

計畫編號：DOH91-DC-1007

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

南台灣呼吸道腺病毒之監測-以分子生物學
方法分型

研究報告

執行機構：高雄醫學大學

計畫主持人：林貴香

研究人員：林貴香、林永政、柯冠銘、黃高彬、陳秀玲、

蔣季融、陳豪勇、劉定萍、林智暉、褚佩瑜

執行期間：91年2月7日至91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
一. 中文摘要	(3)
二. 英文摘要	(4)
三. 計劃內容	
(一) 前言	(6)
(二) 材料與方法	(8)
(三) 結果	(10)
(四) 討論	(12)
(五) 參考文獻	(14)
(六) 圖表	(20)

中文摘要

1999年11月至2001年12月南台灣爆發了三次的腺病毒(adenovirus, Ad)大流行，為瞭解其病毒型別、分子流行病學及其與臨床症狀之關係。自1981-2001的1064分離株隨機選取526株以PCR, PCR-RFLP進行分析，結果顯示亞群B佔45.1%，亞群E佔29.3%，亞群C佔25.5%。Ad3和Ad7為第一次流行(1999, 11月至2000, 3月)的主要型別，而Ad4則為第二、三次流行(2000, 10月和2001, 9月)的主要型別。Ad7和Ad4於1999和2000年再浮現卻於2001消聲匿跡。Ad3自1981年以來一直存在著，2001卻由36%降至2%。1999-2000年的Ad7基因型主要為Ad7b，1983唯一的一株是Ad7a。臨床資料分析顯示79%的病人為7歲以下。男女比為2:1。嚴重下呼吸道感染佔42.6%。本研究結果顯示腺病毒之再浮現，型別之轉換，分子流行病學及其與疾病之關係。

ABSTRACT

Three outbreaks of adenovirus (Ad) respiratory infection were found during Nov. 1999 to Dec. 2001 in southern Taiwan via a surveillance program. To elucidate the serotypes and their molecular epidemiology as well as their association with the clinical features, a total of 526 virus strains were randomly selected from 1064 strains isolated during 1981-2001 and were studied using restriction fragment length polymorphism (RFLP) and Polymerase chain reaction (PCR) -RFLP. The major subgenus found was subgenus B (45.1%), followed by subgenus E (29.3%) and C (25.5%). Ad3 and Ad7 were the major types found during the 1st outbreak from Nov. 1999 to March 2000, while Ad4 was found mainly in the 2nd and 3rd outbreaks in October 2000 and September 2001. Ad7 and Ad4 emerged in 1999 and 2000 and declined in 2001, respectively. Ad3 was constantly isolated during the surveillance, however it declined drastically from more than 36% to only 2% in 2001. Genotype analysis showed that Ad7a was found in 1983, however, only Ad7b was found in 1999-2000. The clinical features of 218 patients were analysed during the 1999-2000 outbreak. About 79% of total cases, their age were less than 7 years old. The ratio of male to female was 2:1.

Severe infections, such as pneumonia and acute bronchitis, account for nearly half of the cases (42.6%). The results reveal the reemerging, shifting of serotypes and the clinical association of respiratory adenovirus infections as well as the molecular epidemiology of Ad7 genotypes in southern Taiwan during recent two decades.

Keywords: Adenovirus, Molecular Epidemiology and RFLP

前言

人類腺病毒 (Ad) 共有 51 型，依其生物特性、致瘤性質與 DNA 相似性可再分為 A~F 亞群，Ad 的感染會導致呼吸道、眼部、腸胃道的疾病。亞群 B (含 Ad3, 7, 14, 16, 21, 34, 35)，亞群 C (含 Ad1, 2, 5, 6) 和亞群 E (只含 Ad4) 常導致嬰幼兒、新兵之急性呼吸道感染 (ARD)【Douglas et al., 1997; Videla et al., 1999; Wadell et al., 2000; Erdman et al., 2002; Kolavic-Gray et al., 2002】。新生兒、幼兒及免疫不全病人為高危險群，常造成嚴重的感染【Abzug et al., 1991; Palomino et al., 2000; Carballal et al., 2002】。

