	4.746 ****	0.029 ****
合计	480	53	11.03	8.378#	0.039#

注: * 为春季与夏季间比较; ** 为夏季与冬季间比较; *** 为春季与秋季间比较; **** 为冬季与秋季间比较; # 为四个季节间比较。

3 讨论

养殖场、农贸市场、餐饮场所是牡蛎从养殖到餐桌的三个主要环节,对此三个环节 NV 污染的研究结果显示除餐饮场所牡蛎未检出 NV 外,养殖场及农贸市场牡蛎均检出 NV,检出率分别为 15.83% (38/240)、12.50% (15/120)。养殖场及农贸市场牡蛎 NV 检出率差异无统计学意义,而养殖场及农贸市场牡蛎 NV 检出率显著高于餐饮场所。该研究结果显示在销售环节 NV 的污染没有增加,与养殖环节 NV 的污染保持在相同水平,说明在销售环节牡蛎 NV 的污染可能大多来源于养殖环节,提示要降低牡蛎中 NV 污染的关键控制点在于养殖环节。从牡蛎的生活习性推断,养殖环节中水源是一个重要的影响因素。牡蛎属双壳滤食性动物,在滤食过程需要过滤大量的海水,牡蛎每小时可过滤海水 24 L,海水中污染的 NV 被特异的富集起来,通过这种富集作用会在短时间内使牡蛎体内的病毒浓度高出海水几十到上千倍^[9]。而海水中 NV 的一个很主要的来源就是城市污水。目前尚无北海市污水中 NV 的调查数据,但邓丽丽等对南宁市朝阳溪污水中 NV 污染状况调查结果显示,NV 总检出率 100% (72/72)^[10]。所以为了降低牡蛎中 NV 的污染,在选择牡蛎养殖场所时,应注重对其周边环境的调查,尽可能避开城市污水的污染。餐饮环节牡蛎未检出 NV,销售环节牡蛎 NV 检出显著高于餐饮环节,提示餐饮环节是控制 NV 感染的一个关键点。本次采集的餐饮环节的样本都是烤好的牡蛎,说明不生食牡蛎、在食用前经过适宜的加工及厨房用品生熟分开,完全可以预防由 NV 引起的食源性疾病的发生。

本研究检出的 NV 均为 G II 型,未检出 G I 型,与广西南宁市腹泻病人 NV 感染的监测结果是一致的,在 2007-2008 年广西南宁市成人腹泻散发病例中,检出的 NV 98.36% 为 G II 型^[8]。该检测结果一方面提示广西牡蛎 NV 污染以 G II 型为主,另一方面也提示可能是监测点的选择覆盖率不够,应扩大监测范围,深

入调查了解 G I、G II 型 NV 在广西牡蛎中的污染状况。

不同季节牡蛎样本 NV 污染监测结果显示,牡蛎中 NV 污染情况呈现季节性特点,冬季牡蛎 NV 检出率显著高于夏、秋季。这与 NV 引起的急性胃肠炎的流行特征是一致的。谭冬梅等^[8]对 2007-2008 年广西南宁市成人腹泻散发病例 NV 检测结果显示,由 NV 引起的成人腹泻散发病例在冬春季 (10 月-翌年 3 月) 出现明显的发病高峰,占全年病例数的 87.78%。

综上所述,广西牡蛎在养殖场、农贸市场、餐饮场所三个环节中,养殖场和农贸市场环节 NV 污染较为严重,而餐饮环节未发现污染;NV 污染呈现明显的季节性特点。该研究找出了降低广西牡蛎 NV 污染及控制 NV 引起的急性胃肠炎的关键控制点,首先从养殖环节开始,重视养殖环境的选择,远离城市污水排放区域,从源头上控制污染;其次加大宣传力度,使人们养成良好的饮食习惯,不生食牡蛎,在食用前进行适宜的烹饪,厨房用品注重生熟分开,从而达到有效的预防和控制食用牡蛎引起的 NV 胃肠炎疾病发生的目的。

参考文献

- [1] Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology - a trip of over 50 years[J]. Annu Rev Microbiol, 1995, 49(2): 461-487.
- [2] Teunis PF, Moe CL, Liu P, et al. Norwalk virus: how infectious is it [J]. J Med Virol, 2008, 80:1468-1476.
- [3] Ma Y, Duan Y, Wei Y, et al. Heat shock protein 70 (hsp70) enhances mucosal immunity against human norovirus when co-expressed from a vesicular stomatitis viral vector[J]. J Virol, 2014, 88(9): 5122-5137.
- [4] Hall AJ, Eisenbart VG, Etingue AL, et al. Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, united states, 2001-2008[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(10): 1566-1573.
- [5] Iijima Y, Tanaka S, Ohishi H. Multiple outbreaks of gastroenteritis due to a single strain of genotype G II/4 norovirus in Kobe, Japan, 2006: risk factors for norovirus spread in health care settings[J]. Jpn Infect Dis, 2008, 61(5): 419-422.
- [6] Allen DJ, Adams NL, Aladin F, et al. Emergence of the G II-4 norovirus Sydney 2012 strain in England, winter 2012-2013 [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(2): e88978.
- [7] Huppertz C, Munnoch SA, Worgan T, et al. A norovirus outbreak associated with consumption of new oysters: implications for quality assurance systems[J]. Commun Dis Intell Q Rep, 2008, 32(1): 88-91.
- [8] 谭冬梅, 刘巍, 邓丽丽, 等. 南宁市 2007-2008 年诺如病毒感染所致成人腹泻散发病例的流行病学特征和诺如病毒基因型分布[J]. 中国疫苗和免疫, 2010, 16(2): 132-135.
- [9] Lees D. Viruses and bivalve shellfish [J]. Int J Food Microbiol, 2000, 59(1-2): 81-116.
- [10] 邓丽丽, 刘巍, 谭冬梅, 等. 南宁市朝阳溪污水中诺如病毒污染状况分析[J]. 实用预防医学, 2015, 22(9): 1033-1034, 1072.

收稿日期: 2016-09-03