



贝类中人源诺如病毒污染净化技术研究进展

杨家乐^{1,2} 薛亮^{*1} 蔡伟程¹ 别小妹² 张菊梅¹ 吴清平^{*1}

1 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省微生物安全与健康重点实验室
广东 广州 510070

2 南京农业大学食品科技学院 江苏 南京 210095

摘要: 人源诺如病毒是全球引起人急性胃肠炎的食物源性病原体之一。牡蛎、贻贝等贝类消化腺组织中含有诺如病毒受体类似物,可从污染水体中富集高浓度病毒,因此,生食或食用加工不当的受污染贝类极易造成诺如病毒感染。污染贝类的净化处理技术已成为诺如病毒防控领域中的研究热点,例如消杀试剂、臭氧处理工艺、新型非热消杀技术以及最近报道的具有抗病毒作用的益生菌等。诺如病毒活性检测对确定贝类中的病毒污染水平和评价消杀技术效果有重要作用,只有完整和具有感染力的病毒才会对人体健康造成威胁。因此,本文在前期工作基础上,进一步对诺如病毒活性鉴定方法、贝类产品消杀技术以及贝类养殖净化工艺等研究进展进行综述,以期完善食源性病毒防控技术提供参考。

关键词: 诺如病毒, 贝类, 活性检测, 净化技术

Research progress on elimination technologies of human norovirus contamination in shellfish

YANG Jiale^{1,2} XUE Liang^{*1} CAI Weicheng¹ BIE Xiaomei² ZHANG Jumei¹
WU Qingping^{*1}

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510070, China

2 College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

Abstract: Human norovirus is one of foodborne pathogens that causes acute gastroenteritis in human beings around the world. The digestive glands of oysters, mussel and other shellfish have the norovirus

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFC1602500); Natural Science Foundations of Guangdong Province for Distinguished Young Scholars (2019B151502065); Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province (2019B020209001); GDAS's Project of Science and Technology Development (2020GDASYL-20200104008)

***Corresponding authors:** XUE Liang: Tel: 86-20-87680942; E-mail: xueliang@gdim.cn
WU Qingping: Tel: 86-20-87688132; E-mail: wuqp203@163.com

Received: 10-03-2021; **Accepted:** 13-05-2021; **Published online:** 07-06-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1602500); 广东省自然科学基金杰出青年基金(2019B151502065); 广东省重点领域研发计划(2019B020209001); 广东省科学院发展专项资金项目(2020GDASYL-20200104008)

***通信作者:** 薛亮: Tel: 020-87680942; E-mail: xueliang@gdim.cn

吴清平: Tel: 020-87688132; E-mail: wuqp203@163.com

收稿日期: 2021-03-10; **接受日期:** 2021-05-13; **网络首发日期:** 2021-06-07

receptor analogue, which can accumulate high concentration of virus from the contaminated water. Eating raw or improperly processed shellfish which are contaminated become a major reason for the norovirus infection. The elimination technologies of contaminated shellfish have become a research hotspot in the field of norovirus prevention and control, including the methods of disinfectant, ozone processing, ultraviolet radiation, and probiotics with antiviral effect that recently reported. Infectivity detection of norovirus plays an important role in determining the level of virus contamination in shellfish and evaluating the efficacy of elimination technology. Only complete, infectious virus would threaten human health. In this study, the current researches on detection of norovirus infectivity, product disinfection technology, and elimination technology of shellfish culturing are reviewed, hoping to provide a reference for improving the control technology of foodborne virus.

Keywords: norovirus, shellfish, infectivity detection, elimination technology

诺如病毒(Norovirus, NoV)是在全球范围内引起人急性胃肠炎的病原体之一,导致了近一半食源性腹泻疫情的暴发^[1]。该病毒主要通过粪口途径传播,传染源除了感染者和隐性病毒携带者外,还包括受污染的水、果蔬和贝类等食物^[2]。对中国山东省2个牡蛎养殖区为期一年的监测发现,冬季是诺如病毒污染牡蛎的高发期^[3]。牡蛎等贝类属于滤食性动物,能够富集养殖水域中的诺如病毒等危害因子,浓度可达到周围水体的近百倍^[4]。同时诺如病毒引起人体急性胃肠炎所需的感染剂量极低^[5]。诺如病毒之所以能够在贝类体内富集并难以除去,主要原因是在贝类的消化组织中存在组织血型抗原(Histo-Blood Group Antigens, HGBAs)类似的物质,该物质在病毒与贝类组织结合过程中发挥重要作用。因此,食用加工不当的受诺如病毒污染贝类极易对人体健康造成危害,尤其在有生食牡蛎饮食习惯的沿海地区,风险更为显著。

全球每年均有关于因食用受污染贝类而引起诺如病毒感染的报道,在加拿大^[6]、法国^[7]、韩国^[8]、日本^[9]等多个国家的消费者在食用被污染的牡蛎后,都出现了大面积感染诺如病毒的情况。我国是诺如病毒流行的主要地区之一,我们课题组长期致力于食源性诺如病毒的“人—环—食”传播规律以及危害进化机制研究,不但证实了诺如病毒已成为造成当地急性胃肠炎的重要病原,也发现多个新型流行株(GII.4 New Orleans 2009、GII.4 Sydney 2012 和 Kawasaki 2014 等)^[10],而且在城市水源以

及市售牡蛎中也普遍存在着诺如病毒的污染^[11],因此,建立牡蛎等贝类中有害物质的高效净化处理方法,对于保障食品安全与民众健康具有重要意义。

贝类中诺如病毒检测主要使用实时荧光定量RT-PCR (Realtime Fluorescence Quantitative RT-PCR)方法,该方法灵敏度高、特异性检测效果好,但不能区分感染性病毒和非感染性病毒,无法准确评估贝类产品中的病毒污染情况。活性检测不仅有利于减少检测中的假阳性结果,还可以更好地评估消杀工艺的效果。目前研究较多的是使用核酸交联剂抑制非感染性病毒的扩增。

