

## 豬瘟檢驗方法修正規定

一、豬瘟 ( Classical swine fever ; CSF ) 指豬隻感染豬瘟病毒 ( Classical swine fever virus ; CSFV )，引起豬隻高傳染性及高致死性疾病。豬瘟的診斷主要可利用抗原及血清學檢測來進行。

二、豬瘟檢驗方法如下：

(一)病毒抗原檢測。

1、病毒分離。

2、病毒核酸檢測。

(二)血清學檢測。

1、螢光抗體病毒中和實驗 (Fluorescent Antibody Virus Neutralization Test ; FAVNT )。

2、酵素連結免疫吸附反應 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; ELISA)。

三、病毒抗原檢測

(一)病毒分離

採集自疑似豬瘟病例之臟器檢體如中樞神經系統、淋巴組織、腎臟及迴腸等都可進行豬瘟病毒之分離，以扁桃腺為最佳臟器。另外抗凝血液及白血球也可做為病毒分離之用。豬腎細胞株(PK-15)常用於豬瘟病毒分離之細胞株，可使用其他豬隻來源之細胞，但應證明該細胞株對豬瘟病毒之敏感性等同 PK-15 細胞株。病毒分離所使用之細胞以及細胞培養所需之血清應確認無任何瘟疫病毒屬相關病毒及抗體。

豬瘟病毒並不會引起細胞病變 (Cytopathic effect; CPE)，應使用免疫螢光染色來證明細胞已被豬瘟病毒感染，故陽性與陰性對照應包含於豬瘟病毒分離試驗中。

其操作步驟如下：

1、細胞培養基及胎牛血清

所有用於豬瘟診斷之細胞培養基使用含 5% (或 8%)胎牛血清 (Fetal Bovine Serum ; FBS) 之最低必須培養基 (Minimum Essential Medium ; MEM)，使用於豬瘟病例

診斷之胎牛血清須經檢驗，不得檢出任何瘟疫病毒屬相關病毒、核酸以及抗體等。若使用之胎牛血清含上述物質，將干擾後續豬瘟病毒之檢驗。

## 2、細胞製備

- (1) 病毒分離及中和抗體檢測所需之細胞為 PK-15 細胞株，該細胞株經檢測無豬環狀病毒及其他微生物之污染，以 1mL (細胞濃度為  $1 \times 10^6$  cells / mL) 置入冷凍小管凍存在液態氮中備用。
- (2) 自液態氮中取出含 PK-15 細胞之冷凍小管 1 管置於 37°C 中快速解凍，將解凍之小管置於 150T (150 cm<sup>2</sup> 面積) 細胞培養角瓶，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱內培養 3 至 4 天直至形成單層細胞(monolayer)。細胞繼代超過 20 代即重新自液態氮中重覆上述步驟解凍細胞株。
- (3) PK-15 細胞株培養角瓶繼代及使用前應以目視及鏡檢確認生長狀態良好，經以 70% 酒精擦拭角瓶瓶身後，移至生物安全操作櫃 (class II biosafety cabinet ; BSC) 內。
- (4) 於 BSC 內，抽棄角瓶內原有之培養液再以 1 倍磷酸鹽緩衝液 (Phosphate buffered saline ; PBS ) 清洗細胞 2 次並去除清洗液後，加入 3 mL 0.25% trypsin-EDTA 移入 37°C CO<sub>2</sub> 細胞培養箱內消化。
- (5) 每 1 分鐘將角瓶取出以顯微鏡觀察細胞變化待細胞完全消化後移出培養箱，轉入 BSC。
- (6) 取 5 mL 細胞培養液加入細胞培養角瓶內中和 0.25% trypsin-EDTA 作用，並將附著於角瓶表面上之細胞完全沖散後吸取至 15 mL 離心管暫存。加入 50 mL 細胞培養液於角瓶內再放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱持續培養。
- (7) 將上述收集細胞之 15 mL 離心管以低速離心機 (Kubota, 5100) 於室溫下 1,000 rpm 進行離心 10 分鐘。
- (8) 離心完畢後於 BSC 內抽棄上清液以 10 mL 細胞生長液懸浮細胞，取適量細胞懸浮液以 4% trypan blue 計算細

