

金山区某学校一起诺如病毒感染性 腹泻疫情流行病学调查

宋灿磊, 刘天, 杜荐如, 朱建明

上海市金山区疾病预防控制中心, 上海 201599

摘要: **目的** 分析一起学校诺如病毒感染性腹泻疫情流行病学特征及其感染病毒基因型别, 探讨可能传播途径, 为有效控制疫情提供科学依据, 同时为类似疫情现场处置提供经验。 **方法** 制定统一病例定义, 在全校学生及教职员中开展主动病例搜索, 采用描述性流行病学和回顾性队列研究进行分析; 采集未经治疗发病学生呕吐物、粪便或肛拭子, 食堂员工及食堂环境样本, 发病班级饮用水及环境拭子, 运用实时荧光 RT-PCR 进行诺如病毒核酸检测, 阳性样本进行 RT-PCR, PCR 产物纯化、测序, 序列经核酸比对确认, 应用 Clustal X、MEGA5.1 等软件分析基因序列, 构建系统进化树; 采用 Excel2010 软件建立数据库, Open Epi3.03 在线软件进行统计学分析。 **结果** 2014 年 11 月 18-24 日, 该校共报告病例 36 例, 19 日为发病高峰 (19 例)。病例集中分布在二 (3) 班, 罹患率为 55.81% (24/43), 其次为二 (10) 班, 罹患率为 14.29% (6/42); 症状以呕吐为主 (97.22%), 发热 (38.89%)、腹痛 (36.11%) 及腹泻 (8.33%)。回归性队列研究显示参加舞蹈兴趣班为发病危险因素 ($RR=6.67, P<0.01$)。经实时荧光 RT-PCR 检测, 16 份发病学生样本中诺如病毒核酸阳性 6 份。序列比对结果显示, Jinshan06、Jinshan09 等 6 株基因同源性为 100%, 其与 GII.P17/GII.17/Kawasaki323/GII.17/Okinaawa/FP027/2012 等株基因同源性高达 98%, 均属 GII.17 型诺如病毒, 指示病毒同源。 **结论** 本次疫情是一起因密切接触引起 GII.17 型诺如病毒感染性腹泻疫情。

关键词: 诺如病毒; 急性胃肠炎; 暴发; 流行病学; 学校

中图分类号: R181.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)04-0429-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.04.014

Epidemiological investigation on an outbreak of norovirus-induced infectious diarrhea in a primary school in Jinshan District

SONG Can-lei, LIU Tian, DU Jian-ru, ZHU Jian-ming

Jinshan District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 201599, China

Abstract: **Objective** To analyze the epidemiological characteristics and the genotypes of pathogens in an outbreak of norovirus-induced infectious diarrhea in a primary school, to explore the possible route of transmission so as to provide scientific evidence for effective prevention and control of the epidemic as well as simultaneously provide experience for on-site disposal of the similar epidemic. **Methods** The uniform case definition was formulated, and the initiative case research was conducted among the students and teaching staff of the school. Descriptive epidemiological approaches and retrospective cohort study were used to identify the risk factors. Vomit and stool or anal swab samples were collected from patients without treatment. Anal swabs from the kitchen workers, drinking water samples from the classes and the environmental surface samples from the kitchen and involved classrooms were also collected. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect norovirus nucleic acid, and the positive samples were amplified by RT-PCR. The PCR amplification products were purified, sequenced and then compared with sequences in GenBank. The sequences were aligned by Clustal X employing MEGA 5.1 program package to construct the phylogenetic trees. The database was established by Excel 2010 software, and then analyzed by Open Epi software version 3.0.3 online. **Results** A total of 36 cases were reported in the school from November 18th to 24th, 2014. The peak incidence was on November 19th ($n=19$). Grade 2 Class 3 had the highest attack rate (55.81%, 24/43), followed by Grade 2 Class 10 (14.29%, 6/42). The main symptoms included vomit (97.22%), fever (38.89%), abdominal pain (36.11%) and diarrhea (8.33%). The retrospective cohort study revealed that participating in dancing class was the risk factor for the incidence ($RR=6.67, P<0.01$). 6 out of 16 samples from the cases were found norovirus positive by real-time fluorescent quantitative PCR. The sequence alignment showed that the nucleotide sequence homology of the 6 viral stains was 100%, and they shared 98% homogeneity with GII.P17/GII.17/Kawasa-

基金项目: 上海市卫生计生委面上项目 (201440590); 金山区卫生计生委青年项目 (JSKJ-KTQN-2015-04)

作者简介: 宋灿磊 (1981-), 男, 河南平顶山人, 硕士研究生, 主管医师, 主要从事急性传染病防控工作。

ki323 and GI.17/Okinawa/FP027/2012 strain, indicating these viruses were homologous and belonged to the G II. 17 norovirus strain. **Conclusion** The outbreak of GI.17 norovirus-induced infectious diarrhea in the school is caused by close contact.

