■公開

□密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：140203B605

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局九十七年度科技計畫研究報告

計畫名稱：**豬環狀病毒第二型快速診斷技術之開發與研究** (第1年/全程1年)

(英文名稱) **Development and study of rapid diagnostic techniques for PCV-2**

計畫編號：97農科-14.2.3-檢-B6(5)

全程計畫期間：97 年 9 月 1 日至 97 年 12 月 31 日

本年計畫期間：97 年 9 月 1 日至 97 年 12 月 31 日

計畫主持人：林時宜

執行機關：私立台北醫學大學

合作機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所

973813

一、中文摘要：

豬環狀病毒第二型主要引起仔豬離乳後多系統消耗症(PMWS)，本病主要感染5-12週齡豬隻，臨床可見患豬呈現漸進性消瘦、蒼白、食慾減退、下痢及黃疸等症狀，近年來造成養豬業者重大之損失。由於豬環狀病毒第二型感染後會造成豬隻免疫系統功能降低，對於未來疫苗接種亦或是其他病原之二次感染有極大之影響，因此，對於田間疑似感染之豬隻，快速而準確的診斷技術是非常重要的。近年來由於分子生物技術的進步，許多快速增幅核酸之技術不斷被開發出來，由於恆溫環形核酸增幅法(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)只需簡單的設備(恆溫的水浴槽或加熱板)以及容易操作，非常適合於田間大規模的篩檢及現場的檢疫工作。本計畫已開發出恆溫環形核酸增幅之新技術，作為豬環狀病毒第二型之快速診斷方法。利用LAMP方法，我們已成功偵測到培養的豬環狀病毒第二型，並且在染病豬隻內臟萃取液，偵測到豬環狀病毒第二型。我們認為此計畫結果將可推廣至田間做大規模的篩檢及現場的檢疫工作，期能對我國養豬農業及環狀病毒之防疫有所貢獻。

二、英文摘要：

Polymerase chain reaction (PCR) technique is a convenient method and has been invented to amplify specific nucleic acid sequences. In addition, the nucleic acid amplification techniques have greatly improved in recent molecular biology. However, the common PCR technique needs a well-equipped laboratory and specially designed thermal cycler to perform the following experiments. In the field, there is always no specific equipment and laboratory and becomes difficult to carry out disease diagnosis, and need more time to perform PCR. Recent research have developed several reliable and convenient techniques to detect virus nucleic acid by nucleic acid amplification method, such as isothermal amplification techniques that including nucleic acid sequence bases amplification, strand displacement amplification, and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). In particular, the LAMP technique needs less equipment and are more convenient to carry out compared to other techniques. In this plan, we will develop a method for rapid detection of the specific sequence of Procine Circo Virus Type 2 (PCV-2) nucleic acids using LAMP technique. After mixing the extracted nucleic acids with specific primers, the reaction will perform under the certain temperature and be visualized the results by electrophoresis in gel. In this plan, we have developed the LAMP method for detection of PCV-2. Using this LAMP method, we have successfully detected the virus DNA in both cultured PCV-2 and field pigs. We think that this method can apply to the detection of field pigs and may profoundly help the establishment of rapid field diagnosis of PCV-2 and prevention of disease outbreak.

三、計畫目的：

豬環狀病毒第二型主要引起仔豬離乳後多系統消耗症(PMWS)，本病主要感染5-12週齡豬隻，臨床可見患豬呈現漸進性消瘦、蒼白、食慾減退、下痢及黃疸等症狀，近年來造成養豬業者重大之損失。由於豬環狀病毒第二型感染後會造成豬隻免疫系統功能降低，對於未來疫苗接種亦或是其他病原之二次感染有極大之影響，因此，對於田間疑似感染之豬隻，快速而準確的診斷技術是非常重要的。近年來由於分子生物技術的進步，許多快速增幅核酸之技術不斷被開發出來，由於恆溫環形核酸增幅法(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)只需簡單的設備(恆溫的水浴槽或加熱板)以及容易操作，非常適合於田間大規模的篩檢及現場的檢疫工作。因此本計畫擬採用恆溫環形核酸增幅之新技術開發豬環狀病毒第二型之快速診斷方法，期能對我國養豬農業及環狀病毒之防疫有所貢獻。

四、重要工作項目及實施方法：

I.豬環狀病毒第二型DNA之萃取

將病毒之培養上清液分別汲取200 μl後，以MagNA Pure LC instruments自動核酸萃取儀(羅氏應用科學，Roche Applied Sciences)進行病毒DNA之萃取工作。最後以100 μl引流液引流萃取病毒之DNA。

II.恆溫環式核酸增幅法 (LAMP)

