

出國報告

(類別:研習)

赴法國 Nancy 狂犬病實驗室研習螢光抗
體病毒中和試驗出國報告

(Training course of Fluorescent
Antibody Virus Neutralization in Nancy
Laboratory for Rabies and Wildlife,
France)

計畫機關及姓名職稱：

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

蔡向榮 所 長

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： 法國(France)

報告日期： 2015 年 10 月 5 日

出國期間： 2015 年 7 月 13 日至 7 月 19 日

赴法國 Nancy 狂犬病實驗室研習螢光抗體病毒中和試驗出國報告 摘要

Nancy 狂犬病與野生動物實驗室(Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife)為法國 echinococcosis(包蟲症)及狂犬病國家診斷實驗室，並做為歐盟及世界動物衛生組織(OIE)狂犬病參考實驗室之一。該實驗室除肩負狂犬病診斷及野生動物特定人畜共通傳染病(如包蟲症、萊姆病等)診斷外，並負責人用及動物用狂犬病疫苗批次疫苗檢定、狂犬病血清中和抗體檢測等工作。該實驗室每年舉辦全球各狂犬病診斷實驗室間的抗原及血清學診斷的能力試驗。為研習狂犬病相關診斷技術，於本年度 7 月 13~19 日赴該實驗室進行研習。研習期間參訪 Nancy 狂犬病參考實驗室及其第三等級生物安全(P3)實驗室，針對其實驗室管理進行了解、研習狂犬病疫苗效力試驗(小鼠接種試驗)、口服疫苗病毒力價測定及螢光抗體病毒中和試驗(Fluorescent Antibody Virus Neutralization, FAVN)。研習期間並針對臺灣目前狂犬病相關試驗結果與法國 Nancy 狂犬病參考實驗室專家 Dr. Cliquet Florence 進行討論。

目次

一、 行程綱要.....	1
二、 研習目的.....	2
三、 研習內容.....	2
(一) 參訪巴斯德博物館.....	2
(二) 實驗室管理.....	3
(三) 研習疫苗效力試驗.....	7
(四) 研習口服疫苗病毒力價測試.....	8
(五) 研習螢光抗體病毒中和試驗.....	10
(六) 討論並交流臺灣狂犬病試驗結果.....	13
四、 心得與建議.....	14

一、 行程綱要

Monday ~ Tuesday, 13~14 July 2015

搭機前往法國戴高樂機場	
-------------	--

Wednesday, 15 July 2015

參訪巴斯德博物館	Pasteur Institute
前往 Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife	

Thursday, 16 July 2015

參訪 Nancy 實驗室	Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife
實驗室管理-參訪 P2 及 P3 實驗室	
研習疫苗效力試驗(小鼠接種試驗)	

Friday, 17 July 2015

研習口服疫苗病毒力價測試	Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife
研習螢光抗體病毒中和試驗 (FAVN)	
與狂犬病專家 Dr. Cliquet Florence 討論交流臺灣狂犬病試驗結果	

Saturday ~ Sunday, 18~19 July 2015

搭機返回臺灣	
--------	--

二、 研習目的

Nancy 狂犬病與野生動物實驗室(Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife)為法國 echinococcosis(包蟲症)及狂犬病國家診斷實驗室，並做為歐盟及世界動物衛生組織(OIE)狂犬病參考實驗室之一。該實驗室除肩負狂犬病診斷及野生動物特定人畜共通傳染病(如包蟲症、萊姆病等)診斷外，並負責人用及動物用狂犬病疫苗批次疫苗檢定、狂犬病血清中和抗體檢測等工作。該實驗室每年舉辦全球各狂犬病診斷實驗室間的抗原及血清學診斷的能力試驗。為研習狂犬病相關診斷技術，於本年度 7 月 13~19 日赴該實驗室進行研習。

