

即時定量聚合酶鏈反應診斷技術與自動化資訊系統之引進與應用發展

張仁杰*、李淑慧、張國慧、蔡國榮、李敏旭、丁履劬、陳燕萍

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

94 年度引進即時核酸偵測儀 (Real-time PCR)，並建立即時定量聚合酶鏈反應診斷技術，初步應用於犬小病毒之核酸偵測，模板 DNA 用量為 100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg 皆有螢光訊號，最低可測得至 1 pg 之核酸濃度，而核酸與循環數之標準曲線，可應用於核酸定量；另已收集美國印第安那州動物疾病診斷實驗室 (Indiana animal disease diagnostic laboratory) 及肯塔基州家畜疾病診斷中心 (Kentucky livestock disease diagnostic center) 的實驗室資訊管理系統相關資料，如檢體送檢流程、檢驗標準流程與系統操作介面等，可資往後本所規劃動物防檢疫自動化資訊系統之參考。

關鍵詞：即時核酸偵測儀、自動化資訊系統、動物防疫檢疫

緒言

歐美等先進國家之動物疾病診斷實驗室已廣泛使用自動化檢體檢驗儀器設備於微生物學、分子生物學、血清學及病理學等領域[4-11,13,14]，以即時核酸偵測儀 (real-time PCR) 在微生物學實驗室之應用為例，其優點具有快速、敏感及減少實驗接觸污染的風險。現今實驗室較常用之即時定量聚合酶鏈反應技術 (real-time polymerase chain reaction) 係利用 SYBR green 此類螢光物質可與 DNA 結合，於核酸增幅過程中持續嵌入增幅產物，由電腦即時偵測螢光訊號強度，藉由螢光強度與增幅循環數關係，與已知濃度之標準 DNA 互相比較，以檢測檢體中是否含病原之特異性 DNA 並同時定其 DNA 濃度，比傳統 PCR 法偵測核酸敏感度佳[1,2]，此技術可發展為實驗室快速診斷技術。另外，隨著資訊科技日新月異，只擁有自動化儀器並無法完全滿足講求經濟、效率的實驗室診斷業務，必須藉由網路連結各自動化檢驗儀器與各診斷實驗室之間，成為一個整合型網路系統，可提供所有實驗室內的檢驗結果與各項實驗室資訊管

理，如此方可達到從檢體送檢、檢驗過程至檢驗結果回送之自動化。由於目前國內尚無此類套裝資訊商品，可於購買後直接使用，也沒有相關獸醫機構使用類似的資訊系統，僅人醫各大醫院所使用的掛號及診療系統較為接近，惟獸醫針對多種動物並非只有人，而且檢體性質多樣化，甚至一隻動物剖檢採材後會產生相當多檢體，諸如此類的瑣碎問題，於設計上都是要考量的關鍵指標，因此，於本年度赴美動物疾病診斷中心研習時，亦將此計畫相關項目，列入在美重要觀察項目，藉由觀摩美國印第安那州動物疾病診斷實驗室及肯塔基州家畜疾病診斷中心實施多年的實驗室資訊管理系統，俾利規劃本所動物防檢疫自動化資訊系統。

