

# 臺灣茨城病病毒基因體序列分析及比較

報告人：丁履紉 助理研究員（疫學研究組）

## 壹、緒言

茨城病病毒（Ibaraki virus; 茨城病病毒）屬於里奧病毒科（Reoviridae）環狀病毒屬（Orbivirus）之流行性出血病病毒（Epizootic hemorrhagic disease virus; EHDV）第 2 血清型，由 *Culicoides* sp. 媒介為非接觸性之傳染病。茨城病病毒與其它 8 種 EHDV 血清型很容易區別，僅與 EHDV 第 2 血清型有部份交叉中和能力。1959 年初次發現於日本，牛隻臨床病徵為發燒、呼吸困難、吞嚥障礙，類似牛流行熱或藍舌病，彼此難以區別。1997 年日本再度於同樣區域發生牛隻大規模流產、早產，但母牛未顯現任何症狀。該次疫情中分離出的茨城病病毒，以交叉中和試驗和 PCR-RFLP 試驗可以區分新型病毒株和傳統病毒株兩者不同。EHDV 由 7 種結構蛋白（VP1-VP7）和 3 種非結構蛋白（NS1-NS3）構築成雙層蛋白鞘，其內包含 10 段雙股核糖核酸基因體如同藍舌病病毒。VP2 蛋白鞘是由 L2 RNA 基因體所轉譯，與中和抗體特異性決定位與血清特異性反應有關，同一種血清型的藍舌病病毒 L2 的核 酸序列有高度的相似性。M5 RNA 轉譯成 VP5 結構蛋白與 EHDV 感染後之血清型別特異性免疫反應有關，比較茨城病病毒 NO2 與 EHDV 第 1 血清型、BTV 第 10 血清型、非洲馬疫第 4 血清型 M5 RNA 氨基酸序列相似性分別為 67%、57% 和 42%。VP3 和 VP7 內層核心蛋白，與血清群組之抗原決定特異性和感染昆蟲的能力有關。RNA3 基因體轉譯成 VP3 病毒蛋白，該蛋白與血清群組之抗原決定特異性有關，其核苷酸序列，能有效區分 EHDV 血清群組。1990 年台灣首次分離到病毒。2003 年再次自流產牛胎兒分離出茨城病病毒，為了解台灣分離株與其它毒株之親緣關係，故完成 4 段 RNA 基因體解讀，並進行序列分析。藉由該病毒 4 段 RNA 基因體序列之解讀並分析其演化圖譜，了解台灣茨城病病毒與其它國家之親緣關係和演化特性，進一步掌握病原變異與傳播的途徑。

## 貳、材料與方法

### 病毒

試驗用之 4 株茨城病株分別為 03H27、03H35、03H38 和 07H43。03H27 株於 2003 年自呼吸道症狀牛隻的紅血球，接種於幼倉鼠腎臟株化細胞（baby hamster kidney cell, BHK-21）增殖 4 代分離得之。03H35 和 03H38 病毒株於同年自牛流產胎分離。07H43 則於 2007 年自健康牛隻紅血球分離而得。

### 基因增幅

自 Genbank 搜尋茨城病病毒基因體序列並參考 Ohashi 等報告進行引子設計引子序列如表 1，首先以單管 RT-PCR 增幅片段基因。反應溶液為 10 倍緩衝溶液 2.5 $\mu$ L、10 倍 dNTP 混合液（dATP、

dTTP、dGTP、dCTP 2.5 mM/ $\mu$ L) 2.5 $\mu$ L、AMV reverse transcriptase (9U/ $\mu$ L, promega) 0.2 $\mu$ L、Ribonuclease inhibitor (40 U/ $\mu$ L, promega) 0.3 $\mu$ L, RNase free H<sub>2</sub>O 16 $\mu$ L、Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L, 引子各 1 $\mu$ L (2.5 $\mu$ M/ $\mu$ L)。反應溫度控制由循環溫控儀 (Thermocycler, Hybaid) 完成反轉錄聚合酶鏈鎖反應之反應條件。

### PCR 產物之選殖定序

PCR 產物以 Topo TA cloning kit (Invitrogen life) 進行基因選殖後，利用載體上之 M13 primer 進行挑選，挑選出之菌落經質體純化後以載體上之 SP6 及 T7 引子進行鹼基標示螢光反應，最後利用自動定序儀 (ABI 3730) 進行定序反應。

