

## 台灣豬第二型環狀病毒與豬纖鍊病毒混合感染之探討

王 羣<sup>1\*</sup>、黃天祥<sup>1</sup>、李淑慧<sup>2</sup>、張仁杰<sup>1</sup>、林有良<sup>1</sup>、蔡向榮<sup>1</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會家畜衛生試驗所

<sup>2</sup>行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

**摘要** 豬第二型環狀病毒(porcine circovirus type 2, PCV2) 為一重要豬隻病毒性疾病，感染豬隻所引起之各種臨床症狀統稱為豬環狀病毒相關疾病(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。豬纖鍊病毒 (Torque teno sus virus, TTSuV)亦為近年來一新興豬病，TTSuV 之基因型主要為第一型(Torque teno sus virus type 1, TTSuV1)以及第二型(Torque teno sus virus type 2, TTSuV2)，在世界各國養豬場亦有極高之流行率。為了解 PCV2 和 TTSuV 在台灣混合感染情形，因此收集 2011 至 2014 年間 243 個豬隻檢體，應用環式恆溫增幅法(loop mediated isothermal amplification, LAMP)以快速診斷 PCV2 病毒，以及應用巢式聚合酶鏈反應法(nested polymerase chain reaction, nested PCR)診斷 TTSuV1 以及 TTSuV2 病毒。結果顯示 PCV2 病毒之陽性率為 93.4%；TTSuV1、TTSuV2 單獨感染以及二病毒混合感染(TTSuV1/TTSuV2)之陽性率分別為 6.1%、8.2%及 83.5%。PCV2 分別與 TTSuV1、TTSuV2 混合感染以及和 TTSuV1/TTSuV2 混合感染之陽性率分別為 6.1%、8.2%與 78.6%。

**關鍵詞：**豬第二型環狀病毒、豬纖鍊病毒、環式恆溫增幅法、巢式聚合酶鏈反應法

### 緒言

豬環狀病毒(porcine circovirus, PCV)因其基因體為環型，而非一般病毒之線型基因體，故因之命名[4,7]。1991 年於加拿大首先證實，本病毒與豬罹患離乳後多系統消耗性綜合症 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)具相關性，最主要特徵為患豬體重下降及出現呼吸症狀等[1,11]。由 PMWS 豬隻所分離到之環狀病毒，被歸類為第二型豬環狀病毒(porcine circovirus type 2, PCV2)，為引起 PMWS 之主要病原[1,11,17]。除了 PMWS 之外、許多報告指出 PCV2 與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 necrotizing pneumonia, PNP)、豬隻流死產等臨床症狀均有相當關聯。目前國際間將 PCV2 感染豬隻所引起之各種臨床症狀統稱為豬環狀病毒疾病(porcine circovirus disease, PCVD)或是豬環狀病毒關聯性疾病(porcine circovirus associated disease, PCVAD) [11]。

豬纖鍊病毒(Torque teno virus, TTV) 屬於 *Anelloviridae* 科，為無封套 DNA 病毒，大小約 30-32 nm，具有負向單股環狀 DNA 基因體，其基因型主要區分為第一型(Torque teno sus virus type 1, TTSuV1)以及第二型(Torque teno sus virus type 2,

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

TTSuV2) [10,11,13]。二者在豬群具有極高陽性率，在許多國家可發現其流行率介於 26%至 100%之間 [3,5,12,14]。目前雖然尚無豬隻單獨感染 TTSuV 後出現明顯臨床症狀之病例報告 [2,15]，然而不能排除 TTSuV 有可能和其它病原混合感染，並導致豬隻出現較明顯之臨床症狀 [6,8,9,13]。

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) 以及 黴漿菌 (*M. Hyopneumoniae*)。據相關報告，超過 98%之 PCVAD 病例均有混合感染之情形，其中 52%之病例為 PCV2 與 PRRSV 混合感染、36%為 PCV2 與 *M. Hyopneumoniae* 混合感染、21.6%為 PCV2 與細菌混合感染、15%為 PCV2 與 PPV 混合感染、5.4%為 PCV2 與 SIV 混合感染，PCV2 單獨感染之病例僅有 1.9% [11]。除此之外，近年來許多研究報告指出 TTSuV 與 PCV2 具有極高之混合感染率，因此懷疑二者之混合感染會導致豬隻出現較明顯之 PCVAD 以及其它臨床症狀。本研究藉由近年來收集的豬隻臨床病例及檢體，探討 PCV2 與 TTSuV 在台灣養豬場混合感染之現況。

