



研究报告

2018–2020 年人轮状病毒锦州地方株 VP4 及 VP7 基因特征

康庚庚^{1,2} 李慧¹ 李卫巍³ 张瑛汀^{1,2} 杨倩文^{1,2} 王涵可^{1,2} 卢颖^{*1}

1 锦州医科大学基础医学院 辽宁 锦州 121000

2 锦州医科大学第三临床学院 辽宁 锦州 121000

3 锦州市妇婴医院 辽宁 锦州 121000

摘要:【背景】人 A 组轮状病毒(Rotavirus Group A, RVA)是婴幼儿胃肠炎的主要病原体及发展中国家婴幼儿死亡的重要原因,目前无特效药物治疗,疫苗预防是唯一可行的预防感染方法。外衣壳蛋白 VP7 和 VP4 是疫苗设计的主要靶点,针对该基因加强 RVA 地方株分子流行病学监测十分必要。

【目的】对锦州地方流行 RVA 株 VP7 和 VP4 基因进行型别鉴定和序列特征分析。【方法】收集锦州地区 2018–2020 年 RVA 感染腹泻患儿的粪便标本,提取病毒 RNA,通过 RT-PCR 扩增 VP7、VP4 基因片段并测序,得到 7 株 RVA VP7 和 VP4 序列。使用在线基因分型工具 RotaC V2.0 对测序结果进行分型分析。应用 BLAST、DNASTar、MEGA X、BioEdit 等生物软件与临床流行株及疫苗株进行系统发育分析及氨基酸序列比对分析。【结果】分型结果表明 7 株锦州地方株均为 G9P[8]型,系统发育分析证实其 VP7 和 VP4 基因分别属于 G9-VI 和 P[8]-3 谱系,核苷酸序列相似性分别为 99.32%–100%与 99.41%–100%。JZ 株 VP7 与疫苗株 Rotavac 和 Rotasiil 相比,在抗原表位区 7-1a、7-1b、7-2 中分别存在 4 个和 3 个氨基酸替换。JZ 株 VP4 与疫苗株 Rotarix 和 RotaTeg VP4 氨基酸序列相比,发现 7 个和 4 个氨基酸替换,位于抗原表位区 8-1 和 8-3。【结论】2018–2020 年在辽宁锦州地区检测到 7 株 G9P[8]型 RVA 株,VP7 和 VP4 序列相似性高于 99%,G9P[8]型可能是辽宁省锦州地区 2018–2020 年婴幼儿轮状病毒腹泻的主要流行基因型之一。与同基因型疫苗株比较,位于 JZ 株 VP7 和 VP4 抗原表位区的氨基酸位点差异对于野毒株免疫逃逸机制的研究具有意义。

关键词: 人 A 组轮状病毒, 外衣壳蛋白 VP7, 外衣壳蛋白 VP4, 系统进化分析

Foundation items: Scientific Research Fund of Liaoning Provincial Education Department (JYTJCZR201909); Undergraduate Innovative Training Program of Jinzhou Medical University (201810160041)

***Corresponding author:** E-mail: yinglu1102@hotmail.com

Received: 09-03-2020; **Accepted:** 24-04-2020; **Published online:** 23-07-2020

基金项目: 辽宁省教育厅技术研究项目(JYTJCZR201909); 锦州医科大学大学生创新训练项目(201810160041)

***通信作者:** E-mail: yinglu1102@hotmail.com

收稿日期: 2020-03-09; **接受日期:** 2020-04-24; **网络首发日期:** 2020-07-23

Gene characterization of human rotavirus Jinzhou strains VP4 and VP7 during 2018 and 2020

KANG Genggeng^{1,2} LI Hui¹ LI Weiwei³ ZHANG Yingting^{1,2} YANG Qianwen^{1,2}
WANG Hanke^{1,2} LU Ying^{*1}

1 College of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China

2 The Third Affiliated Hospital, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China

3 Jinzhou Women and Children's Hospital, Jinzhou, Liaoning 121000, China

Abstract: [Background] Human rotavirus group A (RVA) is the main pathogen of gastroenteritis in infants and important cause of infant death in developing countries. There are no specific drugs until now and vaccines are the only feasible method to prevent infection. As outer capsid proteins VP7 and VP4 are the main targets of rotavirus vaccine, it is necessary to strengthen molecular epidemiological surveillance of local clinical circulating RVA strains against these genes. **[Objective]** To identify VP7 and VP4 genotypes and analyze their sequence characterization of RVA circulating strains in Jinzhou. **[Methods]** The fecal samples of infants suffered from RVA infection diarrhea in Jinzhou during 2018–2020 were collected and viral RNA were extracted. VP7 and VP4 gene fragments were amplified by RT-PCR and PCR products were sequenced. Seven RVA strains VP7 and VP4 genes were obtained. The sequencing results were analyzed by genotyping using online tool RotaC V2.0. Phylogenetic and amino acid sequence alignments analysis compared to clinical epidemic strains and vaccine strains were carried out with BLAST, DNASTar, MEGA X, BioEdit. **[Results]** The genotyping results showed that 7 Jinzhou strains in this study was G9P[8]. Phylogenetic analysis confirmed that VP7 and VP4 belonged to lineages G9-VI and P[8]-3, and nucleotide sequence identity were 99.32%–100% and 99.41%–100%, respectively. There were 4 and 3 amino acid substitutions in the antigen epitope regions 7-1a, 7-1b, 7-2 when JZ strains VP7 were compared with vaccine strains Rotavac and Rotasiil VP7. The amino acid sequences of JZ strains VP4 were compared with vaccine strains Rotarix and RotaTeg VP4. Seven and four amino acid substitution sites located in the antigen epitope regions 8-1, 8-3 were found. **[Conclusion]** Seven G9P[8] RVA strains were detected in Jinzhou, Liaoning province from 2018 to 2020. The identity of VP7 and VP4 sequences was higher than 99%. G9P[8] was probably one of the main epidemic genotypes of infantile rotavirus diarrhea in Jinzhou, Liaoning province in 2018–2020. Compared to the same genotypic vaccines strains, amino acids variations located in VP7 and VP4 epitope regions of JZ strains are significant for understanding immune escape mechanisms of wild RVA strains.

