

研究报告

检测诺如病毒的罗氏 LightMix® Kit 方法与行业标准方法
(SN/T 2626—2010) 的比较研究骆海朋¹, 康敏华², 于海瑶³, 高飞¹, 任秀¹, 余文¹, 崔生辉¹

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 罗氏诊断试剂上海有限公司, 上海 201101; 3. 吉林省长春市食品药品检验中心, 吉林 长春 130012)

摘要:目的 结合不同标准和规范方法,对罗氏 LightMix® Kit 诺如病毒检测试剂盒(以下简称罗氏方法)进行评价。方法 通过对 217 份门诊腹泻病人粪便标本和 158 份市场零售贝类样品中诺如病毒核酸平行检测,对比罗氏方法与我国 SN/T 2626—2010《国境口岸诺如病毒检测方法》中逆转录-聚合酶链反应检测诺如病毒核酸方法(以下简称 SN/T 方法)对粪便标本与贝类样品中诺如病毒核酸检测结果的差异。结果 粪便标本的罗氏方法检测阳性率为 27.2% (59/217),而 SN/T 方法检测阳性率为 17.5% (38/217),两方法结果一致率为 85.7%,检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。贝类样品的罗氏方法检测阳性率为 32.9% (52/158),SN/T 方法检测阳性率为 30.4% (48/158),两方法对诺如病毒检测结果的一致率为 87.3%,检出率差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 市场零售贝类样品中诺如病毒污染率较高,罗氏方法以其快速、简便、灵敏、可靠的优点值得在食品微生物检测行业推广。

关键词:诺如病毒; 逆转录-聚合酶链反应; 粪便; 贝类; 检测方法; 比较; 食品安全

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2017)01-0047-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.01.010

A comparative study of Roche LightMix® Kit and the industry standard method (SN/T 2626-2010) for the detection of *Norovirus*

LUO Hai-peng¹, KANG Min-hua², YU Hai-yao³, GAO Fei¹, REN Xiu¹, YU Wen¹, CUI Sheng-hui¹

(1. National Institute of Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

2. Roche Diagnostics (Shanghai) Limited, Shanghai 201101, China;

3. Jilin Province Inspection Center for Food and Drug, Jilin Changchun 130012, China)

Abstract: Objective To compare LightMix® Kit *Norovirus* detection kit from Roche diagnostics company (hereinafter referred to as “Roche method”) with different methods of standards and norms. **Methods** Two hundred and twenty-seven stool samples of diarrhea patients and 158 shellfish samples from retail markets were detected by Roche method and SN/T 2626-2010 detection of *Norovirus* at frontier port reverse transcription polymerase chain reaction to detect *Norovirus* method (hereinafter referred to as SN/T method). By parallel detection, the differences between the two methods were compared. **Results** For stool samples, about 27.2% (59/217) stool samples were positive by Roche method, while 17.5% (38/217) samples were positive by SN/T method. The consistence between the two methods was 85.7% and the detection rate of Roche methods was significantly higher than that of SN/T method ($P < 0.05$). For shellfish samples, about 32.9% (52/158) shellfish samples were positives by Roche method and 30.4% (48/158) samples were positive by SN/T method. The consistence between the two methods was 87.3% and the detection rate had no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** The *Norovirus* contamination of shellfish samples from retail market was high. Roche method was rapid, simple, sensitive and reliable to detect *Norovirus*, and was worthy to promote in food microbiology testing industry.

Key words: *Norovirus*; reverse transcription polymerase chain reaction; stool; shellfish; detection method; comparison; food safety

诺如病毒(*Norovirus*, NoV)是全球范围内主要的

腹泻病原体之一,每年感染病例数远超沙门菌、弯曲菌等常见致病细菌,在学校、饭店、医院等人员密集场所时有感染暴发的报道^[1-2]。诺如病毒属于杯状病毒科中诺如病毒属的原型代表株,依据病毒衣壳蛋白 VP1 序列的差异,诺如病毒可分为 GI ~ GV 五个基因群,其中引起人类感染的主要是 GI 和 GII 群^[3]。

目前诺如病毒的检测方法主要有分子生物学和免

收稿日期:2016-12-27

作者简介:骆海朋 男 副主任检验技师 研究方向为食品微生物学

E-mail:haipengluo123@ sina.com

通信作者:崔生辉 男 研究员 研究方向为食品微生物学及食品

分子生物 E-mail:cuishenghui@ aliyun.com

疫学方法两大类,其中分子生物学方法中的逆转录-聚合酶链式扩增反应(reversed transcript polymerase chain reaction, RT-PCR)方法相对较特异、灵敏,在食品污染物检测中应用广泛^[4]。国内和国际诺如病毒检验规范中,均有以 RT-PCR 原理为基础的标准检验方法^[5-8]。鉴于诺如病毒在食品安全中的重要地位,不同检测试剂公司也开发了一系列针对诺如病毒的检测试剂盒。

