出國報告(出國類別：實習)

赴日本北海道大學研習家禽流行性感冒診斷技術與研究

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：**102** 年 **8** 月 **25** 日至 **102** 年 **9** 月 **14** 日
報告日期：**102** 年 **12** 月 **11** 日

摘要

102 年赴日本北海道大學 OIE 參考實驗室研習家禽流行性感冒（以下簡稱禽流感）診斷技術，計有反轉錄酶聚合鏈鎖反應（RT-PCR）、核酸序列定序分析、雞隻靜脈內接種致病性指數試驗、雞胚胎接種、血球凝集試驗、血球凝集抑制試驗、病毒斑試驗、即時聚合酶鏈鎖反應（Real-time PCR）等技術，並協商未來進行禽流感診斷實驗室能力比對與可能合作之試驗研究。本次研習瞭解日本禽流感診斷及研究現況，供做我國禽流感未來研究方向及防疫策略研擬之參考，並可促進臺日雙邊農業國際合作及學術交流。

目次

壹、目的.....1

貳、研習課程表 2

參、研習機構介紹 4

肆、研習內容.....5

伍、研習期間觀察與心得 19

陸、檢討與建議 28

柒、附件

附件 1、 Sequencing---------- 32

附件 2、 Advanced lecture on one health---------- 38

附件 3、 Zoonotic disease control in Mongolia ---------- 47

附件 4、 Situation of animal diseases in Vietnam ---------- 54

附件 5、 Wildlife and Zoonosis ---------- 59

附件 6、 Hemagglutination (HA) test ---------- 69

附件 7、 Hemagglutination inhibition (HI) test---------- 71

附件 8、 Lectures by Prof. Hiroshi Kida---------- 74

附件 9、 General introduction of influenza----------100

附件 10、 Rabies ----------110

附件 11、 Quantitative real time PCR for chicken cytokine analysis ----------116

附件 12、 Plaque assay and plaque cloning----------119

壹、目的

為避免家禽流行性感冒（以下簡稱禽流感）對人類健康產生影響，今年我國動物傳染病中央主管機關已實施傳統市場禁宰活禽政策，且從大陸及香港傳出人類感染禽流感案例，突顯出禽流感在防疫及公共衛生之重要，然日本北海道大學禽流感參考實驗室通過世界動物衛生組織（OIE）認可，禽流感診斷及研究經驗豐富，居世界領先地位，本所又是全國唯一動物衛生試驗研究專責機構，肩負著國內動物傳染病防治科技研發與疾病檢驗診斷的重責大任，為強化禽流感診斷技術與研究，以及培育診斷人才，執行 102 年「亞太地區重要人畜共通傳染病病原監測與區域聯防機制之建立」科技計畫，選派兩名研究人員赴日本北海道大學禽流感參考實驗室，研習禽流感診斷技術、病毒特性、病原性分析方法等，並討論有關監測與防疫策略，並協商未來進行禽流感診斷實驗室能力比對與可能合作之試驗研究。本次研習瞭解日本禽流感診斷及研究現況，供做我國禽流感未來研究方向及防疫策略研擬之參考，並可促進臺日雙邊農業國際合作及學術交流。

貳、研習課程表

日期	研習單位及內容
8 月 25 日 (日)	桃園中正國際機場搭機飛往日本北海道札幌市（Sapporo, Hokkaido ）新千歲（New Chitose Airport）國際機場。
8 月 26 日 (一)	北海道大學（Hokkaido University）微生物學實驗室 ➢ 研習技術內容討論 ➢ RT-PCR 研習
8 月 27 日 (二)	➢ RT-PCR 研習 ➢ 定序（附件 1、Sequencing）
8 月 28 日 (三)	➢ RT-PCR 研習 ➢ 定序
8 月 29 日 (四)	➢ RT-PCR 研習 ➢ 定序 ➢ 序列分析
8 月 30 日 (五)	➢ 序列分析
8 月 31 日(六)	假日
9 月 1 日(日)	假日
9 月 2 日 (一)	➢ 雞胚胎接種 ➢ 專題報告：Advanced Lecture on One Health（附件 2） ■ Disease control at the animal-human-ecosystems interface: the influenza experience, Dr. Ruben Donis ■ One Health approach to FAO’s action plan to implement multi-sectoral and multi-sectoral and multi-disciplinary approach to controlling high impact infectious disease, Dr. Subhash Morzaria
9 月 3 日 (二)	➢ 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗 ➢ 雞胚胎接種觀察，接種第一天 ➢ 病毒斑試驗 ➢ 專題報告： ■ Zoonotic disease control in Mongolia, Dr. Boldbaatar Bazartseren（附件 3） ■ Situation of Animal Diseases in Viet Nam, Dr. Nguyen Hoang Dang（附件 4） ➢ 博士班學生實驗交流

9 月 4 日 (三)	➢ 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗，接種後第一天 ➢ 雞胚胎接種觀察，接種第二天 ➢ 病毒斑試驗，接種第一天 ➢ 專題報告： ■ Wildlife and Zoonosis, Dr. Toshio Tsubota（附件 5）
9 月 5 日 (四)	➢ 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗，接種後第二天 ➢ 雞胚胎接種觀察，接種第三天 ■ HA test（附件 6） ■ HI test（附件 7） ➢ 病毒斑試驗，接種第二天 ➢ 專題報告： ■ 1.Ecology of influenza virus; 2.Control of avian influenza; 3.Preparedness for pandemic flu; 4.For the control of zoonoses, Dr. Hiroshi Kida（附件 8） ■ General Introduction of Influenza, Yoshihiro Sakoda（附件 9）
9 月 6 日 (五)	➢ 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗，接種後第三天 ➢ 病毒斑試驗，接種第三天 ➢ 專題報告： ■ Rabies, Dr. Naoto Ito（附件 10）
9 月 7 日(六)	➢ 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗，接種後第四天
9 月 8 日(日)	➢ 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗，接種後第五天
9 月 9 日 (一)	➢ Real-time PCR （附件 11）
9 月 10 日 (二)	➢ Real-time PCR
9 月 11 日 (三)	➢ Real-time PCR
9 月 12 日 (四)	➢ 專題報告 ■ 行政院農業委員會家畜衛生試驗所簡介及臺灣高病原性家禽流行性感冒 H5N2 亞型之病理生理學（AHRI introduction with pathobiology of H5N2 HPAI） ■ 臺灣鼬獾狂犬病診斷流程暨病例報告（Formosan ferret-badge rabies diagnostic procedure and case report） ➢ 實驗討論
9 月 13 日(五)	➢ 病毒斑試驗（附件 12）
9 月 14 日(六)	札幌新千歲國際機場搭機返國，晚上 7 點抵達桃園國際機場

參、研習機構介紹

北海道大學位於日本北海道札幌市市中心，鄰近札幌車站，走路約 15 分鐘可達校門，校區擁有大量農田、綠地及林地等，綠化程度及水源系統讓北海道大學號稱札幌市之肺 [1]，該校創立於 1876 年，舊稱為札幌農學院（Sapporo Agricultural College），1947 年改稱為北海道大學（Hokkaido university）。而 1880 年後開始有獸醫科學，當時獸醫學系（division of Veterinary Medicine）隸屬於農學院（Faculty of Agriculture），1995 年改名為獸醫學研究所 [2]（Graduate school of veterinary medicine），並分別於 2005 年成立人畜共通傳染病控制研究中心（Research Center for Zoonosis Control）以及 2013 年成立獸醫教學醫院（veterinary teaching hospital），至今分成六個單位，分別有獸醫臨床醫學（veterinary clinical sciences）、疾病控制學（disease control）、生物醫學（biomedical sciences）及環境獸醫學（environmental veterinary sciences）、應用獸醫學（applied veterinary sciences）及獸醫教學醫院（veterinary teaching hospital）。疾病控制單位內又包括四個研究室，微生物學研究室、傳染病研究室、寄生蟲學研究室及實驗動物學研究室。每一研究室原則上有一位教授、一位副教授及一位助理教授。此次研習地點為疾病控制學系的微生物學研究室，負責人特任教授喜田宏（Hiroshi Kida）先生建立的禽流感實驗室，係獲得 OIE 認可禽流感參考實驗室之一，喜田宏先生同時也是現任人畜共通傳染病控制研究中心主任。

註 1：http://www.oia.hokudai.ac.jp/about/university-profile/our-campuses/sapporo/
註 2：http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/en/outline/

肆、研習內容與心得

本次赴日本北海道大學之行程於民國 102 年 8 月 25 日上午由桃園國際機場搭機出發，於北海道大學微生物學實驗室（OIE 禽流感診斷參考實驗室）研習家禽流行性感冒相關診斷技術與試驗研究交流，為期 3 週時間，於 9 月 14 日搭機返台，詳細研習內容與心得依序條列如下：

一、8 月 25 日（星期日）

桃園中正國際機場搭機飛往日本北海道札幌市（Sapporo, Hokkaido ）新千歲（New Chitose Airport）國際機場，Dr. Masatoshi Okamatsu 接機送至旅舍下榻後，帶著我們進北海道大學，就獸醫學研究所、禽流感實驗室、人畜共通傳染病控制研究中心及校內環境稍作簡介。

二、8 月 26 日（星期一）

（一）研習技術內容討論

北海道大學微生物學實驗室共有三位負責人，分別為教授喜田宏（Hiroshi Kida）、副教授迫田義博（Yoshihiro Sakoda）及助理教授岡松正敏（Masatoshi Okamatsu）。本次研習行程由 Dr. Masatoshi Okamatsu 安排，由博士班學生七戶新太郎（Shintaro Shichinohe）、日尾野隆大（Takahiro Hiono）、栗林沙彌（Saya Kuribayashi）負責教導我們家禽流行性感冒相關診斷技術，包括 RT-PCR、核酸序列定序分析、雞隻靜脈內接種致病性指數試驗、雞胚胎接種、血球凝集試驗、血球凝集抑制試驗、病毒斑試驗、Real-time PCR 等技術。

