

# 應用反轉錄聚合酶鏈反應檢測 1996 年 台灣流行之牛流行熱

鄺懋勁\* 曾俊憲 黎南榮 楊喜金 林士鈺

台灣省家畜衛生試驗所

**摘要** 對台灣經常發生之牛流行熱 (bovine ephemeral fever, BEF) 開發反轉錄聚合酶鏈反應 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 快速診斷, 設計 2 對引子 BEFV-P1 / BEFV-P2 與 BEFV-P3 / BEFV-P4, 其 PCR 產物分別為 824 bp 與 255 bp, 以 BEF 病毒 (BEF virus, BEFV) 日本株與台灣株來檢測本系統均可得特異之陽性反應。以 BEFV -P1 / BEFV-P2 引子之 RT-PCR 檢測 BEFV 之敏感性可達  $10^4$  TCID<sub>50</sub>, 再以 BEFV-P3 / BEFV -P4 引子進行巢式 PCR 其敏感性可達 1 TCID<sub>50</sub>。以本法對台灣 1996 年秋季發生之疑似 BEF 病材 31 例檢測出陽性 21 例 (67.74%), 並分離到 2 株牛流行熱病毒, 經證實 RT-PCR 可供 BEF 野外病例之快速診斷。

**關鍵詞**: 聚合酶鏈反應, 牛流行熱, 台灣

## 緒 言

牛流行熱 (bovine ephemeral fever, BEF) 是 Rhabdoviridae 的病毒經由節肢動物媒介所引起牛的一種發熱之急性傳染病, 其病原為牛流行熱病毒 (bovine ephemeral fever virus, BEFV), 本病在日本、中國大陸、東南亞、澳洲、印度、南非等熱帶及亞熱帶國家發生<sup>[5]</sup>, 台灣則在 1967、1983、1989、1996 分別發生牛流行熱<sup>[1, 8, 9]</sup>。

1996 年 8 月下旬本病在颱風後西南氣流之大雨後從新竹開始再度爆發, 由於本病病毒之分離需要在小白鼠腦內或 BHK21 或 Vero 等細胞數代盲目繼代後, 才分離得到, 同時臟器內或毒血的病毒力價低, 均無法以電子顯微鏡照到, 故快速確診的方法顯然非常重要, 本次試驗即在建立聚合酶鏈反應於牛流行熱之診斷, 並應用於本次大流行之野外診斷。

## 材料與方法

### 牛流行熱病毒

BEFV 之 YHL 株係分讓自日本家畜衛生試驗場而保存在台灣省家畜衛生試驗所者, TLRI 株係 1984 年本省新化省家畜試驗所分離株, LY 株係 1984 年本省柳營分離株經過小白鼠與 BHK21 馴化後供為疫苗製造用之毒株<sup>[2, 3, 4]</sup>。

### 細 胞

BHK21 細胞株及 Vero 細胞株均以含有 10% 胎牛血清的基礎細胞培養 (Eagle's Minimum Essential Medium, MEM) 並添加 penicillin 200 U/ml, streptomycin 100 µg/ml, Kanamycin 100 µg/ml 及 Fungizon 2.5 µg/ml 來增殖培養, 以供 BEFV 增殖與病毒分離。

\*抽印本索取者  
台灣省家畜衛生試驗所

### 病毒增殖與分離

YHL, TLRI, LY 三株 BEFV 均以 BHK21 在含有 5% 胎牛血清 (BEFV 抗體陰性者) MEM 增殖。野外病牛則採取抗凝血, 並分離白血球層, 接種 BHK21 細胞或 Vero 細胞, 每 4 天盲目繼代至有細胞病變 (cytopathic effect, CPE) 為止。

### 病毒 RNA 的萃取

YHL、TLRI、LY 三株標準 BEFV 在 BHK21 增殖之上清液取 0.25 ml 加 Trizol LS (Gibco BRL) 0.75 ml 依照廠商說明抽取 RNA。野外病牛則採取抗凝血之白血球層取 0.25 ml 加 Trizol LS 0.75 ml 同法抽取 RNA。

