

豬口蹄疫病毒(O/TAW/97)於細胞繼代之變異性研究

黃郁琤*、林有良、孫丕奇、柯穎憶、蔡淑卉

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 本研究將純化的口蹄疫 O/TAW/97 病毒連續在幼倉鼠腎臟 (BHK-21) 細胞株繼代 150 代，並以反轉錄-聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 方法增幅各繼代病毒株之 VP1 基因，經核酸定序後，比對各代病毒之 VP1 核酸序列及其轉譯之氨基酸序列，結果顯示繼代病毒株的 VP1 核酸序列共有 10 個位置發生變異，氨基酸序列則共有 7 個位置發生變異，依序發生於第 16 代至 150 代間。各繼代病毒株 VP1 之核酸變異率介於 0.2 至 1.3% 之間，而氨基酸變異率則介於 0.5 至 2.9% 之間，但氨基酸變異都未發生在主要的抗原決定位上。另一方面，各繼代病毒株與臺灣歷年分離之口蹄疫病毒株之 VP1 基因核酸序列的親源關係演化樹分析顯示，所有繼代病毒株與疫苗株 (O/TAW/205/98) 最為接近，而臺灣歷年分離的病毒株與繼代病毒株則差異較多。各繼代病毒株的 r1 值檢測結果分別落在 0.4 至 0.81 之間，顯示口蹄疫 O/TAW/205/98 疫苗株對各繼代病毒株均具有保護的潛力。上述結果彰顯口蹄疫病毒在無抗體壓力存在下，即使像細胞培養時供給較拮据的環境，仍無法顯現如存在有免疫壓力的生體內所發生之高變異性。

關鍵詞：口蹄疫病毒、基因變異性、繼代

緒言

口蹄疫 (Foot and mouth disease; FMD) 是一種急性偶蹄類動物傳染病，會造成嚴重之經濟損失。引起該病的病原歸類於小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae)、口瘡病毒屬 (Aphthovirus) 具有正股單鏈 RNA 的口蹄疫病毒 (FMDV)，包含 O、A、C、亞洲一型 (Asia I)、南非一型 (SAT I)、南非二型 (SAT II) 及南非三型 (SAT III) 等七種血清型。各血清型尚有許多不同的亞型 [3,6]，均可以感染偶蹄類動物，且不同血清型間沒有交叉保護作用 [8]。換言之，如果選用一種血清型疫苗，不論一次或多次免疫，也無法保護其他血清型病毒的感染，主因為 FMD 病毒有廣泛的抗原變異性 [7]。

口蹄疫病毒就像其他 RNA 病毒一樣，具有高度的變異性，Carrillo 等人以口蹄疫 O/TAW/97 病毒分別連

續在豬體及 BHK 21 細胞繼代 20 代，並將各代病毒完整基因體定序完畢，結果發現病毒的毒力會減弱，且讓未出現臨床症狀之接觸感染豬隻於第 26 天的口鼻拭子分離出口蹄疫病毒，變成類似帶毒狀態，但此病毒株的 VP1 氨基酸序列並未改變 [5]。Herrera 等人的研究指出口蹄疫病毒持續存在 BHK-21 細胞內的最主要且可再現的特徵是病毒與細胞一起演化，顯示快速演化的病毒可做為調查歷史偶發事件對演化的影響力之適當的測試系統 [11]。另一方面，口蹄疫中和抗體也能使口蹄疫病毒產生適應性變異，而藉以在惡劣環境中生存下來，Martin 等人的研究報告已證實此論點 [13]。因此，在中和抗體存在下，有篩選的壓力，病毒經過有限的代數繼代後，其特性會轉變成：一、對中和抗體的抵抗力增加；二、病毒結構蛋白電泳移動性的改變；三、主要抗原決定位核酸序列發生變異。

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

若沒有中和抗體存在，病毒即使經過29代的繼代，其主要抗原決定位的核酸序列也不會發生變異[14]。另由一系列野外病毒分離株的核酸序列分析，在其核酸刪除位（deletion sites）、取代（substantial）、核酸序列不一致性或是不一致性的區域（minor or no nucleotide sequence identity regions）所累積的突變率，在每次病毒繼代中發生0.12個取代[10]。

