

## 诺如病毒基因分型研究进展

沈玲羽<sup>1</sup> 姜博<sup>2</sup> 严寒秋<sup>1</sup> 李伟红<sup>1</sup> 高志勇<sup>1</sup> 王全意<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北京市疾病预防控制中心,北京市预防医学研究中心,传染病地方病控制所 100013

<sup>2</sup>首都医科大学公共卫生学院,北京 100069

通信作者:高志勇, Email: zhiyonggao1@163.com

**【摘要】** 诺如病毒是引起急性胃肠炎的主要病原体之一,极易突变和重组,型别众多。研究早期采用VP1区氨基酸序列对诺如病毒进行分型及鉴定。由于处在或接近聚合酶和衣壳区的重叠区为重组发生的热点区域,因此国际上提出使用聚合酶和衣壳区的双区域分型系统。目前基于2s标准的双区域分型方法,聚合酶区可分为10个基因组及76种基因型,包括2个暂定基因组及16种暂定基因型,VP1可分为12个基因组及53种基因型,包括2个暂定基因组及5种暂定基因型。暂定基因组和基因型有待进一步型别鉴定和基因组划分。本文对诺如病毒分子特征、不同分型方法的原理、序列扩增方法、在线分型工具及最新的基因分型研究进展进行综述。

**【关键词】** 诺如病毒; 基因分型; 聚合酶区; 衣壳区

**基金项目:**首都卫生发展科研专项(2020-2-1011);北京市疾病预防控制中心/北京市预防医学研究中心科研培育专项(2020-BJYJ-21, 2019-BJYJ-10)

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20200302-00234

### Progress on genotyping of norovirus

Shen Lingyu<sup>1</sup>, Jiang Bo<sup>2</sup>, Yan Hanqiu<sup>1</sup>, Li Weihong<sup>1</sup>, Gao Zhiyong<sup>1</sup>, Wang Quanyi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Infectious Diseases and Endemic Diseases Prevention and Control, Beijing Research Center for Preventive Medicine, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China; <sup>2</sup>School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: Gao Zhiyong, Email: zhiyonggao1@163.com

**【Abstract】** Norovirus are now recognized as one of the main pathogens causing acute gastroenteritis in both developed and developing countries. However, norovirus are easily mutated and recombined, and have many genotypes. In early studies, norovirus were amplified and identified by amino acid sequence of VP1 region. It was found that norovirus were easily mutated and recombined in or near the overlapping regions of polymerase and capsid. A two regions genotyping method was positively proposed internationally. Depending on the 2 times standard deviation standard method for two regions identification, norovirus polymerase regions can be divided into 10 gene groups and 76 genotypes including 2 tentative gene groups and 16 tentative genotypes. The VP1 region can be divided into 12 gene groups and 53 genotypes including 2 tentative gene groups and 5 tentative genotypes. However, the tentative gene groups and genotypes need to be further identified and reclassified. In this article, characteristics of norovirus sequences, principles of different genotyping methods, methods of sequence amplification, on-line genotyping tools and the latest studies in norovirus genotypes are reviewed and introduced.

**【Key words】** Norovirus; Genotyping; Polymerase region; Capsid region

**Fund programs:** Capital's Funds for Health Improvement and Research (2020-2-1011); Cultivation Fund of Beijing Center for Diseases Prevention and Control/Beijing Research Center for Preventive Medicine (2020-BJYJ-21, 2019-BJYJ-10)

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20200302-00234

诺如病毒属杯状病毒科(Caliciviridae)诺如病毒属<sup>[1]</sup>,宿主广泛,可感染人类、犬科动物、啮齿动物、家畜(猪、羊、牛)、海狮及蝙蝠等<sup>[2]</sup>。诺如病毒是引起人类非细菌性急性胃肠炎和食源性急性胃肠炎暴发的主要病原体之一,是成年人散发腹泻的第一大病原和≤5岁婴幼儿腹泻的第二大病原<sup>[3-7]</sup>,

各月份均有散发病例,冬春季节高发,全世界约20%的急性胃肠炎病例由诺如病毒引起<sup>[5,8-10]</sup>。

诺如病毒是单股正链RNA病毒,极易变异,包括多个基因组及多种基因型<sup>[11]</sup>。如何准确鉴定诺如病毒基因型,对疫情溯源、分子流行病学监测和疫苗设计至关重要。研究早期

主要基于衣壳蛋白编码区氨基酸或核苷酸序列的差异对诺如病毒分型<sup>[12]</sup>。随着在全球范围内的广泛传播和不断暴发,发现处在或靠近聚合酶区和衣壳 VP1 区重叠区易发生突变及重组,因此国际上推荐使用聚合酶区及 VP1 区双区域分型系统<sup>[4,13]</sup>。基因分型标准早期采用未校正的遗传距离,诺如病毒型别和序列的增多导致原有的分型方法将型别错误分类,研究者在原有方法的基础上,优化遗传距离分类标准,提出了 2 倍标准差(2s)校正后遗传距离的分型方法。依据此方法,将基因型重新划分,鉴定出新的基因组和基因型,并发现聚合酶区 2 个暂定基因组及 10 余种暂定基因型,VP1 区 2 个暂定基因组及 5 种暂定基因型<sup>[13]</sup>。暂定基因组和基因型有待进一步型别鉴定和基因组划分。对诺如病毒分子特征、不同分型方法的原理、序列扩增方法、在线分型工具及最新的基因分型研究进展进行综述,旨在阐明如何开展诺如病毒分型,推动国内诺如病毒分型方法改进及标准化,提高我国诺如病毒监测水平。

