· 综 述 ·

食品中病毒提取与检测方法研究进展*

廖宁波[1], 李静[2], 孙亮[1], 王月霞[3], 施晓峰[2], 张严峻[1], 陈江[1], 章荣华[1]

摘 要: 随着食源性疾病事件的频频发生, 食品安全已成为一个严重的世界卫生问题。研究表明大多数食源性疾病的暴发主要是由食源性病毒引起的。此类病毒在许多食物表面或者内部都有分布, 会引起疫病暴发和流行, 危害人体健康, 对食品企业造成重大经济损失。为及时了解食品中病毒情况, 需要对不同食物来源中的食源性病毒进行准确检测。通常食源性病毒的检测分成 3 个部分: 病毒的提取、病毒基因组的纯化和分子检测。但在实际检测中, 由于食物的组成成分差异性大以及食源性病毒污染量少、致病性高等特点, 使得不同食品中病毒的检测难度增加。本文就已报道文献中食源性病毒提取及检测方法加以阐述, 为进一步完善食品中病毒检测方法提供思路。

关键词: 食品; 食源性病毒; 提取; 纯化; 检测

中图分类号: R 117 **文献标志码**: A **文章编号**: 1001-0580(2017)12-1792-06 DOI: 10.11847/zgggws2017-33-12-30

Research progress in extraction and detection of foodborne viruses from food samples

LIAO Ning-bo*, LI Jing, SUN Liang, et al (* *Department of Nutrition and Food Safety, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang Province* 310051, China)

Abstract: As frequent occurrences of the foodborne disease outbreak, food safety has become a severe health problem worldwide. Studies have shown that the viruses are the most common cause for the foodborne diseases. Foodborne viruses can exist on the surface or inside of foodstuffs, cause outbreak and epidemic of the diseases, which are seriously harmful to human health and even bring about inestimable economic losses to the food enterprises. In order to identify the presence of foodborne viruses in food products in a timely manner, sensitive methods are therefore needed. In general, the strategy for detection of foodborne viruses in food products requires 3 steps: virus extraction, purification of the viral genomic material (RNA for the majority of food-borne viruses), and molecular detection. However, in practice, it is more difficult to detect foodborne viruses in foodstuffs, because the amount of viruses in foodstuffs is low and the composition of food matrix is complex. In this review on published literatures, we summarized currently available methods for the detection of viruses in different food matrices to provide references for further studies on foodborne virus detection.

Key words: food; foodborne virus; extraction; purification; detection

近年来, 随着全球食源性疾病和恶性食品污染事件频频发生, 食品安全问题日益成为全球关注的热点。研究表明多数大规模暴发的食源性疾病主要是由病毒引起的[1]。世界卫生组织将这些可直接通过人接触传播或间接通过被污染的水、食物等载体传播, 导致人类患病的病毒定义为"食源性病毒"[2]。由于食品中病毒的分布非常少, 食物的组成成分也存在很大差异, 在去除这些干扰物质的过程中往往会降低原有食品中病毒的浓度[3]。因此, 增加了对在不同组成的食品中病毒检测的难度, 这也成为制约食品中病毒检测技术发展的瓶颈。尽管目前已有一些文献中提到了不同食品的处理方法[4], 但仅有很少一部分在实际操作中被采用。本文阐述在不同组分的食物中收集和提取病毒的方法及其检测结果, 为不同食物来源中食源性病毒的准确检测提供思路。

1 食源性病毒的种类、分布及其危害

食源性病毒包括以粪 - 口途径传播的病毒, 如轮状病毒、冠状病毒、脊髓灰质炎病毒、环状病毒、小圆结构病毒和戊型肝炎病毒, 以及以畜产品为载体传播的病毒, 如口蹄疫病毒、朊病毒和禽流感病毒等[2]。这些病毒通常存在于动植物体内或吸附到动植物表面, 可在食物运送、加工过程中通过各种媒介污染食品。在一般情况下, 病毒在食品中的含量很低, 它们无色、无味、肉眼不可见, 使人无法觉察, 但感染能力却很强, 对于多种食源性病毒来说, 包括肠道病毒, 只要 10 ~ 100 个病毒粒子的剂量, 就能感染易感的人或细胞培养物[2]。同时大多数食源性病毒在离体条件下存活力很强, 对各种理化因素有

* **基金项目**: 浙江省公益性项目(2015C32017); 浙江省医药卫生科技计划项目(骨干人才)(2015RCA003 和 2017KY282)

