

本土流感病毒株免疫雪貂產製抗體初步結果

李和欣¹、曾燦章²、林智暉²、邱淑君²、徐鳳光²、
蔡長垣¹、胡門興¹、繆柏齡¹、楊世仰³

¹衛生署疾病管制局血清疫苗研製中心

²衛生署疾病管制局研究檢驗中心

³衛生署疾病管制局第三組

摘要

為防治流感 (Influenza)，更快速地鑑定流感病毒株型別實屬必要。在各種實驗動物中，雪貂 (Ferret) 對人類的流行性感冒病毒具高感受性，因此經常被用於建立流行性感冒的動物實驗模式之用，本研究將用此一動物進行免疫實驗，希望藉此建立從檢體中培養流感病毒、實驗用雪貂飼養管理、雪貂免疫採血技術及病理研究技術等相關初步技術。同時由於實驗動物設施飼養雪貂，常會形成疫病感染伴隨人類疾病的共同發生，故本計畫亦擬就本局現有動物實驗相關設施加以強化。

本研究製備之流感抗血清經測試 7 株流感病毒株後，其中 1 號雪貂血球凝集抑制試驗力價最高的為 A/Wellington/1/2004，甚至比本次免疫選定病毒株 A/California/7/2004 高出一倍力價，分別為 2560 及 1280 倍，可是相差一倍的結果，在系列稀釋測量力價時可以忽略，但亦表示兩株流感病毒之抗原表現上十分相近，將來擬將本病毒株一系列演化過程所分離的病毒株，以本次雪貂血清檢測其力價，以做為其演化順序之參考。而 2 號雪貂球凝集抑制試驗力價較低，本次免疫選定病毒株 A/California/7/2004 力價僅為 640 倍，但亦可以適用於此型流感的檢測。

民國 94 年 1 月 9 日受理；民國 95 年 2 月 5 日接受刊載

通訊作者：李和欣；聯絡地址：台北市南港區昆陽街 161 號

E-mail：hslee@cdc.gov.tw

前言

流行性感冒是急性呼吸道疾病，所表現疾病特徵是發燒、肌肉疼痛、疲憊無力、鼻炎、咽喉疼痛和咳嗽等症狀，有時也會噁心、嘔吐或發生腹瀉下痢或病毒性肺炎和腸胃炎等症狀〔1〕。如果禽流感萬一演變為可人傳人，則可能帶來新的大危機，甚至比 SARS 更嚴重。因此我國衛生署四年內將投入三百億元，進行疫苗、藥物等幾道防線的籌備，全世界也積極進行研發抗流感藥物〔2〕。泰國、越南及歐洲等地陸續出現禽傳人的禽流感病例，目前全球已有一百零八人感染，五十四人死亡，全球的新型流感危機也升高〔3〕。政府預計將花四十四億元儲備抗病毒藥物，六十億元則是針對疫苗研發，籌備疫苗先導工廠，並建立量產的能力，萬一大流行才不會沒疫苗可用。

因流感病毒變異迅速，本局為加強流感之監測與防治，必須產製不同病毒株的流感抗體，以由其凝集力價協助診斷流感，所以積極研究如何從動物身上產製大量流感抗體〔4〕，以供進一步製備本土流感病毒株型別鑑定試劑，因此進行本實驗。一方面希望有助於本土流感相關基礎資料之建立與蒐集；另一方面亦可提供實驗過程中，建立流感雪貂動物模式的基本技術，供日後各研究單位有需要自製流感病毒抗體之參考。

