

## 以反轉錄聚合酶鏈反應鑑定臺灣豬生殖與呼吸綜合症分離病毒株之型別

黃天祥 鍾明華 杜文珍 林士鈺

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

### 摘要

利用已發表之豬生殖與呼吸綜合症歐、美洲毒株通用性引子 orf 1b1, orf 1b2 和美洲毒株特異性引子 orf 7(1), orf 7(2) 並以 ATCC VR-2332 馴化疫苗活毒和 H2 英國毒分別作為美、歐代表毒株, 利用反轉錄聚合酶鏈反應進行檢測本省分離毒株結果, 臺灣自 1992 年底首次發生至今由各地分離之 50 株豬生殖與呼吸綜合症病毒均屬美洲型毒株。

**關鍵字：**豬生殖與呼吸綜合症(*porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS*)

*血清型 (serotype)*

*反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR)*

### 緒言

豬生殖與呼吸綜合症(*porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS*), 依據文獻記載最早起源於 1987 年首先發生於美國加州北部地區, 然後迅速傳遍至整個北美地區, 造成美國和加拿大的嚴重流行(18,20)。但也有人利用血清庫(*serum bank*)內的血清實施抗體調查測定結果認為在美國愛渥華州於 1980 年至 1985 年間即有本病的發生(16)。爾後在 1990 年秋天歐洲的德國、荷蘭、西班牙、俄國及英國均有發生, 截至目前為止, 諸多養豬國家包括美國、加拿大、德國、荷蘭、比利時、英國、西班牙、俄國、法國、丹麥、日本(6,8,12,14,18, 19,20,24)和臺灣(1,2,3,4,5)等都有本病疫情的發生。本病已成世界性養豬國家一種重要豬隻傳染性疾病。

PRRS 係由 PRRS 病毒所引起豬隻的一種傳染性疾病(8,22)。主要經由口、鼻呼吸道和消化道而發生感染, 潛伏期為四天左右, 感染母豬發生流死產、早產和新生仔豬死亡率率的提高、而哺乳小豬可見呼吸性疾病和離乳前死亡率率的增加、在肥育豬則僅呈類似感冒症狀等為主徵(8,10,18,19,20,23,24)。

本病毒最先是在 1991 年時由荷蘭的 Lelystad 獸醫研究所研究人員分離和同定出來, 因此稱之為 Lelystad 病毒株, 係歐洲方面代

表毒株(24)。後來美國也分離出 ATCC VR-2332 毒株, 兩者間有些差異性, 即呈異質性(*heterogenous*)(11,25)。本病毒係屬具有封套之 RNA 病毒, 核酸長度約為 15Kb。病毒呈圓型, 平均大小為 62nm(通常界於 48 至 83nm 間)。病毒密度為 1.18-1.19g/ml。病毒感染力價在 pH 值 5 以下和 9 以上會降低 90%以上(9,13,21,26)。

診斷上, 一般都利用健康小豬之肺臟巨噬細胞、或 MA-104 來源之 CL-2621、Marc-145 等株化細胞來作病毒分離, 並以特異抗血清實施間接免疫酵素或螢光抗體染色試驗予以確診(7,24)。此外, 反轉錄聚合酶鏈反應(*reverse transcription and PCR amplification; RT-PCR*) 是近代新興的一種診斷技術, 可用以檢測感染豬血液和臟器內的病毒核酸, 尤其當流死產小豬死亡稍久或因送檢病材不當例如腐敗而不適作病毒分離時本技術尤其有用。聚合酶鏈反應同時亦可用以區別歐、美毒株(15,17)。

臺灣自 1992 年底分離出 PRRS 病毒後至今尚未有人証實分離毒株係屬歐洲型或美洲型。本試驗目的即在利用已發表可區別歐、美毒株之引子來鑑定分離毒株屬何型, 以供防疫參考。

### 材料及方法

#### 材料：

\* 抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

病毒：臺灣分離之 PRRS 病毒株，包括 1992 年 2 株，1994 年 2 株，1996 年 35 株，1997 年 5 株，1998 年 5 株，2000 年 1 株，共計 50 株。均經豬肺臟巨噬細胞分離後再以 Marc-145 株化細胞增殖一代。

