

出國報告
(類別：研究)

104 年度台泰農業合作「臺泰重要豬
隻病毒疾病診斷試劑及實驗室診斷
技術發展合作」與「口蹄疫國家/參考
實驗室診斷技術與經驗交流」出國報
告

服務機關及姓名職稱：

行政院農業委員會家畜衛生試驗所 黃有良 助理研究員
蔡向榮 所長
鄧明中 副研究員

派赴國家： 泰國

報告日期： 104 年 11 月 11 日

出國期間： 104 年 8 月 17 日至 8 月 21 日

摘要

藉由臺泰第四次農業合作會議，促成此次與泰國獸醫研究單位的國際交流，主要針對「臺泰重要豬隻病毒疾病診斷試劑及實驗室診斷技術發展合作」與「口蹄疫國家/參考實驗室診斷技術與經驗交流」等兩項議題進行國際交流，分別參訪了農業合作部畜產發展處、國家動物衛生研究所、獸醫生物藥品局、口蹄疫參考實驗室、動物衛生研究所獸醫生物藥品檢定組與泰國朱拉隆功大學獸醫學院新浮現與再浮現動物傳染病中心，並於國家動物衛生研究所進行本所所開發的豬瘟與豬生殖與呼吸綜合症（PRRS）診斷試劑的測試，於豬瘟單株抗體與核酸檢測均具有良好的呈現，對未來要成立參考實驗室是一大診斷利器，至於 PRRS 病毒（PRRSV）的診斷試劑，對於高病原性的 PRRSV 與美洲型 PRRSV 具有良好的敏感性與特異性，但對於歐洲型 PRRSV 的敏感性不足，需加以改良，將借重泰國的診斷技術從新建置歐洲型 PRRSV 的診斷方法，另外，於參訪過中也針對豬瘟、豬生殖與呼吸綜合症、口蹄疫等重大疾病的診斷與防疫進行經驗分享與交流，藉由此國際交流可了解泰國在於動物疾病診斷與防治之做法，對於具有良好的診斷方法與防治措施，可做為我國重要疾病診斷與防疫之借鏡。

目次

一、前言與目的-----	4
二、研習過程-----	5
三、研習心得-----	32
四、檢討與建議-----	33
五、致謝-----	34

一、前言及目的

家畜衛生試驗所為我國國家動物疾病診斷與研究單位，負責我國許多重要動物疾病的診斷、監測與防治業務，然而，近年來世界各地新浮現與再浮現跨國界動物傳染病疫情日益嚴重，許多重要動物傳染病均已跨國界漫延，一旦這種新浮現或再浮現跨國界動物傳染病傳入國內，均會引發大流行，並衝擊整個畜牧產業，因此，針對這些新浮現與再浮現跨國界動物傳染病的診斷、監控與防治變的即為重要。而在這些新浮現與再浮現跨國界動物傳染病診斷方法的建立過程中，需要許多陽性檢體進行測試，但國內又是許多新浮現與再浮現跨國界動物傳染病的非疫區並無法取得相關之檢體進行測試，需與其他國家進行國際合作方可測試其所建立的診斷方法是否適用。

泰國是東南亞重要的畜牧國，且有許多國內沒有的新浮現與再浮現跨國界動物傳染病在此流行，其國家或區域實驗室對於這些新浮現與再浮現跨國界動物傳染病擁有一套完整的診斷、監測與防治措施，尤其是在口蹄疫診斷與疫苗製造方面的技術與經驗更勝我國，在診斷方面，其擁有世界動物衛生組織（OIE）認可的口蹄疫區域參考實驗室，疫苗製造方面，則設有大型的口蹄疫疫苗工廠，每年均生產大量的 O、A 與 Asia I 等型別的不活化疫苗。

因此，此次藉由臺泰第四次農業合作會議，促成此次與泰國的國際交流，此次交流主要針對「臺泰重要豬隻病毒疾病診斷試劑及實驗室診斷技術發展合作」與「口蹄疫國家/參考實驗室診斷技術與經驗交流」等兩項議題進行國際交流，此次交流來將針對重要豬隻病毒性疾病如豬瘟、高病原性豬生殖與呼吸綜合症與口蹄疫等，於診斷技術、流行病學監測與疾病控制等相關議題進行交流，同時也將於國家動物衛生研究所內測試本所所開發之豬瘟與高病原性豬生殖與呼吸綜合症診斷方法，強化我國針對此類重要豬隻疾病之防範對策與監測平台，此外，豬瘟診斷方法之測試將可評估本所所開發之診斷方法的適用性與其優缺點，將有助於本所後續豬瘟 OIE 參考實驗室之成立，高病原性豬生殖與呼吸綜合症診斷方法之測試，則有助於本診斷方法之優化。

二、研習過程

(一) 行程

此次赴泰國進行國際交流參訪 6 個泰國動物疾病診斷與研究單位，分別為農業合作部畜產發展處（Department of Livestock Development；DLD）、國家動物衛生研究所（National Institute of Animal Health；NIAH）、獸醫生物藥品局（Bureau of Veterinary Biologics；BVB）、口蹄疫參考實驗室（OIE SEA FMD reference laboratory；RRL）、動物衛生研究所獸醫生物藥品檢定組（Veterinary Biologic Assay Division；VBAD）、泰國朱拉隆功大學獸醫學院新浮現與再浮現動物傳染病中心（Center of Emerging and Re-emerging infectious Diseases in Animals），並於 NIAH 進行豬瘟單株抗體、豬瘟診斷試劑與豬生殖與呼吸綜合症診斷套組之測試，詳細行程表與參訪討論議題如表 1。

表 1、赴泰國行程表。

日期	參訪機構
8/17	抵達泰國曼谷蘇汪納蓬國際機場
8/18 上午	農業合作部畜產發展處（DLD）
8/18 下午	口蹄疫參考實驗室（RRL）
8/19	獸醫生物藥品局（BVB）
8/20 上午	國家動物衛生研究所獸醫生物藥品檢定組（VBAD）
8/20 下午	國家動物衛生研究所（NIAH）
8/21 上午	泰國朱拉隆功大學獸醫學院新浮現與再浮現動物傳染病中心
8/21 下午	返國

(二) 單位簡介與研習內容

1. 農業合作部畜產發展處

農業合作部畜產發展處位於曼谷市區，主要負責泰國之畜牧發展、食品衛生以及動物健康等重要工作。其下轄之單位組織請參閱圖 1。目前泰國重畜養約 3.4

億隻雞，1 千萬頭豬，658 萬頭肉牛、123 萬頭乳牛以及 56 萬頭水牛。其中第二區共包含九個省，為泰國重要之畜牧地區，共飼養超過 19.1 萬頭的肉牛、42,000 頭乳牛以及 54,000 頭水牛，另外也飼養超過 180 萬頭豬、7000 萬隻雞與鴨，以及 1 萬頭的綿羊與山羊。

