

# 諾羅病毒快速篩檢試劑應用於疫情監測 與檢驗之效能評估

謝宗廷、邱淑君、廖婉婷、盧祉彤、郭庭佑、林智暉\*

## 摘要

諾羅病毒(norovirus)為國內腹瀉群聚中主要的病毒性病原體之一，每年國內通報腹瀉群聚案件中約有四成個案檢驗結果為諾羅病毒陽性。由於其易於傳播的特性，快速且準確的檢測諾羅病毒是防疫工作上至為重要的參考依據。本研究以2018年1-6月隨機挑選21個腹瀉群聚案件共101件檢體進行市售RIDA®QUICK Norovirus快篩試劑之靈敏度與專一性評估。結果顯示快篩試劑的檢測靈敏度為67.2%，專一性則為100%，顯示快篩試劑檢測為陽性的檢體即可確認為諾羅病毒陽性，但快篩試劑檢測為陰性的檢體則須經過實驗室再進一步確認。因此目前市售之諾羅病毒快篩試劑可提供應用於臨床或群聚疫調時初步快速篩檢，但仍無法取代實驗室real-time RT-PCR的檢測工作。為避免誤判陰性檢驗結果而導致疫情擴大，腹瀉群聚仍須將檢體盡速送往實驗室進行檢測，以防止疫情擴散。

**關鍵字：**諾羅病毒、快速篩檢試劑、real-time RT-PCR

## 前言

諾羅病毒(norovirus)為國內最常引起腹瀉群聚之病毒性病原體，全年均有感染案例發生，而以冬季為感染流行高峰。每年造成學校或安養人口密集機構之腹瀉群聚[1-3]，同期間亦可從急診腹瀉監測系統發現社區性與家庭性的民眾交叉感染事件[4]。

諾羅病毒屬杯狀病毒科(*Caliciviridae*)，沒有外套膜(envelope)，蛋白殼體為正20面體，大小約27-38 nm，核酸為正股單股RNA(ssRNA)，長度約7.7 kb，含有3個蛋白質轉譯區(open reading frame, ORF)。ORF1為與非結構性蛋白質如RNA依賴性RNA聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)，ORF2與ORF3則轉譯出衣殼蛋白(capsid protein)VP1與VP2。目前依據VP1部位之基因序列之差異可再區分為GI至GV五個基因群(genogroups)，而其中的GI、GII、GIV三種可感染人類。常造成人類群聚感染的GI以及GII基因群並可藉由VP1的差異再細分成GI.1-9以及GII.1-23等多種基因型[5, 6]。

感染諾羅病毒患者主要的臨床症狀以嘔吐與急性水瀉為主，含病毒之嘔吐物與水瀉物飛沫易散播病毒[2,5,6]。從過去監測與病毒株演化的研究顯示諾羅病毒的

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

通訊作者：林智暉\*

E-mail : jeffy320@cdc.gov.tw

投稿日期：2018年10月26日

接受日期：2018年12月24日

DOI : 10.6524/EB.201910\_35(20).0002

外殼蛋白具有高變異性[7]，曾感染的患者也無法因此獲得長期免疫保護力，因此常造成各年齡層之急性腸胃炎、嘔吐及腹瀉，嚴重者甚至會引起脫水或是休克症狀，免疫力不佳之年幼者或年長者可能死亡或導致重症。諾羅病毒於體外可以存活長達三周，於水中可以存活更久，且只需極少量病毒（10–100 個病毒粒子）即會造成感染[8]，顯示諾羅病毒具高傳染力。

對於腸道腹瀉傳染病而言，早期診斷為最即時且有效的防疫作為。由於現代生物技術仍無法有效的以細胞培養或小動物感染模式培養諾羅病毒，諾羅病毒的標準檢驗法(gold standard method)為分子生物學檢驗方式：由糞便檢體中萃取出病毒核糖核酸(RNA)，利用具專一性之引子，進行即時反轉錄聚合酵素連鎖反應(real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, real-time RT-PCR)偵測增幅產物[9,10]。此方法相較於傳統 PCR 檢測方法可大幅縮短檢驗時程，但需要在實驗室以精密儀器進行核酸萃取及複製，並須透過檢測機器進行結果判讀。

