DOI：10.3969/j.issn.1002－2694.2022.00.040

·监测分析·

2019－2020年湖北部分地区G9P[8]型人轮状病毒基因特征

杨立君[1]，陈　月[1]，米文琴[1]，唐一通[2]，范久波[2]，王　媛[2]，廖诗英[2]，陈焕春[1]，何启盖[1]，江云波[1]

摘　要：目的　对人A组轮状病毒进行检测及分离鉴定，并研究其各基因片段的遗传进化关系。**方法**　2019－2020年对湖北武汉市和襄阳市临床腹泻病人的粪便样品进行采集，共319份。设计特异性轮状病毒VP6基因引物，RT-PCR检测轮状病毒的感染情况。将阳性样品接种于MA104细胞进行轮状病毒的分离。RT- PCR特异性扩增VP6基因和特异性间接免疫荧光对其进行病毒鉴定及病毒增殖检测；并进一步通过RT-PCR扩增轮状病毒的11个基因片段，在线工具Rota C V2.0对测序结果进行分型分析。Mega软件对其全基因组序列进行遗传进化分析。**结果**　轮状病毒感染阳性标本共69份，阳性率为21.63%。成功分离获得11株人轮状病毒，主要衣壳蛋白VP7和VP4基因型均为G9P[8]型。其中3株轮状病毒归属于类Wa株毒株，基因型图谱为G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1。8株毒株在Wa-like的基因型中具有DS-1-like的NSP4为E2基因型特征。基因型图谱为G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E2-H1。**结论**　G9P[8]型人轮状病毒毒株在2019－2020年湖北部分地区占主导趋势，且其NSP4基因以E2基因型为主要流行形式。

关键词：轮状病毒；分离鉴定；基因型；遗传进化分析

中图分类号：R373.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002－2694(2022)04－0359－07

Genetic characteristics of human rotavirus with the G9P[8] genotype in Part Area of Hubei Province from 2019 to 2020

YANG Li-jun[1], CHEN Yue[1], MI Wen-qin[1], TANG Yi-tong[2], FAN Jiu-bo[2], WANG Yuan[2], LIAO Shi-ying[2], CHEN Huan-chun[1], HE Qi-gai[1], JIANG Yun-bo[1]

(1. *State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070, *China*;
2. *Department of Medicine, Hubei University of Arts and Sciences, Wuhan* 430070, *China*)

Abstract: Human rotavirus group A was detected, isolated and identified, and the genetic evolutionary relationships among its gene fragments were studied. A total of 319 diarrhea-related samples from hospitals in Wuhan and Xiangyang, Hubei province, were collected from 2019 to 2020. Specific primers for the rotavirus VP6 gene were designed, and rotavirus infection was detected with RT-PCR. The positive samples were inoculated into MA104 cells for rotavirus isolation. The virus was identified through amplification of the VP6 gene and specific indirect immunofluorescence. Then 11 rotavirus gene fragments were amplified by RT-PCR, and the sequencing results were typed with Rota C v2.0. The whole genome sequence was analyzed in mega software. A total of 69 samples were found to be positive for rotavirus, and the positivity rate was 21.63%. Eleven human rotavirus strains were successfully isolated. The main capsid protein VP7 and VP4 genotypes of all strains were G9P[8]. Three rotavirus strains were wa like strains, and the genotype constellation was G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1. Among the wa like genotypes, eight strains had the E2 genotype characteristic for NSP4 of DS-1-like strains. The genotype constellation was G9-P[8]-I1- R1-C1-M1-A1-N1-T1-E2-H1. G9P[8] human rotavirus strains remained dominant in some areas of Hubei province from 2019 to 2020, and the NSP4 gene of the epidemic strains was of the E2 genotype. The results lay a foundation for further study of the characteristics of rotavirus epidemic strains and prevention.

Keywords: Rotavirus; isolation and identification; genotype; genetic evolution analysis

中央高校基本科研业务费专项基金资助(No.2662019YJ005)和国家现代产业技术体系(No.CARS-35)联合资助

通讯作者：江云波，Email：jiangyb@mail.hzau.edu.cn；
ORCID：0000-0002-1205-7149

作者单位：1.华中农业大学动物医学院农业微生物学国家重点实验室，武汉　430070；
2.湖北文理学院医学部，武汉　430070

Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No.2662019YJ005) and the National Modern Industrial Technology System (No.CARS-35)

