

## · 实验研究 ·

# 基于六邻体蛋白及纤维蛋白序列测定的腺病毒性结膜炎分类分析

王旌 朱剑锋 陆丽娜

上海市眼病防治中心/上海市眼科医院 上海市第一人民医院 国家眼部疾病临床医学研究中心 上海市眼底病重点实验室 上海眼视觉与光医学工程技术研究中心 上海市眼科疾病精准诊疗工程技术研究中心, 上海 200040

通信作者: 陆丽娜, Email: lulina781019@qq.com

**【摘要】** 目的 基于六邻体蛋白和纤维蛋白的联合基因测序和系统发育分析进行腺病毒性结膜炎中人类腺病毒(HAdV)分型。方法 在上海地区收集 2015 年 1 月至 2017 年 8 月病毒性结膜炎患者下结膜囊结膜拭子样本 256 份, 提取 DNA 后通过 PCR 扩增六邻体蛋白及纤维蛋白全长, 完成基因测序及种系发生学分析。结果 89 例(占 34.76%)患者结膜拭子六邻体蛋白基因扩增阳性, 包括 HAdV-C1、HAdV-C2、HAdV-B3、HAdV-E4、HAdV-D8、HAdV-D19 和 HAdV-D37 各 1、7、20、6、23、17 和 15 例, 分别占 1.12%、7.87%、22.47%、6.74%、25.84%、19.10% 和 16.85%, 其六邻体蛋白种系发生学分析中均与相应参考序列原型聚合。纤维蛋白种系发生学分析中, 15 例 HAdV-D19 样本序列和 1 例 HAdV-D37 样本序列交叉聚合。结论 针对六邻体蛋白和纤维蛋白基因的联合测序可以为 HAdV 分型和毒力分析提供丰富有效的生物学信息。

**【关键词】** 人类腺病毒; 病毒性结膜炎; 腺病毒六邻体蛋白; 纤维蛋白; 序列分析; 系统发育

**基金项目:** 上海市卫生和计划生育委员会青年课题项目 (20144Y0212)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200430-00300

## Classification of adenoviral conjunctivitis based on sequencing and phylogenetic analysis of hexon and fiber

Wang Jing, Zhu Jianfeng, Lu Lina

Shanghai Eye Diseases Prevention & Treatment Center/Shanghai Eye Hospital, Shanghai General Hospital, National Clinical Research Center for Eye Diseases, Shanghai Key Laboratory of Ocular Fundus Diseases, Shanghai Engineering Center for Visual Science and Photomedicine, Shanghai Engineering Research Center of Precise Diagnosis and Treatment of Eye Diseases, Shanghai 200040, China

Corresponding author: Lu Lina, Email: lulina781019@qq.com

**【Abstract】 Objective** To classify human adenovirus (HAdV) of adenoviral conjunctivitis by sequencing and phylogenetic analysis of hexon protein and fiber protein. **Methods** A total of 256 conjunctival swabs were collected from the inferior conjunctival sac of 256 patients with viral conjunctivitis in Shanghai from January 2015 to August 2017. After DNA extraction, the whole length of hexon and fiber was amplified by PCR to perform gene sequencing and phylogenetic analysis. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Shanghai General Hospital (No. 2020-202). Written informed consent was obtained from each subject. **Results** Among the samples, 89 (34.76%) were positive for hexon gene amplification, including 1 (1.12%) of HAdV-C1, 7 (7.87%) of HAdV-C2, 20 (22.47%) of HAdV-B3, 6 (6.747%) of HAdV-E4, 23 (25.84%) of HAdV-D8, 17 (19.10%) of HAdV-D19, and 15 (16.85%) of HAdV-D37. In phylogenetic analysis, sequenced hexon gene was clustered with the reference prototype correctly. In fiber phylogenetic analysis, 15 of HAdV-D19 and 1 of HAdV-D37 were cross clustered. **Conclusions** The combined sequencing of hexon and fiber can provide abundant and effective biological information for the subtype and pathogenicity analysis of HAdV.

**【Key words】** Adenoviruses, human; Conjunctivitis, viral; Hexon protein, adenovirus; Fiber protein; Sequence analysis; Phylogeny

**Fund program:** Young Foundation of Shanghai Health and Family Planning Commission (20144Y0212)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200430-00300

腺病毒性结膜炎好发季节为春末至秋初, 分为流行性角结膜炎 (epidemic keratoconjunctivitis, EKC)、咽结膜热 (pharyngeal conjunctival fever, PCF) 和单纯滤泡性结膜炎, 均可通过接触传播<sup>[1]</sup>。EKC 和 PCF 在密闭

环境和高密度人群中极易传播和流行, 甚至爆发。人类腺病毒 (human adenovirus, HAdV) 是 EKC 的主要病原体<sup>[2]</sup>, 其分型与腺病毒性结膜炎的分型、临床表现和预后密切相关。目前, 基因鉴定技术已基本替代了