材料及方法

即時定量聚合酶鏈反應診斷技術

檢體前處理：取適量病例檢體 (約 0.5 克重) 置入微量離心管內，以組織研磨棒將組織搗碎，或將適量檢體加入 9 倍體積之細胞培養液，以組織均質機製

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

成乳劑，放置入離心機（型號 MX-301, TOMY, CA, USA）以 3500 rpm 離心 10 分鐘取上清液進行核酸萃取或存於-20℃備用。

檢體 DNA 萃取：採用商品化套組 QIAamp DNA Mini Kit（Qiagen, GmbH, Hilden, Germany）進行 DNA 萃取，參照其手冊操作之。取 100 μ L 乳劑於 1.5 mL 微量離心管，依序加入 100 μ L buffer ATL、20 μ L proteinase K 混合均勻後，56℃加熱至液體呈現清澈（約 5~10 分鐘），短暫離心（spin down）後加入 200 μ L buffer AL 並混合均勻，70℃加熱 10 分鐘後短暫離心，再加入 200 μ L 酒精（96%~100%）混合均勻，並將液體移置 spin column。以 8,000 rpm 離心 1 分鐘後丟棄濾液收集管，更換新的收集管後加入 500 μ L buffer AW1，於 8,000 rpm 離心 1 分鐘後丟棄濾液收集管，更換新的收集管加入 500 μ L buffer AW2，以 14,000 rpm 離心 3 分鐘後丟棄濾液收集管，更換新的 1.5 mL 微量離心管加入 200 μ L buffer AE，置於室溫 1 分鐘，以 8,000 rpm 離心 1 分鐘後收集濾液（DNA），該濾液檢體即可進行即時定量聚合酶鏈反應或存於-20℃備用。

檢體 RNA 萃取：取 100~200 μ L 乳劑於 1.5 mL 微量離心管，加入 1 mL TRIzol®試劑（Invitrogen, CA, USA），震盪數秒鐘。加入 200 μ L 氯仿（chloroform, Merck）振盪 20 秒，以 4℃ 12,000 rpm 離心 15 分鐘。收集上清液至另一離心管，加入等量異丙醇（isopropanol, Merck），室溫感作 10 分鐘。以 4℃ 12,000 rpm 離心 15 分鐘，保留核酸沉澱物。加入 1 mL 75%酒精洗去殘留離子（12,000 rpm 離心 5 分鐘，棄上清液），加入 100 μ L diethylpyrocarbonate（DEPC）-treated H₂O 溶解病毒 RNA，即可進行即時定量聚合酶鏈反應或存於-20℃備用。

全自動快速核酸萃取儀：本實驗引進全自動快速核酸萃取儀 MegNA pure compact instrument，利用其專用的核酸萃取套組 MegNA pure compact nucleic acid isolation kit I，一次最多可同時進行 8 個檢體，每個套組上都有條碼，操作上只需用掃描器讀取

個別套組之條碼後，放入全自動快速核酸萃取儀，按下電腦操作板上“RUN”按鍵即可。

即時定量聚合酶鏈反應：依據廠商提供手冊配製反應試劑與操作核酸增幅儀器（LightCycler 1.5, Roche, Rotkreuz, Switzerland），取 14 μ L enzyme 加入 1 管 reaction mix，輕晃混合成 1 管 master mix 備用。取 Light Cycler 專用毛細管加入反應試劑：PCR 等級 H₂O 9 μ L、檢體 DNA 5 μ L（陰性對照用滅菌水）、對 canine parvovirus type 2 VP2 gene[12]具特異性的正向引子 5'-GAAGAGTGGTTGTAAATAATA-3'（5 μ M）1 μ L、反向引子 5'-CCTATATCACCAAAGTTAGTAG-3'（5 μ M）1 μ L（增幅產物大小為 682 bp）、master mix 4 μ L。置入 Light Cycler 上依據手冊建議設定程式、反應時間及溫度如下。preincubation: 95℃，10 分鐘；amplification: 95℃，10 秒；55℃，4 秒；72℃，22 秒（設定為單點擷取螢光訊號），共計 45 個循環，再做 melting curve：95℃，0 秒鐘；65℃，15 秒鐘；95℃，0 秒鐘（降溫速率 0.1℃/秒，設定為連續偵測）。然後 cooling: 40℃，30 秒鐘。反應完成後於電腦檢視螢光訊號及是否有 primer dimer 或其他非特異性產物。

