

台灣雞傳染性支氣管炎病毒之流行病學監控

李敏旭* 鄭明珠 葉修如 郭舒亭 丁履紉 陳燕萍 蕭終融

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 2003 年本所分離之雞支氣管炎病毒株及活毒疫苗株 18 株，針對 S1 基因之高變異區（約 1kb；包含四個高變異區域），應用 RT-PCR 增幅此片段基因，再將產物經基因選殖以定序反應解讀出基因序列，所獲得之各基因序列配合目前已被公開之各地病毒株序列進行多序列比對及親緣樹分析，結果顯示台灣地區所分離之病毒株除分佈在三個獨特於世界之基因群外，尚有一個相似於中國分離株之基因群，並有一分離株來自台灣第 I 基因群與中國基因群之自然重組。

關鍵字：傳染性支氣管炎病毒，反轉錄聚合 鏈反應，親緣分析

前 言

雞傳染性支氣管炎 (avian infectious bronchitis; IB) 是一種具有高度傳染性之病毒性疾病，雞隻不分年齡、品種均具有感受性，尤其以雛雞致死率最高。此病之特色是高傳播力、潛伏期短、發病率幾乎高達 100 %，主要造成雞隻換肉率及增重遲緩、產蛋率下降、蛋的品質不佳，若與細菌性疾病混合感染，往往造成雞群死亡率大幅增加 (Bumstead and Cook, 1989)。根據台灣地區 IB 流行病學調查，自 1958 年發現病例至今 (黃, 1958)，本病一直是台灣地區重要的雞隻傳染病之一。目前對此病大多使用傳統麻州型疫苗來防疫，近來也有業者進口對呼吸道具有良好保護力之 4/91 病毒株製成的活毒疫苗，但在腎炎型為主的情況下仍無法有效控制本地疫情的發生，故此疾病仍普遍存在於雞群，形成雞群散發並因而導致其他疾病的複合感染而造成農戶嚴重損失。

IBV 的基因體 (genome) 大小約為 27.6 Kb，其基因結構共有 10 開讀窗 (open reading frame)，經轉譯

(translation) 後可以合成 5 種蛋白：核醣核酸聚合 (RNA polymerase; P)、S1 棘突醣蛋白 (spike glycoprotein; S1)、S2 棘突醣蛋白 (spike glycoprotein; S2)、基質醣蛋白 (matrix glycoprotein; M)、核蛋白 (nucleocapsid protein; N)。病毒顆粒的外圍是由雙層脂膜 (lipid bilayer) 及三種結構蛋白所構成，由內而外分別為：核蛋白、基質蛋白及棘突蛋白。S glycoprotein 為最外層，由 S1、S2 glycoprotein 所組成。S1 經研究發現具有誘發中和抗體產生的能力以及血清型決定位之所在 (Koch & Kant, 1990)。S2 具有使病毒與細胞膜融合的功能，可與宿主細胞的受體相結合 (Cavanagh, 1984 ; Li & Cavanagh, 1992)。目前以單株抗體 (monoclonal antibody) 技術已證明在 S1、S2、M、N 蛋白上都具有抗原決定位，均可誘發抗體反應 (Cavanagh et al., 1984)，但實際具有中和能力的抗原決定位主要位於 S1 醣蛋白上。S1 醣蛋白上具有 6 個抗原決定位，均具有誘發病毒中和抗體的能力，是屬於 conformation - dependent epitope，並證實為血清型別、保護效力與抗原變異的主要決定位 (Kant et al., 1992)。在 S1 醣蛋白氨基酸序列上第 53-148 氨基

