

出國報告(出國類別：實習)

參加豬生殖及呼吸綜合症與其它豬 病區域實驗室診斷訓練班

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱：王羣助理研究員

派赴國家：中國

出國期間：104 年 4 月 12 日至 104 年 4 月 18 日

報告日期：104 年 7 月 8 日

內容摘要

世界動物衛生組織（World Organisation for Animal Health,OIE）於 104 年 4 月 13 日至 4 月 17 日在中國北京市舉辦豬生殖及呼吸綜合症與其它豬病區域實驗室診斷訓練班（Regional Hands-on Laboratory Training on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) and Other Swine Disease Diagnosis）。本次訓練由 OIE 提供旅費(包括機票、住宿及日支生活費)，邀請東亞各會員國派員參加該次訓練，其中包括蒙古、柬埔寨、越南、寮國、馬來西亞、菲律賓、泰國、印尼以及我國。本次訓練將由中國動物疫病預防控制中心(China Animal Disease Control Center, CADCC)派員擔任講師，針對豬生殖與呼吸綜合症病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)及口蹄疫(Foot-and-mouth disease virus, FMD)等豬隻病毒進行多項診斷技術之研習，其中包括：細胞培養、病毒分離、血清學檢測、即時反轉錄聚合酶鏈檢測等多項研究課題。除此之外，研習期間亦邀請各會員國之學員針對其國內豬隻疾病診斷現況進行報告。藉由參與次研習，將可了解亞洲鄰國的豬隻疾病動向及研究成果，作為我國豬隻疾病防治上的參考，進而保護我國畜產事業。

目 次

壹、目的.....	4
貳、行程安排.....	5
參、研習機構介紹.....	6
肆、研習課程.....	7
伍、研習期間觀察與心得.....	15
陸、檢討與建議.....	16
柒、附錄.....	18

壹、目的

自 2006 年開始，中國大陸及東南亞許多國家養豬場豬隻出現了以高熱、厭食、眼結膜炎、咳嗽、腹式呼吸等呼吸道症狀，以及出現後軀無力、無法站立或搖擺等神經症狀以及高死亡率等嚴重疫情。經由臨床症狀觀察、病理學診斷、病毒分離以及分子生物學檢測，發現主要病原為豬繁殖與呼吸綜合病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV)。但是該病毒與早期發現之 PRRSV 不論是在基因序列、病毒之毒力與致病性均出現相當之差異，又因發病豬隻出現嚴重臨床症狀及較高死亡率，因此將其稱為高病原性 PRRSV(High Pathogen PRRSV; HP PRRSV)。由於 HP PRRSV 大量感染豬隻，造成疫情一發不可收拾及養豬產業極為嚴重經濟損失，因此如何有效診斷及區別 HP PRRSV 與一般傳統 PRRSV 感染，就顯得相當重要。世界動物衛生組織 (World Organisation for Animal Health, OIE) 有鑑於此，與中國動物疫病預防控制中心(China Animal Disease Control Center, CADCC)合作，由其轄下之 PRRS 參考實驗室派出專家擔任講師，辦理 PRRS 與其它豬病區域實驗室診斷訓練班 (Regional Hands-on Laboratory Training on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) and Other Swine Disease Diagnosis)，並廣邀東亞地區各會員國至少派員 1 名與會，接受 OIE PRRS 參考實驗室講師群的各项指導與訓練，採實際操作方式以求精益求精，同時由各國學員進行國情報告(Country Report)，彼此交換最新疫情資訊及心得，並討論未來跨國合作事宜。

貳、行程安排

課程 日期	上午	下午
4 月 12 日(日)		搭機前往北京國際機場，並入住北京大興賓館。
4 月 13 日(一)	• 前往 OIE PRRS 參考實驗室報到 • 主辦單位致詞 • 各國與會學員自我簡介及進行國情報告 • 拍攝團體照	• MARC 145 細胞之培養和繼代 • 血清學檢測技術之介紹
4 月 14 日(二)	• 實驗室風險評估之簡介 • 檢體之採集及乳劑之製作	• 病毒分離及培養 • 血清學檢測之操作
4 月 15 日(三)	• 反轉錄即時聚合酶鏈反應之簡介 • 課程討論	• 反轉錄即時聚合酶鏈反應之操作
4 月 16 日(四)	• 酵素結合免疫吸附法簡介及操作 • 課程討論	• 酵素結合免疫吸附法操作 • 細胞病變之觀察
4 月 17 日(五)	• 病毒力價測定之簡介與計算	• 綜合討論 • 完成所有訓練課程
4 月 18 日(六)	搭機返回桃園國際機場	