本试验主要参考欧盟 ISO/TS 15216《Microbiology of food and animal feed-horizontal method for determination of hepatitis A virus and *Norovirus* in food using real-time PCR》^[7]方法中的前处理方法,比较罗氏 LightMix[®] Kit(以下简称罗氏方法)与 SN/T 2626—2010《国境口岸诺如病毒检测方法》^[5]中 RT-PCR 检测诺如病毒核酸方法(以下简称 SN/T 方法)对门诊腹泻病人粪便标本和零售贝类样品中诺如病毒检测结果的异同。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源

2014年10月—2015年2月,从中国人民解放军总医院腹泻门诊收集腹泻病人粪便标本217份;2015年10月—2016年2月,从北京市市场采集贝类样品158份,其中:生蚝57份、牡蛎33份、海虹34份、扇贝15份、蛤蜊19份,均用于本方法验证研究。

1.1.2 主要仪器与试剂

Lightcycler[®] 480 荧光定量 PCR 仪(罗氏公司)、普通 PCR 仪(美国伯乐)、碎花制冰机、高速冷冻离心机、恒温混匀器、电子天平、生物安全柜。

蛋白酶 K、recombinant、PCR Grade、High pure viral RNA Kit、Lightcycler[®] 480 RNA Master Hydrolysis Probes 和 LightMix[®] Kit *Norovirus* 均购自罗氏公司,磷酸盐缓冲液,本研究所使用的 PAGE 级 PCR 引物由上海英俊公司合成,诺如病毒阳性质控样品(中国食品药品检定研究院),One-step RT-PCR 试剂盒(大连宝生物公司)。

1.2 方 法

1.2.1 样品前处理

粪便标本中病毒 RNA 提取:取约 0.1 g 软便或 0.1 ml 稀便标本,加入 1 ml 磷酸盐溶液(pH = 7.4),涡旋振荡混匀,5 000 × g 离心 5 min,取上清 200 μl,用 High pure viral RNA 提取试剂盒,按使用说明提取病毒 RNA,将提取物 -80 °C 保存备用。

贝类样品病毒 RNA 提取:参照 ISO/TS 15216 方法,取 5 个贝类样品解剖,将分离的消化腺和肠道组织混合均质,称取均质液(2.0 ± 0.1) g,加入 2 ml 磷酸盐溶液和 0.2 mg 蛋白酶 K,37 °C 振荡 1 h 后,

60 °C 水浴 15 min,3 000 × g 离心 5 min,取上清 200 μl,用 High pure viral RNA 提取试剂盒提取 RNA,将提取物 -80 °C 保存备用。

1.2.2 诺如病毒 RT-PCR 检测

SN/T 方法:采用常规 RT-PCR 方法,上游引物 JV12: ATACCACTATGATGCAGATTA,下游引物 JV13: TCATCATCACCATAGAAAGAG,其扩增的区域为诺如病毒 RNA 聚合酶区域,目的片段大小为 326 bp。用上述标本和样品中提取的 RNA 进行诺如病毒检测,如电泳后出现标准中指定的诺如病毒预期产物,且阴性对照未检出,阳性对照检出则判断诺如病毒检测结果为阳性。然后对扩增产物进行序列测定,使用 Mega5 软件,将测得的序列与 GenBank 中权威参考诺如病毒序列进行比对分析,判断诺如病毒的具体型别。

罗氏方法:采用荧光定量 RT-PCR 方法,可以检测 GI 和 GII;扩增的区域为 ORF1 和 ORF2 链接区域,扩增产物大小为 94 bp,使用荧光 DNA 水解探针,检测阳性则在 530 nm 通道检测有信号增强;使用 MS2 噬菌体 RNA 片段作为内控,对该片段进行扩增,在 610 nm 通道检测;使用特异性探针与扩增产物片段杂交,在 670 nm 通道检测,如果有溶解曲线信号出现,则认为是 GII 型诺如病毒检出,如没有溶解曲线的出现则是 GI 型诺如病毒检出。由于涉及该公司的技术保密问题,具体的引物和探针的序列没有详细的公开。参照该试剂盒的说明书,对从上述标本和样品中提取的 RNA 进行诺如病毒检测,如检出诺如病毒,则使用 Lightcycler[®] 480SW1.5.1 软件对扩增产物进行分析,判断诺如病毒的具体型别,具体判断标准见表 1。同时还使用了诺如病毒质控对病毒 RNA 的提取过程进行监测,如外部质控没有检出,可能在 RNA 提取过程存在问题。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 19.0 软件中卡方检验程序,对诺如病毒检验结果的差异进行分析。按如下公式,对检验结果一致性进行分析:

$$\text{检验结果一致率} = [(\text{两种方法均确证为阳性样品数量} + \text{两种方法均确证为阴性样品数量}) / \text{样品检测总数}] \times 100\%$$

