

出國報告(出國類別：考察)

## 赴德國豬瘟診斷參考實驗室訪問及 交流

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱：鄧明中副研究員、張家宜副研究員

派赴國家：德國

出國期間：104年9月5日至104年9月17日

報告日期：104年11月27日

## 內容摘要

豬瘟 (Classical swine fever) 為豬隻重要之傳染病，是由豬瘟病毒 (Classical swine fever virus; CSFV) 所引起之高傳染性與高致死性疾病，一旦爆發疫情常造成重大之經濟損失。本所刻正積極規劃成立世界動物衛生組織 (World Organization for Animal Health; OIE) 豬瘟參考實驗室，於104年9月5日至17日派員赴德國參訪漢諾威獸醫大學之歐盟 (EU Reference Laboratory; EURL) 暨 OIE 豬瘟參考實驗室及德國 Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) 機構之國家豬瘟參考實驗室。研習內容包含細胞培養、病毒分離與血清學檢測技術，及進一步對本所研發之豬瘟同步多重螢光標示探針應用於區別不同基因型豬瘟病毒之診斷技術做測試。經由參訪兩處參考實驗室，可了解參考實驗室任務、運作及作業流程，並藉由此次參訪與兩處參考實驗室建立合作交流管道，對於本所申請 OIE 參考實驗室助益良多。

## 目 次

壹、目的.....	4
貳、行程安排.....	5
參、考察過程.....	6
肆、心得及建議.....	11
附錄.....	13

## 壹、目的

豬瘟是引起豬隻重大死亡的重要法定疾病，一旦爆發常造成重大經濟損失，有鑒於此，世界動物衛生組織(World Organization for Animal Health; OIE)將此病列為重大動物疾病之一。在台灣自使用 LPC 兔化豬瘟疫苗後，豬瘟已被有效控制，然而國內豬場仍有豬瘟發生及傳播的可能性。欲自豬場將豬瘟清除，除了持續使用現行疫苗與有適當免疫計畫外，尚須其他配套措施，如在疾病發生時及時且正確診斷，而在建立與執行豬瘟撲滅計畫中，亦須有優良的診斷與監測技術支援。我國對於豬瘟的研究與診斷已有多年經驗，研究成果也廣為世界各國所接受，然而卻缺乏被 OIE 認可之豬瘟參考診斷實驗室，在豬瘟防疫上未能對國際學術或亞太區域國家有更多貢獻。因此，我們希望能夠經由考察德國漢諾威獸醫大學之歐盟(EU Reference Laboratory; EURL)暨 OIE 豬瘟參考實驗室及德國 Friedrich-Loeffler-Institut(FLI)機構之國家豬瘟參考實驗室，能更深入瞭解 OIE 參考實驗室之任務與運作，並藉由此次參訪與兩參考實驗室建立合作交流管道，對於本所申請 OIE 參考實驗室助益良多，期能完成實踐我國成為 OIE 重要動物傳染病參考實驗室一員之目的。

## 貳、行程安排

本次赴德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室及德國 Friedrich-Loeffler-Institut(FLI)機構之國家豬瘟參考實驗室參訪，自民國 104 年 9 月 5 日至 104 年 9 月 17 日止共 13 天（詳如行程表）。

### 行 程 表

月 日(星期)	內容	地點
9 5 (六)	啓程赴德國漢諾威	桃園
9 6 (日)	到達德國漢諾威	德國漢諾威
9 7 (一)	漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟 參考實驗室參訪 雙方座談、實驗室簡介	德國漢諾威
9 8 (二)	漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟 參考實驗室參訪 研習細胞培養與血清學檢測技術	德國漢諾威
9 9 (三)	漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟 參考實驗室參訪 對本所研發豬瘟同步多重螢光標示探針應用於 區別診斷不同基因型別豬瘟病毒之診斷技術做 測試	德國漢諾威
9 10 (四)	漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟 參考實驗室參訪 研習血清學檢測之判讀	德國漢諾威
9 11 (五)	漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟 參考實驗室參訪 研習豬瘟病毒分離技術	德國漢諾威
9 14 (一)	Friedrich-Loeffler-Institut 機構之 國家豬瘟參考實驗室參訪	德國 Greifswald
9 15 (二)	Friedrich-Loeffler-Institut 機構之 國家豬瘟參考實驗室參訪	德國 Greifswald
9 16 (三)	回程	德國 Greifswald
9 17 (四)	返國	桃園

