

调查研究

餐饮服务单位及宾馆住宿场所环境和食品从业人员中
诺如病毒感染状况研究吉彦莉,王永全,崔海洋,靳博
(北京市西城区疾病预防控制中心,北京 100120)

摘要:目的 了解诺如病毒在餐饮服务单位和宾馆住宿场所环境中的分布及厨师隐性感染状况,并对其基因型别进行研究。方法 共抽检北京市西城区40家餐饮服务单位和10家宾馆住宿场所,每家单位采集4份环境涂抹样品及2名厨师粪便标本。用实时荧光聚合酶链式反应(PCR)对诺如病毒进行初步鉴定。通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)对诺如病毒开放读码框(opening reading frames, ORF)1区序列进行扩增,并对测序结果进行序列和进化分析。结果 共采集环境表面涂抹样品200份,厨师粪便标本100份。其中,1份墩布池涂抹样品为诺如病毒阳性,环境样品诺如病毒阳性率为0.5%(1/200),3份厨师粪便中检出诺如病毒,隐性感染率为3.0%(3/100)。3名厨师粪便标本诺如病毒ORF1区序列经RT-PCR扩增,进化树显示,1名厨师为GII.17基因型,2名厨师为GI.3基因型。结论 北京市西城区餐饮服务单位及宾馆住宿场所存在诺如病毒传播风险,应强化卫生管理,重视物体表面消毒及厨师健康教育,防止诺如病毒的进一步扩散。

关键词:诺如病毒;餐饮服务单位;宾馆;厨师;隐性感染;环境表面;基因型

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)03-0284-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.03.013

Prevalence and genotyping of *Norovirus* in environment
and food handlers of catering services and hotels

JI Yanli, WANG Yongquan, CUI Haiyang, JIN Bo

(Xicheng Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100120, China)

Abstract: Objective To investigate the prevalence and genotyping of *Norovirus* in environment and food handlers in catering services and hotels. **Methods** A total of 40 catering services and 10 hotels were selected as the sampling sites in this study and 4 environment samples and 2 food-handler fecal samples were collected from each site. RNA was extracted and preliminary analyzed for *Norovirus* by real-time polymerase chain reaction (PCR). Partial opening reading frames 1 (ORF1) sequences were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), followed by sequence and phylogenetic analysis. **Results** One mop sink swab out of 200 environment samples (0.5%, 1/200) and 3 out of 100 food handlers fecal samples (3.0%, 3/100) were positive for *Norovirus*. The genotyping of *Norovirus* revealed that one belonged to GII.17 genotype and two belonged to GI.3 genotype. **Conclusion** The transmission risk of *Norovirus* in catering services and hotels should be paid more attention to and hygienic management should be strengthened. Health education of food handlers to prevent the transmission of *Norovirus* should be strengthened.

Key words: *Norovirus*; catering service unit; hotel; food handler; asymptomatic infection; environment surfaces; genotype

诺如病毒是导致急性胃肠炎的重要原因,常引起突发性呕吐和腹泻^[1]。诺如病毒属于杯状病毒科,为单正链RNA病毒,其基因组包括3个开放读码框(opening reading frames, ORFs)。诺如病毒可分为GI~GVII共7个基因组,GI和GII是引起人类

诺如病毒急性胃肠炎的两种主要的基因组并至少分为31个基因型^[2]。由于感染者呕吐物及粪便中病毒含量高、排毒时间长、感染剂量低、环境稳定性强,因此诺如病毒常通过污染的水、食物、接触等在托幼机构、学校、养老院、饭店、宾馆等集体单位或人群密集场所引起急性胃肠炎的聚集或暴发^[3]。本研究对北京市西城区餐饮单位及宾馆进行了抽检,以了解诺如病毒分布及食品从业人员中诺如病毒感染状况,制定针对性的防控策略。

收稿日期:2020-03-24

基金项目:首都卫生发展科研专项(首发2020-3-7022)

