

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-000119

衛生福利部疾病管制署 106 年度署內研究計畫

建立抗蛇毒血漿病毒檢測技術

研究報告

執行機構：衛生福利部疾病管制署

計畫主持人：李政道

協同主持人：陳蓓諭

研究人員：吳慧娟、楊惠晴、徐悅芳

執行期間：2017 年 1 月 1 日至 2017 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本部意見，如對外研究成果應事先徵求本部同意

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
中文摘要	(1)
英文摘要	(2)
壹、前言	(3)
貳、材料與方法	(5)
參、結果	(9)
肆、討論	(14)
伍、結論與建議	(16)
陸、計畫重要研究成果及具體建議	(17)
柒、參考文獻	(18)

共 (18)頁

中文摘要

本署生產之抗蛇毒血漿共有 4 種:1.抗龜殼花及赤尾鮭蛇毒血漿;2.抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血漿;3.抗百步蛇毒血漿;4.抗鎖鏈蛇毒血漿。藥品的安全性仰賴於來源的管制，必須嚴格管控抗蛇毒血清源頭之抗蛇毒血漿以確保馬匹未遭受病毒感染，此為保證起始原料品質的重要措施。

本研究以市售酵素結合免疫吸附分析(ELISA)及免疫沉澱法(AGID)檢驗套組，建立抗蛇毒血漿病毒檢驗方法，病毒種類則依據美國 CFR 建議執行，已完成 Equine Infectious Anemia (EIA)、Equine viral arteritis virus (EAV) 及 Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) 3 種病毒市售檢驗套組之適用性評估。未來規劃將抗蛇毒血漿病毒檢測納入品管常規檢驗，不僅可運用於馬匹早期品質管控，亦能符合主管單位對抗蛇毒血漿之要求。

關鍵詞：抗蛇毒馬血漿、病毒檢測、酵素結合免疫吸附分析

英文摘要

To promote the quality of medicinal products, PIC/S GMP (Part II) has been put into practice in Taiwan in 2016. Four starting plasma of snake antivenom were manufactured by Vaccine Center at Taiwan CDC with a standardized quality control process. According to EMEA and WHO guidelines, minimizing the potential initial viral load by implementing a quality system for the production of the starting material to ensure safety of biologicals. A laboratory monitoring should be in place for freedom from specified infectious agents. The purpose of this study is to establish quality control method for surveillance of viral infection and health of the donor animals. Equine viruses as specified in USDA-APHIS 9 CFR 113.53c and 113.47 are EHV, EVA, EIA, Reovirus, Rabies, and BVDV. Laboratory has evaluated suitability of commercial kits for detecting Equine Infectious Anemia (EIA), Equine viral arteritis virus (EAV) and Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV).

Keywords: equine plasma, viral diagnosis, ELISA

壹、前言

臺灣氣候溫暖潮濕適合蛇類繁殖，早期生態未破壞前處處可見蛇類出沒，其中毒蛇約23種，臨床上較常見的六大毒蛇分別是出血毒性的龜殼花、赤尾鮫及百步蛇；神經毒性的雨傘節及飯匙倩；混合毒性之鎖鏈蛇。除了鎖鏈蛇分佈較偏重南部及東部山區之外，其它五種毒蛇在全台各地都可見，其中以被赤尾鮫咬傷比率最高，而百步蛇雖然在六大毒蛇中毒性較弱，但是每次釋放大量的毒液，所以致死率高居第一。咬傷之後臨床上的症狀，神經毒性蛇毒會造成肌肉麻痺、呼吸衰竭；出血性蛇毒則會使局部腫脹、瘀血、傷口流血，劇痛，全身性的症狀則是血小板降低與各器官出血。治療蛇毒咬傷使用正確種類的抗毒蛇血清是最決定性的治療[1]。本署血清疫苗研製中心目前委託國家衛生研究院產製抗蛇毒血清，而抗蛇毒馬血漿原料仍由本署人員製造，血漿為後續製造產品的原料。

