

鴨小核糖核酸病毒檢測方法之建立

莊育雯

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

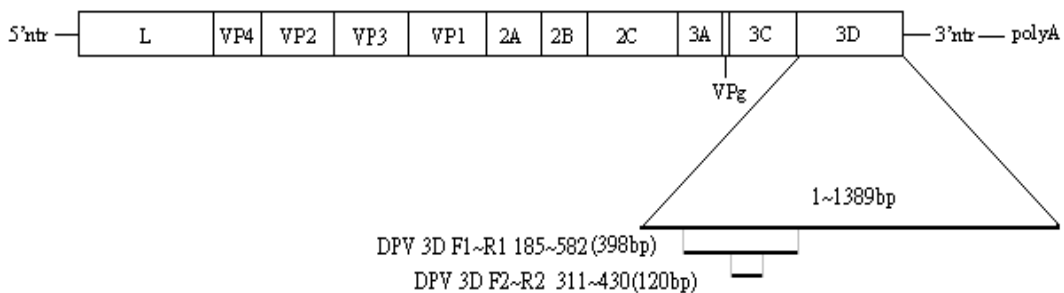
緒言

鴨小核糖核酸病毒(Duck Picornavirus, DPV)是一種類腸道病毒(entero-like virus)，主要病原性為抑制小鴨之生長發育。1990年首次從台灣野外感染新型鴨肝炎(New serotype duck hepatitis, N-DH)死亡鴨隻腸管中分離出來，經由形態學檢查、病毒理化特性試驗及基因體全長核酸定序證實此病毒屬於小核糖核酸病毒(picornavirus)。鑑於台灣尚未建立 DPV 之檢測方法，本次試驗，依據 DPV TW90A 株之 3D (RNA dependent RNA polymerase)區域之核酸序列設計特異性引子，建立 RT-PCR 之快速診斷技術，經檢測其敏感性可達 $10^{0.57}$ TCID₅₀/ml。以人工感染方式接種無 DPV 抗體之 1 日齡菜鴨，定期採集檢體，並以 Nest-PCR 偵測 DPV 特異性核酸片段，結果發現 DPV 在接種後第 8 小時到第 48 小時於小鴨體內呈全身性分佈，第 1~14 天最為顯著，直至接種後第 21 天時仍可在腦、肝臟、脾臟、胰臟、腎臟及直腸等器官檢測出病毒。小鴨經由人工接種 DPV 後，其體重與對照組有明顯的差異 ($p < 0.05$)。

材料與方法

首先先做病毒理化特性，來觀察 DPV 與 picornavirus 特性是否相符，方法包括：利用 Actinomycin D 來做核酸種類測定、溫度耐受性試驗、脂溶劑耐受性試驗、酸耐受性試驗及以 DPV 生長曲線來觀察病毒複製方式(圖二)。

在 DPV 穩定性高的 3D 部位設計一對具敏感性及特異性高的引子，再根據其 PCR 產物序列設計一段引子，以提高其敏感性。



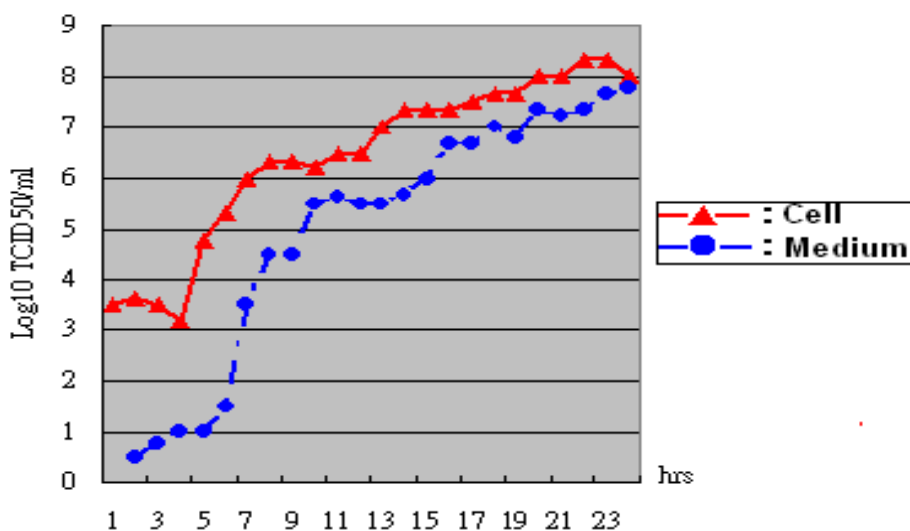
圖一. DPV 之 3D 部位簡圖

以口服方式接種 1 日齡無 DPV 抗體的菜鴨，在第 8、16、24、36 小時及第 2、4、6、10、14、21 天採集腦、肝臟、脾臟、肺臟、胰臟、腎臟、12 指腸、直腸等臟器，製成 10 倍乳劑再萃取 RNA，以 nest-PCR 進行偵測。

將 1 日齡菜鴨分別以口服、靜脈注射、肌肉注射及腹腔注射方式接種 DPV，劑量為 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml，接種後連續觀察 1 週後，並紀錄鴨隻接種前體重及接種 1 週後的體重，再將實驗組與對照組試驗前後的鴨隻體重進行分析。

結果與討論

Actinomycin D 是一種抑制 DNA 病毒複製的抗生素，處理 DPV 24 及 48 小時後結果顯示 DPV 對 actinomycin D 具有抵抗能力，由此實驗結果說明 DPV 屬 RNA 病毒。在溫度耐受性試驗、脂溶劑耐受性試驗及酸耐受性試驗方面，DPV 的病毒力價只有輕微的下降。經由 DPV 的病毒複製方式可以看到它是屬於典型 picornavirus) 之 one step growth curve 複製方式。



圖二.DPV 之生長取線圖

將 DPV 接種 1 日齡小鴨的實驗結果顯示，臟器採材以 nest-PCR 的方式檢測病毒，在接種後第 8 小時可在肝臟、脾臟、腎臟及直腸檢測到，到第 24 小時成全身性分布，到第 21 天可在部分臟器少量的增幅到。經由表一可看到最容易檢測出病毒臟器如肝臟、脾臟、腎臟及直腸等部位，因此 DPV 的檢測可採集這接部位的檢體進行病毒分離應可提高分離率。

小鴨經由靜脈及口服人工接種 DPV 後，其接種前及接種後其體重與對照組有明顯的差異，顯示 DPV 會降低感染鴨隻的飼料換肉率。

[illegible]