

# 食源性病毒及其检测方法\*

吴清平<sup>1</sup> 寇晓霞<sup>1,2</sup> 张菊梅<sup>1</sup>

(广东省微生物研究所 广州 510070)<sup>1</sup> (中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)<sup>2</sup>

**摘要:** 食源性病毒是指以食物为载体, 导致人类发生疾病的病毒。按照病毒的不同来源, 食源性病毒可分为肠道食源性病毒和人畜共患的食源性病毒两大类, 肠道食源性病毒包括以粪便直接或间接污染食物, 通过粪口途径使病毒传播给人类的病毒; 人畜共患的食源性病毒是指一些人畜共患, 以畜禽产品为载体传播的病毒。本文阐述了食源性病毒的种类、生物学特性、流行病学特征、研究现状, 阐明了近年来以 PCR 为基础的分子生物学检测方法及存在的问题, 提出了食源性病毒今后进一步研究的发展方向及实际应用前景。

**关键词:** 食源性病毒, 检测, RT-PCR, 食品

**中图分类号:** Q939.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0101-05

## Foodborne Viruses and its Detection Methods

WU Qing-Ping KOU Xiao-Xia ZHANG Ju-Mei

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)<sup>1</sup>

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)<sup>2</sup>

**Abstract:** Foodborne viruses are defined to be viruses that can lead to human diseases through food. In accordance with the different origin, foodborne viruses can be divided into two kinds: intestinal viruses and zoonotic viruses. The former include those viruses that can be transmitted to person via fecal-orally route. The latter include those zoonotic viruses that chiefly transmitted to person through livestock and poultry products. This paper expounds foodborne viruses categories, biology nature, epidemiology character, and study circumstance, and clarifies the molecular biological methods and problems on the base of the polymerase chain reactions, and presents the development direction and application perspective of the foodborne viruses study.

**Key words:** Foodborne viruses, Detection, Reverse-Transverse polymerase chain reaction, Food

随着生活水平的不断提高, 食品的安全性越来越受关注, 但长期以来, 对食品中病毒的检测一直存在很大的疏漏, 甚至接近于空白。食源性病毒包括以粪便直接或间接污染食物, 经由口腔使人感染, 即通过粪口途径传播的病毒和一些人畜共患, 以畜禽产品为载体传播的病毒。由于检测技术的滞后, 现行的食品卫生学标准不能对食源性病毒有效的监测。虽然病毒是严格的细胞内寄生物, 在食品中不能繁殖, 但食品中微量的病毒就会引起疾病。据国内外资料表明, 食源性病毒及其引起的疾病具有相当的数目和种类, 其中不乏流行范围广, 传染性强, 易爆发易流行, 危害严重的疾病, 这不仅对食品卫生和人们的营养健康水平构成了重大威胁, 而且也给食品工业及国民经济带来较严重的损失。食源性病毒的检测对食品安全体系的完善、预防人类食源性病毒病的发生具有重要意义。常规的食品中病毒的检测方法灵敏度太低, 近年来将分子生物学方法逐步应用于食源性病毒的检测, 大大提高了检测的灵敏度和专一性, 缩

\* 国家十五重大科技攻关项目: 食品安全关键技术应用的综合示范

收稿日期: 2003-09-05, 修回日期: 2003-11-20

短了检测所需时间,为食源性病毒检测方法的完善、标准化及实际应用带来了希望。

## 1 肠道食源性病毒

肠道食源性病毒是指能以各种食物为载体传播并经粪口途径使人类感染的一类病毒。根据其致病类型又可将其分为 3 种:引起胃肠炎的病毒,如人肠道杯状病毒 (HuCV)、轮状病毒 (Rotavirus)、星状病毒 (Astrovirus)、肠道腺病毒 (the enteric adenovirus); 肝炎病毒,包括甲肝 (HAV), 戊肝 (HEV); 引起其他疾病类型的病毒,如肠道病毒 (Enterovirus)<sup>[1]</sup>。

