### 野鳥西尼羅熱之檢測方法建立及 2006 年臺灣監測結果

劉玉彬\*1、張光正<sup>2</sup>、鄭明珠<sup>1</sup>、李敏旭<sup>1</sup>、陳麗璇<sup>1</sup>、李淑慧<sup>1</sup> 「行政院農業委員會家畜衛生試驗所 <sup>2</sup>美國疾病管制局

摘要 西尼羅熱(West Nile fever)為重要之人畜共通傳染病之一,為防範此新興疾病之入侵,建立早期預警監測系統為首要之務,其中又以對野鳥進行帶毒監測,為最敏感之偵測預警方法。家畜衛生試驗所疫學研究組已成功建立 Nested PCR、SYBR Green I real-time PCR 及 TaqMan real-time PCR 三種分子生物學診斷技術。Nested PCR 最低可檢測 5 copies 之病毒核酸,較一般 PCR 敏感約 1000 倍;SYBR Green I real-time PCR 亦具有相似之敏感性,可經由建立之核酸與循環數之檢量線,作為核酸定量之用;TaqMan real-time PCR 則可以成功的區別西尼羅熱、日本腦炎(Japanese encephalitis)、聖路易氏腦炎(St. Louis encephalitis)及黃熱病(Yellow fever)四種黃病毒屬病毒。完成 2006 年野鳥樣本 4,626 件西尼羅病毒之監測,檢測結果均為陰性。

關鍵詞:西尼羅熱;野鳥;即時聚合酶鏈反應

## 緒言

本病最初於 1937 年首次在烏干達的西尼羅地 區, 由發病的女人血液中分離到病毒, 之後於 1950 年代的早期,在埃及的病人、鳥類及蚊子也都有分離 到類似病毒,隨後此病毒被鑑定並劃分屬於黃熱病病 毒科 (Flaviviridae) 【9】。1999年夏天, 紐約市及 其附近數郡有腦炎流行,有60多名老人發病,並使 7 人死亡, 在第一個腦炎病例發生後, 美國疾病管制 中心以血清學檢測 IgM 與 IgG 抗體後, 判定為聖路易 腦炎 (St. Louis encephalitis, SLE), 但以 SLE 病毒 特異性引子作聚合 連鎖反應(PCR)檢測結果,與後 來的血清學檢測結果相對照,吻合程度相當低,另外 在紐約的烏鴉及動物園鳥類的死亡病例中,伴隨組織 病理解剖的證據與臨床中樞系統的症狀支持下,美國 疾病管制中心改變了原先的看法,並且基因的證據顯 示病毒可能為其它的病毒,隨後,確定此病之致病因 子為西尼羅病毒(West Nile Virus)【1】,而鑑定出 的病毒幾乎與 1998 年在以色列從一隻死鵝屍體中 測到的西尼羅病毒毒株吻合,相似度高達 99% ,說明了病毒可能來自中東【6,10】。

目前,西尼羅熱在美國仍持續發生,根據美國疾 病管制中心 (Center of Disease Control, CDC) 資 訊,2006年仍有44州有病例報告,全美總報告 病例為 4.2681 件,發生腦膜炎或腦炎者 1.455 例,出現發燒者 2.612 例,非特異或其他症狀者 194 例,死亡 174 例【3】。已成為近年來重要之 新興人畜共通傳染病【5】。本病可應用組織病理學、 血清學、反轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)、免疫組 織化學染色(Immunohistochemistry method)、原位 雜合法 (In situ hybridization) 等技術診斷 【2,12】。 由於全球交通日益頻繁,及此病可藉候鳥遷徙來傳播 病毒【1,7】,為控制此疾病最重要的是能提供確切 的流行病學資訊,而野鳥是西尼羅病毒之感染窩動 物,因此野鳥體內含病毒與否,對於監測西尼羅病毒 感染症是關鍵之重要指標【11,13】。臺灣位於歐亞 大陸東亞區候鳥遷徙路線上,每年有成千上萬的水鳥 群來台渡冬,為防範新病入侵我國,本研究利用巢式

