

DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2021.04.037

食品中诺如病毒检测技术研究进展

The progress of detection methods for norovirus in foods

廖小艳^{1,2} 陈丽丽² 白亚龙^{1,3}LIAO Xiao-yan^{1,2} CHEN Li-li² BAI Ya-long^{1,3}

(1. 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 上海 201403;

2. 南华大学公共卫生学院卫生检验系, 湖南 衡阳 421000;

3. 上海科立特农产品检测技术服务有限公司, 上海 201403)

(1. Institute for Agri-Food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201403, China; 2. College of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421000, China; 3. Shanghai Kelite Agricultural Products Testing Technology Service Co., Ltd., Shanghai 201403, China)

摘要:文章介绍了诺如病毒的富集纯化技术,并就目前国内可用于食品中诺如病毒检测的技术:核酸检测、免疫学检测,以及生物传感器展开了综述,分析比较了各种方法的优缺点,最后对诺如病毒今后的研究方向进行了展望。

关键词:诺如病毒;富集技术;免疫学检验;核酸检测;生物传感器

Abstract: This paper mainly introduces the enrichment technology of norovirus, and reviews the research advances of norovirus in the nucleic acid detection, immunological detection and biosensor detection at domestic and abroad and also analyzes and compares the advantages and disadvantages of various method. Finally, the future research direction of norovirus was prospected.

Keywords: norovirus; enrichment technique; immunological detection; nucleic acid testing; biosensor

诺如病毒(Norovirus, NoV)属于杯状病毒科诺如病毒属,基因组长度约为 7.4~7.7 kb,为无包膜单股正链 RNA 病毒,能广泛地感染人、猪、鼠、牛等多种哺乳动物,是主要的食源性致病原,可引起以呕吐、腹泻为主的急性胃肠炎^[1-3]。NoV 包含 3 个开放阅读框(Open Reading

Frames, ORFs),分别编码非结构蛋白、衣壳蛋白(Virus particle 1, VP1)、微小结构蛋白。VP1 由壳区(Shell domain, S 区)和突出区(Protruding domain, P 区)组成, P 区又包含 P1 和 P2 亚区, P2 亚区含有主要的中和表位,呈高度易变性^[4-5]。NoV 的基因型和基因组之间存在很大的抗原差异性,根据衣壳蛋白区和 RNA 多聚酶区核酸序列,可将 NoV 分为 10 个基因组(Genogroup, GI~GX),其中 GII 型是引起人体急性胃肠炎最主要的基因群,约有 85% 的 NoV 感染由 GII 型导致^[6]。NoV 在世界范围内均有流行,具有季节性高发、全人群普遍易感、高度变异、感染性强等特点。在中国,约有 15% 腹泻儿童的血清抗体中检出了诺如病毒,自 2014 年以来,诺如病毒造成的公共卫生事件显著增加,极大地加重了疾病负担^[7]。

NoV 主要经粪一口途径传播,污染的食品(如贝类等水产品、蓝莓、生菜等果蔬)是常见的传播媒介。食品中 NoV 含量低,且基质复杂,富含各种 PCR 抑制物,导致 NoV 难以富集检出。目前,病毒富集纯化仍是 NoV 检测的关键点及难点,在尚无特效药物及疫苗的情况下,开发高效准确的检测方法对防止疾病传播十分必要。文章拟阐述诺如病毒前处理环节及检测的最新研究成果,囊括富集技术、核酸检测、免疫学检测,以及生物传感器等。

1 诺如病毒的富集

食品中 NoV 含量低,且基质复杂,富含各种 PCR 抑制物,病毒富集纯化一直是 NoV 检测的瓶颈。有机絮凝沉淀法、膜过滤法、超滤浓缩等技术是目前 NoV 富集的主要方法,但这些富集方法是非特异性的,需要不断优化浓缩条件,且各类分子检测抑制物会随 NoV 的富集而富集^[8]。近年来,免疫(抗原-抗体)结合、病毒-受体结合、核酸适配体等特异性的 NoV 富集手段成为研究

基金项目:上海市自然科学基金(编号:18ZR1425500);上海农产品质量安全工程技术研究中心(编号:19DZ2284100);上海市农产品质量安全评价专业技术服务平台(编号:18DZ2292300)

作者简介:廖小艳,女,南华大学在读硕士研究生。

通信作者:白亚龙(1981—),男,上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所副研究员,博士。

E-mail: yalung@foxmail.com

收稿日期:2020-11-24

热点。

1.1 基于抗原抗体反应的富集技术

免疫磁珠是一种基于抗原抗体反应的特异性病毒富集方法,借助磁珠偶联的方式,利用针对特征性 NoV 的单克隆抗体或多克隆抗体来捕获病毒颗粒,可从复杂的基质中高效分离和浓缩 NoV^[9]。Park 等^[10]通过将克隆表达出的 GI-1 型和 GII-4 型 NoV 的衣壳蛋白对兔进行免疫,制备了针对特定基因型 NoV 衣壳蛋白的多克隆抗体,并将该多克隆抗体与磁珠偶联获得了相应的免疫磁珠。利用上述制备的免疫磁珠联合 RT-PCR 法对人工染毒草莓中 GI-1 型和 GII-4 型 NoV 进行检测,其回收率分别为 29.50%,14.14%,检出限低至 3~7 个 RT-PCR 单位。Lee 等^[11]利用免疫磁珠分离(磁珠上偶联免疫抗人 NoV 多克隆抗体)和量子点分析技术建立了一种检测新鲜生菜中诺如病毒的方法。该试验比较了免疫磁珠分离和聚乙二醇病毒沉淀两种方法的富集效率,两种方法均从人工染毒的 NoV 生菜样品中产生了可检测到的扩增片段(213 bp),但免疫磁珠法以 10 min 的孵育促进病毒沉淀,而聚乙二醇沉淀法需要更长的孵育时间(3 h)和额外的高速离心来沉淀病毒。

