

• 综述 •

牡蛎中诺如病毒的感染及其防控研究进展

赵 峰^{1,2,3}, 佟利惠^{1,2}, 杨 敏¹, 王珊珊¹, 刘 楠¹, 孙 永¹, 周德庆¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所/青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室, 山东青岛 266071; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 3. 重庆三峡学院生物与食品工程学院, 重庆 404100)

摘要: 诺如病毒 (Norovirus, NoV) 是非细菌性急性胃肠炎的主要病原体。牡蛎可通过滤食作用富集海水和环境中污染的 NoV, 是 NoV 传播的重要载体。人们倾向于食用生的或轻微煮熟的牡蛎, 导致 NoV 感染事件时有发生。与牡蛎相关的食源性疾病中, 约 50% 由 NoV 引起。荧光定量 PCR 是检测 NoV 的主要方法, 但其不能有效区分感染性与非感染性 NoV。由于 NoV 难以在体外培养, 致使评估 NoV 灭活方法的有效性存在困难。猪胃黏蛋白 (Porcine gastric mucin, PGM) 及叠氮溴化丙锭 (Propidium monoazide, PMA) 等核酸嵌入剂与 qPCR 结合的方法在检测感染性 NoV 中显现出应用潜力。牡蛎中 NoV 的消灭方式多为超高压处理, 400 MPa 及以上的压力可使 NoV 大量灭活。文章综述了近年来牡蛎 [主要是太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、褶牡蛎 (*Alectryonella plicatula*) 和熊本牡蛎 (*C. sikamea*)] 中 NoV 的污染状况、富集机制、检测方法以及超高压处理消灭 NoV 等方面的研究成果, 为建立牡蛎中 NoV 有效的风险预警和控制技术提供参考。

关键词: 牡蛎; 诺如病毒; 定量检测; 超高压消灭技术

中图分类号: TS 254.7

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Progress and prospects of infection, prevention and control of norovirus in oyster

ZHAO Feng^{1,2,3}, TONG Lihui^{1,2}, YANG Min¹, WANG Shanshan¹, LIU Nan¹, SUN Yong¹, ZHOU Deqing¹

(1. Yellow China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Laboratory of Marine Drugs and Bioproducts Products, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, 266071, China; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China; 3. College of Biology and Food Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing, 404100, China)

Abstract: Norovirus (NoV) is the main pathogen of non-bacterial acute gastroenteritis. Oysters are important carriers for the spread of NoV, which can enrich NoV from contaminated seawater and environment through filter feeding. People tend to eat raw or lightly cooked oysters, which may cause NoV infections. About half of the foodborne diseases associated with oysters are caused by NoV. Reverse transcription fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) is the main method for detecting NoV, but it cannot distinguish infectious from non-infectious viruses effectively. Since NoV cannot be cultured *in vitro*, RT-qPCR has limitations in assessing the effectiveness of inactivation methods for NoV. Porcine gastric mucin (PGM), propidium monoazide (PMA) and other nucleic acid intercalators combined with RT-qPCR have shown potential applications in the detection of infectious NoV. High hydrostatic pressure treat-

收稿日期: 2021-01-21; 修回日期: 2021-03-25

资助项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项 (2019YFD0901702)

作者简介: 赵 峰 (1982—), 男, 博士, 副研究员, 从事水产品加工与质量安全控制研究。E-mail: zhaof_cn@163.com

通信作者: 周德庆 (1962—), 男, 博士, 研究员, 从事水产品加工与质量安全控制研究。E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

ment is an effective method to reduce norovirus in shellfish, and the pressure of over 400 MPa can inactivate NoV significantly. In this paper, we review the enrichment of NoV in oyster, the detection methods to distinguish infectious NoV and the inactivation of high hydrostatic pressure technology on NoV in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*), pleated oysters (*Alectryonella plicatulas*) and Kumamoto oysters (*C. sikamea*), so as to provide references for the establishment of effective NoV risk warning and non-thermal inactivation technology in the future.

Key words: Oyster; Norovirus; Quantitative detection; Inactivation of high hydrostatic pressure technology

诺如病毒 (Norovirus, NoV) 是世界范围内引起非细菌性急性胃肠炎的主要病原体, 常通过被污染的环境、水源及水产品如牡蛎等引起急性胃肠炎疫情暴发^[1]。诺如病毒分为 7 个基因簇 (GI—GVII), 其中 GI、GII 和 GIV 可感染人类, 是引发人类疾病的主要类型, 以 GI、GII 最为常见, 并可进一步分为 9 个和 22 个基因型, 而 GIV 型较少被检出^[1-3]。NoV 具有极强的传染性, 仅 10 个病毒颗粒即可使人致病, 被感染者会出现持续 3 d 左右的腹泻或呕吐, 儿童、老年人和有基础疾病的人群病情可加重^[4-5]。流行病学调查结果显示, 全球范围内约 1/5 的急性胃肠炎暴发由 NoV 引起, 冬、春季是 NoV 疫情的高发期, 近年 NoV 在中国、美国、日本、西欧等均出现大规模暴发^[6-10]。感染者出现感染症状的概率随 NoV 摄入剂量的增加而增大。海产贝类因其底栖和滤食性特性, 可从海洋环境中富集 NoV。素有“海洋牛奶”之称的牡蛎是我国沿海地区重要的经济贝类, 也是 NoV 的重要传播媒介之一。虽然彻底加热处理可有效灭活牡蛎中的 NoV, 但为了保持其鲜美风味, 人们倾向于生食或轻微烹煮, 若食用的牡蛎存在 NoV 污染, 便会增加感染 NoV 的风险。