传统血清学检测用于腺病毒检测,其中,六邻体蛋白是常见检测靶点,可对腺病毒进行初步分型,其次是纤维蛋白和五邻体蛋白,针对纤维蛋白的检测能够预测腺病毒的角膜致病性。与单基因测序相比,六邻体蛋白及纤维蛋白联合测序和系统发育分析能够更好地推断出 HAdV 分型,以及 HAdV 对角膜结膜上皮的黏附力和致病力<sup>[3]</sup>。腺病毒多基因联合测序系统进一步的系统发育分析研究较少。本研究对六邻体蛋白和纤维蛋白进行联合测序及系统发育分析,以期提高腺病毒性结膜炎分型检测的敏感性,为准确预判流行特征、指导个性化用药提供新的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源** 收集 2015 年 1 月至 2017 年 8 月于上海市眼病防治中心或上海市红眼病防控办公室下属红眼病监测站点就诊来自上海市城区及周边县区的可疑病毒性结膜炎患者 256 例,其中男 132 例,女 124 例。病毒性结膜炎诊断标准:(1)急性结膜充血、水肿,起病后约 1 周达发病高峰,对局部抗生素治疗不敏感;(2)大量结膜滤泡;(3)大量水样分泌物;(4)可能伴耳前淋巴结肿大、压痛;(5)早期可能伴角膜上皮微囊样病变,进而发展成角膜上皮浸润,甚至角膜上皮浅基质层白色局部病灶;(6)可能伴上呼吸道感染;(7)可能出现结膜伪膜。本研究经上海市第一人民医院伦理委员会审核批准(批文号:2020 科 202),所有被检者均对本研究目的和过程知情并自愿签署知情同意书。

**1.1.2 主要试剂及仪器** Hank 缓冲液(美国 Gibco 公司);QIA-amp mini 试剂盒(美国 Qiagen 公司);标准相对分子质量 DNA、PCR 反应缓冲液(美国 Invitrogen 公司);TaqDNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ l,商品单位)、三磷酸脱氧核糖核苷(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)(10  $\mu$ mol/ $\mu$ l,美国 Roche 公司);BigDye Terminator 试剂盒(美国 ABI 公司)。紫外分析仪(LMS-20,美国 UVP 公司);UV-240 紫外分光光度计(Nanodrop 2000,美国 ThermoFisher 公司);PCR 仪(T100,美国 Bio-Rad 公司);测序仪(3130xl,美国 ABI 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 用蘸取生理盐水的棉签擦拭患者下穹隆部结膜囊。棉签保存在含有 50 mg/ml 庆大霉素、500 U/ml 青霉素、1 mg/ml 两性霉素 B 和质量分数 5% 牛血清蛋白的 Hank 缓冲液中。

**1.2.2 HAdV 基因组 DNA 的提取和保存** 采用 QIA-amp mini 试剂盒提取病毒基因组 DNA,-20  $^{\circ}$ C 冰箱内

保存。通过质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳,与标准相对分子质量 DNA 对比,在紫外分析仪下观察,可见 1 条边界清楚的金黄色荧光条带,长度约 35 000 bp,无拖尾现象,说明 DNA 纯度和完整性俱佳。采用 UV-240 紫外分光光度计检测 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  值为 1.7~1.8,说明 DNA 样品未受到蛋白质、RNA 和碳水化合物等污染。DNA 样品质量浓度( $\mu$ g/ $\mu$ l) =  $A_{260} \times$  稀释倍数  $\times 50/1\ 000$ 。将部分 DNA 样本稀释至 10 ng/ $\mu$ l 以备 PCR 使用。剩余 DNA 于 -20  $^{\circ}$ C 长期保存。

**1.2.3 HAdV 六邻体蛋白基因测序** 对 256 份样本分别进行六邻体蛋白 PCR 扩增,其正向引物序列为 5'-AAAGTCTCTCAAACGCCGAC-3',反向引物序列为 5'-CTCCTGTTCGCTTGAACCCA-3'。反应体系为 20  $\mu$ l,包括 5 U/ $\mu$ l TaqDNA 聚合酶 0.1  $\mu$ l,含  $Mg^{2+}$  的 PCR 反应缓冲液 2.0  $\mu$ l,10 mol/L dNTP 0.5  $\mu$ l,10  $\mu$ mol/ $\mu$ l 上、下游引物各 0.5  $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O 11.4  $\mu$ l,10 ng/ $\mu$ l 模板 DNA 5.0  $\mu$ l。反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95  $^{\circ}$ C 变性 30 s、60  $^{\circ}$ C 退火 30 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min 后冷却至 4  $^{\circ}$ C 保存。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,紫外分析仪上成像并摄片,显示目的片段清晰。六邻体蛋白 PCR 扩增产物长度约为 3 000 bp,无特异条带,估测质量浓度在 30 ng/ $\mu$ l 以上。将 PCR 产物纯化后,采用 BigDye Terminator 试剂盒进行测序反应,测序引物即为正向引物。测序反应体系为 10  $\mu$ l,包括 PCR 产物和测序引物各 1  $\mu$ l, Terminator Ready Reaction Mix 8  $\mu$ l。采用 3130xl 型测序仪进行电泳分析。将所测得基因序列与 NCBI GenBank 数据库(blast.ncbi.nlm.nih.gov)中已提交基因序列进行比对,初步确定 HAdV 血清型。