Ad7 常與嚴重或致死性呼吸道疾病有關【Nahmias et al., 1967; Kajon et al., 1996; Carballal et al., 2002】。目前 Ad7 共有 12 種基因型 (Ad7p, Ad7a~Ad7k)，在過去的十年中，Ad7b 分佈於澳洲、歐洲、南北美洲；Ad7c 分佈於南非；Ad7d 分佈於中國、日本；Ad7f 分佈於前蘇聯；Ad7h 分佈於南美【Azar et al., 1998; Li et al., 1986, 1996; Wadell et al., 1985, 2000】。

許多國家均有 Ad7 相關之分子流行病學資料。台灣自 1960【Tai et al., 1960】以來均無這方面的資料。1999-2001 台灣爆發了三次的腺病毒流行，為了瞭解相關的致病原及其基因型和分子流行病學，本研究將高醫病毒室 20 年來的呼吸道腺病毒分離株以 PCR-RFLP 或

RFLP 進行分析。

材料與方法

1. 病毒與細胞

本研究由高醫病毒室 1981-2001 年的 1064 分離株中隨機挑選 526 株培養於 HeLa 或 A549 細胞中並以免疫螢光單株抗體確認後大量培養於 HeLa cell 中備用。

2. DNA 萃取

RFLP 分析所需之病毒 DNA 依照已發表之步驟進行(Lin et al., 1986 ; Suzuki et al., 1981)。PCR-RFLP 分析所需之病毒 DNA 萃取則以購自 Amershan Phamacia 生技公司的 blood purification kit 按其步驟進行。

3. 以 PCR-RFLP 進行腺病毒分型

3.1 PCR

以一對 primer

AdnU (5' TTCCCATGGCNCACAACAC-3' 20743-20762)

AdnU-A (5' GCCTCGATGACGCCGCGGTG3' ; 21679-21698)

放大腺病毒 hexon 一段 956bp 的區域【Chroboczek et al., 1992 ; Saitoh-Inagawa et al., 1996】。在 50ul 的反應液中含有 10mM

Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200uM dNTP, 每一 Primer 0.5uM, 1U Taq DNA polymerase (promega, Madison, WI) 及 5ul DNA 萃取物。PCR 程式如下: 94°C 5min (94°C 50sec, 50°C 45min, 72°C 1min) 36 cycles, 72°C 7min。

3.2 RFLP

PCR 產物分別以 Styl I, HaeIII, Hinf I (promega) 於 37°C 作用 4 小時, 然後在含有 0.5ug/ml ethidium bromide 的 3% 明膠上電泳, 拍照, 分析之。

4. 以 RFLP 分析腺病毒基因型

經 PCR-RFLP 鑑定為 Ad7 的病毒株者再進行 RFLP 分析。取 1~2ug 之病毒 DNA 以 BamH I (promega) 作用 4hr, 37°C, 再於含有 0.5ug/ml ethidium bromide 的 1% agarose gel 上電泳 16hr, 50 伏特, 照相, 分析之。

5. 病人資料分析

收集 1999-2000 年流行期間 218 位病人之資料就其年齡、性別及臨床症狀加以分析。

結果

1. 1981-2001 每年腺病毒型別分析

自 1981-2001 所分離的 1064 株病毒隨機選取 526 株，利用一對 primer (AdnU-S' 和 AdnU-A) 放大 hexon 區一 956bp 的片段 (圖一)，再以 Sty I, HaeIII 及 Hinf I 進行 RFLP 分析 (圖二)。524 株中，亞群 B 佔 45.1%，亞群 E 佔 29.3%，亞群 C 佔 25.5%，亞群 D 則只有一株 (表一)。

亞群 B 有 237 株，其中 55.6% (132/237) 為 Ad3，30.4% (72/237) 為 Ad7，13.9% (33/237) 為 Ad14 (表一)。Ad3 為 1981-1989 和 1990-1998 的主要流行株 (分別佔 67.7% 和 44%)。然而，在 1999 年 11 月爆發的腺病毒呼吸道感染的流行中 Ad7 卻已浮現成為主要流行株 (佔 36.0%)。而 2000 年 Ad7 仍為主要流行株之一 (佔 21.3%) 高於 Ad3 (佔 21.3%) 和 Ad4 (佔 27.5%)。

Ad4 於 2001 年轉變為主要流行株 (佔 52.4%) 而 Ad7 則戲劇性的減少到剩 1.0%。Ad3 也降至 2.0%，而 Ad14, Ad1 和 Ad2 則有增加的趨勢 (表一)。

