

出國報告（出國類別：研究）

動物疾病診斷試劑方法之研究與應用

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、陳姿菡助理研究員

王群助理研究員、洪鈴柱助理研究員

派赴國家：泰國

出國期間：105 年 11 月 14 日至 105 年 11 月 18 日

報告日期：106 年 2 月 17 日

摘要

為執行第五屆臺泰農業合作會議決議事項，在泰國國家動物衛生研究所 (National Institute of Animal Health; NIAH) 的安排下，本所四名參訪人員於 105 年 11 月 14 日至 18 日赴 NIAH、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) 及獸醫研究發展中心 (Veterinary Research and Development Center; Lower Northeastern Region)(VRDC) 等機構進行實驗室技術交流。針對泰方所提供的動物試驗血清樣品進行口蹄疫結構蛋白 (SP) 與非結構蛋白 (NSP) 抗體檢測免疫色層分析測試片 (Chromatographic strip) 及口蹄疫 SP 抗體檢測酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 等測試評估，另研習泰方常使用於例行性檢測之口蹄疫結構性蛋白的液相阻斷型 ELISA(LPBE) 方法，及診斷試劑在泰國使用之相關法規及市場等進行研議。

目次

	頁碼
壹、前言與目的-----	4
貳、研習地點簡介-----	8
參、研習過程-----	10
肆、研習心得-----	18
伍、檢討與建議-----	20
陸、致 謝-----	21
柒、圖 表-----	22
捌、附 錄-----	30
玖、參考文獻-----	52

前言與目的

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急性、高度傳染性疾病。偶蹄類家畜，如乳牛、黃牛、水牛及豬感受性最高，其次為綿羊和山羊；野生偶蹄類動物如野豬、鹿及獐等之感受性亦甚高。罹病動物之主要症狀為口腔及舌頭粘膜、鼻鏡、乳頭、蹄冠、趾間皮膚產生灰白色、暗紅色水疱，然後水疱破潰、糜爛，蹄殼邊緣潰裂，甚至脫蹄。患畜拒食、嘴角有泡沫及跛行，重症者倒臥，甚至斃死，不僅產肉及產乳量大降，幼齡動物急性死亡，死亡率高，造成畜產事業極大的損失，而且畜產品之輸出完全禁絕，影響所及，上游飼料製造廠、動物用藥品、獸醫服務及畜牧資材業，下游之屠宰、肉品加工及化製業均會受到重創，為國際貿易中各國動物檢疫的首要疾病，也是各國最為重視之傳染病。本病是重要的法定傳染病，包括 O 型、A 型、C 型、亞洲一型 (Asia 1)、南非一型 (SAT 1)、南非二型 (SAT 2) 及南非三型 (SAT 3) 等七種血清型 (serotype)，每一血清型中又有多種亞型(subtype)，各血清型別間無交叉免疫保護效果。在同一地區同一動物，爆發一種血清型口蹄疫後，還是有可能爆發另一種血清型之口蹄疫，因此防疫工作須特別注意其血清型，尤其對於動物感染口蹄疫病毒後，需分析及確認動物體內血清中抗口蹄疫病毒的血清型別，以了解有無其他血清型別口蹄疫病毒感染。然而，現今全世界的口蹄疫的疫情仍以亞洲，非洲及南美洲為主。在亞洲主要分為三個分布庫(pool) ，Pool 1 以東亞及東南亞為主，口蹄疫血清型以 O 型、A 型及 Asia 1 型為主。Pool 2 以南亞為主，血清型以 O 型、A 型及 Asia 1 型為主。Pool 3 以中東及中亞為主，血清型仍以 O 型、A 型及 Asia 1 型為主。OIE 將東亞包括中、日、韓、東協及台灣等國放在口蹄疫病毒的 pool 1 區內，Pool 1 的血清型為 O, A 及 Asia1，泰國爆發口蹄疫後，經病毒培

養得知現況多屬於 O 和 A 血清型。故分析及確認動物體內血清中抗口蹄疫病毒的血清型別，仍以 O 型、A 型及 Asia 1 型的口蹄疫抗體檢測套組為主。

泰國爲了口蹄疫清除策略，農業合作部畜產發展處 (Department of Livestock Development, DLD) 國家獸醫服務建立了 1997-2020 年全國口蹄疫戰略計畫，並與東南亞及中國口蹄疫聯防計畫 (South-East Asia and China Foot and Mouth Disease, SEACFMD) 有相當程度的協調合作關係，口蹄疫的戰略計畫，其中包括現有的控制和現場獸醫清除的指令。SEACFMD 的主要目標乃希望藉由清除與控制東南亞及中國地區口蹄疫疫情，以達成增加畜牧產業的生產效率與經濟產值。該計畫主要依循「東南亞及中國口蹄疫聯防計畫 2020 路線圖」(SEACFMD 2020 Roadmap)，該圖主要描述如何於 2020 年前經由疫苗免疫達成口蹄疫清除以及維持清淨國或區域。國家口蹄疫策略提供了長期戰略，共分四期有第一期爲 1997-2001 年、第二期 2001-2005 年、第三期 2006-2011 年、第四期 2011-2015 年、第五期 2016-2020 年等，以實現消滅口蹄疫的目標。其中涉及監察計畫、診斷能力、立法及爆發時的介入和政令宣傳等。計畫包括 8 個分項，並且是互有關連的，以下爲八項策略：資源管理、法規、監測與控制、發展畜牧業和相關行業、公眾意識和溝通管道、研究與發展、國際協調與合作、監測和評估等。其中監測與控制策略的目標是使所有家畜免疫，並達到至少 80% 群體保護，以減少口蹄疫感染和傳播的風險，並增加控制和消滅疾病的能力。因此必須要執行和加強現有的疾病監測計畫，其中包含爲了檢驗疾病和維持疾病狀態的主動和被動監測。提高疫苗品質與數量，利用現有的法律，執行動物移動控制，並提高合法動物移動的效率，同時鼓勵傳統的移動，至少需有臨床上的檢查。準備好所有的口蹄疫緊急措施，如動物移動控制、消毒和治療等。然而 FMDV 的檢測市場在泰國會有一定的需求存在，2011 泰國口蹄疫疫苗調查，習慣上是施

打 O、A 及 Asia1 三價疫苗，品牌上多樣，存在各國商品，每劑約 35 泰銖，整年約有 3 千萬劑的市場，共 350 萬美金的產值，2011 年政府提撥 564 萬美金作為監控與免疫經費，因此以目前口蹄疫監測試劑的市場是取決在政府的經費投注在口蹄疫上的多寡。

探就史情，曾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 Asia1 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 及 Asia 1 三價疫苗)，主要以 O Udonthani 189/87、A Lopburi/12 或 A Sakolnakorn/97、Asia1/85 病毒株等製成三價疫苗，此疫苗是由泰國農業合作部畜產發展處獸醫生物製劑局 (Bureau of veterinary biologics; BVB) 製產，且常使用液相阻斷型 ELISA (LPBE ELISA) 評估牛及水牛之免疫性皆可達 80-90%，故至今全無病例報告發生。

近年泰國口蹄疫爆發的狀況，2011 年 44 次，2012 年降為 12 次，由 OIE 統計 2012 時，

牛隻的口蹄疫問題較為嚴重，可歸因為口蹄疫在牛隻帶原期較長，又有頻繁的的邊境交易與移動，因此問題較難以解決。在經過政府多年努力，泰國漸漸減少口蹄疫的發生，部份發生也都以小規模發生為主，全國每年大約 40-50 次左右的爆發事件，可惜的是 2014 年上半年統計已有 55 次爆發事件，再繼續分析發生省份與次數比，最多的省份是 LAMPANG，有 7 次的爆發，而其他的省分發生狀況很平均，約在 4-5 次左右，因此泰國還是零星並常態性的出現口蹄疫，這樣的狀態並非政府所樂見，但是泰國的邊境幅員很廣約 4500KM，並與鄰國的經濟動物市場密切的交易往來，在這樣的狀況下，管理不易，也因此有許多合法或不合法的動物交易在進行著，就像是不斷地將口蹄疫進口到泰國，因此短時間內泰國想要完全的進入口蹄疫非疫區還是有相當難度的。

泰國畜牧發展署資深獸醫官 Dr. SithPremashtira 曾於世界動物衛生組織 (OIE) 第21屆東南亞及中國口蹄疫次委員會會議 (21th Meeting of the OIE subCommission for Foot and Mouth Disease in South-East Asia and China) 中報告。2014年該國共有150件爆發案例，造成共7,543頭動物遭受感染，泰國西部及北部是主要的流行地區，流行病毒株仍以O、A 型口蹄疫病毒株為主。2014年共提供11,146,225劑量的三價口蹄疫疫苗供牛、水牛、豬、羊等偶蹄類動物注射。2015年二月底為止也提供了5,209,220劑量供注射。2015年更準備提供1,170,000美金的預算來執行偶蹄類動物的主動監測。此外，也會加強與周邊國家的合作，共同防疫口蹄疫的危險。

然現今畜衛所仍以 O Taiwan 97 型口蹄疫病毒做中和抗體試驗，無其他血清型口蹄疫病毒可做中和抗體試驗，對於動物感染口蹄疫病毒後，需分析及確認動物體內血清中抗口蹄疫病毒的血清型別，仍以商品化口蹄疫抗體檢測套組為主。現今的商品化口蹄疫抗體檢測套組

以 Liquid-Phase Blocking ELISA (LPBE) 及 Solid-Phase competition ELISA (SPCE) 為主。

爲了發展一套具準確及敏感性的抗體快速檢測方法，畜衛所係利用建構台灣 O 型 FMD 病毒株結構蛋白 (SP) 及非結構蛋白 (NSP) 之原核重組蛋白表現系統，藉由其產生之重組蛋白作爲檢測基質，開發抗體快檢測試片 (pen-side strips) 及 ELISA 則是利用抗原與抗體結合分析原理設計。口蹄疫抗體快檢測試片只要以一滴豬或牛之陽性血清分別進行測試，結果顯示抗體快檢測試片可檢出陽性反應，且在 15-60 分鐘內即可完 SP 及 NSP 等抗體定性檢測，該測試片也可區別診斷豬水疱病病毒 (SVDV) 抗血清之非特異性反應，對感染口蹄疫病毒 O、A、C、Asia1、SAT1、SAT2 及 SAT3 等七種血清型的牛隻 SP 及 NSP 感染血清，檢測結果均呈抗體陽性反應。