胞量並調整細胞量為  $5 \times 10^5$  cells/ mL 備用。

- (9) 取無菌六孔細胞培養盤，每孔加入 3 mL 上述細胞懸浮液，移入 37°C、5%CO<sub>2</sub> 細胞培養箱培養備用。

### 3、檢體處理

- (1) 檢體之採集與包裝須依照世界動物衛生組織 (OIE) 陸生動物疾病診斷與疫苗手冊第 1.1.2 章節-診斷所需樣品之採集與保存及 1.1.3 章節-動物來源檢體之運送內容說明處理。若收到之樣品包裝未依上述規定，或破裂以及標示不完全者，將直接拍照後進行銷毀。
- (2) 病材收取或採集帶回實驗室後若無法立即處理，應立即將病材樣品置於超低溫冷凍櫃內。檢體主要可分為：

檢體種類	說明
抗凝血液	病材以發病中豬隻採集者最佳
臟器組織 樣品	應經無菌之刀具或剪刀採集疑似染病豬隻剖檢之淋巴組織 (如淋巴結、扁桃腺、脾)、腎、末端迴腸等，採集後需置於無菌之離心管或六孔細胞培養盤內
血清	
拭子	咽喉及鼻腔

- (3) 將前述 (2) 之檢體移入 BSC 內拆除包裝，再將檢體取出，若檢體為組織樣品則每個檢體取約 2-3g，以組織研磨機(BAGMIXER®) 研磨，磨碎後以 1:4 (20%, W/V) 比例加入含 5 % FBS (須經確認不含瘟疫病毒屬病原或抗體) 的 1 倍 MEM 細胞培養液後暫存於 15 mL 離心管備用。若檢體為拭子則加入 5 mL 含 5 % FBS 的 1 倍 MEM 細胞培養液後以振盪混合器混合後取出拭子，置於 15 mL 離心管備用。
- (4) 將前述 (3) 步驟處理完畢之送檢檢體以低速離心機 (Kubota, 5100) 於室溫下 3,000 rpm 離心 10 分鐘後取出放入冰桶。

- (5) 於 BSC 內將前述(4)步驟之檢體離心上清液，以 10 mL 附針之螺旋注射筒逐一抽取，再以 0.45  $\mu\text{m}$  聚偏二氟乙烯 (Polyvinylidene difluoride; PVDF) 過濾膜過濾至新的 15 mL 離心管後，依檢體編號標示離心管後，保存於 0-4°C 直至所有檢體過濾完畢。
- (6) 將上述檢體以及無菌採集之抗凝血液、血清直接進行病毒接種、核酸檢測或保存於超低溫冷凍櫃內待用。

#### 4、檢體之病毒接種

- (1) 取已為單層 (monolayer) PK-15 細胞之六孔細胞培養盤，分別在細胞培養盤上標記檢體編號及日期。
- (2) 將六孔盤內之細胞培養上清液小心的抽棄後依照盤上的編號將通過前述 3、(3) 至 3、(6) 步驟之檢體 0.5 mL/孔依序接種至六孔盤內。每一檢體重複進行接種於另一六孔盤內。亦即每一檢體進行兩重覆接種試驗，且應接種於不同六孔培養盤內。
- (3) 若檢體為抗凝血液，則將該檢體置於超低溫冷凍櫃，待其完全冷凍後再移至 37°C 解凍後依 4、(2) 步驟進行。
- (4) 全部接種完畢後將所有六孔盤以塑膠袋密封後移至 37°C 培養箱內用水平震盪平台以 2 rpm 速度進行感作 1 小時。
- (5) 感作完畢後逐一抽棄檢體上清液後加入 3 mL/孔 2 % FBS 的 1 倍 MEM 細胞培養液，換液完畢後放入 37°C CO<sub>2</sub> 培養箱內培養 3 至 4 天。
- (6) 將接種培養之 PK-15 細胞六孔盤於 BSC 內小心吸取上清液至含有病毒消毒液之桶槽中，以無菌之 1 倍 PBS 清洗三次後再以 10% 福馬林固定。隨後以 PBS 清洗三次後，置於 37°C 烘乾即可進行豬瘟螢光抗體染色以確認有無豬瘟病毒。

#### 5、螢光抗體染色及判讀

- (1) 加入適量稀釋之豬隻抗豬瘟血清 (第一抗體)，每孔 500

- μL (稀釋液為 1 倍 PBS)，置入 37°C 內作用 60 分鐘。
- (2) 甩棄第一抗體後，並以 1 倍 PBS (每孔約 1 mL) 清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾。
  - (3) 加入適量稀釋之山羊抗豬免疫球蛋白螢光標示抗體 (第二抗體)，每孔 500 μL (稀釋液為 1 倍 PBS)，置入 37°C 內作用 60 分鐘。
  - (4) 甩棄第二抗體，並以 1 倍 PBS (每孔約 1 mL) 清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾，每孔加入 1 mL 1 倍 PBS。
  - (5) 以倒立螢光平盤顯微鏡於暗視野下判讀，若接種細胞內出現螢光者表示有豬瘟病毒感染。

