

超高压处理对牡蛎中 GII.4 型诺如病毒的消减控制

佟利惠^{1,2}, 杨敏², 赵峰^{3*}, 苏来金^{4,5}, 王珊珊², 周德庆²

(¹上海海洋大学食品学院 上海 201306

²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

³重庆三峡学院生物与食品工程学院 重庆 404100

⁴温州大学生命与环境科学学院 浙江省水环境与海洋生物资源保护重点实验室 浙江温州 325035

⁵温州市特色食品资源工程技术研究中心 浙江温州 325006)

摘要 诺如病毒(NoVs)是世界范围内引起非细菌性胃肠炎的主要病原体。为研究不同压力条件的超高压处理对牡蛎中 NoVs 消减控制的影响,将 GII.4 型 NoVs 分别置于牡蛎消化腺匀浆和 PBS 缓冲液中,采用压力分别为 200,300,400,500 MPa,加压初始温度 5℃,保压时间 5 min 进行处理,并以常压(0.1 MPa)处理为对照组。采用 PMA_{xx}-RT-qPCR 与透射电子显微镜检测超高压处理后的 NoVs,评价不同压力对牡蛎消化腺匀浆和 PBS 缓冲液中 GII.4 型 NoVs 的消减效果;测定超高压处理后牡蛎丙二醛含量和蛋白质巯基含量,评价超高压处理对牡蛎中脂肪和蛋白质的影响。研究结果显示:PMA_{xx} 可有效区分感染性 NoVs;qPCR 检测发现经不同压力的超高压处理后,牡蛎消化腺匀浆和缓冲液中 NoVs 的 RNA 拷贝数均显著减少,当压力为 500 MPa 时,牡蛎和缓冲液中的 RNA 拷贝数减少量分别>3.49 lg(copies/μL)和>3.61 lg(copies/μL),均降至检测限以下;超高压处理对 PBS 缓冲液中 NoVs 的消减效果优于牡蛎消化腺匀浆,还可使牡蛎中脂肪氧化和蛋白质变性,然而,改变程度小于热处理。

关键词 超高压;诺如病毒;牡蛎;消减

文章编号 1009-7848(2022)08-0127-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.08.014

诺如病毒(Noroviruses, NoVs)是世界范围内引起非细菌性急性胃肠炎的主要病原体^[1],可分为 7 个基因簇(GI~GVII),其中 GI、GII 和 GIV 可感染人类,GI、GII 又可进一步分为 9 个和 22 个基因型^[1-3]。NoVs 具有极强的传染性,被感染者表现为腹泻或呕吐,常通过被污染的环境、水源及水产品如贝类等引起急性胃肠炎疫情暴发^[4-6]。冬、春季节是诺如病毒疫情的高发期,近几年我国及美国、日本、西欧等许多国家都出现过大规模诺如病毒暴发的报道^[7-10]。素有“海洋牛奶”之称的牡蛎是沿海地区重要的经济贝类,也是 NoVs 的传播媒介之一。牡蛎的栖息地主要在沿海河口,营固着生活,更容易受到污水等环境污染^[11]。牡蛎属于滤食性

双壳贝类,可在过滤海水时富集环境中的 NoVs,体内病毒浓度可比周围环境中的高几十到几千倍^[3,12-13]。彻底的加热处理虽可有效灭活牡蛎中存在的 NoVs,但会破坏牡蛎的鲜美风味,人们倾向于生食或轻微烹煮。若牡蛎中存在 NoVs 污染,就会增加感染 NoVs 的风险。

目前,食品中 NoVs 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),此方法针对 NoVs 的核酸进行检测,部分 NoVs 失活后,核酸仍然存在,然而,该方法不能很好地区分 NoVs 的存活状态,也就无法区分 NoVs 是否具有感染性。研究发现传统的光激活染料【叠氮溴化丙锭(Propidium monoazide, PMA)和叠氮溴化乙锭(Ethidium monoazide, EMA)】、改进的光激活染料(PMA 增强版——PMA_{xx},同时包含 PMA 和 EMA 的双光激活染料 PEMAX)及猪胃黏蛋白磁珠(Porcine gastric mucin magnetic beads, PGM-MB)常用于消减处理后感染性 NoVs 存活率的检测^[14-18]。现报道较多

收稿日期:2021-08-12

基金项目:国家重点研发计划项目“蓝色粮仓科技创新”专项(2019YFD0901702);烟台市科技计划项目(2019ZDCX011)