### 一、分子特征

诺如病毒基因组核酸全长约 7 000~7 700 bp,分为 3 个开放阅读框(open reading frames,ORFs)<sup>[14-15]</sup>。其中 ORF1 编码 6 种非结构蛋白,分别是氨基末端蛋白(p48)、核昔三磷酸酶(NTPase)、3a 样蛋白(p22)、基因组连接病毒蛋白(VPg)、半胱氨酸蛋白酶(Pro)和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(Pol)。诺如病毒衣壳由主要衣壳蛋白 VP1 和次要结构蛋白 VP2 组成,分别由 ORF2 和 ORF3 编码,衣壳蛋白 VP1 长 539 aa,主要分为壳区(N、S 区)和刺突区(P 区),S 区和 P 区通过铰链区(H 区)连接,其中 P 区由 P1 亚区和 P2 亚区组成,见图 1<sup>[1,16]</sup>。

诺如病毒重组病毒样颗粒(recombinant virus-like particles,rVLPs)三维结构 X 射线晶体学研究显示,VP1 区衣壳蛋白的 P1 及 P2 区形成拱形结构,P2 结构域位于拱形顶部,由两个 P1 结构域“臂”支撑,S 结构域形成围绕 RNA 基因组的病毒离子的内部支架,并将拱形定位到病毒离子表面,见图 2<sup>[17-19]</sup>。研究显示,P2 结构域内存在组织血型抗原(HBGA)碳水化合物结合位点,为诺如病毒与宿主细胞相互作用和免疫识别发生的主要部位,为诺如病毒基因组中变异最活跃的区域,结合 HBGAs 的不同将直接影响病毒感染种群的发病率<sup>[17,20]</sup>。通过病毒抗原变异,从而易于与不同的 HBGAs 结合以及逃避机体免疫应答<sup>[21-22]</sup>。VP2 结构蛋白对诺如病毒颗粒重组有影响,其对 VP1 表达的上调和病毒结构中 VP1 的稳定性有关<sup>[23]</sup>。研究显示重组主要发生在 ORF1~ORF2 重叠区附近,少数发生在 ORF2~ORF3 重叠区<sup>[24-27]</sup>。

### 二、基因型分型方法

1. 基于未校正配对遗传距离的 VP1 区氨基酸序列分型方法:2006 年 Zheng 等<sup>[12]</sup>报道基于未校正配对遗传距离的 VP1 区氨基酸序列分型方法。通过对 GenBank 收录的诺如病毒 VP1 区序列进行比对,氨基酸翻译及贝叶斯系统发育分析,计算系统发育树不同分支之间的未校正配对遗传距离,获得诺如病毒基因组别和基因型别的判定标准:如果毒株遗传距离<15%,属于同一基因型;如果遗传距离在 15%~45%

之间,则属于同一基因组;如果遗传距离>45%,则属于不同基因组。研究结果显示,诺如病毒被分为 5 组 G I~G V,G I 组有 8 种基因型(G I.1~8),G II 组有 17 种基因型(G II.1~17),G III 组有 2 种基因型(G III.1~2),G IV 及 G V 组均有 1 种基因型(G IV.1、G V.1),其中新分型 6 种基因型,包括 G I.8 及 G II.13~17。

2. 基于 2s 标准的聚合酶区和 VP1 区的双区域分型方法:2013 年 Kroneman 等<sup>[28]</sup>对 GenBank 收录的诺如病毒 VP1 区和聚合酶区的氨基酸、核苷酸序列分别进行比对,运用最佳模型构建贝叶斯树、最大似然树,输出进化树中不同基因型的遗传距离,计算同种基因型和同种基因组的平均遗传距离及其标准差,得出基因型判定标准:当与同源性最高的基因型的遗传距离在该基因型的平均遗传距离±2s 范围内,则属于该基因型;当与已知同源性最高的基因型的遗传距离超过该基因型的平均遗传距离±2s,则为新基因型,该分型标准即 2s 标准。据此,VP1 区分型:G I 组有 9 种基因型(G I.1~9),G II 组有 22 种基因型(G II.1~22),其中 G I 及 G II 组共鉴定 4 种新基因型,为 G I.9、G II.20、22。聚合酶区分型结果显示,G II 组共分为 18 种基因型(G II.1~4、G II.6~8、G II.11~13、G II.16、G II.18、G II.20~22、G II.c、G II.e 及 G II.g),与 VP1 鉴定的基因型相符合<sup>[28]</sup>。

### 三、诺如病毒基因型

近年来,诺如病毒序列的增多及新型诺如病毒的出现促使更新基因分型。2019 年 Chhabra 等<sup>[13]</sup>依据 2s 标准分型方法将 GenBank 收录的 VP1 区和聚合酶区序列重新计算和分型。

