

利用即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應分析 豬瘟組織培養活毒疫苗之病毒含有量

謝政橘*、潘姿吟、曾俊憲

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 豬瘟是我國重大的動物疾病之一，目前主要以施打疫苗來控制此疾病發生。本所目前生產豬瘟組織培養活毒疫苗，「病毒含有量試驗」的品質管制實驗是利用螢光抗體染色法 (immunofluorescence assay, IFA) 檢測。本研究旨在縮短品管檢驗期程及提升品管檢驗技術，利用即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 進行病毒含有量試驗之建立，達到品質管制檢驗技術之改良。結果顯示即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應標準曲線在偵測範圍內病毒含有量與 Ct 值都有極佳的線性關係， $R^2 = 0.9976$ 。標準曲線是由 IFA 的 50% 螢光抗體感染劑量 (50% fluorescent antibody infectious dose, FAID₅₀/mL) 與 qRT-PCR 的 Ct 值進行線性迴歸分析，以得到迴歸方程式： $y = -0.289x + 12.33$ 。y 為 FAID₅₀/mL 的對數值代表病毒含有量，x 代入所測為樣品 Ct 值，即可換算出樣品中之病毒含有量。故建立 FAID₅₀/mL 與 Ct 值之線性關係作為標準曲線，可應用於病毒含有量試驗，有效縮短檢驗期程及提升檢驗技術。

關鍵詞：即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應、品質管制、疫苗

緒言

生物檢驗技術日益進步，為提升動物疫苗品質並與國際接軌，動物用疫苗檢驗方法提升與改良是必要的。另因動物福利之議題，本所乾燥兔化豬瘟疫苗已逐年被豬瘟組織培養活毒疫苗所取代。豬瘟組織培養活毒疫苗之病毒力價檢測方法主要仍採用螢光抗體染色法 (immunofluorescence assay, IFA) 檢測 50% 螢光抗體感染劑量 (50% fluorescent antibody infectious dose, FAID₅₀/mL) [1, 9]，以判定病毒含有量，然而此方法必須經由培養細胞、感染細胞等，再加上使用螢光顯微鏡的人工判讀等時間，其檢測時間需 4 天。因此，研發快速、敏感度高且專一性高的檢測方法來進行豬瘟組織培養活毒疫苗之病毒含有量分析，取代傳統費時的檢測方法有其必要性。

由於聚合酶連鎖反應 (polymerase chain

reaction, PCR) 的技術在研究和診斷實驗室裡已成為不可或缺的工具，利用反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 的技術先將豬瘟病毒的 RNA 反轉錄成 cDNA，進行 PCR 以檢測豬瘟病毒，幾乎成為多數實驗室診斷豬瘟病毒的標準技術 [7, 18]。相較於分離病毒後，使用細胞培養一段時間再檢測豬瘟病毒，RT-PCR 技術已被認為是最敏感及快速的檢測方法 [7, 13, 18]。而即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 是 RT-PCR 與即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative polymerase chain reaction, q-PCR) 的結合，其中 q-PCR 是與螢光標記物質結合進行 PCR 的一種技術，具有高度敏感性和特異性，交互污染的風險較傳統的 PCR 低 [17]。在 qRT-PCR 技術中，有

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

許多不同的螢光機制，但目前用於豬瘟病毒的檢測大多為 SYBR Green I 及 TaqMan probe 兩種 [11]。由於 SYBR Green I 並未使用特異性的螢光探針，因此檢測的特異性較低，故本研究選擇使用 TaqMan probe 方式，發展 qRT-PCR 檢測豬瘟病毒技術。在 qRT-PCR 系統中，反應結果是以 Ct (threshold cycle) 值呈現，Ct 值是以相等的螢光量為基準對應，於檢測時進入幾何成長區所需的循環次數，以此方式來測定樣品內特定核酸含量之多寡。配合標準品之標準曲線建立，以每組樣品之 Ct 值即可定量出樣品所含之 DNA copy number。本研究即以 qRT-PCR 進行豬瘟組織培養活毒疫苗病毒含有量試驗之建立，以縮短檢驗期程及提升檢驗技術。

