

## 豬第二型環狀病毒酵素連結免疫檢測法之建立

王羣<sup>1,2\*</sup>、龐飛<sup>2</sup>、李璠<sup>1</sup>、林有良<sup>1</sup>、賴秀穗<sup>2</sup>、鄭謙仁<sup>2</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會家畜衛生試驗所

<sup>2</sup>國立台灣大學獸醫專業學院

**摘要** 豬第二型環狀病毒 (porcine circovirus type 2; PCV2) 為引起離乳後多系統消耗性綜合症 (postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) 之主要病原, 並對全球養豬業構成重大威脅。該病毒之培養與增殖主要以豬腎臟細胞 (PK-15) 為宿主細胞, 為了提高病毒增殖力價以利後續之試驗研究, 因此將 PK-15 細胞進行限制性篩選 (limiting dilution and cell cloning), 以篩選出可增殖較高病毒力價之 PK-15 子代細胞。PK-15 細胞經過篩選後, 發現其中 1 株新篩選之子代細胞株相當生長穩定; 新篩選與未篩選之 PK-15 細胞分別接種 PCV2 病毒後, 其增殖之 PCV2 病毒力價分別為  $10^{6.5}$  和  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml。新篩選之 PK-15 細胞增殖病毒其力價明顯較原先未經篩選之 PK-15 細胞為高。將新篩選 PK-15 細胞所增殖之 PCV2 病毒作為抗原, 進一步開發間接酵素連結免疫分析法 (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay; iELISA) 用以檢測豬隻血清 PCV2 抗體。該 iELISA 對於檢測豬隻血清 PCV2 抗體具極高特異性, 對於檢測其他病毒抗體, 包括豬生殖與呼吸綜合症病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRSV)、假狂犬病病毒 (pseudorabies virus; PRV) 及豬瘟病毒 (classical swine fever virus; CSFV) 等均無偽陽性及交叉反應。另外選取 385 頭豬隻血清樣品, 並與市售之商品化 PCV2 三明治酵素連結免疫分析法 (Sandwich ELISA; sELISA) 抗體檢測套組同時進行檢測。檢測結果發現二者之間相關敏感性及相關特異性分別為 97.8% 和 90.7%; 而二者實驗結果之一致性與 kappa statistic 分別為 95.8% 和 0.86。綜合上述之各項研究顯示本實驗所開發之 iELISA 對於檢測豬隻血清 PCV2 抗體具有高特異性與敏感性。

**關鍵詞：**豬第二型環狀病毒、特異性、敏感性。

### 緒言

近年來, 豬第二型環狀病毒 (porcine circovirus type 2; PCV2) 在美洲、歐洲和亞洲成為最重要之豬病毒性疾病, 並造成產業界之損失 [2,6,8,14,16]。

許多相關研究指出, PCV2 與離乳後多系統消耗性綜合症 (postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS)、豬隻皮膚炎腎病症候群 (porcine dermatitis nephropathy syndrome; PDNS)、先天性震顫 (congenital tremors; CT)、豬呼吸道綜合症

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

(porcine respiratory disease complex ; PRDC) 、增殖性及壞死性肺炎 (proliferative and necrotising pneumonia ; PNP ) 等臨床症狀或疾病有關 [2,6,8,14,22]。在許多無明顯臨床症狀之豬隻淋巴組織、肺臟、肝臟以及精液等亦可檢測PCV2之存在 [2,6 8,14,22]。

PCV2外型為正二十面體，直徑約17 nm，無封套，含有約1.76 kb的單股環狀的小型DNA病毒。PCV2經分析具有11個開讀窗 (Open reading frame ; ORF) [3,10]，其中ORF1可轉譯出約36 kDa的Rep protein (replication associated protein) 以及中間選擇性編輯後約19 kDa的Rep' protein、Rep protein與Rep' protein之功能與病毒複製有關 [3,10]；ORF2主要依照病毒核酸序列以反向方式轉譯出一28 kDa的蛋白產物，該蛋白產物為PCV2最主要之結構蛋白 (capsid protein)，該結構蛋白包含許多主要之抗原決定位 (epitope)，可誘發宿主專一性病毒中和性抗體 [10,13]。依據基因序列分析，PCV2可分為PCV2a與PCV2b二種基因型 [1,4,7]。其中PCV2a包含5個基因亞群，分別為2A、2B、2C、2D與2E。PCV2b包含3個基因亞群，分別為1A、1B與1C [1]。一些研究報告指出，PCV2a與之PCV2b間對於豬隻之毒力與致病性有所差異，但該理論仍需進一步證實 [4,5,7,9]。

