



一株新 G8P[11]型牛轮状病毒的分离鉴定与全基因组遗传进化分析

苏雪繁^{1,2}, 毛立², 王祎祺², 周文豪¹, 陶然², 朱雪蛟², 郭容利², 张雪寒²,
李彬^{1,2}, 周金柱^{2*}, 贡嘎^{1*}

(1. 西藏农牧大学动物科学学院, 林芝 860000; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室, 南京 210014)

摘要: 本研究的目的是分离鉴定 G8P[11]型牛-牦牛源 A 群牛轮状病毒, 并分析其基因组的遗传进化特征。检测江苏泗洪一奶牛场腹泻犊牛粪样中的 6 种腹泻相关病毒, 分离轮状病毒(RV)阳性株并通过 RT-PCR、IFA、dsRNA-PAGE 和电镜鉴定, 测定生长曲线及细胞嗜性, 评估跨种传播潜力。同时, 对分离株进行全基因组测序后构建系统进化树, 确定其 G/P 基因型。结果表明, 成功分离出一株牛轮状病毒, 病毒接种 MA104 细胞出现典型轮状病毒病变; 病毒能够与 VP6 特异性单克隆抗体发生反应, 病毒基因组电泳图谱为 4:2:3:2; 病毒粒子呈典型车轮状、粒径约 70 nm, 并将其命名为 JSSH2024 株。一步生长曲线表明, 该毒株接种 MA104 细胞 18 h 后滴度达峰值($10^{5.75}$ TCID₅₀·mL⁻¹)。跨种感染试验证实其可在 MA104、IPEC-J2、HT-29 及 HCT-8 细胞中增殖。全基因组分析显示其基因型为 G8-P[11]-I2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3, 其中 8 个基因片段与牛源毒株亲缘性近, 3 个片段与牦牛源毒株相近, 提示其为牛-牦牛重配株。本研究首次在国内报道 G8P[11]型牛-牦牛重配 BoRV, 为牛轮状病毒流行病学监测及疫苗研发提供了重要依据。

关键词: 轮状病毒; 牛; 基因型; 全基因组; 遗传进化

中图分类号: S852.659.4

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1581-14

Isolation and Identification of a New G8P[11] Bovine Rotavirus Strain and the Phylogenetic Analysis of the Whole-genome Sequence

SU Xuefan^{1,2}, MAO Li², WANG Yiqi², ZHOU Wenhao¹, TAO Ran², ZHU Xuejiao², GUO Rongli²,
ZHANG Xuehan², LI Bin^{1,2}, ZHOU Jinzhu^{2*}, GONG Ga^{1*}

(1. College of Animal Science, Xizang Agricultural and Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, China; 2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

Abstract: The objective of this study was to isolate and characterize a bovine-yak origin group A rotavirus with the G8P[11] genotype and to analyze the genetic evolutionary features of its genome. Fecal samples from diarrheic calves at a dairy farm in Sihong, Jiangsu Province, were screened for six

收稿日期: 2025-07-24

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD1801302); 国家自然科学基金(32302892); 江苏省农业科技自主创新资金(CX(23)1029); 江苏省重点研发计划[现代农业(BE2023317)]; 江苏省卓越博士后计划(2022ZB766); 中国博士后基金(2024M751210)

作者简介: 苏雪繁, 硕士生, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: 3534171730@qq.com

* 通信作者: 周金柱, 主要从事动物腹泻病研究, E-mail: syzhoujz@163.com; 贡嘎, 主要从事高原动物传染病研究, E-mail: xzlgg@163.com

diarrhea-associated viruses. Rotavirus (RV) -positive samples were isolated and identified using RT-PCR, indirect immunofluorescence assay (IFA), dsRNA-PAGE, and electron microscopy. The growth kinetics and cellular tropism of the isolated strains were characterized, and their cross-species transmission potential was evaluated. Additionally, whole-genome sequencing was performed on the isolates, followed by phylogenetic tree construction to determine their G/P genotypes. A bovine rotavirus strain was successfully isolated. Inoculation onto MA104 cells induced typical cytopathic effects, including cell rounding, shrinkage, detachment, and fragmentation. The virus reacted with VP6-specific monoclonal antibodies, exhibited a 4:2:3:2 genomic RNA electrophoretic pattern, and displayed characteristic wheel-shaped virions approximately 70 nm in diameter. This strain was designated JSSH2024. A one-step growth curve revealed peak viral titers ($TCID_{50}$) as $10^{5.75} \cdot mL^{-1}$ in MA104 cells at 18 hours post-infection. *In vitro* infection assays demonstrated the virus's ability to replicate in MA104, IPEC-J2, HT-29 and HCT-8 cell lines, indicating potential for cross-species transmission. Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis identified its genotype as G8-P[11]-I2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3. Eight gene segments clustered closely with bovine rotaviruses, while three segments showed closer genetic affinity to yak rotaviruses, suggesting its origin as a bovine-yak reassortant virus. This study reports the first G8P[11] bovine-yak reassortant bovine rotavirus (BoRV) in China, providing critical insights for epidemiological surveillance and vaccine development.

Keywords: rotavirus; bovine; genotype; whole-genome sequence; phylogenetic analysis

* **Corresponding author:** ZHOU Jinzhu, E-mail: syzhoujz@163.com; GONG Ga, E-mail: xzlgg@163.com

牛轮状病毒(bovine rotavirus, BoRV)是引起新生犊牛非细菌性腹泻的主要病原体之一^[1]。犊牛感染 BoRV 通常会引起精神萎靡、厌食、腹泻、脱水; 7 日龄内的犊牛最易感染, 成年牛多呈隐性感染并持续排毒, 一旦发病, 极易造成持续性感染^[2]。由于 BoRV 在新生犊牛中流行性广、感染后发病率高、危害严重, 且病毒基因型呈现多样化, 由跨物种来源引起的 BoRV 重组毒株导致牛群腹泻的情况时有发生, 给我国各地的养牛产业造成了严重的经济损失^[3]。

轮状病毒(rotavirus, RV)属于呼肠孤病毒科, 轮状病毒属; 因其病毒粒子呈球形、无包膜, 电镜下形似辐射车轮状而得名^[4]。病毒粒子直径为 70~75 nm, 由外部衣壳、内部衣壳和核心三层组成二十面体立体对称结构, 其结构包括三层同心衣壳及其包裹着的 11 个分节段的双股 RNA^[5]; 这些 RNA 节段分别编码 6 种病毒结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4、VP6、VP7)和 6 个非结构蛋白(NSP1~NSP6), 其中第 11 个片段编码 2 个蛋白(NSP5 和 NSP6), 其余基因片段均编码 1 个蛋白^[6]。根据最新的国际病

毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)的分类标准, 依据 VP6 蛋白抗原性的不同, 轮状病毒可分为 A~D、F~J 共 9 个群, 牛群感染 A 群轮状病毒最为常见。A 群轮状病毒(rotavirus A, RVA)根据 VP7 和 VP4 的核苷酸序列进一步分为 G 型和 P 型^[7]。目前在人和动物上已分离鉴定的 RV 有 42 个 G 型、58 个 P 型^[8]。国外 BoRV 毒株的 G 型以 G6 为主, 其次是 G10; P 型主要是 P[5], 其次是 P[11]^[9-12]; 我国已检出的牛轮状病毒 A 群(bovine rotavirus A, BoRVA)基因型包括 G6P[1]、G6P[5]、G10P[11]、G6P[11] 和 G8P[1] 等基因型^[11,13-14]。我国牛群中主要存在的 G 型是 G6、G10, 常见的 P 型有 P[1]、P[5]-[8] 和 P[11] 基因型^[15-20]。在所有这些基因型中, G6P[5]、G6P[11] 和 G10P[11] 是最普遍的 G/P 组合^[21]。