近年諾羅病毒快篩試劑陸續上市，大部份能在取得檢體 15–30 分鐘內完成操作及目測判讀。其中 RIDA®QUICK Norovirus (Product code: N1402) 諾羅病毒快篩試劑為德國研發，經我國衛福部核准使用之快篩試劑，已有部分醫療院所用於臨床偵測諾羅病毒。其主要原理使用生物素(biotin)與黃金(gold)標定之諾羅病毒專一性單株抗體偵測疑似患者糞便檢體中的抗原(病毒)。若檢體中有諾羅病毒的存在，黃金標定的抗體便會與病毒結合成複合物，並與檢測線上的反應蛋白作用而呈色。此方法的優點在於不需要特殊的儀器設備，且操作步驟快速簡單。然而該試劑與現行之 real-time RT-PCR 的靈敏度與專一性間的效能評估目前仍不清楚。本研究以 2018 年 1–6 月隨機挑選 21 件腹瀉群聚事件共 101 件臨床檢體為材料進行試劑檢測，並與疾病管制署實驗室所使用的 real-time RT-PCR 方法進行比較，探討腹瀉群聚事件利用快篩試劑檢測諾羅病毒的可行性。

## 材料與方法

### 一、檢體來源與前處理

研究檢體為 2018 年 1–6 月依症狀通報腹瀉群聚送驗之糞便檢體。檢體送達實驗室後依照疾病管制署傳染病標準檢驗方法手冊（第三版，ISBN:978-986-04-1280-2)規定，將約 0.2 g 的糞便檢體置於至 5 mL 離心管中，並加入約 5–6 顆直徑 1 公厘的玻璃研磨珠與 1.8 mL 的 PBS，經震盪混合後以 3,000 rpm 離心 10 分鐘後，收取上清液以進行後續檢測。

### 二、諾羅病毒核酸萃取

病毒核酸萃取使用 MagNA Pure LC (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)儀器進行，操作程序依照原廠建議操作流程，取 250  $\mu$ L 前處理完之上清液檢體樣本進行核酸萃取，萃取出 RNA 接續進行 real-time RT-PCR 檢測，剩餘的 RNA 則置於-20°C 冰箱中保存。

### 三、諾羅病毒 real-time RT-PCR 檢驗

Real-time RT-PCR 以 ABI 7500 (Applied Biosystems, Forest City, CA) 快速

同步定量偵測系統進行。每個反應以病毒 RNA 萃取液 5  $\mu\text{L}$  為模板，加入 12.5  $\mu\text{L}$  RT-PCR 緩衝液、諾羅病毒 GI 及 GII 基因群引子對濃度 10  $\mu\text{M}$  各 1  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{M}$  探針各 0.5  $\mu\text{L}$ 、1  $\mu\text{L}$  25X RT-PCR enzyme，補 DEPC 水至反應總體積為 25  $\mu\text{L}$ 。引子及探針的設計及反應條件則參考美國疾病管制中心發表之文獻研究，檢驗結果依據參考文獻設定 Ct 值低於 35 以下判定為諾羅病毒檢測陽性[11]。

#### 四、RIDA®QUICK Norovirus 諾羅病毒快篩試劑檢驗

RIDA®QUICK Norovirus 諾羅病毒快篩試劑檢驗的操作是依據原廠所附說明書進行。取約 50 mg(約一顆豌豆大小)的糞便檢體或者是水樣糞便檢體，與試劑組中的 Reagent A 與 Reagent B 混合後靜置 5 分鐘。檢驗時加入 150  $\mu\text{L}$  的樣本混合液到檢體加樣區，約 15 分鐘後即可由觀測視窗判別檢驗結果。檢驗結果中 C 訊號線為控制組(control band)，若呈現無訊號則表示需重新取樣並重新檢驗。T 訊號線為測試組(test band)，若呈現紅色則判定為陽性，否則判定為陰性(圖)。



圖、RIDA®QUICK Norovirus 諾羅病毒快篩試劑檢驗結果顯示圖。  
其中(A)為諾羅病毒檢測陰性結果，僅 C 訊號線有呈色顯示。  
(B)則為諾羅病毒檢測陽性結果，控制組 C 訊號線以及測試組 T 訊號線均有呈色顯示。

#### 結果

本研究中以 real-time RT-PCR 對 101 件腹瀉群聚檢體進行檢測，Ct 值 35 以下判定為陽性，35 以上則判定為陰性，共檢測出陽性檢體 61 件，其中 GI 基因群陽性為 28 件，GII 基因群陽性為 36 件，有 3 件同時檢驗出 GI 及 GII 兩種基因群(表一)。

表一、real-time RT-PCR 之檢測結果

Ct value	Positive		Negative	Total
	GI	GII		
10-18	3	5	-	8
19-27	25	28	-	53
28-35	0	3	-	3
Negative*	-	-	40	40
Total	28	36	40	104**