2. 1999-2000 年呼吸道腺病毒流行之情形

在 1999-2000 年共爆發三次的呼吸道腺病毒流行，第一次流行

高峰期為 1999 年 11 月到 2000 年元月，Ad3 和 Ad7 為主要的分離株。第二、三次流行高峰期分別為 2000 年 9-10 月和 2001 年 9 月，Ad4 為主要的分離株（圖三）。

3. Ad7 的 RFLP 基因型分析

在 1981-2001 共分離到 71 株 Ad7，其中 70 株（佔 98.6%）來自 1999-2001 年隨機取其中 37 株進行 RFLP 分析。1983 年唯一的一株是 Ad7a，其餘來自 1999-2000 年的 36 株均為 Ad7b（圖四）。

4. 病人之年齡及臨床症狀分析

在 218 個分析病例中，男女比例為 2:1 且 78.8% 為 7 歲以下。三個主要感染型別為 Ad3（佔 36.2%），Ad7（佔 31.2%）和 Ad4（佔 16.5%）（表二）腺病毒感染之主要症狀為 pharyngitis-tonsillitis（佔 40.3%）、acute bronchitis（佔 21.8%）、pneumonia（佔 20.8%）、flu-like symptoms（佔 17.1%）

討論

在台灣因呼吸道感染而住院的小孩中，腺病毒佔第三位(佔 13.3%)，次於腸病毒(10.3%)和 RSV(4.4%)【Tsai et al., 2001】。

本研究分析 20 年來(1981-2001)之 526 分離株，發現有 7 種血清型(Ad1, 2, 3, 4, 7, 8, 14)存在於南台灣。其中亞群 B 的 Ad3 活躍於 1981-2001 年(佔 36.0~67.7%)，但卻於 2001 年降至 2%，另一方面 Ad7 則於 1999 與 2000 再浮現(各佔 45.3%和 21.3%)，卻於 2001 年降到 1%，而與 Ad7 同時於 2000 年浮現的 Ad4(佔 27.5%)卻於 2001 年獨占鰲頭(佔 52.4%)。本研究 2002 年之結果雖然尚未完成，但已可看出 Ad3 與 Ad7 又再一次成為流行之主流，而 Ad4 則明顯減少了(表三)。

Ad4 和 Ad7 曾經是美國新兵訓練中心急性呼吸道疾病的禍首。疫苗停產後 Ad4, Ad7 再度於 1997-2000 年爆發流行【Edman et al., 2000; Kolavic-Gray et al, 2000; Houg et al, 2000】。同時期台灣也於 1999-2000 年爆發 Ad7, Ad4 再浮現所引起的流行，英國、韓國也同樣有 Ad7, Ad4 的流行發生【Cooper et al., 2000; Houg et al., 2002】。

以年代分析台灣株各型之變化及 Ad7 基因型之轉變發現 Ad3, Ad7

主要發生於第一次流行（1999，9月~2000，2月），Ad4則主要發生於第二、三次流行（2000，10月和2001，9月）。台灣有關腺病毒呼吸道感染的報導只有一篇發表於1960年（Tai et al., 1960），當時被發現的型別有Ad3, 4, 5, 7, 8。而關於結膜炎的報告高醫有數篇，被發現之病毒有Ad3, 4, 7, 8, 11, 19和37（Sheu et al., 1987, 1988；Chang et al., 2001a, b）。

有趣的是Ad4, Ad7在1999-2000的流行之前有短暫的出現，隨後即消失。本研究經RFLP分析發現兩種Ad7基因型，Ad7a, Ad7b。其中Ad7a是1983年唯一的一株，Ad7b則全部出現在1999-2000年，這種基因型移轉的現象在世界其他地區也有發現【Erdman et al., 2002】。台灣與澳洲、歐洲、南北美洲的Ad7基因型均為Ad7b，而與台灣鄰近的中國和日本卻為Ad7d。可能的原因是近年來國人旅遊的範圍越來越廣，但是與中國和日本也有頻繁的互動，因此近期內應注意基因型之變化。