1997年3月台灣爆發的口蹄疫疫情，超過400萬頭豬隻遭到撲殺的命運，並造成超過十六億美元的經濟損失[6,7,9,15,17]。引起這次風暴的元兇，是親豬型O血清型口蹄疫病毒，只感染豬隻產生典型的水疱病變，對於其他反芻類動物則不會感染[4,7]。由於兼用撲殺及免疫政策，使這次疫情在三個月內就完全平靜下來。台灣在1997年至2007年間，施行全面性的口蹄疫疫苗免疫政策，因此，只有在1998年1月至2001年2月出現零星的散發疫情。直到2007年4月台灣開始施行口蹄疫疫苗階段性停打策略，於2009年2月才因多數豬隻缺乏口蹄疫抗體而再度出現零星疫情[2]，根據林等研究顯示，自民國86年爆發口蹄疫疫情以來，在臨床病材中萃取之口蹄疫病毒間病毒之核酸及氨基酸序列均有些微差異，其中以2009年新分離之口蹄疫病毒株與1997年之病毒株的VP1核酸序列差異性約10%最高，雖然其氨基酸發生變異的部位多不在重要之抗原決定位上，也未造成目前使用的口蹄疫疫苗失效，但該病毒的r1值分析，已顯著下降，顯然病毒抗原持續在變異中[2,12]。

為了解口蹄疫病毒核酸序列的變化，作為評估病毒變異速率的參考，將口蹄疫O/TAW/ 97 K株純化病毒於BHK-21細胞連續繼代150代，完成每一代病毒之VP1核酸定序及序列分析，篩選VP1核酸序列差異性大於或等於0.5%之口蹄疫細胞繼代病毒株，進行r1值測試及分析，並與臺灣歷年分離病毒株進行親源性分析，以期了解細胞內口蹄疫病毒之核酸與氨基酸變異率，以及與臺灣歷年分離病毒株之親源相關性。

材料與方法

一、口蹄疫 O/TAW/ 97 K 株病毒斑純化：

取口蹄疫患豬之水疱上皮做成10倍乳劑，以1,500 g離心25分鐘將水疱上皮乳劑分層，取其上層液，接種至六孔盤細胞中，在37°C含5% CO₂之培養箱感作一小時，之後用一倍磷酸緩衝溶液（PBS）清洗，再以甲基纖維素（Methylcellulose, Sigma, USA）溶液取代細胞培養液覆蓋在BHK-21單層細胞上，置入37°C含5% CO₂之培養箱中培養。病毒斑產生後，選擇大而單獨的病毒斑，取該斑之口蹄疫病毒接種至75 cm²角瓶中進行病毒複製，複製所得之口蹄疫病毒（名為第0代），供作連續細胞繼代用。

二、細胞連續繼代：

首先在小角瓶中培養單層BHK-21細胞，將先前增殖所得之第0代病毒液接種至25 cm²小角瓶中，置入37°C含5% CO₂之培養箱培養兩天，細胞病變效應（cytopathic effect; CPE）產生後將小角瓶放入超低温冷凍櫃20分鐘使細胞冷凍，解凍時輕拍使細胞掉落，完全溶解後以1,500 g，25分鐘離心取上清液，一部份接至另一個單層BHK-21細胞小角瓶，如此重複進行150代。

三、反轉錄-聚合酶鏈反應（reverse transcription-polymerase chain reaction ; RT-PCR）檢測及分析：

將細胞連續繼代之各代病毒及歷年保存之野外口蹄疫病毒培養液，以1,500 g，25分鐘離心後取上清液，再以TRIZOL（Life Technology, Gaithersburg, MD, USA）萃取核酸並進行RT-PCR反應，以增幅口蹄疫病毒之VP1基因核酸全長片段，所得之產物進行定序並進行相關分析。

四、VP1 核酸變異率分析：

比對各代口蹄疫病毒與口蹄疫 O/TAW/ 97 K株病毒（第0代）之VP1基因核酸序列，藉以計算各代病毒之VP1基因核酸變異率，並歸納出容易產生變異之位置所在。

五、口蹄疫各繼代病毒株與臺灣歷年分離病毒株之親源性分析：

選擇口蹄疫各繼代病毒株VP1基因核酸序列差異性大於或等於0.5%之病毒代表株與臺灣歷年分離

之口蹄疫病毒株之VP1基因核酸序列，以DNASTAR套裝軟體（DNASTAR Inc., Madison, WI, USA）之MegAlign軟體進行序列比對與演化樹分析。