轮状病毒具有跨宿主传播的能力, 可在不同物种间通过基因重配等方式实现传播并产生新病毒, 这增加了防控的难度和复杂性^[3]。动物轮状病毒也是人类轮状病毒的重要来源之一, 并可与人源毒株发生基因重配, 从而增强其适应性和传播潜力。有

研究表明,RV可在人和牛之间相互传播,通过基因重配对人类构成潜在威胁^[22-23]。因此,深入研究该病毒的跨种传播机制和流行规律对于公共卫生来说具有重大的意义^[24]。

本研究在国内首次成功分离并鉴定了牛源 A 群 G8P[11]型牛轮状病毒,通过测序获得分离毒株全基因组序列,并对其进行序列分析,构建进化树,解析其基因组特性。这种新基因型的发现,表明我国牛群中轮状病毒具有复杂性,需要进一步加强流行病学调查和研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 本研究用于病毒培养细胞包括:MA104(恒河猴胚肾上皮细胞)、Marc-145(非洲绿猴肾细胞)、MDBK(牛肾细胞)、ST(猪睾丸细胞)、IPEC-J2(猪空肠上皮细胞)、Caco-2(人结肠腺癌细胞)、HT-29(人结肠腺癌细胞)、HCT-8(人回盲肠腺癌细胞),均由江苏省农业科学院农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室保存。

1.1.2 病毒核酸 本研究用于检测的阳性对照核酸包括:牛轮状病毒(BoRV)、牛冠状病毒(bovine coronavirus, BCoV)、牛肠道病毒(bovine enterovirus, BEV)、牛病毒性腹泻(bovine viral diarrhea virus, BVDV)、牛腺病毒(bovine adeno-

virus, BAdV)、牛星状病毒(bovine astrovirus, BoAstV),均由江苏省农业科学院农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室保存。

1.1.3 主要试剂 DMEM 培养基购自 BasaIMedia 公司;胰酶购自 Sigma 公司;胎牛血清购自中国上海达特希尔生物科技有限公司;RNA 提取试剂盒 FastPure® Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2、2× Green Taq Mix、2× Phanta® Max Master Mix、5× HiScript II qRT SuperMix II 均购自南京诺维赞生物科技股份有限公司;FITC 标记山羊抗鼠 IgG(H+L)、羊抗鼠 IgG/HRP 购自 Solarbio 公司;pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.4 样本的处理 使用无菌棉拭子采集发病期犊牛或感染牛的新鲜粪便样本。将采集样本置于含 1 mL DMEM 培养基的离心管中,补充青霉素的终浓度 2 000 U·mL⁻¹,链霉素的终浓度 2 μg·mL⁻¹,涡旋振荡混匀。将悬液于一 80 °C 超低温冰箱冷冻 30 min 后,转移至 37 °C 水浴解冻,反复冻融 3 次以释放病原体。在 4 °C 条件下离心分离,以 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,小心吸取上清液转移至无菌 EP 管中,采用 0.45 μm 滤器对上清液进行除菌过滤,所得液体于一 80 °C 保存备用。

1.1.5 引物设计及合成 根据参考文献[25, 26] 委托上海生工生物科技有限公司合成引物。

表 1 病毒检测用引物

Table 1 Primers for virus detection

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	退火温度/°C Annealing temperature	产物大小/bp Product length	参考文献 References
RV-VP7-F	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	56	395	[25]
RV-VP7-R	ACTGATCCTGTTGGCCATCCTTT			
BCoV-N-F	AAGGTGTGCCTATTGCACCAG	54	500	[26]
BCoV-N-R	GCTTAGTTACTTGCTGTGGC			
BEV-F	CTTTGCACGCCTGTTTTCC	54	497	
BEV-R	CACACGCTCGGAGGTTGGGAT			
BoAstV-F	GAYTGGACBCGHTWTGATGG	54	418	
BoAstV-R	KYTTRACCCACATNCCAA			
BAdV-F	TCAGGACCGCCTGGATCATA	54	796	
BAdV-R	TCAGCCACGCAAAGCCATTT			
BVDV-F	ATGCCCW TAGTAGGACTAGCA	54	244	
BVDV-R	TCAACTCCATGTGCCATGTAC			

1.2 病原的PCR检测

取“1.1.4”已经处理的上清液样品 200 μL , 根据南京诺唯赞生物科技有限公司 RNA 提取试剂盒 (Fast Pure[®] Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2) 说明书进行病料 RNA 的提取 (30 μL ddH₂O 洗脱 RNA, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存)。参照南京诺唯赞生物科技有限公司反转录试剂盒说明书使用反转录试剂盒进行反转录, 将 RNA 反转录成 cDNA。利用 $2\times$ Green Taq Mix 和 6 种腹泻相关病毒; 检测引物见表 1。

1.3 病毒的分离与纯化

将“1.1.4”中处理过的阳性病料上清液, 加入终浓度为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的胰酶, 然后置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱下处理 1 h, 接着用高压过的 PBS 清洗长成单层的 6 孔板 MA104 细胞, 将处理过的上清液接种到细胞中, 在 $50\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CO}_2$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中吸附, 吸附 1 h 后, 弃掉上清液, 并用 PBS 清洗细胞 2 次, 换成无血清的 DMEM 的维持液含胰酶 ($1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 青霉素 $2\text{ }000\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和链霉素 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 在 $50\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CO}_2$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养, 持续观察细胞病变 (cytopathic effect, CPE) 情况。当有 80% 的细胞出现 CPE 时, 进行病毒液的收集 ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 冻融 3 次, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ }000\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 15 min)。之后按相同的方法进行连续传代。当出现稳定细胞病变时, 对病毒进行空斑纯化。在收获的病毒液中加入终浓度为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的胰酶, 然后置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下激活 1 h, 将激活的病毒进行 10 倍倍比稀释, 选取稀释度为 10^1 倍到 10^6 倍的 6 个不同稀释度, 并接种到 6 孔板上的 MA104 细胞中。在 $50\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CO}_2$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中感作 1 h, 弃培养液, 用 PBS 洗细胞, 同时将无色的 GIBCO $2\times$ MEM 预热至 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。然后与 $11\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的低熔点琼脂糖 1:1 均匀混合, 同时加入胰酶, 使之终浓度为 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔中加入 2 mL 混合液, 注意避免产生气泡。将 6 孔板放置室温使琼脂糖冷却, 将其倒置在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $50\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CO}_2$ 的培养箱中培养, 并观察细胞的病变。当出现典型的病变后, 用中性红进行染色并挑斑, 将挑出的斑块放到无菌的 EP 管中, 进行冻融收获病毒。

1.4 病毒的 RT-PCR 与 RT-qPCR 鉴定

参考 GenBank 数据库收录的国内外 BoRV 毒株 NSP5 基因, 利用 SnapGene 4.1.8 软件设计 RT-qPCR 引物和探针 (RV-NSP5-F207-226: $5'\text{-TCCACTMACCAGYTTTTTCGAT-3'}$; RV-

NSP5-R298-279: $5'\text{-AWGGYCGTGATTGYGY-YGAT-3'}$; RV-NSP5-probe232-261: FAM-TC-GAATGCAGTTAAGACARAYGCAGACGCT-TAMRA) 由通用生物 (安徽) 股份有限公司合成。提取分离毒株 P4、P6、P8、P10、P12 代病毒 RNA, 反转录获得 cDNA, 利用表 1 的 VP7 特异性引物进行 RT-PCR 扩增和 RT-qPCR 进行测定。