材料與方法

試驗疫苗

使用本所於 108 年至 109 年所生產之豬瘟組織培養活毒疫苗，批號 HCTC001 至 HCTC010，共計 10 批。

核酸萃取

豬瘟組織培養活毒疫苗以 1 mL 無菌磷酸鹽緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) 回溶後取 400 μ L，使用核酸萃取套組 (2003 Viral, #ZP02003-48-EVO, Zinexts Life Science Co., Taiwan) 配合自動化核酸萃取儀 (MagPurix Evo[®] 24, Zinexts Life Science Co., Taiwan)，參照產品操作手冊之方法萃取病毒核酸。

引子與探針

本研究利用 OIE 推薦的豬瘟病毒特異性引子對 (primer pair) 及 TaqMan probe 檢測豬瘟病毒 [7]，引子及探針序列如下：

CSF 100-F 5'-ATGCCAYAGTAGGACTAGCA-3'；

CSF 192-R 5'-CTACTGACGACTGTCC TGTAC-3'；

CSF-Probe 1 5'- FAM-TGGCGAGCTCCCTGGGTGG
TCTAAGT-TAMRA-3'。

反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 條件

反轉錄作用使用 Deoxy+OneStep RT-PCR 套組 (Yeastern Biotech Co., Taiwan)。反應液之配製與反轉錄聚合酶連鎖反應之條件，參照產品操作手冊之方法，並依據引子的參數找出最適合之條件。每管反應液含有 2 \times OneStep RT-PCR premix 12.5 μ L，10 μ M Forward primer 2 μ L，10 μ M Reverse primer 2 μ L，PCR-grade water 6.5 μ L，RNA Template (病毒核酸) 2 μ L，反應總體積 25 μ L。反應條件：48°C 30 分鐘，95°C 10 分鐘，再進行 40 個循環之 94°C 30 秒，50°C 30 秒，72°C 1 分鐘，最後進行冷卻 40°C 30 秒。

瓊膠配製

取 1 g 瓊膠 (agarose) 加入 50 mL 之 1 \times 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。待溫度降至不燙手，加入 5 μ L 核酸染劑 (FluoroVue[™] Nucleic Acid Gel Stain (10,000 \times), SMOBIO Technology Inc., Taiwan)。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。

電泳分析

RT-PCR 反應產物取出 5 μ L，與 1 μ L 之染劑 (ExcelDye[™] 6 \times DNA Loading Dye, SMOBIO Technology Inc., Taiwan) 混合均勻後注入齒槽洞中，一孔加入 5 μ L DNA ladder Marker (ExcelBand[™] 50 bp DNA Ladder, SMOBIO Technology Inc., Taiwan)。以 100 伏特電壓泳動約 30 分鐘，電泳完畢後，以電泳膠數位影像分析系統拍照，觀察產物片段大小，以確認結果。

即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction ; qRT-PCR) 條件

使用 KAPA PROBE FAST Universal One-Step

qRT-PCR Master Mix (2×) Kit (Roche, South Africa) · 反應液配製參照產品操作手冊之方法 · 每管反應液含有 KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2×) 10 µL · 10 µM Forward primer 0.8 µL · 10 µM Reverse primer 0.8 µL · 10 µM Probe 0.4 µL · KAPA RT Mix (50×) 0.4 µL · PCR-grade water 4.6 µL · RNA Template(病毒核酸) 3 µL · 反應總體積 20 µL · 反應條件參考行政院農委會公告之豬瘟檢驗方法修正規定 [2] · 條件如下 : RT 50°C 30 分鐘 · Denaturation 95°C 5 分鐘 · Amplification 94°C 30 秒 · 57°C 30 秒 · 68°C 30 秒共 45 個循環 · 最後進行冷卻 40°C 30 秒 · 各樣品做三重複檢測 · 使用儀器為 LightCycler® 480 (Roche Diagnostics Ltd., Switzerland) · 並使用 LightCycler® 480 軟體進行絕對定量 (Absolute Quantitation) 分析 ·