參、研習機構介紹

本次舉辦辦理 PRRSV 與其它豬病區域實驗室診斷訓練班之 OIE PRRS 參考實驗室，位於中國北京市大興區，係經由 OIE 於 2012 年正式核可成為繼波蘭之後世界上第二座 PRRS 參考實驗室（圖一）。該實驗室附屬於中國動物疫病預防控制中心，該實驗室主要從事於豬病診斷監測、病原生態學、分子流行病學、診斷技術、生物製劑、致病機制和免疫機制等研究工作。其中在 PRRS 之相關試驗研究方面，包括疫情分析、流行病學調查、診斷技術研發、基因序列分析及疫苗研究等方面均取得相當之進展。目前該參考實驗室之主要任務與工作內容如下：

一、透過現場調查、採樣（或地方防疫單位送檢）以及實驗室檢測與分析，即時瞭解中國及相鄰國家豬群中不同基因型 PRRS 病毒流行分佈狀況及 HP PRRS 病毒變異情況，以完成 PRRS 流行病學調查研究。

二、利用蛋白質體學和分子生物學等技術探討 PRRS 的致病機制，並持續進行 PRRS 之診斷、預防、控制和撲滅等各項技術研究，以完成 PRRS 基礎與應用研究。

三、進行 PRRS 之病毒收集、鑑定，高力價陽性血清製備、PRRS 診斷方法標準化修訂，以及完成 PRRSV 診斷試劑製備工作。

四、完成 OIE PRRS 參考實驗室年度報告，並於每年年底向 OIE 提交年度工作報告和次年度工作計畫書。

五、加強國際交流與合作：積極參與 OIE 官方活動以及與其它 OIE 豬病參考實驗室交流，積累 PRRS 防治經驗與技術。另一方面積極協調指導相鄰國家 PRRS 防治工作，有效提升區域防治技術與水準。



圖一、附屬於中國動物疫病預防控制中心之 OIE PRRS 參考實驗室，座落於北京市大興區，該實驗室為世界上第二座 PRRS 參考實驗室。

肆、研習課程

4 月 12 日(星期日)

於晚上 7 時搭乘海南航空班機由桃園機場出發，於晚上 10 時 30 分抵達北京國際機場，並於 13 日凌晨 1 時抵達下榻之大興賓館。

4 月 13 日(星期一)

早晨於大興賓館大廳集合後，搭乘接駁巴士前往中國動物疫病預防控制中心(China Animal Disease Control Center, CADCC)會議室。首先由中國農業部張仲秋總獸醫師、OIE 代表釘田博文先生以及中國動物疫病預防控制中心辛盛鵬副主任分別致歡迎辭，並向各國學員介紹講師姓名及專長(圖二)。然後由各國學員進行簡單自我簡介及國情報告，依序為蒙古、柬埔寨、台灣、印尼、寮國、緬甸、菲律賓、泰國及越南。我個人以台灣常見隻豬隻病毒性病原(Common and important Swine Viral pathogen in Taiwan)為主題，向在場與會人員進行簡報。待各國學員完成國情報告後，各國學員與講師群於 CADCC 大樓前拍攝團體照(圖三)。



圖二、中國農業部張仲秋總獸醫師、OIE 代表釘田博文先生以及中國動物疫病預防控制中心辛盛鵬副主任分別致歡迎辭(由左至右)，同時簡介 CADCC 之業務及研究成果。



圖三、本所豬瘟研究組王羣助理研究員向各與會人員進行國情報告(左圖)；待各會員國之國情報告完成後，各國學員與 CADCC 講師群於行政大樓前拍攝團體照(右圖)。

下午首先前往 OIE PRRSV 實驗室之會議室，由講師原霖博士向大家介紹各種不同血清學檢測技術，其中包括螢光抗體檢測法(Fluorescent antibody test, FAT)、免疫過氧化酶檢測法(Immunoperoxidase monolayer assay, IPMA)以及病毒中和試驗法(virus neutralisation test, VN)。然後為大家介紹 MARC 145 細胞之培養和繼代的方法，並引領學員穿戴實驗衣、帽、鞋後進入細胞培養室內(圖四)，然後親自示範 MARC 145 細胞培養、繼代及講解應注意事項。



