

后基因组时代诺如病毒的研究进展

张玮珊^{1,2}, 胡新玲¹, 律娜¹, 徐颖华^{3*}, 米凯霞^{1,2*}

(1. 中国科学院微生物研究所, 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101;
2. 中国科学院大学存济医学院, 北京 101408; 3. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要: 食源性疾病暴发通常是由食品中的微生物污染所引起。诺如病毒是引起急性胃肠炎的主要病原体之一, 每年在世界范围内频繁暴发, 威胁着人们的生命安全, 增加人们的财富负担。由于诺如病毒易发生突变, 各个行业尤其是食品行业的全球化发展迅速, 致使诺如病毒的感染已成为严重的公共卫生问题。随着后基因组时代的到来和技术的成熟, 诺如病毒的研究取得了新的进展。本文就诺如病毒的病毒学特征、感染后的临床症状、人体的免疫反应、诊断技术及现阶段使用基因组学技术的各项发展进行了讨论, 以期对诺如病毒感染的研究和控制提供线索。

关键词: 诺如病毒; 食品质量安全; 食源性疾病; 基因组学

Research progress of norovirus in post-genomic era

ZHANG Wei-Shan^{1,2}, HU Xin-Ling¹, LV Na¹, XU Ying-Hua^{3*}, MI Kai-Xia^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China;
3. China Institute of Food and Drug Identification, Beijing 102629, China)

ABSTRACT: Foodborne disease outbreaks usually caused by microbial contamination in food. Norovirus is one of the main pathogens that cause acute gastroenteritis. It causes frequent outbreaks worldwide every year, threatening people's lives and increasing the wealth burdens. Due to the frequent occurrence of norovirus mutations and the gradual acceleration of the globalization of various industries, especially the food industry, norovirus infection has become a serious public health problem. With the advent of the post-genome era and the development of technology, the research of norovirus has made new progress. This paper discussed the virological characteristics of norovirus, clinical symptoms after infection, human immune response, diagnostic technology and the development of genomics technology at present, in order to provide clues for the research and control of norovirus infection.

KEY WORDS: norovirus; quality and safety of food; foodborne disease; genomics

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1603900、2017YFA0505901)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Project of China (2018YFC1603900, 2017YFA0505901)

*通信作者: 徐颖华, 博士, 研究员, 主要研究方向为细菌性疫苗质量控制与微生物资源标准化研究。E-mail: xuyh@nifdc.org.cn

米凯霞, 博士, 研究员, 主要研究方向为重要病原菌的耐药机制。E-mail: mik@im.ac.cn

*Corresponding author: XU Ying-Hua, Ph.D, Professor, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China. E-mail: xuyh@nifdc.org.cn

MI Kai-Xia, Ph.D, Professor, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, No.3, No.1 Beichen West Road, Chaoyang District, Beijing 100101, China. E-mail: mik@im.ac.cn

0 引言

微生物在自然界和人类社会中分布广泛,且随着科学技术的进步与发展,它们与人们的生活越来越紧密地联系在一起。人们在生产实践中充分利用了微生物的各种特性,并获得了极高的经济效益,特别是在食品行业中。食品微生物是指与食品有关的微生物。作为微生物生产中的双刃剑,这些微生物可分为 2 类:一类是对人类有益的生产型食品微生物,例如酵母菌、醋酸菌和黑曲霉;另一类是对人有负面影响的食源性致病微生物,例如肉毒杆菌、沙门氏菌、诺如病毒等,以及导致食物变质的微生物,如霉菌、芽孢杆菌等^[1]。

微生物对食品的污染导致各种食源性疾病的暴发,这无疑成为了全球公共卫生问题,因此食品质量和安全已成为全球关注的焦点。据统计,发达国家和发展中国家人群中与腹泻相关的病死率已分别达到约 20%和 19%^[2-3],其中,人类诺如病毒(human noroviruses, HuNoVs)是急性胃肠炎(acute gastroenteritis, AGE)的主要病原体之一^[4],由它引起的腹泻暴发率占很大比例。粗略估计,全世界约 50%的胃肠炎暴发与诺如病毒有关。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的统计,全世界每年约有 6.99 亿诺如病毒感染,导致 20 多人死亡^[5]。世界范围内,诺如病毒平均每年直接导致卫生系统损失的成本约为 40 亿美元,社会经济负担高达 600 亿美元^[6]。由此可见,无论在发展中国家还是发达国家,诺如病毒的流行都给社会各阶层造成了严重损失。

诺如病毒,以前称为诺沃克病毒,最早是在 1929 年的俄州诺沃克发生胃肠炎暴发期间从粪便样本中采集到的。1972 年,KAPOKIAN 等^[7]通过免疫电镜观察到直径为 27 nm 的颗粒,并正式鉴定出引起该胃肠炎的病原体为诺如病毒。迄今为止,诺如病毒已成为了第一个被证实可以引起胃肠炎的病毒病原体。最初,由于患者在感染后以呕吐为常见症状,且秋冬季节是频发季节,所以也被称为“冬季呕吐病”^[8]。在历史上,总共记录了 6 次由诺如病毒引起的流行病,病原体分别是 1995 年美国变异株、2002 年法明顿山变异株、2004 年 Hunter 变异株、2006 年 Den Haag 变异株、2009 年新奥尔良变异株和 2012 年悉尼变异株^[9]。同样,在中国,诺如病毒也是威胁人类生命和财产安全的严重隐患。据 JIN 等^[10]的监测和追踪数据显示,从 2016 年 10 月到 2018 年 9 月,总共报告了 556 起诺如病毒暴发事件(图 1)。

1986 年,美国科学家 THOMAS 首次提出了基因组学的概念。随后,自 1990 年实施人类基因组计划(human genome project, HGP)以来^[11],生命科学领域发生了翻天覆地的变化,而基因组学已成为领域研究的重点和热点。由于诺如病毒不能在实验室细胞培养物中进行培养和传代,且没有合适的实验动物模型,因此在基因组学兴起之前,