病例分析顯示79%的病例為7歲以下，其中5歲以下佔62.4%，男女比2：1，下呼吸道感染佔42.6%，此結果與已發之報告相近【Cooper et al., 2000；Hong et al., 2001】。總結本研究結果顯示1980-2001台灣之呼吸道腺病毒感染之趨勢，Ad7, Ad4為近年來再浮現之病毒，Ad7b則為Ad7主要的基因型。以分子生物學方法監

控腺病毒之動態仍然必須持續進行。

參考文獻

1. Abzug MJ, Levin MJ. Neonatal adenovirus infection: four patients and review of the literature. *Pediatrics* 1991; 87: 890-6.
2. Azar R, Varsano N, Mileguir F, Mendelson E. Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in Israel: identification of two new genome types, Ad7k and Ad7d2. *J Med Virol* 1998; 54:291-9
3. Carballal G, Videla C, Misirlian A, Requeijo PV, Aguilar M. Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. *BMC Pediatr* 2002; 16; 2(1): 6
4. Chang CH, Sheu MM, Chern CL, Lin KH, Huang WL, Chen CW. Epidemic keratocconjunctivitis caused by a new genotype of adenovirus Type 8 (Ad8)-a chronological review of Ad8 in Southern Taiwan. *Jpn J Ophthalmol.* 2001; 45: 160-6
5. Chang CH, Sheu MM, Lin KH, Chen CW. Hemirrhagic viral keratoconjunctivitis in Taiwan caused by adenovirus types 19 and 37: Applicability of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in detecting adenovirus genotypes. *Cornea*

2001; 20(3): 295-300

6. Chroboczek J, Bieber F, Jacrot B. The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology* 1992; 186: 280-5.
7. Cooper RJ, Hallett R, Tullo AB, Klapper PE. The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96. *Epidemiol Infect* 2000; 125: 333-45.
8. Douglas DR, Richard JW, Frederick GH. Adenovirus. *Clinical virology*. 1997; 525-547.
9. 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(3): 269-77
10. Hong JY, Lee HJ, Piedra PA, Choi EH, Park RH, Koh YY, Kim SW. Lower respiratory tract infections due to adenovirus in hospitalized Korean Children: epidemiology, clinical feature, and prognosis. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1423-9.
11. Houg HS, Liang S, Chen CM, Keith J, Echavarria M, Sanchez JL, Kolavic SA, Vaughn DW, Binn LN. Rapid type-specific diagnosis of adenovirus type 4 infection using a hexon-based quantitative

- fluorogenic PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 42(4): 227-36
12. 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.
 13. 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(7): 808-18
 14. Li Q.G. and Wadell G. Analysis of 15 Different Genome Types of Adenovirus Type 7 Isolated on Five Continents. *J Virol* 1986; 60(1): 331-5
 15. Li Q.G., Zang QJ, Liu YH, and Wadell G. Molecular epidemiology of adenovirus type 3 and 7 isolated from children with pneumonia in Beijing. *J Med Virol* 1996; 49:170-177.
 16. Li QG, Wadell G. Comparison of 17 genome types of adenovirus type 3 identified among strains recovered from six continents. *J Clin Microbiol* 1988; 26 (5): 1009-15

17. 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. *Kaohsiung J Med Sci* 1986; 2:774-7.
18. Nahmias AJ, Griffith D, Snitzer J. Fatal Pneumonia Associated With Adenovirus Type 7. *Amer J Dis Child* 1967; 114(1): 36-41
19. Palomino MA, Larranaga C, Avendano LF. Hospital-acquired adenovirus 7h infantile respiratory infection in Chile. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 527-31.
20. Saito-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.
21. Sheu MM, Huang WL, Lin KH, Chen CW, Lin CC. A Molecular Study of Adenovirus type 8 isolated from viral conjunctivitis in the Kaohsiung Area during 1983-1984: A chronological comparison of subtypes by endonuclease cleavage analysis. *Kaohsiung J Med Sci* 1987; 3(5): 338-45
22. Sheu MM, Lin KH, Huang WL, Chen CW. Adenovirus type 19 and 37 Isolated from viral conjunctivitis in the Kaohsiung area during

