

## 1999~2004 年呼吸道腺病毒之分型

林永政、林智暉、邱淑君、李政壕、陳豪勇  
行政院衛生署疾病管制局 研究檢驗中心

### 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細胞融合病毒。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 128 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，所得到之序列與 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，以了解國內腺病毒第七型之主要基因型。研究期間以腺病毒第三型為主要的分離株 (55.5%)，其次為腺病毒第一型的 12.5%。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。

關鍵字：呼吸道腺病毒、血清型分析、限制酶片段多型性分析

### 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。目前人類之腺病毒共分成 6 個亞屬(A~F)及 51 種血清型【1】。

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【2,3】。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【1,4,5,6】。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【7】。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【3,8】，血清型第 7 型目前除原型株外可分成 11 種基因型 (Ad 7a~7k) 並且依地域之不同而有不同的主要基因型存在該區域，目前以南美洲流行的 7h 基因型最常造成嚴重的感染【2】，回顧文獻，日本與韓國近年來亦有腺病毒血清型 7 分離率增加的報導【9,10,11】，日本在 1996 年也分離到 7h 基因型【12】，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【13】，故本局呼吸道病毒實驗室實將本局成立以來分離出之呼吸道腺病毒分型以了解國內腺病毒流行的概況。

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【14,15,16】，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，接種檢體後培養於 35°C，5 % CO<sub>2</sub> 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，收取病毒培養上清液，儲存於-80°C 備用，離心沉澱之細胞以加入 1 毫升磷酸緩衝液(PBS)後，混合成細胞懸浮液進行免疫螢光染色確定。進行 RFLP 分析時則以 25T 細胞培養瓶進行培養，待產生 95%以上細胞病變時以細胞刮杓刮下細胞，以 PBS 離心洗去培養基後，加入 2 ml 的 Tris-EDTA 緩衝液 (0.05 M Tris；0.01 M EDTA)混合成細胞懸浮液儲存於-80°C 備用。

### 2. 腺病毒之鑑定 (Immunofluorescence antibody test；IFA)：

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，以單株抗體進行間接免疫螢光染色，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)以商業化試劑萃取(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 ROCHE 的 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid kit

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

取 250  $\mu$ l 細胞懸浮液加入 10%的 SDS (sodium dodecyl sulfate) 及 proteinase K (終濃度 100 $\mu$ g/ml)，置於 65 $^{\circ}$ C 作用 1 到 1.5 小時，而後加十分之一體積的 3M NaOAC，混和均勻後再加入等體積的 Phenol/chloroform/isoamylalcohol (P/C/I；25:24:1) 進行核酸萃取，加入 P/C/I 後輕搖使其混合均勻再以 14000 rpm 離心 5 分鐘，取出水層重複上述步驟萃取 3 次，而後將水層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。加入 RNase(終濃度為 100  $\mu$ g/ml)於 65 $^{\circ}$ C 中作用 30 到 40 分鐘以去除 RNA。去除 RNA 後重複 P/C/I 及氯仿之萃取步驟一次。加入 2.5 倍體積的冰絕對酒精，置於-80 $^{\circ}$ C 15 分鐘，然後以 14000 rpm 於 4 $^{\circ}$ C 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  $\mu$ l TE buffer (Tris-0.01M；EDTA-0.001M) 中備用。

4. 腺病毒分型：

腺病毒以位於 hexon 區域之引子對 AdnU-S(5'-TTCCCATGGCNCACAACAC-3') 及 AdnU-A(5'-GCCTCGATGACGCCGCGGTG-3')【15】進行 PCR 之放大，50 $\mu$ l 反應液中包含病毒 DNA 5 $\mu$ l、2x PCR Master Mix(Promega Corporation)、每一種 primer 0.5  $\mu$ M。PCR 反應條件為先以 94 $^{\circ}$ C，7 分鐘進行變性，而後以 94 $^{\circ}$ C 1 min，50 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 2 min 為一循環，進行 36 循環，最後一個循環以 72 $^{\circ}$ C 7 min 延伸產物，產物為 956 bp【15】。放大後之產物則進行自動化核酸序列分析，所得到的序列資料則使用 BLAST 進行比對，區分血清型。