人们对诺如病毒的研究主要集中在人类志愿者感染病毒后的一系列病理学特征,例如病毒载量、免疫细胞状态、相关酶活性^[12]、病毒蛋白的结构分析^[13]、病毒表面特征等。随着基因组学的不断发展,人们成功从粪便样本中克隆了诺如病毒基因组,诺如病毒研究的分子时代已经开始^[14]。今天,我们已成功进入后基因组时代,并且在该研究领域的相关技术变得更加成熟。诺如病毒的研究逐渐开拓了许多新的方向。本文就诺如病毒的病毒学特征、感染后的临床症状、人体的免疫反应、诊断技术及现阶段使用基因组学技术的各项发展进行讨论,以期对诺如病毒感染的研究和控制提供线索。

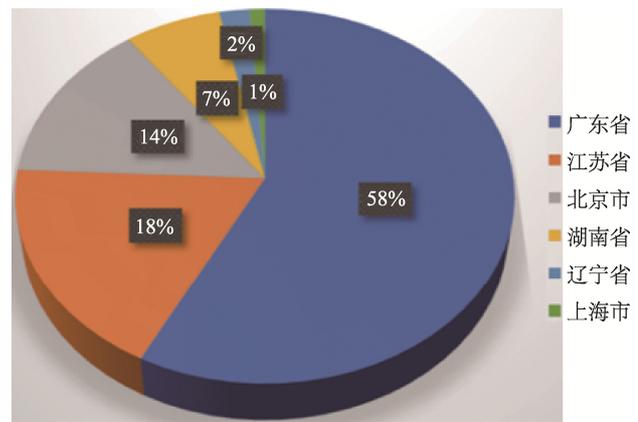


图 1 中国 2016 年 10 月—2018 年 9 月监测的诺如病毒疫情统计
Fig.1 Statistics on the prevalence of norovirus in China from October 2016 to September 2018

1 诺如病毒的病毒学特征

1.1 诺如病毒的分类及基因组特征

在过去,杯状病毒科由诺如病毒属、沙普病毒属、拉丁病毒属、新病毒属、维西病毒属共 5 个属组成,可以感染多个物种。但是,随着元基因分析技术的发展,国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)不断改进病毒科分类,具体见表 1^[15-16]。

人类诺如病毒属于杯状病毒科诺如病毒属。病毒颗粒呈圆形,结构简单,无包膜,表面光滑,只有一层衣壳蛋白^[17]。它体积较小,直径约 27~40 nm,包含从衣壳中延伸出来的长约 4.5 nm 放射性突起,在电子显微镜下显示出杯状结构^[7]。基因组由约为 7.5~7.7 kb 的线性正义 RNA 组成。5'末端与病毒编码蛋白基因组(VPg)共价连接,3'末端多腺苷酸化。除鼠类诺如病毒(murine norovirus, MNoV)外,大多数诺如病毒的基因组均分成 3 个开放阅读框(open reading frame, ORF),鼠类诺如病毒还具有编码毒力因子(virulence factor 1, VF1)的 ORF4,与 ORF2 重叠。尽管鼠类诺如病毒具有附加的 ORF,但在比较二者各区的功能后,发现基本上没有差异(表 2)^[18]。

ORF1 编码一种可以通过蛋白酶水解分解为 6 种非结构蛋白(NS1~NS7)的多蛋白, 例如诺如病毒蛋白酶和基于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)等, 蛋白裂解位点如图 2 所示^[13]。ORF2 编码 VP1, VP1 是病毒的主要结构蛋白, 包括壳区(S)和突出区(P), 后者包括 P1 和 P2。S 结构域包围病毒 RNA, P 结构域通过柔性铰链连接至 S 结构域^[19]。P2 亚区高度可变, 代表蛋白质

的最大暴露区域, 其中包含主要的中和表位、人类组织血型抗原(human blood group antigens, HBGA)的结合位点^[20], 也是衣壳的主要抗原决定簇的位置。ORF3 则编码病毒的次要结构蛋白 VP2, 该蛋白位于病毒颗粒中, 被认为与衣壳组装和基因组封装有关。一个完整的成熟诺如病毒颗粒是由 90 个主要结构蛋白(VP1)和 1 个或 2 个次要结构蛋白(VP2)以二十面体对称方式组装而成的二聚体。

表 1 杯状病毒的分类
Table 1 Classification of Calicivirus

属	模式株	易感物种
诺如病毒属(<i>Norovirus</i>)	诺如病毒	
拉丁病毒属(<i>Lagovirus</i>)	兔出血症病毒	
新病毒属(<i>Nebovirus</i>)	纽伯里-1 病毒	
呼肠孤病毒属(<i>Recovirus</i>)	杜兰病毒	哺乳动物
沙普病毒属(<i>Sapovirus</i>)	札幌病毒	
<i>Valovirus</i>	圣瓦莱里亚病毒	
维西病毒属(<i>Vesivirus</i>)	猪病毒水疱性皮炎	
巴伏病毒属(<i>Bavovirus</i>)	拜仁病毒	鸟类
纳科病毒属(<i>Nacovirus</i>)	新型禽杯状病毒	
微型病毒属(<i>Minovirus</i>)	肥头小鱼杯状病毒	鱼类
<i>Salovirus</i>	大西洋鲑鱼杯状病毒	

表 2 人类诺如病毒与鼠类诺如病毒各区功能比较
Table 2 Comparison of functions of different regions of human norovirus and murine norovirus

