

出國報告（出國類別：研究）

赴越南國家獸醫研究所執行非洲豬瘟診 斷與監測技術 出國報告

服務機關、職稱及姓名：

行政院農業委員會家畜衛生試驗所	助理研究員	黃有良
	研究員兼組長	鄧明中

出國地區：越南

出國期間：108 年 12 月 24 日至 12 月 30 日

報告日期：109 年 2 月 19 日

摘 要

自2018年8月中國爆發非洲豬瘟疫情後，此疾病已擴散至東北亞與東南亞，並成為此區域最為重要的豬隻疾病。而即時疾病確診工作實乃防治非洲豬瘟的重要基石，家畜衛生試驗所（簡稱畜衛所）依世界動物衛生組織陸生動物及疫苗手冊建立非洲豬瘟病毒核酸檢測技術與病毒分離技術，並成功自邊境檢疫肉製品及離島海漂豬隻檢體檢出非洲豬瘟病毒核酸，唯欠缺含有活病毒的樣本測試病毒分離技術，為填補此缺口，畜衛所於108年10月23日與越南國家獸醫研究所簽訂非洲豬瘟合作備忘錄，並於108年12月24至30日間赴該實驗室進行測試，試驗期間成功利用越方所提供之試驗樣品分離出非洲豬瘟病毒，確認畜衛所建立的非洲豬瘟病毒分離技術可成功分離出病毒，並提升我國非洲豬瘟病毒的診斷技術。

目 次

一、緣起及目的	1
二、行程	2
三、行程重點摘要	3
四、心得與建議	18

一、緣起與目的

亞洲非洲豬瘟疫情持續延燒，自從中國 107 年 8 月爆發非洲豬瘟以來，疫情已往北蔓延至蒙古與南韓，往南印尼也於 12 月 19 日證實該國北蘇門答臘省養豬場感染非洲豬瘟，為有效防堵非洲豬瘟入侵，即時疾病確診與跨國防疫合作工作實乃重要。108 年 10 月 23 日我國家畜衛生試驗所（畜衛所）與越南國家獸醫研究所（National Institute of Veterinary Research；NIVR）共同簽署非洲豬瘟診斷與監測合作意向書，雙方就非洲豬瘟檢測技術開發、免疫學研究及區別診斷技術等議題進行合作。為強化雙方之合作，畜衛所豬瘟研究組鄧明中組長與黃有良助理研究員於 108 年 12 月 24 至 30 日赴越南 NIVR 進行我國非洲豬瘟診斷方法之實務檢測，並討論未來雙邊合作與研究之相關細節，冀望能提升雙方在非洲豬瘟的診斷與研究量能，堅固非洲豬瘟防疫基石。

二、行程

赴越南NIVR執行非洲豬瘟診斷與監測技術期間，分別進行非洲豬瘟病毒分離與核酸檢測等多種試驗，並拜會NIVR代理所長范氏玉與農業暨農村發展部獸醫局副局長阮春水（Nguyen Thu Thuy），就非洲豬瘟診斷與防疫經驗進行分享與交流，試驗期間詳細行程如表一。

表一、行程表

日期	項目	地點
2019/12/24 (Tues.)	從台灣至越南	Terminal 2 of Noi Bai Airport, HAN
	抵達 NIVR 並進行細胞培養	NIVR
2019/12/25 (Wed.)	ASFV 病毒分離	NIVR
	拜會范氏玉代理所長與阮春水副局長	NIVR
2019/12/26 (Thu.)	ASFV 病毒分離	NIVR
	ASFV 核酸檢測	
2019/12/27 (Fri.)	ASFV 病毒分離	NIVR
	ASFV 核酸檢測	
2019/12/28 (Sat)	ASFV 病毒分離/ HAD	NIVR
2019/12/29 (Sun)	ASFV 病毒分離/ HAD	NIVR
2019/12/30 (Mon)	ASFV 病毒分離/ HAD	NIVR
	返抵台灣	Terminal 2 of Noi Bai Airport, HAN

三、行程重點摘要

一、越南NIVR

越南農業暨農村發展部下設有NIVR與獸醫局共同負責全國動物疾病相關診斷監測與防疫事宜，兩單位屬於平行單位，其中NIVR設有病毒組、細菌組、寄生蟲組、獸醫保健組、生物化學與免疫組、病理與流行病學組與實驗室基因資材組等7大研究組（圖1），共有23個博士、45個獸醫師與18技術人員，各組試分工如下