### 1.1 胃肠炎病毒

**1.1.1 人肠道杯状病毒:**人肠道杯状病毒是裸露的球形病毒,20 面体对称,直径 28 ~ 35 nm,基因组是单链正义 RNA,结构蛋白编码区位于 3' 端,非结构蛋白位于 5' 端,分子大小为 7.3 ~ 7.6 kb。包括两个属:即诺瓦克样病毒 (Norwalk-Like virus, NLV) 和札幌样病毒 (Sapporo-Like virus, SLV)。NLV 目前被认为是世界范围内流行性、非细菌胃肠炎爆发的主要原因,也是最大通过食源性感染的病毒因子<sup>[2,3]</sup>,而通过食源性感染的 SLV 较少。NLV 有多种血清型,在环境中非常稳定,对热、低酸、乙醚都有抗性。NLV 能感染所有年龄段的人,尤其是老人,在冬天的发病率最高。SLV 在成人胃肠炎爆发中较少见,主要感染婴幼儿。

NLV 可直接通过人接触传播或间接地通过被污染的水、食物等传播,10 ~ 100 个病毒粒子即可引发感染。食源性 NLV 疾病的爆发大多与食用未经烹煮的贝类和各种沙拉有关。在美国,96% 的严重非细菌性胃肠炎由 NLV 引起,其中 24% 为食源性的<sup>[4]</sup>;在我国,由靖宇、钱渊等人对 1109 例来自首都儿科研究所附属儿童医院门诊及体检血清进行检测,发现 NLV 的阳性检出率高达 88.8%<sup>[5]</sup>,说明了北京地区人群中诺瓦克样病毒感染十分普遍,这对于我国病毒样胃肠炎流行的防治和研究具有重要意义。

**1.1.2 人轮状病毒:**人轮状病毒属于呼肠弧病毒科,20 面体结构,直径 70 nm,有双层壳膜。基因组为双链分节段 RNA,共有 11 个节段,所有 11 个节段都有同样的末端结构。能导致人腹泻的轮状病毒有 A、B、C 3 个群。A 群轮状病毒是婴幼儿发病和致死的最主要病因,一般发生在秋冬季节,6 个月至两岁的婴幼儿最易感染,B、C 群为成人轮状病毒。据 WHO 1997 年统计,全世界每年有 14 亿轮状病毒感染者,在发展中国家有 87 万人因此而死亡<sup>[6]</sup>。轮状病毒感染的腹泻常伴轻或中度脱水或代谢性中毒,部分病例在出现消化道症状前常有上呼吸道感染症状。

**1.1.3 星状病毒和肠道腺病毒:**星状病毒属于星状病毒科,基因组为单链正义 RNA,直径 28 ~ 30 nm。肠道腺病毒属于腺病毒科,基因组为双链线状 DNA,直径 70 nm。这两类病毒均引起的急性非细菌性胃肠炎的临床症状和轮状病毒腹泻相似。星状病毒的易感人群是儿童和老人,肠道腺病毒似乎只使儿童致病。

### 1.2 肝炎病毒

能通过食源性感染而使人发病的肝炎病毒包括戊型肝炎病毒和甲型肝炎病毒<sup>[1]</sup>。戊型肝炎病毒是单链正义 RNA 病毒,但目前还没有确定到底属于哪个科,直径约 32 nm (27nm ~ 34nm),20 面体对称,由 5' 端非结构基因区和 3' 端结构基因区组成,3' 末端有 poly (A) 结构。15 ~ 40 岁年龄段的人易感,有较高的死亡率,为 0.5% ~ 3.0%。孕妇的死亡率更高,可达 15% ~ 20%。戊型肝炎主要通过粪口途径传染,食源性感染是