虽然免疫磁珠法可高效特异性富集 NoV,但 NoV 抗原的高度变异性使其无法富集所有的 NoV,往往需要与多种抗体或多价抗体偶联以提高免疫磁珠法的适用范围及性能^[12]。

1.2 基于病毒—受体结合的富集技术

组织血型抗原(Histo-blood group antigens, HBGA)是一类分布于外周组织,可与人源 NoV 结合的受体,主要包括 ABO、Lewis 和“分泌型”系统 3 种^[13]。猪胃黏蛋白(Porcine gastric mucin-conjugate, PGM)被证明含多种 HBGA(A 型、H1 型和 Lewis 抗原),可与 NoV 广谱结合^[14]。Tian 等^[15]采用 PGM 偶联磁珠以浓缩人工染毒食品样本(牡蛎、草莓、树莓和生菜)中 NoV,该方法不仅提高了灵敏度,还可有效去除 RT-PCR 抑制剂。Wang 等^[16]通过将 PGM 包被在 PCR 反应容器上以捕获分离病毒,并评估了热和氯处理对 NoV 灭活的影响。此外, Suresh 等^[17]比较了 ISO/TS 15216-1:2017 方法与猪胃黏蛋白包被磁珠法(Porcine gastric mucin coated magnetic beads, PGM-MB)的病毒提取效率,并结合热变性提取 RNA,用于检测人工染毒的新鲜海藻、罗勒、薄荷和菠菜中的人源 NoV。数据表明,与 ISO/TS 15216-1:2017 相比,PGM-MB 不仅能显著缩短检测时间,回收率也明显升高,PGM-MB 法从 1:10 稀释倍数的海藻中提取 RNA 的回收率高达(52.3±12.9)%。

HBGA 可与绝大部分的人源诺如病毒结合,并且可以去除非致病性病毒颗粒的干扰,在 NoV 前处理中具有广泛的应用前景,但 HBGA 特异性较低,与其他病毒(如

轮状病毒)之间也存在结合^[18-19]。

1.3 基于适配体的富集技术

核酸适配体是一段可特异性识别并捕获目标分子的核酸片段,为 NoV 富集提供了很好的思路^[12]。与抗体相比,适配体具有成本较低、易于化学合成和修饰、不引起免疫反应等优点。此外,通过核酸适配体对 NoV 颗粒进行特异性捕获,可采用简单的洗涤去除分子检测抑制物及样品基质,提高检测的灵敏度,避免假阳性、假阴性结果的产生^[20]。Escudero-Abarca 等^[21]利用指数富集的配体系统进化技术筛选出 4 种能与 GII 2 型人源诺如病毒广泛反应的 ssDNA 核酸适配体,分别命名为适配体 19、21、25 和 26,其中适配体 25 与病毒样颗粒的结合亲和力在 1~5 mg/mL 范围内与市售抗体相当。当使用适配体 25 标记的磁珠结合 RT-qPCR 对人工污染的生菜中的 NoV 进行回收和检测时,结果显示,该方法检测下限为 10 个 RNA 拷贝数/3 g 生菜,捕获率为 2.5%~36.0%。

虽然适配体能特异性捕获 NoV 颗粒,但目前缺乏能够与所有 NoV 基因型广泛结合的适配体,开发能与更多 NoV 基因型结合的适配体是解决问题的关键^[12]。且与抗体、HBGA 受体等相比,利用适配体对 NoV 进行特异性捕获的研究也要少得多,研究者可进行相关研究,拓展这方面的应用。

2 核酸检测

目前 NoV 检测方法主要有电镜法、免疫学检测和核酸分子检测技术等。常规电镜观察法具有灵敏度较低、对操作人员技术要求高、检测费用高等缺点,极大地限制了其应用,现已逐渐淘汰,不再作为主流的检测手段。NoV 是生命物质,随着分子生物学的长足发展,基于核酸的检测得到了广泛的研究与应用。基于核酸分子的 NoV 检测方法主要有常规 RT-PCR、巢式 PCR、多重 PCR、RT-qPCR,以及新兴的数字 PCR 和二代测序技术。由于常规 RT-PCR、巢式 PCR、多重 PCR 等存在一些缺陷,逐渐被其他的方法所替代,在此主要对 NoV 检测的“金标准”RT-qPCR 及新兴的 PCR 技术展开综述。

2.1 RT-qPCR

RT-qPCR 允许在单一反应中进行信号放大和扩增确认,通过实时监测荧光信号的增强达到定量的目的,具有灵敏度较高、特异性强等特点,是目前 NoV 检测的“金标准”^[22]。Rupprom 等^[23]对基于 TaqMan 探针,用于定量检测 GI 和 GII 型 NoV 的 RT-qPCR 检测法进行了评估。该方法对 GII DNA 标准品的灵敏度达 10³ DNA 拷贝数/mL,且未与其他常见肠道病毒产生交叉反应,具有良好的分析灵敏度。此外,Brassard 等^[24]采用 RT-qPCR 对田间灌溉草莓进行了 NoV 检测,并评估其污染来源。该研究采用超滤浓缩的前处理方法,结果显示 GI 型 NoV

检测范围为 $3.0 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^1$ particles/g, 这与其他新鲜产品(叶绿色和浆果)的研究一致。莫雪梅等^[25]根据 GII 型 NoV 保守区域设计引物, 建立了一种基于 SYBR Green I 染料的 RT-qPCR 方法, 并用于贝类中 NoV 检测。该方法检测范围为 $10^2 \sim 10^6$ 拷贝, 对甲肝病毒、轮状病毒、星状病毒等无交叉反应, 灵敏度、特异性较好。