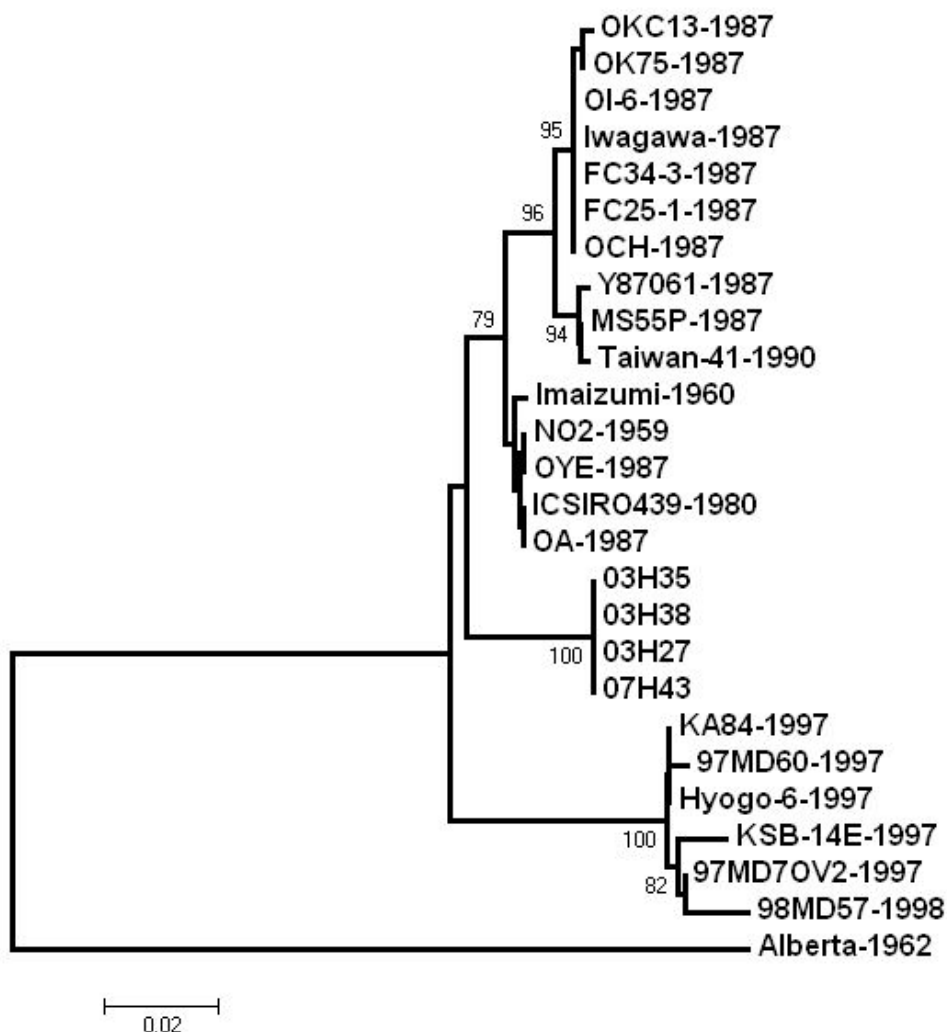
### 演化圖譜分析：

收集 GenBank 中流行性出血性疾病病毒第 2 血清群組病毒株基因序列，將所收集之序列排列並擷取相同基因長度配合所解讀出來之各分離株病毒株序列再以 DNASTAR 套裝軟體中之 "Megalign" 與 "SeqMan" 等程式加以排列比對，最後再利用 MEGA 4 軟體之 NJ 法計算，經 1000 次重新採樣計數圖譜中各節點的 bootstrap 信賴值，以確定其可信度。