### 引子的設計

從 DNASTAR 基因庫 (DNASTAR, INC, Madison, WI, USA) 選出 BEFV-U04166. SEQ (nucleoprotein) 之基因序列, 並以 Oligo V 3.4 軟體程式 (National Biosciences, Hamel, MN, USA) 分析選定引子, 並以 DNASTAR 分析其 PCR 產物是否有適當的內核限制酶切點, 以供增幅片段之確認, 設計選定的 2 對引子 BEFV-P1 / BEFV-P2 及 BEFV-P3 / BEFV-P4 由 TIB MOLBIOL 公司 (Berlin, Germany) 合成。

### 反轉錄聚合酶鏈反應

取一無菌之 0.6 ml 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 BEFV-P1 0.25  $\mu$ g、BEFV-P2 0.25  $\mu$ g、dNTP 各 0.2 mM、10 mM Tris / HCl (pH 8.8)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM 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 (MJ Research, PTC-200), 進行第一個反應為 60  $^{\circ}$ C 5 分鐘將 RNA 變性, 第二個反應為 42  $^{\circ}$ C 30 分鐘合成第一股 cDNA, 第三個反應為 94  $^{\circ}$ C 變性反應 1 分鐘, 50  $^{\circ}$ C 煉合作用 2 分鐘, 72  $^{\circ}$ C 聚合作用 2 分鐘, 第三個反應重覆 30 的循環, 最後 72  $^{\circ}$ C 7 分鐘作用後結束反應。至於 BEFV-P3 / BEFV-P4 引子進行反應時, 煉合溫度改為

48  $^{\circ}$ C, 其它反應均同。但 BEFV-P3 / BEFV-P4 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 BEFV 感染 BHK21 之上清液抽取 RNA, 調整成每 5  $\mu$ l 含 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>, 並進行十倍序列稀釋成 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>、10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>、10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>、10<sup>1</sup> TCID<sub>50</sub>、10<sup>0</sup> TCID<sub>50</sub>、10<sup>-1</sup> TCID<sub>50</sub>, 以此 5  $\mu$ l 進行 BEFV-P1 / BEFV-P2 引子之 RT-PCR, 待此第一次 RT-PCR 完成後, 各取 5  $\mu$ l 再以 BEFV-P3 / BEFV-P4 引子進行巢式 PCR。

### 電泳分析

BEFV-P1 / BEFV-P2 與 BEFV-P3 / BEFV-P4 兩組配對引子之 PCR 反應後, 取 10  $\mu$ l 反應物置於 TAE 緩衝液中之 2% agarose 上, 以 Mupid-2 電泳槽 100 V 潛水式電泳 30 分鐘, 並分析結果。

### 結果

以 Oligo V3.4 分析 BEFV 核蛋白序列 (-U04166.SEQ) 選出的引子其序列位置及預期產物分子大小如表 1, BEFV-P1 / BEFV-P2 為第一對引子可增幅 824 bp 的片段, BEFV-P3 / BEFV-P4 為第二對引子, 可供為巢式反應, 亦可直接診斷用 (RT-PCR), 此可增幅 255 bp 的片段。於位置 469 鹼基處有 *Hpa* I 內核限制酶的獨一切點, 可供為增幅片段的確認。

將 YHL, TLRI 與 LY 三株 BEFV 之 RNA 分別以第一對引子 (BEFV-P1 / BEFV-P2) 與第二對引子 (BEFV-P3 / BEFV-P4) 進行 One-step RT-PCR, 分別可得到 824 bp 與 255 bp (如圖 1), 以 *Hpa* I 切割 BEFV-P1 / BEFV-P2 引子之 RT-PCR 產物可得到 141 bp 與 683 bp 二個片段, 以 *Hpa* I 切割 BEFV-P3 / BEFV-P4 引子之 RT-PCR 產物可得到 116 bp 與 139 bp 二個片段 (資料未顯示)。

