

出國報告
(類別：考察)

104 年度考察「中國大陸狂犬病口服疫苗防疫應用」計畫
出國摘要報告

Investigation on The Situation of Rabies Control
and The Development of Oral Vaccine in
Mainland China in 2015

服務機關及姓名職稱：

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

蔡政達科長

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

曾俊憲博士

行政院農業委員會家畜衛生試驗所-

動物用藥品檢定分所

李淑慧分所長

高雄市動物保護處

葉坤松副處長

出國國家：中國大陸-吉林長春

報告日期：105 年 1 月 15 日

出國期間：104 年 10 月 11 日至 10 月 15 日

104 年度考察「中國大陸狂犬病口服疫苗防疫應用」計畫

出國摘要報告

摘要

自 102 年 7 月起國內發生野生鼬獾狂犬病案例，我國因而成為狂犬病疫區國家，由於臺灣過去 50 幾年未曾發生過狂犬病，在防疫監測上及疫情之應變處理上，實有必要與其他國家進行經驗交流，以利未來在狂犬病的防疫及疾病的清除上，提供重要參據。

本局依據 104 年度考察「中國大陸狂犬病口服疫苗防疫應用」計畫於 104 年 10 月 11 日至 10 月 15 日赴中國大陸吉林省中國農業科學院長春獸醫研究所進行技術考察，參與技術研習人員包括行政院農業委員會衛生試驗所曾俊憲博士、行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所李淑慧分所長、高雄市動物保護處葉坤松副處長及本局蔡政達科長，在長春獸醫研究所扈榮良博士大力協助下，就我國所提「狂犬病病毒基因演化分析」、「野生動物口服疫苗相關實務研習」及「狂犬病防疫相關技術」三項主要研習議題，安排陸方相關專家分享大陸方面在之研究及執行經驗，包括：「中國狂犬病病毒族群進化及流行分布特徵」、「狂犬病毒的基因分型及中國野生動物狂犬病」、「反向遺傳重組狂犬病載體疫苗研究及展望」、「大陸狂犬病流行及防控概況」、「中國狂犬病的流行與監測」及「狂犬病口服疫苗及口服免疫研究」等議題，對大陸狂犬病之疫情發生與分佈情形、病毒族群基因演化與分群及疫苗之發展均有詳細介紹。其中，尤其在野生動物方面的研究分析方面，顯示海峽兩岸狂犬病病毒演化關係，對於國內鼬獾野生動物狂犬病研究方面提供重要的訊息，另參訪長春獸醫研究所扈榮良博士狂犬病研究室、大陸 OIE 狂犬病參考實驗室，以及大陸正業生物工程有​​限公司位於吉林省的動物疫苗製造廠，在狂犬病抗體監測技術運用方面、國際狂犬病參考實驗室運作，以及大陸在狂犬病活毒疫苗生產概況均有深刻瞭解。

本次考察行程藉由參訪中國大陸農業科院長春獸醫研究所與大陸狂犬病相關防疫技術專家就臺灣狂犬病防疫經驗與大陸在鼬獾狂犬病診斷技術、基因演化、口服疫苗研發及實務應用經驗上進行研究交流及學習，已獲初步進展，未來更期能強化雙方的研究交流，以建立野生鼬獾狂犬病區域聯防機制。

目次

摘要.....	1
壹、緣起及目的.....	3
參、研習內容.....	7
一、大陸狂犬病病毒族群進化及流行分布特徵.....	7
二、狂犬病毒的基因分型與大陸野生動物狂犬病.....	13
三、臺灣狂犬病調查分析及防治策略.....	22
四、大陸狂犬病的流行與監測.....	23
五、大陸狂犬病流行及防控概況.....	27
六、反向遺傳重組狂犬病載體疫苗研究及展望.....	30
七、以犬瘟熱病毒之反向遺傳學操作平台構建活毒載體疫苗之研究.....	34
八、狂犬病口服疫苗及口服免疫研究.....	38
九、研習狂犬病抗體監測之競爭型 ELISA 試驗.....	49
十、大陸 OIE 狂犬病參考實驗室-參訪參考實驗室之規範與管理.....	51
十一、前往吉林正業生物製劑股份有限公司參訪.....	56
肆、心得與建議.....	57
伍、誌謝.....	57
陸、附錄.....	58

壹、緣起及目的

自 102 年 7 月起國內發生野生鼬獾狂犬病案例，我國因而成為狂犬病疫區國家，由於臺灣過去 50 幾年未曾發生過狂犬病，在防疫監測上及疫情之應變處理上，實有必要與其他國家進行經驗交流，以利未來在狂犬病的防疫及疾病的清除上，提供重要參據。

本次考察行程藉由參訪中國大陸農業科學院長春獸醫研究所與大陸狂犬病相關防疫技術專家就臺灣狂犬病防疫經驗與大陸在鼬獾狂犬病診斷技術、基因演化、口服疫苗研發及實務應用經驗上進行研究交流及學習，以期建立野生鼬獾狂犬病區域聯防機制。

貳、研習重點

一、出國行程表：

日期	星期	預定行程
2015.10.11	日	由桃園國際機場出發，抵達吉林省長春市龍嘉國際機場
2015.10.12	一	上午：長春獸醫研究所扈榮良教授介紹本次研習活動之安排。 下午：分別由陸方陶曉燕報告中國狂犬病病毒族群進化及流行分布特徵及張守峰報告中國野生動物狂犬病及病毒的基因分型。
2015.10.13	二	上午：首先由防檢局獸醫行政科蔡政達科長介紹臺灣鼬獾狂犬病調查分析及防治策略，隨後分別由中國大陸 CDC 病毒病所腦炎室朱武洋主任報告大陸狂犬病的流行與監測，以及扈榮良教授介紹大陸狂犬病流行及防控概況。 下午：由哈爾濱獸醫研究所帥磊博士介紹大陸在反向遺傳重組狂犬病載體疫苗研究及展望、扈榮良教授研究室李智麗博士報告以犬瘟熱病毒之反向遺傳學操作平台構建活毒載體疫苗之研究，以及扈教授介紹狂犬病口服疫苗及口服免疫研究。
2015.10.14	三	上午：參訪長春獸醫研究所扈教授實驗室進行血清學檢測操作交流-狂犬病抗體監測之競爭型 ELISA 試驗，以及參訪大陸 OIE 狂犬病參考實驗室並由涂長春主任介紹參考實驗室之規範與管理。 下午：前往吉林正業生物製劑股份有限公司參訪。
2015.10.15	四	回程，由長春搭高鐵至瀋陽，再由瀋陽桃仙機場搭乘華航返回桃園機場。

三、研討會議程表

第一天（10月12日）

時間	演講主題	主講人
14：00-14：10	致詞	米獻淼處長 （長春獸醫研究所）
14：10-16：00	大陸狂犬病病毒族群進化及流行分布特徵	陶曉燕副研究員 （大陸 CDC 病毒病所副研究員）
16：00-17：50	狂犬病毒的基因分型與大陸野生動物狂犬病	張守峰主任 （長春獸醫研究所流行病室主任）
18：00	晚餐	

第二天（10月13日）

時間	演講主題	主講人
09：00-10：00	臺灣狂犬病調查分析及防治策略	蔡政達科長 （農委會動植物防疫檢疫局）
10：00-11：00	大陸狂犬病的流行與監測	朱武洋主任 （大陸 CDC 病毒病所腦炎室）
11：00-11：50	大陸狂犬病流行及防控概況	扈榮良教授 （長春獸醫研究所）
12：00-14：00	午餐及休息	
14：00-15：00	反向遺傳重組狂犬病載體疫苗研究及展望	帥磊博士 （哈爾濱獸醫研究所）
15：00-16：00	以犬瘟熱病毒之反向遺傳學操作平台構建活毒載體疫苗之研究	李智麗博士 （長春獸醫研究所）
16：00-17：00	狂犬病口服疫苗及口服免疫研究	扈榮良教授

17：00-18：00	相關議題之自由討論
18：00	晚餐

第三天（10月14日）

時間	參訪單位
09：00-11：30	1. 大陸農業科學院長春獸醫研究所扈榮良教授研究室-研習狂犬病抗體監測之競爭型 ELISA 試驗 2. 大陸 OIE 狂犬病參考實驗室-參訪參考實驗室之規範與管理
14：00-17：00	前往吉林正業生物製劑股份有限公司參訪。

叁、研習內容

一、大陸狂犬病病毒族群進化及流行分布特徵

本議題由中國疾病預防控制中心(CDC)病毒病所副研究員陶曉燕博士介紹，狂犬病的發展史與人類文明的發展是相伴相生，可追溯至西元前 3000 年，距今已有 5000 年的歷史，狂犬病病毒屬 (Lyssavirus) 大約在 3900 年前演化出 2 個基因群，至 2014 年國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses ; ICTV) 最新分類結果明確將狂犬病病毒分為 14 種 (Species)，其中狂犬病病毒 (Rabies virus ; RABV) 屬於第 1 基因群 (Phylogroup I) (如圖 1)。2013 年扈榮良教授發表在吉林省的蝙蝠發現 1 種屬第 1 基因群之 Irkut virus (IRKV) 病毒，是大陸地區唯一非 RABV 種類病毒。

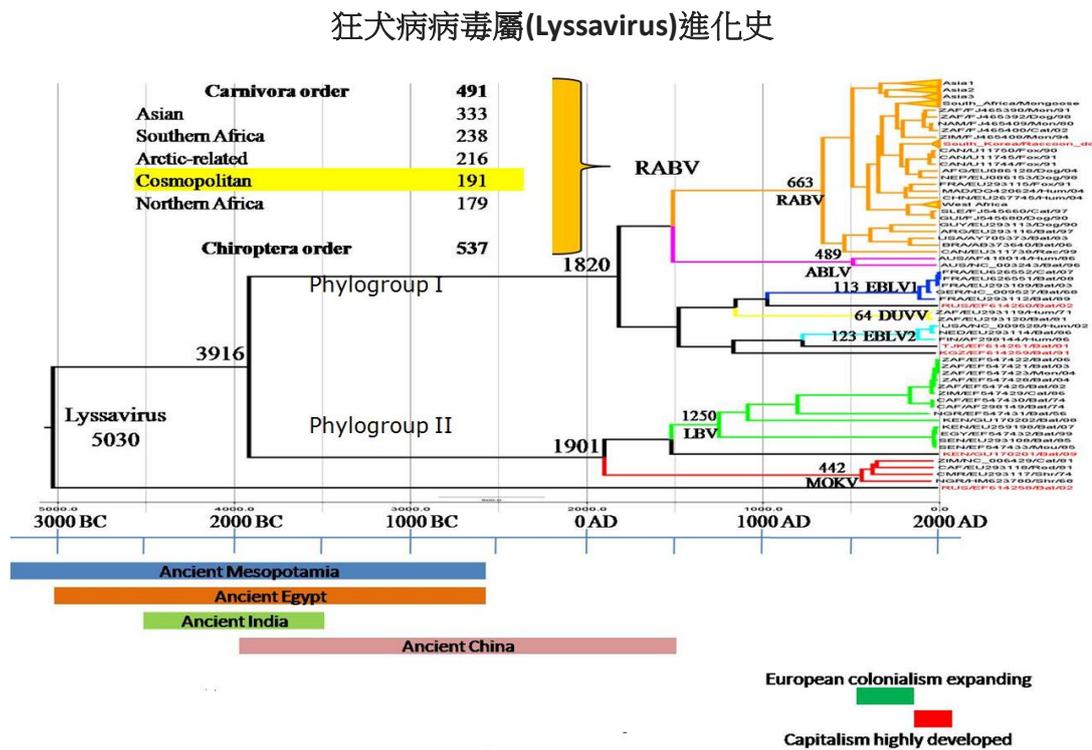


圖 1. 以 BEAST 軟體 Skyline plot 模型構建 LYSSA 病毒流行株時間進化樹

大陸政府於 2005 年開始批准對發生狂犬病發生最嚴重的廣西、湖南及貴州等南部 3 個省份進行狂犬病監測調查，由於該等省份因是吃狗肉的省份，因此，可

方便向狗肉店收購犬腦進行相關研究。這些年來大陸 CDC 陸續由狗肉店採集約 2,887 份犬腦組織標本，其中狂犬病陽性率為 2.3%，經分析 60 個毒株基因序列，可劃分為 3 個毒株群，並將其命名為 I、II、III 群，即所謂 China I、China II、China III。而由 1969-2010 年間所進行來自人、犬、貓、牛、鼬獾、黑線姬鼠等上萬份標本檢測中，陽性標本計 320 件，分佈於 23 省區，透過分析該等狂犬病病毒完整 G 基因的核苷酸序列，大致可將大陸地區狂犬病分為 6 個譜系，分別命名為 China I - China VI（如圖 2）。其中 China I 是中國分佈最廣泛且發生案例最多（254/320 樣本，約佔 80%），地域也佈最廣（19/23 省區），其次是 China II 數量為 49/320 樣本（約佔 15%），局限於南方省區（7/23 省區），其它 4 群數量稀少，分佈局限，其發生比率分別為：China III 0.9%（3/320 樣本；3/23 省區）；China IV 1.2%（4/320 樣本；1/23 省區）；China V 1.8%（6/320 樣本；2/23 省區）；China VI 1.2%（4/320 樣本；2/23 省區）。

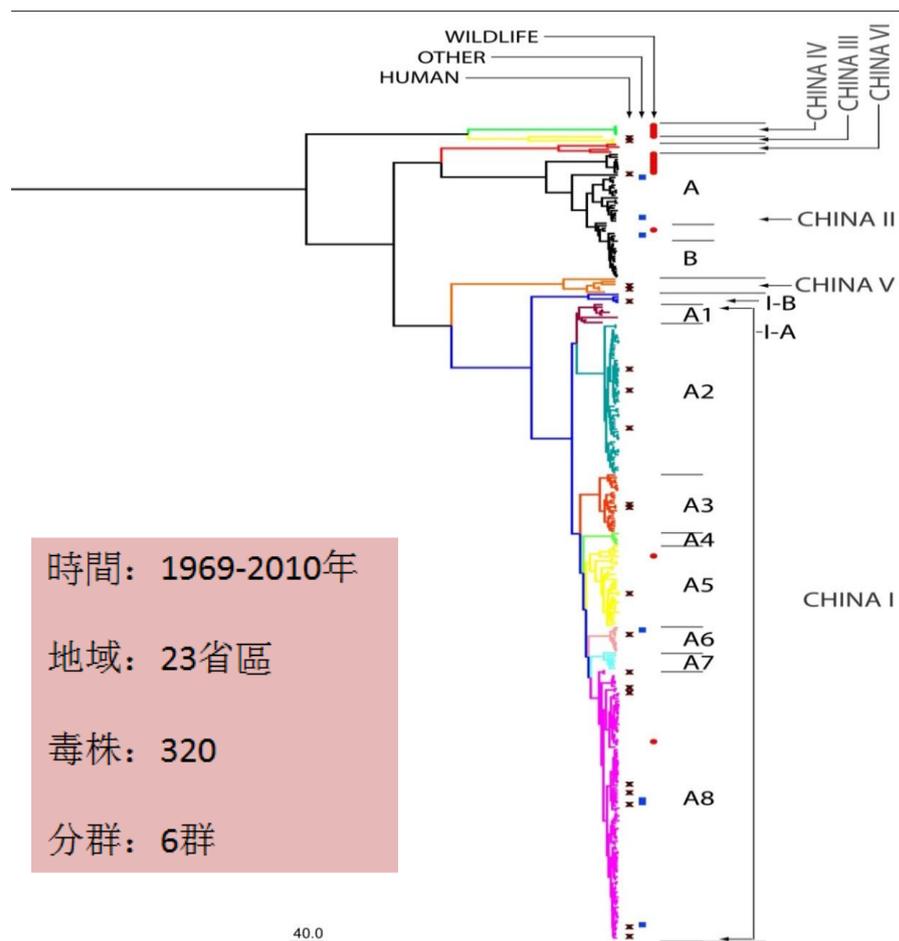


圖 2. 以 BEAST 軟件分析 1969-2010 年間大陸 23 省區 320 個狂犬病流行株 G 基因所構建之 MCC 樹，可分為 6 種不同的譜系（China I - China VI），其中 China I 分佈最廣泛且發生案例最多，其次是 China II。

由於先前狂犬病病毒的相關分類皆為大陸地區境內自行的分類，且各研究單位間的分析也缺乏整合性。為能與全球狂犬病的研究接合，大陸 CDC 於 2014 年底成立狂犬病病毒史研究之專責單位，以從事狂犬病病毒演化與分子流行病學方面的研究，而狂犬病毒持續監測與分子流行病學分析，有利於再度出現狂犬病之地方與國家採取及時且有效的應變作與控制，有鑑於此，中國大陸有必要對所有的狂犬病研究進行全國一致性的譜系劃分與命名，以利完整瞭解大陸地區狂犬病病毒譜系分布之動態，對於狂犬病之控制與設計，可提供更好的科學依據。

由基因病毒的基因演化分析來看，China I 雖然是大陸地區最早發現之狂犬病病毒，但其演化的發生時間卻是最晚的，究其為何最終成為大陸地區狂犬病之優勢族群，比較 China I, II 群的地域分佈變化，2004 年後，China I 群逐漸取代 China II 群，成為分佈最廣數量最多的優勢毒株群，其可能原因為第一和第二個流行期間通過大陸全面的滅犬運動控制狂犬病的結果，藉由主要宿主犬隻的大量消滅，直接導致當時的優勢毒株群的數量及分佈範圍的銳減，與局限分佈的非優勢毒株群重新處於同一起跑線上。因此，總結而言，大陸所採行滅犬運動僅僅改變了流行的病毒種群，隨著宿主數量的恢復，疫情再次上升（如圖 3）。

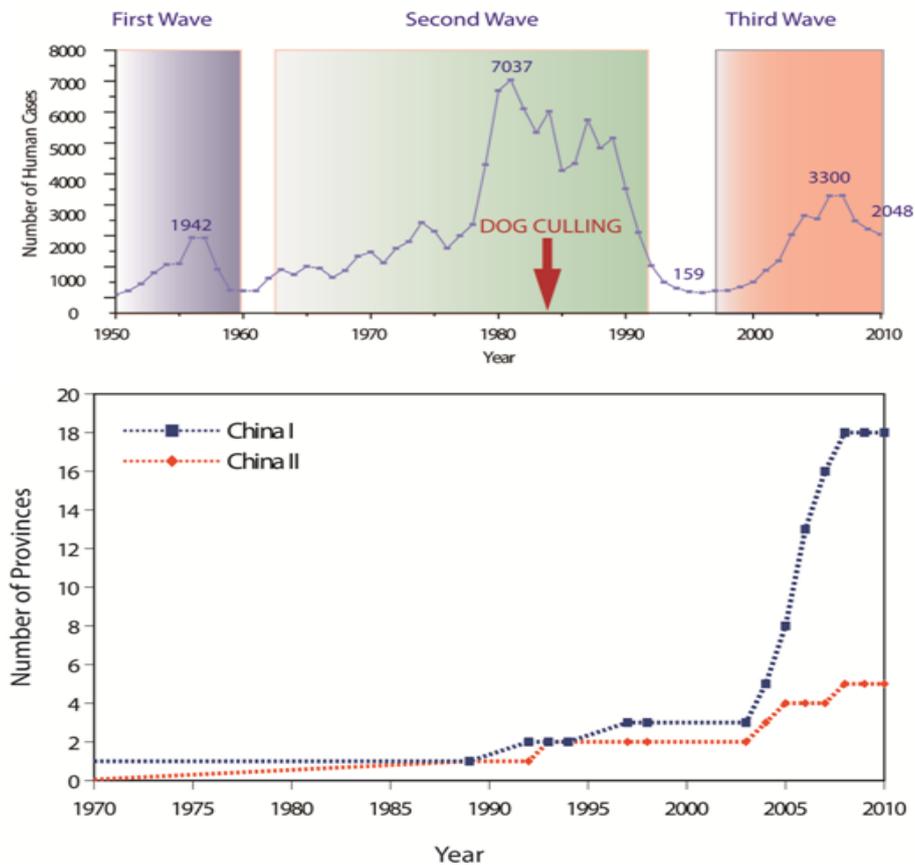


圖 3. China I 群和 II 群地理分佈範圍的變化

針對臺灣發生之鼬獾狂犬病病毒株與大陸地區發生之狂犬病的關係比對，由 2014 年臺灣方面（臺灣大學，邱慧瑛等）的研究分析顯示大陸福建省 2 株鼬獾狂犬病病毒株（CNFB）與臺灣中南地區病毒群（TW- MS 或 TW- CS）之 3 株鼬獾狂犬病病毒株（TWFB）基因體序列比對與 China I 及 China II 皆屬亞洲群（Asia），但似乎與 China I 較為相近（如圖 4）。

