

高病原性家禽流行性感冒檢驗方法修正規定

- 一、高病原性家禽流行性感冒（Highly pathogenic avian influenza；以下簡稱 HPAI）過去稱為「雞瘟」，是由正黏液病毒科（*Orthomyxoviridae*）之 A 型流行性感冒病毒感染所引起。A 型流行性感冒病毒是唯一會自然感染鳥類的正黏液病毒。許多鳥類對 A 型流行性感冒病毒具有感受性。水禽為保毒宿主，而水禽帶原病毒對雞及火雞大多為低病原性。病毒之核蛋白衣（Nucleocapsid protein；以下簡稱為 NP）和基質蛋白（Matrix protein；以下簡稱為 MP）為流行性感冒病毒型別相關抗原，血球凝集素（Hemagglutinin；以下簡稱 H）及神經胺酸酶（Neuraminidase；以下簡稱 N）為亞型（Subtypes）分類抗原。可感染鳥的 A 型流行性感冒病毒有 16 種 H 亞型（H1~H16）及 9 種 N 亞型（N1~N9），目前只有 H5 和 H7 兩種亞型病毒會對雞、火雞及其他經濟鳥類造成高死亡率，屬於 HPAI。大部分 H5 和 H7 亞型病毒對家禽為低毒力，但可能突變為高毒力，因此，世界動物衛生組織（OIE）規範所有 H5 和 H7 病毒為須通報的家禽流行性感冒（Notifiable avian influenza；NAI）。

HPAI 感染會依鳥類的品種及年齡、病毒株的特性及環境因子，而呈現不同的臨床症狀。高感受性鳥類可能呈現無臨床症狀而猝死或呈現嚴重程度不一的臨床症狀，例如結膜炎、鼻炎、咳嗽、噴嚏、呼吸困難、顏面腫脹、沉鬱、警覺性降低、顯著減少飲水及攝食、雞冠、肉垂及腳鱗皮膚發紺、神經症狀及下痢等。產蛋鳥類會有明顯的產蛋量下降，品質不良蛋增加。典型的 HPAI 常呈現高發病率及急速上升之死亡率。低病原性家禽流行性感冒（Low pathogenic avian influenza；以下簡稱 LPAI）通常只造成輕微或無臨床症狀，但在某些情況下會產生嚴重的臨床症狀。

HPAI 之確診係依據病毒之病原性判定，雖然近年對於家禽流行性感冒病毒的致病性特性在分子層面已有更深入的了解，但仍優先以病毒接種無特定病原（Specific pathogen free；以下簡稱 SPF）或特定血清抗體陰性（Specific antibody negative；以下簡稱 SAN）雞隻，所得靜脈接種致病指數（Intravenous pathogenicity index；以下簡稱 IVPI）或接種雞隻死亡率之結果判定。動物試驗結果符合高病原性特徵（IVPI 大於等於 1.2 或接種雞隻死亡率大於等於 75% 者）即判定病毒為 HPAI，但若 H5 及 H7 亞型病毒之動物試驗結果 IVPI 大於等於 1.2 或接種雞隻死亡率大於等於 75%，則仍須檢視病毒血球凝集前驅蛋白（以下簡稱為 HA0）切割位之胺基酸序列，若與其他 HPAI 分離株的序列相似者則判定為 HPAI。為了儘速控制疾病的防疫需求，當有疫情發生時，可在病毒分離與動物試驗完成前，依 HA0 切割位之胺基酸序列先行判定是否為 HPAI。檢測血清抗體可做為輔助工具，但無法用於 HPAI 確診。

二、檢驗方法

（一）病毒檢驗

1. 採取檢體

檢體採取之品質好壞及其保存與輸送的狀況，密切影響家禽流行性感冒（Avian influenza；以下簡稱 AI）病毒之分離及診斷結果。檢體採檢送驗注意事項如附件1。