三、 研習內容

(一) 參訪巴斯德博物館

Dr. Louis Pasteur 被譽為 19 世紀最偉大之科學家之一，Dr. Pasteur 發現了分子不對稱性、細菌發酵(開發巴斯德滅菌法)、於免疫學及疫苗學上等領域有重大貢獻。Dr. Pasteur 晚年致力於研發狂犬病疫苗，Dr. Pasteur 及其合作之科學家於兔子進行狂犬病病毒之繼代，取出兔子脊髓後置於特殊玻璃瓶數天，經由 dry air 使其病毒毒力降低(乾燥時間越長病毒毒力越低)。Dr. Pasteur 將完全乾燥脊髓所製成之懸浮液免疫犬隻進行試驗，並成功免疫 40 隻犬隻。Dr. Pasteur 將繼代狂犬病病毒之兔子脊髓乾燥 14 天後製成乳劑，並以生理食鹽水稀釋後製成狂犬病活性減毒疫苗(attenuated vaccine)。其後 Dr. Pasteur 成功應用此疫苗免疫被感染狂犬病犬隻咬傷之 9 歲男童(Joseph Meister)，使其免於發病。為了紀念 Dr. Pasteur 於狂犬病疫苗研發之貢獻，全球狂犬病控制聯盟、世界衛生組織、世界動物衛生組織、美國疾病預防控制中心等機構共同決定以 Dr. Pasteur 逝世紀念日 9 月 28 日為世界狂犬病日。本次研習期間並參訪巴斯德博物館(圖一~四)，館內展示 Dr. Pasteur 研究時所使用之儀器及其研究發現。



圖一、巴斯德研究所。



圖二、巴斯德研究所及巴斯德博物館。



圖三、院內豎立 Dr. Pasteur 生平紀事。



圖四、院內豎立被狂犬病犬隻咬傷之小男童雕像。

(二) 實驗室管理(參訪 P2 及 P3 實驗室)

本次研習亦針對實驗室管理部分進行交流，Nancy 實驗室負責狂犬病診斷，其中分子診斷部分，該實驗室為降低實驗室污染的可能性，因此特地將各實驗室區隔並明確訂定該實驗室可從事之實驗項目，實驗室區隔及功能如下：

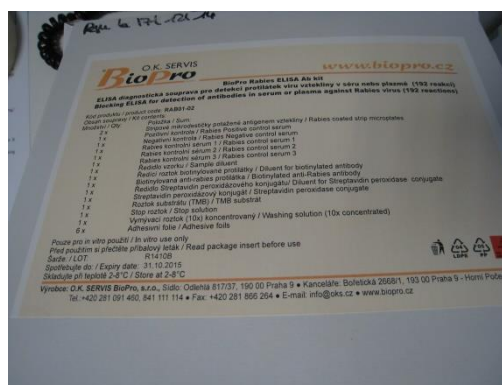
1. 血清學實驗室：進行狂犬病抗體檢測實驗室(以 ELISA 套組進行檢測)(圖五、六)。
2. 樣本收件處理室：由輪值人員進行送檢樣本初步收件及處理，人員收到樣本須填具相關表格(圖七、八)。
3. 核酸萃取室：使用自動核酸萃取機進行 total nucleic acid 萃取(圖九)。

4. PCR 試劑準備室：僅進行 PCR 試劑之配置(圖十)。
5. 樣本加入室：PCR 試劑配置完後，於此實驗室加入樣本核酸(圖十一)。
6. PCR 室：PCR 及 real-time PCR 機器放置區(圖十二)。
7. 電泳室：PCR 結束後，於此實驗室以瓊脂膠體電泳進行產物分析(圖十三)。
8. 其他實驗操作室：其他實驗如 clone 等於此實驗室進行(圖十四)。

為了可以簡易區別實驗人員是否有確實遵從實驗室管理，該實驗室以不同實驗室衣顏色來進行管理(圖十五)，不同實驗室需更換不同實驗衣，因此若見到人員穿著非該實驗室實驗衣，便可以知道人員未依照 SOP 進行實驗衣等更換步驟。此外實驗室門外亦張貼標語提醒實驗人員進出實驗室需更換室內拖、手套及實驗衣(圖十六)。



