

出國報告（出國類別：研究）

**OIE Twinning Project 計畫執行-赴法國
南錫狂犬病及野生動物實驗室執行狂犬
病品質管理訓練以及執行合作試驗**

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所
姓名職稱：李思穎助理研究員
派赴國家/地區：法國南錫
出國期間：108年12月6日至12月16日
報告日期：109年3月4日

摘要

法國南錫狂犬病及野生動物實驗室為 OIE/WHO/歐盟狂犬病參考實驗室，家畜衛生試驗所自 103 年 5 月與該參考實驗室簽訂合作備忘錄，並在其協助下建立多項狂犬病研究及口服疫苗研析工作。107 年 6 月本所與世界動物衛生組織、法國南錫狂犬病及野生動物實驗室三方共同簽訂狂犬病 OIE 偶合計畫，更進一步於同年 10 月舉辦狂犬病 OIE 偶合計畫開幕式會議，會議中進行「亞洲狂犬病診斷能力比對中心」之揭牌儀式。本所於 105 年及 108 年參加並通過由歐盟委託法國南錫狂犬病及野生動物實驗室辦理之能力試驗，該試驗計有來自歐盟會員國、歐洲其他國家、美洲、亞洲、非洲及大洋洲之國家多達 49 間實驗室參加，此法國前揭實驗室主辦之能力試驗在國際上也最具指標性。在 OIE 偶合計畫框架下，辦理能力試驗為核心工作項目之一，法國參考實驗室將輔導本所於 109 年辦理首次亞洲狂犬病抗原診斷能力試驗，為使籌辦完善順利，並展示我國高品質研究量能於國際，108 年 12 月 6 日至 12 月 16 日赴法國南錫狂犬病及野生動物實驗室，學習能力試驗抗原批次生產之排程，以及進行狂犬病抗原診斷品質管理之訓練。

目錄

壹、 目的.....	1
貳、 行程.....	1
參、 內容.....	2
(一) 能力試驗抗原批次生產.....	2
(二) 抗原診斷品質管理.....	7
(三) 討論.....	10
肆、 心得與建議.....	12

壹、 目的

當為了確定實驗室進行特定診斷試驗的能力而進行實驗室間比較時，稱為能力試驗，能力試驗同時也是實驗室品質認證計畫不可或缺的環節。104 年 WHO 的狂犬病專家會議彰顯出全球狂犬病診斷實驗室皆極需參與狂犬病診斷能力比對試驗，然而卻缺乏辦理中心，僅有法國南錫狂犬病及野生動物實驗室辦理此全球性狂犬病診斷能力比對試驗，因此在該會議中提出每一大洲成立辦理中心的構想。狂犬病偶合計畫當中重點工作項目即為建立亞太區狂犬病診斷能力比對中心，並預計於 109 年辦理首次亞洲區狂犬病抗原診斷能力試驗，爰派員赴法國南錫狂犬病及野生動物實驗室進行能力試驗抗原批次生產與狂犬病抗原診斷品質管理之訓練。

貳、 行程

本次研習自民國 108 年 12 月 6 日至 108 年 12 月 16 日止共計 11 天 (詳如行程表)。

12 月 6 日-12 月 8 日	桃園中正國際機場搭機前往法國，適逢法國大罷工高鐵封閉轉搭巴士至南錫
12 月 9 日-12 月 13 日	<ul style="list-style-type: none">• 能力試驗抗原批次生產<ul style="list-style-type: none">◆ 小鼠衛生管制◆ 小鼠腦內接種◆ 死亡小鼠腦採集◆ 小鼠腦凍乾◆ 均一性試驗與安定性試驗• 抗原診斷品質管理<ul style="list-style-type: none">◆ 螢光抗體染色 (FAT)◆ Conventional RT-PCR◆ Real-time RT-PCR• 討論
12 月 14 日-12 月 16 日	適逢法國大罷工，由南錫搭巴士至巴黎戴高樂機場，接著搭機返台

參、 內容

(一)能力試驗抗原批次生產

A. 小鼠衛生管制

新進小鼠進行表單登記，如隻數、日期、來源、年紀、性別（皆使用母鼠因較溫馴）、試驗名稱、何時死亡、是犧牲或死亡等。共 4 間飼育房，檢疫房專門放置新進清淨小鼠、抗原批次生產房、病毒與疫苗效力實驗房、換氣房供特定試驗等。從清淨區開始換墊料，在清淨區或無病毒區可使用手抓小鼠，一旦有進行病毒試驗則要使用鑷子夾實驗鼠，不同實驗室須更換器械避免污染，桌面、墊料及食物箱進入前皆須消毒。不同試驗的小鼠另有每日詳細紀錄，分別紀錄死亡、生病、健康個別隻數。

