

## 兔化豬瘟疫苗迷入兔病毒性出血症病毒之監測

鄭懋勁\* 林淑民 曾瑤芬 林春基 林士鈺

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

### 摘要

針對兔化豬瘟疫苗之兔病毒性出血症病毒迷入，開發反轉錄聚合酶鏈反應快速診斷，設計 2 對引子 RHDV-P1/RHDV-P2 與 RHDV-P5/RHDV-P6，其 PCR 產物分別為 658bp 與 261bp，以本省分離之兔病毒性出血症病毒 RHDV-YL 株檢測本系統，可得特異之預期產物。以此方法檢測 1998 年及 1999 年共 105 批國產兔化豬瘟疫苗均為陰性，顯示國產疫苗穩定。人工接種病毒於無特定病原豬，未觀察到有臨床症狀，且反轉錄聚合酶鏈反應檢測皆為陰性反應，顯示兔病毒性出血症病毒應不會感染豬造成病害。以低劑量 RHDV 人工感染兔子，則可造成無症狀而 RHDV 常存於兔体的情形。

**關鍵字：**兔病毒性出血症病毒 (*rabbit haemorrhagic disease virus, RHDV*)、  
兔化豬瘟疫苗 (*lapinized hog cholera vaccine*)、  
反轉錄聚合酶鏈反應 (*reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR*)

### 緒言

兔病毒性出血症 (*rabbit haemorrhagic disease, RHD*) 是一種由 *calicivirus* 造成兔子急性感染之疾病<sup>[8,9]</sup>，最早的報告見於 1984 年中國大陸<sup>[6]</sup>，台灣自 1994 年由呂榮修博士發現本病後(未發表)迅速蔓延全島<sup>[12]</sup>。本病毒 RHDV 是沒有封套的正向單股 RNA 病毒 (*single plus-stranded RNA virus*)，對兔子有 90-100% 的感染率，感染後主要造成肝細胞的氣球樣變性 (*ballooning degeneration*) 與壞死，肺臟、肝臟、腎臟與脾臟等實質臟器出現散播性血管內凝血 (*disseminated intravascular clotting, DIC*) 與纖維素血栓形成，以及異嗜球的浸潤<sup>[6,13]</sup>，國產豬瘟活毒疫苗以兔化豬瘟疫苗為主，若有 RHDV 感染可能影響到兔化豬瘟疫苗品質。目前 RHDV 常用之檢驗法有人工感染兔子、以電子顯微鏡觀察病毒型態檢查、血球凝集試驗、酵素連結免疫吸附法 (*enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*)<sup>[5]</sup>、免疫組織化學法 (*immunohistochemical method*)<sup>[2]</sup> 等方法，診斷上均有某些限制。亦沒有適合的細胞可供 RHDV 分離，故開發核酸技術來診斷可增加其敏感性及快速診斷之

目的<sup>[3]</sup>。反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 偵測 RHDV 的敏感性與特異性均佳，須時短可作為是否有病毒感染的偵測<sup>[12]</sup>，本試驗在建立 RT-PCR 並將此方法應用於兔化豬瘟疫苗迷入檢測以做好疫苗品質把關的目的。為了解 RHDV 對豬的影響，亦進行人工接種 RHDV 於 SPF 豬試驗。

### 材料方法

#### 引動子設計

參考已發表文獻<sup>[7]</sup>從 Genebank 中選取針對 RHDV 之 RNA dependent polymerase 的基因序列 (M67473)，以 Oligo V3.4 軟體 (National Biosciences, Hamel, MN, USA) 分析選定 3 對引動子 RHDV-P1/RHDV-P2、RHDV-P3/RHDV-P4 及 RHDV-P5/RHDV-P6，並由 TIB MOLBIOL 公司 (Berlin, Germany) 合成。