作者简介:佟利惠(1995—),女,硕士生

通信作者:赵峰 E-mail:zhaof_cn@163.com

的为 PMA_{xx} 和 PGM-MB。Ye 等^[19]用 PGM-MB 对经 500 MPa/0 °C HHP 处理的牡蛎中的 G II.4 型 NoVs 进行检测, NoVs RNA 拷贝数可减少 4 lg (copies/ μ L)。PGM 包含多种组织血型抗原, 可与不同基因型别的 NoVs 特异性结合, 然而其在商业化生产中存在较大的变异性, 造成重复性较差。PMA_{xx} 是一种高亲和力的光反应性核酸染料, 虽不能进入衣壳蛋白完整的 NoVs, 但能够穿透被破坏或损坏的衣壳, 在强光照射下共价插入 RNA, 干扰 RT-PCR 扩增^[17]。在 RT-qPCR 检测前, 利用 PMA_{xx} 对样品进行预处理, 可用来区分感染性 NoVs。

非热加工技术可在保证食品安全(杀灭有害病原体)的条件下实现最小程度地影响食品原有营养、风味和质构等, 在水产品加工中应用较多的有超高压(High hydrostatic pressure, HHP)、臭氧、辐照及紫外照射处理等^[20-22]。超高压技术可用于牡蛎等双壳贝类的脱壳, 使壳与肉分离, 保持营养成分基本不变, 还能有效杀灭有害病原体, 延长贮藏期^[23]。Takahashi 等^[24]对缓冲液、牡蛎匀浆、带壳牡蛎 3 种基质中的鼠诺如病毒(Murine norovirus strain 1, MNV-1)进行 HHP 处理, 结果表明: HHP 对这 3 种基质中的 NoVs 都有消减效果, 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 MNV-1 的消减灭活效果与基质有关, 这可能是由于牡蛎中的蛋白质、脂肪等成分可以保护 MNV-1 不受 HHP 影响。因人源诺如病毒难以进行体外培养, 故现有的 HHP 研究多采用 MNV 进行, 且在研究 HHP 对 NoVs 的消减作用时, 仅使用病毒稀释液, 未考虑食品基质对病毒消减的影响。同时, 受 RT-qPCR 的限制, 无法区分 NoVs 的感染性。

本文以 PMA_{xx} 检测同 RT-qPCR 相结合, 评价该方法区分感染性 NoVs 的效果; 对牡蛎消化腺匀浆和缓冲液中 G II.4 型 NoVs 在不同压力下进行 HHP 处理的效果, 评估食品基质对 NoVs 耐受 HHP 处理的影响, 探究 HHP 处理对 G II.4 型 NoVs 的消减控制效果以及对牡蛎脂肪氧化和蛋白质变性的影响, 以期 HHP 技术在牡蛎加工中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*), 山东威海乳山市牡蛎养殖区; G II.4 NoVs 样品(经测定 G II.4 NoVs RNA 拷贝数为 5.0×10^8 copies/ μ L), 分离自腹泻患者。

1.2 主要试剂

氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、25%戊二醛溶液、Triton X-100, 国药集团化学试剂有限公司; Trizol、病毒 RNA 提取试剂盒, Evo M-MLV 一步法 RT-qPCR 试剂盒, 艾科瑞生物; PMA_{xx}, 美国 Biotium 公司; 丙二醛含量测定试剂盒、巯基含量测定试剂盒, 北京索莱宝公司; RT-qPCR 所用引物如下: QNIF2 (FW): ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA, COG2R (REV): TCGACGC CATCTTCATTCACA, QNIFs (PROBE): FAM-AGCACGTGGGAGGGCGAT CG-TAMRA, 由睿博兴科生物技术有限公司合成; 质粒标准品, 博尚生物技术有限公司。

1.3 设备与仪器

BY-600-1 全自动高压杀菌机, 温州滨一机械有限公司; JEM-1200EX 透射电子显微镜, 日本电子株式会社; BYQ6094-550148 荧光定量 PCR 仪, 杭州博日科技有限公司; 酶标仪, Thermo 公司; H1650-W 高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; GR60DA 压力蒸汽灭菌器, ZEALWAY 公司; HH-4A 数显恒温水浴锅, 常州国华电器有限公司; 32990927 电子分析天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; F013300046 手持均质机, DREMEL 公司。

1.4 试验方法

1.4.1 PMA_{xx}-RT-qPCR 检测方法评价

1.4.1.1 热处理 为了评价 PMA_{xx}-RT-qPCR 检测方法区分 NoVs 感染性的效果, 取 2 mL 1 000 \times 稀释的 G II.4 型 NoVs 样品, 分别在沸水浴中加热 5, 10, 15, 30 min 和湿热灭菌(121 °C, 20 min)条件下处理, 随后均用 PMA_{xx} 处理。

1.4.1.2 PMA_{xx} 处理 取 400 μ L 样品于 1.5 mL 离心管中, 设置平行组, 对照组不做 PMA_{xx} 处理。

避光操作,加入 0.1 mmol/L PMAxx,使其在样品中的终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$,加入 0.5% Triton X-100,在黑暗中室温孵育 10 min,在摇床上进行孵化,试管上覆盖铝箔^[14]。立即将样品暴露在 60 W 蓝光灯下,使 PMAxx 与样品反应 20 min,5 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清用于后续 RNA 提取。