每個飼育房門口有基礎表單，內容包含操作日期及項目;如餵飼：一個禮拜一次、加水：一個禮拜一次、墊料更換：一個禮拜兩次。在批次生產試驗開始前先有一份動物試驗程序，詳述此次試驗內容、操作人員等，同時每個試驗上會編排各自負責工作，飼育房和實驗室中間有通道相隔，進入飼育房要加穿防護衣、鞋套，另飼育房死亡小鼠要送出時使用傳遞箱。

此次接受抗原批次生產訓練，學習以 CV527 病毒進行腦內接種之實驗鼠發病判讀與紀錄，判讀時為兩人操作，先核對小鼠飼養箱上試驗編號及稀釋倍數與紀錄表單是否無誤，一人負責觀察與判讀，另一人負責記錄，以判讀的人意見為主，並以原先進行實驗鼠腦內接種的人當判讀人。法方專家經驗為一般在接種此病毒後若小鼠觀察到進入第三期後即進行人道安樂（不需等到第四五期因為病毒增值量一樣多，且小鼠無須再繼續受到痛苦），第三期症狀為後肢不動，用鑷子順尾巴刺激也不會行動，則建議人道安樂。在整個試驗開始後第 6 天發病死亡的頭兩隻小鼠會留做 FAT 診斷。



圖 1:小鼠房外之每週基礎管理表單。

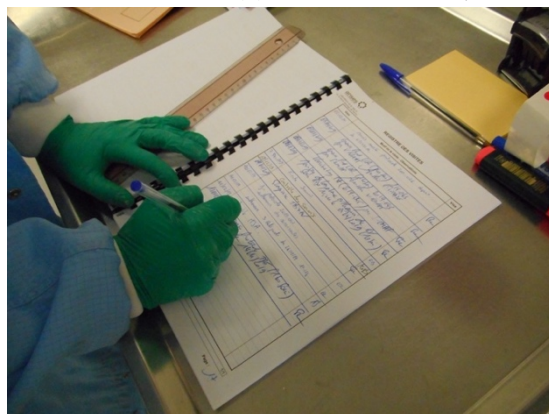


圖 2:針對特殊狀況另行登記(如外部訪客)。

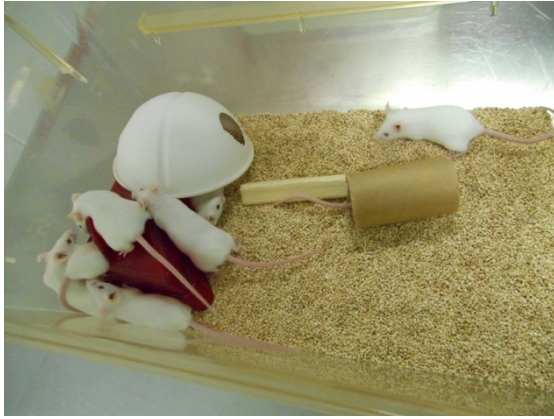


圖 3:小鼠環境豐富化。



圖 4:根據不同試驗進行觀察與詳細紀錄。



圖 5:觀察發病之小鼠。



圖 6：以 CO₂ 氣流進行人道安樂。

B. 小鼠腦內接種

進行小鼠腦內接種，固定小鼠露出腹腔，從大腿脇內側以舒泰 50 進行腹腔注射，小鼠會於 1 分鐘內麻倒，觀察進入麻醉狀態後，輕壓小鼠頭把耳朵稍微向後按進行腦內接種病毒液，接著把小鼠放回籠內觀察，通常 30-40 分鐘內小鼠皆恢復活力。頭 4 天的死亡為非特異性，可能因針頭注射或緊迫導致。

