

出國報告(出國類別：考察)

赴德國與英國 OIE 豬瘟參考實驗室 進行管理經驗與診斷技術交流

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱：張家宜副研究員

派赴國家：德國與英國

出國期間：106 年 9 月 30 日至 106 年 10 月 13 日

報告日期：106 年 11 月 29 日

內容摘要

豬瘟 (Classical swine fever; Hog cholera) 為台灣豬隻重要之惡性傳染病，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。由於本所已於今(106)年5月獲世界動物衛生組織(World Organization for Animal Health; OIE)認可為豬瘟參考實驗室，為能更深入瞭解OIE參考實驗室之實地運作與流程，以及內部管理與檢驗報告所需表格及相關文書作業，並強化與其他國際間OIE豬瘟參考實驗室合作及我國國際能見度，因此派員考察德國漢諾威獸醫大學之歐盟(EU Reference Laboratory; EURL)暨OIE豬瘟參考實驗室及英國Animal and Plant Health Agency (APHA)機構之OIE豬瘟參考實驗室。於兩國OIE豬瘟參考實驗室研習豬瘟病毒與其他瘟疫病毒屬病毒之檢測技術與確效，包含細胞培養、瘟疫病毒屬之病毒分離、分子診斷技術與血清學區別診斷之檢測技術等。經由參訪兩OIE豬瘟參考實驗室，對參考實驗室之實務有更深入之瞭解，並藉由此次訪察與兩參考實驗室建立合作交流管道，對於本所未來運行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.....	12
附錄.....	14

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，豬瘟被世界動物衛生組織(World Organization for Animal Health; OIE)列入重大動物疾病。在臺灣，使用 LPC 兔化豬瘟疫苗後已有效控制豬瘟，然而仍存有豬瘟的威脅。欲清除豬瘟，須配合許多因素，為進一步建立可行之豬瘟撲滅計畫，需奠基在良好診斷與監測體系。我國在豬瘟研究與診斷已有多年經驗，研究成果也廣為國際學術界接受，有幸於今(2017)年 5 月獲得 OIE 認可成為 OIE 豬瘟參考實驗室之一，為善盡參考實驗室義務與國際責任，亟需汲取運行多年之參考實驗室的經驗，瞭解 OIE 參考實驗室之實地運作與流程及內部管理實務，並參考檢驗表格及相關文書作業。緣此，奉派赴德國漢諾威獸醫大學之歐盟(EU Reference Laboratory;EURL)暨 OIE 豬瘟參考實驗室及英國 Animal and Plant Health Agency (APHA)機構之 OIE 豬瘟參考實驗室參訪，並進行檢驗相關研習，如豬瘟病毒與其他瘟疫病毒屬病毒之檢測技術與品質確效。透過上述參訪，對未來本所 OIE 豬瘟參考實驗室需肩負之責任與義務，如實驗室能力比對試驗以及相關樣品準備事宜，探詢德國、英國之經驗，並藉由此次訪察，與兩參考實驗室在豬瘟診斷與研究上進行資訊交流，及建立合作管道，對於本所運行 OIE 參考實驗室有極大助益。

貳、行程安排

本次赴德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室及英國 Animal and Plant Health Agency (APHA)機構之 OIE 豬瘟參考實驗室考察，行程為 106 年 9 月 30 日至 106 年 10 月 13 日止共 14 天(詳如行程表)。

行 程 表

月 日(星期)	內容	地點
9 30 (六)	啟程赴德國漢諾威	桃園
10 1 (日)	到達德國漢諾威	德國漢諾威
	德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室考察	
	-雙方報告與座談	
10 2 (一)	-介紹 OIE 參考實驗室需擔負之任務	
10 至	-研習細胞培養技術	德國漢諾威
10 6 (五)	-研習瘟疫病毒屬之病毒分離技術	
	-研習瘟疫病毒屬之分子診斷技術	
	-研習瘟疫病毒屬之血清學區別診斷技術	
	-研習實驗室診斷之確效與品質管理	
	英國 Animal and Plant Health Agency (APHA)機構之 OIE 豬瘟參考實驗室考察	
	-雙方報告與座談	
10 9 (一)	-介紹 OIE 參考實驗室需擔負之任務	
10 至	-研習細胞培養技術	英國 APHA
10 11 (三)	-研習瘟疫病毒屬之病毒分離技術	
	-介紹高檢驗量自動化血清學檢測設備	
	-研習瘟疫病毒屬之分子診斷技術	
	-研習瘟疫病毒屬之血清學區別診斷技術	
	-研習實驗室診斷之確效與品質管理	
10 12 (四)	回程	英國 APHA
10 11 (五)	返抵國門	桃園