1.4.1.3 RNA 的提取 按照 RNA 提取试剂盒说明,对所有病毒样品进行 RNA 提取。

1.4.1.4 荧光定量 RT-PCR 荧光定量 RT-PCR 反应液采用 50 μL 体系:25 μL 2 \times One Step RT-qPCR 缓冲液,1 μL 上游引物,1 μL 下游引物,0.8 μL 探针,1 μL DNA 聚合酶,1 μL 逆转录酶,1 μL RNA 模板,并用无 RNA 酶水补足至 50 μL 。荧光定量 RT-PCR 反应条件:反转录反应 42 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,1 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,1 个循环。PCR 反应 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环。

1.4.1.5 NoVs 荧光定量标准曲线 利用 NovoPro DNA 分子计量程序和公式(1)计算质粒标准品拷贝数^[25]。

测定样品拷贝数(copies/ μL)=

$$\frac{\text{质粒标准品质量浓度}}{\text{核酸分子质量}} \times 6.02 \times 10^{14} \quad (1)$$

式中,6.02 $\times 10^{14}$ ——阿伏伽德罗常数换算系数;质粒标准品质量浓度为 100 ng/ μL 。

1.4.2 牡蛎样品前处理 牡蛎购买后置于过滤处理的海水中暂养,采用紫外杀菌内循环装置对养殖海水进行灭菌处理。随机选取 5 只牡蛎,经 RT-qPCR 检测无 NoVs 后用于试验。选取有活力的牡蛎,用无菌蒸馏水冲洗,吸水纸擦干表面水分,开壳后使用医用手术刀切断闭壳肌,去掉外壳,取出贝肉,在无菌环境取牡蛎消化腺部位,备用。

1.4.3 超高压处理 NoVs 样品稀释 每个试验组设置 3 组平行和对照组,所有样品均置于冰上保存。

1.4.3.1 牡蛎消化腺匀浆 取 50 g 牡蛎消化腺组织,用手持匀浆机进行匀浆处理,吸取 2 mL 匀浆液于灭菌真空包装袋内,真空袋内加入 20 μL 用 0.01 mol/L PBS 缓冲液稀释的 GII.4 型 NoVs 样品,摇晃使其充分混匀,用封口机封口,GII.4 型 NoVs 终浓度为 5.0 $\times 10^5$ copies/ μL 。

1.4.3.2 NoVs 稀释液 吸取 20 μL 用 0.01 mol/L

PBS 缓冲液稀释的 GII.4 型 NoVs 样品于灭菌真空包装袋内,加入 2 mL 0.01 mol/L PBS 缓冲液,用封口机封口。

1.4.3.3 透射电镜样品 吸取 20 μL 未经稀释的 GII.4 型 NoVs 样品于灭菌真空包装袋内,用封口机封口。

1.4.4 超高压处理 将封装好的样品置于 HHP 设备腔体中,控制加压初始温度为 5 $^{\circ}\text{C}$ 左右,压力大小分别设定为 200,300,400,500 MPa,保压时间设定为 5 min。HPP 处理后按照 1.4.1 节中的方法检测。

1.4.5 透射电子显微镜观察 NoVs 形态 用 2.5% 戊二醛溶液对病毒样品进行固定,将病毒样品滴到蜡板上,把铜网有支持膜的一面与病毒液滴接触,夹起后用滤纸轻轻将铜网边缘多余液体吸干,滴加一滴 1% 磷钨酸负染色 3 min,滤纸吸干多余染液,室温干燥 30 min 后上机观察。

1.4.6 丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量测定

称取约 0.1 g 牡蛎组织,加入 1 mL 提取液进行冰浴匀浆;8 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,取上清,置冰上待测。按照试剂盒说明方法配制样品混合液,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 60 min,置于冰浴中冷却,10 000 $\times g$,常温,离心 10 min。吸取 200 μL 上清液于 96 孔板中,测定个样本在 450,532 nm 和 600 nm 处的吸光度。分别按 $\Delta A_{450\text{nm}} = A_{450\text{nm}}$ 测定 - $A_{450\text{nm}}$ 空白, $\Delta A_{532\text{nm}} = A_{532\text{nm}}$ 测定 - $A_{532\text{nm}}$ 空白, $\Delta A_{600\text{nm}} = A_{600\text{nm}}$ 测定 - $A_{600\text{nm}}$ 空白进行计算。

$$\text{MDA 含量 (nmol/g)} = 5 \times (12.9 \times (\Delta A_{532\text{nm}} - \Delta A_{600\text{nm}}) - 2.58 \times \Delta A_{450\text{nm}}) / 0.1 \quad (2)$$