2. 病毒分離

分離 AI 病毒需用 SPF 或 SAN 的雞胚胎蛋為接種材料。步驟如附件2。

3. 血球凝集抑制試驗（Hemagglutination inhibition test；以下簡稱 HI）鑑定病原亞型

基於 AI 病毒的 H 蛋白具有血球凝集（Hemagglutination；以下簡稱 HA）特性，用已知 H 亞型之抗血清進行 HI 法來鑑定病毒之 H 亞型。本項試驗所需儲備 AI 病毒亞型之標準抗原和抗血清參考之亞型株如附件3，步驟如附件4。

4. 病原性鑑定

病原性的鑑定係以接種雞隻的靜脈接種致病指數（IVPI）或接種雞隻的死亡率，配合 HA0切割位胺基酸序列分析，以評估病毒之病原性。動物接種試驗步驟如附件5，AI 病毒血球凝集蛋白基因片段增幅步驟如附件6。

5. 分子檢驗

進行病毒分離前，可利用分子檢驗方法偵測 A 型流行性感冒病毒，以達到對大量檢體進行快速篩檢的目的，常見分子檢驗方法為即時反轉錄聚合酶鏈反應（Real-time reverse transcription polymerase chain reaction；以下簡稱 real-time RT-PCR）及巢式反轉錄聚合酶鏈反應（Nested reverse transcription polymerase chain reaction；以下簡稱 nested RT-PCR），步驟如附件7。分子檢驗初篩陽性後再以病原性鑑定方法確認病原性。

（二）血清學檢測

1. 酵素連結免疫吸附分析（Enzyme-linked immunosorbent assay；以下簡稱 ELISA）

一般市售商品化 ELISA 抗體檢測套組無法檢測 AI 抗體亞型，只能證實有 A 型流行性感冒的抗體存在，操作依套組使用說明使用。

2. 瓊膠免疫擴散法（Agar gel immunodiffusion；以下簡稱 AGID）

所有 A 型流行性感冒病毒均具有相似的 NP 及 MP 抗原，而本法利用抗原/抗體在高濃度鹽類之瓊膠內移動擴散產生抗原/抗體沉降線反應，檢測血清中有無 A 型流行性感冒病毒之特異性抗體，方法如附件8。

3. 血球凝集抑制試驗 (Hemagglutination inhibition test；以下簡稱 HI)

以 AGID 或 ELISA 檢測 AI 抗體陽性之血清，可依需要以 HI 方法來鑑別其是否為 H5 或 H7 亞型抗體。需預備 H5 或 H7 標準株或已知 H5 或 H7 野外毒株做為本檢測用抗原，檢測結果抗體力價 1:16 或以上判為陽性，抗體力價 1:4 至 1:8 為疑陽性。相關試驗及試劑配製方法如附件 9。

(三) 判定準則

OIE 規範所有家禽分離之 H5 及 H7 亞型家禽流行性感冒病毒均須要通報，HPAI 及 LPAI 之診斷判定依據以下規範辦理：

1. HPAI:

參酌 OIE 對於 HPAI 之認定依據，符合以下二項條件之一者即判定為 HPAI：

- (1) 接種雞隻死亡率大於等於 75% 或 IVPI 大於等於 1.2。
- (2) HA0 切割位胺基酸序列相似於其他 HPAI 病毒株序列 (請參考 OIE/FAO Network of expertise on animal influenza [以下簡稱 OFFLU] 網頁公告所列已知 HPAI 之 HA0 切割位胺基酸序列。)

2. LPAI：

- (1) 自家禽分離的 H5 和 H7 亞型 AI 病毒，其動物試驗未具高病原特性且沒有與過往 HPAI 病毒 HA0 切割位胺基酸序列相似者，可判為 H5 / H7 LPAI。
- (2) 野鳥及水禽常見之 LPAI 病毒株，參照 OFFLU 所列 LPAI 之 HA0 切割位胺基酸序列，在切割位 -1~-3 位點之鹼性胺基酸數量在 2 個以下 (包含)。請參考 OFFLU 網頁最新公告所列已知 LPAI 之 HA0 切割位胺基酸序列。