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  $\mu$ l 反應液中包含有 3 $\mu$ g 的病毒

DNA、20 U 的 *Bam* H I 限制酶、10x 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。反應完成後取出進行電泳 (1% agarose gel ; 50 伏特, 12 小時) 並以  $\lambda$  *Hind* III 及  $\phi$  x174 *Hinc* II 作分子量標定, 經溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色, 將 RFLP 切割圖譜與文獻作比對【14,17】, 確定其基因型。

## 結果

1999 ~ 2004 年間本局呼吸道病毒實驗室所分離出之腺病毒共 128 個分離株。腺病毒分離株以 PCR 進行 Hexon 區域之放大以進行序列分析, 所得之序列與 GenBank 上之參考序列進行分析比對以確定血清型, 1999~2004 年間共分離出十種血清型, 其中以血清型亞屬 B 為主 (63.3%; Ad 3 有 71 株、Ad 7 有 5 株、Ad 11 有 1 株、Ad 35 有 4 株), 其次為亞屬 C (25.8%; Ad 1 有 16 株、Ad 2 有 12 株、Ad 5 有 4 株、Ad 6 有 1 株), 亞屬 E (10.2%; 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 年共 22 株腺病毒被分離出, 以 Ad 3 居多 (77.3%), 2000 年間則出現 Ad4 較多 (40.9%), 2002 年時腺病毒分離大幅增加到 54 株, 此波高峰係以 Ad 3 為主要的分離株 (72.2%), 然後在此波高峰過後, 腺病毒的分離數就減少許多 (表一), 而 2001、2003、2004 年間腺病毒的分離並沒有看到有主要的分離株。

Ad 7 的基因型分析是以限制酶片段多型性分析進行, 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 DNA 切割, 切割後圖譜與文獻之圖譜【14,17】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), 而 7b 基因型主要的流行區域為歐洲地區。

## 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【9,18,19】，Ad 7 通常與臨床上之嚴重感染有關。台灣地區流行概況方面，先前與高醫合作進行的南部地區的監控發現腺病毒在 1999 年後也出現分離件數增加的情況【13】，為了解北部地區是否也有相同的情形，所以我們亦將本局在 1999~2004 年間所分離出之腺病毒作一回溯及監視計畫，在我們的結果中並沒有發現 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 的基因型方面目前可分為 12 種基因型(Ad7p,Ad 7a~7k)，各地區的流行株會因為時間及地點不同而有不同情形，有可能發生基因型的轉換或特定基因型只出現在特定地區，例如歐洲及澳洲分別在 1969 年及 1975 年 7c 轉成 7b【20,21】。北美至 1967 年以來 7b 是主要基因型，但在近年來北美也出現不少 7d2 基因型【5】，因此北美區域的流行株可能將會由 7b 基因型轉變成 7d2 基因型。1988 年俄羅斯從 7a 轉為 7f 基因型【22】。南非 1967 年由 7b 轉變成 7c【4】。大陸 1965 年到 1980 年間為 7b 在 1980 年後則轉為 7d【14,23】。日本之流行株亦為 7d【8】。南美洲方面由 1984 年的 7c 轉成 1986 年後的 7h【6】，1990 及 1992 年分別發現新的基因型 Ad 7i、Ad 7j【8】。1998 年 Ad 7k 在以色列被發現【25】，目前 Ad 7k 也只出現於當地。

台灣地區的資料根據最近的文獻指出南台灣為 7b 基因型【13】，而我們在 1999~2004 年間所分離出的五株 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，我們的五株分離株是屬於 7b 基因型，因此我們推論台灣地區是以 7b 基因型為主要的流行株。然而，現今交通便捷化國際間的交流增加，並且與我國有密切往來的日本地區也發現有活躍於南美洲的 7h 基因型的出現，而 7h 基因型又與嚴重的感染有關【1,2,8,24】，因此我國更應注意呼吸道腺病毒的分離狀況及其基因型別以掌握可能發生的疫情。