目前世界各國許多試驗研究單位在增殖PCV2病毒時，往往遭遇相當程度之困難，最主要之原因在於該病毒培養相當不容易，增殖力價極低 (低於 $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml)，因此造成後續試驗研究室礙難行，包括豬隻血清PCV2抗體檢測 [12,24]。現行之豬隻血清PCV2抗體檢測技術，主要以間接免疫螢光法 (indirect immunofluorescence assay ; IFA)、免疫過氧化酶單層細胞測定法 (immunoperoxidase monolayer assay ; IPMA)、中和抗體試驗 (Serum neutralization test ; SNT) 以及 ELISA 為主 [11,13,15,18,19,20,21]。受限於PCV2病毒增殖不易，上述之檢測方法不易進行，僅能檢測少量血清養品。國內外開發之豬隻血清PCV2抗體診斷試劑時，往往使用重組蛋白做為抗原，但不論以何種表現

用細胞進行重組蛋白質之表現，除了所表現之重組蛋白質以外，也融合多種表現用細胞自身的蛋白質，因此在收集粗重組蛋白後的首要工作，需將重組蛋白進行純化 [13,18]。一般純化重組蛋白的方式包括了鹽溶鹽析、膠體過濾、離子交換、親和層析等方法，但不論是何種方法，均需要較高成本及較多時間，且需要較多實務經驗者進行操作。

PCV2病毒增殖最主要和PK-15細胞之細胞膜表面接受體 (receptor) 有關，因為大部分PK-15細胞之細胞膜表面均不含有PCV2病毒感染所需之heparan sulphate及chondroitin sulphate B接受體，因此造成PCV2病毒無法有效感染PK-15細胞以及增殖 [12,24]。但是依據國外相關文獻指出，若能正確的採用限制性篩選 (limiting dilution method) 方式重新篩選出含有高量PCV2病毒接受體之PK-15子代細胞株，將可有效改善PCV2感染PK-15細胞效率不彰之現象，進而提升PCV2病毒增殖力價 [12,24]。因此本研究將以限制性篩選方式，篩選出細胞膜表面具有高量PCV2病毒接受體之PK-15同源分株 (propagation in homogeneous)，使PCV2感染PK-15細胞之效率提升，有效提高病毒增殖力價。然後將新篩選PK-15細胞所產生之PCV2病毒作為抗原，進一步研發間接酵素連結免疫分析法 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay ; iELISA)，用於檢測豬隻血清PCV2抗體。

## 材料與方法

### 細胞株之篩選

將本所無PCV1汙染之PK-15細胞株 (KL strain) 以limit dilution method方式加以稀釋為1 cell/well，並培養於96孔盤。待其生長為單層細胞時，再繼代至6孔盤，並與原先未經篩選之PK-15細胞株一同進行後續之相關實驗。

### 病毒感染試驗

將上述新篩選之PK-15細胞培養於細胞培養盤 (6孔盤) 並待其生長為單層細胞時，以PCV2病毒 (GenBANK accession no. AF465211) 分別接種於各新篩選之PK-15子代細胞株與原先未經篩選

PK-15細胞株，於37°C、5% CO<sub>2</sub>感作1小時、以phosphate-buffered saline (PBS; 12.33 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 87.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 沖洗3次，加入含8%胎牛血清之新培養液培養72小時。同時每隔24小時收集病毒液一次，將不同收集時間之病毒液做序列稀釋，並測試其病毒增殖力價。

### 病毒力價測定及定量

先將PK-15細胞風乾並以10%中性福馬林固定10分鐘，經PBS沖洗3次，加入PCV2陽性抗血清(anti-PCV2 polyclonal antibody; VMRD Inc.)，於37°C感作40分鐘，經PBS沖洗3次，再加入1 mL之山羊抗豬免疫螢光抗體(goat-anti-swine IgG FITC; Jackson Inc.)，於37°C感作40分鐘，經PBS沖洗3次，最後以螢光顯微鏡進行鏡檢並判定病毒力價[22]。

