

## 即時環式恆溫增幅法應用於豬第二型環狀病毒之診斷

王 羣<sup>1,2\*</sup>、鄭謙仁<sup>2</sup>、黃天祥<sup>1</sup>、龐 飛<sup>2</sup>、賴秀穗<sup>2</sup>、張惟茗<sup>1</sup>、蕭世烜<sup>2</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會家畜衛生試驗所

<sup>2</sup>國立台灣大學獸醫學研究所

**摘要** 豬第二型環狀病毒 (porcine circovirus type 2; PCV2) 是一直徑 17 毫微米 (nm)、不具封套、並具有單股環狀 DNA 之病毒，目前在台灣已造成豬之最主要病毒性疾病之一。目前許多研究報告證實環式恆溫增幅法 (loop-mediated isothermal amplification; LAMP) 是具有高效率、快速和操作簡便之診斷方法。利用二組或三組之引子對，可以檢測出樣品之微生物核酸。本研究主要設計二組環式恆溫增幅法之引子對，並採用即時檢測系統來檢測田間病材之豬第二型環狀病毒核酸。為了解引子對之特異性，總共收集 19 株豬第二型環狀病毒之病毒株、6 株豬第一型豬環狀病毒 (porcine circovirus type 1; PCV1) 病毒株、3 株假性狂犬病病毒株 (pseudorabies virus; PRV)、7 株豬生殖與呼吸道綜合症病毒株 (porcine reproductive and respiratory virus; PRRSV) 以及 3 株豬瘟病毒株 (classical swine fever virus; CSFV) 加以測試。檢測結果發現引子對僅對豬第二型環狀病毒具有反應，對於其他病毒株並沒有出現交叉反應。在引子對敏感性測試方面，引子對之敏感度可達 10 copy number/reaction。上述結果顯示環式恆溫增幅法可作為一精準、敏感和快速的豬第二型環狀病毒診斷方法。

**關鍵字：**豬第二型環狀病毒、環式恆溫增幅法、特異性、敏感性

## 緒言

近年來，豬第二型環狀病毒 (porcine circovirus type 2, 以下簡稱PCV2) 感染在美洲、歐洲和亞洲成為最重要之豬病毒型疾病，並造成產業界相當之損失[2 12 3 19]。目前相關報告指出，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)、甚至是無明顯臨床症狀豬隻之組織亦可檢測到PCV2之存在[2 12 3 19]。

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 被推測有 11 個開讀窗 (open reading frame; ORF)。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 推測與病毒複製有關[5 7]。ORF2 主要依照病毒核酸序列以反向方式轉譯出一 28 kDa 的蛋白質，為 PCV2 最主要之結構蛋白 (capsid protein)，

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

也是引發宿主產生專一病毒中和性抗體最主要部分[13 14]。依據樹狀圖分析，PCV2 可分為 PCV2a 與 PCV2b 二種基因型[9]。一些研究報告指出，二者之間對於豬隻之毒力與致病性有所差異，但是該項理論仍需進一步分析與研究[6]。

環式恆溫增幅法 (Loop-mediated isothermal amplification, 以下簡稱 LAMP) 被廣泛應用於臨床診斷，此檢測技術具高專一性、高敏感性、節省時間以及操作簡便等優點[1 4]，已應用於許多微生物 (細菌、病毒和原蟲等) 之檢測 [1 4 15 17]。其最主要之操作方式乃將待檢測樣品之核酸、二或三對之 LAMP 引子與 Bst DNA polymerase 混合後，於恆溫 (60°C 至 65°C 之間) 感作一小時即可完成，因此 LAMP 為快速和簡便之檢測方法[8 16 17]。本文主要目的，在研究 PCV2 之 LAMP 診斷技術，並將其運用在臨床診斷與分析。