<sup>\*</sup>抽印本索取作者

聚合酶鏈反應及即時反轉錄聚合酶鏈反應來進行野 鳥西尼羅病毒之監測。

#### 材料與方法

監測樣本: 野鳥檢體來源主要有三個部份,包括(1)由台北市野鳥學會採樣送檢,樣本為候鳥季期間主要採集自台北、宜蘭、台中、彰化、嘉義、台南、高雄、屏東及金門等水鳥棲地排遺檢體;(2)縣市防疫單位之野鳥採樣送檢;(3)南投特有生物保育中心之野生動物急救站收容傷病或死亡野鳥之檢體。全年之監測檢體數為4,626件。

病材處理:野鳥排遺拭子試管以震盪器混合均勻後靜置備用。野鳥病材則於本所之負壓解剖房中進行檢體採集,所採取之臟器包括脾臟、肝臟、心臟、腎臟及腦等,並與輸送培養液混合研磨成10%(W/V)乳劑。所製備之排遺混合液及臟器乳劑再利用MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I 進行病毒核酸之萃取,方法參照產品之操作手冊,此核酸供為RNA增幅之模板用。

病毒陽性對照:實驗所使用之四種病毒陽性對照,將含插入四種黃病毒屬病毒 NS5 核酸序列質體之大腸桿菌增殖及純化質體後,經限制 酵素切割後,再以 T7 RNA polymerases 進行胞外轉錄反應合成所需之陽性對照 RNA。

**集式聚合**酶**鏈反應**: 試驗所需之引子係參照 2007年Chao等所發表之黃病毒屬病毒universal primers 【 4 】,序列如下:mFU1,5′-TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA-3′,CFD2,5′-GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC-3′。主要增幅黃病毒屬病毒之非結構性蛋白NS5基因序列部分,所得到之PCR增幅產物大小為266 bp。取一0.2 mL反應管依序加入下項:2 μL RNAtemplate、45 μL DEPC-DDW、5 μL 10X buffer、5 μL dNTP(1.25 mM)、1 μL 順向引子(20μM)、1 μL 逆向引子(20μM)、1 μL 逆向引子(20μM)、1 μL 逆向引子(20μM)、1 μL 逆向引子(20μM)、1 μL 核糖核

酸 抑制劑 O.2 μL、O.6 μL Tag DNA polymerase (2 U/μL), 反應總體積為50 μL。循環加熱器設定時 間和溫度反應條件為42℃ 40分鐘,95℃ 2分鐘; 之後95℃ 40秒,55℃ 40秒,72℃ 40秒,總 共35個循環;最後72℃6分鐘。合成的DNA產物, 接著進行Nested PCR,其所需之引子序列如下: mFU1,5'-TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAA AAA-3′及WNP3,5′-AGGCCGGGTGCCAACTTCA CGCA-3',其中使用之reverse primer係參照文獻中 TaqMan real-time RT-PCR之西尼羅病毒特異性 probe【4】。所增幅之PCR產物大小226 bp。反應 試劑為2 μL RT-PCR產物、45.4 μL DEPC-DDW、  $5 \mu L 10X buffer \cdot 5 \mu L dNTP (1.25 mM) \cdot 1 \mu L$ 順向引子(20 μM)、1 μL 逆向引子(20 μM)、 O.6 μL Tag DNA polymerase (2 U/μL), 反應總體 積為50 μL。循環加熱器設定時間和溫度反應條件為 95℃ 2分鐘;95℃ 30秒,55℃ 30秒,72℃ 30 秒,總共35個循環;最後72℃6分鐘。

