

出國報告(出國類別：研究實習)

赴日本國立感染症研究所及北里大學進行狂犬病診斷技術與研究交流

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱：張仁杰助理研究員

涂央昌助理研究員

派赴國家：日本

出國期間：105年7月3日至105年7月16日

報告日期：105年10月13日

摘要

105 年 7 月 3 日至 16 日赴日本國立感染症研究所 (National Institute of Infectious Diseases, NIID) 獸醫學部及北里大學 (Kitasato University) 獸醫系獸醫病理學部進行狂犬病診斷技術與研究交流，行程計 14 天，包含洽談研究合作，初步完成 MOU 與生物材料轉移同意書草稿，可資合作單位進行生物材料分讓，研習安排計有「病毒中和抗體檢測方法 RFFIT」、「狂犬病快速檢測方法，如「RT-LAMP」、「直接快速免疫化學檢測 DRIT」、「即時定量反轉錄酶鏈反應(Real time RT-PCR)」等，還有利用質體免疫法進行狂犬病抗體研製，野生動物疾病與狂犬病監測以及狂犬病病理學分析及致病機轉研究交流。此次研習有助於提升臺灣狂犬病實驗室之檢測技術與研究，透過雙邊互訪可增進診斷技術交流並建立長期研究合作關係；日方擬提出國際合作計畫邀請亞洲國家的狂犬病實驗室透過試驗的能力比對或問題解決經驗分享，加強實驗室診斷技術共通性及穩定性，可協助無法付費參加參考實驗室能力比對或尚未具有足夠診斷技術的亞洲國家實驗室加強實驗室診斷能力，並對建構亞洲地區狂犬病區域聯防技術平台有極大助益。

目次

壹、目的.....	1
貳、研習課程表	2
參、研習機構介紹	4
肆、研習過程與內容	6
伍、心得及建議	21
柒、附件	
附件 1、 NIID RFFIT procedures-----	23

壹、目的

我國自 102 年 7 月確診第一例鼬獾狂犬病病例，迄今已確診野生動物狂犬病陽性病例超過 500 例，經流行病學調查發現陽性案例發生地區遍及中部、南部及東部等 9 個縣市、76 個鄉鎮。為強化狂犬病診斷技術及研究，以及加強臺日雙方學術合作交流，家畜衛生試驗所(以下簡稱畜衛所)派員赴日本國立感染症研究所獸醫學部及北里大學獸醫系獸醫病理學部進行狂犬病診斷技術與研究交流，包含洽談研究合作、MOU 與生物材料轉移同意書草稿，及研習「病毒中和抗體檢測方法 RFFIT」、狂犬病快速檢測方法，利用質體免疫法進行狂犬病抗體研製，野生動物疾病與狂犬病監測以及狂犬病病理學分析及致病機轉研究交流等，有助於提升臺灣狂犬病實驗室之檢測技術與研究，且日方擬提出國際合作計畫邀請亞洲國家的狂犬病實驗室透過試驗的能力比對或問題解決經驗分享，加強實驗室診斷技術共通性及穩定性，可協助無法付費參加參考實驗室能力比對或尚未具有足夠診斷技術的亞洲國家實驗室加強實驗室診斷能力，並對建構亞洲地區狂犬病區域聯防技術平台有極大助益。

貳、研習課程表

研習日程	研習內容摘要
7月3日(日)	搭機抵達成田機場，電鐵至日本東京
7月4日(一)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 拜會 NIID 獸醫科學部部長 Dr. Shigeru Morikawa 森川茂，獸醫科學部各實驗室人員及環境介紹 ➤ 草擬研究合作備忘錄(MOU)及生物材料轉移同意書(MTA) ➤ NIID 實驗室生物安全訓練及測驗 (Principle and Practice of Biosafety Management of Pathogenic Agents in NIID_Dr. Kiyoshi Tanabayashi)
7月5日(二)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 病毒中和抗體檢測方法 RFFIT_Dr. Akira Noguchi 野口章
7月6日(三)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 病毒中和抗體檢測方法 RFFIT_Dr. Akira Noguchi 野口章
7月7日(四)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 實驗室討論 ➤ 日本獸醫生命科學大學獸醫學部野生動物保育管理中心_Dr. Takuya Kato 加藤卓也 <ul style="list-style-type: none"> ■ 野生動物疾病及狂犬病監測 ■ 野生動物剖檢及腦組織採樣 ➤ 專題演講「Outbreaks of Rabies in Taiwan」(畜衛所張仁杰助理研究員)
7月8日(五)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 專題演講「Molecular Epidemiological and Pathological Studies of Rabies in Ferret Badgers」(畜衛所涂央昌助理研究員) ➤ 東京都健康安全研究機構微生物部病原細菌研究科_Dr. Kaoru Hatakema 畠山薰 <ul style="list-style-type: none"> ■ 實驗室參訪 ■ Real-time RT-PCR

研習日程	研習內容摘要
7月9-10日	週末，7/10 搭東北新幹線至青森縣北里大學
7月11日(一)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 實驗室人員及環境介紹_Dr. Chun-Ho Park 朴天鎬 ➤ 狂犬病犬病例、試驗病例切片判讀及討論 ➤ 獸醫病理學研究室收件外科病例組織修整 ➤ 動物舍(牛、羊、馬)及解剖房參觀
7月12日(二)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Micro-dissection 介紹及研究應用討論 ➤ 外科病例判讀 ➤ 肉眼病變 Show and Tell 組織保存館參觀 ➤ 專題演講「Outbreaks of Rabies in Taiwan」(畜衛所張仁杰助理研究員)及「Endemic zoonotic infections in the Philippines affecting humans」(Dr. Alpha Grace B. Cobic)
7月13日(三)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 外科病例判讀 ➤ Direct Rapid Immunohistochemical Test (DRIT)_Dr. Daria Manalo
7月14日(四)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ DRIT ➤ 臺灣鼬獾病例病理學討論及外科病例判讀 ➤ 專題演講「Molecular Epidemiological and Pathological Studies of Rabies in Ferret Badgers」(畜衛所涂央昌助理研究員)、「The Research Institute for Tropical Medicine (RITM) and Zoonotic Diseases」(Dr. Daria Manalo)及「Rabies surveillance according to guidelines of animal rabies survey in Japan」(Dr. Satoshi Inoue 井上智)
7月15日(五)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 電子顯微鏡介紹 ➤ 綜合座談
7月16日	搭東北新幹線回東京轉至成田機場，搭機返臺

參、研習機構介紹

一、日本國立感染症研究所 (National Institute of Infectious Diseases, NIID)

第二次世界大戰結束後，日本衛生狀態極度惡化，相當多傳染病蔓延，國立感染症研究所係於 1947 年由 National Institute of Health 改名為 National Institute of Infectious Diseases，現隸屬於厚生勞動省 (Ministry of Health, Labour and Welfare)。原專管 1) 傳染病基礎及應用研究，2) 抗生素及疫苗開發及品質管理的國家檢定，而後研究所的發展與時俱進，新增了許多與感染症相關的業務並新設相關單位因應，目前研究所業務的目的在於抑制感染症並改善國民保健醫療，及提供國家保健醫療行政單位相關科學的根據，相關業務包含 1) 研究業務，2) 感染症診斷參考服務，3) 感染症監測業務，4) 國家檢定、檢查業務，5) 國際合作業務及 6) 研修訓練業務等。NIID 研究業務單位計有病毒部、細菌部、寄生動物部、感染病理部、免疫部、真菌部、細胞化學部、昆蟲醫科學部、獸醫科學部、血液·安全性研究部、品質保證·管理部、結核病學部、國際協力室、生物安全管理室、動物管理室、感染症疫學監測研究中心、愛滋病研究中心、病原基因體中心、流感病毒研究中心、痲瘋研究中心等研究單位，本次行程係於獸醫科學部進行研習交流，該部致力於人畜共通傳染病或由動物傳給人類疾病的生物醫學研究與流行病學調查，尤其是針對細菌及病毒，包含本次研習的重點「狂犬病」；獸醫科學部依業務性質分為三個實驗室，第一室為感染源動物對策室 (Laboratory of reservoir control of zoonoses)，第二室為感染控制研究室 (Laboratory of transmission control of zoonoses)，第三室為動物由來稀少感染症室 (Laboratory of emerging zoonoses)，此次研習實驗室係第二室。