Keywords: human rotavirus group A, outer capsid protein VP7, outer capsid protein VP4, phylogenetic analysis

人A组轮状病毒(Rotavirus Group A, RVA)属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)轮状病毒属, 是全世界婴幼儿胃肠炎的主要病原体^[1]。据统计, 2016年全球约128 500患儿死于轮状病毒感染^[2]。轮状病毒基因组共11条双链RNA片段, 编码6种结构蛋白(VP1–VP4, VP6, VP7)和6种非结构蛋白(NSP1–NSP6)^[3]。作为分节段的RNA病毒, 轮状病毒易变异导致型别众多, 不同地域和时间的流行毒株型别不同。外衣壳蛋白VP7 (Glycoprotein,

G)和VP4 (Protease-Sensitive, P)是最主要的病毒抗原, 其编码基因序列是G、P基因型分型基础, 迄今已在人和动物轮状病毒中鉴定出36G和51P基因型^[4]。大多数轮状病毒感染可归因于G1–G4、G9和P[8]、P[4]、P[6]^[5–6]。型别众多及跨时间和地域的差异性给疫苗研发带来了挑战。

目前获得世界卫生组织(World Health Organization, WHO)许可的疫苗包括单价人轮状病毒减毒活疫苗Rotarix[®] (GlaxoSmithKline

Biologicals, Belgium, G1P[8]^[7]、五价人牛重配疫苗 RotaTeq[®] (Merck & Co., Inc., United States, G1-G4 和 P[8])^[8-9]、单价人牛重配疫苗 ROTAVAC[®] (Bharat Biotech International Limited, ORV 116E, G9P[11])及五价人牛重配疫苗 ROTASIIL[®] (Serum Institute of India, G1-G4, G9), 其中 Rotarix[®]和 RotaTeq[®]在世界上使用范围最广泛, 我国国内现已上市但尚未普及, 虽被证实可减少重症感染发病率, 但发展中国家保护效力远低于高收入国家^[10-11]。ROTA-VAC[®]及 ROTASIIL[®]由印度研发, 已在印度本国证实安全有效^[12-13]。目前我国儿童主要使用兰州生物制品所生产的口服羊轮状病毒疫苗 (Lanzhou Lamb Rotavirus Vaccine, LLR), 是基于 G10P[15]的单价疫苗^[14]。由于轮状病毒疫苗在我国尚未纳入免疫规划, 该疫苗在我国的儿童覆盖率低于全球平均水平, 而且与当前亚洲流行株型别不同, 因此 LLR 保护效力有限^[14-15], 有必要对当前我国不同地区临床流行株主要中和保护性抗原和疫苗靶点 VP7 和 VP4 的基因型别和序列进行监测, 从而了解临床株与国外开发的 4 种疫苗的匹配度, 以期在实际选用疫苗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

胶体金法免疫检测试剂盒, 北京万泰生物药业股份有限公司; Trizol LS Reagent, Invitrogen 公司; Superscript III First Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒, Invitrogen 公司; *LA Taq* 酶, TaKaRa 公司。ABI 3730xl 测序仪, 赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 粪便标本采集检测及病毒纯化

2018 年 10 月–2020 年 1 月, 自锦州市妇婴医院急性腹泻住院患儿中采集粪便标本, 收集经胶体金法免疫检测试剂盒 RVA 检测阳性样本 7 例, 分别命名为 JZ1810、JZ1811、JZ1812、JZ1901、JZ1903、JZ1911、JZ2001。将样品与 PBS 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.2)混合制成 10%便悬液, 涡旋振

荡 10 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min。将上清液通过 0.22 μm 滤膜过滤, 病毒滤液–80 °C 冻存^[16]。

1.3 病毒 RNA 提取及 RT-PCR

用 Trizol LS Reagent 从粪便滤液中提取病毒 dsRNA^[16]。使用 Dynamica 分光光度计检测浓度, –80 °C 储存。

应用 Superscript III First Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒, 以提取的病毒 dsRNA 为模板进行 RT-PCR。引物^[16]见表 1, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。PCR 反应体系: 10×*LA Taq* Buffer (Mg²⁺ Plus) 5 μL, dNTP Mixture (各 10 mmol/L) 4 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, 模板 cDNA 2 μL, *LA Taq* DNA 聚合酶 1 μL, 加双蒸水至 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物在 1.2%琼脂糖凝胶上进行分析。

1.4 VP7 及 VP4 测序基因型分析

对 RT-PCR 扩增结果阳性的 7 株 RVA VP7 序列、6 株 RVA VP4 序列 PCR 产物送赛默飞世尔科技有限公司测序。使用 ABI 3730xl 测序仪及配套的 BigDye Terminator 循环测序试剂盒测定核苷酸序列。测定全基因区段全长的核苷酸序列 (不包括 5'末端和 3'末端引物序列), 得到的基因序列进行 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对, 使用 SeqMan (DNASTar 5.0)进行序列拼接。使用在线基因分型工具 RotaC V2.0^[17], 应用 80% (VP7 和 VP4)核苷酸截止值, 对测序结果进行分型分析。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in the study