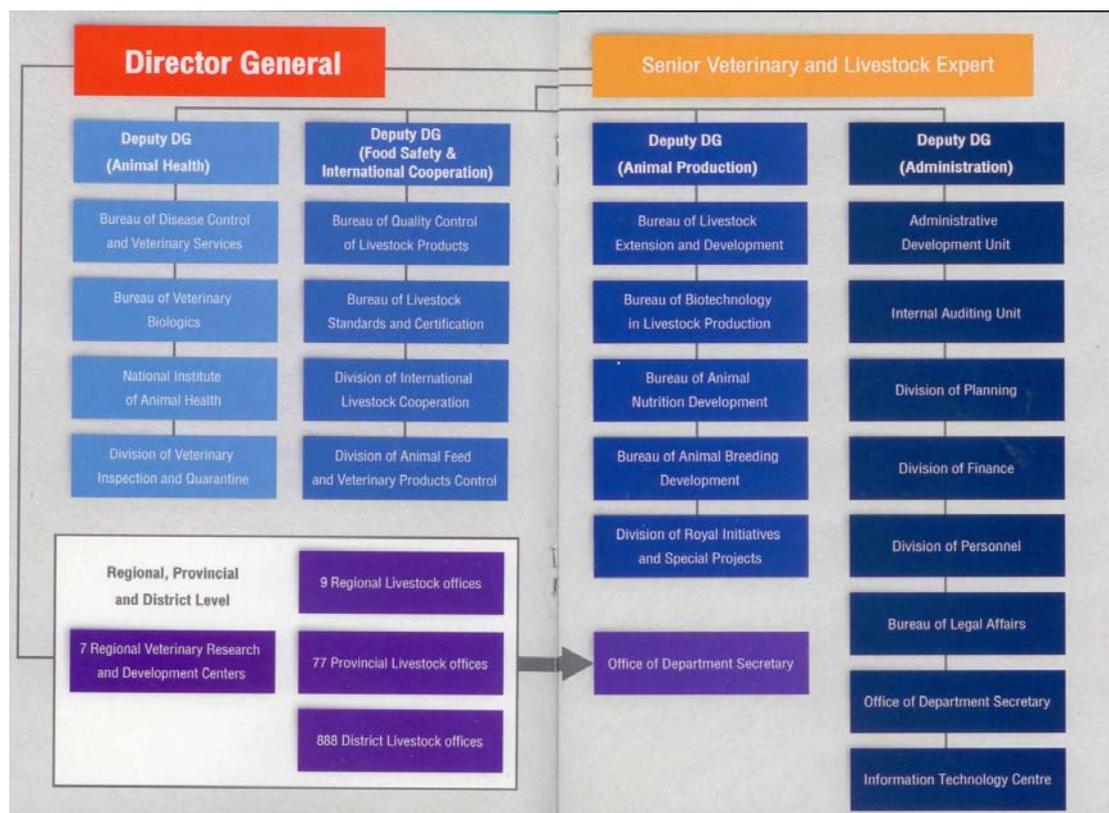


圖 1 農業合作部畜產發展處組織架構圖

議題：臺泰跨國界動物傳染病診斷技術合作望備錄

本次前往 DLD 主要是希望能與其轄下國家動物衛生研究所 (NIAH) 簽訂雙方合作備忘錄 (MOU)。備忘錄的簽訂主要希望針對台泰雙方針對重要動物疾病如豬瘟、高病原性禽流感、高病原性豬生殖與呼吸綜合症以及其他新浮現與在浮現疾病如新型豬流行性下痢等進行雙邊合作，就疾病監測技術、診斷技術以及防治技術等議題，加強資訊與實驗材資之分享與交流。本所於分子生物學診斷技術研發如：多重螢光標示即時定量 PCR 於快速區別診斷、應用層析技術開發口蹄疫非結構蛋白抗體快速診斷套組以及單源抗體開發等皆獲致非常優良之成果，泰

方亦非常有興趣針對上述技術與成果進行後續交流與合作。而我方則針對特定重要疾病病原體之實驗材資如核酸、標準血清以及相關診斷所需之試材等，希望泰方能夠進一步分讓，以利我國針對此類尚未入侵台灣的重要動物病原，能早一步取得相關試材進行診斷技術以及防治技術之開發與研究，以提供決策單位相關資訊及試驗結果，協助疾病預防與控制，降低疾病入侵所引發後續之損失與衝擊。因此，原先預設此行將與泰方洽商有關與動物衛生研究所簽訂合作備忘錄，並就簽訂內容與範圍洽談取得共識。第二天一早便前往位於曼谷的 DLD，泰方則由畜牧發展部部長 Dr. Ayuth Harintharanon 接待與洽談，我方由家畜衛生試驗所蔡所長主談。泰方人員針對我方所提需求，了解我方之目的後，由處長 Dr. Ayuth Harintharanon 指示並訊問相關人員，得出因泰方農業合作部(Ministry of Agriculture and Cooperatives) 與我方農業委員會已簽訂合作計劃，因此，在此計劃底下，本所與泰國動物衛生研究所只需簽訂理解備忘錄 (letter understanding)，內容涵蓋合作的計劃，包括：跨國界動物傳染病生醫材料與遺傳物質之交換、協助測試跨國界動物傳染病診斷試劑之效能。



圖 2、訪問泰國農業合作部畜產發展處，本所蔡向榮所長（左四）、鄧明中副研究員（左二）、黃有良助理研究員（左三）與處長 Dr. Ayuth Harintharanon（右四）、NIAH 所長 Dr. Preecha Wongwicharn（右三）、Dr. Taweewat Deemagarn（右二）、Dr. Prakrit Boonpornprasert（右一）之合照。

2. 口蹄疫參考實驗室

OIE 東南亞區域口蹄疫診斷參考實驗室 (Regional reference laboratory ; RRL) 同樣位於呵叻府 (Nakhon Ratchasima) 省的巴衝區 (Pakchong District) , 與泰國獸醫生物製劑局為鄰。這個診斷實驗室最早成立於 1958 年, 此後一直擔任泰國的國家口蹄疫診斷實驗室。實驗室負責人為 Dr. Somjai Kamolsiripichaiorn , 專長為口蹄疫之實驗室診斷技術。Dr. Kamolsiripichaiorn 與本所負責口蹄疫診斷的同仁以及防檢局人員皆熟悉且互動良好, 較為可惜的是 Dr. Kamolsiripichaiorn 將於今年九月屆齡退休, 目前繼任人選尚不確定。區域口蹄疫診斷參考實驗室則於 2007 年九月獲得 ISO / IEC 17025:2005 認證, 足以顯示該實驗室的標準與技術與世界同步。區域口蹄疫診斷參考實驗室擁有豐富的經驗, 在口蹄疫診斷方面, 它能根據「世界動物衛生組織陸生動物診斷試驗和疫苗手冊」的所刊載的內容進行標準的病毒分離和分子診斷與測試, 也能針對分離株進行基因解序與演化樹分析, 並應用口蹄疫抗原建立區別口蹄疫血清型之 ELISA。此外, RRL 更時常進行野毒株與疫苗株抗原性比較分析 (r 值)。在血清學上, 更常常使用液相阻斷型 (LPB) ELISA 和非結構蛋白 (NSP) ELISA 進行臨床樣品的檢測與分析。並經常舉辦區域國家與地區相關口蹄疫診斷人員之診斷技術培訓, 訂定質量標準和統一方法, 並實地生產口蹄疫診斷所需之標準抗原、血清以及診斷套組等。在此次的參訪的會談上 (圖 3), 泰方 Dr. Kamolsiripichaiorn 簡介 RRL 的組織架構、工作現況、病毒試驗之研究與監測成果、實驗室功能與任務、國際以及週邊國家合作以及相關認證等, 並詳細說明目前泰國口蹄疫診斷與疫情流行病學等現況。雙方並針對口蹄疫之診斷技術相關經驗進行深入討論與資訊交流。此外, 除期許未來兩國於口蹄疫診斷與試驗研究等相關議題上可再進行更深入的互助與合作外, 亦不排除 RRL 未來可作為我國口蹄疫診斷參考實驗室之外部認證單位。隨後由其實驗室同仁帶領我們實地參觀 RRL 之生物安全第三等級 (Biosafety level 3 ; BSL3) 實驗室, 並詳細解說實驗室設計之規劃、動線與軟硬體設施等。

議題：A 型 Asia 拓撲亞型 sea97 口蹄疫病毒株之診斷、培養與流行病學之交流

本次參訪過程，我方代表團成員也特別詢問有關 A 型口蹄疫亞洲拓撲型東南亞病毒株，及俗稱的 Type A SEA-97 strain 在目前泰方流行的疫情。Dr. Kamolsiripichaiorn 在簡報時表示，目前泰國 2015 年分離的口蹄疫病毒皆以 O 型血清型為主，去年 O 及 A 血清型病毒株皆有分離，但 A 血清型病毒株病例較多。由於我國不幸於今年 5 月間於金門發生 A 型口蹄疫病毒疫情，經本所診斷並定序確認同屬 A 型口蹄疫亞洲拓撲型東南亞病毒株，因此，想藉這次機會詢問東南亞地區國家口蹄疫相關疫情，泰國又是位處東南亞中心，同時亦是畜產大國及擁有口蹄疫區域診斷實驗室，對於東南亞口蹄疫疫情應有相當了解。無奈所得答案無法有效說明本次我國 A 型口蹄疫疫情以及可能之病毒來源，未來仍需對於相關疫情的資料與調查結果在進行更深入的分析與研究。

在口蹄疫的診斷經驗交流方面，Dr. Kamolsiripichaiorn 也表示，並非每一個病毒核酸 PCR 檢測為陽性之檢體均可分離出病毒，其病毒分離亦可能受到採樣過程、運送過程以及病例染病過程等多重因素影響而出現陰性的結果。以泰方口蹄疫區域參考實驗室為例，該實驗室若以 PCR 陽性為分母，病毒分離陽性率僅 6 成，無法達成 100%。因此，若病毒核酸 PCR 檢測為陽性且其他水疱性疾區別診斷為陰性，則該病例應判為陽性。因血清需於動物感染病毒一段時間後，體內免疫系統反應後血清方可陽轉，因此，血清學檢測結果僅能作為參考輔助。在口蹄疫病毒分離的議題分享上，泰方口蹄疫區域參考實驗室說明目前使用於臨床疑似病例病毒分離上乃使用羔羊腎初代細胞，Dr. Kamolsiripichaiorn 並說明該細胞敏感性較一般常用之倉鼠腎細胞株（BHK-21）來得優異許多。由於該實驗室與泰國獸醫生物製劑局品管部門共同使用該局每週會犧牲兩頭羔羊（由該局自行培育健康羊隻）所產製之腎初代細胞，因此來源不成問題。但對於我國以及本所，尚未建立健康羊隻培育系統，且外購恐有健康方面其他疑慮，因此該方式恐無法適合我方。對於追求口蹄疫病毒分離更敏感的方式或細胞株，應持續向其他實驗室尋求更好的解決方式。