SYBR Green I 即時聚合酶鏈反應:依序加入 11.8 μL DEPC-DDW、mFU1 及 CFD2 引子各 1 μL、MgCl2 溶液 0.8 μL、LightCycler RT-PCR Reaction Mix SYBR Green I 試劑 4 μL、LightCycler RT-PCR Enzyme Mix 試劑 0.4 μL 及 1 μL RNA 溶 液, 反應總體積為 20 μL。即時聚合酶鏈反應儀器 (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM®) 之條件:55℃ 10分鐘, 95℃ 2分鐘;之後再進行 45 個循環之 95℃ 10 秒,55℃ 20 秒,72℃ 35 秒;最候進行 dissociation curve 程式,於 real-time PCR 結束後進 行於 20 分鐘期間溫度由 60℃升高至 95℃,以觀 察產物之 Tm 值。反應結束後取 8 μL 之 PCR 產物 以 2%瓊膠進行電泳分離,經 ethidium bromide 染色 後於 UV 燈下觀察產物片段大小,以確認結果。病毒 核酸之定量部分則將含插入西尼羅病毒 NS5 核酸序 列質體之大腸桿菌增殖及純化質體後,經限制酶酵素 切割後,再以 T7 RNA polymerases 進行胞外轉錄反 應合成所需之陽性對照 RNA,經 10 倍連續稀釋作

為 real-time PCR 之模板進行敏感性試驗及檢量線之 製作。

Multiplex TagMan Probe 即時聚合酶鏈反 應:檢驗方法主要參照 2007 年 Chao 等所發表之 文獻【4】,適用於日本腦炎、聖路易氏腦炎、西尼 羅熱及黃熱病病毒核酸之定性檢驗。四種病毒使用相 同之 mFU1 及 CFD2 引子增幅,而特異性探針分別 Ħ 本 炎 JE 5′-TCCGTGACATAGCAGGAAAGCAAg-3′,5′端及 3<sup>′</sup>端分別標記 CY3 及 BHQ2a; 聖路易氏腦炎 SLE, 5'-TaCAAGAAATCTCCCAAATcCCAggagga-3', 5′端及 3′端分別標記 CY5 及 BHQ3a; 西尼羅腦炎 WNV, 5'-tgcgtgaagttggcacccggcct-3', 5'端及 3' 端分別標記 FAM 及 BHQ1a; 黃熱病 YF, 5'-TCAGAGACCTGGCTGCAATGGATggt-3',5'端 及 3′端分別標記 Texas Red 及 BHQ2a。反應試劑 除 42.2 μL DEPC 無菌水、2 μL 探針、MgCl2 溶 液 O.8 μL 外,其餘同反轉錄聚合酶鏈反應。循環加 熱器設定時間和溫度反應條件為 42℃ 30 分鐘, 95℃ 2分鐘;之後 95℃ 15 秒,48℃ 3分鐘, 總共 45 個循環。

### 結果

集式聚合酶鏈反應:病毒核酸利用 outer primer (mFU1及CFD2)進行反轉錄 PCR 反應,增幅出266 bp 大小之核酸序列產物,再將此產物做為模板,以 inner primer (mFU1及WNP3)進行第二次PCR 反應,最終之產物大小為226 bp。利用此半巢式聚合酶鏈反應(semi-nested PCR)最低可檢測至1~5 copies number 之病毒核酸,較傳統PCR 檢測方法之檢測極限5000 copies number,敏感性約提高一千倍,結果如 Fig. 1。

SYBR Green即時聚合酶鏈反應:使用與傳統 PCR相同之增幅引子mFU1及CFD2,在Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System進行 SYBR Green | real-time PCR檢測。將含插入西尼羅