（二）RT-PCR

本次樣本病毒株之核酸分別為：A/chicken/Tw/1103/2012、A/chicken/Tw/120502/2012、A/chicken/Tw/A1029/2012、A/chicken/Tw/A1997/2012、A/chicken/Tw/120101/2012。

1. 反轉錄合成 cDNA

   將萃取的 RNA 反轉錄（Reverse transcriptase）成 cDNA。

   Protocol:

   RNA 8μL
   Uni 12 primer 2μL
   ↓
   70℃, 5 min
   ↓
   On ice
   ↓
   DEPC H2O 14μL
   5X Buffer 8μL
   DTT 4μL
   10mM dNTPs 2μL

	RNase inhibitor	1μL
	M-MLV	1μL
	Total	30μL

條件：

42℃	00:60:00
98℃	00:05:00
4℃	∞

2. PCR 增幅 HA gene

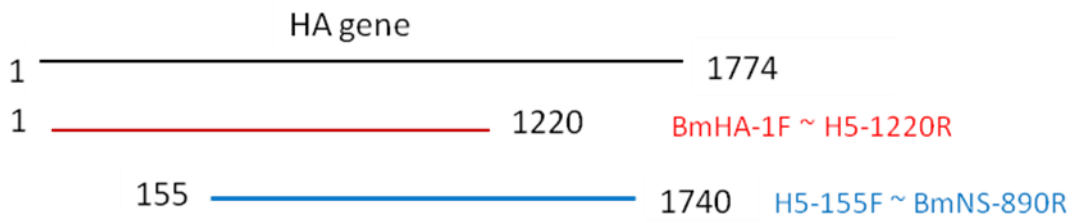
Primer: (1) BmHA-1F ~ H5-1220R

(2) H5-155F ~ BmNs-890R

BmHA-1F: TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG

Bm-NS-890R: ATATCGTCTGGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT

參考文獻：Arch Virol (2001) 146: 2,275-2,289



HA gene 增幅示意圖

配置：	2X Ex-Taq	12.5μL
	H2O	11μL
	Fw Primer (10μM)	0.5μL
	Rv Primer (10μM)	0.5μL
	cDNA	0.5μL
	Total	25μL

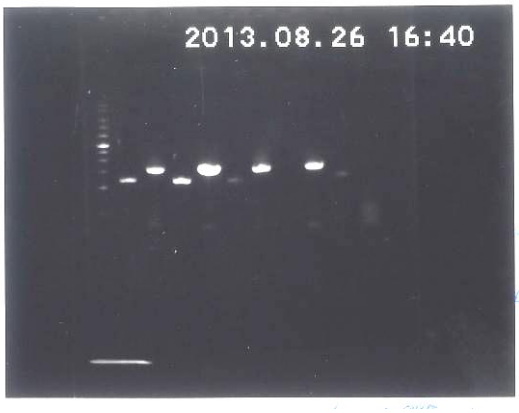
條件：	94℃	00:02:00	
	94℃	00:00:30	┐
	55℃	00:00:20	┼ 30 cycle
	72℃	00:02:00	┘
	72℃	00:04:00	
	4℃	∞	

3. 電泳檢測

電泳膠配置：0.8 % Agar in TAE

電壓：100V

時間：20 min



L1: 120502-1
L2: 120502-2
L3: A1029-1
L4: A1029-2
L5: A1997-1
L6: A1997-2
L7: 120101-1
L8: 120101-2
L9: 1103-1
L10: 1103-2

三、8 月 27 日（星期二）

（一）RT-PCR

1. PCR 產物萃取純化

本次使用商品化之套組(Gel/PCR Extraction kit)

PCR 產物與 Buffer GP1 = 1:5 混合均勻

↓

放入含過濾膜之管柱，13,000 rpm 離心 30 秒

↓

棄置離心出的液體，加入 600μL GP2 Buffer13,000 rpm 離心 30 秒

↓

棄置離心出的液體，13,000 rpm 離心 2 分

↓

更換下管，過濾膜之管柱加入 20μL GP3 Buffer，靜置 2 分

↓

13,000 rpm 離心 2 分

↓

棄置過濾膜之管柱，保留離心後之 PCR 產物。

2. 電泳檢測萃取純化的 PCR 產物

電泳膠配置：0.8 % Agar in TAE

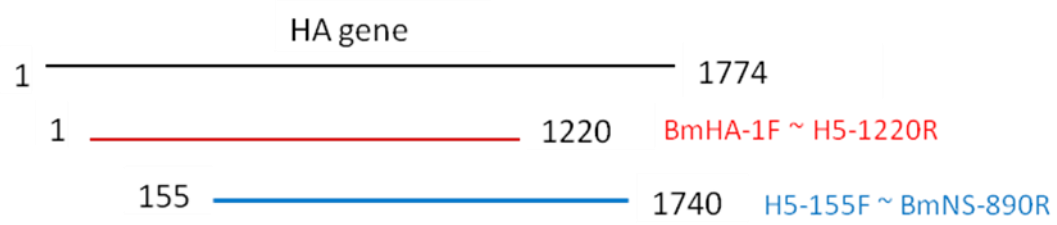
電壓：100V

時間：20 min

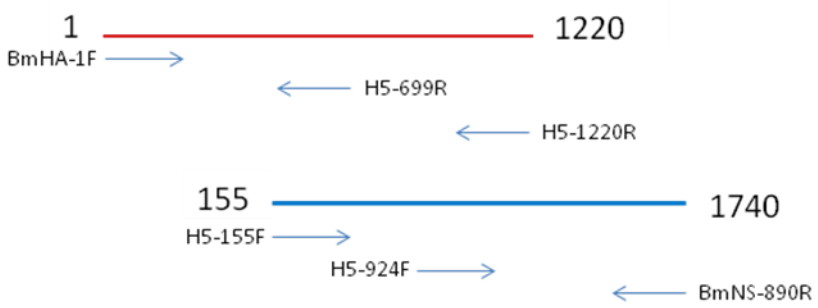
（二）HA gene 全長定序

1. Extension HA 各段基因

說明：HA gene 全長共 1,774 bp，由於微生物學實驗室的核酸定序機器最長只能定出 850 bp，故分別使用 6 種 primer 夾出各段，再組合出 HA 基因全長。



HA gene 增幅示意圖



HA gene 夾出各段之示意圖

Primer: BmHA-1F
H5-155F
H5-924F
H5-699R
H5-1220R
BmNS-890R

配置：

DEPC H2O	4.75μL
BDT	0.5μL
5X Buffer	1.75μL
Template	1μL
Primer (1.6μM)	2μL
Total	10μL

條件：

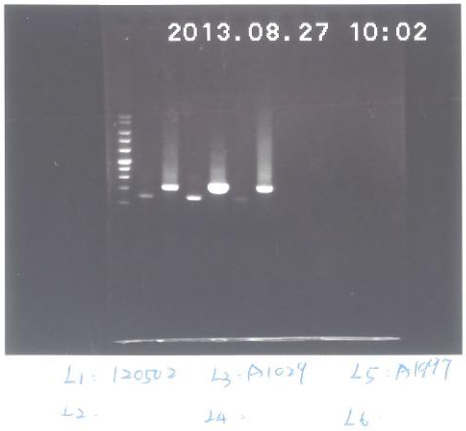
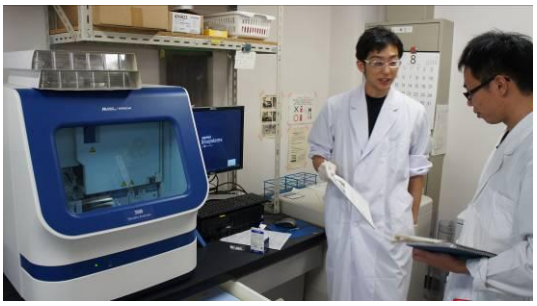
96℃	00:01:00	
96℃	00:00:10	┐
55℃	00:00:05	┼ 25 cycle
60℃	00:01:30	┘
4℃	∞	

1. PCR 產物純化
   (1) 配置 stop solution
   Na_2EDTA (0.25M)　　2μL
   Sodium acetate (3M)　　2μL
   Glycogen (20mg/mL)　　1μL
   (2) 加入 5μL stop solution
   (3) 加入 60μL 的 99.5%酒精，並且震盪均勻。
   (4) 4℃下 8,000 rpm 離心 20 分。
   (5) 棄置上清液。
   (6) 加入 200μL 的 70%酒精，於 4℃下 8,000rpm 離心 2 分。
   (7) 棄置上清液。
   (8) 重複(6)及(7)步驟。
   (9) 4℃下 8,000rpm 離心 2 分，棄置上清液。
   (10) 利用真空乾燥機將管內殘留的水份乾燥。
   (11) 加入 10μL HiDi™ Formamide 將管內的沈澱物混合均勻。
   (12) 進行 denature
   95℃　3 min
   4℃　∞
   (13) 4℃貯存（可貯放一週）或－20℃（可貯放一個月），待核酸序列分析使用。

四、8 月 28 日（星期三）

（一） 核酸序列分析

1. 微生物學實驗室有核酸定序的機器，為 Applied Biosystems 3500 genetic analyzer, HITACH，本機器最多能讀出約 850bp，需要 125min，將核酸放入機器後即可全自動進行讀取。
2. 將讀出序列利用 ATCG-project 軟體分析 HA 基因序列。

