家畜衛試所研報No.41：117~122(2006)

錦鯉疱疹病毒分離技術之建立

涂堅*、黃淑敏、程建智、張惟茗

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

本計畫目的為建立對錦鯉疱疹病毒有感受性之細胞株並發展本病毒之分離方法。我們共發展出兩種初代細胞株（鰭及鰓細胞，目前為 35 代），生長溫度介於 20-25°C，適當培養液為添加 10% 胎牛血清的 Leibovitz-15 （L-15），或添加 10% 胎牛血清的 60% Earle's minimum essential medium （MEM）、10% tryptose phosphate 及 20% L-15 之混合培養液。有關病毒感受性方面，培養在 20°C，細胞病變在鰓細胞約 10-14 天出現；在鰭細胞需 20 天。典型細胞病變為細胞質內的空泡化及細胞溶解。使用鰓或鰭細胞分離本病毒，初代呈現細胞病變，但繼代則無細胞病變。

關鍵字：錦鯉、分離、錦鯉疱疹病毒

前言

錦鯉疱疹病毒於 1998 年發生於以色列，造成大量錦鯉死亡 。不久即藉著國際間錦鯉出口貿易散佈至全球各大洲，目前受到波及的歐洲國家有英國、法國、比利時、荷蘭、盧森堡、丹麥、瑞士、奧地利、波蘭；亞洲國家有印尼、中國、台灣及日本；以色列、美國及南非（1, 4; 8）。本病死亡率約為九成以上，但外表症狀並不明顯，潛伏期約為 10-14 天，而且發病與水溫有關（18-26°C 間才會發病）。我國於 2002 年由農委會家畜衛生試驗所首先發現並確定本病例。本病毒為近三十年來散佈最快的魚類病毒，目前初步估計以色列損失 400 萬美金，日本損失 140 萬美金，印尼約損失之 550 萬美金之錦鯉。本病的傳播疑似由於觀賞錦鯉進口引起。本病散佈極快，且感染不分年齡之錦鯉、鯉魚而造成九成的死亡率及不顯性感染的帶病毒魚。目前除了早期偵測加以淘汰外，並無較佳預防方法。由於錦鯉為我國重要的外銷觀賞魚種，我國出現之病毒目前並無法以現有細胞株分離，因此本研究擬建立細胞株並開發分離錦鯉疱疹病毒技術，以檢測不顯性感染之魚隻，繼而降低本病對我國的錦鯉及鯉魚養殖業的衝擊。

材料與方法

1. 初代錦鯉細胞之建立

選取臨床健康並經 PCR 鑑定為 KHV 陰性的錦鯉，以 0.1 ppm 漂白水消毒 15 秒，再以 70%酒精消毒外表後，以無菌採取腎臟、鰭及鰓並剪碎至 1 mm 大小之組織塊；運用 0.05% trypsin 及消化瓶室溫消化，每 15 分鐘收集一次，離心後分別測試再以下三種培養液的生長情形：1)添加 20%胎牛血清 Leibovitz-15（L-15）培養液，2）添加 20%胎牛血清 Earle's minimum essential medium（MEM）或 3）添加 20%胎牛血清的 L-15 混合 MEM 培養液及其他添加因子（包括 100 IU penicillin/ml，100 μg/ml streptomycin，2.5 μg/ml amphotericin B，1 mM HEPES，10% tryptose phosphate（Difco）），

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

家畜衛試所研報No.41：117~122(2006)

培養在 20 及 25 ℃，每 7 天換液一次。待長成單層細胞時即進行消化並繼代到新的培養瓶，第十代以後改用 10%胎牛血清 L-15 培養液培養在 20 及 25 ℃，每 7 天觀察一次至產生單層細胞。

2. 錦鯉疱疹病毒感受性之測試

利用上述不同器官來源之細胞株進行不同病毒分離方式（接種乳劑上清液或陽性臟器混合培養）及不同來源細胞對 KHV 感受性之測試。分離方式如下：取病魚鰓、脾及腎以研缽及杵搗碎，加入 9 倍體積的細胞培養液（MEM），製成 10 倍乳劑。在 4°C，200 x g 下離心 10 分，取上清液並以 0.45 μm 針頭過濾器過濾，並稀釋成 100 倍備用。取兩瓶長成單層錦鯉鰭或鰓細胞的 25 cm^2 角瓶，並將其內之培養液吸除，以 PBS 洗一次，然後分別加入已過濾的 10 倍及 100 倍稀釋的乳劑各 1.3 ml。 原則上每 2 cm^2 除去培養液的單層細胞至少須接種 100 μl 的稀釋樣品。

20°C 吸附 1 小時，再加入 4 ml 含 2%胎牛血清的培養液，然後在 20℃-25°C 間培養。組織塊共同培養方法則將陽性魚隻解剖，無菌操作取出鰓、腎及脾臟，分別剪成 1 mm 大小組織塊懸浮在 1 ml 培養液中，與消化之單層細胞以 10：1 比例混合培養。其培養條件同於以乳劑接種分離之方式。每天用顯微鏡檢查陰性的對照組與其它已接種過的細胞達 10 天。病變約在 7-14 天出現。如果這些已稀釋的乳劑上清液接種或共同培養的單層細胞出現細胞病變，其細胞病變特徵為細胞聚集（aggregation）、胞質內有嚴重空泡化（vacuolation），最後部分或整片的崩解。則懷疑為陽性。需進一步以 PCR 方法確認。

