

豬生殖與呼吸綜合症病毒歐洲與美洲型區別診斷技術之建立與應用

黃有良*、鄧明中、張家宜、黃天祥

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 豬生殖與呼吸綜合症(Porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) 為臺灣重要豬隻疾病之一，其主要經由豬生殖與呼吸綜合症病毒 (PRRS virus; PRRSV) 所引起。此病毒區分為歐洲與美洲型，由於此兩種型別的交叉保護性不佳，因此，診斷時需加以確認其型別，而為了快速且準確的診斷其型別，本試驗將建立一套快速的區別診斷方法來進行 PRRSV 型別之診斷。將利用反轉錄即時定量聚合酶反應之技術建立此區別診斷方法，此方法經敏感性與特異性測試發現，其可同時檢測歐洲型與美洲型病毒株，且不同型別之間並無交叉反應，顯示其具有良好的特異性。於病毒連續稀釋的檢測極限方面，歐洲型病毒株可達 0.89 TCID₅₀/ml，美洲型病毒株可達 3.19 TCID₅₀/ml，而於 132 個田間樣品之測試中發現，其 PRRSV 檢出率與傳統 RT-PCR 結果一致，均為 9 個陽性，且此方法也成功快速準確的診斷出此 9 個樣品之型別，均為臺灣野外分離株，此結果與 RT-PCR 的定序結果一致。綜合此結果顯示此方法具有良好的敏感性與特異性，且可彌補 RT-PCR 無法快速區別美洲型與歐洲型病毒株之缺陷，並減少 DNA 電泳膠與定序等兩個步驟與縮短一天的診斷時間。

關鍵詞：豬生殖與呼吸綜合症病毒、歐洲型、美洲型

緒言

豬生殖與呼吸綜合症 (Porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) 為臺灣常見重要豬隻病毒性疾病之一[1,2,3]，其是由 PRRS 病毒 (PRRS virus; PRRSV) 所引起，此病毒屬於 *Nidovirales* 目 *Arteriviridae* 科 *Arterivirus* 屬，為具有封套單股正向 RNA 病毒，其病毒顆粒約 45-65 nm [25]。

PRRSV 基因體全長約 15 Kb，包含 9 個開放讀碼區 (open reading frame; ORF)，從 5' 至 3' 端之基因排序分別為 5'UTR-ORF1a-ORF1b-ORF2a-ORF2b-ORF3-ORF4-ORF5-ORF6-ORF7-3'UTR，其中 ORF1a 與 1b 大約佔全體基因體 80%，主要轉譯出 pp1a 與 pp1b 兩種蛋白，且經由細胞與病毒蛋白酶切割後可產生 12 個非結構蛋白，此 12 個非結構蛋白主要與病毒複製有關。而 ORF2 至 ORF7 則分別轉譯為

GP2a、GP2b、GP3、GP4、GP5、M、N 等結構蛋白 [8,20,23]，其中 ORF5 基因最常被使用於 PRRSV 的分子流行病學之研究；而依據過去文獻所發表之分子流行學研究發現，PRRSV 可區分為歐洲型與美洲型兩種，此兩種的基因序列相似性僅有 60% 且兩者之間並無交叉保護 [4,20]，歐洲型 PRRSV 區分為 3 個基因亞型，主要分佈於歐洲，但也有許多的亞洲國家如中國 [18,19]、日本 [13]、南韓 [17]、泰國 [9,22] 等均有歐洲型 PRRSV 的疫情；而美洲型 PRRSV 則區分為 9 個基因亞型，其主要流行於美洲與亞洲地區，於亞洲地區有包括中國 [18,19]、日本 [14]、南韓 [17]、泰國 [9、22] 與臺灣 [8] 等國家發生美洲型 PRRSV 之疫情；另外，中國於 2006 年發生高病原性 PRRS (Highly-pathogenic PRRS; HP-PRRS) 之疫情，此病毒株被歸類於美洲型 [18,19]，之後，

此病毒株也傳播至東南亞，目前已知泰國[9,22]、柬埔寨[9]、寮國[9]、越南[9]與印尼[15]均有相關疫情發生。

臺灣自1991年即發現PRRSV的存在[2]，且經由序列分析發現在1990年代初期臺灣即有兩種PRRSV存在[8]，此兩種PRRSV均為美洲型別且隨著時間逐年突變，到2013年為止其病毒全長序列的差異性可達18.3%[8]，而從過去的PRRSV的監測紀錄發現，臺灣現行田間的流行病毒株依然以美洲型為主[8]，但近年隨著臺灣周邊各國陸續有歐洲型PRRSV的疫情發生，且國內也已核准歐洲型PRRSV疫苗的上市，因此在PRRSV的診斷上需更加精準，而為了有效快速與精準的區別診斷疑似病例的PRRSV是歐洲型或美洲型，本試驗將應用反轉錄即時定量聚合酶反應（reverse-transcription real-time PCR；RRT-PCR）之平臺，建立一套快速區別診斷歐洲與美洲型PRRSV的分子診斷技術。

