

台灣母山羊流產症之病因探討與疫學研究

廖永剛* 洪彩蓮 黎南榮 許天來

台灣省家畜衛生試驗所

摘要 本研究應用聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction ; PCR) 技術，進行山羊披衣菌診斷，結果顯示 PCR 中的引子，以 55 C 的鍊合 (annealing) 溫度最適合。而 PCR 的敏感性，相對於以雞胚接種的力價測定，PCR 可測得 0.001 LD₅₀ 的披衣菌。將 PCR 應用於田間流產胎兒臟器及母羊陰道拭子檢測，經檢驗 256 件樣品，証實 PCR 對雞胚分離的相對敏感性可達 95 %，特異性 86 % 和一致性達 88.6 %。故應用 PCR 技術，不但可縮短診斷時間，減少樣品雜菌干擾問題，並由於 PCR 的敏感性與特異性，本研究研發披衣菌引起母山羊流產症的 PCR 技術應可取代雞胚分離方法，而為臨床診斷之用。

關鍵詞：山羊，流產，聚合酶鏈反應，披衣菌

緒 言

近年來，由於國人飲用鮮乳的習慣日益普遍，因此羊隻飼養數目與日俱增。母羊生產懷孕是母羊泌乳必經的過程，但因近來母羊病例時有流產症之發生，造成酪農的極大損失。我們由各縣市送檢之流產病材中檢驗出披衣菌^[7]，及流產母羊陰道拭子也檢出披衣菌，推測披衣菌可經由動物間接觸而在本省各地陸蔓延而造成損失。

前人對披衣菌感染症的診斷多採病原分離方法或血清抗體檢查法^[2, 3, 6, 8, 9, 11]，病原診斷耗時較長且敏感性較低，因此開發出披衣菌抗原之免疫酵素吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) 供快速診斷^[10, 12]。近年來更由於分子生物學的快速發展，以萃取披衣菌的去氧核糖核酸 (DNA)，及配合聚合酶鏈反應技術 (polymerase chain reaction : PCR) 進行披衣菌的診斷，已有許多研究^[4, 13]。因此要防治披衣菌的感染及其造成的損失，早期診斷出披衣菌流產症，或加強進口種羊的檢疫，檢出帶原的種羊，進行

隔離治療，以建立牧場披衣菌清淨的飼養模式。故開發披衣菌快速診斷技術，提升診斷技術的敏感性與特異性。本研究開發聚合酶鏈反應法，以便應用於披衣菌感染的診斷。

材料與方法

流產病材：

由全省各地防治所或農戶將流產羊胎，以無菌收集之操作胎兒臟器分別以細胞培養液 (Eagle's MEM, GIBCO) 含 Gentamycin 0.1 mg / ml 及 2 % 胎牛血清製成 10 倍乳劑後冷凍保存供病原分離。採集流產母羊陰道拭子置於輸送液^[11]中進行病原檢測。

雞胚胎分離披衣菌：

向台灣省家畜衛生試驗所動物藥品檢定分所購買 6 日齡無特定病原雞胚胎 (SPF 雞胚胎)，供披衣菌分離用。披衣菌的分離是以卵黃囊內接種，經接種後雞胚以 37 °C 恒溫箱培養，

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

並於接種後每天進行兩次檢查雞胚是否死亡。若死亡的雞胚則抽取其卵黃囊液進行病原鑑定，並配合電子顯微鏡的負染色技術進行披衣菌型態鑑定。

披衣菌核酸引子設計：

參考前人發表的披衣菌外套蛋白膜基因序列^[5]進行引子序列位置選取。所用的基因序列係以動物源的披衣菌 (*Chlamydia psittaci*) 序列較一致性的區域，配合 GCG 序列分析軟體 (Wisconsin Package version 8.1; Genetic Computer Group, Inc.) 中的 PRIME 功能設計出下列引子：

正向引子 (Sense primer) CHAG-1

5'-TACGG AGATT ATGTT TTC (T) GA-3'

反向引子 (Antisense primer) CHAG-2

5'-TTAGA TTGAG CGTAG TGGAA-3'