三、 參考文獻

1. Fereidouni SR, Starick E, Grund C, Globig A, Mettenleiter TC, Beer M, Harder T. Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses. *Vet Microbiol.* 2009 Mar 30;135 (3-4):253-60.
2. Gall AI, Hoffmann B, Harder T, Grund C, Beer M. Universal primer set for amplification and sequencing of HA0 cleavage sites of all influenza A viruses. *J Clin Microbiol.* 2008 Aug;46(8):2561-7.
3. Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods.* 2001 Sep;97 (1-2):13-22.
4. Lee MS, Chen LH, Chen YP, Liu YP, Li WC, Lin YL, Lee F. Highly pathogenic avian influenza viruses H5N2, H5N3, and H5N8 in Taiwan in

2015. Vet Microbiol. 2016 May 1; 187:50-57.

5. Moresco KA, Stallknecht DE, Swayne DE. Evaluation of different embryonating bird eggs and cell cultures for isolation efficiency of avian influenza A virus and avian paramyxovirus serotype 1 from real-time reverse transcription polymerase chain reaction-positive wild bird surveillance samples. J Vet Diagn Invest. 2012 May;24(3):563-7.
6. OIE - World Organisation for Animal Health. Avian influenza (Infection with avian influenza viruses). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018; Chapter 3.3.4.
7. Qiu BF, Liu WJ, Peng DX, Hu SL, Tang YH, Liu XF. A reverse transcription-PCR for subtyping of the neuraminidase of avian influenza viruses. J Virol Methods. 2009 Feb;155 (2) :193-8.
8. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. J Clin Microbiol. 2002 Sep; 40(9):3256-60.
9. Yoshida H, Sakoda Y, Endo M, Motoshima M, Yoshino F, Yamamoto N, Okamatsu M, Soejima T, Senba S, Kanda H, Kida H. Evaluation of the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a screening method for the detection of influenza viruses in the fecal materials of water birds. J Vet Med Sci. 2011 Jun;73 (6) :753-8

附件1、檢體採檢送驗注意事項

- (1)採樣以發生臨床症狀3日內所得之檢體檢測效果最佳。
- (2)死禽：死禽可採取全身各組織臟器，包括氣管、肺、氣囊、腸、脾、胰、腎、腦、肝及心臟等，亦可採取喉頭拭子和泄殖腔拭子，檢體可分開或混合處理。
- (3)活禽：活禽採取喉頭拭子和泄殖腔拭子，幼小個體禽類不易採集者，則採新鮮排遺取代之。採取之拭子保存於含有抗生素的磷酸緩衝液（Phosphate buffered saline；以下簡稱 PBS）或含有蛋白質及抗生素的輸送培養液內。
- (4)輸送與保存：採集之檢體應馬上以低溫冷藏方式輸送至檢測實驗室或存放於4°C最多4天。需長期保存之診斷檢體應存放於-80°C，避免重複冷凍解凍。若以乾冰保存或輸送則需將檢體密封，以防二氧化碳之滲入，致 pH 值降低而造成病毒不活化。

(1)檢體處理：

- A. 喉頭拭子及泄殖腔拭子試管以震盪器混合均勻後靜置備用。
- B. 組織檢體與輸送培養液混合研磨成10%（W/V）乳劑，處理完成之乳劑檢體於室溫中1~2小時內儘速接種完成，若放於4 °C僅能保存4天，否則應存放於-80 °C。應避免重複冷凍解凍。
- C. 上述 A. 及 B.檢體 經 $1,000 \times g$ 離心10分鐘，取上清液供接種用。

(2)雞胚胎接種：喉頭拭子、泄殖腔拭子或組織乳劑上清液接種於9~11日齡 SPF 或 SAN 雞胚胎蛋的尿囊腔內。每批檢體接種至少3個蛋，每個蛋接種0.1~0.2 mL。接種後，將蛋放在35~39 °C恆溫箱中培養2~7天。