材料及方法

病毒與樣品收集

為了測試本試驗所建立的PRRSV RRT-PCR診斷方法的敏感性與特異性，共收集了10株非PRRSV的豬隻病毒（包括：classical swine fever virus、swine influenza virus、swine vesicular disease virus、porcine sapelovirus、porcine enterovirus、Seneca Valley virus、porcine teschovirus、transmissible gastroenteritis virus、porcine epidemic diarrhea virus、reovirus）、3株歐洲型PRRSV（2株Lelystad virus與1株HIPRA疫苗株）、20株美洲型PRRSV（1株美洲型疫苗株、1株美洲型標準株VR2332與18株臺灣分離株）、20個來自感染CSFV或PEDV的SPF豬隻檢體並經RT-PCR確認為PRRSV之陰性與132個未經檢測的PRRSV監測樣品（56個疑似PRRSV檢體與76個精液樣品）進行相關測試。

核酸萃取

本試驗所有樣品的核酸均是使用MegNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit(Roche, Mannheim,

Germany) 萃取。

引子與探針

自NCBI基因庫下載PRRSV病毒序列並進行核酸序列比對，針對歐洲型與美洲型病毒株各自共同相似基因序列的區域內設計其歐洲型與美洲型病毒株的特異性引子與探針供後續RRT-PCR所使用，其相關核酸序列如表1。另外，本試驗也有使用到現行診斷PRRSV之RT-PCR，其引子序列也摘錄於表1。

RRT-PCR

本試驗所建立之PRRSV RRT-PCR的配方與反應條件如下：將3 μ L的樣品RNA、1X的Kappa Probe Fast qPCR Master mix (KAPA biosystems, Boston, MA, USA)、40 units的SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、0.15 μ M的ORF5-NA-P1與ORF5-EU-P1探針、0.5 μ M的ORF5-NA-F1、ORF5-U-R1與ORF5-EU-F1引子等混合於微量反應管，將此反應管置於LightCycler® 480 system即時聚合酶鏈反應器(Roche, Mannheim, Germany)反應，先以42°C 30分鐘執行RNA反轉錄酶反應，94°C處理5分鐘後，再以94°C 30秒、56°C 30秒、72°C 20秒完成45個循環PCR反應，每個PCR反應結束前均偵測螢光，當螢光值低於2.15時，則判定為陰性，螢光值高於2.15且Ct值少於40時，即判定為陽性。

RT-PCR

本試驗所使用到的之PRRSV RT-PCR的配方與反應條件則沿用Chang等2014年所發表之診斷方法[5]。

RRT-PCR敏感性與特異性測試

針對本試驗所建立之PRRSV RRT-PCR分別進行敏感性與特異性之測試，特異性測試中分別使用2株Lelystad virus、1株HIPRA疫苗株、1株美洲型疫苗株、1株美洲型標準株VR2332與18株臺灣分離株、10種非PRRSV之豬隻病毒與20個PRRSV陰性樣品進行測試；敏感性之測試中，分別將 8.9×10^4 TCID₅₀/ml HIPRA疫苗株、 3.16×10^6 TCID₅₀/ml的美洲型疫苗株與 3.89×10^6 TCID₅₀/ml的臺灣分離

株進行連續10倍稀釋，以評估此檢測方法的檢測極限；此敏感性經由三次重複檢測後，計算其變異係數。

RT-PCR與RRT-PCR的敏感性比較

將比較RT-PCR與RRT-PCR於檢測極限與疑似病例中PRRSV的檢出率比較，於檢測極限比較中，選取上述RRT-PCR檢測極限試驗之病毒株進行連續稀釋，再分別使用RT-PCR與RRT-PCR進行檢測，以比較此兩種檢測方法之檢測極限。

RRT-PCR的應用

從田間收集132個PRRSV監測樣品，先以本試驗所建立之RRT-PCR進行檢測，以了解此檢測方法應用於臨床樣品監測之情況，同時將此檢體進行PRRSV RT-PCR的檢測，並將此兩種檢測之結果進行交叉比對，以了解此兩種檢驗方法之差異。

結果

判定標準之設立

將20個PRRSV陰性樣品進行PRRSV RRT-PCR測試，其結果顯示所有樣品於RRT-PCR歐洲型與美洲型檢測的螢光值均低於2.15；陽性對照的螢光值均高於2.15，因此，將此兩種型判定的螢光基準值設定為2.15（圖1與2）。當進行陽性樣品連續稀釋時，以2.15的螢光值做為判定基準，其檢測極限的Ct值均低於40（圖3與4），因此，將陽性樣品之判定設定在以2.15的螢光值判定基準且Ct值需小於40。