圖四、CADCC 講師指導學員們正確穿戴實驗衣、帽、鞋方式，然後引領大家進入細胞培養室，並詳細講解及示範 MARC 145 細胞培養、繼代和許多應注意事項(左圖)。然後引領各國學員，利用無菌操作台進行 MARC145 細胞之繼代與培養(右圖)。

在實作方面，學員們首先在細胞培養室門口之緩衝區穿戴實驗衣、帽、鞋後，進入細胞培養室內將事先培養於 150 cm² 面積之 MARC145 細胞塑膠培養瓶由細胞培養箱內取出，置於無菌操作台內，然後將細胞培養液倒棄，加入 5 到 10 ml 之細胞消化液 (Trypsin / versene solution, TVS；解凍並回溫至室溫) 連續洗二次。第二次倒棄細胞消化液時，保留 5 ml 於瓶內，再將細胞培養瓶置於 37°C 作用 1~2 分鐘後，取出拍打瓶壁，可觀察到細胞自瓶壁脫落。加入含 10 % 胎牛血清之細胞培養液約 30 ml 至瓶內，利用無菌吸管將細胞均勻沖散。倒入離心管內離心 1000 rpm 10 分鐘，將上清液倒棄，加入適量的細胞培養液再均勻沖散。另取少量之細胞懸浮液置入血球計算盤計算細胞濃度，再以適量的細胞培養液，調整細胞濃度至 3×10^5 cells / ml，並於塑膠組織 6 孔培養盤之每一孔(well)加入 3 ml 細胞懸浮液，於 37°C、5% CO₂ 培養箱內培養 72 小時，待其使細胞生長成 monolayer，作為分離 PRRS 病毒之用。

4 月 14 日(星期二)

上午於 OIE PRRS 參考實驗室之會議室向各國學員講解有關實驗室生物安全之風險評估、管控、救災及人員進出管制之相關管理事宜。尤其是人員進出管制必須應詳實記錄，人員攜帶的物品也予以嚴格管控。除此之外，對於實驗室之動線規劃亦有詳盡說明，藉由區域的劃分，動線的規劃來做不同區域的分別。例如處理臨床檢體或血清樣本之區域與其他區域即有所區別，而使用生物安全操作櫃更有嚴格規定，例如培養細胞及接種病毒須在各自獨立區域，二者之間不可混用。而不論是進入細胞培養或病毒接種區域之前，均須於緩衝區先行更換實驗衣、帽、鞋套、手套以及口罩，方可進入實驗區域。進入一般實驗區域之前，亦須更換實驗衣、鞋及穿戴手套等。除此之外，一般使用電泳來檢測 DNA 的染劑物質因具有致癌性，使用上必須非常小心，因此必須於隔離之小房間並限制區域來使用。而公共區域明顯處，亦設置淋浴設備、滅火器及斷電照明系統，以備不時之需。各種廢棄物亦須做好分類，具感染性及一般性之廢棄物須放置在不同容器，以免造成生物性汙染及衍生安全問題

然後全員前往實驗室進行實務訓練，講師原霖博士介紹應如何採集何種臟器組織，並示範應用玻璃研磨棒將採集之臟器組織研磨並製作成 10X 乳劑，為後續之 PRRS 病毒分離及即時反轉錄聚合酶鏈反應(real-time reverse transcription polymerase chain reaction, real-time RT-PCR)等實驗預作準備。收先採集具有 PRRS 臨床症狀或剖檢出現病變之衰弱仔豬檢體（扁桃腺、淋巴結、脾臟、肺臟、肝臟等），以剪刀將其剪碎，加入適量之緩衝溶液以玻璃研磨棒將其研磨充分均質化後(圖七)，保存於-70℃。而所有器械在使用過後須確實清洗及消毒，以備後續實驗使用。