贝类产品中诺如病毒的净化方式主要包括了物理净化法和化学净化法,其中贝类暂养过程中主要采用抗菌剂、臭氧处理和紫外线照射等工艺,而在加工过程中还会采用新型的非热消杀方法,例如电子束辐照、脉冲电场和高静水压等技术。近年来,研究人员注意到某些益生菌对诺如病毒具有较好的抗性。本文主要综述近年来在诺如病毒活性鉴定、贝类产品消杀技术以及贝类养殖净化工艺等领域的最新进展,并展望未来的研究方向以及实际应用的前景。

1 诺如病毒活性检测技术

检测技术是开展诺如病毒研究的基础。实时荧光 RT-PCR 方法已成为诺如病毒检测的金标准,但该方法不仅会扩增完整病毒的基因组,而且一些由于衣壳受损而丧失感染性的病毒以及裸露游离的

病毒基因组也会被检出^[12], 因此无法区分感染性和非感染性的诺如病毒, 导致高估感染性病毒的含量, 不能准确评估病毒污染的危害。目前主要发展了4种诺如病毒的活性检测方法, 包括核酸交联剂偶联 RT-qPCR 方法、受体结合捕获法、抗体结合法和 RNase 处理法(图 1)。

1.1 核酸交联剂联合 PCR 法

核酸交联剂是指一类具有光亲和标记特性的荧光核酸染料, 常用的核酸交联剂包括叠氮溴化乙锭(Ethidium Monoazide, EMA)、叠氮溴化丙锭(Propidium Monoazide, PMA)、顺铂(Cis-Dichlorodiammineplatinum, CDDP)等^[13]。经光分解后, 荧光核酸染料能选择性地透过受损的细胞膜或病毒衣壳, 共价结合到细胞核酸上并抑制其在 PCR 中扩增, 从而实现死病毒和活病毒的区分。Randazzo 等^[14]通过在人源诺如病毒(Human Norovirus, HuNoV)悬浮液中分别加入

EMA、PMA、PMAxx (在 PMA 基础上改进的一种核酸染料), 经光激活后用 RT-qPCR 扩增, 结果显示, 使用核酸染料后感染性病毒可以特异性扩增, 而游离的病毒 RNA、衣壳受损的病毒并未扩增; GI 型诺如病毒滴度在 3 种染料处理后都有降低, 相比于使用 EMA 处理, PMA 以及 PMAxx 处理效果更好; GII 型诺如病毒经 PMAxx 处理后其滴度降低比其他 2 种染料更加明显, 但任意 2 种染料联合使用均不能增强鉴别病毒感染性和非感染性的效果。在贝类产品中, 由于样品基质较为复杂, 蛋白质和脂肪等物质会影响病毒从组织中的释放以及后续的富集。Razafigmahefa 等^[15]使用鼠诺如病毒(Murine Norovirus, MNV)作为 HuNoV 的替代物, 比较了 2 种富集方法对 PMAxx 处理评价热灭活病毒和紫外线灭活病毒传染性的效果, 结果证明使用 PMAxx 联合 RT-qPCR 法可以较为准确地评估病毒的感染性。Sarmiento 等^[16]利用该方法对

