

浙江省 2002—2010 年急性出血性结膜炎 暴发疫情病原体 CA24v 的 全基因组序列分析

李焕 徐昌平 严菊英 卢亦愚 金青青 冯燕 莫世华

【摘要】 目的 分析 2002—2010 年浙江省急性出血性结膜炎(AHC)暴发疫情病原柯萨奇病毒 A 组 24 型变种(CA24v)流行株的全基因组序列与遗传特性。方法 选取浙江省不同年份的 CA24v 流行株,采用 RT-PCR 扩增基因序列,并与国内外流行株进行全基因组及 VP1、3C 区序列比较分析。结果 浙江省 2002 年和 2010 年 CA24v 全序列为 7456~7458 bp,编码含 2214 个氨基酸残基的多聚蛋白,2010 年的 Zhejiang/08/10 较 2002 年的毒株在 5' 端非编码区的第 97、119 位各存在一个 T 碱基插入,Zhejiang/08/10 与 2002 年以来的分离株各区段氨基酸同源率为 94.7%~100.0%,与近 60 年来 CA24 流行代表株全序列中各区段氨基酸的平均差异率以 2A 区与 3A 区最大,分别达 8.4%和 7.3%,3D 区最小,仅为 1.9%。1987 年与 2002 年以来的 CA24v 毒株在全序列上共存在 38 个和 20 个氨基酸的稳定变异。2002—2010 年 CA24v 的组间遗传距离分析表明,3C 区较 VP1 区更为稳定,CA24v 的早年流行株 Jamaica/10628/87 在 3D 区上可能存在重组,而在近年流行株中未发现该现象。结论 CA24v 以时间序列为主逐年进化,地域间虽存在差异,但影响较小。自 2002 年起,由 CA24v 引起的 AHC 一直在浙江省本地散在流行。

【关键词】 急性出血性结膜炎;柯萨奇病毒 A 组 24 型变种;全基因组序列分析;重组

Study on the complete sequence of CA24 variant isolated during the acute hemorrhagic conjunctivitis outbreaks in Zhejiang province during 2002 to 2010 Li Huan¹, XU Chang-ping², YAN Ju-ying², LU Yi-yu², JIN Qing-qing¹, FENG Yan², MO Shi-hua². 1 Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2 Virus Institute of Zhejiang Provincial Centre for Disease Control and Prevention

Corresponding author: LU Yi-yu, Email: luyiyuzjh@yahoo.com.cn

This work was supported by a grant from the Zhejiang Province Public Health Inspection Key Discipline Group (No. XKQ-009-003).

【Abstract】 Objective To analyze the genetic characteristics of the complete sequence of coxsackievirus A24 variant (CA24v) isolated from acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC) outbreaks in Zhejiang province during 2002 to 2010. **Methods** Complete sequences of CA24v epidemic strains isolated in different years were amplified under the RT-PCR assay, while the sequences of whole genome, VP1, and 3C region of Zhejiang strains were compared with epidemic strains isolated in other areas of China and abroad. **Results** The whole genome of Zhejiang CA24v strains isolated in 2002 and 2010 was 7456–7458 bp in length, encoding a polyglutamine protein which containing 2214 amino acid residues. There was a insertion with T on site 97 and 119 within 5' non-coding region between epidemic strain Zhejiang/08/10 and strains isolated in 2002. The rates of amino acid homology among Zhejiang/08/10 and other strains isolated since 2002 were between 94.7% and 100.0%. Compared with the representative strains circulated within the recent 60 years, the largest average amino acid variations had been occurred on region 2A and 3A, with the ratios as 8.4% and 7.3% respectively. The smallest variation happened in region 3D, with the ratio only as 1.9%. The rates of stable amino acid variation on the whole genome between strains isolated since 1987 and 2002 were

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.05.019

基金项目:浙江省公共卫生检验检测重点学科群(XKQ-009-003)

作者单位:315211 宁波大学医学院流行病与卫生统计学专业(李焕、金青青);浙江省疾病预防控制中心病毒所 浙江省公共卫生应急检测关键技术重点实验室(徐昌平、严菊英、卢亦愚、冯燕、莫世华)

通信作者:卢亦愚, Email: luyiyuzjh@yahoo.com.cn

38 and 20. P-distance within groups appeared that region 3C was more stable than VP1 of strains isolated in 2002–2010, and the 3D of early strain Jamaica/10628/87 might have had a nature of recombination but not observed on those epidemic strains in recent years. **Conclusion** Within the evolution of CA24v strains, the time course was more significant than the geographical differences. There had been sporadic epidemics of AHC caused by CA24v in Zhejiang province since 2002.

【Key words】 Acute hemorrhagic conjunctivitis; Coxsackievirus A24 variant; Complete genome sequence analysis; Recombination

急性出血性结膜炎(AHC)已在世界各地发生过多次大暴发及流行^[1,2]。其主要病原体为柯萨奇病毒A组24型变种(CA24v),其次为肠道病毒70型与腺病毒^[3-5]。浙江省2002年曾发生由CA24v引起的较大范围AHC流行,报告病例数达18 149例;2007、2008年又发生AHC的局部暴发,报告病例分别为2925例和6848例;2010年再次发生AHC流行,报告病例达24 870例。为全面了解浙江省近年来CA24v流行株的基因特征与变异状况,本研究对2002、2007、2008和2010年浙江省AHC暴发疫情患者眼拭子样本进行病原分离与基因特性分析。