重要的危险因素。

甲型肝炎病毒属于微小 RNA 病毒科。该病毒对热、低酸、氯化物都存在很强的抗性。在潜伏中期具有最大的传播危险性,感染后是否发病取决于感染者的年龄,6 岁以下的儿童大多为无症状携带者,且很少出现黄疸。受染的食物和水是甲型肝炎病毒重要的传播载体,其中由于食用贝类和沙拉致使甲型肝炎爆发流行的比率最高。1988 年在中国上海爆发的甲肝使 25 万多人感染,首先是由食用含有病毒的贝类引起,后来又通过人与人之间传播而导致的,这是世界上有史以来规模最大的食源性疾病的爆发<sup>[7]</sup>。

### 1.3 引起其它疾病的肠道病毒

肠道病毒属归于微小 RNA 病毒科。直径 20 ~ 30 nm,病毒呈 20 面体对称,含有单链 RNA,病毒的蛋白质主要由 4 个多肽构成,分子量在 5 ~ 35 kD 之间。肠道病毒属病毒散布于全世界,其主要传染源是病人和无症状携带者,以接触传播为主,粪便污染的食物、水和用具也可传染,儿童是最敏感的人群。病毒经消化道,最终进入全身的网状内皮组织繁殖,同时侵犯敏感的器官或组织,引起多种特殊的临床表现。

## 2 人畜共患的食源性病毒

人畜共患的食源性病毒是指能引起人畜共患疾病,并主要以畜禽产品为载体再次传播而使人类感染的一类病毒,包括禽流感病毒、口蹄疫病毒、猪水泡病毒、水泡性口炎病毒、伪狂犬病毒等。虽然目前由于食用带有人畜共患病病毒的畜禽产品而使人类发病的实例并不多,但考虑到这类病毒在环境中非常的稳定,在冻肉中能较长时间地保持感染力,还有其高度变异性、宿主广泛性以及畜禽与人类生活的密切关系。因此,人畜共患的食源性病毒具有流行的潜在危险性,我们应未雨绸缪,加强防范。

### 2.1 禽流感病毒

禽流感病毒是禽流感的病原体,属于正黏病毒科,直径 80 ~ 120 nm,球形颗粒,基因组为 8 个节段的单链负义 RNA,螺旋对称,对热、酸和有机溶剂敏感。

禽流感病毒当前是指甲型流感病毒中感染禽类的多种亚型的总称。流感病毒可分为甲、乙、丙 3 型,其中甲型流感病毒的危害程度最大,宿主范围广泛,除可感染人,引起世界性流感大流行外,也在动物中广泛存在,引起动物流感流行和造成大量动物死亡。甲型流感病毒有许多亚型,容易变异,亚型之间无交叉保护作用,至今已发现的所有不同亚型的流感病毒几乎均可在禽中找到。因此,有人认为禽是流感病毒的基因库,并与流感病毒大流行株出现密切相关。

禽流感病毒在干燥血液和组织中可存活数周。在冰冻的肉和骨髓中分别于 287 d 和 303 d 后仍保持感染力。因此食用受禽流感病毒感染的肉及其加工产品对人类健康已构成潜在的危险性。1997 年,禽流感病毒在香港首次发现引起人类流感,受感染发病人数为 18 人,其中死亡 6 人<sup>[8]</sup>。

### 2.2 口蹄疫病毒

口蹄疫病毒属于小 RNA 病毒科,正 20 面体结构,直径 20 ~ 30 nm,无包膜。主要侵害偶蹄兽,尤其是奶牛。该病毒传染性强,易变异,目前已发现 7 个血清型,血清型间无血清交叉和交叉免疫现象。人(尤其是幼儿)饮食未消毒的鲜奶以及其它畜产品,护理及接触患病动物的兽医、研究人员、饲养人员、挤乳工人等均可感染发病,儿童发病较成人多。人感染口蹄疫病毒后体温升高,口腔发干发热,粘膜潮红,在唇、

