

計畫編號：MOHW104-CDC-C-114-113102

衛生福利部疾病管制署 104 年委託科技研究計畫

計畫名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備

## 104 年 度/全 程 研 究 報 告

執行機構：國防醫學院

計畫主持人：謝博軒

研究人員：黃裕權、葉嘉翠、楊淳米、林文欽、張聿秀、謝欣倫、  
林慧足、吳雪齡、譚立政

執行期間：104 年 1 月 1 日至 104 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先  
徵求本署同意\*



## 目 錄

一、摘要.....	3
(1) 中文摘要.....	3
(2) 英文摘要.....	4
二、本文.....	5
(1) 前言.....	5
(2) 材料與方法.....	9
(3) 結果.....	15
I. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(一)Type A 流感病毒株 A/Taiwan/82725/2014 試驗紀錄及結果:.....	15
II. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二)-1 Type B 流感病毒株 B/Taiwan/76712/2015 試驗紀錄及結果:.....	17
III. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二)-2 Type B 流感病毒株 B/Taiwan/76712/2015 試驗紀錄及結果:.....	20
IV. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(一)Type A 流感病毒株 A/Taiwan/S4913/2015 試驗紀錄及結果.....	22
(4) 討論.....	25
(5) 重要研究成果及具體建議.....	27
(6) 參考文獻：請依台灣醫誌編排方式.....	30
三、附錄.....	32

## 一、摘要

### (1) 中文摘要(字數以不超過六百字為原則)。

人類的流感病毒主要為 A 型及 B 型流感病毒，但是流感為 RNA 病毒，而 RNA 病毒則容易產生基因突變及重組，病毒抗原的變異性(包括 antigen drift 及 antigen shift)則成為此病毒最棘手也最需掌握的重要特性。世界各地之季節性流感的高度急性呼吸道傳染力，造成高致病力及顯著之致死率。雪貂到目前為止被認為是對流感病毒反應最佳、研究人類流感病毒最理想的小型動物模式，而流感病毒感染雪貂所產生之抗病毒血清，也為國際上判定不同流感病毒血清型的依據。利用雪貂 (ferret) 血清進行血球凝集抑制試驗 (HI) 來分析流感病毒(包括 A 及 B 型)的抗原性。故以雪貂製作抗血清後可對監測台灣流感病毒的抗原變化的掌握非常重要。本計畫由台灣疾病管制署挑選台灣主要流行之病毒株與對疫苗株低反應株，分讓至本所進行病毒感染雪貂、抗血清製備及測定效價等，運用本所已有流感病毒免疫雪貂之動物模式完成台灣疾病管制署所挑選之流感病毒抗原至少三株的抗病毒血清製備，可提供疾病管制署作為病毒抗原分析鑑定使用，達到台灣流感相關基礎資料之建立與蒐集，增加流感病毒演變了解之目的，並可提供疫苗株選擇的參考，協助台灣疾病管制署分析流感病毒株抗原的變異，以及與疫苗株間之差異。

關鍵詞：流感病毒、雪貂、抗血清

(2) 英文摘要(字數以不超過六百字為原則)

Human Influenza, caused by influenza A and influenza B viruses, is a highly infectious acute respiratory disease spreading around the world in seasonal epidemics resulting in high morbidity and significant mortality. The high mutation rate of the RNA genome is the main reasons for antigenic shift and drift which cause exchange of individual genome segments between different virus subtypes during a mixed infection and the relatively rapid accumulation of point mutations in virus surface glycoproteins. The ferret is considered to develop a disease process that is most like human influenza infection and they are traditionally used to study influenza because they are naturally susceptible to the virus. The model is regularly used for the production of highly specific antisera. The antigenic types of influenza viruses are determined by using the haemagglutination-inhibition (HI) tests with postinfection ferret sera. The postinfection ferret sera are required for characterizing the antigenicity of influenza viruses. For surveillance of influenza viruses in Taiwan, the postinfection ferret sera are required.

In this study, we used the ferrets as the animal model for influenza viruses, including the bleeding and immunization of ferret. The Taiwan CDC selected the predominant circulating strains of influenza viruses in Taiwan for IPM-NDMC to immune ferrets and to generate local strains in Taiwan of the ferret antisera. These sera provided Taiwan CDC to identify the serotype of the new isolates from Taiwan and characterized the antigenicity of major circulating isolates in Taiwan.

keywords : Influenza virus, ferret, antisera

## 二、本文

### (1) 前言：

民國88年6月23日公布實施的「傳染病防治法」將流感納入第三類傳染病，而衛生署「我國因應流感大流行準備第二期計畫」之計畫自99年6月1日起至104年12月31日為期5年半<sup>1</sup>，世界衛生組織(WHO)於98年4月公布「流感大流行準備及應變指引」<sup>2</sup>，由以上法令規定可見我政府及世界衛生組織對流感病毒引起之傳染病的重視。

目前對於流感病毒分離株之血清分型，是利用雪貂(ferret)血清進行血球凝集抑制試驗(HI)鑑定<sup>3</sup>，以往血清來源皆由美國疾病管制署(CDC)提供，但其提供的量有限，無法提供疾病管制署完整分析台灣每年分離的病毒株，易造成有些病毒抗原性已改變而無法即時偵測。一但爆發全球性流感大流行，鑑定血清國際需求量增加時，更可能出現血清短缺之困境。因此製備流感病毒鑑定血清，實在有其必要。流感病毒相當容易發生突變及基因片段重組，以藉此逃避人類免疫系統之監控，每年WHO(世界衛生組織)會依照當年流行的病毒株而更新流感疫苗注射的政策，然而台灣有極高的人口密度以及各式經濟畜禽的密集飼養系統，以上種種因素使台灣成為新型流感流行的高風險國家。所以必須嚴密監控不同流感之流行動態將是刻不容緩的工作。然而流感病毒的抗原性是利用雪貂(ferret)血清進行血球凝集抑制試驗(HI)來分析。雪貂動物是流感病毒的天然宿主在感染流感後產生的臨床病徵、病理現象及免疫反應與人類非常相似，會有發燒、流鼻水、打噴嚏、咳嗽、眼睛流眼淚、

厭食、體重減輕等症狀。流感病毒將感染雪貂和人類呼吸道內類似的纖毛上皮細胞，並經由  $\alpha$ -2,6-糖苷鍵結( $\alpha$ -2,6-glycosidic linkage)黏附於呼吸道內上皮細胞表面的唾液酸(sialic acid)上。而且雪貂可在自然的狀態下感染 A 或 B 型流感病毒，從而提供了一個完整的機制，來研究觀察完整人類族群中流感病毒的相互傳播感染作用和病毒之糖蛋白序列的變異。所以雪貂是到目前為止被認為是對流感病毒反應最佳、研究人類流感病毒最理想的小型動物模式，而這個實驗動物常用來生產高特异性流感病毒抗血清，及用來評估流感病毒的毒力、個體與個體之間的傳染力、疫苗效價及藥物評估<sup>4-7</sup>。雪貂對於 A 形流感病毒可以模擬病毒感染人類的狀況，但對於 B 型流感病毒，則有較低的感受力。流感病毒感染雪貂所產生之抗病毒血清，為國際上判定不同流感病毒血清型的依據。

感冒病毒是屬於正黏液病毒(orthomyxoviridae)的一群，病毒體內具有負股的RNA，依其核蛋白(nucleoprotein)及表面膜蛋白可分為A、B、C三型，其中被分離出來的A型感冒病毒，共有16種HA及9種NA<sup>8</sup>。此病毒與一般的RNA病毒不同，其基因很容易突變，多變異為此病毒最重要的特性，包括antigen drift及antigen shift。antigen drift乃由於HA或NA的點突變產生變異株，antigen shift則指當有2種病毒同時感染1個細胞時，病毒的8段基因可能互相重組而產生新的變種<sup>9</sup>。在近代人類的歷史中，有三次流感大流行，分別為1918西班牙流感、1957亞洲流感及1968香港流感，造成許多生命的喪生及經濟的損失。最近許多研究顯示1918有可能是病毒本身發生的一些點突變之累

積，而直接傳染至人類造成的全球的大流行<sup>10-11</sup>。

近期在1997年香港發生的高病原性H5N1流感病毒株的感染，其為由鳥類傳染至人類具有高致病率及致死率的病毒。亞洲的高病原性H5N1流感病毒株在亞洲、歐洲、非洲的水鳥、家禽及候鳥中持續存在及相互感染。2003年以後，感染人類的案例其臨床死亡率的報導高達60%。H5N1病毒株具有高度的變異性，易於逃避免疫系統的追補及帶有抗藥性，至目前為止已有許多禽流感病毒亞型的出現，目前已有十個亞型，包括Clade 0之1997香港株，Clade 1 於2004-2005 間在越南、泰國、柬埔寨等地所分離出，Clade 2.1 流行於印尼當地，Clade 2.2 則由青海地區的水鳥所分離出，並將病毒由中國帶至東亞及非洲，造成人類的感染，Clade 2.3 病毒株流行於中國南方沿海各省，另外陸續有Clade 3-9 的不同亞型被分離出<sup>11-13</sup>。