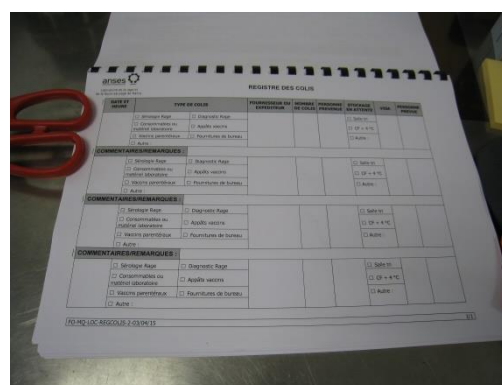
圖五、血清實驗室之一隅。



圖六、目前該實驗室使用之狂犬病抗體檢測 ELISA 套組。



圖七、樣本收件處理實驗室之一隅。



圖八、樣本收件資料登錄。



圖九、核酸萃取室之一隅。



圖十、PCR 試劑準備室之一隅。



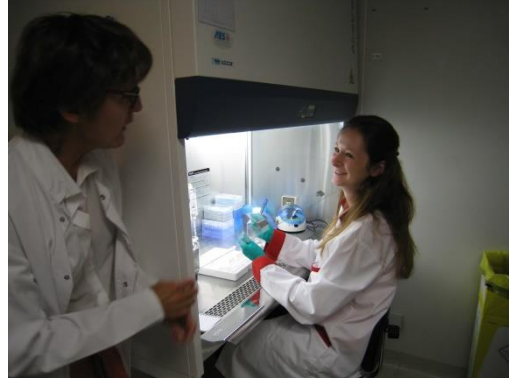
圖十一、樣本加入室之一隅。



圖十二、PCR 室之一隅。



圖十三、電泳室之一隅。



圖十四、其他實驗操作室之一隅。



圖十五、各實驗室須依據 SOP 更換不同實驗衣。



圖十六、實驗室門口張貼提醒人員進入實驗室需更換室內拖、手套及實驗衣。

所有實驗室人員需完成預防性狂犬病疫苗接種，並經狂犬病抗體檢測合格(大於 0.5IU/mL)後，才能進行狂犬病相關試驗操作，且人員需定期檢測是否有足夠的保護性抗體力價。所有涉及狂犬病病毒操作之實驗，需於第三等級生物安全(P3)實驗室內進行，人員進出 P3 實驗室需於門口白板登記(圖十七)，進入 P3 實驗室前需於更衣室內將非允許進入之個人用品置於個人置物櫃內。進入 shower room(未啟用)。於最後一間穿戴個人保護性裝備(防護衣、頭罩、口罩、手套)，進入實驗室。實驗室內進行試驗操作前需穿戴第二層手套，實驗結束後移除第二層手套。所有固體廢棄物品皆須經由雙門高溫高壓滅菌鍋滅菌後(圖十八)，才可移除出 P3 實驗室。



圖十七、P3 實驗室之入口。人員進出需於門口白板進行登記。



圖十八、P3 實驗室物品需經由雙門高溫高壓滅菌鍋滅菌後才可移出實驗室。

(三) 研習疫苗效力試驗(小鼠接種試驗)

依據 OIE 陸生動物衛生手冊狂犬病疫苗檢定之效力測試，狂犬病不活化疫苗效力測試可於小鼠進行血清學測試(serologic test)或是接種測試(challenge test)。本次研習小鼠接種試驗。

試驗動物：OF1 品種母鼠，約 4 週齡大(體重約 13~14g)，10 隻/組。

試驗分組：CVS-11 病毒力價測定對照組(4 組病毒不同稀釋倍數)、reference 疫苗(4 組疫苗不同稀釋倍數)、待測疫苗(4 組疫苗不同稀釋倍數)(圖十九、二十)。

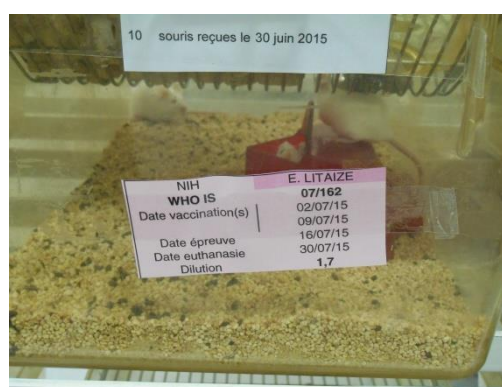
試驗時程：reference 疫苗及待測疫苗稀釋後免疫小鼠，免疫兩週後，進行攻毒試驗。

攻毒試驗步驟：小鼠腹腔注射 0.2 mL 麻醉劑 (舒泰 50)進行麻醉後(圖二十一、二十二)，待麻醉後以 1 mL 針筒抽取 50 ID₅₀/30 μL CVS-11 病毒液腦內接種於小鼠(圖二十三)。不同稀釋倍數之 CVS-11 病毒液接種 30 μL 於小鼠腦內，進行病毒力價之測定。