人类诺如病毒(HuNoV)	鼠类诺如病毒(murine norovirus, MNoV)	功能
p48	NS1/NS2	复制复合物的形成, 使 MNoV 在感染中持续存在
NTase	NS3	RNA 解旋酶/核苷水解酶(NTase)
p22	NS4	复制复合物形成
VPg	NS5	参与复制、翻译的基因组连接蛋白
pro	NS6	蛋白酶
pol	NS7	RdRp
VP1	VP1	主要结构蛋白
VP2	VP2	次要结构蛋白
(-)	VF1	毒力因子

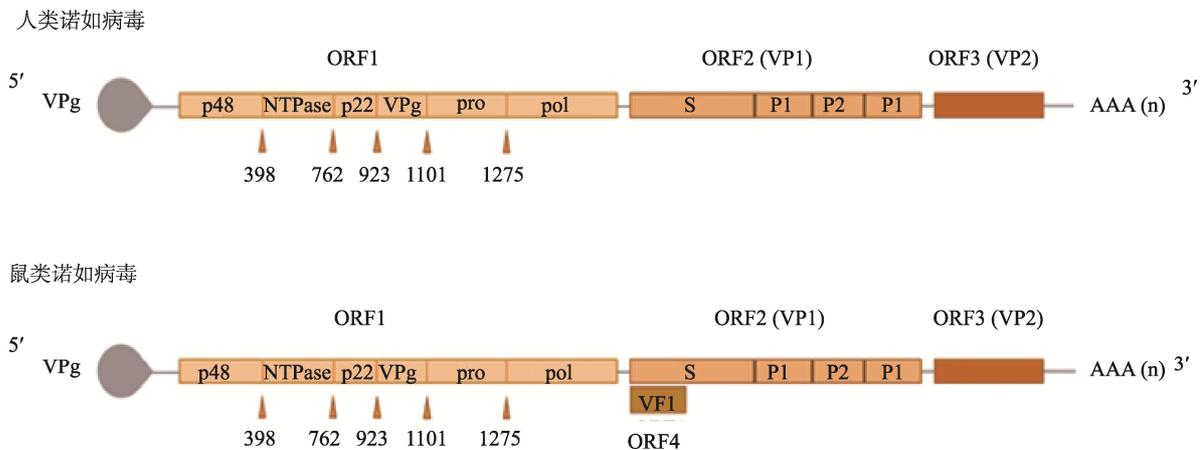


图 2 诺如病毒基因组示意图
Fig.2 Schematic diagram of norovirus genome

诺如病毒目前无法在体外培养,并且无法进行血清型分型鉴定,因此,其遗传分类主要是基于 VP1 和 RdRp 的氨基酸序列。目前有 6 个基因组被正式分类:基因组 I~VI (GI~GVI)和 40 多个基因型。但在 2019 年,CHHABRA 等^[21]根据 VP1 氨基酸序列的多样性,将诺如病毒基因组的数量扩展到了 10 个(GI~GX),并且还具有 2 个暂定的基因组,需要其他 VP1 或 RdRp 序列信息后才能归类。人类诺如病毒感染往往是由 GII (主要是 GII.4)、GI 和 GIV 引起,感染频率为 GII>GI>GIV。多年的跟踪研究发现,每一次诺如病毒的大流行都与 GII.4 新变种的出现有关,表现出一定的周期性突变替换模式。同时,由 GII.4 分离株引起的疾病也被认为是临床胃肠炎病例的最常见原因^[22]。

1.2 诺如病毒的理化性质

氯化铯(CsCl)密度梯度中诺如病毒的浮力密度为 1.36~1.41 g/cm³。WOBUS 等^[23]在对 GI.1 分离株的研究中,发现诺如病毒具有很好的耐酸性和耐热性,而鼠类诺如病毒比人类诺如病毒更具有耐受性。在中性和酸性的条件下,病毒衣壳的结构是稳定的,当 pH 高于 8 时,观察到一定程度的崩解^[24]。此外,病毒颗粒可以在 55 °C 以下保持完整性^[25]。JENNIFER 等^[26]用氯仿、氟利昂和十氟戊烷(vertrex XF)提取病毒后,发现该病毒对 3 种有机溶剂具有相对抗性,并且还发现诺如病毒可以在环境中保持一定程度的稳定性。该病毒在悬液中及在不锈钢表面干燥后最多可保持 7 d 的传染性。中国疾病预防控制中心的一项研究证明,使用有效氯浓度为 5000~10000 mg/L 的消毒剂超过 30 min 可以达到灭活效果^[27]。

1.3 诺如病毒的生命周期

与其他病毒一样,诺如病毒的生命周期也包括 5 个经典阶段:病毒分子的吸附、入侵、脱壳、合成和释放。吸附包括 2 个阶段,首先,诺如病毒使用细胞相关的宿主多糖,例如末端唾液酸、人类组织血型抗原(histo-blood group antigen, HBGA)和可溶性辅因子(包括可溶性 HBGA、胆盐、二价阳离子等)粘附至靶细胞表面,然后依赖 CD300LF 等分子完成受体与反受体的结合^[28];接下来,一旦病毒进入细胞并脱去衣壳,病毒基因组将通过与 5'端 VPg 和一系列细胞翻译机制的相互作用而释放并翻译。翻译后,ORF1 编码的多蛋白将被病毒蛋白酶 NS6 切割。此时,复制复合物将通过与 NS1/NS2 和 NS4 相互作用将细胞膜募集到核周区域。类似于单链 RNA 病毒,诺如病毒基因组的复制依赖于首先产生负链的中间体,并通过负链中间体进行复制。基因组和亚基因组 RNA 的正链和负链均依靠 RdRp 来完成^[29]。复制后,将其翻译并包装到衣壳中,以组装和释放病毒粒子^[30]。

2 诺如病毒的感染

2.1 诺如病毒的传播

诺如病毒具有高度传染性和环境稳定性,通常在感染后持续数周。据估计,单个诺如病毒颗粒出现症状性疾病的概率高达 0.5。诺如病毒感染会引发严重的呕吐和腹泻,每毫升排泄物含有 10⁶~10⁹ 个稳定的非包膜病毒颗粒,为进一步传播和其他感染创造了无限的机会^[31],通常直接通过人与人、粪-口途径和呕吐物-口腔途径传播,并且也可能由食源性、水源性或环境病原体引起。