拍攝於 NIID。



與 NIID 獸醫科學部同仁合影。

二、北里大學（Kitasato University）獸醫系獸醫病理學部

北里大學係整併於學校法人北里研究所下，研究所創立者北里柴三郎博士於 1892 年設立私立傳染病研究所並任第一屆所長，而後於 1914 年設立北里研究所，該所歷史沿革超過 100 年以上，以教育、研究與醫學為基礎，專注於「感染症控制的教育研究」、「農醫學教育研究」、「西洋醫學與東洋醫學統合之醫療」、「醫院間合作進行臨床教育研究」、「專業醫療健康照護計畫」、「生命科學基礎研究」、「預防醫學」及「臨床研究」等八大任務領域發展，而北里大學創立於 1962 年，大學部計有獸醫學部、藥學部、醫學部、海洋生命科學部、看護學部、理學部、醫療衛生學部、一般教育部，研究所計有獸醫學系研究科、藥學研究科、海洋生命科學研究科、看護學研究科、理學研究科、醫療系研究科、感染控制科學府；北里研究所計有北里生命科學研究所、東洋醫學綜合研所；附屬醫院計有北里大學醫院、北里大學東醫院、北里大學北里研究所醫院、北里大學醫學中心；專門學校計有北里大學保健衛生專門學院、北里大學看護專門學校；還有其他相關機構，如北里大學臨床研究機構及北里柴三郎紀念館。此次行程係於青森縣十和田市的北里大學獸醫學部進行研習交流，獸醫學部由獸醫畜產學部發展改制已有 40 年以上歷史，主要學門涵蓋獸醫學、動物科學、環境生物科學，近年以動物生命科學為基礎，透過增加生物科學、全球環境及生態等活動，逐漸強化獸醫學教育研究合作。



與 Dr. Inoue、Dr. Baku 及菲律賓專家於北里大學獸醫學部合影。 與 Dr. Baku 實驗室同仁合影。

肆、研習過程與內容

本次赴日本國立感染症研究所（National Institute of Infectious Diseases, NIID）獸醫學部及北里大學（Kitasato University）獸醫系獸醫病理學部進行狂犬病診斷技術與研究交流，105 年 7 月 3 日至 16 日研習行程計 14 天，NIID 位於日本東京新宿區，住宿點鄰近地鐵東新宿站可搭乘地鐵或直接步行至 NIID，步行約 20 分鐘可抵達，詳細研習內容與心得依序條列如下：

一、 7 月 3 日（星期日）

搭機至成田機場，轉搭電鐵至日本東京。

二、 7 月 4 日（星期一）

1. 拜會獸醫科學部部長 Dr. Shigeru Morikawa 森川茂，獸醫科學部各實驗室人員及環境介紹。

2. 草擬家畜衛生試驗所與 NIID 之研究合作備忘錄（MOU）及生物材料轉移同意書（MTA），簽署 MOU 及 MTA 的立意在於建立雙方長久的合作關係，且是以平等互惠為原則進行合作及生物材料分讓或專業知識的分享，因此在 MOU(草案)的擬定上就幾項重點摘要條列如下：

1) 雙方合作的層級應該要有所對應，例如 Department 對應 Division；MOU 內容 Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, Japan and Epidemiology Division, Animal Health Research Institute, Taiwan enter into this agreement to foster international co-operation in research。

2) 合作備忘錄的目的和研究項目，雖然短期內的合作項目主要是狂犬病，但以長遠角度來看不應該侷限於特定疾病，不論以 NIID 或畜衛所的業務範圍來看，合作項目訂於人畜共通傳染病是比較適合。MOU 內容 Both parties agree to encourage the following activities in particular to promote international academic cooperation as follows: Joint research activities on Zoonosis Researches*. Exchange of materials and technologies in research, publications and academic information.

3) 規範 MOU 生效與廢止，MOU 內容 This agreement shall be effective as of the date of signature by both parties. The amendment or the termination of this agreement shall not be affected without deliberation between the two parties. If either party give the other party written notice not less than sixty (60) calendar days prior to the desired termination date, the agreement will be unilaterally terminated in the case of no response from the other party.

4) 雙方都應該定期檢視評估，是否達到目的或能否改善，MOU 內容 Both parties agree that this agreement should be reviewed approximately every two years in order to evaluate progress and improve the quality of the exchange.

5) 簽署的用意在於承認雙方的合作協定及文件生效，除了雙方研究實驗室

的實驗室主管簽署，還要有所長的同意與見證(Witness)，簽署日期等資訊。

6)附錄並非必要，但其目的在於說明主內容的細項，例如，合作項目明訂 Zoonosis Researches*但是短期工作是以狂犬病為主，就以附錄來說明，MOU 內容 Zoonosis Researches would be including following researches for the objectives of short-term projects:

Research of Rabies: Development of rabies diagnostics for ferret badger strains, Pathological analysis of rabies in animals, to conduct the above activities, material transfer agreement shall be reached and mutually beneficial.

International inter-laboratory proficiency tests for rabies diagnosis: both parties will make efforts to contribute constant diagnostic techniques for rabies diagnosis and reinforce Asia network for rabies laboratories based on one-health.

另外，由於目前的合作會涉及生物材料分讓及專業知識(know how)分享，在交流上透過 MTA 協議雙方的權利義務可避免日後因為人事異動或時間久遠就遺忘或疏忽該盡的責任，MTA 擬定簽署後可以作為生物材料分讓的附件，生物材料分讓申請及辦理生物材料的輸出入運輸等規範，仍要依現行規定辦理不在 MTA 內容中敘明，因此在 MTA 的擬定上就幾項重點摘要條列如下：

1)雙方生物材料移轉的代表人及聯繫資訊，Representative Scientist Division/research unit, Tel, FAX, E-mail 等。

2)雙方生物材料移轉的品項、數量及說明。

3)生物材料移轉的目的及定義生物材料移轉不僅只是生物材料可能包含專業知識(know how)，MTA 內容 To provide both parties with the amount and description of the specific material, and associated know how, hereinafter collectively referred to as the Material. The biological materials as mentioned above shall only be used for (特定用途或目標)

4)最重要的部分就是聲明(Declaration)權利義務，主要原則是要以研究為目的且不能是商業營利，在沒有雙方同意下，不能再移轉給第三方，如果要作為其他研究用途也應該要通知生物材料移轉人，如果有進一步發表或成果展示，應該要標明材料出處及致謝其貢獻，還有未使用完生物材料的處理等，MTA 內容計有 The Material and its derivatives are used only for non commercial research purposes. Both parties declare that the biological material will be utilized solely for research and experimental purposes, and shall not be utilized for commercial or profit making purposes.