## 參、考察過程

### 一、德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室

#### (一)、OIE 參考實驗室介紹

迄 2015 年，OIE 總計認可 252 間診斷參考實驗室，這些實驗室分佈在 39 個國家，診斷疾病別涵蓋 118 個疾病。OIE 參考實驗室被賦予任務包含：

1. 依據 OIE 發佈標準，使用、推廣及發布診斷方法
2. 對 OIE 提供建議指定與替代試驗或疫苗供作製定標準之參考
3. 依據 OIE 公佈標準研發與儲備參考試劑，以協助實施及推廣 OIE 標準
4. 儲備疾病診斷試驗與相關產品並分配給國家實驗室
5. 建置、標準化及確效 OIE 新疾病診斷標準
6. 提供診斷試驗設施，對於 OIE 會員國提供動物疾病防治措施之科學及技術建議
7. 與其他實驗室或組織建立科學性與技術性之合作管道
8. 蒐集、處理、分析、出版及公布與疾病診斷有關之流行病學資料
9. 對 OIE 會員國提供實驗室人員訓練
10. 維持品質保證系統與病原之生物安全
11. 代表 OIE 籌辦及參加技術性會議
12. 建立與維持 OIE 參考實驗室網絡，籌辦 OIE 參考實驗室間及與其他實驗室間之確效試驗，以確保診斷結果之品質
13. 為 OIE 提供諮詢服務

#### (二)、德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟診斷參考實驗室介紹

OIE 共認可五間豬瘟參考實驗室，分別位於德國、英國、加拿大、波蘭與日本。其中位於德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室（圖一）隸屬於獸醫大學（University of Veterinary Medicine）傳染病學系

(Department of Infectious Diseases) 的 Institute of Virology，成立歷史最為悠久，在豬瘟診斷與研究上皆位於領導地位。實驗室負責人為所長 Prof. Dr. Paul Becher，實驗室分為病毒學/血清學部門、分子生物診斷部門、品管部門、動物照顧、行政人員等，服務人員包含獸醫師、研究人員與技術人員共十六人（圖二）。

### (三)、漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟診斷參考實驗室座談與報告

參訪第一天安排座談，Dr. Sophia Austermann-Busch 介紹歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室（圖三）、Dr. Alexander Postel 簡報參考實驗室的豬瘟研究（圖四），我方部分簡報「台灣豬病之現況」（圖五）與「台灣豬瘟之研究」（圖六）。

### (四)、研習「豬瘟病毒血清學檢測技術」

參訪行程安排上，於出發前多次與 Dr. Sophia Austermann-Busch 討論本次參訪與研習需求，在為期一週參訪排定兩個研習重點，分別為「豬瘟病毒血清學檢測技術」與「對本所研發豬瘟同步多重螢光標示探針應用于區別診斷不同基因型別豬瘟病毒之診斷技術做測試」。

#### 1. 細胞培養

技術人員示範操作細胞之培養與繼代，包含 PK-15 與 SK-6 豬腎臟細胞。

#### 2. 血清中和試驗

將待測血清加入 96 孔盤，連續稀釋後，加入力價 100 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l 豬瘟病毒，於 37°C 培養箱感作一小時後，再加入剛消化的細胞，於 37°C 培養箱感作三天。

#### 3. 血清中和試驗染色

將 96 孔盤細胞固定後，加入豬瘟病毒抗血清作為一級抗體，於 37°C 培養箱感作一小時後，再加入標示 peroxidase conjugate 作為二級抗體，

於 37°C 培養箱感作一小時後，加入呈色劑判讀。

#### 4. 血清中和力價判讀

在顯微鏡下可看到病毒增殖所形成的病毒斑，判讀血清連續稀釋所抑制病毒生長的稀釋倍數，則為血清之中和力價。Dr. Sophia Austermann-Busch 並與我們分享如何判定豬瘟病毒與其他同屬於瘟疫病毒屬(pestivirus)的病毒，如牛病毒性下痢病毒(Bovine viral diarrhea virus; BVDV)與邊境病病毒(Border disease virus)之血清中和力價是否有交叉反應，據 Dr. Austermann-Busch 解說若待測血清的豬瘟病毒血清中和力價較其他病毒的血清力價低三倍，則判定為交叉反應，可排除豬瘟病毒抗體陽性。舉例而言，若牛病毒性下痢病毒血清中和力價為 240 倍，而豬瘟病毒中和力價只要低於 80 倍，即可排除豬瘟病毒抗體陽性。