參、考察過程

一、OIE 參考實驗室介紹

至 2017 年，OIE 總共認可 267 間參考實驗室，分佈在 38 個國家，共涵蓋了 118 種疾病。依據 OIE 規範，參考實驗室被賦予任務如下：

1. 依據 OIE 標準，使用、推廣及公布診斷方法
2. 建議指定與替代試驗或疫苗成為 OIE 標準
3. 依據 OIE 標準建構參考試劑，實施及推廣 OIE 標準
4. 儲存疾病診斷試驗相關產品並分配給 OIE 會員國之國家實驗室
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. 維持實驗室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它實驗室間之確效試驗，以確保診斷結果之品質
13. 作為 OIE 的諮詢顧問

我國於 2017 年 5 月獲得 OIE 認可成為 OIE 豬瘟之參考實驗室。至 2017 年，OIE 共設立八個豬瘟參考實驗室，除我國外，另七個參考實驗室分別位於德國、英國、波蘭、西班牙、加拿大、日本與中國。

二、德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室

(一)、德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室介紹

德國漢諾威獸醫大學之歐盟與 OIE 豬瘟參考實驗室(圖一)，歸屬於 University of Veterinary Medicine Hannover 下的 Department of Infectious Diseases 的 Institute of Virology，實驗室於 1980 年設立，在豬瘟診斷與研究上皆位於領導地位。實驗室負責專家為所長 Prof. Dr. Paul Becher，實驗室分為病毒學/血清學部門、分子生物診斷部門與品管部門，包含獸醫師、研究人員、技術人員、動物照顧人員與行政人員(圖二)。

(二)、漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室座談與報告

在德方安排下舉行座談與報告，由 Dr. Sophia Austermann-Busch 介紹歐盟與 OIE 豬瘟參考實驗室之任務，與介紹如何填寫 OIE 參考實驗室之年度報告(圖三)、Dr. Anja Petrov 報告豬瘟病毒在血清檢體之不活化確效(圖四)、Dr. Alexander Postel 報告非典型瘟疫病毒之診斷研究(圖五)與 Dr. Denise Meyer 報告豬瘟病毒 ELISA 抗體檢測技術之研發(圖六)，我方人員報告「台灣豬瘟之研究」(圖七)。研習最後一天安排所有研究人員與我方人員討論未來學術合作方向。

(三)、研習「細胞培養技術」與「瘟疫病毒屬之病毒分離技術」

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、SK-6 與 MDBK 細胞。

2. 病毒分離

將病材分為原液與稀釋十倍，個別接種於細胞於 cell-culture tube，培養於 37°C 培養箱感作三天，再將冷凍解凍後離心之上清液轉到 24 孔盤進行第二次感作，之後染色檢測是否有病毒。德方表示有時病材稀釋十倍時有助於病毒之分離。

(四)、研習「瘟疫病毒屬之血清學區別診斷技術」血清中和試驗

1. 血清中和試驗

將待測血清加入 96 孔盤，連續稀釋後，個別加入力價 100TCID₅₀/50 μ l 之豬瘟病毒、牛病毒性下痢病毒(Bovine viral diarrhea virus;BVDV)與邊境病毒(Borderdisease virus; BDV)，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。

2. 血清中和試驗染色

將 96 孔盤細胞固定後，加入可辨認瘟疫病毒屬病毒之抗血清作為一抗，於 37°C 培養箱感作一小時後，再加入標示 peroxidase conjugated 作為二抗，於 37°C 培養箱感作一小時後，加入呈色劑判讀。