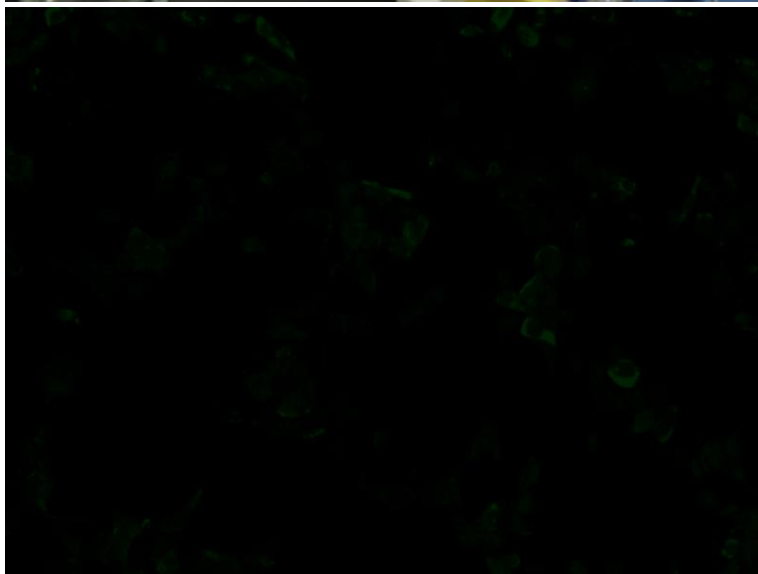


圖七、應用玻璃研磨棒將採集之臟器組織研磨並製作成 10X 乳劑，以備後續實驗之所需。

下午之課程主要以 PRRS 之病毒分離，以及 FAT、IPMA 等 PRRS 血清學診斷技術為主。首先將已均質化之檢體 0.2 ml 接種於 MARC145 細胞，於 37°C、5% CO₂ 感作 1 小時、以滅菌滅菌磷酸緩衝液(phosphate buffer saline; PBS)沖洗 3 次，置入含 2%胎牛血清之新培養液培養 4 小時，將培養液倒棄，以 PBS 沖洗 3 次，置入含 8%胎牛血清之新培養液於 37°C、5% CO₂ 培養箱內培養 (圖八)。另外取出事先已接種 PRRSV 病毒之 MARC 145 細胞 6 孔盤，以 FAT 螢光抗體法進行檢測。先將細胞培養液倒棄並以 PBS 沖洗 3 次後風乾，再以 10%中性福馬林固定 10 分鐘，經 PBS 沖洗 3 次，加入 1ml 之 PRRSV 標準血清 (1:100 稀釋) 於 37°C 感作 40 分鐘，經 PBS 沖洗 3 次，再加入 1ml 之山羊抗豬免疫螢光抗體 (1:100 稀釋) 於 37°C 感作 40 分鐘，再經 PBS 沖洗 3 次，最後以螢光顯微鏡進行鏡檢，可見 MARC 145 細胞之細胞和呈現專一性之螢光反應(圖九)。



圖八、本所豬瘟研究組助理研究員王羣正進行 FAT 螢光抗體染色實驗，將山羊抗豬免疫螢光抗體加入 6 孔盤內。



圖九、經 FAT 螢光抗體染色之後，可見受 PRRSV 感染之 MARC 145 細胞之細胞質呈現明顯之綠色螢光反應。

4 月 15 日(星期三)

本日之課程主要為 real-time RT-PCR 之原理介紹與實際應用。首先由 CADCC 講師向各國學員簡介 real-time RT-PCR 之原理，包括 SYBR 以及鐵克曼(Taq-Man)系統，緊接著讓各國學員開始實務操作。本次實驗採用 CADCC 研發、授權民間生技公司生產之口蹄疫 real-time RT-PCR 套組(圖十)。該套組可抽取動物組織之 RNA，並利用內附之診斷試劑進行 real-time RT-PCR 反應。

