

出國報告（出國類別：研究）

赴泰國曼谷參加全球口蹄疫研究聯盟
（GFRA）2019年科學會議
出國報告

服務機關、職稱及姓名：

行政院農業委員會家畜衛生試驗所	助理研究員	黃有良
	助理研究員	蔡國榮
	副研究員	張仁杰

出國地區：泰國

出國期間：108年10月28日至11月1日

報告日期：109年1月11日

摘 要

全球口蹄疫研究聯盟（Global Foot-and-Mouth Disease Research Alliance；GFRA）是以口蹄疫診斷、防治與控制等研究機構為主體的國際性聯盟，家畜衛生試驗所於108年8月加入GFRA聯盟成為合作者之一，並派員參加2019年GFRA聯盟科學會議，會議於108年10月29日至31日在泰國曼谷舉辦，家畜衛生試驗所發表1篇壁報論文「臺灣口蹄疫分離株基因與抗原性差異（Genetic and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus in Taiwan）」，會議課題包含流行現況、診斷技術、致病機轉、疫苗研發，為獲得口蹄疫診斷與控制新知，協助我國口蹄疫撲滅推動，未來應持續參與GFRA聯盟活動，與各國口蹄疫專家交流，對全球口蹄疫研究及疫情控制貢獻一份心力。

目 次

壹、緣起及目的.....	1
貳、過程.....	2
參、會議情形與科學論文重點摘要.....	8
肆、心得與建議.....	24

壹、緣起與目的

由於口蹄疫（FMD）具有高度的傳染性，並對全世界的畜牧業經濟構成威脅，所以被認定為重要跨境動物疾病之一，且廣泛流行於全球，特別是在亞洲、非洲及中東地區。我國自1997年爆發口蹄疫以來，口蹄疫相關清除、診斷與研究均是我國重要優先執行的國家政策，今（108）年恰逢我國向世界動物衛生組織申請口蹄疫非疫區與加入全球口蹄疫研究聯盟（GFRA），GFRA透過辦理科學會議凝聚全球口蹄疫研究人員，分享他們的研究成果和想法，其目標是利用這些科學研究成果找出現實防疫問題的解決之道，縮短研究與實際運用之差距，出席該會議了解國際上有關口蹄疫之研究現況，以及目前尚待解決的問題，有利於我國口蹄疫研究與國際接軌，也可作為我國口蹄疫防控上之參考並分享我國在口蹄疫撲滅之經驗，為全球清除口蹄疫盡一分心力。

家畜衛生試驗所負責我國口蹄疫診斷、監測與研究之工作，今（108）年8月本所加入GFRA，為了瞭解口蹄疫當前各種研究成果、防疫現況與GFRA相關運作與合作事宜，並與出席會議研究人員交流分享相關研究，由本所負責口蹄疫診斷、監測與研究之工作的黃有良助理研究員、蔡國榮助理研究員與負責GFRA等國際合作業務之張仁杰副研究員參與此次會議，並發表科學壁報論文「臺灣口蹄疫分離株基因與抗原性差異（Genetic and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus in Taiwan）」，於會中與國際專家共同討論與探討口蹄疫在亞洲漫延的來源、路徑與危險因子，也獲得相關知識與經驗交流，並藉由此次會議吸取各國口蹄疫之研究成果與新知，提升國內對於口蹄疫的研究能量與水平，進而跟上國際研究步調。

貳、過程

參加2019年全球口蹄疫研究聯盟（Global Food-and-Mouth Disease Research Alliance；GFRA）科學會議之行程，如表一。

表一、行程表

日期	行程			
108年10月28日	搭機赴泰國曼谷並入住飯店			
108年10月29日	08:30	Opening Ceremony		Opening Session
	09:00	FMD status in South-East Asia, China and Mongolia	Ronello Abila, OIE	
	09:15	The global epidemiological situation of FMD	Anna Ludi, WRL	
	09:30	Global vaccine security and FMD	Keith Sumption, EuFMD	
	09:45	Progress of the global FMD control strategy	Samia Metwally, FAO	
	10:00	DISCUSSION		
	10:45	Improved vaccine for FMD eradication	Jong-Hyeon Park, APQA	Session 1
	11:15	INTRODUCTION	A. Capozzo / M. Mahapatra	
		Low protection with an A/Asia/G-VII lineage FMDV emergency vaccine against an FMDV A/Asia/Iran-05 lineage virus challenge	P. Eblé	
		Challenges in FMDV strain selection as an input to attain broad vaccine cross-protection	I. Bergmann	
		Protective capacity of FMD South American vaccine strains O1-Campos, A24 and A2001 against southeast Asian viruses of currently circulating topotypes	V. Malirat	
		Evaluation of FMDV serotype-O with improved thermostability as a vaccine candidate	B. Sreenivasa	
		DISCUSSION		
		12:20	Poster Pitch 1	
12:40	Lunch and Poster Viewing			
108年10月29日	14:00	Foot-and-mouth disease control in endemic African	Tiziana Lembo, University of	Session 2

日期	行程			
		settings: opportunities and challenges	Glasgow	
	14:30	INTRODUCTION	D. Nilubol/ T. Lembo	
		Complete genome analyses of FMD viruses belonging to serotypes O, A and SAT 2 in East, West and North Africa	N. Knowles	
		Molecular epidemiology of FMD virus serotype O in Thailand during 2017-2019	S. Ungvanijban	
		Use of new bioinformatics tools applied to a regional evolutionary study of FMDV in the 2000-2001 epidemics in Argentina	G. König	
		Evolutionary competition drives the emergence and extinction of FMDV lineages	A. Di Nardo	
		Spatial epidemiology, phylogeography, and risk factors for FMD in Uganda	A. Munsey	
		DISCUSSION		
	15:50	Poster Pitch 2		
	16:00	Tea Time and Poster Viewing		
108年10月29日	16:30	FMD vaccine failures in the field	Dachrit Nilubol, Chulalongkorn University	Session 3
	16:50	INTRODUCTION	A. Ludi / Y. Li	
		An overview of 146S-specific llama single-domain antibody fragments for use in FMD vaccine quality control	M. Harmsen	
		Construction of a recombinant Ab phage display library derived from the immune repertoire of FMDV-SAT infected buffalo. Potential new diagnostic reagents?	P. Opperman	
		Reduction of Agpath reagent used in FMDV real-time TaqMan assay	N. Walker	
		Viral particles prepared by size exclusion chromatography can be used as coating material for serological assays	C. Turco	
		DISCUSSION		
18:00	Poster Pitch 3			

日期	行程			
	18:20	Free Time and Poster Viewing		
	19:00	"GFRA - Are We there yet?"	Jeff Hammond	
108年10月30日	08:30	Towards improved foot-and-mouth disease vaccines by dissecting immune responses using systems immunology approaches	Artur Summerfield, University of Bern	Session 4
		INTRODUCTION	A. Summerfield / N. Singanallur	
		Ripk3 restricted FMDV infection via necroptosis-independent inflammation	X. Qin	
		Viral determinants of FMDV A/Arg/01 virulence in adult mice	M. Gismondi	
		Comparison of the adaptive immune responses induced by FMD-vaccines formulated with 146S and 75S particles in mice and cattle	M. Miraglia	
		The pathogenesis of simultaneous and serial FMDV coinfections in cattle	C. Stenfeldt	
		DISCUSSION		
	10:05	Poster Pitch 4		
	10:20	Tea Time and Poster Viewing		
108年10月30日	10:50	Serological assays used to measure vaccine-induced responses against FMDV	A. Capozzo	Session 5
		Understanding serotypic cross-reactivity of antibody ELISAS and the impact on interpretation	A. Ludi	
		In-vitro vaccine-matching for FMDV: does bovine vaccinal sera (BSV) impact upon the reliability of serological immune responses?	J. Senawi	
		Sero-surveillance of FMD in wild boars in Korea	C. Lee	
		DISCUSSION	K. Scott / R. Reeve	
		11:45	Poster Pitch 5	
		12:00	Lunch and Poster Viewing GFRA Partner Meeting	
108年10月30日	13:30	FMDV undermines the host antiviral response by cleavage of key innate immune sensors. Lessons learned from the foe.	Margarita Saiz, CBMSO-CSIC	Session 6