*抽印本索取作者

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

酸之間有一高度變異區 (hypervariable; HVR), 在其第 100-119 氨基酸位置上有一很短的保留區將上述 HVR 隔成 HVR1 與 HVR2, (IBV 抗原性變異是由此區域氨基酸的改變所造成)。其他蛋白質上雖然也具有抗原決定位, 但經 Cavanagh 與 Davis 等人的研究顯示除非與 M、N protein 相關的少數不同序列和極重要抗原決定位有關, 否則應可解釋不同型病毒株間交叉保護作用不佳是由 S1 protein 的差異所導致 (Cavanagh & Davis, 1988; Kuster et al., 1989)。此外, 收集台灣 IB 病例及以往之分離株, 利用 S1 之高變異區片段基因進行基因演化分析, 結果發現這些病毒株可被分成台灣 I、II 基因型, 而近年更發現中國腺胃型 IBV 侵入台灣。根據中國山東省尹燕博等人之研究結果顯示中國所流行之病毒株可區分成二群, 但與台灣地區之病毒株並不同。

材料與方法

1. 病毒來源

由本所動物藥品檢定分所分讓進口及國產之 IB 活毒疫苗, 並持續收集台灣各地之疑似雞傳染性支氣管炎感染之病雞病材進行病毒分離。

2. 病毒增殖

將病材乳劑接種到 9-11 日齡無特定病原 (specific pathogen free, SPF) 胚胎蛋中, 置於 37°C 恆溫箱中每日至少觀察二次, 收集 2-5 日中止及未中止之胚胎蛋抽取其尿囊液, 並利用電子顯微鏡及特異性引子進行 RT-PCR 確認有無 IB 病毒存在。

3. 引子設計

參考目前已發表在 GenBank 中之序列設計特異性引子供作診斷之, 並針對 S1 之高變異區設計引子供作增幅此片段基因之用。

4. 反轉錄聚合 鏈反應之反應條件

反應溶液為 10 倍緩衝溶液 2.5 μ L, 10 倍 dNTP 混合液 (dATP、dTTP、dGTP、dCTP 2.5 mM/ μ L) 2.5 μ L, AMV reverse transcriptase (9 u/ μ L, promega) 0.2 μ L、Ribonuclease inhibitor (40 u/ μ L, Promega) 0.3 μ L, RNase free H₂O 16 μ L、Taq DNA polymerase (5 u/ μ L) 0.5 μ L, 引子各 1 μ L (2.5 μ M/ μ L)。反應溫度控制由循環溫控儀 (Thermocycler, Hybaid) 完成反轉錄聚合 鏈反應。

5. 特異產物之確認

PCR 完成後之產物以含有 0.5 μ g/mL Ethidium bromide 的 2.0 % 洋菜膠於 0.5 % TAE 緩衝液之 Mini-gel 電泳槽中進行, 取 10 μ L 產物與 1 μ L 6x BPB (bromophenol blue) 混合後, 施以 10.7 V/cm 電壓電泳 25-30 分鐘後, 與 DNA 標準長度溶液 (DNA marker) 輔助產物的判讀。其次進行特異性產物之確認; 將所得之特異性產物經序列比對確認。

6. PCR 產物之選殖、定序與演化圖譜分析

PCR 產物以自動定序儀 (ABI 3730) 進行直接定序, 所得序列再以 DNASTAR 套裝軟體中之 "MagAlign" 與 "SeqMan" 等程式加以排列比對, 所得結果再以 PAUP、PHYLP、Mega 2 軟體進行分析, 繪製演化圖譜。

7. 動物試驗:

將 3 週齡之 SPF 小雞 (購自本所之藥品檢定分所) 20 隻, 分別以病毒株 030311 (第 I 基因型病毒) 及 CH1219 (重組株) 以點鼻方式給予 100 μ L (10^5 TCID₅₀/mL), 觀察 10 天後予以犧牲解剖檢查, 血清部分以交叉中和試驗測試交叉保護能力。

結 果

1. 分子流行病學分析:

收集台灣雞群所分離之傳染性支氣管炎病毒株及目前使用之疫苗病毒株 18 株, 接種於 9-11 日齡雞胚胎蛋後增殖病毒, 收取尿囊液並以 RT-PCR 進行確認病毒之存在再予以妥善保存。參照已發表之各地雞傳染性支氣管炎病毒分離株 S1 序列, 經以 DNASTAR 軟體進行多序列比對後設計出包含四個變異區之引子。以 RT-PCR 增幅此變異區段基因, 經基因選殖後直接應用鹼基螢光標示, 以自動定序儀進行基因序列之解讀。所得各病毒株序列經 DNASTAR 及 Mega 2 軟體分析其親緣關係, 結果顯示台灣分離株與其他各地之分離株明顯不同, 主要分成三個獨立之基因群稱之為台灣第 I、II、III 基因型 (Figure 1)。根據病毒株分離時間之分析, 在 1990 年以前之分離株屬於第 II 基因型, 通常被稱為呼吸道型, 其症狀較輕微; 在 1990 年後此基因型病毒株仍零星存在, 也造成嚴重程度不一的腎炎病變。近年來之分離株則在第 II 基因型中自形成一小分支, 與九〇年代前之分離株相似性在 87.5-90.5%, 而 2002 年與 2003 年之分離株相似性為

92.9%，顯見此一病毒正以快速演化來適應而傳播於雞群間。第I 基因型病毒在九〇年代出現並很快蔓延而造成台灣雞群間之廣泛傳播，主要引起病徵為腎臟腫大之腎炎病變稱之為腎炎型。今年所收集之病例也以此基因型佔絕大部分，臨床上發現除腎炎、呼吸道症狀病變外，更呈現腫頭及腺胃腫大、出血之臨床病變，且發生之情況嚴重，在臨床上易被診斷為新城病毒感染，防疫機關應重視此疾病之演進及早研擬防疫之道。另外有中國腺胃型 IB 侵入，目前依這些病毒株分離之來源，研判這些病毒株已分佈在北、中、南、東各地雞群中，顯示病毒已迅速蔓延。同時我們發現此型病毒與台灣主要流行之第I 基因型病毒產生自然基因重組，在後者之 S1 蛋白中 3'端嵌插入一段約 0.7 Kb 中國腺胃型 IBV 之核酸，但主要變異區仍為第I 基因型病毒基因。

在核酸序列的分析比對上，將包含四個變異區段之基因片段進行比對，結果發現在第I 基因型之演化上其相似度達 84.9 - 99.9 %，差異度在 0.1 - 13.3 %，有部分分離株出現缺損 1 個氨基酸；在第II 基因型之演化上其相似度達 86.7 - 97.7 %，差異度在 0.4 - 11.4 %；第I、II 基因型間的相似度最高為 85.4%，而差異度最大達 29.8 %，顯示兩基因型間存在相當的差異性，可能演化出不同之血清型。此外，新分離到之腺胃型 IB 與中國大陸之分離株 Q1、J2、T3 具有 98% 相似性，而與第I 基因型相似性在 70-80%間、與第II 基因型相似度在 68-73%間。今年我們從台東所送檢之雞隻病例分離到之 IBV，經序列比對分析為一獨特且尚未被公開之病毒株，我們分類為台灣第III 基因型病毒。

2. S1 蛋白基因之分析

將各個不同基因型之分離株 (030311、030403、020902、030106、030513、CH1219 共 6 株) 利用已被公開之 S1 全長序列設計引子經基因增幅、選殖後置入自動定序儀 (ABI 3730) 予以解碼。將這 6 株病毒之 S1 全長序列與已公開之序列進行比對 (Figure 2)，我們可發現台灣主要分離株 (030311、030403、020902) 形成一個大基因群，再細分為第I、II 基因群；分離株 0301062 等則與中國腺胃型 (Q1、J2、T3) 最相近 (China-like)，相似性為 98.8%；而自然重組株 (CH1219) 則位於台灣分離株及中國腺胃型分離株間，與第I 基因群相似性在 89-90%間，和第II 基因群相似性 86.3%，跟中國腺胃型分離株相似性在 83-85%