(二) 病毒核酸檢測

在病毒感染的早期，病毒血症 (Viremia) 未達高峰時可經由反轉錄聚合酶鏈反應 (Reverse-transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) 驗出，較病毒分離及直接螢光抗體染色來得敏感而準確。目前 RT-PCR 亦可應用於豬瘟病例之篩檢，但因我國使用兔化豬瘟活毒疫苗防疫，而兔化豬瘟疫苗毒 (Lapinized Philippines Coronel; LPC) 於特定情況下可經由 RT-PCR 驗出，為避免檢出兔化豬瘟疫苗而出現偽陽性，故區別兔化豬瘟疫苗株及野外豬瘟病毒株之 RT-PCR 試驗應同步進行。

其檢測方法如下：

1、反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR)：

本試驗採一步反應 (one step reaction) 即反轉錄作用 (Reverse transcription; RT) 及聚合酶鏈作用 (Polymerase chain reaction; PCR) 在同一支反應管內進行，所需的試劑同時加在同一支反應管內，其特性為操作簡便，節省時間及避免污染。

(1) 豬瘟病毒核酸萃取操作方式如下：

方法	病毒萃取方式	說明
----	--------	----

方法一	自動化核酸萃取套組	病材乳劑離心後取出 200 $\mu$ L 上清液，使用核酸萃取套組配合自動化核酸萃取儀，依說明書指示萃取病毒 RNA。
方法二	TRIzol® 方法萃取豬瘟病毒核酸	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 取 1 mL 之 TRIzol® Reagent 加入含有 200 <math>\mu</math>L 病材乳劑的 microtube 中，vortex 30 秒，室溫靜置 5 分鐘。</li> <li>2. 加入 0.2 mL chloroform，震盪混合均勻，於室溫靜置 3 分鐘。</li> <li>3. 以 4°C、12,000 rpm 離心 15 分鐘，把上清液轉置於新的 microtube 中。</li> <li>4. 加入等量的異丙醇 (isopropanol)，充分混合後，於室溫靜置 3 分鐘。以 4°C、12,000 rpm 離心 20 分鐘，倒去上清液。</li> <li>5. 加入 50 <math>\mu</math>L 純乙醇，以 4°C、12,000 rpm 離心 5 分鐘，用 micropipete 吸除上清液後風乾。</li> <li>6. 將 60 <math>\mu</math>L 焦碳酸二乙酯 (Diethyl pyrocarbonate； DEPC) 處理過的滅菌二次蒸餾水 (簡稱 DEPC-treated DDW) 加入風乾的 RNA 中，溶解後至於冰上備用。</li> </ol>
方法三	其他市售之病毒 RNA 萃取套組萃取豬瘟病毒核酸	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 使用相同病毒力價之豬瘟病毒，分別使用 TRIzol® 以及市售之病毒 RNA 萃取套組同時進行病毒核酸萃取。</li> <li>2. 萃取之核酸分別以 DEPC-treated DDW 進行 10 倍連續稀釋 (<math>10^{-1}</math> 至</li> </ol>

		<p>10<sup>-8</sup>)。</p> <p>3. 瓊膠式或以即時定量反轉錄聚合酶鏈反應檢測，市售之病毒 RNA 萃取套組萃取之核酸稀釋皆不得低於以 TRIzol® 方法萃取豬瘟病毒核酸之稀釋階。</p>
--	--	---

(2) 引子 (primers) 序列 (參考文獻 Hoffmann et al., 2005。)

引子對 CSF 100-F 與 CSF 383-R 之組合為豬瘟特異性引子，可增幅豬瘟病毒各種基因型，並產生長度為 285 bp 之單一條 RT-PCR 產物。

引子	序列
CSF 100-F	5'-ATG CCC AYA GTA GGA CTA GCA-3' (100bp to 120bp)
CSF 383-R	5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC -3' (383bp to 363bp)

(3) 陽性對照

為豬瘟病毒疫苗株 (LPC-TS 株)，指行政院農業委員會家畜衛生試驗所之豬瘟疫苗毒 LPC 株，經 PK-15 細胞馴化，保存於 -70°C，陽性對照使用病毒力價大約 10<sup>4.7</sup> TCID<sub>50</sub> / mL。

(4) 配製反應液：(每一支反應管包含以下反應試劑)