Corresponding author: Jiang Yun-bo, Email: jiangyb@mail.hzau.edu.cn

轮状病毒(Rotavirus, RV)可导致5岁以下儿童和婴幼儿感染急性胃肠炎,也可以感染猪、牛、犬猫等多种幼龄哺乳动物,引起腹泻,是一种重要的人兽共患病原体。儿童患病时如果病情处理不当,可能会导致严重脱水,最终引起死亡[1];动物感染轮状病毒会引起腹泻,影响生产率乃至经济发展[2]。迄今为止,RV已经从人类以及多种非人类的哺乳动物和鸟类中分离出。

RV属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)的轮状病毒属(*Rotavirus*),根据VP6蛋白的抗原差异,可分为9个种(群),分别命名为A、B、C、D、E、F、G、H和I,可能还有第10种J[3]。其中,A群轮状病毒(RVA)是引起人及多种动物急性腹泻的主要病原体。

RV基因组由分段的双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)共11个基因片段组成,包括6种结构蛋白(VP1-VP4、VP6和VP7)和6种非结构蛋白(NSP1-NSP6)。除第11个片段编码2个蛋白质(NSP5和NSP6)外,其余所有片段均编码1个病毒蛋白。外部衣壳蛋白VP4和VP7在病毒复制和诱导保护性免疫中具有重要作用,诱导产生中和抗体,且在复制早期调节吸附和侵入。RV由胰蛋白酶切割VP4蛋白为VP5和VP8而激活,与细胞膜上相应受体结合,可直接穿过细胞膜或被囊泡包裹进入细胞质。不同RV毒株同源基因片段的非编码区(untranslated regions, UTR)高度保守,包含基因特异性保守序列[4-5]。

轮状病毒分类委员会提出了一种基于11个RVA基因组片段中编码区核苷酸序列同源性临界值的百分比的新轮状病毒分类方案。Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx,x代表该命名下RV所相应的基因型,对应VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6的顺序[6]。迄今为止,已从人类和动物中鉴定出RVA至少27种G、37种P、16种I、9种R、9种C、8种M、16种A、9种N、12种T、15种E和11种H基因型[6]。人轮状病毒通常主要分为3种基因型毒株:1)类Wa株流行株,基因型为I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1,VP7和VP4基因型组合为G1P[8]、G3P[8]、G4P[8]和G9P[8];2)类DS-1株流行株,基因型为G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2;3)类AU-1株流行株,基因型为G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3[7]。

近年来,对人群中轮状病毒进行监测的多个研究发现动物源轮状病毒的基因型,且序列之间显示出紧密的同源性,说明RV存在种间传播,动物源轮状病毒可跨种传播感染人类[8-10]。本研究于2019—2020年间,收集湖北部分地区腹泻病人的粪便相关样品,开展RV的检测及其病原的分离鉴定,同时进行全基因组序列的测定,分析其11个基因片段的基因型,构建各基因片段的进化树,研究其各基因片段的遗传进化关系,以期揭示湖北地区RVA毒株的临床感染及其遗传变异信息。为进一步诊断和防控轮状病毒的感染奠定基础。

1 材料与方法

1.1 临床材料 2019—2020年在湖北省武汉市和襄阳市采集腹泻病人粪便样品,分别采集腹泻儿童样品256份,成人腹泻病人样品63份,共319份。

1.2 试剂及细胞 Trizol、反转录试剂盒为艾科瑞生物公司产品;大肠杆菌DH5α感受态细胞由本实验室制备保存;平末端克隆载体pEASY-blunt购自北京全氏金生物技术有限公司;T4连接酶、dNTPs、Loading Buffer、DNA Marker、黏性末端载体pMD18-T购自宝生物工程(大连)有限公司;酵母浸出物和胰蛋白胨购自OXOID公司;Q5高保真酶购自为美国纽英伦生物(NEB)产品;KOD-Plus-Neo高保真酶购自东洋纺(上海)生物科学有限公司;2×Taq Plus Master Mix酶为南京诺维赞生物科技有限公司产品;西班牙琼脂糖(biowest agarose)购自GENE TECH公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒均购于北京天根生物科技公司。

MEM培养基、胎牛血清、不含EDTA胰酶、HEPES、胰蛋白酶及青链霉素双抗购自GIBCO公司;MA104细胞购自武汉CCTCC细胞库。

40%多聚甲醛溶液、0.1% Triton-X-100溶液购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司(Sigma-Aldrich);牛血清白蛋白(第五组份)(BSA)购自北京博奥拓达生物公司;抗轮状病毒VP6蛋白的单克隆抗体(2B4)购自Santa Cruz公司;Alexa Fluor 488标记山羊抗鼠荧光二抗和DAPI(4′,6′-diamidino-2-Phenylindole)为碧云天生物技术研究所产品。

