

出國報告  
(類別：實習)

豬生殖與呼吸綜合症及其它豬病診  
斷病毒分離及鑑定之區域進階實  
室操作訓練之出國報告

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱：黃有良 助理研究員

派赴國家：中國

報告日期：106 年 1 月 17 日

出國期間：105 年 11 月 27 日至 12 月 2 日

## 摘要

世界動物衛生組織為了提升亞太各國對於豬隻疾病診斷之能力，於 2016 年 11 月 28 日至 12 月 2 日委託中國動物疫病預防控制中心舉辦「豬生殖與呼吸綜合症及其它豬病診斷病毒分離及鑑定之區域進階實驗室操作訓練」，邀請了柬埔寨、台灣、中國、印尼、日本、寮國、菲律賓、越南、泰國、蒙古與緬甸等國家派員參加，其訓練課程包含小組討論、數個豬隻疾病診斷相關之專題講座與 PRRS 診斷方法之介紹，並針對 PRRSV 之分離、分子診斷、病毒力價之檢測與中和抗體檢測等相關技術進行實際操作，藉由此訓練各國學員均可了解國際參考實驗室如何診斷 PRRS 並進行相關診斷經驗之交流，將有助於各國提升 PRRS 診斷之能力。

## 目次

一、前言與目的-----	4
二、研習過程-----	5
三、研習心得-----	19
四、檢討與建議-----	20
五、致謝-----	20

## 一、前言及目的

亞太地區各國均飼養大量的豬隻，卻也同時流行了許多跨國界動物傳染病，如：豬生殖與呼吸綜合症（Porcine reproductive and respiratory syndrome；PRRS）、豬瘟（Classical swine fever；CSF）、傳染性胃腸炎（Transmissible Gastroenteritis；TGE）、豬流行性下痢（porcine epidemic diarrheas；PED）等，而這些跨國界動物傳染病危害著整個亞太地區的豬隻生產系統並造成極大的經濟損失。在防治這些跨國界動物傳染病之前，各國的診斷實驗室需建立相關的診斷方法，而各國實驗室的診斷能力也是世界動物衛生組織（World Organisation for Animal Health；OIE）長期以來關注的焦點之一，為了提升各國診斷實驗室於PRRS與其它豬病的診斷能力，OIE委託中國動物疫病預防控制中心（China Animal Disease Control Center；CADCC）舉辦「豬生殖與呼吸綜合症及其它豬病診斷病毒分離及鑑定之區域進階實驗室操作訓練」，以提升各國於豬隻疾病的診斷能力。

## 二、研習過程

### (一) 行程

此次赴 CADCC 所屬 PRRS OIE 參考實驗室參加 OIE 所舉辦之「豬生殖與呼吸綜合症及其它豬病診斷病毒分離及鑑定之區域進階實驗室操作訓練」，此訓練課程（表 1）為第二次舉辦，於第一天（11 月 28 日）課程中，分別邀請中國農業部獸醫局 Dr. Guosheng Chen、OIE 東京局 Dr. Kugita、CADCC 辛盛鵬副主任與楊林處長進行開幕致詞並進行合影（圖 1），之後，將各國代表進行分組，第 1 組包括：柬埔寨、台灣、中國、印尼、日本、寮國，第 2 組包括：菲律賓、越南、馬來西亞、泰國、蒙古、緬甸。每個小組成員於小組內進行各國的「National swine disease diagnostic systems and main constraints」報告與討論，之後，各小組彙整成一份小組報告並上台報告，下午則將各國代表區分為 4 小組，並進行 Marc-145 的細胞培養與 PRRSV 中和試驗的講解與實際操作。

第二天（11 月 29 日）上午由澳洲動物衛生實驗室（Australian Animal Health Laboratory；AAHL）Dr. Chris Morrissy 進行「Swine disease diagnosis, quality assurance, biosafety & biosecurity」之介紹，之後，CADCC 的 Dr. YuLiang Liu 進行「Major swine diseases and diagnostic techniques」之介紹，下午則進行 PRRSV 之病毒分離與 TCID<sub>50</sub> 力價測定。

第三天（11 月 30 日）早上由 CADCC 之 Dr. Zhi Zhou 進行「Situation of PRRSV research in China」之介紹，Dr. Jiajun Wu 介紹「Real-time PCR」，Dr. Lin Yuan 介紹「Introduction of droplet Digital PCR」，下午進行「Real-time PCR」實務操作。

第四天（12 月 1 日）早上由 CADCC 之 Dr. Zhi Zhou 進行「PRRSV IFA」實務操作並進行 PRRSV 病毒分離之 CPE 觀察與判定，下午 Dr. Lin Yuan 進行「Digital RT-PCR」實務操作。

第五天（12 月 2 日）早上由 CADCC 之 Dr. Zhi Zhou 進行「PRRSV TCID<sub>50</sub> 之判讀與計算」與「PRRSV 中和抗體之判讀」等兩項之實務操作，下午進行東亞實驗室網絡之討論與進行閉幕式。

