

## 2014年豬輪狀病毒病例之基因型別分析

黃有良\*、鄧明中、張家宜、黃天祥、蔡向榮

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

**摘要** 輪狀病毒為誘發豬隻下痢的重要病原之一，依據其表面蛋白 VP4 與 VP7 可區分為多種基因型，且各型間交叉保護成效不佳，而過去台灣也未對豬隻輪狀病毒進行深入調查與研究，因此，本試驗將調查 2014 年輪狀病毒在台灣豬隻下痢所扮演的角色，並進一步分析其基因型別，本試驗共收集 2014 年全國 86 場 242 個下痢檢體進行豬傳染性胃腸炎、豬流行性下痢與輪狀病毒之檢測，結果發現，以豬流行性下痢的檢出率最高，有 47 場 125 個樣品呈現陽性，其次為輪狀病毒，有 4 場 12 個檢體呈陽性反應，而豬傳染性胃腸炎則均呈現陰性。進一步比對輪狀病毒的病毒蛋白 4(VP4)與 7(VP7)序列，其屬於 G9P19 基因型，且其序列與基因庫內的輪狀病毒的序列(包括台灣人型輪狀病毒)均有 10%以上的差異，顯示此輪狀病毒與各國動物及人型輪狀病毒均不同，推測此病毒株為台灣本土病毒株。

**關鍵詞：**輪狀病毒、下痢、病毒蛋白 4、病毒蛋白 7

### 緒言：

下痢是仔豬最常見的臨床症狀，其原因可分為病原性與非病原性兩大類，病原性下痢的病原包括：病毒、細菌與寄生蟲等三大類[4]，其中以病毒性下痢所引發的疫情最為嚴重，其主要是由豬傳染性胃腸炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、豬流行性下痢(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)與豬輪狀病毒(porcine rotavirus, PRV)所引發，而臨床上此三種病毒所引發的臨床症狀並無法區分，均可誘發大規模的豬隻下痢，其中以哺乳仔豬最為嚴重，且伴隨著高死亡率[4]。

輪狀病毒最常引發 1 至 4 日齡哺乳仔豬隻產生黃色水樣下痢，其發生率與死亡率分別不超過 20% 與 15%，解剖時可見胃充滿凝乳塊、腸壁變薄、腸道內充滿黃灰色液體，組織病理學已空腸與迴腸之病變最為嚴重，可發現腸道上皮細胞腫脹、萎縮與壞死，固有層有許多單核炎症細胞浸潤[4]。

輪狀病毒屬於 *Reoviridae* 內 *Rotavirus*，為具封套

之雙股 RNA 病毒[12]，病毒基因體由 11 條雙股 RNA 所組成，除了第 11 條雙股 RNA 可轉譯出非結構蛋白 5 與 6 外，其餘 10 條基因均轉譯出一個病毒結構或非結構蛋白，整個基因體共可轉譯出 6 個結構蛋白與 6 個非結構蛋白。此外，此病毒顆粒大小約 75 nm，為具有三層結構之病毒，最外層由結構蛋白 VP4 與 VP7 所組成，中間層由結構蛋白 VP6 所組成，內層結構蛋白 VP1、VP2 與 VP3 所組成[7,12]。

輪狀病毒具有 A 到 G 等七種血清型[7]，A 型主要引發人與豬隻的胃腸炎，B 與 C 型則曾於人與動物身上被檢出，另外，C 型還可引發 1 週齡以下的小豬產生下痢，E 型目前只有在英國豬隻的檢體中被檢出，D、F 與 G 型則是發生在禽類。在這些血清型別中，A 型最受重視，另還可依據 A 型輪狀病毒之結構蛋白 VP4 或 VP7 次區分為不同基因型，如依 VP4 基因可區分為 1 至 35 等基因型，如依 VP7 基因則可區分為 1 至 27 等基因型[12]。

輪狀病毒自 1969 年首次於牛隻身上檢出後，也

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

陸續於人與豬的下痢病例中被檢出，從過去流行病學的研究發現，韓國、日本、加拿大、美國、英國、斯洛維尼亞、波蘭、泰國、南非、義大利、比利時等國家均有相關病例發生，且從VP4與VP7的序列發現，同一國家均有超過兩種亞型以上的輪狀病毒存在，其中韓國主要流行的病毒株為G5P7基因型，但仍有其他如：G8、G9、P23、P1等基因型的病毒存在；日本主要是以G9P23基因的病毒為主，且同樣有G5、G3、P6、P7、P1等基因型的病毒存在；加拿大主要是以G4P6基因的病毒為主，且同樣有G5、G2、G9、G1、P27、P13等基因型的病毒存在[3,4,13,14]。