依所設計之引子進行 PCR 後將有 459 bp 的產物。

PCR 方法：

將冷凍保存供病原分離的臟器乳劑或採集母羊陰道拭子的輸送液取 0.3 ml，以市售的 DNA 快速萃取試劑 (DNA Extraction Kit; AcuGen Co.) 依操作程序，並經氯仿將樣品的 DNA 萃取出，再經 95% 無水酒精及 75% 酒精沈澱乾燥後，供聚合酶鏈反應。聚合酶鏈反應的試劑為每一反應取 5 μ l 10 倍反應緩衝液 (含鎂離子濃度為 1.5 mM)，去氧核糖三磷酸基質 (dNTP 10 mM) 2 μ l，合成的 2 股引子 (10 μ M) 各 2 μ l 及 Tag DNA Polymerase (5 unit/ μ l, Promega Co.) 0.5 μ l，之後取經 2 次滅菌處理的去離子蒸餾水 29.5 μ l，配製成反應液，再取 10 μ l 的樣品 DNA 混合供反應。於分裝完畢後滴入滅菌過的礦物油 50 μ l，再分別置入程式控溫器 (MJ Research PTC-200, U. S. A) 中反應。

反應的溫度及程序，是將上述配好的反應試管先以 95 $^{\circ}$ C 預熱 60 秒再經急速置於冰浴中，冷凍後再以反應溫度及時間在 95 $^{\circ}$ C 40 秒，55 $^{\circ}$ C 40 秒及 72 $^{\circ}$ C 60 秒連續反應 35 次循環反應後，再以 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 分鐘，然後結束反應。聚合酶鏈反應的判定是取經反應過的試管內反

應 10 μ l 和 2 μ l 之 6 倍濃縮之色素溶液 (Loading Dye)，然後置入以 1 倍 Tris-acetate-EDTA (TAE) 緩衝液所配製之 2% 洋菜膠之電泳水中，電泳時是以 1 倍之 TAE 緩衝液以 100 volt 的電源在小型電泳槽中反應 (Mini-Gel electrophoresis system, Japan)，於反應終了以 ethidium bromide 染色 10 分鐘後水洗，再於紫外線光源裝置上顯現。若為陽性反應者可分別於分子量標示為 400~500 bp 間的中間有明顯的產物呈現，並以拍立得相機拍照記錄其結果。

結 果

披衣菌 PCR：

經反覆測試所設計的引子結果以 55 $^{\circ}$ C 的煉合溫度 (annealing temperature) 最適合，同時反應的循環數及反應時間也都經測試後能偵測出披衣菌的 DNA，顯示以 PCR 應可為披衣菌的診斷。並經測試聚合酶鏈反應對披衣菌偵測的敏感性可達 0.001 LD₅₀。

表 1. 雞胚分離與聚合酶鏈反應檢測樣品結果

PCR	雞 胚 分 離		合 計
	陽 性	陰 性	
陽 性	65	26	91
陰 性	3	162	165
合 計	68	188	256

樣品為臨床病例之流產胎兒臟器或是母羊陰道拭子

PCR 之檢定：

本所現行披衣菌的診斷，是以雞胚胎接種分離或細胞培養方法進行，本試驗是同時以胚胎分離和聚合酶鏈反應進行比對。結果收集 256 個樣品 (臨床病例之流產胎兒臟器或是母羊陰道拭子) 分別測試結果如表 1，顯示在 256 件樣品檢驗後有 227 件的結果是一致 (皆為陽性者 65 件，皆為陰性者 162 件)，另有

29 件是結果不一致的，其中 PCR 陽性而分離是陰性的 26 件。以統計學方法評估聚合酶鏈反應法的敏感性，特異性與一致性分別得如下的結果：敏感性 95 % (65 / (65 + 3))，特異性 86 % (162 / (162 + 26))，一致性 88.6 % ((65 + 162) / 256)。由檢定結果顯示，PCR 的敏感性可達 90 % 以上，特異性和一致性皆達 85 % 以上，故 PCR 是可為山羊披衣菌流產病的診斷技術。

討 論

鑑於診斷技術的開發是著重於敏感性和特異性的檢定，由本試驗結果證明 PCR 技術可應用於臨床診斷，此和前人的研究結果一致 [5, 13]。而應用 PCR 技術除在診斷時間上的縮短，並由實驗樣品是萃取出披衣菌的 DNA，因此在診斷過程中可避免分離時的雜菌污染而提高診斷效率。

披衣菌不僅在母羊造成流產症，在牛、豬也會造成相同的疫情。而由本試驗所設計的引子是針對 *C. psittaci* 的特異基因位置，本 PCR 診斷技術應可用於對牛及豬的病例進行診斷。近年來，因為披衣菌在動物體的增殖雖然可以四環素藥物 (Tetracyclin) 抑制，但為進行抗藥性菌叢發生或進行披衣菌變異的監測，應用分子生物學的基因分析方法，將可對本省披衣菌的污染情形加以追蹤分析研究。