## 材料與方法

### 豬隻檢體

由台灣各縣市於 2011 年至 2014 年收集 4 至 12 週齡具有 PMWS 或其它臨床症狀之衰弱豬隻檢體 (含扁桃腺、淋巴結、脾臟、肺臟、肝臟等)，總共由 47 戶養豬場收集到 243 頭豬隻臟器。將上述組織檢體混和，加入適量之 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)，並以杵及研鉢將其研磨充分均質化，製成 10×乳劑，保存於-70℃冰櫃備用。

### 病毒核酸萃取

上述收集之豬隻檢體乳劑，以 Qiagen 公司生產之商品化 DNA Mini Kit 套組依其說明書萃取病毒 DNA。首先，取 100 μl 之乳劑加入 100 μl 之 Buffer

ATL 及 20 μl 之 Proteinase K，置於 56℃感作至組織完全溶解，然後加入 200 μl 之 Buffer AL 置於 70℃感作 10 分鐘，再加入 200 μl 之無水酒精，震盪 15 秒；將樣品混合液置入 QIAamp spin column 之內(含 2 ml 之收集管)，於室溫離心 6,000 g 約 1 分鐘，將 QIAamp spin column 置入一新 2 ml 之收集管，並加入 500 μl 之 Buffer AW1，於室溫離心 6,000 g 約 1 分鐘，再將 QIAamp spin column 置入一新 2 ml 之收集管，並加入 500 μl 之 Buffer AW2，於室溫高速離心 10,000 g 約 1 分鐘，將 QIAamp spin column 置入一新 1.5 ml 之離心管，加入 200 μl 之 Buffer AE 感作 1 分鐘，於室溫離心 6,000 g 約 1 分鐘，將所萃取之病毒 DNA 核酸保存於-20℃冰櫃備用。

### 恆溫環式增幅法(loop mediated isothermal amplification, LAMP)

有關 PCV2 檢測方面，主要係依據王等於 2014 年發展之即時恆溫環式增幅法(LAMP) [17]。將上述抽好的 DNA、預先設計之引子對(表 1)、2 倍稀釋用 RT-LAMP reaction buffer (Eiken 公司所提供)、BstDNA polymerase (Eiken 公司所提供)共同加入 Eiken 公司生產之 LAMP 反應管內，然後將反應管放入 Eiken 公司生產之 LA320 型即時溫度監控器反應槽內進行 LAMP 反應，而允收值(cutoff value)則依據該儀器之操作說明訂為 0.1 濁度(turbidity)。當 RT-LAMP 反應進行時，反應管內 RT-LAMP 產物之濃度達到 0.1 濁度時，LA320 型即時溫度監控器即自動判讀為陽性，同時每隔 6 秒鐘計算 RT-LAMP 產物濃度一次，以即時觀察 RT-LAMP 產物濃度之變化。反應完畢後 LAMP 產物於瓊膠進行電泳分析，之後浸泡於溴化乙醯(ethidium bromide, EtBr)中染色，並於紫外線下觀察反應產生之條帶後照相。

### 巢式聚合酶鏈反應(nested polymerase chain reaction, nested PCR)

有關 TTSuV 檢測方面，以 Kekarainen [6]等於 2006 年所發表之引子對(表 1)進行巢式聚合酶鏈反應 (nested PCR) 反應 [6]。將上述純化好之病毒核酸，取 12 μl 至預先混合各種反應溶液的 0.65 ml 離心管中(primer 20 μM 0.5 μl、1.25 μM dNTP 8