3. 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)與邊境病毒(Borderdisease virus; BDV)之血清中和力價是否有交叉反應，若豬瘟病毒的血清中和力價高於或等於其他病毒的力價，則判定為豬瘟病毒抗體陽性反應；若豬瘟病毒的血清中和力價相較其他病毒的抗體力價低三倍(含三倍以上)，則判定為交叉反應，並排除豬瘟病毒抗體陽性。舉例來說，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。考慮到未來會接受 OIE 會員國委託檢體，可能遇到其它瘟疫病毒屬感染血清，需透過上述血清學檢驗進行區別，故仍需及早建立上述技術與測試。

(五)、研習「瘟疫病毒屬之分子診斷技術」

1. Real-Time RT-PCR

(1) CSFV specific TaqMan Probe：豬瘟病毒專一性

(2) Virotype CSFV RT-PCR：豬瘟病毒專一性

(3) Pan-pestivirus SYBR Green：可檢測大多數瘟疫病毒屬病毒

搭配不同檢測，可區別豬瘟病毒與其他瘟疫病毒屬病毒。

2. Conventional RT-PCR

傳統 RT-PCR 可將 PCR 產物基因定序以進一步作基因型別分析。

(六)、研習「研習實驗室診斷之確效與品質管理」

設立品質管理部門(Quality Management)，設有專職人員負責實驗室檢驗的品質管控。將所有檢驗相關步驟建立相當詳盡之 SOP 與相對應之紀錄文件，每次檢驗均會完整記錄所有的診斷步驟與檢測結果，紀錄將會保存十年。參考實驗室人員除每年定期訓練外，內部並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。

三、英國 Animal and Plant Health Agency (APHA)機構之 OIE 豬瘟參考實驗室介紹

(一)、Animal and Plant Health Agency (APHA)機構介紹

APHA 機構於 1894 年就已成立，其任務為增進食品的安全、促進農業發展、預防並撲滅動物傳染病的危害、與促進農場動物之動物福利。目標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。APHA 組織架構分成 Epidemiology、Pathology、Virology、Wildlife 與 Bacteriology 部門，所從事研究涵括病毒疾病、細菌疾病、人畜共通疾病、新浮現疾病、野生動物疾病、流行病學及病理學等範疇。

APHA 擁有多間國家參考實驗室，涵蓋多種動物疾病與人畜共通傳染病，有 15 間實驗室為 OIE 參考實驗室，其中 8 間實驗室從事病毒性疾病檢驗，分別為豬瘟(Classical swine fever)、牛病毒性下痢(Bovine viral

diarrhea)、家禽流行性感冒(Avian influenza)、新城病(Newcastle Disease)、狂犬病(Rabies)、牛地方流行性白血病(Enzootic bovine leukosis)、馬病毒性動脈炎(Equine viral arteritis)以及牛傳染性鼻氣管炎(Infected Bovine Rhinotracheitis)，其中家禽流行性感冒、新城病及布氏桿菌(Brucellosis)參考實驗室同時列入世界糧農組織(Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO)參考實驗室(圖八)。OIE 豬瘟參考實驗室歸屬於病毒學部門下之哺乳動物病毒部門，實驗室專家為 Prof. Trevor Drew、實驗室負責人為 Dr. Helen Crooke。

(二)、英國 Animal and Plant Health Agency (APHA)機構之 OIE 豬瘟參考實驗室專題演講與座談

我方人員在英方安排下進行專題演講「台灣豬瘟之研究」(圖九)，隨後舉行座談，Dr. Jane Edwards 介紹豬瘟病毒細胞性免疫之研究、Dr. Ronan McCarty 報告豬瘟病毒感染豬隻之 Microarray 分析，與 Dr. Rebecca Strong 報告瘟疫病毒屬病毒之分子檢測技術。座談中就未來臺英合作方向作討論。

