



台灣豬第2型環狀病毒 抗體檢測試劑之開發

王羣 本所豬瘟研究組

前言

豬第2型環狀病毒 (Porcine Circovirus type 2; PCV2) 目前為已知之最小動物性病毒，其基因體為環型，而非一般病毒之線型基因體，故因此命名 (圖1)。許多國內外之相關報告指出，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 (Porcine Respiratory Disease Complex; PRDC)、增殖性及壞死性肺炎 (Proliferative and Necrotising Pneumonia; PNP) 及豬隻流死產均有關，在許多無明顯臨床症狀豬隻之組織亦可檢測到 PCV2 之存在。目前國際間將 PCV2 感染豬隻所引起之各種臨床症狀統稱為 Porcine Circovirus Associated Disease; PCVAD。PCV2 與其他病原混合感染豬隻之情況十分普遍，且往往可引發較為嚴重之臨床症狀。常見之病原包括豬小病毒 (Porcine Parvovirus; PPV)、豬生殖與呼吸綜合症病毒 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus; PRRSV)、豬流行性感冒病毒 (Swine Influenza Virus; SIV)、假性狂犬病病毒 (Pseudorabies Virus; PRV)、豬鐵士古病毒 (Porcine Teschovirus; PTV)，以及近來常被報導之豬纖鍊病毒 (Torque Teno Virus; TTV) 等。

豬第 2 型環狀病毒診斷方法

目前世界各國均以飼養管理之改善與自衛防疫之強化為主要目標，由於已有不活化 PCV2 疫苗可供使用，因此對於 PCV2 之防治工作方面較為容易。有關 PCV2 疫苗之使用，需有良好之血清學檢測與抗體力價評估，以訂定出適用之免疫適期，方可使疫苗施打發揮最大之效果。除疫苗使用之外，血清學檢測對於許多後續相關之研究均極為重要，包括致病機轉研究以及流行病學分析。現階段應用於豬隻血清 PCV2 抗體檢測所使用之方法，主要包括間接免疫螢光測定法（Indirect Immunofluorescence Assay；IFA，圖 2A）、免疫過氧化酶單層細胞測定法（Immunoperoxidase Monolayer Assay；IPMA，圖 2B）、酵素連接免疫吸附法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay；ELISA，圖 3）以及血清中和試驗（Serum Neutralization Test；SNT）。其中 IFA 以及 IPMA 二種檢測法主要是以 PCV2 感染細胞後，將其製作為抗原盤，然後將豬隻血清適當稀釋後置入抗原盤內，再以免疫螢光抗體或過氧化酶化學染色方式進行後續感作以及判讀。本所曾於 2004 年完成 IFA 以及 IPMA 二種檢測法之建立，該二種方法具有高特異性與敏感性等優點，在進行少量血清樣品檢測時極為便利且檢測結果相當精確。而 PCV2 病毒在增殖時，所應用之宿主細胞主要為豬腎臟細胞（PK-15 cells）。依據本所過往之實驗經驗以及國外相關研究報告均可發現，絕大多數之 PK-15 細胞對於 PCV2 病毒並不具有感受性，僅有少量 PK-15 細胞可用於 PCV2 病毒之感染與增殖，也因此所增殖之病毒力價也十分低落，無法應用於血清中和試驗之進行或發展不活化疫苗。也由於該病毒之增殖不易，使得建立 IFA 與 IPMA 檢測法所需之 PCV2 抗原盤製作不易，兼之操作者需長期訓練方能進行檢測結果之判讀，在人才之培養頗為困難，若要應付大量送檢之豬隻血清樣本，往往力有未逮。

其他研發中 PCV2 檢測方法

有鑑於 PCV2 增殖與抗原盤之製作不易，因此許多國內外之實驗室均應用基因表現方式，以真核或原核表現系統進行 PCV2 第 2 開讀窗（Open Reading Frame 2；ORF2）之基因表現。由於 ORF2 基因之表現蛋白為 PCV2 病毒之主要結構蛋白衣，具有刺激宿主產生專一性抗體之特性，因此該段基因之表現重



組蛋白相當適合應用於 PCV2 抗體檢測試劑與次單位疫苗之發展。目前已有相當多實驗室以此為基礎成功發展出檢測豬隻血清 PCV2 抗體之 ELISA 檢測套組，而 ORF2 次單位疫苗亦為許多養豬場所採用。但是由於 ORF2 基因之核酸序列較為特殊，不論採用真核或原核系統行重組蛋白表現時，往往容易遭遇到表現蛋白產量不易提高之困難。且生產之重組蛋白產物需經過純化以及濃縮等過程，導致生產時間與費用大幅提高。因此所生產之 ELISA 檢測試劑與次單位疫苗成本亦相當昂貴，增加使用者之負擔。

