

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。豬瘟之診斷主要可利用抗原及血清學檢測來進行。

二、檢驗方法

（一）病毒抗原檢驗

1、病毒分離

採集自疑似豬瘟病例之臟器檢體如抗凝血、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。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

A. 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 1×10^6 cells / mL）置入冷凍小管凍存在液態氮中備用。

B. 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 175T (175 cm² 面積) 細胞培養角瓶，於 37°C、5% CO₂ 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。

- C. 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。
- D. 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 5% CO₂ 細胞培養箱內消化。
- E. 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。
- F. 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% CO₂ 培養箱持續培養。
- G. 將上述收集細胞之 15 mL 離心管以低速離心機 (Kubota, 5100 或同等級) 於室溫下 1,000 rpm 進行離心 10 分鐘。
- H. 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 5×10^5 cells/ mL 備用。
- I. 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% CO₂ 培養箱培養備用。

(3) 檢體處理

- A. 檢體之採集與包裝須依照行政院農業委員會發布之

動物感染性生物材料管理辦法或世界動物衛生組織（OIE）陸生動物疾病診斷與疫苗手冊（Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals）第 1.1.2 章-診斷所需樣品之採集與保存及 1.1.3 章-動物來源檢體之運送處理。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。

- B. 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-70℃超低溫冷凍櫃內，主要檢體種類如表一。

表一、檢體種類

檢體種類	說明
抗凝血液	病材以使用 EDTA 或 heparin 抗凝劑採集發病中豬隻血液最佳
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
拭子	採取咽喉及鼻腔拭子
血清	採集時應避免溶血

- C. 將前述 B.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®或同等級）或研鉢研磨，磨碎後以 1:4（20%, W/V）比例加入含 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 之 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。
- D. 將前述 C.步驟處理完畢之送檢檢體以低速離心機（Kubota, 5100 或同等級）於室溫下 3,000 rpm 離心

10 分鐘，取上清液至新的 1.5 mL 微量管內並置於高速離心機，於低溫下（4-8°C）12,000 rpm 離心 10 分鐘後，取出放入冰桶。

- E. 於 BSC 內將前述 D. 步驟之檢體離心上清液，以 10 mL 附針之螺旋頭注射筒逐一抽取，再以 0.22 μ 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。
- F. 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 -70°C 超低溫冷凍櫃內待用。

(4) 檢體之病毒分離

- A. 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。
- B. 將六孔盤內之細胞培養上清液小心抽棄後依照盤上的編號將通過前述(3)、C. 至(3)、F. 步驟之檢體 0.5 mL/孔依序接種至六孔盤內。
- C. 若檢體為抗凝血液，則將該檢體置於 -70°C 超低溫冷凍櫃，待其完全冷凍後再移至 37°C 解凍後依(4)、B. 步驟進行。
- D. 全部接種完畢後將所有六孔盤以塑膠袋密封後移至 37°C 培養箱內用垂直震盪平台以 5 rpm 速度進行感作 1 小時。
- E. 感作完畢後逐一抽棄檢體上清液後加入 3 mL/孔 5% FBS 之 1 倍 MEM 細胞培養液，換液完畢後放入 37°C CO₂ 培養箱內培養 3 至 4 天。
- F. 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，置於 37°C 暖房烘乾 30 分鐘，再以 10% 中性福馬林固定，置於 37°C 暖房固定約 5-20 分鐘。隨後以 PBS 清洗三次後，即可

進行豬瘟螢光抗體染色以確認有無豬瘟病毒。

G. 螢光抗體染色及判讀

- a. 加入適量稀釋之豬隻抗豬瘟血清（第一抗體），每孔 500 μ L（稀釋液為 1 倍 PBS），置入 37°C 內作用 60 分鐘。
- b. 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。
- c. 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 μ L（稀釋液為 1 倍 PBS），置入 37°C 內作用 60 分鐘。
- d. 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。
- e. 以倒立螢光平盤顯微鏡於暗視野下判讀，若第一次或第二次病毒分離之接種細胞內出現螢光者表示有豬瘟病毒感染。

2、病毒核酸檢驗

在病毒感染早期，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）或即時定量反轉錄聚合酶鏈反應（Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction；RRT-PCR）驗出，相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，區別兔化豬瘟疫苗株及豬瘟野外病毒株之 RT-PCR 試驗應由指定實驗室或 OIE 豬瘟參考實驗室進行。