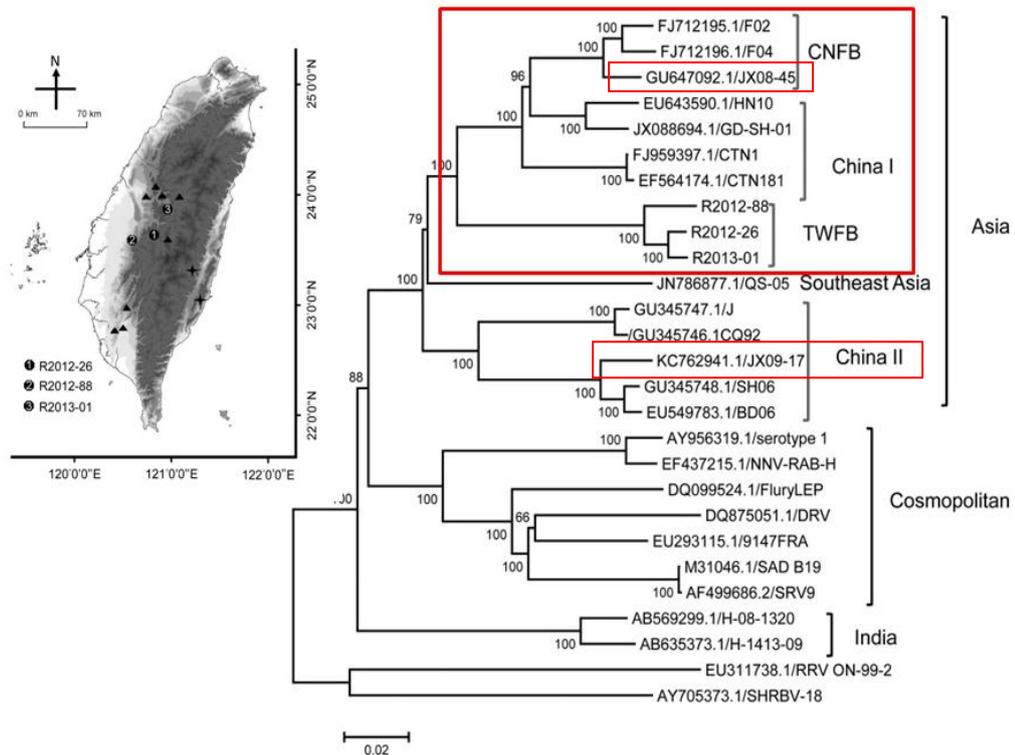


圖 4. 臺灣鼬獾狂犬病病毒株與大陸福建省鼬獾病毒株之比較分析

以 1998 - 2010 年間大陸各省區疫情嚴重程度，係由南向北發展，以南方 4 省最為嚴峻，其次中間省份，再者為北方省份（如圖 5）。由於大陸地區自 2005 年起加強全國監測及實施新型農村合作醫療體系（簡稱“新農合”）等相關措施，提升了曝露後預防（Post-Exposure Prophylaxis; PEP）的質量並改進馴養動物之管理及疫苗的注射率，在促進狂犬病預防控制及減少狂犬病的影響方面，確實發揮了關鍵作用，因而自 2007 年起人狂犬病案例即開始呈下降趨勢，至 2014 年已降至 943 例（如圖 6）。然而在普遍實行監測情形下，大陸地區狂犬病流行形勢出現了變化，原有中、高發生區出現下降趨勢，而低、極低發生區則有增加及新浮現案例發生趨勢（如圖 7）。



圖 5. 1998 - 2010 年大陸各省區疫情嚴重程度分級圖

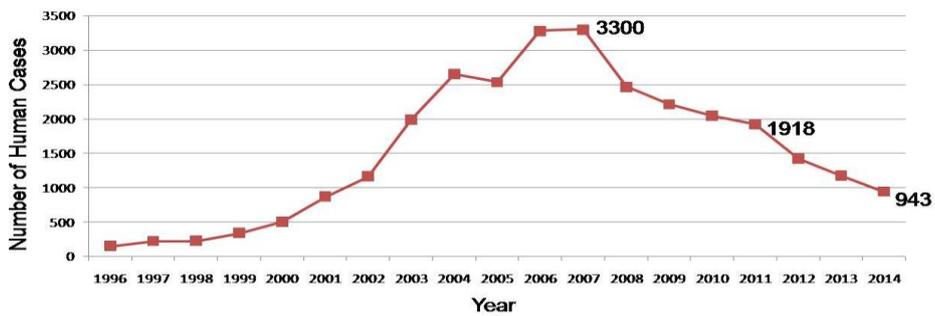


圖 6. 1996-2014 年大陸地區狂犬病年報告病例數變化



圖 7. 2007-2013 年不同流行區狂犬病年報告病例數變化

自 1996 年起 China I 逐漸擴及原 China II 發生區域，而 2009-2010 年間幾乎所有的狂犬病毒株都屬於 China I。目前，China I 已廣為分佈於中國大陸南部及北部，甚至西部也有少數病例報告且有上升趨勢（如圖 8）。青海和西藏，過去曾多年保持無狂犬病狀態，經過 25 年後，最近在 2012 年也報導第一例人類狂犬病案例。由收集青海和西藏的標本中所檢測到之狂犬病病毒係屬 China IV，在內蒙古也有少數 China IV 發生在野生動物（浣熊），其與來自韓國及俄羅斯等罕見毒株相近，都屬於北極相關群（Arctic-like-2）之國際分支，這意味著 China IV 開始在青海、西藏野生動物溢出傳播而逐漸成為國際流行株，同時也說明（除 China I 外）未來 China IV 也是中國必須面對的另一病毒株（如圖 9）。總結 China I、II、V，主要發生在大陸地區，而 China VI 與在東南亞國家發生之毒株親緣關係密切，但由基因分析之結果顯示，近年造成大陸地區狂犬病的流行之病毒株保持獨立演化並未受周邊國家疫情影響。另外，China III 及 China IV 則分別與世界分布群及北極相關群較為相近。



圖 8. China I 群和 China IV 群地理分佈對比

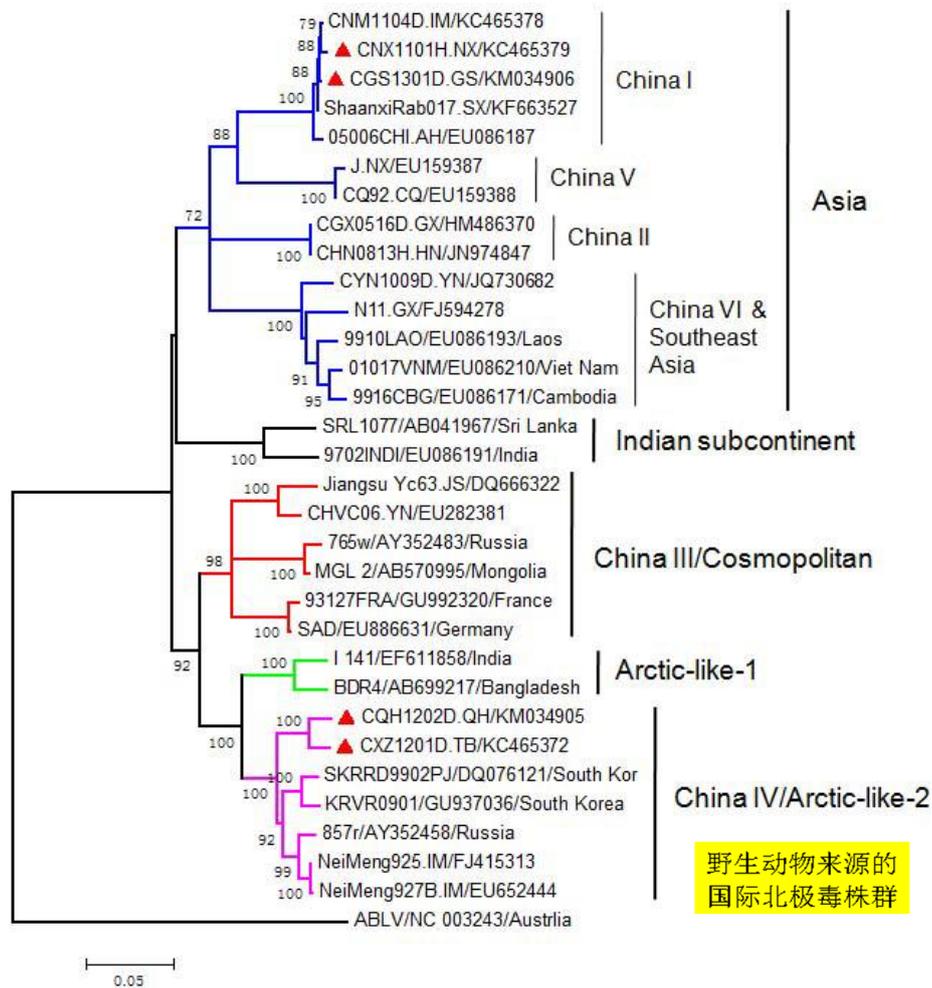


圖 9. 疫情新發省區病毒株 N 基因種系發生樹

二、狂犬病毒的基因分型與大陸野生動物狂犬病

本議題由長春獸醫研究所流行病室張守峰主任作介紹，依據 2014 年國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) 最新分類結果，狂犬病毒屬中截至目前可明確分類有 Rabies virus (RABV)、Duvenhage virus (DUVV)、European bat lyssavirus 1 (EBLV-1)、European bat lyssavirus 2 (EBLV-2)、Australian bat lyssavirus (ABLV)、Aravan virus (ARAV)、Khujand virus (KHUV)、Bokeloh bat lyssavirus (BBLV)、Irkut virus (IRKV)、Lagos bat virus (LBV)、Mokola virus (MOKV)、Shimoni bat virus (SHIBV)、West Caucasian bat virus

(WCBV)、Ikoma virus (IKOV) 等 14 種 (Species) 狂犬病病毒，而 2011 年從西班牙蝙蝠中分離到的 Lleida bat lyssavirus (LLEBV) 暫定為第 15 種，該 15 種病毒可分為 3 個基因群，其中可被分型的有 7 個基因型，而該 7 個基因型倘以血清學分類，則可分為 6 個血清型。在大陸所分離到之狂犬病毒除 2013 年在吉林省的蝙蝠分離到之 IRKV 外，皆為 RABV 病毒 (如表 1、圖 10)。

表 1. 狂犬病病毒屬(Lyssavirus)病毒種類分類一覽表

種縮寫	血清型	基因型	系統發生群	初分離年代	分離地區	宿主	人感染報道
RABV	I	1	I	1880s	除少數島國以外， 全球分布	犬科、鼬科、浣熊科等；美洲蝙蝠	很多
DUVV	IV	4	I	1971	南非	蝙蝠	有
EBLV-1	V	5	I	1968	德國	大棕蝠 (食蟲蝙蝠)	無
EBLV-2	V	6	I	1991	烏克蘭	食蟲蝙蝠	無
ABLV	VI	7	I	1996	澳大利亞	大蝙蝠亞目、小蝙蝠亞目 (食蟲、食果蝙蝠)	有
ARAV			I	1991	中亞	狹耳鼠耳蝠 (食蟲蝙蝠)	無
KHUV			I	2001	中亞	須鼠耳蝠 (食蟲蝙蝠)	無
BBLV			I	2009	德國	鼠耳蝠	
IRKV			I	2009	東西伯利亞、遠東與中國東北部	白腹管鼻蝠 (食蟲蝙蝠)	有
LBV	II	2	II	1956	尼日利亞	大蝙蝠亞目 (食果蝙蝠)	
MOKV	III	3	II	1968	尼日利亞	鼯鼯	
SHIBV			II	2009	肯尼亞	康氏蹄蝠	
WCBV			III	2003	俄羅斯高加索地區	長翼蝠 (食蟲蝙蝠)	
IKOV			III	2009	坦桑尼亞	非洲靈貓	

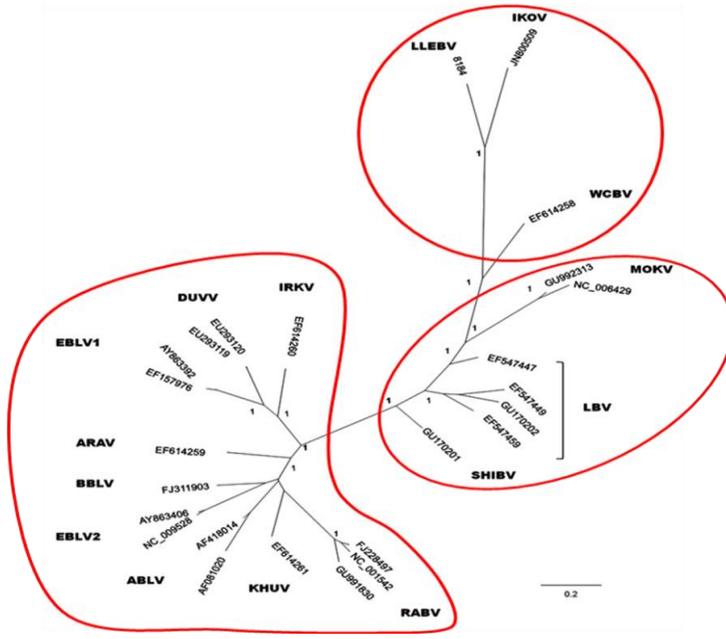


圖 10. 西班牙學者 Aréchiga CN 等按抗原性劃分的系統發生群

在大陸地區對於野生動物之疫情狀況，由於經濟影響層面不及家畜禽生產事業來得重要，因此一直以來並沒有一個強制向上陳報機制，致使實際發生案例與送檢病例產生落差。近年來有關大陸地區境內及周邊國家野生動物病例報導比較多是鼬獾，其發生地區主要分佈在華中及東南地區，而最早被確診的案例發生在浙江，而 2009 年以後才有人遭鼬獾咬傷而感染狂犬病的確診案例（官方正式報告），其他野生動物（狐狸及狼）狂犬病主要發生在北方邊境地區（如內蒙古、黑龍江及新疆）及俄羅斯（如圖 11）。



圖 11. 大陸地區境內及周邊國家野生動物狂犬病報導

在鼬獾罹患狂犬病或人遭鼬獾咬傷而發生狂犬病報導案例（沒有直接證據）發生在 1994-2004 年間，而最早發生在浙江的湖州（在 20 個人狂犬病案例中有 12 例與鼬獾咬傷有關；12/20）、杭州（17/22）及麗水，而 2009 年在江西的婺源也有報導的案例（5/6）（如圖 12）。

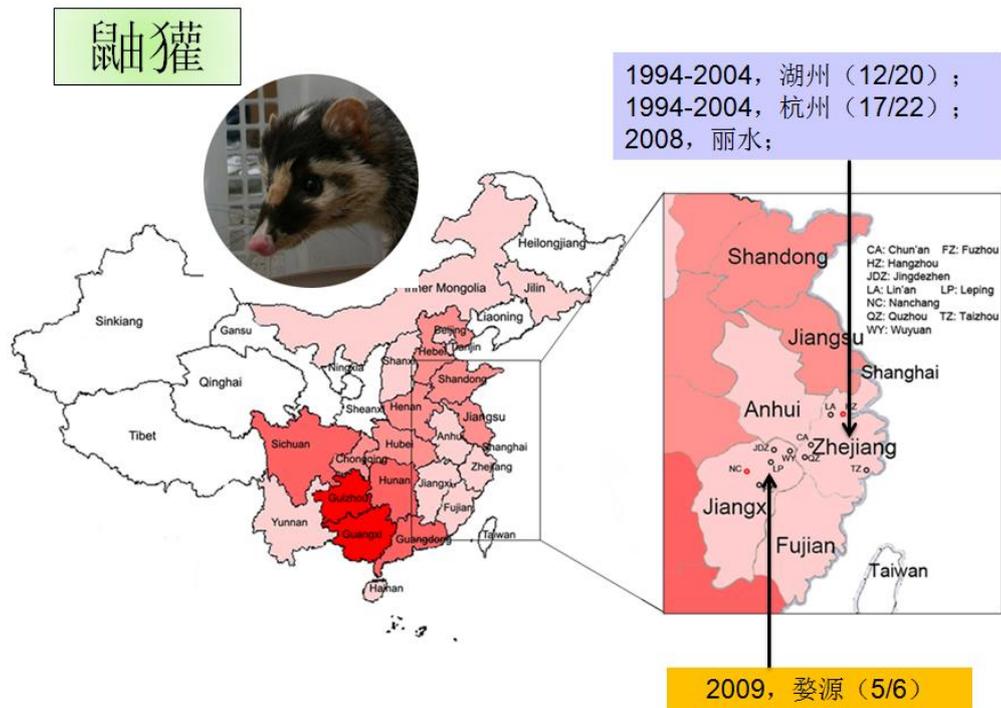


圖 12. 人遭鼬獾咬傷而發生狂犬病報導案例最早發生在 1994-2004 年之間

據瞭解大陸地區鼬獾之商業用途可用於服飾所需之皮毛或製成毛筆或為山產店之野味，甚至有出口其相關產製品，因此商業價值高，為大陸地區普遍捕捉之對象動物，但由於政府沒有強制要求陳報權利與機制，因此，樣材取得都是透過向當地獵人收購運輸過程中即將死亡的鼬獾頭部而來，最早鼬獾狂犬病確診案例且分離到病毒的地點是 2008 年在浙江省臨安縣及麗水市一帶，該病毒株以 ZJ-LA（即是浙江-臨安）為代碼，其後陸續在包括浙江及江西一帶分離到鼬獾狂犬病病毒，並經分析發現，其中一病毒株 JX09-17（即是 2009 年分離於江西-編號 17）病毒株與犬型狂犬病分離株極為相近（約達 97%），而與其他鼬獾狂犬病毒株有明顯差異（如圖 13），而經病毒基因分析發現 JX09-17 的獨特氨基酸是犬型所沒有的，有些氨基酸的改變發生在抗原區內，有些在抗原區外（如圖 14）。但不管其發生情形為何，推測並非在短時間由犬隻咬傷外溢感染，

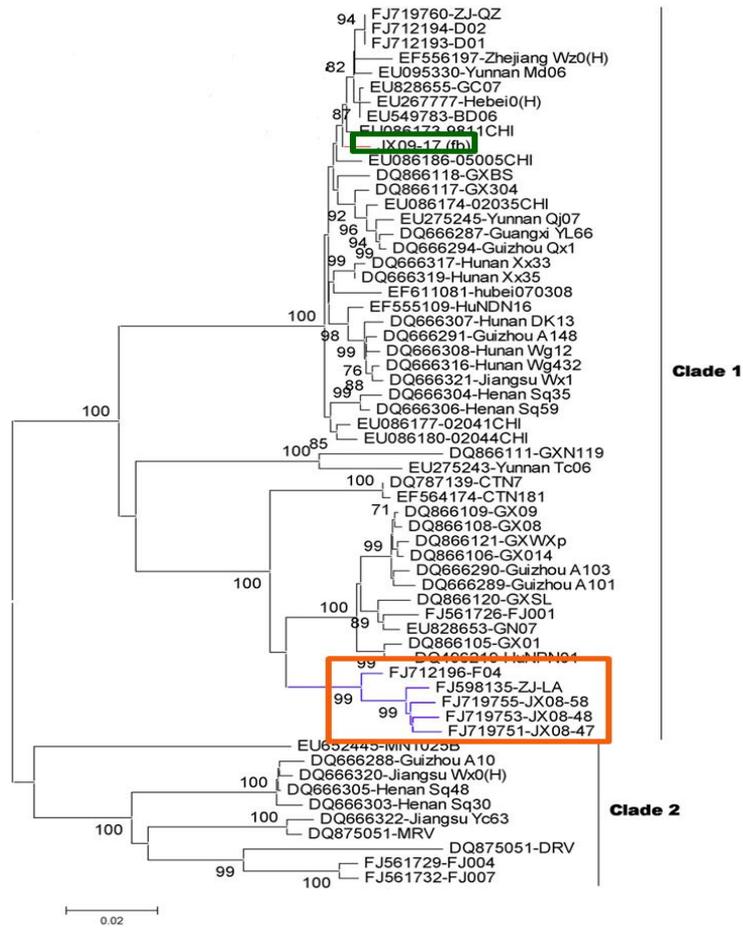


圖 13. 2009 年鼬獾狂犬病病毒分離及分析情形

JX09-17 (fb)	MILQILLFVP LLVFSSCFGR FPIYITPDKL GPWSPIDIHH LSCPNLWVE DEGCTNLSGF	[41]
DQ849064-NC	... V... A...	[41]
FJ719756-ZJ-LA	... P... A... VPL...	[41]
EU549783-BD06	... P... V... ..	[41]
EU828654-GN07	... P... V... .. AVTL...	[41]
AF325714-CVS-N2c	VP... V... L... G... L... .. E...	[41]
AY009100-CTN	... PLA... .. LCVS... SLF... .. T...	[41]
AB085828-HEP-Flury	VP... V... A... .. SPL... .. L...	[41]
EF206707-ERA	VP... A... .. PL...	[41]
M31046-SAD_B19	VP... A... .. PL...	[41]
M13215-PV	VP... A... .. PL...	[41]
JX09-17 (fb)	SIMELKVGYI SAIKVNQFTC TGVVTEAETY TNFVGYVTTT FKRKHFPMP DACRAAYNWK	[101]
DQ849064-NC R.....	[101]
FJ719756-ZJ-LA R... T... .. S.....	[101]
EU549783-BD06 S..... R.....	[101]
EU828654-GN07 I..... R... T... .. S.....	[101]
AF325714-CVS-N2c R... T... ..	[101]
AY009100-CTN R... T... .. S.....	[101]
AB085828-HEP-Flury R... T... ..	[101]
EF206707-ERA L... M..... R... T... ..	[101]
M31046-SAD_B19 L... .. R... T... ..	[101]
M13215-PV M..... R... T... ..	[101]