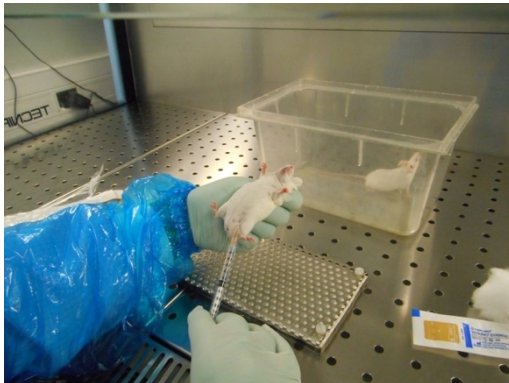


圖 7:以舒泰 50 進行腹腔注射。

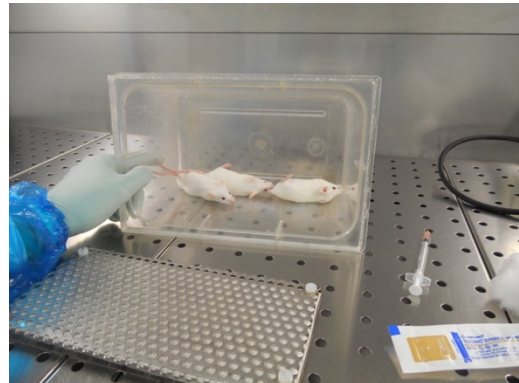


圖 8:觀察麻醉狀態。

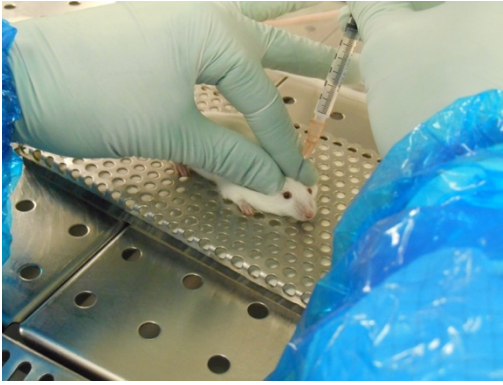


圖 9:進行腦內接種病毒液。

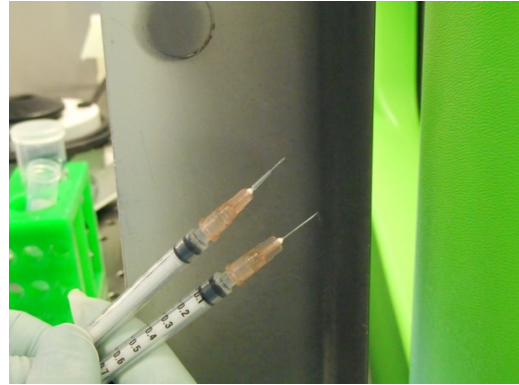


圖 10: 示範可用 tip 剪短當注射緩衝。

C. 死亡小鼠腦採集

檯面先用消毒劑消毒後擦拭，準備滅好的器械（鑷子、剪刀、刮勺）、再消毒擦拭檯面一次後，放入紙盤及小鼠屍體袋，並核對試驗編號後抄寫試驗名稱、日期、抗原批次生產用、小鼠腦數量於兩個 50cc 離心管。以鑷子夾住小鼠眼睛，右手將身體向後拉展，接著用鑷子往左拉開皮膚，露出 T 字型頭蓋骨，再用鑷子夾住眼睛固定，右手剪刀剪開及掀開頭蓋骨，接著以刮勺取出腦組織放入 50cc 離心管，取完離心管冰 -80°C 冰箱，器械放入消毒槽，所使用泡器械用消毒劑每月輪替。

D. 小鼠腦凍乾

進行已採集之小鼠腦凍乾程序：從 -80°C 冰箱將小鼠腦取出放置於水中浸泡解凍，超過一小時後可解凍。期間準備凍乾所需物品：全新凍乾瓶、凍乾塞、兩個大鐵盤(以消毒劑擦拭乾淨)、滅菌器械、微量電動吸管、吸管頭 2 個、採材盒等，備於工作檯中準備。接著開啟凍乾機器預冷，再回實驗室填寫品質管理記錄表單。