(3)收集病毒液：收集病毒液前先將蛋冷卻於4 °C 4小時或隔夜，待蛋內血管收縮後，抽取尿囊液。並以血球凝集試驗進行篩檢，如果沒有血球凝集性，該尿囊液應至少再盲目接種一代。當無菌的尿囊液體具有血球凝集性時，最可能是由 A 型流行性感冒病毒、禽類副黏液病毒或家禽里奧病毒的少數毒株引起，需進一步以 AGID 或 RT-PCR 等方法鑑定病毒型別，再以血球凝集抑制試驗、神經胺酸酶抑制試驗或 RT-PCR 等方法鑑定亞型。

(4)核酸鑑定使用如 RT-PCR、Real-time RT-PCR、反轉錄恆溫環形核酸擴增法（Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification；以下簡稱 RT-LAMP）等以分子檢驗為基礎的鑑定技術，配合引子或探針的特異性進行檢驗，或比對基因序列，以達鑑定病原之目的。

附件3、A 型流行性感冒病毒診斷鑑定用參考亞型株

亞型	病毒株
H1	A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)
H2	A/Singapore/1/1957 (H2N2)
H3	A/duck/Ukraine/1/1963 (H3N8)
H4	A/duck/Czech/1956 (H4N6)
H5	A/duck/Hong Kong/820/1980 (H5N3)
H6	A/shearwater/Australia/1/1972 (H6N5)
H7	A/duck/ Hong Kong /301/1978 (H7N2)
H8	A/turkey/Ontario/6118/1968 (H8N4)
H9	A/turkey/Wisconsin/1/1966 (H9N2)
H10	A/chicken/Germany/N/1949 (H10N7)
H11	A/duck/England/1/1956 (H11N6)
H12	A/duck/Alberta/60/1976 (H12N5)
H13	A/gull/Maryland/704/1977 (H13N6)
H14	A/mallard/Astrakhan/263/1982 (H14N5)
H15	A/wedge-tailed shearwater/Western Australia/2576/1979 (H15N9)
H16	A/black-headed gull/Sweden/5/1999 (H16N3)

附件4、以血球凝集抑制試驗（HI）鑑定家禽流行性感冒病毒亞型之方法

首先需儲備 A 型流行性感冒病毒（Influenza A virus；以下簡稱 IAV）亞型之標準抗原和抗血清（詳見附件3），HI 使用之紅血球取自 SPF 或 SAN 雞隻的血液。HI 前需先測定抗原之力價，以定量的4 個血球凝集單位（Hemagglutination unit；以下簡稱 HAU）抗原來執行 HI 檢測。

(1)對照抗原和分離株 HA 力價測定：

- A. 以96孔 V 底型微量測定盤進行試驗。
- B. 分裝25 μ L PBS 至第2~第12孔（A~H 列）。
- C. 第1孔（A1~F1）分別加50 μ L 分離株病毒液或對照抗原。G 及 H 列的第1孔不加抗原液。
- D. H 列作為血球對照用，所以 H 列第1孔加50 μ L PBS。
- E. 由第1孔開始進行25 μ L 兩倍連續序列稀釋，稀釋之最後一孔丟棄25 μ L。
- F. 再加25 μ L PBS 至每一孔。
- G. 全盤每孔加25 μ L 之1% 雞紅血球懸浮液。
- H. 輕拍盤子使混合均勻，在室溫中放置約40分鐘，見血球對照孔之血球完全沉降下來即可判讀及記錄。
- I. 血球與病毒（或抗原）完全凝集記為”+”，不完全凝集記為”+/-”，血球完全沉降者記為”-”。將盤子傾斜，觀察血球淚滴狀流下，流下之速度與血球對照相同者表示血球完全沉降。完全凝集之病毒（或抗原）最高稀釋倍數，即代表病毒（或抗原）之 HA 力價。