1.4.7 蛋白质巯基含量测定 参照索莱宝巯基含量测定试剂盒说明中的方法进行。

2 结果与分析

2.1 GII.4 型 NoVs 荧光定量标准曲线

在 NoVs 质粒标准品为 10²~10⁹ copies/ μL 范围内,标准曲线线性关系良好, $y = -3.0171x + 41.109$,GII.4 型 NoVs 样本的浓度为 5.0 $\times 10^8$ copies/ μL 。

2.2 PMAxx 区分感染性 NoVs 效果评价

为了探究 PMAxx 是否能有效区分感染性和非感染性 NoVs,本试验采用 1 000 \times 稀释的 GII.4

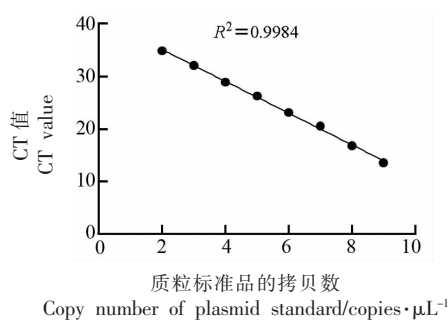


图1 GII.4型NoVs荧光定量标准曲线

Fig.1 The standard curve of fluorescence quantitative of GII.4 NoVs

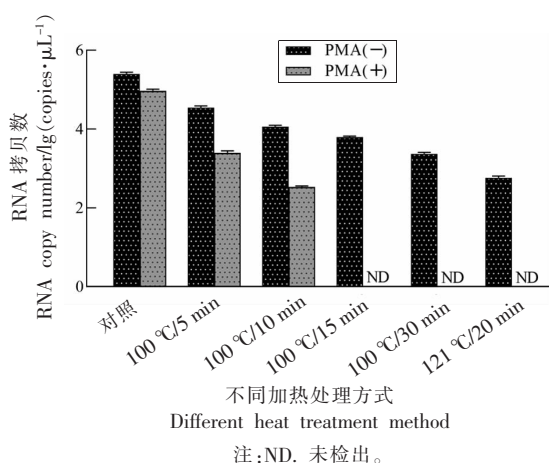


图2 不同灭活方式下PMAxx-RT-qPCR区分感染性NoVs效果评价

Fig.2 The evaluation of PMAxx-RT-qPCR for distinguishing infectious NoVs under different inactivation methods

型NoVs(病毒浓度为 5.0×10^5 copies/ μL),分别进行沸水加热5,10,15,30 min和湿热灭菌(121 °C, 20 min)处理,而后分别使用PMAxx-RT-qPCR和传统RT-qPCR方法进行检测。结果显示,不同加热条件处理后,使用PMAxx-RT-qPCR的定量值均低于传统RT-PCR方法,使用PMAxx-RT-qPCR在沸水加热15,30 min和湿热灭菌条件下均未检出NoVs,而传统RT-qPCR则均有检出。由于热处理对NoVs有杀灭效果,在煮沸条件下加热超过15 min NoVs即可完全失活死亡,不具有感染性,因此传统RT-PCR具有假阳性的问题。上述结果表明,PMAxx-RT-qPCR与传统RT-qPCR相比,可有效检测出感染性NoVs,PMAxx-RT-qPCR方法可用于后续超高压消灭NoVs试验中感染性NoVs的检测。

2.3 不同压力水平超高压处理对GII.4型NoVs的影响

由表1可知,对照组牡蛎消化腺匀浆和PBS缓冲液中的NoVs浓度分别为 9.18×10^4 copies/ μL 和 4.10×10^5 copies/ μL 。经HHP处理5 min后,牡蛎消化腺匀浆和缓冲液中的GII.4型NoVs浓度均显著降低($P < 0.05$);NoVs减少量随着压力水平的提高而增大。与未处理组相比,PMAxx处理后牡蛎消化腺匀浆和缓冲液中的可检出的感染性GII.4型NoVs浓度均减少。400 MPa HHP处理下缓冲液中的GII.4型NoVs浓度降低到检测限(10^2 copies/ μL)以下,经过500 MPa HHP处理后,牡蛎消化腺匀浆和缓冲液中的GII.4型NoVs减少量分别超过2.96 lg(copies/ μL)和3.61 lg(copies/ μL),牡蛎消化腺匀浆和缓冲液中的GII.4型NoVs浓度均降至可检测水平以下。结果表明HHP处理可有效消灭牡蛎消化腺匀浆和缓冲液中的GII.4型NoVs。

