

出國報告  
(類別:其他)

赴美國疾病控制與預防中心進行蝙蝠血  
清麗沙病毒抗體監測出國報告  
(Lyssavirus antibody test of bat sera in  
Poxvirus and Rabies Branch of CDC,  
USA)

計畫機關及姓名職稱：

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

胡書佳助理研究員

奉派國家： 美國(USA)

報告日期： 2015 年 6 月 29 日

出國期間： 2015 年 3 月 7 日至 3 月 29 日

# 赴美國疾病控制與預防中心進行蝙蝠血清麗沙病毒抗體監測出國報告

## 摘要

為執行「我國狂犬病中、長程科技研究之前期計畫」之細部計畫「建立國際合作機制」，於本(104)年 3 月 7 日至 29 日奉派前往美國疾病控制與預防中心 Poxvirus and Rabies Branch 實驗室進行技術研習，研習內容主要為學習快速螢光斑點抑制試驗(RFFIT)及 micro RFFIT 技術，期間並進行臺灣蝙蝠血清麗沙病毒中和抗體監測。返國後將於實驗室內建立 micro RFFIT 技術，用以進行國內蝙蝠血清抗體監測。

研習期間以 CVS-11 病毒株完成 94 例蝙蝠血清抗體監測，檢測結果為陰性，其餘樣本將於實驗室內建立 micro RFFIT 檢測技術後進行檢測。未來並將應用此種技術持續進行臺灣蝙蝠血清抗體監測，若有出現疑似抗體陽性，則會委託美國疾病控制與預防中心 Poxvirus and Rabies Branch 實驗室再次確認結果。

## 目次

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 一、 行程綱要.....                    | 1  |
| 二、 研習內容.....                    | 2  |
| (一) CDC 安檢審核.....               | 2  |
| (二) 進入實驗室前之檢核.....              | 2  |
| (三) RFFIT 及 micro RFFIT 訓練..... | 3  |
| (四) 盲樣測試.....                   | 9  |
| (五) 蝙蝠血清麗沙病毒中和抗體檢測.....         | 10 |
| 三、 心得與建議.....                   | 11 |
| 四、 附圖.....                      | 14 |
| 五、 附表.....                      | 16 |

一、 行程綱要

**Saturday~Sunday, 7~8March 2015**

|            |  |
|------------|--|
| 搭機前往美國亞特蘭大 |  |
|------------|--|

**1<sup>st</sup> week, 9~13March 2015**

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| CDC 安檢及身分查驗                                     | Poxvirus and Rabies<br>Branch, CDC |
| 許可證(badge)取得                                    |                                    |
| Safety Survival Training (I,II,IV)              |                                    |
| Computer Security Awareness<br>Training         |                                    |
| Counterintelligence/Insider<br>Threats Training |                                    |
| 採集血清樣本進行狂犬病中和<br>抗體力價檢測                         |                                    |

**2<sup>nd</sup> week, 16~20March 2015**

|                  |                                    |
|------------------|------------------------------------|
| RFFIT SOP 研讀     | Poxvirus and Rabies<br>Branch, CDC |
| RFFIT 操作訓練       |                                    |
| Micro RFFIT 操作訓練 |                                    |
| RFFIT 練習         |                                    |
| RFFIT 盲樣測試       |                                    |

**3<sup>rd</sup> week, 23~27March 2015**

|              |                                    |
|--------------|------------------------------------|
| 蝙蝠血清麗沙病毒抗體檢測 | Poxvirus and Rabies<br>Branch, CDC |
| 分享台灣狂犬病現況    |                                    |

**Saturday~Sunday, 28~29 March 2015**

|        |  |
|--------|--|
| 搭機返回臺灣 |  |
|--------|--|

## 二、 研習內容

### (一) CDC 安檢審核

外籍研究人員或訪客進入 CDC 研究設施皆需 CDC 人員領航，研習第一週主要任務便是通過 CDC 安檢審核並取得許可證(badge)。研習首日 CDC 人員陪同至 Security Service Office 進行身分確認，包含護照查驗、指紋按壓、個人資料登入(身高、體重、髮色、瞳孔顏色等等)，取得暫時通行許可證。進入 CDC 設施前，在各大樓大廳都需接受保全的身分查驗。待 CDC smart office 查驗外籍研究人員各項申請資料無誤，便會核發許可證。取得許可證後便可聯繫 IT office 創建 CDC 內部使用帳號，便可以此帳號登入 CDC 內部系統，進行相關線上教育訓練。

線上教育訓練包含 Safety Survival Training (I,II,IV)、Computer Security Awareness Training、Counterintelligence/Insider Threats Training。Safety Survival Training (I,II,IV)為辦公室及實驗室安全教育訓練，講解了辦公室可能遇到的危害，及其預防跟處理方式；個人保護裝備(PPE)介紹、實驗室標示介紹、實驗室意外(潑濺及受傷)處理程序，於實驗室工作時可能遇到的危害及其預防跟處理方式，並說明遇到緊急狀況(火災、地震等)時的逃生方式及指引等內容。Computer Security Awareness Training 講解 CDC 從業人員為確保病人隱私及研究資料需特別注意電腦資料洩漏，需使用個人許可證登入電腦，離開電腦時務必登出並移除個人許可證，避免被有心人士登入竊取資料，及不允許插入非 CDC 許可之 USB 等移動裝置等內容。Counterintelligence/Insider Threats Training 訓練 CDC 人員遇到威脅(收到疑似炭疽粉末信封或包裹，或人員接到放置炸彈威脅電話)時的處理方式等內容。

### (二) 進入實驗室前之檢核

進入 Poxvirus and Rabies Branch 實驗室前需先通過 2 項檢核，分別為確認狂犬病血清中和抗體力價及完成傳染病實驗室工作人員健康及安全介紹(Infectious

Disease Laboratory Worker Health and Safety Checklist)。於 CDC 醫療室採集血液樣本後，於實驗室內以快速螢光斑點抑制試驗(Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test,RFFIT)進行狂犬病血清中和抗體力價判定，中和抗體力價需通過0.5 IU/mL，人員才可被允許進入實驗室。Poxvirus and Rabies Branch 負責實驗室生物安全的人員會進行傳染病實驗室工作人員健康及安全介紹，內容包含感染性物質的暴露計畫、生物安全手冊回顧、化學衛生計畫(chemical hygiene plan)回顧、潛在電子及設備危害、個人實驗室衛生(如洗手)、個人保護裝備之使用、感染性及非感染性廢棄物的處理程序、拋棄式銳利物質的處理程序、生物安全櫃的使用、廢棄物的滅菌區及滅菌監控程序的介紹、眼睛清洗器及緊急淋浴裝置之位置及使用介紹、感染性物質發生噴濺的處理程序、緊急應變計畫之回顧、建築物清空路徑、集合點、避難點的介紹、緊急通報電話之介紹等。

### (三) RFFIT 及 micro RFFIT 訓練

快速螢光斑點抑制試驗(Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test,RFFIT)為一於細胞培養系統中進行狂犬病中和抗體力價判定的技術，感染細胞會經由免疫螢光染色被染出，RFFIT 需培養約 20 小時後可進行染色判讀，此檢測方法於訓練良好的操作人員可呈現高敏感及高特異性。狂犬病病毒抗體可使用 ELISA 來進行檢測，惟 ELISA 檢測方法可檢出所有與狂犬病抗原結合的抗體，但此抗體不見得具有中和病毒之能力，而 RFFIT 則可檢出具有中和狂犬病抗原功能的抗體。RFFIT 為 Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) 及 World Health Organization (WHO)所建議狂犬病血清中和抗體的標準檢測方法。

(1) 快速螢光斑點抑制試驗(Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test,RFFIT)：可依據需求進行終點稀釋法(end-point titer)檢測及篩檢(screening)用。該方法為使用 chamber slide 進行檢測，血清檢體使用量為 50uL。因 RFFIT 每次進行檢測所需血清量較多，因應蝙蝠等動物每次採集血清量較少，故改良 RFFIT 成 micro RFFIT 其血清量僅需使用 3~5uL。

