

計畫編號：DOH93-DC-2006

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

呼吸道腺病毒監測計畫

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局 研究檢驗中心

計畫主持人：陳豪勇

研究人員：陳豪勇、林智暉、邱淑君、林永政

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

頁 碼

封面 1

目錄 2

一、 中文摘要 3

二、 英文摘要 4

三、 前言 5

四、 材料與方法 7

五、 結果 10

六、 討論 11

七、 參考文獻 12

八、 圖、表 15

共 (18) 頁

摘要：

呼吸道腺病毒主要感染對象為嬰幼兒，兒童及青少年，感染大多發生在冬、春兩季。人類腺病毒目前有 51 種血清型，6 個亞屬(A~F)，造成呼吸道方面感染的腺病毒主要為亞屬 B 的血清型 3、7、14、35；亞屬 C 的血清型 1、2、5 及亞屬 E 的血清型 4，其中以亞屬 B 之血清型 7 最常造成肺炎等嚴重病症，進而造成病患死亡。腺病毒在國內為嬰幼兒呼吸道感染的第三位，僅次於腸病毒及呼吸道融合病毒。本次研究所使用之檢體為 1999~2004 年間本局呼吸道病毒實驗室所分離之腺病毒分離株共 125 株，血清型分析是利用聚合酶連鎖反應將病毒核酸放大後進行序列分析，所得之序列與 GenBank 上之序列進行比對用以確定基因型。而確定為腺病毒第七型之分離株再以限制酶 *Bam* H I 進行限制酶片段多型性分析來區分其基因型，以了解國內優勢之腺病毒第七型。研究期間以腺病毒第三型為主要的分離株 (54.4%)，其次為腺病毒第一型的 12.8%。並且在 2002 年時腺病毒出現一波以第三型為主的高峰，在腺病毒第七型限制酶片段多型性分析方面發現只有一種基因型(7b)存在。利用此監測計畫所得到的結果，可提供防疫上之重要參考，並且可以用於快速檢驗方法研發之參考。

關鍵字：腺病毒、血清型、限制酶片段多型性分析

Abstract

Respiratory adenoviruses infections mostly occur in infants, young children and adolescent in winter and spring season. It comprise 51 stereotypes and grouped into 6 subgenera, A to F. Respiratory infections of adenoviruses are usually caused by stereotypes from subgenus B(Ad 3, Ad 7, Ad 14, Ad 35), subgenus C (Ad 1, Ad 2, Ad 5), and subgenus E (Ad 4). Adenovirus type 7 is one of the most common causative agents of severe illness, such as pneumonia and death. In Taiwan, adenovirus is the third causation for the respiratory infections in infants and young children, just behind enterovirus and respiratory syncytial virus.

A total 125 positive specimen were collected and isolated from respiratory virus laboratory of Center for Disease Control, Taiwan, during 1999 to 2004. In this study we used polymerase chain reaction (PCR) and sequence to obtain correct serotype (to compare by GenBank). Further, we proceed the restriction fragment length polymorphism (RFLP) for genotype Ad 7.

Serotype data shown the Ad3 (54.4%) is the main isolates in this study and Ad1 (12.8%) is the second. Furthermore, we found an Ad 3 peak in 2002. RFLP analysis suggests only one genotype Ad 7(7b) in Taiwan. Summarize the outcomes, we provide important information about the trend of respiratory adenovirus infections and the Ad7 genotypes during 1999~2004 in Taiwan. This information is important for the control measure of the diseases, as well as provides the information of rapid test development.

Keywords : Adenovirus 、 Serotype 、 restriction fragment length polymorphism

前言：

人類腺病毒屬於腺病毒科(Adenoviridae)中的 Mastadenovirus 屬，由 Rowe 等人在 1953 年所分離出，1956 年正式定名為腺病毒。其病毒顆粒為大小約 70 ~ 90 nm，不具外套膜的正二十面體，其中 DNA 佔 13% 蛋白質佔 87%，對乙醚、酸、熱具有抗性，由 252 個蛋白鞘 (capsomeres) 所組成，252 個蛋白鞘中有 240 個 hexon 及 12 個 pentons 構成。核酸為直線型雙股 DNA，大小約 35~36 Kb (Douglas et al., 1997)。目前人類之腺病毒共分成 6 個亞屬(A~F)及 51 種血清型 (Douglas et al., 1997, Videla et al., 1999, Wadell et al., 2000)。