### 病毒增殖

先以前述之方法，篩選出能增殖較高病毒量之PK-15子代細胞，然後將PCV2病毒接種於該PK-15子代細胞，視細胞生長程度進行繼代。感染後的PK-15細胞經過繼代3代累積病毒量後，將每代細胞以-80°C冰箱冷凍解凍三次，細胞破裂使病毒釋放出來，再以微量試管進行分裝，貯存於-80°C冰箱備用。

### 病毒定量

將接種PCV2之PK-15細胞經反復凍融3次後，先以5,000 g離心15分鐘後，取上清液，然後再加入PEG 600並以2,0000 g高速離心3小時後取沉澱物。將沉澱物用少量Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA PH 8.0; TE buffer) 溶解。離心管中依次加入60%、50%、40%、30%以及20%之蔗糖溶液，最後再加入TE buffer溶解物，並以20,000 g高速離心3小時。然後將懸浮於蔗糖溶液之病毒液以長針抽取出來，即可獲得純化之PCV2病毒，並置於-70°C備用，同時以分光光度計將病毒濃度調整為0.8 mg/mL。

### 間接酵素連結免疫吸附法 (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay, iELISA) 之備製

以coating buffer (35 mM NaHCO<sub>3</sub>, 15 mM

NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 將病毒以50至200倍進行稀釋，再以每孔100 μL分別加入96孔ELISA plate內並置於4°C感作一夜。之後每孔加入200 μL之wash buffer (6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mL/L v/v Tween-20) 清洗3次，然後每孔加入200 μL blocking buffer (Gelatin 2.5g/L w/v, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-base, 5 mM EDTA, 0.5 mL/L v/v Tween-20) 置於室溫作用1小時，用以填塞ELISA plate的空隙。以wash buffer清洗三次，將待測血清以assay buffer (Gelatin 1g/Lw/v, 150 mM NaCl, 30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 進行20至200倍稀釋稀釋，每孔分別加入100 μL不同稀釋濃度之待測血清並置於室溫作用一小時。以wash buffer清洗三次，加入以assay buffer稀釋5000倍的標示山羊抗豬IgG過氧化氫抗體 (goat anti-swine IgG-HRP; Jackson Inc.)，每孔加入100 μL避光置於室溫作用一小時。以wash buffer清洗三次後，每孔加入OPD 200 μL呈色劑 (3.7 mM o-phenylenediamine, 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶於PBS) 避光置於室溫作用5分鐘。每孔加入6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 μL停止呈色。最後以ELISA reader讀取OD450 nm/690 nm 數值。

### iELISA cut-off 值、與特異性及重複性之分析

主要選取30支無特定病原豬 (Specific Pathogen Free; SPF) 之PCV2陰性血清，36支PCV2、35支豬生殖與呼吸綜合症病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV)、23支假狂犬病病毒 (pseudorabies virus; PRV) 及65支豬瘟病毒 (classical swine fever virus; CSFV) 等豬隻陽性血清進行檢測，並以陰性血清吸光度之平均值 (mean) 加上3倍標準偏差值 (standard Deviation; SD) 作為篩選值，凡樣品吸光度大於篩選值者判為陽性，小或等於篩選值者判為陰性。同時以組內 (intra-assay) 及組間 (inter-assay) 檢測之方式計算變異係數 (coefficient of variation; CV)。並觀察有無偽陽性或交叉反應，所有樣品均為重覆測試二次。

## iELISA 檢測法相關性之分析

以逢機取樣方式選取2006年至2012年間收集之385頭豬隻血清樣品，並與市售之商品化PCV2 三明治酵素連結免疫分析法 (sandwich ELISA ; sELISA) 抗體檢測套組同時進行檢測。二者檢測結果之相關敏感性 (relative sensitivity)、相關特異性 (relative specificity) 以及檢測結果一致性 (kappa value) 之計算，則參考王等於2013年所採用之方法 [23]。

## 結果

### PK-15 細胞株之篩選

首先針對所篩選之不同PK-15子代細胞株觀察其生長情形，發現大部分之細胞株在篩選後培養至1星期內即相繼死亡，最後僅21株PK-15子代細胞株被成功篩選，其中15株PK-15細胞株生長情形良好。

### PCV2 病毒力價測定

上述所收集PK-15細胞株感染PCV2病毒後持續培養72小時，同時每隔24小時收集病毒液一次，將不同時間收集之病毒液做序列稀釋，並測試其病毒力價，經計算其中有一株PK-15細胞株所增殖之PCV2病毒力價為 $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL (圖1及圖2)，其餘細胞株 (包括未經篩選之PK-15細胞) 所增殖之PCV2病毒力價最高為僅達 $10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL。

