

青岛地区贝类产品中诺如病毒的感染和流行初探

柳淑芳 李 振 周德庆

(农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要 从 2006 年 1 月至 2007 年 1 月, 在青岛市内 3 区 5 个主要水产品批发市场连续采集贝类样品, 其中太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* 208 个、毛蚶 *Scapharca subcrenata* 169 个、杂色蛤 *Venerupis variegata* 169 个, 采用 RT-PCR 方法检测诺如病毒(Noroviruses, NV)的感染, 旨在为贝类食品的安全监控提供基础数据资料。研究结果表明, 太平洋牡蛎和毛蚶样品中 NV 检出率分别为 10.1% 和 5.3%, 而杂色蛤未检出, NV 流行的季节主要是 11 月至次年 3 月, 感染部位主要分布于贝类的消化道。

关键词 贝类 诺如病毒 流行

中图分类号 S94 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)01-0061-06

Epidemic of noroviruses in bivalves in Qingdao

LIU Shu-fang LI Zhen ZHOU De-qing

(Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT Epidemic of noroviruses (NV) was monitored in three major bivalve species on sale in the markets in three districts of Qingdao during Jan. 2006~Jan. 2007. Results showed that the positive rate of NV infection was 10.1% in 208 samples of *Crassostrea gigas*, 5.3% in 169 samples of *Scapharca subcrenata*, and no positive samples were detected in 169 samples of *Venerupis variegata*. Furthermore, the seasonal epidemic of NV happens mostly in winter from November to March, and NV was usually detected in the alimentary canal.

KEY WORDS Bivalves Noroviruses Epidemic

海产贝类品种多、价格低,且营养丰富、味道鲜美,深受广大消费者的喜爱。有研究表明,牡蛎中蛋白质含量高达 9.90%,而脂肪含量仅为 1.22%,是一种高蛋白、低脂肪和富含矿物质的食品,是名副其实的“海洋牛奶”。我国沿海地区的居民素有食用海产贝类的习惯,但是由于双壳贝类属于滤食性动物,其内脏团中经常会富集大量的致病菌和病毒粒子,生食海产贝类很容易引起急性胃肠炎,给消费者带来极大的健康隐患(Meed *et al.* 1999)。

诺如病毒(Noroviruses, NV)是食源性疾病中最常见的病原体, NV 最早于 1972 年美国诺瓦克城发现并

国家科技基础条件平台工作项目(2004DEA70880)、山东省科技攻关项目(2007GG10005015)和国家高技术研究发展计划课题(2007AA09Z400)共同资助

收稿日期:2007-11-07;接受日期:2008-01-06

作者简介:柳淑芳(1975-),女,副研究员,主要从事水产品质量与安全研究。E-mail: liusf@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85836340

命名为诺瓦克病毒(Norwalk-like Virus, NV)(Kapikian *et al.* 1972)。2002年8月,国际病毒分类委员会将诺瓦克样病毒重新命名为诺如病毒。流行病学调查提示 NV 最主要的载体是双壳软体动物,即通常所说的贝类(Meed *et al.* 1999)。因此,NV 的监控对保障贝类的食用安全具有重要作用。近年来,随着海洋污染的日益严重以及世界各国对食品卫生的重视,我国水产品出口屡屡碰壁,欧洲、美国和日本等许多国家对我国的水产品提出了诸多严格的检测指标,其中一项是诺瓦克样病毒的检测,规定 NV 不得检出。但遗憾的是,迄今为止,我国贝类中感染 NV 的情况仍不清楚,这对于我国水产品的生产和出口十分不利。为尽快解决这一问题,作者以青岛市场为例,从2006年1月至2007年1月,在市内三区连续采集了不同的海产贝类样品,使用 RT-PCR 方法进行 NV 的检测,初步获得了青岛地区海产贝类中 NV 污染的基本情况,为进一步了解我国贝类等水产品中 NV 的感染打下了基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本试验样品采自青岛市内三区主要水产品市场(包括团岛水产品市场、南山水产品市场、新贵都农贸市场、广饶路农贸市场和抚顺路批发市场),包括:太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* 样品共计 208 个,毛蚶 *Scapharca subcrenata* 样品共计 169 个,杂色蛤 *Venerupis variegata* 样品共计 169 个。采样时间为 2006 年 1 月至 2007 年 1 月。样品详细情况见表 1。

