

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54(1):69-79; 4 January 2014

ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.01.009

## 我国沿海主要经济贝类中典型人类肠道病毒的污染分布

明红霞<sup>1</sup>, 樊景凤<sup>1\*</sup>, 吴利军<sup>1,2</sup>, 岳龙涛<sup>3</sup>, 高雪琴<sup>3</sup>, 梁玉波<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023

<sup>2</sup> 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北 武汉 430071

<sup>3</sup> 山东省医药生物技术研究中心, 卫生部生物技术药物重点实验室, 山东 济南 250062

**摘要:**【目的】了解我国沿海主要经济贝类中肠道病毒的污染分布对保障贝类食用安全具有重要作用。【方法】通过建立 5 种典型人类肠道病毒的特异、灵敏、高通量的基因芯片检测技术, 开展全国范围内沿海主要海水增殖区经济贝类体内肠道病毒的污染调查。【结果】采集的 162 份经济贝类中肠道病毒的阳性检出率分别为: 甲肝病毒 4.3%; 诺如病毒 14.8%; 轮状病毒 6.2%; 星状病毒 5.6%; 腺病毒 9.9%, 其中诺如病毒污染居于首位, 该检测结果与 PCR 结果高度一致。我国沿海省市主要养殖区内贝类均受到了肠道病毒不同程度的污染, 且不同省市之间差异不显著。在选取的 6 类经济贝类中, 牡蛎中肠道病毒阳性检出率最高, 其次是毛蚶和泥蚶。【结论】本研究表明, 在我国, 沿海主要经济贝类受到肠道病毒污染是一种较普遍的现象, 给人类健康带来了潜在的危害, 本研究为贝类食品的安全监控提供了基础数据资料。

**关键词:** 基因芯片, 人类肠道病毒, 沿海经济贝类

**中图分类号:** X172      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209(2014)01-0069-11

贝类作为滤过性摄食动物, 是病毒和细菌病原体的重要载体<sup>[1]</sup>。流行病学调查显示, 双壳贝类是包括甲肝病毒和诺如病毒等多种肠道病毒的主要传播者, 国内外因生食或食用未充分煮熟的贝类而造成肠炎疾病屡有发生, 给人体健康带来很大危害。如 1988 年上海暴发的一起因食用毛蚶而造成的大范围甲肝病毒 (Hepatitis A virus, HAV) 事件, 导致了 31 万人感染<sup>[2]</sup>; 2001 年西班牙暴发的因食用斧蛤 (*coquina clam*) 而造成的甲肝病毒事件, 导致 183 人

感染<sup>[3]</sup>。由此可见, 了解主要经济贝类中肠道病毒的污染分布对保障贝类的食用安全具有重要作用。

我国海域生活着 800 余种海洋贝类, 其产量名列世界第一, 一些主要经济贝类如牡蛎、贻贝、扇贝、文蛤、青蛤等已成为我国水产品出口创汇的重要品种<sup>[4]</sup>, 但是, 近年来, 随着海洋污染的日益加剧以及世界各国对食品安全的重视, 我国水产品出口屡屡碰壁, 因此, 为快速了解我国贝类中肠道病毒的污染状况, 进行海产贝类中人致病性肠道病毒快速检测

**基金项目:** 国家“863 计划” (2006AA09Z162, 2006AA09Z170); 国家专项 (908-01-ZH3); 海洋公益性行业科研专项 (201105007); 国家海洋局近岸海域生态环境重点实验室开放研究基金 (201201)

\* 通信作者。Tel: +86-43124110186; Fax: +86-411-84782602; E-mail: jiffan@nmemc.gov.cn

**作者简介:** 明红霞 (1981-), 女, 山东人, 助理研究员, 博士, 主要研究方向为环境微生物。E-mail: hxming@nmemc.gov.cn

**收稿日期:** 2013-04-18; **修回日期:** 2013-07-29

系统研发,是目前我国海洋生态环境监测和公共安全健康工作的迫切需要。近年来,生物芯片技术的发展提供了解决这一问题的途径,该技术以高通量和高灵敏度的优点被广泛应用于医学和研究领域<sup>[5-6]</sup>,其中长探针 $\geq 70$  mers 寡核苷酸芯片与以往的 20-25 mers 和 60mers 短探针相比,具有更好的特异性和均一的  $T_m$  值<sup>[7]</sup>,可明显提高芯片的稳定性和可重复性<sup>[8]</sup>,被证明在灵敏度和特异度两方面表现最佳,此外还能兼顾信号强度<sup>[9]</sup>,然而基因芯片技术,尤其是长探针寡核苷酸芯片技术在环境样品(海产品)中肠道病毒的监测应用上还较少。

海洋环境中肠道病毒有 150 多种,不可能实现一一检测,选取有代表性的种类进行检测是切实可行和非常必要的,其中诺如病毒和甲肝病毒被认为是因贝类传播的病毒性胃肠炎中最重要的病原体,几乎在每个国家均有暴发<sup>[10]</sup>。除此之外,轮状病毒、腺病毒(Adenovirus, AdV)、星状病毒(Astrovirus, AsV)也是胃肠炎疾病重要病原<sup>[11]</sup>。因此,本研究选取以上 5 种主要的人类肠道病毒为研究对象,构建平行检测的长探针寡核苷酸芯片技术,应用于 162 份经济贝类的检测,并将检测结果与 PCR 结果进行比对,以评价我们所建立的基因芯片技术的特异性和灵敏度,以期快速、准确地反映全国范围内主要沿海经济贝类的肠道病毒污染状况。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** AMV 反转录酶(Promega 公司)、rTaqDNA 聚合酶(TaKaRa 公司)、CL-1000 紫外交联仪(UVP 公司 USA)、醛基化玻片(上海百傲科技有限公司)、PTC-200 型基因扩增仪(BIO-RAD 公司 USA)、PCA300 型电泳仪(BIO-RAD 公司 USA)、Pixy5500 点样仪(Cartesian 公司 USA)、ScanArray 4000 激光共聚焦扫描仪(General Scanning Inc USA)、Hybri-slips 杂交盖片(sigma 公司 USA)、BioPhotometer 型微量核酸定量仪(Eppendorf 公司)。

**1.1.2 病毒标准株:** 选取 5 种肠道病毒为标准毒株

建立基因芯片方法,其中轮状病毒(RV-A)、诺如病毒(GII 4)、星状病毒(HsV-1)、腺病毒(AdV-3)阳性粪便标本均由国家疾病预防控制中心病毒学研究所段招军研究员提供,甲肝病毒减毒活疫苗(H<sub>2</sub> 株)购于山东省疾病预防控制中心。

**1.1.3 贝类样品采集:** 2007 年 8 月,于全国重点沿海城市的 45 个增殖区采集 162 份贝类样品,共包括 6 种经济贝类:蚶[毛蚶(*Scapharca subcrenata*)、泥蚶(*Arca granosa*)],蛤蜊[中国蛤蜊(*Macratria chinensis*)、四角蛤蜊(*Macratria Veneriformis*)、日本镜蛤(*Dosinia Japonica*)、青蛤(*Cyclina sinensis*)、菲律宾蛤蜊(*Ruditapes philippinarum*)、饼干镜蛤(*Dosinia biscocta*)、波纹巴非蛤(*Paphia undulata*)、真曲巴非蛤(*Paphia euglypta*)等],蛭[缢蛭(*Sinonovacula constricta*)、长竹蛭(*Solen strictus*)等],牡蛎[近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*)、缘齿牡蛎(*Dendostrea crenulifera*)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、褶牡蛎(*Crassostrea plicatula*)等],贻贝类[翡翠贻贝(*Perna viridis*)、紫贻贝(*Mytilus edulis*)]和扇贝[栉孔扇贝(*Chlamys Farreri*)、虾夷盘扇贝(*Pecten yessoensis*)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)等],每份样品大约采集 500 g。162 份样品分别采集于辽宁省 44 份、山东省 20 份、河北省 9 份、天津市 1 份、江苏省 15 份、浙江省 16 份、福建省 17 份、广东省 18 份、广西省 11 份、海南省 11 份, -20℃ 冻存备检,采样站位见图 1。

### 1.2 引物和探针的合成

分别选择甲肝病毒的 VPS (外壳蛋白) (AF396408), 轮状病毒的 VP7 (外壳蛋白) (AB118022), 诺如病毒的 NSP 基因(非结构蛋白) (EU703722), 星状病毒的 5'端 NSP(非结构蛋白) (AB308374), 腺病毒(AdV)的 Hexon(六邻体区) (AY027809)为靶序列, 阴性对照(NC)为乙脑病毒(JEV)探针: NH2-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-Poly(dT)<sub>15</sub>-GTGCAAACAAGGTTTCACTGATCGTGGGTGGGGCAACGGATGTGGACTTTTCGGGAAGGAAGCATTTGAC, 应用 Primer premier 5.0 在线软件对靶序列引物和探针进行设计和筛选, 由上海博尚有限公司合成。引物和探针的具体信息如表 1 所示。



图 1. 我国主要贝类养殖区调查站位图

Figure 1. Sampling sites in coastal cultivation areas of China.

### 1.3 寡核苷酸芯片的制备

将探针用  $3 \times \text{SSC}$  ( $20 \times \text{SSC}$  的配置:  $\text{NaCl}$  175.3 g/L; 柠檬酸三钠· $2\text{H}_2\text{O}$  88.2 g/L, 用 1 mol/L 的  $\text{HCl}$  调节 pH 至 7.0, 抽滤并高压备用) 稀释成 20 mmol/L, 采用 Cartisan5500 点样仪将探针点至氨基化修饰的玻片表面, 每个探针设置 4 个重复, 以 TAMRA 修饰的探针为阳性对照, 乙脑探针为阴性对照, 双蒸水为空白对照, 阵列上的探针分布如图 2 所示。

### 1.4 待测靶基因的多重 PCR 扩增标记

用 Viral Nucleic Acid Extraction Kit II (Gene Aid) 提取阳性粪便样品和疫苗的 DNA 和 RNA, 溶

于 50  $\mu\text{L}$  DNA-free 水中。参照 Promega 的 AMV 试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA, 然后与 DNA 合并。优化后进行多重 PCR 扩增, 采用 100  $\mu\text{L}$  反应体系: 10  $\times$  buffer 10  $\mu\text{L}$ ;  $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L) 6  $\mu\text{L}$ ; dNTP (10 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ ; 5 种病毒上游引物 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.6  $\mu\text{L}$ ; 5 种病毒的下游 TAMRA 荧光标记引物 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.6  $\mu\text{L}$ ; cDNA/DNA 模板 10  $\mu\text{L}$ ; rTaqDNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ ; 双蒸水 65  $\mu\text{L}$ 。扩增程序: 94 $^\circ\text{C}$  3 min; 94 $^\circ\text{C}$  30 s, 55 $^\circ\text{C}$  45 s, 72 $^\circ\text{C}$  1 min, 34 个循环; 72 $^\circ\text{C}$  10 min。

表 1.5 种肠道病毒的引物和探信息

Table 1. The primer and probe sequence of five enteric viruses

virus	primer and probe	sequence (5'→3')	$T_m / ^\circ\text{C}$	fragmen/bp
HAV	HAV-F	TGTGCTATGGTTCCTGGTGA	55	510
	HAV-R	CCCAATCGAATCTGAAGCAT		
	HAV-P	NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -P <sub>ol</sub> (dT)15-TTAAAGATCCACAGTATCCAGTTTGG AATTAACAATCAGAGTTTGGTCAGAGCTGAACATTGGAACAG		
RV	RV-F	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	50	392
	RV-R	GATCCTGTTGGCCATCC		
	RV-P	NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -P <sub>ol</sub> (dT)15-TTATGTCTGTATTATCCAACCTGA AGCAACTACTCAAATCAATGATGGTGACTGG		
NV	NV-F	GATTACTCCAGGTGGGACTCCAC	55	319
	NV-R	TGACGATTTTCATCATCACCATA		
	NV-P	NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -P <sub>ol</sub> (dT)15-GGTAGCAGAAGACCTTCTTTCTCCT AGCGTGCTGGATGTGGGTGACTTCACAATATCAATCAACGAG		
AdV	AdV-F	TTCTTCCCATGGCTCACAACA	55	1005
	AdV-R	TTATGTGGTGGCGTTGCCG		
	AdV-P	NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -P <sub>ol</sub> (dT)15-CTACTTCGTATATTCTGGATCTATTCCC TACCTGGATGGCACCTTCTACCTTAACCACACTTTCAAG		
AsV	AsV-F	CGTCATTGTTTGTGTACATACT	55	288
	AsV-R	ACATGTGCTGCTTACTATG		
	AsV-P	NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -P <sub>ol</sub> (dT)15-GAATTCGTTGTCATAAAACCAGGTGCA TTATGTGTTATAGACACCCCTGAAGGAAAAGGGACAGGTT		

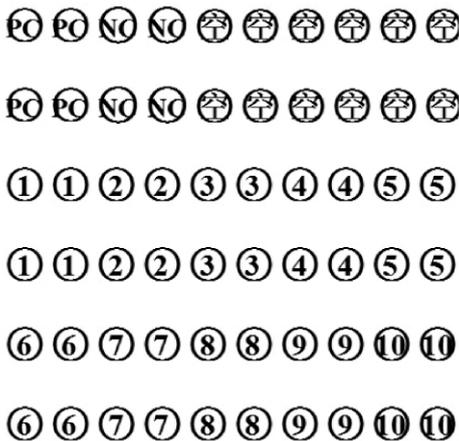


图 2. 5 种肠道病毒基因芯片阵列排布

Figure 2. Gene chip arrays for five kinds of enteric viruses, in which (PC) presented positive control; (NC) presented negative control; (空) presented blank control; ①, ⑥ presented probe of HAV; ②, ⑦ presented probe of RV; ③, ⑧ presented probe of NV; ④, ⑩ presented probe of AsV; ⑤, ⑨ presented probe of AdV.

### 1.5 寡核苷酸探针的固定化与杂交

将 5' 端氨基修饰的探针溶于  $3 \times \text{SSC}$  中, 采用 Cartisan5500 点样仪将探针点到氨基化修饰的玻璃片表面, 在湿盒中  $37^\circ\text{C}$  水合 2 h, 过夜干燥、紫外交联 (参数设置为  $3600 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ )、 $\text{NaBH}_4$  还原、洗脱,  $4^\circ\text{C}$  避光保存备用。将荧光标记的靶 DNA 序列溶于  $2 \times$

SSC (含 0.5% SDS、50% 甲酰胺、1% 鲑鱼精 DNA 封闭液) 杂交液中, 取  $2 \mu\text{L}$  标记的 DNA 溶液加到芯片表面, 用盖玻片压匀 (避免产生气泡): 放入杂交盒中  $62^\circ\text{C}$  杂交 6 - 12 h; 取出后, 先用  $2 \times \text{SSC}$  (含 0.2% SDS) 冲洗 2 遍, 再用  $2 \times \text{SSC}$  冲洗 2 遍, 最后用  $0.2 \times \text{SSC}$  清洗 2 min,  $800 \times g$  离心 5 min, 然后采用 Scanarray 4000 扫描仪扫描杂交结果, 扫描参数为: 激光强度 100%, PMT100%, 如果背景较高可以再用  $2 \times \text{SSC}$  洗 1 次。用 Quantarray3.0 定量分析软件分析扫描图像的荧光强度。

### 1.6 寡核苷酸微阵列对靶基因检测灵敏度评价

以 AsV 为例, 评价基因芯片技术的灵敏度。取  $2 \mu\text{L}$  作为模版进行荧光标记扩增, 标记产物用核酸定量仪进行定量, 然后用双蒸水将实验室制备的星状病毒质粒稀释浓度成  $100 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 、 $10 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 、 $1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 、 $0.1 \text{ pg}/\mu\text{L}$  和  $0.01 \text{ pg}/\mu\text{L}$  5 个浓度, 与芯片杂交<sup>[12]</sup>。

### 1.7 寡核苷酸微阵列对靶基因重复性检验

同样以 AsV 为例, 评价基因芯片技术的重复性。

(1) 使用同一批次的点样芯片, 按照 1.4 和 1.5 的方法标记靶序列、杂交、洗片、扫描, 重复 3 次;

(2) 用同样的方法对不同批次的芯片的扫描结

果进行荧光强度分析, 检验基因芯片技术的重复性。

## 1.8 五种病毒检测的寡核苷酸芯片应用评价

### 1.8.1 贝类样品中肠道病毒的回收:

由于贝类样品中肠道病毒的含量比较低, 所以在进行检测之前先采用高效的超速离心法对其进行浓缩。操作步骤: (1) 将贝类组织用匀浆器搅碎, 称取 20 g 加入等体积的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 9.0); (2) 调整 pH 至 7.2 左右, 室温震荡 0.5 h 使之充分混匀; (3) 于 4°C, 5000 × g 离心 15 min, 取上清继续离心, 10000 × g, 1 h, 收集上清; (4) 于 4°C, 140000 × g, 超速离心 1.5 h; (5) 弃上清, 将沉淀取出, 用约 500 μL 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4) 重悬, 向悬液中加入等量氯仿, 重新抽提, 震荡 15 min 后 4000 × g 离心 30 min, 上层液相即为病毒抽提样, 约 500 μL。操作过程中以 HAV 疫苗株 H<sub>2</sub> 为阳性对照, 采用 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法测定病毒的回收率。

### 1.8.2 贝类样品的检测:

取 200 μL 上述前处理样品, 参照 1.4 进行核酸提取和反转录。采用构建的长探针寡核苷酸芯片体系, 对 162 份贝类样品进行

芯片检测, 计算出每个阵列中 4 个阴性重复点的平均值 ( $\bar{x}$ ) 和标准差 ( $s$ ), 得出 95% 的参考范围 ( $\bar{x} \pm 2s$ ), 然后统计出每种探针的 4 个重复点平均荧光值, 若平均值高于  $\bar{x} + 2s$  则为阳性, 低于  $\bar{x} - 2s$  则为阴性。同时以普通 RT-PCR 和 PCR 方法为参照, 评价基因芯片技术的灵敏度及特异性。

灵敏度 = 真阳性 / (真阳性 + 假阳性),

特异性 = 真阴性 / (真阴性 + 假阴性)。

## 1.9 数据统计

统计学分析采用 SPSS15.0 软件进行。

## 2 结果和分析

### 2.1 芯片灵敏度评价

本研究以星状病毒为例对基因芯片技术的灵敏度进行了评价, 结果如图 3 所示, 在浓度为 1 pg/μL 时, 荧光强度值高于阳性点荧光值的  $\bar{x} - 2s$ , 显示其敏感性为 1 pg。

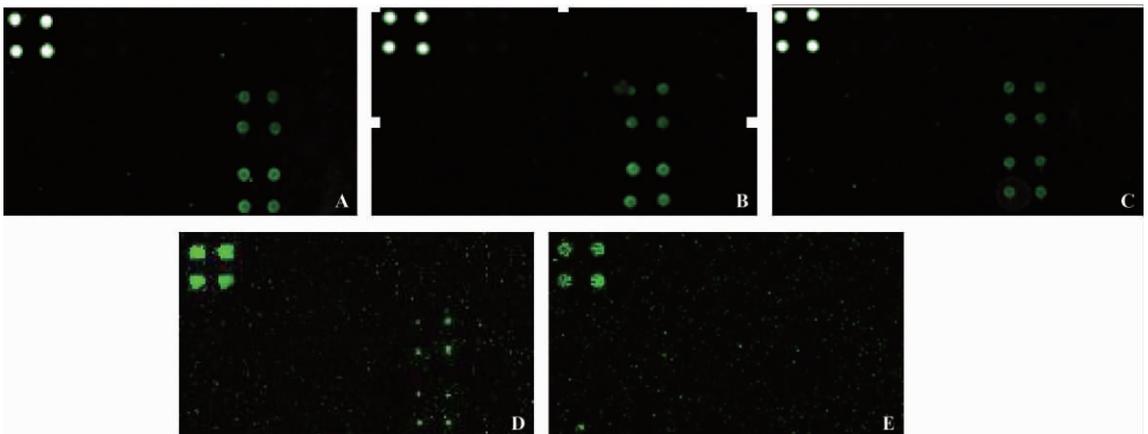


图 3. 不同浓度的荧光标记产物杂交结果

Figure 3. Hybridization results of fluorescence labeling products with different concentrations. A: the concentration of nucleic acid is 100 pg/μL; B: the concentration of nucleic acid is 10 pg/μL; C: the concentration of nucleic acid is 1 pg/μL; D: the concentration of nucleic acid is 0.1 pg/μL; E: the concentration of nucleic acid is 0.01 pg/μL.

### 2.2 基因芯片探针的重复性检验

用星状病毒的标准株对相同批次的芯片重复性进行检验, 结果表明同一批次的荧光强度具有很高的重复性, 每条探针 4 个重复点的应光强度值非常接近, 变异系数 (CV) 如表 2。

用星状病毒的标准株对不同批次的芯片重复性进行检验, 结果表明同一份样品用不同的芯片检测其荧光信号非常一致, 每条探针 4 个重复点的应光

强度值非常接近, 变异系数 (CV) 如表 3。

### 2.3 芯片探针的特异性检验

分别用 5 种肠道病毒的标准毒株对探针的特异性进行检验。杂交结果显示, 每种病毒的 PCR 扩增产物与阴性对照和其他 4 种病原体的探针均没有非特异的杂交点出现, 说明本研究所设计的探针具有良好的特异性, 可以用于各自病原体的特异检测 (如图 4 所示)。

表 2. 同一批次重复性检验的荧光强度

Table 2. The fluorescence intensity of the same batch repeatability test

group	fluorescence intensity				MEAN	SD	CV
A	8724.62	8644.58	8766.29	8603.53	8574.92	121.74	1.42%
	8654.37	8597.06	8659.11	8692.19			
B	8685.36	8742.91	8395.25	8576.27			
	8586.94	8622.48	8586.34	8726.54			
C	8436.24	8506.37	8467.69	8437.15			
	8397.68	8407.96	8424.33	8456.89			

表 3. 不同批次重复性检验的荧光强度

Table 3. The fluorescence intensity of the different batch repeatability test

group	fluorescence intensity				MEAN	SD	CV
A	7824.53	7909.65	7844.37	7793.21	7758.79	110.14	1.42%
	7956.11	7822.92	7863.36	7792.99			
B	7625.31	7654.42	7687.95	7703.94			
	7505.49	7700.25	7595.83	7698.19			
C	7856.23	7906.65	7839.46	7754.83			
	7682.57	7663.82	7742.60	7786.26			

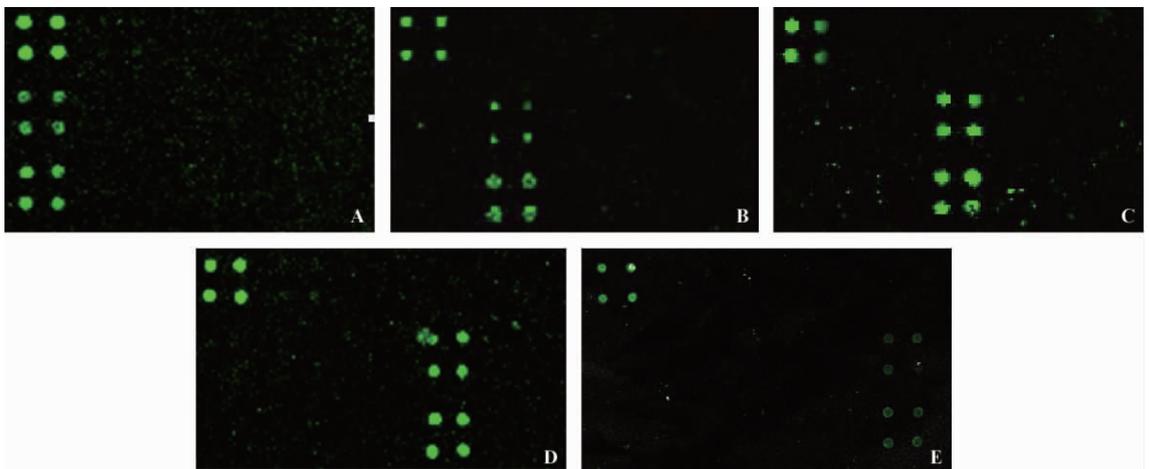


图 4. 5 种肠道病毒探针特异性检验结果

Figure 4. The probe specific test of five enteric viruses. A: Hybridization result of HAV; B: Hybridization result of RV; C: Hybridization result of NV; D: Hybridization result of AsV; E: Hybridization result of AdV.

## 2.4 基因芯片检测贝类样品

采用超滤浓缩法对贝类组织中的肠道病毒进行了回收,操作过程以 HAV 的 H<sub>2</sub> 疫苗株为阳性对照,通过 Real-time PCR 技术测定该方法对甲肝病毒的回收率达 62.7%。

利用寡核苷酸芯片法对采集的样本进行检测,162 份贝类样品中阳性检出率分别为:HAV 4.3% (7/162); RV 6.2% (10/162); NV 14.8% (24/162); AsV 5.6% (9/162); AdV 9.9% (16/162),检测过程中出现了某些样品同时被两种或多种肠道病毒感染现象,代表性图片如图 5 所示。

## 2.5 基因芯片和 PCR 方法检测 5 种肠道病毒的结果比较

用普通 PCR 方法对上述 162 份贝类样品进行检测,验证基因芯片技术的灵敏度和特异性,结果如表 4 所示。根据  $p$  大于 0.05 说明无统计学差异 (95% 的置信区间),Kappa 值大于 0.75 说明一致程度相当满意的标准,对基因芯片技术和 PCR 技术的检测结果进行了评价,结果如表 5 所示。基因芯片技术对 5 种肠道病毒的检测灵敏度在 87.5% - 100% 之间,特异度在 97.2% - 100% 之间,这两种方法无统计学差异,并且具有高度的一致性。

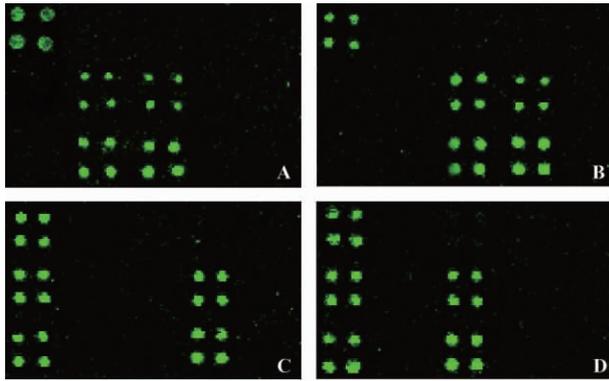


图 5. 同时感染两种肠道病毒的样品检测结果

Figure 5. Test results of samples infected by two kinds of enteric viruses. A: Sample 16 infected by RV and NV; B: Sample 22 infected by NV and AsV; C: Sample 37 infected by HAV and AsV; D: Sample 54 infected by HAV and NV.

表 4. 基因芯片和 PCR 方法对 162 份贝类样品的检测结果比较

Table 4. Results comparison between gene chip assay and PCR assay in the detection of 162 shellfish samples

virus	positive results of gene chip	positive results of PCR
HAV	7	8
RV	10	11
NV	24	20
AdV	9	9
AsV	16	15

### 2.6 全国不同省市贝类中主要肠道病毒的污染分布

对分布于全国沿海省市的主要海水养殖区贝类进行抽样检测,结果显示本研究选取的主要沿海省市贝类中均受到了肠道病毒污染,其中辽宁省的

表 5. 两种方法对贝类样品的检测结果评价

Table 5. Evaluation of two methods in the detection of shellfish samples

virus	gene chip	PCR		evaluation index			chi-square test	
		positive	negative	efficiency/%	specificity%	kappa value	$\chi^2$	P value
HAV	positive	7	0	87.5	100	0.93	0.07	0.79
	negative	1	154					
RV	positive	10	0	90.9	99.3	0.95	0.05	0.82
	negative	1	151					
NV	positive	20	4	100	97.2	0.89	0.42	0.51
	negative	0	138					
AdV	positive	9	0	100	100	1	0	1.00
	negative	0	153					
AsV	positive	15	1	100	99.3	0.96	0.04	0.85
	negative	0	146					

If Kappa value is greater than 0.75, the degree of consistent is quite satisfied; If the P value is greater than 0.05, there is no significant difference.

贝类同时受到了 5 种病毒的污染,但是经 SPSS 统计分析,不同省市之间的肠道病毒污染没有显著差异 ( $P > 0.5$ )。

### 2.7 不同贝类肠道病毒的污染状况

采集包括蛤蜊、蛭、牡蛎、贻贝、蚶和扇贝 6 种经济贝类进行基因芯片检测,不同贝类中肠道病毒阳性检出率如图 6 所示,其中牡蛎、蚶(毛蚶、泥蚶)和蛤蜊中 5 种肠道病毒均有检出,蛭中有 4 种,贻贝和扇贝中均有两种。采用 SPSS15.0 皮尔森卡方检验中的单因子变异数分析不同贝类之间的肠道病毒污染相关性,结果如表 6 所示,其中牡蛎组织内肠道病毒的污染与其他 5 种贝类差异均显著,蚶(毛蚶和泥蚶)与牡蛎、贻贝、扇贝的污染差异显著,而与蛤蜊和蛭的污染差异不显著。

## 3 讨论

本研究通过设计 70 mers 的长片段探针构建了 5 种肠道病毒平行检测的寡核苷酸芯片,该方法检测的敏感度达到 pg 级,可以有效地对含量少的人类致病性病原体进行检测。采集 162 份贝类样品同时进行基因芯片和 PCR 检测,结果显示虽然基因芯片技术灵敏度比 PCR 稍低 (87.5% - 100%),但是检测的特异性很高 (97.2% - 100%),这两种方法对 5 种肠道病毒的检测结果没有显著性差异 ( $p > 0.05$ ),具有很高的-一致性 (Kappa 值  $> 0.89$ )。由此可见,我们研制的芯片能对两种以上的病毒的平行检测,而且与 PCR 结果吻合,因此在海洋环境食品及海水的检测与监测中具有广阔的应用前景。

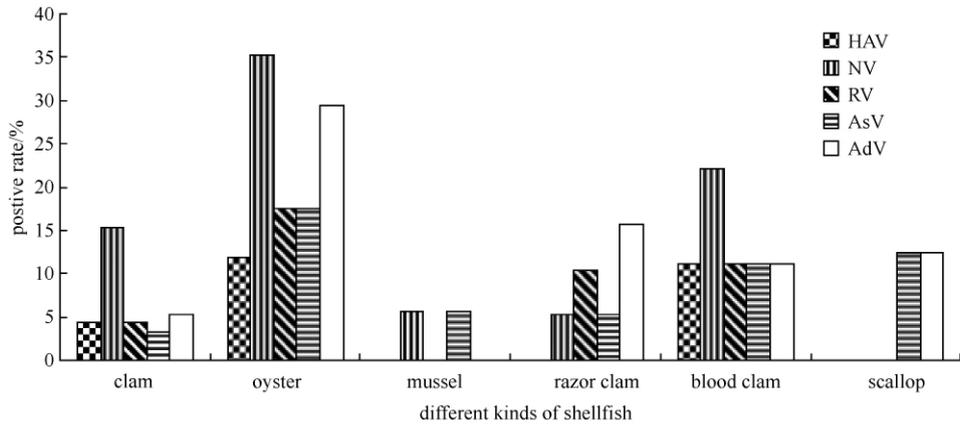


图 6. 6 种贝类中 5 种肠道病毒的阳性检出率

Figure 6. The positive detection results of enteric viruses in seven kinds of shellfish.

表 6. 不同贝类肠道病毒污染相关性

Table 6. Correlation between different kinds of shellfish polluted by enteric viruses

different kinds of shellfish	P value				
	oyster	mussel	razor clam	blood clam	scallop
clam (91 specimens)	0.001*	0.286	0.838	0.101	0.697
oyster (17 specimens)		0.000*	0.001*	0.032*	0.000*
mussel (18 specimens)			0.207	0.010*	0.493
razor clam (19 specimens)				0.147	0.553
blood clam (9 specimens)					0.046*

The confidence interval is 95%, \* presents a significant difference.

本研究首次在全国范围内主要沿海省市对多种经济贝类进行调查, 以期全面反映我国主要增养殖区经济贝类的肠道病毒污染现状。从北到南主要沿海省市都受到了肠道病毒不同程度的污染, 但是不同的省市之间差异并不显著。由此分析, 在中国, 经济贝类被肠道病毒污染可能是比较普遍的现象。然而, 贝类一旦被肠道病毒污染, 目前尚无有效方法将其完全去除<sup>[13]</sup>, 因此, 为保护公众健康, 进行贝类体内主要肠道病毒的监测是预防或减少相关疾病的有效措施, 尤其是在贝类收获季节。

由于不同贝类生活的地理环境、水文条件存在差异, 因此, 其携带病毒的能力也有所不同<sup>[14]</sup>。本研究检测的 6 种经济贝类中, 牡蛎受几种肠道病毒污染最为严重, 与其他几种贝类具有显著差异。研究显示, 牡蛎每小时可过滤多达 40 L 海水, 可以高度浓缩存在于周围海水中的病毒<sup>[1]</sup>, 除牡蛎外, 毛蚶和泥蚶携带病毒的能力也比较强, 这与国内外相关报道一致<sup>[1, 15-16]</sup>。养殖牡蛎一般位于近海港湾和潮间带, 属于浅海区域, 极易受到陆源排污的影响而污染肠道病毒。毛蚶生活于内湾浅海低潮线下至

水深十多米的泥砂底中, 尤喜于淡水流出的河口附近, 该生长区域通常靠近居民生活区, 极易受到生活污水的污染, 进而感染肠道病毒。虽然本研究中蛤蜊受到了所检 5 种肠道病毒的污染, 但是其携带病毒的能力与其他几种贝类并没有显著差异, 分析原因可能是蛤蜊一般栖息在潮间带中、下区以下的泥沙滩海底, 以干潮线以下产量最多, 相对来讲受到人类活动的影响较小。但是本研究选取的蛤蜊样本最多, 采样随机性较大, 因此被污染的几率也相对较高。

不同的肠道病毒在贝类中的污染分布也不尽相同。据报道, 诺如病毒是非细菌性胃肠炎的首要病原体, 世界上 50% 以上的胃肠炎暴发都由该病毒引起<sup>[17]</sup>, 其中海产品是重要的传播载体<sup>[18]</sup>。在本研究选取的 5 种肠道病毒中 NV 的污染居于首位(表 4), 其阳性检出率高于国内广东(10%)<sup>[14]</sup>和青岛地区(10.1%)<sup>[19]</sup>, 也高于国外瑞士(9.2%)<sup>[20]</sup>、日本(9.0%)<sup>[21]</sup>、挪威(6.8%)<sup>[22]</sup>报道的数据, 仅低于法国报道的 NV 的检出率(20.3%)<sup>[23]</sup>, 这说明全国增养殖区经济贝类中 NV 的污染状况较为严重。因

此, 监测贝类中的重要病原体—诺如病毒对保护公众健康具有重要的意义, 并且具有广泛的应用, 因为诺如病毒在所有与污水相关的国家都存在。

而在本研究中, 腺病毒的阳性检出率仅次于诺如病毒, 在人类病毒病原体中, 腺病毒是唯一一种 DNA 病毒, 是最耐热的病毒, 因此相对于其他肠道病毒来讲在环境中存活时间长<sup>[24]</sup>, 且腺病毒引发的疾病全年都有发生, 没有季节差异, 这也大大增加了贝类感染的机会。尽管前期研究表明 HAV 和 NV 是世界上食源性病毒两个最主要的病原体<sup>[15,25]</sup>, 但是在本研究中, HAV 阳性检出率并不高, 分析原因可能是甲肝病毒虽然全年均可暴发, 但在秋冬季和早春季更为流行<sup>[26]</sup>, 而我们的采样季节是在夏季, 因此其阳性检出率可能偏低。

综上所述可知, 在我国沿海省市的主要海水增殖区经济贝类体内肠道病毒污染是一种比较普遍的现象, 为保证食品卫生安全, 加强贝类的卫生监管是预防疾病的重要措施。

## 4 结论

本研究得到以下几点结论:

(1) 本研究设计了 70 mers 长的寡核苷酸探针芯片技术体系, 可以在一张玻片上同时对多种海洋环境肠道病原体的检测, 与 PCR 方法具有很高的一致性, 是一种值得在海洋环境监测中推广应用的高通量检测方法。

(2) 我国沿海省市主要贝类增殖区的经济贝类均受到了肠道病毒不同程度的污染, 其中以诺如病毒污染最为严重, 因此在今后的监测工作中应该重点关注。

(3) 选取的 6 种经济贝类中牡蛎中肠道病毒的阳性检出率最高 ( $P < 0.5$ ), 其次是毛蚶和泥蚶, 与前期的研究结果一致, 因此, 应重点加强这两种贝类中肠道病毒的监视监测。

**致谢:** 感谢国家疾病预防控制中心病毒学研究所段招军研究员对本研究阳性病毒株的提供。

## 参考文献

[1] Provost K, Dancho BA, Ozbay G, Anderson RS, Richards GP, Kingsley DH. Hemocytes are sites of

enteric virus persistence within oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (23) : 8360-8369.

- [2] Tang YW, Wang JX, Xu ZY, Guo YF, Qian WH, Xu JX. A serologically confirmed case-control study of a large outbreak of hepatitis A in China associated with consumption of clams. *Epidemiology and Infection*, 1991, 107 (3) : 651-658.
- [3] Bosch A, Sánchez G, Le Guyader F, Vanaclocha H, Haugarreau L, Pintó RM. Human enteric viruses in coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Science and Technology*, 2001, 43 (12) : 61-65.
- [4] Zhang K, Ding C, Zhang D. Isolation and biodiversity analysis of bacteria attached on the marine shellfish and selection of vibrios-antagonism bacteria. *Marine Sciences*, 2011, 35 (7) : 26-36. (in Chinese)  
张柯, 丁翠玲, 张栋. 海洋贝类附生细菌区系分析及弧菌拮抗菌的筛选. *海洋科学*, 2011, 35 (7) : 26-36.
- [5] Engel EA, Escobar PF, Rojas LA, Rivera PA, Fiore N, Valenzuela PD. A diagnostic oligonucleotide microarray for multianeous detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 2010, 163 (2) : 445-451.
- [6] Gu D, Sun H, Xu Y, Shi L, Huang T, Sun J, Mo Q. Technology of visualization gene chip in detection of intestinal infectious disease pathogens. *Chinese Frontier Health Quarantine*, 2009, 32 (5) : 317-323. (in Chinese)  
顾大勇, 孙虹, 徐云庆, 史蕾, 黄彤文, 孙杰, 莫秋华. 肠道传染病病原体可视化基因芯片检测技术的研究. *中国国境卫生检疫杂志*, 2009, 32 (5) : 317-323.
- [7] Wang LC, Pan CH, Severinghaus LL, Liu LY, Chen CT, Pu CE, Huang D, Lir JT, Chin SC, Cheng MC, Lee SH, Wang CH. Simultaneous detection and differentiation of Newcastle disease and avian influenza viruses using oligonucleotide microarrays. *Veterinary Microbiology*, 2008, 127 (3-4) : 217-226.
- [8] Engel EA, Escobar PF, Rojas LA, Rivera PA, Fiore N, Valenzuela PD. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. *Journal of Virology Methods*, 2010, 163 (2) : 445-451.
- [9] Chung IH, Yoo HS, Eah JY, Yoon HK, Jung JW, Hwang SY, Kim CB. A DNA microarray for identification of selected Korean birds based on mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences. *Molecular Cell*, 2010, 30 (4) : 295-301.
- [10] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV,

- Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Disease*, 2011, 17 (1): 7-15.
- [11] Vernacchio LMD, Vezina RM, Mitchell AA, Lesko SM, Plaut AG, Acheson DW. Diarrhea in American infants and young children in the community setting: Incidence, clinical presentation and Microbiology. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 2006, 25 (1): 2-7.
- [12] Yue L, Gao X, Pan J, Fan J, Han J, Huang H. Optimization of hybridization condition of 70 mer oligonucleotide probe microarrays for astrovirus detection. *Shandong Medicine*, 2009, 49 (11): 41-43. (in Chinese)  
岳龙涛, 高雪芹, 潘继红, 樊景凤, 韩金祥, 黄海南. 星状病毒 70mer 探针寡核苷酸芯片制备及杂交条件的优化. *山东医药*, 2009, 49(11): 41-43.
- [13] Jean J, Morales-Rayas R, Anoman MN, Lamhoujeb S. Inactivation of hepatitis A virus and norovirus surrogate in suspension and on food-contact surfaces using pulsed UV light (pulsed light inactivation of food-borne viruses). *Food Microbiology*, 2011, 8 (3): 568-572.
- [14] Ke D, Zhang Y. Survey on norovirus contamination of oysters cultured in Guangdong Province. *Chinese Journal of Disease Control and Prevention*, 2012, 16 (10): 881-884.  
柯丹枫, 张永慧. 广东养殖牡蛎的诺如病毒污染状况调查. *中华疾病控制杂志*, 2012, 16(10): 881-884.
- [15] Su L, Ma L, Xu Y, Xu J, Zhou D. Noroviruses pollution status of shellfish in the area of Shandong Peninsula and preliminary identification of virus. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2010, 26 (5): 451-454. (in Chinese)  
苏来金, 马丽萍, 徐仰丽, 徐静, 周德庆. 山东半岛地区贝类中诺如病毒污染状况与病毒鉴定初报. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(5): 451-454.
- [16] Nappier SP, Graczyk TK, Schwab KJ. Bioaccumulation, retention and depuration of enteric viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (22): 6825-6831.
- [17] Suffredini E, Pepe T, Ventrone I, Croci L. Norovirus detection in shellfish using two real-time RT-PCR methods. *New Microbiologica*, 2011, 34 (1): 9-16.
- [18] Yuan Q, Wang C, Li H, Deng X. The research on the progress of norovirus virus detection method in shellfish. *South China Journal of Preventive Medicine*, 2012, 38 (5): 30-33. (in Chinese)  
袁巧, 王晨, 李晖, 邓小玲. 贝类中诺如病毒检测方法的研究进展. *华南预防医学*, 2012, 38(5): 30-33.
- [19] Liu S, Li Z, Zhou D. Epidemic of noroviruses in bivalves in Qingdao. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30 (1): 61-66. (in Chinese)  
柳淑芳, 李振, 周德庆. 青岛地区贝类产品中诺如病毒的感染和流行初探. *渔业科学进展*, 2009, 30(1): 61-66.
- [20] Beuret C, Baumgartner A, Schluep J. Viruscontaminated oysters: A three month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (4): 2292-2297.
- [21] Nishida T, Kimura H, Saitoh M, Kato M, Fukuda S, Munemura T, Mikami T, Kawamoto A, Akiyama M, Kato Y, Nishi K, Kozawa K, Nishio O. Detection, quantitation and phylogenetic analysis of Noroviruses in Japanese oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (10): 5782-5786.
- [22] Myrnel M, Berg EMM, Rimstad E, Grinde B. Detection of enteric viruses in bivalves from the Norwegian coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (5): 2678-2684.
- [23] Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods*, 2005, 123 (1): 1-7.
- [24] Page MA, Shisler JL, Mariñas BJ. Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. *Water Research*, 2009, 43 (11): 2916-2926.
- [25] Baker K, Morris J, McCarthy N, Saldana L, Lowther J, Collinson A, Young M. An outbreak of norovirus infection linked to oyster consumption at a UK restaurant. *Journal of Public Health*, 2010, 33 (2): 205-211.
- [26] Wang L, Lin S, Li J, Zhao W. The investigation on the pollution of HAV in shellfish along the coast of Lianyungang. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2000, 12 (3): 33-34. (in Chinese)  
王理兴, 林书红, 李家富, 赵文彬. 连云港海域贝类 HAV 污染状况调查. *中国食品卫生杂志*, 2000, 12(3): 33-34.

# Contamination of typical human enteric viruses in economic shellfish along the Chinese coast

Hongxia Ming<sup>1</sup>, Jingfeng Fan<sup>1\*</sup>, Lijun Wu<sup>1,2</sup>, Longtao Yue<sup>3</sup>, Xueqin Gao<sup>3</sup>, Yubo Liang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, Liaoning Province, China

<sup>2</sup>Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan 116023, Hubei Province, China

<sup>3</sup>Shandong Medicinal and Biotechnological Center, Key Laboratory for Biotech-drugs of the Ministry of Health, Jinan 250062, Shandong Province, China

**Abstract:** [Objective] The objective of this study is to understand the contamination of human enteric viruses in economic shellfish along the Chinese coast, an important issue of ensuring the seafood safety. [Methods] We established the specific, sensitive and high-throughput gene chip technology, to investigate the contamination of economic shellfish by enteric viruses across a large geographical region of China. [Results] The percentage of positive samples for each virus was as follows: Hepatitis A Virus 4.3%, norovirus 14.8%, rotavirus 6.2%, astrovirus 5.6%, and adenovirus 9.9%. In these five viruses, norovirus was contaminated in the first place. The results detected by gene chip were highly consistent with that of polymerase chain reaction (PCR). The economic shellfishes in shellfish-growing areas along the coastal cities were all contaminated with enteric viruses at different levels. However, there was no significant correlation between any two cities. In the selected 6 economic shellfishes, oyster had the highest positive rate of enteric viruses, followed by blood clam. [Conclusion] The contamination of shellfish with human enteric viruses was common across the main coastal cities of China, indicating a potential public health threat from seafood.

**Keywords:** gene chip, human enteric viruses, coastal economic shellfish

(本文责编:王晋芳)

---

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2006AA09Z162, 2006AA09Z170), by the National Key Scientific and Technological Project (908-01-ZH3), by the Marine Public Benefit Research Foundation (201105007) and by the State Bureau of Oceanic Administration Ecological Environment in Offshore Area Key Laboratory Open Foundation (201201)

\* Corresponding author. Tel: +86-43124110186; Fax: +86-411-84782602; E-mail: jffan@nmemc.gov.cn

Received: 18 April 2013 / Revised: 29 July 2013