雖然病毒經由馬血液傳染給人的發生率極低，但原料來源品質仍須嚴加管控[2]，在本署抗蛇毒血清製程中分別有加入有機溶劑、酸處理、熱處理及硫酸銨沈澱等病毒清除或不活化之步驟，確保生物製劑在製造過程中可避免或降低被動物病毒污染的風險。

近來衛生福利部為提昇國內藥廠品質與國際間對於GMP的要求與日俱增，衛生福利部食品藥物管理署公告（署授食字第1021101127）「西藥藥品優良製造規範」第二部原料藥[3]。105年1月1日起原料藥廠必須全面完成實施國際GMP標準(PIC/S GMP)，預計於108年1月1日全面實施原料藥DMF管理。

目前原料藥之起始原料尚未納入 PIC/S GMP 管理規範中，抗蛇毒血漿未納入藥廠之原料藥相關規範，但政策仍較傾向於將之納入，未來抗蛇毒血漿的製造將順勢遵循相關規範進行。本署於 104 年申請抗蛇毒血清凍晶注射劑委託製造，經食藥署 FDA 藥字第 1041408380 號函要求針對馬血漿執行病毒管控。

依據行政院農業委員會公告，抗蛇毒血漿產製的馬匹在輸出國應施行相

關疫病診斷試驗，如馬傳染性貧血、馬焦蟲病、馬接觸傳染性子宮炎、馬病毒性動脈炎、水疱性口炎等試驗結果陰性，使得輸入台灣。雖然馬匹來源已控管，但於台灣飼養後並無再確認馬匹是否感染，馬匹健康檢測有必要確實監控。本研究計畫目的在評估市售檢測試劑使用於馬血漿病毒檢測的適用性。

貳、材料與方法

一、馬傳染性貧血病毒, Equine Infectious Anemia (EIA)

參考世界動物衛生組織 (OIE) 建議的診斷方法，進行洋菜膠免疫擴散試驗及酵素免疫法分析。試驗檢測抗原為 EIA 之重組 p26 抗原，其為病毒 gag 基因編碼病毒的結構蛋白，p26 在病毒中相較於醣蛋白 gp45 和 gp90，具有較穩定之抗原性，藉此抗原偵測馬血漿中是否有抗 EIAV p26 之特異性抗體，以診斷馬匹是否感染馬傳染性貧血病毒。

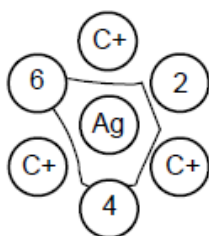
(一) 免疫擴散法(The agar gel immunodiffusion, AGID)

1. 廠牌: (1)試劑組:ID.vet, Lot 790, exp.03/2018

(2)馬陰性標準血清: GE HyClone 之 donor equine serum，作為陰性對照組, Lot.AAE203228, exp.05/2020

2. 試驗流程:

此方法為單向免疫擴散試驗，取 Petri dish (底面直徑 8.7 cm) 加入 15 mL 膠，靜置 1 小時後以 EIA cutter 挖洞(中心 1 孔，另 6 孔則環繞中心孔)，將標準抗原 (Ag) 50 μ L 加入中心孔及 50 μ L 陽性血清 (C+) 間隔加入周圍之孔，並將 3 個待測血清各 50 μ L 加入其餘待測孔中，室溫下 (20 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C) 恆濕箱靜置 24 小時候判讀。判讀標準如圖 1，樣本排列如圖 2。



C+ : Positive control
2 : Positive serum
4 : Weak positive serum
6 : Negative serum

圖 1: 判讀標準

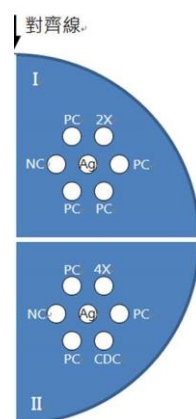


圖 2: 樣本排列

(二) 酵素免疫分析法 (ELISA)