$\mu\text{l}$ 、10X Taq buffer 5  $\mu\text{l}$ 、2.5 U Taq DNA polymerase) 並加入 DDW 補至總體積 100  $\mu\text{l}$  直接放入 ABI 公司生產之 2400 型溫度控制器內進行 PCR 反應。反應條件如下：先以 94°C 進行 1 分鐘，再以 94°C、30 秒，52°C、20 秒，72°C、30 秒，共進行 35 cycles；最後再以 72°C 進行 10 分鐘。然後再取 12  $\mu\text{l}$  之 PCR 產物進行 nested-PCR 反應，反應溶液之配置與反應條件如同前述。然後取反應完成之產物 10  $\mu\text{l}$  於 2% 瓊膠進行電泳分析，電泳完畢後浸泡於 EtBr 中染色，並於紫外線下觀察反應產生之條帶後照像及判讀。

### 核酸定序及分析

以隨機取樣之方式，各選取 6 個 TTSuV1 與 TTSuV2 之 nested-PCR 增幅產物，利用 ABI PRISM 377 Automated Fluorescent DNA Sequencer 進行 DNA 之分析定序 [16]。其方法是以 Perkin Elmer 公司的 ABI PRISM™ Cycle Sequencing Kit，原理為利用 ddNTP 上帶有四種不同吸光波長的螢光劑以 dideoxynucleotide termination 的方式及 PCR 的方法進行試管內 DNA 合成，加入十分之一體積的 3M NaOAc 及 2.5 倍體積 98% 酒精，於冰上作用 10 分鐘，離心倒掉上清液，加入 5  $\mu\text{l}$  loading dye 後，經 6% polyacrylamide gel 分析後，以 sequencer detector 上雷射光束來激發螢光的訊號，黑色代表鳥嘌呤核苷酸(guanine nucleotide)，綠色代表腺嘌呤核苷酸(adenosine nucleotide)，紅色代表胸腺嘧啶核苷酸(thymidine nucleotide)，藍色代表胞嘧啶核苷酸(cytidine nucleotide)。

### 樹狀圖分析

經定序完成之 6 條台灣 TTSuV1、6 條 TTSuV2 病毒株序列與 2 株 TTSuV 標準株 (DQ229868 以及 DQ229859) 序列以 DNASTAR package version 8.1 軟體之 MegAlign program 程式加以排列與整理，再進一步以 DNASTAR package version 8.1 軟體之 distance-based, neighbor-joining method 進行演化數分析，樹狀圖再現性(bootstrap values)之計算次數則訂為 1,000。

## 結果

### PCV2 與 TTSuV 之陽性率

由 2011 至 2014 年間收集 243 個豬隻檢體，應用 LAMP 以快速診斷 PCV2 病毒，以及 nested PCR 診斷 TTSuV1 以及 TTSuV2 病毒。結果顯示台灣 PCV2 病毒之陽性率為 93.4%(227/243) (表 2)；TTSuV1、TTSuV2 單獨感染以及二病毒混合感染 (TTSuV1/TTSuV2) 之陽性率分別為 6.1% (15/243)、8.2% (20/243) 及 83.5% (203/243)(表 2)。PCV2 分別與 TTSuV1、TTSuV2 混合感染以及和 TTSuV1/TTSuV2 混合感染之陽性率分別為 6.1%(15/243)、8.2%(20/243) 與 78.6%(191/243) (表 3)。本次試驗研究結果亦顯示 TTSuV1 以及 TTSuV2 病毒在台灣養豬場之陽性率均極高，二者並無顯著差異。且 PCV2 與 TTSuV1/TTSuV2 混合感染之陽性率佔有最高比率 (表 3)。

### 樹狀圖分析

台灣 TTSuV1 與 TTSuV2 病毒株序列分別形成 2 個獨立之族群(圖 1)。其中台灣 TTSuV1 病毒株序列與 TTSuV1 標準株 DQ229868 序列間之基因相似度高達 93% 至 99%；而台灣 TTSuV2 病毒株序列與 TTSuV2 標準株 DQ229859 序列間之基因相似度亦高達 92% 至 98%(圖 1)。