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。

A. 豬瘟病毒核酸萃取操作方式（如附件 1）。

B. RT-PCR 引子（Primer）序列如表二（參考文獻：

Paton et al., 2000；Greiser-Wilke et al., 1998）。

引子對 CSF-UP1 與 CSF-UP2 之組合為豬瘟特異性引子，可增幅豬瘟病毒核酸 5'-NTR (Non-translated region) 片段，並產生長度為 421 bp 之單一條 RT-PCR 產物。

表二、RT-PCR 引子序列

引子	序列
CSF-UP1	5'-CTAGCCATGCCCWYAGTAGG-3' (94-113)
CSF-UP2	5'-CAGCTTCARYGTTGATTGT-3' (514-496)

C. 陽性對照

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

D. 配製反應液：RT-PCR 每一支反應管所包含之反應液如表三。

表三、RT-PCR 反應液配製內容

RT-PCR 反應液配製	1 管 (μ L)
兩倍 PCR 反應液	25
20 μ M Primer (CSF-UP1)	1
20 μ M Primer (CSF-UP2)	1
AMV (10U/ μ L)	0.2

RNasin (40U/ μ L)	0.2
DEPC-treated DDW	17.6
Template (RNA)	5
反應總體積	50

E. 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 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：42°C 30 分鐘 → 95°C 5 分鐘 (1 循環)；95°C 45 秒 → 50°C 60 秒 → 72°C 60 秒 (35 循環)；72°C 5 分鐘 (1 循環) → 4°C 保存至使用。

F. 瓊膠 (Agarose) 製作

取 2 g 瓊膠加入 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。

G. RT-PCR 產物瓊膠電泳分析

PCR 反應產物取出 5 μ L 預先與 1 μ L 之 6 倍核酸染劑 (SafeView™ 或同級產品) 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。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。

H. 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-

UP1 與 CSF-UP2 配對之產物長度為 421 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 (RRT-PCR)

A. 引子及探針 (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 推薦之豬瘟病毒特異性引子對及鐵克曼探針 (TaqMan probe) 能同時檢測三種基因型之豬瘟病毒，引子及探針序列如表四 (參考文獻 Hoffmann et al., 2005)。

表四、RRT-PCR 引子及探針序列

引子	序列
CSF 100-F	5'-ATGCCCAYAGTAGGACTAGCA-3' (100-120)
CSF 192-R	5'-CTACTGACGACTGTCCTGTAC-3' (192-172)
CSF-Probe 1	5'-FAM- TGGCGAGCTCCCTGGGTGGTC TAAGT -TAMRA-3' (141-166)

B. 配製反應液：每一支反應管所包含之反應液如表五。

表五、RRT-PCR 反應液配製內容

RRT-PCR 反應液配製	1 管 (μL)
兩倍 PCR 反應液	12.5
20 μM Primer (CSF 100-F)	1
20 μM Primer (CSF 192-R)	1
10 μM Probe (CSF-Probe 1)	0.5
AMV (10U/μL)	0.2
RNasin (40U/μL)	0.2

DEPC-treated DDW	7.1
Template (RNA)	2.5
反應總體積	25

C. 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 15 秒 → 57°C 30 秒 → 68°C 30 秒 (40 循環)。

D. 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。

E. 結果判讀

無法檢測到 Ct 值者為陰性。Ct 值 ≤ 35.9 者為陽性。Ct 值 ≥ 36 者建議再測試，如結果仍相同，則可認定為陽性；如果重複檢測無法檢測到 Ct 值，則視為陰性。

(二) 血清學檢驗：

1. 螢光抗體病毒中和實驗 (Fluorescent antibody virus neutralization test；FAVNT)

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。而豬場可能感染其他瘟疫病毒屬病毒如牛病毒性下痢病毒 (Bovine viral diarrhea virus；BVDV) 及邊境病毒 (Border disease virus；BDV)，如有疑慮時應進行比較 CSFV/BVD/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