	
Primer: (1) BmHA-1F ~ H5-1220R (2) H5-155F ~ BmNs-890R 重新再增幅一次。	Applied Biosystems 3500 genetic analyzer, HITACH

(1) 8 月 29 日（星期四）

（一） RT-PCR

1. Extension HA 各段基因

由於只定出 120101 這株病毒株之 HA 全基因序列，另外三株 120502、A1029、A1917 未完成拼湊出全 HA 基因序列，因此再各挑選 6 種不同 primer 夾出其餘 3 株 HA 基因片段。

各病毒株分別由 BmHA-1F ~ H5-1220R (1)及 H5-155F ~ BmNs-890R (2) Primer 夾出 2 段。

Primer: BmHA-1F for (1)
H5-155F for (2)
H5-924F for (2)
H5-699R for (1)
H5-1220R for (1)
BmNS-890R for (2)

2. PCR 產物純化

如上述三、(二)、2.步驟。

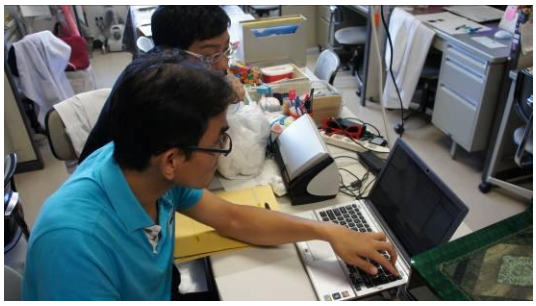
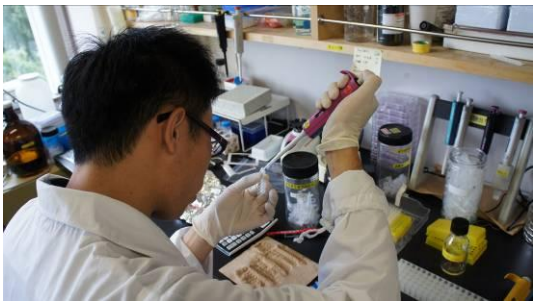
（二） 核酸序列分析

將純化好 Extension 的 HA 基因片段，利用 Applied Biosystems 3500 genetic analyzer, HITACH 定序出各鹼基核苷酸。

(2) 8 月 30 日（星期五）

將讀出序列利用 ATCG-project 軟體分析 HA 基因序列。

本次研習僅針對 HA 全段基因定序，而其他七段的基因如 NA、PB1、PB2、M 等基因，也是可依此原則及方法定出全長。

	
利用 ATCG-project 軟體分析 HA 基因序列。	進行 Extension 後的 HA 基因之純化工作。

(3) 8 月 31 日（星期六）

假日

(4) 9 月 1 日（星期日）

假日

(5) 9 月 2 日（星期一）

（一） 雞胚胎接種

1. 選用 9-11 天的雞胚胎蛋，照蛋劃出接種尿囊腔的位置，接種時避開血管。
2. 本次接種的病毒如下：
   (1) H1N1 豬源
   (2) H3N2 野鳥
   (3) NDV
   (4) Influenza B 人源
3. 步驟：
   (1) 用含抗生素（penicillin & streptomycin）的 PBS 連續 10 倍稀釋 4 階病毒液。
   (2) 每株病毒取 10^{-3} 及 10^{-4} 稀釋階，各接種 2 顆蛋，每顆 100μL，供日後的 HA 及 HI 試驗用。
   (3) 接種前用針於標記戳洞的位置，接種後用樹脂封口。
   (4) 34℃孵育。

照蛋，觀察胚胎發育情形，及標記接種位置。	將下針點用針戳一小洞。
接種 100μL 之病毒液。	接種完後用樹脂封洞。

（二） 專題報告：Advanced Lecture on One Health

筆者參與北海道大學獸醫系舉辦之國際研討會，邀請美國 CDC Dr. Ruben O. Donis 及 FAO 亞太區辦事處 Dr. Subhash Morzaria 進行專題演題。

1. Dr. Ruben Donis 的題目：以流行性感冒為例，探討動物與人類生態間之疾病控制模式（Disease control at the animal-human-ecosystems interface: the influenza experience），流行性感冒病毒在人類及動物是重要病原，而 Dr. Donis 的研究是如何防止流感病毒的傳播，如監測流感病毒在保毒動物體內演化、抗原性及致病機轉之變化。探討病毒血球凝集素(Hemagglutinin)及神經胺酸酶(Neuraminidase)蛋白的多醣(Glycan)特異性，以瞭解在不同品種間的傳播及毒力關係。此外，與各國流感病毒專家學者合作，以實現“One-Health”的理想，分析及評估各國的監測資料，預測且發展流感疫苗以因應下波的威脅。
2. Dr. Subhash Morzaria 的題目：FAO 如何實踐“One-Health”的理想策略（One Health approach to FAO’s action plan to implement multi-sectoral and multi-sectoral and multi-disciplinary approach to controlling high impact infectious disease），FAO 制定的減少傳染病風險策略，能提升未開發國家的農業利潤，不僅能控制在未開發國家不被重視的新興傳染病，也能進而監測新興傳染病之疫情，達到 One-Health One-World。

(6) 9 月 3 日（星期二）

（一） 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗

此次的實驗病毒株為Ck/Taiwan08/H5及Ty/Italy/H7，前株為靜脈接種0.2 mL，後者為鼻腔接種0.1 mL，死亡雞隻採取腦、肺、脾、腎、胰、腸供細胞激素檢測。每 24 小時觀察一次，持續10天，在每次觀察時紀錄每隻雞之分數：正常雞計0分、發病雞計1分、嚴重發病計2分、死亡雞計3分（發病程度之判定通則：出現呼吸症狀、沈鬱、下痢、無毛部皮膚或肉垂發紺、頭或臉水腫及神經症狀等其中一種症狀時，判為“發病”，呈現一種以上症狀時，判為“嚴重發病”）。

本實驗於P3 level的實驗室操作，進入實驗室時於緩衝室穿著2件Tyvek防護衣（內件為全新，外件為前次內件且滅菌過，使用3次後丟棄），手套及鞋套戴兩層，並配戴口罩，護目鏡等防護措施。離開實驗室時，將外件防護衣、手套及鞋套丟至實驗室內，其餘於緩衝室脫去後留在實驗室內待下次進入實驗室再行打包滅菌，最後再離開實驗室，並洗手及用消毒水漱口。

P3 實驗室進出嚴格管制。	左側為 IVC，均有個別的換氣，防止病毒外洩。	右側為 BSC-Ⅱ操作櫃，實驗均在裡面操作。

（二） 雞胚胎接種觀察

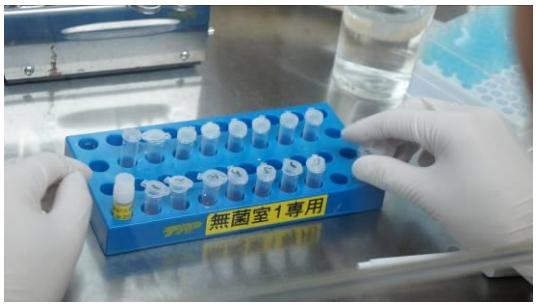
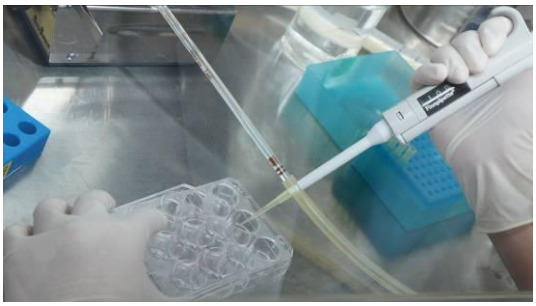
接種後第一天，照蛋觀察是否有胚胎中止（無血管）或細菌感染（尿囊腔混濁）等情形。

（三） 病毒斑試驗

由於細胞培養技術需要各多的時間來學習，因此筆者此行的時間不足夠安排此技術，所以他們先行準備病毒斑試驗所需的 MDCK cell，而 MDCK cell 是培養在 12 孔盤上以方便病毒斑實驗的操作。

步聚：

(1) 準備連續 10 倍稀釋（1X MEM, CS free）的病毒液。
(2) 倒掉孔盤內培養液，以 1X MEM (CS free) 或 PBS 清洗一次，接種病毒液 10^{-3}~10^{-8} 各 2 孔，每孔 0.1 mL。
(3) 35℃培養 1 小時，為增加病毒對細胞的吸附性，每 15 分鐘搖均一次。
(4) 利用微波爐溶化 2% Bact Agar。
(5) 冷卻 Agar，2X MEM (CS free)置於 42℃，兩者 1:1 混合。加入 trypsin acetylated (最終濃度 0.0005% v/v)。
(6) 倒到(3)之病毒液。
(7) 以 1X MEM (CS free) 或 PBS 清洗一次，清洗後倒掉。
(8) 每孔加入 1 mL MEM-Agar 混合之液體。
(9) 待 Agar 凝固後，放入 35℃培養 2 天。