間，另外台灣新分離株 (030513) 則獨特地形成一個分支 (TW-III)，與第I 基因群相似性 42-43%，和第II 基因群相似性 44%，跟中國腺胃型分離株相似性為 42.6%。(Table 1)

3. 動物試驗：

進行病毒株 030311(第I 基因型病毒)及 CH1219 (重組株) 之動物試驗。發現兩株病毒在感染初期有咳嗽、囉音、精神沉鬱及羽毛蓬鬆之臨床症狀，5 天後陸續有雞隻死亡，經解剖可見雞隻呈現嚴重腎臟腫大且尿酸鹽沉積、呼吸道有黏液及肺炎，氣囊腔可見積水，而交叉中和試驗呈現具 2-4 倍差異，可見彼此仍有交叉保護能力。

4. 疫苗株之基因分析

將 16 株進口及 2 株國產 (Vac14 和 16) 之活毒疫苗共 18 株 (Vac 1-18) 進行 S1 基因高變異區之分析，其中 15 種 (Vac 13、14、16 除外) 均屬於麻州基因群，Vac 13 和 Vac 14 則屬於相近於 Holt 疫苗病毒株，Vac 16 則為國產疫苗商自日本引進之 TM86 株此為最接近台灣第II 基因型病毒。值得重視的是 Vac 8 污染微量之台灣第I 基因群病毒 (Figure 1)。

討 論

依據冠狀病毒之特性，雞傳染性支氣管炎病毒具有許多血清型，而目前尚無標準之血清型區別方法。利用具抗原相關基因序列的比對分析來區別血清型及流行病學之研究，可進一步讓研究者便於分析而得到確切之結果，實為現代科學進步之佐證。由於 RNA 病毒的多變、基因的漂移、交換及基因的缺損或插入，具有不同抗原性之病毒不斷的產生，加上本地長期使用同一血清型之活毒疫苗進行免疫，雞傳染性支氣管炎病毒在台灣形成一特異區域的演化。從 1958 年雞傳染性支氣管炎病毒被證實在台灣發生，一直是威脅雞群健康的主要疾病之一。依照基因分析，台灣所分離到之野外病毒株與其它地區之分離株不同，具有相當大之差異，除所使用疫苗病毒之麻州基因群及 4/91 病毒群外，可分成四個基因群，稱之為台灣第I、II、III 基因型病毒及 China-like 基因型病毒；根據實驗結果，在 1990 年前之病毒株屬於第II 基因型病毒株，此基因型病毒株在 1990 年後則呈現散發之情形，而在此一時期第I 基因型病毒出現並很快傳播開

來，為目前主要影響雞群健康之基因型病毒。中國腺胃型病毒的侵入對本土主要的流行株產生衝擊，於是藉由此病毒的易變性產生了自然基因重組株，雖然除此一病例分離株外，之後我們未曾分離到相似病毒，顯示此一病毒株應只是偶發病例未能形成優勢族群而傳播。對此善變之病毒，我們所執行之監測及分子分析僅止於 S1 基因，相對於病毒之基因體在為 27-32Kb 而言，似乎尚未能了解此重組株之全貌。同時台灣分離株又具備了地域的特異性，因此無法了解田間病毒株是否重複的產生基因重組。對於這個與 SARS 病毒在病毒蛋白組成雷同的禽類病毒，又其在動物試驗中產生嚴重肺炎及氣囊積水與 SARS 病徵相同之臨床症狀，全基因體的解碼是目前亟需進行之工作。對於疫苗之使用方面，由於台灣所流行之病毒株與疫苗病毒株血清型上並不相同，長期使用的結果造成台灣流行病毒株針對於疫苗病毒株進行演化，目前已無法有效的提供交叉保護抗體。許多學者投入相當大的心血，希望從本土分離病毒株篩選出有效之減毒或死毒疫苗，但由於此一病毒主要侵害粘膜器官，死毒疫苗所產生抗體無法提供足夠保護力，而必須藉由活毒疫苗之研發，所以目前仍無法成功的篩選出有效之疫苗株供作防疫使用。然而國產疫苗 (Vac 16) 的上市其病毒株為自日本引進之 TM86 株，基因親緣分析上相似於台灣 1983 年分離株屬於第 II 基因群，但為目前疫苗株中最接近台灣第 I 基因群。若在病原性上能再馴化及配合台灣第 I、II 基因群混合之死毒疫苗進行免疫應可發揮防疫功效。根據此一計畫之執行，雖仍無法達成有效之防疫，但可作為台灣雞傳染性支氣管炎病毒流行病學之調查，尤其在加入世界貿易組織之際，在檢疫及防疫工作上監測其它基因型病毒株侵入事實提出警訊，減少對於畜產事業之衝擊力，實為目前亟需努力之重點。

