

計畫編號：DOH93-DC-1111

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

# 台灣地區呼吸道融合病毒 抗原型及基因型之分析研究

## 研究報告

執行機構：國立台灣大學

計畫主持人：高全良

研究人員：蔡岱倪

執行期間： 93 年 3 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

壹、中文摘要	. 2
貳、英文摘要	3
參、前言	4
肆、材料與方法	. 8
伍、結果	15
陸、討論	.. 16
柒、結論與建議	.. 17
捌、參考文獻	.. 17
玖、圖表	21

## 中文摘要

呼吸道融合病毒在臨床上常會引起嬰兒及孩童之急性下呼吸道感染，主要症狀有咽、氣管、支氣管綜合病徵，支氣管炎，細小支氣管炎，肺炎等，嚴重者常會致死 RSV 在少年及大人也會引起感染。近年來呼吸道感染日益研重，在美國及英國之調查顯示 RSV 細支氣管炎為嬰住院原因之首位重症住院者，均會花費龐大之醫藥費用，因此 RSV 在臨床上及呼吸道感染防治上之重要性，不容忽視。國外已有針對 RSV 之抗原型及基因型之分子流行病學進行詳細之探討以供防治之參考。台灣地區呼吸道融合病毒之感染亦非常普遍，但國內對抗原型及基因型之分佈一直缺乏相關之文獻資料以供參考。為因應此一狀況，本計畫收集台灣地區 2004 年之呼吸道融合病毒臨床分離株，進行抗原型及基因型之分析。抗原分型將以單株抗體進行 A 及 B 亞群及其各亞型之分析。基因型則以 N 基因之限制酵素圖譜分型及 G 蛋白基因之部份基因核酸序列分析。由 2004 年收集之 20 株呼吸道融合病毒分析結果，A 亞群居多數有 65% (13/20)，B 亞群則只有 35% (7/20)。A 亞群之抗原型，主要為 A4 佔了 92.3% (12/13)，另外有 1 株為 A5(7.7%，1/13)。B 亞群之抗原型，主要為 B3 有 6 株 (85.7%)，另外有 1 株為 B1(14.3%)，此與以往之流行型別之分佈類似。N 基因型分析，在 A 亞群有了些改變以 NP2 (45.5%)最多，其次依序為 NP4 (36.4%) 及 NP3( 18.1%)，此與以往以 NP4 為主有所差異。至於 B 亞群則全部為 NP3。G 基因分析則在分析之 2 株中分屬不同 cluster。研究之結果，有助於呼吸道融合病毒流行病學之瞭解，亦可進一步作為未來疫苗研發及評估上之重要參考。

**關鍵詞：** 呼吸道融合病毒、抗原型、基因型、分子流行病學

## **Abstract**

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the major cause of acute lower respiratory infection in infancy, causing annual epidemics together with repeated infections of individuals. Severe HRSV pneumonia was also found in immuno-compromised hosts with neoplastic disease or bone marrow transplantation patients. HRSV infection is also a very common and important disease in Taiwan. Various antigenic types and genotypes of HRSV have been reported in other countries. There is no clear data showed the antigenic and genotypes of HRSV circulated in Taiwan. In order to understanding the strain variations of HRSV in Taiwan, virus strains isolated in 2004 were collected for analysis. The subgrouping and antigenic typing of HRSV are determined by immunofluorescence stain with monoclonal antibodies. The N and G gene typing are identified by RT-PCR and partial nucleotide sequencing. The results showed that 65% (13/20) of HRSV isolated in 2004 was belonged as subgroup A and 35% (7/20) of isolates were grouped as subgroup B. Based on antigenic analysis, 92.3% of subgroup A was further identified as A3 and 7.7% was as A5. In subgroup B, six of 7 strains (85.7%) was identified as B3 and only one strain was as B1 (14.3%). By N gene typing, NP2 (45.5%), NP3 (18.1%) and NP4 (36.4%) was identified in subgroup A, whereas all 7 strains of subgroup B was NP3 (100%). Two clusters of subgroup A was found by phylogenetic analysis. The results can provide pictures of molecular epidemiology of HRSV in Taiwan.

**Keywords : Respiratory syncytial virus, antigenic type, genotype , molecular epidemiology**

## 前言

呼吸道融合病毒(Respiratory syncytial virus, RSV)屬 paramyxoviridae 之 pneumovirus genus 為 single strand RNA 病毒。不論在開發中或已開發之國家地區，RSV 均為引起孩童特別是幼兒之急性下呼吸道感染之重要致病原之一<sup>(1,2)</sup>。RSV 在溫帶地區，每年在冬季常易造成流行。在熱帶地區，則在雨季流行<sup>(3-7)</sup>。RSV 在臨床上常會引起嬰兒及孩童之急性下呼吸道感染，主要症狀有咽、氣管、支氣管綜合病徵，支氣管炎，細小支氣管炎，肺炎等，嚴重者常會致死<sup>(8)</sup>RSV 在少年及大人<sup>(9)</sup>也會引起感染，但症狀均較輕微，且主要為上呼吸道之感染。近年來一些免疫機能下降之患者如腫瘤、骨髓移植病人身上也會造成嚴重之感染<sup>(10,11)</sup>。近年來呼吸道感染日益嚴重，1997-2000 年在美國之調查顯示 RSV 細支氣管炎為嬰住院原因之首位此四年之總費用超過 26 億美元每年新生兒因 RSV 感染死亡約有 400 例<sup>(12)</sup>。英國之報告估計 RSV 重症感染者每一住院約需 4431 英磅<sup>(13)</sup>。因此 RSV 在臨床上及呼吸道感染防治上之重要性，不容忽視。

RSV 之基因大約 15kb，其組成為 3' 1C-1B-N-P-M-1A-G-F-22K-L。其中 G 基因為大家所注意，大小約 0.9~1.1kb，負責製造 G 蛋白。G 蛋白為 RSV 病毒顆粒外圍 envelope 之主要成分，且為病毒感染細胞時的重要 attachment protein<sup>(14)</sup>。G 蛋白具有強抗原性，動物實驗以老鼠為例，G 蛋白所產生的抗

體具有保護力<sup>(15)</sup>。G 蛋白在 RSV 感染與 host immune response 間扮演重要的角色。G 蛋白之分子量約為 90Kd，為一種醣蛋白<sup>(16)</sup>。其蛋白部分由 298 個氨基酸組成。N 端為 cytoplasmic domain，C 端為 extracellular domain。自 1956 年 RSV 被分離成功後，被認為只有一種血清型存在，但 1985 年 Anderson<sup>(17)</sup>，Mufson<sup>(18)</sup>等分別在不同之實驗室，以 G 蛋白單株抗體證明 RSV 之抗原結構至少可分成兩種亞群(A,B)存在。每一年每一地區可能同時流行此兩亞群，但每次流行常有一種亞群為主，另種為輔之情形存在<sup>(19,20)</sup>。國外之許多地區研究顯示，同一地區會有隔數年，兩種亞群交替流行之現象<sup>(21,22)</sup>。如在日本 Sapporo，1980-1987 年之 RSV 研究發現 1980-1981 年以 A 亞群為主，1982-1986 年則大多以 B 亞群為主，1987 年則以 A 亞群為主<sup>(23)</sup>。在烏拉圭之 RSV 研究，則顯現不一樣之結果。1985 年以 A 亞群為主，1986-1987 年則以 B 亞群為主<sup>(20)</sup>。兩種 RSV 亞群中，G 蛋白之氨基酸序差異，最大可達 53%<sup>(24)</sup>。臨床上觀察，發現孩童常會有 RSV 從覆再次感染之情形，再次感染除可能為不同亞群外，同一亞群亦會發生<sup>(25)</sup>。此種再感染如為不同亞群，則可由兩種亞群間之抗原差異極大，相互間之保護力較差加以解釋。但如果再次感染為同一亞群時，則除部份原因可能為患者免疫力不足外，另外最大之可能原因，為同一亞群病毒抗原結構可能經常發生改變之結果。Akerlind<sup>(26)</sup>，Storch<sup>(27)</sup>等均曾報告 RSV 同一亞群中其 G 抗原具有多樣性變異存在。Anderson 等人以 G 蛋白所產生之各種單株抗體進