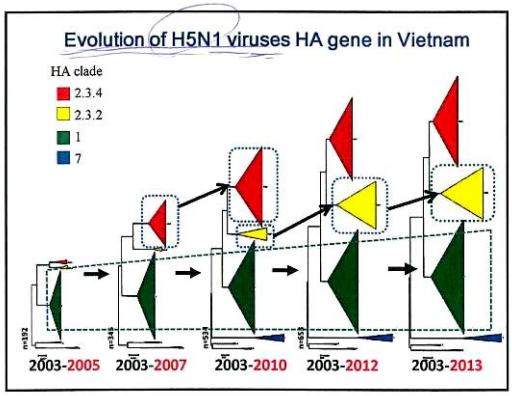
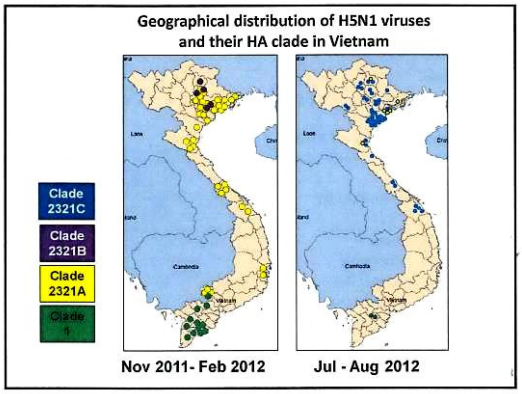
	
病毒液連續 10 倍稀釋。	每孔加入 0.1 mL 的病毒液。

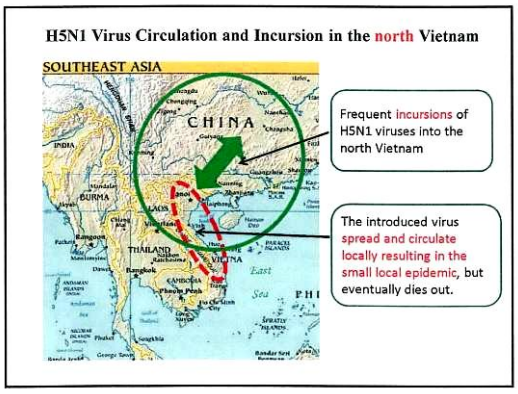
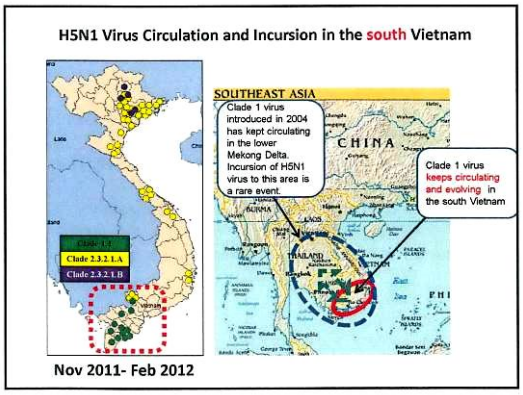
（四） 專題報告：

北海道大學有提供將學金給未開發國家的專家學者為期 3 個月的短期進修，在進修期間安排各國學員專題演講，內容包括該國的疫情介紹、研究主題等，筆者利用研習空檔參與來自蒙古及越南的學員報告。

此外，Dr. Sakoda 非常重視微生物學實驗室內研究生、學生與外國研究人員之間的交流，因此邀請筆者們參加實驗室的研究討論會。

1. Dr. Boldbaatar Bazartseren 演講蒙古人畜共通傳染病的控制（Zoonotic disease control in Mongolia），蒙古重要的人畜共通傳染病，包括：Brucellosis、Tuberculosis、Anthrax、Glanders、Rabies、Avian influenza、Plaque、TBEV 等。國家公共衛生實驗室網路系統（National public health laboratory network）的成立，提供人類及動物醫學間的學術交流與合作管道，方便制定新興傳染病之監測及反應。
2. Dr. Nguyen Hoang Dang 演講越南動物疾病疫情（Situation of Animal Diseases in Viet Nam），越南目前最重視的疾病有高病原性家禽流行性感冒 H5N1、PRRS 及口蹄疫，而高病原性家禽流行性感冒 H5N1 如下圖說明。越南豬隻疾病除 PRRS 外，Classic swine fever 為第二大好發。FMD 屬於 O 型、Topotye ME-SA、Strain PanAsia。

	
越南 H5N1 的 HA clade 從 2003 到 2013 年包括 clade 2.3.4、clade 2.3.2、clade 1、clade 7。	2009 至 2012 年北越至少有 3 種傳入的 H5N1 病毒(2.3.2.1A、B、C)。

	
越南 H5N1 病毒大部份來自中國，之後存在當地變成流行。	2003~2004 年 H5N1 HA clade 1 已存在南越，至今已持續循環 7~8 年。

3. 博士班學生實驗交流

(1) Shintaro Shichinohe 題目為 Selection of H3 avian influenza viruses with SAα2,6Gal receptor specificity during serial passages in pigs。鴨分離出的 A/duck/Hokkaido/5/77 (H3N2)病毒鼻腔接種 3 週齡豬，鴨分離出的 H3 病毒在 HA 基因 226-227-228 位置的胺基酸為 Gln-Ser-Gly，能辨認細胞上 SAα2,3Gal 接受體，而人類 H3 病毒的胺基酸為 Leu-Ser-Ser，則辨認 SAα2,6Gal 接受體。而豬上呼吸道具有 SAα2,3Gal 及 SAα2,6Gal 接受體，因此在豬體內連續繼代觀察 HA 基因是否會轉變 Leu-Ser-Ser。結果顯示”會”，故豬流感病毒的監測是重要的，以防止流感病毒的流行。

(2) Saya Kuribayashi 題目 Pathogenesis of highly pathogenic avian influenza virus infection and cytokine response in chickens。高病原性禽流感會過量表現 IL-6，造成血管損壞且通透性增加等。而此題目目的是探討細胞激素，如 IL-6 在嚴重禽流感扮演角色為何？

(7) 9 月 4 日（星期三）

（一） 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗，接種後第一天。

觀查接種病毒株 Ck/Taiwan08/H5 (IV) 及 Ty/Italy/H7 (IN) 之雞隻症狀，接種第一天雞隻無明顯臨床症狀，將 IVC 移入 BSC-Ⅱ內更換飼料及水。

（二） 雞胚胎接種觀察，接種第二天

接種後第二天，照蛋觀察胚胎蛋是否有死亡，而尿囊液供 HA 及 HI 檢測用。

（三） 病毒斑試驗，接種第一天

觀察病毒感作細胞情形，待接種第二天 CPE 更明顯再染色。

（四） 專題報告：

1. 北海道大學野生動物生物學與醫學實驗室 Dr. Toshio Tsubota 主講野生動物與人畜共通傳染病（Wildlife and Zoonosis），Dr. Tsubota 調查北海道地區野生動物生態及疾病，如調查及研究北海道棕熊，以減少與當地居民的衝突，也可建立基本生態資料。

(8) 9 月 5 日（星期四）

（一） 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗，接種後第二天

觀查接種病毒株 Ck/Taiwan08/H5 (IV) 及 Ty/Italy/H7 (IN) 之雞隻症狀，2 株病毒株皆出現食慾不振與沈鬱等症狀。

（二） 雞胚胎接種觀察，接種第三天

蒐集尿囊液供 HA 及 HI 檢測用。

1. 血球凝集試驗（Hemagglutination test; HA test）

特異性的抗原會與特定的紅血球發生凝集現象，屬於先天性結合。

(1) 以 96 孔微量測定盤進行試驗。

(2) 加入 50 μL PBS。

(3) 第 1 孔（A1~G1）分別加 50 μL 尿囊液。陰性對照：H 列的第 1 不加抗原液。

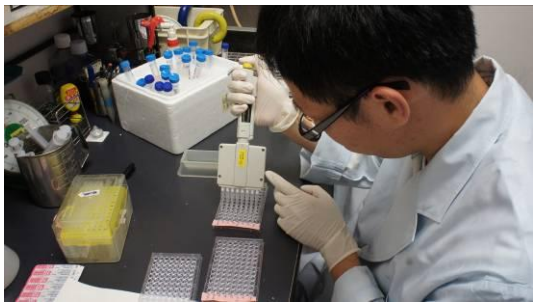
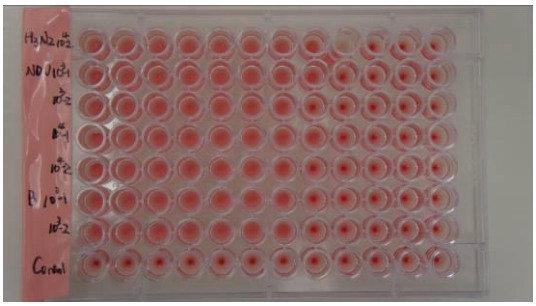
(4) 由第 1 孔開始進行 50 μL 兩倍連續序列稀釋，稀釋之最後一孔丟棄 50 μL。

(5) 全盤每孔加 50μL 之 0.5% 雞紅血球懸浮液，貼上膠帶防止溢出。

(6) 輕拍盤子使混合均勻，在室溫中放置約 30 分鐘，見血球對照孔之血球完全沉降下來即可判讀及記錄。

(7) 血球與病毒（或抗原）完全凝集記為”＋”，不完全凝集記為”+/－”，血球完全沉降者記為”－”。完全凝集之病毒（或抗原）最高稀釋倍數，即代表病毒（或抗原）之 HA 力價。

敲開氣室外的蛋殼。	抽出尿囊液。

	
由第 1 孔開始進行 50 μL 兩倍連續序列稀釋。	HA 結果。

2. 血球凝集抑制法（Hemagglutination inhibition test; HI test）

因為有抗體的存在，抗原即與抗體發生中和作用，以致 RBC 無法與抗原產生凝集。做 HI test 前必須先做 HA test 來測出 HAU，通常 HI test 的定量為 8 HAU。

(1) 製備 HI 試驗用標準抗原液及迴歸力價測定：
先計算進行 HI 試驗所需 8 HA 單位（8 HAU）抗原液總量後，將已知力價之病毒（或抗原）以 PBS 稀釋為 8 HAU / 50 μL 濃度。

