

- [27] TTT V, ALTER T, HUEHN S. Prevalence of *Vibrio* spp. in retail seafood in Berlin, Germany [J]. J Food Prot, 2018, 81(4):593-597.
- [28] PASSALACQUA P L, ZAVATTA E, BIGNAMI G, et al. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* in the clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) from Emilia Romagna and Sardinia, Italy [J]. Ital J Food Saf, 2016, 5(1):5709.
- [29] CHANGHAI N, SAUNJIT S. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in retail raw oysters from the eastern coast of Thailand, Southeast Asian [J]. J Trop Med Public Health, 2014, 45(3):662-669.
- [30] COLLIN B, REHNSTAM-HOLM A S. Occurrence and potential pathogenesis of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* on the South Coast of Sweden [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2011, 78(2):306-313.

## 实验技术与方法

# 不同水源中 G II 型诺如病毒实时荧光逆转录聚合酶链式反应检测方法建立及应用

李楠,王佳慧,李凤琴,江涛

(国家食品安全风险评估中心 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

**摘要:**目的 建立不同水源中 G II 型诺如病毒(NoV G II)实时荧光逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测方法,对某市疾病预防控制中心送检的 10 份疑似引起诺如病毒中毒的水样进行 NoV G II 检测。方法 以瓶装水、河水和生活污水为研究对象,采用硝酸纤维素膜-聚乙二醇(PEG)沉淀法富集病毒,对取样体积、病毒洗脱条件、PEG 终浓度及 PEG 沉淀条件等进行了优化,提取病毒 RNA、建立实时荧光 RT-PCR 检测方法;通过外加 MS2 计算方法的回收率,评价所建方法对水样中诺如病毒的回收效果。结果 建立的方法对瓶装水、河水和生活污水中 NoV G II 的平均回收率分别为  $(60.1 \pm 8.0)\%$ 、 $(22.0 \pm 6.5)\%$  和  $(35.7 \pm 8.1)\%$ , 10 份送检水样中 3 份检出 NoV G II。结论 建立的实时荧光 RT-PCR 方法适用于瓶装水、河水和生活污水中 NoV G II 的检测,饮用水被 NoV G II 是引发某市人员中毒的原因之一。

**关键词:**实时荧光逆转录聚合酶链式反应; G II 型诺如病毒; 水; 检测方法

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2018)06-0597-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.06.009

## Development and application of real-time reverse transcription polymerase chain reaction for detection of *Norovirus* G II in water

LI Nan, WANG Jiahui, LI Fengqin, JIANG Tao

(NHC Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To develop a real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method for detection of *Norovirus* G II (NoV G II) in water. To survey NoV G II in 10 water samples. **Methods** Nitrocellulose membrane and PEG precipitation were used to enrich virus in bottle water, river and sewage samples, and real-time RT-PCR method was developed. The recoveries from MS2 spiked samples were used to evaluate the effect of the established method. **Results** The average recoveries of bottle water, river and sewage samples were  $(60.1 \pm 8.0)\%$ ,  $(22.0 \pm 6.5)\%$  and  $(35.7 \pm 8.1)\%$  respectively. Three in 10 submitted water samples were positive for NoV G II. **Conclusion** A real-time PCR method for detection of NoV G II in water sources was developed in this study. NoV G II was one of the reasons of the poisoning incidents.

