

犬瘟熱及其診斷技術

報告人：蔡國榮 助理研究員（疫學研究組）

壹、緒言

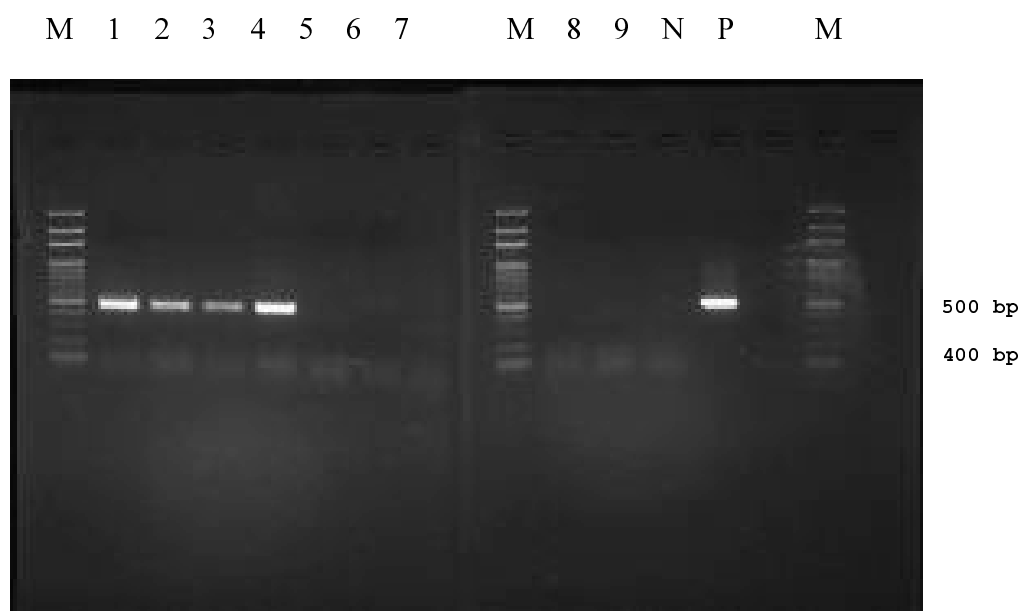
犬瘟熱的病原為一大型 RNA 病毒在分類上屬於 Paramyxoviridae 病毒科，Morbillivirus 病毒屬。犬瘟熱病毒(Canine distemper virus；CDV)可感染犬科、貓科、海豹等動物。患犬臨床可見眼鼻分泌物、下痢、呼吸症狀、神經症狀等，為一影響多器官系統之複雜病毒性疾病。本研究經由進行收容犬隻疾病調查，收集犬瘟熱疑似病例，運用組織病理學及核酸增幅等技術進行疾病診斷，同時收集國內犬瘟熱病例與樣本，供作國內犬瘟熱發生情形或本土犬瘟熱病毒株研究參考。

貳、材料與方法

CDV 基因體可轉譯出 6 種蛋白，分別為 nucleocapsid protein(NP)、phosphoprotein(P)、matrix protein(M)、fusion protein(F)、haemagglutinin(H)與 large protein。本研究參考已發表之 CDV 基因序列(CDV 基因配置情形如圖二)於核蛋白高度保留區設計 1 組引子，採用市售犬瘟熱活毒疫苗抽取之核酸當模板，建立反轉錄核酸聚合酶鏈反應(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)技術供作 CDV 核酸檢測用。配合收容犬隻疾病調查工作收集犬瘟熱疑似病例之檢體，如遇臨床呈現眼鼻分泌物、鼻鏡乾燥、神經症狀或動物剖檢時發現有肺炎病灶等情形，以無菌操作程序採集分泌物、肺臟、腦組織等檢體供作 CDV 核酸檢測，同時採取福馬林固定病材，以常規方式製作切片，以 H&E 染色進行鏡檢。檢體以 PBS 製成 10 倍乳劑，檢體乳劑或分泌物以核酸抽取試劑(Nucleic acid isolation kit, Roche)搭配自動核酸萃取儀(MagNA Pure Compact, Roche)進行核酸抽取，再以反轉錄核酸聚合酶鏈反應(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)搭配核酸定序檢測檢體中是否有 CDV 存在。RT-PCR 反應為核酸抽取物 5 μ l 加入反應試劑：dNTP 20nmol, Mg⁺⁺ 75nmol, primer 各 5pmol, Taq 0.25U, AMV 3U, RNasin 8U；反應條件：42 $^{\circ}$ C 45min, 94 $^{\circ}$ C 5min, 再以 94 $^{\circ}$ C 1min, 58 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 90 sec 進行 40 個循環，再經 72 $^{\circ}$ C 10min 完成反應。取增幅產物 8ul 混合些許 loading dye 置於 2%瓊脂膠片進行電泳，於 UV 燈下檢視是否有特異性條帶存在並拍取照片。若檢體出現符合預期產物大小(約 493bp)之條帶，將增幅產物送交生物技術公司(MB Mission Biotech)進行核酸定序。