## 材料與方法

### 病毒株之核酸萃取

本研究選擇 19 株 PCV2 病毒株、6 株豬第一型豬環狀病毒 (porcine circovirus type 1; PCV1) 病毒株、3 株豬假性狂犬病病毒株 (pseudorabies virus; PRV)、7 株豬生殖與呼吸道綜合症病毒株 (porcine reproductive and respiratory virus; PRRSV) 以及 3 株豬瘟病毒株 (classical swine fever virus; CSFV) 加以測試。有關病毒核酸萃取方式，採用 Roche 公司發展的 MagNA Pure LC 系統來進行重病毒核酸萃取，使用之試劑為 Roche 公司的 Total Nucleic Acid Isolation Kit。由於 PRRSV 與 CSFV 屬於 RNA 病毒，因此需進行該病毒 cDNA 之轉錄。有關 PRRSV cDNA 之轉錄主要是參考王等 2008 年之方法，以 PRRSV ORF5 為 target gene 進行 PRRSV cDNA 之轉錄[18]。有關 CSFV cDNA 部分，則分讓自本所豬瘟研究組潘居祥博士，主要以 CSFV LPC strain 之 E2 為 target gene 進行 CSFV cDNA 之轉錄。

### 引子之設計 (Designs of primer)

以 PCV2 台灣分離株 (GENBANK accession number: AF364094) 為模板，進行引子之設計。

設計軟體採用日本 Eiken 公司發展之 LAMP Primer Explorer V4 引子設計軟體，其序列如 Table 1。

### 環式恆溫增幅反應 (Loop mediated isothermal amplification; LAMP)

上述各抽好的病毒核酸溶液取 2  $\mu$ L，並同時加入 FIP (20  $\mu$ M/ $\mu$ L) 引子以及 BIP (20  $\mu$ M/ $\mu$ L) 引子各 2  $\mu$ L、F3 (10  $\mu$ M/ $\mu$ L) 引子和 B3 (10  $\mu$ M/ $\mu$ L) 引子各 0.5  $\mu$ L、12.5  $\mu$ L 之 2 倍稀釋用 LAMP reaction buffer (Eiken 公司所提供)、1  $\mu$ L Bst DNA polymerase (Eiken 公司所提供) 至 Eiken 公司發展之 LAMP 反應管內、最後加入 DDW 補至總體積 25  $\mu$ L，然後將反應管放入 Eiken 公司發展之 LA320 型即時溫度監控器反應槽內進行 LAMP 反應。而允收值 (cut-off value) 則依據該儀器之操作說明訂為 0.1 濁度 (Turbidity)，當 LAMP 反應進行時，反應管內 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 LAMP 產物濃度一次，以即時觀察 LAMP 產物濃度之變化。反應條件如下：先以 60°C 進行 60 分鐘之 LAMP 反應，再以 84°C 進行 7 分鐘以破壞 Bst DNA polymerase。反應完畢後取 10  $\mu$ L LAMP 產物於 2% agarose 進行電泳分析，電泳完畢後浸泡 ethidium bromide (EtBr) 染色，並於紫外線下觀察後照像。

### 聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction; PCR)

將純化好之病毒核酸以 PCR 方法增幅 PCV2 基因，引子對採用本次 LAMP 設計之 F3/B3 引子對。二者可針對 PCV2 基因之序列增幅出 279 bp 之 PCR 產物。上述抽好的 DNA 溶液取 6  $\mu$ L 至預先混合各種反應溶液的 0.65 ml 離心管中 (primer 20  $\mu$ M 0.5  $\mu$ L、1.25  $\mu$ M dNTP 8  $\mu$ L、10X Taq buffer 5  $\mu$ L、2.5 U Taq DNA polymerase) 並加入 DDW 補至總體積 50  $\mu$ L 直接放入溫度控制器內行 PCR 反應。反應條件如下：先以 94°C 進行 1 分鐘，再以 94°C、1 分鐘，57°C、1 分鐘，72°C、1 分鐘，共進行 42 個循環；最後再以 72°C 進行 10 min。取反應完畢後之產物 10  $\mu$ L 於 2% agarose 進行電泳分析，