以均質機將腦組織均勻化，裝入採材盒中，接著以分注器將均質後之腦組織分裝入凍乾瓶中，蓋上凍乾塞（勿全壓），放入凍乾機進行凍乾，凍乾完再壓上鋁蓋完成能力試驗之成品。

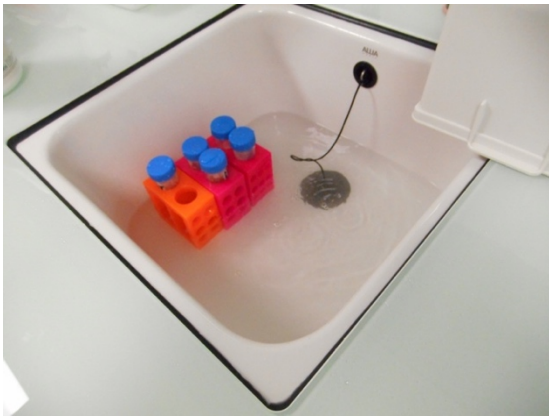


圖 11:小鼠腦解凍。

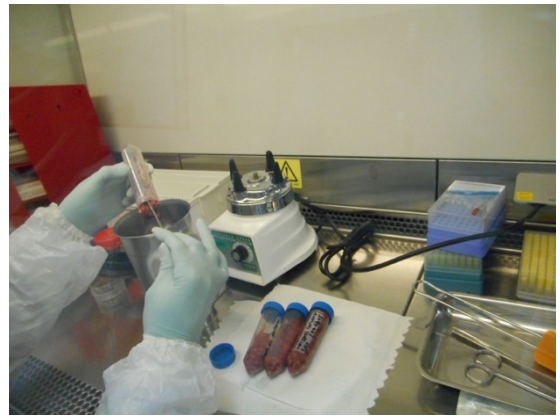


圖 12:將腦組織置入均質杯。

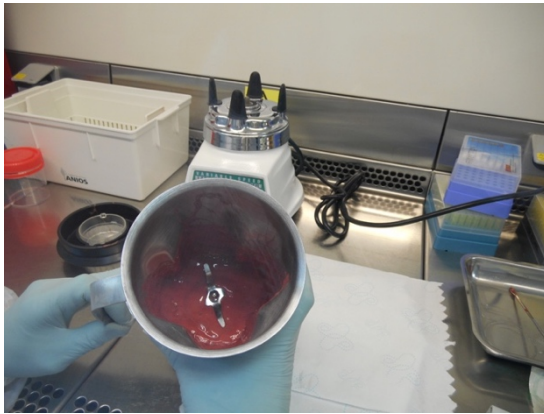


圖 13:均質後腦組織呈奶昔樣。

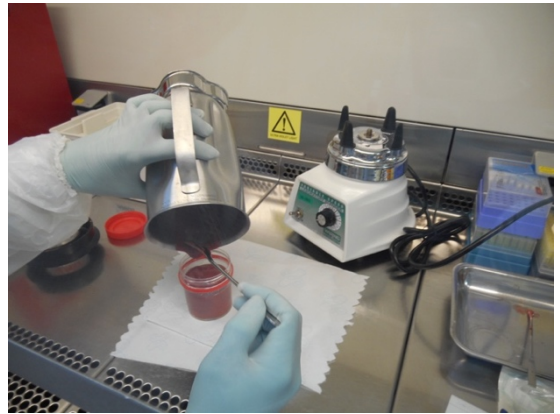


圖 14:將腦組織置入採材盒中。

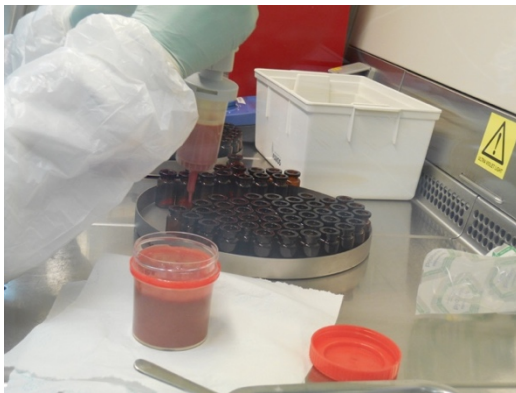


圖 15:以分注器平均分裝腦組織。



圖 16:蓋上凍乾塞。

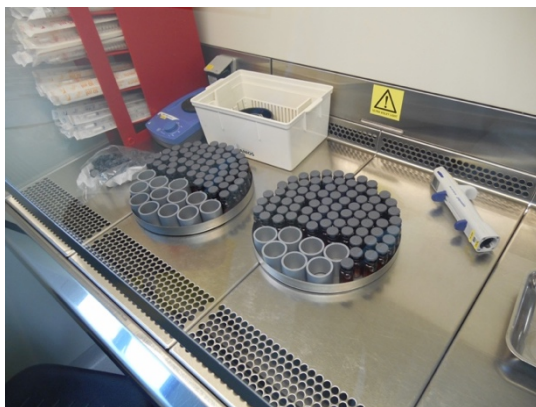


圖 17:完成之待凍乾樣本。



圖 18:進行凍乾程序。

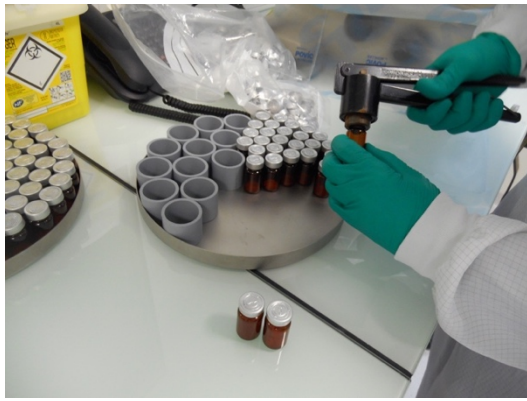


圖 19:凍乾完成後壓上鋁蓋。

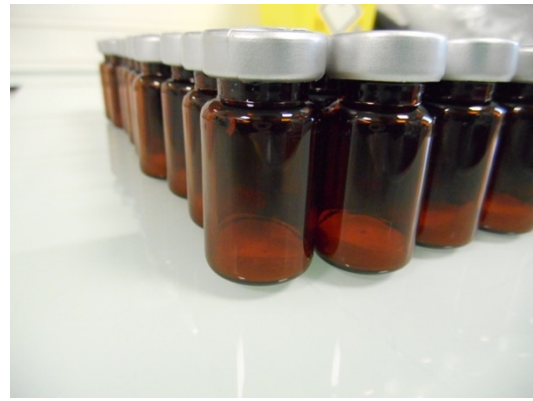


圖 20:完成凍乾之樣本。

E. 均一性試驗與安定性試驗

均一性試驗為評估所生產之每批次陽性/陰性抗原品質是否均一，法國專家 Dr. Emmanuelle 建議每批次生產之抗原，可隨機採 6 瓶凍乾樣本進行 FAT、RTCIT、RT-PCR 和 Real-time RT-PCR 檢測結果是否與原先樣品之陽性/陰性結果吻合。

另與法國專家 Dr. Emmanuelle 討論，根據狂犬病能力試驗參與國家為東亞及東南亞區域(包含日本、新加坡、印尼、菲律賓、泰國...等)，為了確認狂犬病抗原診斷能力試驗之樣品在運輸過程中，受到不可抗拒之環境因素如溫度變化之影響，且考量第一次辦理寄送國外可能因遇到通關流程及手續，或是物流業者運送的時間長短(實際寄送國外經驗可延遲達 7 天)，也將時間納入風險考量，因此將樣品置於特定的環境溫度下於一段時間後進行狂犬病專一性診斷，以了解樣品是否仍保有理想之安定性，確保樣品在寄達各實驗室後仍保有其原有的診斷有效性。