2.2 诺如病毒感染后宿主的免疫反应

感染后,宿主机体也具有完整的免疫反应,包括先天免疫反应及获得性免疫反应。在正常情况下,病毒进入细胞后,会引起宿主体内多种细胞因子的产生。首先,它被细胞膜及内体隔膜上的 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)捕获^[32-33],然后胞浆中的视黄酸诱导基因(retinoic acid-inducible gene, RIG)样解旋酶(例如 RIG-1)识别外源 RNA,从而诱导强烈的先天免疫反应^[34]。此外,干扰素- γ 还可以通过调节自噬蛋白并诱导干扰素诱导的三磷酸鸟苷酶(GTPase)破坏细胞质中的诺如病毒复制复合物^[35]。病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)的受体(melanoma differentiation associated protein-5, MDA-5)也会增加干扰素(interferon, IFN)及其相关基因的表达。MDA-5 还通过线粒体抗病毒信号(mitochondrial antiviral signal, MAVS)蛋白激活干扰素反应因子 3 和 7 以及 NF- κ B 通路,从而导致干扰素刺激基因和促炎细胞因子的表达^[36]。

进入到适应性免疫后,有助于控制和清除感染的体液和细胞因子将发挥作用。换句话说,诺如病毒的免疫控制也会涉及到 B 细胞和 T 细胞。SAPPARAPU 等^[37]证明免疫球蛋白 A (IgA)也可以有效阻断病毒颗粒与 HBGA 的结合。此外,在体外模型中,呈递诺如病毒多肽的单核细胞和单核细胞衍生的树突状细胞均可激活 CD8⁺ 和 CD8⁻T 细胞^[38]。

先天免疫和适应性免疫对于控制诺如病毒的感染都非常重要,但有时该病毒还会进化出一系列免疫逃逸机制,从而使其很难控制和清除^[39]。由于 IFN 信号在抗病毒状态的启动中起着重要作用^[40],因此诺如病毒也往往采取逃避干扰素 $\alpha\beta$ 信号的机制进行免疫逃避,特别是通过抑干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3)的激活。YUMIKETA 等^[41]发现病毒的 NS3 蛋白通过阻止 IRF3 的激活而阻碍了 I 型干扰素的产生。MEGAN 等^[42]以小鼠为模型证明了肠道中的共生微生物群存在通过下调干扰素- λ 途径来实现免疫逃避的作用。另外,导致流行性疫情的诺如病毒基因型,如 GII.4,还会利用衣壳蛋白的进化来逃避宿主的免疫防御等^[43]。

2.3 感染诺如病毒的临床表现和诊断技术

感染诺如病毒后,患者通常会表现出呕吐、恶心、腹痛、

发热、自限性或非出血性腹泻等症状, 潜伏期为 24~48 h, 症状通常持续 12~60 h^[44]。WANG 等^[45]对 2017 年上海一所小学的流行病暴发进行统计(图 3), 表明呕吐症状占很大比例。

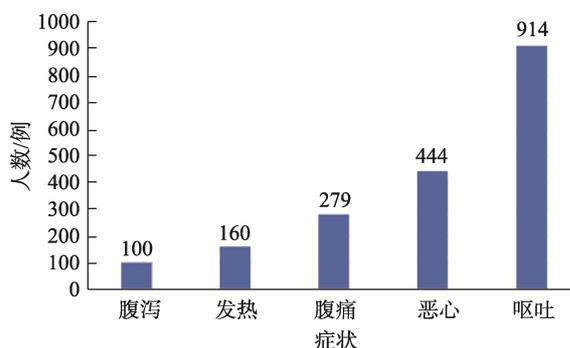


图 3 2017 年上海某小学诺如病毒流行中患者症状统计

Fig.3 Statistics of patients' symptoms in a norovirus epidemic in a primary school in Shanghai in 2017

经典的诊断方法是通过电子显微镜检测直径为 27~30 nm 的病毒颗粒。但这一技术灵敏度低、操作困难、检测病毒颗粒大小有限, 并不适用于临床。随后, 酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)出现并应用于检测诺如病毒抗原, 同时也基于该技术开发了快速检测试剂盒投入到临床应用中。免疫层析技术也可被用于快速检测诺如病毒, 这一技术结合了免疫亲和作用及层析技术, 时间短、操作便捷, 广泛用于临床检测。虽然利用免疫学的检测技术有诸多优点, 但由于特异性不够也只适用于对诺如病毒的初步筛查。因此, 分子生物学技术的出现, 很好地解决了这一难题。除了常规的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)^[46]、多重 PCR 外, TRUJILLO 等^[47]表明 TaqMan 检测方法可以适用于处理大量临床和环境样本, 有利于对 GI、GII 和 GIV 型的诺如病毒进行定量和即时分型, 这一方法不但高效, 还可以检测到样本中极低的病毒量。JOR 等^[48]也开发了一种新的基于 SYBR Green 的实时 RT-PCR 测定技术, 用于检测 GIII 型的牛诺病毒。此外, 由于诺如病毒全长仅有 7.5 kb 左右, 因此还可采用高通量测序技术高效地从临床分离样本中检测到诺如病毒并进行病毒的进化追踪等。现阶段, 随着技术的不断改进更新, CHUNG 等^[49]利用基因芯片的原理和技术快速灵敏地检测到牡蛎中的鼠诺如病毒; 张捷等^[50]利用诺如病毒 ORF1 与 ORF2 的高度保守区设计探针并构建生物传感器, 也实现了对诺如病毒的检测。