\*Ct 值>35 則判定為諾羅病毒檢測陰性

\*\*101 支檢體中有 3 支檢體為 GI, GII 檢測均為陽性

以 RIDA®QUICK Norovirus 諾羅病毒快篩試劑對 101 件腹瀉群聚檢體進行檢測，並與 real-time RT-PCR 方法的結果進行比較分析（表二）。在檢測靈敏度 (sensitivity) 方面，real-time RT-PCR 檢測為諾羅病毒陽性的 61 件檢體中，快篩試劑檢測亦為陽性的檢出率為 67.2% (41/61)。進一步分別將諾羅病毒以 GI 與 GII 兩種基因群進行分析，結果顯示快篩試劑對 GI 基因群的檢出率為 57.1% (16/28)，對 GII 基因群的檢出率則為 77.8% (28/36)，表示 RIDA®QUICK Norovirus 諾羅病毒快篩試劑對 GI 基因群的檢出能力比起 GII 基因群病毒略差，可能是快篩試劑所選用的抗體對 GI 基因群型別的識別能力較差。若再將 GII 基因群進一步以檢出基因型別進行分析，則各基因型檢出率分別為 GII.2 80% (12/15)、GII.4 Sydney (2012) 100% (4/4)，其他 GII 基因型別 (包含 GII.6、GII.7、GII.17 等) 70.6% (12/17)。而檢測專一性 (specificity) 方面，在 40 件 real-time RT-PCR 檢測結果為諾羅病毒陰性檢體中，均無快篩檢測為偽陽性的結果，顯示快篩試劑的檢測專一性為 100%。

表二、RIDA®QUICK Norovirus 諾羅病毒快篩試劑與 real-time RT-PCR 之檢測靈敏度與專一性比較

RIDA	GI	real-time RT-PCR			Negative	Total
		GII				
		GII.2	GII.4 Sydney (2012)	Others*		
Positive	16	12	4	12	0	44
Negative	12	3	0	5	40	60
Total	28	15	4	17	40	104**

\*Others 包含有 GII.6、GII.7、GII.17

\*\*101 支檢體中有 3 支檢體為 GI, GII 基因群檢測均為陽性

## 討論

諾羅病毒因其傳播快速的特性，是全球急性腸胃道症候群最主要的致病原之一[12]。依據我國腹瀉監測以及症狀通報系統資料顯示近幾年常見引起急性腸胃炎及腹瀉群聚之主要感染源即為諾羅病毒，病患感染後極易透過人傳人或食物、環境汙染方式散播而引起大型群聚事件。諾羅病毒在我國好發於每年冬季月份，常發生於學校團膳、學生旅遊、人口密集機構，以及民眾聚餐與出遊之場所。因此，監測疫情能夠提早提醒民眾警覺，減少個案傳播至群聚疫情，將有助於病例減少及有效控制疫情擴散。

由於諾羅病毒至今仍沒有好的培養系統可以進行增幅培養，因此目前仍無法以疫苗進行防治[13,14]。現階段實驗室之檢驗依照國際所使用之檢驗方法以 real-time RT-PCR 為標準檢驗方法[9,10]。本次研究以隨機收集 2018 年 1-6 月通報

的 21 件腹瀉群聚共 101 個糞便檢體進行評估測試，根據本研究對 RIDA®QUICK Norovirus 諾羅病毒快篩試劑評估結果顯示，此試劑對 GII 基因群的病毒檢測表現較 GI 基因群略佳，而對於 2018 年我國諾羅病毒主要的流行基因型別 GII.2 基因型的檢測靈敏度亦達到 80%。近年也曾有其他研究團隊針對此組 RIDA®QUICK Norovirus 諾羅病毒快篩試劑進行相關評估測試，結果整體靈敏度 68.8%，與本研究的 67.2% 結果相近；其中 GII 基因群本次研究結果靈敏度為 77.8%，與過去其他評估報告的 GII 基因群靈敏度為 76% 的結果相似[15]。綜合上述研究結果顯示，RIDA®QUICK Norovirus 諾羅病毒快篩試劑對 GII 基因群的靈敏度與過去研究報告結果相近，且對於我國 2018 年流行病毒株 GII.2 以及 GII.4 有良好的靈敏度。過去文獻資料顯示，臺灣在 2006–2011 年間主要流行型別為 GII.4 以及 GII.2[16]，而近期在 2016 年及 2017 年流行之 GII.4Sydney (2012) 及 GII.17 基因型經由本次評估測試皆有不錯的靈敏度，對其他零星出現的 GII.6、GII.7 型別也能偵測到，惟過去曾出現過的包括 GII.12 或其他基因型則仍需更多樣本測試。本次測試結果 RIDA®QUICK Norovirus 諾羅病毒快篩試劑在 GI 基因群上的靈敏度為 57.1%，相較於 GII 基因群的 77.8% 的靈敏度仍有段差距，因此推測此快篩試劑對於 GI 基因群的諾羅病毒的檢出效果較不靈敏，若流行期的主要病毒型別為 GI 基因群時，快篩試劑檢測為陰性的檢體，必須配合實驗室其他檢驗方法做進一步確認。