特異性分析

此測試中，2株Lelystad virus與1株HIPRA疫苗株經PRRSV RRT-PCR檢測均顯示為歐洲型陽性與美洲型陰性（圖1），而美洲型疫苗株、美洲型標準株VR2332與18株臺灣分離株的檢測結果則為歐洲型陰性與美洲型陽性（圖2），此結果均符合其原本病毒株的型別。以10種非PRRSV豬隻病毒進行PRRSV RRT-PCR測試，其結果均為歐洲型與美洲型陰性（圖1與2）。將20個PRRSV陰性樣品進行PRRSV RRT-PCR測試，結果於歐洲型與美洲型的檢測均為陰性（圖1與2）。

敏感性分析

分別將HIPRA疫苗株、美洲型疫苗株與臺灣分離株病毒連續10倍稀釋，萃取核酸後，以PRRSV RRT-PCR檢測，結果顯示HIPRA疫苗株於歐洲型的反應中可檢測至0.89 TCID₅₀/ml（圖3）；而美洲型疫苗株於美洲型的反應中可檢測至3.16 TCID₅₀/ml（圖4A）；臺灣分離株於美洲型的反應中可檢測至3.89 TCID₅₀/ml（圖4B）。經由三重複試驗，歐洲型檢驗方法的CV值介於0.14至2.58%之間，美洲型檢驗方法於美洲型疫苗株的CV值介於0.08至1.17%之間，臺灣分離株的CV值介於0.23至0.96%之間。

RT-PCR與RRT-PCR的敏感性比較

將上述連續稀釋的HIPRA疫苗株、美洲型疫苗株與臺灣分離株樣品同樣進行PRRSV RT-PCR之檢測，其RT-PCR於HIPRA疫苗株的檢測極限為8.9 TCID₅₀/ml（圖5），於美洲型疫苗株與臺灣分離株的檢測極限分別為31.6與38.9 TCID₅₀/ml（圖5），RT-PCR於歐洲型與美洲型PRRSV的檢測極限均較上述PRRSV RRT-PCR的檢測極限少10倍。

RRT-PCR的應用

將田間所收集的132個PRRSV監測樣品進行RRT-PCR檢測，56個疑似PRRSV檢體中檢出9個美洲型與0個歐洲型，此結果與後續經由RT-PCR檢測並經定序確認為美洲型的結果相同；而76個精液樣品於RRT-PCR與RT-PCR的檢測結果則均呈陰性（表2）。此結果顯示，RT-PCR與RRT-PCR於疑似病例的檢出率相同均為16%，但RRT-PCR在型別鑑定上減少DNA電泳膠與定序等兩個步驟，並縮短一天的診斷時間。

討論

本試驗應用RRT-PCR成功建立一套區別歐洲型與美洲型PRRSV病毒株的診斷方法，將可有效快速準確檢測PRRSV並分型，本試驗建立之RRT-PCR測試方法檢測不受其它豬隻病毒所影響，且兩種型別間也不會出現偽陽性，顯示良好的特異性，且檢測極限也較RT-PCR檢驗方法敏感10倍，表示其具有較佳之敏感性。另外，在操作上RRT-PCR減少RT-PCR反應所

需之電泳分析與定序分析兩大檢驗步驟，可減少現有診斷工作天數達一天以上，將診斷時間縮短於一天以內。由於RT-PCR檢測方法需經電泳分析且依據所檢測標的核酸長度進行人工判讀，當偽陽性反應之核酸片段長度接近標的核酸之長度時，容易發生誤判，而降低其特異性，反之，RRT-PCR則是以特異性探針進行偵測，此舉將可大幅提高RRT-PCR的特異性。

RRT-PCR已廣泛被使用在多種動物或人類疾病之檢測，近年來隨著RRT-PCR反應器的改進與效能提升，此檢測平台已可同時偵測多種標的基因。本試驗應用此平台成功開發出可同時檢測歐洲型與美洲型PRRSV的診斷方法，而這樣的區別診斷平台也已被成功應用在許多人類或動物疾病病原之檢測，如：家禽傳染性支氣管炎病毒基因型的區別診斷[23]、豬E型肝炎病毒基因型別的區別診斷[12]、A型輪狀病毒疫苗株與野外株之區別診斷[11]等，顯示隨著分子診斷技術平台的開發，分子診斷方法已由傳統檢測單一標的的RT-PCR檢測技術，提升為可同時檢測多種標的的RRT-PCR檢測技術，而本試驗利用RRT-PCR檢測平台所開發的PRRSV歐洲型與美洲型區別診斷方法除了可精準診斷其型別外，其敏感性也較傳統RT-PCR更為敏感，將可逐漸取代RT-PCR，做為未來PRRSV的分子診斷方法。

臺灣現行國內豬場所流行的PRRSV以美洲型病毒株為主[8]，且國內有核准使用美洲型與歐洲型PRRSV活毒減毒疫苗防治PRRS。然而，使用活毒減毒疫苗的過程中，該疫苗株病毒會在場內循環感染，因此，國內所送檢的檢體中可能有臺灣野外病毒株、美洲型疫苗株與歐洲型疫苗株等PRRSV存在，且不同型PRRSV之間的交叉保護性不佳[15]，所以在PRRSV的疾病診斷上，型別的確證很重要，而傳統病毒分離的敏感性與特異性不佳且無法有效區別歐洲型與美洲型病毒株；至於傳統的RT-PCR檢測雖然可同時檢測歐洲型與美洲型，但型別檢測需經由定序方可知其型別，在疾病爆發與大規模監測並不適用。反之，本試驗所開發的PRRSV RRT-PCR具有良好的特異性與敏感性，可有效彌補傳統病毒分離與RT-PCR的不

