

诺如病毒检测方法研究进展

李志凯¹ 苏国成^{1,2} 苏文金^{1,2} 周常义^{1,2*}

(1. 集美大学 生物工程学院 福建 厦门 361021)

(2. 厦门市食品科技研发检测中心 福建 厦门 361021)

摘要: 诺如病毒是引起人类非细菌性胃肠炎的主要病原之一, 具有很高的传染性和变异性, 可导致严重的公共卫生问题, 尤其在抵抗力弱的人群中有很高的发病率, 因此开发快速、准确的检测技术对预防和控制诺如病毒的传播是非常重要的。本文综述了近年来 RT-PCR、环介导等温扩增、实时荧光定量 PCR、巢式 PCR、ELISA、免疫层析、基因芯片等技术在诺如病毒检测中的应用及发展趋势。

关键词: 诺如病毒, 检测方法, RT-PCR, 环介导等温扩增, 实时荧光定量 PCR, 巢式 PCR, ELISA, 免疫层析, 基因芯片

Progress of detection methods for norovirus

LI Zhi-Kai¹ SU Guo-Cheng^{1,2} SU Wen-Jin^{1,2} ZHOU Chang-Yi^{1,2*}

(1. College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

(2. Xiamen Food Research and Inspection Centre, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: Norovirus is one of the main pathogens causing human nonbacterial gastroenteritis. Due to its high infectivity and variability, norovirus could lead to a serious public health problem, especially in the people with weak resistance. Therefore, it is important to develop rapid and accurate detection technique on preventing and controlling norovirus. This article reviews recent technology application and development trends in the detection of norovirus, such as RT-PCR, loop mediated isothermal amplification, real-time fluorescence quantitative PCR, nested PCR, ELISA, immunochromatography, and gene chip.

Keywords: Norovirus, Detection methods, RT-PCR, Loop mediated isothermal amplification, Real-time fluorescence quantitative PCR, Nested PCR, ELISA, Immunochromatography, Gene chip

诺如病毒首先由美国学者 Kapikian 等^[1], 于 1972 年采用免疫电镜方法, 从 1968 年在美国俄亥俄州诺沃克地区的一所学校暴发的胃肠炎病人粪便标本中检出, 并以发现地名称将其命名为诺瓦克

样病毒(Norwalk-like virus, NLVs)。2002 年 8 月国际病毒学命名委员会将其正式命名为诺如病毒(Norovirus, NoV)。诺如病毒主要通过粪-口途径传播及人与人之间的直接传播, 媒介为污染的水、食

基金项目: 福建省科技计划项目(No. 2008Y0056); 厦门市科技计划项目(No. 3502Z20133012); 厦门市集美区科技计划项目(No. 20119C02); 福建省科技计划重大项目(No. 2012N5007)

*通讯作者: Tel: 86-592-6183915; 信箱: chyizhou@163.com

收稿日期: 2013-09-16; 接受日期: 2013-12-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-02

物、呕吐物等。诺如病毒具有较高传染性,因此快速、准确的检测技术对预防和控制诺如病毒的传播有重要意义。

1 诺如病毒的分子生物学特性

诺如病毒直径约为 26–35 nm,无包膜,表面粗糙,球形,呈二十面体对称,基因组为单股正链 RNA,全长约 7.3–7.7 kb,GC 含量 48%,包括 3 个开放阅读框(Open reading frames, ORF)、5'和 3'端非编码区,3'端为多聚腺苷酸(Poly A)。其中,ORF1 长约 5 kb,编码非结构蛋白,经翻译后修饰成 6 个功能蛋白,包括:N 末端蛋白、NTPase、3A 样蛋白、VPg(病毒基因组连接蛋白)、3C 样蛋白和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRP)。ORF2 长约 1.8 kb,编码 530 个左右氨基酸的衣壳蛋白(Virus particle 1, VP1),VP1 蛋白折叠成两个区域:壳区(S 区)和突出区(P 区),其中 S 区为 VP1 的内壳,P 区位于 VP1 结构的壳外,包含 P1 和 P2 两个亚区,P2 亚区位于衣壳蛋白的最外层,易发生变异。ORF3 长约 0.6 kb,编码一个微小结构蛋白(VP2),VP2 蛋白的具体功能未知,有研究认为它可能参与病毒衣壳的构建,并有助于整个衣壳蛋白的稳定^[2-4]。3 个开放阅读框中的 ORF2 编码衣壳蛋白为 NoV 抗原主要决定簇,同时负责与受体结合,已成为 NoV 研究的热点^[5-6]。

