

鼬獾狂犬病病毒動物試驗計畫書

一、前言：

我國發生鼬獾狂犬病 (Rabies, RABV) 疫情以來累積已發生一百餘例，目前除了一例可能是偶發感染的錢鼠案例外，於 9 月 10 日已出現首例狂犬病確診犬隻，該犬隻係臺東縣海端鄉民眾飼養犬隻，於 8 月 14 日晚間遭一狂犬病鼬獾咬傷，飼主於 8 月 15 日將該犬隻送交臺東縣動物防疫所隔離留置觀察。9 月 6 日出現食慾不佳、極度沉鬱等症狀，9 月 8 日該犬隻出現癱軟症狀，當 (9/8) 天安樂死後，立即採樣送本所檢驗。由此唯一經由鼬獾咬傷感染鼬獾狂犬病病毒犬隻臨床症狀顯示，犬隻於鼬獾咬傷後第 22 日開始呈現食慾及精神不振之臨床症狀。因該犬隻僅隔離留置觀察 24 天，觀察期間未進行相關檢測，因此臨床數據不足，且因感染犬隻為 1 個半月齡幼犬對 RABV 感受性可能較高，因此鼬獾狂犬病病毒對不同年齡之犬隻及其他動物之最低感染劑量、感染後病程、臨床症狀與唾液腺排毒均無完整數據可供後續防疫及野生動物口服疫苗評估、檢驗及政策制定之參據，故本所擬定本動物試驗計畫以期解決前述必要且急迫的問題。

目前 RABV 病例檢測結果顯示，這波狂犬病疫情以鼬獾為最主要感染及保毒動物，並且依據病毒分子演化分析的結果顯示我國鼬獾狂犬病病毒已形成一獨立分群 (圖 1a、1b)，凡此表示此病毒可能是適應於鼬獾的病毒株，雖然狂犬病病毒已知可以感染所有的溫血動物 (2、3、5)，但是由國外的經驗顯示適應於某一物種的狂犬病病毒對其他物種的感染力因物種之不同而可能有所差異 (5、6、9、11、13)。唯一在鼬獾也有狂犬病疫情的中國大陸，也有研究指出，鼬獾狂犬病病毒可能來自於狗，但是在適應於鼬獾後對狗的感染力有降低的情形 (14、15、21)，我國發生的鼬獾狂犬病病毒之核酸序列與中國的毒株仍有相當的差異，我國的毒株是否有類似對狗感染力低的情形，並且鼬獾與狗在感染鼬獾狂犬病病毒後之傳播能力，凡此未進行動物試驗皆無法斷定 (表一)。

本試驗將以不同病毒量之 RABV 接種鼬獾以探討 RABV 對鼬獾感染力與鼬獾感染 RABV 之潛伏期、臨床症狀、唾液腺排毒時間、病毒量及對其他食肉目動物感染力進行相關動物試驗，以釐清 RABV 對鼬獾病原性及傳播途徑，供防疫策略制定參考。此外，由於犬隻是人類社會的重要伴侶動物，也是已知狂犬病的重要傳染窩，在狂犬病的傳播扮演著重要的角色，台灣目前已發生經由鼬獾咬傷感染 RABV 之犬隻病例，因此本試驗將參考在小鼠與鼬獾的試驗結果，後續規劃以不同病毒量之 RABV 接種犬隻，以探討鼬獾 RABV 對犬隻最低病毒感染劑量、犬隻感染 RABV 之潛伏期、病程、臨床症狀、特別是唾液腺排毒時間與各病程時間點之病毒排毒量。因為經由 RABV 即時定量 PCR 檢測結果顯示，感染 RABV 鼬獾腦組織之 RABV RNA 拷貝數約為鼬獾咬傷感染

RABV 犬隻腦組織之 40,000 倍 (表二)，因此感染鼬獾 RABV 犬隻經由唾液排毒的可能性及排毒量與病程相關性，均需以犬隻動物試驗釐清，以供犬隻免疫及防疫策略之參據。

二、試驗項目：

1. 小鼠病原性、病毒力價測定及疫苗效力試驗 (1、7、12、16、18)。
2. 鼬獾病原性、傳播途徑及病毒排毒試驗 (1、14、15、16、18、21)。
3. 犬隻感染力試驗及病毒排毒試驗 (1、5、6、8、11、16、17、18、19)。

三、試驗場所：本所 ABSL-3 (Animal biosafety level-3) 非人類靈長類動物實驗室。本試驗場所於進行動物試驗時均備有符合規定之飼養設備，列如 IVC 小鼠籠、犬及鼬獾專用飼養籠。本試驗場所每次只進行一種動物試驗，不同動物別的動物試驗不可同時進行。

四、研究人員

所有研究人員均已接受生物安全等級三級教育訓練及該動物舍操作演練，並且完成三次狂犬病疫苗免疫，狂犬病抗體力價均高於 0.5 IU/mL (16)。

五、材料、方法：

1. 動物：

- 1.1 小鼠：3-4 週齡無特定病原 BALB/cByJNarl 小鼠 (購於國研院實驗動物中心) 共計 210 隻。
- 1.2. 鼬獾：健康無 RABV 抗體鼬獾 (自苗栗地區誘捕) 共計 36 隻。
- 1.3. 犬：6-12 月齡無 RABV 抗體米格魯犬 14 隻。

2. 病材：依演化及序列分析結果，台灣鼬獾 RABV 可區分為(1)花東(2)南部(3)中部等 3 個族群 (圖 1c)，其中第 1 群花東病毒株與第 2、3 族群 RABV 之醣蛋白核酸序列相似性僅 91.0-91.7%，胺基酸序列相似性為 93.3-95.0%，為釐清花東與其他區域 RABV 病原性及差異性，擬以第 1 群 (花東) 及第 3 群 (中部) RABV 腦乳劑 (20%)，依照**方法 4** 進行病毒分離。

3. 螢光抗體染色 (fluorescent antibody testing; FAT)：將本試驗小鼠、鼬獾及犬之大腦皮質、延髓、小腦、海馬角、橋腦及丘腦等六個部位組織，以直接壓片的方式將組織黏附在玻片上。組織壓片或待測細胞經由適當的風乾與 -20°C 丙酮固定後，以抗狂犬病病毒螢光標示抗體 (FITC anti-rabies monoclonal globulin, FDI Inc)，進行螢光抗體染色。染色後以 0.01 M 磷酸鹽緩衝溶液 (PBS, pH8.5) 洗滌 3 次，再以二次蒸餾水洗去殘留鹽類。將組織壓片或細胞玻片去除多餘水份後，滴上適量 PBS-甘油液後鏡檢 (4、16)。