Key words: norovirus; acute gastroenteritis; outbreak; epidemiology; school

诺如病毒 (norovirus, NoV) 又称为诺瓦克病毒 (norwalk viruses, NV), 是人类杯状病毒科 (human calicivirus, HuCV) 中诺如病毒属的原型代表株。该病毒具有发病急、感染剂量低、传播途径广泛、人群缺乏持久免疫力且普遍易感等特点, 是引起人类非细菌性急性胃肠炎暴发和散发的重要病原, 极易在幼儿园、学校、养老院等聚集场所引起暴发^[1]。2006-2013 年国内诺如病毒感染导致突发公共卫生事件呈上升趋势, 累计报告 56 起, 发病 4 979 例, 极大危害公众身心健康^[2]; 同样上海市感染性腹泻监测结果显示, 腹泻患者中诺如病毒检出率高达 26.17%, 诺如病毒已成为上海市腹泻患者感染最主要病原体^[3]。2014 年 11 月 20 日, 上海市金山区某学校发生一起聚集性呕吐、腹泻病例疫情, 为掌握其流行病学和感染的病原学特征, 探寻感染来源和传播的危险因素, 提出针对性防控措施, 预防类似事件的发生, 开展本次调查。

1 对象与方法

1.1 病例定义

1.1.1 疑似病例 2014 年 11 月 15-26 日, 在该学校的全体学生及教职员工中出现有呕吐症状者或腹泻次数 ≥ 3 次/d 或者腹泻次数 < 3 次/d, 并伴有腹痛、恶心主观症状之一者。

1.1.2 确诊病例 疑似病例中呕吐物、腹泻物或肛拭子样本中至少 1 项实时荧光 RT-PCR 诺如病毒核酸检测阳性者。

1.2 病例搜索 根据病例定义通过查阅学校卫生室就诊记录、学校因病缺勤缺课登记记录进行病例搜索, 并采用面对面访谈及电话调查方式开展个案调查, 内容包括病例基本情况、发病情况、临床特征、发病前 3 d 饮食饮水史及流行病学接触史等。

1.3 卫生学调查 对学校内供水、食堂设施、卫生状况、食品加工过程和食堂员工饮食饮水情况进行调查。

1.4 实验室检测

1.4.1 样本采集 随机采集发病学生的呕吐物样本 2 份、粪便 3 份及肛拭子样本 11 份; 采集 4 份食堂员工肛拭子及 3 份食堂内环境样本; 采集 3 份发病班级桶装水及 4 份班级内环境样本。病毒管 4 ℃ 保存、送检。

1.4.2 RNA 提取及 cDNA 合成 使用 QIAamp®

Viral RNA Mini Kit 试剂盒从采集样本中提取病毒核酸, 操作方法见试剂说明书; 采用 SuperScript™ III First Synthesis System for RT-PCR 试剂盒, 按照其操作说明书利用所提取的病毒核酸合成 cDNA。反转录条件: 25 ℃ 预热 10 min, 50 ℃ 作用 50 min, 85 ℃ 灭火 5 min, 再加入 M-MLV 反转录酶 1 μ l, 37 ℃ 作用 20 min。产物置于 -20 ℃ 存贮备用。

1.4.3 实时荧光 RT-PCR 利用上述提取 RNA 样本, 按照荧光 RT-PCR 测定试剂盒操作说明书 (上海之江生物科技有限公司) 对其进行诺如病毒核酸检测, 以明确患者诺如病毒感染。反应体系 25 μ l: NoV 荧光 PCR 检测混合液 18 μ l、逆转录酶 1 μ l、无 RNA 酶水 1 μ l、RNA 5 μ l。扩增条件: 45 ℃, 逆转录反应 10 min; 95 ℃, 预变性 15 min; 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 1 min, 共 40 个循环。判断标准: 以 Ct 值 ≤ 30 为结果阳性; $30 < \text{Ct 值} < 40$ 为检测灰区, 需复检 1 次, Ct 值仍小于 40 可判断为阴性; Ct 值无任何数值判为阴性。

1.4.4 常规 RT-PCR 应用引物对 COG2F 和 G II SKR 扩增诺如病毒衣壳蛋白基因区 (Capsid) N/S 端, PCR 产物大小为 387 bp, PCR 产物经质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.4.5 DNA 纯化、测序和序列分析 利用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒, 按照其操作说明书对 PCR 产物进行纯化回收, PCR 产物委托上海生工生物技术公司进行双向测序; 测得序列经核酸比对程序 (www.nvbi.nlm.nih.gov) 比对确认, 利用 Clustal X、MEGA5.1 等软件进行序列分析, 构建系统进化树。