以螢光抗體染色法檢測豬瘟組織培養活毒疫苗病毒含有量

參考動物用藥品檢驗標準之乾燥兔化豬瘟組織培養活毒疫苗檢驗標準 [1] · 將 10 批疫苗混合且依序 10 倍連續稀釋後 · 即與各批疫苗分別之進行病毒含有量檢驗 · 將 PK-15 豬腎細胞株的細胞懸浮液 (約 2×10^5 cells/mL) 滴入 96 孔盤內 · 每孔滴入 100 µL · 置入 5% CO₂ 37°C 培養箱內培養 · 次日 · 當細胞生長成覆蓋底面積 50-60% 的單層細胞時 · 取冷凍乾燥疫苗 2 支 · 每支加入 20 mL PBS 溶解恢復疫苗原量 · 將 2 支疫苗液混合 · 以細胞培養液將疫苗液作 10 倍連續稀釋至 $10^{-7.0}$ · 取昨日培養細胞之 96 孔盤 · 甩棄培養液再依序將稀釋疫苗液滴入 96 孔盤內 · 每孔滴入 100 µL · 每稀釋階做 8 重覆 · 接種完立即將 96 孔盤置入 5% CO₂ 37°C 培養箱內靜置感作 60 分鐘 · 再取出 96 孔盤 · 補滴細胞培養液每孔 100 µL · 再置入 5% CO₂ 37°C 培養箱內培養 3 天 · 3 天後 · 取出 96 孔盤並甩棄細胞培養液至含有消毒液的桶槽中 · 以吸水紙拍乾 · 置於無 CO₂ 37°C 培養箱烘乾 30 分鐘 · 烘乾後每孔滴入 100 µL 10% 福馬林 · 常溫靜置 10 分鐘固定 · 隨後以 PBS 清洗三次 · 以吸水紙拍乾即可進行豬瘟螢光抗體染色以確認有無豬瘟病毒感染 · 加入以 1× PBS 作 200 倍稀釋之第一抗體 (SPF 豬隻抗豬瘟血

清 : 檢定分所分讓 · 中和抗體力價 1,000 倍以上) · 每孔 50 µL · 置入無 CO₂ 37°C 培養箱內作用 40 分鐘 · 甩棄第一抗體後 · 以 PBS 清洗三次並吸水紙拍乾 · 操作環境關燈以避光 · 加入 1× PBS 作 100 倍稀釋之第二抗體 (山羊抗豬免疫球蛋白螢光標示抗體) (Fluorescein (FITC) AffiniPure Goat Anti-Swine IgG (H+L), Jackson Immuno Research Inc., USA) · 每孔 50 µL · 包覆鋁箔避光 · 置入無 CO₂ 37°C 培養箱內作用 40 分鐘 · 操作環境關燈避光 · 甩棄第二抗體 · 以 PBS 清洗三次並吸水紙拍乾 · 每孔加入 50 µL 之 PBS 以保持濕潤 · 包覆鋁箔避光 · 以倒立螢光平盤顯微鏡於暗視野下判讀 · 若接種細胞出現螢光者表示有豬瘟病毒感染 · 使用 Reed-Muench 法 [14] 計算 FAID₅₀/mL ·

豬瘟病毒含有量標準曲線之建立

將 108 年至 109 年所生產之豬瘟組織培養活毒疫苗共 10 批 · 將 10 批疫苗混合且依序 10 倍連續稀釋後 · 即與各批疫苗分別以 qRT-PCR 檢測豬瘟疫苗病毒含有量 · 各樣品三重複檢測 · 將 FAID₅₀/mL 的對數值作 Y 軸 · 其相對的 qRT-PCR 檢測病毒含有量之 Ct 值作 X 軸 · 利用 LightCycler® 480 軟體分析其擴增曲線圖與 Ct 值 · 並與先前 FAID₅₀/mL 計算病毒含有量進行比較 · 換算出最佳之關係 · 俾利用定量 RT-PCR 檢測方式代替螢光染色實驗之病毒含有量試驗 ·

資料分析與統計

利用 MicroSoft® Excel 軟體進行資料整理 · 豬瘟疫苗標準曲線的建立與線性迴歸分析及製圖 ·

結果

反轉錄聚合酶連鎖反應

取 108 年至 109 年所生產之豬瘟組織培養活毒疫苗共 10 批 · 利用 OIE 推薦的豬瘟病毒特異性引子對檢測豬瘟病毒 · 經 RT-PCR 幅增後產物片段大小約為 92 bp · RT-PCR 產物經 2% 瓊膠電泳分析 · 也有預期之 DNA 片段 · 結果如圖 1 · 證明該豬瘟病毒特異性引子對適用於豬瘟病毒檢測 ·