1.5 间接免疫荧光试验鉴定

将经胰酶激活处理的 P10 代病毒接种于 MA104 细胞单层, 同步设置正常细胞对照。经适当时间培养后 (病毒感染 MA104 细胞 24 h 后), 弃上清, 同时利用预冷的无水乙醇对其进行固定, 使用 VP6 单克隆抗体作为一抗 (本实验室制备, $1:2\text{ }000$)^[5] 进行孵育, 随后用 FITC 标记山羊抗鼠 IgG ($1:500$) 二抗进行孵育。在荧光显微镜下观察是否有特异性绿色荧光出现。

1.6 dsRNA-PAGE 鉴定

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术进行 dsRNA 分子分离与可视化分析, 采用“1.2”的方法提取 P10 代病毒的 RNA, 在 RNA 样本中加入 $5\times$ loading 后, 上样于 7.5% 分离胶 (厚度 1.0 mm), 在 ($1\times$ TAE 缓冲液 ($89\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-base, $89\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸, $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA) 体系中, 于 Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra 电泳系统进行恒压 (180 V) 电泳分离 5 h。采用核酸染色法: 电泳后凝胶浸入含 0.03% YeaRed 核酸染料的染色液 (终浓度: $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 含 $10\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 高压灭菌水), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光振荡染色 30 min 后, 在 Gel Doc XR+ 凝胶成像系统 (Bio-Rad) 下观察。

1.7 电镜观察

采用超速离心联合负染色技术对 BoRV 进行形态学鉴定, 具体操作流程如下: 当 MA104 细胞感染出现超过 80% 的 CPE 时, 收集病毒感染的细胞悬液。首先通过 $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 15 min ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 去除细胞碎片, 所得上清经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 孔径滤膜过滤后, 采用配备 70 Ti 型转子的 Beckman 超速离心机 (Optima XE 系列) 进行富集: $30\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 1.5 h 富集病毒颗粒。病毒沉淀用 TNC 缓冲液 [$20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl ($\text{pH}=8.0$), $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2] 轻柔重悬至终体积 1 mL。病毒样品经 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 磷钨酸 ($\text{pH}=6.8$) 负染色处理后, 使用 Hitachi HT7800 型透射电子显微镜进行病毒粒子形态特征的观察。

1.8 病毒生长曲线

按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.1, 将 P10 代病毒液接种到长满单层的 MA104 细胞的 12 孔板中。分别在接毒后 6、12、18、24 和 36 h 收取板中全部液体, 参考文献[27]的方法, 利用免疫过氧化物酶单层细胞染色法(IPMA)检测病毒的感染情况, 判定 CPE 结果; 根据 Reed-Muench 法计算每毫升样品的 50% 组织培养感染剂量。使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘制病毒生长曲线, 从而确定毒株在体外的增殖动力学情况。

1.9 细胞的易感性

以 MOI 为 0.1, 将 P10 代病毒分别感染 MA104、Marc-145、MDBK、ST、IPEC-J2、Caco-2、HT-29 和 HCT-8 细胞, 在 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 按照“1.4”方法进行间接免疫荧光试验, 观察病

毒对不同细胞的感染水平。

1.10 全基因组测序

本研究基于 GenBank 数据库收录的国内外 BoRV 毒株全基因组序列, 采用 SnapGene 4.1.8 软件设计 11 对兼并扩增引物。以“1.3”中 P10 代病毒的 cDNA 为模板, 按照表 2 参数进行分段 PCR 扩增, 经凝胶电泳验证后切取目的条带进行纯化回收。随后将 11 个片段克隆至 pMD19-T 载体, 筛选阳性质粒送至南京擎科生物有限公司完成双向测序。获得的测序结果经 DNASTar 软件拼接后, 提交至 NCBI BLAST 进行全基因组序列同源性分析, 选取不同基因型轮状病毒参考毒株建立比对数据库, 进行轮状病毒全基因组基因分型的确定。最终利用 MEGA 11 软件构建全基因组系统发育进化树, 分析该毒株的遗传进化关系。

表 2 BoRV 全基因组扩增引物

Table 2 BoRV whole-genome amplification primers

基因 Gene	引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	退火温度/℃ Annealing temperature	产物大小/bp Product length
VP1	VP1-F	GGCTATTAAAGCTGTACAATGG	51	3 302
	VP2-R	GGTCACATCTAAGCACTCTA		
VP2	VP2-F	GGCTATTAAAGGCTCAATGG	51	2 686
	VP2-R	GGTCATATCTCCACAGTGG		
VP3	VP3-F	GGCTATTAAAGCAGTACTAGTAG	51	2 591
	VP3-R	GGTCAYATCRTGACYDGTGTG		
VP4	VP4-F	GGCTATAAAATGGCTTCTCTAA	56	2 352
	VP4-R	GGTCACATCCTCAATAGCG		
VP6	VP6-F	GGCTTTTAAACGAAGTCTTCG	51	1 356
	VP6-R	GGTCACATCCTCTCACTATA		
VP7	VP7-F	GGCTTTTAAAGAGAGAATTTCCG	56	1 062
	VP7-R	GGTCACATCAWACARTTCTAMT'		
NSP1	NSP1-F	GGCTTTTTTTATGAAAAGTCTTGTGG	51	1 476
	NSP1-R	GGTTCACATTTTATGCTGCC		
NSP2	NSP2-F	GGCTTTTAAAGCGTCTCAGT	51	1 059
	NSP2-R	GGTCACATAAGCGCTTCTATTC		
NSP3	NSP3-F	GGCTTTTAATGCTTTTCAGTGG	51	1 074
	NSP3-R	GGTCACATAACGCCCTA		
NSP4	NSP4-F	GGCTTTTAAAGTTCTGTTCCG	51	750
	NSP4-R	GGTCACATTAAGACCATTC		
NSP5	NSP5-F	GGCTTTTAAAGCGCTACAG	51	667
	NSP5-R	GGTCACAAAACGGGAGTG		

2 结果

2.1 病原 PCR 检测

病料经 PCR 检测,结果显示仅有 RV 引物扩增区域呈现清晰的 395 bp 特征条带(图 1),与预期扩增片段完全一致,证实该腹泻样本中存在 RV 特异性核酸,提示牛群可能存在 BoRV 感染。其余 5 种常见腹泻病原体核酸检测结果均为阴性。

2.2 病毒分离纯化

将胰酶处理后的病料滤液接种至 MA104 单层细胞后,前 3 代盲传未观察到明显 CPE。然而,从第 4 代开始,细胞逐渐出现典型的 CPE,表现为细胞变圆、皱缩、脱落及碎裂见图 3B,而对照细胞保持正常形态。当 80% 的细胞出现 CPE 时,收集病毒液,经冻融和离心处理后获得病毒上清液。随后,通过连续传代使 CPE 稳定出现,表明病毒已成功适应细胞培养环境。分离毒株命名为 JSSH2024。为进一步

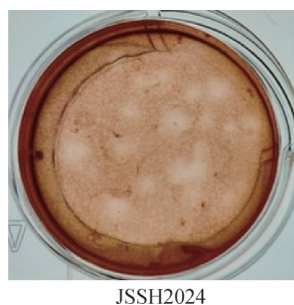


图 2 JSSH2024 毒株纯化结果

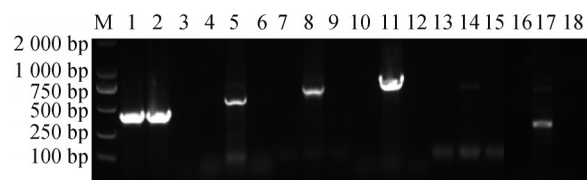
Fig. 2 Purification results of JSSH2024 strain