2 结 果

2.1 粪便标本和贝类样品诺如病毒扩增序列的系统发育分析

使用 Mega5 软件对粪便标本和贝类样品 SN/T 方法成功测序的序列与 GenBank 中已有的诺如病毒序列进行比对分析,结果见图 1。

表3 158份贝类样品中诺如病毒检测结果(份)
Table 3 Results of *Norovirus* detection in 158 samples
of shellfish

样品种类	检测 样品数	罗氏方法 阳性样品	SN/T方法 阳性样品	两方法同为 阳性样品数
生蚝	57	20	20	14
牡蛎	33	7	7	6
海虹	34	21	20	19
扇贝	15	2	1	1
蛤蜊	19	2	0	0
合计	158	52	48	40

表4 贝类样品中诺如病毒检测结果(份)
Table 4 Results of *Norovirus* detection in shellfish

SN/T方法	罗氏方法		合计
	阴性	阳性	
阴性	98	12	110
阳性	8	40	48
合计	106	52	158

通过对扩增产物溶解曲线分析发现,罗氏方法检出的52份阳性样品中,49份为GII型,3份为GI型;对SN/T方法检测出的48份阳性样品扩增产物进行测序分析,其中34份样品测序成功,经与GenBank中已有序列进行比对,发现均为GII型,用SN/T方法未检出GI型诺如病毒。

3 讨论

本研究平行使用罗氏和SN/T方法,对217份门诊腹泻病人粪便标本和158份市场采集的贝类样品中诺如病毒检测进行了对比测试分析,结果显示罗氏方法对粪便标本中诺如病毒的检出率高于SN/T方法,差异有统计学意义($P < 0.05$),而对贝类样品,两方法的检出率差异无统计学意义($P > 0.05$)。此结果提示,罗氏方法使用的引物和探针对腹泻病人粪便标本和贝类样品中的诺如病毒均有较好的覆盖性,可分别适用于两类样本的检测,此结果为今后食品病毒检测用分子试剂盒的比对分析提供了参考数据。

本研究结果显示,针对粪便标本,两方法诺如病毒的检出率存在明显差异,而对贝类样品,两方法的检出率差异较小。根据对粪便和贝类诺如病毒阳性分型结果,粪便标本中的诺如病毒型别较多,而贝类样品中诺如病毒型别较单一,这可能是两方法所使用引物对不同病毒种类的覆盖性不同造成的。首先,罗氏方法的扩增位点为GI和GII诺如病毒ORF1和ORF2链接区域^[9-10],结合溶解曲线分析可区分I和II型诺如病毒,而SN/T方法扩增的区域为ORF1区域中的RNA依赖的聚合酶片段^[11],这一检测靶点的差异可能对检测结果造成一定影响。另外,本研究使用的粪便标本来自门诊腹泻病人,阳性标本中病毒序列

的多样性可能高于来源相对集中的近海养殖的贝类样品。罗氏方法为增强覆盖性,引物和探针使用了简并序列,这可能也是造成与SN/T方法检出阳性率差异的原因之一。

在方法设计上,罗氏方法存在一定的优越性。该方法使用噬菌体MS2 RNA作为RT-PCR扩增反应的内部阳性质控,而SN/T方法是采用传统的PCR扩增和电泳方法,未设置内部质控,不能识别RNA提取物中是否存在对RT-PCR扩增过程的抑制剂。其次,罗氏方法结合溶解曲线分析,可直接区分I和II型诺如病毒,而SN/T方法则需要对扩增产物进行测序,才能区分诺如病毒的具体型别,鉴于PCR扩增产物的浓度时常较低,如本研究结果显示,较容易出现测序失败。

综上,本研究显示,北京冬季市场采集的贝类样品中,诺如病毒污染率较高,SN/T方法和罗氏方法均可用于贝类样品中诺如病毒的检测,而罗氏方法以其快速、方便,且准确性与SN/T方法相当的特点值得在食品微生物检测行业推广。

参考文献

- [1] GUO Z N, HUANG J W, SHI G Q, et al. A food-borne outbreak of gastroenteritis caused by *Norovirus* GII in a university located in Xiamen City, China [J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2014, 28(6): 101-106.
- [2] Maritschnik S, Kanitz E E, Simons E, et al. A food handler-associated, foodborne *Norovirus* GII.4 Sydney 2012-outbreak following a wedding dinner, Austria, October 2012 [J]. *Food and Environmental Virology*, 2013, 5(4): 220-225.
- [3] Verhoef L, Hewitt J, Barclay L, et al. *Norovirus* genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999-2012 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(4): 592-599.
- [4] Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of *Norovirus* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(2): 373-381.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2626—2010 国境口岸诺如病毒检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [6] Alain H, Danielle L, Elyse P, et al. Detection of *Norovirus* genogroups I and II using the conventional and real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction [EB/OL]. (2010-03-20) [2016-07-26]. <https://www.researchgate.net/publication/234130767>.
- [7] International Organization for Standardization. ISO/TS 15216-1 Microbiology of food and animal feed—horizontal method for determination of hepatitis A virus and *Norovirus* in food using real-time PCR [S/OL]. (2013-03-15) [2016-07-26]. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=55382.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1635—2005 贝类中诺沃克病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.