在200~500 MPa的HHP处理下,缓冲液中的NoVs消灭效果优于牡蛎消化腺匀浆中。Ye等^[26]研究发于6 °C/500 MPa/5 min条件下处理的牡蛎匀浆上层清液以及6 °C/600 MPa/5 min条件下处理的牡蛎匀浆中的NoVs浓度均可达到检测限水平以下^[19],与本文的结果类似。通过比较2种基质中NoVs拷贝数减少量的差异,可以看出HHP处理对缓冲液中NoVs的消灭效果比牡蛎消化腺匀浆中的效果好,这可能是因为HHP处理的效果与食品基质等环境条件密切相关,牡蛎匀浆中含有大量的蛋白质、脂肪等物质,在HHP处理过程中,这些物质会对NoVs形成保护作用,保护病毒颗粒不受压力影响,从而降低HHP处理效果。

在200 MPa HHP条件下处理5 min后,与未经HHP处理的样品相比,牡蛎消化腺匀浆中的NoVs浓度可减少1.30 lg(copies/ μL);缓冲液中的NoVs浓度可减少1.68 lg(copies/ μL),此压力水平和保压时间下可以实现牡蛎的部分脱壳。研究表明300 MPa HHP处理下保压1 min,牡蛎脱壳效果最好^[27],而此试验结果显示,300 MPa HHP下牡蛎中的NoVs也有显著减少,因此,HHP技术解决了牡蛎加工中的两大难题,在脱壳的同时又可有效消灭体内的病毒。

表 1 不同 HHP 对 GII.4 型 NoVs 的消减效果
Table 1 The inactivation effect of GII.4 NoVs under different HHP

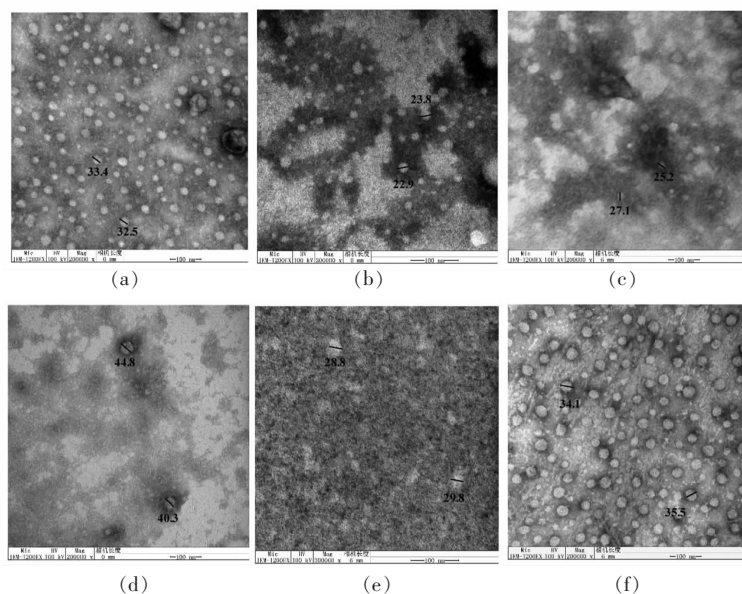
| HHP/MPa | NoVs 减少量/ $\lg(\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1})$ | | NoVs 浓度/ $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ | |
|---------|---|-------------------|---|--------------------|
| | 牡蛎消化腺匀浆 | PBS 缓冲液 | 牡蛎消化腺匀浆 | PBS 缓冲液 |
| 对照 | 0.00 | 0.00 | 9.18×10^4 | 4.10×10^5 |
| 200 | 1.30 ± 0.17^a | 1.68 ± 0.07^a | 4.57×10^3 | 8.46×10^3 |
| 300 | 2.57 ± 0.19^b | 2.43 ± 0.16^b | 2.45×10^2 | 1.51×10^3 |
| 400 | 3.15 ± 0.24^c | >3.61 | 2.82×10^2 | - |
| 500 | >2.96 | >3.61 | - | - |

注:表中数据为平均值加标准偏差;同一列数据不同上标字母代表有显著差异($P < 0.05$);“-”代表低于检测限。

2.4 不同 HHP 压力处理后 GII.4 型 NoVs 的透射电镜观察

为了探究 HHP 处理对 NoVs 形态产生的影响,采用透射电子显微镜 (Transmission electron microscope, TEM) 观察 HHP 处理后 NoVs 形态结构发生的改变。结果显示,与未经 HHP 处理的 GII.4 型 NoVs 相比,在 200~500 MPa HHP 下处理的 GII.4 型 NoVs 的边界模糊不清或形状改变,不再呈现一个饱满完整的球形,表明 HHP 对 NoVs 造成了很大的损害,破坏了病毒衣壳蛋白。