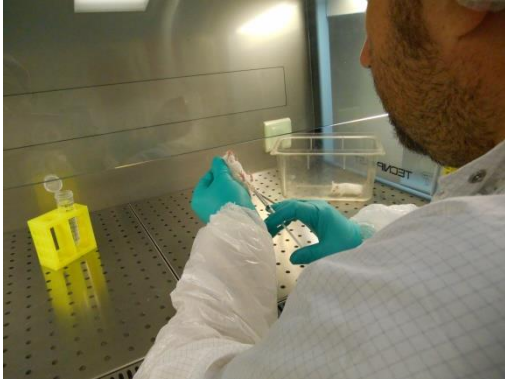
觀察：病毒接種後觀察 14 天(圖二十四)，接種 4 天內若小鼠死亡則判定為非特异性，紀錄動物於接種後 5~14 天之發病及死亡率，以計算攻毒之病毒力價及比較 reference 疫苗及待測疫苗之保護效力。



圖十九、疫苗效力測定之接種試驗。



圖二十、鼠籠外標示組別、疫苗免疫時間、稀釋倍數及攻毒時間。



圖二十一、腹腔注射麻醉劑麻醉小鼠。 圖二十二、待小鼠被麻醉後進行病毒接種。



圖二十三、以 CVS-11 病毒液腦內接種 圖二十四、接種後觀察 14 天記錄發病及死亡率。

(四) 研習口服疫苗病毒力價測試

依據 OIE 陸生動物衛生手冊狂犬病疫苗檢定之效力測試，口服狂犬病活毒疫苗可利用病毒力價測定來做為疫苗效力之指標。

病毒力價測定步驟如下：

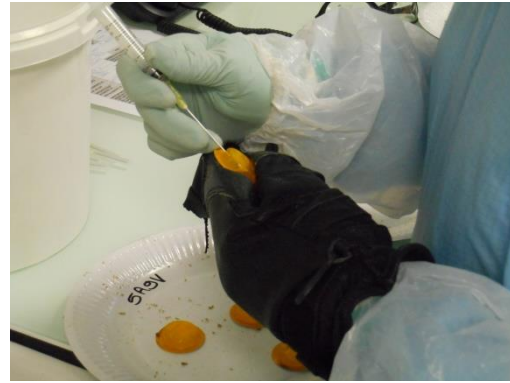
1. 狂犬病口服活毒疫苗解凍後，利用鉗子取出內含病毒液之疫苗樣本。每一批次疫苗隨機選取 5 個樣本進行測試(圖二十五)。
2. 手戴防戳刺手套以針筒將 5 個樣本的病毒液分次抽取出，紀錄各樣本抽取量、顏色等性狀(圖二十六、二十七)。
3. 將病毒液置於冰上，準備 11 個試管(11 個稀釋階)，每管加入 0.9 mL GMEM。第一管加入所抽取之病毒液 100 μ L(10 倍稀釋)，混合後取出 100 μ L 進行下

一階稀釋(圖二十八)。完成 11 個稀釋階的稀釋。Reference virus strain 亦同時進行病毒力價測定，以便與待測病毒力價進行比較。

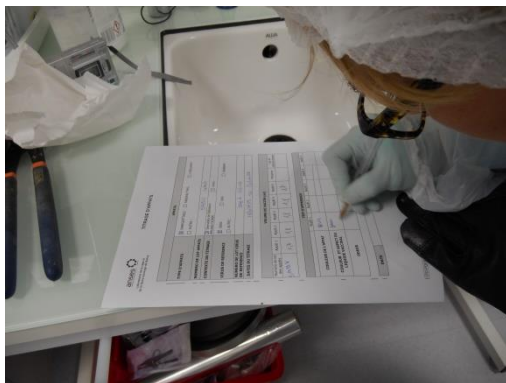
4. 將於 96 孔盤培養 24 小時的細胞取出進行標示後(細胞對照組、病毒力價測定組[12 稀釋階，包括病毒液原液與 11 個稀釋階])(圖二十九)，去上清液。每一稀釋階 6 重複，每孔加入 50 μL 各稀釋階病毒液後置於 36 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培養箱感作 1 小時(圖三十)。
5. 感作後，每孔加入 200 μL 含有 2% FBS 的 GMEM，置於 36 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培養箱培養 72 小時。72 小時後，進行固定、染色、及判讀，計算待測疫苗之病毒力價。(固定、染色、及判讀與螢光抗體病毒中和試驗步驟相同。)