法國專家建議 3 個測試溫度 (4°C、20°C、30°C) 下，模擬惡劣的運輸條件 (放置一週)、模擬最糟的運輸條件 (放置兩週) 並模仿貨運包裝室內避光進行長時間之放置，接著透過 FAT、RTCIT、RT-PCR 和 Real-time RT-PCR 檢測結果是否與原先樣品之陽性/陰性結果吻合。另考量未來將持續舉辦能力試驗，將備妥能力試驗樣品分別保存於 4°C 及 -80°C 條件下，並分析試驗樣品在此兩種保存條件下之安定性，進行長期保存試驗之安定性評估，做為往後能力試驗辦理之期程安排規劃。

(二) 抗原診斷品質管理

A. 螢光抗體染色(FAT, Fluorescent antibody test)

FAT 為 OIE 與 WHO 建議之狂犬病黃金標準檢驗方法，使用能力試驗抗原批次生產頭兩隻死亡小鼠做實驗，實驗步驟如下：

1. 取內部實驗室流水編號，並將此編號註記在品質管理文件中。
2. 將玻片標記陽性對照(共 2 個陽性對照：感染 CVS27 的小鼠腦、感染 EBLV-2 的小鼠腦)、1 個陰性對照(陰性小鼠腦)、2 個樣本之小鼠腦(各做 2 重複)。
3. 將小鼠腦取出進行壓片於玻片 4 個 well 上。
4. 於室溫風乾 15 分鐘。
5. 於在丙酮(-20 °C)固定 30 分鐘後風乾。
6. 加入結合 fluorescein isothiocyanate 的多株抗體(商品化，配完吸起至離心管離心 5 分鐘，隨後採上清液至透明小離心管，冰 4°C 冰箱可保存 14 天)，使用 pipette 於每個 well 加入 70µL 多株抗體。
7. 將玻片放入潮濕的 37 °C 培養箱中感作 30 分鐘。
8. 取出玻片，使用 pipette 以 PBS 輕輕沖洗背面正面各 1-2 次，接著再使用 H₂O 輕輕沖洗背面正面各 1-2 次，注意皆不要直接滴在樣本上。
9. 玻片風乾後放於避光紙盤中，每片玻片滴一滴封片劑後蓋上蓋玻片。
10. 於螢光顯微鏡下判讀，先判讀陽性、陰性、接著判讀樣本。

另此次針對能力試驗抗原批次生產之凍乾後樣本，也隨機取樣 6 個樣本進行檢測，再加入當日送檢之狗腦組織，狗腦組織在準備室進行抹片，採腦四個部分：海馬角、小腦、皮質、延髓，接著分別抹在同個玻片的 4 個 well 上，以壓舌板壓片，用傳遞箱送入實驗室，加上兩個陽性對照及一個陰性對照，同上述實驗步驟進行檢測。