病毒組：主要負責禽流感、新城雞病、傳染性華氏囊病、鴨肝炎病毒、豬瘟、豬生殖與呼吸綜合症、日本腦炎與狂犬病等疾病之研究。

細菌組：巴士德桿菌、鏈球菌、乳房炎、沙士桿菌、大腸桿菌、分支桿菌與梭菌等疾病之研究

寄生蟲組：錐蟲、弓蟲、隱孢子蟲、滴蟲、住血線蟲與肝吸蟲等等疾病之研究。

獸醫保健組：中毒、食媒性細菌、電子顯微鏡等相關疾病之研究

生物化學與免疫組：禽流感、鴨肝炎病毒、口蹄疫、豬瘟、豬傳染性胃腸炎、豬流行性下痢、生殖與呼吸綜合症、豬第二型環狀病毒、巴士德桿菌、大腸桿菌、非洲豬瘟、錐蟲、滴蟲、肝吸蟲等疾病的免疫學相關研究。

病理與流行病學組：動物疾病的流行病學研究。

實驗室基因資材組：生物資材的保管與維護。

目前該所主要研究的病毒性疾病包括：禽流感、新城雞病、口蹄疫、豬瘟、非洲豬瘟、豬生殖與呼吸綜合症與外來惡性傳染病，此次畜衛所人員與該所生化與免疫研究組黃鄧武組長（Dr. Dang Vu Hoang）接洽，經雙方同意，於該所生化與免疫研究組進行非洲豬瘟病毒分離與核酸檢測測試。