日期	行程			
	14:00	INTRODUCTION	E. Rieder / T. De Los Santos	
		Deep sequencing of FMDV reveals association between vaccination, population bottlenecks, and adaptation	I. Fish	
		Single point mutation of FMDV L-pro affects deisgylation and modulates the host innate immune response	G. Medina	
		Sec62 negatively regulates FMDV replication by up-regulating IRE1a–RIG-I-mediated antiviral response	H. Guo	
		STING-mediated integrated stress response to FMDV infection	R. Zhang	
		DISCUSSION		
	15:05	Poster Pitch 6		
	15:15	Tea Time and Poster Viewing		
108年10月30日	15:45	INTRODUCTION	W. Vosloo / F. Maree	Session 7
		FMD vaccine platform: formulations for safe and DIVA-compatible FMD vaccines with improved potency	J. Hardham	
		Baculovirus-induced fast-acting innate immunity as an antiviral strategy against FMDV	G. Molina	
		Re-establishment of FMD vaccine production capacity in South Africa: immunogenicity studies of vaccine's antigens in guinea pigs and cattle	F. Peta	
		FMD vaccines for Eastern Africa Initiative	J. Salt	
		DISCUSSION		
	16:50	Poster Pitch 7		
	17:00	Free Time and Poster Viewing		
108年10月31日	08:30	INTRODUCTION	Z. Zhang / M. Saiz	Session 8
		Identification of RNA packaging signals in the genome of FMDV	T. Tuthill	

日期	行程			
		Molecular features of the integrin receptor and its interaction with the FMDV, an in-silico study	G. König	
		RNA secondary structure variation of CRE of FMDV is associated with host infection sensitivity	J. Cheong	
		Antiviral efficacy of short hairpin RNAs and artificial microRNAs targeting FMDV 3D	M. Gismondi	
		DISCUSSION		
	09:35	INTRODUCTION	J. Arzt / M. Perez-Filgueira	Session 9
		Genetic basis of the antigenic variation of the FMD virus during persistent infection in naturally infected cattle and Asian buffalo	J. Biswal	
		A new topical therapy for FMD addresses animal welfare and other issues	P. Windsor	
		Experimental infection of goats with FMDV SAT-1 serotype: their role in disease transmission	P. Mutowembwa	
		DISCUSSION		
	108年10月31日	10:30	Tea Time and Poster Viewing	
	11:00	The FMD and its control in China	Y. Li, The Chinese/OIE Reference Laboratory for FMD	Session 10
	11:20	INTRODUCTION	G. König/F. Mwiine/N. Knowles	
	11:20	Our challenge is to deliver effective biosecurity in FMD endemic countries in South East Asia	I. MacPhillamy	
		Serological epidemiology of FMD in sedentary mixed-species herds in Adamawa, Cameroon	S. Lendzele	
		Estimation of R0 for FMDV from surveillance data in endemic settings	A. Dekker	
		DISCUSSION		
		Interaction of temperature	N. Singanallur	

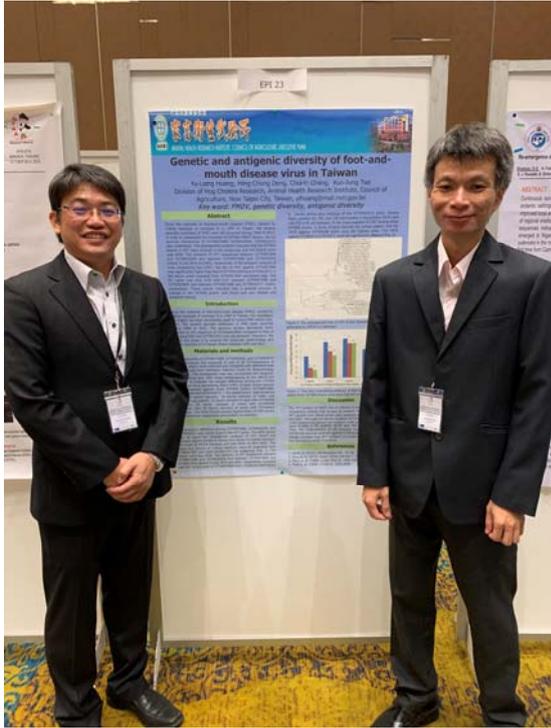
日期	行程				
		and humidity on stability of FMD virus serotype O strains			
		Livestock mobility and the implications for endemic FMD spread and control in East Africa	D. Ekwem		
		Updating parameters for modeling infectiousness of FMDV in pigs	J. Arzt		
		DISCUSSION			
	12:50	Wrap Up Session		Closure	
108年11月1日	從泰國搭機返台				

參、會議情形與科學論文重點摘要

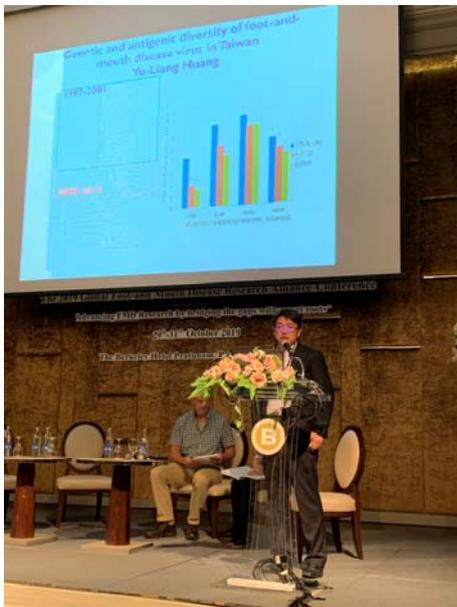
此次科學會議內容區分為流行病學、疫苗、診斷、致病機轉與病毒學等五大領域，進行熱烈的討論與交流，共有超過200位以上的研究人員與會，發表51篇口頭論文與59篇壁報論文，且每個壁報論文均有90秒時間進行上台發表（圖一）。畜衛所於此會議上發表壁報論文1篇「臺灣口蹄疫分離株基因與抗原性差異（Genetic and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus in Taiwan）」（圖二、三與四），有關此次會議各國研究學者發表的研究論文重點摘要如後：



