



# 传染病专报

总第 61 期

Infectious Diseases Report, IDR

中国疾病预防控制中心传染病预防控制处 2015年11月17日 第3卷 第37期

编者按 .....	01
防治技术指南 .....	01
诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南（2015 版） .....	01

## 编者按

诺如病毒具有高度传染性和快速传播能力，是全球急性胃肠炎的散发病例和暴发疫情的主要致病原，疾病负担严重。2013 年以来，我国其他感染性腹泻病暴发多以诺如病毒感染为主，尤其自 2014 年冬季起，诺如病毒感染暴发疫情大幅增加，显著高于历年水平。

为加强对全国诺如病毒感染暴发疫情调查处置和预防控制工作的技术指导，我中心组织专家编写了《诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南（2015 版）》。该指南可供各级疾病预防控制中心、医疗机构和有关单位在开展诺如病毒感染暴发疫情的发现、报告、调查、处置、预防和感染控制等相关工作时参考使用。

## 防治技术指南

# 诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南（2015版）

## Guidelines on Outbreak Investigation, Prevention and Control of Norovirus Infection (2015)

### 摘要

诺如病毒具有高度传染性和快速传播能力，是全球急性胃肠炎的散发病例和暴发疫情的主要致病原，疾病负担严重。2014年冬季以来，我国诺如病毒暴发疫情大幅增加，显著高于历年水平，主要发生在学校、托幼机构和医疗机构等人群聚集场所。

为加强对全国诺如病毒感染暴发疫情调查处置和预防控制工作的技术指导，中国疾病预防控制中心组织专家编写了《诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南（2015版）》，主要内容包括：(1)诺如病毒的病原学、临床特征和流行病学特征；(2)诺如病毒感染的病例定义、聚集性和暴发疫情的判定标准；(3)现场流行病学调查和卫生学调查的要点；(4)病人标本、食品、水及环境标本的采集方法、核酸检测和抗原检测方法；(5)病例管理、手卫生、环境消毒、食品安全、水安全、风险评估和健康教育等预防控制措施。

本指南适用于各级疾病预防控制机构、医疗机构和有关单位开展诺如病毒感染暴发疫情的发现、报告、调查、处置、预防和感染控制等工作。中国疾病预防控制中心将根据指南执行过程中反馈的问题和学科进展定期对指南进行修订。

### Abstract

Noroviruses are a leading cause of sporadic cases and outbreaks of acute gastroenteritis globally. Noroviruses are highly contagious and spread rapidly. Since the winter of 2014, norovirus outbreaks have been more frequently reported in mainland China compared to previous years. The reported outbreaks predominantly occur in schools, child-care centers, health-care facilities and other crowded settings.

To strengthen the technical guidance for the investigation, control, and prevention of norovirus outbreaks in mainland China, the Chinese Center for Disease Control and Prevention (China CDC) organized a panel of experts to compile the “Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines (2015 version)”. The main contents include: (1) the virologic, clinical, and epidemiological features, (2) standardized case definitions and criteria for norovirus clusters and outbreaks, (3) recommendations for how to conduct field epidemiological and environmental investigation, (4) specific instructions for how to collect clinical, food, water, and environmental specimens, and how to test for noroviruses using viral nucleic acid detection and enzyme immunoassays, (5) prevention and control strategies including case management, hand hygiene, environmental disinfection, food and water safety, risk assessment, and health education.

The guidelines are intended for use by staff at public health agencies at all levels, healthcare workers at medical institutions, and other stakeholders at related institutions who work on norovirus outbreak detection, reporting, field investigation, prevention and infection control. China CDC will update the guidelines periodically based on the international progress in this field and feedback from users during the implementation of the guidelines.

诺如病毒变异快、环境抵抗力强、感染剂量低，感染后潜伏期短、排毒时间长、免疫保护时间短，且传播途径多样、全人群普遍易感，因此，诺如病毒具有高度传染性和快速传播能力。诺如病毒感染发病的主要表现为腹泻和/或呕吐，国际上通常称之为急性胃肠炎。我国一直将其列入丙类传染病中“其他感染性腹泻病(除霍乱、细菌性和阿米巴性痢疾、伤寒和副伤寒以外的感染性腹泻病)”进行报告管理，这在一定程度上影响了以呕吐为主要症状的诺如病毒感染病例及其暴发的报告。诺如病毒是全球急性胃肠炎散发病例和暴发疫情的主要致病原，疾病负担严重<sup>[1-2]</sup>。2013年以来，我国其他感染性腹泻病暴发多以诺如病毒暴发疫情为主，尤其是2014年冬季以来，诺如病毒暴发疫情大幅增加，显著高于历年水平。

为进一步指导各级疾病预防控制机构、医疗机构和有关单位开展诺如病毒暴发疫情的发现、报告、调查、处置、预防和感染控制等相关工作，中国疾病预防控制中心组织专家制定了本指南，并将根据指南执行过程中反馈的问题和研究进展，定期对指南进行修订、完善。

## 一、病原学

1968年，美国诺瓦克镇一所小学发生急性胃肠炎暴发。1972年，Kapikian等科学家在此次暴发疫情的患者粪便中发现一种直径约27nm的病毒颗粒，将之命名为诺瓦克病毒(Norwalk virus)<sup>[3]</sup>。此后，世界各地陆续从急性胃肠炎患者粪便中分离出多种形态与之相似但抗原性略异的病毒颗粒，统称为诺瓦克样病毒(Norwalk-like viruses, NLVs)。由于此病毒呈圆形，无包膜，表面光滑，也称作小圆状结构病毒(small round structured viruses, SRSVs)。

1992年，诺瓦克病毒的全基因组序列被解析。此后根据基因组结构和系统发生特征，诺瓦克病毒归属于杯状病毒科(Caliciviridae family)<sup>[4]</sup>。2002年8月，第八届国际病毒命名委员会统一将诺瓦克样病毒改称为诺如病毒，并成为杯状病毒科的一个独立属——诺如病毒属(Norovirus)。

### (一) 病毒结构

诺如病毒为无包膜单股正链RNA病毒，病毒粒子直径约27-40nm，基因组全长约7.5-7.7kb，分为三个开放阅读框(Open Reading Frames, ORFs)，两端是5'和3'非翻译区(Untranslated region, UTR)，3'末端有多聚腺苷酸尾(PolyA)<sup>[4]</sup>。ORF1编码一个聚蛋白，翻译后被裂解为与复制相关的7个非结构蛋白(Non-structural polyprotein)，其中包括RNA依赖的RNA聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)。ORF2和ORF3分别编码主要结构蛋白(VP1)和次要结构蛋白(VP2)<sup>[5]</sup>。病毒衣壳由180个VP1和几个VP2分子构成，180个衣壳蛋白首先构成90个二聚体，然后形成二十面体对称的病毒粒子。根据蛋白在衣壳中的位置，每个衣壳蛋白可分为两个主要区域，分别为壳区(Shell domain, S区)和突出区(Protruding domain, P区)，二者之间是由8个氨基酸组成的铰链区(Hinge)连接。S区由衣壳蛋白的前225个氨基酸组成，形成病毒内壳，围绕病毒RNA。P区由剩余的氨基酸组成，进一步分为两个亚区P1区和P2区。P区通过二聚体相互作用增加衣壳稳定性并形成电镜下可见的病毒粒子突出端。P2区高度变异，包含潜在的抗原中和位点和受体组织血型抗原(histoblood group antigens, HBGAs)识别位点。VP2位于病毒粒子内部，被认为参与衣壳聚集<sup>[6]</sup>。

### (二) 基因分型

诺如病毒目前还不能体外培养，无法进行血清型分型鉴定。根据基因特征，诺如病毒被分为6个基因群(Genogroup, GI-GVI)，GI和GII是引起人类急性胃肠炎的两个主要基因群，GIV也可感染人，但很少被检出。GIII、GV和GVI分别感染牛、鼠和狗。根据衣壳蛋白区系统进化分析，GI和

GII 进一步分为 9 个和 22 个基因型，除 GII.11、GII.18 和 GII.19 基因型外，其他可感染人。GIV 分为两个基因型，GIV.1 感染人，GIV.2 感染猫和狗<sup>[7,8]</sup>。

### （三）病毒变异

诺如病毒变异速度快，每隔 2-3 年即可出现引起全球流行的新变异株。1995 年至今，已有 6 个 GII.4 基因型变异株与全球急性胃肠炎流行相关，包括 95/96 US 株（1996 年）、Farmington Hills 株（2002 年）、Hunter 株（2004 年）、Den Haag 株（2006 年）、New Orleans 株（2009 年）以及 Sydney 2012 株（2012 年）<sup>[9-12]</sup>。我国自 2014 年冬季以来，GII.17 变异株所致的暴发疫情大幅增加<sup>[13-15]</sup>。

### （四）理化特性

诺如病毒在氯化铯（CsCl）密度梯度中的浮力密度为 1.36-1.41g/cm<sup>3</sup>，在 0°C-60°C 的温度范围内可存活，且能耐受 pH2.7 的环境室温下 3 小时、20%乙醚 4°C 18 小时、普通饮用水中 3.75-6.25mg/L 的氯离子浓度（游离氯 0.5-1.0mg/L）。但使用 10 mg/L 的高浓度氯离子（处理污水采用的氯离子浓度）可灭活诺如病毒，酒精和免冲洗洗手液没有灭活效果。

### （五）免疫保护与宿主易感性

一项志愿者人体试验研究表明，诺如病毒的免疫保护力可持续 6-24 个月，即使先前感染过诺如病毒，同一个体仍可重复感染同一毒株或不同毒株的诺如病毒<sup>[16]</sup>。

部分人群即使暴露于大剂量诺如病毒仍不会感染，这可能与先天宿主因素和后天获得性免疫有关。组织血型抗原（HBGAs）包括 H 型、ABO 血型和 Lewis 抗原被认为是诺如病毒的可能受体。1,2-岩藻糖转移酶基因突变导致组织血型抗原缺乏表达者（非分泌型），可能不容易感染诺如病毒<sup>[17]</sup>。

### （六）病毒核酸排出规律

诺如病毒主要通过病人的粪便排出，也可通过呕吐物排出。病人在潜伏期即可排出诺如病毒，排毒高峰在发病后 2-5 天，持续约 2-3 周，最长排毒期有报道超过 56 天<sup>[18-21]</sup>，在免疫抑制病人中更长<sup>[22]</sup>。诺如病毒感染剂量为 18-2800 个病毒粒子<sup>[23-24]</sup>。

## 二、临床特征

### （一）潜伏期

诺如病毒的潜伏期相对较短，通常 12-48 小时。瑞典曾对一起食源性传播引起的涉及 30 家托幼机构和学龄儿童托管机构的暴发数据进行分析，潜伏期中位数为 34 小时（范围：2-61 小时）<sup>[25]</sup>。一篇系统综述总结了 GI 和 GII 基因群诺如病毒的潜伏期，其中位数分别为 1.1 天（95% CI：1.1-1.2 天）和 1.2 天（95% CI：1.1-1.2 天），不同基因群的潜伏期没有显著差异<sup>[26]</sup>。

### （二）轻症病例临床表现

诺如病毒感染发病以轻症为主，最常见症状是腹泻和呕吐，其次为恶心、腹痛、头痛、发热、畏寒和肌肉酸痛等<sup>[25,27-31]</sup>。有两项研究对不同年龄组病例的腹泻和呕吐症状进行比较<sup>[25,31]</sup>。其中一项研究发现成人中腹泻更常见（72% VS 52%），而儿童比成人更容易出现呕吐（81% VS 64%）<sup>[25]</sup>；而另一项研究显示，<1 岁婴幼儿（95%）和 ≥12 岁组（91%）出现腹泻的比例高于 1-4 岁（84%）和 5-11 岁组（74%），而 5-11 岁组出现呕吐的比例最高（95%），其次分别是 ≥12 岁组（82%）、1-4 岁（75%）和 <1 岁婴幼儿（59%）<sup>[31]</sup>。

诺如病毒感染病例的病程通常较短，症状持续时间平均为 2-3 天<sup>[25,27-30]</sup>，但高龄人群和伴有基础性疾病患者恢复较慢。研究结果显示，40% 的 85 岁以上老年人在发病 4 天后仍有症状<sup>[25]</sup>，免疫抑制病人平均病程为 7 天<sup>[32]</sup>。然而，荷兰一项基于社区的前瞻性随访研究对诺如病毒感染的自然史

进行了研究,发现病程中位数为5天,且年龄越小病程越长,其病程明显高于其他研究结果,可能与循环的诺如病毒毒株和研究设计不同有关。该研究还发现多数病例仅在病程第一天出现恶心、呕吐和发热,而腹泻持续时间较长<sup>[31]</sup>。

### (三) 重症临床表现和相关危险因素

尽管诺如病毒感染主要表现为自限性疾病,但少数病例仍会发展成重症,甚至死亡。一篇系统综述对843起诺如病毒暴发数据进行分析,住院和死亡病例的比例分别为0.54%和0.06%,并利用poisson回归模型分析住院、死亡与暴发环境(医疗机构或社区)、病毒株和传播途径的相关性,发现GII.4基因型诺如病毒引起的暴发中住院和死亡比例更高,而医疗机构暴发出现死亡的风险更高<sup>[33]</sup>。

重症或死亡病例通常发生于高龄老人和低龄儿童。1999-2007年,诺如病毒感染暴发与荷兰85岁以上老年人超额死亡显著相关,期间恰好出现了诺如病毒新变异株,此年龄组老年人中诺如病毒相关死亡占全死因的0.5%<sup>[34]</sup>。2001-2006年,在英格兰和威尔士≥65岁的人群中,诺如病毒感染占感染性肠道疾病所致死亡的20%(95%CI:13.3%-26.8%)<sup>[35]</sup>。2008-2009年,北欧地区82例社区获得性诺如病毒感染发病者(年龄中位数77岁)在一个月内死亡的比例高达7%<sup>[36]</sup>。而新生儿感染诺如病毒后,除出现与其他年龄组儿童同样的症状和体征外,还可能发生坏死性小肠结肠炎等严重并发症<sup>[37-40]</sup>,如有报道1998年1月费城一家医院的新生儿ICU中8名早产儿(平均胎龄28周)于出生后第5至38天内出现坏死性小肠结肠炎,其中2例死亡,6名早产儿的粪便标本中诺如病毒阳性<sup>[38]</sup>。新生儿坏死性小肠结肠炎主要累及小肠,但有一篇报道,3名早产新生儿仅出现结肠缺血,没有小肠病变<sup>[2]</sup>。