參考文獻

1. 黃萬居。台灣發生之雞傳染性支氣管炎 (初步報告)。台灣畜獸會學報 1:1-5, 1958。
2. Bumstead N, Huggins MB and Cook JKA. Genetic differences in susceptibility to a mixture of avian infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. Br.Poult.Sci. 30:39-48,1989.
3. Cavanagh D, Darbyshire JH, Davis PJ and Peters RW. Induction of humoral neutralizing and haemagglutinin inhibiting antibody by the spike protein of avian infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 13:573-583, 1984.
4. Cavanagh D, Davis PJ, Cook JKA, Li D, Kant A and Koch G. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotype of infectious bronchitis virus. Avian Pathol.21:33-43, 1992.
5. Cavanagh D, Davis PJ, Mockett APA. Amino acid within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. Virus Res. 11:141-150, 1988.
6. Kant A, Koch G, van Roozelaar DJ, Kusters JG, Poelwijk FAJ and van der Zeijst BAM. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. J. Gen.Virol. 73:591-596, 1992.
7. Koch G, Hartog L, Kant A and van Roozelaar DJ. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. J.Gen.Virol. 71:1929-1935, 1990.
8. Kusters JG, Jager EJ, Lenstra J, Koch AGW, Posthumus PAR, Melen h and Zeijst BAM. Analysis of an immunodominant region of infectious bronchitis virus. J.Immunol. 143 :2692-2698, 1989.
9. Ladman BS, Pope CR, Ziegler AF, Swieczkowski T, Callahan CJ, Davison S, Gelb JJ. Protection of chickens after live and inactivated virus vaccination against challenge with nephropathogenic infectious bronchitis virus PA/Wolgemuth/98.Avian Dis. 46:938-44, 2002.
10. Wang CH, and Tsai CT. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. Arch. Virol. 141:1677-1688, 1996.
11. Wang CH, Hsieh MC and Chang PC. Isolation, Pathogenicity, and H120 protection efficacy of infectious bronchitis viruses isolated in Taiwan. Avian Dis. 40:620-625, 1996.

