

附件 9

广东省诺如病毒感染性腹泻样品检测工作指引

诺如病毒的实验室检测方法主要包括核酸检测和抗原检测，核酸检测是目前国际上最常用的检测方法。这些方法各有优缺点，在操作时可根据技术水平、经济条件和使用目的进行选择，对于检测结果应参照临床症状和流行病学特征进行分析。

一、标本处理

（一）粪便

将 1ml PBS 加入至 1.5ml EP 管或 2ml 螺口管中，再加入 0.1g 固体粪便标本或 0.1ml 液体粪便标本，置于漩涡震荡器充分混匀， $\geq 5000\text{r}/\text{min}$ 离心 5min，或 $\geq 3000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min，吸上清，制成 10% 的便悬液，立即检测或置-20℃冰箱保存备用。注意便悬液如果过浓，可能导致提取的核酸中抑制物过多，影响核酸检测结果。

（二）肛拭子

旋涡振荡器震荡 15 秒后，吸上清立即检测或置-20℃冰箱保存备用。

（三）呕吐物

置于漩涡震荡器充分混匀， $\geq 5000\text{r}/\text{min}$ 离心 5min，或 $\geq 3000\text{r}/\text{min}$ 离心 30min，吸上清，立即检测或置-20℃冰箱保存备用。

（四）环境涂抹标本

经旋涡振荡器震荡 15 秒后，吸上清立即检测或置-20℃冰箱保存备用。

二、标本检测

（一）核酸检测

1. 核酸提取

目前有多种商业试剂可用于粪便等标本的核酸提取，可用病

毒 RNA 提取试剂，也可用 RNA&DNA 总核酸提取试剂，具体提取方法按照试剂说明书。采用总核酸提取试剂，在使用逆转录聚合酶链反应扩增核酸时容易受到来自人、细菌等非目标物种基因的影响，产生假阳性，因此以 RNA 提取试剂为佳。

核酸提取完成后，尽快放入冰箱保存，如果 3 天内开展核酸检测，10℃以下保存即可，超过这个时间需放入-70℃冰箱保存。注意尽量不要让核酸被环境中、手套上的细菌、灰尘中含有的 RNA 酶降解，也不要反复冻融。

2. 荧光逆转录聚合酶链反应(real-time RT-PCR)

本方法是诺如病毒核酸检测的首选方法，特异性和敏感性较高，出现假阳性的机率也远低于传统 RT-PCR，但受病毒核酸变异影响较 RT-PCR 大。目前国内商业化的试剂可检测 GI 和 GII 组病毒，但对于 GIV 组病毒的检测效果还不清楚，有些试剂的 GI 组检测效果也相对较差，因此如果检测结果为阴性不能排除该病毒感染。

3. 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)

本方法是国际上常用检测方法，可准确、灵敏地检测标本中的诺如病毒，敏感性和特异性较 real-time RT-PCR 方法低。该方法最大优点在于可以进一步进行病毒基因型的研究，这对于流行病学具有重要意义。但该方法也有缺点，首先由于粪便中抑制 PCR 反应的成分多，可能影响 PCR 反应，造成假阴性，对此可通过稀释标本降低抑制物浓度来解决。另外由于诺如病毒基因变异大，目前还没有一对引物能把所有的基因型都检测出来，这也可能造成假阴性。采用套式 PCR 方法还可进一步提高检测的灵敏度，也可提高特异性，但非常容易造成实验室污染，因此操作时需做好防污染措施。

（二）抗原检测

1. 酶链免疫法

此法操作简便、结果较稳定，在暴发疫情粪便标本检测中可考虑使用这种检测方法。但由于病毒抗原制备复杂，病毒变异大，只能检出与抗体同源或相近的病毒，因此对于某些型的病毒可能无法检测到。现有质量较好的试剂盒对于目前引起暴发的主要基因型一般可以检出。由于粪便中成分复杂，影响因素多，可能出现假阳性，应结合临床症状和流行病学特征分析结果。在检测暴发疫情标本时，标本数量多、种类主要为粪便时，可考虑使用这一检测方法。

2. 胶体金法

操作简便，但敏感性较低，特殊情况下可以考虑使用，不推荐。

三、检测结果分析

根据既往社区诺如病毒感染监测数据和近年诺如病毒感染暴发标本检测情况等，对暴发疫情标本检测结果提出以下分析供参考，同时需综合考虑疫情现场流行病学调查结果等情况。

（一）粪便标本：如果在非流行季节，诺如病毒检出阳性率高于 20%，可能为诺如病毒暴发；在流行季节，诺如病毒检出阳性率高于 40%，可能为诺如病毒暴发。

肛拭子标本：如果在非流行季节，诺如病毒检出阳性率高于 20%，可能为诺如病毒暴发；在流行季节，诺如病毒检出阳性率高于 25%，可能为诺如病毒暴发。

各类标本如低于上述比例，需考虑是否存在其他主要病原体。

（二）当用某一种方法检测诺如病毒为阴性，而流行病学无法排除诺如病毒感染时，建议选用另一种方法检测诺如病毒。