以qRT-PCR檢測檢測豬瘟組織培養活毒疫苗病毒含有量

取108年至109年所生產之豬瘟組織培養活毒疫苗共10批，將10批疫苗混合且依序10倍連續稀釋後，及與各批疫苗分別以qRT-PCR檢測豬瘟疫苗病毒含有量，使用LightCycler® 480軟體進行絕對定量分析其Ct值，結果如表1、表2。

以螢光抗體染色法檢測豬瘟組織培養活毒疫苗病毒含有量

取108年至109年所生產之豬瘟組織培養活毒疫苗共10批，將10批疫苗混合且依序10倍連續稀釋後，各批疫苗分別以螢光抗體染色法檢測豬瘟疫苗病毒含有量，細胞如有豬瘟病毒感染則呈現螢光染色，如圖2。螢光判讀完成後，以Reed-Muench法計算FAID₅₀/mL，如表1、表2。

豬瘟病毒含有量標準曲線之建立

將10批疫苗混合且依序10倍連續稀釋後之病毒含有量與Ct值有極佳的線性關係， $R^2 = 0.9996$ ，如圖3。將FAID₅₀/mL的對數值與qRT-PCR的Ct值進行線性迴歸分析，以得到迴歸方程式： $y = -0.282x + 12.09$ 。另併入各批疫苗病毒含有量與Ct值後，亦有極佳的線性關係， $R^2 = 0.9976$ ，如圖4。得到迴歸方程式： $y = -0.289x + 12.33$ 。y為FAID₅₀/mL的對數值代表病毒含有量，x代入所測為樣品Ct值，即可換算出樣品中的FAID₅₀/mL的對數值。

討論

以往豬瘟病毒的診斷和檢測常利用血清學，對於可能感染豬瘟病毒的豬群中，抗體是很好的指標。最常用的抗體試驗有病毒中和試驗 (virus neutralization; VN) 和酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)。VN被視為豬瘟病毒檢測的黃金標準 (gold standard)，但是必須依賴細胞培養技術，既費力又費時 [13]。而ELISA雖具有較高的靈敏度，但其特異性較低，可能因為抗體的交叉反應而檢測到其他瘟疫病毒屬病毒 (Pestiviruses) [5]。

現今PCR的技術應用，已普遍使用於研究和診斷實驗室 [11, 15]，而利用RT-PCR技術來檢測豬瘟病毒核酸是自90年代開始發展 [8, 10, 15]。在此期間，RT-PCR幾乎已成為大多數實驗室診斷豬瘟病毒的標準技術。相較於分離病毒後，再使用細胞培養一段時間檢測豬瘟病毒，RT-PCR技術已被認為是最敏感及快速的檢測方法 [3, 6]。然而，若實驗室污染時可能會出現偽陽性結果，或因樣品中含有抑制劑而出現偽陰性結果。因此，實驗室的內部控制及風險評估亦是非常重要的。

本研究使用OIE推薦的豬瘟病毒特異性引子對，將豬瘟組織培養活毒疫苗進行傳統RT-PCR分析，結果證實其具有良好的增擴效果，且藉由2%瓊膠電泳分析顯示RT-PCR產物為專一性產物，增擴片段的長度為92 bp，證明適用於後續qRT-PCR。

