

一起由诺如病毒感染引起的胃肠炎暴发事件实验室检测结果分析

杜东生, 李艳芹*

(滕州市疾病预防控制中心, 滕州 277599)

摘要: 目的 分析一起由诺如病毒感染引起的胃肠炎暴发事件实验室检测结果, 为诺如病毒检测提供参考。

方法 对2023年11月滕州市某镇报告的某小学胃肠炎暴发疫情中的病例进行个案调查和现场流行病学调查, 并对采集的相关标本进行实验室检测。**结果** 实验室共检出16份GⅡ型诺如病毒核酸阳性(含3例无症状隐性感染者)。金黄色葡萄球菌、致泻性大肠埃希氏菌、沙门氏菌、志贺氏菌、蜡样芽孢杆菌均未检出。**结论** 诺如病毒实验室检测结果准确, 在预防诺如病毒传播中起到积极作用。

关键词: 诺如病毒; 胃肠炎; 实验室检测

0 引言

急性胃肠炎是比较普遍病症, 主要包括腹泻、腹痛、恶心、呕吐等典型表现。引起急性胃肠炎的原因很多, 包括细菌感染、病毒感染、寄生虫感染等^[1]。导致急性胃肠炎的重要病原体是诺如病毒, 具有很高的感染性, 主要通过粪口进行传播, 通过食物、呕吐物、水等可以生成气溶胶, 很可能导致幼儿园、中小学校等的聚集性疫情^[2]。诺如病毒(Norovirus)又称“诺罗克样病毒”, 是传染性很强的疾病, 耐药性很强、传播速度很快, 患者被感染后会出现持续的免疫缺失等症状, 给患者的生活带来很大的困难^[3]。诺如病毒以传染性腹泻为主要症状, 发病急、传播迅速、传播范围广, 是暴发型非细菌性腹泻的重要致病因素。诺如病毒主要存在于肠道, 传染源包括受污染的水和食物、空气, 所以在学校和社区中很容易发生群体感染。诺如病毒是典型的球形病毒, 其大小为25~38 nm。常规的病毒感染诊断主要采用电子显微镜, 其诊断率非常低, 主要依据病毒形态特征、主要抗原决定簇以及特定的核酸序列, 同时还与手术方式有关。2023年11月9日, 滕州市疾病预防控制中心接到报告, 滕州市界河镇某学校有17名学生中午陆续出现呕吐、腹痛和腹泻等症状, 初步怀疑为食物中毒, 经市中心人民医院、市第二人民医院对症治疗, 康复情况良好^[4]。接到报告后, 市疾病预防控制中心迅速组织专业人员赶赴现场开展流行病学调查以及样本的采集。为核实诊断, 调查疫情, 查明

可疑危险因素和传染源, 并提出针对性预防性控制措施, 区疾病预防控制中心进行了现场流行病学调查, 结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

对学校食堂、教室、饮水、饮食、保洁等开展卫生学调查。通过班主任了解学生的健康状况, 对病例进行个案调查。对学校食堂人员、教职员工进行访谈, 对食品采购、加工、贮存等环节进行调查了解, 并对从业人员采样。整起事件处置现场共采集样本54份, 包括病例和教职工、厨师肛拭子标本37份, 食堂餐食留样和现场采样14份, 现场采环境样本3份(饮用水、食堂案板、餐具等各1份)。

1.2 仪器

全自动核酸提取仪(西安天隆)、PCR分析系统 Gentier 48E/48R (西安天隆)、千分之一电子分析天平、涡旋振荡器、无菌均质器、高精度恒温培养箱 BD260、生物安全柜 B1TC-1300AZ。

1.3 试剂与培养基

RNA提取试剂盒(西安天隆, 批号: 20230912A)轮状病毒A组、诺如病毒(GⅠ、GⅡ)三重(带内参)核酸检测试剂盒(深圳生科原, 批号: 20230412)、沙门氏志贺氏菌联合试剂盒(上海之江, 批号: P20230202)、磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)、无菌生理盐水、7.5%氯化钠肉汤、缓冲蛋白胨水 BPW 增菌液、四硫磺酸钠煌绿(TTB)菌液、亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液营养肉