自動化資訊系統規劃：網路搜尋及資詢國內外相關機構。

結果

已建立犬小病毒即時定量聚合酶鏈反應診斷技術：以犬小病毒核酸進行敏感性試驗，模板 DNA 用量為 100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg 皆有螢光訊號，而稀釋至 1 pg 時仍可觀察到螢光訊號且由 melting curve 並未發現非特異訊號，顯示以犬小病毒核酸所進行之即時定量聚合酶鏈反應技術兼具敏感性與特異性。（如圖 1、2、3）

疾病檢驗自動化前置作業：本年度已完成動物疾病診斷中心各項檢驗表格，組織架構上以病理診斷實驗室為中心，建立之流程如圖 4，與各診斷實驗室相互平行支援，目前已完成疾病檢驗紀錄建檔，本年度完成

各項動物病例檢驗服務 2,043 件、病理學檢驗檢體 10,010 件、水禽疾病病原核酸檢驗約 1,200 件、草食動物疾病病原核酸檢驗約 1,200 件、家禽疾病病原核酸檢驗 2,707 件，共計 5,107 件。

自動化資訊系統規劃：

網路資源：利用網路上較為常用的幾個搜尋引擎，例如 google、yahoo、AOL 等，找尋國內外相關資訊，有幾個網站可供參考 VisuaLab、Automated Technologies Incorporated (ATI)、Health Level Seven (HL7)、LOINC、SNOMED 等[3, 15, 16, 17, 18, 19]。

國內資訊廠商：由於目前國內沒有相關獸醫機構使用類似的資訊系統，但有相關資訊廠商可以接受委託開發此系統，所以可透過該資訊廠商規劃設計。

國外相關機構：觀摩美國印第安那州動物疾病診斷實驗室及肯塔基州家畜疾病診斷中心實施多年的實驗室資訊管理系統，藉由實際參與檢體送檢與檢驗流程，獲得相關資訊與經驗，攜回該實驗室資訊管理系統介面以供參考。

討論

94 年度經由網路搜尋及資詢國內外相關機構及舉辦數場座談會之結果，綜合彙整如下：(一)網路資源：可找到國內相當多有關「資訊管理系統」、「實驗室資訊管理系統」或「掛號、病歷管理系統」等等，發現多數實驗室資訊管理系統與獸醫機構無關，僅掛號、病歷管理系統多應用於人醫看診體系，以及少數資訊廠商開發套裝軟體可資應用於一般動物醫院管理門診掛號與病歷。(二)國內資訊廠商：目前透過座談會方式，已聽取幾家資訊廠商做過簡報與使用示範，惟國內並無適當之套裝軟體可資使用，適合獸醫疾病診斷使用之實驗室資訊管理系統可由國外引進，使用介面為英文語系，仍需修改為中文介面，而且價格較為昂貴，但其優點為可強化實驗室物流管理與實驗品管 (QC)；另一選擇為自行開發，優點是量身訂做較符合實際所需，缺點是價格不便宜且耗費時間長。(三)國外相關機構：經由觀摩美國印第安那

州動物疾病診斷實驗室及肯塔基州家畜疾病診斷中心實施多年的實驗室資訊管理系統，並實際參與檢體送檢與檢驗流程，發現前述機構均有專責資訊人員負責管理系統與維護，甚至有能力自行改善系統，他們的經驗均為購置套裝系統後，視應用之實際狀況再自行改良以符合實需，所以，如果將來以購買套裝系統或委託開發，都需考量實際應用後之狀況可能需要修改系統程式，如果沒有專責資訊人員，也必須要委外辦理，如此資訊管理系統才能越用越好用，得以發揮功效。