本研究各批疫苗中病毒含有量最高值為 $10^{5.77}$ FAID₅₀，另將10批疫苗混合且依序10倍連續稀釋後之病毒含有量與Ct值檢驗結果 (表1)，當稀釋至 10^{-3} 時，可測得病毒含有量為 $10^{2.41}$ FAID₅₀，故檢測比對範圍涵蓋 $10^{2.41} \sim 10^{5.77}$ FAID₅₀，檢量線的範圍已包含可量測不合格 ($10^{3.5}$ FAID₅₀ 以下) 至現有疫苗成品的濃度。惟當進一步稀釋至 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 時，螢光抗體染色法即產生判讀困難，但仍能檢測出Ct值，顯示qRT-PCR敏感度高於螢光抗體染色法；所以當螢光抗體染色法結果為陰性時並不能完全排除豬瘟感染，若懷疑豬瘟感染時，應獲取更多樣本或嘗試進行反轉錄聚合酶連鎖反應或細胞培養中的病毒分離 [13]。且當實驗室對使用螢光抗體染色法不熟悉時，因人為判讀因素，出現偽陽性或偽陰性結果的風險相對較高。因此，建議應由具有該技術經驗、定期執行並接受過能力比對實驗的實驗室操作，以降低誤差。

螢光抗體染色法主要是利用抗原 (活病毒) 與螢光抗體的結合反應與細胞形態學相結合的方法，可檢測被豬瘟病毒顆粒感染之細胞，所得數據為豬瘟疫苗中之有效病毒力價。而qRT-PCR則是檢測病毒核酸片段，包含活病毒、破碎病毒或複製不完全病毒之核酸片段等皆可檢測出，故qRT-PCR技術可能會高估病毒顆粒數。惟本研究是依據每次檢測螢光抗體染色法之病毒含有量 (y值) 與qRT-PCR之Ct值 (x值)

之相對關係，且有極佳的線性關係 ($R^2=0.9976$)，故可藉由已知 x 值代入迴歸方程式推算出 y 值，推算出病毒含有量。

藉由 qRT-PCR 實驗所產生的 Ct 值結果，經標準曲線之迴歸曲線計算後，可推論出病毒含有量 $FAID_{50}/mL$ 之數值，例如依據乾燥兔化豬瘟組織培養活毒疫苗檢驗標準 [1]，病毒含有量試驗可利用螢光抗體染色法試驗，每劑量須含 $10^{3.5} FAID_{50}$ 以上之病毒。若 $y=3.5$ 代入公式 $y = -0.289x + 12.33$ 即可得到 $x=30.55$ ，當 Ct 值大於 30.55 時，則顯示病毒含

有量試驗不足 $10^{3.5} FAID_{50}$ ，可作為病毒含有量不符合之依據。

本研究的目的是在於建立一快速、高專一性及具穩定性的疫苗病毒含有量檢測方法 [4]，OIE 推薦的豬瘟病毒特異性引子對在此檢測方法上有良好的效果。qRT-PCR 檢測方法相較於傳統的螢光抗體染色法檢測方法可節省大量時間及具更高之靈敏度，將來可應用於豬瘟疫苗的製程中病毒含有量最大化檢測及品管實驗中病毒含有量之檢測。