圖 14. 鼬獾狂犬病病毒 JX09-17 的獨特氨基酸

而時經過長時間的適應演化而形成。由於以往各研究單位對於狂犬病病毒分析所取得之病毒株與使用之分析方式多不盡相同，因此，結果的呈現有以 Group、Clade 或 China、Asia 等不同的描述方式，但經詳細分析仍有一定規律性。2010 年分離到之鼬獾狂犬病病毒仍屬於 2009 年所分離到的相同病毒群，然而，到 2012 年所收集到的鼬獾狂犬病案例之病毒株即可分為 A、B、C、D 4 個 Clade，其中 Clade A 為 2009 年相同的病毒群，由地理的分佈來看，大陸鼬獾狂犬病分佈遍及華中及東南地區，且依地理區域演化出不同病毒群（如圖 15、16）。在其他野生動物方面，狂犬病案例也發生在狼、狐狸、貉及駱駝等，其中駱駝狂犬病病毒株與犬型相似，推測是遭狂犬病犬隻咬傷而感染，而狐狸、貉所分離到之狂犬病病毒屬於北極相關群。

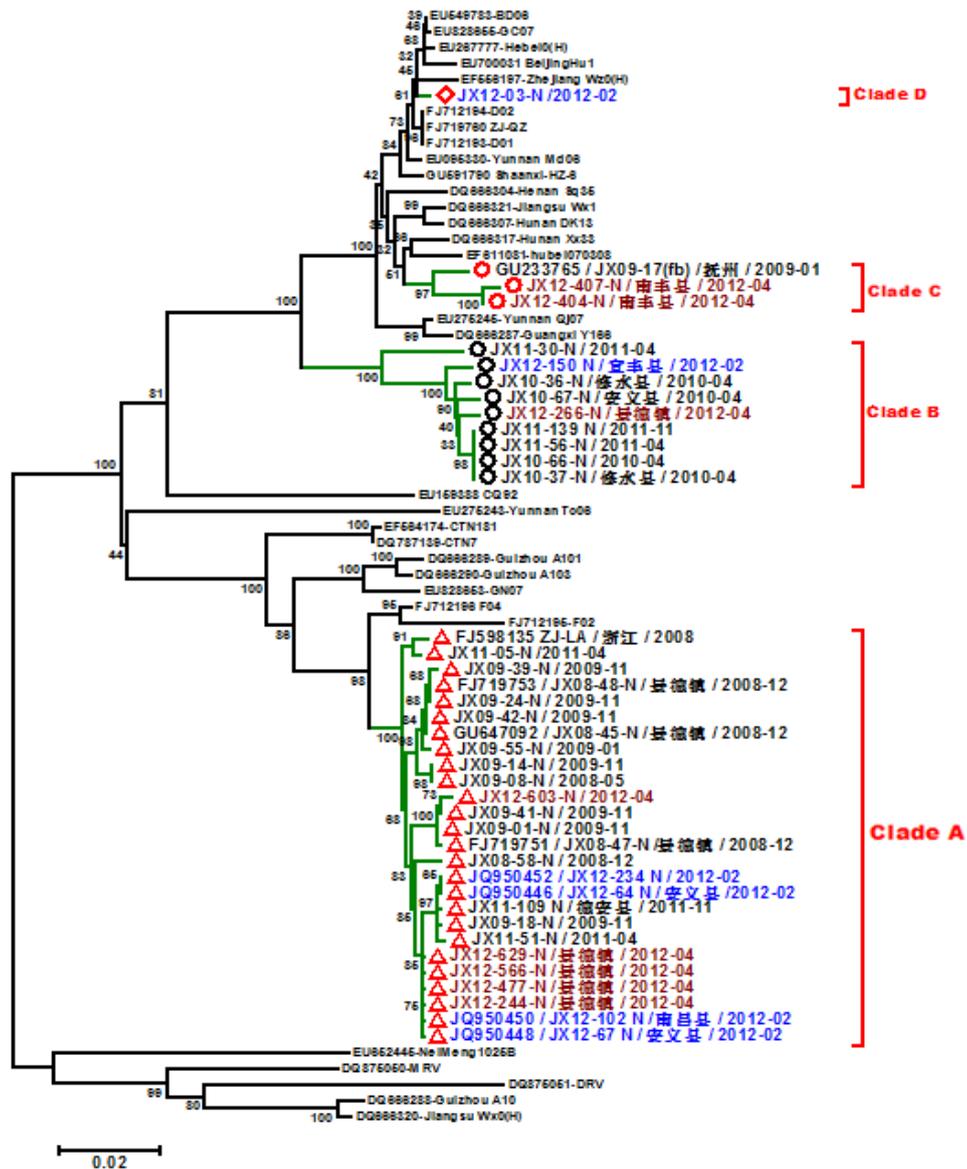


圖 15. 2012 年鼬獾狂犬病病毒分離及分析情形

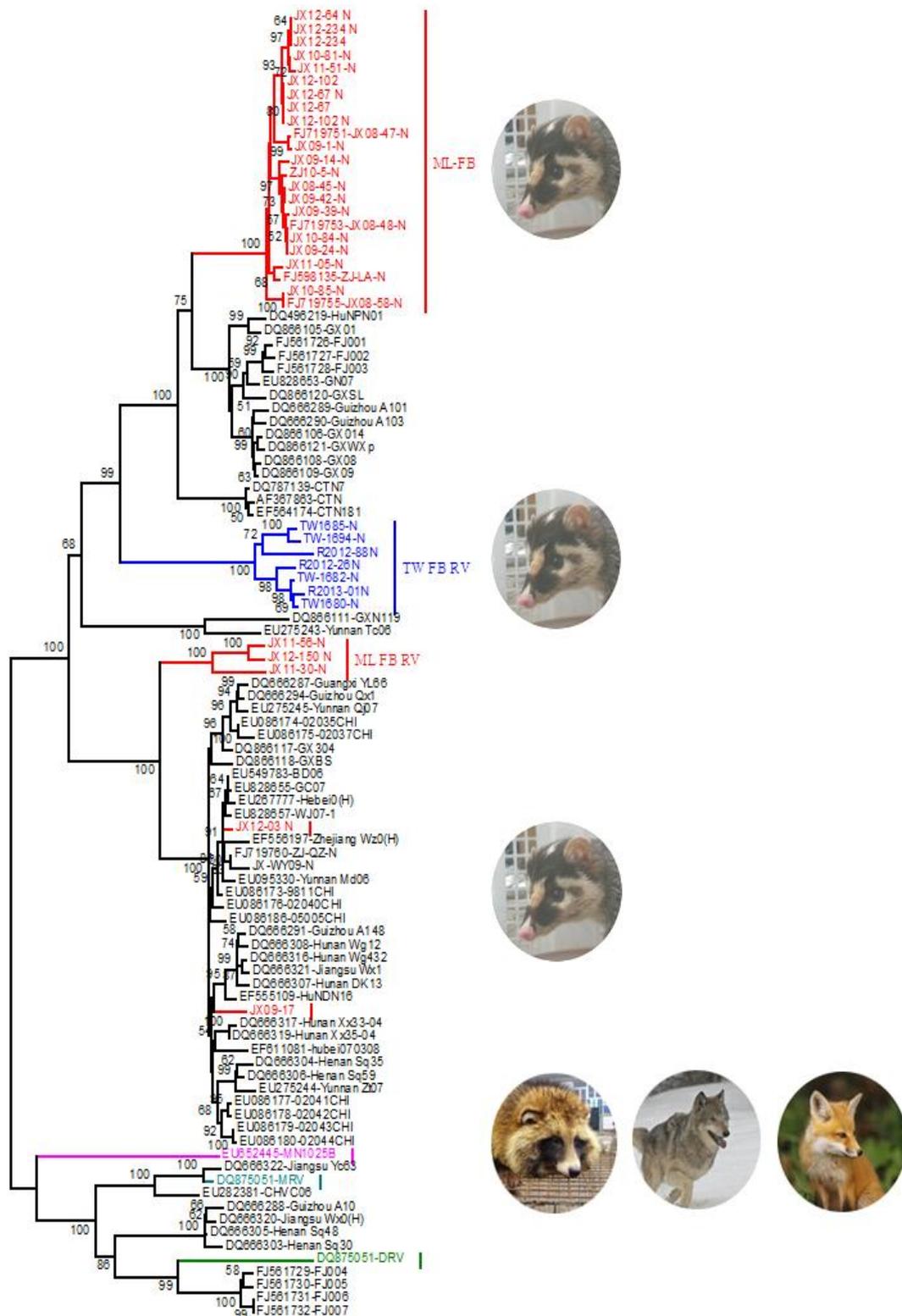
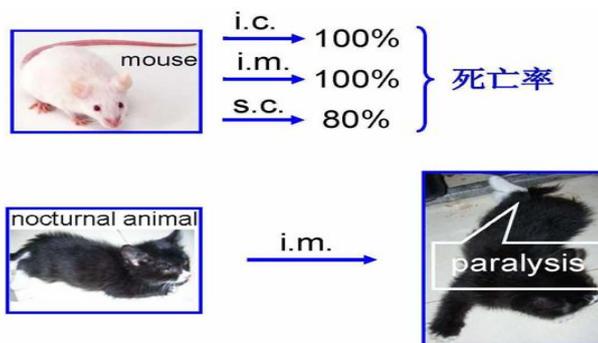


圖 17. 大陸地區野生動物與臺灣鼬獾狂犬病病毒基因種系關係比對分析圖



→ 我国蝙蝠传播人狂犬病发生地点
 → 俄罗斯Irkut病毒分离地点

圖 18. 大陸地區 2012 年在白腹管鼻蝠分離到與俄羅斯 Irkutsk 相近的 Lyssa 病毒



动物种类	外周感染致死率	
	IRKV-THChina12	RABV-BD06
小鼠	100%	100%
猫	30%	90%
犬	20%	80%

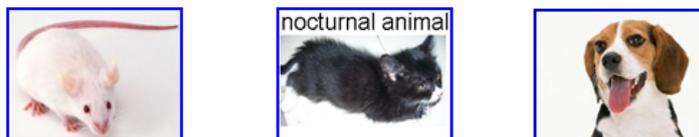


圖 19. 大陸地區蝙蝠 Lyssa 病毒之致病性分析

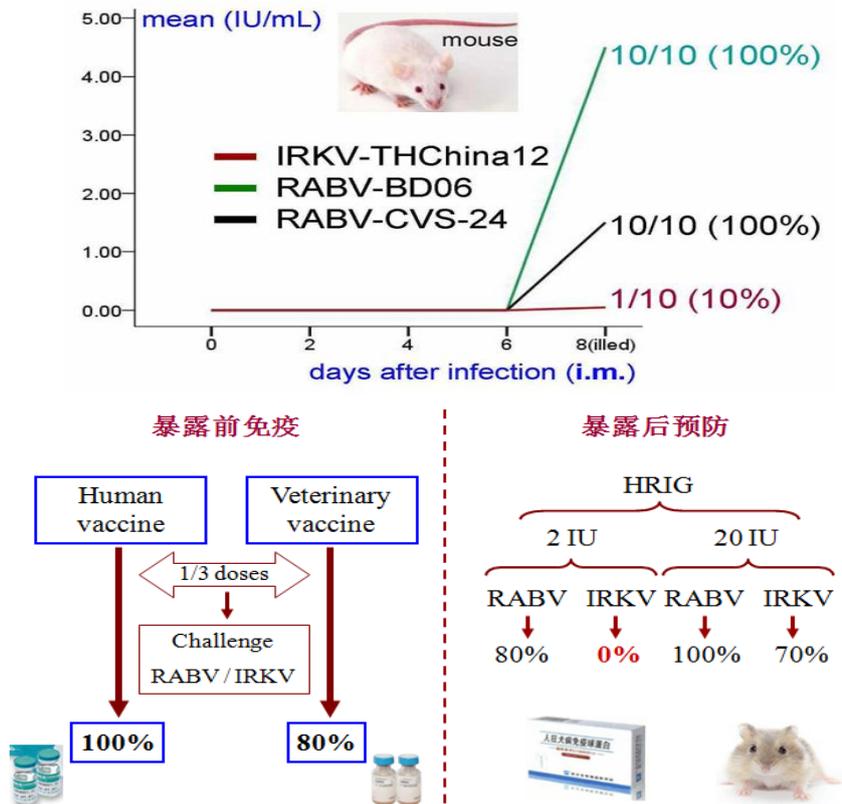


圖 20. 大陸地區蝙蝠 Lyssa 病毒之免疫原性分析及保護試驗

三、臺灣狂犬病調查分析及防治策略

本議題由行政院農業委員會動植物防疫檢疫局蔡政達科長介紹臺灣鼬獾狂犬病疫情概況，自 1961 年至 2013 年 6 月臺灣曾被認定為 10 個無狂犬病的國家之一，自 1999 年起動植物防疫檢疫局實施犬隻狂犬病監測方案，而自 2008 年起再增加蝙蝠監測，至 2013 年 6 月共檢測 7,266 例犬隻及 347 例蝙蝠樣本，均未檢出陽性案例。2013 年起再針對野生動物進行監測，以期瞭解臺灣野生動物是否有狂犬病流行的問題。2013 年 7 月 17 日家畜衛生試驗所 (AHRI) 證實 3 例鼬獾狂犬病，該報告已提交給世界動物衛生組織。截至 2015 年 7 月 23 日，共檢測食肉目野生動物計 1,541 件樣本及其他野生動物計 393 件樣本，經確認 479 例鼬獾狂犬病 (TFBRV) 陽性案例，另有 7 例外溢 (Spillover) 的感染案例，包括 1 隻遭狂犬病鼬獾咬傷而隔離之幼犬、1 例錢鼠及 5 例白鼻心。而從 15 個回顧性樣品中亦檢出 7 例狂犬病案例，其中發現最早 1 例可追溯至 2010 年 7 月 17 日。在臺灣鼬獾是狂犬病最主要感染的物種，經分析該病毒屬於麗莎病毒基因型 I，而經病毒核蛋白基因 (N 基因) 的研究，依地理位置劃分成 2 大群：中南部群 (TW-MS) 及東部群 (TW-E)。在臺灣主要的狂犬病控制措施包括：提升高風險地區 (狂犬病陽性或山區) 犬貓的疫苗注射率達 90% 之目標，而在其它區域目標為 70%；儲

備緊急防疫用狂犬病疫苗約 25 萬劑，當低於 15 萬劑時即啟動疫苗採購，以因應緊急防疫免疫或提供高風險區域及收容所犬、貓免費疫苗注射；對於飼主未依規定攜帶犬、貓注射狂犬病疫苗者，則依法裁處新台幣 3 -15 萬元罰鍰；針對路倒或路殺之野生動物、狗、貓及蝙蝠等所有溫血動物，以及咬傷人之動物進行狂犬病檢驗，並進行野生動物分佈、密度、行為及狂犬病之發病率調查；持續執行口服狂犬病疫苗之研究開發，以及狂犬病流行病學與病原性調查；加強進口動物的檢疫措施，防止走私非法動物及發展快速公共衛生之應變機制。目前臺灣狂犬病獲得穩定控制，幾乎侷限於鼬獾族群，目前積極與全球狂犬病防控策略及以口服疫苗消除野生動物狂犬病之研究單位進行經驗交流。

四、大陸狂犬病的流行與監測

本議題由中國大陸 CDC 病毒病所腦炎室朱武洋主任介紹大陸狂犬病的流行與監測，其說明全球約有 150 多個國家有流行狂犬病，3 億 9 千萬人口處於感染狂犬病的危險之中，每年約有 6 萬人死於狂犬病，每年引起的健康損失約 200 萬傷殘調整生命年 (disability-adjusted life year; DALYs)，經濟負擔約為 40 億美元。而 2014 年大陸地區通報狂犬病死亡病例數為 943 例，一直穩居法定報告傳染病死亡人數前三名 (如表 2)。2005 年 7 月中國大陸頒布《全國狂犬病監測方案》，在疫情持續高發的 6 省 15 個高發省市縣區作為監測點，建立全國狂犬病監測系統 (如圖 21)，監測迄今已持續 10 年，目前“中國疾病預防控制中心法定傳染病報告系統”可查詢 2003 年至今的狂犬病發病及死亡情況。1960-2014 年總計狂犬病死亡病例數為 120,913 例，期間狂犬病經歷了幾次流行起伏，最低點為 1996 年 159 例，出現 2 次流行高峰 (1981 年 7,037 例；2007 年 3,300 例)，其間雖有病例數下降的情形，為其分布範圍反倒是擴大的。2007 年之後疫情持續下降，至 2014 年死亡病例數為 943 例。2015 年 1-8 月累計死亡 494 人，61.75/月，31 個省份均有人類狂犬病發生 (如圖 22)。

目前中國狂犬病流行特性為，以往高發生的廣東、廣西、湖南、貴州省份因加強相關防控措施而使病例數大幅下降，反之，部分低發生省份近年來反倒疫情出現回升現象，如 2010 年的雲南，2011 年的山西，以及 2009-2013 年的陝西。這些發生案例中 40% 以上的病例集中在 7-10 月份，夏秋季節高發，在性別方面，男性多於女性 (2.32:1)，而年齡分佈則介於 0-14 歲 (19.71%) 與 30-74 歲 (81.76%) 呈現兩個年齡分佈高峰，就其職業分佈，農民 (67.13%) 為主，其次為學生 (13.32%)

和散居兒童 (6.80%)。2005-2014 年間 22,555 例有記錄病例中，96.77%的病例分佈在農村地區，其中 80.81%分佈在村莊。而絕大部分案例發生是遭犬 (93.74%)、貓 (4.57%) 咬傷，尤其是沒有注射疫苗之犬隻 (大陸地區犬貓注射率僅約 5%)。

在狂犬病毒遺傳變異與疫情傳播擴散間關係方面，中國狂犬病病毒分化同時存在著地理分散和遷移事件 (即基因漂移) 兩種機制，其中地理分散為病毒播散的主要方式 (如圖 23)。中國狂犬病病毒存在分別以江蘇、上海和湖南為中心的東部和西南部 2 個循環圈，相應地區發生的擴散，對中國的狂犬病疫情發展發揮作用，造成狂犬病疫情從 1996 年進入新的流行高峰並在 2001 年和 2003 年經歷了疫情的最快增長。鑒於狂犬病在中國大陸重要的公共衛生意義及不斷變化的疫情形勢及防控的要求，原有監測系統已難以滿足當前需要。由大陸 CDC 傳染病防治處帶頭，會同病毒病所腦炎室及各省疾控部門一起制定了 2014 版《全國人間狂犬病監測方案》，其主要特點在於強調針對每個病例展開調查、加強暴露後預防處置監測、增加一犬傷多人事件調查及開發狂犬病監測資訊管理系統。而在實驗室監測的主要職能方面，包括規範實驗室檢測、提高確診病例的比例、加強分子流行病學為主的病原學監測、推廣暴露後處理血清學監測，以及人員培訓與質控考核等重點提升。再者，2014 版《全國人間狂犬病監測方案》規範臨床採樣及檢測方法，以提高確診病例比例；其中，強調在適當生物安全防護的前提下，進行規範合理的樣品採集，譬如唾液須一日內間隔 3-6 小時採集 3 次，或不同日期採集 3 次， $\geq 1\text{ml}/\text{次}$ ；血清須在發病中後期採集， $\geq 3\text{ml}$ ；腦脊液也指定在發病中後期或瀕死時採集，0.5ml；頸後皮膚組織和腦組織則須在死亡前後採集均可，直徑 5-6mm 等等。

表 2. 自 2004 年起迄今大陸地區通報狂犬病死亡案例，穩居法定傳染病之前三名

Order	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	
1	Rabies	TB		AIDS							
2	TB	Rabies		TB							
3	Hepatitis B	AIDS		Rabies							
4	AIDS	Hepatitis B					HFMD	Hepatitis B			
5	Neonatal tetanus	Japanese Encephalitis		Neonatal tetanus	Influenza A (H1N1)	Hepatitis B	HFMD				
6	Epidemic hemorrhagic fever	Neonatal tetanus		Japanese Encephalitis	HFMD	Influenza A (H1N1)	Hepatitis C				
7	Japanese Encephalitis	Epidemic hemorrhagic fever		HFMD	Japanese Encephalitis	Hepatitis C	Epidemic hemorrhagic fever				
8	Meningococcal Meningitis	Hepatitis C	Meningococcal Meningitis	Hepatitis C			Epidemic hemorrhagic fever	Syphilis			
9	dysentery	Meningococcal Meningitis	Hepatitis C	Meningococcal Meningitis	Neonatal tetanus	Japanese Encephalitis	Influenza A (H1N1)	Japanese Encephalitis			
10	Hepatitis C	dysentery		Epidemic hemorrhagic fever		Neonatal tetanus	Japanese Encephalitis	Neonatal tetanus			