表 1 青岛不同销售区域样品采集数量
Table 1 Sample size in three districts of Qingdao

样品 Sample	市南区 Shinan district		市北区 Shibei district		四方区 Sifang district	合计 Total
	团岛市场 Tuandao market	新贵都市场 Xinguidou market	广饶路市场 Guangraolu market	南山市场 Nanshan market	抚顺路市场 Fushunlu market	
太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	39	39	39	39	52	208
毛蚶 <i>Scapharca subcrenata</i>	33	33	33	33	32	169
杂色蛤 <i>Venerupis variegata</i>	33	33	33	33	32	169

1.2 试验方法

1.2.1 贝类样品中 NV 的富集

将样品去壳,分别取其消化腺、鳃以及肌肉组织,加入 7 倍体积冷的去离子水,快速匀浆。调匀浆液 pH5.0,4℃ 2 000g 离心 30min,收集沉淀。加入 7 倍体积 pH 7.5 甘氨酸缓冲液(0.05mol/L Gly,0.15mol/L NaCl),室温下震荡 15 min 洗脱病毒粒子;4℃ 5 000g 离心 30 min 收集上清。用 PEG8000 于 4℃ 沉淀病毒粒子 4h;4℃ 6 700g 离心 30min,收集沉淀;用 0.15mol/L 的 Na₂HPO₄ 重悬沉淀,4℃ 10 000g 离心 30min,取上清液,-20℃ 保存待用。

1.2.2 病毒 RNA 的提取

按照 High Pure Viral RNA Kit [Roche] 的使用说明书,提取上述处理后样品中的 RNA,用 DEPC 处理过的二次水溶解作为 RT-PCR 模板,-20℃ 保存备用。

1.2.3 RT-PCR 扩增

引物采用 Vinje(1996)报道的序列(表 2),由上海生工生物工程有限公司合成。

反转录反应体系为: Tris-HCl 50mmol/L, KCl 75mmol/L, MgCl₂ 8mmol/L, DTT 10mmol/L, dNTP 0.5mmol/L, JV13 引物 1μmol, AMV 反转录酶 5U, RNA 酶抑制剂 40U, RNA 模版 5μl。反应条件为 42℃, 90min, 反应结束后得到的 cDNA 直接进行 PCR 反应。

PCR 反应体系为: 10×PCR Buffer 2.5μl, dNTP 0.2mmol/L, JV12 0.5μl, JV13 0.5μl, rTaq 2.5U, cDNA 3μl。反应条件为变性(94℃, 3min), 30 个循环(94℃, 30s; 37℃, 30s; 72℃, 60s), 延伸 72℃, 7min。

2 结果

2.1 青岛地区贝类中 NV 的三间感染和流行分布

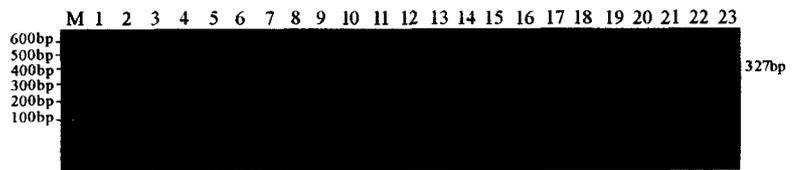
2.1.1 不同贝类品种 NV 感染状况

对青岛地区的 208 个太平洋牡蛎样品和 169 个杂色蛤样品和 169 个毛蚶样品进行了 RT-PCR 扩增, 结果太平洋牡蛎和毛蚶样品中 NV 检出率分别为 10.1% 和 5.3%, 而杂色蛤未检出(表 3)。电泳结果见图 1。其中, 泳道 9、12、13、16、18 和 21 为 NV 阳性样品。

表 2 诺瓦克样病毒 RT-PCR 检测的引物

Table 2 Primers of Noroviruses by RT-PCR

引物 Primer	序列 Sequence	位置 Nt location	片段大小 Fragment size
JV12	5'-ATACCACTATGATGCAGATTA-3'	4 552~4 572	327 bp
JV13	5'-TCATCATCACCATAGAAAGAG-3'	4 858~4 878	



M: DNA marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3~23: 待检样品
M, DNA marker 1, positive control 2, negative control 3~23: test samples

图 1 待检样品 PCR 扩增琼脂糖电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of PCR from test samples