引物名称	引物序列	扩增产物长度
Primers name	Primers sequence (5'→3')	Product size (bp)
VP4 F	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	2 300
VP4 R	TTACATTGTAGAATTAAGT	
VP7 F	GGCTTTAAAAGMGAGAATTTCC	1 062
VP7 R	GGGGGTCACATCATACAATTCT	

1.5 系统发育分析及氨基酸序列分析

从 GenBank 中下载所测序基因的国内外近期流行株、不同谱系标准株及疫苗株序列为参考序列,使用 MEGA X 软件(<http://www.megasoftware.net/>)^[18]对 JZ 株 VP4 和 VP7 序列与参考序列进行多重比对,并通过邻接法(N-J 法)构建系统发生树,Bootstrap 对进化树的可靠性进行评价,重复 1 000 次,通过 Kimura-2-Parameter 模型测量系统发育距离,水平距离与遗传距离成正比。用 BioEdit 4.8.10 对 JZ 株和 RVA 疫苗株进行氨基酸序列比对并分析。

2 结果与分析

2.1 VP7、VP4 的 RT-PCR 结果及基因型鉴定

应用 VP7 及 VP4 基因引物进行 RT-PCR 扩增病毒 dsRNA,得到 1 062 bp VP7 基因产物和 2 300 bp VP4 基因产物。全部 7 株 RVA VP7 序列及 6 株 VP4 序列(其中 JZ1810 VP4 扩增失败, JZ1901 VP4 仅获得 C 端部分序列)已经提交 GenBank,获得的序列登录号见表 2。

使用轮状病毒在线基因分型工具 RotaC V2.0 对测序结果进行分析,结果表明本研究中 JZ RVA 株均为 G9P[8]型。患儿家庭互不相识并来自市内不同区域,表明 G9P[8]型 RVA 病毒株在 2018–2020 年轮状病毒流行季确实已在锦州地方流行并传播。

表 2 2018–2020 年 JZ RVA 株 VP7 与 VP4 基因序列登录号

Table 2 VP7 and VP4 gene accession number of JZ RVA strains in 2018-2020

锦州 RVA 株名称	VP7 基因序列号	VP4 基因序列号
JZ RVA strains name	VP7 gene accession No.	VP4 gene accession No.
JZ1810	MT107163	—
JZ1811	MN529646	MN529640
JZ1812	MN529645	MN529639
JZ1901	MT107164	MT107167
JZ1911	MT107165	MT107168
JZ1903	MN529647	MN529641
JZ2001	MT107166	MT107169

注: —: 标本 JZ1810 VP4 基因扩增失败

Note: —: JZ1810 VP4 gene cannot be amplified successfully

2.2 VP7、VP4 的种系进化分析

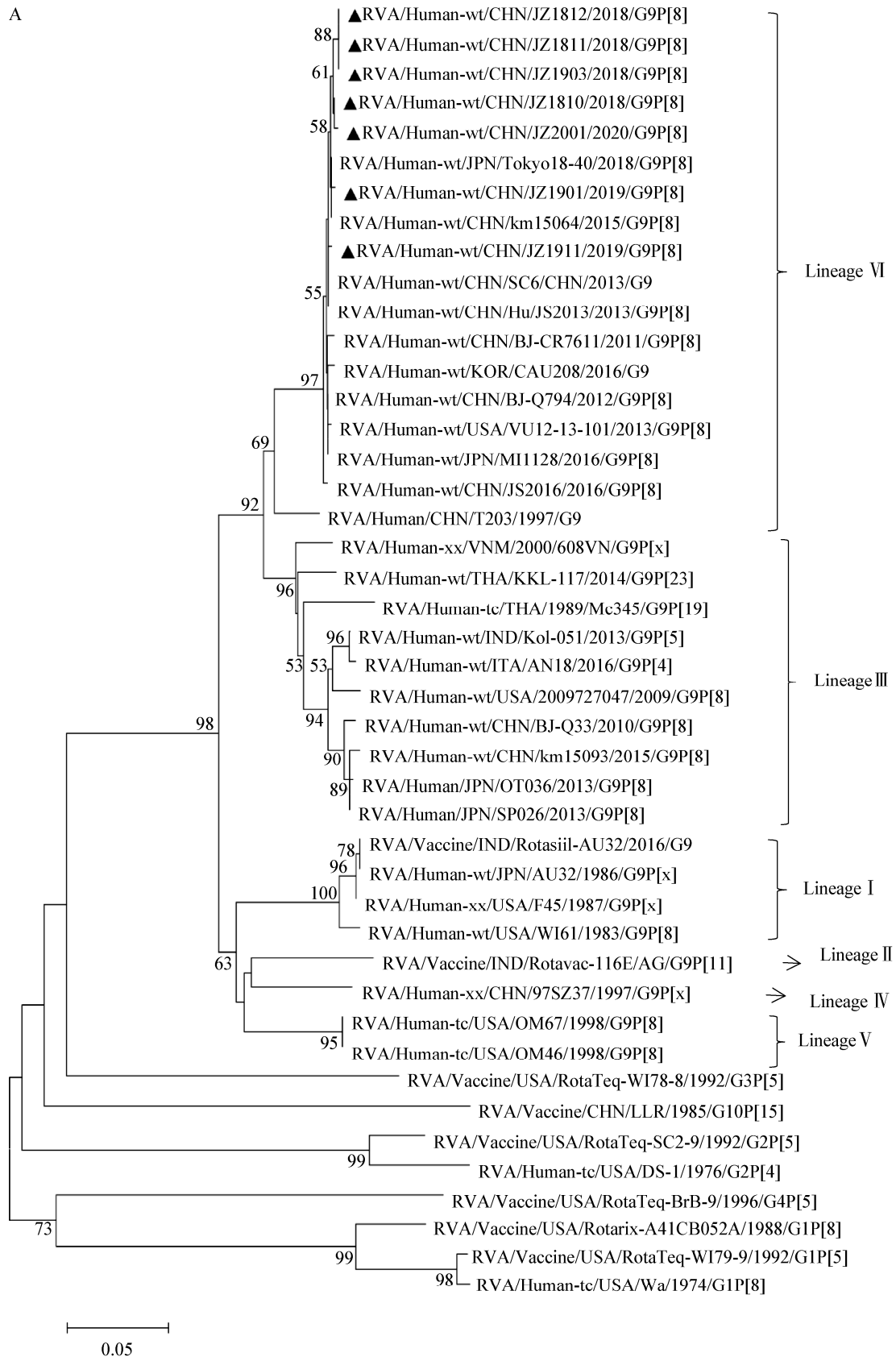
7 例 JZ 株的 VP7 核苷酸序列高度相似,相似性为 99.32%–100%, 6 株 VP4 相似性为 99.41%–100%。2018–2019 年与 2019–2020 年 2 个流行季流行株 VP7 及 VP4 的基因序列相似性无明显差异。