貴州
湖南
廣西
安徽
山東
江蘇

圖 21. 2005 年大陸政府在疫情持續高發生的 6 省 15 個市（縣、區）設立監測點，建立全國狂犬病監測系統

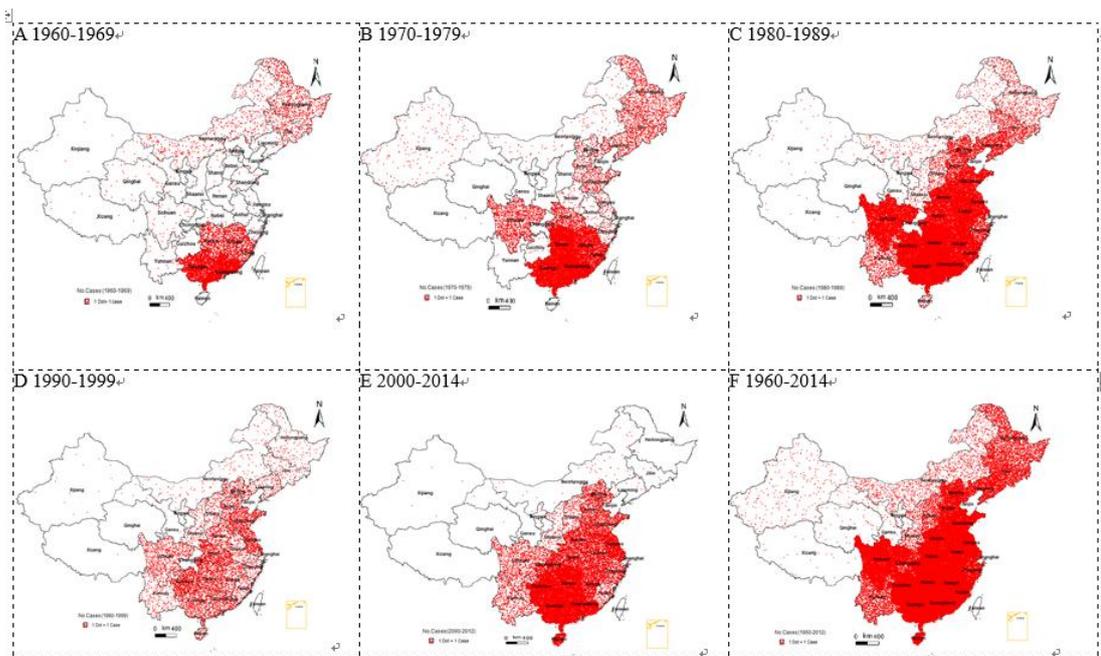
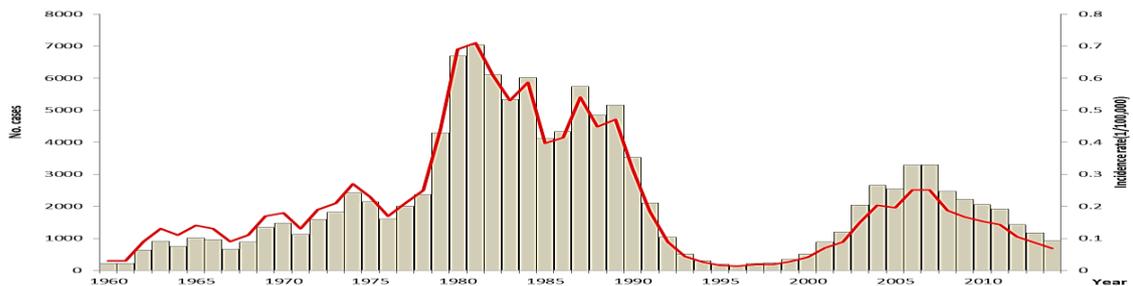


圖 22. 1960-2014 年間大陸地區人狂犬病案例分佈總體特徵

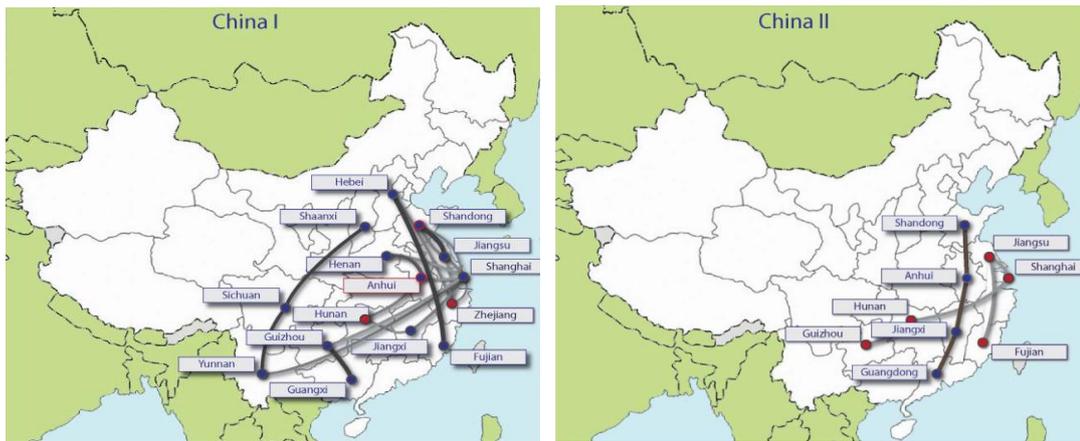


圖 23. 以核蛋白(N)基因分析狂犬病病毒遺傳變異與疫情傳播擴散間之關係

近年來大陸地區在強化狂犬病病原學監測與分子進化分析方面，係藉由調查毒株來源、進化規律及型群特徵，來推演遺傳進化與疫情變化趨勢間內在關係，進而對疫病的發展有所掌握與防範，同時也強化對 PEP 處理案例進行血清學監測，主要是因“問題狂犬病疫苗”事件促使各級疾病預防控制中心都意識到進行狂犬病疫苗接種後的血清學監測工作是必要的。而狂犬病暴露後預防處置效果影響因素的科學評估存在全程暴露後處理的狂犬病死亡病例，PEP 監測有利於評估疫苗質量外，免疫程序完整性及運輸保藏等因素，對 PEP 效果的影響甚鉅。

另外在專業技術團隊業務質能的提升方面，針對人員培訓及質控進行考核：包括（一）盲樣考核：中國疾控中心病毒病所對所有省級疾控機構實驗室每兩年進行一次盲樣標本考核工作；省級疾控機構每年對本地區地、市級疾控機構實驗室進行一次考核，考核結果反饋給當地疾控機構及國家疾控中心病毒病所；（二）檢測結果複核：省級疾控機構應於每季度末彙總各類存疑標本，由中國疾控中心病毒病所進行複核。國家疾控中心病毒病所狂犬病研究室在國內首次建立能滿足不同目標、多種類、多梯度、大容量的抗狂犬病病毒中和抗體檢測之標準檢測套組。RFFIT 標準檢測套組的建立對於血清學監測門診及相關實驗室的建立及其質控考核，確保實驗室檢測結果的科學性具有顯著意義。另中央對地方的補助、“新農合”方案、宣傳教育（由衛生部負責）；動物狂犬病監測（農業部負責）；狂犬病疫苗監管（藥監部門負責），在相關措施的實施下，自 2007 年起疫情開始出現轉折並持續下降，2014 年全國狂犬病死亡病例數與 2007 年相比下降了 71.44%。目前犬隻接種率 5%-20%（3 億左右），31 個省市均有疫情爆發，每年狂

犬病疫苗使用量不低於 1,000 萬人份，在大陸國慶（十月一日）長假期間北京市狂犬病免疫預防門診共接診犬咬傷病例 3,962，且多有器官移植引發狂犬病的案例發生。未來大陸地區狂犬病的防控工作，疾病負擔的評估，主要取決於政府部門重視、政策抉擇及財政支持，而在執行分工方面：衛生部負責人類狂犬病預防控制、狂犬病監測、人員培訓及宣傳教育等；農業部負責動物狂犬病預防控制狂犬病預防控制（包括野生動物、家養動物等）；藥監部門負責產品的審核及質控、疫苗監管及免疫球蛋白等製劑之研發；公安檢疫部門則負責犬隻管理、注冊登記及免疫接種等管理工作，期望在多部門協同努力下，實現 2020 年消除人間狂犬病的最終目標。

五、大陸狂犬病流行及防控概況

本議題由長春獸醫研究所扈榮良教授介紹大陸狂犬病流行及防控概況，其介紹狂犬病及狂犬病病毒（RABV）以演化分析方法可區分成 5 個以上的基因亞型及無數的群和亞群，所有病毒株間核苷酸同源性 $\geq 82\%$ ，以血清學方法進行狂犬病病毒分析結果顯示，狂犬病病毒僅 1 個血清型，因此，歷經一個世紀以來所使用的疫苗都是通用的。在中國狂犬病病毒依演化分析結果可區分成 5 群：第 I 群（犬源）遍佈各主要流行省區，第 II 群（鼬獾）主要分佈於南方省區，第 III 群見於廣西、雲南，與東南亞分離株同源性 97.7%，第 IV 群在東北、中原、東南和西部地區均零星報導，毒株少。第 V 群偶見於內蒙東北部及黑龍江省俄接壤地區，與俄羅斯遠東及韓國流行株同源性高達 98.5%。至於第 VI 群蝙蝠狂犬病毒係屬於 IRKV 群見於東北。在中國狂犬病病毒感染的能力分：（一）野毒株（field isolate）= 街毒（street virus），毒力有較明顯差異：犬源 BD06 株感染致死率達 100%，鼬獾分離株 JX08-45 及 JX09-17 感染致死率為 0-50%。（二）固定毒：強毒（CVS），中間毒（Flury-LEP），弱毒株（ERA），低毒（genetically engineered，SAG-2、ERA2g333）。

大陸地區狂犬病的發生情形：（一）在人狂犬病方面：中國衛生部門將狂犬病列為乙類傳染病管理，1950 年開始病例報告。經歷了幾次流行起伏。跨入 21 世紀，疫情重新快速增長，2001 年和 2003 年增長最快（75.6%和 71.3%），2003 年突破 2000 例，2007 年達到頂峰。目前流行趨勢為：1. 主要在農村：2005-2014 年間在 22,555 例有記錄的病例中，96.77%的病例分佈在農村地區，其中 80.81%分佈在

村莊（如圖 24）；2.南往北擴散：疫情上升階段，病例主要分佈在南部，疫情下降階段，與高發生省份相鄰的雲南、海南和重慶，病例數呈現上升趨勢。北部的青海、甘肅、寧夏、陝西、山西、山東、河北、北京、天津、遼寧和內蒙古等疫情上升省份在地理位置上緊密相連，顯示疫情在北部省份呈現擴散態勢；3.東向西擴散； 4.流行地向非流行地擴散；5.中間向外擴散。 2005-2012 年間，北京共報告病例 41 例，狂犬病呈現波動上升的趨勢，2012 年北京市報告 13 例狂犬病例，成為 2005 年以來發病率最高的一年。全年均有病例報告，夏秋季發病相對多於其他季節；（二）犬狂犬病方面：中國犬隻預估飼養數量約 8,000 萬-13,000 萬隻，其死亡犬數無從得知，而死亡動物中狂犬病的比例亦不清楚，且沒有健全監測網或是監測網內沒有狂犬病案例資料可查，雖有監測計畫，但相關經費實在有限，且監測實驗室之數量與作用亦相當有限，而在幾個主要大城市之監測數量才較為明確。（三）貓的狂犬病方面：占人狂犬病死因的 4%-5%。貓不會連續攻擊人類，因此其其實際發病數可能大於同期統計的人類死亡數字。（四）牛的狂

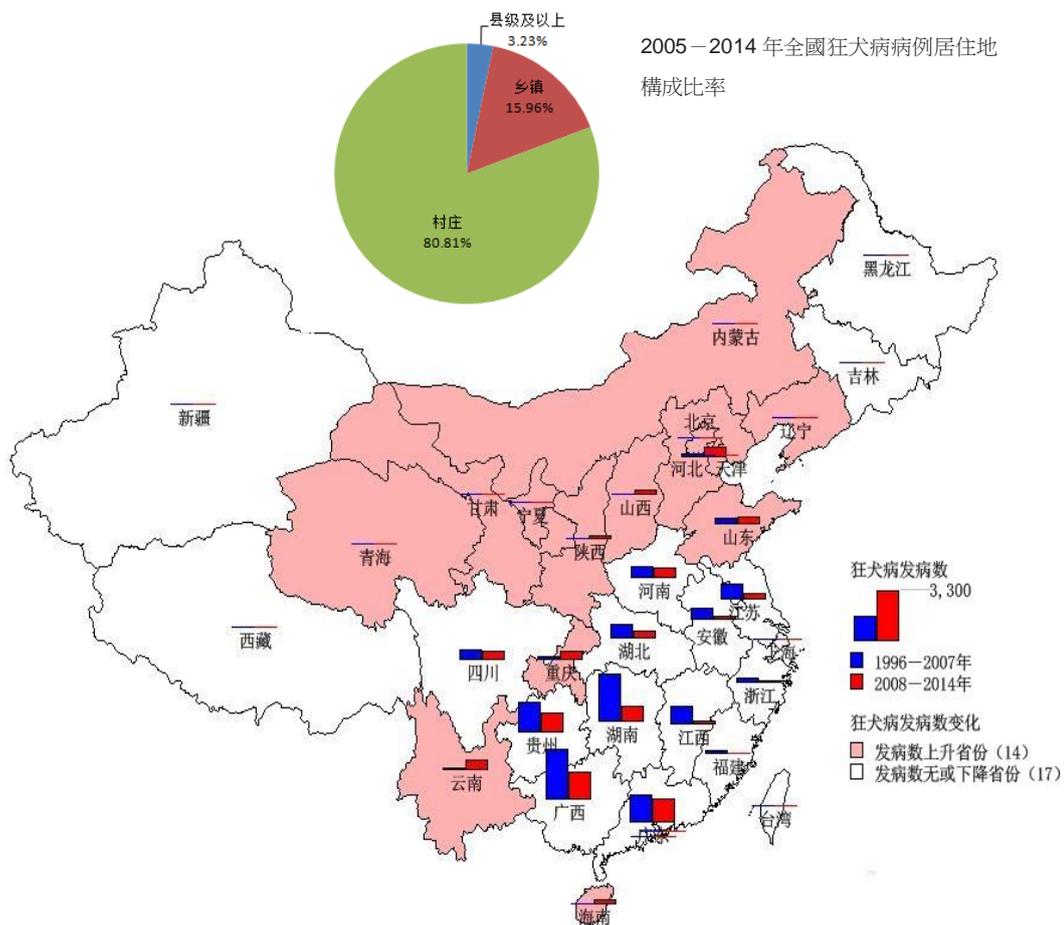


圖 24. 1996-2007 年與 2008-2014 年狂犬病病例地理分佈及消長情形

犬病方面：過去幾年一直延續至今，數量不少，草原散養牛（肉牛），主要由狐（從西向東）引起，而集中飼養的奶牛，則主要由犬（從南方擴散）引起；而該牛病死前主要症狀有發熱，反芻減少，食欲降低，起臥不安，出現興奮性和攻擊性動作，衝撞牆壁，磨牙流涎，怪叫（呻吟），出現麻痺症狀，表現為吞咽困難，伸頸，最終臥地不起，衰竭而死，而疫情於 2015 年實施免疫疫苗後得到控制。（五）駱駝狂犬病方面：由狐和犬咬傷引起，和牛的狂犬病流行區域重疊，臨床上可見吼叫及口部泡沫樣唾液。野生動物的狂犬病：（一）鼬獾狂犬病方面：鼬獾為貯存宿主和傳播宿主（溢出到人的情況），鄱陽湖周圍地區均有流行，其對犬的致死率相對於犬型小很多，約為 0%-40%（如表 3）；（二）狐、狼、貉的狂犬病方面：因為退耕還草，治沙，鄰國冬天缺糧及植被增多，生態改善，生物（食物）鏈建立造成犬科野生動物數量的恢復。

表 3. 鼬獾狂犬病病毒對犬的致病性

Group	Lineage	MICLD ₅₀ log 10 (0.03mL)	Fatality/Total	Mortality (%)	
Shaanxi-HZ-6 (n = 5)	Group I	5.4	4/5	80%	犬型
ZJ12-03 (n = 5)	D	4.5	2/5	40%	
ZJ13-431 (n = 5)	D	4.6	1/5	20%	鼬獾型
JX13-189 (n = 5)	A	4.9	0/5	-	
JX13-417 (n = 5)	B	4.5	0/5	-	
JX13-228 (n = 5)	C	4.6	0/5	-	

在經濟損失方面，每年損失包括疫苗（1600 萬人份）約 420 億人民幣，免疫球蛋白（160 萬人份）約 20 億人民幣，另外咬傷門診、交通負擔及政府形象（不同部門責任推諉）等，實難估計。就流行原因而言，從全球範圍來看，狂犬病流行情況在不同地區可大致分為三類：第 1 類：無狂犬病國家：主要有北歐諸國、英國、澳大利亞、日本、新加坡等國家；第 2 類：狂犬病病人很少的國家：肇禍動物主要是野生動物，如美國從 1960 年至上世紀 80 年代，年死於狂犬病的只有

0~4 人；第 3 類：狂犬病在犬及人群中流行：如亞洲的印度、中國等國家，疫情嚴重，流行廣泛，主要原因在於沒有針對狂犬病嚴格的法律，沒有國家層面的宣傳與足夠的資金支持，百姓也不太重視（尤其農村），且非地方防疫部門的重點疫病。因此，在防控做法上，大陸現階段應強化的重點：包括 1. 行政管理部門應有正確的宣傳及強制的規定；2. 養犬人及社區、鄰居社會力量應該被動員；3. 防疫部門應提供疫苗注射和技術服務；4. 監督部門應針對疫苗、免疫及病例進行監測。

六、反向遺傳重組狂犬病載體疫苗研究及展望

本議題由哈爾濱獸醫研究所帥磊博士介紹大陸在反向遺傳重組狂犬病載體疫苗研究及展望，其說明幾乎所有的人類狂犬病死亡病例均由犬所傳播，而日益增多的流浪犬、散養家畜和野生動物，構成了狂犬病流行區人間感染狂犬病的最主要的傳染源，應用口服疫苗，是控制或消滅散養動物和野生動物狂犬病，切斷人類狂犬病傳染源最有效的措施。目前在大陸狂犬病口服疫苗研究與應用現況，可分：（一）弱毒疫苗：1. ERA、SAD-B19：用於紅狐、貉……等，對成年嚙齒動物及貓有一定的致病性，對貓和臭鼬免疫無效（Baer et al., 1971; Steck et al., 1982; MacInnes et al., 2001; Nunan et al., 2002; Rosatte et al., 2007）；2. SAG-1、SAG-2：用於狐、貉、多種嚙齒動物、郊狼、水貂、貓鼬、犬……等，劑量大，成本高；口服免疫誘導的中和抗體轉陽率低、持續期短；知識產權限制（Cliquet et al., 2006; Cliquet et al., 2007; Fekadu et al., 1996; Follmann et al., 1996; WHO, 2013）。（二）重組疫苗：1. ONRAB®（HAdV5-RVG）、CAdV2-RVG：用於浣熊、灰狐、臭鼬……等，口服免疫動物後誘導的 RABV 中和抗體力價較低，且有免疫耐受（Knowles et al., 2009; Wold et al., 1995）；2. Raboral V-RGTM（V-RG）：用於郊狼、灰狐、浣熊、臭鼬……等，感受性動物廣泛，有生物安全隱憂，僅用於野生動物；一次口服免疫效果不佳，對臭鼬、貓鼬及犬保護力有限（Fischer et al., 2006; Grosenbaugh et al., 2007; Rupprecht et al., 2005），目前僅 SAG-2 和 V-RG 滿足 WHO 對 ORV 的推薦要求；SAG-2 已獲得印度官方批准為犬狂犬病口服疫苗，但免疫效果尚不確定；而大陸方面目前批准使用的狂犬病活疫苗有 ERA 和 LEP 株 2 種，均具明顯噬神經性和殘留毒性，不能達到 OIE 和 WHO 注射及口服疫苗安全標準。因此，迫切需要研製安全、有效，能對犬提供持久保護的狂犬病口服疫苗。