行美國地區之 RSV G 蛋白之抗原分析，發現 A 亞群可進一步分成 A1-A6，B 亞群可分成 B1-B3 等不同之抗原亞型存在<sup>(28)</sup>。Cane 等人之研究，顯示人類之 RSV 之 Nucleocapsid(N) 基因又可分成 NP<sub>1</sub>-NP<sub>6</sub> 六種基因型<sup>(29-30)</sup>，此種 N 基因型之分析可供分子流行病學上之參考。Cane<sup>(31)</sup>及 Sullender<sup>(32)</sup>等人進一步以核酸序列及氨基酸序列比對分析，發現 B 亞群氨基酸序列最高有 12% 之差異，A 亞群則可達 20%。因此此部分之抗原之多變性可能與容易發生同一亞群之再感染有關，而此種多變性也可能與 immune selection 有關。此種抗原之氨基酸之改變可能係經長時間累積之結果。Cane<sup>(33)</sup> 等人收集不同時間之 A 亞群 RSV 進行 G 基因之分析，將結果與 1956、1961 年之 A 亞群原型分離株比較，推測在 RSV A 亞群 G 蛋白之氨基酸演變速率可能平均為每年 0.25%。RSV 抗原型及基因型之變異性隨著不同年代及不同地區而有所不同在歐美及亞洲地區(韓國、日本、中國大陸)等近年來亦有類似之報告<sup>(34-43)</sup>。台灣地區呼吸道融合病毒之感染亦非常普遍<sup>(44-47)</sup>。但有關 RSV 之抗原型及基因型一直未能有正式之報告。為了解台灣地區呼吸道融合病毒之抗原型及基因型之現況及流行變化情形。本計畫擬對進行 3 年之觀察及分析，將於 3 年內同時收集北部地區及南部地區之 RSV 分離株進行分析。如果可能亦將透過疾管局，收集中部地區之分離株。經由此 3 年之研究，期望能提供國內 RSV 抗原分析及基因型之分子流行病學之基本資料，並與國外之流行情形作一比較。研究結果可以用為臨床上及呼吸道傳染病防治

上之參考，未來亦可進一步作為診斷試劑及疫苗研發上之重要參考。本計畫擬收集台灣地區 2004 年之呼吸道融合病毒臨床分離株及病毒庫存株，進行抗原型及基因型之分析。抗原分型將以單株抗體進行 A 及 B 亞群及其各亞型之分析。基因型則以 N 基因之限制酵素圖譜分型。另外亦將以 G 蛋白基因之部份基因核酸序列分析，進行種系分析。分析結果，並將與國外之報告作比較。研究之結果，可以提供臨床上及呼吸道傳染病防治上之參考，亦可進一步作為未來診斷試劑及疫苗研發上之重要參考。



## 材料與方法

### A：檢測及分析系統之建立

#### 一、細胞之生長

將 HEp-2 細胞以含 10% fetal calf serum 之 Eagle's MEM 繁殖於組織培養瓶及試管，以提供病毒生長用。部份生長良好之細胞，並同時以 DMSO 冷凍保存於液態氮中以隨時提供 low passage 之細胞以使實驗能維持在最理想之條件。

#### 二、病毒之收集與繁殖

將分別收集台大醫院檢醫部病毒實驗室及高雄醫學院附設醫院病毒室之 RSV 分離株，以 HEp-2 細胞繼代培養。待病毒繁殖至高 titer 後，保存於-80 ，以供進一步研究實驗用。

#### 三、病毒血清亞型之分析

首先 RSV 感染 HEp-2 細胞，待有 50% 以上之 CPE 時，將感染之細胞取下。經離心後，做成 spot smear。乾燥後，以 cold acetone 固定 10 分鐘後，存於-80 備免疫螢光染色用。免疫螢光染色採間接法。首先將 spot smear 加上 RSV 亞型特異性之單株抗體 MAB92-11c 及 MAB102-10b，經 37 作用 30 分鐘後，以 PBS(pH7.2)清洗三次，涼乾後再以 goat anti-mouse

IgG FITC conjugate(KPL)進行第二次之抗原抗體反應，反應之步驟與第一次之反應相同。最後以 buffered glycerol 封片，然後置於螢光顯微鏡下觀察。如與 MA92-11c 反應則判定為 A 亞型，如與 MAB102-10b 反應則為 B 亞型。除 A、B 亞型分析外，亦使用 panel of monoclonal antibodies against distinct epitopes of G proteins of RSV (130-5f, 130-6d, 130-9g, 143-5a 等)進行次分型，可將 RSV 分成 A1-A6 及 B1-B3 等。

#### 四、RSV N 基因之限制酵素圖譜型分析

##### 1.RNA 之抽取：

將感染病毒之 HE-p2 細胞 lysis，然後以 nucleic acid extraction kit(QIAamp mini-RNA kit, QIAgen inc., USA)，萃取核酸。

##### 2.RT-PCR：

以萃取之病毒核酸進行反錄聚合酵素鍊反應，增幅病毒之核酸，其反應之條件如下：

Primer：primer1: 5' GGAACAAGTTGTTGAGGTTTATGAATATGC 3'  
primer2: 5' CTTCTGCTGTCAAGT,CTAGTACACGTAGT 3'

RT-PCR reaction：將 100ul 含 30mM Tris-HCl pH8.3, 50mM KCl, 4mM

MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM dNTP, 5 units reverse transcriptase, 1.5 unit Taq, 病毒核

酸及 primer 之溶液於 42 °C 下作用 30 分鐘，然後以 93 °C, 1.5min, 55 °C, 1.5min 及 72 °C, 1.5min 之條件反應 30 cycles 可得 PCR 產物。

### 3. PCR 產物之限制酵素之分割圖譜分析

將 PCR 產物純化後，以 HindIII, PstI, Bgl II, HaeIII, RsaI, NdeI 進行酵素反應，最後以 agarose 電泳測定其切割之位置，由切割位置之有無與標準病毒株相較，而定出 N 基因之分型結果。分型之方式採 Cane<sup>(29)</sup> 之分類法。

## 五. 病毒核酸之增幅及定序

### 1. 病毒核酸之增幅(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

將每年選擇南北代表株進行分析。病毒核酸之增幅是以反轉錄-聚合 連鎖反應(Reverse transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)進行，所用之核酸引子是以 RSV 標準株(A2 strain) 之 G、F 蛋白的 mRNA 所設計：