RT-qPCR 是目前 NoV 检测的常规方法, 灵敏度较高、特异性强, 但 RT-qPCR 无法区分致病性和非致病性诸如病毒颗粒, 且食品样品基质中存在的一些分子检测抑制剂也会对检测结果产生影响。所以, 有一些研究会通过与其他技术结合消除此类问题, 比如先用 PGM 对有活性的病毒粒子进行分离, 然后进行 RT-qPCR^[15]。

2.2 数字 PCR

微滴式数字 PCR (Droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR) 对样品进行微滴化处理, 含有待测靶核酸分子的微滴产生荧光信号, 判读为 1, 否则为 0, 根据阳性微滴的比例及泊松分布原理实现目标待测物的检测。ddPCR 克服了实时 PCR 需要依赖外部标准曲线和 Ct 值的局限性, 逐渐成为一种替代的 RT-qPCR 的分析方法。作为一种第三代 PCR 技术, ddPCR 具有灵敏度更高、不受基质抑制的优势, 是精准检测含有大量 PCR 抑制剂的食品和环境样品中低水平 NoV 的理想方法^[26-27]。陈嘉茵等^[28]利用 RT-ddPCR 技术对不同浓度人工染毒生菜样品中的 GII 型 NoV 进行了检测, 结果显示, RT-ddPCR 检测范围为 $2.12 \sim 8.47 \times 10^4$ 拷贝/ μL , 其扩增效率为 95.44%。在回收率检测试验中, 抑制剂对结果无显著性差异。该方法可避免抑制剂造成的“假阴性”结果, 对低浓度受污染样品进行有效检测。王雪晴等^[29]也采用 RT-ddPCR 建立了一种检测冷冻草莓中 GI 型、GII 型 NoV 方法。该方法在 10^{-6} 稀释倍数的标准品中, 实测拷贝数浓度低至 1.8 拷贝/ μL , 其灵敏度比 RT-qPCR 法高一个数量级。但当样品浓度不在检测限范围内时, 会因阈值的设置的差别产生结果偏差^[30]。此外, Tan 等^[31]采用一步法 RT-ddPCR, 以公开的引物和探针组 JJV1F/JJV1R/JJV1P/JJV2F/COG2R/RING2 分别用于检测牡蛎中 GI 型、GII 型 NoV, 并与 RT-qPCR 进行比较。结果显示, RT-qPCR 检测 NoV 的灵敏度为 1.88×10^2 拷贝/ μL , 而 RT-ddPCR 定量检测 NoV 的灵敏度为 1.88×10^1 拷贝/ μL , 是 RT-qPCR 的 10 倍。

越来越多的研究开始将数字 PCR 用于食源性致病微生物的检测, 并且显示出一定的优势, 但目前仪器价格昂贵制约着该技术的实际应用, 相信随着科技的发展, 仪器成本的下降, 将会得到普及。

2.3 二代测序技术

二代测序 (Next-generation sequencing, NGS) 是基于 PCR 和基因芯片发展起来的一种 DNA 测序技术, 该方法

通过捕捉 DNA 复制过程中新添加的碱基所携带的特殊标记来实现测序, 具有高通量、超高速、低成本的特点^[32]。常见的技术平台包括 Roche 的 454 FLX、Illumina 的 Miseq/Hiseq 等。常规的 RT-PCR 之后 NGS 只能简单地检测 NoV RNA 的存在, 无法区分感染性和非感染性病毒颗粒。为避免非感染性病毒颗粒造成的假阳性, 可对样品进行 RNase 预处理。Imamura 等^[33-34]结合 RNase 酶解预处理和 NGS 技术对牡蛎样品中基因型进行鉴定, 证明了牡蛎中传染性 NoV 的多样性。牡蛎中含有几种 NoV 基因型 (GII.3、GII.4、GII.13、GII.16 和 GII.17), 不同基因型的检出率和比例不同。Bartsch 等^[35]为了提供用于浆果中病毒检测和鉴定的新方法, 对曾造成大规模 NoV 肠胃炎暴发的草莓进行了 NGS 测试。研究证明, 使用 NGS 技术可以鉴定自然污染的冷冻浆果中的人类致病性病毒, 此次试验产生了约 2 900 万个序列, 仅两个序列显示出与人源 NoV 同源。

二代测序技术可对诸多常见及罕见的 NoV 变异序列进行类别鉴定与分析, 对于分型溯源具有不可比拟的优势。然而, 该方法仍需进一步优化以减少干扰序列, 使得能够在高度丰富的核酸的背景下方便且可再现地检测出少量的人类致病性病毒序列, 如通过对样品进行 DNases 处理。

3 免疫学检验

免疫学检验主要基于抗原抗体反应, 即用特异性的抗体来检测样本中的 NoV。根据用于检测或量化分析物的标记方法, 可以将免疫学检验分为不同的类型, 目前用于 NoV 检测的免疫学方法主要有 ELISA 和免疫层析技术。

3.1 ELISA

ELISA 是一种常见的免疫学检测技术, 它通过将抗原或抗体结合在固相载体表面, 再加入酶标抗体或抗原, 当抗原抗体发生特异性结合时, 酶催化底物显色以达到检测的目的, ELISA 具有检测时间短、操作简单等优点。已有许多商业 ELISA 试剂盒用于临床样本中 NoV 的检测, 如英国 DakoCytomation 公司开发的 IDEIATM 诺如病毒试剂盒、德国 R-biopham 公司开发的 Ridascreen[®] 诺如病毒试剂盒, 但这些试剂盒的灵敏度和特异性范围差异很大, 且可能出现假阳性结果, 制约了其发展应用。食品中 NoV 含量低, 而 ELISA 的最低检测浓度为 $10^4 \sim 10^6$ 病毒颗粒/g, 因此目前 ELISA 尚不能满足食品样本对 NoV 检测的灵敏度要求^[36]。

