

計畫編號：MOHW106-CDC-C-114-133110

衛生福利部疾病管制署 106 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

106 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：葉嘉翠、楊淳米、張聿秀、林文欽、譚立政

執行期間：106 年 01 月 01 日至 106 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 95 萬元整

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.....	2
(1) 中文摘要.....	2
(2) 英文摘要.....	3
二、本文.....	5
(1) 前言：.....	5
(2) 材料與方法。.....	6
(3) 結果:.....	13
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/87966/2017(H3N2)試驗紀錄及結果:.....	13
II. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二) Type A 流感病毒株 A/Taiwan/97789/2017(H3N2)試驗紀錄及結果:.....	15
III. 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/98583/2017(H3N2)試驗紀錄及結果.....	17
(4) 討論。.....	19
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/87966/2017(H3N2)結果討論:.....	19
II. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二) Type A 流感病毒株 A/Taiwan/97789/2017(H3N2)結果討論:.....	19
III. 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/98583/2017(H3N2)結果討論:.....	20
(5) 重要研究成果及具體建議。.....	21
(6) 參考文獻：請依台灣醫誌編排方式。.....	23
三、附錄.....	26

一、摘要

(1) 中文摘要(字數以不超過六百字為原則)。

研究目的: 對於季節性流感的快速變異, 對抗流感病毒已經成為全球性的重要議題。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, 常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。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。

研究方法: 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增殖、感染雪貂、製備抗血清及測定效價等。

預期結果為: (1). 運用本所已有流感病毒免疫雪貂之動物模式(2). 製備台灣疾病管制署所挑選之流感病毒抗原(3). 製備台灣流感病毒之雪貂抗血清, 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)

Aim: Face to seasonal flu variation rapidly, against the flu virus has become a global important issue. Human Influenza, 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 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 antigenic types of influenza viruses were determined by using the haemagglutination-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 surveillance of influenza viruses in Taiwan, the postinfection ferret sera are required.

Method: Taiwan CDC select the predominant strain and /or low reactors against vaccine stain circulating in Taiwan and provide NDMC to proliferate virus and immune ferrets then obtain the postinfection ferret sera.

Conclusion: In this study, we use 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 NDMC to immune ferrets and generates local strains in Taiwan of the postinfection ferret sera. These sera will provide Taiwan CDC to identify the serotype of the new isolates from Taiwan and characterize the antigenicity of major circulating isolates in Taiwan.

keywords : influenza virus, ferret, antisera

二、本文

(1) 前言：

流感病毒基因片段相當容易發生突變及重組，以藉此逃避人類免疫系統之監控，常經由抗原漂移(antigenic shift)與抗原轉換(antigenic drift)等分子機制，造成主要表面抗原的改變。這使得每一季的病毒疫苗株所產生的免疫力，到了隔年便降低了保護的效果。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。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，不同流感病毒感染雪貂所產生之不同抗病毒血清，可作為判定不同流感病毒血清型的依據。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。雪貂動物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。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 α - 2,6 -糖苷鍵結(α -2,6-glycosidic linkage)黏附於呼吸道內上皮細胞表面的唾液酸(sialic acid)上。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。流感病毒的快速變異嚴重影響了人類的健康，如果能快速製備雪貂抗流感病毒血清，來即時偵測台灣流感病毒抗原性的變化，對於國人疫苗施打的規劃與預防將有重大幫助。

因此本計畫將進行由疾管署分讓各年度台灣之主要流行株與/或低反應流感病毒株 3-6 株。進行病毒之培養，施打誘發出雪貂抗血清，以提供防疫單位對國內流感病毒變異狀態之監測及疫苗發展提供參考。

國防醫學院預防醫學研究所(以下簡稱本所)目前已建立：(1) 雪貂的飼育管理標準操作程序。(2) 並依流感病毒之感染生險，可於感染性動物實驗室以已建立之標準操作流程執行實驗。(3) 於各級生物安全實驗室進行血球凝集抑制試驗 (HI) 測試及中和性抗體效價。(4) 病毒攻毒實驗除評估免疫反應外、亦可進行鼻腔灌洗液病毒量之偵測、及生理變化 (如體重、體溫等) 及病徵評估等。本研究計畫製備之流感病毒抗血清，將提供予疾病管制署作為監測台灣流感病毒流行之狀況。在本計劃中，由台灣疾病管制署分讓提供篩選出之流感病毒株，並進行病毒之增殖後免疫雪貂，免疫後得到的血清，將提供台灣的疾病管制署用於分析台灣流感病毒抗原的演化變異狀況，如此便能比較台灣流感病毒流行株與疫苗株之差異，以作為未來流感防治策略的判斷。

(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% CO₂ 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 TCID₅₀ 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，H₂O₂ 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 TCID₅₀ 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 10⁶/孔，以含 10% FBS 之 DMEM 培養液培養於 6 孔盤中，37°C、5% CO₂ 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% CO₂ 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。

(3) 以 TCID₅₀ 測定病毒效價:

取 MDCK 細胞 1.5×10^4 /孔，培養於 96 孔盤，37°C、5% CO₂ 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 °C、5% CO₂ 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。

(4) 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。

(5) 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 $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ ，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。

(6) 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 0.5 ml 流感病毒培養液(HA 力價約 1024~2048 或 10^6 /ml TCID₅₀), 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/87966/2017(H3N2)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	2017.04.18
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔 滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	2017.04.20
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2017.04.20~05.12
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次 採血及血清分離於 D(14)，血清 送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2017.05.04
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	2017.05.04
6	第二次採血及血清分離，於 D(14+5)	076-P2 實驗室	2017.05.09
7	第三次採血及血清分離於 D(14+8)，血清送測抗體效價。 雪貂抗血清之製備試驗結束即 D(23)。	076-P2 實驗室	2017.05.12
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2017.05.16

試驗紀錄及結果:	操作者						
1. 試驗動物(物質)品質確認。 季節性流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<20 鼻滴入試驗 雪貂耳標編號：No. : <u>No.345、347</u>	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u>						
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 / 128 HA/隻	<u>葉嘉翠</u> <u>林文欽</u>						
3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(14)，血清送 測抗體效價檢測結果。 <table border="1" data-bbox="300 981 1023 1205"> <thead> <tr> <th>雪貂耳標編號</th> <th>HI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><u>No.345</u> (鼻滴入)</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td><u>No.347</u> (鼻滴入)</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table>	雪貂耳標編號	HI	<u>No.345</u> (鼻滴入)	80	<u>No.347</u> (鼻滴入)	80	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u> <u>及疾管署研檢中心</u>
雪貂耳標編號	HI						
<u>No.345</u> (鼻滴入)	80						
<u>No.347</u> (鼻滴入)	80						
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 / 128HA/隻。	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u>						
5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(14+5)	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u>						
6. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(14+8)，血清 送測抗體效價檢測結果。 <table border="1" data-bbox="300 1720 1023 1944"> <thead> <tr> <th>雪貂耳標編號</th> <th>HI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><u>No.345</u> (鼻滴入)</td> <td>160</td> </tr> <tr> <td><u>No.347</u> (鼻滴入)</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table>	雪貂耳標編號	HI	<u>No.345</u> (鼻滴入)	160	<u>No.347</u> (鼻滴入)	80	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u> <u>及疾管署研檢中心</u>
雪貂耳標編號	HI						
<u>No.345</u> (鼻滴入)	160						
<u>No.347</u> (鼻滴入)	80						

II. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二) Type A 流感病毒株
A/Taiwan/97789/2017(H3N2)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	2017.07.12
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴 定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	2017.07.14
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2017.07.14~08.02
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採 血及血清分離於 D(11)，血清送測 抗體效價。	076-P2 實驗室	2017.07.25
5	雪貂抗血清之製備試驗流感病毒 分別以鼻滴入或腳掌免疫試驗施 行 D(14+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	2017.07.28
6	第二次採血及血清分離，於 D(14+3)	076-P2 實驗室	2017.07.31
7	第三次採血及血清分離於 D(14+5)，血清送測抗體效價。雪 貂抗血清之製備試驗結束即 D(19)。	076-P2 實驗室	2017.08.02
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2017.08.03

試驗紀錄及結果	操作者						
1. 試驗動物(物質)品質確認。 季節性流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<40 鼻滴入試驗 雪貂耳標編號： <u>No.319</u> 、 <u>327</u>	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u>						
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 / 256 HA/隻	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u>						
3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(11)，血清送測抗體 效價檢測結果。 <table border="1" data-bbox="264 745 987 929" style="margin-left: 40px;"> <thead> <tr> <th>雪貂耳標編號</th> <th>HI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>No.319 (鼻滴入)</td> <td>320</td> </tr> <tr> <td>No.327 (鼻滴入)</td> <td>640</td> </tr> </tbody> </table>	雪貂耳標編號	HI	No.319 (鼻滴入)	320	No.327 (鼻滴入)	640	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u> 及疾管署研檢中心
雪貂耳標編號	HI						
No.319 (鼻滴入)	320						
No.327 (鼻滴入)	640						
4. 第二次免疫 D(14+0)，每一隻皆以(Zoletil 50， 7.5 mg/kg)進行麻醉，鼻腔滴定動物於鼻腔滴定 0.5ml 病毒 液 0.5ml / 256 HA/隻，腳掌免疫動物分別於前肢兩腳 掌肉墊中肌肉注射各 0.25ml 病毒液，共 0.5ml / 256 HA/隻。 <table border="1" data-bbox="207 1240 1099 1541" style="margin-left: 40px;"> <thead> <tr> <th>第二次免疫途徑 雪貂耳標編號</th> <th>劑量 HA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><u>No.319</u> (鼻滴入)</td> <td>0.5ml 病毒液 0.5ml / 256 HA/隻</td> </tr> <tr> <td><u>No.327</u> (腳掌免疫)</td> <td>左有肢各注射 0.25ml 病毒液， 共 0.5ml / 256 HA/隻</td> </tr> </tbody> </table>	第二次免疫途徑 雪貂耳標編號	劑量 HA	<u>No.319</u> (鼻滴入)	0.5ml 病毒液 0.5ml / 256 HA/隻	<u>No.327</u> (腳掌免疫)	左有肢各注射 0.25ml 病毒液， 共 0.5ml / 256 HA/隻	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u>
第二次免疫途徑 雪貂耳標編號	劑量 HA						
<u>No.319</u> (鼻滴入)	0.5ml 病毒液 0.5ml / 256 HA/隻						
<u>No.327</u> (腳掌免疫)	左有肢各注射 0.25ml 病毒液， 共 0.5ml / 256 HA/隻						
5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(14+3)	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u>						
6. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(14+5)，血清送測抗 體效價檢測結果。 <table border="1" data-bbox="264 1765 1046 1946" style="margin-left: 40px;"> <thead> <tr> <th>雪貂耳標編號</th> <th>HI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><u>No.319</u> (1'鼻滴入+2'鼻滴入)</td> <td>2560</td> </tr> <tr> <td><u>No.327</u> (1'鼻滴入+2'腳掌免疫)</td> <td>1280</td> </tr> </tbody> </table>	雪貂耳標編號	HI	<u>No.319</u> (1'鼻滴入+2'鼻滴入)	2560	<u>No.327</u> (1'鼻滴入+2'腳掌免疫)	1280	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u> 及疾管署研檢中心
雪貂耳標編號	HI						
<u>No.319</u> (1'鼻滴入+2'鼻滴入)	2560						
<u>No.327</u> (1'鼻滴入+2'腳掌免疫)	1280						

III. 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/98583/2017(H3N2)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	2017.09.12
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	2017.09.14
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2017.09.14~10.05
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(11)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2017.09.25
5	雪貂抗血清之製備試驗流感病毒分別以鼻滴入或腳掌免疫試驗施行 D(13+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	2017.09.27
6	第二次採血及血清分離，於 D(13+5)	076-P2 實驗室	2017.10.02
7	第三次採血及血清分離於 D(13+8)，血清送測抗體效價。雪貂抗血清之製備試驗結束即 D(21)。	076-P2 實驗室	2017.10.05
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2017.10.06

試驗紀錄及結果:	操作者						
1. 試驗動物(物質)品質確認。 季節性流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<10 鼻滴入試驗 雪貂耳標編號 : : <u>No.348</u> 、 <u>351</u>	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u>						
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 / 512 HA/隻	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u>						
3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(11) ，血清送測抗 體效價檢測結果。 <table border="1" data-bbox="279 779 1002 958"> <thead> <tr> <th>雪貂耳標編號</th> <th>HI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><u>No.348</u> (鼻滴入)</td> <td>160</td> </tr> <tr> <td><u>No.351</u> (鼻滴入)</td> <td>160</td> </tr> </tbody> </table>	雪貂耳標編號	HI	<u>No.348</u> (鼻滴入)	160	<u>No.351</u> (鼻滴入)	160	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u> 及疾管署 研檢中心
雪貂耳標編號	HI						
<u>No.348</u> (鼻滴入)	160						
<u>No.351</u> (鼻滴入)	160						
4. 第二次免疫 D(13+0) ，每一隻皆以(Zoletil 50， 7.5 mg/kg)進行麻醉，鼻腔滴定動物於鼻腔滴定 0.5ml 病 毒液 0.5ml / 256 HA/隻，腳掌免疫動物分別於前肢兩 腳掌肉墊中肌肉注射各 0.25ml 病毒液，共 0.5ml / 256 HA/隻。 <table border="1" data-bbox="226 1279 1139 1574"> <thead> <tr> <th>第二次免疫途徑 雪貂耳標編號</th> <th>劑量 HA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><u>No.348</u> (鼻滴入)</td> <td>0.5ml 病毒液 0.5ml / 256 HA/隻</td> </tr> <tr> <td><u>No.351</u> (腳掌免疫)</td> <td>左有肢各注射 0.25ml 病毒液， 共 0.5ml / 256 HA/隻</td> </tr> </tbody> </table>	第二次免疫途徑 雪貂耳標編號	劑量 HA	<u>No.348</u> (鼻滴入)	0.5ml 病毒液 0.5ml / 256 HA/隻	<u>No.351</u> (腳掌免疫)	左有肢各注射 0.25ml 病毒液， 共 0.5ml / 256 HA/隻	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u>
第二次免疫途徑 雪貂耳標編號	劑量 HA						
<u>No.348</u> (鼻滴入)	0.5ml 病毒液 0.5ml / 256 HA/隻						
<u>No.351</u> (腳掌免疫)	左有肢各注射 0.25ml 病毒液， 共 0.5ml / 256 HA/隻						
5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(13+5)	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u>						
6. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(13+8) ，血清送測 抗體效價檢測結果。 <table border="1" data-bbox="279 1805 1082 1989"> <thead> <tr> <th>雪貂耳標編號</th> <th>HI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><u>No.348</u> (1'鼻滴入+2'鼻滴入)</td> <td>1280</td> </tr> <tr> <td><u>No.351</u> (1'鼻滴入+2'腳掌免疫)</td> <td>2560</td> </tr> </tbody> </table>	雪貂耳標編號	HI	<u>No.348</u> (1'鼻滴入+2'鼻滴入)	1280	<u>No.351</u> (1'鼻滴入+2'腳掌免疫)	2560	<u>葉嘉翠</u> <u>楊淳米</u> 及疾管署 研檢中心
雪貂耳標編號	HI						
<u>No.348</u> (1'鼻滴入+2'鼻滴入)	1280						
<u>No.351</u> (1'鼻滴入+2'腳掌免疫)	2560						

(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/87966/2017(H3N2)結果討論:

Type A A/Taiwan/87966/2017(H3N2)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，該病毒於實驗中觀察到動物感染後雪貂流感症狀並不顯著，無咳嗽、流鼻水、打噴嚏等症狀且無倦怠活力低下的狀態。本次試驗 D14+8 於第二次免疫以後之雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 效價僅達到 160、80，抗體效價勉強達到檢測需求，本實驗於 2017.05.12 完成本株病毒株 A/Taiwan/87966/2017 (H3N2)之抗血清製作，並製作完整結果紀錄。實驗室端發現近年來 H3N2 病毒經細胞培養後的 HA titer 持續逐年下降，經濃縮後的病毒 HA titer 也才勉強落在 128~256 之間，未來免疫方式將改以 IN 做為第一次免疫，第二次免疫改以腳掌免疫方式施行，以提高免疫製作之抗血清效價。

II. 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二) Type A 流感病毒株 A/Taiwan/97789/2017(H3N2)結果討論:

Type A A/Taiwan/97789/2017(H3N2)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，該病毒於實驗中觀察到動物感染後雪貂無咳嗽、流鼻水、打噴嚏等症狀，但有一點倦怠活力低下的現象，流感症狀並不顯著。本次試驗 D14+3 於第二次免疫以後之雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 效價為 2560、1280，抗體效價達到檢測需求，本實驗於 2017.08.03 完成本病毒株 A/Taiwan/97789/2017(H3N2)之抗血清製作，並完成結果紀錄。參考前次試驗，本次試驗 H3N2 病毒的 HA tite 經濃縮後達到

256~512/ml 之間，第一次免疫以 IN 方式進行，第二次免疫則分別以 IN 或腳掌免疫方式施行，希望能提高製作之抗血清的免疫效價，結果 HI 的效價都相當高，且二者並無顯著的差異，所以推測，當抗原量足夠的時候，免疫路徑不同所誘發的抗體產生差異已經不大，當然這也可能與病毒抗原感染後的病理特性有關。

III. 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/98583/2017(H3N2)結果討論：

Type A A/Taiwan/98583/2017 (H3N2)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，而第二次免疫則分別以 IN 或腳掌免疫方式施行。該病毒於實驗中觀察到動物感染後雪貂無咳嗽、流鼻水、打噴嚏等症狀，活動力正常，流感症狀不顯著。本次試驗 D13+5 於第二次免疫以後之雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 效價為 1280、2560，抗體效價達到檢測需求，本實驗於 2017.10.05 完成本病毒株 A/Taiwan/98583/2017 (H3N2)之抗血清製作，並完成結果紀錄。參考前次試驗，本次試驗 H3N2 病毒第一次免疫以 IN 方式進行，第二次免疫則分別以 IN 或腳掌免疫方式施行，結果 HI 的效價都相當高，但以腳掌免疫方式施行之 No.351，比以 IN 方式施行免疫者 No.348 產生之抗體效價略高，但因實驗方法採 2 倍率稀釋，僅差一個稀釋倍數，故不敢斷言二者有確有顯著的差異，惟本次試驗結果，可供未來試驗做為參考。

(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2017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 4/20 第一株流感病毒 A/Taiwan/87966/2017 (H3N2)
 - ii. 於 7/14 第二株流感病毒 A/Taiwan/97789/2017(H3N2)
 - iii. 於 9/14 第三株流感病毒 A/Taiwan/98583/2017(H3N2)
- III. 完成了下列三株流感病毒之抗血清製備及效價之測定:
- i. 第一株流感病毒 A/Taiwan/87966/2017 (H3N2) 以兩隻雪貂製備抗血清，HI 力價分別為 160 及 80。
 - ii. 第二株流感病毒 A/Taiwan/97789/2017(H3N2)以兩隻雪貂製備抗血清，HI 力價分別為 2560 及 1280。
 - iii. 第三株流感病毒 A/Taiwan/98583/2017(H3N2)以兩隻雪貂製備抗血清，HI 力價分別為 1280 及 2560。
- 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，而且實驗室端發現近年來 H3N2 病毒經細胞培養後的 HA titer 持續逐年下降，經濃縮後的病毒 HA titer 也才勉強落在 128~256 之間，未來免疫方式如有必要將 IN 做為第一次免疫，第二次免疫改以腳掌免疫方式施行，以提高免疫製作之抗血清效價。
- V. 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。

(6) 參考文獻：請依台灣醫誌編排方式。

1. WHO(2009) National Influenza Center WHO guidance document; Apr.
2. WHO (2002). WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance.
<http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs20025rev.pdf>
3. WHO (2005). WHO global influenza preparedness plan, 2005.
http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_5/en/index.html
4. WHO (2005). WHO guidelines for the storage and transport of human and animal specimens for laboratory diagnosis of suspected avian influenza A infection January 2005
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/transport/en/index.html
5. WHO (2007). WHO National Influenza Center
<http://www.who.int/csr/disease/influenza/centres/en/index.html>
6. Smith, H., Sweet, C., 1988. Lessons for human influenza from pathogenicity studies with ferrets. *Rev. Infect. Dis.* 10, 56–75.
7. 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.
8. Barnard, D.L., 2009. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Res.* 2441-2453.
9. Belser, J.A., J.M. Katz, and T.M. Tumpey, The ferret as a model organism to study influenza A virus infection. *Dis Model Mech*, 2011. 4(5): p. 575-9.
10. Inagaki, K., et al., Determination of Influenza Virus Infectivity and

Correlation to Diagnostic Assays in Ferret Model. *J Infect Dis*, 2015.

11. Belser, J. A., Eckert, A. M., Tumpey, T. M., & Maines, T. R. (2016). Complexities in Ferret Influenza Virus Pathogenesis and Transmission Models. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80(3), 733-744.
12. Taylor, G. (2017). Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine*, 35(3), 469-480.
13. 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.
14. Schweiger B, Zadow I, Heckler R. Antigenic drift and variability of influenza viruses. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2002, 191:133-138.
15. 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.
16. 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).
17. Tomas R., Alberto J.L., et al., Modeling host responses in ferrets during A/California/07/2009 influenza infection. *Virology* 401(2009) 257-265.
18. Herfst, S., et al., Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*, 2012. 336(6088): p. 1534-41.
19. Zhu, H., et al., Infectivity, transmission, and pathology of

- human-isolated H7N9 influenza virus in ferrets and pigs. *Science*, 2013. 341(6142): p. 183-6.
20. Lipsitch, M., Avian influenza: Ferret H7N9 flu model questioned. *Nature*, 2013. 501(7465): p. 33
 21. Tsuda, Y., Weisend, C., Martellaro, C., Feldmann, F., & Haddock, E. (2017). Pathogenic analysis of the pandemic 2009 H1N1 influenza A viruses in ferrets. *J Vet Med Sci*, 79(8), 1453-1460.
 22. WHO: Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2010-2011 northern hemisphere influenza season. *Weekly epidemiological record* 2010; 85:81-92.
 23. WHO: Recommendations for influenza vaccines, <http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinerecommendations/en/index.html>
 24. 實驗動物管理與使用指南第三版(擴充版)，行政院農業委員會出版，(A GUIDEBOOK FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS)，九十九年十二月出版。
 25. 實驗動物技術人員訓練教材，第一級，中華實驗動物學會編製，九十四年十二月出版。
 26. 實驗室生物安全手冊，第三版，世界衛生組織日內瓦2004，九十四年六月譯。
 27. 『機構動物管理及使用委員會作業手冊』，中華民國實驗動物學會出版，九十六年十一月出版。
 28. 動物生物安全第一等級至第三等級實驗室安全規範(第一版)，行政院衛生署疾病管制局，一0二年十二月出版編製。
 1. 微生物及生物醫學實驗室生物安全規範 (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories) (第5版) 2009。

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/87966/2017 (H3N2)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/87966/2017(H3N2)

試驗機構：國防醫學院預防醫學研究所

試驗人員：葉嘉翠、林文欽、楊淳米

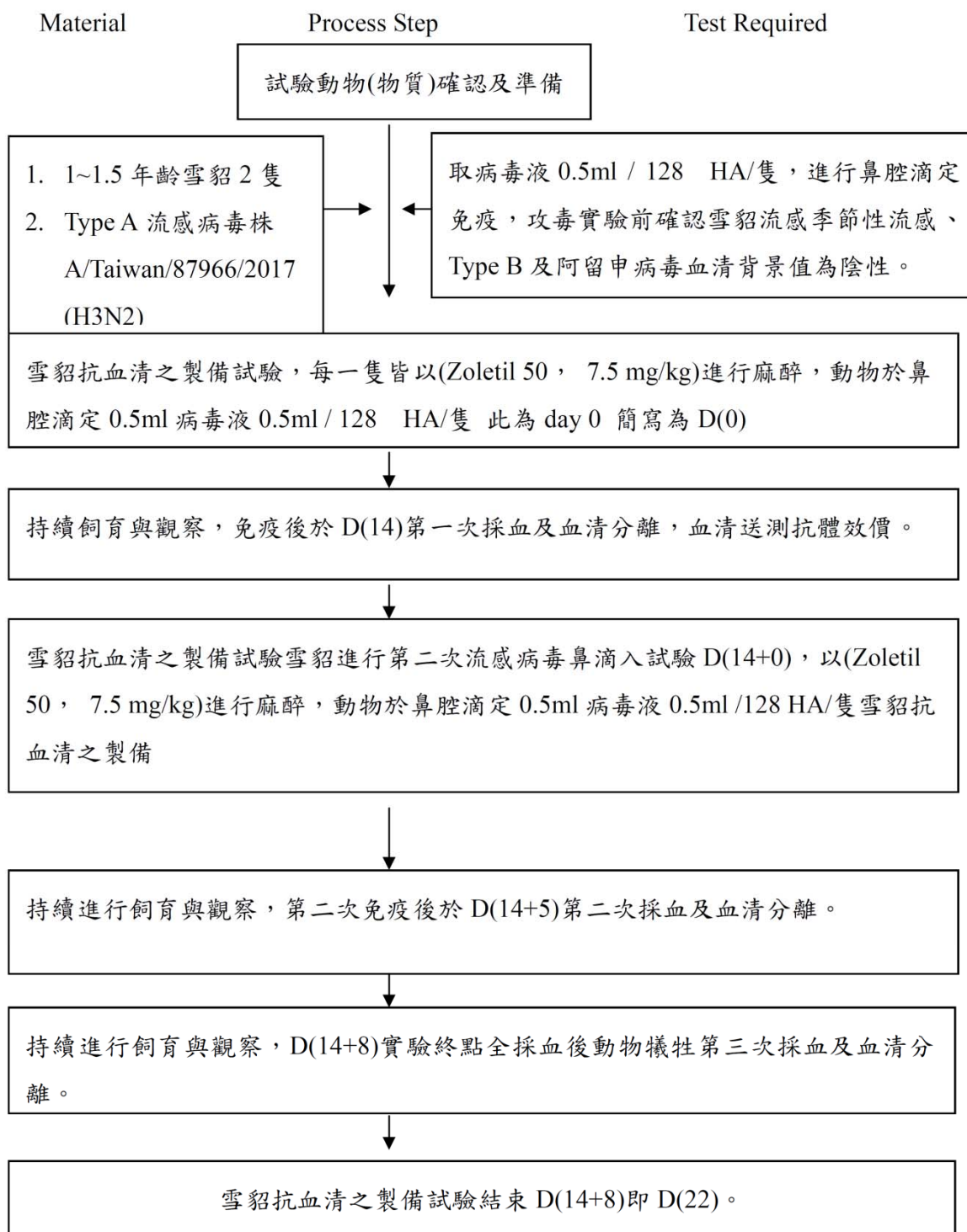
試驗日期：20170420~20170512

試驗主持人：葉嘉翠

計畫主持人：謝博軒

試驗機構負責人：

(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	2017.04.18	葉嘉翠、楊淳米
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	2017.04.20	葉嘉翠、林文欽
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2017.04.20~05.12	葉嘉翠、溫芷瑀
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(14)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2017.05.04	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	2017.05.04	葉嘉翠、楊淳米
6	第二次採血及血清分離，於 D(14+5)	076-P2 實驗室	2017.05.09	葉嘉翠、楊淳米
7	第三次採血及血清分離於 D(14+8)，血清送測抗體效價。雪貂抗血清之製備試驗結束即 D(22)。	076-P2 實驗室	2017.05.12	葉嘉翠、楊淳米
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2017.05.16	楊淳米

(三) 試驗紀錄及結果:

操作者

1. 試驗動物(物質)品質確認。

季節性流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<20

鼻滴入試驗 雪貂耳標編號：No.345、347

葉嘉學 楊厚平

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 / 128 HA/隻

葉嘉學 楊厚平

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(14)，血清送測抗體

效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.345</u> (鼻滴入)	80
<u>No.347</u> (鼻滴入)	80

葉嘉學 楊厚平

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 / 128 HA/隻。

葉嘉學 楊厚平

5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(14+5)

葉嘉學 楊厚平

6. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(14+8)，血清送測抗

體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.345</u> (鼻滴入)	160
<u>No.347</u> (鼻滴入)	80

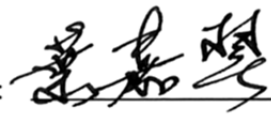
葉嘉學 楊厚平

及疾管署研檢中心

7. 結論:

本次試驗為 Type A A/Taiwan/87966/2017(H3N2) 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，該病毒於實驗中觀察到動物感染後雪貂流感症狀並不顯著，無咳嗽、流鼻水、打噴嚏等症狀且無倦怠活力低下的狀態。本次試驗 D14+8 於第二次免疫以後之雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 效價僅達到 160、80，抗體效價勉強達到檢測需求，本實驗於 2017.05.12 完成本株病毒毒株 A/Taiwan/87966/2017 (H3N2)之抗血清製作，並製作完整結果紀錄。實驗室端發現近年來 H3N2 病毒經細胞培養後的 HA titer 持續逐年下降，經濃縮後的病毒 HA titer 也才勉強落在 128~256 之間，未來免疫方式將改以 IN 做為第一次免疫，第二次免疫改以腳掌免疫方式施行，以提高免疫製作之抗血清效價。

試驗負責人簽名：



(2) 試驗名稱：流感病毒雪貂抗血清之製備(二) Type A 流感病毒株 A/Taiwan/97789/2017(H3N2)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)

Type A 流感病毒株 A/Taiwan/97789/2017(H3N2)

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

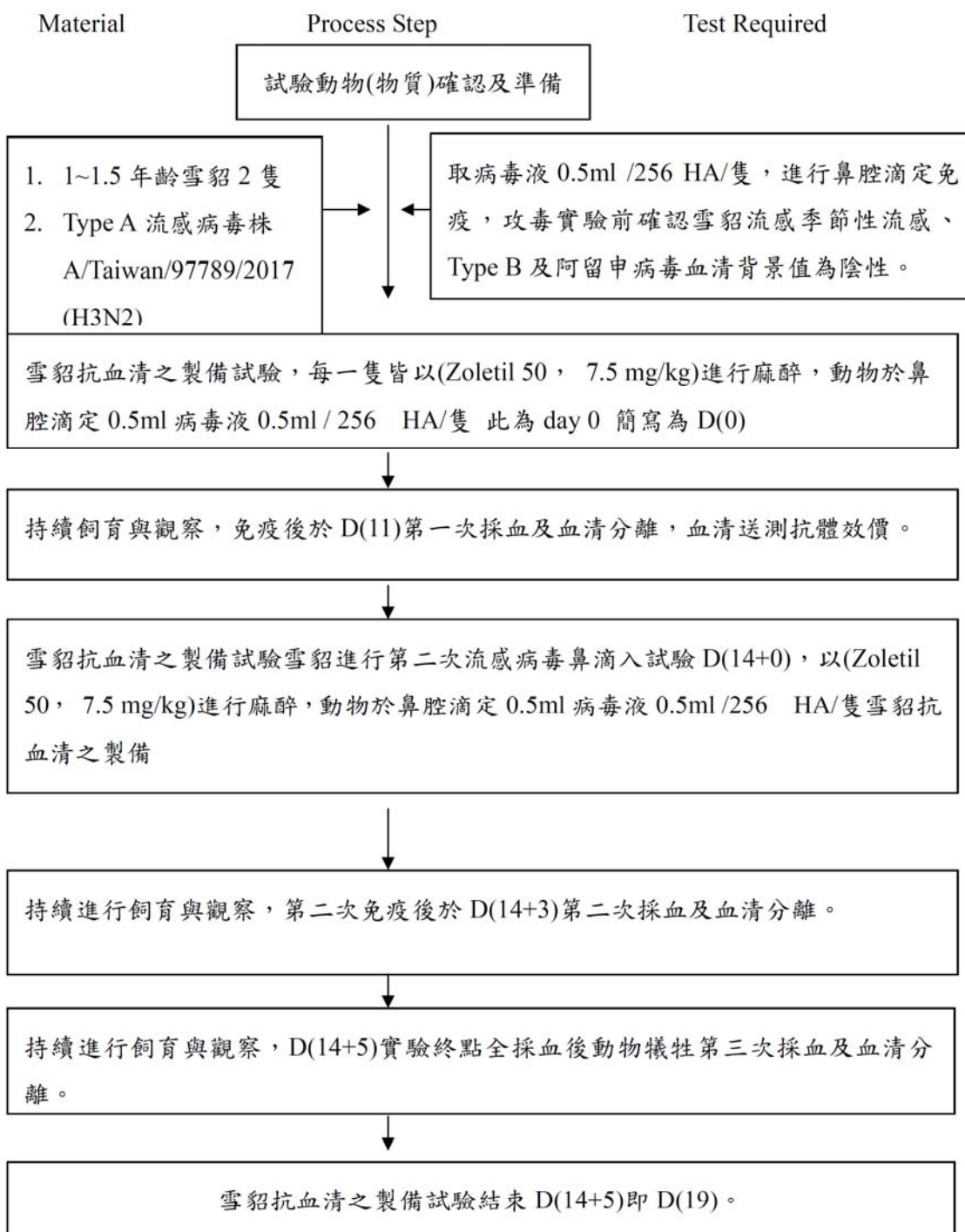
試驗日期：20170714~20170803

試驗主持人：葉嘉翠

計畫主持人：謝博軒

試驗機構負責人：

(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	2017.07.12	葉嘉翠、楊淳米
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	2017.07.14	葉嘉翠、楊淳米
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2017.07.14~08.02	葉嘉翠、溫芷瑀
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(11)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2017.07.25	葉嘉翠、楊淳米
5	雪貂抗血清之製備試驗流感病毒分別以鼻滴入或腳掌免疫試驗施行 D(14+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	2017.07.28	葉嘉翠、楊淳米
6	第二次採血及血清分離，於 D(14+3)	076-P2 實驗室	2017.07.31	葉嘉翠、楊淳米
7	第三次採血及血清分離於 D(14+5)，血清送測抗體效價。雪貂抗血清之製備試驗結束即 D(19)。	076-P2 實驗室	2017.08.02	葉嘉翠、楊淳米
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2017.08.03	楊淳米、林文欽

(三) 試驗紀錄及結果:

操作者

1. 試驗動物(物質)品質確認。

季節性流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<40

鼻滴入試驗 雪貂耳標編號：No.319、327

葉嘉明 楊淳米

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 / 256 HA/隻

葉嘉明 楊淳米

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(11)，血清送測抗體

效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.319</u> (鼻滴入)	320
<u>No.327</u> (鼻滴入)	640

葉嘉明 楊淳米

及疾管署研檢中心

4. 第二次免疫 D(14+0) ，每一隻皆以(Zoletil 50， 7.5 mg/kg)進行麻醉，鼻腔滴定動物於鼻腔滴定 0.5ml 病毒液 0.5ml / 256 HA/隻，腳掌免疫動物分別於前肢兩腳掌肉墊中肌肉注射各 0.25ml 病毒液，共 0.5ml / 256 HA/隻。

第二次免疫途徑	劑量 HA
雪貂耳標編號	
<u>No.319</u> (鼻滴入)	0.5ml 病毒液 0.5ml / 256 HA/隻
<u>No.327</u> (腳掌免疫)	左有肢各注射 0.25ml 病毒液， 共 0.5ml / 256 HA/隻

葉嘉明 楊淳米

5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(14+3)

葉嘉恩 楊淳米

6. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(14+5)，血清送測抗體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
No.319 (1'鼻滴入+2'鼻滴入)	2560
No.327 (1'鼻滴入+2'腳掌免疫)	1280

葉嘉恩 楊淳米

及疾管署研檢中心

7. 結論:

本次試驗為 Type A A/Taiwan/97789/2017(H3N2) 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，該病毒於實驗中觀察到動物感染後雪貂無咳嗽、流鼻水、打噴嚏等症狀，但有一點倦怠活力低下的現象，流感症狀並不顯著。本次試驗 D14+3 於第二次免疫以後之雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 效價為 2560、1280，抗體效價達到檢測需求，本實驗於 2017.08.03 完成本病毒株 A/Taiwan/97789/2017(H3N2)之抗血清製作，並完成結果紀錄。參考前次試驗，本次試驗 H3N2 病毒的 HA tite 經濃縮後達到 256~512/ml 之間，第一次免疫以 IN 方式進行，第二次免疫則分別以 IN 或腳掌免疫方式施行，希望能提高製作之抗血清的免疫效價，結果 HI 的效價都相當高，且二者並無顯著的差異，所以推測，當抗原量足夠的時候，免疫路徑不同所誘發的抗體產生差異已經不大，當然這也可能與病毒抗原感染後的病理特性有關。

試驗負責人簽名：

葉嘉恩

- (3) 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/98583/2017(H3N2)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/98583/2017(H3N2)

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

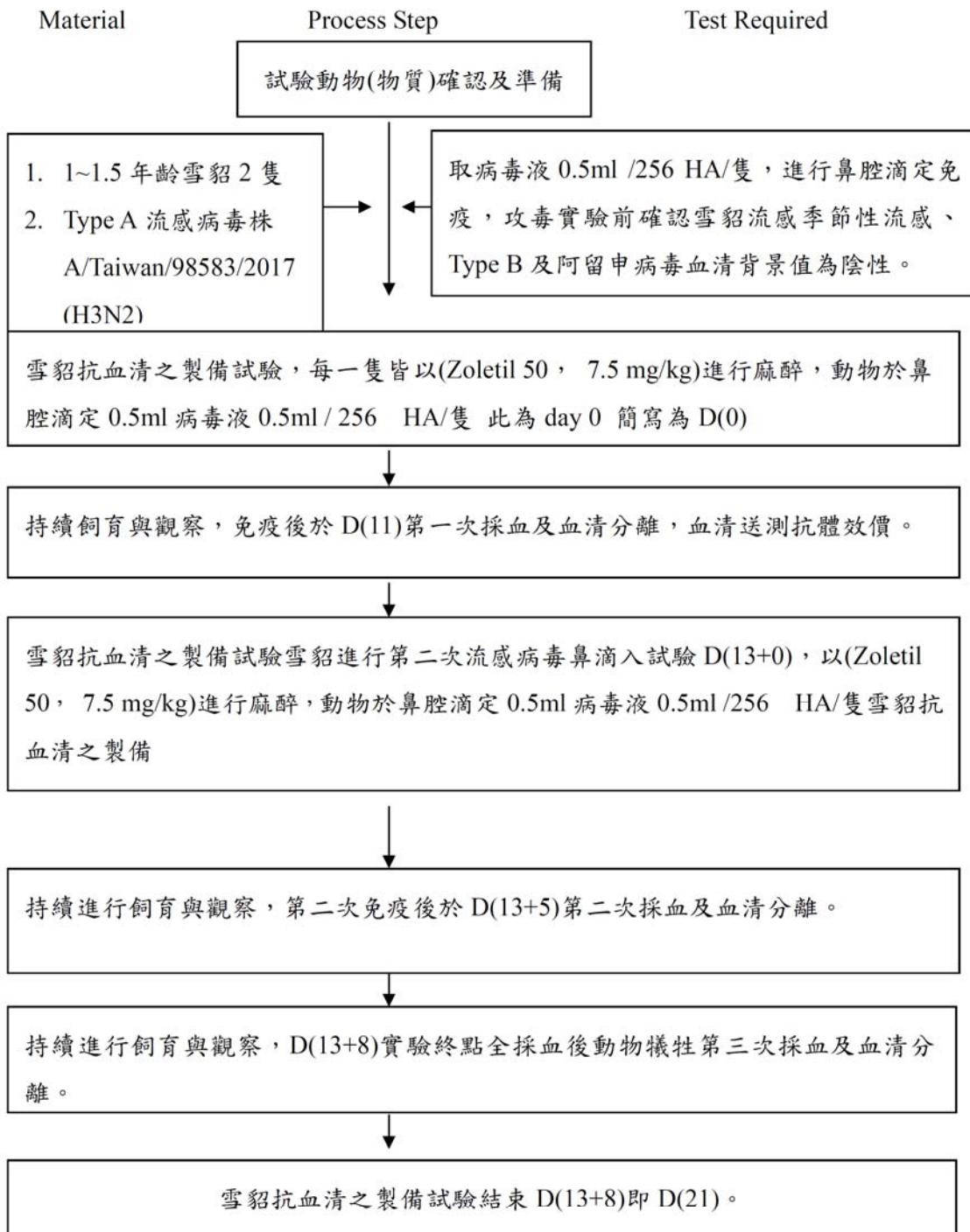
試驗日期：20170914~20171005

試驗主持人：葉嘉翠

計畫主持人：謝博軒

試驗機構負責人：

(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	2017.09.12	葉嘉翠、楊淳米
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	2017.09.14	葉嘉翠、楊淳米
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2017.09.14~10.05	楊淳米、溫芷瑀
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(11)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2017.09.25	葉嘉翠、楊淳米
5	雪貂抗血清之製備試驗流感病毒分別以鼻滴入或腳掌免疫試驗施行 D(13+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	2017.09.27	葉嘉翠、楊淳米
6	第二次採血及血清分離，於 D(13+5)	076-P2 實驗室	2017.10.02	楊淳米、溫芷瑀
7	第三次採血及血清分離於 D(13+8)，血清送測抗體效價。雪貂抗血清之製備試驗結束即 D(21)。	076-P2 實驗室	2017.10.05	葉嘉翠、楊淳米
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2017.10.06	楊淳米、林文欽

(三) 試驗紀錄及結果:

操作者

1. 試驗動物(物質)品質確認。

季節性流感病毒血清背景值篩檢，皆 HA<10

鼻滴入試驗 雪貂耳標編號：No.348、351

葉嘉琪 楊淳米

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 / 256 HA/隻

葉嘉琪 楊淳米

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(11)，血清送測抗體

效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.348</u> (鼻滴入)	160
<u>No.351</u> (鼻滴入)	160

葉嘉琪 楊淳米

及疾管署研檢中心

4. 第二次免疫 D(13+0) ，每一隻皆以(Zoletil 50， 7.5

mg/kg)進行麻醉，鼻腔滴定動物於鼻腔滴定 0.5ml 病毒

液 0.5ml / 256 HA/隻，腳掌免疫動物分別於前肢兩腳

掌肉墊中肌肉注射各 0.25ml 病毒液，共 0.5ml / 256

HA/隻。

第二次免疫途徑 雪貂耳標編號	劑量 HA
<u>No.348</u> (鼻滴入)	0.5ml 病毒液 0.5ml / 256 HA/隻
<u>No.351</u> (腳掌免疫)	左有肢各注射 0.25ml 病毒液， 共 0.5ml / 256 HA/隻

葉嘉琪 楊淳米


5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(13+5)



6. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(13+8)，血清送測抗

體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
No.348 (1'鼻滴入+2'鼻滴入)	1280
No.351 (1'鼻滴入+2'腳掌免疫)	2560


及疾管署研檢中心

7. 結論:

本次試驗為 Type A A/Taiwan/98583/2017 (H3N2) 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，而第二次免疫則分別以 IN 或腳掌免疫方式施行。該病毒於實驗中觀察到動物感染後雪貂無咳嗽、流鼻水、打噴嚏等症狀，活動力正常，流感症狀不顯著。本次試驗 D13+5 於第二次免疫以後之雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 效價為 1280、2560，抗體效價達到檢測需求，本實驗於 2017.10.05 完成本病毒株 A/Taiwan/98583/2017 (H3N2) 之抗血清製作，並完成結果紀錄。參考前次試驗，本次試驗 H3N2 病毒第一次免疫以 IN 方式進行，第二次免疫則分別以 IN 或腳掌免疫方式施行，結果 HI 的效價都相當高，但以腳掌免疫方式施行之 No.351，比以 IN 方式施行免疫者 No.348 產生之抗體效價略高，但因實驗方法採 2 倍率稀釋，僅差一個稀釋倍數，故不敢斷言二者有確有顯著的差異，惟本次試驗結果，可供未來試驗做為參考。

試驗負責人簽名：