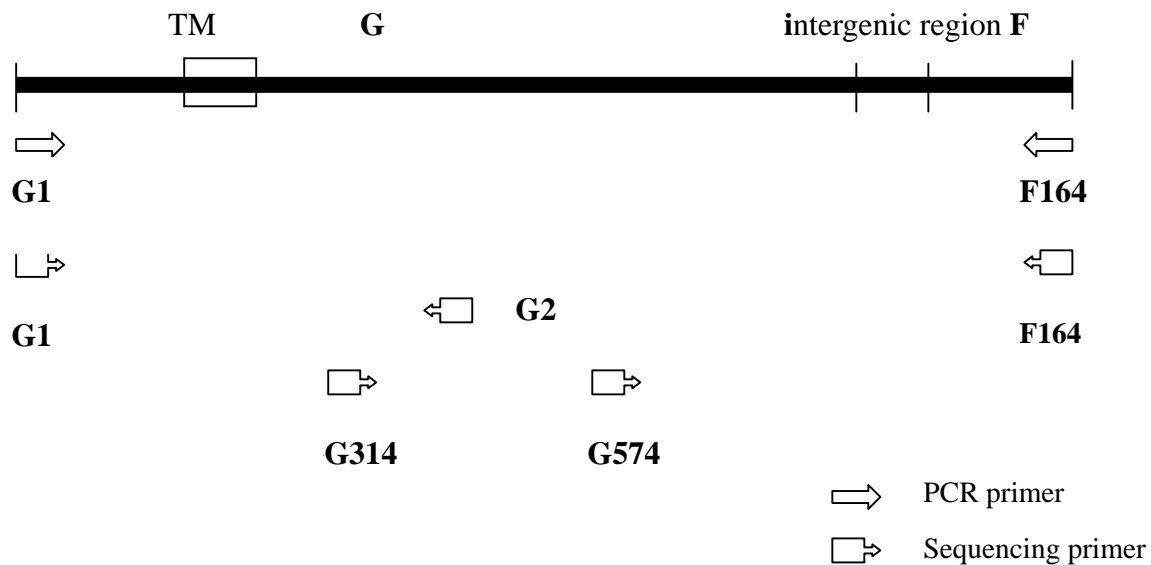
G1 : 5'-GGATCCCGGGGCAAATGCAAACATGTCC-3' 共 28mer

G2 : 5'-GGTATTCTTTTGCAGATAGC-3' 共 23mer

F164 : 5'-GTTATGACACTGGTATAACCAACC-3' 共 20mer

G574 : 5'-AAAAGAATACCAAACAAAAAAC-3' 共 22mer

G314: 5'-CAGCTTGGAATCAG-3' 共 14mer



G1, F164 引子可複製 RSV-A 亞群之 G 基因及一部分之 F 基因約 1100 鹼基對(base pair ; bp)。RT-PCR 過程中，先進行 RNA 之反轉錄反應(reverse transcription)，以得到 cDNA 產物。取 2 $\mu$ l(20 pmol) F164 引子溶液與 10 $\mu$ l 病毒核酸抽取液，依序加入 PCR 反應管，並將此混合液混勻，以桌上型離心機離心下所有沾黏於管壁之液體。在 95 $^{\circ}$ C 下加熱 10 分鐘，以解開可能影響反應之 RNA 二級結構與引子之 dimer，之後立即靜置冰上五分鐘。進行加熱及冰浴的同時，先行配置反轉錄反應混和液。混和液中含有：0.5 $\mu$ l 0.1% DEPC-H<sub>2</sub>O、5 $\mu$ l 5 $\times$ first strand buffer[250mM Tris-HCl(pH 8.3、375mM KCl、15 mM MgCl<sub>2</sub>]、4 $\mu$ l 20mmol/ul dNTP mixture、2.5 $\mu$ l 0.1MD.T.T、0.5 $\mu$ l RNase inhibitor(40 unit/ul)、0.5 $\mu$ l RT(200 unit/ul，SuperScriptII<sup>TM</sup> RNase H-Reverse Transcriptase)，每個反應所需之反轉錄反應混和液之體積為 13  $\mu$ l。待 RNA 與引子之混和液冰浴完成，即可加入 13 $\mu$ l 之反轉錄反應混和液，使終體積成為 25 $\mu$ l，將反應液再混和均勻，並以離心震盪下所有沾於管壁之殘餘混和液及管蓋上的水氣。此時各試劑之終濃度為：20 pmol F164 primer、50mM Tris-HCl pH 8.3、75 mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、3.2 mM dNTPs、20unit RNase inhibitor，100 U RT in DEPC-H<sub>2</sub>O。為防止水份蒸發，進行反轉錄反應前，先加入少許礦物油(mineral oil，sigma)，再至入循環加熱器(Thermal cycle

cutus 480 , Perkin Elmer , USA) , 於 42°C 下進行反轉錄反應 50 分鐘。待反應完成 , 加溫至 70°C、15 分鐘 , 以去除反轉錄 之活性 , 同時可配置聚合連鎖反應混和液 , 內含 5 $\mu$ l F164 primer(50pmol)、5 $\mu$ l G1 primer(50pmol)、10 $\mu$ l 10 $\times$ PCR buffer , 54 $\mu$ l H<sub>2</sub>O。接下來進行聚合連鎖反應(Polymerase Chain Reaction ; PCR) , 加入預先配置之聚合連鎖反應混和液於反轉錄反應混合液中 , 使終體積為 100 $\mu$ l , heat shock 5 分鐘後 , 再加入 0.5 $\mu$ l Taq 聚合 (2.5U ; BM , Germany) , 進行 PCR 反應 , 以 94°C 加熱 1 分鐘 , 60°C 加熱 1 分鐘使引子接上模板核酸 , 再以 72 °C 加熱 2 分鐘 , 作為一個循環反應 , 每次反應 30 次溫度循環反應後 , 續以 72 °C 加熱 7 分鐘使反應完全 , 將反應物於 4°C 下靜置。取 8 $\mu$ l PCR 產物混合 2 $\mu$ l loading dye 注入已裝有 0.5 $\times$ TBE 緩衝液之迷你電泳槽(Mupid II ; Japan)中的 1% 瓊脂凝膠內 , 以 50 伏特電泳 15 分鐘後 , 繼以 100 伏特電泳 30 分鐘 , 電泳結束後 , 以濃度 0.5mg/ml 之 ethidium-bromide 染色 30 分鐘 , 再以去離子水去染 30 分鐘 , 最後用短波長 UV 激發螢光 , 以拍立得相機拍攝結果。

## 2. 核酸增幅產物之純化

為去除核酸增幅產物中所含之雙引子及其餘未完全反應之試劑 , 以減少直接核酸定序反應所受之干擾。本純化步驟使用 Watson 純化試劑組。先取核酸增幅產物 45-50  $\mu$ l , 注入 1%之瓊 凝膠 , 於迷你電泳槽中以 100 伏特 , 跑 30 分鐘 , 再以短波長紫外線確定是否為正確大小之核酸產物。以小刀切下包含正確之單一大小核酸產物之瓊 凝膠 , 置於 1.5 ml 之微量離心管 , 加入 Melt 及 Salt(比例為 1:9) , 混合均勻後 , 於 55°C 下 , 加熱 5 分鐘 , 務必使瓊酯凝膠完全溶解。加入 5  $\mu$ l Bead , 並使 Bead 均勻分佈於溶液中 , 室溫 5 分鐘(期間必須不斷上下輕搖微量離心管) , 以使 Bead 與核酸產物鍵結完全 , 再以最大轉速離心 5 秒鐘 , 去除上清液 , 真空乾燥沉澱下之 Bead。以 1ml Wash buffer 洗滌 Bead , 最大轉速離心 5 秒鐘 , 去除上清液後 , 重複離心一次 , 小心取出殘餘之 Wash buffer , 真空乾燥沉澱之 Bead。加入適當體積之滅菌去