病毒NS5核酸序列質體之大腸桿菌增殖及純化質體後,10倍連續稀釋作為real-time PCR之模板進行敏感性試驗。實驗結果顯示其線性關係涵蓋5個10倍稀釋區間5~50000 copies number,線性關係相關係數為0.996(Fig. 2),利用此檢測方式之偵測極限並可達1 copy number病毒核酸。引子dimers 的Tm曲線的頂點溫度約在80.7~81.4℃之間,產物的Tm曲線的頂點溫度約在87.2~87.8℃之間(Fig. 3),將PCR 陽性的產物以洋菜膠電泳分析,也有預期之266 bp 的DNA band,而產物進一步定序確認後也無誤。陰性對照組於real-time PCR反應40個循環時,螢光強度皆無顯著上升。而本檢測方法使用之增幅引子為黃病毒屬病毒之universal primer,不具西尼羅病毒核酸之特異性,僅適用於病毒核酸之定量用。

日本腦炎、聖路易氏腦炎、西尼羅腦炎及黃熱病病毒Multiples TaqMan即時聚合酶鍵反應:利用黃病毒屬在非結構蛋白核酸序列NS5之universal primer包括mFU1及CFD2,可增幅此四種重要之人畜共通傳染病黃病毒屬病毒,再利用四種不同之探針5′端及3′端分別標記上不同之Reporter Dye 及 適 用 之 Quencher Dye , 利 用 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System檢測四種釋放出螢光波長。利用此種檢測技術可成功的將四種病毒於同一檢測管中進行檢測,在不同之檢測波長中明確的區分出四種黃病毒屬病毒,鑑別效果良好(Fig. 4)。

及翡翠科等 16 科鳥種,為對西尼羅病毒具感受性之鳥種,共 4585 件檢體;而鵯科、畫眉亞科、五色鳥科、水雉鳥科、水雉科、鶇亞科、長尾山雀科、黃鸝科、鶲亞科等 9 科鳥種目前尚無文獻發現對西尼羅病毒具感受性,共 41 件檢體。全年之全部檢體件數為 4.626 件,其監測結果均為陰性 (Table 1)。

#### 討論

在西尼羅病毒之分子生物學檢測技術部份,本計 畫共完成 Nested RT-PCR、SYBR Green | real-time RT-PCR 及 Multiples TagMan real-time RT-PCR 三 項檢測方法之建立。雖然目前現行之西尼羅熱或黃病 毒屬病毒之診斷方法主要利用 real-time PCR 檢測技 術【4】,但由於 Nested RT-PCR 具有操作簡單,且 利用兩組特異性引子來進行病毒核酸增幅,可改進傳 統 PCR 反應造成之偽陽性,提升檢測之專一性,兼 具敏感性及特異性之優點, Johnson et al., 2001 亦 指出利用 Nested RT-PCR 較一般之 RT-PCR 之敏感 性增加十的六次方倍【8】,且目前本所仍以傳統 RT-PCR 為使用之主流,因此 Nested RT-PCR 為本 所日後例行性之野鳥西尼羅病毒監測標準方法。而 SYBR Green I 即時 RT-PCR 優點為不需額外設計及 合成特殊序列之探針,方法簡單成本低,並省去了傳 統 PCR 之後所必須的瓊膠電泳分析,除節省時間 外,也可降低因跑膠時 DNA 污染而導致誤判的可能 性,此外可以進行 Melting Curve 分析以增加其特異 性。若發生西尼羅熱時,此方法所建立之核酸標準曲 線,可進行未知濃度病毒之定量。Multiples TaqMan 即時 RT-PCR 具有專一性高之優點, 但需額外設計及 合成特殊序列之探針,因此將會實際應用於黃病毒屬 病毒性疾病之鑑別診斷。應用此三項分子生物學檢測 技術,可有效的應用在西尼羅病毒感染症之監測。在 今年之 4626 件野鳥檢體監測中,均未發現西尼羅 病毒之存在, 結果顯示臺灣目前仍無該病之非疫區國 家。

