· 实验研究 ·

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

王旌　赵蓉　童晓维　朱剑锋

【摘要】 **背景**　流行性角膜结膜炎是常见的眼部传染性疾病，腺病毒为常见病原体之一。六邻体蛋白是构建病毒衣壳的重要蛋白，也是病毒与抗体结合的主要靶点。应用针对六邻体蛋白编码区的测序方法可对腺病毒进行快速分型，对于流行性角膜结膜炎的早期诊断、病情监测和预后判断具有重要意义。 **目的**　通过针对腺病毒六邻体蛋白编码区的测序，完成上海地区腺病毒与流行性角膜结膜炎相关的分子流行病学调查。 **方法**　在受检者知情同意的情况下，收集 2010 年 1 月至 2012 年 12 月在上海市眼病防治中心和上海市急性出血性结膜炎防控办公室下属红眼病监测站点就诊的 214 例可疑流行性角膜结膜炎患者结膜囊的结膜拭子样本 214 份。对结膜囊标本提取 DNA 后，通过 PCR 法扩增病原体六邻体蛋白编码区内 140 bp 的保守序列，对于腺病毒阳性的标本，通过对六邻体蛋白保守区域内 956 bp 的序列进一步测序以确定其病毒分型。 **结果**　在 214 例患者中，109 例在通用 PCR 中显示腺病毒阳性，占 50.93%。其中通过基因测序确定 AdV1 者 4 例，AdV2 者 33 例，AdV3 者 15 例，AdV4 者 12 例，AdV8 者 19 例，AdV19 者 15 例，AdV37 者 8 例。属于 D 组腺病毒的 AdV8、AdV19 和 AdV37 检出阳性患者更容易出现角膜炎症反应、伪膜性结膜炎和耳前淋巴结肿大等，而 B 组腺病毒检出阳性者易伴发上呼吸道感染，但角膜受累者较少。 **结论**　针对六邻体蛋白编码区内保守区域的测序是腺病毒分型的重要方法之一，可快速确定流行性角膜结膜炎是否系腺病毒感染引起，并确定腺病毒分型。

【关键词】 人腺病毒感染；病毒性角膜结膜炎/诊断；碱基序列；保守序列；PCR/方法；六邻体蛋白

Application of hexon gene sequencing of adenovirus in pathogen detection of epidemic keratoconjunctivitis

Wang Jing, Zhao Rong, Tong Xiaowei, Zhu Jianfeng. Shanghai Eye Disease Prevention and Treatment Center, Shanghai 200040, China

Corresponding author: Zhu Jianfeng, Email: jfzhu1974@hotmail.com

[**Abstract**] **Background**　Epidemic keratoconjunctivitis is a common eye disease, and adenovirus is one of the common pathogens. The hexon protein, one main capsid protein of the virus, is an important target of antibody binding. Thus, sequencing the coding region of the hexon protein is an important way for adenovirus fast typing. **Objective**　This study was to complete a molecular epidemiology survey of epidemic keratoconjunctivitis and investigate its association with adenovirus in Shanghai area by sequencing the coding region of hexon protein. **Methods**　Two hundred and fourteen sacconjunctival swab specimens were collected from 214 patients with suspicious epidemic keratoconjunctivitis who visited Shanghai Eye Disease Prevention and Treatment Center and the clinical sites supervised by the Shanghai Prevention and Monitoring Office of Acute Hemerragic Conjunctivitis under the informed consent from January 2010 to December 2012. DNA was extracted from the specimens and then the 140 bp conserved sequence in hexon protein coding region was amplified by PCR initially to determine an adenovirus pathogen. Furtherly, 956 bp conserved sequence of the hexon codind district was sequencied to clarify the serotype of adenovirus in the adenovirus-positive specimens.　**Results**　50.93% patients (109/214) were detected to be adenovirus-positive by generic PCR, in which $AdV1^+$ was in 4 patiens, $AdV2^+$ was in 33 patients, $AdV3^+$ was in 15

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.009
基金项目：上海市卫生局青年课题项目(2010Y135)
作者单位：200040 上海市眼病防治中心
通信作者：朱剑锋，Email: jfzhu1974@hotmail.com

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

patients, AdV4$^+$ was in 12 patients, AdV8$^+$ was in 19 patiens, AdV19$^+$ was in 15 patients, AdV37$^+$ was in 8 patients. The subgenus D adenoviruses, including AdV8$^+$, AdV19$^+$ and AdV37$^+$ often resulted in corneal inflammation, pseudomembranous conjunctivitis and preauricular lymph nodes; while subgenus B adenovirus induced much frequent tract infection and less corneal response. **Conclusions** PCR-sequence of conserved region of hexon protein coding district is applicable for the detection and serotyping of adenovirus in epidemic keratoconjunctivitis.