RT-PCR 反應液配製	1 管 (μL)
兩倍 PCR 反應液	25
20 μM Primer (CSF 100-F)	1
20 μM Primer (CSF 383-R)	1
AMV (10U/μL)	0.2
r RNasin (40U/μL)	0.2
DEPC-treated DDW	17.6
Template (RNA)	5
反應總體積	50

(5) 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，設定增幅條件：先以 42°C 進行 40 分鐘反轉錄作用 (RT) 後直接進行聚合酶鏈反應 (PCR)。反應條件如下：42°C 40 分鐘 → 95°C 2 分鐘 (1 循環)；95°C 20 秒 → 55°C 20 秒 → 72°C 20 秒 (35 循環)；72°C 3 分鐘 (1 循環) → 4°C 保存至使用。

#### (6) 瓊膠 (agarose) 製作

取 2 mg 瓊膠 (agarose) 加入 100 mL 之 1 倍 TAE 電泳緩衝液配製成 2% 瓊膠溶液，以微波爐加熱溶解瓊膠直到呈現完全透明狀態。置於 55°C 恆溫水槽中，待內外溫度平衡後加入。將膠液倒入製膠台內，插入電泳梳 (comb)，待膠液冷卻凝固後取出電泳梳。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。

#### (7) CSF RT-PCR 產物電泳瓊膠 (agarose) 電泳分析

PCR 反應產物取出 5  $\mu$ L 預先與 1  $\mu$ 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  $\mu$ L 之 DNA 100 bp ladder Marker。將電極選定為“-”極到“+”極，以 100 伏特電壓泳動約 20 分鐘。電泳完畢後膠片置於 UV 透視燈下觀察。

#### (8) 測試結果判讀

將電泳膠片置於 302 nm 波長之紫外光下觀察分子標示物及 RT-PCR 產物，並比較分子量大小。引子 CSF 100-F 與 CSF 383-R 配對之產物長度為 285 bp。陰性樣品及陰性對照則無 RT-PCR 產物出現。

## 2、即時定量反轉錄聚合酶鏈反應 (Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction; rRT-PCR)：

### (1) 引子 (primers) 及探針 (probe) 設計

即時反轉錄聚合酶鏈反應技術已被應用在豬瘟的診斷上，利用 OIE 推薦的豬瘟病毒特異性引子對 (pair



of primer) 及鐵克曼探針 (TaqMan probe)能同時檢測三種基因型之豬瘟病毒。

診斷豬瘟病毒三種基因型之引子及探針序列如下  
(參考文獻 Hoffmann et al., 2005。):

引子	序列
CSF 100-F	5'-ATGCCCA YAGTAGGACT GCA-3' (100 bp to 120 bp)
CSF 383-R	5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC -3' (383 bp to 363 bp)
CSF-Probe 1	5'-FAM-TGGCGAGCTCCCTGGGTG GTCTAGT -TAMRA-3'

(2) 配製反應液：(每一支反應管包含以下反應試劑)

RT-PCR 反應液配製	1 管 (μL)
兩倍 PCR 反應液	12.5
10 μM Primer (CSF 100-F)	1
10 μM Primer (CSF 192-R)	1
10 μM Probe (CSF-Probe 1)	0.5
AMV (10U/μL)	0.2
r RNasin (40U/μL)	0.2
DEPC-treated DDW	7.1
Template (RNA)	2.5
反應總體積	25

(3) 反應條件

反應液混合均勻後立即將試管放在溫度循環器內，設定增幅條件：先以 50°C 進行 30 分鐘反轉錄作用 (RT) 後直接進行聚合酶鏈反應 (PCR)。反應條件如下：50°C 30 分鐘 → 95°C 5 分鐘 (1 循環)；94°C 30 秒 → 57°C 30 秒 → 68°C 30 秒 (40 循環)。

(4) 陽性對照

以豬瘟病毒 LPC 疫苗株經核酸萃取後取出 2.5 μL 作為 rRT-PCR 之陽性對照。

(5) 結果判讀

若 CSF-Probe 1 有螢光訊號產生，即可判定為豬瘟病毒核酸陽性。

3、應用反轉錄聚合酶鏈反應區別豬瘟野外毒及免化豬瘟疫苗毒核酸

(1) 引子序列 (參考 Pan et al., 2008。)

針對免化豬瘟疫苗毒與豬瘟野外毒核酸序列之差異，利用免化豬瘟疫苗毒核酸之 3'端相較於豬瘟野外病毒株具有一段大約 12-13 個核苷酸插入之特點，於該插入片段之兩端設計引子對，進行 RT-PCR 及 Nested-PCR 檢測。直接從電泳膠片顯示之 PCR 產物長短判讀結果，達到快速辨別豬瘟野外毒或免化豬瘟疫苗毒的目標。