研究表明, G9 型 RVA VP7 基因分化为 6 个谱系(I–VI) 11 个亚系^[19]。为明确 JZ 株与已知谱系标准株、近年来世界各地流行株及疫苗株的遗传相似性及谱系分布,将 JZ 株 VP7 基因核苷酸序列与 GenBank 中其他 G9 株进行了比较,系统发育分析表明, JZ 株均属于 G9 VI 系,与 2018 及 2016 年日本株 Tokyo18-40、MI1128 和 2015 年昆明株 km15064 与 2013 年成都株 SC6、江苏株 Hu/JS2013 及 2012 年北京株 BJ-Q794 的亲缘关系最为密切,相似性为 99.42%–99.81%。但与 80–90 年代 G9 型美国原型株 WI61 及国内首例 G9 株 T203 比较相似性低,分别为 88.68%–88.99%及 95.05%–95.66% (图 1A)。7 株锦州株 VP7 与 Rotavac G9 II 及 Rotasiil G9 I 比较,其核苷酸(氨基酸)一致性基本相同,分别为 88.57%–88.99% (93.53%–93.87%)及 88.19%–88.56% (94.50%–95.09%)。

6 株 JZ 株与 27 株临床流行参考株及疫苗株系统进化分析表明(图 1B), JZ 株被划分到目前世界流行谱系 P[8]-3 中^[20-21]。JZ 株 VP4 基因序列与 2018 年日本株 Tokyo18-30、2014 年中国株 SC9、2012 年越南株 SP071 高度相似,相似性均在 99% 以上。JZ 株与 Rotarix P[8]-1 相比,核苷酸(氨基酸)相似性为 89.59%–90.09% (93.50%–94.13%), 与 RotaTeq 中人 WI79 株 P[8]-2 相比,相似性更高,为 91.97%–92.83% (95.13%–95.52%)。

2.3 VP7 与 VP4 的氨基酸序列分析

轮状病毒 VP7 编码由 326 个氨基酸构成的三聚体糖蛋白,分子量为 37 kD,是中和性抗体的主要靶标^[3]。野毒株 VP7 抗原表位处的氨基酸变异形成免疫逃逸可干扰疫苗的有效性。7 个 JZ 株 VP7 氨基酸序列相似性为 99.35%–100%,其中 JZ1811、