電泳完畢後浸泡 ethidium bromide (EtBr) 染色，並於紫外線下觀察後照像，以了解 LAMP 引子對之特異性 (specificity)。

### 重組質體之構築

將上述增幅完成之 PCR 產物先行以 QIAGEN 公司發展之 PCR products purification Kit 加以純化。然後將 Invitrogen 公司發展之 pCRII-TOPO plasmid 質體與已純化之 PCR 產物加以混合，於室溫感作 10 分鐘。再加入 Invitrogen 公司發展之 Top10F<sup>®</sup> Escherichia coli，於 4°C 於感作 1 小時，然後 42°C 感作 1.5 分鐘，再於 4°C 於感作 5 分鐘，然後加入不含抗生素之 LB 培養液，於 37°C 感作至少 1 小時。然後塗抹於含 Ampicillin 抗生素以及 X-gal 之 LB agar 上，於 37°C 隔夜培養，然後挑選極有可能成功選殖之白色菌落以 QIAGEN 公司之 QIAprep Spin Miniprep Kit 進行重組質體之萃取，並將重組質體進行核酸定序及分析加以確認。重組質體之定序，主要委由明欣生物科技公司負責進行。

### 環式恆溫增幅反應之敏感度分析

將經確認序列之重組質體以 GE 公司發展之 UV/visible spectrophotometer 來計算其濃度，並將其濃度調整為  $10^8$  copies/reaction。然後將重組質體以 10 倍連續稀釋，其濃度由  $10^8$  copies/reaction 至 1 copy/reaction，一共為 9 個稀釋階。將不同濃度重組質體以上述之 LAMP 檢測法來進行檢測，以了解 LAMP 引子之敏感性 (sensitivity)。

### LAMP 與 PCR 檢測法相關性之分析

取 97 個田間病材（主要為臨床上出現疑似呼吸症狀之發病豬隻淋巴結或扁桃腺），分別以 LAMP 與 PCR 等方法進行檢測。二者檢測結果之可重複性 (Percentage of observed agreement)、相關敏感性 (Relative sensitivity)、相關特異性 (Relative specificity) 以及檢測結果之一致性 (kappa value) 之計算，則參考黃等於 2009 年[10]所發表之方法。

## 結果

### 引子之特異性分析

在 LAMP 引子之特異性檢測方面，主要是以 PCV2、PCV1、PRV 之 DNA 和 CSFV、PRRSV 之 cDNA 來進行檢測。(Fig.1) 結果顯示僅有 PCV2 之 DNA 可以順利被 LAMP 之引子增幅，而且並無偽陽性或是交叉反應之情況發生。

### 引子之敏感性分析

在 LAMP 引子之敏感性檢測方面，由 (Fig.2) 之結果可知最低檢測濃度為 10 copies/ reaction。將不同濃度之重組質體經 LAMP 檢測之後，將不同濃度重組質體之允收值 (cut-off value) 和重組質體濃度加以計算，其線性迴歸之係數為  $r^2 = 0.99$  (Fig.3)。在 PCR 檢測方面，將不同濃度之重組質體經 PCR 檢測之後，由 (Fig.4) 之結果可知最低檢測濃度為 100 copies/ reaction。

### LAMP 與 PCR 檢測法之相關性探討

將 97 個樣品以 PCV2-LAMP 與 PCV2-PCR 分別進行檢測，結果發現 67 個樣品以二種檢測方法檢測均為陽性，27 個樣品以二種檢測方法檢測均為陰性，1 個樣品為 LAMP 檢測呈陽性反應而 PCR 檢測呈陰性反應，2 個樣品為 LAMP 檢測呈陰性反應而 PCR 檢測呈陽性反應。二種檢測方法之檢測結果之重複性為 96.9%，其相關之特異性 (Relative specificity) 為 97.1%，其相關之敏感性 (Relative sensitivity) 為 96.4%。另一方面，LAMP 與 PCR 檢測結果之一致性，經計算其 kappa value 為 0.969。

## 討論

LAMP 由於操作簡單，加上感作時間僅一小時，因此較傳統之 PCR 方法省時。此外，本次實驗設計之 LAMP 引子也顯示出其高度之特異性，許多其它豬隻病毒性疾病之病毒，例如 PCV1 和 PRRSV 均未被檢測出，因此本方法極適合應用於田間病例之檢測。

在本次研究當中，增幅之 LAMP 產物不僅可以利用傳統瓊脂凝膠電泳法來加以分析，也可以採用即時 (real-time) 偵測之方式了解 LAMP 產物增幅之時間

點與速率。將即時溫度監控器登錄之各項原始數據資料，經由電腦之 Office Excel 作業系統加以分析，並比對不同稀釋濃度重組質體之增幅時間點以及速率，可以進一步了解檢測樣品之原始濃度，達到定量之效果。