1. VP1 区基因型:诺如病毒 VP1 区基因组共分为 12 组,包括明确分类的基因组 10 组,即 G I~G X,以及新暂定基因组 2 组,即 GNA1、GNA2,共分为 48 种确定基因型及 5 种新暂定基因型,见表 1<sup>[13,28-33]</sup>。48 种明确分类的基因型,其中 9 种为 G I 组(G I.1~9)、26 种为 G II 组(G II.1~14、16~27)、3 种为 G III 组(G III.1~3)、G IV 组、G V 组、G VI 组各 2 种(G IV.1~2、G V.1~2、G VI.1~2)、G VII.1、G VIII.1、G IX.1 及 G X 各 1 种(G VII.1、G VIII.1、G IX.1 和 G X.1)<sup>[13,28-33]</sup>。5 种新暂定基因型包括 G II 组 2 种(G II.NA1、G II.NA2)、G IV 及暂定基因组 GNA1 和 GNA2 各 1 种(G IV.NA1、GNA1.1、GNA2.1)<sup>[13,28-33]</sup>。其中 G II.4 又被分为不同基因亚型,包括 G II.4 Asia、G II.4 Den Haag、G II.4 Farmington Hills、G II.4 Hong Kong、G II.4 Hunter、G II.4 New Orleans、G II.4 Osaka、G II.4 Sydney、G II.4 US95~96、G II.4 Yerseke<sup>[29-33]</sup>。

可感染人的诺如病毒 VP1 区基因组共 5 组,为 G I、G II、G IV、G VIII 及 G IX,包括 38 种可感染人的基因型,其中 9 种为 G I 组(G I.1~9)、25 种为 G II 组(G II.1~10、G II.12~14、G II.16、G II.17、G II.20~27 及暂定基因型 G II.NA1~G II.NA2)、2 种为 G IV 组(G IV.1 及 G IV.NA1)、G VIII、G IX 组各 1 种(G VIII.1、G IX.1)<sup>[13,31,33]</sup>。

可感染动物的诺如病毒 VP1 区基因组共 8 组,为 G II、G III、G IV、G V、G VI、G VII、GNA1 及 GNA2,包括 15 种可感染动物的基因型<sup>[13,29-32,34]</sup>。其中感染猪的基因型为 G II.11、G II.18、

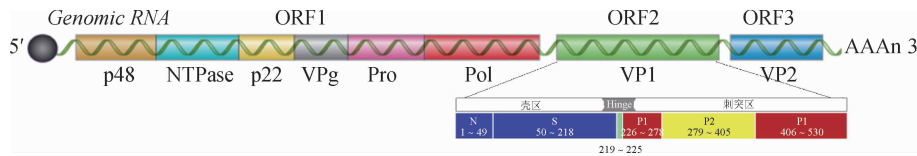


图1 诺如病毒基因组结构图<sup>[11-12]</sup>

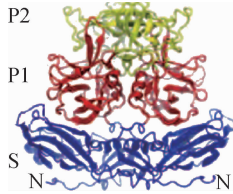


图2 诺如病毒衣壳蛋白二聚体三维结构图<sup>[13]</sup>

G II.19,属于G II组;感染牛的基因型为G III.1、G III.2,属于G III组;感染羊的基因型为G III.3,属于G III组;感染鼠的基因型为G V.1、G V.2,属于G V组;感染犬的基因型为G IV.2、G VI.1、G VI.2、G VII.1,分别属于G IV、G VI及G VII组;感染菊头蝠的基因型为G X.1,属于G X组;感染港湾鼠海豚的基因型为G NA1.1,属于G NA1组;感染海狮的基因型为G NA2.1,属于G NA2组<sup>[13,29-32,34]</sup>。

2. 聚合酶区基因型:诺如病毒的聚合酶区基因组共分为10组,其中明确分类的基因组共8组,即G I.P~G X.P,新暂定基因组为2组,即G NA1.P、G NA2.P,共分为60种确定基因型及16种新暂定基因型,见表2<sup>[12-13,29-32,34]</sup>。60种确定基因型,其中14种为G I.P组(G I.P1~14)、37种为G II.P组(G II.P1~8、11~13、15~18、20~41)、G III.P、G V.P及G VI.P组各2种(G III.P1~2、G V.P1~2、G VI.P1~2)、G IV.P、G VII.P

及G X.P组各1种(G IV.P1、G VII.P1、G X.P1)<sup>[12-13,28-32]</sup>。16种新暂定基因型包括G I.P组4种(G I.PNA1~4)、G II组9种(G II.PNA1~9)、G IV、G NA1.P及G NA2.P各1种(G IV.PNA、G NA1.P、G NA2.P1)<sup>[32-33,35]</sup>。其中G II.P4又被分为不同基因亚型,包括G II.P4 Den Haag、G II.P4 Farmington Hills、G II.P4 Hunter、G II.P4 New Orleans、G II.P4 US95~96、G II.P4 Yerseke<sup>[13,29-30,32-34]</sup>。

可感染人的诺如病毒聚合酶区基因组共3组,为G I.P、G II.P、G IV.P,包括63种可感染人的基因型,其中18种为G I组(G I.P1~14、G I.PNA1~4)、43种为G II组(G II.P1~8、G II.P12~13、G II.P15~17、G II.P20~41、G II.PNA1~3、G II.PNA5~9)、2种为G IV组(G IV.P1及G IV.PNA1)<sup>[12-13,31,33]</sup>。