对食品中 NoV 的检测主要采用反转录实时荧光定量聚合酶链式反应 (Reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR), 但此方法不能区分 NoV 是否具有活性或感染性。近年来国内外研究发现猪胃黏蛋白偶联磁珠 (Porcine gastric mucin-conjugated magnetic beads, PGM-MB)、核酸嵌入剂 [叠氮溴化丙锭 (Propidium monoazide, PMA) 和叠氮溴化乙锭 (Ethidium monoazide, EMA) 等结合 RT-qPCR 方法检测感染性 NoV 有效果^[11-15]。超高压 (High hydrostatic pressure, HHP) 处理作为一种非热加工技术, 主要用于生产高端生食产品, 应用于牡蛎不仅可杀灭有害病原体、延长贮藏期, 还可用于脱壳。本文综述了牡蛎中 NoV 的污染状况、富集机制、检测方法以及 HHP 处理技术对 NoV 消减控制方面的研究进展, 旨在为牡蛎产业的发展与食用安全提供参考。

1 牡蛎中 NoV 的污染与富集机制

1.1 NoV 对牡蛎的污染状况

许多由 NoV 引起的食源性急性胃肠炎暴发均与食用牡

蛎有关。据统计, 与牡蛎相关的食源性疾病中, 约一半由 NoV 引起^[16]。牡蛎是滤食性双壳类, 每小时可过滤约 20 L 海水, 在过滤海水时环境中的 NoV 可进入牡蛎体内并富集^[17], 牡蛎体内的病毒浓度比周围环境高几十甚至几千倍^[3,18-19]。且牡蛎的栖息地主要在沿海河口, 营固着生活, NoV 可以通过多种方式进入牡蛎生产区, 如城市排污管、污水处理厂未处理彻底的污水、进入生产区的感染 NoV 的人等^[20]。生长水域被 NoV 污染后, 牡蛎会通过自身的滤食作用从污染的水中富集 NoV, 并在消化道等部位积累; NoV 一旦进入体内, 牡蛎很难通过自身代谢或净化作用将其排出体外^[21]。

每年 11 月至翌年 3 月是牡蛎消费旺季, 也是因食用受 NoV 污染的牡蛎而染病的高风险季节。寇晓霞等^[22]应用 RT-qPCR 方法对广东省地区市售牡蛎中 NoV 的污染状况进行调查与分型鉴定, 发现牡蛎样品的 NoV 总检出率为 17.20% (50/290), 不同季节的 NoV 污染率分别为春季 12.50%、夏季 6.90%、秋季 18.30% 和冬季 30.70%, 冬季显著高于其他季节, NoV 的基因型以 GII 型 (11%) 为主。吕素玲等^[23]对广西养殖牡蛎中 NoV 的污染状况进行调查, 发现牡蛎样品中 NoV 总检出率为 11.04% (53/480), 其基因型为 GII 型。马丽萍^[24]对黄渤海区沿海城市牡蛎中 NoV 污染状况调查发现, NoV 检出率可达 19.35%。Liu 等^[16]对山东省沿海地区牡蛎养殖区进行了为期 1 年的监测, 发现 NoV 检出率为 16.9% (60/356); 60 份阳性样本中, 43.3% (26/60) 为 GI 型, 31.7% (19/60) 为 GII 型, 25.0% (15/60) 同时检出 GI 和 GII; 阳性样本大多为冬季样本, 占 65.0% (39/60)。上述研究表明, 我国牡蛎中 NoV 的污染水平相对较高, 冬季 NoV 的污染水平显著高于其他季节, 应加强防控。

1.2 牡蛎与 NoV 结合机制

组织血型抗原 (Histo-blood group antigens, HBGAs) 为人类结合 NoV 的受体, 是一类具有高度多态性的糖类抗原, 在肠道上皮细胞上表现为 ABO 型、分泌型和 Lewis 型。研究表明, 牡蛎体内也存在类似的 HBGAs, 被认为是 NoV 同牡蛎相结合的受体, NoV 通过与牡蛎组织中的类 HBGAs 特异结合, 使得 NoV 难以排出体外^[25]。Le

Guyader 等^[26-27]对太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 组织中的类 HBGA 与 NoV 病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 特异结合的研究表明, GI.1 型 VLPs 只与太平洋牡蛎的消化腺结合, 而 GI.3、GI.4 型 VLPs 可与太平洋牡蛎的所有组织结合。此外, 环境因素如溶解氧、pH、温度和盐度均会对牡蛎类 HBGA 的表达产生影响, 高溶氧量、高 pH、低温和高盐利于牡蛎中类 A 型 HBGA 的表达^[28-29], 在此条件下 NoV 更易在牡蛎体内积累^[30]。但牡蛎中类 HBGA 的产生以及调控 NoV 积累的机制还有待进一步研究。

