

出國報告（出國類別：考察）

赴西班牙研習非洲豬瘟診斷技術報告

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱：蔡國榮助理研究員

派赴國家：西班牙

出國期間：105 年 9 月 10 日至 105 年 9 月 18 日

報告日期：105 年 11 月 18 日

摘要

行政院農業委員會家畜衛生試驗所(以下簡稱本所)為執行非洲豬瘟 (African Swine Fever; ASF)診斷與監測業務，於 105 年 9 月 10 日至 18 日派遣豬瘟研究組蔡國榮助理研究員赴西班牙 Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA)的非洲豬瘟診斷實驗室研習非洲豬瘟診斷技術。CISA 非洲豬瘟診斷實驗室為歐盟與聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO)認定之非洲豬瘟參考實驗室，研習期間於三級實驗室學習檢體處理、競爭型 ELISA、間接免疫過氧化酶技術 (Indirect Immunoperoxidase technique；IPT)、即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction)，透過本次實地研習可增加對該實驗室及 ASF 診斷技術認識，有利於未來與 CISA 實驗室聯繫諮詢，及商討輸入 ASF 陽性對照(或標準)物質事宜，以建立本所 ASF 檢測技術與相關評估測試。

研習行程表

時間	行程	地點
9 月 10 日至 11 日	啟程飛往馬德里	9 月 11 日住宿：馬德里
9 月 12 日至 16 日	非洲豬瘟診斷技術研習課程 1. 檢體處理(實作) 2. 血清抗體檢測(實作) (1) ELISA 法 (2) Indirect Immunoperoxidase technique (IPT) 3. 病毒核酸檢測(實作) (1) DNA 萃取 (2) Real-time PCR 檢測 4. 白血球收集(觀摩)	● 研習地點：非洲豬瘟參考實驗室，隸屬於 Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) ● 住宿：馬德里
9 月 17 日至 18 日	返程飛回台北	

研習內容

Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA)簡介

CISA 隸屬 Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)，負責研發動物傳染病預防控制方法與環境衛生，位於馬德里東北方 Valdeolmos 村落。CISA 實驗室的試驗研究涵括病毒、疫苗及免疫學領域，包含新浮現人畜共通傳染病(西尼羅腦炎、流感)、重要動物疫病病毒(口蹄疫、豬瘟、非洲豬瘟、藍舌病)、病毒載體、核酸或胜肽疫苗、免疫調控等主題，其中非洲豬瘟診斷實驗室為歐盟與聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO)認定之非洲豬瘟參考實驗室，即本次提供技術研習的實驗室。CISA 主建築物樓高三層，實驗室及動物舍位於二樓，實驗室區域內有 BSL-3 及 BSL-3+ 實驗室，動物舍區域分為 BSL-2、BSL-3、BSL-3+房舍，一樓為廢水與廢棄物處理設施，三樓容納負壓與抽氣設施。實驗室與動物舍屬於管制區域，須持員工證通過辨識後方能進入，進入管制門後必須脫去個人衣物，更換實驗室衣物進入實驗室區域；動物舍區域另有指紋辨識系統，僅允許動物舍工作人員，含飼養人員、管理人員、病理人員，及部分實驗室人員(僅限於動物試驗期間)進入，人員必須接受半年訓練，才被授權進入工作或進行動物試驗。



圖一、CISA 實驗室標示牌



圖二、CISA 實驗室專家

非洲豬瘟簡介

非洲豬瘟病毒(African swine fever virus ; ASFV)是複雜的大型 DNA 病毒，具封套的 20 面體。ASFV 屬於 Asfviridae 病毒科，Asfivirus 屬，含有 28 個以上結構蛋白及 100 個以上感染性蛋白，感染性蛋白中至少一半以上會與感染豬或恢復豬的血清作用。病毒基因體約 170~192 kb，包含 125kb 的中央保留區及末端大小不一區域，變異區可轉譯成 5 個多基因群，造成病毒基因體的不同。目前只有一個血清型。病毒 VP72 的 C 端可用於分子流行病學研究，目前已發現 22 種以上基因型別。