議題： O 型 SEA 拓樸亞型口蹄疫病毒診斷與培養技術之交流

在 RRL 的口蹄疫標準診斷流程中，病毒分離均是使用羔羊腎初代細胞進行分離，且經數代繼代培養後再轉至 BHK-21 細胞株上，此方法可得到較高的病毒力價。

議題：如何應用 Ab-ELISA 進行不同口蹄疫型別之區別診斷

口蹄疫血清抗體區別診斷 ELISA 以及本所目前預計研發之液相阻斷型口蹄疫血清 ELISA 診斷套組的部分，亦透過本次參訪機會詢問泰方口蹄疫區域參考實驗室是否有相關的經驗以及改善的做法，Dr. Kamolsiripichaiorn 表示，若希望 ELISA 檢驗時不要出現相關交叉反應或無預期之結果，最好使用經蔗糖梯度超高速離心純化之口蹄疫不活化抗原作為檢測套組的基礎，這樣才會減少交叉反應或無預期結果的機會。

	
A. Dr. Kamolsiripichaiorn 進行 RRL 之簡介	B. 本所蔡向榮所長贈送 Dr. Kamolsiripichaiorn 禮物
	
C. 參訪 RRL 實驗室	D. 參訪 LP ELISA 實驗室

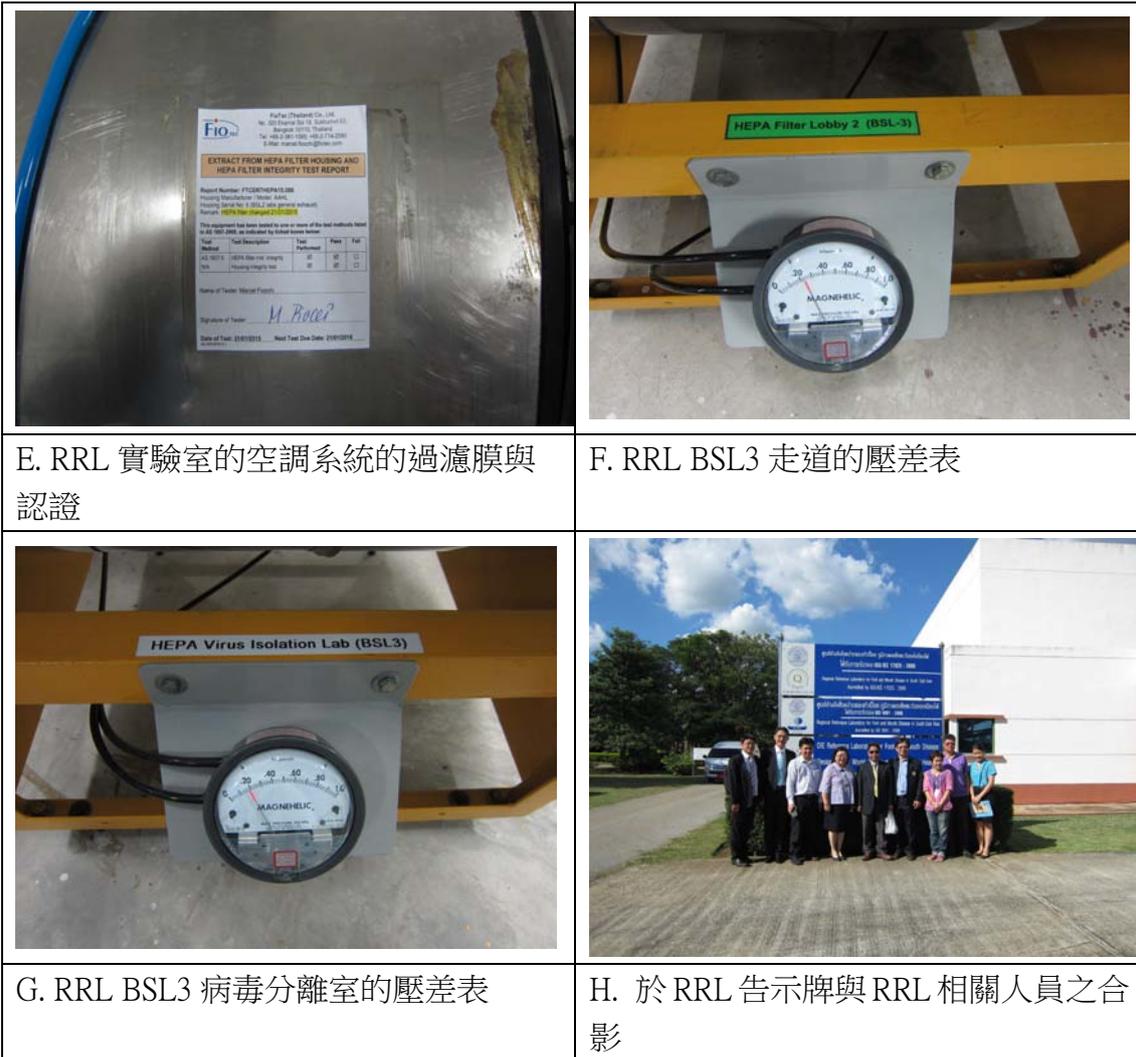


圖 3. RRL 的參訪過程。

3. 獸醫生物藥品局

泰國獸醫生物製劑局（Bureau of veterinary biologics, BVB）是隸屬於 DLD，其組織位階請參閱圖 4，主要業務為生產動物用藥品、診斷試劑等。位於泰國首府曼谷東北方呵叻府（Nakhon Ratchasima）省的巴衝區（Pakchong District）。占地面積 8,000 餘畝，目前包括研究單位約佔 573 英畝，大學約 377 畝，577 畝提供給政府機構土地開發署，剩餘大約 6,900 英畝單位的土地。研究單位包含一個口蹄疫區域參考實驗室、動物用生物技術研究以及提供研究用之試驗動物。目前獸醫生物製劑局擁有 383 名員工，轄下共分七個部門，分別為疫苗生產部門（Vaccine Production）、實驗動物部門（Experimental Animal）、行銷部門（Marketing）、

品質管制部門 (Quality Control)、品質保證部門 (Quality Assurance)、行政部門 (General Administration) 與研發部門 (Research and Development)。其中疫苗生產部門包含五個生產工廠，分別為口蹄疫疫苗廠 (豬與牛)、豬瘟與鴨瘟疫苗廠、禽類疫苗廠與細菌疫苗廠。因此，除口蹄疫外，該廠也生產多種動物用病毒及細菌性疫苗，總計共生產五種牛用疫苗、兩種豬用疫苗、六種禽用疫苗與四種抗原。實驗動物部門負責生產家禽類疫苗以及豬瘟疫苗製造所需之 SPF 雞、蛋以及兔；此外，亦生產健康羊隻供品管以及品保部門使用。此外，另設有支援與供應單位支援工廠以及整個場區之維護工作，詳細組織架構請參閱圖 5。