**Key words:** Real-time reverse transcription polymerase chain reaction; *Norovirus* G II; water; detection method

收稿日期:2018-11-14

作者简介:李楠 女 副研究员 研究方向为食品卫生 E-mail:linan100041@cfsa.net.cn

通信作者:江涛 男 研究员 研究方向为食品卫生 E-mail:jiangtao001@cfsa.net.cn

诺如病毒(*Norovirus*, NoV)是引起我国秋冬季学校和托幼机构等人群聚集场所急性胃肠炎暴发的主要病原体之一,具有高度感染性。NoV根据基因特征至少可分为6个基因组GI~GVI和40多个基因型,最常见引发人类感染的为GII(多数为GII.4),其次为GI,GIV的感染则非常有限<sup>[1]</sup>。水是NoV的主要传播媒介之一,多次在世界范围内引发急性胃肠炎暴发,涉及运河水、洗澡水、矿泉水、污水等多种水源<sup>[2-4]</sup>。2016年西班牙加泰罗尼地区4146人饮用了被人粪便污染的瓶装水后,出现了恶心、呕吐与发烧等症状。我国报道的水源性NoV暴发多集中在井水、池塘水、自来水及桶装水,据浙江省突发公共卫生事件报告管理信息系统,2003—2013年间共暴发14起桶装水导致的疫情。其中较大规模暴发出现在2014年2月,浙江省嘉兴市多所学校暴发NoV感染疫情,累计报告发病924人<sup>[5-10]</sup>。由此可见,水源性传播NoV可能引发人群大规模疫情暴发,严重危害公众健康。建立不同水源中NoV的检测方法,提高基层单位的检测能力,是适应我国水源污染NoV安全防控需要的当务之急。

国际标准化组织(ISO)规定了瓶装水中NoV实时荧光逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)的定量和定性检测方法<sup>[11-12]</sup>,该方法采用正电膜吸附、超滤浓缩管富集瓶装水中的NoV,不适用于污水、自来水、地下水、养殖水等基质复杂的水体。我国2017年6月正式实施的GB 4789.42—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验》<sup>[13]</sup>中,也未涉及水中NoV检测。本试验采用硝酸纤维素膜吸附-聚乙二醇(PEG)沉淀法对瓶装

水、河水及生活污水中NoV进行富集并优化其条件,建立了适用于不同基质水中NoV实时荧光RT-PCR检测方法,并将其应用于疑似中毒样品的检测,为水源性NoV胃肠炎监测预警提供技术支持,具有较强的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

在北京地区采集市售瓶装水、护城河水,在某生活污水处理厂采集排放口污水,用于方法的建立。疑似NoV中毒水样10份,由某市疾病预防控制中心送检。所有样品4℃保存,1周内检测。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

实时荧光PCR仪(美国Bio-Rad)、小型高速离心机、高速冷冻离心机、pH计、真空抽滤装置、低温摇床。

QIAamp Viral RNA Mini Kit(上海凯杰企业管理有限公司),MS2过程控制试剂盒(RT-PCR探针法)、一步法RT-qPCR Mix(*Taqman*)、NoV GII外加扩增控制RNA均购自北京良润生物科技有限公司,One-Step<sup>TM</sup> PCR Inhibitor Removal Kit(美国ZYMO),PEG8000(上海拜力生物公司),硝酸纤维素膜(孔径0.45 μm,直径47 mm,德国默克密理博),牛肉膏(英国OXOID),DNase/RNase-Free ddH<sub>2</sub>O(北京天根生化科技有限公司),NoV GII引物及探针由上海英骏生物技术有限公司合成。TGBE(Tris、甘氨酸、牛肉膏)、5 × PEG8000/NaCl和2.5 × PEG8000/NaCl的配制方法见表1。

表1 试剂配制

Table 1 Reagents preparation

洗脱缓冲液	成分及制备方法
TGBE	Tris base 12.1 g,甘氨酸 3.8 g,牛肉膏 10 g,超纯水 1 L,pH调节至9.5,高压灭菌
5 × PEG8000/NaCl	PEG8000 500 g,NaCl 87 g,加1 000 ml水(加热)溶解,高压灭菌
2.5 × PEG8000/NaCl	PEG8000 250 g,NaCl 43.5 g,加1 000 ml水(加热)溶解,高压灭菌

## 1.2 方法

### 1.2.1 单因素优化

对水中NoV富集、RNA提取和纯化等关键步骤进行单因素优化试验,因素条件见表2。在其他因

素固定的条件下(各因素优化前均默认按水平1操作),每份样品加入10 μl MS2,依次按照A、B、C、D、E的顺序进行试验,每个因素水平进行5份平行样品检测,优化出回收率最高的因素水平。