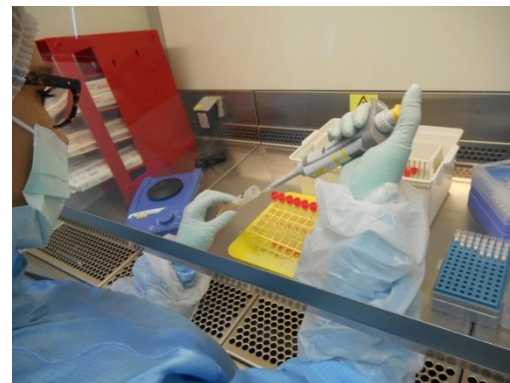
圖二十五、每批次疫苗，選取 5 樣本進行檢測，以鉗子將內含病毒液取出。



圖二十六、以針筒抽取出其內病毒液，紀錄容量、顏色等性狀。



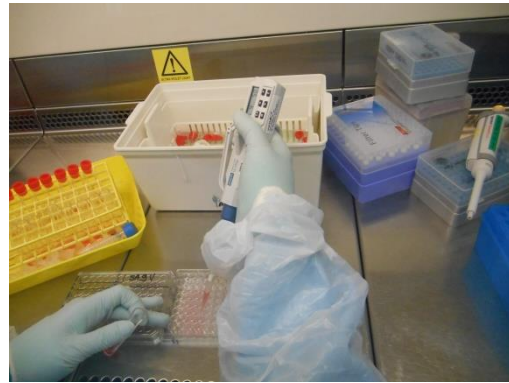
圖二十七、將資料謄寫於樣本紀錄表內。



圖二十八、病毒 10 倍稀釋，共進行 11 個稀釋階稀釋。



圖二十九、標示 96 孔盤(上為細胞對照，下為病毒力價測定:6 重複 12 稀釋階)。



圖三十、每孔加入各稀釋階病毒液 50 μL 後進行感作。

(五) 研習螢光抗體病毒中和試驗(FAVN)

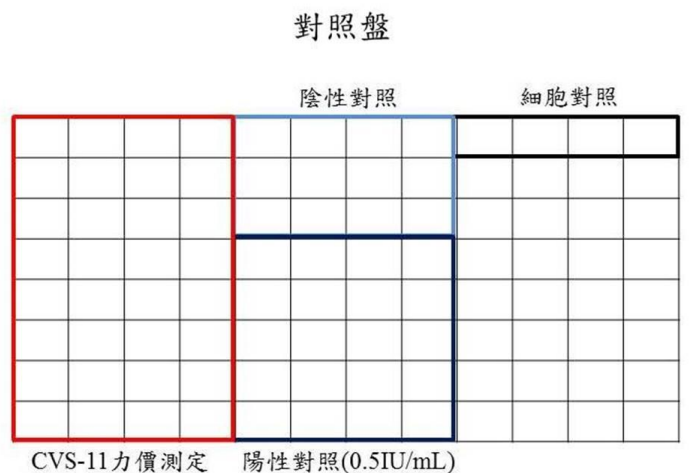
螢光抗體病毒中和試驗(Fluorescent Antibody Virus Neutralization, FAVN)為一體外病毒中和試驗(*in vitro* neutralization)，檢測可抑制 50%細胞孔出現螢光之血清最高稀釋倍數，於同樣實驗條件下比較已知抗體力價的 OIE 標準犬血清之血清中和能力，則被檢測之血清狂犬病抗體力價可以 IU/mL 來表示。

螢光抗體病毒中和試驗步驟如下：

1. 待測血清：56°C，不活化 30 分鐘。
2. 96 孔盤標示(對照盤及樣本盤)。標示如圖三十一、三十二。
3. 病毒力價測定孔：每孔加入 150 μL 培養液(4 重覆 8 稀釋階)，第一稀釋階每孔加入 100 TCID₅₀/50 μL 病毒液進行稀釋。最後一稀釋階混合後取出 50 μL 丟棄。
4. 待測血清樣本測試孔：每孔加入 100 μL 培養液(4 重覆 6 稀釋階)，第一稀釋階每孔加入 50 μL 進行稀釋。最後一稀釋階混合後取出 50 μL 丟棄。
5. 陽性血清樣本：每孔加入 100 μL 培養液(4 重覆 5 稀釋階)，第一稀釋階每孔加入 50 μL 進行稀釋。最後一稀釋階混合後取出 50 μL 丟棄。
6. 陰性血清樣本：每孔加入 100 μL 培養液(4 重覆 3 稀釋階)，第一稀釋階每