#### 5. 病毒分離

將病材分為原液與十倍稀釋液，個別接種於細胞，培養於 37°C 培養箱感作三天，再將上清液轉到 24 孔盤進行第二次感作，之後依照上述染色方式檢測是否有病毒。

### (五)、對本所研發「豬瘟同步多重螢光標示探針應用于區別診斷不同基因型別豬瘟病毒之診斷技術」做測試

此次本所於參訪德國歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室的同時，也趁這樣難得的機會，測試本所所研發之豬瘟同步多重螢光標示探針區別診斷不同基因型別豬瘟病毒之新診斷技術（圖七）。由於本所目前僅收集台灣田間三種不同基因亞型之病毒株，為求慎重診斷不致因測試不全以致疏漏，特於該參考實驗室測試其所收藏計九種不同基因亞型共二十五株之豬瘟病毒核酸，測試結果有部分基因型別無法被偵測，故未來仍需調整與修正反應條件。



Dr. Alexander Postel 並與我們經驗分享診斷實驗室的品質管理經驗 (圖八)，據 Dr. Postel 表示每次進行檢驗均會完整記錄所有的診斷步驟與檢測結果，這些記錄將會保存十年。參考實驗室人員除每年定期接受訓練外，實驗室會定期舉辦人員能力比對測試，以確保每位工作/操作人員所進行的步驟與判讀標準是一致的。

## 二、Friedrich-Loeffler-Institut 機構之國家豬瘟參考實驗室介紹

### (一)、Friedrich-Loeffler-Institut 機構介紹

FLI 機構成立於 1910 年，為全球最早成立的病毒試驗機構。FLI 的任務為增進動物的健康與福利，保護人類免受人畜共通傳染病的危害。機構目的為快速診斷技術與預防措施之改善、提供相關資訊以供動物疾病與人畜共通傳染病控制策略之擬訂。FLI 總部位於 Greifswald 的 Insel Riems 島上 (圖九)，FLI 另擁有四個分所。FLI 編制有十一個 Institute，包含 Institute of Diagnostic Virology、Institute for Bacterial Infections and Zoonoses、Institute of Epidemiology、Institute of Immunology、Institute of Infectology、Institute of Molecular Pathogenesis、Institute of Molecular Virology and Cell Biology、Institute of Novel and Emerging Infectious Diseases、Institute of Farm Animal Genetics、Institute of animal Nutrition、Institute of Animal Welfare and Animal Husbandry，研究範疇涵括病毒疾病、細菌疾病、人畜共通疾病、流行病、免疫、分子病毒與細胞生物、新浮現疾病、經濟動物基因體、營養、動物福利等。FLI 另有一個部門，Department of Experimental Animal Facilities and Biorisk Management 負責實驗動物的管理與生物安全。FLI 並有一個工作小組，Biomathematics working group 負責數學與電腦的生物統計，以分析試驗與田間研究之數據。

FLI 共有七十五個國家參考實驗室，其中有七個為 OIE 參考實驗室，分

別為家禽流行性感冒(Avian Influenza)、新城病(Newcastle Disease)、牛皰疹病毒第一型(Bovine Herpesvirus 1)、狂犬病(Rabies)、布氏桿菌(Brucellosis)、披衣菌症(Chlamydiosis)及馬鼻疽(Glanders)，其中新城病參考實驗室亦是世界糧農組織(Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO)認可之參考實驗室。國家豬瘟參考實驗室隸屬於 Institute of Diagnostic Virology，所長為 Prof. Dr. Martin Beer，實驗室負責人為 Dr. Sandra Blome (圖十)。

### (二)、Friedrich-Loeffler-Institut 機構之國家豬瘟參考實驗室考察

此次參訪 FLI 行程較緊湊僅有兩天，故安排位於 Greifswald 之 Insel Riems 島上的總所之參訪。參訪第一天由 Dr. Sandra Blome 介紹 FLI 機構與豬瘟參考實驗室，Dr. Christoph Staubach 報告豬瘟與非洲豬瘟在德國的監控。參訪第二天與 Dr. Sandra Blome 討論德方與台方的豬瘟研究成果與進展。