本研究開發的 PCR 技術明顯較胚胎分離技術敏感，同時在操作上也能節省時間，並於特異性上可由不同的引子設計而進行種株間的區別。由披衣菌的 PCR 診斷技術，可對流產母羊作早期診斷和立即進行隔離治療，避免帶病原母羊仍在族群中散佈病原。而對外購移入的種羊也可先以 PCR 的檢查，檢出帶原種羊，而可防範清淨族群遭受污染，這是應用 PCR 在敏感性提高和時間縮短的診斷中對披衣菌做最好的防治。

披衣菌是人畜共通的病原，而本省養羊戶在規模日漸擴大及從業人員日益增加的情形下，如何避免人畜共通的披衣菌造成公共衛生的問題，是須先將動物源的披衣菌傳染阻斷以避免人畜間的接觸感染^[1]，所以開發快速診斷的 PCR 檢測披衣菌是有實際的貢獻與價值。

參 考 文 獻

1. Buxton D. (1986) Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from Sheep. *Vet. Rec.*, 118 : 510 – 511.
2. Domeika M., Ganusauskas A., Bassiri M., Froman G., March P. A. (1994) Comparison of polymerase chain reaction, direct immunofluorescence, cell culture and enzyme immunoassay for the detection of *Chlamydia psittaci* in bull semen. *Vet. Microbiol.*, 42 : 273 – 280.
3. Griffiths P. C., Philips H. L., Dawson M. and Clarkson M. J. (1992) Antigenic and morphological differentiation of placental and intestinal isolates of *Chlamydia psittaci* of ovine origin. *Vet. Microbiol.*, 30 : 165 – 177.
4. Holland S. M., Gaydos C. A. and Quinn T. C. (1990) Detection and differentiation of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification. *J. Inf. Dis.*, 162 : 984 – 987.
5. Kaltenboeck B., Kousoulas K. G. and Storz J. (1993) Structures and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (ompA) genes of the four chlamydial species. *J. of Bact.*, 175 : 487 – 502.
6. Leonard C., Caldow G. L. and Gunn G. L. (1993) An estimate of the prevalence of enzootic abortion of ewes in Scotland. *Vet. Rec.*, 133 : 180 – 183.
7. Liao, Y. K., Chain, C. Y., Lu, Y. S., Li, N. J., Tsai, H. J. and Liou, P. P. (1997) Epizootic of *Chlamydia psittaci* infection in goats in Taiwan. *J. Basic Microbiol.*, 37 : 327 – 333.
8. Markey B. K., McNulty M. S. and Todd D. (1993) Comparison of serological tests for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection of sheep. *Vet. Microbiol.*, 36 : 233 – 252.
9. Seaman J. T., Cockram F. A. and Scrivener C. J. (1986) Isolation of *Chlamydia psittaci* from an aborted bovine fetus. *Aust. Vet. J.*, 63 : 233 – 234.

10. Souriau A. and Rodolakis A. (1986) Rapid detection of *Chlamydia psittaci* in vaginal swabs of aborted ewes and goats by enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). Vet. Microbiol., 11 : 251 – 259.
11. Spencer W. N. and Johnson F. W. A. (1983) Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material. Vet. Microbiol., 113 : 535 – 536.
12. Sting R. and Hafez H. M. (1992) Purification of *Chlamydia psittaci* antigen by affinity chromatography on polymyxin B agarose for use in the ELISA. Zbl. Bakt., 277 : 436 – 455.
13. Thiele D., Wittenbrink M. M., Fischer D. and Krauss H. (1992) Evaluation of the polymerase chain reaction for detection of *Chlamydia psittaci* in abortion material from ewes. Zbl. Bakt., 277 : 436 – 445.

Application of polymerase chain reaction in diagnosis of *Chlamydia psittaci*

Liao, Y. K*., T. L. Hong, N. J. Li and T. L. Hsu

Taiwan Animal Health Research Institute

SUMMARY A polymerase chain reaction (PCR) was applied to diagnosis the pathogen of *Chlamydia psittaci*. The annealing temperature of primer was adjusted to be 55 °C in PCR protocol. The sensitivity of PCR was detectable the chlamydial doses of 0.001 LD₅₀ which was reciprocal in chicken embryos. For the clinical trial, the relative sensitivity was 95 %, specificity was 86 % and the agreement was 88.6 % among 256 samples. According to the results, we performance suggested that the PCR was a validated assay for diagnosis of chlamydial infection.

Keywords: *Goat , Abortion , Polymerase chain reaction (PCR)*

*Corresponding author
Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.