人類是人類流行性感冒病毒之主要宿主之一，但具不同抗原株之流行性感冒病毒亦會感染許多種動物，包括鳥類、豬〔5〕、馬、貂和海豹〔6〕，其中雪貂（Ferret）是人類的流行性感冒之高感受性動物，且經常用來做為流行性感冒的動物實驗模式〔7〕，因此本實驗採用雪貂做為免疫用動物，並在 P2 負壓實驗室中進行實驗。但即使在具備相關實驗設施設備的情況下，進行雪貂免疫流感病毒實驗，在其過程中據文獻記載，也有造成病毒在雪貂與人類間相互傳染的情形〔8〕，所以本次流感免疫實驗之工作人員，均穿著適當防護衣物及裝備，避免直接接觸有流行性感冒感染之雪貂。

設施、材料與方法

（一）感染性動物實驗室

1. 具負壓設計之生物安全等級二級 (BSL2) 實驗室一間。
2. 空調進氣、排氣，須經 Hepa Filter(D.O.P. up to 99.995%)，室溫維持在 $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ ，並且每日檢查負壓及溫度。
3. 生物安全等級二級生物安全操作櫃 (BSC) 一台。
4. 雪貂飼養隔離箱 (Isolator) 一台。
5. 雙門滅菌器一台。

(二) 雪貂 (Ferret, *Mustella putoriusfuro*)

從美國 Marshall Farm 引進實驗用公雪貂共 2 隻，10-12 月齡，編號 1 號雪貂體重 1.70 Kg，編號 2 號雪貂體重 2.30 Kg。

(三) 流感病毒選擇

由於目前尚無選定免疫流感病毒株的機制，且本次實驗目的為建立本項實驗技術，故選擇本土最近流行較需要抗血清協助診斷的流感株 [9,10]，此次選用本局 93 年 9 月份分離、培養成功的本土 A 型流感病毒 (本局編號 A/Taipei/07702/2004，簡稱疾管局 7702 病毒)，該株病毒經基因定序分型為 A/California like/7/2004，為今年國人 A 型流感較常見的病毒株，以美國疾病管制局提供的該株病毒 (A/California) 抗血清測得 HI 力價為 160。業經以 MDCK 細胞株培養病毒液達 200ml，並分別測試病毒培養液之 TCID₅₀ 為 $10^6/\text{ml}$ ，HA 力價為 64，再經離心濃縮 10 倍可達 TCID₅₀ 為 $10^7/\text{ml}$ ，以提供免疫雪貂時不同濃度的流感病毒。

(四) 雪貂第一次免疫方法(11,14)

免疫方式取病毒液 1ml，分別滴入雪貂左右鼻腔各 0.5ml。

(五) 雪貂第一次免疫劑量

1. 編號 1 號雪貂免疫 1ml 疾管局 7702 病毒 (10^5 TCID₅₀，原液稀釋 10 倍)。
2. 編號 2 號雪貂免疫 1ml 疾管局 7702 病毒 (10^6 TCID₅₀)。

(六) 雪貂第二次免疫方法

免疫方式取病毒液 0.5ml 分成各 0.25ml，分別注射雪貂左右後肢腳掌皮下。

(七) 雪貂第二次免疫劑量

1. 編號 1 號雪貂免疫 0.5ml 疾管局 7702 病毒 (10^7 TCID₅₀，由原病毒液濃縮 10 倍製成)。
2. 編號 2 號雪貂免疫劑量同 1 號雪貂。

(八) 雪貂麻醉

麻醉劑使用法國 Virbac 藥廠製造之 Zoletil 50(舒泰 50)，內含 Zolezepine 與 Tiletamine，雪貂使用量為 0.1ml/0.4kg，購自台灣維克法蘭斯股份有限公司。

(九) 免疫間隔與過程

1. 雪貂第一次免疫後，第 14-15 天試血，測試抗體力價；繼續於一週內進行雪貂第二次免疫，再經 14-15 天進行第二次試血，預定如果雪貂之抗體 HI 力價達 320 倍以上，隨即進行心臟穿刺全採血。
2. 實驗過程中雪貂飼養管理由專人照料，每日觀察雪貂精神狀況，並測量體溫（雪貂正常體溫為 37.8-40°C）。使用過之器具、廢棄物等均經過雙門滅菌器滅菌後，依本局感染性廢棄物處理流程處理。

