

出國報告  
(類別:其他)

赴新加坡杜克大學 (Duke-NUS) 參加  
「蝙蝠媒介傳播之人畜共通新興傳染病  
訓練課程」出國報告

**(The Training Reports of “Bat Borne  
Virus Surveillance Workshop” in  
Duke-National University of Singapore)**

計畫機關及姓名職稱：

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

胡書佳助理研究員

奉派國家：新加坡(Singapore)

報告日期：2014年8月31日

出國期間：2014年5月19日至5月30日

## 赴新加坡杜克大學 (Duke-NUS) 參加「蝙蝠媒介傳播之人畜共通新興傳染病訓練課程」出國報告 摘要

蝙蝠分布遍及全球、壽命長，並具有飛行能力，已於全球 12 科超過 200 種蝙蝠品種內證實有超過 15 個病毒科的病毒存在，高病原性疾病的病原如狂犬病病毒及相關麗莎病毒、立百病毒、亨德拉病毒、及 SARS-CoV-like 病毒已被證實會經由蝙蝠傳染，故蝙蝠媒介疾病之監控日趨重要。「蝙蝠媒介傳播之人畜共通新興傳染病訓練」課程目的旨在訓練人員具有野外蝙蝠捕捉及樣本採集之能力，並可後續進行實驗室診斷，訓練課程分兩階段實施，第一階段訓練課程於本(103)年 5 月 19~30 日於新加坡杜克大學舉辦，訓練課程包含:3.5 天相關課程教授、3 天野外捕捉操作訓練、3.5 天實驗室操作訓練。

相關課程教授內容包含:蝙蝠基礎介紹、蝙蝠野外捕捉方法介紹(及野外操作注意事項、個人防護用具(PPE)介紹、蝙蝠媒介病原簡介、樣本收集及記錄等課程。野外捕捉操作訓練包含:個人防護用品穿戴、野外蝙蝠捕捉器材架設、捕捉之蝙蝠操作、捕捉之蝙蝠基本資料紀錄、蝙蝠樣本採集等。實驗室操作課程:蝙蝠解剖及樣本收集、外寄生蟲觀察及樣本收集、收集樣本之核酸萃取、分子診斷、血清學檢測等。

下一年(104)度將進行本次計畫之第二階段訓練，預計將進行更深入訓練內容授予，內容包含野外樣本捕捉、P3 實驗室操作等課程。

## 目次

一、 行程綱要.....	1
二、 研習內容.....	5
(一) 蝙蝠-基本介紹.....	5
(二) 蝙蝠媒介相關病原簡介.....	10
(三) 風險評估及個人保護裝備.....	11
(四) 蝙蝠捕捉方法介紹.....	13
(五) 新興感染性疾病診斷方法.....	17
(六) 蝙蝠野外捕捉訓練.....	18
(七) 實驗室操作.....	24
三、 心得與建議.....	28
四、 附圖.....	29
五、 附件	

一、 行程綱要

**Sunday, 18 May 2014**

Take Airplane to Singapore		
----------------------------	--	--

**Monday, 19 May 2014**

Introduction to course and instructors	Ian Mendenhall	9:00 - 9:15 AM
Participant Introductions		9:15 – 10:00 AM
Bat as Reservoirs of Zoonotic Pathogens	Linfa Wang	10:00 - 11:00 AM
Disease Ecology and a One Health approach	Ian Mendenhall	11:00 – 12:00 PM
Lunch Break		12:00 – 1:30 PM
Bat Morphology	Benjamin P. Y-H. Lee	1:30 – 2:30 PM
Bat Identification: Morphological and Molecular	Benjamin P. Y-H. Lee	2:30 – 3:30 PM
Break		3:30 – 4:00 PM
Bat Ecology	Benjamin P. Y-H. Lee	4:00 – 5:00 PM
Field Methods for Bat Population Monitoring	Benjamin P. Y-H. Lee	5:00 – 6:00 PM

**Tuesday, 20 May 2014**

Laboratory Safety Walkthrough	Huiling Guo	12:30 – 1:00 PM
Safety and Personal Protective Equipment	Ian Mendenhall	1:00 – 2:00 PM
Samples and Testing Schematics	Ian Mendenhall	2:00 – 3:00 PM
Break		3:00 – 3:30 PM
Field Excursions – A Walkthrough	Ian Mendenhall Benjamin P. Y-H. Lee	3:30 – 4:00 PM
Field trip to Rifle Range Rd: <i>Eonycteris spelaea</i>	Meet at 9 <sup>th</sup> floor of EID	4:00 PM – 2:00 AM

**Wednesday, 21 May 2014**

Field Trip Review	Ian Mendenhall Benjamin P. Y-H. Lee	12:30 – 1:00 PM
Breakout brainstorming session: Identification of knowledge gaps	Ian Mendenhall	
Field trip to Bukit Timah: <i>Rhinolophus lepidus</i>	Meet at 9 <sup>th</sup> floor of EID	3:00 PM – 2:00 AM

**Thursday, 22 May 2014 – Room 6A**

Field Trip Review	Ian Mendenhall Benjamin P. Y-H. Lee	2:00 PM – 3:00 PM
Field trip to Bukit Timah: <i>Penthetor lucasi</i>	Meet at 9 <sup>th</sup> floor of EID	3:00 PM – 2:00 AM

**Friday, 23 May 2014 – Room 6A**

Bat Immunology	Aaron Irving	1:00 – 2:00 PM
Coronaviruses	Vijay Dhanasekaran	2:00 – 3:00 PM
Break		3:00 – 3:30 PM
Paramyxoviruses	Danielle Anderson	3:30 – 4:30 PM
Group Dinner		6:00 PM

**Monday, 26 May 2014**

Second Week Overview	Ian Mendenhall Benjamin P. Y-H. Lee	9:00 – 9:30 AM
Bat Dissection and Tissue Harvesting	Erica Sena Neves	9:30 – 12:30 PM
Lunch		12:30 – 1:30 PM
Bat Fly Mounting, Identification, and Blood smears (Alternate groups of 4)	Ian Mendenhall	1:30 – 3:00 PM
Break		3:00 – 3:30 PM
Nucleic Acid Extraction (Manual)	Ian Mendenhall	3:30 – 6:00 PM

**Tuesday, 27 May 2014**

High throughput nucleic acid	Erica Sena Neves	9:30 – 11:30 AM
------------------------------	------------------	-----------------

extraction - Qiaextractor		
Lunch		11:30 – 1:30 PM
PCR detection of parasites		1:30 – 6:00 PM
Serology		

### Wednesday, 28 May 2014

PCR detection of parasites		9:00 -
Demonstration of NGS Library Preparation	Kristy Okahara	
Group Dinner		

### Thursday, 29 May 2014

Breakout brainstorming session: Standardization of BBV surveillance		12:30 – 1:30 PM
Pathogen Discovery	October Sessions	1:30 – 2:30 PM
Primer and Probe Design for Emerging Viruses	Mahesh Marothy	2:30 – 4:00 PM
Break		4:00 – 5:00 PM
Field trip to Kent Ridge Park: <i>Cynopterus brachyotis</i>	Meet at 9 <sup>th</sup> floor of EID	5:00 PM – 2:00 AM

### Friday, 30 May 2014

Introduction to Pathogen Evolution and Fundamentals of Molecular Evolution	Gavin Smith Udayan Philip	10:00 – 11:00 AM
Sequence Alignment Algorithms: Lecture and Practical	Gavin Smith Udayan Philip	11:00 – 12:30 PM
Lunch		12:30 – 1:30 PM
Selecting Best Fit Evolutionary Models: Lecture and Practical	Gavin Smith Udayan Philip	1:30 – 2:30 PM
Phylogenetic Tree Reconstruction: Lecture and Practical	Gavin Smith Udayan Philip	2:30 – 4:00 PM

Break		4:00 – 4:30 PM
Course Wrap Up & Review	Ian Mendenhall Benjamin P. Y-H. Lee	4:30 – 6:00 PM

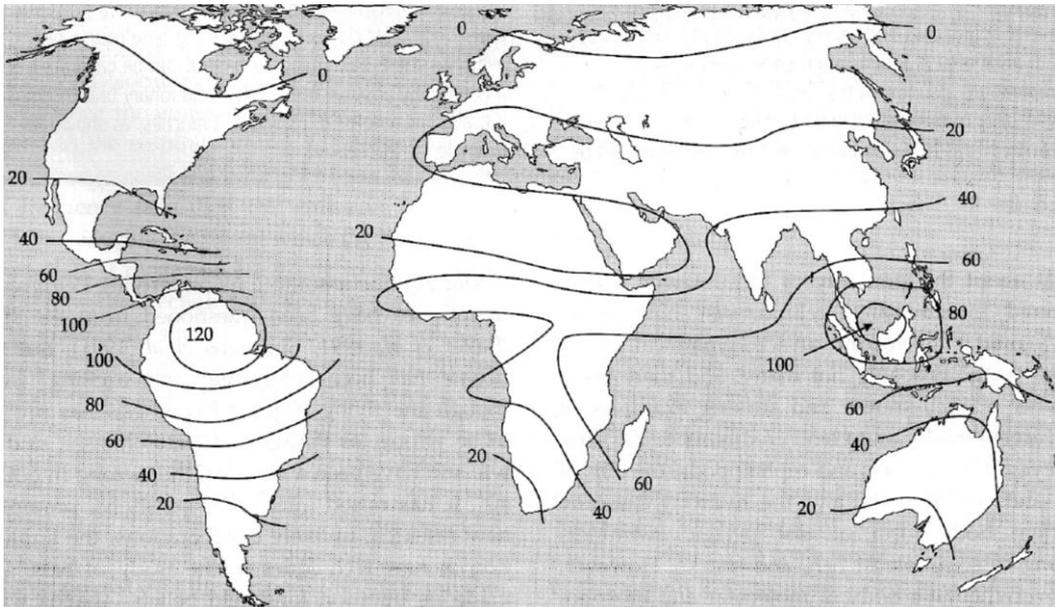
**Saturday, 31 May 2014**

Take Airplane to Taiwan		
-------------------------	--	--

## 二、 研習內容

### (一) 蝙蝠-基本介紹：

蝙蝠(翼手目, order: Chiroptera)為哺乳類中種類數目僅次於啮齒類的脊椎動物, 分布範圍遍布全球(僅次於人類)(圖一), 翼手目其下區分成兩亞目, 分別為大翼手亞目(Megachiroptera)及小翼手亞目(Microchiroptera)(表一), 其下有超過千種品種的蝙蝠。大翼手亞目的蝙蝠(megabats), 多數體型較大, 多數為食果性蝙蝠, 視覺較為發達, 主要依靠視覺及嗅覺尋找果實, 不使用超音波覓食(除了 *Rousettus*, 果蝠屬), 亦被稱為 flying foxes。小翼手亞目的蝙蝠(microbats), 體型較小(翼展長約 30 公分), 70%的蝙蝠為食蟲性蝙蝠, 主要依靠超音波回聲定位覓食。亦有些品種蝙蝠以果實、花蜜、魚、青蛙、小哺乳動物、或動物的血液為食。