腺病毒之感染常見於春、冬兩季，主要是透過由飛沫、糞口及接觸等途徑造成感染，潛伏期平均為 10 天，腺病毒感染所造成的疾病有，類流感症狀、急性呼吸道感染、角膜結膜炎、腸胃炎等。另外在嬰幼兒或免疫缺陷病患則容易造成嚴重的肺炎症狀，進而導致病患死亡(Palomino et al., 2000; Carballal et al., 2002)。又由於其透過飛沫傳播故容易在團體中爆發感染，例如軍隊之新兵中心及學校等。呼吸道方面之腺病毒感染主要由亞屬 B 的血清型 3、7、14、35；亞屬 C 的血清型 1、2、5 及亞屬 E 的血清型 4(Wadell et al., 1984, Douglas et al., 1997; Videla et al., 1999, Erdman et al., 2002, Kolavic-Gray et al., 2002)。雖然腺病毒並非法定傳染病，但根據國衛院台南病毒實驗室與成大醫學院在 2001 年發表的文獻指出，腺病毒是造成兒童呼吸道感染的第三大病毒，僅次於腸病毒及呼吸道融合病毒(Tsai et al, 2001)。另外根據國外的文獻回顧，腺病毒亞屬 B 中的血清型第 7 型常與嚴重及致死的呼吸道感染有關(Nahmias et al., 1967; Kajon et al., 1996; Carballal et al., 2002)，且鄰近之日本、韓國近年來亦有腺病毒血清型 7 分離率增加的文獻 (Yamadera et al., 1998, 2000, Hong et al., 2001, Ikeda

et al., 2003) ，而在國內高雄醫學大學病毒實驗室最近的一篇文獻也指出在國內亦有腺病毒血清型 7 分離率增加的趨勢 (Lin KH et al., 2004) ，故有必要將局內之呼吸道腺病毒分型並進一步嘗試發展快速檢驗方法。

目前腺病毒分型之方法包括中和試驗、聚合酶連鎖反應、限制酶片段多型性分析、序列分析等(Wadell et al., 1987, Li et al., 1996, Fujimoto et al., 1998, Saito-Inagawa et al., 1996, Xu et al., 2000, Heim et al., 2003) ，本次研究則是利用聚合酶連鎖反應放大腺病毒之部分 Hexon 基因，然後以序列分析來對腺病毒加以分型，以達到最正確之分型結果。

材料與方法：

1. 腺病毒之分離：

研究所使用的病毒株為 1999 年 2004 年間，本局呼吸道病毒實驗室所分離之腺病毒。病毒培養使用 H292 細胞株，H292 細胞株以添加 5% fetal calf serum、1% Penicillin-Streptomycin 及 1% Fungizone 之 RPMI 1640 作為生長培養基培養，接種檢體後培養於 35°C，5 % CO₂ 培養箱，一樣以添加 5% fetal calf serum、1% Penicillin-Streptomycin 及 1% Fungizone 之 RPMI 1640 作為維持培養基。接種後每天觀察細胞病變當產生 90% 以上細胞病變則將細胞培養管以 3000rpm 離心 15 分鐘，收取上清液，儲存於-80°C 備用。

2. 腺病毒之鑑定(免疫螢光染色；Immunofluorescence antibody test)：

將病毒接種於 H292 細胞中，待細胞株被腺病毒感染產生 95% 以上的 CPE 時，將細胞培養管以 3000rpm 離心 15 分鐘，收取上清液。離心沉澱之細胞以加入 1 毫升磷酸緩衝液(PBS)後，混合成細胞懸浮液，取出 10 µl 的細胞懸浮液作成抹片，乾燥後以冰的 Acetone 固定 10 分鐘，取出在室溫中乾燥，以單株抗體進行免疫螢光染色，染色後，以螢光顯微鏡進行鏡檢，細胞呈現蘋果綠螢光則判定為腺病毒陽性。

3. 病毒核酸萃取：

病毒核酸萃取依目的之不同分成兩種(1)以商業試劑萃取(2)以傳統 Phenol/chloroform/ iso- amylalcohol 進行萃取。前者為 PCR 反應用；後者則是用於 RFLP 反應，因 RFLP 反應需要大量且完整之病毒 DNA 故採用傳統核酸萃取方法萃取。

(1)以商業試劑萃取：

係以 QIAGEN 的 QIAamp DNA Mini kit 或 ROCH 的 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid kit