台灣自1982年即有PRV的病例報告[5]，而從1994年黃等人[1]的田野調查的報告中發現，PRV在台灣豬場的盛行率高達39%，且可感染不同階段的豬隻，其中以離乳仔豬的感染率最高，其次是哺乳仔豬，所感染的病毒株是以第5型OSU病毒株(G57)為主，佔所有感染病例的96.8%，但仍有少數第4型Gottfried病毒株(G4P6)的感染病例，以及部分無法鑑定型別的病毒株。然而，於1994年以後雖然田間仍有零星病例發生，但均未對輪狀病毒在仔豬下痢中所扮演的角色進行分析與探討，因此，本試驗將探討在2014年輪狀病毒於仔豬下痢中所扮演的角色並進一步分析其基因型。

## 材料與方法：

### 樣品收集

2014年共收集全國各縣市86個豬場242個下痢檢體進行分析，將這些檢體以1：9比例製成10%乳劑後，於4°C下以3,000 rpm離心10分鐘後，取上清液進行病毒核酸之萃取。

### 核酸萃取

使用 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit(Roche)進行總核酸之萃取，首先，取200 µl乳劑上清液置入樣品槽內，之後，分別將Wash Buffer I、Wash Buffer II、Wash Buffer III、Lysis/Binding Buffer、Proteinase K、Magnetic Glass

Particles、Elution Buffer置入相對應反應槽內，再使用MagNA Pure LC(Roche)機器進行核酸萃取。

### 核酸檢測

將所萃取出之核酸分別進行TGEV、PEDV、PRV之RT-PCR檢測，其檢測引子之序列詳述於表1，每管反應液包含2.5 µl核酸、1X DNA polymerase buffer、4單位(units)的 recombinant RNase inhibitor (Promega, Madison, WI, USA)、1 unit的 AMV reverse transcriptase (Promega)、1 unit的 GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega)、0.2 µM的 deoxyNTP mixture與0.4 µM的引子。之後放至溫度控制器(AB 3700, ThermoFisher Scientific)進行反應，將先進行1個循環的反轉錄反應(40°C 40分與94°C 3分鐘)，再進行35循環之增幅反應(95°C 40秒、55°C 40秒、72°C 40秒)，最後再進行1個循環之72°C 10分鐘，反應結束後以DNA電泳進行分析。

### 輪狀病毒VP4與VP7序列之增幅

經上述方法檢測為PRV陽性者之檢體，再以PRV特異性引子分別增幅出VP4與VP7的部分基因片段，其大小分別為867與1062核苷酸，VP4與VP7特異性引子之序列詳述於表1，每管反應液包含2.5 µl核酸、1X DNA polymerase buffer、4 units的 recombinant RNase inhibitor (Promega)、1 unit的 SSTIII reverse transcriptase (Invitrogen)、1 unit的 KAPA DNA polymerase (Promega)、0.2 µM的 deoxyNTP mixture與0.4 µM的引子。之後放至溫度控制器(AB 3700, ThermoFisher Scientific)進行反應，將先進行1個循環的反轉錄反應(40°C 60分與94°C 3分鐘)，再進行35循環之增幅反應(95°C 60秒、42°C 60秒、72°C 90秒)，最後再進行1個循環之72°C 10分鐘，反應結束後以DNA電泳進行分析，之後，RT-PCR產物再使用BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Invitrogen)於3700 XL DNA Analyzer (Invitrogen)進行序列解析。

## 序列分析

將所定序的PRV VP4與VP7序列與NCBI基因庫的相關序列進行比對，並用MEGA 5.2軟體內的MUSCLE比對法進行排序比對，之後，再以maximum-likelihood method進行樹狀圖之分析