研習地點之簡介

一、 泰國國家動物衛生研究所 (National Institute of Animal Health; NIAH)：

泰國國家動物衛生研究所 (National institute of animal health; NIAH) 位於泰國首都曼谷，現任所長爲 Dr. Preecha Wongwicharn，共分 4 個主要單位，其中位於 NIAH 的實驗室單位包括 8 個部門實驗室如病理室、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與水生動物與野生動物疾病等，及 4 個支援部門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。其次是位於曼谷的北方 Pakchong Nakhonratchasima 省之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)，另位於 8 個區域的獸醫研究發展中心 (RVRDC)，及還有獸醫生物製劑檢測中心 (Veterinary Biologics Assay Center; VBAC) (圖一)。然 NIAH 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。

二、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) :

東南亞口蹄疫區域參考實驗室是此次至泰國試驗研究的主要地點，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 SEACFMD Campaign 計畫之診斷服務中心(圖二)。現任實驗室主任是 Dr. Pranee Rodtian 負責執行有關口蹄疫診斷試驗與研發工作，此次承蒙熱心提供豬及牛血清樣品，以使口蹄疫病毒抗體免疫測試片及 ELISA 能順利完成試驗研究。

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)，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) 及凝膠免疫擴散法 (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 方法有阻斷型 ELISA 及競爭型 ELISA。此外，也負責進行周邊鄰近國家口蹄疫診斷實驗室合作與人員訓練等工作。及定期對周邊9個國家(越南有兩個實驗室)包含泰國8個區域診斷實驗室計18個診斷實驗室進行能力比對測試。

三、獸醫研究發展中心(Veterinary Research and Development Center; Lower

Northeastern Region)(VRDC)：

泰國國家動物衛生研究所 (National Institute of Animal Health; NIAH)轄下的東北部下半區域(Lower Northeastern)獸醫研究發展中心(Regional Veterinary Research and Development Center; RVRDC)。NIAH 在編制上共轄有七個區域 RVRDC，包括北部上半區域、北部下半區域、東北部上半區域、東北部下半區域、西部區域、東部區域及南部區域。本次參訪之東北部下半區域 RVRDC 位於素輦省(Surin)，距泰國的首都曼谷約為 457 公里，主要管轄呵叻 (Nakhon Ratchasima)、猜也賁(Chaiyaphum)、武里喃(Buri Ram)、益梭通(Yasothon)、四色菊(Si Sa Ket)、素輦(Surin)、安納乍能(Amnat Charoen)與烏汶(Ubon Ratchathani)等 8 省獸醫事務。

研習過程

一、行程表：

本次參訪係透過泰國國家動物衛生研究所的協助進行相關安排，行程表如下：

日期	內容
11/14(一)	上午：台北桃園中正國際機場至曼谷 Suvarnabhumi 國際機場 (長榮-BR67，09:00-11:50)
	下午：曼谷 國家動物衛生研究所(NIAH) --與出席代表及研究人員座談、檢驗技術交流、實驗室參觀。
11/15(二)	曼谷、北沖(Pakchong, Nakhon ratchasima Province) 東南亞口蹄疫區域參考實驗室(RRL) --口蹄疫病毒抗體快速診斷試劑套組、抗體 ELISA 及 LPBE ELISA 之測試評估。

11/16(三)	北冲(Pakchong, Nakon rachasima Province) 上午：東南亞口蹄疫區域參考實驗室(RRL) --口蹄疫病毒抗體快速診斷試劑套組、抗體 ELISA 及 LPBE ELISA 之測試評估。 下午：至 Surin Province 參訪獸醫研究發展中心(VRDC)
11/17(四)	Surin Province 上午：技術拜訪獸醫研究發展中心(VRDC) 下午：參訪大象村及水牛農場
11/18(五)	上午：曼谷國家動物衛生研究所(NIAH) 下午：回程：曼谷-台北 (長榮- BR68 , 17:10-21:45)

二、參訪人員：

潘居祥 Chu-Hsiang Pan	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.
陳姿菡 Tsu-Han Chen	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.
王群 Chun Wang	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.
洪鈴柱 Ling-Chu Hung	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、11月14日：

當日中午抵達曼谷國際機場，下午立即驅車至 NIAH 做雙方交流，由泰方人員先自我介紹，接由本所 4 位參訪人員自我介紹。並由泰方撥放 20 分鐘的該單位 NIAH 短片介紹了解該機關的檢測項目與發展。我方人員對該影片的平板凝集測試提出針對檢測疾病的項目，泰方人員解釋該平板凝集測試主要針對檢測布氏桿菌疾病為主，因該病為泰國重要疾病。我方人員提出台灣的布氏桿菌疾病防治歷史，是嚴重人畜共通傳染病，現在該病台灣已經撲滅了。

我方人員先說明世界口蹄疫爆發的主要疫區及血清型別，經 OIE 的統計仍以血清型別 O、A 及 Asia 1 為主。故未來將以開發口蹄疫血清型別 O、A 及 Asia 1 為主的檢測套組，並開發簡易且快速的不同口蹄疫血清型的抗體檢測套組或抗原檢測套組或試條，用於診斷及區別口蹄疫的血清型。分析各口蹄疫 OIE 參考實驗室生產的套組，及世界上口蹄疫 ELISA 及其他快速檢測套組的演化與發展，並說明快篩套組(Lateral flow device test)的簡易原理及方法。泰方人員提出台灣現今的口蹄疫血清型問題。我方回應台灣以前主要感染血清型以 O 型為主，僅前年金門有檢測出 A 型口蹄疫亞洲拓璞型東南亞病毒株的核酸及抗體但未分離出病毒。經過 2 小時的討論，會後我方參訪人員與泰方研究人員於 NIAH 合拍團體照(圖三)。

二、11 月 15 日：

早上出發至 Regional Reference Laboratory for FMD in South East Asia, RRL SEA (Pakchong)，了解該單位的運作(圖四)。以泰國口蹄疫區域參考實驗室提供的豬及牛隻血清樣品測試口蹄疫快檢試劑，並評估其效能。從泰國提供如田間陽性血清、田間免疫口蹄疫三價疫苗(含 O, A 及 Asia1 血清型)血清及由泰方購自澳大利亞的陰性血清等樣品，

皆由泰方先行以液相阻斷型 ELISA(Liquid Phase Blocking ELISA; LPBE)及 PrioCHECK ELISA 方法測試確認。

將建構 FMDV-SP-VP1 及 FMDV-NSP-3ABC 最具高度免疫原性的 pET 重組質體，並經轉形作用至大腸桿菌菌株以選殖最佳表現的重組蛋白，於蛋白質電泳膠分析 (SDS-PAGE assay) 確認蛋白質分子量之大小及量產，藉低壓色層分析儀(Low-pressure liquid chromatography; LPLC)進行親和性色層分析(Ni-NTA)與純化，以獲得具有功能性的可溶性重組蛋白質，製成口蹄疫病毒抗體快檢檢測套組(Pen side strip)，測試步驟詳如附錄 A。

Liquid Phase Blocking ELISA (LPBE)，由泰方人員操作示範，檢驗 10 個抗體樣品，分析抗體對不同血清型(O 型、A 型及 Asia 1 型)口蹄疫病毒的特異性及交互作用(cross reaction)，測試步驟詳如附錄 B。

口蹄疫病毒VP1結構蛋白抗體ELISA檢測套組之測試以原核系統表現O型口蹄疫病毒VP1衣殼蛋白(capsid protein)，將純化之FMDV-VP1重組蛋白(5µg/mL)以coating buffer (0.06 M carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6) 披覆於96孔U型微量盤，置於4°C 隔夜，測試步驟詳如附錄C。泰方提供之測試血清包含FMD陽性血清、陰性及疫苗免疫血清，其中疫苗免疫血清則是來自泰國田間以O, A, Asia 1三價口蹄疫疫苗免疫牛及豬隻取得之血清。

三、11月16日：

上午於東南亞口蹄疫區域參考實驗室(RRL)續以完成口蹄疫病毒抗體快速診斷試劑套組、抗體 ELISA 及 LPBE ELISA 之測試(圖五)。經結果顯示抗體快檢測試片可檢出陽性反應，且在 15-60 分鐘內即可完成定性檢測 SP 及 NSP 等抗體。以口蹄疫抗體測試片檢測感

染、健康及免疫等樣品，經初步試驗結果顯示口蹄疫結構蛋白 (FMD-SP) 抗體之診斷敏感性可達 80-88%及診斷特異性約 77-83%。口蹄疫非結構蛋白 (FMD-NSP) 抗體之診斷敏感性可達 100% 及診斷特異性約 69-100%。口蹄疫 SP 抗體檢測酵素連結免疫吸附法 (ELISA) 之試驗結果顯示口蹄疫結構蛋白 (FMD-SP) 抗體之診斷敏感性可達 92-100% 及診斷特異性約 91-100% (表一、表二及表三)。另研習泰方常使用於例行性檢測之口蹄疫結構性蛋白的液相阻斷型 ELISA(LPBE)方法(Liquid Phase Blocking ELISA;LPBE)，由泰方人員操作示範，檢驗 10 個血清樣品，分析抗體對不同血清型(O 型、A 型及 Asia 1 型)口蹄疫病毒的特異性及交互作用(cross reaction)，經試驗結果僅 2 個樣品有抗體力價，且對血清型 O 型口蹄疫病毒的特異性抗體有顯著的反應。這些研發方法頗值得作為未來應用開發豬及牛等動物血清學檢測之參考及改進。

在完成所有實驗後，由於時間較為倉促，下午則前往 Surin 參訪獸醫研究發展中心 (VRDC)。因此立即驅車離開 OIE 東南亞區域口蹄疫診斷參考實驗室(RRL)，前往預定參訪之泰國國家動物衛生研究所 (NIAH)轄下的東北部下半區域(Lower Northeastern)獸醫研究發展中心(RVRDC)。在抵達 RVRDC 時，由於 RVRDC 主任 Dr. Udom Chuachan 之前已造訪過本所，彼此之間相當熟識，因此我方人員受到 RVRDC 熱情接待(圖六)。在雙方一陣熱情問候和寒暄之後，旋即由 Dr. Udom Chuachan 進行 RVRDC 簡介。Dr. Udom Chuachan 在進行簡介時首先提到 RVRDC 涵蓋多項業務題，包括：1.主導畜禽類重要疾病的試驗研究；2.提供診斷服務及建議農民治療與控制的方法；3.動物疾病診斷試劑的研製與標準化；4.做為疾病確診之地區參考實驗室；5.主導外來與新興動物疾病的研究與監測；6.辦理教育訓練、技術轉移、研究及國際技術合作；7.與其他地區 RVRDC 進行協調、分工與合作；