4. 病毒分離：將 FAT 檢測陽性之鼬獾腦組織或唾液腺加入適量 PBS 或 MEM 研磨製成 20% 乳劑，經 4 °C 3,000 rpm/min 離心 20 分鐘後取上清液與新鮮配製之細胞 (MNA 細胞) 於 24 孔盤以 37 °C、5% CO₂ 同時培養，經 24 小時後換液加入維持液，於 37 °C、5% CO₂ 繼續培養 3 天，收集培養之細胞與細胞培養液經 4 °C、1,000 rpm 離心 10 分鐘後取部分上清液，經病毒核酸萃取後以專一性引子進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)，RT-PCR 陽性反應之病毒經細胞多次繼代後可以適應細胞培養及增殖。成功分離之 RABV 病毒液以病毒即時定量核酸偵測 (方法 7) 挑選 RABV RNA 拷貝數較高之病毒株。挑選第 1 群(花東)及第 3 群(中部) RABV 中 RABV RNA 拷貝數較高之病毒株 1 株，合計 2 株，依據方法 5、6 進行病毒增殖及病毒力價測定 (10、14、15、16、19)。動物病原性試驗使用之 RABV，以自唾液腺分離之病毒較合適，因為無法以細胞取代 RABV 於動物體內的病毒複製，故 RABV 應該採用鼠腦內接種，而且只於小鼠腦內增殖一代，以降低病毒因為連續繼代造成突變的機率，小鼠腦內增殖之 RABV 乳劑經離心後取上清液小量分裝 (0.5 mL/瓶) 後，至於 -80 °C 超低溫冷凍保存。

5. 小鼠腦內病毒增殖：小鼠以 ketamine (80-100mg/kg) 合併 xylazine (5-10mg/kg) 麻醉後，於腦內分別接種體積為 30µl 經上述處理過後成功分離繼代之 RABV(台灣株)，每株 RABV 接種 10 隻小鼠，合計 20 隻。待小鼠出現狂犬病第三期臨床症狀後 (參照附件二)，以腹腔注射過量巴比妥鹽麻醉劑 (100-150 mg/kg) 方式進行人道安樂死。犧牲後之動物，將其腦組織取出，經研磨、離心後，收集上清液小量分裝 (0.5 mL/瓶) 後，至於 -80 °C 超低溫冷凍保存，並依方法 6 進行病毒力價測定 (7、12、16、18) 及進行基因體核酸定序，以確保增殖之病毒未發生突變。

6. 病毒力價測定：將依照方法 5 增殖之第 1、3 群之 RABV 以十倍系列稀釋後，以小鼠進行病毒力價測定，病毒經系列稀釋後取各個稀釋階病毒液接種小鼠，每個稀釋階須接種 10 隻小鼠，病毒力價依據 Spearman and Karber 算式計算 (10、15、16)。

7. 病毒即時定量核酸偵測：依據台灣鼬獾 RABV 序列設計專一性引子及螢光標定探針，進行下述即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction) 試驗。將欲檢測之狂犬病病毒核酸與連續十倍序列稀釋之陽性對照核酸 (由 in vitro transcription 所獲得之定量 RNA)，同時使用商品化套組 (一步驟水解性定量聚合酶套組)、引子及探針進行反轉錄反應 (Reverse Transcription) 3 分鐘、雙股解離 (Denaturation) 30 秒、45 個增幅及螢光訊號收集循環。反應結束後，以 Roche LightCycler 480 內附之軟體對連續十倍序列稀釋之陽性對照核酸反應予以製作核酸拷貝數對應 Ct 值 (臨界生成量的循環數) 之標準曲線，將所檢測之狂犬病

病毒核酸所獲得的 Ct 值套入該標準曲線，即可得知其原始 RABV 核酸拷貝數。

8. 抗體測定：採血分離血清做血清抗體力價分析，以病毒中和試驗(Fluorescent antibody virus neutralization test, FAVN)或狂犬病快速螢光抑制試驗(The rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT)測定血清力價，以確認試驗前實驗動物為抗體陰性反應，試驗過程中抗體變化及釐清病毒接種後未發病動物是否因為成為隱性感染而造成抗體力價上升(4、5、6、16)。

9. RABV 接種及採材流程：

- 9.1. 動物以氣體麻醉劑 Isoflurane 依誘導麻醉量：5%，維持量：1.5~2.5% 進行誘導及維持麻醉，於左右兩側咀嚼肌各注射 0.5ml 鮑獲狂犬病病毒。
- 9.2. 動物須每天二次例行照護與觀察(犬隻試驗增加三次攝影機觀察)，一旦動物出現神經症狀，如流口水、四肢抽動、震顫、精神不振、對外界刺激較敏感或不再進食。則增加觀察頻率。若連續觀察二次，動物症狀未獲改善，體重下降達 20%，動物將給予安樂死，進行相關剖檢及依據方法 4 及 7 實施病毒分離及病毒核酸偵測(16、18)。
- 9.3. 動物每週採集唾液、血液及量測體重二次，動物照護人員將動物飼養籠於密閉容器內以氣體麻醉劑 Isoflurane 依誘導麻醉量：5%，維持量：1.5~2.5% 誘導及維持麻醉，再採集唾液及血液。
- 9.4. 採集之唾液依照方法 4 及 7 實施病毒分離及病毒核酸偵測，以確認鮑獲 RABV 排毒之途徑、時間及排毒量。
- 9.5. 採集之血液依照方法 8 實施抗體測定。

六、動物試驗設計：

1. 小鼠病原性及病毒力價測定：

目的：測定 RABV 病毒株之小鼠顱內接種致死半量 (mouse intra-cranial LD₅₀, MIC LD₅₀) 供後續鮑獲及犬隻試驗攻毒劑量之依據。