**1.2.4 HAdV 纤维蛋白基因测序** 对六邻体蛋白 PCR 扩增阳性标本进行纤维蛋白的 PCR 扩增和测序,其正向引物、反向引物见表 1。PCR 反应体系与六邻体蛋白相同。用上述方法经 1% 琼脂糖凝胶电泳后得到纤维蛋白 PCR 扩增产物,长度约为 1 500 bp,无特异条带,估测质量浓度在 30 ng/ $\mu$ l 以上。采用 1.2.3 部分相同的纯化和测序反应进行基因测序。测序结果通过以 74 种 HAdV 原型作为参考,对六邻体蛋白及纤维蛋白序列进行系统发育分析。

**1.2.5 系统发育分析** 从 GenBank 获取 74 种 HAdV 原型作为参考,其分型及登录号包括 C1(AF534906)、C2(NC\_001405)、B3(NC\_011203)、E4(NC\_003266)、C5(AY339865)、C6(FJ349096)、B7(AC\_000018)、D8(AB448767)、D9(AJ854486)、D10(AB695622)、

B11 ( FJ597732. 1 )、A12 ( X73487 )、D13 ( JN226747 )、B14 ( AY803294 )、D15 ( JN226748 )、B16 ( AY601636 )、D17 ( AF108105 )、A18 ( GU191019 )、D19 ( JQ326209 )、D20 ( JN226749 )、B21 ( AY601633 )、D22 ( FJ404771 )、D23 ( JN226750 )、D24 ( JN226751 )、D25 ( JN226752 )、D26 ( EF153474 )、D27 ( JN226753 )、D28 ( FJ824826 )、D29 ( JN226754 )、D30 ( JN226755 )、A31 ( AM749299 )、D32 ( JN226756 )、D33 ( JN226758 )、B34 ( AY737797 )、B35 ( NC\_004001 )、D36 ( GO384080 )、D37 ( DQ900900 )、D38 ( JN226759 )、D39 ( JN226760 )、F40 ( NC\_001454 )、F41 ( AB728839 )、D42 ( JN226761 )、D43 ( JN226762 )、D44 ( JN226763 )、D45 ( JN226764 )、D46 ( AY875648 )、D47 ( JN226757 )、D48 ( EF153473 )、D49 ( DQ393829 )、B50 ( AY737798 )、D51 ( JN226765 )、G52 ( DQ923122 )、D53 ( FJ169625 )、D54 ( NC\_012959 )、B55 ( FJ643676 )、D56 ( HM770721 )、C57 ( HQ003817 )、D58 ( HQ883276 )、D59 ( JF799911 )、D60 ( HQ007053 )、A61 ( JF964962 )、D62 ( JN162671 )、D63 ( JN935766 )、D64 ( EF121005 )、D65 ( AP012285 )、B66 ( JN860676 )、D67 ( AP012302 )、B68 ( JN860678 )、D69 ( JN226748 )、D70 ( KP641339 )、D71 ( KF268207 )、D72 ( KF268335 )、B79 ( AY601636 )、D81 ( AB765926 )。采用 MEGA7.0.26 软件对样本的六邻体蛋白及纤维蛋白序列进行分析,并与 74 株 HAdV 原型进行比对。采用最大似然比程序构建纤维蛋白和六邻体蛋白基因的系统发育树;采用 1 000 个自引复制验证树的可靠性,利用 Kimura-2 参数计算遗传距离。

表 1 7 种人类腺病毒的纤维基因引物  
Table 1 Fiber gene primers for seven types of human adenoviruses

腺病毒种类	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
A	正向引物:TTCCCAATCCCTACCCACCAT 反向引物:AAAGGGGGAAAGGGAGGTAT	1 918
B	正向引物:TTCCCAATCCCTACCCACCAT 反向引物:AAAGGGGGAAAGGGAGGTAT	1 111
C	正向引物:AGATTCTCTTGTTCCTGCCC 反向引物:TGGGAAGGGGGAGGCAAAAAT	1 891
D	正向引物:GTCCACAATTTTCATTGTCTTCCT 反向引物:CATCTCAATCACCGACCC	1 348
E	正向引物:TGTCAAATTCCTCTGTCCCTC 反向引物:AAAGGTGGGTTGGCATGCAG	1 352
F、G	正向引物:AGCGCAATCTTCGCATTTTC 反向引物:GGGGAGGGAGATTAACGG	1 745

考虑到 HAdV-D8、HAdV-D19 和 HAdV-D37 为腺病毒性结膜炎,尤其是流行性角结膜炎的重要病原体,因此,HAdV 和非 HAdV 分别构建发育树,以方便图形展示。在非 HAdV 构建系统发育树时,将 HAdV-D8、