第一作者: 杜东生, 主治医师, 研究方向为公共卫生管理、疾病预防控制。

*** 通信作者:** 李艳芹, 副主任技师, 研究方向为卫生检验、微生物检验。E-mail: Lyq69696@163.com

汤、肠道增菌肉汤、GN 增菌液、志贺氏增菌肉汤、Baird-Park 琼脂平板、三糖铁(TSI)琼脂、血琼脂平板、XLD 琼脂平板、SS 选择培养基、麦康凯(MAC)选择培养基、亚硫酸铋(BS)琼脂、沙门氏菌显色培养基、营养琼脂、伊红美蓝(EMB)培养基、生化鉴定试剂盒。所有培养基及试剂均在有效期内使用。

1.4 实验室检测

对采集学生病例和非病例、食堂工作人员、教职工的大便和肛拭子以及留样食品、环境涂抹样本,开展诺如病毒和轮状病毒、金黄色葡萄球菌、致泻性大肠埃希氏菌、沙门氏菌、志贺氏菌、蜡样芽孢杆菌的检测与鉴定。

1.4.1 检验标准

依据诺如病毒标本处理及诺如病毒检测技术方案进行病毒检测;依据食品安全国家标准食品微生物学检验,金黄色葡萄球菌检验 GB 4789.10—2016 沙门氏菌检验 GB 4789.4—2016 志贺氏菌检验 GB 4789.5—2012、蜡样芽孢杆菌检验 GB 4789.14—2014、增致泻性大肠埃希氏菌的检验 GB 4789.6—2016 及食品微生物学检验总则 GB 4789.1—2016 进行细菌学检测^[5]。

1.4.2 病毒学检测

(1)试剂准备和样品处理试剂反应体系配制:试剂从冰箱取出待完全溶解到室温(20~25℃),需震荡混匀并与 2000 r/min 离心 10 s,根据反应体系配制方法计算当次实验所需要的各种试剂量,单反应体系配方:以 RVA/GI/G II/RNP RT-PCR 反应液 17 μL、RVA/GI/G II/RNP 引物探针混合液 2uL、RVA/GI/G II/RNP 混合酶液 1 μL 的比例配制混合。

(2)标本前处理:将 0.1 g(黄豆粒大小)或 0.1 mL 液体标本加到 1.5 mL EP 管中,加入 0.9 mL 磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)标本处理液,震荡 3 次,每次 10 s。然后静置 10 min,再以 8000 r/min 离心 5 min,吸取上清 200 μL 进行核酸提取。

(3)结果判定核酸扩增吸取 5 μL 提取液、阴、阳对照与 20 μL 反应体系至八联 PCR 反应管中,盖紧管盖按下表升温程序进行 PCR 扩增(PCR 反应条件见表 1)。

表 1 PCR 反应条件

阶段	条件	循环数
反转录	50℃: 15 min	1
预变性	95℃: 3 min	1
PCR	95℃: 5 s	45
	55℃: 30 s	
	(此阶段结束时采集荧光信号)	

反应结束后自动保存结果,根据分析后的曲线调节 baseline 的 Start 值、以在 threshold 值(根据实际情况自行调整,Start 值可在 3~15 范围、end 值可以设在 5~20 范围,调整阴性对照的曲线平直或低于阈值线),点击 Analysis 自动获得分析结果,并

在 report 界面查看结果。

样本结果判定:

(1)阳性:样本检测结果 Ct 值≤ 41,有明显指数增长。

(2)可疑:样本检测结果 Ct 值在 38~41 范围。此时应对样本进行重复检测,如重复实验结果 Ct 值仍在 38~41 范围,有明显指数增长。则判定为阳性,否则为阴性。