離子水，將 Bead 均勻散於去離子水中，室溫下靜置 5 分鐘，使核酸產物自 Bead 中溶出，再以最大轉速離心 5 秒鐘，取出上清液置於新的微量離心管中，此即為核酸增幅產物溶液，可做直接核酸定序反應。

### 3. G 及 F 蛋白基因之核酸定序：

#### 核酸定序反應(cycle sequencing reaction)

以 ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kit (Perkin-Elmer) 試劑組做核酸定序反應。取 0.3-0.5 $\mu$ g 預定序之已純化 DNA 增幅產物，加入 3.2pmol 引子，前混和液 premix(廠商已配置完成：含 5X sequencing buffer 4 $\mu$ l，dNTP mix 1 $\mu$ l，A dye terminator 0.5 $\mu$ l，C dye terminator 0.5 $\mu$ l，T dye terminator 0.5 $\mu$ l，G dye terminator 0.5 $\mu$ l，AmpliTag DNA polymerase FS 1ul) 6 $\mu$ l，加入適當之去離子蒸餾水使反應總體積為 20  $\mu$ l，最後覆以一層礦物油。於聚合 連鎖反應器(Perkin Elmer DNA Thermal cycle 480)中，以 94 $^{\circ}$ C 30 秒，50 $^{\circ}$ C 15 秒，60 $^{\circ}$ C 4 分鐘，進行 25 次反應後，保持於 4 $^{\circ}$ C。

#### 4. 純化核酸定序反應之產物

為移除核酸定序反應完成後產物內多餘之 dye terminators 及 primer。先以膜(parafilm)移除反應前所製入之礦物油後加入 2 $\mu$ l 3M sodium acetate pH4.6 和 50 $\mu$ l 100% ethanol，混合均勻並置於冰上 10 分鐘，以 14000 rpm 離心 15-30 分鐘，小心移除上清液，並以 70% ethanol 250 $\mu$ l 清洗 DNA 沈澱物，真空乾燥後可保存於 -20  $^{\circ}$ C，待上機前才將之溶於 3 $\mu$ l loading buffer 中 (deionized formamide : 50mM EDTA , pH8.0=5 : 1)。

#### 5. 核酸定序凝膠之準備

使用不含螢光之清潔劑洗淨玻璃，晾乾後置於自動核酸定序儀(ABI-373A-I8 DNA sequencing)中掃描，以確定玻璃表層無螢光物質汙染後，將間格條(spacer)置於兩塊玻璃之間，並以 3M 膠帶將玻璃兩側及底部密封，再用夾子固定，灌入預先配置之凝膠溶液(含 40% acrylamide[acrylamide : bis=19 : 1])

7.125ml ; , 9.3M urea 45ml , 10×TBE 6ml , H<sub>2</sub>O 1.875ml , 20% ammonium persulfate 150ul , TEMED 60ul) , 且於玻璃上端插入 spacer。約 2 小時後 , 凝膠完全凝結 , 拆除玻璃外圍膠帶並重新清洗玻璃表層 , 晾乾後即可使用。

## 6. 核酸定序

將玻璃裝置於螢光自動核酸定序儀內 , 再次掃描確定玻璃表層無其他螢光雜質汙染 , 加入電泳槽緩衝液(1×TBE buffer ; 含 89 mM Tris , 2mM borate , 2mM EDTA)後 , 拔出凝膠上方之 spacer , 並以塑膠滴管吸取 buffer , 沖去多餘之凝膠 , 再插以齒槽(comb) , 預跑 5 分鐘以確定電壓是否介於 1000-1300 伏特。將已溶於 loading buffer 之核酸定序反應產物 , 先經 94°C 加熱 2 分鐘以解開 DNA 雙股結構 , 並馬上置於冰上 , 依序注入齒槽中 , 固定電流 25mA 跑 8 小時 , 電腦將收集結果並自動分析核酸序列。

## 7. G 蛋白基因之分析比較

經自動核酸定序儀分析所得之蛋白基因序列 , 以電腦軟體 GeneWorks 2.01(IntelliGenetics)做序列之連結與比對 , 並比較不同分離株基因間的相似性 , 再將不同株 RSV 之 G 蛋白基因以電腦程式 Dnasis7.0 做進一步排序 , 再利用 PHYLIP3.5c 程式建立病毒株之種系分析圖(phylogenetic tree)。

## 結果

我們收集之病毒一共有 20 株(表一)。由男性患者分離者有 11 株由女性分離者有 9 株。如以季節看大多數之分離株係由 7-9 月分離，其次為 2-5 月分離者(圖一)。顯示 2004 年之夏季有一流行高峰。11 月開始知冬季由於收件仍然在培養中無法確定是否會有另一波之流行。

以單株抗體(MA92-11c & MAB102-10b)進行群別分析，結果顯示 65%(13/20)屬於 A 亞群，35% (7/20)屬於 B 亞群。如再進一步以(130-5f, 130-6d, 130-9g, 143-5a 等)進行抗原型分析則可得到表二及圖二、三之結果。A 亞群中以 A4 最多佔了 92.3%(12/13)另外有 1 株為 A5(7.7%, 1/13)。今年並未發現其他抗原型至於 B 亞群之抗原分析結果以 B3 最多有 6 株(85.7%)，另外有 1 株為 B1(14.3%)，其他抗原型則未發現。

以 N 基因限制酵素圖譜分型之結果如以月比較時無明顯之月份特殊性(表三及圖四)。A 亞群之 N 基因型別以 NP2(5 株)最多，其次分別為 NP4(4 株)，NP3(2 株)，而 B 亞群之 N 基因型別則只有 NP3(100%)並未發現其他型別(表五及圖五、六)。男女受到之呼吸道融合病毒感染之 N 基因型，並無明顯差別。

由於 RT-PCR 增幅及定序失敗之株數不少，目前我們只收集之 2 株病毒進行 G 基因之分析，其種系[分析所得之結果顯示於圖七。04-4473 及 04-4170 有些許差異但與原始參考株 Long strain 有較大之差異但與肯亞之部份分離株相比則屬不同之族群。



## 討論

我們實驗室曾收集台北地區 1984-1999 年呼吸道融合病毒分離株(182株)進行抗原分型及基因分型分析。初步之結果顯示，過去台北地區之 RSV 以 A 亞群為主。抗原分群結果：74.18%為 Group A、25.82%為 Group B。N 基因型分析結果：Group A 主要為 NP4 (83.21%)，Group B 主要為 NP3(93.62%)<sup>(48)</sup>。2004 年之分析結果之亞群分型(A:65%,B:35%)，仍然以 A 亞型為主，相似顯示台灣地區之呼吸道融合病毒之亞群型別分佈模式並無太大之改變。至於 N 基因型別之分佈 Group A 主要為 NP2(45.5%)及 NP4 (36.4%)，此與以前之觀察略有不同，似乎 NP2 有增加之情形。至於 B 亞群則與以往相同，100%均為 NP3。各亞型內之抗原型亦大致未變亦及 A 亞群以 A4 為主，B 亞群則以 B3 為主。但 A 亞群中有 1 株為 A5 則為以前未曾發現者有必要分析其核酸序列才能進一步分析。以 G 基因種系分析只分析 2 株就發現可能屬不同 cluster。其中 1 株與肯亞 2004 年之分離株接近另一株則與 2000 年之分離株較接近。由於分析之病毒株數太少，加上建立種系分析時，只用 1 種軟體分析，可能要再經其他軟體分析才有可能呈現真正之情形。

