

利用反轉錄聚合酶鏈反應技術在新城雞病病毒 臺灣分離株之檢測

林德田* 許天來 林地發 鄭明珠 楊華章
黎南榮 蘇杰夫 林士鈺

臺灣省家畜衛生試驗所 疫學研究系

摘要 為發展快速精確診斷新城雞病，並設計二組共 4 條配對引子，應用反轉錄聚合酶反應技術 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 以檢測新城雞病病毒 (Newcastle disease virus, NDV)，所得 PCR 產物以快速電泳分析與 ethidium bromide 染色證實為新城雞病病毒核酸之特異增幅產物，因此本技術可應用於新城雞病病毒之檢測。利用 RT-PCR 技術檢測於 1997~1998 年間本省臺南縣、彰化縣、桃園縣、苗栗縣及新竹縣等縣市之疑似新城雞病病例，結果可快速檢測出 ND 陽性的病材及產生特異 PCR 增幅產物，因此本技術可應用在疑似新城雞病病例初步快速診斷參考。

關鍵詞：新城雞病，反轉錄—聚合酶鏈反應

緒 言

新城雞病是一種藉空氣傳播極快速之家禽重要傳染病，其感染宿主範圍相當廣泛，因此本病除感染雞群外亦感染許多禽類及鳥類，甚至感染人類導致眼結膜炎^[4]。本病毒對外界抵抗力相當強，故可活存在感染禽所有分泌液及排泄物中，因此本病流行病學上其冷凍禽肉、食品類及運輸器具等污染新城雞病病毒則較自然帶病原之野生鳥類為重要^[4, 7]。本病病毒分離株依照雞胚胎之平均致死時間、雞胚胎纖維細胞形成斑點能力與造成雞致死程度，將 NDV 分離株分為強毒株、中間毒株及弱毒株^[8]，其中又以強毒株對雞病害性最大，尤其在本省於民國 84 年 1 月至 3 月間強毒內臟型新城雞病病毒肆虐整個雞群，造成雞群死傷慘重，足可見強毒株病害性大。

新城雞病病毒之基因體是屬於分子大小為

15 kb 之 nonsegmented negative sense 股的 RNA^[6]，在感染宿主細胞後會產生 50 s 正股 RNA 與 18 s、22 ~ 28 s 及 35 s RNA^[17]。新城雞病病毒在整個病原性而言以病毒 hemagglutinin-neuraminidase (HN) 及 fusion (F) 醣蛋白^[15] 之基因為主，因此相繼有許多學者對強毒株及弱毒株進行基因選殖與核酸序列分析^[12, 14]。本病傳統診斷上以病理性病變及病毒分離為主，但當非典型及潛伏病例時則就無法確切診斷本病，其他螢光抗體法、酵素免疫吸附法等雖能快速診斷但非特異性高，時有診斷試驗中非特性反應之出現。自 1985 年 Saiki 等^[13] 利用 PCR 技術增幅基因後，使得 PCR 技術廣泛應用於基因的增幅與疾病的診斷，尤其本技術應用於腮腺病毒野外毒株與疫苗株區別^[3]，而在 1991 年 Jestin 等^[6] 亦利用本技術檢測感染 NDV 雞胚胎之尿囊液，由以上文獻報告得知 PCR 技術可應用在新城雞病疾病的診斷上。而本次試驗

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

是以 RT-PCR 檢測新城雞病病毒及野外疑似新城雞病之病例，以瞭解本技術應用在新城雞病診斷之實用性。

材料與方法

病毒增殖^[1]

取 NDV 病毒株 (NDV: 691036, Sato, 石井株, ME8, 宮室株, B₁, B₁-Lasota, Lasota) 以 10⁵ PFU 病毒感染力價接種於 9~11 日齡 SPF 雞胚胎，置 37 °C 恒溫箱中，感染 24 小時後檢蛋淘汰死亡的雞胚胎，爾後陸續將死亡的雞胚胎收集及感染 48 小時後之雞胚胎收集置 4 °C 冰箱中隔夜，促使雞胚胎血管收縮，以減少收取尿囊病毒液時紅血球之釋出，此病毒尿囊液分裝於小瓶置於 -70 °C 以備萃取 RNA 使用^[1]。並同時準備傳染性華氏囊病 (infectious bursal disease, IBD)，馬立克 (Marek's disease, MD) 及傳染性喉頭氣管炎 (infectious laryngotracheitis, ILT) 等病毒株為實驗對照組。