## 討論

本研究結果顯示，TTSuV1 與 TTSuV2 在台灣養豬場均具有高陽性率，且二者混合感染之比率極高(表 2、3)。此外，TTSuV 與 PCV2 混合感染亦呈現極高陽性率。目前已知 PCV2 和 PRRSV、PPV 以及假性狂犬病病毒(pseudorabies virus, PrV) 等其它病原混合感染後，會導致豬隻出現較明顯之臨床症狀，包括 PMWS、PDNS 以及 PCVAD。雖然尚未有豬隻單獨感染 TTSuV 後發病以及出現較嚴重臨床症狀之病例，但是 TTSuV 在台灣豬場呈現如此高陽性率，是否會提升 PCV2 和其它病原對於豬隻之致病性並提升臨床症狀的嚴重性，仍需要更進一步之探討。

經由演化樹分析以及基因序列比對本研究所選取

之 6 株台灣 TTsuV1 以及 6 株 TTsuV2 病毒株序列之相關距離(phylogenetic distance)，可以了解到 TTsuV1 與 TTsuV2 在台灣養豬場環境存在一段相當長的時間，二族群基因序列之差異也是經年累月所形成之現象，這些資料對於未來研究台灣 TTsuV 病毒將提供極大助益。惟病毒基因型差異是否影響到病毒之毒力與致病性，仍有待進一步探討。未來亦將儘速完成台灣 TTsuV 之全長基因體定序以及序列分析，以充分了解國內 TTsuV1 以及 TTsuV2 之基因體全長序列和國外 TTsuV 病毒株之差異。

由於 TTsuV 目前仍無法以細胞培養來進行分離以及增殖，因此造成許多相關試驗研究停滯不前。且該病毒在豬隻組織內之含量極低，因此 TTsuV 的診斷目前主要是以 nested PCR 為主，該檢測法之特異性與敏感性均極佳，但相當耗費時間及人力。因此未來將參考世界各國發表於 GenBank 之基因序列，並應用分析軟體以設計出適用之引子對，完成新 TTsuV 之診斷技術開發，包括 LAMP 等相關技術，以便更有效及

快速診斷 TTsuV1 以及 TTsuV2。另一方面嘗試建立 TTsuV 之活體內(*in vivo*)實驗技術，包括找尋適用之細胞株與建立動物試驗模式，為後續之試驗研究奠定良好基礎。

依據本次結果顯示，台灣豬隻同時感染 PCV2 以及 TTsuV 相當普遍。因此，目前 PCV2 以及 TTsuV 的防治對策對於台灣養豬業者來說絕對不可輕忽。針對豬隻感染疾病的現況，防疫措施亦需相對因應。畜舍之環境及飼養管理與呼吸道疾病之發生有極密切的關連，例如畜舍通風不良、舍內溫差過大、飼養密度過高及床面設計不當等皆會誘發呼吸道疾病或加重病情。單一病原的感染或許對豬群不會有危害，或僅造成輕微之干擾，然而混合感染造成複合疾病時，往往會使得情況惡化而難以控制。因此，若欲控制疾病的發生，不能只把焦點放在感染病原上，除應作好各項免疫注射計畫外，如何降低豬群間的接觸、減少豬隻緊迫、提供良好的營養、環境的清潔衛生及適當之飼養管理以切斷病原之循環應為首要工作。

表 1、LAMP 以及 nested PCR 反應所使用之引子對序列

	Target	Primer	Type	Sequence (5'-3')
LAMP	PCV2	F3	Forward outer	GCC CAC TCC CCT TGT CAC
		B3	Backward outer	CAT CTT CAA CAC CCG CCT C
		FIP <sup>1</sup>	Forward inner	TCT GTG CCC TTT GAA TT -TTTT <sup>1</sup> - GGG
		F1c-TTTT-F2		AGC AGG GCC AGA A
		BIP <sup>1</sup>	Backward inner	GGG GGA GGA CCC CCT TT -TTTT <sup>1</sup> - CC
		B1c-TTTT-B2		CGC ACC TTC GGA T
Nested PCR	TTsuV1	F1	First forward	TAC ACT TCC GGG TTC AGG AGG CT
		R1	First Reverse	ACT CAG CCA TTC GGA ACC TCA C
		Nest-F1	Second forward	CAA TTT GGC TCG CTT CGC TCG C
		Nest-R1	Second Reverse	TAC TTA TAT TCG CTT TCG TGG GAA C
	TTsuV2	F2	First forward	AGT TAC ACA TAA CCA CCA AAC C
		R2	First Reverse	ATT ACC GCC TGC CCG ATA GGC
		Nest-F2	Second forward	CCA AAC CAC AGG AAA CTG TGC
		Nest-R2	Second Reverse	CTT GAC TCC GCT CTC AGG AG