作者单位: 1. 浙江省疾病预防控制中心营养与食品安全所, 浙江 杭州 310051; 2. 浙江中医药大学; 3. 浙江省检验检疫科学技术研究院

作者简介: 廖宁波(1982 -), 男, 江西上饶人, 助理研究员, 博士, 研究方向: 食源性致病微生物与食品安全。

通讯作者: 孙亮, E-mail: lsun@ cdc. zj. cn

数字出版日期: 2017 - 3 - 3 7:32

数字出版网址: http://kns. cnki. net/kcms/detail/21. 1234. R. 20170303. 0732. 002. html

很强的抵抗能力,耐弱酸和乙醚,用超声波、氯仿处理和反复冻融等方法都不能使其失活[5]。因而它们存在于食品中的量即使很少,对人体健康也仍具有潜在的危害性。如星状病毒可导致胃肠炎;诺如病毒可引起婴幼儿腹泻;轮状病毒可引起成人和儿童胃肠炎;腺病毒可引起眼部感染、胃肠炎、心脏疾病、呼吸性疾病等[5-6]。据美国疾病控制与预防中心报道,1971—2002 年共有 764 次与饮食有关的疾病暴发,其中 8% 由病毒所致,另外有 47% 急性胃肠炎的病原体还未确定,但这 47% 不明原因的急性胃肠炎与病毒引起的急性胃肠炎症状有很大的一致性[7]。食源性病毒还会对世界各国的经济造成重大损失,如近年来在欧洲等地不断发生的口蹄疫。Blackall 等[8](1981)报道,以畜产品为污染源的口蹄疫病毒气溶胶可至少传播 60 km,且在 10 km 以内不沉降,给欧洲肉类食品出口造成了极大损失。因此,发展高效、灵敏、快速的检测方法对加强食源性病毒的检测与监控具有重要意义。

由于大部分食源性病毒还不能够体外培养,因此,其检测方法与食源性细菌有所不同,且发展也较为缓慢。传统的检测方法不仅操作复杂、耗时、且检测灵敏度也不高[9]。随着病毒基因组不断被破译,近年来以分子生物学为基础的病毒检测方法有了非常大的进步[10]。然而,由于食源性病毒所处的食品基质成分复杂多样,因此,在实际病毒提取的前处理中仍然面临着很多困难。目前已被采用的食源性病毒分子生物学检测方法通常包括 3 个步骤:病毒的浓缩和提取、病毒遗传物质的纯化和病毒核酸分子的检测。

2　食源性病毒的浓缩和提取

通常由于病毒在食物中的分布非常少,不同的食物其组成成分存在很大差异,某些成分(蛋白质、多糖等大分子物质)甚至直接影响到后面的纯化及检测结果。因此,测定食品中病毒的关键在于对不同类型食品的前处理方式。以往的文献报道中,已成功应用于食品中病毒检测的前处理方法为病毒颗粒的洗脱(包括酸吸附工序的前处理)——浓缩。

2.1　*食源性病毒颗粒的洗脱*　洗脱 - 浓缩法就是通过适当的缓冲液将病毒颗粒从食物表面洗脱下来再进一步浓缩的一种方法。洗脱液的酸碱度通常对病毒颗粒的洗脱效果影响非常大。在大多数情况下,用 pH 9 ~ 10.5 的碱性缓冲液来洗脱食品表面病毒,因为碱性环境可以使病毒颗粒从食品基质中分离。另一方面,在酸性环境中,病毒粒子结合到食品表面的能力则会得到加强。所以说,酸性环境会影响病毒洗脱的效力,从而降低检测的灵敏度。但是在对食物表面的病毒颗粒进行酸性吸附时,酸性介质还是可以使用的。当使用阴离子交换或超速离心的方法来浓缩洗脱病毒颗粒时,则一般使用中性缓冲液。由于许多食物(尤其是果蔬类食品)中酸性成分含量较高,所以通常使用 Tris-为基础的碱性缓冲液来进行洗脱[11]。此外,磷酸缓冲液(pH 7.6)被用于生菜和新鲜的草莓中甲肝病毒的洗脱;碳酸氢钠缓冲液(1 mol/L)被用于浆果和凉拌菜中的脊髓灰质炎病毒的获取[12]。由于在病毒的提取过程中,牛肉膏和甘氨酸可以减少病毒颗粒对食物成分的非特异性吸附,因此它们常和洗脱液一起使用。其中,高蛋白的牛肉膏还可以促进诺如病毒对聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)分子的吸附。目前已用的洗脱液中牛肉膏的浓度分别是 1% 和 3%[12]。其中含牛肉膏 1%(weight/volume, w/v)的碱性洗脱液中可分别使山竹果中甲肝病毒、诺如病毒和轮状病毒的回收率提高 7 倍、3.5 倍和 5.7 倍[13]。然而,牛肉提取物可能会干扰分子检测方法,导致假阴性结果。因此,病毒洗脱后需进行纯化。至于甘氨酸,一般的使用浓度是 0.05 mol/L。在一些水果和蔬菜类食品的洗脱过程中,也可使用果胶酶。因为在洗脱过程中,果胶酶能通过破坏这类食品中的果胶分子,避免了洗脱过程中胶状物的影响。此外,在通过超速离心来提取食品中的病毒时,大豆蛋白粉能促进病毒从食物表面释放,这使病毒回收效率提高了至少 10 倍[14]。目前,洗脱 - 浓缩的方法已经广泛运用于碳水化合物食品、脂肪/蛋白质食品及水产贝类食品的病毒提取。一般来说不同食品种类中病毒的洗脱方法基本上都是相同的,即它们都采用特定的(碱性或中性)洗脱缓冲液。然而,在浓缩步骤中可采用的方法则非常多,包括 PEG 沉淀、超离心、超滤、免疫浓缩和阳离子分离等方法。