RFFIT 步驟如下：

1. 樣本前處理:動物血清 56°C 不活化處理 30 分鐘，人血清 56°C 不活化處理 45 分鐘。
2. End-point test：血清將會進行 8 階 5 倍序列稀釋；Screening test：血清將進行 2 階 5 倍序列稀釋(圖一)。
3. 將依 End-point test 為例說明序列稀釋，第一孔加入 75uL 10%FBS-MEM，其餘 7 孔加入 100uL10%FBS-MEM，第 1 孔加入 50uL 待測血清，混合後取 25uL 入下一稀釋階，重複同樣稀釋步驟直至第 8 孔，最後一孔稀釋階混合後取 25uL 入廢液桶。
4. 對照組：4 孔進行標準血清力價計算，3 孔進行病毒力價回歸測試，1 孔為細胞對照組(圖二)。

標準血清(Reference serum)：使用 WHO Standard Rabies Immune Globulin(SRIG) 2 IU/mL 當作標準血清，待測血清結果與標準血清相比較後可算出待測血清抗體力價。第一孔加入 75uL 10%FBS-MEM，其餘 3 孔加入 100uL10%FBS-MEM，第 1 孔加入 50uL 標準血清，混合後取 25uL 入下一稀釋階，重複同樣稀釋步驟直至第 4 孔，最後一孔稀釋階混合後取 25uL 入廢液桶。

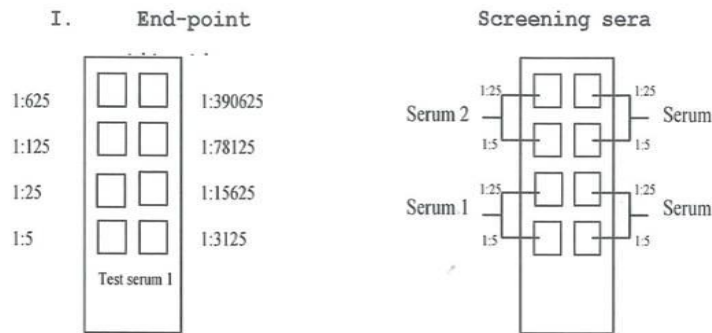
病毒力價回歸測試：每孔加入 100uL 10%FBS-MEM，待加入 100uL 不同力價的病毒(0.5 FFD<sub>50</sub>、5 FFD<sub>50</sub>、50 FFD<sub>50</sub>)，以進行病毒力價測定。

細胞對照組：加入 200uL MEM(不加入病毒液)。

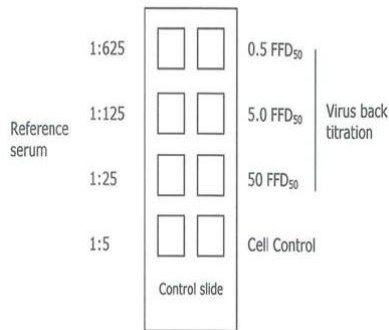
5. 病毒液配置：取一管分裝凍存的病毒液，稀釋至 50 FFD<sub>50</sub>/0.1mL 病毒液，另進行 2 階 10 倍序列稀釋(900uL10%FBS-MEM 加入 100uL 50 FFD<sub>50</sub>/0.1mL 病毒液，配置成 5 FFD<sub>50</sub>/0.1mL 病毒液，依據相同步驟配置 0.5 FFD<sub>50</sub>/0.1mL 病毒液)。病毒力價回歸測試，分別加入 0.5 FFD<sub>50</sub>/0.1mL、5 FFD<sub>50</sub>/0.1mL、50 FFD<sub>50</sub>/0.1mL 病毒液各 100uL。

6. 病毒感作：除了細胞對照組及病毒回歸力價測定外，待測血清及標準血清每孔加入 100uL 50 FFD<sub>50</sub>/0.1mL 病毒液，於 37°C 培養箱感作 90 分鐘。
7. MNA 細胞配置：繼代後於 75T flask 培養 3~4 天形成完整的 monolayer 的 MNA 細胞最適合 RFFIT 操作，細胞建議使用前配置較適宜。抽出其內的 MEM 後，加入 5~8mL PBS 清洗細胞後，將 PBS 抽出，另加入 2mL 0.5%(1x) Trypsin 消化細胞，消化約 2~3 分鐘後，加入 8mL 10% FBS-MEM 中止消化。所收穫之 10mL 細胞液另加入 15~16mL 10% FBS-MEM 配置成約 25~26mL 細胞液，其濃度大約為  $5.0 \times 10^5$ /mL。
8. 細胞感作：每孔加入 200uL 細胞液( $5.0 \times 10^5$ /mL)，於 37°C 培養箱感作 20 小時。
9. 固定及染色：感作完成後，將 chamber 移除，玻片浸入 PBS 3 次後再浸入 acetone 3 次，以 -20°C acetone 固定 30 分鐘。固定後，將玻片取出置於生物安全操作櫃晾乾後，以 Fujirebio40x 稀釋的 rabies 單株抗體進行染色，置於 37°C 培養箱染色 30 分鐘。染色完成後，將玻片靜置於 PBS 5 分鐘，重複清洗步驟 1 次。
10. 判讀：玻片清洗後，置於生物安全操作櫃晾乾，晾乾後以螢光顯微鏡進行判讀，slide chamber 約含有 25~50 視野(分別以 160 倍~200 倍觀察時)。以 20 倍物鏡(10 倍目鏡，放大 200 倍)進行觀察，每孔觀察 20 個視野，計算出現螢光訊號出現的視野數(圖三)。

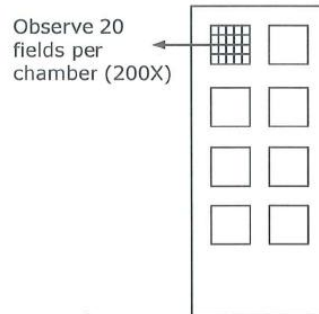




圖一、RFFIT 兩種檢體測試模式。



圖二、對照組配置。



圖三、判讀方法。

(2) Micro RFFIT 雖是改良自 RFFIT，但尚未標準化，各文獻血清稀釋倍數皆有所差異，以標準血清於 RFFIT 及 micro RFFIT 進行定量的結果，可得知 micro RFFIT 於力價定量上仍有缺陷，因此建議以 micro RFFIT 進行樣本定性(確認是否有抗體)而非定量。

Micro RFFIT 步驟如下：

1. micro RFFIT 於四孔玻片上進行，孔洞直徑為 6mm，因操作液體量較少，需於底層鋪設潮濕紙巾以避免液體於操作時或培養時乾掉。
2. 將血清樣本若進行 1:5 稀釋時，每孔直接加入 3uL 待測血清；若進行 1:10 稀釋，每孔加入 12uL 10%FBS-MEM，再加入 3uL 待測血清。若進行 end-point test，則混合後取 3uL 入下一稀釋階，最後一孔稀釋階混合後取 3uL 入廢液桶。

3. 對照組：以兩張玻片作為對照組，一張(4孔)進行標準血清力價計算(圖四)，另一張其中3孔進行病毒力價回歸測試，另1孔為細胞對照組(圖五)。

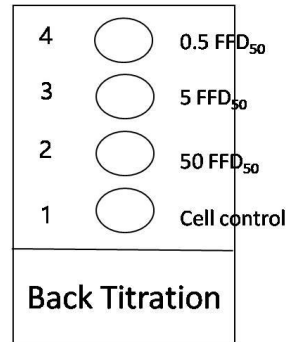
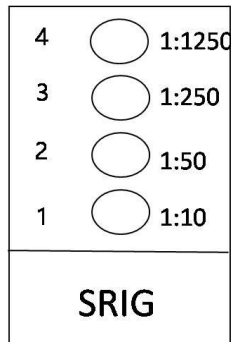
標準血清：以 WHO SRIG 2 IU/mL 進行力價測定，每孔加入 12uL