(2)製備 HI 用標準抗原液及迴歸力價測定：

- A. 先計算進行 HI 所需4 HAU 抗原液總量後，將已知力價之病毒（或抗原）以 PBS 稀釋為4 HAU / 25 μ L 濃度，置於4°C備用，稀釋好的抗原液僅限於當日使用。
- B. 製備好的4 HAU 抗原液再次進行 HA 力價測定，迴歸檢測以確定製備之抗原液力價，檢測結果應在前三孔呈現 HA 反應。如果力價不對，HA 反應多一孔則再將抗原等量稀釋二倍，HA 反應少一孔則需再加入等量的抗原，使抗原濃度增加一倍。

(3)HI（鑑定野外分離株病毒）：

- A. 分裝25 μ L PBS 至 B~H 列的第1~12孔。
- B. 分別加50 μ L H1~H16標準抗血清至 A 排各孔。
- C. 由第1孔開始進行25 μ L 兩倍連續序列稀釋，稀釋之最後一孔丟棄25 μ L。
- D. 每孔加入25 μ L 4 HAU 病毒或抗原，在室溫感作至少30分鐘。
- E. 每孔再加25 μ L 1%之雞紅血球懸浮液，輕微振盪混勻後，靜置室溫中約40分

鐘，見血球對照孔之血球完全沉降下來即可判讀及記錄。

- F. 可以完全抑制4 HAU 抗原的血清最高稀釋倍數即為 HI 力價。
- G. 每一血清均採重複二列之序列稀釋，一列供檢測分離株病毒用，一列做為陽性抗原對照用。
- H. 最後兩列（G 及 H 列）作為紅血球對照用，以 PBS 取代血清稀釋及抗原添加。
- I. 若有抗原與抗體反應，則血球凝集被抑制。同樣將盤子傾斜判讀，血球完全凝集記為”+”，不完全凝集記為”+/-”，完全抑制凝集記為”-”。完全抑制凝集之最高血清稀釋倍數，即代表抗體之 HI 力價。
- J. 假如野外分離株與某一亞型參考血清反應的 HI 力價大於其他亞型血清4倍以上，則此力價較高者表示為分離株之亞型，或可搭配核酸鑑定之方法確認。

(1)IVPI：

- A. HA 力價大於1:16之新鮮病毒尿囊液，以滅菌之生理食鹽水稀釋10倍。
- B. 取稀釋之病毒液靜脈接種10隻6週齡 SPF 或 SAN 雞隻，每隻0.1 mL。
- C. 每24小時觀察一次，持續10天，在每次觀察時記錄每隻雞之分數：正常雞記0分、發病雞記1分、嚴重發病記2分、死亡雞記3分（發病程度之判定通則：出現呼吸症狀、沈鬱、下痢、無毛部皮膚或肉垂發紺、頭或臉水腫及神經症狀等其中一種症狀時，判為”發病”，呈現超過一種症狀時，判為”嚴重發病”）。死亡之雞隻在死亡之後每日的觀察值皆要記為3分。
- D. IVPI 係指10日觀察期間，每天每隻雞之平均分數。將全部雞隻10日之總分除以100即為 IVPI 值。IVPI=3.00表示所有的雞在24小時內死亡；IVPI=0.00表示在10日觀察期間沒有雞隻呈現任何臨床症狀；IVPI 值大於等於1.2者為 HPAI。

(2)接種雞隻死亡率檢測：

- A. 無菌病毒尿囊液稀釋10倍。
- B. 靜脈接種8隻4~8週齡 SPF 或 SAN 雞隻，每隻接種0.2 mL，觀察10日。
- C. 計算死亡率，當雞隻死亡6、7或8隻時（即死亡率大於等於75%），則判定為 HPAI。

病毒株其 IVPI 小於1.2或接種雞隻死亡率小於75%者，都須再進行本方法分析 H5或 H7病毒的 HA0切割位胺基酸序列，若序列與其他 HPAI 分離株相似，則判定為 HPAI。本法旨在分析 H5和 H7亞型 AI 病毒 HA0切割位核酸序列，而推演出對應的胺基酸序列。有許多方式可獲得核酸序列，以較常見的 RT-PCR 與自動化序列分析儀分析為例，在切割位兩端序列設引子，進行循環序列分析。可依商品化套組之建議設定過程中不同的條件，並以自動化序列分析儀分析。