1.3 轮状病毒的检测 取临床粪便样品0.2 g,加

入 800 μL PBS 溶液，制成 25％的悬液后进行涡旋处理，经反复冻融 3 次后，放入离心机中，4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min，取 200 μL 上清，利用 Trizol 试剂进行病毒 RNA 提取，其余上清放入－80 ℃冰箱保存待用。根据艾科瑞生物公司反转录试剂盒说明书推荐体系和程序进行病毒 RNA 的反转录。利用特异性引物 VP6-F 和 VP6-R（见表 1）扩增轮状病毒的 VP6 基因，判定样品的轮状病毒感染的阴阳性。扩增片段大小为 1 356 bp。PCR 反应体系（25.0 μL）为：2×Taq Master Mix 12.5 μL、上游引物 VP6-F 1 μL、下游引物 VP6-R 1 μL、cDNA 模板 1 μL，H_2O 加至终体积 25.0 μL。PCR 反应条件为：94 ℃变性 5 min 后进入循环，循环参数为：94 ℃ 15 s，49 ℃ 15 s，72 ℃ 1 min 25 s，35 个循环，72 ℃延伸 10 min。PCR 产物在 0.8％的琼脂糖凝胶上电泳检测扩增产物片段大小。随后，用琼脂糖胶 DNA 回收试剂盒纯化 PCR 扩增产物。特异性 PCR 扩增产物回收后，连接到 pMD18-T 载体送擎科新业生物技术有限公司进行序列测定。

1.4　轮状病毒的分离培养　将－80 ℃冻存的阳性样品的上清液通过 0.22 μm 滤膜过滤，收集病毒滤液。滤液中加入含终浓度为 10 μg/mL 的胰蛋白酶，于 37 ℃、5％ CO_2 培养箱中激活 1 h，获得激活的轮状病毒液。

取已长成致密单层的 MA-104 细胞，弃液后用 PBS 洗细胞 3 次，加入激活的轮状病毒液，置于 37 ℃、5％ CO_2 培养箱中，每隔 0.5 h 轻晃病毒液，使病毒均匀、充分地吸附到细胞上。3 h 后吸弃病毒液，用 PBS 洗细胞 3 次，加入含有终浓度为 5 μg/mL胰蛋白酶的无血清的 MEM 维持液，于 37 ℃、5％ CO_2 培养箱中培养数天，观察细胞病变效应。待接毒的细胞完全病变后直接置于－80 ℃，冻融 3 次后，4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min，收集上清（病毒液）分装后保存于－80 ℃冰箱中，用于下一次接毒。阳性样品均盲传至第 10 代。

1.5　轮状病毒的间接免疫荧光鉴定　按 1.3 中的方法检测盲传分离的病毒。参照文献方法[11]进行 RVA 间接免疫荧光鉴定。简要步骤如下：将生长旺盛的 MA104 细胞接种于 24 孔细胞培养板中，待细胞生长至 80％左右时，接种激活的病毒液，同时设未接毒对照。待细胞 80％病变后，吸弃培养基，预冷的 PBS 漂洗 2 次，每次 5 min，4％多聚甲醛室温固定 15 min 后吸弃，随即用预冷的 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。用含 0.1％ Triton-100 的 PBS 室温穿孔处理 15 min 后吸弃，再用预冷的 PBS 漂洗 3 次，5％ BSA 室温封闭 1 h，预冷的 PBST 漂洗 3 次，加入轮状病毒单抗（2B4），37 ℃ 作用 1 h，预冷的 PBS 漂洗 3 次后，加入羊抗鼠荧光二抗（1∶500 稀释），37 ℃避光反应 45 min，预冷的 PBST 漂洗 3 次，加入 DAPI 染色液，室温避光作用 7 min 后，预冷的 PBST 漂洗 3 次，随后，再用预冷的 PBS 漂洗 3 次，在荧光显微镜下观察结果。

1.6　全基因组的克隆及序列测定　利用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。

KOD-Plus-Neo 酶的 PCR 扩增体系（50 μL）为：H_2O 32 μL、10×PCR Buffer for KOD-Plus-Neo 5 μL、1×2 mmol/L dNTPs 5 μL、25 mmol/L $MgSO_4$ 3 μL、上游引物（10 μmol/L each）1.5 μL、下游引物（10 μmol/L each）1.5 μL、相应模板（cDNA）1 μL 和 KOD-Plus-Neo 1 μL。KOD-Plus-Neo 酶的 PCR 扩增程序为：94 ℃预变性 2 min 后进入循环；94 ℃变性 15 s，退火温度根据各片段引物的 Tm 值决定，退火时间 30 s，68 ℃延伸，其延伸时间根据片段长短决定，进行 45 个循环。

