

# 医院内诺如病毒感染的三种病原学检测方法应用比较

陈冬梅 贾立平 张又 钱渊 邓莉 贾莉英 高燕

**【摘要】** 目的 找到一种简便易行的检测感染性腹泻粪便标本中诺如病毒的方法。方法 用两种酶免疫吸附试剂盒检测北京地区婴幼儿腹泻和综合医院内成人感染性腹泻粪便标本中的诺如病毒,并用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)作对照,评价这两种试剂盒。用两种试剂盒分别检测 69 份儿科病房标本和来自 3 家综合医院 15 份成人医院内感染性腹泻的粪便标本中诺如病毒;其中 5 份儿科病房和 15 份成人病房的粪便标本还同时进行了 RT-PCR 检测。结果 84 份粪便标本中,试剂盒甲的诺如病毒检出率为 20.2% (17/84),试剂盒乙的诺如病毒检出率为 36.9% (31/84);两种试剂盒的符合率为 73.8% (62/84),但试剂盒乙的检出率显著高于试剂盒甲 ( $P < 0.01$ )。在应用了 RT-PCR 检测的 20 份标本中,阳性率为 55.0% (11/20)。试剂盒甲与 RT-PCR 检测结果相比,检出率明显低于 RT-PCR ( $P < 0.05$ ),试剂盒乙与 RT-PCR 检测结果相比,检出率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。3 家综合医院的成人标本中,每家医院都有 2 份或 2 份以上送检标本诺如病毒检测阳性,结合临床诊断可判定为诺如病毒医院内感染暴发。结论 酶免疫吸附方法检测诺如病毒感染简便易行、利于推广,试剂盒乙可以替代 RT-PCR 方法应用于临床。3 家综合医院都存在诺如病毒医院内感染的暴发。

**【关键词】** 诺如病毒; 医院内感染; 暴发; 酶免疫吸附

**Comparison of methods for Norovirus detection in stool specimens collected from hospitalized patients with hospital acquired diarrhea** CHEN Dong-mei\*, JIA Li-ping, ZHANG You, QIAN Yuan, DENG Li, JIA Li-ying, GAO Yan. \*Beijing Municipal Laboratory of Infection and Immunity, Laboratory of Virology, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China  
Corresponding author: QIAN Yuan, Email: yqianbjc@263.net

**【Abstract】 Objective** In order to find out a more convenient, rapid and efficient way in detecting human Norovirus infections in specimens collected from hospitalized patients with acute non-bacterial diarrhea in Beijing. **Methods** Two kits for enzyme immunoassay (EIA) were used to detect human Noroviruses in stool specimens collected from 69 infants and young children as well as 15 adults who were all diagnosed as acute non-bacterial diarrhea in 4 different hospitals. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to evaluate the data from two kits in this study. Data were statistically analyzed by SPSS 11.5 software.  $\chi^2$  test was used to test categorical variables. **Results** Out of 84 stool specimens collected from infants and young children or adults with acute non-bacterial diarrhea, 17 (20.2%) were Norovirus positive determined by EIA kit A and 31 (36.9%) were Norovirus positive determined by EIA kit B.  $\chi^2$  test used to test categorical variables showed significant differences ( $P < 0.01$ ), suggesting that the EIA kit B was superior to the EIA kit A. Among these 84 stool specimens, 20 were tested by RT-PCR simultaneously. Out of those 20 specimens, 11 (55.0%) were Norovirus positive as determined by RT-PCR, which was higher than that from 2 EIA kits. Results from 10 (50.0%) samples detected by EIA kit A were consistent with those detected by RT-PCR. Through  $\chi^2$  test, the categorical variables showed significant differences with  $P < 0.05$ , suggesting that RT-PCR was superior to the EIA kit A. Results from 14 (70.0%) samples detected by EIA kit B were consistent with those detected by RT-PCR while  $\chi^2$  test showed that the differences were not significant ( $P > 0.05$ ), among categorical variables suggesting that EIA kit B was as sensitive as RT-PCR in detecting Norovirus. There were hospital acquired diarrhea outbreaks in these three hospitals since at least 2 Norovirus positive specimens were detected in each of the hospitals. **Conclusion** To detect human Noroviruses infection, EIA seemed to be more convenient and time saving than RT-PCR which had been used worldwide. The EIA kit

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270067)

作者单位:100020 北京,首都儿科研究所病毒研究室 北京市感染与免疫中心实验室(陈冬梅、贾立平、张又、钱渊);首都儿科研究所附属儿童医院感染消化科(邓莉、贾莉英);北京大学人民医院感染科(高燕)

通讯作者:钱渊, Email: yqianbjc@263.net

B in this study was comparable to RT-PCR for detecting Norovirus in stool specimens. Norovirus was a pathogen causing hospital acquired diarrhea outbreaks in these three hospitals.