(1)病毒 RNA 萃取（或依商品化套組之建議操作）

- A. 病毒液200 μ L 加入1 mL 核酸萃取液（Trizol），混合均勻後，靜置室溫5分鐘。
- B. 加200 μ L 氯仿（Chloroform），混合後，靜置室溫3分鐘，12,000 rpm 離心15分鐘。
- C. 取分離層之上層600 μ L 於另一新試管內，加入600 μ L 異丙醇（Isopropanol），混合均勻，靜置室溫10分鐘，12,000 rpm 離心20分鐘。
- D. 倒掉上清液，加入75%酒精1 mL，混合後再於12,000 rpm 離心5分鐘。
- E. 輕輕倒掉上清液，並用微量吸管小心抽掉其餘酒精，靜置數分鐘使殘餘之酒精揮發。加入100 μ L 含 DEPC（Diethylpyrocarbonate）處理過的蒸餾水，以微量吸管將病毒 RNA 溶解均勻。
- F. 待用時置放於4°C，否則保存於-20°C。

(2)RT-PCR（或依商品化套組之建議操作）

- A. 每管取2 μ L RNA 加入48 μ L RT-PCR 反應液。
- B. RT-PCR 使用之寡核苷引子參考序列

引子名稱	引子序列
HA-1057.1-F	ggRgAATgCCCCAAATAYgT
HA-1057.2-F	ggRARATgCCCCAgRTATgT
HA-1057.3-F	ggRgAATgCCCCAARTAYAT
HA-1232.1(555)-R	TTgCTATgVTgRTAWCCATACCA
HA-1232.2(555)-R	TTYTgATgYCTgAADCCRTACCA

*Codes for mixed bases position: R=A/G，Y=C/T，D=A/G/T，V=A/C/G，W=A/T

參自參考文獻2

- C. 將反應管放在溫度循環器內，設定增幅條件：
 - a. 50°C，30分鐘
 - b. 94°C，2分鐘
 - c. 94°C，30秒
 - d. 50°C，45秒
 - e. 68°C，45秒
 - f. 72°C，7分鐘

} 35個循環

g. 4°C至使用

(3)PCR 產物電泳

- A. 將1%瓊脂糖電泳膠 (Agarose gel) 放入電泳槽內，倒入1x TBE 緩衝液，蓋過膠片。
- B. 加4 μL 分子量標示物於電泳膠第一孔。
- C. 取5 μL PCR 產物、陽性對照和陰性對照，分別混以1 μL DNA 加樣緩衝液 (DNA loading buffer)，加入電泳膠的不同孔中。
- D. 蓋上電泳槽蓋子，設120 V 電壓跑15-20分鐘。
- E. 最後在302 nm 波長之紫外光下觀察分子標示物及 PCR 產物，並比較核酸片段大小。

(4)PCR 產物定序

若經電泳分析 PCR 產物之核酸片段大小應為164-176 bp，此特異性片段產物利用自動核酸序列分析儀進行定序反應，核酸序列分析結果以電腦序列分析軟體自動轉換為胺基酸序列後，讀取檢測毒株之 HA0切割位胺基酸序列。

(5)判讀

HA0切割位胺基酸序列如果和已知高病原性病毒之序列相似，即判定為 HPAI。

(1)檢體 RNA 萃取（依商品化套組之建議操作或參考附件6）

(2) 巢式反轉錄聚合酶鏈反應（Nested RT-PCR）：

A. A 型流行性感冒病毒核酸反轉錄酶聚合酶鏈反應（RT-PCR）（或依商品化套組之建議操作）

a. 每管取2 μ L RNA 加入48 μ L RT-PCR 反應液

b. 將反應管放在溫度循環器內，設定增幅條件：

(A) 42°C，40分鐘

(B) 95°C，2分鐘

(C) 95°C，40秒

(D) 50°C，40秒

(E) 72°C，50秒

(F) 72°C，7分鐘

} 35個循環

(G) 25°C保存至使用進行巢式聚合酶鏈反應（Nested polymerase chain reaction；以下簡稱 Nested PCR）

c. RT-PCR 使用之參考引子序列：（引子可依病毒流行情況進行調整）

引子名稱	引子序列	產物大小
NP-1085f	gTMTCAAgyTTCATYAgAgg	481 bp
NP-1565r	AgTAGAAACAaggTATTTTTC	