試劑已將 p26(Gene GAG)的重組抗原吸附在塑膠 96 微孔盤中，作為固相，可同時偵測樣品中 IgG 與 IgM 抗體。

1. 廠牌:(1)試劑組: ID.vet, Lot B61, exp.04/2019
 - (2)陽性參考血清: ID.vet 廠牌之 MRI-EIA 凍乾血清, Lot.002
 - (3)馬陰性標準血清: GE 廠牌之 donor equine serum, 作為陰性對照組, Lot.AAE203228, exp.05/2020
2. 每次試驗於不同天進行, 重複 3 次
3. 試驗流程: (ID.vet 說明書操作)
 - (1) 每個 microwell 加入 50 μ L 稀釋緩衝液, 再分別加入 50 μ L 的陽性、陰性對照組及待測血漿(2 重複)
 - (2) 在 21 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C 培養 45 分鐘
 - (3) 倒掉盤中液體, 以 400 μ L 沖洗液沖洗 3 次
 - (4) 加入 100 μ L (1X) P26 Ag-HRP conjugate
 - (5) 在 21 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C 培養 30 分鐘
 - (6) 倒掉盤中液體, 以 400 μ L 沖洗液沖洗 3 次
 - (7) 加入 100 μ L substrate solution
 - (8) 在 21 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C 避光培養 15 分鐘
 - (9) 加入 100 μ L stop solution 停止反應
 - (10) 測 OD₄₅₀

二、馬動脈炎病毒, Equine viral arteritis virus (EAV)

以間接型酵素連結免疫吸收分析(ELISA) 偵測馬血漿中的抗 EVA 抗體。ELISA 試劑已將病毒特定胜肽(peptide)吸附到塑膠 96 微孔盤中, 加入待測馬血漿, 如馬血漿中有病毒抗體存在, 則會形成抗原-抗體複合物, 再加入 anti-horse IgG-peroxidase (HRP) conjugate, 會與抗病毒抗體結合, 最後再以 TMB 呈色。

1. 廠牌:(1)試劑組: ID.vet, Lot B61, exp.04/2019
 - (2)陽性參考血清: ID.vet 廠牌之 MRI-EVA 凍乾血清, Lot:002
 - (3)馬陰性標準血清: GE 廠牌之 donor equine serum, 作為陰性對照組, Lot.AAE203228, exp.05/2020
2. 每次試驗於不同天進行, 重複 3 次
3. 試驗流程: (奇數排孔盤未附著病毒抗原, 偶數排孔盤有附著抗原)
 - (1) 每個 microwell 加入 90 μ L 稀釋緩衝液, 再分別加入 10 μ L 的陽性、

- 陰性對照組及待測血漿(奇數及偶數盤皆要加入 sample,2 重複)
- (2) 在 $37^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 培養 45 分鐘
 - (3) 倒掉盤中液體，以 $300\mu\text{L}$ 沖洗液沖洗 3 次
 - (4) 加入 $100\mu\text{L}$ (1X) conjugate
 - (5) 在 $21^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 培養 30 分鐘
 - (6) 倒掉盤中液體，以 $400\mu\text{L}$ 沖洗液沖洗 3 次
 - (7) 加入 $100\mu\text{L}$ substrate solution
 - (8) 在 $21^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光培養 15 分鐘
 - (9) 加入 $100\mu\text{L}$ stop solution 停止反應
 - (10) 測 OD_{450}

三、牛病毒性腹瀉病毒 Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)[6]

牛病毒性腹瀉病毒屬於黃病毒科瘟病毒屬，主要感染牛、羊和豬的一種接觸性傳染病。BVDV-p80 Ab 檢測試劑，為競爭型 ELISA 方法，是建立在抗體和 anti-p80-horseradish peroxidase(HRP) conjugate 之間的競爭原理的基礎上。市售 ELISA 試劑的塑膠 96 微孔盤已附著病毒 P80 抗原，血漿中如含有對抗 BVDV 的抗體，則會與 well 上 p80 抗原結合並覆蓋(mask) p80 epitopes，再加入 anti-p80-horseradish peroxidase(HRP) conjugate，會與未結合的 epitope 作用，洗去游離的 conjugate，加入 TMB 呈色。如無抗體存在，液體呈現藍色，再加入 stop solution 後變成黃色。如有抗體存在，則無呈現。

