

行政院及所屬各機關出國報告

(出國類別：研習)

赴美「研習口蹄疫之檢驗」

服務機關：行政院農業委員會家畜  
衛生試驗所

出國人 職 稱：助理研究員

姓 名：林有良

出國地區：美國

出國期間：92年9月13日至92年10月1日

報告日期：93年1月12日

F10/  
CO9300160

行政院及所屬各機關出國報告提要

C09300160

頁數 18 含附件：是 否

出國報告名稱：赴美「研習口蹄疫之檢驗」

出國計畫主辦機關/聯絡人/電話

行政院農業委員會家畜衛生試驗所/林有良/(02)26212111 ext.304

出國人員姓名/服務機關/單位/職稱/電話

林有良/行政院農業委員會家畜衛生試驗所/豬瘟研究組/助理研究員  
(02)26212111 ext.304

出國類別：1 考察 2 進修 3 研究 4 實習 5 其他

出國期間：92 年 9 月 13 日至 92 年 10 月 1 日

出國地區：美國

報告日期：93 年 1 月 12 日

分類號/目

關鍵字：口蹄疫、非結構性蛋白抗體、監測

內容摘要：

本次研習，旨在瞭解美國目前口蹄疫檢驗流程及應用方法，熟諳其操作技能，納入國內現有規範中，期以強化我國口蹄疫監測體系。復值美國九一一恐怖攻擊事件剛屆滿二週年，已將原隸屬於該國農業部的梅島外來動物疾病研究中心，改隸於其國家安全署，且復增只有通過安全考核的員工，方能單獨進入該中心之負壓實驗室管制區及開啟病毒保存冰櫃的指紋辨識鎖等項安全規範措施，顯示出美國對於生物安全的戒慎恐懼之情，值得我們深思與效仿。此外這次研習適逢梅島外來動物疾病研究中心正辦理「外來動物疾病診斷訓練班」，所以有機會見到口蹄疫病毒接種動物的發病實況及相關檢測之經驗，令人印象深刻。此行研習收穫豐碩，筆者亦將傾盡所學，期以對國內現行口蹄疫檢驗診斷知能提昇，有所裨益。

## 目 次

壹、目的.....	1
貳、研習行程安排.....	1
參、研習情形概述.....	1
肆、口蹄疫之檢驗實際應用於國內之評估.....	14
伍、研習心得.....	16
陸、建議事項.....	18

## 壹、目的

本次研習，旨在瞭解美國的口蹄疫檢驗流程及其應用的方法，熟諳其操作技能，納入國內現有規範中，期以強化我國口蹄疫的監測體系。此行除順利完成研習目的外，並領略到美國國家對於動物惡性傳染病之生物安全的高度關懷與重視。

## 貳、研習行程安排

本項研習自民國 92 年 9 月 13 日至 92 年 9 月 26 日止，共計 14 日，於美國梅島外來動物疾病診斷中心進行，詳細行程如下：

9 月 13 日：啟程，下榻於紐約長島銀沙旅館

9 月 14~26 日：於外來動物疾病診斷中心研習「口蹄疫之檢驗」

9 月 29 日：搭機返台

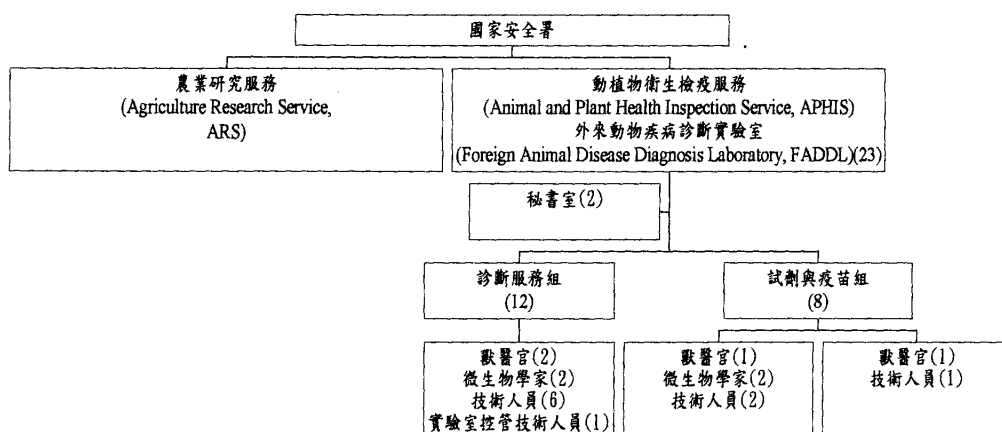
## 參、研習情形概述

### 一、美國梅島外來動物疾病診斷中心簡介

美國梅島外來動物疾病診斷中心包括主司研究外來動物疾病病原（如口蹄疫病毒、非洲豬瘟等）而不負責例行性診斷業務的「農業研究服務部門（Agriculture Research Service, ARS）」，及只負責外來動物疾病例行性診斷、試劑及疫苗的「動植物衛生檢驗服務（Animals and Plants Health Inspection Service, APHIS）外來動物疾病診斷實驗室（Foreign Animal Disease Diagnosis Laboratory, FADDL）」等兩個部門。本中心原隸屬於美國農業部，因 911 恐怖攻擊事件，已於 2003 年 10 月，改隸於該國之國家安全署。