3 基因组学研究的主要应用方向

随着后基因组学时代的到来, 诺如病毒的研究也进入一个新阶段。基于诺如病毒容易发生突变的特征, 人们使用基因组学的各种技术开辟了许多新的研究方向, 并将

其成果应用于实践。

3.1 分型及溯源分析

诺如病毒在 ORF1 和 ORF2 交界处的基因重组频率很高。在自然选择下出现了许多重组菌株, 然后新的突变株将取代旧的毒株, 导致新一轮的感染和暴发。ZHANG 等^[51]在对 2019 年中国长沙市暴发的诺如病毒进行采样分型后, 确定导致暴发的基因型是 GII.13、GII.2、GII.17 和 GI.4。在建立 ORF1 和 ORF2 基因片段的系统发育树基础上, 确定这些变异株的起源可能是一些与中国相邻的国家。RUETHER 等^[52]还分析了诺如病毒的基因组, 发现属于 GII.6 及 GII.9 的重组毒株在 2006 年至 2011 年期间在希腊中部人群中普遍存在, 并且与瑞典和悉尼的 2 株亲缘关系相近。另外, 典型的溯源分析过程还将确定靶序列是否发生重组并确定重组位点。例如, RUETHER 等^[53]还使用 Simplot 程序分析系统发育谱, 并通过序列比对确定位点 5043 核苷酸位置的重组断裂点。除了 Simplot 外, 诺如病毒的重组检测程序(recombination detection procedure, RDP)也已被广泛使用。多年来, 诺如病毒引起的急性胃肠炎疫情的暴发仍然是世界紧迫问题。因此, 对变异基因型进行分型及溯源将有助于人们获得有关诺如病毒的遗传多样性和基因的更多信息, 并准确地采取相应的措施进行流行病的预防和控制。

3.2 进化方向和流行病学分析

详细的基因组序列数据有助于追踪诺如病毒的传播和进化。COTTEN 等^[54]对从患者处获得的诺如病毒基因组进行了深度测序, 详细描述了整个基因组, 采用了新的引物设计算法来分析基因组每个区域的进化速率, 并通过蛋白质序列比较确定氨基酸变化的差异。由此找到进化压力, 确定进化方向, 并描述整个社区内诺如病毒的进化。另外, KUNDU 等^[55]在从暴发点采样获得的信息与参考序列信息之间建立了一个轴, 继而通过系统发育树分析基因型以确定流行株。随后, 使用多种方法(例如序列拼接分析等)来发现重组基因特点(例如氨基酸变化、等位基因变化、是否存在同义或非同义替换等), 以追踪病毒传播的方向, 进行流行病学分析并还原感染暴发时间线, 为准确地采取各项措施提供参考。

3.3 环境监测与传播媒介

诺如病毒主要通过水源、食源和人与人之间接触传播^[31]。同时, 诺如病毒通常以极高的浓度被感染的个体排泄, 而且在排泄物中具有高度持久的传染性^[56]。因此, 它们在污水中的浓度通常很高, 并且在对水域造成破坏的同时, 还经常会影响到将废水直接用于灌溉的地区的各类食品。无疑, 这是当今的主要公共卫生问题^[57]。FUMIAN 等^[58]使用下一代测序技术(next generation sequencing, NGS)来检测污水和粪便样本中的诺如病毒。他们选择富集样本(未经处理过的污水)获得大量的全基因组, 以评估病毒株的多样性, 分析采

样位点区域中每种基因型分布及载量,并计算每种基因型的流行率,找出可能存在的突变点,确定新毒株。通过这种方法,可以监测并确定传播媒介,并在一定程度上反映当地人的肠道微生物群落的组成和病原多样性。如今,基因组学分析在传播媒介的环境监测和识别中的应用大大提高了流行病的预防和控制、种群结构分析与临床应用的效率。

3.4 与肠道菌群的相互作用

肠道菌群是指栖息于肠道中的微生物的整个集合。该菌群在维持肠道的动态平衡中起着重要作用^[59],其抗定植能力和免疫调节功能可以在抵御病原微生物方面发挥作用。PATIN 等^[60]使用元基因组深度测序来评估无症状患者的肠道微生物组对病毒感染的反应,并使用 16S rRNA 分析和元基因组组装基因组(meta-genome assembly genome, MAG)来确定感染过程中微生物种群的变化响应模式。与数量发生较大变化的群体及其生化功能之间建立联系,然后确定病毒与微生物菌群之间的相互作用。

此外,当入侵的诺如病毒遇到宿主菌群时,也会发生一系列变化。GRAU 等^[61]对缺乏肠道菌群的小鼠进行攻毒实验,结果表明共生菌可以针对肠道病毒进行区域化。共生细菌抑制近端小肠的病毒感染,并促进远端小肠的病毒感染。抑制作用可能取决于胆汁酸介导的 III 型干扰素信号。另一方面,LEI 等^[62]将人类肠道菌群移植到猪中,发现 GII.4 菌株的感染得到了增强。这种现象不难解释,先前的研究表明,HBGA 样基团在肠道中的大多数细菌上广泛表达,因此,诺如病毒可以直接与这些细菌结合并相互作用^[63],从而促进 B 细胞的感染。同时,细胞表面的唾液酸部分也是诺如病毒感染巨噬细胞的辅助受体,胆汁酸也起一定的促进作用^[64]。分泌型 IgA (SIgA)分子从上皮细胞分泌到肠腔中,并与肠腔中的相应抗原结合。它是黏膜抵抗肠道病原体的第一道防线^[65]。肠道菌群也可以与 SIgA 相互作用,以改变微生物的免疫反应,从而促进感染。

3.5 群体性疾病关键位点与生物学途径的分析

基于诺如病毒的高度传染性,它通常会导致大规模疾病,例如传染性肠炎。O'BRIEN 等^[66]对英国第二次社区传染性肠道病的数据进行了人群队列研究,获得表 3 数据。不难看出,与其他年龄段相比,5 岁以下儿童的发病率更高。