感染动物的诺如病毒聚合酶区基因组共8组,为G II.P、G III.P、G V.P、G VI.P、G X.P、G NA.P1及G NA.P2,包括13种可感染动物的基因型<sup>[12-13,29-32,34]</sup>。其中感染猪的基因型为G II.P11、G II.P18、G II.PNA4,属于G II.P组;感染牛的基因型为G III.P1、G III.P2,属于G III.P组;感染鼠的基因型为

表2 诺如病毒聚合酶区基因型

基因组	聚合酶区基因型	基因型合计
G I.P	G I.P1、G I.P2、G I.P3、G I.P4、G I.P5、G I.P6、G I.P7、G I.P8、G I.P9、G I.P10、G I.P11、G I.P12、G I.P13、G I.P14、G I.PNA1 <sup>a</sup> 、G I.PNA2 <sup>b</sup> 、G I.PNA3 <sup>b</sup> 、G I.PNA4 <sup>b</sup>	14及4(暂定)
G II.P	G II.P1、G II.P2、G II.P3、G II.P4(G II.P4 Den Haag、G II.P4 Farmington Hills、G II.P4 Hunter、G II.P4 New Orleans、G II.P4 US95~96、G II.P4 Yerseke)、G II.P5、G II.P6、G II.P7、G II.P8、G II.P11、G II.P12、G II.P13、G II.P15、G II.P16、G II.P17、G II.P18、G II.P20、G II.P21、G II.P22、G II.P23、G II.P24、G II.P25、G II.P26、G II.P27、G II.P28、G II.P29、G II.P30、G II.P31、G II.P32、G II.P33、G II.P34、G II.P35、G II.P36、G II.P37、G II.P38、G II.P39、G II.P40、G II.P41、G II.PNA1 <sup>b</sup> 、G II.PNA2 <sup>b</sup> 、G II.PNA3 <sup>b</sup> 、G II.PNA4 <sup>b</sup> 、G II.PNA5 <sup>b</sup> 、G II.PNA6 <sup>b</sup> 、G II.PNA7 <sup>b</sup> 、G II.PNA8 <sup>b</sup> 、G II.PNA9 <sup>b</sup>	37及9(暂定)
G III.P	G III.P1、G III.P2	2
G IV.P	G IV.P1、G IV.PNA1 <sup>b</sup>	1及1(暂定)
G V.P	G V.P1、G V.P2	2
G VI.P	G VI.P1、G VI.P2	2
G VII.P	G VII.P1	1
G X.P	G X.P1	1
G NA1.P <sup>a</sup>	G NA1.P1 <sup>b</sup>	1(暂定)
G NA2.P <sup>a</sup>	G NA2.P1 <sup>b</sup>	1(暂定)

表1 诺如病毒VP1区基因型

基因组	VP1区基因型	基因型合计
G I	G I.1、G I.2、G I.3、G I.4、G I.5、G I.6、G I.7、G I.8、G I.9	9
G II	G II.1、G II.2、G II.3、G II.4(G II.4 Asia、G II.4 Den Haag、G II.4 Farmington Hills、G II.4 Hong Kong、G II.4 Hunter、G II.4 New Orleans、G II.4 Osaka、G II.4 Sydney、G II.4 US95~96、G II.4 Yerseke)、G II.5、G II.6、G II.7、G II.8、G II.9、G II.10、G II.11、G II.12、G II.13、G II.14、G II.16、G II.17、G II.18、G II.19、G II.20、G II.21、G II.22、G II.23、G II.24、G II.25、G II.26、G II.27、G II.NA1 <sup>b</sup> 、G II.NA2 <sup>b</sup>	26及2(暂定)
G III	G III.1、G III.2、G III.3	3
G IV	G IV.1、G IV.2、G IV.NA1 <sup>b</sup>	2及1(暂定)
G V	G V.1、G V.2	2
G VI	G VI.1、G VI.2	2
G VII	G VII.1	1
G VIII	G VIII.1	1
G IX	G IX.1(原G II.15)	1
G X	G X.1	1
G NA1.P <sup>a</sup>	G NA1.1 <sup>b</sup>	1(暂定)
G NA2.P <sup>a</sup>	G NA2.1 <sup>b</sup>	1(暂定)

注: <sup>a</sup>暂定基因组; <sup>b</sup>暂定基因型(因 GenBank 收录的此类诺如病毒序列较少,无法对其明确分类,需要进一步研究<sup>[13]</sup>)

注: <sup>a</sup>暂定基因组; <sup>b</sup>暂定基因型(因 GenBank 收录的此类诺如病毒序列较少,无法对其明确分类,需进一步研究<sup>[13]</sup>)



G V.P1、G V.P2,属于 G V.P 组;感染犬的基因型为 G VI.P1、G VI.P2、G VII.P1,分别属于 G VI.P 及 G VII.P 组;感染菊头蝠的基因型是 G X.P1,属于 G X.P 组;感染港湾鼠海豚的基因型是 G NA1.P1,属于 G NA1.P 组;感染海狮的基因型是 G NA2.P1,属于 G NA2.P 基因组<sup>[29-32,34]</sup>。