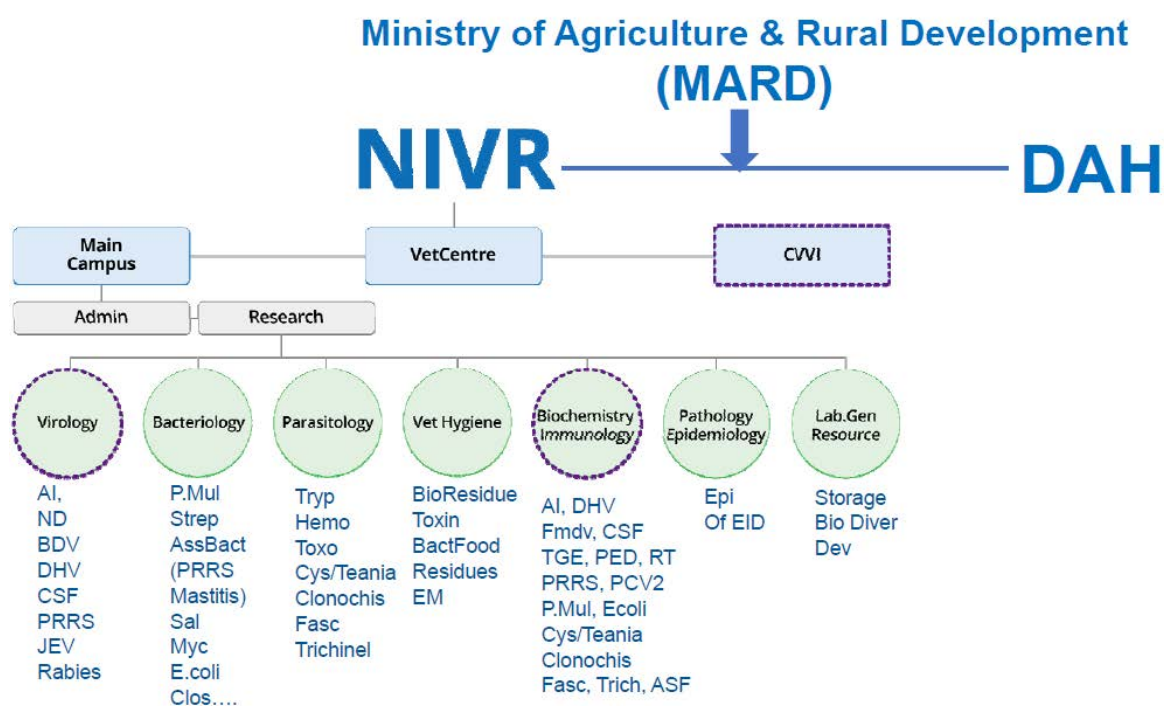


圖1、越南國家獸醫研究所相關組室與任務分配。



圖2、本所鄧明中組長、黃有良助理研究員與越南國家獸醫研究所生化與免疫組人員合影。

二、ASFV 病毒分離

本所人員於赴越南前，已先將相關試驗材料包含：病毒分離所需之細胞、核酸檢驗所需之試劑等，以空運方式寄送至越南NIVR，先請該所人員將寄送之細胞於該所實驗室內進行培養，隨後於108年12月24至30日間由本所豬瘟研究組鄧明中組長與黃有良助理研究員赴越南進行相關測試。於越南期間，由該所生化與免疫研究組黃鄧武組長（Dr. Dang Vu Hoang）與同仁的協助下進行非洲豬瘟病毒分離與核酸檢測方法的相關測試。於病毒分離方面，本所人員於抵達越南當天（24日）即立即赴該單位進行本所細胞之優化，並將細胞重新培養於24孔盤內，待細胞完全貼覆後，利用越方所提供的非洲豬瘟檢體乳劑（編號：11561）與病毒（DO Thail strain； $10^{4.9}$ HAD/ml）等樣品進行接種，待接種後18小時再加入紅血球，之後每日觀察拍照紀錄，如發現有疑似非洲豬瘟特異的紅血球吸附現象（Haemadsorption；HAD）時，將進行核酸萃取與核酸檢測確認，詳細試驗流程與結果如下

（一）非洲豬瘟病毒分離步驟

1. 將豬隻巨噬細胞（PAM）培養於 24 孔盤內，待完全貼附或隔天方可接種病材。
2. 每孔加入 100 μ l 乳劑或病毒。
3. 於 37°C 5% CO₂ 培養箱內，培養 18 小時。
4. 加入 100 μ l 0.75% RBC (7.5 μ l + 1ml PBS)

RBC/Alserver's solution (1:1 混合後保存於 4°C，1 週內使用)

➔ 取 0.5 ml RBC +5 ml PBS

➔ 離心 800 xg 4 min

➔ 重複洗 2 次

➔ 棄上清液用 PBS 調整為 0.75% RBC (7.5 μ l + 1ml PBS)

5. 培養 18 小時，每日觀察是否有 HAD
6. 當發現 HAD 後，取 100 μ l 細胞懸浮液冷凍解凍，進行核酸檢測確認
7. 未發現 HAD 的樣品，則將細胞培養盤冷凍解凍後，取 100 μ l 加入新的 PAM 內
8. 重複上述2致5步驟，並培養至第3代確認無HAD方可判定陰性。

(二) 非洲豬瘟病毒分離結果：

1. DO Thail-ASFV-P2 ($10^{4.9}$ HAD/ml)：一代 (表 1 與 3)

- A. 第 2 天：於 407-1 與 407-4 PAM 中，病毒原液至稀釋 100 倍均可發現 HAD (圖 3)，但 HAD 數目會隨稀釋逐漸減少，敏感性可至 $10^{1.9}$ HAD ($10^{2.9}$ HAD/ml)，且經由 ASFV QPR 確認其核酸量有上升之趨勢。
- B. 第 3 天：於 407-1 與 407-4 PAM 中，病毒原液至稀釋 100 倍均可發現 HAD，但 HAD 數目逐漸減少，但 HAD 數目較第 2 天少，PAM 細胞數也較少，顯示細胞有壞死或凋亡；另外，在 407-1 PAM 中，稀釋 1000 的其有出現 1 個 HAD，敏感性可至 $10^{0.9-1.9}$ HAD ($10^{1.9-2.9}$ HAD/ml)
- C. 第 4 天：於 407-1 與 407-4 PAM 中，病毒原液至稀釋 1000 倍均可發現 HAD，但 HAD 數目逐漸減少，PAM 細胞數也較少，顯示細胞有壞死或凋亡；另外，在 407-1 PAM 中，稀釋 10000 的其有出現 1 個 HAD→敏感性可至 $10^{0.9}$ HAD ($10^{0.9}$ HAD/ml)

2. 11561 乳劑：一代 (表 1 與 3)