Q5 高保真 DNA 聚合酶的 PCR 扩增体系（50 μL）为 H_2O 32 μL、5×ReactionBuffer 10 μL、10 nmol/L dNTPs 1 μL、上游引物（10 μmol/L each）2.5 μL、下游引物（10 μmol/L each）2.5 μL、相应模板（cDNA）1 μL 和 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL。Q5 高保真 DNA 聚合酶的 PCR 扩增程序为：98℃预变性 30 s 后进入循环；98 ℃变性 15 s，退火温度根据各片段引物的 Tm 值决定，退火时间 30 s，72 ℃延伸，其延伸时间根据片段长短决定，进行 35 个循环，最后 72 ℃终延伸 5 min。

PCR 产物经电泳鉴定，回收后连接到平末端载体 pEASY-blunt 后进行克隆测序。对扩增的各片段送擎科生物公司进行序列测定。

1.7　基因组遗传进化分析　序列分析使用 DNASTAR 软件中的 Seqman 程序，将序列拼接完整，采用 BLAST 和在线分型工具 Rota C V2.0 进行在线分子定型，运行 MEGA X 软件利用邻接法（Neighbor-Joining，NJ）构建系统发育树。系统发育树各分枝置信度采用重抽样法（Bootstrap）进行自举检验，检验次数设置为 1 000 次。

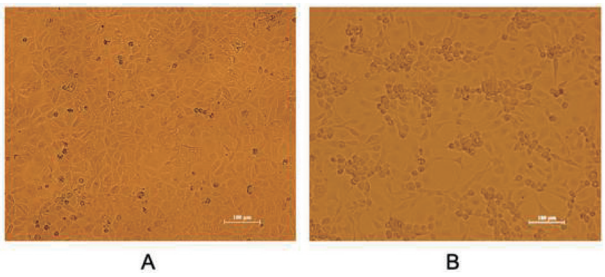
2　结　果

2.1　湖北部分地区 RV 流行情况　本研究于 2019－2020 年期间，从湖北省武汉市和襄阳市采集腹泻病人临床粪便样品共计 319 份。病人主要表现黄色水样腹泻。通过 RT-PCR 检测，RV 样品阳性共 69

份,总阳性率为 21.63%。其中儿童 256 份有 60 份阳性,阳性率 23.44%。成人 63 份样品中有 9 份为阳性,阳性率为 14.29%。

2.2 RV 的分离与鉴定 RT-PCR 检测轮状病毒阳性的临床粪便样品,接种于 MA-104 细胞上进行 RV 分离,盲传至第 6 代后,有 11 份阳性样品开始出现明显的细胞病变(CPE),连续传代至第 10 代,细胞病变呈现稳定状态,并在培养 48 h 后出现明显病变。正常 MA-104 细胞形态清晰,生长良好(图 1),病毒感染后,MA-104 细胞出现脱落、皱缩、拉网等现象,脱落的细胞聚集成团块,如图 1B。将从粪检样品中分离得到的 11 株 HRV 毒株分别命名为 RVA/Human/CHN/HB-1/2019、RVA/Human/CHN/HB-18/2019、RVA/Human/CHN/HB-19/2019、RVA/Human/CHN/HB-20/2019、RVA/Human/CHN/HB-22/2019、RVA/Human/CHN/HB-27/2019、RVA/Human/CHN/HB-28/2019、RVA/Human/CHN/HB-33/2019、RVA/Human/CHN/HB-43/2019、RVA/Human/CHN/HB-45/2019 和 RVA/Human/CHN/HB-109/2019。

对临床阳性样品在 MA104 细胞上的第 10 代培养毒进行 RT-PCR 检测(图略),测序结果经 Blast 比对,其基因序列与人源 RV 的 VP6 序列 100% 相同,表明所有分离株确实为人轮状病毒。