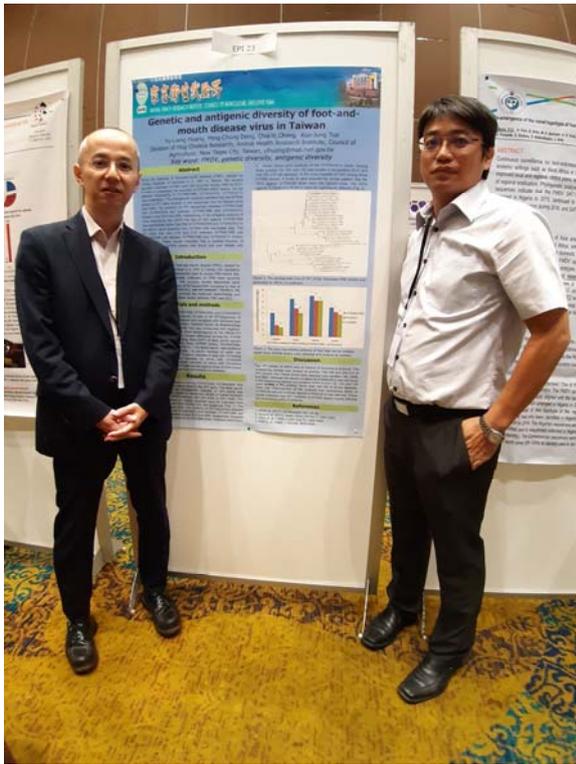
圖一、本次全球口蹄疫研究聯盟（GFRA）科學會議一隅。



圖二、本次全球口蹄疫研究聯盟（GFRA）科學會議由黃有良助理研究員、蔡國榮助理研究員與張仁杰副研究員與會，並發表壁報論文。



圖三、黃有良助理研究員上台進行壁報論文成果摘要介紹。



圖四、日本動物衛生研究所Dr. Katsuhiko Fukai與黃有良助理研究員於壁報論文前合影。

一、GFRA歷史與介紹

1. Dr. Jeff Hammond介紹全球口蹄疫研究聯盟（Global Foot-and-Mouth Disease Research Alliance；GFRA）的歷史背景，於2003年由5個研究機構籌組發起之國際性聯盟，包括英國Pirbright實驗室、美國Plum island實驗室、加拿大國家海外動物疾病中心（National Centre of Foreign Animal Disease）、澳洲動物衛生實驗室（Australian Animal Health Laboratory, AAHL）及肯亞國際家畜研究所（International Livestock Research Institute），設定5項重要研究方向（research pillars），包含新一代的疫苗、抗病毒、FMDV免疫學及分子結構、帶原狀態及診斷方法、控制口蹄疫產品的效能與影響，至今已有26個會員夥伴（members/partners）、15個合作者（collaborators）及15個利益關係者（stakeholders），共同努力為口蹄疫研究與防控進行國際合作，該聯盟主要目的在於提供新穎的預防疫苗、診斷技術、抗FMDV物質及針對口蹄疫疫區及非疫區的防控策略或工具，該聯盟預估五年期計畫（人力、動物、計畫及旅費、維護費等項目）的資金挹注達8千8百萬美金，並估計口蹄疫疫苗市場每年約2~3億美金，其中阿根廷和巴西就占了62%的全球銷售額，而2014年時GFRA開發新一代的疫苗已經可以取代目前商品化死毒疫苗，改善

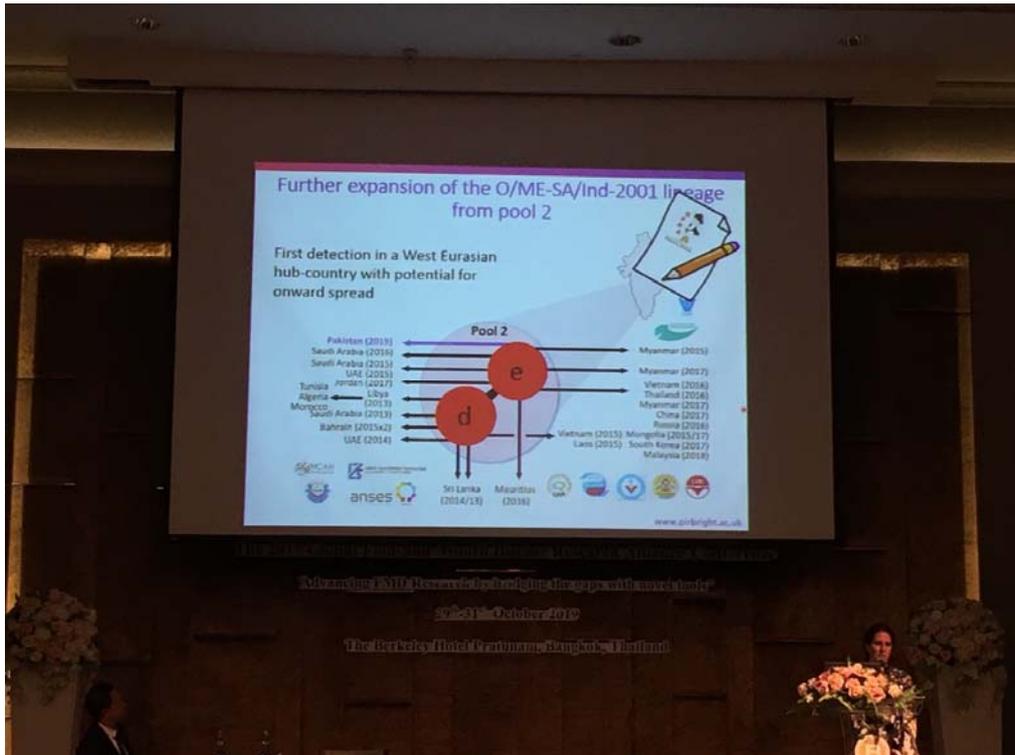
了死毒疫苗的不穩定性及其冷鏈保存需求、特定病毒株、無法引發較長且持續的免疫性等缺點，疫苗開發估計花費1千9百萬美金，而免疫反應研究經費亦達1千9百萬美金，花費更高者為抗病毒研究，達2千5百萬美金；針對帶原狀態及診斷方法的研究，於2012年時也已開發具較強特異性及敏感性的診斷套組，在五年期計畫估計花費超過9百萬美金；控制口蹄疫產品的效能與影響相關研究花費約2.7百萬美金；儘管GFRA組織已逐漸壯大，且無論在研究、疫苗開發、口蹄疫流行區域的控制策略以及協助清淨國家如何降低風險等方面都有亮眼成果，顯然大家都知道無法光靠疫苗就能解決問題，教育、生物安全都非常重要且關鍵，還有其他因素會影響口蹄疫控制的能力與意願，總而言之，情況仍是複雜未明；由於全球豬肉相關產品於2017年消費占4成（40.4%），高於雞肉（32.4%）及牛肉（21.8%），為重要食物來源，而養豬大城市多位居亞洲區域且旅客往來亞洲或非洲都日漸頻繁，2016年搭飛機旅行者超過30億人次，預估2035年會倍增至70億人次，都是造成口蹄疫跨境傳播的可能風險，除了口蹄疫，2019年非洲豬瘟入侵亞洲，並且疫情已在亞洲區域內擴散，包括中國大陸（含香港、澳門）、蒙古、越南、柬埔寨、北韓、寮國、緬甸、菲律賓、韓國、東帝汶、印尼等11國，非洲豬瘟勢必與口蹄疫並列豬隻疾病防疫的首要工作。

2. 家畜衛生試驗所（畜衛所）係自本（2019）年8月加入該聯盟成為合作者之一，因我國已向世界動物衛生組織提出申請臺灣、澎湖、馬祖為「非施打疫苗的口蹄疫非疫區」，未來將透過持續參與GFRA聯盟活動，能對全球口蹄疫研究及疫情控制貢獻一份心力。

二、 流行病學：

1. 綜合Abila Ronello、Ludi Anna、Eble Phaedra發表的口蹄疫在東南亞與中國及蒙古現況（FMD status in south-east Asia, China and Mongolia）、全球口蹄疫現況（Update on the current FMD global situation）、A/Asia/G-VII 緊急疫苗對A/Asia/Iran-05病毒的保護性不足（Low protection with an A/Asia/G-VII lineage FMDV emergency vaccine against an FMDV A/Asia/Iran-05 lineage virus challenge）等專題，了解到現有FMD病毒流行區（FMD pools）中病毒株逐漸擴散，如之前測到的O型病毒株O/ME-SA/Ind-2001隨著動物與其產品