表 1、訓練行程表

日期	行程	講師
11/27 (日)	➤ 下午從桃園機場搭機赴中國北京首都機場，再轉搭快鐵與地鐵至飯店	
11/28 (一)	➤ 上午 1. 開幕式  2. Country report / 小組討論 / 小組報告	Guosheng Chen、 Hirofumi Kugita、 Lin Yang 各國學員
	➤ 下午 實務操作：細胞培養與中和抗體試驗	Lin Yuan & Zhi Zhou
11/29 (二)	➤ 上午 1. Swine disease diagnosis, quality assurance, biosafety & biosecurity 2. Major swine diseases and diagnostic techniques	Chris Morrissy  YuLiang Liu
	➤ 下午 實務操作：PRRSV 之病毒分離與 TCID <sub>50</sub> 力價測定	Lin Yuan & Zhi Zhou
11/30 (三)	➤ 上午 1. Situation of PRRSV research in China 2. Real-time PCR 3. Introduction of droplet Digital PCR	Zhi Zhou Jiajun Wu Lin Yuan
	➤ 下午 實務操作：Real-time PCR	Jiajun Wu
12/1 (四)	➤ 上午 實務操作：PRRSV IFA 並進行 PRRSV 病毒分離之 CPE 觀察與判定。	Zhi Zhou
	➤ 下午 實務操作：Digital RT-PCR	Lin Yuan
12/2 (五)	➤ 上午 實務操作：TCID <sub>50</sub> 與 VN 結果判定	Zhi Zhou
	➤ 下午 Discussion of East Asia Lab network Close training	Dr. Noriyoshi Ojima CADCC and OIE

## （二）參加國家

此次參加的國家包括：柬埔寨、台灣、中國、印尼、日本、寮國、菲律賓、越南、泰國、蒙古與緬甸。



圖 1、參加國家開幕式後大合照。

## （三）研習機構之簡介

CADCC 為中國國家動物疾病診斷中心，機關內部區分為行政體系、專業體系與技術支援體系等 3 大組織，專業體系包括：Emergency Control、Epidemic Surveillance、Animal Health Inspection、Certificate Veterinarian Affairs、Lab Biosafety Management、Animal Health Information、Veterinary Public Health、Slaughtering Working Group 等單位，技術支援體系則包括 Animal Product Inspection Center 與農業部獸醫診斷中心（National Veterinary Diagnostic Center；NVDC）等單位，而此次訓練於 NVDC（圖 2）轄下之 PRRS OIE 參考實驗室（圖 3）內進行。

NVDC 於 1996 年 7 月經由中國農業部批准設立，為中國國家級動物疫病檢測實驗室，內有 32 名員工，包括 3 名研究員、12 名獸醫師與其他專業技術人員，其職責包括：

- （1）全國動物疫病與人畜共通傳染病診斷，並協調各級防疫機構診斷實驗室之工作。

- (2) 動疾病之防疫技術與快速診斷技術之研究、開發與推廣。
- (3) 重大動物疫病之監測、診斷與撲滅工作。
- (4) 培訓各級防疫機構動物疾病之診斷人員。
- (5) 制定動物疫病之診斷標準。

此機構設有 BSL-2、BSL-3 實驗室與 ABSL3 動物房，負責禽流感、口蹄疫、PRRS、布氏桿菌等 43 種疾病之診斷，該診斷中心之 PRRS 診斷實驗室於 2012 年 5 月被 OIE 認定為 PRRS 的世界參考實驗室，並於 2016 年 5 月被 OIE 認可搬遷至 CADCC 新落成之 PRRSV 診斷實驗室，此實驗室研發出高病原性豬生殖與呼吸綜合症病毒（Highly pathogenic PRRSV；HP-PRRSV）之活毒疫苗（JXA1-R 病毒株）、研究 HP-PRRSV 致病機轉與開發出多種 PRRSV 的診斷試劑。



圖 2、研習所在地位於中國動物疫病預防控制中心轄下之農業部獸醫診斷中心大樓。



圖 3、農業部獸醫診斷中心設有 PRRS OIE 參考實驗室。

#### (四) 各國「National swine disease diagnostic systems and main constraints」

此次各國的報告均包含 3 大議題，包括各國的豬隻疾病狀況、豬隻疾病診斷系統與診斷的困境與建議（圖 4）。

##### 1. 各國的豬隻疾病狀況

柬埔寨：豬隻生產系統以後院式方式為主，其主要的豬隻疾病以 Salmonellosis、口蹄疫（Foot-and-mouth disease；FMD）、CSF 與 PRRS 為主，其中 HP-PRRSV 於 2010 年 7 月首次被檢出，之後，每年均有 HP-PRRS 的病例被檢出。另外，每年也均有數個 CSF 的病例發生。

台灣：於 2014 年 PED 爆發前，是以 PRRS 與豬環狀病毒相關疾病（Porcine circovirus-associated disease；PCVAD）為主，於 2014 年 PED 爆發後，PED virus（PEDV）已成為影響台灣豬隻生產系統的主要病因之一，於所送檢的消化病例中，絕大部分均為 PEDV 所引起。但於 2015 的病例統計結果發現，仔豬呼吸道疾病依然以 PRRS 為主，PCVAD 次之，且兩者經常混合感染。