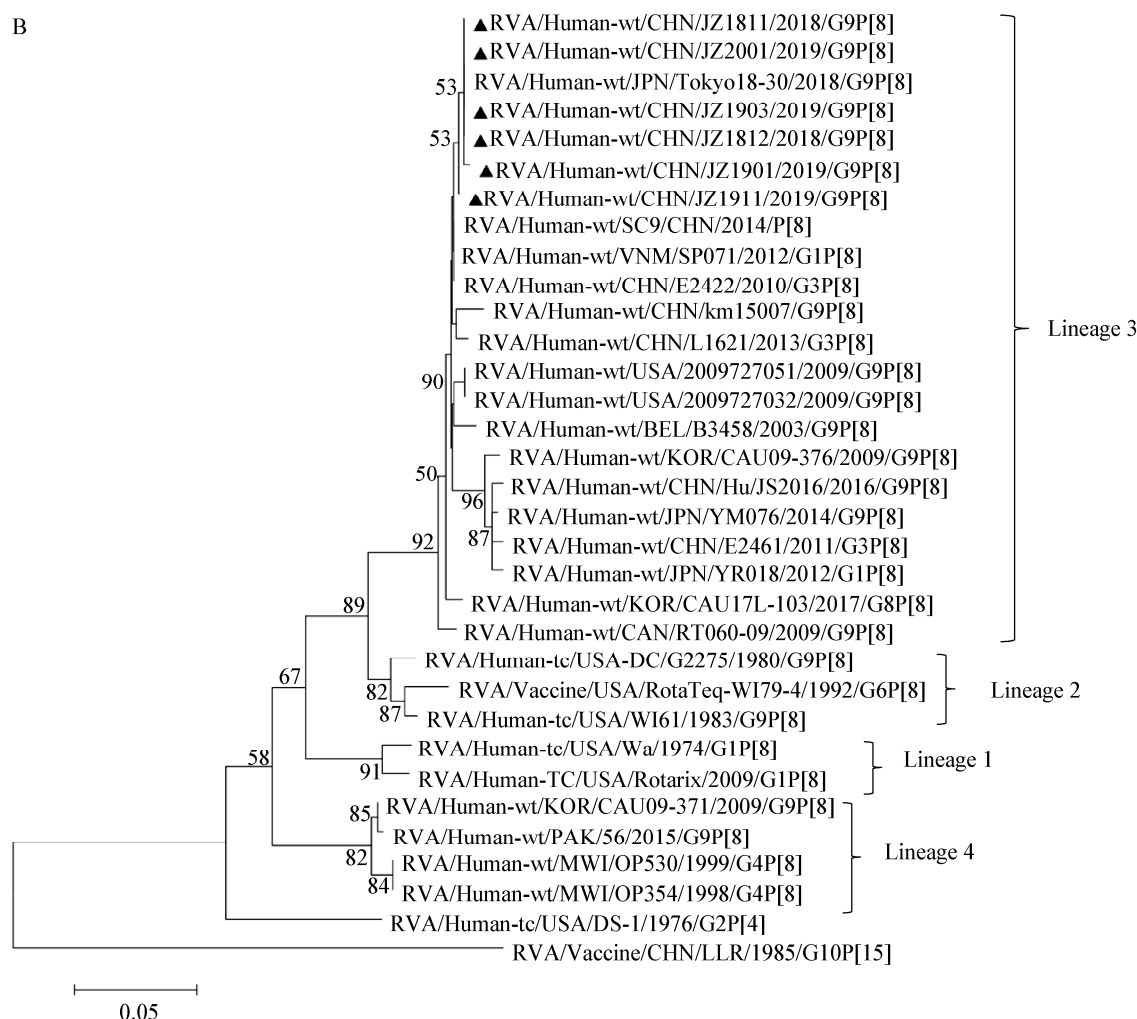


图 1 应用 MEGA X 建立 N-J 法锦州地方株 VP7 (A)和 VP4 (B)核苷酸序列与 GenBank 数据库中已知的人轮状病毒流行株及疫苗株同源基因序列的系统发生树

Figure 1 Phylogenetic trees of JZ strains VP7 (A) and VP4 (B) sequences and homologous genes of RVA epidemic and vaccine strains published in GenBank database were conducted by MEGA X based on neighbor-joining analysis

注: ▲表示本研究中锦州地方株, 进化树分支点的数字表示该分支点的 Bootstrap 值(%), 仅 50%及以上的 Bootstrap 值显示。树底部标尺表示遗传距离

Note: ▲: Jinzhou strains. Numbers at nodes (above 50%) indicated the level of bootstrap support (%). Bar: The genetic distance

JZ1812、JZ1903 序列完全相同。研究表明, VP7 三聚体含有 2 个抗原表位 7-1 和 7-2, 7-1 表位进一步细分为 7-1a 和 7-1b^[22]。应用 BioEdit 将 7 株 JZ RVA VP7 氨基酸序列之间及 2 种疫苗株 Rotavac 和 Rotasiil 的相应序列进行比较(表 3), 检测到 3 个 JZ 株特异性氨基酸位点变异, 分别是 JZ1901 (G54E), JZ2001 (T75I), JZ1811、JZ1812 和 JZ1903 (P112S), 均为 3 个抗原表位之外。在

这些表位的 29 个氨基酸残基中, 24 个在所有 JZ 株及 Rotavac 和 Rotasiil 中绝对保守, 5 个氨基酸位点有差异。与 Rotavac G9 VP7 相比, JZ 株替换位点为 I87T、G100N、N145D 和 N221S, 与 Rotasiil 相比为 A87T、D100N 和 T242N。2 种疫苗株 Rotavac 和 Rotasiil 未曾在国内使用, 这些变异并非疫苗选择性压力造成, 而是自然选择点突变。

表 3 应用 BioEdit 4.8.10 获得 JZ 株和疫苗株 Rotavac-116E/AG、Rotasiil-AU32 VP7 3 个抗原表位区 7-1a、7-1b 和 7-2 对应的 29 个氨基酸比对结果

Table 3 Amino acid sequences comparisons of 29 amino acid sites in three antigenic epitope regions 7-1a, 7-1b and 7-2 between JZ strains and Rotavac-116E/AG, Rotasiil-AU32 VP7 obtained by BioEdit 4.8.10

Strains and lineages	7-1a										7-1b										7-2								
	87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	291	201	211	212	221	238	242	143	145	146	147	148	190	217	221	264
G9-VI JZ1810	T	T	G	T	E	W	K	N	Q	D	A	I	D	K	Q	N	T	A	D	N	K	D	S	T	L	S	E	S	G
JZ1811	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JZ1812	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JZ1901	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JZ1903	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JZ1911	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JZ2001	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G9-II Rotavac-116E/AG	I	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	*	*	*	*	*	N	*
G9-I Rotasiil-AU32	A	*	*	*	*	*	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*