引子對 CP5/CP6 增幅豬瘟野外毒及免化豬瘟疫苗毒核酸產物長度分別為 367 bp 及 379 bp。

引子對 CP3/CP6 增幅豬瘟野外毒及免化豬瘟疫苗毒核酸產物長度分別為 135 bp 及 147 bp。

引子對 CP3/CP6 可作為 Nested-PCR 增幅引子對 CP5/CP6 之 RT-PCR 產物。

引子	序列
CP5-F	5'- GTAGCAAGACTGGRAAYAGGTA -3' (sense)
CP6-R	5'- AAAGTGCTGTTAAAAATGAGTG -3' (anti-sense)
CP3-F	5'- ACCCTRTTG TARATAACTA -3' (sense)

(2) 配製反應液：(每一支反應管包含以下反應試劑)

RT-PCR

RT-PCR 反應液配製	1 管 (μL)
兩倍 PCR 反應液	25
20 μM Primer (CP5-F)或(CP3-F)	1
20 μM Primer (CP6-R)	1
AMV (10U/μL)	0.2
r RNasin (40U/μL)	0.2
DEPC-treated DDW	17.6
Template (RNA)	5

反應總體積	50
-------	----

Nested PCR

RT-PCR 反應液配製	1 管 (μL)
兩倍 PCR 反應液	25
20 μM Primer (CP3-F)	1
20 μM Primer (CP6-R)	1
DEPC-treated DDW	22
Template (CP5-F, CP6-R RT-PCR 產物)	1
反應總體積	50

(3) 反應條件如下：

RT-PCR	1、42°C 30 分鐘 → 94°C 3 分鐘 (1 循環) 2、94°C 40 秒→57°C 30 秒→72°C 30 秒(35 循環)。
Nested-PCR	1、94°C 3 分鐘 (1 循環) 2、94°C 20 秒→57°C 20 秒→72°C 20 秒(30 循環)。

(4) 陽性對照

以豬瘟病毒 LPC 疫苗株經核酸萃取後取出 2.5 μL 作為 rRT-PCR 之陽性對照。

(5) 結果判讀

以 4% 瓊膠進行電泳分析以檢測其產物，直接從電泳膠片顯示之 PCR 產物長短判讀結果。

CP5/CP6 增幅豬瘟野外毒及兔化豬瘟疫苗毒核酸產物長度分別為 367 bp 及 379 bp。

引子對 CP3/CP6 增幅豬瘟野外毒及兔化豬瘟疫苗毒核酸產物長度分別為 135 bp 及 147 bp。

(6) 核酸定序

陽性樣品取出 RT-PCR 產物及原始增幅引子一同進行核酸定序，以利判讀豬瘟野外毒之基因型別。

四、血清學檢測

### (一) 螢光抗體病毒中和試驗 (FAVNT)

由於豬瘟感染所造成免疫抑制之緣故，血清學的檢查特別是針對豬瘟清除計畫末期，種豬場是否帶有殘存之豬瘟病毒。抗體可提供非常有用之流行病學資訊並可提供病毒入侵豬場可能之來源。而種豬場可能感染有其他瘟疫病毒屬病毒如牛病毒性下痢病毒(Bovine virus diarrhea (BVD) and Mucosal disease (MD)；BVD/MDV)/邊境病毒(Border disease virus；BDV)，中和抗體檢驗及使用單源抗體之 ELISA 檢驗時必須注意敏感性與交叉反應之問題，故應進行比較 CSFV/BVD-MDV/BDV 之中和抗體試驗以確認是否為豬瘟中和抗體。其操作步驟如下：

#### 1、待測血清處理

(1) 待測血清在試驗前需先置於水浴槽中經 56 °C 30 分鐘進行非慫化處理。

(2) 微量盤的準備

以無菌操作方式拆封 96 孔微量培養盤。

編列試驗及對照血清於微量培養盤上，分別以雙孔重覆試驗。

#### 2、血清稀釋

(1) 在室溫中以無菌操作方式將血清加至 96 孔微量培養盤的 H 列位置 (25 μL / 孔)，每個血清樣品以雙孔 (Duplicate) 進行重覆試驗。

(2) 取已加有血清的培養盤按序放於自動分注器上，每孔分別注入 50 μL 含 8 % FBS 的細胞培養液 (第 H 列再注入 25 μL 含 8 % 胎牛血清的細胞培養液)，除 H 列為 100 μL 外，其餘各列(G、F、E、D、C、B、A) 每孔皆含 50 μL 細胞培養液。