2.2　*食源性病毒颗粒的浓缩和提取*　PEG 沉淀可以使洗脱后的病毒沉淀,提高病毒提取浓度,是食品病毒浓缩的有效方法[15]。PEG 能使病毒在 pH 中性的高离子浓度(0.3 mol/L NaCl)的环境中沉淀下来,而不受其他有机质的干扰[11]。如对于红色浆果来说,这种方法可以使诺如 I 型病毒和诺如 II 型病毒的回收数在每 10 g 浆果中分别达到 10^4 和 10^6 个病毒拷贝数,回收效力分别为 7.4% ~ 61.1% 和 20.7% ~ 47.7%[11]。对于脂肪或蛋白质为基础的食品来说,通过使用碱性或中性洗脱缓冲液结合的浓缩步骤,可从汉堡中成功地回收 10^3 ~ 10^4 个逆转录 - PCR 单位(reverse transcription-PCR unit, RT-PCRU)甲肝病毒、脊髓灰质炎病毒和诺如病毒,同时也可使生奶油和火腿中检测出杯状病毒和诺如病毒的回收

率分别达到 10% 和 24%[16]。碱性和中性洗脱与 PEG 沉淀相结合的方法可用来证实牡蛎和蛤是两起诺如病毒食源性暴发事件的源头[17]。利用碱性缓冲液洗脱、PEG 沉淀方法也使贝样中的噬菌体得到有效浓缩回收,最高回收率达到了 95.4%[18]。

超速离心常被用于从贝类、碳水化合物和脂肪/蛋白质为基础的食品中甲肝病毒和诺如病毒颗粒洗脱后的浓缩步骤。也有些研究把超速离心浓缩与 PEG 沉淀法进行比较,如对于新鲜草莓和树莓来说,超速离心的回收率比 PEG 沉淀的回收率略低大约 0.1%(诺如病毒)和 2.5%(甲肝病毒)[19]。另外,由于超速离心对生菜中辣椒褪绿病毒回收率达到 10%,该方法也被推荐为生菜中的病毒检测方法[20]。该方法在 25 g 牡蛎中以 10% 的回收效率回收了甲肝病毒[21];在意大利蒜味腊肠、烟熏火腿和烤猪排中分别以 3.4%、5.9%、12.5% 的回收率回收了猫科杯状病毒[22]。由于食物样品的碎片和其他成分会影响超速离心方法的进行,在超速离心的浓缩步骤中还需要对离心前洗脱的病毒进行纯化。这种纯化方式包括常规的离心或者用 0.22/0.45 μm孔径过滤去杂质。在超速离心过程中,过滤后的病毒颗粒在高达 120 000 × g 和 235 000 × g 的离心力作用下被沉淀下来。这种浓缩技术的优势是稳定性非常好,但是也有一些劣势,例如设备昂贵。而且如果病毒洗脱液中蔬果中的硬质物不被剔除,也可能会因为难以溶解而影响了浓缩的效果[14]。