外來動物疾病診斷實驗室（FADDL），下再分為二個組，其一以診斷業務為主的「診斷服務組」，另者則是以試劑研發測試及疫苗測試保存為主的「試劑疫苗組」，其組織架構如圖一。在人員編制上，該室共有二十三人，除主任一名及秘書室二名外，在「診斷服務組」，除組長外，尚有獸醫官、微生物學家各二名、技術人員六名及一名實驗室控管技術人員，共計十二人；而「試劑疫苗組」除組長外，試劑部門計有獸醫官一名、微生物學家及技術人員各二名；疫苗部門則有獸醫官及技術人員各一名，共計八人。業務

上，診斷服務組所掌理的包括診斷美國境內外來動物疾病(FAD)之疑似病例、進口動物外來動物疾病之篩檢、豬瘟監測、試劑之生物安全性測試以及如遺傳物質及r射線等外放物質的安全處理，檢測之專業範圍則涵蓋病毒學、血清學及病理學。動物種類上包括除了馬以外的所有動物，總計該組所進行的疾病診斷有三十種以上，包括國際動物衛生組織的所有A表病與部分B表病，在2001全年間共檢測75,264件檢體(含血清樣本)，在2002年共計檢測50,405件檢體(含血清樣本)；試劑疫苗組則是執掌六百種免疫學試劑的貯藏、一千五百種微生物原料之庫存及生產診斷試劑(含抗原與抗血清)，此外尚包括北美口蹄疫疫苗銀行之維護及測試，以及開辦外來動物傳染病診斷訓練班等事項，每年舉辦四次外來動物傳染病診斷訓練班及數次外來動物傳染病宣導班。



圖一：美國國家安全署梅島外來動物疾病診斷中心組織架構圖

## 二、口蹄疫實驗室的診斷流程

### (一) 病材的檢驗

對於送至該診斷中心，包括組織(水疱痂皮)、拭子、水疱液、及

咽喉食道液等疑似口蹄疫病材，均不分晝夜，立即分別進行檢測（圖二）。

1. 組織：先研磨成十倍乳劑後，分別進行下列五種測試—

- (1) 病毒分離 (Tissue Culture-Virus isolation, TC-VI, 整個流程需要七個工作天以上)：分別取 1 ml 的乳劑接種在小綿羊腎臟細胞(Lamb kidney cell)及豬腎臟細胞(IB-RS-2)二代，每次觀察三天，其間若出現病毒陽性反應，則收取病毒液後，再進行病毒鑑定。鑑定方法包括電子顯微鏡(Electronic Microscope, EM)檢查、Realtime 聚合酶鏈反應(Realtime PCR)、以抗原-酵素結合免疫吸附法 (Ag-ELISA) 進行血清分型以及抗原補體結合反應 (Ag-CF test) 等，EM 結果僅供做診斷方向的參考，其他三個檢測方法之結果則是最後診斷的依據。
- (2) 反轉錄-聚合酶鏈反應 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR, 整個流程大約需要六小時)：備有七種血清型特異性引子進行檢測，倘出現陽性產物，則再進行核酸定序以茲確認，此方法可供做最後診斷之依據。
- (3) Realtime 聚合酶鏈反應 (Realtime Polymerase Chain Reaction, Realtime PCR, 整個流程大約需要二小時)：結果可供做最後診斷之依據。
- (4) 抗原-酵素結合免疫吸附法(Antigen- Enzyme Linked Immunosorbent assay, 抗原- ELISA, 整個流程大約需要五小時)：係購自英國 Pirbright 口蹄疫世界參考實驗室，供作血清分型之用，其結果可供做最後診斷之依據。
- (5) 抗原補體結合反應 (Antigen Complement Fixation test, Ag-CF test, 整個流程大約需要三小時)：此反應係使用綿羊紅血球作為指示劑，若未溶血表示抗原陽性反應，若溶血則表示抗原

陰性反應，此結果也可作為最後診斷之依據。

2. 拭子：先經培養液潤濕後，再以震盪器充分震盪，使拭子上的沾粘物能完全混入培養液中，再進行下列三種測試：

- (1) 病毒分離 (Tissue Culture-Virus isolation, TC-VI, 整個流程需要七個工作天以上)：方法同上文組織之病毒分離，即分別取 1 ml 的拭子沖洗液接種在小綿羊腎臟細胞(Lamb kidney cell)及豬腎臟細胞(IB-RS-2)二代，每次觀察三天，其間若出現病毒陽性反應，則收取病毒液後，再進行病毒鑑定。鑑定方法包括電子顯微鏡(Electronic Microscope, EM)檢查、Realtime 聚合酶鏈反應(Realtime PCR)、以抗原-酵素結合免疫吸附法 (Ag-ELISA) 進行血清分型以及抗原補體結合反應 (Ag-CF test) 等，EM 結果僅供做診斷方向的參考，其他三個檢測方法之結果則是最後診斷的依據。
- (2) 反轉錄-聚合酶鏈反應 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR, 整個流程大約需要六小時)：方法同上文組織之反轉錄-聚合酶鏈反應，即以七種血清型特異性引子進行檢測，倘出現陽性產物，則再進行核酸定序以茲確認，此方法可供做最後診斷之依據。
- (3) Realtime 聚合酶鏈反應 (Realtime Polymerase Chain Reaction, Realtime PCR, 整個流程大約需要二小時)：方法同上文組織之 Realtime 聚合酶鏈反應，結果可供做最後診斷之依據。