(三)、研習「細胞培養技術」與「瘟疫病毒屬之病毒分離技術」

1. 細胞培養

技術人員示範操作 PK-15 細胞之培養與繼代。

2. 病毒分離

將病材個別接種細胞於 cell-culture tube，培養於 37°C 培養箱分別感作 24, 48 與 72 小時，之後染色檢測是否有病毒。若為緊急病例，則在感作 24 小時就會先染色確認是否陽性。

(四)、研習「瘟疫病毒屬之血清學區別診斷技術」血清中和試驗

1. 血清中和試驗染色

將待測血清加入 96 孔盤，連續稀釋後，個別加入力價 100 TCID₅₀/50 μ l 之豬瘟、牛病毒性下痢病毒(Bovine viral diarrhea virus;BVDV)與邊境病毒(Borderdisease virus; BDV)，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。

2. 血清中和試驗染色

將 96 孔盤細胞固定後，加入可辨認瘟疫病毒屬病毒之抗血清作為一抗，於 37°C 培養箱感作一小時後，再加入標示 peroxidase conjugated 作為二抗，於 37°C 培養箱感作一小時後，加入呈色劑判讀。

3. 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。若豬瘟病毒的血清中和力價高於或等於其他病毒的力價，則判定為豬瘟病毒抗體陽性反應；若豬瘟病毒的血清中和力價低於其他病毒的力價一階至兩階稀釋倍數，則判定為交叉反應，可排除豬瘟病毒抗體陽性。

(五)、研習「瘟疫病毒屬之分子診斷技術」

1. Real-Time RT-PCR

- (1) CSFV specific TaqMan Probe：豬瘟病毒專一性
- (2) Virotype CSFV RT-PCR：豬瘟病毒專一性
- (3) CSFV and ASFV TaqMan Probe：可檢測豬瘟病毒與非洲豬瘟病毒
- (4) Pan-pesti probe for CSFV, BDV and BVDV Type 1：可檢測豬瘟病毒、邊境病毒與牛病毒性下痢病毒第一型
- (5) Probe for BVDV Type 2：牛病毒性下痢病毒第二型專一性
- (6) Probe for BDV：邊境病毒專一性

搭配不同檢測，可區別豬瘟病毒、邊境病毒、牛病毒性下痢病毒第一型、牛病毒性下痢病毒第二型，以及非洲豬瘟病毒(African swine fever

virus; ASFV)。

2. Conventional RT-PCR

傳統 RT-PCR 可將 PCR 產物用於基因定序以作基因型別分析。

(六)、研習「研習實驗室診斷之確效與品質管理」

設立品質管理部門(Quality Management)，設有專職人員負責實驗室檢驗的品質管控。每次檢驗均會完整記錄所有的診斷步驟與檢測結果，紀錄將會保存至少五年。參考實驗室人員除每年定期訓練外，內部並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。

APHA 機構將所有檢驗相關步驟建立相當詳盡之 SOP 與相對應之紀錄文件，並將 SOP 做成線上資料庫，對各類疾病與不同檢驗方法進行編號，檢驗人員可在資料庫直接下載，且下載時文件會附上下載日期，以確保是最新版本。SOP 內容若要修正皆需經過確效及審核，且需經過申請審核後才可提供給其它機構。

APHA 儀器之確效、使用紀錄皆非常確實。每台儀器皆有編號，每次試驗使用儀器之編號會確實記錄。冰箱會放 probe 由電腦記錄溫度，若有異常會立即送出警告。

APHA 有專職部門負責試驗相關試劑之配置工作，並會於試驗上標示配製日期與有效期限，過了有效期限之試劑不再使用。

肆、心得及建議

- 一、德國與英國兩國之 OIE 豬瘟參考實驗室對實驗室之檢驗控管非常嚴謹，兩實驗室皆參照 ISO17025 品質管理規範建立豬瘟病毒與其他瘟疫病毒屬病毒之檢測技術與確效之標準作業程序(Standard Operating Procedures; SOP)，兩國參考實驗室每次檢驗均會完整記錄所有的檢測條件與結果，此紀錄將會