(3)阴性:样本检测结果 Ct 值> 41 或无 Ct 值。

(4)内参:FAM、JOE/VIC/HEX、CY5 三个通道都为阴性时,人源阴性样本内参通道(ROX 通道)Ct 值≤ 38,该样本判为阴性;Ct 值> 38,则判为无效样本,需重新采样,重新提取并重新检测。检验结果的解释见表 2。

表 2 通道及检测结果

通道及检测结果		检测结果及解释
FAM	阳性(+)	样本中检测出轮状病毒
	阴性(-)	样本中未检测出轮状病毒
JOE/VIC/HEX	阳性(+)	样本中检测出诺如病毒 I 型
	阴性(-)	样本中未检测出诺如病毒 I 型
CY5	阳性(+)	样本中检测出诺如病毒 II 型
	阴性(-)	样本中未检测出诺如病毒 II 型
ROX		内参

1.4.3 细菌学检测

增菌培养对采集的样本进行分类预增菌及增菌培养,无菌操作取样品 25.0 g 分别加入到 225 mL 不同增菌液的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1~2 min,对于涂抹采样直接增菌培养,金黄色葡萄球菌、致泻性大肠埃希氏菌、沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌与(36±1)℃ 培养 8~18 h,志贺氏菌(41.5±1)℃ 厌氧培养 16~20 h。

分离、培养用一次性取菌环接种划线或无菌 L 棒涂布平板于下列表中培养基上,继续培养 18~24 h。

1.5 统计学处理

流行病学和实验室检测数据采用 WPS 表格建立数据库,并对数据进行统计学分析,组间计数资料的比较使用卡方检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 病毒学检测

对采集的 40 份标本,包括病例和教职工、厨师肛拭子标本 37 份,现场采环境样本 3 份(饮用水、食堂案板、餐具等各 1 份)。进行诺如病毒 GI 型、GII 型检测,结果显示,13 份学生肛拭子、3 份教职工员肛拭子均呈 GII 型核酸阳性、GI 型核酸阴性。

2.2 细菌学检测

采集的 54 份样本,包括病例和教职工、厨师肛拭子标本 37 份,食堂餐食留样和现场采样 14 份,现场采环境样本 3 份(饮用

水、食堂案板、餐具等各 1 份)，均未检出金黄色葡萄球菌、致泻性大肠埃希氏菌、沙门氏菌、志贺氏菌、蜡样芽孢杆菌，见表 3。

表 3 细菌学检测结果

增菌液		选择培养基	典型菌落	细菌生长情况
金黄色葡萄球菌	7.5% NaCl 肉汤	Baird-Park 琼脂平板、血平板	BP: 表面光滑、凸起、湿润、颜色呈灰黑至黑色 血平板: 菌落较大、圆形、金黄色、有透明溶血环	无可疑菌落生长
致泻性大肠埃希氏菌	营养肉汤、肠道增菌肉汤	MAC 平板、EMB 平板	MAC: 砖红色、无色或淡粉色 EMB: 菌落中心紫黑色或金属光泽	无可疑菌落生长
沙门氏菌	缓冲蛋白胨水(BPW)	BS、XLD、沙门氏菌显色培养基	BS: 黑色金属光泽，灰绿色 沙显: 按照说明书进行判断	无可疑菌落生长
蜡样芽孢杆菌	无菌生理盐水	MYP 平板、营养琼脂	MYP: 微粉红色、周围沉淀环。营养琼脂: 表面粗糙似毛玻璃或融蜡状。	无可疑菌落生长
志贺氏菌	GN 增菌液	XLD、MAC 培养基	XLD: 粉红色至无色、半透明、光滑、湿润 MAC: 圆形无色至浅粉色、半透明光滑	无可疑菌落生长

3 讨论与结论

随着科学技术的进步，现在诺如病毒的检测主要通过转录协作实验和 RT-PCR 来进行，这种方法敏感性和特异性都很高，但对检测人员的技能要求很高，所以在使用这种技术之前，必须提升操作者的综合素质^[6]。