本項研究係對狂犬病 ERA 株進行分子修飾成為 rERAG_{333E}，並進行一連串的

生物學特性、生物安全性和免疫原性研究，初步評估了 rERAG_{333E} 作為犬狂犬病口服疫苗的可行性。其作法係將 G333 位點的精氨酸 (R) 突變成谷氨酸 (E)，經過在 BSR 細胞上生長試驗所繪製的曲線顯示該修飾株 G333E 突變保持 ERA 株良好的培養特性 (如圖 25)。在乳鼠腦內接種傳 5 代和神經細胞接種傳代 20 代，對其測序顯示該修飾株遺傳性穩定，而經過嗜神經指數的測定發現該修飾株失去了體外嗜神經性 (如圖 26)。再者，參照 WHO 推薦對狂犬疫苗安全性評價方法，對核心動物小鼠進行顱內接種進行致病力評價；即將親本株和修飾株分別以 10⁵ 或

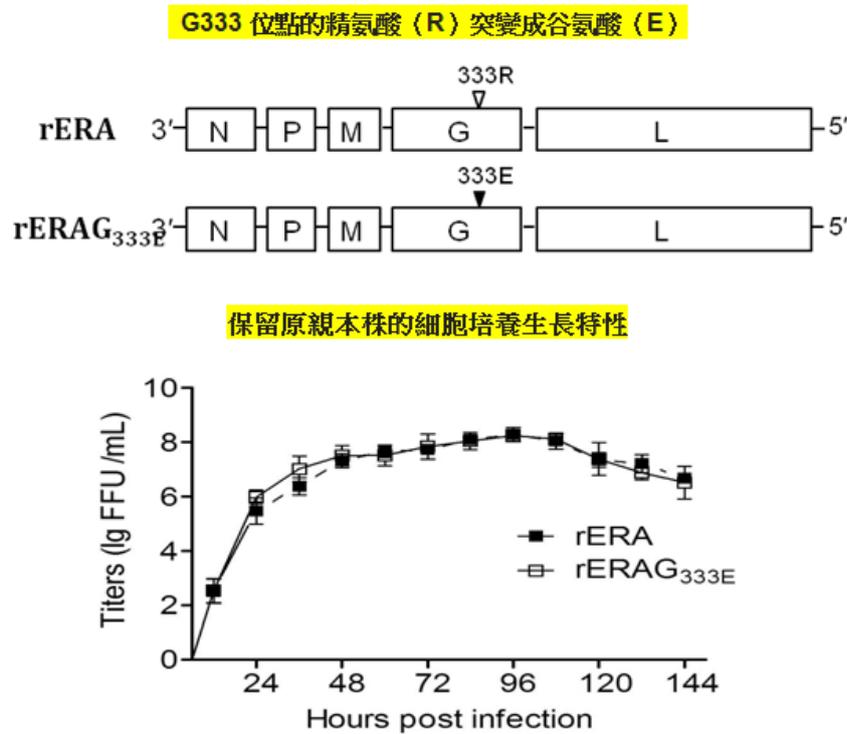


圖 25. 分子修飾的狂犬病 ERA 株 (rERAG_{333E}) 的體外生長特性

Viruses	Titers (lg FFU/mL)		Neurotropism index ^a
	NA	BSR	
rERAG _{333E}	8	8	0
rERA	8.6	8.2	0.4

^a: 嗜神經指數 (NI)，RABV 分別在 NA 細胞和 BSR 細胞上滴度的對數之差。

圖 26. 分子修飾的狂犬病 ERA 株 (rERAG_{333E}) 的體外嗜神經性測定

10⁶ 腦內接種 4 週齡小鼠，連續觀察 28 天，親本株組小鼠於 14 天完全致死，而修飾株組無發病或死亡情況，說明 G333E 突變失去了 ERA 株對 BABL/c 成年小鼠上的致病力（如圖 27）。同時，按相同的劑量分別腦內接種 3 日齡乳鼠，發現修飾株組乳鼠的死亡進程延遲 2 天，說明 G333E 突變降低了 ERA 株對乳鼠上的致病力，又對修飾株進行了小鼠肌肉接種的免疫原性評價，將疫苗株 10 倍梯度稀釋，以 10²~10⁵ FFU 分別肌肉接種 6 週齡小鼠，免疫後 3 週採血，並進行攻毒實驗，參照 WHO 標準採用 FAVN，也就是螢光抗體病毒中和試驗方法檢測血清狂犬病毒中和抗體；利用狂犬街毒 GX/09 株，按 50MLD₅₀ 的劑量肌肉接種進行攻毒實驗，除 10² 免疫組外修飾株組小鼠的中和抗體均在 1IU 以上，並獲得完全攻毒保護，顯示出該修飾株具有良好的免疫原性和攻毒保護效果，同時，也按 10⁶ 劑量肌肉接種比格犬，3 週後補強免疫，按月採血以測定中和抗體力價，持續監測 1 年發現肌注 1 年後所有的犬血清抗 RABV 中和抗體力價均在 1IU 以上（0.5IU 為不活化疫苗免疫後的強毒攻擊保護臨界點），該突變株保留原親本株對小鼠和比格犬肌肉接種的免疫原性，隨之進行小鼠口服接種的免疫原性評價；分別按 10⁶、10⁷、10⁸ 劑量的修飾株口服接種小鼠，口服接種小鼠後能誘導高力價且持續 1 年的中和抗體；免疫 1 年後以強毒攻擊，結果小鼠獲得完全保護。

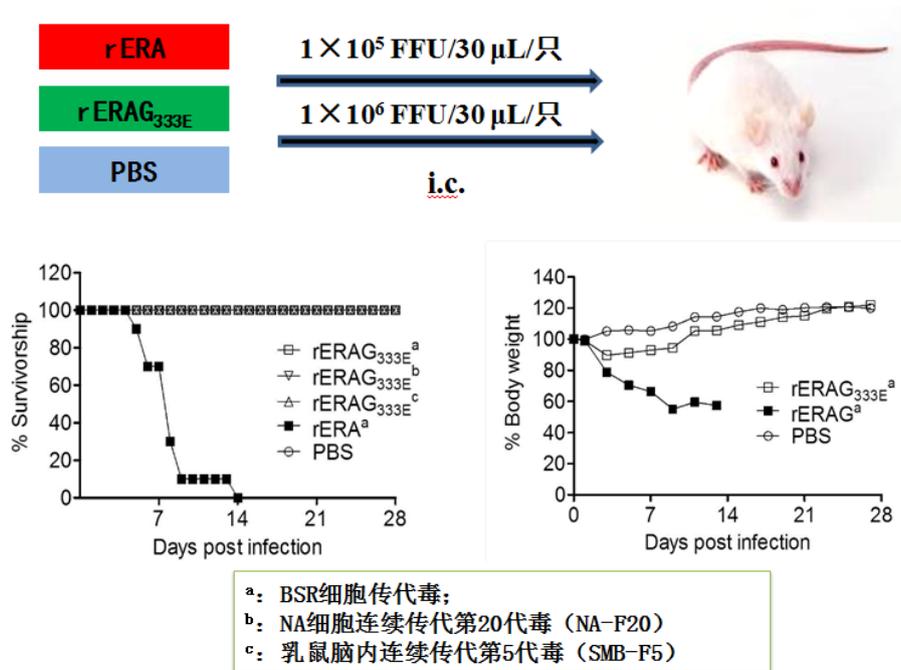


圖 27. rERAG_{333E} 對成年小鼠致病力的評估

在評估修飾株可否成為犬候選口服疫苗方面，按 $10^8 \sim 10^9$ FFU 的劑量口服接種比格犬，二免疫組於第 1 次免疫後 55 週進行補強免疫，1 次口服免疫高低劑量均能誘導持續 3 年以上的狂犬病病毒中和抗體，並且力價均在 0.5IU 以上，補強免疫組的結果顯示犬在加強免疫後誘導顯著的免疫記憶效應，並且中和抗體能保持高力價、持續 2 年以上（如圖 28）。同時，檢測犬唾液狂犬病特異性 IgA 反應，高低劑量組均能產生一定的唾液 IgA 轉陽率，表明該修飾株對犬能誘導一定水準的特異性黏膜免疫反應。

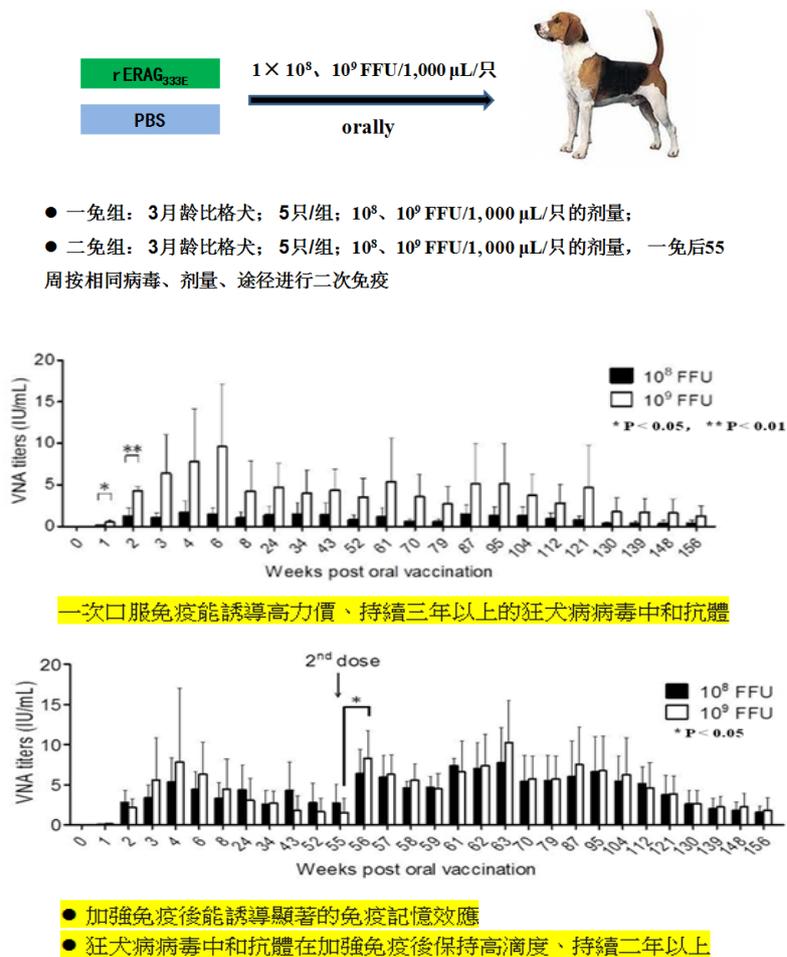


圖 28. rERAG_{333E} 對比格犬口服接種免疫原性評估

總結：1. G333E 突變保持 ERA 疫苗株良好的細胞培養特性，在乳鼠腦內和神經細胞接種傳代遺傳穩定； 2. G333E 突變使 ERA 疫苗株失去嗜神經性，以及對成年 BABL/c 小鼠上的致病力； 3. rERAG_{333E} 株對小鼠和比格犬肌肉接種，均顯示良好的免疫原性； 4. rERAG_{333E} 株口服免疫小鼠誘導持久、高水準中和抗體反應並提供完全攻毒保護； 5. rERAG_{333E} 株口服免疫比格犬，能誘導持續 3 年以

上的中和抗體反應，以及特異性黏膜 IgA 反應。根據以上實驗結論顯示 ERA 修飾株具有良好的安全性、遺傳穩定性和免疫原性，是一株有希望的候選狂犬病口服疫苗株；該毒株已獲得農業部轉基因微生物生產應用安全證書，未來更將爭取拿到新獸藥證書。

七、以犬瘟熱病毒之反向遺傳學操作平台構建活毒載體疫苗之研究

本議題由扈榮良教授研究室李智麗博士介紹以犬瘟熱病毒之反向遺傳學操作平台構建活毒載體疫苗之研究，其說明犬瘟熱 (canine distemper, CD) 是由犬瘟熱病毒 (canine distemper virus, CDV) 感染犬或其他食肉目動物引起的高度接觸傳染性、致死性疾病。感染動物以呈現雙相熱型、鼻炎、嚴重的消化道障礙和呼吸道炎症等為特徵，少數病例可發生腦炎，此病分佈於全世界，是當前危害養犬業、皮毛動物養殖業和野生動物保護業最嚴重的疫病之一 (如圖 29)。病毒基因體為不分節段的單股負鏈 RNA，長為 15,690 nt，具有 3' 前導序列和有 5' 尾隨序列。3' 前導序列長為 107 nt，5' 尾隨序列長為 106 nt。蛋白編碼區按 3' 5' 依次為 N-P-M-F-H-L 6 個結構蛋白開放閱讀框，其中 P 蛋白編碼基因可通過移碼、RNA 編輯產生非結構蛋白 V、C。各蛋白功用分別為，H：吸附細胞表面受體並啟動膜融合。F：協助 H 蛋白完成膜融合。M：參與病毒的裝配過程。N：每個 N 蛋白結合 6 個連續的核苷酸。P：在核衣殼中起橋樑的作用。L：RNA 依賴的 RNA 聚合酶。

中國農業科學院長春獸醫研究所目前已完成建立犬瘟熱病毒弱毒株 CDV-L 反向遺傳學操作平臺。以犬瘟熱病毒弱毒株 CDV-L 基因組為載體表達外源基因，探究其作為活病毒疫苗載體的能力。其研究內容主要有三項重點步驟：(1) 犬瘟熱病毒弱毒株 CDV-L 反向遺傳學操作平台的構建；(2) 以犬瘟熱病毒弱毒株 CDV-L 基因組為載體表達外源基因 EGFP；(3) 表達狂犬病毒 G 蛋白的重組犬瘟熱病毒株 CDV-RV-G 的構建及其生物學、免疫學研究。而犬瘟熱病毒拯救系統需要構建四個質體，分別為 N、P、L 蛋白的表達載體及病毒基因組全長 cDNA 分子克隆載體，以表達三個蛋白的，其過程需要將病毒基因組由 cDNA 分子形式還原為 RNA 分子形式，鑑於 RNA 分子不穩定性，爰選擇體內轉錄的方式，並採用傳統的 T7 RNA 聚合酶轉錄系統，以提供方式多元、穩定且效率比較高的細胞系建立方法 (如圖 30)。

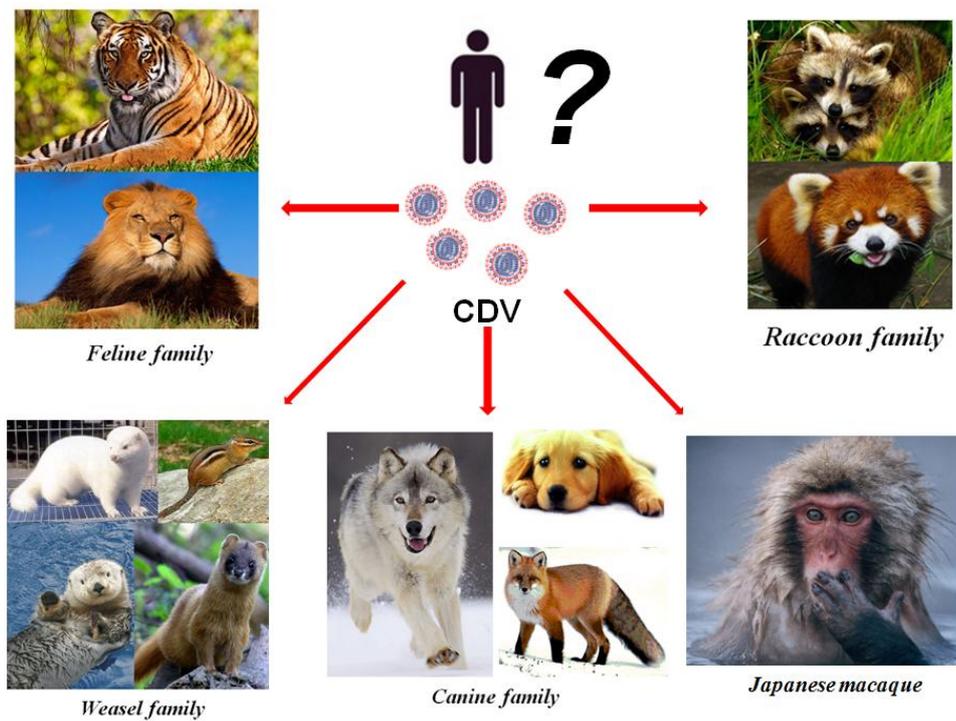


圖 29. 犬瘟熱分佈於全世界，危害犬隻及多種野生動物

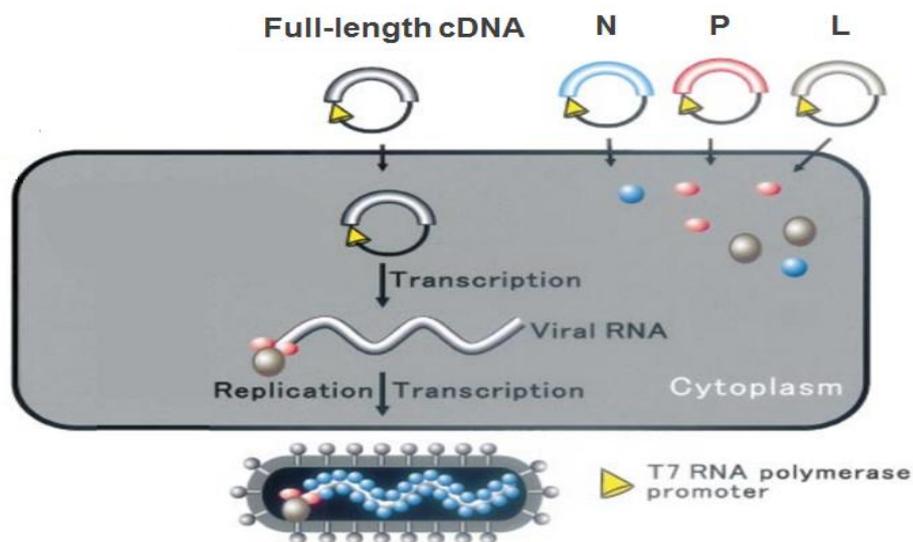


圖 30. 構建 4 個載體及 1 株穩定表達 T7 RNA 聚合酶的細胞株

在犬瘟熱病毒弱毒株 CDV-L 反向遺傳學操作平台的構建方面之重要步驟，包括：(一) CDV 全長基因組 cDNA 中長片段擴增；(二) 構建 CDV-L 全長基因組 cDNA 克隆載體：利用 in-fusion 技術分兩步依次將 CDV-L 各 cDNA 片段相連接

入 pBluescript II SK (+), 獲取 CDV-L 全長基因組 cDNA 克隆載體 (如圖 31); (三) CDV-L 各輔助質粒構建; (四) 細胞系的選擇; (五) T7 RNA 聚合酶功能; (三) CDV-L 各輔助質粒構建; (四) 細胞系的選擇; (五) T7 RNA 聚合酶功能驗證; 1. 構建表達 T7 RNA 聚合酶的載體 pcDNA3.1-T7; 2. 載體 pcDNA3.1-T7 的功能驗證; (六) 穩定表達 T7 RNA 聚合酶的 BHK-21 細胞株的克隆鑑定; (七) CDV-L 病毒的拯救; (八) 拯救病毒的鑑定: 為了區分母毒與新拯救的重組病毒, pB-CDV 構建過程中透過於病毒基因組第 11,375 位點的突變引入酶切位點 KpnI; (九) 拯救病毒 rCDV-L 的生長曲線; (十) 拯救病毒 rCDV-L 穩定性的鑑定等。

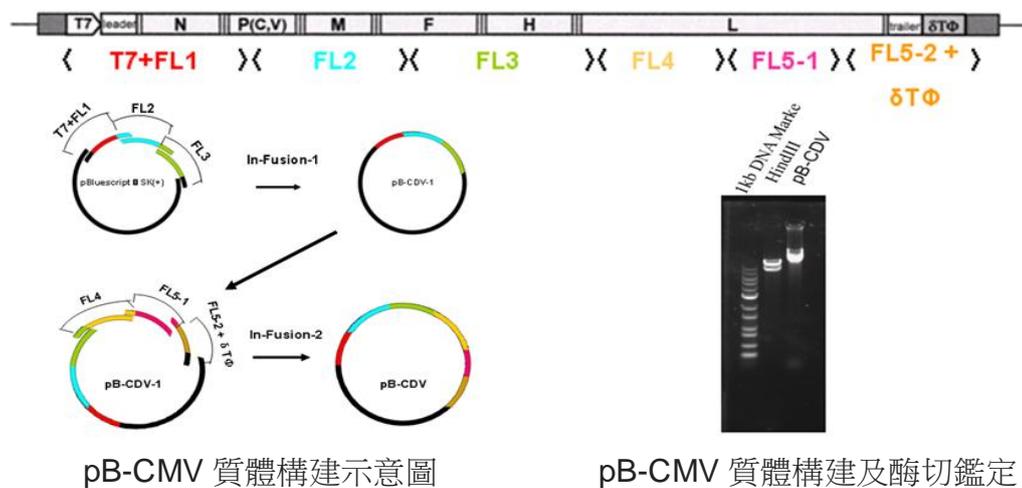


圖 31. 構建 CDV-L 全長基因組 cDNA 克隆載體

在以犬瘟熱病毒弱毒株 CDV-L 基因組為載體表達外源基因 EGFP 方面, 包括 5 項重點工作: (一) EGFP 重組 CDV 基因組全長 cDNA 克隆的構建; (二) 重組病毒 ICDV-GFP 的拯救; (三) 重組病毒 rCDV-EGFP 穩定性鑑定; (四) 拯救病毒 rCDV-EGFP 的生長曲線; (五) 重組病毒 rCDV-EGFP 穩定性鑑定等。