表 3 诺如病毒相关感染性肠道疾病的年龄特异性发病率
Table 3 Age-specific incidence rates for norovirus-associated infectious intestinal disease

年龄分布/岁	人数/例	每千人发病率/%
<1	5	178.2
1~5	26	137.3
5~15	26	59.6
15~64	103	39.0
≥65	38	27.7

BUSTAMANTE 等^[67]还对婴幼儿腹泻疾病进行了相关研究。在对 1000 个基因组输入的基因型数据进行校对后,他们进行了全基因组关联的 Meta 分析,并评估了全基因组关联分析(genome-wide association studies, GWAS)的结果,指出可能具有遗传突变的基因,如岩藻糖转移酶 2 基因(fucosyltransferase 2, FUT2)与婴幼儿腹泻疾病的强相关性。同时,通过基因富集找到了发病机制,并进一步分析了致病性的生物学机制。一系列的基因组学分析技术有效地帮助人们找到了寻找群体性疾病的关键点,为疾病的治疗做出了贡献。

3.6 疫苗开发

诺如病毒基因组具有很高的遗传多样性。不同的基因型在抗原特征上可能会存在微小但重要的差异,甚至在基因位点上也有突变,从而导致具有不同抗原性的变种。同时,人类诺如病毒不能在实验室中常规培养,这使得很难开发出有效的诺如病毒通用疫苗。尽管目前表达诺如病毒 VP1 的单价疫苗、二价疫苗和重组腺病毒疫苗已进入临床阶段,还有一些疫苗将很快进入临床阶段,例如诺如病毒和轮状病毒的联合疫苗、诺如病毒和肠道病毒的联合疫苗。但是,疫苗的开发仍然存在需要紧急探索瓶颈的情况^[68]。PARRA 等^[69]则另辟蹊径,采取了不同的方法,从以时间为轴的基因型重组的角度分析了整个基因组,并获得了 2 种不同的突变进化模型:静态和进化。进化型病毒会随着时间的推移积累其基因型的突变,而静态型病毒不会。基于这些特征,他们建立了一个再感染模型,试图寻找交叉保护的菌株并确定它们的共同抗原组,这为疫苗开发提供了新思路。

另外,2019 年,2 种由我国独立研制开发的诺如病毒疫苗取得重要进展。其一为兰州生物制品研究所有限公司针对 GI.1 与 GII.4 开发的二价重组病毒样颗粒(virus like particles, VLP)疫苗;其二为中国科学院上海巴斯德研究所与智飞龙科马生物制药有限公司针对 G1.1、GII.3、GII.4 及 GII.17 共同研制的四价重组 VLP 病毒疫苗,二者均获得了国家药品监督管理局进行下一步临床试验的许可^[70]。

4 结 论

诺如病毒是引起食源性疫情暴发的主要病原体之一,是当前关注和重点研究的对象。由于诺如病毒具有很容易发生突变的特征,世界各地每年仍然频繁发生由诺如病毒引起的流行病,造成人类生命危害和财产损失。目前,尚无可预防诺如病毒感染的特定抗病毒药物和有效疫苗。因此,仍然有必要加强对已知感染源如食物和水的预防和控制,例如保持良好的手部卫生,仔细清洗水果和蔬菜,避免直接喝生水,并正确烹饪食物。如果出现诺如病毒簇或暴发流行,应使用有效浓度范围内的含氯消毒剂进行全面消毒^[27]。如今,利用新兴的基因组学技术,已经开辟

了许多新的研究途径, 例如类型和可追溯性分析、进化方向和流行病学分析、环境监测和传播载体的鉴定及与肠道菌群的相互作用研究, 关键部位和生物学分析等。基因组学的发展为诺如病毒研究提供了多个方向和新思路, 在深入了解诺如病毒的同时, 对诺如病毒的临床治疗及流行病的预防和控制也具有极高的参考价值。