材料与方法

1. 样本及病毒分离鉴定:样本源自浙江省各县市疾病预防控制中心采集送检的AHC暴发疫情患者眼拭子标本。参照卫生部《急性出血性结膜炎诊断标准及处理原则(WS 217-2008)》进行病毒分离^[6];采用荧光RT-PCR方法检测CA24v病毒特异性核酸^[7],并对病毒VP1区基因测序进行辅助鉴定^[8]。

2. CA24v全序列扩增:采用德国QIAGEN公司的RNeasy Mini Kit,按照试剂盒说明书进行病毒RNA提取。序列扩增采用Roch公司的Titan One Tube RT-PCR Kit,进行RT-PCR反应^[9,10]。除对2002、2007、2008、2010年CA24v分离株进行VP1与3C区序列进行扩增外,对2002、2010年分离株进行全序列扩增。肠道病毒通用引物CX3和CX10参考文献[11],其他扩增及测序引物均由本实验室自行设计(表1)。全序列扩增中5'和3' cDNA末端分别利用RACE法扩增出cDNA片段^[12-15],将其各自与pGEM-T载体连接得到含有5'端470 bp和3'端453 bp cDNA的重组质粒,引物序列为:5'R: TTA GCC GCA TTC AGG GGC CGG AGG ACT C, 3'F: TAC CCC CAT GAG GTT GAC GCT AGT CTC C。

3. 核酸测序及进化分析:RT-PCR扩增产物纯化后,委托南京金斯瑞生物有限公司测序。其他国内外CA24及CA24v毒株的全序列及VP1和3C区序列均从GenBank下载。采用DNAMAN 5.2.2软件进

表1 本研究用于CA24v RT-PCR和测序的引物

RT引物	位置	引物序列(5'~3')	方向
CX3	355~374	CGGTGGCTGCGTTGGCGGCC	U
CX10	599~580	ATTGTACCATAAGCAGCCA	L
QF1	5~24	AACAGCTGTGGGGTTGTCC	U
QR1	244~223	GTACAAGAGCGGGTAACGGATC	L
QF2	65~83	CGGTACCCTTGTACGCCTG	U
QR2	1050~1031	ACCACTGCATTCGCTGCCTC	L
F1	885~908	CACAGGATCCTTCCAAGTTTACCG	U
R1	2106~2085	CTCAACGAACCGGTCCAGTGGG	L
HF1	1864~1883	AATACACATACCAGGAGAGG	U
HR1	4497~4478	CGGTGTTTGTCTTGAAGT	L
HF2	4284~4303	CCAAGCTCAAGCAGCTGGGA	U
HR2	7418~7396	CCAATCCAATTCGACTGAGGTAG	L

行序列比对和同源性分析;用Mega 4.1软件以邻位相接法构建序列进化树进行氨基酸变异分析和计算遗传距离^[16];使用RDP 3.0软件检测重组事件^[17,18],并用SimPlot 3.5.1软件进行相似性和BOOTSCAN分析^[19,20]。

结 果

1. 病毒分离及型别鉴定:AHC患者眼拭子样本接种Hep-2细胞3~4 d,当细胞出现明显散在性变圆、缩小等病变现象时收获。阳性分离物采用CA24v荧光RT-PCR鉴定,VP1区测序结果采用GenBank的BLAST进行比对,结果证实浙江省这些年来AHC暴发的病原均为CA24v。

2. 序列测定:经测序获得2002年和2010年浙江省3株CA24v分离株的全序列以及2007、2008、2010年浙江省其他10株CA24v毒株的VP1与3C区序列。浙江省CA24v全序列长度为7456~7458 bp(不含3'端的polyA尾),编码区长6645 bp,编码一个含2214个氨基酸残基的多聚蛋白,而非编码区5'端长745~747 bp,3'端长66 bp。2010年Zhejiang/08/10株与2002年CA24v流行株Ningbo/3/02及Hangzhou/13/02株相比,在5'非编码区的核糖体结合位点,即nt91~745区段的第97、119位各存在一个T碱基插入。

3. CA24v各区段基因同源性比较:以Zhejiang/08/10株为参照,将2002年Ningbo/3/02株及国内外

不同时期的7株CA24v流行株的全序列各区段分别进行同源性比较(表2)。Zhejiang/08/10株与2002—2010年中国浙江和广东及韩国、新加坡CA24v株各区段氨基酸同源性为94.7%~100.0%，与最早分离的CA24v Singapore/EH24/70株各区段氨基酸同源性为89.7%~99.2%。这些CA24v全序列氨基酸平均差异率为3.4%，各编码区氨基酸平均差异率以2A区与3A区为最大，分别达到8.4%和7.3%，以3D区为最小，仅为1.9%。

4. 全序列氨基酸差异比较：以最早分离的CA24v株 Singapore/EH24/70为参照，1987年后分离的毒株 Jamaica/10628/87、Dominican Republic/10630/93、Ningbo/3/02、Singapore/DSO-52/05、Guangdong/01/10、Zhejiang/08/10共有38个氨基酸发生稳定性变异，2002年后共有20个氨基酸发生稳定性变异。Singapore/EH24/70株与CA24v株 Zhejiang/08/10、Ningbo/3/02在全序列上分别存在81个和72个氨基酸差异(表3)。

5. VP1区和3C区基因进化树：2002—2010年浙江省与国内外不同时期CA24分离株的VP1区进化树形成两大不同进化支，分别为CA24型和CA24v型，其中CA24v型又进一步分为2000年以前的Group1(G1)分支和2000年后的Group2(G2)分支。1982年分离于波多黎各的Puerto Rico/10686/82、Puerto Rico/10626/82毒株均位于CA24v G1分支。2002—2010年浙江、云南和广东分离株均在CA24v G2分支上(图1)，与2002—2010年浙江分离株亲缘关系最近的分别为2010年江苏株、2007年广东、云