保存多年；兩國實驗室均設立品質管理部門(Quality Management)，設有專職人員負責實驗室檢驗的品質管控，故儀器確效、使用紀錄皆非常確實。參考實驗室人員除每年定期接受訓練外，機構內部並定期舉辦人員能力比對測試，以確保每位操作人員操作符合標準。此外，英國參考實驗室會於無豬瘟疫情爆發時，每半年演習豬瘟爆發之診斷流程，以確保檢驗品質。

二、為確保診斷之品質、確效及可追溯性，診斷實驗室應符合 ISO 17025 要求，針對診斷所需之儀器使用與校正、試劑配置、陽陰性對照檢測結果及使用紀錄等，皆需詳實記錄。在參訪過程中，兩國實驗室之診斷人員在回答問題時，皆可非常快速的找出相對應之 SOP 或紀錄文件，可見平日對文件之管理與紀錄相當確實，值得我們借鏡。

三、在檢測樣本時，例如本次研習的豬瘟病毒與其他瘟疫病毒屬病毒之病毒分離、分子診斷技術與血清學區別診斷之檢測技術，皆會放入陰性與陽性對照組，以掌控每次檢測品質，而在即時聚合酶鏈鎖反應，會額外加入對照檢體 (internal control)，以監控核酸抽取品質，排除核酸抽取不當造成陰性反應，故本所在建立前述技術或檢測時，亦須考慮監控檢測品質與核酸抽取等前置作業的品質等細節，以確保檢測品質與正確性。

四、本所目前已參考 OIE 診斷手冊建立豬瘟病毒檢測技術，惟考量 OIE 豬瘟參考實驗室需協助會員國作診斷，未來可能遇到豬瘟病毒以外之瘟疫病毒檢體，亦即實驗室不僅是針對豬瘟病毒檢體，仍需對與其它同屬之瘟疫病毒，例如：牛病毒性下痢病毒、邊境病毒等都需建立區別診斷技術，且須持續研發診斷方法，以求診斷結果正確無誤。目前尚待建立其它瘟疫病毒之檢測技術與確效。本次研習期間已向德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室要求分讓不同基因型別豬瘟病毒株、牛病毒性下痢病毒與邊境病毒，做為陽性對照(或標準)物質，當建立其它瘟疫病毒之檢測技術後可做評估與測試，且可作為陽性對照。德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室每年皆會舉辦豬瘟診斷能力測試比對，近年來每年有不同國家診斷實驗室(約四十