注：*：相同氨基酸。I：异亮氨酸；G：甘氨酸；N：天冬酰胺；A：丙氨酸；D：天冬氨酸；T：苏氨酸
Note: *: Identical amino acids. I: Isoleucine, Ile; G: Glycine, Gly; N: Asparagine, Asn; A: Alanine, Ala; D: Aspartic acid, Asp; T: Threonine, Thr

JZ RVA (除 JZ1810 及 JZ1901 外) VP4 氨基酸序列相似性为 99.19%–100%，与 Rotarix 及 RotaTeq VP4 做相似性比较，检测到 5 个 JZ 株特异氨基酸突变位点：JZ1811、JZ1812、JZ1903 (S146G，M630V)、JZ1911 (L697F，P701S)、JZ2001(I744S)。VP4 是 RVA 外衣壳上刺突蛋白，在感染宿主细胞过程中被胰酶裂解为 2 个亚单位蛋白，氨基端 VP8* (28 kD，aa1–247) 及羧基端 VP5* (60 kD，aa248–776)，分别介导病毒的吸附和穿入^[3]。VP8* 在病毒体表面形成球状头部，包含 4 个(8-1、8-2、8-3 和 8-4)表面暴露抗原表位，含 25 个氨基酸^[23]，是轮状病毒亚单位疫苗候选株靶位蛋白^[24]。5 株 P[8] 型 JZ 株 VP8* 的 4 个抗原表位与 Rotarix 比较在 146、150、195、113、125、131、135 共有 7 个氨基酸差异，而与 RotaTeq 有 146、150、195、113 共 4 个氨基酸差异，均分布于 8-1、8-3 (表 4)。

3 讨论与结论

尽管 GP 型别众多，全世界大多数 RVA 感染与 5 种 G/P 组合有关：G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8]^[25]。自 1983 年从美国费城感染住院患儿标本中鉴定了世界上第一例 G9 型 RVA (G9-

I 原型株 WI61)^[26]，目前 G9 型 RVA 已成为继 G1–G4 后全球范围内^[20,27–29]最主要的流行基因型。我们应用 RotaC V2.0 检测到辽宁锦州地区 2018–2020 年 2 个流行季轮状病毒株与国内外当前优势流行株相同，均为 G9P[8]型，说明 G9P[8]型可能已经替代既往流行株 G1P[8]和 G3P[8]^[30–31]，成为辽宁锦州地区近 2 年的优势流行株。

在轮状病毒的 11 个基因中，VP4 和 VP7 系统进化研究最广泛，基因型内谱系分类最细化。系统进化树证实本研究中锦州流行株均为 G9 型谱系 VI 和 P[8]型谱系 3，毒株之间 VP7 和 VP4 核苷酸序列高度相似，并与国内多地^[20,32]及日本^[33]等周边国家近年来流行株相似性高，但与中国较早的 G9 株 T203 株相比，亲缘关系相对较远，因为缺乏其他基因数据，锦州 7 例患儿感染的 RVA 与国内外近年来 G9P[8]流行株是否为同一来源尚待确定。

JZ 株、疫苗株 Rotavac 和 Rotasiil VP7 分别分布于 G9 谱系 VI、II、I，与 2 个疫苗株比较，检测到 5 个 VP7 氨基酸变异位点 87、100、145、221、242，其中 G100N 及 I87T 可能形成潜在 N 及 O 连接糖基化位点。JZ 株 VP4 与疫苗株 Rotarix 和

表 4 应用 BioEdit 4.8.10 获得 JZ 株和疫苗株 Rotarix、RotaTeq VP4 四个抗原表位区 8-1、8-2、8-3 和 8-4 对应的 25 个氨基酸比对结果

Table 4 Amino acid sequences comparisons of 25 amino acid sites in four antigenic epitope regions 8-1, 8-2, 8-3 and 8-4 between JZ strains and Rotarix, RotaTeq VP4 obtained by BioEdit 4.8.10

Strains and lineages		8-1												8-2		8-3										8-4		
		100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89		
P[8]-3	JZ1811	D	G	Q	D	S	T	N	L	N	G	I	T	A	D	P	V	D	N	R	N	D	D	N	T	N		
	JZ1812	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
	JZ1903	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
	JZ1911	*	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
	JZ2001	*	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
P[8]-1	Rotarix	*	S	*	E	*	*	*	*	*	N	*	*	*	N	*	*	*	S	S	*	*	N	*	*	*		
P[8]-2	Rotateq	*	S	*	E	*	*	*	*	*	D	*	*	*	N	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

注：*：相同氨基酸。S：丝氨酸；E：谷氨酸；N：天冬酰胺；D：天冬氨酸
Note: *: Identical amino acids. S: Serine, Ser; E: Glutamic acid, Glu; N: Asparagine, Asn; D: Aspartic acid, Asp

RotaTeq 比较，仅在表位 8-1 和 8-3 存在差异，其中位点 125、131、135 变异与俄罗斯株^[34]及比利时株^[23]研究结果一致。相比 P[8]-1 型 Rotarix，P[8]-3 型 JZ 株与 P[8]-2 型 RotaTeq 匹配度更好，VP4 系统进化分析也支持这一结果。本研究涉及病例均未接种任何疫苗，序列差异为自然选择变异，可促进 VP7 及 VP4 基因的进化和多样性的产生，并可获得新的抗原性，有助于病毒株逃逸疫苗诱导的中和抗体而使现有疫苗保护效力下降^[23]。这些抗原漂移积累所致变异对病毒地方流行株生物学功能和疫苗有效性的影响有待进一步探讨。