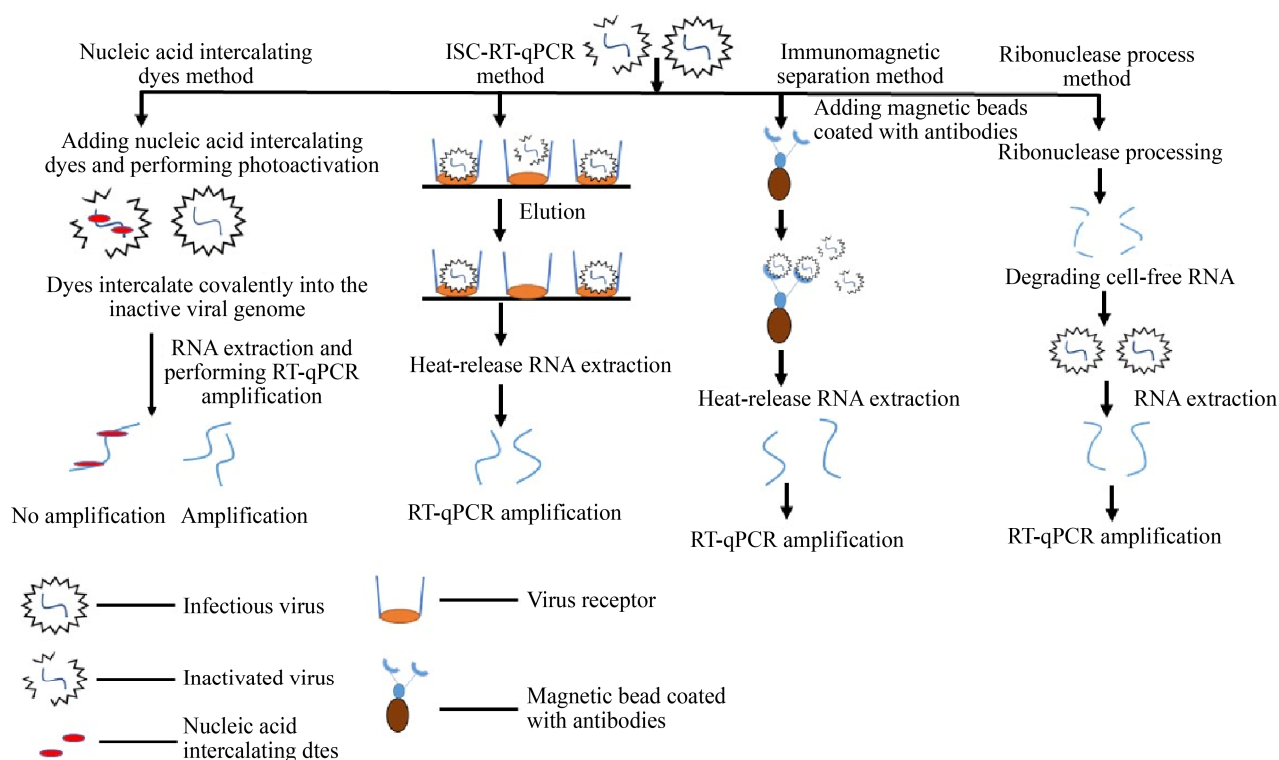


图 1 4 种诺如病毒活性检测方法

Figure 1 Four detection methods of norovirus infectivity

77 份受污染的贝类产品进行检测,发现在阳性样本中经 PMAxx 处理的样品与未经处理的样品相比,诺如病毒浓度降低了 3 个数量级,因此可以认为检测到的病毒均为完整且具有感染能力的病毒。

此外,Canh 等^[17]建立了一种 Sodium Deoxycholate-Cis-Dichlorodiammineplatinum-Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (SD-CDDP-RT-qPCR)的检测新方法,通过使用脱氧胆酸钠(SD)预处理,增强了 3 种活性标记物(EMA、PMA 和 CDDP)效果,SD-CDDP-RT-qPCR 法相比其他核酸交联检测方法,在检测灭活的 Aichi 病毒时最为明显,不存在假阳性 RT-qPCR 信号,因此可以用于评估饮用水中感染性病毒颗粒的存在。

1.2 基于受体结合和抗原抗体结合的检测方法

原位捕获反转录实时定量 PCR (*in situ* Capture Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, ISC-RT-qPCR) 是 RT-qPCR 衍生技术的主要代表,该方法是基于病毒受体或类受体捕获病毒的原理,即以诺如病毒受体 HBGAs 为介质特异性吸附病毒颗粒,待热裂解释放核酸后,再对病毒核酸进行检测,从而达到区分感染性和非感染性诺如病毒的目的。周震寰等^[18]研究发现,ISC-RT-qPCR 与传统的 RT-PCR 进行比较,在对 40 份样品的检测中,ISC-RT-qPCR 的检出率为 22.5%,减少了非感染性病毒的样本数,而且这种方法能够批量操作,还无需提取病毒的核酸,成本较低,有广阔的市场前景。此外,还有报道采用了猪胃黏蛋白(Porcine Gastric Mucin, PGM)法检测热处理失活的人源诺如病毒(GI.1 和 GI.4)^[19],其活性检出量由加热失活的病毒与猪胃黏蛋白偶联磁珠的结合率决定。

抗体捕获也常被用于鉴定感染性和非感染性病毒,主要是借助磁性微球作为固相载体,免疫磁珠法就是将带有特异性抗体的免疫磁珠加到待测样品中,相应的病毒颗粒就会和免疫磁珠上的抗体发生特异性结合,形成病毒颗粒-抗体-磁珠免疫复

合物。通过外加磁场的作用,复合物与其他非抗原物质分离,从而能够得到完整且具有感染性的病毒颗粒^[20],并在随后的 PCR 扩增过程中检测到。

1.3 其他方法

除了上述 3 种活性检测方法外,还可以在 RT-qPCR 之前进行酶处理,原理是病毒衣壳的破损导致病毒 RNA 的释放,而 RNA 酶可以降解病毒 RNA,阻止其随后的扩增,这是基于检测衣壳完整性的一种方法^[21]。此外,还有基于病毒基因组完整性的检测方法,长距离 PCR (Long-Distance PCR, LD-PCR)技术可以合成大约 7.56 kb 的扩增子,几乎包括诺如病毒的整个基因组,从而可以确定近完整的基因组序列^[22]。Chan 等^[23]通过开发的人肠道(Human Intestinal Enteroids, HIE)培养系统(含有多重肠上皮细胞类型的培养物)检测诺如病毒的感染性,在实时荧光定量 RT-PCR 检测中 C_t 值小于 30 的诺如病毒样品能在 HIE 中产生高效的病毒复制,证明其中存在感染性病毒。然而由于其复杂性、高成本和耗时长,这种方法不适合常规食品检测。

在诺如病毒的活性检测方法中,每种方法的原理各不相同,评价的标准也不一致。在不同的检测条件下选取合适的检测方法是关键,因此,建立一种操作方便、步骤简单、效果相对准确的方法是当前贝类产品检测的当务之急。目前利用核酸交联剂结合 PCR 扩增的研究较多,选择适合的核酸染料并进行适当的预处理可以增加其与破损病毒的 RNA 结合的效率。活性检测不仅有利于减少检测中的假阳性结果,也可科学评估消杀、净化效果提供技术支撑。

2 贝类中诺如病毒的灭活方法

食源性病毒灭活主要通过破坏衣壳蛋白或破坏核酸来实现。诺如病毒等肠道病毒的衣壳不但保护病毒免受环境中不利因素的影响,如极端的 pH 值、高温和紫外线,而且可以附着在宿主细胞受体上,使病毒进入宿主细胞,因此衣壳的构象变化会影响病毒的稳定性或病毒与宿主细胞上受体的结

合,主要体现在对病毒抗原位点和受体结合位点的干扰^[24],而病毒颗粒中核酸的损伤则会阻止宿主细胞的复制^[25]。表 1 总结了常见的贝类产品中诺如病毒的灭活方法。