2.3 毒株体外传代的 PCR 与 RT-qPCR 检测

对分离毒株 JSSH2024 的 P4、P6、P8、P10、P12 代次病毒核酸进行 VP7 基因扩增,PCR 检测结果见图 3A,各代次样本在 395 bp 处均呈现与阳性对照(RV-VP7)大小完全一致的特征性条带;RT-qPCR 检测结果,分离毒株的 P4、P6、P8、P10、P12 的 C_t 值均 < 25 ,分别为 21.23、21.54、20.85、19.73、19.13;阴性对照为 C_t 值 > 35 ,为 36.25。进一步表明该毒株可在 MA104 细胞上进行稳定传代。

2.4 间接免疫荧光试验

将 P10 代病毒接种 MA104 细胞,接毒后 24 h,细胞出现 CPE,将接毒细胞进行固定,用 VP6 特异性单抗进行鉴定,间接免疫荧光结果见图 3B,接种病毒的 MA104 细胞中出现大量特异性的绿色荧光,进一步表明分离株为轮状病毒,而不接毒对照细胞



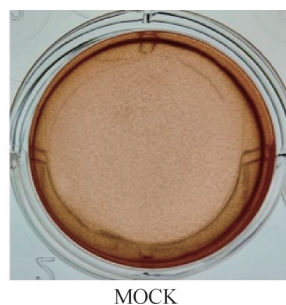
M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1、4、7、10、13、16. 腹泻样本;3、6、9、12、15、18. 阴性对照;2. BoRV 阳性对照;5. BoAstV 阳性对照;8. BEV 阳性对照;11. BAdV 阳性对照;14. BCoV 阳性对照;17. BVDV 阳性对照

M. DL2000 DNA marker; 1, 4, 7, 10, 13, 16. Diarrhea samples; 3, 6, 9, 12, 15, 18. Negative control; 2. BoRV; 5. BoAstV; 8. BEV; 11. BAdV; 14. BCoV; 17. BVDV

图 1 PCR 检测 6 种腹泻相关病毒

Fig. 1 Detection of six diarrhea-associated viruses by PCR

纯化病毒,对稳定传代的病毒液进行噬斑试验,结果形成典型的圆形或类圆形噬斑见图 2。挑取单个噬斑进行冻融处理后获得纯化病毒样本。



无荧光。

2.5 dsRNA-PAGE

提取 P10 代病毒的 RNA,进行 dsRNA-PAGE 电泳,核酸电泳结果见图 3C,分离株具有 A 群轮状病毒的特征性电泳图谱,排列方式为 4:2:3:2,包括 4 个高分子量的双链 RNA(dsRNA)节段)(对应片段 1~4),5 个中等大小的基因片段(对应片段 5~9,其中片段 7~9 紧密排列形成三体结构),2 个小节段(对应片段 10 和 11)。进一步证实了 JSSH2024 毒株为 A 群轮状病毒。

2.6 电镜观察

将毒株 JSSH2024 病毒培养液(P10 代)浓缩纯化,电镜结果见图 3D,镜下可见典型轮状病毒特征的颗粒,表面呈完整球形,具有清晰的双层衣壳结构,衣壳间辐射状排列的棘突形成特征性的“车轮

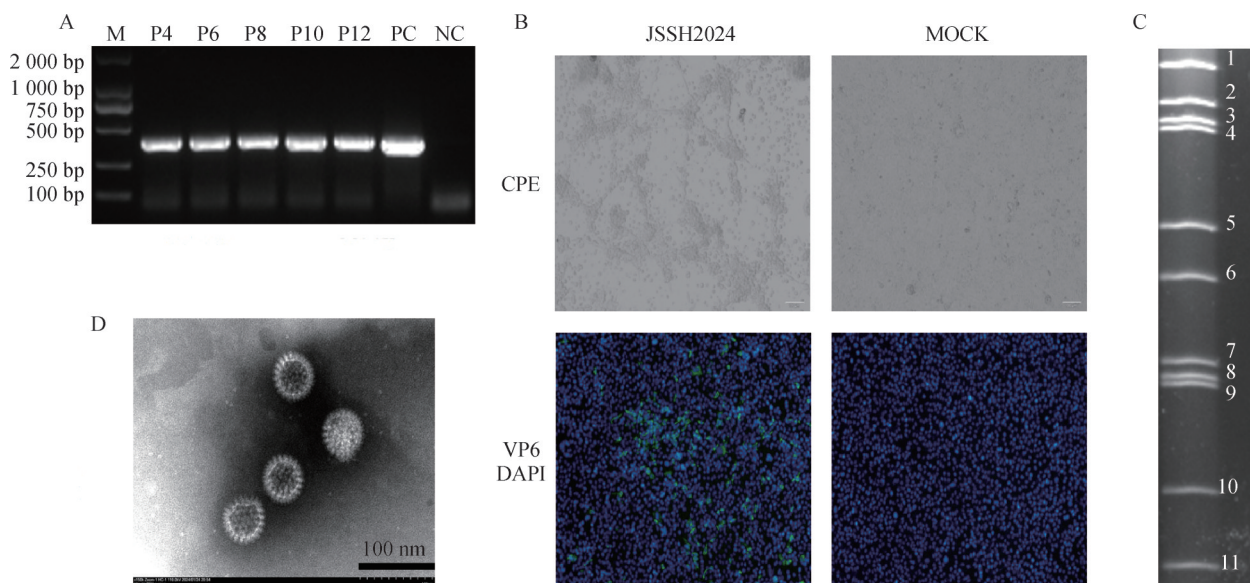


图3 JSSH2024毒株鉴定结果
A. 各代次病毒 RV-VP7-395 基因 RT-PCR 扩增(M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;P4、P6、P8、P10、P12. JSSH2024 毒株 4、6、8、10、12 代扩增产物;PC. 阳性对照;NC. 阴性对照);B. JSSH2024 毒株感染 MA104 细胞的 CPE 和间接免疫荧光试验结果(标尺=100 μm);C. JSSH2024 毒株 dsRNA-PAGE 基因组的核酸带型;D. JSSH2024 毒株病毒粒子

A. RT-PCR amplification results of RV-VP7-395 gene for various generations of JSSH2024 strain (M. DL2000 DNA marker; P4, P6, P8, P10, P12. 4, 6, 8, 10, 10 generations of JSSH2024 strain; PC. Positive control; NC. Negative control); B. CPE and IFA results of MA104 cells infected with JSSH2024 strain (bar=100 μm); C. dsRNA-PAGE map of viral dsRNA extracted from the strain JSSH2024; D. Electron micrograph of virus particle of JSSH2024 strain

图3 JSSH2024毒株鉴定结果

Fig. 3 Identification of JSSH2024 strain

状”形态特征。颗粒直径约为 70 nm,与轮状病毒科成员的形态学标准高度吻合。

2.7 病毒生长曲线

将毒株 JSSH2024 P10 代病毒按照 MOI 为 0.1 接种 MA104 细胞, JSSH2024 毒株的生长曲线见图 4,在 MA104 细胞中接种后 18 h 后病毒滴度达峰值 $10^{5.75} \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$,随着感染时间的延长,病毒滴度逐渐降低。由此可见,病毒在体外 MA104 细胞上培养 18~24 h 为最适收毒时间。

2.8 细胞的易感性

将 P10 代病毒接种 8 种不同类型的细胞系,通过间接免疫荧光检测病毒对不同细胞的易感性,如图 5 结果显示, JSSH2024 株对 MA104 为易感;其也能够感染 IPEC-J2 细胞、HT-29 和 HCT-8,但感染性有限;不能感染 Caco-2、Marc-145、ST 和 MDBK 细胞。