病毒分離^[15]

將疑似 ND 之禽類病材包括氣管、脾、腎及其他臟器研製成 10 倍體積 MEM (Minimum essential medium) 懸浮液 (含 Penicillin 10,000 IU/mL 及 Streptomycin 10,000 µg/mL)，並經 3,000 rpm 轉數離心 30 分鐘取其 0.2 mL 上清液接種於 9~11 日齡 SPF (Specific pathogenic free) 雞胚胎蛋之尿囊腔後，置於 37 °C 恆溫箱中每日觀察是否胚胎蛋死亡並收集 24 小時以後死亡雞胚胎蛋之尿囊液，再經電子顯微鏡技術及特異 ND 抗血清 (本所研製) 進行病原鑑定。

新城雞病病毒分離株鑑定

將疑似 ND 病例之組織臟器試材接種雞胚胎所收集尿囊液先進行血球凝集試驗，若為陽性反應者再進行電子顯微鏡技術觀察病毒外觀形態，最後再以抗特異 NDV 抗體血清進行血球凝集抑制試驗以鑑定是否是新城雞病病毒。

血球凝集試驗 (Hemagglutination test, HA)：取 25 µL 量 5% 新鮮雞紅血球 (三週齡以下小雞) 與 25 µL 量尿囊液，混合均勻 20 分鐘

後判毒是否有呈現血球凝集現象。

電子顯微鏡技術：將檢測血球凝集為陽性之尿囊液先經 3,000 rpm 轉速低速離心以去除細胞沉渣，再取其上清液經 90,000 rpm 轉速離心 10 分鐘 (氣動式離心機)，最後取其沉澱物經 2% 磷鎢酸進行負染色與電子顯微鏡下觀察副黏液病毒之形態。

血球凝集抑制試驗 (Hemagglutination-Inhibition test, HI)：以抗新城雞病之特異性血清進行血球凝集抑制試驗，取 0.025 mL 抗 NDV 血清在生理鹽水中連續 2 倍稀釋後，每一稀釋階段加入等量 4 HA 血球凝集力價之 ND 病毒尿囊液，充分混合均勻靜置於室溫中感作 20 分鐘後，再加入 0.025 mL 1% 雞紅血球懸浮液並充分混合均勻，靜置於室溫 30~60 分鐘後判讀。

病毒 RNA 萃取

樣品來源為病毒尿囊液和病材之臟器組織作成 10 倍乳劑。RNA 的萃取係參考應用 GIBCO BRL 公司新發展的 RNA 快速萃取試劑 TRIZOL^R，萃取總量 RNA，並依該公司操作指示下進行操作：取 100 µL PCR 產物加入 1 mL TRIZOL^R 劇烈震盪 30 秒並靜置室溫 5 分鐘，加入 200 µL Chloroform 以手劇烈震盪 15 秒後靜置室溫 3 分鐘，置於 4 °C 下 12,000 xg 離心 15 分鐘。取上清液與等量 Isopropanol (Sigma) 充分混合後靜置室溫 10 分鐘，再置於 4 °C 下 12,000 xg 離心 15 分鐘。倒棄上清液加入 1 mL 75% 乙醇經搖動後於 4 °C 下 12,000 xg 離心 5 分鐘後去上清液。將總量 RNA 團塊經空氣乾燥 10 分鐘或真空乾燥 3 分鐘後加入 60~80 µL DEPC (Diethylpyrocarbonate) 水，以微量吸管頭沖散 RNA 團塊。迅即進行 RT-PCR 過程。

引子 (primer) 設定

參閱 Jestin et al^[5] 和 Collins, et al^[2] 設定引子，並設定 4 條特異性引子如下：

Primer 1: 5'-CTT TGC TCA CCC CCC TTG G-3' (315-333, 19 mer)