健康人感染诺如病毒后偶尔也会发展为重症。2002年5月13日至19日,驻阿富汗英国军人中诺如病毒暴发,29人患病,最先发病的3名患者不仅出现胃肠道症状及发热,同时还伴有头痛、颈强直、畏光以及反应迟钝,其中一名患者出现弥漫性血管内凝血,另两名患者需要呼吸机辅助支持<sup>[29]</sup>。

### (四) 隐性感染

根据已有文献报道,隐性感染的研究设计包括志愿者人体试验<sup>[41]</sup>、横断面调查<sup>[42-49]</sup>和随访研究<sup>[50,51]</sup>。50名志愿者人体试验中,41人(82%)感染了诺如病毒,其中32%表现为无症状感染<sup>[41]</sup>。

几项横断面调查对5岁以下儿童的隐性感染比例进行研究,研究对象主要来自社区中抽取的健康儿童<sup>[42-45]</sup>,少数研究选自在医院就诊的无胃肠炎表现的患病儿童<sup>[46,47]</sup>。研究结果显示隐性感染比例相差较大:英国一项大型研究(2205人)<sup>[42]</sup>和布基纳法索研究<sup>[43]</sup>发现隐性感染比例超过24%,尼加拉瓜、法国等研究在8%-11.7%<sup>[1,44,45]</sup>,而我国和越南的研究仅为2.7-2.8%<sup>[46-47]</sup>。但健康儿童和非急性胃肠炎患病儿童的隐性感染比例没有明显差异。研究结果差异较大可能与研究时间不同等因素有关。有研究显示,诺如病毒流行季节的隐性感染比例明显高于非流行季节<sup>[42]</sup>。少数几项研究对5岁以上人群的隐性感染比例进行调查,结果在1.0-12%<sup>[1,42,48,49]</sup>,其中有两项专门针对食品从业人员的调查,其隐性感染比例为1.0-3.7%<sup>[48,49]</sup>。

巴西于2009年10月-2011年10月期间对一所托幼机构进行了两年随访,期间诺如病毒隐性感染比例为37.5%<sup>[50]</sup>,而墨西哥的一项研究对6-22月龄的儿童随访三个月,49.2%的儿童出现了隐性感染<sup>[51]</sup>。

### 三、流行病学特征

#### (一) 疾病负担

诺如病毒疾病负担主要有三种估计方法：①通过建立基于人群和基于病原监测的全国性监测系统或有代表性的哨点监测系统，直接计算诺如病毒每年引起的病例数、住院数、重症数和死亡数等指标；②根据急性胃肠炎的整体疾病负担和不同严重程度急性胃肠炎的病原构成，外推诺如病毒感染急性胃肠炎的疾病负担；③利用回归模型进行估计<sup>[52]</sup>。目前，直接而准确评估诺如病毒疾病负担还存在较大困难，主要原因在于：①全球绝大多数国家没有基于诺如病毒个案病例的全国性监测系统；②没有适用于临床的敏感快速的检测方法；③多数急性胃肠炎病人没有就医，且就医病例中仅少量病人采集了标本进行病原检测。

尽管如此，近些年来，诺如病毒引发的重要公共卫生问题已越来越受到国际科学界的关注。基于对急性胃肠炎就诊患者中病原构成的认识和对暴发疫情的分析，可间接反映诺如病毒的严重疾病负担。例如，2014年发表的一项系统综述和Meta分析，纳入了48个国家报道的175篇文献，结果发现1/5的急性胃肠炎病例是由诺如病毒感染引起，在社区病例、门诊和住院病例中所占比例分别是24%、20%和17%<sup>[1]</sup>。我国的研究也发现，儿科门诊和住院病人中诺如病毒感染的比例与全球水平相似（26%）<sup>[53]</sup>。诺如病毒也是急性胃肠炎暴发疫情的主要病原体。美国和欧洲50%以上的急性胃肠炎暴发由诺如病毒所致（范围：36%–59%）<sup>[54]</sup>。2012年以来，诺如病毒已成为我国其他感染性腹泻病暴发的优势病原体（60%–96%），尤其自2014年冬季起，诺如病毒感染暴发疫情大幅增加，2015年1月1日–11月15日通过突发公共卫生事件管理系统已报告88起，显著高于历年水平，主要发生在中、小学校。

现阶段，仅有少量文献测算了诺如病毒感染每年引起的病例数、住院数和死亡数等疾病负担指标。世界卫生组织估计全球每年因诺如病毒感染死亡的人数约3.5万人<sup>[55]</sup>。美国每年约有1900–2100万诺如病毒胃肠炎病例，其中170–190万病例医院门诊就诊，40万急诊就诊，5.6–7.1万住院治疗，570–800人死亡<sup>[52]</sup>。英国于2008年4月至2009年10月开展了一项基于社区的队列研究，诺如病毒急性胃肠炎的发病率为47/1000人年，就诊率为2.1/1000人年，相当于每年300万病例和13万次全科医生就诊<sup>[56]</sup>。我国至今尚未有关于诺如病毒疾病负担的相关报道。

#### (二) 传播途径

诺如病毒传播途径包括人传人、经食物和经水传播<sup>[54]</sup>。人传人可通过粪口途径（包括摄入粪便或呕吐物产生的气溶胶）、或间接接触被排泄物污染的环境而传播。食源性传播是通过食用被诺如病毒污染的食物进行传播，污染环节可出现在感染诺如病毒的餐饮从业人员在备餐和供餐中污染食物，也可出现食物在生产、运输和分发过程中被含有诺如病毒的人类排泄物或其它物质（如水等）所污染。牡蛎等贝类海产品和生食的蔬果类是引起暴发的常见食品。经水传播可由桶装水、市政供水、井水等其他饮用水源被污染所致。一起暴发中可能存在多种传播途径。例如，食物暴露引起的点源暴发常会导致在一个机构或社区内出现续发的人与人之间传播。

#### (三) 季节性

诺如病毒具有明显的季节性，人们常把它称为“冬季呕吐病”。根据2013年发表的系统综述，全球52.7%的病例和41.2%的暴发发生在冬季（北半球是12月–次年2月，南半球是6–8月），78.9%的病例和71.0%的暴发出现在凉爽的季节（北半球是10月–次年3月，南半球是4–9月）<sup>[57]</sup>。

#### 四、病例定义

##### (一) 疑似病例

即急性胃肠炎病例，定义为 24 小时内出现排便 $\geq 3$  次且有性状改变（呈稀水样便），和/或 24 小时内出现呕吐 $\geq 2$  次者<sup>[30]</sup>。

##### (二) 临床诊断病例

在诺如病毒感染引起的聚集性或暴发疫情中，满足疑似病例定义，且与实验室诊断病例有流行病学关联的病例。

##### (三) 实验室诊断病例

疑似病例或临床诊断病例中，粪便、肛拭子或呕吐物标本经诺如病毒核酸检测阳性，或 ELISA 抗原检测阳性者。

#### 五、聚集性疫情和暴发判定标准

(一) 聚集性疫情：3 天内，同一学校、托幼机构、医疗机构、养老院、工厂、建筑工地、游轮、社区/村庄等集体单位或场所，发生 5 例及以上有流行病学关联的诺如病毒感染病例，其中至少 2 例是实验室诊断病例。

(二) 暴发：7 天内，同一学校、托幼机构、医疗机构、养老院、工厂、建筑工地、游轮、社区/村庄等集体单位或场所，发生 20 例及以上有流行病学关联的诺如病毒感染病例，其中至少 2 例是实验室诊断病例。

(三) 如不具备诺如病毒实验室检测能力，或在疫情发现早期，若符合以下卡普兰标准（Kaplan Criteria）的 4 项特征，可判定为疑似诺如病毒感染聚集性疫情或暴发：①一半以上患者出现呕吐症状；②平均潜伏期 24-48 小时；③平均病程 12-60 小时；④排除细菌、寄生虫及其他病原感染。卡普兰标准识别诺如病毒暴发的灵敏度为 68%，特异度 99%<sup>[58]</sup>。

#### 六、疫情发现、核实与报告

(一) 学校、托幼机构、医疗机构、养老院、工厂、建筑工地、游轮等集体单位或场所发现急性胃肠炎聚集性疫情或暴发，应立即以电话或传真的方式向属地县/区级疾病预防控制中心报告。

(二) 属地疾病预防控制中心接到疫情报告后应及时开展调查，根据疫情流行病学、病例临床表现及实验室检测结果等对疫情进行核实。

(三) 凡实验室确诊的诺如病毒感染暴发事件，应严格根据病例定义统计病例数，包括以呕吐症状为主的病例。符合《国家突发公共卫生事件相关信息报告管理工作规范（试行）》报告标准的诺如病毒感染暴发，属地疾病预防控制中心应通过突发公共卫生事件管理信息系统进行相关信息的报告。

#### 七、疫情调查

聚集性疫情和暴发疫情的调查流程、调查内容相同，主要包括疫情发生机构基本情况调查、现场流行病学调查、卫生学调查和疫情终止评估，调查中涉及的标本采集和实验室检测见“八、实验室检测”。

##### (一) 基本情况

调查内容包括：①疫情发生机构名称、类型（小学、中学等）、详细地址和定位信息（GPS 经纬度）；②人员分布情况，疫情波及人数；③疫情发生机构内部平面图，重点关注如教学楼、宿舍、食堂、卫生间的地理位置和供水线路分布等；④供餐和饮用水信息：集体餐饮供应模式（食堂、外

卖、周围商业餐馆等)、生活用水和饮用水供应来源和消毒情况;⑤其他相关信息:近期天气异常(如长期暴雨)或灾害(如内涝)情况,其它可能影响疫情的特殊情况(如群体性活动、水电故障)等。

## (二) 流行病学调查

### 1. 核实诊断

疾病预防控制中心现场调查组抵达现场后,应核实发病情况、开展访谈和采集病例标本等。

(1)核实发病情况。了解病例主要临床特征、诊治情况,查阅病历记录和临床检验报告等,摘录和复制相关资料。

(2)开展病例和关键人物访谈。病例访谈对象首选首发病例、指示病例、重症病例、住院病例、发病的食品从业人员、护理人员和教职工等。访谈内容主要包括人口统计学信息、发病和就诊情况以及发病前的暴露史等,访谈提纲可参考附件 1。关键人物访谈对象和访谈提纲根据疫情实际情况而定。

(3)采集病例标本。调查员到达现场后应尽快采集病例标本,标本采集要求见第八部分。

### 2. 制定病例定义、开展病例搜索

参考上述病例定义制定疫情调查的病例定义。采用一览表收集病例信息(见附件 2),根据病例定义对搜索到的病例进行核实。可参考以下方法搜索病例:

(1)怀疑因聚餐引起的疫情,收集参加聚餐人员名单,通过电话调查或面对面调查等方式搜索全部病例。

(2)对发生在学校、托幼机构或其他集体单位的疫情,可通过收集缺勤记录、晨检和校医(厂医)记录等,搜索可能发病的人员。

(3)涉及范围较小或病例居住地相对集中的疫情,或有死亡或重症病例发生时,可入户搜索。

(4)涉及范围较大,或病例人数较多时,应建议卫生行政部门组织医疗机构查阅门诊就诊日志、出入院登记等,搜索并报告符合病例定义者。

### 3. 个案调查

参考附件 3,并根据疫情需要自行修改个案调查表,对病例逐一进行调查。也可将个案调查与病例搜索相结合,如采用此方式,应在附件 2 自行增加暴露史收集信息。调查方式可根据病例的文化水平及配合程度,选择面访、电话调查或自填式问卷调查等。

调查内容应包括人口统计学信息、发病和诊疗情况、暴露史等。暴露史信息主要关注发病前 3 天的暴露情况:①饮食史:各餐次进食时间、地点、品种及进食量,正常餐次外的进食情况等;②饮水史:饮水类型(市政供水、自备井水、桶装水、瓶装水等)、饮水习惯(生水、开水等)、饮用时间、地点和饮水量等;③与类似病例的接触史:接触时间、时长、接触地点和方式等;④其他暴露:参加的集体活动、医疗机构暴露史等。

### 4. 描述性分析

个案调查结束后,应快速建立数据库,及时录入收集的信息资料,按以下但不限于以下内容进行描述性流行病学分析:①描述病例中出现各种症状和体征、住院、死亡等指标的人数和比例,分析病例的临床特征和疫情严重程度;②绘制流行曲线,描述病例的时间分布和推断可能的暴露时间和方式;③利用上述收集的疫情发生机构平面图,可绘制标点地图或面积地图,描述病例的地区分布;④按性别、年龄(学校或托幼机构常用年级代替年龄)、职业等人群特征进行分组,以及考虑



饮食饮水可能存在差异的相关特征（住校和走读，白班和夜班等）进行分组，分析各组人群的罹患率是否存在统计学差异，以推断高危人群，并比较有统计学差异的各组人群在暴露史方面的异同，以寻找病因线索。

#### 5. 提出病因假设

根据上述描述性分析和访谈结果，提出病因假设，常见假设为食源性传播、水源性传播或人传人，也可能同时存在多种传播途径。各种传播途径的疫情特点如下：

(1) 食源性传播：污染食物一次性供应常出现点源暴发，持续供应时则呈现持续同源暴发模式。疫情早期大部分病例具有相同食物暴露史或共同进餐史，病例分布与污染食物的供应范围一致。停止污染食物供应后疫情即明显下降或停止。

(2) 水源性传播：疫情早期病例空间分布与污染源供应范围或水源管网分布一致，可出现点源暴发或持续同源暴发。病例出现前可能存在造成水污染的相关因素，如水管破损、维修，降雨量增加等。水源性因素解除后疫情明显下降或停止。

(3) 人与人传播：病例迁延不断，流行曲线呈增殖模式，可能出现班级聚集性、宿舍聚集性等。

#### 6. 分析性研究

为验证病因假设，进一步查明暴发疫情传播途径及危险因素，可根据实际情况开展分析性研究，通常采用病例对照或回顾性队列研究。在难以调查全部病例或暴露人群不确定时，适合开展病例对照研究；如暴露人群容易界定（电子就餐打卡记录等）且人群数量较少时，适合开展队列研究。

### （三）卫生学调查

根据前期流行病学调查，获得具有一定指向性的危险因素后，及时开展卫生学调查，进一步调查食品或水的污染源、污染环节、导致疫情传播的危险因素，进一步验证现场流行病学调查结果，为采取预防控制措施提供依据。调查方法可包括访谈相关人员、查阅记录、现场勘察、采集样本检测等，调查内容因不同病因假设而异，具体如下：