2 牡蛎中 NoV 的检测方法

2.1 NoV 定量检测方法

2013 年国际标准化组织发布定性和定量检测各种食品 (包括贝类) 中 NoV 的标准方法 (ISO/TS 15216-1 和 ISO/TS 15216-2), 中国于 2016 年也颁布了贝类中 NoV 的 RT-qPCR 检测方法标准。RT-qPCR 具有灵敏度高、可定量检测等优点, 在进行 RT-qPCR 前要先提取病毒 RNA, 由于 NoVs 在牡蛎中的含量较低且回收富集困难, 因此寻找简便有效的牡蛎中 NoVs RNA 的提取方法对后续的检测尤为重要^[31-32]。Zhang 等^[32]以现行 ISO/TS 15216-2: 2013 为基础, 对 4 种从牡蛎消化组织中提取 NoV 的方法进行比较, 结果发现蛋白酶 K 消化联合聚乙二醇沉淀法效果最好, 该方法的回收率和扩增效率分别为 (11.07±0.09)% 和 (124.12±5.99)%, 是 ISO/TS 15216-2: 2013 方法的 7 倍。

牡蛎中含有的 NoV 颗粒较少, 研究已证实少数 (仅 10 个) 具有感染活性的 NoV 颗粒即可引发人类急性胃肠炎, 且在食品基质及环境中 NoV 基因组的稳定性也远高于其他具有相应感染活性的病毒^[17]。目前, 现有的有关 NoV 检测的国家、国际检测标准大多以 RT-qPCR 扩增结果为依据, 但这种检测方法并不能辨别 NoV 的感染性 (RT-qPCR 会同时扩增 NoV 中游离、部分降解或受损的以及受损衣壳中的 RNA), 导致感染性 NoV 的检出率偏高, 因此感染性 NoV 的确证一直是检测技术的瓶颈。

NoV 最早在电子显微镜下被观察到, 电泳法可对粪便样本中的 NoV 颗粒进行观察检测。酶联免疫吸附 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 也是一种检测 NoV 的方法, 但其灵敏度不高, 检测限为每克 $10^4 \sim 10^6$ 且耗时较长, 特别是在检测牡蛎中低含量水平的 NoV 时容易受到限制。

宏基因组测序可以检测和识别病毒基因组物质, 现已广泛应用于食源性病毒的检测。Imamura 等^[33]对日本 6 个不同地点的牡蛎中感染性 NoV 进行了为期 5 个月的检测, 通过测序对基因型进行了鉴定。Strubbia 等^[34]通过宏基因

组学方法评估 3 种牡蛎类型中 NoV 的积累规律时发现宏基因组学方法在检测牡蛎样本中低浓度 NoV 时较为困难。由于 NoV 的基因型具有多样性, 在牡蛎中的含量也较低, 导致病毒宏基因组学在检测中的应用仍存在挑战, 现广泛应用于 NoV 检测的方法是 RT-qPCR^[35]。

2.2 感染性 NoV 的检测方法

2.2.1 与 HBGA 结合的检测方法 具感染性的 NoV 衣壳蛋白是完整的, 可与 HBGA 结合, 故能通过检测衣壳与 HBGA 的结合能力来评估 NoV 是否具有感染性。猪胃黏蛋白 (Porcine gastric mucin, PGM) 含有 A、H1 和 Lewis b 型 HBGA, NoV 与 PGM 的相互作用可以抑制 NoV 与 HBGA 的结合能力^[36]。利用 PGM 与磁珠结合捕获 NoV, 再进行 RT-qPCR 检测 NoV, 可有效检测牡蛎中的感染性 NoV。已有大量报道应用 PGM-RT-qPCR 测定 NoV 在各种消减处理后的灭活情况, 如热处理、含氯消毒剂等^[37]。Leon 等^[38]对人工污染 NoV 的牡蛎样品进行 HHP 处理灭活 NoV, 结果发现 400 MPa HHP 处理后, NoV 成活率降低至 21%, 在 600 MPa 下处理后能对 NoV 完全灭活。Ye 等^[39]为了验证 PGM-RT-qPCR 检测方法的可行性, 采用与 Leon 等^[38]完全相同的实验条件处理牡蛎, 并利用 PGM-RT-qPCR 进行测定, 结果表明此方法对感染性 NoV 的检出率与 Leon 等^[38]的结论有密切的相关性。使用 PGM 研究不同 HHP 处理条件对 NoV 灭活效果的大量实验证明, PGM-RT-qPCR 是一种可有效区分感染性 NoV 的检测方法。