### 參考文獻

- Campbell A, Dreher HM. A new Transcontinental disease: the West Nile virus. Medsurg Nursing 11: 112-119, 2002.
- Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. Lancet Infect. Dis. 2: 519-529, 2002.
- CDC. 2006 West Nile Virus Activity in the United States.
  - http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&controlCaseCount06 detailed.htm.
- Chao DY, Davis B, Chang GJ. Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. J. Clin. Microbiol. 45: 584-9, 2007.
- Charrel RN, De Lamballerie X. West Nile virus, an emerging arbovirus. Rresse Med 33(21): 1521-1526, 2004.
- Giladi M, Metzkor-Cotter E, Martin DA, Siegman-Igra Y, Korczyn AD, Rosso R, Berger SA, Campbell GL, Lanciotti RS. West Nile encephalitis in Israel, 1999: the New York connection. Emerging Infect. Dis. 7: 659-661, 2001.
- 7. Hubalek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. J. Wildlife Dis. 40: 639-659, 2004.
- Johnson, DJ, Ostlund EN, Pedersen DD, Schmitt BJ.
   Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. Emerging Infect. Dis. 7: 739-741, 2003.
- Knudsen TB, Andersen O, Kronborg G. Death from the Nile crosses the Atlantic: the West Nile fever story. Scand. J. Infect. Dis. 35: 820-825, 2003.
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J,
   Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree
   MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp

- CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. Science 286: 2333-2337, 1999.
- Mostashari F, Kulldorff M, Hartman JJ, Miller JR,
   Kulasekera V. Dead bird clusters as an early

- warning system for West Nile virus activity. Emerging Infect. Dis. 9: 641-646, 2003.
- 12. Petersen LR, Marfin AA. West Nile virus: a primer for the clinician. Ann. Intern. Med. 137: 173-179, 2002.
- 13. Rappole JH, Derrickson SR, Hubalek Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in the western hemisphere. Emerging Infect. Dis. 6: 319-328, 2000.

Table 1.95 年野鳥西尼羅病毒調查檢體統計表

鳥種	件數	鳥種	件數	鳥種	件數
雁鴨科	3596	鷲鷹科	5	伯勞科	1
鷸鴴科	899	雉科	4	鸕鷀科	1
鷺科	36	隼科	3	八哥科	1
鴟鴞科	12	燕科	3	山雀科	1
秧雞科	12	鴉科	2	其他 <sup>°</sup>	41
鳩鴿科	7	翡翠科	2	共計	4626 件

a:包括鵯科、畫眉亞科、五色鳥科、水雉鳥科、水雉科、鶇亞科、長尾山雀科、黃鸝科、 鶲亞科等 9 科鳥種。

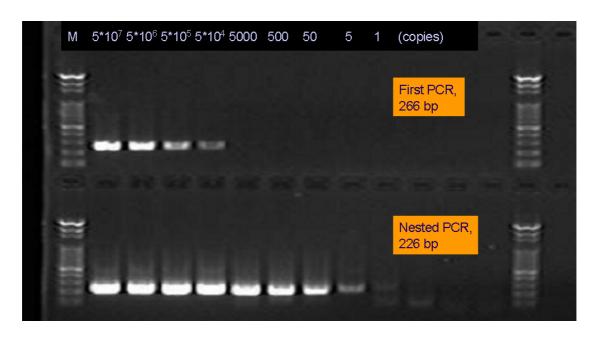


Fig. 1 上排為傳統 RT-PCR 電泳結果;下排為 Nested PCR 電泳結果。 lane 1 為 DNA ladder;