本所新研發 PCV2 診斷試劑

由於 PK-15 細胞株僅有少量細胞對於 PCV2 病毒具有感受性，若能將其重新株化 (Cloning)，將對於 PCV2 病毒具有較高感受性與不具感受性之 PK-15 細胞分離，得到 1 株全新之高 PCV2 感受性細胞株，則可有效提高 PCV2 病毒增殖之力價。因此本所於 101 年開始著手進行新 PK-15 細胞株之選殖，首先以 Limiting Dilution 方法將 PK-15 細胞消化，然後以 1 個細胞 / 每孔方式並置於 96 孔盤內培養繼代，經過數日後將存活之 PK-15 細胞轉移至 6 孔盤內培養，最後轉至一般細胞角瓶內培養即完成初步之篩選。緊接著將 PCV2 病毒接種於所篩選之 PK-15 細胞，並培養 48 至 72 小時，並以 IFA 進行病毒力價檢測。在本次研究中成功篩選出 1 株對於 PCV2 病毒具較高感受性之新 PK-15 細胞株，其病毒增殖力價由 $10^{4.5}$ 提升至 $10^{6.5}$ 組織培養感染劑量 / 毫升 (Median Tissue Culture Infective Dose/ml; TCID₅₀)，有效提高病毒力價約 100 倍，初步解決 PCV2 病毒接種 PK-15 細胞後增殖不易之問題。

在選殖出適用之細胞株後，接著就是進行 PCV2 檢測套組之研發。由於 ELISA 具有適合檢測大量血清樣品之優點，因此後續之開發工作主要以其為主。首先將大量增殖之病毒加以純化作為抗原，接著將已知之豬隻 PCV2 陽性與陰性血清進行適當稀釋並進行感作，以便制定出正確的陽性與陰性檢測結果之閾值 (Cut-off Value)。最後以隨機取樣方式選取 385 支豬隻血清，並以本所自行開發與商品化之 ELISA 檢測套組同時進行檢測，並將二者結果加以比較與分析。由其結果可發現二者之相關敏感性為 97.8% ($271/277 \times 100\%$)、相關特異性為 90.7% ($98/108 \times 100\%$)；Kappa statistics 值可達 0.958，顯示

二者具有極高之一致性（表 1）。除此之外，經由計算所需之製作成本，本所自行研發之 ELISA 檢測試劑套組製作成本僅為商品化檢測試劑套組之十分之一。綜合上述各項結果，本所研發之 ELISA 檢測試劑套組具有成本低廉、使用便利、高特異性與高敏感性等諸多優點。對於未來後續之各項相關試驗研究，必能提供極大之助益。對於養豬場之飼養管理、自衛防疫以及疫苗之評估與使用，也將能提供正確之方向。

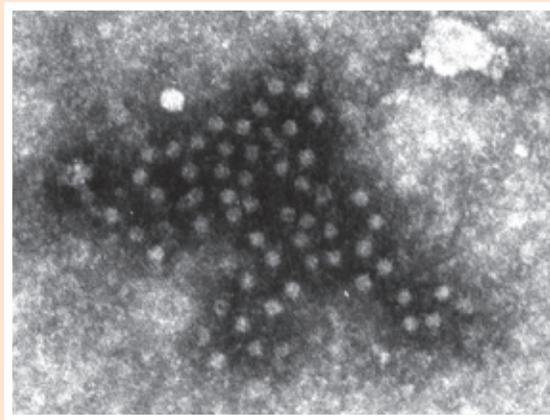
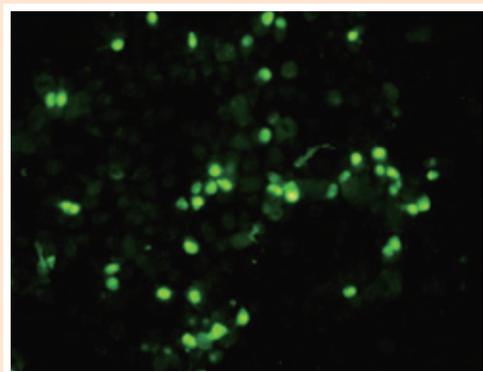
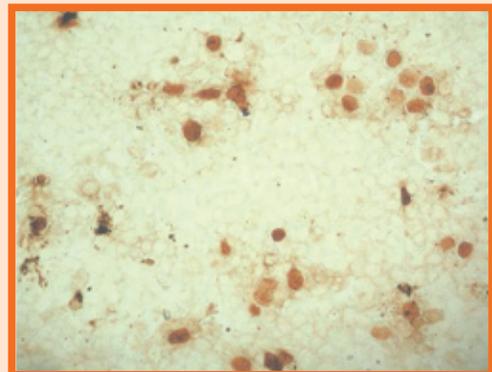


圖 1、豬第 2 型環狀病毒為已知之最小動物病毒，僅約 17nm。（本圖為生物組郭舒亭助理研究員提供）



A



B

圖 2、豬第 2 型環狀病毒感染豬腎臟細胞並固定之後，以 IFA (A) 或 IPMA (B) 進行檢測，可在豬腎臟細胞觀察到特異性之螢光 (A) 或呈色 (B) 反應。



圖 3、ELISA 極為適合應用於大規模之送檢樣品檢測，可在較短時間內完成檢測工作。

表 1、本所開發 PCV2 抗體 ELISA 檢測套組與商品化 ELISA 之分析比較

本所開發 ELISA	商品化 ELISA		總計
	陽性	陰性	
陽性	271	10	281
陰性	6	98	104
總計	277	108	385

備註：本次檢測以隨機取樣方式選取 385 頭豬隻血清，並以本所開發 ELISA 與商品化 ELISA 同時進行檢測。可發現二者之相關敏感性為 97.8% (271/277 × 100%)、相關特異性為 90.7% (98/108 × 100%)；Kappa statistics 值可達 0.958，顯示二者具有極高之一致性。