中國：於中國的豬隻生產系統中，PED 為最主要之疾病，其次為 TGE 與

- Mycoplasma pneumoniae*，PRRS 於中國之報告中反而不是很重要。
- 印尼：於印尼的豬隻生產系統中，PRRS、CSF 與 Swine influenza (SI) H1N1 為最主要的豬隻病毒性疾病，其 PRRSV 主要以北美型為主且同時具有 HP-PRRSV 的存在，而 CSF 則以 2.1 基因型為主。
- 日本：自 2013 年爆發 PED 後，PED 已成為日本豬隻生產系統中最為重要之豬隻疾病，於 2015 年仍有 270,807 病例發生。其次豬隻疾病為豬丹毒 (Swine Erysipelas)，於 2015 年有 3,380 個病例數。第 3 為 Salmonellosis，於 2015 年有 301 病例數。至於 PRRS 之病例數於 2015 年有 131 個，佔總送檢病例數之比例甚低。
- 寮國：於現有的診斷能力發現 PRRS 於 2010 年發生大規模爆發，之後，每年均有零星之病例，FMD 與 CSF 也是每年均有零星之病例發生，至於其他疾病則因未進行檢測所不得而知。
- 菲律賓：於 2011 年已成為 FMD 的清淨國家，之後每年仍持續針對乳牛、水牛、山羊、綿羊、豬等動物進行口蹄疫之血清學監測，其結果均為陰性，於其他豬隻疾病方面，該國每年仍有零星之 PRRS、CSF、假性狂犬病 (Pseudorabies; PR)、SI、PED 等疾病發生，於 2014 年有 PED 疫情之爆發，經由 AAHL 協助鑑定後，發現此疫情大部分均是由北美流行株所引起，少數病例則是感染菲律賓本土病毒株。
- 越南：於越南的豬隻生產系統中，經常受到 PRRSV、CSFV、PEDV、TGEV、豬第二型環狀病毒 (Porcine circovirus type 2; PCV2)、PR virus (PRV) 與 FMD virus (FMDV) 等病毒的危害，於 2016 年越南國家獸醫診斷中心 (National Centre for Veterinary Diagnosis; NADC) 的檢測結果發現，以 PRRS、CSF、PCV2 與 FMD 等病的病例數較多，進一步分析 PRRSV 的序列發現，其 PRRSV 疫情均是由 HP-PRRSV 所引起，且其分佈在 JXA1/2006-Like 與 SX2009/2009-Like 兩個亞群內，其中以 SX2009/2009-Like 亞群的病例是較多。
- 泰國：泰國的豬隻生產系統分為後院式、開放式商業飼養系統與負壓水濺式飼養系統，而在這些豬隻生產系統中，以 PRRS、PED 與 FMD 所造成的危害最大。於 PRRSV 方面，泰國於 1996 年檢出第一例北美型 PRRSV，2004 年檢出歐洲型 PRRSV，且部分豬場同時有北美型與歐洲型兩種 PRRSV 存在。於 PED 方面，有 3 種不同基因型之 PEDV 在該國豬場內流行，分別傳統第 1 基因型、non-INDEL 之第 2 基因型與 INDEL 之第 2 基因型。
- 蒙古：豬隻數目佔蒙古全國畜養動物之比例非常低，僅有 0.1%，其主要的豬隻疾病包括：CSF、PRRS、SI、豬小病毒 (Porcine parvovirus; PPV) 與 Porcine Enzootic pneumonia 等，其中 CSF 於 2007、2014、2015 與 2016 年均有相關病例發生，PRRS 於 2012 與 2014 年也有相關病例發生。
- 緬甸：緬甸的豬隻生產系統中，有 99% 的豬場均屬於後院式養豬，僅有 1% 是屬於商業化豬場。而在現有的監測系統中，PRRS、CSF 與 PCVAD 是現有

危害最嚴重之 3 大疾病，CSF 的發生跟畜主願意施打疫苗的意願有關，往往許多畜主均不願施打 CSFV 疫苗。PRRSV 則於 2011 年後經常被檢出，而 PCVAD 於 2010 至 2016 年間已有兩次的大流行。

## 2. 各國的豬隻疾病的診斷系統

柬埔寨：HP-PRRSV 的診斷於 2015 年出現瓶頸，應用舊有的診斷發方法並無法有效檢出 HP-PRRSV，之後，進一步修正 HP-PRRSV 的診斷引子與探針後方可有效檢出 HP-PRRSV。

台灣：台灣的豬隻疾病診斷系統，是由行政院農業委員會家畜衛生試驗所、各縣市防疫機關、4 所獸醫學院以及農業科學研究院所組成，於政府的診斷系統方面，病例通常被送至各地方防疫機關進行剖檢與初步檢驗後，當需確診或家畜衛生試驗所協助檢驗時，會將病例轉送家畜衛生試驗所，該所收到相關病例時，會分別進行病毒分離、分子檢測、細菌學檢測與組織病理檢測，必要時也會針對毒物進行相關病例之檢測。