3. 国内外优势基因型:虽然诺如病毒分型众多,但引起人急性胃肠炎的诺如病毒主要为 G II 组,部分为 G I 组,少数由其他组引起<sup>[32-33]</sup>。人群中不同 HBGA 表型的个体对诺如病毒结合力不同<sup>[22]</sup>。“分泌型”个体,即 FUT2 基因未失活,可分泌转移酶,在 HBGA 上加一个  $\alpha(1,2)$ -盐藻糖,使之成为 ABO 抗原的前体 H 抗原。分泌型个体对大多数诺如病毒易感,尤其是 G II.4,“非分泌型”个体,即 FUT2 基因失活,不能形成 H 抗原,对大部分诺如病毒耐受<sup>[36]</sup>。近期研究显示, G II.4 也可表现出结合非分泌型 HBGA Le<sup>a</sup> 抗原的能力<sup>[37-38]</sup>。

因此,诺如病毒中最主要优势株是 G II.4,不同变异株及重组株的检出率占全球因诺如病毒引发疫情的 55%~85%,其易于发生抗原漂移,通过与 HBGA 之间相互作用,导致适应性变异的长期积累,形成新的亚型,发生 HBGA 结合特异性变化,导致人群大流行<sup>[32,39]</sup>。自 20 世纪 90 年代中期报道 G II.P4-G II.4 成为世界诺如病毒流行株之后,每隔几年就会产生新的基因型,引起全球的诺如病毒感染的暴发流行,截至目前,共引起 6 次大流行,分别由 US95~96 (1995 年)、Farmington Hills (2002 年)、Hunter (2004 年)、Yerseke 和 Den Haag (2006 年)、Neworlean (2009 年) 及 Sydney (2012 年) 引起。2012 年后 G II.P31 (G II.Pe)-G II.4 Sydney 2012 株成为国内外优势流行株<sup>[40]</sup>。

G II.P17-G II.17 于 1978 年首次发现,2012 年以前流行率低,2012—2013 年, G II.P17-G II.17 占肯尼亚河流沿岸农村和城市地区水环境检测到的诺如病毒的 76%<sup>[41]</sup>。2014—2015 年冬季, G II.P17-G II.17 新亚型出现,在韩国、日本及中国等亚洲地区引起急性胃肠炎暴发,造成了严重的疾病负担<sup>[42]</sup>。在中国,报道显示占广东省和江苏省的暴发疫情中的 82% 和 70%,在中国香港地区取代了 G II.4 Sydney 2012 成为优势株,感染 85% 发生于学校,其次是工厂与幼儿园,易感人群主要为大龄儿童和成年人<sup>[43-44]</sup>。G II.P17-G II.17 被分为 4 个进化分支 (A~D), C、D 支为在中国、韩国和日本引起暴发的主要毒株,在欧洲、美国和澳大利亚仅偶有发现<sup>[42]</sup>。

G II.P16-G II.2 于 2006—2007 年冬季突然出现,并迅速

成为优势流行株,在德国、日本、法国、美国和澳大利亚等均检测到这种病毒引起的暴发<sup>[45]</sup>。2016 年冬季, G II.P16-G II.2 新进化分支出现,引起的胃肠炎病例于既往同期相比大幅度激增<sup>[46]</sup>。研究推断, G II.P16 聚合酶区影响聚合酶功能和病毒传播的位点发生碱基突变,故而增强了病毒复制和传播的能力,提高了病毒适应性<sup>[46]</sup>。

四、常用基因分型区域

基于诺如病毒基因型和序列的多样性,扩增聚合酶区和 VP1 区序列全长较为困难,研究显示聚合酶区和 VP1 区中的不同基因区域可用于基因分型,从而减少扩增难度<sup>[29,34]</sup>。聚合酶区分型区域有 A 和 B,衣壳区分型为 C、D 及 E,其中常用的聚合酶区为 B、衣壳区 C,见图 3<sup>[27,31,34,47-48]</sup>。诺如病毒 ORF2 区 C 及 D 的基因分型方案比较,发现 D 分型实验退火温度较低,为 40 °C,增加非特定序列的扩增,并且 D 位于 ORF2 的更可变部分,故 C 分型成功率高于 D,分型成功率分别为 78%、52%,但 D 更助于鉴定 G II.4 变异株的序列遗传多样性。基于整体性能,研究者推荐诺如病毒的 ORF2 基因分型区域为 C、D 可用于识别 G II.4 变异<sup>[27,31]</sup>。

目前 G I 组常用的 VP1 区分型引物,正向引物 G1SKF (5' - CTGCCCGAATTGTAATGA-3', 5 342 ~ 5 361 bp) 及反向引物 G1SKR (5' - CCAACCCARCCATTRTACA-3', 5 653 ~ 5 671 bp),获得片段长度为 330 bp<sup>[33,35]</sup>。以及正向引物 COG1F (5' - CGYTGGATGCGNTTYCATGA-3', 5 291 ~ 5 310 bp),与反向引物 G1SKR,获得片段长度为 381 bp<sup>[29,30,37]</sup>。G I 组可同时进行聚合酶区和 VP1 区分型的正向引物为 MON432 (5' - TGGACICGYGGICCYAAYCA-3', 4 811 ~ 4 830 bp),反向引物 G1SKR,获得片段长度为 579 bp<sup>[32-33,35]</sup>。