- 1.1 動物：體重 13 至 15 公克(約 3-4 週齡)SPF 小鼠共計 100 隻。
- 1.2. 病毒：經方法 5 增殖第 1 及第 3 群之 RABV。
- 1.3. 方法：將第 1 及第 3 群之 RABV 分成 2 組，病毒以十倍系列稀釋後，取 10⁻¹~10⁻⁵ 倍稀釋乳劑行小鼠腦內接種 (30 µl)，每個稀釋倍數接種 10 隻小鼠，通常約 10 天發病，連續觀察 28 日，從攻毒後第 4 天以後死亡之動物每天記錄(依據附件二之第三階段症狀判定死亡並安樂死，以降低小鼠疼痛與痛苦)，於攻毒第 28 天存活之小鼠將其全數安樂死。
- 1.4. 採材：所有死亡小鼠採取腦組織，以螢光抗體染色(FAT) 檢測確認感染狂犬病毒，以 Spearman and Karber Method 計算病毒株之 MIC LD₅₀ 劑量。

組別	動物數	病毒	稀釋階	附註
A	50 隻*	第 1 群	10 ⁻¹ ~10 ⁻⁵	小鼠採腦內接種，觀察期 28 日，病毒力價(MIC LD ₅₀) 以 Spearman and Karber Method 計算
B	50 隻*	第 3 群	10 ⁻¹ ~10 ⁻⁵	

*：每一病毒稀釋階接種 10 隻小鼠

2. 小鼠 RABV 疫苗效力試驗：

目的：依據 OIE/WHO 方法，探討現行 RABV 不活化疫苗以台灣鼬獾 RABV 攻毒之疫苗保護效力，以瞭解目前動物及人類接種的狂犬病疫苗保護台灣鼬獾狂犬病病毒之能力？

2.1. 動物：3~4 週齡（體重 11~15 公克）健康小白鼠 70 隻。

2.2. 疫苗：寵必威狂犬病不活化疫苗(NOBIVAC RABIES)，10 劑量/瓶。免疫小鼠前將疫苗混合均勻後，取 1 劑量 RABV 不活化疫苗以磷酸緩衝液進行 5 倍、25 倍及 125 倍稀釋，供小鼠腹腔注射使用，同時 陽性參考疫苗也必須同時進行。

2.3. 病毒：由三群台灣鼬獾 RABV 挑選 MIC LD₅₀ 較高之病毒株進行本試驗，目前暫定為第 1 群（花東）RABV，後續依照試驗結果擇定病毒株。

2.4. 方法：

2.4.1. 4 採逢機方式將小鼠分成免疫組及未免疫對照組，免疫組小鼠以腹腔注射經稀釋之 RABV 不活化疫苗 0.5 mL/隻，共注射 6 次，初次免疫後第 14 日將免疫組及陽性對照組各分為 3 組，每組 10 隻，及未免疫對照組 10 隻小鼠，以含 2% 經熱處理馬血清之磷酸緩衝液稀釋台灣鼬獾狂犬病病毒為 50 MIC LD₅₀/30μl 劑量，以小白鼠腦內注射方式進行狂犬病疫苗效力攻毒試驗。

2.4.2. 攻毒後免疫組及對照組各觀察 2 週，每日記錄發病症狀（麻痺痙攣）及死亡情形，以 Spearman and Karber 方法統計攻毒後之 LD₅₀。

2.4.3. 疫苗效力試驗結果係比較測試疫苗及陽性參考疫苗免疫組小鼠攻毒後之保護效果，用以評估現行狂犬病疫苗對台灣鼬獾狂犬病病毒保護效果。

2.5. 採材：攻毒後第 15 日，以腹腔注射過量巴比妥鹽麻醉劑 (150mg/kg) 方式進行人道安樂死。所有死亡小鼠採取腦組織，以螢光抗體染色(FAT) 檢測確認是否感染 RABV。

3. RABV 對鼬獾病原性、LD₅₀ 測定及攻毒後排毒檢測：

目的：將 RABV 對鼬獾病原性及攻毒後排毒檢測與 LD₅₀ 測定試驗合併進行，以達動物減量之目的。以 RABV 抗體及抗原檢測陰性之健康鼬獾經由顳肌肌肉注射 RABV，進行 LD₅₀ 測定，以確定後續鼬獾 RABV 口服疫苗效力試驗攻毒株 LD₅₀ 力價。此外於接種後每日觀察並記錄，連續觀察 180 天期間內，每週採血及唾液 2 次，供抗體檢測、病毒分離及病毒即時定量核酸偵測，探討鼬獾感染不同力價 RABV 之潛伏期、臨床症狀、唾液腺排毒時間、病毒量及死亡率。以瞭解鼬獾除了是保毒動物外經由唾液腺排毒再感染犬及其他食肉目動物的能力，以釐清 RABV 對鼬獾病原性、傳播能力，以供防疫策略制定參考。

3.1. 動物：本試驗使用自苗栗（目前為 RABV 非疫區）捕獲之鼬獾，經本

所飼養觀察 6 個月，無任何 RABV 之神經症狀且 RABV 抗體及抗原檢測陰性之健康鼬獾 36 頭 ($10^{2.0}$ 、 $10^{3.4}$ 、 $10^{4.8}$ 、 $10^{6.2}$ 及 $10^{7.6}$ MIC LD₅₀ 等 5 種病毒階接種組，每組 6 隻，合計 30 隻，對照組 6 隻，總計 36 隻)，本試驗 LD₅₀ 測定結果，將供口服疫苗效力試驗攻毒之依據。

3.2. 病毒：由三群台灣鼬獾 RABV 挑選 MIC LD₅₀ 較高之病毒株進行本試驗，目前暫定為第 1 群（花東）RABV，後續依照試驗結果擇定病毒株。

3.3. 病毒接種：取前述擇定之 RABV 之病毒液與劑量，行咀嚼肌肌肉注射 1.0 ml（每側 0.5 mL）。

3.4. 觀察及採樣：接種連續觀察 180 天，觀察期間內每週採血及唾液 2 次，臨床症狀產生後每日收集唾液。以氣體麻醉劑 Isoflurane 依誘導麻醉量：5%，維持量：1.5~2.5% 行誘導及維持麻醉後進行採血及唾液，採血自頸靜脈以 25-22G 針頭採集 1-2ml/次，唾液以無菌棉花棒收集，每次約採集 0.5ml。採集之唾液及血液依照方法 3、6 及 7 進行病毒分離、病毒核酸定量檢測及抗體測定。

3.5. 安樂死：本試驗過程中鼬獾只要呈現附件一 1.1 及方法 9.2 之臨床症狀即予以安樂死，以降低動物疼痛與痛苦。鼬獾攻毒後臨床呈現神經症狀或者在對照組最後一隻鼬獾死亡後第 180 天將所有動物安樂死，動物安樂死前需採集唾液及血液。以氣體麻醉劑 Isoflurane 依 5% 誘導麻醉劑量行誘導及維持麻醉，再以靜脈注射 pentobarbital (100-150 mg/kg)，並確認動物無生命跡象。所有死亡動物採取腦組織、唾液腺、脊髓等組織，以螢光抗體染色(FAT) 檢測確認感染狂犬病毒，及以方法 7 進行病毒核酸定量檢測。