*Codes for mixed bases position: Y=C/T，M=A/C

B. A 型流行性感冒病毒核酸巢式聚合酶鏈反應（Nested PCR）（或依商品化套組之建議操作）

a. 每管取(2) A b.之產物2 μ L 加入48 μ L PCR 反應液

b. 將反應管放在溫度循環器內，設定增幅條件：

(A) 95°C，2分鐘

(B) 95°C，30秒

(C) 55°C，40秒

(D) 72°C，40秒

(E) 72°C，7分鐘

(F) 25°C保存至使用

} 35個循環

c. Nested-PCR 使用之參考引子序列：（引子可依病毒流行情況進行調整）

引子名稱	引子序列	產物大小
NP-1200f	CAGRTACTgggCHATAAgRAC	330 bp
NP-1529r	gCATTgTCTCCgAAgAAATAAg	

*Codes for mixed bases position: R=A/G，H=A/C/T

C. 膠片電泳分析：

陽性檢體及陽性對照組會出現一條片段大小約330 bp 之 PCR 產物，陰性檢體、陰性對照和空白對照則無產物出現。

(3) A 型流行性感冒病毒核酸 M 基因即時反轉錄酶聚合酶鏈反應（real-time RT-PCR）
（或依商品化套組之建議操作）

A. 每管取5 μ L RNA 加入20 μ L real-time RT-PCR 反應液

a. Real-time RT-PCR 反應條件

(A) 50°C，30分鐘

(B) 95°C，15分鐘

(C) 95°C，10秒

(D) 60°C，20秒

(E) 25°C保存

} 45個循環

B. A 型流行性感冒病毒核酸 M 基因 real-time RT-PCR 之參考引子對及探針序列
（引子可依病毒流行情況進行調整）

引子/探針名稱	引子序列
M+25F Primer	AgATgAgTCTTCTAACCgAggTCg
M+64 Probe	FAM-TCAggCCCCCTCAAAGCCgA-BHQ1
M-124R Primer	TgCAAAAACATCTTCAAgtCTCTg

參自參考文獻8

C. 結果判讀

a. 由於 A 型流行性感冒病毒核酸 M 基因 real-time RT-PCR 檢測法敏感，所以適合用於所有 A 型流行性感冒病毒樣品的篩選。

b. 無法檢測到 Ct 值者為陰性。Ct 值 $\leq$ 35者為陽性。Ct 值 $>$ 35者建議再測試，如結果仍相同，則可以認定是陽性，如果重複檢驗無法檢測到 Ct 值則視為陰性。判定為陽性的樣本，後續可依病毒分離或其他分子檢驗方式確認。

附件8、瓊膠免疫擴散法

- (1) 抗原製備：以 AI 病毒接種10日齡 SPF 或 SAN 雞胚胎蛋後，取其絨毛尿囊膜研磨成均質化，再經重複冷凍解凍三次使細胞裂解後，以 $1,000 \times g$ 離心10分鐘，取上清液添加0.1%福馬林或1% betapropiolactone 使病毒不活化，再離心（ $1,000 \times g$ ，10分鐘）一次之上清液即為 AGID 抗原使用。以本法製備之抗原主要為核蛋白衣（Nucleocapsid；以下簡稱 NP）抗原。
- (2) 瓊脂盤製備：泡製1%（w/v）瓊脂（Agar）或純化的 type II agar 與8%（w/v）氯化鈉溶於 PBS 內，加熱溶解，倒20 mL 至9 cm 平皿內，使用孔徑5 mm 孔間距為2-5 mm 的孔型打洞後挖除洞中之瓊脂。
- (3) 方法：每孔加入50 μ L 試劑，每個測試血清緊鄰已知陽性血清和抗原，如此才能確定測試血清與 NP 抗原間產生的沉降線和已知陽性沉降線是否連續吻合。加完試劑後，瓊脂盤放入密封容器內，再放入一塊濕棉花以保持容器內溼度，置於室溫。
- (4) 判讀：約24-48 小時後檢查沉降線，在暗視野有背光之下觀察，當測試孔與抗原間產生了沉降線，且與陽性對照線連成連續性的吻合線則判為特異性陽性。若為交叉線則表示測試血清與陽性對照血清的抗體不同，應判為陰性。