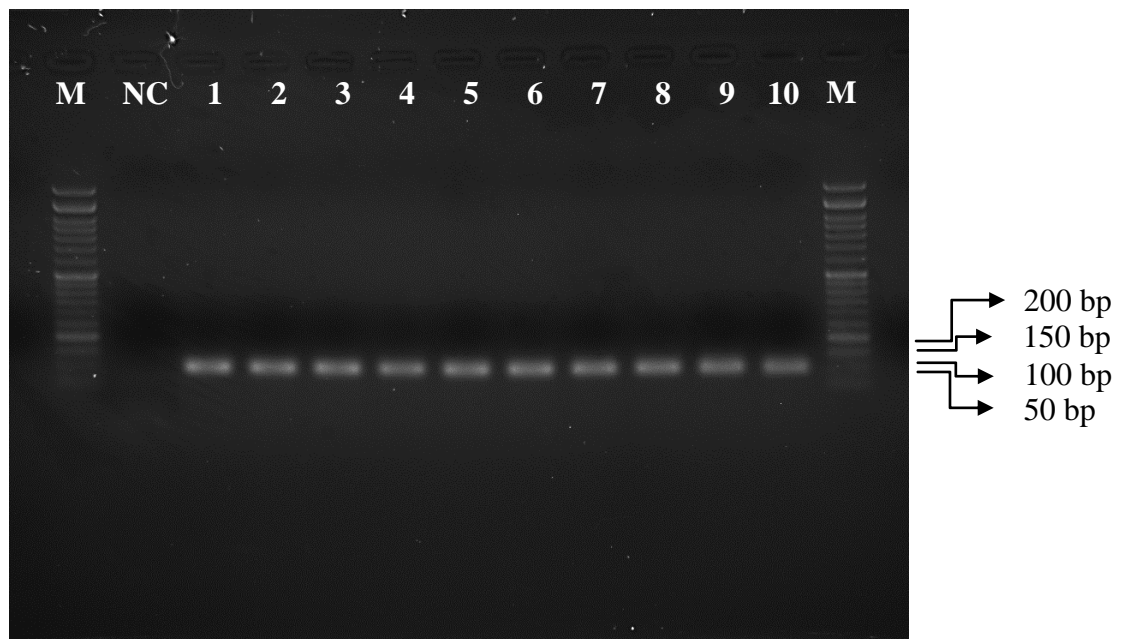
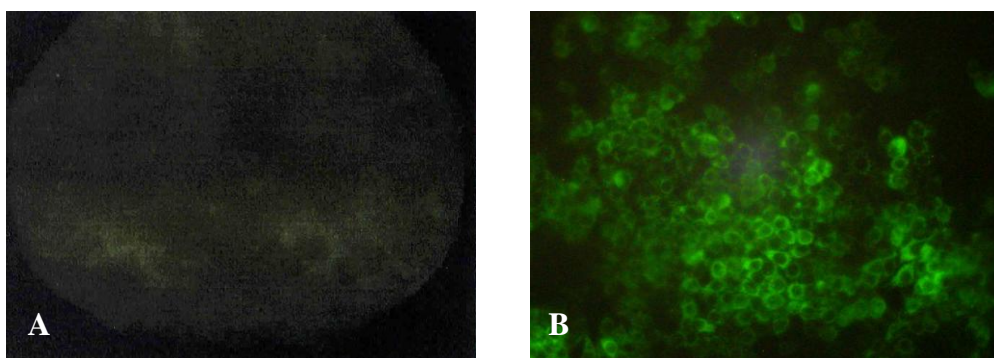


圖 1、豬瘟組織培養活毒疫苗經反轉錄聚合酶連鎖反應增幅豬瘟病毒核酸片段之 2% 瓊膠電泳分析結果，產物片段大小約為 92 bp。M：50 bp DNA Ladder，NC：陰性對照，Lanes 1-10：豬瘟組織培養活毒疫苗 HCTC001-HCTC010 批次 RT-PCR 產物。



A.未感染豬瘟病毒之 PK-15 豬腎細胞。

B.感染豬瘟病毒之 PK-15 豬腎細胞。

圖 2、豬瘟病毒感染 PK-15 豬腎細胞之螢光反應偵測。

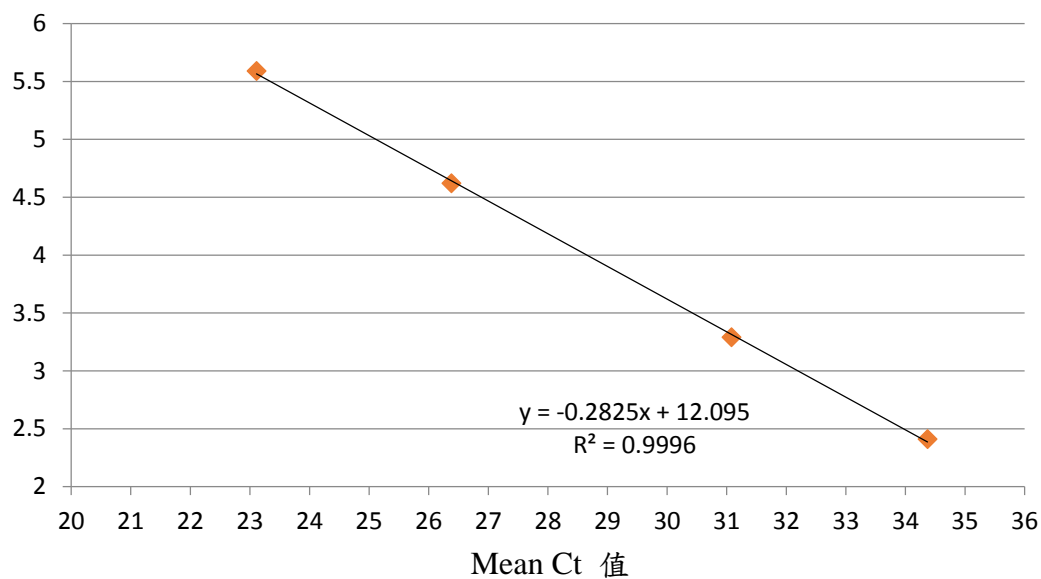
FAID₅₀/mL (10^y)