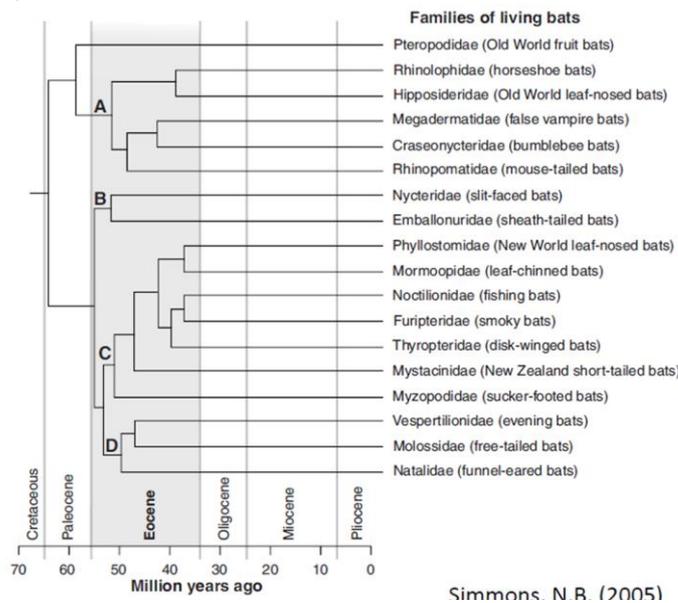


圖一、蝙蝠於全球的分布(每 500 平方公里, 蝙蝠品種分布數目)(Findley, 1993)。

表一、蝙蝠(翼手目)分類(Calisher, C.H., 2006)。

Family and subfamily
Megachiroptera, Pteropodidae
Microchiroptera
Craseonycteridae
Emballonuridae
Furipteridae
Hipposideridae
Megadermatidae
Molossidae
Mormoopidae
Mystacinidae
Myzopodidae
Natalidae
Noctilionidae
Nycteridae
Phyllostomidae
Rhinolophidae
Rhinopomatidae
Thyropteridae
Vespertilionidae

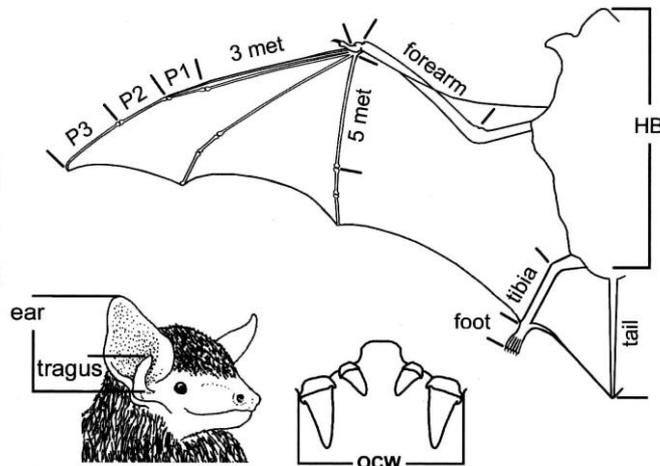
蝙蝠演化較早，且相對於其他哺乳動物分類群(taxon)來說蝙蝠變化較小，演化起源於哺乳動物常見的祖先。近年分子演化研究結果，將蝙蝠區分為兩亞目，分別為 Yinpterochiroptera (此亞目包含 Rhinolophoidea 及 Pterodidae)及 Yangochiroptera (此亞目包含 Emballonuroidea、Noctilionoidea 及 Vespertilionoidea)，此兩亞目於 64 億萬年前演化區隔開。翼手目其內不同科蝙蝠自 52~50 億萬年前(使新世紀，Eocene period，和地球溫度顯著上升同一時期)演化區隔開(圖二)。



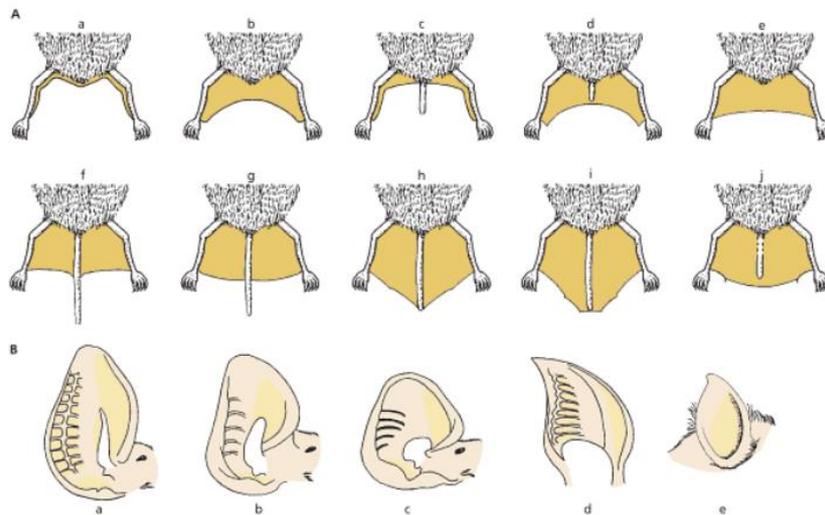
圖二、蝙蝠(翼手目)起源及分化(Simmons, 2005)(A: Rhinolophoidea ; B: Emballonuroidea ; C: Noctilionoidea ; D: Vespertilionoidea)。

蝙蝠品種主要依照下列形態學來做鑑別(圖三、四、五):

- 體型、大小及體重。
- 前臂長度。
- 耳朵及耳屏(tragus)。
- 毛色
- 牙齒及頭顱。

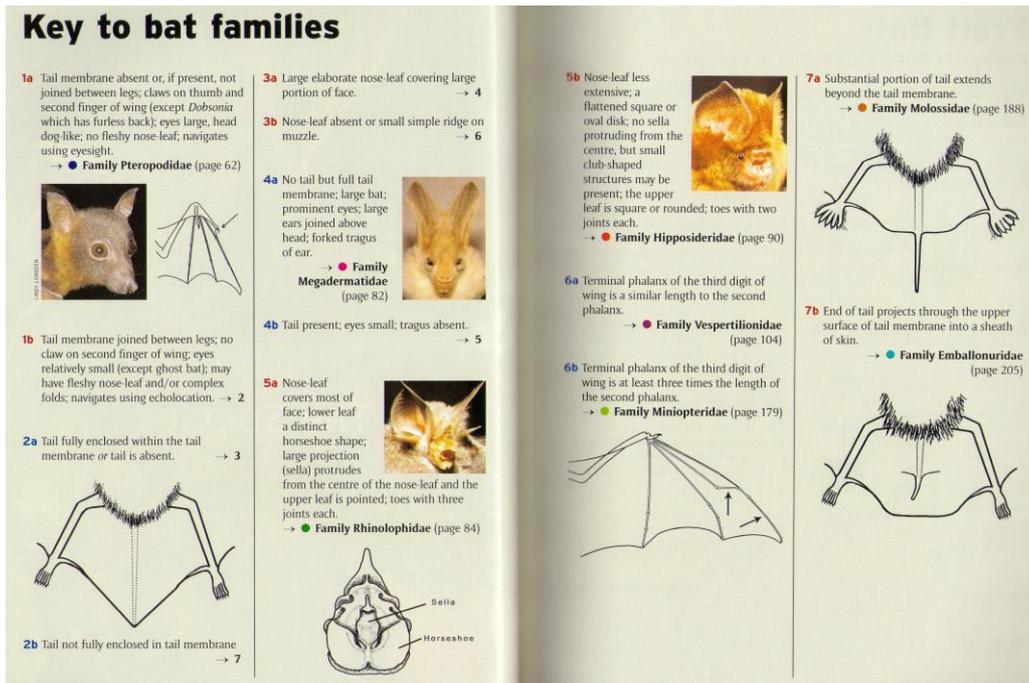


圖三、蝙蝠外觀構造簡圖(Churchill, S., 2008)。



**Figure 13.2** Variation in the uropatagium, tail, external ear, and tragus of representative families of bats. (A) (a) Fruit bats (Pteropodidae) in the genus *Pteropus*, as well as some New World leaf-nosed bats (Phyllostomidae); (b) New World leaf-nosed bats; (c) tube-nosed fruit bats in the genera *Nyctimene* and *Paranyctimene* (Pteropodidae); (d) New World leaf-nosed bats; (e) hog-nosed bat (Craseonycteridae), with extensive uropatagium but no external tail; (f) mouse-tailed bats (Rhinopomatidae) with long, thin tail free of the uropatagium; (g) free-tailed bats (Molossididae) with about one-half the tail free of the uropatagium; (h) common bats (Vespertilionidae), similar to tails in horseshoe bats (Rhinolophidae) and false vampire bats (Megadermatidae); (i) slit-faced bats (Nycteridae) with T-shaped tip of the tail; (j) sac-winged bats (Emballonuridae), fishing bats (Noctilionidae), and moustached bats (Mormoopidae) have a tail that protrudes through the uropatagium. (B) Representative sizes and shapes of the external ears and tragus in bats. (a-c) Variation in size and shape of the ear and tragus in vespertilionids; (d) antitragus in a rhinolophid; (e) continuous inner ear margin without tragus or antitragus in a pteropodid. Adapted from Hill and Smith, 1984, *Bats: A Natural History*, British Museum of Natural History.