**參考文獻：**

1. Videla C, Carballal G, Kajon A: Genomic analysis of adenovirus isolated from Argentinian children with acute lower respiratory infections. *J Clin Virol* 1999; 14(1): 67-71.
2. Palomino MA, Larranaga C, Avendano LF: Hospital-acquired adenovirus 7h infantile respiratory infection in Chile. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(6): 527-31.
3. Carballal G, Videla C, Misirlian A, et al.: Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. *BMC Pediatr* 2002; 2(1): 6.
4. Wadell G: Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1984; 110: 191-220.
5. Erdman DD, Xu W, Gerber SI, et al.: Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(3): 269-77.
6. Kolavic-Gray SA, Binn LN, Sanchez JL, et al.: Large epidemic of adenovirus type 4 infection among military trainees: epidemiological, clinical, and laboratory studies. *Clin Infect Dis* 2002; 35(7): 808-18.
7. 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(1): 111-8.
8. Kajon AE, Mistchenko AS, Videla C, et al.: Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991-1994). *J Med Virol* 1996; 48(2): 151-6.
9. Yamadera S, Yamashita K, Akatsuka M, et al.: 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(1): 43-51.
10. Hong JY, Lee HJ, Piedra PA, et al.: Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis* 2001; 32(10): 1423-9.
  11. Inada T : Brief history, situation in the world, abroad, national surveillance, diagnosis and molecular epidemiology of adenovirus type 7 infection. *臨床とウイルス*; 1998 26 (4): 205-214.
  12. Hashido M, Mukouyama A, Sakae K, et al.: Molecular and serological characterization of adenovirus genome type 7h isolated in Japan. *Epidemiol Infect* 1999; 122(2): 281-6.
  13. Lin KH, Lin YC, Chen HL, et al.: A two decade survey of respiratory adenovirus in Taiwan: the reemergence of adenovirus types 7 and 4. *J Med Virol* 2004; 73(2): 274-9.
  14. 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(3): 170-7.
  15. Saitoh-Inagawa W, Oshima A, Aoki K, et al.: Rapid diagnosis of adenoviral conjunctivitis by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1996; 34(9): 2113-6.
  16. Xu W, McDonough MC, Erdman DD: Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11): 4114-20.
  17. Li QG, Wadell G: Analysis of 15 different genome types of adenovirus type 7 isolated on five continents. *J Virol* 1986; 60(1): 331-5.