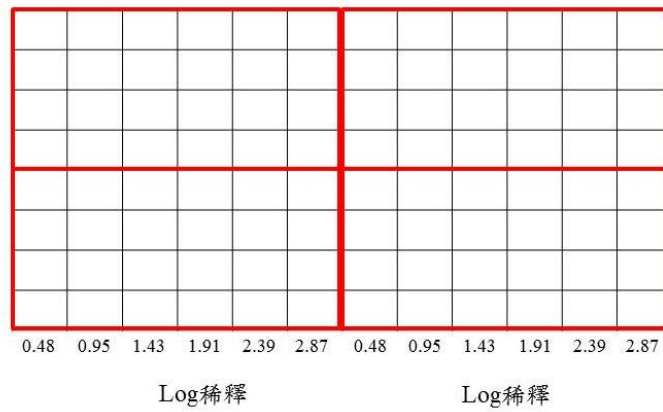
孔加入 50 μL 進行稀釋。最後一稀釋階混合後取出 50 μL 丟棄。

7. 細胞對照組：加入 100 μL 培養液。
8. 除了病毒力價測定孔及細胞對照組外，每孔加入 100 TCID₅₀/50 μL 病毒液，置於 36°C，5% CO₂ 培養箱感作 1 小時。
9. 消化 BHK21 細胞，將其配置成 4x10⁵/mL 細胞液，每孔加入 50 μL 細胞液，置於 36°C，5% CO₂ 培養箱培養 48 小時。
10. 培養 48 小時後，移除上清液(圖三十三)，加入 80% 丙酮(保存於-20°C)室溫固定 30 分鐘(每孔底部表面有被 80% 丙酮覆蓋到即可)(圖三十四)。
11. 去上清液，將 96 孔盤置於操作櫃內風乾(圖三十五)，此時可觀察血清是否有造成細胞毒性，若有造成細胞毒性，則培養孔底部表面呈透明；若否則培養孔底部表面呈白色霧狀(圖三十六)。每孔加入稀釋後狂犬病螢光抗體 50 μL (稀釋倍數依所使用之抗體廠牌而有差異)，置於 37°C 烘箱染色 30 分鐘。
12. 去上清液，以 PBS 清洗 2 次後，將 96 孔盤倒置於擦手紙上拍乾後，置於螢光顯微鏡上觀察。
13. 以 10 倍目鏡，20 倍物鏡進行觀察，先檢查對照盤，再依序檢查樣本盤，若有培養孔有出現螢光訊號，則該孔判定為陽性，若無則判定為陰性，紀錄結果於紀錄表內(圖三十七)。
14. 進行病毒力價計算，及樣本狂犬病抗體力價計算。



圖三十三、對照盤之標示。

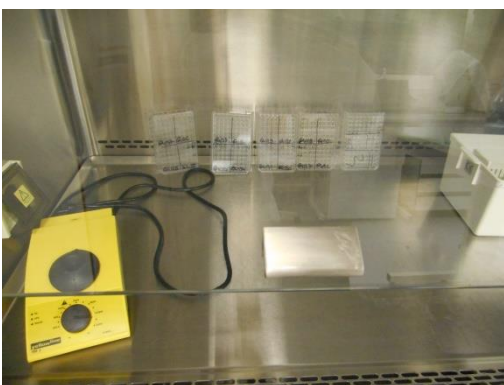
樣本盤



圖三十四、樣本盤之標示。



圖三十三、培養 48 小時後，去上清液。 圖三十四、以 80% 丙酮室溫固定 30 分鐘。



圖三十五、固定後，將 96 孔盤至於操作櫃內風乾。 圖三十六、固定完成後，觀察樣本是否有造成細胞毒性導致細胞無法生長。

anses
Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy

FEUILLE DE LECTURE : PLAQUE CONTROLE

VISA : _____ DATE : _____

PLAQUE N° _____

Matin
Après-midi

CVS utilisée : 25 µl dans 30 ml	SR-												Log dilution		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
7.88	A	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	1.43	témoin cellule
7.28	D	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0.99	témoin CVS
6.68	C	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	0.48	4.23
6.08	D	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	2.38	
5.48	E	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	1.91	
4.89	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1.43	
4.29	G	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	0.96	
3.69	H	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0.48	