ASF 感染可呈現多種症狀，由超急性、急性、慢性至無症狀的帶毒者皆有。豬是唯一會被 ASFV 感染的經濟動物，在歐洲，野公豬與野生豬種皆會被感染，在非洲的野生豬種，如 warthogs、bush pigs 與 giant forest hogs 對 ASFV 有抵抗力，只產生輕微或無臨床症狀，而成為 ASFV 儲主(reservoirs)。此外，*Ornithodoros* 屬的軟壁蝨(soft ticks)，特別是 *Ornithodoros moubata* 與 *Ornithodoros erraticus*，已被證實是 ASFV 的儲主與傳播媒介。ASF 潛伏期 4~19 天，病原性高的病毒株引起超急性或急性出血，以高熱、無食慾、皮膚與內臟出血、快速(4~10 天內)死亡為特徵，有時候，豬未及產生症狀即死亡，死亡率可達 100%。病原性稍弱的毒株引起症狀輕微，如輕微發熱、食慾降低、沉鬱，而不會懷疑是 ASF。毒力較低或不造成血球吸附的病毒有時主要造成亞臨床、無出血性感染，豬隻血清抗體會陽轉，有些動物肺臟會有病灶或皮膚創傷處或骨頭較突出區域有病灶。急性感染或慢性感染恢復後會持續感染而成為帶原者，目前對 ASFV 如何持續存在的機制尚不清楚。

單靠臨床或病灶檢查無法區分 ASF 與豬瘟，遇豬隻發生急性發熱與出血，須將前述 2 種疾病及細菌性敗血症列入考量，必須藉由實驗室檢查才能作區別。PCR

可在感染早期檢出 ASFV，遇有急性感染或慢性感染，病豬通常持續幾週有病毒血症，或當豬感染低毒力或中間毒力的病毒株，PCR 亦是有效檢測工具。目前無疫苗可使用，當檢出抗體表示先前有感染，抗體於感染首週出現，可持續很長時間，使得抗體檢測技術，如 ELISA、免疫墨點法(immunoblotting)或間接螢光抗體法，成為判定亞急性及慢性感染的有效方法。ASF 流行病學隨著在歐洲與非洲的流行模式差異而變複雜，ASF 傳播循環涵括飼養豬、歐洲野豬、非洲野豬、軟壁蝨。

非洲豬瘟診斷技術

本次研習期間於 BSL-3 實驗室學習檢體處理、競爭型 ELISA、間接免疫過氧化酶技術 (Indirect Immunoperoxidase technique; IPT)、即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction)，其中競爭型 ELISA 與 IPT 法用於 ASF 抗體檢測，而核酸檢測部分，ASF 診斷實驗室採用自行研發的即時聚合酶鏈鎖反應流程，可檢測大部分基因型別 ASFV，敏感性高於世界動物衛生組織 (OIE) 診斷手冊建議之即時聚合酶鏈鎖反應。茲將前述技術敘述如下

一、 檢體處理

檢體送到 CISA ASF 診斷實驗室時，必須進行登錄，樣本會被賦與一個辨識號碼 (identification number; ID number)，樣本分為 2 類，分別是血清學檢測樣本，如血清或未加抗凝劑的血液，病毒檢測樣本如 EDTA 抗凝血、血清、組織均質液、細胞培養液與軟壁蝨 (soft ticks)。組織種類包含脾臟、肺臟、腎臟、心臟、扁桃腺、淋巴結等。軟壁蝨樣本可放入液態氮運送至 CISA 實驗室。

實驗室人員必須在生物安全操作台內處理檢體，操作時必須穿戴操作服與手套，檯面上放置一缸消毒溶液，浸泡使用過耗材，器械浸泡後拭乾另行包裹，操作完成後送入滅菌鍋消毒。樣本處理步驟如下：

1. 凝結的血液(抗體檢測用)

- (1) 置於 37°C 感作 1 小時，移至 4°C 放隔夜
- (2) 去掉上層凝結血液，780g 離心 10 分鐘
- (3) 分裝血清至 1.5mL 微量管，標示 ID number，進行抗體檢測或存放 -70°C

2. 凝結的血液(病毒檢測用)