10%FBS-MEM，第1孔加入 3uL 標準血清，混合後取 3uL 入下一稀釋階，最後一孔稀釋階混合後取 3uL 入廢液桶。

病毒力價測定：每孔加入 12uL 10%FBS-MEM，待加入 12uL 不同力價的病毒 (0.5 FFD<sub>50</sub>、5 FFD<sub>50</sub>、50 FFD<sub>50</sub>)，以進行病毒力價測定。

細胞對照組：加入 24uL 10%FBS-MEM(不加入病毒液)。

4. 病毒液配置：如 RFFIT。病毒力價回歸測試，分別加入 0.5 FFD<sub>50</sub>/0.1mL、5 FFD<sub>50</sub>/0.1mL、50 FFD<sub>50</sub>/0.1mL 各 12uL。
5. 病毒感作：除了細胞對照組及病毒回歸力價測定外，待測血清及標準血清每孔加入 12uL 50 FFD<sub>50</sub>/0.1mL 病毒液，於 37°C 培養箱感作 90 分鐘。
6. MNA 細胞配置：如 RFFIT。加入 2mL 0.5%(1x) Trypsin 消化細胞，消化約 2~3 分鐘後，加入 8mL 10% FBS-MEM 中止消化，抽出約 10mL 細胞液，供 micro RFFIT 使用。
7. 細胞感作：每孔加入 24uL 細胞液，蓋上塑膠上蓋，置於 37°C 培養箱感作 20 小時。
8. 固定及染色：如 RFFIT。
9. 判讀：玻片清洗後，置於生物安全操作櫃晾乾，晾乾後以螢光顯微鏡進行判讀。以 20 倍物鏡(10 倍目鏡，放大 200 倍)進行觀察，每孔觀察 10 個視野，計算出現螢光訊號出現的視野數。



圖四、micro RFFIT 之標準血清稀釋。 圖五、micro RFFIT 之病毒力價測定。

(3) RFFIT 抗體力價(end-point titer)計算：抗體力價係採 50%螢光抑制計算之，亦即在可抑制一半細胞孔出現螢光(病毒斑灶)之血清最高稀釋倍數為抗體之力價。

| Serum Dilution | No. of fields containing infected cells | Fields containing infected cells | Fields containing no infected cells | Percentage of fields containing infected cel |
|----------------|---|----------------------------------|-------------------------------------|--|
| 1:5            | 0/20                                    | 0                                | 88                                  | 0/88=0                                       |
| 1:25           | 0/20                                    | 0                                | 68                                  | 0/68=0                                       |
| 1:125          | 0/20                                    | 0                                | 48                                  | 0/48=0                                       |
| 1:625          | 0/20                                    | 0                                | 28                                  | 0/28=0                                       |
| 1:3125         | 12/20                                   | 12                               | 8                                   | 12/20=60                                     |
| 1:15625        | 20/20                                   | 32                               | 0                                   | 32/32=100                                    |
| 1:79125        | 20/20                                   | 52                               | 0                                   | 52/52=100                                    |
| 1:390625       | 20/20                                   | 72                               | 0                                   | 72/72=100                                    |

以上表為例進行感染細胞視野數百分比計算後，以 Reed & Muench 方法計算：

$$\frac{50 - (\text{低於 50\% 感染百分率})}{(\text{高於 50\% 感染百分率}) - (\text{低於 50\% 感染百分率})} \times \text{稀釋因子的對數值}$$

上表為例 starting point dilution(感染百分率低於 50%)為 1:625(稀釋時感染率為 0%)，而稀釋因子為 5，其對數值 0.69897。則算法為：

$$\frac{50 - 0}{60 - 0} \times 0.69897 = 0.582475$$

而病毒感染能力會隨血清稀釋倍數越高而增加，所以 50% end-point dilution(中止 50%螢光抑制的血清倍數)會高於 starting point dilution。算式如下

$$\begin{aligned} & \log(\text{recipocal of 50\% end - point dilution}) \\ &= \log(\text{recipocal of starting point dilution}) + \text{difference of logarithms} \\ &= 2.79588 + 0.582475 = 3.38 \end{aligned}$$

$\log(50\% \text{ end - point dilution}) = -3.38$ ，而 50% end-point dilution 為  $10^{-3.38}$  即為血清 1:2399 稀釋時可抑制 50% 螢光產生。或可利用檢索表快速求出待測血清之 end-point titer(附表一)。

得出標準血清及待測血清的力價(end-point titer)後，便可和標準血清(2 IU/mL)比對後得出待測血清確實之抗體力價，算式如下：

$$\frac{\text{待測血清之 end - point titer}}{\text{標準血清之 end - point titer}} \times 2 \text{ IU/mL}$$

當待測血清 end-point titer 為 2399，標準血清 end-point titer 為 200 時，則可算出待測血清確實之抗體力價為 24 IU/mL。

$$\frac{2399}{200} \times 2 \text{ IU/mL} = 24 \text{ IU/mL}$$

- (4) 病毒回歸力價計算：以 Reed & Muench 方法計算病毒力價。或可利用檢索表快速求出待測血清之 end-point titer(附表二)。RFFIT 試驗，病毒抗體力價可接受範圍為 32~100 FFD<sub>50</sub>(於 50 FFD<sub>50</sub> 檢測孔可見有 20 個視野出現螢光訊號(20/20)，5 FFD<sub>50</sub> 檢測孔可見有 20 個視野出現螢光訊號(20/20)，於 0.5 FFD<sub>50</sub> 檢測孔可見有 0~10 個視野出現螢光訊號(0~10/20))。
- (5) 標準血清力價計算：可接受範圍為 1:5 稀釋時未見螢光訊號(0/20)，1:25 稀釋時未見螢光訊號(0/20)，1:125 稀釋時可見 4~8 個視野出現螢光訊號(4~8/20)，1:625 稀釋時可見 20 個視野出現螢光訊號(20/20)，end-point titer 為 200。

#### (四) 盲樣測試

完成 RFFIT 訓練及操作後(附表三)，Poxvirus and Rabies Branch 實驗室給予未知樣本進行盲樣測試，RFFIT 訓練是由 Ms. Xiaoyue Ma 進行，進行盲樣測試

時則是由另一 RFFIT 技術專責人員 Ms. Michael Niezgoda 進行監督。並於實驗完成後，進行樣本抗體力價計算(附表四)。

#### (五)蝙蝠血清麗沙病毒中和抗體檢測

本次寄送本所與台北市蝙蝠協會合作所收集的歷年蝙蝠血清樣本共計 262 例。原預計進行麗沙病毒中和抗體檢測，惟 Poxvirus and Rabies Branch 實驗室人員內部討論過認為操作人員雖接受暴露前狂犬病疫苗免疫，但於 BSL-2 實驗室操作麗沙病毒仍有風險，因此建議麗沙病毒中和抗體檢測需於 BSL-3 實驗室進行操作，惟 Poxvirus and Rabies Branch 的 BSL-3 實驗室尚未完工，因此討論過後建議先利用 CVS-11 標準病毒株來進行麗沙病毒中和抗體檢測的初篩，因為麗沙病毒屬血清抗體彼此具有交叉反應，若血清中有麗沙病毒中和抗體則使用 CVS-11 病毒株作為 challenge virus 亦可檢測出抗體陽性。倘若臺灣蝙蝠血清經 CVS-11 病毒株測定為抗體陽性，則可待 Poxvirus and Rabies Branch 的 BSL-3 實驗室完工後進行特異性麗沙病毒抗體檢測。

最後一周共進行 2 批次 micro RFFIT 試驗，共計完成 94 例臺灣蝙蝠血清抗體監測，結果皆為陰性(附表五、六)。惟研習時間有限，無法完成所有樣本檢測，其餘樣本待本實驗室完成 micro RFFIT 技術建立後，會利用 CVS-11 標準病毒株進行檢測，若有出現疑似抗體陽性，則會委託 Poxvirus and Rabies Branch 實驗室進行結果確認。