#### 病毒 RNA 的萃取

將 RHDV 感染兔臟器製成 10% 乳劑後，取 0.25ml 加入 Trizol LS (Gibco BRL) 0.75ml 依照廠商說明書抽取 RNA。

\* 抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

### 反轉錄聚合酶鏈反應

取一無菌之 0.2ml PCR 用微量離心管，加入 5 $\mu$ l 之 RNA 溶液，再加入 45 $\mu$ l 之 RT-PCR 混合液，使得最終濃度為 RHDV-P1 0.25 $\mu$ g、RHDV-P2 0.25 $\mu$ g、dNPT 各 0.2mM、10mM Tris/HCl(pH 8.8)、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、0.1% Triton X-100、AMV reverse transcriptase 3U、RNasin 8U、Dynazyme (Tbr DNA polymerase) 1U，反應液混合均勻後置於程式控溫器(PE geneAmp PCR system 2400)，進行第一個反應為 60C 5 分鐘將 RNA 變性，第二個反應為 42C 30 分鐘合成第一股 cDNA，第三個反應為 94C 變性反應 1 分鐘，56C 煉合作用 2 分鐘，72C 聚合作用 3 分鐘，第三個反應重覆 35 的循環，最後 72C 10 分鐘作用後結束反應。至於 RHDV-P5/RHDV-P6 引子進行反應時，煉合溫度改為 59C，變性反應、煉合作用及聚合作用均改為 1 分鐘。但 RHDV-P5/RHDV-P6 供為巢式反應時則不進行 cDNA 合成的部份。

### 聚合酶鏈反應之敏感性試驗

取 RHDV 感染乳劑抽取 RNA，調整成每 5 $\mu$ l 含 10<sup>3</sup> RLD<sub>50</sub>(50% rabbit lethal dose)，並進行十倍序列稀釋成 10<sup>2</sup> RLD<sub>50</sub>、10<sup>1</sup> RLD<sub>50</sub>、10<sup>0</sup> RLD<sub>50</sub>、10<sup>-1</sup> RLD<sub>50</sub>、10<sup>-2</sup> RLD<sub>50</sub>、10<sup>-3</sup> RLD<sub>50</sub>、10<sup>-4</sup> RLD<sub>50</sub>，以 5 $\mu$ l 各階樣品進行 RHDV-P1/RHDV-P2 引子之 RT-PCR，待此第一次 RT-PCR 完成後，各取 5 $\mu$ l 再以 RHDV-P5/RHDV-P6 引子進行巢式 PCR。

### 電泳分析

RHDV-P1/RHDV-P2 與 RHDV-P5/RHDV-P6 兩組配對引子之 PCR 反應後，取 10 $\mu$ l PCR 產物，置於 TAE 緩衝液中之 2% agarose 上，以 Mupid-2 電泳槽 50V 潛水式電泳 40 分鐘，並分析結果。

### 兔化豬瘟疫苗之 RHDV 感染檢測

選取 1998 年及 1999 年台灣生產之兔化豬瘟疫苗台畜 5 批、太元 10 批、大豐 23 批、高農 15 批、全亞洲 6 批、家衛所 19 批共 105 批，以蒸餾水(DEPC 處理過)還原成每 ml 含有 5 劑量，並依前述方法抽取 RNA，進行第一次 RT-PCR 及巢式 PCR，檢測 RHDV 感染情形。

### 人工接種無特定病原豬試驗

將台灣分離之兔出血症病毒 RHDV-YL 株取 10<sup>4.5</sup> RLD<sub>50</sub>/ml 接種於 4 頭 12 週齡無特定病原豬每頭 1 ml 並留 1 頭對照，於接種後 1 天至 7 天量體溫，記錄其溫度之變化，並抽血供測 RHDV 之 RT-PCR。於接種病毒後第 4 天及第 7 天犧牲豬各 2 頭取其淋巴結、肺臟、肝臟、腎臟、脾臟製成 10%乳劑抽取 RNA 後，進行反轉錄聚合酶鏈反應。