疫苗毒株，係 Boehringer Ingelheim Animal Health 公司產品，為美洲型代表毒株 ATCC VR-2332 馴化活毒疫苗。

H2 英國毒株，系由英國分讓而得。供歐洲型代表毒株用。

#### 引子：〔17〕

ORF 1b1 5' CCGTCACCAGTGTGTCCAA 3'  
(8751 至 8771)

ORF 1b2 5' CCGTTCTGAAACCCAGCAT 3'  
(9003 至 8984)

ORF 1b 配對引子係依歐洲型代表毒株 Lelystad 病毒株核酸序列設計出來，可用以檢測美、歐兩種病毒株。

ORF 7-1 5' TCGTGTTGGGTGGCAGAAAAGC 3'  
(2763 至 2785)

ORF 7-2 5' GCCATTCACCACACATTCTTCC 3'  
(3247 至 3225)

ORF7 配對引子係依美洲型病毒株 PRRSV VR-2332 核酸序列設計出來，只能用以檢測美洲型 PRRS 病毒株。

#### 方法：

##### RT-PCR：

核酸的萃取：將上述病毒細胞增殖液，分別取出 0.1ml 並置 1.5ml 微量試管中，再加入泰柔 RNA 萃取試劑 (trizol RNA isolation reagent) 1ml，經震盪 30 秒後靜置於室溫中 5 分鐘，再加入 0.2ml 之氯仿，充份混合後於室溫中靜置 3 分鐘，再以 12,000rpm、4°C 離心 15 分鐘，隨即取其上清液裝在另一滅菌之微量試管中，並加入等量的異丙醇，充份混合後再靜置於室溫中 10 分鐘，然後以上述條件離心 20 分鐘，去除上清液後再加入 0.1ml 絕對酒精，以同條件離心 5 分

鐘，再去除上清液後真空離心乾燥。最後，再加入 60μl 經 DEPC 處理過之二次蒸餾水即完成核酸的萃取。

合成第一股 cDNA 及 RT-PCR：抽取試材及對照之核酸萃取液各 10μl，分別置入兩支 0.5ml 的微量試管中，並分別加入 5μl 之 10 倍 Prozyme 緩衝液(含 500mM KCl, 100mM Tris-HCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100)、24.1μl DEPC 處理過之二次蒸餾水、8μl 鹼基(dATP, dCTP, dGTP 及 dTTP 各為 1.25mM)、各 1μl 的配對引子 ORF 1b1、ORF 1b2(濃度各為 39μM)或配對引子 ORF 7-1、ORF 7-2(濃度各為 32 和 33μM)、0.2μl RNasin(40U/μl)、0.2μl AMV 反轉錄 (10U/μl) 和 0.5μl Prozyme 聚合酶(2.0U/μl)。每管反應溶液之總體積為 50μl，混合均勻後，上面覆蓋適量之礦物油。整個反應是在熱循器(Touch Down 機)中進行。反應之條件為：42°C 進行 20 分鐘之反轉錄作用，隨即進行 PCR 反應。95°C 變性 (denaturing)60 秒，58°C 煉合(annealing)30 秒，74°C 延展(extension)60 秒，進行 40 個循環。洋菜膠片電泳分析：分別取 10μl PCR 產物，和 DNA 100bp Ladder(100-1,000bp)市售分子量標記溶液與 1μl 的膠片載入緩衝液(10X gel loading buffer)混合後，各別載入 2%洋菜膠片行電泳分析。此一膠片是以 TAE 緩衝液泡製而成，其中包含溴化醯液(ethidium bromide)每 ml 含 0.5μg，經 100 伏特電壓電泳 20 分鐘後，在紫外光燈下判定。

#### 結果

將臺灣分離之 PRRS 病毒株，50 株。經豬肺臟巨噬細胞分離後再以 Marc-145 株化細胞增殖一代。並以 ATCC-VR2332 馴化活毒疫苗和 H2 英國毒株分別作為美洲型和歐洲型代表毒株，利用歐美洲毒株通用性引子 orf 1b1, orf 1b2 和美洲毒株特異性引子 orf 7(1), orf 7(2)實施反轉錄聚合酶鏈反應檢測臺灣分離之 50 株 PRRS 病毒株結果，臺灣分離毒株與 ATCC-VR2332 馴化活毒疫苗一樣均能與歐、美洲毒株通用性引子作用產生 253bp 產物，亦能與美洲毒株特異性引子作用產生 485bp 產物，而 H2 英國毒株則僅能與歐美洲毒株通用性引子作用產生 253bp 產物。顯示臺灣分離之 50 株 PRRS 病毒株均屬美洲型毒株。