表2 水中NoV富集优化因素和水平(n=5)

Table 2 Optimum factors and levels of NoV enrichment in water

因素	水平1	水平2	水平3	水平4
A:洗脱条件	超声 10 min	涡旋剧烈振荡 2 min	450 r/min 振荡 20 min	—
B:PEG终浓度	8%	10%	13%	15%
C:PEG沉淀条件	振荡均质 60 s,4℃下 150 r/min 孵育 60 min	4℃下静置 3 h	—	—
D:取样体积	0.5 L	1.0 L	1.5 L	2.0 L
E:PCR抑制剂	未去除	去除	—	—

注:—表示未设置

### 1.2.2 MS2 及病毒的浓缩富集

硝酸纤维素膜吸附:河水、生活污水用中速滤纸过滤(瓶装水无需过滤),量取一定体积水样(因素 D)置于三角瓶中,加入 10  $\mu\text{l}$  MS2 过程控制,振荡混匀。将样品 pH 调节至 3.0,加入 5.08 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  使其终浓度为 0.05 mmol/L。用干净镊子夹取硝酸纤维素膜,置于过滤瓶上,用正压泵在正压下将所有水样缓慢通过硝酸纤维素膜。用干净剪刀将滤膜剪碎,转入 50 ml 离心管。

PEG 沉淀:向离心管中加入 20 ml TGBE 缓冲液,用 6 mol/L HCl 将洗脱液 pH 值调节至 7.0,采用不同方式洗脱病毒(因素 A)。液体转入 50 ml 高速离心管,按不同终浓度(因素 B)加入  $5 \times \text{PEG}8000/\text{NaCl}$  或  $2.5 \times \text{PEG}8000/\text{NaCl}$  溶液。不同条件下沉淀病毒(因素 C),10 000  $\times g$  离心 30 min,弃上清,再离心 5 min 使沉淀紧凑。用 1 000  $\mu\text{l}$  磷酸盐缓冲液(PBS)重悬沉淀,待提取病毒 RNA。

### 1.2.3 病毒 RNA 的提取及 PCR 抑制剂的去除(因素 E)

从 QIAamp Viral RNA Mini Kit 中吸取 560  $\mu\text{l}$  已加入 Carrier RNA 的 Buffer AVL 到 1.5 ml 离心管中,加入 200  $\mu\text{l}$  1.2.2 中病毒富集液,并按照试剂盒说明书操作,共得到 100  $\mu\text{l}$  RNA 洗脱液。

RNA 抑制剂的去除按照 One-Step<sup>TM</sup> PCR Inhibitor Removal Kit 说明书操作。将上述收集的 RNA 洗脱液加入 Zymo-Spin<sup>TM</sup> IV-HRC 离心柱,6 000  $\times g$  离心 1 min。收集液体用于实时荧光 RT-PCR 检测。

### 1.2.4 回收率的计算

以水样中添加的 MS2 回收率作为病毒提取的过程控制,用于计算病毒回收率。按照 MS2 过程控

制试剂盒说明书提取 RNA,10 倍稀释配制成为  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  标准系列,分别取 5  $\mu\text{l}$  检测,以 RNA 浓度 lg 值为  $x$  轴,以其循环阈值(Ct)为  $y$  轴,建立标准曲线。每份水样中添加 10  $\mu\text{l}$  MS2 过程控制,得到 1 000  $\mu\text{l}$  病毒富集浓缩液,取 200  $\mu\text{l}$  提取 RNA,最终得到 100  $\mu\text{l}$  洗脱液,取 5  $\mu\text{l}$  检测。则回收率(%)为 Bio-Rad CFX Manager 3.0 软件计算浓度乘以 5 000。