### 生產兔化豬瘟疫苗材料兔之人工感染試驗

以 0.1 RLD<sub>50</sub> 之 RHDV 人工接種 17 週齡材料兔 10 隻，並於 1 天後接種 HCV 種毒 (LPC-China) 5 隻及 14 天後接種 HCV 種毒 5 隻，分別於接種 HCV 種毒後 96 小時採收脾臟及腸間淋巴製成 10%乳劑，抽取 RNA 並以 RT-PCR、巢式 PCR 測定 RHDV 如前所述，HCV 之 RT-PCR 測定依照潘等<sup>[1]</sup>方法實施。

### 結果

以 Oligo V3.4 版軟體分析 RNA dependent polymerase 基因序列(Mayers *et al.* 1991)選出的引子，RHDV-P1/RHDV-P2 為第一對引子可增幅 658 bp 的片段，如表 1，RHDV-P5/RHDV-P6 為第二對引子可增幅 261 bp 片段，RHDV-P3/RHDV-P4 因非特異性反應強而未選用。

引子 RHDV-P1/RHDV-P2 RT-PCR 產物長度 658 bp 用 *Msp* I 限制切割產物可切割成 380 bp、207 bp、71 bp 三個片段，引子 RHDV-P5/RHDV-P6 所得之預期產物用 *Msp* I 限制切割 261bp 產物可切成 191 bp、70 bp 兩片段，以確定合成的產物無誤(圖 1)。

在 RHDV 之 RT-PCR 敏感性試驗方面，以 RHDV-P1/RHDV-P2 PCR 引子進行 RT-PCR，稀釋度從 10<sup>3</sup> RLD<sub>50</sub> 至 10<sup>-4</sup> RLD<sub>50</sub>，結果顯示敏感性可達 10<sup>1</sup> RLD<sub>50</sub>(圖 2)，再以 RHDV-P5/RHDV-P6 引子進行巢式 PCR，結果顯示敏感性可達 10<sup>-2</sup> RLD<sub>50</sub>(圖 3)。

以此二對引子對國產 1998 年及 1999 年兔

化豬瘟活毒疫苗進行檢測，在 105 批中不論 RT-PCR 或巢式 PCR 結果均為陰性(表 2)。

人工接種無特定病原豬試驗，於接種 RHDV 後 7 天內觀察臨床症狀為正常，體溫正常，採血進行 RT-PCR 反應皆為陰性；於接種病毒後第 4 天及第 7 天犧牲動物採臟器進行 RT-PCR 試驗結果亦皆為陰性。顯示 RHDV 應不會感染豬而造成不適及病害。

以人工感染 0.1 RLD<sub>50</sub> RHDV 之兔子生產兔化豬瘟疫苗，結果不論兔化豬瘟疫苗種毒接種前 1 天或 14 天感染 RHDV，均可在兔化豬瘟疫苗種毒接種後 96 小時以 RT-PCR 再巢式 PCR 二次增幅後發現感染 RHDV(表 3)。

## 討論

台灣從 1994 年爆發兔病毒性出血症後即遍佈全台，當時即有開發臟器不活化疫苗供緊急防疫（呂榮修等未發表），目前台灣仍為本病常在地區，最早發生時之 RHDV 毒株致病以成兔為主，但在 1996 年之病例筆者亦見 1 至 2 月齡幼兔之大量發病，同時 RHDV-YL 株之紅血球凝集性亦較先前毒株為差(資料未發表)，可能田間有變異的毒株存在。Schirmeier 等<sup>[1]</sup>亦報告 Hagenow 分離株不具紅血球凝集性，但在兔繼代後可恢復，Ramiro-Ibanez 等<sup>[10]</sup>報告 RHDV 之致病性與巨噬細胞之 tropism 相關，Capucci 等<sup>[4]</sup>對無病源性之 RHDV 定性發現少許的氨基酸改變即變成腸道 tropism 之無病源性 RHDV，以上可知 RHDV 在國外已有變異。由於我國豬瘟活毒疫苗是以由 LPC-China 株在兔體生產之兔化豬瘟活毒疫苗為主，故對材料兔之兔病毒性出血症病毒污染監測甚為重要。本試驗成功開發以 RT-PCR 方法檢測，再經巢式 PCR 後敏感性可達 10<sup>-2</sup> RLD<sub>50</sub>，可謂相當敏感。以此方法檢測 1998 年及 1999 年之兔化豬瘟疫苗 105 批，均為陰性，顯示國產疫苗品質優良。試驗亦顯示 RHDV 並不在豬體增殖，在兔體亦有低劑量感染不造成死亡的情形，故為確保兔化豬瘟活毒疫苗之品質，應加強對材料兔之選擇與監測。