目前对诺如病毒的快速、直观的诊断方法主要集中在实验室，随着实验室诊断方法在不断完善，诊断准确性也在不断提高。在使用特定实验室检测技术时，要根据诊断要求和目标选择合适的检测技术。由于诺如病毒的基因型多样，并不断演化，使用特异性引物很难保证其准确性^[7]。目前，LAMP 技术、纳米技术、高通量测序等技术已逐渐被科研单位所采用，在将来这些技术将被用于实验室检测，从而更好地适应诺如病毒检测和治疗的需要。由于诺如病毒的基因组是复杂的，而且还在不断变化，所以目前还没有有效的疫苗来预防和治疗。等温扩增技术属于等温扩增法，目前已广泛用于对诺如病毒进行检验，在单个温度下进行放大，不需要加热周期的设备，可以实现荧光定量 PCR，并且灵敏度高^[8]。基于等温放大的核酸依赖放大方法可实现对 NDV RNA 的快速测定，但目前对 NDV 的特异性还不能满足临床需求，而且低温（-40℃）对 RNA 的特异性影响不大^[9]。该方法与环形等温放大方法相比，检测速度快、操作简便、反应时间短，且对环境的需求不高，通常可在 60~65℃ 范围内完成，不需要大规模的温控装置。该方法仅需要对浑浊程度进行观测即可，还可以加入一些金属荧光物质来增加其显示的清晰度。目前，利用环形等温法进行诺如病毒的快速、准确、快速分析，可以获得与目前临床常用的 GII、GI 等基因片段类似的 PCR 方法^[10]。

目前，诺如病毒的实验室诊断方法种类繁多，且其检测机理也存在着一定的差别，因此，本项目的研究对于推动诺

如病毒的实验室诊断研究有着十分重要的意义，能够对诺如病毒基因进化与新突变株进行追踪，以预防诺如病毒潜在性胃肠炎的爆发，同时还能在最短时间内进行检测，确保诺如病毒诊断水平全面提高，为预防与控制胃肠炎爆发事件提供重要依据。

参考文献

[1] 郎丽琴. 诺如病毒感染发生的危险因素分析[J]. 口岸卫生控制, 2023, 28(06): 59-62.

[2] 韩瑛, 杨梅, 王楠, 等. 蒙脱石散联合穴位贴敷治疗儿童诺如病毒感染性腹泻的效果[J]. 妇儿健康导刊, 2023, 2(24): 50-52.

[3] 柯振华. 冷链食品中诺如病毒的检测方法研究以及污染状况分析[J]. 福建轻纺, 2023, (12): 12-15, 6.

[4] 孙睿阳, 刘永祥, 钟武. 小分子诺如病毒抑制剂的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(12): 1656-1665.

[5] 刘杰, 丛龙学. 天津市宁河区某中学 1 起 GⅡ 型诺如病毒暴发疫情分析[J]. 中国校医, 2023, 37(12): 905-907.

[6] 唐小清, 向辉, 秦静, 等. 南岸区学校及托幼机构诺如病毒感染聚集及暴发疫情影响因素分析[J]. 保健医学研究与实践, 2023, 20(S2): 28-30.

[7] 李冯, 杨慧, 杜文旗, 等. 深圳市龙岗区 2015—2022 年病毒性腹泻监测结果分析[J]. 海峡预防医学杂志, 2023, 29(06): 67-69.

[8] 舒高林. 儿童诺如病毒性胃肠炎的治疗和预防[J]. 青春期健康, 2023, 21(23): 54-55.

[9] 李双姝, 唐丽, 李兵兵, 等. 2017—2022 年淮安市社区门诊腹泻病人病原学分析[J]. 江苏预防医学, 2023, 34(06): 732-734.

[10] 王卫华, 张云杰, 乔宇飞. 2018—2022 年焦作市 < 18 岁人群感染诺如病毒基因分型分析[J]. 江苏预防医学, 2023, 34(06): 738-740.