

2021 年臺灣地區野豬口蹄疫、豬瘟與非洲豬瘟監測結果

蔡國榮*、黃有良、張家宜、倪正翔、謝佩妮、黃乙軒、張捷、蔡淑卉、鄧明中

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 臺灣、澎湖及馬祖已被世界動物衛生組織認定為不施打口蹄疫疫苗之口蹄疫非疫區，為取得維持口蹄疫非疫區狀態之科學證據，必須針對野豬進行口蹄疫監測。110 年在各縣市動物防疫機關與林務局林區管理處協助下，透過獵捕方式收集野豬檢體，進行口蹄疫、豬瘟及非洲豬瘟病毒核酸檢測。本研究收集 113 頭被獵捕野豬之 533 件臟器，應用即時反轉錄聚合酶鏈反應或即時聚合酶鏈反應檢測前述三種病毒核酸，結果均呈陰性。於其中 54 頭野豬同時取得血清，針對前述三種病毒進行抗體檢測，亦均呈陰性，顯示國內野豬並未感染口蹄疫、豬瘟及非洲豬瘟。

關鍵詞：野豬、口蹄疫、豬瘟、非洲豬瘟、病毒核酸檢測

緒言

口蹄疫 (Foot and mouth disease ; FMD) 係由小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae) 中口瘡病毒屬 (Aphthovirus) 之口蹄疫病毒引起之特急性、高度傳染性疾病。偶蹄類動物，如乳 / 肉牛、家豬、綿羊、山羊、野豬、亞洲水牛及南美水牛等均具感受性；其中，牛被視為病毒儲主 (reservoir)，小型反芻動物為病毒傳播者，豬為病毒增幅者。遭感染動物之主要症狀為急性發熱，口腔、蹄部及乳腺周圍出現水疱。豬隻症狀明顯，四肢因疼痛而跛行，不願站立或行走，無食慾，嚴重時沉鬱，聚在一起，不進食。患畜體表水疱會破潰、糜爛，蹄殼邊緣潰裂，甚至脫蹄。重症者倒臥，甚至斃死，仔豬容易因急性心肌炎而死亡，死亡率高。本病傳播快速，可在國際上快速蔓延且造成畜產事業極大的損失，為世界動物衛生組織表列疾病之一，是國際貿易中各國動物檢疫的首要疾病 [6]。

豬瘟 (Classical swine fever ; CSF) 是由豬瘟病毒 (Classical swine fever virus ; CSFV) 引起的飼養豬隻及野豬高傳染性及高死亡性之疾病。豬瘟病毒屬於黃熱病毒科 (Flaviviridae) 中的瘟疫病毒屬

(Pestivirus)，同屬的病毒包括牛病毒性下痢病毒 (Bovine viral diarrhea virus ; BVDV) 及羊邊境病毒 (Border disease virus ; BDV)。BVDV 與 BDV 可感染反芻獸類及豬隻，豬瘟病毒則只能感染豬隻。病程可能隨病毒毒力、感染時期及宿主等差異而有不同，可能呈現急性、亞急性、慢性或不明顯感染症，年齡大的豬隻被感染常常較年幼動物呈現較輕微症狀且存活率也較高，懷孕母豬若感染，病毒可穿過胎盤，進入胎兒體內，導致胎兒死亡，若感染到中到低毒力之病毒株，則會產下弱小仔豬或外表健康卻持續感染的小豬。飼養豬一旦發生豬瘟疫情，不僅需要撲殺豬隻以控制疫情擴散，也將對豬隻及其產品形成重大貿易障礙，嚴重影響豬隻產品出口 [2]。豬瘟有 3 種基因型，分別是基因 1 型、2 型及 3 型，東亞與東南亞地區流行基因亞型 1.1、2.1、2.2、2.3 及 3.4，我國田間養豬場曾流行 3.4 亞型，之後被 2.1 亞型取代，2014 年中國養豬場出現新的豬瘟病毒株 2.1d 亞型 [16]。2018 年 9 月日本岐阜縣養豬場及野豬發生疑似豬瘟案例，致病病毒株隨後被證實為豬瘟病毒 2.1d 亞型，演化分析結果，該病毒株與日本境內曾經檢出病