3. 咽喉食道液：與保存液均質化之後，進行下列三種測試—

- (1) 病毒分離 (Tissue Culture-Virus isolation, TC-VI, 整個流程需要七個工作天以上)：方法同上文組織之病毒分離，即分別取 1 ml 的咽喉食道液接種在小綿羊腎臟細胞(Lamb kidney cell)及豬腎臟細胞(IB-RS-2)二代，每次觀察三天，其間若出現病毒

陽性反應，則收取病毒液後，再進行病毒鑑定。鑑定方法包括電子顯微鏡(Electronic Microscope, EM)檢查、Realtime 聚合酶鏈反應(Realtime PCR)、以抗原-酵素結合免疫吸附法 (Ag-ELISA) 進行血清分型以及抗原補體結合反應 (Ag-CF test) 等，EM 結果僅供做診斷方向的參考，其他三個檢測方法之結果則是最後診斷的依據。

- (2) 反轉錄-聚合酶鏈反應 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR, 整個流程大約需要六小時): 方法同上文組織之反轉錄-聚合酶鏈反應，即以七種血清型特異性引子進行檢測，倘出現陽性產物，則再進行核酸定序以茲確認，此方法可供做最後診斷之依據。
- (3) Realtime 聚合酶鏈反應 (Realtime Polymerase Chain Reaction, Realtime PCR, 整個流程大約需要二小時): 方法同上文組織之 Realtime 聚合酶鏈反應，結果可供做最後診斷之依據。

4. 水疱液：以培養液稀釋 100 倍後，分別進行下列五種測試－

- (1) 病毒分離 (Tissue Culture-Virus isolation, TC-VI, 整個流程需要七個工作天以上): 方法同上文組織之病毒分離，即分別取 1 ml 的百倍稀釋水疱液接種在小綿羊腎臟細胞(Lamb kidney cell)及豬腎臟細胞(IB-RS-2)二代，每次觀察三天，其間若出現病毒陽性反應，則收取病毒液後，再進行病毒鑑定。鑑定方法包括電子顯微鏡(Electronic Microscope, EM)檢查、Realtime 聚合酶鏈反應(Realtime PCR)、以抗原-酵素結合免疫吸附法 (Ag-ELISA) 進行血清分型以及抗原補體結合反應 (Ag-CF test) 等，EM 結果僅供做診斷方向的參考，其他三個檢測方法之結果則是最後診斷的依據。
- (2) 反轉錄-聚合酶鏈反應 (Reverse Transcription-Polymerase

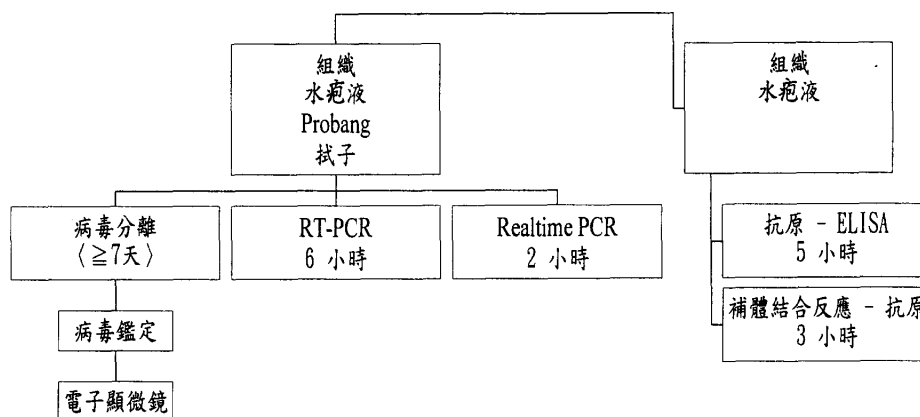


Chain Reaction, RT-PCR, 整個流程大約需要六小時): 方法同上文組織之反轉錄-聚合酶鏈反應, 即以七種血清型特異性引子進行檢測, 倘出現陽性產物, 則再進行核酸定序以茲確認, 此方法可供做最後診斷之依據。

(3) Realtime 聚合酶鏈反應 (Realtime Polymerase Chain Reaction, Realtime PCR, 整個流程大約需要二小時): 方法同上文組織之 Realtime 聚合酶鏈反應, 結果可供做最後診斷之依據。

(4) 抗原-酵素結合免疫吸附法(Antigen- Enzyme Linked Immunosorbent assay, 抗原- ELISA, 整個流程大約需要五小時): 係購自英國 Pirbright 口蹄疫世界參考實驗室, 供作血清分型之用, 方法同上文組織之抗原-酵素結合免疫吸附法, 其結果可供做最後診斷之依據。

(5) 抗原補體結合反應 (Antigen Complement Fixation test, Ag-CF test, 整個流程大約需要三小時): 方法同上文組織之抗原補體結合反應, 即使用綿羊紅血球作為此反應之指示劑, 若未溶血表示抗原陽性反應, 若溶血則表示抗原陰性反應, 此結果也可作為最後診斷之依據。