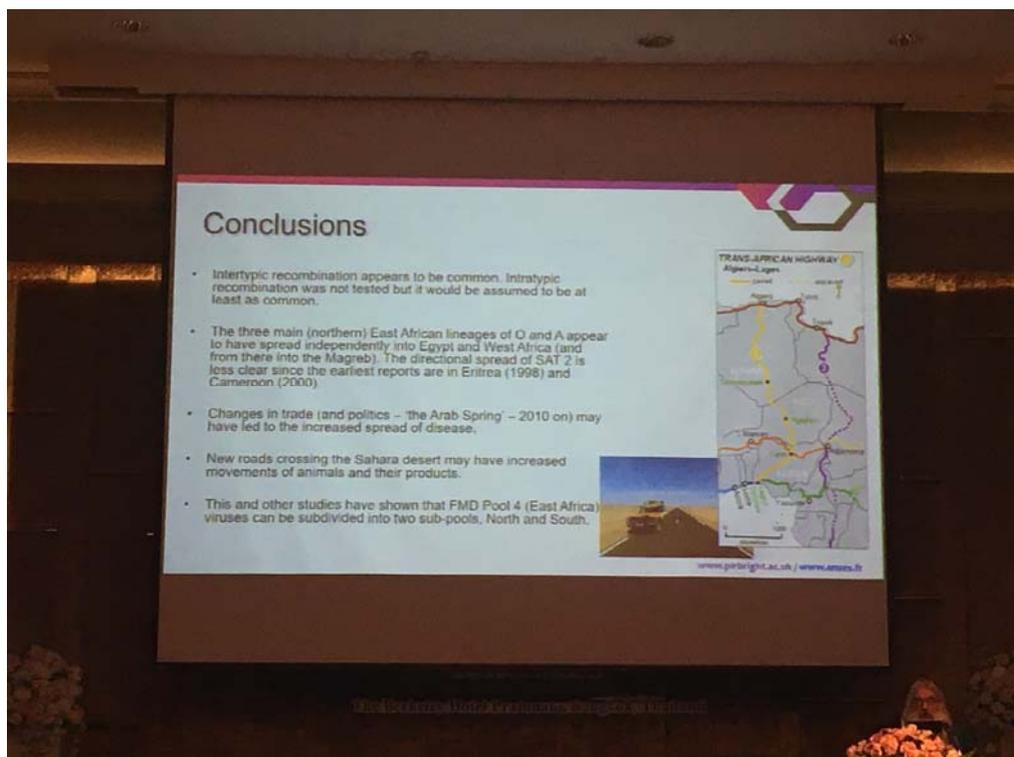
運輸（邊境貿易），從南亞傳入東南亞後逐漸蔓延（圖五），又如南亞的 A/Asia/G-VII 病毒株傳入中東地區，使該病毒流行區（pool）的病毒株變複雜，影響疫苗株挑選等防疫措施如疫苗儲備等。而需要考量在原有 A/IRN-05 疫苗株之外增加外來入侵病毒的疫苗儲備（如使用 A/G-VII 同源株或 A/MAY/97）等。動物運輸主要因同一 FMDV pool 內在不同國家之間存有價格差異而驅使貿易活動，造成口蹄疫傳播風險。



圖五、O型病毒株O/ME-SA/Ind-2001隨著動物與其產品運輸傳入東南亞與東亞。

2. 從Ludi Anna發表全球口蹄疫現況（Update on the current FMD global situation）亦顯示部分檢體受限於疾病期程或檢體狀態或冷藏運輸條件等不利因素，影響後續世界參考實驗室的病毒分離率或核酸檢出，阻礙對相關區域的疫情掌握，諸如對該地區流行病毒株監控與配合的疫苗株測試等研究。針對前述不利因素如同參考實驗室專家建議可能需透過策略討論或經濟分析如成本效益等多種誘因刺激或進行溝通，取得該區域獸醫主導機關或政策高層同意，進而願意投資從事相關改善。
3. 綜合Wadsworth Jemma、Munsey Anna發表非洲口蹄疫病毒株基因分析（Complete genome analysis of FMD viruses belonging to serotypes O, A and

Sat 2 in east, west and north Africa) 、在烏干達執行口蹄疫空間分布與地理演化及風險因子研究 (Spatial epidemiology, phylogeography, and risk factors for FMD in Uganda) 等專題，顯示透過持續對FMD病毒流行區 (FMD pools) 中病毒株序列監控，搭配演化分析、網絡分析工具及加入空間、時間、宿主等因子，可望探討病毒演化、病毒來源與傳播風險等，有助擬定該地區FMD控制措施與發展防疫策略及制定全球防疫規範等研究。Wadsworth Jemma表示東非洲的FMDV如O型與A型病毒株傳入埃及與西非北部，間接造成歐洲地區威脅，而貿易政策改變與公路穿越薩哈拉沙漠等人為建物會增加動物與動物產品移動與運輸頻率，進而提高疾病傳播風險 (圖六)。Munsey Anna表示在烏干達調查發現FMDV有空間群聚現象，且接近國境邊界伴隨著較高疾病傳播風險，此外在動物飼養密度高或低降雨量地區有較高疾病傳播風險，而分子流行病學分析亦顯示病毒容易持續存在臨近家畜市場、人口密度高、牛群密度高地區。



圖六、貿易政策改變與公路穿越薩哈拉沙漠等人為建物會增加動物與動物產品移動與運輸頻率，進而提高疾病傳播風險

4. 口蹄疫在東南亞與中國及蒙古現況 (FMD status in south-east Asia, China and

Mongolia) : Abila Ronello表示在中國是由O、A、Asia1等3種血清型FMDV引起疫情，主要病毒株有O/Cathay、O/ME-SA/Ind-2001、O/SEA/Mya-98、O/ME-SA/PanAsia、A/Asia/Sea-97、Asia1，其中Asia1自2010年無病例發生，A/Asia/Sea-97區分成2群，分別是2013年至2018年發生的疫情，主要感染牛與豬隻，以及主要發生於牛隻的病毒群。O型病毒包含有 O/Cathay發生於2016年及2018年至2019年期間，造成豬隻疫情；O/ME-SA/Ind-2001發生於2017年至2019年，感染牛與豬隻；O/SEA/Mya-98發生於2010年至2018年，有2群病毒分別造成牛及豬隻感染；O/ME-SA/PanAsia發生於2011年，2018年再度傳出疫情，病毒株序列與越南2017年至2018年期間的病毒株相近。

5. 泰國執行O型口蹄疫病毒的分子流行病學 (Molecular epidemiology of FMD virus serotype O in Thailand during 2017-2019) : Ungavanijban Sahawatchara表示在泰國發生的口蹄疫是由O、A、Asia1等3種血清型引起，先前O型流行病毒株包含O/SEA/Mya-98、O/Cathay、O/ME-SA/PanAsia，近些年隨著O/ME-SA/Ind-2001病毒株傳入東南亞地區，對豬場樣本調查發現主要病毒株為O/ME-SA/PanAsia與柬埔寨2015年病毒相近，O/SEA/Mya-98似乎與泰國2016年病毒相同，至於主要的病毒株O/ME-SA/Ind-2001則與泰國及緬甸2016年病毒株相近。