1. 廠牌: (1)試劑組: ID.vet, Lot B61, exp.04/2019

(2)陽性參考血清: ID.vet 廠牌之 MRI-BVD 凍乾血清, Lot:003

(3)馬陰性標準血清: GE 廠牌之 donor equine serum，作為陰性對照組, Lot.AAE203228, exp.05/2020

2. 每次試驗於不同天進行，重複 3 次

3. 試驗流程:

- (1) 每個 microwell 加入 $25\mu\text{L}$ 稀釋緩衝液，再分別加入 $25\mu\text{L}$ 的陽性、陰性對照組及待測血漿
- (2) 在 $37^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 培養 45 分鐘
- (3) 倒掉盤中液體，以 $300\mu\text{L}$ 沖洗液沖洗 3 次
- (4) 加入 $100\mu\text{L}$ (1X) conjugate

- (5) 在 $21^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 培養 30 分鐘
- (6) 倒掉盤中液體，以 $300\ \mu\text{L}$ 沖洗液沖洗 3 次
- (7) 加入 $100\ \mu\text{L}$ substrate solution
- (8) 在 $21^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光培養 15 分鐘
- (9) 加入 $100\ \mu\text{L}$ stop solution 停止反應
- (10) 測 OD450

四、馬皰疹病毒, Equine herpesvirus (EHV)[5]

馬傳染性鼻肺炎 (equine rhinopneumonitis) 是由馬皰疹病毒引起的一種傳染病，為雙股 DNA 病毒。以酵素連結免疫吸收分析(ELISA)方法進行馬皰疹病毒抗體血清學檢測。

1. 廠牌: (1)試劑組: INGENASA,14. HVE. K1, Lot 2331116,exp.06-2018

(2)陽性參考血清: INGENASA 廠牌, Lot:241017

(3)馬陰性標準血清: GE 廠牌之 donor equine serum，作為陰性對照組, Lot.AAE203228, exp.05/2020

2. 每次試驗於不同天進行，重複 2 次

3. 試驗流程:

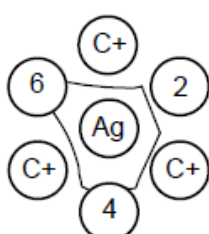
- (1) 每個 microwell 分別加入 $100\ \mu\text{L}$ 的陽性、陰性對照組及待測血漿
- (2) 在 37°C 培養 60 分鐘
- (3) 倒掉盤中液體，以 $300\ \mu\text{L}$ 沖洗液沖洗 4 次
- (4) 加入 $100\ \mu\text{L}$ (1X) conjugate
- (5) 在 25°C 培養 30 分鐘
- (6) 倒掉盤中液體，以 $300\ \mu\text{L}$ 沖洗液沖洗 5 次
- (7) 加入 $100\ \mu\text{L}$ substrate solution
- (8) 在室溫培養 15 分鐘
- (9) 加入 $100\ \mu\text{L}$ stop solution 停止反應
- (10) 測 OD405

參、結果

一、馬傳染性貧血病毒, Equine Infectious Anemia (EIA)

(一) 免疫擴散法(The agar gel immunodiffusion, AGID)

- 判讀標準如圖 1，試驗樣本排列如圖 2。



C+ : Positive control
2 : Positive serum
4 : Weak positive serum
6 : Negative serum

圖 1: 判讀標準

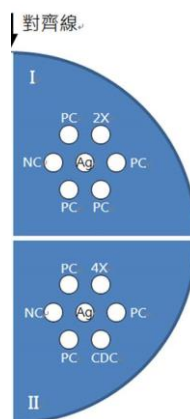


圖 2: 樣本排列

- 試驗結果:

以試劑組內陽性血清當作陽性樣本序列稀釋 2X、4X，皆能呈現沉澱線，判讀為陽性。以馬陰性血清當陰性對照組，本署產製之抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒血漿(批號 MG378)為檢測樣本，結果皆呈現陰性反應。(如圖 3)