(3) 由 H 列開始，以裝有滴頭 (Tips) 之十二爪微量稀釋器以 2 倍序列 (H 列為 4 倍) 由高至低抗體濃度連續稀釋(稀釋順序由 H→G→F→E...→A)，最後在 A 列

(為 512 倍) 的稀釋液混合均勻後取 50  $\mu$ L 稀釋混合液丟棄。

- (4) 對照血清包括已知力價之陽性血清及陰性血清，如同上述血清稀釋方法以二重覆方式加入至微量培養盤中。另有正常細胞作為對照，僅加入 100  $\mu$ L 之細胞培養液（不加入樣品血清及病毒稀釋液）。另一微量培養盤只含細胞培養液 50  $\mu$ L 預作病毒回歸力價 (Virus back titration) 對照。
- (5) 完成初步之血清稀釋後，即進行豬瘟病毒與血清抗體之中和作用及加入 PK-15 細胞等後續實驗工作。

### 3、細胞製備

- (1) 細胞繼代與培養請參照三、病毒抗原檢測，(一) 病毒分離，2、細胞製備。
- (2) 將消化之 PK-15 豬腎細胞株以 1,000 rpm 離心約 10 分鐘，將上清液倒棄，取下層細胞，加入適量的細胞培養基再均勻沖散。
- (3) 取少量之細胞懸浮液置入血球計算盤計算細胞濃度，再以適量的細胞培養基調整細胞濃度至  $3 \times 10^5$  cells / mL 備用。

### 4、中和抗體試驗用豬瘟病毒力價測定

- (1) 豬瘟病毒 (LPC-TS 株) 係由行政院農業委員會家畜衛生試驗所之兔化豬瘟疫苗毒 (LPC 株) 經 PK-CL 細胞馴化而得；使用時再經 PK-15 細胞培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱增殖，以 1 mL 量分裝於試管內並置於 -70°C 冰箱保存，同時測定其 50% 組織細胞感染力價 (50% tissue culture infective dose; TCID<sub>50</sub>)。
- (2) 將保存於 -70°C 之 LPC-TS 株豬瘟病毒解凍後以細胞培養液由 10<sup>-1</sup> 至 10<sup>-6</sup> 作 10 倍連續稀釋，並從最高稀釋階 (10<sup>-6</sup>) 開始，於 96 孔塑膠細胞培養盤第 6 欄每孔放入 50  $\mu$ L 10<sup>-6</sup> 經稀釋之病毒液、第 5 欄為 10<sup>-5</sup>、第 4 欄為

$10^{-4}$ ，以此類推，直到第 1 欄每孔放入  $10^{-1}$  經稀釋之病毒液 50  $\mu\text{L}$ ，再於第 1 至 6 欄每孔放入 50  $\mu\text{L}$  細胞培養液並於第 7 及第 8 欄每孔放入 100  $\mu\text{L}$  細胞培養液。

- (3) 上述 96 孔塑膠細胞培養盤，每孔放入 50  $\mu\text{L}$  細胞懸浮液（細胞濃度為  $3 \times 10^5$  cells/mL），置入  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱培養 72 小時。
- (4) 培養 72 小時後，將 96 孔塑膠細胞培養盤取出，甩棄培養液，並以 1 倍 PBS（每孔約 200  $\mu\text{L}$ ）清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾後，置於  $37^\circ\text{C}$  暖房烘乾 30 分鐘。
- (5) 加入 100  $\mu\text{L}$ /孔 10% 中性福馬林，置於  $37^\circ\text{C}$  暖房固定約 5 至 20 分鐘。
- (6) 甩棄 10% 中性福馬林，並以 1 倍 PBS（每孔約 200  $\mu\text{L}$ ）清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾。
- (7) 加入適量稀釋之豬隻抗豬瘟血清（第一抗體），每孔 50  $\mu\text{L}$ （稀釋液為 1 倍 PBS），置入  $37^\circ\text{C}$  暖房，作用 40 分鐘。
- (8) 甩棄第一抗體，並以 1 倍 PBS（每孔約 200  $\mu\text{L}$ ）清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾。
- (9) 加入適量稀釋之山羊抗豬免疫球蛋白螢光標示抗體（第二抗體），每孔 50  $\mu\text{L}$ （稀釋液為 1 倍 PBS），置入  $37^\circ\text{C}$  暖房，作用 40 分鐘。
- (10) 甩棄第二抗體，並以 1 倍 PBS（每孔約 200  $\mu\text{L}$ ）清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾。
- (11) 於暗視野倒立螢光平盤顯微鏡下判讀，有螢光者表示有病毒感染，其  $\text{TCID}_{50}$  之計算依據 Reed-Muench Methods 法計算。