Primer 2: 5'-CTT CCC AAC TGC CAC TGC-3' (

572 – 589, 18 mer)

Primer 3 : 5'-TAT ACC TCA TCC CAG ACA GG-3'
(203 – 222, 20 mer)

Primer 5 : 5'-TAC TGC TGT CGC TAC ACC TAA-3'
(487 – 507, 21 mer)

反轉錄聚合酶鏈反應操作過程

首先配製 PCR 反應液包括 dNTP (dATP、dTTP、DGTP、dCTP mixtures 1.25 mm) 16 μ L, 10 \times Dynazyme buffer 10 μ L, Rnasin (40 u / μ L) (promega) 0.4 μ L, AMV Transcriptase (8 u / mL) 0.3 μ L, Primer (Primer 1 和 Primer 2 為一組, Primer 3, 5 為一組) 1 μ L, Dynazyme 1 μ L, Template DNA (Sample DNA) 13 μ L, 加 H₂O 至 100 μ L 為最終反應體積。其反應條件為 42 $^{\circ}$ C 40 分鐘單一循環。94 $^{\circ}$ C 40 秒 – 45 $^{\circ}$ C 1 分鐘 – 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘進行 35 個循環。72 $^{\circ}$ C 延長 7 分鐘。每一試驗試管為 100 μ L 總體積, 放置在 DNA Thermal Cycler (MJ RESEARCH, PTC-200, 美國) 中進行 PCR 試驗。

洋菜膠電泳分析^[9]

首先配製 2% Agarose (1X TAE 緩衝溶液, 0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA), PCR 產物在迷你式電泳槽中 (Mupid-2) 進行核酸電泳分析。取 PCR 產物 10 μ L 與適量 6X Loading buffer (0.25% Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF, 30% glycerol in water) 混合均勻注入齒槽中, 以 100 volt 泳動 30 分鐘, 電泳完畢後並加入 Ethidium bromide (Sigma) 染色數分鐘, 置於 UV 透視 (UV transilluminator, FOTODYNE) 下觀察, 並用 Polaroid type 667 相紙照像。

結 果

病毒分離及鑑定

將彰化縣、臺南縣、桃園縣、苗栗縣及新竹

縣等疑似新城雞病試材經 9~10 日齡 SPF 雞胚胎三次盲目繼代接種, 並經 HA 活性、HI 試驗及電子顯微鏡負染色等技術證實所分離到 NDV 病毒株包括彰化縣 29 株 (表 1), 桃園縣 3 株 (表 2)、苗栗縣 4 株 (表 2) 及新竹縣 7 株 (表 2), 但臺南縣試材並未分離到 ND 病毒株。

引子特異性試驗

分別利用 primer 1 與 primer 2 配對為一組及 primer 3 與 primer 5 配對另一組, 並分別檢測 NDV Sato 病毒株試驗結果顯示兩組試驗均能產生特異的增幅 PCR 產物, 尤其第一組引子 (primer 1, primer 2) 對 Sato NDV 可產生 275 base pairs (bps) 之增幅產物, 及第二組引子 (primer 3, primer 5) 可產生 305 bps。primer 1 和 primer 2 之引子進行對 NDV 691036, Sato, ME8, 石井, 宮室, B₁, B₁-Lasota, Lasota 等 NDV 病毒株進行特異性試驗, 結果所有檢測 NDV 病毒株均能產生 275 bps 之 PCR 增幅產物, 而檢測不出 IBD, MD, ILT 等 PCR 增幅產物 (圖 1)。此外, 以 Primer 3 和 Primer 5 之引子進行對 NDV 691036, Sato, ME8, 石井, 宮室, B₁, B₁-Lasota, Lasota 等 NDV 病毒株進行特異性試驗, 結果所有檢測 NDV 病毒株均能產生 305 bps 之 PCR 增幅產物, 而檢測不出 IBD, MD, ILT 等 PCR 增幅產物 (圖 2)。