2009年四月爆發的新流感疫情，許多文獻及利用此種動物模式，研究新型流感病毒，包括免疫反應、臨床症狀、致病力等等。新型流感起源於豬流感病毒，為北美洲與歐洲的兩株豬流感病毒混合重組而成。一般而言，豬流感病毒傳染給人類的機會不大，感染者多數為豬隻的飼養者，但有可能成為人傳人。型流感感染人後之臨床症狀為發燒、下痢、咳嗽、喉嚨痛，有些患者會引起嚴重的肺炎導致必須住院治療，對於孕婦及慢性病患者，新型流感則存在潛在性的危險<sup>14-16</sup>。

由於流感病毒本身具備持續突變的能力，使其可躲避人體免疫系統的攻擊。對抗流感病毒感染可以仰賴抗病毒藥物，而疫苗的施打也是一個重要的防疫措施。隨著病毒演化的結果，



不同亞型之流感病毒已對不同種類之抗病毒藥物產生抗藥性，疫苗也因病毒抗原性的突變失去其預期的保護效力。有鑒於此，對於流感病毒之抗原性、抗藥性以及演化趨勢等資訊的即時監視是必需且重要的。為監測台灣流感病毒的抗原變化情形，必須倚賴雪貂抗血清的製備，提供疾管署分析比較台灣每年流行的病毒株與世界衛生組織建議之疫苗株是否有差異，藉此提供疫苗之評估及監測本土病毒株之演化。

流感疫苗之選用，具有全球一致性，由於流感病毒時常發生變異，世界衛生組織（WHO）每年均依據全球 83 個國家地區，超過 110 個監測點所偵測之流感病毒，每年 2 月中召集會議研商推測北半球下一年可能流行的病毒株，公開宣佈建議疫苗成分，由製造廠商據以生產供應給各國使用<sup>17-18</sup>。近年來，流感疫苗均包含有同時流行的二種 A 型及一種 B 型病毒株。而為防治流感，快速鑑定流感病毒株及監測台灣之流感病毒株與世界衛生組織所建議之疫苗株是否有差異，有其必要性，建立台灣本土流感病毒之抗血清，將有助於流感疫情之防治。由於分析鑑定流感病毒之抗血清由雪貂免疫而來，雪貂由國外進口相當昂貴且耗時。國防醫學院預防醫學研究所國內少數具有繁殖雪貂及操作雪貂實驗的研究所，且本所擁有國內少數操作高致病病原之動物實驗室，目前我們已建立(i)雪貂的繁殖技術 (ii)流感病毒於不同生物等級動物實驗室標準操作流程及實務經驗流感病毒於不同生物等級動物實驗室標準操作流程及實務經驗 (iii)測試血球凝集抑制試驗（HI）及中和性抗體效價 (iv)病毒攻擊性實驗:包括評估免疫反應、偵測鼻腔灌洗液之病毒量、體重

及體溫之變化、病徵之評估。因此國防醫學院預防醫學研究所可以提供疾病管制署流感病毒雪貂的抗病毒血清，應用於台灣流感的監視，提供實驗室用於檢驗判定，以辨認病毒之型別及變異，期能在流感防疫體制上及早採取適當防治措施，避免無謂的損失及民眾恐慌。

維持流感病毒免疫雪貂之動物模式，製備不同流感病毒感染雪貂所產生之不同台灣流感病毒之雪貂抗血清，提供疾病管制署做為病毒抗原分析鑑定不同流感病毒血清型的依據，幫助台灣流感相關基礎資料之建立與蒐集，增加流感病毒演變的了解，能即時偵測台灣流感病毒抗原性的變化，並能快速製備雪貂抗流感病毒血清並鑑定是否具抗原性變異，將有助於台灣流感病毒發生及變異之監測及疫苗施打策略的規劃與預防。

## (2) 材料與方法。

### I. 病毒培養：

- i. 以 MDCK 細胞擴增病毒：將 MDCK 細胞，以含 10% FBS 之 DMEM 培養液培養於 25T flask 中長至八分滿。將 MDCK 細胞以 PBS 沖洗兩次除去血清，加入 1-2ml 含 0.03% BSA 之無血清 DMEM 覆蓋細胞。加入病毒液，靜置一小時讓病毒吸附細胞，期間每 15 分鐘輕微搖晃一次。加入 4ml 含 0.03% BSA 及 2 ug/ml TPCK-Trypsin 之無血清 DMEM，置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養，每日觀察，當細胞有 CPE 現象時即可收集培養液，離心去除細胞破片後存於-70°C 冷凍保存。以菌斑試驗(Plaque assay)或 TCID<sub>50</sub> 試驗測定病毒效價。

- ii. 以雞胚蛋擴增病毒: 雞胚蛋以照蛋器觀察畫出氣室及雞胚頭部，於氣室邊緣上方 5 mm 處，避開血管及頭部做一記號，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 燻蒸消毒蛋殼後，於記號處鑽孔。以 1 mL 針筒抽取病毒液，從孔洞垂直插入尿囊腔(Allantoic Cavity)，注入 0.2 mL 病毒液，接種完成後以膠帶封住洞口，置於 35°C 恆溫箱中培養 40~72 小時。將雞胚蛋放置於 4°C 下 4 小時待血管收縮後，抽取尿囊液，分裝冷凍保存於 -70°C 中。以菌斑試驗(Plaque assay)或 TCID<sub>50</sub> 試驗測定病毒效價。

II. 以菌斑試驗(Plaque assay)測定病毒效價：

取 MDCK 細胞 1 x 10<sup>6</sup>/孔，以含 10% FBS 之 DMEM 培養液培養於 6 孔盤中，37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養 16 小時。細胞以 PBS 沖洗兩次除去血清，每孔加入 0.5ml 含 0.03% BSA 之無血清 DMEM 覆蓋細胞。將待測病毒以無血清 DMEM 做 10 倍系列稀釋，並各取 200 ul/孔感染 MDCK 細胞。靜置一小時讓病毒吸附細胞，期間每 15 分鐘輕微搖晃一次以免細胞乾掉。吸去並丟棄培養液，加入含 0.03% BSA、2 ug/ml TPCK-Trypsin 及 2% SeaPlaque agarose 之無血清 DMEM，待洋菜膠凝固後，置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養約 3-4 天，觀察菌斑產生。加入 10% 福馬林溶液靜置 30-60 分鐘固定細胞，以刮勺小心挖去洋菜膠。加入結晶紫溶液染色約 30 分鐘，以清水沖去多於染劑。待培養盤風乾後，計算菌斑數及病毒效價。

三、以 TCID<sub>50</sub> 測定病毒效價：

取 MDCK 細胞  $1.5 \times 10^4$ /孔，培養於 96 孔盤， $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養 16 小時。將待測病毒以含 0.03% BSA、2 ug/ml TPCK-Trypsin 無血清 DMEM 做 10 倍序列稀釋。細胞以 PBS 沖洗兩次除去血清，並各取 100 ul/孔稀釋之病毒液感染 MDCK 細胞，每一稀釋倍數作八重複，置於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  條件二氧化碳培養箱中觀察細胞病變(CPE)3-7 日，依據 Reed-Muench method 計算病毒效價。

#### 四、病毒濃縮:

病毒培養液離心去細胞碎片，以 Amicon Ultra-15 10K 濃縮離心管，swing bucket 離心轉子之轉速為 4000xg，fixed angle 離心轉子之轉速為 5000xg，離心濃縮病毒。

#### 五、雪貂之繁殖飼養管理：

- i. 雪貂之繁殖: 目前使用之雪貂，為本所自行繁殖。雪貂之繁殖季為每年 3-8 月，繁殖期間需適當調整日照時數，促進雪貂發情。雪貂於交配成功後一星期將公貂及母貂分開，分娩前 7-10 天將母貂安置於巢箱中，適應環境。雪貂懷孕期為 42 天，每胎可產 1-13 隻幼貂，初生幼貂體重僅約 10-20 公克，至 3 週齡大體重約達 200 公克，約 6-8 週離乳。母貂懷孕期間其營養需求較大，需增添飼料至每日 100 公克。
- ii. 雪貂之飼養管理: 每隻成貂每日約食用 50 公克貂飼料，雪貂對熱很敏感，其最適室溫為  $23^\circ\text{C}$ ，為夜行性動物，夏日照時間 13 小時，冬日照時間 10 小時，春（1-3 月）秋兩季各發情一次，繁殖以一公一母為原則，約 5 個月齡性成熟，6 個月齡以上為成貂，母貂體重約 0.5-1.0 公斤，公貂體重約

1.0-2.0 公斤，平均壽命 5-11 年。相關雪貂之飼養管理皆依本所實驗動物中心規範之下列各項操作流程執行：

- A. 依“LAC-SOP-005 實驗動物接收作業辦法”，進行實驗動物接收就地檢疫工作。
- B. 依“LAC-SOP-011 實驗動物檢疫作業辦法”，進行實驗動物檢疫工作。
- C. 依“LAC-SOP-022MD 雪貂飼養管理作業辦法”，進行實驗動物雪貂飼養管理工作。
- D. 依“LAC-SOP-018 實驗動物例行健康監測作業辦法”，進行實驗動物雪貂健康監測作業工作。
- E. 依“LAC-SOP-033 實驗動物中心清潔及消毒作業辦法”，進行實驗動物雪貂檢疫及飼育室清潔及消毒工作。
- F. 依“LAC-SOP-031 動物飼育實驗室環境維持作業辦法”，進行實驗動物雪貂檢疫及飼育室環境維持工作。