此外本次研究結果顯示諾羅病毒快篩試劑檢測為陽性的檢體，其 real-time RT-PCR 檢測亦均為陽性，顯示試劑的專一性為 100%，與原廠操作手冊以及過去研究的專一性為 87.5%–100% 相符，但仍有 20 支臨床檢體 real-time RT-PCR 偵測為陽性，其快篩試劑檢測為陰性的偽陰性結果，顯示此快篩試劑靈敏度仍不足以完全取代實驗室的檢驗方法，在診所或醫院等操作快篩試劑檢測為陽性，可直接判定為諾羅病毒感染，但陰性檢體仍需採集檢體送往專業實驗室進行檢驗。

病毒快篩試劑因其操作便利，能使臨床醫師於採集病患檢體後快速檢驗並得到結果。目前已有數個諾羅病毒快篩試劑取得衛生福利部食品藥物管理署許可，但多數仍有待進口，國內使用並不普及。本研究所評估的快篩試劑已有部分醫療院所用於臨床偵測諾羅病毒。經本次評估結果顯示，快篩試劑雖具有高度專一性，但靈敏度不足，仍是各種市售快篩試劑的共同問題。因此，本次研究之諾羅病毒快篩試劑雖然可提供快速初步篩檢結果，但仍無法取代實驗室的檢測方法。對於疑似腹瀉群聚或食物中毒事件，可藉由快篩試劑檢驗進行初步快篩。若有檢體呈現陽性檢驗結果，則可以視為諾羅病毒為可能的感染原之一；但若檢體結果均呈現陰性時，為避免因快篩試劑的偽陰性誤判檢驗結果而導致疫情擴大，仍須將所採檢檢體儘速送至實驗室進行分子生物學檢驗，以確保檢驗品質，掌握時效，防止疫情擴散，維護民眾健康。

## 參考文獻

1. Chen MY, Chen WC, Chen PC, et al. An outbreak of norovirus gastroenteritis associated with asymptomatic food handlers in Kinmen, Taiwan. *BMC public health* 2016; 4;16:372.
2. Chi CY, Liao LN, Ho CM, et al. Epidemiology, clinical features, and microbiology of patients with diarrhea in community clinics in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2018; 51(4): 527–34.
3. Chen SY, Feng Y, Chao HC, et al. Emergence in Taiwan of novel norovirus GII.4 variants causing acute gastroenteritis and intestinal haemorrhage in children. *J Med Microbiol* 2015; 64(Pt 5): 544–50.
4. Burke RM, Shih SM, Yen C, et al. Burden of severe norovirus disease in Taiwan 2003-2013. *Clin Infect Dis* 2018; 67(9): 1373–78.
5. Atmar RL, Ramani S, Estes MK. Human noroviruses: recent advances in a 50-year history. *Curr Opin Infect Dis* 2018; 31(5): 422–32.
6. Banyai K, Estes MK, Martella V, et al. Viral gastroenteritis. *Lancet* 2018; 14; 392(10142): 175–86.
7. Ludwig-Begall LF, Mauroy A, Thiry E. Norovirus recombinants: recurrent in the field, recalcitrant in the lab - a scoping review of recombination and recombinant types of noroviruses. *J Gen Virol* 2018; 99(8): 970–88.
8. Davis C, Vally H, Bell R, et al. Viral gastrointestinal outbreaks in residential care facilities: an examination of the value of public health unit involvement. *Aust N Z J Public Health* 2014; 38(2): 177–83.
9. Jonckheere S, Botteldoorn N, Vandecandelaere P, et al. Multicenter evaluation of the revised RIDA(R) QUICK test (N1402) for rapid detection of norovirus in a diagnostic laboratory setting. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; 88(1): 31–5.
10. Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 2015; 53(2): 373–81.
11. Cannon JL, Barclay L, Collins NR, et al. Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses. *J Clin Microbiol* 2017; 55(7): 2208–21.
12. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2014; 14(8): 725–30.
13. Karst SM, Wobus CE, Goodfellow IG, et al. Advances in norovirus biology. *Cell Host Microbe* 2014; 15(6): 668–80.
14. Karst SM, Zhu S, Goodfellow IG. The molecular pathology of noroviruses. *J Pathol* 2015; 235(2): 206–16.

15. 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 Trop Pediatr* 2017. doi:10.1093/tropej/fmx014.
16. Tsai, CN, Lin CY, Lin CW, et al. Clinical relevance and genotypes of circulating norovirus in northern Taiwan 2006-2011. *J Med Virol* 2014; 86(2): 335–46.