在 BEFV 之 RT-PCR 敏感性試驗方面, 以 BEFV-P1 / BEFV-P2 引子進行 RT-PCR, 稀釋度從 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> 至 10<sup>-1</sup> TCID<sub>50</sub>, 結果顯示敏感性可達 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> (圖 2), 再以 BEFV-P3 / BEFV-P4 引子進行巢式 PCR, 結果顯示敏感性可達 10<sup>0</sup>

TCID<sub>50</sub> (圖 3)。

臨床上以引子 BEFV-P1 / BEFV-P2 對新竹市病牛之鼻汁進行 RT-PCR 偵測，再以引子 BEFV-P3 / BEFV-P4 進行巢式 PCR 偵測，從 10 頭病牛中可檢測出 9 頭陽性 (圖 4)，對新竹市、苗栗縣、台中縣、嘉義縣、台南縣病牛之 RT-PCR 檢測成績與病毒分離成績如表 2，從總共 31 頭病牛樣

品經過第一次 RT-PCR 可檢測出 12 頭陽性 (38.7%)，其中以鼻汁檢出率為低，血液檢出率為高，其中 10 頭鼻汁第一次 RT-PCR 陰性者，經過巢式 PCR 後大大提升檢出率 (90%)。第一次 RT-PCR 與第二次 PCR 檢出之陽性率合計為 21 / 31 (67.74%)，病材經過 3 至 5 代之 BHK21 或 Vero 細胞可分離 BEFV 2 株，Reoviridae 2 株。

表 1. 4 條 Bovine ephemeral fever virus 引子之序列及其預產物分子大小

BEFV 引子	序 列	位 置	預期產物大小 (bp)
BEFV-P1	5'-CTGGATTTCTTTTGGTGTTA-3'	329-348	824
BEFV-P2	5'-CGTCTTCTTGTCTTTTCTCA-3'	1133-1152 之互補鏈	
BEFV-P3	5'-GGAAGACGGAATCAAGAAAT-3'	354-373	255
BEFV-P4	5'-AACAGCAACATCATCAATAA-3'	589-608 之互補鏈	

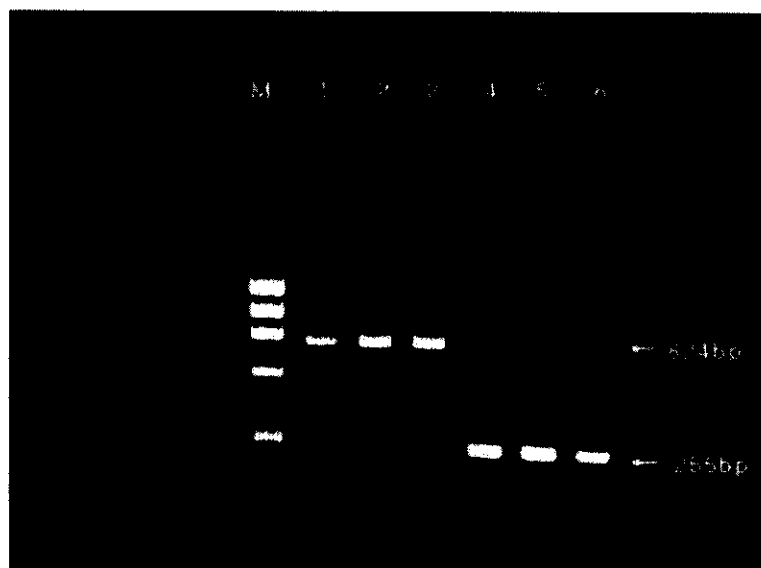


圖 1. 牛流行熱病毒之反轉錄聚合酶鏈反應。M:  $\phi$  X174 / HaeIII marker, No. 1, 2, 3 係 YHL、TLRI、LY 三株使用 P1P2 引子得到特異之電泳帶 824 bp, No. 4, 5, 6 係同 YHL、TLRI、LY 三株使用 P3P4 引子得到之特異電泳帶 255 bp。