### 三、 心得與建議

感謝行政院國家科學技術發展基金管理會補助計畫提供經費及本所長官提供本次珍貴機會以參加本次研習，感謝美國疾病控制與預防中心 Poxvirs and Rabies Branch 實驗室主持人 Dr. CarrollDarin 同意赴其實驗室研習、感謝 Dr. PanayampalliSubbianSatheshkumar、Ms. Singletary Meadows Kristi、Ms.Ma Xiaoyue 於安排研習內容及期程的建議、感謝 Ms.Ma Xiaoyue、Mr.Niezgoda Michael、Dr. Smith, Todd G 於 RFFIT 研習間的協助與照顧，感謝 Dr.Li Yu、Dr. Velasco-VillaAndres 於分子診斷學的交流，感謝 Dr. WallaceRyan 提供相關流行病學的意見，感謝 Ms. Ellison James A.及 Ms. HudsonYvonne 於 CDC 研習時相關行政程序及申請的協助、感謝 Ms.Orciari Lillian、Ms. YagerPamela、Dr. GreenDouglas、Dr. Wu Xianfu 及所有 Poxvirus and Rabies Branch 所有人員於研習期間的照顧、感謝楊淑珠女士於研習生活期間的關照。

臺灣自 2013 年於鼬獾檢出及分離出狂犬病病毒，後持續野生鼬獾族群中檢出狂犬病陽性病例。蝙蝠至今已被證實，有超過 15 個病毒科的病毒可從蝙蝠身上分離出來，且已知蝙蝠可作為麗沙病毒的保毒宿主，故持續進行蝙蝠麗沙病毒的監控實有其必要性，本所持續與台北市蝙蝠協會合作進行蝙蝠樣本收集，蝙蝠樣本送至本所會以腦組織按壓製作玻片進行直接免疫螢光抗體色檢測狂犬病。惟本所先前並未建立 micro RFFIT 檢測技術，故所採集之蝙蝠血清會先行保存，為主要促成本次赴美國疾病控制與預防中心進行蝙蝠血清麗沙病毒抗體監測的原因。本次研習內容主要著重於熟悉及操作 RFFIT 及 micro RFFIT 技術，並進行臺灣蝙蝠血清麗沙病毒抗體檢測。相關心得整理如下：

- 嚴謹的保全系統及人員管控

美國疾病控制與預防中心(CDC)作為全美國疾病之防治、診斷及研究的重要機構，於全球疾病診斷具有重大貢獻。CDC 隸屬於美國聯邦政府，於近年美國恐怖行動頻傳後，加強其內的保全系統。外籍研究人員或訪客若需進入 CDC 內

的實驗室皆需盡早提出申請，相關行政程序繁瑣耗時，行政程序尚未通過前皆無法得知確切的參訪日期。待申請通過後，僅能於 CDC 所核可的時間內進行參訪及研習。抵達 CDC 首日還需進行指紋收集等，才可取得暫時性的訪客通行證，待相關身分查驗核可及相關行政程序遞出申請核可後，才可取得許可證(badge)。許可證內會設定每人所被允許進入的各大樓及實驗室門禁管控，進出各門禁管控時皆需使用許可證進行感應。各大樓入口前會有警衛及門禁管控人員進出，許可證感應時，系統旁的螢幕會顯示許可證持有者的照片及姓名，避免有心人士持其他人的許可證進出。

但本次研習所持有之許可證無法進出參訪實驗室大樓，故每日皆需有實驗室同仁於研究大樓入口前陪同進入進行身分查驗，研習或參訪結束前需繳回許可證，且 CDC 轄內禁止人員拍照及攝影，嚴謹的保全系統令人印象深刻。

#### ● 實驗室生物安全及廢棄物處理的注重

人員進入實驗室前需通過各項線上安全教育訓練，採集血清檢測狂犬病抗體力價，力價高於 0.5 IU/mL 才可被允許進入實驗室，開始實驗室操作前需經由實驗室生物安全專責人員介紹實驗室各項文件、設施、環境等介紹，待完成上述事項後，實驗室生物安全專責人員簽署文件後，才可於實驗室內進行實驗操作。另本次研習前 Poxvirus and Rabies Branch 實驗室團隊亦多次進行會議討論本次試驗可能有的風險及人員的防護。因此建議本次以 CVS-11 病毒株進行蝙蝠血清中和抗體力價檢測。每次進行相關試驗前需討論試驗相關風險、人員防護、及後續如何改善及建議修正事項，可有助於避免實驗室內感染等意外之造成，此經驗亦可促進改善本所狂犬病實驗室之生物安全，以保障實驗室從事人員的健康。

CDC 內部對於廢棄物處理之管控流程亦值得學習，實驗室廢棄物妥善打包後需黏貼 1D 條碼後推入滅菌室，待專人滅菌處理。該 1D 條碼可使廢棄物後續處理若有問題可追蹤回原實驗室。另 CDC 亦會不定時進行滅菌前廢棄物的檢查，以避免實驗室廢棄物打包過量(尖銳容器放入鐵製容器內進行滅菌，裝入過多會

導致上蓋無法完全密合等)。

- 實驗流程 SOP 及文件留存

本次研習 RFFIT 技術，操作前需研讀 RFFIT 標準操作流程(SOP)，RFFIT 試驗操作各項步驟實需填具 SOP 流程表，包含樣本前處理、培養基批號及有效期限、標準血清批號、病毒液批號及稀釋濃度、使用抗體的批號及有效期限、各項步驟操作時間之登記。試驗完成時，紀錄標準血清、病毒力價測定結果及待測血清樣本結果，並計算其實際抗體力價。整份文件完成後，需經過 RFFIT 試驗技術專責人員的審核，確認試驗各項對照組數值皆位於可容許範圍內，其待測樣本檢驗結果才可被接受。

SOP 流程表除了可用於確保不同操作人員所進行的 RFFIT 試驗偏差不會太大，亦可於試驗出現問題時，技術專責人員經由 SOP 流程表的紀錄來回顧試驗是否哪裡有問題需要進行修正。文件的保存亦可於日後機關內部及外部查核使用。

- 未來的持續合作

藉由本次研習機會，未來希望於本所狂犬病實驗室建立 micro RFFIT 技術用以進行蝙蝠麗沙病毒中和抗體檢測，本次寄送至美國疾病控制與預防中心的蝙蝠血清，多數樣本有分裝保留於本所實驗室內，僅有少數血液量較稀少者未分裝保留，未來將於本所狂犬病實驗室建立該技術後，完成剩餘樣本的麗沙病毒中和抗體檢測，若有測出疑似有中和抗體陽性的檢體，則將委請美國疾病控制與預防中心 Poxvirus and Rabies Branch 實驗室進行確認。希望經由此模式持續進行蝙蝠血清麗沙病毒中和抗體監控。

本次研習於最後一日於 Poxvirus and Rabies Branch 進行臺灣狂犬病現況之分析並與專家進行交流，希望經由互相交流及研習參訪奠定未來密切合作之契機。



