

應用即時定量反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-qPCR)

評估牛流行熱疫苗病毒含量

謝政橘*、潘姿吟、陳燕萍

農業部獸醫研究所

摘要 農業部獸醫研究所目前量產牛流行熱不活化疫苗之病毒含量檢測，係觀察細胞病變作用 (CPE)，並依 Reed-Muench 法計算半數組織培養感染劑量 (TCID₅₀)，檢驗期程約 4 – 5 天。為縮短檢驗時間並提升效率與準確性，本研究建立即時定量反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-qPCR) 檢測方法作為改良方案。結果顯示，RT-qPCR 標準曲線在偵測範圍內，病毒含量與 Ct (cycle threshold) 值呈良好線性關係 ($R^2=0.9667$)。標準曲線係以 $\log_{10}$ (TCID₅₀) 對應 Ct 值進行線性迴歸分析，所得方程式為 $y=-0.3719x+13.822$ ，其中 y 為 $\log_{10}$ (TCID₅₀)，x 為 Ct 值。依此公式可迅速換算檢體之 TCID₅₀，作為病毒含量估算依據。此方法可有效應用於牛流行熱疫苗品質管制檢驗，顯著縮短檢驗期程，並提升技術精確度與效率，具高度實務應用價值。

關鍵詞：疫苗、細胞病變作用、半數組織培養感染劑量、即時定量反轉錄聚合酶鏈反應、品質管制

緒言

牛流行熱 (bovine ephemeral fever, BEF)，又稱三日熱或僵硬病，是由桿狀病毒科 (Rhabdoviridae) 的牛流行熱病毒 (bovine ephemeral fever virus, BEFV) 所引起的季節性急性媒介傳播疾病。該病毒已自蚊子與庫蠓 (Culicoides biting midges) 中分離出，具有顯著的經濟影響 [20, 23]。臨床上，牛流行熱的特徵包括雙相發熱、精神沉鬱、跛行、臥地不起、關節腫脹、後肢癱瘓、鼻眼分泌物增多、過度流涎、僵硬以及產乳量驟降等，大多數感染牛隻可於三日內自發恢復。該疾病流行於中東、亞洲、非洲與澳洲等亞熱帶及溫帶地區 [8]。

BEFV 為具負股單股 RNA 基因組之病毒，包含五種結構蛋白：核蛋白 (N)、聚合酶相關蛋白 (P)、基質蛋白 (M)、RNA 依賴性 RNA 聚合酶 (L) 與包

膜糖蛋白 (G) [34]。其中，G 蛋白為具中和活性的特異性抗原，可誘導牛體內產生保護性免疫反應 [31]。N 蛋白亦具免疫原性，但不會誘導中和抗體或保護性免疫，主要激發 T 細胞增殖反應 [32]。

牛流行熱的防控策略包括限制牛隻移動、在無媒介區域進行短期隔離、媒介控制、對症治療以及疫苗接種。目前已開發四種疫苗類型，分別為減毒疫苗、不活化疫苗、G 蛋白次單位疫苗與重組疫苗，其中以減毒與不活化疫苗最常被商業化應用 [35]。

傳統的聚合酶鏈反應 (PCR) 檢測方法通常透過 PCR 擴增產物進行瓊脂膠電泳分析，具定性功能 [3]。相較之下，即時定量聚合酶鏈反應 (real-time quantitative PCR, qPCR) 可結合螢光染劑或螢光探針 (probe) 與猝滅劑 (quencher)，使核酸擴增過程得以即時監測，具有更高的特異性與靈敏度，且反

* 抽印本索取作者
農業部獸醫研究所

應速度更快 [13, 33]。使用嵌入染料的 qPCR 系統通常需搭配熔解曲線分析以驗證特異性 [10, 22]，而使用螢光探針的系統則多可省略此步驟 [1, 24]。qPCR 技術應用範圍廣泛，例如可用於偵測山羊痘病毒 (capripoxviruses) 基因組 [4, 14]、區分三種山羊痘病毒株 [5, 36]，甚至實現區分感染動物與接種動物的 DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) 分析 [1, 24]。

本研究所目前以半數組織培養感染劑量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀) 法檢測牛流行熱不活化疫苗半成品之病毒含量，流程需培養細胞、感染細胞並觀察細胞病變，整體檢測期程較長。為提高檢測效率並縮短時程，本研究導入即時定量反轉錄 PCR (RT-qPCR) 技術，建立病毒含量分析方法。首先透過反轉錄 PCR (RT-PCR) 將 BEFV RNA 反轉錄為 cDNA，後續再與螢光標記探針結合進行 qPCR 反應。鑑於螢光標記方式眾多，本研究選用特異性較高的 TaqMan 螢光探針，以提升定量準確性與實驗可靠性。為驗證此技術的效益，本研究將 RT-qPCR 與傳統 TCID₅₀ 在定量準確性與實驗可靠性上進行直接比較，並於結果中呈現相關誤差指標與重複精密度數據。

材料與方法

檢測樣本

本所於 106 年至 109 年所生產之牛流行熱不活化疫苗，共 10 批。本研究採樣之批次編號為 001-010 (詳表 2)，並於圖 4 以各點對應呈現。

核酸萃取

牛流行熱不活化疫苗半成品係採用病毒核酸萃取套組 (2003 Viral, #ZP02003-48-EVO, Zinexts, New Taipei City, Taiwan)，搭配自動化核酸萃取儀 (MagPurix Evo[®] 24, Zinexts, New Taipei City, Taiwan) 進行操作，並依照產品使用手冊所載標準流程執行病毒核酸萃取。