2.1 传统消杀病毒方法

传统的消毒方法主要使用含氯消毒剂、加热处理、臭氧和紫外线照射等,在灭活病毒方面有较好效果。二氧化氯是代表性的氯消毒剂,通常是将其加入到暂养所用海水中,二氧化氯的强氧化性能够破坏诺如病毒的衣壳蛋白,使病毒 RNA 水解,从而阻止其感染宿主。氯消毒的有效性在很大程度上取决于有机负荷,因此养殖环境中氯的含量对病毒净化效果至关重要^[31]。研究表明,在海水中游离氯浓度 2.5 mg/L 的条件下需要长时间的接触才能显著降低病毒含量^[32]。氯还可以与其他物质协同作用,增强消毒效果^[33]。加热是最简单、有效的病毒消杀方式之一,高温使衣壳蛋白的结构发生变化。对人工接种诺如病毒的牡蛎在高于 60 °C 温度下加热处理约 5 min 后,病毒拷贝数降低 2-3 个数

量级,并且随着时间的增加,病毒感染力持续下降^[34]。其他食品或者水体均可以通过加热灭活病毒,而加热处理易使生食或微加工食品(如贝类等)特有的风味口感发生变化^[35]。此外,臭氧在水中分解产生的过氧化氢、羟基和超氧化物自由基等可破坏病毒衣壳蛋白,从而阻断病毒对宿主细胞的吸附以及病毒的复制等,但臭氧的稳定性容易受到温度、pH 值和有机物存在等因素的影响,随着环境温度上升,臭氧在水中加速分解,其溶解度也降低^[36];水的纯度会影响臭氧的溶解,水中的有机物越多,消耗的臭氧就越多,从而减弱消杀效果;臭氧稳定性随着水体 pH 值的降低而增加,水体 pH 值偏高时,羟基离子的催化活性可能会造成臭氧的分解^[37],从而影响消杀效果。紫外线是一种简单、可靠、经济的处理方法,其通过杀灭贝类所处水中的诺如病毒以达到净化作用。然而紫外线对贝类体内病毒的去除收效甚微^[38]。此外,紫外线还可以与其他净化方法结合,对贝类体内的大肠杆菌有较好的清除效果^[39]。

表 1 贝类产品中诺如病毒灭活方法评价

Table 1 Evaluation of inactivation technologies of norovirus in shellfish product

方法 Methods	机理 Inactivation mechanism	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	病毒类型 Type of virus	病毒减少量 Reduction of virus	参考文献 References
Chlorine	Denaturing the capsid proteins and RNA	Cheap and convenient	Formation of toxic chlorine gas	GI.1/GII.4	GI.1: 4.84 Log ₁₀ GII.4: 3.74 Log ₁₀	Liu et al ^[26]
Ozone	Altering the capsid structure and damaging the viral capsid proteins	No effect on water	Affected by temperature, pH and organic substances	MNV-1 and TV	4.1 Log ₁₀	Predmore et al ^[27]
Heating	Destroying virus capsid protein	Simple and efficient	Changing sensory quality of food	HuNoVs (GI, GII)	GI: 2.96 Log ₁₀ GII: 2.56 Log ₁₀	Fuentes et al ^[28]
UV light	Affecting capsid protein and genome	Easy to operate	The turbidity, color and soluble iron salt of water affect the purification	MNV-1	2.9 Log ₁₀	Kim et al ^[29]
High hydrostatic pressure	Causing the separation and denaturation of capsid protein	Keeping the original flavor of shellfish	Other ingredients in shellfish protect the virus	GI.1	4 Log ₁₀	Ye et al ^[30]

2.2 新型非热消杀病毒方法

新型非热消杀技术近年来广泛应用于食品中微生物的消杀, 主要包括高能电子束辐照、高静水压处理技术等。Kim 等^[40]在采用电子束辐照技术杀灭生鲍鱼中鼠诺如病毒时发现, 随着电子束辐照剂量的逐步增大, 样品中病毒的活性明显降低, 当辐照剂量大于 5 kGy 时能够杀灭内脏中 90% 以上的病毒。然而目前电子束辐照处理成本较高, 并且经过处理的食物还需要更多的数据来证明其安全性。另外一种脉冲电场(Pulsed Electric Fields, PEF)加工技术是利用短时间的电脉冲来灭活微生物, 对食品质量造成的影响较小, 但这种处理方法对食品中的细菌有较好的杀灭作用, 对病毒的效果并不理想。这主要是因为脉冲电场在灭活细菌时能够在细胞膜上形成空隙, 从而导致胞内物质的损失, 却几乎无法破坏病毒的蛋白外壳^[41]。高静水压(High Hydrostatic Pressure, HHP)处理也被开发用于控制食品中的病毒污染^[42]。Sido 等^[43]用鼠诺如病毒当做替代病毒研究高静水压对人源诺如病毒的消杀效果时发现, 高静水压可以破坏宿主细胞中病毒的受体, 达到净化病毒的目的。Takahashi 等^[44]研究证明, 在 25 °C、400 MPa 条件下处理 5 min, 可有效杀灭牡蛎中的人源诺如病毒(GII.4 型)。

2.3 益生菌抗病毒方法

益生菌可以通过产生溶菌酶、蛋白酶、过氧化氢及有机酸等多种具有抗菌活性的物质^[45], 从而起到杀毒、抑毒以及防止病原扩散的作用。近年来, 益生菌已成为建立新型消杀病毒工艺以及挖掘抗病毒活性物质的重要资源。Kwak 等^[46]研究了植物乳杆菌 LBP-K10 (*Lactobacillus plantarum* LBP-K10) 产生抗菌性质的环二肽(Antimicrobial Cyclic Dipeptides, CDPs)及其抑菌机理及效果, 并证明 CDPs 对甲型流感病毒具有较强的抗性; Welch 等^[47]发现乳酸杆菌(*Lactobacillus*)和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*)分泌的抑菌物质月桂酸单甘油酯能够有效抑制有包膜的病毒如