[**Key words**] Adenovirus infections, human; Keratoconjunctivitis, viral/diagnosis; Base sequence; Conserved sequence; PCR/methods; Hexon

流行性角膜结膜炎是常见的眼部传染性疾病，常于春季和秋季爆发，通过接触分泌物传播，在封闭环境中该疾病的患病率可达 80% 以上，主要致病病毒为腺病毒、柯萨奇病毒和肠道病毒，腺病毒感染占 50% 以上。腺病毒复制力强，免疫原性强，这可以解释流行性角膜结膜炎易于流行且早期症状严重的特点。腺病毒包括 A、B、C、D、E、F 6 个亚组，引起急性结膜炎的主要病原体为 B 组的 AdV3 和 AdV7，C 组的 AdV1、AdV2 和 AdV5 以及 E 组的 AdV4，引起流行性角膜结膜炎的主要为 D 组的 AdV8、AdV19 和 AdV37 亚型[1]。腺病毒是一种无外壳的双链 DNA 病毒，六邻体蛋白是构成腺病毒衣壳的重要蛋白，也是病毒与外界交换信息的重要结构以及与抗体结合的主要靶点[2]。在血清学上，血清中和实验识别六位体蛋白上的 ε 决定域；在基因学上，编码六邻体蛋白的区域是病毒基因组中变异最大的区域之一。因此，六邻体蛋白是腺病毒基因研究的热点区域[3-6]，既与传统的血清学中和实验相关联，又可以研究病毒的变异与进化。随着基因技术的进步，通过 PCR 技术扩增分泌物中的病毒 DNA 片段，并对病毒进一步分型已成为国际上常见的研究方法，方法成熟，过程简单，结果可靠，但中国目前应用较少。本研究对可疑流行性角膜结膜炎患者的结膜囊样本进行 PCR 及基因测序，为相关的分子流行病学调查提供方法学基础。

1　材料与方法

1.1　结膜拭样本的收集

2010 年 1 月至 2012 年 12 月在上海市眼病防治中心和上海市红眼病防控办公室下属红眼病监测站点就诊的可疑流行性角膜结膜炎患者 214 例，纳入的患者均居住在上海市城区及周边区县。纳入标准：(1) 眼部表现为急性结膜充血、水肿，伴结膜滤泡，伴大量的水样分泌物。(2) 伴有或不伴有角膜浸润。(3) 伴有或不伴有耳前淋巴结肿大。(4) 伴有或不伴有上呼吸道感染症状。(5) 初次就诊且尚未使用抗病毒药物。符合诊断标准者在知情同意的情况下，用蘸取生理盐水的棉签擦拭患者下穹隆部的结膜囊以采集下结膜囊的结膜拭子样本。将棉签保存于 1 ml 含有 50 mg/ml 庆大霉素、500 U/ml（商品单位）青霉素、1 mg/ml 两性霉素 B 和体积分数 5% 胎牛血清的 Hank 缓冲液（美国 Invitrogen 公司）中，置于 5 ml 的密封管，4 ℃ 条件下冷藏，保存时间不超过 1 周。

1.2　细胞培养和病毒检测

将 A549 细胞保存在含 2% 胎牛血清的 MEM 培养基中，加入结膜拭子混悬液 200 μl 后在 37 ℃ 下作用 90 min。移除结膜拭子，细胞经 PBS 洗涤，在 37 ℃ 下培养 2 周，其间每 2 天更换一次血清，并观察细胞病变效应（cytopathic effects, CPE）[7]。如果 2 周末仍未出现 CPE，则将培养瓶反复冻融 3 次，并将溶解液 200.0 μl 加入新的培养瓶，在相同条件下做第 2 轮培养，为期 2 周。以 AdV40 和脊髓灰质炎病毒 1 型作为阳性对照，以 10 mmol/L 的 PBS 作为阴性对照。第 2 轮培养中如果出现细胞团聚等 CPE，则将培养瓶反复冻融 3 次，并收集溶解液。如果在第 2 轮培养 2 周后仍未出现 CPE 则结束培养，将培养瓶反复冻融 3 次，并收集溶解液。溶解液经纯化后取上清 5.0 μl，通过逆转录多重 PCR 技术扩增[8]，将 PCR 产物行质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳后，溴化乙啶染色，紫外分析仪上成像并判读。