引子與探針

本研究採用發表於文獻 [30] 之牛流行熱病毒特異性引子對與 TaqMan 螢光探針進行檢測。所使用之

引子及探針序列如表 1 所示，預期擴增產物片段大小約為 176 bp。

反轉錄聚合酶鏈反應

反轉錄聚合酶鏈反應係使用 Deoxy + One Step RT-PCR Kit (Deoxy + One Step RT-PCR Kit, Yeastern, Taipei, Taiwan) 進行。反應液之配置及反應條件依據試劑產品操作手冊進行，並根據本研究所選用引子的序列特性調整以獲得最佳反應條件。每一反應管總體積為 25 μ L，組成如下：2 $\times$ One Step 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 模板 (病毒核酸) 2 μ L。RT-PCR 反應條件如下：48°C 30 分鐘，95°C 10 分鐘，再進行 40 個循環之 94°C 30 秒，49°C 30 秒，72°C 1 分鐘。

瓊膠配製

將 1 g 瓊膠 (agarose) 加入 50 mL 之 1 $\times$ TAE 電泳緩衝液中，配製成 2% 瓊膠溶液，並以微波加熱至完全溶解，膠液呈現透明狀態後取出。待其自然冷卻至不燙手之溫度後，加入 5 μ L 核酸染劑 (FluoroVue[™] Nucleic Acid Gel Stain, SMOBIO, Hsinchu, Taiwan)，混合均勻。隨即將膠液倒入製膠臺，插入電泳梳，待膠體冷卻凝固後，移除電泳梳，即可進行樣品上樣與電泳操作。

電泳分析

RT-PCR 反應產物取 5 μ L，加入 1 μ L 染劑 (ExcelDye[™] 6 $\times$ DNA Loading Dye, SMOBIO Hsinchu, Taiwan) 混合均勻後，注入瓊膠齒槽中；另於一孔加入 5 μ L DNA 分子量標記 (ExcelBand[™] 50 bp DNA Ladder, SMOBIO, Hsinchu, Taiwan) 作為對照。以 100 V 電壓進行電泳約 30 分鐘，電泳結束後使用數位電泳膠成像分析系統進行拍照，並依產物片段大小進行觀察與確認。

即時定量反轉錄聚合酶鏈反應

RT-qPCR 反應採用 KAPA PROBE FAST Universal One-Step RT-qPCR Master Mix (2 $\times$)

試劑組 (KAPA PROBE FAST Universal One-Step RT-qPCR Master Mix (2×) , Roche, Basel, Switzerland) · 依據產品使用手冊進行反應液配置。每管反應液含有 KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2×) 10 µL · 10 µM Forward primer 0.5 µL · 10 µM Reverse primer 0.5 µL · 10 µM Probe 0.25 µL · KAPA RT Mix (50×) 0.4 µL · PCR-grade water 7.35 µL · RNA Template (病毒核酸) 1 µL · 反應總體積 20 µL。反應條件參考 Stokes 等人發表 [30]之條件如下：反轉錄反應 50°C 10 分鐘，變性反應 95°C 5 分鐘，擴增反應 95°C 15 秒、49°C 45 秒共 45 個循環。每一檢體進行三重複檢測以確保數據一致性。反應使用 LightCycler® 480 系統 (LightCycler® 480, Roche, Basel, Switzerland) 執行，並以其搭配之 LightCycler® 480 軟體進行絕對定量 (absolute quantitation) 分析。

以半數組織培養感染劑量檢測牛流行熱不活化疫苗半成品病毒含量

將 BHK-21 乳倉鼠腎細胞懸浮液 (濃度約 3×10^5 cells/mL) 分注於 96 孔培養板中，每孔 100 µL，置於 37°C 培養箱內培養約 4 小時以促進細胞貼附。細胞貼附期間，以 1× MEM 培養液對牛流行熱不活化疫苗半成品進行 10 倍序列稀釋，稀釋至 10^{-6} 。細胞貼附完成後，將各稀釋階之疫苗樣品 100 µL 分注於對應之細胞孔中，每個稀釋階設置 8 個重複孔。培養板置於 34°C 培養箱中培養 72 小時，並於培養結束後使用倒立顯微鏡觀察細胞病變作用 (cytopathic effect, CPE)。若細胞出現細胞病變作用，即表示該孔細胞感染牛流行熱病毒。最終以 Reed-Muench 法 [27] 計算樣品之 TCID₅₀。

牛流行熱病毒含量標準曲線建立

選取 106 年至 109 年間生產之牛流行熱不活化疫苗半成品共 10 批，將其混合後進行 10 倍序列稀釋，並與各批原始疫苗樣品分別以 RT-qPCR 進行牛流行熱病毒含量檢測。每一樣品均進行三重複檢測以確保數據穩定性。實驗中，以各樣品經由細胞培養法所得病毒含量 (單位為 TCID₅₀/mL) 的對數值作為

Y 軸，對應之 RT-qPCR 檢測所得 Ct 值作為 X 軸，利用 LightCycler® 480 軟體分析其螢光擴增曲線與 Ct 值。進一步進行線性迴歸分析，建立 Ct 值與病毒含量 (log₁₀ TCID₅₀/mL) 間之對應關係。本研究旨在比較 RT-qPCR 與傳統細胞培養法之病毒含量檢測結果，以建立可替代細胞培養試驗的 RT-qPCR 方法，期望提升品管檢驗效率並縮短檢驗時程。

資料分析與統計

利用 Microsoft® Excel (Redmond, Washington, USA) 軟體進行資料整理、牛流行熱疫苗病毒標準曲線的建立與線性迴歸分析及製圖。

