

計畫編號：MOHW105-CDC-C-114-123110

衛生福利部疾病管制署 105 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

105 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、吳雪齡、譚立政

執行期間：105 年 01 月 01 日至 105 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.....	3
(1) 中文摘要.....	3
(2) 英文摘要.....	4
三、 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/ S5102 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 /85606/2016 (H1N1)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/87302/2016(H3N2)試驗紀錄及結果.....	17
(4) 討論。.....	19
(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.....	25

I. 摘要

(1) 中文摘要(字數以不超過六百字為原則)。

研究目的: 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: 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 strain 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 generate 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

II. 本文

(1) 前言：

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。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。目前流感病毒對人類健康影響甚鉅，為了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，將有助於台灣疫苗施打策略的規劃與預防。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，協助於台灣流感病毒發生及變異之監測及疫苗發展之參考。

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。

III. 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。

IV. 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。

V. 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℃，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。

VI. 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 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/ S5102 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	2016.02.01
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔 滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	2016.02.01
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2016.02.01~02.16
4	持續飼育與觀察，免疫後第一 次採血及血清分離於 D(15)，血 清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2016.02.16
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(15+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	2016.02.16
6	第二次採血及血清分離，於 D(15+7)	076-P2 實驗室	2016.02.23
7	第三次採血及血清分離於 D(15+9)，血清送測抗體效價。 雪貂抗血清之製備試驗結束即 D(24)。	076-P2 實驗室	2016.02.25
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2016.02.25

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.290、293

葉嘉翠 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 /

10240 HA/隻

葉嘉翠 楊淳米

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(15)，血清送

測抗體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.290</u> (鼻滴入)	2560
<u>No.293</u> (鼻滴入)	1280

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(15+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 / 10240HA/隻。

葉嘉翠 楊淳米

5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(15+7)

葉嘉翠 楊淳米

6. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(15+9)，血清

送測抗體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.290</u> (鼻滴入)	2560
<u>No.293</u> (鼻滴入)	1280

葉嘉翠 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) Type A 流感病毒株
A/Taiwan /85606/2016 (H1N1) 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	2016.04.07
2 雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔 滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	2016.04.07
3 每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2016.04.07~04.20
4 持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(13)， 血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2016.04.20
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(13+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	2016.04.20
6 第二次採血及血清分離，於 D(13+5)	076-P2 實驗室	2016.04.25
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	2016.04.28
9 實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2016.04.28

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.291、295

葉嘉翠 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 / 10240 HA/隻

葉嘉翠 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免疫後第一次採血及血清分離於 D(13)，血清送測抗體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.291</u> (鼻滴入)	2560
<u>No.295</u> (鼻滴入)	2560

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(13+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 / 10240HA/隻。

葉嘉翠 楊淳米

5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(13+5)

葉嘉翠 楊淳米

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
<u>No.291</u> (鼻滴入)	2560
<u>No.295</u> (鼻滴入)	2560

葉嘉翠 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(三) Type A 流感病毒株
A/Taiwan/87302/2016(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	2016.10.07
2	雪貂抗血清之製備試驗- 鼻腔滴定免疫 D(0)	076-P2 實驗室	2016.10.12
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2016.10.07~11.04
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	2016.10.26
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	2016.10.26
6	第二次採血及血清分離，於 D(14+6)	076-P2 實驗室	2016.11.01
7	第三次採血及血清分離於 D(14+9)，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	2016.11.04
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2016.11.07

操作者

7. 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.343、344

葉嘉翠 楊淳米

8. 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

葉嘉翠 楊淳米

9. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(13)，血清送測抗體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.343</u> (鼻滴入)	160
<u>No.344</u> (鼻滴入)	80

葉嘉翠 楊淳米

及疾管署

研檢中心

10. 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 / 512 HA/隻。

葉嘉翠 楊淳米

葉嘉翠 楊淳米

11. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(14+6)

及疾管署

研檢中心

12. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(14+9)，血清送測抗體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.343</u> (鼻滴入)	320
<u>No.344</u> (鼻滴入)	320

葉嘉翠 楊淳米

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/S5102 結果討論:

本次試驗為 Type A A/Taiwan/S5102(H1N1)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活力明顯下降但流感症狀並不顯著，無咳嗽、流鼻水、打噴嚏等症狀但有倦怠活力低下的狀態。D15+9 第二、三次雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 達到 2560、1280，抗體效價達到檢測需求。本實驗於 2016.02.05 完成本株病毒毒株 A/Taiwan/S5102(H1N1)之抗血清製作，並製作完整結果紀錄。

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/85606/2016 (H1N1)結果討論:

本次試驗為 Type A A/Taiwan /85606/2016 (H1N1) 流感病毒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活力並無明顯下降且無流感症狀，無咳嗽、流鼻水、打噴嚏等症狀活動力正常。D13+8 第二、三次雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 達到 2560、2560，抗體效價達到檢測需求。本實驗於 2016.04.28 完成本株病毒毒株 A/Taiwan /85606/2016 (H1N1)之抗血清製作，並製作完整結果紀錄。

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/87302/2016(H3N2)結果討論:

本次試驗為 Type A A/Taiwan/87302/2016 (H3N2) 流感病毒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活力並無明顯下降且無流感症狀，無咳嗽、流鼻水、打噴嚏等症狀活動力正常。D14+6、D14+9 第二、三次雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 320 抗體效價達到檢測需求。惟本次使用之雪貂為剛足四月齡，原本雪貂之代謝就非常快速(也是為何其糞便排泄物多且氣味相當重)，而四月齡之雪貂正值成長期，若未適度於抽血前控制進食，則造成血液中血脂過高，而影響血清分離的效率，但就 11/1(先禁食，血脂非常低) 及 11/4(未禁食，血脂非相對高) ，但抗體效價皆為 HI 320，故判斷血脂僅影響血清純化產出率，並不會影響抗體效價高低。推測原因為剛足四月齡雪貂，免疫系統發育可能尚未完全成熟，且 Type A H3N2 流感病毒通常不會引起劇烈的病徵，故免疫效果較差是可預期。為本實驗於 2016.11.04 完成本株病毒毒株 A/Taiwan/87302/2016 (H3N2)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2016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 2/01 第一株流感病毒 A/Taiwan/S5102
 - ii. 於 4/7 第二株流感病毒 A/Taiwan/85606/2016 (H1N1)
 - iii. 於 10/12 第三株流感病毒 A/Taiwan/87302/2016(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:
- ii. 第一株流感病毒 A/Taiwan/S5102. 以兩隻雪貂製備抗血清，HI 力價分別為 2560 及 1280。
 - iii. 第二株流感病毒 A/Taiwan/85606/2016 (H1N1)以兩隻雪貂製備抗血清，HI 力價分別為 2560 及 2560。
 - 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/87302/2016(H3N2)以兩隻雪貂製備抗血清，HI 力價分別為 320 及 320。
- 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。
- 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. 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/S5102 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/S5102