中國：中國的豬隻疾病檢診系統將診斷實驗室區分為數種層級，第一層由各鄉鎮（市）診斷實驗室（County laboratory）所構成，也是整個診斷系統最基礎之實驗室，往上依序是縣級實驗室（Prefecture laboratory）、省級實驗室（Provincial laboratory）、區域級實驗（National regional laboratory）、國家實驗室（National laboratory）。其國家實驗室目前是由 CADCC 所擔任，負責流行病學之研究、主要動物疾病之監測與 H7N9、Peste des petits ruminants（PPR）等疾病之清除計畫。

印尼：印尼的豬隻疾病診斷系統網絡與中國相似，具有多層區域實驗室協助國家實驗室進行動物疾病之診斷，其第一層同樣是由各鄉鎮（市）診斷實驗室（County laboratory）所構成，也是整個診斷系統最基礎之實驗室，往上直接至省級實驗室（Provincial laboratory）與區域級實驗（National regional laboratory），最後，由國家實驗室（National laboratory）進行全國動物疾病診斷實驗室之統整。此國家實驗室協助各級實驗室建立相關的診斷方法並舉辦相關訓練、能力比對等，並進行 CSF 與 PRRS 的全國監測性計畫。

日本：日本的豬隻疾病診斷系統與台灣相似，都是由縣市動物疾病診斷機關進行初步診斷後，在後送至國家實驗室進行確認或其他分析，其主要診斷之豬隻疾病包括：FMD、Salmonellosis、PED、PRRS、SI、日本腦炎（Japanese encephalitis；JE）、TGE、Erysipelas、Swine dysentery、Porcine pleuropneumonia、Mycoplasma infection、E. coli infection、Streptococcal infection、PCVAD 等疾病。

寮國：於各個省均有動物疾病診斷機構，但因受限於人力與財力之限制，只有被動性的監測動物性疾病，而國家實驗室則主要進行 PRRS、CSF、非洲豬瘟（African swine fever；ASF）、SI 與 FMD 等疾病之診斷，其診斷試劑

與方法要均是由 FAO 和 AAHL 所提供，

菲律賓：整個豬隻疾病之診斷系統是由 Animal Disease Diagnosis and Reference Laboratory (ADDRL) 與 17 個 Regional Animal Disease Diagnosis and Reference Laboratory (RADDRL) 所組成，ADDRL 主要職責為疾病爆發之調查、監控、檢疫動物之檢測、種豬場認證之檢測、動物疾病之研究與支援 17 個 RADDRL 之診斷等項目，另外，也參與 Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) 之計畫，其目的為經由動物健康與疾病控制之改善，提升澳洲與菲律賓之豬隻生產與競爭力。也參加 Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) -AAHL 的能力比對，針對 PRRS, CSF, ASF 與 SI 等疾病進行實驗室診斷能力之比對。

越南：越南的動物疾病診斷系統是由各省之動物檢驗中心、7 個區域動物健康辦公室 (Regional Animal Health Office ; RAHO) 與 NADC 所組成，其中 RAHO 與 NADC 隸屬於國家動物健康部，NADC 於豬隻疾病之診斷方面，主要負責 PRRS、CSF、PED、TGE、PCVAD、PR、SI 與 FMD 之診斷。

泰國：泰國的動物疾病診斷系統是由動物衛生研究所 (NIAH)、口蹄疫參考實驗室、獸醫生物藥品檢定組與 8 各區域獸醫研究發展中心 (RVRDC) 所組成，整個診斷系統隸屬於泰國農業合作部畜產發展處 (DLD)，該系統負責泰國所有動物之健康與衛生，為全國動物疾病之診斷核心，而此 8 個 RVRDC 分別為位於北部上半區域 (RVRDC 位於 Lampang 省)、北部下半區域 (RVRDC 位於 Pitsanulok 省)、東北部上半區域 (RVRDC 位於 Khonkaen 省)、東部下半區域 (RVRDC 位於 Surin 省)、西部區域 (RVRDC 位於 Ratchaburi 省)、東部區域 (RVRDC 位於 Chonburi 省)、南部上半區域 (RVRDC 位於 Nakhonsrithammarat 省) 與南部下半區域 (RVRDC 位於 Songkhla 省)。

蒙古：蒙古的動物疾病診斷系統由食品與農業部下獸醫與動物生產處 (Veterinary and Animal breeding agency) 所管轄，由 21 個省獸醫服務與實驗室與州立中心獸醫實驗室所組成 (State Central Veterinary Laboratory ; SCVL)。

緬甸：緬甸的動物疾病診斷系統隸屬於農業部家畜生產與獸醫局 (Livestock Breeding and Veterinary Department) 管轄，由 14 個疾病診斷實驗室 (Disease Diagnosis Labs) 與研究與疾病控制組 (Research and Disease Control Division ; RDCD) 所組成，RDCD 組要負責疫苗生產、動物疾病之診斷、動物福利、人畜共通傳染病之控制與進出口動物、畜產品與飼料之檢驗。