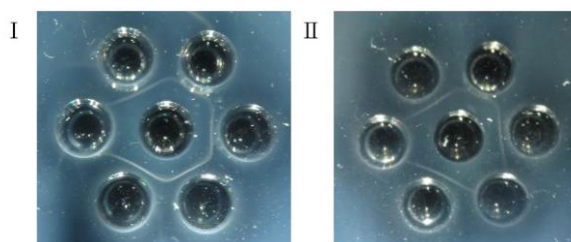


圖 3: EIA-AGID 結果圖示

(二) 酵素免疫分析法 (ELISA)

- 判讀標準:

試驗結果必須符合 $OD_{PC} > 0.350$; $OD_{PC}/OD_{NC} > 3$ ，結果判定標準依說明書：

$$S/P \% = \frac{OD_{sample} - OD_{NC}}{OD_{PC} - OD_{NC}} \times 100$$

Result	Status
S/P % ≤ 50%	NEGATIVE
50% < S/P % < 60%	DOUBTFUL
S/P % ≥ 60%	POSITIVE

- 試驗結果:

以參考陽性血清當作陽性樣本序列稀釋 2X、4X、8X，3 次試驗結果陽性參考血清稀釋 4 倍能呈現陽性反應，以馬陰性血清當陰性對

照組，本署產製之抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒血漿(批號 MG378)為檢測樣本，2 樣本結果皆呈現陰性反應。試驗數據如表 1。

表 1:EIA-ELISA 試驗數據

項次		1	2	3		
PC	平均 OD 值	2.029	2.226	1.688		
NC		0.139	0.055	0.055		
OD _{PC} >0.350 ; OD _{PC} /OD _{NC} >3		符合	符合	符合		
檢品	OD 值	判讀				
	S/P%					
EIA 參考陽性血清 (不稀釋)	3.298	Positive	3.395	Positive	2.298	Positive
	161.7		153.8		137.3	
EIA 陽性血清 (2 倍稀釋)	2.519	Positive	2.967	Positive	1.972	Positive
	121.8		134.1		117.3	
EIA 陽性血清 (4 倍稀釋)	2.002	Positive	2.392	Positive	1.434	Positive
	95.3		107.6		84.4	
EIA 陽性血清 (8 倍稀釋)	1.286	Doubtful	1.093	Negative	0.995	Doubtful
	58.7		47.8		5705	
馬血漿 MG378	0.125	Negative	0.164	Negative	0.105	Negative
	-0.719		5.0		3.0	
馬標準陰性血清	-	-	0.159	Negative	0.076	Negative
	-		4.7		1.3	

二、馬動脈炎病毒, Equine viral arteritis virus (EAV)

判讀標準:

$\text{net OD} = \text{OD}_{\text{even well}} - \text{OD}_{\text{odd well}}$ 。

試驗結果必須符合 $\text{net OD}_{\text{PC}} > 0.350$; $\text{net OD}_{\text{PC}} / | \text{net OD}_{\text{NC}} | > 3$,

結果判定標準依說明書：

$$\text{S/P \%} = \frac{\text{net OD}_{\text{sample}}}{\text{net OD}_{\text{PC}}} \times 100$$

Result	Status
S/P % ≤ 50%	NEGATIVE
50% < S/P % ≤ 60%	DOUBTFUL
S/P % > 60%	POSITIVE

試驗結果:

以參考陽性血清當作陽性樣本序列稀釋 2X，3 次試驗結果一致，陽性參考血清不稀釋使用可呈陽性反應，而稀釋 2 倍則為陰性反應，故陽性參考血清不能稀釋使用。本署產製之抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒血