#### 四、 附圖



圖一、研習期間與美國疾病控制與預防中心 Poxvirus and Rabies Branch 研究人員交流臺灣狂犬病現況。



圖二、與美國疾病控制與預防中心 Poxvirus and Rabies Branch 研究人員合影。



圖三、與本次研習主要 RFFIT 技術訓練人 Ms. Ma Xiaoyue 合影。

## 五、 附表

表一、RFFIT 血清抗體力價檢索表。

Appendix B. Table for determining 50% end-point titer Page 50 of 57

|          |        |        |        |        |        |        |        |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1:5      | 0/20   | 1/20   | 2/20   | 3/20   | 4/20   | 5/20   | 6/20   | 7/20   | 8/20   | 9/20  | 10/20 | 11/20 | 12/20 | 13/20 | 14/20 | 15/20 | 16/20 | 17/20 | 18/20 | 19/20 | 20/20 | 320   |       |
| 1:25     | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 320   |
|          | 11     | 11     | 10     | 9      | 9      | 8      | 7      | 7      | 6      | 5     | <5    | <5    | <5    | <5    | <5    | <5    | <5    | <5    | <5    | <5    | <5    | <5    | 18/21 |
| 1:25     | 0/20   | 1/20   | 2/20   | 3/20   | 4/20   | 5/20   | 6/20   | 7/20   | 8/20   | 9/20  | 10/20 | 11/20 | 12/20 | 13/20 | 14/20 | 15/20 | 16/20 | 17/20 | 18/20 | 19/20 | 20/20 | 20/21 |       |
| 1:125    | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 150C  |
|          | 56     | 54     | 50     | 50     | 45     | 42     | 40     | 36     | 33     | 29    | 25    | 21    | 19    | 17    | 16    | 14    | 13    | 13    | 13    | 12    | 12    | --    | 18/21 |
| 1:125    | 0/20   | 1/20   | 2/20   | 3/20   | 4/20   | 5/20   | 6/20   | 7/20   | 8/20   | 9/20  | 10/20 | 11/20 | 12/20 | 13/20 | 14/20 | 15/20 | 16/20 | 17/20 | 18/20 | 19/20 | 20/20 | 18/21 |       |
| 1:625    | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/21 |
|          | 280    | 270    | 250    | 250    | 230    | 210    | 200    | 180    | 170    | 145   | 125   | 110   | 95    | 85    | 75    | 70    | 70    | 65    | 60    | 60    | 60    | --    | 18/21 |
| 1:625    | 0/20   | 1/20   | 2/20   | 3/20   | 4/20   | 5/20   | 6/20   | 7/20   | 8/20   | 9/20  | 10/20 | 11/20 | 12/20 | 13/20 | 14/20 | 15/20 | 16/20 | 17/20 | 18/20 | 19/20 | 20/20 | 750C  |       |
| 1:3125   | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 18/21 |
|          | 1400   | 1300   | 1300   | 1200   | 1100   | 1100   | 1000   | 900    | 800    | 700   | 625   | 540   | 480   | 440   | 390   | 360   | 340   | 320   | 320   | 290   | 290   | --    | 20/21 |
| 1:3125   | 0/20   | 1/20   | 2/20   | 3/20   | 4/20   | 5/20   | 6/20   | 7/20   | 8/20   | 9/20  | 10/20 | 11/20 | 12/20 | 13/20 | 14/20 | 15/20 | 16/20 | 17/20 | 18/20 | 19/20 | 20/20 | 18/21 |       |
| 1:15625  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/21 |
|          | 7000   | 6800   | 6300   | 6000   | 5700   | 5400   | 5100   | 4600   | 4200   | 3600  | 3125  | 2700  | 2400  | 2200  | 1900  | 1800  | 1600  | 1600  | 1500  | 1500  | 1500  | --    | 18/20 |
| 1:15625  | 0/20   | 1/20   | 2/20   | 3/20   | 4/20   | 5/20   | 6/20   | 7/20   | 8/20   | 9/20  | 10/20 | 11/20 | 12/20 | 13/20 | 14/20 | 15/20 | 16/20 | 17/20 | 18/20 | 19/20 | 20/20 | 18/21 |       |
| 1:78125  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/21 |
|          | 34800  | 33489  | 31950  | 30313  | 28571  | 26718  | 24747  | 22652  | 20432  | 18086 | 15625 | 13500 | 12000 | 10000 | 10000 | 9500  | 8500  | 8000  | 7500  | 7500  | 7500  | --    | 18/20 |
| 1:78125  | 0/20   | 1/20   | 2/20   | 3/20   | 4/20   | 5/20   | 6/20   | 7/20   | 8/20   | 9/20  | 10/20 | 11/20 | 12/20 | 13/20 | 14/20 | 15/20 | 16/20 | 17/20 | 18/20 | 19/20 | 20/20 | 18/21 |       |
| 1:390625 | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20  | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/21 |
|          | 174692 | 167448 | 159750 | 151565 | 142857 | 133591 | 123735 | 113263 | 102160 | 90434 | 78124 | 67491 | 59744 | 53887 | 49326 | 45687 | 42724 | 40269 | 38206 | 36450 | 36450 | --    | 18/20 |

|                           |                                   |
|---------------------------|-----------------------------------|
| RFFIT 1.2                 | Effective date: September 7, 2010 |
| Revision No. 2 (04/11/14) | Date originated: January 1, 2010  |
| Changes to page (Date):   |                                   |
| Approved by:              |                                   |

表二、RFFIT 病毒回歸力價檢索表。

D. Acceptable ranges for the challenge virus and reference immune globulin control

Titers of challenge virus used in the RFFIT (Reed-Muench)

|  |                 | Number of fields with fluorescing foci / Total number of fields |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                      |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                 |                 |                 |                 |                 |
|--|-----------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Challenge dose<br>(50 FFD <sub>50</sub> /0.1 ml) | $\frac{20}{20}$ | →   |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                      |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                 |                 |                 |                 |                 |
| 1:10 (-1)  | $\frac{10}{20}$ | $\frac{11}{20}$   | $\frac{12}{20}$ | $\frac{13}{20}$ | $\frac{14}{20}$ | $\frac{15}{20}$ | $\frac{16}{20}$ | $\frac{17}{20}$ | $\frac{18}{20}$ | $\frac{19}{20}$ | $\frac{20}{20}$ | →                    |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                 |                 |                 |                 |                 |
| 1:100 (-2)                                       | $\frac{0}{20}$  | →   |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 | $\frac{0}{20}$       | $\frac{1}{20}$ | $\frac{2}{20}$ | $\frac{3}{20}$ | $\frac{4}{20}$ | $\frac{5}{20}$ | $\frac{6}{20}$ | $\frac{7}{20}$ | $\frac{8}{20}$ | $\frac{9}{20}$ | $\frac{10}{20}$ | $\frac{11}{20}$ | $\frac{12}{20}$ | $\frac{13}{20}$ | $\frac{14}{20}$ |
| FFD <sub>50</sub>                                | 10              | 15  | 15              | 17              | 19              | 25              | 26              | 26              | 27              | 30              | 32              | 32                   | 35             | 40             | 43             | 47             | 51             | 59             | 68             | 80             | 100            | 150             | 150             | 170             | 190             |                 |
|  |                 |   |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 | ← Acceptable range → |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                 |                 |                 |                 |                 |

B. Acceptable range of fields with fluorescing foci for the control reference serum.  
Standard rabies immune globulin; Lot R-3 (2 IU/ml):

Dilution

- 1:5            0 of 20 infected fields
- 1:25          0 of 20 infected fields
- 1:125        4 to 8 infected fields of 20
- 1:625        20 of 20 infected fields

|  |   |
|--|---|
| RFFIT 1.2<br>Revision No. 2 (04/11/14) | Effective date: September 7, 2010<br>Date originated: January 1, 2010 |
| Changes to page (Date):                |   |
| Approved by:                           |   |



表三、第一次操作 RFFIT SOP 流程表登記及結果。

Test conditions

Testing room # 6081

Date 03/17/2015

|    |   |  |              |
|----|---|--|--------------|
| 1  | Heat inactivation of sample(s) at 56°C              | Time in  | Time out     |
| 2  | Serum dilutions in MEM-10                           | MEM Lot # <u>133847</u><br><u>Exp 06-APR-2015</u>                                      |              |
| 3  | Standard Rabies Immune Globulin (SRIG)              | Lot # <u>R-3</u><br><u>07-10-2013</u>  |              |
| 4  | Addition of rabies challenge CVS-11                 | Lot # <u>A14-1056</u><br><u>07/2014 (4 ml/mL)</u>                                      |              |
| 5  | Incubation of virus-serum mixture                   | Time <u>10:55 AM</u><br><u>03/17/2015</u>  |              |
| 6  | Addition of MNA cells                               | Time <u>12:50</u> Passage # <u>41</u><br>Split ratio <u>1:5</u> Monolayer day <u>4</u> |              |
| 7  | Incubation of virus-serum-cell mixture (20 hours)   | <u>12:50 pm</u> <u>03/17/2015</u>  |              |
| 8  | Fixation of slides                                  | Time <u>9:05 am</u><br>Acetone lot # <u>54218</u>                                      |              |
| 9  | Staining Direct Fluorescent Antibody (DFA) Test     | Lot # <u>523486</u><br><u>Jun 2015</u>   |              |
| 10 | Incubation of DFA stained slides                    | Time <u>9:57</u>   |              |
| 11 | Rinse in PBS  | Time <u>10:42</u>  |              |
| 12 | Staining completed                                  | Time <u>10:52</u>  |              |
| 13 | Observation of slides under fluorescence microscope | Date <u>03/18/2015</u><br>Bulb hours <u>0182</u>                                       | Time         |
| 14 | Second reader of reference slide                    | Initials   | Date<br>Time |
| 15 | Other slides observed                               |  |              |