圖四、蝙蝠品種鑑別簡圖(Hill and Smith, 1984)。



圖五、蝙蝠品種鑑別指引(Churchill, S., 2008)。

現亦可使用基因分析來鑑別蝙蝠品種，如使用 DNA 條碼(DNA barcode)來做品種鑑別(粒線體細胞色素 C 氧化酶亞基 I 基因，COI gene)。或可使用聲納來鑑別蝙蝠品種(需要聲納自動區別儀器)。

和其他哺乳動物不同，蝙蝠具有獨特的飛行能力，蝙蝠每日需飛行以便於覓食，於季節性遷移時，某些品種的蝙蝠會進行長途飛行(*Myotis* spp.的蝙蝠，需進行 200~400 英里飛行前往冬季冬眠地)，文獻指出，於法國，狂犬病感染和 *Pipistrellus nathusii* 蝙蝠的遷徙路徑有關。有學者提出假設，蝙蝠與其他哺乳動物最大不同點為飛行能力，由於每日蝙蝠飛行時會提高身體代謝及體溫增加，因此宿主-病毒反應使得於蝙蝠的人畜共通病毒產生了變異，因而病毒對於熱反應更具有耐受性，且對於宿主蝙蝠的毒力較低。研究證實，已於全球 12 科超過 200 種蝙蝠品種內證實有超過 15 個病毒科的病毒存在。蝙蝠感染病毒，不常見有明顯症狀，且與某些例子可見有持續性感染；且蝙蝠比起啮齒類更易感染人畜共通病毒。文獻證實，蝙蝠可作為許多人畜共通病毒的主要來源宿主(表二)。

表二、全世界從自然感染的蝙蝠中所分離出的病毒(Calisher, C.H., 2006)。

Virus	Bat species (common name)*
<b>Family Rhabdoviridae, genus Lyssavirus</b>	
Rabies virus.....	Numerous bat species, essentially worldwide
Lagos bat virus.....	<i>Eidolon helvum</i> (African straw-colored fruit bat), <i>Micropteropus pusillus</i> (Peters' lesser epauletted fruit bat), <i>Epomops dobsonii</i> (Dobson's epauletted fruit bat), <i>Nycteris gambiensis</i> (Gambian slit-faced bat), <i>Epomophorus walbergi</i> (Wahlberg's epauletted fruit bat)
Duvenhage virus.....	<i>Miniopterus</i> sp., <i>Nyctalus noctula</i> (noctule), <i>Vesperugo murinus</i> (particolored bat), <i>Nycteris thebaica</i> (Egyptian slit-faced bat)
Australian bat lyssavirus.....	Megachiroptera (multiple <i>Pteropus</i> spp.), Microchiroptera sp. from Australia, <i>Saccolaimus flaviventris</i> (yellow-bellied pouched bat)
European bat lyssavirus 1.....	<i>Eptesicus serotinus</i> (common serotine), <i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette)
European bat lyssavirus 2.....	<i>Myotis myotis</i> (mouse-eared myotis), <i>Myotis dasycneme</i> (pond myotis), <i>Myotis nattereri</i> (Natterer's myotis), <i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreibers' long-fingered bat), <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (greater horseshoe bat), <i>Myotis daubentonii</i> (Daubenton's myotis)
Aravan virus.....	<i>Myotis blythii</i> (lesser mouse-eared myotis)
Khujand virus.....	<i>Myotis mystacinus</i> (whiskered myotis)
Irkut virus.....	<i>Murina leucogaster</i> (greater tube-nosed bat)
West Caucasian bat virus.....	<i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreibers' long-fingered bat)
<b>Family Rhabdoviridae, genus unassigned</b>	
Gossas virus.....	<i>Tadarida</i> sp.
Kern Canyon virus.....	<i>Myotis yumanensis</i> (Yuma myotis)
Mount Elgon bat virus.....	<i>Rhinolophus eloquens</i> (eloquent horseshoe bat)
Oita 296 virus.....	<i>Rhinolophus comutus</i> (little Japanese horseshoe bat)
<b>Family Orthomyxoviridae, genus Influenzavirus A, influenza A virus.....</b>	
<i>Nyctalus noctula</i> (noctule)	
<b>Family Paramyxoviridae, genus Henipavirus</b>	
Hendra virus.....	<i>Pteropus alecto</i> (black flying fox), <i>Pteropus poliocephalus</i> (gray-headed flying fox), <i>Pteropus scapulatus</i> (little red flying fox), <i>Pteropus conspicillatus</i> (spectacled flying fox)
Nipah virus.....	<i>Pteropus hypomelanus</i> (variable flying fox), <i>Pteropus vampyrus</i> (large flying fox), <i>Pteropus lylei</i> (Lyle's flying fox)
<b>Family Paramyxoviridae, genus Rubulavirus</b>	
Mapuera virus.....	<i>Sturmira lillium</i> (yellow epauletted bat)
Menangle virus.....	<i>Pteropus poliocephalus</i> (gray-headed flying fox)
Tiomam virus.....	<i>Pteropus hypomelanus</i> (variable flying fox)
<b>Family Paramyxoviridae, genus undetermined, a parainfluenzavirus.....</b>	
<i>Rousettus leschenaultii</i> (Leschenault's rousette)	
<b>Family Coronaviridae, SARS coronavirus.....</b>	
<i>Rhinolophus sinicus</i> (Chinese horseshoe bat), <i>Rhinolophus pearsonii</i> (Pearson's horseshoe bat), <i>Rhinolophus macrotis</i> (big-eared horseshoe bat), <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (greater horseshoe bat)	
<b>Family Togaviridae, genus Alphavirus</b>	
Chikungunya virus.....	<i>Scotophilus</i> sp., <i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette), <i>Hipposideros caffer</i> (Sundevall's leaf-nosed bat), <i>Chaerephon pumilus</i> (little free-tailed bat)
Sindbis virus.....	Rhinolophidae sp., Hipposideridae sp.
Venezuelan equine encephalitis virus.....	<i>Desmodus rotundus</i> (vampire bat), <i>Uroderma bilobatum</i> (tent-making bat), <i>Artibeus phaeotis</i> (pygmy fruit-eating bat)
<b>Family Flaviviridae, genus Flavivirus</b>	
Bukalasa bat virus.....	<i>Chaerephon pumilus</i> (little free-tailed bat), <i>Tadarida condylura</i> (Angola free-tailed bat)
Carey Island virus.....	<i>Cynopterus brachyotis</i> (lesser short-nosed fruit bat), <i>Macroglossus minimus</i> (lesser long-tongued fruit bat)
Central European encephalitis virus.....	Unidentified bat
Dakar bat virus.....	<i>Chaerephon pumilus</i> (little free-tailed bat), <i>Taphozous perforatus</i> (Egyptian tomb bat), <i>Scotophilus</i> sp., <i>Mops condylurus</i> (Angola free-tailed bat)
Entebbe bat virus.....	<i>Chaerephon pumilus</i> (little free-tailed bat), <i>Mops condylurus</i> (Angola free-tailed bat)
Japanese encephalitis virus.....	<i>Hipposideros armiger terasensis</i> (great roundleaf bat; also known as Formosan leaf-nosed bat), <i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreibers' long-fingered bat), <i>Rhinolophus comutus</i> (little Japanese horseshoe bat)
Jugra virus.....	<i>Cynopterus brachyotis</i> (lesser short-nosed fruit bat)
Kyasanur Forest disease virus.....	<i>Rhinolophus rouxi</i> (rufous horseshoe bat), <i>Cynopterus sphinx</i> (greater short-nosed fruit bat)
Montana myotis leucoencephalitis virus.....	<i>Myotis lucifugus</i> (little brown bat)
Phnom-Penh bat virus.....	<i>Eonycteris spelaea</i> (lesser dawn bat), <i>Cynopterus brachyotis</i> (lesser short-nosed fruit bat)
Rio Bravo virus.....	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i> (Mexican free-tailed bat), <i>Eptesicus fuscus</i> (big brown bat)
St. Louis encephalitis virus.....	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i> (Mexican free-tailed bat)
Saboya virus.....	<i>Nycteris gambiensis</i> (Gambian slit-faced bat)
Sokuluk virus.....	<i>Vesperugo pipistrellus</i> (probably <i>Pipistrellus pipistrellus</i> ; common pipistrelle)
Tamana bat virus.....	<i>Pteronotus parnellii</i> (Parnell's mustached bat)
Uganda S virus.....	<i>Rousettus</i> sp., <i>Tadarida</i> sp.
Yokose virus.....	Unidentified bat
<b>Family Bunyaviridae, genus Bunyavirus</b>	
Catu virus.....	<i>Molossus obscurus</i> (possibly <i>Molossus currentium</i> ; Thomas' mastiff bat)
Guama virus.....	Unidentified bat
Nepuyo virus.....	<i>Artibeus jamaicensis</i> (Jamaican fruit-eating bat), <i>A. lituratus</i> (great fruit-eating bat)
<b>Family Bunyaviridae, genus Hantavirus,</b>	
Hantaan virus.....	<i>Eptesicus serotinus</i> (common serotine), <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (greater horseshoe bat)
<b>Family Bunyaviridae, genus Phlebovirus</b>	
Rift Valley fever virus.....	<i>Micropteropus pusillus</i> (Peters' dwarf epauletted fruit bat), <i>Hipposideros abae</i> (Aba leaf-nosed bat), <i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreibers' long-fingered bat), <i>Hipposideros caffer</i> (Sundevall's leaf-nosed bat), <i>Epomops franqueti</i> (Franquet's epauletted bat), <i>Glauconycteris argentata</i> (common butterfly bat)
Toscana virus.....	<i>Pipistrellus kuhlii</i> (Kuhl's pipistrelle)
<b>Family Bunyaviridae, genus unassigned</b>	
Kaeng Khoi virus.....	<i>Chaerephon plicatus</i> (wrinkle-lipped free-tailed bat)
Bangui virus.....	<i>Scotophilus</i> sp., <i>Pipistrellus</i> sp., <i>Tadarida</i> sp.
<b>Family Reoviridae, genus Orbivirus</b>	
Ife virus.....	<i>Eidolon helvum</i> (straw-colored fruit bat)
Japanaut virus.....	<i>Syconycteris australis</i> (southern blossom bat)
Fomede virus.....	<i>Nycteris nana</i> (dwarf slit-faced bat), <i>Nycteris gambiensis</i> (Gambian slit-faced bat)
<b>Family Reoviridae, genus Orthoreovirus</b>	
Nelson Bay virus.....	<i>Pteropus poliocephalus</i> (gray-headed flying fox)
Pulau virus.....	<i>Pteropus hypomelanus</i> (variable flying fox)
Broome virus.....	<i>Pteropus alecto</i> (black flying fox)
<b>Family Arenaviridae, Tacaribe virus.....</b>	
<i>Artibeus lituratus</i> (great fruit-eating bat), <i>A. jamaicensis</i> (Jamaican fruit-eating bat)	
<b>Family Herpesviridae, genus unassigned</b>	
Agua Preta virus.....	<i>Carollia subrufa</i> (gray short-tailed bat)
A cytomegalovirus.....	<i>Myotis lucifugus</i> (little brown bat)
Parixa virus.....	<i>Lonchophylla thomasi</i> (Thomas' nectar bat)
<b>Family Picornaviridae, genus undetermined,</b>	
Juruca virus.....	Unidentified bat
<b>Unclassified</b>	
Issyk-kul (Keterah virus).....	<i>Nyctalus noctula</i> (noctule), <i>Eptesicus serotinus</i> (common serotine), <i>Pipistrellus pipistrellus</i> (common pipistrelle), <i>Myotis blythii</i> (lesser mouse-eared myotis), <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (greater horseshoe bat), <i>Scotophilus kuhlii</i> (lesser Asiatic yellow house bat), <i>Cynopterus brachyotis</i> (lesser short-nosed fruit bat), <i>Eonycteris spelaea</i> (lesser dawn bat), <i>Chaerephon plicatus</i> (wrinkle-lipped free-tailed bat), <i>Hipposideros diadema</i> (diadem leaf-nosed bat), <i>Taphozous melanopogon</i> (black-bearded tomb bat), <i>Rhinolophus lepidus</i> (Blyth's horseshoe bat), <i>Rhinolophus horsfeldi</i> (possibly <i>Megaderma spasma</i> , lesser false vampire bat)
Mojui dos Campos virus.....	Unidentified bat
Yogue virus.....	<i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette)
Kasokero virus.....	<i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette)