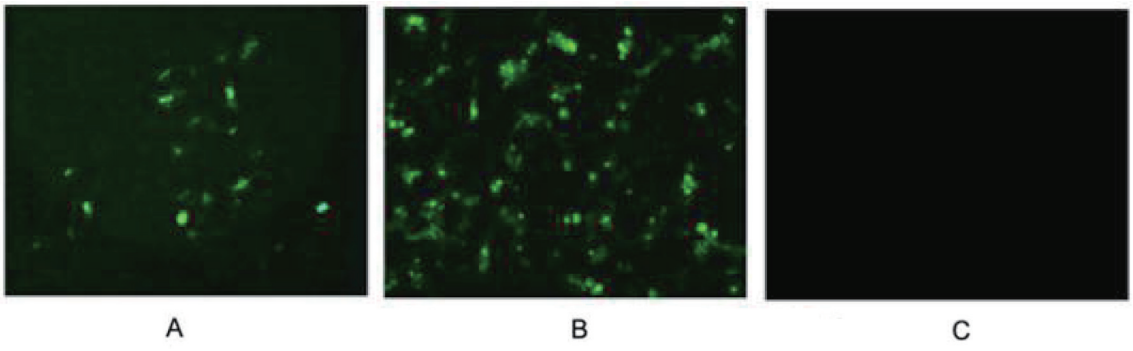


A:未接毒正常细胞对照;B:感染 RV 后的致病变细胞

图 1 RV 感染 MA104 细胞病变图(400×)

Fig.1 Cytopathology effects of MA104 cells infected with RV

MA-104 细胞接毒 24 h 后经过固定、透化、封闭,以及一抗和荧光二抗的特异性反应作用后,在荧光显微镜下可观察到病毒感染细胞出现特异性绿色荧光反应。感染 24 h 后的荧光如图 2A 所示。感染 48 h 后的荧光如图 2B 所示。图 2B 清楚地显示了被病毒感染的细胞的特异性荧光染色,且 48 h 的荧光强度强于 24 h 的荧光,表明 RVA 可以在 MA-104 细胞中稳定地增殖。未接毒的 MA-104 细胞未见染色荧光(图 2C)。间接免疫荧光结果进一步从蛋白质水平证实,分离的病毒为轮状病毒。并且通过不同感染时间的特异性荧光表明分离的轮状病毒在 MA-104 细胞中具有较好的增殖能力。



A:病毒感染后 24 h; B:病毒感染后 48 h; C:未接毒细胞对照

图 2 轮状病毒的间接免疫荧光鉴定(400×)

Fig.2 Rotavirus identification by indirect immunofluorescence

2.3 全基因组序列测定及基因型别分析 对 11 株 HRV 分离株进行全基因组扩增,进行序列测定。使用 DNAStar 的 SeqMan 软件拼接 11 个基因片段的分段测序结果,获得 11 株分离株的所有 11 个分节段的全基因组序列。所有分离株的 11 个基因片段序列均已上传至 GenBank。

序列分析结果显示,3 株 RVA/Human/CHN/HB-19/2019、RVA/Human/CHN/HB-20/2019 和 RVA/Human/CHN/HB-43/2019 分离株明显属于类 Wa 株轮状病毒株。基因型为 G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1,而 8 株分离株 NSP4 基因序列分析归属为类 DS-1 株基因型毒株,但其他节段仍然为类 Wa 株基因型。基因型为 G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E2-H1。序列分析显示其

具有 Wa 株与 DS-1 株交叉重组的基因特征。

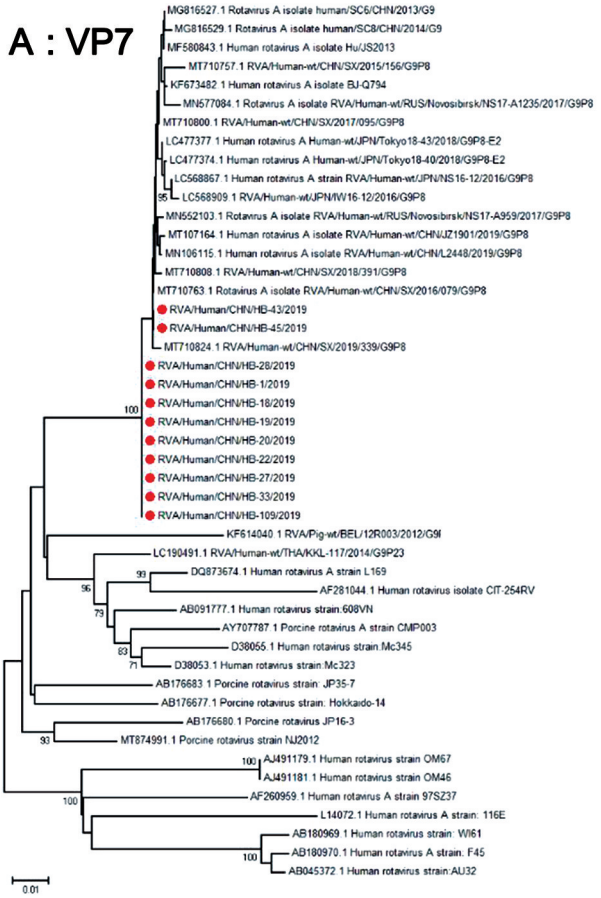
2.4　衣壳蛋白基因序列的遗传进化分析　利用 BLAST 软件对分离株各序列比对选择相应毒株以及 GenBank 中不同谱系中的代表毒株分别进行遗传进化分析。