三、疫苗：

1. 全球疫苗安全與口蹄疫 (Global vaccine security and FMD; progress and directions since the EUFMD open session 2018) : Sumption Keith表示為穩定疫苗供應及確保品質，急需政府與疫苗產業合作，制定前置品質確認系統 (pre-qualification system)，同時針對緊急防疫用疫苗的生產、發證與成效等訂定規範。
2. 全球口蹄疫控制策略進展 (Progress of the global FMD control strategy) : Metwally Samila表示部分疫區尤其是經濟條件較差國家，缺乏經費採購疫苗，疫苗覆蓋率普遍低，急需國際組織經濟支援以及確認與檢驗疫苗品質，如參考實驗室或參考中心等技術協助。
3. Metwally Samila補充說明部分疫區尤其是經濟條件較差國家，基於成本考量，多數農民傾向使用藥物治療口蹄疫感染動物，而不願意使用疫苗做預

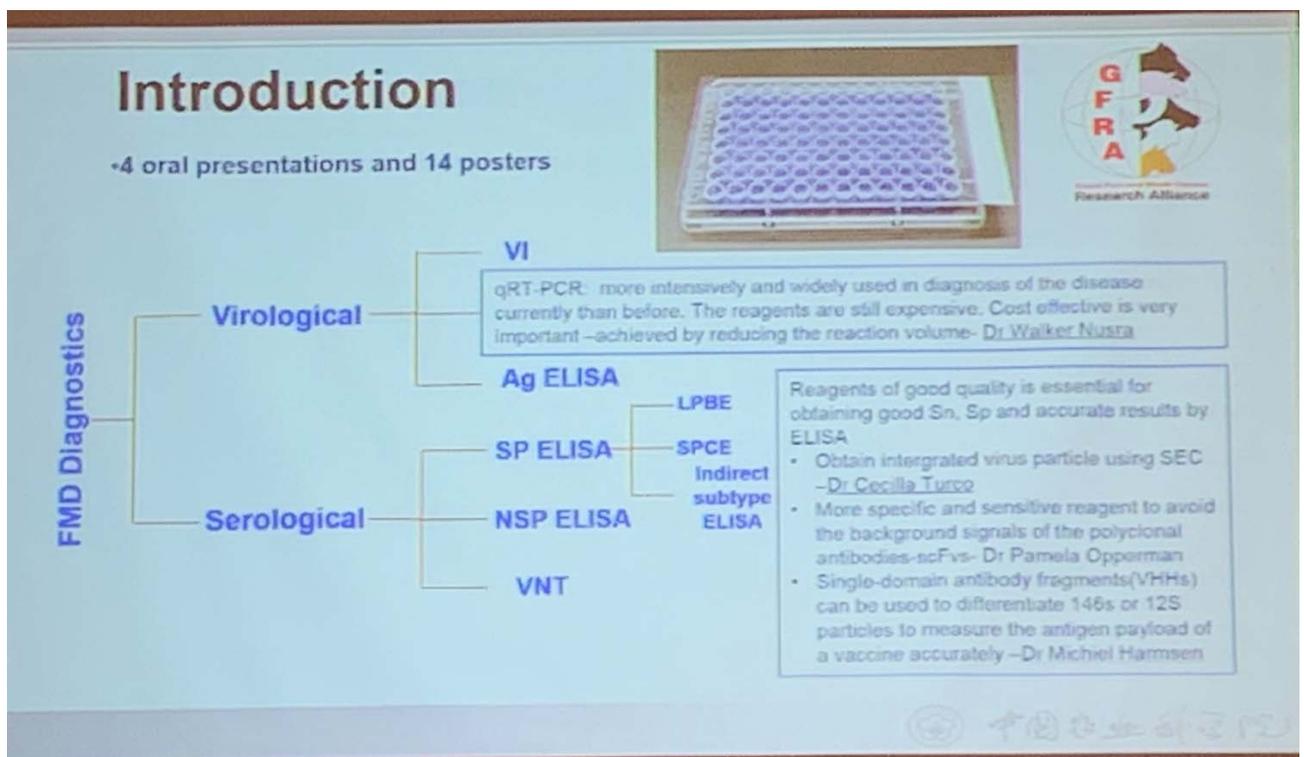
防，且不習慣尋求獸醫服務體系幫助，這些現況皆會阻礙口蹄疫防疫推動與疫情控制。

4. 南美洲疫苗株對東南亞流行病毒之保護研究 (Protective capacity of FMD south American vaccine strains O1 Campos, A24 and A2001 against southeast Asian viruses of currently circulating topotypes) : Malirat Viviana表示使用南美洲疫苗株含O1 Campos、A24 Cruzeiro、A2001與東南亞地區流行的病毒株包含O/SEA/Mya-98、O/ME-SA/PanAsia、O/ME-SA/Ind-2001、O/Cathay、A/Asia/Sea-97、A/Asia/G-VII等病毒進行抗原及序列相似度比對分析，輔以中和抗體檢測，交叉分析南美疫苗株接種牛與豬隻後血清中對東南亞地區現行O型與A型野外毒株的中和能力，並以攻毒試驗來測試證實前述疫苗株俱有保護效力。
5. 口蹄疫疫苗平台研究 (FMD vaccine platform: formulation for safe and DIVA-compatible FMD vaccines with improved potency) : Hardham John表示使用基因工程生產FMDV非結構蛋白基因，如3D或3B缺損病毒株或置換具血清型特異性殼蛋白，可發展安全性佳兼具DIVA區別功能疫苗，目前對豬隻、牛測試結果，不會造成臨床症狀也不會排毒，未來將朝佐劑搭配做開發。
6. 在非洲南部重新建立口疫苗疫苗生產量能研究 (Re-establishment of FMD vaccine production capacity in south Africa: immunogenicity studies of vaccine's antigens in guinea pigs and cattle) : Peta Faith表示針對盛行於非洲南部的病毒型別，包含SAT1、2、3，挑選出5株病毒製成5價疫苗，依據天竺鼠免疫結果訂出疫苗用量0.5mL與各別病毒的抗原量3.0 μ g (SAT2需提高至6.0 μ g)，進一步以牛隻免疫與攻毒試驗訂出單價疫苗劑量4-30 PD50，後續將評估免疫效果可維持時間，研究結果可應用於非洲南部疫情以及境內國家公園野生動物預防措施。
7. 昆蟲桿狀病毒誘發快速免疫反應研究 (Baculovirus-induced fast-acting innate immunity as an antiviral strategy against FMD virus) : Molina Guido Nicolas表示以昆蟲桿狀病毒表達的病毒體 (budded virions; BVs) 接種小鼠，可於1周內誘發免疫反應，分析結果發現第一型干擾素與NK cell是提供試驗動物對抗FMDV與防止發病的主要來源，若將BVs加入豬周邊血液單核白血球進行培養可誘發IFN- α 作用，將BVs打入豬隻血管可在初期 (約9小時內) 提升