人类免疫缺陷病毒 1 型感染正常细胞。Fajardo 等^[48]从紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)中分离出的一株编号为 3M21 的细菌, 鉴定后确定为海氏肠球菌(*Enterococcus hirae*), 这株细菌显示出对单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、粪肠球菌(*E. faecalis*)以及鼠诺如病毒很强的抗性, 但目前还没有研究证明其能够在贝类自净化或其他采收后处理期间降低贝类产品中诺如病毒的含量。

在水产养殖中使用的微胶囊往往包含了有利于贝类产品生长的物质, 如免疫刺激剂、纤维素酶、木聚糖酶等^[49]。Darmody 等^[50]通过实验证明了微胶囊能够被牡蛎摄取并将其中包埋的物质释放到不同的组织部位, 这为将来利用抗诺如病毒的益生菌净化牡蛎中的诺如病毒提供了一个方向, 即将益生菌包埋在微胶囊中, 通过贝类吸收富集而起到净化病毒的效果。在接下来的研究中, 可以从益生菌种库中筛选出具有抗病毒活性的资源, 并利用益生菌具有抗病毒的特点, 筛选出其中对诺如病毒有抗性的菌株, 并对其抑制机理进行深入研究, 以期提高贝类中诺如病毒的净化效果。

根据灭活技术、灭活机理和毒株的不同, 诺如病毒对不同处理技术灭活的敏感性也不尽相同, 消杀技术在不同的食物基质中对病毒的影响还需要进一步研究。传统的消杀方法操作简便、成本较低, 虽然对大肠杆菌、沙门氏菌等常见病原菌有较好的杀灭效果, 但对贝类体内诺如病毒的消杀效果并不理想。新型非热消杀方法对食品的品质影响较小, 病毒的杀灭效果也较传统的消杀方法更好, 但一次性处理的食物数量有限且成本高, 实际应用存在困难。益生菌抗病毒活性的消杀方法对环境影响小, 并且不会对贝类的品质产生不良影响, 适合大量产品的消杀, 该方法具有较好的应用潜力。

3 贝类暂养中诺如病毒的净化方法

目前贝类净化技术主要有自然净水区暂养净化处理和工厂化暂养净化处理。自然净化是将已受污染的贝类运至清洁无污染的海区进行暂养, 直至

其体内的病原微生物数量低于卫生标准为止,然后重新收获并上市销售。欧美国家在贝类暂养净化方面都有完备的规章制度,对贝类养殖区的水体划分等级,来自低等级养殖区的贝类必须按照相应措施进行净化,在整个净化过程中贝类必须自始至终暂养在洁净的海水中,需要较长时间才能降低贝类组织中的病毒含量^[51]。此外,净化装置的一些参数如温度、pH、盐度、水流速度等都会对净化效果产生影响^[52]。

在工厂化暂养净化处理中,基本上是用臭氧、二氧化氯、紫外线方法对海水进行单独或联合处理^[53]。臭氧在杀灭海水中的革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌方面有较好的效果,但在杀灭病毒方面得到的结果并不理想;用二氧化氯作为消毒液处理牡蛎往往会有残留问题和潜在的化学毒性^[54];紫外线消毒受水体的浑浊度、颜色和可溶性铁盐等因素的影响较大^[55]。在使用鼠诺如病毒和腺病毒建立对肠道病毒模型生物蓄积的动态过程中发现,在使用紫外线净化时,腺病毒被完全净化,但鼠诺如病毒仍然能被检测到,推测可能是由于这种病毒与牡蛎组织相互作用的作用较强^[56]。近几年兴起的生物方法在控制诺如病毒方面取得了一定进展,利用天然产物研发消毒剂是生物消杀方式研究的新趋势。从植物中提取获得的原花青素等活性物质被证明对控制诺如病毒具有一定的效果^[57],但关于这些活性物质直接作用于食品的抗诺如病毒作用的研究并不多,使用这些天然提取物对食品(如新鲜农产品和贝类)进行净化处理需要进一步的研究才能评估其效果。

在贝类养殖过程中对诺如病毒进行消杀有助于控制其在贝类体内的蓄积,在洁净的海水环境可以促进贝类的净化进程,提高净化效率。养殖过程中用到的净化方法大多数是上述传统的消杀方法,因为这些方法针对水体中的病毒,减少了贝类富集病毒的可能,从源头控制了病毒污染贝类产品。

4 展望

贝类产品中病毒的活性检测是有效评估净化技术的前提。目前国际上对食品中诺如病毒的检测采用实时荧光定量 RT-PCR 法,但这种方法不能确定检测出的病毒是否具有感染性,因而不能准确判定牡蛎中具有感染能力的病毒数量,从而对贝类中诺如病毒的净化以及制定相关检测标准造成了一定困难。针对这一问题,研究人员可提取牡蛎组织中的病毒后进行富集,使用核酸交联剂处理富集液,或者在前处理阶段用免疫磁珠对感染性病毒进行富集,尽可能除去已经不具备活性的病毒,然而在现行的检测标准中没有能够区分死病毒与活病毒的检测方法,可在检测环节中加入区分的步骤,建立较为完备的食品中诺如病毒活性检测方法。

