

PCR-RFLP 法によるアデノウイルス結膜炎の迅速診断

齋藤 和香¹⁾, 伊藤 典彦¹⁾, 磯部 和美¹⁾, 大野 重昭¹⁾, 大嶋 彰¹⁾²⁾
 永本 洋子²⁾, 中嶋 治彦²⁾, 畠 啓視²⁾, 石古 博昭²⁾, 青木 功喜³⁾

¹⁾横浜市立大学医学部眼科学教室, ²⁾三菱化学ビーシーエル, ³⁾青木眼科

要 約

結膜炎を起こすアデノウイルス(Ad)の検出と同定を行うために, polymerase chain reaction (PCR) 法と restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP 分析) を組み合わせた PCR-RFLP 法を開発した. Ad のヘキソン蛋白をコードする構造遺伝子内 956 塩基対を増幅する nested-PCR を, 主な結膜起因の Ad 血清型 (3, 4, 8, 11, 19, および 37 型) を含む標準株 14 血清型に対して行った. その結果, すべての血清型で目的とする遺伝子増幅産物を得ることができた. この増幅産物に対し, 3 種類の制限酵素 *Eco* T 14 I, *Hae* III, および *Hin* fI の切断パターンを組み合わせる RFLP 分析を行ったところ, 14 血清型の分類が可能であった. 以上の方法を 1994 年 6 月から 8 月の間に全国の 5 眼科施設でウイルス性結膜炎と診断された患者の結膜擦過物 70 検体に応用し, 同時に分離培養—中和試験を行い, 結果を比較した. 70 検体のうち, PCR では 38 検体 (54.3%) が Ad 陽性であり, 分離培養では 33 検体 (47.1%) が陽性で

あった. 分離培養が陽性であった 33 検体はすべて PCR 陽性であった. PCR 陽性の 38 検体の PCR-RFLP 法の結果は, Ad 37 型が 44.7%, 3 型が 39.5%, 11 型が 7.9%, 8 型が 5.3%, そして 4 型が 2.6% であった. PCR 陽性で分離培養が陰性であった 5 検体の PCR-RFLP 法による血清型は Ad 37 型が 3 検体, 8 型が 2 検体であった. 分離培養陽性の 33 検体では PCR-RFLP 法の結果と中和試験の結果は一致した. また, 分離培養—中和試験は結果を得るまでに少なくとも 2 週間以上を要したのに対し, PCR-RFLP 法では検体採取から約 3 日間で Ad の同定が可能であった. 以上から, PCR-RFLP 法による Ad の検出同定法は従来の分離培養—中和試験と比較して高感度であり, 迅速であった. (日眼会誌 100: 163—168, 1996)

キーワード: アデノウイルス, 結膜炎, 迅速診断, PCR-RFLP 法, 結膜擦過物

Rapid Detection and Identification of Human Adenovirus Directly from Conjunctival Scrapings by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis

Waka Saitoh¹⁾, Noriko Itoh¹⁾, Kazumi Isobe¹⁾,
 Shigeaki Ohno¹⁾, Akira Oshima¹⁾²⁾, Yoko Nagamoto²⁾,
 Haruhiko Nakajima²⁾, Keishi Hata²⁾, Hiroaki Ishiko²⁾
 and Koki Aoki³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

²⁾Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc

³⁾Aoki Eye Clinic

Abstract

Polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis were combined for detection and identification of adenovirus (Ad), a common agent of conjunctivitis in Japan. Nested-PCR with two primer sets that hybridize to the conserved region for hexon protein

of 14 prototypes of Ad serotype 1 to 8, 11, 14, 19, 37, 40, and 41, amplified 956 bps DNA fragment. The amplified fragments from 14 prototypes were completely differentiated with the combination of three restriction endonucleases, *Eco* T14I, *Hae* III, and *Hin* fI. We applied this new method to 70 conjun-

別刷請求先: 〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦3-9 横浜市立大学医学部眼科学教室 齋藤 和香
 (平成7年7月25日受付, 平成7年10月6日改訂受理)