### 1.2.5 实时荧光 RT-PCR 反应及质量控制

NoV GII 的引物、探针序列参照 ISO/TS 15216-2<sup>[12]</sup> 技术规范合成,上游引物 QNIF2: ATGTTCA GRTGGATGAGRTTCTCWGA;下游引物 COG2R: TCGACGCCATCTTCATTCACA;探针 QINIF<sub>s</sub>: FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-TAMRA,均配制为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。NoV 的实时荧光 RT-PCR 反应采用一步法 RT-qPCR Mix 进行,MS2 的检测参照 MS2 过程控制试剂盒(RT-PCR 探针法)说明书进行。反应体系见表 3,反应参数为:50  $^{\circ}\text{C}$  逆转录 30 min;95  $^{\circ}\text{C}$  预热 5 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火、延伸 30 s,65  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,45 个循环,60  $^{\circ}\text{C}$  采集荧光信号。每份样品检测的反应孔见表 4。

表 3 反应体系(25  $\mu\text{l}$ )

组分	加样量/( $\mu\text{l}$ /反应)	
	NoV G II	MS2
2 $\times$ RT Buffer	12.5	12.5
RT-PCR Enzyme Mix	1	1
引物、探针 Mix	4.125 <sup>a</sup>	1.5 <sup>b</sup>
ddH <sub>2</sub> O	2.375	5.0
RNA 模板	5	5

注:<sup>a</sup> 上、下游引物及探针取样量分别为 1.25、2.25 和 0.625  $\mu\text{l}$ ;<sup>b</sup> 由 MS2 过程控制试剂盒提供

表 4 反应孔设置  
Table 4 Reaction matrix

反应孔	描述
空白对照	A 孔 5 $\mu\text{l}$ 无 RNase 超纯水 + 20 $\mu\text{l}$ NoV G II 引物探针反应体系
阴性对照	B <sup>a</sup> 孔 5 $\mu\text{l}$ 阴性提取对照 RNA + 20 $\mu\text{l}$ NoV G II 反应体系
提取过程控制	C 孔 5 $\mu\text{l}$ 含 MS2 过程控制水样 RNA + 20 $\mu\text{l}$ MS2 过程控制反应体系
	D 孔 5 $\mu\text{l}$ $10^0$ MS2 过程控制 RNA + 20 $\mu\text{l}$ MS2 过程控制反应体系
	E 孔 5 $\mu\text{l}$ $10^{-1}$ MS2 过程控制 RNA + 20 $\mu\text{l}$ MS2 过程控制反应体系
	F 孔 5 $\mu\text{l}$ $10^{-2}$ MS2 过程控制 RNA + 20 $\mu\text{l}$ MS2 过程控制反应体系
	G 孔 5 $\mu\text{l}$ $10^{-3}$ MS2 过程控制 RNA + 20 $\mu\text{l}$ MS2 过程控制反应体系
扩增控制	H 孔 5 $\mu\text{l}$ 含 MS2 过程控制水样 RNA + 1 $\mu\text{l}$ 外加扩增控制 RNA + 19 $\mu\text{l}$ NoV G II 反应体系
	I 孔 5 $\mu\text{l}$ 10 倍稀释的含 MS2 过程控制水样 RNA + 1 $\mu\text{l}$ NoV G II 外加扩增控制 RNA + 19 $\mu\text{l}$ NoV G II 反应体系
	J <sup>b</sup> 孔 5 $\mu\text{l}$ 无 RNase 超纯水 + 1 $\mu\text{l}$ 外加扩增控制 RNA + 19 $\mu\text{l}$ NoV G II 反应体系
样品检测	K 孔 5 $\mu\text{l}$ 含 MS2 过程控制水样 RNA + 20 $\mu\text{l}$ NoV G II 反应体系
	L 孔 5 $\mu\text{l}$ 10 倍稀释的含 MS2 过程控制水样 RNA + 20 $\mu\text{l}$ NoV G II 反应体系