**【Key words】** Norovirus; Hospital-acquired infection; Outbreaks; Enzyme immunoassay

诺如病毒感染性腹泻是由诺如病毒属病毒引起的腹泻,具有发病急、传播速度快、涉及范围广等特点,是引起非细菌性腹泻暴发的主要病因。诺如病毒基因高度变异,在同一时期和同一社区内可能存在遗传特性不同的毒株流行。诺如病毒抗体没有显著的保护作用,尤其是没有长期免疫保护作用,极易造成反复感染<sup>[1,2]</sup>。由于诺如病毒的高变异性,至今没有找到简单快速的检测方法,本研究收集了两种检测试剂盒,希望能找到一种简单、快速、有效的检测方法,以便在临床单位推广应用。

## 材料与方 法

### 1. 材料:

(1)标本来源:本研究用于检测诺如病毒的腹泻患者粪便标本共有 84 份,其中 69 份来源于某医院儿科病房,15 份分别来自 3 家医院成人病房(老年病房、心脏外科术后病房和精神病房)。

(2)试剂盒来源:试剂盒 1:由日本大阪堺市卫生研究所所长田中智之教授研制并赠送;试剂盒 2:由德国必发分析系统销售(北京)有限公司惠赠。

(3)引物设计:根据本实验室前期从北京市婴幼儿散发的腹泻标本中检测到的诺如病毒核衣壳蛋白(N 蛋白)的编码基因设计<sup>[3]</sup>。

### 2. 方法:

(1)试剂盒 1:用诺如病毒抗体包被板检测诺如病毒。每次检测时设空白和阳性对照:一孔作空白,两孔用试剂盒中的诺如病毒阳性对照作阳性对照。按照试剂盒说明书操作。①标本用样品稀释液稀释成 10% 的粪便悬液,室温静置 10 min,取上清液备用。每孔加入稀释的标本、样品稀释液(空白)或阳性对照各 100  $\mu$ l。按照上述步骤的顺序和时间间隔,依次在每孔中加入 100  $\mu$ l 酶标抗体,用铝箔覆盖置于平稳处,室温孵育 2 h。②吸出孔中的液体,每孔加入约 250  $\mu$ l 的洗液,混匀,吸出孔中的液体。重复洗涤 4 次。然后倒置板子,在干净的纸巾上拍击,以去除孔中残余液体;每孔加入 100  $\mu$ l 底物,用铝箔覆盖置于平稳处,室温孵育 30 min。③每孔加入 100  $\mu$ l 终止液,20 min 内于 450/630 nm 测量每孔的吸光度(A)值。④结果判定:A 值  $\geq 0.5 \times$  (两阳性对照孔 A 值的均值)即判定为阳性结果,A 值  $< 0.5 \times$