表 3 不同月份贝类产品中 NV 的检测结果

Table 3 NV test results of the bivalve samples in different months

样品采集时间 The time of sample collection	样品数量(阳性样品数量)Sample size (positive sample size)		
	牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	毛蚶 <i>Scapharca subcrenata</i>	杂色蛤 <i>Venerupis variegata</i>
2006-01	16(4)	13(1)	13(0)
2006-02	16(2)	13(1)	13(0)
2006-03	16(1)	13(1)	13(0)
2006-04~2006-10	112(3)	91(1)	91(0)
2006-11	16(3)	13(2)	13(0)
2006-12	16(4)	13(1)	13(0)
2007-01	16(4)	13(2)	13(0)
合计 Totle	208(21)	169(9)	169(0)
检出率(%)Positive ratio	10.1	5.3	0

2.1.2 不同季节 NV 感染状况

从检测结果(图 2~图 3)可见, NV 的污染呈现明显的季节性分布, 主要集中在气温较低的月份。本研究冬季(2006 年 1~3 月、2006 年 11 月至次年 1 月)采集的 96 个牡蛎样品检出 18 个阳性, 阳性率平均 18.8%; 78 个毛蚶样品检出 8 个阳性, 阳性率平均 10.3%; 其中牡蛎的最高检出率为 25%, 毛蚶的最高检出率为 15.4%。从 4~10 月, 牡蛎的 NV 检出率为 2.7%, 毛蚶的检出率为 1.1%, 而在 2006 年 5 至 8 月, 牡蛎和毛蚶中均未发现 NV 感染。

2.1.3 不同区域 NV 感染状况

对分布于青岛市南、市北和四方三市区的 5 个大型水产品批发市场销售的牡蛎和毛蚶进行抽样检测,结果均有 NV 检出,牡蛎中 NV 的阳性率为 8.9%~11.5%,毛蚶中 NV 的阳性率为 4.5%~6.2%。杂色蛤未检出 NV(表 4)。

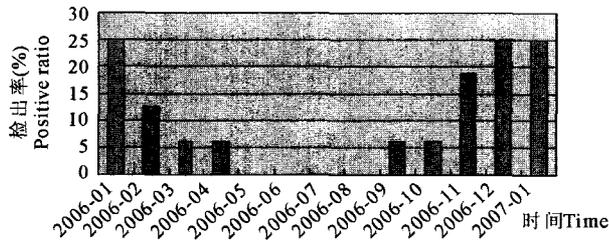


图 2 牡蛎样品 NV 的检出率

Fig. 2 Positive ratio of NV in *Crassostrea gigas* samples

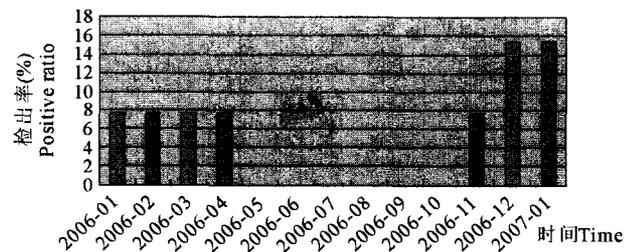


图 3 毛蚶样品中 NV 的检出率

Fig. 3 Positive ratio of NV in *Scapharca subcrenata* samples

表 4 青岛不同销售区域贝类产品中 NV 的检测结果

Table 4 NV test results of the bivalve samples in different districts of Qingdao

样品 Sample	NV 检出率 Positive ratio (%)			平均检出率 (%) Average positive ratio
	市南区 Shinan district	市北区 Shibei district	四方区 Sifang district	
牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	10.2	8.9	11.5	10.1
毛蚶 <i>Scapharca subcrenata</i>	4.5	6.1	6.2	5.3
杂色蛤 <i>Venerupis variegata</i>	0	0	0	0

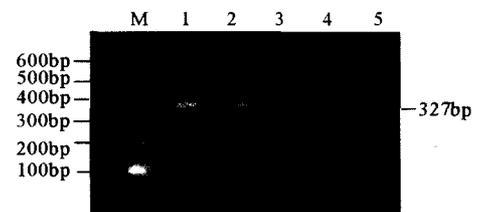
2.2 牡蛎不同组织中 NV 的分布

为了进一步揭示牡蛎中 NV 的感染部位,作者对初选检测为阳性的牡蛎样品又分别检测了消化腺、鳃以及肌肉中的病毒分布情况,结果只有消化腺中可检测到 NV,而鳃和肌肉中未检出(图 4)。