注:<sup>a</sup> 为 B 孔以无 RNase 超纯水提取 RNA 作为模板;<sup>b</sup> 为 J 孔同时作为阳性对照

### 1.2.6 实时荧光 RT-PCR 质量控制

空白对照、阴性对照无荧光信号检出或 Ct 值  $\geq 40$ ,

阳性对照有荧光信号检出且出现典型的扩增曲线,检测有效。MS2 过程控制回收率  $\geq 1\%$ ;若回收率

<1%,需重新检测。扩增控制需满足样品原液抑制指数(H孔 Ct 值-J孔 Ct 值)<2.00,如抑制指数 $\geq$ 2.00,需比较10倍稀释水样的抑制指数(I孔 Ct 值-J孔 Ct 值);如10倍稀释水样扩增的抑制指数<2.00,则扩增有效,采用10倍稀释水样 RNA 的 Ct 值作为结果。上述条件需同时满足,否则检测无效。

### 1.2.7 送检样品的检测

为了验证建立方法的适用性,对北京地区采集的18份水样进行检测。样品检测孔的 Ct 值 $\geq$ 30则判定为 NoV G II 阴性,Ct 值<30则判定为 NoV G II 阳性。

## 2 结果

### 2.1 单因素水平优化及方法回收率

不同因素水平下 MS2 的回收率见表 5。因素

水平 A3 即“450 r/min 振荡 20 min”对病毒的洗脱效果最好,回收率在 79.6%~101.2%。随着 PEG 终浓度的增加回收率提高,在因素水平 B2 即“PEG 终浓度 10%”时达到最高为 80.8%~99.1%,随后逐步降低。因素水平 C1 即“振荡均质 60 s,4℃下 150 r/min 孵育 60 min”的 PEG 沉淀条件下,回收率最优。在优化得到的 A3B2C1 条件下,对不同种类水样进行因素 D 取样体积的优化。瓶装水中 MS2 的回收率在 20.3%~34.3%,4 个水平未显示出较大差异。河水在取样体积达到水平 4 即 2.0 L 时,MS2 的回收率从 19.3%~34.3%下降至 9.6%~19.8%;生活污水在取样体积达到水平 3 即 1.5 L 起,MS2 的回收率从 17.3%~26.8%下降至 8.5%~19.4%;因此,瓶装水、河水、生活污水分别按照 1.5、1.0 和 0.5 L 取样进行因素 E 的优化。

表 5 因素 A~D 不同水平下 MS2 的回收率(n=5)

Table 5 Recovery of MS2 at factor A to D

因素	样品种类	回收率/%			
		水平 1	水平 2	水平 3	水平 4
A:洗脱条件	瓶装水	28.6~61.1	61.9~66.8	79.6~101.2	—
B:PEG 终浓度	瓶装水	67.6~78.0	80.8~99.1	43.4~56.8	29.9~37.5
C:PEG 沉淀条件	瓶装水	26.2~47.5	16.4~27.8	—	—
D:取样体积	瓶装水	26.6~29.0	20.3~27.6	29.5~34.3	29.2~29.9
	河水	24.3~34.3	24.9~31.9	19.3~30.6	9.6~19.8
	生活污水	23.2~26.8	17.3~25.9	8.5~19.4	8.8~18.0

注:—表示未设置

不同种类水样中因素 E(PCR 反应抑制剂)对检测的影响见表 6。瓶装水中 PCR 抑制剂去除前后原液抑制指数分别为 0.55 和 0.28,均小于 2;河水中 PCR 抑制剂去除前原液抑制指数和 10 倍稀释液抑制指数分别为 2.70 和 1.06,去除后分别为 2.42 和 0.29,抑制剂的去除使 10 倍稀释液抑制指数明显下降;生活污水中也得到了相同结果;因此,对河水、生活污水进行 PCR 抑制剂的去除。用建立的方法对不同种类水样中 MS2 的回收率进行检测,瓶装水、河水和生活污水的平均回收率分别为(60.1 $\pm$ 8.0)%、(22.0 $\pm$ 6.5)%和(35.7 $\pm$ 8.1)%,见表 7。

表 6 因素 E 抑制剂的影响

Table 6 Impact of PCR factor E inhibitor

样品种类	水平	原液抑制指数	10 倍稀释抑制指数
瓶装水	水平 1	0.55	0.30
	水平 2	0.28	0.02
河水	水平 1	2.70	1.06
	水平 2	2.42	0.29
生活污水	水平 1	0.74	0.34
	水平 2	0.26	-0.23