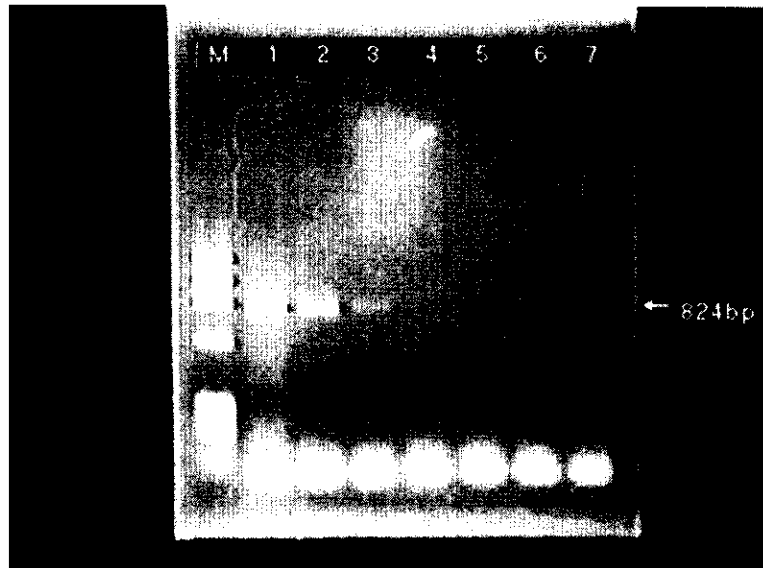


圖 2. Bovine ephemeral fever virus reverse transcription polymerase chain reaction 敏感性試驗之一 (第一次 RT-PCR)。M:  $\phi$  X174 / HaeIII marker, 1 號至 7 號分別為  $10^5$  TCID<sub>50</sub>、 $10^4$  TCID<sub>50</sub>、 $10^3$  TCID<sub>50</sub>、 $10^2$  TCID<sub>50</sub>、 $10^1$  TCID<sub>50</sub>、 $10^0$  TCID<sub>50</sub>、 $10^{-1}$  TCID<sub>50</sub> 組。圖中顯示第一次 RT-PCR 敏感性可達  $10^4$  TCID<sub>50</sub>。