参考文献

- [1] 白海娜. 食品中微生物污染的来源及其控制分析[J]. 食品安全导刊, 2020, 36: 8.
BAI HN. Analysis of the source and control of microbial contamination in food [J]. Chin Food Saf Magaz, 2020, 36: 8.
- [2] FISCHER WCL, PERIN J, ARYEE MJ, *et al.* Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: A systematic review [J]. BMC Public Health, 2012, 12(220): 1–7.
- [3] LOZANO R, NAGHAVIET M, FOREMAN K, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the global burden of disease study 2010 [J]. Lancet, 2012, 380(9859): 2095–2128.
- [4] LOPMAN BA, STEELE D, KIRKWOOD CD, *et al.* The vast and varied global burden of norovirus: Prospects for prevention and control [J]. PLoS Med, 2016, 13(4): 1–12.
- [5] NETZLER NE, TUIPULOTU DE, WHITE PA. Norovirus antivirals: Where are we now? [J]. Med Res Rev, 2019, 39(3): 860–886.
- [6] BARTSCH SM, LOPMAN BA, OZAWA S, *et al.* Global economic burden of norovirus gastroenteritis [J]. PLoS One, 2016, 11(4): 1–16.
- [7] 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.
- [8] ROBILOTTI E, DERESINSKI S, PINSKY BA. Norovirus [J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(1): 134–164.
- [9] WHITE PA. Evolution of norovirus [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(8): 741–745.
- [10] JIN M, WU SY, KONG XY, *et al.* Norovirus outbreak surveillance, China, 2016–2018 [J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(3): 437–445.
- [11] WEISSENBACH J. The rise of genomics [J]. CR Biol, 2016, 339(7-8): 231–239.
- [12] SALIM AFM, PHILLIPS AD, FARTHING MJG. Pathogenesis of gut virus infection [J]. Baillieres Clin Gastroenterol, 1990, 4(3): 593–607.
- [13] HARDY ME. Norovirus protein structure and function [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 253(1): 1–8.
- [14] JIANG X, GRAHAM DY, WANG KN. Norwalk virus genome cloning and characterization [J]. Science, 1990, 250(4987): 1580–1583.
- [15] VINJE J, ESTES MK, ESTEVES P, *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Caliciviridae [J]. J Gen Virol, 2019, 100(11): 1469–1470.
- [16] DESSELBERGER U. Caliciviridae other than noroviruses [J]. Viruses, 2019, 11(3): 1–15.
- [17] SMITH H, SMITH T. The dynamic capsid structures of the noroviruses [J]. Viruses, 2019, 11(3): 1–18.
- [18] THORNE LG, GOODFELLOW IG. Norovirus gene expression and replication [J]. J Gen Virol, 2014, 95(2): 278–291.
- [19] BÁNYAI K, ESTES MK, MARTELLA V, *et al.* Viral gastroenteritis [J]. Lancet, 2018, 392(10142): 175–186.
- [20] HUTSON AM, ATMAR RL, MARCUS DM, *et al.* Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to H histo-blood group antigens [J]. J Virol, 2003, 77(1): 405–415.
- [21] CHHABRA P, GRAAF MD, PARRA GI, *et al.* Updated classification of norovirus genogroups and genotypes [J]. J Gen Virol, 2019, 100(10): 1393–1406.
- [22] EDEN JS, TANAKA MM, BONI MF, *et al.* Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage [J]. J Virol, 2013, 87(11): 6270–6282.
- [23] WOBUS CE, THACKRAY LB, VIRGIN HW. Murine norovirus: A model system to study norovirus biology and pathogenesis [J]. J Virol, 2006, 80(11): 5104–5112.
- [24] POGAN R, DULFER J, UETRECHT C. Norovirus assembly and stability [J]. Curr Opin Virol, 2018, 31: 59–65.
- [25] ARTHUR SE, GIBSON KE. Physicochemical stability profile of Tulane virus: A human norovirus surrogate [J]. J Appl Microbiol, 2015, 119(3): 868–875.
- [26] JENNIFER LC, PAPAFRAGKOU E, PARK GW, *et al.* Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus [J]. J Food Protect, 2006, 69(11): 2761–2765.
- [27] 廖巧红, 冉陆, 靳森, 等. 诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南 (2015 版)[J]. 中国病毒病杂志, 2015, 5(6): 448–458.
LIAO QH, RAN L, JIN M, *et al.* Technical guide for investigation and prevention and control of norovirus outbreaks (2015 Edition) [J]. Chin J Viral Dis, 2015, 5(6): 448–458.
- [28] GRAZIANO VR, WEI J, WILEN CB. Norovirus attachment and entry [J]. Viruses, 2019, 11(6): 1–13.
- [29] ROHAYEM J, ROBEL I, JAGER K, *et al.* Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol [J]. J Virol, 2006, 80(14): 7060–7069.
- [30] SARVESTANI ST, COTTON B, FRITZLAR S, *et al.* Norovirus infection: Replication, manipulation of host and interaction with the host immune response [J]. J Interf Cytokine Res, 2016, 36(4): 215–225.
- [31] TEUNIS PFM, MOE CL, LIU PB, *et al.* Norwalk virus: How infectious is it? [J]. J Med Virol, 2008, 80(8): 1468–1476.
- [32] TAKEUCHI O, AKIRA S. Recognition of viruses by innate immunity [J]. Immunol Rev, 2007, 220: 214–224.
- [33] TUIPULOTU DE, NETZLER NE, LUN JH, *et al.* TLR7 agonists display potent antiviral effects against norovirus infection via innate stimulation [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(5): 1–13.
- [34] FUJITA T, ONOGUCHI K, ONOMOTO K, *et al.* Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases [J]. Biochimie, 2007, 89(6-7): 754–760.
- [35] BIERING SB, CHOI J, HALSTROM RA, *et al.* Viral replication complexes are targeted by LC3-guided interferon-inducible GTPases [J]. Cell Host Microbe, 2017, 22(1): 74–85.
- [36] MCCARTNEY SA, THACKRAY LB, GITLIN L, *et al.* MDA-5 recognition of a murine norovirus [J]. PLoS Pathog, 2008, 4(7): 1–7.
- [37] SAPPARAPU G, CZAKO R, ALVARADO G, *et al.* Frequent use of the IgA isotype in human B cells encoding potent norovirus-specific monoclonal antibodies that block HBGA binding [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(6): 1–17.
- [38] VERMEULEN BL, GLEICH SE, DEDEURWAERDERA, *et al.* In vitro assessment of the feline cell-mediated immune response against feline panleukopeniavirus, calicivirus and felid herpesvirus 1 using 5-bromo-2'-deoxyuridine labeling [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2012, 146(2): 177–184.
- [39] PEÑAFLORES-TÉLLEZ Y, TRUJILLO-USCANGA A, ESCOBAR-ALMA ZÁN JA, *et al.* Immune response modulation by caliciviruses [J]. Front Immunol, 2019, 10(2334): 1–14.
- [40] RAJSBAUM R, ALBRECHT RA, WANG MK, *et al.* Species-specific inhibition of RIG-I ubiquitination and IFN induction by the influenza A virus NS1 protein [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(11): 1–16.