HAdV-D19 和 HAdV-D37 原型序列作为 HAdV-D 的代表性序列,以展示 HAdV-D 与其他腺病毒序列的系统发育关系。

## 2 结果

### 2.1 HAdV 的分型与临床表现

89 例患者样本可扩增得到约 3 000 bp 的清晰条带,占 34.8%,表明此 89 例样本中含有 HAdV DNA。将六邻体蛋白基因序列与 NCBI 数据库比对,确定此 89 例患者中 HAdV-C1 1 例、HAdV-C2 7 例、HAdV-B3 20 例、HAdV-E4 6 例、HAdV-D8 23 例、HAdV-D19 17 例、HAdV-D37 15 例,分别占 1.12%、7.87%、22.47%、6.74%、25.84%、19.10% 和 16.85%。

HAdV-C1 和 HAdV-C2 患者均表现为单纯滤泡性结膜炎。HAdV-B3 患者伴耳前淋巴结肿大压痛、上呼吸道感染、轻度角膜上皮浸润者分别为 13、10 和 5 例,HAdV-E4 患者伴上述改变者分别为 3、4 和 1 例。伴轻度角膜上皮浸润的 HAdV-B3 和 HAdV-E4 患者均未发展为浅基质层白色病灶。HAdV-D8、HAdV-D19 和 HAdV-D37 患者伴耳前淋巴结肿大压痛者分别有 15、10 和 8 例,伴结膜伪膜者分别有 6、4 和 3 例,伴轻度角膜上皮浸润者分别有 13、8 和 8 例,伴浅基质层白色病灶者分别有 7、4 和 3 例(表 2)。

### 2.2 HAdV 系统发育分析

在六邻体蛋白序列系统发育分析中,此 89 例患者序列均与相应参考序列原型聚集。除 2 例 HAdV-D8 样本与参考序列间遗传距离为 0.04 和 0.01 外,其余样本与原型间遗传距离皆小于 0.001(图 1,2)。

进一步纤维蛋白序列系统发育分析显示,HAdV-D19 和 HAdV-D37 的参考序列接近,遗传距离<0.01,二者样本存在交叉聚集,1 例 HAdV-D37 样本与 HAdV-D19 参考序列原型聚集,15 例 HAdV-D19 样本与 HAdV-D37 参考序列原型聚集,其余样本,包括 HAdV-C1、HAdV-C2、HAdV-B3、HAdV-E4 和 HAdV-D8 均与相应的参考序列原型聚集(图 1,2)。纤维蛋白聚集情况不同的 HAdV-D19 和 HAdV-D37 阳性病例临床体征占比差别不明显。

六邻体蛋白系统发育组间比较提示,以 HAdV-D 六邻体蛋白序列为参考,HAdV-B 和 HAdV-E 遗传距离较短,其次为 HAdV-C。HAdV-A、HAdV-F 和 HAdV-G 六邻体蛋白遗传距离较远。纤维蛋白系统发育组间比较提示,以 HAdV-D 六邻体蛋白序列为参考,HAdV-C 遗传距离最短,其次为 HAdV-E 和 HAdV-B。HAdV-A、HAdV-F 和 HAdV-G 纤维蛋白遗传距离同样较远。

表 2 不同 HAdV 分型临床体征例数及所占比例 [n( % )]
Table 2 Cases and the ratio of different HAdV genotypes with various clinical manifestations (n[ % ])

Table with 11 columns: HAdV 分型, 上呼吸道感染 (阴性, 阳性), 耳前淋巴结肿大压痛 (阴性, 阳性), 结膜伪膜 (阴性, 阳性), 角膜上皮浸润 (阴性, 轻度上皮浸润, 浅基质层病灶), 总例数. Rows include HAdV-C1, HAdV-C2, HAdV-B3, HAdV-E4, HAdV-D8, HAdV-D19, and HAdV-D37.