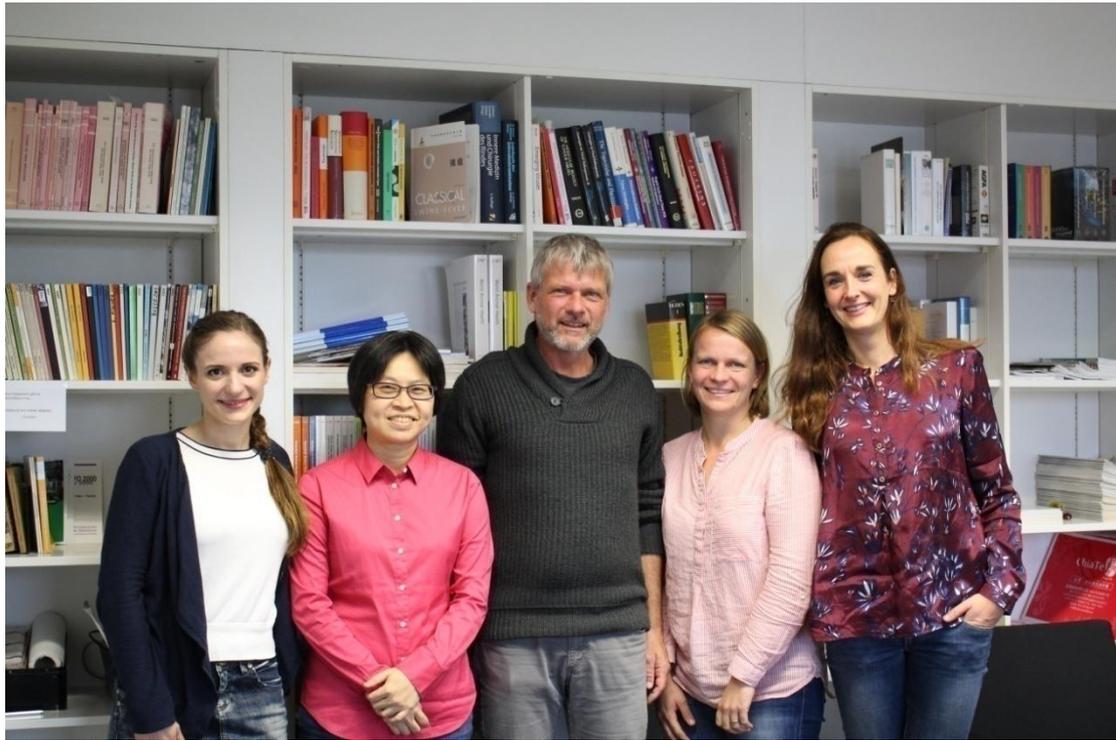
餘個)參加，本所實驗室今年也應邀參加，可藉此機會，檢視我方對不同基因型別豬瘟病毒株之診斷能力，有助於本所建立豬瘟病毒與其它瘟疫病毒之檢測技術與評估測試，以符合國際參考實驗室之檢驗水準。本次研習期間，德方並提議未來可由各間OIE豬瘟參考實驗室輪流定期舉辦能力測試比對，藉此比對審視參考實驗室之檢驗能力。

五、為促成豬瘟在全球之控制與撲滅，英國 OIE 豬瘟參考實驗室專家 Prof.Trevor Drew 提議建立 OIE 豬瘟參考實驗室合作網路，由 8 間 OIE 豬瘟參考實驗室與其它國際上研究豬瘟之重點實驗室參與，將規劃成立專屬網頁並每年固定召開會議，且會加強各實驗室之間樣材與診斷技術之分享與研究人員之交流。未來我國加入此合作網路後，將有助於提昇我國之國際地位，並可參考世界各國防疫豬瘟之經驗，對未來我國撲滅豬瘟目標之達成有極大助益。

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：與德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室人員合影。所長 Prof. Dr. Paul Becker (正中)、Dr. Sophia Austermann-Busch(右一)、Dr. Denise Meyer (右二) 與 Dr. Anja Petrov (左一)。



圖三：德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室會議室。Dr. Sophia Austermann-Busch 介紹歐盟與 OIE 豬瘟參考實驗室