超滤浓缩对病毒颗粒的分子量有限制。过滤器中滤膜特定的孔径允许液体和小分子量颗粒(小于 50 ~ 100 kDa)通过,病毒颗粒则会被过滤器拦截。与超速离心相似,超滤步骤中也必须对病毒洗脱液进行额外的纯化,以防止堵塞过滤器。超滤的一个优点是在分离病毒的同时可以去除 RT-PCR 抑制成分。而且,用牛血清蛋白处理过滤器或用超声操作处理病毒洗脱液可提高回收率。Scherer 等[16](2010)报告,使用超滤法从生菜、树莓和火腿中回收诺如病毒的回收率分别为 9%、3%、7%,明显低于用 PEG 沉淀法分别为 23%、7%、24% 的回收率。以超滤为基础的技术,在新鲜草莓、冷冻树莓、冷冻蓝莓和新鲜树莓中的回收率一般在 1.7% ~ 19.6%[13]。与 Scherer 等[16]观点相反的是,一些研究发现使用超滤法在树莓和草莓中的回收率要远远高于 PEG 沉淀法。然而,使用超滤法在生菜中的诺如病毒回收率也仅有 0.1% ~ 1%[20]。

对食品中洗脱病毒进行浓缩的其他方法还有阳离子分离和免疫浓缩。在诺如病毒的免疫浓缩过程中,磁珠表面通过包被 A、B、H(2)和 H(3)型组织 - 血型抗原或者 III 型猪胃粘蛋白,来捕获从食物样品中洗脱下来的诺如病毒颗粒。被磁珠捕获的诺如病毒随后被适宜的缓冲液洗脱下来[23]。对于甲肝病毒的提取来说,磁珠表面包被的是单克隆(K3 - 2F2)甲肝病毒抗体。这个方法已被成功地运用在生菜、绿洋葱、草莓和火腿中甲肝病毒的检测中。如 GI 和 GII 型的诺如病毒在草莓中的回收率分别为 14.1% 和 29.5%,并且该方法在一起有食物引起的诺如病毒暴发案例中也被成功地用于卷心菜和通心粉中病毒的检测[23]。尽管免疫磁珠法可以在各种食品类型(牡蛎,加工产品)中特异性地捕获食源性病毒颗粒,并能够有效地去除 PCR 抑制剂,但问题在于长期使用抗体会导致食源性病毒间的免疫遗传漂移(新的免疫遗传特性病毒)的出现。

阳离子的分离是通过带电荷的磁性颗粒与负电荷的病毒结合,并通过磁珠捕获系统将结合有病毒颗粒的磁珠进一步来浓缩,从而达到将病毒颗粒从食品基质中分离和浓缩的目的。由于该方法中病毒衣壳结合的带负电的蛋白质会和带正电荷的磁性粒子结合,因此,浓缩后的病毒还需进一步的纯化。Fumian 等[24](2009)表示,使用基于过滤器的阳离子方法回收生菜和米纳斯芝士中的诺如病毒的回收率在 5.2% ~ 56.3%。目前一个名为 Pathatrix TM 商业化的自动阳离子分离系统(Matrix Micro-Science, Newmarket, 英国)已上市,在测试中取得了一定程度的成功。如使用 Pathatrix TM 从生菜、绿洋葱、草莓、熟火鸡、牡蛎和蛋糕的病毒洗脱液中浓缩甲肝病毒的回收效率在 17.0% ~ 81.7%,效果较为满意[25]。然而,该项技术无论有没有整合免疫浓缩这个步骤,从生菜、草莓、树莓和绿洋葱中回收诺如病毒的效果都不太稳定。同时,阳离子的分离也有与超速离心法类似的缺点,因为它需要昂贵的设备和专门的技术人员。

除此之外,病毒的浓缩和提取还可以通过直接从食品基质中提取病毒 RNA 法和蛋白酶 K 处理法。直接的病毒 RNA 提取技术包括用异硫氰酸酯(glucopyranosyl isothiocyanate, GITC)/苯酚为主的试剂处理食物产品,随后对已提取的 RNA 再进一步纯化。直接 RNA 提取被成功应用于脂肪性/蛋白质基础的食品中,比如在 10 ~ 30 g 汉堡,火鸡,烤牛肉,通心粉,面条和熟火腿中个回收 1 ~ 100 个诺如病毒 RT-PCRU[26]。用锆珠将牡蛎消化组织撕裂后再用直接 RNA 提取法,已成功在 0.15 g 牡蛎消化组织中回收了 10 个 RT-PCRU 诺如病毒[27]。此方法同时也用在食源性诺如病毒疾病暴发中牡蛎中诺如病毒的检测。然而,Baert 等[28]论证了在检测贻贝消化组织中的诺如 GⅡ型病毒时,洗脱浓缩方法相对于直接 RNA 提取法更具敏感性。尽管如