根据诺如病毒 RNA 多聚酶区和衣壳蛋白区的核苷酸序列,可将 NoV 分为 5 个基因组:GI、GII、GIII、GIV、GV。根据 ORF2 全基因序列,GI 可分为 14 个基因型,GII 可分为 17 个基因型。其中基因组 GI、GII 和 GIV 可感染人,基因组 GIII 和 GV 分别感染牛和鼠。GII 型诺如病毒比 GI 型更加流行,其中 GII-4 型诺如病毒一直是世界范围内诺如病毒流行最主要的基因型,而且大部分的诺如病毒暴发都与 GII-4 变异株有关^[7-8]。除 GII-4 型外,GII-3 型在儿童中也比较常见^[9]。一般情况下,诺如病毒感染人后反应是温和的、非致命的,但也会

导致一些免疫抑制患者死亡^[10]。

由于诺如病毒首先是由电镜检测到,因此诺如病毒的早期诊断方法主要有直接电镜法和免疫电镜法(Immunoelectron microscope, IEM)等。由于这些方法灵敏度和特异性较低^[11],使得许多诺如病毒感染病例无法确诊,并且这些方法都只能在专业的检测机构实施而不能普遍应用。随着人们对诺如病毒的不断研究,特别是分子生物学的飞速发展,相继建立了多种灵敏、特异、快速的检测方法。本文综述近几年诺如病毒检测方法的研究进展。

2 核酸检测方法

该方法主要通过提取病毒 RNA、逆转录和 PCR 扩增等步骤检测病毒核酸,以一步法或二步法进行。其中,逆转录是以 RNA 为模板,在逆转录酶的催化下,经引物引导合成互补 DNA 序列的过程,逆转录所使用的引物有随机引物、Oligo(dT)或基因特异性引物;PCR 扩增采用特异性引物,使特异序列大量复制以提高灵敏度。引物设计是该方法的关键。诺如病毒核酸检测常用方法及其引物见表 1。

2.1 常规 RT-PCR 技术

逆转录 PCR (Reverse transcription PCR, RT-PCR)易于操作,灵敏度较高,是目前检测诺如病毒应用最广泛的方法,被称为检测诺如病毒的“金标准”。寇晓霞等^[12]建立诺瓦克病毒的 RT-PCR 检测方法,所用引物为 RNA 多聚酶区的 JV12/JV13,并对模拟水样进行检测。

结果表明,RT-PCR 产物长度为 327 bp,在临床粪便样中检测限为 50 ng/L,在模拟水样中检测灵敏度为 200 ng/L,该实验所建立的方法对水质控制起到了很好的监测作用。Adabian S.等^[13]利用 RT-PCR 技术对伊朗腹泻患者的粪便样本进行诺如病毒检测,来自 5 个城市儿科医院的 2 170 个样本中诺如病毒阳性率为 4.14%,该方法检测诺如病毒有较高的灵敏度和特异性。Lee S. G.等^[14]为了克服 RT-PCR 方法假阴性结果,设计了 4 个标准阳性对