使用傳統 PCR 或其他方法（例如定序），由於組織樣品的抗原濃度過低以至於不能被檢測出，進而造成診斷上困擾。本次實驗所設計之 LAMP 引子具有極高敏感性（sensitivity），並且可以檢測和定量出樣品內微量 PCV2 DNA，因此其敏感性（sensitivity）相較於 PCR 為高，可在臨床病材之檢測方面發展成為一良好的診斷工具。

將 LAMP 與 PCR 在 97 個臨床樣品之檢測結果

加以比較，可發現二者間檢測結果之相關敏感性（Relative Sensitivity）和相關特異性（Relative Specificity）百分比分別為 97.1% 以及 96.4%，顯示 LAMP 與 PCR 之間檢測結果的相關特異性和敏感性相當高。而二者間檢測結果之重複性則為 96.9%。一致性分析方面，依照 Kappa value 統計分析之分類與比較[10]，LAMP 與 PCR 之 Kappa value 為 0.969，其結果亦顯示 LAMP 與 PCR 之間檢測結果具有極高之一致性。

綜合上述研究結果，我們所研發之 LAMP 檢測技術可特異地偵測 PCV2。將運用此技術於臨床樣品之檢測，其檢測結果具高度之敏感性和特異性，因此本技術將可作為臨床診斷和流行病學研究之用。

Table 1  
Oligonucleotide primer sets used for the PCV2 LAMP assay

Target	Primer	Sequence (5'-3')
PCV2	F3	GCC CAC TCC CCT TGT CAC
	B3	CAT CTT CAA CAC CCG CCT C
	FIP	TCT GTG CCC TTT GAA TTT TTT GGG AGC AGG GCC AGA A
	BIP	GGG GGA GGA CCC CCT TTT TTT TCC CGC ACC TTC GGA T

Table 2  
Correlation of the relative sensitivity and relative specificity of LAMP and PCR results

LAMP assay	PCR assay		
	positive	Negative	Total
positive	67	1	68
Negative	2	27	29
Total	69	28	97

Percentage of observed agreement:  $(67 + 27) / 97 \times 100\% = 96.9\%$ .

Relative sensitivity:  $(67/69) \times 100\% = 97.1\%$ .

Relative specificity:  $(27/28) \times 100\% = 96.4\%$ .

Kappa value = 0.969 (very good)