2.9 全基因组扩增

将毒株 JSSH2024 P10 代病毒提取 RNA,逆转录成 cDNA,以此为模板,采用高保真 PCR 体系

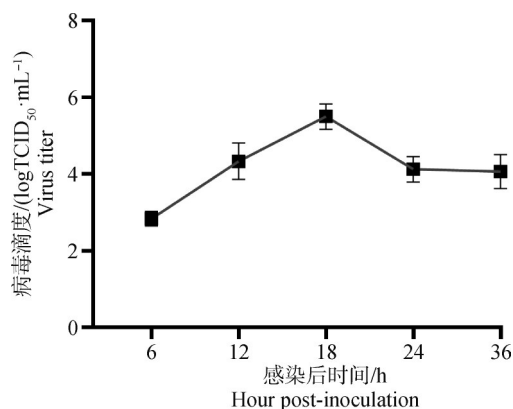


图4 JSSH2024毒株的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of JSSH2024 strain

(2× Phanta® Max Master Mix)配合表 2 所示引物对全基因组进行分段扩增。经 $15 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳(120 V, 40 min)结合核酸染料显示。扩增结果见图 6,11 对引物的扩增产物在预期分子量对应位置(3.3 kb~0.6 kb)处出现目的条带,且与预期基因片段大小相符。

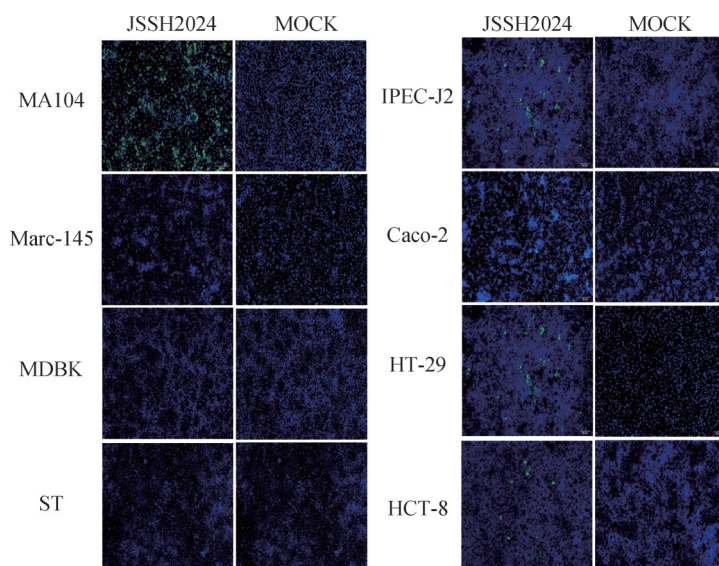
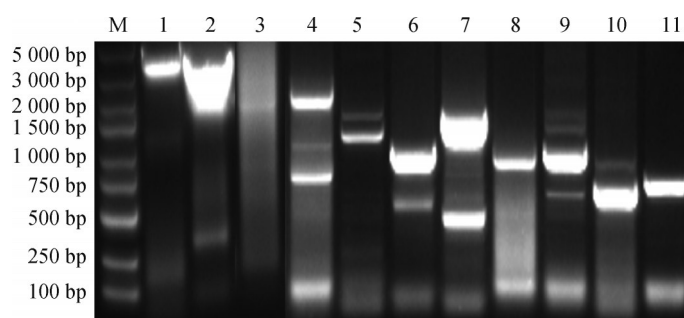


图5 分离毒株 JSSH2024 对不同细胞的易感性 (标尺=100 μm)

Fig. 5 Susceptibility of isolated strain JSSH2024 to different cells (bar=100 μm)



M. DL5000 DNA 相对分子质量标准; 1~11. *VP1*~*VP4*、*VP6*、*VP7*、*NSP1*~*NSP5* (3 302 bp、2 686 bp、2 591 bp、2 352 bp、1 356 bp、1 062 bp、1 476 bp、1 059 bp、1 074 bp、750 bp、667 bp)

M. DL5000 DNA marker; 1-11. *VP1*~*VP4*、*VP6*、*VP7*、*NSP1*~*NSP5* (3 302 bp, 2 686 bp, 2 591 bp, 2 352 bp, 1 356 bp, 1 062 bp, 1 476 bp, 1 059 bp, 1 074 bp, 750 bp, 667 bp)

图6 JSSH2024 毒株全基因组扩增结果

Fig. 6 Whole-genome amplification of JSSH2024

2.10 全基因组序列及系统发育分析

将扩增的目的条带进行回收,连接克隆到 pMD19-T 载体并进行测序,我们获得了 JSSH2024 毒株的全基因组序列,序列与 NCBI 中的序列进行比对分析,进一步确认其为 BoRV。全基因组序列相似性分析结果见表 3,该分离株的基因型为“G8-P[11]-I2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3”。

本研究利用 MEGA 11 软件,分别基于 JSSH2024 毒株的 11 条基因核苷酸序列,与不同基因型及不同种属轮状病毒的相应基因序列进行比对,构建了系统发育进化树。基因相似性见表 3,该毒株 *VP7* 基因(98.8%)、*VP4* 基因(98.8%)和 *VP6* 基因(99.7%)分别与中国牛源毒株 JS31(2020)、中

国牦牛源毒株 HB-3(2021)以及中国牛源毒株 SCMY1(2021)呈现高度序列相似性;*VP1* 基因、*VP2* 基因和 *VP3* 基因分别与 Sun9 牛源毒株、牦牛源株 Y3 和 WC3(1981)牛源毒株存在 98.7%、99.9%、97.4% 相似性;非结构蛋白基因 *NSP1* 与日本牛源毒株 GB12-22(2007)相似性为 98.6%,*NSP2* 和 *NSP4* 分别与中国牛源株 JS31(2020)、牦牛源株 HB-3(2021)高度相似,相似性分别为 98.95% 和 98.11%,*NSP3* 基因与牛源株 C73 相似性为 99.4%,*NSP5* 基因与中国牛源株 HLJ-H3(2022)相似性最高,达 100%。

系统进化树结果见图 7 和图 8, JSSH2024 毒株是典型的牛源-牦牛源重配轮状病毒,其基因组呈现

表 3 JSSH2024 毒株各基因片段分析结果

Table 3 Analysis of each fragment of JSSH2024

基因 Gene	段号 Number	基因型 Genotype	相似性最高的病毒 Virus with the highest homology	宿主 Host origin	相似性/% Homology
VP7	9	G8	RVA/Bovine-wt/CHN/JS31/2020/G10P[11]	牛 Cow	98.8
VP4	4	P[11]	RVA/Yak-tc/CHN/HB-3/2021/G10P11	牦牛 Yak	98.8
VP6	6	I2	RVA/Cow-tc/China/SCMY1/2021	牛 Cow	99.7
VP1	1	R2	Sun9	牛 Cow	98.7
VP2	2	C2	Y3	牦牛 Yak	99.9
VP3	3	M2	RVA/Cow-tc/USA/WC3/1981/G6P[5]	牛 Cow	97.4
NSP1	5	A13	RVA/Cow-tc/JPN/GB12-22/2007/G8P[11]	牛 Cow	98.6
NSP2	8	N2	RVA/Bovine-wt/CHN/JS31/2020/G10P[11]	牛 Cow	98.7
NSP3	7	T6	RV/Bovine/C73/G6P[1]	牛 Cow	99.4
NSP4	10	E2	RVA/Yak-tc/CHN/HB-3/2021/G10P11	牦牛 Yak	98.3
NSP5	11	H3	HLJ-H3/2022/CHN	牛 Cow	100