(两阳性对照孔 A 值的均值)即判定为阴性结果。

(2)试剂盒 2:用诺如病毒抗体包被板检测诺如病毒。每次检测时,设阴性对照和阳性对照:一孔作阴性对照,两孔用试剂盒中的诺如病毒阳性对照作阳性对照。按照试剂盒说明操作。①标本用样品稀释液 1:6 稀释成粪便悬液,5000 r/min 离心 5 min,取上清液备用,每孔加入稀释的标本、样品稀释液(阴性对照)或阳性对照各 100  $\mu$ l;用铝箔覆盖置于平稳处,室温孵育 1 h。②吸出孔中的液体,每孔加入约 300  $\mu$ l 的洗液;混匀,吸出孔中的液体,重复洗涤 4 次;然后倒置板子,在干净的纸巾上拍击,以去除孔中残余液体;按照上述步骤的顺序和时间间隔,依次在每孔加入 100  $\mu$ l 酶标抗体。用铝箔覆盖置于平稳处,室温孵育 30 min。③吸出孔中的液体,每孔加入约 300  $\mu$ l 的洗液;混匀,吸出孔中的液体,重复洗涤 4 次;然后倒置板子,在干净的纸巾上拍击,以去除孔中残余液体。按照上述步骤的顺序和时间间隔,依次在每孔加入 100  $\mu$ l 底物。用铝箔覆盖置于平稳处,室温孵育 15 min。④每孔加入 100  $\mu$ l 终止液,于 450/630 nm 测量每孔的 A 值。⑤结果判定:A 值  $\geq$  (阴性对照孔的 A 值 + 0.15)  $\times$  (1 + 10%) 即为阳性结果,A 值  $<$  (阴性对照孔的 A 值 + 0.15)  $\times$  (1 - 10%) 即为阴性结果。如果 A 值在 (阴性对照孔的 A 值 + 0.15)  $\times$  (1  $\pm$  10%) 之间,重测一次,如果结果还是在此范围,建议为阴性。

(3)逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR):取适量粪便标本,用 Trizol 按照说明书提取 RNA。取适量 RNA,用随机引物逆转录成 cDNA,用上述特异引物进行 PCR 检测,扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,引物序列和具体操作参照文献[3]。

(4)统计学分析:用 SPSS 11.5 统计软件;计数资料以百分比表示,率的显著性检验采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 试剂盒检测:为避免推荐嫌疑,在本结果中,将两种试剂盒随机编号为试剂盒甲和试剂盒乙。在检测的 84 份标本中,儿童标本 69 份,成人标本 15 份。试剂盒甲共检出阳性标本 17 份,阳性率为 20.2%,其中 14 份来自儿科病房,占儿科标本的

20.3% (14/69);另外 3 份来自成人病房,占成人标本的20.0% (3/15)。试剂盒乙共检出阳性标本 31 份,阳性率为36.9%,其中 25 份来自儿科病房,占儿科标本的36.2% (25/69);6 份来自成人病房,占成人标本的40.0% (6/15)。

两种试剂盒检测结果符合情况见表 1。两种试剂盒的符合率为73.8% (62/84),其中 13 份为阳性,49 份为阴性;另外 22 份标本检测结果不一致。这两组检测结果经过  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$ ,说明两组数据之间差异有统计学意义,即在本研究中试剂盒乙的阳性检出率明显高于试剂盒甲。

表1 两种试剂盒检测诺如病毒结果比较

试剂盒		试剂盒甲	
		阳性	阴性
试剂盒乙	阳性	13	18
	阴性	4	49

2. RT-PCR 结果:本研究中,有 20 份粪便标本进行了RT-PCR检测:15 份来自成人病房的粪便标本、5 份来自儿科病房。RT-PCR 与 EIA 由不同工作人员完成,各方法独立判定结果。检测的 20 份标本中,11 份为阳性,阳性率高达55.0% (11/15),其中 9 份为成人粪便标本,占成人标本的60.0% (9/15),2 份为儿科病房的粪便标本,占儿科标本的40.0% (2/5)。

3. 两种试剂盒与 RT-PCR 检测结果的比较:对于诺如病毒感染,RT-PCR 检测是目前为止公认的敏感性和特异性都较好的检测方法,因此,本研究以 RT-PCR 检测结果作为标准,评价两种试剂盒。RT-PCR 结果与两种试剂盒检测结果相比较,3 种方法检测结果完全一致的标本有 10 份,其中 2 份为阳性,其余 8 份为阴性,另外 10 份检测结果不一致(表 2)。

表2 20 份标本 3 种方法检测诺如病毒的结果

检测方法	标本编号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
试剂盒甲	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
试剂盒乙	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
RT-PCR	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-

  

检测方法	标本编号									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
试剂盒甲	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
试剂盒乙	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
RT-PCR	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-

