

非洲豬瘟檢驗方法修正規定

一、非洲豬瘟（African swine fever；ASF），指由非洲豬瘟病毒（African swine fever virus；ASFV）所引起的豬隻高傳染性及高致死性疾病，需以病毒分離或核酸檢測定序方法進行非洲豬瘟病毒檢測，其中以核酸檢測方法是用於檢出持續感染動物最敏感方法，亦為針對保存不佳檢體的有效檢測方法。

二、檢驗方法：

（一）血球吸附試驗（Haemadsorption test）- 病毒分離（Virus isolation；VI）試驗：

1. 抗原檢測：

疑似非洲豬瘟病例必須採集送至實驗室之樣本，包括含EDTA抗凝血、脾臟、淋巴結、扁桃腺及腎臟。樣本運送時儘可能冷藏，不要冷凍。非洲豬瘟病毒分離係採用初代細胞培養搭配血球吸附試驗（Haemadsorption test；HAD）來確認樣本中是否有非洲豬瘟病毒存在；血球吸附試驗原理是豬紅血球會吸附於被非洲豬瘟病毒感染的豬單核白血球及巨噬細胞表面，大部分非洲豬瘟病毒都會引起血球吸附。血球吸附試驗陽性可診斷為非洲豬瘟。目前有極少數非洲豬瘟病毒不會引起血球吸附，絕大多數是無毒力，但有少數可造成典型急性症狀。血球吸附試驗流程是將疑似患豬的血液或組織懸浮液體接種至白血球或肺泡巨噬細胞等初代細胞以測試樣本中是否有非洲豬瘟病毒。

2. 試驗步驟：

（1）檢體處理：

- A.取 0.5-2 g 組織塊，加入 5-10mL 緩衝鹽液或組織培養液體，以組織研磨機，製備組織懸浮液。
- B.離心 1000 g，5 分鐘 4 °C，取上清液體做病毒分離及血球吸附試驗。

(2)白血球製備與樣本接種：

- A.收集健康豬之新鮮脫纖血或抗凝血。
- B.700 g 離心 30 分鐘，收集膚色層（buffy coat）。加入 3 倍體積 0.83% NH₄Cl 溶液，混勻，在室溫作用 15 分鐘。
- C.650 g 離心 15 分鐘，小心倒掉上清液體，加入培養液體或 PBS 清洗細胞。
- D.加入含 10-30%原採血豬之血清及抗生素的細胞培養液體，調整細胞濃度至 10⁶-10⁷/mL。為防止非特異性血球吸附，必須加入與白血球相同豬隻來源的豬血清或血漿，如果必須檢測大量樣本，可嘗試以同源性（homogenous）血清取代，但必須先篩檢排除會形成非特異性（auto- ette）。
- E.取 96 孔盤加入白血球，每一孔放 300,000 個細胞，於 37°C、5% CO₂ 培養（若需例行做血球吸附檢測，培養 2-4 天細胞的敏感性較佳）。
- F.取白血球培養盤，接種樣本 0.02mL/孔。保存不佳的病材可同時接種 10 倍及 100 倍稀釋樣本。
- G.留一些孔洞做不接種之陰性對照，可確認是否有非特異性血球吸附。

H.每孔加入 0.02mL 新鮮 1% 豬紅血球溶液。

(3)肺泡巨噬細胞接種樣本

A.由液態氮中取出一管肺泡巨噬細胞，於 39°C 水浴快速解凍，將解凍的細胞抽出加入 10mL RPMI-C，270 g 離心 10 分鐘，倒掉上清，加入 RPMI-C 回溶，算細胞，將細胞調整為 $1 \times 10^6/\text{mL}$ ，24 孔細胞培養盤，每孔加入 1mL($1 \times 10^6/\text{mL}$)，於 37°C 5% CO₂ 培養箱培養 1 天。
RPMI-C 配製:RPMI 1L 加入 10 ml 三合一抗生素及 100mL 胎牛血清。

B.於每孔（24 孔盤）接種 100μl 樣品乳劑過濾液（0.45μm 過濾），於 37°C 5% CO₂ 培養 18 個小時後，加入清洗好之 0.75% 紅血球 100μl。留一些孔洞做不接種之陰性對照，可確認是否有非特異性 HAD。

(4)血球吸附(HAD)現象之觀察：

A.樣本接種於初代細胞後每天於顯微鏡下觀察，持續 7 天，檢查血球吸附或細胞病變效應（cytopathic effect；CPE）。

B.(a)若觀察到大量豬紅血球吸附在感染細胞表面，則為血球吸附陽性。

(b)若無血球吸附而貼附細胞數量減少則為細胞病變效應，可能是樣本有細胞毒性或假性狂病毒（Pseudorabies virus；PRV）感染或不造成血球吸附的非洲豬瘟病毒，此時可用 PCR 檢測。