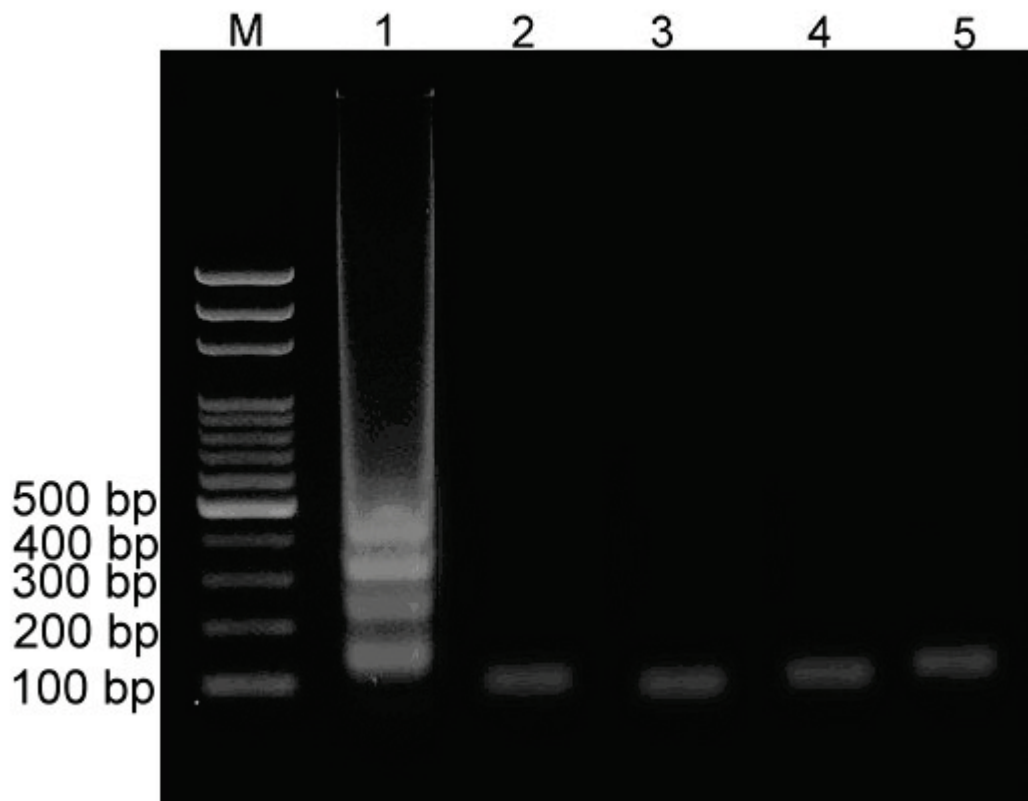


Fig.1 Specificity of the LAMP assay was analyzed by using agarose gel electrophoresis. Lane M: 1000-100 bp ladder marker (Portec, Taipei, Taiwan); Lanes 1-5: extracted DNA of PCV2, PCV1 and PRV ; cDNA of PRRSV and CSFV, respectively.

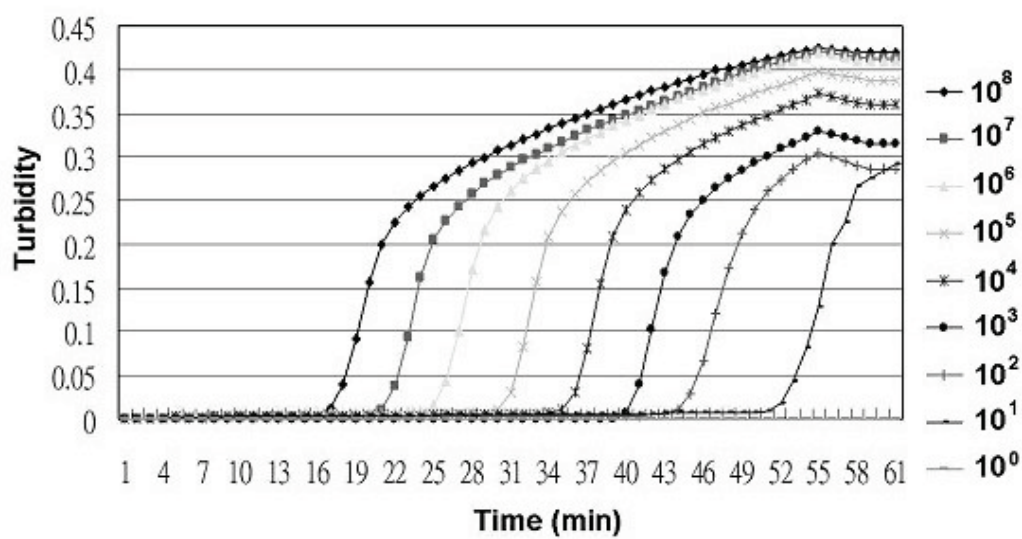


Fig.2 Sensitivity of the PCV2 LAMP assay was evaluated by real-time assays with 10 fold serial dilutions of recombination plasmids ( $10^8$  copies to 1 copy per reaction), respectively.