- 1983-1984: Molecular epidemiological study by DNA endonuclease cleavage analysis. *Kaohsiung J Med Sci* 1988; 4(2): 72-80.
23. Suzuki N, Ueno T, Yemashita T, Fujinaga K. Grouping of adenoviruses and identification of restriction endonuclease cleavage patterns of adenovirus DNA using infected cell DNA: Simple and practical methods. *Microbiol Immunol* 1981; 25(12): 1291-301
24. Tai FH, Grayston, JY, Johnston, PB, Woolridge, RL. Adenovirus infections in Chinese army recruits on Taiwan. *J Infect Dis* 1960; 107:160-4.
25. 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.
26. 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.
27. Wadell G, Annika Allard, and John C. Hierholzer. general issues in microbiology. Chapter 76. 2000; 970-982.
28. Wadell G, Cooney MK, Linhares A, da C, de Silva L, Kennet ML, Kono R, Fang RG, Lindman K, Nascimento JP, Schoub BD, Smith

- CD. Molecular epidemiology of adenovirus: Global distribution of adenovirus 7 genome types. *J Clin Microbiol* 1985; 21:403-408.
29. Wadell G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1984; 110: 191-220.
30. Yamadera S, Yamashita K, Akatsuka M, Kato N, Inouye S. Trend of adenovirus type 7 infection, an emerging disease in Japan. *Jpn. J. Med. Sci. Biol* 1998; 51:43-51.

Subgenus and species	1981~89	1990~98	1999	2000	2001	Total
B						
3	21 (67.7)	22 (44)	27 (36.0)	58 (36.3)	4(1.9)	
7	1 (3.2)	0	34 (45.3)	34 (21.3)	3(1.4)	237(45.1)
14	3 (9.7)	4 (8)		3 (1.9)	23(11.0)	
C					0	
1	4 (12.9)	9 (18)	8 (10.7)	10 (6.3)	39(18.6)	134(25.5)
2	2 (6.5)	14 (28)	6 (8.0)	10 (6.3)	32(15.2)	
D						
8				1(0.6)		1(0.2)
E						
4		1 (2)		44 (27.5)	109(51.9)	154(29.3)
Total	31	50	75	160	210	526

表一 1981-2001 年呼吸道腺病毒分離情形

表二 各年齡層線病毒感染情形

Subgenus and species	1999~2000 Age groups				Total
	3	4~7 years	8~11 years	12	
B					
3	24	40	11	4	79(36.2)
7	22	28	14	4	68(31.2)
14	1	0	1	1	3(1.4)
C					
1	6	10	0	0	16(7.3)
2	10	5	0	0	15(6.9)
D					
8	1	0	0	0	1(0.5)
E					
4	7	18	9	2	36(16.5)
Total	71(32.6)	101(46.2)	35(16.1)	11(5.0)	218

表三 2002 年 1-12 月呼吸道拭子分離腺病毒之分型

分型/月份	一月	二月	三月	四月	五月	六月	七月	八月	九月	十月	總計	%
2 型	5	1	3	0	0	0	0	2	0	6	17	12.1%
3 型	0	0	0	1	1	0	2	6	17	25	52	37.1%
4 型	2	0	0	2	4	1	0	0	2	0	11	7.9%
1 / 5 / 6 型	0	2	4	3	2	1	2	2	2	1	19	13.6%
7 型	0	0	1	2	0	1	7	3	8	6	28	20.0%
14 型	3	3	4	1	0	0	1	0	1	0	13	9.3%
合計	10	6	12	9	7	3	12	13	30	38	140	100%