8. 協調政府與國內外私人部門或機構合作開發動物衛生資訊系統。RVRDC 編制上設有正式人員 14 名 (包括主任 1 名、副主任 2 名、獸醫師 6 名、研究人員 5 名)、技術與行政人員 39 名、承攬人員 19 名。RVRDC 之組織架構依工作性質共區分為六個實驗室，包括免疫暨血清學實驗室 (Immunology and Serology Laboratory)、細菌暨黴菌學實驗室 (Bacteriology and Mycology Laboratory)、病毒學實驗室 (Virology Laboratory)、病理學實驗室 (Pathology Laboratory)、乳質分析實驗室 (Milk Quality Analysis Laboratory) 及化學實驗室 (Chemical Laboratory)。而實驗室運作與管理也經過多個機構評鑑與認證，包括於 2005 年通過 ISO 17025 認證，2008 年通過 ISO 9001 認證。

依據 Dr. Udom Chuachan 提供之資料顯示，2015 年 RVRDC 一共收到 47,917 個檢診樣品，包括 37,712 個血清樣品、5,404 個血液樣品和 3,891 個糞便樣品，遠超過原定目標 34,918 個樣品。另外 RVRDC 一共完成 26,181 個禽流感樣品調查，包括 23,058 個雞隻樣品、2,883 個血液樣品和 240 個其他家禽樣品，遠超過原定目標 12,960 個樣品，成績可說十分斐然。在參訪過程中，可發現 RVRDC 之建築物本身雖較為老舊，相關診斷設備仍應有盡有，人員動線規劃與管制亦相當明確。部分耗材在經過清洗、高壓滅菌及風乾後，在不影響實驗品質之情況下仍重覆使用約 10 次。而工作人員平均年齡約在 25 至 40 歲之間，工作士氣高昂且熱情。最有趣的是，分子實驗室所使用之全自動核酸萃取儀係由台灣製造，可在短時間、低成本情況下萃取檢體之全核酸產物，包括 DNA 以及 RNA，且萃取核酸產物之品質深獲 RVRDC 肯定與喜愛，本所亦有採購及使用該型儀器。因此當泰方專家 Dr. Liolalong Boonchan 向本所參訪人員介紹該儀器時，對於我國生技與工業產業能力不斷流露出無比敬佩之意。能見到我國生產之科學儀器在外國發光發熱，可說是讓在現場之本所參訪人員

感到無比驕傲，與有榮焉。就在一片歡樂氣氛中，完成這次難得的參訪行程(圖七、八、九)。

四、11月17日：

於VRDC進行雙方技術交流，並聽取泰方的防疫及檢定技術，包含細菌檢測、病毒檢測、核酸檢測、血清檢測、樣品登錄作業系統、牛乳檢測及藥物殘留檢測，其中包含使用的儀器及試劑套組等。根據泰方人員表示，目前高病原性豬生殖與呼吸綜合症病毒(HP-PRRSV)之疫情，只有在泰國與寮國及柬埔寨邊境發生，該病防疫政策採用撲殺方式處理，並未施打PRRSV疫苗。除此之外，泰國歷年所分離到PRRSV病毒之基因型，包括第一型(歐洲型)及第二型(美洲型)。而後安排參觀大象訓練場及飼養等觀摩，了解大象常見的疾病。另為我們安排參觀水牛牧場，聽取牧場主人如何培育出1,200公斤冠軍水牛及經營和防疫等心得(圖十)。

五、11月18日：

本次研習及參訪泰方所安排之行程豐富而緊湊，但實驗室內進行試驗的時間稍短促略顯不足。故於泰國之國家動物衛生研究所(NIAH)最後一天之討論會議中已協調溝通取得泰方之同意我方另製一批口蹄疫快檢試劑分別寄送到泰國之東南亞口蹄疫區域參考實驗室(RRL)及獸醫研究發展中心(VRDC)等機構，由泰國研究人員進一步測試(圖十一)。

泰方專家Dr. Prakrit Boonpornprasert為參訪同仁簡介有關豬生殖與呼吸綜合症病毒在泰國之疫情。豬生殖與呼吸綜合症 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus ; PRRSV)係由具有封套之Nidovirales目Arteriviridae科RNA病毒所引起豬隻的傳染性疾病。豬生殖與呼吸綜合症病毒可經由其封套蛋白ORF5基因序列區分為歐洲型病毒株(第1基因型)與美洲型病毒株(第2基因型)等2種基因型。感染母豬發生流死產、早產和新生仔豬

死亡率提高、而哺乳小豬可見呼吸性疾病和離乳前死亡率的增加、在肥育豬則僅呈類似感冒症狀等為主徵。自2006年開始，中國大陸許多養豬場豬隻出現了高熱、厭食、眼結膜炎、咳嗽、腹式呼吸等呼吸道症狀，以及後軀無力、無法站立或搖擺等神經症狀並呈現高死亡率等嚴重疫情。經由病毒分離以及分子生物學檢測，發現主要病原為美洲型豬繁殖與呼吸綜合病毒。但是該病毒與早期發現之美洲型豬繁殖與呼吸綜合病毒在基因序列有所不同，最大的差異點在於其非結構蛋白2（non-structure protein 2；NSP2）有一段30個胺基酸之缺損。此外該病毒之毒力與致病性較早期發現之美洲型豬繁殖與呼吸綜合病毒為高，又因發病豬隻出現嚴重臨床症狀及較高死亡率，因此將其稱為高病原性豬繁殖與呼吸綜合病毒(High Pathogen PRRSV; HP PRRSV)。

提及泰國的養豬場目前存在3種主要基因型豬生殖與呼吸綜合症病毒，包括美洲型、歐洲型與高病原性豬生殖與呼吸綜合症病毒等。泰國最早可於1989年豬隻血清檢測出豬生殖與呼吸綜合症病毒抗體，在1991至2002年可觀察到豬隻血清抗體陽性率大幅提昇。泰國首次於1996年分離到美洲型病毒株，緊接著在數年後於同一養豬場再次分離到歐洲型病毒株，該結果證實泰國部分豬場存在有至少2種不同基因型豬生殖與呼吸綜合症病毒混合感染的問題。也顯示出不同基因型別豬生殖與呼吸綜合症病毒的交叉保護性並不高，以及市售之活毒疫苗(MLV)的保護效力也未盡理想等情。此外在2010年開始，在鄰近寮國及柬埔寨之邊境地區，陸續發生豬隻感染高病原性豬生殖與呼吸綜合症病毒之疫情，剖檢可見除了可見早期美洲型豬繁殖與呼吸綜合病毒感染所引發之肺臟病變外，還可見腎臟、肝臟與胸膜出血，偶爾可見脾臟梗塞。目前診斷方式主要以多重定量反轉錄聚合酶鏈反應 (multiplex quantitative reverse transcription PCR; Multiplex qRT-PCR)為主，可針對不同型別之豬生殖與呼吸綜合症病毒株進行區別診斷。

因應政府推動新南向政策，臨行前被賦予一項任務，即針對有關診斷試劑在泰國使用之相關法規及市場等進行研議，於是利用本次研習機會向泰方人員詢問相關規定。在泰國動物使用的檢測診斷試劑被歸類為一般醫療設備器材，進口申請程序比照一般醫療設備器材，由泰國食品藥物管理局(FDA)所屬醫療設備器材管理部門所管轄。泰方人員建議動物用檢測診斷試劑輸入泰國可先於泰國尋找當地代理商，再由代理商尋一般行政程序向FDA所屬醫療設備器材管理部門申請，一般醫療設備器材進口相關規定詳見附錄四。

研習心得

一、口蹄疫抗體免疫測試片具快速區別診斷之測試：

泰方提供之FMD陽性血清、陰性及疫苗免疫血清，其中陽性血清是來自FMDV感染牛及豬隻取得之血清樣品、陰性血清是來自澳洲(FMD清淨國)所進口之牛及豬隻血清，疫苗免疫血清則是來自泰國田間以O, A, Asia 1三價口蹄疫疫苗免疫牛及豬隻取得之血清。依據 O-Taiwan 口蹄疫病毒結構蛋白(FMDV-SP)VP1 核酸序列分析顯示 FMDV/O/TW/1997與最新分離病毒株 FMDV/O/TW/2012之核酸有90.1%的相似性，即二株存在有10% 差異性，自文獻報告顯示泰國目前以O Udonthani 189/87、A Lopburi/12 或 A Sakolnakorn/97、Asia1/85 等病毒株製成三價疫苗，故針對本土型O血清型設計的構築的重組蛋白抗原進行泰國動物血清樣品測試皆可有效測出由疫苗免疫產生的體液性抗體，由此方式將建立的試驗模式，預期對東南亞口蹄疫疫區國家所爆發的PanAsia、SEA 及 Cathy等病毒株能有效檢出同源及異源的O型口蹄疫病毒結構性蛋白抗體及非結構性蛋白抗體。本試驗研發的 FMDV-SP/NSP strip 對於同源及異源之O血清型及與牛標準血

清 (如A、C、Asia1、SAT1、SAT2、SAT3)等血清型，也可測得陽性反應(圖十二)。其他水疱性疾病如豬水疱病(SVD)、水疱性口炎(VS)及豬水疱疹(VE)等非特異性反應之確效，有必要與外國產製的標準血清抗體測試，以確認偵測鑑別Strip的適用範圍的廣度與準確性。

二、口蹄疫病毒 VP1 抗體 ELISA 檢測套組之測試結果：

以上述三種血清以自製 FMDV 結構蛋白抗體 ELISA 套組檢測結果顯示，牛隻陰性血清之特異性為 100%，牛隻陽性血清之敏感性為 92%，牛隻免疫血清之敏感性為 94%。豬隻陰性血清之特異性為 93%，牛隻陽性血清之敏感性為 100%，牛隻免疫血清之敏感性為 92%。此結果顯示，自製抗體 ELISA 套組檢測對於豬及牛隻 FMD 抗體檢測之正確性超過 90%以上，且 FMDV-SP ELISA 對於同源及異源之 O 血清型及自豬及牛三價疫苗免疫血清樣品 (如 A 及 Asia1 等血清型) 間接評估測得陽性反應(表三)。

三、診斷試劑的應用：

本次到參訪泰國東南亞口蹄疫參考實驗室，了解該實驗室對於口蹄疫抗體檢測之實際狀況，對於口蹄疫病毒結構蛋白抗體的檢測，該實驗室以口蹄疫不活化病毒為抗原自行開發 LPBE 法檢測口蹄疫疫苗免疫後產生之抗體力價。至於口蹄疫病毒非結構蛋白抗體的檢測則使用歐洲生產的商品化套組 (PrioCHECK)，本所先前技轉給凌越生醫公司的口蹄疫病毒非結構蛋白檢測套組則尚未進軍泰國市場。2014 年泰國共有 150 件爆發案例，造成共 7,543 頭動物遭受感染，泰國西部及北部是主要的流行地區，流行病毒株仍以 O、A 型口蹄疫病毒株為主，上述資料顯示泰國對於口蹄疫抗原及抗體檢測試劑市場需求量大，值得開發。

四、 加強台泰農業合作計畫：

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，故參與各項試驗與研究為增加研究人員視野與技術發展，並與國外研究學者交流吸收新知，因此派員出國參訪或參與各項研究與試驗對於個人和機關皆可提升正向的學習能力。