4. RABV 對犬隻感染力及攻毒後排毒檢測試驗：

目的：適應於某一物種的狂犬病病毒對其他物種的感染力，可能會因物種之不同而有所差異。由分子演化分析結果顯示台灣鼬獾 RABV 可能至少已存在台灣達 50 年以上，但截至目前為止僅於 9 月 10 日確診 1 隻臺東縣海端鄉犬隻經由鼬獾咬傷感染 RABV，完全無經由犬隻咬傷人引發之狂犬病病例，因此有必要探討 RABV 對犬隻感染力及犬隻感染後之傳播能力。本試驗將經由高、低二種病毒力價 (10^6 及 10^2 MIC LD₅₀)，經由咀嚼肌肌肉注射進行犬隻接種，接種後連續觀察 180 天期間內，每週採血及唾液 2 次，供抗體檢測、病毒分離及病毒即時定量核酸偵測，探討犬隻感染不同力價 RABV 之潛伏期、臨床症狀、唾液腺排毒時間、病毒量及死亡率，以瞭解是否犬隻於感染鼬獾 RABV 後，病毒因動物物種差異，造成不易感染犬腦或者於犬腦之複製能力不佳，而造成感染犬隻無法再經由唾液腺排毒或病毒量太低以至無後續再感染其他動物的機會或機率非常低，亦即釐清犬隻是否為鼬獾 RABV 感染的終宿主動物，以供防疫策略制定參考。

4.1. 動物：本試驗使用 6-12 月齡無 RABV 抗體米格魯犬 14 隻。(RABV 分別以 10^6 及 10^2 MIC LD₅₀ 等 2 種病毒階接種組進行犬隻接種，每組 6 隻犬，

合計 12 隻犬，對照組 2 隻犬，總計 14 隻)。

4.2. 病毒：由 RABV 挑選 MIC LD₅₀ 高、病毒複製能力佳之病毒株進行本試驗，目前暫定為第 1 群（花東）RABV，後續依照試驗結果擇定病毒株。

4.3. 病毒接種：取 10⁶ 及 10² MIC LD₅₀ 病毒液，行顳肌肌肉注射 1 ml（每側 0.5 mL）。每個劑量組使用 6 隻狗。

4.3. 觀察：依台灣犬隻經由鼬獾咬傷感染 RABV 首例之潛伏期約 3 週，此外依據美國 CDC 專家建議應連續觀察 180 日。

4.4. 採樣：觀察期間內以氣體麻醉劑 Isoflurane 依誘導麻醉量：5%，維持量：1.5~2.5%行誘導及維持麻醉後進行採血及唾液，每週採血及唾液 2 次，臨床症狀產生後每日收集唾液。採集之唾液及血液依照方法 3、6 及 7 進行病毒分離、病毒核酸定量檢測及抗體測定。

4.5. 安樂死：病毒接種後第 180 天依然存活之犬隻以氣體麻醉劑 Isoflurane 依 5%誘導麻醉劑量行誘導及維持麻醉，再以靜脈注射 pentobarbital (100-150 mg/kg)，進行安樂死，動物安樂死前需採集唾液及血液。所有死亡犬隻採取腦組織、唾液腺、脊髓等組織，以螢光抗體染色(FAT) 檢測確認感染狂犬病毒，及以方法 6 進行病毒核酸定量檢測。試驗過程中犬隻只要呈現附件一 1.1 及方法 8.2 之臨床症狀即予以安樂死，以降低動物疼痛與痛苦 (1、16、18)。

附件一、狂犬病實驗動物人道終止點：

- 1.1. 本試驗為朝減量、替代及精緻化目標進行動物試驗，所有犬隻及鼬獾應依據**方法 9.2.**之規範「動物出現神經症狀，如流口水、四肢抽動、震顫、精神不振、對外界刺激較敏感或不再進食。則增加觀察頻率，若動物症狀未獲改善，體重下降達 20%，動物將給予安樂死」，以降低動物疼痛、痛苦及獲取有效試驗結果，避免重新進行動物試驗之前提下，完成相關動物試驗。
- 1.2. 小鼠人道終止點：利用觀察臨床症狀替代死亡來做為試驗終止點，減少動物遭受的痛苦。在接種狂犬病病毒的小鼠可能出現 5 個階段典型的臨床症狀（1）被毛粗剛，拱背。（2）移動緩慢，失去警覺(可能出現原地繞圈的情形) **(3) 搖晃的移動，震顫，抽蓄。**（4）局部麻痺或癱瘓。（5）垂死的狀態。攻毒後 4 天開始每天至少觀察兩次。每次觀察記錄下臨床症狀。**經驗顯示以第三階段作為實驗終止點與死亡作為終止點的試驗結果是一致的**（1、16、18）。

附件二、小鼠人道終止點參考資料 (1、16、18)

1. 臨床症狀：

攻毒後四天內不會顯現臨床症狀，一般四天內出現症狀，基本上比較是屬於顱內接種步驟導致，因此必須將這些動物排除。一旦出現臨床症狀後會在 2-6 天內死亡，臨床症狀可區分成五個階段。

- 1.1. 第一階段：皮毛粗糙，拱背：皮毛粗糙與拱背是第一病徵，在許多疾病也可觀察到。表示動物不舒服。
- 1.2. 第二階段：移動緩慢，繞圈圈運動：動物喪失靈敏度，步伐較平時緩慢，如果觀察一段時間可以發現動物會頻繁的以同一方向繞圈圈移動。這是神經性疾病的第一表徵。
- 1.3. 第三階段：搖晃，發抖，抽搐：神經症狀變得明顯，主要是以發抖及搖晃運動為主，並在誘發下會有抽搐情形。此階段也會有顯著的體重喪失。基本上此一階段可以清楚地確認狂犬病感染。
- 1.4. 第四階段：癱瘓：常見後肢跛行及輕度癱瘓，顯示狂犬病漸進性的感染。並且很快地，動物將全身癱瘓。動物有顯著的脫水現象。
- 1.5. 第五階段：垂死動物：動物呈現俯臥或橫躺休息，並且明顯的無法進食或飲水。動物約在 1-2 天後死亡。

