出國報告（出國類別：研究）

赴泰國評估動物疾病診斷試劑並研習豬瘟免疫學相關技術

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所
姓名職稱：潘居祥副研究員、林有良副研究員
陳姿菡助理研究員、黃有良助理研究員
派赴國家：泰國
出國期間：98 年 7 月 19 日至 98 年 7 月 24 日
報告日期：98 年 10 月 21 日

摘　　要

我們在泰國農業合作部畜產發展處 (The Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives) 的安排下，於本 (98) 年 7 月 19 日至 24 日赴泰國國家動物衛生研究所 (National Institute of Animal Health; NIAH) 及東南亞口蹄疫區域參考實驗室 (Regional reference laboratory for foot and mouth disease in South East Asia; RRL) 進行台泰農業合作決議事項之實驗室技術交流，執行有關「口蹄疫病毒非結構蛋白免疫色層分析測試片及豬與禽流感病毒 DNA 晶片診斷試劑」之測試評估。有關口蹄疫非結構蛋白抗體檢測，從泰國提供的 281 個豬隻血清檢體測試結果顯示，口蹄疫非結構蛋白 (FMD-NSP) 抗體免疫色層分析測試片(Chromatography strip)之確效試驗 (Validation)，檢測經口蹄疫 Asia 1 病毒株攻毒後第 14 天之豬隻血清的診斷敏感性可達 93.8% (15/16)，且與 VIA-AGID 及 UBI 診斷試劑套組檢測結果完全符合，因此證實本測試片也可檢測口蹄疫 Asia 1 血清型病毒感染血清之 NSP 抗體。另以免疫口蹄疫三價疫苗 (含 O, A, Asia 1 血清型) 之豬隻免疫血清及陰性血清檢測結果，其診斷特異性分別可達 98.1% (155/158) 及 100% (31/31)，且與 PrioCHECK FMDV-NS 診斷試劑套組檢測結果之符合率達 98.6% (142/144)。本所開發豬及家禽流行性感冒病毒 DNA 晶片抗原檢測原型試劑亦攜帶到泰國國家衛生研究院進行評估測試。泰國共提供 17 個流感病毒及 8 個新城病毒檢體，經 DNA 晶片測試結果顯示，流感病毒可同步區別流感病毒 H1、H3、H5、H6、H7 及 H9 亞型，並可鑑別 H5N1 高病原性家禽流行性感冒病毒株，測試結果與預期相符。此外，豬瘟為國內極重要之豬隻病毒性傳染性疾病，已有報告指出細胞性免疫對於豬瘟的免疫成效影響很大，為了吸取與建立豬瘟特異性細胞性免疫反應之檢測技術，此行亦前往泰國朱拉隆功大學 (Chulalongkorn University) 研習有關應用 ELISPOT 技術檢測豬瘟特異性細胞免疫反應與應用流式細胞儀檢測豬瘟病毒特異性干擾素 (Interferon-gamma) 等檢測技術。

目　　次

頁碼

壹、目　　的……4

貳、研習地點簡介……5

參、過　　程……9

肆、心　　得…… 15

伍、建 議 事 項…… 17

陸、致　　謝……18

柒、圖　　表……19

捌、附　　錄……29

玖、參 考 文 獻……..32

目　　的

為強化與提昇本所豬隻及家禽等重要傳染病之檢診及防治技術，俾以有效服務豬禽產業，保障畜禽動物福祉，本次藉由第 2 屆台泰農業合作會議第 8.9 項決議事項之實驗室技術交流，派員赴泰國國家動物衛生研究所、東南亞口蹄疫區域參考實驗室及朱拉隆功大學獸醫學院等三處參訪、研習並進行實驗室技術交流。本次共執行三項工作 1.口蹄疫病毒非結構蛋白抗體快速診斷試劑套組之測試評估，2. 豬與禽流感病毒 DNA 晶片診斷試劑之測試評估，3. 學習豬瘟病毒特異性細胞性免疫反應檢測技術。前兩項係藉由泰國提供當地的病毒株及血清來測試評估本所研發的兩種診斷試劑原型套組，後者是研習如何使用酵素免疫斑點試驗（Enzyme-linked Immunospot Assay；ELISPOT）與流式細胞儀進行豬瘟病毒特異性伽瑪干擾素 (Interferon-gamma; IFN-γ) 之檢測。

研習地點簡介

1. 泰國國家動物衛生研究所

泰國國家動物衛生研究所 (National Institute of Animal Health; NIAH) 隸屬於泰國農業合作部畜產發展處 (The Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives)，目前所長為 Dr. Vimol Jirathanawat。組織架構上該所係由三個主要單位構成 (圖一)，分別是總所 (Head Office, 位於泰國首都曼谷)、東南亞口蹄疫區域參考實驗室 (Regional reference laboratory for foot and mouth disease in South East Asia; RRL, 位於曼谷的北方 Pakchong Nakhonratchasima 省) 及位於各區域的獸醫研究發展中心 (RVRDC)。其中總所又分成實驗室及後援二部份，實驗室部份包括病理學、病毒學、細菌學及黴菌學、寄生蟲學、免疫血清學、生化毒理學及鉤端螺旋體中心等七部門，後援部份則包括流行病學實驗室、品質開發實驗室、動物衛生管理及實驗動物等。另外，東南亞口蹄疫區域參考實驗室則包括服務中心、標準診斷測試及品質保證部門、收集病毒及試劑生產的研發部門。此外，共有七個區域獸醫研究發展中心，包括北部上半區域 (位於 Lampang 省)、北部下半區域 (位於 Pitsanulok 省)、東北部上半區域 (位於 Khonkaen 省)、東北部下半區域 (位於 Surin 省)、西部區域 (位於 Ratchaburi 省)、東部區域 (位於 Chonburi 省)及南部區域 (位於 Nakhonsrithammarat 省)。該所之功能涵蓋八項：一、主導畜禽重要疾病的研究；二、提供檢測病原的診斷服務及建議農民治療與控制的方法；三、診斷試劑的研發與標準化；四、做為疾病確診的參考實驗室；五、主導包括外來重要疾病的研究與監測；六、辦理訓練活動、技術轉移、研究及國際技術合作；七、支持與協調各 RVRDC；八、協調政府與國內外私人部門或機構為研究及疾病控制計畫，開發動物衛生資訊系統。

泰國農業合作部畜產發展處 (DLD) 目前正推動一項國家型口蹄疫監控撲滅計畫 (The South-East Asia FMD-SEAFMD Campaign)(OIE, 2007)，主要目的即加強動物預防注射以增加畜群之免疫力及國內與國際間動物之移動管制，施行自 1997 年起至 2020 年止，共分五期，現階段為第三期即 2006~2010 年，全年經費估計約 60 億美元，以作為支援各定點的獸醫檢疫站及儲備緊急性疫苗之用。參與的國家有泰國、緬甸、柬埔寨、寮國、越南、印尼、菲律賓及馬來西亞等八國，其中菲律賓及馬來西亞已於 2009 年 6 月通過世界動物衛生組織 (OIE) 認可為口蹄疫非疫區。此計畫執行的進展中區域包括馬來西亞-泰國-緬甸區 (MTM)、湄公河上游區(UMZ)、湄公河下游區 (LMZ)、菲律賓口蹄疫非疫區、越南紅河 Delta 區及緬甸區 (MYZ)

等，在這些區域設立獸醫檢疫站，以達疾病監控之目的。故期望於 2020 年能達成計畫之終極目標即獲得 OIE 認可成為「口蹄疫疫苗接種的非疫區」。除了口蹄疫之外，其他疾病如高病原性家禽流行性感冒 (HPAI)、新城病 (ND) 及豬瘟 (HC) 已適用而納入於第三期執行計畫中。

2. 東南亞口蹄疫區域參考實驗室

東南亞口蹄疫區域參考實驗室是此次至泰國測試免疫色層分析測試片的主要地點，該實驗室最初於 1958 年設立為口蹄疫實驗室，2004 年 10 月三級實驗室正式開幕，於 2009 年 5 月經 OIE 國際委員會核准通過成為東南亞口蹄疫區域參考實驗室，也是 SEAFMD Campaign 計畫之診斷服務中心。目前由 Dr. Wilai Linchongsubongkoch 主任 (圖四) 負責執行有關口蹄疫診斷試驗與研發工作，已發表約 40 篇國際論文，此次承蒙熱心提供約 281 支豬血清樣品，以使口蹄疫病毒非結構蛋白免疫色層分析測試片能順利完成口蹄疫病毒 Asia 1 血清型之確效試驗。

RRL 於 2007 年 9 月通過 ISO/IEC 17025:2005 實驗室認證，該實驗室所有試驗皆依據世界動物衛生組織 (Office International Des Epizooties；OIE) -陸生動物診斷試驗及疫苗手冊 (Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals)(OIE, 2008)，執行項目有抗原分型試驗(ELISA typing test)、病毒中和試驗 (Virus neutralization test; VNT)、液相阻斷型 ELISA (Liquid phase blocking ELISA; LPBE) 及膠免疫擴散法 (Agar gel immunodiffusion; VIA-AGID)，其中該實驗室有自行研發 VIA-AGID 之檢測方法。另於檢測 FMDV-NSP 方法有間接型 ELISA 及競爭型 ELISA。

然而於今年由七個國家學者共同發表有關 2003-2007 年亞洲地區爆發口蹄疫病毒 Asia 1 血清型之報告 (Valarcher et al., 2009)，依據完整的病毒蛋白外鞘 VP1 的基因序列樹狀圖分析證實亞洲地區爆發之 FMDV Asia 1 血清型分離株可分為六個不同的族群 (group) (I~VI)，這些族群的核酸相似性約為 95~100%。如愛爾蘭 (Iran) 屬於 group I 及 VI；巴基斯坦 (Pakistan) 屬於 group II 及 VI；阿富汗 (Afghanistan) 等北方國家屬於 group II；印度 (India) 屬於 group III；緬甸及越南 (Myanmar and Vietnam) 屬於 group IV；香港特別行政區屬於 group II；東俄羅斯 (Eastern Russia)、北韓 (North Korea)、中國 (China) 包括北京、河北、山東、江蘇、甘肅、青海、四川、重慶等地區屬於 group V；雲南省屬於 group IV&V。然而中國與香港特別行政區核酸序列差異較大，約 16.1~17.2%，北韓曾於 2007 年爆發口蹄疫病毒 Asia 1 血清型，感

染原因為輸入進口來自中國遼寧省約 461 頭牛隻 (431/461; 93% 感染率) 引起的，當時採全數撲殺策略，其他沒有感染的易感動物豬隻計有 2,630 頭也全數撲殺處理，至 2008 年無發生感染。泰國曾於 2001 年爆發感染口蹄疫病毒 Asia 1 血清型之後，由於防疫工作確實每年執行二次預防注射 (O, A, Asia 1 三價疫苗)，此疫苗乃是由泰國農業合作部畜產發展處獸醫生物製劑局製產，且常使用液相阻斷型 ELISA 評估牛及水牛之免疫性皆可達 80-90%，故至今全無病歷報告發生。

3. 朱拉隆功大學獸醫學院

朱拉隆功大學是泰國歷史最古老之高等學府，被稱為「全國最有威望的大學」，大學擁 18 個學院、2 個研究生學院、1 個分校、12 個研究所、2 個教育中心、3 個附屬學校。學校於 1917 年由泰國第六世皇瓦吉拉伍德國王所創辦，學校名字取自朱拉隆功王國國王拉瑪五世之姓名，在最初創辦之 20 年間，是泰國唯一的一家高級教育學院。校址創於曼谷市中心區，佔地 500 公頃，周圍商業繁盛，大規模商場與辦公廳遍設。朱拉隆功大學目前共設有 18 個學院，約有 3 萬名學生與 2700 名教師。泰國獸醫學相關知識與學校的建立，在 1904 年由 Chao Phraya Weswongwiwat 農業部長開始建立獸醫的訓練，當時由 Mr. H.S. Leonard 這位具有流行病學與食物安全之歐洲的獸醫師擔任訓練員，並於 1909 年成立為期 4 年的獸醫訓練課程，1923 後由 Mr. H. S. L. Woods 與 Robert Percy Jones 擔任訓練員，且於 1917 年朱拉隆功大學成立之後，整個獸醫學訓練課程併入朱拉隆功大學內，並於 1934 年由 Major-General M.C.、Thongtikhayu Thongyai、Major-General Luang Sananraksat、 Colonel Luang Sanitraksat 與 Lt.Col. Luang Chai Assawarak 合力成立獸醫學系、並維持現有的 4 年獸醫學訓練課程，1937 年開始規劃與執行符合國際水準之 4 年獸醫學課程、1939 年開始 5 年獸醫學課程、1942 年獸醫學院併入醫學大學內、1967 獸醫學系再次回到朱拉隆功大學、1971 年創立並發行獸醫學雜誌，而整個朱拉隆功大學獸醫學院發展至今已包括獸醫解剖學系、獸醫藥理學系、獸醫病理學系、獸醫外科學系、獸醫生理學系、畜牧學系、產科學系、獸醫學系、微生物學系與動物醫院。此次研習的地點在獸醫學院微生物學系 Sanipa Suradhat 教授的實驗室，Sanipa Suradhat 教授已從事豬瘟病毒相關研究多年並於著重在疫苗免疫效力與免疫學之相關研究，且已發表數篇有關豬瘟疫苗效力與豬瘟病毒細胞性免疫反應之國際研究論文，其所發表有關豬瘟病毒之國際論文如下：

編號	標　　題	期　　刊
1	Factors critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas	Vet Microbiol. 2007
2	Negative impact of porcine reproductive and	Vaccine. 2006

	respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever vaccine	
3	The kinetics of cytokine production and CD25 expression by porcine lymphocyte subpopulations following exposure to classical swine fever virus (CSFV).	Vet Immunol Immunopathol. 2005
4	Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J Gen Virol. 2003
5	The influence of maternal immunity on the efficacy of a classical swine fever vaccine against classical swine fever virus, genogroup 2.2, infection.	Vet Microbiol. 2003
6	The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection	Vet Immunol Immunopathol. 2001

過　　程

一、行程表

本次考察係透過泰國農業合作部畜產發展處的協助進行相關安排，行程表如下：

日期	內容
7/19(日)	台北-曼谷 (華航 CI 0835　13:20-16:00)
7/20(一)	曼谷 The National Institute of Animal Health (國家動物衛生研究所) --與所長及研究人員座談、檢驗技術交流、實驗室參觀。
7/21(二)	曼谷 朱拉隆功大學 --與 Sanipa Suradhat 教授會面並討論實驗相關事宜、簡介細胞性免疫反應檢測技術、學習如何分離豬周邊血液單核細胞。
7/22(三)	曼谷 朱拉隆功大學、國家動物衛生研究所 -- Rachod Tantilertcharoen 獸醫師簡介朱拉隆功大學獸醫學院診斷豬瘟病毒之檢測技術流、與學習如何利用 ELISPOT 檢測豬瘟特異性 IFN-γ 分泌細胞。 --向國家動物衛生研究所介紹 DNA 晶片的應用並示範操作流程。
7/23(四)	曼谷、北沖 朱拉隆功大學、國家動物衛生研究所、東南亞口蹄疫區域參考實驗室 --學習如何利用流式細胞儀檢測豬瘟特異性 IFN-γ 分泌細胞。 --DNA 晶片的測試評估。 --口蹄疫病毒非結構蛋白抗體快速診斷試劑套組之測試評估。
7/24(五)	曼谷、北沖 朱拉隆功大學、國家動物衛生研究所、東南亞口蹄疫區域參考實驗室 --與 Sanipa Suradhat 教授、Rachod Tantilertcharoen 及 Piya Wongyanin 分享台灣行政院農委會家畜衛生試驗所診斷豬瘟病毒之方法。 --DNA 晶片的測試評估。 --口蹄疫病毒非結構蛋白抗體快速診斷試劑套組之測試評估。
7/25(六)	曼谷 泰國農業處 Pak-uthai Thanee 先生陪同市區旅遊
7/26(日)	回程：曼谷-台北 (華航-CI 0834　12:20- 17:00)

二、參訪人員

潘居祥 Pan, Chu-hsiang	行政院農業委員會家畜衛生試驗所副研究員 Associate Researcher, Animal Health Research Institute, Taipei, Taiwan.
林有良 Lin, Yu-Liang	政院農業委員會家畜衛生試驗所副研究員 Associate Researcher, Animal Health Research Institute, Taipei, Taiwan.
陳姿菡 Chen, Tsu-Han	政院農業委員會家畜衛生試驗所助理研究員 Assistant Researcher, Animal Health Research Institute, Taipei, Taiwan.
黃有良 Huang, Yu-Liang	政院農業委員會家畜衛生試驗所助理研究員 Assistant Researcher, Animal Health Research Institute, Taipei, Taiwan.

三、研習過程

一、7 月 20 日

國家動物衛生研究所

參訪泰國國家動物衛生研究所與所長及研究人員座談、檢驗技術交流、實驗室參觀，參訪人員與泰方人員於泰國國家動物衛生研究所之合影(圖二、圖三)。

二、7 月 21 日

朱拉隆功大學

上午由 Sanipa Suradhat 教授簡介細胞性免疫反應之檢測技術 (圖五)，其簡介內容包括細胞性免疫、豬周邊血液單核細胞（Peripheral blood mononuclear cell；PBMC）分離術、與如何應用 ELISPOT 與流式細胞儀檢測豬瘟病毒特異性 IFN-γ 分泌細胞。

（1）細胞性免疫：病原入侵豬隻體內後可分別誘發體液性免疫反應與細胞性免疫反應，其中體液性免疫反應可經由檢測血清中的抗體力價來進行評估，細胞性免疫反應則可分別經由檢測淋巴球對抗原的增殖反應、毒殺能力與特異性細胞激素的量來進行評估，於細胞激素中，目前已知豬隻分泌豬瘟病毒特異性 IFN-γ 的能力與豬隻抵抗豬瘟病毒感染能力有關，然而 IFN-γ 主要由 T 淋巴球所分泌，因此可藉由評估豬淋巴球分泌豬瘟病毒特異性 IFN-γ 的能力來衡量豬隻細胞性免疫反應之強弱。

（2）周邊血液單核細胞分離術：周邊血液單核細胞是由淋巴球與單核球所組成，由於此兩種免疫細胞都具有調節免疫系統之能力且容易從血液中取得，因此，此兩種細胞經常被用來評

估動物體內免疫反應之狀況，而此次的周邊血液單核細胞分離術主要利用 Ficoll-Hypaque（密度為 1.078）其密度剛好介於周邊血液單核細胞與紅血球、顆粒球之間，可成功分離出周邊血液單核細胞。

（3）酵素免疫斑點試驗：此方法之原理與間接酵素免疫吸附法相似，但其敏感性卻高出間接酵素免疫吸附法 20 至 200 倍。其需先於含有硝化纖維濾紙的 96 孔盤內覆蓋一層抗體，再加入所要檢測之細胞，再加入標示鹼性磷酸酶的二次抗體進行偵測，最後以呈色劑進行呈色，並計算孔內的斑點數目(圖六)。

（4）流式細胞儀：一種由流體帶動細胞進行檢測的儀器，其可同時檢測數種標的。此儀器是由流體系統、光學系統與電子系統所組成。流體系統主要的目的是利用流體力學的方式將散布於 3 度空間中的細胞一顆接著一顆地通過光學系統的雷射光束。光學系統則是利用雷色光束激發細胞所攜帶的螢光物質，最後這訊號會由電子系統的感測器所吸收，並進一步將其數據化且呈現於電腦螢幕上。下午由 Piya Wongyanin 帶領進行豬周邊血液單核細胞分離術的實際操作，其詳細步驟於於附錄一中，另外，也於 96 孔盤內附著一層抗豬 IFN-γ 的抗體。

三、7 月 22 日

朱拉隆功大學

上午分別由 Rachod Tantilertcharoen 與 Sanipa Suradhat 教授簡介「朱拉隆功大學獸醫學院診斷豬瘟病毒之檢測技術」與「影響豬瘟疫苗效力之因子」，其豬瘟病毒之診斷方法包括血清學、抗原檢測、病毒分離與核酸檢測法，於血清學方面，主要利用 neutralising peroxidase linked assay（NPLA）進行豬瘟病毒中和抗體之檢測；抗原檢測主要將組織塊製作成冷凍切片，之後再利用豬瘟抗體進行螢光抗體染色；核酸檢測法方面，則於 gpE 區域設計引子且利用此引子進行 RT-PCR 之檢測。於 Sanipa Suradhat 教授所簡介的「影響豬瘟疫苗效力之因子」主題中，其可將影響因子分成三個層面，分別為疫苗、豬隻與其它因子；疫苗方面，其所使用的疫苗種類為何，是活毒減毒疫苗、次單位疫苗或是其他種類疫苗，不同種類的疫苗其所提供的保護力不同，另外，豬隻本身所感染的病毒株是否與疫苗豬為同一型，不同型之間的交叉保護效果如何，這些因子都必須考慮在疫苗的選擇上；於豬隻方面，豬隻本身所得到的移行抗體多寡，將影響疫苗免時機與效力，於活毒減毒株瘟疫苗之免疫中，豬隻本身的病毒中和抗體不能超過 32 倍、否則將影響疫苗之效力，無法達到 100％的保護效果，另外，豬隻本身

如只依賴中和抗體進行保護時，其病毒中和抗體需高於 512 倍以上方可抵抗強毒株之感染，綜合有關移行抗體對豬瘟活毒減毒疫苗效力之影響，其疫苗免疫適期的抉擇將非常重要，其關係到豬隻是否可因疫苗免疫而受到保護；至於其它因子方面，如豬瘟活毒減毒疫苗與假行狂犬病疫苗合併使用或豬隻感染豬隻生殖與呼吸綜合症時，其均會導致豬瘟活毒減毒疫苗效力低落。下午由 Piya Wongyanin 博士候選人帶領進行 ELISPOT 檢測豬瘟特異性 IFN-γ 分泌細胞之試驗，將 7/21 日所分離並經由豬瘟病毒活化之 PBMC 接種至以附著一層抗豬 IFN-γ 抗體的 96 孔盤內。其詳細步驟於附錄二中。

國家動物衛生研究所

早上以演講方式向國家動物衛生研究所研究人員介紹本所開發的口蹄疫病毒非結構蛋白抗體快速診斷試劑及豬與禽流感病毒 DNA 晶片診斷試劑之原理與應用，下午則示範 DNA 晶片的操作流程。豬流行性感冒 (Swine influenza; SI) 及家禽流行性感冒(Avian influenza; AI)為現今最重要之人、畜、禽共同傳染病，往往造成畜禽產業重大的經濟損失及相關人員機緣性的感染。目前已知有 H5, H7 及 H9 三種不同亞型 AI 病毒會感染人類，其中 H5N1 亞型病毒會造成大批禽鳥死亡及出現人類感染死亡的案例，H1 及 H3 亞型 SI 病毒則會同時感染人類及豬隻，因此在病原診斷與病毒型別的鑑定上十分重要。最近 H1N1 新流感疫情在全世界蔓延，由於 H1N1 新流感病毒帶含豬、禽、人的流感基因，且 8 段基因已被重組過，屬於一種全新的變種病毒。加拿大及阿根廷陸續報導豬場的豬隻被 H1N1 新流感病毒感染；顯示，新流感病毒可在人與豬隻之間循環感染，此將會造成往後 H1N1 傳統豬流感病毒與 H1N1 新流感病毒感染豬隻產生區別診斷上之困難，目前要區別 H1N1 傳統豬流感病毒與 H1N1 新型人類流感病毒唯有依靠核酸定序方法進行鑑別診斷。DNA 晶片技術提供一個同步多功能檢測的操作系統，突破傳統檢驗後續繁瑣的核酸定序及序列分析，為技術層次上的一大突破。採用多引子 RT-PCR 反應增幅病毒核酸增加檢測的病毒種類，再經由特異性核酸探針雜交確認可以增加檢測的 準確度。本方法適用於豬、家禽流行性感冒病毒及 H1N1 新流感病毒之同步檢測及分型。利用 DNA 晶片平台測試結果顯示，可區別豬及家禽重要流感病毒 H1、H3、H5、H6、H7、H9 及 N1 亞型，可同步鑑別 H5N1 高病原性家禽流行性感冒病毒株，可區別 A 型、B 型流行性感冒病毒，可區別 H1N1 豬流感病毒及 H1N1 新流感病毒。

四、7 月 23 日

朱拉隆功大學

上午由 Piya Wongyanin 博士候選人帶領進行 ELISPOT 檢測豬瘟特異性 IFN-γ 分泌細胞之試驗，使用 PBS 緩衝液清洗三次再加入標示有生物素之抗豬 IFN-γ 單株抗體進行感做，之後再加入標示有鹼性磷酸酶卵白素（streptavidin-alkaline phosphatase）與呈色劑進行感做。其詳細步驟於附錄二中。下午由 Piya Wongyanin 博士候選人帶領進行流式細胞儀檢測豬瘟特異性 IFN-γ 分泌細胞之試驗，首先使用 PBS 緩衝液清洗經由豬瘟病毒活化之 PBMC，之後再將細胞固定並使用標示有生物素之抗豬 IFN-γ 單株抗體進行感做，再以 PBS 緩衝液進行清洗後，已標示有螢光之卵白素進行感作。其詳細步驟於附錄三中。

國家動物衛生研究所

國家動物衛生研究所提供包括新城病及豬、家禽流行性感冒病毒株共 25 株，其中流感病毒包含 H1 至 H15 等 15 種亞型共 17 株，新城病毒則提供 8 株 (表一)。25 株病毒經核酸萃取後，先進行多引子 RT-PCR 反應後接著 DNA 晶片雜合試驗 (步驟詳如附錄四)。

東南亞口蹄疫區域參考實驗室

由於免疫色層分析測試片先前已完成口蹄疫病毒 (Foot - and - mouth disease viruse; FMDV) O/TAW/97 及 O/TAW/99 血清型的抗體測試，因此希望能測試其他血清型之抗體反應程度，故藉此機會可至東南亞口蹄疫區域參考實驗室，初步證實測試片對目前東南亞發生的 FMDV-Asia 1 血清型具有良好的檢測能力(圖七)。

五、7 月 24 日

朱拉隆功大學

由 Piya Wongyanin 博士候選人帶領進行流式細胞儀之操作，並將 7/23 日所染色的 PBMC 進行豬 IFN-γ 之檢測與分析。

國家動物衛生研究所

繼續進行 DNA 晶片診斷試劑之測試評估，各病毒亞型特異性探針晶片分布圖詳如圖八，DNA 晶片雜合結果詳如圖九。豬及家禽流行性感冒病毒 DNA 晶片診斷套組係針對豬及家禽流行性感冒病毒 H1、H3、H5、H6、H7、H9 及 N1 亞型病毒設計 8 對特異性引子及 16 條特異性探針，經由 2 組 Multiplex RT-PCR 方式增幅後取其產物與點製在高分子塑膠材質上專一性之探針進行點雜交，結果顯示，可達到確認豬及家禽流行性感冒病毒 H1、H3、H5、H6、

H7、H9 及 N1 亞型之目標，亦可同步鑑別 H5N1 高病原性家禽流行性感冒病毒株。

東南亞口蹄疫區域參考實驗室

經 281支免疫色層分析測試片試驗結果顯示，口蹄疫非結構蛋白 (NSP) 抗體免疫色層分析測試片之確效試驗 (Validation)，可於15~20分鐘內快速完成定性判讀 (圖十、十一)。檢測結果有16頭豬隻以口蹄疫Asia 1病毒株攻毒後，於第7、14、21及28天分別收集共64支血清樣品，以 LPBE 檢測Asia 1 抗體力價皆≧1:90~1:1280等陽性反應，其中有一頭豬隻為1:80 (所有檢測方法皆呈陰性反應)，然以免疫色層分析測試片於第 14 天之豬隻血清檢測診斷敏感性可達 93.8%，且與 VIA-AGID 及 UBI 診斷試劑套組檢測結果完全符合，因此證實本測試片也可檢測口蹄疫 Asia 1 血清型病毒感染血清之 NSP 抗體 (圖十二)。另以免疫口蹄疫三價疫苗 (含O, A, Asia 1血清型) 之158支免疫豬血清，以 LPBE 檢測 O, A, Asia 1 抗體力價呈＜1:40~＞1:5120等反應，免疫色層分析測試片之診斷特異性可達 98.1%；31支陰性血清檢測結果，以 LPBE 檢測 O, A, Asia 1 抗體力價皆＜1:90等陰性反應，免疫色層分析測試片其診斷特異性可達 100%，然而二者免疫色層分析測試片的結果與 PrioCHECK FMDV-NS 診斷試劑套組檢測結果之符合率達 98.6% (表二)。另外有10支豬血清樣品使用各種 NSP 檢測方法的比較試驗(表三)，其中有5支豬隻於免疫後3 週再以口蹄疫Asia 1病毒株攻毒後3週之血清樣品(LPBE 檢測O, A, Asia 1抗體力價為1:160~1:1280) ，經免疫測試片檢測陽性率為20%，顯示部份免疫豬隻經攻毒後仍能檢出口蹄疫NSP抗體，而其他測試方法之檢測結果，也多能支持此一論點；另有5支豬血清來自口蹄疫Asia 1病毒株攻毒後3週 (LPBE 檢測 Asia 1 抗體力價為1:160~1:640)，免疫測試片測試結果與VIA-AGID、WRL、UBI等方法完全符合，其陽性率皆達100%。18支來自2004年攻毒後第10天之豬血清樣品，以免疫色層分析測試片之陽性檢出率結果為 44%。

心　　得

一、口蹄疫免疫測試片具快速區別診斷的效率與功能：

泰國為虔誠的佛教國家，人民非常敬崇君王禮節，讓人感覺具有樸實簡約的生活，及藝術建築的宏偉。除須努力專於試驗研究之外，參訪時也發現試驗其實可利用簡單非昂貴的儀器設備仍可達到完整而有效的試驗品質與研究目的。其次，研究人員應善用優良試驗環境以增加研究成果之產出。然泰方對於品保作業之把關非常嚴謹是值得學習，即每批來自各試驗防疫單位的血清樣品之優劣，使用記分方法評估整體血清之品質並作好詳盡記錄，以改善降低試驗不準確性的產生。本次試驗行程雖短暫，以免疫色層分析測試片作為檢測之工具，確實能充份發揮快速區別診斷的效率與功能。泰方現階段使用多價 O, A, Asia 1 血清型疫苗進行預防接種可防範及免除受鄰近口蹄疫感染國家 (如中國雲南省、緬甸、寮國、柬埔寨、越南、印尼等國) 的威脅，尤其是該國之口蹄疫病毒 Asia 1 血清型已自 2001 年之後，即無任何病史發生，可見執行多價血清型疫苗顯見有效增強動物對口蹄疫病毒 Asia 1 血清型之抗體免疫能力，該國已如上述依照東南亞口蹄疫監控撲滅計畫「The South-East Asia FMD (SEAFMD) Campaign」期望於 2020 年能通過 OIE 之認可獲得「口蹄疫疫苗接種的非疫區」，然而也期望我國也能在有效之疾病監控診斷下能如馬來西亞及菲律賓一樣早日成為 OIE 認可的「口蹄疫無疫苗接種的非疫區」。

二、DNA 晶片具快速區別豬及家禽重要流感病毒亞型之功能：

國家動物衛生研究所提供包括新城病及豬、家禽流行性感冒病毒株共 25 株，經盲樣測試結果顯示，不同亞型流感病毒皆能特異性地與其對應探針結合，不會產生非特異性反應，泰方提供 1 株高病原性 H5N1 病毒株經雜合結果顯示，H5N1 特異性探針出現陽性反應，顯示可同步鑑別高病原性 H5N1 病毒株，此結果亦讓泰方研究人員感到好奇，並對於 DNA 晶片產生興趣。

三、研習豬瘟病毒特異性細胞性免疫反應檢測技術：

此次非常感謝朱拉隆功大學 Sanipa Suradhat 教授與其團隊熱心教導檢測豬瘟病毒細胞性免疫反應之相關技術，讓此次學習過程十常充實，雖然相當多的資訊可透過國際期刊取得，但當面的討論與實際操作對於整個實驗技術的學習仍是非常重要，除了可了解實驗之細節外，更有助於建立溝通的管道與維持良好的互動，對未來本所要自行建立相關技術有莫大幫助，且也可經由此次建立溝通管道，提供未來合作之機會。此次研習過程對其實驗設計與態

度亦受益良多，尤其能夠在現有實驗設備與環境不佳的情況下還能建立許多種檢測技術，並發表許多重要之 SCI 論文，此為我國值得學習的地方。另外，經由此次研習過程中也了解細胞性免疫對於豬隻抵抗豬瘟病毒的重要性，由其是當豬隻本身尚未有豬瘟抗體時，更顯得重要，從此處更可以得知細胞性免疫的重要性。

建 議 事 項

一、加強台泰雙方之合作：

我國與泰國在動物疾病方面所面臨之問題有許多相似的地方，而過去本所與泰國接觸的機會比較少，藉由本次研習經驗，建議應繼續辦理台泰雙方合作計畫包括口蹄疫血清樣品及重要疾病 DNA 樣品等分讓，以供試驗之進行。

二、建立細胞性免疫反應檢測技術：

此次研習過程了解到細胞性免疫對於豬隻抵抗豬瘟病毒的重要性，尤其是當豬隻本身尚未有豬瘟抗體時，更顯得重要，因此建議國內應建立本項檢測技術。

三、在疫苗的開發過程中檢測疫苗所引發之細胞性免疫能力：

藉由此次泰國研習的過程中發現，細胞性免疫反應在對抗疾病的重要性，而在疫苗的研發過程中如能有效誘發動物產生特異性的細胞性免疫反應，對於疫苗的價值將大為提升，而此次所學習的細胞性免疫反應檢測技術，對於本所目前或未來在研發許多動物性疫苗的過程中，建議利用細胞性免疫反應檢測技術加以檢測疫苗所誘發的細胞性免疫反應能力，藉以改良疫苗之免疫成效，當能大幅提升疫苗之免疫效力。

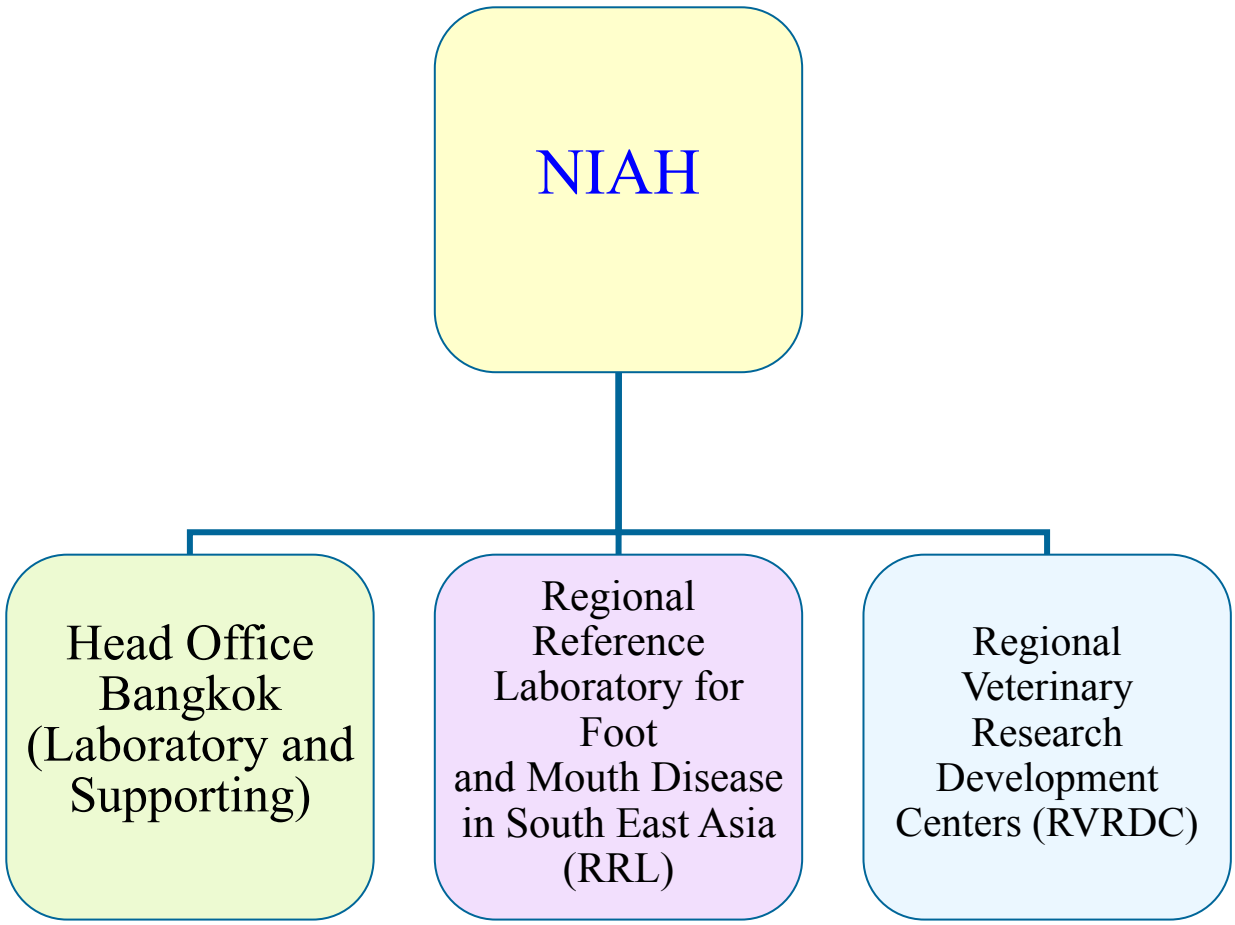
四、寬列出國研習參訪預算：

為使研究人員增廣見聞進而達到專業知識技術及研究經驗等學術交流的目的，藉以提昇研究水準並加速科技成果商品化，建議寬列出國研習參訪預算，鼓勵研究人員出國赴先進國家實驗室及學術機構研習參訪。

致　　謝

首先感謝農委會經費支助及長官們熱心提攜協助計畫推動與指導，泰國朱拉隆功大學 Sanipa Suradhat 教授帶領她的研究團隊於 7/21 至 7/24 日期間的不辭辛勞的教導，其中要感謝 Piya Wongyanin 與 Rachod Tantilertcharoen 先生於此期間無私與不辭辛勞的教導；非常感謝泰國國家動物衛生研究所(NIAH)病毒系主任 Dr. Sujira 慷慨提供受測病毒株並對本試驗的鼎力相助，讓此行 DNA 晶片測試評估工作能順利完成；同時感謝東南亞口蹄疫區域參考實驗室 Dr. Wilai Linchongsubongkoch 主任熱心提供豬血清樣品，以使口蹄疫病毒非結構蛋白免疫測試片能順利完成口蹄疫病毒 Asia 1 血清型之確效試驗；另外要感謝行政院農業委員會朱世文研究員、行政院農業委員會家畜衛生試驗所鍾明華組長、駐泰國台北經濟文化辦事處秘書組許芬娟組長、連周慶秘書、高文杰秘書及泰國農業處代表 Pak-uthai Thanee 先生等熱心事先安排聯繫與規劃，讓此次台泰農業合作交流能夠順利完成；最後要再次感謝泰國農業處代表 Pak-uthai Thanee 先生於泰國期間不辭辛勞的安排與照顧，且細心製作可愛的卡片與具有紀念價值的照片 CD 分送予每位參訪者，讓我們倍感溫馨與友善。另感謝凌越生醫股份有限公司及晶宇生物科技實業股份有限公司參與試驗研究，使本次研習任務順利圓滿達成，特此致謝。

圖　　表



圖一、國家動物衛生研究所(NIAH)之組織結構圖。

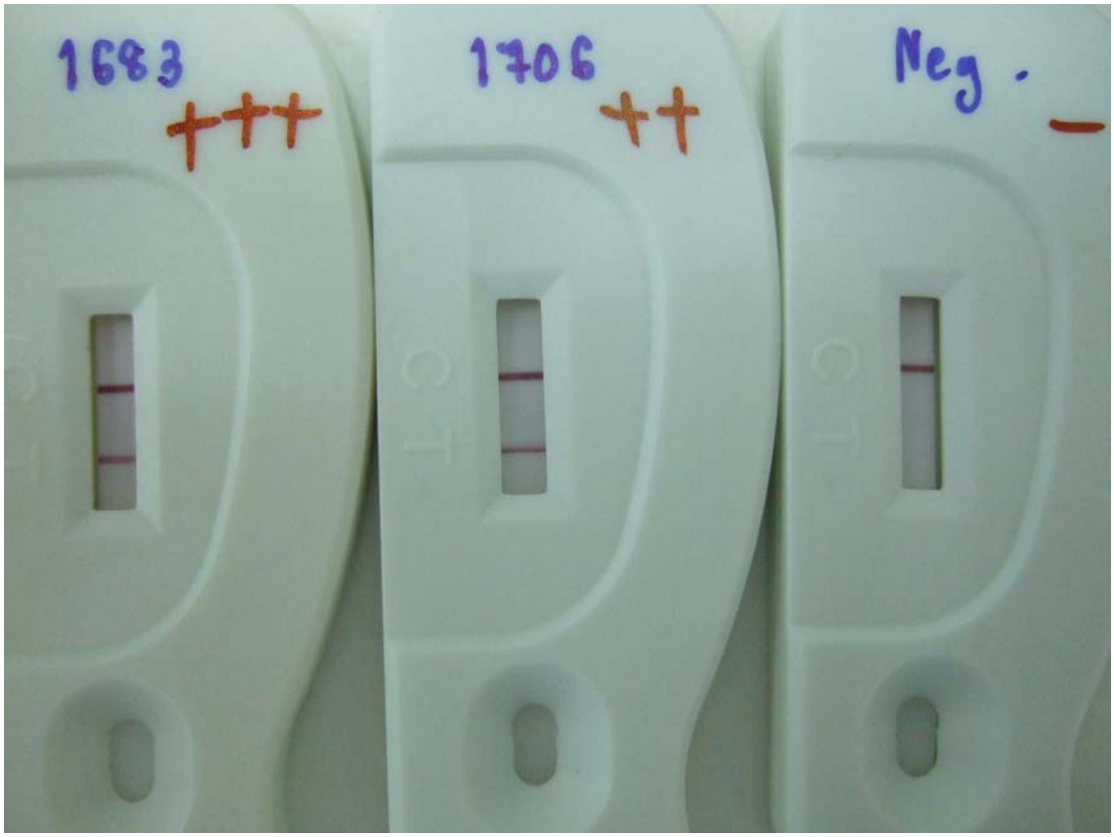
圖二、 我國參訪人員與泰方人員於泰國國家動物衛生研究所 (NIAH) 之合影。

圖三、參訪人員與泰國國家動物衛生研究所所長及主任之合影。

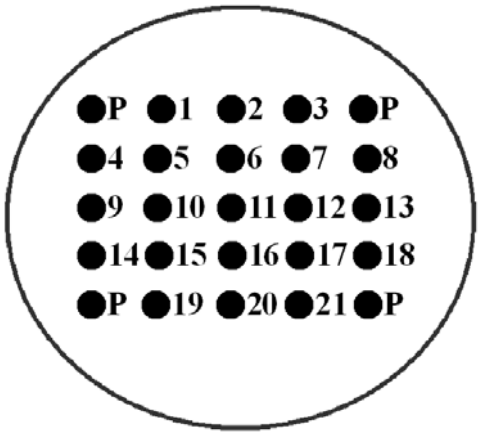
圖四、泰國東南亞口蹄疫區域參考實驗室 (RRL)主任 Dr. Wilai Linchongsubongkoch。

圖五、於朱拉隆功大學獸醫學院與 Rachod Tantilertcharoen 獸醫師（右一）及 Sanipa Suradhat 教授（左一）討論豬瘟病毒之檢測診斷技術與影響豬瘟疫苗效力等因子之會議後合影。

圖六、使用顯微鏡進行 ELISPOT 結果之判讀過程。

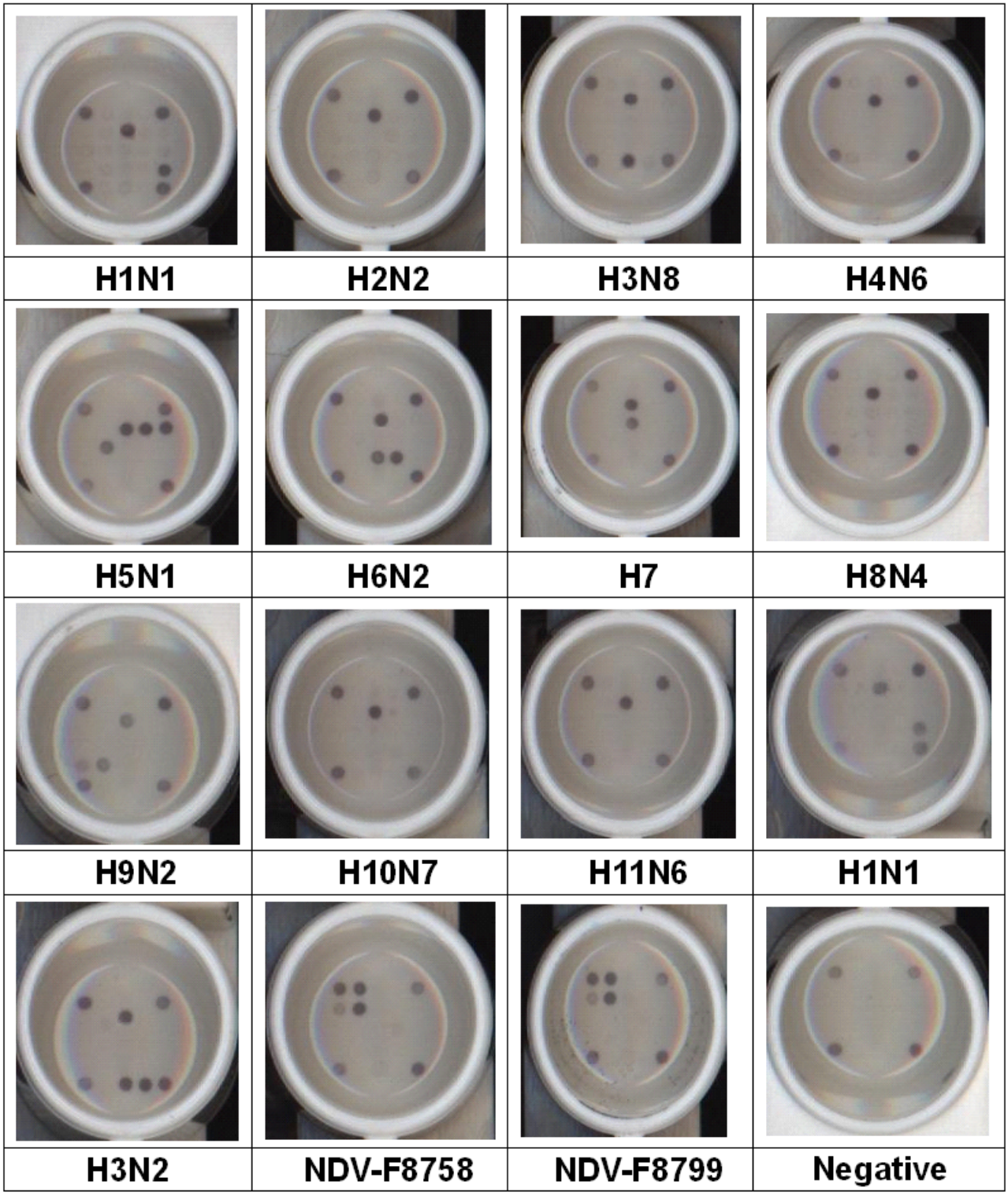


圖七、以口蹄疫非結構蛋白免疫色層分析測試片檢測血清抗體之結果，於 C 控制線後之 T 測試線 (+++) 表示抗體強陽性、(++) 為抗體中陽性、(－) 表示抗體陰性。



1 : NDV-U	9 : AIV-H5-u3	17 : AIV-H6-America (美洲型)
2 : NDV-vm-1 (強毒型)	10 : AIV-H5N1 (H5N1 特異性)	18 : AIV-H1-u1
3 : NDV-vm-2 (強毒型)	11 : AIV-H7-E.A.-1 (歐亞型)	19 : AIV-H1-u2
4 : NDV-11 (疫苗型)	12 : AIV-H7-America (美洲型)	20 : H3-u1
5 : NDV-12 (疫苗型)	13 : AIV-H7-eqine specific (馬型)	21 : H3-u2
6 : AIV-M gene	14 : AIV-H9-E.A. (歐亞型)	
7 : AIV-H5-u1	15 : AIV-H9-America (美洲型)	P : Hybridization control
8 : AIV-H5-u2	16 : AIV-H6-E.A. (歐亞型)	

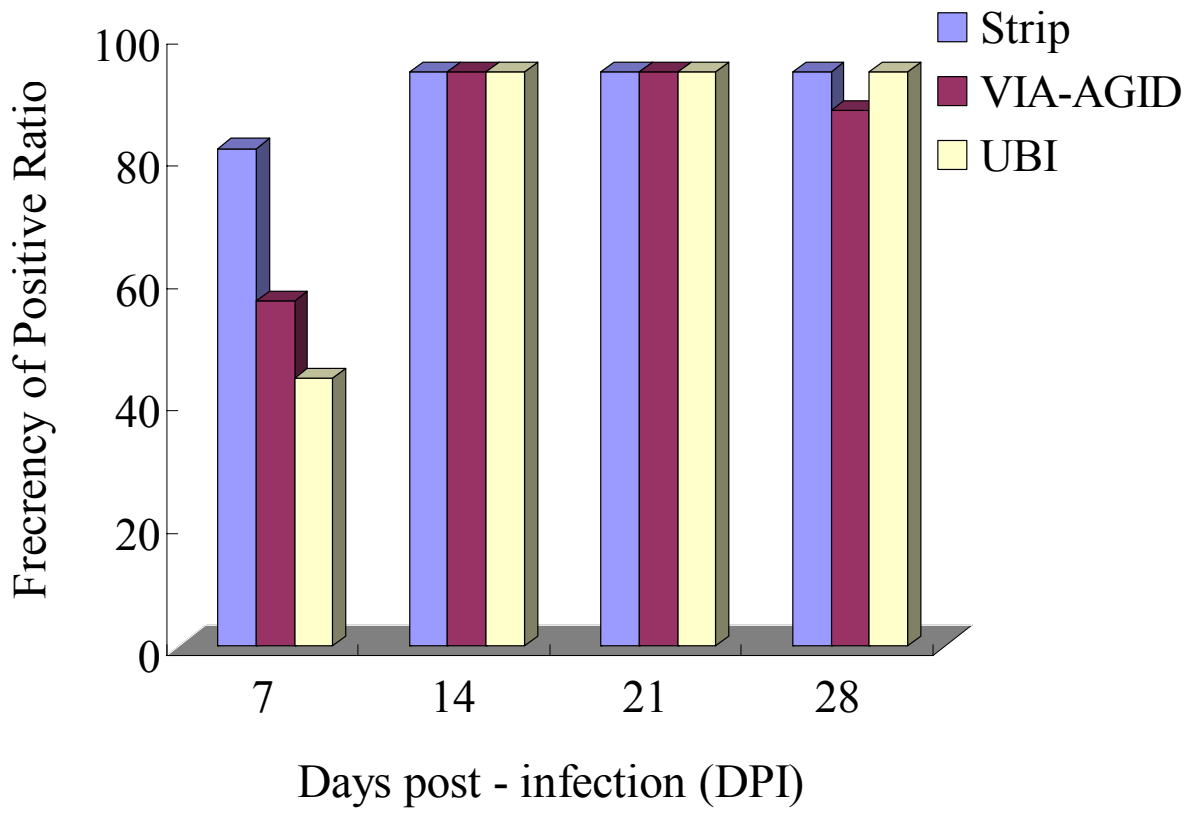
圖八、各病毒亞型特異性探針晶片分布圖。



圖九、DNA 晶片雜合結果。

圖十、泰國東南亞口蹄疫區域參考實驗室之研究人員 Dr. Preecha Liang 正進行口蹄疫免疫色層分析測試片的試驗過程。

圖十一、試驗結束後與泰方研究人員合影留念。



圖十二、口蹄疫非結構蛋白免疫色層分析測試片 (Strip) 與 VIA-AGID 及商品化 ELISA kit (UBI) 等陽性率之比較。

表一、泰國國家動物衛生研究所 (NIAH) 提供包括新城病及豬、家禽流行性感冒病毒株共 25 株。

序 號	病 毒 株 名 稱
1	H1N1=A/PR/8/34
2	H2N2=A/Singapore/1/57
3	H3N8=A/Dk/Ukraine/63
4	H4N6=A/Dk/Czeck/56
5	H5N1=A/ck/Sukhothai/NIAH 114843/08
6	H6N2=A/Tk/Massachusetts/3740/65
7	H7
8	H8N4=A/Tk/Ontario/67
9	H9N2=A/turkey/winconsin/66
10	H10N7=A/Ck/Germny/N/49
11	H11N6=A/DK/England/1/56
12	H12N5=A/DK/Alberia/60/76
13	H13N6=A/gull/Maryland/704/7
14	H14N5=A/mall/Astrakhan/263/82

15	H15N8=A/DK/Australia/341/83
16	H1N1=A/Chonburi/110702/08 no.7
17	H3N2=A/Chonburi/110702/08 no.15
18	F8758 (NDV)
19	F8799 (NDV)
20	F8817 (NDV)
21	F8845 (NDV)
22	F884 (NDV)
23	F8848 (NDV)
24	F8850 (NDV)
25	F8852 (NDV)

表二、口蹄疫非結構蛋白免疫色層分析測試片之特異性、敏感性及符合率的比較。

	Naïve sera	**Vaccination**	**Experimentally infected [a]**
Positive	0	3	15
Negative	31	155	1
Total	31	158	16
Sensitivity (%)	—	—	93.8
Specificity (%)	100	98.1	—
95% CI [b]	99-100	97.7-98.5	88-99.5
Agreement (%)	98.6 (PrioCHECK FMDV-NS kit)		100 (VIA-AGID and UBI)

[a] From 14th (PDI) of infectious sera panel

[b] CI：Confidence Interval

表三、10 頭豬血清樣品之各種口蹄疫非結構蛋白（NSP) 檢測方法的比較結果

樣品編號	血清來源	VIA-AGID	WRL	UBI	USDA	Chromatographic strip
789	免疫後 3 週+	－	＋	＋	－	＋
790	Asia 1 攻毒後 3	－	－	－	－	－
791	週 (LPBE ：O,	－	＋	＋	－	－
792	A, Asia 1 抗體力	－	－	－	－	－
793	價 1:160~1:1280)	＋	＋	＋	－	－
794	Asia 1 攻毒後 3	＋	＋	＋	－	＋
795	週 (LPBE：Asia	＋	＋	＋	－	＋
796	1 抗體力價為	＋	＋	＋	＋	＋
797	1:160~1:640)	＋	＋	＋	－	＋
798		＋	＋	＋	＋	＋

VIA-AGID: Virus infection associated antigen agar gel immunodiffusion test, RRL Thailand.

WRL: 3ABC NSP World Reference Laboratory, UK.

UBI: 3B NSP United Biomedical Inc., USA.

USDA: 3AB NSP Plum Island Animal Disease Center, USA.

Chromatographic strip: 3ABC NSP Animal Health Research Institute, Taiwan.

附　　錄

附錄一、豬周邊血液單核細胞之分離

1. 採集 10 至 15 ml 的抗凝血。
2. 將抗凝血與等量不含鈣與鎂離子之磷酸緩衝液混合。
3. 將混合後抗凝血加至已有 5 ml 分離液的離心管內。
4. 以 1000 Xg 離心 30 分鐘。
5. 將 PBMC 收集至新的離心管內，並加入 10 ml 的磷酸緩衝液。
6. 以 1000 Xg 離心 10 分鐘。
7. 棄上清液，加入 2 至 4 ml 無菌水混合，再加入等量 2 倍磷酸緩衝液。
8. 以 1000 Xg 離心 10 分鐘。
9. 棄上清液，並加入 10 ml 的磷酸緩衝液。
10. 以 1000 Xg 離心 10 分鐘。
11. 棄上清液，並加入 3 ml 含有 10% 胎牛血清之 RPMI 培養液。
12. 計算細胞數，並置於冰上備用。

附錄二、應用 ELISPOT 進行豬瘟病毒特異性 IFN-γ 分泌細胞之檢測

1. 將兔子抗豬 IFN-γ 抗體使用覆蓋液（carbonate/bicarbonate buffer）稀釋至 10 μg/ml，並加至 ELISPOT 專用盤內且置 4℃感做 18 小時。
2. 使用含有 0.5% PBST 清洗三次，再使用磷酸緩衝液（PBSA）清洗三次。
3. 加入 50 μl 含有 10% 胎牛血清之 RPMI 培養液並於 37℃感做 1 小時。
4. 將所分離之 PBMC（6×10^6 cell）培養至 24 孔盤內並加入 1 MOI 之 ALD 病毒液進行刺激。
5. 培養 18 至 20 小時後，取出懸浮性細胞並以 PBSA 清洗一次，再加入含有 10% 胎牛血清之 RPMI 培養液，並進行計算細胞數。
6. 取 5×10^5 或 2.5×10^5 細胞至 ELISPOT 專用盤內，37℃感做 18 小時。
7. 移除細胞加入 250 μl 之 DDW 感做 1 分鐘，再以 0.5% PBST 與 PBSA 各清洗三次。
8. 加入 biotin-anti-swine IFN-γ Mab（1 μg/ml），於室溫感做 1.5 小時。
9. 以 0.5% PBST 與 PBSA 各清洗三次。
10. 加入 1000 稀釋之 streptavidin-alkaline phodphatase，於室溫感做 1.5 小時。
11. 以 0.5% PBST 與 PBSA 各清洗三次。
12. 加入 BCIP/NBT 感做 20 至 40 分鐘，再以 DDW 清洗 4 次後乾燥。

附錄三、應用流式細胞儀進行豬瘟病毒特異性 IFN-γ 分泌細胞之檢測

1. 將所分離之 PBMC（6×10^6 cell）培養至 24 孔盤內並加入 1 MOI 之 ALD 病毒液進行刺激。
2. 培養 40 至 48 小時後，加入 protein transport inhibitor，並於 37℃培養 4-12 小時。
3. 取出懸浮性細胞並以 PBSA 清洗一次，並懸浮於 PBSA 中且計算細胞數。
4. 取 2×10^6 細胞至 U 行盤內，分別加入 anti-CD4-FITC、anti-CD8-PE-Cy5 與 anti-CD25-PE 單株抗體，於 4℃感做 40 分鐘。

5. 以 FACS 緩衝液清洗 2 次，再加入 50% Reagent A（Leucoperm, Serotec），於室溫感做 15 分鐘。
6. 再以 FACS 清洗 2 次。
7. 加入已經由 Reagent B（Leucoperm, Serotec）稀釋之 biotin-anti-swine IFN-γ Mab，於室溫感做 55 分鐘。
8. 再以 FACS 清洗 2 次。
9. 加入 streptavidin-APC，於 4℃感作 40 分鐘。
10. 再以 FACS 清洗 3 次，加入 2% formadehyde 保存或直接使用流式細胞儀進行分析。

附錄四、DNA 晶片操作步驟

I. RT-PCR Amplification

1. Preparation of RT-PCR Master Mix

Transfer the following reagents into a RT-PCR tube and mix thoroughly. For every batch of tests, prepare additional tubes for the RT-PCR negative control.

☆ n = number of samples (including RT-PCR negative control)

A. AI-ND Master mixes 1 preparation

Reagent	Volume	tube	Total volume
Master mixes 1	44.4 μL	×(n + 1)	= _____μL
RT	0.2 μL	×(n + 1)	= _____μL
RNi	0.2 μL	×(n + 1)	= _____μL
DNA Pol.	0.2 μL	×(n + 1)	= _____μL

B. AI-ND Master Mix 2 preparation

Reagent	Volume	tube	Total volume
Master mixes 2	44.4 μL	×(n + 1)	= _____μL
RT	0.2 μL	×(n + 1)	= _____μL
RNi	0.2 μL	×(n + 1)	= _____μL
DNA Pol.	0.2 μL	×(n + 1)	= _____μL

2. Pipette 45 μL RT-PCR mixes 1 or 2 into each PCR tube individually. .
3. Transfer 5 μL extracted RNA sample into each tube, mix thoroughly; for RT-PCR negative control, use 5 μL sterile DEPC water. Final volume of each tube is 50 μL.
4. Place all PCR tubes in a thermal cycler and follow the amplification program listed below.

42 C 40 min

94 C 5 min

94 C	50 sec	┐
50 C	50 sec	├ 35 cycles
72 C	50 sec	┘
72 C	6 min	
4 C	~	

5. Proceed to hybridization reaction, Store amplicons at -20 C if NOT used immediately.

II. Hybridization

Note: Before hybridization, you should preheat the washing buffer to 50 C temperature reserve.

1. Denature the analytic PCR product for 10 minutes by PCR thermal cycler, and cool down on ice bath for about 2 mins. During the denaturing time, pipette 200 μL hybridization buffer (Stored at 2~8 C) into Chip to wait for hybridization.
2. Pipette 10 μL denaturing PCR product into chip which had been loaded with the hybridization buffer before and incubate at optimal hybridization temperature in hybridization oven with vibration for 1 hour.

Stringent Wash

1. Discard the hybridization liquid.
2. Add 200 μL Wash Buffer (50 C) into the hybridization chamber and discard the wash liquid; repeat this step twice (total number of wash cycles = 3).

Blocking

1. For each chip mixe 0.2 μL Strep-AP with 200 μL Blocking Reagent. Transfer the mixture into the chamber, allowing reaction for 30 minutes at room temperature (25~35 C).
2. Discard the reacted blocking liquid and add 200 μL Wash Buffer (room temperature) into the hybridization chamber and then discard the wash liquid.
3. Add 200 μL detection buffer to rinse for two times.
4. Discard the liquid, invert the chip and place it on paper towel to absorb residual liquid.

III. Detection & Colorimetric Development

1. Mix 4 μL NBT/BCIP with 196 μL Detection Buffer for each chip, transfer the mixture to the chip.
2. Allow reaction to occur in the dark for 10 minutes at room temperature.
3. Discard the detection liquid, stop the colorimetric development with 300 μL water twice and read the results of the developed pattern on the chip.

IV. Result Interpretation

Interpretation of is based on the pattern formed on the chip. Virus-specific oligonucleotide probes are designed and pre-spotted on the chip to capture specific targets prepared from specimen. After hybridization reaction and colorimetric development, perfectly matched probe-target hybrid, if present, forms a blue-purple precipitant on the chip as a result of enzymatic reaction.

參 考 文 獻

1. Valarcher JF, Knowles NJ, Zakharov V, Scherbakov A, Zhang Z, Shang YJ, Liu ZX, Liu XT, Sanyal A, Hemadri D, Tosh C, Rasool TJ, Pattnaik B, Schumann KR, Beckham TR, Linchongsubongkoch W, Ferris NP, Roeder PL, Paton DJ. 2009. Multiple origins of foot-and-mouth disease virus serotype Asia 1 outbreaks, 2003-2007. Emerg Infect Dis. 15(7):1046-51.
2. World Organization for Animal Health (OIE) 2007. SEAFMD 2020. ISBN 978-974-8371-63-4. P1~P63.
3. World Organization for Animal Health (OIE) 2008. Foot and mouth disease. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial animals. Chapter 2.1.5.