南株以及2004年韩国株。

在3C区进化树上，2010年浙江、江苏、广东及2006—2009年台湾、巴西、古巴等地的CA24v流行株聚集在CA24v GIV-Cluster4(C4)分支上，2005年新加坡的CA24v流行株与2007—2008年浙江、云南、广东等地分离的CA24v株均在GIV-C3分支上，2004年的韩国CA24v流行株与2002年浙江省杭州、宁波流行株均位于GIV-C2分支上(图2)。Puerto Rico/10686/82、Puerto Rico/10626/82流行株与VP1区进化树上位于CA24v分支不同，均在CA24分支上。

6. 遗传距离分析：将2002—2010年浙江与国内外CA24v流行株的VP1区、3C区及全序列按每3年分为1组，进行组内和组间遗传距离分析(表4)。在VP1、3C区和全序列上，2002—2004年流行株组内遗传距离均最小。在VP1区上，随着年份推移，组间遗传距离变大，如2002—2004年与2008—2010年组间遗传距离最大，其次是2005—2007年与2008—2010年组间遗传距离，2002—2004年与2005—2007年组间遗传距离最小。在3C区上，各年份组间的遗传距离无明显差异，如2002—2004年与2008—2010年组间遗传距离为0.046，2005—2007年与2008—2010年组间距离是0.047，差异较小。

7. 重组分析：在2002—2010年分离的毒株中未发现重组现象，而在1987年分离于牙买加的毒株Jamaica/10628/87序列中发现重组信号，主母序列为Puerto Rico/10686/82，次母序列是Dominican Republic/10630/93，重组片段为3D区18~263 nt，P

表2 CA24v株 Zhejiang/08/10与其他CA24v的核苷酸(氨基酸)同源性比较

毒株	5'端	全基因	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D	3'端
South Africa/Joseph/52	86.8	79.6 (93.5)	75.4 (95.7)	76.4 (95.2)	78.7 (93.8)	76.2 (91.1)	77.3 (84.0)	77.0 (90.7)	79.9 (94.5)	76.2 (86.2)	81.8 (90.9)	82.9 (95.1)	85.0 (97.6)	98.5
Texas/DN19/63	82.9	80.4 (94.4)	78.7 (95.7)	79.5 (96.7)	79.8 (95.4)	78.8 (92.8)	77.6 (86.7)	75.6 (87.6)	80.9 (95.7)	75.9 (86.2)	81.8 (95.5)	82.0 (95.6)	84.5 (97.6)	98.5
Singapore/EH24/70	83.8	85.7 (96.3)	82.6 (97.1)	85.6 (97.4)	86.4 (99.2)	86.7 (95.1)	85.8 (92.7)	79.4 (89.7)	85.8 (97.3)	83.9 (92.0)	84.8 (95.5)	85.6 (96.2)	86.9 (97.8)	98.5
Puerto Rico/10686/82	84.0	81.0 (93.7)	83.6 (95.7)	80.0 (95.9)	81.5 (93.4)	79.1 (91.5)	78.2 (84.7)	77.0 (87.6)	80.6 (95.7)	80.8 (90.8)	80.3 (86.4)	79.8 (91.8)	84.9 (98.3)	98.5
Dominican Republic/10630/93	94.4	89.5 (97.6)	87.4 (98.6)	89.4 (97.8)	90.7 (99.6)	92.0 (98.4)	90.9 (95.3)	89.7 (97.9)	91.8 (98.5)	84.3 (90.8)	92.4 (95.5)	89.6 (96.7)	86.4 (97.6)	97.0
Ningbo/3/02	97.7	95.5 (99.1)	95.7 (100.0)	94.7 (100.0)	94.6 (99.2)	95.2 (99.3)	95.8 (95.3)	96.6 (99.0)	96.0 (99.7)	95.4 (98.9)	97.0 (100.0)	95.4 (99.5)	95.9 (98.7)	100.0
Singapore/DSO-52/05	97.9	95.5 (98.8)	97.1 (100.0)	95.1 (99.6)	95.3 (99.2)	95.5 (99.7)	94.2 (95.3)	96.2 (99.0)	95.8 (98.8)	93.5 (97.7)	95.5 (100.0)	95.8 (98.9)	96.2 (98.5)	100.0
Guangdong/01/10	98.4	97.7 (99.2)	98.6 (100.0)	96.9 (98.5)	97.4 (100.0)	98.4 (100.0)	97.1 (98.7)	97.6 (99.0)	98.5 (99.4)	98.1 (98.9)	97.0 (100.0)	98.4 (99.5)	97.5 (98.9)	92.1
氨基酸平均差异率	-	3.4	2.2	2.4	2.5	4.0	8.4	6.2	2.6	7.3	4.6	3.4	1.9	-

注：数据为核苷酸(氨基酸)同源性(%)；VP1~VP4为结构区P1区；2A~3D为非结构区；2A~2C为P2区；3A~3D为P3区；-为不存在5'和3'端氨基酸平均差异率