2.2.2 与核酸嵌入剂结合的检测方法 核酸嵌入剂如 EMA 和 PMA 已被许多研究者作为区分感染性与非感染性 NoV 的方法^[13-14]。PMA 是一种高亲和力的光反应性核酸染料, 不能进入衣壳蛋白完整的病毒, 但能够穿透被破坏或损坏的衣壳, 穿透后在强光照射下共价插入 RNA, 干扰 RT-qPCR 扩增^[12]。Randazzo 等^[14]对不同核酸嵌入剂进行对比, 结果表明 PMA_{xx} 对感染性 NoV 的区分效果优于 EMA, PMA_{xx} 处理后感染性 NoV 的减少量高于 EMA 0.64 lg。PMA 可与 RT-qPCR 检测方法结合, 在 RT-qPCR 检测前对样品进行预处理, 以区分感染性病毒。Kim 和 Ko^[12]用 PMA_{xx}-RT-qPCR 方法检测鉴别时发现 PMA_{xx}-RT-qPCR 可以有效区分感染性 NoV。PMA_{xx} 已在区分感染性 NoVs 方面应用广泛, 未来的研究中可对 PMA_{xx} 浓度、照射时间等处理条件进一步优化。

PGM-RT-qPCR 与 PMA-RT-qPCR 已应用于 HHP 处理对 NoV 消减灭活效果评价的研究, 研究显示经 PGM 或 PMA 处理后, 500 MPa HHP 对 NoV 灭活的减少量要比仅用 qPCR 多, GI.1 型 NoV 减少 3 lg, GI.4 型可减少 4 lg^[40-41]。由于 PMA 与 NoV 核酸结合的效率取决于浓度、光活化及

孵育时间等诸多因素，这些因素均会对 PMA 与 NoV 的结合效率产生影响。而 PGM 可以与 NoV 特异性结合，所以 PGM 在检测感染性 NoV 灵敏度方面优于 PMA。PGM 的成本与 PMA 相近，综合而言，PGM 与免疫磁珠、qPCR 结合在区分感染性 NoV 中具有较大的推广潜力。

3 牡蛎中 NoV 的防控措施

3.1 热加工方法

热处理是灭活牡蛎中 NoV 的有效方法之一，中国疾病预防控制中心指南显示，餐具表面 NoV 的消除需煮沸消毒 30 min。将带壳牡蛎蒸煮 3 min，消化道内部温度仅有 63 ℃，

不足以灭活 NoV。将受 NoV 污染的牡蛎消化腺内部温度保持在 90 ℃ 持续 90 s，即可实现病毒灭活^[42]。但过度加热会对牡蛎的风味和外观产生负面影响。

3.2 牡蛎收获后净化处理消减 NoV

牡蛎在收获后，通常会在净化池中暂养 2~3 d，使其通过自身作用排出有毒有害物质。此处理对牡蛎中细菌的消减效果较好，但对 NoV 的消减效果不显著^[43]。由表 1 可知，净化对 NoV 消减效果不明显，延长净化时间可以在一定程度上消减 NoV，但其效果仍难以达到 NoV 安全剂量水平。因此，为了保持牡蛎的新鲜美味且兼顾安全性，还需依赖 HHP 等非热现代食品加工技术的发展。

表1 净化对牡蛎中诺如病毒消除效果的影响

Table 1 Effect of purification on elimination of NoV in oysters

诺如病毒类型 Genotype	净化时间 Clarification time	诺如病毒初始拷贝数 Initial copies	净化后诺如病毒拷贝数 Copies after depuration	参考文献 Reference
GII	23 h	2.7×10^4 拷贝·g ⁻¹	3.9×10^4 拷贝·g ⁻¹	[43]
GI	8 d	1.4×10^4 拷贝·g ⁻¹	4.6×10^3 拷贝·g ⁻¹	[44]
	8 d	5.9×10^4 拷贝·g ⁻¹	7.6×10^3 拷贝·g ⁻¹	
GII	10 d	1.7×10^3 拷贝·g ⁻¹	1.8×10^3 拷贝·g ⁻¹	[45]
GI	8 周	3.8×10^4 拷贝·g ⁻¹	<100 拷贝·g ⁻¹	[44]
GI	6 周	$(1 \sim 2) \times 10^6$ 拷贝·个 ⁻¹	1×10^4 拷贝·个 ⁻¹	[46]
	6 周	$(1 \sim 2) \times 10^6$ 拷贝·个 ⁻¹	3.8×10^4 拷贝·个 ⁻¹	

3.3 HHP 处理对牡蛎中 NoV 的消减控制效果

HHP、辐照、酸性电解水等方法常用于杀灭贝类中的有害病原体，这些非热处理方法能较好地保持牡蛎原有的营养、口感、风味、色泽以及新鲜度。在辐照过程中，射线穿透牡蛎，可直接或间接破坏 NoV 的核酸以及衣壳蛋白，从而杀死 NoV。低剂量 (<10 kGy) 的辐射不会改变产品原有的感观性状，保证了其营养价值且无任何有害物质残留。酸性电解水的主要功能成分是次氯酸，次氯酸分子量小，可以扩散到细胞体内，使病毒衣壳蛋白氧化，从而灭活 NoV^[47]。辐照和电解水技术在牡蛎加工中虽有应用，但并不广泛。目前，牡蛎加工中应用最广泛的是 HHP 技术，可在消减牡蛎中有害病原体的同时实现脱壳。