Reprint requests to: Waka Saito M.D. Department of Ophthalmology, Yokohama city University School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken 236, Japan
 (Received July 25, 1989 and accepted in revised form October 6, 1995)

ctival scrapings from patients with conjunctivitis, and compared the results with those of the combination of culture isolation and neutralization test. PCR was positive in 38 out of 70 samples (54.3%), whereas 33 of 70 samples (47.1%) were positive by cell culture. Compared with cell culture isolation, the PCR method had a sensitivity of 100% (33 of 33). Positive PCR samples were further classified into Ad 37 (44.7%), 3 (39.5%), 11 (7.9%), 8 (5.3%), and 4 (2.6%) by PCR-RFLP analysis. Of five samples that were PCR positive and cell culture negative, three samples were Ad 37 and two were Ad 8 by PCR-RFLP analysis. These differentiations of cell culture positive samples were identical to the results of the

neutralization test. It took only about three days to detect and identify Ad by PCR-RFLP analysis, whereas it took at least two weeks by culture isolation and neutralization test. Our newly developed method of detecting and typing human Ad by PCR-RFLP analysis is more sensitive, accurate, and prompt than the conventional cell culture isolation and neutralization test. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 163-168, 1996)

Key words: Adenovirus, Conjunctivitis, Rapid diagnosis, PCR-RFLP analysis, Conjunctival scrapings

I 緒 言

アデノウイルス(以下, Ad)結膜炎は, 眼科領域において日常よく遭遇する感染症である. Ad はウイルスの生物学的特性によって, A~F 群までの 6 亜群と 49 の血清型に分類されている¹⁾. 我が国における主要な結膜炎起因の血清型は Ad 3, 4, 8, 11, 19, 37 型である²⁾. Ad 結膜炎は流行性が高く, しばしば家族内, 学校内, 職場内, および院内感染の原因となる. しかし, 有効な抗 Ad 薬が開発されていないため, Ad 結膜炎を迅速に診断し, 患者を隔離して感染を予防することは, 公衆衛生上重要な対策である. 従来, Ad 検出同定のための標準法は分離培養-中和試験であった. しかし, 分離培養法では, 特に Ad 8 型の細胞変性効果が起こりにくく, 最低 2 週間以上の期間を必要とする点, また, 中和試験では同じ亜群内(特に亜群 D)で交差性が存在する点, そして, 世界的に中和血清が不足しているため, 再現性の点などに問題があった. 最近, Ad を結膜擦過物から直接検出する迅速診断法としてアデノクロン®が開発され, 臨床応用されているが, 偽陰性が少なくなく分離培養法と比較した陽性一致率が目視判定で 47.8% との報告³⁾があった. このため, 日常臨床においてより実用的な病因診断法の確立が望まれていた.

近年 polymerase chain reaction(以下, PCR)法が開発され, 臨床検査法として応用されてきた. PCR 法は目的とする DNA がわずかでも存在すれば, 数時間で増幅反応を行うことができる高感度, 迅速な検査法であり, 目的の DNA に対する特異的なプライマーさえあれば, 再現性も確実である. また, restriction fragment length polymorphism analysis(以下, RFLP)法は, DNA の多様性を分類する方法として分子生物学の分野で重要な役割を果たしてきた. 今回我々は, Ad のヘキソン領域をコードする構造遺伝子の下流側を含む 956 塩基対を増幅する nested-PCR を開発した. そして, この方法を *Eco* T 14 I, *Hae* III, および *Hin* fl の 3 種の制限酵素を用い

た RFLP 法と組み合わせることによって, 主な Ad 結膜炎起因の 6 血清型(3, 4, 8, 11, 19, 37 型)を含む 14 血清型を検出同定することができた. さらに, この方法を臨床検体に応用し, 本法が Ad 結膜炎の正確な迅速診断法であるという結果を得たので, ここに報告する.

II 実験方法

1. 対 象

1) 臨床検体

1994 年 6 月から 8 月の間に札幌, 盛岡, 足柄, 松山, および熊本の 5 眼科施設で, ウイルス性結膜炎を疑った患者の結膜擦過物 70 検体を対象とした. 2 本の綿棒によって下眼瞼結膜を数回擦過した後, 1 本は 4.5 ml ネジぶた付きプラスチック製(住友ベークライト)の PCR 用チューブ(10 mM Tris, 1 mM EDTA[pH 8.0] 1.5 ml 溶液)に保存し, 他の 1 本は同様に分離培養用滅菌スクリーキャップ付チューブ(FALCON)(0.5% ウシ血清アルブミン, 2.5% プイオン, 0.01% ゲンタマイシン 2.5 ml 溶液)に保存した.