1. 食源性：① 疫情发生机构内供食堂和商业性餐馆日常运作管理模式、食堂数量和布局、供应餐次和食谱、供应范围、食品从业人员岗位、资质和数量等；② 外卖供餐单位的供应链条及其他用餐单位病例出现情况；③ 供餐环境卫生和餐具消毒情况；④ 高风险食品的备餐流程，包括原材料、配方、加工用水、加工过程、保存条件、运输和销售等，高风险食品主要包括贝类（蛤、牡蛎、贻贝等）、沙拉、凉菜、面包/糕点等；⑤ 加工过程是否可能存在交叉污染；⑥ 食品从业人员近一个月来是否有急性胃肠炎史和备餐中的个人卫生情况；⑦ 根据疫情需要和前期调查结果，尽早采集相关食品、环境样品及食品从业人员的标本进行诺如病毒核酸检测。

2. 水源性：① 调查生活饮用水的来源（包括市政自来水、小型集中供水、河水、井水、桶装水（品牌名）、直饮水等）、供应范围和频次等，如有二次供水，调查二次供水的方法、频次等；② 水生产工艺和制水流程、消毒过程、水质监测结果；③ 病例分布与供水分布的关系等；④ 水厂工作人员健康情况和人员更换情况；⑤ 近期水管网破损、维修情况；⑥ 同一来源水源供水的其他单位病例发病情况；⑦ 根据疫情需要和前期调查结果，采集可疑污染水样本进行诺如病毒核酸检测。

3. 人传人：① 场所被病例粪便、呕吐物污染情况，直接接触排泄物的人员、或在排泄物附近活动人员的发病情况；② 教室、宿舍、食堂、厕所等场所及周边环境通风和清洁卫生现况，洗手液或肥皂、洗手设施等配备及使用情况；③ 近期是否有大型集体活动，病例在班级、车间、宿舍等场所的活动情况；④ 污染场所清洁消毒情况（包括清洁消毒范围、频次，污染物处理方式，是否专人进

行及其培训情况)等;⑤病例的手卫生习惯;⑥病例发病后隔离治疗情况;⑦个人防护:重点调查清洁人员在处理排泄物过程中是否有防护(戴口罩、手套等),清洁用品是否经常进行消毒;护理人员(养老院、孤儿院、医院等)在护理过程中是否使用基本防护用品(如口罩、手套等),及非即弃型防护用品的清洁消毒情况等。

#### (四) 疫情终止评估

组织专家组对暴发疫情及时开展分析研判,评估疫情是否终止。判定疫情终止条件为:①传播危险因素得到有效控制,如停止供应污染源或食品;②自最后一例病例隔离起72小时后未再发现新的诺如病毒感染病例,或者疫情发生机构的急性胃肠炎病例数降至往年同期基线水平。

### 八、实验室检测

#### (一) 标本采集

多种病原体可引起急性胃肠炎聚集性或暴发疫情,应充分考虑不同病原体检测对标本采集和保存的特殊要求。因此对同一采集对象,应按照细菌、病毒、寄生虫等不同要求,采集、分装和保存多份标本,以备必要时做其他病原体检测、复核实验结果或进一步鉴定。采样时需填写标本信息登记表(见附件4)。

##### 1. 标本类型

###### (1) 粪便

诺如病毒检测首选粪便标本。每份标本5g或5mL以上,直接放置于清洁、无菌、干燥的密闭容器内。容器内不可加入任何保护剂、培养基、去污剂或金属离子,不可稀释。

###### (2) 肛拭子

肛拭子标本不能长期保存,且检出率低于粪便标本。肛拭子含粪便量很低时,如检测结果呈弱阳性,结果容易被误判,导致假阴性。采集时需注意肛拭子上应有可见的粪便,放入无菌带盖密闭采样管。采样管中应有2mL无菌PBS缓冲液或Hank's液,液体需没过肛拭子棉签部分,并尽快检验。

###### (3) 呕吐物

呕吐物每份标本采集5g或5mL以上,直接放置于清洁、无菌、干燥的密闭容器内。容器内不可加入任何保护剂、培养基、去污剂或金属离子,不可稀释。

###### (4) 水

目前没有水样品采集量的权威规定。怀疑水源性暴发时,建议尽量采集1升以上的水样品。桶装水、瓶装水等直接采集原包装,自来水需要以无菌容器采集。采用膜过滤法浓缩后检验,有助于提高检出率。

###### (5) 食品

由于食品成分复杂、病毒含量不高,从食品样品中提取诺如病毒RNA的回收率受限。本指南仅提供海产品、草莓、蓝莓和部分蔬菜的参考方法。推荐采集牡蛎、海虹至少10个,三文鱼200克,扇贝、毛蚶、文蛤等250克,草莓、蓝莓250克,生菜和芽苗菜等500克。食品样品应置于无菌容器中,立即4℃冷藏,当天运至实验室进行检验。

###### (6) 环境涂抹样

根据疫情调查需要采集疫情发生机构相关场所如厨房、厕所、门把手、玩具等环境涂抹样品。可用无菌拭子在无菌PBS里蘸湿,用力涂抹待采表面(最大面积100cm<sup>2</sup>)后,立即浸入核酸提取试

剂盒裂解缓冲液中（QIAamp 试剂盒 560μL，Genaid 试剂盒 400μL）。

## 2. 标本采集对象

### (1) 病例

采集病例发病 2-5 天内的粪便、带便肛拭子或呕吐物标本。若病例在 10 例以下，全部采集；病例在 10 例以上，至少采集 10 例病例的标本。根据初步流行病学调查结果，尽量采集重点病例（如首发病例、指示病例、住院病例、发病的食品从业人员、重点岗位的病例等）的标本。

### (2) 重点人群

根据疫情调查需要，可采集食品从业人员、护理员等工作人员的粪便、带便肛拭子标本。重点采集近期出现过胃肠不适症状、直接接触食品的食品从业人员、直接接触早期病例的护理人员等。

## 3. 标本保存和运输

标本在 4℃ 冰箱可暂存 12 小时，之后标本应放置 -20℃ 以下冷冻保存，需长期保存的标本应储存在 -70℃ 冰箱，避免反复冻融。依据《人间传染的病原微生物名录》，含诺如病毒的标本属于 B 类包装分类，需按照 UN3373 规定进行包装和手续申报，并在冷藏或冷冻条件下运送。通常对于短途运输（1 天以内），包装盒内放冰袋或冰排，长途运输（1-2 天）需用干冰。但无论短途或长途运输，均需保证冻存标本在运输过程没有出现融化。标本送达实验室时应包装完整，包装盒内应有未融化的冰。在运输中应避免强烈震动、重力挤压等现象。标本保存和运送的条件应有详细记录。

## (二) 标本检测

为避免实验室污染，食品、水、环境样品与病人标本不能在同一实验室检测，必须分别在独立的空间进行样品处理和检验。

### 1. 核酸检测和基因型鉴定

完整的检测流程应包括以下 6 个步骤，见图 1。

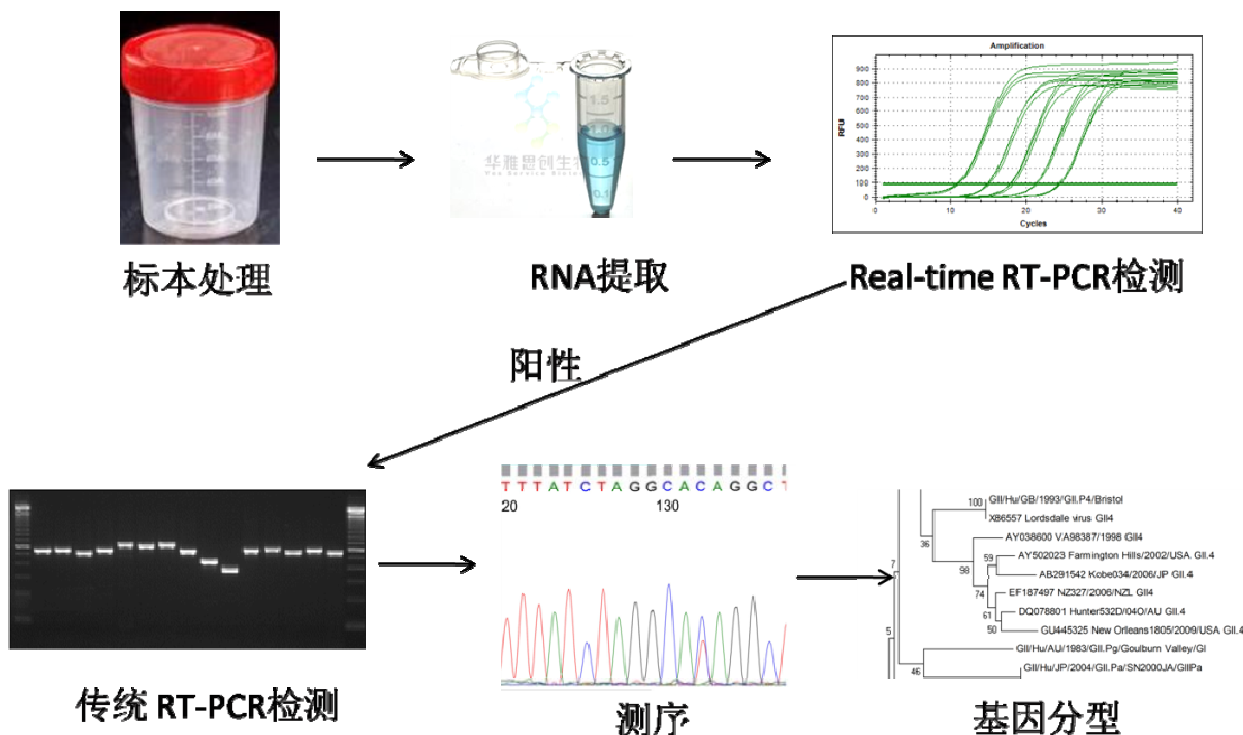


图 1 诺如病毒核酸检测和基因型鉴定流程图

### (1) Real-time RT-PCR

ORF1/ORF2 区是诺如病毒基因组中最保守的区域,在同一基因型不同毒株间有相同的保守序列,根据这段保守区域可用于设计 TaqMan 为基础的 Real-time RT-PCR 的引物和探针。除可检测病例临床标本中的诺如病毒 RNA 外,引物和探针经优化提高灵敏度后,还可用于环境样本(如食物和水)的检测。Real-time RT-PCR 的敏感性高于传统 RT-PCR,可检测诺如病毒 G I 群和 G II 群。

### (2) 传统 RT-PCR

采用传统 RT-PCR 对 Real-time RT-PCR 阳性标本的 PCR 产物进行测序,通过序列分析确定诺如病毒的基因型。测定 ORF2 完整衣壳蛋白基因序列,是诺如病毒基因分型的金标准。基因组中四种不同的区域(Region A-D)均可用于诺如病毒基因分型,基于衣壳蛋白区 Region C 和 D 两区域分型效果更好。但对于 GII.4 变异株的进一步分型,仅根据 Region C 序列不足以区别,需进一步扩增 Region D。

## 2. 抗原检测

由于诺如病毒抗原高度变异(基因型超过 29 个)且某些基因型存在抗原漂移(如 GII.4 型),开发广泛反应的 ELISA 方法存在较大挑战。虽然目前已有商品化的试剂盒如 IDEIA (Oxioid,英国)、SRSV(II)-AD (Denka Seiken,日本)以及 RIDASCREEN (r-Biopharm AG,德国),但其敏感性(36%-80%)和特异性(47%-100%)均不太理想。即使已通过美国 FDA 认证的 RIDASCREEN 诺如病毒第三代 ELISA 试剂盒,也没有在美国广泛应用。ELISA 可适用于暴发疫情中大量样本的筛查,但不适合散发病例的检测。ELISA 检测结果阴性的样本还需要通过 Real-time RT-PCR 进行第二次检验确认。鉴于 ELISA 试剂盒成本高、敏感性低,ELISA 方法仅可作为辅助检测手段。标本处理、核酸提取和检测、测序和基因定型,抗原检测的操作方法和要求见附件 5。

## 九、预防控制措施

目前,针对诺如病毒尚无特异的抗病毒药和疫苗,其预防控制主要采用非药物性预防措施,包括病例管理、手卫生、环境消毒、食品和水安全管理、风险评估和健康教育。这些措施既适用于聚集性和暴发疫情的处置,也适用于散发病例的预防控制。

### (一) 病例管理

鉴于诺如病毒的高度传染性,对诺如病毒感染人员进行规范管理是阻断传播和减少环境污染的有效控制手段。原则如下:

1. 病例:在其急性期至症状完全消失后 72 小时应进行隔离。轻症患者可居家或在疫情发生机构就地隔离;症状重者需送医疗机构按肠道传染病进行隔离治疗,医疗机构应做好感染控制,防止院内传播。
2. 隐性感染者:建议自诺如病毒核酸检测阳性后 72 小时内进行居家隔离。
3. 从事食品操作岗位的病例及隐性感染者:诺如病毒排毒时间较长,尽管病例症状消失 72 小时后,或隐性感染者自核酸检测阳性算起 72 小时后的病毒排出载量明显下降,但仍可能存在传播的风险。为慎重起见,建议对食品从业人员采取更为严格的病例管理策略,需连续 2 天粪便或肛拭子诺如病毒核酸检测阴性后方可上岗。

### (二) 手卫生

保持良好的手卫生是预防诺如病毒感染和控制传播最重要最有效的措施。应按照《消毒技术规范(2002 年版)》<sup>[60]</sup>中的 6 步洗手法正确洗手,采用肥皂和流动水至少洗 20 秒。需要注意的是,消毒

纸巾和免冲洗的手消毒液不能代替标准洗手程序，各集体单位或机构应配置足够数量的洗手设施（肥皂、水龙头等），要求相关人员勤洗手。此外，还需注意不要徒手直接接触即食食品。

### （三）环境消毒

环境消毒的总体原则如下，具体消毒方法见附件 6。

1. 学校、托幼机构、养老机构等集体单位和医疗机构应建立日常环境清洁消毒制度。
2. 化学消毒剂是阻断诺如病毒通过被污染的环境或物品表面进行传播的主要方法之一，最常用的是含氯消毒剂，按产品说明书现用现配。
3. 发生诺如病毒感染聚集性或暴发疫情时，应做好消毒工作，重点对患者呕吐物、排泄物等污染物污染的环境物体表面、生活用品、食品加工工具、生活饮用水等进行消毒。
4. 患者尽量使用专用厕所或者专用便器。患者呕吐物含有大量病毒，如不及时处理或处理不当很容易造成传播，当病人在教室、病房或集体宿舍等人群密集场所发生呕吐，应立即向相对清洁的方向疏散人员，并按附件 6 的方法对呕吐物进行消毒处理。
5. 实施消毒和清洁前，需先疏散无关人员。在消毒和清洁过程应尽量避免产生气溶胶或扬尘。环境清洁消毒人员应按标准预防措施佩戴个人防护用品，注意手卫生，同时根据化学消毒剂的性质做好化学品的有关防护。