## 討論

豬生殖與呼吸綜合症，傳統診斷上由於病毒本身不穩定，感染小豬往往於死後數小時內病毒即遭不活化，因而無法分離出病毒。此外，利用 MA-104 來源株化細胞作病毒分離結果，常因中和抗體的干擾而無法分離出血液或臟器內的病毒；若以小豬肺臟巨噬細胞來作病毒分離，雖不受中和抗體的影響，但需考慮肺臟巨噬細胞的來源。因為，即使來自同一無 PRRS 抗體豬場的小豬其肺臟巨噬細胞對 PRRS 病毒的感受性也會有所不同。因此，診斷上最好能與 RT-PCR 技術相互配合。RT-PCR 主要在偵測病毒核酸，即使病毒業遭不活化亦可檢測得出來，同時亦可免除病材對細胞毒性的困擾問題。RT-PCR 除可供診

斷外，亦可用以區別毒株型別〔17〕。這也是本試驗應用傳統與新興技術來確認臺灣分離毒株屬何型別之因。

臺灣自 1992 年底首次分離出 PRRS 病毒後，豬場污染率曾高達 75% 以上〔4,5〕。筆者曾多次利用歐、美病毒株抗原盤以間接螢光抗體血清學方法檢測各縣市送檢豬隻血清證實本省豬生殖與呼吸綜合症均屬美洲型毒株。對美洲型病毒株之間接螢光抗體力價往往超過歐洲型病毒株的四倍以上。而此次利用已發表可區別歐、美毒株之引子檢測本省 50 株病毒株更能證實本省之 PRRS 純屬美洲型毒株無誤。往後仍應注意避免歐洲型毒株的侵入，並持續利用這兩對或其它引子實施監測，甚至建立本土 PRRS 病毒基因圖譜，以供防疫上的參考。

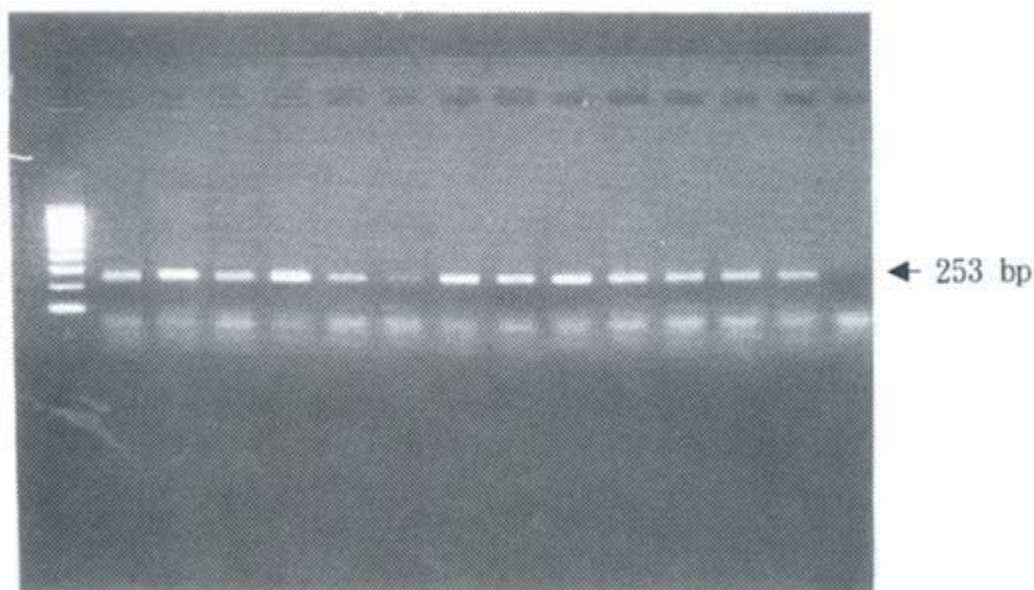


圖 1、顯示本省分離之豬生殖與呼吸綜合症毒株與美洲型 ATCC-VR2332 馴化活毒疫苗及英國毒株 H2 同。經與歐美毒株通用性引子 Orf 1b1, Orf 1b2 作用後均可產生 253 bp 產物。圖中左邊算起第一道為標準 DNA，100 bp ladder (100 – 1,000 bp) 第二道為 ATCC-VR2332 疫苗毒，第三道為英國 H2 毒株，第四至十四道為本省分離毒株，而最右邊一道為豬瘟病毒對照。