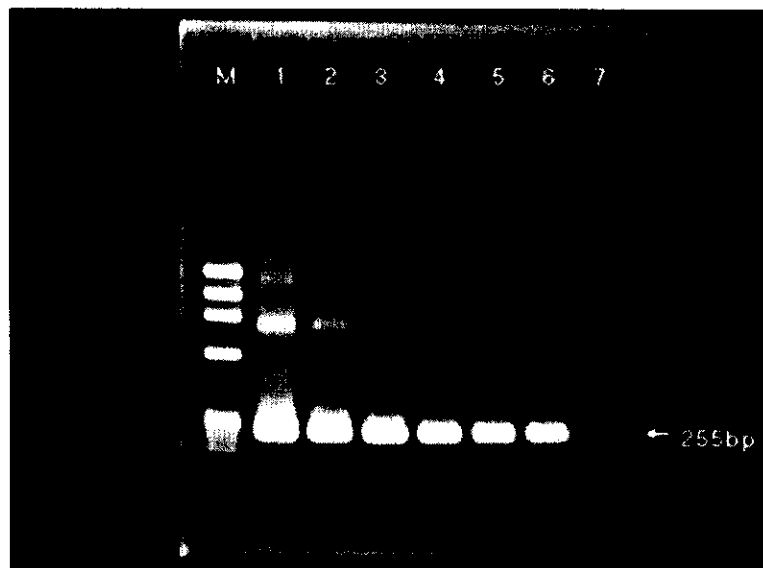


圖 3. Bovine ephemeral fever virus reverse transcription polymerase chain reaction 敏感性試驗之二 (巢式 PCR)。M:  $\phi$  X174 / HaeIII marker, 1 號至 7 號分別為  $10^5$  TCID<sub>50</sub>、 $10^4$  TCID<sub>50</sub>、 $10^3$  TCID<sub>50</sub>、 $10^2$  TCID<sub>50</sub>、 $10^1$  TCID<sub>50</sub>、 $10^0$  TCID<sub>50</sub>、 $10^{-1}$  TCID<sub>50</sub> 組。圖中顯示巢式 PCR 之敏感性可達  $10^0$  TCID<sub>50</sub>。

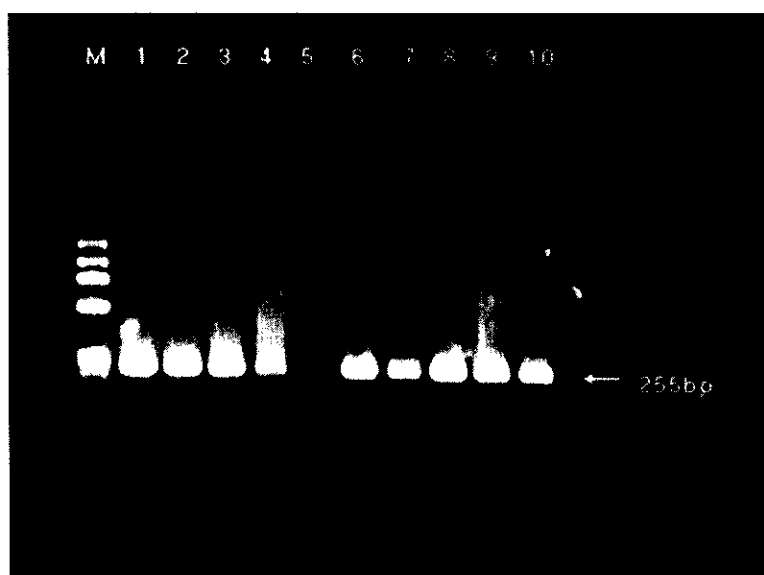


圖 4. 以巢式聚合酶鏈反應對新竹市牛流行熱病牛 10 頭之鼻汁進行檢測。9 頭有 255 bp 電泳帶者為陽性。

表 2. 聚合酶鏈反應技術檢測與病毒分離牛流行熱病毒之比較

病牛來源	樣品	陽性數 / 檢測數 (%)		病毒分離株	
		RT-PCR	巢式 PCR	BEFV	Reoviridae
新竹市	鼻汁	0 / 10 (0%)	9 / 10 (90%)	—	—
苗栗縣	血液	NT	NT	—	1
台中縣	血液	6 / 10 (60%)	NT	2	1
嘉義縣	血液	3 / 5 (60%)	NT	—	—
台南縣	血液	2 / 5 (40%)	NT	—	—
	氣管	1 / 1 (100%)	NT	—	—
合計		12 / 31 (38.7%)	9 / 10 (90%)	2	2

## 討 論

台灣目前已是牛流行熱之常在地區，在本省分別在 1967, 1983, 1989, 1996 等有大流行，此種週期性的發生大流行與澳洲的情形相似<sup>[12]</sup>，又 1996 年牛流行熱之大流行的發生是在颱風後西南氣流之大雨後，此情形與國內外發生情形相符<sup>[7, 10, 12]</sup>，國外均有從蚊蟲分離到本病毒的報告<sup>[6, 11]</sup>，大雨後此時蚊蟲容易滋生，導致牛流行熱之大流行。