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

毒株及疫苗株不同，與 2014 年至 2015 年在蒙古及中國檢測出之病毒株關係最接近，隨後疫情持續擴大，日本農林水產省為控制疫情，2019 年 3 月起針對野豬執行豬瘟疫苗餌料投予，所使用疫苗為歐盟進口之載體疫苗，同年 10 月起針對養豬場執行 GPE (-) 疫苗接種 [15]，為防止野豬疫情擴大，設置數條免疫區帶，對野豬族群投放疫苗餌料及進行監測，2020 年超過 8 個縣養豬場傳出疫情，依據野豬監測數據，超過 17 個縣的野豬受到感染，顯見野豬感染豬瘟時將加深疾病的控管難度 [7]。

非洲豬瘟病毒 (African swine fever virus; ASFV) 可感染飼養豬隻及野豬，歐洲野豬被認為感受性如同家豬，可視為病毒儲主 (reservoir) [9]。非洲豬瘟病毒亦可在部分品種軟蜱 (*Ornithodoros ticks*) 透過交配、藉卵或個體間傳播，若感染非洲豬瘟病毒之軟蜱叮咬健康豬隻，將會造成豬隻感染該病毒。非洲豬瘟病毒屬於 *Asfviridae* 病毒科 *Asfivirus* 屬，也是目前該科的唯一成員。病毒顆粒直徑大小約 200 nm，病毒結構相當複雜，至少存在 60 種結構蛋白質，依據該病毒 p72 結構蛋白質之 B646L 基因序列相似性進行比對，目前非洲豬瘟病毒至少可分為 23 種基因型。非洲豬瘟病毒感染可呈現多種症狀，由超急性、急性、慢性至無症狀的帶毒者皆有 [1, 11]。

自 2018 年 8 月中國遼寧省養豬場爆發非洲豬瘟後，疫情迅速擴散，短時間之內中國各省區均淪為非洲豬瘟疫區。而蒙古、越南、柬埔寨、北韓、寮國、緬甸、菲律賓、韓國、東帝汶、印尼、印度、馬來西亞、不丹、泰國及尼泊爾等亞洲國家亦先後均淪為非洲豬瘟疫區。亞洲各國非洲豬瘟病毒流行株均屬第二基因型，與俄羅斯和東歐目前流行的 Georgia 2007 病毒株屬於同一演化分支。

口蹄疫、豬瘟、非洲豬瘟均屬於豬隻重要疫病，兼具跨國界傳播風險，其中，野豬因對病毒具感受性，個體可任意移動，不容易透過人為方式限制族群活動，增加疫病控制的複雜性與難度，證諸如近年歐洲東部 ASF 的擴散、南韓野豬族群 ASF 疫情、日本野豬 CSF 爆發，皆凸顯前述跨境動物疫病牽涉到野豬族群遭受感染時疫情控制之難度，世界動物衛生組織 (World Organization of Animal Health; WOA)H

要求會員國定期提供野豬的 FMD 監測數據，俾以支持或維持 FMD 非疫區 (或國家) 狀態。本研究依此收集臺灣地區野豬檢體進行前述病毒核酸的檢測，除了收集野豬前述跨境動物疫病檢測資料，並協助提供維持 FMD 非疫區狀態所需之監測數據。

材料與方法

野豬檢體

110 年 1 月至 12 月委託各縣市防疫機關與農委會林務局林區管理處協助收集野豬檢體，提供本所執行口蹄疫、豬瘟及非洲豬瘟監測。檢體收集主要是委託野豬獵戶從事獵捕野豬活動時，配合本所提供的採樣指引收集包含脾臟、肺臟、淋巴結、肌肉等檢體，並鼓勵收集心臟血塊，檢體包裝妥當後連同採樣資訊，冷藏保存寄送至家畜衛生試驗所進行檢驗。