表 1 核酸检测方法所用引物表					
Table 1 The primer for method of detecting nucleic acid					
扩增区域 Amplified region	引物序列 Primer sequences (5'→3')	产物大小 Product length (bp)	检测方法 Detection method	逆转录引物 Reverse transcription primer	文献出处 References
GI 衣壳蛋白区 GI capsid protein region	F: CTGCCC GAATTYGTAAATGATGAT R: CCAACCCARCCATTRTACATYTG	330	一步法 RT-PCR	特异引物(同第二列 F)	Lee S. G. 等 ^[14]
GII 衣壳蛋白区 GII capsid protein region	F: GGGAGGGCGATCGCAATCT R: CCRCCIGCATRICCRTTRTACAT	341	一步法 RT-PCR	特异引物(同第二列 F)	Lee S. G. 等 ^[14]
GI 衣壳蛋白区 GI capsid protein region	F: CTGCCC GAATTYGTAAATGA R: CCAACCCARCCATTRTACA	330	两步法多重 RT-PCR	随机引物(TaKaRa)	Khamrin P. 等 ^[15]
GII 衣壳蛋白区 GII capsid protein region	F: CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG R: TCGACGCCATCTTCATT CACA	387	两步法多重 RT-PCR	随机引物(TaKaRa)	Khamrin P. 等 ^[15]
GII 聚合酶区和衣壳蛋白区 GII polymerase region and capsid protein region	F: CNTGGGAGGGCGATCGCAA R: CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	344	两步法多重 RT-PCR	随机引物(TaKaRa)	Shigemoto N. 等 ^[16]
GII 聚合酶区和衣壳蛋白区 GII polymerase region and capsid protein region	外: GTGGTATGGATTTTACGTGCC 外: GACAACGGGGCTCCAAAGC 内: CAGATTGCGATCGCCCTCCCGAGCC AATGTT CAGATGGATGA 内: TGAAGATGGCGTCGAATGACGCAAC CTCATTGTTGACCTCTGG 环: CGTGCTCAGATCTGAGAATC 环: TCCGCAGCCAACCTCGT R: GTAGGCAAGTCCATCAAAGTC	207	逆转录环介导 等温扩增法		Luo J. M. 等 ^[17]
GI 聚合酶区和衣壳蛋白区 GI polymerase region and capsid protein region	F: ATGTTCCGCTGGATGCG R: CCTTAGCCATCATCATTTAC		一步法 qPCR (SYBR Green I 染料)	特异引物(同第二列 F)	Miura T. 等 ^[18]
GII 聚合酶区和衣壳蛋白区 GII polymerase region and capsid protein region	F: ATGTT CAGRTGGATGAGRTTCTC R: TCGACGCCATCTTCATT CACA		一步法 qPCR (SYBR Green I 染料)	特异引物(同第二列 F)	Miura T. 等 ^[18]
GIV 聚合酶区和衣壳蛋白区 GIV polymerase region and capsid protein region	F: ATGTACAAGTGGATGCGRTTC R: TCGACGCCATCTTCATT CACA		一步法 qPCR (SYBR Green I 染料)	特异引物(同第二列 F)	Miura T. 等 ^[18]
(待续)					

(续表)			
GI 聚合酶区和衣壳蛋白区 GI polymerase region and capsid protein region	F: CGCTGGATGCGNTTCCAT R: CCTTAGACGCCATCATCATTTAC Probe: FAM-TGGACAGGAGAYCGCRATC-T-BHQ1	一步法 qPCR (TaqMan 探针)	特异引物(同第二列 F) Lowther J. A.等 ^[21]
GII 聚合酶区和衣壳蛋白区 GII polymerase region and capsid protein region	F: ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA R: TCGACGCCATCTTCATTACACA Probe: FAM-AGCACGTGGGAGGGGATC-G-BHQ1	一步法 qPCR (TaqMan 探针)	特异引物(同第二列 F) Lowther J. A.等 ^[21]
GI 聚合酶区和衣壳蛋白区 GI polymerase region and capsid protein region	F: CGYTGGATGCGNTTYCATGA R: CTTAGACGCCATCATCATTYAC Probe A: FAM-AGATYCGGATCYCCTGTC-CA-BHQ1 Probe B: FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTC-CA-BHQ1	85 两步法 qPCR (TaqMan 探针)	随机引物(Invitrogen) 周冬梅等 ^[22]
GII 聚合酶区和衣壳蛋白区 GII polymerase region and capsid protein region	F: CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG R: TCGACGCCATCTTCATTACACA Probe: JOE-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-BHQ1	98 两步法 qPCR (TaqMan 探针)	随机引物(Invitrogen) 周冬梅等 ^[22]
GII N/S 结构域 GII N/S domain	第一轮 F: CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG R: CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT 第二轮 F: CNTGGGAGGGCGATCGCAA R: CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	399 两步法 RT-半巢式 PCR	特异引物(同第二列第 1 轮 F) 李丹等 ^[23]
		344	