作者简介:吉彦莉 女 主管检验师 研究方向为肠道病毒

E-mail: dls1015@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品/标本来源

本研究采用横断面调查方法,于2019年8月抽样检测北京市西城区40家餐饮服务单位和10家宾馆住宿场所。餐饮服务单位中A级18家、B级22家,被抽检的餐饮服务单位中须包含集体配餐企业;宾馆住宿场所中五星级1家、四星级1家、三星级8家。每家单位在冷荤间砧板、厨房地漏、墩布池/桶、卫生间厕坑4个区域各采集1份环境涂抹样品,共200份;同时每家单位采集2名厨师(冷荤厨师优先)肛拭子/粪便标本,共100份。

1.1.2 主要仪器与试剂

Express96全自动核酸提取仪、7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪均购自美国ABI, QIAxcel Advanced全自动实时毛细管电泳系统(德国QIAGEN)。

5×MagMAX™-96病毒核酸提取试剂盒(美国ABI),诺如病毒GI/诺如病毒GII核酸双重实时荧光PCR检测试剂盒(北京卓诚惠生生物科技股份有限公司), OneStep RT-PCR Kit、QIAxcel DNA Screening Kit均购自德国QIAGEN,PCR引物由上海生工生物股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 采样及前处理

粪便标本采集5g或5mL以上,置于清洁、无菌、干燥的密闭容器内;肛拭子采集时应有可见的粪便;环境样品采集时,用无菌拭子在磷酸盐缓冲液(PBS)中蘸湿,用力涂抹待采表面(最大面积100cm²)后,立即浸入病毒采样管。所有样品及标本在采集后4h内进行检测,粪便标本与PBS以1:10混合制备成10%粪便悬液,充分振荡混匀,8000r/min离心5min,取上清液用于检测。环境涂抹样品在检测前将病毒采样管充分振荡混匀,室温静置后吸上清液备用。

1.2.2 核酸提取及病毒检测

采用病毒核酸提取试剂盒,通过全自动核酸提取仪提取核酸。采用诺如病毒实时荧光PCR检测试剂盒对诺如病毒GI、GII基因组核酸进行检测。检测中严格设立空白对照、阴性对照、阳性对照,对检测全过程进行质量控制。实时荧光PCR检测结果判读时,若样品/标本有S型曲线扩增且荧光信号达到阈值时的循环数(Ct值)≤35,则为阳性结果。

1.2.3 诺如病毒ORF1区序列RT-PCR扩增及测序

将实时荧光PCR鉴定为诺如病毒阳性的样品/

标本核酸继续扩增其ORF1区序列(nt4568-4886, GenBank参考序列M87661)。引物P289/P290序列参考文献[4],RT-PCR反应程序为:55℃逆转录30min;94℃预变性2min;94℃变性30s,55℃退火30s,68℃延伸1min,40个循环;68℃末端延伸5min。使用QIAGEN OneStep RT-PCR Kit进行RT-PCR扩增,目的片段大小为319bp。使用全自动实时毛细管电泳系统对PCR产物进行分析,阳性片段由北京诺赛基因组研究中心有限公司进行切胶回收纯化及基因特异引物双向测序。

1.2.4 诺如病毒ORF1区基因序列进化分析

检查测序峰图的匹配程度确保测序结果真实可靠,将序列通过BLAST与GenBank中的核酸序列进行比对。从GenBank中下载诺如病毒不同基因型序列作为参考序列(表1)进行进化分析。用Vector NTI Advance® 11.5软件完成序列比对,用MEGA7软件进行进化分析,用邻接(N-J)法构建生物进化树,用Kimura 2-parameter模型计算毒株间遗传距离。

2 结果

2.1 诺如病毒检出情况

经实时荧光PCR检测,200份环境涂抹样品中,1份墩布池涂抹检出诺如病毒GII基因组,环境样品诺如病毒阳性率为0.5%(1/200);100份厨师肛拭子/粪便标本中,3份检出诺如病毒,其中1份为GII基因组,2份为GI基因组,厨师隐形感染率为3.0%,见表2。