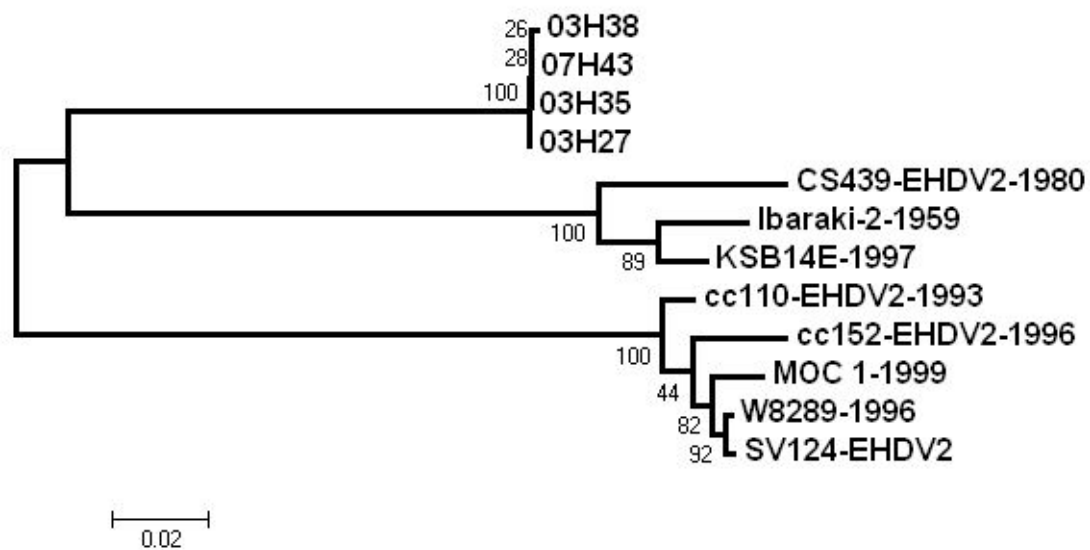
## 參、結果與討論

分析 1959-2003 年日本所分離的 19 株茨城病病毒 (OCH-1987、OI6-1987、Iwagawa-1987、FC34-3-1987、FC25-1-1987、OK75-1987、OKC13-1987、MS55P-1987、Y87061-1987、OA-1987、NO2-1959、OYE-1987、Imaizumi-1960、MD57-1998、MD70V2-1987、KSB-14E-1997、MD60-1997、Hyogo6-1997、KA84-1997)、澳洲株 (Csiro439-1980-EHDV2)、台灣茨城病病毒-1990 年株 (Taiwan41-1990)、2003 年 3 株 (O3H27,35,38)、2007 年 1 株 (O7H43) 和加拿大株 (Alberta-1962-EHDV2) 共 26 株 L3 基因演化圖譜，結果可區分加拿大株群與亞洲株群，亞洲株群又可依病毒分離出的時間不同聚集分 3 群，1959-1987 年、1997-1998 年和 2003-2007 年 (圖 1)。日本 1997 年之後的病毒株群基因變異度比其它亞洲株群都明顯。2003 年後之分離株與日本 1959-1987 年病毒株群較接近相似度約 95.8-97.1%，與 Taiwan41 相似度約 95.9%，而與日本 1997 年之後的新變種毒株相似度較低為 93.46%。4 株茨城病病毒台灣株與 2 株日本茨城病病毒株 (Ibaraki-2-1959、KSB-14E-19997)、5 株北美洲 EHDV-2 毒株 (MOC1-1999、W8289-1996、CC110-1993、CC152-1996、SV124)、1 株澳洲 EHDV-2 毒株 CS439-Deer 進行親緣分析。顯示主要分成二個族群，分別為北美洲 EHDV2 和亞洲 IBAV 群 (圖 2)。亞洲 IBAV 群又可區分為台灣株和日本及澳洲株，彼此相似性為 81.4-83.5%。4 株茨城病病毒台灣株與 4 株日本茨城病病毒株 (Ibaraki-2、40054、KSB-14E97、Y87061) 和 1 株 CS439-Deer，進行