RFFIT  
HUMAN SEROLOGY

State \_\_\_\_\_

Patient \_\_\_\_\_

Date received \_\_\_\_\_

Date tested \_\_\_\_\_

Test performed by \_\_\_\_\_

Page \_\_\_\_ of \_\_\_\_

|             |       |    |                  |
|-------------|-------|----|------------------|
| SRIG 2IU/ml | 1:625 | 20 | 3 <sup>-2</sup>  |
|             | 1:125 | 1  | 17 <sup>-1</sup> |
|             | 1:25  | 0  | 20               |
|             | 1:5   | 0  | 0                |
|             |       |    | Cell control     |
|             |       |    | 0                |

Reference slide

SRIG Titer 270

FFD<sub>50</sub> 40

7 2  
0 8  
0 10  
0 0

Comments:

Reviewed by: \_\_\_\_\_

Date: \_\_\_\_\_

IU/ml: 88.8  
Titer: 1:12000

|          |       |   |          |
|----------|-------|---|----------|
| Sample # | 1:625 | 0 | 20       |
|          | 1:125 | 0 | 20       |
|          | 1:25  | 0 | 12       |
|          | 1:5   | 0 | 0        |
|          |       |   | 1:390625 |
|          |       |   | 1:78125  |
|          |       |   | 1:15625  |
|          |       |   | 1:3125   |
|          |       |   | Date:    |

IU/ml:  
Titer:

|          |       |  |          |
|----------|-------|--|----------|
| Sample # | 1:625 |  | 1:390625 |
|          | 1:125 |  | 1:78125  |
|          | 1:25  |  | 1:15625  |
|          | 1:5   |  | 1:3125   |
|          |       |  | Date:    |

IU/ml:  
Titer:

|          |       |  |          |
|----------|-------|--|----------|
| Sample # | 1:625 |  | 1:390625 |
|          | 1:125 |  | 1:78125  |
|          | 1:25  |  | 1:15625  |
|          | 1:5   |  | 1:3125   |
|          |       |  | Date:    |

IU/ml:  
Titer:

|          |       |  |          |
|----------|-------|--|----------|
| Sample # | 1:625 |  | 1:390625 |
|          | 1:125 |  | 1:78125  |
|          | 1:25  |  | 1:15625  |
|          | 1:5   |  | 1:3125   |
|          |       |  | Date:    |

IU/ml:  
Titer:

|          |       |  |          |
|----------|-------|--|----------|
| Sample # | 1:625 |  | 1:390625 |
|          | 1:125 |  | 1:78125  |
|          | 1:25  |  | 1:15625  |
|          | 1:5   |  | 1:3125   |
|          |       |  | Date:    |

IU/ml:  
Titer:

|          |       |  |          |
|----------|-------|--|----------|
| Sample # | 1:625 |  | 1:390625 |
|          | 1:125 |  | 1:78125  |
|          | 1:25  |  | 1:15625  |
|          | 1:5   |  | 1:3125   |
|          |       |  | Date:    |

Signature: \_\_\_\_\_

RFFIT RES 1.1 # positive fields of 20 fields read at 200x magnification

表四、盲樣測試 SOP 流程表及結果。

Test conditions

Testing room # 6081

Date 3/19/2015

|    |   |  |   |
|----|---|--|---|
| 1  | Heat inactivation of sample(s) at 56°C              | Time in  | Time out<br><i>pre-heat inactivated</i> |
| 2  | Serum dilutions in MEM-10                           | MEM Lot # <i>133847</i><br><i>Exp 06-Apr-2015</i>                                      |   |
| 3  | Standard Rabies Immune Globulin (SRIG)              | Lot # <i>R-3</i><br><i>07-10-2013</i>  |   |
| 4  | Addition of rabies challenge CVS-11                 | Lot # <i>A14-1056</i><br><i>SM 1295</i><br><i>07/2014</i>                              |   |
| 5  | Incubation of virus-serum mixture                   | Time <i>11:00 am</i>   |   |
| 6  | Addition of MNA cells                               | Time <i>12:35</i> Passage # <i>42</i><br>Split ratio <i>1:5</i> Monolayer day <i>3</i> |   |
| 7  | Incubation of virus-serum-cell mixture (20 hours)   | <i>12:35</i><br><i>09:55 AM</i>  |   |
| 8  | Fixation of slides                                  | Time <i>09:55 AM</i><br>Acetone lot # <i>54218</i>                                     |   |
| 9  | Staining Direct Fluorescent Antibody (DFA) Test     | Lot # <i>62486</i><br><i>Jun 2015</i>  |   |
| 10 | Incubation of DFA stained slides                    | Time <i>09:37 am</i>   |   |
| 11 | Rinse in PBS  | Time <i>10:07 am</i>   |   |
| 12 | Staining completed                                  | Time <i>10:20 am</i>   |   |
| 13 | Observation of slides under fluorescence microscope | Date <i>03/20</i><br>Bulb hours <i>0185</i>  | Time <i>11:20</i>                       |
| 14 | Second reader of reference slide                    | Initials   | Date<br>Time                            |
| 15 | Other slides observed                               |  |   |



RFFIT  
HUMAN SEROLOGY

State \_\_\_\_\_

Patient \_\_\_\_\_

Date received \_\_\_\_\_

Date tested 3/19/2015

Test performed by SHU-CPHA HU

Page 1 of 1

SRIG 2IU/ml Ref - 1

|       |                  |
|-------|------------------|
| 1:625 | 8 <sup>-2</sup>  |
| 20    |                  |
| 1:125 | 20 <sup>-1</sup> |
| 5     |                  |
| 1:25  | Challenge        |
| 0     | 20               |
| 1:5   | Cell control     |
| 0     | 0                |

SRIG Titer 210

FFD<sub>50</sub> 68

Comments: Calculation based on reference slide 1

Reviewed by: Xiangmei Ma

Date: 03/23/2015

Reference slide

IU/ml:  
Titer:

Sample # Ref - 2

|       |              |
|-------|--------------|
| 1:625 | 1:390625     |
| 20    | 6            |
| 1:125 | 1:78125      |
| 1     | 20           |
| 1:25  | 1:15625      |
| 0     | Challenge    |
|       | 20           |
| 1:5   | 1:3125       |
| 0     | Cell control |
|       | 2            |

SRIG Titer: 270  
FFD<sub>50</sub> = 51

Date:

IU/ml: 257  
Titer: 270

Sample # A150433 - 1

|       |          |
|-------|----------|
| 1:625 | 1:390625 |
| 20    | 1        |
| 1:125 | 1:78125  |
| 1     |          |
| 1:25  | 1:15625  |
| 0     |          |
| 1:5   | 1:3125   |
| 0     | 20       |

Date:

IU/ml: 2.38  
Titer: 250

Sample # A150433 - 2

|       |          |
|-------|----------|
| 1:625 | 1:390625 |
| 20    | 1        |
| 1:125 | 1:78125  |
| 2     |          |
| 1:25  | 1:15625  |
| 0     |          |
| 1:5   | 1:3125   |
| 0     | 20       |

Date:

IU/ml:  
Titer:

Sample #

|       |          |
|-------|----------|
| 1:625 | 1:390625 |
|       |          |
| 1:125 | 1:78125  |
|       |          |
| 1:25  | 1:15625  |
|       |          |
| 1:5   | 1:3125   |
|       |          |