(2) 傳統 Phenol/ chloroform/ isoamylalcohol 核酸萃取：

係依照 1986 年 Lin 等所發表 (Lin et al., 1986) 的步驟進行，其步驟如下：

將 multiplicity of infection (m.o.i.) 為 1 ~ 10 的腺病毒加入培養於 75 ml bottle 的 HeLa 細胞中培養，待細胞產生 95% 以上 CPE 後用細胞刮勺將細胞刮下，收集到之細胞置於 10 ml 離心管中，以 1000 rpm 離心 10 分鐘將上清液丟棄，沉澱之細胞以 PBS 清洗後加入 2 ml 的 Tris-EDTA (Tris- ethylenediaminetetraacetic acid) buffer (0.05 M Tris ; 0.01 M EDTA) 中，混合成細胞懸浮液。取 250 μ l 細胞懸浮液加入 10% 的 SDS (sodium dodecyl sulfate) 及 proteinase K (終濃度 100 μ g/ml)，置於 65 $^{\circ}$ C 1 到 1.5 小時，將細胞消化。加十分之一體積的 3M NaOAc，再加入等體積的 Phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 萃取三次，每次輕搖使其混合均勻後以 14000 rpm 離心 5 分鐘，水層再以兩倍體積的氯仿萃取兩次，將其置於 65 $^{\circ}$ C 短暫加熱(約 10~15 分鐘)，將水層中之微量氯仿移除。萃取出之水層加入 RNase 使終濃度為 100 μ g/ml 於 65 $^{\circ}$ C 中作用 30 到 40 分鐘以去除 RNA。作用完後再重複上述 P/C/I 及氯仿之萃取步驟一次。然後取水層加 2.5 倍體積的冰絕對酒精，置於-80 $^{\circ}$ C 10 分鐘，然後於 4 $^{\circ}$ C 以 14000 rpm 離心 20 分鐘將 DNA 沉澱下來，沉澱的 DNA 以 70% 酒精清洗兩次後，乾燥後溶於 500 μ l TE buffer (Tris-0.01M ; EDTA-0.001M) 中備用。

4. 腺病毒分型：

腺病毒以位於腺病毒 hexon 區域的引子對進行 PCR 之放大，50 μ l 反應液中包含病毒 DNA 0.3 μ g，10 mM Tris-HCl (pH8.3)，50 mM KCl，1.5 mM MgCl₂，每一種 primer 0.5 μ M，dNTP 200 μ M，Taq polymerase 1

unit。PCR 反應條件為先以 94°C，7 分鐘進行變性，而後以 94°C 1 min，50°C 1 min，72°C 2 min 為一循環，進行 36 循環，最後一個循環以 72°C 7 min 延伸產物，產物為 956 bp (Saito-Inagawa et al., 1996)。放大後之產物則進行序列分析，使用 BLAST 進行比對，區分血清型。

引子之序列為：

AdnU-S' 5'-TTCCCCATGGCNCACAACAC-3'

AdnU-A 5'-GCCTCGATGACGCCGCGGTG-3'

5. 基因型分析：

腺病毒血清型 7 之基因型分析使用 RFLP 法進行。以傳統 Phenol/chloroform/ iso- amylalcohol (25:24:1)方法所萃取出之病毒 DNA，經分光光度計定量後，進行 RFLP 分析，在 30 µl 反應液中包含有 3 麴g 的病毒 DNA、20 U 的限制酶、10 倍限制酶緩衝液、BSA。依限制酶不同而置於理想反應溫度水浴中作用 4~6 小時。取出反應物於 TBE buffer 中進行 1 % agarose gel 電泳 (50 伏特，12 小時) 並以 λ *Hind* III 及 φ x174 *Hinc* II 作 marker，經 0.5 麴g/ ml 的 ethidium bromide 染色，UV 下觀察並照相，經 RFLP 後與先前發表之文獻作比對 (Li et al., 1986,1996)，已確定其基因型，本次研究則採用 *Bam* H I 限制酶區分出腺病毒血清型 7 之基因型。

6. 快速檢驗方法與標準品製備：

快速試驗建立方面，我們使用 Heim 所發表的 Real-time PCR 來測試是否可以應用於臨床檢驗之用(Heim A et al.,2003)，故利用分離株及臨床檢體作測試，以確立快速檢驗流程，另外並製備標準品用於定量 real-time PCR 使用。