1.5 统计学分析 采用 Excel2010 软件建立数据库, 并进行流行病学特征分析; 运用 Open Epi3.03 在线软件进行数据分析, 计算 RR 值及其 95% 可信区间, 并进行连续校正 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 基本情况 该学校有 2 栋楼, 1 栋为 5 层教学楼, 1 栋为行政办公楼; 仅设置一、二个年级 19 个班级, 学生 835 人, 教职工 53 人。校内设有食堂, 从业人员 12 名, 食物统一制作, 仅供应在校师生午餐。2014 年 11 月 15-26 日该校共报告病例 36 例, 病例集中报告于二 (3) 班, 罹患率为 55.81% (24/43); 此外二

(10)班、二(5)班、二(4)班等其它 6 个班级也有相似症状病例报告,校内教职员工无相似症状病例报告。所有病例均为轻症,无重症病例、死亡病例。

2.2 流行病学特征

2.2.1 首发病例调查 首发病例 8 岁男性,二(3)班学生。该病例发病前 1 d(17 日 17 时)有某小龙虾馆就餐史,期间食用盱眙麻辣小龙虾,白灼小龙虾及蛤蜊炖蛋;18 日凌晨 4 点呕吐 2 次,期间无发热、腹泻及腹痛等症状,18 日当日继续上课,并参与班级内集体活动。19 日早上 7 时,患者腹部有不适症状,医院给予胃肠炎对症治疗。

2.2.2 时间分布 首发病例 11 月 18 日 4 时发病,19 日发病 19 例达到发病高峰、20 日发病 7 例、21 日发病 3 例、23 日发病 1 例及 24 日发病 4 例,25 日及以后再无新发病例报告。此次疫情持续 6 d,见图 1。

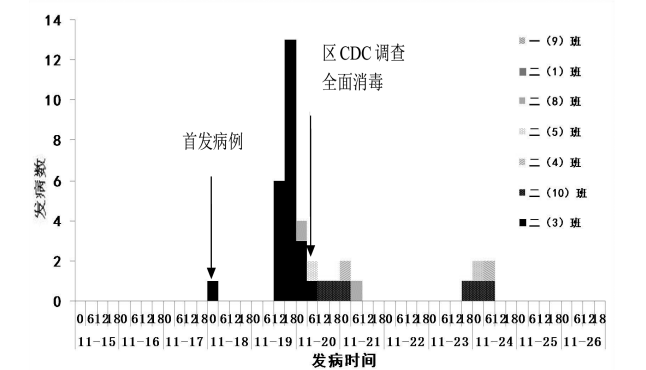


图 1 金山区某学校诺如病毒性感染性腹泻病例发病时间分布

2.2.3 性别、年龄分布 报告的 36 例病例中男性、女性各发病 18 例;7 岁者 1 例,8~9 岁者 35 例。病例较多的二(3)班男、女发病各 12 例,男性罹患率和女性罹患率分别为 57.14%和 54.55%,两者之间差异无统计学意义($RR=1.30,95\%CI:0.62\sim1.78$)。

2.2.4 班级分布 病例分布在 7 个班级,其中二(3)班共计发病 24 例,二(10)班发病 6 例,二(8)班发病 2 例、二(5)班、二(4)班、二(1)班及一(9)班各发病 1 例。二(3)班罹患率(55.81%)显著高于其他发病班级(4.71%)($RR=11.86,95\%CI:6.43\sim21.89$)。

表 1 金山区某学校诺如病毒性感染性腹泻病例主要临床症状分布

症状	病例数	百分比(%)
呕吐	35	97.22
1~3 次	19	52.78
4~6 次	10	27.78
≥7 次	6	16.67
发热	14	38.89
37.5≤T<38.0	8	22.22
T≥38.0	6	16.67
腹痛	13	36.11
恶心	11	30.56
腹泻	3	8.38

2.3 临床症状 所有病例急性起病,症状均为轻型,以呕吐为主,少数伴有腹痛、腹泻症状。其中呕吐者占 97.22%(35/36),多数在为 1~6 次/d;发热者 38.89%(14/36)、腹痛者 36.11%(13/36)、恶心者 30.56%(11/36)及腹泻者 8.33%(3/36),见表 1。患者病程为 1~3 d,中位数为 2 d。