- (1) 置於 37°C 感作 1 小時，移至 4°C 放隔夜

- (2) 去掉上層凝結血液，780g 離心 10 分鐘
 - (3) 分裝血清至 1.5mL 微量管，加入抗生素，放 4°C 作用 1 小時，標示 ID number，進行病毒檢測或存放 -70°C
3. 組織
- (1) 使用無菌器械剪取組織，以 1X PBS PH7.2 製成 1/10 均質溶液或乳劑
 - (2) 1050g 離心 10 分鐘
 - (3) 收集上清液，以 0.45µm filter 過濾
 - (4) 分裝血清至 1.5mL 微量管，加入抗生素，放 4°C 作用 1 小時，標示 ID number，進行病毒檢測或存放 -70°C
4. 軟壁蝨樣本處理：本次實習期間無壁蝨樣本可供操作。原則上以研鉢研磨蟲體製成研磨液，經 5000g 離心 5 分鐘，收取上清液，進行病毒檢測或存放 -70°C。

二、血清抗體檢測

1. 競爭型 ELISA

使用商品化套組 (Ingenzim PPV Compac) 作抗體初檢，參照使用手冊作檢測與判讀。

ELISA 2 13/09/2016

Measurement count: 1 Filter: 450

	1	2	3
A	2,218	0,05	
B	2,21	0,05	
C	0,076	0,171	
D	0,102	0,166	
E	2,136	2,433	
F	2,121	2,485	
G	2,034	2,441	
H	2,06	2,52	

圖三、ASF 抗體初檢結果

2. 間接免疫過氧化酶技術 (Indirect Immunoperoxidase technique ; IPT)

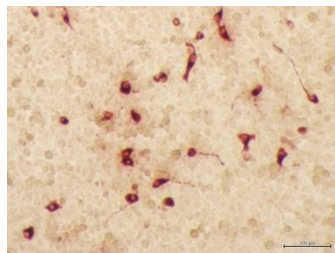
將接種 ASFV 病毒的猴源細胞(monkey cell)製成抗原盤，檢測 ELISA 初檢呈陽性或無法判定結果的血清，可作為抗體檢測確診方法。IPT 法經過 CISA 實驗室測試評估，及應用於大規模監測，其敏感性與特異性 98.2%及 98.95%。

步驟

- (1) 取出 IPT 抗原盤置於室溫解凍
- (2) 每孔加入 100 μ L blocking solution (PBS/0.05%Tween 20/milk 5%)放入 37°C 持續搖晃，感作 1 小時
- (3) 取一個 96 孔盤，使用 blocking solution 以 40:1 比例加入待側血清、對照血清(duplicate)，於 37°C 持續搖晃，感作 1 小時
- (4) 甩掉抗原盤內 blocking solution，移入 96 孔盤內待側血清、對照血清
- (5) 於 37°C 持續搖晃，感作 45 分鐘
- (6) 以 1XPBS wash 3 次(200 μ L/孔)，每次於 37°C 搖晃 5 分鐘
- (7) 每孔加入 100 μ L conjugate (1/5000 in blocking solution)
- (8) 於 37°C 持續搖晃，感作 45 分鐘
- (9) 以 1XPBS wash 3 次
- (10) 移入化學操作櫃加入 50 μ L substrate (300 μ L stock solu, 5 μ L H₂O₂ in 5mL acetate buffer)
- (11) 於操作櫃加入 PBS
- (12) 顯微鏡下判讀

陽性樣本：細胞質染成紅色，染色形狀不一定

陰性樣本：細胞質無染色



圖四、ASF 抗體陽性檢體



圖五、ASF 抗體檢測陰性對照

三、 病毒核酸萃取

使用 High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics) 萃取 ASF 病毒核酸，可用於 EDTA 抗凝血、血清、組織均質液、細胞培養液與軟壁蟲。