照, 分别为 4 种不同的质粒扩增产物(诺如病毒 GI-5 和 GII-4 衣壳区插入人轮状病毒片段及诺如病毒 GI-6 和 GII-4 衣壳区插入甲肝病毒片段), 分别针对诺如病毒衣壳蛋白区、轮状病毒 VP7 区和甲肝病毒 VP1/P2A 区设计引物, 用一步法试剂盒进行 RT-PCR。结果表明, 诺如病毒 GI 和 GII、轮状病毒和甲肝病毒的扩增产物大小分别为 330、341、375 和 612 bp, 片段长度易于区分, 并经实验证明它们有良好的可靠性和重复性, 可作为实验室 RT-PCR 技术检测诺如病毒的阳性对照。

2.2 多重 RT-PCR 技术

该技术是在同一个 PCR 反应体系中加入多对引物以检测不同类型或亚型的病毒, 它可以同时检测多种不同型别的病毒, 减少反应次数, 节约时间, 但该方法灵敏度较低, 因此需要优化 PCR 反应条

件来尽可能减少非特异扩增。Khamrin P.等^[15]建立了两种方法以检测 10 种不同腹泻病毒, 其中一种为两步法多重 PCR, 其中 RT 反应采用随机引物, 而 PCR 引物设计使扩增的目标片段长度有不同大小易于区分: 札幌病毒、爱知病毒、轮状病毒 C 组、副肠孤病毒、诺如病毒 GI、诺如病毒 GII、肠病毒、腺病毒、轮状病毒 A 组和星状病毒的扩增产物片段分别为 100、158、205、270、330、387、440、482、569、719 bp。另一种为荧光标记多重 PCR 法, 设计 3 对引物, 采用两种方法分别对来自 2008–2009 年日本京都的婴幼儿腹泻患者粪便样本 235 份进行检测, 结果表明, 前者的检出率为 47.2% (111/235), 9 种病毒被检出; 后者检出率 46.4% (109/235), 8 种病毒被检出, 两种方法的检测结果较为一致。Shigemoto N.等^[16]调查了广岛市

区 2007 年 7 月至 2010 年 5 月暴发的 71 例急性胃肠炎情况, 利用荧光标记两步法多重 RT-PCR 技术对粪便样品中诺如病毒、札如病毒和人星状病毒进行检测, 其中 RT 反应采用随机引物, 而 PCR 引物根据诺如病毒聚合酶区和衣壳蛋白区、札如病毒和人星状病毒引物扩增衣壳蛋白区序列进行设计。分别用不同颜色的荧光染料染色, 经琼脂糖凝胶电泳分析发现, 在证实的 61 个阳性样本中, 诺如病毒、札如病毒和人星状病毒的检出率分别为 96.7%、3.3% 和 0, 对诺如病毒 GI 和 GII、札如病毒和人星状病毒的检出限分别为 6.0×10^1 、 3.6×10^2 – 1.3×10^4 、 5.2×10^2 – 8.3×10^2 和 8.0×10^1 – 2.4×10^2 拷贝/反应。多重 PCR 方法及荧光标记多重 RT-PCR 技术在检测多种腹泻病毒感染方面具有快速、经济的优点, 可作为暴发性肠道疾病病原的筛查方法。

2.3 环介导等温扩增技术(LAMP)