Log dilution CVS POS 0.5 U.I. Sérum à titrer Log dilution

FO-PQSR-ESS-LECTCONT-7-10/04/15 *O Mistake well done* 1/1

圖三十七、本次 FAVN 檢測對照盤之判讀結果。

(六) 討論並交流臺灣狂犬病試驗結果

本次赴 Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife 期間，與狂犬病專家 Dr. Cliquet Florence 討論至今臺灣狂犬病實驗結果及臺灣現今鮑獲狂犬病現況。Dr. Cliquet Florence 亦針對現今結果提出後續試驗的改善及建議(圖三十八、三十九)。



圖三十八、本所蔡向榮所長與 Dr. Cliquet Florence 針對臺灣狂犬病實驗結果進行討論交流。



圖三十九、本所蔡向榮所長與 Dr. Cliquet Florence 針對臺灣狂犬病實驗結果進行討論交流。

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長官提供本次珍貴機會以參加本次研習，感謝法國 Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife 同意赴其實驗室研習，感謝 Dr. Cliquet Florence 於行程安排的協助及研習期間的照顧，並感謝 Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife 所有同仁於研習期間的協助及交流分享。

相關心得整理如下：

- 技術人員流暢的操作及嚴謹執行 SOP

Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife 人員不多，卻肩負法國狂犬病診斷、疫苗批次效力測試、各項國際實驗室合作及舉辦各項實驗室間能力測試之責任。本次研習各項實驗室技術，觀察到該實驗室之技術分工，每位技術人員有各自特定實驗操作項目，針對各自實驗室操作項目熟練、流暢且快速。

進行批次不活化疫苗效力測試之技術人員，進行小鼠接種試驗時，兩兩分工，一人負責麻醉小鼠，一人負責腦內接種，順暢的工作線，加速試驗之進行。

口服活毒疫苗之病毒力價測定及螢光抗體病毒中和試驗的技術人員，熟知試驗步驟，流暢之操作，各實驗間銜接時間的安排，都有利於最少的技術人員於最短的時間內處理一定樣本，使得工作效率大大的提升。

雖然實驗操作流暢且快速，但技術人員仍嚴謹執行 SOP，於表單詳實登記取用之藥品批次及配置時間、使用之病毒株等，以便於實驗結果有問題時，可往回追溯發生的原因。

- 技術人員操作穩定性紀錄

每項實驗測試項目皆有數位技術人員負責進行測試，為了評估技術人員之間進行測試之誤差，利用每次進行實驗測試時紀錄對照盤之結果，彙整結果製成每位技術人員實驗的誤差範圍，一方面可使技術人員了解每次試驗之結果是否位於可接受之誤差範圍內，並可彙整所有技術人員之誤差範圍，製成實驗室之誤差範圍，可依據此誤差範圍校正實驗結果，並可使實驗室出具的報告更具有公信力。

- 電子化紀錄

該 P3 實驗室原先是利用紙本記錄所有實驗數據，再傳真至 P3 實驗室外辦公室，技術人員在回到辦公室後進行後續試驗數據的計算。現該實驗室與軟體公司合作，請軟體公司依據其需求開發軟體，現該實驗室正在初步進行軟體試用，未來技術人員將可直接於電腦登錄所有實驗記錄步驟、藥品批號及配置時間、及實驗結果等。螢光抗體病毒中和試驗結果判讀後，可直接於電腦登錄結果，再經由電腦軟體計算出實驗結果。

電子化紀錄可便利技術主管管理各項實驗紀錄，並可避免人為誤算導致實驗數據計算錯誤。

- 未來的持續合作

Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife 於法國協助狂犬病控制之經驗長達 40 多年，對於法國狂犬病控制多有貢獻。臺灣自 102 年於野生鼬獾發現狂犬病，至今仍持續於野生鼬獾發現狂犬病陽性病例，本所已與 Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife 簽訂 MOU，近年並多次邀請該所專家來臺進行演講及技術指導狂犬病相關實驗，去(103)年及本(104)年度並指派本所同仁赴該實驗室進行技術研習，與該實驗室建立良好關係，未來希望雙方實驗室在狂犬病之診斷及研究能持續合作。