專家提醒需記錄核酸萃取套組的批號及有效日期，以便後續出現問題時回溯除錯。

步驟

1. 取 1.5mL 微量離心管，加入 200 μ L binding buffer、40 μ L proteinase K (20mg/mL)
2. 加入 200 μ L 檢體，另取 2 支微量管，分別放陽性對照與陰性對照，將管子內樣本與試劑混勻，移於 72°C 作用 10 分鐘
3. 短暫離心
4. 加入 100 μ L isopropanol
5. 取出 High pure filter tube 與 collection tube，套好，將上述液體移入上方 filter tube
6. 8000 rpm 離心 1 分鐘
7. 更換新 collection tube
8. 加入 500 μ L inhibitor Removal buffer，8000 rpm 離心 1 分鐘
9. 更換新 collection tube
10. 加入 450 μ L wash buffer，8000 rpm 離心 1 分鐘
11. 更換新 collection tube，重複 wash 步驟
12. 更換新 collection tube，13000 rpm 離心 10 秒鐘，移除殘留 wash buffer
13. 將 filter tube 套入新 1.5mL 微量管
14. 加入 50 μ L 經 72°C 預熱的無菌水，8000 rpm 離心 1 分鐘
15. DNA 可暫放於 4°C，稍後進行 PCR 檢測或保存於 -20°C

四、 病毒核酸檢測

CISA 實驗室採用自行研發的即時聚合酶鏈鎖反應流程，可檢測大部分基因型別 ASF，敏感性高於世界動物衛生組織 (OIE) 診斷手冊建議之即時聚合酶鏈鎖反應。透過 VP72 基因特異性引子 ASF-VP72-F (5'-cccaggrgataaaatgactg -3')、ASF-VP72-R (5'-cactrgttccctccaccgata -3') 搭配 UPL- probe (Roche Applied Science)，

達到特異性偵測，進而判定是否含 ASFV DNA。

步驟

1. 配製 Master Mix

step	reagents	1X volume (μL)	Final concentration
1	H ₂ O	7	
2	Master mix (2X)	10	1X
3	Primer ASF-VP72-F (20μM)	0.4	0.4μM
4	Primer ASF-VP72-R (20μM)	0.4	0.4μM
5	UPL- probe (10μM)	0.2	0.1μM

2. 分裝至 0.2 mL PCR tube

3. 加入 2μL DNA template，檢測樣本時，必須放陽性對照(ASFV DNA)、陰性對照(蒸餾水)
4. Spin down the PCR mix，移置於 real-time thermocycler 進行反應及讀取螢光 (at the end of each cycle)

PCR step	Temperature	Time	Number of cycles
Activation of DNA polymerase	95°C	5 min	1
DNA denaturation	95°C	10 sec	45
Primer annealing/elongation	60°C	30 sec	

分析與結果判讀

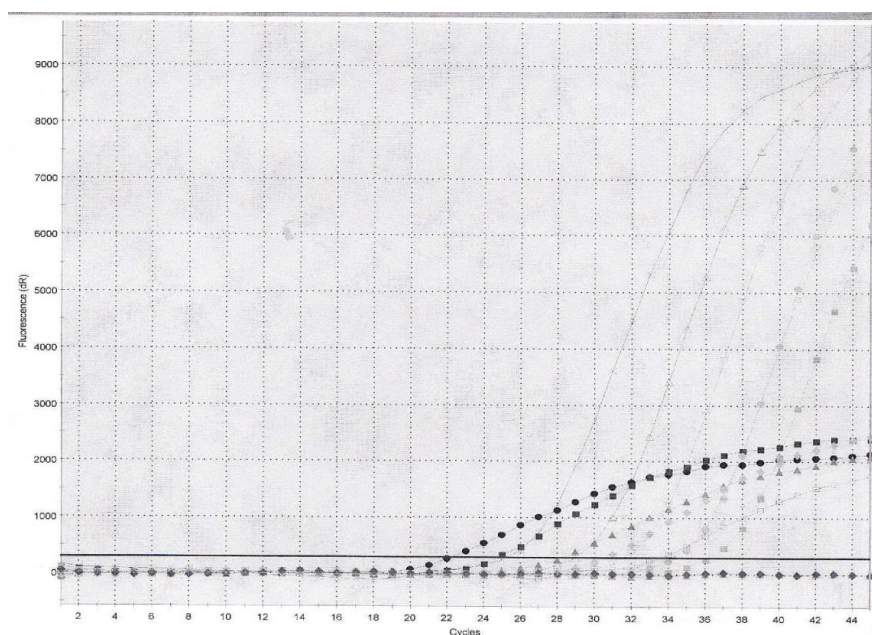
1. 陽性對照 Ct value 必須為 30~36，陰性對照必須 ≥ 40 ，則此次 PCR 反應符合標準，否則 PCR 必須重作
2. 待側樣本螢光訊號曲線呈 S 形時， $C_t < 38$ 判為陽性；當樣本曲線呈線形， $C_t > 38$ ，判陰性。若未出現 C_t ，判陰性。