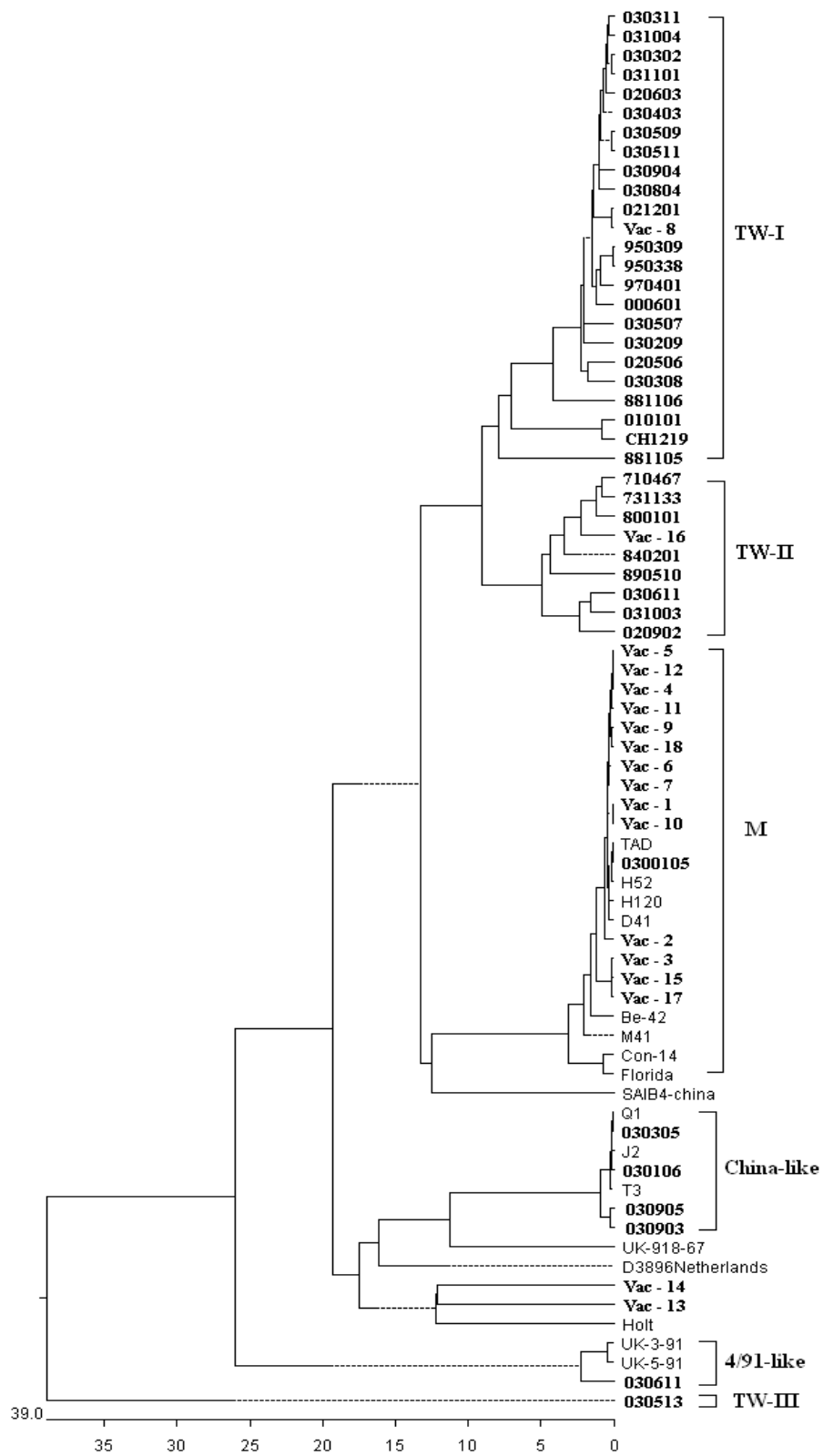


Figure 1. Phylogenetic relationships of IBV isolates based on S1 highly variant region sequences