- (1)輸送培養液：功能為保護病毒及抑制細菌，包含有基礎液、蛋白質以及抗生素等三種成分。輸送培養液混合後以0.22 μm 過濾膜過濾，並以2 mL 分裝於螺旋蓋試管。
 - A. 基礎液，可使用細胞培養液（Minimum essential medium；MEM）、PBS、或腦心浸出液（Brain-heart infusion；BHI）等。
 - B. 蛋白質，可使用5% 牛血清、0.5%牛白蛋白或1%明膠（Gelatin）等。
 - C. 抗生素，可使用 penicillin（10,000 U/mL）、streptomycin（10 mg/mL）、gentamicin（250 $\mu\text{g/mL}$ ）或 mycostatin（5,000 U/mL）。
- (2)磷酸緩衝液：NaCl 8 g、KCl 0.2 g、 Na_2HPO_4 1.15 g、 KH_2PO_4 0.2 g 溶於蒸餾水使總體積為1公升，調整 pH 7.2 $\pm$ 0.1，高溫高壓滅菌後保存於4°C，勿超過3星期。
- (3)阿氏液（Alsever's Solution）：稱取 dextrose 20.5 g、sodium citrate dihydrate（ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）8.0 g、NaCl 4.2 g、citric acid（ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ）0.55 g，溶於蒸餾水使總體積為1公升，調整 pH =6.1 $\pm$ 0.1，以0.22 μm 過濾膜過濾後保存於4°C。
- (4)生理食鹽水，0.85% NaCl：秤取 NaCl 8.5 g，溶於蒸餾水使總體積為1公升，121°C高溫高壓滅菌後保存於4°C，勿超過3星期。
- (5)1%雞紅血球懸浮液：抽取至少三隻雞的血液加入等量的 Alsever's 溶液，以紗布過濾，1,200 rpm 離心10分鐘，抽掉上清液及白血球層，再加入 PBS 50 mL，輕輕混合均勻，再離心1,200 rpm 5分鐘後抽掉上清液，重複 PBS 洗兩次，取1 mL 洗完成之紅血球懸浮於99 mL PBS 中。保存於4°C中備用，若產生溶血則不可使用。
- (6)RT-PCR 反應液（RT-PCR Master Mix）：每管 RT-PCR 反應須調配5 μL PCR buffer、35 μL H_2O 、5 μL 2.5 mM dNTP、1 μL RT-PCR 酵素及2 μL 10 μM primer，依所需管數全量先行調配。
- (7)PCR 反應液（PCR Master Mix）：每管 PCR 反應須調配5 μL PCR buffer、35.4 μL H_2O 、5 μL 2.5 mM dNTP、0.6 μL PCR 酵素及2 μL 10 μM primer，依所需管數全量先行調配。
- (8)1%瓊脂糖電泳膠：agarose 1g 溶於100 mL 1xTBE，於微波爐內加熱融解後，倒入電泳膠模型器內，冷卻後使用。
- (9)10X TBE 緩衝液：Tris 107.8 g、硼酸（boric acid）55.0 g、EDTA-2Na 8.2 g，溶於去離子水使總體積為1公升，測量 pH，如果 pH 超出8.3 $\pm$ 0.3，須重新泡製。勿試圖調整 pH 值，因離子濃度改變影響跑膠時 DNA 之移動。
- (10) DNA 加樣緩衝液：30% glycerol、0.25% bromophenol blue 及0.25% xylene cyanol。