Ct : dR

Replicates: Treated individually (since no replicates in selection)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	E-1	E-2	E-3	E-4	E-5	E-6	+E	-E	R-1	R-2	R-3	R-4
A	22.27 R-5	24.80 R-6	28.31 -R	30.65 +R	33.74	34.28	33.57	No Ct	25.32	29.01	31.64	34.39
B	36.16	No Ct	No Ct	30.57								
C												
D												

圖六、ASF 核酸檢測樣本配置



圖七、ASFV 核酸增幅曲線

五、白血球收集與病毒分離

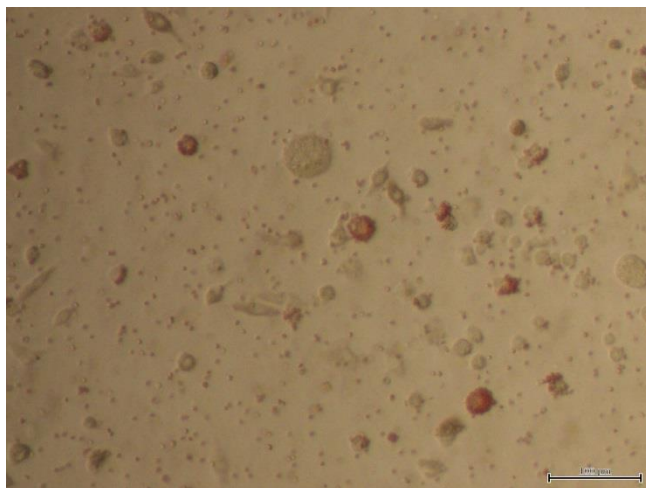
檢體經過 PCR 或 Ag ELISA 檢測 ASFV 呈現陽性結果時，以病毒分離做確認。

CISA 實驗室採集豬白血球接種檢體，搭配紅血球吸附現象(haemadsorption；HAD)，判定檢體是否有 ASFV，若無血球吸附現象，但有 CPE 出現，必須以 FAT 或 PCR 檢測。整個流程包含白血球收集與培養、檢體接種、紅血球吸附檢視，操作繁複且耗時，檢體接種後須觀察 5 天至 10 天，檢查是否有血球吸附，若是陰性，必須再盲目接種二代，需觀察 15 至 30 天作最終判定。本次研習時間有限，

僅由專家示範收集白血球，觀察先前檢測樣本所呈現的 HAD。

收集白血球

1. 收集豬隻脫纖血液於 50mL 離心管，約 10 管
2. 放入 swim type rotor，2500 rpm 離心 30 分鐘
3. 血液分成三層 — 血清、白血球、紅血球，分別收集於 50mL 離心管
4. 加入 3 倍體積的 0.83%紅血球溶解液處理白血球中紅血球，放冰上 15 分鐘
5. 2000 rpm 離心 15 分鐘
6. 小心倒掉上層液體，再加 3 倍體積的 0.83%紅血球溶解液，混勻放冰上 15 分鐘
7. 2000 rpm 離心 15 分鐘
8. 收集細胞，加入 10mL 收集血清(步驟 3)
9. 計算白血球細胞數，調整細胞濃度為 $8-10 \times 10^6/\text{mL}$
10. 取 96 孔盤，每孔加入 200 μL 白血球(300,000 個/孔)，於 37°C、0.5%CO₂ 培養箱，培養 3 至 4 天



圖八、ASFV 陽性檢體呈現紅血球吸附現象

心得與建議

ASF 可感染飼養豬與野豬，以軟壁蝨 (soft ticks) 當傳播媒介，目前發生在非洲、高加索地區、蘇聯，據悉在非洲與歐洲疫區，野豬感染後其症狀及軟壁蝨的生活循環均有差異，增加本病防疫難度，本病無疫苗可用，故若自豬隻樣本檢測出抗體即表示感染了本病，CISA 實驗室專家並指出 ASF 特異性抗體可維持很長時間，當抗體與病毒並存於豬隻，會形成免疫複合體干擾抗原檢測，並強調 ASF 診斷需仰賴良好樣本，且必須同時檢測抗體與病毒，綜合判斷後可協助判定疾病感染期與病毒量，協助疾病防治。