### 3. 診斷的困境

隨著各國動物疾病診斷技術之提升，許多跨國境動物傳染病陸續於亞太地區

許多國家被檢出，而為了防治這些跨國境動物傳染病，各國開始針對這些跨國境動物傳染病進行監測計畫，且均由各國的國家實驗室負責執行，但在現有實驗室人力、物力與經費未增加之情況下，各國的國家實驗室均面臨著人力短缺與經費不足等窘境，許多東南亞國家甚至需依靠 OIE 與 FAO 等國際組織之奧援方可進行相關的動物疾病診斷與監測。另外，在診斷技術方面，許多國家在建立診斷方法時均欠缺當時所流行之跨國境動物傳染病的陽性標準品，因此，無法即時建立相關的診斷方法。



圖 4、各國學員於各小組內進行簡報與討論。

#### (五)「Swine disease diagnosis, quality assurance, biosafety & biosecurity」之簡介

此專題演講是由 AAHL Dr. Chris Morrissy 進行授課，其內容區分為豬隻疾病診斷、診斷之品保、生物安全與生物防護等四大項目，於豬隻疾病診斷系統中，需先行規劃整個豬隻疾病診斷之實驗室網絡，並確立各個診斷實驗室於診斷系統中所變演之角色，是屬於初篩實驗室、區域實驗室、國家實驗室、國際區域實驗室、國際參考實驗室等，因每一位階實驗室所負責之任務均不同，且所設計的診斷流程也不同。當實驗室定位完成後，則需確立要診斷哪些疾病以及其相對應的診斷流程的建立。當進行動物疾病監測計畫時，需由實驗室人員與流行病學專家共同依照整個動物疾病監測的目的，設計出其所需之試驗方法與檢驗標的，並依據各實驗室之能力進行分工。

診斷方法之品保方面，為了確認每次的診斷結果均是在同一個標準上，每個診斷方法均需進行相關的診斷品管措施，其包括將每個診斷方法進行認證（如：ISO17025）且需準備每個診斷方法的標準品與 Internal Quality Control (IQC)，並落實相關的品保紀錄，特別是標準品與 IQC 之反應，並進行批次比對。而整個診斷方法品系統需依靠下列幾各項目進行維護，包括：

1. 品管之管理架構：需召開品保會議，由機關首長主持，並請品管相關人員、實驗室技術人員與管理人等人出席，就如何落實診斷之品保加以擬訂與推動。
2. 診斷標準與 IQC 的紀錄：診斷標準需每年進行檢視與修正，IQC 部分，每一種診斷方法均需要有其 IQC，且 IQC 必須要有一個弱的陽性對照與陰性對照，

弱陽性對照的選擇方法如下：real-time PCR 需選用 Threshold cycle (Ct) 值約 32 左右之樣品、血球凝集抑制試驗需選用 64 倍之抗體力價、酵素連結免疫吸附試驗需選用弱陽性之對照品。

3. 能力比對：參與國際參考實驗室之能力比對，以檢視其診斷能力。
4. 品保官
5. 人員訓練
6. 生物安全與生物防護
7. 儀器設備之校正
8. 儀器設備使用與試劑使用之紀錄
9. 品保守則

#### (六)「Major swine diseases and diagnostic techniques」之簡介

此專題由 CADCC 的 Dr. YuLiang Liu 演講，主要介紹中國豬隻疾病現況與所使用之檢驗方法，現有豬隻疾病現主要集中在呼吸、消化與生殖系統，呼吸系統之主要病原有 PRRSV、SIV 與 Mycoplasma，消化系統之主要病原有 PEDV、TGEV、Rotavirus Enteritis Virus (REV)、Porcine Kobuvirus (PKoV)、Bocavirus (BoV)與 Norovirus (NV)，生殖系統之主要病原有 PRV 與 PPV，多系統疾病之病原以 PCV2 與 CSFV 為主，細菌性疾病以 *Haemophilus Parasuis* infection、Porcine Contagious Pleuropneumonia 與 Eperythrozoonosis 為主。然而，自 2010 開始，中國豬隻疾病發生極大之變化，在 2010 年以前 PEDV 與 TGEV 這些對整體豬隻生產系統影響較小之疾病，於 2010 發生大規模之流行，成為影響中國豬隻生產系統中最主要之疾病，並持續之今，於 2015 與 2016 年的病例統計發現，以 PED 所佔的病例數最多，其次為 TGE，第 3 為 Mycoplasmal Pneumonia。PED 疫情於 2010 年開始發生，並於 2011 至 2012 年開始大流行，2013 年開始進行預防控制，但每年仍有許多病例發生並持續至今，經由序列分析發現，2010 年以後所發之病毒株與過去中國境內所發生之病毒株（第 1 基因型）不同，其屬於第 3 基因型，與韓國 2009 發生之病毒株最為接近，相似度達 96%。於 PRV 病例中，將 gC 基因進行的分子流行病分析後，發現有第 2 基因型之病毒株入侵，與過去主要流行之第 1 基因病毒株不同，此基因型病毒於 2015 年 8 月中國的豬場引發相關疫情，該場豬隻死亡率高達 21%，並引發懷孕母豬之流產與哺乳仔豬之神經症狀。CSF 疫情每年於許多省份仍有零星病例發生，將 1979 年至 2013 年所收集的病毒株進行 E2 基因的序列分析，發現中國的豬瘟野外毒主要以 1.1、2.1、2.2 與 2.3 基因型為主，並無第 3 基因型之 CSF 病例。PCV2 疫情經由序列分析發現，所流行之病毒株已由過去 PCV2a 基因型轉變為 PCV2b 基因型。另外，在各種豬隻疾病的診斷中，CADCC 會依據其診斷目的而使用不同診斷方法進行診斷，其常用之各疾病診斷方法如表 2。