傳統的牛流行熱診斷方法多靠病毒分離，但此法須在細胞或哺乳小白鼠多次盲目繼代才有可能分離病毒，曠日費時，本次試驗開發聚合酶鏈反應之診斷方法，可在 1 至 2 日即可得到結果，同時敏感性亦高，可診斷達到 1 TCID<sub>50</sub> 的病毒，同時診斷試劑易於保存，故可知本法對牛流行熱之診斷應有很大的助益。

## 參考文獻

1. 呂榮修、李永林、黃士則、蔡向榮、廖永剛、林地發、曾俊憲、宋華聰。1989 年發生在台灣之牛流行熱疫學研究。台灣畜牧獸醫學會會報。60 : 51 - 56, 1992
2. 邱仕炎、呂榮修。牛流行熱預防的研究。中華民國獸醫學會雜誌。13 : 189 - 195, 1987
3. Chiu S. Y. The isolation of bovine ephemeral fever virus in Taiwan in 1984. J. Chinese Soc. Vet. Sci. 12 : 275 - 288, 1986
4. Chiu S. Y., Lu Y. S. The serological study on bovine ephemeral fever in Taiwan in 1984. J. Chinese Soc. Vet. Sci. 12 : 289 - 296, 1986
5. Chiu S. Y., Lu Y. S. The epidemiology of the bovine ephemeral fever in Taiwan in 1984. J. Chinese Soc. Vet. Sci. 13 : 1 - 9, 1987
6. Davies FG, Walker AR. The isolation of ephemeral fever virus from cattle and *Culicoides* midges in Kenya. Vet. Rec. 95 : 63 - 64, 1974
7. Davies FG, Shaw T, Ochieng P. Observations on the epidemiology of ephemeral fever in Kenya. J. Hyg. (Cambridge) 5 : 231 - 235, 1975
8. Lin CS, Inoue M. A study on the bovine influenza occurred in Taiwan in 1967. Publication Division Chung Hsing University 18B : 151 - 166, 1969
9. Otte E. Virus disease of cattle in Taiwan. Journal of Taiwan Association of Animal Husbandry No. 12 : 1 - 22, 1968
10. Shirakawa H. A comparison of the epidemiology of bovine ephemeral fever in South Korea and southwestern Japan. Aust. Vet. J. 71 (2) : 50 - 52, 1994
11. St. George TD, Standfast HA, Dyce AL. The isolation of ephemeral fever virus from mosquitoes in Australia. Aust. Vet. J. 52 : 242, 1976
12. St. George TD, Standfast HA, Christie DG, Knott SG, Morgan IR. The epizootiology of bovine ephemeral fever in Australia and Papua-New Guinea. Aust. Vet. J. 53 : 17 - 28, 1977

# The Use of the Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for the Detection of Bovine Ephemeral Fever Epidemic in Taiwan in 1996

M. J. Kwang\*, C. S. Tsenz, N. J. Li, S. G. Yang and S. Y. Lin

Taiwan Animal Health Research Institute  
The Branch Institute of Animal Drugs Inspection

**SUMMARY** A reverse transcription polymerase chain reaction ( RT-PCR ) assay was developed for the detection of bovine ephemeral fever virus ( BEFV ). Two primer sets, BEFV-P1 / BEFV-P2 and BEFV-P3 / BEFV-P4, were used for the RT-PCR. Two DNA fragment, 824 bp and of 255 bp, could be specifically amplified respectively. Both Taiwan isolates and Japan isolate of BEFV could be detected positively. The sensitivity of RT-PCR with primers BEFV-P1 / BEFV-P2 for the detection of BEFV was  $10^4$  TCID<sub>50</sub>. The sensitivity increased  $10^4$ -fold when a pair of nested primers BEFV-P3 / BEFV-P4 was used. Twenty-one out of 31 ( 67.74 % ) samples, suspected of BEF infection, were diagnosed positive by this method, and two isolates of BEFV were isolated in this epidemic occurrence.

**Keywords:** *Polymerase chain reaction , Bovine ephemeral fever , Taiwan*

---

\*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.