1.3　结膜拭子直接基因组 DNA 的提取和保存

对结膜拭子和剩余的病毒保存液使用 QIA-amp minikit（美国 QIAGEN 公司）提取病毒基因组 DNA。提取出的 DNA 样本在 -20 ℃ 冰箱内保存。病毒分离阳性者同样提取培养细胞中的 DNA，样本另外保存并编号，同样在 -20 ℃ 冰箱内保存。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳，与标准相对分子质量 DNA（美国 Invitrogen 公司）对比，在紫外分析仪下观察，可见一条边界清楚的金黄色荧光条带，长度约 35 kb，无拖尾现象，说明 DNA 的纯度和完整性俱佳。使用 UV-240 紫外分光光度计检测 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值为 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 样品的质量浓度（μg/μl）= A_{260} × 稀释倍数 × 5/100，按

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

照此公式测算 DNA 样品的质量浓度，并将部分 DNA 样本稀释至 10 ng/μl 以用于 PCR。剩余 DNA 在 -20 ℃恒温冷冻箱内长期保存，在 4 ℃冰箱内留存供短期使用。

1.4　六邻体基因保守区的通用 PCR 检测

对所有 214 份病例的结膜拭子样本 DNA 进行通用片段的 PCR 扩增，从 NCBI GenBank 数据库中下载腺病毒序列（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html）。在腺病毒六邻体蛋白编码区尾端的高度保守区域内设计引物，其正向引物为 5'-GACATGACTTTCGAGGTCGATCCCATGGA-3'，反向引物为 5'-CCGGCTGAGAAGGGTGTGCGCAGGTA-3'。反应体系为 20.0 μl，包括 0.1 μl TaqDNA 聚合酶（5 U/μl［商品单位］，美国 Biolabs 公司），2.0 μl 含 Mg^{2+} 的 PCR 缓冲液（美国 Invitrogen 公司），0.5 μl 三磷酸脱氧核糖核苷（dNTP，10 μmol/μl，美国 Roche Diagnostics GmbH 公司），10 μmol/μl 上下游引物各 0.5 μl，11.4 μl 去离子水（ddH_2O），5.0 μl 模板 DNA（10 ng/μl）。反应条件：95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 30 s，59 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环，72 ℃再延伸 5 min，冷却至 4 ℃保存。

对 214 份细胞培养溶解液上清取 5.0 μl 在相同条件下进行同样的扩增。PCR 扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳后，如果经紫外分析仪上成像并摄片显示目的片段清晰，长度为 140 bp 左右，无特异条带，估测质量浓度在 30 ng/μl 以上，则表明通用 PCR 结果阳性。如果不能扩增出特异条带，则表明通用 PCR 结果阴性。

1.5　六邻体蛋白基因测序与腺病毒分型

所测序列为六邻体蛋白编码区尾部长约1 004 bp 的区域。首先对所有 214 份病例的结膜拭子样本 DNA 进行目的片段的 PCR 扩增，正向引物为 5'-TTCCCCATGGCNCACAACAC-3'，反向引物为 5'-GCCTCGATGACGCCGCGGTG-3'。反应体系为 20.0 μl，包括 0.1 μl TaqDNA 聚合酶，2.0 μl 含 Mg^{2+} 的 PCR 缓冲液（美国 Invitrogen 公司），0.5 μl dNTP（10 μmol/μl，美国 Roche Diagnostics GmbH 公司），10 μmol/μl 上下游引物各 0.5 μl，11.4 μl ddH_2O，5.0 μl 模板 DNA（10 ng/μl）。反应条件：95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 30 s，57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环，72 ℃延伸 5 min，冷却至 4 ℃保存。PCR 扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳后，经 UVP 成像并摄片显示目的片段清晰，长度为 1 000 bp左右，无特异条带，估测浓度在 30 ng/μl 以上。将 PCR 产物纯化后，使用 BigDye Terminator 试剂盒（美国 Applied Biosystems 公司）进行测序反应。测序引物即为正向引物。测序反应的体系为 10.0 μl，包括 1.0 μl PCR 产物，1.0 μl 测序引物和 8.0 μl 试剂盒内 Terminator Ready Reaction Mix。通过使用 ABI 3130xl 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）中已提交的基因序列进行对比，确定腺病毒的分型。对 214 份细胞培养溶解液上清取 5.0 μl 在相同条件下进行同样的扩增，产物纯化后测序，并将测序结果与结膜拭子样本 DNA 的测序结果进行比较。