3 讨论

3.1 不同贝类品种 NV 感染状况

贝类属于滤食性动物,通过滤食水中的微藻获取食物的同时,消化道可大量富集随污水进入养殖区域的 NV。在此次污染状况的调查中作者发现,青岛地区市售海产贝类中已经污染了 NV。在本实验室检测的 3 种海产贝类中,牡蛎的阳性检出率最高,达到了 10.1%(21/208)。毛蚶中也发现了 NV,阳性检出率低于牡蛎,为 5.3%(9/169)。杂色蛤作为青岛的特色水产品,在此次调查中并未发现污染 NV。几种海产贝类中 NV 的检出率差别较大,这可能是由于几种贝类养殖方式和生活习性不同所致。浅滩以及污水排放口附近的一些地方是被病毒污染的高风险区域,因此,贝类在海水中生长的深度非常重要。养殖牡蛎的海域一般位于风浪较平静及滩涂坡度较小的内湾,属于浅海区域,极易污染 NV。而且牡蛎每小时可以过滤 10~20L 水,可以浓缩可能存在于水中的病毒,导致其体内的病毒含量远远超过其周围的水环境 (Metcalf *et al.* 1979)。毛蚶生活于浅海泥沙底部,尤其喜在有淡水流入的河口附近生长,该生长区域通常靠近居民生活区,极易污染大量的 NV 粒子,毛蚶在滤食过程中也可以富集 NV。杂色蛤主要产于胶州湾内,栖息在潮间



M: DNA marker; 1: 阳性对照; 2: 消化腺;

3: 鳃; 4: 肌肉; 5: 阴性对照

M, DNA marker 1, Positive control 2, Alimentary canal

3, Gill 4, Muscle 5, Negative control

图 4 阳性牡蛎样品不同组织 PCR 扩增结果

Fig. 4 Electrophoresis of PCR of different tissues from positive samples

带中、下区以下的泥沙滩海底,以干潮线以下产量最多,故而降低了感染病毒的风险。

3.2 不同季节 NV 感染状况

本研究结果说明 NV 的污染具有明显的季节性,冬季是 NV 污染的高峰期。从 11 月至次年 3 月,市售牡蛎样品中 NV 的最高检出率为 25%,平均阳性率为 18.8%;毛蚶样品的最高检出率为 15.4%,平均阳性率为 10.3%;而在 2006 年 5~8 月,牡蛎和毛蚶中均未发现 NV 感染。这与国外许多相关研究报道的结果一致 (Burkhardt *et al.* 2000; Hamano *et al.* 2005),如美国 Burkhardt 等(2000)曾对 1991 年到 1997 年由 NV 感染牡蛎引起的 1 030 例胃肠炎的发病季节进行了研究,结果发现在 12 月份发生数最多,为 692 例,其次为 11 月份,为 218 例,1 月份也有 77 例,而 2~4 月只有 43 例,5~10 月竟然无一例发生。导致该状况的原因可能与病毒在外界存活的时间长短有关,冬季水温低,病毒存活时间长,贝类富集的活病毒较多,故贝类中 NV 的感染较严重。由此可见,冬季应加强水产品中 NV 感染状况的监控。尽管我国已有贝类中 NV 感染的报道,但其感染强度和流行分布规律尚不清楚,本研究结果可为贝类食品的安全监控提供基础数据资料。

3.3 不同区域 NV 感染状况

NV 引起的食源性疾病呈世界性分布(表 5)。在此次调查过程中,青岛地区市售牡蛎样品中 NV 的平均检出率为 10.1%,高于日本、挪威、瑞士报道的数据,仅低于法国报道的 NV 的检出率,这说明青岛地区牡蛎中 NV 的污染状况较为严重。青岛当地不同市区销售的牡蛎和毛蚶样品均有 NV 检出,且检出率差异不显著,表明 NV 在贝类中的污染是一种普遍现象,因此青岛地区贝类产品的卫生安全状况应该给予高度重视。

表 5 不同国家牡蛎产品中 NV 的检测结果

Table 5 NV test results of oyster samples in different countries

国别 Country	采集样品时间(年一月) The time of sample collection	牡蛎样品数量(份) Sample size	检出率(%) Positive ratio	文献 Reference
日本 Japan	2001—12~2002—02	191	9.0	Nishida <i>et al.</i> 2003
法国 France	1995~2003	300	20.3	Loisy <i>et al.</i> 2005
挪威 Norway	2000—06~2003—06	681	6.8	Myrmel <i>et al.</i> 2004
瑞士 Switzerland	2001—11~2002—02	87	9.2	Beuret <i>et al.</i> 2003