圖二：梅島外來動物疾病診斷實驗室口蹄疫診斷步驟

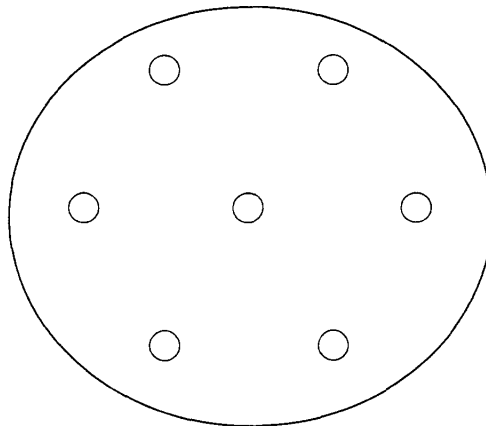
## (二) 口蹄疫之血清學檢測

針對送至該診斷實驗室之疑似口蹄疫的血清樣本，則進行抗病毒感染相關抗原(Virus infection associated antigen, VIAA)之抗體、抗口蹄疫病毒非結構性蛋白(3ABC)抗體及中和抗體等三種抗體之檢測(圖六)。

### 1. 抗病毒感染相關抗原(Virus infection associated antigen, VIAA)之抗體檢測

VIAA 抗體的檢測係以瓊膠免疫擴散法 (Agar Gel Immunodiffusion, AGID) 來進行。

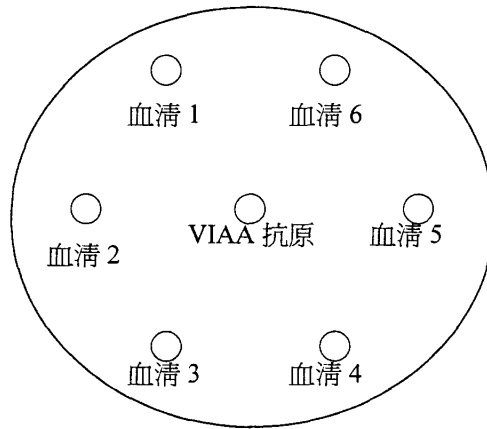
- (1) 瓊脂培養皿之製作：溶解之瓊脂放入培養皿中，厚約 3-4 mm，在室溫使其充分凝固在 (在室溫 15°C 約 30 分鐘)，凝固後取出鑄型 (如圖三)，如孔中留有瓊脂者則以鑷子取出。



圖三：瓊膠免疫擴散法之瓊脂培養皿製作

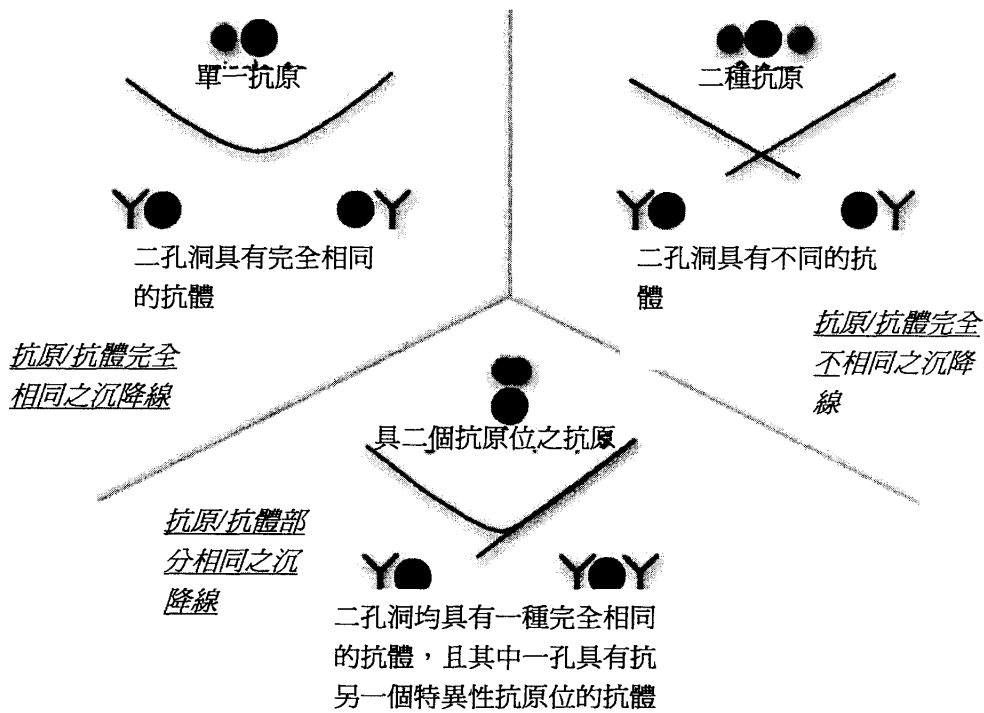
- (2) 抗原/抗體之添加：取 50 微升(ul) VIAA 抗原注入中央孔洞中，外圍六個孔洞則分別加入 50 ul 的待測血清樣本，加蓋