表 2、中國動物疾病預防控制中心（CADCC）各種豬隻疾病主要之診斷方法。

Disease	Diagnostic technique	Standard serial number
Pseudorabies (PR)	Immunohistochemistry	NY/T 678-2003
	gE-ELISA	
	PCR	GB/T 18641-2002
	gB-ELISA	
Classical swine fever (CSF)	RT-PCR	GB/T 16551-2008
	CSFV ELISA- Ag	
	CSFV ELISA- Ab	
	Positive indirect agglutination test (PIAT)	
Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)	Indirect ELISA	GB/T 18090-2008
	Virus isolation	
	RT-PCR	
	Real-time RT-PCR	
	Immunohistochemistry	
Porcine parvovirus infection	PCR	SN/T 1874-2007
	ELISA	
Swine Influenza (SI)	RT-PCR	GB/T27521-2011
Porcine circovirus disease	ELISA-Ab	GB/T 21674-2008
Swine actinobacillus pleuropneumonia	ELISA	NY/T 537-2002
Foot and mouth disease (FMD)	Virus infection related antigen agar gel immunodiffusion (VIA-AGID)	GB/T 18935-2003
	Liquid blocking enzyme-linked immunosorbent assay (LB-ELISA)	
	RT-PCR	
	Nonstructural protein monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay (Nsp- ELISA)	
	Positive indirect agglutination test (PIAT)	

### (七)「Situation of PRRSV research in China」之簡介

此專題是由 CADCC 之 Dr. Zhi Zhou 進行「Situation of PRRSV research in China」介紹，主要介紹近幾年來中國的 PRRS 疫情與相關研究成果，中國現行所流行之病毒株包括北美與歐洲兩種型別之病毒株，北美型病毒株包括：CH1-a、HB-1、JXA-1 與 NADC-30-like 之病毒株，歐洲型則為 BJEU06-1 病毒株，CH1-a 與 HB-1 病毒株為傳統北美型病毒株，JXA-1 為 2006 年 HP-PRRSV 分離株，NADC-30-like 為 2012 年新分離之美洲型病毒株。

於 2006 年的 HP-PRRS 疫情中，有超過 2 百萬以上之豬隻因此病死亡，臨床上豬隻感染後會引發高燒（體溫達 41~42°C）、藍耳、結膜炎與嚴重之呼吸症狀，並引發高的發生率與死亡率，之後，中國政府開始針對此病毒積極研發其相關疫苗，於 2012 年已成功開發出活毒減毒疫苗，並應用於田間豬場，從近幾年的檢測病例發現，HP-PRRSV 的病例數自 2012 年以後已大幅下降，但每年仍有許多零星病例發生。然而，從過去的病例檢測結果發現，於 2012 年 NADC-30-like 病毒株從美國傳入中國，之後快速擴散至整個沿海城市，於 2015 年的檢測結果發現，整個東部沿海城市均已出現 NADC-30-like 的感染病例，此病毒與美國 NADC-30 病毒株全長序列之相似性達 93.6~97%，與中國市售 PRRSV 疫苗之全長序列之相似性僅 82.1~85.4%，此病毒於 NSP2 蛋白有高達 131 胺基酸之缺損片段，而豬隻感染後同樣會引發嚴重之 PRRS 臨床症狀，且只有部分豬隻會引發高燒與死亡，其臨床症狀、發病率與死亡率均較 HP-PRRS 輕微，而使用現行中國所研發之 HP-PRRSV 活毒減毒疫苗也只有部分之保護性。

### (八) PRRSV 診斷技術之研習

所有人員進入不同實驗室前均須穿戴該實驗室之防護措施，包括：毛帽、口罩、手套、實驗衣與鞋套，之後，方可進入實驗室（圖 5），離開前需將所有防護措施脫去方可離開。

#### 1. Marc-145 細胞株組織培養與繼代

- (1) 事前準備：將所需使用之培養液、PBS 與胰蛋白酶置入水浴槽內回溫。
- (2) 觀察 25T 培養瓶之 Marc-145 細胞株生長狀況，以及是否有汙染。
- (3) 去除 25T 培養瓶之培養液，以 1 ml 胰蛋白酶清洗 2 次。
- (4) 加入 1 ml 胰蛋白酶並置於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 內培養 5 分鐘。
- (5) 加入 5 ml 培養液（8% FBS / 1% PS / MEM）懸浮細胞，並計算細胞數。
- (6) 取 1~2 × 10<sup>5</sup> cell 至新的 25T 培養瓶，置於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱內培養。