結果

RT-PCR

針對 106 年至 109 年間生產之 10 批牛流行熱不活化疫苗半成品，採用 Stokes 等人發表 [30] 的牛流行熱病毒特异性引子對進行 RT-PCR 檢測。擴增後之產物片段大小約為 176 bp，經 2% 瓊脂糖膠電泳分析後，皆可觀察到與預期相符之 DNA 條帶 (圖 1)，顯示該特异性引子對具有良好專一性，適用於牛流行熱病毒之檢測。

以 RT-qPCR 檢測牛流行熱不活化疫苗半成品病毒含量

針對前述 10 批牛流行熱不活化疫苗半成品，採用 RT-qPCR 進行病毒含量檢測，並使用 LightCycler® 480 軟體進行 Ct 值之絕對定量分析，結果彙整如表 2 所示。

以半數組織培養感染劑量檢測牛流行熱不活化疫苗半成品病毒量

針對前述 10 批牛流行熱不活化疫苗半成品，採用半數組織培養感染劑量法進行病毒含量測定。當細胞受到牛流行熱病毒感染時會出現 CPE 如圖 2 所示。完成 CPE 觀察與判讀後，依 Reed-Muench 法計算各批次樣品之 TCID₅₀/mL，結果彙整如表 2。

牛流行熱病毒含量標準曲線建立

將 10 批牛流行熱不活化疫苗半成品混合後，進行 10 倍連續稀釋，並以 RT-qPCR 檢測其 Ct 值，結果顯示病毒含量之對數值與 Ct 值之間具有高度線性相關性 ($R^2 = 0.9764$)，如表 3 所示。進一步將 TCID₅₀/mL 之對數值與對應 Ct 值進行線性迴歸分析，建立迴歸方程式為 $y = -0.3802x + 14.057$ (圖 3)。此外，將各批次半成品疫苗分別納入分析後，其病毒含量對數值與 Ct 值同樣呈現良好線性關係 ($R^2 = 0.9667$)，所建立之迴歸方程式為： $y = -0.3719x + 13.822$ (圖 4)。其中，y 代表病毒含量 (以 TCID₅₀/mL 之對數值表示)，x 則為樣品實測之 Ct 值，據此可推算樣品中病毒的 TCID₅₀/mL 對數值。

方法學比較

RT-qPCR 可有效應用於牛流行熱疫苗病毒含量之品管檢驗，顯示精確度與效率皆優於傳統方法，其實務應用價值，比較說明如下：

- 一、**期程差異**：傳統 TCID₅₀ 流程需 4-5 天 (含培養觀察與判讀)；RT-qPCR 以本研究條件 (50°C 10 分鐘 + 95°C 5 分鐘 + 45 個循環 [95°C 15 秒 + 49°C 45 秒]) 僅約 60 分鐘儀器時間完成擴增，搭配自動化核酸萃取 (MagPurix Evo[®] 24) 可於同日內產出結果 (全流程小於 1 天，較 TCID₅₀ 至少縮短 3 天)。
- 二、**定量精確度 (對 TCID₅₀ 的一致性)**：以 10 批次半成品 (表 2) 建立之 RT-qPCR 與 TCID₅₀ 的迴歸式為 $y = -0.3719x + 13.822$ (圖 4)，將 Ct 換算為 $\log_{10}(\text{TCID}_{50})$ ，與實測 TCID₅₀ 比較之平均絕對誤差 (mean absolute error, MAE) = $0.19 \log_{10} = 10^{0.19}$ 、均方根誤差 (root mean square error, RMSE) = $0.22 \log_{10} = 10^{0.22}$ 、平均誤差 (mean error, ME) = $+0.036 \log_{10} = 10^{0.036}$ (n=10)，顯示與 TCID₅₀ 具良好一致性 (整體相關 $R^2 = 0.9667$)。結果顯示本法對 TCID₅₀ 具有良好之定量準確性與實驗可靠性。

與傳統 TCID₅₀ 比較之誤差指標依下列公式計算：

$$\text{MAE} = (1/n) \sum |y_i - x_i|$$

$$\text{RMSE} = \sqrt{[(1/n) \sum (y_i - x_i)^2]}$$

$$\text{ME} = (1/n) \sum (y_i - x_i)$$

其中 y_i 為 RT-qPCR 換算所得之 $\log_{10}(\text{TCID}_{50})$ 值， x_i 為實測 TCID₅₀ 值，n 為樣本數 (本研究為 10 批)。計算結果如下：

$$\text{MAE} = 0.19 \log_{10}, \text{RMSE} = 0.22 \log_{10},$$

$$\text{ME} = +0.036 \log_{10}$$

三、技術重複精密度 (RT-qPCR 重複比較)：

三重 Ct 的平均標準差 (standard deviation, SD) = 0.072 (表 2)；依斜率 0.3719 換算為 $0.027 \log_{10}(\text{TCID}_{50})$ ，相當於約 ±6.4% 的變異度 ($10^{0.027} \approx 1.064$)。

RT-qPCR 三重複試驗的精密度以 Ct 值的標準差計算如下：

$$\text{SD}_{\text{Ct}} = \sqrt{[(\text{Ct}_1 - \bar{Y}_{\text{Ct}})^2 + (\text{Ct}_2 - \bar{Y}_{\text{Ct}})^2 + (\text{Ct}_3 - \bar{Y}_{\text{Ct}})^2] / (3 - 1)}$$