(2) 分裝 25 μL PBS 至 A~D 列的第 1~12 孔。

(3) 分別加 25 μL 標準抗血清至 A1、B1、C1、D1 孔。

(4) 由第 1 孔開始進行 25 μL 兩倍連續序列稀釋，稀釋之最後一孔丟棄 25 μL。

(5) 每孔加入 25 μL 8 HAU 病毒或抗原，除 E、F 排。

(6) E 排供迴歸檢測（Back titration），E 排每孔再加 50μL PBS，第一孔加入 50μL 標準血清，由第 1 孔開始進行 50 μL 兩倍連續序列稀釋，稀釋之最後一孔丟棄 50 μL。

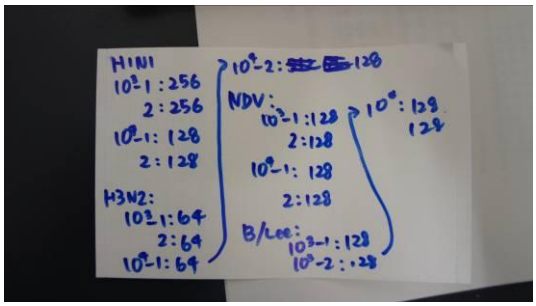
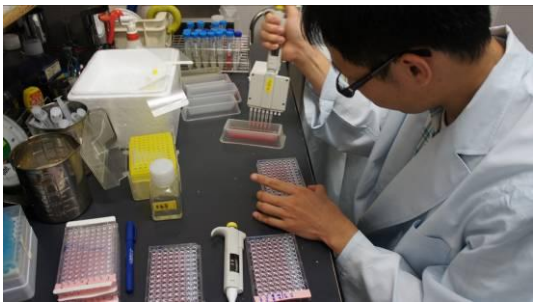
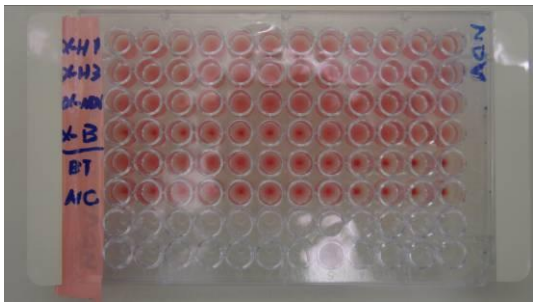
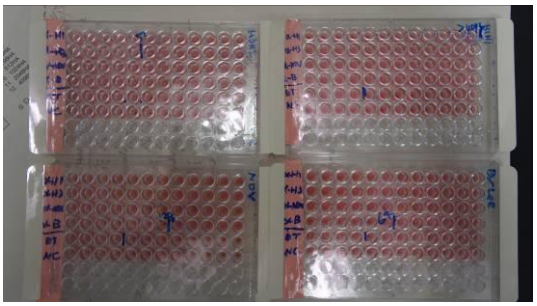
(7) F 排供陰性對照，每孔加入 50μL PBS。

(8) 貼上膠帶，室溫感作 30~60 分。

(9) 加入 0.5%之雞紅血球懸浮液，輕微振盪混勻後，靜置室溫中約 15~20 分鐘，見血球對照孔之血球完全沉降下來即可判讀及記錄。

(10) 可以完全抑制 8 HAU 抗原的血清最高稀釋倍數即為 HI 力價。

(11) 若有抗原與抗體反應，則血球凝集被抑制。同樣將盤子傾斜判讀，血球完全凝集記為”＋”，不完全凝集記為”+/－”，完全抑制凝集記為”－”。完全抑制凝集之最高血清稀釋倍數，即代表抗體之 HI 力價。

	
四株病毒之 HA 力價。	加入 0.5%雞 RBC。
	
NDV 之 HI test 結果。	四株病毒之 HI test 結果。

（三） 病毒斑試驗，接種第二天

病毒斑試驗－染色

染色液共有兩種：

(1) 中性紅（Neutral red method）：

配置：1g + 200mL DDW。

方法：MEM-2%Agar 1 比 1 混合，加入 1%中性紅 1:200，37℃ CO2 培養箱培養隔日挑病毒斑。

目的：供挑選病毒斑之後續培養研究，病毒斑計算不適合此染色法。

(2) 結晶紫（Crystal violet method）：

配置：10g 結晶紫 + 37%福馬林 100mL。

方法：加入 0.5 mL 10%結晶紫，室溫感作超過 12 小時。

目的：供病毒斑計算用，因此染色含福馬林，故無法再分離病毒。而此次的研習僅學此技術。

（四） 專題報告：

1. 喜田宏教授（Dr. Kida）演講流感病毒的簡介及禽流感控制（a. Ecology of influenza virus; b. Control of avian influenza; c. Preparedness for pandemic flu; d. For the control of zoonoses）。

流感病毒在鴨隻體內主要是在腸管複製（結腸），大量減少免疫細胞的威脅，故流感病毒的抗原性（antigenically）及基因性（genetically）在鴨非常的穩定，而病毒對鴨無致病性，且候鳥（鴨）是 A 型流感的自

然宿主，所以能將病毒帶到各國。Dr. Kida 非常不建議使用禽流感疫苗，因為會造成家禽無症狀的散播病毒（Silent spread of virus），對高病原性禽流感採取“撲滅”措施，此策略是主要控制方法。

2. 迫田義博副教授（Dr. Sakoda）演講流感概略（General Introduction of Influenza），包括使用 AGID（Agar Gel Immunodiffusion Test）來區分 A、B 及 C 型病毒，野外病材的蒐集，使用雞胚胎蛋分離病毒及後續之 HA test、HI test、NI test、RT-PCR 及基因分析等檢測，此課程主要針對國外的學員所開的基礎課程，演講後還有實務練習，而筆者也藉此更加穩固基礎。

(9) 9 月 6 日（星期五）

（一） 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗，接種後第三天

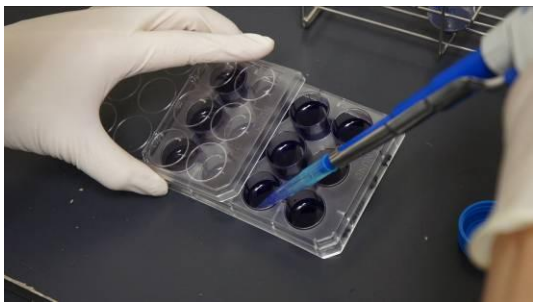
Ty/Italy/H7 (IN)病毒株接種的雞隻出現高病原性禽流感的典型臨床症狀，如沈鬱，雞冠、顏面、肉垂及腳鱗水腫出血等症狀，因此決定將雞隻犧牲，我們採靜脈注射過量的麻醉劑，以符合動物福祉。犧牲的雞隻採取腦、脾、肺、腎、胰、腸等器官，放入 RNAlater 緩衝液，保護核酸。而 Ck/Taiwan08/H5 (IV) 接種雞隻出現食慾不振、沈鬱及下痢等症狀。

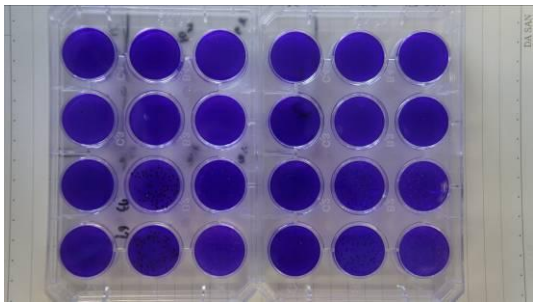
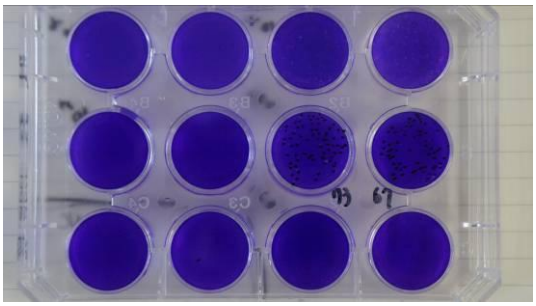
（二） 病毒斑試驗，接種第三天

病毒斑計數：

結晶紫染色之培養皿可見有透明的病毒斑，吸出染劑，再用自來水將 Agar 連同染劑沖洗掉，棄置 Agar。

判讀：計數 plaque，病毒稀釋 10^n 次方，取 0.1 mL 接種 2 孔，平均有 k 個 plaque，則病毒力價= k x 10^n x 10 (0.1 mL x 10 = 1 mL) = k x 10^{n+1} PFU/mL。

	
吸出結晶紫染劑。	自來水沖掉 Agar 及多餘的染劑。

	
接種病毒液 10^{-3}~10^{-8} 各 2 孔之結果。	10^{-4} 計算的平均 plaque 為 70。病毒力價為 $7x10^{6}$ PFU/mL。

（三） 專題報告：

1. 由於筆者赴北海道大學時，國內正爆發狂犬病疫情，因此在實驗空檔之餘特別參加 Dr. Naoto Ito 的專題演講"狂犬病"（Rabies），Dr. Ito 為日本 Gifu 大學人畜共通傳染病實驗室負責人。狂犬病為病毒性之人畜共通傳染病，會造成急性腦炎（嚴重神經症狀），死亡率 100%，發病後沒有有效的治療方法，根據 OIE 資料每年約 55,000 死於狂犬病，平均每 10 分鐘有 1 人死於狂犬病，亞洲及非洲為最多人類的病例（>95%）。黃金診斷標準為螢光抗體染色（Fluorescent antibody test），而診斷的樣本為腦（海馬角、小腦、腦幹），被疑似動物咬傷則需要立即做曝露後的免疫注射（post-exposure prophylaxis）。在預防上若有大於 70%以上的疫苗覆蓋率（vaccination coverage）就可阻斷疾病擴散。