本研究已初步建立檢體檢驗自動化系統之雛型，其中包括利用全自動快速核酸萃取儀進行核酸萃取，平均每個檢體約可節省 20 分鐘，且每次可同時送進 8 個檢體，利用 Roche LightCycler SYBR green 的系統進行 real-time PCR，可省去了傳統 PCR 增幅產物後所必須的瓊膠電泳分析，45 個 PCR 循環加上 Tm 曲線的鑑定過程在 30 分鐘內就可以得到結果，可比傳統 PCR 節省約 3 小時的時間，不單單只是可以節省等待跑膠結果的時間，另可減少因跑膠時 DNA 污染所導致之誤判，而且利用電腦來分析螢光強度的敏感度也較以肉眼判讀瓊膠上的 DNA 條帶 (band) 高出許多。所以，本技術可資應用於檢體量爆增或是有大流行爆發時作為快速篩檢之用，可以提早將檢驗結果提供給送檢單位參考給予適當防範措施。95 年度擬彙整國內外自動化系統之資訊，結合本所動物疾病診斷中心之實務操作經驗及需求，逐步建構適合本動物疾病診斷中心之自動化資訊網絡系統。

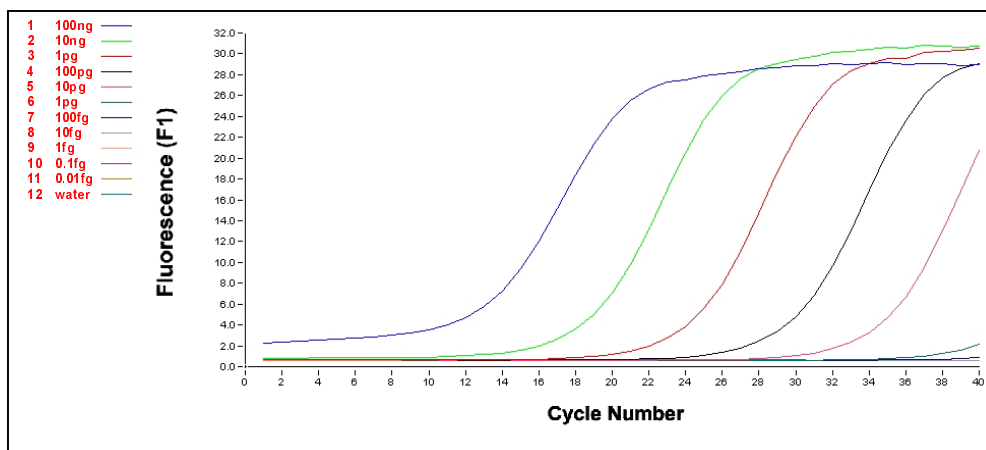


圖 1、敏感度試驗結果：以 SYBR Green 為螢光所進行 real-time PCR 之螢光強度與 PCR 循環數作圖，可見陰性對照組於 rear-time PCR 反應 40 個循環時，螢光強度並無上升。