目前 G II 组常用的 VP1 区分型引物,正向引物为 G2SKF (5' - CNTGGGAGGGCGATCGCAA-3', 5 058 ~ 5 076 bp) 与反向引物 G2SKR (5' - CCRCCNGCATRHCCRTTRTACA-3', 5 379 ~ 5 401 bp),获得片段长度为 344 bp<sup>[33,35]</sup>,以及 COG2F (5' - CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3', 5 003 ~ 5 028 bp) 与 G2SKR,获得片段长度为 387 bp<sup>[30,34,36]</sup>。G II 组可同时进行聚合酶区和 VP1 区分型的正向引物为 MON431 (5' - TGGACIAGRGGICCYAAYCA-3', 4 820 ~ 4 838 bp),反向引物 G2SKR,获得片段长度为 570 bp<sup>[32,35]</sup>。

五、诺如病毒命名

基于诺如病毒聚合酶区和 VP1 区双区域分型,为了区分

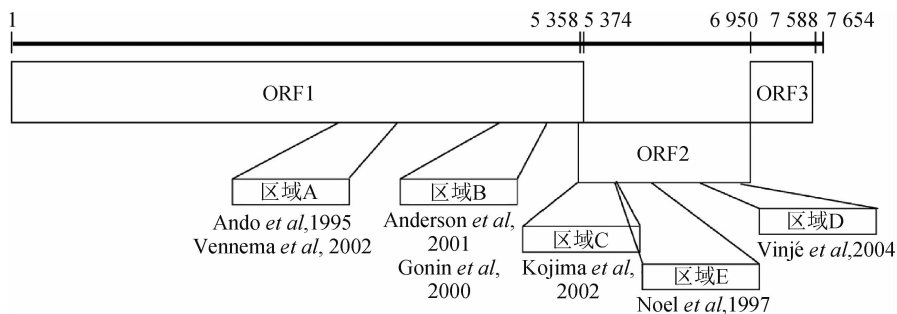


图 3 诺如病毒基因分型所用区域<sup>[22]</sup>

混合感染和重组,提出诺如病毒聚合酶区和VP1区双区域双命名系统,其聚合酶区基因型由大写P指定,如G II.P4,然后是基因型指定,如G II.4,即G II.P4-G II.4。命名系统包括诺如病毒/基因组别/宿主/国家/检出时间/基因型/毒株编号,例:诺如病毒已获得聚合酶区和VP1区双分型结果,则毒株名称应为:norovirus G II/Hu/US/2010/G II.P12-G II.12/HS206<sup>[28]</sup>。仅VP1序列已知,名称应为:norovirus/G II/Hu/AU/2012/G II.4 Sydney/Melbourne456<sup>[12,28]</sup>。

#### 六、在线分型软件

1. 荷兰在线分型软件:Kroneman等<sup>[49]</sup>开发诺如病毒在线基因分型工具,其分型原理共分为3步:①纳入感染人的杯状病毒科病毒的基因序列作为参考序列,对目的序列进行BLAST比对,确定其是否为诺如病毒及其不同基因组,当BLAST分析期望值(E) $<10^{-5}$ 时,可给出目的序列的片段长度和基因组片段位置;②对已鉴定成功的诺如病毒序列,且序列长度VP1区 $>100$  bp或聚合酶区在 $100\sim 800$  bp之间,通过序列比对及系统发育分析,对诺如病毒的聚合酶区和VP1区序列进行分型;③通过对G II.4序列比对,运用邻连法和HKY85-36替代模型构建系统发育树,进行基因亚型及变异株分型。目前该方法已通过验证并广泛使用,目前软件已更新为Norovirus Typing Tool Version 2.0,其网址为<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>。

2. 美国在线分型软件:美国CaliciNet实验室推出诺如病毒在线分型软件<sup>[50]</sup>,其原理是使用类似于BLAST算法,根据不同基因型别的参考序列,对G I、G II、G IV、G VIII和G IX组的聚合酶区和衣壳区序列进行分型,并对G I、G II、G IV和G V的诺如病毒衣壳区进行分型<sup>[26]</sup>。基因组命名会根据NoroNet命名工作组的建议进行更新,分型参考序列分别依据最新的研究进展进行更新<sup>[13,28,39,51]</sup>。目前该方法已通过验证,其网址为<https://norovirus.phiresearchlab.org/bctyping.html>。

#### 七、展望

随着GenBank中诺如病毒收录序列增多,诺如病毒基因分型更加明确和细化,分型方法从2006年未校正配对遗传距离的VP1区氨基酸序列分型方法,发展和更新为2013年基于2 s标准的诺如病毒聚合酶区和VP1区的双区域分型方法。运用该方法2019年诺如病毒基因分型细化到聚合酶区已确定60种基因型及16种暂定基因型,VP1区已确定48种基因型及5种暂定基因型。诺如病毒极易变异,新型诺如病毒以及重组诺如病毒不断出现,新的变异株因突变或重组从而提高病毒适应性和感染性,常常导致急性胃肠炎暴发流行。今后需进一步探究诺如病毒分型方法,推动国内诺如病毒分型方法改进及标准化,提高我国诺如病毒监测水平,为新型诺如病毒以及重组诺如病毒的发现和鉴定提供方法支持,对预防诺如病毒引起的急性胃肠炎暴发流行奠定基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参 考 文 献