其中 $\bar{Y}_{\text{Ct}}$ 為三重 Ct 值之平均。

再依 RT-qPCR 與 TCID₅₀ 迴歸斜率 b (由 $y = a + bx$ ，其中 x 為 Ct 值，y 為 $\log_{10}(\text{TCID}_{50})$) 換算至 $\log_{10}(\text{TCID}_{50})$ 的變異：

$$\text{SD}_{\log_{10}(\text{TCID}_{50})} = |b| \times \text{SD}_{\text{Ct}}$$

以本研究數據 $b = -0.3719$ 、 $\text{SD}_{\text{Ct}} = 0.072$ 代入：

$$\text{SD}_{\log_{10}(\text{TCID}_{50})} = 0.3719 \times 0.072 = 0.027 \log_{10}$$

換算後之變異幅度：

$$10^{0.027} \approx 1.064 \text{ (約 } \pm 6.4\%)$$

- 四、**效率 (用孔數 / 人工作業)**：TCID₅₀ 每一檢體需 6 個序列稀釋 × 每階 8 重複 = 48 孔，另需 72 小時培養與顯微判讀；RT-qPCR 每檢體 3 孔即可，且無需細胞培養。以用孔數計，RT-qPCR 對單一檢體減少 ~16 倍耗用。

討論

本研究之檢量迴歸的建立，採用 10 批牛流行熱不活化疫苗半成品混合樣品進行 10 倍序列稀釋 (圖 3；方法詳述)，其考量如下：

- 一、基質相符：日後品質管制的檢體即為同型態之不活化半成品，選用相同基質可降低萃取與擴增之基質效應。
- 二、代表性與穩健度：混合 10 批可平衡各批間的差異，避免單一批之偶發偏差，使迴歸參數更能代表常規生產範圍。
- 三、可追溯與維護：混合批次可製備長期參考材料，便於批內/批間監測與儀器效能比對。
- 四、至於不用『確定 TCID₅₀ 的種毒或單一批疫苗』，主因在於其基質與常規檢體不一致，易引入基質不匹配誤差；此外，單一批之迴歸參數可能代表性不足，不利於後續跨批次之量測一致性。

目前已發展出多種病毒含量的檢測方法 [21]。傳統技術可獲得病毒含量如 TCID₅₀ 與斑點形成單位 (plaque forming unit, PFU) 常被用於評估病毒濃度及活毒疫苗之穩定性 [7, 9, 15]。其中，PFU 雖為評估病毒含量的有效工具，但並不適用於所有病毒 [16]。這兩種方法皆需依賴細胞培養，因此操作程序繁複、耗時，且實驗成本較高 [19]。為克服上述限制，近年來研究人員積極開發現代化替代技術。舉例而言，流式細胞術已成功應用於麻疹病毒、水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus) 及人類免疫缺陷病毒第一型之快速定量，且可於 24 至 52 小時內完成分析 [11]。此外，2012 年 qPCR 技術首次被用於替代 TCID₅₀ 以評估人類疱疹病毒第六型的病毒力價，證實其具備高效率與準確性 [12]。Pourianfar 等人亦提出以比色法測定腸病毒 71 型的病毒含量 [26]。Jonsson 等人則於 2009 年證實 qPCR 可作為估算腸病毒含量之可接受替代工具 [17]。RT-qPCR 目前也被廣泛應用於登革熱病毒定量，且與 PFU 法之結果具有顯著相關性 [2]。Schalk 等人更進一步將 qPCR 應用於活毒疫苗中麻疹病毒的定量分析，結果顯示該法除具備與 PFU 相當之準確性與精密度外，亦顯著縮短檢測時間 [28]。

測量 PFU 與 TCID₅₀ 仍為評估疫苗降解速率的

主要方法，分子技術如 qPCR 目前尚未被廣泛應用於此目的 [25]。不過，根據 Kallesh 等人研究 [18]，將 qPCR 應用於單價及多價山羊痘疫苗之品質控管，藉由在不同時間點收集樣本、建立標準曲線，所估算之病毒力價與 TCID₅₀ 結果具良好一致性。Shahkarami 等人亦以 qPCR 分析疫苗病毒 RNA 拷貝數，發現其與 TCID₅₀ 估算之降解速率具有顯著相關性 ($p < 0.05$) [29]。因此，qPCR 可視為傳統方法的良好補充，亦可在特定應用中作為替代方案 [6, 29]。雖然細胞培養法如 TCID₅₀ 目前仍為評估疫苗病毒力價及熱穩定性的金標準，但 qPCR 具備快速、低成本與操作簡便等優勢，也適用於同一目的。

日後執行 RT-qPCR 時，常規換算優先使用「多批次建立」之方程式 $y = -0.3719x + 13.822$ (圖 4)，因其係基於 10 批實際半成品建立，代表性與穩健度較高，可作為方法學之「跨批校準」參考。另每一檢測批仍需以內建標準品建立「當次 5 點檢量線」(由混合半成品參考材料配製，對應圖 3 的操作精神)，以當次檢量線換算 Ct 至 $\log_{10} (\text{TCID}_{50})$ ，並將其斜率/截距與「多批次方程式」進行系統適用性檢核 (例如：斜率偏差在 $\pm 10\%$ 、 $R^2 \geq 0.95$)。若超出界限，則重建迴歸並追蹤原因 (儀器、試劑或樣本基質)。亦可暫以 $y = -0.3719x + 13.822$ 做為「目標迴歸參數」與品質管制圖之中心線；同時每季擇 3–5 批樣本進行 TCID₅₀ 平行試驗，若觀察到系統性偏移 (例如平均偏差 $> \pm 0.2 \log_{10}$)，即更新方程式與標準作業書。總結，日後常規檢驗每一檢測批以混合半成品參考材料建 5 點檢量線，據以換算 Ct；並以本研究多批次迴歸式 $y = -0.3719x + 13.822$ 作為方法學參考曲線進行斜率/截距之系統適用性檢核。若當次檢量線之斜率偏離參考值超過 $\pm 10\%$ 或 $R^2 < 0.95$ ，則啟動迴歸重建與原因追查流程；同時維持定期 (每季) 與 TCID₅₀ 的平行比對以確保可溯源性與量測一致性。