(十) 血球凝集試驗試劑製備：0.75%天筑鼠血球懸浮液：本法利用天筑鼠血球上的多醣體成份，吸附流感病毒的特性，以測試病毒濃度，所以混濁不沉澱為陽性，沉澱成一小圓點為陰性〔11,12,13〕。

1. 取天筑鼠血液約 5-10ml，加入 35ml 的抗凝劑保存液，充份混合後，可保存二星期。
2. 清洗血球：取 20ml 含抗凝劑血液，以 1200RPM 6 分鐘(各別離心機數據不同，需再測試)。
3. 倒掉上清液，再加入 PBS，輕輕混合，底層 packed RBC 若無法懸浮，不必強搖。

4. 再次離心重覆清洗直到上清液清澈為止。
5. 取三角瓶加入 20ml PBS，再取離心後中段 RBC 150ul，泡成 0.75% 的 RBC 懸浮液
6. 於 4°C 冰箱備用。

血球凝集試驗(Haemagglutination test, HA)：

1. 以 20X、40X、80X、160X、320X、640X、1280X 稀釋，應依病毒力價不同，訂定可能的偵測力價。
2. 最初 20X 稀釋：取 100 μ l 的病毒培養後胚胎蛋尿囊腔液加入 1.9ml 的 PBS。
3. 取一個 96 孔的 U 型盤，分別標示檢體名稱及稀釋倍數，RBC control 位置，每隻檢體做兩次實驗。
4. 每個 well 先加 50 μ l 的 PBS。
5. 第一排 well 加入 50 μ l 的 20X 病毒稀釋液，充份混合後，抽 50 μ l 到第二排 well 充份混合以此系列稀釋，最後 50 μ l 丟掉。
6. 每個 well 加入 50 μ l 先前製備之 0.75% 天筑鼠血球懸浮液。
7. 靜置室溫 30 分鐘或 4°C 冰箱 2 小時後觀察。

血球凝集抑制試驗(Haemagglutination inhibition test, HI)

1. 取 25 μ l 的 PBS 分注測定盤之每一孔(U-字型底)。
2. 加 25 μ l 血清入測定盤第一孔。並經 2 倍連續稀釋每一孔為 25 μ l。
3. 每一孔再加入 4HAU 的病毒抗原輕微震盪，並靜置 30 分鐘。
4. 每孔再加入 25 μ l 0.75% 雞紅血球懸浮液輕微振盪後靜置 40 分鐘，且對照組之正常 0.75% 雞紅血球懸浮液應可沉降至 U 字型底部。
5. HI 的力價是指血清最高稀釋濃度可以完全抑制 4HAU 的抗原。由傾斜觀察測定盤之凝集試驗會更精確。
6. 對照組的孔僅含有 25 μ l 0.75% 的雞紅血球懸浮液和 50 μ l 的 PBS。陰性對照組血清其力價不可大於 4 倍，且陽性對照組血清必須檢測出預

估之 HI 力價。

結果

(一) 免疫過程雪貂健康狀況 (表一):

1. 第一次免疫後, 1 號雪貂健康狀況良好無明顯感冒症狀, 2 號雪貂則在前幾天出現反應較遲緩、疲倦等狀況, 第 14 天出現打噴涕現象, 其餘健康狀況大致良好。
2. 第二次免疫後, 1 號雪貂體重明顯下降, 2 號雪貂健康狀況大致良好。

(二) 體溫變化 (圖一):

雪貂的體溫是以百靈耳溫槍測量雪貂耳內溫度, 此種方法並非標準方法, 經過實際健康雪貂的耳溫與肛溫量測 12 次的校正, 發現以耳溫槍量測雪貂耳溫平均與肛溫相差約 2.48°C , 校正後免疫雪貂體溫變化如圖一。第一次免疫後, 兩隻雪貂體溫皆僅些微上升, 但在第二次追加免疫後, 1 號雪貂體溫明顯上升 2°C , 2 號雪貂之體溫仍僅些微上升。