3.3.1 HHP 灭活 NoV 的原理及牡蛎品质的变化 HHP 是食品工业广泛应用的一种控制食源性病原体的非热加工处理方法^[48-49]。目前，HHP 技术在牡蛎等双壳类的加工中主要用于脱壳，且剥离的贝肉完整，可以节省劳动力^[50]。通常用于牡蛎等贝类加工的压力范围为 200~600 MPa，应用 HHP 技术处理牡蛎时，压力迫使牡蛎组织中的水进入病毒，导致蛋白质三级和四级结构发生变化，使病毒衣壳蛋

白变性，从而致使病毒生物活性和繁殖能力丧失，无法与宿主细胞表面受体结合^[51-52]。使用 HHP 处理时，压力在整个牡蛎中传递均匀、瞬时，且过程中温度变化很小 (约为 3 ℃ 每 100 MPa)，可以减少食品的形变和感官特性的改变^[53]。

与热加工处理方法相比，HHP 技术可以降低对食品造成的质量损失，保留大部分天然的色、味，维生素和挥发性化合物等对热敏感的营养物质可保持不变^[54]，且对产品的形状、大小没有要求^[55]。研究表明 HHP 处理可能会对牡蛎的外观、颜色、气味和质地产生影响。目前，在牡蛎加工生产中，一般认为压力超过 300 MPa 会影响其理化品质，使其颜色变黄，这是由于 HHP 可以加剧脂肪的氧化，且氧化程度与压力处理水平呈正相关^[56]。但总体来说利大于弊，原因为：1) 使用 HHP 对牡蛎进行开壳后，肉比较完整，这点要优于传统的人工开壳方式，手工开壳时牡蛎肉可能会被刀片切碎。2) HHP 处理后，牡蛎肉的硬度和耐咀嚼性略有增强。硬度是评价牡蛎新鲜度的一个重要指标，HHP 处理后的牡蛎肉硬度轻微增强，优于未处理牡蛎。3) 在压力的作用下，牡蛎壳内的水被挤压到组织内部，使

其多汁性和风味得到很好的保持^[57]。

3.3.2 影响 HHP 灭活效果的因素 HHP 处理 NoV 时,有许多需要考虑的因素,虽然对消灭效果具决定性作用的是施加的压力水平,但加压时间、加压初始温度及 NoV 所在基质等也会对消灭效果产生相当大的影响。研究表明,延长加压时间确实会使 NoV 减少量增多,但随着时间的延长,病毒减少量差异变小^[58]。牡蛎含有大量的蛋白质和脂肪,这些物质会在 HHP 处理过程中对 NoV 形成保护作用,降低 HHP 对 NoV 的消灭效果;低 pH 也会抑制 HHP 对 NoV 的消灭效果^[59]。有研究认为温度对消灭效果的影响较大,降低加压温度,如 4 ℃ 或 6 ℃ 下与 20 ℃ 相比,前者 NoV 的减少量显著提高^[39, 41]。

3.3.3 HHP 对 NoV 消灭效果的研究 由于 HHP 处理对贝类的感官特征和营养品质的影响很小,国内外研究者对应用 HHP 来消灭牡蛎等贝类中的 NoV 产生了浓厚的兴趣。HHP 对 NoV 研究的试验表明,需要 400 MPa 以及更高压力才能使牡蛎中的 NoV 大量灭活^[41, 60-62]。HHP 对牡蛎中 NoV 消灭效果的影响见表 2。Leon 等^[38]对人类志愿者进行了双盲临床试验,以评估 HHP 灭活 GI.1 NoV 所需条件,将 4 lg 基因拷贝数的 GI.1 NoV 注入牡蛎,结果显示只有 600 MPa、6 ℃ 下 NoV 才完全灭活,受试者完全未出现感染情况。400 MPa、6 ℃ 处理下,受试者患病概率降低,可以推测此处理条件可以灭活大多数 NoV。Ye 等^[39]于 0 ℃、350 和 500 MPa 下对牡蛎中的 GI.1 和 GII.4 NoV 进行处

表2 超高压对牡蛎中诺如病毒消灭效果的影响

Table 2 Effects of high hydrostatic pressure on inactivation effect of NoV in oysters

型别 Genotype	加压基质 Matrix	压力 Pressure/MPa	温度 Temperature/℃	时间 <i>t</i> /min	初始拷贝数 Initial copies/lg	诺如病毒减少量 Reduction/lg	参考文献 Reference					
GII.4	牡蛎上清液	300	25	5	4	1.0	[41]					
			6			3.5						
		400	25			1.4						
			6			3.9						
		500	25			1.7						
			6			>4.0						
		600	25			1.7						
			6			>4.0						
GII.4	牡蛎匀浆	300	25	5	4	1.7						
			6			2.9						
		400	25			3.6						
			6			3.6						
		600	25			—						
			6			>4.0						
		GI.1	牡蛎			600		6	5	4	>4.0	[38]
GII.4	牡蛎匀浆	300	25	2	4~5	0.7	[39]					
			0			3.2						
		350	25			3.6						
			0			>4.2						
GI.1	牡蛎匀浆	450	25	5		0.7						
			0			3.2						
		500	25			0.8						
			0			>4.3						
		600	6			>4						