足，但其缺點為無法有效區別美洲型疫苗株與臺灣美洲型病毒株，因此，無法做為最終診斷，僅能作為PRRSV診斷與大規模監測使用時第一階段的初篩使用。

PRRSV主要危害豬隻的呼吸與繁殖系統，其中呼吸系統的危害通常發生在保育豬群，繁殖系統之危害則主要影響種豬群之繁殖性能[25]，從過去的文獻發現種公豬不管是感染野外PRRSV或是免疫活毒減毒疫苗均會從生殖系統排出帶有PRRSV之精液[6, 7]，並經人工授精或自然交配感染母豬，引發母豬繁殖障礙，顯示精液是PRRSV重要的傳染源之一。然而，近年來隨著豬場商業化飼養的普及率愈來愈高，人工受精與外購精液的比例也逐年上升，因此，精液的品管極為重要，必須定期檢測場內種公豬精液是否帶有PRRSV與檢測外購精液是否為PRRSV陰性，方可有效降低因精液帶有PRRSV所引發之母豬繁殖障礙。於本試驗所收集的76個精液檢體中，並無檢出任何PRRSV，顯示這些種公豬並無感染PRRSV，而這樣監控種公豬感染PRRSV之模式，將可有效早期發現種公豬感染PRRSV之情況，且進一步防止PRRSV於場內之擴散，此模式也可做為各場監控種公豬感染PRRSV之借鏡。

綜合以上，本試驗所建立之PRRSV RRT-PCR診斷方法，可有效區別歐洲型與美洲型PRRSV並具有良好的特異性與敏感性，此檢測方法之敏感性較RT-PCR更為敏感10倍，並減少DNA電泳膠與定序等兩個步驟與縮短一天的診斷時間。經田間樣品測試也可精準分型，這些功能將可彌補現行PRRSV RT-PCR的診斷缺陷，並做為未來田間監控PRRSV流行之利器。

誌謝

感謝行政院農業委員會動植物防疫檢疫局提供計畫經費(103農科-10.1.1-檢-B3)與豬瘟研究組同仁的協助，讓本試驗可順利完成，在此一併感謝。

表 1、引子與探針序列。

引子與探針	序列	備註
ORF5-NA-F1	5'-ATGTTGGAGAAATGCTTGA-3'	RRT-PCR
ORF5-U-R1	5'-GTGCCATTCAGCTCACATA-3'	
ORF5-NA-P1	5'-FAM-TGTGGTGTATCGTGCCGTCCTG-BBQ-3'	
ORF5-EU-F1	5'-CGTTTCTTGACTCCTCACTC-3'	
ORF5-EU-P1	5'-YAK-TGGTCCTTTGTGCGATGGCAACG-BBQ-3'	
PRRSV-ORF7F	5'-AAAAGCCTCGTGTGGGTGGCA-3'	RT-PCR
PRRSV-ORF7R	5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTGACT-3'	