#### 六、雪貂免疫：

於生物安全等級二級動物（ABSL2）實驗室中進行流感病毒免疫，流感病毒免疫雪貂的步驟如下：

- i. 雪貂麻醉：感染、免疫與採血全部過程，皆須進行麻醉，麻醉劑使用法國 Virbac 藥廠製造之 Zoletil 50（舒泰 50,購自台灣維克法蘭斯股份有限公司），內含 Zolezepine 與 Tiletamine，雪貂使用量為 0.1ml/0.4kg，另加 0.005mg/kg 之 atropine。
- ii. 取 1 ml 流感病毒培養液(HA 力價約 1024~2048 或  $10^6$ /ml TCID<sub>50</sub>)，分別滴入麻醉雪貂之兩個鼻腔，完成免疫。
- iii. 十四天後，由頸靜脈採血 2-3ml 檢測抗體力價，若抗體力價

已達 HI 640 以上，則執行實驗終點心臟全採血後犧牲。

- iv. 若抗體力價尚未達到需求時，再次追加免疫，方式為腳掌皮下注射 0.25 ml 病毒，再經十四天後採血檢測抗體力價。

#### VII. 實驗動物室相關硬體設施：

主要實驗地點位於國防醫學院預防醫學研究所動物中心，本中心設有生物安全等級二級之感染性動物實驗室 (BSL2+級)，實驗室為負壓隔離設計，備有可操作生物安全等級二級之生物安全操作櫃與雙門滅菌器，實驗過程產生之廢棄物經過滅菌處理避免汙染環境。實驗過程亦確保動物實驗相關器材之清潔及無菌狀態。實驗中鼻滴定免疫雪貂一週內可暫飼養於負壓 IVC 或負壓層流架中，每組 IVC 主機及負壓層流架有獨立的 Prefilter 及 Hepa Filter ( D.O.P. up to 99.97%)過濾裝置，進行感染病原的汙染控制。

#### VIII. 病毒與抗血清價位測定：

- i. 紅血球懸浮液製備：抽天竺鼠或雞血與阿氏抗凝劑混合均勻。血球用無菌雙層紗布過濾，以 pH 7.2 PBS 洗三次，製成 10% 儲存懸浮液，置 4°C 冰箱備用，(須於一週內使用)。試驗時使用 0.75%紅血球懸浮液。
- ii. 紅血球凝集效價測定(HA)：取病毒液於 V-plate 上，以 PBS (PH 7.2) 做 2 倍稀釋。自第二列起加 25 ul PBS 於所有微孔(well)中。第一列加 50ul 病毒抗原。用 25 uL 微量分注器，做連續稀釋。之後再各加 25 mL PBS 於所有微孔中使總體積為 50 ul。加 50 ul 的 0.75%天竺鼠紅血球懸浮液至所有微孔中，並做三重複之紅血球對照: 50 ul 紅血球加 50ul PBS。

用微量振盪器混合均勻。加蓋，放室溫或 4°C 冰箱一小時。  
結果判讀：最高稀釋倍數能產生部分或完全紅血球凝集現象者，為 1 個凝集單位(1 HA unit)。

- iii. 血清 RDE 酵素(receptor destroy enzyme)前處理步驟：
- iv. 將 100 ul 血清檢體與 400ul 之 RDE(100 units/ml)混合，vortex 震盪後於 37°C 作用隔夜。加入 300ul 之 sodium citrate(2.5%)，vortex 震盪混合後，於 56°C 作用 30 分鐘，再加入 200 ul 的 PBS (Final serum dilution 為 1:10) ，於-20°C 保存。
- v. 紅血球凝集抑制試驗 (HI)：將抗血清 (Type Specific Antiserum)，從 1/10 開始做 2 倍稀釋，每一稀釋序列作八重複，即自第二行至第六行，每微孔先加入 25ul PBS。於第一行加入 50ul 抗血清(RDE 處理過)，用 25ul 微量分注器混合稀釋之。加 25ul 的 4 個凝集單位(4 HA unit)之病毒抗原至每個微孔。用振盪混合均勻，將病毒和血清混合液置室溫作用一小時。加 50 ul 之 0.5%天竺鼠紅血球懸浮液至每個微孔中，振盪混合均勻，加蓋置室溫或 4°C 冰箱，1~2 小時。試驗同時，須包括抗原的效價反測(Ag Back Titration)，抗血清對照及紅血球對照。
- vi. 抗原效價反測(Ag Back Titration)：從第二行至第六行，每微孔加入 25 ul PBS。於第一行加入 50ul 之 4 個血球凝集單位 (4 HA unit)的稀釋病毒。用 25ul 微量分注器向二-六行作序列稀釋。每個微孔再加入 25 ul PBS 使總體積 50 為 ul。每個微孔再加入 50 ul 0.75% 天竺鼠血球懸浮液。混合均勻，置 4 °C 冰箱或室溫 1-2 小時。

(3) 結果:

I. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(一)Type A 流感病毒株  
A/Taiwan/82725/2014 試驗紀錄及結果:

試驗步驟		操作場所	完成日期
1.	試驗動物(物質)確認及準備		
1.1	雪貂體溫晶片施打及實驗前檢血清採樣篩檢	P2-2 實驗室	2015.04.10
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定免疫 D(0)	083-P2 實驗室	2015.04.17
3	每日進行雪貂飼育觀察	083-P2 實驗室	2015.04.17~ 05.13
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(10)，血清送測抗體效價。	083-P2 實驗室	2015.04.27
5	雪貂抗血清之製備試驗雪貂進行第二次流感病毒鼻滴入試驗 D(17+0) (第二次免疫)	083-P2 實驗室	2015.05.04
6	第二次採血及血清分離，於 D(17+7)	083-P2 實驗室	2015.05.11
7	第三次採血及血清分離於 D(17+9)，血清送測抗體效價。	083-P2 實驗室	2015.05.13
8	雪貂抗血清之製備試驗結束 D(17+9)即 D(26)。	083-P2 實驗室	2015.05.13
9	實驗室滅菌及清消	083-P2 實驗室	2015.05.14~ 19



1. 試驗動物(物質)品質確認。

操作者

1.1 雪貂試驗動物「晶片及飼育編號對照紀錄表」

LAC-SOP-039-F01(附件一)

林文欽 楊淳米

1.2 雪貂血清背景值篩檢結果血球凝集抑制試驗  
結果。

實驗前送血清樣本至疾管署研檢中心進行

楊淳米 林文欽

H3N2 流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<10

及疾管署研檢中心

1.3 雪貂阿留申病毒血清酵素免疫分析試驗(簡寫  
為 ELISA)報告(附件二)

楊淳米 吳雪齡

免疫後第一次採血及血清分離於 D(10)，血清送測抗  
體效價檢測結果。

雪貂編號	HI
273	320
274	160

葉嘉翠 楊淳米

及疾管署研檢中心

2. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(17+7)。

葉嘉翠 楊淳米

及疾管署研檢中心

免疫後第三次採血及血清分離於 D(17+7) 及  
D(17+9)，血清送測抗體效價檢測結果。

雪貂編號	HI
273	320
274	320

林文欽 楊淳米

及疾管署研檢中心

II. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二)-1 Type B 流感病毒株  
B/Taiwan/76712/2015 試驗紀錄及結果：

試驗步驟	操作場所	完成日期
1. 試驗動物(物質)確認及準備	076-P2 實驗室	2015.07.09
2 雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	2015.07.10
3 每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2015.07.10~09.02
4 持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(12)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2015.07.22
5 雪貂抗血清之製備試驗雪貂進行第二次流感病毒鼻滴入試驗 D(20+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	2015.07.30
6 第二次採血及血清分離，於 D(20+18)	076-P2 實驗室	2015.08.17
7 雪貂抗血清之製備試驗雪貂進行第三次流感病毒鼻滴入試驗 D(20+29) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	2015.08.28
7 第三次採血及血清分離於 D(20+34)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2015.09.02
8 雪貂抗血清之製備試驗結束 D(20+34)即 D(54)。	076-P2 實驗室	2015.09.02
9 實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2015.09.02

操作者

1. 試驗動物(物質)品質確認。

H3N2 流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<10

阿留申病毒血清酵素免疫分析試驗結果為陰性

楊淳米 林文欽

雪貂耳標編號：No.271、272

2. 雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定第一次免疫 D(0) ，  
每一隻皆以(Zoletil 50， 7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於  
鼻腔滴定 0.2ml 病毒液 0.2ml /1024 HA/隻

林文欽 楊淳米

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(10)，血清送測抗體  
效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
271	80
272	80

林文欽 楊淳米

及疾管署研檢中心

4. 鼻腔滴定第二次免疫 D(20) ，每一隻皆以(Zoletil 50，  
7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於鼻腔滴定 0.2ml 病毒液  
0.2ml / 1024 HA/隻

林文欽 楊淳米

5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(10)，血清送測抗體  
效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
271	160
272	160

林文欽 楊淳米

及疾管署研檢中心

6. 鼻腔滴定第三次免疫 D(20) ，每一隻皆以(Zoletil 50，  
7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於鼻腔滴定 0.2ml 病毒液  
0.2ml /1024 HA/隻

葉嘉翠 楊淳米

7. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(17+7)及 D(17+9) ,  
血清送測抗體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
271	320
272	320

林文欽 楊淳米

及疾管署研檢中心

III. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二)-2 Type B 流感病毒株 B/Taiwan/76712/2015 試驗紀錄及結果：