注: HAdV: 人类腺病毒
Note: HAdV: human adenovirus

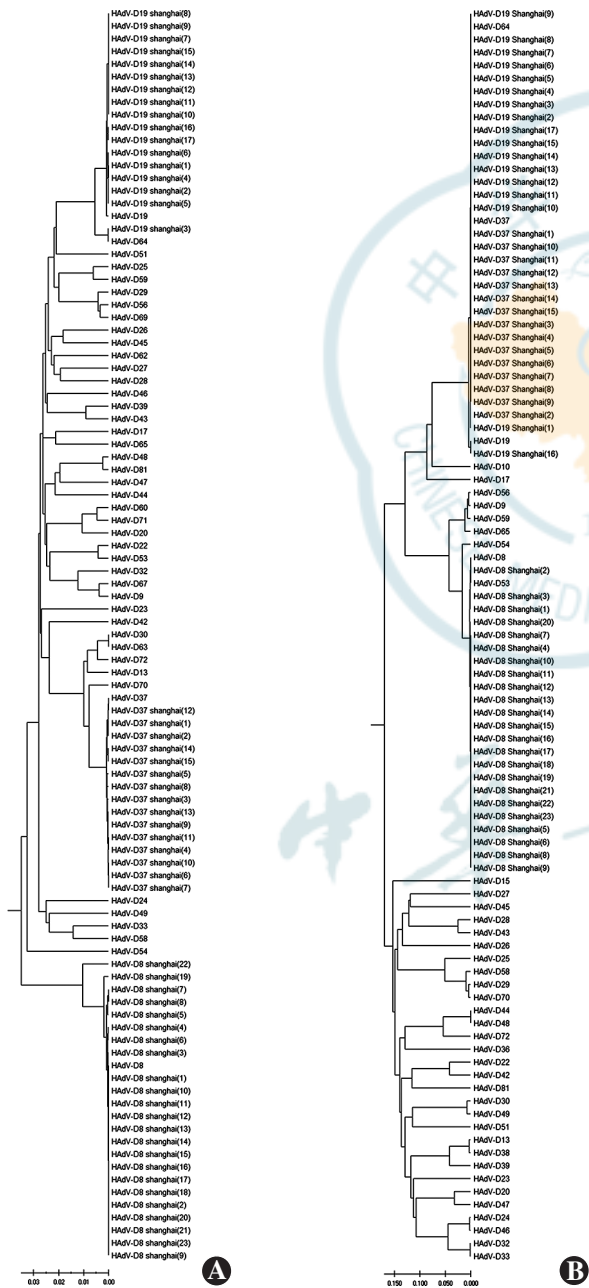


图 1 HAdV-D 腺病毒阳性样本序列及腺病毒参考序列在六邻体基因和纤维基因的系统发育树 A: 六邻体蛋白基因 B: 纤维蛋白基因 HAdV: 人类腺病毒
Figure 1 Phylogenetic tree of HAdV-D positives and HAdV reference strains in hexon gene and fiber gene A: hexon gene B: fiber gene HAdV: human adenovirus