(c)若無變化或 PCR 檢測呈陰性，必須抽出細胞接種上

清液再接再種至新的初代細胞，需連續 2 次繼代，每次接種必須以 PCR 及定序確認有無非洲豬瘟病毒。

(5)結果判讀程序：

- A.接種後觀察其有血球吸附或細胞病變效應產生。陰性對照為未接種的正常初代細胞，應無血球吸附及細胞病變效應。
- B.細胞接種樣本後觀察 7 天即為第一代，若有血球吸附非洲豬瘟病毒陽性，若無血球吸附而有細胞病變效應，經 PCR 檢測非洲豬瘟病毒呈陽性，判非洲豬瘟病毒陽性；反之，盲目進行繼代(稱第二代)。
- C.第二代參照第一代方式判讀;依結果決定是否進行第三次繼代。
- D.第三代參照第一代方式判讀。

(二)病毒核酸檢測 (Detection of virus genome by the polymerase chain reaction) - 非洲豬瘟病毒即時聚合酶鏈反應 (real-time PCR) 試驗：

方法一

1.步驟與方法：

引子 (primers) 及探針 (probe) 設計：

定量聚合酶鏈反應技術已被應用在非洲豬瘟的診斷上，利用 WOAHP 推薦的非洲豬瘟病毒特異性引子對 (pair of primer) 診斷非洲豬瘟病毒之引子及探針序列如下：

引子 FOR3 序列為

5'-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-3' (sense)

引子 REV2 序列為

5'-GATACCACAAGATCRGCCGT-3' (anti-sense)

探子 ASF-P 序列為 FAM-5'-

CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-3'-TAMRA

2. 病毒核酸萃取:

- (1) 取出 200 μ L 以處理完成之組織乳劑上清液，如使用 QIAamp DNA Mini kit 以 QIA cube、TANBead Nucleic Acid Extraction Kit 或 MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit 等自動核酸萃取。依據 WOA 陸生動物診斷試驗及疫苗手冊 2023 年版推薦方法(Chapter 3.9.1)萃取病毒核酸。操作方法與所適用之檢體種類包含細胞培養樣本、病材乳劑、臨床拭子樣本(clinical swab samples)、血液、血清等樣本依儀器及相關套組使用說明書內容辦理。
- (2) 全血處理，將採集的抗凝血轉置 0.3mL 至新的微量離心管，並加入適量不活化劑充分混合作用，作為萃取核酸之樣本。
- (3) 使用自動核酸萃取儀或其他套組依各實驗室現有設備辦理，惟需經能力比對測試驗證萃取成效。
- (4) 操作時需帶口罩和手套作正確防護。
- (5) 自動核酸萃取儀定期以清潔試劑清潔及除污，若有問題通知保養工程師做保養，核酸萃取套組(kit)放置在正確適當的儲存場所。

3. 即時聚合酶鏈反應

- (1) 本試驗採單一步反應 (One-step reaction)，所需的試劑

加在同一支反應管內。

(2)配製反應液：（每一支反應管包含以下反應試劑）

Real-time PCR 反應液配製	1管（ μL ）
商品化預混酵素反應液	12.5
20 μM Primer（FOR3）	1
20 μM Primer（REV2）	1
10 μM Probe（ASF-P）	1
DEPC-treated water	6.5
Template（核酸）	3
反應總體積	25

(3)陽性對照以及陰性對照：

每次進行反應時，加入非洲豬瘟病毒 p72 基因質體作為陽性對照組以及滅菌蒸餾水作為陰性對照組，與實驗組同時進行。

(4)反應條件：

反應液混合均勻後隨即將試管放在溫度循環器內，反應條件如下：50 $^{\circ}\text{C}$ 2分鐘（1循環） \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$ 10分鐘（1循環）或各商品化預混酵素反應試劑建議時間；95 $^{\circ}\text{C}$ 15秒 \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 60秒（40循環）。

4.結果判讀：

反應完成後，軟體即自動統計並繪製擴增曲線圖（Amplification curve），以擴增曲線圖進行判讀，陽性檢體的判讀標準為：閾值（Ct value） $<$ 40則將該檢體判定為陽性檢體；反之，則判定為陰性。

方法二

1. 步驟與方法：

(1) 引子 (primers) 及探針 (probe) 設計：

利用 WOAHA 推薦的非洲豬瘟病毒特異性引子對 (pair of primer) 診斷非洲豬瘟病毒之引子及探針序列如下：

引子 ASF-VP72-F 序列為

5'-CCCAGGRGATAAAATGACTG-3' (forward primer)

引子 ASF-VP72-R 序列為

5'-CACTRGTTCCCTCCACCGATA-3' (reverse primer)

R 為 A+G 混合鹼基位置。

探子為商品化用 FAM 標記，濃度 10 pmol/μl。

如果無法取得專一性的探子，則可以用相同濃度和反應條件的標準探針取代 (5'-[6-carboxy-fluorescein (FAM)]-TCC-TGG-CCR-ACC-AAG-TGC-TT-3'-[black hole quencher (BHQ)])

2. 病毒核酸萃取：同方法一。

3. 即時聚合酶鏈反應：

(1) 本試驗採單一步反應 (One-step reaction)，所需的試劑加在同一支反應管內。

(2) 配製反應液：(每一支反應管包含以下反應試劑)