2.2 诺如病毒ORF1区序列RT-PCR扩增

4份实时荧光PCR检测为诺如病毒阳性的样品/标本,通过扩增其基因组ORF1区序列,经毛细管电泳检测,仅3份厨师肛拭子/粪便标本扩增测序成功,经美国生物信息中心(NCBI)BLAST比对确认均为诺如病毒,分别命名为1902X017、1902X209和1902X210,其中1902X209和1902X210来自同一餐饮单位。

2.3 诺如病毒ORF1区基因序列进化分析

3名厨师诺如病毒ORF1区核酸序列比对发现,1902X017与1902X209和1902X210差异较大,同源率为66%。1902X209和1902X210之间同源率为100%,且两名厨师工作于同一餐饮单位,推测这两株诺如病毒毒株具有共同来源。从NCBI GenBank中下载不同基因型别、不同时间和不同地区的诺如病毒ORF1区基因序列作为参考,与研究中的3株诺如病毒毒株序列共同构建生物进化树,见图1。进化树显示,1902X017位于GII基因

表1 诺如病毒参考序列

Table 1 Reference sequences of *Norovirus*

GenBank 登录号	毒株	基因型	国家	采集时间
MN318341	2019-8-6-18/2019/GI. Pd_GI. 3	GI. 3	中国	2019年
MK073893	Hu/USA/2016/GI. Pd-GI. 3/Nashville-0047	GI. 3	美国	2016年
KX458103	PoHuTejo2015	GI. 9	葡萄牙	2015年
KX907730	Hu/USA/2014/GI. P7_GI. 7/GA5043	GI. 7	美国	2014年
KF429765	Hu/GI. 1/8 W/1968/USA	GI. 1	美国	1968年
LN854563	GI/Hu/NL/2011/GI. 4/Groningen	GI. 4	荷兰	2011年
JQ388274	Hu/GI. 6/Kingston/ACT160D/2010/AU	GI. 6	澳大利亚	2010年
KF306212	Hu/GI. 2/Jingzhou/2013401/CHN	GI. 2	中国	2013年
LN854568	GII/Hu/NL/2014/GII. 6/Groningen	GII. 6	荷兰	2014年
GU131223	Hu/NoV GII/Alingsas/p1/2009/SWE	GII. 9	瑞典	2009年
GU017905	Hu/GII. 14/8560/Maizuru/2008/JPN	GII. 14	日本	2008年
HM635119	Hu/GII. 7/Seoul/0342/2008/KOR	GII. 7	韩国	2008年
JX989075	Hu/GII. 6/GZ2010-L96/Guangzhou/CHN/2011	GII. 6	中国	2011年
MH443730	Hu/GII/JA128/CN/2016	GII. 17	中国	2016年
KU310886	FT/CHN/wan 4	GII. 17	中国	2014年
MK073885	Hu/USA/2016/GII. P16-GII. 4 Sydney/Fresno-0182	GII. 4	美国	2016年
KJ407074	Hu/GII. 2/HS255/2011/USA	GII. 2	美国	2011年
LN854569	GII/Hu/NL/2014/GII. 21/Groningen	GII. 21	荷兰	2014年
GU980585	CBNU1	GII. 3	韩国	2006年
KR007960	Hu/GII. 12-GII. 1/B1341/TH/2014	GII. 12	泰国	2014年

表2 诺如病毒检测结果

Table 2 Detection results of *Norovirus*

编号	采样地点	单位级别	来源	检测结果	Ct 值
1902X017	餐饮服务单位	A 级	厨师粪便	GII. 17 基因型	24.01
1902X209	餐饮服务单位	A 级	厨师肛拭子	GI. 3 基因型	21.89
1902X210	餐饮服务单位	A 级	厨师肛拭子	GI. 3 基因型	20.18
1902X297	宾馆住宿场所	三星	墩布池	GII 基因组	33.31