干擾素產量，幫助細胞抵抗FMDV感染。

四、診斷技術：

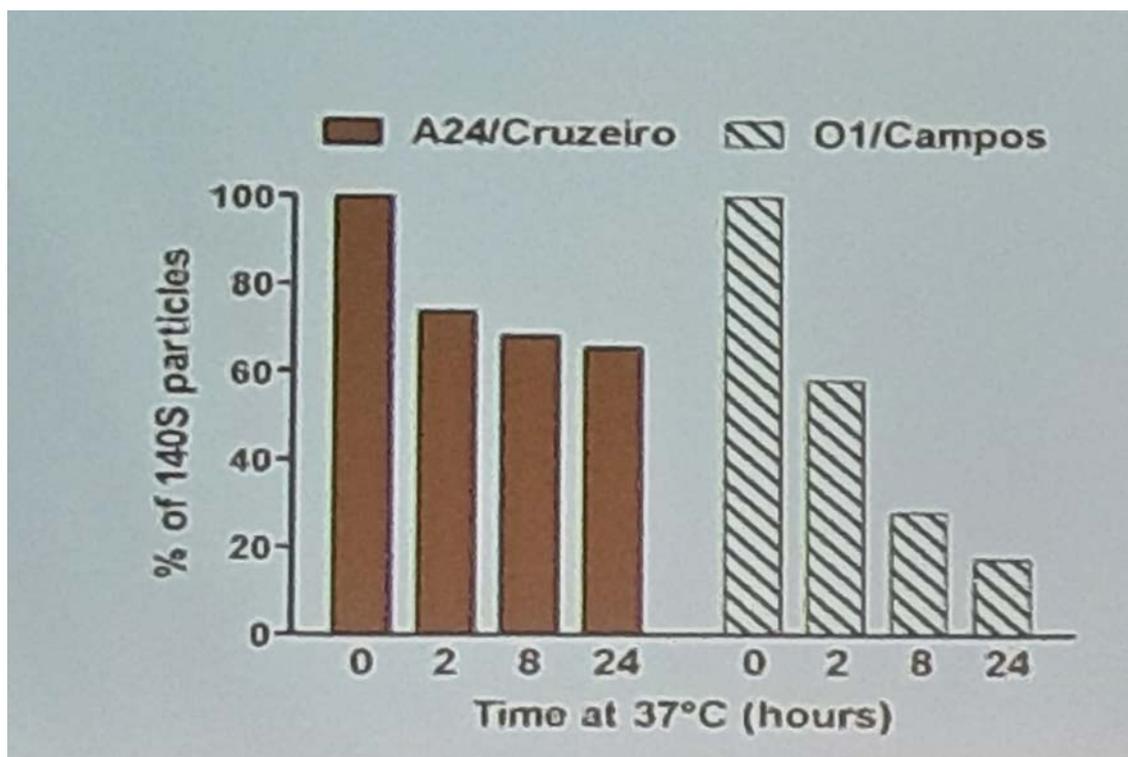
口蹄疫診斷方法區分為病毒學診斷與血清學診斷，病毒學診斷包括：病毒分離（包含核酸檢測）與抗原ELISA；血清學診斷包括：病毒中和試驗（VNT）、液相阻斷-酵素結合免疫吸附試驗（LPBE）、固相競爭-酵素結合免疫吸附試驗（SPCE）、間接型-酵素結合免疫吸附試驗（IE）與非結構蛋白-酵素結合免疫吸附試驗（NSP ELISA）等（圖七）。



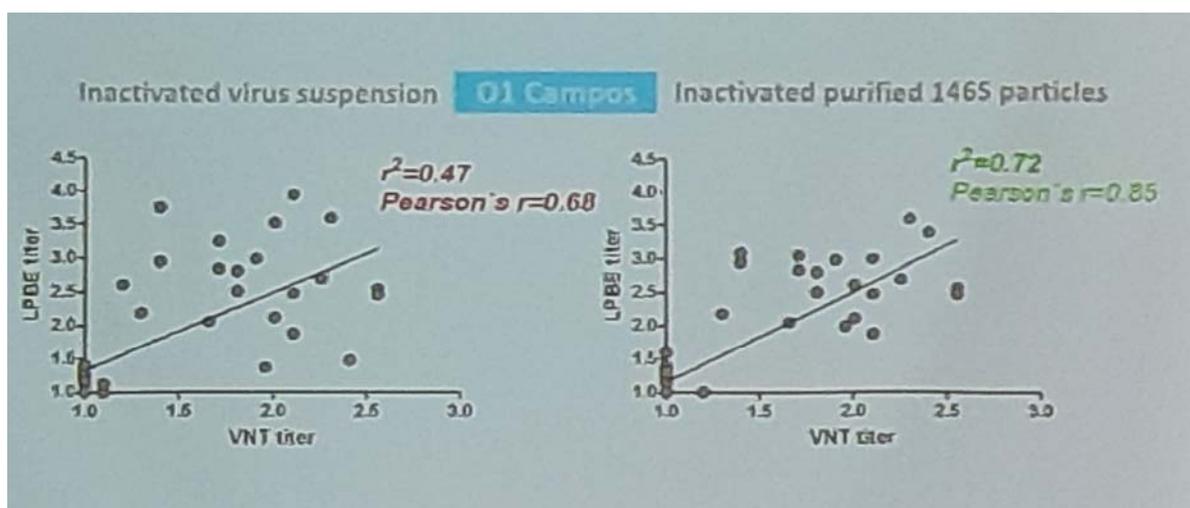
圖七、口蹄疫檢測技術

1. 使用血清學分析監測口蹄疫疫苗誘發的反應（Serological assays used to measure vaccine-induced responses against foot-and-mouth disease virus）：
Capozzo Alejandra Victoria說明不活化的全病毒顆粒結合油質或鋁膠佐劑製成的口蹄疫疫苗被廣泛使用於全世界，而疫苗的保護性是基於其疫苗株的血清型別與所誘發免疫反應，然而，現行疫苗的選擇都是使用血清學分析的方式進行評估，其效力往往容易受試驗分析方法的不同而受到限制，血清學的檢測的檢測方式包括VNT、LPBE與SPCE等方法，但VNT與LPBE間的相關性

並無法發讓人接受，其可能的原因在於，LPBE等ELISA方式是檢測抗口蹄疫病毒顆粒所有抗體，但VNT只針對中和抗體部分而導致差異，另外，在製做LPBE等ELISA時，其所使用的口蹄疫抗原保存時間，容易因病毒株的不同有所差異，以A24與 O1/Campos病毒株為例，A24病毒株的146S病毒顆粒於37°C存放24時後仍有保有60%，但O1/Campos病毒株的146S病毒顆粒於37°C存放24時後只剩下20%（圖八）。再者將含有90% A24病毒株146S與45% O1/Campos病毒株146S分別免疫豬隻，其LPBE抗體力價並無顯著性差異，但在IE與VNT之間則有顯著性差異，另外，也發現使用146S抗原的LPBE與VNT的相關性較使用病毒上清液做為抗原高，於O1/Campos病毒株試驗中，病毒上清液的LPBE與VNT的相關性 r^2 為0.47，而使用全病毒顆粒的LPBE與VNT的相關性 r^2 則為0.72（圖九）。結論，使用全病毒顆粒所製成的ELISA檢測方法與VNT有較佳相關性。



圖八、A24與 O1/Campos病毒株抗原保存半衰期。



圖九、不同抗原LPBE與VNT的相關性。

2. ELISA檢測法之血清型交叉反應與判讀影響研究（Understanding serotypic cross reactivity of antibody ELISAs and the impact on interpretation）：Ludi Anna表示當使用抗體ELISA進行血清學診斷時，必須考慮不同血清型別間的交叉反應；在比較現行3種商品化試劑與2種英國口蹄疫參考實驗室（Pirbright）所建立之LPBE與SPCE檢測方法後，發現大約有10%比例的血清樣品會與其它血清型別的FMDV有交叉反應，部分試劑甚至會高達50%，因此，這些樣品需要用病毒中和試驗進行最後確診。
3. 綜合Turco Cecilia、Opperman Pamela 發表 以色層分析法純化病毒顆粒作為血清學檢測試劑研究（Viral particles prepared by size exclusion chromatography can be used as coating material for serological assays）、建構抗體表達之噬菌體庫（Construction of a recombinant antibody phage display library derived from the immune repertoire of FMDV-Sat infected buffalo .potential new diagnostic reagents?）等專題，OIE參考實驗室或合作中心鑒於抗體檢測標準方法-中和抗體或替代方法如LPBE的技術門檻與缺點，研發較簡化的抗原純化法或較佳捕捉或檢測抗體等試劑，可望改善現行抗體檢測缺點，建立較便利、快速的抗體檢測技術。例如以色層分析法（size exclusion chromatography）取代傳統蔗糖梯度超高速離心，可取得完整病毒殼顆粒，協助研發抗體間接ELISA法。LPBE使用多源血清作為捕捉及檢測抗體，有較高背景值，若將不同SAT血清型，如SAT1、SAT2、SAT3感染水牛後，自其脾臟核酸萃取物中增幅免疫球蛋白的重鏈與輕鏈，透過phage