- [41] YUMIKETA Y, NARITA T, INOUE Y, *et al.* Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation [J]. *Vet Microbiol*, 2016, 185: 62–67.
- [42] MEGAN TB, HOLLY T, CHRISTIANE EW. Norovirus regulation by host and microbe [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(12): 1047–1059.
- [43] DONALDSON EF, LINDESMITH LC, LOBUE AD, *et al.* Norovirus pathogenesis: Mechanisms of persistence and immune evasion in human populations [J]. *Immunol Rev*, 2008, 225: 190–211.
- [44] ATMAR RL, ESTES MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(1): 15–37.
- [45] WANG YP, HAO LP, PAN LF, *et al.* Age, primary symptoms, and genotype characteristics of norovirus outbreaks in Shanghai schools in 2017 [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1–8.
- [46] SCHWAB KJ, ESTES MK, NEILL FH, *et al.* Use of heat release and an internal ma standard control in reverse transcription-PCR detection of norwalk virus from stool samples [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(2): 511–514.
- [47] TRUJILLO AA, MCCAUSTLAND KA, ZHENG DP, *et al.* Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(4): 1405–1412.
- [48] JOR E, MYRMEL M, JONASSEN CM. SYBR Green based real-time RT-PCR assay for detection and genotype prediction of bovine noroviruses and assessment of clinical significance in Norway [J]. *J Virol Methods*, 2010, 169(1): 1–7.
- [49] CHUNG SH, BAEK C, CONG VT, *et al.* The microfluidic chip module for the detection of murine norovirus in oysters using charges witchable micro-bead beating [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 67: 625–633.
- [50] 张捷, 许美玲, 王璇, 等. F0F1-ATPase 生物传感器检测食品中食源性诺如病毒[J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(24): 116–120.
ZHANG J, XU ML, WANG X, *et al.* Detection of food-borne norovirus by F0F1-ATPase biosensor [J]. *Food Res Dev*, 2014, 35(24): 116–120.
- [51] ZHANG H, DONG Y, SHAN X, *et al.* Full-genome sequences of GII.13 [P21] recombinant norovirus strains from an outbreak in Changsha, China [J]. *Arch Virol*, 2020, 165(7): 1647–1652.
- [52] RUETHER IGA, DIMITRIOU TG, TSAKOIANNIS D, *et al.* Characterization of novel intergenogroup and intergenotype recombinant noroviruses from central Greece [J]. *Mol Cell Probes*, 2014, 28(4): 204–210.
- [53] RUETHER IGA, TSAKOIANNIS D, PLIAKA V, *et al.* Molecular characterization of a new intergenotype norovirus GII recombinant [J]. 2012, 44(2): 237–243.
- [54] COTTEN M, PETROVA V, PHAN MVT, *et al.* Deep sequencing of norovirus genomes defines evolutionary patterns in an urban tropical setting [J]. *J Virol*, 2014, 88(19): 11056–11069.
- [55] KUNDU S, LOCKWOOD J, DEPLEDGE DP, *et al.* Next-generation whole genome sequencing identifies the direction of norovirus transmission in linked patients [J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 57(3): 407–414.
- [56] TU ETV, BULL RA, KIM MJ, *et al.* Norovirus excretion in an aged-care setting [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(6): 2119–2121.
- [57] SANO D, AMARASIRI M, HATA A, *et al.* Risk management of viral infectious diseases in wastewater reclamation and reuse: Review [J]. *Environ Int*, 2016, 91: 220–229.
- [58] FUMIAN TM, FIORETTI JM, LUN JH, *et al.* Detection of norovirus epidemic genotypes in raw sewage using next generation sequencing [J]. *Environ Int*, 2019, 123: 282–291.
- [59] BELKAID Y, HAND TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation [J]. *Cell*, 2014, 157(1): 121–141.
- [60] PATIN NV, PENAGA, HATT JK, *et al.* The role of the gut microbiome in resisting norovirus infection as revealed by a human challenge study [J]. *mBio*, 2020, 11(6): 1–15.
- [61] GRAU KR, ZHU S, PETERSON ST, *et al.* The intestinal regionalization of acute norovirus infection is regulated by the microbiota via bile acid-mediated priming of type III interferon [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(1): 84–92.
- [62] LEI S, TWITCHELL EL, RAMESH AK, *et al.* Enhanced GII.4 human norovirus infection in gnotobiotic pigs transplanted with a human gut microbiota [J]. *J Gen Virol*, 2019, 100(11): 1530–1540.
- [63] ALMAND EA, MOORE MD, OUTLAW J, *et al.* Human norovirus binding to select bacteria representative of the human gut microbiota [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): 1–13.
- [64] SULLENDER ME, BALDRIDGE MT. Norovirus interactions with the commensal microbiota [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(9): 1–7.
- [65] TURULA H, CUNHA BJ, MAINOU BA, *et al.* Natural secretory immunoglobulins promote enteric viral infections [J]. *J Virol*, 2018, 92(23): 2–22.
- [66] O'BRIEN SJ, DONALDSON AL, ITURRIZAGM, *et al.* Age-specific incidence rates for norovirus in the community and presenting to primary healthcare facilities in the United Kingdom [J]. *J Infect Dis*, 2016, 213 (Suppl): S15–S18.
- [67] BUSTAMANTE M, STANDL M, BASSAT Q, *et al.* A genome-wide association meta-analysis of diarrhoeal disease in young children identifies FUT2 locus and provides plausible biological pathways [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(18): 4127–4142.
- [68] ESPOSITO S, PRINCIPI N. Norovirus vaccine: Priorities for future research and development [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1–9.
- [69] PARRA GI, SQUIRES RB, KARANGWA CK, *et al.* Static and evolving norovirus genotypes: Implications for epidemiology and immunity [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(1): 1–22.
- [70] 周弘璐, 汪莹怡. 诺如病毒在研疫苗及挑战[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(21): 2607–2611.
ZHOU HL, WANG XY. Norovirus is developing vaccines and challenges [J]. *Chin J New Drugs*, 2019, 28(21): 2607–2611.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



张玮珊, 主要研究方向为重要病原菌的耐药机制。

E-mail: 2037609943@qq.com



徐颖华, 博士, 研究员, 主要研究方向为细菌性疫苗质量控制与微生物资源标准化研究。

E-mail: xuyh@nifdc.org.cn



米凯霞, 博士, 研究员, 主要研究方向为重要病原菌的耐药机制。

E-mail: mik@im.ac.cn