### iELISA 操作條件最適化

將不同稀釋濃度之病毒抗原、PCV2陽性與陰性血清以iELISA進行檢測及交叉比對。由表1之結果可發現PCV2抗原之濃度以100倍 (8 µg/mL) 稀釋為佳，而PCV2陽性與陰性血清之稀釋比例以150倍之效果最好，陽性血清OD值為1.124，陰性血清之OD值為0.119，二者之間差異可達9.44倍 (表1)。

### iELISA cut-off 值、與特異性及重複性之分析

由表2之結果可發現，PCV2陰性對照組血清吸光度之平均值加上3倍標準偏差值分別為0.267 (intra-assay) 以及0.275 (inter-assay)，因此將吸光度大於0.3者判為PCV2抗體陽性，小或等於0.3

者判為PCV2抗體陰性。除此之外，試驗結果發現iELISA對於PRRSV、PRV及CSFV之陽性血清均呈現陰性反應且無交叉反應 (表2)。而CV值之範圍為0.02至0.14 (intra-assay) 及0.02至0.18 (inter-assay)，該結果顯示其重複性相當高。

### iELISA相關性之探討

將385個豬隻血清同時以iELISA 與sELISA進行檢測，結果發現271個血清樣品以二種檢測方法檢測均為陽性，97個血清樣品以二種檢測方法檢測均為陰性，10個血清樣品為iELISA檢測呈陽性反應而sELISA檢測呈陰性反應，6個樣品為iELISA 檢測呈陰性反應而sELISA檢測呈陽性反應。二種檢測方法之相關特異性 (relative specificity) 為90.7%，相關之敏感性 (relative sensitivity) 為97.8%。iELISA 與sELISA檢測結果之一致性與kappa statistic 分別為95.8%和0.86。

## 討論

過去之研究顯示，PCV2感染PK-15細胞後其病毒增殖力價約為 $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL以下 [22]。在本次研究中，我們首先利用limit dilution method篩選出多株之PK-15子代細胞株，並將其接種PCV2病毒，然後以間接免疫螢光染色法判定其力價，以篩選出對PCV2感染效率較高之PK-15細胞株。本研究顯示所篩選之PK15細胞株能穩定產生PCV2病毒，其最高增殖力價為 $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL。依據國外之文獻指出PCV2之感染最主要和其宿主細胞PK-15之細胞膜表面接受體有關[12,24]，因為大部分PK-15細胞之細胞膜表面均不含有PCV2病毒所需之heparan sulphate以及chondroitin sulphate B接受體，因此造成PCV2病毒無法有效進入PK-15細胞並進行增殖。若能正確的採用homogeneous subpopulation以及limit dilution method方式重新選殖 (篩選) 含有高量PCV2病毒接受體之PK-15細胞株，可有效提高PCV2之病毒力價[24]。本研究顯示PK-15細胞株經過篩選後所得之子代細胞，的確可以有效提高PCV2感染效率與增殖力價。

本所曾於90至91年間利用IFA及IPMA針對全國

北、中、南各地區養豬場進行血清學檢測，並將不同年齡層豬隻之檢測結果進行分析及評估。PCV2 抗體陽性率及力價以 9 週齡豬隻最低，而種豬、肥育後期豬隻及上市肉豬均具有高抗體陽性率及力價[22]。惟受限於該病毒增殖困難，抗原盤製作不易，未能持續進行後續相關試驗研究，因此無法為養豬業界提供良好之檢診服務。而商品化之 ELISA 檢測套組雖已上市多年，但售價卻一直高居不下，使用上造成極為嚴重之成本壓力。因此若能有效提升 PCV2 病毒增殖力價，將可有效解決上述難題。本次研究即是以提升 PCV2 病毒增殖力價為主要目標，並將增殖之 PCV2 病毒作為抗原，進而發展出豬隻血清 PCV2 抗體診斷用 iELISA。本次試驗結果顯示所開發之 iELISA 具有操作容易、成本低廉、專一性高以及節省時間等多重優點，有助於各項後續實驗之進行。

為了瞭解本研究開發之 iELISA 之特異性，因此選取各種不同之豬隻病毒陽性血清進行檢測，其中包括 PCV2、PRRSV、PRV 以及 CSFV 等病毒之陽性血清。由表 2 結果可發現 iELISA 對於 PCV2 陽性血清具有極