The applicant understands that any breach will incur punishment by relevant laws.

The research material will be used by recipient investigator in connection with the following research project described with specificity as follows (use

attachment page if necessary).

The Material is not further distributed to third parties without written permission issued by the distributor. The applicant declares that the biological material will not be further provided to others. The applicant understands that any breach will incur punishment by relevant laws.

The distributor will be informed if the material would be used for different projects from the proposed ones.

At presentation and/or publication of the research results, the source of the Material, will be clearly shown.

We shall keep distributor informed of the results obtained through use of the Material, provide distributor with a copy of any manuscript that describes the work with the Material prior to submission for publication, and acknowledge distributor's contribution to the work reported.

We will use up the biological material for research and rabies diagnosis no later than the expiration of this Agreement. If the Agreement is not continue or renew by both parties, the biological material shall be returned, destroyed, or otherwise disposed of, as instructed by distributor.

Confidentiality: Both parties shall not disclose the Material marked "Confidential" or "Proprietary" to anyone third party nor use such Confidential Information for any purpose other than that given above without distributor's written permission.

最後一個部分就是要提到同意書的生效、效期與廢止，The amendment or the termination of this agreement shall not be affected without deliberation between the two parties. If either party give the other party written notice not less than sixty (60) calendar days prior to the desired termination date, the agreement will be unilaterally terminated in the case of no response from the other party.

This Material Transfer Agreement shall become effective upon date of final signature and shall continue in effect for a period of 2 years; provided, however, that the obligations assumed by both parties, regarding the maintenance of confidentiality, under this Agreement shall remain in effect for two (2) years from the expiration of this Agreement.

3. 完成 NIID 實驗室生物安全訓練及測驗，由 Dr. Kiyoshi Tanabayashi 實施生物安全訓練，講授 Principle and Practice of Biosafety Management of Pathogenic Agents in NIID 課程，並於課後進行測驗，通過後可進入狂犬病實驗室進行實作。

三、 7月5日（星期二）

與 Dr. Akira Noguchi 野口章進行病毒中和抗體檢測方法 Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)，試驗步驟(English version，如附件) 條列如下：

1. 待檢測血清經 56°C，30 分鐘非動化。
2. 血清稀釋：使用血清稀釋用 96 孔盤(圓底)，第一階先稀釋 2.5 倍，取待測血清 60µl 加入 90µl EMEM-2(2%胎牛血清)，然後進行 5 倍序列稀釋，取 30µl 加入 120µl EMEM-2。
3. 加入病毒液：每孔加入 120µl 病毒(32-100 FFD50/0.1 mL)至血清稀釋盤。
4. 培養：置於 5%二氧化碳培養箱內，35°C，90 分鐘。
5. 接種細胞：試驗前一天要先準備細胞用 96 孔盤(平底)，從 T75 細胞培養瓶(1x10⁷/瓶)或 T25(3x10⁶/瓶)培養瓶將 3 天左右的細胞，作出細胞液濃度調整至 4x10⁵/ml，每孔加入 100µl 的細胞懸浮液，將細胞盤置於 5%二氧化碳培養箱內，37°C 培養 24 小時，接種前先將細胞盤內的培養液移除後，每孔接種血清病毒中和液，置於 5%二氧化碳培養箱內，35°C 培養 21-23 小時(平均培養約 22 小時)。

◆ 攻毒用病毒力價 Back titration

1. 取 150µl 攻毒用病毒(32-100 FFD50/0.1mL)加入 150µl EMEM-2，相當於 0.5 倍稀釋。
2. 病毒序列稀釋：取 30µl 0.5 倍稀釋液，加入 270µl EMEM-2，持續進行 10 倍序列稀釋至 0.5x10⁻³。
3. 培養：置於 5%二氧化碳培養箱內，35°C，90 分鐘。
4. 將細胞盤內的培養液移除後，每孔接種病毒液 100µl 每稀釋階 2 孔，置於 5%二氧化碳培養箱內，35°C 培養 21-23 小時(平均培養約 22 小時)。

NIID 實驗室改良過的 RFFIT 步驟，和 OIE 手冊所列主要不同點係使用 96 孔盤代替 8 孔培養玻片(LabTek chamber slide)，目的在於節省耗材成本，第二個主要不同點係使用培養 1 天已貼附於 96 孔盤底部的細胞(單層)進行血清病毒中和液接種，而非如傳統 RFFIT 於細胞接種前 30 分鐘內再準備細胞懸浮液與血清病毒中和液感作及接種，第三個不同點在於使用 EMEM-2(2%胎牛血清)低於傳統上使用 10%胎牛血清 MEM-10 且培養時間較長 2 小時，據 NIID 過去開發改良方法的經驗，這幾個修正的差異點與傳統 RFFIT 的結果是相近且具有可比對性。

	
<p>進入 BSL2 實驗室操作病毒時著實驗衣及戴手套。</p>	<p>操作 CVS11 病毒要於實驗室外套上拋棄式防護衣及戴兩層手套。</p>

四、 7 月 6 日 (星期三)

RFFIT 培養 22 小時，第二天與 Dr. Noguchi 進行固定、染色、觀察判讀。

◆ 固定(Fixation)

1. 用尖頭滴管(tip)將培養盤血清病毒中和液(上清液)移除(利用真空幫浦吸取至廢液桶)。
2. 加入 100 μ l 磷酸緩衝液 PBS 再用尖頭滴管(tip)移除以進行清洗。
3. 加入 80% 冷凍丙酮，並放置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱 30 分鐘。
4. 移除丙酮。
5. 於生物安全操作櫃內風乾(至少約須 15-30 分鐘)，可擺放 1-2 小時，注意不可開啟 UV 進行照射。

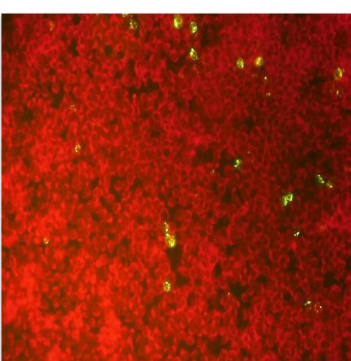
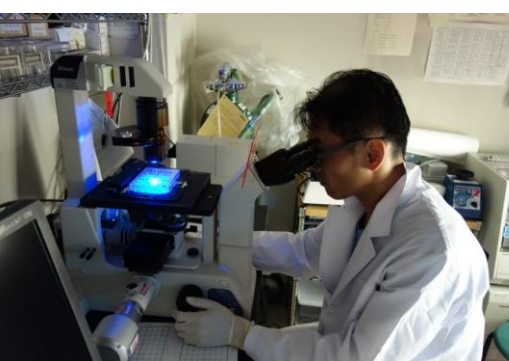
◆ 染色使用的螢光抗體與 FAT 使用的 FITC 相同(Fujirebio Diagnostics Inc, FDI)。

1. 加入 80 μ l FITC 螢光抗體，室溫下感作 30 分鐘；染色用螢光抗體係使用 PBS 進行 100 倍稀釋並加入 1% Evans Blue 1/500 vol.(最後濃度 0.002%)。
2. 加入 200 μ l 磷酸緩衝液 PBS 再用尖頭滴管(tip)移除，進行清洗 3 次。

◆ 使用倒立式螢光顯微鏡進行判讀

1. 物鏡調整至 200 倍，進行觀察與計算螢光灶，每孔可觀察 10 個視野，每個檢體每稀釋階為 2 孔可計算 20 個視野(與使用 LabTek chamber slide 相同)。
2. 依結果紀錄將螢光灶數值轉換成 IU/ml。