Luo J. M. 等^[17]建立了一种基于颜色判定的逆转录环介导等温扩增技术, 它可以简单、快速、灵敏地检测 GII 型诺如病毒。该研究根据 GII 型诺如病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶和衣壳蛋白基因区域, 用 LAMP 引物设计软件设计相应的 RT-LAMP 引物 6 条。经过 65 °C、60 min 等温条件扩增 RNA 依赖的 RNA 聚合酶区和衣壳蛋白区的编码基因, 在反应体系中加入羟基萘酚蓝, 可以通过琼脂糖电泳观察从紫色到天蓝色全部反应过程。通过检测多种不同的病毒评价其专一性, 通过将 GII 型诺如病毒的 RNA 系列稀释并与传统的 RT-PCR 方法作比较评价其敏感性, 对 93 份临床样本检测结果发现检测限为 10^3 拷贝/ μL , 检测结果与常规 RT-PCR 方法基本一致。实验表明, 该方法有特异性强、灵敏性高、省时和低成本等特点, 可以作为诺如病毒现场快速检测的有效方法。

2.4 实时荧光定量 PCR 技术(qPCR)

该方法通过监测 PCR 反应管中荧光信号增加, 实时监测反应过程而达到定量的目的, 根据检测原理可分为探针类和非探针类两种, 在诺如病毒的检测中主要采用以 SYBR Green I 染料和

TaqMan 探针等为基础的实时荧光定量 PCR 技术。

SYBR Green I 方法不用设计探针, 只需在反应体系中加入染料即可, 但其最终结果需要经过熔解曲线分析。Miura T. 等^[18]在定量的基础上建立了一种一步法 qPCR 方法, 它可以同时检测感染人的 3 种基因型的诺如病毒(GI, GII 和 GIV)。该方法针对 3 种基因型病毒设计 3 对引物, 与多重 PCR 方法不同的是该方法使用一种荧光染料进行染色, 使得各基因组的荧光信号可以叠加, 从而提高反应的灵敏度和特异。使用该方法对污水和贝类产品中诺如病毒进行检测, 检测出所有的阳性样本, 其结果与单一的 RT-PCR 反应检测结果一致。Radin D. 等^[19]通过在 qPCR 反应体系中加入内标来剔除假阴性, 其中 RNA 内标是由两对高反应性的简并引物(MON 和 COG)构成, 它们分别用来检测人诺如病毒 GI 和 GII, 其中 MON 引物是依据 ORF1 的 RNA 依赖的 RNA 多聚酶区设计, COG 引物是依据 ORF1 和 ORF2 连接处保守区序列设计。并利用 SYBR Green I 染料为基础的 qPCR 技术对 15 个粪便样本(6 个 GI, 9 个 GII)进行检测, 以比较两对引物的灵敏度, 并对 PCR 反应条件进行优化, 结果发现两对引物检测灵敏度相近(GI 和 GII 粪便样本稀释度分别为 10^{-5} 和 10^{-4}), 但引物 COG 比 MON 检测范围更广。随后 Radin D. 等^[20]又用同样的引物建立了一种检测方法, 以 SYBR Green I 染料为基础的 qPCR 方法检测生菜、蕃茄和大葱表面 GI 和 GII 型诺如病毒。首先将病毒稀释不同倍数加入到水果中, 经过洗涤, TRIZOL 法提取 RNA, 最终通过实时 RT-PCR 方法检测(加入内标), 检测结果通过熔解曲线分析和内标验证, 生菜和蕃茄表面诺如病毒 GI 和 GII 检测限均为 10 个 RT-PCR 单位/25 g, 大葱表面诺如病 GI 和 GII 检测限分别为 1 个和 10 个 RT-PCR 单位/25 g。该方法可以用于农产品中诺如病毒的检测。

TaqMan 方法需要设计荧光探针, 费用较高, 但其灵敏性高于染料法, 并且不用熔解曲线分析, 反应结束直接可以读出结果, 所以应用相对较广,

近年来的文献主要用于检测 GI 和 GII 型诺如病毒。Lowther J. A. 等^[21]调查了英国 39 个地区 24 个月的牡蛎样本, 利用一步法 qPCR 技术检测 GI 和 GII 型诺如病毒, 其引物和探针是根据诺如病毒 ORF1 和 ORF2 连接处保守区序列设计。结果显示, 诺如病毒检出率为 76.2% (643/844), 灵敏度为 88.8%, 特异性为 68.7%。周冬梅等^[22]采用双重荧光定量 PCR 检测 GI、GII 型诺如病毒, 其用两步法进行 qPCR 反应, 逆转录反应采用反转录试剂盒所带随机引物进行扩增; 对于 PCR 反应, 设计 GI、GII 型诺如病毒特异性引物和 TaqMan 探针, 分别对 GI、GII 型诺如病毒的探针做了 FAM、JOE 标记, 实现了在检测的同时完成病毒分型, GI 和 GII 型诺如病毒的检测限为 10^3 拷贝/ μ L 质粒标准品 RNA。