呼吸道融合病毒之保存及培養不易，曾嚐試由庫存之病毒株，進行再繁殖時，常會無法成功，由高雄地區之病毒株一直無法繁殖生長因此尚無病毒納入分析中。仍需更常長時間收集更多之病毒株才可有較清楚之瞭解。雖然病毒分析株數不多但初步結果仍可提供呼吸道融合病毒流行病學之參考。

## 結論與建議

由 2004 年收集之 20 株呼吸道融合病毒分析結果。A 亞群居多數有 65% , B 亞群則只有 35%。A 亞群之抗原型主要為 A4 , B 亞群主要為 B3 此與以往之流行型別之分佈類似。N 基因型分析在 A 亞群有了些改變以 NP2 最多其次依序為 NP4 及 NP3 此與以往以 NP4 為主有所差異。至於 B 亞群則全部為 NP3。G 基因分析則在分析之 2 株中分屬不同 cluster。

由以上之數據對瞭解呼吸道融合病毒流行病學應可提供幫助。由於呼吸道融合病毒病毒之培養不易因此建議應有專門之研究單位收集並維持其庫存之存活率以供研究用 , 而未瞭解病毒變化之情形應有計畫支持長期分析除有助國內疫情之瞭解外亦可建立基本資料以供未來呼吸道融合病毒疫苗研發評估 之重要參考。

## 參考文獻

1. McIntosh K. Pathogenesis of severe acute respiratory infections in the developing world.: respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. Rev Infect Dis 13;(suppl 6): s492--500, 1991.
2. La Via WV, Marks MI, Stutman HR. Respiratory syncytial virus puzzle: clinical features, pathophysiology, treatment, and prevention. J Pediatr 121; 503-510, 1992.
3. Spence L, Barratt N, Respiratory syncytial virus associated with acute infection in Trinidadian patients. Am J Epidemiol 88: 257-266, 1968.
4. Mufson NA, Levine HD, Wash RE, Nocega-Gonzales HE, Krause HH. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection among infants and children in Chicago. Am J Epidemiol 98: 289-300, 1973.
5. Reese PE, Marchette NJ. Respiratory syncytial virus infection and prevalence of subgroups A and B in Hawaii. J Clin Microbiol 29:2614-2615, 1991.
6. Sung RYT, Murray HGS, Chan RCK, Davies DP, French GL. Seasonal patterns of respiratory syncytial infection in Hong Kong: a preliminary report. J Infect Dis 156: 527-528, 1987.

7. Kim HW, Arrobio JO, Brandt CD, Jeffries BC, Pyles G, Reid JL, Chanock RM, Parrott RH. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. 1. Importance of virus in different respiratory tract diseases syndromes and temporal distribution of infection. *Am J Epidemiol* 98: 216-225, 1973.
8. CDC. Update: Respiratory syncytial virus activity-United States, 1993. *MMWR* 42; 871-973, 1993.
9. Finger R, Anderson JL, Dicker RC, Harrison B, Doan R, Dowing A, Corey L. Epidemic infection caused by respiratory syncytial virus in institutionalized young adults. *J Inf Dis* 155; 1335-1338, 1987.
10. Whimbey E, Bodey GP. Viral pneumonia in the immunocompromised adult with neoplastic disease: the role of common community respiratory viruses. *Semin Respir Infect* 7; 122-131, 1992.
11. Harrington RD, Hooton TM, Hackman RC, Storach GA, Osborne B, Cleaves CA, Benson A, Meyers JD. An out break of respiratory syncytial virus in a bone marrow transplant center. *J Inf Dis* 165; 987-993, 1992.
12. Leader S, Kohlhase K. Recent trends in severe respiratory syncytial virus (RSV) among US infants, 1997 to 2000. *J Pediatr* 143 (5 Suppl): s127-132, 2003.
13. Zaw W, McDonald J. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in ex-preterm infants in the Scottish highlands: review of hospital admissions and an analysis of hospital cost. *Scott Med J* 48: 108-110, 2003.
14. Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Viro* 68; 2571-2524, 1987.
15. Stott EJ, Ball LA, Anderson K, Young KK, King AMQ, Wertz GW. Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant vaccinia virus that express individual genes of respiratory syncytial virus. *J Virol* 61; 3855-3861, 1987.
16. Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levines S, Ball LA. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 82; 4075-4079, 1985.
17. Anderson Lj, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, McIntosh K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 151; 626-633, 1992.
18. Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distant subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 66; 2111-2124, 1985.
19. Reese PE, Marchette NJ. Respiratory syncytial virus infection and prevalence of subgroups A and B in Hawaii. *J Clin Microbiol* 29; 2614-2615, 1991.
20. Russi JC, Delfraro A, Arbiza JR, Chiparelli H, Orvell C, Grandien M, Hortal M. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus associated with acute respiratory infections in Uruguayan children from 1985 to 1987. *J Clin Microbiol* 27; 1464-1466, 1989.
21. Tsutsumi H, Onuma M, Suga K, Honjo T, Chiba S, Ogra PL. Occurrence of

- respiratory syncytial virus subgroups A and B strains in Japan, 1980-1987. *J Clin Microbiol* 26: 1171-1174, 1988.
22. Hendry RM, Pierik LT, McIntosh K. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987. *J Infect Dis* 160; 185-190,1989.
  23. Tsutsumi H, Onuma M, Nagai K, Yamazaki M, Chiba S. Clinical characteristics of respiratory syncytial virus (RSV) subgroup infections in Japan. *Scan J Infect Dis* 23; 671-674, 1991.
  24. Johnson PR, Springgs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci* 84; 5625-5629, 1987.
  25. Mufson MA, Belshe RB, Orvell C, Norrby E. Subgroup characteristics of respiratory syncytial virus strains recovered from children with two consecutive infections. *J Clin Microbiol* 25; 1535-1559, 1987.
  26. Akerlind B, Norrby E, Orvell C, Mufson MA. Respiratory syncytial virus: heterogeneity of subgroup B strains. *J Gen Virol* 69; 2145-2154, 1988.
  27. Storch GA, Anderson LJ, Park CS, Dohner DE. Antigenic and genomic diversity within group A respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 163; 858-861, 1991.
  28. Anderson LJ, Hendry RM, Pierik LT, Tsou C, Dohner DE. Multi-center study of strains of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 63; 687-682, 1991.
  29. Cane PA, Pringle CR. Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleotide sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J Gen Virol* 72: 349-357, 1991.
  30. Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Analysis of relatedness of subgroup A respiratory syncytial viruses isolated worldwide. *Virus Res* 25: 15-22, 1992.
  31. Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Identification of variable domains of attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 72; 2091-2096, 1991.
  32. Sullender WM, Mufson MA, Anderson LJ, Wertz GW. Genetic diversity of attachment protein of subgroup B respiratory virus. *J Virol* 65; 5425-5434, 1991.
  33. Cane PA, Pringle CR. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: Evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *J Virolo* 69; 2918-2925, 1995.
  34. Sanz MC, Kew OM, Anderson LJ. Genetic heterogeneity of the attachment glycoprotein G among group A respiratory syncytial virus. *Virus research* 33; 203-217, 1994.
  35. Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *J Clin Microbiol* 32: 1-4, 1994.
  36. Plows DJ, Pringle CR. Variation in the fusion glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus subgroup A. *Virus Gene* 11:37-45, 1995.
  37. Lukic-Grlic A, Cane PA, Brce A, Pringle CR, Mlinaric-Galinovic G, Popow-Kraupp T. Antigenic and genomic diversity of central European respiratory syncytial virus.