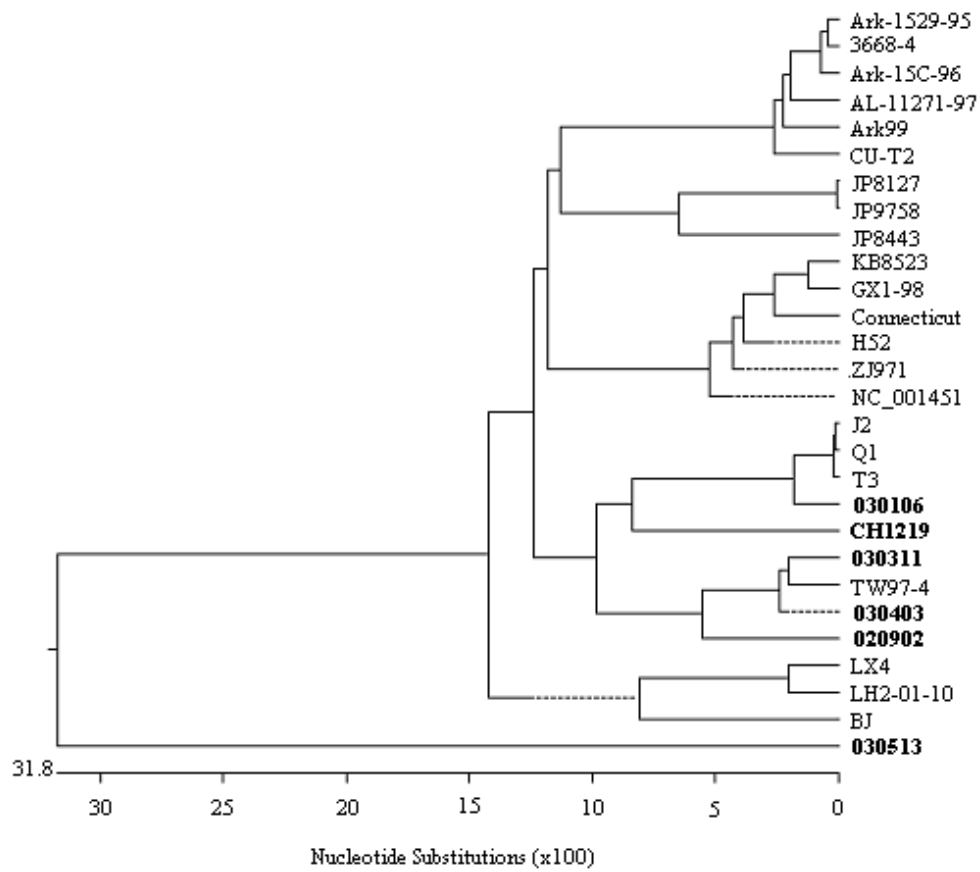


Figure 2. Phylogenetic relationships of IBV isolates based on S1 protein complete cds.

		Percent Identity								
Divergence		1	2	3	4	5	6	7		
	1		73.6	80.2	86.1	86.3	43.6	80.1	1	CH1219
	2	24.2		73.5	80.2	80.2	44.3	74.4	2	020902
	3	18.6	27.5		73.1	72.6	32.6	98.8	3	030106
	4	12.4	16.8	27.4		99.0	43.1	73.2	4	030311
	5	12.2	16.8	27.7	1.0		42.3	72.8	5	030403
	6	39.2	40.6	43.6	36.9	37.2		42.6	6	030513
	7	18.9	27.1	0.4	27.7	28.0	43.6		7	T3
		1	2	3	4	5	6	7		

Table 1. Comparison relationships of IBV isolates based on S1 protein.

Epidemiological Study of Avian Infectious Bronchitis Viruses Isolated in Taiwan

Ming-Shiuh Lee, Ming-Chu Cheng, Shiu-Ru Yeh, Shu-Ting Kuo,

Lu-Jen Ting, Yen-Ping Chen, and Jong-Rong Shiau

National Institute for Animal Health, Council of Agriculture

Avian infectious bronchitis viruses (IBV) isolated in Taiwan in 2003 and 18 live vaccine viruses were studied with reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and subsequent sequence analysis of the region of 1,100 nucleotides covering the spike 1(S1) protein highly variant region gene. Both genetic and antigenic heterogeneity of the strains was significant. Specifically, according to phylogenetic analysis Which there are three genetic group are to distinguish with other isolates in the world, one genetic group are closed to the isolated from China, and one virus isolated is nature recombination from Taiwan genetic group I with China genetic group.

Keyword : Avian Infectious Bronchitis Viruses, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), phylogenetic analysis