在贝类净化标准中,主要是对重金属、贝类毒素、大肠杆菌等有害因素进行严格控制,但诺如病毒污染贝类产品情况存在较普遍,通常在贝类产品上市前会进行一段时间的暂养净化,从产地收获的贝类放在洁净水域中并用紫外线或者消毒剂氯对水体进行持续消毒,这种处理方式可以在一定程度上降低贝类中的病毒含量。整个过程操作简单,花费的成本较低,因此生产中普遍使用这类方法,但此类方法并不能保证完全将病毒除去或使贝类体内的病毒降低至可接受水平,一旦污染水平超过暂养净化的能力,消费者在食用净化不彻底的贝类食品时存在感染病毒的风险。另外,贝类产品在食用前经过非热处理工艺如高静水压、电子束辐照技术等可有效去除食源性诺如病毒且对产品品质影响较小,但由于成本较高,在实际生产中一般不适用。因此,建立贝类产品中高效的诺如病毒净化工艺和技术标准对保障贝类产品贸易以及疾病暴发溯源等有重要意义。很多研究也证明诺如病毒在贝类产品尤其是牡蛎中易富集却难去除,对牡蛎及其所处的水体环境采取有效的净化是防止诺如病毒感染的关键控制措施。在水产养殖中,益生菌不仅可以作为饲料添加剂有助于贝类生长,而且某些特定益

生菌株可能对人源诺如病毒有较好的抗性,未来将进一步探究其潜力,以推动益生菌在水产养殖中的实际应用。

REFERENCES

- [1] Noda M. Current status of *Norovirus* food poisoning related to bivalve mollusk and its control measures[J]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 2017, 58(1): 12-25
- [2] La Rosa G, Della Libera S, Iaconelli M, Proroga YTR, De Medici D, Martella V, Suffredini E. Detection of *Norovirus* GII.17 Kawasaki 2014 in shellfish, marine water and underwater sewage discharges in Italy[J]. *Food and Environmental Virology*, 2017, 9(3): 326-333
- [3] Zhang HN, Liu DL, Zhang ZL, Hewitt J, Li XP, Hou PB, Wang DP, Wu QP. Surveillance of human *Norovirus* in oysters collected from production area in Shandong Province, China during 2017-2018[J]. *Food Control*, 2021, 121: 107649
- [4] Brake F, Kiermeier A, Ross T, Holds G, Landinez L, McLeod C. Spatial and temporal distribution of *Norovirus* and *E. coli* in Sydney rock oysters following a sewage overflow into an estuary[J]. *Food and Environmental Virology*, 2018, 10(1): 7-15
- [5] Lü SL. Research progress of *Norovirus* enrichment methods in food and water samples[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2016, 26(10): 1518-1520 (in Chinese)
吕素玲. 食品及水样中诺如病毒富集方法的研究进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(10): 1518-1520
- [6] Meghna K, Hasselback P, McCormick R, Prystajec N, Taylor M, McIntyre L, Man S, Whitfield Y, Warshawsky B, McKinley M, et al. Outbreaks of *Norovirus* and acute gastroenteritis associated with British Columbia oysters, 2016-2017[J]. *Food and Environmental Virology*, 2019, 11(2): 138-148
- [7] Mennec C, Parnaudeau S, Rumebe M, Saux JC, Piquet JC, Guyader SF. Follow-up of *Norovirus* contamination in an oyster production area linked to repeated outbreaks[J]. *Food and Environmental Virology*, 2017, 9(1): 54-61
- [8] Cho HG, Lee SG, Lee MY, Hur ES, Lee JS, Park PH, Park YB, Yoon MH, Paik SY. An outbreak of *Norovirus* infection associated with fermented oyster consumption in South Korea, 2013[J]. *Epidemiology and Infection*, 2016, 144(13): 2759-2764
- [9] Kobayashi D, Saito M, Heike YJ, Yokota K, Arioka H, Oshitani H. The association between consuming bivalves, and acute gastroenteritis and *Norovirus* in Tokyo, Japan[J]. *Journal of Medical Virology*, 2019, 91(6): 986-996
- [10] Xue L, Dong RM, Wu QP, Li YL, Cai WC, Kou XX, Zhang JM, Guo WP. Molecular epidemiology of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis in Guangzhou, China, 2013-2015[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(5): 1377-1384
- [11] Zhang L, Xue L, Gao JS, Cai WC, Jiang YT, Zuo YT, Liao YY, Qin ZW, Wu HM, Cheng T, et al. Development of a high-efficient concentrated pretreatment method for noroviruses detection in independent oysters: an extension of the ISO/TS 15216-2: 2013 standard method[J]. *Food Control*, 2020, 111: 107032
- [12] Oristo S, Lee HJ, Maunula L. Performance of pre-RT-qPCR treatments to discriminate infectious human rotaviruses and noroviruses from heat-inactivated viruses: applications of PMA/PMAXx, benzonase and RNase[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(4): 1008-1016
- [13] Randazzo W, Khezri M, Ollivier J, Le Guyader FS, Rodríguez-Díaz J, Aznar R, Sánchez G. Optimization of PMAXx pretreatment to distinguish between human *Norovirus* with intact and altered capsids in shellfish and sewage samples[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 266: 1-7
- [14] Randazzo W, López-Gálvez F, Allende A, Aznar R, Sánchez G. Evaluation of viability PCR performance for assessing *Norovirus* infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 229: 1-6
- [15] Razafimahefa RM, Ludwig-Begall LF, Guyader FS, Farnir F, Mauroy A, Thiry E. Optimisation of a PMAXx™-RT-qPCR assay and the preceding extraction method to selectively detect infectious murine *Norovirus* particles in mussels[J]. *Food and Environmental Virology*, 2021, 13(1): 93-106
- [16] Sarmiento SK, De Guerra CR, Malta FC, Coutinho R, Miagostovich MP, Fumian TM. Human *Norovirus* detection in bivalve shellfish in Brazil and evaluation of viral infectivity using PMA treatment[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2020, 157: 111315
- [17] Canh VD, Kasuga I, Furumai H, Katayama H. Viability RT-qPCR combined with sodium deoxycholate pre-treatment for selective quantification of infectious viruses in drinking water samples[J]. *Food and Environmental Virology*, 2019, 11(1): 40-51
- [18] Zhou ZH, Liu DL, Zhang L, Cui Y, Shi XM, Wang DP. Optimization and application of receptors capturing based human noroviruses assay[J]. *Journal of Shanghai Jiao Tong University: Agricultural Science*, 2017, 35(5): 83-88 (in Chinese)
周震寰, 刘丹蕾, 张麟, 崔妍, 史贤明, 王大鹏. 基于受体捕获的人源诺如病毒检测方法的优化及应用[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2017, 35(5): 83-88
- [19] Afolayan OT, Webb CC, Cannon JL. Evaluation of a porcine gastric mucin and RNase A assay for the discrimination of infectious and non-infectious GI.1 and GII.4 *Norovirus* following thermal, ethanol, or levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate treatments[J]. *Food and Environmental Virology*, 2016, 8(1): 70-78