而其操作步驟如下：將前述之 10X 乳劑依據該套組之 RNA Extraction kits 進行 RNA 萃取。先取 100 μ l 均質化之乳劑加入 100 μ l 之 Lysis Buffer，置於室溫感作至檢體完全溶解，再加入 200 μ l 之無水酒精，震盪 15 秒；將樣品混合液置入該套組提供之 Spin column 之內(含 2ml 之收集管)，離心 6000g 約 1 分鐘，再將 Spin column 置入一新 2ml 之收集管，並加入 500 μ l 之 Wash buffer，離心 6000g 約 1 分鐘，再將 Spin column 置入一新 2ml 之收集管，並加入 500 μ l 之 Wash buffer，超高速離心約 3 分鐘，將 Spin column 置入一新 1.5ml 之離心管，加入 200 μ l 之 Elute buffer 感作 1 分鐘，離心 6000g 約 1 分鐘，即可萃取出 RNA 核酸。而 real-time RT-PCR 反應液包括 6 μ l RNA、10 μ l FMD TaqMan MasterDNA polymerase、30U Reverse Transcriptase、1 M 引子與 0.15M TaqMan probe，並補充 2 次滅菌蒸餾水至 20 μ l。將此反應液放置於 ABI 7500 進行反應，其條件如下：42 $^{\circ}$ C 30 分鐘，94 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒進行 35 個循環。反應完畢後經比對實驗結果，各國學員均能圓滿完成該項實驗。



圖十、FMD real-time RT-PCR 診斷試劑組為 CADCC 自行開發，並授權民間生物技術公司生產，再由其年度收入分享權利金。其設計主要採用鐵克曼探針系統(TaqMan Probe)，使用上十分方便及簡易，而完成實驗時間亦極短。

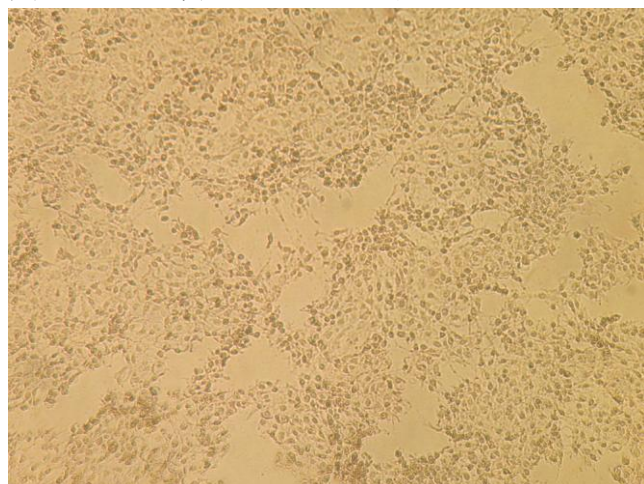
4 月 16 日(星期四)

本日之課程主要為酵素結合免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)簡介及操作。首先由 CADCC 向各國學員簡介 ELISA 之原理，然後讓各國學員開始實務操作。本次實驗採用法國 LSI Vet 公司研發之 PRRS 血清抗體檢測 ELISA 試劑組。將待測血清以內附之 DB PRRS/US 稀釋液進行 20 倍稀釋，置於室溫感作 5 分鐘，再以內附之 DB PRRS/US 稀釋液進行 5 倍稀釋，合計為 100 倍稀釋。之後於 96 孔反應盤每孔加入 50 μ l 之稀釋樣品，置於 37°C 作用 1 小時。以 wash buffer 清洗三次後，每孔分別加入 50 μ l 內附之 4-Conjugate PRRS/US，置於 37°C 作用 1 小時。以 wash buffer 清洗三次後，每孔加入 50 μ l 之 C-Substrate 避光置於室溫作用 10 分鐘，每孔加入 50 μ l 之 D-Stop 停止呈色。最後以 ELISA reader 讀取 OD450 nm/620 nm 數值。依據實驗結果顯示，各國學員均能正確操作，正確判讀血清樣品是否為 PRRS 陽性或陰性 (圖)。



圖十一、本次實驗採用法國 LSI Vet 公司研發之 PRRS 抗體檢測 ELISA 試劑組

除此之外，大家也前往細胞培養室進行觀察，可發現星期二接種 PRRSV 病毒之 MARC 145 細胞出現明顯之細胞病變 (Cytopathic effects; CPE)，顯示當日之實驗操作非常成功，有助於後續之試驗研究。



圖十二、MARC 145 細胞接種 PRRSV 病毒後，出現明顯之細胞病變 (Cytopathic effects; CPE)。

4 月 17 日(星期五)