圖 5、於實驗室進行細胞培養之情況。

## 2. PRRSV 分離

- (1) 事前準備：將所需使用之培養液置入水浴槽內回溫。
- (2) 觀察 25T 培養瓶之 Marc-145 細胞株生長狀況，以及是否有汙染。
- (3) 將疑似病例之組織以研磨器進行研磨，並加入 5 ml 不含 FBS 之培養液進行懸浮。
- (4) 以 3500 xg 離心 5 分鐘，再以 0.22 $\mu$ m 過濾膜進行過濾。
- (5) 將 25T 培養瓶內之細胞培養液去除，加入 0.5 ml (4) 過濾液，於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱內感作 2 小時。
- (6) 棄上清液，以 1 ml 不含 FBS 之培養液清洗 2 次，加入含 2% FBS 之培養液，於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱內培養 3-5 天。
- (7) 每日觀察 CPE。

## 3. PRRSV 中和抗體檢測

- (1) 事前準備：將所需使用之培養液置入水浴槽內回溫。
- (2) 取 400 $\mu$ l 細胞培養液與 400 $\mu$ l 待測血清進行連續 2 倍稀釋 (1:2 至 1:32)，每個稀釋倍數分注至 3 孔 96 孔盤內 (100 $\mu$ l/孔)。陽陰性血清進行相同之稀釋與分注。
- (3) 每孔加入含有 200 TCID<sub>50</sub> 之 100 $\mu$ l PRRSV，於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱內感作 1 小時。
- (4) 取 100 $\mu$ l 混合液至含有單層 Marc-145 細胞之 96 孔盤內，於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱內感作 2 小時。
- (5) 去除上清液，加入 100 $\mu$ l 含 2% FBS 之培養液，於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱內培養 3 至 5 天。

(6) 每日觀察 CPE。

#### 4. PRRSV TCID<sub>50</sub> 力價之測定

- (1) 事前準備：將所需使用之培養液置於水浴槽內回溫。
- (2) 取 900µl 細胞培養液與 100µl 待測 PRRSV 進行連續 10 倍稀釋，每個稀釋階分注至 6 孔含有單層 Marc-145 細胞之 96 孔盤內 (100µl/孔)。每盤均需 2 孔 PRRSV 陽性對照與 2 孔 PRRSV 陰性對照。
- (3) 於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱內感作 1 小時。
- (4) 去除上清液，加入 100µl 含 2% FBS 之培養液，於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱內培養 3 至 5 天。
- (6) 每日觀察 CPE 並計算病毒力價。

#### 5. PRRSV REAL-TIME PCR

此次進行 PRRSV NA 與 EU 之區別診斷，使用 CADCC 所研發之診斷試劑(圖 6)。

- (1) 核酸萃取
  - A. 取 50µl 之待測樣品、陽性對照與陰性對照分別與 600µl lysis buffer 進行混合。
  - B. 於室溫感作 5 分鐘。
  - C. 將混合液置入 RNeasy spin column，以 13,000 rpm 離心 30 秒。
  - D. 棄過濾液，加入 600µl washing buffer，以 13,000 rpm 離心 30 秒。
  - E. 重複 D 步驟。
  - F. 棄過濾液，以 13,000 rpm 離心 2 分鐘。
  - G. 將 RNeasy spin column 移至新的 1.5 ml 微量管，加入 50µl DEPC 處理水，以 13,000 rpm 離心 30 秒。
  - H. 棄 RNeasy spin column，收集並保存過濾液。

#### (2) Real-time PCR

- A. 反應液配方如下：

成分	量 (µl)	總量 (µl) / (5 個反應)
Buffer	12.5	62.5
Primer/probe mix	3.4	17
Enzyme mix	1.0	5.0
RNase-free water	5.6	28
Sample	2.5	-
Total	25	112.5

- B. 分注反應液至微量小管，並加入檢測檢體、陽性對照與陰性對照。

C. 於 ABI 7500 Fast Real-Time PCR system 進行反應。

D. 反應條件如下：

反應溫度	時間	循環數
42°C	5 min	1
95°C	10 s	
95°C	5 s	40
60°C	35 s	

E. 判讀：北美型為 FAM 螢光、歐洲型為 VIC 螢光；陽性對照之 Ct < 30、陰性對照之 Ct > 37。



圖 6、中國動物疾病預防控制中心（CADCC）所研發之 PRRSV 北美型與歐洲型區別診斷試劑。

## 6. PRRSV digital RT-PCR

(1) 反應液配方如下：

成分	量 (μl)	總量 (μl) / (5 個反應)
Supermix	5	25
Reverse transcriptase	2	10
300mM DTT	1	5
Primer	1.8	9
probe	0.5	2.5
RNase-free water	9.5	47.5
Sample	2.2	-
Total	22	99