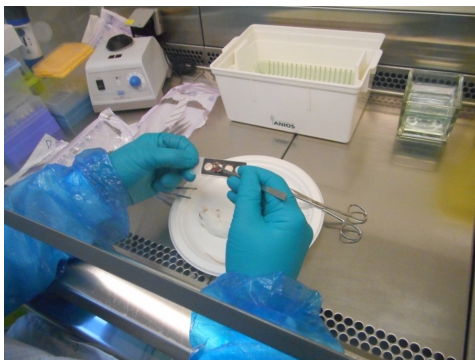


圖 21:將腦組織置於玻片。

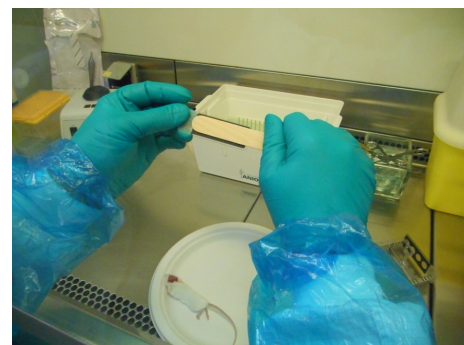


圖 22:以壓舌板進行按壓。

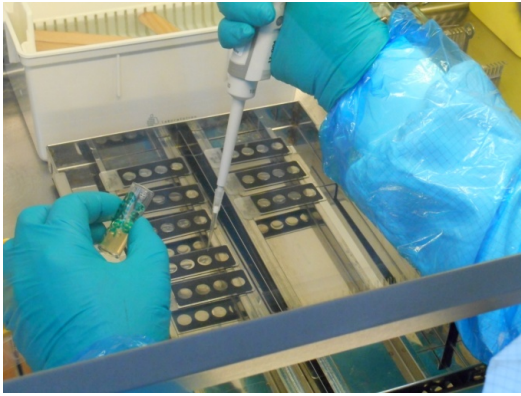


圖 23: 加入結合 fluorescein isothiocyanate 的多株抗體。

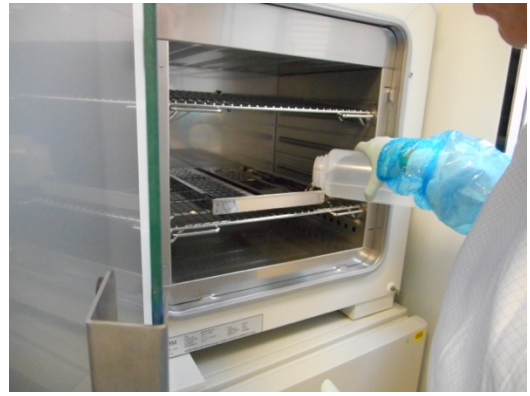


圖 24: 將玻片放入潮濕的 37 °C 培養箱中感作 30 分鐘。



圖 25: 以 PBS 及 H₂O 輕輕沖洗玻片。

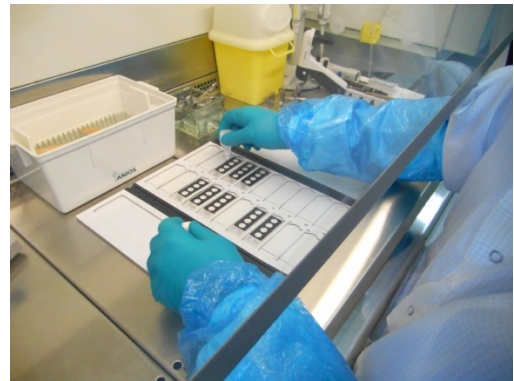


圖 26: 加入封片液。

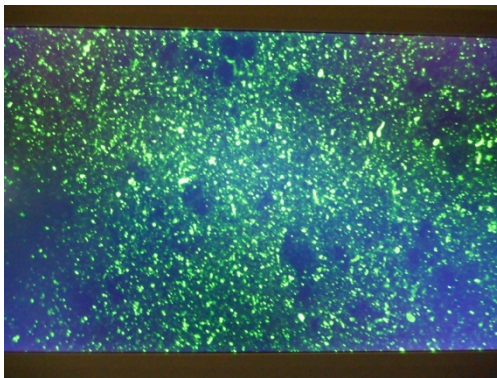


圖 27: 陽性反應之樣本於螢光顯微鏡下呈滿天星斗綠螢光。

B. 常規反轉錄聚合酶連鎖反應試驗(conventional RT-PCR, conventional reverse transcription polymerase chain reaction)

核酸萃取: 使用 QIAMP mini kit ARN extraction, 試劑皆已經分配好裝在有標示的透明盒子裡, 照使用順序及需求取用, 使操作者可以很快上手並減少錯誤發生, 加入前