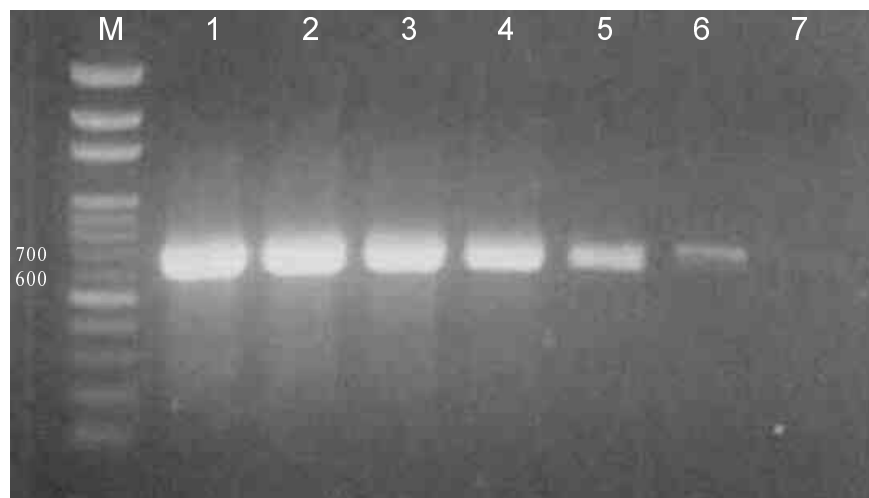


圖 2、確認核酸偵測結果，1-6 排即時聚合酶鏈反應增幅產物（100 ng 至 1 pg），產物大小為 682 bp。

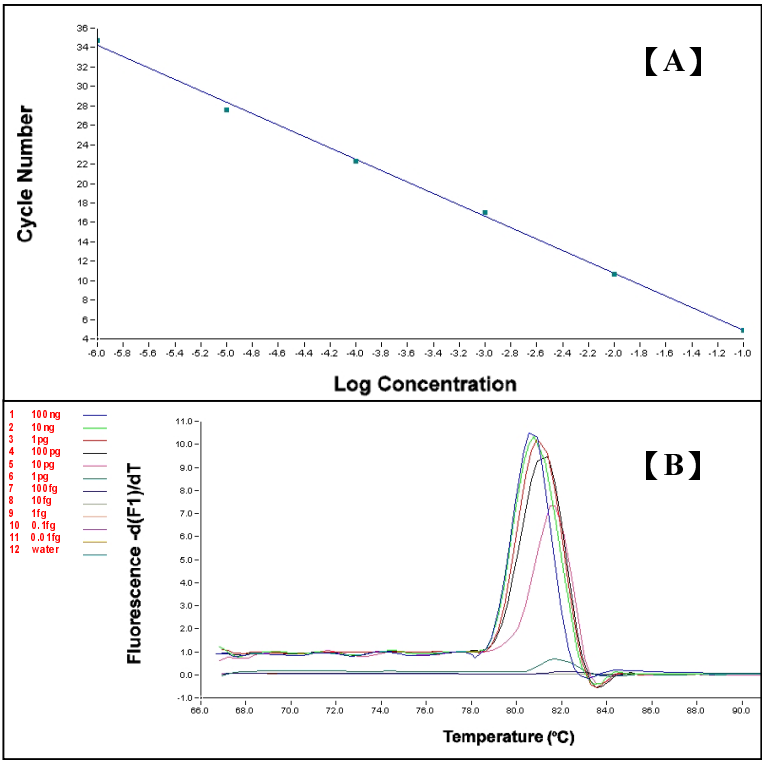


圖 3、將 10 倍序列稀釋的病毒核酸（100 ng 至 0.01 fg）以 canine parvovirus type 2 VP2 gene 具特異性的引子進行即時 PCR。(A) 分析標準曲線 (B) Melting curve。