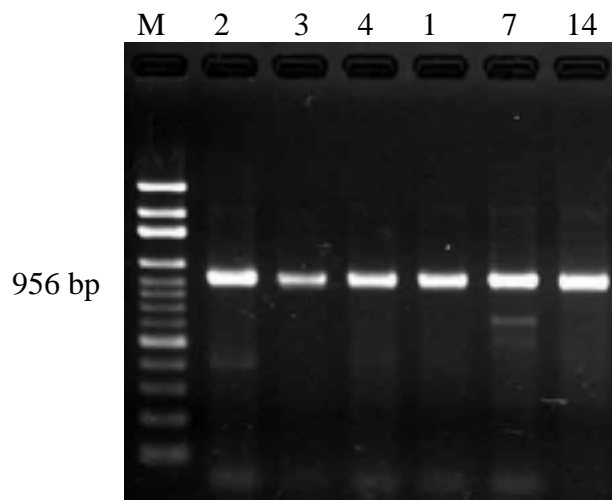


圖 1 .Adenovirus hexon gene 之 PCR 產物電泳圖，圖上方數字表示 Ad 之血清型，

M: 100 bp Ladder

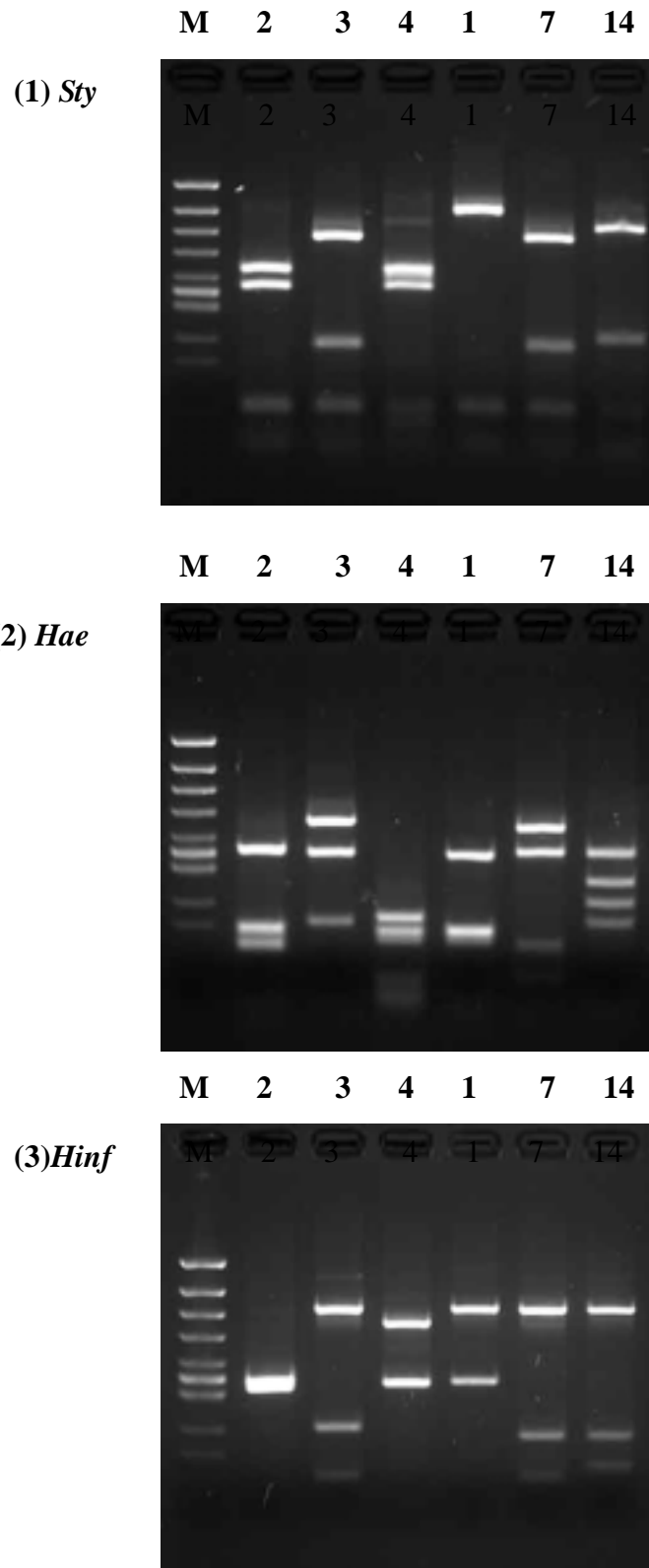


圖 2. 以 956 bp Adenovirus hexon gene PCR 產物經限制酶 *Sty* , *Hae* 及 *Hinf*

切割後電泳分析圖，圖上數字為 Ad 血清型別 M: *X174 Hinc* 。