在表達狂犬病毒 G 蛋白的重組犬瘟熱病毒株 rCDV-RV-G 的構建及其生物學、免疫學研究方面, 包括 5 項重點工作: (一) 含外源基因 RV-G 的重組犬瘟熱病毒基因組 cDNA 全長克隆的構建; (二) 重組病毒 rCDV-RV-G 的鑑定; (三) 重組病毒 rCDV-RV-G 生長曲線的繪製: 作法上與表達外源基因 EGFP 相同, 而重組病毒 ICDV-RV-G 生長曲線於免疫後 96 小時, 即可達到與母源株相同的 TCID₅₀ 之力價 (如圖 32); (四) G 蛋白插入重組病毒 rCDV-RV-G 囊膜; (五) 重組病毒 rCDV-RV-G 免疫原性研究: 1. 將犬瘟熱病毒與重組病毒分別以 5×10⁴ TCID₅₀ 的劑

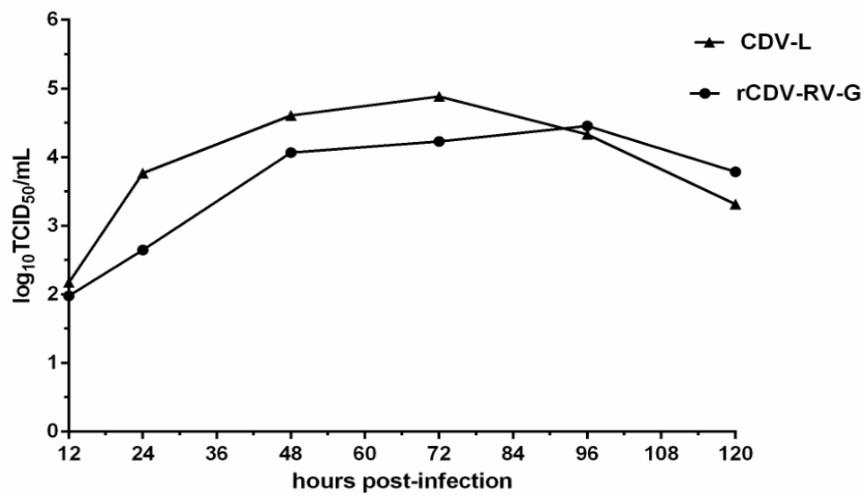
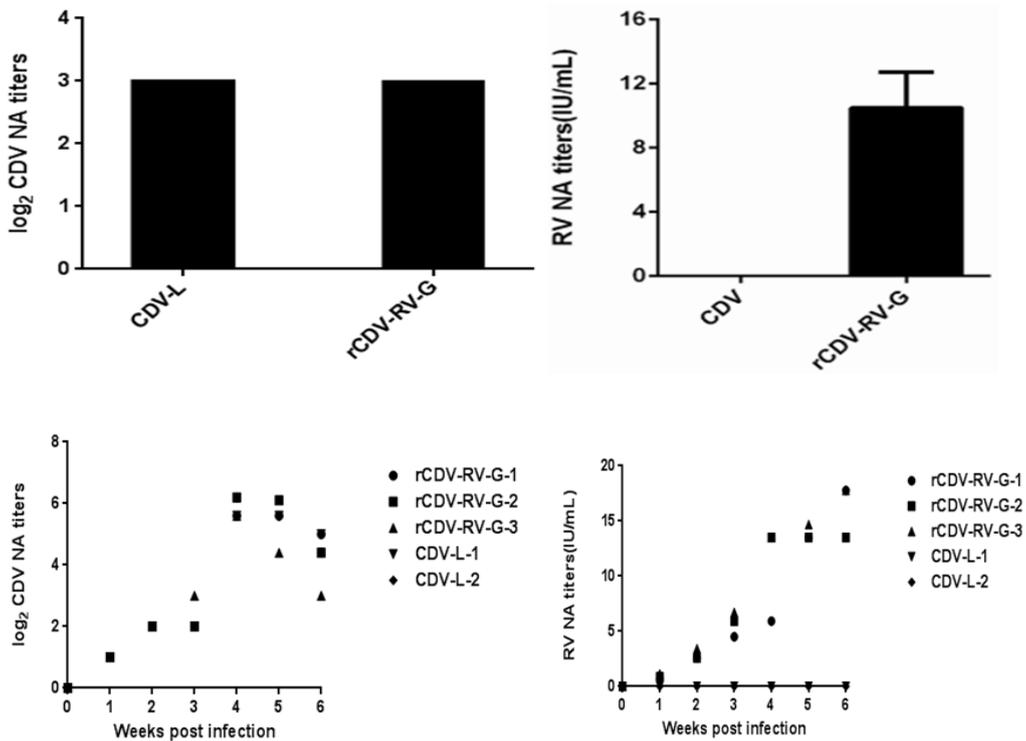


圖 32. 母源株與拯救病毒株 rCDV-RV-G 感染 Vero 細胞的生長動力學曲線



免疫幼犬體內 CDV 中和抗體效價測定

免疫幼犬體內 RV 中和抗體效價測定

圖 33. 重組病毒 rCDV-RV-G 免疫原性研究

量，經小鼠後腿腓腸肌肌肉注射，每組 10 隻小鼠，1 週及 3 週後，以相同劑量、相同方式再次注射。首次免疫 5 週後，分離獲取小鼠血清用於 CDV、RV 中和抗體效價測定（如圖 33）；2. 將重組病毒和犬瘟熱病毒以 10⁵ TCID₅₀ 的劑量，經肌肉注射途徑免疫幼犬，每組 3 隻幼犬。3 週後，以相同劑量、相同方式再次注射。實驗為期 6 週，每週分離獲取幼犬血清用於 CDV、RV 中和抗體效價測定（如圖 34）。目前已完成免疫原性分析，結果顯示本劑接種幼犬 4 周後可誘發 5 IU 之高抗體力價。

八、狂犬病口服疫苗及口服免疫研究

本議題由中國農業科學院長春獸醫研究所扈榮良博士介紹狂犬病口服免疫和免疫監測現況，其首先說明大陸與美國每年在狂犬病的防疫經費比較，雖彼此犬隻數相當，但所耗費之經費大陸確是美國的 21 倍，而高達 420 億元，其主要的耗費即在人疫苗的使用上（如表 4）。

表 4. 大陸、美兩國狂犬病防控每年所需費用

比較內容	中國大陸	美國
人不活化疫苗產量	14,000,000 人份	2000 人份
犬的數量	8,000 萬-1.3 億隻	6,992.6 萬-7,800 萬隻
動物狂犬病活毒疫苗	2 種活毒疫苗	無
動物狂犬病不活化疫苗	2011 年以前無（現在有 5 種犬用疫苗）	9 種犬用、6 種貓用、2 種野生動物用疫苗
狂犬病疫苗生產總費用	420 億人民幣	3 億美元（約 20 億人民幣）
疫苗主要應用範圍	人	犬等動物
死亡人數	2,000-3,000 例	0-5 例

在狂犬病疫苗之種類方面，可分：1. 由未經改造的完整病毒製備的疫苗；2. 人工致弱病毒疫苗；3. 病毒活載體重組疫苗；4. 病毒抗原亞單位疫苗和多肽疫苗；5. 細菌活載體重組疫苗；6. 重組核酸疫苗；7. 其它疫苗研究策略等。而目前大陸具備之狂犬病疫苗生產能力，包括：人用狂犬病疫苗十幾家企業年產

1400-1600 萬人份（換算成動物疫苗） 1400×5 （支） $\times 3 \sim 6 = 7000$ 萬 $\times 3 \sim 6 = 2.1 \sim 4.2$ 億頭份；在動物狂犬病疫苗方面：4 家（英特威、梅裡亞、富道、維克）進口不活化疫苗 400 萬頭份、國產不活化疫苗：7 家 2,000 萬頭份、8 家國產活疫苗、準備生產口服疫苗預計有 2 家，目前尚無野生動物狂犬病疫苗生產。其中影響狂犬病疫苗效力的因素須要注意的有：1.毒株的使用和篩選；2.生產技術（傳統的轉瓶培養）：懸浮或微載體；3.病毒濃縮；4.佐劑：氫氧化鋁膠、水包油、鹽佐劑；5.免疫增強劑；6.穩定劑等。

狂犬病口服疫苗種類可分：傳統篩選獲得之狂犬病疫苗（如 Flury、ERA、SAD B-19、SAD Bern、SAD-P5/88、Vnukovo-32、SAG1、SAG2）、反向遺傳獲得之狂犬病疫苗（主要策略有 G 基因突變、插入 2 或 3G 基因、插入細胞因素（ICAM-1）或免疫調節因數（IFN- γ ）及插入標記基因等方式）、重組疫苗（如犬腺病毒為載體、犬瘟熱病毒為載體、犬副流感病毒為載體、犬皰疹病毒為載體、痘苗病毒載體（VRG）、人 5 型腺病毒載體（AdG）、新城病毒載體及豬泡疹病毒載體等），其他種類尚有：不活化的口服疫苗、聚丙交酯或乳酸交酯-共乙交酯微球、蓖麻毒素 B 鏈融合糖蛋白在番茄毛根中表達、糖蛋白加細菌腸內毒素、轉基因玉米表達糖蛋白等等。

在口服疫苗組成方面，（一）疫苗部份：目前安全的活毒疫苗株有 SRV9、SAD-B19、SAG1 及 SAG2；餌料部份：製備食餌的材料在大規模用於野生動物時應避免使用可能攜帶病毒的成分；食餌形狀、硬度和重量應當充分考慮，較重和堅硬的食餌在從空中投放時可能造成致死性傷害；較為尖銳的食餌包裝可能在靶動物狼吞虎嚥地攝食時卡在喉嚨中；人尤其是兒童在接觸食餌後的安全性也應考在內；食餌的大量生產能力和食餌的費用應該在設計時給予考慮。同時需要安全標記及免疫（攝食）標記（四環素）。（二）口服疫苗餌料之研究方向：1.食餌大小：例如 SAG2 是 $4.9 \times 4.4 \times 1.5$ cm 重量最高為 28.1 公克；2.安全性：形狀、硬度和重量應當充分考慮；3.穩定性：抗性或耐受性；4.病毒劑量和穩定性：穩定劑、自然抗性病毒載體、抗性較強的選擇株。（三）口服疫苗的給予或投放方面，大致可分：1.手工—適用於城市或居民密集農村的流浪動物免疫（動員防疫人員和社區）；2.飛機—使用於森林、草原、保護區等（專門的公司，國家大量投入）：按標的及非標的動物種類及密度決定投放密度，例如：用於狐狸之投予量為 7-25 個餌料/平方公里；欲達 70% 狐狸，60% 臭鼬攝入則需投予 35 個餌料/平方公里；500 多隻狗，79% 的攝入需投 369 個餌料/60 平方公里；74% 狐狸、54%

臭鼬、43%浣熊、85%叢林狼的攝入需投 18-120 個餌料/平方公里，欲達 92%為浣熊血清，對於臭鼬血清 96% 需投 150 個餌料/平方公里。

新型疫苗的研發與應用，主要是靠口服疫苗的發展，關鍵是靠國家認可和扶植，近年來越來越受到關注即投入相當多的研究。就口服疫苗的歷史與種類：1960 年代開始有口服疫苗的概念，其後於 1971 年即有用於狐狸的 SAD 口服疫苗 (Baer et al, 1971)；1976 年瑞士用於狐狸膠囊與雞頭之 SAD Bern 口服疫苗，以及用於狐狸的無病原性之 SAD B19 口服疫苗；1988 年用於歐美的 SAG1(SAD Bern mutant) 口服疫苗；SAG2 (McAb screened, 2 mutations at 333 from SAD Bern) 口服疫苗 (如圖 34)。針對狂犬病病毒本身篩選獲得的疫苗株有：Flury、ERA、SAD B-19、SAD Bern、SAD-P5/88、Vnukovo-32、SAG1、SAG2，主要都是透過反向遺傳操作獲得 G 基因上的突變、插入雙 G 基因、插入細胞因子或免疫調節因子、插入標誌基因等方式獲得 (如圖 35)。

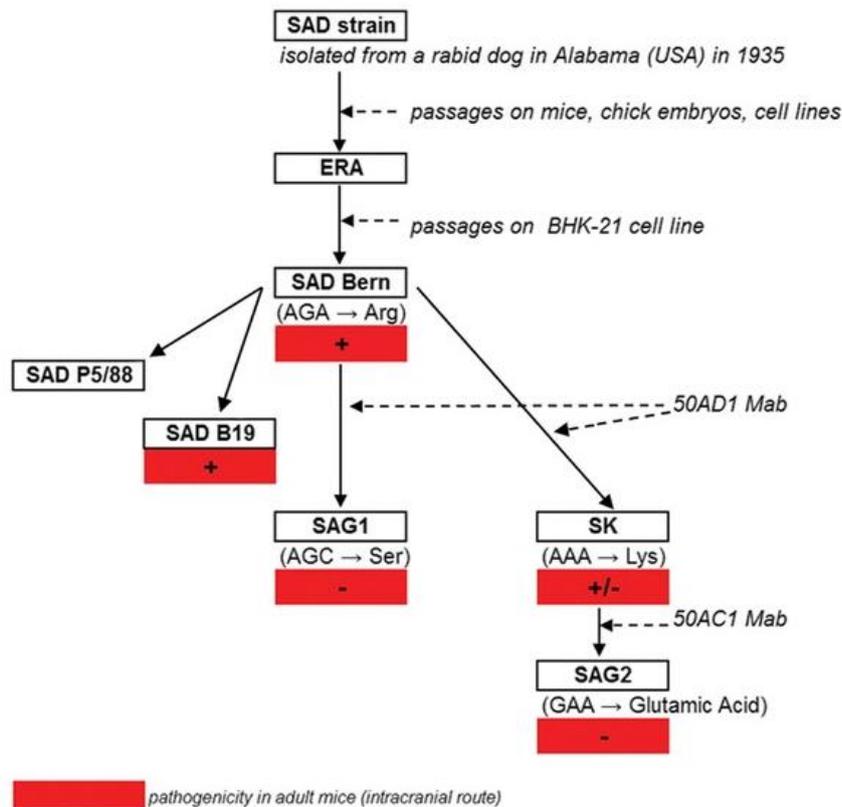


圖 34. 口服疫苗的發展歷史與種類

主要策略

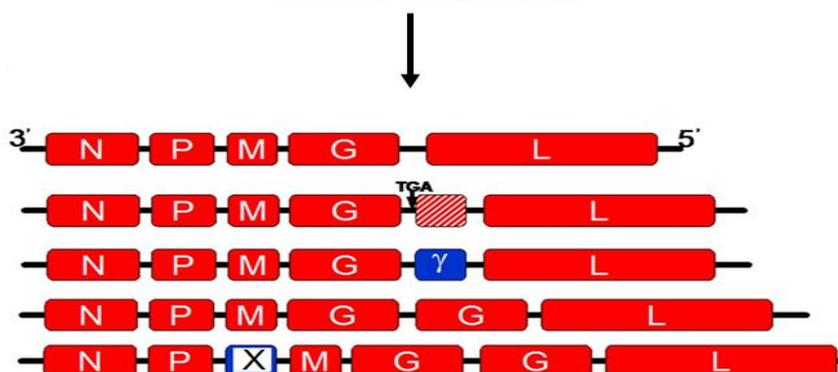


圖 35. 透過反向遺傳操作獲得口服疫苗株之策略

基於開發犬源型病毒疫苗的重組疫苗，可運用之載體有：(一) 犬腺病毒為載體：目前在中國大陸有長春獸醫研究所扈教授研究團隊投入相關研究，以口服方式可誘發 87.8% 抗體陽轉率（如表 5、表 6、圖 36）；(二) 犬瘟熱病毒為載體：目前有中國農業大學、哈爾濱獸醫研究及長春獸醫研究所扈教授研究團隊投入相關研究；(三) 犬副流感病毒為載體；(四) 及犬疱疹病毒為載體等。

表 5. 犬接種腺病毒基因重組疫苗及抗體誘導

接種途徑	犬隻數	免疫隻數	抗體陽轉率	2 年內 抗體保護水平
口服疫苗	96	90/96	79/90 (87.8%)	72/90(80.0%)
疫苗點鼻	46	46/46	40/46 (87.0%)	36/46(78.3%)

表 6. 狗口服腺病毒基因重組疫苗的攻毒結果和陰性對照

組別	不同接種時間後狗的死亡數量					存活犬隻數
	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週	
口服免疫	0	0	0	0	0	10
陰性對照	0	6	3	0	0	1

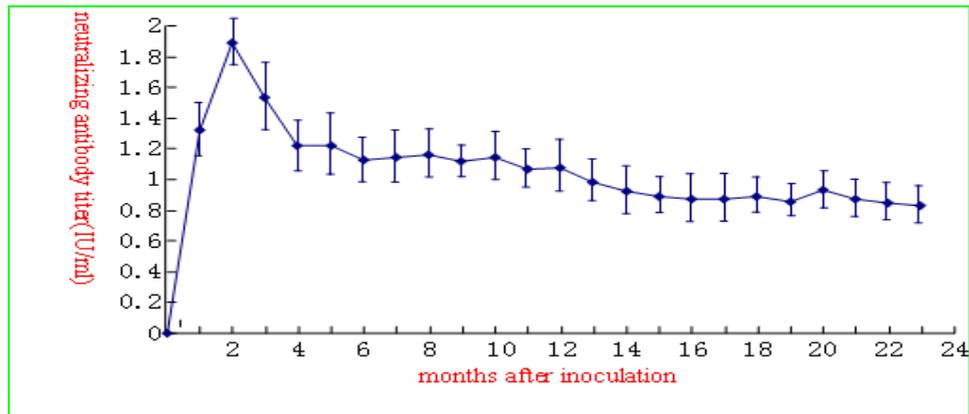


圖 36. 犬接種腺病毒基因重組疫苗抗體的生產和持久性

在異源性病毒載體疫苗：(一) 痘病毒載體 (VRG)：已有商品化疫苗，於加拿大安大略省使用 V-RG 餌料疫苗控制浣熊、臭鼬、狐狸狂犬病 (如圖 37)；(二) 人 5 型腺病毒載體 (AdG)：ONRAB (Ontario Rabies Vaccine Bait) 為歐美多國使用之商用狂犬病口服載體疫苗；(三) 新城疫病毒載體 (如圖 38)；(四) 豬疱疹病毒載體等等。

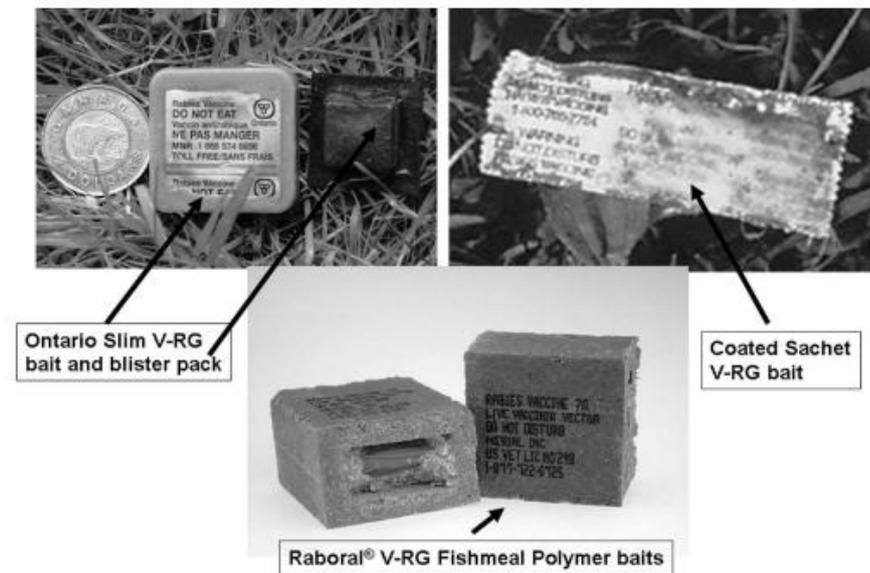


圖 37. 痘病毒載體口服疫苗 - VRG

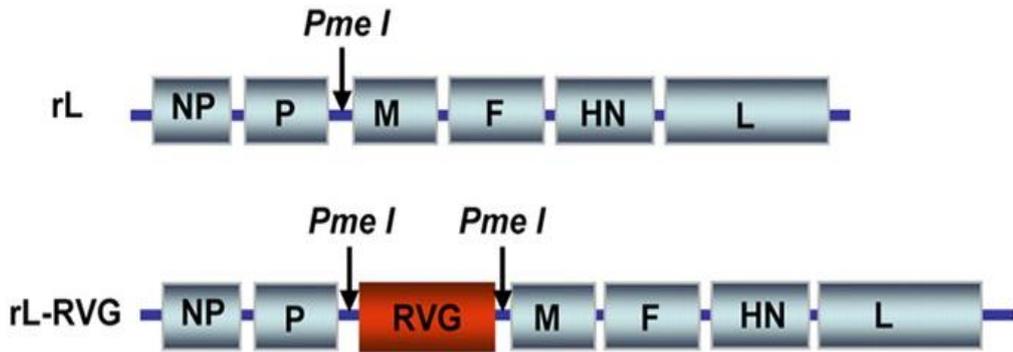


圖 38. 新城疫病毒載體插入位點

其他口服疫苗，尚有：(1) 不活化疫苗的口服：係應用奈米技術之聚丙交酯或乳酸交酯 - 共乙交酯微球，使不活化疫苗經口服途徑誘發產生狂犬病中和抗體；(2) 蓖麻毒素乙鏈融合糖蛋白在西紅柿毛根中表現誘發抗體的蛋白；(3) 糖蛋白+細菌腸內毒素；(4) 轉基因玉米表達糖蛋白。