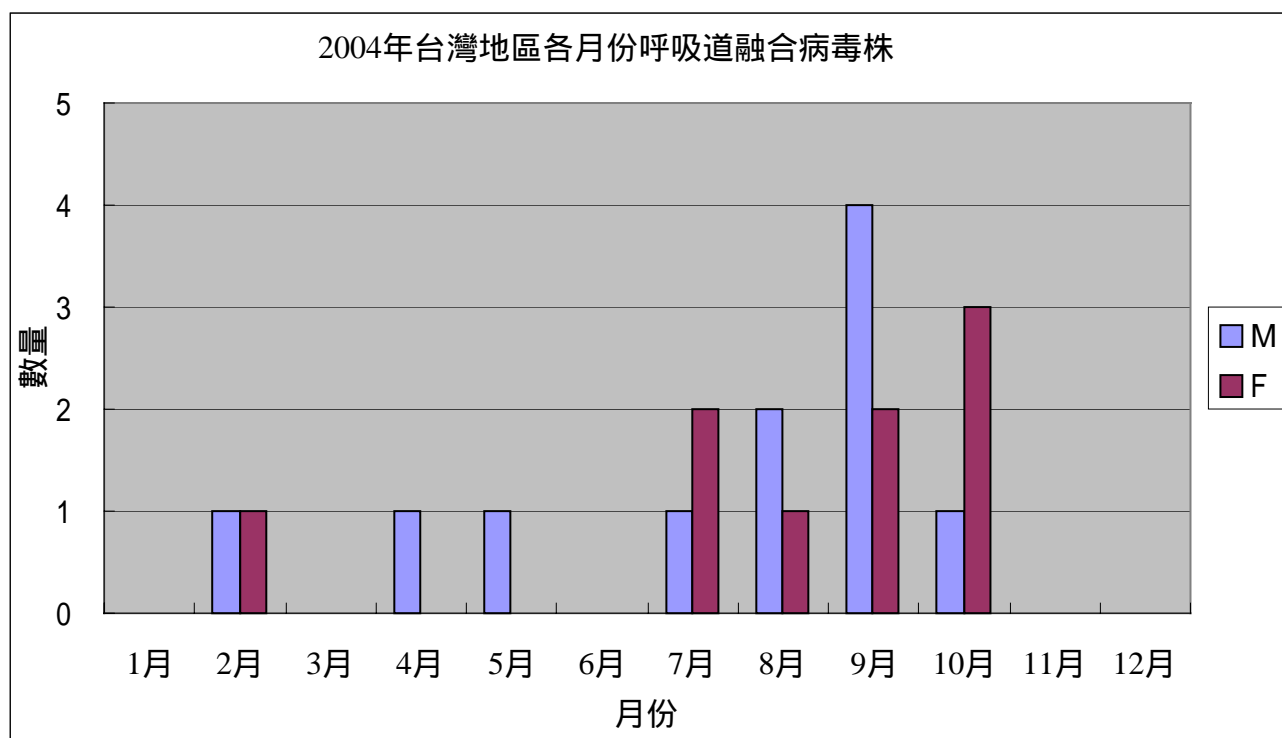
- Arch Virol 143: 1141-1147, 1998.
38. Choi EH, Lee HJ. Genetic diversity and molecular epidemiology of the G protein of subgroup A and B of respiratory syncytial viruses isolated over 9 consecutive epidemics in Korea. *J Infect Dis* 181: 1547-1556, 2000.
  39. Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, Tsou C, Anderson LJ. *J Infect Dis* 181: 1891-1896, 2000.
  40. Seki K, Tsutsumi H, Ohsaki M, Kamasaki H, Chiba S. Genetic variability of respiratory syncytial virus subgroup A strain in 15 successive epidemics in one city. *J Med Virol* 64: 374-80, 2001.
  41. Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol* 2117-24, 2001.
  42. Kong X, Shou H, Liu C, Jiang Z. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Chin Med J* 114: 364-368, 2001.
  43. Frabasile S, Delfraro A, Facal L, Videla C, Galiano M, de Sierra MJ, Ruchansky D, Vituriera N, Berois M, Carballal G, Russi J, Arbiza J. Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. *J Med Virol* 71: 305-312, 2003.
  44. Huang JJ, Huang nTY, Huang MY, Chen BH, Lin KH, Jeng JE, Wu JR, Dai ZK. Simultaneous multiple viral infections in childhood acute lower respiratory tract infections in southern Taiwan. *J Trop Pediatr* 44: 308-311, 1998.
  45. Lin HC, Kao CL, Lu CY, Lee CN, Chiu TF, Lee PI, Tseng HY, Hsu HL, Lee CY, Huang LM. Enteric adenovirus infections in children in Típei. *J Microbiol Immunol Infect* 33: 176-80, 2000.
  46. Tsai HP, Kuo PH, Liu CC, Wang JR. Respiratory viral infections among pediatric in patients and out patients in Taiwan from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 39: 111-118, 2001.
  47. Huang YC, Lin TY, Chang LY, Wong KS, Ning SC. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection among paediatric in patients in northern Taiwan. *Eur J Pediatr* 160: 581-582, 2001.
  48. Kao CL et al. Unpublished data.

## 圖表

表一進行抗原型及基因型分析之 2004 年呼吸道融合病毒株之月份及性別分布

月份	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	小計
男	0	1	0	1	1	0	1	2	4	1	0	0	11
女	0	1	0	0	0	0	2	1	2	3	0	0	9
月統計	0	2	0	1	1	0	3	3	6	4	0	0	20