2. 人道終止判定依據：

2.1. 臨床症狀指標：小鼠感染狂犬病的進程，一開始較緩慢，約 4-6 天後才有症狀。與其他動物不同處是，小鼠一般不會顯現侵略攻擊的臨床症狀。而且在進入第三階段後數天後即會死亡，無法恢復。絕大多數感染狂犬病小鼠一旦見到緩慢的繞圈圈運動時，不遲於 3 天，動物即進入死亡。因此在第三階段結束動物生命，將不會影響任何科學上的誤差。故建議當動物進入第三階段時犧牲動物，將可減少動物的痛苦。

2.2. 體重指標：

為避免接種病毒當日的影響，取感染後第二日體重為基準點。體重是很顯著的指標，在其他臨床症狀出現前，即可觀察到輕微的體重減少。一般直到動物死亡前，體重約莫會減輕 30-50%。實驗結果顯示在體重減少 20%時，也是人道終止的指標。

2.3. 體溫指標：

與其他動物感染狂犬病不同的是，小鼠在感染早期也沒有發燒的現象。小鼠在感染末期，一直呈現低溫狀態。但這一現象出現極晚，故不適用做人道終點依據。

3. 結論:

一旦體重減少超過 15%，並且伴隨有神經症狀時，則將步入死亡的不歸路。

因此當動物有體重減少時，並且動物已經呈現典型的臨床症狀(第三或第二階段)時即可犧牲動物。

4. 記錄表：

動物號碼		感染後天數																
		-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
	體重(g)																	
	體溫(°C)																	
	評分 0-5																	
	1																	
	1																	
	2																	
	2																	
	3																	
	3																	
	3																	
	4																	
	4																	
	5																	
	5																	

附件三、動物疼痛評估標準

動物疼痛程度的評估對實驗者和動物福利保護者而言，一直是個最難以解決的問題，因此在1985年，由Moron & Griffiths 建立了一套可作為依據的評估方法，此種方法用了5種資料來評估動物於實驗中所可能遭受的疼痛狀況，這5種資料包含有：體重、外觀、臨床症狀、先天性的行為及對刺激的反應等。本動物試驗將參據表A：小鼠疼痛評估表及表B：犬隻疼痛評估表。此外根據麥吉爾大學（McGill University）心理學教授Jeffrey S. Mogil博士的研究，目前已發展出新一代的疼痛評估方法，老鼠和人類一樣透過面部表情表達痛苦。該團隊分析老鼠在接受中度疼痛刺激之前及遭受疼痛期間的圖像。結果發現根據刺激的劇烈程度，可以將面部特徵分成5項來評量，包括眼眶緊密程度（orbital tightening, eye closing），鼻子、臉頰鼓起的程度，耳朵以及落腮鬚的位置(圖A)。目前這項研究繼續在實驗室中進行實驗，也適用於其他物種，如大鼠，兔子等。於試驗過程中隨時評估相關試驗方法對於動物之影響，以期建立符合實驗需求及動物福利之相關試驗方法與步驟。

表A、小鼠疼痛評估表

	評估項目	輕微程度	中等程度	嚴重程度
體重	*體重	*體重減少原體重的10%以下	*體重減少原體重的10-25%	*體重減少原體重的25%以上
外觀	*身體姿勢 *毛髮豎起情形	*短暫的拱背，特別是在投藥後 *部分毛髮豎起	*間歇性拱背 *明顯皮毛粗糙	*持續性拱背 *明顯皮毛粗糙，並伴隨其他症狀如拱背、遲鈍反應及行為
臨床症狀	*呼吸 *流涎 *震顫 *痙攣 *沉鬱、臥倒	*正常 *短暫的 *短暫的 *無 *無	*間歇性的呼吸異常 *間歇性的弄濕下顎附近的皮毛 *間歇性 *間歇性（每次10分鐘以下） *短暫的（1小時以下）	*持續性呼吸困難 *持續性的弄濕下顎附近的皮毛 *持續性 *持續性（若每次超過10分鐘以上，則建議安樂死） *持續1小時以上（若每次超過3小時以上，則建議安樂死）
無刺激時一般行為	*社會化行為	*與群體有對等的互動	*與群體的互動較少	*沒有任何的互動行為
對刺激的反應	*受刺激時行為反應	*變化不大	*受刺激時亦壓抑行為反應(如：被人捉拿時)	*對刺激或外部行為無任何反應

表B、犬隻疼痛評估表

	評估項目	輕微疼痛	中度疼痛	嚴重疼痛
體重	*體重 *食物/飲水消耗	*7天間減少原體重的10%以下 *72小時內攝食正常量的40-75%	*7天間減少原體重的10-25% *72小時內攝食低於正常量的40%以下	*7天間減少原體重的25%以上 *7天間攝食低於正常量的40%以下或食慾不振超過72小時
外觀	*皮毛狀況 *身體姿勢	*正常 *正常	*皮毛無光澤，較少整理皮毛 *間歇性有hang dog姿勢	*皮毛狀況非常差，不整理皮毛，並伴隨有其他如'hang dog'症狀、遲鈍反應及行為 *持續性有'hang dog'姿勢
臨床症狀	*呼吸 *震顫 *痙攣 *沉鬱、臥倒	*正常 *短暫的 *無 *無	*間歇性呼吸異常 *間歇性 *間歇性（每次10分鐘以下） *短暫的（1小時以下）	*持續性呼吸困難 *持續性 *持續性（若每次痙攣超過10分鐘以上，則建議安樂死） *持續1小時以上（若持續超過2小時以上，則建議安樂死）
無刺激時一般行為	*社會化行為	*與群體有對等的互動	*與群體的互動較少	*沒有任何的互動行為
對刺激的反應	*受刺激時行為反應	*受刺激時有溫和且正常反應	*受刺激時有較少的反應	*對刺激或外來行為無任何反應