(三) 體重變化:

1. 第一次免疫後, 1 號雪貂體重維持在 1.70kg, 體重下降比率 0%; 2 號雪貂體重則由 2.30kg 降至 2.15kg, 體重下降比率 6.5%。
2. 二次免疫後, 1 號雪貂體重由 1.70kg 降至 1.58kg, 體重下降比率 7.0%; 2 號雪貂體重由 2.15kg 降至 2.08kg, 體重下降比率 3.2%。

(四) 雪貂流感免疫各時程抗體力價 (表一):

1. 於 94 年 4 月 28 日完成疾管局 7702 病毒培養, 接著進行 TCID₅₀ 與 HA 之檢測。94 年 5 月 24 日進行雪貂第一次免疫, 到 6 月 6 日試血 (第一次免疫後第 14 天), 抗體力價 HI 為 10。
2. 繼續於 94 年 6 月 9 日進行雪貂第二次免疫, 到 6 月 23 日試血 (第二次免疫後第 15 天), 兩隻雪貂之抗體 HI 力價均達 1280 倍, 隨即進行心臟穿刺全採血, 分別採得 85ml 及 70ml 血液。

(五) 免疫後雪貂之血清對各型流感病毒中和之抗體力價 (表二):

1. 1 號雪貂免疫後所採血清，對本次免疫用病毒 H3N2 (A/Taipei/07702/2005) 之抗體力價 HI 為 1280，如再用其他 7 株流感病毒株，測試 1 號雪貂免疫後所採血清之抗體力價，其 HI 較高者分別為 2560 (A/Wellington/1/2004)、1280 (A/California /7/2004)、640 (A/Fujian/411/2002)。
2. 2 號雪貂免疫後所採血清，對本次免疫用病毒 (A/Taipei/07702/2005) 之抗體力價 HI 為 1280，如再用其他 7 株流感病毒株，測試 2 號雪貂免疫後所採血清之抗體力價，其 HI 較高者分別為 640 (A/Wellington/1/2004)、640 (A/California /7/2004)、640 (A/Fujian/411/2002)。

討論

本次實驗算是前驅性實驗，首度引進實驗用雪貂，利用本實驗過程，培訓了 3 位雪貂飼養管理同仁外，並以此次雪貂流感病毒感染模式的經驗，參考本局感染性實驗室規範，建立了雪貂飼養管理的標準操作程序。後續將藉本次經驗持續改善實驗室之硬體設備，如應加裝供氣排氣間微電腦聯動裝置，以維持人員進出實驗室的負壓。同時由於雪貂免疫前後體溫變化是判定流感免疫是否有效的依據之一，未來將嘗試以植入體溫晶片方式量測體溫，以免造成雪貂的緊迫。

由於雪貂對流感病毒的易感受性，本次實驗能成功，主因使用了兩個具隔離屏障的飼養系統：未免疫雪貂飼養於密閉式飼養安全隔離系統設備 (IVC) 及免疫期間的雪貂飼養隔離箱，因為在文獻探討中了解必須避免雪貂接觸到流感病原 [14]，因雪貂對流感十分敏感，為產製單一性具特異性的抗病毒血清，必須是從未感染過任何流感病毒的雪貂，並且在免疫前必須再次測量該雪貂的流感抗體力價，若對某一株流感力價上高，代表曾接觸過