中国公共卫生 CPH

此,Nenonen 等[29]还是选择直接 RNA 提取法作为病毒提取方法证实了牡蛎是诺如病毒食源性暴发的来源之一。蛋白酶 K 处理法主要是采用蛋白酶 K 和 65 ℃高温处理相结合的方法,从贝类消化组织中提取最常见的肠道病毒[30]。这种酶/高温处理能破坏病毒衣壳,从而释放病毒核酸。但至今,此方法只在贝类食品中检验过。

3　食源性病毒遗传物质的纯化

纯化是进行分子检测方法之前尤其重要的一个环节。通常采用的是过滤或氟氯昂 113、Vertrel® XF、氯仿:正丁醇、纯化(去除食物残渣和抑制物质)洗脱液或病毒的浓缩物。由于氟利昂 113(1,1,2 - 三氯 - 1,2,2 - 三氟乙烷)能提取脂质和脂质双层但不包括蛋白质类(极性)的物质,例如无包膜病毒。因此,氟利昂被用于食品中病毒洗脱液的纯化,但它对臭氧层的破坏以及伴随的环境问题,已逐步被淘汰。杜邦公司开发了一种危害较小的氟氯昂替代物:Vertrel® XF(1,1,1,2,3,4,4,5,5,5 - 十氟戊烷),在以脂肪/蛋白质为主的食物中,Vertrel® XF 在多个病毒提取方案中的用途评估已获得了成功[24]。然而,在贝类病毒的提取中,Vertrel® XF 的运用还未有报道。氟利昂的另一替代方法是由有机溶剂如氯仿:正丁醇混合物进行 RNA 纯化,此方法已用于贝类中病毒 RNA 的直接提取及碳水化合物为基础的食品中诺如病毒的检测[11]。另外还可通过粗棉布过滤或 0.45 μm 和 0.20 μm 的过滤器对洗脱液进行过滤纯化[16]。

4　食源性病毒核酸分子的检测

食源性病毒早期的检测方法主要有电镜观察、细胞培养和酶联免疫等,然而检出率并不高,且有些病毒仍然不能够培养。近年来,伴随着灵敏、高效的 PCR 技术的发展,食源性病毒检测方法得到了快速的完善。PCR 技术是基于天然 DNA 复制规律而设计的一种体外迅速扩增特异性核酸片断的方法,主要根据病毒的基因在不同型别病毒株之间高度变异而在同型之间高度保守这一特性,设计特异性引物来区分病毒的不同血清型,进行定量或半定量分析。因此,PCR 技术具有灵敏度高、特异性强、高效快捷的特点,已逐步运用于多种病毒的检测。由于大多食源性病毒为 RNA 病毒,且 RT-PCR 方法因其应用性强、特异性好、较易操作等特点,因此 RT-PCR 检测法应用得最多[31]。近年来,为提高检测敏感性和特异性,不断地对传统 RT-PCR 进行改进,建立了巢式 RT-PCR、多重引物 RT-PCR、内标定量 RT-PCR、荧光 RT-PCR、实时定量/半定量 RT-PCR 等方法。比如 Mohamed 等[32](2006)建立一种简单的单管反转录实时定量 RT-PCR,该方法利用双探针和 3 条引物(针对 open reading frame 1(ORF1)的复制酶基因和 ORF2 基因)来增强灵敏性,同时还可以区分粪样中不同基因型的诺如病毒;一步法 TaqMan RT-PCR 可以检测并鉴别粪样和贝类样品中的 I 类和 II 类诺如病毒,该方法较巢式 PCR 灵敏度要高,耗时仅为 90 min[30];另外双重荧光 RT-PCR 方法对 G Ⅰ 和 G Ⅱ 型诺如病毒核酸的最低检出限可 10 copies/L,特异性与重复性均较好[33]。

尽管 PCR 法可检测含量极低、不易通过细胞培养的病毒,达到定量或者半定量的效果。然而,大部分 PCR 反应的阳性结果只能表示存在相应的核酸序列,并不一定表示存在具有感染性的、完整的病毒。因此,为了弥补 PCR 方法的缺陷,目前常在 PCR 扩增之前增加预处理过程,先对感染性病毒进行初步筛选,再联合 PCR 对其进行检测。细胞培养与 PCR 方法相结合(integrated cell culture and PCR, ICC-PCR)是近年来兴起的方法,该方法主要利用 PCR 方法快速检测病毒在宿主细胞内复制时产生的 mRNA 来检测具有感染性的病毒。这种方法不仅灵敏度更高,同时还克服了 PCR 不能区分病毒感染性和完整性的不足。此外,免疫捕获联合 PCR 法也广泛运用于病毒的检测,该方法基于免疫学原理,利用待测病毒与其抗体特异性结合的特征,高效捕获并分离完整病毒粒子,再将其与 PCR 技术相结合后,能够同时检测病毒的抗原性及核酸,能去除食物样品中的杂质对检测的干扰,减少了假阴性或假阳性结果[34]。