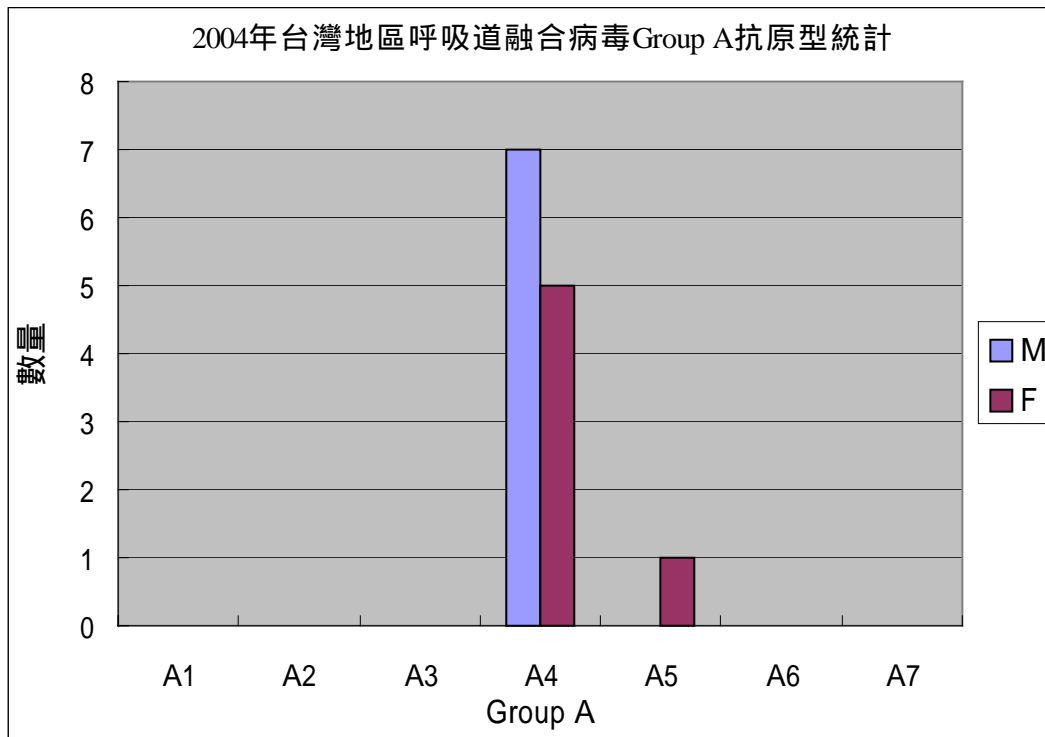
圖一 進行抗原型及基因型分析之 2004 年呼吸道融合病毒株之月份及性別分布柱狀圖



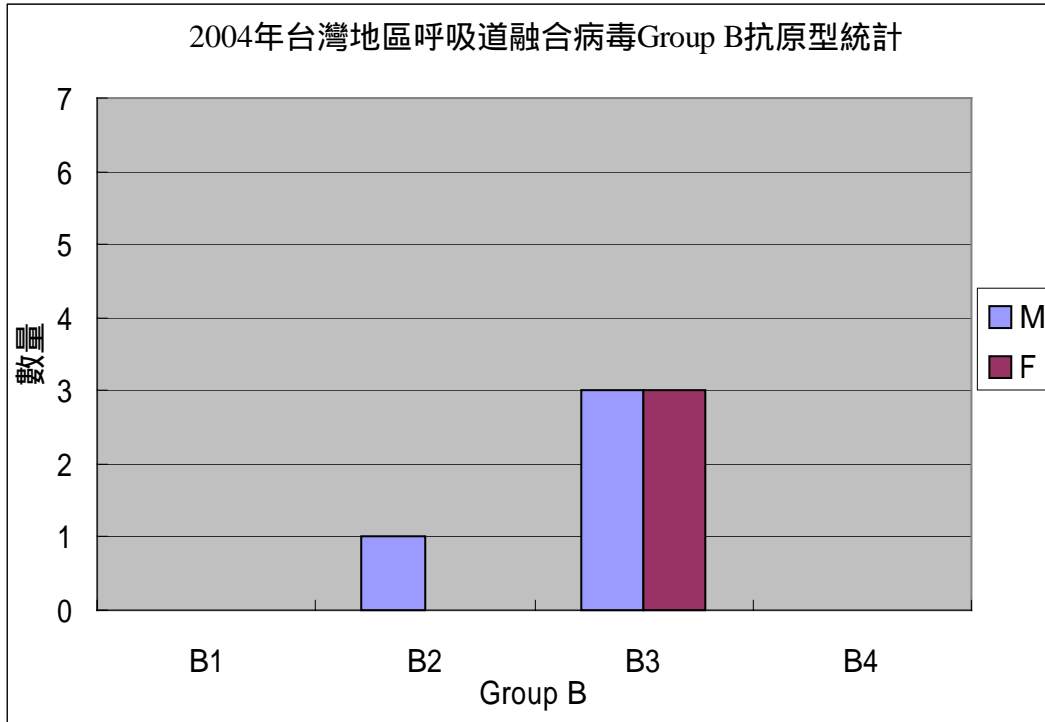
表二 2004 年台灣地區呼吸道融合病毒亞群及抗原型分析

2004 年	M	F	合計
<b>Group A</b>			
A1	0	0	0
A2	0	0	0
A3	0	0	0
A4	7	5	12
A5	0	1	1
A6	0	0	0
A7	0	0	0
<b>Group B</b>			
B1	0	0	0
B2	1	0	1
B3	3	3	6
B4	0	0	0

圖二 2004 年台灣地區呼吸道融合病毒 A 亞群之抗原型分析



圖三 2004 年台灣地區呼吸道融合病毒 B 亞群之抗原型分析

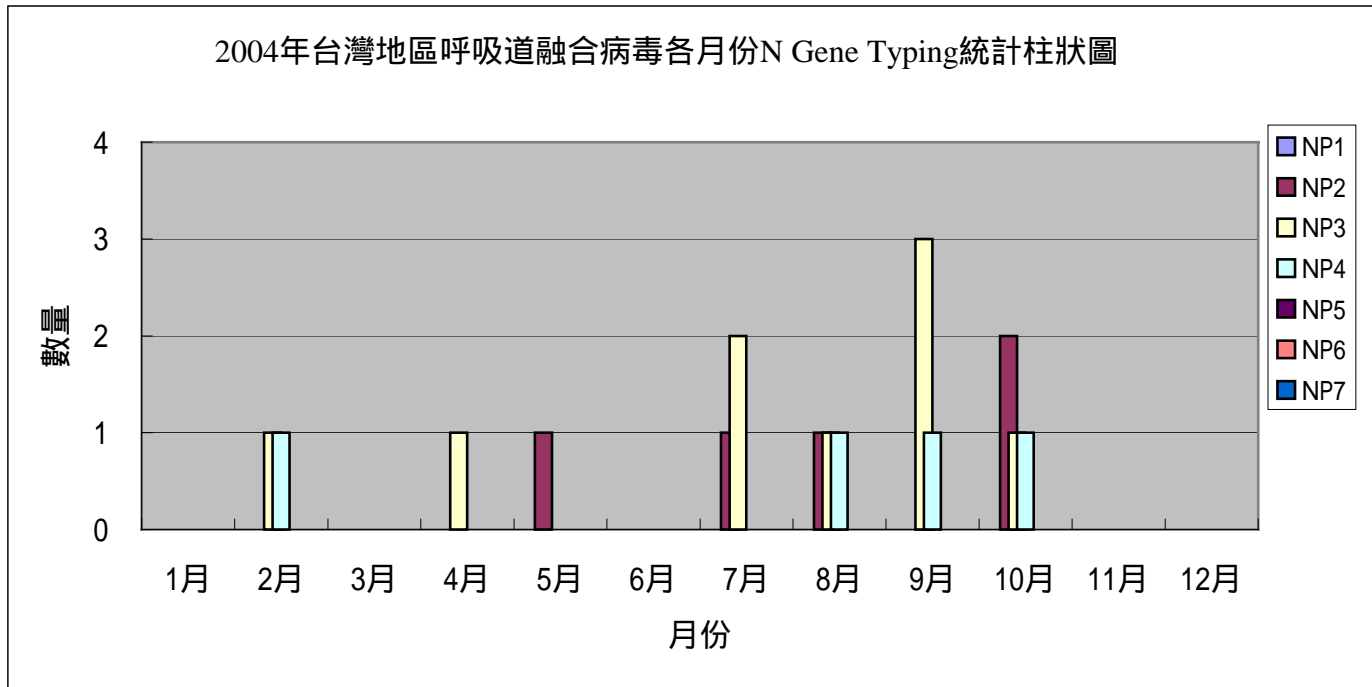


表三 2004 年台灣地區呼吸道融合病毒各月份 N Gene Typing

月份	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	小計
NP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NP2	0	0	0	0	1	0	1	1	0	2	0	0	5
NP3	0	1	0	1	0	0	2	1	3	1	0	0	9
NP4	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	4
NP5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NP6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NP7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
月計	0	2	0	1	1	0	3	3	4	4	0	0	18