在口服疫苗的組成方面：(1) 疫苗：安全的活毒疫苗株 (SRV9、SAD-B19、SAG1、SAG2) (所述 SAG2 菌株的液體懸浮液，用一個滴度 $\geq 10^8$ CCID₅₀/劑量 (CCID₅₀=細胞培養感染劑量 50%) 的載在 PVC/鋁泡罩被嵌入在一個誘餌；(2) 餌料：誘食 (誘餌是從油脂作為結合媒介混合魚粉及天然魚香氣提升適口性，以石蠟為形狀和防潮的混合物製成的聚合物，以提供從飛機或直升機投下之機械阻力所需，且以四環素 (150 毫克/餌) 為攝取的生物標記物；(3) 安全標記，以防誤食；(4) 免疫 (攝食) 標記：以四環素為確定攝食之標記。口服疫苗的研發，包括餌料組成的專門研究、安全性、穩定性 (抗性或耐受性) 及病毒劑量與穩定 (如水解酪蛋白衍生物等防護材料、自然抗性病毒載體、抗性較強的選擇株) 等，都是影響其免疫成效的關鍵。口服疫苗的生產，包括：疫苗填充、餌料包被、疫苗餌料之冷卻及疫苗產品包裝 (如圖 39) 及疫苗的質量檢驗和控制。

疫苗的給予或投放，可分：(一) 手工—適用於城市或居民密集農村的流浪動物免疫 (動員防疫人員和社區)：大陸曾針對鄉村犬及流浪犬嘗試以手投方式評估其免疫成效 (如圖 40)，SAG2 口服疫苗在印度進行過口服試驗，目前均屬於試驗性質；(二) 飛機—使用於森林、草原、保護區等 (專門的公司，國家大量投入) (如圖 41)。

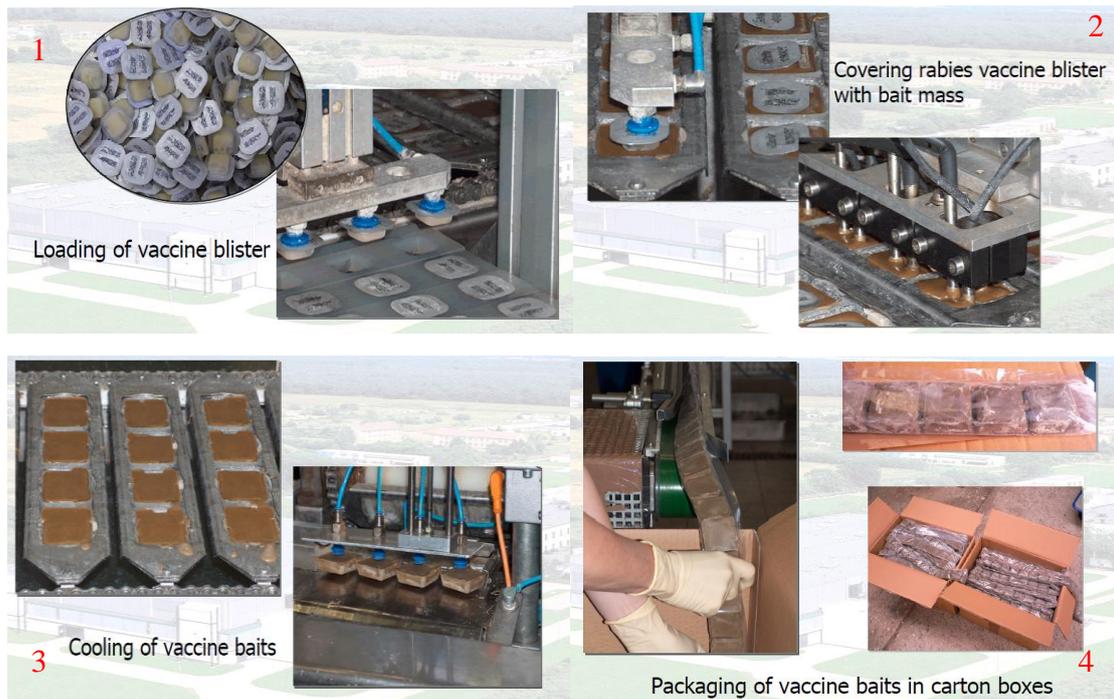


圖 39. 口服疫苗之食餌生產過程

犬口服的實驗性研究



圖 40. 犬使用口服疫苗之可行性評估



圖 41. 口服疫苗的給予之航空投放

在疫苗食餌投放密度方面，(一) 狐狸：7-25 個餌料/平方公里；(二) 70% 狐狸，60% 臭鼬：35 個餌料/平方公里；(三) 500 多隻狗，79% 的攝入量：369 個餌料/60 平方公里；(四) 獲得 74% 的狐狸、54% 的臭鼬、43% 的浣熊及 85% 叢林狼的接受：需 18-120 個餌料/平方公里；(五) 92% 浣熊血清及 96% 臭鼬血清抗體呈陽性反應：150 個餌料/平方公里。該等設計須參酌目標動物與非目標動物之密度及種類。

致於鼬獾的免疫方面，大陸擁有的其他口服疫苗株弱毒活疫苗 (ERA2g333)、SRV9-LP、SAG3副流感病毒、犬瘟熱病毒、麻疹病毒載體、新城疫病毒載體。鼬獾的口服犬腺病毒載體疫苗，須考量新鮮的食物構成、食餌的適口性、免疫試驗問題，以及口服疫苗對人群的安全性（顯然 RABV 的弱毒株不太合適）。其口服免疫結果，如表 7、8：

表 7. 鼬獾口服疫苗免疫前後之抗體檢測結果

分組	編號	免疫後時間	FAVN檢測結果 (IU/ml)	
			免疫前1	免疫後1
SRV9	51	8d	0	2.6
	52	9d	0	2.6
	53	14d	0.29	0.66
	54	8d	0.13	3.42
	55	10d	0	0.39
	56	8d	0.29	3.42
	57	10d	0	0.87
	58	8d	0.13	1.97
	59	6d	0.29	0.66
	60	9d	0	1.97
CAV2-G	61	11d	0.13	1.14
	62	13d	0	0.5
	63	14d	0.29	0.87
	64	9d	0	1.5
	65	9d	0.29	0.87
	66	7d	0.13	0.5
	67	6d	0.29	2.6
	68	10d	0	0.87
	69	4d	0.13	0
	70	4d	0	0

表 8. 鼬獾口服疫苗免疫後之抗體消長情形

Animal grouping and number	Rabies virus neutralizing antibodies (IU/ml)		
	Day 0	Day 14	Day 21
Group 1 (CAV-2-E3Δ-RGP n=20 鼬獾重组疫苗免疫结果	0	1.36	1.97
	0	0.29	0.22
	0	0.22	0.29
	0	0.50	0.66
	0	0.50	0.50
	0	1.50	1.36
	0	0.29	0.87
	0	0.87	0.66
	0	0	0.22
	0	1.14	1.36
	0	0.87	1.14
	0	0.87	0.87
	0	0.50	0.50
	0	2.60	2.60
	0	1.14	1.97
	0	0.66	0.87
	0	1.50	1.50
	0	0	0.66
	0	1.36	1.14
	0	0.66	0.66
Mean ± SD	0	0.84 ± 0.62	1.00 ± 0.64

Group 2 (SRV9) n=20 鼬獾RABV弱毒免疫效果	0	0.13	1.50
	0	0	0.50
	0	0.22	0.22
	0	0	0.10
	0	0.22	4.50
	0	0.29	2.60
	0	2.60	2.60
	0	0.39	0.39
	0	0.87	1.14
	0	1.97	1.36
	0	0.66	0.66
	0	0.87	3.42
	0	0.29	2.60
	0	0.29	0.66
	0	1.97	1.97
	0	2.60	3.42
	0	0	0.13
	0	0.66	0.87
	0	1.14	1.14
	0	2.60	2.60
Mean ± SD	0	0.90 ± 0.91	1.62 ± 1.28

在口服疫苗免疫的檢測方面，野生動物經常須進行捕捉及採樣（如圖 42），一般於（1）疫苗免疫效果測定時；（2）動物國際間運輸時；（3）動物由疫區轉運至非疫區時；（4）寵物更換主人時；（5）寵物主人想知道免疫水平時（監測個體） - 確定是否須補強免疫；（6）免疫普查或流行病學監測（隨機抽樣監測群體免疫覆蓋率）-分析流行風險、指導免疫；（7）懷疑動物感染狂犬病等之時機實施，OIE 將 0.5IU/ml 作為中和抗體的最低保護效價，抗體效價在該水平以上即可判為具保護效果。



圖 42. 野生動物的捕捉及採樣

抗體檢測方法：第一類，病毒中和試驗：（1）小鼠的血清中和試驗（時間長）；（2）細胞病變中和試驗（時間長）；（3）空斑減少中和試驗（時間長）；（4）快速免疫螢光灶抑制試驗（RFFIT）；（5）螢光抗體病毒中和試驗（FAVN）-OIE。第二類，抗原 - 抗體間接凝集試驗（非特異性強）；（6）間接血凝試驗；（7）反相間接血凝試驗；（8）乳膠凝集試驗；第三類，間接酶或螢光標記檢測法（非特異性強）；（9）間接免疫螢光試驗；（10）ELISA 檢測。目前長春獸醫研究所已成功開發競爭 ELISA 套組試劑，一步反應即可完成，約 45 分鐘，一次可檢測 40 個樣品，並已申請大陸方面註冊。

未來實驗室的研發方向，在應用方面：包括狂犬病診斷試劑（FAT，dRIT，RT-PCR）、狂犬病抗體監測試劑（FAVN，CELISA）及狂犬病不活化疫苗（常規，增效）研發等相關技術；在應用基礎方面：狂犬病重組疫苗載體和疫苗構建之研究（腺病毒、副流感病毒、犬瘟熱病毒和疱疹病毒載體等）；在基礎方面：強化狂犬病的流行病學和分子流行病學，以及狂犬病的感染和抗感染（重大發現）的研究；公益性項目：包括抗體監測服務與協助狂犬病防控知識的普及化。

九、研習狂犬病抗體監測之競爭型 ELISA 試驗

本議題由軍事醫學科學院軍事獸醫研究所扈榮良教授實驗室研究團隊介紹其開發競爭型 ELISA 檢驗套組之法，係以中和抗體間競爭、一步反應、45 分鐘，每次可檢測 40 個樣品，目前已註冊為商品化的狂犬病競爭型 ELISA 套組試劑（RABIES competitive ELISA kit），可用於監測高狂犬病病毒感染風險之野生動物或家犬（貓），使用疫苗後的體內抗體變化，目前 OIE 僅認可 Platelia Rabies II kit（Bio-Rad）為例行檢測使用之套組試劑。該套組試劑使用純化的狂犬病病毒外套膜糖蛋白作為抗原，檢測結果由分光光度計於特定波長下讀取吸光強度，吸光強度換算 equivalent units（EU） ml^{-1} ，該套組試劑檢測專一性與標準檢測分析方法 FAVN（fluorescent antibody virus neutralization）相較，高達 98% 的一致性，檢測敏感度與 FAVN 相較為其 92.4%-94.5%（狐狸）與 83%（家犬或家貓），不同實驗室間檢測結果再現性極高。（Servat et al., 2007; OIE, 2007; Feysaguet et al, 2007; Servat et al, 2008）。市面上亦有使用純化的完整病毒，或持續表現狂犬病病毒外套膜糖蛋白之細胞作為抗原，針對家犬、家貓開發的競爭型 ELISA 套組（Abbexa）或檢測方法（Nicholson et al., 1982; Esterhuysen et al., 1995; Zhang et al., 2009），其檢測專一性及敏感度尚需更進一步測試分析。

套組試劑使用流程如下：稀釋之樣本（唾液、血清或脊髓液）與定量之狂犬病病毒特定抗體混合，一同與抗原盤中的狂犬病病毒抗原反應之後，加入呈色劑先驅物質，藉由狂犬病病毒特定抗體上帶有的酵素將呈色劑先驅物質催化形成有色物質，以分光光度計於特定波長下讀取該有色物質吸光強度，吸光強度越強，則代表樣本中的抗狂犬病抗體含量越低，相關檢測步驟試劑套組說明書。美國（夏威夷、關島以外）、法國、德國等疫區國家，採用競爭型 ELISA 套組試劑於例行監測疑似感染家犬（貓）或野生動物（狐狸）。

狂犬病競爭 ELISA 抗體檢測試劑套組說明書

通用名：狂犬病競爭 ELISA 抗體檢測試劑套組

英文名：Rabies competitive ELISA kit for antibody assay

成分	裝量	數量
抗原包被板	96 孔	1 塊
10X 酶標抗體	600 μ l	1 管
0IU/ml 對照血清	110 μ l	1 管
0.5IU/ml 對照血清	110 μ l	1 管
1.0IU/ml 對照血清	110 μ l	1 管
顯色液	10ml	1 瓶
20X 洗液	10ml	1 瓶
終止液	5ml	1 瓶
說明書	1 份	1 份

作用與用途：用於檢測血清中的狂犬病病毒抗體

用法與判定：

1 用法：

1.1 樣品的保存和運輸：

1.1.1 樣品的保存：所有待檢血清樣品在 2~8 $^{\circ}$ C 保存應不超過 24 小時，長期保存時，-20 $^{\circ}$ C 已下為宜。

1.1.2 樣品運輸：一定要放置在有冰塊的冷藏包中，保持全程冷鏈運輸。要求在運輸至實驗室時冰仍未完全溶化。

1.2 血清樣品處理：56 $^{\circ}$ C 水浴不活化 30 分鐘後，5000r/分鐘離心 1 分鐘，每份樣品取 110 μ l 進行檢測。

1.3 檢測：

1.3.1 將 20X 洗液全部加入 190ml 純化水中，稀釋成 1X 洗液。將 10X 酶標抗體 3000r/分鐘離心 5 秒，取 600 μ l 加入 5.4ml 1X 洗液中，混勻，做為工作酶標抗體。

1.3.2 打開鋁塑複合袋，取出抗原包被板，按 200 μ l/孔將 1X 洗液加入各孔，3 分鐘後，棄洗液。重複 2 次後，在吸水紙上拍乾。

十、大陸 OIE 狂犬病參考實驗室-參訪參考實驗室之規範與管理

本議題由軍事醫學科學院軍事獸醫研究所暨中國農科院長春獸醫研究所研究員及世界動物衛生組織（OIE）狂犬病參考實驗室負責人涂長春主任介紹參考實驗室之規範與管理，其說明狂犬病與及野生動物與人共通疾病診斷實驗室於 2005 年由農業部正式批准成立，並展開流行病學調查、監測、診斷、疫情應急處理、技術培訓與諮詢，在疫病控制中發揮著參考實驗室的作用，並於 2012 年正式成為“OIE 狂犬病參考實驗室”，其主要任務，包括：疫情應急處置、流調與監測、實驗室確診、疫苗評價、科學研究、技術培訓、公眾諮詢與宣傳、狂犬病實驗室檢測技術、三位一體檢測技術、實驗室診斷全覆蓋、狂犬病實驗室診斷、病毒抗原檢測、病毒核酸檢測及血清學檢測。

在實驗室能力建置方面，係遵循 ISO/IEC17025：2005 之檢驗能力標準，其實驗室規範化管理，首先須建立健全標準化操作程序；再者，實驗標準操作程序，包括：1. 臨床樣品的處理；2. 熒光抗體實驗（FAT）；3. 套式 RT-PCR 方法；4. 螢光定量 PCR 方法；5. 螢光抗體中和實驗（FAVN）；6. 乳鼠腦內接種實驗（MIT）；7. 組織培養分離實驗（RTCIT）；8. 病毒滴度測定實驗（TCID₅₀測定）；9. 毒株保藏標準操作規程。儀器設備使用標準操作程序，包括：1. 高速離心機操作規程；2. 顯微鏡操作規程；3. 熒光顯微鏡操作規程；4. 製冰機操作規程；5. 二氧化碳培養箱器操作規程；6. 超低溫冰箱操作規程；7. 電子天平期間核查規程；8. 電熱恆溫培養箱操作規程；9. 自動化核酸提取工作站操作規程；10. 組織破碎儀操作規程；11. 全自動控溫水浴鍋操作規程；12. 生物安全櫃操作規程；13. 實時定量 PCR 擴增儀操作規程；14. 多功能酶標儀操作規程；15. pH 計使用操作規程；16. 濃度測定儀操作規程；17. 高壓滅菌器操作規程；18. ISOcage 通氣籠操作規程。另須定期接受國際實驗室間比對試驗。

在建立健全規章制度方面，包括 1. 檢測實驗監督工作計畫；2. 實驗室安全檢查記錄；3. 廢棄物處理記錄；4. 試劑採購申請；5. 供應品驗收記錄；6. 毒株使用記錄；7. 細胞凍存記錄，以及其他規定之記錄。

在狂犬病實驗室安全防護方面，所有實驗室工作人員務必進行狂犬病疫苗的暴露前免疫，動物樣品操作應該在 2 級生物安全櫃中進行，操作時應帶一次性乳膠手套和穿工作服等。操作完畢應對工作檯面以及樣品可能沾染的儀器設備和工具等用消毒液擦洗消毒。所有用後剩餘的樣品、廢棄物和可能污染的實驗用品等應進行高壓滅菌處理後，再進行常規垃圾處理。另實驗室的安全級別及抗體檢

測流程，詳如表 9 及圖 43：

表 9. 實驗室的安全級別

名稱	狂犬病毒
危害程度分類	第二類
街毒病毒培養	BSL-3
街毒動物感染實驗	ABSL-3
固定毒培養 (FAVN)	BSL-2
未經培養的感染材料的操作	BSL-2
不活化材料的操作	BSL-1
無感染性材料的操作	BSL-1

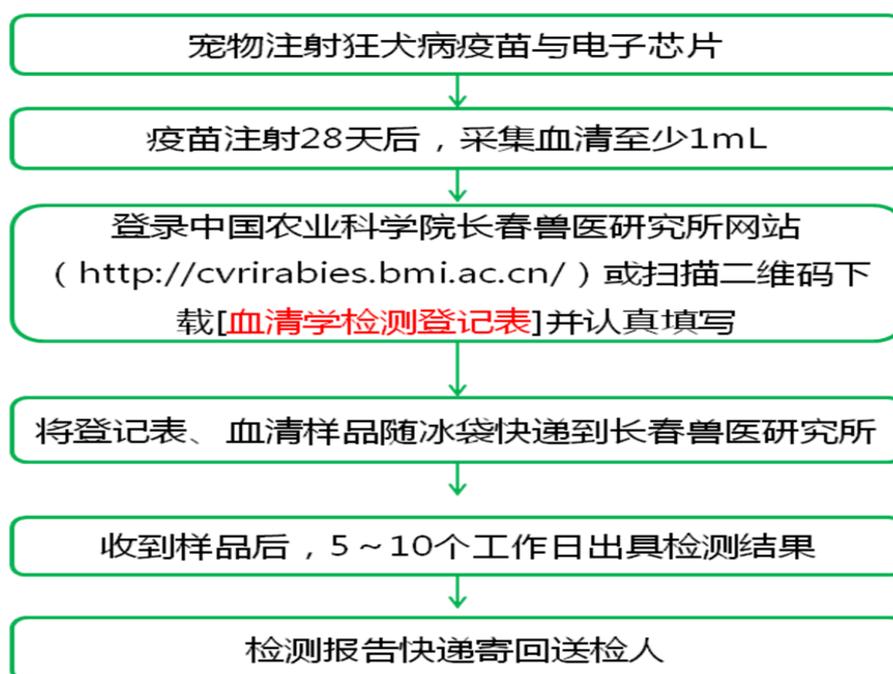


圖 43. 抗體檢測流程

該狂犬病實驗室診斷包括病毒抗原檢測、病毒核酸檢測及血清學檢測。其

中狂犬病實驗室檢測技術國際標準包括：(一)採樣技術：吸管法(腦組織)。(二)病原檢測(抗原與核酸)：包括 1.免疫螢光抗體檢測(Fluorescent antibody test；FAT)； 2.快速免疫診斷法(Rapid immunodiagnostic test；RIDT)：免疫酶技術，免疫組化法(dRIT)，其只需普通光鏡，不需螢光顯微鏡； 3.組織學檢測：Negri bodies. 已淘汰；4.核酸檢測：RT-PCR，螢光定量PCR，基因探針或晶片等；5.單株抗體測定、序列測定與種系發生樹分析。(三)病毒分離：細胞培養(RTCIT)及小鼠接種試驗(MIT)。(四)血清學檢測：螢光抗體中和實驗(FAVN)、快速螢光灶抑制試驗(RFFIT)及ELISA：各種抗體檢測試劑盒狂犬病實驗室檢測技術國際標準。