把 RT-PCR 结果作为标准,对两种试剂盒的结

果进行评价(表 3)。试剂盒甲与 RT-PCR 相比,符合率为50.0% (10/20);试剂盒乙与 RT-PCR 相比,符合率为70.0% (14/20)。两种试剂盒的结果与 RT-PCR 结果分别做  $\chi^2$  检验,试剂盒甲与 RT-PCR 的结果相比较,  $P < 0.05$ ,说明两检测结果之间差异有统计学意义,试剂盒乙与 RT-PCR 的结果相比较,  $P > 0.05$ ,说明两检测结果之间差异无统计学意义;即在本研究中试剂盒乙与 RT-PCR 结果的差异无统计学意义,可以替代 RT-PCR 检测,而试剂盒甲不能取代 RT-PCR 检测。

表3 两种试剂盒检测诺如病毒结果评价

试剂盒	试剂盒甲		试剂盒乙	
	阳性	阴性	阳性	阴性
RT-PCR 阳性	2	9	6	5
RT-PCR 阴性	1	8	1	8

4. 医院内感染:本研究中所用 15 份来自成人病房的标本,是由于这三家医院病房内发生了住院患者多人腹泻,症状相同,怀疑为医院内感染,但排除了细菌感染,送到本研究室进行病毒病原检测。本研究室先前的工作排除了轮状病毒感染的可能<sup>[3]</sup>,进一步做诺如病毒检测。这 15 份标本,7 份来自医院甲,6 份来自医院乙,2 份来自医院丙。三家医院送检标本的诺如病毒检出率分别为42.8% (3/7),83.3% (5/6)和 100% (2/2)。三家医院送检标本中都有 2 份或 2 份以上为阳性;根据 2001 年 11 月卫生部下发的医院感染管理规范和医院感染诊断标准(试行),均可判定为诺如病毒医院内感染暴发。

### 讨论

诺如病毒感染性腹泻在全世界范围内均有流行,全年均可发生感染<sup>[4]</sup>。在我国 5 岁以下腹泻儿童中,诺如病毒检出率为 20% 左右,血清抗体水平调查表明我国人群中诺如病毒的感染亦十分普遍<sup>[5,16]</sup>。

本研究中所用两种试剂盒,检出率有一定差异,可能与试剂盒制备中所用的抗原有关。所用抗原与此次流行毒株的抗原性接近,其检出率就高,反之,则检出率降低。由本研究看,试剂盒乙所用抗原与优势毒株的抗原更为接近。而试剂盒甲所用的抗原可能与本研究中的抗原性有一定差异,检出率不如试剂盒乙高。本研究中,诺如病毒的检出率,除试剂盒甲外,均高于以前的研究<sup>[9,13]</sup>。原因可能有以下几个方面:

1. 检测方法优于以前。以前的检测方法一般用酶免疫分析法,此次使用的试剂盒乙虽然也是酶免疫分析法,但为以前方法的改良,是第二代酶免疫分析试剂盒,检测效果较好,检出率高。在一定程度上讲,RT-PCR方法的检出率与引物设计的好坏相关性较高,本研究中所用引物为本研究室根据引起北京地区散发的儿童腹泻的诺如病毒的核衣壳蛋白的基因序列设计的,与北京地区的优势毒株匹配较好,检出率较高。

2. 与多次暴发有关。医院内感染亦称医院获得性感染。它可泛指发生在医院内所有人员的一切感染,但确切地说,它是指患者在入院时既不存在、又不处于潜伏期,而是在住院过程中获得的感染;医院内感染性腹泻是医院内感染类型中的一种,其发病率为0.3%~0.7%,在医院内感染中位居2~4位。医院各科室均可有感染性腹泻病例发生,但多见于儿科患者<sup>[17]</sup>。有报道从2006年10月以来,诺如病毒在全球连续引起暴发;我国广州市及北京市多家医院发生了多起住院患者腹泻,怀疑与诺如病毒感染有关<sup>[18]</sup>。本研究结果也进一步证实了这一点,确定这三家医院的院内感染与诺如病毒有关。

本研究中的84份标本,2份来自于某精神病院的病房,13份来自老年或心脏病术后的病房,69份来自于儿科病房,这些人群均属于免疫力较低的人群。精神病患者住院期间发生腹泻的因素是多方面的,由于患者的特殊性,长期住院身体抵抗力下降,而抗精神病治疗所产生的副作用是主要的诱发因素,且具有一定的季节性、多发生在春夏季<sup>[19]</sup>。本研究中的2例精神病患者发生诺如病毒腹泻,另外该病房有多人腹泻,由于收集标本有一定的困难,故只送检了2份标本,检测均为阳性。