<sup>1</sup>Both inner primers FIP and BIP contained 2 binding regions and were connected by a TTTT bridge

表 2、2011 年至 2014 年間台灣地區 PCV2 與 TTSuV 感染隻數

Year	No. of samples	PCV2		TTSuV			
		Positive	Negative	TTSuV1	TTSuV2	TTSuV1/2 <sup>1</sup>	Negative
2011	63	60	3	1	11	49	2
2012	78	76	2	8	3	67	0
2013	49	44	5	4	1	42	2
2014	53	47	6	2	5	45	1
Total	243	227	16	15	20	203	5

<sup>1</sup>TTSuV1/2: co-infection of TTSuV1 and TTSuV2

表 3、2011 年至 2014 年台灣地區 PCV2 與 TTSuV 混合感染隻數

PCV2	TTSuV				Total
	TTSuV1	TTSuV2	TTSuV1/2 <sup>1</sup>	Negative	
Positive	15	20	191	1	227
Negative	0	0	12	4	16
Total	15	20	203	5	243

<sup>1</sup>TTSuV1/2: co-infection of TTSuV1 and TTSuV2

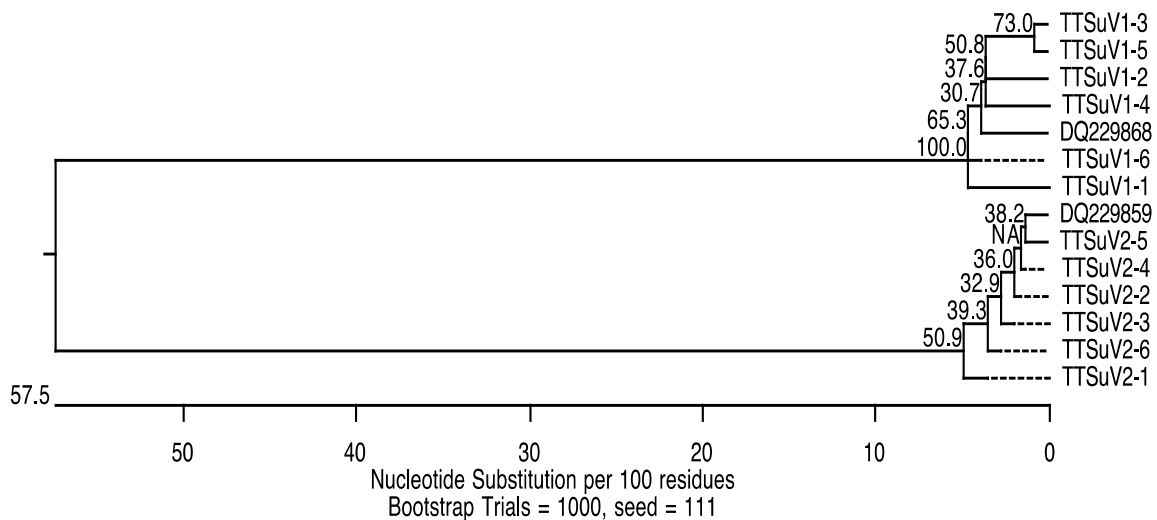


圖 1、台灣 TTSuV1、TTSuV2 及 2 株 TTSuV 標準病毒株(DQ229868 以及 DQ229859)之親源樹狀圖分析。

## 參考文獻

1. Aramouni M, Segalés J, Sibila M. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Vet Microbiol* 153: 377–381, 2011.
2. Brassard J, Gagné MJ, Leblanc D. Real-time PCR study of the infection dynamics of Torque teno sus viruses in naturally infected pigs from nursery to slaughterhouse. *Vet J* 197: 506–508, 2013.
3. de Arruda Leme R, Alfieri AF, Alfieri AA. Torque teno sus virus infection in suckling piglets from Brazilian pig herds. *Trop Anim Health Prod* 44: 1885–1890, 2012.
4. Dupont K, Nielsen EO, Baekbo P, Larsen LE. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 128: 56–64, 2008.
5. Jarosova V, Pogradichny R, Celer V. Prevalence and age distribution of porcine torque teno sus virus (TTSuV) in the Czech Republic. *Folia Microbiol* 56: 90–94, 2011.
6. Kekarainen T, Sibila M, Segalés J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *J Gen Virol* 87: 833–837, 2006.
7. Kim HK, Luo Y, Moon HJ, Park SJ, Keum HO, Rho S, Park BK. Phylogenetic and recombination analysis of genomic sequences of PCV2 isolated in Korea. *Virus Genes* 39: 352–358, 2009.
8. Lee S, Shin J, Kim C, Lyoo YS. Comparison of Torque Teno Sus Virus (TTSuV) viral load in Porcine Circovirus Type 2 vaccinated and non-vaccinated pig herds. *Res Vet Sci* 93: 1039–1041, 2012.
9. Liu J, Guo L, Zhang L, Wei Y, Huang L, Wu H, Liu C. Three new emerging subgroups of Torque teno sus viruses (TTSuVs) and co-infection of TTSuVs with porcine circovirus type 2 in China. *Virology* 10: 189–195, 2013.
10. Macera L, Cortey M, Maggi F, Segalés J, Kekarainen T. A novel rolling circle amplification assay to detect members of the family *Anelloviridae* in pigs and humans. *Virus Res* 160: 424–427, 2011.
11. Meng XJ. Emerging and Re-emerging Swine Viruses. *Transbound Emerg Dis* 23: 1865–1882, 2012.