六、VP1 氨基酸變異率分析：

將口蹄疫各繼代病毒及口蹄疫 O/TAW/ 97 K株病毒之VP1基因核酸序列轉譯成氨基酸序列，再以DNASTAR套裝軟體（DNASTAR Inc., Madison, WI, USA）之MegAlign軟體進行序列比對，藉以計算各代病毒之氨基酸變異率。

七、標準血清製備：

以市售口蹄疫O/TAW/98疫苗（Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia）免疫3頭12月齡無口蹄疫抗體牛隻，於免疫後第21天，採取免疫牛隻之血液製備標準血清。

八、病毒 r1 值分析：

依據口蹄疫病毒VP1核酸序列比對結果，選擇差異性大於或等於0.5%之病毒株，進行口蹄疫病毒中和試驗，以計算其r1值。先分別以第一項純化之口蹄疫病毒及VP1核酸序列差異性大於或等於0.5%之繼代病毒株，與本試驗製備之牛標準血清，進行血清中和試驗，並讀取各病毒株之中和抗體力價，再以各繼代病毒株之中和抗體力價除以第0代之口蹄疫病毒測得之中和抗體力價，計算出r1值。各病毒株均重複3次試驗後，捨棄其中差異性較大的1組，再求出其餘2組之平均r1值，做為該株病毒之r1測定值。

結果

一、細胞連續繼代：

將第0代之口蹄疫病毒液0.1 ml接種至長滿單層BHK-21細胞的小角瓶中，置入37°C含5% CO₂之培養箱培養，經一天即產生全面性的細胞病變效應（CPE），以冷凍解凍及離心方式收取繼代病毒，共生產150代病毒。

二、VP1 核酸變異率分析：

150代口蹄疫繼代病毒與口蹄疫O/TAW/ 97 K株病毒第0代之VP1基因核酸序列比對結果，第137個及第301個鹼基對在繼代至第36代時開始變異；第213個鹼基對在繼代至第45代時開始出現變異；

第322個鹼基對在繼代至第98代時開始出現變異；第328個鹼基對則在繼代至第43代時開始出現變異；第366個鹼基對在繼代至第98代時也開始變異；第413個鹼基對則在第16代至第35代繼代時出現變異；第435個鹼基對繼代至第98代時開始出現變異；而第593個鹼基對則在繼代至第17代至35代及第80代開始出現變異；第628個鹼基對在繼代至第77代時開始出現變異，總計在150代的繼代中，共有10個鹼基對出現變異(表1)。而各繼代病毒VP1之核酸變異率，在第1至第15代的繼代病毒均未出現變異，從第16代至150代間，繼代病毒的VP1之核酸變異率分佈於0.2至1.3之間(表2)。

三、口蹄疫各繼代病毒株與臺灣歷年分離病毒株之親源性分析：

將口蹄疫各繼代病毒株VP1基因核酸序列差異性大於或等於0.5%之病毒代表株，並選擇與病毒VP1基因10個鹼基對發生變異的相近繼代代數，共21株（包括第1、15、16、17、25、35、36、37、43、44、45、50、51、70、76、77、80、81、100、101及150代）與臺灣歷年分離之口蹄疫病毒株之VP1基因核酸序列，以DNASTAR套裝軟體之MegAlign軟體進行演化樹分析結果，所有繼代病毒株與疫苗株(O/TAW/205/98)最為接近，而臺灣歷年分離病毒株與繼代病毒株則差異較多(圖1)。

四、VP1 氨基酸變異率分析：

將各代口蹄疫病毒及口蹄疫 O/TAW/ 97 K株病毒之VP1基因核酸序列轉譯成氨基酸序列，再進行序列比對，結果發現各繼代病毒株之VP1氨基酸序列分別於第46, 101, 108, 110, 138, 198及210等處出現變異(表3)，均為非同義置換(non-synonymous substitution, dN)。而各代病毒之VP1氨基酸變異率，在第1至第15代的繼代病毒均未出現變異，從第16代至150代間之變異率則介於0.5至2.9之間(表4)。經計算該等變異位之非同義置換(dN)與同義置換(synonymous substitution, dS)數值差為 -0.21874 ± 0.01348 (dN-dS \pm SD)，因此該等變異係消極選擇(Negative selection)所致。