3.2 免疫层析技术

免疫层析技术以固定有检测线 (包被抗体) 和质控线 (抗抗体) 的条状纤维层析材料为固定相, 测试液为流动相, 是一种在免疫渗滤基础上发展而来的新型免疫学检

测方法。当样品中存在相应的抗原时,抗原会与抗体发生特异性反应,在检测线出现可见的条带而达到检测目的。免疫层析具有检测时间短、保质期长、成本相对较低等优点,一些商业免疫层析试剂盒也用于 NoV 检测。Kumthip 等^[37]评估了最新版的 RIDA® QUICK 诺如病毒免疫层析试剂盒对临床样本中 NoV 检测的敏感性和特异性,并与 RT-PCR 进行比较。结果显示,该试剂盒具有较高的灵敏度和特异性,且与其他胃肠炎病毒无交叉反应。由于免疫层析技术具有检测灵敏度和特异性较低的缺点,且对 NoV 的分型能力有限,因而主要用于临床样本中 NoV 的检测。但可将其与其他技术联合以提高检测的灵敏度,从而满足食品中 NoV 的检测要求。

ELISA 和其他免疫学检测方法一样具有检测灵敏度和特异性较低的缺点,其检测下限为 $10^4 \sim 10^6$ 个病毒颗粒/g,不利于食品基质中 NoV 检测。随着新方法的出现以及与其他技术联用,使得食品中 NoV 的检测成为可能。如张捷等^[38]通过将免疫层析法与近红外荧光结合,制备了一种用于检测贝类中 NoV 的便携式试纸条;Al-harami 等^[39]开发了一种基于纳米材料的免疫分析方法,可实现对鸡肉、黄瓜、生菜中 NoV 的检测。免疫学技术与其他技术联用不仅提高了检测的灵敏度,满足了食品中 NoV 的检测要求,还使检测设备更加便捷。核酸检测、免疫学检测用于诺如病毒检测的评价汇总见表 1。

4 生物传感器

生物传感器是一种可将生物响应转换成可测量的光、电或物理信号的分析装置,由生物刺激性材料识别元

件和理化转换系统组成。根据所使用的信号转换器,生物传感器可分为电化学、光学、压电晶体和半导体生物传感器等^[40]。生物传感器具有灵敏度高、成本低、分析速度快、高度自动化、集成化等特点,越来越成为研究的重点。

4.1 电化学生物传感器

电化学生物传感器是一种将生物识别转换为电流、电位、阻抗等电信号的传感平台,具有低成本、高灵敏度的特点。Baek 等^[41]以 NoroBP-nonFoul-(FlexL)₂ 多肽为特异性生物分子结合剂,研制了一种用于高选择性、高灵敏度检测牡蛎样品中 NoV 的电化学生物传感器。NoroBP 多肽通过噬菌体表面展示技术从随机肽库中筛选而出,能与 NoV 特异性结合。NoroBP-nonFoul-(FlexL)₂ 多肽是以 NoroBP 为骨架,将两个(GGGGS)连接子和一个(EKEKEKE)连接子插入到 NoroBP 中而成。此外,该多肽含有巯基,可在 Au 表面形成 Au-S 共价键,利用该特点可将多肽包被在电极上,电流信号随 NoV 量的增加而递减。该传感器能对牡蛎中 NoV 进行高灵敏度、高选择性检测,检测下限低至 1.7 拷贝数/mL。此外,Baek 等^[42]还开发了一种 NoV 特异性捕获多肽功能化金纳米修饰的二硫化钨纳米花电化学传感平台。当病毒与金纳米颗粒修饰的二硫化钨纳米花结合时,通过阻止工作电极与氧化还原物之间的电荷转移而提高了阻抗,阻抗值会随着 NoV 量的增加而增加。利用电化学阻抗谱技术对传感器检测性能进行评估,该传感器具有良好的选择性和灵敏度,在牡蛎样品中检测限为 6.21 拷贝数/mL。

表 1 诺如病毒检测方法(核酸检测、免疫学检测)及评价[†]

Table 1 Detection methods of norovirus (nucleic acid detection, immunological detection) and evaluation

方法	检测样品	洗脱、富集	灵敏度	优缺点	参考文献
RT-qPCR	草莓	超滤浓缩	50 particles/g	灵敏度较高、特异性强,但无法区分致病性和非致病性	[24]
	贝类	PEG 沉淀法	100 拷贝	NoV 颗粒,受基质抑制剂干扰	[25]
数字 PCR	生菜	PEG 沉淀法	2.12 拷贝/ μ L	灵敏度更高、不受基质抑制、	[28]
	草莓	PEG 沉淀法	1.8 拷贝/ μ L	不依赖标准曲线和 Ct 值,但仪器价格昂贵	[29]
	贝类	ISO/TS 15216-1 (PEG 沉淀法)	18.8 拷贝/ μ L		[31]
二代测序技术	贝类	ISO/TS 15216-1 (PEG 沉淀法) + RNase 酶解预处理	/	高通量、超高速、低成本、有利于分型溯源,但难以在丰富的核酸背景下再现少量的致病序列	[33-34]
	草莓	ISO/TS 15216-2 (PEG 沉淀法)	/		[35]
免疫层析技术	贝类	超滤浓缩	93.3%	检测时间短、成本相对较低,但灵敏度和特异性较低,且对	[38]
	鸡肉、生菜、黄瓜	/	10~53 PFU/mL	NoV 分型能力有限	[39]