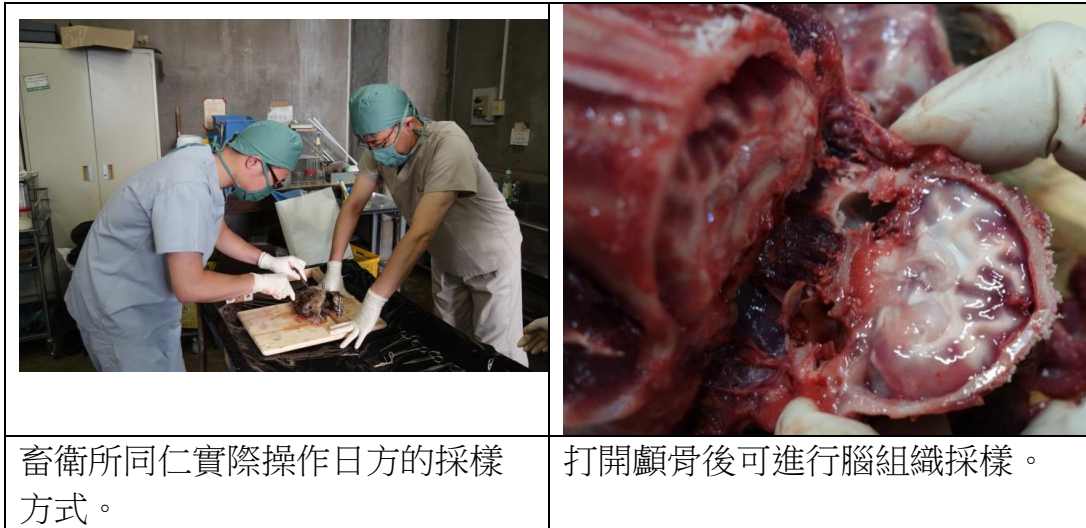
NIID 實驗室改良過的 RFFIT 步驟於固定、染色及判讀原則與傳統 RFFIT 的差異點還是在於因應從 8 孔培養玻片換為 96 孔盤，例如使用 80% 冷凍丙酮避免高純度的丙酮會將 96 孔盤腐蝕，還有須使用真空幫浦利用尖頭滴管(tip)移除培養液，雖然尖頭滴管是拋棄式，每次使用後可丟棄視為醫療廢棄物進行消毒滅菌，但是多了一項小設備真空幫浦且吸取液體的管線都要滅菌消毒及清潔；判讀上於每孔計算 10 個視野，並提供觀察視野的順序，可有效避免觀察視野重疊與重複計算到相同螢光灶。

	
<p>200 倍視野下，於細胞培養盤上觀察視野下的螢光灶。</p>	<p>利用倒立螢光顯微鏡觀察 RFFIT 結果。</p>

五、 7 月 7 日 (星期四)

1. 實驗室討論：與 Dr. Inoue 就 MOU、MTA 與其主管 Dr. Shigeru Morikawa 森川茂進行原則討論後進行修正，並修改後稿件攜回畜衛所進行簽核；有關單株抗體分讓及應用質體免疫方式來製備抗體，已將分讓材料列入生物移轉同意書，且 Dr. Inoue 提供進行質體免疫的方法，期望由畜衛所自行製備針對鼬獾狂犬病抗原的特異性抗體；另就 RFFIT 結果進行討論，經檢視 Dr. Noguchi 與畜衛所同仁檢測的結果，得知 NIID 改良過的 RFFIT 試驗在不同人員進行檢測及判讀，仍可維持極高的一致性，人為判讀的偏差並沒有顯著差異。
2. Dr. Inoue 安排與日本獸醫生命科學大學獸醫學部野生動物保育管理中心 Dr. Takuya Kato 加藤卓也助理教授進行會晤，主要討論有關野生動物疾病及日本目前如何進行狂犬病監測，日本有鑑於臺灣發生狂犬病案例，已經開始進行野生動物狂犬病監測，目前結果均陰性。
3. 野生動物剖檢及腦組織採樣：日本為了進行野生動物狂犬病監測，自行開發固定架以利打開顱骨進行腦組織採樣，此固定架量產後提供給各地第一線採樣人員使用，頭部進行適當固定後可避免剖檢打開顱骨時不慎發生被鋸子或開腦工具切割傷意外；畜衛所同仁也實際操作日方採樣的方式，並且有示範畜衛所開顱骨的方式，就野生動物剖檢及腦組織採樣進行交流。

	
<p>日本自行開發固定架，提供給第一線採樣人員使用，固定後可避免打開顱骨時不慎發生切傷意外。</p>	<p>固定後切開皮膚，用鋸子打開顱骨。</p>



4. 專題演講「Outbreaks of Rabies in Taiwan」：本專題演講由 Dr. Inoue 安排，聽眾多是臨床獸醫師及獸醫師公會會員，所以演講時間安排在晚上，能有比較多獸醫師前來參加，演講內容分享臺灣如何應用狂犬病診斷技術檢測出鼬獾狂犬病病例、狂犬病現況以及狂犬病之診斷、監測及防治成果等，綜合討論時聽眾提問的問題在於如何因應及臺灣針對狂犬病疫苗使用及免疫情形，此外還討論到獸醫師繼續教育、分科及執照的更新制度等。

六、 7月8日（星期五）

1. 專題演講「Molecular Epidemiological and Pathological Studies of Rabies in Ferret Badgers」：本專題演講由 Dr. Inoue 安排，聽眾是 NIID 獸醫科學部部內同仁，日方對於臺灣從狂犬病非疫區變為狂犬病疫區國家非常感興趣，希望我們能分享臺灣在狂犬病診斷、野生動物監測及研究的經驗，因此安排鼬獾狂犬病之基因序列分析及病理學變化專題演講。鼬獾狂犬病基因序列分析顯示，臺灣病毒株為獨立於亞洲狂犬病病毒群，並在 91 至 113 年前形成演化分歧。病理學檢查感染狂犬病病毒的鼬獾可見無至中等程度的非化膿性腦膜腦脊髓炎，病變包括淋巴球性漿胞性腦膜炎及圍管、神經元變性、細胞質內 Negri body 等，而病毒的抗原量則以腦幹最多。
2. 建立 RT-LAMP 及 real-time RT-PCR 篩檢用引子對：Dr. Inoue 想要建立的分子生物學診斷技術是希望可以偵測到鄰近國家不同狂犬病病毒株的引子，所以想要向畜衛所分讓核酸進行後續測試，設計後的引子也願意提供給畜衛所，由畜衛所研究同仁進行檢測病例，可以評估檢測方法及不同實驗室間的檢測能力，此部分待完成 MOU 及 MTA 簽署後進行。
3. Dr. Inoue 安排與東京都健康安全研究機構微生物部病原細菌研究科 Dr. Kaoru Hatakema 嶋山薰研究員進行會晤，主要洽談 Real-time RT-PCR 引子設計，Dr. Kaoru Hatakema 與 Dr. Inoue 合作，目前其實驗室針對臺灣鼬獾狂犬病病毒株，參考已發表序列有完成設計幾對 Real-time