- [9] Hoehne M, Schreier E. Detection of *Norovirus* genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe[J]. BMC Infectious Disease, 2006, 6(1):69.
- [10] Dreier J, Stormer M, Maede D, et al. Enhanced reverse transcription-PCR assay for detection of *Norovirus* genogroup I [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8):2714-2720.
- [11] Jan V, Marion P K. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands [J]. The Journal of Infectious Diseases, 1996, 174(3):610-615.

研究报告

Baird-Parker 琼脂上被抑制的金黄色葡萄球菌的筛选与特征研究

于海瑶^{1,2}, 骆海朋², 任秀², 张庆生², 丁宏², 孟庆群¹, 王玉杰¹, 雷晓利¹, 崔生辉²

(1. 吉林省长春市食品药品检测中心, 吉林 长春 130012;

2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要:目的 对在 Baird-Parker 琼脂平板上被抑制的金黄色葡萄球菌(以下简称金葡菌)的遗传特征进行深入研究,并提出针对性检验措施。方法 通过对 127 株不同来源的金葡菌和 8 株金葡菌标准菌株在 Baird-Parker 琼脂平板上进行测试,筛选在 Baird-Parker 琼脂平板上被抑制的金葡菌,并对菌株的遗传特征进行分析,同时检测 Baird-Parker 琼脂平板中的抑菌成分对金葡菌的抑制作用。结果 3 株分离自北京猪肉馅中的菌株和金葡菌标准菌株(CMCC 26112)在 Baird-Parker 琼脂上生长率低于万分之一, Baird-Parker 琼脂基础培养基中添加甘氨酸(12.0 g/L)可明显抑制这 4 株金葡菌的生长,而六水合氯化锂(5.0 g/L)、丙酮酸钠(10.0 g/L)和卵黄亚碲酸钾(50 ml)的添加对这 4 株金葡菌的生长没有明显影响;这 4 株菌在高盐甘露醇琼脂和科马嘉显色平板上的生长率均高于 60%;脉冲场电泳(PFGE)分析发现,北京来源的 3 株金葡菌为同一 PFGE 型别,与标准菌株(CMCC 26112)存在明显差异。结论 为保证食品安全国家标准检验方法 GB 4789.10—2010 对不同金葡菌计数的覆盖性,计数检验过程中应使用两种或两种以上金葡菌选择性平板。

关键词:金黄色葡萄球菌; Baird-Parker 琼脂; 计数; 生长抑制; 筛选; 特征; 检验方法

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)01-0051-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.01.011

Screening and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates inhibited on Baird-Parker agar

YU Hai-yao^{1,2}, LUO Hai-peng², REN Xiu², ZHANG Qing-sheng², DING Hong²,

MENG Qing-qun¹, WANG Yu-jie¹, LEI Xiao-li¹, CUI Sheng-hui²

(1. Jilin Province Inspection Center for Food and Drug, Jilin Changchun 130012, China;

2. National Institute of Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To characterize the *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) isolates that were inhibited on Baird-Parker agar and propose the possible solutions for the enumeration of these isolates. **Methods** The isolates inhibited on Baird-Parker agar were identified from 127 *S. aureus* isolates from different sources and eight *S. aureus* reference strains. The characteristics of these isolates were analyzed and the inhibitory effects of the components in Baird-Parker were determined. **Results** Three *S. aureus* isolates from the ground pork samples in Beijing and a reference strain *S. aureus* (CMCC 26112) showed poor growth on Baird-Parker agar. The glycine (12.0 g/L) in the Baird-Parker agar could inhibit the growth of these four isolates, and the supplement of sodium pyruvate, lithium chloride and egg yolk potassium tellurite didn't inhibit the growth of these isolates. These four isolates showed over 60% growth rate on mannitol salt agar and chromogenic agar. The pulsed field gel electrophoresis (PFGE) showed that three isolates from Beijing had the same PFGE pattern which was significantly different from the pattern of (CMCC 26112). **Conclusion** To guarantee the good coverage of the national

收稿日期: 2016-08-08

基金项目: 北京市科学技术委员会基金课题 (D161100002116003)

作者简介: 于海瑶 女 助理工程师 研究方向为食品微生物检测 E-mail: yuhaiyao11@126.com

通信作者: 崔生辉 男 研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail: cuiyshenghui@aliyun.com