注:墩布池样品病毒量低(Ct 值为 33.31),无法确定基因型别

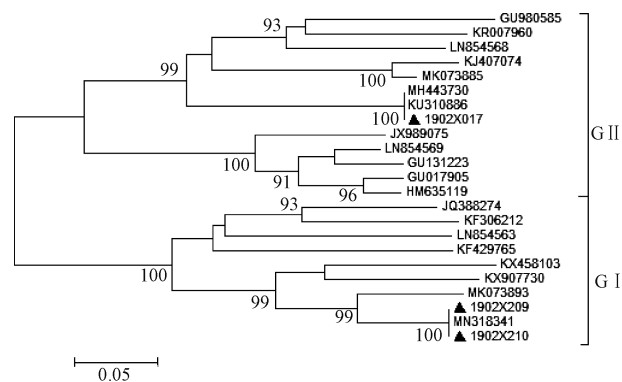


图1 诺如病毒 ORF1 区部分核苷酸序列进化树

Figure 1 Phylogenetic tree based on partial ORF1 region of *Norovirus*

组分支,与 GII 基因组参考序列同源性在 69%~100%之间,其中,与 2009 年瑞典 GII. 9 基因型参考序列 GU131223 的同源性最低(69%);与中国两株 GII. 17 基因型参考序列 MH443730(2016 年)和 KU310886(2014 年)同源性高达 100%,表明 1902X017 为 GII. 17 基因型。1902X209 和 1902X210 在进化树上位于 GI 基因组分支,其与 GI 基因组参考序列同源性为 72%~100%,其中,与 2010 年澳大利亚 GI. 6 基因型参考序列 JQ388274

同源性最低(72%);与 2019 年中国台湾 GI. 3 基因型参考序列 MN318341 同源性为 100%,且这三株毒株在进化树上构成一簇,表明 1902X209 和 1902X210 为 GI. 3 基因型。

3 讨论

诺如病毒感染后常出现呕吐、腹泻等急性胃肠炎症状,部分感染者可以不出现临床症状,为隐性感染者。人体感染试验中,诺如病毒隐性感染者占 30%^[5]。无症状和有症状感染者粪便排毒量和排毒时间相似,且均有感染性^[6-7]。在食品加工过程中,厨师隐性感染可能造成食品污染,从而导致诺如病毒的食源性传播^[8-10]。在美国,70%的食源性诺如病毒暴发疫情均与厨师感染有关^[11]。日本厨师诺如病毒隐性感染率高达 7%^[12]。本研究中,厨师诺如病毒隐性感染率为 3.0%,与韩国^[13]相似(2.3%),高于我国广州市荔湾区(1.2%)^[14]。本研究厨师感染诺如病毒包括 GII. 17 和 GI. 3 两种基因型,其中 GII. 17 基因型于 2014—2015 年在亚洲部分地区广泛流行并导致诺如病毒疫情暴发^[15];芬兰某宾馆曾因 GI. 3 基因型诺如病毒污染水和环境表面而导致胃肠炎的暴发^[16]。病例对照研究^[17]表

明,在厨师诺如病毒隐性感染引起的诺如病毒暴发疫情中,饭前便后洗手是保护因素。由于厨师诺如病毒隐性感染者不易甄别且危害严重,因此,建议通过以下措施加强对餐饮工作人员的健康管理:首先,应加强健康教育,增强厨师及餐饮工作人员防病意识,养成良好卫生习惯,操作时要戴手套和口罩,重视洗手频次及饭前便后洗手,确保手部卫生;其次,餐饮单位还应加强对食品从业人员的健康监督,定期体检,发现感染后应立即调离岗位;此外,还应落实消毒措施,重视粪便管理和卫生间消毒力度,防止出现交叉感染。

诺如病毒对环境的抵抗力强,可在多种环境中存活并被检出^[18-19]。在试验条件下,诺如病毒能在物体表面存活较长时间,并可能进一步扩散^[20]。餐饮服务单位和宾馆住宿场所环境中的诺如病毒能增加人群暴露风险,因此,对于餐饮服务单位和宾馆住宿场所应加强环境卫生管理,厕所专用墩布和墩布池要有明确标识,同时要加强对环境表面的消毒,防止诺如病毒的进一步扩散。

参考文献

- [1] HARDSTAFF J L, CLOUGH H E, VITTORIA L, et al. Foodborne and food-handler *Norovirus* outbreaks: a systematic review[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2018, 15(10): 589-597.
- [2] HAESSLER S, GRANOWITZ E V. *Norovirus* gastroenteritis in immunocompromised patients[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(10):971.
- [3] RONNQVIST M, AHO E, MIKKELA A, et al. *Norovirus* transmission between hands, gloves, utensils, and fresh produce during simulated food handling[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(17):5403-5410.
- [4] 高志勇,吕虹,黄芳,等. 90例病毒性胃肠炎患者粪便中诺如病毒检出情况分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2008, 3(8):564-566.
- [5] KIRBY A E, SHI J, MONTES J, et al. Disease course and viral shedding in experimental norwalk virus and snow mountain virus infection[J]. *J Med Virol*, 2014, 86(12):2055-2064.
- [6] HUYNEN P, MAUROY A, MARTIN C, et al. Molecular epidemiology of *Norovirus* infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso[J]. *J Clin Virol*, 2013, 58(3):515-521.
- [7] TEUNIS P F, SUKHRIE F H, VENNEMA H, et al. Shedding of *Norovirus* in symptomatic and asymptomatic infections [J]. *Epidemiol Infect*, 2015, 143(8):1710-1717.
- [8] SABRIA A, PINTO R M, BOSCH A, et al. *Norovirus* shedding among food and healthcare workers exposed to the virus in outbreak settings[J]. *J Clin Virol*, 2016, 82(7):119-125.
- [9] 华伟玉,陈春枝,梁金博,等. 2017年北京市海淀区某小学一起诺如病毒感染性腹泻暴发疫情调查[J]. *寄生虫病与感染性疾病*, 2018, 16(3):35-38.
- [10] 李世聪,吴杨,官旭华,等. 湖北省某中学因面条引起诺如病毒感染性腹泻暴发[J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(2): 174-178.
- [11] HALL A J, WIKSWO M E, PRINGLE K, et al. Vital signs: foodborne *Norovirus* outbreaks—United States, 2009–2012 [J]. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2014, 63(22):491-495.
- [12] OKABAYASHI T, YOKOTA S I, OHKOSHI Y, et al. Occurrence of *Norovirus* infections unrelated to *Norovirus* outbreaks in an asymptomatic food handler population[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(6):1985-1988.
- [13] KOO H S, LEE M O, KU P T, et al. Molecular epidemiology of *Norovirus* in asymptomatic food handlers in Busan, Korea, and emergence of genotype GII. 17[J]. *J Microbiol*, 2016, 54(10): 686-694.
- [14] 蔡明伟,陆龙,王敏,等. 广州市荔湾区餐饮业厨工诺如病毒感染情况及影响因素调查[J]. *医学动物防制*, 2018, 34(6):523-526.
- [15] 史永林,葛盈露,金晶,等. 安徽省急性胃肠炎疫情相关 GII. P17-GII. 17 基因型诺如病毒分子特征研究[J]. *病毒学报*, 2019, 35(2):233-239.
- [16] SOINI J, HEMMINKI K, PIRNES A, et al. Recurrent epidemics of gastroenteritis caused by *Norovirus* GI. 3 in a small hotel[J]. *Duodenum*, 2016, 132(2):165-171.
- [17] 沈钰钢,应锡钧,竺小春,等. 浙江某中学一起 GII 型诺如病毒引起的急性胃肠炎暴发疫情分析[J]. *中国农村卫生事业管理*, 2016, 36(9):1154-1158.
- [18] 宋灿磊,袁佳春,李澜,等. 诺如病毒胃肠炎疫情密切接触者感染及环境污染状况调查[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(16):3290-3292.
- [19] NENONEN N P, HANNOUN C, SVENSSON L, et al. *Norovirus* GII. 4 detection in environmental samples from patient rooms during nosocomial outbreaks[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(7):2352-2358.
- [20] LAMHOUEB S, FLISS I, NGAZOA S E, et al. Molecular study of the persistence of infectious human *Norovirus* on food-contact surfaces[J]. *Food Environ Virol*, 2009, 1(2):51-56.