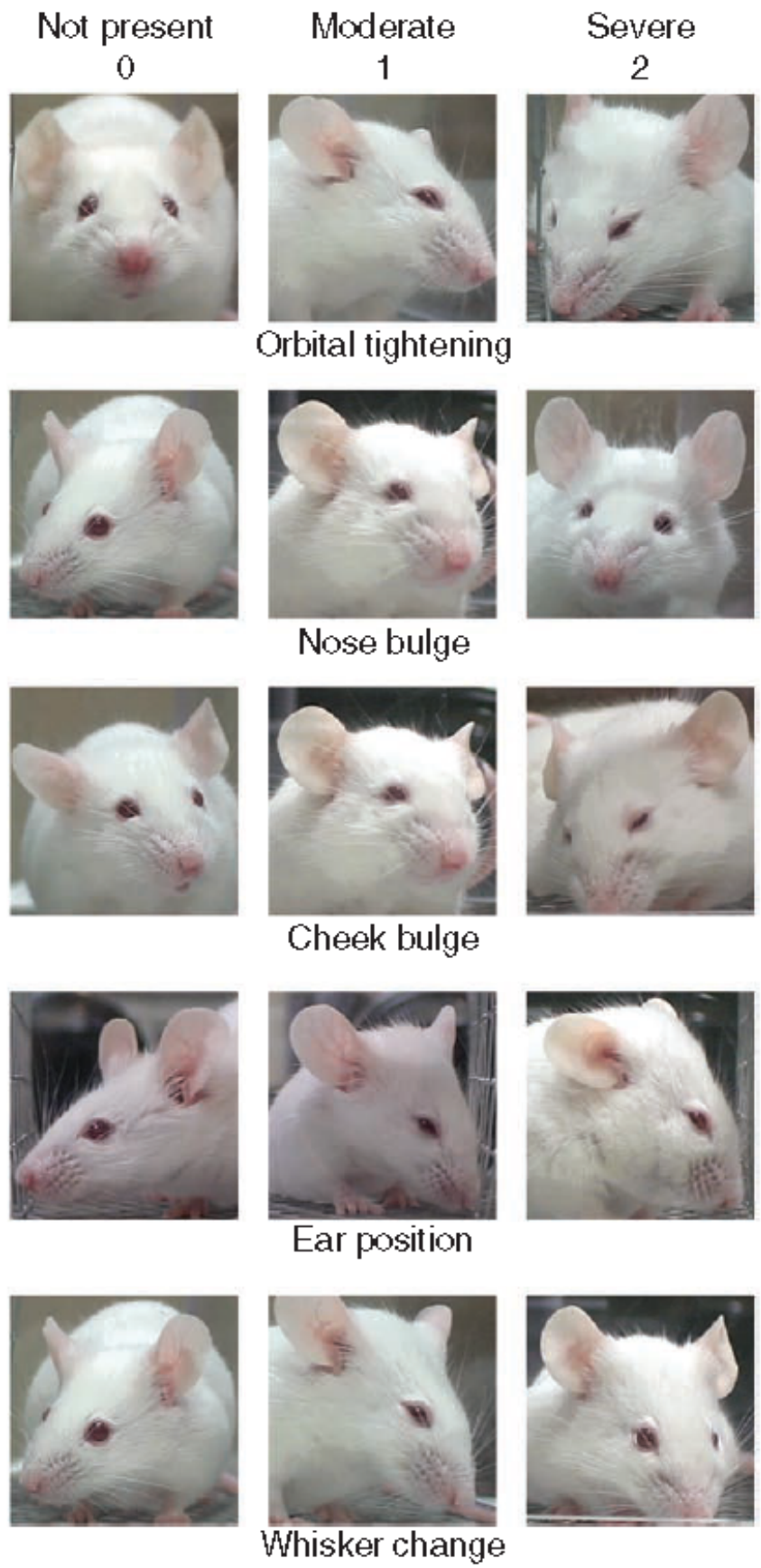
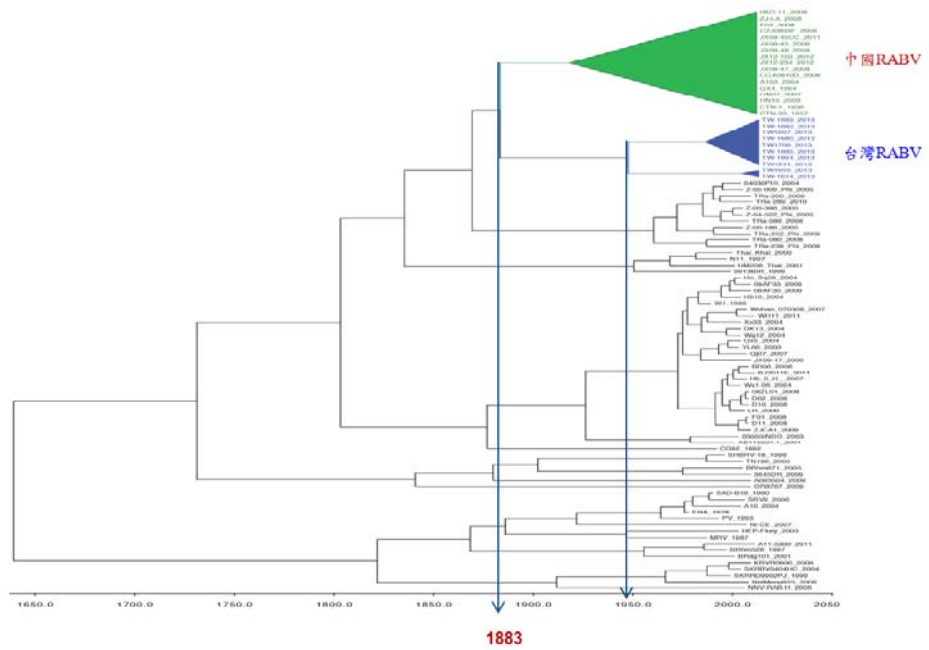
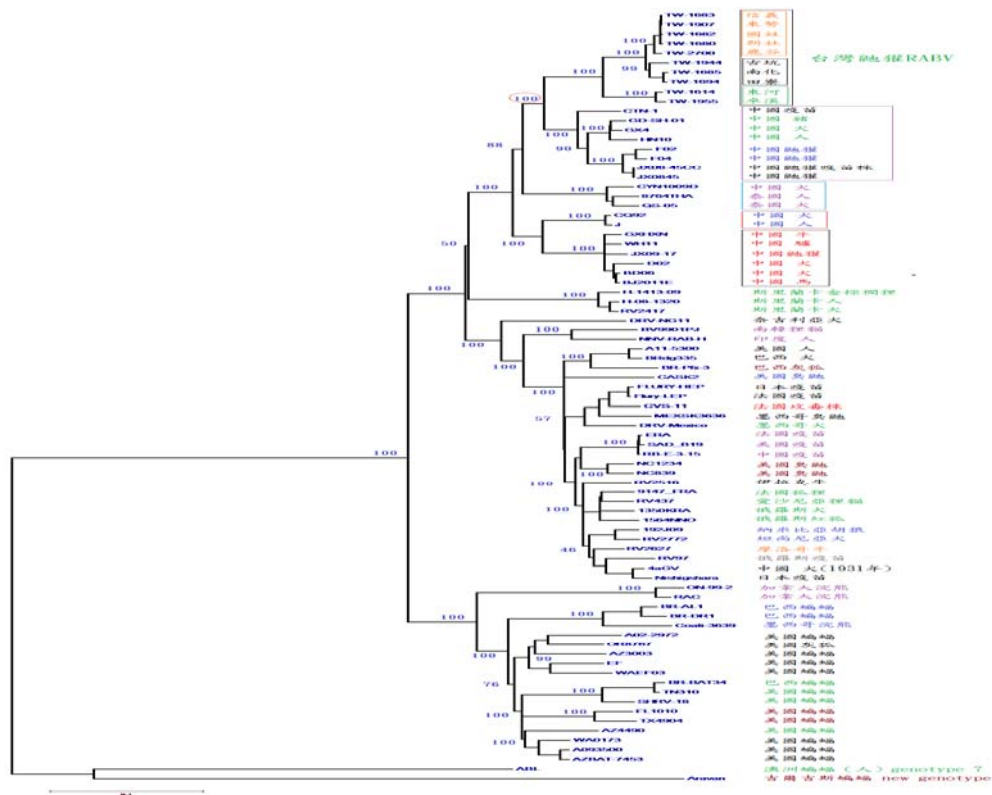