显著的多源嵌合特征。牛源基因为主体 VP1 R2 型、VP3 M2 型、VP6 I2 型、VP7 G8 型、NSP1 A13 型、NSP2 N2 型、NSP3 T6 型、NSP5 H3 型共 8 个基因均与牛源毒株聚集成簇,证实病毒主干源于牛宿主。而 VP2 C2 型、VP4 P[11]型、NSP4 E2 型形成独立进化簇,与牦牛源轮状病毒高度同源。提示这些基因可能通过跨种重配整合到病毒基因组中,这一发现进一步证实了轮状病毒在牛和牦牛之间的跨宿主重组演化。

3 讨 论

轮状病毒感染是引起婴幼儿及幼龄动物病毒性胃肠炎的重要病原体,是受全世界关注的公共卫生问题。BoRVA 是导致犊牛腹泻的主要病原体之一,具有较高的临床检出率^[28],但由于轮状病毒是一个分段基因组病毒,它可以通过点突变、重组变异或重配发生遗传变异从而产生新毒株,这种特性导致其极易发生基因重配产生新毒株。因此,对不同国家和地区的牛群进行牛轮状病毒的流行病学调查和病毒分离,对牛轮状病毒引起的相关疾病的防控具有重要意义^[29-32]。

G8 型毒株是国外 BoRVA 中常见的基因型之一,G8 型 RVA 最早于 1979 年首次在印度尼西亚的人类标本中发现^[33]。随后,G8 基因型 RVA 在许多国家的儿童中被检出,如:非洲、南亚、东亚、部分南美洲国家的检出率显著上升,甚至成为当地主要流行基因型之一^[34-38]。在中国 G8 型 BoRVA 毒株也有

很高的检出率。另外,根据 NCBI 数据库显示,从 2021 年到 2022 年,中国一直检测到 G8P[8]的毒株在流行,如北京、广州、武汉、江苏等地区均发现了 G8P[8]型 RVA 流行^[39]。P[11]基因型轮状病毒主要感染猪、牛等动物,近年来在人类中的检测也有报道^[40]。当前人用的轮状病毒疫苗针对主流型别(G1P[8]等),对 P[11]型的保护效果未知^[13,40-41],需关注其流行演变和跨物种传播风险。

JSSH2024 毒株是一种罕见的牛-牦牛源重组轮状病毒,其基因型为 G8-P[11]-I2-R2-C2-M2-A8-N2-T6-E2-H3。基因组分析显示,该毒株的主要结构蛋白基因(VP1、VP3、VP6、VP7)和非结构蛋白基因(NSP1~3、NSP5)来源于牛源轮状病毒,而 VP2、VP4(关键宿主结合蛋白基因)和 NSP4(毒力因子)则与牦牛源毒株高度同源,表明其通过跨宿主基因重组形成。这种独特的嵌合式基因组结构可能赋予病毒新的宿主适应性或传播优势,使其能够在不同宿主间传播。这种动物源重组病毒具有潜在的跨物种传播风险,建议加强 G8P[11]型毒株在牛群及牦牛中的流行监测,评估现有牛轮状病毒疫苗的保护效力,并通过全基因组分析揭示重组热点以预警高致病性变异株的产生。

本研究首次在中国奶牛腹泻样本中检测到 G8P[11]型 BoRVA,丰富了国内 BoRVA 的流行病学资料。有必要进一步监测 G8P[11]型 BoRVA 毒株在我国牛群中的流行情况,为深入理解轮状病毒跨宿主传播机制及人兽共患病防控提供科学依据。

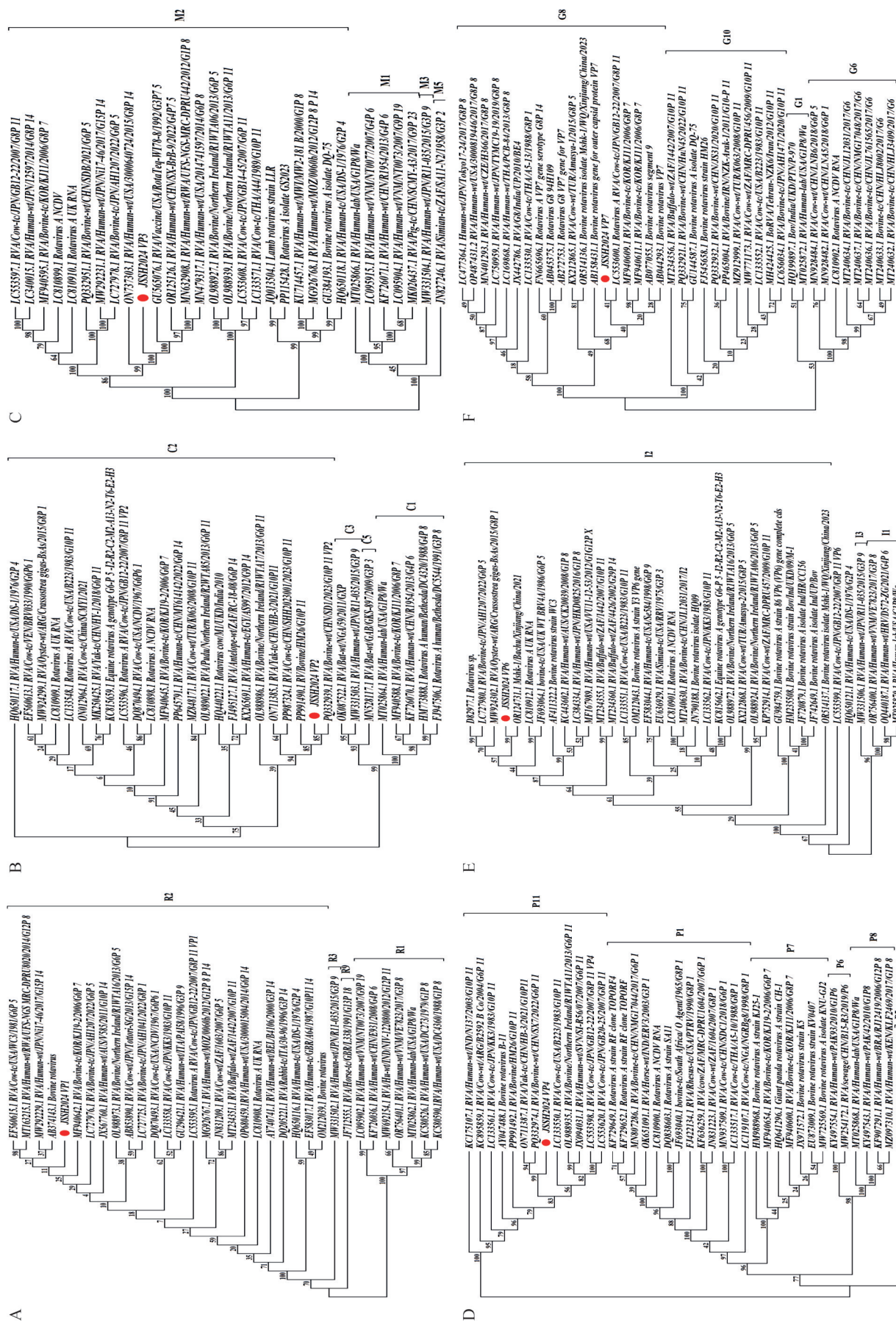


图7 基于JSSH2024毒株的VP1-VP3(A-C)、VP4(D)、VP6(E)、VP7(F)基因构建的系统进化树
Fig. 7 Phylogenetic analysis of the VP1-VP3 (A-C), VP4 (D), VP6 (E), VP7 (F) genes of the JSSH2024 strain