表 2、132 個 PRRSV 監測樣品中，RT-PCR 與 RRT-PCR 的檢測結果。

檢測方法	結果	RRT-PCR	
		美洲型陽性/歐洲型陽性	美洲型陰性/歐洲型陰性
RT-PCR	陽性	9 ^a /0	0/0
	陰性	0/0	123/132

^a此 9 個陽性樣品的 RT-PCR 產物經定序均為美洲型。

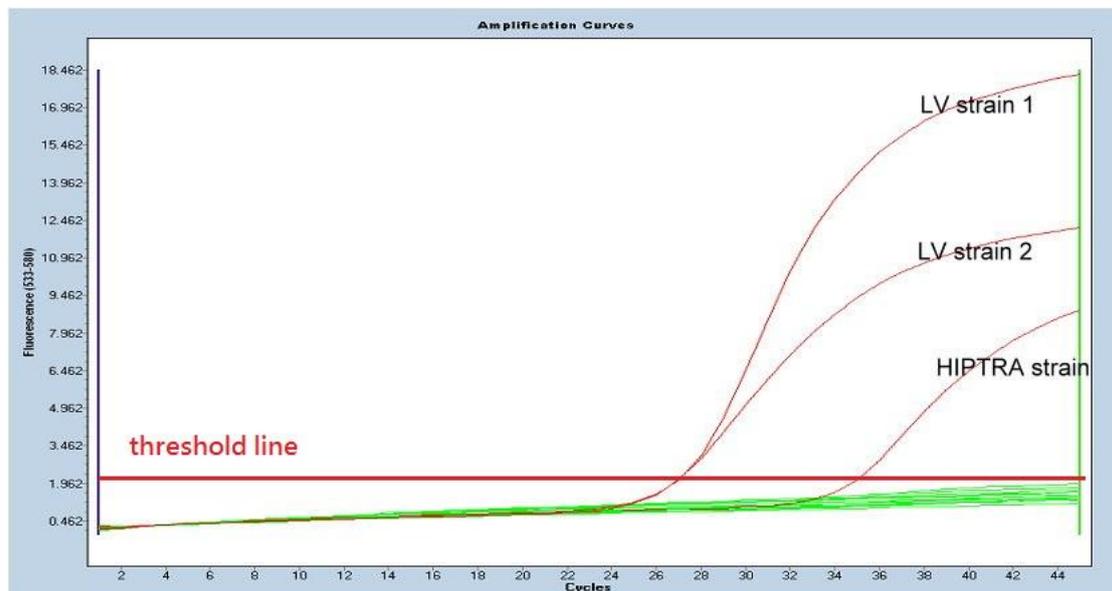


圖 1、PRRSV RRT-PCR 區別診斷方法中針對歐洲型鑑定的特異性分析，其中紅色曲線代表歐洲型陽性反應，包括 Lelystad virus (LV) 與 HIPTRA 疫苗株，綠色線代表歐洲型陰性反應，包括美洲型病毒、非 PRRSV 豬隻病毒與 PRRSV 陰性樣品。

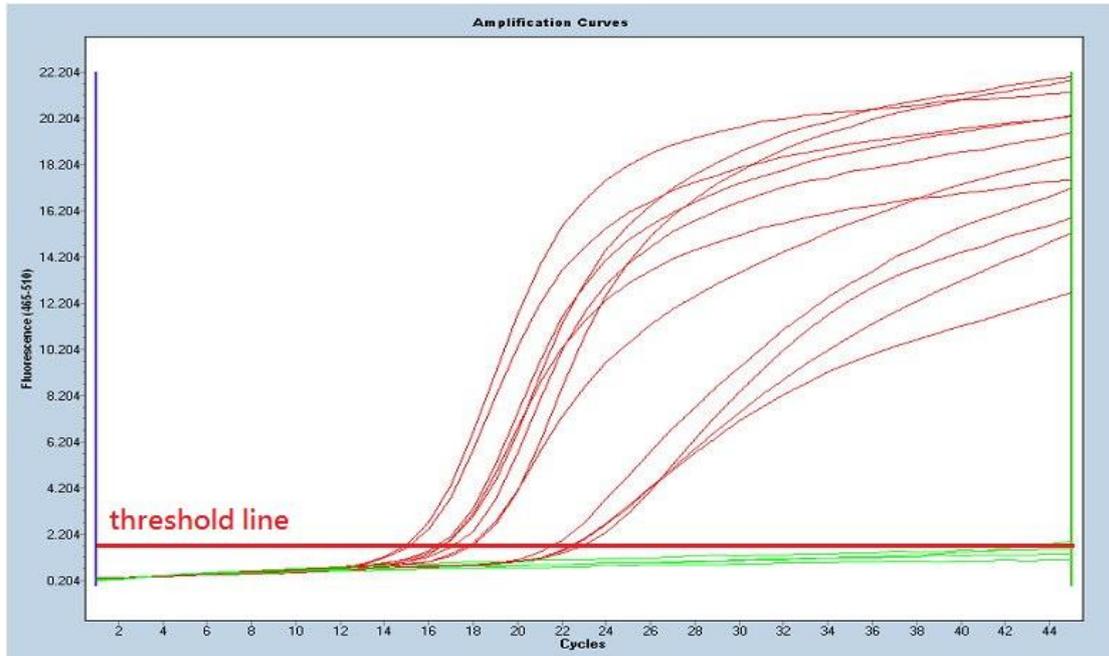


圖 2、PRRSV RRT-PCR 區別診斷方法中針對美洲型鑑定的特異性分析，其中紅色曲線代表美洲型陽性反應，包括美洲型疫苗株、標準株與臺灣分離株，綠色線代表美洲型陰性反應，包括歐洲型 PRRSV、非 PRRSV 豬隻病毒與 PRRSV 陰性樣品。