RT-PCR 引子，希望由畜衛所來進行檢測臨床檢體，如完成 MOU 及 MTA 簽署後再由 Dr. Inoue 進行，可以評估檢測方法及不同實驗室間的檢測能力。

4. 東京都健康安全研究機構實驗室參訪：Dr. Kaoru Hatakema 安排參訪食品微生物部(Division of Food Microbiology)、病毒部(Division of Virology)、臨床微生物部(Division of Clinical Microbiology)、BSL3 及實驗動物房。

七、 7月11日(星期一)

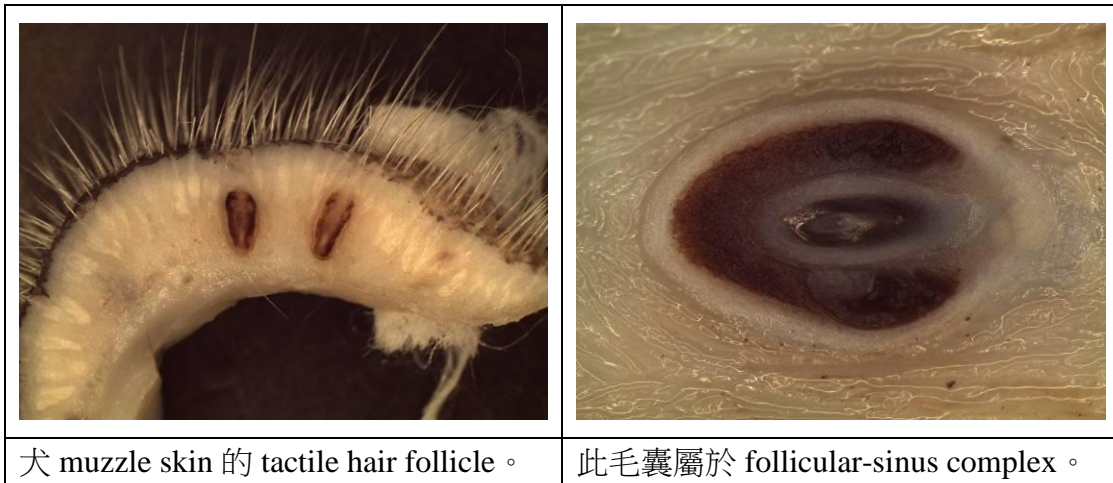
1. 動物舍(牛、羊、馬)及解剖房參觀：青森縣以前是生產馬的主要重鎮，如今也是養乳牛的重要縣市，因此解剖房的設計都依解剖大型動物為規格，如電動吊具系統、大型焚化爐等，惟經濟動物的病理診斷業務漸漸減少，現都以小動物外科為主。



2. 狂犬病犬病例、試驗病例切片判讀及討論：

1) Dr. Baku 分享他們最近狂犬病的實驗研究，犬的 muzzle skin 上有 tactile hair follicle 是屬於 follicular-sinus complex，有感覺神經經過，他們曾在此毛囊上染到很強訊號的病原，又毛囊周圍的細胞也有陽性訊號，目前懷疑是神經末端的 Merk cell，但 Dr. Baku 說需要進行雙重染色來證實這理論。

2) 小鼠狂犬病經驗分享，除犬狂犬病外，Dr. Baku 也做很多小鼠接種的實驗，並不吝嗇與我們分享小鼠狂犬病的病理病變，如 CVS11 接種在小鼠的腦並不會出現 Negri body，IHC 染色中 phosphoprotein 比 nucleoprotein 的效果好，而 Dr. Inoue 也樂於分享抗 phosphoprotein 的抗體給畜衛所，在簽訂 MOU 後應可應用於鼬獾狂犬病病例上。



八、 7月12日(星期二)

1. Micro-dissection 介紹及研究應用討論。

Micro-dissection 原名稱為 Laser capture microdissection (LCM)，利用雷射切割原理在組織切片上切下特定的細胞、組織或器官，之後可應用於 DNA、RNA 或蛋白質分析，除了特定細胞的切割外，也可切割於非細胞的物質如鈣鹽、類澱粉等，供物質分析，此外血液抹片、冷凍切片或細胞培養等均能應用。在狂犬病的應用上，可切割特定神經元、神經軸突或突觸、神經膠質細胞等，供後續 RT-PCR 檢測用。



2. 外科病例判讀

由於北里大學獸醫所病理室近幾年小動物外科的診斷病例逐年增加，Dr. Baku 介紹他們的送檢流程並分享當日的病例，而我們也利用研習空檔參與病例的討論。

	
<p>Dr. Baku 修整送檢的組織。</p>	<p>病例切片的討論，先由當日輪值的學生判讀後並撰寫病理報告，再由 Dr. Baku 確診。</p>

3. 肉眼病變 Show and Tell 組織保存館參觀

北里大學獸醫學部早期解剖大量的馬及牛，而歷任的病理老師對於值得供病理教學用的組織均會以福馬林保存下來，因此累積不少的組織供肉眼教學用。

	
<p>組織保存館。</p>	<p>馬之腸結石樣本。</p>

4. 專題演講「Outbreaks of Rabies in Taiwan」(張仁杰助理研究員)。

分享臺灣如何應用狂犬病診斷技術檢測出鼬獾狂犬病病例、狂犬病現況以及狂犬病之診斷、監測及防治成果等。

5. 專題演講「Endemic zoonotic infections in the Philippines affecting humans」(Dr. Alpha Grace B. Cabic)

Dr. Alpha 是一位臨床醫生，服務於熱帶醫學研究所 (Research Institute for Tropical Medicine, RITM)，她分享菲國人常見感染的疾病，包括狂犬病、日本血吸蟲 (*Schistosoma japonicum*) 及鈎端螺旋體的疫情，每年菲國人死於狂犬病約 200-300 人，但在制定曝露後免疫 (Post-exposure prophylaxis, PEP) 的計畫後，於 2010~2013 年死亡率降至 27%，人類感染狂犬病重要來源是狗 74.9%，另包括貓 20.4% 及其他動物 9%。日本血吸蟲好發於熱帶及亞熱帶國家，菲國人深受其害，菲國在 2011 年的人類盛行率約 26%，水牛 65.4%，菲國的防疫策略為清除中間宿主螺類，以阻斷生活史，民眾的教育宣導，及改

善水牛的飼養方式等。鈎端螺旋體在菲國每年有 680 例感染例，其中 40 例死亡，好發季節為十月雨季時，防治著重於民眾的教育宣導。



畜衛所張仁杰助理研究員專題演講。



Dr. Alpha 專題演講。

九、 7月13日（星期三）

直接快速免疫組織化學染色（Direct Rapid Immunohistochemical Test, DRIT）：

DRIT 由美國疾病控制與預防中心(CDC)開發，主要推廣於未開發、開發中及經濟落後的國家或野外調查研究等，由於此方法不須使用高單價的螢光顯微鏡，僅一般光學顯微鏡即可診斷，且具高敏感性及特異性、安全、快速、易判讀、耗材便宜等特性，此法的抗體在美國 CDC 是採雞尾酒方式混合多種抗核蛋白抗體，而菲律賓則是採自家的病毒自製成多株抗體，而抗體的自製方法是採日本建立的標準作業流程，具有簡單及方便操作特性，操作人員不需要具備病毒分離技術、蛋白質體學、高深生物技術等基礎，作法上僅將 PCR 增幅出的核酸，利用基因槍打入兔子皮下，經多次免疫後即可產生多株抗體，細詳步驟俟畜衛所與日方簽訂 MOU 後即可得知。