理, NoV 基因拷贝数可减少4 lg。Takahashi 等^[62]对缓冲液、牡蛎匀浆、带壳牡蛎3种基质中的NoV进行HHP处理, 结果表明HHP对这3种基质中的NoV均有消减效果, 但在缓冲液、牡蛎匀浆、带壳牡蛎中的消减效果依次降低, 表明HHP对NoV的消减效果与病毒所处的环境基质有关, 牡蛎中的脂肪和蛋白质可以保护NoV不受HHP影响。此外, HHP处理过程中时间、pH、盐度等对病毒的灭活效果也有一定影响, 在中性pH条件下, GI.1和GII.4 NoV的减少量(2.3 lg和>3.8 lg)高于pH=4(0.4 lg和1.2 lg)^[21]。

此外, Kim 等^[63]将紫外线照射与HHP处理结合起来灭活NoV的实验表明两者对病毒具有协同灭活作用。在实际生产中的成功应用证明, 与单独的HHP处理相比, 紫外照射辅助组合可实现更好的病毒灭活效果。

3.3.4 HHP在牡蛎产业应用中的挑战 HHP技术可以有效消减牡蛎体内的NoV, 但它在牡蛎加工中的广泛应用仍面临诸多挑战。首先, 最主要的挑战是设备成本较高, 对小规模经营的牡蛎养殖场来说经济负担太大。其次, 多个牡蛎养殖场联合共用一台HHP处理装置可降低成本, 但也存在一些问题: 若牡蛎养殖区分布广, 会导致无法在短时间内及时加工牡蛎, 这也是高品质牡蛎生产加工中所面临的问题; 在牡蛎生产旺季时, 又会因生产消费高峰而导致设备供不应求。最后, HHP技术生产的牡蛎产品, 考虑其运作成本, 将以高端牡蛎产品为主, 且适合短期消费, 现今在大众接受普及度方面相对较低。目前有关HHP对牡蛎中NoV消减效果的研究多以人工污染牡蛎匀浆为主, 在评估消减效果方面的准确性不足, 同时加压和卸压过程中可能发生变化和内在反应, 这些还需更深入的研究。

4 展望

食源性NoV引发的公共安全事件越来越引起公众的关注。中国是世界上最大的牡蛎生产国, 牡蛎是NoV传播的重要载体, 其食用安全至关重要。研究牡蛎同NoV的结合特点与机制, 建立可区分NoV感染性的检测方法, 评价不同加工方式对NoV的消减效果, 是提高牡蛎食用安全性的重要手段。在保持牡蛎的感官品质和营养物质的前提下, 应用HHP处理等非热加工技术建立有效消减牡蛎中NoV的方法, 开发新的牡蛎加工产品, 是产业发展的迫切需要。

参考文献:

- [1] 苏来金. 诺如病毒在贝类中的分布及与牡蛎类组织血型抗原结合机制研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 3-4.
- [2] WANG J, DENG Z J. Modeling and prediction of oyster norovirus outbreaks along Gulf of Mexico coast[J]. *Environ Health Persp*, 2016, 124(5): 627-633.
- [3] 周德庆, 苏来金, 赵峰, 等. 诺如病毒在贝类中的富集特性与机制研究进展[J]. *病毒学报*, 2015, 31(3): 313-317.
- [4] HASSAN E, BALDRIDGE M T. Norovirus encounters in the gut: multifaceted interactions and disease outcomes[J]. *Mucosal Immunol*, 2019, 12: 1259-1267.
- [5] 俞进存, 向以斌, 靳森, 等. 2015~2018年玉溪市5岁以下儿童诺如病毒分子流行病学分析[J]. *病毒学报*, 2020, 36(3): 110-118.
- [6] 王美欢, 郭莉敏, 凌水权. 一起幼儿园诺如病毒感染性腹泻暴发调查[J]. *寄生虫病与感染性疾病*, 2020(1): 41-44.
- [7] WESTRELL T, DUSCH V, ETHELBERG S, et al. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010[J]. *Eurosurveillance*, 2010, 15(12): 19524.
- [8] BAKER K, MORRIS J, MCCARTHY N, et al. An outbreak of norovirus infection linked to oyster consumption at a UK restaurant, February 2010[J]. *Public Health*, 2011, 33(2): 205-211.
- [9] KRONEMAN A, VENNEMA H, HARRIS J, et al. Increase in norovirus activity reported in Europe[J]. *Weekly Releases*, 2006, 11(50): 3093.
- [10] WANG X, WEI Z, GUO J, et al. Norovirus activity and genotypes in sporadic acute diarrhea in children in Shanghai during 2014-2018[J]. *J Pediatr Inf Dis Soc*, 2019, 38(11): 1085.
- [11] DICAPRIO E, YE M, CHEN H, et al. Inactivation of human norovirus and Tulane virus by high pressure processing in simple mediums and strawberry puree[J]. *Agroecol Sust Food*, 2019, 3: 26.
- [12] KIM S Y, KO G. Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2012, 55(3): 182-188.
- [13] SARMENTO S K, GUERRA C R, MALTA F C, et al. Human norovirus detection in bivalve shellfish in Brazil and evaluation of viral infectivity using PMA treatment[J]. *Mar Poll Bull*, 2020, 157: 111315.
- [14] RANDAZZO W, LÓPEZ-GÁLVEZ F, ALLENDE A, et al. Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water[J]. *Int J Food Microbiol*, 2016, 229: 1-6.
- [15] AHMED H, MAUNULA L, KORHONEN J. Reduction of norovirus in foods by nonthermal treatments: a review[J]. *J Food Protect*, 2020, 83(12): 2053-2073.
- [16] LIU D, ZHANG Z, HEWITT J, et al. Surveillance of human norovirus in oysters collected from production area in Shandong Province, China during 2017-2018[J]. *Food Control*, 2020, 121(10): 7649.
- [17] MEGHNATH K, HASSELBACK P, MCCORMICK R, et al. Outbreaks of norovirus and acute gastroenteritis associated with