### (三)、豬瘟在德國的控制、撲滅與監控

Dr. Christoph Staubach 為 Institute of Epidemiology 的研究人員，為我們簡報德國在豬瘟控制、撲滅及監控。在豬瘟的控制上，豬場飼養豬於 1993 年就停止施打疫苗，野豬則為 2002 年開始施打疫苗，於 2012 年停止施打。Dr. Christoph Staubach 認為欲撲滅豬瘟，豬場飼養豬的豬瘟抗體陽性率須達 80~90%，野豬豬瘟抗體陽性率須 60%。在豬瘟的撲滅上，德國於 2012 年宣布撲滅豬瘟，其中豬場飼養豬於 2006 年最後一個病例後就成功撲滅，而野豬由於控制較為不易，則是到 2009 年最後一個病例後完全撲滅。在豬瘟的監控上，每年會安排獸醫至豬場訪查兩次，觀察是否有臨床上異常豬隻，以及豬場是否有流產率增加或懷孕率減少的情形，採樣時不採用隨機採樣，只採生病的豬隻作豬瘟的監控。

### (三)、豬瘟與非洲豬瘟的研究

豬瘟與非洲豬瘟實驗室負責人 Dr. Sandra Blome，向我們簡報豬瘟與非洲豬瘟的研究。非洲豬瘟現有中間毒力的病毒株，臨床症狀已不像早期在教科書所描述般有大量血便、脾腫大等典型症狀與病變。豬瘟與非洲豬瘟在豬隻的攻毒試驗顯示，兩者感染所誘發的臨床症狀十分相近。此外從未在同一隻豬隻上同時分離到豬瘟與非洲豬瘟。

### 肆、心得及建議

- 一、欲建立參考實驗室，必須仰賴多個機構擁有共同的意志與共識方能成形。從此次參訪德國歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室及德國國家豬瘟參考實驗室所得經驗，了解到參考實驗室被賦予許多的任務以及責任。首先，由於參考實驗室必須肩負週邊，甚至世界其他國家疑似病例的最終確診工作，因此，許多的疑似或確認的病例樣品、血清甚至是活病毒都會送到參考實驗室，此時政府其他單位，以我國為例則為動植物防疫檢疫局必須同意接受這些檢體輸入我國，若因伴隨輸入存有風險而拒絕接受這類檢體輸入，這樣的情形將影響參考實驗室資格。因此，若我國有心成為 OIE 豬瘟參考實驗室，這樣的問題勢必先取得共識及解決之道，以利後續申辦事宜。
- 二、欲成立參考實驗室並非根據單一診斷能力而被認可，而須借由實驗室不斷地自我審查與檢討，並持續更新與反覆認證，以確保診斷結果無誤而來的。以此次參訪德國歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室所得其經驗分享為例，參考實驗室人員除每年定期訓練外，內部須持續對從事人員能力做比對測試，以確保每位工作及操作人員所進行的步驟與判讀標準是一致的，並非僅僅只是確認人員會依照標準作業流程操作而已。此外，參考實驗室更要自我嚴格要求，所有的診斷步驟與過程皆有完整的記錄及內部審查機制，並不斷地進行品管分析及品管控制，按時接受內部及外部查核，以確保實驗室診斷結果與品質。