3.4 牡蛎不同组织中 NV 的分布

通过对阳性牡蛎样品不同部位的检测发现,牡蛎的内脏团中可以检测到 NV,而肌肉、鳃等部位未发现 NV。究其原因,一方面 NV 病毒外壳为蛋白质,表面往往带负电荷,易吸附于颗粒物表面。在颗粒物和浊度较高的水中,病毒往往随颗粒物沉淀于水底,再加上 NV 对不良环境条件的抵御能力较强,这些病毒一旦释放到环境中,就会在外界环境中长时间生存;另一方面,双壳贝类依靠摄食和捕获水中的悬浮颗粒并送入口中消化或作为粪便排出,摄食和呼吸主要通过吸入一定量的海水,流经其复杂的鳃部结构,然后进入消化道。养殖牡蛎的海域一旦污染了 NV,牡蛎就可以通过摄食过程富集海水中的病毒粒子,其消化道内 NV 粒子的含量会远远高于周围水域,而鳃部以及肌肉部分不含有 NV。尽管 1 只牡蛎每小时可以过滤 10~20L 水,通过滤食作用将水体中的 NV 富集在消化道内,但是, NV 无法在贝类消化道内增殖,也无法扩散到贝类的其他部位。美国 Schwab 等(1998)通过分析牡蛎组织内病毒的分布来研究 NV 的吸收、分布和排泄情况,结果发现,不管接种病毒的高低,消化道和胃均可以检测到病毒,但暴露在高浓度病毒下的检出效果更好,当牡蛎暴露在高浓度的 NV 中时,肌肉和体液细胞才能检出 NV。而水体中的 NV 含量非常少,不可能达到人为模拟试验的浓度,因此,贝类在 NV 的流行和传播中起到重要的中间宿主和保藏宿主的作用,对传染性胃肠炎等疫病的发生起到重要作用,同时也表明,牡蛎等贝类的消化道中的 NV 含量最高。我国居民在食用牡蛎的时候,有时为了获得

更好的口感,对贝类的加工和处理不够充分,导致 NV 的传播和流行,这一结果也告诫人们在食用贝类时一定要充分加热和消毒。

4 结论

本文从不同季节、不同区域和不同产品及其不同组织部位探讨了青岛地区贝类产品中 NV 的感染和流行情况。研究表明,NV 在贝类中的污染是一种普遍现象,感染部位主要分布于贝类的消化道,但不同海产贝类品种的 NV 感染率差别较大,所检样品中牡蛎的阳性检出率最高,且 NV 的污染具有明显的季节性,冬季是 NV 污染的高峰期。本研究结果为贝类食品的安全监控提供了基础数据资料,但研究过程中发现不同销售区域采集的样品,其检测结果有差异,故样品来源值得关注,有必要针对样品的原产地进一步深入调研。

参 考 文 献

- Beuret, C., Baumgartner, A., and Schlupe, J. 2003. Virus-contaminated oysters; A three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(4):2 292~2 297
- Burkhardt, W., and Calci, K. 2000. Selective accumulation may account for bivalves-associated viral illness. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1 375~1 378
- Hamano, M., Kuzuya, M., Fujii, R., Ogura, H., and Yamada, M. 2005. Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by Noroviruses in Okayama, Japan. *J. Med. Virol.* 77(2):282~289
- Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., and Chanock, R. M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of 27nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 10:1 075~1 081
- Loisy, F., Atmar, R. L., Guillon, P., Cann, P. le, Pommepuy, M., and Guyader, F. S. le. 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in bivalves. *Journal of Virological Methods*, 123:1~7
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., and Tauxe, R. V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5:607~625
- Metcalf, T. G., Mullin, B., Eckerson, D., Moulton, E., and Larkin, E. P. 1979. Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the soft-shelled clam. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:275~282
- Myrmel, M., Berg, E. M. M., Rimstad, E., and Grinde, B. 2004. Detection of enteric viruses in bivalves from the Norwegian coast. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5):2 678~2 684
- Nishida, T., Kimura, H., Saitoh, M., Shinohara, M., Kato, M., Fukuda, S., Munemura, T., Mikami, T., Kawamoto, A., Akiyama, M., Kato, Y., Nishi, K., Kozawa, K., and Nishio, O. 2003. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(10):5 782~5 786
- Schwab, K. L., Neill, F. H., Estes, M. K., Metcalf, T. G., and Atmar, R. L. 1998. Distribution of Norwalk virus within bivalves following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J. Food Prot.* 61(12):1 674~1 680
- Vinje, J., and Koopmans, M. P. 1996. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.* 174:610~615