由图 3 看出, GII.4 型 NoVs 经 HHP 处理后数量明显减少,这与表 1 结果吻合, NoVs 的消减效果与压力水平大小呈正相关;超高压的作用主要是破坏病毒衣壳和受体结合活性,使得蛋白质挤压变形,暴露出病毒 RNA,促使病毒发生降解^[28-29]。图 3f 为 65 °C 加热 4 min 处理的 NoVs,处理后部分 NoVs 出现降解,但大部分 NoVs 颗粒仍可保持衣壳蛋白完整,说明 65 °C 加热 4 min 对 NoVs 的消减效果并不显著。



注:(a)为未经 HHP 处理的 GII.4 型 NoVs;(b)~(e)分别为 200~500 MPa HHP 处理的 GII.4 型 NoVs;(f)为 65 °C 加热处理的 GII.4 型 NoVs。

图 3 GII.4 型 NoVs 透射电镜图

Fig.3 Transmission electron microscope image of GII.4 NoVs

2.5 HHP 处理对牡蛎中脂肪和蛋白质的影响

牡蛎肉中的富含多不饱和脂肪酸,容易发生氧化反应。图 4a 和 4b 分别为 HHP 对牡蛎脂肪和

蛋白质的影响,可以看出 HHP 处理后 MDA 含量显著增大($P < 0.05$),且随着压力水平的增大,脂肪氧化的程度也在增大,这可能是由于牡蛎中铁和

铜含量较多,压力可以促进游离金属离子铁和铜的释放,这些离子会促进脂肪的氧化反应。加热处理组比HHP处理组MDA值的变化幅度更大,这是因为高温使脂肪发生了很大程度的氧化和聚合。

二硫键是维持蛋白质三级结构及天然构象重要的共价键,断裂会形成巯基,蛋白质巯基含量可以反映蛋白质三级结构的变化情况。由图可知,HHP和加热处理下,牡蛎蛋白巯基含量均随处理压力和加热时间的增大而增加,HHP处理组的牡蛎蛋白巯基含量的增幅整体小于加热处理组。

HHP处理组300~400 MPa下,巯基含量基本不变,说明处理压力大于300 MPa后,牡蛎蛋白质分子中的二硫键开始断裂产生大量的巯基。

蒸、煮超过15 min,牡蛎中的NoVs才能得到有效的消减。在HPP处理下,500 MPa处理5 min即可使牡蛎中的NoVs消减到无法检出的水平,在保证NoVs消减效果的前提下,与加热处理相比,HHP处理虽使牡蛎发生脂肪氧化和蛋白质变性,在一定程度上降低了牡蛎品质,但对脂肪和蛋白质的负面影响仍远优于加热处理(如图4c,d所示)。