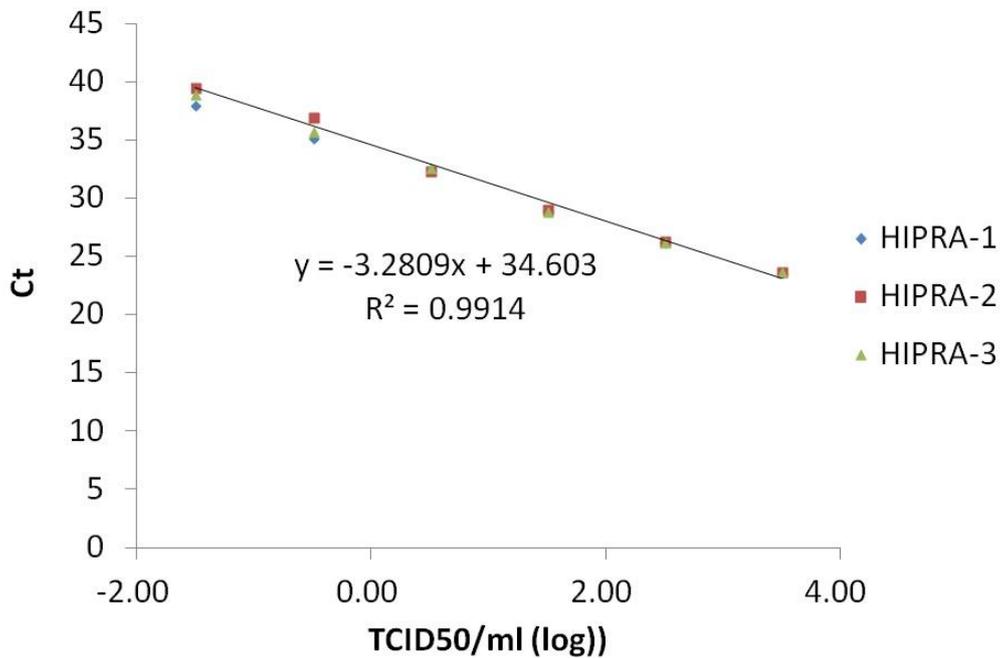


圖 3、PRRSV RRT-PCR 區別診斷方法中針對歐洲型鑑定的檢測極限，將含有 8.9×10^4 TCID₅₀/ml 的 HIPRA 疫苗株進行連續稀釋，並重複檢測 3 次，其可檢測至 0.89 TCID₅₀/ml。