- A. 第 2 天：於 407-1 與 407-4 PAM 中，10 倍乳劑可發現 HAD，乳劑其他物質會干擾 HAD 判定，稀釋 100 倍乳劑看不到 HAD。
- B. 第 3 天：於 407-1 與 407-4 PAM 中，10 倍乳劑可發現 HAD 且較第 2 清楚，乳劑其他物質會干擾 HAD 判定，稀釋 100 倍乳劑看不到 HAD。
- C. 第 4 天：於 407-1 與 407-4 PAM 中，10 倍乳劑可發現 HAD 且較第 2 天清楚，乳劑其他物質會干擾 HAD 判定，稀釋 100 倍乳劑可看到 HAD。

3. DO Thail-ASFV-P2 ($10^{4.9}$ HAD/ml)：二代 (表 2)

- A. 第 2 天：於 407-1 與 407-4 PAM 中，病毒原液至稀釋 1000 倍均可發現 HAD，但 HAD 數目逐漸減少；另外，在 407-1 PAM 中，稀釋 10000 倍的有出現 1 個 HAD→敏感性可至 $10^{0.9}$ HAD ($10^{0.9}$ HAD/ml)

4. 11561 乳劑：二代

- A. 第 2 天：於 407-1 與 407-4 PAM 中，10 與 100 倍乳劑均可發現 HAD，HAD 判

定不會受其他物質會干擾。

表 2、第 1 代非洲豬瘟病毒分離結果（第 4 天）

PAM-407-4	DO Thail-ASFV-P2 → Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 Dilution → Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 ² Dilution → Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 ³ Dilution Positive (1HAD)	C-
	DO Thail-ASFV-P2 10 ⁴ Dilution Negative	DO Thail-ASFV-P2 10 ⁵ Dilution Negative	C-	11561 Positive	11561 10 Dilution Positive
PAM-407-1	DO Thail-ASFV-P2 Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 Dilution Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 ² Dilution Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 ³ Dilution Positive (3 HAD)	C-
	DO Thail-ASFV-P2 10 ⁴ Dilution Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 ⁵ Dilution Negative	C-	11561 Positive	11561 10 Dilution Positive

表 3、第 2 代非洲豬瘟病毒分離結果（第 2 天）

PAM-407-4	DO Thail-ASFV-P2 → Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 Dilution → Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 ² Dilution → Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 ³ Dilution Positive	C-
	DO Thail-ASFV-P2 10 ⁴ Dilution Negative	DO Thail-ASFV-P2 10 ⁵ Dilution Negative	C-	11561 Positive	11561 10 Dilution Positive
PAM-407-1	DO Thail-ASFV-P2 Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 Dilution Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 ² Dilution Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 ³ Dilution Positive	C-
	DO Thail-ASFV-P2 10 ⁴ Dilution Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 ⁵ Dilution Negative	C-	11561 Positive	11561 10 Dilution Positive

表 4、第 1 代非洲豬瘟病毒分離第 2 天後，以即時聚合酶鏈反應檢測結果

PAM-407-4	DO Thail-ASFV-P2 → Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 Dilution → Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 ² Dilution → Positive		
QPCR Ct	24.23	28.64	30.22		
PAM-407-1	DO Thail-ASFV-P2 Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 Dilution Positive	DO Thail-ASFV-P2 10 ² Dilution Positive		C-
QPCR Ct	23.63	27.02	29.17		
	DO Thail-ASFV-P2 (10 ^{4.9} HAD/ml)接種 的 ASFV	10 Dilution	10 ² Dilution	10 ³ Dilution	10 ⁴ Dilution
QPCR Ct	22.49	25.18	28.42	32.03	37.55