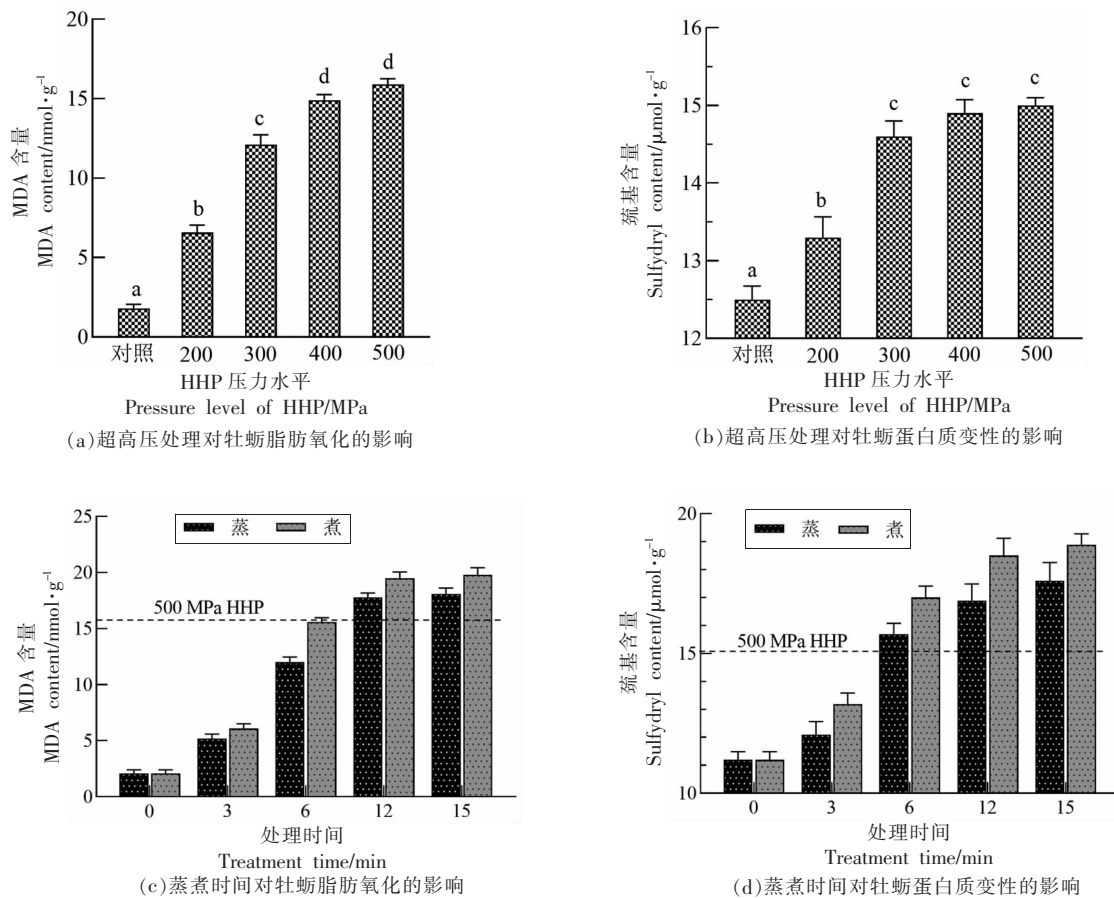


图4 超高压和加热处理对脂肪和蛋白质的影响

Fig.4 Effects of HHP and heating treatments on fat and protein

3 结论

超高压处理对牡蛎消化腺匀浆和缓冲液中的G II.4型NoVs的消减控制效果与压力水平的大小呈正相关。当压力为500 MPa时,两种基质中NoVs含量均可降至检测限以下。牡蛎消化腺匀浆

中的蛋白质、脂肪等物质在超高压处理对NoVs具有一定的保护作用。超高压处理虽会使牡蛎脂肪的氧化和蛋白质变性,但影响程度远小于加热处理。500 MPa/5 °C HHP处理5 min可将牡蛎中NoVs消减到无法检出的水平。

参 考 文 献

- [1] IMAI K, HAGI A, INOUE Y, et al. Virucidal efficacy of olanexidine gluconate as a hand antiseptic against human norovirus[J]. Food and Environmental Virology, 2020, 12(2): 180–190.
- [2] WANG J, DENG Z Q. Modeling and prediction of oyster norovirus outbreaks along gulf of Mexico coast [J]. Environmental Health Perspectives, 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.
ZHOU D Q, SU L J, ZHAO F, et al. Research progress in norovirus bioaccumulation in shellfish[J]. Chinese Journal of Virology, 2015, 31(3): 313–317.
- [4] NENONEN N P, HANNOUN C, OLSSON M B, et al. Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak[J]. Journal of Clinical Virology, 2009, 45(2): 105–108.
- [5] LOURY P, LE GUYADER F, LE SAUX J, et al. A norovirus oyster-related outbreak in a nursing home in France, January 2012[J]. Epidemiology and Infection, 2015, 143(12): 1–8.
- [6] BITLER E, MATTHEWS J, DICKEY B, et al. Norovirus outbreaks: A systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles[J]. Epidemiology & Infection, 2013, 141(8): 1563–1571.
- [7] BURKE R M, SHAH M P, WIKSWO M E, et al. The norovirus epidemiologic triad: Predictors of severe outcomes in US norovirus outbreaks, 2009–2016[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2019, 219(9): 1364–1372.
- [8] SAKON N, SADAMASU K, SHINKAI T, et al. Foodborne outbreaks caused by human norovirus GII. P17–GII. 17-contaminated nori, Japan, 2017[J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(5): 920.
- [9] 张静, 常昭瑞, 孙军玲, 等. 我国诺如病毒感染性腹泻流行现状及防控措施建议[J]. 疾病监测, 2014, 29(7): 516–521.
ZHANG J, CHANG Z R, SUN J L, et al. Infectious diarrhea epidemics caused by norovirus and its control strategy in China [J]. Disease Surveillance, 2014, 29(7): 516–521.
- [10] KRONEMAN A, VENNEMA H, HARRIS J, et al. Increase in norovirus activity reported in Europe[J]. Weekly Releases (1997–2007), 2006, 11(50): 3093.
- [11] CRUZ-ROMERO M, KERRY J, KELLY A. Changes in the microbiological and physicochemical quality of high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage[J]. Food Control, 2008, 19(12): 1139–1147.
- [12] 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]. European Communicable Disease Bulletin, 2010, 15(12): 19524.
- [13] BAKER K, MORRIS J, MCCARTHY N, et al. An outbreak of norovirus infection linked to oyster consumption at a UK restaurant, February 2010 [J]. Journal of Public Health, 2011, 33(2): 205–211.
- [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]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 229: 1–6.
- [15] KARIM M R, FOUT G S, JOHNSON C H, et al. Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 219: 51–61.
- [16] KIM S Y, KO G. Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(3): 182–188.
- [17] 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]. Marine Pollution Bulletin, 2020, 157: 111315.
- [18] LI X H, HUANG R Z, CHEN H Q. Evaluation of assays to quantify infectious human norovirus for heat and high-pressure inactivation studies using Tulane virus[J]. Food and Environmental Virology, 2017, 9(3): 314–325.
- [19] 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]. Journal of Food Science, 2015, 80(6):