5　质量控制

食品样品中病毒检测质量过程控制意味着在对检测的整个环节进行适当的控制,这对于检测结果的准确性是相当重要的。在最基本的层面上,过程控制包括添加一种模式病毒作为(平行试验)测试样品。过程控制可以将模式病毒添加到相同的样品中作为内部过程控制(internal process control, IPC),或者添加在一个设置了相同条件的平行分析样品中作为一个外部过程控制(external process control, EPC)。一个内部过程控制需要添加额外的分子检测分析,但因为不同个体的病毒回收率和抑制剂清除率是不同的,内部过程控制允许每个独立样品有各自的提取效力。理论上,过程控制中的模式病毒应具备以下条件:(1)可进行基于相关方法的测试病毒;(2)容易培养;(3)不易自然污染待测试的食物样品。

鼠诺如病毒 1、猫科杯状病毒、经遗传修饰的门

戈病毒和 MS2 噬菌体最常被用作食品肠道病毒检测的过程控制病毒,而辣椒褪绿病毒和脊髓灰质炎病毒相对较少见。鼠诺如病毒 1 作为过程控制菌已成功用于贝壳类、红色浆果和即食食品的病毒测试中[11]。由于其遗传相似性,其在检测人类感染的诺如病毒时作为过程控制模式病毒被推荐使用。猫科杯状病毒是一种能感染猫科动物的水疱疹病毒属,被用于贝类、瓶装水和新鲜农产品中诺如病毒检测的过程控制中。经遗传修饰的门戈病毒是对人体不致病的门戈病毒菌株,能在人宫颈癌细胞(HeLa)中进行培养。它已被作为过程控制的模式病毒广泛应用在贝类和瓶装水中的诺如病毒和甲肝病毒等肠道病毒的检测上。而 MS2 噬菌体作为光滑病毒科家族中一种不致病的噬菌体菌属也被建议作为红色浆果和水中检测甲肝病毒过程中的控制模式病毒[35]。

6 展 望

通常认为引起食源性疾病暴发的病毒数量远远超过目前所报道的。据估计,由于缺乏足够的抽样和检测方法,至少有一半的食源性病毒不为我们所知[36]。理论上,食品中的病毒检测方法应该能够快速有效地确定食源性疾病暴发的源头。但在第一步食品中病毒提取的方法学中仍然存在着一些问题。首先,目前实验室用于检测食源性疾病及食品中病毒检测的方法要么来源于已发表的文章,要么是自己内部建立的,不便于对不同的方法进行比较;其次由于不同的食品组成各不相同,需建立统一的对不同种类食品的特定检测方法体系。对于贝类食品,可使用蛋白酶 K,因为在试验中已证实该方法对贝类中自然污染和接种后诺如病毒检测结果是一致的。对于以碳水化合物为主的食品,如软红水果和生菜,这类食品存在被诺如病毒和甲型肝炎病毒污染风险较大,洗脱 - 浓缩法应该是最合适的方法。然而,要从各种各样的浓缩方法中选出一种合适的也有一定难度。此外,食品中食源性病毒的提取过程通常是耗时耗力,如何开发既省时又省力的方法也是下一步所期待解决的问题。总之,研究人员在食品中食源性病毒的检测道路上仍然面临着很多困难,尤其是关于当前病毒检测方法学上的统一。

参考文献

[1] Atreya CD. Major foodborne illness causing viruses and current status of vaccines against the diseases[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2004, 1(2): 89 - 96.

[2] Halligan A. Food-borne viruses[J]. Nutrition and Food Science, 1992, 92(4): 11 - 13.

[3] Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, van der Poel WH, et al. Detection of noroviruses in foods: a study on virus extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(8): 1949 - 1956.

[4] Bosch A, Sanchez G, Abbaszadegan M, et al. Analytical methods for virus detection in water and food[J]. Food Analytical Methods, 2011, 4(1): 4 - 12.

[5] 欧阳雅博,马慧,金敏,等. 天津市婴幼儿病毒性腹泻诺如病毒检测[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(6): 657 - 658.

[6] Hale A. Foodborne viral infections[J]. BMJ, 1999, 318(7196): 1433 - 1434.