RT-PCR 檢測野外疑似 ND 之試材

利用 RT-PCR 技術檢測臺南縣、彰化縣、桃園縣、苗栗縣及新竹縣等疑似 ND 病例試材, 檢測結果如下: 臺南縣 45 個試材未檢出任何 PCR 增幅產物, 彰化縣 40 個試材中可檢出有 16 個特異性 PCR 增幅產物 (表 1), 桃園縣 10 個試材可檢出有 3 個特異性 PCR 增幅產物 (表 2), 苗栗縣 9 個試材中可檢出有 4 個特異性 PCR 增幅產物 (表 2), 新竹縣 10 個試材中可檢測出 7 個特異性 PCR 增幅產物 (表 2)。

表 1 以聚合酶鏈反應技術檢測 1998 年 8 月彰化縣某一仿土雞場疑似新城雞病送檢病材。顯示經聚合酶鏈反應檢測結果 16 個陽性反應，並且分離到 16 株新城雞病病毒。本試驗之檢材均是來自組織臟器懸浮液經低速離心之上清液。

檢材編號 (上清液)	聚合酶鏈反應檢測試驗	病毒分離試驗
98-8-17-1 腸	+	Y
98-8-17-1 腺胃	+	Y
98-8-17-1 氣管	+	Y
98-8-17-1 肝臟	+	Y
98-8-17-1 脾臟	+	Y
98-8-17-2 腸	-	N
98-8-17-2 腺胃	+	Y
98-8-17-2 氣管	+	Y
98-8-17-2 肝臟	-	N
98-8-17-2 脾臟	-	N
98-8-17-3 腸	+	Y
98-8-17-3 腺胃	-	N
98-8-17-3 氣管	+	Y
98-8-17-3 肝臟	-	N
98-8-17-3 脾臟	-	N
98-8-17-4 腸	-	N
98-8-17-4 腺胃	+	Y
98-8-17-4 氣管	+	Y
98-8-17-4 肝臟	-	N
98-8-17-4 脾臟	-	N
98-8-17-5 腸	-	N
98-8-17-5 腺胃	+	Y
98-8-17-5 氣管	+	Y
98-8-17-5 肝臟	-	N
98-8-17-5 脾臟	-	N
98-8-17-6 腸	+	Y
98-8-17-6 腺胃	+	Y
98-8-17-6 氣管	+	Y
98-8-17-6 肝臟	-	N
98-8-17-6 脾臟	-	N

註：-，陰性反應 +，陽性反應
 N，未分離到 ND 病毒 Y，分離到 ND 病毒

表 2 以聚合酶鏈反應技術檢測 1998 年桃園縣 (6 月)、苗栗縣 (6 月)、新竹縣 (3 月) 等肉雞場疑似新城雞病送檢病材。顯示經聚合酶鏈反應檢測結果之陽性反應分別為桃園縣 (3)、苗栗縣 (4)、新竹縣 (7)，並且分離到新城雞病病毒株分別為桃園縣 (3)、苗栗縣 (4)、新竹縣 (7)。本試驗之檢材均是來自組織臟器懸浮液經低速離心之上清液。

檢材編號 (上清液)	PCR 檢測試驗	病毒分離試驗
桃園縣		
98-6-26-3 肺臟	-	N
98-6-26-1 腦	-	N
98-6-26-2 脾	+	Y
98-6-26-4 肺臟	-	N
98-6-26-3 直腸	-	N
98-6-26-1 直腸	-	N
98-6-26-2 腎臟	+	Y
98-6-26-2 肺臟	-	N
98-6-26-1 腎臟	+	Y
98-6-26-1 脾臟	-	N
苗栗縣		
98-6-24-2 氣管	-	N
98-6-24-2 脾臟	-	N
98-6-24-3 腎臟	-	N
98-6-24-1 氣管	-	N
98-6-24-4 腎臟	+	Y
98-6-24-1 脾臟	+	Y
98-6-24-1 肺臟	+	Y
98-6-26-2 肺臟	-	N
98-6-24-2 腎臟	+	Y
新竹縣		
98-3-18-6 結腸	+	Y
98-3-18-1 氣管	-	N
98-3-18-3 氣管	+	Y
98-3-18-1 腺胃	+	Y
98-3-18-9 結腸	-	N
98-3-18-3 肝臟	+	Y
98-3-18-1 肝臟	+	Y
98-3-18-1 氣管	+	Y
98-3-18-2 肝臟	-	N
98-3-18-5 肝臟	+	Y