圖 A. 老鼠經由面部表情表達痛苦。

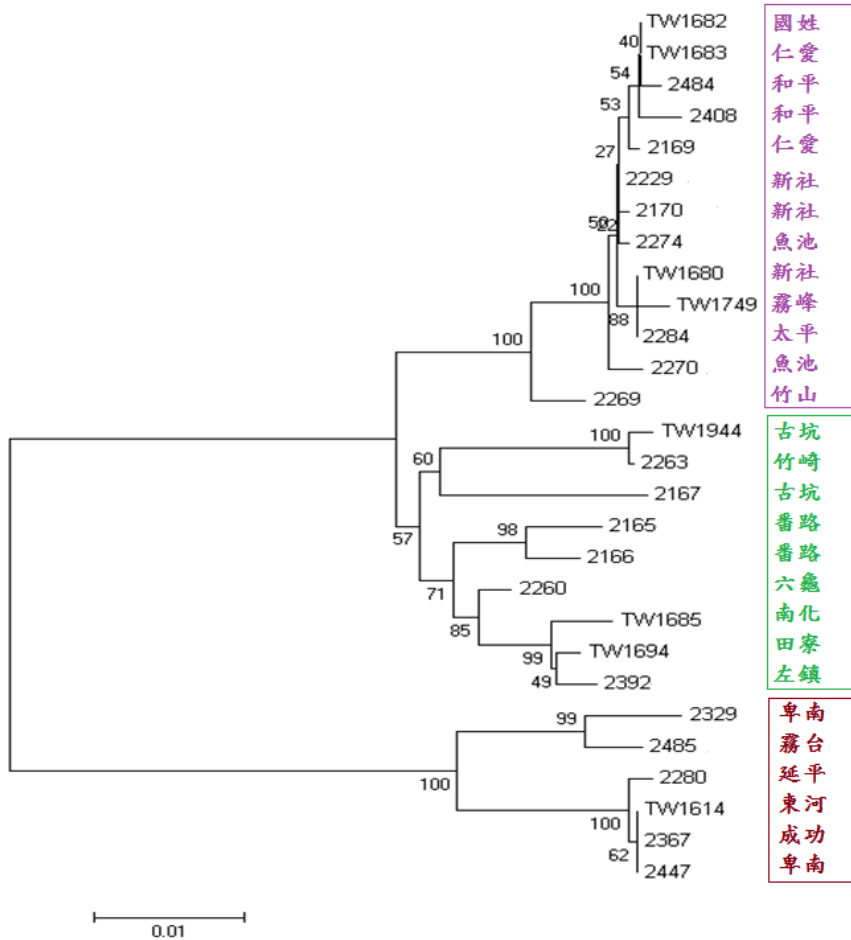
圖、表：



(圖 a)



(圖 b)：基因體全長核酸序列演化分析結果。



(圖 c)：部分 G 基因序列演化分析結果。

圖 1、依據鼬獾狂犬病病毒 G 基因序列演化分析結果，台灣鼬獾 RABV 於 130 年前與中國狂犬病病毒具有共同的祖先，而且存在台灣已超過 66 年以上的時間（圖 1a），所以才能成為一個獨立的演化分枝，甚至台灣 RABV 可依地域性區分為東部、中部及南部 3 個病毒演化族群（圖 1b, 圖 1c），以上結果均說明台灣鼬獾 RABV 存在台灣已經是一段長的時間。

表一、台灣鼬獾 RABV 醣蛋白胺基酸序列分析結果: 狂犬病病毒 (Rabies Virus, RABV) 醣蛋白抗原位 III 之第 333 個胺基酸與病原性具關聯性, 台灣鼬獾狂犬病病毒在這個位置的胺基酸均為精胺酸 (Arginine; R), 顯示台灣鼬獾狂犬病病毒對老鼠可能具有致死的能力, 基本上當第 333 胺基酸為 R 時, 病毒可以進行神經軸突傳播, 造成病毒接種老鼠死亡。