[7] Dewey-Mattia D, Roberts V, Yoder J, et al. Summary of notifiable noninfectious conditions and disease outbreaks: foodborne and waterborne disease outbreaks - United States, 1971 - 2012[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2015, 62(54): 86 - 89.

[8] Blackall RM, Gloster J. Forecasting the airborne spread of foot and mouth disease[J]. Weather, 1981, 36(6): 162 - 167.

[9] 吴清平,寇晓霞,张菊梅. 食源性病毒及其检测方法[J]. 微生物学通报, 2004, 31(3): 101 - 105.

[10] 雷永良,王晓光,梅少林,等. 食品中食源性病毒快速检测方法的建立研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(6): 855 - 857.

[11] Stals A, Baert L, Van Coillie E, et al. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits[J]. Food Microbiology, 2011, 28(1), 52 - 58.

[12] Dubois E, Hennechart C, Merle G, et al. Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: characterization of the method performances[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(2): 141 - 149.

[13] Butot S, Putallaz T, Sanchez G. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(1): 186 - 192.

[14] Rzezutka A, D´Agostino M, Cook N. An ultracentrifugation-based approach to the detection of hepatitis A virus in soft fruits[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108(3): 315 - 320.

[15] 周晓红,李晖,杨杏芬. 食源性及水源性诺如病毒研究进展[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(9): 1213 - 1214.

[16] Scherer K, Johne R, Schrader C, et al. Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak[J]. Journal of Virological Methods, 2010, 169(1): 22 - 27.

[17] Calder L, Simmons G, Thornley C, et al. An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries[J]. Epidemiology and Infection, 2003, 131(1): 745 - 751.

[18] 寇晓霞,吴清平,薛亮,等. 贝类中诺如病毒的研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(2): 200 - 204.

[19] Rzezutka A, Alotaibi M, D´Agostino M, et al. A centrifugation-based method for extraction of norovirus from raspberries[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(9): 1923 - 1925.

[20] Huang CH, Zheng YX, Cheng YH, et al. First report of capsicum chlorosis virus infecting tomato in Taiwan[J]. The American Phytopathological Society, 2010, 94(10): 1263.

[21] Casas N, Amarita F, de Maranon IM. Evaluation of an extracting method for the detection of hepatitis A virus in shellfish by SYBR-Green real-time RT-PCR[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 120(1 - 2): 179 - 185.

[22] Rzezutka A, Chrobocinska M, Kaupke A, et al. Application of an ultracentrifugation-based method for detection of feline calicivirus (a norovirus surrogate) in experimentally contaminated delicatessen meat samples[J]. Food Analytical Methods, 2008, 1(1): 56 - 60.

[23] Park Y, Cho YH, Jee Y, et al. Immunomagnetic separation combined with real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of norovirus in contaminated food[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(13): 4226 - 4230.

[24] Fumian TM, Leite JP, Marin VA, et al. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce[J]. Journal of Virological Methods, 2009, 155(1): 39 - 43.

[25] Papafragkou E, Plante M, Mattison K, et al. Rapid and sensitive detection of hepatitis A virus in representative food matrices[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 147(1): 177 - 187.

[26] Schwab KJ, Neill FH, Fankhauser RL, et al. Development of methods to detect "Norwalklike viruses" (NLVs) and hepatitis A

中国公共卫生 CPH

virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 213 – 218.
[27] de Roda Husman AM, Lodder-Verschoor F, van den Berg HH, et al. Rapid virus detection procedure for molecular tracing of shellfish associated with disease outbreaks[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(4): 967 – 974.
[28] Baert L, Uyttendaele M, Debevere J. Evaluation of viral extraction methods on a broad range of ready-to-eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 123(1 – 2): 101 – 108.
[29] Nenonen NP, Hannoun C, Olsson MB, et al. Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak[J]. Journal of Clinical Virology, 2009, 45(2): 105 – 108.
[30] Jothikumar N, Lowther JA, Henshilwood K, et al. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 1870 – 1875.
[31] Li Y, Zhang C, Xing D, et al. Fast identification of foodborne pathogenic viruses using continuous-flow reverse transcription-PCR with fluorescence detection[J]. Microfluidics and Nanofluidics, 2010, 10(2): 367 – 380.
[32] Mohamed N, Belak S, Hedlund K, et al. Experience from the development of a diagnostic single tube real-time PCR for human caliciviruses, Norovirus genogroups I and II. [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 132(1 – 2): 69 – 76.
[33] 王毅谦,石晶,吴福平,等. GⅠ和GⅡ型诺如病毒双重荧光RT-PCR法检测[J]. 中国公共卫生,2013,29(4):599 – 602.
[34] Sano T, Smith CL, Cantor CR. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates[J]. Science, 1992, 258(5079): 120 – 122.
[35] Blaise-Boisseau S, Hennechart-Collette C, Guillier L, et al. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control [J]. Journal of Virological Methods, 2010, 166(1 – 2): 48 – 53.
[36] Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 90(1): 23 – 41.