由於近年豬瘟組織活毒疫苗使用率逐年增高，且動物疫苗開發廠商亦多朝組織疫苗方向發展，此亦為解決 RHDV 污染問題之方法。

## 誌謝

本試驗承蒙行政院農業委員會家畜衛生試驗所潘助理研究員居祥提供豬瘟活毒疫苗病毒診斷引子，特申謝忱。

## 參考文獻

1. 潘居祥。應用反轉錄聚合酶鏈反應及限制片段多形性區別不同豬瘟病毒株。國立台灣大所碩士論文。中華民國。1995
2. Alexandrov M, Peshev R, Yanchev I, Bozhkov S, Doumanova L, Dimitrov T, Zacharieva S. Immunohistochemical localization of the rabbit haemorrhagic disease viral antigen. Arch. Virol. 127: 355-363, 1992
3. Bascunana CR, Nowotny N, Belak S. Detection and differentiation of rabbit hemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by amplification of VP60 genomic sequences from fresh and fixed tissue specimens. J. Clin. Microbiol. 35: 2492-2495, 1997
4. Capucci L, Fusi P, Lavazza A, Pacciarini ML, Rossi C. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit haemorrhagic disease virus but nonpathogenic. J. Virol. 70: 8614-8623, 1996
5. Guittre C, Baginski I. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction. Res. Vet. Sci. 58: 128-132, 1995
6. Liu SJ, Xue HP, Pu BQ, Qian NH. A new viral disease in rabbits. An. Husb. Vet. Med. 16: 253-255, 1984
7. Meyers G, Wirblich G, Thiel MJ. Rabbit hemorrhagic disease virus molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus

- genom. *J. Virol.* 184: 664-676, 1991
8. Ohlinger VF, Haas B, Meyers G, Weiland F, Thiel HJ. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J. Virol.* 64: 3331-3336, 1990
  9. Parra F, Prieto M. Purification of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J. Virol.* 64: 4013-4015, 1990
  10. Ramiro-Ibanez F, Martin-Alonso JM, Palencia PG, Parra F, Alonso C. Macrophage tropism of rabbit hemorrhagic disease virus is associated with vascular pathology. *Virus Res.* 60: 21-28, 1999
  11. Schirrmeyer H, Reimann I, Kollner B, Granzow H. Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch. Virol.* 144: 719-735, 1999
  12. Shien JH, Shieh HK, Lee LH. Characterization of rabbit hemorrhagic disease virus field isolates in Taiwan. *J. Virol. Meth.* 71: 27-33, 1998
  13. Xu ZJ, Chen WX. Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review. *Vet. Res. Commun.* 13: 205-212, 1989

表 1. 4 條 Rabbit haemorrhagic disease virus 引子之序列及其預期產物分子大小

RHDV 引子	序列	位置	預期產物大小 (bp)
RHDV-P1	TTTGAGTTCGTGATGATTCG	5965-5984	658
RHDV-P2	GTTGAGGCGTGTATGTGATG	6603-6622 之互補鏈	
RHDV-P5	GGGGTGGGTTGGATTTGGTGC	6360-6380	261
RHDV-P6	TGAGGCGTGTATGTGATGGCG	6600-6620 之互補鏈	

表 2. 應用反轉錄聚合酶鏈反應檢測 1998 及 1999 年度生產的兔化豬瘟疫苗迷入 RHDV 的結果

廠商	批數	RT-PCR	巢式 PCR
台畜	32	-	-
太元	10	-	-
大豐	23	-	-
高農	15	-	-
全亞洲	6	-	-
家衛所	19	-	-
合計	105	-	-