表3 2002—2010年CA24v流行株与国内外流行株的全序列氨基酸差异比较

毒株	VP4				VP2								VP3				VP1									
	18	60	62	64	112	114	141	142	215	222	227	228	229	234	248	398	417	418	486	591	605	612	631	636	669	680
Singapore/EH24/70	V	I	L	S	D	R	T	S	I	K	S	S	T	E	L	V	G	K	D	S	L	S	V	I	M	E
Jamaica/10628/87	I	V	D	.	A	A	.	I	.	A	E	T	S	P	A	V	I	.
Dominican Republic/10630/93	.	.	I	N	.	.	D	.	A	T	.	.	.	A	.	T	S	P	A	V	I	.
Ningbo/3/02	.	.	I	T	.	K	K	.	V	.	D	N	A	A	.	.	S	A	.	T	P	L	A	V	I	D
Singapore/DSO-52/05	.	.	I	T	.	K	K	.	V	.	D	N	A	A	.	.	S	A	.	T	H	L	A	V	I	D
Guangdong/01/10	.	.	I	T	N	K	K	.	V	R	D	N	A	T	I	.	.	A	E	T	H	L	A	V	I	D
Zhejiang/08/10	.	.	I	T	.	K	K	.	V	.	D	N	A	A	.	.	.	A	E	T	H	L	A	V	I	D

毒株	VP1										2A															
	683	726	731	776	800	804	830	836	868	881	914	918	926	929	935	942	945	947	954	956	960	968	973	987	989	1022
Singapore/EH24/70	K	T	Y	I	K	V	F	I	F	N	D	R	M	S	S	N	T	V	K	Y	T	Y	D	M	F	I
Jamaica/10628/87	.	A	H	M	R	A	Y	T	L	.	G	S	I	N	T	.	A	F	E	.	.	.
Dominican Republic/10630/93	.	A	H	M	.	A	Y	T	.	.	S	S	I	.	T	S	A	M	.	H	.	F	E	.	.	
Ningbo/3/02	R	A	H	M	.	A	Y	T	.	.	S	D	I	N	T	S	A	.	.	.	F	E	V	.	V	
Singapore/DSO-52/05	R	A	H	M	.	A	Y	T	.	.	S	D	I	.	T	S	A	.	M	.	F	E	V	.	V	
Guangdong/01/10	R	A	H	M	.	A	Y	T	.	D	S	D	I	.	T	S	A	.	.	H	S	F	E	V	Y	
Zhejiang/08/10	R	A	H	M	.	A	Y	T	.	D	S	D	I	.	A	S	.	.	.	H	S	F	E	V	Y	

毒株	2B										2C																	
	1054	1061	1069	1070	1083	1090	1106	1110	1120	1123	1125	1137	1167	1169	1179	1180	1187	1207	1234	1239	1282	1317	1371	1388	1442	1446	1447	
Singapore/EH24/70	N	S	S	S	I	S	L	Y	A	V	E	L	R	I	I	T	I	I	S	T	E	N	N	I	V	R	N	
Jamaica/10628/87	S	.	N	.	V	N	.	C	T	I	G	M	K	.	.	S	M	.	F	.	.	.	S	.	I	K	.	
Dominican Republic/10630/93	S	.	N	.	V	N	.	C	T	I	G	M	K	.	.	S	M	.	F	.	D	.	.	I	K	.		
Ningbo/3/02	S	T	N	.	V	N	.	C	T	I	G	M	K	.	V	S	M	I	K	S		
Singapore/DSO-52/05	S	T	N	.	V	N	.	C	T	I	G	M	K	.	V	V	S	M	.	.	I	.	.	.	I	K	.	
Guangdong/01/10	S	T	N	T	V	N	S	C	T	I	G	M	K	.	V	S	M	V	D	.	V	I	K	S
Zhejiang/08/10	S	T	N	T	V	N	.	C	T	I	G	M	K	.	V	S	M	V	I	K	S

毒株	3A										3B				3C										
	1469	1470	1473	1491	1501	1505	1506	1507	1513	1514	1523	1536	1560	1564	1578	1585	1622	1624	1638	1662	1668	1684	1709	1721	1730
Singapore/EH24/70	V	M	I	S	K	A	R	L	M	E	I	V	S	V	V	I	K	V	T	T	N	V	N	I	M
Jamaica/10628/87	M	R	.	.	.	V	K	.	V	.	.	.	G	I	I	V	.	.	A	.	H	.	.	.	
Dominican Republic/10630/93	M	R	V	N	R	V	K	V	V	.	.	.	G	I	I	V	.	I	A	.	H	.	.	.	
Ningbo/3/02	L	K	.	.	.	V	K	.	V	.	V	.	.	I	.	V	.	I	.	I	H	V	I	.	
Singapore/DSO-52/05	L	K	.	.	.	V	K	.	V	.	V	I	.	I	.	V	R	.	I	.	I	H	V	I	
Guangdong/01/10	L	K	.	.	.	V	K	.	V	.	V	.	.	I	.	V	.	I	.	S	I	H	V	I	
Zhejiang/08/10	L	K	.	.	.	V	K	.	V	D	V	.	.	I	.	V	.	I	I	.	I	H	V	I	

毒株	3D																										
	1763	1774	1785	1786	1790	1795	1798	1825	1840	1846	1875	1876	1884	1889	1892	1900	1919	1950	1958	1963	2004	2015	2064	2114	2124	2141	2189
Singapore/EH24/70	K	S	H	V	A	V	K	E	S	E	A	M	L	R	K	T	T	A	V	V	M	V	K	A	V	V	V
Jamaica/10628/87	.	.	.	I	V	.	R	.	.	S	.	L	.	K	.	.	.	I	.	I	.	R	T	.	I	I	.
Dominican Republic/10630/93	V	.	R	G	.	.	T	A	S	.	I	I	I	.
Ningbo/3/02	.	.	Y	.	V	A	I	.	.	I	I	.
Singapore/DSO-52/05	.	.	Y	.	V	A	.	.	T	A	I	.	.	I	I	I	.
Guangdong/01/10	Q	R	Y	.	V	R	A	.	T	.	I	.	I	.	I	.	I	.
Zhejiang/08/10	.	.	Y	.	V	M	.	R	A	.	T	.	.	.	I	.	.	I	I	I