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：20160201~20160225

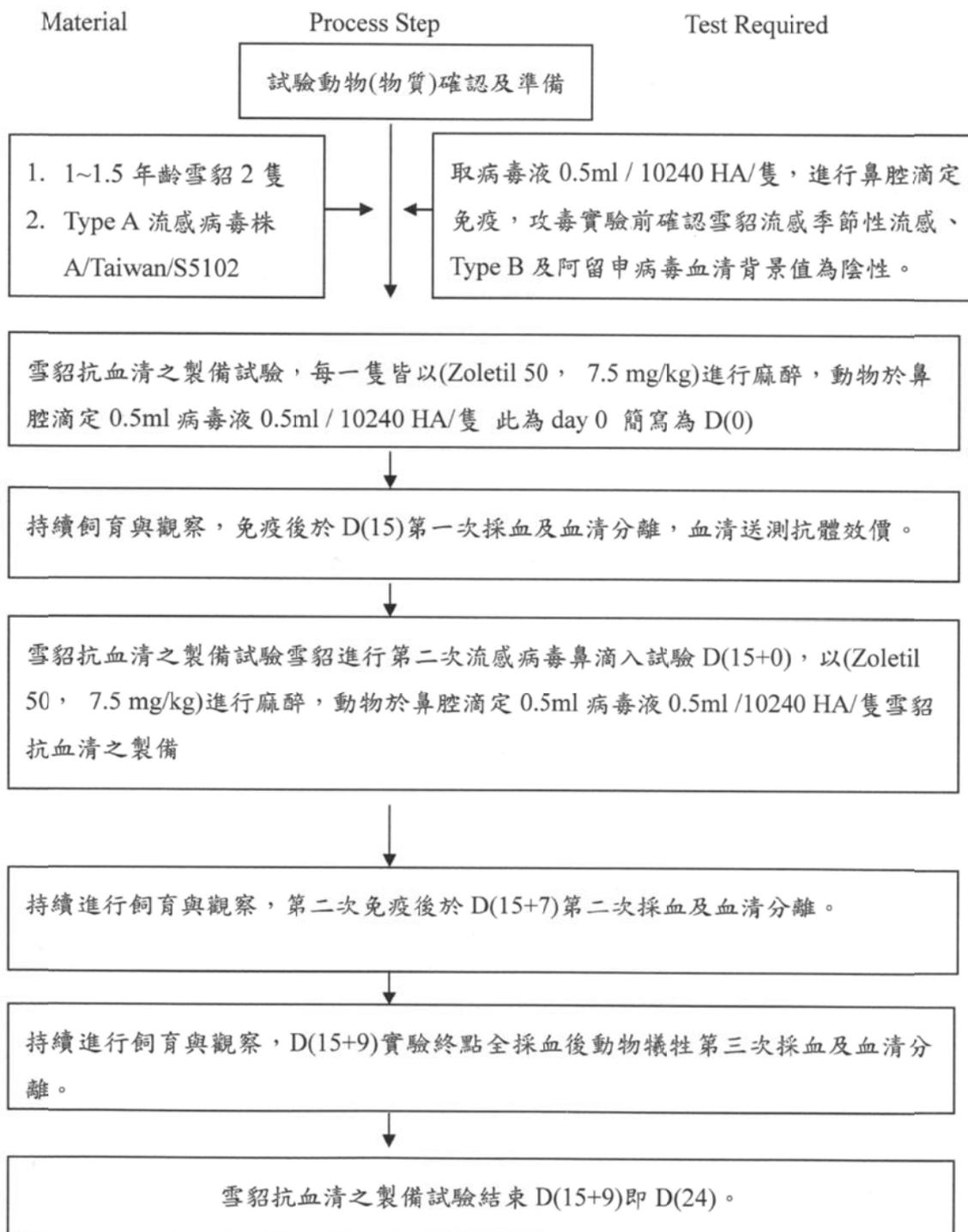
試驗主持人：葉嘉翠

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	2016.02.01	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	2016.02.01	葉嘉翠、楊淳米
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2016.02.01~02.16	葉嘉翠、楊淳米
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(15)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2016.02.16	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(15+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	2016.02.16	葉嘉翠、楊淳米
6	第二次採血及血清分離，於 D(15+7)	076-P2 實驗室	2016.02.23	葉嘉翠、楊淳米
7	第三次採血及血清分離於 D(15+9)，血清送測抗體效價。雪貂抗血清之製備試驗結束即 D(24)。	076-P2 實驗室	2016.02.25	葉嘉翠、楊淳米
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2016.02.25	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<10

鼻滴入試驗 雪貂耳標編號：No.290、293

葉嘉琪 楊厚宇

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 / 10240 HA/隻

葉嘉琪 楊厚宇

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(15)，血清送測抗體

效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.290</u> (鼻滴入)	2560
<u>No.293</u> (鼻滴入)	1280

葉嘉琪 楊厚宇

及疾管署研檢中心

4. 鼻腔滴定第二次免疫 D(15+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 / 10240HA/隻。

葉嘉琪 楊厚宇

5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(15+7)

葉嘉琪 楊厚宇

6. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(15+9)，血清送測抗

體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.290</u> (鼻滴入)	2560
<u>No.293</u> (鼻滴入)	1280

葉嘉琪 楊厚宇

及疾管署研檢中心

7. 結論:

本次試驗為 Type A A/ Taiwan/S5102(H1N1)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活力明顯下降但流感症狀並不顯著，無咳嗽、流鼻水、打噴嚏等症狀但有倦怠活力低下的狀態。D15+9第 二、三次雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 達到 2560、1280，抗體效價達到檢測需求。本實驗於 2016.02.05 完成本株病毒毒株 A/Taiwan/S5102(H1N1)之抗血清製作，並製作完整結果紀錄。

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/85606/2016(H1N1)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/85606/2016 (H1N1)

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

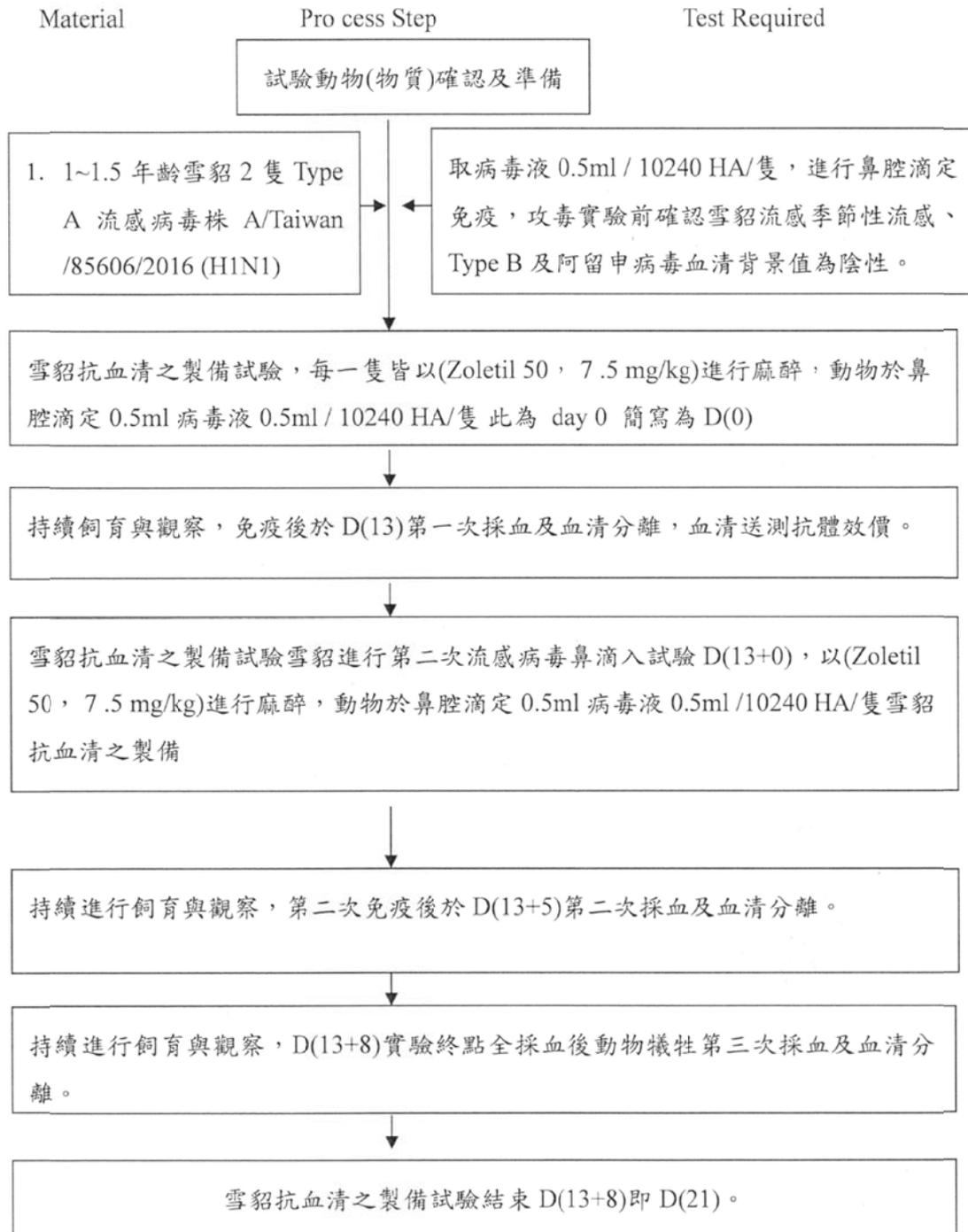
試驗日期：20160407~20160428

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	2016.04.07	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	2016.04.07	葉嘉翠、楊淳米
3	每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2016.04.07~04.20	葉嘉翠、楊淳米
4	持續飼育與觀察，免疫後第一次採血及血清分離於 D(13)，血清送測抗體效價。	076-P2 實驗室	2016.04.20	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(13+0) (第二次免疫)	076-P2 實驗室	2016.04.20	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	2016.04.25	葉嘉翠、楊淳米
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	2016.04.28	葉嘉翠、楊淳米
9	實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2016.04.28	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<10

鼻滴入試驗 雪貂耳標編號：No.291、295

葉嘉學 楊厚中

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 / 10240 HA/隻

葉嘉學 楊厚中

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(13) ，血清送測抗體

效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.291</u> (鼻滴入)	2560
<u>No.295</u> (鼻滴入)	2560

葉嘉學 楊厚中

及疾管署研檢中心

4. 鼻腔滴定第二次免疫 D(13+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 / 10240HA/隻。

葉嘉學 楊厚中

5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(13+5)

葉嘉學 楊厚中

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
<u>No.291</u> (鼻滴入)	2560
<u>No.295</u> (鼻滴入)	2560

葉嘉學 楊厚中

及疾管署研檢中心

7. 結論:

本次試驗為 Type A A/Taiwan /85606/2016 (H1N1) 流感病毒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活力並無明顯下降且無流感症狀，無咳嗽、流鼻水、打噴嚏等症狀活動力正常。D13+8第二、三次雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 達到 2560、2560，抗體效價達到檢測需求。本實驗於 2016.04.28 完成本株病毒毒株 A/Taiwan /85606/2016 (H1N1) 之抗血清製作，並製作完整結果紀錄。。

試驗負責人簽名：



- (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/87302/2016(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/87302/2016(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

試驗日期：20161012~2061104

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	2016.10.07	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	2016.10.12	葉嘉翠、楊淳米
3 每日進行雪貂飼育觀察	076-P2 實驗室	2016.10.07~11.04	葉嘉翠、楊淳米
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	2016.10.26	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	2016.10.26	葉嘉翠、楊淳米
6 第二次採血及血清分離, 於 D(14+6)	076-P2 實驗室	2016.11.01	葉嘉翠、楊淳米
7 第三次採血及血清分離於 D(14+9), 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	2016.11.04	葉嘉翠、楊淳米
9 實驗室滅菌及清消	076-P2 實驗室	2016.11.07	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<10

鼻滴入試驗 雪貂耳標編號：No.343、344

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 / 512 HA/隻

葉嘉琪 楊淳米

3. 免疫後第一次採血及血清分離於 D(13)，血清送測抗體

效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.343</u> (鼻滴入)	160
<u>No.344</u> (鼻滴入)	80

葉嘉琪 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 / 512 HA/隻。

葉嘉琪 楊淳米

5. 免疫後第二次採血及血清分離於 D(14+6)

葉嘉琪 楊淳米

6. 免疫後第三次採血及血清分離於 D(14+9)，血清送測抗

體效價檢測結果。

雪貂耳標編號	HI
<u>No.343</u> (鼻滴入)	320
<u>No.344</u> (鼻滴入)	320

葉嘉琪 楊淳米

及疾管署研檢中心

7. 結論:

本次試驗為 Type A A/Taiwan/87302/2016 (H3N2) 流感病毒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活力並無明顯下降且無流感症狀，無咳嗽、流鼻水、打噴嚏等症狀活動力正常。D14+6、D14+9 第二、三次雪貂血清抗體的誘發與製備，HI 320 抗體效價達到檢測需求。惟本次使用之雪貂為剛足四月齡，原本雪貂之代謝就非常快速(也是為何其糞便排泄物多且氣味相當重)，而四月齡之雪貂正值成長期，若未適度於抽血前控制進食，則造成血液中血脂過高，而影響血清分離的效率，但就 11/1(先禁食，血脂非常低) 及 11/4(未禁食，血脂非相對高) ，但抗體效價皆為 HI 320，故判斷血脂僅影響血清純化產出率，並不會影響抗體效價高低。推測原因為剛足四月齡雪貂，免疫系統發育可能尚未完全成熟，且 Type A H3N2 流感病毒通常不會引起劇烈的病徵，故免疫效果較差是可預期。為本實驗於 2016.11.04 完成本株病毒株 A/Taiwan/87302/2016 (H3N2) 之抗血清製作，並製作完整結果紀錄。

試驗負責人簽名:

