

出國報告(出國類別：考察)

# 赴美國威斯康辛獸醫診斷實驗室 考察出國報告

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱：吳介豪助理研究員

派赴國家：美國

出國日期：2017年9月3日至9月9日

報告日期：2017年11月29日

## 摘要

本所派一員於 106 年 9 月 3 日至 9 月 9 日前往美國威斯康辛州獸醫診斷實驗室(Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory)考察水產動物疾病診斷，與該魚病實驗室負責人 Dr. Hui-Min Hsu 作為聯繫窗口，主要目的為透過實地訪查、實作及討論進而瞭解該實驗室水產動物疾病診斷及美國州政府獸醫診斷實驗室實際運作與實驗室管控相關運作實務，有助於我國強化水產動物疾病診斷實驗室，增進我國水產動物疾病診斷技術，與國外研究學者交流，建立合作與互訪關係。

本次赴美國威斯康辛獸醫診斷實驗室進行考察結論 1) 威斯康辛獸醫診斷實驗室有完整實驗室管理系統，落實 AAVLD 認證系統、2)多採用自動化實驗設備以減少人為操作失誤、3)完整魚類動物疾病診斷流程，值得借鏡。

## 目次

摘要	2
壹、目的	4
貳、行程	5
參、過程	6-14
肆、心得及建議	15-16

## 壹、目的

水生動物之養殖及外銷是我國農業經濟與國際貿易之重要產業，水生動物疾病之診斷更是維繫該等產業永續經營之重要關鍵。為維護我國水生動物健康，爰本所派一員前往美國威斯康辛州獸醫診斷實驗室(Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory, WVDL)考察水產動物疾病診斷，與該魚病實驗室負責人 Dr. Hui-Min Hsu 作為聯繫窗口，透過實地訪查、實作及討論而瞭解該實驗室水產動物疾病診斷及相關運作實務，有助於我國強化水產動物疾病診斷實驗室，與國外研究學者交流，建立合作與互訪關係。

本次考察由家畜衛生試驗所吳介豪助理研究員前往，主要目的為 1) 瞭解美國州政府獸醫診斷實驗室實際運作與實驗室管控、2) 增進我國水產動物疾病診斷技術、3) 瞭解美國威斯康辛州魚類養殖與疾病現況。

## 貳、行程

日期	地點	活動內容
9月3日	台北至美國威斯康辛州 麥迪遜(Madison)	啟程
9月4日	威斯康辛獸醫診斷 實驗室(WVDL)	一、美國威斯康辛大學(UW)介紹 二、美國威斯康辛獸醫診斷實驗室 (WVDL)簡介
9月5日	威斯康辛獸醫診斷 實驗室(WVDL)	一、魚病診斷流程 二、參訪威斯康辛大學病理課程簡介
9月6日	威斯康辛獸醫診斷 實驗室(WVDL)	一、威斯康辛獸醫診斷實驗室內部管控 系統以及 Q-pulse 簡介 二、參訪威斯康辛大學醫學系
9月7日	威斯康辛獸醫診斷 實驗室(WVDL)	一、魚類 <i>Flavobacterium sp.</i> 鑑定 二、參訪威斯康辛大學生命科學系水生 動物實驗室
9月8日至 9月9日	美國威斯康辛州麥迪遜 (Madison)至台北	返程

## 參、過程

### 一、美國威斯康辛獸醫診斷實驗室(WVDL)簡介

美國威斯康辛獸醫診斷實驗室(Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory, WVDL) 在威斯康辛大學內，位於威斯康辛州中央南方的首府麥迪遜(Madison)，屬於溫帶氣候，Mendota 湖以及 Monona 湖之間的狹長區域，威斯康辛州為乳牛大洲，所生產的牛油及乳酪為美國第一位，1930 年初威斯康辛大學與美國農業部達成協議在該州由獸醫提供動物疾病診斷，隨著愈來愈多的需求，在 1938 年遷至新設施中。1958 年成立巴倫實驗室，開始服務該州的家禽業及酪農業，1964 年經過農業、貿易和消費者保護部門(Department of Agriculture, Trade, and Consumer Protection, DATCP)管轄下在麥迪遜的西邊安置麥迪遜實驗室，實驗室增加其測試產品和服務，成為牛人工授精行業的主要測試服務提供商。

實驗室除了提供診斷之外，在撲滅威斯康辛動物之豬瘟、牛及豬之布氏桿菌、牛結核病以及假性狂犬病中發揮重要作用。

2000 年 4 月 28 日威斯康辛州法令制定，實驗室自 DATCP 轉移至威斯康辛大學系統，並更名為威斯康辛獸醫診斷實驗室(WVDL)，2000 年 7 月 1 日生效。在 2006 年為追求高品質診斷及需求不斷增加下，威斯康辛大學麥迪遜分校設計與建造新實驗室，名為 Easterday Lane (如圖一)。

該實驗室由國家提供特定資金，由威斯康辛大學麥迪遜分校管理。作為威斯康辛大學的一部分，WVDL 繼續發展，目前僱約 75 人。

威斯康辛獸醫診斷實驗室的任務，如下：

1. 提供這州所有類型動物(包括魚類) 的檢測和診斷服務，重點是農場動物。
2. 提供必要的診斷服務，以滿足美國獸醫實驗室認證協會(AAVLD)的認證要求。
3. 提供農業、貿易和消費者保護部門所需的檢測和診斷服務，以履行有關疾病控制和動物健康的部門職責。
4. 維護威斯康辛州巴倫市的區域實驗室。
5. 與獸醫學院和農業貿易和消費者保護部門合作，作為獸醫診斷實驗室平台參與研究、提供野外服務、諮詢服務和教育。

2002 年，該實驗室成為美國國家動物實驗室健康網絡(NALHN)的核心實驗室，使實驗室成為州和聯邦機構保護農業動物的完整合作夥伴。努力不斷地成為診斷測試領域的全球領導者，並為乳品和肉牛市場的檢驗以及傳染性海綿狀腦病等新興傳染病建立了卓越的聲譽。

## 二、威斯康辛獸醫診斷實驗室之魚病診斷流程

本次前往美國威斯康辛獸醫診斷實驗室主要考察魚類疾病診斷之流程與技術，為美國獸醫實驗室診斷師協會(American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, AAVLD)的認證實驗室，需符合認證要求，檢體來源為該州內地方單位或執業獸醫師，收發室將檢體依動物種類及檢體分類，將病例資料鍵入 Q-pulse 系統，系統將自動傳訊至當日輪值獸醫師或專職獸醫師作通知，檢體則分別以傳送箱及傳送電梯配送至不同樓層實驗室，所有檢體運送符合生物樣材輸送作業，以堅固整理箱防止檢體逸散，獸醫師自電腦系統或電子郵件得知送檢病例後進行檢診。

本次前往美國考察實驗室，水生動物獸醫師 Dr. Hui-Min Hsu 為聯繫人 (如圖二)，Dr. Hui-Min Hsu 主要負責實驗室中所有魚類疾病的檢診及實驗室認證的文件管理負責人，該實驗室魚病診斷流程包含病例回溯、剖檢、微生物學檢查、組織病理學檢查、分子生物學檢查、寄生蟲學檢查、病毒分離，其中分子生物學檢查主要以聚合酶連鎖反應(PCR)與反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)檢驗病毒核酸，病毒分離過去用於每件魚類檢體均進行細胞接種，發現在水生動物體常有病毒存在，但無致病性，導致經常分離出病毒，耗費人力及經費研究；現在，該實驗室由於分子生物學檢查(如 PCR、RT-PCR)與病毒分離不符合成本效益，該實驗室已不作兩項檢驗，改送至合作實驗室進行。該實驗室經費來源為檢驗費用與實驗



耗材販售(包含自配培養基、血清、其他耗材等)，網站上有完整收費標準，經詢問得知包含地方政府單位送檢亦需收費，每年皆有利潤所得。

在魚類微生物學檢查中，該實驗室之診斷流程為 1)以血液培養基(Blood agar plate；BAP)或胰蛋白大豆瓊脂培養基(Tryptone soy agar；TSA)、Selective Kidney Disease Medium-2 (SKDM-2)與 Hsu-Shotts 培養基同時進行細菌分離，2)進行細菌繼代與純化，3)選取單一菌落，以 MALDI-TOF 質譜儀機器進行細菌鑑定，即完成細菌鑑定並可回復結果(如圖三)；與過去細菌繼代與純化後，需再進行生化鑑定、Biolog 微生物鑑定系統、16S PCR 與基因定序相比，引進 MALDI-TOF 質譜儀機器後所花費時間大幅減少，鑑定時間約數十分鐘即可完成，且可以單一菌落進行鑑定，其數據來源為細菌 16S 基因序列包含大部分水生動物疾病細菌且持續更新，準確度較 Biolog 微生物鑑定系統高。MALDI-TOF 細菌鑑定方法確實為趨勢，本所應考慮逐步建立。

Selective Kidney Disease Medium-2 (SKDM-2)用於培養 *Renibacterium salmoninarum*，其為細菌性腎病(Bacterial kidney disease)之病原，主要感染鮭魚，在我國氣候較少見。

*Flavobacterium columnare* 為淡水魚柱狀病(Columnaris Disease)之病原，適合生長溫度在 22 至 30 度，造成淡水魚爛鰓、爛鰭，為一種伺機性細菌，當高水溫期，水質不良，魚體受傷或健康狀況不佳時常會爆發感染，培養基可用 tryptone yeast extract salts agar(TYES)、Cytophaga agar 和選擇性培養基 Hsu-Shotts 培養，

在威斯康辛獸醫診斷實驗室將此菌作為例行培養分離，選擇性培養基 Hsu-Shotts agar 上可產生黃色或淡黃色，且邊緣不規則樹枝樣菌落，*Flavobacterium columnare* 細菌鑑定方法是利用 Griffin Screen：1) 可在含有 neomycin 和 polymycin B 培養基生長，例如 Hsu-Shotts agar 需添加 neomycin，2) 觀察菌落顏色及型態，3) 可產生一種具擴散性可分解 gelatin 的酵素，4) 可結合 0.1% 剛果紅(Congo red)以染色作確認，5) 產生具擴散性酵素可分解 chondroitin sulfate A (如圖四)，以上 5 個簡易方法可鑑別出 *Flavobacterium columnare*，另外，可挑純菌以 MALDI-TOF 細菌鑑定。

### 三、威斯康辛獸醫診斷實驗室之管理系統

威斯康辛獸醫診斷實驗室為美國獸醫實驗室認證協會(AAVLD)認證實驗室，與我國 ISO 17025 精神類似，經由獨立的第三公正單位對實驗室進行認證，以確認實驗室具有進行特定試驗的能力，實驗室認證不僅僅是品質系統的確認，還包含能力的展示。AAVLD 認證需每五年評鑑一次，WVDL 實驗室是每個月一次內部會議，每次以不同章節為主題，由該診斷實驗室負責人報告執行情況、提出問題及討論，主要精神為發現問題進行改善，該問題可能發生在任何實驗室或人員上，並非是對某個負責人或單位責難。

#### (一) 文件管理

該實驗室引進 Q-pulse 管理系統以電腦化進行管理，該系統為一套終端設備管理軟體，提供集中化遠端管理，將所有管理文件、操作手冊及標準作業流程皆放置於雲端系統中，每間實驗室皆有電腦連接可觀看標準作業流程，有效減少紙張及修改操作手冊時繁瑣的文件管理及保存問題，惟 Q-pulse 管理系統昂貴，將紙本轉化為電腦管理系統轉換時間長，該實驗室花費數年逐漸將文件電子化及流程完備。當增加新文件時，設定每年審核一次，以確保該文件是否合用；舊文件是每二年審核一次。實驗室試驗 SOP 分為管制文件及非管制文件，每印出一份管制文件皆有標示授權人員名稱、印出時間及版次，以免誤用舊版次。

## (二) 人員訓練

實驗室應確保實驗室內所有人員，包括新進人員、技術人員及非從事技術工作的行政人員，在進行被指派的工作前完成其資格鑑定。資格鑑定的意義為：對特定的工作有足夠的技能、知識、能力或取得執照或證書。WVDL 實驗室對新進人員會先進行 1 小時實驗室一般訓練，後續再針對各試驗技術分別進行訓練以及考核，考核並授權完成後，方完成人員訓練。並且該實驗室因人員流動率大，為減少人為操作失誤，多採自動化儀器設備，例如自動化機械手臂、自動化培養基配置、分注儀和自動化切片脫蠟染色儀等。

## (三) 儀器設備

落實所有儀器設備皆有識別、保養及校正，確保所有重要儀器維持正常使用狀態，儀器的監控極為重要。實驗室中所有儀器皆有識別，非認證儀器則會標誌「研究使用(research only)」，其中，計時器亦需校正，校正方法為利用美國政府公布標準時間網站([www.time.gov](http://www.time.gov))相差時間需在正負 2 秒。該實驗室新購具監控溫度的儀器裝置於冰箱或培養箱等實驗儀器，每 5 分鐘紀錄一次冰箱或儀器溫度，自動上傳至內部監控系統，可隨時登入查看異常狀態，並可發送警報至儀器負責人手機簡訊，通知異常情形。實驗室儀器因故障或校正因素搬離實驗室，當檢修完成送回實驗時，在重新開始使用該設備前，實驗室應測試或查驗其功能是否恢復正常。

#### (四) 不符合測試的發生

當實驗室中有不符合測試的事件發生時，需探究根本原因，避免重複發生同樣錯誤。首先採取補救措施(remedial action)，接下來進行根本原因分析(Root cause analysis)，使用適當的文件證據以及人員的面談等，包含所有牽涉此不符合事項的所有相關人員，使用工具例如 5 個為什麼(5 whys)、魚骨圖等，應蒐集不符合事項所有相關文件並加以分析，切忌針對特定的人，讓大家瞭解面談的目的是要解決問題，讓實驗室更進步。

## 附圖



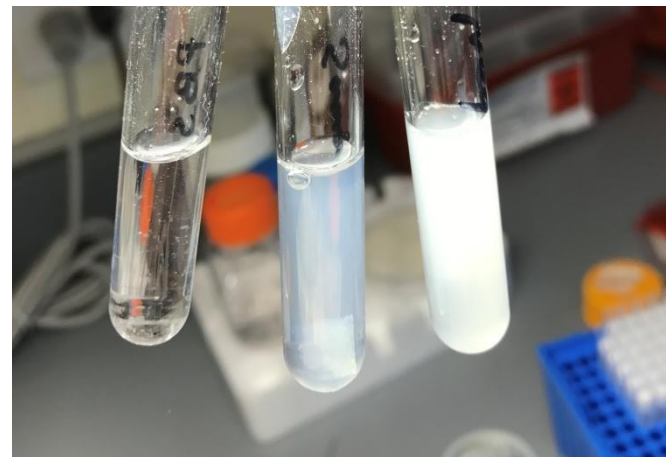
圖一、威斯康辛獸醫診斷實驗室建築物外觀。



圖二、與水生動物疾病專家 Dr. Hui-Min Hsu 合影。



圖三、MALDI-TOF 質譜儀機器



圖四、*Flavobacterium columnare* 鑑定試驗，實作添加 chondroitin sulfate A，左:空白對照組 (PBS)，中：*F. columnare*，顯示半混濁狀態，含有分解酵素，右：chondroitin sulfate A

## 肆、心得及建議

1. 本次前往美國威斯康辛州獸醫診斷實驗室主要考察魚類疾病診斷之流程與技術，該實驗室檢體來源為該州內地方單位或執業獸醫師，檢體由魚病獸醫師進行檢診，診斷流程包含剖檢、微生物學檢查、組織病理學檢查、分子生物學檢查、病毒分離；其中分子生物學檢查主要以聚合酶連鎖反應(PCR)與反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)檢驗病毒核酸；病毒分離過去用於每件魚類檢體均進行細胞接種，發現在水生動物體常有病毒存在，但無致病性，導致經常分離出病毒，耗費人力及經費研究；現在，該實驗室由於分子生物學檢查(如 PCR、RT-PCR)與病毒分離不符合成本效益，該實驗室已不作兩項檢驗，改送至合作實驗室進行。本所病毒檢驗目前以分子生物學檢查(PCR、RT-PCR)為主，若有核酸陽性之檢體再進行病毒分離，建議未來有未知重要病例時，再選用合適細胞株進行接種，較符成本效益。
2. 在魚類微生物學檢查中，該實驗室之診斷流程為 1)以血液培養基(Blood agar plate；BAP)或胰蛋白大豆瓊脂培養基(Tryptone soy agar；TSA)與 Hsu-Shotts 培養基同時進行細菌分離，2)進行細菌繼代與純化，3)選取單一菌落，以 MALDI-TOF 質譜儀機器進行細菌鑑定，即完成細菌鑑定並可回復結果；與過去細菌繼代與純化後，需再進行生化鑑定、Biolog 微生物鑑定系統、16S PCR 與基因定序，引進 MALDI-TOF 質譜儀機器後所花費時間大幅減少，且可以單一菌落進行鑑定，其數據來源為細菌 16S 基因序列包含大部分水生動物疾

病細菌且持續更新，準確度較 Biolog 微生物鑑定系統高。本所例行之細菌分離鑑定方法為 1) 以血液培養基進行細菌分離，2) 進行細菌繼代與純化，3) 細菌鑑定以自動生化鑑定儀(Vitek 2)、16S PCR 與基因定序進行。16S PCR 與基因定序所花費時間久，每次定序費用高，操作步驟多。建議本所未來可購置 MALDI-TOF 作為病原鑑定方法以符國際趨勢，提供快速診斷服務。

3. 威斯康辛獸醫診斷實驗室為美國獸醫實驗室認證協會(AAVL)認證實驗室，與我國 ISO 17025 相似，該實驗室引進 Qpulse 管理系統以電腦化進行管理，該系統為一套終端設備管理軟體，提供集中化遠端管理，將所有管理文件、操作手冊及標準作業流程皆放置於雲端系統中，每實驗室皆有電腦連接可觀看標準作業流程，有效減少紙張及修改操作手冊時繁瑣的文件管理及保存問題，惟 Q-pulse 管理系統昂貴，將紙本轉化為電腦管理系統轉換時間長。並且該實驗室因人員流動率大，為減少人為操作失誤，多採自動化儀器設備，例如自動化機械手臂、自動化培養基配置及分注儀和自動化切片脫蠟染色儀等。建議本所例行檢驗過程應朝向自動化取代人力方向，另外也應逐步符合實驗室認證要求，順應國際趨勢。
4. 該實驗室經費來源為檢驗費用與實驗耗材販售(包含自配培養基、血清、其他耗材等)，網站上有完整收費標準，經詢問得知包含地方政府單位送檢亦需收費，每年皆有利潤所得。建議本所為民服務檢驗亦應朝向收支併列收費，以因應計畫經費之短缺。