高之專一性，對於 PRRSV、PRV 以及 CSFV 等陽性血清並無交叉反應。另一方面由逢機取樣方式選取 385 頭豬隻血清，並與商品化之 sELISA 同時進行檢測，比較二者之間檢測結果可發現其相關敏感性 (relative sensitivity) 和相關特異性 (relative specificity) 分別為 97.8% 以及 90.7%，顯示二者之間的相關特異性和敏感性非常高；而實驗結果之一致性與 kappa statistic 分別為 95.8% 和 0.86，亦顯示二者之間具有相當高之一致性，也證明該 iELISA 具有良好之豬隻血清 PCV2 抗體檢測效果。

PCV2 為豬隻重要的新浮現病毒性疾病，對全球養豬產業造成極大的衝擊，如何有效預防與監控 PCV2 感染是當前最重要的課題之一。本研究成功建立起較有效增殖 PCV2 病毒的方法，不但擺脫過去病毒增殖不易之困擾，且讓後續之試驗研究得以持續進行。有助於第一時間內採取防疫重要措施，找尋適當之防治方法，有效使用 PCV2 疫苗，遏止疫病蔓延以及降低養豬業者的經濟損失，達到疫病防治之終極目標。

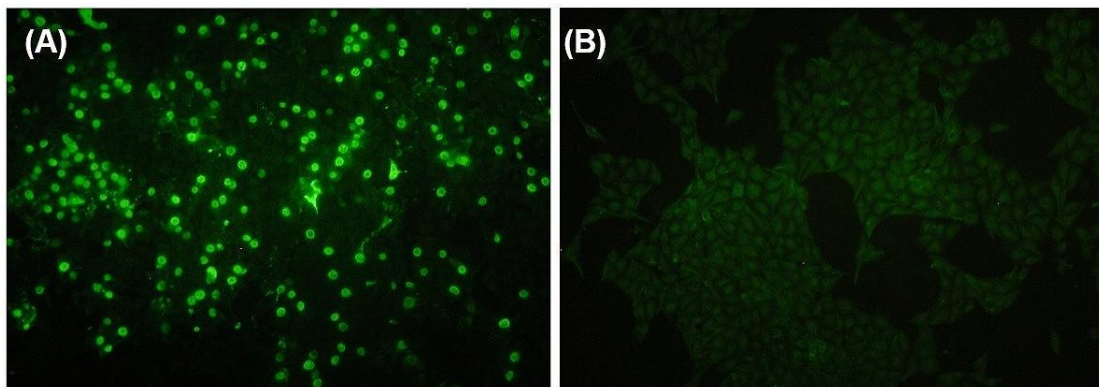


圖 1、(A)以 PCV2 感染新篩選 PK-15 子代細胞，經 72 小時之後將 PK-15 細胞固定，並以 PCV2 陽性抗血清 (anti-PCV2 polyclonal antibody; VMRD Inc) 進行 IFA 檢測，可觀察到 PK-15 子代細胞之細胞核呈現特異性之螢光反應。(B)未感染 PCV2 之 PK-15 細胞陰性對照。