檢討與建議

一、 啓動合作機制即積極進行國際合作連繫以達互助互惠之共識：

本所與泰方 NIAH 之研究人員曾多次藉以資訊之交流與參訪討論的機會，了解該口蹄疫目前發展情形，且實驗室收集有牛、豬及羊等樣品，因此未來有機會能與該國學者共同多方合作研究。然而試驗過程中面臨可能的困難是量產 strip 的材料及數量有限、製產批次產品的不穩定及抗體與抗原結合反應於動物品系間的差異等問題皆可能會影響試驗的特異性與敏感性因子，因此將是我們急需解決克服的問題。

二、 口蹄疫快檢試劑的開發與展望：

本所先前技轉給凌越生醫公司的口蹄疫病毒非結構蛋白檢測套組經該公司數年的努力，目前已完成商品化，配合政府的新南向政策，正準備進軍國東南亞市場。建議政府創造優質投資環境，大力協助國內生技廠商進軍海外市場。因此為了本所口蹄疫快檢試劑的推展，經泰方的同意新製一批產品以提供泰方的 RRL 及 VRDC 二個機構進一步測試，以為協助促進我國農業科技產業對外拓銷。

三、 配合推行「新南向政策」：

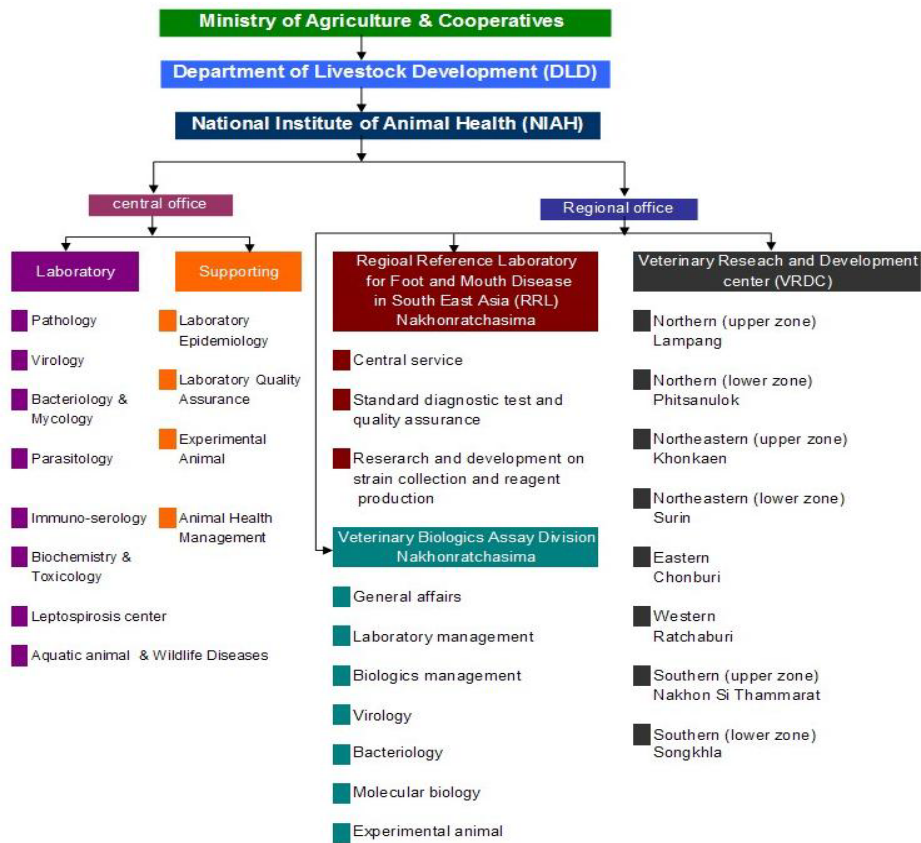
本次利用臺泰農業合作交流之機會亦針對診斷試劑在泰國使用之相關法規及市場進

行討論及收集「體外診斷醫療器材(in vitro diagnostic device; IVD)進口之驗證程序及流程」等資料(如附錄 D)，預期研發完成技轉及商品化後，以配合政府推行的「新南向政策」，嘗試將本所多項研發的診斷試劑推行銷售至國內外市場，如東南亞口蹄疫疫區等國家。

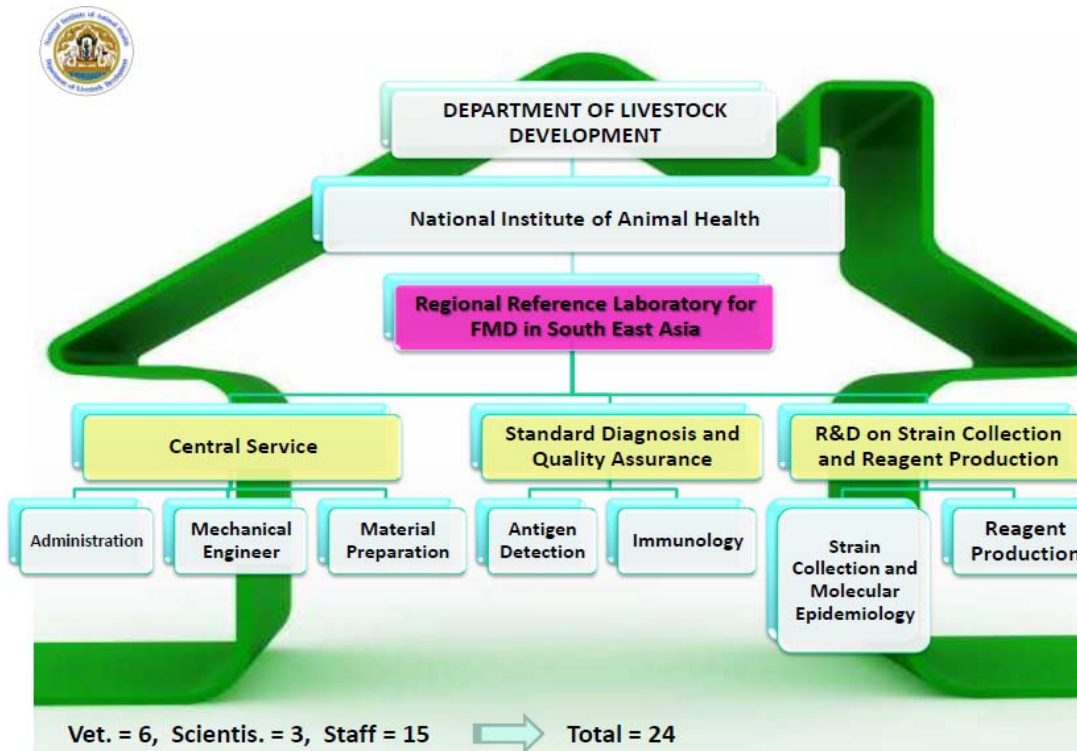
致謝

感謝行政院農業委員會經費支助及長官們熱心提攜協助計畫的推動及科技處周曉倩研究員熱心指導。並感謝本所長官們之細心斧正，另感謝泰國國家動物衛生研究所代表 Dr.Prakit Boonpornprasert、東南亞口蹄疫區域參考實驗室代表 Dr.Amonrat Choornasard 及獸醫研究發展中心代表 Dr.Udom Chuachan 事先聯繫與安排規劃，及於泰國參訪與研究期間的陪同與協助，讓此次台泰農業交流之任務得以順利完成，另感謝凌越生醫股份有限公司熱心協助提供相關資訊，使本次研習任務順利圓滿達成，特此謝忱。

圖表



圖一、泰國國家動物衛生研究所(NIAH)之組織結構圖。



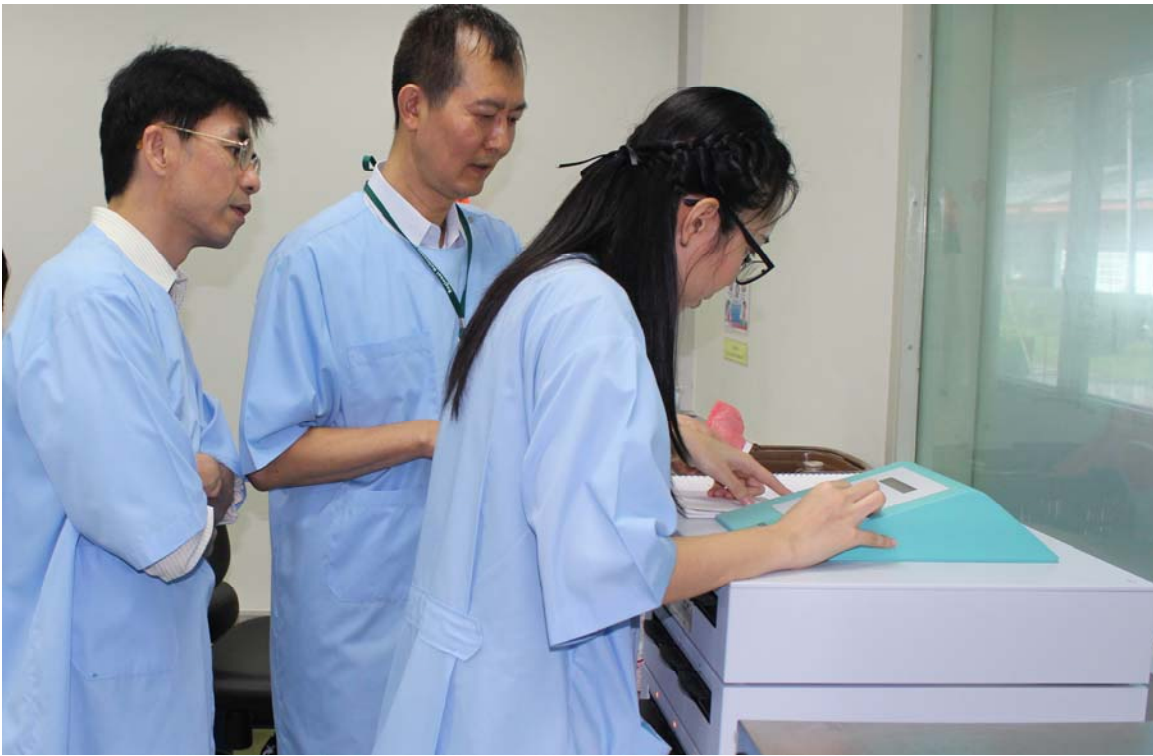
圖二、泰國東南亞口蹄疫區域參考實驗室(RRL)之組織結構圖。



圖三、我國參訪人員與泰方研究人員於 NIAH 之團體照。



圖四、參訪人員與 RRL 的研究人員合照。



圖五、泰國東南亞口蹄疫區域參考實驗室之研究人員 Dr.Amonrat Choonasard 與參訪人員進行儀器操作與解說等試驗過程。



圖六、參訪人員與 RVRDC 專家合影，泰方陪同人員有主任 Dr. Udom Chuachan 、Dr. Prakrit Boonpornprasert、Dr. Bopit Puyati 及 Dr. Liolalong Boonchan，其他皆為本所參訪人員。