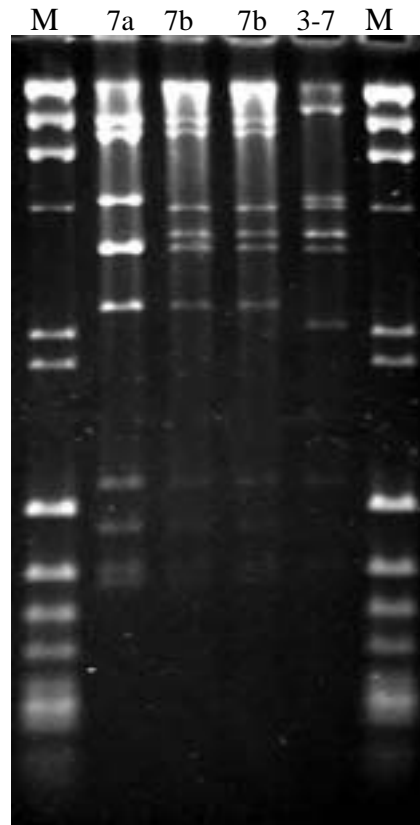


圖 3.以限制酶 *Bam* *H* 切割 Ad7 後電泳分析圖。

Lane 1:Ad 7a(1155/83), Lane 2:Ad 7b(2123/99), Lane 3:Ad 7b(1469/00),Lane
 4:Ad 3-7(2165/99). M : molecular weight marker (*Hind* and *X174 Hinc*
)

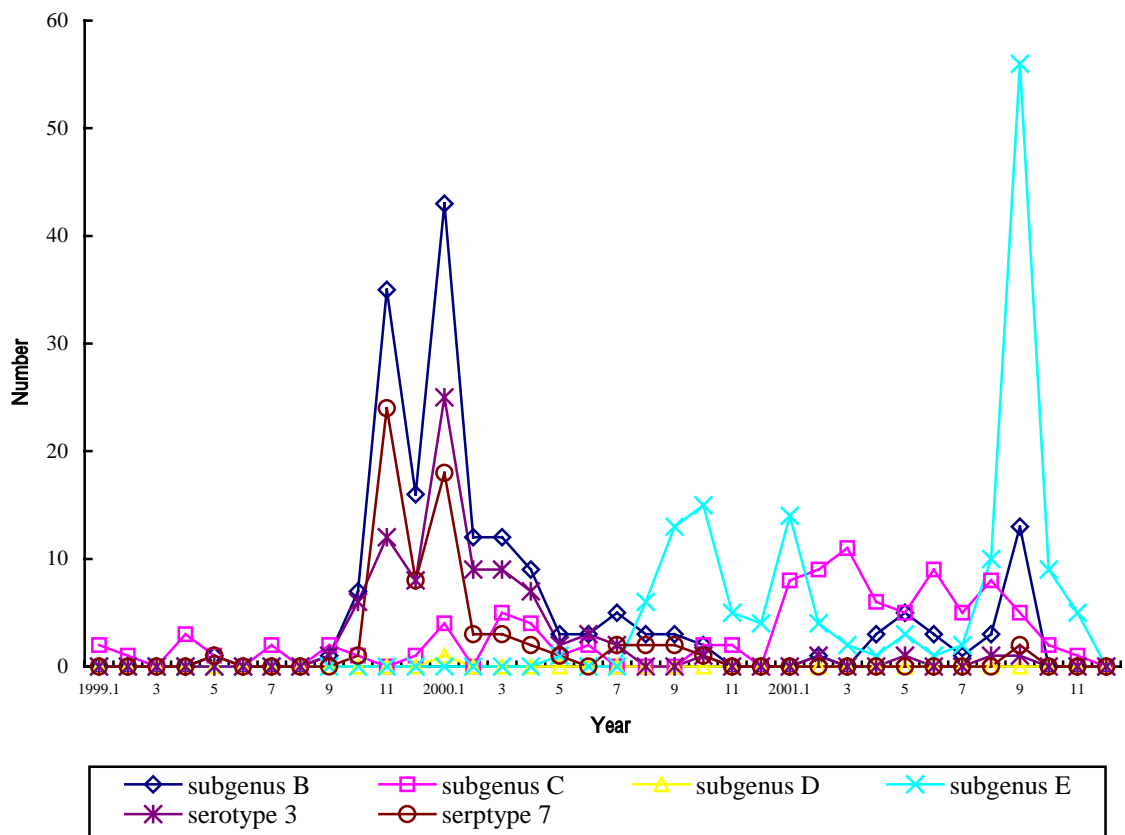


圖 4. 1999-2001 年呼吸道線病毒野外分離情形。