試驗步驟		操作場所	完成日期
1.	試驗動物(物質)確認及準備	076-P2 實驗室	2015.08.27
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	2015.08.28
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2015.08.10~ 09.29
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(12)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2015.09.09
5	雪貂抗血清之製備試驗雪貂進行第二次流感病毒腳掌皮下注射 0.25 ml 病毒試驗 D(14+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	2015.09.11
6	第二次採血及血清分離，於 D(14+11)	076-P2 實驗室	2015.09.22
7	第三次採血及血清分離於 D(14+18)，血清送測抗體效價。雪貂抗血清之製備試驗結束即 D(32)。	076-P2 實驗室	2015.09.29
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2015.09.30

操作者

1. 試驗動物(物質)品質確認。

H3N2 流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<10

阿留申病毒血清酵素免疫分析試驗結果為陰性

雪貂耳標編號：No.151、270

楊淳米 林文欽

2. 雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定第一次免疫 D(0)，每一隻皆以(Zoletil 50，7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於鼻腔滴定 0.2ml 病毒液 0.2ml / 1024 HA/隻

林文欽 楊淳米

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(12)，血清送測抗體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
151	40
270	80

林文欽 楊淳米  
及疾管署研檢中心

4. 流感病毒腳掌皮下注射第二次免疫 D(14)，每一隻皆以(Zoletil 50，7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於腳掌皮下注射 0.25ml 病毒液 0.25ml /1280 HA/隻

葉嘉翠 楊淳米

5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(14+11)，血清送測抗體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
151	320
270	640

林文欽 楊淳米  
及疾管署研檢中心

IV. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(一)Type A 流感病毒株  
A/Taiwan/S4913/2015 試驗紀錄及結果

試驗步驟		操作場所	完成日期
1.	試驗動物(物質)確認及準備	076-P2 實驗室	2015.10.22
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	2015.10.23
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2015.10.23 ~11.29
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(12)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2015.11.04
5	雪貂抗血清之製備試驗雪貂進行第二次流感病毒鼻滴入試驗 D(14+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	2015.11.06
6	第二次採血及血清分離，於 D(14+11)	076-P2 實驗室	2015.11.17
7	第三次採血及血清分離於 D(14+17)，血清送測抗體效價。雪貂抗血清之製備試驗結束即 D(31)。	076-P2 實驗室	2015.11.23
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2015.11.23

操作者

1. 試驗動物(物質)品質確認。

H3N2 流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<10

阿留申病毒血清酵素免疫分析試驗結果為陰性

鼻滴入試驗 雪貂耳標編號：No.TF5、TF7

(第二次免疫以背部皮下注射 雪貂耳標編號：No.TF8

第二次免疫以大腿肌肉注射雪貂耳標編號：No.TF9) 楊淳米 林文欽

2. 雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定第一次免疫 D(0) ，  
每一隻皆以(Zoletil 50， 7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於  
鼻腔滴定 0.5ml 病毒液 0.5ml / 1024 HA/隻

葉嘉翠 楊淳米

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(12)，血清送測抗體  
效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
TF5(鼻滴入)	160
TF7(鼻滴入)	160
TF8(鼻滴入)	320
TF9(鼻滴入)	320

葉嘉翠 楊淳米

及疾管署

研檢中心

4. 鼻腔滴定第二次免疫 D(14+0) ，每一隻皆以(Zoletil 50，  
7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於鼻腔滴定 0.5ml 病毒液  
0.5ml / 1024 HA/隻。

(第二次免疫以背部皮下注射 No.TF8，0.5ml 病毒液 0.5ml  
/ 1024 HA/隻

第二次免疫以大腿肌肉注射 No.TF9，0.5ml 病毒液 0.5ml  
/ 1024 HA/隻)

葉嘉翠 楊淳米



5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(14+11)，血清送測  
抗體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
TF5(1'鼻滴入+2'鼻滴入)	320
TF7(1'鼻滴入+2'鼻滴入)	640
TF8(1'鼻滴入+2'背部皮下注射)	320
TF9(1'鼻滴入+2'大腿肌肉注射)	640

及疾管署  
研檢中心

(4) 討論。

I. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(一)Type A 流感病毒株 A/Taiwan/82725/2014 結果討論:

本次試驗為 H3N2 台灣本土株雪貂抗血清之製備- 鼻腔滴定免疫試驗，該病毒於實驗中並未觀察到動物感染後雪貂活力下降及流感發生症狀，無明顯咳嗽、流鼻水、打噴嚏及倦怠活力低下嗜睡的症狀。本次試驗完成 H3N2 流感病毒株 A/Taiwan/82725/2014 雪貂血清抗體的誘發與製備

II. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二)-1 Type B 流感病毒株 B/Taiwan/76712/2015 結果討論:

本次試驗為 Type B B/Taiwan/76712/2015 台灣本土株雪貂抗血清之製備- 鼻腔滴定免疫試驗，該病毒於實驗中並未觀察到動物感染後雪貂活力下降及流感發生症狀，無明顯咳嗽、流鼻水、打噴嚏及倦怠活力低下嗜睡的症狀。本次試驗中第二次免疫後，抗體效價並未明顯提升，雖然 B 型流感素來就誘發抗體反應較差，本次試驗亦追加第三次免疫，最終完成流感病毒株 B/Taiwan/76712/2015 雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 達到 320，但是多次免疫可能導致抗體對病毒的抗原決定位(epitope)的專一性不足，對病毒變異的辨識度也就較不敏感。且本次試驗期間本中心遭遇工程施作及外部機構查核的準備工作，人力無法依期程執行試驗工作，故無法判定是否 HI 的偏低為 B 型原本就反應較差亦或抽血時間延後所致。故決定於 8/28 重新製作本株病毒之抗血清。

III. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二)-2 Type B 流感病毒株

B/Taiwan/76712/2015 結果討論:

本次試驗為 Type B B/Taiwan/76712/2015 台灣本土株雪貂抗血清之製備第二次試驗 - 第一次免疫以鼻腔滴定進行，該病毒於實驗中並未觀察到動物感染後雪貂活力下降及流感發生症狀，無明顯咳嗽、流鼻水、打噴嚏及倦怠活力低下嗜睡的症狀。但本次試驗中第二次免疫即改以病毒腳掌皮下注射免疫後，D14+11 流感病毒株 B/Taiwan/76712/2015 第二次雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 達到 320、640，抗體效價明顯提升，表示以皮下誘發抗體反應較佳，於 9/29 最終完成本株病毒 B/Taiwan/76712/2015 之抗血清重新製作。

IV. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(三)Type A 流感病毒株 A/Taiwan/S4913/2015 結果討論:

本次試驗為 Type A A/Taiwan/S4913/2015 台灣本土株雪貂抗血清之製備試驗 - 第一次免疫以鼻腔滴定進行，該病毒於實驗中並未觀察到動物感染後雪貂活力下降及流感發生症狀，無明顯咳嗽、流鼻水、打噴嚏及倦怠活力低下嗜睡的症狀。本次試驗中第二次免疫，除以常規鼻腔滴定方式免意外，亦同步進行背部皮下注射 0.5 ml 病毒，大腿肌肉注射 0.5 ml 病毒，希望進行免疫途徑不同，所誘發抗體效率的比較，D14+11 流感病毒株 A/Taiwan/S4913/2015 第二次雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 達到 320、640、320 及 640，抗體效價達到檢測需求。本實驗於 11/23 完成本株病毒 A/Taiwan/S4913/2015 之抗血清製作，並製作完整結果紀錄。

(5) 重要研究成果及具體建議。

對於流感病毒分離株之血清分型，利用雪貂（ferret）血清進行血球凝集抑制試驗（HI）鑑定，目前為止仍被認為是一個研究人類流感病毒最理想的小型動物模式。以前試驗用雪貂皆由國外進口相當昂貴且耗時，然而目前國內雪貂小型動物模式的繁殖、飼育與試驗的建立，具有其獨特性與重要性。更需要長期計畫的被需求及市場性，所以除了開發更多雪貂動物模式的運用性外，期望能維持雪貂小型動物模式的繁殖、飼育的能量，以往雪貂抗病毒血清來源皆由美國疾病管制署(CDC)提供，但其提供的量有限，無法提供疾病管制署完整分析台灣每年分離的病毒株，同時因有些病毒抗原性的改變造成無法即時偵測疫情變化，或對於流感病毒之抗原性、抗藥性以及演化趨勢等資訊的即時監測，更嚴重的是一旦爆發全球性或區域性的流感大流行時，鑑定血清可能出現血清短缺，或他國無暇顧及台灣需求，無法及時提供比較台灣每年新分離流感病毒株彼此間抗原性的差異，因而無法完整分析台灣每年分離的病毒株，易造成有些病毒抗原性已改變而無法即時偵測之困境。因此台灣本土必須要有建立及維持製備流感病毒鑑定血清的能力。

本計畫除利用已建立的雪貂的繁殖方法及雪貂的飼育執行雪貂抗病毒血清之製備試驗。故本計畫完成下列事項：

- I. 依標準作業程序完成實驗級雪貂飼育與繁殖。並進行季節性流感血清背景篩檢，並結果呈現陰性。
- II. 分讓了2015年由台灣疾病管制署挑選主要的流行病毒株選與抗原偏離的病毒株，進行病毒抗血清之製備。病毒株如下：

i. 於 4/17 第一株流感病毒 A/Taiwan/82725/2011.