- British Columbia oysters, 2016–2017[J]. Food Environ Virol, 2019, 11(2): 138-148.
- [18] UEKI Y, AMARASIRI M, KAMIO S, et al. Human norovirus disease burden of consuming *Crassostrea gigas* oysters: a case-study from Japan[J]. Food Control, 2021, 121: 107556.
- [19] GUIX S, FUENTES C, PINTO R M, et al. Infectivity of norovirus GI and GII from bottled mineral water during a waterborne outbreak, Spain[J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(1): 134.
- [20] MCINTYRE L, GALANIS E, MATTISON K, et al. Multiple clusters of norovirus among shellfish consumers linked to symptomatic oyster harvesters[J]. J Food Protect, 2012, 75(9): 1715-1720.
- [21] GYAWALI P, FLETCHER G C, MCCOUBREY D J, et al. Norovirus in shellfish: an overview of post-harvest treatments and their challenges[J]. Food Control, 2019, 99: 171-179.
- [22] 寇晓霞, 吴爱武, 范宏英. 广东省市售牡蛎中诺如病毒污染调查[J]. 现代预防医学, 2018, 45(24): 29-32.
- [23] 吕素玲, 谭冬梅, 姚雪婷, 等. 广西养殖牡蛎中诺如病毒的污染状况及风险评估[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(5): 509-513.
- [24] 马丽萍. 贝类中诺如病毒的风险评估及与组织血型抗原相关性[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 38.
- [25] MA L, SU L, LIU H, et al. Norovirus contamination and the glycosphingolipid biosynthesis pathway in Pacific oyster: a transcriptomics study[J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 66: 26-34.
- [26] Le GUYADER F S, KROL J, AMBERT-BALAY K, et al. Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(3): 915-920.
- [27] Le GUYADER F S, PARNAUDEAU S, SCHAEFFER J, et al. Detection and quantification of noroviruses in shellfish[J]. Appl Environ Microb, 2009, 75(3): 618-624.
- [28] 刘慧, 马丽萍, 赵峰, 等. 长牡蛎类 HBGA 的提取与组织分布以及温度和盐度对其表达的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(2): 236-243.
- [29] 刘萌, 刘慧, 赵峰, 等. 溶氧量及 pH 对太平洋牡蛎类 A 型组织血型抗原表达的影响研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019(8): 7.
- [30] MA L, LIU H, SU L, et al. Histo-blood group antigens in *Crassostrea gigas* and binding profiles with GII.4 Norovirus[J]. J Oceanol Limnol, 2018, 36(4): 1383-1391.
- [31] QUANG LE H, SUFFREDINI E, TIEN PHAM D, et al. Development of a method for direct extraction of viral RNA from bivalve molluscs[J]. Lett Appl Microbiol, 2018, 67(5): 426-434.
- [32] ZHANG L, XUE L, GAO J, 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, 2019, 111: 107032.
- [33] IMAMURA S, KANEZASHI H, GOSHIMA T, et al. Next-generation sequencing analysis of the diversity of human noroviruses in Japanese oysters[J]. Foodborne Pathog Dis, 2017, 14(8): 465-471.
- [34] STRUBBIA S, SCHAEFFER J, BESNARD A, et al. Metagenomic to evaluate norovirus genomic diversity in oysters: impact on hexamer selection and targeted capture-based enrichment[J]. Int J Food Microbiol, 2020, 323: 108588.
- [35] NASHERI N, PETRONELLA N, RONHOLM J, et al. Characterization of the genomic diversity of norovirus in linked patients using a metagenomic deep sequencing approach[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 73.
- [36] SURESH M, HARLOW J, NASHERI N. Evaluation of porcine gastric mucin assay for detection and quantification of human norovirus in fresh herbs and leafy vegetables[J]. Food Microbiol, 2019, 84: 103254.
- [37] KINGSLEY D H, VINCENT E M, MEADE G K, et al. Inactivation of human norovirus using chemical sanitizers[J]. Int J Food Microbiol, 2014, 171: 94-99.
- [38] LEON J S, KINGSLEY D H, MONTES J S, et al. Randomized, double-blinded clinical trial for human norovirus inactivation in oysters by high hydrostatic pressure processing[J]. Appl Environ Microb, 2011, 77(15): 5476-5482.
- [39] YE M, LINGHAM T, HUANG Y, et al. Effects of high-hydrostatic pressure on inactivation of human norovirus and physical and sensory characteristics of oysters[J]. J Food Sci, 2015, 80(6): 1330-1335.
- [40] MONTEIRO S, SANTOS R. Enzymatic and viability RT-qPCR assays for evaluation of enterovirus, hepatitis A virus and norovirus inactivation: implications for public health risk assessment[J]. J Appl Microbiol, 2018, 124(4): 965-976.
- [41] YE M, LI X, KINGSLEY D H, et al. Inactivation of human norovirus in contaminated oysters and clams by high hydrostatic pressure[J]. Appl Environ Microb, 2014, 80(7): 2248-2253.
- [42] ALFANO-SOBSEY E, SWEAT D, HALL A, et al. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission[J]. Epidemiol Infect, 2012, 140(2): 276-282.
- [43] MCLEOD C, POLO D, Le SAUX J C, et al. Depuration and relaying: a review on potential removal of norovirus from oysters[J]. Compr Rev Food Sci F, 2017, 16(4): 692-706.
- [44] DROUAZ N, SCHAEFFER J, FARKAS T, et al. Tulane virus as a potential surrogate to mimic norovirus behavior in oysters[J]. Appl Environ Microb, 2015, 81(15): 5249-5256.
- [45] UEKI Y, SHOJI M, SUTO A, et al. Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration[J]. Appl Environ Microb, 2007, 73(17): 5698-5701.
- [46] CHOI C, KINGSLEY D H. Temperature-dependent persistence of human norovirus within oysters (*Crassostrea virginica*)[J]. Food Environ Virol, 2016, 8(2): 141-147.
- [47] 李泮生, 黄雅婷, 阮征. 非热杀菌技术在生食水产品中的应用研究进展[J]. 水产学报, 2020, 44(10): 1-18.
- [48] GAYÁN E, GOVERS S K, AERTSEN A J B C. Impact of high hydrostatic pressure on bacterial proteostasis[J]. Biophys Chem,