VP7 全长序列长度 1 061 bp，蛋白质编码区（Coding sequence，CDS）长度 981 bp，编码 326 个氨基酸。11 株分离株的 VP7 核苷酸序列均处于谱系Ⅲ中，聚在一个相对独立的分支，序列之间核苷酸序列相似性介于 98.7%～99.6%。与武汉的人源 RVA/Human-wt/CHN/L2448/2019/G9P[8]毒株同源性最高，全基因序列相似性为 99.53%，与中国其他的 G9 型 RV 毒株处在相对不同的进化分支（图 3A）。

VP4 全长序列长度 2 359 bp，CDS 长度 2 337 bp，编码 778 个氨基酸，均为 P[8]型，序列之间核苷酸序列相似性为 99.7%～99.8%。遗传进化表明分离株的 VP4 基因序列均处于谱系 III 中，并且与中国 P[8]型 RV 毒株处于相同的进化分支，与武汉的人源 RVA/Human-wt/CHN/L2448/2019/G9P[8]毒株同源性最高，相似性为 99.7%（图 3B）。

VP6 基因是轮状病毒群特异性抗原，在 A 群轮状病毒中相对保守。11 株分离株的 VP6 全长序列长 1 356 bp，CDS 长 1 194 bp，编码 397 个氨基酸，均为 I1 型，遗传进化显示 VP6 基因聚在 I1 型人源 RV 毒株之中，与武汉的 RVA/Human-wt/CHN/L2448/2019/G9P[8]株亲缘关系最近，相似性为 99.85%（图 3C）。

2.5　NSP4 基因序列的遗传进化分析　遗传进化分析显示，3 株轮状病毒株的 NSP4 基因为 E1 基因型，8 株轮状病毒株的 NSP4 基因为 E2 基因型（图 4）。8 株毒株在 Wa-like 的基因型中具有 DS-1-like 的 NSP4 E2 基因型特征，是一种具有明显基因重组特征的新型轮状病毒毒株，其比例占到了 72.7%（8/11）。表明该型病毒株已成为新的国内流行毒株。其与来自日本分离株 Tokyo18-38 同源性最高 99.73%，与武汉的 L2448/2019 株同源性 99.33%。



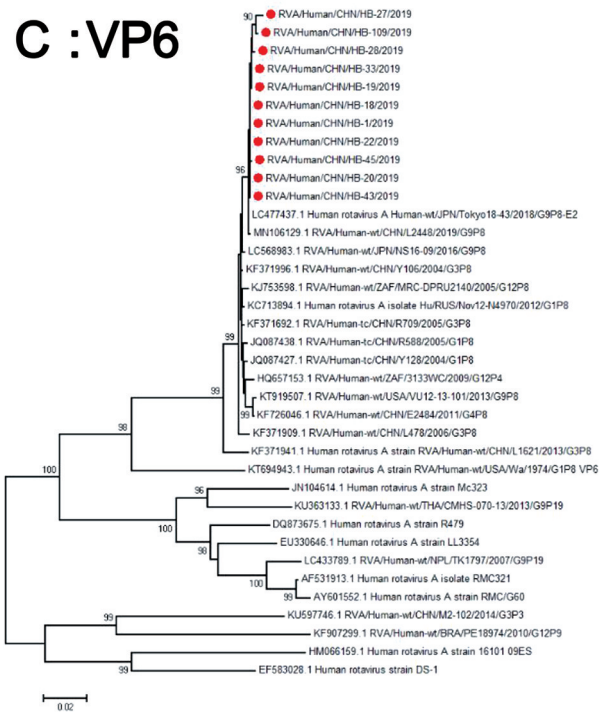


图 3 结构蛋白 VP7、VP4、VP6 基因进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree analysis of structural proteins VP7, VP4 and VP6