2) Ad 標準株

Ad 1~8 型, 11 型, および 19 型は国立予防衛生研究所から譲渡された. Ad 14 型, 37 型, 40 型, および 41 型は American Type Culture Collection から購入した. Ad 1~8 型, 11 型, 14 型, および 19 型は 2% 仔牛胎児血清(CSL Limited)とゲンタマイシンを含んだ e-MEM 培地(ニッスイ)で培養された HEp-2 細胞に接種した. Ad 37 型は, 2% 仔牛胎児血清とゲンタマイシンを含んだ e-MEM 培地で培養された HEL 細胞に接種した. Ad 40 型と 41 型は, 2% 仔牛胎児血清とゲンタマイシンを含んだ e-MEM 培地で培養された 293 細胞に接種した.

2. 方 法

1) DNA 調整

i) 臨床検体の DNA 溶出

臨床検体から DNA を溶出させるため, PCR 用のチューブに回収された 1.5 ml の試料のうち, 200 μ l の溶

液を1.5 mlの微量遠心管に分注し、12,000×g、4°Cで30分間遠心分離した。沈殿物に98 μlの溶出用緩衝液(10 mM Tris-Cl[pH 8.3], 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20)と15.5 mg/mlのproteinase Kを2 μl加えて55°Cで1時間反応させた。その後、95°Cで10分間加熱しDNA溶出を終了した。

ii) Ad標準株のDNA抽出

Ad 1~8型, 11型, 14型, 19型, 37型, 40型, および41型の標準株DNAの抽出を行った。分離培養液の上清200 μlに対して、抽出緩衝液(0.1 M Tris-HCl[pH 8.0], 0.01 M EDTA, 1% SDS)を174.2 μlと15.5 mg/mlのproteinase Kを25.8 μl加え、42°Cで4時間反応を行った。その後、フェノールクロロホルム抽出し、エタノール沈殿を行った。沈殿物を50 μlの緩衝液(10 mM Tris[pH 8.0], 1 mM EDTA)に溶解し、これを20倍希釈したものの、260 nmにおける吸光度を測定した。260 nmにおける吸光度の値が1.00を濃度が50 μg/mlであると、標準株DNA溶液の濃度を10 pM/μlに調整した。

2) Ad検出

i) プライマー

Nested-PCRを行うため、すでに明らかにされているAd 2型⁴⁾、5型⁹⁾、40型⁹⁾、および41型⁹⁾のヘキソン領域の塩基配列を比較し相同性の最も高い位置をプライマーの位置として選択した。第一段階PCRを行うプライマーセット(AdTU 7: 5'-GCCACCTTCTTCCCCATGGC-3'およびAdTU 4': 5'-GTAGCGTTGCCGCGCAGAA-3')はAd 2型の塩基配列において20,734塩基対から21,737塩基対に相当する1,004塩基対を増幅し、第二段階PCRを行うプライマーセット(AdnU-S': 5'-TTCCCCATGGCNCACAACAC-3'およびAdnU-A: 5'-GCCTCGATGACGCCGCGGTG-3')はAd 2型の塩基配列において20,743塩基対から21,698塩基対に相当する956塩基対を増幅するように設計した。

ii) Nested-PCR

プライマーセットAdTU 7とAdTU 4'によって第一段階を行い、プライマーセットAdnU-S'とAdnU-Aによって第二段階PCRを行った。PCR反応には検体から溶出させたDNA溶液の原液または滅菌水で100倍希釈した液の10 μlを鋳型DNAとして用いて、0.5 mlのチューブで行った。PCR反応液50 μl中には10 mMのTris-HCl[pH 8.3]、50 mMのKCl、1.5 mMのMgCl₂、200 μMのdNTP(すなわちdATP, dGTP, dCTP, dTTP)、0.5 μMのそれぞれのプライマー、および1ユニットのTaq DNA polymerase(Roche Diagnostic Systems)が含まれていた。PCR法はPerkin-Elmer Cetus製のCetus 9600を用いて、DNA変性は94°C 1分間、アニーリングは50°C 1分間、DNA伸長は72°C 2分間を1サイクルとし、計36サイクル行った。1 pg/反応チューブのAd 5型標準株DNAをPCR反応の陽性対