Date:

IU/ml:  
Titer:

Sample #

|       |          |
|-------|----------|
| 1:625 | 1:390625 |
|       |          |
| 1:125 | 1:78125  |
|       |          |
| 1:25  | 1:15625  |
|       |          |
| 1:5   | 1:3125   |
|       |          |

Date:

IU/ml:  
Titer:

Sample #

|       |          |
|-------|----------|
| 1:625 | 1:390625 |
|       |          |
| 1:125 | 1:78125  |
|       |          |
| 1:25  | 1:15625  |
|       |          |
| 1:5   | 1:3125   |
|       |          |

Date:

Signature: SHU-CPHA HU



附表五、臺灣蝙蝠血清抗體力價檢測(第一批)。

Test conditions

Testing room # 6081

Date 3/23/2015

|    |   |            |   |
|----|---|------------|---|
| 1  | Heat inactivation of sample(s) at 56°C              | Time in    | Time out  |
| 2  | Serum dilutions in MEM-10                           | MEM Lot #  | 133847<br>Exp: 06-Apr-2015                            |
| 3  | Standard Rabies Immune Globulin (SRIG)              | Lot #      | Lot R-3<br>07-10-2013                                 |
| 4  | Addition of rabies challenge CVS-11                 | Lot #      | A14-1056<br>SM 1295<br>07/2014 JAE                    |
| 5  | Incubation of virus-serum mixture                   | Time       | 11:30   |
| 6  | Addition of MNA cells                               | Time       | 12:20 Passage # 43<br>Split ratio 1:5 Monolayer day 4 |
| 7  | Incubation of virus-serum-cell mixture (20 hours)   |            | 12:20 pm<br>09:28 am                                  |
| 8  | Fixation of slides                                  | Time       | 09:45<br>Acetone lot # 54218                          |
| 9  | Staining Direct Fluorescent Antibody (DFA) Test     | Lot #      | 8523486<br>Exp: Jun 2015                              |
| 10 | Incubation of DFA stained slides                    | Time       | 10:37   |
| 11 | Rinse in PBS  | Time       | 11:08   |
| 12 | Staining completed                                  | Time       | 11:30   |
| 13 | Observation of slides under fluorescence microscope | Date       | 3/24  |
|    |   | Bulb hours | 0188  |
| 14 | Second reader of reference slide                    | Initials   | Date<br>Time  |
| 15 | Other slides observed                               |            |   |



RFFIT SCREEN  
ANIMAL SEROLOGY

State \_\_\_\_\_  
Date received \_\_\_\_\_  
Date tested \_\_\_\_\_  
Test performed by \_\_\_\_\_  
Page \_\_\_\_ of \_\_\_\_

MICRO RFFIT

|              |              |
|--------------|--------------|
| 1:25<br>250  | -2           |
| 10           | 3            |
| 1:125<br>250 | -1           |
| 0            | 10           |
| 1:50         | Challenge    |
| 0            | 10           |
| 1:10         | Cell control |
| 0            | 0            |

Reference slide

SRIG Titer \_\_\_\_\_

FFD<sub>50</sub> 51.88

|              |              |            |              |
|--------------|--------------|------------|--------------|
| Titer _____  | 1:25<br>10   | 1:25<br>10 | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 10           | 10         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>10   | 1:10<br>10 | ID # / date: |
| KM08-01      |              |            | KM08-03      |
| Titer _____  | 1:25<br>10   | 1:25<br>10 | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 5/9          | 10         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>6/10 | 1:10<br>10 | ID # / date: |
| KM08-02 ✓    |              |            | KM08-04      |

|              |             |             |              |
|--------------|-------------|-------------|--------------|
| Titer _____  | 1:25<br>10  | 1:25<br>10  | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 7/7         | 1/4         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>6/6 | 1:10<br>0/5 | ID # / date: |
| KM08-05      |             |             | KM08-07 ✓    |
| Titer _____  | 1:25<br>10  | 1:25<br>10  | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 5/5         | 8/8         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>5/2 | 1:10<br>7/7 | ID # / date: |
| KM08-08      |             |             | KM08-08      |

|              |            |            |              |
|--------------|------------|------------|--------------|
| Titer _____  | 1:25<br>10 | 1:25<br>10 | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 8/8        | 10         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>10 | 1:10<br>10 | ID # / date: |
| KM08-09      |            |            | KM08-11      |
| Titer _____  | 1:25<br>10 | 1:25<br>10 | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 3/7        | 10         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>10 | 1:10<br>10 | ID # / date: |
| KM08-10 ✓    |            |            | KM08-12      |

|              |             |             |              |
|--------------|-------------|-------------|--------------|
| Titer _____  | 1:25<br>10  | 1:25<br>10  | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 10          | 8/8         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>7/8 | 1:10<br>10  | ID # / date: |
| KM08-13      |             |             | KM08-15      |
| Titer _____  | 1:25<br>10  | 1:25<br>10  | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 10          | 5/9         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>9/9 | 1:10<br>3/6 | ID # / date: |
| KM08-14      |             |             | KM08-16 ✓    |

|              |              |             |              |
|--------------|--------------|-------------|--------------|
| Titer _____  | 1:25<br>10   | 1:25<br>10  | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 10           | 0/7         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>4/10 | 1:10<br>6/7 | ID # / date: |
| KM08-17 ✓    |              |             | KM08-19 ✓    |
| Titer _____  | 1:25<br>10   | 1:25<br>10  | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 5/8          | 10          | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>8/8  | 1:10<br>8/8 | ID # / date: |
| KM08-18      |              |             | KM08-20      |

|              |            |             |              |
|--------------|------------|-------------|--------------|
| Titer _____  | 1:25<br>10 | 1:25<br>10  | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 10         | 8/8         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>10 | 1:10<br>6/6 | ID # / date: |
| KM08-21      |            |             | KM08-42      |
| Titer _____  | 1:25<br>10 | 1:25<br>10  | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 10         | 6/6         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>10 | 1:10<br>3/3 | ID # / date: |
| KM08-22      |            |             | KM08-43      |

|              |             |             |              |
|--------------|-------------|-------------|--------------|
| Titer _____  | 1:25<br>10  | 1:25<br>10  | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 6/6         | 3/3         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>4/4 | 1:10<br>6/6 | ID # / date: |
| KM08-44      |             |             | KM08-46      |
| Titer _____  | 1:25<br>10  | 1:25<br>10  | Titer _____  |
| IU/ml _____  | 6/6         | 4/4         | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:10<br>4/4 | 1:10<br>6/6 | ID # / date: |
| KM08-45      |             |             | KM08-47      |

附表六、臺灣蝙蝠血清抗體力價檢測(第二批)。

Test conditions

Testing room # 8601

Date 3/25

|    |   |  |              |
|----|---|--|--------------|
| 1  | Heat inactivation of sample(s) at 56°C              | Time in  | Time out     |
| 2  | Serum dilutions in MEM-10                           | MEM Lot # 133847<br>Exp 06-Apr-2015                        |              |
| 3  | Standard Rabies Immune Globulin (SRIG)              | Lot # E-3<br>07-10-2013                                    |              |
| 4  | Addition of rabies challenge CVS-11                 | Lot # A14-1056<br>0712014 (5ML/mL)                         |              |
| 5  | Incubation of virus-serum mixture                   | Time 14:13   |              |
| 6  | Addition of MNA cells                               | Time 16:00 Passage # 44<br>Split ratio 1:4 Monolayer day 3 |              |
| 7  | Incubation of virus-serum-cell mixture (20 hours)   | 16:05<br>12:10   |              |
| 8  | Fixation of slides                                  | Time 12:30<br>Acetone lot # 54218                          |              |
| 9  | Staining Direct Fluorescent Antibody (DFA) Test     | Lot # 523486<br>Exp = Jun 2015                             |              |
| 10 | Incubation of DFA stained slides                    | Time 14:45   |              |
| 11 | Rinse in PBS  | Time 15:20   |              |
| 12 | Staining completed                                  | Time 15:35   |              |
| 13 | Observation of slides under fluorescence microscope | Date 3/26<br>Bulb hours 193                                | Time 16:25   |
| 14 | Second reader of reference slide                    | Initials   | Date<br>Time |
| 15 | Other slides observed                               |  |              |