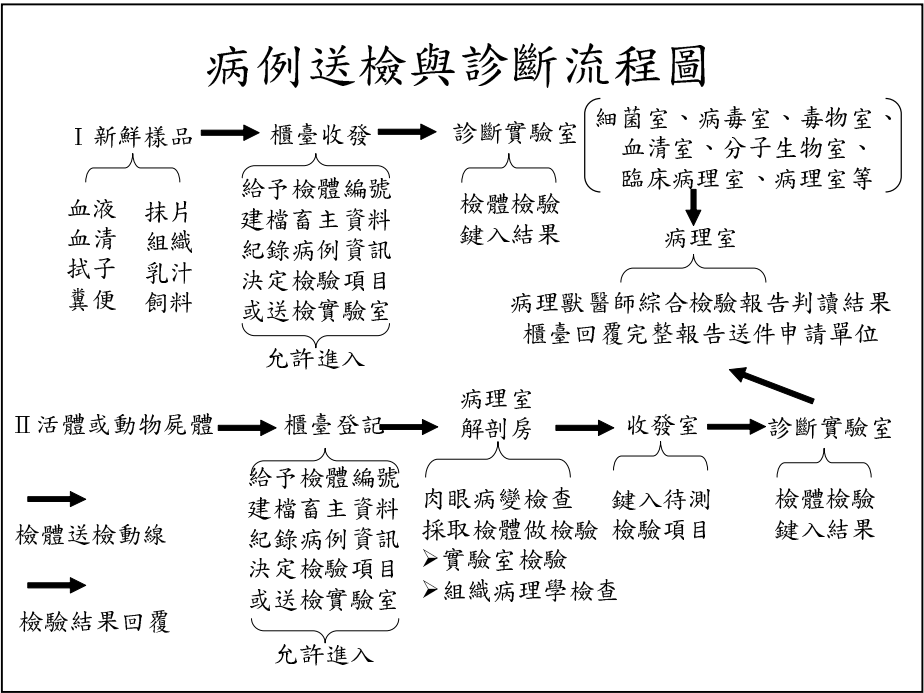


圖 4、各診斷實驗室檢驗流程

参考文献

- Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Trani LD, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavoglia C. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet Microbiol* 105 : 19-28, 2005
- Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Elia G, Martella V, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia C. Canine parvovirus infection : Which diagnostic test for virus? *J Virol Methods* 126 : 179-185, 2005
- Friedman BA. The total laboratory solution : a new laboratory e-business model based on a vertical laboratory meta-network. *Clin Chem* 47 : 1526-1535, 2001
- Lee CW, Suarez DL. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *J Virol Methods* 119 : 151-158, 2004
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 10 : 190-212, 2004
- Makino S, Cheun HI. Application of the real-time PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores. *J Microbiol Methods* 53 : 141-147, 2003
- Oggioni MR, Meacci F, Carattoli A, Ciervo A, Orru G, Cassone A, Pozzi G. Protocol for real-time PCR identification of anthrax spores from nasal swabs after broth enrichment. *J Clin Microbiol* 40 : 3956-3963, 2002
- Papin JF, Vahrson W, Dittmer DP. SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile virus circumvents false-negative results due to strain variability. *J Clin Microbiol* 42 : 1511-1518, 2004
- Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J Clin Microbiol* 42 : 257-263, 2004
- Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol* 42 : 1290-1293, 2004
- Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ and McKay DB. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infectious Diseases* 2 : 1-7, 2002
- Senda M, Parrish CR, Harasawa R, Gamoh K, Muramatsu M, Hirayama N, Itoh O. Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines. *J Clin Microbiol* 33 : 110-113, 1995
- Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 40 : 3256-3260, 2002
- Tewari D, Kim H, Ferial W, Russo B, Acland H. Detection of West Nile virus using formalin fixed paraffin embedded tissues in crows and horses : quantification of viral transcripts by real-time RT-PCR. *J Clin Virol* 30 : 320-325, 2004
- Automated Technologies Incorporated (ATI), <http://www.atiinternational.com> or <http://216.169.167.138/web/>
- Health Level Seven (HL7), <http://www.hl7.org/>
- Logical Observation Identifiers Names and Codes (LOINC), <http://www.regenstrief.org/loinc/>
- SNOMED®, <http://www.snomed.org/>
- VisuaLab, <http://www.visualab.com/>

Introducing and application of the automated system to animal health inspection and quarantine

Chang JC*, Lee SH, Chang KH, Tsai KR, Lee MS, Ting LJ, Chen YP
Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive of Yuan

Abstract We have set up the real-time PCR machine and the procedure of the nucleic acid detection with real-time polymerase chain reaction (PCR). The procedure was applied to detect canine parvovirus firstly. The level of nucleic acid which could be detected by the constructed assay in this study was as low as 1 pg. The standard curve about the relationship between concentration of nucleic acid and cycle numbers could be applied to quantify the nucleic acid. Information provided from Indiana Animal Disease Diagnostic Laboratory (ADDL) and Kentucky Livestock Disease Diagnostic Center (LDDC) can be applied successfully to set up an automated information system for animal inspection and quarantine in the future.

Keywords : *Real-time PCR, Automated information system, Animal health inspection and quarantine*

*Corresponding Author
Animal Health Research Institute