### （四）食品安全管理

加强对食品从业人员的健康管理，急性胃肠炎患者或隐性感染者须向本单位食品安全管理人员报告，应暂时调离岗位并隔离；对食堂餐具、设施设备、生产加工场所环境进行彻底清洁消毒；对高风险食品（如贝类）应深度加工，保证彻底煮熟；备餐各个环节应避免交叉污染。

### （五）水安全管理

暂停使用被污染的水源或二次供水设施，通过适当增加投氯量等方式进行消毒；暂停使用出现污染的桶装水、直饮水，并立即对桶装水机、直饮水机进行消毒处理；经卫生学评价合格后方可启用相关饮用水。

集体单位须加强二次供水监管和卫生学监测，禁止私自使用未经严格消毒的井水、河水等作为生活用水，购买商品化饮用水须查验供水厂家的资质和产品合格证书。农村地区应加强人畜粪便、病例排泄物管理，避免污染水源。

### （六）风险评估

疾病预防控制机构需根据疫情的规模和传播危险因素、控制措施落实情况等，实时开展疫情发展趋势研判和风险评估，提出针对性的控制措施建议。

### （七）健康教育

疫情流行季节，各级政府及其卫生、教育、宣传、广电等部门应高度重视、密切合作，充分利用 12320 热线、广播、电视、报纸、网络、手机短信、宣传单/宣传栏等多种方式，开展诺如病毒感染防控知识的宣传，提高社区群众防控意识，养成勤洗手、不喝生水、生熟食物分开、避免交叉污染等健康生活习惯。

## 十、附件

- 1、诺如病毒感染聚集性和暴发疫情病例访谈提纲
- 2、诺如病毒感染聚集性和暴发疫情调查病例一览表
- 3、诺如病毒感染聚集性和暴发疫情个案调查表

- 4、诺如病毒感染聚集性和暴发疫情标本采集登记表
- 5、诺如病毒标本处理及诺如病毒检测技术方案
- 6、诺如病毒消毒方法

## 参考文献

- [1] Ahmed SM et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2014,14(8): 725-30.
- [2] Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. 2015. Norovirus. *Clin Microbiol Rev* 28:134–164. doi:10.1128/CMR.00075-14.
- [3] Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electronmicroscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*.1972,10:1075-81.
- [4] Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genomecloning and characterization. *Science (New York, NY)* 1990, 250:1580–1583.
- [5] Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 30end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: A novel function for the VP2 protein. *J Virol*2003,77:11603–11615.
- [6] Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 1999, 286:287-290.
- [7] Mesquita JR, Barclay L, Nascimento MS & Vinje J. Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2010,16:980-2.
- [8] Zheng DP, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006, 346:312-23.
- [9] Lopman B, Vennema H, Kohli E, et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant[J]. *Lancet*,2004,363(9410):682-688.
- [10] Bull R A, Tu E T, Mciver C J, et al. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis[J]. *J Clin Microbiol*,2006,44(2):327-333.
- [11] Eden J S, Bull R A, Tu E, et al. Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008[J]. *J Clin Virol*,2010,49(4):265-271.
- [12] Yen C, Wiksw M E, Lopman B A, et al. Impact of an emergent norovirus variant in 2009 on norovirus outbreak activity in the United States[J]. *Clin Infect Dis*,2011,53(6):568-571.
- [13] Lu J et al. Gastroenteritis Outbreaks Caused by Norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014-2015. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(7): 1240-2.
- [14] Fu J, Ai J, Jin M, Jiang C, Zhang J, Shi C, Lin Q, Yuan Z, Qi X, Bao C, Tang F, Zhu Y. Emergence of a new GII.17 norovirus variant in patients with acute gastroenteritis in Jiangsu, China, September 2014 to March 2015. *Euro Surveill*. 2015 Jun 18;20(24). pii: 21157.
- [15] Han J, Ji L, Shen Y, Wu X, Xu D, Chen L. Emergence and predominance of norovirus GII.17 in Huzhou, China, 2014-2015. *Virol J*. 2015 Sep 11;12(1):139.
- [16] Parrino TA, Schreiber D, Trier J, Kapikian A, Blacklow N. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med*. 1977.297:86–9.
- [17] Le Pendu J, Ruvo N, Kindberg E, Svensson L. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin Immunol*. 2006.18:375–86.

- [18] Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1553-7.
- [19] Kirby AE, Shi J, Montes J, Lichtenstein M, Moe CL. Disease course and viral shedding in experimental Norwalk virus and Snow Mountain virus infection. *J Med Virol*. 2014 Dec;86(12):2055-64. doi: 10.1002/jmv.23905. Epub 2014 Feb 14.
- [20] Teunis PF1, Sukhrie FH2, Vennema H2, Bogerman J3, Beersma MF3, Koopmans MP3. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. *Epidemiol Infect*. 2015 Jun;143(8):1710-7. doi: 10.1017/S095026881400274X. Epub 2014 Oct 22.
- [21] Aoki Y, Suto A, Mizuta K, Ahiko T, Osaka K, Matsuzaki Y. Duration of norovirus excretion and the longitudinal course of viral load in norovirus-infected elderly patients. *J Hosp Infect*. 2010 May;75(1):42-6.
- [22] Atmar J, Mullen E. Norovirus in immunocompromised patients. *Oncol Nurs Forum*. 2013 Sep;40(5):434-6.
- [23] Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, Calderon RL. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol*. 2008 Aug;80(8):1468-76. doi: 10.1002/jmv.21237.
- [24] Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Ramani S, Hill H, Ferreira J, Graham DY. Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *J Infect Dis*. 2014 Apr 1;209(7):1016-22. doi: 10.1093/infdis/jit620. Epub 2013 Nov 18.
- [25] Gotz H, Ekdahl K, Lindback J, de Jong B, Hedlund KO, Giesecke J. Clinical spectrum and transmission characteristics of infection with Norwalk-like virus: findings from a large community outbreak in Sweden. *Clin Infect Dis* 2001;33:622-628.
- [26] Lee RM, Lessler J, Lee RA, Rudolph KE, Reich NG, Perl TM, Cummings DA. Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2013;13:446.
- [27] Tseng CY, Chen CH, Su SC, Wu FT, Chen CC, Hsieh GY, Hung CH, Fung CP. Characteristics of norovirus gastroenteritis outbreaks in a psychiatric centre. *Epidemiol Infect* 2011;139:275-285.
- [28] Arness MK, Feighner BH, Canham ML, Taylor DN, Monroe SS, Cieslak TJ, Hoedebecke EL, Polyak CS, Cuthie JC, Fankhauser RL, Humphrey CD, Barker TL, Jenkins CD, Skillman DR. Norwalk-like viral gastroenteritis outbreak in U.S. Army trainees. *Emerg Infect Dis* 2006;12:204-207.
- [29] Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of acute gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses among British military personnel—Afghanistan, May 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:477-479.
- [30] Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis* 2004;39:318-324.
- [31] Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, Koopmans M. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis*. 2002 Aug 1;35(3):246-53. Epub 2002 Jul 10.
- [32] Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, Loddenkemper C, Reinwald M, Schmidt-Hieber M, Flegel WA, Thiel E, Schneider T. 2011. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 117:5850-5856. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-12-325886>.
- [33] Desai R, Hembree CD, Handel A, Matthews JE, Dickey BW, McDonald S, Hall AJ, Parashar UD, Leon JS, Lopman B. Severe outcomes are associated with genogroup 2 genotype 4 norovirus outbreaks: a systematic literature review. *Clin Infect Dis* 2012;55:189-193.
- [34] van Asten L, van den Wijngaard C, van Pelt W, van de Kastelee J, Meijer A, van der Hoek W, Kretzschmar M, Koopmans M. Mortality attributable to 9 common infections: significant effect of influenza A, respiratory syncytial virus, influenza B, norovirus, and parainfluenza in elderly persons. *J Infect Dis* 2012;206:628-639.

- [35] Harris JP, Edmunds WJ, Pebody R, Brown DW, Lopman BA. Deaths from norovirus among the elderly, England and Wales. *Emerg Infect Dis* 2008,14:1546–1552.
- [36] Gustavsson L, Andersson LM, Brink M, Lindh M, Westin J. Venous lactate levels can be used to identify patients with poor outcome following community-onset norovirus enteritis. *Scand J Infect Dis* 2012,44:782–787.
- [37] Stuart RL, Tan K, Mahar JE, Kirkwood CD, Andrew Ramsden C, Andrianopoulos N, Jolley D, Bawden K, Doherty R, Kotsanas D, Bradford J, Buttery JP. An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with norovirus genotype GII.3. *Pediatr Infect Dis J* 2010,29:644–647.
- [38] Turcios-Ruiz RM, Axelrod P, St John K, Bullitt E, Donahue J, Robinson N, Friss HE. Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr* 2008,153:339–344.
- [39] Bagci S, Eis-Hubinger AM, Yassin AF, Simon A, Bartmann P, Franz AR, Mueller A. 2010. Clinical characteristics of viral intestinal infection in preterm and term neonates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29:1079–1084. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-010-0965-4>.
- [40] Pelizzo G, Nakib G, Goruppi I, Fusillo M, Scorletti F, Mencherini S, Parigi GB, Stronati M, Calcaterra V. 2013. Isolated colon ischemia with norovirus infection in preterm babies: a case series. *J Med Case Rep* 7:108. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-1947-7-108>.
- [41] Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis*. 1994 Jul;170(1):34-43.
- [42] Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, Lopman B. Prevalence and characteristics of asymptomatic norovirus infection in the community in England. *Epidemiology and Infection* 2010, 138(10): 1454-8.
- [43] Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, et al. Asymptomatic norovirus infections in Nicaraguan children and its association with viral properties and histo-blood group antigens. *The Pediatric infectious disease journal* 2010, 29(10): 934-9.
- [44] Qi R, Ye C, Chen C, Yao P, Hu F, Lin Q. Norovirus prevention and the prevalence of asymptomatic norovirus infection in kindergartens and primary schools in Changzhou, China: Status of the knowledge, attitudes, behaviors, and requirements. *Am J Infect Control*. 2015 Aug;43(8):833-8. doi: 10.1016/j.ajic.2015.04.182. Epub 2015 May 28.
- [45] My PV, Thompson C, Phuc HL, Tuyet PT, Vinh H, Hoang NV, Minh PV, Vinh NT, Thuy CT, Nga TT, Hau NT, Campbell J, Chinh NT, Thuong TC, Tuan HM, Farrar J, Baker S. Endemic norovirus infections in children, Ho Chi Minh City, Vietnam, 2009-2010. *Emerg Infect Dis*. 2013 Jun;19(6):977-80. doi: 10.3201/eid1906.111862.
- [46] Huynen P, Mauroy A, Martin C, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2013, 58(3): 515-21.
- [47] Frange P, Touzot F, Debre M, et al. Prevalence and clinical impact of norovirus fecal shedding in children with inherited immune deficiencies. *The Journal of infectious diseases* 2012, 206(8): 1269-74.
- [48] Jeong AY, Jeong HS, Lee JS, et al. Occurrence of norovirus infections in asymptomatic food handlers in South Korea. *Journal of clinical microbiology* 2013,51(2): 598-600.
- [49] Yu JH, Kim NY, Lee EJ, Jeon IS. Norovirus infections in asymptomatic food handlers in elementary schools without norovirus outbreaks in some regions of Incheon, Korea. *Journal of Korean medical science* 2011,26(6): 734-9.
- [50] Marques Mendanha de Oliveira D, Souza M, Souza Fiaccadori F, Cesar Pereira Santos H, das Dores de Paula Cardoso D. Monitoring of Calicivirus among day-care children: evidence of asymptomatic viral excretion and first report of GI.7 Norovirus



- and GI.3 Sapovirus in Brazil. *Journal of medical virology* 2014,86(9): 1569-752.
- [51] Garcia C, DuPont HL, Long KZ, Santos JI, Ko G. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *Journal of clinical microbiology* 2006,44(8): 2997-3000.
- [52] Hall AJ et al. Norovirus disease in the United States. *Emerg Infect Dis*, 2013. 19(8):1198-205.
- [53] Zeng M, Xu X, Zhu C, Chen J, Zhu Q, Lin S, Jie Y, Shu X; Chinese Pediatric Study Group of Norovirus Diarrhea. Clinical and molecular epidemiology of norovirus infection in childhood diarrhea in China. *J Med Virol*. 2012 Jan;84(1):145-51. doi: 10.1002/jmv.22248. Epub 2011 Oct 25.
- [54] Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recomm Rep*, 2011. 60(RR-3):1-18.
- [55] WHO. Available at <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/food-safety/en/>
- [56] Tam CC, Rodrigues LC, Viviani L, Dodds JP, Evans MR, Hunter PR, Gray JJ, Letley LH, Rait G, Tompkins DS, O'Brien SJ; IID2 Study Executive Committee. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. *Gut*. 2012 Jan;61(1):69-77. doi: 10.1136/gut.2011.238386. Epub 2011 Jun 27.
- [57] Ahmed SM, Lopman BA, and Levy K. A systematic review and meta-analysis of the global seasonality of norovirus. *PLoS One*, 2013. 8(10):e75922.
- [58] Turcios RM1, Widdowson MA, Sulka AC, Mead PS, Glass RI. Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998-2000. *Clin Infect Dis*. 2006 Apr 1;42(7):964-9. Epub 2006 Feb 27.
- [59] Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, et al. (2003) Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 41: 1548-1557.
- [60] 卫生部.消毒技术规范 (2002年版) .  
<http://www.nhfpc.gov.cn/zhhcj/s9139/200804/86d017920ad84e64a90806717719624f.shtml>.