DRIT 的原理似 DFA 方法，只是組織的固定由丙酮改為 10% 中性福馬林，抗體的接合由原本的 FITC 改為 biotin，呈色液以 AEC 或 DAB 呈色，最後以光學顯微鏡檢查。菲國的專家示範她們已建立並推廣於地方診斷中心的 DRIT 方法，並讓我們實際操作，未來若建立此標準作業方法即可推廣於各地方防疫單位，抗體由畜衛所製備及提供，並訓練操作人員的技術，因此 DRIT 也是擴大檢驗量能之方式之一。



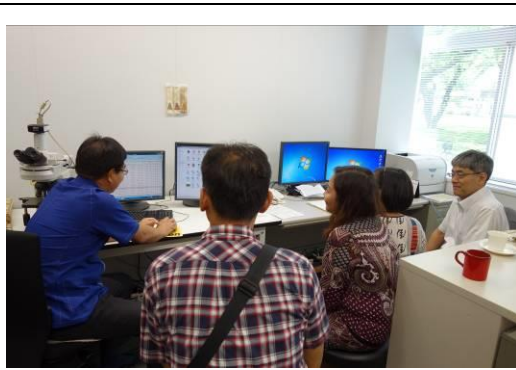
十、 7 月 14 日 (星期四)

1. DRIT 實際操作

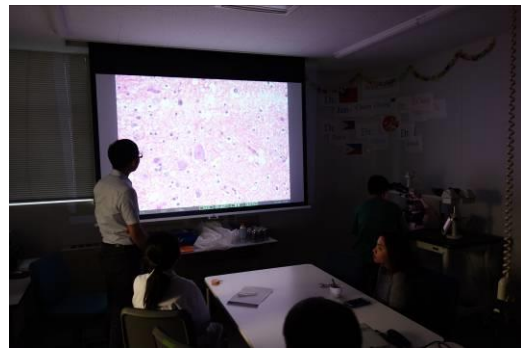
以菲國提供的陽性犬腦病例進行 DRIT 的染色並判讀。

2. 臺灣鼬獾病例病理學討論及外科病例判讀

Dr. Baku 對於犬狂犬病的病理診斷研究有豐富的經驗，並以此題目栽培多位研究生，然而狂犬病的臨床樣本來源均由 RITM 提供，Dr. Baku 對於鼬獾的狂犬病病理變化非常感興趣，因此我們也樂於分享我們的經驗，在互相交流中得知犬與鼬獾在的腦炎症反應是有差異，犬的炎症反應較鼬獾嚴重，並且有較多的 Babe's nodules，而 Dr. Baku 對於鼬獾狂犬病的腦出現大量的 Negri body 感到很訝異，並提出在犬的狂犬病並不會出現像鼬獾一樣明顯且數量又多的 Negri body，且因為鼬獾狂犬病的唾腺液常見到發炎反應及腺泡的壞死，Dr. Baku 建議我們做 IHC 染色區別是 B、T 細胞抑或是巨噬細胞，這些炎症細胞出現均代表不同的意思。此外，在我們提出侵神經的病毒是如何穿過基底層 (basement membrane) 而跑到唾腺液的上皮內？Dr. Baku 回答：他們的經驗是在基底層上有染到神經的 marker 並且染到抗犬病的抗原，因此，是有末稍的神經通過基底層且 nerve end 在上皮上。此理論如能加以印證便可解開狂犬病病毒如何出現在唾腺液的迷團，經過多次的狂犬病病理討論，讓此行不只除了技術上的提升，在狂犬病病理的觀念及理論均增長不少。



Dr. Baku 分享犬狂犬病的病理病變。



畜衛所同仁分享臺灣鼬獾狂犬病病理病變。

3. 專題演講：「Molecular Epidemiological and Pathological Studies of Rabies in Ferret Badgers」(涂央昌助理研究員)。

日方對於臺灣從狂犬病非疫區變為狂犬病疫區國家非常感興趣，希望我們能分享臺灣在狂犬病診斷、野生動物監測及研究的經驗，因此安排鼬獾狂犬病之基因序列分析及病理學變化專題演講。鼬獾狂犬病基因序列分析顯示，臺灣病毒株為獨立於亞洲狂犬病病毒群，並在 91 至 113 年前形成演化分歧。病理學檢查感染狂犬病病毒的鼬獾可見無至中等程度的非化膿性腦膜腦脊髓炎，病變包括淋巴球性漿胞性腦膜炎及圍管、神經元變性、細胞質內 Negri

body 等，而病毒的抗原量則以腦幹最多。

4. 專題演講：「The Research Institute for Tropical Medicine (RITM) and Zoonotic Diseases」(Dr. Daria Manalo)。

Dr. Daria 為一名獸醫師，服務於熱帶醫學研究所 (RITM)，主要負責狂犬病的診斷業務，該機構成立於 1981 年，主要針對傳染病與熱帶性疾病為主，包括醫療、診斷、研究及生物試劑開發為主要方針，RITM 也是國家級之狂犬病診斷實驗室。Dr. Daria 分享菲律賓狂犬病、日本血吸蟲 (*Schistosoma japonicum*) 及伊波拉病毒 (Ebola Reston virus) 疫情。狂犬病的診斷實驗室除了國家級的 RITM 外，也包括 19 個地方實驗室，目前的狂犬病疫情主要以犬為主佔 98.3%、貓佔 1.1%、其他動物佔 0.6%，而菲國政府的防疫策略仍以提高犬隻的免疫注射率，但目前犬隻免疫覆蓋率僅 25%，因此低免疫覆蓋率是造成菲國狂犬病疫情居高不下的主要原因。除狂犬病外，日本血吸蟲的感染也是困擾著菲國，此病雖是對人類的危害較為嚴重，但哺乳動物已有超過 40 種以上被確診有感染，此病的中間宿主為螺類，而人類的感染源是接觸含有卵囊的動物糞便，其中以鼠、狗及水牛的動物糞便受污染的情形最為嚴重，但動物的日本血吸蟲診斷卻不是常規的檢測業務，也因此造成菲國人類感染日本血吸蟲的高發生率。伊波拉病毒 (Ebola Reston virus) 是因輸出的猴子在美國的檢疫期間被檢測出帶有此病毒，經調查後才知此病毒存在蝙蝠，目前此病毒的基因型感染人類是很罕見的。

5. 專題演講：「Rabies surveillance according to guidelines of animal rabies survey in Japan」(Dr. Satoshi Inoue)。

Dr. Inoue 服務於 NIID 為感染控制研究室的負責人，他致力於推動日方的野生動物狂犬病監測，因此相當注重臺灣的經驗，此次他介紹日本政府在狂犬病的防疫策略研究，狂犬病的預防法於 1999 年立法，包括預防及診斷方法，自臺灣發現鼬獾狂犬病後，即制訂日本狂犬病的監測策略，監測的動物依急迫性分級，第一級為浣熊、貉 (raccoon dog)、紅狐及獐 (small Indian mongoose)；第二級為鼬、白鼻心及黃鼠狼 (Siberian weasel)；第三級為蝙蝠。樣本的蒐集則結合各地大學的野生動物專家與獸醫師協助採樣，而地方政府實驗室則負責篩檢，由國家級實驗室做確診。