豬生殖與呼吸綜合症病毒歐洲與美洲型區別診斷技術之建立與應用

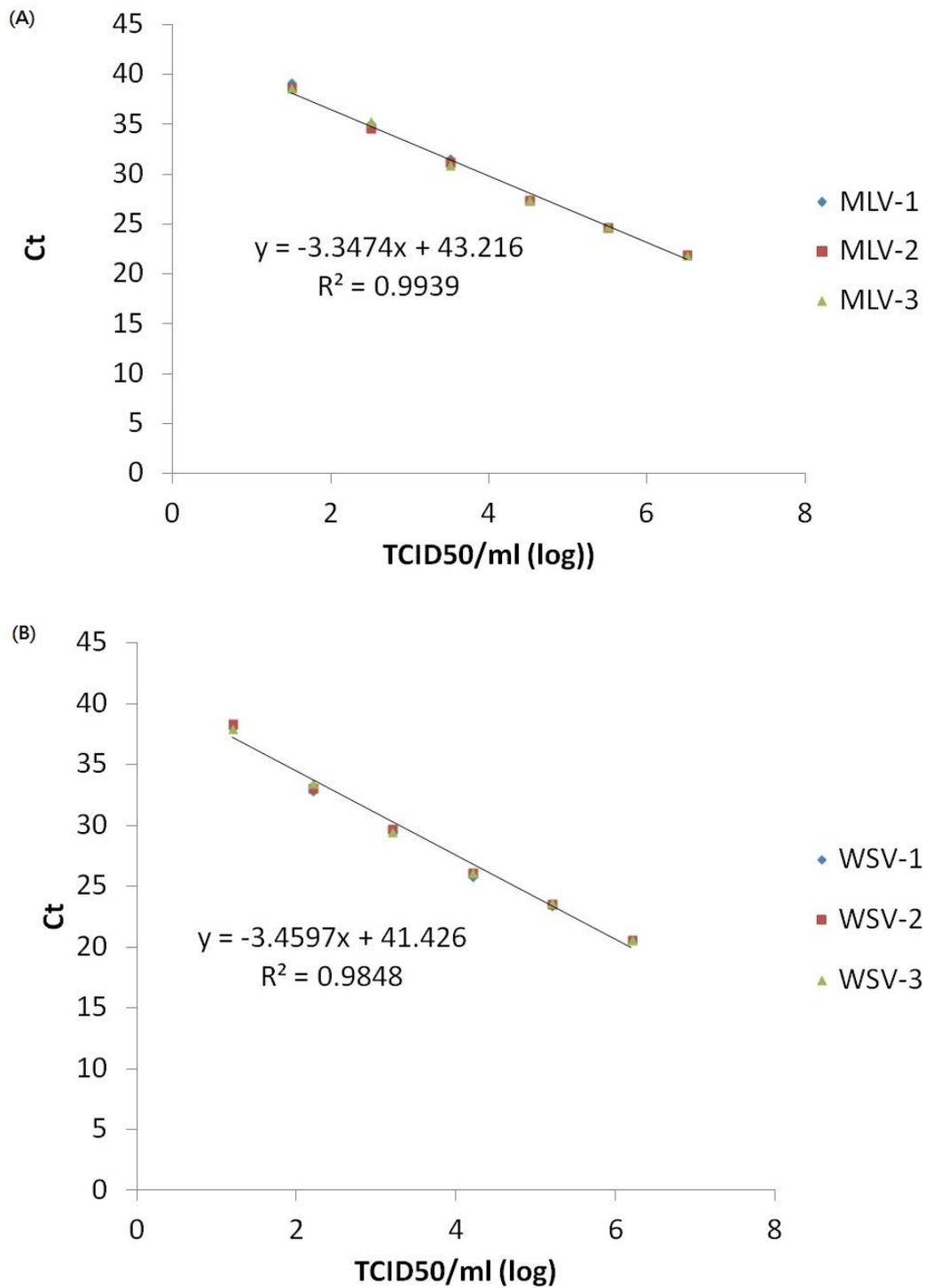


圖 4、PRRSV RRT-PCR 區別診斷方法中針對美洲型鑑定的檢測極限，將含有 3.16×10^6 TCID₅₀/ml 的美洲型疫苗株 (A) 與 3.89×10^6 TCID₅₀/ml 的臺灣分離株 (B) 進行連續稀釋，並重複檢檢 3 次，其可分別檢測至 3.16 與 3.89 TCID₅₀/ml。

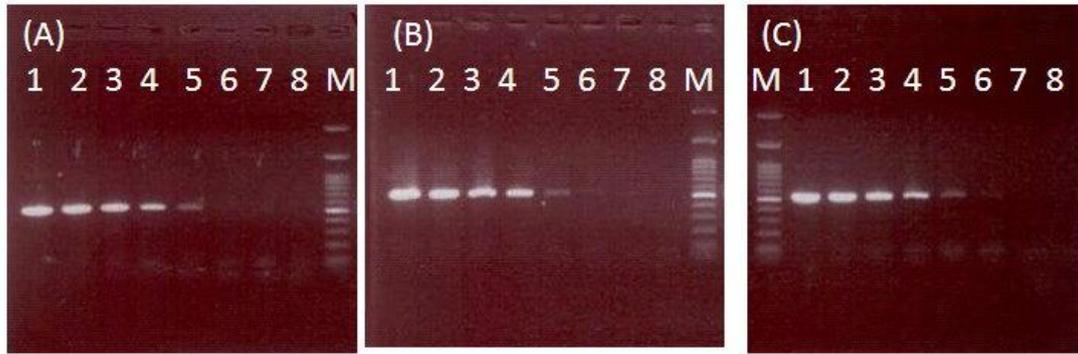


圖 5、PRRSV RT-PCR 於歐洲與美洲型病毒株的檢測極限。將含有 8.9×10^4 TCID₅₀/ml 的 HIPRA 疫苗株(A)、 3.16×10^6 TCID₅₀/ml 的美洲型疫苗株(B)與 3.89×10^6 TCID₅₀/ml 的臺灣分離株(C)進行連續稀釋，其可分別檢測至 8.9、31.6 與 38.9 TCID₅₀/ml。M 為標準 DNA 標示，1-8 分別為病毒原液與連續 10 倍稀釋之樣品。

參考文獻

1. 李淑慧、蔡國榮、張仁杰、涂央昌、鄭明珠、丁履紉、李敏旭、陳燕萍、許偉誠、莊為傑、陳金蘭、鍾明華。臺灣動物重要疾病流行病學與疾病控制模式研究。家畜衛試所研報 47: 61-76, 2012。
2. 張志成、鍾文彬、林敏雯、楊平政、翁仲男、邱雲棕、張文發、朱瑞民。臺灣地區豬繁殖與呼吸道症候群 I. 病毒分離。中華獸醫誌 19: 268-276, 1993。
3. 楊程堯、張聰洲、林昭男、蔡敬屏、邱明堂。臺灣地區豬呼吸道疾病綜合症相關病原之分析。臺灣獸醫誌 33: 40-46, 2007。
4. Allende R, Lewis TL, Lu Z, Rock DL, Kutish GF, Ali A, Doster AR, Osorio FA. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. J Gen Virol 80: 307-315, 1999.
5. Chang CY, Deng MC, Wang FI, Tsai HJ, Yang CH, Chang C, Huang YL. The application of a duplex reverse transcription real-time PCR for the surveillance of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. J Virol Methods 201: 13-19, 2014.
6. Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Chase CL, Yaeger MJ, Benfield DA. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. J Vet Diagn Invest 7: 456-464, 1995.
7. Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK, Benfield DA. Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. Am J Vet Res 58: 40-45, 1997.
8. Deng MC, Chang CY, Huang TS, Tsai HJ, Chang C, Wang FI, Huang YL. Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated from 1991 to 2013 in Taiwan. Arch Virol 160: 2709-2718, 2015
9. Faisal F, Widayanti R, Haryanto A, Tabu CR. Molecular identification and genetic diversity of open reading frame 7 field isolated porcine reproductive and respiratory syndrome in North Sumatera, Indonesia, in the period of 2008-2014. Vet World 8: 875-880, 2015.
10. Firth AE, Zevenhoven-Dobbe JC, Wills NM, Go YY, Balasuriya UB, Atkins JF, Snijder EJ, Posthuma CC. Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. J Gen Virol 92:1097-1106, 2011.
11. Gautam R, Mijatovic-Rustempasic S, Esona MD, Tam KI, Quaye O, Bowen MD. One-step multiplex real-time RT-PCR assay for detecting and genotyping wild-type group A rotavirus strains and vaccine strains (Rotarix® and RotaTeq®) in stool samples. Peer J 4: e1560, 2016.
12. Gerber PF, Xiao CT, Cao D, Meng XJ, Opriessnig T. Comparison of real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of swine hepatitis E virus in fecal samples. J Clin Microbiol 52: 1045-1051, 2014.
13. Iseki H, Takagi M, Kawashima K, Shibahara T, Kuroda Y, Tsunemitsu H. Type I porcine