照とし、健康人の結膜擦過物を陰性対照として使用した。PCR反応後、反応液のうちの5 μlを0.5 μg/mlのエチジウムブロマイドを含有した3%アガロースゲルに電気泳動し、目的の長さのバンドの有無(1,004塩基対または956塩基対)を紫外線照射下で観察した。

また、Ad以外の結膜に存在する可能性の高いウイルス(herpes simplex virus 1型および2型, cytomegalovirus)、真菌(*Candida albicans*)および細菌(*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*)のDNAを用いて、このnested-PCR法の特異性を確認した。

さらに、nested-PCRの感度を測定するため、既知の濃度のAd 5型標準株から抽出したDNAに対しPCR反応を行った。フェノールクロロホルム抽出液、エタノール沈殿を行ったAd 5型標準株のウイルスDNA量を吸光度から算出し、1 μl中10¹⁰個から1個まで濃度を希釈した。この希釈列に対し本PCR法を行った後、0.5 μg/mlのエチジウムブロマイドを含む3%アガロースゲルによる電気泳動を行い956塩基対のバンドを紫外線下で観察した。

iii) Ad分離培養

Adの分離培養は、HEp-2細胞とHEL細胞を用いて行った。細胞変性効果の起こらなかったもののうち、PCRが陽性であった検体に対しては6代の継代培養を行い、この間に細胞変性効果のみられなかったものを分離培養陰性とした。継代培養もすべてHEp-2細胞およびHEL細胞を用いて行った。PCRが陰性であった検体に対しては2代の継代を行い、Chemicon International社の抗Adモノクローナル抗体を用いて同定した。

3) Ad血清型同定

i) PCR-RFLP法

Nested-PCRが陽性であった検体に対し、3種の制限酵素Eco T 14 I, Hae III, およびHin flの切断パターンを組み合わせるPCR-RFLP法を行った。PCR法によって得られた956塩基対の遺伝子増幅産物を3種の制限酵素で切断した後、0.5 μg/mlのエチジウムブロマイドを含有した3%アガロースゲルに電気泳動し、切断パターンを紫外線照射下で観察した。

ii) 中和試験

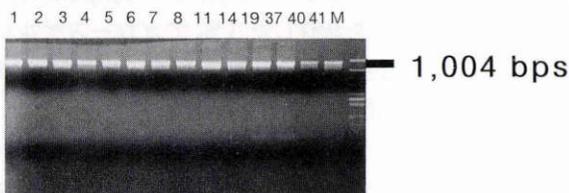
分離培養で細胞性効果がみられた検体に対し、抗Ad標準血清による血清型同定を行った。

III 結 果

1. プライマーの特異性

主なAd結膜炎起因の血清型(3型, 4型, 8型, 11型,

a) 第1段階 PCR



b) 第2段階 PCR

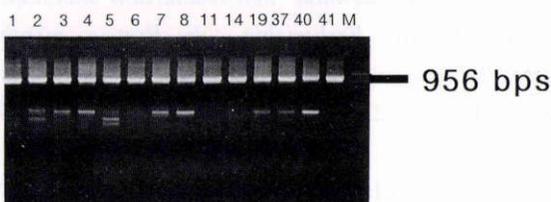


図1 標準株 14 血清型における polymerase chain reaction (PCR) 法の結果.

a) 第1段階 PCR の結果, Ad 標準株 14 血清型すべてにおいて, 1,004 塩基対の増幅産物がみられる(棒線), b) 第2段階の PCR の結果, Ad 標準株 14 血清型すべてにおいて, 956 塩基対の増幅産物がみられる(棒線). 各レーンの数字は Ad の血清型, M は分子量マーカーの ϕ X 174-*Hinc* II を表す.

19 型, 37 型) を含む 14 血清型の標準株すべての DNA において, 第一段階 PCR プライマーセット (AdTU 7 と AdTU 4') によって 1,004 塩基対の遺伝子産物が増幅され, 第二段階 PCR プライマーセット (AdnU-S' と AdnU-A) によって 956 塩基対の遺伝子産物が増幅された(図 1).

Ad 以外の結膜に存在する可能性の高いウイルスおよび細菌の DNA を用いて, この nested-PCR 法の特異性を確認した. Ad 以外のいずれの生物の DNA から増幅反応は観察されなかった(結果非提示).