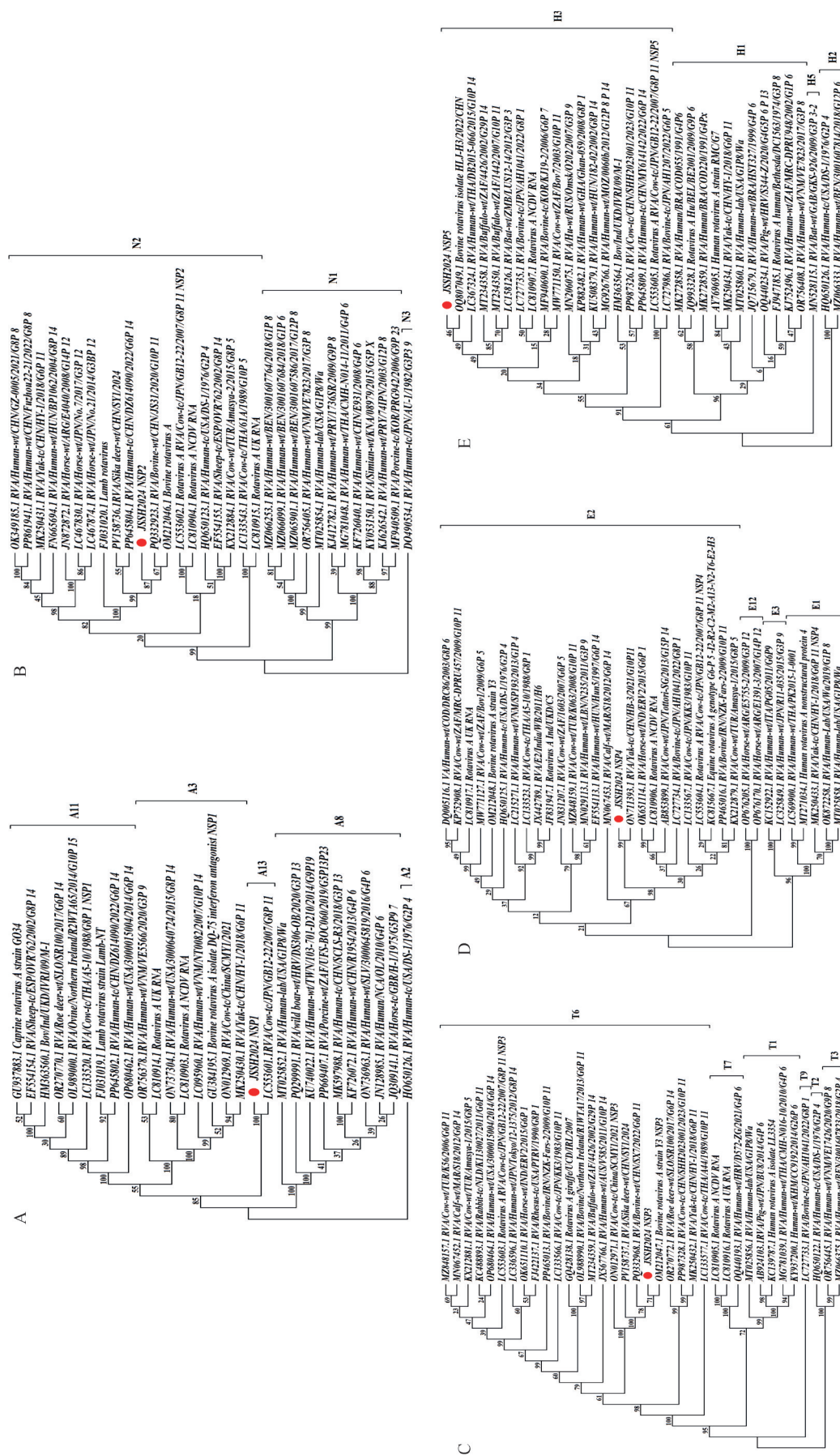


图 8 基于 JSSH2024 毒株的 NSP1~NSP5(A~E) 基因构建的系统进化树

Fig. 8 Phylogenetic analysis of the NSP1-NSP5 (A~E) genes of JSSH2024 strain

4 结 论

在奶牛腹泻样本中检测到 G8P[11] 型牛轮状病毒 JSSH2024, 全基因组分析显示其基因型为 G8-P[11]-I2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3, 为重配毒株, 丰富了国内 BoRVA 的流行病学资料。

参考文献(References):

- [1] 吴 畏, 耿 旭, 陈铭泽, 等. 检测牛轮状病毒抗体的双抗原夹心 ELISA 方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2022, 52(9):1073-1079.
- WU W, GENG X, CHEN M Z, et al. Development of a double-antigen sandwich ELISA for detecting bovine rotavirus antibodies [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2022, 52(9):1073-1079. (in Chinese)
- [2] 姜玲玲, 牛小霞, 刘 强, 等. 宁夏地区肉牛腹泻相关病毒感染状况的分析[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(9):3863-3871.
- JIANG L L, NIU X X, LIU Q, et al. Analysis of viral infections associated with bovine diarrhea in Ningxia region [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(9):3863-3871. (in Chinese)
- [3] 葛 雨. 宁夏某牛场轮状病毒的分离鉴定及全基因组序列分析[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2019.
- GE Y. Isolation, identification, and complete genome sequence analysis of rotavirus in a cattle farm in Ningxia [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [4] SAURABH S, SIRCAR S, KATTOOR J J, et al. Analysis of structure-function relationship in porcine rotavirus a enterotoxin gene [J]. *J Vet Sci*, 2018, 19(1):35-43.
- [5] 李科茫, 周金柱, 周俊明, 等. 猪 A 群轮状病毒 VP6 单克隆抗体的制备和初步鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(4):79-85.
- LI K M, ZHOU J Z, ZHOU J M, et al. Preparation and preliminary identification of monoclonal antibodies against VP6 protein of porcine group A rotavirus [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(4):79-85. (in Chinese)
- [6] CRAWFORD S E, RAMANI S, TATE J E, et al. Rotavirus infection[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3:17083.
- [7] TAO R, CHANG X, ZHOU J, et al. Molecular epidemiological investigation of group a porcine rotavirus in east China [J]. *Front Vet Sci*, 2023, 10:1138419.
- [8] AZZAZY E A, AMER R M, ABDELLATIF G M, et al. Frequency and genotyping of group A rotavirus among Egyptian children with acute gastroenteritis: a hospital-based cross-sectional study[J]. *Virol J*, 2024, 21(1):238.
- [9] MOHAMED F F, MANSOUR S M G, EL-ARABY I E, et al. Molecular detection of enteric viruses from diarrheic calves in Egypt. [J]. *Arch Virol*, 2017, 162(1):129-137.
- [10] POURASGARI F, KAPLON J, KARIMI-NAGHLANI S, et al. The molecular epidemiology of bovine rotaviruses circulating in iran: A two-year study [J]. *Arch Virol*, 2016, 161(12):3483-3494.
- [11] COLLINS P, MULHERIN E, CASHMAN O, et al. Detection and characterisation of bovine rotavirus in Ireland from 2006-2008. [J]. *Irish Vet J*, 2014, 67(1):13.
- [12] MADADGAR O, NAZAKTABAR A, KEIVANFAR H, et al. Genotyping and determining the distribution of prevalent G and P types of group a bovine rotaviruses between 2010 and 2012 in iran [J]. *Vet Microbiol*, 2015, 179(3):190-196.
- [13] BADARACCO A, GARAICOECHEA L, RODRÍGUEZ D, et al. Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in argentina from 2004 to 2010 [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 158(3):394-399.
- [14] SWIATEK D L, PALOMBO E A, LEE A, et al. Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005 [J]. *Vet Microbiol* 2010, 140(1):56-62.
- [15] 王铭月, 张锦华, 章 青, 等. G6P[1] 型牛轮状病毒的分离培养及鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2024, 40(2):134-139.
- WANG M Y, ZHANG J H, ZHANG Q, et al. Isolation, cultivation and identification of bovine G6P[1] rotavirus [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2024, 40(2):134-139. (in Chinese)
- [16] 雷 蕾, 徐晨夏, 汪嘉仪, 等. G8P[1] 型牛轮状病毒的分离和基因组特征[J]. 中国兽医科学, 2025, 55(3):299-307.
- LEI L, XU C X, WANG J Y, et al. Isolation and genomic characterization of bovine G8P[1] rotavirus [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2025, 55(3):299-307. (in Chinese)
- [17] 贾伟强, 胡林杰, 孟 野, 等. 黑龙江省大庆市部分地