以恆溫環式核酸增幅法檢測豬環狀病毒第二型核酸的試驗中，先加入一定量豬瘟病毒培養液萃取之的 DNA (2 μl) 置於 0.2 ml薄壁反應管中，隨後分別加入FIP與BIP（50 pmol/each）、loop primer F與B（25 pmol/each）以及F3與B3（5 pmol/each）、dNTP（1.4 Mm/ each）、0.8M betaine、0.1% Tween 20、10 mM (NH4)2SO4, 8 mM MgSO4, 10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.8，最後加入8 U of Bst DNA polymerase (New England Biolabs, U.S.A.)。將反應管置於63℃下反應50分鐘後，以80℃作用5分鐘以終止反應。上述反應結果以1 %瓊脂膠於100V 電壓條件下進行30 分鐘電泳，隨後以溴化乙錠（ethidium bromide, EtBr）染色30秒，再以純水洗淨脫色後置於紫外光燈箱上觀察結果。或加入SYBR Green 1 ?愫至反應管中，於肉眼下觀察有無綠色螢光。

III.即時恆溫環式核酸增幅試驗

上述已配置好之反應液置於即時恆溫環式核酸增幅濁度儀 (The Loopamp® Realtime Turbidimeter LA-320C, Eilen Chemical, Japan)，於63℃下反應60分鐘後，於電腦螢幕中觀察反應液濁度反應與起始時間判定反應結果。

五、結果與討論：

1.圖1：十倍連續稀釋病毒核酸進行恆溫環式核酸增幅法檢測豬環狀病毒第二型核酸DNA。反應後加入SYBR Green 1 μl搖至反應管中，於肉眼下觀察。綠色為陽性，橘色為陰性。第一管即表示10稀釋之DNA，其餘類推。結果顯示恆溫環式核酸增幅法，不需電泳分析即可判讀結果且靈敏度甚高。

2.圖2：恆溫環式核酸增幅法檢測豬環狀病毒第二型核酸DNA之瓊脂凝膠電泳圖。M為100bp ladder，lane1為豬環狀病毒第二型核酸DNA、lane 2為豬假性狂犬病毒(Pseudorabies)核酸、lane 3為豬霍亂沙氏桿菌(S. cholerasuis)染色體核酸、lane 4為鼠傷寒沙氏桿菌(S.typhimurium)、lane 5為豬放線桿菌胸膜肺炎（A. pleuropneumoniae）、lane 6 為陰性對照組。Lane 1出現帶狀條紋，判定結果為陽性。結果顯示我們設計的引子經恆溫環式核酸增幅法可專一性放大PCV-2 DNA，而對其他菌種不會有反應。

3.圖3：即時恆溫環式核酸增幅反應檢測環狀病毒第二型核酸DNA。十倍連續稀釋病毒核酸後進行即時恆溫環式核酸增幅反應，結果顯示約18-20分鐘即可觀察出特異性之核酸產物產生。

4.表一 比較病毒分離法及恆溫環式核酸增幅法偵測病豬感染PCV-2的差異。結果顯示我們設計的恆溫環式核酸增幅法，同病毒分離法可以偵測到病豬的PCV-2 DNA。

六、結論

利用LAMP方法，我們已成功偵測到培養的豬環狀病毒第二型，並且在染病豬隻內臟萃取液，偵測到豬環狀病毒第二型。我們認為此計畫結果將可推廣至田間做大規模的篩檢及現場的檢疫工作，期能對我國養豬農業及環狀病毒之防疫有所貢獻。

七、參考文獻：

1. Segalés J, Domingo M, Chianini F, Majó N, Domínguez J, Darwich L, Mateu E. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. Vet. Microbiol. 2004;98: 151-158.
2. Chianini F, Majó N, Segalés J, Domínguez J, Domingo M. Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Vet Immunol Immunopathol. 2003;94: 63-75.
3. Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Gilpin D, Meehan B, McCullough K, Allan G. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. Viral Immunol. 2002;15: 567-582.
4. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000;28:E63.
5. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol. Cell Probes 2002;16:223-229.
6. Mori Y, Nagamine K, Tomita N et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001;289:150-154.
7. Fukuta S, Iida T, Mizukami Y et al. Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. Arch. Virol. 2003;148:1713-1720.
8. Parida M, Posadas G, Inoue S et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. J. Clin. Microbiol. 2004;42:257-263.
9. Kuboki N, Inoue N, Sakurai T et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. J. Clin. Microbiol. 2003;41:5517-5524.
10. Fukuta S, Kato S, Yoshida K et al. Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. J. Virol. Methods 2003;112:35-40.
11. Savan R, Igarashi A, Matsuoka S et al. Sensitive and rapid detection of edwardsiellosis in fish by a loop-mediated isothermal amplification method. Appl. Environ. Microbiol. 2004;70:621-624.
12. Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T. Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002;290:1195-1198.