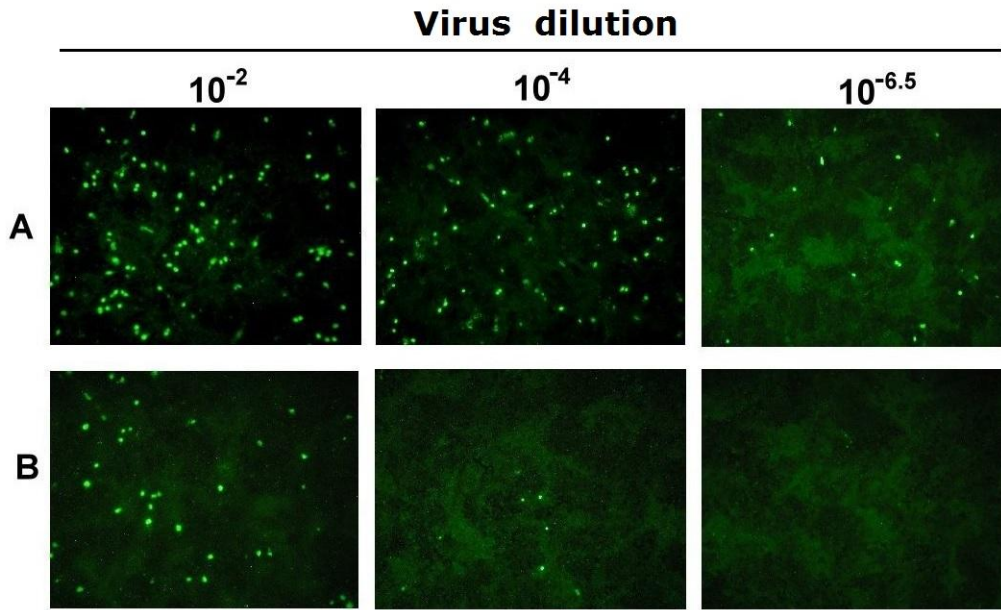


圖 2、新篩選 PK-15 細胞 (A) 與原先未經篩選之 PK-15 細胞 (B)，同時感染不同濃度之 PCV2 病毒，經 72 小時後將細胞固定，並以對 PCV2 陽性抗血清 (anti-PCV2 polyclonal antibody ; VMRD Inc) 進行 IFA 檢測，計算後可知新篩選 PK-15 子代細胞接種 PCV2 後所增殖之病毒力價為  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml (A)，而原先未經篩選之 PK-15 細胞接種 PCV2 後所增殖之病毒力價為  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml (B)。

表 1、iELISA 操作條件最適化。

Serum dilution *	Concentration of antigen ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
	16	8	4
1:20 (+)	1.323	1.121	1.236
1:20 (-)	0.551	0.448	0.341
1:50 (+)	1.288	1.219	1.027
1:50 (-)	0.431	0.426	0.382
1:100 (+)	1.195	1.164	1.038
1:100 (-)	0.297	0.214	0.184
1:150 (+)	1.149	<b>1.124**</b>	0.875
1:150 (-)	0.179	<b>0.119**</b>	0.099
1:200 (+)	0.967	0.735	0.689
1:200 (-)	0.168	0.103	0.086

\*+ 為陽性血清，- 為陰性血清

\*\* 陽性與陰性血清於 150 倍稀釋時，OD 值比達 9.44 倍 (1.124/0.119)



表 2、iELISA cut-off 值、與特異性及重複性之分析。

Repeatability	Intra-assay				Inter-assay			
	Mean	SD	Mean+3SD	CV	Mean	SD	Mean+3SD	CV
PCV2	1.119	0.031	1.212	0.02	1.127	0.023	1.196	0.02
PRRSV	0.197	0.017	0.242	0.08	0.168	0.031	0.261	0.18
PRV	0.195	0.027	0.276	0.14	0.203	0.014	0.272	0.06
CSFV	0.193	0.026	0.271	0.13	0.182	0.031	0.275	0.17
Negative	0.198	0.023	0.267	0.13	0.191	0.028	0.275	0.14

表 3、iELISA 檢測法相關性之分析。

iELISA	sELISA		Total
	No. positive	No. negative	
No. positive	271	10	281
No. negative	6	98	104
Total	277	108	385

Relative sensitivity and specificity were 97.8% ( $271/277 \times 100\%$ ) and 90.7% ( $98/108 \times 100\%$ ), respectively. Percentage of observed agreement was 95.8% ( $(271 + 98)/385 \times 100\%$ ). Kappa statistics was 0.86.

## 參考文獻

- An DJ, Roh IS, Song DS, Park CK, Park BK. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Res* 129: 115-122, 2007.
- Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* 169: 326-336, 2005.
- Cheung AK. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology* 305: 168-180, 2003.
- Dupont K, Nielsen EO, Baekbo P, Larsen LE. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS casecontrol study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 128: 56-64, 2008.
- Gagnon CA, Tremblay D, Tijssen P, Venne MH, Houde A, Elahi SM. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J* 48: 811-819, 2007.
- Gillespie J, Opriessnig T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell V. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J Vet Internal Med* 23: 1151-1163, 2009.
- Grau-Roma L, Crisci E, Sibila M, López-Soria S, Nofrarias M, Cortey M, Fraile L, Olvera A, Segalés J. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet Microbiol* 128: 23-35, 2008.
- Hansen MS, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, Nielsen OL. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J Comp Pathol* 143: 120-131, 2010.
- Horlen KP, Schneider P, Anderson J. A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated disease: Clinical features and association with the PCV2b genotype. *J Swine Health Prod* 15: 270-278, 2007.
- Mahé D, Blanchard P, Truong C, Arnauld C, Le Cann P, Cariolet R, Madec F, Albina E, Jestin A. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of