結果：

目前研究完成 1999 ~2004 年間本局呼吸道病毒實驗室所分離出之腺病毒血清型 125 個分離株。經過 PCR 放大後，進行序列分析並與 GenBank

上之參考序列進行比對分型，計劃執行期間共分離出十種血清型，其中以血清型亞屬 B 為主(62.4%；Ad 3 有 68 株、Ad 7 有 5 株、Ad 11 有 1 株、Ad 35 有 4 株)，其次為亞屬 C (26.4%；Ad 1 有 16 株、Ad 2 有 12 株、Ad 5 有 4 株、Ad 6 有 1 株)，亞屬 E (10.4%；Ad 4 有 13 株)，亞屬 D (0.8%；Ad 8)則只有一株被分離出(表一)。將各年度腺病毒分離的情況作一統計可以發現 1999~2001 年腺病毒的分離並沒有很大的變化，而在 2002 年時則有一波以 Ad 3 為主要的分離株高峰，然後在此波高峰過後，腺病毒的分離數就減少許多(表一，圖一)

在 Ad 7 的限制酶片段多型性分析方面，將所分離出之五株 Ad 7 以傳統核酸萃取方法萃取腺病毒之完整核酸，並以限制酶 *Bam H I* 進行基因切割，切割後圖譜與文獻之圖譜比較，比對結果發現五株 Ad 7 的分離株都是屬於 7b 基因型(圖二)。

在快速試驗建立方面，分離株使用文獻之引子及探針(Heim A et al.,2003)可以偵測到有病毒存在，但是在使用臨床檢體檢驗時發現可能出現非特異性的訊號。

討論：

根據文獻的回顧，可以知道的是日本以及韓國近年來都有腺病毒分離增加的情形，並且多是以 Ad 7 為主(Yamadera et al., 1998, 2000, Hong et al., 2001, Ikeda et al., 2003) ，而在國內高醫的一篇文獻亦指出了腺病毒在 1999 年也出現分離率增加的情況 (Lin KH et al., 2004) ，所以我們亦將本局所分離出的 1999~2004 年間所分離出之腺病毒作一回溯及監視計畫，在我們的結果並沒有發現 Ad 7 有明顯的上昇，這樣的結果與高醫的報告有些許的不同。另外在我們在 2002 年也發現一波由 Ad 3 為主的分離率增加(表一、圖三)。在 Ad 7 的基因型分析方面，我們所分離出的五株 Ad 7 經過限制酶 *Bam H I* 切割，以 50 伏特進行 12 小時的電泳，所得到的限制酶圖譜與文獻上的參考圖譜比較得知，我們的五株分離株皆是屬於 7b 基因型，比較高醫的文獻在南部地區近年來也都是 Ad 7 也都是以 7b 基因型出現，只有在 1983 有一株 Ad 7a (Lin KH et al., 2004)，回顧文獻可知 7b 基因型是廣泛存在的一種基因型，主要的流行區域為北美及歐洲(Wadell et al.1984, 1987,2000)，近年來北美區域也出現不少 7d2 基因型(Erdman et al.,2002)，或許有機會北美區域的流行株將會由 7b 基因型轉變成 7d2 基因型。另外文獻指出在中國大陸及日本的流行株是 7d (Li et al.,1996; Noda et al., 2002) ，也與台灣目前發現的流行株不同。

而在快速檢驗系統的建立方面，我們所測試的 Light cyclor real-time PCR 系統在分離株上有良好的表現，但是在臨床檢體上卻有時會發現非特異性的訊號產生，且執行的時間太長，因此下一步我們將發展敏感度更好且特異性更優良之 real-time PCR 系統用於臨床未明原因呼吸道感染的檢驗。

