

中華民國八十年二月十三日

八十農牧字第〇〇五〇七九A號

馬傳染性貧血症檢驗採用免疫擴散反應試驗

一、 免疫擴散反應試驗：

抗原：馬傳染性貧血病毒實驗感染之馬脾臟或經細胞培養增殖所得之培養液，

再經精製濃縮供為免疫擴散法檢驗馬傳染性貧血抗體用之抗原。

陽性對照血清：健康馬接種馬傳染性貧血病毒後之不活化血清。

瓊膠平板的製作方法：

瓊脂（Noble Agar）一公克，加入於一〇〇公撮硼酸鹽緩衝溶液（附錄一）內煮沸溶解後，再經攝氏一二一度，十五磅壓力的高壓蒸氣滅菌七分鐘，待冷卻至攝氏四十五度，取十八公撮置入直徑十公分寬的培養皿內製成平板瓊脂凝膠層。

使用方法：

凝固後的瓊膠平板，用打孔器打出由中央一個，周圍六個，共七個小孔的反應組。其每一小孔之直徑為五公釐，各小孔距離為三公釐。反應組中心孔加入〇・〇五公撮抗原。周圍六個孔以間隔順序分別各加入對照血清及受檢血清〇・〇五公撮，最後將加入各檢體的瓊膠平板置於能保持濕度、溫度（攝氏二十至二十五度）的密閉容器內反應。

二、反應結果：

免疫擴散反應試驗於反應後二十四至四十八小時觀察沈澱線，但得觀察至九十六

小時判定。依下列方法判定之：

陽性：抗原與受檢血清之間產生能和抗原與對照血清之間所產生之沈澱線（以下稱標準沈澱線）融合者。

陰性：抗原與受檢血清之間無產生與標準沈澱線融合之沈澱線，標準沈澱線接近加入受檢血清之孔或者碰到者。

疑陽性：不屬陽性或陰性者。

非特異性：抗原與受檢血清之間產生與標準沈澱線不融合之沈澱線且形成交叉狀。

三、判定標準：

有下列情形之一者，為罹患馬傳染性貧血症馬匹：

免疫擴散反應試驗呈陽性者。

免疫擴散反應試驗呈疑陽性者，經再複驗一次，其結果仍呈疑陽性或陽性者。

免疫擴散反應試驗呈疑陽性者，為疑患馬傳染性貧血症馬匹。

免疫擴散反應試驗呈陰性及非特異性者為健康馬匹。

四、複檢：疑陽性者應於初檢後二十一日再複驗一次，其結果仍呈疑陽性或轉呈陽性者為陽性，轉為陰性者為陰性。

五、檢驗次數：每年檢驗一次。

六、進口馬匹之檢疫：

進口馬匹於檢疫期間，經檢驗判定為陰性者，准予放行；陽性者，立即撲殺。疑陽性者，另行隔離，經二十一日再行複驗一次，倘仍為疑陽性或轉為陽性者，立即撲

殺；轉為陰性者，准予放行。

附錄一：

硼酸鹽緩衝溶液（Borate Buffer）t 製法：

氫氧化鈉（NaOH） 二公克

硼酸（HBO） 九公克

加蒸餾水至一公升使其溶解，並調整酸鹼值為八·六。

附錄一、 AI 診斷鑑定用參考亞型株

亞型	病毒株
H1	A/PR/8/34 (H1N1)
H2	A/Singapore/1/57 (H2N2)
H3	A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8)
H4	A/duck/Czech/56 (H4N6)
H5	A/duck/Hong Kong/820/80 (H5N3)
H6	A/Shearwater/Australia/1/72 (H6N5)

H7	A/duck/ Hong Kong /301/78 (H7N1)
H8	A/turkey/Ontario/6118/68 (H8N4)
H9	A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2)
H10	A/chicken/Germany/N/49 (H10N7)
H11	A/duck/Memphis/546/74 (H11N9)
H12	A/duck/Alberta/60/76 (H12N5)
H13	A/gull/Maryland/704/77 (H13N6)
H14	A/mallard/ Australia /263/82 (H14N5)
H15	A/shearwater/W.Aus./79 (H15N8)