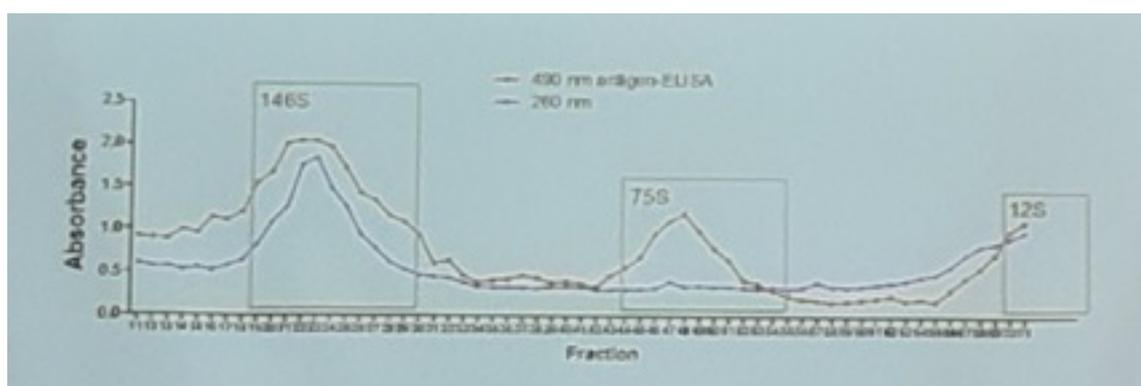
表達篩選出分別針對SAT1與SAT3具有特異性抗體的片段（即取得血清型別特異性抗體的局部結構；SAT specific single chain variable fragments（scFvs），初步分析結果顯示前述抗體片段可改進現行檢測技術的敏感性與特異性。

4. 已有新的技術改善血清學和交叉保護的關聯性（correlation），例如目前使用中和抗體試驗（VNT）及LPBE除了使用r1值作為評估，應考量免疫球蛋白G亞型（IgG subtype）及抗體親和性（avidity）等因素，由英國、德國、澳洲、南非及阿根廷等實驗室開始進行技術移轉，後續會需要檢體來進行確效（validation）並尋求更多口蹄疫參考實驗室協助。

五、致病機轉及免疫：

1. 藉由系統性免疫反應來改善口蹄疫疫苗（Towards improved foot-and-mouth disease vaccines by dissecting immune responses using systems immunology approaches）：Summerfield Artur等人使用週邊血液單核細胞的基因轉譯模式去評估羊與豬免疫後的免疫反應，於動物於疫苗免疫後24小時，即可引起很強的免疫反應，其可活化炎症反應、記憶細胞、樹突細胞、循環T與B細胞。另外，在一些缺乏抗體的動物中，其抗體生成不佳與本身基因反應不佳或延遲有關。在免疫後1週，週邊血液單核細胞的基因轉譯與免疫球蛋白、循環T與B細胞間的免疫反應間呈現正相關，這些結果表示，早期週邊血液單核細胞的基因轉譯反應可提供疫苗佐劑與刺激的重要資訊，有助於疫苗之研發。
2. 在牛與小鼠上比較口蹄疫 146S 與 75S 病毒顆粒疫苗的免疫反應（Comparison of the adaptive immune responses induced by FMD vaccines formulated with 146s and 75s particles in mice and cattle）：Miraglia Maria Cruz說明疫苗免疫是控制與預防口蹄疫重要的方式，現有商業口蹄疫疫苗生產對口蹄疫非疫區國家來說存在極大生物風險，並增加更多生產成本。單純的口蹄疫病毒殼蛋白被設定為安全的替代抗原，它保留抗原本身的抗原決定位且不具有感染性，從過去的研究顯示口蹄疫病毒顆粒可區分無146S、75S與12S等不同大小病毒顆粒（圖十）。此試驗的目是比較口蹄疫A24/Cruzeiro病毒株的75S與146S病毒顆粒所製成的油質佐劑疫苗在小鼠與牛身上的免

疫效力，並評估其細胞性免疫反應與體液性免疫反應。於小鼠試驗，將小鼠區分為3組（每組5隻），分別免疫146S（0.3 μ g）、75S（0.3 μ g）與不免疫，免疫後26天，以 1×10^6 pfu/200 μ L進行腹腔注射攻毒，其結果顯示，IgG1抗體力價在146S與75S兩者並無顯著差異；在免疫後（DPV）14、21、27天與攻毒後（DPI）3與7天，IgG2A抗體力價檢測中發現146S顯著高於75S。牛隻試驗則以8個月小牛進行試驗，區分為146S與75S兩組，每隻免疫3 μ g口蹄疫抗原，免疫後70天再以商業化疫苗進行補強，用LPBE進行抗體測定時，146S組在免疫後28至70天均有較高的抗體力價，用VNT進行抗體測定時，75S組在免疫後無法檢出中和抗體，但146S組可檢出中和抗體；在抗體Isotype分析試驗發現，146S組可誘發IgM、IgG1、IgG2等抗體，75S可誘發IgM與IgG1抗體，但無發誘發IgG2抗體，其IgG1抗體力價也較146S組低。牛隻抗原量試驗，分為146S組與75S組兩種抗原，每種抗原分為10 μ g與3 μ g兩組，共4組，結果顯示，146S 10 μ g組有最高的LPBE與VNT抗體力價，146S組所誘發的IFN- γ 量也較75S組高，146S-3 μ g組所誘發的LPBE與VNT抗體也較75S-3 μ g組高。結論，口蹄疫病毒複製過程中會產生146S、75S與12S的病毒顆粒或蛋白，其中以146S病毒顆粒所產生的疫苗免疫效力最佳，可誘發高價的中和抗體與IFN- γ 量；另外，免疫抗原量也是影響疫苗效力的因子之一，免疫高抗原量較低抗原具有較佳的保護性。



圖十、口蹄疫病毒顆粒區分為146S、75S與12S等3種。

3. 研究牛隻同時或連續性感染口蹄疫的致病機轉（The pathogenesis of simultaneous and serial FMDV coinfections in cattle）: Stenfeldt Carolina說明此試驗主要評估當牛隻同時或先後感染兩種血清型別的口蹄疫病毒後，病毒於