收稿日期: 2013-12-03　　(吴少慧编辑　郑新校对)

中国公共卫生 CPH

· 实验研究 ·

β-谷甾醇对 H_{22} 荷瘤小鼠体内抗肿瘤作用*

林明珠,赵岩,蔡恩博,祝洪艳,郜玉钢,何忠梅,杨鹤,刘双利,张连学

摘　要:目的　探讨 β-谷甾醇对 H_{22} 荷瘤小鼠体内抗肿瘤作用及其机制。**方法**　建立 H_{22} 荷瘤小鼠模型,将荷瘤小鼠随机分为模型组、环磷酰胺组、β-谷甾醇高、低剂量组,每组 10 只,连续给药 14 d,眼球取血后颈椎脱臼处死,称取 H_{22} 荷瘤小鼠的实体瘤重,计算抑瘤率、脾指数、胸腺指数,测定血清学指标,并进行肿瘤和脾脏组织病理学观察。**结果**　与模型组比较,环磷酰胺组、β-谷甾醇高、低剂量组小鼠瘤重减轻,差异均有统计学意义($P<0.05$),环磷酰胺组、β-谷甾醇高、低剂量组小鼠抑瘤率分别为 56.1%、53.0%、41.4%;与对照组比较,模型组小鼠血清中白细胞介素-6(IL-6)、血管内皮生长因子(VEGF)水平[分别为(1 112.47 ± 76.15)、(512.75 ± 22.55)pg/mL]明显升高($P<0.05$);与模型组比较,高剂量 β-谷甾醇组小鼠血清中 IL-6、VEGF 水平[分别为(341.31 ± 31.19)、(356.92 ± 19.45)pg/mL]明显下降,而 IFN-γ 水平[(122.92 ± 13.66)pg/mL]明显升高($P<0.05$);与模型组比较,β-谷甾醇组小鼠肿瘤组织细胞出现一定的坏死区域,肿瘤组织细胞凋亡明显。**结论**　β-谷甾醇对 H_{22} 荷瘤小鼠具有一定的抑瘤作用,其机制可能与其对 IL-6、IFN-γ 和 VEGF 表达的调节有关。

关键词: β-谷甾醇;H_{22} 荷瘤小鼠;体内;抗肿瘤
中图分类号: R 114　**文献标志码:** A　**文章编号:** 1001-0580(2017)12-1797-04　DOI: 10.11847/zgggws2017-33-12-31

Anti-tumor effect of β-sitosterol in H_{22} tumor-bearing mice

LIN Ming-zhu, ZHAO Yan, CAI En-bo, et al (*College of Chinese Herbal Medicines, Jilin Agriculture University, Changchun, Jilin Province* 130118, China)

Abstract: Objective　To study antitumor effect of β-sitosterol and its mechanism in H_{22} tumor-bearing mice. **Methods**　The tumor-bearing ICR mouse model was established with intraperitoneal injection of H_{22} cell suspension and the 10 mice with intraperitoneal injection of normal saline were used as the controls. Then the model mice were randomly divided into a model group, a cyclophosphamide (30 mg/kg) group, and low- and high-dose β-sitosterol (10 and 50 mg/kg) groups (10 mice in each group). All the treatments were administered through intraperitoneal injection once a day continuously for 14 days. At the end of the treatments, the weight of tumor tissues from the tumor-bearing mice was determined and the tumor inhibition rate, the spleen index and the thymus index of the mice were calculated; in addition, serological parameters were measured and the histopathological changes in organs of the mice were observed. **Results**

* **基金项目:** 国家公益性行业科研专项(201303111);吉林省科技发展计划项目(20140204013YY;20150307012YY)
作者单位: 吉林农业大学中药材学院,吉林 长春 130118
作者简介: 林明珠(1993 –),女,河南焦作人,硕士在读,研究方向:天然药物化学成分与生物活性。
通讯作者: 赵岩,E-mail: zhyjlu79@163.com;郜玉钢,E-mail: gaoyugang_2006@163.com
数字出版日期: 2017 – 5 – 9 15:02
数字出版网址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20170509.1502.004.html