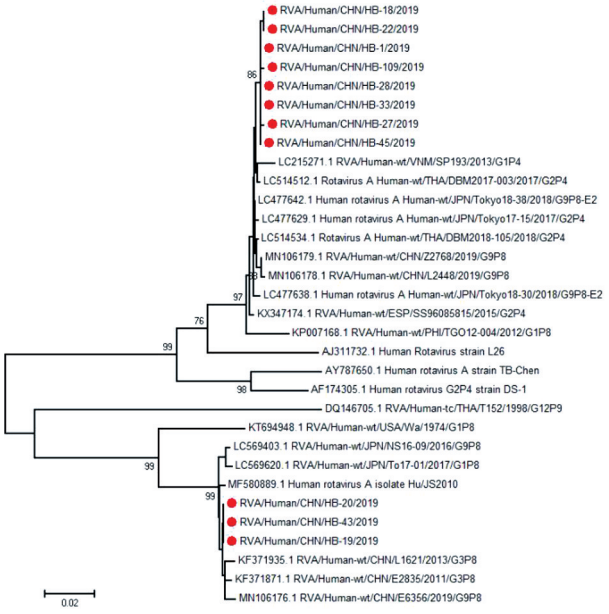


图 4 非结构蛋白 NSP4 基因进化树分析

Fig.4 Phylogenetic tree analysis of the *nsp*4 gene

3 讨 论

RV 感染是引起全世界 5 岁以下儿童胃肠炎的主要原因之一。与许多细菌性肠胃炎病原体不同，RV 在发达国家和发展中国家都存在，且改善社会经济条件并不能减少 RV 的感染[12]。

1994－2013 年，在中国关于 RV 的流行病学和临床研究中最常报道就是 G1/G3/G9P[8]和 G2P[4]基因型[13-15]。自 2012 年以来在武汉 G9P[8]已成为儿童和成人中 RV 最常见的基因型组合，并且一直占主导地位[13]。Yoshiki 等 2020 年报道了发现日本一种新型的 NSP4 重配的 G9P[8]-E2 轮状病毒株[15]，进一步研究分析认为其重配的祖先毒株是 G9P[8]型和 G2P[4]型毒株的 E2 基因型 NSP4 基因重配而产生的新型轮状病毒株[16]。而同时期中国也分别不同地区监测报道了 G9P[8]-E2 毒株 JZ1812、JZ1811、JZ1903 毒株和 L2448、E5867、Z2768 毒株[17]的流行感染。本研究发现流行于中国湖北地区的 G9P[8]-E2 型毒株，与国内报道的流行毒株及日本发现的以及国内流行的 G9P[8]-E2 重配毒株高度相似，属于同型流行毒株。该型毒株可能会进一步发展为轮状病毒新的流行优势基因型毒株。

通过 RV 的全基因组测序表明，本研究中 RVA/Human/CHN/HB-1/2019、RVA/Human/CHN/HB-18/2019、RVA/Human/CHN/HB-22/2019、RVA/Human/CHN/HB-27/2019、RVA/Human/CHN/HB-28/2019、RVA/Human/CHN/HB-33/2019、RVA/Human/CHN/HB-45/2019 和 RVA/Human/CHN/HB-109/2019 共 8 株 G9P[8]-E2 毒株与武汉的 G9P[8]型 L2448 毒株基因核苷酸序列相似性最高，并与北京的 G9P[8] BJ-Q-194 毒株、成都的 G9P[8] SC6 毒株、江苏的 G9P[8] JS2016 毒株、锦州的 G9P[8] JZ1812 毒株和昆明的 G9P[8] km15093 毒株基因核苷酸序列相似。且值得注意的是，这些 G9P[8]毒株均在 Wa-like 的 RV 基因型中具有 DS-1-like 的 NSP4 基因的 E2 基因型。除 NSP4 基因 E1 和 E2 型的差异外，这 11 株 G9P[8]毒株的其余基因序列均具有较高的相似性。文献报道，湖北近年来均检测到此新型 G9P[8]-E2 型毒株，表明该型 RV 已在武汉及湖北范围内广泛传播。NSP4 蛋白在诱导感染动物腹泻中扮演着类似肠毒素功能的独特致病作用，根据文献报道研究显示[13]，在武汉流行的 RV 毒株有 G9P[8]和 G2P[4]型，而 G2P[4]型 RV 的 NSP4 基因为 E2 型，日本报道发现的 G9P[8]-E2 毒株即是可能由 G9P[8]毒株与 G2P[4]毒株发生基因重组重配而形成的新型毒株[13]，而湖北地区近年流行的也主要是 G9P[8]和 G2P[4]型[13]。本研究分离的 G9P[8]-E2 病毒株是否由本地毒株重组形成，或者由其他地区流行传入，亦或是由日本等周边国家流行传入，还