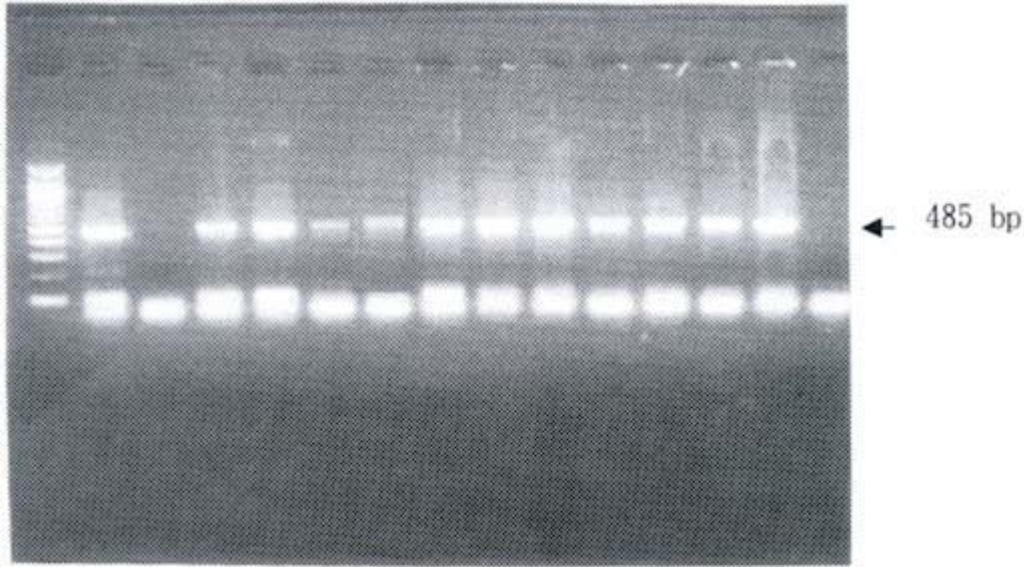


圖 2、顯示本省分離之豬生殖與呼吸綜合症毒株與美洲型 ATCC-VR2332 馴化活毒疫苗同。經與美洲型毒株特異特異性引子 Orf 7(1), Orf 7(2)作用後均可產生 485 bp 產物。而英國毒株 H2 則無產物行成。圖中左邊算起第一道為標準 DNA, 100 bp ladder(100 - 1,000 bp)第二道為 ATCC-VR2332 疫苗毒, 第三道為英國 H2 毒株, 第四至十四道為本省分離毒株, 而最右邊一道為豬瘟病毒對照。

### 參考文獻

1. 豬繁殖呼吸症候群 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) 報告書。臺灣省家畜衛生試驗所。未發表, 1993。
2. 張志成、鍾文彬、林敏雯、翁仲男、楊平政、邱雲棕、張文發、朱瑞民。臺灣地區豬繁殖與呼吸道症候群 I。病毒分離。中華民國獸醫學會雜誌。Vol. 19, 268-276, 1993。
3. 張志成、鍾文彬、林敏雯、楊平政、翁仲男、張文發、邱雲棕、劉振軒、朱瑞民。臺灣地區豬繁殖與呼吸道症候群 II。以無特定病原豬人工接種豬繁殖與呼吸道症候群病毒。中華民國獸醫學會雜誌。Vol. 19, 277-284, 1993。
4. 黃天祥、陳聖怡、陳金蘭、黎南榮、楊揚輝、劉培柏。臺灣地區豬生殖及呼吸症候群疫情調查。臺灣省政府農林廳八十五年度畜產試驗評議會一八十四年度試驗研究報告書。臺灣省家畜衛生試驗所八十四年八月編印。397-404, 1995。
5. 黃天祥、陳聖怡、陳金蘭、杜文珍、黎南榮、劉培柏。本省豬生殖與呼吸綜合症疫情調查及其疫苗的開發。臺灣省畜衛研報 No.32: 9-16, 1996。
6. Ahl R, Pensaert M, Robertson IB, Terpstra C, Sande W van der, Walker KJ, Meredith ME and White M. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS or blue-eared pig disease). *Vet. Rec.* 130:87-89. 1992.
7. Albina E, Leforban Y, Baron T, Duran J Plana, Vannier P. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus. *Ann. Rech. Vet.* 23: 167-176. 1992.
8. American Association Of Swine Practitioners Newsletter. Vol. 4, No. 4. July-August. 1992.
9. Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robinson D, Christianson WT, Morrison RB, Gocyca D. and Chladek D. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate

- ATCC VR-2332). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:127-133. 1992.
10. Busse von FW, Janthur Alt Irmgard, Neuman W, Schoss P. Epidemiologische untersuchungen im zusammenhang mit dem auftreten des seuchenhaften spataborts der sauen im weserEms-Gebiet(NordwestDeutschland). *Tierarztl Umschau* 46:708-714. 1991.
  11. Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB, Joo HS, Goreyca D, Chladek D. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus(Isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:117-126. 1992.
  12. Commission of the European Communities, Directorate General for Agriculture. Porcine respiratory and reproductive failure syndrome. Proc Seminar on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in Brussels, VI/B/II.2, 1991.
  13. Conzelmann KK, Visser N, Woensel P Van and Thiel HJ. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology* 193:329-339.1993.
  14. Dea S, Bilodeau R, Athanaseous R, Sauvageau R, Martineau G. PRRS syndrome in Quebec: isolation of a virus serologically related to Lelystad virus. *Vet. Rec.* 130:167. 1992.
  15. Helmi Mardsaai, Louise Wilson, Samir Mounir and Serge Dea. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differenciation between canadian and european strains by reverse transcription and PCR amplification. *J. Clin. Microbiology.* 32:2197-2203. 1994.
  16. Hill H, Owen W, Eernisse K, Zimmermann J, Uhlenhopp E, Frey M. Prevalence of SIRS in Iowa swine herds. *AASP.*4:4,47. 1992
  17. Jane Christopher-Hennings, Eric A Nelson, Julie K Nelson, Rebecca J Hines. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semem by PCR. *J. Clin. Microbiology.* 33:7,p. 1730-1734. 1995.
  18. Keffaber KK. Reproductive failure of unknown etiology. *AASP Newsletter* 2:1-10. 1989.
  19. Lindhaus W, Lindhaus B. Ratselhafte Schweinekrankheit. *Der praktische Tierarzt* 5:423-425. 1991.
  20. Loula T. Mystery pig disease. an update for the practitioner. *Agri-Practice* 12:23-34. 1991.
  21. Meulenberg JJM, Hulst MM, De Meijer EJ, Moonen PLJM, Den Besten A, De Kluyver EP, Wensvoort G and Moormann RJM. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome(PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192:62-72.1993.
  22. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL. Virus taxonomy, sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch Virol.* 10:412-415. 1995.
  23. Ohlinger VF, Weiland F., Haas B, Visser N, Ahl R, Mettenleiter TC, Weiland L, Rziba HJ, Saalmuller A, Straub OC. Der "Seuchenhafte spatabort beim schwein" - Ein beitrag zur atiologie des" porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)". *Tierarztl Umschau.* 46:703-708. 1991.
  24. Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, Ter Laak EA. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet. Quart* 13: 121-130. 1991.
  25. Wensvoort G, Kluyver EP De, Luijze EA, Den Besten A, Harris L, Collins JE, Christianson WT and Chladek D. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:134-138. 1992.
  26. Wensvoort G, Kluyver EP De, Pol JMA, Wagenaar F, Moormann RJM. Hult MM, Bloemraad R, Den Besten A, Zetstra T and Terpstra C. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome : a review of mystery swine disease research at Lelystad. *Vet. Microbiol.* 33:185-193.1992.

## **Differentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses Isolated in Taiwan by RT-PCR**

Huang, T. S., M. H. Jong, W. J. Tu and S. Y. Lin

National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan

### **SUMMARY**

Fifty porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSV), isolated in 1992 to 2000 in Taiwan, were tested by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) with two sets of primers, orf 1b and orf 7, to differentiate the genotypes. The orf 1b primers were universal to all genotypes of PRRSV, the orf 7 primers were only specific to the North America virus strains. Our results showed that all of virus isolates from Taiwan were amplified with both primer sets, suggesting that the viruses in Taiwan are closely related to North America type in genotypes.

***Keywords: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Reverse transcription and polymerase chain reaction***