病毒核酸萃取

各送檢臟器組織取 0.5 - 1.0 g，加入 5 - 10 mL modified Eagle medium (MEM)，以組織研磨機進行研磨製備成樣品懸浮液。經 1,000 g 離心 10 min，取出 200 μ L，加入等量的 MagNA Pure 96 External Lysis Buffer 試劑，使用 TNeat extraction kit 以自動核酸萃取儀萃取病毒核酸。所萃取之核酸樣品立即進行檢測或凍存於 -70°C 備用。

口蹄疫病毒之即時反轉錄聚合酶鏈反應 (Real-time reverse transcription polymerase chain reaction; real-time RT-PCR)

引子及探針序列之設計係依據 WOA 推薦之口蹄疫病毒特異性引子對 (Pair of primer) (表 1)。Real-time RT-PCR 採單一步驟反應 (One-step reaction)，所需試劑加在同支反應管內，反應液配製如表 2。每次進行反應時，除實驗組外，亦同時加入帶有 FMDV O type 核酸以及陰性對照組。反應完成後，電腦分析軟體即自動統計並繪製擴增曲線圖 (Amplification curve)，再依據擴增曲線圖進行判讀。陽性檢體的判讀標準為：該檢體在最後一個循環數 (Cycles numbers) 的閾值 (Ct) 小於 40 且有完

整的 PCR 增幅曲線，則將該檢體判定為陽性檢體，反之，若該檢體的 Ct 值大於 50，判定為陰性；若 Ct 值落在 40 - 50 則須重新測試。

豬瘟病毒之即時反轉錄聚合酶鏈反應 (Real-time reverse transcription polymerase chain reaction; real-time RT-PCR)

檢測引子及探針序列均依據 WOA 推薦之豬瘟病毒特異性引子對 (Pair of primer) (表 3)。Real-time RT-PCR 採單一步驟反應，所需試劑加在同支反應管內，反應液配製如表 4。每次進行反應時，除實驗組外，亦同時加入帶有 LPC 毒株核酸以及陰性對照組。反應完成後，電腦分析軟體即自動統計並繪製增幅曲線，再依增幅曲線進行判讀。陽性檢體的判讀標準為：該檢體有完整 PCR 增幅曲線且在最後一個循環數 (Cycles numbers) 的螢光讀值大於閾值，則將該檢體判定為陽性檢體，反之，若該檢體的螢光讀值小於閾值，則判定為陰性。

非洲豬瘟病毒之即時聚合酶鏈反應 (Real-time polymerase chain reaction; real-time PCR)

引子及探針序列之設計係依據 WOA 推薦之非洲豬瘟病毒特異性引子對 (Pair of primer) (表 5)。Real-time PCR 採單一步驟反應，所需試劑加在同支反應管內，反應液配製如表 6。每次進行反應時，除實驗組外，亦同時加入 ASFV p72 基因之質體以及陰性對照組。反應完成後，電腦分析軟體即自動統計並繪製增幅曲線，再依增幅曲線進行判讀。該檢體在最後一個循環數 (Cycles numbers) 的閾值 (Ct) 小於 40 且有完整 PCR 增幅曲線，則將該檢體判定為陽性檢體，反之，若該檢體的 Ct 值大於 40，則判定為陰性。

FMDV real-time RT-PCR 反應條件為：50°C 30 分鐘 (1 循環) → 95°C 10 分鐘 (1 循環) ; 95°C 15 秒 → 60°C 60 秒 (50 循環)。CSFV real-time RT-PCR 反應條件為：50°C 30 分鐘 (1 循環) → 95°C 5 分鐘 (1 循環) ; 94°C 15 秒 → 57°C 30 秒 →

68°C 30 秒 (40 循環)。ASF real-time PCR 反應條件為：50°C 2 分鐘 (1 循環) → 95°C 10 分鐘 (1 循環) ; 95°C 15 秒 → 60°C 60 秒 (40 循環)。

口蹄疫、豬瘟、非洲豬瘟病毒抗體檢測

將各野豬心臟血塊置於 50 mL 離心管以 3,000 rpm 離心 10 分鐘，收集血清樣本，凍存於 -20°C 備用。血清樣本的抗體檢測係使用商品化 ELISA 試劑套組，包含 Sentinel FMD virus Nonstructural Protein Antibody ELISA kit (Excelsior Bio-System Incorporation)、IDEXX CSFV Ab Test (IDEXX Laboratories, Inc) 及 Ingezim PPA Compac (Eurofins Technologies Ingenasa)，依據原廠說明書分別檢測口蹄疫、豬瘟及非洲豬瘟病毒之血清抗體。