2.4 危险因素调查

2.4.1 饮食情况 校内有食堂,仅提供学生与教职工午餐,统一制作。食堂负责每天食品原料采购,加工后统一分装餐盒送至教室供学生用餐,餐具统一清洗、消毒处理,卫生情况良好;食堂从业人员均持有健康证。调查所有病例发病前 3 d 就餐史,学生仅有发病前 1 d(周一)共同食物就餐史,但学生食用相同种类午餐,未发现可疑食物进食史。

2.4.2 饮水情况 学生及教职工饮用过同一品牌、同一批次桶装水,教职工及其他班级学生无发病情况;二(3)班发病学生日常饮水类型不同,但相比该班发病学生饮用开水罹患率(53.85%),饮用温水罹患率(57.89%)及凉水罹患率(54.55%),差异均无统计学意义($\chi^2=0.43,0.51,P>0.05$);实验室检测桶装水符合饮用水标准。

2.4.3 日常接触情况 二(3)班发病学生未能及时隔离,仍在正常上课;疫情发生前 2 d 该班均有集体性活动课,且该班级 11 名学生参加校内每日两次舞蹈兴趣课。舞蹈兴趣课:二年级 10 个班级共 37 人参加每日两次校内舞蹈课,二(3)班发病 5 例、二(10)班发病 3 例及二(4)班发病 1 例;舞蹈兴趣课内男女性罹患率(20.00%、19.05%),差异无统计学意义($\chi^2=0.46,P>0.05$);参加舞蹈兴趣课学生发病风险为未参加的 6.67 倍($RR=1.05,95\%CI:1.67\sim26.57$),见表 2。

表 2 跳舞兴趣课学生发病回顾性队列研究

舞蹈兴趣课	发病	未发病	χ^2 值	P 值	RR 值	95%CI
参加	4	10	6.11	0.013	6.67	1.67~26.57
未参加	3	67				

2.5 实验室检测

2.5.1 实时荧光 RT-PCR 采集发病学生(粪便、肛拭子及呕吐物)、食堂员工、发病班级(门把手、扶梯等)及食堂(餐具、砧板等)环节样本及发病班级桶装水。实验室检测结果证实发病学生中 1 份呕吐物、3 份粪便及 4 份肛拭子样本检出 G II 型诺如病毒核酸,其它采样样本诺如病毒核酸均为阴性。

2.5.2 诺如病毒 Capsid 的 N/S 区遗传进化分析 在诺如病毒 Capsid 的 N/S 区,jinshan06/2014/shang-

hai/CHN、jinshan06/2014/shanghai/CHN 等 6 株与 GII/JP/2014/GII. P17_GII. 17/Kawasaki323、NoV/Hu/GII. 17/Okinawa/FP027/2012 等株在进化树的同一分支上,可信度为 98%,基因型为 GII. 17 型诺如病毒,见图 2。

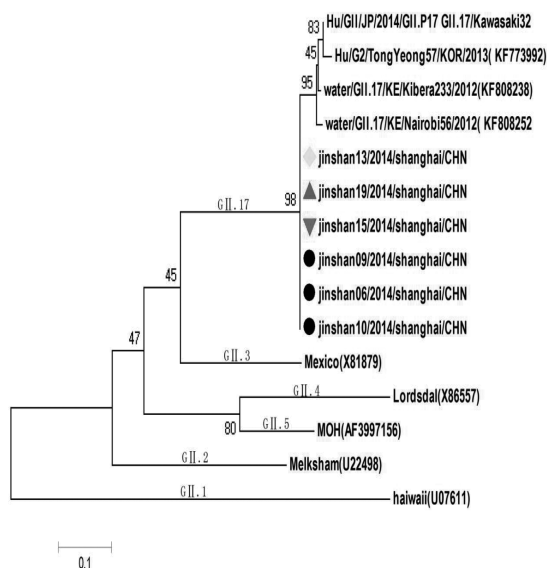


图2 诺如病毒 Capsid N/S 区核苷酸序列 (nt5085-5367) 遗传进化树

3 讨论

根据本起疫情流行病学调查、临床症状及实验室分析结果,确定该疫情是一起因密切接触由 GII. 17 型诺如病毒感染引起学校感染性腹泻疫情。GII. 17 型诺如病毒感染引起暴发或散发疫情鲜见报告,美国 2009-2013 年间仅有 4 起 GII. 17 型诺如病毒暴发报道^[4],前期也仅在韩国、日本等散发急性胃肠炎患者及肯尼亚河水中检出 GII. 17 型诺如病毒^[5-6],但近期相关研究证实 GII. 17 型诺如病毒导致大量感染性腹泻疫情的暴发^[7-8],GII. 17 型诺如病毒已成优势病毒株。