- immunorelevant epitopes. *J Gen Virol* 81: 1815-1824, 2000.
11. Magar R, Muller P, Larochelle R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can J Vet Res* 64: 184-186, 2000.
  12. Misinzo, G, Meerts P, Bublot M, Mast J, Weingartl HM, Nauwynck HJ. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J Gen Virol* 86: 2057-2068, 2005.
  13. Nawagitgul P, Harms PA, Morozov I, Thacker BJ, Sorden SD, Lekcharoensuk C, Paul PS. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol* 91: 33-40, 2002.
  14. Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circovirus type 2 associated diseases: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19: 591-615, 2007.
  15. Rodriguez-Arrijo GM, Segales J, Balasch M, Rosell C, Quintant J, Folch JM, Plana-Duran J, Mankertz A, Domingo M. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. *Vet Rec* 146: 762-764, 2000.
  16. Rodriguez-Arrijo GM, Segales J, Calsamiglia M, Resendes, AR, Balasch M, Plana-Duran J, Casal J, Domingo M. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 63: 354-357, 2002.
  17. Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Ani Health Res Rev* 6: 119-142, 2005.
  18. Shang SB, Li YF, Guo JQ, Wang ZT, Chen QX, Shen HG, Zhou JY. Development and validation of a recombinant capsid protein-based ELISA for detection of antibody to porcine circovirus type 2. *Res Vet Sci* 84: 150-157, 2008.
  19. Tischer I, Bode L, Peters D, Pociuli S, Germann B. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch Virol* 140: 737-743, 1995.
  20. Tischer I, Miels W, Wolff D, Vagt M, Griem W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 91: 271-276, 1986.
  21. Walker IW, Konoby CA, Jewhurst VA, McNair I, McNeilly F, Meehan BM, Cottrell TS, Ellis JA, Allan GM. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 12: 400-405, 2000.
  22. Wang C, Huang TS, Huang CC, Tu C, Jong MH, Lin SY, Lai SS. Characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan. *J Vet Med Sci* 66: 469-475, 2004.
  23. Wang C, Pang VF, Lee F, Liao PC, Huang YL, Lin YL, Lai SS, Jeng CR. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection and differentiation of two genotypes of porcine circovirus type 2. *J Microbiol Immunol Infect*: 123-131, 2013.
  24. Zhu Y, Lau A, Lau J, Jia Q, Karuppappan AK, Kwang J. Enhanced replication of porcine circovirus type 2 (PCV2) in a homogeneous subpopulation of PK15 cell line. *Virology* 369: 423-430, 2007.



## Establishment and Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Porcine Circovirus Type 2

C Wang<sup>1,2\*</sup>, VF Pang<sup>2</sup>, F Lee<sup>1</sup>, YL Lin<sup>1</sup>, SS Lai<sup>2</sup>, CR Jeng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

<sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, National Taiwan University

**Abstract** Post-weaning multi-systemic wasting syndrome (PMWS) has emerged as a major disease that poses a significant threat to the economics of the global swine industry. Porcine circovirus type 2 (PCV2) is the causative agent of PMWS in pigs. PK-15 cell culture, which is widely used for PCV2 propagation, is not efficient and heterogeneous in terms of permissivity to viral infection. To acquire a homogeneous porcine kidney cell line that can reliably produce PCV2, PK-15 parent cells were re-cloned by limiting dilutions for PCV2 propagation. Maximum virus titers in newly generated PK-15 and PK-15 parent cells were  $10^{6.5}$  and  $10^4$  tissue culture infective dose 50 (TCID<sub>50</sub>)/ml, respectively. In addition, a PCV2 indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA) based on PK-15 -generated PCV2 was developed for the detection of antibodies to PCV2. This method was highly specific for PCV2. No cross-reaction to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), pseudorabies virus (PRV) and classical swine fever virus (CSFV) was observed. A total of 385 porcine sera were tested using both iELISA and a commercial sandwich ELISA (sELISA). The sensitivity and specificity of ELISA relative to those of sELISA were 97.8% and 90.7%, respectively. The percentage of observed agreement was 95.8%, and the kappa statistic was 0.86. These results indicated that iELISA was a specific and sensitive diagnostic method for the detection of PCV2 antibodies in clinical porcine sera.

**Keywords:** *porcine circovirus type 2, specificity, sensitivity.*