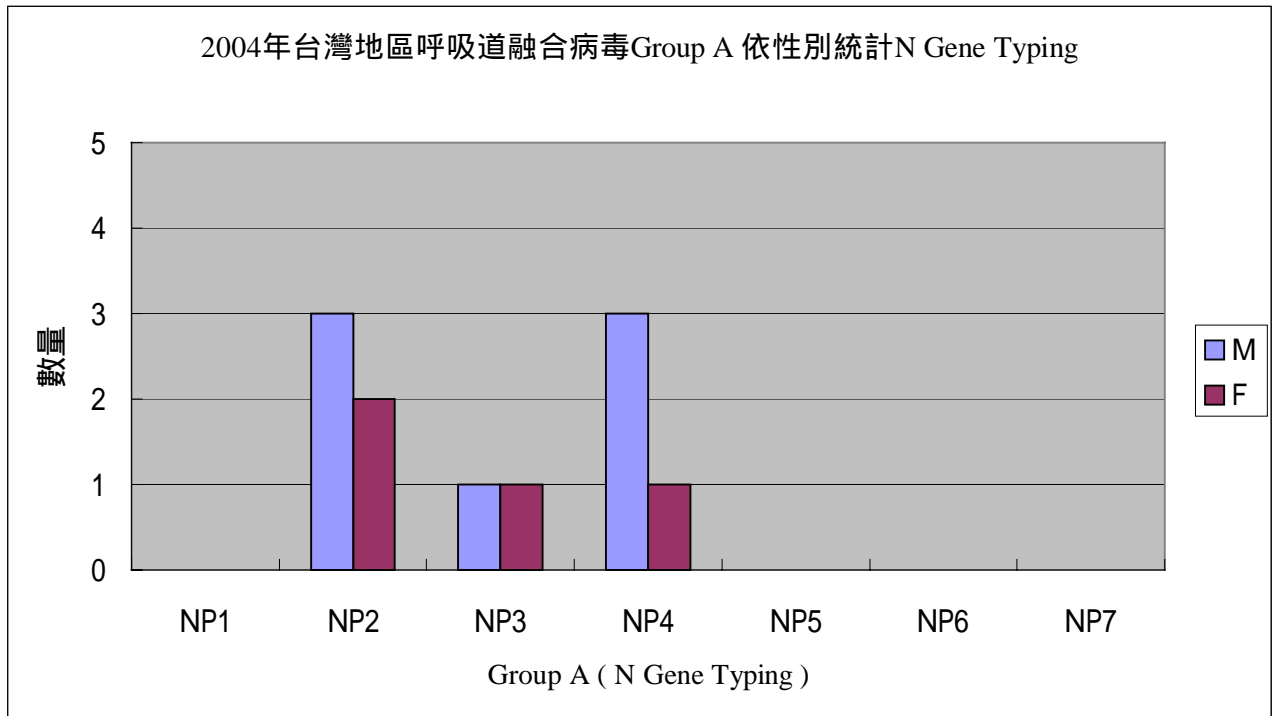
圖四 2004 年台灣地區呼吸道融合病毒各月份 N Gene Typing 分布柱狀圖:



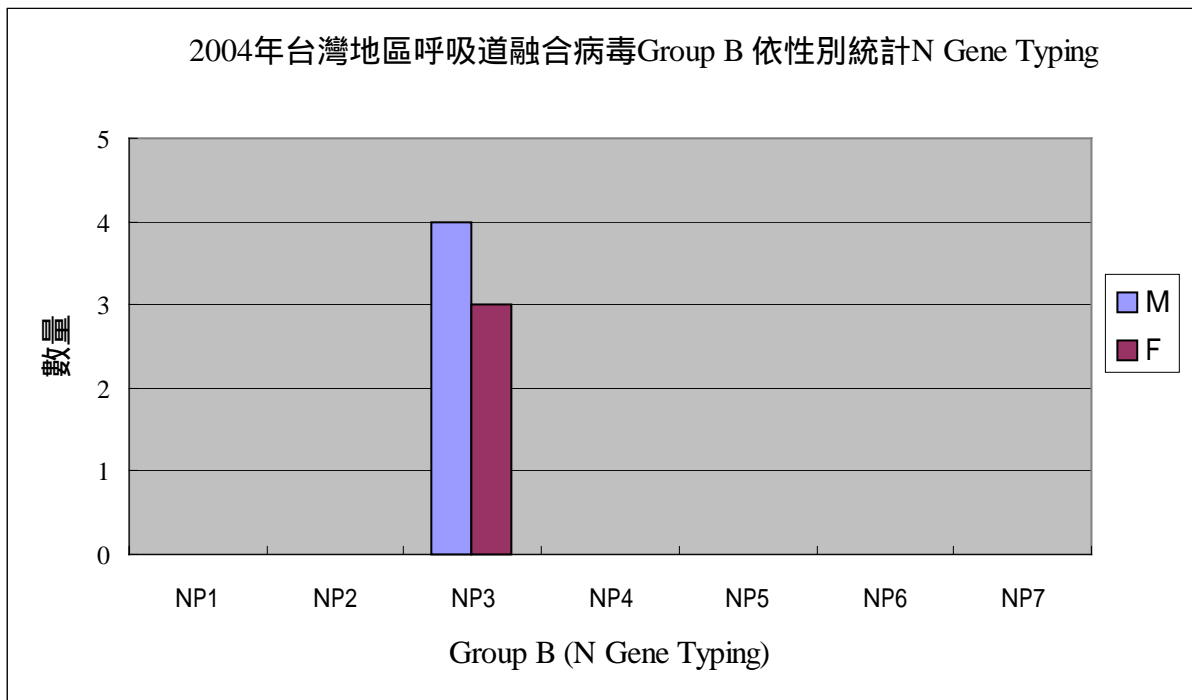
表四. 2004 年台灣地區呼吸道融合病毒 Group A& B 依性別統計 N Gene Typing 之結果

2004 年	M	F	合計
<b>Group A</b>			
NP1	0	0	0
NP2	3	2	5
NP3	1	1	2
NP4	3	1	4
NP5	0	0	0
NP6	0	0	0
NP7	0	0	0
<b>Group B</b>			
NP1	0	0	0
NP2	0	0	0
NP3	4	3	4
NP4	0	0	0
NP5	0	0	0
NP6	0	0	0
NP7	0	0	0

圖五. 2004 年台灣地區呼吸道融合病 A 亞群 N Gene Typing 依性別統計之柱狀圖:



圖六. 2004 年台灣地區呼吸道融合病 B 亞群 N Gene Typing 依性別統計之柱狀圖



圖七.2004 年呼吸道融合病毒 G 基因之種系分析圖