食源性传播是诺如病毒重要传播途径^[9],美国 2009-2010 年间报告实验室确诊 790 起食源性疾病暴发中诺如病毒感染引起占 42%^[4],且有隐性携带病毒食堂员工污染食物导致诺如病毒感染性腹泻暴发报道^[11]。本次疫情流行病学调查分析显示食源性传播意义不大,学校所有学生食用同一种类午餐,未发现有可疑食物进食史,且食堂员工及食堂内环境均未检出诺如病毒。

水源性传播在诺如病毒暴发中起着重要作用,浙江省 2004-2014 年 16 起诺如病毒感染性暴发疫情中 14 起因饮用水污染引起^[12];本次疫情学生及教职工饮用过同一品牌、同一批次桶装水,发病学生日常饮水

类型罹患率差异也无统计学意义,但病例集中在二(3)班,且实验室检测桶装水符合饮用水标准,排除桶装水污染导致暴发可能。

密切接触也是导致诺如病毒暴发主要原因^[13]。美国诺如病毒监测网络显示,2009 年 8 月-2013 年 9 月共报告 2 895 起明确传播途径的诺如病毒感染性腹泻疫情,密切接触传播导致暴发疫情占 83.7% (2 425/2 895),密切接触为美国诺如病毒感染性腹泻暴发最主要原因^[14]。本起疫情中发病学生未能及时隔离,患者参与班内集体性活动及校内舞蹈兴趣课,通过回顾性队列研究进一步证实学生间密切接触为本起疫情发生危险因素,并且不同班级发病学生所感染诺如病毒核苷酸同源性达 100%,指示病毒同源,密切接触导致本起学校诺如病毒感染性腹泻疫情暴发。

综上所述,本次学校疫情因密切接触导致 GII. 17 型诺如病毒感染性腹泻疫情。通过加强学校晨检及课间巡查,做到早发现、早隔离,暂停校内一切集体性活动及实施校内全面消毒等综合防控措施,及时控制疫情,维护师生身心健康。

志谢:本文在上海市现场流行病学三期培训时完成,得到了康来仪教授、庄宇老师以及指导老师何懿主任、潘浩主任的指导和帮助,特此致谢!

参考文献

- [1] Hall AJ, Lopman BA, Payne DC, et al. Norovirus disease in the United States[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(8): 1198-1205.
- [2] 张静,常昭瑞,孙军玲,等. 我国诺如病毒感染性腹泻流行现状及防控措施建议[J]. 疾病监测, 2014, 29(7): 516-521.
- [3] 黎健,肖文佳,胡家瑜,等. 2012 年 5—12 月上海市感染性腹泻细菌和病毒病原学监测结果分析[J]. 疾病监测, 2014, 29(11): 880-883.
- [4] Vega E, Barclay L, Gregoricus N, et al. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(1): 147-155.
- [5] Cho HG, Lee SG, Kim JE, et al. Molecular epidemiology of norovirus GII.4 variants in children under 5 years with sporadic acute gastroenteritis in South Korea during 2006-2013[J]. J Clin Virol, 2014, 61(3): 340-344.
- [6] Kiulia NM, Mans J, Mwenda JM, et al. Norovirus GII.17 Predominates in selected surface water sources in Kenya[J]. Food Environ Virol, 2014, 6(4): 221-231.
- [7] Xue L, Wu Q, Cai W, et al. Molecular characterization of new emerging GII. 17 norovirus strains from South China[J]. Infect Genet Evol, 2016, 40(1): 1-7.
- [8] de Graaf M, van Beek J, Vennema H, et al. Emergence of a novel GII. 17 norovirus - End of the GII. 4 era[J]. Euro Surveill, 2015, 20(26): 21178.
- [9] 张恒秋,陈斌,周伴群,等. 一起诺如病毒感染致胃肠炎暴发的危险因素分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21(6): 683-685.
- [10] Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 2009-2010[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2013, 62(1): 41-47.
- [11] Thornley CN, Hewitt J, Perumal L, et al. Multiple outbreaks of a novel norovirus GII. 4 linked to an infected post-symptomatic food handler[J]. Epidemiol Infect, 2013, 141(8): 1585-1597.
- [12] 秦淑文,柴程良,蔡剑,等. 2004-2014 年浙江省诺如病毒感染暴发疫情分析[J]. 中华临床感染病杂志, 2014, 7(4): 324-327.
- [13] Wikswo ME, Hall AJ. Outbreaks of acute gastroenteritis transmitted by person-to-person contact-United States, 2009-2010[J]. MMWR Surveill Summ, 2012, 61(1): 1-12.

收稿日期:2016-10-08