在腦組織樣品的採集方面：吸管採集法為WHO、OIE共同推薦，適合大規模的流行病學調查，適於野外採樣，操作簡單，不容易引起氣溶膠，污染面積小，涉及到的實驗器材少，取直徑0.5mm吸管，沿枕骨大孔向一隻眼的方向插入，邊插邊輕輕旋轉至不能深入為止，捏緊吸管後端並拔出，管裡即含有腦組織樣品(包括腦幹、小腦、海馬角和皮質)。

在狂犬病病毒螢光抗體試驗方面：(一)狂犬病病毒螢光抗體試驗 Rabies fluorescent antibody test (FAT)，準確性98-100%，為全球最常用的方法，且為WHO和OIE推薦之國際金標準，亦為大陸國家標準GB/T18639-2002“狂犬病診斷技術”所規範為每個實驗室的必備之技術，其特異性強、敏感性高、操作簡單，能在2小時內得到檢測結果，但是需要螢光顯微鏡、螢光素標記的抗狂犬病病毒抗體和具有經驗豐富的專業技術人員，適用於動物腦組織、延髓樣品和感染病毒的細胞的檢測。(二)直接免疫組化法 Direct Immunohistochemistry test (dRIT)：敏感性、特異性與FAT一樣，但不需螢光顯微鏡，特別適合現場檢測或發展中國家實驗室。(三)狂犬病病毒組織培養感染試驗 Rabies Tissue Culture Isolation Test (RTCIT)：WHO和OIE推薦的狂犬病診斷的確診方法，易為大陸國家標準GB/T18639-2002“狂犬病診斷技術”所規範之診斷技術，結果可靠、靈敏度高，但是費時且技術條件高。(四)乳鼠腦內接種實驗 Mouse inoculation test (MIT)：為國際標準及大陸國家標準GB/T18639-2002“狂犬病診斷技術”規範之技術，使用於可疑動物腦組織懸液通過顱內注射方式接種乳鼠，發病乳鼠的典型症狀：豎毛，鑷子夾其尾部倒提時出現震顫，行動時後腿運動失調、麻痺，最終死亡。適用於確診、病毒分離與毒力測定等方面。敏感、適用於不具備組織細胞培養條件的實驗室進行狂犬病病毒的分離。但是耗時長且生物安全條件高，不利於動物

福利。(五) 病毒核酸檢測方法：模式RT-PCR方法：OIE推薦，但不能用於確診，滿足獸醫部門對狂犬病檢測的需要，常用於進行狂犬病分子流行病學研究，大規模篩查，其檢測套組特點：1. 高檢測靈敏度，檢測底線為0.02個TCID₅₀； 2. 檢測時間短，可在8個小時內完成96份樣品的檢測工作； 3. 螢光定量PCR（Taqman RT-PCR）方法：OIE推薦，但不能用於確診，但能滿足獸醫部門對臨床樣本快速檢測之需要。將反轉錄與螢光定量PCR方法整合一步，降低交叉污染的幾率，3h內就可完成：快速、靈敏、精確定量、可重複性好，可檢測4.68個TCID₅₀的細胞毒樣品。

在不同檢測方法靈敏度的比較：模式RT-PCR、定量RT-PCR及基因晶片3種方法的檢測SRV9株細胞毒RNA，結果基因晶片的檢測靈敏度是另外兩種檢測技術的10倍，其最低檢測滴度可達到 0.158個TCID₅₀/ml，螢光定量RT-PCR方法與模式RT-PCR方法相比，靈敏度相當，均可靈敏的檢測到10^{0.2} TCID₅₀/ml力價的病毒。而不同檢測方法檢測人工腐敗性樣品：FAT能檢測到腐敗6天以內的腦組織樣品；定量RT-PCR和RT-PCR能檢測到腐敗17天以內的腦組織樣品；MIT不能檢測腐敗的腦組織樣品。環介導的等溫核酸擴增（LAMP）：克服了PCR技術需要昂貴的儀器設備的缺點，只需使用等溫水浴就可以完成所有的反應，其產物可以不需任何儀器即時觀察，非常適合於基層及現場使用。LAMP法和傳統PCR法的敏感性一致，但整個試驗過程比普通PCR法節省時間1.5小時。

在狂犬病抗體檢測方面：螢光抗體中和試驗（FAVN）快速螢光灶抑制試驗（RFFIT），為WHO和OIE共同推薦之狂犬病抗體檢測“金標準”之檢驗方法，適合於國際貿易，且可以準確定量血清中的抗體水準，因此特別適用於免疫效果評價、寵物出國抗體檢測等。狂犬病抗體膠體金檢測試紙能在20分鐘內快速判斷抗體是否達到保護效力，可以為犬免疫後的抗體監測提供參考。目前試紙條已經獲得中國國家專利，該方法正在申請獸用新生物製品。重組狂犬病病毒rHEP-eGFP，建立狂犬病病毒中和試驗檢測方法FAVN-eGFP，該方法不僅同標準FAVN一致性良好，而且無需固定、染色步驟，方便快捷。更重要的是FAVN-eGFP與CVS-11株相比，更加安全穩定，在普通實驗室中進行即可。

在鼬獾狂犬病的診斷方面，鼬獾 Chinese ferret badgers 自 1995 年起，鼬獾狂犬病在安徽、江西、浙江省等散在發生，存在狂犬病的獨立傳播循環；不同進化分支的毒株呈明顯的地域分佈；有證據表明，鼬獾與犬可能發生交叉傳播(Lei YL, 2008.Zhang S,2010. Liu Y, 2010.)。2002、2012、2013 年臺灣出現 3 例從中國大陸、

菲律賓輸入性狂犬病疫情。1999-2012年臺灣檢測的6841隻犬和2008-2012年檢測的322只蝙蝠中均未發現狂犬病病毒。2012年5月-2013年1月在臺灣分離的3株RABV毒株均屬於亞洲2群(即China II)(如圖)。2007年內蒙古自治區，野生貉引起超過15只家養貉死亡。2014年內蒙古自治區，犬感染狂犬病病毒死亡。蝙蝠Bat2010年雲南、廣西、廣東和海南，蝙蝠血清狂犬病抗體陽性率2.22%(15/685)。2012年白腹管鼻蝠(*Murina leucogaster*)體內分離到伊爾庫特病毒(Irkut virus)(Jiang Y, 2010. Liu Y, 2013.)。

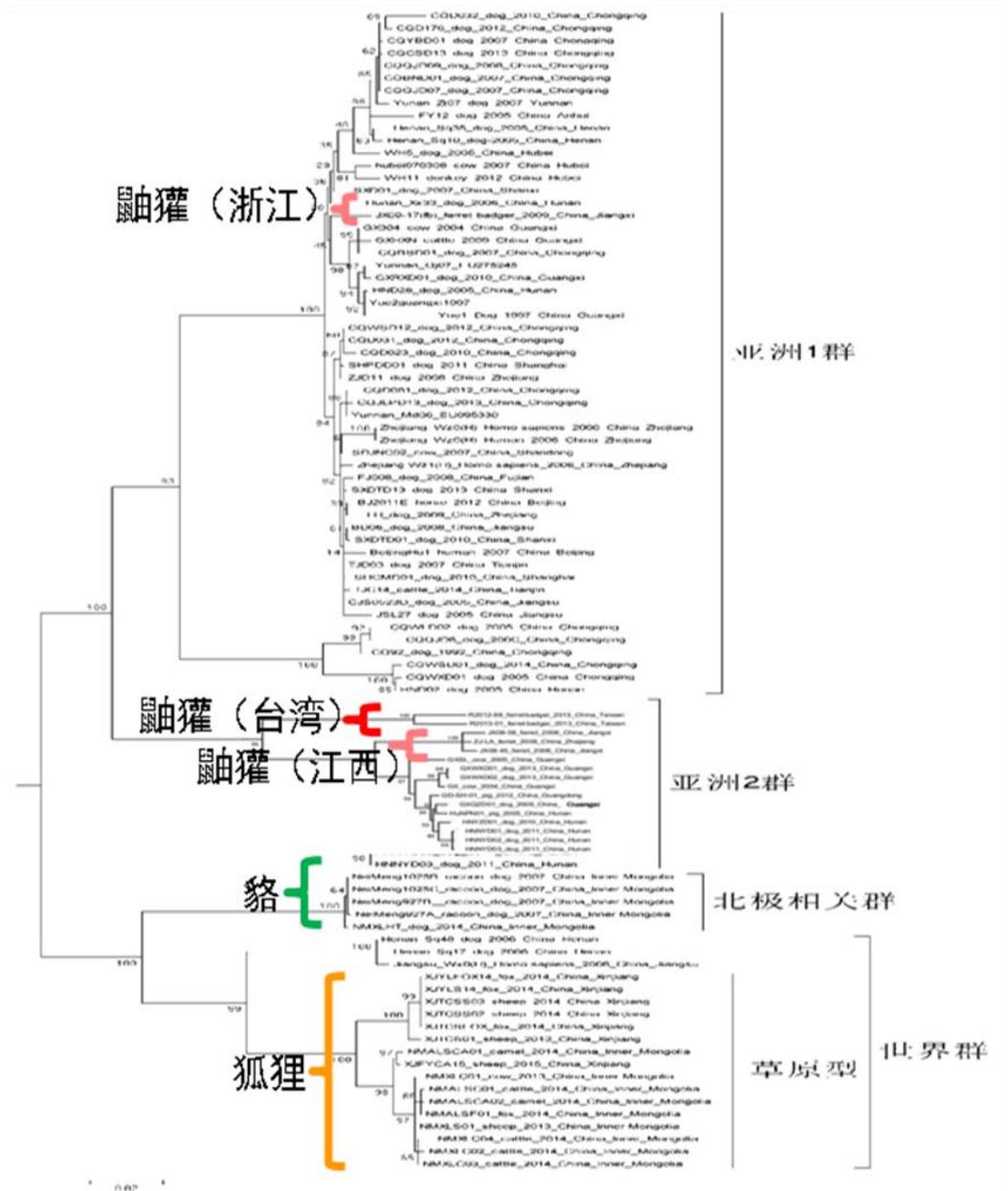


圖 44. 以 N 基因分析大陸地區野生動物與臺灣鼬獾狂犬病之種系演化關係分析

十一、 參訪吉林正業生物製劑股份有限公司

吉林正業生物制品股份有限公司（以下簡稱為吉林正業），前身為中國農科院哈爾濱獸醫研究所附屬藥廠，後更名為農牧漁業部哈爾濱獸用生物制品廠，因大陸產業形勢需求其部分搬遷至吉林市，又改名吉林省獸藥廠，後 1979 年再改為吉林省生物制品廠。2004 年獲吉林省正業集團投資，順利轉型為中英合資企業，改名為吉林正業生物制品有限責任公司，隸屬於吉林省正業集團，2009 年再更名為現今吉林正業生物製劑股份有限公司。

吉林正業現有員工約 300 人，公司主營動物用生物制品及診斷試劑等生物製劑，現有通過農業部 GMP 認證的生產線 9 條（目前尚未符合 cGMP 獲 PICs 標準），擁有年產種蛋 120 萬枚的 SPF 雞舍一座，產品 50 多種禽畜生物製劑產品，年生產能力可達 180 億劑量，包括高致病性豬藍耳病不活化疫苗及活毒疫苗（HuN4-F112 株）、狂犬病不活化疫苗（Flury LEP 株）及活毒疫苗（ERA 株）、雞法氏囊中等毒力活疫苗、雞傳染性中等毒力活疫苗、禽霍亂 B26-T1200 活疫苗、雞新城疫、雞傳染性法氏囊二聯不活化疫苗、仔豬紅痢不活化疫苗（A+C 型）、禽霍亂苗（B26-T1200 株）、馬傳貧活疫苗、禽霍亂 B26 活疫苗、法氏囊 B87 活疫苗等，是農業部指定生產豬瘟兔化活毒減毒疫苗的企業，是吉林省規模最大的獸用生物制品企業。

近年來，吉林正業先後與中國農科院哈爾濱獸醫研究所、上海獸醫研究所、長春軍事獸醫研究所、吉林大學、中國農業大學、吉林農業大學等高校和科研機構建立了產學研合作關係，共同開展新產品、新技術、新工藝的研究。2007 年全面停止生產禽用非 SPF 疫苗。2008 年與中國農科院上海獸醫研究所簽署了戰略合作協議。2010 年初建置占地面積 1000 平方米的研發中心，其中碩士研究生 23 人，高級獸醫師 5 人，中級獸醫師 13 人，與中國獸醫藥品監察所聯合研制的狂犬病純化凍乾不活化疫苗並獲得大陸政府“新獸藥證書”，逐步取代現行於農村使用之狂犬病活毒疫苗。近幾年來，該公司積極導入各種疫苗細胞懸浮培養技術之新製程，為大陸畜禽生物製劑之重要供應商之一。

肆、心得與建議

有關本次派員參與會議，與本局業務密切相關之心得與繼續努力之方向如下：

- 一、 鑑於大陸地區狂犬病發生歷史久遠，相關研究分析也進行多年，因此，海峽兩岸倘能進行合作研究，在狂犬病的防治工作必能達到事半功倍的效果。
- 二、 本次研習對於大陸的狂犬病疫情與相關研究的發展現況，獲得深刻的了解，尤其在大陸狂犬病病毒的基因演化與臺灣鼬獾狂犬病的親緣關係，惟可惜廣東等大陸南部及沿海地區野生動物狂犬病之病毒基因分析資料相當少，因此，倘欲釐清臺灣狂犬病的演化由來及時程，建議未來能透過兩岸合作機制對該等區域進行更多的研究分析。
- 三、 大陸地區分離到鼬獾狂犬病病毒大分部有其地緣關係，而最多病毒株之群別主要為分布在大陸東南的浙江、江西鄱陽湖以東一帶，但在鄱陽湖以南和以西也仍有一些病毒群分支。而將大陸地區野生動物的病毒基因加以分析比對，隨著病毒株分析陸續增加，大陸鼬獾狂犬病病毒與臺灣鼬獾狂犬病病毒間的關係亦隨之明朗，由病毒基因的種系發生樹來看，臺灣鼬獾狂犬病病毒群與大陸 China II 較為接近，就地理分布確有其合理性。
- 四、 在口服疫苗方面，國內目前為期望能早日應用於野生鼬獾的防疫工作上，現行研究都侷限於商用疫苗的評估試驗與餌料開發，然而就長遠而言，國內仍有必要進行其他包括重組或載體等口服疫苗的開發，以提供更多的防疫工具。
- 五、 扈教授開發之競爭型 ELISA 試劑對於未來口服疫苗免疫後的抗體監測工作有其實用性，值得國內參採。

伍、誌謝

感謝中國大陸農業部獸醫局及中國農科院長春獸醫研究所的協助與安排，使本次研習考察活動得以順利成行，尤其特別感謝扈榮良教授之熱心規劃與接待，使我方人員充分瞭解大陸在狂犬病防控方面之執行現況與口服疫苗的研發進展與成果。

陸、附錄

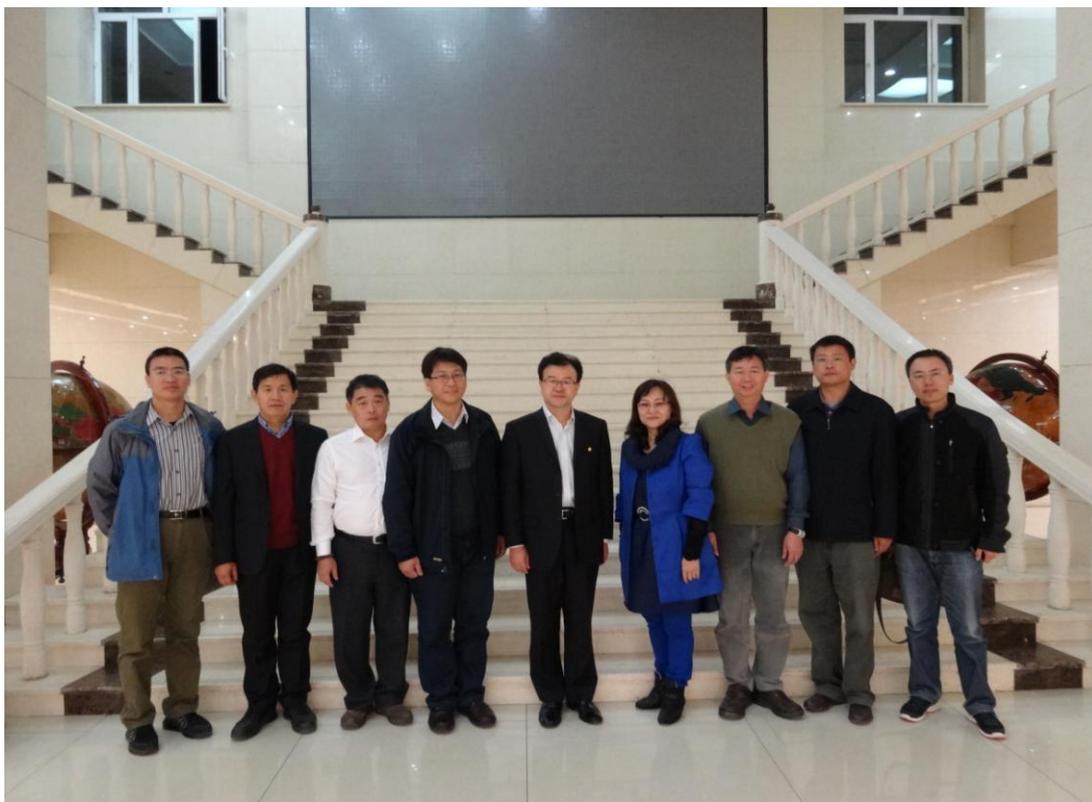


圖 1、大陸長春獸醫研究所所長錢軍及所內同仁與我方研習人員合影



圖 2、大陸長春獸醫研究所米處長及所內同仁與我方研習人員合影



圖 3、扈教授講解大陸口服疫苗之研究與發展



圖 4、參與本次研習之專家與有關研究人員



圖 5、扈教授實驗室進行狂犬病競爭型 ELISA 抗體檢測

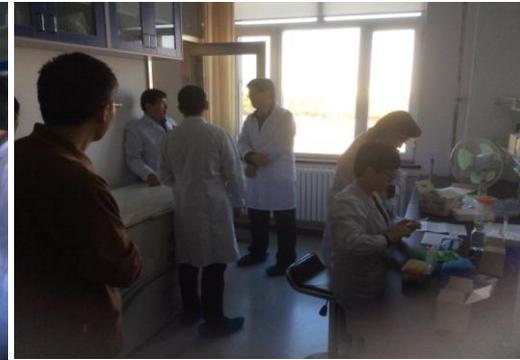


圖 6、我方李分所長瞭解該項 ELISA 抗體檢測之步驟與流程

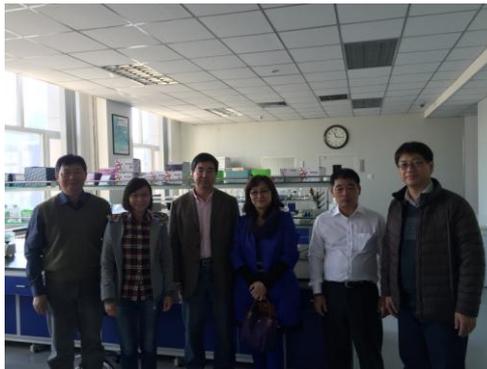


圖 7、大陸 OIE 狂犬病參考實驗室塗主任與我方人員合影



圖 8、大陸 OIE 狂犬病參考實驗室負壓實驗室資料傳遞裝置



圖 9、赴吉林正業生物製劑股份有限公司參訪



圖 10、吉林正業何副總為我方人員簡介該公司廠房之配置動線