- [1] Inns T, Harris J, Vivancos R, et al. Community-based surveillance of norovirus disease: a systematic review [J]. BMC Infect Dis, 2017, 17 (1): 657-667. DOI: 10.1186/s12879-017-2758-1.
- [2] Lindesmith LC, Brewer-Jensen PD, Mallory ML, et al. Virus-host interactions between nonsecretors and human norovirus [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2020, 10 (2): 245-267. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2020.03.006.
- [3] Queiros-Reis L, Lopes-João A, Mesquita JR, et al. Norovirus gastroenteritis outbreaks in military units: a systematic review [J]. BMJ Mil Health, May 2020. DOI: 10.1136/bmjilitary-2019-001341.
- [4] Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis [J]. J Virol, 1972, 10 (5): 1075-1081. DOI: 10.1128/JVI.10.5.1075-1081.1972.
- [5] Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, et al. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and G II.4 variants [J]. J Clin Virol, 2013, 56 (3): 185-193. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.11.011.
- [6] 王宇,贾蕾,高志勇,等.综合指数法建立北京市诺如病毒急性胃肠炎流行水平分级标准[J].国际病毒学杂志,2019,26(4): 225-228. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2019.04.004. Wang Y, Jia L, Gao ZY, et al. Establishment of grading thresholds for epidemic intensity of norovirus acute gastroenteritis in Beijing by synthetic index method [J]. Int J Virol, 2019, 26 (4): 225-228. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2019.04.004.
- [7] Hall AJ, Wikswo ME, Pringle K, et al. Vital signs: foodborne norovirus outbreaks-United States, 2009-2012 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2014, 63 (22): 491-495.
- [8] Hall AJ, Eisenbart VG, Etingue AL, et al. Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001-2008 [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18 (10): 1566-1573. DOI: 10.3201/eid1810.120833.
- [9] Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and Meta-analysis [J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14 (8): 725-730. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70767-4.
- [10] Matsui SM, Kim JP, Greenberg HB, et al. The isolation and characterization of a Norwalk virus-specific cDNA [J]. J Clin Invest, 1991, 87(4): 1456-1461. DOI: 10.1172/JCI115152.
- [11] Xi JN, Graham DY, Wang KN, et al. Norwalk virus genome cloning and characterization [J]. Science, 1990, 250 (4987): 1580-1583. DOI: 10.1126/science.2177224.
- [12] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature [J]. Virology, 2006, 346(2): 312-323. DOI: 10.1016/j.viro.2005.11.015.
- [13] Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes [J]. J Gen Virol, 2019, 100 (10): 1393-1406. DOI: 10.1099/jgv.0.001318.
- [14] Thorne LG, Goodfellow IG. Norovirus gene expression and replication [J]. J Gen Virol, 2014, 95 (2): 278-291. DOI: 10.1099/vir.0.059634-0.
- [15] Prasad BV, Crawford S, Lawton JA, et al. Structural studies on gastroenteritis viruses [J]. Novartis Found Symp, 2001, 238: 26-37. DOI: 10.1002/0470846534.ch3.
- [16] Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, et al. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid [J]. Science, 1999, 286 (5438): 287-290. DOI: 10.1126/science.286.5438.287.
- [17] Cao S, Lou ZY, Tan M, et al. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus [J]. J Virol, 2007, 81 (11): 5949-5957. DOI: 10.1128/JVI.00219-07.
- [18] Choi JM, Hutson AM, Estes MK, et al. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group

[1] Inns T, Harris J, Vivancos R, et al. Community-based surveillance of norovirus disease: a systematic review [J]. BMC