需要进一步流行病学和病原学分析研究才能确证。但明显 G9P[8]-E2 病毒株已成为轮状病毒流行地区的优势基因型毒株。

利益冲突：无

引用本文格式：杨立君，陈月，米文琴，等. 2019－2020 年湖北部分地区 G9P[8]型人轮状病毒基因特征[J]. 中国人兽共患病学报，2022，38(4)：359-365. DOI：10.3969/j.issn.1002-2694.2022.00.040

参考文献：

[1] Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, et al. Global, regional, and national estimates of Rotavirus mortality in children ＜5 years of age, 2000－2013 [J]. Clin Infect Dis, 2016, 62(Suppl 2): s96-s105. DOI: 10.1093/ cid/civ1013

[2] Midgley SE, Bányai K, Buesa J, et al. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe [J]. Vet Microbiol, 2012, 156: 238-245. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.10.027

[3] Mihalov-Kovács E, Gellért á, Marton S, et al. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21: 660-663. DOI: 10.3201/eid2104.141370

[4] Chen D, Barros M, Spencer E, et al. Features of the 3′-consensus sequence of rotavirus mRNAs critical to minus strand synthesis [J]. Virology, 2001, 282: 221-229. DOI: 10.1006/viro.2001.0825

[5] Barro M, Mandiola P, Chen D, et al. Identification of sequences in rotavirus mRNAs important for minus strand synthesis using antisense oligonucleotides [J]. Virology, 2001, 288: 71-80. DOI: 10.1006/viro.2001.1054

[6] Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) [J]. Arch Virol, 2011, 156: 1397-1413. DOI: 10.1007/s00705-011-1006-z

[7] Tinh-Huu N, Van-Thai T, Hien-Dang T, et al. Evidence of multiple reassortment events of feline-to-human rotaviruses based on a rare human G3P[9] rotavirus isolated from a patient with acute gastroenteritis [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2016, 46: 53-59. DOI: 10.1016/j.cimid.2016.04.003

[8] Krisztián B, Mathew D. E, Tara-K K, et al. Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rotavirus strain, G11P[6], from Ecuador [J]. Arch Virol, 2009, 154: 1823-1829. DOI: 10.1007/s00705-009-0499-1

[9] Shoko O, Toshiyuki H, Aksara T, et al. Detection and molecular characterization of two rare G8P[14] and G3P[3] rotavirus strains collected from children with acute gastroenteritis in Japan [J]. Infect Genet Evol, 2018, 62: 95-108. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.04.011

[10] 姜涛，吴丛梅，刘新涛，等. 轮状病毒间接免疫荧光的检测方法[J]. 吉林大学学报(理学版)，2016，54：919-923. DOI：10.13413/j.cnki.jdxblxb.2016.04.43

[11] Nelson EA, Bresee JS, Parashar UD, et al. Rotavirus epidemiology: the Asian Rotavirus surveillance network [J]. Vaccine, 2008, 26: 3192-3196. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.03.073

[12] Zhou X, Wang YH, Pang BB, et al. Surveillance of human Rotavirus in Wuhan, China (2011－2019): predominance of G9P[8] and emergence of G12 [J]. Pathogens, 2020, 9: 810. DOI: 10.3390/pathogens9100810

[13] Nan X, Wu JY, Yan Z, et al. Epidemiological and clinical studies of rotavirus-induced diarrhea in China from 1994－2013 [J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10: 3672-3680. DOI: 10.4161/21645515.2014.979691

[14] Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments [J]. Arch Virol, 2008, 153: 1621-1629. DOI: 10.1007/s00705-008-0155-1

[15] Yoshiki F, Mayuko O, Yoshiko S, et al. Molecular characteristics of novel mono-reassortant G9P[8] Rotavirus A strains possessing the NSP4 gene of the E2 genotype detected in Tokyo, Japan [J]. Jpn J Infect Dis, 2020, 73: 26-35. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2019.211

[16] Ying L, Hui L, Weiwei L, et al. Characterization of a G9 group A rotavirus reassortant strain detected in Jinzhou, China, in 2018－2019 [J]. Archives Virol. 2020, 165: 977-983. DOI: 10.1007/s00705-020-04563-0

[17] Xuan Z, Yuanhong W, BeiBei P, et al. Surveillance of human Rotavirus in Wuhan, China (2011－2019): predominance of G9P[8] and emergence of G12 [J]. Pathogens, 2020, 9:810. DOI: 10.3390/pathogens9100810

收稿时间：2021-09-06　**编辑**：张智芳