上午開始進行 PRRSV 之病毒力價之測定與計算：收先將保存於-70℃之 PRRSV 病毒解凍後以細胞培養液由 10^{-1} 至 10^{-6} 作 10 倍連續稀釋，並從最高稀釋階 (10⁻⁶) 開始，於 96 孔塑膠細胞培養盤第 6 欄每孔放入 50 μ l 10^{-6} 經稀釋之病毒液、第 5 欄為 10^{-5} 、第 4 欄為 10^{-4} ，以此類推，直到第 1 欄每孔放入 10^{-1} 經稀釋之病毒液 50 μ l，再於第 1 至 6 欄每孔放入 50 μ l 細胞培養液並於第 7 及第 8 欄每孔放入 100 μ l 細胞培養液。上述 96 孔塑膠細胞培養盤，每孔放入 50 μ l 細胞懸浮液（細胞濃度為 3×10^5 /ml），置入 37℃、5% CO₂ 培養箱培養 120 小時。然後於倒立螢光平盤顯微鏡下判讀，有 CPE 者表示有病毒感染，其 TCID₅₀ 之計算依據 Reed-Muench Methods 法計算（實驗部分已於 4 日前進行，本日僅由學員進行力價判讀之工作）。

表一、PRRSV 力價之測定

培養盤欄號	1	2	3	4	5	6	7	8
病毒稀釋 倍 數	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	正常細胞 對照組	正常細胞 對照組
稀釋液	900 μ l	900 μ l	900 μ l	900 μ l	900 μ l	900 μ l	—	—
LPC 種毒	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	—	—
稀釋病毒液	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	—	—
細胞培養液	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	100 μ l	100 μ l
細胞懸浮液	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
培養	將 96 孔塑膠細胞培養盤置入 37℃、5% CO ₂ 培養箱培養 120 小時							
	觀察病毒之 CPE							
	進行病毒力價判讀							

表二、Reed-Muench Methods 之計算 TCID₅₀ 方法

病毒 稀釋	判讀結果		累積值		感染率 CPE 數/總和	感染百分率
	CPE	Non-CPE	CPE	Non-CPE		
10^{-1}	8	0	25	0	25/25	100
10^{-2}	8	0	17	0	17/17	100
10^{-3}	7	1	9	1	9/10	90
10^{-4}	2	6	2	7	2/9	22
10^{-5}	0	8	0	15	0/15	0
10^{-6}	0	8	0	23	0/23	0
$(90^* - 50) \div (90 - 22^{**}) = 40/68 = 0.6$						

* 僅高於 50% 之感染百分率，** 僅低於 50% 之感染百分率

由以上公式求得之 0.6 加到僅高於 50% 感染率的稀釋指數(此例中為 10)得 10 即該病毒之感染力價為 $10^{3.6}$ TCID₅₀/50 μ l。

下午用餐後，舉行 CADCC 講師群與各國學員之座談會，會後於 OIE 參考實驗室大門口合影(圖十三)，在一片依依不捨氣氛中，完成所有訓練課程。



圖十三、東亞各國學員結訓後，於 OIE PRRS 參考實驗室大門口合影，最左側為本所助理研究員王羣。

4 月 18 日(星期六)

於上午 8 時搭乘中國國際航空班機由北京首都國際機場出發，於中午 11 時 30 分抵達桃園機場。

伍、研習期間觀察與心得

繼口蹄疫及禽流感等 OIE 參考實驗室之後，中國再度於 2012 年成立 PRRS 參考實驗室，期間投注之人力及物力均非常可觀。而實驗室之內部設計及人員動線規劃亦相當完善，相關文件及生物樣品之管制亦非常嚴格，所有實驗操作、人員管理、生物性風險管制等都有一套標準流程。而實驗室外圍環境亦十分理想，腹地十分遼闊，有利於後續實驗室之擴建及修繕。而且任本次訓練課程之講師，皆為一時之選，不僅經驗豐富，教學十分認真，與學員之間互動良好，彼此之間感情極為融洽。研習期間所遭遇之實驗瓶頸，皆可透過討論而獲得解決。因此在結訓時，各國學員對於 PRRS 之診斷技術都有一定之水準，相信回國後對於母國之 PRRS 之診斷及防疫具有相當之助益。