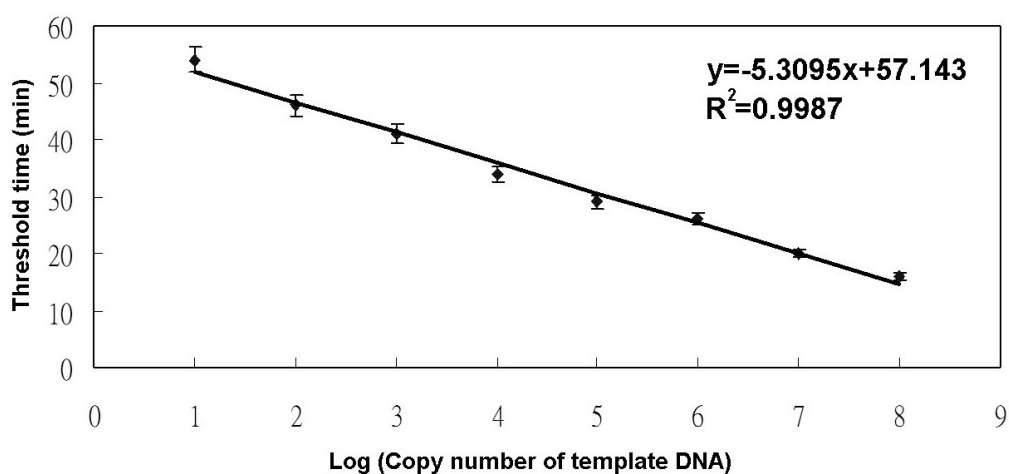


Fig.3 The plot of the mean threshold time against the log of the input PCV2 recombination plasmids fit a linear function was shown.

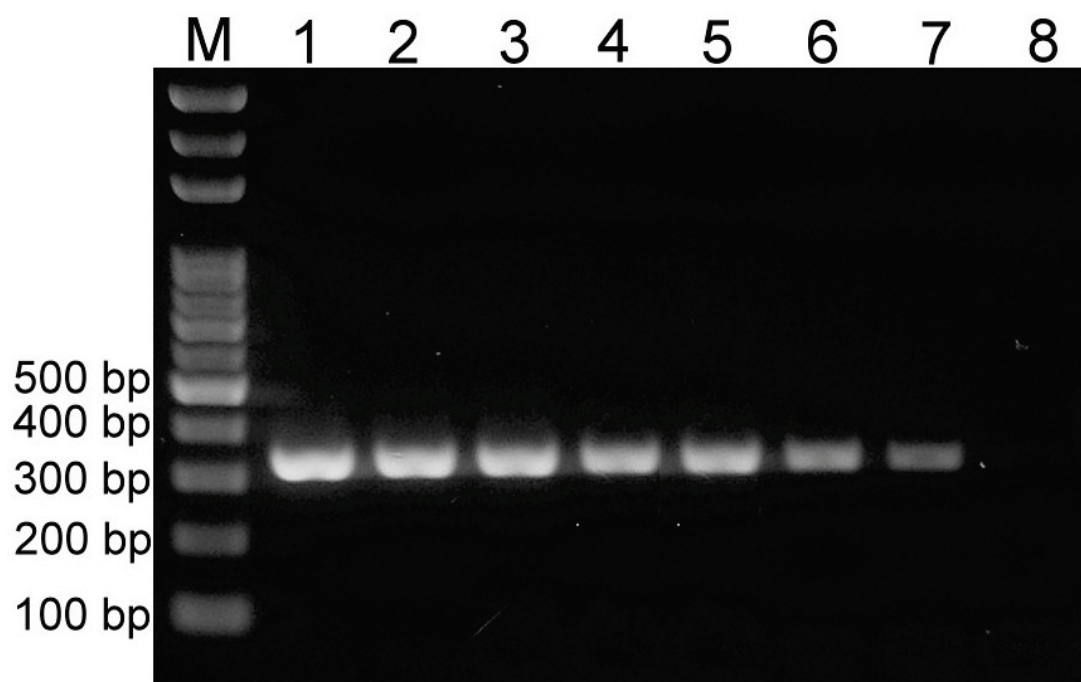


Fig.4 Sensitivity of PCR for detection of PCV2 was analyzed. Lane M: 1000-100 bp ladder marker ; Lanes 1-8: with 10 fold serial dilutions of recombination plasmids( $10^8$  copies to  $10^1$  copy per reaction), respectively.