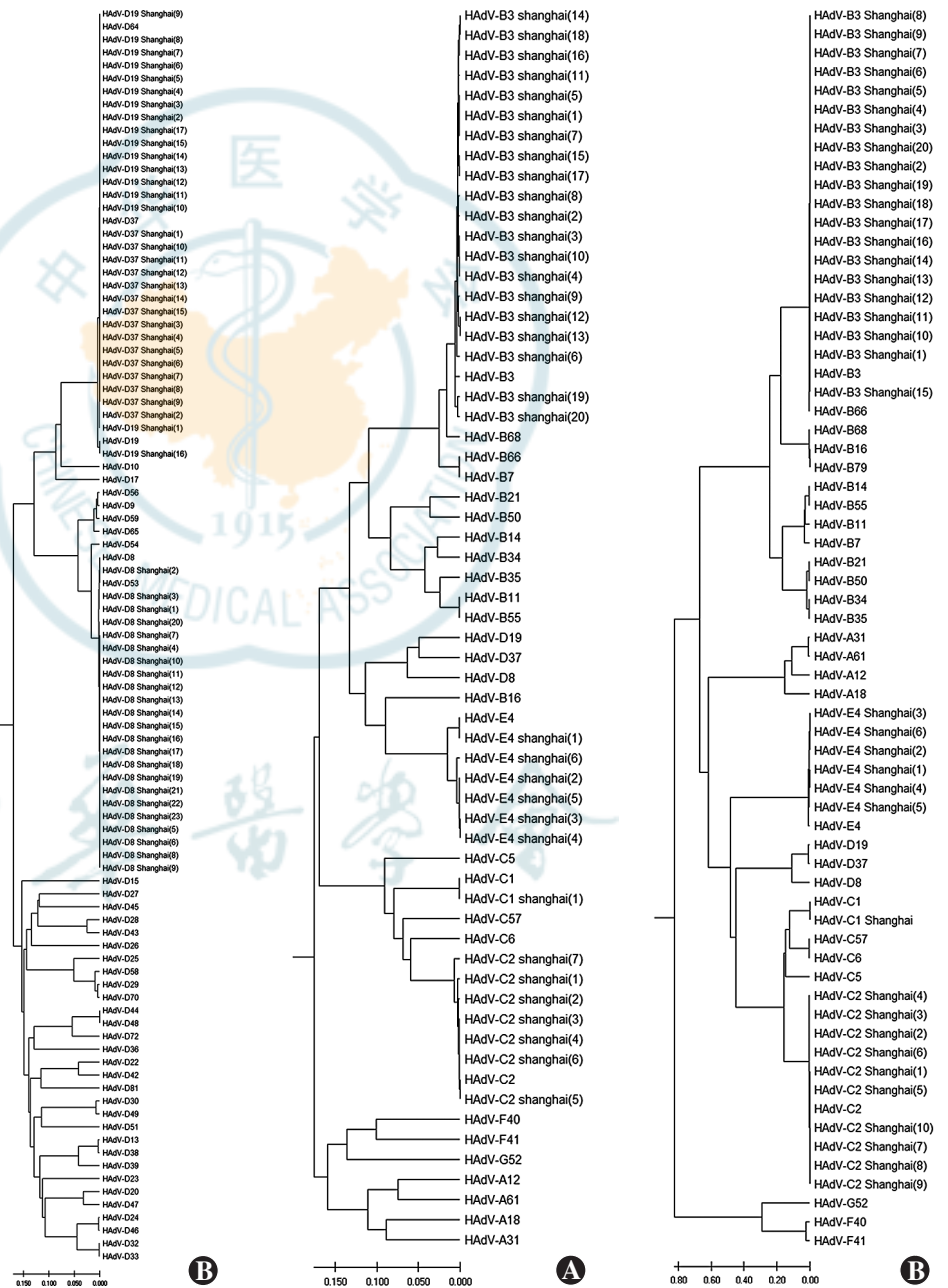


图 2 非 HAdV-D 腺病毒阳性样本序列及腺病毒参考序列在六邻体基因和纤维基因的系统发育树 A: 六邻体蛋白基因 B: 纤维蛋白基因 HAdV: 人类腺病毒
Figure 2 Phylogenetic tree of non-HAdV-D positive samples and HAdV reference strains in hexon gene and fiber gene A: hexon gene B: fiber gene HAdV: human adenovirus

### 3 讨论

HAdV 属于腺病毒科的哺乳动物腺病毒属,为无包膜双链 DNA 病毒,直径为 65~80 nm,由 1 个二十面体形状的蛋白质衣壳组成,包括 252 个壳粒、含 DNA 病毒基因组的核蛋白核心和内部蛋白质。HAdV 已鉴定出 70 余种分型,分为 HAdV-A~G 7 种,可引起人体多种组织感染,包括结膜炎、胃肠炎、肝炎、心肌炎和肺炎等。腺病毒性结膜炎主要通过手眼接触、眼分泌物以及与眼科护理人员及医疗器械的接触传播<sup>[4]</sup>。

HAdV 分型与临床分型高度相关。EKC 是腺病毒性结膜炎中最严重的表现,主要由 HAdV-D 引起, HAdV-D8、HAdV-D19 和 HAdV-D37 较常见,还包括 HAdV-D54、HAdV-D56 等<sup>[5-8]</sup>,一般病程持续约 3 周,表现为水样分泌物、结膜充血、结膜伪膜、角膜浸润、睑球粘连和同侧淋巴结肿大,部分角膜斑翳可能会残存数年<sup>[1,9]</sup>;PCF 表现为突然发热、咽炎、双侧结膜炎和耳周淋巴结肿大,常由 HAdV-B 引起,包括 HAdV-B3、HAdV-B5、HAdV-B7 和 HAdV-B11 等<sup>[10]</sup>;单纯滤泡性结膜炎仅表现为结膜滤泡,无角膜或全身受累,HAdV-B、HAdV-C、HAdV-D 和 HAdV-E 均可引起,包括 HAdV-B3、HAdV-B7、HAdV-B11、HAdV-C1、HAdV-C2、HAdV-C5、HAdV-C6、HAdV-D8、HAdV-D9、HAdV-D10 和 HAdV-E4 等。HAdV-B、HAdV-C、HAdV-D 和 HAdV-E 较易引起腺病毒性结膜炎,这与其在六邻体蛋白及纤维蛋白上存在较近的遗传距离有关。同样,在六邻体蛋白和纤维蛋白结构上遗传距离较大的 HAdV-A、HAdV-F 和 HAdV-G,则较少引起腺病毒性结膜炎。

快速、经济、简便的 HAdV 检测和分型可以为腺病毒性结膜炎的确诊和进一步临床分型提供重要依据,为疗效的预判、个性化用药选择、减少抗生素滥用提供实验基础<sup>[11-12]</sup>。大多数腺病毒性结膜炎为自限性,轻症者不需要治疗,或仅需要使用人工泪液等支持性治疗缓解症状,清洁眼表;严重病例需要局部使用糖皮质激素滴眼液减少角膜斑翳、结膜伪膜和睑球粘连<sup>[13]</sup>,甚至可能需行准分子激光手术切削严重的角膜斑翳<sup>[14-15]</sup>。但单纯依靠症状和体征的腺病毒性结膜炎的临床诊断准确率低于 50%,缺乏快速、准确的诊断方法使很多腺病毒性结膜炎被误诊为细菌性结膜炎,造成不必要的抗生素使用<sup>[2]</sup>。

PCR 检测结膜标本中的 HAdV 基因以及进一步的基因测序已经替代细胞培养联合免疫荧光,成为 HAdV 检测的常用方法<sup>[16]</sup>。六邻体蛋白是目前 HAdV 分型最重要和常用的依据,其在所有血清型中都保留

了抗原决定簇,能够检测几乎全部的 HAdV 分型。基于六邻体蛋白的快速抗原检测试剂盒已得到美国食品和药物管理局批准,用于临床 HAdV 分型。六邻体蛋白基因位于 HAdV 基因组中部,相对保守,可以通过 1 对通用引物扩增不同种的 HAdV。但是,单纯的六邻体蛋白基因分析仅能得到 HAdV 分型的初步依据,而不能取代基因组或蛋白组测序带来的完整生物学信息。