	Signal Peptide																			Antigenic Site-II											Ag-I						
	-19	-18	-17	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	33	34	35	36	37	38	39	40	41	197	198	199	230					
conserved	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	C	-	G	/	G	C	T	N	L	S	G	F	S	/	K	-	A	/	-	/		
TW fb	☆	I	P	Q	A	L	L	F	V	P	F	☆	G	F	P	L	☆	L	☆	/	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	/	☆	R	☆	/	P	/		
		/A					/A	/A	/A	/V	/S																			/K			/L				
CH fb	☆	I	P	Q	A	L	L	F	V	P	L	☆	V	V	P	L	☆	F	☆	/	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	/	☆	R	☆	/	L	/		
		/A	/V	/F						/F	/S	/S																					/P				
				/A																																	
PHI	☆	V	P	Q	A	L	L	F	V	P	L	☆	V	F	S	L	☆	F	☆	/	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	☆	/	☆	R	☆	/	L	/		
		N	/R		/M	/L	/A	/I	/I	/S																											
										/G																											
	Ag-IV	Antigenic Site-III											Transmembrane Domain																								
	263	330	331	332	333	334	335	336	337	338	340	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460				
conserved	-	/	K	S	-	-	T	W	N	E	I	/	K	/	Y	V	L	-	S	A	G	-	L	-	-	L	-	-	-	-	F	-	-	-	C	C	
TW fb	H	/	☆	☆	V	R	☆	☆	☆	☆	/	☆	/	☆	☆	☆	M	☆	☆	☆	V	☆	I	V	☆	V	L	M	V	☆	L	M	T	☆	C		
	/R			I											/V				/A			/A			/S	V				/M		/R					
CH fb	H	/	☆	☆	V	R	☆	☆	☆	☆	/	☆	/	☆	☆	☆	M	☆	☆	☆	I	☆	T	A	☆	M	L	M	I	☆	L	M	T	☆	C		
				I	Q										/I				/A						/V												
																				/V																	
PHI	R	/	☆	☆	V	R	☆	☆	☆	☆	/	☆	/	☆	☆	☆	M	☆	☆	☆	V	☆	T	A	☆	M	L	M	I	☆	L	M	T	☆	C		
															/T				/A			/V			/T			/F	/T								
																				/I																	

表二、發病鼬獾腦組織中 RABV RNA 拷貝數約為發病狗之 40,000 倍。

核酸編號	動物別	樣品	RNA copies/ g
TW1955 (台東)	鼬獾	腦組織	1.168×10^{13}
TW3065 (台東)	狗	腦組織	2.89×10^8

參考文獻：

1. 行政院農業委員會。2010。實驗動物管理與使用指南第三版(擴充版)。
2. **Badrane, H., C. Bahloul, P. Perrin, and N. Tordo.** 2001. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J Virol* **75**:3268-76.
3. **Barbosa, T. F., D. B. Medeiros, E. S. Travassos da Rosa, L. M. Casseb, R. Medeiros, S. Pereira Ade, A. C. Vallinoto, M. Vallinoto, A. L. Begot, R. J. Lima, P. F. Vasconcelos, and M. R. Nunes.** 2008. Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. *Virology* **370**:228-36.
4. **CDC.** Protocol for Postmortem Diagnosis of Rabies in Animals by Direct Fluorescent Antibody Testing. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA.
5. **Charlton, K.M., G. A. Casey, and J. B. Campbell.** 1983. Experimental rabies in skunks: mechanisms of infection of the salivary glands. *Can J Comp Med.* **47**:363-9.
6. **Cliquet, F., E. Picard-Meyer, J. Barrat, S. M. Brookes, D. M. Healy, M. Wasniewski, E. Litaize, M. Biarnais, L. Johnson, and A. R. Fooks.** 2009. Experimental infection of foxes with European Bat Lyssaviruses type-1 and 2. *BMC Vet Res* **5**:19. doi: 10.1186/1746-6148-5-19.
7. **Cunha, E. M., A. F. Nassar, C. Lara Mdo, E. C. Villalobos, G. Sato, Y. Kobayashi, Y. Shoji, T. Itou, T. Sakai, and F. H. Ito.** Pathogenicity of different rabies virus isolates and protection test in vaccinated mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **52**:231-6.
8. **Dietzschold, B., W. H. Wunner, T. J. Wiktor, A. D. Lopes, M. Lafon, C. L. Smith, and H. Koprowski.** 1983. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:70-4.
9. **Gould, A. R., J. A. Kattenbelt, S. G. Gumley, and R. A. Lunt.** 2002. Characterisation of an Australian bat lyssavirus variant isolated from an insectivorous bat. *Virus Res* **89**:1-28.
10. **He, C. Q., S. L. Meng, H. Y. Yan, N. Z. Ding, H. B. He, J. X. Yan, and G. L. Xu.** Isolation and identification of a novel rabies virus lineage in China with natural recombinant nucleoprotein gene. *PLoS One* **7**:e49992.
11. **Hill, R.E. Jr., and G. W. Beran.** 1992. Experimental inoculation of raccoons

- (*Procyon lotor*) with rabies virus of skunk origin. *J Wildl Dis.* **28**:51-6.
12. **Irwin, D. J., W. H. Wunner, H. C. Ertl, and A. C. Jackson.** 1999. Basis of rabies virus neurovirulence in mice: expression of major histocompatibility complex class I and class II mRNAs. *J Neurovirol* **5**:485-94.
 13. **Kuzmin, I. V., M. Shi, L. A. Orciari, P. A. Yager, A. Velasco-Villa, N. A. Kuzmina, D. G. Streicker, D. L. Bergman, and C. E. Rupprecht.** Molecular inferences suggest multiple host shifts of rabies viruses from bats to mesocarnivores in Arizona during 2001-2009. *PLoS Pathog* **8**:e1002786.
 14. **Liu, Y., S. Zhang, X. Wu, J. Zhao, Y. Hou, F. Zhang, A. Velasco-Villa, C. E. Rupprecht, and R. Hu.** Ferret badger rabies origin and its revisited importance as potential source of rabies transmission in Southeast China. *BMC Infect Dis* **10**:234.
 15. **Liu, Y., S. Zhang, F. Zhang, and R. Hu.** Adaptation of a Chinese ferret badger strain of rabies virus to high-titered growth in BHK-21 cells for canine vaccine development. *Arch Virol* **157**:2397-403.
 16. **OIE.** 2013. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2013.
 17. **Seif, I., P. Coulon, P. E. Rollin, and A. Flamand.** 1985. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J Virol* **53**:926-34.
 18. **Stokes, W.S.** 2002. Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. *Institute for Laboratory Animal Research.* **43**:31-8.
 19. **Takayama-Ito, M., K. Inoue, Y. Shoji, S. Inoue, T. Iijima, T. Sakai, I. Kurane, and K. Morimoto.** 2006. A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein. *Virus Res* **119**:208-15.
 20. **Yang, D. K., Y. N. Park, G. S. Hong, H. K. Kang, Y. I. Oh, S. D. Cho, and J. Y. Song.** Molecular characterization of Korean rabies virus isolates. *J Vet Sci* **12**:57-63.
 21. **Zhang, S., J. Zhao, Y. Liu, A. R. Fooks, F. Zhang, and R. Hu.** Characterization of a rabies virus isolate from a ferret badger (*Melogale moschata*) with unique molecular differences in glycoprotein antigenic site III. *Virus Res* **149**:143-51.