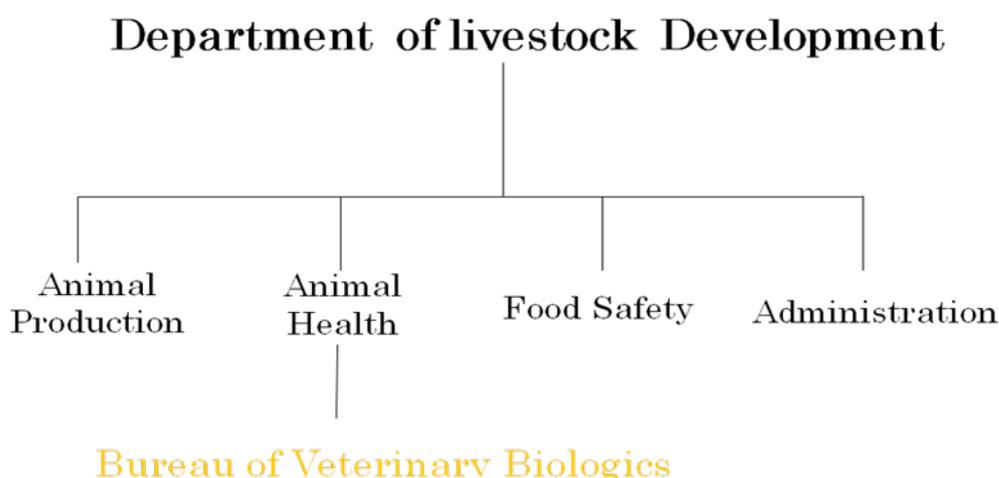


圖 4、獸醫生物製劑生產局於 DLD 內之組織位階圖

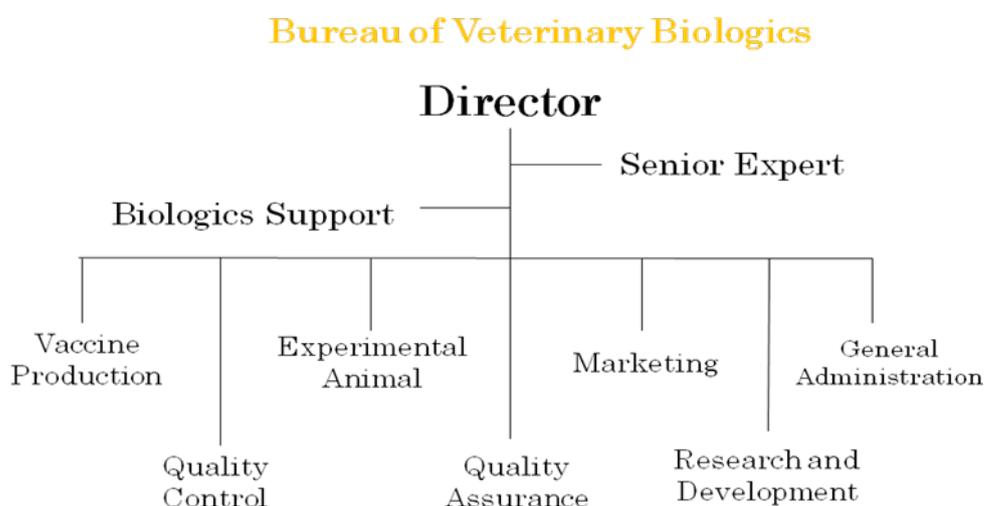


圖 5、獸醫生物製劑生產局內部組織架構圖

參訪過程：

本次參訪泰國獸醫生物製劑局，除見到該局局長 Dr. Niteth Lerdimchalalai 之外，雙方除交換禮物外，更談及多年來雙方合作的歷程與目前所獲致的成果。我國先前為推動口蹄疫疫苗國產化，曾派員赴該局豬隻口蹄疫疫苗廠進行疫苗製程了解與學習，而泰方也自 2012 年起，每年自該局派五名不同領域的專家，接受我方邀請下前來我國協助口蹄疫疫苗工廠規劃等事宜。今年，該局為開發口蹄疫快速診斷套組，特派遣兩名研究人員前來本所進行為期四週之口蹄疫病毒抗原蛋白表現以及快速診斷套組開發等相關技術之研習與訓練。由此看出，台泰雙方，特別是泰方獸醫生物製劑局與我方家畜衛生試驗所，從 2012 年起便不斷地建立雙方友好合作交流，分享技術經驗，建立良好溝通管道與平台，期待未來能共創雙贏局面。

此次參訪泰方獸醫生物製劑局，廠方人員也特別帶領我們參觀該廠特殊的設施，由於該廠占地規模廣大，各廠區間距離遠，因此，交叉污染的可能性很低。我們主要參觀的地方有：豬口蹄疫疫苗工廠（佐劑混合區與分裝區、疫苗廠外觀以及鍋爐間）、家禽疫苗工廠、生物安全第三等級動物房、污水處理區以及水處理廠等設施。由於該廠耗水量極大，因此目前該廠設有自己的淨水廠，引入旁邊的河水進行水淨化處理，以供全廠區使用。

議題：疫苗效力測試

- (1) 豬隻疫苗：使用 18 隻至少 2 月齡以上健康無口蹄疫抗體（中和抗體力價 ≤ 0.9 ）之豬隻，其中 16 隻豬免疫一劑量疫苗，免疫 4 週後將 16 隻免疫豬隻與 2 隻對照豬隻進行攻毒，攻毒劑量為 10,000 TCID₅₀ (50% Tissue culture infectious dose)，攻毒後觀察 10 天，並採集血清測定豬隻抗體力價，對照組豬隻至少一隻腳以上有水疱病徵，其中 75% 免疫豬隻必須耐過攻毒 (12/16 豬隻耐過攻毒)。

- (2) 牛隻疫苗：使用 17 隻至少 6 月齡以上健康無口蹄疫抗體（中和抗體力價 ≤ 0.9 ）之牛隻，將牛隻分成三組，每組各 5 隻，個別免疫 1:1、1:4 與 1:16 劑量。免疫 3 週後將 15 隻免疫牛隻與 2 隻對照牛隻進行舌部攻毒，攻毒劑量為 10,000 BID₅₀ (50% Bovine infectious dose)，攻毒後觀察 8 天，並採集血清測定牛隻抗體力價，對照組牛隻至少三隻腳以上有水疱病徵，試驗結果需大於或等於 3PD₅₀/dose。

議題：疫苗品質管制 (Quality Control; QC)

(1) 初代細胞之製備

口蹄疫疫苗所有試驗使用的細胞來源皆為小羊腎臟製備之細胞。製備細胞之區域與操作人員皆與口蹄疫疫苗製造區（病毒污染區）作區隔。初代細胞乃以滅菌之器械採集小羊之腎臟，經稱重、剪碎再使用培養液清洗後，加入消化液消化細胞後，分裝至細胞培養專用 175T flask，於 37°C 細胞培養箱培養 5 天。隨後繼續進行二代細胞培養。此二代細胞則用於口蹄疫病毒力價測定與試驗動物免疫疫苗後之中和抗體力價測定。

(2) 口蹄疫病毒力價測定

每批生產之口蹄疫疫苗在生產過程中一定會測定其病毒力價，而測定方式則依照 Karber method 計算病毒力價方法，將口蹄疫病毒連續稀釋後，每孔加入 100 μ l 小羊二代腎臟細胞，置於 37°C 細胞培養箱培養，感作 24 小時、48 小時與 72 小時後，判讀有細胞病變之孔數。

(3) 病毒抗原含量測定 (146S test)

此技術乃檢測病毒抗原於蔗糖梯度下，沉降係數 146S (斯維德伯格單元 Svedberg unit, S，一個單位等於 10^{-13} 秒) 的大分子含量。此分子即為整個完整口蹄疫病毒，藉由分光光度計檢測分子含量便可得知病毒含量。但由於口

蹄疫病毒在培養過程中會產生許多的蛋白分子，而這些分子也具有不同的沈降係數，也會經由分光光度計而檢測出來，因此，在完整病毒的抗原含量測定上，必須確認檢測的是 146S 的含量。

(4) 病毒不活化測試

應用細胞培養技術，將已由 BEI 不活化劑處理之口蹄疫病毒抗原，加入培養液 10 倍稀釋進行不活化檢測，以確認該步驟中是否含有未殺死之口蹄疫病毒 (即不活化不完全)。該測試重複進行三次以確保無虞。

(5) 無菌測試

本技術主要應用細菌微生物培養之方法，將各疫苗製程階段採樣之檢體，包含培養液、細胞、病毒、不活化口蹄疫抗原 (抗原 1 ml + 100 ml VanBekum 培養液)、混合口蹄疫抗原 (與佐劑混合前)、量產口蹄疫疫苗 (裝瓶前)，進行細菌與黴菌培養，接種 *E.coil* 作為陽性對照，滅菌水作為陰性對照，以檢測生產之口蹄疫疫苗成品是否含有不得出現之細菌或黴菌。一旦疫苗成品中含有不應出現的細菌或黴菌，在培養過程中一定會顯現出來，藉由如此方式檢查疫苗成品中是否為無菌。

(6) 疫苗安全試驗

將 2 隻健康無口蹄疫抗體動物免疫二劑量疫苗 (豬隻至少 2 月齡以上，疫苗為肌肉注射；牛隻至少 6 月齡以上，疫苗為皮下注射)後觀察 14 天，並記錄體溫與臨床症狀，試驗動物必須完全無中毒反應與發病且不得於注射之宿主動物產生不適當之反應與副作用。