五、繼代病毒 r1 值分析：

以市售口蹄疫O/TAW/98疫苗免疫無口蹄疫抗體牛隻3頭，免疫21天後，採血製備標準血清。以繼代用之口蹄疫純化病毒，並選擇VP1核酸序列差異性大於或等於0.5 %之繼代病毒株共9株代表病毒株（包括第25、43、45、51、70、80、98、100及150代），分別進行標準血清之口蹄疫病毒中和試驗，經判讀各病毒株之口蹄疫中和抗體力價後，再以各繼代病毒株測得之中和抗體力價分別除以繼代用之口蹄疫純化病毒所測得之中和抗體力價，而計算出各繼代病毒株之r1值，結果顯示各繼代病毒株之r1值介於0.4至0.81之間（表5）。

討論

口蹄疫病毒像其他RNA病毒一樣，具有高度的變異性，為了解親豬源性口蹄疫病毒（O/TAW/97）的變異情形，我們將該病毒在BHK-21細胞進行150代的繼代，結果發現繼代至第16代開始，病毒VP1核酸序列就出現變異，而且VP1氨基酸也發生改變，繼代至第20代病毒的VP1核酸及氨基酸序列，均有二個位置發生變異，此與Carrillo等人以口蹄疫O/TAW/97病毒連續在BHK 21細胞繼代20代，發現該病毒的VP1的氨基酸序列並未改變[5]而有所不同。可能係本試驗使用的病毒先經過病毒斑的篩選，再進行連續繼代，而Carrillo等人試驗所使用的病毒，係源自水疱液的混合液，可能夾雜不同的病毒族群。

本試驗在繼代至150代時，病毒VP1核酸序列共有10個位置發生變異，但在繼代第100代至第150代期間，並未再出現其他位置的變異，有可能是該繼代病毒已適應細胞環境，因此在沒有環境壓力存在下，病毒可能就像Rojas等人的研究所稱，即使經過29代的繼代，其主要抗原決定位的核酸序列也不會發生變異[14]。在本研究雖發現繼代第16代至第150代的各代病毒株之VP1氨基酸共有7個位置發生變異，但都不是發生在主要抗原決定位上，這也呼應了Rojas等人的報告。

蛋白質的空間結構是由氨基酸與水分子以及氨基酸與氨基酸之間的相互作用決定，而蛋白質是在水溶

液的環境中經過折疊才具有生物功能，為減小其厭水旁鏈與水介質間的相互作用，蛋白質在形成空間結構時，會將厭水旁鏈埋入分子內部而將親水旁鏈暴露在表面與水接觸[1]。本研究由繼代第16代至第150代的各代病毒株之VP1氨基酸的變異中，第46個氨基酸雖然均由酸性的麩胺酸（Glutamic acid）變成脂肪族的甘胺酸（Glycine），而第138個及第198個氨基酸也均由酸性的天門冬胺酸（Aspartic acid）變成脂肪族的甘胺酸，但都屬於親水性的氨基酸，因此不致影響抗原構形，而第101個氨基酸由具親水性、極性的酥胺酸（Threonine）變成疏水性脂肪族的胺基丙酸（Alanine），第108個氨基酸由親水性具鹼性的組織胺酸（Histidine）變成親水性芳香族的酪胺酸（Tyrosine），以及第110個氨基酸由具親水性的酸性麩胺酸變成具親水性的鹼性離胺酸（Lysine），可能會影響抗原構形，但由於該等氨基酸位置不在已知的抗原決定位上，所以對整體抗原構形影響不大。另第210個氨基酸雖然由具親水性的鹼性離胺酸變成具親水性及極性的麩胺酸醯胺（Glutamine），此二者都屬於親水性的氨基酸且不在重要抗原決定位上，因此不致影響抗原構形。總計7個位置的氨基酸所發生的變異均屬於非同義置換，而由該等變異位之非同義置換（dN）與同義置換（synonymous substitution, dS）數值差為 -0.21874 ± 0.01348 （dN-dS \pm SD），因此該等變異係消極選擇（Negative selection）所致。