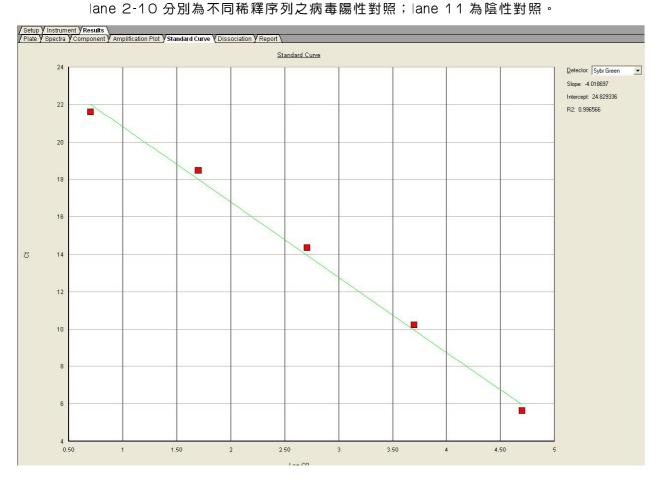


Fig. 2 SYBR Green real-time PCR 之線性關係曲線,相關係數為 0.996。

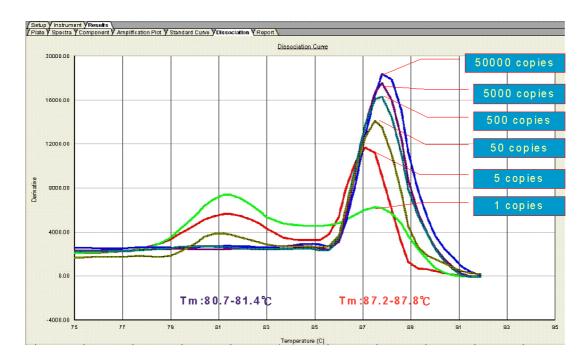
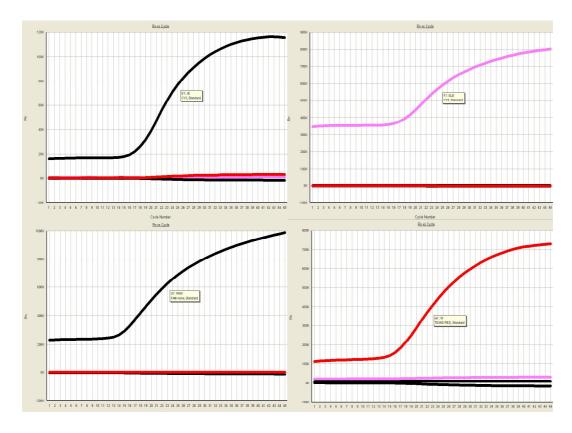


Fig. 3 西尼羅熱病毒 SYBR Green 定量 real-time PCR 實驗。將病毒 RNA 十倍序列稀釋 (50000 copies 至 1 copy number),其 melting curve 的實驗結果。



# Development of Molecular Diagnostic Methods for Detecting West Nile Virus in Wild Birds in Taiwan in 2006

Liu YP1\*<sup>1</sup>, Chang GJ<sup>2</sup>, Cheng MC<sup>1</sup>, Lee MS<sup>1</sup>, Chen LH<sup>1</sup>, Lee SH<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

<sup>2</sup> Centers of Disease Control and Prevention, United States

**Abstract** West Nile virus (WNV) infection is an important zoonosis. To prevent the possible introduction of this emerging disease into Taiwan, we have established a comprehensive wild-bird surveillance system for monitoring the presence of West Nile viral RNAs in migratory birds. Three detection methods for West Nile viral RNA, including nested PCR, SYBR Green I real-time PCR and Multiplex TaqMan real-time PCR, were used for this study. The nested PCR assay could detect 5 RNA copies, and it was 1000-fold more sensitive than that of traditional PCR. The sensitivity of SYBR Green I real-time PCR assay was equal to nested PCR. However, if the standard curve generated from known copy-number control specimens was included in the assay, the SYBR Green assay could be used to quantify the copy number of testing specimens. The multiplex TaqMan real-time PCR could differentiate four important flaviviruses, including WNV, JE, SLE and YF viruses. We have incorporated the surveillance project of WNV into the avian influenza surveillance project established previously. A total of 4,626 specimens from wild birds were processed in 2006, and none of them was WNV positive.

**Key words:** West Nile fever, Wild birds, Real-time polymerase chain reaction

<sup>\*</sup>Corresponding Author Animal Health Research Institute