動物體內競爭情況，此試驗選用A型（A24病毒株）與O型（O1 Manisa病毒株）口蹄疫病毒進行牛隻感染試驗，第一批試驗4隻牛隻同時感染A24與O1 Manisa病毒株，於攻毒後1至10天的口水與血清中均可檢出A24與O1 Manisa兩種病毒，但水疱液內的A24與O1 Manisa的量則明顯不同，4隻牛隻中1頭只檢出O1 Manisa，1頭只檢出A24，2頭同時檢出A24與O1 Manisa兩種病毒，其中一頭A24量較多，另一頭O1 Manisa較多，顯示兩種病毒於宿主體內會互相競爭。第二批試驗，4隻牛隻先感染A24病毒株，21天後再感染O1 Manisa病毒株，牛隻感染A24後均有中度至嚴重的病變且咽喉亦可檢出A24，但O1 Manisa攻毒後則無顯現臨床症狀且鼻腔、血清無法檢出FMDV，持續追蹤發現O1 Manisa攻毒後14-49天期間，在咽喉液中，只有1隻檢出A24，然而4隻均可檢出O1 Manisa。結論，當牛隻同時感染A型（A24病毒株）與O型（O1 Manisa病毒株）口蹄疫病毒後，於感染後1至10天可於口腔拭子同時檢出兩種病毒，但如先感染A型（A24病毒株）後21天再感染O型（O1 Manisa病毒株）則，牛隻不會產生臨床症狀且口腔拭子並無法檢出口蹄疫病毒，但後續咽喉液樣本中均可檢出O型口蹄疫病毒，與少數的A型病毒，這結果顯示，當有兩種病毒於同一地區流行時，會互相影響臨床症狀表現與病毒排毒。

4. 口蹄疫病毒SAT-1型山羊攻毒試驗（Experimental infection of goats with FMDV SAT-1 serotype: their role in disease transmission）：P. Mutowembwa指出山羊感染口蹄疫病毒SAT-1型後，病程較為溫和(mild)，臨床症狀包括發燒、口腔及蹄部皮膚潰瘍性病變。試驗羊隻有觀察到鼻分泌物增多，未曾於其他文獻發表中提及。在南非地區，山羊在流行病學及口蹄疫病毒傳播扮演的角色值得後續研究與調查。

六、病毒學

1. 口蹄疫病毒透過切割免疫系統重要感測器來破壞宿主抵抗機制（FMDV undermines the host antiviral response by cleavage of key innate immune sensors. Lessons learned from the FOE）：Saiz Mararita表示宿主細胞的retinoic acid inducible gene-I like receptors亦即ubiquitous cytosolic RNA helicase與辨認病毒RNA有重要關聯，可誘發後續一連串第一型干擾素分泌

與抗病毒作用。研究顯示FMDV的L^{pro}蛋白質可切割宿主的RNA helicase等多種蛋白質，導致β干擾素與抗病毒作用下降，顯示FMDV的L^{pro}蛋白質具有強大對抗宿主免疫系統能力。

2. 口蹄疫病毒L^{pro} 蛋白的點突變對宿主免疫反應影響 (Single point mutation of FMD virus L^{pro} affects deisglylation and modulates the host innate immune response) : Medina Gisselle N表示干擾素可誘發基因表現，包含ubiquitin-like蛋白質調控ISG15可結合多種蛋白質（稱為ISGylation作用），影響免疫反應的多種訊號傳遞，FMDV L^{pro}的保留區可與ISG15做交互作用，若將L^{pro}做突變發現無法切割ISG15，且不似原始病毒般會降低宿主的ISGylation，進一步檢視涉及免疫反應的蛋白質，發現L^{pro}突變的病毒雖可切割宿主蛋白質但速率較緩慢，又透過人類現病毒載體過度表現豬隻的ISG15可降低豬源細胞中FMDV複製，顯示ISG15可能具有治療或作為疫苗佐劑的潛力。
3. 小髮夾RNA與合成小分子RNA對口蹄疫的抗病毒效力 (Antiviral efficacy of short hairpin RNAs and artificial MircoRNAs targeting FMDV 3D) : Curra Anabella表示小分子RNA (sRNAs) 可調控蛋白質轉譯，故普遍被推測具抗病毒作用。透過分析FMDV3D分子搭配預測軟體，推敲出具有小分子RNA作用的區域如序列290、444與1055，透過細胞轉染技術使BHK-21細胞株表達此類小分子RNA，如小髮夾RNA (shRNA) 或合成小分子RNA (amiR) 檢測病毒複製情形，發現sRNAs在某段時間（如24小時）內可抑制或延遲FMDV複製。
4. 口蹄疫病毒組裝研究 (Identification of RNA packaging signals in the genome of FMDV) : T. Tuthill說明利用deep sequencing比較FMDV組裝與所有RNA族群可能獲得組裝基因的限制因素。而PPS1基因對病毒的生存能力極為重要，可能是負責主要的組裝訊息傳遞。在病毒組裝過程、轉錄及轉譯，genomic RNA的PK region可能會有構型上的改變。
5. 口蹄疫病毒核酸次級結構研究 (RNA secondary structure variation of CRE of FMDV is associated with host infection sensitivity) : J. Cheong說明口蹄疫病毒核酸次級結構與感染宿主種別有關，但與血清型無關，而辨識宿主因子與口蹄疫病毒的CRE交互作用有關，其中PCBP2可直接與口蹄疫病毒CRE RNA結合，因此CRE RNA與PCBP2蛋白交互作用可說明其為感染宿主的機

制之一。

6. 持續感染狀態下口蹄疫病毒抗原性變異研究 (Genetic basis of the antigenic variation of the FMD virus during persistent infection in naturally infected cattle and Asian buffalo) : J. Biswal說明在口蹄疫O型病毒辨識到一個新的抗原位VP3-131, 且發現抗原熱點 (hot-spot) 在於口蹄疫病毒的殼蛋白 (capsid protein) 上, 建議於Viral fitness與抗原性變異領域仍值得後續研究。

七、畜衛所於此會議上發表壁報論文1篇「臺灣口蹄疫分離株基因與抗原性差異 (Genetic and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus in Taiwan)

1. 自1997年臺灣爆發O型口蹄疫以後至2012年期間, 有數個散發性口蹄疫病例之發生, 為了瞭解這些病毒株是否演化成不同的病毒株, 本試驗將針對O/TWN/1998、O/TWN/2009與O/TWN/2012病毒株進行全基因之解序。從VP1基因的分子樹狀圖分析發現, O/TWN病毒株可區分為兩亞群, 其分界點位於2009年, 而O/TWN/1998 VP1基因與O/TWN/2009和O/TWN/2012的相似性分別僅有90.8%與89%。
2. 當使用中和抗體交叉反應分析其抗原性時, 四種O/TWN/1998疫苗免疫後之血清其中和O/TWN/2009與O/TWN/2012之能力顯著下降, 且r1值也分別僅有0.52與0.37, 這結果顯示O/TWN病毒株隨著時間演化突變也連帶影響著抗原的改變。

肆、心得及建議

- 一、為落實全球防疫一體（one health）及身為聯盟成員的義務，臺灣未來應持續參與國際組織辦理之相關會議與活動，特別是此類科學會議有助於臺灣在口蹄疫研究等獸醫研究發展領域與國際接軌。
- 二、隨著全球貿易網路日趨頻繁，病原跨國或跨區域傳播也日趨頻繁，為了面對日趨嚴峻的跨國界動物傳染病的傳播與疫情，相關疾病的病毒、血清、核酸與試劑等生物資材的引進，將有助於疾病診斷方法的建立，以協助疾病早期監測預警。
- 三、GFRA的目的是利用科學研究解決牧場或野生動物口蹄疫診斷與防疫所面臨之問題，由會議專題內容得知英國、阿根廷、南非、澳洲、美國、泰國等知名研究機構均有跨國合作，依據GFRA夥伴國商談決議，分頭進行重點研究工作，藉以持續提升口蹄疫診斷與防治技術與知識，協助口蹄疫控制，此種模式也可借鏡運用於國內重大疾病防疫與研究上，進行跨單位整合與分工。
- 四、為降低使用市售或英國參考實驗室之ELISA檢測試劑套組所產生交叉反應問題，而致能力比對時出現診斷不足處，建議同意進口不同型別之FMDV，以利進行血清中和試驗，提升診斷能力。