2　结果

2.1　病毒分离与通用 PCR 结果的比较

纳入的 214 例患者中 148 例出现 CPE，通过多重 real-time PCR 技术扩增，93 例患者为腺病毒阳性，55 例患者为肠道病毒阳性。在未出现 CPE 的 66 例患者中，16 例裂解液中扩增出腺病毒 DNA，50 例在裂解液中扩增出肠道病毒 RNA，共判定 109 例（占 50.93%）患者系腺病毒感染，105 例患者系肠道病毒感染。腺病毒感染的 109 例患者通用 PCR 扩增结果为阳性，得到约 140 bp、质量浓度≥30 ng/μl 的清晰条带。在这些患者中，通过结膜囊拭子所提取的 DNA 和细胞培养所得的裂解液上清均在通用 PCR 中扩增出清晰的特异性条带。另外，105 例通过细胞培养及后续整合的多重 real-time PCR 技术证实为肠道病毒感染的患者，未能在通用 PCR 中扩增得到特异的清晰条带，患者在六邻体基因测序中也未能通过 PCR 扩增出有效片段。

2.2　六邻体基因测序与腺病毒分型

在 109 例腺病毒感染的样本中，通过对六邻体基因的相应片段进行基因测序，并与 NCBI GenBank 数据库中已提交的基因序列进行对比，确定 AdV1 者 4 例，AdV2 者 33 例，AdV3 者 15 例，AdV4 者 12 例，AdV8 者 19 例，AdV19 者 15 例，AdV37 者 8 例。109 例患者中通过结膜囊拭子所提取的 DNA 和病毒分离所提取的 DNA 测序结果一致，因此，通过基因序列对比所确定的病毒分型结果也是一致的。腺病毒检测阳性结果多出现于每年的 7—9 月（图 1），与急性结膜炎发病的高峰时间相吻合。纳入的患者均有结膜充血、结膜水肿和结膜滤泡等眼部表现，D 组腺病毒中的 AdV8、AdV19、AdV37 感染患者更容易出现角膜炎症、伪膜性结膜炎和耳前淋巴结肿大等，而 B 组腺病毒感染更容易伴发上呼吸道感染，角膜受累者较少（表 1）。

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

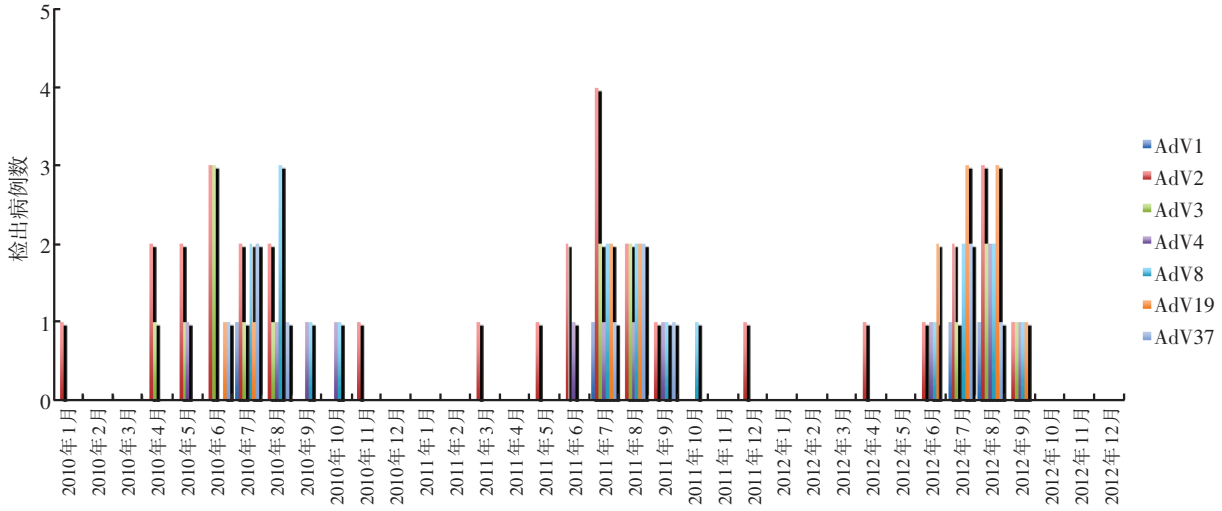

图 1　不同时间点不同类型的腺病毒检出情况　AdV：腺病毒

表 1　不同腺病毒血清型与临床表现之间的联系

临床表现	AdV1	AdV2	AdV3	AdV4	AdV8	AdV19	AdV37
结膜充血	4	33	15	12	19	15	11
结膜水肿	4	33	15	12	19	15	11
结膜滤泡	4	33	15	12	19	15	11
伪膜	0	0	0	0	5	3	3
上皮下角膜浸润	0	0	0	0	10	7	6
鼻部水样卡它	2	8	12	2	3	2	2
耳前淋巴结肿大	0	0	0	0	3	3	2
咽炎	3	13	9	4	2	1	1
总计	4	33	15	12	19	15	11