附件 1

## 诺如病毒感染聚集性和暴发疫情病例访谈提纲

### 一、基本信息

- 1.姓名：\_\_\_\_\_ 2.性别：男 女
- 3.出生日期：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月（或年龄：\_\_\_\_\_岁）
- 4.职业：\_\_\_\_\_，如食品从业人员、护理员等重点人群，具体岗位：\_\_\_\_\_
- 5.家庭住址：\_\_\_\_\_ 联系电话：\_\_\_\_\_
- 6.分类：首发病例 指示病例 重症病例 住院病例

### 二、临床表现

- 1.发病时间：\_\_月\_\_日\_\_时  
（如不能确定几时，可注明上午、下午、上半夜、下半夜等）
- 2.有哪些症状、体征（注明首发症状、各种症状出现的时间和持续时间，如发热及温度、恶心、呕吐、腹泻、腹痛、大便性状等）？
- 3.发病后是否自行服药？服药时间？服用过什么药物？
- 4.发病后是否就诊、就诊医院名称、是否住院、住院医院名称，是否补液治疗？
- 5.医院是否采集标本进行检测？粪便、血等临床标本检验结果（包括大便 WBC 计数、RBC 计数、血 WBC 等，可复印验单粘贴）？

### 三、流行病学相关信息

1. 自发病前 3 天以来，病例家庭/同宿舍/同部门（车间等）/同班级成员以及其他认识的朋友中是否出现过类似症状（腹泻或呕吐）？（如果没有，跳至 11 题）

1.1 类似症状者的发病时间、病例与类似症状者的关系、病例与类似症状者的接触方式等；收集类似症状者的名单和联系方式，这些病例是否集中在某一些局限区域。

- 1.2 是否打扫或清理过他人的呕吐物或腹泻病人的粪便？（如果是，处置吐泻物的时间？是否有带手套、口罩？事后是否洗手？如何洗手？）

2.详细了解发病前 3 天病例就餐的地点和摄入的食物，关注高风险食品（蛤、牡蛎、贻贝等贝类、沙拉、凉菜等）。

发病前 3 天内有无进食过市场销售的食物或饮料、各种食物或饮料的购买时间、购买地点名称和地址、共同食用人员信息等。

与类似症状者是否有共同就餐史（如聚餐、同一食堂就餐、同一餐馆或流动摊点就餐）？如果有，其中病例和有类似症状者均吃或吃得较多的食物有哪些？共同就餐未发病者没吃或吃的很少的食物有哪些？必要时，收集共同就餐成员名单和联系方式。

3.病例发病前 3 天的生活用水、饮用水源（桶装水和瓶装水应了解品牌）、饮生水的习惯，特别关注与类似症状者共同暴露的生活饮用水。近期是否有引起水源污染的可疑事情发生，如停水、水质混浊异味、水管维修等。

4.发病前 3 天有无医疗机构暴露史？暴露的医疗机构名称、暴露次数，暴露科室及原因。

5.病例认为自己发病的原因

调查人员签名：

调查日期： 年 月 日

附件 2

诺如病毒感染聚集性和暴发疫情调查病例一览表

编号	姓名	性别	年龄	职业	电话	所在部门/ 班级/宿舍	发病时间	临床表现									就诊 情况	症状 消失 时间	是否 采集 标本	诺如病 毒检测	诺如 病毒 基因 组	诺如 病毒 基因 型
								发 热	最 高 体 温 ( $^{\circ}$ C)	恶 心	呕 吐 次 数	腹 痛	腹 泻 次 数	大 便 性 状	血 常 规 WBC 计 数	便 常 规 WBC 计 数						

注：1.编号：按流水号从 1 开始； 2.性别：1=男，2=女； 3. 发病时间、症状消失时间：月日时；  
 4. 发热、恶心、腹痛：1=是，2=否； 5.大便性状：1=水样便， 2=粘液便， 3=脓血便， 4=其他；  
 6.就诊情况：1=门急诊，2=住院，3=自行用药，4=未治疗； 7. 是否采集标本：1=是，2=否；  
 8.诺如病毒检测：1=采样但没检测，2=诺如病毒核酸阳性，3=诺如病毒核酸阴性，4=诺如病毒 ELISA 阳性，5=诺如病毒 ELISA 阴性  
 9.如果病例搜索与个案调查用同一表格，请自行设计暴露史信息。

调查单位\_\_\_\_\_调查时间\_\_\_\_\_调查者签名：\_\_\_\_\_

附件 3

## 诺如病毒感染聚集性和暴发疫情个案调查表

编号

□□□□□

### 一、基本情况

- 1、被调查对象类别：(1) 疑似病例 (2) 临床诊断病例 (3) 实验室诊断病例
- 2、患者姓名：\_\_\_\_\_ 被访家长/家属姓名：\_\_\_\_\_
- 3、性别： (1) 男 (2) 女
- 4、出生日期：\_\_\_\_年\_\_月 (年龄：\_\_\_\_周岁)
- 5、工作单位/学校：\_\_\_\_\_
- 6、工作部门/班级/班组：\_\_\_\_\_ 如住宿则宿舍房间号：\_\_\_\_\_
- 7、职业：(1) 学生 (2) 教师 (3) 厨工，岗位\_\_\_\_\_ (4) 医护人员 (5) 工人 (6) 农民 (7) 散居儿童 (8) 幼托儿童 (9) 其他\_\_\_\_\_
- 8、文化程度：(1) 学龄前儿童 (2) 文盲 (3) 小学 (4) 初中 (5) 高中或中专 (6) 大专及以上 (7) 不详
- 9、现住址：\_\_\_\_\_
- 10、联系电话：\_\_\_\_\_

### 二、发病及诊疗经过

- 1、发病时间：\_\_\_\_月\_\_\_\_日\_\_\_\_时 (上午/下午)
- 2、是否就诊：①是 ②否 ③不清楚  
首次就诊时间：\_\_\_\_月\_\_\_\_日\_\_\_\_时 (上午/下午)
- 3、是否住院：①是 ②否 ③不清楚  
入院时间：\_\_\_\_月\_\_\_\_日\_\_\_\_时 (上午/下午)  
出院时间：\_\_\_\_月\_\_\_\_日\_\_\_\_时 (上午/下午)
- 4、是否补液治疗：(1) 口服补液治疗 (2) 静脉补液治疗 (3) 无
- 5、是否已经痊愈：①是 ②否 ③不清楚  
痊愈时间：\_\_\_\_月\_\_\_\_日\_\_\_\_时 (上午/下午)

### 三、临床表现

- 1、首发症状：
 

(1) 腹泻	①是, _____次	②否	③不清楚
(2) 腹痛	①是	②否	③不清楚
(3) 恶心	①是	②否	③不清楚
(4) 呕吐	①是, _____次	②否	③不清楚
(5) 发热	①是, _____℃	②否	③不清楚
(6) 其他	_____		

2、 整个病程的临床表现：

症状 体征	是否出现	开始出现时间	消失时间
腹泻	①是（最多____次/天）②否 ③不清楚	月__日__时	月__日__时
腹痛	①是 ②否 ③不清楚	月__日__时	月__日__时
恶心	①是 ②否 ③不清楚	月__日__时	月__日__时
呕吐	①是（最多____次/天）②否 ③不清楚	月__日__时	月__日__时
发热	①是（最高__℃）②否 ③ 不清楚	月__日__时	月__日__时
头痛	①是 ②否 ③不清楚	月__日__时	月__日__时
肌肉酸痛	①是 ②否 ③不清楚	月__日__时	月__日__时
其他		月__日__时	月__日__时
其他		月__日__时	月__日__时

3、 临床检验结果：

- (1) 首次血常规： 采血时间: \_\_月\_\_日, 结果: WBC\_\_\_\_ (10<sup>9</sup>/L) 血小板\_\_\_\_ (10<sup>9</sup>/L)
- (2) 第二次血常规： 采血时间: \_\_月\_\_日, 结果: WBC\_\_\_\_ (10<sup>9</sup>/L) 血小板\_\_\_\_ (10<sup>9</sup>/L)
- (3) 首次便常规： 采样时间: \_\_月\_\_日, 结果: WBC 计数\_\_\_\_ RBC 计数\_\_\_\_
- (4) 第二次便常规： 采样时间: \_\_月\_\_日, 结果: WBC 计数\_\_\_\_ RBC 计数\_\_\_\_

四、 流行病学：

- 1、 宿舍/家庭同住\_\_\_\_人，发病\_\_\_\_人（不含患者本人）  
同班或同部门\_\_\_\_人，发病\_\_\_\_人（不含患者本人）

填写其他人员发病情况（根据实际情况定是否需要填下表）：

姓名	性别	年龄	发病时间 (具体到小时)	接触方式	与患者 关系	联系方式

注：性别：(1) 男 (2) 女；

接触方式：(1) 同吃 (2) 同住 (3) 一起上学 (4) 一起工作  
(5) 同活动；(6) 其他：\_\_\_\_\_

2、发病前 72 小时内同类病人暴露情况

2.1 是否接触同类病人：(1) 是 (2) 否，跳至 2.2 (3) 不清楚，跳至 2.2

接触方式：(1) 同吃 (2) 同住 (3) 一起上学 (4) 一起工作  
(5) 同活动 (6) 其他\_\_\_\_\_

首次接触同类病人时间：\_\_\_月\_\_\_日\_\_\_时（指病人发病后的首次暴露）

最后接触同类病人时间：\_\_\_月\_\_\_日\_\_\_时

接触时是否采取防护：(1) 是\_\_\_\_\_ (2) 否

2.2 是否直接接触过患者呕吐物或粪便：

(1) 是 (2) 否，跳至 2.3 (3) 不清楚，跳至 2.3

首次接触时间：\_\_\_月\_\_\_日\_\_\_时

最后接触时间：\_\_\_月\_\_\_日\_\_\_时

接触时是否采取防护：(1) 是\_\_\_\_\_ (2) 否

2.3 是否短距离暴露过患者呕吐物或粪便（一米内）：(1) 是 (2) 否

首次接触时间：\_\_\_月\_\_\_日\_\_\_时

最后接触时间：\_\_\_月\_\_\_日\_\_\_时

接触时是否采取防护：(1) 是\_\_\_\_\_ (2) 否

3、发病前 72 小时内摄入的食物（包括食品、饮料、酒和水果等）

3.1 如果病例间有单次餐次的共同暴露，可参考下表设计问题，根据食谱，调查所有食品品种及饮料的进食史，并在“□”中划“√”

宫保鸡丁	吃 <input type="checkbox"/> (夹了	筷子)	未吃 <input type="checkbox"/>	不记得 <input type="checkbox"/>
鱼香肉丝	吃 <input type="checkbox"/> (夹了	筷子)	未吃 <input type="checkbox"/>	不记得 <input type="checkbox"/>
酱肘子	吃 <input type="checkbox"/> (夹了	筷子)	未吃 <input type="checkbox"/>	不记得 <input type="checkbox"/>
油炸大虾	吃 <input type="checkbox"/> (夹了	筷子)	未吃 <input type="checkbox"/>	不记得 <input type="checkbox"/>
蒸甲鱼	吃 <input type="checkbox"/> (夹了	筷子)	未吃 <input type="checkbox"/>	不记得 <input type="checkbox"/>
清蒸海鱼	吃 <input type="checkbox"/> (夹了	筷子)	未吃 <input type="checkbox"/>	不记得 <input type="checkbox"/>
西芹炒百合	吃 <input type="checkbox"/> (夹了	筷子)	未吃 <input type="checkbox"/>	不记得 <input type="checkbox"/>
清炒四季豆	吃 <input type="checkbox"/> (夹了	筷子)	未吃 <input type="checkbox"/>	不记得 <input type="checkbox"/>
肉焖茄子	吃 <input type="checkbox"/> (夹了	筷子)	未吃 <input type="checkbox"/>	不记得 <input type="checkbox"/>
凉拌黄瓜	吃 <input type="checkbox"/> (夹了	筷子)	未吃 <input type="checkbox"/>	不记得 <input type="checkbox"/>
鲜榨果汁	喝 <input type="checkbox"/> (喝了	杯)	未喝 <input type="checkbox"/>	不记得 <input type="checkbox"/>
桶装水	喝 <input type="checkbox"/> (喝了	杯)	未喝 <input type="checkbox"/>	不记得 <input type="checkbox"/>

3.2 如果病例发病前与其他病例有多个餐次共同暴露，可参考下表设计问题。

时间	餐次	进餐具体地点或名称 (在“ <input type="checkbox"/> ”中划“√”，其他详细注明)
发病前 1 天 月 日	早餐	餐馆 A <input type="checkbox"/> 餐馆 B <input type="checkbox"/> 餐馆 C <input type="checkbox"/> 超市 <input type="checkbox"/> 其他
	中餐	餐馆 A <input type="checkbox"/> 餐馆 B <input type="checkbox"/> 餐馆 C <input type="checkbox"/> 超市 <input type="checkbox"/> 其他
	晚餐	餐馆 A <input type="checkbox"/> 餐馆 B <input type="checkbox"/> 餐馆 C <input type="checkbox"/> 超市 <input type="checkbox"/> 其他
	其他	餐馆 A <input type="checkbox"/> 餐馆 B <input type="checkbox"/> 餐馆 C <input type="checkbox"/> 超市 <input type="checkbox"/> 其他
发病前 2 天 月 日	早餐	餐馆 A <input type="checkbox"/> 餐馆 B <input type="checkbox"/> 餐馆 C <input type="checkbox"/> 超市 <input type="checkbox"/> 其他
	中餐	餐馆 A <input type="checkbox"/> 餐馆 B <input type="checkbox"/> 餐馆 C <input type="checkbox"/> 超市 <input type="checkbox"/> 其他
	晚餐	餐馆 A <input type="checkbox"/> 餐馆 B <input type="checkbox"/> 餐馆 C <input type="checkbox"/> 超市 <input type="checkbox"/> 其他
	其他	餐馆 A <input type="checkbox"/> 餐馆 B <input type="checkbox"/> 餐馆 C <input type="checkbox"/> 超市 <input type="checkbox"/> 其他
发病前 3 天 月 日	早餐	餐馆 A <input type="checkbox"/> 餐馆 B <input type="checkbox"/> 餐馆 C <input type="checkbox"/> 超市 <input type="checkbox"/> 其他
	中餐	餐馆 A <input type="checkbox"/> 餐馆 B <input type="checkbox"/> 餐馆 C <input type="checkbox"/> 超市 <input type="checkbox"/> 其他
	晚餐	餐馆 A <input type="checkbox"/> 餐馆 B <input type="checkbox"/> 餐馆 C <input type="checkbox"/> 超市 <input type="checkbox"/> 其他
	其他	餐馆 A <input type="checkbox"/> 餐馆 B <input type="checkbox"/> 餐馆 C <input type="checkbox"/> 超市 <input type="checkbox"/> 其他



3.3 如果病例间没有餐次共同暴露，可参考下表设计问题。

日期	餐次	进餐地点	食物名称	共同餐者人数	同餐者发病人数
发病前 1 天 月 日	早餐				
	中餐				
	晚餐				
发病前 2 天 月 日	早餐				
	中餐				
	晚餐				
发病前 3 天 月 日	早餐				
	中餐				
	晚餐				