本研究即在此背景下，旨在建立一套具快速性、高特異性與穩定性的 BEF 疫苗病毒含量檢測方法。結果顯示，RT-qPCR 不僅具備高靈敏度，亦能顯著節省檢測時間，未來可廣泛應用於 BEF 疫苗製程控制與品管檢測中，作為傳統 TCID₅₀ 方法的有效替代。

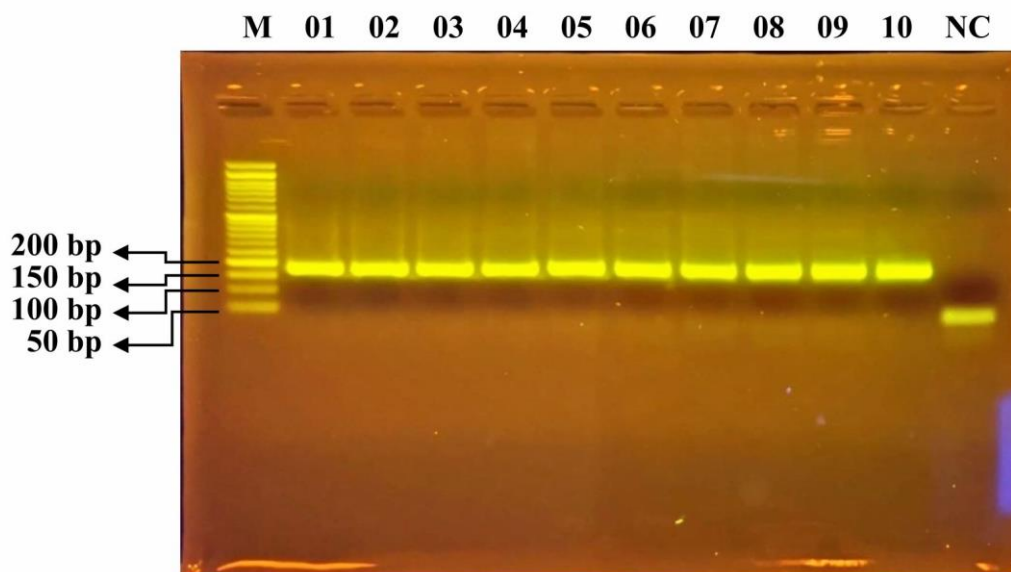


圖 1、牛流行熱疫苗病毒經反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR)增幅牛流行熱病毒核酸片段之 2% 瓊膠電泳分析結果，產物片段大小約為 176 bp。