參考文獻：

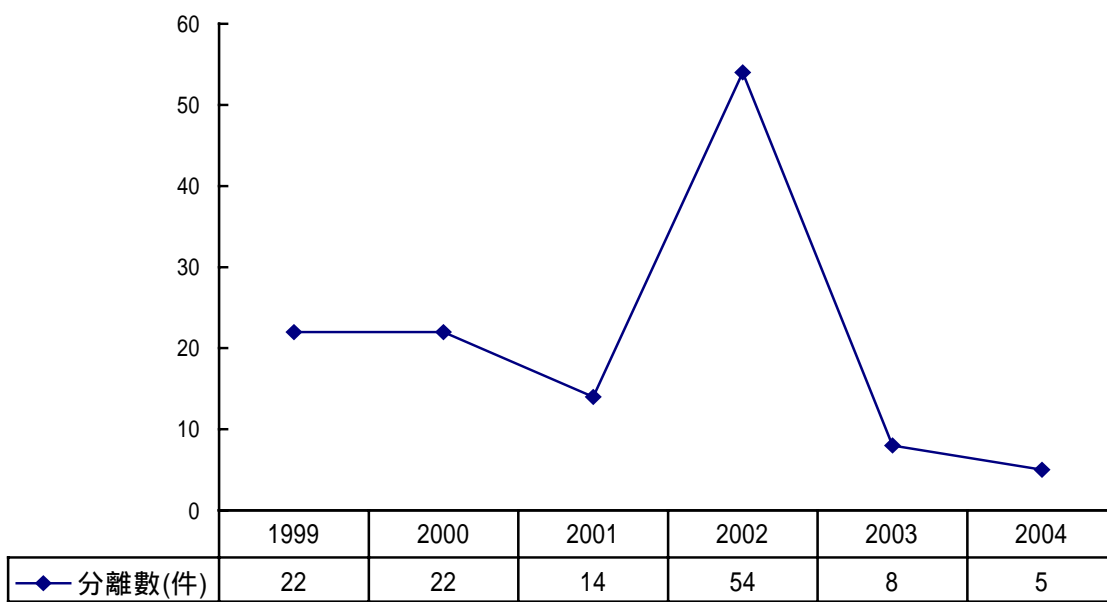
1. Carballal G, Videla C, Misirlian A, Requeijo PV, Aguilar Mdel C: Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. *BMC Pediatr* 2002, 2:6.
2. Chen HL, Chiou SS, Hsiao HP, Ke GM, Lin YC, Lin KH, Jong YJ: Respiratory adenoviral infections in children: a study of hospitalized cases in southern Taiwan in 2001--2002. *J Trop Pediatr* 2004, 50:279-284.
3. Douglas DR, Richard JW, Frederick GH..Adenovirus. *Clinical virology*. 1997, 525-547.
4. Erdman DD, Xu W, Gerber SI, Gray GC, Schnurr D, Kajon AE, Anderson LJ: Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. *Emerg Infect Dis* 2002, 8:269-277.
5. Fujimoto T, Chikahira M, Nishio O: Selective detection and differentiation of subgenus B adenoviruses (types 3, 7 and 11) by polymerase chain reaction. *Kansenshogaku Zasshi* 1998, 72:1202-1207.
6. Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom P: Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 2003, 70:228-239.
7. Hong JY, Lee HJ, Piedra PA, Choi EH, Park KH, Koh YY, Kim WS: Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis* 2001, 32:1423-1429.
8. Ikeda Y, Yamaoka K, Noda M, Ogino T: Genome types of adenovirus type 7 isolated in Hiroshima City. *J Med Virol* 2003, 69:215-219.
9. Kajon AE, Mistchenko AS, Videla C, Hortal M, Wadell G, Avendano LF: Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991-1994). *J Med Virol* 1996,

- 48:151-156.
10. Kolavic-Gray SA, Binn LN, Sanchez JL, Cersovsky SB, Polyak CS, Mitchell-Raymundo F, Asher LV, Vaughn DW, Feighner BH, Innis BL: Large epidemic of adenovirus type 4 infection among military trainees: epidemiological, clinical, and laboratory studies. *Clin Infect Dis* 2002, 35:808-818.
 11. Li QG, Wadell G: Analysis of 15 different genome types of adenovirus type 7 isolated on five continents. *J Virol* 1986, 60:331-335.
 12. Li QG, Zheng QJ, Liu YH, Wadell G: Molecular epidemiology of adenovirus types 3 and 7 isolated from children with pneumonia in Beijing. *J Med Virol* 1996, 49:170-177.
 13. Lin KH, Chow TY, Sheu MM, Huang WL, Chen CW: A rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA for restriction endonuclease cleavage studies. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi* 1986, 2:774-777.
 14. Lin KH, Lin YC, Chen HL, Ke GM, Chiang CJ, Hwang KP, Chu PY, Lin JH, Liu DP, Chen HY: A two decade survey of respiratory adenovirus in Taiwan: the reemergence of adenovirus types 7 and 4. *J Med Virol* 2004, 73:274-279.
 15. Nahmias AJ, Griffith D, Snitzer J: Fatal pneumonia associated with adenovirus type 7. *Am J Dis Child* 1967, 114:36-41.
 16. Noda M, Yoshida T, Sakaguchi T, Ikeda Y, Yamaoka K, Ogino T: Molecular and epidemiological analyses of human adenovirus type 7 strains isolated from the 1995 nationwide outbreak in Japan. *J Clin Microbiol* 2002, 40:140-145.
 17. Palomino MA, Larranaga C, Avendano LF: Hospital-acquired adenovirus 7h infantile respiratory infection in Chile. *Pediatr Infect Dis J* 2000, 19:527-531.
 18. Saitoh-Inagawa W, Oshima A, Aoki K, Itoh N, Isobe K, Uchio E, Ohno S,