- 1330-1335.
- [20] MARTINEZ-ALBORES A, LOPEZ-SANTAMARINA A, RODRIGUEZ J A, et al. Complementary methods to improve the depuration of bivalves: A review [J]. *Foods*, 2020, 9(2): 129.
- [21] XIA Q, ZHENG Y R, LIU Z M, et al. Nonthermally driven volatilome evolution of food matrices: The case of high pressure processing[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 106: 365-381.
- [22] IMAMURA S, KANEZASHI H, GOSHIMA T, et al. Effect of high pressure processing on a wide variety of human noroviruses naturally present in aqua-cultured Japanese oysters[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2018, 15(10): 621-626.
- [23] BONFIM R C, OLIVEIRA F A, GODOY R L O, et al. A review on high hydrostatic pressure for bivalve mollusk processing: Relevant aspects concerning safety and quality[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 39(3): 515-523.
- [24] TAKAHASHI M, OKAKURA Y, TAKAHASHI H, et al. Evaluation of inactivation of murine norovirus in inoculated shell oysters by high hydrostatic pressure treatment[J]. *Journal of Food Protection*, 2019, 82(12): 2169-2173.
- [25] 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.
- SU L J. Distribution of norovirus in shellfish and the binding mechanism to HBGA-like molecules in oysters [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.
- [26] YE M, LI X, KINGSLEY D H, et al. Inactivation of human norovirus in contaminated oysters and clams by high hydrostatic pressure[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(7): 2248-2253.
- [27] 李学鹏, 周凯, 王祺, 等. 牡蛎超高压脱壳效果的研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(15): 210-214.
- LI X P, ZHOU K, WANG Q, et al. The effect of ultra high pressure treatment on the shucking of oysters[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(15): 210-214.
- [28] CHEN H, HOOVER D G, KINGSLEY D H J J O F P. Temperature and treatment time influence high hydrostatic pressure inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate[J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(11): 2389.
- [29] ARCANGELI G, TERREGINO C, DE BENEDICTIS P, et al. Effect of high hydrostatic pressure on murine norovirus in Manila clams[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 54(4): 325-329.

Inactivation Effect of High Hydrostatic Pressure on GII.4 Norovirus in Oysters

Tong Lihui^{1,2}, Yang Min², Zhao Feng^{3*}, Su Laijin^{4,5}, Wang Shanshan², Zhou Deqing²

¹College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306

²Yellow 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, Shandong

³College of Biology and Food Engineering, Chongqing Three Gorges university, Chongqing 404100

⁴College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Zhejiang Provincial Key Laboratory for Water Environment and Marine Biological Resources Protection, Wenzhou 325035, Zhejiang

⁵Wenzhou Characteristic Food Resources Engineering and Technology Research Center, Wenzhou 325006, Zhejiang

Abstract Noroviruses (NoVs) are the major pathogens causing non-bacterial acute gastroenteritis in the world. To investigate the inactivation effect of high hydrostatic pressure (HHP) on NoVs in oysters under different pressure conditions and the effect of PMAxx in distinguishing infectious NoVs, GII.4 NoVs in oyster digestive gland homogenate and PBS buffer were subjected to HHP treatment with pressure conditions of 200, 300, 400, 500 MPa, respectively, at the initial pressure temperature was 5 °C and holding time of 5 min. The normal pressure (0.1 MPa) was used as the control group. After HHP treatment, PMAxx combined with RT-qPCR was applied for the detection of infectious NoVs, transmission electron microscope was used to observe the morphology of NoVs, and then the effect of different pressures on the re-

duction of GII.4 NoVs was calculated. The effects of HHP treatment on lipids and proteins were evaluated by measuring the malondialdehyde content and protein sulfhydryl content of oysters. The results showed that PMAxx-RT-qPCR could effectively distinguish infectious NoVs. After the HHP treatment of each pressure, NoVs in oyster digestive gland homogenate and PBS buffer showed significant reduction, and the reduction of NoVs in oyster and PBS buffer was >3.49 lg (copies/ μ L) and >3.61 lg(copies/ μ L) at the pressure of 500 MPa, respectively, and both of them were reduced below the detection limit; the effect of NoVs in the PBS buffer was better than that of oyster digestive gland homogenate; although the HHP treatment promoted fat oxidation and protein degradation in oysters, the effect on oyster quality was still better than that of heat treatment.

Keywords high hydrostatic pressure (HHP); noroviruses (NoVs); oyster; inactivation