### 2.2 样品检测

用所建立的方法对 10 份送检样品进行 NoV G II

表 7 不同水源中 MS2 的回收率(n=5,%)

Table 7 Recovery of MS2 in different water

样品种类	回收率/%					
	1	2	3	4	5	$\bar{x} \pm s$
瓶装水	46.7	65.1	66.6	58.9	63.0	60.1 $\pm$ 8.0
河水	15.1	17.6	20.9	31.6	24.9	22.0 $\pm$ 6.5
生活污水	35.4	43.5	24.9	31.1	43.8	35.7 $\pm$ 8.1

检测。结果显示,检测有效的条件下,1 号、5 号和 8 号样品出现典型的扩增曲线,Ct 值均<30(分别为 27.24、28.59、27.09),判定为 NoV G II 阳性,见表 8。

表 8 送检样品 NoV G II 检测结果

Table 8 Test results of submitted samples

样品编号	样品名称	Ct 值	结果判定
1	饮水机水	27.24	+
2	桶装水	33.54	-
3	自来水	33.62	-
4	饮水机水	31.55	-
5	饮水机水	28.59	+
6	自备井水	31.62	-
7	矿泉水	33.11	-
8	地下污水	27.09	+
9	饮用水	32.86	-
10	洗菜水	32.11	-

注: + 为 NoV G II 阳性, - 为 NoV G II 阴性

### 3 讨论

水中病毒浓度一般很低,需取大体积水样富集后才能检测,ISO/TS 15216-2 采用正电膜吸附-超滤离心从 0.3 ~ 5 L 瓶装水中富集 NoV。本试验前期曾参照该法开展了相关研究,发现受样品基质成分的差异及病毒浓度的影响,不同样品超滤离心后获得的浓缩液体积相差较大,需要根据实际情况调节转速、时间等参数,且存在堵膜的情况,难以建立一个标准化的适用于多种水样的标准化操作。此外,国内外学者对水中 NoV 富集方法的研究多集中在终端超滤-PEG 沉淀病毒。DE GIGLIO 等<sup>[14]</sup>采用 MAXIFLEX 25 ECO 过滤系统和 ULTRAN-MINIFLEX 过滤系统对井水中 NoV 进行两步法连续富集,该过滤系统采用分子截留量 10 kD 的聚丙烯膜,将 20 L 井水最终浓缩到 40 ml。QIN 等<sup>[9]</sup>采用离心、滤纸过滤、硝酸纤维膜吸附、PEG 沉淀法对 2014 年河北省一家宾馆暴发 NoV 急性胃肠炎的饮水井水进行检测,将 5 L 样品浓缩到 1 ml。然而,有学者认为大体积样品同时也将水中的 PCR 抑制剂浓缩,从而干扰 PCR 检测造成假阴性结果;因此,本试验在现有硝酸纤维素膜吸附-PEG 沉淀法基础上,对病毒洗脱条件、PEG 终浓度、PEG 沉淀条件、PCR 反应抑制剂以及不同水样的取样体积进行了优化。

试验结果显示,随着 PEG 终浓度在 8% ~ 15% 范围内的增加,MS2 回收率呈现先增长后下降的趋势,在 10% 时达到最高回收率。此外,本试验结果也证实了取样体积并非越大越好,应因水质而异。瓶装水由于生产中经过了精滤、灭菌等工艺处理,去除了杂质和细菌,MS2 回收率受取样体积影响不大,且 PCR 抑制剂去除前后原液抑制指数均小于 2;而河水在取样量达到 1.5 ~ 2.0 L 时 MS2 回收率呈现降低趋势,且抑制剂去除前原液抑制指数均大于 2,去除后 10 倍稀释液抑制指数率降低明显;因此在实际工作中,应根据水样种类在一定范围内选取不同初始体积检测,并进行抑制剂的去。