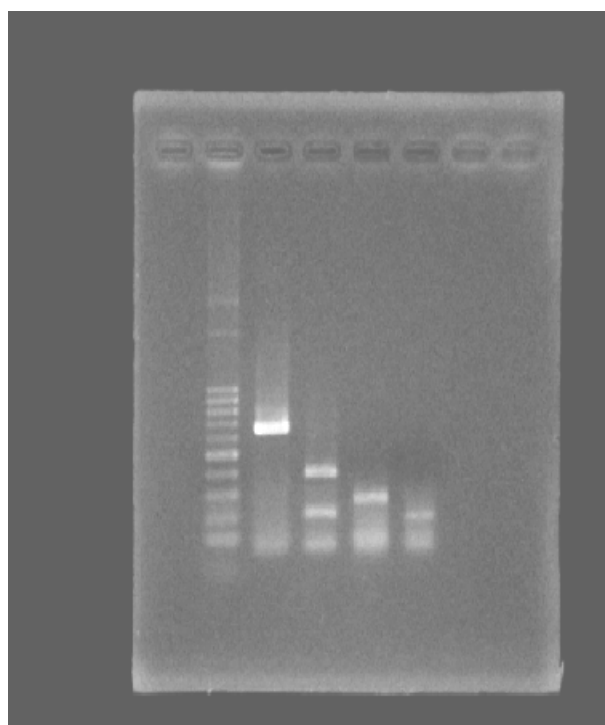


圖 1. 兔病毒性出血症病毒反轉錄聚合酶鏈反應。M: 100 bp ladder marker (100 bp 至 1,000 bp, 500 bp 為濃電泳帶)。Lane 1 為 RHDV-P1/ RHDV-P2 之 RT-PCR 產物 658 bp。Lane 2 為 Lane 1 產物以 *Msp* I 切割成三個片段 380 bp、201 bp、71 bp。Lane 3 為 RHDV-P5/RHDV-P6 之 RT-PCR 產物 261 bp。Lane 4 為 Lane 3 產物以 *Msp* I 切割成二個片段 191 bp 及 70 bp。

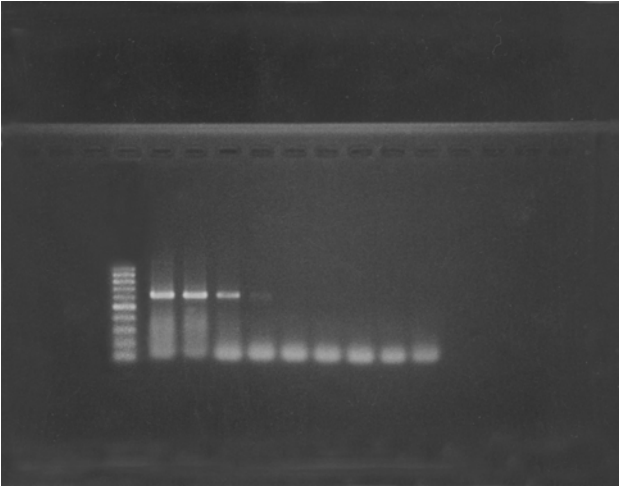


圖 2. 兔病毒性出血症病毒反轉錄聚合酶鏈反應敏感性試驗之一(第一次 RT-PCR)。M: 100 bp ladder marker (100 bp 至 1,000 bp, 500 bp 為濃電泳帶), 1 至 9 號分別為  $10^3$  RLD<sub>50</sub>、 $10^2$  RLD<sub>50</sub>、 $10^1$  RLD<sub>50</sub>、 $10^0$  RLD<sub>50</sub>、 $10^{-1}$ RLD<sub>50</sub>、 $10^{-2}$  RLD<sub>50</sub>、 $10^{-3}$  RLD<sub>50</sub>、 $10^{-4}$ RLD<sub>50</sub>、陰性對照組。圖中顯示第一次 RT-PCR 敏感性可達  $10^1$  RLD<sub>50</sub>。