- [20] Lee HM, Yang JS, Yoon SR, Lee JY, Kim SJ, Lee HW, Kim SH, Ha JH. Immunomagnetic separation combined with RT-qPCR for evaluating the effect of disinfectant treatments against *Norovirus* on food contact surfaces[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2018, 97: 83-86
- [21] Escudero-Abarca BI, Goulter RM, Arbogast JW, Leslie RA, Green K, Jaykus LA. Efficacy of alcohol-based hand sanitizers against human *Norovirus* using RNase-RT-qPCR with validation by human intestinal enteroid replication[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2020, 71(6): 605-610
- [22] Strubbia S, Schaeffer J, Oude Munnink BB, Besnard A, Phan MVT, Nieuwenhuijse DF, De Graaf M, Schapendonk CME, Wacrenier C, Cotten M, et al. Metavirome sequencing to evaluate *Norovirus* diversity in sewage and related bioaccumulated oysters[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2394
- [23] Chan MCW, Cheung SKC, Mohammad KN, Chan JCM, Estes MK, Chan PKS. Use of human intestinal enteroids to detect Human *Norovirus* infectivity[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2019, 25(9): 1730-1735
- [24] Hirneisen KA, Black EP, Casciarino JL, Fino VR, Hoover DG, Kniel KE. Viral inactivation in foods: a review of traditional and novel food-processing technologies[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010, 9(1): 3-20
- [25] Brié A, Boudaud N, Mssihid A, Loutreul J, Bertrand I, Gantzer C. Inactivation of murine *Norovirus* and hepatitis A virus on fresh raspberries by gaseous ozone treatment[J]. *Food Microbiology*, 2018, 70: 1-6
- [26] Liu PB, Kim M, Schlesinger D, Kranz C, Ha S, Ha J, Schlauch J, Baek S, Moe C. Immunomagnetic separation combined with RT-qPCR for determining the efficacy of disinfectants against human noroviruses[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2015, 8(2): 145-154
- [27] Predmore A, Sanglay G, Li JR, Lee K. Control of human *Norovirus* surrogates in fresh foods by gaseous ozone and a proposed mechanism of inactivation[J]. *Food Microbiology*, 2015, 50: 118-125
- [28] Fuentes C, Pérez-Rodríguez FJ, Sabrià A, Beguiristain N, Pintó RM, Guix S, Bosch A. Inactivation of hepatitis A virus and human *Norovirus* in clams subjected to heat treatment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 3504
- [29] Kim SH, Shahbaz HM, Park D, Chun S, Lee W, Oh JW, Lee DU, Park J. A combined treatment of UV-assisted TiO₂ photocatalysis and high hydrostatic pressure to inactivate internalized murine *Norovirus*[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2017, 39: 188-196
- [30] Ye M, Lingham T, Huang YX, Ozbay G, Ji L, Karwe M, Chen HQ. Effects of high-hydrostatic pressure on inactivation of human *Norovirus* and physical and sensory characteristics of oysters[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(6): M1330-M1335
- [31] Kingsley DH, Fay JP, Calci K, Pouillot R, Woods J, Chen HQ, Niemira BA, Van Doren JM. Evaluation of chlorine treatment levels for inactivation of human *Norovirus* and MS2 bacteriophage during sewage treatment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017. DOI: 10.1128/aem.01270-17
- [32] De Abreu Corrêa A, Carratala A, Barardi CRM, Calvo M, Girones R, Bofill-Mas S. Comparative inactivation of murine *Norovirus*, human adenovirus, and human JC *Polyomavirus* by chlorine in seawater[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(18): 6450-6457
- [33] Park SY, Ha SD. Synergistic effects of combined chlorine and vitamin B₁ on the reduction of murine *Norovirus*-1 on the oyster (*Crassostrea gigas*) surface[J]. *Food and Environmental Virology*, 2019, 11(3): 205-213
- [34] Lunestad BT, Maage A, Roiha IS, Myrmet M, Svanevik CS, Duinker A. An outbreak of *Norovirus* infection from shellfish soup due to unforeseen insufficient heating during preparation[J]. *Food and Environmental Virology*, 2016, 8(4): 231-234
- [35] Gyawali P, Fletcher GC, McCoubrey DJ, Hewitt J. *Norovirus* in shellfish: an overview of post-harvest treatments and their challenges[J]. *Food Control*, 2019, 99: 171-179
- [36] Lan WQ, Zhao YN, Liu L, Xie J. Research progress on the applications of ozonated water in the sterilization and preservation of aquatic products[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(4): 190-197 (in Chinese)
蓝蔚青, 赵亚楠, 刘琳, 谢晶. 臭氧水处理在水产品杀菌保鲜中的应用研究进展[J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(4): 190-197
- [37] Brodowska AJ, Nowak A, Śmigielski K. Ozone in the food industry: principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: an overview[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(13): 2176-2201
- [38] Garcia LAT, Barardi CRM. Performance of a storage tank coupled with UV light on enteric virus inactivation in drinking water[J]. *Water Supply*, 2019, 19(4): 1103-1109
- [39] Zhao MM, Liu HX, Ma QT, Ye T, Lin Q, Zheng HP. Comparison of purging effects for *Escherichia coli* in the oyster *Crassostrea angulata* using different methods[J]. *Marine Science Bulletin*, 2018, 37(2): 177-180 (in Chinese)
赵明明, 刘宏星, 马庆涛, 叶挺, 林清, 郑怀平. 不同处理方法对葡萄牙牡蛎体内菌群净化效果的比较[J]. *海洋通报*, 2018, 37(2): 177-180
- [40] Kim SE, Park SY, Rui ML, Ha SD. Effects of electron beam irradiation on murine *Norovirus*-1 in abalone (*Haliotis discus Hannai*) meat and viscera[J]. *LWT*, 2017, 86: 611-618
- [41] Wang QJ, Li YF, Sun DW, Zhu ZW. Enhancing food processing by pulsed and high voltage electric fields: principles and applications[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(13): 2285-2298
- [42] Park SY, Jung YJ, Kwon JY, Kim SE, Jeong MI, Ha SD.