本试验采用二次浓缩方法富集病毒,引用 ISO/TS 15216-2 技术规范中公布的 NoV G II 引物、探针检测体系。对 3 种水样 MS2 添加回收试验结果显示,抑制指数、回收率均达到了 GB 4789.42—2016 及 ISO/TS 15216-2 关于检测有效性的要求,对某市疾病预防控制中心送检的 10 份疑似 NoV 中毒水样进行的检测进一步验证方法的适用性,为中毒事件的病原调查提供了佐证。所建方法与国内外同类研究<sup>[15-17]</sup>相比具有适用水样范围广、结果可信度高、方法易推广等特点,但同时也存在一些局限

性问题有待进一步分析研究,例如对大体积水样处理上能力不足以及对更广泛来源水样检测适用性的验证。

### 参考文献

- [1] ROBILOTTI E, DERESINSKI S, PINSKY B A. *Norovirus* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(1):134-164.
- [2] KAUPPINEN A, AL-HELLO H, ZACHEUS O, et al. Increase in outbreaks of gastroenteritis linked to bathing water in Finland in summer 2014 [J]. *Euro Surveill*, 2017, 22(8): 1-8.
- [3] JOOSTEN R, SONDER G J B, PARKKALI S, et al. Risk factors for gastroenteritis associated with canal swimming in two cities in the Netherlands during the summer of 2015: a prospective study [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0174732.
- [4] BLANCO A, GUIX S, FUSTER N, et al. *Norovirus* in bottled water associated with gastroenteritis outbreak, Spain, 2016 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(9):1531-1534.
- [5] 马涛,洪镭,张钟,等. 1 起疑似介水传播的诺如病毒暴发疫情调查报告 [J]. *江苏预防医学*, 2015, 26(4):78-79.
- [6] 吴浩生,旷翠萍,张风雷,等. 深圳市二次供水污染诺如病毒引起感染性腹泻的流行病学调查 [J]. *医学与社会*, 2012, 25(8):31-33.
- [7] 吴红杏,蒲祖伟,姚正才,等. 一起因饮水污染所致的学校诺如病毒感染性腹泻暴发调查 [J]. *实用预防医学*, 2016, 23(8): 977-979.
- [8] 宋建强,朱晓微,楼银伟,等. 饮用不洁桶装水引起的一起诺如病毒急性胃肠炎暴发调查 [J]. *浙江省预防医学*, 2015, 27(10):1045-1048.
- [9] QIN M, DONG X G, JING Y Y, et al. A waterborne gastroenteritis outbreak caused by *Norovirus* G II. 17 in a hotel, Hebei, China, December 2014 [J]. *Food Environ Virol*, 2016, 8(3):180-186.
- [10] SHANG X P, FU X F, ZHANG P, et al. An outbreak of *Norovirus*-associated acute gastroenteritis associated with contaminated barrelled water in many schools in Zhejiang, China [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171307.
- [11] ISO. Microbiology of the food chain—horizontal method for determination of hepatitis A virus and *Norovirus* using real-time RT-PCR—Part 1: method for quantification; ISO/FDIS 15216-1:2017[S]. 2017.
- [12] ISO. Microbiology of food and animal feed—horizontal method for determination of hepatitis A virus and *Norovirus* in food using real-time RT-PCR—Part 2: method for qualitative detection; ISO/TS 15216-2:2013[S]. 2013.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验:GB 4789.42—2016 [S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [14] DE GIGLIO O, CAGGIANO G, BAGORDO F, et al. Enteric viruses and fecal bacteria indicators to assess groundwater quality and suitability for irrigation [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14(6): 558.
- [15] IKNER L A, SOTO-BELTRAN M, BRIGHT K R. New method using a positively charged microporous filter and ultrafiltration for

concentration of viruses from tap water [ J ]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(10):3500-3506.

[16] IKNER L A, SOTO-BELTRAN M, BRIGHT K R. New method using a positively charged microporous filter and ultrafiltration for

concentration of viruses from tap water [ J ]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(10):3500-3506.