註：-：陰性反應

+：陽性反應

N：未分離到 ND 病毒

Y：分離到 ND 病毒



圖 1. 引子 (Primer 1, 2) 對新城雞病病毒與其他病毒株之特異性試驗。在 Mupid-2 中 100V 30 分鐘電泳分析。結果顯示 Primer 1~2 對所有新城雞病病毒均能產生特異性聚合酶鏈反應產物，但對 IBD, MD 及 ILT 等病毒株均不產生聚合酶鏈反應產物。

M: Φ X174/Hae III marker

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| 1. NDV691036 株病毒之聚合酶鏈反應產物 | 2. Sato 株病毒之聚合酶鏈反應產物 |
| 3. ME8 株病毒之聚合酶鏈反應產物 | 4. 石井株病毒之聚合酶鏈反應產物 |
| 5. 宮室株病毒之聚合酶鏈反應產物 | 6. B1 株病毒之聚合酶鏈反應產物 |
| 7. B1-Lasota 株病毒之聚合酶鏈反應產物 | 8. Lasota 株病毒之聚合酶鏈反應產物 |
| 9. Sato 株病毒之聚合酶鏈反應產物 | 10. IBD 株病毒之聚合酶鏈反應產物 |
| 11. MD 株病毒之聚合酶鏈反應產物 | 12. ILT 株病毒之聚合酶鏈反應產物 |

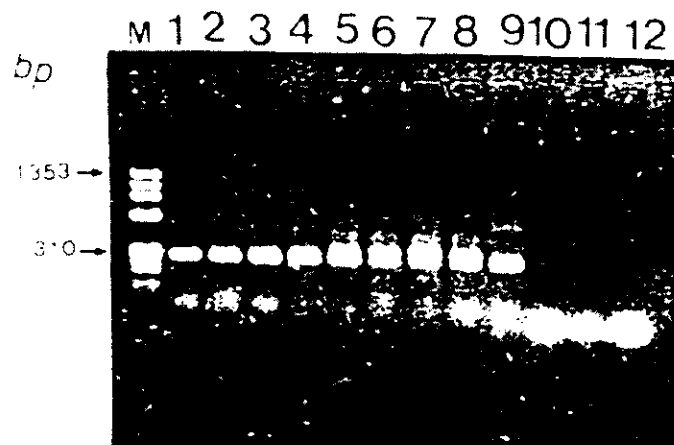


圖 2. 引子 (Primer 3, 5) 對新城雞病病毒與其他病毒株之特異性試驗。在 Mupid-2 中 100V 30 分鐘電泳分析。結果顯示 Primer 3, 5 對所有新城雞病病毒均能產生特異性聚合酶鏈反應產物，但對 IBD, MD 及 ILT 等病毒株均不產生 PCR 產物。

M: Φ X174/Hae III marker

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| 1. NDV691036 株病毒之聚合酶鏈反應產物 | 2. Sato 株病毒之聚合酶鏈反應產物 |
| 3. ME8 株病毒之聚合酶鏈反應產物 | 4. 石井株病毒之聚合酶鏈反應產物 |
| 5. 宮室株病毒之聚合酶鏈反應產物 | 6. B1 株病毒之聚合酶鏈反應產物 |
| 7. B1-Lasota 株病毒之聚合酶鏈反應產物 | 8. Lasota 株病毒之聚合酶鏈反應產物 |
| 9. Sato 株病毒之聚合酶鏈反應產物 | 10. IBD 株病毒之聚合酶鏈反應產物 |
| 11. MD 株病毒之聚合酶鏈反應產物 | 12. ILT 株病毒之聚合酶鏈反應產物 |