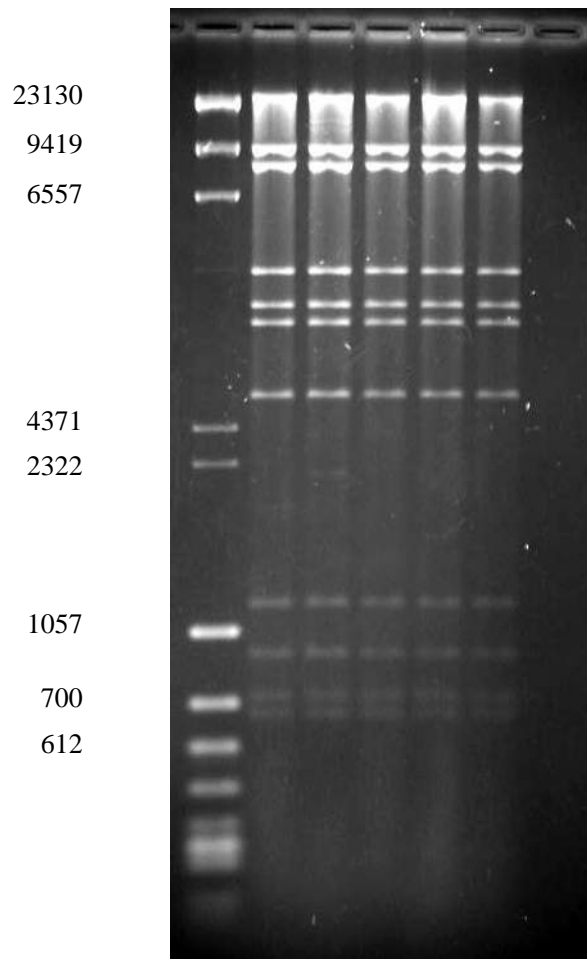


18. Hong JY, Lee HJ, Piedra PA, et al.: Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean children: epidemiology, clinical features, and prognosis. *Clin Infect Dis* 2001; 32(10): 1423-9.
19. Ikeda Y, Yamaoka K, Noda M, et al.: Genome types of adenovirus type 7 isolated in Hiroshima City. *J Med Virol* 2003; 69(2): 215-9.
20. de Silva LM, Colditz P, Wadell G: Adenovirus type 7 infections in children in New South Wales, Australia. *J Med Virol* 1989; 29(1): 28-32.
21. Wadell G, Cooney MK, da Costa Linhares A, et al.: Molecular epidemiology of adenoviruses: global distribution of adenovirus 7 genome types. *J Clin Microbiol* 1985; 21(3): 403-8.
22. Golovina GI, Zolotaryov FN, Yurlova TI: Sensitive analysis of genetic heterogeneity of adenovirus types 3 and 7 in the Soviet Union. *J Clin Microbiol* 1991; 29(10): 2313-21.
23. Fu WY, Liang D, Zheng YC, et al.: A study of molecular epidemiology of adenovirus of types 3 and 7 on infant pneumonia in northern China. *Chin Med J (Engl)* 1989; 102(11): 857-61.
24. Kajon A, Wadell G: Genome analysis of South American adenovirus strains of serotype 7 collected over a 7-year period. *J Clin Microbiol* 1994; 32(9): 2321-3.
25. Azar R, Varsano N, Mileguir F, et al.: Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in Israel: identification of two new genome types, Ad7k and Ad7d2. *J Med Virol* 1998; 54(4): 291-9.

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	4	71	55.5
7	1	1		3			5	3.9
11					1		1	0.8
35			2	2			4	3.1
C								
1	3	2	4	4	1	2	16	12.5
2		3	2	4	3		12	9.4
5		1		1	1	1	4	3.1
6	1						1	0.8
D								
8						1	1	0.8
E								
4		9	3	1			13	10.2
TOTAL	22	22	14	54	8	8	128	100.0

M 1 2 3 4 5



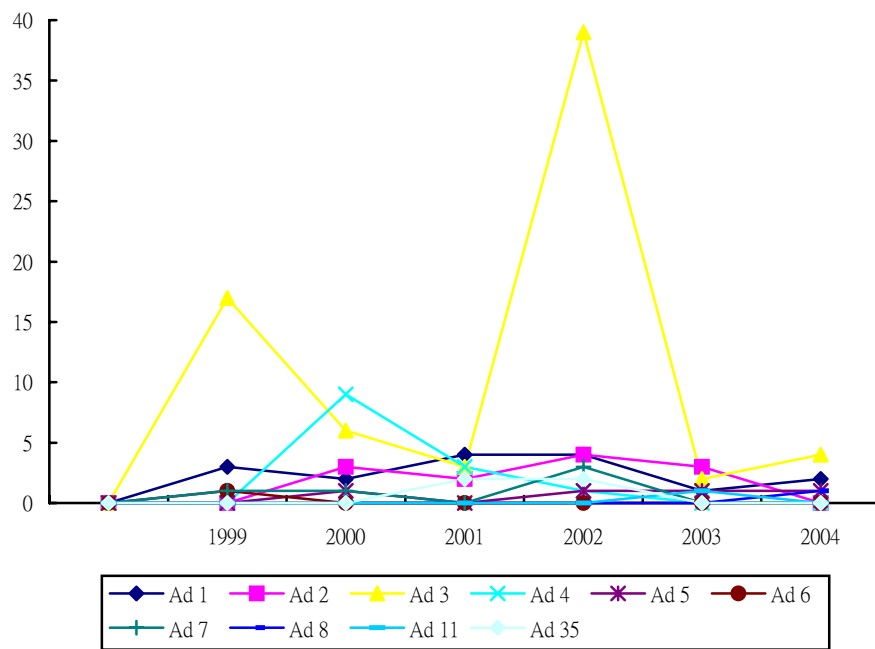
圖二：腺病毒第七型 RFLP 分析(*Bam* HI)。

M : marker ,  $\lambda$  Hind III 加  $\phi$  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