上述表二所列舉的絕大多數病原尚未證實會經由蝙蝠傳播其他動物或人類造成疾病。會經由蝙蝠傳播造成高病原性疾病的病原，包括蝙蝠的狂犬病病毒及相關麗莎病毒、立百病毒、亨德拉病毒、及 SARS-CoV-like 病毒。

由於蝙蝠壽命長(不同品種蝙蝠至高可存活 25~30 年不等)，且可以持續感染病毒，表示蝙蝠可以維持病毒存在並傳播病毒給其他脊椎動物，且會增加蝙蝠同一品種及品種間病毒傳播。野外觀察發現感染狂犬病病毒的蝙蝠對於其他品種具有攻擊性。Mexican free-tailed 蝙蝠感染狂犬病病毒株和 hoary bat (*Lasiurus cinereus*)有相關聯，證實病毒於蝙蝠品種間的傳播。而蝙蝠高族群密度及密集棲息的行為亦增加了病毒於品種內及品種間的傳播。某些品種的蝙蝠(如 Mexican free-tailed 蝙蝠)為高度群居動物，主要棲息於美國西南部洞穴，其密度高達每平方英尺棲息 300 隻蝙蝠，因此發生一例因排泄物或是小顆粒飛沫造成病毒的空氣傳播(airborne)狂犬病案例。小翼手目的蝙蝠主要靠由喉部所發出的超音波來定位，發出超音波時可能會產生咽喉液、黏液或唾液的小顆粒飛沫，可能會傳播病毒給近距離接觸的個體。

## (二) 蝙蝠媒介相關病原簡介:

### 1. 副黏液病毒 Paramyxovirus

Hendra virus 首次於 1994 年澳洲的馬匹造成急性呼吸道疾病，共有 21 匹馬感染。於 1995 年澳洲有農民死於腦炎，其病患有和 14 個月前被證實感染 Hendra 病毒的馬匹(解剖為輕微腦炎)的接觸史。至今 Hendra 病毒造成人類 4 個死亡病例，並持續於馬匹中有病例發生。病毒可從蝙蝠(尿液、肺臟及肝臟組織)、馬(脾臟、肺臟及血液中)及人類病患(肺臟、肝臟、腎臟及脾臟)中分離出來。並於果蝠 (*Pteropus poliocephalus*, *P. alecto*, *P. conspicillatus*, *P. scapulatus*)血清學監測可檢出 Hendra virus 抗體陽性。現已有研發出使用於馬匹中 hendra virus 疫苗(Equivac® HeV)。

Nipah virus 首次於 1998 年馬來西亞發生，病例一開始被誤認為日本腦炎，

並造成豬場工作人員腦炎，共造成人類共 265 例感染，其中 105 例死亡。於新加坡，Nipah 病毒共造成 11 例感染，其中一例死亡。Nipah 病毒會經由豬隻傳染給人，於疫情爆發期間，有超過一億豬隻被撲殺。Pteropus bats 為其自然宿主，蝙蝠不會出現臨床症狀，並可自尿液及唾液排毒。2001 年 Nipah 病毒於孟加拉爆發，死亡率高達 92%，病原出現人傳人的傳染途徑。2001 年 Nipah 病毒於印度爆發，亦出現人傳人的病原傳染途徑。2000 年於柬埔寨進行蝙蝠血清學調查，調查 1303 隻於餐廳或是棲息地的蝙蝠，其血清陽性率為 10.9%，和泰國的研究調查結果相似。其他於食果蝙蝠(*P. hypomelanus*, *P. vampyrus*, *Cynopterus brachyotis*, *Eonycteris spelaea*)、食蟲蝙蝠(*Scotophilus kuhlii*)、孟加拉的食果蝙蝠(*P. giganteus*)及柬埔寨的 flying fox(*P. lylei*)血清學檢測中亦檢出陽性血清。

## 2. 冠狀病毒 Coronavirus

嚴重急性呼吸道症候群(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)疾病起源自中國，可能是來自野味市場(*Paradoxurus hermaphroditus*, *Nyctereutes procyonoides*)，而後續研究顯示這些野生動物可能是中間宿主而非自然宿主。於後續研究證實 horseshoe bat(*Rhinolophus sinicus*)可能為 SARS-like CoV 的自然宿主，蝙蝠(*Rhinolophus sinicus*)的肛門拭子檢測出冠狀病毒核酸，其核酸和 SARS-CoV 高度相似，但並非 SARS-CoV，可能是由蝙蝠傳給麝香貓在傳給人類的期間病毒發生突變。

### (三) 風險評估及個人保護裝備(Personal Protective Equipment, PPE)

先區分 hazard (危險)及 risk(風險)，hazard 為可能導致感染或死亡的可能病原或物質，或是可能某些不好的事情發生的情況。而 risk 為不好的事情發生的可能性或是危險(hazard)發生後的相關後果。於每次的採樣行動都必須評估危險發生的可能性及比較結果的嚴重性，來評估風險管理的層級(表三)。必須評估每一工作由開始到結束的風險，並試圖將風險降至最低。為降低危險發生的可能性，人員需配備個人防護裝置(手套、N95 口罩、袖套、頭罩、及安全眼鏡)。為降低危險發

生後的嚴重性，人員需進行相關疫苗免疫。

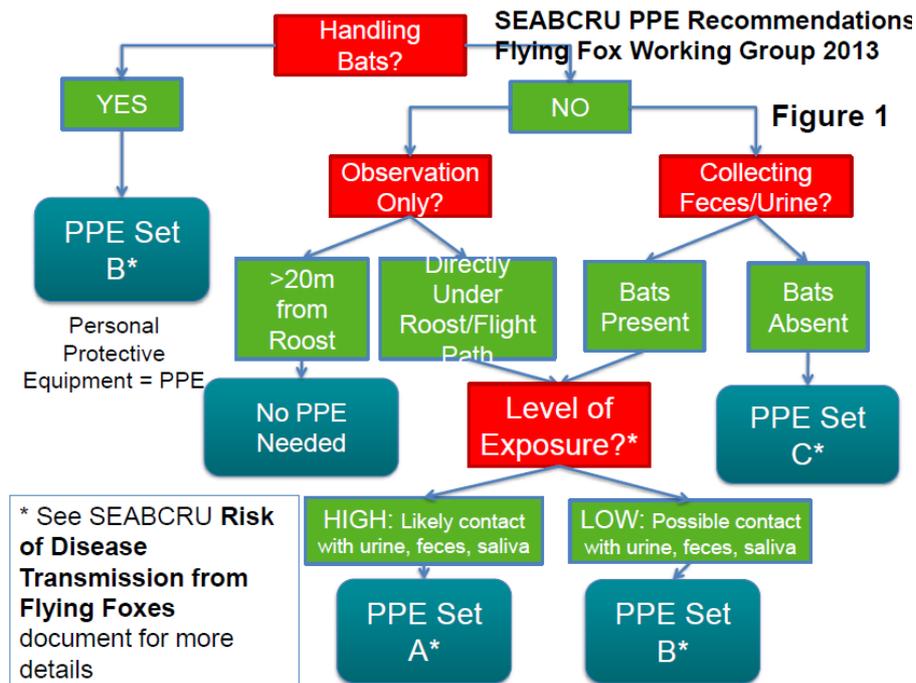
表三、風險管理層級評估表。

		Consequences		
		Minor 3	Moderate 2	Major 1
Likelihood	Probable A			
	Possible B			
	Improbable C			