纤维蛋白是 HAdV 区别于其他二十面体病毒的特有蛋白,相关序列变化带来的空间构象变化与 HAdV 致病力的进化有关<sup>[17]</sup>。纤维蛋白基因位于 HAdV 基因组尾部,在各种 HAdV 中变异较大,各种 HAdV 需要设计不同的引物进行扩增和测序,可以识别宿主细胞表面的柯萨奇/HAdV 受体,促使 HAdV 颗粒与宿主细胞链接并锚定,在 HAdV 的内吞过程中起到重要作用。但是,部分类型的 HAdV 具有近似的纤维蛋白结构,因此,单纯针对纤维蛋白的基因测序不能有效进行 HAdV 分型,例如, HAdV-D19 与 HAdV-D37 纤维蛋白结构高度相似,本研究中也出现了 HAdV-D19 和 HAdV-D37 样本与参考序列原型互相交叉聚集的现象。纤维蛋白与六邻体蛋白的联合基因测序可以更加有效地确定 HAdV 分型,并进行进一步的毒力分析。然而,本研究中存在交叉聚集的 HAdV-D19 与 HAdV-D37 样本在临床表现占比上无明显差异。一方面可能是因为 HAdV-D19 与 HAdV-D37 纤维蛋白结构差异较小,另一方面可能是因为样本量有限。但对纤维蛋白结构的系统发育分析仍是腺病毒致病力分析的重要方法之一。

在 HAdV-D53 之后出现了大量由现有 HAdV 的基因组变异、替换和重组发展出的新的基因组类型。通过五邻体蛋白(P)、六邻体蛋白(H)和纤维蛋白(F)标记和命名这些新型 HAdV 已经成为国际通用的方法,如 HAdV-D53(P37H22F8)、HAdV-D59(P64H25F56)、HAdV-C57(P1H57F6)、HAdV-D58(P58H58F29)和 HAdV-D63(P30H30F29)等。这些新型的 HAdV 也可能引起腺病毒性结膜炎,甚至可能引起 EKC 爆发,并日益成为 EKC 流行的重要血清型<sup>[8,18-21]</sup>。如果仅通过单个基因的测序分析,这些新型的 HAdV 可能会被错误地鉴定为传统的 HAdV,而双基因,甚至三基因的联合测序可以有效鉴定出新型 HAdV。

相比于单纯的基因测序和比对,系统发育分析为 HAdV 分类和分子进化监测提供了一种更加有效、可靠的方法。系统发育分析提示,HAdV-D 与 HAdV-B、HAdV-C、HAdV-E 的亲缘关系更近,而与 HAdV-A、和 HAdV-F 的亲缘关系较远。这可以从侧面解释 HAdV-D、

HAdV-B、HAdV-C、HAdV-E 容易引起眼部感染,而 HAdV-A 和 HAdV-F 引起眼部感染的可能性较小。

六邻体蛋白基因和纤维蛋白基因位于 HAdV 基因组中部和尾部,变异程度较大,是进行 HAdV 分型、变异研究和毒力分析的重要靶点<sup>[22]</sup>。本研究选用六邻体蛋白基因和纤维蛋白基因的联合测序,可以涵盖 HAdV 基因组中近 80% 的变异,相对于全基因组测序更加快速、有效、易推广,也比针对单一的六邻体蛋白或纤维蛋白测序更加可靠,并且可能发现由基因变异、替换和重组发展出的新型 HAdV。本研究方法在所得数据丰度上逊于全基因组测序,但种系分析能够比单纯的序列比对提供更丰富的病毒进化和发展信息。总之,六邻体蛋白基因和纤维蛋白基因的联合测序可能为临床预后判断、减少角膜病损的发生及个性化治疗方法的选择提供丰富的分型和毒力分析信息。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 王旌:实施研究、采集数据、统计分析、论文撰写和修改;朱剑锋、陆丽娜:分析数据、论文修改及定稿