## 結果

### 仔豬下痢病因分析

2014年各地方防治所共送檢86豬場242個豬隻下痢檢體進行檢測（圖1），其中1-3月送檢53場151個檢體，4-6月送檢7場14個檢體，7-9月送檢15場52個檢體，10-12月送檢11場25個檢體。當進行TGEV、PEDV與PRV檢測時，共有47場125個檢體為PEDV陽性，4場12個檢體為PRV陽性，TGEV則均為陰性反應。PEDV陽性場主要集中於1-3月，共有38場108個，之後每季約有2至3場的PEDV陽性場，而4場PRV陽性場則分散於4至12月之間。

### 輪狀病毒VP4基因序列分析

4場PRV陽性之檢體中有兩場（編號2353與2278）成功的定序出VP4序列，其餘兩場（編號1939與2785）則無法解析其VP4序列，進一步分析2353與2278序列時發現，此兩者均為P19基因型，且兩者的相似度達99.9%，其與越南人型輪狀病毒（HG513048）及泰國豬型輪狀病毒（JX102489）最為相近，但其差異性高達21.1-25.3%（圖2）。

### 輪狀病毒VP7基因序列分析

4場PRV陽性之檢體中有兩場（編號2353與2278）成功的序出其VP7序列，其餘兩場（編號1939與2785）則無法解析其VP7序列，進一步分析2353與2278序列時發現，此兩者均為G9基因型，且兩者的相似度達100%，其與美國人型輪狀病毒（AJ491181與EU153554）最為相近，但其差異性高達11.7-12.6%（圖3）。

## 討論

檢視2014年所送檢的下痢檢體發現，其送檢病

例主要集中在1至3月且以PEDV所引發為主，此結果與台灣自2013年底即爆發PEDV大流行有關[6,11]，而當PEDV大流行過後，雖然其疫情自4月開始明顯趨緩，但仍有許多零星的PED病例，而當疫情趨緩後，其它原本在各場導致下痢的病因也逐漸浮現，在4月至12月間所送檢的33場下痢檢體中，只有8場為PEDV陽性，其餘25場中有4場為PRV所引起。

VP4的樹狀圖分析顯示，病例2278與2253為同一病毒株，其被歸類為P19基因型，然而，從基因庫的比對發現其最接近的序列為越南人型與泰國豬型的P19基因型PRV，但其差異性高達21.1-25.3%，顯示台灣豬型PRV雖屬P19基因型，但與基因庫內的P19基因型PRV並無關聯，而台灣人型RV目前只知有P3、P4、P6、P8、P14、P25等基因型[8,15-17]，因此，與台灣豬型RV的P19不同。

從VP7的樹狀圖分析發現，4場PRV陽性場中有兩場為G9型別，且兩者的相似度達100%，顯示此病毒為同一來源，進一步分析其地理位置發現兩場在同一鄉鎮同一村里，直線距離僅相距200至300公尺，且兩場的發病間距，也僅差距一週，表示此PRV是由病例2278傳至病例2353。另外，將PRV的VP7基因序列放至基因庫進行比對時，其最相近之序列為AJ491181與EU153554，此兩株均從1980年代美國人的下痢檢體中所發現，但其與病例2278與2353的差異性高達11.7-12.6%，當與台灣人型PRV病毒的VP7序列比對時，其最小的差異性也達到19.0%，這些結果顯示，導致台灣豬隻下痢的PRV與導致人類下痢的PRV為不同病毒株。

VP4與VP7為鑑定PRV型別的重要依據，因這兩種病毒蛋白位於病毒顆粒最外層，且具有誘發中和抗體之能力[7]，當其VP4或VP7型別不同時，交叉保護成效不佳，不容易引發其保護性，截至目前為止，已知VP4有P1至P35等35種，VP7有G1至G27等27種基因型[12]，而此次於豬隻下痢所檢測的PRV為G9P19型別，其與基因庫內的序列差異頗大，從目前的研究成果可知，此病毒與台灣人型PRV或是其他國家的豬型PRV均有很大的不同，推測其可能為台

灣本土的演化株，至於是否還有其他型別的PRV存在則需進一步擴大監測方可知。而整個擴大監測的對象應以3至5週齡的下痢仔豬為主，當以95%信賴水準與5%發生率（依本試驗的陽性率為基準）進行計算，全國8,137豬場共需採59場，且各縣市採集戶數依飼養戶數比例進行分配，每場採集15個3至5週齡下痢仔豬的糞便檢體，之後再將這些檢體進行輪狀病毒