截至目前，辽宁地区尚缺乏 RVA 基因型别及序列的流行病学资料，本研究监测到我国辽宁省锦州地区近 2 年未接种疫苗散居儿童轮状病毒感染免疫源性基因的序列数据，对阐明轮状病毒感染机制和我国未来疫苗的推广具有一定的参考价值。由于样本数量有限、收集样本的地域集中，检测到的毒株基因型单一，今后的研究中应增加样本量及地域和时间跨度，以获得更加全面及连续性的流行病学信息。

综上所述，我们在 2018–2020 年辽宁省锦州地区鉴定了 7 株婴幼儿轮状病毒株 VP7 和 VP4 基因，属 G9 谱系 VI 和 P[8] 谱系 3，G9P[8] 很可能是近年来

辽宁省锦州地区 RVA 感染腹泻的主要流行基因型之一。VP7 与 VP4 与同基因型疫苗株相应基因比较发现，在抗原表位区检测到氨基酸位点差异，这些变异位点对于 RVA 野毒株的免疫逃逸机制具有一定研究意义。

REFERENCES

[1] Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children[J]. Emerging Infectious Diseases, 2003, 9(5): 565-572

[2] Troeger C, Khalil IA, Rao PC, Cao SJ, Blacker BF, Ahmed T, Armah G, Bines JE, Brewer TG, Colombara DV, et al. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhea among children younger than 5 years[J]. JAMA Pediatrics, 2018, 172(10): 958-965

[3] Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function[J]. Microbiological Reviews, 1989, 53(4): 410-449

[4] Matthijnssens J, Ruggeri F, Esona MD, Steyer A, Estes M, Banyai K, Ciarlet M, Desselberger U, Kirkwood C, Martella V. Rotavirus classification working group: RCWG[EB/OL]. (2018-05-29)[2020-07-09]. <http://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagénomics/virus-classification/rcwg>

[5] Iturriza-Gómara M, Dallman T, Banyai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, Fiore L, Johansen K, Koopmans M, Korsun N, et al. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network[J]. Epidemiology & Infection, 2011, 139(6): 895-909

[6] Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine[J].

- Reviews in Medical Virology, 2005, 15(1): 29-56
- [7] Ward RL, Bernstein DI, Plotkin S. Rotarix: a rotavirus vaccine for the world[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2009, 48(2): 222-228
 - [8] Matthijnssens J, Joëlsson DB, Warakowski DJ, Zhou TY, Mathis PK, Van Maanen MH, Ranheim TS, Ciarlet M. Molecular and biological characterization of the 5 human-bovine rotavirus (WC3)-based reassortant strains of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq®[J]. *Virology*, 2010, 403(2): 111-127
 - [9] Ciarlet M, Schödel F. Development of a rotavirus vaccine: clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq®[J]. *Vaccine*, 2009, 27(Suppl 6): G72-G81
 - [10] Armah GE, Sow SO, Breiman RF, Dallas MJ, Tapia MD, Feikin DR, Binka FN, Steele AD, Laserson KF, Ansah NA, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *The Lancet*, 2010, 376(9741): 606-614
 - [11] Zaman K, Anh DD, Victor JC, Shin S, Yunus, Dallas MJ, Podder G, Thiem VD, Mai LTP, Luby SP, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *The Lancet*, 2010, 376(9741): 615-623
 - [12] Bhandari N, Rongsen-Chandola T, Baydekar A, John J, Antony K, Taneja S, Goyal N, Kawade A, Kang G, Rathore SS, et al. Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *The Lancet*, 2014, 383(9935): 2136-2143
 - [13] Rathi N, Desai S, Kawade A, Venkatramanan P, Kundu R, Lalwani SK, Dubey AP, Venkateswara Rao J, Narayanappa D, Ghildiyal R, et al. A Phase III open-label, randomized, active controlled clinical study to assess safety, immunogenicity and lot-to-lot consistency of a bovine-human reassortant pentavalent rotavirus vaccine in Indian infants[J]. *Vaccine*, 2018, 36(52): 7943-7949
 - [14] Fu CX, He Q, Xu JX, Xie HP, Ding P, Hu WS, Dong ZQ, Liu XY, Wang M. Effectiveness of the Lanzhou lamb rotavirus vaccine against gastroenteritis among children[J]. *Vaccine*, 2012, 31(1): 154-158
 - [15] He Q, Wang M, Xu JX, Zhang CH, Wang H, Zhu W, Fu CX. Rotavirus vaccination coverage among children aged 2-59 months: a report from Guangzhou, China[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e68169
 - [16] 藤井克樹, 染谷雄一. 病原体検出マニュアルロタウイルス (第 2 版) [EB/OL]. (2019-06)[2020-07-09]. <http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Rotavirus20190619.pdf>
 - [17] Maes P, Matthijnssens J, Rahman M, Van Ranst M. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses[J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9(1): 238
 - [18] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549
 - [19] Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2007, 7(5): 656-663
 - [20] Xu C, Fu JG, Ai J, Zhang J, Liu C, Huo X, Bao CJ, Zhu YF. Phylogenetic analysis of human G9P[8] rotavirus strains circulating in Jiangsu, China between 2010 and 2016[J]. *Journal of Medical Virology*, 2018, 90(9): 1461-1470
 - [21] Morozova OV, Sashina TA, Epifanova NV, Zverev VV, Kashnikov AU, Novikova NA. Phylogenetic comparison of the VP7, VP4, VP6, and NSP4 genes of rotaviruses isolated from children in Nizhny Novgorod, Russia, 2015-2016, with cogent genes of the Rotarix and RotaTeq vaccine strains[J]. *Virus Genes*, 2018, 54(2): 225-235
 - [22] Aoki ST, Settembre EC, Trask SD, Greenberg HB, Harrison SC, Dormitzer PR. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab[J]. *Science*, 2009, 324(5933): 1444-1447
 - [23] Zeller M, Patton JT, Heylen E, De Coster S, Ciarlet M, Van Ranst M, Matthijnssens J. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(3): 966-976
 - [24] Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication[J]. *Virus Research*, 2004, 101(1): 67-81
 - [25] Kawai K, O'Brien MA, Goveia MG, Mast TC, El Khoury AC. Burden of rotavirus gastroenteritis and distribution of rotavirus strains in Asia: a systematic review[J]. *Vaccine*, 2012, 30(7): 1244-1254
 - [26] Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, Groff J, Hess G, Bachman P, Offit PA. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25(9): 1757-1762
 - [27] Dian ZQ, Wang BH, Fan M, Dong SW, Feng Y, Zhang AM, Liu L, Niu H, Li YY, Xia XS. Completely genomic and evolutionary characteristics of human-dominant G9P[8] group A rotavirus strains in Yunnan, China[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(6): 1163-1168
 - [28] Qian Y, Yuan LJ, Xiong CH, Zhang Y, Liu J, Guan DH, Wang ZL. Identification of rotavirus G9 type from a stool specimen collected from a child with diarrhea in Beijing[J]. *Chinese Journal of Virology*, 1994, 10(3): 263-267 (in Chinese)