## 参考文献

- [1] Killerby ME, Stuckey MJ, Guendel I, et al. Notes from the field: epidemic keratoconjunctivitis outbreak associated with human adenovirus type 8-U. S. Virgin Islands, June–November 2016 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2017, 66(30): 811–812. DOI: 10.15585/mmwr.mm6630a3.
- [2] Jhanji V, Chan TC, Li EY, et al. Adenoviral keratoconjunctivitis [J]. *Surv Ophthalmol*, 2015, 60(5): 435–443. DOI: 10.1016/j.survophthal.2015.04.001.
- [3] Fedaoui N, Ben Ayed N, Ben Yahia A, et al. Molecular detection and characterization through analysis of the hexon and fiber genes of adenoviruses causing conjunctivitis in Tunisia, North Africa [J]. *J Med Virol*, 2017, 89(2): 304–312. DOI: 10.1002/jmv.24622.
- [4] Calkavur S, Olukman O, Ozturk AT, et al. Epidemic adenoviral keratoconjunctivitis possibly related to ophthalmological procedures in a neonatal intensive care unit: lessons from an outbreak [J]. *Ophthalmic Epidemiol*, 2012, 19(6): 371–379. DOI: 10.3109/09286586.2012.718402.
- [5] Muller MP, Siddiqui N, Ivancic R, et al. Adenovirus-related epidemic keratoconjunctivitis outbreak at a hospital-affiliated ophthalmology clinic [J]. *Am J Infect Control*, 2018, 46(5): 581–583. DOI: 10.1016/j.ajic.2017.11.011.
- [6] Lei Z, Zhu Z, Wang B, et al. Outbreaks of epidemic keratoconjunctivitis caused by human adenovirus type 8 in the Tibet Autonomous Region of China in 2016 [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0185048 [2022-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5600394/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0185048.
- [7] Kaneko H, Suzutani T, Aoki K, et al. Epidemiological and virological features of epidemic keratoconjunctivitis due to new human adenovirus type 54 in Japan [J]. *Br J Ophthalmol*, 2011, 95(1): 32–36. DOI: 10.1136/bjo.2009.178772.
- [8] Huang G, Yao W, Yu W, et al. Outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by human adenovirus type 56, China, 2012 [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110781 [2022-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4208770/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0110781.
- [9] Ersoy Y, Otlu B, Türkçüoğlu P, et al. Outbreak of adenovirus serotype 8 conjunctivitis in preterm infants in a neonatal intensive care unit [J]. *J Hosp Infect*, 2012, 80(2): 144–149. DOI: 10.1016/j.jhin.2011.11.007.
- [10] Ghanaem H, Averbuch D, Koplewitz BZ, et al. An outbreak of adenovirus type 7 in a residential facility for severely disabled children [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2011, 30(11): 948–952. DOI: 10.1097/INF.0b013e31822702fe.
- [11] Sambursky R, Trattler W, Tauber S, et al. Sensitivity and specificity of the AdenoPlus test for diagnosing adenoviral conjunctivitis [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2013, 131(1): 17–22. DOI: 10.1001/2013.jamaophthalmol.513.
- [12] González-López JJ, Morcillo-Laiz R, Muñoz-Negrete FJ. Adenoviral keratoconjunctivitis: an update [J]. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 2013, 88(3): 108–115. DOI: 10.1016/j.oftal.2012.07.007.
- [13] Koçluk Y, Sukgen EA, Cevher S, et al. Symptomatic treatment of subepithelial infiltrates after viral conjunctivitis: loteprednol or dexamethasone? [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2017, 25(5): 649–653. DOI: 10.3109/09273948.2016.1149593.
- [14] Alevi D, Barsam A, Kruh J, et al. Photorefractive keratectomy with mitomycin-C for the combined treatment of myopia and subepithelial infiltrates after epidemic keratoconjunctivitis [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2012, 38(6): 1028–1033. DOI: 10.1016/j.jcrs.2011.12.039.
- [15] Sun G, Su G, Bai Y, et al. Analysis on the treatment and prevention of epidemic conjunctivitis in 108 cases [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2017, 30(4(Suppl.)): 1501–1503.
- [16] Kaufman HE. Adenovirus advances: new diagnostic and therapeutic options [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2011, 22(4): 290–293. DOI: 10.1097/ICU.0b013e3283477eb5.
- [17] Ismail AM, Lee JS, Dyer DW, et al. Selection pressure in the human adenovirus fiber knob drives cell specificity in epidemic keratoconjunctivitis [J]. *J Virol*, 2016, 90(21): 9598–9607. DOI: 10.1128/JVI.01010-16.
- [18] Aoki K, Ishiko H, Konno T, et al. Epidemic keratoconjunctivitis due to the novel hexon-chimeric-intermediate 22, 37/H8 human adenovirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(10): 3259–3269. DOI: 10.1128/JCM.02354-07.
- [19] Hage E, Espelage W, Eckmanns T, et al. Molecular phylogeny of a novel human adenovirus type 8 strain causing a prolonged, multi-state keratoconjunctivitis epidemic in Germany [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40680 [2022-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5234003/>. DOI: 10.1038/srep40680.
- [20] Kaneko H, Ishiko H, Ohguchi T, et al. Nucleotide sequence variation in the hexon gene of human adenovirus type 8 and 37 strains from epidemic keratoconjunctivitis patients in Japan [J]. *J Gen Virol*, 2009, 90(Pt 9): 2260–2265. DOI: 10.1099/vir.0.010934-0.
- [21] Walsh MP, Chintakuntlawar A, Robinson CM, et al. Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis [J/OL]. *PLoS One*, 2009, 4(6): e5635 [2022-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2685984/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0005635.
- [22] 王旌, 赵蓉, 童晓维, 等. 腺病毒六邻体蛋白的基因测序在流行性角膜结膜炎病原检测中的应用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(5): 430–435. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.009.

(收稿日期:2022-04-20 修回日期:2022-08-16)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)