A. 待測血清在試驗前需先置於水浴槽中經 56°C 30 分鐘進行非動化處理。

B. 微量盤之準備

- a. 以無菌操作方式拆封 96 孔微量培養盤。
- b. 編列試驗及對照血清於微量培養盤上，分別以單孔進行試驗。

(2) 血清稀釋

- A. 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 μ L/孔)。
- B. 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 μ L 含 8% FBS 的細胞培養液 (第 H 列再注入 25 μ L 含 8% 胎牛血清的細胞培養液)，除 H 列為 100 μ L 外，其餘各列 (G、F、E、D、C、B、A) 每孔皆含 50 μ L 細胞培養液。
- C. 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 $\rightarrow$ G $\rightarrow$ F $\rightarrow$ E... $\rightarrow$ A)，最後在 A 列 (為 512 倍) 的稀釋液混合均勻後取 50 μ L 稀釋混合液丟棄。
- D. 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加入至微量培養盤中。另有正常細胞作為對照，僅加入 100 μ 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 μ L 預作病毒回歸力價 (Virus back titration) 對照。
- E. 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

- A. 細胞繼代與培養請參照(一)病毒抗原檢驗，1. 病毒分離，(2)細胞製備。
- B. 將消化之 PK-15 豬腎細胞株以 1,000 rpm 離心約 10 分鐘，將上清液丟棄，取下層細胞，加入適量細胞培養基再均勻沖散。

- C. 取少量之細胞懸浮液置入血球計算盤計算細胞濃度，再以適量細胞培養基調整細胞濃度至 3×10^5 cells / mL 備用。

(4) 中和抗體試驗用豬瘟病毒力價測定

- A. 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 、 $5\% \text{CO}_2$ 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% 細胞感染力價 (50% Tissue culture infective dose; TCID_{50})。
- B. 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^{-1} 至 10^{-6} 作 10 倍連續稀釋，並從最高稀釋階 (10^{-6}) 開始，於 96 孔塑膠細胞培養盤第 6 欄每孔放入 50 μL 10^{-6} 經稀釋之病毒液、第 5 欄為 10^{-5} 、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 μL ，再於第 1 至 6 欄每孔放入 50 μL 細胞培養液並於第 7 及第 8 欄每孔放入 100 μL 細胞培養液。
- C. 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 3×10^5 cells/mL)，置入 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培養箱培養 72 小時。
- D. 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。
- E. 加入 100 μL /孔 10% 中性福馬林，置於 37°C 暖房固定約 5 至 20 分鐘。
- F. 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。
- G. 加入適量稀釋之豬隻抗豬瘟血清 (第一抗體)，每孔

50 μL (稀釋液為 1 倍 PBS)，置入 37°C 暖房，作用 60 分鐘。

- H. 甩棄第一抗體，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。
- I. 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 μL (稀釋液為 1 倍 PBS)，置入 37°C 暖房，作用 60 分鐘。
- J. 甩棄第二抗體，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。
- K. 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_{50} 之計算依據 Reed-Muench methods 法計算。

(5) 豬瘟中和抗體病毒對照組

- A. 從 -70°C 超低溫冷凍櫃中取出力價為 $10^{6.3} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 豬瘟病毒 (LPC-TS 株)，待解凍後以含 8% FBS 之培養液稀釋成 100 $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ 。另以病毒之回歸力價測定，其結果應在 30-300 $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ 範圍內。
- B. 取 0.2 mL 的 100 TCID_{50} 稀釋病毒液加入 0.8 mL 之細胞培養液充分混合均勻，稀釋成 20 TCID_{50} ；再取 0.2 mL 的 20 TCID_{50} 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_{50} ；再取 0.5 mL 的 4 TCID_{50} 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_{50} ，再依相同步驟連續稀釋三次稀釋成 1、0.5 及 0.25 TCID_{50} 之病毒液。
- C. 於 96 孔塑膠細胞培養盤第 1 欄每孔放入力價為 100 TCID_{50} 病毒液 50 μL ，第 2 欄每孔放入力價為 20 TCID_{50} 病毒液 50 μL ，第 3 欄每孔放入力價為 4 TCID_{50} 病毒液 50 μL ，以此類推，直到第 7 欄每孔放入力價為 0.25 TCID_{50} 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_2 培養箱感作 2 小時。
- D. 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 $3 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ ），置入 37°C、5% CO_2 培養箱培養 72 小時。
- E. 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。
- F. 加入 100 μL /孔 10% 中性福馬林，置於 37°C 暖房固定約 5-20 分鐘。
- G. 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。
- H. 加入適量稀釋之豬隻抗豬瘟血清（第一抗體），每孔 50 μL （稀釋液為 1 倍 PBS），置入 37°C 暖房，作用 60 分鐘。
- I. 甩棄第一抗體，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。
- J. 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 μL （稀釋液為 1 倍 PBS），置入 37°C 暖房，作用 60 分鐘。
- K. 甩棄第二抗體，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。
- L. 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_{50} 之計算依據 Reed-Muench methods 法計算。
- (6) 豬瘟中和抗體檢測
- A. 取 50 μL 含 100 TCID_{50} 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_2 培養箱感作 1 小時。