[†] 二代测序技术主要用于分型。

除了利用多肽直接对 NoV 进行检测外,也可利用 NoV 衣壳蛋白和诺如病毒样颗粒进行间接检测。如,Guo 等^[43]通过将制备的针对 NoV 衣壳蛋白的单克隆抗体偶联在 ITO/CdS 电极表面,开发了一种光电化学生物传感器,用于特异性和灵敏检测 NoV。该传感器电极的光电流随着 NoV 衣壳蛋白浓度的变化而变化,可在 30 min 内以浓度依赖的方式检测到低至 2×10^{-10} g/mL 的 NoV 衣壳蛋白。此外, Lee 等^[44]利用外加磁力将金/磁性纳米颗粒修饰的石墨烯沉积在叉指式铂电极上作为电传感通道,再与 GII 型 NoV 抗体偶联,形成诺如病毒样颗粒传感平台。该传感平台可通过测量电阻的变化来监测诺如病毒样颗粒浓度的变化,在 0.01 pg/mL ~ 1.00 ng/mL 质量浓度范围具有较高的灵敏度和特异性,检测限为 1.16 pg/mL。电化学生物传感器作为一种高灵敏检测病原体 and 污染物的新型工具,具有快速、现场诊断的 NoV 的潜力,可有效提高检测的灵敏度,但在实际中的应用尚未普及^[45]。

4.2 光学生物传感器

光学生物传感器可分为基于荧光、吸收、反射、表面等离子体共振等,这些传感器通常具有无标记、所需样品量少、高灵敏度或特异性、可近乎实时地进行检测的优点,在食品中诺如病毒检测方面具有巨大应用潜力^[46]。局域表面等离子体共振(Localized surface plasmon resonance, LSPR)是一种应用广泛的传感方法,具有响应速度快、衰变长度短的特点,可高灵敏度地检测其表面的各种分析物^[47]。Heo 等^[48-49]利用该技术开发了一种由亲和肽引导的可检测 NoV 衣壳蛋白和人源 NoV 的传感器。亲和肽通过从多价 M13 随机肽库中经生物筛选而来,可与 NoV 特异性结合,经 ELISA 鉴定,其与 NoV 的结合亲和力和为纳摩尔级别。NoV 衣壳蛋白含量与 LSPR 信号的吸光度呈正比,该传感器的最低检测限为 0.1 ng/mL。但值得注意的是,利用 LSPR 进行传感时需严格控制反应条件以减少非特异性结合,而当配体固定在传感器表面后其天然构型可能会改变,这将影响与分析物的结合^[50]。

除表面等离子体共振型光学传感器外,基于荧光的光学传感器也被应用于食品中 NoV 检测。Zhao 等^[51]从嗜热菌中提取载色体,构建了一种以“ ϵ -亚单位抗体—链霉素—生物素—探针”检测系统的 F_0F_1 -ATPase 生物传感器,并成功用于食品中 NoV 检测。该研究利用链霉素—生物素系统将设计的探针连接至传感器,根据探针与 NoV RNA 的特异性结合可实现对 NoV 的检测。与对照相比,该传感器对 NoV 的荧光强度有显著性差异,表明 NoV 被成功捕获并连接到探针。所构建的生物传感器可在 1 h 内完成 NoV RNA 检测,灵敏度达 0.005 ng/mL。此外, Adegoke 等^[52]开发了一种 SiO_2 包覆合金化 CdZnSeS 量子点—分子信标纳米传感器,用于检测 GII 型 NoV。该研究利用核酸杂交原理,通过分子信标探针对 NoV RNA 进行特异性捕获。该量子点分子信标探针可实现对低浓度 NoV RNA 的超灵敏检测,最低检出限为 8.2 拷贝数/mL。与传统的分子检测探针相比,该检测系统具有快速、高特异、高灵敏度等优点。

除了电化学和光学生物传感器之外,还有一些其他的生物传感器也被用于 NoV 的检测,如基于质量的生物传感器(石英晶体微天平和微悬臂梁)、比色型生物传感器、免疫传感器等。与其他方法相比,生物传感器具有灵敏度高、成本低、分析速度快、所需样品量少等特点,在食品中诺如病毒检测方面具有巨大应用潜力。虽然生物传感器的开发极大地提高了检测的灵敏度,但在实际中的应用尚未普及,且当其利用配体捕获 NoV 时,可能会改变配体的天然构象,从而影响与分析物的结合,因此仍需进一步改进。生物传感器用于诺如病毒及其代替物检测评价汇总见表 2。

5 展望

在半个世纪的过程中,食品中 NoV 检测和分析技术取得了极大的进展,人们对 NoV 的流行病学特征、基因分型、检测和诊断有了更深入的认识。但目前 NoV 的检测仍存在诸多挑战,需要进一步的研究。首先,将含量极

表 2 诺如病毒及其代替物检测方法(生物传感器)和评价

Table 2 Detection methods of norovirus and its surrogates (Biosensor) and evaluation

方法	检测样品	特异性结合剂	灵敏度	优缺点	参考文献
电化学生物传感器	牡蛎	NoroBP-nonFoul-(FlexL) ₂ 多肽	1.7 拷贝数/mL	灵敏度高、特异性强、成本低、所需样本量少、可用于现场快速诊断,但在实际中的应用尚未普及,可能会改变配体天然构象而影响与分析物的结合	[41]
	牡蛎	NoV 特异性捕获多肽	6.21 拷贝数/mL		[42]
	NoV 衣壳蛋白	单克隆抗体	2×10^{-10} g/mL		[43]
	诺如病毒样颗粒	GII 型 NoV 抗体	1.16 pg/mL		[44]
光学生物传感器	NoV 衣壳蛋白	亲和肽	0.1 ng/mL	[48-49]	[51]
	牡蛎/猪肉	探针	0.005 ng/mL		
	NoV RNA	分子信标探针	8.2 拷贝数/mL		