## 參考文獻

1. Alhassan A, Thekisoe OM, Yokoyama N, Inoue N, Motloang MY, Mbatia PA, Yin H, Katayama Y, Anzai T, Sugimoto C, Igarashi I. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmosis. *Vet Parasitol*, 143: 155-160, 2007.
2. Carman S, Cai HY, DeLay J, Youssef SA, McEwen BJ, Gagnon CA, Tremblay D, Hazlett M, Lusis P, Fairles J, Alexander HS, van Dreumel T. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease 2004-2006. *Can J Vet Res*, 72: 259-268, 2008.
3. Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J*, 169: 326-336, 2005.
4. Chen HT, Zhang J, Sun DH, Chu YF, Cai XP, Liu XT, Luo XN, Liu Q, Liu YS. Rapid detection of porcine circovirus type 2 by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*, 149: 264-268, 2008.
5. Cheung AK. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology*, 305: 168-180, 2003.
6. de Castro AM, Cortez A, Heinemann MB, Brandão PE, Richtzenhain LJ. Molecular diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2). *Res Vet Sci*, 85: 197-200, 2008.
7. Fan H, Xiao S, Tong T, Wang S, Xie L, Jiang Y, Chen H, Fang L. Immunogenicity of porcine circovirus type 2 capsid protein targeting to different subcellular compartments. *Mol Immunol*, 45: 653-660, 2008.
8. Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, Jin L, Takeo S, Tsuboi T. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*, 45: 2521-2528, 2007.
9. 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 Production*, 15: 270-278, 2007.
10. Huang YL, Pang VF, Pan CH, Chen TH, Jong MH, Huang TS, Jeng CR. Development of a reverse transcription multiplex real-time PCR for the detection and genotyping of classical swine fever virus. *J Virol Methods*, 160: 111-118, 2009.
11. Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, Akimoto S, Ohashi M, Suga S, Nishimura N, Ozaki T, Nishiyama Y, Notomi T, Ohta Y, Asano Y. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*, 42: 140-145, 2004.
12. Kixmüller M, Ritzmann M, Eddicks M, Saalmüller A, Elbers K, Fachinger V. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine*, 25: 3443-3451, 2008.
13. Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul PS, Thangthumnyom N, Wajjawalku W, Meng XJ. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J Virol*, 78: 8135-8145, 2004.
14. 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.
15. Nagashima S, Yoshida A, Ansai T, Watari H, Notomi T, Maki K, Takehara T. Rapid detection of the cariogenic pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* using loop-mediated isothermal amplification. *Oral Microbiol Immunol*, 22: 361-368, 2007.
16. Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Lakshmi V, Mamidi N, Shrivastva A, Gupta N, Saxena P, Babu JP, Rao PV, Morita K. Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol*, 45: 351-357, 2007.
17. Toriniwa H and Komiya T. Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol Immunol*, 50: 379-387, 2006.

18. Wang C, Lee F, Huang TS, Pan CH, Jong MH, Chao PH. Genetic variation in open reading frame 5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Taiwan. *Vet Microbiol*, 131: 339-347, 2008.
19. 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.



## Differential and Real-time Detection of Two Genotypes Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) by Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay (LAMP)

C Wang<sup>1,2\*</sup>, CR Jeng<sup>2</sup>, TS Huang<sup>1</sup>, VF Pang<sup>2</sup>, WM Chang<sup>1</sup>, SS Lai<sup>2</sup>, SH Hsiao<sup>2</sup>

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

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

**Abstract** PCV2 causes on infection in pigs is one of most clinically important swine viral diseases throughout the world. Studies indicate that loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a specific, efficiency, and easy method for the detection the nucleic acids of various microorganisms in field samples through the use of 2 or 3 sets of LAMP primers. In this study, we designed 2 sets of primers for use in a real-time PCV2 LAMP system to detect PCV2 in field samples. To determine the diagnostic specificity of the PCV2 LAMP assay, a total of 19 PCV2 isolates, 6 porcine circovirus type 1 (PCV1) isolates, 3 pseudorabies virus (PRV) isolates, 7 porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) isolates, and 3 classical swine fever virus (CSFV) isolates were tested. The results showed that only the PCV2 isolates were detected by PCV2 LAMP, without cross-reaction with other tested viruses. The sensitivity of LAMP for the PCV2 was tested to be 10 copy numbers / reaction for positive recombinant plasmid. These results showed that the PCV2 can be detected and distinguished accurately by using PCV2 LAMP assay with real-time monitoring. The PCV2 LAMP is a specific, sensitive, and quick diagnostic method for the detection of PCV2.

**Keywords:** *Porcine circovirus type 2, Loop-mediated isothermal amplification, Specificity, Sensitivity*

---

\*Corresponding Author  
Animal Health Research Institute