該病毒則不適合產製流感抗體，因免疫後將干擾不同株流感力價反應，這些飼養管理的潔淨操作，都寫在感染性實驗動物標準操作程序中。

本次實驗採用的血球凝集試驗(Haemagglutination test, HA)及血球凝集抑制試驗(Haemagglutination inhibition test, HI)是參考多篇相關期刊的初步方法〔11,12,13〕，疾病管制局正在研擬標準作業程序中，由表二雪貂免疫後所採血清，經測量不同病毒株的抗體力價來看，本次抗血清對 A/Wellington/1/2004 及 A/California/7/2004 兩株力價反應最佳，有相當高的靈敏度，兩隻雪貂抗血清各達 2560、1280 及 640 倍，可見此株本土 A 型流感株已與 A/California/7/2004 產生此微變異。而以表二第七、八項之流感株 (H1N1) 其抗血清力價已下降至 <20，代表此抗血清具特異性，且可區別出兩種不同型別的流感病毒，將可協助日後本土流感株鑑別診斷流感的檢驗。本次 A 型流感本土病毒株免疫雪貂血清的製備實驗，已獲得的經驗除可提供本局研究檢驗中心，後續其他本土流感病毒株免疫雪貂實驗之重要參考外，也可提供疫苗中心與國衛院，研發流感疫苗保護力之參考。

致謝

感謝台大醫學院陳培哲教授及所有給予寶貴意見的專家學者，本研究全體參與工作的夥伴，將繼續努力。

參考文獻

1. Thompson CI, Barclay WS, Zambon MC. Changes in in vitro susceptibility of influenza A H3N2 viruses to a neuraminidase inhibitor drug during evolution in the human host. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:759-765.
2. Kilbourne ED, Smith C, Brett I, et al. The total influenza vaccine failure of 1947 revisited: major intrasubtypic antigenic change can explain failure of vaccine in a post-World War II epidemic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10748-10752. Epub 2002 Jul 22. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA*

2003;100:764.

3. Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Taubenberger JK, et al. Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3166-3171.
4. Abed Y, Coulthart MB, Li Y, et al. Evolution of surface and nonstructural-1 genes of influenza B viruses isolated in the Province of Quebec, Canada, during the 1998-2001 period. *Virus Genes* 2003;27:125-135.
5. Wesley RD, Tang M, Lager KM. Protection of weaned pigs by vaccination with human adenovirus 5 recombinant viruses expressing the hemagglutinin and the nucleoprotein of H3N2 swine influenza virus. *Vaccine* 2004;22:3427-3434.
6. Benenson AS. *Control of Communicable Diseases Manual* (16th Edition) American Public Health Association. Washington: 1995.
7. Fox JG, Lipman NS. Infections transmitted by large and small laboratory animals. *Infectious Disease Clinics of North America* 1991;5:131-163.
8. Marini RP, Adkins JA, and Fox JG. Proven or potential zoonotic diseases of ferrets. *JAVMA- Journal of the American Veterinary Medical Association* 1989;195:990-994.
9. Yoshikawa T, Suzuki Y, Nomoto A, et al. Antibody responses and protection against influenza virus infection in different congenic strains of mice immunized intranasally with adjuvant-combined A/Beijing/262/95 (H1N1) virus hemagglutinin or neuraminidase. *Vaccine* 2002;21:60-66.
10. Schweiger B, Zadow I, Heckler R. Antigenic drift and variability of influenza viruses. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2002;191:133-138.
11. Small PA Jr, Waldman RH, Bruno JC, et al. Influenza infection in ferrets: role of serum antibody in protection and recovery. *Infect Immun* 1976;13:417-424.