注：AdV：腺病毒

3　讨论

并非所有的流行性角膜结膜炎均由腺病毒引起，可以引起类似症状的病原体除腺病毒外，还包括肠道病毒属中的柯萨奇病毒 A24v 和肠道病毒 EV70 等[9]。本实验中选用的 A549 细胞为分离腺病毒的常用细胞株，也可以分离出部分肠道病毒。通过细胞培养整合 PCR，提高了判定病毒分类的有效性，本实验在 109 例患者的结膜囊样本中分离出腺病毒。

肠道病毒（包括柯萨奇病毒 A24v 和肠道病毒 EV70）属于 RNA 病毒，在结膜囊样本中提取 RNA 较为困难，而腺病毒属于 DNA 病毒，在结膜囊样本中提取 DNA 较为容易。应用通用 PCR 特异性扩增腺病毒相应的片段可以快速确定流行性角膜结膜炎的病原体是否为腺病毒[10]。本研究选用的通用 PCR 引物可特异性地扩增位于腺病毒六邻体蛋白尾部 2743-2812 位核苷酸 139 bp 的保守区片段，该片段在所有腺病毒分型中均相当保守，且在腺病毒以外的其他病原体中均不存在，也不存在于人类的基因组中，因此检出腺病毒具有特异性的诊断价值，广泛用于腺病毒的检测。

本研究的 214 例受检者中，109 例患者的结膜囊拭子 DNA 样本中通过 PCR 扩增出特异性的病毒条带，提示约有 50.93% 的急性结膜炎或急性角膜结膜炎患者系腺病毒感染所致，结果与细胞培养整合多重 real-time PCR 的结果一致。结膜囊拭子 DNA 样本直接行通用 PCR 的阳性率高于 A549 细胞 CPE 的阳性率，与细胞培养整合 PCR 阳性率一致。由此可见，通用 PCR 有高度特异性和敏感性，可以作为检测腺病毒的重要手段。

腺病毒除了引起眼部感染外，还可以引起呼吸系统、消化系统和泌尿系统的感染。中国有腺病毒与呼吸系统和消化系统相关疾病的流行病学研究，但腺病毒与眼部感染的相关研究资料较少，可能与结膜囊容积较小、采样困难且采集到的样本少有关。本研究中结膜囊拭子 DNA 样本中相关片段的测序结果与细胞培养后抽提 DNA 得到的相关片段的测序结果一致，说明 PCR 扩增的效率和敏感性高，能有效克服样本收集的困难，为相关的研究提供了很好的范例。

对于确定为腺病毒的标本，本研究通过一步基因测序确定其分型。本研究所选区域为六邻体蛋白 1828-2783 位核苷酸，长度为 956 bp，为六邻体蛋白编码区内中度变异的区域，在不同腺病毒各型中有一定变异，因此可以区别各型腺病毒，同时，又比高度变异区突变少，增加了 PCR 的成功率，降低了实验难度，可操作性强。目前，基因测序已经取代血清学检查而成为腺病毒分型的重要手段[11-13]，尤其腺病毒研究协会在 2011 年明确提出腺病毒的鉴定和分型应该以全基因组测序分析为基础，而不是以血清学鉴定手段为基础[14]。在全长 35.0 kb 的腺病毒基因组中，五邻体蛋白（约 1.5 kb）、六邻体蛋白（约 3.0 kb）和纤维蛋白的

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

编码区(约 1.5 kb)[15-16],这 3 个区域是腺病毒基因测序的重点区域。六邻体蛋白是构成衣壳的重要蛋白,其测序与腺病毒的分型有确切的联系[17-19]。五邻体蛋白和纤维蛋白与病毒的内吞作用有关,其测序与病毒的毒力和致病性有密切关系[20-22]。尽管全基因组测序可以提供更准确的信息[23],但是针对局部区域测序,尤其是针对六邻体蛋白测序仍然因其方便、快捷和价廉的优势,成为流行病学调查中的重要方法[24-29],其中六邻体蛋白覆盖了腺病毒表面 90% 以上的区域,是构成腺病毒衣壳的重要蛋白,同时也是血清中和实验中特异中和抗体结合的主要目标[30-34]。因此,针对六邻体蛋白测序是对腺病毒进行分型的重要方法之一[35-38],尤其因为其方便和快捷而大量应用在流行病学调查中[39-41]。在六邻体蛋白编码区的中央高度变异区与血清学中和实验的分型结果有明确的对应关系,但是其变异太大,不易扩增,因此往往在实验中选用尾部的中度变异区,既可以方便扩增,又可以有效区分腺病毒分型。本实验所扩增片段覆盖腺病毒尾端大部分区域,增强了分型的准确性。

通过病原学研究,确定腺病毒分型并预测急性角膜结膜炎患者发生角膜浸润的危险性对临床随访和治疗具有一定的指导意义。尽管目前尚缺少确实有效的抗腺病毒药物,且流行性角膜结膜炎的治疗以支持治疗为主,但对于伴有角膜浸润的患者应酌情使用糖皮质激素类药物以减轻角膜炎症反应。腺病毒根据其血清学分型、全基因组序列和遗传相似性被分为 A、B、C、D、E、F 6 个组,不同组的腺病毒中纤维长度、致癌潜力、血凝集素试验类型和 G+C 百分比有所不同。本研究中 D 组腺病毒中的 AdV8、AdV19、AdV37 阳性患者更容易出现角膜受累、伪膜性结膜炎和耳前淋巴结肿大等,而 B 组腺病毒中 AdV3 阳性患者更容易伴发上呼吸道感染,角膜受累的情况较少,主要与不同类型腺病毒的纤维蛋白构型不同有关。纤维蛋白可识别细胞表面的柯萨奇和腺病毒受体,在腺病毒进入宿主细胞的过程中发生重要作用。种系发生学研究证实,D 组腺病毒与其他 5 个组腺病毒的纤维蛋白差异极大,人类的角膜上皮细胞更容易与 D 组腺病毒纤维蛋白头部的球状结节结合,因此 D 组腺病毒很少引起眼部以外的器官感染。同样,其他各组腺病毒,包括 B 组腺病毒感染可以累及结膜,但很少引起角膜浸润[42-43]。因此,对于 D 组腺病毒感染的患者应注意随访,以便及时发现并治疗角膜浸润。

本研究的检测结果还证实,每年的 7—9 月流行性急性角膜结膜炎的检出者较多,说明该时段是病毒繁殖的活跃期,也是急性结膜炎发病的高峰期。此外本研究中也提示,实施本研究的 3 年中腺病毒在 7—9 月较为活跃,但未出现严重的病毒爆发事件。本研究仅局限于上海地区,因此需要更长时间、更大规模、覆盖地区更为广泛的分子流行病学调查,为急性结膜炎和急性角膜结膜炎的病原学研究提供更加详细的资料和信息。

参考文献

[1] Adhikary AK, Numaga J, Kaburaky T, et al. Rapid detection and typing of oculopathogenic strain of subgenus D adenoviruses by fiber based PCR and restriction enzyme analysis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(9): 2010-2015.

[2] Rux JJ, Burnett RM. Adenovirus structure[J]. Hum Gene Ther, 2004, 15(12): 1167-1176. doi: 10.1089/hum.2004.15.1167.

[3] Ebner K, Pinsker W, Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes, phylogenetic, taxonomic, and clinical implications[J]. J Virol, 2005, 79(20): 12635-12642. doi: 10.1128/JVI.79.20.12635-12642.2005.

[4] Madisch I, Harste G, Pommer H, et al. Phylogenetic analysis of the main neutralization and hemagglutination determinants of all human adenovirus prototypes as a basis for molecular classification and taxonomy[J]. J Virol, 2005, 79(24): 15265-15276. doi: 10.1128/JVI.79.24.15265-15276.2005.

[5] Madisch I, Hofmayer S, Moritz C, et al. Phylogenetic analysis and structural predictions of human adenovirus penton proteins as a basis for tissue-specific adenovirus vector design[J]. J Virol, 2007, 81(15): 8270-8281. doi: 10.1128/JVI.00048-07.

[6] Miura-Ochiai R, Shimada Y, Konno T, et al. Quantitative detection and rapid identification of human adenoviruses[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(3): 958-967. doi: 10.1128/JCM.01603-06.

[7] Fujimoto T, Matsushima Y, Shimizu H, et al. A molecular epidemiologic study of human adenovirus type 8 isolates causing epidemic keratoconjunctivitis in Kawasaki City, Japan in 2011[J]. Jpn J Infect Dis, 2012, 65(3): 260-263. http://dx.doi.org/10.7883/yoken.65.260.

[8] Lee C, Lee SH, Han E, et al. Use of cell culture-pcr assay based on combination of a549 and bgmk cell lines and molecular identification as a tool to monitor infectious adenoviruses and enteroviruses in river water[J]. ApplEnviron Microbiol, 2004, 70(11): 6695-6705. doi: 10.1128/AEM.70.11.6695-6705.2004.