vortex 及 spin down，加入後不再 vortex 及 spin down，先操作陰性對照再做待測樣本及陽性對照，同時填寫品質管理文件。

為避免污染，於 RNA 萃取、試劑配置、樣本添加，跑 PCR 及電泳分析等不同步驟會於不同實驗室進行，並必須穿上該實驗室之實驗衣以做區分。

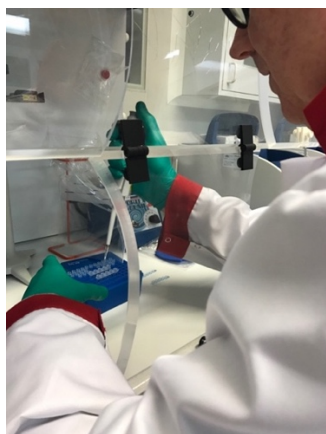


圖 28:樣本添加。

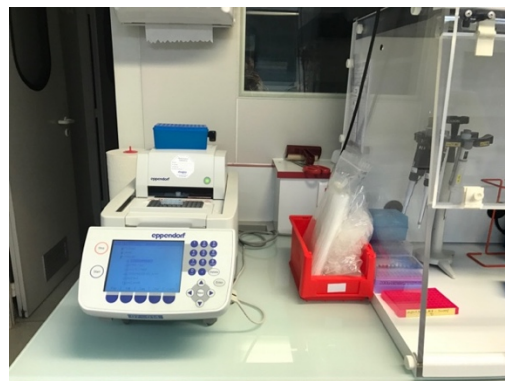


圖 29: PCR 室一隅。



圖 30:電泳室一隅。

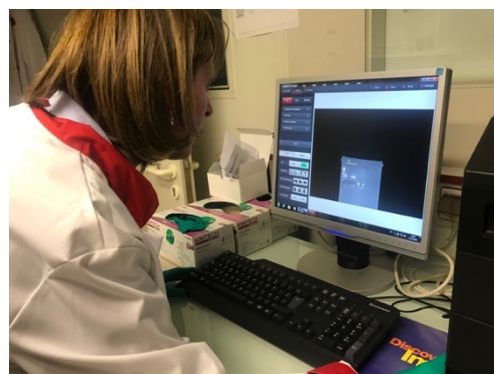


圖 31:分析膠體電泳。

C. 即時聚合酶連鎖反應試驗(Real time RT-PCR)

使用 SYBR GREEN qPCR，為降低污染風險，試劑配置、樣本添加，跑 real-time PCR 等不同步驟仍於不同實驗室進行。使用 beta actin 作為 housekeeping gene，陽性對照使用 GT1，陰性對照使用陰性雞腦，因有腦組織因此 beta actin 有反應。陰性對照與未知樣本做 3 重複、陽性對照做 2 重複，陽性對照與其他樣本間隔 2 個以避免污染。當有蝙蝠樣本時會改用 GT5 or GT6 作為陽性對照。



圖 32:實驗文件填寫。



圖 33:樣本添加。



圖 34: qPCR 室一隅。

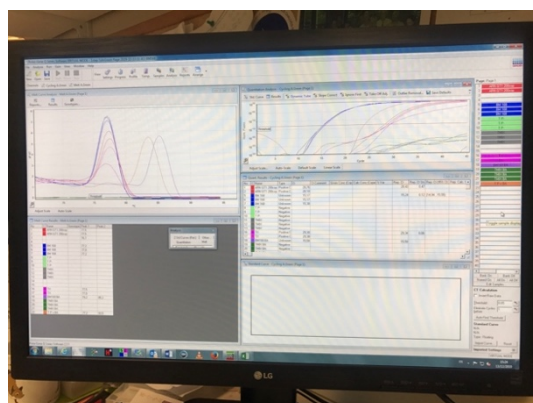


圖 35:分析結果。

(三)討論

能力試驗準備工作

法國專家 Dr. Emmanuelle 以深厚的辦理經驗給予許多建議，如小鼠腦內接種最好為常規熟悉操作人員，以免操作不良影響病毒進程發展及收取，存放凍乾樣品的冰箱務必確認避免影響品質等。另外如陰性樣本，由於可能有細菌的污染，有時會有細菌的抗原偵測出現弱螢光，操作人員切勿與陽性樣本的表现搞混。在生產及驗證方面，生產陰性抗原建議完全使用分隔開之實驗室及儀器，避免污染的風險，務必做好所有表單整理，以便日後對外有足夠信心接受考驗。另 Dr. Emmanuelle 建議之生產量如下：