#### 5、豬瘟中和抗體病毒對照組

- (1) 從  $-70^\circ\text{C}$  超低溫冷凍櫃中取出力價為  $10^{6.3}$   $\text{TCID}_{50}$  / mL

豬瘟病毒 (LPC-TS 株)，待解凍後以含 8 % FBS 之培養液稀釋成 200 TCID<sub>50</sub>/50 μL。另以病毒的回歸力價測定，其結果應在 60-600 TCID<sub>50</sub> 範圍內。

- (2) 取 0.1 mL 的 200 TCID<sub>50</sub> 稀釋病毒液加入 0.9 mL 的細胞培養液充分混合均勻，稀釋成 20 TCID<sub>50</sub>；再取 0.2 mL 的 20 TCID<sub>50</sub> 病毒液加入 0.8 mL 細胞培養液經充分混合均勻後，稀釋成 4 TCID<sub>50</sub>；再取 0.5 mL 的 4 TCID<sub>50</sub> 病毒液加入 0.5 mL 細胞培養液經充分混合均勻後，稀釋成 2 TCID<sub>50</sub>，再依相同步驟連續稀釋三次稀釋成 1、0.5 及 0.25 TCID<sub>50</sub> 之病毒液。
- (3) 於 96 孔塑膠細胞培養盤第 1 欄每孔放入力價為 200 TCID<sub>50</sub> 病毒液 50 μL，第 2 欄每孔放入力價為 20 TCID<sub>50</sub> 病毒液 50 μL，第 3 欄每孔放入力價為 4 TCID<sub>50</sub> 病毒液 50 μL，以此類推，直到第 7 欄每孔放入力價為 1/4 TCID<sub>50</sub> 病毒液 50 μL，並於第 1 欄至第 7 欄每孔再放入細胞培養液 50 μL，第 8 欄至第 12 欄每孔放入細胞培養液 100 μL，置入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱感作 2 小時。
- (4) 上述 96 孔塑膠細胞培養盤，每孔放入 50 μL 細胞懸浮液（細胞濃度為 3×10<sup>5</sup> cells/mL），置入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱培養 72 小時。
- (5) 培養 72 小時後，將 96 孔塑膠細胞培養盤取出，甩棄培養液，並以 1 倍 PBS（每孔約 200 μL）清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾後，置於 37°C 暖房烘乾 30 分鐘。
- (6) 加入 100 μL/孔 10% 中性福馬林，置於 37°C 暖房固定約 5-20 分鐘。
- (7) 甩棄 10% 中性福馬林，並以 1 倍 PBS（每孔約 200 μL）清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾。
- (8) 加入適量稀釋之豬隻抗豬瘟血清（第一抗體），每孔

- 50  $\mu\text{L}$  (稀釋液為 1 倍 PBS)，置入 37°C 暖房，作用 40 分鐘。
- (9) 甩棄第一抗體，並以 1 倍 PBS (每孔約 200  $\mu\text{L}$ ) 清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾。
- (10) 加入適量稀釋之山羊抗豬免疫球蛋白螢光標示抗體 (第二抗體)，每孔 50  $\mu\text{L}$  (稀釋液為 1 倍 PBS)，置入 37°C 暖房，作用 40 分鐘。
- (11) 甩棄第二抗體，並以 1 倍 PBS (每孔約 200  $\mu\text{L}$ ) 清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾。
- (12) 於暗視野倒立螢光平盤顯微鏡下判讀，有螢光者表示有病毒感染，其 TCID<sub>50</sub> 之計算依據 Reed-Muench Methods 法計算。

#### 6、豬瘟中和抗體檢測

- (1) 取 50  $\mu\text{L}$  含 200 TCID<sub>50</sub> 之病毒稀釋液以自動分注器分別加入至前述已稀釋完成的待檢抗體血清微量培養盤中，置於 96 孔平盤混合台上震盪 1 分鐘使之充分混合，置入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱感作 2 小時。
- (2) 上述 96 孔塑膠細胞培養盤，每孔放入 50  $\mu\text{L}$  細胞懸浮液 (細胞濃度為  $3 \times 10^5$  cells/mL)，置入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱培養 72 小時。
- (3) 培養 72 小時後，將 96 孔塑膠細胞培養盤取出，甩棄培養液，並以 1 倍 PBS (每孔約 200  $\mu\text{L}$ ) 清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾後，置於 37°C 暖房烘乾 30 分鐘。
- (4) 加入 100  $\mu\text{L}$ /孔 10% 中性福馬林，置於 37°C 暖房固定約 5-20 分鐘。
- (5) 甩棄 10% 中性福馬林，並以 1 倍 PBS (每孔約 200  $\mu\text{L}$ ) 清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾。
- (6) 加入適量稀釋之豬隻抗豬瘟血清 (第一抗體)，每孔 50  $\mu\text{L}$  (稀釋液為 1 倍 PBS)，置入 37°C 暖房，作用 40