M：50 bp DNA Ladder，

NC：陰性對照，

Lanes 01-10：牛流行熱疫苗病毒 01-10 批次 RT-PCR 產物。

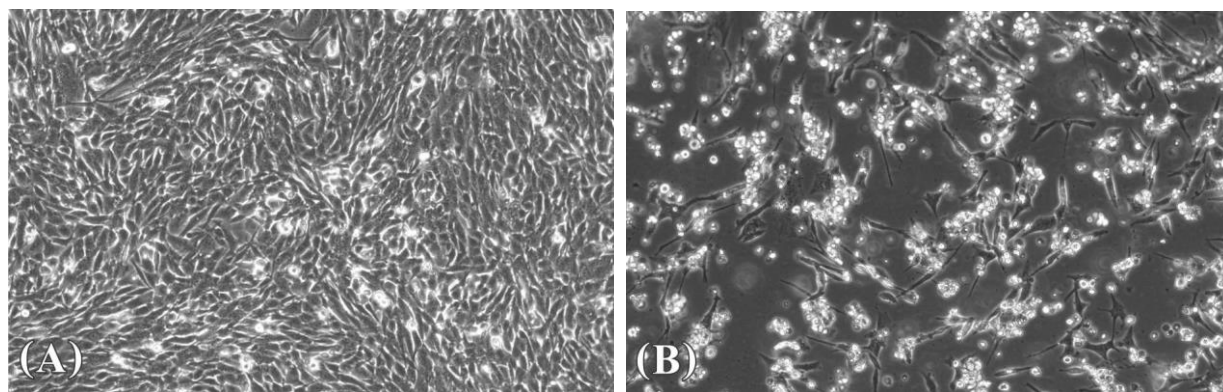


圖 2、牛流行熱病毒感染 BHK-21 幼倉鼠腎臟細胞之細胞病變現象。

(A) 未感染牛流行熱病毒之 BHK-21 細胞。

(B) 感染牛流行熱病毒之 BHK-21 細胞。

應用即時定量反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-qPCR) 評估牛流行熱疫苗病毒含量

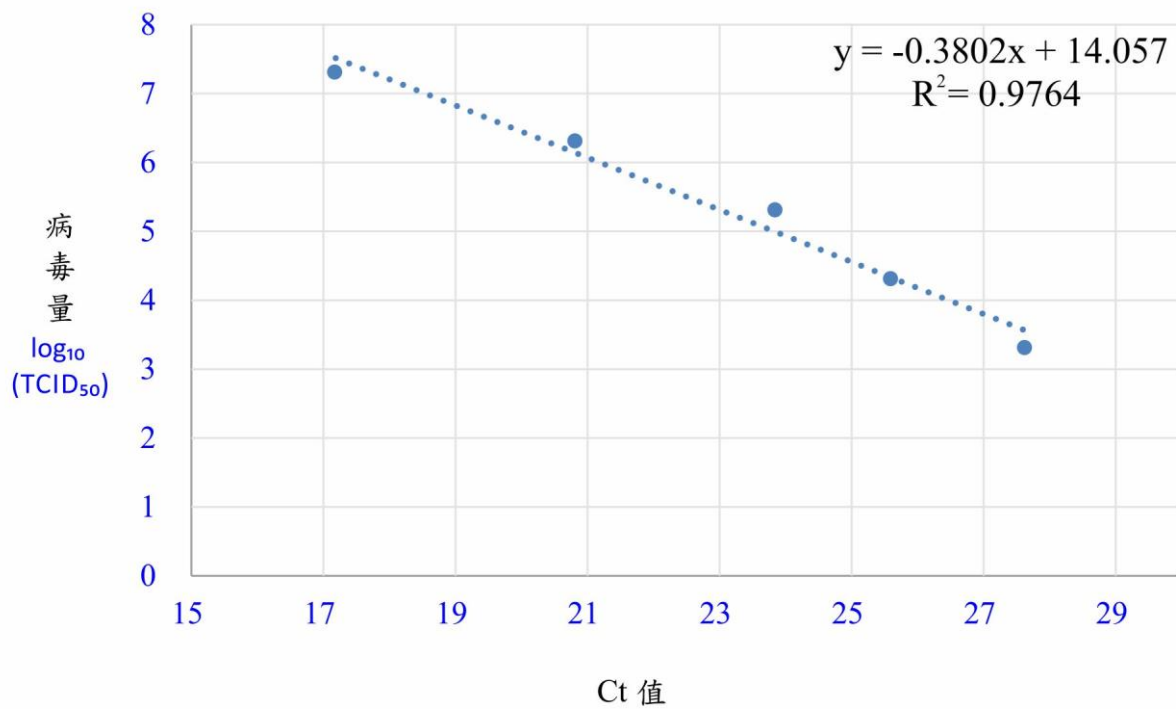


圖 3、10 批半成品混合樣本經 10 倍序列稀釋 ($10^0 \sim 10^{-4}$) 之標準曲線；各點分別對應於不同稀釋階之平均 Ct 與相應的 $\log_{10}$ (TCID₅₀) 值 (表 3)。