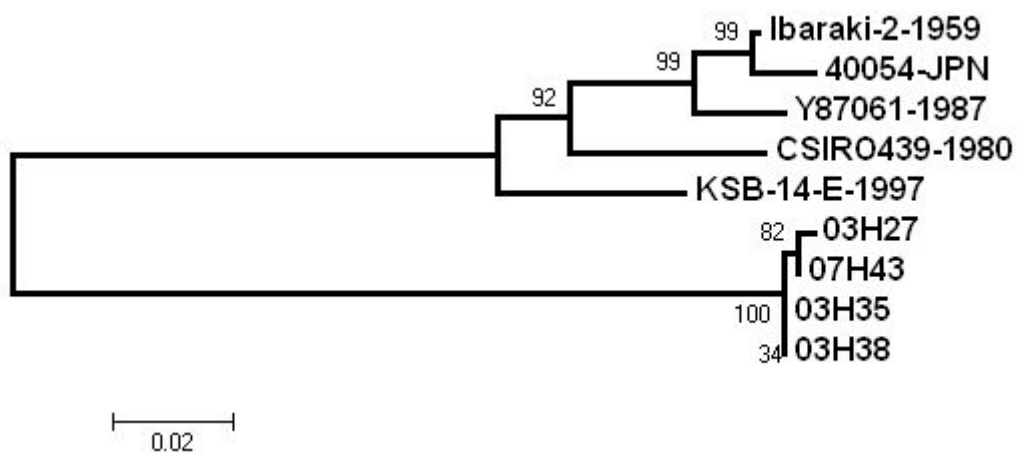
親緣分析（圖 3）。顯示主要分成 2 個族群，台灣株自成一群。台灣株群核苷酸相似性為 99.6%與另一群病毒相似性 78.1-79.5% KSB-14E-1997 與日本原型株和澳洲株不同亞群相似性 92.1-93.1%。4 株茨城病病毒台灣株、7 株北美洲 EHDV-2 (6000041、600042、600044、SV-124、600045、600036、600038)、1 株澳洲 EHDV-2 (CSIRO439) 和 3 株日本茨城病病毒 (Ibaraki2、Y87021、KSB-14E97) 進行親緣分析（圖 4）。結果台灣株與其它病毒群差異很大約 32%，日本 KSB-14E 自成一群，而北美洲 EHDV-2 病毒群與日本原型茨城病病毒與澳洲聚集成一群結。台灣 5 株茨城病病毒其 L3 基因體 17 年來的核苷酸突變率約 4.1%，彼此氨基酸相似為 99.5%，推測這支病毒群自 1990 年起以符合自然狀態的速率進行演化而存在。台灣株茨城病病毒與其它茨城病病毒病毒株 VP3、VP7、VP2、VP5 平均相似性分別為 95.33%、83.75%、68.00%、79.15%，VP3 和 VP7 的基因保守性較高，VP2 和 VP5 的基因保守性較低。



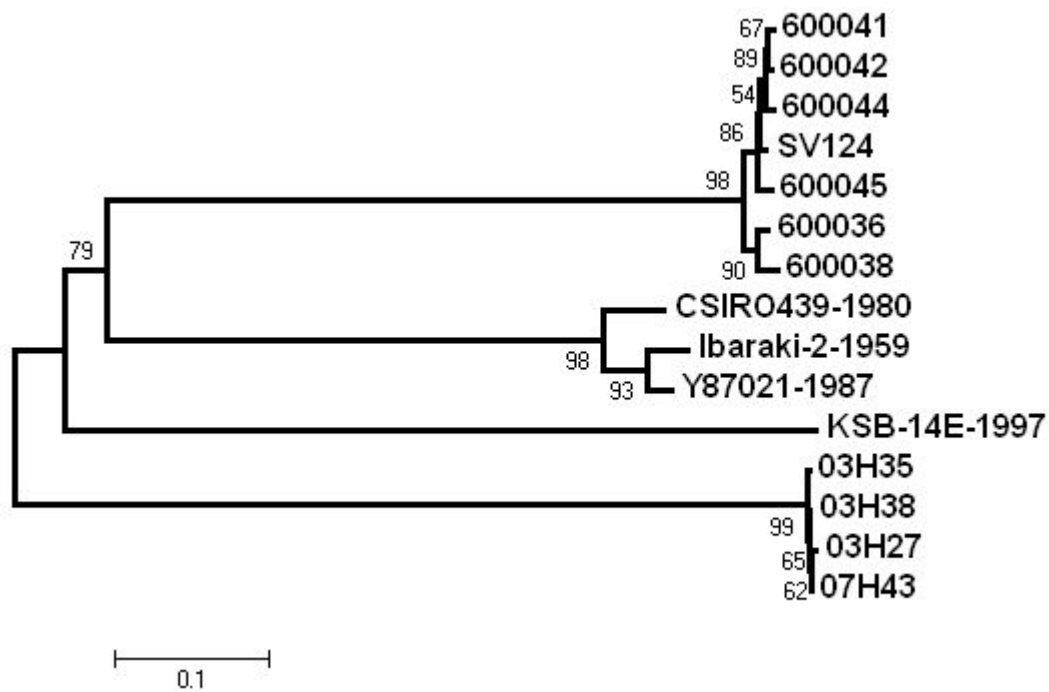
圖一、L3 基因核苷酸序列演化樹狀圖



圖二、S7 基因核苷酸序列演化樹狀圖



圖三、M5 基因核苷酸序列演化樹狀圖



圖四、L2 基因核苷酸序列演化樹狀圖