

非洲豬瘟檢驗方法

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、非洲豬瘟檢驗方法說明：

（一）範圍：依據世界動物衛生組織（Office International Des Epizooties；OIE）2012年陸生動物診斷試驗及疫苗手冊（Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial animals）Chapter 2.8.1.）。

（二）病毒抗原檢測：

1. 血球吸附試驗（Haemadsorption test）- 病毒分離（Virus isolation；VI）試驗。

2. 病毒核酸檢測（Detection of virus genome by the polymerase chain reaction）。

（1）非洲豬瘟病毒定量聚合酶鏈反應（qPCR）試驗。

（2）非洲豬瘟病毒聚合酶鏈反應（PCR）試驗。

三、病毒抗原核酸檢測：

(一) 非洲豬瘟病毒分離 (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：

(I) 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，製備組織懸浮溶液。

(II) 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：

(I) 收集健康豬之新鮮脫纖血或抗凝血

- (II) 700 g離心30分鐘，收集膚色層 (buffy coat)。加入3倍體積0.83% NH_4Cl 溶液，混勻，在室溫作用15分鐘。
- (III) 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。
- (IV) 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 10^6 - 10^7 /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-rosette)。
- (V) 取96孔盤加入白血球，每一孔放300,000個細胞，於 37°C 、5% CO_2 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)。
- (VI) 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。
- (VII) 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。
- (VIII) 每孔加入0.02mL新鮮1%豬紅血球溶液。

(3) 血球吸附(HAD)現象之觀察：

(I) 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）。

(II) (i) 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。

(ii) 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犬病病毒（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。

(iii) 若無變化或PCR檢測呈陰性，必須抽出細胞接種上清液再接種至新的初代細胞，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。

(4) 結果判讀程序：

(I) 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。

(II) 細胞接種樣本後觀察7天即為第一代，若有血球吸附判為非洲豬瘟病毒陽性，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)。

(III) 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。

(IV) 第三代參照第一代方式判讀。

(二) 非洲豬瘟病毒定量聚合酶鏈反應 (qPCR) 試驗：

1. 步驟與方法：

(1) 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 OIE 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 MagPurix Virus Nucleic Acid Extraction Kit 以 ZINEXTS 自動核酸萃取儀萃取病毒核酸、QIAamp DNA Mini kit 以 QIA cube 或 MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit I 以 MagNAPure Compact 等自動核酸萃取儀或 OIE 陸生動物診斷試驗及疫苗手冊推薦方法 (Chapter 2.8.1) 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. 定量聚合酶鏈反應

- (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)

qPCR 反應液配製	1管 (μL)
商品化預混酵素反應液	12.5
20μM Primer (FOR3)	1
20μM 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°C 2分鐘（1循環）→ 95°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°C 15秒→60°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。

(三) 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 OIE 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：

(I)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。

(II)置於55°C恆溫水槽中，待內外溫度平衡後再進行製膠。

(III)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。

(IV)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。

(V)PCR 產物電泳瓊脂膠電泳電泳分析。

(VI)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。

(VII)將電極選定為“-”極到“+”極，以100伏特電壓泳動約20分鐘。

(VIII)電泳完畢後膠片置於 UV 透視燈下觀察，並記錄影

像。

4. 測試結果判讀：

(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。

四、參考文獻：

World Organization for Animal Health (OIE). 2012. Chapter 2.8.1. African swine fever. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th ed., OIE, Paris.