圖 3、將 10 批疫苗混合且依序 10 倍連續稀釋後之病毒含有量與 Ct 值有極佳的線性關係，
 $y = -0.2825x + 12.095$ ($R^2 = 0.9996$)。

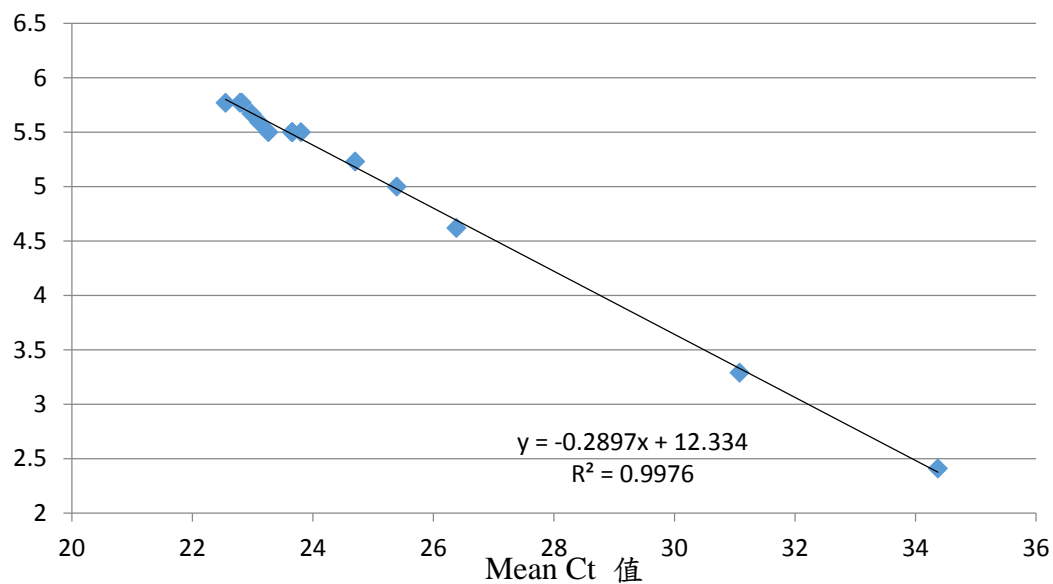
FAID₅₀/mL (10^y)

圖 4、各批疫苗之病毒含有量與 Ct 值有極佳的線性關係，
 $y = -0.2897x + 12.334$ ($R^2 = 0.9976$)。

表 1、將 10 批疫苗混合且依序 10 倍連續稀釋後之病毒含有量與 Ct 值檢驗結果。

10 倍連續稀釋	qRT-PCR (Ct)	螢光抗體染色法 (FAID ₅₀ /mL)
10 ⁰	23.11±0.09	5.59
10 ⁻¹	26.38±0.12	4.62
10 ⁻²	31.08±0.16	3.29
10 ⁻³	34.47±0.20	2.41
10 ⁻⁴	37.96±1.77	-
10 ⁻⁵	40	-

表 2、各批豬瘟組織培養活毒疫苗病毒含有量與 Ct 值檢驗結果。

疫苗批號	qRT-PCR (Ct)	螢光抗體染色法 (FAID ₅₀ /mL)
HCTC001	22.82±0.13	10 ^{5.77}
HCTC002	23.65±0.25	10 ^{5.5}
HCTC003	23.80±0.05	10 ^{5.5}
HCTC004	25.39±0.15	10 ^{5.0}
HCTC005	22.79±0.02	10 ^{5.77}
HCTC006	22.98±0.02	10 ^{5.67}
HCTC007	23.26±0.16	10 ^{5.5}
HCTC008	22.55±0.24	10 ^{5.77}
HCTC009	23.66±0.07	10 ^{5.5}
HCTC010	24.70±0.17	10 ^{5.23}