綜觀 CISA ASF 實驗室的診斷技術，競爭型 ELISA 與 IPT 法用於抗體檢測，核酸檢測部分，採用自行研發的即時聚合酶鏈鎖反應流程，可檢出大部分基因型別 ASFV，敏感性高於 OIE 建議之即時聚合酶鏈鎖反應；本所現階段採用與 CISA 實驗室相同之 ELISA 套組檢測血清抗體，而 CISA 另外採用的 IPT 法係以病毒培養製成抗原盤，用於確認 ELISA 抗體檢測結果，惟必須擁有活病毒，搭配高生物安全等級實驗室及病毒培養方能製備。

CISA ASF 實驗室對檢測結果控管頗為嚴謹，文件管理上已參照 ISO 品質管理規範建立 ASF 檢測流程，各流程文件除了參考文獻，亦註記人員需擁有的相關檢測技能，便於初學者安排學習課題，以達成獨立操作目的。在檢測樣本時，例如本次研習的 ELISA 與 IPT 抗體檢測、核酸抽取，皆會放入陰性與陽性對照組，且部分檢測流程，會使用較低含量的對照物，以掌控每次檢測品質。

隸屬於西班牙 CISA 的 ASF 診斷實驗室，除了協助歐盟國家進行 ASF 診斷，辦理相關診斷與流行病學訓練課程，亦對歐盟以外國家提供診斷服務與訓練課程，此次赴 CISA 學習到數種 ASF 檢測技術，亦蒙專家經驗分享，透過本次實地研習可拉近彼此距離，有利於未來與 CISA 實驗室聯繫諮詢，及商討輸入 ASF 陽

性對照(或標準)物質事宜，以建立本所 ASF 檢測技術與相關評估測試，推動 ASF 診斷與監測業務。

本所目前已參考 OIE 診斷手冊設立 ASF 病毒核酸檢測技術，含 PCR 及 real-time PCR 方法，但缺乏 ASFV 陽性核酸，無法進行評估，未來可洽詢國際參考實驗室，輸入陽性對照(或標準)物質，以補足前述技術評估缺憾，並作為日後檢測之陽性對照；至於血清檢測，本所目前採用採用與 CISA 實驗室相同之 ELISA 套組，依據 CISA 同仁經驗，其抗體檢測效果良好。

CISA 實驗室針對 ASF 提供診斷技術及流行病學兩種課程，為預防本病入侵，除了透過實驗室診斷與監測提供預警，亦需有流行病學研究與防治策略做後盾，本病在歐洲與非洲大陸呈現不同流行模式，在國際運輸與貿易往來頻繁下，許多重大動物疫病已突破疆界，可能需儲備流行病學與防疫策略人才，為本病防治預做準備。

致謝

承蒙本所長官給予研習機會，本所 105 年公務預算「口蹄疫疫苗先導工廠規劃與製程研究」計畫 (105 農科-10.1.1-衛-H2) 支應國外旅費，感謝 CISA 的 Dr. Carmina Gallardo、Dr. Marisa Arias Neira 及 Ana Sanchez 女士事前聯繫與課程排定，及 Dr. Raquel Nieto、Alicia Simon 女士、獸醫師 Alexander 在研習期間的指導，方能完成本次研習。

參考資料

African swine fever. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.8.1. OIE, 2012

Aguero M., Fernandez J., Romero L., Sanchez C., Arias M., Sanchez-Vizcaino J.M. Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples. J Clin Microbiol 41(9), 4431-4434, 2003

Arias, M., Sanchez-Vizcaino, J.M. African swine fever. In: Zimmerman, J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. Eds, Disease of swine, 10th Edition. John Wiley and Sons, USA, 396-404, 2012

Fernandez-Pinero, J., Gallardo, C., Elizalde, M., Robles A., Gomez C., Bishop R., Heath L., Couacy-Hymann E., Fasina F.O., Pelayo V., Soler A., Arias M. Molecular diagnosis of African swine fever (ASF) by a new real-time PCR using Universal Probe Library. Transbound Emerg Dis 60:48-58, 2013

Protocol of High pure PCR Template preparation kit. Roche Diagnostics.