世界動物衛生組織（OIE）陸生動物診斷測試與疫苗手冊中，關於口蹄疫疫苗製造時疫苗株之選擇係以疫苗病毒株與野外流行分離株之配對試驗結果，計算二者之抗原相關性（r1值），作為預測該二種病毒株之交叉保護能力之依據，若二者之r1值大於0.3，表示其抗原相關性良好，可推薦為疫苗生產用之病毒株。而本試驗各繼代病毒株與口蹄疫O/TAW/205/98疫苗株的r1值均落在0.4至0.81之間，顯示該疫苗株對各繼代病毒株均具有保護力。而此等繼代病毒株VP1基因核酸序列與純化病毒株之差異性只有0.5%至1.3%，與2009年分離自野外的口蹄疫病毒其VP1核酸差異性約達10%，但2009病毒株仍可藉口蹄疫O/TAW/205/98疫苗

株加以保護[2]，進一步證實口蹄疫O/TAW/205/98疫苗株對於該等病毒具有保護潛力。但是低繼代數的r1值為何不是最高？反而是高繼代數的r1值最高，這可能是各繼代病毒株的中和試驗之確切病毒力價雖都在允許範圍，但卻無法一致所致。然而由各繼代病毒株在親源關係演化樹上的分佈可知，雖已繼代了150代，仍未達到野外分離株的變異程度，因此，所有的繼代病毒株，還是與疫苗株病毒的親源性最為接近，可能是因為在細胞內繼代，不像在豬體內有抗體壓力，所以變異率就相對不高。因此，在無抗體壓力存在下，即使像細胞培養時供給較拮据的環境，仍無法