參、結果與討論

犬瘟熱感染犬隻臨床上可由症狀及理學檢查結果等作初步診斷，但由於感染動物之病程不同或呈不顯性感染，加上宿主免疫反應的差異，導致犬瘟熱確診的困難。因此犬瘟熱之診斷除依據臨床症狀、病歷及理學檢查結果等，亦需配合實驗室檢查結果以進行綜合診斷。現行可用之診斷技術包括病毒分離、直接免疫螢光抗體染色法、反轉錄聚合酶鏈反應等，此外，組織病理學檢查及免疫組織化學染色法可檢查臟器組織中病變或 CDV 抗原存在，以協助本病診斷。



圖一、以 RT-PCR 進行犬瘟熱疑似病例之檢體檢測。結果於脾、腎、膀胱及大腦檢體檢視出符合預期大小之核酸增幅產物。

Lane 1：脾；Lane 2：腎；Lane 3：膀胱；Lane 4：大腦；

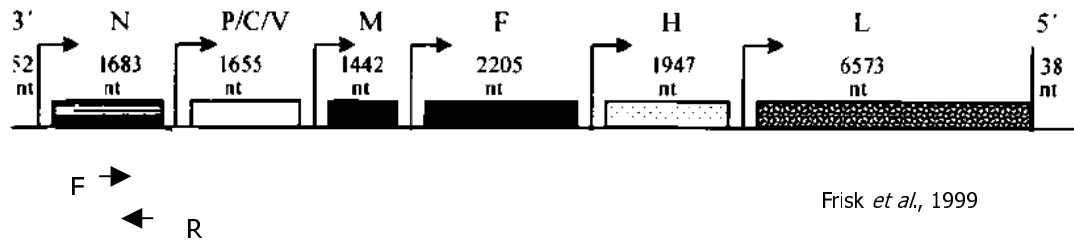
Lane 5：海馬角；Lane 6：小腦；Lane 7：延腦；Lane 8：扁桃腺；

Lane 9：肺；Lane p：陽性對照，取自市售犬瘟熱活毒疫苗抽取之核酸

Lane N：陰性對照，無菌水；Lane M：分子標記，100 bp DNA ladder

目前本實驗室已建立 RT-PCR 技術，應用於疑似病例或臨床樣本檢測，可於犬瘟熱疑似犬隻病例腦組織、拭子及臟器等檢體檢測出 CDV 核酸，用以輔助犬瘟熱之診斷。犬隻檢體經核酸抽取、RT-PCR 及瓊脂膠片電泳等步驟，於 UV 燈下可檢視到核酸增幅產物(預期大小約 493bp，增幅產物電泳結果如圖一)。2007 年於收容犬隻疾病調查工作收集犬瘟熱疑似病例 14 例，以 RT-PCR 及核酸定序技

術可於犬隻腦組織、脾、肺、腎等臟器檢出 CDV 核酸，此外自臨床疑似病例採集血液、分泌物等臨床檢體，採用本檢驗技術亦可檢測出 CDV 核酸。本試驗結果顯示以 RT-PCR 搭配核酸定序可檢測出檢體中 CDV，可應用於協助犬瘟熱之臨床診斷。未來可運用此診斷技術進行國內犬瘟熱病例收集或流行病學研究之用。



圖二、犬瘟熱病毒(CDV)基因配置圖。本研究於 CDV 核蛋白高度保留區設計引子進行反轉錄核酸聚合酶鏈反應。