計畫編號：DOH101-DC-1015

行政院衛生署疾病管制局 101 年度科技研究發展計畫

台灣流感病毒抗原變化監測-
雪貂抗病毒血清的製備

研 究 報 告

執行機構：國防醫學院預防醫學研究所

計畫主持人：陳錦龍

研究人員：賴思佳、葉嘉翠、譚立政、周學澧、黃郁茵、吳雪齡、李振明

執行期間：101 年 05 月 03 日至 101 年 12 月 31 日

＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意*

目　　錄

頁　碼

封面

目錄

一、中文摘要

（4）

英　文　摘　要

（4）

二　、　本　文

（5）

(1）、前言

（6）

(2)　、　材　料　與　方　法

（9）

(3)　、　結　果

（15）

(4)　、　討　論

（18）

(5)　、　計　畫　重　要　研　究　成　果　及　具　體　建　議

（20）

(6)　、　參　考　文　獻

（21）

三　、　圖　、　表　次

（22）

共

（27）頁

中文摘要

人類的流感病毒主要為 A 型及 B 型流感病毒，在世界各地之季節性流感，常具有高度急性呼吸道傳染力，造成高致病力及顯著之致死率。流感病毒為 RNA 病毒，RNA 病毒容易產生突變及基因重組，多變異為此病毒最重要的特性，包括 Antigen drift 及 Antigen shift。流感病毒的抗原性為利用雪貂 (Ferret) 血清進行血球凝集抑制試驗 (HI) 來分析，其對於人類的流感病毒 (包括 A 及 B 型) 具有高度感受力。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。

目前國際上並無台灣本土株流感病毒之雪貂抗血清，因此運用我們已有流感病毒免疫雪貂之動物模式，由台灣疾病管制局挑選台灣主要流行之病毒株與對疫苗株低反應株，分讓給我們進行病毒增殖、感染雪貂、製備抗血清及測定效價等。

我們有繁殖、飼育雪貂及研究流感病毒多年之經驗，以我們自行繁殖之雪貂，由台灣疾病管制局所挑選之流感病毒抗原，製備台灣本土流感病毒之雪貂抗血清，提供疾病管制局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，協助台灣疾病管制局分析流感病毒株抗原的變異，以及與疫苗株間之差異。雪貂抗血清的製備對監測台灣流感病毒的抗原變化情形，具有重大助益。

關鍵詞：流感病毒、雪貂、抗血清

Abstract

Aim: Human Influenza, mainly cause by influenza A and influenza B viruses, is a highly infectious acute respiratory disease spreading around the world in seasonal epidemics resulting in high morbility and significant mortality. It is a type of RNA virus. During a mixed infection and the relatively rapid accumulation of point mutations in virus surface glycoproteins, the exchange of individual genome segments between different virus subtypes are the main reasons for antigenic 〝shift〞 ”and 〝drift〞 due to the high mutation rate of the RNA genome. The antigenic types of influenza viruses were determined by using the haemaggluti circulating nation- inhibition (HI) tests with postinfection ferret sera. 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 postinfection ferret sera are required for characterizing the antigenicity of influenza viruses. For the surveillances of influenza viruses in Taiwain, the postinfection ferret sera are also required.

Taiwan CDC selected the predominant strain and /or low reactors against vaccine stain circulating in Taiwan, and provided NDMC these viruses above to proliferate and immune ferrets, then obtains the postinfection ferret sera.

Conclution : In this study, we use the ferrets as the animal model for studying influenza viruses, including the bleeding and immunization of ferret. The Taiwan CDC selected the 6 predominant strains of influenza

viruses circulating in Taiwan for NDMC to immune ferrets and generate 6 local strains in Taiwan of the postinfection ferret sera. These sera will be 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

前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等

感冒病毒是屬於正黏液病毒 (orthmyxoviridae) 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[1] 。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[2]。在近代人類的歷史中，有三次流感大流行，分別為1918年西班牙流感、1957年亞洲流感及 1968年香港流感，造成許多生命的喪生及經濟的損失。最近許多研究顯示 1918年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[3-4]。

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，Clase 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，Clade2.3 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[4-6]。

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。

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[7]，以往血清來源皆由美國疾病管制局 (CDC) 提供，但其提供的量有限，無法提供疾病管制局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。一旦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。雪貂是傳統用來研究流感病毒的實驗動物，因為雪貂是流感病毒的天然宿主，雪貂感染流感病毒後，所呈現的臨床症狀與人類最為接近，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。

雪貂的呼吸系統在生理解剖學上與人類十分接近，這個實驗動物常用來生產高特異性流感病毒抗血清，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[8-11]。雪貂對於 A型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。

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個監測點所偵側之流感病毒，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[12-13]。

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 P3 動物實驗室，目前我們已建立 (1).雪貂的繁殖技術。 (2).流感病毒於第三等級動物實驗室標準操作流程及實務經驗流感病毒於第三等級動物實驗室標準操作流程及實務經驗。 (3).測試血球凝集抑制試驗 (HI)、及中和性抗體效價。 (4).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局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。

本計畫之目的為完成下列事項:

維護流感病毒免疫雪貂之動物模式，製備台灣流感病毒之雪貂抗血清，提供疾病管制局做為病毒抗原分析鑑定，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，並可提供疫苗株選擇的參考。

材料與方法

1. 培養流感病毒株：

細胞培養病毒: 流感病毒測定出病毒效價後，感染 MDCK (Madin-Darby canine kidney cell) 細胞，用含 2ug/mL TPCK之 DMEM培養基培養病毒，34℃，5% CO_2條件下培養，觀察細胞達二價 CPE (50%)，即收取上清液，離心測試病毒效價並分裝冷凍保存於 -80℃中。MDCK細胞以 DMEM培養基 (內含10%胎牛血清) 於 37℃，5% CO2下繼代培養。

2. 流感病毒 HA 效價測定:

(1) 紅血球懸浮液製備：抽天竺鼠或雞血於阿氏抗凝劑中，混合均勻。血球用無菌雙層紗布過濾，用 pH7.2 PBS 洗三次，並製成 10% 儲存懸浮液，置 4℃冰箱備用，但不得超過一週。做試驗時配成 0.75% 懸浮液，即0.75mL 10% 紅血球和 19.25 mL PBS PH 7.2 混合。

(2). 紅血球凝集效價測定：用感染過之組織培養液或蛋羊膜腔尿囊液，於 U-plate 上，以 PBS（PH 7.2）做 2 倍稀釋。自第二列起加 0.025 mL PBS於所有孔洞 (well)中。第一列加 0.05mL 病毒抗原。用 0.025 mL 微量稀釋器，做連續稀釋。加 0.025 mL PBS 於所有孔洞 (well) 中。加 0.05 mL 的 0.75% 天竺鼠紅血球懸浮液至所有孔洞中。並做三個孔洞 (well)的紅血球對照: 0.05 mL 紅血球加 0.05 mL PBS。用微量振盪器混合均勻。加蓋，放室溫或 4℃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，也就是 1 個凝

集單位 (1 HA unit)。

3. 流感病毒 $TCID_{50}$ 效價測定:

(1). 病毒準備:

病毒作 10^{-1} 至 10^{-5} 之五個序列稀釋。測試起始點分別取 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}四點 為起始點。加 100 μL 病毒生長液於 96 孔盤中除了 column1 (A1～H1) 每一個孔洞。加 146 μL 10^{-2} 倍病毒原液於 plate 1 的 A1～D1 孔洞， 146 μL 10^{-3} 倍病毒原液於 plate 1 的 E1-H1 孔洞，146 μL 10^{-4} 倍病毒原液於 plate 2 的 A1～D1 孔洞， 146 μL 10^{-5} 倍病毒原液於 plate 2 的 E1～H1 孔洞(做四重複)。從 column 1 取 46 μL 病毒液做序列稀釋。Column 12 (A12～H12) 為細胞控制組，只加病毒培養液，不加任何病毒。稀釋後之病毒放置於 37 ± 2 ℃ 二氧化碳培養箱中靜置 60 ± 5 分鐘。上述序列稀釋法為 1/2 $\log_{10}$ 。

(2). 細胞準備:

細胞培養於 75T 至 70～90 % 滿， 一盤 96 孔盤需要 1.5×10^{6} 細胞，試驗所需細胞數為 96 孔盤數 × 1.5×10^{6} 細胞 × 1.2 倍。加病毒培養液將細胞調整為 1.5×10^{5}/mL。

(3). 感染細胞:

取 100 μL 細胞 (1.5×10^{4}/well) 加入上述 96 孔盤中。置於 37 ℃、5% CO_2 條件二氧化碳培養箱中，病毒為Influenza A 培養 18～24 小時，繼續 (4) 之步驟，病毒為 Influenza B， 繼續 (5) 之步驟。

(4). 病毒為Influenza A virus作法如下:

(A). 固定細胞:

去除上述 96 孔盤中之培養基。以 200 μL PBS 清洗每一個孔洞。去除 PBS ，加入 200 μL/well 預冷之細胞固定液，蓋上上蓋，靜置室溫 10～12 分鐘。去除固定液，晾乾。

(B). 酵素免疫反應:

一次抗體反應: Anti-influenza A NP 單株抗體室溫反應 60-120 分鐘。

二次抗體反應: Anti-mouse IgG HRP-labeled 抗體，室溫反應60 ± 5 分鐘。

(C).呈色反應:

加入TMB 呈色劑 5-20 分鐘，加入 Stop solution。讀取吸光值 OD_{450}

(D).結果計算 ：

依據 Reed-Muench method 計算病毒效價

(5). 病毒為 Influenza B virus 作法如下:

置於 37℃、5% CO_2 條件二氧化碳培養箱中，培養箱靜置培養 3-7 天觀察細胞病變，依據 Reed-Muench method 計算病毒效價。

4. 流感病毒濃縮:

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 4000×g，fixed angle 離心轉子之轉速為 5000×g，離心濃縮病毒，濃縮後之病毒以 HA 方法測試病毒效價。

5. 雪貂免疫:

於生物安全等級二級（BSL2）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：

(1). 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。

(2) 第一次免疫，取 1 ml 流感病毒培養液**(HA 價位為 1024~2048/50µl)**，分別滴入麻醉雪貂之兩個鼻腔，完成免疫。

(3) 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，則進行心臟全採血。

(4) 若抗體力價尚未達到需求時，再次追加免疫，方式為四個腳掌各皮下注射 0.25 ml **(病毒 HA 價位為 1024~2048/50µl)**病毒，再經十四天後進行心臟全採血，檢測抗體力價。

6. 實驗動物室相關硬體設施：

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 20±3℃，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。

主要實驗地點位於國防醫學院預防醫學研究所

(1). 動物中心，該中心有兩間 P2 級動物實驗室，該實驗室為生物安全等級二級之感染性動物實驗室 (BSL2＋級)—具負壓隔離設計，備有一台可用以操作生物安全等級二級以上之生物安全操作櫃與雙門滅菌器,所以實驗過程產生之廢棄物，皆必須經過滅菌，以避免實驗過程的二次污染，確保動物實驗相關器材之清潔及無菌狀態，並維護動物實驗操作者及實驗動物之健康。實驗中免疫雪貂皆暫飼養於

負壓 IVC 或負壓層流架，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。

(2). 017 生物安全等級三級靈長類實驗室，該實驗室具有六台負壓隔離操作箱及符合生物安全第三等級實驗室之雙門滅菌器。實驗中免疫雪貂皆暫飼養於負壓隔離操作箱，每組主機有獨立的 Prefilter 及 Hepa Filter (D.O.P. up to 99.97%) 過濾裝置。實驗過程中室溫維持於雪貂適合的 20±3℃，並且每日檢查負壓及溫度記錄表。

7. 雪貂之飼養管理：

(1). 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 40±2 天，每胎可產 1~10 隻幼貂，初生幼貂體重僅約 8~10 公克，至 3 週齡大體重約達 100 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。

(2). 雪貂之飼養籠架—雪貂之飼養籠應以家兔用不銹鋼飼養籠為主，避免使用有噴漆或油漆之金屬籠，以免雪貂因啃咬而導致鉛中毒；飼養籠底部可以是小於 1 ㎝^{2} 的不銹鋼網，其下置糞盤，或是一塑膠平面空間，上置木屑。

8. 病毒與抗血清價位測定

(1). 血清 RDE 酵素 (receptor destroy enzyme) 前處理步驟：

將 1 volume 血清檢體吸至 1.5 mL 離心管中，取 4 volume

RDE(100 units/ml)與血清混合，vortex 37℃作用，O/N。加入 3 volume Sodium itrate(2.5%)， vortex ，56℃作用 30分鐘 ，加入 2 volume 的 PBS (Final serum dilution 為 1:10) ，-20℃保存。

(2). 紅血球凝集抑制試驗：將各型特異性抗血清 (Type Specific Antiserum)，從 l/10 開始做 2倍稀釋，即自第二行至第六行，每個洞(well)，加25 μL PBS。加 50 μL 抗血清或病人血清(處理過)於第一行，用25μL 微量稀釋器混合稀釋之。加25 μL 4個凝集單位 (4 HA unit)的病毒抗原至每個洞 (well)。用微量振盪器混合均勻，將病毒和血清混合液置室溫作用一小時。加 50 μL 之 0.75% 天竺鼠紅血球懸浮液至每個洞 (well)中，微量振盪器混合均勻，加蓋置室溫或 4℃冰箱，1~2 小時。試驗同時，須包括抗原的反滴定效價 (Back Titration)，抗血清對照及紅血球對照。

抗原效價反測 (Ag Back Titration)：從第二行至第六行洞(wel1)，各加25 μL PBS。第一行加 50 μL，4 個血球凝集單位 (4 HA unit)的稀釋病毒。用 25 μL 微量稀釋器混合稀釋之。每個洞(well)再加 25 μL PBS。每個孔洞 (well)加 50 μL 0.75% 天竺鼠血球懸浮液。混合均勻，置 4℃或室溫 1~2 小時。

結果判讀：最高稀釋倍數能產生完全紅血球凝集抑制現象者，也就是抗體之效價。

結果

雪貂之飼育與繁殖:

(1). 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，由平時之日照 10～11 小時漸漸增加到 14 小時，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 40±2 天，每胎可產 1~10 隻幼貂，初生幼貂體重僅約 8~10 公克，至 3 週齡大體重約達 100 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 **(圖一)**。(2). 雪貂之飼養: 雪貂之飼養籠以家兔用不銹鋼飼養籠為主，飼養籠底部是不銹鋼網，其下置糞盤，上置木屑，每星期換籠一次，每隻成貂每日約食用 35~50 公克貂飼料。於正壓的環境中飼養，其最適室溫為 20±3℃，濕度 60~75% **(圖二)**。(3). 目前預醫所約飼養之雪貂，足供本計畫所需。

流感病毒之培養與抗原之製備:

疾管局分析 2011~2012 年台灣疾病管制局病毒合約實驗室分離出的流感病毒，流感病毒 HA 基因序列與其抗原性做分析後，挑選主要的流行病毒株選與抗原偏離的病毒株，分為三期分讓:

第一期:(1).A/Taiwan/3534/2012(H3N2) (2).B/Taiwan/4748/2012。

第二期:(1).A/Victoria/361/2011(H3N2) (2).B/Hubei-Wujiagang/158/2009。

第三期:(1).A/Taiwan/95051/2012(H1N1) (2).A/Taiwan/94932/2012(H3N2)。

分讓之病毒於 MDCK 細胞中做培養，以 2 μg/mL TPCK 之 DMEM 培養基，34℃ 5% CO_2 條件下培養病毒，觀察細胞達二價 CPE (50%)，即收

取上清液，離心測試病毒效價。將病毒液以 Amicon Ultra-15 10K 濃縮離心管濃縮至 HA 價位 512~2048/50 μL 後以 1 mL 免疫雪貂。

流感病毒抗血清之製備:

雪貂免疫**(圖三)**: 第一次免疫，取濃縮病毒液 1 mL (HA 價位 512~2048/50 μL)，分別滴入雪貂左右鼻腔各 0.5 mL，免疫後第十四天測試抗體效價，若抗體力價未達 HI 640 則以腳掌皮下各注射 0.25 mL 病毒(病毒 HA 價位 512~2048/50 μL)，進行第二次免疫。

各病毒株免疫之病毒效價為:

(1). A/Taiwan/3534/2012(H3N2): 第一次免疫病毒 HA 效價為 512 HA/50 μL ，第二次免疫病毒 HA 效價為 512 HA/50 μL。

(2). B/Taiwan/4748/2012: 第一次免疫病毒 HA 效價為 1024 HA/50 μL ，第二次免疫病毒 HA 效價為 1024 HA/50 μL。

(3). A/Victoria/361/2011 (H3N2) : 第一次免疫病毒 HA 效價為 512 HA/50μl，第二次免疫病毒 HA 效價為 2048 HA/50 μL 。

(4). B/Hubei-Wujiagang/158/2009: 第一次免疫病毒 HA 效價為 1024 HA/50 μL，第二次免疫病毒 HA 效價為 2048 HA/50 μL。

(5). A/Taiwan/95051/2012(H1N1) : 第一次免疫病毒 HA 效價為 1024 HA/50 μL，第二次免疫病毒 HA 效價為 2048 HA/50 μL。

(6). A/Taiwan/94932/2012(H3N2) : 第一次免疫病毒 HA 效價為 1024 HA/50 μL ，第二次免疫病毒 HA 效價為 2048 HA/50 μL **(表一)**。其中 A/Taiwan/95051/2012(H1N1) 及 A/Taiwan/94932/2012(H3N2) 各免疫兩隻雪貂。

流感病毒抗血清之生產:

由疾病管制局分讓六株流感病毒株病毒株，分成三期免疫雪貂，測得

抗體力價分別為

(1). A/Taiwan/3534/2012(H3N2): 免疫前 HI 力價為 20，第一次免疫 HI 力價為 160 ，第二次免疫 HI 力價為 320。

(2). B/Taiwan/4748/2012: 免疫前 HI 力價為 20，第一次免疫 HI 力價為 320 ，第二次免疫 HI 力價為 1280。

(3). A/Victoria/361/2011 (H3N2) : 免疫前 HI 力價為 80，第一次免疫 HI 力價為 320，第二次免疫 HI 力價為 640。

(4). B/Hubei-Wujiagang/158/2009: 免疫前 HI 力價為 40，第一次免疫 HI 力價為 160，第二次免疫 HI 力價為 640 。

(5). A/Taiwan/95051/2012(H1N1) : 免疫了兩隻雪貂，第一隻雪貂免疫前 HI 力價為 10，第一次免疫之血清，因頸動脈及尾巴採血未採得，因此無數據，第二次免疫 HI 力價為 2560。

第二隻雪貂免疫前 HI 力價為 40 ，第一次免疫 HI 力價為 1280，已達抗體力價之標準。

(6). A/Taiwan/94932/2012(H3N2) : 免疫兩隻雪貂，第一隻雪貂免疫前 HI 力價為 40，第一次免疫之血清，因頸動脈及尾巴採血未採得，因此無數據，第二次免疫 HI 力價為 2560。

第二隻雪貂免疫前 HI 力價為 20 ，第一次免疫 HI 力價為 640，已達抗體力價之標準。 **(表二)**

我們免疫了兩株 2012年台灣本土 A型 H3N2流感病毒株，一株 2012年台灣本土 A型 H1N1流感病毒株，一株 2012年台灣本土 B型流感病毒株，另外免疫了 A型 H3N2流感疫苗株及 B型流感疫苗株。將免疫之雪貂病毒抗血清提供疾病管制局，作為分析比較新分離

的病毒其抗原性的關係，與疫苗株的抗原性關係。

討論

雪貂到目前為止被認為是一個研究人類流感病毒最理想的小型動物模式，其抗病毒血清，也為國際上分析流感病毒抗原差異的依據。流感病毒的抗原性是利用雪貂血清進行血球凝集抑制試驗 (HI) 來分析，以往國際流感病毒株雪貂抗血清來源由美國疾病管制局 (CDC) 或日本 NIID 提供，但其提供的量有限，無法及時提供比較台灣每年新分離流感病毒株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。因此自行製備流感病毒抗血清，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，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。本計畫已建立了雪貂的繁殖方法、雪貂的飼育及雪貂抗病毒血清之製備。我們每年穩定繁殖 20~30 隻雪貂，飼育 50~60 隻雪貂。雪貂的繁殖月份為 3~8 月，此時期的雪貂對於日照時間之長短相當敏感，日照時數不夠無法促使雪貂發情，而最好的繁殖月份為 3、4、5 月。由於雪貂進口相當昂貴，雪貂的飼育亦花費相當之人力成本，而我們建立了雪貂之繁殖及飼育方法，每年穩定生產雪貂，除供應流感雪貂抗血清之生產外，亦可提供流感病毒之研究、疫苗安全性及有效性之研究。

本計畫分讓了 2011~2012 年由台灣疾病管制局挑選主要的流行病毒株選與抗原偏離的病毒株，進行病毒的大量培養與抗原之製備，在雪貂供應數量許可的範圍下，免疫雪貂，製備雪貂抗病毒血清，提供

疾管局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。

本計畫中，A/Taiwan/3534/2012(H3N2) 之抗血清製備，由於兩次免疫之病毒效價僅 512 HA/50 μL，因而所得之抗病毒血清 HI 力價為 320，因此為避免血清抗體力價過低，免疫雪貂之病毒效價需達 1024 HA/50 μL 含以上。另為避免血清抗體力價過低，每株病毒感染雪貂數，在雪貂供應數量許可的範圍下酌增。

在本計畫中，完成了下列六株流感病毒之抗血清製備:

(1). A/Taiwan/3534/2012(H3N2) : HI 力價為 320。

(2). B/Taiwan/4748/2012: HI 力價為 1280。

(3). A/Victoria/361/2011 (H3N2) : HI 力價為 640。

(4). B/Hubei-Wujiagang/158/2009 : HI 力價為 640。

(5). A/Taiwan/95051/2012(H1N1):以兩隻雪貂製備抗血清，HI 力價分別為 2560 及 1280。

(6). A/Taiwan/94932/2012(H3N2) 以兩隻雪貂製備抗血清，HI 力價分別為 2560 及 640。

本計畫目前已成功繁殖雪貂並持續維護雪貂的飼養與病毒感染的動物模式，並成功製備雪貂抗病毒血清，後續將提供此抗流感病毒的血清給疾病管制局，作為分析比較台灣每年流行的病毒株間免疫反應的關係，並由疾病管制局挑選適合的病毒株，再製備雪貂抗病毒血清。

流感病毒對人類的潛在威脅仍然甚鉅，本計畫製備之抗血清，提供疾病管制局做為分析流感病毒抗原差異的依據，因此此抗血清對於

台灣流感疫情之監測，疾病之防護，將可貢獻一份心力。而本計畫維持流感病毒在雪貂的動物模式，對於一旦發生流感疫情時，可以藉由此動物模式研究流感病毒之致病力及傳染力等。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 建立與維護雪貂的繁殖、飼養管理與流感病毒的感染模式，有助於流感病毒所引起之免疫反應與致病性等特性的研究。

2. 利用本所製備之流感病毒株抗原與製備 6株流感病毒株雪貂抗血清，提供疾管局分析 2012年流感病毒株的抗原特性。

3. 製備 6株流感病毒抗血清，提供疾病管制局進行台灣流感病毒的分析，將有助於疾病管制局掌握流感病毒的流行特性，對疫苗株的挑選與疫苗施打策略提供參考。

參考文獻：

1. 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.
2. Schweiger B, Zadow I, Heckler R. Antigenic drift and variability of influenza viruses. Med Microbiol Immunol (Berl) 2002, 191:133-138.
3. Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Taubenberger JK, et al. Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 padamic virus. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:3166-3137.
4. Nicholson Kg, Wood JM, Zambon M: Influenza. *Lancet* 2003;362: 1733-1745.
5. 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.
6. WHO. Avian influenza: assessing the pandemic threat. Feb 2005. (Accessed Feb 2005, at http://www.who.int/csr/disease/influenza/en/H5N1-pass.pdf)
7. Small PA Jr, Waldman RH, Bruno JC, et al. Influenza 1nfection in ferrets: role of serum antibody in protection and recovery. Infect Immin 1976; 13: 417-424.
8. Smith, H., Sweet, C., 1988. Lessons for human influenza from pathogenicity studies with ferrets. Rev. Infect. Dis. 10, 56–75.
9. 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.

10. Barnard, D.L., 2009. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. Antiviral Res. 2441-2453.
11. 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
12. WHO: Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2010-2011 northern hemisphere influenza season. *Weekly epidemiological record* 2010; 85:81-92.
13. WHO: Recommendations for influenza vaccines, http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinerecommendations/en/index.html