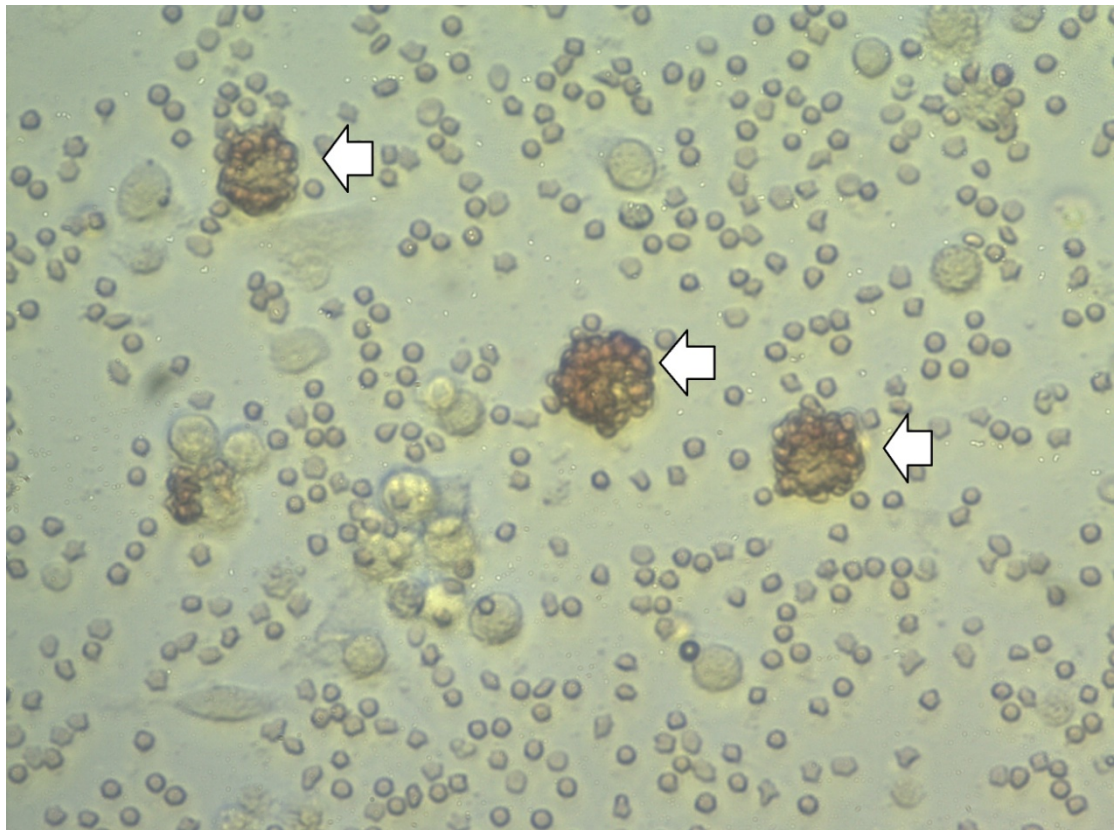


圖 3、肺泡巨噬細胞感染非洲豬瘟病毒後呈現特有之紅血球吸附現象 (Haemadsorption)(如箭頭處)。

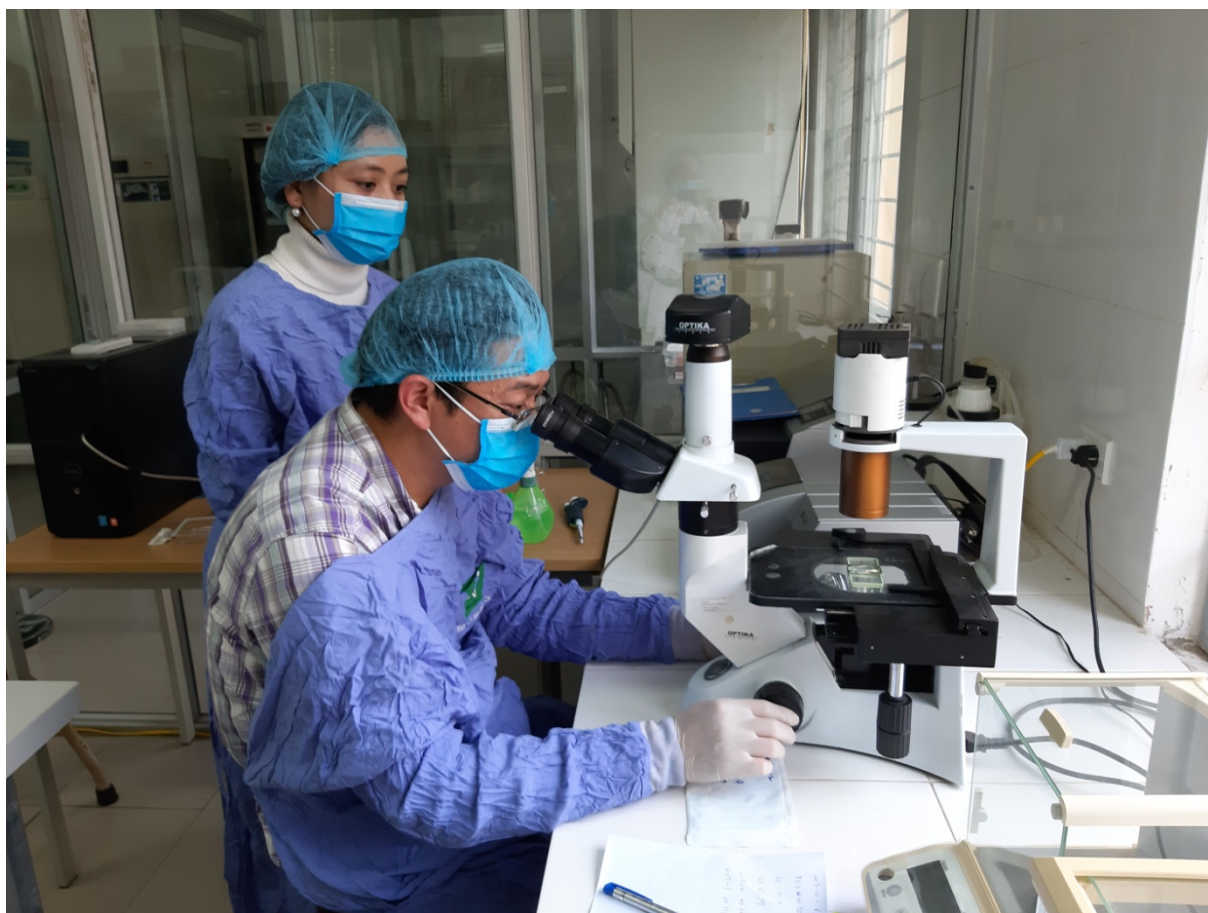


圖4、越南國家獸醫研究所人員協助本所黃有良助理研究員進行計數與細胞培養事宜。



圖5、本所鄧明中研究員兼組長與黃有良助理研究員於越南國家獸醫研究所進行非洲豬瘟病毒分離試驗。

（三）結論：

本所建立的非洲豬瘟病毒分離方法，可有效從陽性檢體中分離出非洲豬瘟病毒，於第1代時培養4天時，其敏感性可至 $10^{0.9}$ HAD/ml，豬隻肺臟巨噬細胞因豬隻個體差異，導致其敏感性有所差異，407-1的巨噬細胞較407-4豬隻巨噬細胞敏感；另外，PAM的敏感性隨著培養時間增加其敏感性也會增加，但細胞在後第3天即會陸續死亡。接種第2代後，其HAD較快出現，可增加其敏感性。

三、ASFV 核酸檢測

ASF核酸檢測的部分，本所人員依照世界動物衛生組織（OIE）陸生動物疾病診斷與疫苗手冊中，有關非洲豬瘟病毒核酸檢測章節所建立之方法進行越南臨床檢體測試，越方共提供陽性與陰性檢體測試本所建立的即時聚合酶鏈反應。

（一）即時聚合酶鏈反應

1. 步驟與方法：

(1) 樣品：

A. 越方共提供 30 個陽性檢體與陰性檢體的核酸進行測試。

B. ASFV： $10^{4.9}$ HAD/ ml

(2) 引子 (primers) 及探針 (probe)：

定量聚合酶鏈反應技術已被應用在非洲豬瘟的診斷上，利用 OIE 推薦的非洲豬瘟病毒特異性引子對 (pair of primer) 診斷非洲豬瘟病毒之引子及探針序列如下：

引子 FOR3 序列為 5' -CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-3' (sense)

引子 REV2 序列為 5' -GATACCACAAGATCRGCCGT-3' (anti-sense)

探子 ASF-P 序列為 FAM-5' -CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-3' -TAMRA

(3) 即時聚合酶鏈反應配方

Master mix(DNA)		
Primer	F(20 μ M)	1 μ l
	R(20 μ M)	1 μ l
2xProb mix buffer(KAPA)		10 μ l
Probe(10 μ M)		1 μ l
DEPC H2O		4 μ l
Sample		3 μ l
Total volumn		20 μ l

(4) 反應液混合均勻後隨即將試管置於溫度循環器內，反應條件如下：

95°C 10 分鐘 (1 循環)；95°C 15 秒→60°C 60 秒 (45 循環)