本次研習所使用之 FMD real-time RT-PCR 診斷試劑組，為 CADCC 自行開發該，並授權民間生物技術公司生產，再由其年度收入分享權利金。其設計主要採用鐵克曼探針系統 (TaqMan Probe)，使用上十分方便及簡易，而完成實驗時間極短，獲得各國學員一致好評。兼之中國市場使用量極大，因此在極短時間內即能回本，並有能力外銷至週邊國家，賺取外匯並提升中國之整體形象。相較於我國，受限於國內需求量較小，在使用上面臨較大成本經濟壓力，必須考量外銷市場，惟中國、韓國及日本均已推出類似診斷用產品，因此如合突破現有技術及生產成本之瓶頸，恐須詳細規畫及提供充足研發人力與經費。

當CADCC講師介紹PRRS之real-time RT-PCR診斷技術，此時各國學員無不興致勃勃，希望CADCC講師能教授有關HP PRRSV之相關診斷細節，包括引子及探針之設計，反應溫度與時間、以及分讓HP PRRSV之cDNA產物。惟CADCC講師告之其相關細節與技術均已轉移至民間生物技術公司並生產相關之診斷試劑，因此無法向大家透露相關細節，更無法分讓HP PRRSV之cDNA產物，讓各國學員均略感失望，實為本次研習課程最大遺珠之憾。不過幾經要求，CADCC講師曾略提及如果需進行HP PRRSV與一般PRRSV之區別診斷時，應該針對PRRSV之病毒聚合酶(RNA polymerase)的NSP2區域來進行引子及探針設計。此一說明與許多國際間發表之論文觀點可說是不謀而合，因為HP PRRSV與一般PRRSV之基因序列最大差異，在於HP PRRSV之NSP2區域出現一段約30個不連續胺基酸序列之缺損，若能以此為基礎，正確的設計出適用之引子及探針，對於我國診斷及防範HP PRRSV入侵國內養豬場，將是一大利器。

陸、檢討與建議

相較於口蹄疫及禽流感等疾病之診斷訓練課程，本次診斷訓練班課程為全世界首次針對 PRRS 而開辦，因此得到諸多東亞地區會員國高度重視。因此部分會員國派出參加本次訓練課程之學員層級甚高，例如柬埔寨即由該國家畜衛生試驗所副所長親自與會，另外該國以自費方式，增派第二位學員與會；而緬甸亦以 OIE 額外補助部分經費方式增派第二位學員與會。而在研習期間，各國學員無不兢兢業業、全力以赴，對於許多實驗步驟之細節均問之甚詳，而學員之間交流亦十分頻繁，為將來之跨國交流事宜立下良好基礎。

本所對於 PRRS 之診斷及相關試驗研究已有多年經驗，相較於 OIE PRRS 參考實驗室，本所之各項診斷技術及研究成果可說並不遜色。但是近年來本所受限於人力及研究經費之不足，因此部分試驗研究只能暫時停擺，與國外各 PRRS 實驗室之交流亦顯得明顯不足，對於 HP PRRS 之防疫容易出現漏洞死角。本國雖暫無 HP PRRS 之疫情，有鑑於國際間交流頻繁，跨國界疫病已成為各國重點防疫之項目，因此未來希望本所能增加必要之人力及經費，增聘國外 PRRS 專家來台指導及交流，同時薦送相關人員前往各國 PRRS 實驗室研習並建立合作情誼，以便防患於未然，降低疫病發生之風險。

本次行程安排，係由 OIE 全權處理，但受限於 OIE 經費使用限制，因此預定之飛機航班不甚理想，各國學員均於深夜或凌晨方抵達北京首都機場。而預訂住宿之北京大興賓館距離機場十分遙遠，且因時間過晚已無巴士或機場快鐵可供搭乘，因此必須搭乘計程車前往下榻處，不僅耗費時間且在人身安全方面容易產生顧慮。而結訓後 OIE 亦未安排機場接駁事宜，且許多學員搭乘班機返國之時間為凌晨時分，因此必須請求賓館櫃檯人員代為預約接駁計程車，不料各國學員口音極重，英語發音不甚標準，導至賓館櫃檯人員無法即時了解各國學員需求，產生諸多誤解及不安。未來我國若有機會舉辦類似之研習課程，在許多生活細節方面，不妨多加協助及安排，讓與會各國學員能更加安心研習各項相關課程，不需為生活瑣事所苦。