後保存於 37°C，每日觀察沉降線之出現至 7-10 日為止(圖四)。



圖四：瓊膠免疫擴散法之抗原/抗體添加

- (3) 結果判讀：若抗原與抗體能形成大的免疫複合體，即能形成沉降線，表示待測血清中含有抗 VIAA 的抗體，即為口蹄疫抗體陽性。若二種血清中，均能與 VIAA 抗原形成沉降線，抗體間的沉降線連成平滑線，表示二種抗體辨識相同抗原位 (lines of identity)；若抗體間的沉降線互相交叉，表示二種抗體辨識不相同的抗原位 (lines of non-identity)；若抗體間的沉降線部份連成平滑線且出現交叉，表示其中一種抗體可辨識二種抗原位 (lines of partial identity) (圖五)。



圖五：抗原與抗體之反應結果

## 2. 抗口蹄疫病毒非結構性蛋白(3ABC)之抗體檢測 (3ABC ELISA)

對於疑似口蹄疫的血清檢體，則進行抗口蹄疫病毒非結構性蛋白 3ABC 抗體之檢測。此套系統是以昆蟲病毒表現之口蹄疫 3ABC 蛋白作為抗原，進行酵素結合免疫吸附法 (ELISA) 之測試，此方法屬於一種間接抗體終力價 ELISA，一天內即可完成測試。在牛隻感染口蹄疫病毒後 14 天至數百天的血清檢體，以此系統檢測均可得到陽性結果；至於免疫動物的血清檢體，此系統之檢測結果是陰性的。故此法可應用於區別免疫族群與自然感染族群的血清抗體，而且比目前使用的 VIAA 測試法更為優良。由於疫苗中仍會殘存 VIAA，因此如果動

物經過多次免疫後，其 VIAA 抗體會出現偽陽性反應之可能。由於此系統檢測的初步成果僅來自有限的牛、豬之血清檢體，所以實際使用的狀況目前仍正在評估中。另外，本系統亦曾與美國聯合生物醫學公司(UBI, USA)所開發的口蹄疫 peptide 合成非結構性蛋白抗體檢測套組，針對相同的牛及豬血清檢體進行測試，結果證實二者之敏感性與特異性相似。

本系統之檢測步驟如下：

- (1) 被覆：將調好適當濃度之口蹄疫病毒非結構性蛋白 (3ABC) 溶液被覆於 96 孔 ELISA 盤的 1~3 及 7~9 列，每孔 100 微升(ul)，另外將調適與 3ABC 相同濃度之 GRB 病毒感染昆蟲細胞的溶液，被覆於 96 孔 ELISA 盤的 4~6 及 10~12 列 (表一)，每孔 100 微升(ul)，加蓋子後置於 4~8 °C 至少 12 小時後方可進行下一步驟，若要長期保存則需以膠布封貼，並儲存於 4~8°C，但不可超過三個月。
- (2) 清洗：將 96 孔 ELISA 盤之內容物甩至容器槽，以吸水紙瀝除餘液，以 PBST(phosphate buffer saline + 0.05%twin 20)清洗液將每個小孔注滿後，再將清洗液甩掉，以吸水紙瀝淨，共重複清洗三次。清洗時不得讓 96 孔 ELISA 盤之各孔乾涸。
- (3) 加檢測抗體：以 PBST 將血清樣品及對照血清稀釋 100 倍，而後加入 96 孔 ELISA 盤 (表二)，每孔 100 微升(ul)，加蓋子後，置於室溫作用 30 分鐘。
- (4) 清洗：依前述方法，以 PBST 清洗三次。
- (5) 加蛋白質 A/G 過氧化氫酵素結合體：在清洗後每孔立即加入 100 ul 以 PBST 稀釋的蛋白質 A/G 過氧化氫酵素結合體，再將盤子封蓋後置於室溫作用 30 分鐘。
- (6) 清洗：依前述方法，以 PBST 清洗三次。
- (7) 每孔加入受質／呈色劑(10.5 ml 檸檬酸-磷酸緩衝溶液，溶解 1 錠 TMB，再加入 35 ul 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 100 ul，並於加第一孔時即開始計時，置於室溫 4 分鐘，之後，每孔再加入 100 ul 的 3 M 硫酸終止液，使停止反應。
- (8) 將 96 孔盤置於 ELISA 判讀機以波長 450 nm 及參考波長 650 nm 讀取其吸光值，並以電腦的 KELA 程式或其他計算程式來計算及分析此等資料。
- (9) 測試結果判讀：
  - ①將陰性對照吸光值減去相對的抗原吸光值。

②計算平均值及標準偏差

- a. 標準偏差若大於 0.050 或大於平均值的 10%，則所得之資料不可信，須重新檢測。
- b. 若陰性對照抗原的吸光值太大，因無法檢測陽性樣本可能升高的吸光值，所以陰性對照抗原的平均值必須小於（2.0-22%陽性吸光值-3 倍陰性對照抗原的標準偏差）的差值。
- c. 稀釋的標準血清倍數與其吸光值所形成的圖必須是一直線，由此線取的斜率及 Y 截距，做為判定陽性與否的依據。曲線之斜率必須大於 每“%陽性” 0.006 吸光單位；Y 截距必須在-0.145 ~ 0.432 之間，否則，此試驗必須重做。
- d. 陰性對照之結果必須不大於 0%陽性，否則，該盤試驗必須重做。
- e. 已具有 V-mask 的 CUSUM 控制圖檢查陽性對照的執行率，陽性對照必須是 40~85%陽性，否則，所得之資料不可信，須重新檢測。