[9] Madhavan HN, Malathy J, Priya K. An outbreak of acute conjunctivitis caused by Coxackie virus A24[J]. Indian J Ophthalmol, 2000, 48(2): 159.

[10] Mejía-López H, Santacruz-Valdés C, Matías-Florentino M. Genetic characterization of adenovirus isolated from follicular conjunctivitis and epidemic keratoconjunctivitis in a group of mexican patients[J]. Arch Soc Esp Oftalmol, 2008, 83(3): 161-167.

[11] Kaneko H, Iida T, Ishiko H, et al. Analysis of the complete genome sequence of epidemic keratoconjunctivitis-related human adenovirus type 8, 19, 37 and anovel serotype[J]. J Gen Virol, 2009, 90(Pt 6): 1471-1476. doi: 10.1099/vir.0.009225-0.

[12] Adhikary AK, Inada T, Numaga J, et al. Characterisation of hexon and fibre genes of a novel strain of adenovirus involved in epidemic keratoconjunctivitis[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(1): 95-97.

[13] Sarantis H, Johnson G, Brown M, et al. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(9): 3963-3969. doi: 10.1128/JCM.42.9.3963-3969.2004.

[14] Seto D, Chodosh J, Brister JR, et al. Using the whole-genome sequence to characterize and name human adenoviruses[J]. J Virol, 2011, 85(11): 5701-5702. doi: 10.1128/JVI.00354-11.