Key	Green Low Risk	Yellow Medium Risk	Red High Risk
-----	-------------------	-----------------------	------------------

由於蝙蝠已被證實攜帶多種病毒，且會影響人體健康。蝙蝠將病原傳播給人類途徑有兩種：直接接觸(蝙蝠的血、尿液、唾液及糞便、咬傷、或是蝙蝠排泄物經由眼口鼻等黏膜進入人體)及吸入氣化的糞便及尿液微粒。雖然蝙蝠傳播病毒給人的可能性很低，但是人類一旦感染患病後其結果很嚴重(於孟加拉，感染 Nipah 病毒的人當中有超過 70% 的人死亡)，因為人類一旦疾病感染其後果都很嚴重，所以人員建議穿戴個人保護裝備(PPE)以降低病原接觸的可能性。依據人員參與蝙蝠操作的層級不同(圖六)，而配備不同等級的個人保護裝備。人員可能高度暴露於蝙蝠體液時須配戴 PPE Set A。PPE set A 包含 Tyvek 拋棄式防護衣或是拋棄式雨衣、眼睛防護器具(護目鏡等)、口罩(N95 或 P100 呼吸器)、手套(操作蝙蝠者配戴厚橡膠手套，棲息地樣本採集者配戴一般乳膠手套)、不露腳趾及腳跟的鞋(可以消毒)。人員須操作蝙蝠或是可能暴露於蝙蝠體液時須配戴 PPE Set B。PPE set B 包含採樣專用衣物(長袖衣服、長褲，並於野外工作結束後移除，不將衣物攜回處所)、眼睛防護器具(護目鏡等)、口罩(N95 或 P100 呼吸器)、手套(操作蝙蝠者配戴厚橡膠手套，棲息地樣本採集者配戴一般乳膠手套)、不露腳趾及腳跟的鞋(可以消毒)。人員暴露於蝙蝠體液可能性低時，配備 PPE Set C 僅可，PPE set C 包含採樣專用衣物(長袖衣服、長褲，並於野外工作結束後移除，不將衣物攜回處所)、口罩(N95 或 P100 呼吸器)、手套(配戴一般乳膠手套)、不露腳趾及腳跟的鞋(可以消毒)。



圖六、依據人員參與蝙蝠操作不同配戴不同等級個人防護裝備。

#### (四) 蝙蝠捕捉方法介紹:

某些品種的蝙蝠屬於保育類動物，擅自捕捉或飼養屬於非法行為。進行捕捉前須先向有關當局審請許可(如國家公園等)，參與蝙蝠捕捉或操作人員於試驗進行前需完成相關疫苗免疫注射(如:狂犬病疫苗、B型肝炎疫苗、破傷風等)。工作人員於野外進行動物捕捉時，可能會被抓傷或咬傷，故需要配備個人保護裝備(Personal Protective Equipment, PPE)以便於安全進行動物操作。依據野外工作的危險等級不同，來選擇不同等級 PPE 裝備配戴。

蝙蝠捕捉方法及裝備，可依據蝙蝠品種、居住習性、欲捕捉樣本數目、及參與野外捕捉的工作人員數目來做選擇。而野外天氣、地形、月色及棲息地等情況亦會影響到是否能成功捕捉到蝙蝠。

##### 1. Hand net /Butterfly nets(抄網/捕蟲網)

抄網/捕蟲網(圖七)可用於局限空間中(如洞穴、礦坑、建築物內)捕捉蝙蝠。於蝙蝠飛行時需注意避免空揮或是過度用力而導致蝙蝠受傷。

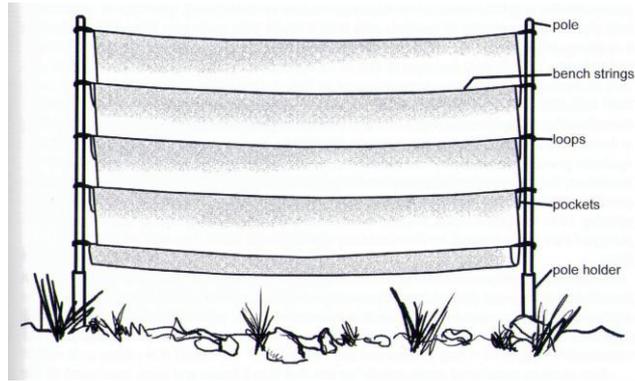


圖七、使用抄網/捕蟲網捕捉蝙蝠。

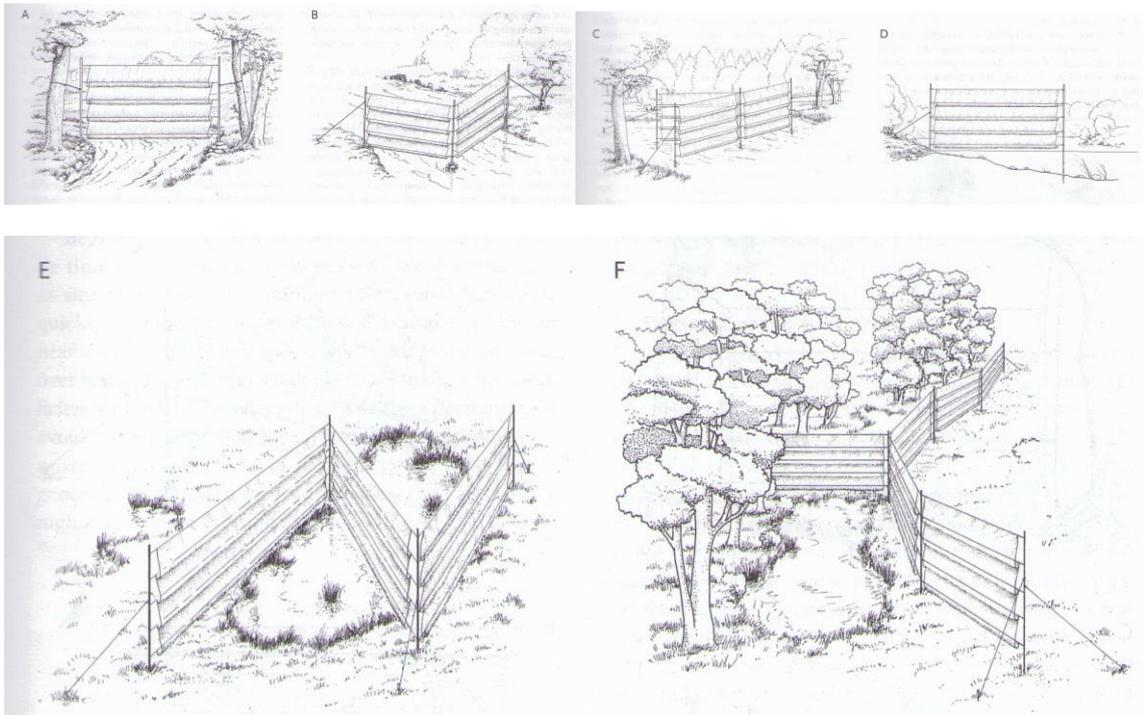
## 2. Mist nets(霧網)

其成分為尼龍或聚酯纖維，為常見、便宜、方使用來捕捉蝙蝠的工具(圖八)。尼龍製成之霧網，其網子較硬且便宜，較適合用於洞穴或礦坑等較差的環境。聚酯纖維所製成之霧網，其網子較為柔軟及耐用，對於蝙蝠捕捉效果要好，較常用來捕捉體型小的蝙蝠。而霧網桿可由樹枝、竹子、或是鋁製成。可依據需求選擇網目大小、丹尼數(Denier)(丹尼數越高越耐用，但高丹尼數的霧網易被蝙蝠經由視覺或是超音波辨識而躲避)、纖維股數、霧網高度及長度(依據架設地形及環境而變，最常用的為6~9公尺長的霧網)等(圖九)。50丹尼數或更高丹尼數的霧網通常適合用來捕捉小翼手目及體型較小的大翼手目的蝙蝠。霧網長度常見為2.6、6、9、12及18公尺，高度通常為2.3~2.6公尺。

用於 small bats 捕捉，可選用 36~38 mm 網目、30、50、70 丹尼數，及兩股製成的霧網。用於 Flying foxes 捕捉，則可選用 100 mm 網目、高度超過 2 米及具有 4 個 pockets 的霧網。



圖八、Mist net (霧網)結構介紹。

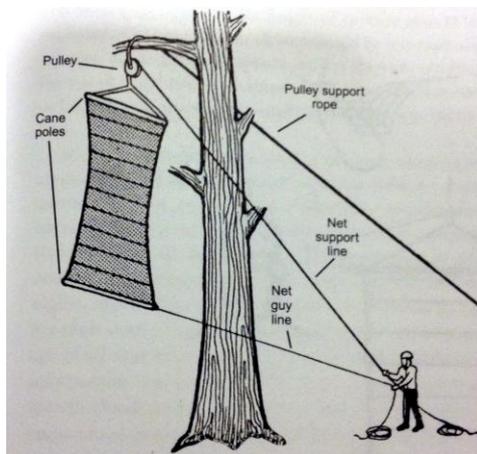


圖九、依據地形、環境及蝙蝠棲息地不同，可將霧網做不同的設置。(A:單一霧網；B:V型；C:T型；D:單一霧網，一面近河流或池塘；E:Z型，橫跨池塘；Y型。)