RFFIT SCREEN  
ANIMAL SEROLOGY

State \_\_\_\_\_

Date tested \_\_\_\_\_

Test performed by \_\_\_\_\_

Page \_\_\_\_ of \_\_\_\_

|              |       |              |      |      |
|--------------|-------|--------------|------|------|
|              | 1     | 2            | 1    | 2    |
| SRIG 2 IU/ml | 1:625 | 1:25         | 1:25 | 1:2  |
|              | 0     | 1            | 2    | 6    |
|              | 1:125 | 1:25         | 1:10 | 1:10 |
|              | 0     | 0            | 10   | 10   |
|              | 1:25  | Challenge    | 0    | 10   |
|              | 0     | 0            | 0    | 10   |
|              | 1:5   | Cell control | 0    | 0    |
|              | 0     | 0            | 0    | 0    |

Reference slide

SRIG Titer \_\_\_\_\_

FFD<sub>50</sub> \_\_\_\_\_

EAB  
 Ref 1/2 BT 1/2  
 10 5 6  
 0 1 10 10  
 0 0 10 10  
 0 0 0 0

All Sera sample were ⇒ 1:5 dilute

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: KM08-14  
 KM08-5  
 10 10  
 10 10

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: KM08-83  
 KM08-89  
 10 60  
 10 10

4/8

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: KM08-103  
 KM08-108  
 10 10  
 4/4 10

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: KM08-181  
 KM08-193  
 7/7 10  
 10 10

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: R11-060-20  
 R11-060-29  
 10 10  
 6/8 10

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: R11-060-28  
 R11-060-31  
 10 10  
 10 1

2/4

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: R11-060-44  
 R11-060-45  
 10 10  
 10 10

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: R11-1241  
 12-A-1  
 10 10  
 10 10

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: 12-A-6  
 12-A-7  
 10 10  
 10 10

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: 12-A-8  
 12-A-9  
 10 10  
 10 10

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: 12-A-14  
 12-A-15  
 10 10  
 10 10

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: 12-A-17  
 12-A-18  
 10 3  
 10 10

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: 12-B-64  
 12-B-69  
 10 10  
 10 10

Titer \_\_\_\_\_

IU/ml \_\_\_\_\_

ID # / date: 12-B-68  
 12-B-69  
 10 10  
 10 10





RFFIT SCREEN  
ANIMAL SEROLOGY

State \_\_\_\_\_

Date tested \_\_\_\_\_

Test performed by \_\_\_\_\_

Page \_\_\_\_\_ of \_\_\_\_\_

|                          |      |      |                          |
|--------------------------|------|------|--------------------------|
| Titer _____              | 1:25 | 1:25 | Titer _____              |
| IU/ml _____              | 10   | 10   | IU/ml _____              |
| ID # / date: r13-2681-36 | 1:5  | 1:5  | ID # / date: r13-2681-40 |
| r13-2681-37              | 10   | 10   | r13-2681-41              |
| Titer _____              | 1:25 | 1:25 | Titer _____              |
| IU/ml _____              | 10   | 10   | IU/ml _____              |
| ID # / date: r13-2681-38 | 1:5  | 1:5  | ID # / date: r13-2681-42 |
| r13-2681-39              | 10   | 10   | r13-2681-43              |

|                          |      |      |                     |
|--------------------------|------|------|---------------------|
| Titer _____              | 1:25 | 1:25 | Titer _____         |
| IU/ml _____              | 0    | 10   | IU/ml _____         |
| ID # / date: r13-2681-45 | 1:5  | 1:5  | ID # / date: 140905 |
| 14002                    | 10   | 10   | 14005               |
| Titer _____              | 1:25 | 1:25 | Titer _____         |
| IU/ml _____              | 10   | 10   | IU/ml _____         |
| ID # / date: 14003       | 1:5  | 1:5  | ID # / date: 14006  |
| 14004                    | 6/6  | 5/5  | 14007               |

|                      |      |      |                      |
|----------------------|------|------|----------------------|
| Titer _____          | 1:25 | 1:25 | Titer _____          |
| IU/ml _____          | 10   | 10   | IU/ml _____          |
| ID # / date: KM08-7  | 1:5  | 1:5  | ID # / date: KM08-16 |
| <del>KM08-9</del>    | 10   | 10   |                      |
| Titer _____          | 1:25 | 1:25 | Titer _____          |
| IU/ml _____          | 10   | 10   | IU/ml _____          |
| ID # / date: KM08-10 | 1:5  | 1:5  | ID # / date: KM08-17 |
|                      | 10   | 10   |                      |

|                       |      |      |                          |
|-----------------------|------|------|--------------------------|
| Titer _____           | 1:25 | 1:25 | Titer _____              |
| IU/ml _____           | 10   | 10   | IU/ml _____              |
| ID # / date: KM08-019 | 1:5  | 1:5  | ID # / date: r13-2681-40 |
|                       | 10   | 10   | <del>14005</del>         |
| Titer _____           | 1:25 | 1:25 | Titer _____              |
| IU/ml _____           | 10   | 10   | IU/ml _____              |
| ID # / date: KM08-022 | 1:5  | 1:5  | ID # / date: r13-2681-42 |
|                       | 10   | 10   |                          |

|              |      |      |              |
|--------------|------|------|--------------|
| Titer _____  | 1:25 | 1:25 | Titer _____  |
| IU/ml _____  |      |      | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:5  | 1:5  | ID # / date: |
|              |      |      |              |
| Titer _____  | 1:25 | 1:25 | Titer _____  |
| IU/ml _____  |      |      | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:5  | 1:5  | ID # / date: |
|              |      |      |              |

|              |      |      |              |
|--------------|------|------|--------------|
| Titer _____  | 1:25 | 1:25 | Titer _____  |
| IU/ml _____  |      |      | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:5  | 1:5  | ID # / date: |
|              |      |      |              |
| Titer _____  | 1:25 | 1:25 | Titer _____  |
| IU/ml _____  |      |      | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:5  | 1:5  | ID # / date: |
|              |      |      |              |

|              |      |      |              |
|--------------|------|------|--------------|
| Titer _____  | 1:25 | 1:25 | Titer _____  |
| IU/ml _____  |      |      | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:5  | 1:5  | ID # / date: |
|              |      |      |              |
| Titer _____  | 1:25 | 1:25 | Titer _____  |
| IU/ml _____  |      |      | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:5  | 1:5  | ID # / date: |
|              |      |      |              |

|              |      |      |              |
|--------------|------|------|--------------|
| Titer _____  | 1:25 | 1:25 | Titer _____  |
| IU/ml _____  |      |      | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:5  | 1:5  | ID # / date: |
|              |      |      |              |
| Titer _____  | 1:25 | 1:25 | Titer _____  |
| IU/ml _____  |      |      | IU/ml _____  |
| ID # / date: | 1:5  | 1:5  | ID # / date: |
|              |      |      |              |

附表七、完成 RFFIT 訓練所核發之證書。

# Certificate of Training

This certifies that

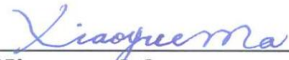
**Shu-Chia Hu**

has successfully completed the training of

## **Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)**

In-vitro assay for the detection and measurement of rabies virus neutralizing antibodies

**March 26, 2015**




Xiaoyue Ma  
Trainer, Technical Supervisor  
Poxvirus and Rabies Branch



Michael Niezgoda  
Evaluator, Technical Supervisor  
Poxvirus and Rabies Branch



Subbian Satheskumar Panayampalli  
Immunodiagnosics Team Lead  
Poxvirus and Rabies Branch



Darin Carroll  
Branch Chief  
Poxvirus and Rabies Branch