(5) 結果：

A. 30個陰性檢體DNA經本所非洲豬瘟即時聚合酶鏈反應檢測，其結果均為陰性，
30個陽性檢體DNA經本所非洲豬瘟即時聚合酶鏈反應檢測，其結果均為陽性 (圖6)，顯示本所建立的非洲豬瘟即時聚合酶鏈反應具有良好的特異性

與敏感性，並可利用於臨床監測。

- B. 將已知ASFV病毒 ($10^{4.9}$ HAD/ ml) 進行核酸萃取並進行連續10倍稀釋，再進行即時聚合酶鏈反應，結果顯示，此檢驗方法的檢測極限為 $10^{-0.1}$ HAD/ml (0.8 HAD/ ml) (表5)。

表5、非洲豬瘟即時聚合酶鏈反應知檢測極限

	strain	Viral load	Ct
A	DO Thail-ASFV-P2	$10^{4.9}$ HAD/ml	22.49
B	DO Thail-ASFV-P2	$10^{3.9}$ HAD/ml	25.18
C	DO Thail-ASFV-P2	$10^{2.9}$ HAD/ml	28.42
D	DO Thail-ASFV-P2	$10^{1.9}$ HAD/ml	32.03
E	DO Thail-ASFV-P2	$10^{0.9}$ HAD/ml	37.55
F	DO Thail-ASFV-P2	$10^{-0.1}$ HAD/ml	38.11
G	DO Thail-ASFV-P2	$10^{-1.1}$ HAD/ml	-
H	NTC		-