2.5 巢式 PCR

巢式 PCR 利用两套 PCR 引物对进行两轮 PCR 扩增反应, 两对 PCR 引物与检测模板进行配对, 增加了检测的可靠性, 并且经过两次的信号放大大增加了检测的灵敏度。李丹等^[23]检测海蛎样品比较使用 RT-PCR、两步法 RT-半巢式 PCR、RT-LAMP 技术, 实验结果表明, RT-半巢式 PCR 较常规 PCR 大大提高了检测灵敏度。但该方法操作过程比较繁杂, 耗时较长, 影响了该方法的普及。Mäde D. 等^[24]在 2012 年德国草莓事件中的样品检测方法除了采用荧光定量 PCR 方法外, 还采用巢式 PCR 对阳性 RNA 样本扩增, 并做测序分型。结果表明, 在草莓和部分患者样品中共检测出诺如病毒 3 种不同的基因型 GI-9、GII-16 和 GII-13。其中 GII-16 和 GII-13 发生重组为德国首次检出。在针对 ORF1/ORF2 交界区进行巢式 PCR 的实验中, 对于发生重组的基因型, 单独使用巢式 PCR 技术出现了漏检, 而使用随机引物扩增结合荧光定量 PCR 方法成功检测出重组基因型, 因此巢式 PCR 技术在检测重组基因型上尚有一定欠缺。

2.6 基因芯片技术

该技术是指将大量探针分子固定于支持物上与标记的样品分子进行杂交, 通过检测每个探针分

子的杂交信号强度, 进而获取样品分子的数量和序列信息。Chen H. 等^[25]为了扩大基因芯片技术在腹泻病毒检测中的应用, 设计了一条引物以获得单链 cDNA, 用基因芯片技术对 3 种腹泻病毒(甲肝病毒、诺如病毒和柯萨奇病毒 B2)进行检测, 通过改变加入 RNA 的量(30–55 pg)优化反应体系, 发现最少加入 55 pg 病毒 RNA 可以不改变检测特异性, 用单链 cDNA 作为靶序列可以增加基因芯片检测灵敏度。

3 蛋白质检测方法

蛋白质检测方法的原理主要是利用诺如病毒特异抗体检测样本中的诺如病毒, 该方法的灵敏度和特异性与抗原和抗体的差异性有很大关系。目前较常用的免疫学方法包括 ELISA 技术和免疫胶体金技术等。

3.1 ELISA 技术

已上市的诺如病毒检测试剂盒有 IDEIA™ Norovirus 试剂盒 (DakoCytomation 公司)、Ridascreen® Norovirus (德国 R-biopham 公司)等, 文献报道的多数研究结果都是与诺如病毒检测“金标准”RT-PCR 方法作比较。该技术相对于 PCR 技术更加简单方便, 但由于存在抗体抗原的特异性, 该方法可能出现假阳性或假阴性结果。Morillo S. G. 等^[26]比较了一种 ELISA 检测试剂盒(Ridascreen® Norovirus 3rd Generation kit)和 RT-PCR 方法检测诺如病毒的效果, 结果显示该试剂盒检测诺如病毒的灵敏度和特异性分别为 61.8% 和 92.5%, 该试剂盒检测 GII 型诺如病毒的灵敏度较高, 但不能检出 GI 和混合型感染(GI/GII)。

3.2 免疫层析技术

该技术是把层析技术和免疫亲和作用相结合的快速检测诺如病毒的方法, 由于其操作简便及用时短等特点被广泛应用。该方法的建立一般采用获得病毒的抗原(大多为衣壳蛋白), 制备单抗或多抗, 组装成试纸条进行检测。该方法首先由 Takanashia S. 等^[27]用于诺如病毒检测, 以重组样病毒基因亚型(GII-3 和 GII-4)为抗原制备多克隆抗