的檢測與基因型別鑑定，方可了解全國豬場輪狀病毒發生之概況。

## 誌謝

感謝豬瘟研究組同仁協助，讓本試驗(103農科-10.1.1-衛-H1(6))可順利完成。

表1、試驗中所使用到的引子序列。

病毒	引子名稱	序列 (5' 到 3')	產物大小	參考文獻		
PEDV	PED-F	GGGCGCCTGTATAGAGTT TA	412	[9]		
	PED-R	AGACCACCAAGAATGTGT CC				
TGEV	TGE-F	GATGGCGACCAGATAGAA GT	612	[9]		
	TGE-R	GCAATAGGGTTGCTTGTA CC				
PRV	NSP3-F	ACCATCTACACATGACCC TC	89	[2]		
	NSP3-R	GGTCACATAACGCCCC				
	VP7-Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAAT TTCCGTCTGG			1062	[10]
	VP7-End9	GGTCACATCATACAATTC TAATCTAAG				
	VP4-CON2	ATTTCTGACAATTTATATC C			867	[10]
VP4-CON3	TGGCTTCTTTGATTTATAG GCA					

2014 年豬輪狀病毒病例之基因型別分析

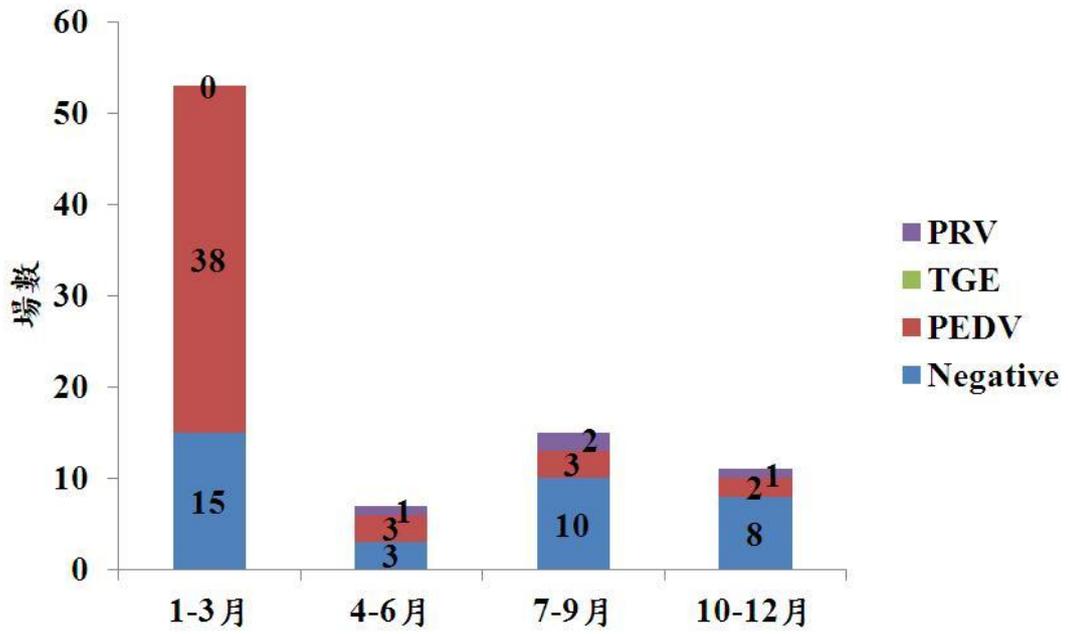


圖1、民國104年家畜衛生試驗所所收集的86個下痢豬場的病因分析。

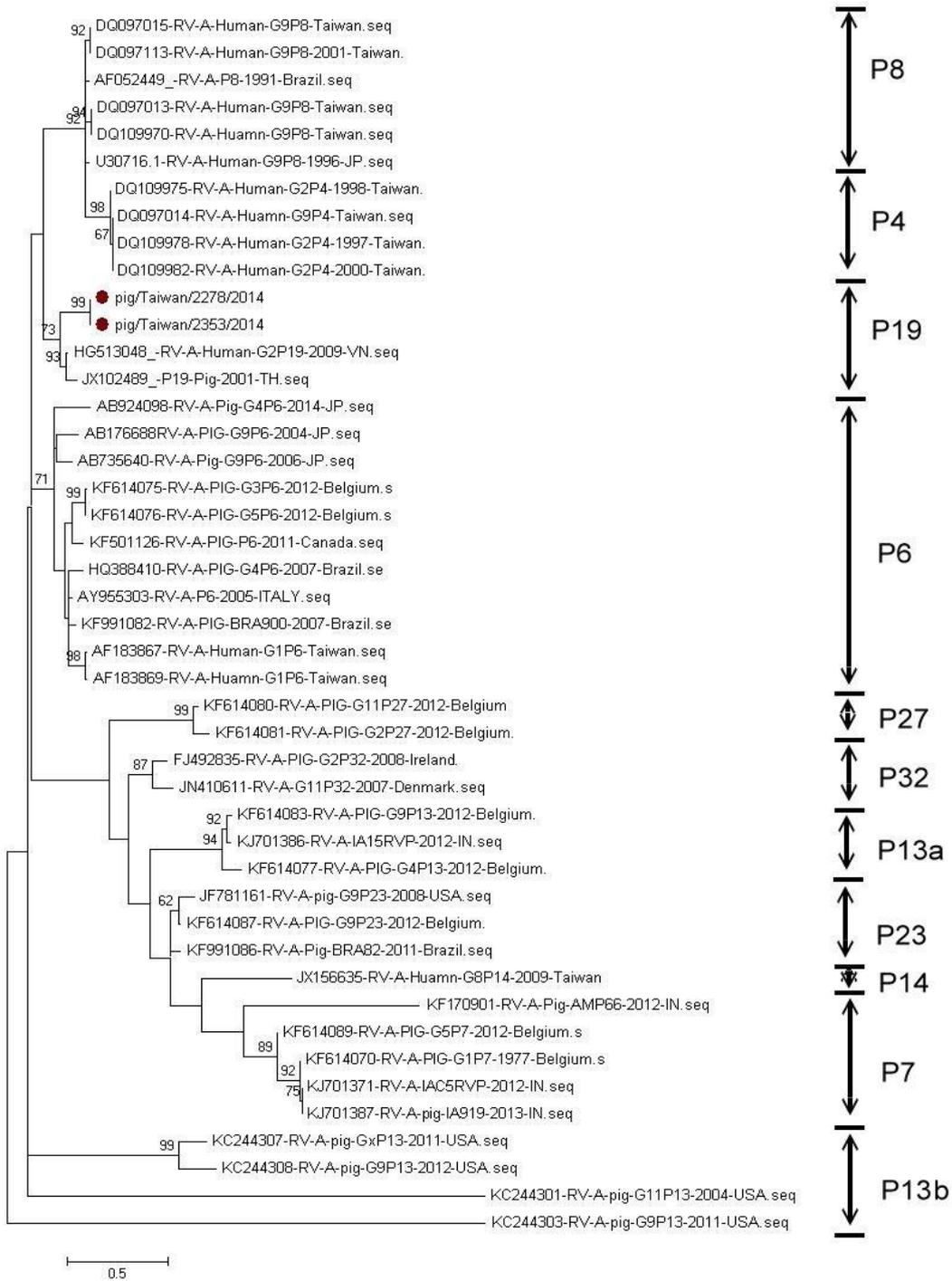


圖2、豬輪狀病毒VP4 (P) 基因樹狀圖分析。棕色圓點之標示代表台灣豬隻輪狀病毒。

## 2014 年豬輪狀病毒病例之基因型別分析

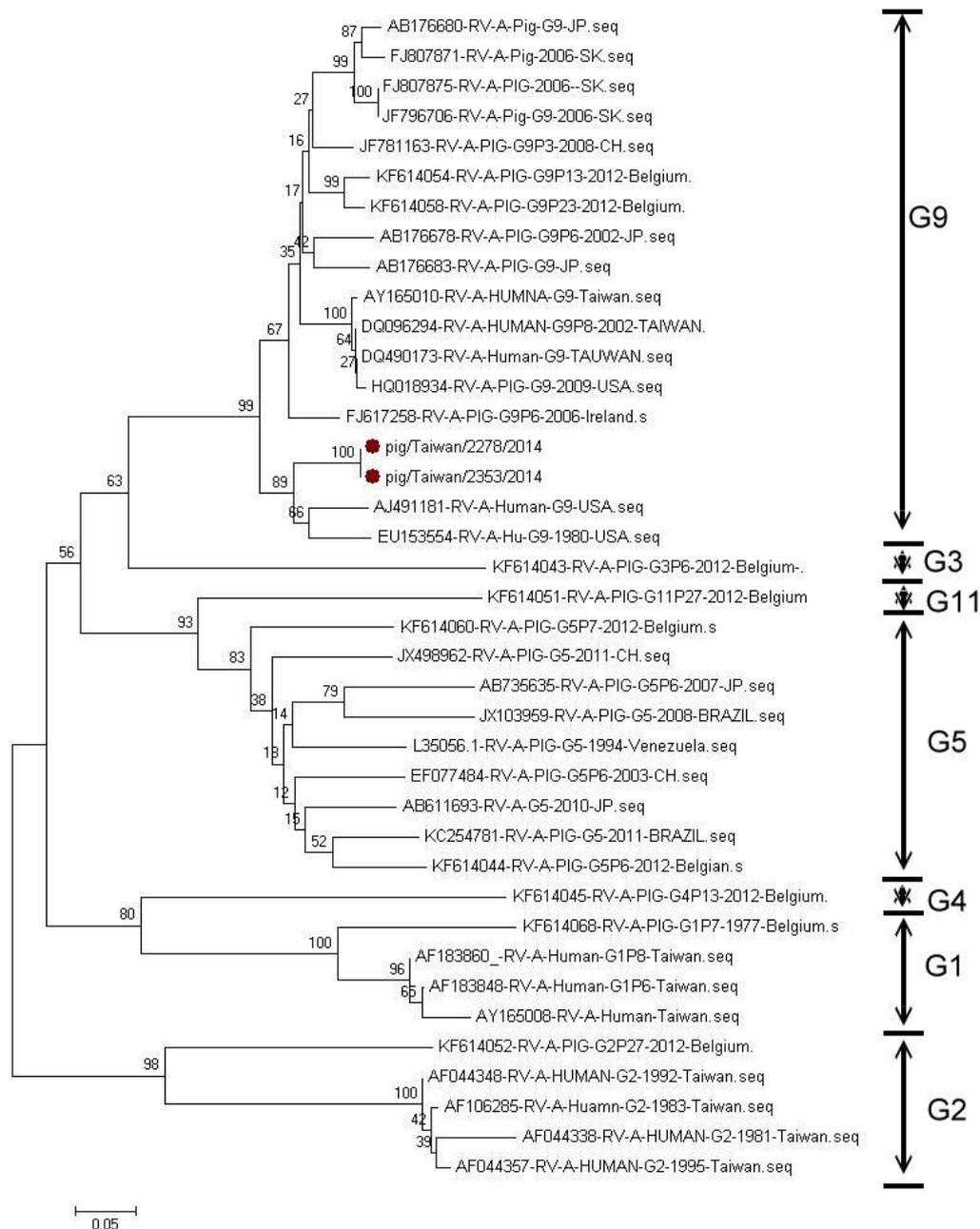


圖3、豬輪狀病毒VP7 (G) 基因樹狀圖分析。棕色圓點之標示代表台灣豬隻輪狀病毒。

## 參考文獻

1. 黃于哲。臺灣地區豬輪狀病毒的疫情調查。國立台灣大學獸醫學系碩士班論文，1994。
2. Amimo JO, Vlasova AN, Saif LJ. Detection and genetic diversity of porcine group A rotaviruses in historic (2004) and recent (2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets. *J Clin Microbiol* 51 : 1142 - 1151, 2013.
3. Chandler-Bostock R, Hancox LR, Nawaz S, Watts O, Iturriza-Gomara M, Mellits KM. Genetic diversity of porcine group A rotavirus strains in the UK. *Vet Microbiol* 173 : 27-37, 2014.
4. Chang KO, Saif LJ, Kim Y. Reoviruses (Rotaviruses and Reoviruses) In: *Disease of Swine*, 10th edition. Edited by Zimmerman JJ,

- Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Blackwell Publishing Ltd., Chapter 43. 621-634, 2012.
5. Chueh LL, Chu RM, Li WI, Chang WF. Isolation and identification of swine rotavirus in Taiwan. *Chinese J Microbiol* 15 : 212-220, 1982.
  6. Deng MC, Chang CY, Huang TS, Kuo ST, Tsai HJ, Chang C, Huang YL. The outbreak of porcine epidemic diarrhea in Taiwan. *Taiwan Vet J* 40 : 115 -121, 2014.
  7. Estes MK, Kapikian AZ. 2007. Rotaviruses. In DM Knipe, PM Howley, eds. *Field Virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1917-1974.
  8. Hwang KP, Wu FT, Bányai K, Wu HS, Yang DC, Huang YC, Lin JS, Hsiung CA, Huang JC, Jiang B, Gentsch JR. Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children. *J Med Microbiol* 61 : 990-997, 2012.
  9. Jung K, Chae C. RT-PCR-based dot blot hybridization for the detection and differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in fecal samples using a non-radioactive digoxigenin cDNA probe. *J Virol Methods* 123 : 141-146, 2005.
  10. Leener KD, Rahman M, Matthijnssens J, Van-Hoovels L, Goegebuer T, van der Donck I, Van Ranst M. Human infection with a P[14], G3 lapine rotavirus. *Virology* 325 : 11-17, 2004.
  11. Lin CN, Chung WB, Chang SW, Wen CC, Liu H, Chien CH, Chiou MT. US-like strain of porcine epidemic diarrhea virus outbreaks in Taiwan, 2013-2014. *J Vet Med* 76 : 1297-1299, 2014.
  12. Patton JT.. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med* 13 : 85-97, 2012.
  13. Theuns S, Desmaretts LM, Heylen E, Zeller M, Dedeurwaerder A, Roukaerts ID, Van Ranst M, Matthijnssens J, Nauwynck HJ. Porcine group A rotaviruses with heterogeneous VP7 and VP4 genotype combinations can be found together with enteric bacteria on Belgian swine farms. *Vet Microbiol* 172 : 23-34, 2014.
  14. Winiarczyk S, Paul PS, Mummid S, Panek R, Gradzki Z. Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and the United States using RT-PCR. *J Vet Med B* 49, 373-378, 2002.
  15. Wu FT, Bányai K, Huang JC, Wu HS, Chang FY, Hsiung CA, Huang YC, Lin JS, Hwang KP, Jiang B, Gentsch JR. Human infection with novel G3P[25] rotavirus strain in Taiwan. *Clin Microbiol Infect* 17 : 1570-1573, 2011.
  16. Wu FT, Bányai K, Jiang B, Wu CY, Chen HC, Fehér E, Huang YC, Lin JS, Huang FC, Hsiung CA, Huang JC, Wu HS. Molecular epidemiology of human G2P[4] rotaviruses in Taiwan, 2004-2011. *Infect Genet Evol* 28 : 530-536, 2014.
  17. Wu FT, Bányai K, Lin JS, Wu HS, Hsiung CA, Huang YC, Hwang KP, Jiang B, Gentsch JR. Putative canine origin of rotavirus strain detected in a child with diarrhea, Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12 : 170-173, 2011.

## Genotype of Porcine Rotavirus in Taiwan in 2014

YL Huang<sup>\*</sup>, MC Deng, CY Chang, TS Huang, HJ Tsai

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture

**Abstract** Rotaviruses are important causative agents for swine diarrhea and are classified into 35 genotypes by the VP4 locus and 27 genotypes by the VP7 locus sequences. Vaccines use to protect swine induce little, if any cross protection between the many VP4 and VP7 genotypes, so genotype identity is crucial in responses to outbreaks. The aim of this study is to survey porcine Rotavirus in swine diarrhea outbreaks during 2014. A total of 86 farms with 242 fecal samples tested as positive for transmissible gastroenteritis virus, porcine epidemic diarrhea virus, and porcine Rotavirus by RT-PCR. The results showed that the predominant pathogen of swine diarrhea was porcine epidemic diarrhea virus. Porcine rotavirus was found only in 4 farms with 12 diarrhea samples and was classified as a G9P19 genotype by phylogenetic analysis of VP4 and VP7. The sequences of VP4 and VP7 in the Rotavirus isolated in this study were less than 90 % homologous than those found in strains from NCBI gene bank, including animal and human sources. These results suggested that the porcine Rotavirus strains discussed here are novel ones originating from Taiwan.

**Key words:** *Rotavirus, diarrhea, viral protein 4 and 7*