參考文獻

1. 行政院農業委員會。動物用藥品檢驗標準。引自：第 22 節第 66 條。2021 年 6 月 10 日修正。
2. 行政院農業委員會。豬瘟檢驗方法修正規定。2017 年 6 月 2 日修正。
(https://www.coa.gov.tw/theme_data.php?theme=publication&id=3201)
3. Dewulf J, Koenen F, Mintiens K, Denis P, Ribbens S, de Kruif A. Analytical performance of several classical swine fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection. J Virol Methods 119:137-143. 2004.
4. Emery SL, Erdman DD, Bowen MD, Newton BR, Winchell JM, Meyer RF, Tong S, Cook BT, Holloway BP, McCaustland KA, Rota PA, Bankamp B, Lowe LE, Ksiazek TG, Bellini WJ, Anderson LJ. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. Emerg Infect Dis 10:311-316. 2004.

5. Floegel-Niesmann G. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISAs. *Vet Microbiol* 83:121-136. 2001.
6. Handel K, Kehler H, Hills K, Pasick J. Comparison of reverse transcriptase-polymerase chain reaction, virus isolation, and immunoperoxidase assays for detecting pigs infected with low, moderate, and high virulent strains of classical swine fever virus. *J Vet Diagn Invest* 16:132-138. 2004.
7. Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirrmeier H, Depner K. Validation of a real time RT PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods* 130:36-44. 2005.
8. Katz JB, Ridpath JF, Bolin SR. Presumptive diagnostic differentiation of hog cholera virus from bovine viral diarrhea and border disease viruses by using a cDNA nested-amplification approach. *J Clin Microbiol* 31:565-568. 1993.
9. Lin HT, Tsai HY, Liu CP, Yuan TT Thomas, Comparability of bovine virus titers obtained by TCID₅₀/ml and FAID₅₀/ml. *Virol Methods* 165:121-124. 2010.
10. Liu ST, Li SN, Wang DC, Chang SF, Chiang SC, Ho WC, Chang YS, Lai SS. Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 35:227-236. 1991.
11. Matsenko NU, Rijikova VS, Kovalenko SP. Comparison of SYBR Green I and TaqMan real-time PCR formats for the analysis of her2 gene dose in human breast tumors. *Bull Exp Biol Med* 145:240-244. 2008.
12. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* 155:335-350. 1987.
13. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.9.3. Classical swine fever (infection with classical swine fever virus). 2019.
14. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 27:493-497. 1938.
15. Roehe PM, Woodward MJ. Polymerase chain reaction amplification of segments of pestivirus genomes. *Arch Virol* S3:231-238. 1991.
16. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higushi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491. 1988.
17. van Elden LJ, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 39:196-200. 2001.
18. Zhao JJ, Cheng D, Li N, Sun Y, Shi Z, Zhu QH, Tu CC, Tong GZ, Qiu HJ. Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 126:1-10. 2008.

Using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction to analyze the virus content of hog cholera tissue culture live vaccine

CC Hsieh*, TY Pan, CH Tseng

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Classic swine fever is one of the major animal diseases in our country. At present, the disease is mainly controlled by classic swine fever vaccination. Our institute is currently producing classical swine fever vaccine by cell culture, and then the product needs to use immunofluorescence assay (IFA) for quality control. In order to reduce the quality control inspection period and improve the technology, real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to replace the conventional virus content test, the IFA. The results showed that the standard curves had an excellent linear relationship between the virus content measured by and IFA and qRT-PCR, giving $R^2=0.9976$. The standard curve was a linear regression analysis of \log_{10} (50% fluorescent antibody infectious dose, FAID₅₀/mL) and the Ct value of qRT-PCR to obtain the regression equation: $y=-0.289x+12.33$. y is \log_{10} (FAID₅₀/mL) which represents the virus content, and x is substituted into the measured Ct value of the sample to convert the FAID₅₀/mL in the sample. The result can effectively shorten the inspection period.

Keywords: *real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, quality control, vaccine.*