Dr. Udom Chuachan 熱情向本所參訪人員進行RVRDC簡介



RVRDC 之實驗室運作與管理於 2005 年通過 ISO 17025 認證



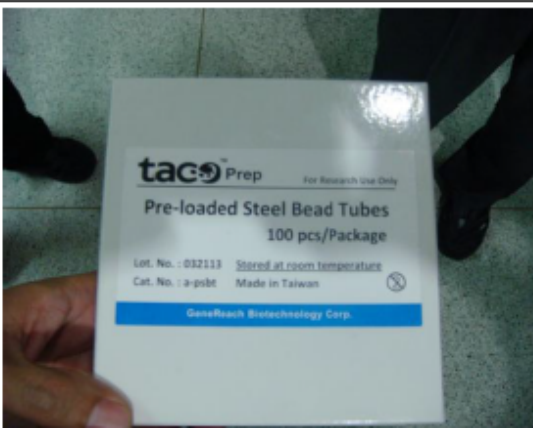
本所參訪人員參觀RVRDC實驗室



Dr. Liolalong Boonchan 向本所同仁提出自己之工作心得及經驗



RVRDC實驗室所採用之全自動核酸萃取儀係由台灣製造



全自動核酸萃取儀所附之試劑組，可見 Made in Taiwan 字樣

圖七、參訪人員與 RVRDC 專家之互動合影。



Dr. Liolalong Boonchan熱情向本所參訪人員簡介實驗室運作情形



部分耗材在經過清洗、高壓滅菌及風乾後仍重覆使用



各實驗室出入口均有明顯標示



分子實驗室配備 PCR 與 QPCR 等相關先進儀器

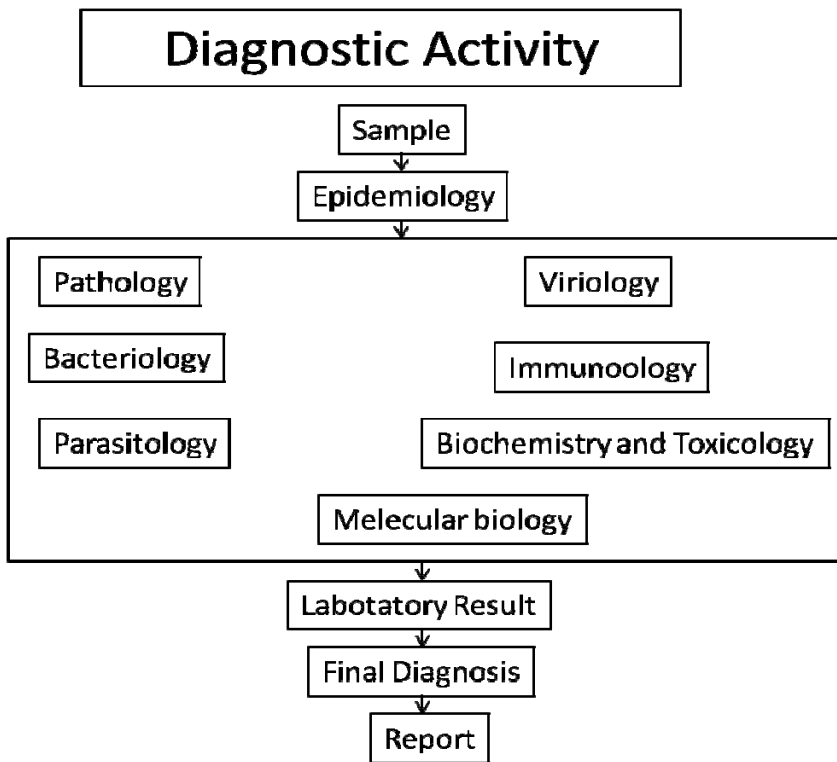


乳質分析之作業流程圖



完成參訪活動後，全體人員於 RVRDC 大廳合影留念。

圖八、參訪人員與 RVRDC 專家之互動合影。



圖九、RVRDC 之臨床病歷與病材診斷流程圖，其流程與作業方式與我國各縣市防疫單位極為類似。



圖十、參訪人員至水牛牧場，聽取牧場主人如何培育 1,200 公斤的冠軍水牛及經營和防疫等心得。



圖十一、參訪人員與泰方研究人員討論台泰合作未來方向及詢問檢測診斷試劑使用於泰國之相關規定。



Control line(C)
Test line (T1): SP
Test line (T2): NSP

圖十二、以口蹄疫免疫色層分析測試片血清抗體測試之結果，檢測牛陽性血清主要檢測 SP 及 NSP 抗體之結果。陽性者於 NC paper 上顯示第一條線為含 anti goat-IgG 控制線(C)、第二條線標示結構性蛋白(SP)試驗線(T1)、第三條線為含非結構性蛋白(NSP)試驗線(T2)，其中陰性反應者為 FCS 陰性血清(-)及未含血清之緩衝溶液(PBS)(B)。

表一、豬口蹄疫結構蛋白(SP)與非結構蛋白(NSP) 抗體免疫色層分析測試片之特異性、敏感性
性及符合率的比較。

	Positive sera		Negative sera		Vaccinated sera	
	NSP	SP	NSP	SP	NSP	SP
Positive	2	4	0	5	0	48
Negative	0	1	20	25	20	12
Total No.	2	5	20	30	20	60
Sensitivity(%)	100	80				80
Specificity(%)			100	83	100	

表二、牛口蹄疫結構蛋白(SP)與非結構蛋白(NSP)抗體免疫色層分析測試片之特異性、敏感性
及符合率的比較。

	Positive sera		Negative sera		Vaccinated sera	
	NSP	SP	NSP	SP	NSP	SP
Positive	18	23	4	7	31	40
Negative	0	3	26	23	69	6
Total No.	18	26	30	30	100	46
Sensitivity(%)	100	88				87
Specificity(%)			87	77	69	

表三、豬及牛口蹄疫結構蛋白(SP)抗體間接型 ELISA 之特異性、敏感性
及符合率的比較。

	Positive sera		Negative sera		Vaccinated sera	
	Swine	Bovine	Swine	Bovine	Swine	Bovine
Positive	5	24	2	0	55	94
Negative	0	2	28	30	5	6
Total No.	5	26	30	30	60	100
Sensitivity(%)	100	92			92	94
Specificity(%)			93	100		

附錄

A、FMDV-SP 及 FMDV-NSP 快檢測試片之抗體檢測方法：

1. Pen side strip之製作：

1.1 選擇在膠體金(Colloid gold)及硝化纖維素(nitrocellulose; NC)理想的抗原及抗體濃度之定量。

1.2 結合Anti-swine/bovine IgG到40 μ m直徑之膠體金(Colloid gold)微顆粒溶液。

1.3 吸附適量產重組蛋白抗原到Nitrocellulose，使用生化點漬器點漬於NC膜上測試線(T1及T2)及使用Anti-goat IgG抗體於控制線(C)。

1.4 吸附Colloid gold-anti swine/bovine IgG及量產重組蛋白抗原結合到玻璃纖維濾膜(glass fibre filters)。

1.5 裝配快檢試片組。

2. 測試方法：進行本試劑使用前，測試血清樣品及對照組，皆須調至室溫（20-30 $^{\circ}$ C）準備測試。

2.1 爲了避免反應膜因溼度造成凝結，打開前將本試劑置放室溫下，然後再將試劑從保護袋中取出，測試片可標示檢驗組及對照組供辨識。首先製備 96 孔 ELISA 盤，每 well 加入 150 μ L 的稀釋液(0.01M PBS, 0.05% Tween20, pH7.4)，從受檢血清樣品取 5-8 μ L 加入含稀釋液的 well 中，均勻混合。

2.2 將 pen-side 測試片的切片瓶裝口拆封(內附乾燥包)，取 150 μ L 稀釋 30-50 倍的血清樣品，依序分別標示 pen-side 測試片並將直立式放入含有樣品稀釋液的 ELISA 盤中反應 15-60 分鐘，每次取樣或對照皆須使用不同的滴管及裝置，以避免污染。

3. 測試結果說明：

3.1 陽性反應：兩條明顯之帶狀色線出現，一於測試區 (T) 而另一於對照區 (C)。

3.2 陰性反應：僅一條明顯之帶狀線出現對照區(C)，而無明顯色線出現於測試區 (T)。

3.3 反應無效：二區域上皆無帶狀色線出現，表示可能操作順序錯誤或者檢驗試劑損壞發生。需重新以另一片的試劑檢測並觀察顏色控制線的顯現。

3.4 本試劑套組是利用免疫色層分析原理設計，其優點爲操作簡便，不需仰賴儀器，只要一滴血清即可在 15-60 分鐘快速完成定性檢測。

4. 儲存及安定性：本組檢驗試劑需存放在冷藏（2-8 °C）或室溫（低於 30 °C），於尚未拆封之有效期限為半年。
5. 注意事項：
 - 5.1 僅供體外檢驗使用。
 - 5.2 有效期限半年，超過後不可使用。
6. 檢體的收集：收集的血清檢體須置於清潔、乾燥塑膠或玻璃試管。任何時刻收集之血清皆可使用。血清檢體可暫放在冷藏(2-8 °C)或長期存放-20 °C保存，冷藏或凍存的血清檢體需平衡至室溫(20-30 °C)，才可測試。溶血檢體應避免產生。

B、LPBE 試驗方法如下：

1.設備 (Equipment)：

- 1.1 實驗室：符合農業生物安全等級第三級之負壓實驗室
- 1.2 ELISA 微量盤清洗機
- 1.3 ELISA 判讀機
- 1.4 微量單管吸管
- 1.5 十二爪微量稀釋器
- 1.6 玻璃器具 (滅菌)：燒杯 (beakers)、血清瓶 (bottles)、瓶型容器
- 1.7 磁性攪拌棒 (Magnetic stir bar)，各種大小
- 1.8 磁性攪拌器 (Magnetic stirrer)
- 1.9 試管振盪器 (Vortex mixer,)
- 1.10 低速離心機 (Centrifuge, low speed)
- 1.11 冷凍櫃 (Freezers;)：-20°C，-80°C，液態氮
- 1.12 培養盤振盪器 (Plate shaker)
- 1.13 4°C 冷凍櫃 (4°C Refrigerators)
- 1.14 分析用天平 (Analytical balance)
- 1.15 高速滅菌器 (Automatic high speed autoclave)
- 1.16 酸鹼值測定器 (pH Meter)
- 1.17 微電腦自動控制快高壓滅菌器 (Autoclave)
- 1.18 置物架 (Racks)：各種大小試管架 (tube racks) 和低溫架