Real-time PCR 反應液配製	1 管 (μL)
商品化預混酵素反應液	10
20 pmol/μl Primer (ASF-VP72-F)	0.4

20 pmol/ μ Primer (ASF-VP72-R)	0.4
10 pmol/ μ l Probe	0.2
DEPC-treated water	7
Template (核酸)	2
反應總體積	20

(3)陽性對照以及陰性對照：同方法一。

(4)反應條件：

反應液混合均勻後隨即將試管放在溫度循環器內，反應條件如下：95°C 5分鐘（1循環）→ 95°C 10秒鐘 →60°C 30秒（45循環）。

4.結果判讀：

反應完成後，軟體即自動統計並繪製擴增曲線圖（Amplification curve），以擴增曲線圖進行判讀，具有增幅曲線且閾值（Ct value）< 35則將該檢體判定為陽性檢體。當 Ct value 為35至40之間且具增幅曲線判為疑陽性，需重複試驗做確認。未偵測到 Ct value，判為陰性檢體。Ct value > 40判為陰性；當血清檢測或流行病學資訊推測為 ASFV 感染，則需重複試驗以確認 PCR 陰性結果。

(三)病毒核酸檢測（Detection of virus genome by the polymerase chain reaction）-非洲豬瘟病毒聚合酶鏈反應（PCR）試驗：

1.步驟與方法：

(1)引子（primers）設計：

聚合酶鏈反應技術已被應用在非洲豬瘟的診斷上，參考

WOAH 推薦非洲豬瘟病毒特異性引子對，設計 PPA-1/PPA-2 進行 PCR。

(2)PCR 引子序列如下：

PPA-1：5'-AGTTATGGGAAACCCGACC-3'

PPA-2：5'-CCCTGAATCGGAGCATCCT-3'

2.病毒核酸萃取:參照qPCR病毒核酸萃取方法。

3.聚合酶鏈反應：

(1)本試驗採單一步反應，所需的試劑加在同一支反應管內。

(2)配製反應液：（每一支反應管包含以下反應試劑）

PCR 反應液配製	1管 (μL)
商品化預混酵素反應液	12.5
20μM Forward primer (PPA-1)	1
20μM Reversed primer (PPA-2)	1
DEPC-treated water	7.5
Template (核酸)	3
反應總體積	25

(3)陽性對照及陰性對照：

每次進行反應時，非洲豬瘟病毒 p72基因質體作為陽性對照組及滅菌蒸餾水作為陰性對照組，與實驗組同時進行。

(4)反應條件：

反應液混合均勻後隨即將試管放在溫度循環器內，反應條件如下：95°C 3分鐘1 循環）或各商品化預混酵素反應試劑建議時間；95°C15秒→62°C 30秒→72°C30秒（40循環）→72°C7分鐘。

(5)瓊脂膠（agarose）製作：

A.取 2 公克瓊脂膠加入 100mL 之 1X TAE 電泳緩衝液配製成 2%瓊脂膠溶液，以微波爐加熱溶解瓊脂膠直到呈現完全透明狀態。

B.置於 55°C恆溫水槽中，待內外溫度平衡後再進行製膠。

C.將膠液倒入製膠台中，插入電泳梳（comb），待膠液冷卻凝固後取出電泳梳。

D.將膠片裝入塑膠袋密封後放入不透光盒內，置入 4°C 冰箱中保存。

E.PCR 產物電泳瓊脂膠電泳電泳分析。

F.PCR 反應產物取出 10 μ L 預先與 2 μ L 之 6 倍染劑（SafeView Nucleic Acid Stain）混合均勻後注入齒槽洞中，最後一孔加入 5 μ L 之 DNA 100 bp ladder Marker。

G.將電極選定為“-“極到“+” 極，以 100 伏特電壓泳動約 20 分鐘。

H.電泳完畢後膠片置於 UV 透視燈下觀察，並記錄影像。

4.結果判讀：

(1)將電泳膠片置於 302 nm 波長之紫外光下觀察分子標示物及 PCR 產物，並比較分子量大小。PPA-1/PPA-2 PCR 產物為 257 bp。

(2)所有電泳結果皆應拍照存檔。

三、參考文獻：

- (一)Chapter 15.1. Infection with African swine fever virus. (NB: Version adopted in May 2023), In: Terrestrial Animal Health Code, WOA, Paris.
- (二)Chapter 3.9.1. African swine fever (infection with African swine fever virus). (NB: Version adopted in May 2021), In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 12th ed., WOA, Paris.
- (三)European Union Reference Laboratory for ASF. Standard Operation Procedure for The Detection of African Swine Fever Virus by Real-Time Polymerase Chain Reaction (TaqMan probe ASF-VP72P1 or UPL commercial probe)
- (四)Fernandez-Pinero J., Gallardo C., Elizalde M., Robles A., Gomez C., Bishop R., Heath L., Couacy-Hymann E., Fasina FO., Pelayo V., Soler A., Arias M. Molecular Diagnosis of African Swine Fever by a New Real-Time PCR Using Universal Probe Library. Transboundary and emerging diseases, 60 (1), 48-58, 2013