3. 錦鯉疱疹病毒感染之確認

不論是所使用來接種的乳劑或 CPE 上清液均以以下 PCR 方式確認存在錦鯉疱疹病毒。其方式如下：依據廠商指示，以市售 DNA 萃取套組從病魚之鰓、脾及腎乳劑或已接種病毒的細胞萃取 DNA。聚合酶鏈反應之引子為 2002 年 Gilad.等（4）發表之 KHV9/5F 5’-GAC-GAC-GCC-GGA-GAC-CTT - GTG-3’，及 KHV9/5R5’-CAC-AAG-TTC-AGT-CTG-TTC-CTC-AAC-3’，其反應條件為 2 mM $MgCl_2$，400 μm dNTP，30 pmol 引子，1 U Taq 聚合酶，70-100 ng 病材 DNA。反應時間為 95°C 5 分，然後進行 39 次增幅（每次包括 94°C 1 分，68°C 1 分，72°C 30 秒），最後進行 72°C 7 分的延長。取增幅的各個產物 10 μl 並加入 2 ul 追蹤染色劑，同時取 5 μl 核酸長度標準，依序加入 2%瓊脂膠片樣品槽中，在裝有 TAE 緩衝液的電泳槽中，以 100 V 電壓進行電泳。電泳完畢，以 ethidium bromide 染色 10 分，退染，然後在紫外燈箱上觀察。紫外燈箱上出現大小為 484 bp 的色帶則判為陽性；若無或出現大小不同的色帶，則判為陰性。

結果與討論

不論以 Leibovitz-15（L-15）、Earle’s MEM 或 Pikarsky 氏培養液(7)：成份為 20% L-15、50% Eagle’s MEM、20%胎牛血清、10% tryptose phosphate（Difco）及 1% HEPS 均可成功發展出初代細胞（圖一），長成為單層細胞時間約 3-5 天。但是以單純 Eagle’s MEM 培養時，由於其採用 bicarbonate buffer systerm，而低溫培養箱並無 CO_2 裝置，培養液 pH 值容易高於 8 以上，有造成細胞死亡的風險存在。L-15 培養液內含較一般培養液濃度高的胺基酸來緩衝酸鹼值，而 Pikarsky 氏培養液則添加 1% HEPES，二者均能有效維持培養液的酸鹼值在 pH 在 7.2-7.4（2）。根據此次實驗結果顯示以上二者均可使用於初代細胞，然而由於 L-15 培養液配製較 Pikarsky 氏培養液簡單，目前本研究室採用前者做為本細胞的細胞培養用。目前成功開發出鰓及鰭細胞，已培養至 35 代，但是腎臟細胞並未開發成功。

關於溫度對細胞生長的影響，當細胞以 1:3 比例繼代時，在 20°C 培養約需 6-7 日才能長成單層細胞；在 25°C 培養時需 4-5 日即可長成單層細胞。由於已成功開發兩種細胞，因此並未進一步研究是否需要添加任何其他生長因子來促進細胞生長。

有關細胞對錦鯉疱疹病毒感受度測試，發現以新鮮 PCR 陽性病材直接做乳劑或直接以組織塊做混合

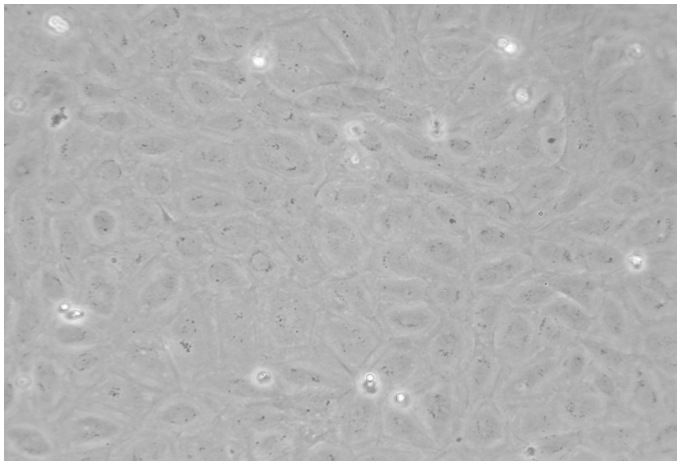
培養來分離病毒時，初代分離使用在 20°C 培養時，於 10-14 天細胞質出現空泡化（圖二），此空泡化現象會逐漸蔓延，約 7 日後開始脫落；此種細胞病變之上清液經 PCR 測試為陽性，此發現與 Hedrick et al (5)報告相符。初步發現鰓細胞較鰭細胞敏感，較容易產生細胞病變。嘗試繼代病毒時，將此種細胞病變之上清液接種於 24 小時長滿之單層細胞，但是並無法產生細胞病變，此點可能與病毒對本所發展的細胞株感受性不強，雖產生 CPE 但是初代的病毒力價並不高，導致無法引起繼代細胞的病變；另種可能為此初代病變是由接種乳劑中細胞酵素所引發。另外發現經過-80°C 冷凍解凍後之乳劑，接種細胞亦無法產生細胞病變，表示 KHV 經過冷凍解凍會降低其感染所需力價，此點與其他研究者發現相同（6）。基本上，錦鯉疱疹病毒並不容易分離，其可能原因為具感受性的細胞株尚未被建立，加上本病毒在一般溫度環境下極易喪失感染能力。因此專家建議使用急性發病活魚有助於本病毒分離，但是有時甚至以 PCR 證實陽性的頻死病魚進行分離卻仍無法分離到本病毒，真正原因未明（3），推測與分離使用的細胞的低感受性有關。筆者嘗試以國外 KF1 細胞株分離我國的 KHV（4），但是仍無法分離出此病毒（未發表資料）。因此仍需繼續開發高感受性的細胞株以對此病毒做進一步的研究。