- reproductive and respiratory syndrome virus emerged in Japan. In: 22nd International Pigs Veterinary Society Congress. International Pigs Veterinary Society, pp 978, 2012.
14. Iseki H, Takagi M, Miyazaki A, Katsuda K, Mikami O, Tsunemitsu H. Genetic analysis of ORF5 in porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan. *Microbiol Immunol* 55: 211-216, 2011.
 15. Jantafong T, Sangtong P, Saenglub W, Mungkundar C, Romlamduan N, Lekchareonsuk C, Lekcharoensuk P. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Thailand and Southeast Asia from 2008 to 2013. *Vet Microbiol* 176: 229-238, 2015.
 16. Lager KM, Mengeling WL, Brockmeier SL. Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. *Am J Vet Res* 60: 1022-1027, 1999.
 17. Lee JA, Lee NH, Lee JB, Park SY, Song CS, Choi IS, Lee SW. Genetic diversity of the Korean field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Infect Genet Evol* 40: 288-294, 2016.
 18. Li B, Fang L, Liu S, Zhao F, Jiang Y, He K, Chen H, Xiao S. The genomic diversity of Chinese porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from 1996 to 2009. *Vet Microbiol* 146: 226-237, 2010.
 19. Liu JK, Wei CH, Yang XY, Hou XL, Dai AL, Li XH, Wei MK, Pan XZ. Genetic diversity and evolutionary characterization of Chinese porcine reproductive and respiratory syndrome viruses based on NSP2 and ORF5. *Arch Virol* 158:1811-1816, 2013.
 20. Murtaugh MP, Elam MR, Kakach LT. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol* 140:1451-1460, 1995.
 21. Music N, Gagnon CA. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Animal Health Res Rev* 11:135-163, 2010.
 22. Nilubol D, Tripipat T, Hoonsuwan T, Tipsombatboon P, Piriyaongsa J. Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genotypes I and II in Thailand. *Arch Virol* 158:943-953, 2013.
 23. Padilha de Fraga A, Ikuta N, Salvador Kazantzi Fonseca A, Rosado Spilki F, Balestrin E, Dias Rodrigues C, Wageck Canal C, Ricardo Lunge V. A real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for differentiation of Massachusetts vaccine and Brazilian field genotypes of avian infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 60:16-21, 2016.
 24. Snijder EJ, Meulenbergh JJ, The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 79: 961-979, 1998.
 25. Zimmerman JJ, Benfield DA, Dee, SA, Murtaugh MP, Stadejek T, Stevenson GW, Torremorell M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Porcine Arterivirus), In: *Disease of Swine*. 10th ed. Edited by Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Blackwell Publishing Ltd. Chapter 31, 461-486, 2012.

The Application and Development of a Differential Method between of European Type and North American Type of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Taiwan

YL Huang^{*}, MC Deng, CY Chang, TS Huang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture

Abstract Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is one of the important swine diseases and is caused by PRRS virus (PRRSV), which is divided into European (EU) and North American (NA) types. Due to the cross-protection between two types was poor, the PRRSV diagnosis was needed to confine its type. Therefore, the aim of the study was to develop a differential method between two types of PRRSV. The differential reverse-transcription real-time PCR (RRT-PCR) of PRRSV was established. It was able to differentiate between NA and EU types and was not cross-reaction between two types. The detected limited was reached to the 3.19 and 0.89 TCID₅₀/ml for NA and EU types, respectively. Compared with RT-PCR, the detected limits of the differential RRT-PCR were more sensitive. In the test of clinical samples, a total of 132 clinical samples were detected by RT-PCR and differential RRT-PCR in this study. The results of both RT-PCR and different RRT-PCR were the same that only 9 samples were PRRSV positive. These samples were all NA type by diagnosis of different RRT-PCR and were also coincident with the result of sequencing. In conclusion, the differential RRT-PCR of the study was able to differentiate between NA and EU types and was specific and sensitive. In the diagnostic process, RRT-PCR omitted the process of gel electrophoresis and sequencing, and shortened the one diagnostic days.

Keywords: *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, European type, North American type*