4. 发病前 72 小时内饮水史

4.1 是否喝生水：(1) 是 (2) 否

4.2 生活用水来源：(1)自来水 (2)井水 (3)河水 (4)泉水 (5)开水  
(6)桶装水，品牌\_\_\_\_\_ (7)瓶装水，品牌\_\_\_\_\_ (8)其它

4.3 饮水来源：(1)自来水(2)井水 (3)河水 (4)泉水 (5)开水  
(6)桶装水，品牌\_\_\_\_\_ (7)瓶装水，品牌\_\_\_\_\_ (8)其它

5. 个人卫生

5.1 饭前便后洗手：(1) 每次都洗 (2) 有时洗手 (3) 偶尔洗手 (4) 从不洗手

5.2 是否用洗手液或肥皂：(1) 是 (2) 否

5.3 是否喜吃生冷食： (1) 是 (2) 否

6. 其他情况： \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

调查者： \_\_\_\_\_ 调查时间： \_\_\_\_年\_\_月\_\_日





## 附件 5

## 诺如病毒标本处理和实验室检测技术方案

诺如病毒完整的检测及分型流程包括标本前处理、RNA 提取、Real-time RT-PCR 检测、传统 RT-PCR 检测、测序和基因分型 6 个步骤。Real-time RT-PCR 方法灵敏度和准确度高，是检测诺如病毒的金标准。用传统 RT-PCR 可对 Real-time RT-PCR 阳性标本的 PCR 产物进行测序，通过序列分析确定诺如病毒的基因群和基因型。在发生聚集或暴发时，ELISA 方法可作为辅助的手段快速检测诺如病毒抗原。食品、水、环境涂抹样检测方法的灵敏度不稳定，仅作为参考方法。

### 1 标本前处理

#### 1.1 粪便、呕吐物

##### 1.1.1 设备和材料

微量移液器、无菌过滤器、漩涡振荡器、微量离心机、1.5mL 无菌离心管、磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS) 10mM pH7.0-7.4。

##### 1.1.2 操作方法

(1) 离心管每管分装 0.5mLPBS。用一次性移液管（或无菌棒）添加豌豆大小的粪便（约 0.1 克），稀释成约 10% 至 20%（重量/体积）的粪便悬浮液。当粪便样品是液态时，不必在 PBS 中稀释，直接使用 500 $\mu$ L 的样品。

(2) 漩涡振荡每个样品 1 分钟。在 5000 rpm 下离心 5 分钟，使得固体沉淀。澄清上清液可以直接用于病毒核酸提取或贮存于 -70 $^{\circ}$ C。

(3) 取澄清的上清液 200 $\mu$ L 进行 RNA 提取。

#### 1.2 水

通过阴离子滤膜过滤水样品。用牛肉膏（1.5%w/v）含 0.05M 甘氨酸（pH9.0）缓冲液洗脱附在膜上的病毒。使用 Microsep 100TM 或 CentriconTM columns 离心管进一步浓缩洗脱液。

##### 1.2.1 设备和材料

DEPC 水、新配置次氯酸盐（至少 1%）或等效消毒剂、Millipore HA filter（孔径 0.45 $\mu$ m）、换膜过滤器、真空泵、计时器、PH 值酸度计、磁力搅拌器及转子、低温冰箱（-20 $^{\circ}$ C、-70 $^{\circ}$ C）、Microsep 100 K columns（PALL 公司）、Centriprep YM-50（Millipore 公司）、洗脱液（BE-0.05Gly pH7.0）、PBS (pH7.2)、离心机、氯仿、丁醇。

##### 1.2.2 操作方法

###### 1.2.2.1 过滤装置准备

(1) 使用无菌的镊子将滤膜放在滤器架上，滤膜有三层，型号分别为 Millipore HA filter、AP15 和 AP20，放置顺序为 Millipore HA filter  $\rightarrow$  AP15  $\rightarrow$  AP20。

注意：暴露出滤膜表面使其能与水样接触，请将滤膜光滑表面的那边向下。所有的玻璃器皿应干净无菌。每批水样使用不同的漏斗。

(2) 将滤膜置中，将有刻度的漏斗放在滤器的上边。

(3) 使用不锈钢滤器夹进行水的密封。

(4) 真空泵连接 1000mL 的锥形瓶。

注意：为防止气溶胶的污染，应在无菌的环境中过滤，在生物安全柜进行操作。

(5) 向滤器中倒入 20mL 无菌水 (DEPC 水) 检查滤膜的密封情况。

(6) 打开泵, 调整水的流速至形成缓慢的细流。

#### 1.2.2.2 水样品的过滤

(1) 向玻璃漏斗里倒水样, 当水样完全滤过立刻关闭真空泵。

(2) 用不锈钢的滤器夹, 小心移开滤膜上的刻度漏斗。

#### 1.2.2.3 用酸漂洗滤膜

将膜用无菌的镊子夹放在有 200mL 0.05mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH3.0) 的无菌 500mL 烧杯中进行漂洗滤膜去除 Mg<sup>2+</sup>。

#### 1.2.2.4 洗脱

(1) 将膜夹出放在无菌的 60mm 培养皿中, 加 5mL 洗脱液。盖上铝箔。

注意: 要将滤膜的上边向下 (倒置) 放在锥形瓶里。

(2) 将锥形瓶放在恒温摇床上, 转速 45rpm, 室温 (23°C ± 3°C), 15min。

(3) 关闭摇床, 将洗脱液 (大约 5mL) 转移到管子里。

#### 1.2.2.5 中和洗脱液

用 1N HCl 或 1N NaOH 调整洗脱液的 pH 到 7.0-7.4。检测前, 洗脱液在 -70°C 储藏。

#### 1.2.2.6 二次浓缩

方法一: 用 Microsep 100 K columns 或 Centriprep YM-50 浓缩病毒

(1) 为防止病毒的附着, 先用无病毒粒子的洗脱液浸湿过滤器。

(2) 将水标本滤膜洗脱液 (大约 5mL) 加入到浓缩柱中, 5000rpm 离心 5min。

(3) 吸取浓缩液 (约 150μL), 转移至 1.5mL 离心管中。

方法二: PEG 沉淀

(1) 向标本洗脱液中加入 NaCl 终浓度是 0.3mol/L (若洗脱液为 5mL 加 0.08775g 的 NaCl), 有助于病毒的沉淀, 再等量加入 PEG-6000 终浓度为 12.5% (w/v) (若洗脱液为 5mL, 加 0.0625g 的 PEG-6000。4°C 过夜。

(2) 4°C, 10000rpm 离心 30 分钟, 收集沉淀。

(3) Millipore HA filter, 倾倒并弃掉上清液。每个离心管添加 150-500μL pH7.2 (±0.2) PBS 重悬沉淀物。将离心管放置在离心管架上, 为更好的让缓冲液与沉淀物接触, 将离心管架成一定角度放置。室温放置 30min。

注意: 如果沉淀物没有溶解, 可用缓冲液反复的轻轻吹打沉淀物。吹打过力会产生气泡。

(4) 向悬液中加入等体积的氯仿/丁醇 (1:1 vol/vol) 混合。去除病毒悬液中的抑制剂。

(5) 4°C, 10000rpm, 离心 20 分钟。

(6) 分离出水相 (上清液), -80°C 储藏。

(7) 取 200μL 上清液进行核酸提取。

### 1.3 环境涂抹样

1.3.1 将棉签在 PBS 里蘸湿, 用力涂抹待测表面 (最大面积 100cm<sup>2</sup>) 后, 立即浸入核酸提取试剂盒裂解缓冲液中 (QIAamp 试剂盒 560μL, Genaid 试剂盒 400μL), 将棉签用力压 EP 管的侧壁, 释放棉签中的液体。重复浸入和压侧壁的步骤 3-4 次, 确保病毒最大释放量, 直接进入核酸提取步骤。

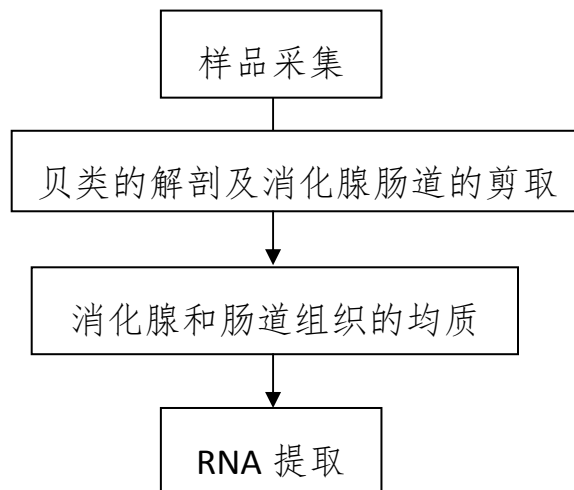
### 1.4 食品

### 1.4.1 贝类

#### 1.4.1.1 设备和材料

诺如病毒质控样（中国食品药品检定研究院）、高速离心机（可离心 15mL~50mL 体积）、台式离心机、碎花制冰机、生物安全柜、实时荧光定量 PCR 检测系统、眼科剪、眼科镊、一次性无菌培养皿、恒温摇床、高压灭菌器、电磨均质器（LX134MO）、一次性研磨杵（上海生工）、15mL 去 RNAase 离心管、1.5mL 去 RNAase Eppendorf 管、20μL、200μL、1000μL 微量移液器、PBS 溶液 pH7.2（Gebico）、蛋白酶 K（PCR 级 Roche）。

#### 1.4.1.2 贝类样品处理程序



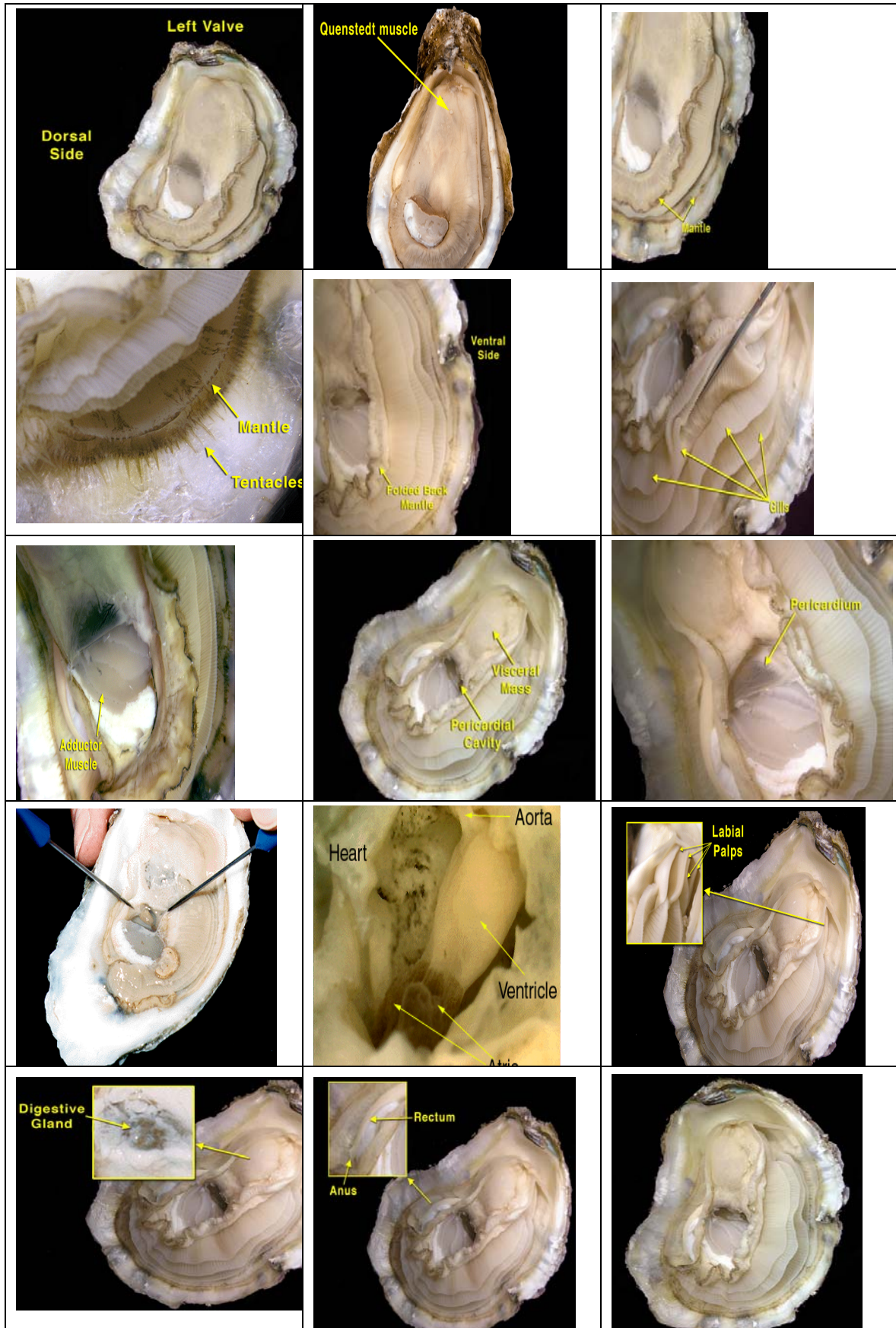
#### 1.4.1.3 解剖方法

5 个贝类个体作为一件样品，分别解剖，取其消化腺和肠道，用于检测。如果一件样品的消化腺和肠道的总质量不够 2.0g，应适当增加取样量，使得每件样品检验的总质量达到 2.0g。

##### (1) 牡蛎的解剖方法

使用灭菌的刀具将牡蛎壳撬开，使用灭菌的眼科剪和眼科镊，先将牡蛎的内脏部分剪取下来放到一个灭菌的平皿里，沿肠道将牡蛎软体部分剪开，暴露出肠道和消化腺，将多余的组织去掉，取其消化腺和肠道用于检测。牡蛎的解剖过程及解剖结构见下图。





(图片源自 [http://ww2.mdsg.umd.edu/interactive\\_lessons/oysters/anatlab/lab\\_i.htm](http://ww2.mdsg.umd.edu/interactive_lessons/oysters/anatlab/lab_i.htm))

## (2) 海虹

用灭菌刀具将双壳撬开，将消化腺用镊子直接夹下，同时尽量将肠道取下。由于海虹的消化腺相对牡蛎较小，所以需要增加取样的海虹个体数，以使得总质量达到 2.0g，用于后续的检测。海虹的解剖结构见下图，图中镊子所指的位置为海虹的消化腺。