- antigens by Norwalk virus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(27):9175-9180. DOI:10.1073/pnas.0803275105.
- [19] Verhoef LPB, Kroneman A, van Duynhoven Y, et al. Selection tool for foodborne norovirus outbreaks [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(1):31-38. DOI:10.3201/eid1501.080673.
- [20] Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus [J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(1):134-164. DOI:10.1128/cmr.00075-14.
- [21] Graziano VR, Wei J, Wilen CB. Norovirus attachment and entry [J]. Viruses, 2019, 11(6):495. DOI:10.3390/v11060495.
- [22] Zhang DS, Tan M, Zhong WM, et al. Human intestinal organoids express histo-blood group antigens, bind norovirus VLPs, and support limited norovirus replication [J]. Sci Rep, 2017, 7:12621. DOI:10.1038/s41598-017-12736-2.
- [23] Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, et al. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system [J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(3):231-241. DOI:10.1038/nrmicro2296.
- [24] 蒋翠莲, 曹雪, 艾静, 等. G II.P21/G II.3 型重组诺如病毒的分子特征分析 [J]. 国际病毒学杂志, 2019, 26(4):233-236. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2019.04.006.  
Jiang CL, Cao X, Ai J, et al. Analysis on the molecular characteristics of G II.P21/G II.3 recombinant norovirus [J]. Int J Virol, 2019, 26(4):233-236. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2019.04.006.
- [25] Fu J, Ai J, Jin M, et al. Emergence of a new G II.17 norovirus variant in patients with acute gastroenteritis in Jiangsu, China, September 2014 to March 2015 [J]. Euro Surveill, 2015, 20(24):21157. DOI:10.2807/1560-7917.es2015.20.24.21157.
- [26] Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, et al. Complete genome sequence of a recombinant G II.P16-G II.4 norovirus detected in Kawasaki City, Japan, in 2016 [J]. Genome Announc, 2016, 4(5):e01099-16. DOI:10.1128/genome.A.01099-16.
- [27] Mattison K, Grudski E, Auk B, et al. Multicenter comparison of two norovirus ORF2-based genotyping protocols [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(12):3927-3932. DOI:10.1128/JCM.00497-09.
- [28] Kroneman A, Vega E, Vennema H, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping [J]. Arch Virol, 2013, 158(10):2059-2068. DOI:10.1007/s00705-013-1708-5.
- [29] Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses" [J]. J Infect Dis, 2000, 181 Suppl 2:S336-348. DOI:10.1086/315589.
- [30] Gao ZY, Liu BW, Huo D, et al. Increased norovirus activity was associated with a novel norovirus G II.17 variant in Beijing, China during winter 2014-2015 [J]. BMC Infect Dis, 2015, 15:574. DOI:10.1186/s12879-015-1315-z.
- [31] Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(2):373-381. DOI:10.1128/JCM.01535-14.
- [32] 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 G II.4 recombinant viruses [J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(7):2208-2221. DOI:10.1128/JCM.00455-17.
- [33] Gao ZY, Liu BW, Yan HQ, et al. Norovirus outbreaks in Beijing, China, from 2014 to 2017 [J]. J Infect, 2019, 79(2):159-166. DOI:10.1016/j.jinf.2019.05.019.
- [34] Vinjé J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses [J]. J Virol Methods, 2004, 116(2):109-117. DOI:10.1016/j.jviromet.2003.11.001.
- [35] Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses [J]. J Virol Methods, 2002, 100(1/2):107-114. DOI:10.1016/s0166-0934(01)00404-9.
- [36] Ferrer-Admetlla A, Sikora M, Laayouni H, et al. A natural history of *FUT2* polymorphism in humans [J]. Mol Biol Evol, 2009, 26(9):1993-2003. DOI:10.1093/molbev/msp108.
- [37] Jin M, He YQ, Li HY, et al. Two gastroenteritis outbreaks caused by G II Noroviruses: host susceptibility and HBGA phenotypes [J]. PLoS One, 2013, 8(3):e58605. DOI:10.1371/journal.pone.0058605.
- [38] Nordgren J, Kindberg E, Lindgren PE, et al. Norovirus gastroenteritis outbreak with a secretor-independent susceptibility pattern, Sweden [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(1):81-87. DOI:10.3201/eid1601.090633.
- [39] Yu YX, Yan SL, Li BL, et al. Genetic diversity and distribution of human norovirus in China (1999-2011) [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:196169. DOI:10.1155/2014/196169.
- [40] Farsi M, Roodbari F, Nejati B, et al. Prevalence and genetic diversity of norovirus genogroup II in children less than 5 years of age with acute gastroenteritis in Tehran, Iran [J]. Med Microbiol Immunol, 2018, 207(3/4):201-210. DOI:10.1007/s00430-018-0541-6.
- [41] Kiulia NM, Mans J, Mwenda JM, et al. Norovirus G II.17 Predominates in selected surface water sources in Kenya [J]. Food Environ Virol, 2014, 6(4):221-231. DOI:10.1007/s12560-014-9160-6.
- [42] Sang SW, Yang XY. Evolutionary dynamics of G II.17 norovirus [J]. Peer J, 2018, 6:e4333. DOI:10.7717/peerj.4333.
- [43] Lu J, Sun LM, Fang L, et al. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus G II.17, Guangdong province, China, 2014-2015 [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(7):1240-1242. DOI:10.3201/eid2107.150226.
- [44] Han JK, Ji L, Shen YH, et al. Emergence and predominance of norovirus G II.17 in Huzhou, China, 2014-2015 [J]. Virol J, 2015, 12:139. DOI:10.1186/s12985-015-0370-9.
- [45] Niendorf S, Jacobsen S, Faber M, et al. Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain G II.P16-G II.2, Germany, winter 2016 [J]. Euro Surveill, 2017, 22(4):30447. DOI:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.4.30447.
- [46] Ao YY, Cong X, Jin M, et al. Genetic analysis of reemerging G II.P16-G II.2 noroviruses in 2016-2017 in China [J]. J Infect Dis, 2018, 218(1):133-143. DOI:10.1093/infdis/jiy182.
- [47] 靳森, 孙军玲, 常昭瑞, 等. 中国 2006-2007 年诺如病毒胃肠炎暴发及其病原学特征分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(5):549-553. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.05.017.  
Jin M, Sun JL, Chang ZR, et al. Outbreaks of noroviral gastroenteritis and their molecular characteristics in China, 2006-2007 [J]. Chin J Epidemiol, 2010, 31(5):549-553. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.05.017.
- [48] Vinjé J, Vennema H, Maunula L, et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4):1423-1433. DOI:10.1128/jcm.41.4.1423-1433.2003.
- [49] Kroneman A, Vennema H, Deforche K, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses [J]. J Clin Virol, 2011, 51(2):121-125. DOI:10.1016/j.jcv.2011.03.006.
- [50] Oka T, Wang QH, Katayama K, et al. Comprehensive review of human sapoviruses [J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(1):32-53. DOI:10.1128/CMR.00011-14.
- [51] Vinjé J, Estes MK, Esteves P, et al. ICTV virus taxonomy profile: *Caliciviridae* [J]. J Gen Virol, 2019, 100(11):1469-1470. DOI:10.1099/jgv.0.001332.

(收稿日期:2020-03-02)

(本文编辑:斗智)