2. PCR 法の感度

今回の PCR 法により, 1 反応チューブ当たり 10^3 個のウイルス DNA 量からの検出が可能であった(結果非提示).

3. Ad 検出

臨床検体からの直接 PCR では 70 検体中 38 検体 (54.3%) で Ad が陽性であった. 一方, 分離培養法では 70 検体中 33 検体 (47.1%) が陽性であった. PCR が陽性であった検体のうち, 86.8% (33/38) が分離培養陽性であった(表 1). 分離培養で陽性と判定された検体は平均 24.6 日間で Ad が検出された. PCR が陰性であった検体はすべて分離培養陰性であった(表 1).

4. Ad 血清型同定

1) PCR-RFLP 法による Ad 標準株の血清型同定
増幅産物は *Eco* T 14 I では 7 パターン, *Hae* III では

表 1 Polymerase chain reaction (PCR) 法と分離培養法との比較

		PCR		計
		+	-	
分離培養	+	33	0	33
	-	5	32	37
計		38	32	70

a) *Eco* T 14 I



b) *Hae* III



c) *Hin* f I



図2 標準株 14 血清型における PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism analysis) の結果.

Ad 標準株 14 血清型の nested-PCR 産物を, a) *Eco* T 14 I, b) *Hae* III, c) *Hin* f I によって切断した写真, *Eco* T 14 I では 7 パターン, *Hae* III では 12 パターン, *Hin* f I では 6 パターンの切断パターンがそれぞれ得られた. 各レーンの数字は Ad の血清型, M は分子量マーカーの ϕ X 174-*Hinc* II, 右端の数字は DNA の分子量を表す.

12 パターン, *Hin* f I では 6 パターンに切断された. この 3 種の制限酵素の切断パターンを組み合わせることにより, Ad 標準株の 14 血清型すべての同定が可能であった(図 2).

2) PCR-RFLP 法による臨床検体の血清型同定

結膜擦過物 70 検体中, PCR が陽性であった 38 検体の血清型の頻度は, Ad 37 型が 17 検体 (44.7%), 3 型が 15 検体 (39.5%), 11 型が 3 検体 (7.9%), 8 型が 2 検体 (5.3%), そして 4 型が 1 検体 (2.6%) であった(表 2). PCR が陽性で分離培養が陰性であった 5 検体の PCR-RFLP 法による血清型は Ad 37 型が 3 検体, 8 型が 2 検

表2 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism analysis)法の結果

亜群	血清型	%	n=38
B	3	39.5%	15
	11	7.9%	3
D	8	5.3%	2
	37	44.7%	17
E	4	2.6%	1

体であった。

3) 中和試験による臨床材料の型別

分離培養が陽性であった33検体に対して抗Ad標準血清による型同定を行った。その結果、Ad 3型が15検体(45.5%)、37型が14検体(42.4%)、11型が3検体(9.1%)、そして、4型が1検体(3.0%)であった。分離培養陽性であった30検体のPCR-RFLP法と中和試験による血清型同定の結果はすべて一致した。

PCR-RFLP法では検体採取から約3日間でAdの血清型同定まで可能であったが、分離培養—中和試験では検体採取から同定まで最低でも2週間を必要とした。

IV 考 按

今回我々は、PCR-RFLP法を用いてAdのDNAを正確に、そして迅速に検出する高感度の新しい診断法を開発した。この方法を結膜擦過物70検体に応用し、従来の分離培養—中和試験と比較したところ、38検体(54.3%)でPCRが陽性であった。また、分離培養陽性であった33検体はすべてPCR陽性であった。さらに、PCRが陽性であった38検体は37型、3型、11型、8型、および4型の5血清型に分類され、分離培養陽性の33検体の中和試験とPCR-RFLP法の結果も完全に一致した。

ウイルスDNA量を吸光度から算出したAd 5型標準株に、このnested-PCRを行い感度を測定したところ、1反応チューブ当たり 10^3 個のウイルス数からの検出が可能であった。これは臨床検体におけるPCRと分離培養法の検出率を比較した結果からは、実用上十分な感度と考えられた。しかし、Adが結膜上に何ウイルス数存在すれば結膜炎を発症するのかは依然として不明であるため、定量PCRを含めたさらなる研究が必要である。