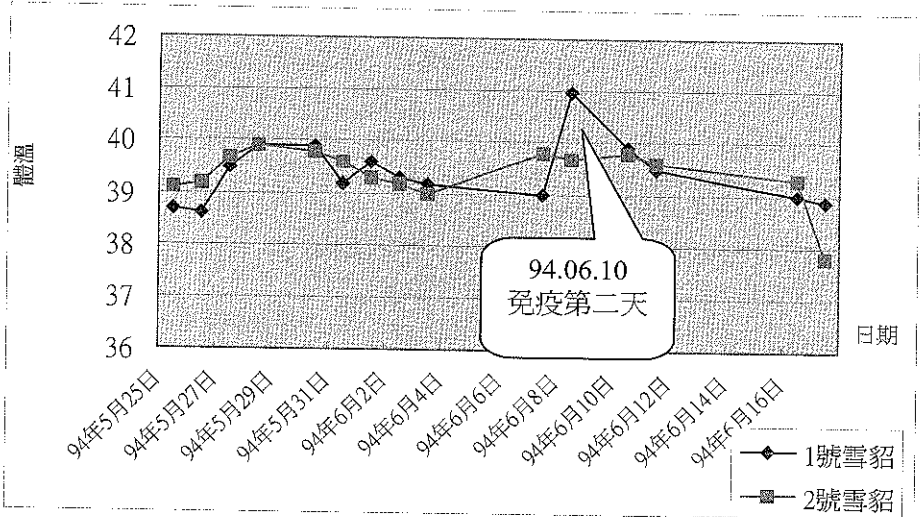
12. Veijalainen PM, Neuvonen E, Niskanen A, et al. Latex agglutination test for detecting feline panleukopenia virus, canine parvovirus, and parvoviruses of fur animals. *J Clin Microbiol* 1986;23:556-559.
13. Stephenson I, Wood JM, Nicholson KG, et al. Sialic acid receptor specificity on erythrocytes affects detection of antibody to avian influenza haemagglutinin. *J Med Virol* 2003;70:391-398.
14. Lipatov AS, Hoffmann E, Salomon R, et al. Cross-protectiveness and immunogenicity of influenza A/Duck/Singapore/3/97(H5) vaccines against infection with A/Vietnam/1203/04(H5N1) virus in ferrets. *J Infect Dis* 2006;194:1040-1043.

表一、雪貂免疫流感病毒 (A/Taipei/07702/2004) 免疫期程與相關結果

免疫階段	第一次免疫		間隔 2 天	第二次免疫		備註
期間	14 天			15 天		
日期	5/24	6/6		6/9	6/23	
免疫劑量 或 試血力價	1 # 1ml HA 力價 64	1 # HI 10		1 # 0.5ml 10 ⁷ TCID ₅₀	1 # HI 1280	第一次免疫 體重下降係 計算 5/24-6/6 之變化。 第二次免疫 體重下降係 計算 6/6-6/23 之變化。
	2 # 1ml HA 力價 64	2 # HI 10		2 # 0.5ml 10 ⁷ TCID ₅₀	2 # HI 1280	
免疫路徑	左右鼻腔各 0.5ml	—		左右後肢腳 掌皮下注射 各 0.25ml	—	
體重下降比率	—	1 # 0% 2 # 6.5%		—	1 # 7.0% 2 # 3.2%	
健康狀況	1 # 良好 2 # 微疲倦	1 # 良好 2 # 打噴涕		1 # 良好 2 # 打噴涕	1 # 消瘦 2 # 微消瘦	
體溫變化	1 # 免疫後第 3 天微升 2 # 免疫後第 3 天微升			1 # 免疫後第 2 天微升 2 # 免疫後第 3 天升 2℃		

表二、雪貂免疫後所採血清，對各型流感病毒抗體力價

REFERENCE ANTIGENS	表面抗原	FERRET ANTISERA(HI 力價)	
		1 號雪貂	2 號雪貂
1 A/Wellington/1/2004	H3N2	2560	640
2 A/California/7/2004	H3N2	1280	640
3 A/Fujian/411/2002	H3N2	640	640
4 A/Wyoming/03/03	H3N2	320	160
5 A/Panama/2007/99	H3N2	<20	20
6 A/New Caledonia/20/99	H1N1	<20	<20
7 B/Hong Kong/330/2001	H1N1	<20	<20



圖一：雪貂流感免疫過程之體溫變化(經過肛溫校正)