低的 NoV 从大样本的复杂食品基质中提取富集一直都是 NoV 检测的瓶颈环节,虽然已有一些基于靶向结合的特异性富集方法,但仍缺少能与不同基因型 NoV 进行广谱结合的配体,因此开发具有广谱配位性的配体对 NoV 的检测极为重要^[12];其次感染性和非感染性病毒颗粒的区分对食品中 NoV 的检测也十分关键。受损的衣壳蛋白虽然使 NoV 失去感染性,但其 RNA 依然存在,导致了核酸检测假阳性结果的产生。目前,可以通过在 PCR 扩增之前加入核酸嵌入剂(如单叠氮乙烷和单叠氮丙啶)来达到区分感染性和非感染性病毒颗粒的目的^[53]。核酸嵌入剂能够穿透受损的衣壳蛋白,并与 RNA 共价结合,使得非感染性病毒不能进行 RT-qPCR 扩增从而区分;最后仍需进一步提升 NoV 检测的灵敏度,实现快速、高通量检测。核酸检测耗时较长,不利于实时检测、免疫学检验的灵敏度和特异性通常较低,且对 NoV 的分型能力有限,而目前正在开发的可快速检测的生物传感器还没有在实际应用中得以普及。虽然食品中 NoV 检测研究已取得重大进展,但仍存在一些挑战,需要继续深入研究。

参考文献

- [1] COSTANTINI V P, COOPER E M, HARDAKER H L, et al. Epidemiologic, virologic, and host genetic factors of norovirus outbreaks in long-term care facilities[J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 62(1): 1-10.
- [2] DI MARTINO B, DI PROFIO F, MELEGARI I, et al. A novel feline norovirus in diarrheic cats[J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 38: 132-137.
- [3] PRINGLE K, LOPMAN B, VEGA E, et al. Noroviruses: Epidemiology, immunity and prospects for prevention[J]. *Future Microbiol*, 2015, 10(1): 53-67.
- [4] CHHABRA P, DE G M, PARRA G I, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. *Gen Virol*, 2019, 100(10): 1 393-1 406.
- [5] DE GRAAF M, BODEWES R, VAN ELK C E, et al. Norovirus infection in harbor porpoises[J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(1): 87-91.
- [6] 李婷, 雷清. 诺如病毒的流行及进化概述[J]. *微生物学免疫学进展*, 2019, 47(6): 70-74.
- [7] 廖巧红, 冉陆, 靳森, 等. 诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南(2015版)[J]. *中华预防医学杂志*, 2016, 50(1): 7-16.
- [8] 管锦绣, 许喜林, 翁文川, 等. 西生菜中低污染量 G II 型诺如病毒的富集与定量检测研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(9): 3 536-3 542.
- [9] 林吉恒, 黄朱梁, 彭志兰, 等. 免疫磁珠分离技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(18): 5 998-6 005.
- [10] PARK Y, CHO Y H, JEE Y, et al. Immunomagnetic separation combined with real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of norovirus in contaminated food[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(13): 4 226-4 230.
- [11] LEE H M, KWON J, CHOI J S, et al. Rapid detection of norovirus from fresh lettuce using immunomagnetic separation and a quantum dots assay[J]. *J Food Prot*, 2013, 76(4): 707-711.
- [12] 张乐, 吴清平, 吴克刚, 等. 基于靶向结合的食源性诺如病毒富集与检测研究进展[J]. *病毒学报*, 2019, 35(6): 978-983.
- [13] HENNESSY E P, GREEN A D, CONNOR M P, et al. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type[J]. *Infect Dis*, 2003, 188(1): 176-177.
- [14] ZHOU Zhen-huan, TIAN Zhen-gan, LI Qian-qian, et al. In situ capture RT-qPCR: A new simple and sensitive method to detect human norovirus in oysters[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 554-561.
- [15] TIAN Peng, ENGELBREKTSON A, MANDRELL R. Two-log increase in sensitivity for detection of norovirus in complex samples by concentration with porcine gastric mucin conjugated to magnetic beads[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(14): 4 271-4 276.
- [16] WANG Da-peng, TIAN Peng. Inactivation conditions for human norovirus measured by an in situ capture-qRT-PCR method[J]. *Inter J Food Microbiol*, 2014, 172: 76-82.
- [17] 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: 103 254-103 284.
- [18] MARIONNEAU S, CAILLEAU-THOMAS A, ROCHER J, et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world[J]. *Biochimie*, 2001, 83(7): 565-573.
- [19] 马丽萍, 苏来金, 赵峰, 等. 长牡蛎中类 HBGAs 的分型及与诺如病毒 P 粒子结合特性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(10): 3 970-3 975.
- [20] TOMBELLI S, MINUNNI M, MASCINI M. Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis[J]. *Biomol Eng*, 2007, 24(2): 191-200.
- [21] ESCUDERO-ABARCA B I, SUH S H, MOORE M D, et al. Selection, characterization and application of nucleic acid aptamers for the capture and detection of human norovirus strains[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106805.
- [22] XU De-shun, WU Xiao-fang, HAN Jian-kang, et al. Detection of GI and GII noroviruses in drinking water and vegetables using filtration and real-time RT-PCR[J]. *Eur Food Res Technol*, 2014, 239(5): 795-801.
- [23] RUPPROM K, CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR

- P, DIRAPHAT P, et al. Evaluation of real-time RT-PCR assays for detection and quantification of norovirus genogroups I and II[J]. *Virol Sin*, 2017, 32(2): 139-146.
- [24] BRASSARD J, GAGNE M J, GENEREUX M, et al. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(10): 3 763-3 766.
- [25] 莫雪梅, 高东微. SYBR Green I 荧光 RT-PCR 法检测贝类中的诺如病毒[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(6): 817-822.
- [26] MIOTKE L, LAU B T, RUMMA R T, et al. High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(5): 2 618-2 624.
- [27] MU Di, YAN Liang, TANG Hui, et al. A sensitive and accurate quantification method for the detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by the application of a droplet digital polymerase chain reaction amplification system[J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(10): 2 063-2 073.
- [28] 陈嘉茵, 方苓, 吴诗微, 等. 一步法微滴数字 PCR 检测生菜中 GII 型诺如病毒[J]. *食品科学*, 2019, 40(4): 332-337.
- [29] 王雪晴, 王群, 房保海, 等. 微滴式数字 PCR 检测冷冻草莓中 GI、GII 型诺如病毒[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(2): 89-94.
- [30] WU Xu-long, LIN Hua, CHEN Shi-jie, et al. Development and application of a reverse transcriptase droplet digital PCR (RT-ddPCR) for sensitive and rapid detection of Japanese encephalitis virus [J]. *J Virol Methods*, 2017, 248: 166-171.
- [31] TAN Dong-mei, LIU Su-ling, LIU Wei, et al. Utility of droplet digital pcr assay for quantitative detection of norovirus in shellfish, from production to consumption in Guangxi, China [J]. *Biomed Environ Sci*, 2018, 31 (10): 713-720.
- [32] HASING M E, HAZES B, LEE B E, et al. A next generation sequencing-based method to study the intra-host genetic diversity of norovirus in patients with acute and chronic infection [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17 (1): 480-490.
- [33] IMAMURA S, KANEZASHI H, GOSHIM T, et al. Application of next-generation sequencing to evaluate the profile of noroviruses in pre-and post-depurated oysters[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2016, 13(10): 559-565.
- [34] IMAMURA S, HARUNA M, 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.
- [35] BARTSCH C, HÖPER D, MÄDE D, et al. Analysis of frozen strawberries involved in a large norovirus gastroenteritis outbreak using next generation sequencing and digital PCR[J]. *Food Microbiol*, 2018, 76: 390-395.
- [36] GYAWALI P, KC S, BEALE D J, et al. Current and emerging technologies for the detection of norovirus from shellfish[J]. *Foods*, 2019, 8(6): 187-204.
- [37] KUMTHIP K, KHAMRIN P, SAIKRUANG W, et al. Comparative evaluation of norovirus infection in children with acute gastroenteritis by rapid immunochromatographic test, RT-PCR and Real-time RT-PCR[J]. *J Trop Pediatr*, 2017, 63(6): 468-475.
- [38] 张捷, 王琳, 霍江莲, 等. 基于近红外免疫层析技术食源性诺如病毒快速检测方法研究[J]. *黑龙江医学*, 2017, 41 (7): 691-694.
- [39] ALHADRAMI H A, AL-AMER S, ALORAIJ Y, et al. Development of a simple, fast, and cost-effective nanobased immunoassay method for detecting norovirus in food samples[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(21): 12 162-12 165.
- [40] SAYLAN Y, ERDEM Ö, ÜNAL S, et al. An alternative medical diagnosis method: biosensors for virus detection [J]. *Biosensors (Basel)*, 2019, 9(2): 65-86.
- [41] BAEK S H, KIM M W, PARK C Y, et al. Development of a rapid and sensitive electrochemical biosensor for detection of human norovirus via novel specific binding peptides[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 123: 223-229.
- [42] BAEK S H, PARK C Y, NGUYENB T P, et al. Novel peptides functionalized gold nanoparticles decorated tungsten disulfide nanoflowers as the electrochemical sensing platforms for the norovirus in an oyster[J]. *Food Control*, 2020, 114: 107 225-107 231.
- [43] GUO Jiu-biao, LIU Dan, YANG Zhi-qiang, et al. A photoelectrochemical biosensor for rapid and ultrasensitive norovirus detection [J]. *Bioelectrochemistry*, 2020, 136: 107 591-107 598.
- [44] LEE J, TAKEMURA K, KATO C N, et al. Binary nanoparticle graphene hybrid structure-based highly sensitive biosensing platform for norovirus-like particle detection[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(32): 27 298-27 304.
- [45] HIRANO S, SAITO J, YUKAWA B, et al. Improvement of electrochemical conditions for detecting redox reaction of $K_3 [Fe (CN)_6]$ toward the application in norovirus aptasensor[J]. *Electrochemistry*, 2020, 88(3): 205-209.
- [46] LIU Ling-ling, MOORE M D. A survey of analytical techniques for noroviruses[J]. *Foods*, 2020, 9(3): 318.
- [47] ZHAO Xing-hai, WONG M K, CHIU S K, et al. Effects of three-layered nanodisk size on cell detection sensitivity of plasmon resonance biosensors [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74: 799-807.
- [48] HEO N S, SEO Y O, MYUNG Y R, et al. Affinity peptide-guided plasmonic biosensor for detection of noroviral protein and human norovirus [J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2019, 24(2): 318-325.

(下转第 232 页)

[47] Frontmtec. PH-K21 [EB/OL]. [2020-08-20]. <https://www.frontmtec.com/cn/other/instruments/quality-control/ph-k21>.