結果

本研究於 110 年度透過各縣市動物防疫所與農委會林務局林區管理處協助，委託野豬獵戶幫忙共收集被獵捕的野豬 113 頭檢體 533 件，野豬獵捕數與來源地區分別為臺中 7 頭、南投 5 頭、嘉義 39 頭、高雄 32 頭、屏東 10 頭、臺東 10 頭、花蓮 10 頭。各檢體先抽取其總核酸，再應用即時反轉錄聚合酶鏈反應進行口蹄疫病毒核酸、豬瘟病毒核酸檢測，以及應用即時聚合酶鏈反應檢測非洲豬瘟病毒核酸，結果均呈陰性。由 54 頭野豬取得之血清樣本，經使用 Sentinel FMD virus Non Structural Protein Antibody ELISA kit、IDEXX CSFV Ab Test、Ingezim PPA Compac 等商品化 ELISA 試劑套組進行口蹄疫、豬瘟及非洲豬瘟病毒之抗體檢測，結果亦均呈陰性。

討論

本研究 110 年度透過各縣市防疫機關與農委會林務局協助，共針對由 113 頭被獵捕野豬所收集的 533 件檢體進行核酸抽取，並應用即時反轉錄聚合酶鏈反應或即時聚合酶鏈反應分別針對口蹄疫病毒、豬瘟病毒及非洲豬瘟病毒進行核酸檢測，結果均呈陰性。同時亦針對由其中 54 頭被獵捕野豬取得之血清樣本，使用商品化 ELISA 試劑套組進行口蹄疫、豬瘟及非洲

豬瘟病毒之抗體檢測，結果亦均呈陰性。豬瘟病毒有 3 種基因型，東亞與東南亞地區流行基因亞型 1.1、2.1、2.2、2.3、3.4，我國田間養豬場曾流行 3.4 亞型，之後被 2.1 亞型取代，2014 年中國養豬場出現新的豬瘟病毒株 2.1d 亞型 [16]。2018 年 9 月日本岐阜縣養豬場及野豬感染病毒亞型 2.1d 造成疫情，該病毒與 2014 年至 2015 年蒙古及中國檢測出病毒株相近，隨後疫情持續擴大，日本農林水產省為控制疫情，針對野豬執行豬瘟疫苗餌料投放，以及養豬場執行 GPE (-) 疫苗接種 [15]，並嘗試以數條免疫區帶，形成包圍網帶，藉以阻遏野豬疫情，2020 年共計 8 個以上縣養豬場，17 個以上縣的野豬受到感染，顯見豬瘟疫情涉及野豬族群時防疫的難度 [7]，日本野豬豬瘟疫情再度凸顯野豬在重大動物疫病防治上的重要性與執行監控之必要性，歐盟也將清除野豬感染源列為保護養豬產業的主要目標，實際執行時併用野豬數量控制及疫苗餌料投放策略，搭配多項處理措施 [3, 12]。

非洲豬瘟以往侷限在非洲及歐洲局部地區，自 2007 年喬治亞共和國爆發第二基因型 (Genotype II) 感染，疫情從高加索地區沿俄羅斯邊境及波羅的海向外傳播，隨後傳到歐洲東部野豬族群與養豬場，以及俄羅斯境內 [13]，2018 年中國遼寧省養豬場爆發首例案件，隨後疫情逐漸擴散，亞洲鄰近 10 多個國家養豬場陸續發生疫情。期間韓國野豬斷斷續續傳出案例，其他國家則是持續通報發生家豬案例，顯示國際非洲豬瘟疫情沒有降溫，疫病侵入我國的風險仍高 [15]。東歐野豬疫情直接威脅當地養豬產業，歐盟針對野豬疫情執行一系列緊急措施，包含搜尋及移除野豬屍體、構築圍籬、控制野豬數量等，捷克及比利時因此控制住野豬疫情 [14]。有關養豬場防護，主要防止野豬或牧場外豬隻接觸，施行措施如牧場外圍需設置柵欄防護等隔絕設施，防止場內豬隻直接或間接接觸到野豬或遊蕩豬隻或自其它牧場脫逃豬隻；牧場主人或工作人員若有從事打獵，自獵場返回後不可立即進入牧場 [10, 13]。然而，由於野豬感染後，其分泌物、排泄物、血液及病豬屍體中皆含有 ASFV，會透過接觸方式，傳染給健康野豬，造成 ASF 在原發生地區繼續發生，或野豬嗅聞碰觸含病毒的屍體後，再藉由移動將 ASFV 帶至新的地區，造成 ASF 的持續散

播。此外，除了部分歐洲地區有野狼會獵捕野豬，野豬鮮少有天敵，加上野豬繁殖力強，隨著全球氣候暖化，歐洲野豬族群持續上升，亦造成歐洲野豬的 ASF 疫情持續發生 [5, 8]。

臺灣養豬產業已達成「非施打疫苗之口蹄疫非疫區」之新里程碑，然而亞洲鄰近國家除日本外，幾乎皆有非洲豬瘟疫情，非洲豬瘟病毒入侵威脅仍舊存在，為保障養豬場業，我國仍舊持續執行邊境檢疫與管制，加強養豬場業生物防護及警覺教育，同時整備國內非洲豬瘟應變措施與資源，且結合國內 5 所大專院校醫學與獸醫學院及農業科技研究院資源，建立非洲豬瘟初篩實驗室，有效擴大診斷量能，期許有效阻絕非洲豬瘟於境外。另鑑於野豬可感染口蹄疫、豬瘟及非洲豬瘟等重大疫病造成疫情蔓延，且為遵守世界動物衛生組織 (WOA) 規範，有必要持續收集野豬檢體，供口蹄疫、豬瘟及非洲豬瘟監測，提供 WOA 年度問卷中所需之野豬 FMD 監測數據，協助提供維持非疫區科學證據，同時累積國內野豬在前述疫病的監測資料，有助協助預警。

表 1、FMD real-time RT-PCR 引子對及探針序列：

Primer/probe	Sequence (5' - '3)
FMD 3D-F	ACTGGGTTTTACAAACCTGT-GA
FMD 3D-R	GCGAGTCCTGCCACGGA
FMD 3D-p	FAM-TCCTTTGCACGCCGTGGGAC-BHQ

表 2、FMD real-time RT-PCR 反應液配製：

反應液配製	1 管 (μ L)
Probes Master mix	12.5
20 μ M Primer (3D-F)	1
20 μ M Primer (3D-R)	1
10 μ M Probe	0.75
AMV 10U/ μ L	0.2
RNasin 40U/ μ L	0.2
DEPC-treated Water	6.85
Template	2.5
反應總體積	25

表 3、CSF real-time RT-PCR 引子對及探針序列：

Primer/probe	Sequence (5' - '3)
CSF 100-F	ATGCCAYAGTAGGACTAGCA
CSF 192-R	CTACTGACGACTGTCCTGTAC
CSF-p	FAM-TGGCGAGCTCCCTGGGTGGTCTAAGT-TAMRA

表 4、CSF real-time RT-PCR 反應液配製：

反應液配製	1 管 (μ L)
Probes Master mix	12.5
10 μ M Primer (100-F)	1
10 μ M Primer (192-R)	1
10 μ M Probe	0.5
AMV 10U/ μ L	0.2
RNasin 40U/ μ L	0.2
DEPC-treated Water	7.1
Template	2.5
反應總體積	25

表 5、ASF real-time PCR 引子對及探針序列：

Primer/probe	Sequence (5' - '3)
ASF-F	CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA
ASF-R	GATACCACAAGATCRGCCGT
ASF-p	FAM-GACTCCCGCTCTCCAACAAGG-TAMRA

表 6、ASF real-time PCR 反應液配製：

反應液配製	1管 (μ L)
KAPA Probes Master mix	12.5
20 μ M Primer (F)	1
20 μ M Primer (R)	1
10 μ M Probe	1
DEPC-treated Water	6.5
Template	3
反應總體積	25

參考文獻

1. African Swine Fever. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Chapter 3.8.1, 2019, World Organization for Animal Health.
2. Classical Swine Fever. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Chapter 3.9.3, 2019, World Organization for Animal Health.
3. EFSA. Scientific report: Control and eradication of classic swine fever in wild boar and animal health safety of fresh meat derived from pigs vaccinated against classic swine fever. Annex to The EFSA Journal 932 & 933, 2009.
4. European Commission. Directorate General for Health and Food Safety. Strategic approach to the management of African swine fever for the EU. SANTE/7113/2015-Rev11(2019)
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations. African swine fever: Detection and diagnosis, FAO 2017
6. Foot and Mouth Disease. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Chapter 3.1.8, 2021, World Organization for Animal Health.
7. Fukai K, Nishi T, Yamada M, Ikezawa M. Toward better control of classical swine fever in wild boars: susceptibility of boar-pig hybrids to a recent Japanese isolate and effectiveness of a bait vaccine. *Vet Res*, 51: 96, 2020
8. Guberti V, Khomenko S, Masiulis M, Kerba S. Handbook on african swine fever in wild boar and biosecurity during hunting , 2018. Global Framework for the Progressive Control of Transboundary Animal Diseases.
9. Jori F, Bastos ADS. Role of wild suids in the epidemiology of African swine fever. *EcoHealth* 6: 296-310, 2009
10. Jurado C, Martinez-Aviles M, La Torre AD, Stukelj M, Carvalho Ferreira HC, Cerioli M, Sanchez-Vizcaino JM, Bellini S. Relevant measures to prevent the spread of African swine fever in the European union domestic pig sector. *Front Vet Sci*, 5: 77, 2018
11. Kolbasov D, Titov I, Tsybanov S, Gogin A, Malogolovkin A. African Swine fever virus, Siberia, Russia, 2017. *Emerg Infect Dis*, 24: 796-798, 2018.
12. Moenning V. The control of classical swine fever in wild boar. *Front Microbiol*, 1211: 6, 2015
13. Sánchez-Cordón PJ, Montoya M, Reis AL, Dixon LK. African swine fever: A re-emerging viral disease threatening the global pig industry. *Vet J*, 233: 41-48, 2018.
14. UFZ website. <https://www.ufz.de/>.
15. World Organization for Animal Health. WAHIS interface. 2020
16. Zhang H, Lemg C, Tian Z, Liu C, Chen J, Bai Y, Li Z, Xiang L, Zhai H, Wang Q, Peng J, An T, Kan Y, Yao L, Yang X, Cai X, Tong G. Complete genome characteristics and pathogenic analysis of the newly emerged classical swine fever virus in China. *BMC Vet Res*, 14: 204, 2018

The surveillance of foot and mouth disease, classical swine fever and African swine fever in hunted wild boars in Taiwan in 2021

KJ Tsai*, YL Huang, CY Chang, CH Ni, PN Hsieh, IH Huang, C Chang, SH Tsai, MC Deng

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Taiwan, Penghu and Matsu have been recognized as foot and mouth disease (FMD) free area without FMD vaccination by OIE. It is required for the free area to conduct the surveillance of FMD in wild boars to obtain the scientific data to support the status of FMD free. In 2021, a collection of 533 organ samples from 113 hunted wild boars and 54 sera from 54 hunted wild boars was obtained through assistance from the Local Animal Disease Inspection Authorities and the Forest District Offices of the Forest Bureau. The organ samples were processed to nucleic acid extraction and viral genome detection for FMD, classical swine fever (CSF) and African swine fever (ASF) by real-time reverse transcription polymerase chain reaction or real-time polymerase chain reaction. None of those organ samples was positive. The sera samples were screened for the antibodies against FMD, CSF and ASF by commercial ELISA kits. All sera samples were negative.

Keywords: *Wild boar, foot and mouth disease, classical swine fever, African swine fever, Viral nucleic acid detection*