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

[15] Al Qurashi YM, Alkhalaf MA, Lim L, et al. Sequencing and phylogenetic analysis of the hexon, fiber, and penton regions of adenoviruses isolated from aids patients[J]. J Med Virol, 2012, 84(8): 1157-1165. doi: 10.1002/jmv.23331.
[16] Nemerow GR, Stewart PL, Reddy VS, et al. Structure of human adenovirus[J]. Curr Opin Virol, 2012, 2(2): 115-121. doi: 10.1016/j.coviro.2011.12.008.
[17] Ishiko H, Shimada Y, Konno T, et al. Novel human adenovirus causing nosocomial epidemic keratoconjunctivitis[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(6): 2002-2008. doi: 10.1128/JCM.01835-07.
[18] Miura-Ochiai R, Shimada Y, Konno T, et al. Quantitative detection and rapid identification of human adenoviruses[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(3): 958-967. doi: 10.1128/JCM.01603-06.
[19] Lin B, Vora GJ, Thach D, et al. Use of oligonucleotide microarrays for rapid detection and serotyping of acute respiratory disease-associated adenoviruses[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(7): 3232-3239. doi: 10.1128/JCM.42.7.3232-3239.2004.
[20] Choi EH, Kim HS, Eun BW, et al. Adenovirus type 7 peptide diversity during outbreak, Korea, 1995-2000[J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(5): 649-654. doi: 10.3201/eid1105.041211.
[21] Weaver EA, Hillestad ML, Khare R, et al. Characterization of species C human adenovirus serotype 6 (Ad 6)[J]. Virology, 2011, 412(1): 19-27. doi: 10.1016/j.virol.2010.10.041.
[22] Robinson CM, Rajaiya J, Walsh MP, et al. Computational analysis of human adenovirus type 22 provides evidence for recombination among species D human adenoviruses in the penton base gene[J]. J Virol, 2009, 83(17): 8980-8985. doi: 10.1128/JVI.00786-09.
[23] Kaneko H, Aoki K, Ohno S, et al. Complete genome analysis of a novel intertypic recombinant human adenovirus causing epidemic keratoconjunctivitis in Japan[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(2): 484-490. doi: 10.1128/JCM.01044-10.
[24] Adhikary AK, Banik U, Okabe N, et al. Molecular characterization of human adenovirus type 8 (HAdV-8), including a novel genome type detected in Japan[J]. Jpn J Infect Dis, 2011, 64(6): 493-498.
[25] Maranhão AG, Soares CC, Albuquerque MC, et al. Molecular epidemiology of adenovirus conjunctivitis in Rio de Janeiro, Brazil, between 2004 and 2007[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2009, 51(4): 227-229.
[26] Qurei L, Seto D, Salah Z, et al. A molecular epidemiology survey of respiratory adenoviruses circulating in children residing in southern Palestine[J/OL]. PLoS One, 2012, 7(8): e42732[2014-10-23]. http://journals.plos.org/plosone/articles?id=10.1371/journal.pone.0042732. doi: 10.1371/journal.pone.0042732.
[27] Abd-Jamil J, Teoh BT, Hassan EH, et al. Molecular identification of adenovirus causing respiratory tract infection in pediatric patients at the University of Malaya Medical Center[J]. BMC Pediatrics, 2010, 10: 46. doi: 10.1186/1471-2431-10-46.
[28] Melendez CP, Florentino MM, Martinez IL, et al. Outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus in medical residents[J]. Mol Vis, 2009, 15: 557-562.
[29] Ishiko H, Aoki K. Spread of epidemic keratoconjunctivitis due to a novel serotype of human adenovirus in Japan[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(8): 2678-2679. doi: 10.1128/JCM.r00313-09.
[30] Ebner K, Pinsker W, Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes, phylogenetic, taxonomic, and clinical implications[J]. J Virol, 2005, 79(20): 12635-12642. doi: 10.1128/JVI.79.20.12635-12642.2005.
[31] Imai Y, Kameya S, Ohkoshi M, et al. Identification of the hexon region of an adenovirus involved in a new outbreak of keratoconjunctivitis[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(8): 2975-2977. doi: 10.1128/JCM.39.8.2975-2977.2001.
[32] La Rosa G, Iaconelli M, Pourshaban M, et al. Molecular characterization of adenovirus from clinical samples through analysis of the hexon and fiber genes[J]. J Gen Virol, 2011, 92(Pt 2): 412-420. doi: 10.1099/vir.0.023176-0.
[33] Rux JJ, Kuser PR, Burnett RM. Structural and phylogenetic analysis of adenovirus hexons by use of high-resolution x-ray crystallographic, molecular modeling, and sequence-based methods[J]. J Virol, 2003, 77(17): 9553-9566. doi: 10.1128/JVI.77.17.9553-9566.2003.
[34] Smith TJ. Structural studies on antibody recognition and neutralization of viruses[J]. Curr Opin Virol, 2011, 1(2): 150-156. doi: 10.1016/j.coviro.2011.05.020.
[35] Ebner K, Suda M, Watzinger F, et al. Molecular detection and quantitative analysis of the entire spectrum of human adenoviruses by a two-reaction real-time PCR assay[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(7): 3049-3053. doi: 10.1128/JCM.43.7.3049-3053.2005.
[36] Shimada Y, Ariga T, Tagawa Y, et al. Molecular diagnosis of human adenoviruses d and e by a phylogeny-based classification method using a partial hexon sequence[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(4): 1577-1584. doi: 10.1128/JCM.42.4.1577-1584.2004.
[37] Casas I, Avellon A, Mosquera M, et al. Molecular identification of adenoviruses in clinical samples by analyzing a partial hexon genomic region[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(12): 6176-6182. doi: 10.1128/JCM.43.12.6176-6182.2005.
[38] McCarthy T, Lebeck MG, Capuano AW, et al. Molecular typing of clinical adenovirus specimens by an algorithm which permits detection of adenovirus coinfections and intermediate adenovirus strains[J]. J Clin Virol, 2009, 46(1): 80-84. doi: 10.1016/j.jcv.2009.06.008.
[39] Madisch I, Harste G, Pommer H, et al. Phylogenetic analysis of the main neutralization and hemagglutination determinants of all human adenovirus prototypes as a basis for molecular classification and taxonomy[J]. J Virol, 2005, 79(24): 15265-15276. doi: 10.1128/JVI.79.24.15265-15276.2005.
[40] Tohma K, Bayasgalan N, Suzuki A, et al. Detection and serotyping of human adenoviruses from patients with influenza-like illness in mongolia[J]. Jpn J Infect Dis, 2012, 65(4): 289-294. doi: org/10.7883/yoken.65.289.
[41] Sriwanna P, Chieochansin T, Vuthitanachot C, et al. Molecular characterization of human adenovirus infection in Thailand, 2009-2012[J]. Virol J, 2013, 10: 193. doi: 10.1186/1743-422X-10-193.
[42] Robinson CM, Shariati F, Gillaspy AF, et al. Genomic and bioinformatics analysis of human adenovirus type 37, new insights into corneal tropism[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 213. doi: 10.1186/1471-2164-9-213.
[43] Robinson CM, Shariati F, Zaitshik J. Human adenovirus type 19, genomic and bioinformatics analysis of a keratoconjunctivitis isolate[J]. Virus Res, 139(1): 122-126. doi: 10.1016/j.virusres.2008.10.001.

（收稿日期：2014-12-04）

（本文编辑：尹卫靖）

读者 · 作者 · 编者

欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊、中国中文核心期刊和 CSCD 核心期刊，月刊，96 面，每月 10 日出版，每期定价 16 元，邮发代号：36-13，国内外公开发行，欢迎到各地邮局或直接与本刊编辑部联系订阅。联系电话：0371-65580157。

（本刊编辑部）

中華醫學會雜誌社 版权所有 违者必究　Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?