ii. 於 7/10 第二株流感病毒 B/Taiwan/76712/2015

iii. 於 11/23 第三株流感病毒 A/Taiwan/S4913/2015

III. 完成了下列三株流感病毒之抗血清製備及效價之測定:

ii. 第一株流感病毒 A/Taiwan/82725/2011. 以兩隻雪貂製備抗血清，HI 力價分別為 320 及 640。

iii. 第二株流感病毒 B/Taiwan/76712/2015 第一次抗病毒血清製作以兩隻雪貂製備抗血清，HI 力價分別為 320 及 640。

iv. 第二株流感病毒 B/Taiwan/76712/2015 第一次抗病毒血清製作以兩隻雪貂製備抗血清，HI 力價分別為 320 及 640。

v. 第三株流感病毒 A/Taiwan/S4913/2015 以四隻雪貂製備抗血清，HI 力價分別為 320、640、320 及 640。

IV. 由於不同的病毒株有不同的免疫抗原性，因此所每株病毒免疫雪貂後產生之抗體的誘發期程和產生抗病毒效價的程度各有不同，須依實驗結果來判斷並修正，以減少下次實驗可能遭遇的問題。

本計畫製備之雪貂抗病毒血清提供給疾管署研檢中心對台灣流感病毒進行流感監測：疾病毒的抗原性、抗藥性與基因變化分析，用來作為流感疫情的監測與趨勢的判斷和預防政策的參考。

(重要研究成果及具體建議(附件 6))

## 衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫

### 104 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：  流感病毒雪貂抗血清之製備  

主持人：  謝博軒  

計畫編號：  MOHW104-CDC-C-114-113102  

1.計畫之新發現或新發明

無

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

提供疾病管制署流感病毒雪貂的抗病毒血清，應用於台灣流感的監視，提供實驗室用於檢驗判定，以辨認病毒之型別及變異，期能在流感防疫體制上及早採取適當防治措施。

維持流感病毒免疫雪貂之動物模式，製備不同流感病毒感染雪貂所產生之不同台灣流感病毒之雪貂抗血清，提供疾病管制署做為病毒抗原分析鑑定不同流感病毒血清型的依據。

幫助台灣流感相關基礎資料之建立與蒐集，增加流感病毒演變的瞭解，能即時偵測台灣流感病毒抗原性的變化，並能快速製備雪貂抗流感病毒血清並鑑定是否具抗原性變異，將有助於台灣流感病毒發生及變異之監測及疫苗施打策略的規劃與預防。

(6) 參考文獻：請依台灣醫誌編排方式。

1. 行政院衛福部疾病管制署「我國因應流感大流行準備第二期計畫」，疾病管制署網站 (<http://www.cdc.gov.tw>) 之流感防治專區。
2. WHO. Pandemic influenza preparedness and response. WHO guidance document; Apr 2009.
3. 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.
4. Smith, H., Sweet, C., 1988. Lessons for human influenza from pathogenicity studies with ferrets. *Rev. Infect. Dis.* 10, 56–75.
5. Maher, J.A., DeStefano, J., 2004. The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab. Anim. (NY)* 33, 50–53. Mishin, V.P., Nedyalkova, M.S., Hayden, F.G., Gubareva.
6. Barnard, D.L., 2009. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Res.* 2441-2453.
7. Mishin, V.P., Nedyalkova, M.S., Hayden, F.G., Gubareva, L.V., 2005. Protection afforded by intranasal immunization with the neuraminidase-lacking mutant of influenza A virus in a ferret model. *Vaccine* 23, 2922–2927.
8. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005;79: 2814-2822.
9. Schweiger B, Zadow I, Heckler R. Antigenic drift and variability of influenza viruses. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2002,

191:133-138.

10. 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 USA* 2004; 101:3166-3137.
11. Nicholson Kg, Wood JM, Zambon M: Influenza. *Lancet* 2003;362: 1733-1745.
12. Zitzow, L.A., Rowe, T., Morken, T., Shieh, W.J., Zaki, S., Katz, J.M., 2002. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. *J. Virol.* 76, 4420–4429.
13. WHO. Avian influenza: assessing the pandemic threat. Feb 2005. (Accessed Feb 2005, at <http://www.who.int/csr/disease/influenza/en/H5N1-pass.pdf>)
14. WHO: Summary report of a High-Level Consultation: new influenza A (H1N1), Geneva, 18May 2009.
15. Vincent J.M., Emmie de W. et al., Pathogenesis and Transmission of Swine-Origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science* 325, 481(2009).
16. Tomas R., Alberto J.L., et al., Modeling host responses in ferrets during A/California/07/2009 influenza infection. *Virology* 401 (2009) 257-265.
17. WHO: Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2010-2011 northern hemisphere influenza season. *Weekly epidemiological record* 2010; 85:81-92.
18. WHO: Recommendations for influenza vaccines, <http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinerecommendations/en/index.html>



### 三、附錄

- (1) 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(一)Type A 流感病毒株  
A/Taiwan/82725/2014 試驗報告簽署。

## 試驗報告簽署



委託單位：衛生福利部疾病管制署研檢中心

「流感病毒雪貂抗血清之製備」委託計畫

試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(一)