(图片由中国食品药品检定研究院生物检测室提供)

## (3) 扇贝、毛蚶与文蛤

扇贝与毛蚶的解剖结构与海虹相似，参照海虹的方法将壳打开后，直接判断消化腺所处的位置，用眼科镊和眼科剪，将其消化腺和肠道取下用于诺如病毒的检测。文蛤的消化腺包在内脏团里，在解剖时可以直接用镊子在内脏团消化腺位置撕开，将消化腺取下，同时将肠道取出，用于检测，文蛤的消化腺体积较小，需要适当增加取样量以满足检验的要求。

### 1.4.1.4 均质

将上述解剖下的消化腺和肠道放到 50mL 灭菌的小烧杯内，用电磨均质器 (LX134MO) 将消化腺仔细打碎，成糊状。

### 1.4.1.5 蛋白酶 K 消化

将上述均质的消化腺，分别称取  $2.0 \pm 0.1\text{g}$ ，加入 15mL 的离心管，然后每管加入 2mL 的 PBS 溶液，加入 20mg/mL 蛋白酶 K (Roche) 溶液  $10\mu\text{L}$  进行消化，另外取 1 件样品加入诺如病毒的阳性质控球，作为外部质控阳性对照。

1.4.1.6 将上述样品于摇床  $37^\circ\text{C}$ ，320rpm 振荡 1h。恒温水浴  $60^\circ\text{C}$ ，保持 15min；将 15mL 离心管，3000g 离心 5min，取  $200\mu\text{L}$  用于 RNA 的提取，剩余部分冷冻保存，用于复检。

## 1.4.2 三文鱼

### 1.4.2.1 设备和材料

诺如病毒质控样 (中国食品药品检定研究院)、恒温振荡器、食品均值器、天平：感量 0.1 g、高



速低温离心机 (4 °C, 10000 g)、5×PEG8000/NaCl 溶液 (PEG8000 500±2g, NaCl 87±1g,先用 450mL 蒸馏水溶解,稍微加热,待溶解后定容至 1000mL, 121°C, 15min 灭菌)、磷酸盐缓冲液 (PBS pH 7.2)、Tris/甘氨酸/牛肉膏缓冲液 (TGBE) (Tris base 12.1±0.2g,甘氨酸 3.8±0.1g, 牛肉膏 10±1.0g, 蒸馏水 1000±1mL, 121°C, 15min 灭菌)、氯仿/正丁醇 (1:1 体积比) 溶液。

#### 1.4.1.2 样品处理程序及方法



(1) 取三文鱼样品 25 g, 剪碎后置于带滤网的均质袋中, 加入 TGBE 缓冲液 40 mL, 均质均匀, 于室温 60 r/min 震荡 20 min。

(2) 取滤液至 50 mL 新的离心管中, 4 °C, 10000 g 离心 30 min。

(3) 取上清液 (小心避开液体表面的油脂层), 加入上清液 1/4 体积的 5×PEG/NaCl 溶液, 颠倒 60 s, 4 °C, 60 r/min 震荡 60 min。

(4) 将上述溶液于 4 °C, 10000 g 离心 30 min, 弃去上清液。向沉淀物中加入 PBS 溶液 700 μL, 震荡重悬。

(5) 加入与上述重悬液等体积的氯仿/正丁醇 (1:1) 溶液, 充分振荡, 室温孵育 5 min。于 4 °C, 10000 g 离心 15 min。

(6) 取上层水相液体 200 μL 用于提取病毒 RNA。

#### 1.4.3 草莓、蓝莓

##### 1.4.3.1 设备和材料

诺如病毒质控样 (中国食品药品检定研究院)、PEG8000 (Polyethylene glycol)、氯化钠 (NaCl)、氯化钾 (KCl)、碳酸氢钠 (NaHCO<sub>3</sub>)、磷酸二氢钾 (KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>)、磷酸氢二钠 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>)、NaOH 溶液 (5M)、HCl 溶液 (1M)、纯水 (Milli Q 系统净化)、氯仿 (Methenyl trichloride)、丁醇 (1-Butanol)、牛肉膏 (Beef Extract)、甘氨酸 (Glycine)、蛋白酶 K (Proteinase K)、果胶酶 (Pectinase from *Aspergillus niger*, Sigma)、5×PEG/NaCl 缓冲液 (PEG8000 500±2g, NaCl 87±1g,先用 450mL 蒸馏水溶解,稍微加

热,待溶解后定容至 1000mL, 121°C, 15min 灭菌)、TGBE 缓冲液( Tris base 12.1±0.2g,甘氨酸 3.8±0.1g, 牛肉膏 10±1.0g, 蒸馏水 1000±1mL, 121°C, 15min 灭菌)、DHZ-D 型冷冻恒温振荡器、FE20K 型酸度计、小型高速离心机、CR22E 型高速冷冻离心机。

#### 1.4.3.2 样品处理程序及方法

(1) 取样称取 25g 草莓(蓝莓)样本放入滤膜均质袋中,加入 40mL TGBE 缓冲液,(取一份样本作为阳性对照,可在这步加入诺如病毒的阳性质控球),以及 30 单位果胶酶(Pectinase from *Aspergillus niger*, Sigma)。

(2) 样品提取室温振荡孵育 10min,测量 pH 值。若 pH<9.0,用 NaOH(5M)溶液小心调节至 9.5,再振荡孵育 10min。每调节一次 pH 值后,孵育 10min,直至 pH>9.0;将流出液倒至离心管中(必要时使用 2 个离心管),4°C,10000g 离心 30min;上清移至一新管或瓶,用 HCl(1M)调节 pH 至 7.0±0.5。

(3) 样品富集浓缩加入 1/4 体积的 5×PEG/NaCl 缓冲液,在 4°C 条件下,于振荡孵育器孵育 60min;4°C,10000g 离心 30min(必要时将液体分装于 2 只离心管)。

弃去上层溶液,4°C,再次 10000g 离心 5min 以使颗粒紧凑。

弃去上层溶液,用 500μL PBS 重悬沉淀。如果一个样品分两管离心,则用同样体积 PBS 依次重悬。

将重悬液移至新的 EP 管中,加入等体积的氯仿/丁醇溶液,涡旋混匀,室温孵育 5min。4°C,10000g 离心 15min,小心将水相转移至新管待提取 RNA。

#### 1.4.4 生菜和苗芽菜

##### 1.4.4.1 设备和材料

食品均质器(可拆卸、可清洗、可高压灭菌)、电子天平(感量 0.01g)、台式离心机(最高转速 15000g)、微型离心机、电热恒温水浴锅(0-100°C)、涡旋振荡器、实时荧光 PCR 仪、Roche, LightCycler 480。

##### 1.4.4.2 样品处理程序及方法

(1) 同一批次的生菜或苗芽菜样品,随机抽取样品数不少于 5 件,并用灭菌处理的剪刀剪碎至 2.5cm×2.5cm×2.5cm 大小的形状,称量 25g 放入带有滤膜均质袋一侧中,作为待试样品。另称取 200g 样品放入 50mL 离心管中,-80°C 保存,留作备样,并做好标记。

(2) 向上述均质袋中加入 40mL TGBE buffer,均质器拍打混匀,尼龙扎带封口后,室温振荡约 20min。

(3) 将均质袋滤膜一侧液体倾入 50 mL 离心管,4°C 条件下 10000×g 离心 30min。

(4) 离心结束后,将上清转移至另一 50 mL 离心管,加入 1/4 倍体积的 5×PEG/NaCl 溶液,室温条件振荡 60min。

(5) 振荡完毕,4°C 条件下 10000×g 离心 30min。

(6) 离心结束,弃上清,继续 4°C 条件下 10000×g 离心 5min 压实沉淀。

(7) 向沉淀加入 500μL PBS 溶液以溶解沉淀。吸取溶解沉淀后的 PBS 溶液 200μL 转移至无菌离心管中,作为试样。剩余的溶液分装到离心管中标记作为备样,-80°C 冻存。

## 2 核酸提取

各类样品经前处理后,每个样品分别取 200μL,下面表格中提供的 RNA 提取试剂盒供参考,按试剂盒说明书操作提取 RNA。

样品种类	试剂盒
粪便或呕吐物	QIAGEN病毒核酸提取试剂盒 (QIAamp® viral RNA mini kit ) 或Geneaid 病毒核酸提取试剂盒 (Viral Nucleic Acid Extraction Kit II)
水和环境标本	NucliSENS Lysis Buffer和NucliSENS Magnetic试剂盒 (梅里埃公司)
食品标本	High Pure Viral RNA Kit (罗氏公司)

### 3 诺如病毒核酸检测方法

#### 3.1 粪便、呕吐物、肛拭子、水、环境涂抹样

##### 3.1.1 诺如病毒双重 Real-time (TaqMan®) RT-PCR 分析

3.1.1.1 使用范围: ABI 7500 realtime PCR、Smartcycler (Cepheid), Mx3005P, Mx3000P (Stratagene)和 ICycler iQTM Real-Time PCR 检测系统(BioRad)等。

本设计应用 QuantiTect Multiplex RT-PCR Kits (Qiagen), 引物和探针浓度分别被优化为终浓度 400 nM 和 200 nM。每个试剂盒特异的 RT 最适环境和活化步骤, 需要遵循制造说明书使用。

该试验方法来自美国 CDC 诺如病毒暴发网络 (CaliciNet USA) 双重 Real-time RT-PCR 操作标准, 引物设计参考文献<sup>[59]</sup>。

##### 3.1.1.2 设备和材料

涡流混合器、微量离心机、移液器 (量程为P20、P200和P1000)、Real-time PCR仪可以是ABI 7500 (ABI)、Smartcycler (Cepheid)、Mx3005P or Mx3000P (Stratagene)或BioRad iCycler iQTM Real-Time PCR检测系统(BioRad)。一次性手套、带滤芯枪头、无菌 1.5mL 微量离心管、RNA酶去除剂、96-孔反应板、盖子或薄膜。

##### 3.1.1.3 诺如病毒寡核苷酸引物/探针

表 1 多重荧光定量 RT-PCR 扩增诺如病毒的引物和探针

基因型	引物/探针	序列 (5'-3')	工作浓度 nM)
GI	Cog 1F	CGY TGG ATG CGI TTY CAT GA	400
	Cog 1R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C	400
	Ring 1A	FAM – AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA – BHQ*	200
	Ring 1B	FAM – AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA – BHQ*	200
GII	Cog 2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	400
	Cog 2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	400
	Ring 2	JOE –TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT – BHQ**	200

\* GI TaqMan®探针: 5'端用FAM荧光素标记, 3'端用BHQ淬灭基团标记; BHQ淬灭基团1更好。

\*\*GII TaqMan®探针: 5'端用 JOE (HEX 或 VIC 等) 荧光素标记, 3'端用 BHQ 淬灭基团标记。

##### 3.1.1.4 操作方法

###### (1) 实验准备

用 RNA 酶去除剂擦拭工作台表面、移液器和离心机除去潜在的 RNA 酶污染。Real time PCR 仪开机预热 15 分钟。

###### (2) 试剂准备

- ①所有试剂冰浴。
- ②轻弹管壁混合2×QuantiTect Multiplex RT-PCR Master Mix反应液。
- ③涡旋所有引物和探针5秒钟。
- ④QuantiTect Multiplex RT Mix、引物、探针置于冰上。

(3) 对照设立

每一次实验都要包括无模板对照(NC) (第一个和最后一个孔各设一个) 和阳性对照 (PC) (GI 和 GII 诺如病毒核酸或标准品)。

(4) 检测

注意：请在PCR清洁区准备、配制反应体系 (master mix) 。

- ①在1.5 mL离心管中准备master mix。
- ②确定每次分析的反应数(N), 需要多配反应数来弥补重复移液中的小量丢失：
  - ◆ 如果样本数(n) (包括NC和VC对照) = 1 - 14, 做 n + 1 个反应的mix。
  - ◆ 如果样本数(n) (包括NC和VC对照) > 15, 做 n + 2 个反应的mix。
- ③配制Real-time RT-PCR反应混合液22.5μL (表2)

**表2 诺如病毒双重反应体系配制方案**  
(QuantiTect Multiplex RT-PCR Kits)

组成成分	体积 (μL)	终浓度
RNase-free water	4.25	
Cog 1F (10μM)	1	400nM
Cog 1R (10μM)	1	400nM
Ring 1A (10μM)	0.5	200nM
Ring 1B (10μM)	0.5	200nM
Cog 2F (10μM)	1	400nM
Cog 2R (10μM)	1	400nM
Ring 2 (10μM)	0.5	200nM
RNase-free water	4.25	
QuantiTect Multiplex RT Mix	0.25	
2×QuantiTect Multiplex RT-PCR Master Mix	12.5	1×

- ④吸打混匀Master Mix。
- ⑤按如下方式排列阴性对照、阳性对照和样品，在每孔中加入22.5μL Master Mix。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	NC	PC (GI)	PC (GII)
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

\*阴性模板对照(NC) 加入第一列，样本加入后面的11列，检查加入样本时可能的交叉污染。病毒模板对照(PC在所有样本和NC密封后加入到最后。

- ⑥加入2.5μL DEPC水到第一个NC孔，盖好。
- ⑦将反应平板转移到核酸处理区域或清洁区外面。
- ⑧将RNA样本从-70°C冰箱转移到冰上融化;漩涡振荡5秒钟之后快速离心5秒钟，移液2.5 μL RNA样本到标记好的孔。例如，加样本1 (S1)到平板位置A2和B2。如果样本体积小于2.5 μL，加DEPC水至反应管使总反应体积达到25 μL。
- ⑨加2.5 μL水到最后的NC孔，盖好。
- ⑩最后，移液GI和GII诺如病毒阳性对照各2.5μL到适当的PC孔，盖好。
- ⑪小心混合平板。
- ⑫4°C离心平板500rpm 1分钟，以移除孔中可能存在的气泡和液滴。
- ⑬ RT-PCR扩增条件：按照ABI 7500 (or other platform) 的说明书放置好平板。终反应体积为25μL。