[48] Frontmtec. NitForm [EB/OL]. [2020-08-20]. <https://www.frontmtec.com/cn/other/instruments/carcass-grading-traceability/nitfom>.

[49] Marel. Overhead classification and sorting[EB/OL]. [2020-08-20]. http://wechat.marel.cn/product_category/高架分级和分选.

[50] Marel. Classifier[EB/OL]. [2020-08-20]. http://wechat.marel.cn/product_category/分级机.

[51] BARBIN Douglas F, ELMASRY Gamal, SUN Da-wen, et al. Predicting quality and sensory attributes of pork using near-infrared hyperspectral imaging[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 719: 30-42.

[52] BARBIN Douglas F, ELMASRY Gamal, SUN Da-wen, et al. Near-infrared hyperspectral imaging for grading and classification of pork[J]. *Meat Science*, 2012, 90(1): 183-195.

[53] ELMASRY Gamal, SUN Da-wen, ALLEN Paul. Near-infrared hyperspectral imaging for predicting colour, pH and tenderness of fresh beef[J]. *Journal of Food Engineering*, 2011, 110(1): 127-140.

[54] ANDERSEN Petter Vejle, WOLD Jens Petter, GJERLAUG-ENGER Eli, et al. Predicting post-mortem meat quality in porcine longissimus lumborum using Raman, near infrared and fluorescence spectroscopy[J]. *Meat Science*, 2018, 145: 94-100.

[55] KIPPER M, MARCOUX M, ANDRETTA I, et al. Assessing the accuracy of measurements obtained by dual-energy X-ray absorptiometry on pig carcasses and primal cuts[J]. *Meat Science*, 2019, 148: 79-87.

[56] TAHERI-GARAVAND Amin, FATAHI Soodabeh, OMID Mahmoud, et al. Meat quality evaluation based on computer vision technique: A review[J]. *Meat Science*, 2019, 156: 183-195.

[57] BRETHOUR J R. Using serial ultrasound measures to generate models of marbling and backfat thickness changes in feedlot cattle[J]. *Journal of animal science*, 2000, 78(8): 2 055-2 061.

[58] 闫忠心. 肉类智能分级系统: 201821625619.1[P]. 2019-11-19.

[59] 贾渊. 一种基于图像处理的猪肉外在品质在线分级装置: 201020524094.X[P]. 2011-03-30.

[60] 陈林. 近红外在线肉品分级自动检测装置: 201020193726.9[P]. 2010-12-22.

[61] 郭楠, 王丽红, 丁有河, 等. 气动式羊胴体自动分级系统开发[J]. *肉类工业*, 2017(11): 49-51.

[62] 韩宏宇. 基于深度学习的猪胴体图像分级系统设计与实现[D]. 沈阳: 沈阳工业大学, 2018: 44.

[63] 吴贵茹. 基于计算机视觉的牛肉产量自动分级技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 60-61.

[64] 伍学千. 基于计算机视觉技术的猪肉品质检测与分级研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010: 77-78.

[65] 伍学千, 廖宜涛, 樊玉霞, 等. 基于 KFCM 和改进分水岭算法的猪肉背最长肌分割技术[J]. *农业机械学报*, 2010, 41(1): 172-176.

[66] 李明静. 计算机视觉在牛肉大理石花纹自动分级中的应用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007: 41.

[67] 刘晓晔. 基于近红外光谱技术的牛肉在线分级及分类初探[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012: 45.

[68] 谢新月. 基于光谱特性肉品种类及新鲜度识别方法研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013: 51.

[69] 姜新华, 薛河儒, 郜晓晶, 等. 高光谱图像与稀疏核典型相关分析冷鲜肉新鲜度无损检测[J]. *光谱学与光谱分析*, 2018, 38(8): 2 498-2 504.

[70] 陈丽. 羊胴体分级模型与分级评定技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011: 50-51.

[71] 赵杰文, 黄晓玮, 邹小波, 等. 基于嗅觉可视化技术的猪肉新鲜度检测[J]. *食品科学技术学报*, 2013, 31(1): 9-13.

[72] 黄星奕, 周芳, 蒋飞燕. 基于嗅觉可视化技术的猪肉新鲜度等级评判[J]. *农业机械学报*, 2011, 42(5): 142-145, 124.

[73] NASSY Gilles, 黄亚宇, 孟庆翔. 控制猪肉品质的新型感应器: 用于屠宰和加工阶段测定猪胴体组分和评估猪肉品质[J]. *肉类研究*, 2015, 29(2): 21-24.

(上接第 206 页)

[49] HWANG H J, RYU M Y, PARK C Y, et al. High sensitive and selective electrochemical biosensor: Label-free detection of human norovirus using affinity peptide as molecular binder[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 87: 164-170.

[50] HELMERHORST E, CHANDLER D J, NUSSIO M, et al. Real-time and label-free bio-sensing of molecular interactions by surface plasmon resonance: A laboratory medicine perspective[J]. *Clin Biochem Rev*, 2012, 33(4): 161-173.

[51] ZHAO Zhou, ZHANG Jie, XU Mei-ling, et al. A rapidly new-typed detection of norovirus based on F0F1-ATPase molecular motor biosensor[J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2016, 21(1): 128-133.

[52] ADEGOKE O, SEO M W, KATO T, et al. An ultrasensitive SiO₂-encapsulated alloyed CdZnSeS quantum dot-molecular beacon nanobiosensor for norovirus[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 135-142.

[53] ESCUDERO-ABARCA B I, RAWSTHORNE H, GOULTER R M, et al. Molecular methods used to estimate thermal inactivation of a prototype human norovirus: More heat resistant than previously believed? [J]. *Food Microbiol*, 2014, 41: 91-95.