- 2017, 231: 3-9.
- [49] SIDO R F, HUANG R, LIU C, et al. High hydrostatic pressure inactivation of murine norovirus and human noroviruses on green onions and in salsa[J]. *Int J Food Microbiol*, 2017, 242: 1-6.
- [50] LOU F, NEETOO H, CHEN H, et al. High hydrostatic pressure processing: a promising nonthermal technology to inactivate viruses in high-risk foods[J]. *Annu Rev Food Sci T*, 2015, 6: 389-409.
- [51] KINGSLEY D H. High pressure processing of bivalve shellfish and HPP's use as a virus intervention[J]. *Foods*, 2014, 3(2): 336-350.
- [52] BONFIM R C, OLIVEIRA F A D, GODOY R L D O, et al. A review on high hydrostatic pressure for bivalve mollusk processing: relevant aspects concerning safety and quality[J]. *Food Sci Technol*, 2019, 39(3): 515-523.
- [53] RENDUELES E, OMER M K, ALVSEIKE O, et al. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2011, 44(5): 1251-1260.
- [54] HEINZ V, BUCKOW U R. Food preservation by high pressure[J]. *J Consum Prot Food S*, 2010, 5(1): 73-81.
- [55] KOVAČ K, DIEZ-VALCARCE M, HERNANDEZ M, et al. High hydrostatic pressure as emergent technology for the elimination of foodborne viruses[J]. *Trends Food Sci Tech*, 2010, 21(11): 558-568.
- [56] VÁZQUEZ M, TORRES J A, GALLARDO J M, et al. Lipid hydrolysis and oxidation development in frozen mackerel (*Scomber scombrus*): effect of a high hydrostatic pressure pre-treatment[J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2013, 18: 24-30.
- [57] NARWANKAR S P, FLIMLIN G E, SCHAFFNER D W, et al. Microbial safety and consumer acceptability of high-pressure processed hard clams (*Mercenaria mercenaria*)[J]. *J Food Sci*, 2011, 76(6): 375-380.
- [58] KINGSLEY D H. High pressure processing and its application to the challenge of virus-contaminated foods[J]. *Food Environ Virol*, 2013, 5(1): 1-12.
- [59] LI X, CHEN H, KINGSLEY D H. The influence of temperature, pH, and water immersion on the high hydrostatic pressure inactivation of GI.1 and GI.4 human noroviruses[J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 167(2): 138-143.
- [60] KINGSLEY D H, HOLLIMAN D R, CALCI K R, et al. Inactivation of a norovirus by high-pressure processing[J]. *Appl Environ Microb*, 2007, 73(2): 581-585.
- [61] KINGSLEY D H, CALCI K, HOLLIMAN S, et al. High pressure inactivation of HAV within oysters: comparison of shucked oysters with whole-in-shell meats[J]. *Food Environ Virol*, 2009, 1(3/4): 137.
- [62] TAKAHASHI M, OKAKURA Y, TAKAHASHI H, et al. Evaluation of inactivation of murine norovirus in inoculated shell oysters by high hydrostatic pressure treatment[J]. *J Food Protect*, 2019, 82(12): 2169-2173.
- [63] KIM S H, SHAHBAZ H M, PARK D, et al. A combined treatment of UV-assisted TiO₂ photocatalysis and high hydrostatic pressure to inactivate internalized murine norovirus[J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2017, 39: 188-196.