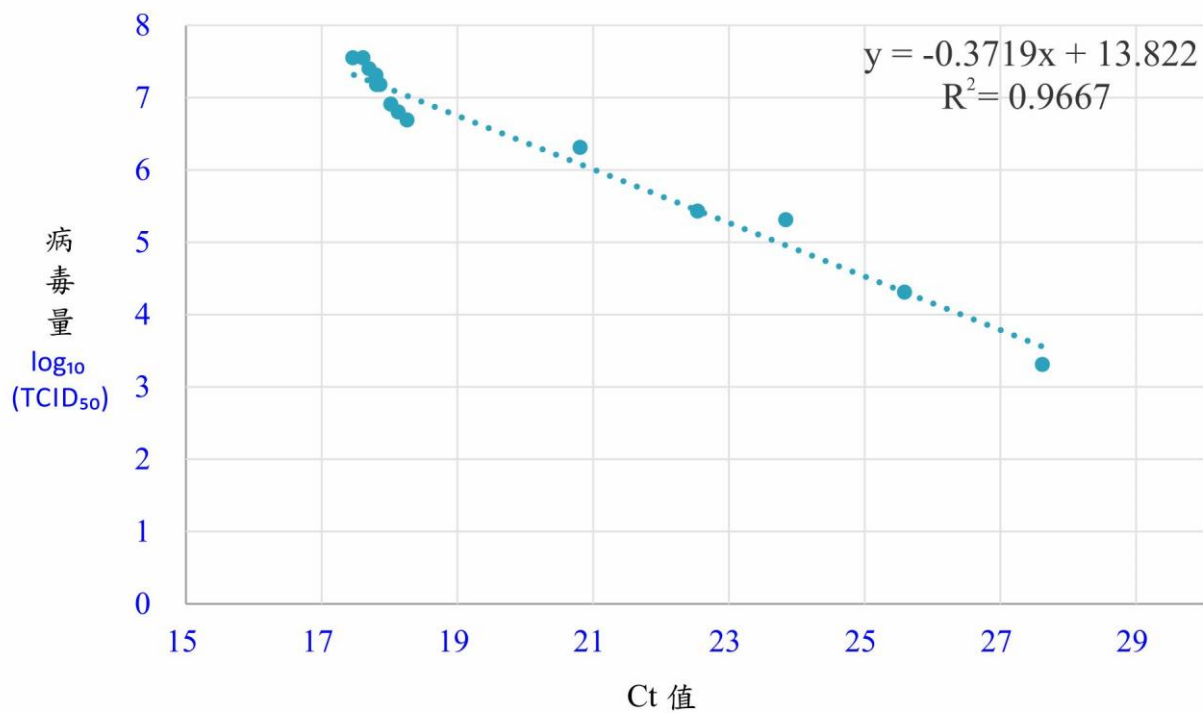


圖 4、各單一批次半成品 (批號 001 ~ 010) 之平均 Ct 與其對應之 $\log_{10}$ (TCID₅₀) (表 2)。

每一點代表一個批次 (三重複 Ct 取平均；TCID₅₀ 依 Reed-Muench 法計算)。

迴歸式 $y = -0.3719x + 13.822$ ， $R^2 = 0.9667$ 。

表 1、檢測牛流行熱病毒 (bovine ephemeral fever virus, BEFV) 之引子與探針序列。

Primer	Sequence	Final concentration	Genome location (BEFV genome MN078236)
BEFV-F	5'-CAT TGG GAA TGC ATT ACA GT-3'	10 pmoles/μL	3,683-3,202
BEFV-P	5'- [FAM]AGA TTA TGG GAA GCT CCA GA [TAM]-3'	5 pmoles/μL	3,737-3,756
BEFV-R	5'-GTT TGG TTT TCT ATA CTC CAC-3'	10 pmoles/μL	3,838-3,858

表 2、各批牛流行熱疫苗病毒含量與 Ct 值檢驗結果比較。

Batch	Log ₁₀ (TCID ₅₀)	RT-qPCR
001	6.91	18.02±0.02
002	7.31	17.80±0.03
003	7.18	17.86±0.17
004	7.40	17.70±0.11
005	6.80	18.14±0.04
006	6.69	18.26±0.05
007	7.55	17.61±0.07
008	7.18	17.81±0.05
009	7.55	17.46±0.11
010	6.80	18.13±0.07

表 3、將 10 批疫苗混合且依序 10 倍連續稀釋後之病毒含量與 Ct 值檢驗結果。

Dilution multiple	Log ₁₀ (TCID ₅₀)	RT-qPCR
10 ⁰	7.31	17.80±0.03
10 ⁻¹	6.31	20.81±0.19
10 ⁻²	5.31	23.84±0.10
10 ⁻³	4.31	25.59±0.36
10 ⁻⁴	3.31	27.62±0.18

參考文獻

1. Agianniotaki EI, Chaintoutis SC, Haegeman A, Tasioudi KE, Leeuw ID, Katsoulos PD, Sachpatzidis A, Clercq KD, Alexandropoulos T, Zoe S Polizopoulou, Chondrokouki ED, Dovas CI. Development and validation of a TaqMan probe-based real-time PCR method for the differentiation of wild type lumpy skin disease virus from vaccine virus strains. *J Virol Methods*, 249: 48-57, 2017.
2. Anwar A, August JT, Too HP. A stem-loop-mediated reverse transcription real-time PCR for the selective detection and quantification of the replicative strand of an RNA virus. *Anal Biochem*, 352: 120-128, 2006.
3. Balamurugan V, Jayappa KD, Hosamani M, Bhanuprakash V, Venkatesan G, Singh RK. Comparative efficacy of conventional and taqman polymerase chain reaction assays in the detection of capripoxviruses from clinical samples. *J Vet Diagn Invest*, 21: 225-231, 2009.
4. Bowden TR, Babiuk SL, Parkyn GR, Copps JS, Boyle DB. Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, 371: 380-393, 2008.
5. Chibssa TR, Settypalli TBK, Berguido FJ, Grabherr R, Loitsch A, Tuppurainen E, Nwankpa N, Tounkara K, Madani H, Omani A, Diop M, Cattoli G, Diallo A, Lamien CE. An HRM assay to differentiate sheeppox virus vaccine strains from sheeppox virus field isolates and other capripoxvirus species. *Sci Rep*, 9: 6646, 2019.
6. 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 LA. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg Infect Dis*, 10: 311-316, 2004.
7. Esna-Ashari F, Mirchamsy H, Shafyi A, Taqavian M, Mohammadi A, Ashtiani MP, Sabiri GH, Sheikh-Mohammadi N. Comparison of micro and macro titration for evaluation of potency of mumps vaccine. *Arch Razi Inst*, 62: 151-154, 2007.
8. Finlaison DS, Read AJ, Kirkland PD. An epizootic of bovine ephemeral fever in New South Wales in 2008 associated with long-distance dispersal of vectors. *Aust Vet J*, 88: 301-306, 2010.
9. Galazka A, Milstien J, Zaffran M. Thermostability of Vaccines: Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization; 1998.
10. Gelaye E, Lamien CE, Silber R, Tuppurainen ESM, Grabherr R, Diallo A. Development of a cost-effective method for capripoxvirus genotyping using snapback primer and dsDNA intercalating dye. *PLoS One*, 8: e75971, 2013.
11. Grigorov B, Rabilloud J, Lawrence P, Gerlier D. Rapid titration of measles and other viruses: Optimization with determination of replication cycle length. *PLoS One*, 6: e24135, 2011.
12. Gustafsson R, Engdahl EE, Fogdell-Hahn A. Development and validation of a Q-PCR based TCID₅₀ method for human herpesvirus 6. *Virol J*, 9:311, 2012.
13. Haegeman A, De Vleeschauwer A, De Leeuw I, Vidanović D, Šekler M, Petrović T, Demarez C, Lefebvre D, De Clercq K. Overview of diagnostic tools for Capripox virus infections. *Prev Vet Med*, 181: 104704, 2020.