A. 本所蔡向榮所長贈送 BVB 局長 Dr. Niteth Lerdlimchalalai 禮物



B. 與 BVB 相關人員之合影



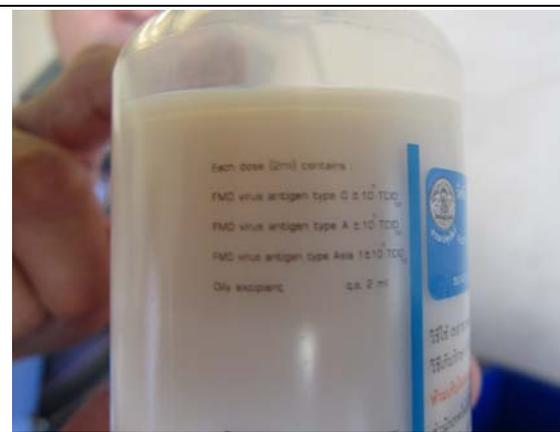
C. 參觀口蹄疫疫苗工廠



D. 口蹄疫抗原儲存區



E. 口蹄疫疫苗保存試驗



F. 3 價隻口蹄疫疫苗、有部分分層之情況



圖 6、BVB 參訪過程。

4. 獸醫生物藥品檢定組

獸醫生物藥品檢定組 (VBAD) 隸屬於 NIAH，為動物藥品專責檢驗機構，其主要負責之工作項目包括：獸醫生物藥品的品管、病毒、細菌、黴漿菌與試驗用細胞之收集與保存、動物用藥品檢驗方法的建立與研究、提供技術服務與訓練等，此機構依工作性質區分為 7 個小組，分別為行政組、實驗室管理組、生物管理組、病毒組、分子檢測組、細菌組與實驗動物組，在人力編制方面設有所長 1 名、獸醫師 5 名、科學人員 8 名、技術人員 25 名、行政人員 19 名、承攬人員 14 名。

參訪過程：

此次參訪 VBAD 主要了解泰國動物疫苗的檢定過程與程序，再進入實驗室前所參訪人員均須穿著實驗衣與戴髮帽與鞋套，之後再進入吹塵室清除身上灰塵後再進入實驗室，每一個實驗進均設有門卡管制與標示實驗用圖，大致區分為洗滌室、藥品室、細菌室、細胞室、培養室、分子診斷室等多個區域，且實驗室走道以 Air lock 隔開，以避免病原交叉汙染，而細菌與病毒室雖然只一間實驗室，但為了避免交出汙染，每次僅能使用一種病毒或細菌，其餘則需隔日方可使用，而在分子診斷實驗室，除了配置傳統的 PCR 與 QPCR 機器外，也配置定序儀，所送檢的活毒或死毒疫苗均需經過分子鑑定，確定其病毒株或細菌沒有變異，但其分子診斷實驗室內只有將核酸萃取、PCR 反應液配製、PCR、DNA 電泳、定序等區域分散在不同的角落，並沒有個分散在不同的密閉空間，此現象容易增加 PCR 反應交叉汙染的機率。另外也參觀了家禽疫苗檢定之動物舍，其區分為 P2 與 P3 兩種動物房，P2 動物房只做疫苗免疫使用，P3 動物房則做攻毒使用，較本所不同的是，家禽動物試驗結束後均以高壓滅菌此理動物屍體，而本所則以焚化進行處理。



A. 與 VBAD 相關人員之合影



B. 參訪 VBAD



C. VBAD 人員解說如何做汙染管控

D. 禽類疫苗檢定動物舍流程圖

圖 7、VBAD 之參訪過程。

5. 國家動物衛生研究所

國家動物衛生研究所 (NIAH) 隸屬於泰國農業合作部畜產發展處 (DLD)，負責泰國所有動物之健康與衛生，為全國動物健康之實驗核心，其由總所與 3 個區域單位（口蹄疫參考實驗室、獸醫生物藥品檢定組與區域獸醫研究發展中心）所組成組成（圖 8），該所之功能如下：

- (1) 主導畜禽重要疾病的研究。
- (2) 提供動物疾病病原檢測之服務與後續疾病治療與預防控制之方法
- (3) 診斷試劑的研發與標準化
- (4) 疾病確診的參考實驗室
- (5) 主導外來重要動物疾病的研究與監測
- (6) 辦理訓練活動、技術轉移、研究及國際技術合作
- (7) 做為區域獸醫研究發展中心 (RVRDC) 之後勤與協調各 RVRDC 之工作
- (8) 協調政府與國內外私人機構為研究及疾病控制計畫，開發動物衛生資訊系統。

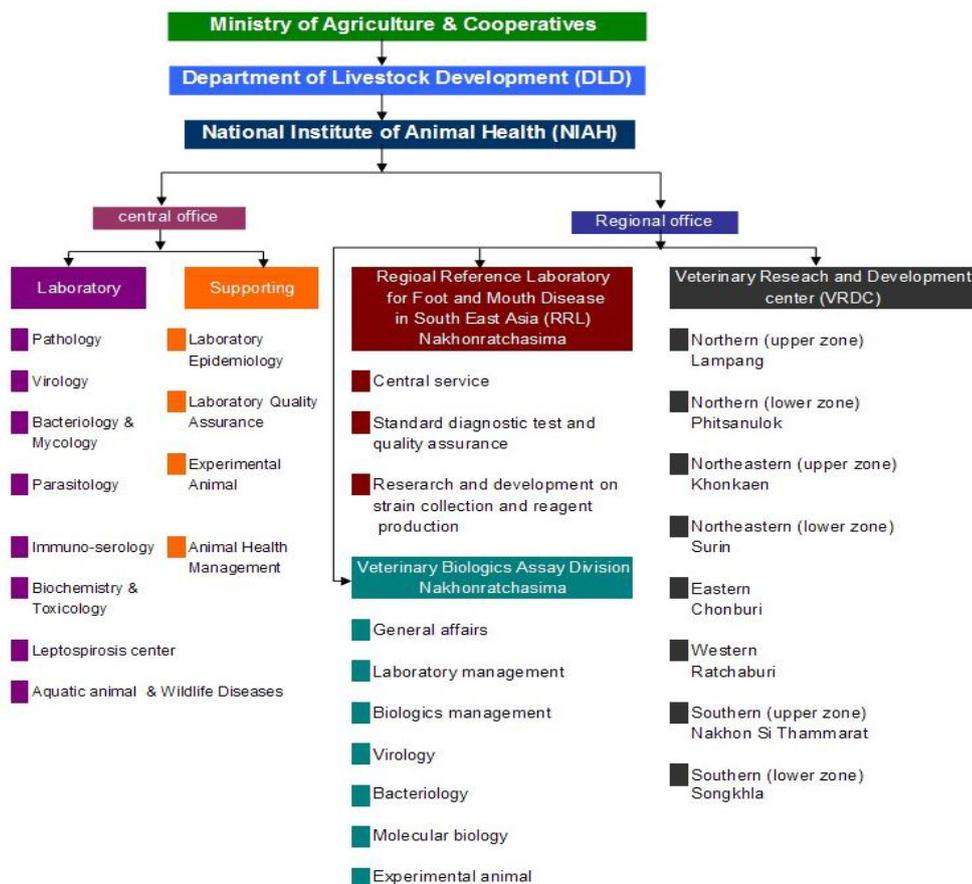


圖 8、國家動物衛生研究所 (NIAH) 組織圖。

總所位於泰國首都曼谷，且內部區分為實驗室及後勤支援等二部份，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、鉤端螺旋體中心與水生動物與野生動物疾病等 8 個實驗部門，後勤支援部份則包括流行病學實驗室、實驗品質管理、動物衛生管理及實驗動物等 4 個部門，且該總所之實驗室與管理也經過多個機構之評鑑與認證，包括於 2005 年通過 ISO 17025 認證，於 2008 年通過 ISO 9001 認證，於 2011 年通過 Thailand Public Service Awards 認證，2012 年通過 Department of Livestock Development Quality Awards 認證，而個實驗部門之共座項目如下：

病理學部門：

- (1) 動物疾病致病機轉之研究與提升病理學診斷之國際標準
- (2) 動物疾病診斷與病理參考實驗室
- (3) 病理生物學診斷之研究

病毒學部門：

- (1) 病毒性動物疾病之診斷與研究與建立國際診斷標準
- (2) 病毒參考實驗室
- (3) 研究病毒性動物疾病之生物學、疫苗與診斷試劑
- (4) 病毒性動物疾病之監控

細菌與黴菌部門：

- (1) 細菌與黴菌性動物疾病之診斷與研究與建立國際診斷標準
- (2) 細菌與黴菌參考實驗室
- (3) 研究細菌與黴菌性動物疾病之生物學、疫苗與診斷試劑
- (4) 細菌與黴菌性動物疾病之監控
- (5) 細菌與黴菌之保種與利用

寄生蟲部門：

- (1) 寄生蟲性動物疾病之診斷與研究與建立國際診斷標準
- (2) 寄生蟲參考實驗室
- (3) 驅蟲藥效力之研究
- (4) 研究寄生蟲性動物疾病之生物學、疫苗與診斷試劑
- (5) 寄生蟲性動物疾病之監控

免疫與血清學部門：

- (1) 動物疾病在免疫與血清學診斷之研究與建立免疫與血清學國際診斷標準
- (2) 免疫與血清學參考實驗室
- (3) 免疫與血清學診斷試劑之開發
- (4) 動物疾病之血清學監控

生化毒理學部門

- (1) 中毒、生物化學藥品與營養失調所造成疾病之診斷與研究
- (2) 動物飼料安全與品管之研究
- (3) 研究毒性物質對動物健康之影響

- (4) 毒化物參考實驗室
- (5) 毒化物診斷試劑之開發

鈎端螺旋體中心

- (1) 鈎端螺旋體之診斷與研究與建立國際診斷標準
- (2) 鈎端螺旋體參考實驗室
- (3) 研究鈎端螺旋體之生物學與診斷試劑
- (4) 針對鈎端螺旋體所引發之疾病進行國際合作與交流

水生動物與野生動物疾病部門

- (1) 水生動物與野生動物疾病之診斷與研究
- (2) 建立國際診斷標準
- (3) 水生動物與野生動物疾病參考實驗室

口蹄疫參考實驗室與獸醫生物藥品檢定組之簡介則描述於上述文章中，至於位於區域獸醫研究發展中心（RVRDC）則依據地理位置區分為 9 大區域（圖 9），其中 NIAH 總所位於第 1 區域，也負責該區域之監測，其他 8 個區域則每一區域均設有一個 RVRDC，分別為為北部上半區域（RVRDC 位於 Lampang 省）、北部下半區域（RVRDC 位於 Pitsanulok 省）、東北部上半區域（RVRDC 位於 Khonkaen 省）、東部下半區域（RVRDC 位於 Surin 省）、西部區域（RVRDC 位於 Ratchaburi 省）、東部區域（RVRDC 位於 Chonburi 省）、南部上半區域（RVRDC 位於 Nakhonsrithammarat 省）與南部下半區域（RVRDC 位於 Songkhla 省）。

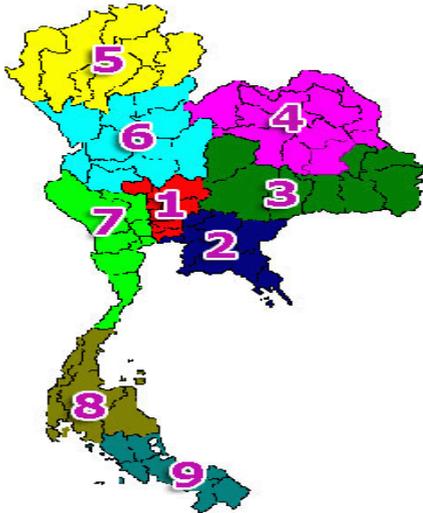


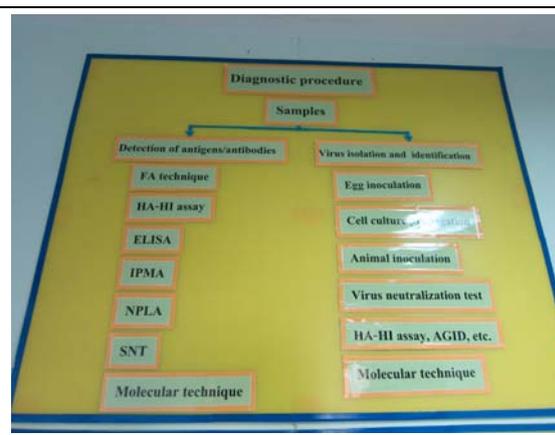
圖 9、泰國 9 大區域獸醫研究發展中心所負責之區域。

參訪過程：

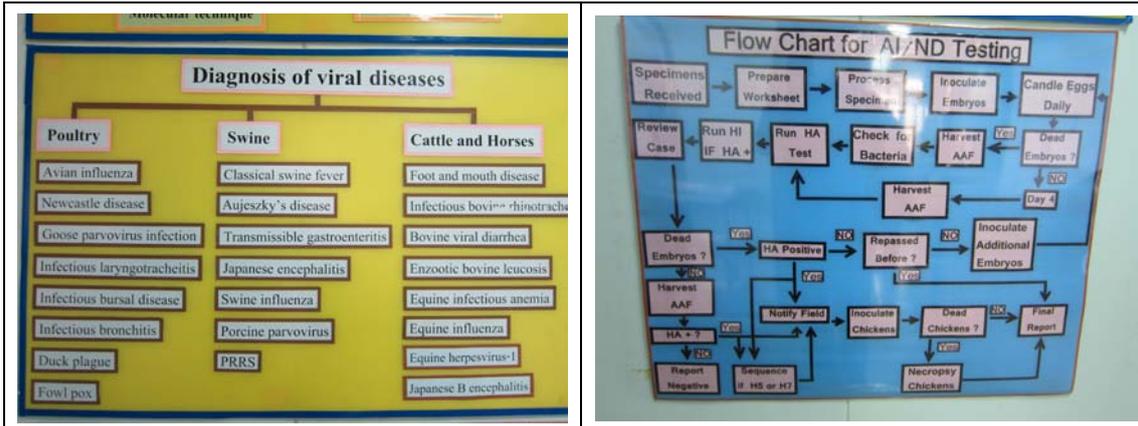
此次主要於 NIAH 總所的生物部門進行本所所開發的豬瘟單株抗體、豬瘟診斷試劑與豬生殖與呼吸綜合症診斷套組之測試，且於試驗空檔簡單參訪其實驗室，由於整個試驗室正在整建新的 P3 實驗室來供高病原性禽流感診斷與監測使用，因此實驗室動線有點混亂，但人有值得學習的地方，其分子診斷、病毒培養、血清學診斷是區分在不同的實驗室，且分子診斷的核酸萃取、PCR 反應液配製、PCR、DNA 電泳、定序等區域分散在不同的小型實驗室內，此可避免核酸的交叉汙染，且對於疾病診斷有一個完整的流程圖，與需做的檢測項目，對於外來人員與新進員工可快速了解整個診斷流程。



A. 於泰國 NIAH 進行診斷試劑之測試



B. 泰國 NIAH 負責診斷之項目



C. 病毒性疾病診斷項目

D. AI 與 ND 診斷流程圖。

圖 10、於 NIAH 測試診斷試劑與 NIAH 負責診斷之業務與流程圖。

議題：豬瘟單株抗體、豬瘟診斷試劑與豬生殖與呼吸綜合症診斷套組之測試

(1) 豬瘟單株抗體測試：此次測試 2 個本所所開發之豬瘟 (CSFV) 單株抗體 (編號 3 與 4)，其實驗流程如下：

- 先將泰方所製備之抗原盤已 10% 福馬林進行固定 10 分鐘。
- 將單株抗體先以 PBS 進行 10 後稀釋後再進行連續 2 倍稀釋。
- 將固定好之抗原盤以 PBS 清洗 3 次。
- 加入稀釋好之單株抗體加入抗原盤內並於 37°C 感做 1 小時。
- 以 PBS 清洗 3 次。
- 加入標示 FITC 山羊抗豬 IgG 之抗體，並於 37°C 感做 1 小時。
- 最後以螢光顯微鏡進行判讀。
- 結果：3 與 4 號 Mab 對 ALD strain 均有反應，其可分別稀釋至 40 與 20 倍

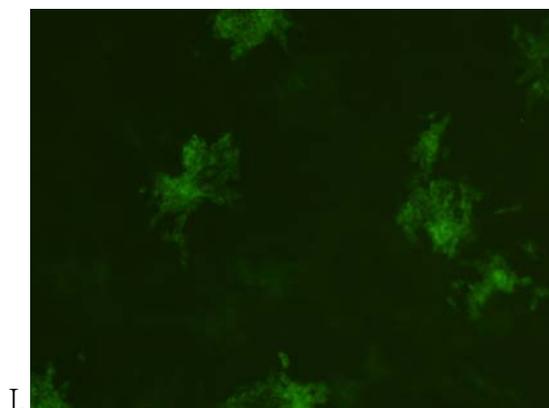


圖 11、豬瘟單株抗體測試結果，呈現陽性之綠色螢光。

(2) 豬瘟診斷方法之測試

此次將測試之前發表於 Journal of Virological Methods 期刊所建立的 CSFV MRRT-PCR 診斷方法，共測試 5 個豬瘟樣品、9 個 PRRSV 樣品與 1 個陰性檢體，其配方與反應條件如下：

表 2、CSFV MRRT-PCR 配方

項目	體積
Primer: CP5/CP6	3.8ul
TaqMan probe (5uM): G1/G2/G3	1+1+1ul
Kappa master mix (2x)	25ul
SSTII+Plat Taq	0.2
DEPC water	13 ul
RNA	5ul
Total	50ul

表 3、CSFV MRRT-PCR 反應條件

溫度	循環次數
42°C 60 min	1 cycle
94°C 5 min	
94°C 20 s	45 cycle
60°C 20 s	
72°C 30 s	
40°C 30s	1 cycle

結果：

5 個豬瘟樣品均為陽性且為第 1 基因型，9 個 PRRSV 樣品與陰性樣品均為陰性。

表 4、豬瘟診斷方法之測試結果

NUMBER	SAMPLE	G1	G2	G3
1	HP-PRRSV-1	-	-	-
2	HP-PRRSV-2	-	-	-
3	EU strain	-	-	-
4	NA strain	-	-	-
5	EU strain	-	-	-
6	Non	-	-	-
7	NA strain	-	-	-
8	EU strain	-	-	-
9	EU strain	-	-	-
10	106280/58 (EU strain)	-	-	-
11	CSFV Thailand strain-78	+	-	-
12	CSFV Thailand strain-79	+	-	-
13	CSFV Thailand strain-80	+	-	-
14	CSFV -ALD	+	-	-
15	CSFV-ALD	+	-	-

(3) 豬生殖與呼吸綜合症診斷方法之測試

將本所建立的豬生殖與呼吸綜合症診斷方法進行測試，此診斷方共有 3 對引子，分別針對 ORF7、ORF5 與 NSP2 基因，且所有診斷方法均測試 5 個豬瘟樣品、9 個 PRRSV 樣品與 1 個陰性樣品，其配方與反應條件如下：

表 5、PRRSV RT-PCR 反應配方

TakaRa one step(RR055A)	
component	Volume in 25.0 μ l
DEPC water	6.5
2x buffer	12.5
Enzyme	1
primers F	1
primers R	1
Template	3
total	25

表 6、PRRSV RT-PCR 反應條件

溫度	循環次數
42°C 60 min	1 cycle
94°C 5 min	
94°C 45 s	3 cycle
50°C 45 s	
72°C 60 s	
72°C 10 min	1 cycle
4°C 30s	1 cycle

結果：

ORF7 引子於 9 個 PRRSV 將品中可測得 6 個陽性，包括 2 個高病原性 PRRSV、2 個美洲型 PRRSV 與 2 個歐洲型 PRRSV，另外，有 3 個歐洲型 PRRSV 呈現陰性反應，至於 5 個豬瘟樣品與 1 個陰性樣品均為陰性反應，此結果顯示 ORF7 的特異性高，並不會與其他病毒交叉反應，且對 HP-PRRSV 與美洲型具有良好的敏感性，但對歐洲型 PRRSV 的敏感性不佳需再調整。ORF5 引子於 9 個

PRRSV 將品中可測得 4 個陽性，包括 2 個高病原性 PRRSV 與 2 個美洲型 PRRSV，所有歐洲型 PRRSV 呈現陰性反應，至於 5 個豬瘟樣品與 1 個陰性樣品同樣均為陰性反應，此結果顯示 ORF5 的特異性高，並不會與其他病毒交叉反應，且對 HP-PRRSV 與美洲型具有良好的敏感性，但對歐洲型 PRRSV 不反應。NSP2 引子於所有檢體中均呈現許多非特異性反應，顯示此引子並不適用於 PRRSV 診斷。

表 7、PRRSV RT-PCR 檢測結果

NUMBER	SAMPLE	ORF7	ORF5	NSP2
1	HP-PRRSV-1	+	+	多條 BAND
2	HP-PRRSV-2	+	+	多條 BAND
3	EU strain	-	-	多條 BAND
4	NA strain	+	+	多條 BAND
5	EU strain	-	-	多條 BAND
6	Non	-	-	多條 BAND
7	NA strain	+	+	多條 BAND
8	EU strain	-	-	多條 BAND
9	EU strain	+	-	多條 BAND
10	106280/58 (EU strain)	+	-	多條 BAND
11	CSFV Thailand strain-78	-	-	多條 BAND
12	CSFV Thailand strain-79	-	-	多條 BAND
13	CSFV Thailand strain-80	-	-	多條 BAND
14	CSFV -ALD	-	-	多條 BAND
15	CSFV-ALD	-	-	多條 BAND

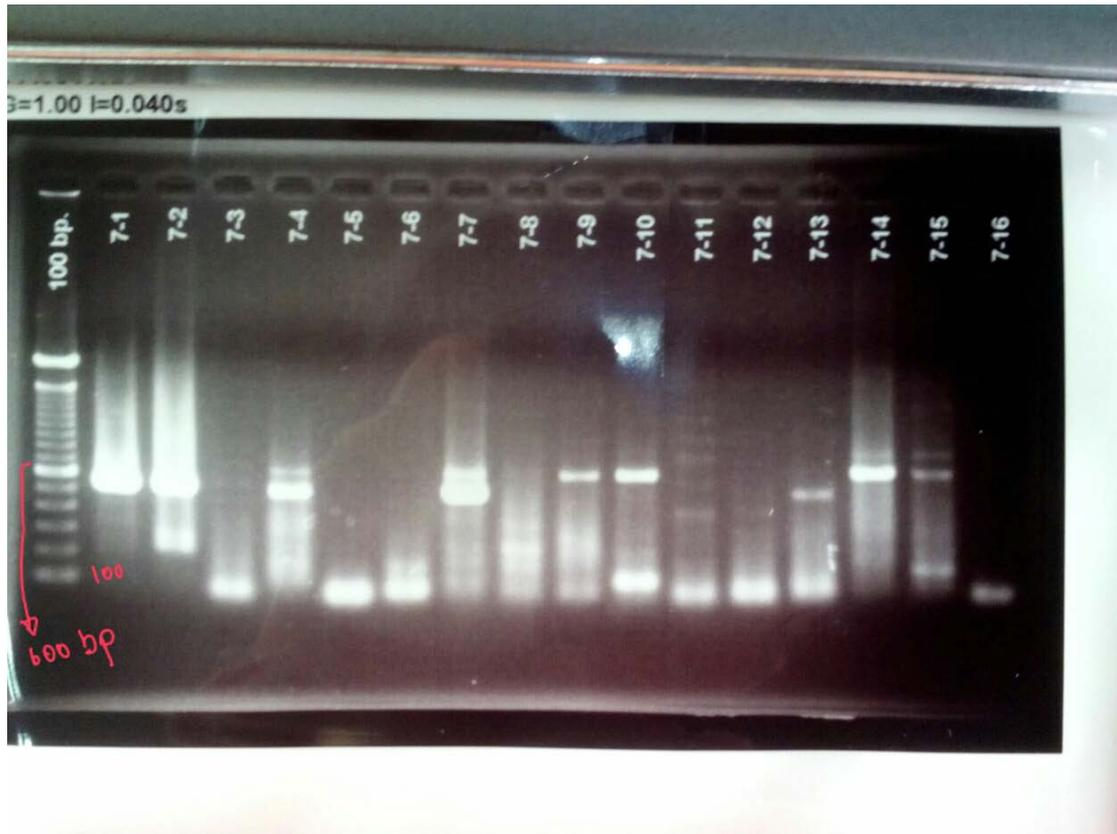


圖 12、PRRSV ORF7 引子測試之電泳結果。

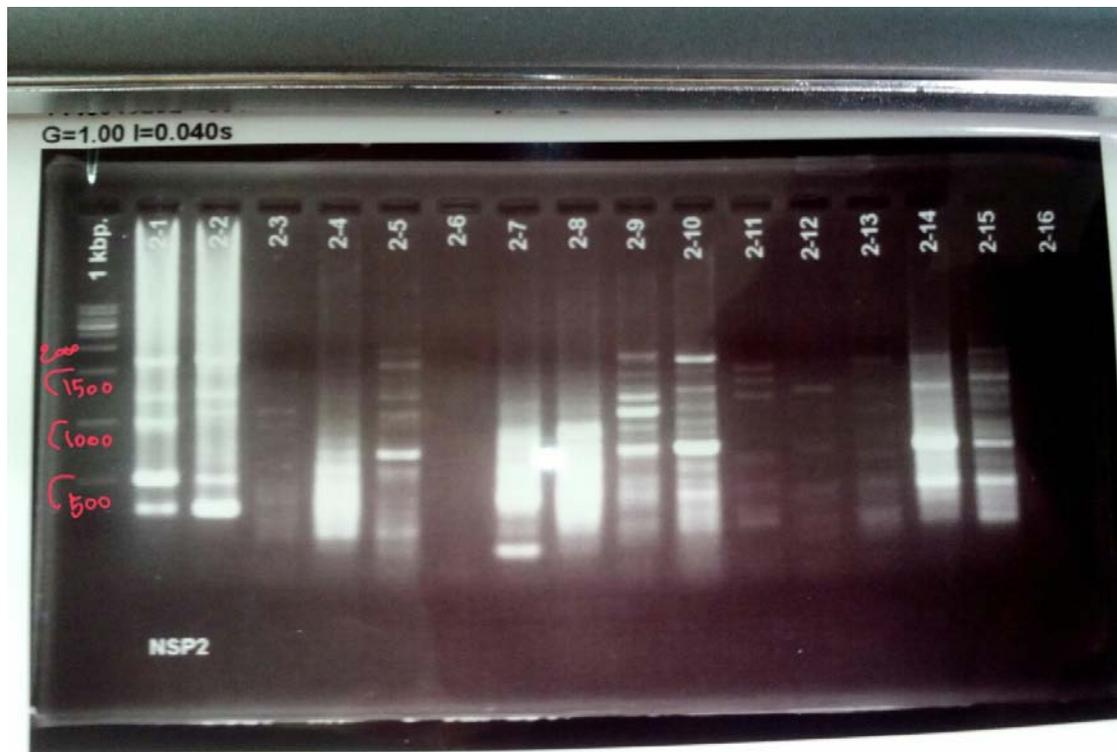


圖 13、PRRSV NSP2 引子測試之電泳結果。



圖 14、PRRSV ORF5 引子測試之電泳結果。

6. 泰國朱拉隆功大學獸醫學院新浮現與再浮現動物傳染病中心

泰國獸醫學相關知識與學校的建立，在 1904 年由 Chao Phraya Weswongwivat 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。此次參訪獸醫學院微生物學系新浮現與再浮現動物傳染病中心（Center of Emerging and Re-emerging infectious Diseases in Animals），並與 Sanipa Suradhat 教授針對豬瘟與豬生殖與呼吸綜合症疫情與防治措施進行經驗分享與討論。

參訪過程

此新浮現與再浮現動物傳染病中心由泰國糧農組織（FAO）出資新建，為全新的 P3 實驗室，主要負責禽流感之監測與診斷，且設有門禁管制，更衣室與實驗室，而就有的 P2 禽流感診斷實驗時則改建為動物舍專供低病原性禽流感動物試驗使用，內部設有多個動物飼養隔離箱，可進行雞隻、小白鼠、天竺鼠等小型動物的攻毒試驗，且當動物需解剖與採樣時，會將動物移至新的隔離操作臺，再進行剖檢採樣，且將剖檢樣之檢體直接送進 P3 實驗室進行後續檢測與分析。

議題：豬瘟與豬生殖與呼吸綜合症疫情與防治措施經驗分享

Sanipa Suradhat 教授已從事豬瘟病毒與豬生殖與呼吸綜合症相關研究多年，並在病毒學、疫苗學與免疫學上有多年的研究經驗，且發表多篇相關論文，此次除了參訪其新成立的新浮現與再浮現動物傳染病中心外，並與 Sanipa Suradhat 教授豬瘟與豬生殖與呼吸綜合症疫情與防治措施進行經驗分享，泰國目前同樣使用疫苗再進習豬瘟之控制，其疫苗有兩種活毒疫苗（C-strain 與 GPE-）與一種豬瘟次單位疫苗，其中次單位疫苗主要用於補強注射，而一般田間的免疫計畫則於 4 與 6 週齡各免疫一次豬瘟疫苗，雖然現場持續有再進行豬瘟疫苗之免疫，但每年仍有部分零星病例之發生，且其病毒株屬於第 2 基因型為主，屬於中間毒，而會造成此零星發生之原因，根據 Sanipa Suradhat 教授推斷可能與許多疫苗免疫干擾因子存在有關，其中以移行抗體的干擾與複合性疾病所造成的影響最大，因為，泰國並沒有完整的疫苗免疫成效與豬瘟抗體監測系統，所以許多豬場的農民並無法了解場內豬瘟疫苗的免疫成效，另外，泰國也有許多其他會干擾豬

瘟疫苗免疫效力之疾病，包括：假性狂犬病、豬生殖與呼吸綜合症（PPRS）、豬第二型環狀病毒等疾病之存在，其中泰國的 PRRSV 有 3 大基因型，包括：高病原性 PRRSV、美洲型 PRRSV 與歐洲型 PRRSV 等，且此 3 種型別 PRRSV 的交叉保護性並不強，市售疫苗的保護效力也不是很高的情況下，造成許多豬場均有 PRRSV 感染的問題存在，且部分豬場甚至有 2 種或 3 種 PRRSV 混合感染的問題存在，因此，Sanipa Suradhat 教授才會推斷此豬瘟零星病例的發生可能與移行抗體的干擾或複合性疾病造成疫苗免疫失效，而導致豬瘟的發生，另外，有關高病原性 PRRSV 的問題，目前 Sanipa Suradhat 教授的實驗是已成功建立相關的攻毒模式並進行其致病之研究，其所造之病變與中國高熱病的病變相似，但對高病原性 PRRSV 的防治措是，目前泰國也尚在研究中。



圖 15、參訪獸醫學院微生物學系新浮現與再浮現動物傳染病中心。

三、研習心得

1. 泰國因地大且畜牧為其重要產業，其動物疾病診斷防疫統一由 NIAH 負責，其依據地理位置劃分為 9 區，各區均有一個區域診斷實驗室負責區域所有的動物疾病診斷的初篩與監測，而 NIAH 的總所則負其中一區的診斷業務並做為各區域實驗室後勤部隊與最後確診單位，此方式有利於加速動物疾病之診斷速度。

2. 泰國所有的口蹄疫診斷、監測與研究均是由 RRL 負責，且直接隸屬於 NIAH 下，這樣編製方式與專責的方式，可以做為未來本所成立 CSFV 參考實驗室的借鏡，並思考本所 CSFV 參考實驗室未來在豬瘟診斷與防疫所扮演的腳色為何，是單純的診斷實驗室還是要統整整個豬瘟的診斷、防疫與研究。
3. 本次亦同時參訪泰國獸醫生物製劑局(BVB)，該局負責泰國動物用疫苗之生產與製造。其角色與本所生物製劑組非常相似，但規模更大，生產之疫苗也更全面。此乃因泰國未如同我國具有多家民間動物用藥品生產廠商，且泰國畜牧業規模產值雖大，但許多藥品仍仰賴政府補助與支持。此次參訪也同時了解 BVB 於口蹄疫疫苗以及家禽疫苗之生產方式，對於未來雙邊合作建立良好的管道。我國於動物用疫苗研發能力強，泰國疫苗市場廣大，若未來合作將具有非常廣大的遠景。
4. 此次診斷試劑的測試，於豬瘟單株抗體與核酸檢測均具有良好的呈現，對未來要成立參考實驗室是一大診斷利器，至於 PRRSV 的診斷試劑，對於高病原性的 PRRSV 與美洲型 PRRSV 具有良好的敏感性與特異性，但對於歐洲型 PRRSV 的敏感性不足，這與國內並無歐洲行野外 PRRSV 有關，無法開發出良好的診斷試劑，將借重泰國的診斷技術從新建置歐洲型 PRRSV 的診斷方法。
5. 泰國幅員廣大，農畜牧業為其主要生產業。以本次參訪所得，該國於動物試驗與管理分工較為細緻，其畜牧發展部下轄國家動物衛生研究所以及獸醫生物製劑局，而該所再下轄藥品檢定組以及口蹄疫區域診斷參考實驗室。而各區則設有區診斷實驗室以及疾病控制中心，各單位緊密聯繫與合作。而本此前往泰國畜牧發展部接洽，蒙獲該部部長首肯於台泰合作計畫案之下，可與各下轄單位就欲合作之議題簽定理解備忘錄。對於未來我國獸醫生技產業與泰國合作將有非常大之便利性與發展性。
6. 此次參訪的這些實驗室，均有嚴密的人員與物品進出管控，且每個實驗室均有標示其用途，這樣的措施將有助於降低實驗室間的交叉汙染，提升整體的診斷精準度。

四、檢討與建議

1. 國際合作已是重要跨國境動傳染病防治重要的一環，其有助於國內診斷單位對於跨國境動傳染病診斷與防治技術之提升，應持續強化且對於雙方有興趣之議題應進一步深入合作。
2. 參考實驗室的成立，事前的規劃與定位非常重要，此次參訪口蹄疫 RRL 了解到，參考實驗室的成立並非單獨僅僅是實驗室申請成立的案件。它必須是全面性的考量實驗室在國際區域及防疫合作上之定位、重要動物疾病的研究議題與方向，以及該疾病與欲成立實驗室對於國際合作與防疫之貢獻。此外，申請參考實驗室是一條漫漫的不歸路，一旦申辦成立後不可受其他因素而貿然廢止。因此，再申辦成立之前，政府必須有全盤性及長遠性的規劃，就維持實驗室所需之必要通關文件、維持經費以及人力需求等進行全面性考量。

五、致謝

感謝農委會在經費上之協助，讓此計畫得以順利執行，特別感謝農委會國際處項品元研究員之協助與泰國 NIAH 的 Dr. Prakrit Boonpornprasert、Dr. Taweewat Deemagarn、Mrs. Sriwana NaNa Sanyakamdhorn 在參訪與研究期間的陪同與協助。