综上所述,RT-PCR灵敏度和特异性均较酶免疫吸附方法高,但是推广上存在困难,而酶免疫吸附方法的试剂盒则是一种适于临床推广的检测方法。本研究中,两种试剂盒相比较,试剂盒乙可能更适于近期的诺如病毒感染的检测( $P < 0.01$ )。另外,诺如病毒引起院内感染的情况应引起广大医务工作者和卫生行政管理部门的高度关注。

#### 参 考 文 献

[1] Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human calicivirus//

Knipe DM, Howley PM. Fields virology. vol. 1. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2001: 841-874.

- [2] Green KY, Ando T, Balayan MS, et al. Taxonomy of the Caliciviruses. J Infect Dis, 2000, 180 Suppl 2: S323-330.
- [3] 贾立平, 钱渊, 张又, 等. 北京地区 Noro 病毒主要衣壳蛋白编码基因的序列分析. 中华微生物与免疫学杂志, 2007, 待发表.
- [4] Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. J Virol, 1972, 10 (5): 1075-1081.
- [5] 方肇寅, 温乐英, 晋圣谨, 等. 在我国腹泻患儿中发现诺瓦克样病毒感染. 病毒学报, 1995, 11(3): 215-219.
- [6] 靖宇, 钱渊, 王洛平. 北京地区人群诺瓦克样病毒血清抗体水平的调查. 病毒学报, 1998, 14: 322-328.
- [7] Jing Y, Qian Y, Huo Y, et al. Seroprevalence against Norwalk-like human caliciviruses in Beijing, China. J Med Virol, 2000, 60: 97-101.
- [8] 靖宇, 钱渊, 吴立平, 等. 太原市部分人群诺瓦克样病毒血清抗体水平的调查. 中华儿科杂志, 1999, 37(9): 559-561.
- [9] 陈冬梅, 张又, 钱渊, 等. 我国婴幼儿中存在不同基因型杯状病毒的感染. 病毒学报, 2001, 17(3): 265-269.
- [10] 陈冬梅, 张又, 钱渊, 等. 北京地区婴幼儿人类杯状病毒感染状况及亚型分析. 中华儿科杂志, 2002, 40(7): 398-401.
- [11] Zheng DP, Tamie A, Rebecca LF, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology, 2006, 346(2): 312-323.
- [12] 吕红霞, 方肇寅, 谢华萍, 等. 河北省卢龙县 1999-2001 年婴幼儿杯状病毒腹泻流行病学研究. 中华流行病学杂志, 2003, 24(12): 1118-1121.
- [13] 谢华萍, 方肇寅, 王光, 等. 长春市儿童医院 1998-2001 年婴幼儿杯状病毒腹泻流行病学调查. 病毒学报, 2002, 18(4): 332-336.
- [14] 金玉, 黄湘, 方肇寅, 等. 2001-2004 年兰州地区婴幼儿杯状病毒腹泻的流行病学调查. 中华儿科杂志, 2005, 43(9): 657-660.
- [15] 周跃华, 黄国华. 肇庆市某幼儿园诺瓦克样病毒性胃肠炎暴发情况调查. 中国公共卫生管理, 2006, 22(1): 73-74.
- [16] 黄念先, 陈复才, 熊杏茄, 等. 梅县学校食堂厨工诺瓦克病毒感染情况调查. 热带医学杂志, 2006, 6(8): 929-930.
- [17] 郭顺明. 医院内感染与感染性腹泻. 热带病与寄生虫学, 1999, 28(3): 185-188, 135.
- [18] 钱渊, 张又, 贾立平, 等. 近来北京市某些医院院内感染性腹泻与 Noro 病毒相关. 中华流行病学杂志, 2007, 28(1): 9.
- [19] 吴艳玲, 纪淑荣, 徐士芬. 精神病人院内感染性腹泻危险因素分析. 黑龙江护理杂志, 2000, 6(7): 75-76.

(收稿日期: 2007-01-25)

(本文编辑: 尹廉)