(2) 分注反應液至微量盤內，以 QX200™ Dropet Generator 進行油滴包覆。

(3) 於 PCR 反應器進行反應，反應條件如下：

反應溫度	時間	循環數
42°C	60 min	1
95°C	10 min	
95°C	30 s	40
55°C	1 min	
98°C	10 min	1
4°C	60 min	1

E. 判讀：以 QX200™ Dropet reader 進行判讀。

## 7. PRRSV IFA

- (1) 將已感染 PRRSV 的 Marc-145 細胞 96 孔盤，以 PBS 清洗 2 次。
- (2) 每孔加入 100µl 的 Methanol/Acetone 混合液，於室溫感作 30 分鐘。
- (3) 棄上清液，以 PBS 清洗 3 次。
- (4) 每孔加入 100µl 含有 4%馬血清之 PBS，於室溫感作 15 分鐘。
- (5) 棄上清液，加入抗 PRRSV 之陽性與陰性血清，於 37°C 感作 30 分鐘。
- (6) 棄上清液，以 PBS 清洗 3 次。
- (7) 加入 100µl 標示 FITC 抗豬 IgG 抗體，於 37°C 感作 30 分鐘。
- (8) 棄上清液，以 PBS 清洗 3 次。
- (9) 於倒立螢光顯微鏡下進行判讀。

## 三、研習心得

此次訓練課程於CADCC轄下NVDC舉辦，該診斷中心擁有OIE認可之PRRS參考實驗室，且實驗室內PRRS與其它豬隻疾病的診斷專家擔任此訓練課程之教師。此訓練課程邀請了柬埔寨、台灣、中國、印尼、日本、寮國、菲律賓、越南、馬來西亞、泰國、蒙古與緬甸等國家派員與會，各國學員於訓練開始後，即分組並進行「National swine disease diagnostic systems and main constraints」之簡報與討論，會中發現隨著豬隻疫病於亞太地區的漫延，PRRS、PED、CSF是影響各國豬隻生產系統非常重要之疾病，且隨著疫情的漫延，各國豬隻疾病診斷系統的負荷量愈來愈高，但人員與經費卻沒有得到相對應的增加，導致整各豬隻疾病診斷與疾病監測在各國國家實驗室的負荷量均非常重，各國實驗室均只能針對重要之疾病進行重點監測與診斷，甚至許多東南亞國家還需倚賴其他國際組織或國家給予奧援，方可進行相關之豬隻疾病診斷與監測。

此訓練課程中邀請了澳洲動物衛生實驗室Dr. Chris Morrissy進行「swine disease diagnosis, quality assurance, biosafety & biosecurity」之介紹，也邀請PRRS參考實驗室相關研究人員分別進行「Major swine diseases and diagnostic

techniques」、「Situation of PRRSV research in China」以及PRRS相關診斷方法之介紹，並針對PRRSV之分離、分子診斷、病毒力價檢測與中和抗體檢測等相關技術進行實做。於「Swine disease diagnosis, quality assurance, biosafety & biosecurity」之演講，主要介紹如何建立動物疾病之診斷技術與後續如何維持實驗的檢驗品質，並介紹實驗室相關的生物安全防護觀念。「Major swine diseases and diagnostic techniques」與「Situation of PRRSV research in China」兩大議題則是介紹目前中國豬隻疾病現況與PRRSV之研究成果，於中國豬隻生產系統中，PED的危害最大，其次是TGE，第3則是黴漿菌性肺炎，至於，PRRS的部分，近幾年的病例數佔總送檢數的比例低於1%，但從序列分析發現，中國於2012年有新的病毒株入侵，其全長序列與美國2008年NADC-30病毒株最為接近，相似性高達93.6至97%，之後，此病毒也漫延至中國沿海各省。至於診斷技術程面，也學習了PRRSV分離、力價檢測、抗體檢測與分子檢測等相關技術。

#### 四、檢討與建議

1. 為提升本所研究人員對於各國豬隻疾病現況之了解並學習海外跨國界動物傳染病之診斷能力，派員出國研習相關課程將有助於提升本所對於海外跨國界動物傳染病之診斷能力。
2. OIE 參考實驗室非常注重實驗室生物安全與診斷技術品管之落實，這是整個診斷實驗室重要核心之一，身為國家動物疾病之診斷實驗室，如要提升為國際級實驗室，這些項目的落實是非常重要的，為了強化本所於實驗室生物安全之能力與其診斷品質，可邀請相關之專家就實際面加以指導，以提升本所實驗室生物安全之能力與其診斷品質。

#### 五、致謝

本次出國訓練承蒙所內鈞長與行政院農業委員會動植物防疫檢疫局之協助，致使訓練得以圓滿完成，特此感謝。另外，感謝 OIE 與 CADCC 舉辦此次訓練與在訓練過程中所提供之協助，特此感謝。