注：L:亮氨酸；I:异亮氨酸；F:苯丙氨酸；R:精氨酸；E:谷氨酸；Q:谷氨酰胺；K:赖氨酸；H:组氨酸；T:苏氨酸；G:甘氨酸；S:丝氨酸；A:丙氨酸；D:天冬氨酸；N:天冬酰胺；Y:酪氨酸；V:缬氨酸；P:脯氨酸；M:蛋氨酸；C:半胱氨酸；W:色氨酸；“.”表示在同一位点上流行株的氨基酸与Singapore/EH24/70相同

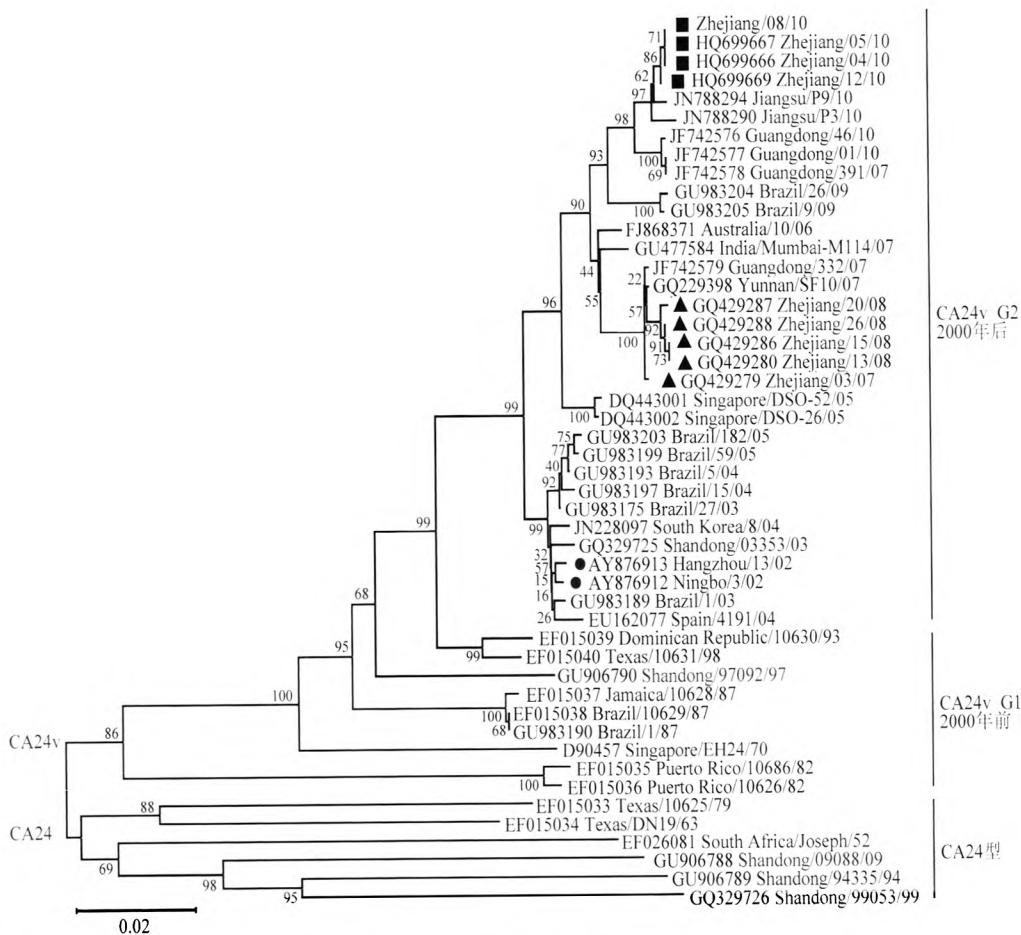
值为 $2.303 \times 10^{-7} \sim 7.530 \times 10^{-3}$ 。同时,采用 SimPlot 3.5.1 软件对潜在重组序列进行相似性和 BOOTSCAN 验证(图3),结论与 RDP 3.0 软件检测到的重组结果一致。

讨 论

当前 CA24v 已成为许多国家与地区 AHC 暴发和流行的主要病原体^[21,22]。近 10 年来,我国也多次发生 CA24v 引起的 AHC 较大范围流行,波及北京、

浙江、广西、云南、海南和广东等地^[23]。AHC 传染性强,且由于抗体在感染者体内持续存在时间不长,造成大量人群对 AHC 易感,导致不断发生暴发和流行。通常关于 CA24v 基因特性的研究,大多集中在 VP1 区与 3C 区上。本研究发现非结构区的 2A 区与 3A 区的氨基酸平均差异率,几乎是 VP1 区与 3C 区的 2 倍,此外部分 CA24v 毒株的 3D 区也发现重组。上述现象的生物学意义目前尚不清楚。