討 論

本試驗應用 PCR 技術檢測疑似新城雞病之病例，並同時配合雞胚胎病毒分離試驗，且每次收集之尿囊液均經 HA、HI 及電子顯微技術方能確診為新城雞病病毒，尤其經 PCR 檢測為特異性核酸增幅產物之試材均能分離 NDV 病毒株，而 PCR 檢測為陰性者則並未分離到 NDV 病毒，本試驗 NDV 病毒株並未檢測其病原指數試驗。因此僅證實有分離到 ND 病毒株，並未鑑定是屬於強毒、中間毒及弱毒。

Jestin 等^[5]首度以 PCR 技術檢測與增幅感染尿囊液之新城雞病病毒核酸，而且更證實對 NDV 可產生特異性 PCR 產物，但對家禽 paramyxovirus type II 和 type III 並不產生 PCR 增幅產物。本試驗參照與設定 Jestin 等^[5]所報告之 PCR 技術，並應用引子 (primer 1 和 primer 2) 進行新城雞病病毒株增幅試驗，結果均能產生特異性 PCR 核酸增幅產物，足見本引子可增幅本省 NDV 分離株 (691036) 與其他 NDV 標準株 (Sato、B₁ 及 Lasoda)，但對 IBD、MD 及 ILT 並未產生 PCR 產物，因此本次設計之引子 primer 1 及 primer 2 是特異增幅 NDV 核酸 PCR 產物。另又參閱 Collins 等^[2]之報告設計引子 (primer 3 和 primer 5) 進新城雞病病毒株增幅試驗，結果亦能產生特異 PCR 核酸增幅產物，足見本引子能增幅本省 NDV 分離株 (691036) 與其他 NDV 標準株 (Sato、B₁ 及 Lasoda)，但對 IBDV、MDV 及 ILTV 並未產生 PCR 產物，因此本引子 (primer 3 和 primer 5) 亦可特異增幅 NDV 核酸 PCR 產物。綜觀兩組引子進行 NDV 臺灣分離株 (691036) 及其他 NDV 標準株之 PCR 特異性試驗而言，增幅出來之 PCR 產物均與 Jestin 和 Collins 等增幅出的 PCR 產物相似即 275 bp (primer 1 and primer 2) 和 305 bp (primer 3 and primer 5) 之特異性增幅產物。因此 PCR 技術應可增幅 NDV 特異核酸產物。

為了快速檢測野外疑似 NDV 之感染病例，於是利用 RT-PCR 技術檢測臺南縣、彰化縣、桃園縣、苗栗縣及新竹縣等疑似雞群之 NDV 感染病例，在整個檢測過程中每一試材僅取 100 μ L 病

材懸浮液量即可經 RT-PCR 檢測是否有 NDV，因此整個病毒 RNA 萃取量只要 100 μ L 病材懸浮液即夠。應用 RT-PCR 檢測臺南縣疑似 NDV 感染病例結果均為陰性反應，並配合病毒分離試驗未分離到 NDV，於是確認本病例非 NDV 感染症，並推翻臨床上認定疑似 ND 之病例，由此病例得知 RT-PCR 技術可用在 ND 之快速診斷技術。另外彰化縣 (表 3)、桃園縣、苗栗縣、及新竹縣 (表 4) 等疑似 ND 病例經 RT-PCR 技術確認陽性之試材，並經病毒分離試驗均能分離到 NDV 病毒。因此經此次 RT-PCR 技術檢測 ND 疑似病例與病毒分離試驗，及 Stauber 等^[16]應用 RT-PCR 技術檢測其他禽病疫苗是否污染 NDV，可知 RT-PCR 應可使用於 NDV 感染病例之診斷。