(10) 9 月 7 日（星期六）

（一） 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗，接種後第四天

Ck/Taiwan08/H5 (IV) 接種雞隻出現食慾不振及沈鬱等症狀，外觀腳鱗出現輕微出血。

(11) 9 月 8 日（星期日）

（一） 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗，接種後第五天

犧牲 Ck/Taiwan08/H5 (IV) 接種雞隻，採取腦、脾、肺、腎、胰、腸等器官，放入 RNAlater 緩衝液，保護核酸。

(12) 9 月 9 日（星期一）

（一） Real-time PCR

1. RNA 萃取（使用 RNeasy® Mini Kit, QIAGEN）

步驟：

(1) 取出 RNAlater 內的組織（腦、脾、肺、腎、胰、腸等），組織不超過 30 mg，加入 RLT buffer 700μL，用 1 mL 的針來回抽取切碎組織，

再用拋棄式研磨棒將組織研磨均勻。

(2) 13,000 rpm 離心 3 分鐘，抽取上清液 500μL。

(3) 加入 70%酒精 500μL，pipetting。

(4) 分次加入 500μL 於 RNeasy spin column，13,000 rpm 離心 15 秒，棄置離下的液體。

(5) 加入 RW1 buffer 700μL，13,000 rpm 離心 15 秒，棄置離下的液體。

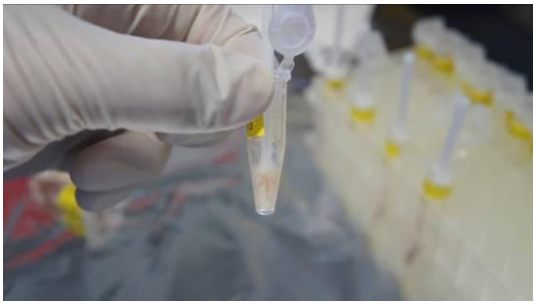
(6) 加入 RPE buffer 500μL，13,000 rpm 離心 15 秒，棄置離下的液體。

(7) 加入 RPE buffer 500μL，13,000 rpm 離心 2 分鐘，棄置離下的液體。

(8) 更換收集管，再 13,000 rpm 離心 1 分鐘，去除所以液體。

(9) 更換收集管，加入 30μL RNase-free 水於膜上，13,000 rpm 離心 1 分鐘萃取 RNA。

(10) 進行 RT-PCR 前加入 DNase。

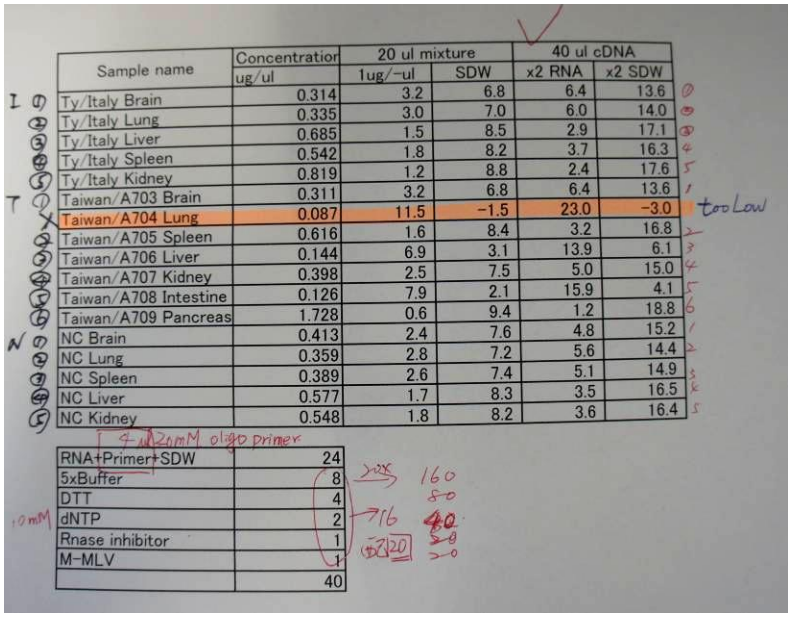
	
取出 RNAlater 內的組織。	拋棄式研磨棒將組織研磨均勻。

2. 檢查檢體 RNA 的濃度

(1) 利用 OD_{260} 的吸光值檢測各檢體的濃度（μg/mL）。

(2) 將所有的樣本濃度定量。

RNA Determination Dilution Factor: 20× (5ul + 95 ul) DW Integration Time: 1s Factor: 40 Units: μg/ml No. 260nm 280nm Ratio Conc. 1 0.392 0.267 1.465 314 Ty/Italy Brain 2 0.419 0.269 1.555 335 Lung 3 0.852 0.536 1.590 681 Liver 4 0.677 0.433 1.565 542 Spleen 5 1.114 0.700 1.592 891 kidney 6 0.388 0.251 1.55 311 Taiwan/A703 Brain 7 0.109 0.073 1.50 87 Lung 8 0.771 0.487 1.58 616 Spleen 9 0.179 0.124 1.45 144 Liver 10 0.497 0.317 1.565 396 kidney 11 0.158 0.106 1.50 126 Intestine 12 2.160 1.382 1.563 1728 Pancreas 13 0.516 0.352 1.470 413 NC Brain 14 0.449 0.291 1.545 359 Lung 15 0.486 0.296 1.645 389 Spleen 16 0.721 0.463 1.560 577 Liver 17 0.685 0.442 1.550 548 kidney	利用 OD_{260} 的吸光值檢測各檢體的濃度（μg/mL）。



Sample name	Concentration ug/ul	20 ul mixture 1ug/-ul	20 ul mixture SDW	40 ul cDNA x2 RNA	40 ul cDNA x2 SDW
Ty/Italy Brain	0.314	3.2	6.8	6.4	13.6
Ty/Italy Lung	0.335	3.0	7.0	6.0	14.0
Ty/Italy Liver	0.685	1.5	8.5	2.9	17.1
Ty/Italy Spleen	0.542	1.8	8.2	3.7	16.3
Ty/Italy Kidney	0.819	1.2	8.8	2.4	17.6
Taiwan/A703 Brain	0.311	3.2	6.8	6.4	13.6
Taiwan/A704 Lung	0.087	11.5	-1.5	23.0	-3.0
Taiwan/A705 Spleen	0.616	1.6	8.4	3.2	16.8
Taiwan/A706 Liver	0.144	6.9	3.1	13.9	6.1
Taiwan/A707 Kidney	0.398	2.5	7.5	5.0	15.0
Taiwan/A708 Intestine	0.126	7.9	2.1	15.9	4.1
Taiwan/A709 Pancreas	1.728	0.6	9.4	1.2	18.8
NC Brain	0.413	2.4	7.6	4.8	15.2
NC Lung	0.359	2.8	7.2	5.6	14.4
NC Spleen	0.389	2.6	7.4	5.1	14.9
NC Liver	0.577	1.7	8.3	3.5	16.5
NC Kidney	0.548	1.8	8.2	3.6	16.4

RNA+Primer+SDW	24
5xBuffer	8
DTT	4
dNTP	2
Rnase inhibitor	1
M-MLV	1
	40

將濃度 μg/mL 更換為 μg/μL，再全部除以 1 求恆定值，和 SDW 補成 20μL。

3. 反轉錄合成 cDNA（Reverse transcription reaction）

將萃取的 RNA 反轉錄（Reverse trancriptase）成 cDNA。

Protocol: RNA + Uni 12 primer + Sterile DW 24μL

↓

70℃, 5 min

↓

On ice

↓

5X Buffer	8μL
DTT	4μL
10mM dNTPs	2μL
RNase inhibitor	1μL
M-MLV	1μL
Total	40μL

條件：

42℃	00:60:00
98℃	00:05:00
4℃	∞

(13) 9 月 10 日（星期二）

（一） Real-time PCR

1. 配置標準曲線

β-actin (stock 10ng/μL)連續 10 倍稀釋當標準曲線(如 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 pg/μl）

2. 本次研習僅檢測 IL-6 的細胞激素

IL-6 primer: F’ CGCTCACAGTCCTTCGACATC

R’ CCGCTCATCACACACGACATGT

β-actin: F’ TCTTGGGTATGGAGTCCTGTGG

R’ GCACTGTGTTGGCATACAGATCCT

3. 配置反應物

KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix	10μl
F primer (5 μM)	2μl
R primer (5 μM)	2μl
DDW	4μl
Template	2μl
Total:	20 μl/well

4. 用膠帶將孔盤封住，spin down。

5. PCR program

1. pre-incubation		95℃	10min	
2. PCR	Denature	95	10sec	45 cycle
	Annealing	68	10sec	
	Elongating	72	20sec	
3. Melting cure	Denature	95	5sec	
	Annealing	65	60sec	
		97	—	
4. Cool		40	∞	