在第一天上午各國會員進行之國情報告中，讓我個人印象最深的，莫過於菲律賓代表所提出之報告。在其內容中指出，菲律賓已經是不使用疫苗之口蹄疫非疫區國家。我國從 1997 年口蹄疫爆發至今，已經十多個年頭，但是截至目前為

止，似乎連成為使用疫苗之口蹄疫非疫區國家都顯得困難重重，許多防疫工作若僅是由中央及地方政府單位推行，而業者及一般民眾不願真正去配合，只怕是事倍功半，到頭來還是一場空，成為口蹄疫非疫區國家變成一個遙不可及之夢想。”菲律賓能、而台灣不能”，豈能不讓人汗顏及深思！到頭來真正受苦的還是業者及一般民眾。



Regional Hands-on Laboratory Training on PRRS and Other Swine Disease Diagnosis

13-17 April 2015, Beijing, China

Provisional Agenda

DAY 1	MONDAY	
8:30 - 9:00	Registration	
9:00 - 9:20	Opening session	
	Remarks by China	CVO of China
	Remarks by OIE RRAP	Hirofumi Kugita
9:20 - 9:35	Introduction of CADC, RL	Shengpeng Xin
9:35 - 9:45	Outline of the training	Xinyan Zhai
9:45 - 9:50	Group photo	
9:50 - 10:10	Tea break *	
10:10 - 11:50	Country report: brief national swine disease diagnostic systems and main constraints (Mongolia, Cambodia, Chinese Taipei, Indonesia, Laos, Myanmar, Philippines, Thailand and Vietnam)	Xinyan Zhai
11:50 - 12:00	Discussion and set trainees into 2 groups	Zhi Zhou
12:00 - 13:00	Lunch	
13:00 - 13:20	General procedures of collection, submission and storage of live viral diagnostic specimens	Lin Yuan
13:20 - 15:10	Group 1: cell culture (Marc-145), cell passage Group 2: Instruction of fluorescent antibody test (FAT), immunoperoxidase monolayer assay (IPMA), virus neutralisation test (VN) for PRRSV and CSFV*	Lin Yuan Zhi Zhou
15:10 - 17:00	Groups rotated	
18:00 - 19:30	Welcome dinner	Hirofumi Kugita

DAY 2	TUESDAY	
8:30 - 9:30	General standards for managing biorisk in the veterinary laboratory	Xinyan Zhai
9:30 - 9:50	Discussion	Xinyan Zhai
9:50 - 12:00	General procedures of tissue specimens collection, preparation for virus isolation (saliva, tissue grinding, RT-PCR test preparedness)	Lin Yuan
12:00 - 13:00	Lunch	
13:00 - 15:00	PRRSV isolation and culture (Group 1)	Lin Yuan
	Practice of PRRS serological tests (FAT/IPMA) (Group 2)	Zhi Zhou
15:00 - 17:00	Groups rotated	
DAY 3	WEDNESDAY	
8:30 - 10:00	Instruction of fluorescence real-time RT-PCR for PRRSV/FMDV/PEDV	Jiajun Wu
10:00 - 10:30	Discussion	
10:30 - 12:00	Practice of PRRSV VN test	Jiajun Wu
12:00 - 13:00	Lunch	
13:00 - 17:00	Practice of PRRSV real-time RT-PCR	Jiajun Wu
DAY 4	THURSDAY	
8:30 - 9:30	Instruction of ELISA for PRRSV/FMDV/CSFV*	Yingyi Liu
9:30 - 9:50	Discussion	Yingyi Liu
9:50 - 12:00	Practise of ELISA for PRRSV	Yingyi Liu
12:00 - 13:00	Lunch	Yingyi Liu
13:00 - 15:00	Interpretation of results of ELISA	Yingyi Liu
15:00 - 17:00	Observation of cytopathic effect (CPE) of PRRSV	Lin Yuan
DAY 5	FRIDAY	
8:30 - 9:30	Instruction of TCID50	Zhi Zhou
9:30 - 9:50	Discussion	Zhi Zhou
9:50 - 12:00	Observation of TCID50 and VN	Lin Yuan
12:00 - 13:00	Lunch	
13:00 - 15:00	Summarisation and discussion for further cooperation	Xinyan Zhai
15:00 - 17:00	Wrap up, certification offering	OIE/CADC
	Close training	

* Morning / afternoon tea breaks are available in a flexible time during the training.