參考文獻

1. 林德田。新城雞病病毒 F 與 M 單源抗體之製備，國立臺灣大學獸醫學研究所。碩士論文。1991。
2. Collins, M S., Bashiruddin, J B. and Alexander, D J. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. Arch. Virol. 128 : 363 – 370, 1993
3. Forsey, T., Mawa, TA. Yayas, P J. Bentley, M L. Mior, PD. Differentiation of vaccine and wild mumps viruses using the polymerase chain reaction a dideoxynucleotide sequencing. J. Gen. Virol. 71 : 987 – 990, 1990
4. Hofstad, MS., Barnes, HJ. Calnek, B. W. Rid, WM. and Yoder, HW. Jr. In "Newcastle disease," Disease of Poultry, 8th, Chapter 19 : 452 – 470, 1984
5. Jestin, V. and Jestin, A. Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). Arch. Virol. 118 : 151 – 161, 1991
6. Kolakofsky, D. Tour, B and Delious, H. Molecular weight determination of Sendai and Newcastle

- disease virus RNA. *J. Virol.* 13 : 261 – 268, 1974
7. Lancaster, J E. Newcastle disease, In "Virus diseases of food animals a world geography of epidemiology and control, "(e. P. J. Gibbs, ed) 2 : 43, 1981
 8. Lancaster, JE., Alexander. DJ. Newcastle disease virus and spread. A review of some of the literature. Can. Dept. Agri. Monograph. No. 11, 1975
 9. Maniatis, T. Fritsch, EF. Sambrook, J. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory, New York, pp 230 – 324, 1982
 10. Mc Gookin, R. RNA extraction by the proteinase K method. In : Walker JM (ed) methods in molecular biology, vol 2, nucleic acid. Humana Press, Clifton, NJ, pp109 – 112, 1984
 11. Millar, NS., Chambers, P. Emmerson, PT. Nucleotide sequence of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein genes in pathogenicity between strains. *J. Gen. Virol.* 69 : 613 – 620, 1988
 12. Palmieri, S. Genetic relationship among lentogenic strains of Newcastle disease virus. *Avian Dis.* 33 : 351 – 356. 1989
 13. Saiki, RK., Scharf, S. Faloona, F. Mullis, KB. Horn, GT Erlich, H. A Arnhin, N. Enzymatic ampification of s-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 : 1350 – 1354, 1985
 14. Schaper, UM., Fuller, FJ. Ward, MD. Merotra, Y. Stone, HO. Stripp, BR. Brysscher. E. V. De . Nucleotide sequence of the envelope protein genes of a highly virulent neurotropic strain of Newcastle disease virus. *Virology*, 165 : 291 – 295, 1988
 15. Scheid, A. and Choppin, PW. Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 11 (2) : 263 – 271, 1973
 16. Stauber, N, Brechtbuhl, K. Bruckner, L. and Hofmann, MA. Detection of newcastle disease virus in poultry vaccines using the polymerase chain reaction and direct sequencing of amplified cDNA. *Vaccine*, 13 (4) : 360 – 364, 1995
 17. Weiss, SR. and Bratt, MA. Effect of cordycepin (3'-deoxyadenosin) on virus-specific RNA species synthesized in Newcastle disease virus infected cells. *J. Virol.* 16 : 1575 – 1583, 1975

Detection of Newcastle disease virus isolates in Taiwan using the reverse transcription-polymerase chain reaction

*Der-Tyan Lin Tien-Lai Hsu Dih-Fa Lin Ming-Chu Cheng
Huar-Jarng Yang Nan-Jong Li Jei-Fu Su Shih-Yuh Lin

Taiwan Animal Health Research Institute 376 Chung-Cheng Rd.
Tansui, Taipei, 251 Taiwan, ROC

SUMMARY For the development of a rapid diagnostic technique of Newcastle disease, two primer pairs were designed and used in the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for the detection of Newcastle disease virus (NDV). Amplified cDNA of NDV was confirmed by electrophoresis and staining of ethidium bromide. The technique was further applied to the diagnosis of suspected Newcastle cases occurring in Prefectures of Tainan, Chuanghwa, Taoyuang, Mialee and Hsingchu during January 1997 to August 1998. Specific PCR products could be amplified and confirmed in all cases of Newcastle disease which were diagnosed by routine virus isolation and identification. The RT-PCR technique developed could be used first and before any other type of examination for the rapid, tentative diagnosis of Newcastle disease.

Keywords: *Newcastle disease , Reverse transcription-polymerase chain reaction*

*Corresponding author
Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.