体, 并与 RT-PCR 法作比较以评估该方法, 结果显示, 它们的一致性为 84.1%, 灵敏度为 69.8%, 特异性为 93.7%, 病毒载量检测限为约 10^6 – 10^7 拷贝/g 粪便。由于该技术操作简便, 在国外已经出现多种商用免疫层析试剂盒, 但国内尚未见同类产品。Pombubpa K. 等^[28]评估了一种商用免疫层析试剂盒 RIDA[®] QUICK Norovirus 对诺如病毒的检测效果, 对泰国暴发的急性胃肠炎患者的粪便样品进行检测, 与 RT-PCR 结果对比发现灵敏度和专一性分别为 83.3% 和 87.5%。RIDA[®] QUICK Norovirus 与商用实时定量 RT-PCR 试剂盒相比具有高度一致性, 该方法的检测限量范围为 3.22×10^6 – 3.26×10^8 拷贝/mL。Thongprachum A. 等^[29]采用 3 种商用免疫层析试剂盒检测感染急性胃肠炎的儿童粪便 70 份样品, 与 RT-PCR 结果对比, 3 种免疫层析试剂盒 IP-NoV、QuickEx-Norovirus 和 QuickNavi-Norovirus 的灵敏度分别为 85.2%、63.9% 和 55.7%, IP-NoV 试剂盒较其它两种效果好。

4 展望

近年来诺如病毒在世界各地频繁暴发流行, 引起社会各界的广泛关注, 提高诺如病毒检测方法的灵敏度、特异性是研究热点, 开发经济实用的试剂盒成为研究的主要方向。本文综述的各种方法各有其优缺点, 可以根据不同的情况选择适合的检测方法进行诺如病毒的检测。基于抗原抗体反应原理的免疫层析技术具有操作简单、用时短、便于肉眼观察的优点, 可作为诺如病毒流行时的大量样品初筛方法和基层实验室筛查使用。ELISA 方法简便快速, 灵敏性和特异性较高, 但成本较高, 可做为样品筛查及其他检测方法阳性样品的复查或确认方法; 核酸类检测方法灵敏性高, 但需要相应仪器, 操作技术要求高, 适合于医院、研究机构实验室, 可作为诺如病毒监测的主要方法。

在检测实践中, 考虑到诺如病毒感染样品的复杂性、病毒的高度变异性和混合感染的可能性等因素, 因此, 对于可疑样品建议采用两种以上方法进行检测。另外, 在检测方法研究中, 针对蛋白、脂

类等 PCR 反应抑制物含量高的食品样品的前处理, 同时检测混合感染细菌或其他病毒, 辨别诺如病毒变异株或重组型, 低含量样品的浓缩, 降低假阳性率等方面还有待于进一步研究。随着检测技术的不断发展, 诺如病毒的检测方法将朝着快速、高通量、高灵敏度和特异性的方向发展。

参考文献

- [1] Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis[J]. *Journal of Virology*, 1972, 10(5): 1075-1081.
- [2] Chhabra P, Walimbe AM, Chitambar SD. Complete genome characterization of genogroup II norovirus strains from India: Evidence of recombination in ORF2/3 overlap[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2010, 10(7): 1101-1109.
- [3] Park JW, Lee SG, Lee YM, et al. Full sequence analysis and characterization of the South Korean norovirus GII-4 variant CUK-3[J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 167.
- [4] Lee GC, Jung GS, Lee CH. Complete genomic sequence analysis of norovirus isolated from South Korea[J]. *Virus Genes*, 2012, 45(2): 225-236.
- [5] Sakamaki N, Ohiro Y, Ito M, et al. Bioluminescent enzyme immunoassay for the detection of norovirus capsid antigen[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2012, 19(12): 1949-1954.
- [6] Koho T, Huhti L, Blazevic V, et al. Production and characterization of virus-like particles and the P domain protein of GII.4 norovirus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 179(1): 1-7.
- [7] Parra GI, Abente EJ, Sandoval-Jaime C, et al. Multiple antigenic sites are involved in blocking the interaction of GII.4 norovirus capsid with ABH histo-blood group antigens[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(13): 7414-7426.
- [8] Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, et al. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage[J]. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(3): e1000831.
- [9] Zeng M, Gong Z, Zhang Y, et al. Prevalence and genetic diversity of norovirus in outpatient children with acute diarrhea in Shanghai, China[J]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2011, 64(5): 417-422.
- [10] Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, et al. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Blood*, 2011, 117(22): 5850-5856.
- [11] Atmar RL, Metcalf TG, Neill FH, et al. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(2): 631-635.
- [12] 寇晓霞, 吴清平, 薛亮, 等. 水体中诺瓦克病毒 RT-PCR 检测研究[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 650-653.
- [13] Adabian S, Fallah F, Gachkar L, et al. Detection of norovirus in stool samples by RT-PCR in 5 disease centers