- 区牛轮状病毒腹泻的分子流行病学调查[J]. 畜牧与饲料科学, 2019, 40(5): 107-108, 112.
- JIA W Q, HU L J, MENG Y, et al. Molecular epidemiological investigation of bovine rotavirus diarrhea in some areas of Daqing City, Heilongjiang Province [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2019, 40(5): 107-108, 112. (in Chinese)
- [18] ZHU Q, LI B, SUN D. Advances in bovine coronavirus epidemiology[J]. *Viruses*, 2022, 14(5): 1109.
- [19] 李平, 张博文, 朱亚楠, 等. 新疆维吾尔自治区喀什地区某引种奶牛场新生犊牛的牛轮状病毒分子检测及遗传特征分析[J]. 畜牧与饲料科学, 2025, 46(1): 114-119.
- LI P, ZHANG B W, ZHU Y N, et al. Molecular detection and genetic characterization of bovine rotavirus in newborn calves at an introduced dairy farm in Kashgar region, Xinjiang Uygur Autonomous Region [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2025, 46(1): 114-119. (in Chinese)
- [20] DA SILVA MEDEIROS T N, LORENZETTI E, ALFIERI A F, et al. Phylogenetic analysis of a G6P[5] bovine rotavirus strain isolated in a neonatal diarrhea outbreak in a beef cattle herd vaccinated with G6P[1] and G10P[11] genotypes [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(2): 447-451.
- [21] CHENG X, WU W, TENG F, et al. Isolation and characterization of bovine RVA from northeast China, 2017-2020[J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(12): 1389.
- [22] KUMAR N, MALIK Y S, SHARMA K, et al. Molecular characterization of unusual bovine rotavirus a strains having high genetic relatedness with human rotavirus; Evidence for zoonanthropontic transmission [J]. *Zoonoses Public Health*, 2018, 65(4): 431-442.
- [23] KOMOTO S, ADAH M I, IDE T, et al. Whole genomic analysis of human and bovine G8P[1] rotavirus strains isolated in nigeria provides evidence for direct bovine-to-human interspecies transmission [J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 43: 424-433.
- [24] 王笑冉. 黑龙江地区牛轮状病毒分离与鉴定及其对乳鼠致病性[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2024.
- WANG X R. Isolation, identification of bovine rotavirus in Heilongjiang region and its pathogenicity in suckling mice [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2024. (in Chinese)
- [25] 王建新, 马润超, 周金柱, 等. G1P[7]型猪轮状病毒的分离鉴定及其全基因组分析[J]. 南方农业学报, 2025, 56(3): 932-943.
- WANG J X, MA R C, ZHOU J Z, et al. Isolation, identification and complete genome analysis of G1P[7] porcine rotavirus [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2025, 56(3): 932-943. (in Chinese)
- [26] WU Q, LI J, WANG W, et al. Next-generation sequencing reveals four novel viruses associated with calf diarrhea[J]. *Viruses*, 2021, 13(10): 1907.
- [27] WANG J, ZHOU J, ZHU X, et al. Isolation and characterization of a G9P[23] porcine rotavirus strain AHFY2022 in China[J]. *Microb Pathog*, 2024, 190: 106612.
- [28] GELETU U S, USMAEL M A, BARI F D. Rotavirus in calves and its zoonotic importance[J]. *Vet Med Int*, 2021, 2021: 6639701.
- [29] DA SILVA MEDEIROS T N, LORENZETTI E, ALFIERI A F, et al. G and P genotype profiles of rotavirus a field strains circulating in beef and dairy cattle herds in Brazil, 2006 - 2015[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2019, 64: 90-98.
- [30] CHEN S, ZHANG W, ZHAI J, et al. Prevalence of bovine rotavirus among cattle in mainland of China: A meta-analysis[J]. *Microb Pathog*, 2022, 170: 105727.
- [31] LIU X, YAN N, YUE H, et al. Detection and molecular characteristics of bovine rotavirus a in dairy calves in China[J]. *J Vet Sci*, 2021, 22(5): e69.
- [32] REIDY N, LENNON G, FANNING S, et al. Molecular characterisation and analysis of bovine rotavirus strains circulating in ireland 2002-2004[J]. *Vet Microbiol*, 2006, 117(2): 242-247.
- [33] TANIGUCHI K, URASAWA T, URASAWA S. Independent segregation of the VP4 and the VP7 genes in bovine rotaviruses as confirmed by VP4 sequence analysis of G8 and G10 bovine rotavirus strains[J]. *J Gen Virol*, 1993, 74(6): 1215-1221.
- [34] HASEGAWA A, INOUE S, MATSUNO S, et al. Isolation of human rotaviruses with a distinct RNA electrophoretic pattern from indonesia [J]. *Microbiol Immunol*, 1984, 28(6): 719-722.
- [35] JAGANNATH M R, VETHANAYAGAM R R, REDDY B S Y, et al. Characterization of human symptomatic rotavirus isolates MP409 and MP480 having 'long' RNA electropherotype and subgroup I specificity, highly related to the P6[1], G8 type bovine rotavirus A5, from Mysore, India [J]. *Arch Virol*, 2000, 145(7): 1339-1357.
- [36] MODARESS S, RAHBARIMANESH A A, EDALAT R, et al. Human rotavirus genotypes

- detection among hospitalized children, a study in Tehran, Iran[J]. *Arch Iran Med*, 2011, 14(1):39-45.
- [37] TACHAROENMUANG R, KOMOTO S, GUNTAPONG R, et al. Full genome characterization of novel DS-1-like G8P[8] rotavirus strains that have emerged in Thailand: Reassortment of bovine and human rotavirus gene segments in emerging DS-1-like intergenogroup reassortant strains [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11):e0165826.
- [38] CHIA G, HO H J, NG C G, et al. An unusual outbreak of rotavirus G8P[8] gastroenteritis in adults in an urban community, singapore, 2016 [J]. *J Clin Virol*, 2018, 105:57-63.
- [39] 熊光萍,田 毅,范佳欣,等. 中国中南部 G8P[8]型 A 组轮状病毒全基因组遗传特征研究[J]. 病毒学报, 2024, 40(1):27-37.
- XIONG G P, TIAN Y, FAN J X, et al. Genetic characteristics of complete genome of G8P[8] group A rotavirus in south-central China[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2024, 40(1):27-37. (in Chinese)
- [40] ALI S, KHAN S, KHAN S N, et al. Molecular detection and prevalence of rotavirus with acute gastroenteritis among the children of rural and urban areas[J]. *Brazil J Biol*, 2021, 83:e244365.
- [41] GOLAVIYA A, MATHAKIYA R, JAKHESARA S, et al. Determining genetic diversity of prevalent G and P genotype of bovine rotavirus A from neonatal calves of Gujarat, India[J]. *J Vet Sci*, 2024, 25(4): e55.
- (编辑 白永平)