附錄二、 RT-PCR 使用之寡核苷酸引子參考序列：

Primer 序列	primer 認別位置
-----------	-------------

AGCAAAAGCAGG	Uni-12 (1-12)
GGAGACTCAGCAATCCCATGAAAG	H5-775f (775-798)
CCATACCAACCGTCTACCATTCC	H5-1021r (1043-1021)
ACATACAGTGGGATAAGAACC	H7-421f (421-441)
CCCA(AGTC)CCATTTTCAAT	H7-1075r (1090-1075)

附錄三、各種試劑配製方法

一、 MEM 輸送培養液：細胞培養基 Minimum essential medium 加 0.5% bovine serum albumin 及抗生素 penicillin (10,000 U/mL)、streptomycin (10mg/mL)、gentamicin (250ug/mL) 及 mycostatin (5,000 U/mL)，以 0.22 μ m 過濾膜過濾後 2 mL 分裝於螺旋蓋試管。

二、 甘油輸送培養液（適宜較長時間無法低溫運輸之情況）：PBS 與甘油等量混合，高溫高壓滅菌後加入抗生素 penicillin (10,000 U/mL)、streptomycin (10mg/mL)、gentamicin (250ug/mL) 及 mycostatin (5,000 U/mL)，2 mL 分裝於螺旋蓋試管。

三、 磷酸緩衝液 PBS：NaCl 8g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄ 1.15g、KH₂PO₄ 0.2g 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。

四、 Alsever's 溶液：稱取 dextrose 20.5 g、sodium citrate dihydrate (Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O)

8.0 g、sodium chloride (NaCl) 4.2 g、citric acid (C₆H₈O₇) 0.55 g，溶於蒸餾水使總體積為 1 公升，調整 pH =6.1 ±0.1，以 0.22 μm 過濾膜過濾後保存於 4°C。

五、生理食鹽水，0.85% NaCl：稱取 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。

六、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 1mL 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。

七、MDCK 細胞培養液：500 mL D-MEM 中加 Penicillin/Streptomycin 100 U/mL 及 100μg/mL、牛血清白蛋白 0.2%、HEPES 緩衝液 25 mM、胎牛血清 10%。

八、AI 病毒生長培養液：500 mL D-MEM 中加 Penicillin/Streptomycin 100 U/mL 及 100μg/mL、牛血清白蛋白 0.2%、HEPES 緩衝液 25 mM、TPCK-trypsin 2μg/mL（無胰蛋白 培養試驗時不加）。

九、TPCK-trypsin 原液製備：溶解 20 mg TPCK-trypsin 於 10 ml PBS 中，經 0.22 μm 膜過濾，保存於-20°C。泡製前先確認 TPCK-trypsin 的有效期限。

十、CDNA 合成反應液(cocktail)：每一管 RNA 合成 cDNA 試驗需量 1.5μL H₂O、2.0μL reverse transcriptase buffer、0.5μL 10mM dNTP、0.5μL RNasin、1.0μL reverse transcriptase，全部配製量依所需合成試驗管數而定。

十一、 PCR 反應液 (Master Mix) : 每管 PCR 反應須調配 5 μ L PCR buffer、38.65 μ L H₂O、1 μ L 10 mM dNTP、3 μ L 25 mM MgCl₂、0.25 μ L Taq DNA polymerase、0.3 μ L forward primer (1 μ g/ μ l) 及 0.3 μ L reverse primer (1 μ g/ μ l)，依所需管數全量先行調配。

十二、 1% Agarose 電泳膠：1g Agarose 溶於 100mL 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。

十三、 10X TBE 緩衝液：Tris 107.8g、硼酸 Boric acid 55.0g、EDTA(Na₂) 8.2g，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。

十四、 PCR 產物電泳 loading buffer (GLB)：30% Glycerol、0.25% bromophenol blue 及 0.25% xylene cyanole。