- Application of high hydrostatic pressure for the inactivation of *Norovirus* and quality stability in fresh sea squirt (*Halocynthia roretzi*)[J]. Food Science and Technology International, 2019, 25(7): 573-578
- [43] Sido RF, Huang RZ, Liu CH, Chen HQ. High hydrostatic pressure inactivation of murine *Norovirus* and human noroviruses on green Onions and in salsa[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 242: 1-6
- [44] Takahashi M, Okakura Y, Takahashi H, Yamane H, Akashige S, Kuda T, Kimura B. Evaluation of inactivation of murine *Norovirus* in inoculated shell oysters by high hydrostatic pressure treatment[J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(12): 2169-2173
- [45] Ringø E, Doan HV, Lee S, Song SK. Lactic acid bacteria in shellfish: possibilities and challenges[J]. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 2020, 28(2): 139-169
- [46] Kwak MK, Liu R, Kang SO. Antimicrobial activity of cyclic dipeptides produced by *Lactobacillus plantarum* LBP-K10 against multidrug-resistant bacteria, pathogenic fungi, and influenza A virus[J]. Food Control, 2018, 85: 223-234
- [47] Welch JL, Xiang JH, Okeoma CM, Schlievert PM, Stapleton JT. Glycerol monolaurate, an analogue to a factor secreted by *Lactobacillus*, is virucidal against enveloped viruses, including HIV-1[J]. mBio, 2020. DOI: 10.1128/mbio.00686-20
- [48] Fajardo P, Atanassova M, Garrido-Maestu A, Wortner-Smith T, Cotterill J, Cabado AG. Bacteria isolated from shellfish digestive gland with antipathogenic activity as candidates to increase the efficiency of shellfish depuration process[J]. Food Control, 2014, 46: 272-281
- [49] Prado-Alvarez M, Lynch SA, Kane A, Darmody G, Pardo BG, Martínez P, Cotterill J, Wortner-Smith T, Culloty SC. Oral immunostimulation of the oyster *Ostrea edulis*: impacts on the parasite *Bonamia ostreae*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(1): 43-51
- [50] Darmody G, Maloy AP, Lynch SA, Prado-Alvarez M, Cotterill J, Wortner-Smith T, Culloty SC. Tissue targeting of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, using microencapsulated microbeads as a biological proxy[J]. Aquaculture International, 2015, 23(2): 647-659
- [51] Hartard C, Banas S, Rivet R, Boudaud N, Gantzer C. Rapid and sensitive method to assess human viral pollution in shellfish using infectious F-specific RNA bacteriophages: application to marketed products[J]. Food Microbiology, 2017, 63: 248-254
- [52] Dong HJ, Yan DS, Deng LY, Guo HF, Wang KS, Wu MF, Yu BJ, Wang J, Fan HD. Purification effect of oysters based on the analysis of environmental parameters[J]. Studies in Engineering and Technology, 2019, 6(1): 78
- [53] McLeod C, Polo D, Le Saux JC, Le Guyader FS. Depuration and relaying: a review on potential removal of *Norovirus* from oysters[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017, 16(4): 692-706
- [54] Simpson AMA, Mitch WA. Chlorine and ozone disinfection and disinfection byproducts in postharvest food processing facilities: a review[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2021: 1-43
- [55] Weng S, Dunkin N, Schwab KJ, McQuarrie J, Bell K, Jacangelo JG. Infectivity reduction efficacy of UV irradiation and peracetic acid-UV combined treatment on MS2 bacteriophage and murine *Norovirus* in secondary wastewater effluent[J]. Journal of Environmental Management, 2018, 221: 1-9
- [56] Pilotto MR, Souza DSM, Barardi CRM. Viral uptake and stability in *Crassostrea gigas* oysters during depuration, storage and steaming[J]. Marine Pollution Bulletin, 2019, 149: 110524
- [57] Joshi S, Howell AB, D'Souza DH. Blueberry proanthocyanidins against human *Norovirus* surrogates in model foods and under simulated gastric conditions[J]. Food Microbiology, 2017, 63: 263-267