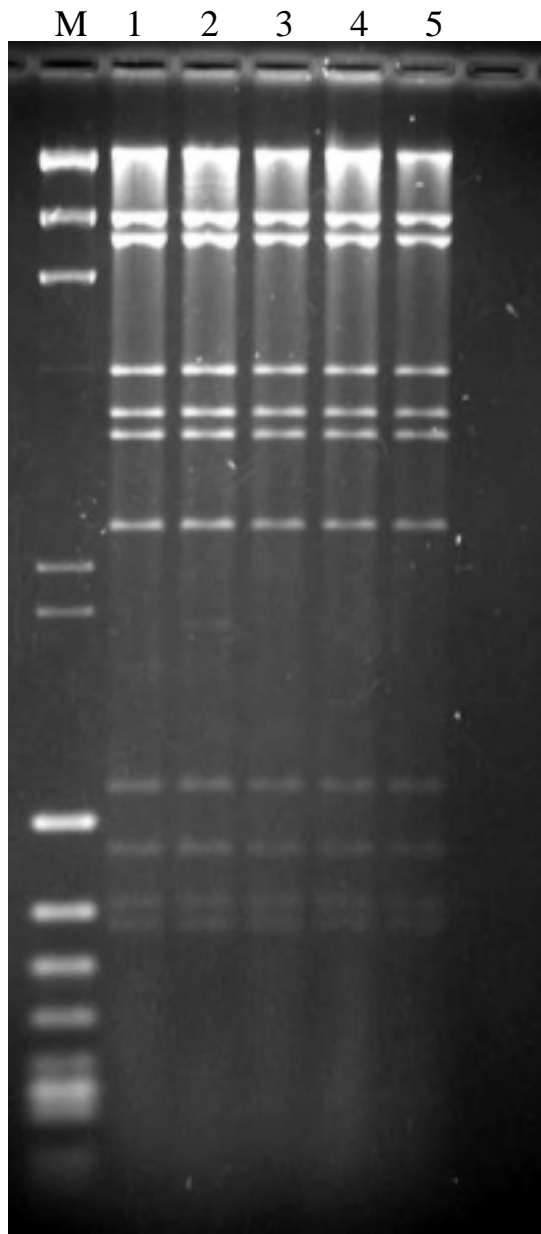
- Nakajima H, Hata K, Ishiko H: Rapid diagnosis of adenoviral conjunctivitis by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1996, 34:2113-2116.
19. Tsai HP, Kuo PH, Liu CC, Wang JR: Respiratory viral infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 2001, 39:111-118.
 20. Tsai HP, Kuo PH, Liu CC, Wang JR: Respiratory viral infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 2001, 39:111-118. Videla C, Carballal G, Kajon A: Genomic analysis of adenovirus isolated from Argentinian children with acute lower respiratory infections. *J Clin Virol* 1999, 14:67-71.
 21. Wadell G: Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1984, 110:191-220.
 22. Wadell G. Adenovirus .In Principles and Practices of Clinical Virology. 1987,251-274
 23. Wadell G, Allard A, Hierholzer JC. Adenovirus .In: Manual of Clinical Microbiology. 2000.Chapter 76:970-982
 24. Xu W, McDonough MC, Erdman DD: Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000, 38:4114-4120.
 25. Yamadera S, Yamashita K, Akatsuka M, Kato N, Inouye S: Trend of adenovirus type 7 infection, an emerging disease in Japan. A report of the National Epidemiological Surveillance of Infectious Agents in Japan. *Jpn J Med Sci Biol* 1998, 51:43-51.
 26. Yamadera S, Yamashita K, Akatsuka M, Kato N, Tokunaga M, Inouye S: Adenovirus type 7 outbreaks in Japan in 1998. *Jpn J Infect Dis* 2000, 53:22-