致謝 本計畫（94 農科-14.4.2-衛-H1）執行承蒙農委會提供經費特此致謝。

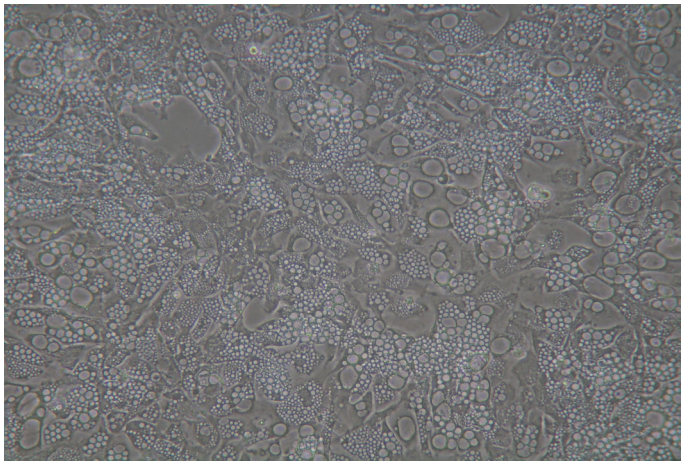
參考文獻

1. Bertzinger A, Fisher-Scherl T, Oumouna M, Hoffman R, and Truyen U. 1999. mass mortalities in koi carp, Cyprinus carpio, associated with gill and skin disease. Bull. Eur. Asssoc. Fish pathol. 19: 182-185.
2. Freshney RI. 1983. *Culture of Animal Cells*. pp. 295. Alan R Liss, New York.
3. Crane M, Sano M and Komer C. 2004. Infection with koi herpesvirus-disease card. NACA, Bangkok, Thailand. pp. 11
4. Gilad O, Yun S, Andree KB, Adison MA, Zlotkin A, Bercovier H, Eldar A and Hedrick RP. 2002 Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* koi. *Dis Aquat Org* 48:101-108.
5. Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangenberg JV, Marty GD, Nordhausen RW, Kebus MJ, Bercovier H and Eldar A. 2000 A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of a commom carp. *J Aquat Anim Health* 12: 44-57.
6. Iida T & Sano M. 2005. Koi herpesvirus disease. *Virus* 55: 145-151
7. Pikarsky E, Ronen A, Abramowitz J, Levavi-Sivan B, Hutoran M, Shapira Y, Steinitz M, Perelberg A, Soffer D and Kotler M. 2004. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J Viro* 78: 9544-9551.
8. Tu C, Weng MC, Shiau JR and Lin SY. 2004. detection of koi herpesvirus in koi Cyprinus carpio in Taiwan. Fish pathol 39: 109-110.

家畜衛試所研報No.41：117~122(2006)



圖一、正常 14 日生長之錦鯉鰓細胞 (200 x)



圖二、感染錦鯉疱疹病毒 14 天之錦鯉鰓細胞，

病變主要為胞質內空泡化 (100 x)

Exp.Rep AHRI.,No.41：117~122(2006)

Development of Isolation Techniques on Koi Herpesvirus

Tu C*, Huang SM, Cherng C, Chang WM
Animal Health Research Institute, Council of agriculture, Executive Yuan

Abstract The purpose of this project is establishing cell lines permissible to koi herpesvirus (KHV) for developing the isolation method of KHV. We established two primary cell lines from koi (35-passage koi gill and koi fin); the optimum growth medium was either Leibovitz-15 supplemented with 10% fetal calf serum or a mixture containing 60% Earle's minimum essential medium, 30% Leibovitz-15, 10% tryptose phosphate and 10% fetal calf serum. The optimum growth temperature was between 20-25℃. Those two cell lines were susceptible to KHV and the cytopathic effect (CPE) appeared in koi gill cell 10-14 days post infection; and 20 days post infection in fin cell. The typical CPE showed cytoplasmic vacuolation and cell lysis. The CPE appeared only at first generation of isolation but it disappeared after the sub-passage of the virus in the same cells.

Keywords: Koi Isolation Koi herpesvirus

*Corresponding Author
Animal Health Research Institute