③測試血清檢測值與陽性臨界值得比較

- a. 若測試血清檢測值低於 22%陽性值為陰性反應。
- b. 若測試血清檢測值不小於 22%陽性值為陽性反應。
- c. 所選擇的陽性臨界值標準，係依診斷所需要的特異性及敏感性而定。

表一：抗原分佈對照表

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	3ABC			GRBV 感染昆蟲細胞(陰性對照)			3ABC			GRBV 感染昆蟲細胞(陰性對照)		

表二：抗體相對位置對照表

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	陰性對照						檢測血樣 3					
B	弱陽性標準						檢測血樣 4					
C	中陽性標準						檢測血樣 5					
D	強陽性標準						檢測血樣 6					
E	最強陽性標準						檢測血樣 7					
F	陽性對照						檢測血樣 8					
G	檢測血樣 1						檢測血樣 9					
H	檢測血樣 2						檢測血樣 10					

### 3. 口蹄疫中和抗體之檢測 (Tissue Culture-Virus Neutralization, TC-VN)

用於血清中和試驗的細胞是 BHK 21 細胞株，檢測所需時間約 2 至 3 天。其檢測方法如下：

#### (1) 試驗用種毒保存

進行中和抗體測試所用的口蹄疫病毒為 O1/Manisa 病毒株，經 BHK 細胞增殖後，測試其病毒力價，再小分裝保存於 -80°C 冰箱中，待每次進行中和試驗時取出稀釋使用。

#### (2) 血清的處理

將送檢的血清，先經 56°C 水浴槽非動化處理 30 分鐘後，供做中和試驗用。

#### (3) 操作步驟

##### ① 稀釋血清

先準備 96 孔平底細胞培養盤，做好記號後，分別加入 0.05ml 細胞生長培養液做為血清的稀釋液，再取一個非動化 (inactivated) 的血清 0.05ml 加入 H1 及 H2 孔，而後依序由 H 行取 0.05 ml 之稀釋血清至 G 行，混合後再從 G 行取 0.05 ml 之稀釋血清至 F 行，．．．一直進行至 A 行，最後再從 A 行吸取 0.05 ml 之稀釋血清丟棄，即完成二倍稀釋至 512 倍，若要測出最高倍之抗體力價，則另外再加一個培養盤或將培養盤打直，血清加入 A 及 B 二孔，

再由 1 行稀釋至 12 行。

②病毒泡製

取 O1/Manisa 病毒，以細胞培養液做適當稀釋，使其成為每 0.05 ml 含有 100 TCID<sub>50</sub> 的口蹄疫病毒。

③細胞製備

將 BHK 21 細胞自培養角瓶上，以 0.25% 胰蛋白酶 (TV) 消化下來，經沖散後，以細胞生長培養液泡成每毫升含  $2.5 \times 10^5$  個懸浮細胞，置於 4°C 中備用。

④病毒與血清中和試驗

將稀釋好血清的 96 孔平底細胞培養盤，每孔加入 0.05 ml 的 100 TCID<sub>50</sub> O1/Manisa 病毒液，混合均勻後，置於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之 CO<sub>2</sub> 恆溫器中感作一小時，之後取出 96 孔平底細胞培養盤，每孔再加入 0.1 ml 的 BHK 21 細胞懸浮液(每毫升含  $2.5 \times 10^5$  個細胞)，再將 96 孔平底細胞培養盤放在 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 之 CO<sub>2</sub> 恆溫器中培養 2~3 天，最後取出 96 孔平底細胞培養盤以光學顯微鏡檢視各孔 CPE 產生情形。

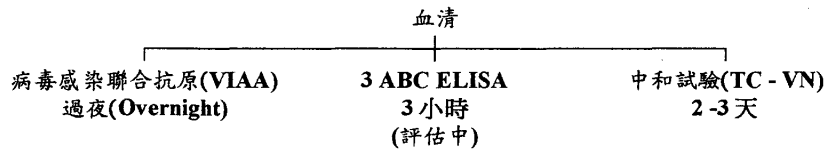
(4) 結果判讀

①在二重複的稀釋血清中，其中一孔出現 CPE 而另一孔未出現 CPE，則該稀釋倍數即為該血清之口蹄疫中和抗體力價，若某稀釋倍數的二孔均未出現 CPE 而次一稀釋倍數二孔均出現 CPE，則該血清的口蹄疫中和抗體力價為該二個稀釋倍數之幾何平均值。