表一： 1999~2004 年間呼吸道腺病毒感染之年度分布情形

Subgenus and species	1999	2000	2001	2002	2003	2004	Total	% of all isolates
B								
3	17	6	3	39	2	1	65	54.4
7	1	1		3			5	4.0
11					1			0.8
35			2	2				3.2
C								
1	3	2	4	4	1	2	16	12.8
2		3	2	4	3		12	9.6
5		1		1	1	1	4	3.2
6	1						1	0.8
D								
8						1	1	0.8
E								
4		9	3	1			13	10.4
Total	22	22	14	54	8	5	125	100.0



圖一：1999~2002 年間各年度呼吸道腺病毒分離概況



23130

9419

6557

4371

2322

2028

1057

700

612

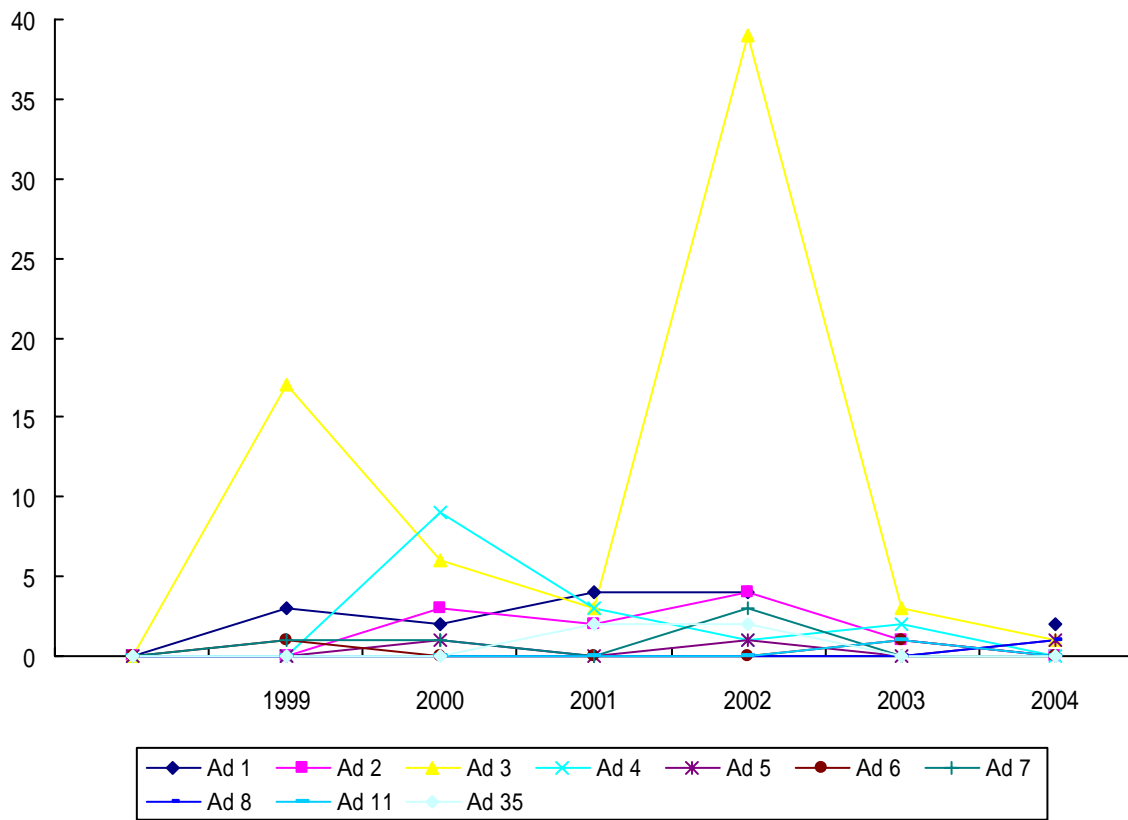
圖二：腺病毒第七型 RFLP 分析(*Bam* H I)。

M：marker， λ Hind III 加 ϕ X174 Hin C；

Line1: 880419； Line2:890330

Line3: 910267； Line4:910337

Line5:910359



圖三：1999~2002 年間各血清型腺病毒分離概況