漿(批號 MG378)及馬標準陰性血清為檢測樣本，結果皆呈現陰性反應。試驗數據如表 2。

表 2: EAV-ELISA 試驗數據

項次		1	2	3		
PC	平均 net OD 值	1.465	1.309	1.201		
NC		0.006	0.003	-0.003		
net OD _{PC} > 0.350 ; net OD _{PC} / net OD _{NC} > 3		符合	符合	符合		
檢品	net OD	判讀				
	S/P%					
參考 EAV 陽性血清 (不稀釋)	1.025	Positive	1.25	Positive	1.106	Positive
	69.9		95.5		92.0	
EAV 陽性血清 (2 倍稀釋)	0.612	Negative	0.549	Negative	0.478	Negative
	41.8		41.9		39.8	
馬血漿 MG378	0.015	Negative	0.023	Negative	0.053	Negative
	0.01		1.7		4.4	
馬標準陰性血清	-	-	0.116	Negative	0.15	Negative
	-		8.8		12.4	

三、牛病毒性腹瀉病毒 Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)

判讀標準：

試驗結果必須符合 $OD_{NC} > 0.7$; $OD_{PC}/OD_{NC} < 0.3$ ，結果判定標準依說明書：

$$S/N \% = \frac{OD_{sample}}{OD_{NC}} \times 100$$

Result	Status
S/N % ≤ 40%	POSITIVE
40% < S/N % ≤ 50%	DOUBTFUL
S/N % > 50%	NEGATIVE

試驗結果：

以參考陽性血清當作陽性樣本序列稀釋 2X、4X、8X、16X、32X，3 次試驗結果一致，陽性參考血清稀釋至 16X 使用可呈陽性反應。本署產製之抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒血漿(批號 MG378)及馬標準陰性血清為檢測樣本，結果皆呈現陰性反應。試驗數據如表 3。

表 3: BVDV-ELISA 試驗數據

項次		1	2	3	
PC	平均 OD 值	0.193	0.1	0.144	
NC		1.351	1.239	0.774	
OD _{NC} >0.7 ; OD _{PC} /OD _{NC} <0.3		符合	符合	符合	
檢品	OD 值	判讀			
	S/N%				
BVD 參考陽性血清 (不稀釋)	0.191	Positive	0.108	Positive	0.139
	14.1		8.6		18.0
BVD 陽性血清 (2 倍稀釋)	0.105	Positive	-	-	0.161
	7.7		-		20.7
BVD 陽性血清 (4 倍稀釋)	0.154	Positive	0.136	Positive	0.157
	11.3		10.9		20.3
BVD 陽性血清 (8 倍稀釋)	0.200	Positive	0.228	Positive	0.237
	14.8		18.4		30.6
BVD 陽性血清 (16 倍稀釋)	0.43	Positive	0.416	Positive	0.287
	31.7		33.5		37.0
BVD 陽性血清 (32 倍稀釋)	-	-	0.905	Negative	0.558
	-		73.0		72.1
馬血漿 MG378	1.551	Negative	1.144	Negative	0.756
	114.7		92.2		97.6
馬標準陰性血清	-	-	1.729	Negative	0.668
	-		139.5		86.2

四、馬皰疹病毒, Equine herpesvirus (EHV)

● 判讀標準:

試驗結果必須符合 $OD_{PC} > 1.0$; $OD_{NC} < 0.3$, 結果判定標準依說明書:

$$S/P = \frac{OD_{Sample} - OD_{NC}}{OD_{PC} - OD_{NC}}$$

樣品之 $S/P \geq 0.3$ 判讀為陽性; $S/P < 0.3$ 判讀為陰性。

● 試驗結果:

以參考陽性血清當作陽性樣本序列稀釋 2X、4X、8X、16X、32X、64X, 2 次試驗結果一致, 陽性參考血清稀釋至 32X 使用可呈陽性反應。本署產製之抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒血漿(批號 MG577)結果皆呈現陰性反應, 但馬標準陰性血清卻呈陽性反應, 已洽試劑及標準陰性血清廠商詢問釐清試劑是否可能有偽陽性情形。試驗數據如表 3。