12. Nieto D, Aramouni M, Grau-Roma L. Dynamics of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) DNA loads in serum of healthy and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Vet Microbiol* 152: 284–290, 2011.
13. Nieto D, Kekarainen T, Aramouni M, Segalés J. Torque teno sus virus 1 and 2 distribution in tissues of porcine circovirus type 2-systemic disease affected and age-matched healthy pigs. *Vet Microbiol* 163: 364–367, 2013.
14. Segalés J, Martínez-Guinó L, Cortey M. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Vet Microbiol* 134: 199–207, 2009.
15. Tshering C, Takagi M, Deguchi E. Infection dynamics of Torque teno sus virus types 1 and 2 in serum and peripheral blood mononuclear cells. *J Vet Med Sci* 74: 513–517, 2012.
16. 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.
17. 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* 47: 363–370, 2014.

## Detection of Dual-infection of Porcine Circovirus Type 2 and Torque Teno Sus Virus in Taiwan

C Wang<sup>1\*</sup>, TS Huang<sup>1</sup>, SH Lee<sup>2</sup>, JC Chang<sup>1</sup>, YL Lin<sup>1</sup>, HJ Tsai<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Animal Drugs Inspection Branch, Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

**Abstract** Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a prominent swine viral pathogen. PCV2 is considered as the major causative agent of PCV2 associated disease (PCVAD). Co-infection of PCV2 with other viral pathogens is common; one of which is the Torque teno sus virus. Torque teno sus virus (TTSuV) contains 2 major genotypes, TTSuV and TTSuV2, and is known to have a high prevalence in pig populations throughout the world. The purpose of this study was to investigate the prevalence of co-infection of PCV2 and TTSuV in Taiwanese pig farms. A total of 243 clinical tissue samples collected from pigs between years 2011 and 2014 were used. The PCV2 and TTSuV sequences were amplified and differentiated by using the loop mediated isothermal amplification (LAMP) and the nested polymerase chain reaction (nested PCR), respectively. Of the 243 clinical samples, 93.4% were PCV2 positive, 6.1% were TTSuV1 positive alone, 8.2% were TTSuV2 positive alone, and 83.5% were TTSuV1 and TTSuV2 double positive. The rate of co-infection of PCV2 and TTSuV1, PCV2 and TTSuV2 as well as PCV2 and TTSuV1/TTSuV2 were 6.1%, 8.2%, and 78.6%, respectively.

**Keywords:** *Porcine circovirus type 2, torque teno sus virus, loop mediated isothermal amplification, nested polymerase chain reaction.*