- in Iran[J]. BMC Infectious Diseases, 2012, 12(1): O10.
- [14] Lee SG, Lee SH, Park SW, et al. Standardized positive controls for detection of norovirus by reverse transcription PCR[J]. Virology Journal, 2011, 8: 260-267.
- [15] Khamrin P, Okame M, Thongprachum A, et al. A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea[J]. Journal of Virological Methods, 2011, 173(2): 390-393.
- [16] Shigemoto N, Fukuda S, Tanizawa Y, et al. Detection of norovirus, sapovirus, and human astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers[J]. Microbiology and Immunology, 2011, 55(5): 369-372.
- [17] Luo JM, Wu XY, Xu ZQ, et al. Colorimetric detection of norovirus genotype GII by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. Chinese Journal of Virology, 2012, 28(2): 163-171.
- [18] Miura T, Parnaudeau S, Grodzki M, et al. Environmental detection of genogroup I, II, and IV noroviruses by using a generic real-time reverse transcription-PCR assay[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(21): 6585-6592.
- [19] Radin D, D'Souza DH. Evaluation of two primer sets using newly developed internal amplification controls for rapid human norovirus detection by SYBR Green I based real-time RT-PCR[J]. Food and Environmental Virology, 2011, 3(2): 61-69.
- [20] Radin D, D'Souza DH. Simple and rapid detection of human norovirus from produce using SYBR Green I-based real-time RT-PCR[J]. Food and Environmental Virology, 2011, 3(3/4): 121-129.
- [21] Lowther JA, Gustar NE, Powell AL, et al. Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5812-5817.
- [22] 周冬梅, 靳森, 李慧莹, 等. 双重荧光定量一步 RT-PCR 法同时检测 GI、GII 型诺如病毒[J]. 病毒学报, 2013, 29(3): 310-315.
- [23] 李丹, 唐庆娟, 李兆杰, 等. 三种分子生物学方法检测牡蛎中诺如病毒的比较研究[J]. 食品科学, 2009, 30(12): 246-250.
- [24] Mäde D, Trübner K, Neubert E, et al. Detection and typing of norovirus from frozen strawberries involved in a large-scale gastroenteritis outbreak in Germany[J]. Food and Environmental Virology, 2013, 5(3): 162-168.
- [25] Chen H, Chen X, Hu Y, et al. Reproducibility, fidelity, and discriminant validity of linear RNA amplification for microarray-based identification of major human enteric viruses[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 4129-4139.
- [26] Morillo SG, Luchs A, Cilli A, et al. Norovirus 3rd generation kit: an improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection[J]. Journal of Virological Methods, 2011, 173(1): 13-16.
- [27] Takanashia S, Okamea M, Shiota T, et al. Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroups I and II[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 148(1/2): 1-8.
- [28] Pombubpa K, Kittigul L. Assessment of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of norovirus gastroenteritis[J]. European Journal Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2012, 31(9): 2379-2383.
- [29] Thongprachum A, Khamrin P, Tran DN, et al. Evaluation and comparison of the efficiency of immunochromatography methods for norovirus detection[J]. Clinical Laboratory, 2012, 58(5/6): 489-493.