表 3:EHV-ELISA 試驗數據

項次		1	2	
PC	平均 OD 值	1.651	1.996	
NC		0.14	0.127	
OD _{PC} >1.0 ; OD _{NC} <0.3		符合	符合	
檢品	OD 值	判讀		
	S/P%			
EHV 參考陽性血清 (不稀釋)	2.334	Positive	-	-
	1.45		-	
EHV 陽性血清 (2 倍稀釋)	1.804	Positive	2.119	Positive
	1.10		1.06	
EHV 陽性血清 (4 倍稀釋)	1.578	Positive	1.707	Positive
	0.95		0.84	
EHV 陽性血清 (8 倍稀釋)	1.224	Positive	1.609	Positive
	0.71		0.79	
EHV 陽性血清 (16 倍稀釋)	1.022	Positive	1.146	Positive
	0.58		0.54	
EHV 陽性血清 (32 倍稀釋)	0.77	Positive	0.876	Positive
	0.41		0.40	
EHV 陽性血清 (64 倍稀釋)	0.537	Negative	0.620	Negative
	0.26		0.26	
馬血漿 MG577	0.261	Negative	0.576	Negative
	0.08		0.24	
馬標準陰性血清	0.834	Positive	0.996	Positive
	0.46		0.46	

肆、討論

分析敏感性(analytical sensitivity)係方法能從檢體中正確檢驗某種特定物質的最低量，為評估血清學檢測技術的重要參數之一，而在台灣飼養馬匹並不興盛，且台灣亦非馬屬動物疫病區，在缺乏足夠馬匹感染病毒之陽性血清的限制下，評估檢測套組時需要從國外購買或與國外單位合作取得陽性參考血清方能進行敏感度比對測試。

本研究分別從歐洲廠商購買受病毒感染之馬血清當作陽性參考血清，包括馬傳染性貧血病毒(EIA)、馬動脈炎病毒(EAV)、牛病毒性腹瀉病毒(BVDV)、馬皰疹病毒(EHV)進行敏感度測試，分別檢測各陽性血清可呈現陽性反應之稀釋倍數，此稀釋倍數將作為檢驗套組一致性的參考標準。

馬傳染性貧血病毒(EIA)抗體檢測方法有 2 種，為酵素連結免疫吸附分析(ELISA)及免疫擴散法(AGID)，ID.vet 廠牌 EIA 陽性血清在 ELISA 方法中可呈陽性反應之最高稀釋倍數為 4 倍，然而此陽性血清僅能使用於酵素免疫分析法 (ELISA)，用於免疫擴散法(AGID)卻無法產生沉澱線 (本文未呈現數據)，需要另購專用血清才適用 AGID 方法，如此可推論 ELISA 方法敏感度高於免疫擴散法(AGID)方法。

在馬動脈炎病毒(EAV)的 ELISA 方法評估，參考血清不稀釋才能呈陽性反應，牛病毒性腹瀉病毒(BVDV)之參考血清呈陽性反應之最高稀釋倍數為稀釋 16 倍。

因外購之參考陽性血清為受感染馬血清，目前無法得知抗體濃度單位，不能以此單一血清量化試劑的分析敏感度，但仍可用陽性參考血清作為試劑間的 internal control，評估檢驗套組的一致性。

在馬皰疹病毒 Equine herpesvirus (EHV)部分，陰性標準血清理論上結果應為陰性，但卻呈現陽性反應，試驗使用之馬匹標準陰性血清廠牌為 GE Hylone，依廠商出具之 COA 證明馬匹來源無 EHV、EVA、EIA、BVDV、Rabies、Reovirus 及 EIA 感染，所以判定此檢測套組不適用，需再釐清造成此狀況的原因，而目前也正積極尋找其他適用的檢驗套組。

依據 OIE 診斷感染狂犬病之標準方法，係取新鮮腦組織進行直接免疫螢光抗體染色法(DFA)，檢測是否有病毒抗原存在。本計畫相關技術的檢體為馬血漿，馬匹感染狂犬病毒的潛伏期約為 4-8 週，在潛伏期不會產生抗體，通常都是感染後期出現症狀後才會產生抗體，所以不適合以馬血漿為檢體當作馬匹早期健康監測，但仍能作為法規單位要求須執行馬血漿病毒相關檢驗的參考數據，未來將持續建立狂犬病毒檢驗技術。