霧網需於日落前設置完成，以便於捕捉到較早活動的蝙蝠，建議於將霧網設置於蝙蝠預計的飛行路徑中，最佳設置地點為近棲息處、水源(water hole)、覓食處及飛行路徑等。霧網架設後需每 15 分鐘檢查是否有蝙蝠被捕捉，並立即移除。為了避免 net shyness(蝙蝠了解此位置有霧網設置，並學習躲避)，霧網通常不可於同一位置連續放置超過 2 晚。亦可使用超音波偵測器、引誘劑、昆蟲叫聲、其他品種蝙蝠的叫聲或於近霧網處設置紫外線燈(吸引昆蟲)，以增加蝙蝠捕捉的成功率。

### 3. High nets/canopy nets

主要使用於樹林冠叢下，用來評估蝙蝠族群的垂直分層(圖十)。亦可用來捕捉飛行高度較高的品種。

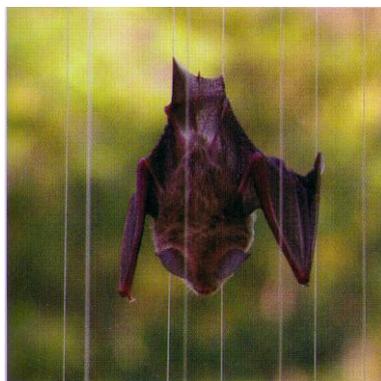
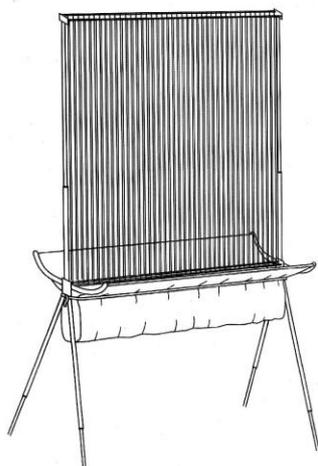


圖十、canopy net 簡圖。

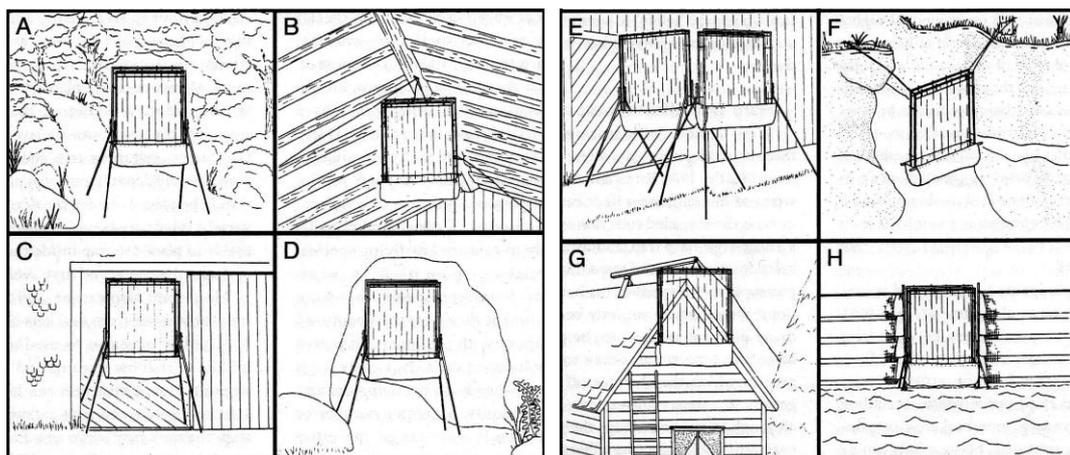
### 4. Harp traps(豎琴網)

由一或二個支撐型直角框架構成，由釣魚線 2~3 公分垂直區隔，底部則為捕捉袋(catch bag)(圖十一)。由於垂直線很難被蝙蝠探測到，當蝙蝠撞擊到釣魚線，則會沿著釣魚線向下掉入捕捉袋。豎琴網可和霧網混合使用。

豎琴網可藉由調整底架高度使用於不平整地形(圖十二)。並可設置於蝙蝠棲息洞穴出口，於日間設置豎琴網後，可放置到夜間再行觀察，夜間需觀察多次，並將被捕捉到的蝙蝠移除。



圖十一、豎琴網簡圖與蝙蝠捕捉圖。



圖十二、豎琴網應用於不同地形之示意圖。(A:樹林小徑；B:懸吊於樑柱下；C:屋子入口；D:洞穴入口；E:L型設置於密閉門前；F:懸吊於山谷間；G:懸吊於建築物外；H:豎琴網併用霧網，設置於淺池塘)

#### (五) 新興感染性疾病(Emerging Infectious Diseases)診斷方法

75%的新興疾病為人畜共通疾病，多數的新興疾病為病毒所造成。疾病出現可分為幾個階段:初始傳播(initial transmission)、病毒適應於新的人類宿主(疾病爆發有限)、epidemic/pandemic(流行性/大流行)、endemic(地方性流行)。診斷方法需要注意幾點:直接偵測病原的樣本應為受影響臟器及排毒處樣本(如病灶-水疱或皮膚採樣；呼吸道樣本-拭子、肺臟樣本；糞便/肛門拭子；腦脊髓液/腦組織；血漿/血清、尿液-若毒血症期間較長時；血清抗體可用以檢測抗體；若是慢性疾病可檢測可能的保毒臟器)；適當的樣本收集方法(拭子及組織保存於VTM中)；樣本運送至實驗室的方法；樣本儲存及立即檢測。下列簡介部分實驗室診斷方法。

##### 1. 病毒培養

為病毒診斷的黃金標準。可接種於蛋內(卵黃囊接種、尿囊液接種、尿囊絨毛膜接種)或是細胞培養(初代細胞培養、二倍體細胞系培養 diploid，連續細胞系培養 continuous line)，病毒培養後續可做其他分析(如 HA、IFA 或 PCR)。

細胞培養的優點是其結果是具有決定性證據的，所分離出高力價的病毒可用做後續研究使用。缺點為可能有病毒無法在細胞中培養、或是沒有准許使用的細胞株可供培養、或是混合感染案例時細胞培養的結果不見得是主要病原被培養出

來，且病毒培養費時，效果有限。

## 2. 聚合酶鏈反應/即時聚合酶鏈反應

聚合酶鏈反應(PCR)及即時聚合酶鏈反應(real-time PCR)為快速且具有敏感性及特異性的檢測方法。並可經由同時經由單一對或多對引子進行病原的偵測。此診斷方法對於引子的設計較為要求，並可視試驗需求進行病原定量。但此診斷方法的缺點為常見有混合病原感染、需要事前了解欲檢測病原的序列資訊以便於設計引子，此試驗方法不會產生活病毒供後續試驗使用。

用來篩檢樣本的引子設計可分兩部分:初次大範圍篩檢用(引子多設計自保守區域，如:5'UTR)及後續特異性分析檢測(引子多設計自病原特異性區域，如VP1)。病原表面基因及聚合酶基因多為引子設計常選擇的目標基因。引子設計須注意長度在 18~24bp 較恰當、 $T_m$  值於 50~60°C 較適當，且需避免 hairpin 及 primer dimer 等細節，可使用 Primer 3 等軟體幫助設計引子。引子設計出來後，可使用 blast 來評估所設計引子的適合程度(E score 需低於  $10^{-3}$ )，若是設計即時聚合酶鏈反應的引子，除了需注意上述事項外，建議產物長度於 50~150bp 較為恰當。引子設計完後，需依照產物長度來決定反應循環時間，產物長度較短時(低於 500bp)，反應的延伸時間約 30~45 秒即可，若是產物長度增加，需適時增加反應延伸時間(1 分鐘可延伸 1000bp)。

## 3. 抗體檢測方法

可偵測病原特異性的 IgM 或 IgG 抗體，但可能會有偽陽性的風險(使用病毒溶解物來偵測特異性抗體其偽陽性風險較高，而使用重組蛋白或胜肽來偵測的偽陽性風險較低)。

(六) 蝙蝠野外捕捉訓練

於野外進行蝙蝠捕捉前，可依照野外裝備清單(表四)準備所需物品。

表四、野外蝙蝠捕捉所需物品清單。

**BATS - FIELD SUPPLIES CHECKLIST**

TRAPPING		SAMPLING	
Mist nets		VTM Cryovials	Data sheet sample
Mist net poles		Sterile 1.5ml tubes	Masking tape
Harp trap		Cooler box and ice packs	Microscope slides
Tent stakes		Plastic sample box x2	Slide box
Ropes		Syringes (1ml)	Mango juice
Bungee cords		Needles (27G)	Scissors
Bat bags		Oral swabs *	Plastic tubes holders
Head lamp		Anal swabs **	Paper towels
Torch light		20ul pipette	Tool box
Extra batteries		200ul pipette	Waste bag
Multi-tool		20ul pipette tips	
		200ul pipette tips	
		PBS – 7.6pH (50ml)	
		EtOH + Glycerol (50ml)	
		EtOH 70% (50ml)	
		Methanol – 100% (200ml)	
ENVIROMENTAL/ CLIMATE VARIABLES		MeOH glass container	
Data form		Biohazard bags	
GPS		Biohazard sharps container	
Spherical Densiometer		Paint brush	SAFETY
Ruler		Forceps	Hand sanitizer
Weather-monitoring device		Eye dropper x2	Alcohol spray
		Punch biopsy	Leather gloves
		Cutting board	Latex gloves
		Cotton pads	N95 mask
OTHERS		Calipers	Disposable long sleeve
Permits		Scales	Helmets
Permit IDs		Clipboard	Betadine
Laminated permits		Data sheets	Bottles with clean water
		Pencil/ pens/markers	

	ITEM	VENDOR	ITEM NO
*	Sterile swabs (rayon) - oral	Fisher	23-400-111
**	Sterile swabs, small - anal	Fisher	14-960-01

1. *Eonycteris spelaea*(圖十三)