总体而言,CA24v 全序列氨基酸较为稳定,尤其



注：●、▲、■ 分别表示浙江 2002、2003—2009、2010 年的 CA24v 流行株

图 1 2002—2010 年浙江省 CA24v 分离株 VP1 区核苷酸序列进化树

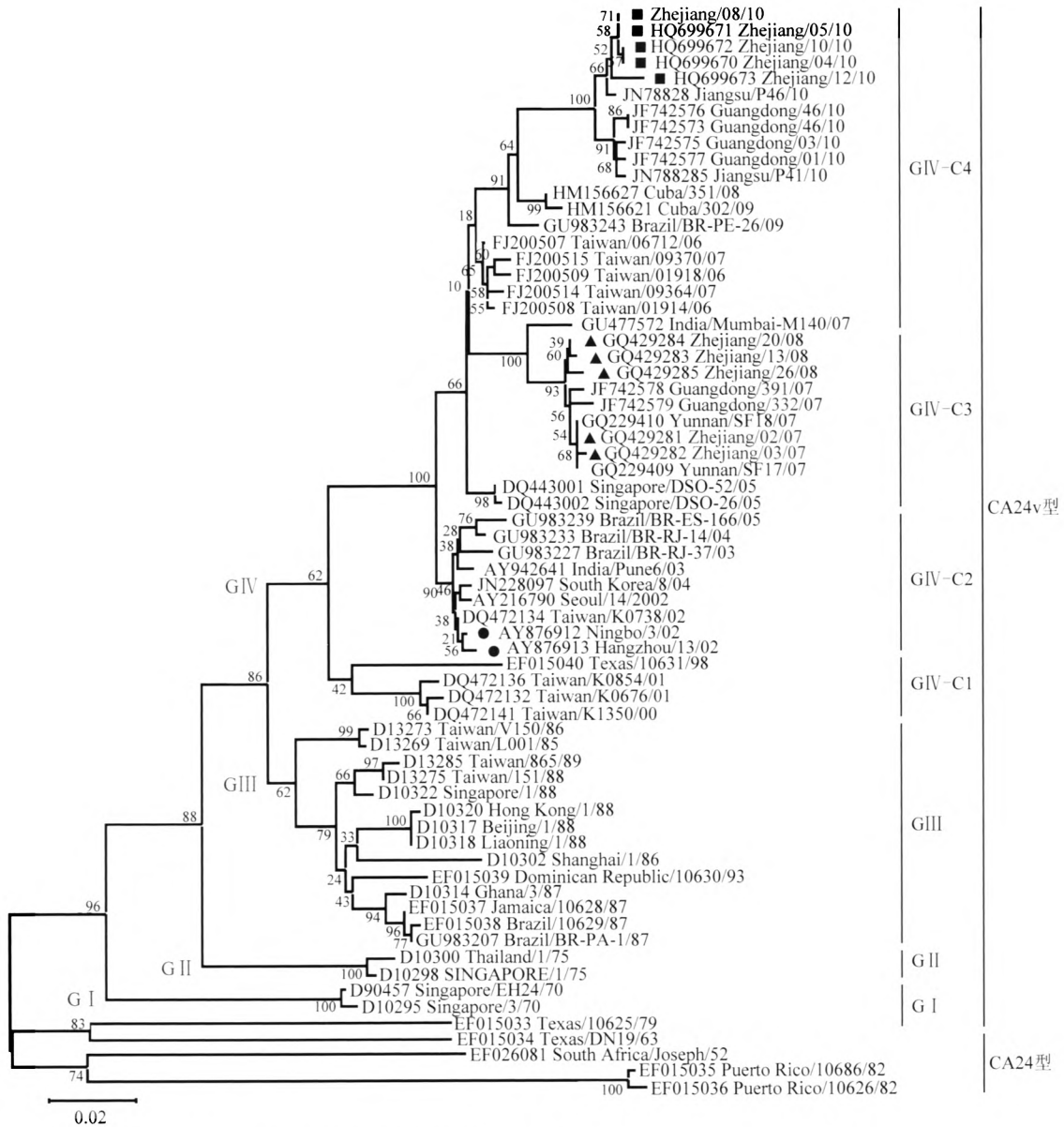
近 8 年来 CA24v 株变异很小。VP1 是肠道病毒的核衣壳蛋白，含有重要的抗原位点，在自然选择的压力下，较非结构蛋白 3C 区进化更快^[24]，从 CA24v 株的遗传距离的比较上，也可看出 3C 区较 VP1 区更为稳定。本研究表明不同地区或不同时期分离的 CA24v 株存在一定差异，总体上以时间序列为主，逐年进化，如 Zhejiang/08/10 与 1993 年分离的 CA24v 株全编码序列氨基酸同源性达 97.6%，与 2002 年分离株的全序列氨基酸同源性却达 99.1%。CA24v 流行株在地域之间，虽然也存在一定差异，但影响较小，如 Zhejiang/08/10 与 8 年前分离的 Ningbo/3/02 株全序列氨基酸同源性达 99.1%，而与同年分离的 Guangdong/01/10 的氨基酸同源性为 99.2%。此外，浙江 CA24v 的 2010 年分离株较 2002 年分离株在内部核糖体结合位点上存在核苷酸的插入，这种变异