根据QuantiTect Multiplex RT-PCR Kits说明书，RT-PCR热循环程序为：

循环数	温度	时间
1	50°C	20min
1	95°C	15min
45	94°C	45S
	60°C	45S

### 3.1.1.5 结果解释

#### (1) 阴性对照 (NC)

如果一个或更多NC反应出现假阳性,则可能发生了污染。这种情况下,检测无效，需重复检测。

#### (2) 阳性对照 (PC)

阳性对照产生超过阈值的荧光曲线或扩增图像。

#### (3) 检测样本

只有在所有质量控制严格准确时，如果曲线在 Ct 值为 ≤40，则认为检测样本为阳性。

### 3.1.2 诺如病毒传统 RT-PCR 分析

#### 3.1.2.1 原理

人诺如病毒分为 5 个基因组 (Genogroup, G)，其中 GI、GII 和 GIV 型可感染人。本方案利用衣壳蛋白的部分区域 (region C) 来对诺如病毒进行分型。本方案由四个引物组成，扩增 ORF2 的 5' 末端，编码主要外壳蛋白 VP1。引物 G1SKF 和 G1SKR 用于 GI 的检测，扩增片段 330bp。引物 CoG2F 和 G2SKR 用于 GII 的监测，扩增片段 387bp。

#### 3.1.2.2 设备与材料

涡流混合器、微量离心机、移液器、PCR 仪、微波炉、电泳仪和制胶器。一次性手套、带滤芯枪头、无菌 1.5-mL 微量离心管、RNA 酶去除剂、薄壁 PCR 管 (Rnase free, 0.5mL)、Loading Buffer、Qiagen OneStep RT-PCR Kit (货号: 210212)。

#### 3.2.2.3 诺如病毒寡核苷酸引物/探针 (见表 3)

表3 诺如病毒传统RT-PCR寡核苷酸引物

Region	型别	引物名称	序列 (5'-3')	产物(bp)
C	I	G1SKF (+)	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA	330
		G1SKR (+)	CCA ACC CAR CCA TTR TAC A	
	II	COG2F (+)	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	387
		G2SKR (-)	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT	

Y = C or T; H = A, C, or T; R = A or G; I = inosine; S = C or G; N = G, A, T, or C; W = A or T; K = G or T。

#### 3.2.2.4 操作方法

##### (1) 实验准备

用RNA酶去除剂擦拭工作台表面、移液管和离心机以去掉潜在的RNA酶污染。

##### (2) 试剂准备

- ①所有试剂冰浴。
- ②轻弹管壁混合5X缓冲液。
- ③离心酶、RNA酶抑制剂和dNTPs后将其放在冰上备用。
- ④涡旋所有引物5秒钟，离心5秒钟备用。

##### (3) 对照设立

每次PCR实验都应设置阴性对照和阳性对照，包括诺如病毒GI和GII，阳性对照为阳性粪便样品。

##### (4) 检测

注意：在PCR清洁区配置反应体系。

- ①用1.5 mL离心管准备反应体系。
- ②确定每次分析的反应数(N)，在操作需配置过量的反应体系来校正重复移液中的小量丢失；见下面的样本：

- ◆ 如果样本数(n) (包括NC和VC对照) = 1 - 14, 做 n + 1 个反应的mix。
- ◆ 如果样本数(n) (包括NC和VC对照) > 15, 做 n + 2 个反应的mix。

③将每个引物对按以下计算量添加到反应混合液中（表4和5）。

表4 诺如病毒Region C反应体系-Genogroup I

成分	体积/反应 (μL)	最终浓度
5XRT-PCR Buffer	5	1 x
dNTP mix	1	
Enzyme mix	1	
GISKF(50 μM)	0.25	500nM
GISKR (50μM)	0.25	500nM
Rnase Inhibitor (30-40U/ μL)	0.50	
Rnase-free water	12	
反应体系总体积	20	

表5 诺如病毒Region C反应体系-Genogroup II

成分	体积/反应 (μL)	最终浓度
5x RT-PCR Buffer	5	1 x
dNTP mix	1	
Enzyme mix	1	
COG2F(50 μM)	0.25	500nM
GIISKR (50μM)	0.25	500nM
Rnase Inhibitor (30-40U/ μL)	0.50	
Rnase-free water	12	
反应体系总体积	20	

- ④用移液管上下吹打混合液。
- ⑤向每个反应管中分装20μL混合液。
- ⑥设立阴性对照，加5μLDEPC水。
- ⑦将反应管转移到核酸处理区。
- ⑧将病毒核酸在冰上融化，漩涡振荡5秒钟之后快速离心5秒钟。
- ⑨移取5μL的RNA模板到每一个相应的反应管中。
- ⑩最后加5μL阳性对照。
- ⑪将所有的反应管放置在PCR仪上，按照下面的条件设置：

循环数	时间	温度°C
1	30min	42
1	15min	95
40	30sec	95
	30sec	50
	30sec	72
1	10min	72

⑫准备2%的琼脂糖凝胶，进行核酸电泳。

(5) 解释

如果阴性对照出现条带，说明可能出现污染，需重复实验。阳性对照在正确位置出现条带，则判定反应体系工作正常。

3.2 食品诺如病毒荧光定量 PCR (Roche LightMix® Kit Norovirus GG I ,GG II ,MS2 或等效的诺如病毒检测试剂盒)

3.2.1 反应体系及仪器设置

反应体系的添加按下表：

表 6 诺如病毒定量 PCR 体系

试剂	1 个反应	10 个反应
PCR 水	4.3μL	47μL
Activator 激活剂	1.3μL	14.3μL
引物和探针	1μL	11μL
内对照	1μL	11μL
预混液	7.4μL	81.4μL
模板	5 μL	-
总体积	20μL	165μL

具体的仪器设置为检测信号通道 FAM 通道 465nm-510nm，内参信号 ROX 通道 533nm-610nm，做分型的 LC670 通道 498nm-660nm，反应具体参数设置如下：

- (1) 逆转录 61°C，3min。
- (2) 预变性 95°C，30s。



(3) PCR 循环, 95°C 10s, 56°C 10s 收集信号, 72°C 5s, 45 个循环。

(4) 溶解曲线, 95°C 30s, 40°C 2min, 85°C 1s 收集信号。

### 3.2.2 诺如病毒荧光定量 PCR 结果判读

实验结束后, 分析结果, 具体分析标准按下表进行。

表 7 诺如病毒结果判读

FAM (510nm)	Rox(610nm)	熔解曲线 (660nm)	阴性对照	结果判读
有扩增	有无扩增均可	无信号	无扩增	G I 型
有扩增	有无扩增均可	熔解峰在 50-60 度	无扩增	G II 型
无扩增	有扩增	无信号	无扩增	阴性
无扩增	无扩增	无信号	无扩增	PCR 抑制
有扩增	有扩增	有无信号均可	有扩增	污染

在食品类的诺如病毒检测方法中, 通过诺如病毒质控样的加入作为外部质控以判断 RNA 的提取过程是否正常; 同时在 RT-PCR 过程中还含有 ROX 荧光通道检测内部质控噬菌体 pMS2, 用以判断在 PCR 过程中是否含有 PCR 抑制物质, 如含有抑制物质扩增过程为阴性或扩增效率不高, 正常则扩增为阳性。该试剂盒还含有与 GII 产物结合的探针, 用以区分诺如病毒的型别。如果扩增的结果为 GII, 则可以检测到探针信号, 如果为 GI 型则无信号。可以根据上表来对诺如病毒的检测结果进行判断。

## 4. 诺如病毒 ELISA 检测方法 (粪便、呕吐物)

### 4.1 操作步骤 (RIDASCREEN® Norovirus 3<sup>rd</sup> Generation) :

- (1) 将两滴 (100µL) 阳性质控液 [Control+], 标本稀释液 [Diluent-] (阴性质控液) 和 10% 便悬液上清加入为微孔中。
- (2) 再分别加入 2 滴 (100µL) 生物素标记抗体标记物 1 [Conjugate 1], 在充分混匀 (轻轻振动微孔板边缘) 后, 室温(20-25°C) 孵育 60 分钟。
- (3) 每孔加入 300µL 洗液, 洗 5 次, 在吸水纸上拍干。
- (4) 微孔中加入 2 滴 (100 µL) 酶结合物标记物 2 [Conjugate 2], 室温 20-25°C 孵育 30 分钟。
- (5) 每孔加入 300µL 洗液, 洗 5 次, 在吸水纸上拍干。
- (6) 在每个孔中加入 2 滴 (100 µL) 的底物 [Substrate]。然后微孔板在室温 (20-25°C) 下避光孵育 15 分钟。在每个微孔中加入 1 滴 (50 µL) 终止液 [Stop] 以终止反应。轻微混合后 (轻拍微孔板的边缘), 用酶标仪测定在 450 nm 的光波下测定吸光度。
- (7) 结果判定: 将阴性质控所得吸光度值加上 0.15 即为 Cut-off 值。样本吸光度值大于 Cut-off 值 10% 视为阳性。样本吸光度值处于上述 Cut-off 值± 10% 范围视为可疑, 应重复检测。重复测试新鲜粪便样本, 结果仍在此区域, 则视为阴性。样本吸光度值小于上述 Cut-off 值+10% 视为阴性。阴性样品还需按本指南 “3.1.1 诺如病毒双重 Real-time (TaqMan®) RT-PCR 分析” 检测确认。

## 附件 6

## 诺如病毒消毒方法

### 一、病人呕吐物、粪便

用一次性吸水材料（如纱布、抹布等）沾取 5000mg/L~10000mg/L 的含氯消毒液完全覆盖污染物，小心清除干净。清除过程中避免接触污染物，清理的污染物按医疗废物集中处置，或用含有效氯 5000mg/L 消毒剂溶液浸泡消毒 30min 后处理。厕所马桶或容器内的污染物，可小心倒入足量的 5000 mg/L~10000mg/L 的含氯消毒液，作用 30min 以上，排入有消毒装置的污水处理系统。清洁中使用的拖把、抹布等工具，盛放污染物的容器都必须用含有效氯 5000mg/L 消毒剂溶液浸泡消毒 30min 后彻底冲洗，才可再次使用。厕所、卫生间的拖把应专用。

### 二、地面、墙壁及物体表面

用于消毒地面、墙壁及物体表面的消毒液，应含有效氯 1000mg/L。有肉眼可见污染物时应先清除污染物再消毒。无肉眼可见污染物时，家具和生活设施用消毒液进行浸泡、喷洒或擦拭消毒，作用 30 分钟后用清水擦拭干净。墙壁可直接用消毒剂按 100mL/m<sup>2</sup>~300mL/m<sup>2</sup> 用量擦拭或喷洒消毒。地面消毒先由外向内喷洒一次，喷药量为 100mL/m<sup>2</sup>~300mL/m<sup>2</sup>，待室内消毒完毕后，再由内向外重复喷洒一次。消毒作用时间应不少于 15 分钟。

### 三、衣物、被褥等织物

收拾被污染的衣物、被褥等织物时应避免产生气溶胶。先将固体污秽物移除后浸在有效氯为 500mg/L 的含氯消毒剂溶液内 30 分钟，然后清洗。也可用流通蒸汽或煮沸消毒 30 分钟。若不能即时消毒，应把它们放置在密封的袋内，并尽快处理。

### 四、食品用具

餐（饮）具和食品加工工具清除食物残渣后，煮沸消毒 30 分钟，也可用有效氯为 500mg/L 含氯消毒液浸泡或擦拭，作用 30 分钟后，再用清水洗净。

### 五、皮肤、粘膜

皮肤被污染物污染时，应立即清除污染物，然后用一次性吸水材料沾取 0.5%碘伏消毒液擦拭消毒 3 分钟以上，使用清水清洗干净；粘膜应用大量生理盐水冲洗或 0.05%碘伏冲洗消毒。

### 六、医疗废物

患者产生的生活垃圾、一次性诊疗用品采用双层医疗废物袋，按医疗废物集中收集处置。

### 七、生活饮用水和供水设施

导致暴发的水及水源，应立即停止使用。对污染的供水管网、水箱、桶装水机、直饮水机进行消毒处理，应进行彻底清洗消毒，可用有效氯 100mg/L 消毒液浸泡 1 小时，或 50 mg/L 消毒液浸泡 24 小时，然后冲洗管网后使用。污染的水井需进行彻底消毒清掏后再开放取水。消毒时需保持余氯量为 0.5mg/L 以上，按水井的容量计算所需含氯消毒剂的量，加入井水中充分混匀，保持 30 分钟以上。抽出井水，清除淤泥，用清水冲洗井壁、井底，再抽尽污水。待水井自然渗水到正常水位后，按 1 立方米水加含有效氯 25%的漂白粉 150g~200g（含有效氯 25 mg/L~50 mg/L）进行消毒，浸泡 12~24 小时后，抽出井水。再待自然渗水到正常水位后，按正常消毒方法消毒，即可投入正常使用。污水按每升加 4g 漂白粉或 2 片消毒泡腾片搅匀，作用 60 分钟再排放。

## 八、室内空气

保持室内空气流通。自然通风或机械通风，也可采用循环风式空气消毒机进行空气消毒，无人的空间也可用紫外线对空气消毒，不可采用喷洒消毒剂的方法对室内空气进行消毒。

## 致谢

感谢美国疾控中心 Aron J. Hall、吴蜀豫，中国食品药品检定研究院骆海鹏，首都儿科研究所病毒研究室赵林清，北京大学第一医院侯凤琴，中国疾控中心传染病预防控制处常昭瑞、刘凤凤、袁辰、邢薇佳，浙江省疾控中心陈恩富、林君芬、缪梓萍，四川省疾控中心唐雪峰，湖南省疾控中心高立冬、胡世雄，湖北省疾控中心邢学森，北京市疾控中心钱海坤，广东省疾控中心方苓，深圳市疾控中心何雅青，北京市海淀区疾控中心华伟玉、北京市朝阳区疾控中心马建新和深圳市宝安区疾控中心李苑等专家在指南制定和修订过程中提供宝贵的修改建议和意见！

## 编写人员

廖巧红、冉陆、靳淼、崔生辉、袁俊、马会来、班海群、孙立梅、罗莉、刘娜、段招军、余宏杰

## 编写人员单位

- 102206 北京，中国疾病预防控制中心传染病预防控制处，传染病监测预警重点实验室（廖巧红、冉陆、罗莉、余宏杰）  
102206 北京，中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所（靳淼、刘娜、段招军）  
102206 北京，中国疾病预防控制中心中国现场流行病学培训项目（马会来）  
100021 北京，中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所（班海群）  
100050 北京，中国食品药品检定研究院（崔生辉）  
511430 广州，广东省疾病预防控制中心（孙立梅）  
510440 广州，广州市疾病预防控制中心（袁俊）

**主 办：**中国疾病预防控制中心 传染病预防控制处

**主 编：**余宏杰

**副主编：**李中杰

**编 辑：**王丽萍 曾令佳

**编辑部联系方式：**

**通讯地址：**北京市昌平区昌百路 155 号

**邮 编：**102206

**联系人：**王丽萍 曾令佳

**电 话：**010-58900546

**E-mail：**did@chinacdc.cn