為大翼手目蝙蝠，捕捉地點為 Rifle Range Rd.，蝙蝠棲息於高架高速公路下

的橋面(圖十四)，參與人員配備 PPE set B 個人保護裝備。於蝙蝠棲息處下方鋪設塑膠墊以便收集尿液及糞便，等待約 1 小時，以棉棒收集糞便置入含有 VTM 收集小管並編號註記，使用微量吸管收集尿液置入小管(註記尿量)並編號(圖十五)。日落前於蝙蝠棲息處下方架設霧網進行蝙蝠捕捉，蝙蝠被霧網捕捉後，從蝙蝠進入霧網的那面將蝙蝠小心從霧網移除，操作人員須配戴厚皮革手套以避免被蝙蝠咬傷(可使用大拇指輕壓迫蝙蝠下頷使其閉口，以防止咬人)。蝙蝠移除後，將其置入可束口的棉布袋中等待進行樣本採集(圖十六)。

蝙蝠捕捉數目到達設定目標後，可進行蝙蝠樣本採集。需將所採集的樣本內容紀錄於樣本收集表(表五)。蝙蝠樣本採集前需先收集蝙蝠基本資料(蝙蝠品種、重量、前臂長、耳長、性別、成體或幼體等；若發現所捕捉之蝙蝠懷孕，則不進行樣本收集，以滴管餵飼芒果汁後將蝙蝠釋放)，採集樣本包含外寄生蟲收集(使用有刷毛的筆沾取 70% 酒精，可短暫使外寄生蟲無法移動並可使用鑷子收集，並記錄每隻蝙蝠身上所發現外寄生蟲的數目)、口腔拭子、肛門拭子(或糞便；若蝙蝠體型過小，最小號的棉棒對於肛門來說過大時，則將棉棒輕拭肛門一圈來替代)、血液(並同時製作血液抹片；體型較大之蝙蝠，使用針輕戳前臂靜脈 antebrachial vein，而體型較小之蝙蝠，使用針輕戳 uropatagial vein，並使用微量吸管收集流出血液，紀錄收集血量，並將其作十倍稀釋；體型較小之蝙蝠可收集血液量有限，則不製備血液抹片。)。待蝙蝠採集完所有樣本後，使用滴管餵飼芒果汁後將蝙蝠釋放(圖十七~二十)。



圖十三、*Eonycteris spelaea*。



圖十四、蝙蝠棲息於高架高速公路橋面下。



圖十五、於棲息處下設置塑膠墊以收集蝙蝠尿液及糞便。



圖十六、可將蝙蝠暫時置於束口棉布袋，等待採樣。



圖十七、蝙蝠體重、前臂長及耳長量取。



圖十八、蝙蝠口腔及肛門拭子採集。



圖十九、蝙蝠血液採集。



圖二十、樣本收集完畢後，給予蝙蝠餵飼芒果汁後釋放。

表五、蝙蝠樣本紀錄表。

Bat Collection				Collector		Sheet			
				Site		Date			
				Collection Number					
Bat # & Species	Sample #	Sample Type	Qty		Bat # & Species	Sample #	Sample Type	Qty	
Net #:					Net #:				
Time:					Time:				
Age: J SA A				RW LW 1 2 3 4 5 Band Number:	Age: J SA A				RW LW 1 2 3 4 5 Band Number:
Sex: M F				Blood Smear Y N	Sex: M F				Blood Smear Y N
Forearm:				Comments:	Forearm:				Comments:
Ear:					Ear:				
Weight:					Weight:				
Bat # & Species	Sample #	Sample Type	Qty		Bat # & Species	Sample #	Sample Type	Qty	
Net #:					Net #:				
Time:					Time:				
Age: J SA A				RW LW 1 2 3 4 5 Band Number:	Age: J SA A				RW LW 1 2 3 4 5 Band Number:
Sex: M F				Blood Smear Y N	Sex: M F				Blood Smear Y N
Forearm:				Comments:	Forearm:				Comments:
Ear:					Ear:				
Weight:					Weight:				

Sample Key \* B = blood ; F = feces ; A = anal swab ; O = oral swab ; P = punch ; E = ectoparasite ; U = urine

## 2. *Rhinolophus Lepidus*(圖二十一)

為小翼手目蝙蝠，又稱為 horseshoe bat，捕捉地點為 Bukit Timah(武吉知馬)自然保護區，於此進行蝙蝠之捕捉，需先得到國家公園處及其他相關單位的許可。日落前於蝙蝠飛行路徑中架設豎琴網，人員離開並於夜間再次進行觀察並收集所捕捉的蝙蝠(圖二十二)。將蝙蝠由捕捉袋中移入可束口之棉布袋中，等待進行採樣，採樣流程如上文所提及。可觀察到 *Rhinolophus Lepidus* 特殊的鼻部構造，且由於屬小翼手目蝙蝠可見其體型相較於其他大翼手目之蝙蝠來的小。



圖二十一、*Rhinolophus Lepidus*，可觀察其特殊之鼻部構造。



圖二十二、於蝙蝠行進路徑架設豎琴網，所捕捉之蝙蝠位於捕捉袋內。

## 3. *Penthetor lucasi*(圖二十三)

為大翼手目蝙蝠，捕捉地點為 Bukit Timah(武吉知馬)自然保護區。於日落前將豎琴網設置於蝙蝠所棲息之洞穴出入口，並做適當偽裝，人員離開並於夜間再次進行觀察並收集所捕捉的蝙蝠(圖二十四)。



圖二十三、*Penthetor lucasi*。



圖二十四、於蝙蝠棲息之洞穴出口架設豎琴網。

#### 4. *Cynopterus brachyotis*(圖二十五)

為大翼手目蝙蝠，捕捉地點為 Kent Ridge Park 肯特岡公園。由參與訓練之成員進行霧網之架設，於天橋一側架設兩個霧網，並使用預錄之蝙蝠叫聲以增加捕捉成功率(圖二十六)。由於 *Cynopterus brachyotis* 性情較暴烈、易咬人，操作人員需特別注意避免咬傷。於口腔拭子收集時，蝙蝠容易咬住不放，可利用木棒輕觸蝙蝠嘴角周圍以利棉棒之移除。



圖二十五、*Cynopterus brachyotis*。

圖二十六、本次參與訓練人員進行霧網之架設。

#### (七) 實驗室操作

實驗室操作主要於 Duke-NUS 9 樓 Emerging Infectious Diseases 實驗室進行。9 樓樓層共分兩部分，人員辦公區及實驗室，實驗室區域皆位於負壓區，人員進出皆需管控。

##### 1. 蝙蝠解剖

新加坡動物園會將民眾送樣或是園內死亡之蝙蝠送至 EID 實驗室進行解剖採樣。蝙蝠解剖前，需先收集蝙蝠基本資料(蝙蝠品種、重量、前臂長、耳長、性別、成體或幼體等)(圖二十七)，將蝙蝠以針頭固定於保麗龍板上進行解剖，採集各臟器分別置入兩管收集管(含 PBS 用以保存於-80°C 冰箱；含 lysis buffer 及陶珠用以組織均質及核酸萃取用)(圖二十八)。核酸萃取後，使用分子診斷方法診斷相關病原。



圖二十七、欲解剖蝙蝠之基本資料收集 圖二十八、蝙蝠以針頭固定於保麗龍板上進行解剖及組織採樣。

## 2. 外寄生蟲解剖

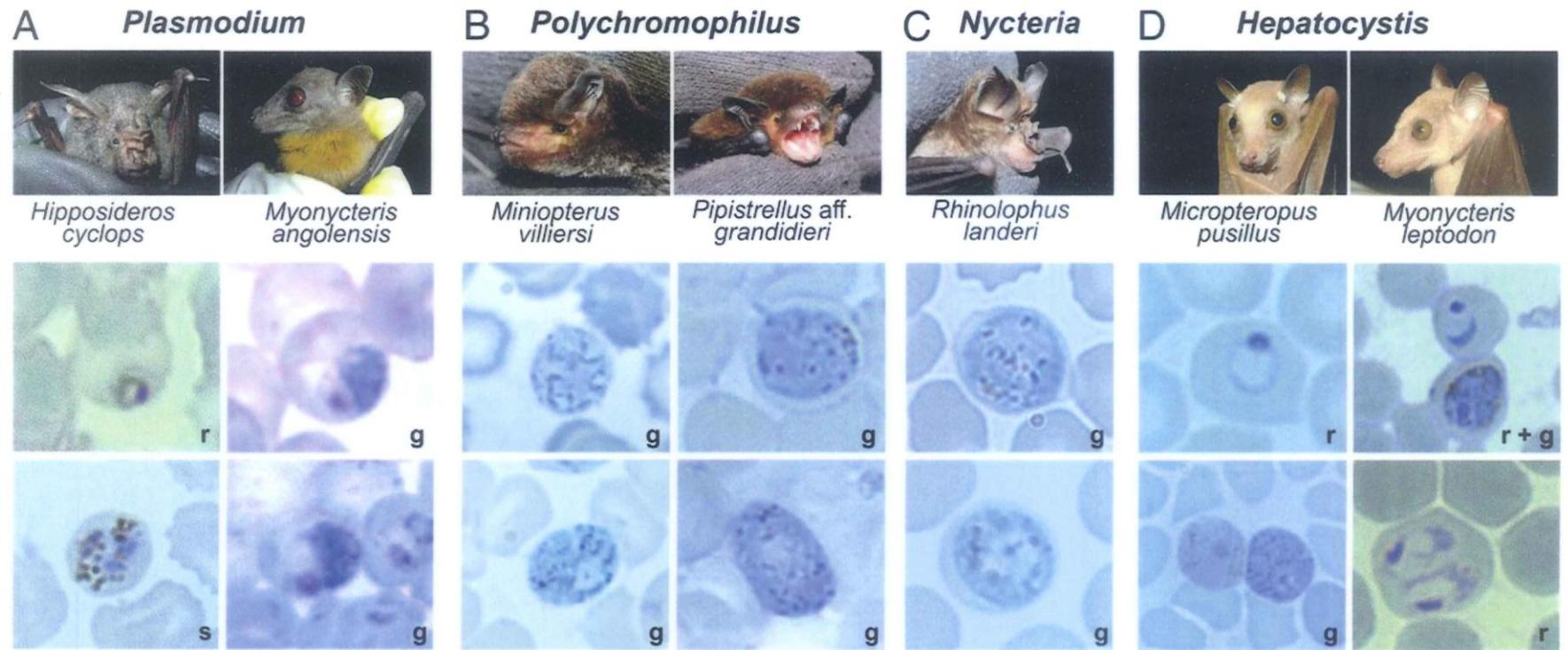
為了瞭解外寄生蟲媒介病原於蝙蝠攜帶病原的關聯性，需進行外寄生蟲解剖（以便於保存完整蟲體用以未來鑑別外寄生蟲品種用）（圖二十九）。外寄生蟲解剖於解剖顯微鏡下進行，使用精密解剖刀將外寄生蟲腹部切開，收集腹部臟器以進行核酸萃取（圖三十）。核酸萃取後，使用分子診斷方法診斷相關病原。