舌、牙龈等部位出现水泡。水泡豌豆大，迅速破裂并愈合，有时伴有灼热疼痛及流涎。病程约7~10 d，严重者可因心肌麻痹而死亡<sup>[9]</sup>。

### 2.3 猪水泡病毒

猪水泡病毒属于肠道病毒属。基因组为单链正义 RNA。该病毒引起的猪水泡病流行性强，发病率高，人类有一定的易感性。猪水泡病毒在环境中很稳定，存活时间长，普通冰箱里能存活两年。在粪便和腌肉中也能存活较长时间，而且该病毒对消毒剂的抵抗力强。

### 2.4 水泡性口炎病毒

水泡性口炎病毒属于弹状病毒科，基因组为单链 RNA。此病毒对酸碱的变化有异常的稳定性，在低于 pH 4 或高于 pH 10 的条件下放置 1 h，病毒的滴价只有中度的减少。在室温下可生存 7~21 d，在冻结培养物中可存活几年。人感染时，症状很象流感，突然发热、恶心、筋肉痛，也有少数病例发生口炎和扁桃体炎。

## 3 食源性病毒的检测

食品中病毒的检测有助于预防人类食源性病毒病的发生。常规的食品中病毒的检测方法有电镜观察、细胞培养、核酸杂交、酶联免疫及聚合酶链反应，但是电镜观察、核酸杂交及酶联免疫检测方法的灵敏度相对都很低，还不能单独应用于检测；细胞培养法的操作烦琐，需时较长，一般需要一周才能观察到细胞病理反应，更重要的是许多肠道食源性病毒不能进行细胞培养，或者可以培养但不出现细胞病理效应，这给检测工作带来了很大的困难和挑战。现在发展的分子生物学方法为食品中快速、灵敏的病毒检测带来了希望，而且由于大多食源性病毒是 RNA 病毒，所以反转录 PCR (RT-PCR) 应用较多，并在这一核心技术的基础上进行改进或和其它的检测方法组合，演化发展出许多新的检测方法。

### 3.1 病毒的洗提、浓缩和核酸提取

由于食品中病毒的浓度都非常低，因此在检测前首先要对病毒进行浓缩和富集。而且食源性病毒的成功检测依赖于样品经处理后，病毒能否有效活化，能否得到纯度较高且完整的核酸。

从样品中提取病毒用得较多的洗提液有甘氨酸溶液、硼酸盐缓冲液、生理盐水牛肉提取物、生理盐水牛肉-Feron 试剂。病毒浓缩法有免疫磁珠吸附法、正电荷滤膜法、沉淀法等。对病毒核酸的裂解纯化除了运用常规的去垢剂和胍类试剂外，还可利用磁珠-寡聚核苷酸杂交法分离 RNA、柱层析法、抗原捕获裂解法等方法可更为有效的得到高质量的病毒核酸。

### 3.2 病毒核酸的检测

**3.2.1 聚合酶链反应 (PCR) 检测病毒核酸：**PCR 作为一种灵敏的分子生物学技术，已逐步应用于食源性病毒的检测。为提高检测敏感性和特异性，不断地对传统 RT-PCR 进行改进，建立了套式、半套式 RT-PCR<sup>[10]</sup>、多重引物 RT-PCR、内标定量 RT-PCR 等方法，大大提高了检测的效率和实用性。另外，还可将套式、半套式 PCR 和多重引物 PCR 扩增法相结合，如半套式多重 RT-PCR<sup>[11]</sup>，将其应用于检测 NLV 的同时，还可进一步分型。用这些方法检测病毒核酸后，再用凝胶电泳和 Northern 杂交法对扩增产物进行验证。Kellogg 等人建立的 RT-PCR-DNA 酶免疫法 (RT-PCR-DEIA)<sup>[3]</sup>，可进一步缩短检

测时间, RT-PCR-DEIA 法的特点是用一种对热稳定的 rTth 聚合酶代替反转录酶和 Taq 聚合酶, 用地高辛-dUTP 标记终产物, 然后用微孔杂交法验证。相比较 Northern 杂交, 扩增后用 DEIA 法进行证实非常快速, Northern 杂交需 1-2 d, DEIA 所需时间不到 4 h。