PCR反応のために、すでに明らかにされているAd 2型、5型⁴⁾、40型⁵⁾、および41型⁶⁾のヘキソン領域の塩基配列を比較し、相同性の高い部分を選んでnested-PCRのプライマーを設計した。ヘキソン領域を用いたAdのPCRとしては、Allardら⁷⁾が308塩基対、Kinchingtonら⁸⁾が306塩基対の増幅反応を行っている。彼らのプライマーに対し、我々のプライマーは956塩基対と増幅反応が長く、非特異な反応を起こす可能性も考えられた。しかし、本研究の主たる目的は、結膜炎を起こすAdの検出と血清型の同定を行うことであった。結膜炎起因のAd

の血清型は少なくとも6種類(Ad 3型、4型、8型、11型、19型、37型)が存在するため、PCR反応の後にRFLP解析を行って血清型の同定を行うためには、長い増幅産物が必要と考えられた。このPCR法を結膜からしばしば検出されるAd以外のウイルスおよび細菌のDNAに対し行ったところ、Ad以外のいずれの微生物DNAでも増幅反応は観察されず、特異性が判明した。一方、型特異的プライマーを設計してAdの検出同定を試みたという報告⁷⁾⁹⁾もあった。鑑別すべき血清型がわずかである場合は、特異的プライマーによる同定は有用であると考えられる。しかし、結膜炎起因のAd血清型は少なくとも6種類が存在するため、それぞれに型特異的プライマーを設計し、遺伝子増幅産物の有無や得られた増幅産物の長さで血清型同定を行うことは困難であり、Ad結膜炎の血清型同定法にはPCR-RFLP法が適していると考えられる。

Adは我が国における結膜炎の一般的な病因である。従来、Ad結膜炎の診断は分離培養によるAdの検出と抗Ad標準血清による血清型の同定であった。眼科領域からの検体は、糞便、喀痰や尿などとは異なり、PCR反応阻害物質がほとんど存在しないため、病因検出法として直接PCR法が可能であり、最適な方法と考えられた。また、PCR法は分離培養の難易度などのAd間の生物学的特性には左右されず、病原体を検出することができるだけでなく、長期間異なる施設間においても高い再現性を維持できる。加えて本研究のPCR-RFLP法は、臨床検討において分離培養と比較した陽性一致率が100%であったこと、最低でも約2週間を要する分離培養—中和試験に対して約3日間でAdの検出が可能であったことから、Ad結膜炎の迅速診断法としての有用性が示された。今後我々は、この方法を日本国内および世界各地におけるAd結膜炎の疫学調査にも応用し検討する予定である。

本研究に際し、結膜擦過物採取にご協力頂いた安藤展代先生、幸塚悠一先生、谷藤泰寛先生、日隈陸太郎先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Wadell G: Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 110: 190—220, 1984.
- 2) 青木功喜: 結膜炎とウイルス. *眼科* 35: 959—964, 1993.
- 3) 中川 尚, 大野重昭, 磯部 裕, 青木功喜, 谷藤泰寛, 安藤展代, 他: ELISA法(アデノクロン®)によるアデノウイルス結膜炎の迅速診断. *日本の眼科* 65: 221—226, 1994.
- 4) Chroboczek J, Bieber F, Jackrot B: The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology* 186: 280—285, 1992.

- 5) **Toogood CIA, Murali R, Burnett RM, Hay RT**: The adenovirus type 40 hexon gene sequence, its predicted structure and relationship to other adenovirus hexons. *J Gen Virol* 70: 3203—3214, 1989.
 - 6) **Toogood CIA, Hay RT**: DNA sequence of the adenovirus type 41 hexon gene and predicted structure of the protein. *J Gen Virol* 69: 2291—2301, 1988.
 - 7) **Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G**: Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 28: 2659—2667, 1990.
 - 8) **Kinchington PR, Turse SE, Kowalski RP, Gordon YJ**: Use of polymerase chain amplification reaction for the detection of adenoviruses in ocular swab specimens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 4126—4134, 1994.
 - 9) **Pring-Akerblom P, Adrian T**: Type- and group-specific polymerase chain reaction for adenovirus detection. *Res Virol* 145: 25—35, 1994.
-