1.19 無菌操作箱 (Lamina flow)

1.20 37°C 培養箱

2. 供應品：

2.1 ELISA-antigen 診斷套組：符合國際畜疫會 (Office International Des Epizooties ; OIE) 及口蹄疫世界參考實驗室要求標準，包括兔抗 FMD (O 型、A 型及 Asia 1 型)各血清型病毒標準血清、FMD 各血清型病毒(O 型、A 型及 Asia 1 型)標準抗原、天竺鼠抗各口蹄疫病毒血清(O 型、A 型及 Asia 1 型)之血清、兔抗天竺鼠 HRP 標示免疫球蛋白、阻斷劑、受質、OPD 呈色劑、緩衝鹽類、coating 緩衝液、溶解液 I 及溶解液 II 等。

2.2 滴管尖 (Tips)：20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L

2.3 吸量管 (Pipets)：1 mL, 5 mL, 10 mL

2.4 注射器：10 mL, 20 mL, 30 mL, 60 mL

2.5 ELISA 專用 96 孔盤：Nunc Immunoplate

2.6 離心管 (Centrifuge)：15 mL, 50 mL

2.7 低溫管 (Cryotubes)：1.8 mL

3. 化學藥品 (Chemicals)：

3.1 Ortho-phenylenediamine (OPD)：Sigma

3.2 雙氧水(Merck)

3.3 硫酸液 (Merck)

3.4 脫脂奶粉 (Marvel)

3.5 PBS 粉末(Sigma)

4. 試驗之製備：

4.1 人員

4.2 器材的製備

4.3 緩衝液及溶液的配製

4.3.1 被覆緩衝液 (Coating Buffer)：0.05 M Carbonate/bicarbonate，pH9.6 +/- 0.05。

取一膠囊 Carbonate/bicarbonate 溶於 100 mL 蒸餾水中標貼後保存於 4 °C，不可超過一週。

4.3.2 稀釋液 A (Diluent Buffer A): 取 PBS 粉末一瓶, 溶於滅菌過之蒸餾水 1000 mL 中, 加入 0.5 mL 之 Tween 20, pH=7.4 +/- 0.20, 標貼後保存於 4 °C, 不可超過二週。

4.3.3 稀釋液 B (Diluent Buffer B): 取 PBS 粉末一瓶, 溶於滅菌過之蒸餾水 1000 mL 中, 加入 0.5 mL 之 Tween 20, 加入 5% 脫脂奶粉 pH7.4 +/- 0.20, 當天配製。

4.3.4 清洗液 (0.002 M PBS): 取 PBS 粉末一瓶, 溶於滅菌過之蒸餾水 5000 mL 中, pH7.4 +/- 0.20, 標貼後保存於室溫, 不可超過二週。

4.3.5 Chromogen Buffer: 0.05 M phosphate-citrate buffer, pH5.0。取 phosphate-citrate buffer 一錠 (Sigma), 溶於 100 mL 蒸餾水中, pH 5.0, 標貼後保存於 4°C, 不可超過一週。

4.3.6 呈色劑 (Chromogen Stock): 3.3 mM OPD。OPD 一錠, 溶於 50 mL Chromogen Buffer (pH 5.0) 中, 標貼後保存於室溫黑暗處。

4.3.7 受質 (Substrate Stock): 3% H₂O₂ (882 mM)。取一錠過氧化氫溶於 10 mL 蒸餾水中, 標貼後保存於 4°C 黑暗處。

4.3.8 停止液: 慢慢的將 68 mL 濃硫酸(18 M), 加入 932 mL 之蒸餾水中, 標貼後保存於室溫。

4.3.9 消毒液 (0.4 %w/v Citric Acid) : 取 4 g 檸檬酸溶於 1 L RO 水中, 配製後保存於室溫待用。

5. 試驗的步驟:

5.1 捕捉抗體的被覆: 先將兔抗各種血清型(O, A 及 Asia1)之血清依 1000 倍稀釋於被覆緩衝液 (coating buffer) 後, 被覆於 96 孔 ELISA 免疫盤, 每孔 50 µL, 各 1 盤, 密封後置 4 °C 感作一夜, 以清洗液清洗 3 次, 甩乾。

5.2 強陽性(C++)、弱陽性(C+)和陰性(C-)及樣品(S)等牛參考血清的添加:

在 U 形底 96 孔板 (載體板) 中, 於每個對應孔中加入 50µl 的強陽性, 弱陽性和陰性的牛參考血清。如下圖。各種血清型(O, A 及 Asia1)各做 1 盤。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C++	C++	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33
B	C++	C++	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34

C	C+	C+	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35
D	C+	C+	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
E	C-	C-	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
F	C-	C-	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
G	稀釋液 A	稀釋液 A	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
H	稀釋液 A	稀釋液 A	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40

5.3 測試血清的 2 倍系列稀釋：

在 U 形底 96 孔板（載體板）中，加入 50 μ l 的稀釋液 A，每個測試血清的 2 倍系列稀釋。如下圖。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C++	C++	1/2	1/2	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25
B	C++	C++	1/4	1/4	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26
C	C+	C+	1/8	1/8	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27
D	C+	C+	1/16	1/16	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28
E	C-	C-	1/32	1/32	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29
F	C-	C-	1/64	1/64	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30
G	稀釋液 A	稀釋液 A	1/128	1/128	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31
H	稀釋液 A	稀釋液 A	1/256	1/256	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32

5.4 抗原的添加：

在 U 形底 96 孔盤（載體板）中的每個孔中加入 50 μ l 血清同源的恆定劑量的病毒抗原，並將混合物在 4 $^{\circ}$ C 下放置過夜。

5.5 抗原及測試血清的混合液的轉置：

取步驟 3.4 的混合液 50 μ l 轉置對應相同血清型(O, A, Asia1)的捕捉抗體 96 孔盤，在 37 $^{\circ}$ C 溫育 1 小時，以清洗液清洗 3 次，甩乾。

5.6 抗血清型(O, A, Asia1)的天竺鼠血清的添加：

對應相同血清型(O, A, Asia1)的 96 孔盤中，添加抗相同血清型的天竺鼠血清的稀釋液 50 μ l 於各孔。在 37 $^{\circ}$ C 溫育 1 小時，以清洗液清洗 3 次，甩乾。

5.7 兔抗天竺鼠 HRP 標示免疫球蛋白的添加：

添加兔抗天竺鼠 HRP 標示免疫球蛋白的稀釋液 50 μ l 於各孔。在 37 $^{\circ}$ C 溫育 1 小時，以清洗液清洗 3 次，甩乾。

5.8 呈色劑的添加：

添加呈色劑(含 1:200 的受質)50 μ l 於各孔。在室溫作用 15 分。

5.9 停止液的添加：

添加停止液 50 μ l 於各孔。

5.10 取吸光值：

ELISA 判讀機，設定讀取波長 512nm，先讀取空白盤的吸光值，再讀取試驗的 96 孔盤，將值減去空白盤的吸光值，並進行計算。

5.11 判讀：

5.11.1 PI 值計算:

PI 值=100-[(參考血清或測試血清吸光值的平均值/稀釋液 A 吸光值的平均值)x100]

5.11.2 試驗可接受的條件：

5.11.2.1 稀釋液 A 吸光值去除極大值及極小值，剩餘 2 孔，應介於規定的上限及下限，並列為 PI 值用的稀釋液 A 吸光值。

5.11.2.2 強陽性(C++)，弱陽性(C+)和陰性(C-)各孔的 PI 值，應至少 3 孔的 PI 值介於規定的上限及下限。

5.11.2.3 陰性判定: PI 值低於 50。

C. ELISA protocol

a. Material preparation

1. 96 wells plate
2. 10X Coating buffer pH 9.6
3. Sterile DDW
4. PBS
5. PBST
6. Hyblock 10 min blocking buffer
7. 5 % Skim milk in PBS
8. 2% Skim milk in PBS
9. Protein sample solution
10. Bovine serum solution
11. 2° Antibody (goat anti-bovine HRP; goat anti-swine HRP)
12. TMB solution
13. Stop solution

b. General Procedure

1. Dilute the 10X coating buffer to the 1X coating buffer in sterile DDW.
2. Test samples containing protein are pipeted onto the plate 5 µg/ml in 1X coating buffer, (100 µl/well) at 4°C overnight.
3. Remove coating buffer-protein solution. Wash plate 3 times with PBST.
4. Block plates by adding 100 µL of hyblock 10 min blocking buffer to each well. Incubate at room temperature for a minimum of 30 minutes.
5. Remove blocking buffer. Wash plate 3 times with PBST.
6. Add 100 µL of the 5% skim milk and 1 µL serum solution to each well. Incubate 1 hour at 37°C.
7. Remove skim milk-serum solution. Wash plate 3 times with PBST.
8. Add 100 µL of the 2° antibody (goat anti-bovine HRP or goat anti-swine HRP), diluted in 2 % skim milk (1:5000), to each well. Incubate 30~60 minutes at

37°C.

9. Remove skim milk-2° antibody solution. Wash plate 3 times with PBST.
10. Add 100 µL of substrate TMB solution to each well. Incubate for 15~30 minutes at room temperature (if color depth of substrate solution is not as requested, the incubation time should be optimized). Avoid placing the plate in direct light.
11. Determine the optical density of each well using a microplate reader set to 405 nm.
12. Add 100 µL of stop solution to each well.
13. Determine the optical density of each well immediately using a microplate reader set to 450 nm.

D. Application for license in manufacturing / importing medical devices

3.1.1 Procedure

3.1.1.1 Related Laws and Regulations

The Medical Device Act (B.E. 2531) designates that all manufacturers / importers of licensed medical devices must get a licence from the Thai- Food and Drug Administration as prescribed in the following regulations.

Section 12 Prohibits the production or importation of medical devices prescribed by the announcement of the Minister under Section 35(1) unless a licence has been granted by the licensor.

The application for and granting of a licence shall be made in accordance with the rules, procedures and conditions prescribed by the Ministerial Regulation.

Section 21 The licence under Section 12 shall be valid until the 31st of December of the fifth year of issuance.

Ministerial Regulation No.1 (B.E.2533) Article 1 Any person who wishes to obtain a licence for the production of the medical devices prescribed by the Minister under Section 35(1) shall submit an application together with the accompanying documents as detailed in form Phor.Phor. 1 in the attachment hereof.

Ministerial Regulation No.2 (B.E.2533) Article 1 Any person who wishes to obtain

a licence for the importation of the medical devices prescribed by the Minister under Section 35(1) shall submit an application together with the accompanying documents as detailed in Form Nor. Por.1 in the attachment hereof.