- 三、此次參訪德國歐盟暨 OIE 參考實驗室及德國國家豬瘟參考實驗室獲得非常珍貴的成果，兩實驗室對於我國目前診斷豬瘟的技術與成果也給予許多肯定，並期望未來能繼續與我國保持聯繫及尋求合作的可能。欲成立豬瘟參考實驗室並非僅僅針對豬瘟病毒進行診斷，仍需對同屬豬瘟病毒的瘟疫病毒屬相關的病毒如：牛病毒性下痢病毒、羊邊境病病毒等都需建立完整的區別診斷技術及持續不斷研發診斷的方法，以求診斷結果正確無誤。
- 四、參考實驗室除平時肩負診斷任務之外，也需負責所有其他合作，及世界各國診斷實驗室平時訓練與每年一次的實驗室能力比對測試，甚至診斷所需之標準品及套組等診斷物資皆需備妥，並完成每批所有相關物資的品管測試後，分享及供應給其他實驗室使用。因此，成立 OIE 參考實驗室需耗費許多人力以及財力，這些經費以及人力、物資需求必須仰賴政府與其他相關單位擬定完整長期計劃來因應，一旦成立參考實驗室，不能因為經費短缺或其他因素而停止相關的服務，否則亦將會影響參考實驗室的資格。這一點非常值得我國政府參考，在申辦之前需完整考慮以及擬定長遠完整的規劃方足以因應。
- 五、此次本所於參訪德國歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室的同時，也趁這樣難得的機會，測試本所研發之豬瘟同步多重螢光標示探針區別診斷不同基因型別豬瘟病毒之新診斷技術。由於本所目前僅收集台灣田間三種不同基因亞型之病毒株，為求慎重並要求未來診斷不致因測試不全以致疏漏，於該參考實驗室測試其所收藏計九種各不同基因亞型之豬瘟病毒核酸，有些結果令人興奮，但也有部分結果未臻完美，仍需繼續修正，未來的測試需要引進相關病毒核酸基因 panel 以確保測試完善。希望未來國內相關實驗室需引進相關試驗病材時，應依引進之材料而有不同考量。為求更加提升診斷技術，也希望國內能儘速訂定相關法規以利樣材輸入與技術研發。

附錄：



圖一：德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室



圖二：與歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室人員合影。所長 Prof. Dr. Paul Becker (後排右一)、Dr. Sophia Austermann-Busch (後排左二)、Dr. Alexander Postel (後排左一) 與 Dr. Denise Meyer (前排左一)。



圖三：Dr. Sophia Austermann-Busch 介紹歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室



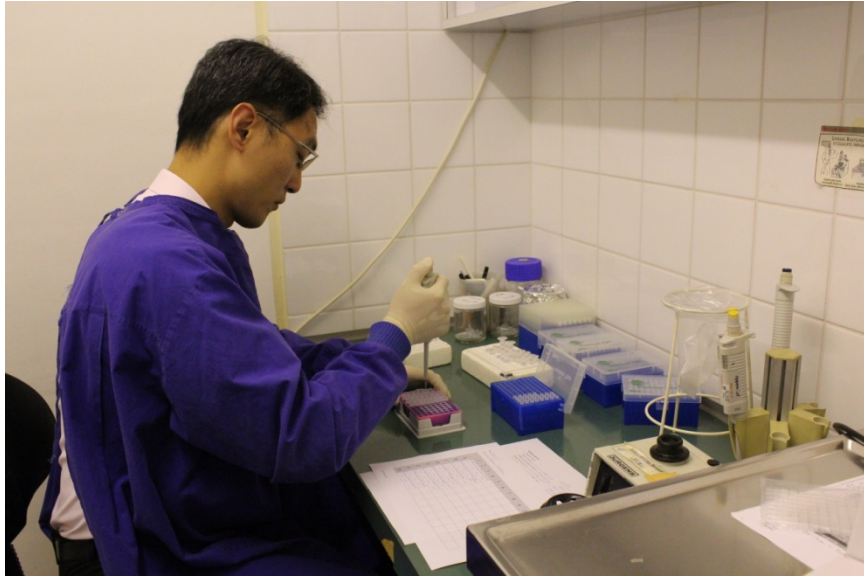
圖四：Dr. Alexander Postel 簡報歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室的豬瘟研究



圖五：鄧明中副研究員簡報「台灣豬病之現況」



圖六：張家宜副研究員簡報「台灣豬瘟之研究」



圖七：於歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室測試「本所研發豬瘟同步多重螢光標示探針區別診斷不同基因型別豬瘟病毒之診斷技術」



圖八：於歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室討論疾病診斷之品質管理





圖九：坐落於 Insel Riems 島上之 FLI 總所。照片取自 FLI 官網 (<http://www.fli.de/en/ueber-das-fli/the-fli/>)。



圖十：與 FLI 機構 Institute of Diagnostic Virology 所長 Prof. Dr. Martin Beer(右二)及國家豬瘟參考實驗室負責人 Dr. Sandra Blome(左二)合影