[17] 叶晓艳. 饮用水中病毒浓缩及检测方法的研究和应用[D]. 武汉:同济医学院, 2012.

## 实验技术与方法

# 超高效液相色谱-串联质谱法测定纯牛奶中喹乙醇及其代谢物

马晓年, 张秀清, 张瑞雨, 赵丽, 陈俊秀

(昆明市疾病预防控制中心, 云南昆明 650228)

**摘要:**目的 建立可靠的前处理方法, 采用超高效液相色谱-串联质谱法检测纯牛奶中喹乙醇及其代谢物 3-甲基-喹噁啉-2-羧酸(MQCA)。方法 样品经盐酸水解, 乙腈-乙酸乙酯(1:1, V/V)提取, 分析了直接浓缩及分别经 PAX、PEP 固相萃取小柱净化、富集的结果; 以乙腈-0.05% 氨水为流动相, 经 Inertsil ODS-3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3 μm)分离, 采用多反应监测正离子模式进行定性及定量分析。结果 直接浓缩具有较好的回收率, 喹乙醇的方法检出限为 0.06 μg/kg, 方法定量限为 0.20 μg/kg, 在 0.20、1.00、5.00 μg/kg 3 个加标水平下回收率分别为 69.8%、111%、97.4%; MQCA 的方法检出限为 0.02 μg/kg, 方法定量限为 0.10 μg/kg, 在 0.10、1.00、3.00 μg/kg 3 个加标水平下回收率分别为 75.8%、112%、117%。结论 该检测方法适用于纯牛奶中喹乙醇及其代谢物残留的检测。

**关键词:** 喹乙醇; 3-甲基-喹噁啉-2-羧酸; 超高效液相色谱-串联质谱; 纯牛奶; 兽药残留

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2018)06-0602-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2018.06.010

## Determination of olaquinox and its metabolite in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MA Xiaonian, ZHANG Xiuqing, ZHANG Ruiyu, ZHAO Li, CHEN Junxiu

(Kunming Center for Disease Control and Prevention, Yunnan Kunming 650228, China)

**Abstract: Objective** To establish a reliable pretreatment method for olaquinox and its metabolite methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA) in milk with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

**Methods** The sample was hydrolyzed by hydrochloric acid and extracted by ethyl acetate-acetonitrile (1:1, V/V), then the concentration was analyzed directly or after PAX and PEP cartridge purification. The objective compounds were separated using Inertsil ODS-3 column (2.1 mm × 100 mm, 3 μm) with acetonitrile-water (0.05% ammonia) as mobile phase and analyzed by mass spectrometry in the positive electrospray ionization under multiple reaction monitoring mode (MRM). **Results** The result showed that direct concentration had good recovery. The detection limit of olaquinox was 0.06 μg/kg, limit of quantitation was 0.20 μg/kg, the average recoveries or spiked levels of 0.20, 1.00, 5.00 μg/kg were 69.8%, 111% and 97.4%. The detection limit of MQCA was 0.02 μg/kg, the limit of quantitation was 0.10 μg/kg, the average recoveries for spiked levels of 0.10, 1.00, 3.00 μg/kg were 75.8%, 112%, 117%.

**Conclusion** The method was suitable for the detection of olaquinox residual in milk.

**Key words:** Olaquinox; methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; milk; residue of veterinary drug

喹乙醇(olaquinox)又称喹酰胺醇,属喹噁啉类化合物<sup>[1]</sup>,商品名为倍育诺、快育灵,该类药物具有明显的促进动物生长的作用,且具有较强的抑菌作用<sup>[2]</sup>,广泛用于促进猪、牛、鸡、羊生长和抗菌治病。喹乙醇在动物体内代谢后会生成 3-甲基-喹噁啉-2-羧酸(MQCA),它能抑制脱氧核糖核酸的合

收稿日期:2018-10-25

作者简介:马晓年 女 主管技师 研究方向为食品质量与安全

E-mail:179267837@qq.com

通信作者:陈俊秀 女 初级检验师 研究方向为理化分析

E-mail:752110643@qq.com