Type A 流感病毒株 A/Taiwan/82725/2014

試驗機構：國防醫學院預防醫學研究所

試驗人員：葉嘉翠、楊淳米、林文欽、吳雪齡

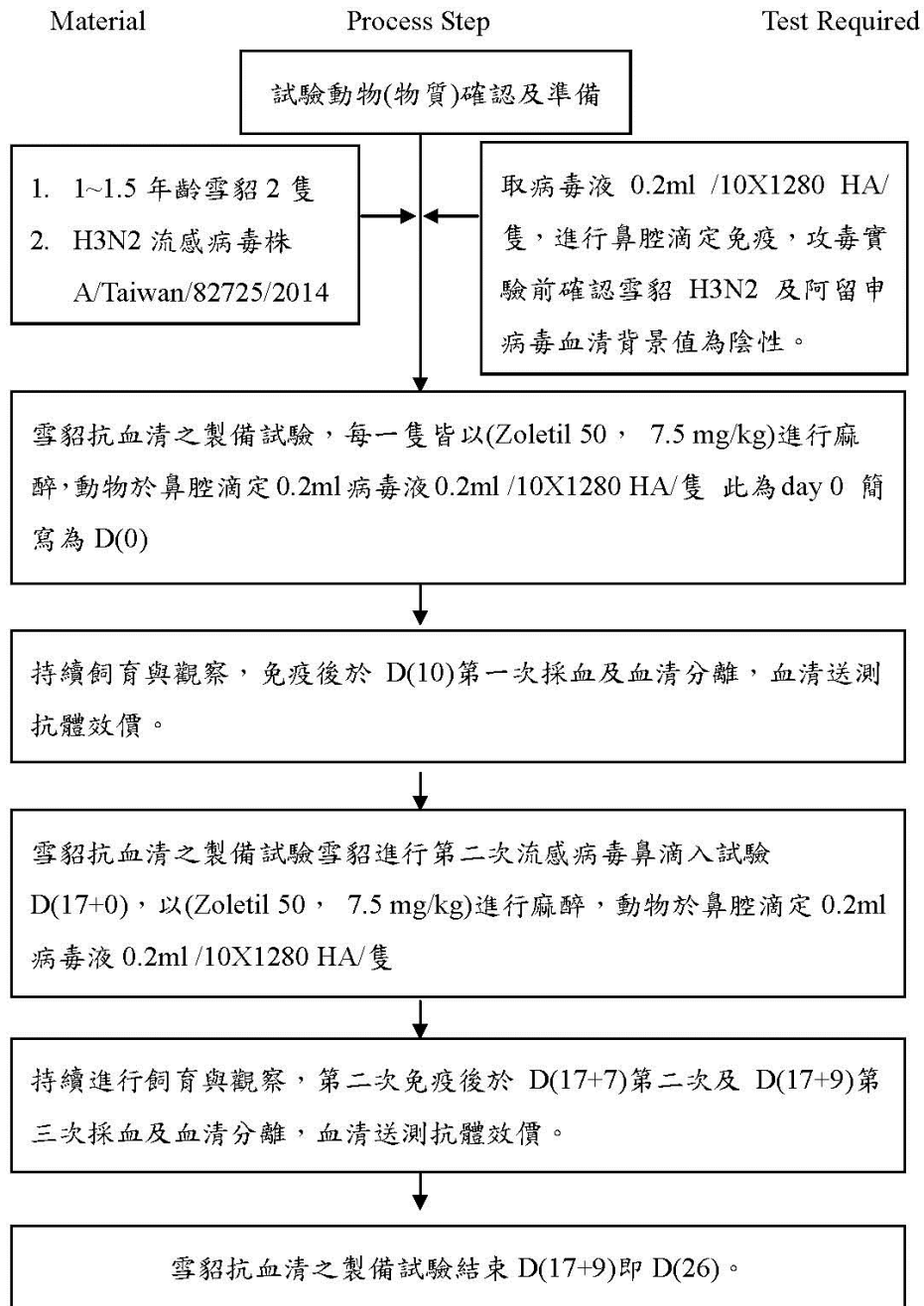
試驗日期：20150417~20150506

試驗主持人：葉嘉翠

計畫主持人：謝伯軒

試驗機構負責人：謝伯軒

(一) 試驗流程圖：



## (二) 試驗程序 Processing

試驗步驟		操作場所	完成日期	操作者、核對者
1.	試驗動物(物質)確認及準備	P2-2 實驗室	<b>2015.04.10</b>	楊淳米、林文欽
1.1	雪貂體溫晶片施打及實驗前檢血清採樣篩檢			楊淳米、林文欽
2	雪貂抗血清之製備試驗-鼻腔滴定免疫 D(0)	083-P2 實驗室	<b>2015.04.17</b>	葉嘉翠、楊淳米
3	每日進行雪貂飼育觀察	083-P2 實驗室	<b>2015.04.17~05.13</b>	葉嘉翠、楊淳米、林文欽、吳雪齡
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(10)，血清送測抗體效價。	083-P2 實驗室	<b>2015.04.27</b>	葉嘉翠、楊淳米
5	雪貂抗血清之製備試驗雪貂進行第二次流感病毒鼻滴入試驗 D(17+0) (第二次免疫)	083-P2 實驗室	<b>2015.05.04</b>	葉嘉翠、楊淳米
6	第二次採血及血清分離，於 D(17+7)	083-P2 實驗室	<b>2015.05.11</b>	葉嘉翠、楊淳米
7	第三次採血及血清分離於 D(17+9)，血清送測抗體效價。	083-P2 實驗室	<b>2015.05.13</b>	葉嘉翠、楊淳米
8	雪貂抗血清之製備試驗結束 D(17+9)即 D(26)。	083-P2 實驗室	<b>2015.05.13</b>	楊淳米、林文欽
9	實驗室滅菌及清消	083-P2 實驗室	<b>2015.05.14~19</b>	楊淳米、林文欽、詹協章

(三) 試驗紀錄及結果:

1. 試驗動物(物質)品質確認。

操作者

1.1 雪貂試驗動物「晶片及飼育編號對照紀錄表」

LAC-SOP-039-F01(附件一)

林文欽 楊淳米

1.2 雪貂血清背景值篩檢結果血球凝集抑制試驗結果。

實驗前送血清樣本至疾管署研檢中心進行 H3N2 流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<10

楊淳米 林文欽

及疾管署研檢中心

1.3 雪貂阿留申病毒血清酵素免疫分析試驗(簡寫為

ELISA)報告(附件二)

楊淳米 吳雪齡

2. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(10)，血清送測抗體效價檢測結果。

雪貂編號	HI
273	320
274	160

葉嘉學 楊淳米

及疾管署研檢中心

3. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(17+7)。

葉嘉學 楊淳米

及疾管署研檢中心

4. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(17+7)及 D(17+9)，血清送測抗體效價檢測結果。

雪貂編號	HI
273	320
274	320

林文欽 楊淳米

及疾管署研檢中心

5. 結論:

1. 本次試驗為 H3N2 台灣本土株雪貂抗血清之製備- 鼻腔滴定免疫試驗，該病毒於實驗中並未觀察到動物感染後雪貂活力下降及流感發生症狀，無明顯咳嗽、流鼻水、打噴嚏及倦怠活力低下嗜睡的症狀。本次試驗完成 H3N2 流感病毒株 A/Taiwan/82725/2014 雪貂血清抗體的誘發與製備。預劃進行第下一次試驗。

葉嘉學

試驗負責人簽名：



1.3 雲貂阿留申病毒血清酵素免疫分析試驗(簡寫為 ELISA) (附件二)

1.3.1 血清酵素免疫分析儀: 廠牌: Thermo; 型號: multiskam Ex; 保養效期: 2014.6.28。

Raw data:

日期:20130812

抽檢結果:

血清	檢測盤編號	讀值
Positive control:	A1	2.069
	A2	1.677
Negative control	B1	0.116
	B2	0.116
	C1	0.137
	C2	0.126
	D1	0.073
	D2	0.072
	E1	0.084
	E2	0.081
編號:167;	B9	0.107
	B10	0.127

動物編號 167、178 雲貂血清阿留申病毒監測結果：經判讀為陰性。本所實驗動物中心雲貂未經阿留申病毒感染及帶原。本次使用之雲貂動物編號 273、274，為本實驗中心 10 級清境等級實驗室自行繁殖，故亦無阿留申病毒感染。

試驗負責人簽名 楊淳米 吳雪齡

(2) 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二)-1 Type B 流感病毒株 B/Taiwan/76712/2015 試驗報告簽署。

## 試驗報告簽署



**委託單位：衛生福利部疾病管制署研檢中心**

**「流感病毒雪貂抗血清之製備」委託計畫**

**試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二) - 1**

**Type B 流感病毒株 B/Taiwan/76712/2015**

**試驗機構：國防醫學院預防醫學研究所**

**試驗人員：葉嘉翠、楊淳米、林文欽、吳雪齡**

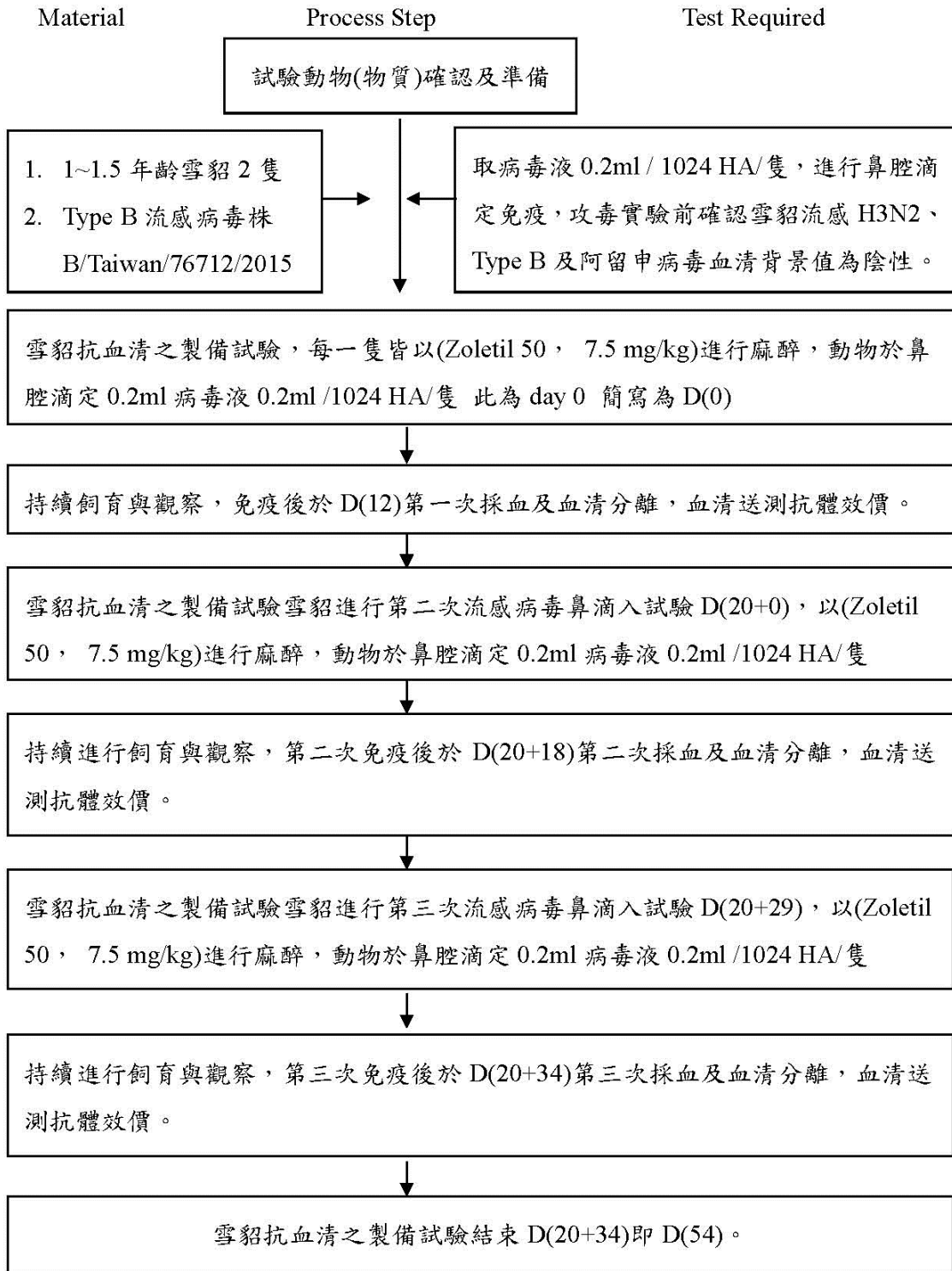
**試驗日期：20150710~20150902**

**試驗主持人：葉嘉翠**

**計畫主持人：謝博軒**

**試驗機構負責人：謝博軒**

(一)試驗流程圖：





## (二) 試驗程序 Processing

	試驗步驟	操作場所	完成日期	操作者、核對者
1.	試驗動物(物質)確認及準備	076-P2 實驗室	<b>2015.07.09</b>	楊淳米、林文欽
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	<b>2015.07.10</b>	林文欽、楊淳米
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	<b>2015.07.10~09.02</b>	葉嘉翠、楊淳米、林文欽、吳雪齡
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(12)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	<b>2015.07.22</b>	林文欽、楊淳米
5	雪貂抗血清之製備試驗雪貂進行第二次流感病毒鼻滴入試驗 D(20+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	<b>2015.07.30</b>	林文欽、楊淳米
6	第二次採血及血清分離，於 D(20+18)	076-P2 實驗室	<b>2015.08.17</b>	林文欽、楊淳米
7	雪貂抗血清之製備試驗雪貂進行第三次流感病毒鼻滴入試驗 D(20+29) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	<b>2015.08.28</b>	葉嘉翠、楊淳米
7	第三次採血及血清分離於 D(20+34)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	<b>2015.09.02</b>	林文欽、楊淳米
8	雪貂抗血清之製備試驗結束 D(20+34)即 D(54)。	076-P2 實驗室	<b>2015.09.02</b>	楊淳米、林文欽
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	<b>2015.09.02</b>	楊淳米、林文欽、詹協章