可能对 CA24v 的翻译产生一定影响^[25,26]。

根据分离株的 3C 区序列进化树，将全球的 CA24 毒株分为 CA24 型和 CA24v 型，CA24v 型又进一步被分为 3 个基因型(G I ~ G III)^[27]，近年来有学者又将其分为 4 个基因型(G I ~ G IV)^[28]，根据毒株流行年代 G III 和 G IV 基因型又可进一步分为不同进化支。CA24v 型分离株在 3C 进化树上时间效应明显，整个进化树按照毒株流行的年代划分为几大进化分支，G I ~ G III 为 2000 年以前的分离株，G IV 为 2000 年后的分离株^[28]。3C 进化树上同时也存在一定的地域性，如 2010 年浙江 5 株 CA24v 株与 2010 年广东 4 株 CA24v 株分别在 G IV-C4 分支上聚集成 2 个不同的小簇。CA24v 3C 区进化树显示，浙江省 2002、2007—2008 和 2010 年 CA24v 分离株分别位于 G IV 亚型的 C2、C3 和 C4 分支上，相互间有较密切亲

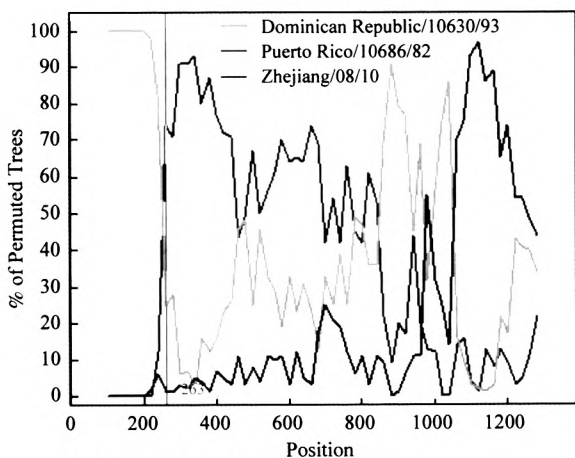
表 4 不同时间 CA24v 流行株在 VP1 区和 3C 区基因上遗传距离的分析

年份	VP1 区			3C 区			全序列		
	2002—2004 年	2005—2007 年	2008—2010 年	2002—2004 年	2005—2007 年	2008—2010 年	2002—2004 年	2005—2007 年	2008—2010 年
2002—2004	0.011	-	-	0.009	-	-	0.007	-	-
2005—2007	0.037	0.034	-	0.032	0.025	-	0.028	0.021	-
2008—2010	0.053	0.038	0.027	0.046	0.047	0.032	0.050	0.046	0.017



注：●、▲、■分别表示浙江2002、2003—2009、2010年的CA24v流行株

图2 2002—2010年浙江省CA24v分离株3C区核苷酸序列进化树



注：竖线示RDP3.0软件检测到的重组断点

图3 重组子序列Jamaica/10628/87及其母序列3D区BOOTSCAN分析

缘关系,因此可推测,自2002年以来由CA24v引起的AHC一直在浙江本地散在流行,并存在一定程度的变异与进化。

CA24原型株是1952年分离于南非的Joseph株^[8, 29, 30],从VP1区系统进化树上可见,山东省在1994、1999和2009年的分离株与该株的亲缘关系很近,但这些毒株并非来自AHC疫情,而均来自急性弛缓性麻痹疑似患者的粪便分离物^[24],表明CA24的原型株并非引起AHC的病原,而仅仅是与引起AHC疫情的CA24v亲缘关系较近的肠道病毒。此外,从3C区系统进化树可见,1982年分离于波多黎各的2株病毒均在CA24分支上,但在VP1区系统进化树上却在CA24v G1分支的边缘,提示该毒株与

CA24原型株存在较近的亲缘关系。

肠道病毒中普遍存在重组现象,常发生在基因组的非结构区域^[31-33]。目前GenBank上CA24毒株全基因序列资料有限,对现有资料的研究发现,同属肠道病毒的CA24v,仅在部分早年流行的CA24v毒株的3D非结构区中发生重组,近年分离的毒株中并未发现这一现象。