伍、結論與建議

本研究計畫以市售檢驗套組評估其使用於馬血清病毒檢測的適用性。共完成 3 種馬相關病毒包括馬傳染性貧血病毒(EIA)、馬動脈炎病毒(EAV)、牛病毒性腹瀉病毒 (BVDV)，共 4 項檢測方法的適用性評估。未來除馬匹年度例行健康檢查外，將規劃進行病毒檢驗以確保馬血漿之安全品質。

ID.vet 廠牌 EIA 凍乾血清僅能當酵素免疫分析法 (ELISA) 陽性參考血清，使用於免疫擴散法無法產生沉澱線，可顯示 ELISA 方法的敏感度較高。然而 AGID 仍為世界動物衛生組織 (OIE) 建議的診斷方法，同時本國防檢局仍使用此方法檢測 EIA，目前已尋找到適合 AGID 方法的陽性參考血清，將於明年度採購並持續建立此方法。

本研究所使用之 INGENASA 廠牌 HPV 檢驗套組因標準陰性血清呈現陽性反應，不符合適用性評估，須再與原廠進一步討論解決方法或另尋其他廠牌再行評估。

陸、計畫重要研究成果及具體建議

本計畫已完成評估 3 種馬匹相關病毒共 4 項檢測方法。依據美國 9 CFR 建議，生物製劑使用之動物性來源原料需檢驗 Equine herpesvirus (EHV)、Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)、Reovirus、Rabies Virus、Equine Infectious Anemia (EIA)、Equine viral arteritis virus (EAV) 等 6 種病毒。為嚴格管控抗蛇毒血清源頭之抗蛇毒血漿，確定馬匹未遭受病毒感染，以確保後端產品品質，故未來除馬匹飼養管控包含馬場清掃、消毒及馬匹清洗、外觀觀察、健康檢查等，將規劃初期納入 BVDV、EIA、EVA 馬血漿病毒檢驗來加強監測馬匹健康。後續將持續編列經費來建立其餘 Reovirus、Rabies Virus 之馬血漿病毒檢測方法。

柒、參考文獻

1. Gutierrez, J.M., G. Leon, and T. Burnouf, *Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead*. *Biologicals*, 2011. 39(3): p. 129-42.
2. Geneva, W.H.O., *WHO Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins*. 2017: p. 288-291.
3. 「西藥藥品優良製造規範」第二部原料藥.
4. *Equine Infectious Anaemia*. OIE Terrestrial Manual 2013. Chapter 2.5.6.
5. *Equine Rhinopneumonitis (Equine Herpesvirus-1 and -4)*. OIE Terrestrial Manual 2015. Chapter 2.5.9.
6. *Bovine Viral Diarrhoea*. OIE Terrestrial Manual 2015. Chapter 2.4.7.
7. *Rabies (Infection with Rabies Virus)*. OIE Terrestrial Manual 2013. Chapter 2.1.17.
8. *Equine Viral Arteritis (Infection with Equine Arteritis Virus)*. OIE Terrestrial Manual 2013. Chapter 2.5.10.

衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫
106 年度計畫重要研究成果及具體建議
(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：建立抗蛇毒血漿病毒檢測技術

主持人：李政道

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-000119

1.計畫之新發現或新發明

本研究計畫以市售檢驗套組評估其使用於馬血清病毒檢測的適用性。共完成 3 種馬相關病毒包括馬傳染性貧血病毒(EIA)、馬動脈炎病毒(EAV)、牛病毒性腹瀉病毒(BVDV)，共 4 項檢測方法的適用性評估。未來除馬匹年度例行健康檢查外，將規劃進行病毒檢驗以確保馬血漿之安全品質。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

無。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

目前抗蛇毒血漿尚未納入藥廠之原料藥 PIC/S GMP 管理規範，但政策仍較傾向於將之納入，未來抗蛇毒血漿的製造將順勢遵循相關規範進行。本署未來將針對馬血漿執行病毒檢驗以落實源頭品質管控。