(三) 試驗紀錄及結果:

操作者

1. 試驗動物(物質)品質確認。

H3N2 流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<10

阿留申病毒血清酵素免疫分析試驗結果為陰性

雪貂耳標編號：No.271、272

楊淳華 振欽

2. 雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定第一次免疫 D(0)，

每一隻皆以(Zoletil 50，7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於  
鼻腔滴定 0.2ml 病毒液 0.2ml /1024 HA/ 隻

振欽 楊淳華

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(10)，血清送測抗體  
效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
271	80
272	80

振欽 楊淳華  
及疾管署研檢中心

4. 鼻腔滴定第二次免疫 D(20)，每一隻皆以( Zoletil 50，

7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於鼻腔滴定 0.2ml 病毒液  
0.2ml / 1024 HA/ 隻

振欽 楊淳華

5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(10)，血清送測抗體  
效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
271	160
272	160

振欽 楊淳華  
及疾管署研檢中心

6. 鼻腔滴定第三次免疫 D(20)，每一隻皆以( Zoletil 50，

7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於鼻腔滴定 0.2ml 病毒液  
0.2ml /1024 HA/隻

葉嘉慶 楊淳華

7. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(17+7)及 D(17+9)，  
血清送測抗體效價檢測結果。

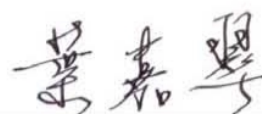
雪貂耳標編號	HI
271	320
272	320

振欽 楊淳華  
及疾管署研檢中心

8. 結論:

本次試驗為 Type B B/Taiwan/76712/2015 台灣本土株雪貂抗血清之製備- 鼻腔滴定免疫試驗，該病毒於實驗中並未觀察到動物感染後雪貂活力下降及流感發生症狀，無明顯咳嗽、流鼻水、打噴嚏及倦怠活力低下嗜睡的症狀。本次試驗中第二次免疫後，抗體效價並未明顯提升，雖然 B 型流感素來就誘發抗體反應較差，本次試驗亦追加第三次免疫，最終完成流感病毒株 B/Taiwan/76712/2015 雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 達到 320，但是多次免疫可能導致抗體對病毒的抗原決定位(epitope)的專一性不足，對病毒變異的辨識度也就較不敏感。且本次試驗期間本中心遭遇工程施作及外部機構查核的準備工作，人力無法依期程執行試驗工作，故無法判定是否 HI 的偏低為 B 型原本就反應較差亦或抽血時間延後所致。故決定於 8/28 重新製作本株病毒之抗血清。

試驗負責人簽名：



- (3) 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二)-2 Type B 流感病毒株 B/Taiwan/76712/2015 試驗報告簽署。

## 試驗報告簽署



委託單位：衛生福利部疾病管制署研檢中心

「流感病毒雪貂抗血清之製備」委託計畫

試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二)-2

試驗機構：國防醫學院預防醫學研究所

試驗人員：葉嘉翠、楊淳米、林文欽、吳雪齡

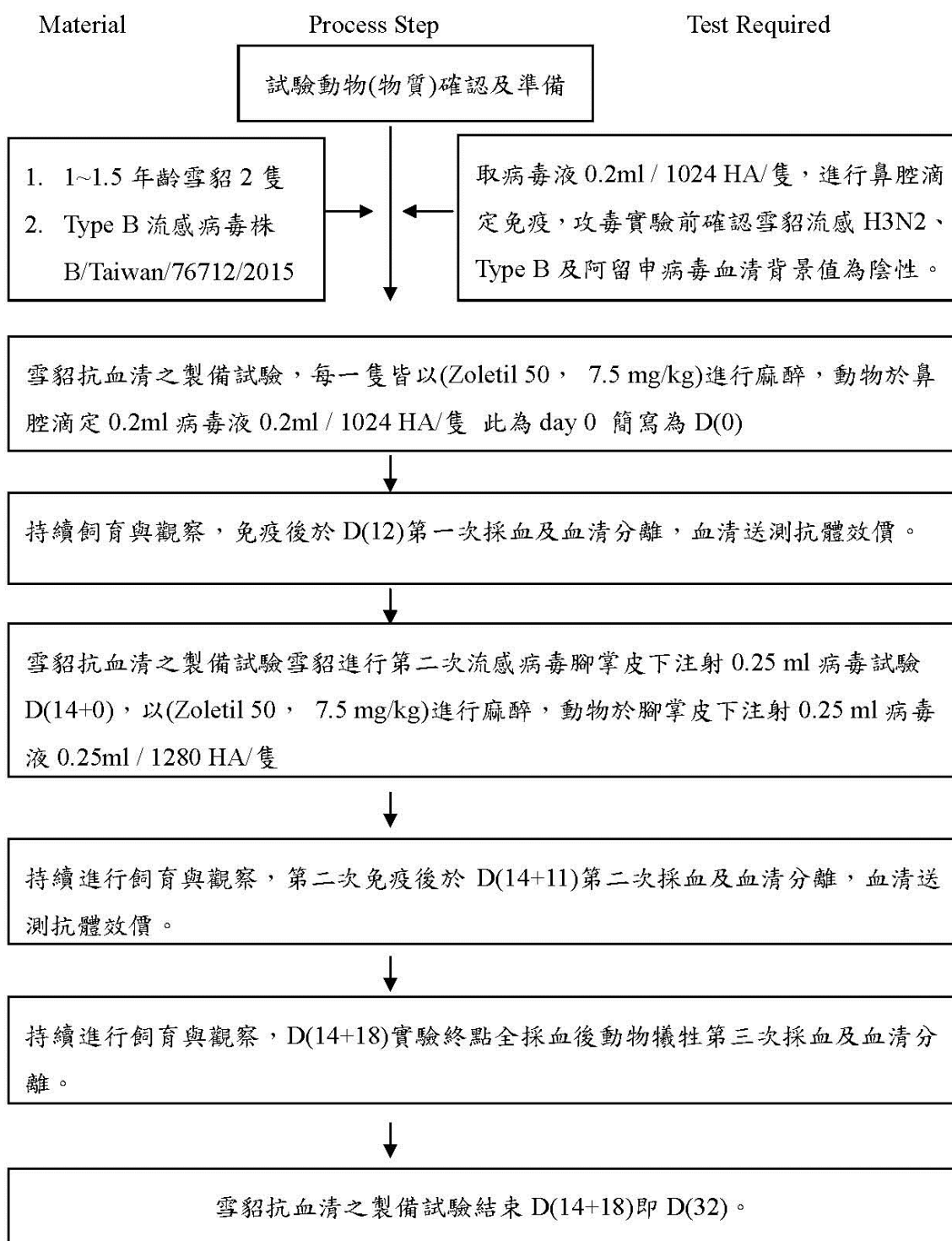
試驗日期：20150828~20150929

試驗主持人：葉嘉翠

計畫主持人：謝博軒

試驗機構負責人：謝博軒

**(一)試驗流程圖：**



(二) 試驗程序 Processing

	試驗步驟	操作場所	完成日期	操作者、核對者
1.	試驗動物(物質)確認及準備	076-P2 實驗室	<b>2015.08.27</b>	楊淳米、林文欽
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	<b>2015.08.28</b>	林文欽、楊淳米
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	<b>2015.08.10~09.29</b>	葉嘉翠、楊淳米、 林文欽、吳雪齡
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(12)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	<b>2015.09.09</b>	林文欽、楊淳米
5	雪貂抗血清之製備試驗雪貂進行第二次流感病毒腳掌皮下注射 0.25 ml 病毒試驗 D(14+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	<b>2015.09.11</b>	葉嘉翠、楊淳米
6	第二次採血及血清分離，於 D(14+11)	076-P2 實驗室	<b>2015.09.22</b>	林文欽、楊淳米
7	第三次採血及血清分離於 D(14+18)，血清送測抗體效價。雪貂抗血清之製備試驗結束即 D(32)。	076-P2 實驗室	<b>2015.09.29</b>	林文欽、楊淳米
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	<b>2015.09.30</b>	楊淳米、林文欽、 詹協章

(三) 試驗紀錄及結果:

操作者

1. 試驗動物(物質)品質確認。

H3N2 流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<10

阿留申病毒血清酵素免疫分析試驗結果為陰性

雪貂耳標編號：No.151、270

楊序華 林欽

2. 雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定第一次免疫 D(0)，

每一隻皆以(Zoletil 50， 7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於

鼻腔滴定 0.2ml 病毒液 0.2ml / 1024 HA/ 隻

林欽 楊序華

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(12)，血清送測抗體

效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
151	40
270	80

林欽 楊序華

及疾管署研檢中心

4. 流感病毒腳掌皮下注射第二次免疫 D(14)，每一隻皆

以(Zoletil 50， 7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於腳掌皮下

注射 0.25ml 病毒液 0.25ml / 1280 HA/ 隻

葉嘉恩 楊序華

5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(14+11)，血清送測

抗體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
151	320
270	640

林欽 楊序華

及疾管署研檢中心

6. 結論:

本次試驗為 Type B B/Taiwan/76712/2015 台灣本土株雪貂抗血清之製備第二次試驗 - 第一次免疫以鼻腔滴定進行，該病毒於實驗中並未觀察到動物感染後雪貂活力下降及流感發生症狀，無明顯咳嗽、流鼻水、打噴嚏及倦怠活力低下嗜睡的症狀。但本次試驗中第二次免疫即改以病毒腳掌皮下注射免疫後，D14+11 流感病毒株 B/Taiwan/76712/2015 第二次雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 達到 320、640，抗體效價明顯提升，表示以皮下誘發抗體反應較佳，於 9/29 最終完成本株病毒 B/Taiwan/76712/2015 之抗血清重新製作。

試驗負責人簽名：





- (4) 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(三)Type A 流感病毒株 A/Taiwan/S4913/2015 結果討論試驗報告簽署。

## 試驗報告簽署



委託單位：衛生福利部疾病管制署研檢中心

「流感病毒雪貂抗血清之製備」委託計畫

試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(三)

Type A 流感病毒株 A/Taiwan/S4913/2015

試驗機構：國防醫學院預防醫學研究所

試驗人員：葉嘉翠、楊淳米、林文欽、吳雪齡

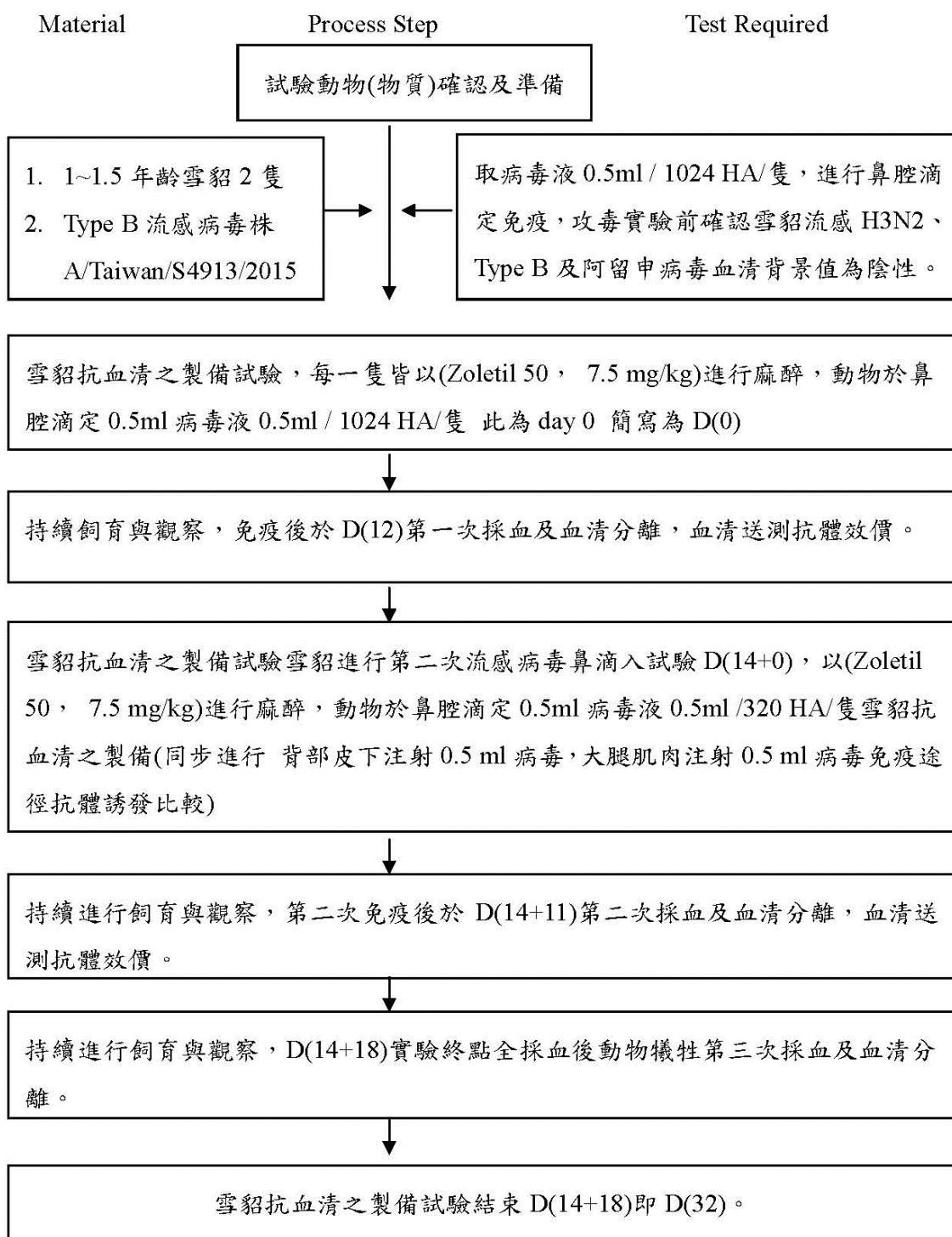
試驗日期：20151023~20151120

試驗主持人：葉嘉翠

計畫主持人：謝伯軒

試驗機構負責人：謝伯軒

**(一)試驗流程圖：**



## (二) 試驗程序 Processing

	試驗步驟	操作場所	完成日期	操作者、核對者
1.	試驗動物(物質)確認及準備	076-P2 實驗室	<b>2015.10.22</b>	楊淳米、林文欽
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	<b>2015.10.23</b>	葉嘉翠、楊淳米
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	<b>2015.10.23~11.29</b>	葉嘉翠、楊淳米、 林文欽、吳雪齡
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(12)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	<b>2015.11.04</b>	葉嘉翠、楊淳米
5	雪貂抗血清之製備試驗雪貂進行第二次流感病毒鼻滴入試驗 D(14+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	<b>2015.11.06</b>	葉嘉翠、楊淳米
6	第二次採血及血清分離，於 D(14+11)	076-P2 實驗室	<b>2015.11.17</b>	林文欽、楊淳米
7	第三次採血及血清分離於 D(14+17)，血清送測抗體效價。雪貂抗血清之製備試驗結束即 D(31)。	076-P2 實驗室	<b>2015.11.23</b>	林文欽、楊淳米
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	<b>2015.11.23</b>	楊淳米、林文欽、 詹協章

(三) 試驗紀錄及結果:

操作者

1. 試驗動物(物質)品質確認。

H3N2 流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<10

阿留申病毒血清酵素免疫分析試驗結果為陰性

鼻滴入試驗 雪貂耳標編號：No.TF5、TF7

(第二次免疫以背部皮下注射 雪貂耳標編號：No.TF8

第二次免疫以大腿肌肉注射雪貂耳標編號：No.TF9)

楊淳 振欽

2. 雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定第一次免疫 D(0)，

每一隻皆以(Zoletil 50，7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於

鼻腔滴定 0.5ml 病毒液 0.5ml / 1024 HA/隻

葉嘉 楊淳

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(12)，血清送測抗體

效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
TF5(鼻滴入)	160
TF7(鼻滴入)	160
TF8(鼻滴入)	80
TF9(鼻滴入)	160

葉嘉 楊淳

及疾管署研檢中心

4. 鼻腔滴定第二次免疫 D(14+0)，每一隻皆以(Zoletil 50，

7.5 mg/kg)進行麻醉，動物於鼻腔滴定 0.5ml 病毒液

0.5ml / 1024 HA/隻。

(第二次免疫以背部皮下注射 No.TF8，0.5ml 病毒液

0.5ml / 1024 HA/隻

第二次免疫以大腿肌肉注射 No.TF9，0.5ml 病毒液

0.5ml / 1024 HA/隻)

葉嘉 楊淳

5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(14+11)，血清送測

抗體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
TF5(1'鼻滴入+2'鼻滴入)	320
TF7(1'鼻滴入+2'鼻滴入)	640
TF8(1'鼻滴入+2'背部皮下注射)	320
TF9(1'鼻滴入+2' 大腿肌肉注射)	640



及疾管署研檢中心

6. 結論:

本次試驗為 Type A A/Taiwan/S4913/2015 台灣本土株雪貂抗血清之製備試驗 - 第一次免疫以鼻腔滴定進行，該病毒於實驗中並未觀察到動物感染後雪貂活力下降及流感發生症狀，無明顯咳嗽、流鼻水、打噴嚏及倦怠活力低下嗜睡的症狀。本次試驗中第二次免疫，除以常規鼻腔滴定方式免意外，亦同步進行背部皮下注射 0.5 ml 病毒，大腿肌肉注射 0.5 ml 病毒，希望進行免疫途徑不同，所誘發抗體效率的比較，D14+11 流感病毒株 A/Taiwan/S4913/2015 第二次雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 達到 320、640、320 及 640，抗體效價達到檢測需求。本實驗於 11/23 完成本株病毒 A/Taiwan/S4913/2015 之抗血清製作，並製作完整結果紀錄。

試驗負責人簽名：