(14) 9 月 11 日（星期三）

（一） Real-time PCR

1. 數據分析

(1) 利用電腦計算標準曲線及 mRNA 的濃度

Standardization= cytokine level/β-actin level

β-actin 及 IL-6 濃度結果如下：

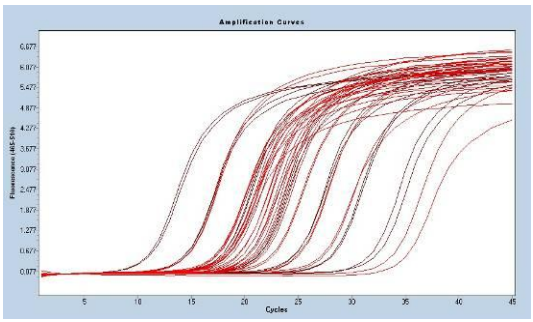
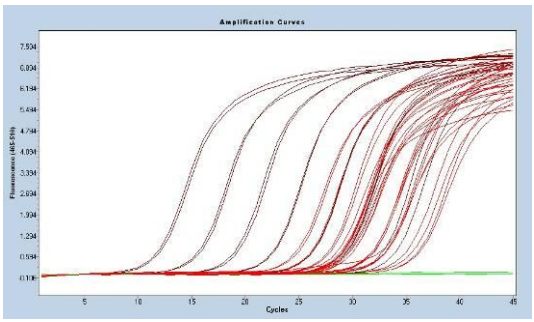
beta-actin

Name	Concentration		Average	10/Average
I-Brain	3.60E-01	3.57E-01	3.59E-01	2.79E+01
T-Brain	8.48E-03	7.86E-03	8.17E-03	1.22E+03
NC-Brain	2.05E-01	2.29E-01	2.17E-01	4.61E+01
I-Lung	5.22E-01	6.39E-01	5.81E-01	1.72E+01

NC-Lung	7.64E-01	7.77E-01	7.71E-01	1.30E+01
I-Liver	8.72E-02	7.46E-02	8.09E-02	1.24E+02
T-Liver	1.18E-01	1.05E-01	1.12E-01	8.97E+01
NC-Liver	1.44E+00	1.59E+00	1.52E+00	6.60E+00
I-Spleen	1.34E-01	1.83E-01	1.59E-01	6.31E+01
T-Spleen	7.99E+00	7.94E+00	7.97E+00	1.26E+00
NC-Spleen	1.72E-03	1.98E-03	1.85E-03	5.41E+03
I-Kidney	6.71E-01	8.00E-01	7.36E-01	1.36E+01
T-Kidney	1.39E+00	1.38E+00	1.39E+00	7.22E+00
NC-Kidney	9.47E-01	8.30E-01	8.89E-01	1.13E+01
T-Int	4.17E-02	3.82E-02	4.00E-02	2.50E+02
T-Pan	2.52E-01	2.44E-01	2.48E-01	4.03E+01

IL-6

Name	Concentration		Average	Standardized	Original standardization
I-Brain	2.62E-02	2.09E-02	2.36E-02	6.57E-01	6.57E-02
T-Brain	1.17E-04	Nil	1.17E-04	1.43E-01	1.43E-02
NC-Brain	2.54E-04	2.27E-04	2.41E-04	1.11E-02	1.11E-03
I-Lung	9.21E-03	1.01E-02	9.66E-03	1.66E-01	1.66E-02
NC-Lung	2.12E-03	2.16E-03	2.14E-03	2.78E-02	2.78E-03
I-Liver	1.37E-03	1.38E-03	1.38E-03	1.70E-01	1.70E-02
T-Liver	Nil	Nil			
NC-Liver	1.15E-03	1.02E-03	1.09E-03	7.16E-03	7.16E-04
I-Spleen	3.28E-03	2.91E-03	3.10E-03	1.95E-01	1.95E-02
T-Spleen	1.38E-03	1.37E-03	1.38E-03	1.73E-03	1.73E-04
I-Kidney	1.18E-03	1.25E-03	1.22E-03	1.65E-02	1.65E-03
T-Kidney	8.25E-04	7.81E-04	8.03E-04	5.80E-03	5.80E-04
NC-Kidney	1.23E-04	1.40E-04	1.32E-04	1.48E-03	1.48E-04
T-Int	2.39E-04	2.80E-04	2.60E-04	6.50E-02	6.50E-03

	
β-actin 曲線	IL-6 曲線

結果：

a. Italy H7N1 → IVPI=3，24 小時內死亡。
   → IN inoculate，<5 天內死亡。
b. LPAI: IL-6 4~5 天上升，但不會高。
   HPAI: IL-6 2 天上升。

(15) 9 月 12 日（星期四）

（一） 專題報告

Dr. Sakoda 邀請我們各自提供自己的研究進行專題報告，目的為建立研究交流，促進兩國間學術合作等。

1. 涂央昌助理研究員演講題目：行政院農業委員會家畜衛生試驗所簡介及臺灣高病原性家禽流行性感冒 H5N2 亞型之病理生理學（AHRI introduction with pathobiology of H5N2 HPAI）
   介紹本所職掌、分工及業務等，使其瞭解家畜衛生試驗所，另外報告 2012 年爆發高病原性家禽流行性感冒 H5N2 亞型之肉眼、組織病變、利用免疫組織化學染色及原位雜交反應技術瞭解抗原分佈與病毒核酸存在何種細胞。
2. 張仁杰助理研究員演講題目：臺灣鼬獾狂犬病診斷流程暨病例報告（Formosan ferret-badge rabies diagnostic procedure and case report）。
   由於筆者們去北海道大學研習時，國內正爆發狂犬病疫情，因此日本非常想知道狂犬病的疫情，故筆者準備臺灣鼬獾狂犬病診斷流程暨病例報告的題目，介紹本所對於狂犬病的診斷流程、目前疫情、分子流行病學等內容。

涂央昌助理研究員演講。	張仁杰助理研究員演講。

（二） 實驗討論

1. A/chicken/Penghu/1103/2012 (H5N2)

這株病毒是從澎湖縣仿土雞場分離出，當時鄭明珠研究員判定為高病原性（IVPI > 1.2）且 HA 基因的胺基酸切割位為 REKR/GLF，具有 3 個鹼性胺基酸，而根據以往文獻資料，高病原性通常為 4 個鹼性胺基酸，此株病毒非常特別，因而將其分讓給日本禽流感參考實驗室進行研究，所得的結果為低病原性（IVPI < 1.2），此次赴日本研習除了學習診斷技術外，也希望再次與日本討論此株病毒的實驗結果比對。

Dr. Sakoda 談到雖然依 OIE 規定得到實驗結果為低病原性，但可比喻此一病毒為中度病原性（Moderate），特殊狀況下有傾向及能力轉變為高病原性，況且生物性實驗在各個試驗條件上很多差異，例如試驗雞隻品種、年齡、環境，甚至病毒液等等都可能造成影響，Dr. Sakoda 建議我們再送一次原始的病毒液（尿囊液）或者由他親自來臺進行實驗，而日方也需要我們分讓其他高病原性 H5N2 病毒分離株，試驗分析後可與澎湖株進行病原性及抗原性等實驗的比較與分析。Dr. Sakoda 也建議在進行 IVPI 試驗時，可針對死亡的雞隻進行病毒分離（回收病毒），如果發現 HA 胺基酸切割位不同，可能是因為病毒液存有高低不同病原性的禽流感病毒，只是病毒存於雞胚胎蛋之病毒液中的比例問題，可透過 deep sequencing 試驗進一步檢驗，或是病毒可能經過動物繼代後毒力增強。

Dr. Sakoda 也曾建議本所禽流感診斷實驗室研究人員針對澎湖株進行下述實驗，以釐清原因：8 段基因的定序、胰蛋白酶敏感性（trypsin sensitivity）、流行病學調查、鼻腔接種、病毒斑分析等。

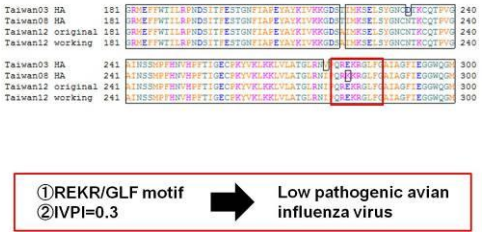
2. 高低病原性的判讀：IVPI 試驗 vs 致死性試驗

IVPI 試驗為歐洲系統，而致死性試驗為美洲系統，兩者都可採用，因為會影響高及低指數的最重要因子是“死亡”，但日方偏好 IVPI 試驗，可以每日觀察紀錄雞隻的臨床症狀，結果的呈現上比較細膩。

3. 尿囊液抽出的病毒液是否須過濾？如果過濾後病毒力價是否會下降？

Dr. Sakoda 認為過濾是考量細菌汙染問題，而接種 SPF 雞胚胎蛋的

乳劑或樣本已經有用抗生素處理，理應無菌不須再過濾；他認為科技進步，過濾膜的材質應該已經克服與蛋白質產生非特異性結合的問題，況且尿囊液中大量的蛋白質多於病毒，也會先與過濾膜產生非特異性結合，應不致使病毒與過濾膜結合無法通過，理論上病毒力價不會下降。