②注意事項

- a. 每個血清至少做 2 管(Duplicate)。
- b. 陽性、陰性血清之序列稀釋液亦需與試驗樣品一同操作，另加一組為未加稀釋血清做毒性對照。
- c. 每管加入 0.05ml 含有 100 TCID<sub>50</sub> 的 O1/Manisa 病毒液，在毒性對照則以培養液取代病毒液，細胞對照則是不加樣品血清也不加病毒而加 0.1ml 之細胞生長培養液。
- d. 將殘餘的病毒原液以培養液做 10 倍序列稀釋至少 4 個梯度，每個稀釋倍數分別加入一列 (即 8 孔) BHK 21 細胞，每孔接種量為 0.05 ml，此即供病毒力價回歸測定。
- e. 要判讀血清中和抗體力價終點時，病毒劑量則要落在  $10^{1.5}$  至  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub> 之間，否則應重做，該批不予判讀。



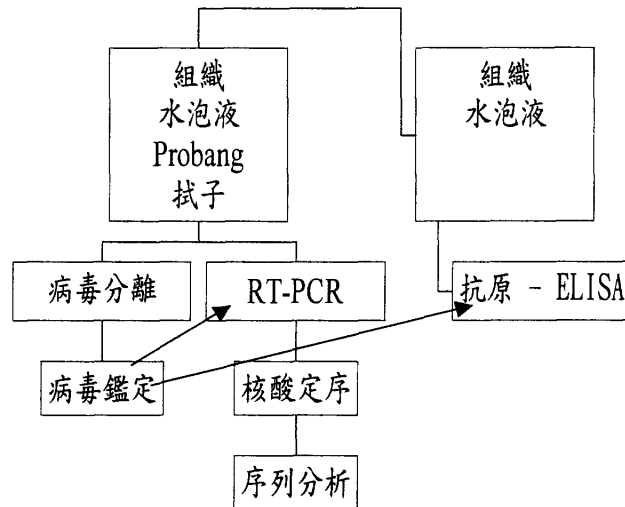


圖六：送到梅島外來動物疾病診斷實驗室的疑似口蹄疫之血清樣本檢測項目。

#### 肆、口蹄疫之檢驗實際應用於國內之評估

##### 一、疑似口蹄疫病材的檢驗

目前國內對於疑似口蹄疫的病例，所採取的檢測方法類似於美國梅島外來動物疾病診斷實驗室的檢測內容（圖七），有二個不同之處，一是國內未進行 real time PCR 的檢測，而該檢測方法，除了需特殊的儀器設備外，尚須特定的反應試劑與特异性引子，但以目前的診斷流程而言，應用 RT-PCR 方法加上核酸定序，足以數應，惟 real time PCR 在反應的時間上可節省甚多。所以在診斷上，也是很好的工具，因此若客觀條件許可的話，我們也將建立此一檢測方式；其二就是補體結合反應，因為早先本檢測方法是應用於口蹄疫血清亞型的分型，而血清亞型的分型是做為疫苗選擇時的參考，之後，由於發現口蹄疫血清亞型與疫苗的使用並無絕對之相關性，鑑於目前英國 Pirbright 口蹄疫世界參考實驗室已不再將該法做為例行檢測的方法，而是以抗原 ELISA 的血清分型套組為主，故目前國內並未建立此一檢測系統，

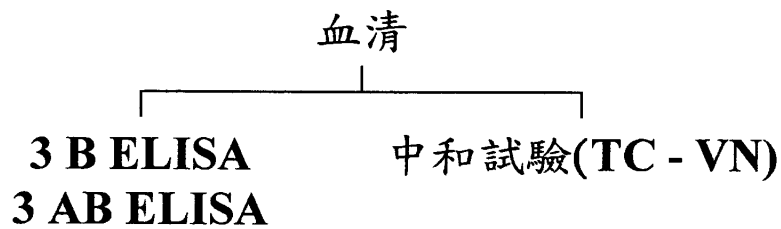


圖七：目前國內對於疑似口蹄疫的病例所採取的檢測方法。

## 二、口蹄疫之血清學檢測

目前國內對於疑似口蹄疫病例的血清樣本，所採取的檢測方法類似於美國梅島外來動物疾病診斷實驗室（FADDL）的檢測內容（圖八），也是包括口蹄疫中和抗體與非結構性蛋白抗體的檢測，其間的不同只在於非結構性蛋白抗體的檢測。目前我們使用的套組是美國聯合生物醫學公司（UBI, USA）所開發的口蹄疫 peptide 合成非結構性蛋白（3B）抗體檢測套組與丹麥獸醫病毒研究所昆蟲病毒所表現的口蹄疫 3AB 蛋白抗體檢測套組，都是使用酵素結合免疫吸附法（ELISA），因為該二種套組的特性不同，前者對於感染早期（感染後七天）的檢出較佔優勢，而後者則在感染後期（感染後七週以後）的檢出較敏感且特異性較高，因此往往將二種檢測套組交互應用，以彌補彼此間之不足。而 VIAA 抗體之檢測，雖然所使用之方法（AGID）較簡單，但是因為 VIAA 會嵌鑲在口蹄疫病毒的結構蛋白間，所以無法於疫苗的純化步驟中移除，故在多次免疫的動物，往往會出現偽

陽性的結果，此時則需要另一種檢測結果做為輔助診斷，因此此一方法較無建立之迫切需要；反之，3ABC 的非結構性蛋白抗體檢測系統是較適合建立的系統，然而根據 FADDL 表示，該套系統尚在評估階段，因此目前尚無法引進，以進行國內實際應用之評估。