Ministerial Regulation No.6 (B.E.2533) has specified that the fee for a licence for production of medical devices is 1,000 baht each and a licence for the importation of medical devices is 2,000 baht each.

3.1.1.2 Documentation Required

(1) Application to Manufacture Medical Devices (Phor. Phor 1) / Application to Import Medical Devices (Nor. Phor. 1)

(2) Attached Document

(2.1) Document of Applicant

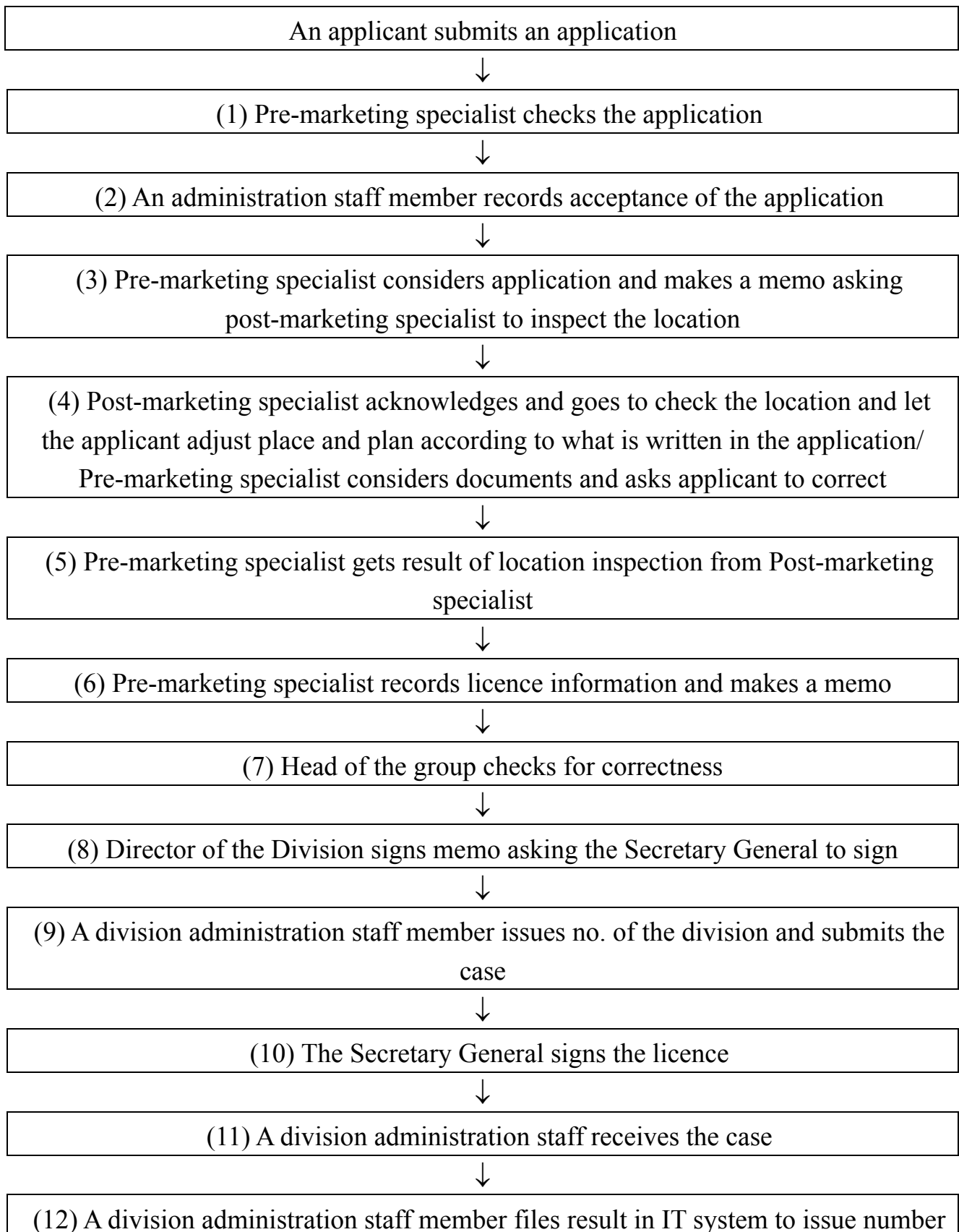
(2.1.1) In case of a private individual

- Copy or photocopy of identity card
 - Copy or photocopy of domestic registration
 - 3 photos, from the waist up, directly facing the camera, no hat, 3x4 cm. taken no longer than 6 months ago
 - Health Certificate states that applicant is not insane or mentally unfit, has not been adjudged incompetent or quasi-incompetent and is not suffered from these illnesses
 - ..leprosy in communicable period
 - ..TB in communicable period
 - ..drug addiction
 - ..chronic alcoholism
 - copy or photocopy of Trade or Commercial Registration
 - Location map of the production /importation premises, storage area and nearby structures
 - A construction plan drawn to scale of the structures within the premises for the manufacturing and storage of medical devices
- (2.1.2) In case of a Juristic Person
- Copy or photocopy of Registration Certificate
 - Copy or photocopy of letter issued by a registrar of the juristic person showing purpose and name of person who can sign on behalf of the juristic person who applies, issued no longer than 6 months ago
 - Certificate of proxy to act on behalf of applicant with excise tax of 30 BAHT (valid for 1 year)

- copy of identity card of the operator
 - copy or photocopy of domestic registration of the operator
 - 3 photos, from waist up, directly facing the camera, no hat, 3x4 cm taken no longer than 6 months ago
 - Health Certificate stating that applicant is not insane or mentally unfit, has not been adjudged incompetent or quasi-incompetent and is not suffering from these illnesses
 - ..Leprosy in communicable period
 - ..Tuberculosis in communicable period
 - ..Drug addiction
 - ..Chronic alcoholism
 - Photocopy of the company's registration issued by the Ministry of Commerce and a business licence issued in accordance with the Revolution Party Decree Number 281 dated 24 November B.E.2515 (1972) (if applicable),
 - Location map of the production /importation premises, storage area and nearby structures
 - A construction plan drawn to scale of the structures within the premises for the manufacturing and storage of medical devices,
- (2.2) Detail of the Medical Device
- Thai name, other language names
 - Category / type
 - The characteristic of the medical device
 - Packaging
 - The type and quantity of component
 - Manufacturing Procedure
 - Indication and usage
 - Instruction for use
 - Storage and shelf life
 - Standard, quality, inspection and analytical procedure
 - Label
 - Inserts of Medical Device
 - Other related documents

3.2.2 Flowchart

In cases when documents are not required to be sent to specialist/ working group or subcommittee for consideration

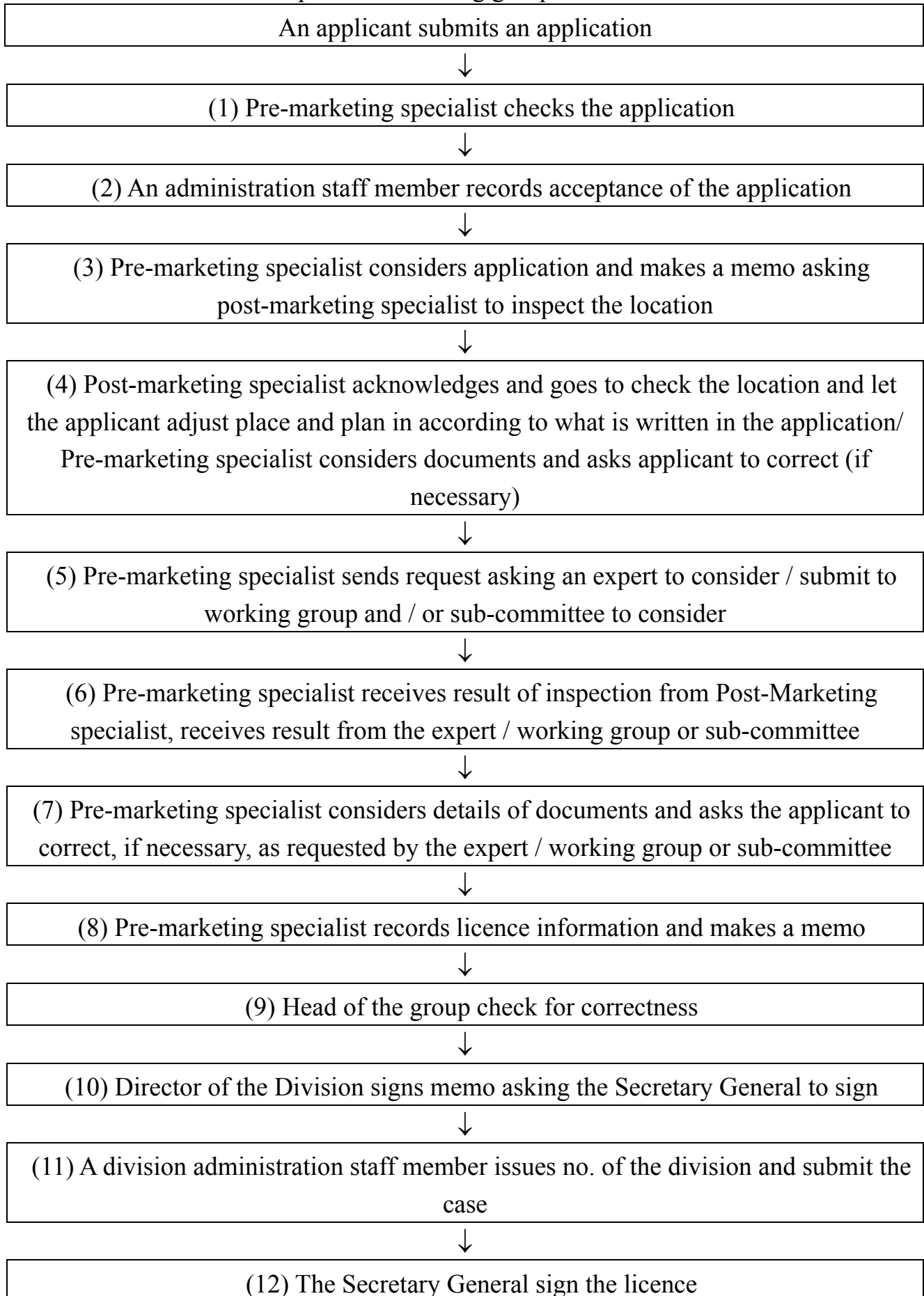


of the licence and prints out number of licence and date that the Secretary General signed



licence is issued

In case of need to send to specialist/ working group or subcommittee to consider





(13) A division administration staff receives the case



(14) A division administration staff member files the result in IT system to issue number of the licence and prints out number of licence and date that the Secretary General signed



licence is issued

3.2.3 Duration of Procedure

Not more than 25 working days in a case that needs not to be considered by specialist / working group or sub-committee

Not more than 60 working days in a case that needs to be considered by specialist / working group or sub-committee

3.2.4 Forms to Fill

Phor. Phor. 1/ Nor. Phor. 1

3.2.5 Fee

A licence for production of medical device is 1,000 baht each.