参 考 文 献

- [1] Park K, Lee K, Lee J, et al. Acute hemorrhagic conjunctivitis epidemic caused by coxsackievirus A24 variants in Korea during 2002–2003. *J Med Virol*, 2006, 78: 91–97.
- [2] Cabrerizo M, Echevarria JE, Otero A, et al. Molecular characterization of a coxsackievirus A24 variant that caused an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Spain, 2004. *J Clin Virol*, 2008, 43: 323–327.
- [3] Wu D, Ke CW, Mo YL, et al. Multiple outbreaks of acute hemorrhagic conjunctivitis due to a Variant of coxsackievirus A24: Guangdong, China, 2007. *J Med Virol*, 2008, 80: 1762–1768.
- [4] Khan A, Sharif S, Shaikat S, et al. An outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC) caused by coxsackievirus A24 variant in Pakista. *Virus Res*, 2008, 137(1): 150–152.
- [5] Ghazali O, Chua KB, Ng KP, et al. An outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Melaka, Malaysia. *Singapore Med J*, 2003, 44(10): 511–516.
- [6] The Healthy Ministry of the People's Republic of China (WS 217–2008) The Health Industry Standard of the People's Republic of China. Acute hemorrhagic conjunctivitis diagnostic criteria and principles. Appendix B: Acute hemorrhagic conjunctivitis laboratory testing. Beijing: People's Medical Publishing house, 2009: 4–5. (in Chinese)
中华人民共和国卫生部(WS 217–2008) 急性出血性结膜炎诊断标准及处理原则 附录B: 急性出血性结膜炎的实验室检测. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 4–5.
- [7] Yan JY, Chen Y, Li Z, et al. Study on the pathological and molecular characteristics of AHC epidemic in Zhejiang province in 2010. *Chin J Virol*, 2011, 27(5): 421–426. (in Chinese)
严菊英, 陈寅, 李榛, 等. 2010年浙江省部分地区急性出血性结膜炎暴发疫情病原学研究. *病毒学报*, 2011, 27(5): 421–426.
- [8] Betty AB, Kai JM, Mary RF, et al. Resolving ambiguities in genetic typing of human enterovirus species C clinical isolates and identification of enterovirus 96, 99 and 102. *Gen Virol*, 2009, 90: 1713–1723.
- [9] Yan JY, Lu YY, Xu CP, et al. Rapid detection of enterovirus with TaqMan real-time RT-PCR. *Chin J Public Health*, 2007, 23(7): 818–820. (in Chinese)
严菊英, 卢亦愚, 徐昌平, 等. 肠道病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 法快速检测. *中国公共卫生*, 2007, 23(7): 818–820.
- [10] Lévêque N, Amine IL, Tchong R, et al. Rapid diagnosis of acute hemorrhagic conjunctivitis due to coxsackievirus A24 variant by real-time one-step RT-PCR. *J Virol Meth*, 2007, 142: 89–94.
- [11] Giovanni MS, Luisa M, Arturo F, et al. Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *Clin Microbiol*, 1993, 31(5): 1345–1349.
- [12] Rychlik W, Rhodes RE. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(21): 8543–8551.
- [13] Rychlik W. Priming efficiency in PCR. *Biotechniques*, 1995, 18(1): 84–90.
- [14] Delidow BC, Lynch JP, Peluso JJ, et al. Polymerase Chain reaction: basic protocols. *Methods Mol Biol*, 1993, 15: 1–29.
- [15] Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*, 1993, 15: 31–40.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. Mega4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [17] Martin DP, Lemey P, Lott M, et al. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2462–2463.
- [18] van Der Sanden S, van Eek J, Martin DP, et al. Detection of recombination breakpoints in the genomes of human enterovirus 71 strains isolated in the Netherlands in epidemic and nonepidemic years, 1963–2010. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(5): 886–894.
- [19] Zhang SL, Xu BL, Guo WS, et al. Complete genome sequencing of enterovirus 71 (EV71) HENAN08 strain isolated in Henan province. *Chin J Epidemiol*, 2009, 30(9): 938–941. (in Chinese)
张绍丽, 许汴利, 郭万申, 等. 河南省手足口病例肠道病毒71型分离株的全基因组序列分析. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(9): 938–941.
- [20] Yoke-Fun C, Abubakar S. Phylogenetic evidence for intertypic recombination in the emergence of human enterovirus 71 subgenotypes. *BMC Microbiol*, 2006, 6: 74.
- [21] Mirkovic RR, Schmidt NJ, Yin-Murphy M, et al. Enterovirus etiology of the 1970 Singapore epidemic of acute conjunctivitis. *Intervirology*, 1974, 4(2): 119–127.
- [22] Oh M, Park S, Choi Y, et al. Acute hemorrhagic conjunctivitis caused by coxsackievirus A24 variant, South Korea, 2002. *J Emerg Infect Dis*, 2003, 89: 91–97.
- [23] Chang ZR, Zhang J, Wang ZJ. Analysis on epidemic feature of acute hemorrhagic conjunctivitis from 2004 to 2008 in China. *Chin J Public Health Management*, 2009, 25(3): 268–270. (in Chinese)
常昭瑞, 张静, 王子军. 2004—2008年全国急性出血性结膜炎流行特征分析. *中国公共卫生管理*, 2009, 25(3): 268–270.
- [24] Zhang Y, Li Z. The etiology and research progress of acute hemorrhagic conjunctivitis. *Chin J Vacc Immun*, 2011, 17(6): 555–559. (in Chinese)
张岩, 李忠. 急性出血性结膜炎的病原学及研究现状. *中国疫苗和免疫*, 2011, 17(6): 555–559.
- [25] Lin JY, Shih SR, Pan M, et al. hnRNP A1 interacts with the 5' untranslated regions of enterovirus 71 and Sindbis virus RNA and is required for viral replication. *J Virol*, 2009, 83(12): 6106–6114.
- [26] Wu D, Zheng HY, Li H, et al. Phylogenetic and molecular characterization of coxsackievirus A24 variant isolates from a 2010 acute hemorrhagic conjunctivitis outbreak in Guangdong, China. *Virol J*, 2012, 9: 41.
- [27] Leveque N, Amine IL, Cartet G, et al. Two outbreaks of acute hemorrhagic conjunctivitis in Africa due to genotype III coxsackievirus A24 variant. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006, 26: 199–202.
- [28] Chua PY, Keb GM, Chang CH, et al. Molecular epidemiology of coxsackie A type 24 variant in Taiwan, 2000–2007. *J Clin Virol*, 2009, 45: 285–291.
- [29] Rosen L, Melnick J, Schmidt J, et al. Subclassification of enterovirus and ECHO virus type 34. Brief report. *Arch Gesamte Virusforsch*, 1970, 30(1): 89–92.
- [30] World Health Organization. The work of WHO virus of reference centres and the services the provide. Geneva: World Health Organization, 1968: 11.
- [31] Chan YF, Sam IC, AbuBakar S, et al. Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences. *Infect Genet Evol*, 2010, 10(3): 404–412.
- [32] Oberste MS, Maher K, Pallansch MA, et al. Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J Virol*, 2004, 78(2): 855–867.
- [33] Lukashev AN, Lashkevich VA, Ivanova OE, et al. Recombination in circulating human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 12): 3281–3290.

(收稿日期: 2012-11-29)

(本文编辑: 张林东)