- B. 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 $3 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ ），置入 37°C 、5% CO_2 培養箱培養 72 小時。
 - C. 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。
 - D. 加入 100 μL /孔 10% 中性福馬林，置於 37°C 暖房固定約 5-20 分鐘。
 - E. 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。
 - F. 加入適量稀釋之豬隻抗豬瘟血清（第一抗體），每孔 50 μL （稀釋液為 1 倍 PBS），置入 37°C 暖房，作用 60 分鐘。
 - G. 甩棄第一抗體，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。
 - H. 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 μL （稀釋液為 1 倍 PBS），置入 37°C 暖房，作用 60 分鐘。
 - I. 甩棄第二抗體，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。
 - J. 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
- A. 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之結果，並予詳實計算與記錄培養盤中產生螢光反應之細胞孔數目。
 - B. 先計算中和試驗之病毒對照組產生螢光反應之細胞孔數目。
 - C. 由病毒對照組之病毒回歸力價產生的結果計算 50 μL 病

毒可產生 1 TCID₅₀ 之稀釋倍數。

D. 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 ≤ 3 倍。

E. 於培養盤中判讀與記錄血清樣品出現螢光反應之孔數。

F. 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。

2. 酵素連結免疫吸附反應（Enzyme-linked immunosorbent assay；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，該檢驗結果不作為最終判定標準。

三、參考文獻

1. Chapter 3.8.3. Classical swine fever (infection with classical swine fever virus) (NB: Version adopted in May 2019), In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 8th ed., OIE, Paris.
2. Chapter 1.1.2. Collection, submission and storage of diagnostic specimens (NB: Version adopted in May 2013), In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 8th ed., OIE, Paris.
3. Chapter 1.1.3. Transport of biological materials (NB: Version adopted in May 2018), In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 8th ed., OIE, Paris.
4. Greiser-Wilke I, Depner K, Fritzemeier J, Haas L, Moennig V. (1998) Application of a computer program for genetic typing of classical swine fever virus isolates from Germany. J Virol Methods. Nov;75(2): 141-50.

5. Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirrmeier 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.
6. Paton DJ, McGoldrick A, Greiser-Wilke I, Parchariyanon S, Song JY, Liou PP, Stadejek T, Lowings JP, Björklund H, Belák S. (2000) Genetic typing of classical swine fever. *Vet. Microbiol.*, 73, 137–157.

附件 1、豬瘟病毒核酸萃取操作方式

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 μ 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	1. 取 1 mL 之 TRIzol® Reagent 加入含有 200 μL 病材乳劑的 Microtube 中，vortex 30 秒，室溫靜置 5 分鐘。 2. 加入 0.2 mL Chloroform，震盪混合均勻，於室溫靜置 3 分鐘。 3. 以 4°C、12,000 rpm 離心 15 分鐘，把上清液轉置於新的 Microtube 中。 4. 加入等量之異丙醇 (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。 5. 加入 50 μL 純乙醇，以 4°C、12,000 rpm 離心 5 分鐘，用 Micropipete 吸除上清液後風乾。 6. 將 60 μL 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) 加入風乾之 RNA 中，溶解後至於冰上備用。
方法三	其他市售之病毒 RNA 萃取套組萃取豬瘟病毒核酸	使用市售病毒 RNA 萃取套組進行病毒核酸萃取，請依說明書指示萃取病毒 RNA。

疑似豬瘟病例檢驗流程图