分鐘。

- (7) 甩棄第一抗體，並以 1 倍 PBS（每孔約 200  $\mu\text{L}$ ）清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾。
- (8) 加入適量稀釋之山羊抗豬免疫球蛋白螢光標示抗體（第二抗體），每孔 50  $\mu\text{L}$ （稀釋液為 1 倍 PBS），置入 37°C 暖房，作用 40 分鐘。
- (9) 甩棄第二抗體，並以 1 倍 PBS（每孔約 200  $\mu\text{L}$ ）清洗再甩乾，如此清洗 3 次，最後 1 次以吸水紙拍乾。
- (10) 於暗視野倒立螢光平盤顯微鏡下判讀，有螢光者表示有病毒感染。

#### 7、豬瘟中和抗體力價判讀/記錄與評估試驗對照組之結果

- (1) 於暗視野倒立螢光平盤顯微鏡依序由低至高稀釋倍數判讀陽性及陰性血清對照的結果，並予詳實計算與記錄培養盤中產生螢光反應之細胞孔的數目。
- (2) 先計算中和試驗之病毒對照組產生螢光反應之細胞孔的數目。
- (3) 由病毒對照組之病毒回歸力價產生的結果計算 50  $\mu\text{L}$  的病毒可產生 1 TCID<sub>50</sub> 之稀釋倍數。
- (4) 進行陽性血清及陰性血清對照中 50% 之終點抗體力價之判讀，每次檢驗力價結果須介於陽性血清中和抗體力價正負 2 倍內，陰性血清中和抗體力價為  $\leq 3$  倍。
- (5) 於培養盤中判讀與記錄血清樣品出現螢光反應的孔數。
- (6) 血清樣品之中和抗體力價係以 50% 螢光抑制計算之，亦即 2 個細胞孔有 1 個細胞孔出現螢光（病毒斑灶）之血清最高稀釋倍數即為抗體力價。

#### (二) 酵素連結免疫吸附反應 (ELISA)

有關 ELISA 檢測操作方法，請參照市售商品化抗體檢測套組之使用說明書操作。

## 五、參考資料

1. Classical Swine Fever (Hog Cholera), 2014. in: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Office International Des Epizooties (OIE). Chapter 2.8.3
2. Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirrmeyer H, Depner K, 2005. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods* 130(1-2):36-44.
3. Pan CH, Jong MH, Huang YL, Huang TS, Chao PH, Lai SS, 2008. Rapid detection and differentiation of wild-type and three attenuated lapinized vaccine strains of classical swine fever virus by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 20(4):448-456.
4. Chang CY, Huang CC, Deng MC, Huang YL, Lin YJ, Liu HM, Lin YL, Wang FI, 2012. Identification of conformational epitopes and antigen-specific residues at the D/A domains and the extramembrane C-terminal region of E2 glycoprotein of classical swine fever virus. *Virus Res* 168(1-2):56-63.
5. Chang CY, Huang CC, Deng MC, Huang YL, Lin YJ, Liu HM, Lin YL, Wang FI, 2012. Antigenic mimicking with cysteine-based cyclized peptides reveals a previously unknown antigenic determinant on E2 glycoprotein of classical swine fever virus. *Virus Res* 163(1):190-196.
6. Huang YL, Pang VF, Lin CM, Tsai YC, Chia MY, Deng MC, Chang CY, Jeng CR, 2011. Porcine circovirus type2 (PCV2) infection decreases the efficacy of an attenuated classical swine fever virus (CSFV) vaccine. *Vet Res* 42:115.
7. Chang CY, Huang CC, Lin YJ, Deng MC, Tsai CH, Chang WM, Wang FI, 2010. Identification of antigen-specific residues on E2 glycoprotein of classical swine fever virus. *Virus Res* 152(1-2):65-72.
8. Chang CY, Huang CC, Lin YJ, Deng MC, Chen HC, Tsai CH, Chang WM, Wang FI, 2010. Antigenic domains analysis of classical swine fever virus E2 glycoprotein by mutagenesis and conformation-dependent monoclonal antibodies. *Virus Res* 149(2):183-189.

疑似豬瘟病例檢驗流程图