**3.2.2 NASBA-ELISA 法**<sup>[12]</sup> (A colorimetric nucleic acid sequence-based amplification-enzyme-linked immunosorbent assay): NASBA 是一种恒温的 RNA 扩增技术, 整个扩增过程在 40℃ 下进行, 标准的反应体系包括 AMV 逆转录酶、T7 RNA 合成酶、RNase-H、dNTP、NTP, 两个特殊的引物和适宜的缓冲液, 然后用酶联免疫法对扩增产物进行证实。它相比较 RT-PCR 的优点是直接对 RNA 扩增, 且不需要热循环仪, 无需特殊的仪器。它已成功应用于水果、蔬菜中 HAV 的检测。

### 3.3 检测中存在的若干问题

**3.3.1 假阳性问题:** PCR 的假阳性结果主要来源于两个方面: 一是扩增产物受污染, 二是无法区分病毒的感染性而导致的假阳性。针对前者, 可在 PCR 反应体系中用 dUTP 代替 dTTP, 并在进行 RT-PCR 前将样品用 UDG 酶处理, 切除包含 dUTP 的扩增产物, 阻止受污染的扩增产物再作为模板, 从而保证了 PCR 检出的阳性结果均来源于被检样品的核酸<sup>[10]</sup>。对于后者, 目前仍无好的解决办法, 有待于进一步突破。

**3.3.2 假阴性问题:** 样品中存在的 PCR 抑制物常常会导致假阴性结果, 针对这一点, 可根据被测病毒扩增序列, 设计、制备分子量不同的序列作 RNA 内标对照, 加入被测样品, 以此来确定 PCR 阴性结果是否由样品中的抑制物引起。

## 4 展望

食源性病毒是食品安全的一大危险因子, 我们一方面要积极的预防, 对食品原材料及加工过程的每一个环节严格把关; 另一方面要克服分子生物学方法的缺点, 简化检测程序, 使食源性病毒的检测方法向自动化、快速化、灵敏度高、特异性强、重复性好, 以及简易、经济的方向不断发展。同时希望通过对食源性病毒的高危食品进行广泛调研的基础上, 分析和评估各类食品受病毒污染的风险性, 寻找对多种食品都适用的关键控制点, 将食品按照受污染机率的大小重新分类, 力争建立具有我国自主知识产权的高水平、高质量的食品安全保障体系。

### 参考文献

- [1] Koopmans M, Bonsdorff C H, Jan V, *et al.* FEMS Microbiol Rev, 2002, **26**: 187 ~ 205.
- [2] David H K, Gary P R. Appl Environ Microbiol, 2001, **67** (9): 4152 ~ 4157.
- [3] Kellogg J, Schwab H N, Francoise L G, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2001, **67** (2): 742 ~ 749.
- [4] Fankhauser R L, Noel J S, Monroe S S, *et al.* Infect Dis, 1998, **178**: 1571 ~ 1578.
- [5] 靖 宇, 钱 渊, 王洛平. 病毒学报, 1998, **14** (4): 322 ~ 324.
- [6] Bajolet O, Chippaux-Hypolite C. Bull Soc Pathol Exot 1998; **91** (5): 432 ~ 437.
- [7] Halliday M L, Kang L Y, Hu M D, *et al.* China J. Infect Dis, **164**: 852 ~ 859.
- [8] Chung H, Jaykus L A, Sobsey M D. Appl Environ Microbiol, 1996, **62** (10): 3772 ~ 3778.
- [9] 江鹏斐, 赵启祖, 谢庆阁. 中国农业科学, 1999, **32** (6): 93 ~ 100.
- [10] Neill H J O, Caughey C M, Wyatt D E, *et al.* BMC Microbio, 2001, **1**: 14.
- [11] Lilly K W Y, Michael G C, Bradley J C, *et al.* Jour of Clin Microbio, July 2001, **39** (7): 2690 ~ 2694.
- [12] Jean J, Blais B, Darveau A, *et al.* FEMS Microbiol Lett, 2002, **210**: 143 ~ 147.