A licence for importation of medical device is 2,000 baht each.

3.2.6 Penalty

Any person who violates the first paragraph of Section 12 shall be liable to imprisonment for a term not exceeding three years or to a fine not exceeding one hundred and fifty thousand baht, or both (Section 58)

3.2.7 Contact Address

Licensed Medical Device Group, Medical Device Control Division, Food & Drug Administration of Thailand, Ministry of Public Health, Royal Thai Government
Tiwanont Road Tambon Talatkhwan Amphoe Muang, Nonthaburi , Tel:
0-2590-7416

Photo of
Applicant
or
Operator



No.....
Date.....
Applicant.....
(Authority Only)

**Licence Application Form for the
Manufacture of Medical Device**

Written at.....
Day.....Month.....Year.....

1.

I.....

(1) A private individual

Age.....years.....Nationality.....

Identity Card or other card (specified).....Number.....

Issued at

District.....Province.....

Address.....Lane.....Road.....Commune.

No.....

Sub

district.....District.....

Province.....Postal

Code.....Telephone.....

(2) A Juristic Person

Type.....

Registered on.....Registration No. Office

Located at

.....Lane.....Road.....Commune.

No.....

Sub

district.....District.....

..

Province.....Postal

Code.....Telephone.....

Having.....as the representative of juristic person Age.....years
Nationality..... Identity Card or other card (specified).....
Number.....Issued at
District.....Province.....
Address.....Lane.....Road.....Commune.
No.....
Sub
district.....District.....
Province.....Postal
Code.....Telephone.....

2. I hereby apply for a medical device manufacturing licence as prescribed in section 35 (1) having a place to manufacture called.....

Located atLane.....Road.....Commune.
No.....
Sub
district.....District.....
..
Province.....Postal
Code.....Telephone.....

Having a Storage facility located atLane.....Road.....
Commune. No.....Sub
district.....District.....
Province.....Postal
Code.....Telephone.....

In the case of applying for a licence to manufacture medical devices of which the licensee must organize a supervisor to control as specified in the Section 35 (9). I have arranged the supervisor as follow

.....
.....
.....
.....

.....

3. I guarantee that

In case of the licensee is a private individual

(1) I hold qualifications as described in the Section 14 of the Medical Device Act B.E. 2531.

In case of the licensee being a juristic person

(2) I hold qualification as described in the Section 14 of the Medical Device Act B.E. 2531.

4. Enclosed herewith is the following supporting evidence

(1) In case of a private individual

(a) Copy or photocopy of identity card or other card that can be used instead

(b) Copy or photocopy of domestic registration

(c) 3 photos, from waist up, directly facing the camera, no hat, 3x4 cm. taken no longer than 6 months ago

(d) Certificate issued by medical professional stating that applicant is not suffering from illnesses prescribed in the Section 14 (6) of The Medical Device Act B.E. 2531

(e) copy or photocopy of Trade or Commercial Registration

(f) Two copies of Location map of the production /importation premises, storage area and nearby structures

(g) Two copies of a construction plan drawn to scale of the structures within the premises for the manufacturing and storage of medical device

(2) In case of an applicant that is a juristic person

(a) Copy or photocopy of Registration Certificate

(b) Copy or photocopy of letter issued by a registrar of the juristic person showing purpose and name of person who can sign on behalf of the juristic person who applies issued no longer than 6 months ago

(c) Certificate of proxy to act on behalf of applicant with excise tax of 30 BAHT (valid for 1 year)

(d) Copy or photocopy of identity card or other card that can be used as a substitute

(e) Copy or photocopy of domestic registration

(f) 3 photos, from waist up, directly facing the camera, no hat, 3x4 cm. taken no longer than 6 months ago

(g) Certificate issued by medical professional stating that applicant is not suffer from illnesses prescribed in the Section 14 (6) of The Medical Device Act B.E. 2531

(h) Photocopy of the company's registration issued by the Ministry of

Commerce and business licence issued according to the Revolution Party Decree Number 281 dated 24 November B.E.2515 (1972) (if applicable),

(i) Two copies of Location map of the production /importation premises, storage area and nearby structures

(j) Two copies of a construction plan drawn to scale of the structures within the premises for the manufacturing and storage of medical device

5. Detail of Medical Devices as follow

(1) Thai name.....

Other language name.....

(2) Category.....

Type.....

(3) The characteristics of the medical devices

(4) Packaging

(5) The type and quantity of components

(6) Manufacturing Procedures

(7) Indication and use

(8) Instruction for use

(9) Storage and shelf life

(10) Standard, quality, inspection and analytical procedure

(11) Label

(12) One unit of Sample or 5 sets of photos showing detailed characteristics of the medical device

(13) 4 copies of medical devices inserts (if any)

(14) 4 copies of other related documents

6. In case of application for the Manufacturing of Medical Devices those need to have manufacture supervisor, I promise to submit the following documents before the granting of a medical device manufacturing licence

(1) Document stating qualifications and skill of the supervisor

(2) Employment contract between the applicant and the supervisor of manufacturing

Signature.....

Applicant(.....)

Note: 1. Put in in front of required statement.

2. For number 5 (3)-(14) show detail by attaching documents.

Photo of Applicant or Operator

No.....
Date.....
Applicant.....
(Authority Only)

Application Form for the Importing of Medical Devices

Written at.....
Day.....Month.....Year.....

1.

I.....

(1) A private individual Age.....years.....Nationality.....
Identity Card or other card (specified).....Number.....

Issued at

District.....Province.....

Address.....Lane.....Road.....Commune.No.....

.....Subdistrict.....District.....

.....Province.....Post

Code.....Telephone.....

(2) A Juristic Person

Registered on.....Registration No. Located

Office at..... Lane.....Road.....Commune.

No.....

Subdistrict.....District.....

.....
Province.....Post

Code.....Telephone.....

Having.....as the representative of juristic person Age.....years

Nationality..... Identity Card or other card (specified).....

Number.....Issued at

District.....Province.....

Address.....Lane.....Road.....Commune.

No.....Subdistrict.....District.....

.....
Province.....PostCode.....Telephone.....

2. I hereby apply for licence for the Importing of medical devices as prescribed in section 35 (1) having an manufacturing place called.....

..
Located at Lane.....Road.....Commune.
No.....
Subdistrict.....District.....

.....
Province.....Post
Code.....Telephone.....
Having a Storage Located at Lane.....Road.....
Commune. No.....Sub
district.....District.....
Province.....Post
Code.....Telephone.....

In the case of making application for the importation of medical devices for which the licensee must organize a supervisor to control as specified in the Section 35 (9). I have arranged the supervisor as follow

.....
.....
.....
.....
.....

3.I guarantee that
 In case of the licensee is a private individual
(1) I hold qualifications as described in the Section 14 of the Medical Device Act B.E. 2531.
 In case of the licensee being a juristic person
(2) I hold qualification as described in the Section 14 of the Medical Device Act B.E. 2531.
4. Enclosed herewith is the following supporting evidence

- (1) In case of a private individual
 - (a) Copy or photocopy of identity card or other card that can be used instead
 - (b) Copy or photocopy of domestic registration
 - (c) 3 photos, from waist up, directly facing the camera, no hat, 3x4 cm. taken no longer than 6 months ago
 - (d) Certificate issued by medical professional stating that applicant is not suffering from illnesses prescribed in the Section 14 (6) of The Medical Device Act B.E. 2531
 - (e) Copy or photocopy of Trade or Commercial Registration
 - (f) Two copies of Location map of the production /importation premises, storage area and nearby structures
 - (g) Two copies of a construction plan drawn to scale of the structures within the premises for the importing place and storage of medical device

- (2) In case that the applicant is a juristic person
 - (a) Copy or photocopy of Register Certificate
 - (b) Copy or photocopy of letter issued by a registrar of the juristic person showing purpose, and name of person who can sign on behalf of juristic person who applies issued no longer than 6 months ago
 - (c) Certificate of proxy to act on behalf of applicant with excise tax of 30 BAHT (valid for 1 year)
 - (d) Copy or photocopy of identity card or other card that can be used as a substitute
 - (e) Copy or photocopy of domestic registration
 - (f) 3 photos, from waist up, directly facing the camera, no hat, 3x4 cm. taken no longer than 6 months ago
 - Certificate issued by medical professional stating that the applicant is not suffering from illnesses prescribed in the Section 14 (6) of The Medical Device Act B.E. 2531
 - (h) Photocopy of the company’s registration issued by the Ministry of Commerce and business licence issued according to the Revolution Party Decree Number 281 dated 24 November B.E.2515 (1972) (if applicable),
 - (i) Two copies of Location map of the importation premise and storage of medical devices and nearby structures
 - (j) Two copies of a construction plan drawn to scale of the structures within the premises for the importing place and storage of medical device

5. Detail of Medical Devices as follow

- (1) Thai name/s.....
- Other language name/s.....

- (2) Category.....
Type.....
- (3) Manufactured by.....
- (4) The characteristic of the medical devices
- (5) Packaging
- (6) The type and quantity of components
- (7) Manufacturing Procedures
- (8) Indication and use
- (9) Instruction for use
- (10) Storage and shelf life
- (11) Standard, quality, inspection and analytical procedure
- (12) 4 copies of label
- (13) One unit of Sample or 5 set of photos showing detailed characteristics of the medical device
- (14) 4 copies of medical devices inserts (if any)
- (15) 4 copies of other related documents

6. In case of application for importation of medical devices those need to have manufacture supervisor, I promise to submit the following documents before the granting of an importation licence for medical devices.

- (1) Document stating qualification and skill of the supervisor
- (2) Employment contract between the applicant and the supervisor of importing

Signature.....Applicant
(.....)

Note:1. Put \surd in in front of required statement.

2. For number 5 (3)-(14) show detail by attaching document.

參考文獻

1. Department of Livestock Development. 2012. Animal Health in Thailand 2011, Bangkok, Thailand. Issued June 2012.
2. Importing of General Medical Devices (10 August 2010). ISBN: 978-974-244-378-8.
3. OIE South-East Asia and China for foot and mouth disease (SEACFMD) campaign, 2011. A roadmap to prevent, control and eradicate foot and mouth disease (by 2020) in South-East Asia and China. ISBN 978-974-8371-63-4. P1~P108.
4. Regional Coordination Unit, OIE Sub-Commission for foot and mouth disease in South-east asia, 2007. SEAFMD 2020. ISBN 978-974-8371-63-4. P1~P64.
5. World Organization for Animal Health (OIE) 2012. Foot and mouth disease. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial animals. Chapter 2.1.5.
6. 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.