顯現如存在有免疫壓力的生體內所發生之高變異性，因此未來可在細胞培養時，添加不同力價的抗體，以模擬生體內的免疫壓力環境，探討繼代病毒之變異率。

誌謝

感謝本組王羣助理研究員幫忙完成本報告口蹄疫病毒株之VP1基因核酸序列的親源關係演化樹分析以及氨基酸變異位之非同義置換與同義置換數值計算與分析。

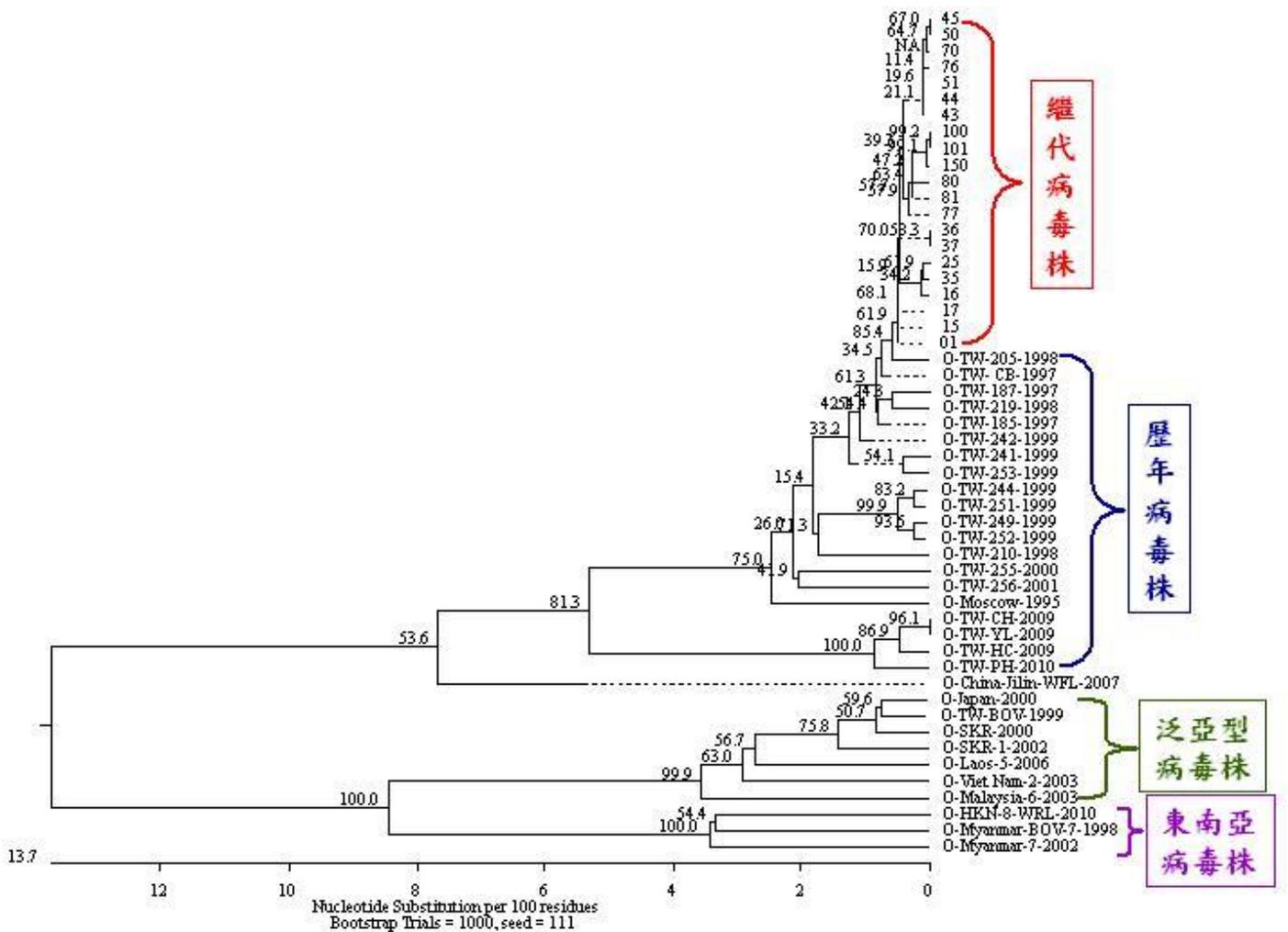


圖 1、口蹄疫各繼代病毒株與臺灣歷年分離病毒株之親源性分析

表 1、繼代病毒 VP1 核酸變異位置

	VP1 核酸變異位置									
	137	213	301	322	328	366	413	435	593	628
發生變異之		45~50~150		98~150		98~150		98~150		77~150
繼代代數	36~150		36~150		43~150		16~35		17~35	80~150
鹼基對變異		C→T→C		C→T		A→G		A→G		A→C
情形	A→G		A→G		G→A		A→G→A		A→G→A→G	

表 2、繼代病毒 VP1 核酸變異率

繼代代數	1~15	16~19	20~21	22~23	24	25	26~42	43~44	45~50
變異率	0.0	0.2	0.3	0.2	0.3	0.5	0.3	0.5	0.6
繼代代數	51~69	70~72	73~74	75	76	77~79	80~97	98~150	
變異率	0.5	0.6	0.5	0.6	0.5	0.6	0.8	1.3	

表 3、繼代病毒 VP1 氨基酸變異位置

	VP1 氨基酸變異位置							
	46	101	108	110	138	198	210	
發生變異之		36~150		43~150		17~35	80~150	
繼代代數	36~150		98~150		16~35			77~150
氨基酸變異		T→A		E→K		D→G→D→G		
情形	E→G		H→Y		D→G→D			K→Q

註：E = 麩胺酸(Glutamic acid)；G=甘胺酸(Glycine)；T=蘇胺酸(Threonine)；A=胺基丙酸(Alanine)；
H=組織胺酸(Histidine)；Y=酪胺酸(Tyrosine)；K=離胺酸(lysine)；D=天門冬胺酸(Aspartic Acid)；
Q=麩胺酸醯胺(Glutamine)。

表 4、繼代病毒 VP1 氨基酸變異率

繼代代數	1~15	16~19	20~21	22~23	24	25	26~42	43~74
變異率	0.0	0.5	0.9	0.5	0.9	1.4	0.9	1.4
繼代代數	75	76	77~79	80~97	98~150			
變異率	1.9	1.4	1.9	2.4	2.9			

表 5、以中和抗體力價計算繼代病毒 r1 值之結果

病毒繼代代數	25	43	45	51	70	80	98	100	150
測試 1	0.44	0.56	0.79	0.9	0.71	0.79	0.79	0.89	0.9
測試 2	0.35	0.45	0.44	0.71	0.56	0.62	0.5	0.5	0.7
r1 值	0.4	0.51	0.62	0.81	0.64	0.71	0.65	0.7	0.8