畜衛所涂央昌助理研究員專題演講。



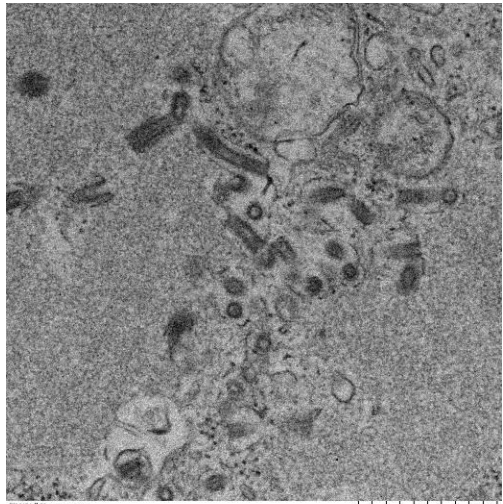
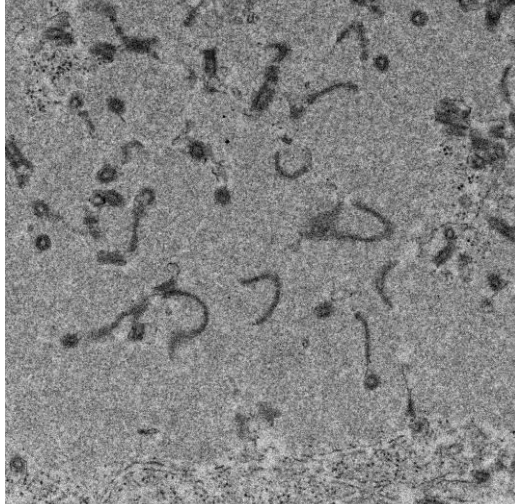
Dr. Daria 有豐富的狂犬病診斷經驗，並

	樂於分享。
	
Dr. Inoue 致力於推動日方的野生動物 狂犬病監測。	參與專題演講學生及老師。

十一、 7月15日（星期五）

1. 電子顯微鏡介紹

Dr. Baku 除了是病理學專家外，也是顯微病理專家，他分享狂犬病在超微鏡下的心得，狂犬病病毒在神經元細胞內會形成具有特徵性的質內包涵體，因最早由 Dr. Adelchi Negri 發現，故又稱 Negri body，正常情況下在電子顯微鏡的包涵體形態似病毒工廠，工廠內部生產大量病毒的核酸物質，外部則是經由出芽（budding）方式產生病毒的顆粒（viral particles），Dr. Baku 發現某些區域的工廠內部呈現螺旋線狀的物質聚集，而在這樣的工廠外並無發現組裝好的病毒顆粒，他懷疑這些是 abortive virus 或是似 nucleoprotein 物質，但確切原因還需要再深入研究。

	
<p>狂犬病病毒於細胞質內 RER 進行組裝並以出芽方式排出，圖中平行管狀結構為核蛋白核酸、基質蛋白與磷酸蛋白，管狀外圍的光暈為病毒外殼的</p>	<p>包涵體的超微結構，可見內部呈現螺旋線狀的物質聚集，疑似這些是 abortive virus 或是似 nucleoprotein 物質。</p>

醣蛋白。	
------	--

2. 綜合座談

Br. Baku 分享許多狂犬病病理的研究與心得，此次的行程讓我們收穫不少，早期畜衛所對狂犬病的工作重點僅在診斷技術的建立，2013 年發現鼬獾存在狂犬病病毒後，才投入鼬獾狂犬病的研究，又鼬獾狂犬病目前僅中國與臺灣有病例發生，而關於鼬獾狂犬病病理的研究甚少，此行 **Dr. Baku** 除了給予很多建議外，也樂意分享心得及 **phosphoprotein** 抗體，他希望臺日雙方能多點交流，畢竟病毒是無國界的，需要區域聯防的思維，才能實現世界衛生組織預定於 2030 年清除家犬狂犬病的目標。

十二、 7 月 16 日（星期六）

日本東京成田機場搭機返國，晚上 6 點多抵達桃園國際機場。

伍、心得及建議

本出國研習有助於提升臺灣狂犬病實驗室之檢測技術與研究，透過雙邊互訪可增進診斷技術交流並建立長期研究合作關係；日方擬提出國際合作計畫邀請亞洲國家的狂犬病實驗室透過試驗的能力比對或問題解決經驗分享加強實驗室診斷技術共通性及穩定性，可協助無法付費參加參考實驗室能力比對或尚未具有足夠診斷技術的亞洲國家實驗室加強實驗室診斷能力，並對建構亞洲地區狂犬病區域聯防技術平台有極大助益。就研習期間觀察，歸納出以下心得與建議提供參考：

一、 未來試驗研究合作：仍有待 MOU 及 MTA 簽訂後實施。

Dr. Baku 提供犬狂犬病的研究心得，希望我們也能應用在鼬獾狂犬病上，結果再與他分享，建議可以進行幾項研究工作：

1. 鼬獾 muzzle skin 上的 tactile hair 是否能發現與犬狂犬病一樣存在抗原。
2. 利用 PCR 增幅的核酸以質體免疫方式進行製備抗體。
3. 比較抗 phosphoprotein 與抗 nucleoprotein 抗體在 IHC 染色上的抗原分佈是否不一樣。
4. 鼬獾狂犬病常見唾液腺發炎，可利用不同 markers 辨識是何種淋巴球。
5. 鼬獾狂犬病的唾液腺腺體上皮是否發現抗原存在上皮的基體層中。

二、 “平等”“互惠”為原則的合作研究與生物材料分讓

簽署 MOU 及 MTA 的立意在於建立雙方長久的合作關係且是以平等互惠為原則進行合作及生物材料分讓或專業知識的分享，由於目前的合作會涉及生物材料分讓及專業知識(know how)分享，在交流上透過 MTA 協議雙方的權利義務可避免日後因為人事異動或時間久遠就遺忘或疏忽該盡的責任，MTA 擬定簽署後可以作為生物材料分讓的附件，生物材料分讓申請及辦理生物材料的輸出入運輸等規範，仍要依現行規定辦理。

三、 透過合作研究提升臺灣狂犬病實驗室之檢測技術與研究

協助亞洲各國狂犬病實驗室加強實驗室診斷技術共通性及穩定性，建構亞洲地區狂犬病區域聯防技術平台，日方此點建議與法國 OIE 狂犬病參考實驗室專家的想法不謀而合，近來接獲專家建議應該要成立亞洲狂犬病實驗

室的 Network，在 OIE 參考實驗室的輔導下，亞洲地區的狂犬病實驗室可以自己辦理實驗室間能力比對，可以分擔參考實驗室的負擔及每年進行能力比對龐大的工作量，OIE 已經有建立 twinning project 相關制度，並有相關資料可供參考 http://www.oie.int/Veterinary_Education_Twinning_Guide.pdf，建議可由畜衛所或日本實驗室共同參與。

四、 持續培訓動物傳染病診斷技術人才與國際學術交流合作

日方雖目前並無狂犬病疫情，但仍積極的建立發生狂犬病後的因應措施，並且推動野生動物狂犬病的監測網，因此非常重視我國的對於狂犬病的因應措施。此次的交流除了分享臺灣狂犬病疫情及控制經驗，有助於加強與推廣臺灣目前執行狂犬病監測及診斷業務，而與菲國的討論亦可強化我國對亞太地區狂犬病防治的國際觀，並期能建立亞太各國狂犬病區域聯防技術平台，進而協助實現世界衛生組織“2030 年消除家犬狂犬病”的目標。

RFFIT procedure for 96 well plate modified versions in NIID

Cell preparation

- 1) MNA cell can prepare from confluent 75cm² Flask (about 1 x 10⁷ cell/flask) and 25cm² Flask (about 3 x 10⁶ cell/flask) to 3 plates of 96well plate
 - (a) Resuspend to about 33ml of EMEM-10(10%-FBS) (count by hemacytometer) (adjust to about 4x10⁵/ml)
 - (b) 100ul of cell suspension is dispensed to each well of 96well flat bottom plate
- 2) 24hrs at 37°C in 5%-CO₂ incubator