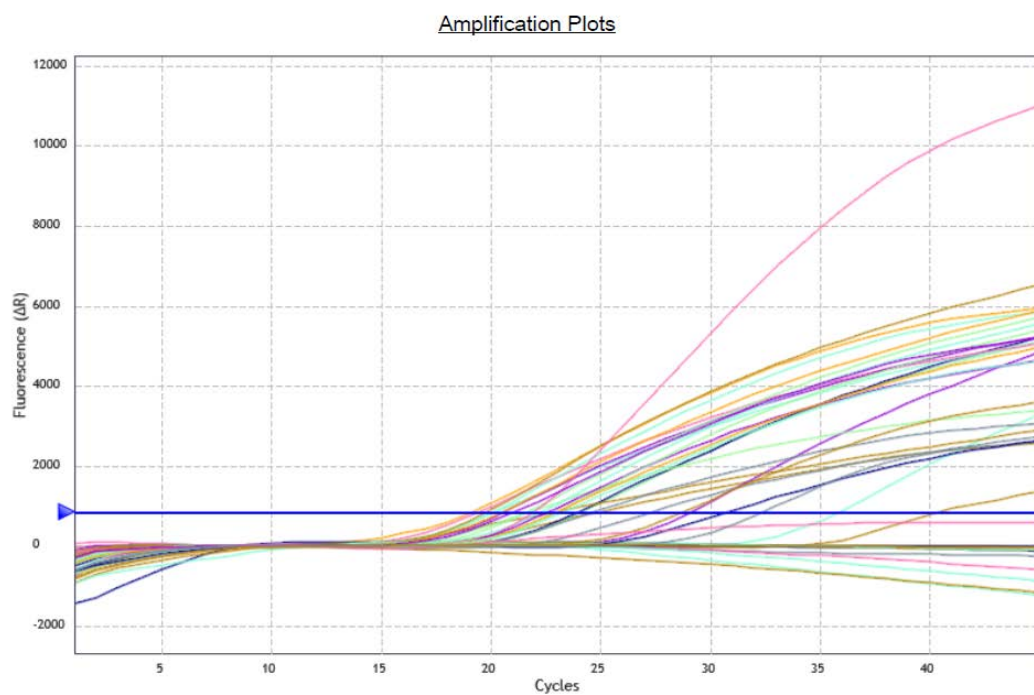


圖6、非洲豬瘟即時聚合酶鏈反應檢測反應曲線圖。



圖7、本所鄧明中研究員兼組長於越南國家獸醫研究所進行非洲豬瘟即時聚合酶鏈反應。



圖8、越南國家獸醫研究所人員協助進行非洲豬瘟即時聚合酶鏈反應條件設定與機器操作。

四、拜會范氏玉代理所長與阮春水副局長

於試驗研究空檔期間，本所人員也分別拜會越南NIVR代理所長范氏玉（圖9）與農業暨農村發展部獸醫局副局長阮春水(Nguyen Thu Thuy)（圖10），與范代理所長商談內容主要針對未來四年內，依據MOU架構下，除規劃未來一年雙方人員互訪以及實驗目標等，雙方也就非洲豬瘟診斷與防疫之經驗進行經驗分享與交流，而未來也將朝非洲豬瘟病毒全長基因定序部分共同合作與研究。爰此，本所將儘速規劃MOU中有關非洲豬瘟試驗所需文件以及材料，越方儘速備妥試驗所需樣材，以加速雙方合作效率以及進程。另針對非洲豬瘟以及重要豬隻疾病之診斷與控制技術方面，本次也有幸與獸醫局阮副局長見面會談，阮副局長強調，由於越南國土大，南北距離遠，北部又屬高山丘陵地形，許多農場地屬偏遠，疾病防治與採樣常造成獸醫與防疫人員困擾，不力疫情監測與診斷工作。未來雙方如能就重要疾病之診斷與防治技術，協助越南進行重要動物疾病如：非洲豬瘟、口蹄疫等現場診斷與防治措施，將有助於越南控制此類威脅動物健康與畜牧產業之病原，早日達成區域聯防，甚至全球防衛一體之目標。



圖 9、本所鄧明中組長與黃有良助理研究員拜會越南國家獸醫研究所范氏玉代理所長。



圖 10、本所鄧明中組長與黃有良助理研究員拜會農業暨農村發展部獸醫局副局長阮春水。

五、心得及建議

- 一、豬肉是臺灣與越南民眾攝取動物蛋白的主要來源，隨著非洲豬瘟疫情在越南境內的蔓延，其豬肉價格已節節飆升，但在越南境內其生物安全等級較低豬場因缺乏防護及經費以有效進行非洲豬瘟監測與診斷下，越南國內始終無法有效遏止非洲豬瘟的擴散，因此，如能有效提升豬農對豬場生物安全的重視並落實，再結合體系完善之非洲豬瘟監測與診斷，可能是阻絕非洲豬瘟疫情在越南境內擴散的重要方法之一。越南的非洲豬瘟防疫困境，也可作為我國強化非洲豬瘟防疫之借鏡，在我國尚未有非洲豬瘟疫情入侵之際，如能進行超前佈署，建立完整診斷、監測與通報體系，將有效降低非洲豬瘟入侵對我國畜牧相關產業的衝擊。
- 二、我國非洲豬瘟病毒分離技術，在過去一直缺乏適合的檢體與活體病毒可供測試與優化，此次在臺越農業合作機制以及畜衛所與越南 NIVR 簽署合作意向書下，越方提供良好的非洲豬瘟檢體與病毒供我國畜衛所進行相關測試，並成功利用之前在國內所建立的非洲豬瘟病毒分離方法從豬隻組織乳劑中分離出非洲豬瘟病毒，並與越方合作持續優化相關分離方法，此種雙方互惠共同合作，有助於提升雙方對非洲豬瘟病毒分離與培養的能力。此次雙方合作模式建立良好的合作典範，雙方均期望未來能持續合作。
- 三、此次合作，我國同時測試所建立的非洲豬瘟病毒核酸檢測方法，其均可有效檢出越南的臨床檢體，顯示所建立的核酸檢測方法可有效從臨床病例檢體中檢出非洲豬瘟，加深我國對於非洲豬瘟診斷之信心。
- 四、國際合作一直是我國提升動物疾病診斷能力的方法之一，此次在臺越雙方共同合作與互惠下，我國成功檢驗所建立非洲豬瘟診斷方法，對於提升國內非洲豬瘟診斷有實質性幫助，未來可透過多種國際合作模式，與世界各國共同合作，提升國內動物疾病診斷與研究量能。
- 五、病毒基因之差異往往可作為流行病學追蹤與研究之依據，本次前往越南 NIVR 雙方研究人員均期望未來朝非洲豬瘟病毒全基因定序進行合作，希望透過非洲豬瘟病毒全基因解析，了解病毒演化與分子流行病學，做為未來雙方研究非洲豬瘟的基石。