圖二十九、於解剖顯微鏡下進行外寄生蟲解剖。 圖三十、以解剖刀切開外寄生蟲腹部後，收集腹部臟器進行後續試驗。

## 3. 血液抹片觀察

將先前與野外所製作之蝙蝠血液抹片進行染色及觀察，觀察血液寄生蟲。可參考相關文獻所提供各種蝙蝠血液寄生蟲型態觀察參照圖（圖三十一）。



圖三十一、蝙蝠血液寄生蟲型態觀察。

#### 4. 樣本核酸萃取

使用自動核酸萃取儀(利用 vacuum system 來萃取)萃取樣本 total NA, 後續萃取出之核酸可使用機械手臂進行聚合酶鏈反應試劑之配置, 並可協助直接加入樣本。

#### 5. 反轉錄/聚合酶鏈反應

使用特異性引子進行不同科病毒的分子診斷。依據收集的樣本, 分別針對特異病原進行監測。如由蝙蝠血液所萃取出之 DNA 可用來監測 bat malaria。口拭、肛拭或臟器所萃取出之核酸, 可依據病原特性使用特異性引子來監測。

#### 6. 血清學-ELISA

可利用 ELISA 監測蝙蝠血液內特定病原的抗體, 來監控蝙蝠媒介相關病原。本次利用 EID 實驗室自行研發所製成之 ELISA, 可同時偵測兩種病原特異性抗體, 分別為 Reovirus 及 Rhabdovirus。96 孔盤於試驗前已 coating Reovirus 及 Rhabdovirus 抗原。待測樣本為已 10 倍稀釋的蝙蝠血清, 加入待測血清使其與抗原盤作用, 於 37°C 感作 30 分鐘。以清洗液清洗 3 次後, 加入二抗(rabbit anti-Protein A/G HRP)後於 37°C 感作 30 分鐘。再以清洗液清洗 3 次後, 加入呈色劑, 待反應孔呈現藍色後加入終止液, 使用 450nm 波長進行樣本分析。

### 三、 心得與建議

感謝農委會及本所長官提供本次珍貴機會以參加本次訓練課程，感謝新加坡杜克大學 Emerging Infectious Diseases 實驗室舉辦本次訓練及 Mr. David Trudil 與 Mrs. Mary Ann Wo 於協助參與本次訓練及聯繫等幫助，並由衷感謝 Dr. Linfa Wang、Dr. Ian H Mendenhall、Dr. Benjamin Lee 等指導訓練人員於本次訓練期間所給予的幫助及指導。

本次參加第一階段「蝙蝠媒介傳播之人畜共通新興傳染病訓練課程」，課程內容簡要介紹蝙蝠媒介疾病及蝙蝠於媒介病原傳播的重要性，蝙蝠分布遍布全球且至今已被證實有超過 15 個病毒科的病毒可從蝙蝠身上分離出來，且蝙蝠具有飛行能力，對於蝙蝠媒介疾病之傳播相當重要。本次課程內容主要著重於操作人員生物安全及野外蝙蝠捕捉與操作。並經由實際進行野外捕捉網架設、蝙蝠捕捉操作、樣本採集使成員更能了解野外採樣操作的重點。相關心得整理如下：

- 推動國際疾病監控合作及分享

各國對於蝙蝠媒介病原所進行之研究及監測較為有限，本次訓練課程舉辦目的為期望各國參與訓練人員於接受此課程後，可於國內展開蝙蝠媒介疾病之監測及研究。並希望藉由此種訓練課程促進國際間成員對於蝙蝠媒介病原的監控及訊息交流間的合作，訓練期間並與參與訓練的各國人員交流國內對於蝙蝠媒介疾病的監測活動，多數參與成員國內蝙蝠媒介病原主要著重於狂犬病之監測，泰國及喬治亞國內皆已建立蝙蝠團隊赴野外進行蝙蝠捕捉及樣本採集，菲律賓派員參與此訓練並預計人員結訓後將負責國內蝙蝠團隊的建立及蝙蝠媒介疾病監控。喬治亞國內檢測機構與美國疾病管制中心之狂犬病診斷實驗室有密切合作，會將喬治亞國內所捕捉蝙蝠樣本寄送至該中心進行疾病檢測。台灣地區蝙蝠疾病監測之情況，本所自民國 97 年與台灣蝙蝠學會合作進行蝙蝠狂犬病及麗莎病毒監測，檢測樣本來源為民眾拾獲或是主動採樣，迄今檢測結果皆為陰性。本次訓練課程中提及全球交通日趨便捷，疾病傳播已無國界，故疾病監測及預防已非以往單獨國

家各自監控及控制即可。因應疾病快速傳播，各國疾病監測分享及疫情透明化勢在必行，更需要積極推動國際間疾病監測及研究合作的交流。

- 統整各領域學者進行研究合作

本次訓練舉辦單位為新加坡杜克大學 Emerging Infectious Disease 實驗室，該實驗室集聚不同學術背景及領域的專家，包括生物學專家、病毒學專家、生態學專家、生物統計學專家等，依據學術專長分別進行野外採樣、實驗室操作、結果分析、數據統整、生物資訊學分析，並將其所得數據統整而得完整資訊。訓練課程中分享過去於漢他病毒案例中，成功匯集了不同學術專長的學者(人醫、病毒學專家、哺乳動物學專家、流行病學專家等)進行密切合作，成功證實漢他病毒如何自鹿鼠傳播給人，並成功發展出預警系統以警告人們何時為漢他病毒易爆發季節。不同專長的學者密切合作，可揚長補短，彼此發表及交流意見，更有利於疾病及科學研究。

- 完善實驗室流程及樣本儲存

本次訓練課程由於參與人員需經手野外蝙蝠操作，故該野外蝙蝠操作課程需先經過新加坡杜克大學實驗動物照護及使用委員會(IACUC)審查，審查通過後才可進行野外蝙蝠捕捉，且參與人員需進行新加坡杜克大學的實驗動物照護及使用之線上教學並經測試合格後才可參與野外蝙蝠捕捉。從此可了解新加坡杜克大學於動物福祉的落實之嚴謹。

實驗室人員進行野外樣本採集已建立完善且固定之流程，野外所採集之樣本需經由實驗室所建立之既定編碼歸檔並儲存於妥善規劃之冰箱空間內，並需填寫線上文件，以便於未來資料追蹤用。

- 培養大眾正確觀念

由於新加坡地窄人稠，蝙蝠群聚地與人類活動居住地重疊，本次分別於公園

附近及國家公園進行野外蝙蝠捕捉，蝙蝠捕捉時偶遇民眾詢問時，訓練指導人員會向民眾解釋為何需進行蝙蝠捕捉，主要是為了監控蝙蝠媒介疾病，並教導民眾蝙蝠雖會媒介疾病，但對於花果繁衍、害蟲控制等方面亦有助益，故無須過度害怕蝙蝠，因為該實驗室有定期進行蝙蝠媒介疾病之監控。

本次赴新加坡參與此訓練期間，了解各國對於蝙蝠媒介病原的監控情形，國內對於蝙蝠媒介病原監控的尚有不足(除了狂犬病外，立百病毒、亨德拉病毒、及 SARS-CoV-like 病毒等高病原性疾病之病原亦會經由蝙蝠所傳播，蝙蝠亦被懷疑是否可媒介現今中東所流行之 MERS 冠狀病毒)，希望藉由此研習所得之經驗及實際野外蝙蝠捕捉操作經驗用以進行國內蝙蝠媒介病原的監控。第二階段「蝙蝠媒介傳播之人畜共通新興傳染病訓練課程」預計於明(年)第一季舉辦，課程內容預計著重於 P3 實驗室操作，於實驗室針對蝙蝠媒介病原進行操作。

四、 附圖



圖一、本次訓練舉辦地點為新加坡杜克大學(Duke-NUS)。



圖二、參與本次訓練課程成員與指導人員。



KETEVAN SIDAMONIDZE  
Georgia



LELA URUSHADZE  
Georgia



NISREEN DAIFALLAH AL-HMONDE  
Jordan



ANDREAS VELASCO-VILLA  
USA



SUPAPORN WACHARAPLUESADEE  
Thailand



CATALINO S. DEMETRIA  
Philippine

SIMON EDSON MICHAEL MANGUBAT  
Philippine



圖三、各國參與此次練課程人員。



Linfa Wang



Ian H Mendenhall



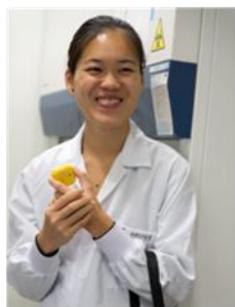
Benjamin Lee



Erica Sena Neves



Sophie Borthwick



Dolyce Low



圖四、負責本次訓練課程之指導人員及餐敘合照。



圖五、新加坡杜克大學 EID 實驗室之一隅。



圖六、Dr. Linfa Wang 進行課程講解。



圖七、進行野外蝙蝠捕捉時，需懸掛該告示牌表示此試驗已經過  
相關單位審查通過。