參考文獻

1. 王自豪、林誠謙、李弘謙。2002。談蛋白質折疊與氨基酸序列。物理雙月刊 24 (2), 320-327。
2. 林有良、黃郁琰、鍾明華、張惟茗、黃金城、張伯俊、謝快樂。2010。口蹄疫疫苗(O/TAW/98)對2009年台灣新分離病毒株之保護效力評估。台灣獸醫誌36(3), 214-221。
3. Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., 1989. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* 337, 709-716.
4. Beard, C. W., Mason, P. W., 2000. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 74, 987-991.
5. Carrillo, C., Lu, Z., Borca, M. V., Vagnozzi, A., Kutish, G. F., Rock, D. L., 2007. Genetic and phenotypic variation of foot-and-mouth disease virus during serial passages in a natural host. *J. Virol.* 81(20), 11341-11351.
6. Chu, R. M., Yang, P. C., Cheng, I. C., 1997. Review: Foot-and-mouth disease. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* 23(6), 477-491.
7. Donaldson, A. I., 1997. Foot-and-mouth disease in Taiwan. *Vet. Rec.* 140, 407.
8. Donaldson, A. I., Kitching, R. P., Barnett, P. V., 1996. Foot and mouth disease. In: OIE manual of standards for diagnostic test and vaccines, Office international des epizooties, Paris, Chapter 2.1.1., pp. 47-56.
9. Dunn, C. S., Donaldson, A. I., 1997. Natural adaptation to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus. *Vet. Rec.* 141, 174-175.
10. Garcia-Arriaza, J., Ojosnegros, S., Davila, M., Domingo, E., Escarmis, C., 2006. Dynamics of mutation and recombination in a replicating population of complementing, defective viral genomes. *J. Mol. Biol.* 360, 558-572.
11. Herrera, M., Grande-Perez, A., Perales, C., Domingo, E., 2008. Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. *J. Gen. Virol.* 89, 232-244.
12. Lin, Y. L., Jong, M. H., Huang, C. C., Shieh, H. K., Chang, P. C., 2010. Genetic and antigenic characterization of foot-and-mouth disease viruses isolated in Taiwan between 1998 and 2009. *Vet. Microbiol.* 145, 34-40.
13. Martin, V., Perales, C., Davila, M., Domingo, E., 2006. Viral fitness can influence the repertoire of virus variants selected by antibodies. *J. Mol. Biol.* 362, 44-54.
14. Rojas, E. R., Carrillo, E., Schiappacassi, M., Campos, R., 1992. Modification of foot and mouth disease virus O1 Caseros after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *J. Virol.* 66(6), 3368-3372.
15. Shieh, H. K., 1997. The FMD situation in Taiwan. *J. Chin. Vet. Sci.* 23: 395-402.
16. Tsai, C. P., Pan, C. H., Liu, M. Y., Lin, Y. L., Chen, C. M., Huang, T. S., Cheng, I. C., Jong, M. H., Yang, P. C., 2000. Molecular epidemiological studies on foot-and-mouth disease type O Taiwan viruses from the 1997 epidemic. *Vet. Microbiol.* 74, 207-216.
17. Yang, P. C., Chu, R. M., Chung, W. B., Sung, H. T., 1999. Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan. *Vet. Rec.* 145:731-734.

Study on the Genetic Variation of Porcinophilic Foot and Mouth Disease Virus in Taiwan

YW Huang*, YL Lin, PQ Sun, YY Ke, SH Tsai

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract A purified O/TAW/97 foot-and-mouth disease virus (FMDV) was serially passaged in baby hamster kidney (BHK-21) cells for a total of 150 times. The VP1 gene from each passage was amplified using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The RT-PCR products were sequenced. Nucleotide and deduced amino acid sequences were compared among those of known virus strains. The results showed that a total of 10 and 7 mutations were found in VP1 nucleotide and deduced amino acid sequences of passaged FMDV between the 16th generation and the 150th generation, respectively. The variation rates of nucleic acid and deduced amino acid sequences in the progeny of passaged FMDV were 0.2 to 1.3 and 0.5 to 2.9, respectively. However, the mutations did not occur at the major antigenic sites. On the other hand, based on a phylogenetic tree analysis of VP1 sequences of passaged and isolated Taiwanese FMDVs, the passaged FMDVs displayed greater similarity to the FMDV O/TAW/205/98 vaccine strains than to the Taiwanese FMDV isolates. Furthermore, the resulting correlation of the vaccine virus and the wild virus (r_1 values) were between 0.4 and 0.81, respectively, indicating that the FMDV O/TAW/205/98 vaccine strain should provide a certain level of protection against passaged field FMDV isolates. Results revealed that even at the constraints condition, the FMDV mutation rate *in vitro* culture lacking neutralization antibodies, was not comparable to that *in vivo* with neutralization antibodies.

Keywords: Foot and mouth disease virus, Genetic variation, Passage