圖八：目前國內對於疑似口蹄疫病例的血樣所採取的檢測方法。

#### 伍、研習心得

口蹄疫是偶蹄類動物最重要的傳染病，雖然其致死率不高，但由於其疫病傳播快速，所以被國際動物衛生組織（OIE）納入 A 表病，也被國際之間，引用做為貿易障礙的動物傳染病之一，因此，在動物疫病的監控上，口蹄疫的檢測與防治是非常重要的環。

此次有機會赴美國梅島外來動物疾病診斷實驗室研習其口蹄疫之檢驗步驟，研習心得如下：

##### 一、口蹄疫實驗室檢驗技術研習

針對疑似口蹄疫病材之病性鑑定以及血清檢體之血清學檢測的實驗室診斷流程，有了通盤的瞭解。其中的檢測項目，與英國口蹄疫世界參考實驗室有些差異，例如抗原補體結合反應在英國已不再使用，而血清抗體的檢測，在英國則多一項抗體-酵素結合免疫吸附法

(ELISA) 之檢測，此等檢測方法均符合國際動物衛生組織 (OIE) 所規範，而目前國內則已建立符合需求之檢測項目。

## 二、生物安全防恐之實際體驗

此次除了親臨該實驗室實地進行實驗室操作及動物試驗觀察外，並感受到整個實驗室嚴謹的安全監控系統，經詢問該實驗室人員，才知道美國在受到 911 恐怖攻擊之後，除了加強所有的安檢外，並特別注重生物安全問題。唯恐再遭受外來生物製劑的攻擊威脅，尤其是對美國畜產業可能造成重大損失的外來動物疾病病原的管制，更是不敢輕忽鬆懈，並積極採行下列措施以資因應：

### 1. 調整安全檢診部門之隸屬

在 2003 年 10 月將位於梅島的二個實驗室--外來動物疾病診斷實驗室 (FADDL) 及農業研究服務部門 (ARS) 直接由原農業部改隸於美國國家安全署，裨益於直接指揮與運作。

### 2. 提升人員安全之管制

對於進出該島的所有人員均進行嚴格的管控，尤其對於進入該島 P3 實驗室區的研究人員及工作人員，除了先通過安全考核人員外，餘者均不能擅自進入或獨自留在實驗室區；且未經過安全考核人員則必須在經過安全考核者的陪同下方能進入實驗室區，此外，在實驗室區也必須聽從通過安全考核者 (即帶領者, escort) 的安排。

### 3. 加強對試驗材料、物品保存與處理之管控

實驗室區保存試材及病毒的冷凍冰櫃均以指紋辨識鎖上鎖，只有通過安全考核人員才能開啟指紋辨識鎖；對於外送的試材，都先進行徹底的去感染原 (disinfection)，例如外送血清都先以核糖核酸酵素 (RNase) 處理，以去除其中可能存在的病毒 RNA。如此對於試材與實驗室的管控措施，可謂已做到滴水不漏的地步，這是我國在生物安全的警戒心上，所需要從善如流之處。

#### 4. 擴大推動傳染病防治檢定技能之培訓與宣導

美國除了對既有的動物病原與實驗設施戮力維持其生物安全外，也針對各州之獸醫從業人員，定期舉辦「外來動物疾病診斷研習班」，除了講師以授課方式講解外，並實地以動物接種病源方式，讓每位學員認識與了解動物疾病發生的過程、病症及解剖病變，以提供各州獸醫師，能儘速辨別外來動物疾病的發生，而掌握控制疫情蔓延的先機。在「外來動物疾病診斷研習班」中，除了認識動物疾病外，尚會提供疾病診斷所需器材的取得資訊、如何包裝送檢病材以及如何聯繫相關診斷單位，如此將有助於縮短疾病確診的時間。因此，面對國際間人員往來與畜產貿易頻繁，為能防範外來動物疾病的入侵，這種溫故知新的「外來動物疾病診斷研習班」是有提升防疫認知與減少疾病所帶來之衝擊的正面意義。

#### 陸、建議事項

- 一、為讓基層獸醫從業人員能了解外來動物疾病之疫病狀況，應發行外來動物疾病宣導手冊，並定期舉辦外來動物疾病之診斷研習班，以讓第一線獸醫從業人員充分瞭解口蹄疫等疫病資訊，俾能及時反應疫病狀況。
- 二、為能與世界重要國家的動物疾病診斷技術接軌，並提升國內對於外來動物疾病的診斷能力，最好能每年編列疫病研習預算，派遣研究人員前往先進國家研究及實習外來動物疾病之診斷技術，同時吸取最新之資訊，以及建立研究邦誼。
- 三、由於交通發達加速國際間的相互往來頻繁，因而使動物疾病的蔓延與防範，已無國界可言。為達成國際間區域聯合防疫策略之宗旨，加強國際間彼此的聯繫與知能資訊之交換，最好能每年編列疫病考察預算，萬一鄰近國家發生疫病時，能及時派員前往疫區，以便給予必要之協助及汲取該國之相關疫病資訊。

四、建議國內各研究試驗機關能仿照美國梅島之制度，將疾病研究與診斷兩項工作分軌，以充分有效發揮機關之功能，並提升國際競爭力。