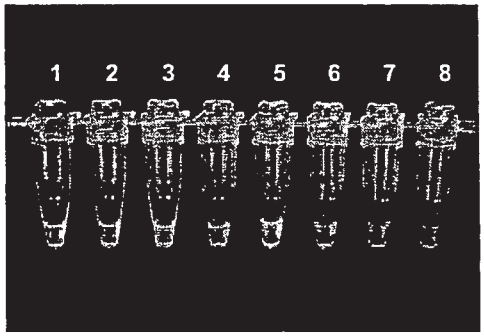

圖 1：十倍連續稀釋病毒核酸進行恒溫環式核酸增幅法檢測豬環狀病毒第二型核酸 DNA，反應後加入 SYBR Green 1 μl 至反應管中，於肉眼下觀察，綠色為陽性，橘色為陰性。第一管即表示 10^1 稀釋之 DNA，其餘類推。

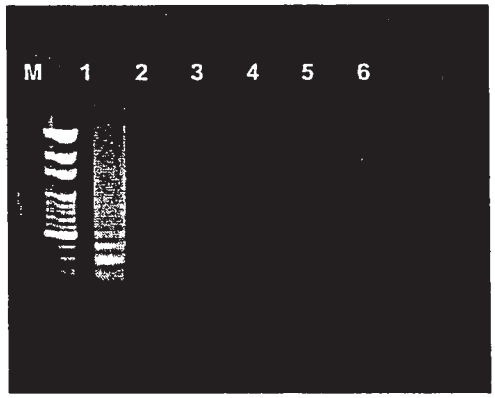

圖 2：恒溫環式核酸增幅法檢測豬環狀病毒第二型核酸 DNA 之瓊脂凝膠電泳圖，M 為 100bp ladder，lane1 為豬環狀病毒第二型核酸 DNA、lane 2 為豬假性狂犬病毒(Pseudorabies)核酸、lane 3 為豬霍亂沙氏桿菌(*S. cholerasuis*)染色體核酸、lane 4 為鼠傷寒沙氏桿菌(*S.typhimurium*)、lane 5 為豬放線桿菌胸膜肺炎（*A. pleuropneumoniae*）、lane 6 為陰性對照組。

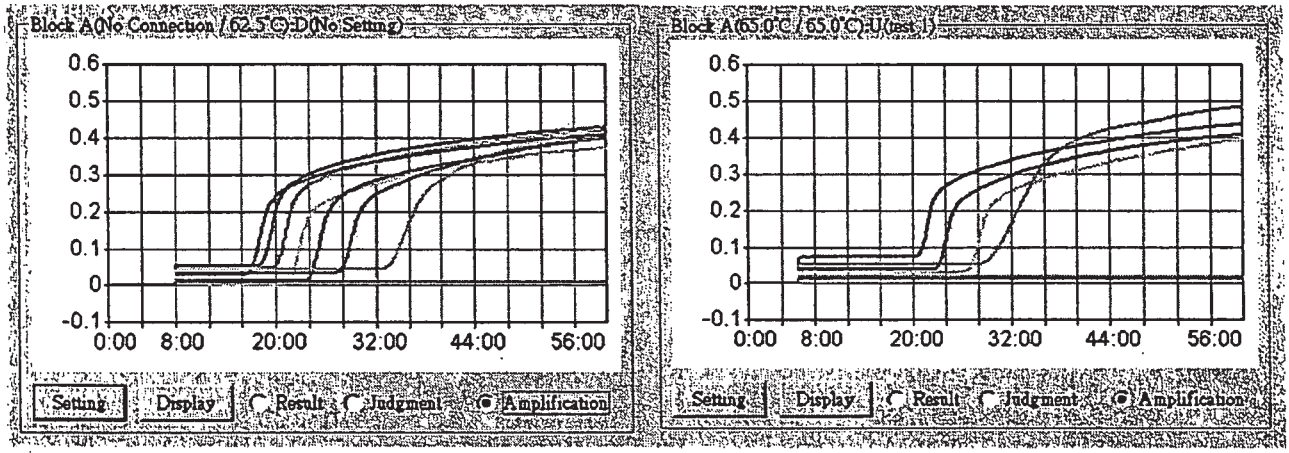

圖 3：即時恒溫環式核酸增幅反應檢測環狀病毒第二型核酸 DNA。十倍連續稀釋病毒核酸後進行即時恒溫環式核酸增幅反應，結果顯示約 18-20 分鐘即可觀察出特異性之核酸產物產生。

Table1 Comparison with the detection of PCV2 between virus isolation and LAMP methods in field pigs.

	Virus isolation	LAMP
Positive	36/36	36/36
Negative	0/36	0/36