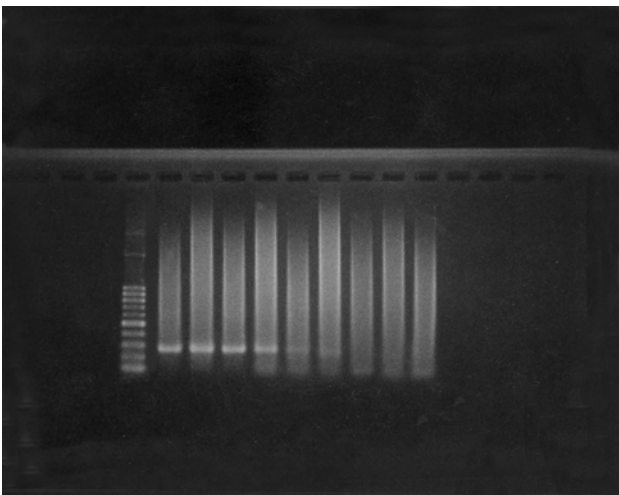


圖 3. 兔病毒性出血症病毒反轉錄聚合酶鏈反應敏感性試驗之二(巢式 PCR)。M: 100 bp ladder marker (100 bp 至 1,000 bp, 500 bp 為濃電泳帶), 1 至 9 號分別為  $10^3$  RLD<sub>50</sub>、 $10^2$  RLD<sub>50</sub>、 $10^1$  RLD<sub>50</sub>、 $10^0$  RLD<sub>50</sub>、 $10^{-1}$  RLD<sub>50</sub>、 $10^{-2}$  RLD<sub>50</sub>、 $10^{-3}$  RLD<sub>50</sub>、 $10^{-4}$ RLD<sub>50</sub>、陰性對照組。圖中顯示巢式 PCR 之敏感性可達  $10^2$ RLD<sub>50</sub>。

表 3. 以人工感染 RHDV 兔來生產兔化豬瘟活毒疫苗之 RT-PCR 檢測

組	隻數	人工感染 RHDV 及 接種 HCV 間隔天數 <sup>a</sup>	HCV RT-PCR <sup>b</sup>	RHDV RT-PCR <sup>b</sup>	RHDV 巢式 PCR <sup>b</sup>
			陽性數/檢查數	陽性數/檢查數	陽性數/檢查數
A	5 <sup>c</sup>	1	3/3	0/3	3/3
B	5 <sup>c</sup>	14	3/3	0/3	3/3
對照	2	-	0/2	0/2	0/2

- a. A、B 兩組以 0.1 RLD<sub>50</sub> 之 RHDV 人工感染兔子後 1 天及 14 天分別接種 HCV 種毒。
- b. 接種 HCV 種毒後 4 天(96 小時), 取脾臟及腸間淋巴製造兔化豬瘟活毒疫苗之樣品檢測。
- c. A、B 組接種 RHDV 後 2 天及 3 天各死亡 1 頭, 其臟器乳劑檢測 RHDV/RT-PCR 均為陽性。

## **The Detection of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus Contamination in Lapinized Hog Cholera Vaccines**

M. J.Kwang\*, S. M. Lin, Y. F. Tseng, H. Lin and S. Y. Lin

National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan

### **SUMMARY**

A reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was developed to detect the contamination of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) in lapinized hog cholera vaccine. Two primer sets, RHDV-P1/RHDV-P2 and RHDV-P5/RHDV-P6, were used for the RT-PCR producing two DNA fragments, 658 bp and 261 bp, respectively. No RHDV was detected in 105 lots of lapinized hog cholera vaccine collected from 1998 to 1999. In control studies, SPF pigs received RHDV did not develop any symptom and no RHDV activity was detected by RT-PCR, however rabbit received low titer of RHDV resulted in persistent infection.

***Keywords: Polymerase chain reaction, Rabbit haemorrhagic disease virus, Lapinized hog cholera vaccine***

---

\* Corresponding Author  
National Institute for Animal Health