<table>
<tr>
<td>
IVPI of A/chicken/Penghu/1103/12 (H5N2)
In Taiwan
<table>
<tr><th>Clinical signs</th><th>D1</th><th>D2</th><th>D3</th><th>D4</th><th>D5</th><th>D6</th><th>D7</th><th>D8</th><th>D9</th><th>D10</th><th>Total</th><th>Score</th></tr>
<tr><td>Normal</td><td>10</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td><td>2</td><td>2</td><td>2</td><td>18x0</td><td>=0</td></tr>
<tr><td>Sick</td><td>0</td><td>3</td><td>0</td><td>1</td><td>1</td><td>2</td><td>2</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td><td>13x1</td><td>=13</td></tr>
<tr><td>Paralyzed</td><td>0</td><td>6</td><td>5</td><td>3</td><td>3</td><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>1</td><td>21x2</td><td>=42</td></tr>
<tr><td>Dead</td><td>0</td><td>1</td><td>5</td><td>6</td><td>6</td><td>6</td><td>6</td><td>6</td><td>6</td><td>6</td><td>48x3</td><td>=144</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>Sum 199</td><td></td></tr>
</table>
IVPI=199/100=1.99(>1.2=HPAIV)
In Hokudai
<table>
<tr><th>Clinical signs</th><th>D1</th><th>D2</th><th>D3</th><th>D4</th><th>D5</th><th>D6</th><th>D7</th><th>D8</th><th>D9</th><th>D10</th><th>Total</th><th>Score</th></tr>
<tr><td>Normal</td><td>10</td><td>10</td><td>8</td><td>6</td><td>5</td><td>6</td><td>9</td><td>8</td><td>9</td><td>9</td><td>80x0</td><td>=0</td></tr>
<tr><td>Sick</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td><td>4</td><td>4</td><td>3</td><td>0</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>14x1</td><td>=14</td></tr>
<tr><td>Paralyzed</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0x2</td><td>=0</td></tr>
<tr><td>Dead</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>6x3</td><td>=18</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>Sum 32</td><td></td></tr>
</table>
IVPI=32/100=0.32(<1.2=LPAIV)
</td>
<td>
Amino acid sequence at cleavage site on the HA


①REKR/GLF motif
②IVPI=0.3 ➡ Low pathogenic avian influenza virus
</td>
</tr>
<tr>
<td>日方及我方澎湖株之 IVPI 結果。</td>
<td>澎湖株 HA 基因之胺基酸切割位。</td>
</tr>
</table>

(16) 9 月 13 日（星期五）

（一） 病毒斑試驗

病毒斑試驗除計算病毒濃度外，更重要的是挑選單一病毒形成的斑，由於不同類型的病毒會存在培養的尿囊液中，利用此技術可挑選毒力強（病毒斑大），因此此技術非常重要，而挑選病毒斑需要用中性紅（Neutral red method）染色法，在培養 48 小時後加入含 Agar 的染劑，隔日挑病毒斑。利用滅菌的巴斯得吸管（Sterilized Pasteur pipettes）吸取病毒斑，放入 300µl MEM 溶出病毒後再培養，此法需要連續進行 3 次，以達 one clone one virus population。

(17) 9 月 14 日（星期六）

札幌新千歲國際機場搭機返國，晚上 7 點抵達桃園國際機場。

陸、檢討與建議

本出國計畫目的對強化我國禽流感診斷技術及未來研究方向與防疫策略研擬參考有相當助益，並可促進臺日雙邊農業國際合作及學術交流，就研習期間觀察，歸納出以下檢討與建議提供參考：

一、對我國現行禽流感診斷及監測之建議

(一) 持續禽流感監測：

Prof. Kida 強調持續禽流感監測是必要的，無論是執行主動或是被動監測計畫，都能有效瞭解禽流感現況，監測病毒的演化，但是，檢驗畢竟只是檢驗，研究也就是轉化成文獻發表，Prof. Kida 鼓勵寫作與投稿，但針對禽流感防治，適當的政策與採取行動才是避免疫情發生與蔓延，有效避免禽流感成為人畜共通傳染病的威脅。

(二) 建議採取不使用疫苗的stamping-out政策：

幾位專家都建議針對 H5、H7 亞型禽流感，無論高低病原性，都應採取 stamping-out 策略，不可例行性使用疫苗免疫來控制禽流感，世界上使用疫苗的經驗都沒有顯著改善，反而會造成家禽無症狀的散播病毒（Silent spread of virus），建議使用疫苗應限定有配套措施或有條件的使用於環帶免疫，以此原則，只要檢驗出 H5、H7 亞型禽流感，stamping-out 策略是明確的，不須等待高低病原性判定結果前，就會採取清場行動，對於後續的補償或配套措施，政府應與產業進行溝通，日本政府就此項措施也花了相當的時間與努力才獲得農民諒解。

(三) 高低病原性判定：

提問「雞隻靜脈內接種致病性指數試驗（IVPI）」涉及臨床症狀觀察給分，與觀察人員的主觀判斷與經驗有關，恐影響試驗的客觀性，日本專家表示 IVPI 試驗為歐洲系統，而致死性試驗為美洲系統，兩者都被 OIE 採用，皆具公信力，其中會影響高低病原性指數的最重要因子是“死亡”，該實驗室較少有經驗試驗結果會介於模糊地帶，不過日方仍偏好 IVPI 試驗，優點是可以觀察並記錄雞隻的臨床症狀，在結果的呈現上比較細膩。

(四) 未來試驗研究合作：仍有待與日本實驗室進一步洽談與合作。

1. 禽流感病毒澎湖分離株試驗：日本實驗室曾建議本所禽流感診斷實驗室研究人員針對澎湖株進行下述實驗，8段基因的定序、胰蛋白酶敏感性（trypsin sensitivity）、流行病學調查、鼻腔接種、病毒斑分析等，而本所基於釐清此株病毒之高低病原性已經進行部分試驗，部分疑問仍有待後續研究。
2. 高病原性禽流感病毒特性：
   (1) 基因型分析（Phylogenetic analysis）
   (2) 抗原性分析(Antigenic analysis，例如HI tests, FA tests)
   (3) 胰蛋白酶敏感性分析（Propagation properties in MDCK cells with or without trypsin acetylated）
   (4) 從尿囊液進行病毒分離並分析HA基因的胺基酸切割位是否有鹼性胺基酸轉變（Proportion of virus/plaque clones in allantoic fluids have whether di-basic amino acids or not）
3. 高病原性禽流感病毒對雞隻致病性研究：
   (1) 雞隻靜脈內接種致病性指數試驗（IVPI test）
   (2) 雞隻鼻腔內接種致病性試驗（Intranasal pathogenicity test）
   (3) 混合感染H5N2高病原性禽流感病毒及H6N1低病原性禽流感病毒（Evaluation of the pathogenicity in co-infection with H5N2 HPAIV and H6N1 LPAIV）
4. 高病原性禽流感病毒對鴨、豬及鼠的致病性研究：
   (1) 動物鼻腔內接種致病性試驗（Intranasal pathogenicity test）
   (2) 從試驗動物檢體回收病毒進行基因分析（Genomic analysis of recovered viruses from swabs or organs）
5. 病毒在雞隻繼代後變異性研究
   (1) 連續不斷的在雞隻氣囊或鼻腔內接種病毒（Consecutive passage in air sac or by intranasal inoculation）
   (2) 雞隻年齡影響，小雞、年輕及成熟雞隻（Chick, young, or adult chicken）

(五)　與禽流感參考實驗室進行外部能力比對

透過與世界動物衛生組織(OIE)認可之禽流感參考實驗室合作，進行診斷能力比對。禽流感為重要的人畜共通傳染病會威脅動物甚至人類健康，畜衛所建構禽流感診斷及監測實驗室並通過財團法人全國認證基金會 (TAF) 的審核並授與證書。未來臺日雙方實驗室可透過提供樣本測試進行外部能力比對，強化我國禽流感實驗室之檢驗水準。

二、增建生物安全第三等級 (Biosafety Level-3, BSL-3) 實驗室以及動物房

畜衛所實驗室因檢診或試驗需要進行病毒分離培養或操作陽性對照時，會有接觸人畜共通傳染病病原的風險，並涉及操作 RG3 感染性生物材料之相關實驗及研究，應符合疾病管制局相關法令規定，雖然臺灣目前尚無動物新型流行性感冒病例、H7N9 亞型或禽鳥 H5N1 病例、西尼羅熱病毒感染症、狂犬病及 BSE 等新浮現人畜共通傳染病疫情，一旦國內發生禽畜家禽流行性感冒病毒傳染至人類等新型流行性感冒疑似病例或 H5N1 病毒入侵臺灣養禽場時，或其他新浮現人畜共通傳染病入侵，而目前畜衛所無相關 BSL-3 實驗室可執行前述疾病確診與試驗研究業務，依前述環境情勢分析人畜共通的新型流感及禽流感威脅與日俱增，爰建議中央主管機關儘速成立專案計畫，興建 BSL-3 實驗室以及動物房，以資因應。增建 BSL-3 實驗室並進行人員訓練，可有效提升人畜共通傳染病診斷效率及實驗室生物安全，降低研究人員操作人畜共通傳染病病原及相關生物材料之生物安全風險性，以禽流感而言，日本專家建議部分試驗仍須於 BSL-3 實驗室操作。

三、持續培訓動物傳染病診斷技術人才與國際學術交流合作

應持續編列相關經費積極培訓動物傳染病診斷技術人才，利用本所動物疾病診斷中心之檢驗技術平台，結合公共衛生、野生動物、動物保育等不同領域專長，建立跨領域合作技術平台，進行新浮現人畜共通傳染病診斷。並且透過持續辦理新浮現人畜共通傳染病國際會議或實驗室訓練課程，邀請各國專家來臺指導，進行學術交流合作，促進瞭解各國對禽流感等新浮現人畜共通傳染病監測及研究現況，未來或可將此跨領域合作技術平台與國際接軌，強化亞太地區新浮現人畜共通傳染病區域聯防機制。

四、專業與決策

Prof. Kida 一再強調，實驗室專家應該不厭其煩去讓決策者瞭解禽流感防治的重要性，正確迅速的檢驗是疾病防疫的後盾，但及時採取行動更是重要，Prof. Kida 堅持應以 stamping-out 為防堵 H5、H7 亞型家禽流行性感冒原則，不要使用禽流感疫苗；本次研習瞭解日本禽流感診斷及研究現況，及其在專業上的堅持與努力，特此列入報告內容，供做我國禽流感未來研究方向及防疫策略研擬之參考。