RFFIT

- 1) Serum treatment → inactivate at 56°C for 30min
- 2) Serum dilution → 60ul of test serum is added to 90ul of EMEM-2(2%-FBS) and perform pipetting (x 2.5 dilution) using 96well round bottom plate. 30 ul of x 2.5 diluted serum is added to 120ul of EMEM-2 and perform pipetting (x 12.5) → next dilution (same pattern : 5-fold dilution)
- 4) Add virus solution → 120ul of virus (32-100FFD50/0.1ml) is added to 120ul of diluted serum well
- 5) Incubation → 35°C for 90min in 5%-CO₂ incubator
- 6) Inoculation → cell medium of 96well flat bottom plate is discard → transfer to serum-virus mixture : 100ul/well x 2 well → 35°C for 21-23hrs(22h +1h) in 5%-CO₂ incubator

Back titration of challenge virus

- 1) 150ul of challenge virus (32-100FFD50/0.1ml) is added to 150ul of EMEM-2 (1/2 x 10⁰ dilution) and perform pipetting.
- 1) 30ul of 1/2 x 10⁰ diluted virus is added 270ul of EMEM-2 and perform pipetting(1/2 x 10⁻¹ dilution). (same pattern : 10-fold dilution until 1/2 x 10⁻³)
- 2) 35°C for 90min in 5%-CO₂ incubator
- 3) cell medium of 96well flat bottom plate is discard → transfer from virus dilution: 100ul/well x 2 well → 35°C for 21-23hrs in 5%-CO₂ incubator

Fix

- 1) discard serum-virus mixture by tip
- 2) add 100ul of PBS (gently) and discard PBS by tip (wash)
- 3) add about 80% cooled acetone (gently)(-20°C)→ 4°C for 30min
- 4) decant acetone
- 5) air dry about 1-2hrs in safety cabinet(not under UV)

Stain

(DFA : FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio Diagnostics, inc.)

- 1) 80ul of FITC antibody(dilution by PBS → x 100 dilution and add 1% evans blue 1/500 vol.(final 0.002%)) → RT for 30 min
- 2) wash 200ul of PBS 3-times

Fluorescent microscope

- 1) 200 times magnification, count 20 fields/2wells
- 2) calculate IU/ml

Instruments and Reagents

1. IWAKI Microplate 96well flat bottom #3860-096
2. IWAKI Microplate 96well round bottom #3870-096
3. Minimum Essential Medium Eagle (SIGMA) M4655
4. FBS
5. 0.05% Trypsin EDTA(1X) Invigtrogen 25300-054
6. Dulbecco'S PBS (prepare in Labo.)
7. Penicillin-Streptomycin, (Pen Strep) 100ml Invigtrogen 15140-122
8. 200ul Multichannel pipetter
9. Various micropitetter
10. Various tip

Determination of 50% end-point titers of serum (example)

Serum dilution	No. of fields Containing infected cells	Fields containing infected cells	Felds containing no infected cells	Percentage of fields containing infected cells
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
1:3,125	12/20	12	8	12/20=60
1:15,625	20/20	32	0	32/32=100
1:79,125	20/20	52	0	52/52=100
1:390,625	20/20	72	0	72/72=100

$$\frac{50\% - (\text{infectivity next below } 50\%)}{(\text{infectivity next above } 50\%) - (\text{infectivity next below } 50\%)} \times \text{logarithm of dilution factor}$$

The dilution showing an infectivity next below 50% is 625, the dilution factor is 5.
Hence, the difference in logarithms is :

$$\frac{50 - 0}{60 - 0} \times 0.69897 = 0.582475 \quad * \log_{10} 5 = 0.69897$$

$$\begin{aligned} &\text{log (reciprocal of 50\% end-point dilution)} \\ &\text{log (reciprocal of the starting point dilution)} + \text{difference of logarithms} \\ &= 2.79588 + 0.582475 = 3.38 \text{ (approx.)} \quad * \log_{10} 625 = 2.79588 \end{aligned}$$

Hence, log (50% end-point dilution) = -3.38 and the 50% end-point dilution = $10^{-3.38} = (1:2399)$

Determination of the potency of test serum in international units (IU) per ml

$$\text{Number of IU/ml} = \frac{\text{End-point titer of the test serum}}{\text{End-point titer of the reference}} \times \text{2 IU/ml in the reference serum}$$

Example from above:

Test serum titer = 2399

Reference serum titer = 200

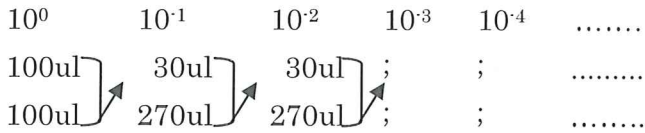
$$\begin{aligned} \text{Number of IU/ml in the test serum} &= \frac{2399}{200} \times 2 \text{ IU/ml} \\ &= 12 \times 2 \text{ IU/ml} \\ &= 24 \text{ IU/ml} \end{aligned}$$

Determination of FFD₅₀ of challenge virus (example)

Titration of seed virus suspension

Seed virus prepare 8-serial 10-fold dilution (10^{-1} - 10^{-8}) in MEM-2.

Although first dilution 2 fold dilution, consider 10^0 .



96 well plate method is 100ul/well. And, field count is 20 count in 2 wells.

Hence, in order to apply virus of 50ul/well, beforehand virus is diluted 2 times. And then each virus dilution is applied 100ul/well.

Virus dilution	No. of fields containing infected cells	Fields containing infected cells	Fields containing no infected cells	Percentage of fields containing infected cells
10^{-1}	20/20	70	0	70/70=100
10^{-2}	20/20	50	0	50/50=100
10^{-3}	20/20	30	0	30/30=100
10^{-4}	8/20	10	12	10/22=45
10^{-5}	2/20	2	30	2/32=6
10^{-6}	0/20	0	50	0/50=0
10^{-7}	0/20	0	70	0/70=0
10^{-8}	0/20	0	90	0/90=0

$$\frac{50\% - (\text{infectivity next below } 50\%)}{(\text{infectivity next above } 50\%) - (\text{infectivity next below } 50\%)} \times \text{logarithm of dilution factor}$$

The dilution showing an infectivity next below 50% is 10^{-4} , and the dilution factor is 10.

Hence, the difference in logarithms is :

$$\frac{50 - 45}{100 - 45} \times 1 = 0.091 \quad * \log_{10} 10 = 1$$

log (reciprocal of 50% end-point dilution)

log (reciprocal of the starting point dilution) - difference of logarithms

$$= \log 10^4 \cdot 0.091 = 4 - 0.091 = 3.91 \text{ (approx.)} \quad * \log_{10} 10^4 = 4$$

Hence, \log (50% end-point dilution) = 3.91 and the 50% end-point dilution
= $10^{-3.91}$ $* 10^{-3.91} = 1 / 8128$

This virus seed is :

8128 FFD₅₀

1 FFD₅₀ → 1 / 8128 → 0.000123 ml · virus / ml – dilent

50 FFD₅₀ → 50 x 0.000123 ml-virus / ml · dilent = 0.00615 ml-virus / ml-dilent

(50FFD₅₀ → 1/(8128/50) → 1/162)