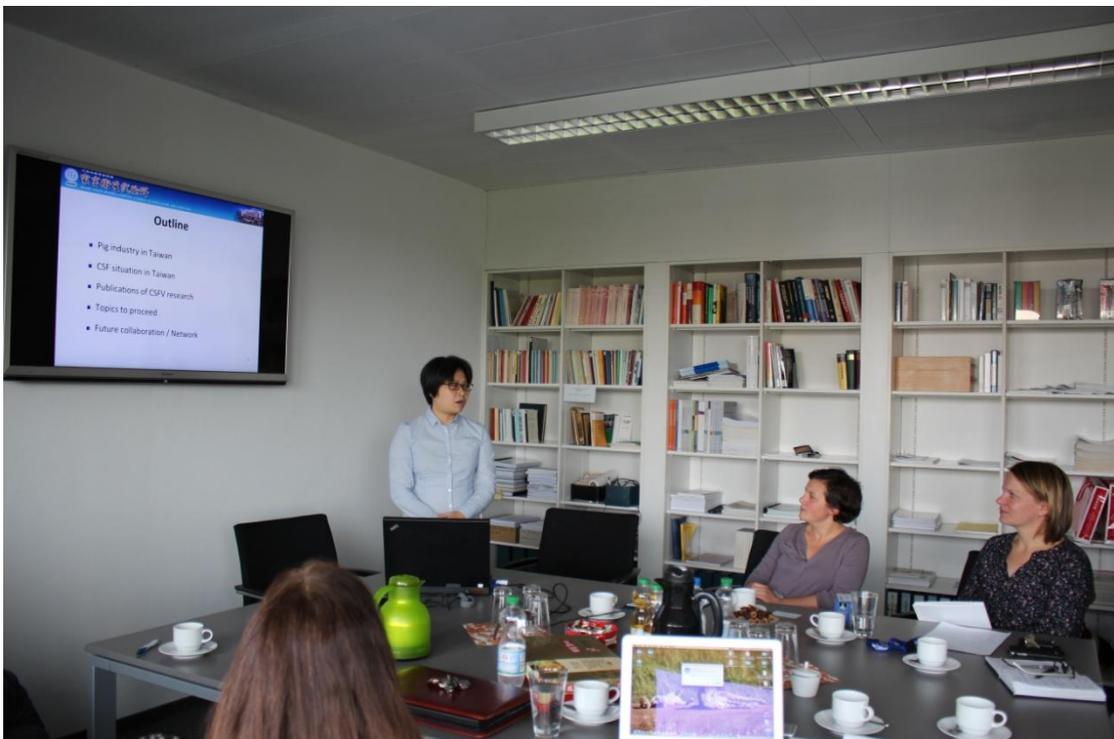
圖四：德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室會議室。
Dr. Anja Petrov 報告豬瘟病毒在血清檢體之不活化確效



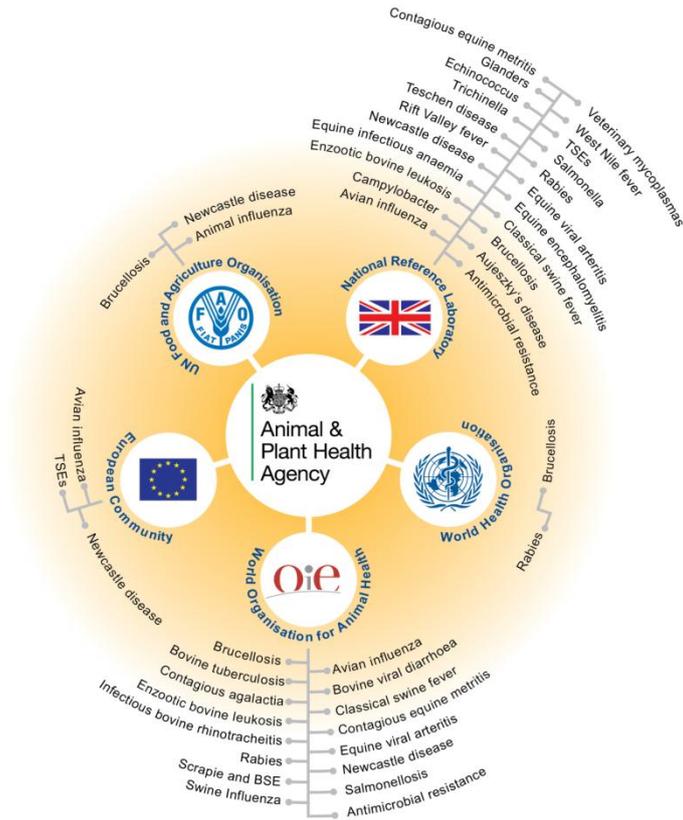
圖五：德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室會議室。
Dr. Alexander Postel 報告非典型瘟疫病毒之診斷研究



圖六：德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室會議室。
Dr. Denise Meyer 報告豬瘟病毒 ELISA 抗體檢測技術之研發



圖七：德國漢諾威獸醫大學之歐盟暨 OIE 豬瘟參考實驗室會議室。本所
張家宜副研究員報告「台灣豬瘟之研究」



圖八：英國 Animal and Plant Health Agency (APHA)機構之參考實驗室架構



圖九：英國 Animal and Plant Health Agency (APHA)機構之 OIE 豬瘟參考實驗室會議室。本所張家宜副研究員進行「台灣豬瘟之研究」專題