- 钱渊, 袁丽娟, 熊朝晖, 张又, 刘军, 关德华, 王之梁. 在我国腹泻患儿中发现 G9 型轮状病毒感染[J]. 病毒学报, 1994, 10(3): 263-267
- [29] Ren Y, Yao WQ, Han Y, Wang ZS, Zhao Z. First detection of group A rotavirus G9 in Liaoning province[J]. Chinese Journal of Public Health, 2015, 31(4): 476-478 (in Chinese)
- 任毅, 姚文清, 韩悦, 王作龑, 赵卓. 辽宁省首次检出 G9 型 A 组轮状病毒[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(4): 476-478
- [30] Chen SC, Tan LB, Huang LM, Chen KT. Rotavirus infection and the current status of rotavirus vaccines[J]. Journal of the Formosan Medical Association, 2012, 111(4): 183-193
- [31] Wang YH, Pang BB, Ghosh S, Zhou X, Shintani T, Urushibara N, Song YW, He MY, Liu MQ, Tang WF, et al. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e88850
- [32] Tian Y, Chughtai AA, Gao ZY, Yan HQ, Chen YW, Liu BW, Huo D, Jia L, Wang QY, MacIntyre CR. Prevalence and genotypes of group A rotavirus among outpatient children under five years old with diarrhea in Beijing, China, 2011-2016[J]. BMC Infectious Diseases, 2018, 18(1): 497
- [33] Fujii Y, Oda M, Somura Y, Shinkai T. Molecular characteristics of novel mono-reassortant G9P[8] rotavirus A strains possessing the NSP4 gene of the E2 genotype detected in Tokyo, Japan[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2020, 73(1): 26-35
- [34] Morozova OV, Sashina TA, Fomina SG, Novikova NA. Comparative characteristics of the VP7 and VP4 antigenic epitopes of the rotaviruses circulating in Russia (Nizhny Novgorod) and the Rotarix and RotaTeq vaccines[J]. Archives of Virology, 2015, 160(7): 1693-1703

2021 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-2)

序号	活动名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
12	第 18 届全国微生物学教学和科研及成果产业化学术研讨会	中国微生物学会普通微生物学专业委员会、微生物教学工作委员会	2021 年 7 月	200	贵州 翁庆北	贵阳 15285912021
13	全国酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	2021 年 8 月	500	广东 欧阳浩森	广州 010-64807420
14	第十八届全国微生物培养基学术研讨会	中国微生物学会生物制品专业委员会	2021 年 8 月	70	福建 赵贵明	漳州 13701210443
15	干扰素与细胞因子产业化新进展	中国微生物学会干扰素与细胞因子专业委员会	2021 年 8 月	200	浙江 倪健	杭州 13818096617
16	医学真菌学基础知识提高班	中国微生物学会真菌学专业委员会	2021 年 8 月	50	北京 宋营改	18311041378
17	人兽共患病学术交流研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	2021 年 8-9 月	200	待定 蒋毅	13520419382
18	第十二届中国临床微生物学大会暨《医学参考报》微生物学与免疫学论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	2021 年 9 月	500	陕西 吕宝霞	西安 0574-87035856
19	第十二届青年微生物学工作者学术研讨会	中国微生物学会普通微生物学专业委员会	2021 年 9 月 11-12 日	300	山东 李越中 李盛英	青岛 13583118964 15066181927
20	第十四届全国病毒学研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	2021 年 10 月	1 000	湖北 吴莹	武汉 15901455682
21	2021 猪瘟疫国际学术研讨会	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	2021 年 10 月	150	北京 朱良全 丁家波	010-62103675
22	第三届微生物及昆虫转化有机废弃物研究与应用国际研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	2021 年 10 月	150-200	湖北 张吉斌	武汉 zhangjb@mail.hzau.edu.cn