能力試驗主辦方	ANSES-Nancy	AHRI
生產凍乾瓶數/批次	100	50
FAT+RTCIT 抽檢瓶數/批次	10	6
Molecular diagnosis 抽檢瓶數/批次 (避免污染另外一批)	10	6
運輸安定性試驗抽檢瓶數/批次	5	6
預估參加實驗室	50	15

抗原診斷品質管理

此次 FAT 試驗時正逢法國實驗室新批號之螢光抗體進貨，同時測試相同製造商生產新進批號之多株抗體，目的是為確保品質管理，因此陽性與陰性對照組同時多做一組以便比較。

實驗記錄表單：會登記如目的、樣品取用、製造日期、批號、失效日期、使用 pipette 編號等。在陽性、陰性對照以及試劑如抗體方面皆有取用登記記錄。於實驗前，人員會先填寫表單以確保準備好所需實驗用品再開始實驗。



圖 36:降低污染風險，特別準備一間實驗室與儀器供能力試驗陰性抗原生產，並於門上設提醒標誌告知人員進出防護規定。

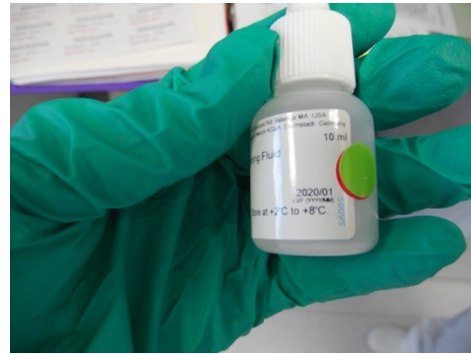


圖 37:新批號螢光抗體試劑皆會同時與現有試劑測試過結果一致後，再貼上綠標籤表示之後實驗可取用。

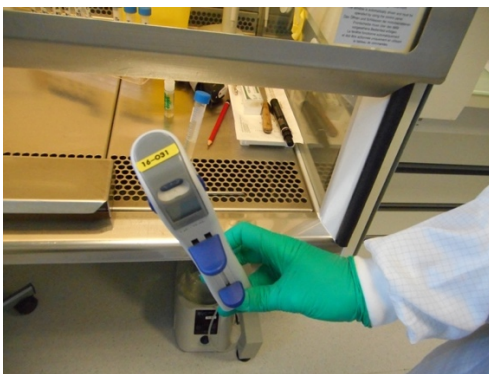


圖 38:實驗所需固定儀器皆會編號列於品質管理文件中。



圖 39:填寫取用登記文件，以便對於流向與庫存有更好的管理。

肆、心得與建議

- 一、感謝農委會與防檢局計畫補助提供經費，也很感謝長官與法國 Nancy 實驗室給予寶貴研習機會，尤其是 Dr. Emmanuelle 與 Dr. Florence 於行程安排的幫忙及研習期間的照顧，並感謝 Nancy 實驗室所有人員期間的協助，適逢法國大罷工交通停擺收到許多人溫暖的問候與幫忙真的非常感激。
- 二、此次至法國南錫狂犬病及野生動物實驗室進行能力試驗抗原批次生產以及狂犬病抗原診斷之品質管理之訓練，並與法方共同討論能力試驗辦理細節內容，法國參考實驗室並藉其豐富辦理能力試驗經驗指導如何妥善辦理，從一開始籌辦規劃就有許多值得審慎思考安排的重點，由多方面不同層面切入，包含流程決定、與參與實驗室之溝通、抗原批次生產的排程、完善標準品的製作與實驗清消、避免污染的重要性等。
- 三、其人員出入除受到管制外，對於實驗動線皆嚴格安排，確實按 SOP 執行實驗，如此才能在大量且多種病毒株生產製造中保持良好品質。此外，品質文件設計及管理更讓試驗保持效率並降低失誤，在追蹤追溯時更是重要的工具。藉由此次交流學習，不但得一窺國際參考實驗室專業水準，也同時對其運作思考之縝密、人員訓練及管理之完善感到驚嘆不已。
- 四、在與法國狂犬病參考實驗室合作下，本所將持續深植狂犬病研究專業能力，完成建立亞太區狂犬病診斷能力比對中心，以提升我國國際能見度。
- 五、此次受訓所學將運用投入亞洲區狂犬病能力試驗辦理工作，以及協助建立狂犬病診斷品質管理系統，藉由逐步完整化準備，有利於本所未來申請成為 OIE 狂犬病參考實驗室。