14. Ireland DC, Binepal YS. Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J Virol Methods*, 74: 1-7, 1998.
15. Jamil RK, Taqavian M, Sadigh ZA, Shahkarami MK, Esna-Ashari F, Hamkar R, Hosseini SM, Hatami A. Evaluation of the thermal stability of a novel strain of live-attenuated mumps vaccine (RS-12 strain) lyophilized in different stabilizers. *J Virol Methods*, 199: 35-8, 2014.
16. Jerome KR, Lennette EH. *Lennette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. New York: Informa Healthcare USA; 2010.
17. Jonsson N, Gullberg M, Lindberg AM. Real-time polymerase chain reaction as a rapid and efficient alternative to estimation of picornavirus titers by tissue culture infectious dose 50% or plaque forming units. *Microbiol Immunol*, 53: 149-154, 2009.
18. Kallesh DJ, Hosamani M, Balamurugan V, VBhanuprakash V, Yadav V, Singh RK. Quantitative PCR: A quality control assay for estimation of viable virus content in live attenuated goat pox vaccine. *Indian J Exp Biol*, 47: 911-915, 2009.
19. Kangro HO, Mahy BWJ. *Virology Methods Manual*: Elsevier Science; 1996.
20. Kirland PD. The epidemiology of bovine ephemeral fever in Southwestern Australia: Evidence for a mosquito vector. In 1st International Symposium (Beijing) on bovine ephemeral fever and related arboviruses. *ACIAR Proceedings*, Canberra, 44: 33-37, 1995.
21. Knipe DM. *Fields Virology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
22. Lamien CE, Lelenta M, Goger W, Silber R, Tuppurainen E, Matijevic M, Luckins AG, Diallo A. Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *J Virol Methods*, 171: 134-140, 2011.
23. Mellor PS. Culicoides: vectors, climate change and disease risk. *Vet Bull*, 66: 301-306, 1996.
24. Möller J, Moritz T, Schlottau K, Krstevski K, Hoffmann D, Beer M, Hoffmann B. Experimental lumpy skin disease virus infection of cattle: Comparison of a field strain and a vaccine strain. *Arch Virol*, 164: 2931-2941, 2019.
25. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. *Vaccines*: Saunders, Elsevier Inc.; 2008.
26. Pourianfar HR, Javadi A, Grollo L. A colorimetric-based accurate method for the determination of Enterovirus 71 titer. *Indian J Virol*, 23: 303-310, 2012.
27. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg*, 27: 493-497, 1938.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>.
28. Schalk JAC, van den Elzen C, Ovelgonne H, Baas C, Jongen PMJM. Estimation of the number of infectious measles viruses in live virus vaccines using quantitative real-time PCR. *J Virol Methods*, 117: 179-187, 2004.
29. Shahkarami MK, Shayestehpour M, Sancholi A, Taqavian M, Jamil RK, Esna-Ashari F, Shahbazi R. Application of real-time PCR method for evaluation of measles vaccine heat stability. *J Paramed Sci*, 6: 26-30, 2015.
30. Stokes JE, Darpel KE, Gubbins S, Carpenter S, Fernández de Marco MDM, Hernández-Triana LM, Fooks AR, Johnson N, Sanders C. Investigation of bovine ephemeral fever virus transmission by putative dipteran vectors under experimental conditions. *Parasit Vectors*, 13: 597, 2020.

31. Uren MF, Walker PJ, Zakrzewski H, George St TD, Byrne KA. Effective vaccination of cattle using the virion G protein of bovine ephemeral fever virus as an antigen. *Vaccine*, 12: 845-850, 1994.
32. Uren MF, Zakrzewski H, Davis SS. Antibody and cell proliferative responses of cattle vaccinated with bovine ephemeral fever virus proteins. In: St George TD, Uren MF, Young PL, Hoffmann D (eds). *Proceedings of the 1st International Symposium on Bovine Ephemeral Fever and Related Rhabdoviruses*, Beijing, August 1992. Australian Centre for International Agricultural Research Proceedings, 44: 122-126, 1993.
33. Venkatesan G, Balamurugan V, Bhanuprakash V. TaqMan based real-time duplex PCR for simultaneous detection and quantitation of capripox and orf virus genomes in clinical samples. *J Virol Methods*, 201: 44-50, 2014.
34. Walker PJ, Byrne KA, Cybinski DH, Doolan DL, Wang YH. Proteins of bovine ephemeral fever virus. *J Gen Virol*, 72: 67-74, 1991.
35. Walker PJ, Klement E. Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. *Vet Res*, 46: 124, 2015. DOI10.1186/s13567-015-0262-4.
36. Zhao Z, Fan B, Wu G, Yan X, Li Y, Zhou X, Yue H, Dai X, Zhu H, Tian B, Li J, Zhang Q. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for specific and rapid detection of differential goat pox virus and sheep pox virus. *BMC Microbiol*, 14: 10, 2014.

Application of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) method for evaluation of virus titration in bovine ephemeral fever vaccine

CC Hsieh*, TY Pan, YP Chen

Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture

Abstract The current method for estimating virus titration in inactivated bovine ephemeral fever vaccines produced by the Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture relies on observing cytopathic effects and calculating the 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) using the Reed-Muench method. This process requires approximately 4–5 days. To reduce testing time and enhance the efficiency of quality control procedures, this study aimed to establish a virus measurement based on real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). We demonstrated that the RT-qPCR standard curve exhibited a strong linear correlation between viral titration (log₁₀ TCID₅₀) and Ct values within the detection range, with an R² value of 0.9667. The linear regression analysis yielded the following equation: $y = -0.3719x + 13.822$, where y represents the viral titer expressed as log₁₀ TCID₅₀, and x denotes the Ct value obtained from the RT-qPCR assay. This RT-qPCR-based method provides a reliable and efficient alternative for virus titration, significantly reducing testing time and enhancing analytical precision in vaccine quality control.

Keywords: *Vaccine, Cytopathic effects, 50% Tissue culture-infective dose, Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, Quality control*

* Corresponding Author
Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture