

計畫編號：DOH95-DC-1404

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

我國流行性感冒病毒抗體監測分析系統之建立—民眾疫苗接種後抗體反應評估及疫苗接種後抗體不良反應者之免疫狀態分析

研究報告

執行機構：台北榮民總醫院

計畫主持人：李建賢

研究人員：李壽東 黃信彰 詹宇鈞 等

執行期間：95年1月1日至97年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
一、中文摘要	(3)
二、英文摘要	(4-5)
三、前言	(6-8)
四、材料與方法	(9-16)
五、結果	(17-22)
六、討論	(23-25)
七、結論與建議	(26-27)
八、參考文獻	(28-29)
九、圖、表	(30-37)
十、附錄	(38-45)
十一、回覆意見書	(46)
	共 (46)頁

一、中文摘要：

流行性感冒（簡稱流感）雖為古老之傳染病，但流感防治工作已成為全球性主要工作，預防流感的方法除了增強自身的免疫抵抗力，與流行季節期間避免曝曬之外，接種疫苗是其中關鍵性的一環。但由於流感病毒基因本身具有高度變異之特性，使得流感疫苗之施打需年年為之。台灣地區自民國 87 年 10 月開始，每年針對高危險群民眾，由衛生署補助施打流感疫苗，然而疫苗施打後之保護作用與疫苗施打者本身之免疫狀態須要評估。加以近年發生人禽流感病毒流行，雖然目前禽流感疫苗使用於人類仍處於研發階段，為因應未來禽流感疫苗施打之評估，實有必要建立一套國人基礎流感疫苗接種血清反應之資料庫及監測系統。

本計畫除了因應疾管局要求建立我國流感病毒抗體監測分析系統，及分析民眾流感疫苗接種後之血清抗體反應外，並期於榮民安養體系建構一監測分析系統。

本研究計畫實施方法及步驟分為三大方向：（一）疫苗之施打及臨床狀態評估與檢體收集。（二）流感病毒之分離鑑定及疫苗施打者血清免疫反應之實驗室評估。（三）新型（禽）流感病毒之快速基因解碼分析。

第一年依查核進度於 9-10 月間已施打 281 名受測者，佔預估值之 93.7%，且已評估並抽取施打前血清，第二次血清抽取時間將依進度完成。目前為止並已完成 134 例施打前補體結合實驗（CF）及酶連結免疫吸附實驗（ELISA），及 89 例施打後血清反應測試，部分血球凝集抑制反應（HI，30 例）已陸續進行。初步分析發現陽性反應率在 CF 法及 HI 法均未超過 50%，但未施打前抗體陽性率卻相當高（>95%），可能影響疫苗施打後血清陽性反應之發生。本年內並未發現新型流感病毒株，但培養結果得知類疫苗株之流感病毒已在社區中流行。

此計畫除了有助於了解流感疫苗對台灣地區的民眾到底產生多少的保護力，探知台灣地區本土流行株的感染情形與是否已產生抵抗力，且藉由本計畫以建構一個完整針對特定高危險族群之監測系統。

關鍵詞：流行性感冒病毒、疫苗、抗體、監測

二、英文摘要：

Abstract：

Although influenza (Flu) is an old infectious disease, it will cause pandemic and requires global cooperation for control and prevention. In addition to the avoidance of exposure during the flu season and increasing the host immunity vaccination has been the most effective modality for preventing influenza epidemics. However, due to the genetic variability of the influenza it requires vaccination every year. Our Department of Health supported influenza vaccination for high risk people since October 1998, but the protection rate and the host immune responses after the vaccination had not been well evaluated. Furthermore, the epidemics of human avian influenza epidemics urges the R&D for avian influenza vaccine and it is imperative to establish a surveillance system and data base for evaluating the vaccine immune responses for our people.

This project will follow the Taiwan CDC requirements to establish a surveillance system and to evaluate the immune responses after influenza vaccination, particularly among the veterans' nursing homes. The procedures and steps include: 1. collecting and evaluating the clinical data and serum samples after vaccination, 2. laboratory tests for host immune responses, and 3. decoding the possible new emerging influenza viruses.

According to our schedule we had accomplished the vaccination for 281 people (93.7% of the estimated number) and had collected their sera before vaccination. The second serum sampling will be finished on schedule. We had tested 134 pre-immunized and 89 post-immunized sera

by complement fixation and ELISA tests and 30 cases by hemagglutinin inhibition test. Our preliminary results indicated that both the CF and HI response rates were less than 50%, but the pre-immunized antibody positive rates were quite high (>95%), which might influence the vaccine response rate. We did not obtain any new variant of influenza viruses in the year but found that the vaccine-like strains had circulated in our society.

We hope that this project will help to understand the host immune responses and the protection rate of the vaccination. In addition, we can establish a surveillance network.

Key words : influenza virus, vaccine, antibody, surveillance

三、前言

流行性感冒（簡稱流感）雖為古老之傳染病，但由於流感病毒基因本身具有高度變異之特性，使得流感疫苗之施打需年年為之。台灣地區自民國 87 年 10 月開始，每年針對高危險群民眾，由衛生署補助施打流感疫苗，然而疫苗施打後之保護作用隨當年世界衛生組織(WHO)建議之疫苗病毒株是否能準確預測當季本土流行株而不同，同時疫苗施打者本身之免疫狀態亦可能影響疫苗反應。加以近年禽鳥類流感病毒已証實能夠直接感染人類，並可能因此造成再一次流感病毒在人類大流行。雖然目前禽流感疫苗使用於人類仍處於研發階段，為因應未來禽感疫苗施打之評估，實有必要建立一套國人基礎流感疫苗接種血清反應之資料庫及監測系統。同時由此監測系統之持續運作，更可能早期發現變種病毒株（對疫苗不反應者）甚至新型（禽）流感病毒。

本研究總體目標在於評估在台灣地區國人實施高危險群病患流感疫苗施打後，施打者之疫苗免疫反應狀況，而本院為全國醫學中心之一，肩負經常往來兩岸榮民健康照護之責，除了符合疾管局要求建立我國流感病毒抗體監測分析系統，及分析民眾流感疫苗接種後之血清抗體反應外，同時也利用本院照顧特定老年族群（榮民）之特性，希望了解榮民安養系統中對流感免疫力之一般狀況，並由此計畫結果得到流感疫苗之反應率及保護率。由臨床觀察得知部分受試者雖接受疫苗接種，仍有呼吸道症狀之產生，或因無法產生有效抗體而致病，或因感染病毒之變異株而得到新感染，希望經由此計畫可以了解每年疫苗之成效（以三年取得平均值）。並由此前瞻性之研究，期望可以早期偵測到由不同病毒亞型或變異株造成新流行之可能，同時經由此一監控系統更容易由接種流感疫苗有反應者但仍感染流感病患中分離出新型或變種之流感病毒株。另外因為台灣之流感流行依歷年之分析結果，通常本土新流行流感病毒株之流行常早於世界衛生組織公布當季可能爆發之流行株一至二年，因此如何先發現新流行株且將其基因定序亦為本次計畫之目標。

流行性感冒(流感)為一種核糖核酸(RNA)病毒引起之感染症，遠自希博拉底時代即有記載西元 1580 年曾有類似流感流行的確實描述，自 1580 年至 20 世紀初，共三十多起大流行，包括 20 世紀期間，總共有 1918 年、1957 年、1968 年以及 1977 年的大流行，其中尤以 1918 年所謂“Spanish flu”的全球流行，造成至少 2 千萬人以上的死亡最為慘重，且死亡年齡層以二十至四十歲青壯年為主，更是對社會及經濟造成巨大衝擊 [1,2]。

歐美先進國家自 1940 年代流感疫苗上市以來，即鼓勵如老人及心肺疾病患者等高危險群每年定期接種。由於免疫力較差者如老年人或慢性病病患等，如果罹患流感，比較容易發生肺炎、急性支氣管炎、腦炎、中耳炎、肌炎、抽搐及憂鬱症等併發症，並增加住院率及致死率 [3,4]。根據美國疾病管制中心的建議

[5-7]，易產生流感併發症的高危險群，如 65 歲以上的老人、6 個月至 2 歲的幼兒、慢性呼吸道疾病、慢性心臟病、慢性腎臟疾病、免疫能力缺陷、其他代謝疾病、居住於安養機構的老人與健康照護提供者等，應該每年接受流感疫苗的接種。

在台灣地區，基於維護老人健康，避免老年人因罹患流感導致嚴重併發症或死亡，衛生署特於民國 87 年首度試辦「65 歲以上高危險群老人流感疫苗接種先驅計畫」，針對該計畫之後續評估結果，亦顯示流感疫苗確為安全、有效之疫苗，對於我國住在安養機構、養護機構、長期照護機構及榮民之家之老人，確可減少 54% 因肺炎或其他心肺疾病住院之機率，對於過去 1 年曾經住院者而言，更可減少 75% 因肺炎或心肺疾病住院之機率。有鑑於此，乃繼續推展本計畫，逐年擴大實施對象，並自 90 年起，開放所有 65 歲以上老人免費接種。而於 92 年度，為因應流感對 SARS 疫情之可能衝擊，亦將醫療機構之醫護等工作人員納入接種對象，另為因應亞洲地區爆發之禽流感疫情，乃針對禽畜養殖、屠宰、販賣、運送、化製等相關人員提供免費接種服務，期能預防病毒基因重組可能引發新型病毒之危機。93 年度，經考量 SARS 與禽流感之可能發生或流行季節與國內人類流感流行季節相當，其初期感染症狀相近，而醫療機構之醫護等工作人員，除第一線接觸病人外，同時肩負照顧病人之重責，為預防其遭受感染或造成傳染，也為避免發燒等症狀引起臨床診斷之混淆，仍比照 92 年度，將醫療機構之醫護等工作人員及衛生等單位之防疫相關人員，列入計畫優先施打對象；另亦考量 2 歲以下年齡小之嬰幼兒感染流感住院之比例不亞於 65 歲以上老人及其他流感高危險群，93 年度起，計畫對象增加 6 個月以上 2 歲以下之幼兒；另為避免人類、禽類流行性感胃病毒之感染，造成基因重組，產生新型毒力增強且可人傳人之病毒，進而引發大流行，導致嚴重症狀或合併症及死亡，故亦將養禽（雞、鴨、鵝）業、養豬業、禽畜屠宰、禽畜運輸、禽畜活體屠宰兼販賣等業之工作人員及中央、地方實際參與動物防疫人員列入接種對象，期能達到事先預防扼阻流感之傳播及引發流行。

自 1948 年起，世界衛生組織（world health organization, WHO）建立了一套全球監測系統，共涵蓋了八十多國，一百多個流感監測中心，及位於美國、英國、澳洲及日本的研究中心實驗室，於每年二月及九月將各種研究結果加以回顧，作為世界衛生組織及疫苗公司對來年選擇疫苗株的參考。自 1977 年 WHO 建議流感疫苗應包括兩種 A 型(H3N2 及 H1N1)及一種 B 型流感疫苗株，並且每年略作修正，北半球使用的疫苗株於二月選定，而南半球國家疫苗株，則於九月選定。有關使用疫苗的時機與應注意事項，由於流行性感胃好發於冬季，且疫苗保護期一般四到六個月，因此北半球國家最好接種時機為十月到十一月中旬，以使疫苗於數週內發生效益，而疫苗的有效率依人口數之不同，約在 30~80% 之間。一般接種流感疫苗常見幾種副作用，如：注射部位疼痛，紅腫，肌肉痛等，多屬輕微，偶見發燒，

但若對蛋之蛋白質或疫苗其他成分過敏者，不予接種，以免發生嚴重過敏反應，年齡太小(小於六個月)亦不宜接種，孕婦則建議經專科醫師評估，而有發燒或急性疾病者，則建議延後接種 [8]。

根據過去前瞻性研究指出，流感疫苗接種在安養中心的老年人可以降低 60~70% 病發肺炎的機率，並且可以減少 60~70% 之死亡率 [9]。Govaert 等之雙盲臨床試驗發現，老年人接受流感疫苗接種可降低一半血清學上或者是臨床上流感之發生率 [10]。Gross 等之統合分析(meta-analysis)研究發現，流感疫苗接種可以減少至少一半的呼吸系統疾病、肺炎及因肺炎併發症而住院之機會，另外也預防了 68% 的死亡率 [11]。Nichol 等之追蹤研究發現，社區之 65 歲以上老人接種流感疫苗除了可減少一半因肺炎併發症而住院之機會，也減少了三分之一因鬱血性心衰竭而住院之機會，同時也使得所有死因之死亡率降低了一半，這樣的結果支持老人接種流感疫苗可以直接的增進健康，也間接的減少了整體醫療費用的支出 [12]。而對年輕人的研究也發現可減少上呼吸道疾病的發生率，及因病請假的頻率。因此，國外研究皆證實，施打流感疫苗對於民眾、家庭及社會而言，是符合預防醫學的目的及經濟效益。

過去認為流感病毒在禽鳥類雖具備所有血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 及神經氨酸胺 (neuraminidase, NA) 之亞型，但卻無禽鳥的流感病毒 (禽流感病毒) 直接侵襲人類致病之證據。直至一九九七年於香港發生一位三歲幼童因感染禽流感而死於雷氏症候群 (Reye's syndrome) 之併發症，並於其氣管抽取物之培養中分離出八段基因均為禽鳥來源之 H5N1 亞型病毒，自此禽流感病毒可直接感染人類之臨床病例方得確認 [13,14]。而市售雞隻糞便中也因檢出 H5N1 病毒而遭撲殺逾一百五十萬隻。2003 年初香港再度發生 H5N1 致死病例，隨後更有越南、泰國、柬埔寨、印尼等國發生高病原性 (highly pathogenic avian influenza, HPAI) H5N1 人禽流感致死病例，使得禽流感是否會再度引起如一九一八年之大流行成為全世界及世界衛生組織極度關切之議題，而流感的診斷與治療，亦再度受到重視 [15,16]。

由於抗病毒藥物研發的成功使得流感的治療與預防進入新的時代，但流感疫苗的研發與應用仍是預防流感的重要手段。然而疫苗施打後之保護作用隨當年世界衛生組織 (WHO) 建議之流感病毒疫苗株是否能準確預測當季本土流行株而不同，同時疫苗施打者本身之免疫狀態亦可能影響疫苗反應。加以近年禽鳥類流感病毒已証實能夠直接感染人類，並可能因此造成再一次流感病毒在人類大流行。雖然目前禽流感疫苗使用於人類仍處於研發階段，為因應未來禽感疫苗施打之評估，實有必要建立一套國人基礎流感血清反應之資料庫及監測系統。同時由此監測系統之持續運作，更可能早期發現變種病毒株 (對疫苗不反者) 甚至新型 (禽) 流感病毒。

四、材料與方法：

95 年度

受試對象

第一年度受試對象，共分成二組，每組目標樣本數為約 150 人，共 300 人：

- (1) 成人：18 歲以上，65 歲以下民眾
- (2) 老人：65 歲以上民眾（以榮民身分者優先）

計畫主要納入條件：

- (1) 受試者願意遵守試驗所需之返診與記錄。
- (2) 受試者必須同意填寫並簽署受試者同意書。 計畫主要排除條件：
 - (1) 過去六個月內曾接受流感疫苗接種者。
 - (2) 過去一週內曾有急性發熱性症狀。
 - (3) 過去 72 小時內有上呼吸道的急病，包括一般感冒或鼻塞等症狀。
 - (4) 對雞蛋及雞蛋蛋白質或對試驗藥物類似的疫苗過敏。
 - (5) 有疑似流感的發燒症狀（溫度大於 38.5 度）及下列四症狀其中兩種：頭痛，肌肉／關節酸痛（例如：肌痛及關節痛），喉嚨痛及咳嗽。
 - (6) 懷孕、哺乳中，以及在試驗期間可能懷孕的婦女。
 - (7) 過去三個月之內曾使用類似試驗藥物或曾參與其他臨床試驗。
 - (8) 本身有免疫不全，抑制免疫力或接觸家中有抑制免疫力的成員。
 - (9) 過去三個月之內有氣喘或使用支氣管擴張藥物的記錄。
 - (10) 過去一個月之內曾經接種或在將來一個月內可能會接種活性病毒疫苗。
 - (11) 過去二個月之內曾接種非活性疫苗。
 - (12) 過去三個月之內曾輸入任何血中產物，包括免疫球蛋白。
 - (13) 任何醫師認為可能干擾對疫苗之評估的狀況。
 - (14) 有任何一般需要接種非活性疫苗的慢性疾病。

疫苗施打與檢體收集

- (1) 在試驗前，醫師將針對受試者的身體狀況進行評估，以初步確定適合本研究計畫。取得受試者的同意與簽署同意書之後，醫師將詳細詢問受試者的病史，並做身體檢查。
- (2) 若確定受試者符合本試驗計畫之條件，於疫苗注射前抽取靜脈血 10ml，抽血後，為受試者注射流感疫苗於上臂。
- (3) 為預防並即時處理接種後發生率極低的立即型嚴重過敏反應，接種後應於接種單位或附近稍做休息並觀察至少 30 分鐘，無恙後再離開。接種後如有持續發燒、嚴重過敏反應如呼吸困難、氣喘、眩昏、心跳加速等不適症狀，立即緊急醫療處置，並以電話通報當地衛生局或疾病管制局。
- (4) 接種後第三週，受試者回診接受身體檢查，醫師將詳細詢問受試者於疫苗

注射後是否產生任何副作用與不適並記錄於個案資料單(附表五)。此外，再次抽取靜脈血 10ml。

- (5) 上述所有血清樣本取得後，皆立即送至本院病毒科離心處理，分別以疫苗株與本土流行株之抗原測量血清抗體效價及補體固定反應。

個案追蹤

- (1) 第一次追蹤：接種後第四週回診，並再次採集血清。
- (2) 若個案有任何不適，隨時回診治家庭醫學部門診，進行全身身體評估。有類流感症狀即行採樣培養及 PCR 檢查，並於當時及 3-4 週後抽取靜脈血 10ml 評估。
- (3) 每位個案至少追蹤半年，頻率為每月至少一次，第二次至第六次以電話訪問為主要追蹤方式，並記錄於個案記錄表。

流感病毒分離與鑑定

1 操作步驟

1.1 檢體處理

1.1.1 swab 檢體

以 1.5 mL 0% EMEM(0% 維持培養基)稀釋後，經無菌過濾器 (0.45 μ m Millipore 的濾膜)，將濾液存放 4°C 冰盒上的無菌小瓶中。

1.1.2 CSF

檢體內加入適量的 0% EMEM 稀釋，混合均勻。接種於細胞上。

1.1.3 Blood

直接用無菌吸管吸取 Buffy coat，加 1.5mL 0% EMEM，接種於細胞上。

1.1.4 組織

先加入 2 mL 0% EMEM 以均質器(homogenizer)磨碎後，以 2,000 rpm，4°C,10 分鐘，離心，取上清液，無菌過濾之。濾液接種於細胞上。

1.2 接種

- 1.2.1 無菌吸管吸取檢體濾液 0.1 mL~0.3 mL，接種到長成單層細胞的狗腎細胞株(MDCK)。但狗腎細胞株(MDCK)在接種前需先使用約 3 mL PBS 清洗胎牛血清，再更換不含胎牛血清 (0% EMEM+Trypsin bovine pancreas) 之培養基。

- 1.2.2 隔日觀察細胞，確定沒受標本的毒素(Toxicity)或接種標本引起的污染，即換 1.5 mL 新的 0% EMEM+Trypsin bovine pancreas 培養基。

1.3 病毒生長觀察

- 1.3.1 培養在狗腎細胞 (MDCK) 的檢體，取其培養液 0.05mL，加 0.5%天竺鼠紅血球(Guinea pig)0.05mL 混合，放室溫 45 分至 1 小時觀察血球凝集(Hemagglutination)。每週一至二次、兩週後沒有陽性又不見細胞病變產生則以滅菌處理清洗試管。若得 HA 陽性，則刮下細胞，離心 1000

rpm、10 分鐘。上清液至無菌小管中，保存於 -70°C 冰箱。以剩餘約 0.3 mL 培養基打散沉澱細胞，作成抹片，以丙酮固定後做 FA 試驗，鑑定病毒。或以血球凝集抑制試驗(Hemagglutination inhibition) 鑑定病毒。

1.4 病毒鑑定

1.4.1 血球凝集試驗(Hemagglutination Test)

許多病毒含有血球凝集素(Hemagglutinin)，如流行性感冒病毒、副流行性感冒病毒、腮腺炎病毒等，能使不同動物的紅血球凝集。利用此特性可以測知病毒存在與否，也可大致定量病毒，其實驗步驟如下：天竺鼠(Guinea pig)紅血球以 PBS (PH 7.2) 洗三次，製成 0.5% 紅血球懸浮液。以 0.05mL，0.5%天竺鼠紅血球與接種過標本的 MDCK 細胞試管中的培養液 0.05mL 混合均勻在 V 型微量滴定盤上。靜置室溫 1 小時後，觀察是否有血球凝集現象。同時作對照組比較，以 PBS 代替培養液，作為陰性對照組(Negative Control) 及含有凝集素的培養液為陽性對照組(Positive Control)。

1.4.2 直接免疫螢光抗體染色（要搭配陽性、陰性對照組）：刮下病變細胞，作成抹片。在空氣中自然乾燥。浸入 -20°C 的丙酮固定 10 分鐘。取出風乾，加入螢光抗體，放在 37°C 作用 30 分鐘（放在 wet chamber 內）。將抹片放入 PBS 中，浸泡 5 分鐘。共 2 次。用蒸餾水沖洗一次。乾燥之。滴上 mounting fluid，蓋上蓋玻片，用螢光顯微鏡觀查結果。

1.4.3 血球吸附試驗(Hemadsorption Test, Had)：有些不會使細胞產生病變的病毒，有血球凝集素，可與某些動物的紅血球上的接受器結合，而使紅血球吸附在細胞上。其實驗步驟如下：天竺鼠(Guinea pig)的紅血球以 PBS (PH 7.2) 洗三次後，製成 0.5%紅血球懸浮液。以漢克溶液(Hank's solution)洗培養過標本的 MDCK 細胞一次。照第二步驟洗未接種標本的 MDCK 細胞做對照用。加 1mL 0.5%天竺鼠紅血球於第 2 與第 3 步驟處理過的試管中。靜置試管於 4°C 冰箱，20 分鐘。顯微鏡下觀察血球是否吸附在細胞上。做完 HAd 的試管，吸除紅血球液，並用 Hank's 液，將細胞上之紅血球洗掉。每支試管重新加入 1.5mL (0% EMEM+Trypsin)，繼續培養。一周後再做 Had (即第 5,10,15 天)。

流感病毒抗體偵測(complement fixation test, CF)

1 原理

抗原和抗體結合的複合物會與補體結合，而綿羊紅血球和溶血素的結合也是一種抗原抗體複合物。我們先將待測血清和已知抗原及定量補體混合，若形成了 Ag-Ab-C' 就是將補體固定住了。隨後在加入致敏化的紅血球，也沒有補體與之作用，就不會溶血，也因此證明了抗體的存在。若抗體不存在，就不會形成

Ag-Ab-C' 複合物。補體未被固定，隨後加入的致敏化紅血球就會被補體附著而破壞溶血。參予實驗的東西有抗原 Ag, 補體 C', 致敏化紅血球 sensitized SRBC, 和待測血清四樣。抗體保護力：血清之 HAI(hemagglutination inhibition, HAI)抗體效價若大於等於 1:40 以上，則視為具有保護力。保護率(Protection rate)：注射疫苗前無抗體保護力者在注射疫苗後產生抗體保護力的比率。反應率(response rate)：注射疫苗後血清 HAI 抗體效價或補體固定反應升高 4 倍(包含)以上的比率。

2 操作步驟

- 2.1 準備冰盒。(ICE BATH) 所有試劑都要放在冰盒中，保持試劑活性。
 準備緩衝液：取 4 分 Gelatin solution 和 1 分 VBS solution 混合均勻置冰盒中備用。(Gelatin powder 0.5gm + 400ml H₂O 開鍋即成 solution，若使用前有混濁，應置於 56°C 待清澈再用)。
- 2.2 操作流程：
- 2.2.1 取血清(或血漿)檢體 0.1ml 再加 VBD 0.3ml 於小試管中，置 56°C 水浴 30 分鐘。把檢體中既有的補體去活化。稀釋 1/4 倍待用。
- 2.2.2 取補體 0.4 ml 加入 VBD 9.6 ml 於大試管中，(1/25 稀釋當作 1unit) 置冰盒 20 分鐘。
 (補體要充分溶解，要保持在低溫狀態)
- 2.2.3 依下表配置 1.5U，1.0U，0.5U 於小試管中、標示清楚、放冰盒中備用。
- 2.2.4 取微量滴定盤，依下圖寫上標本號碼，勾畫各區。

標本號 (例)	122-1	124-6	325-8	406-9	519-7	608-3	704-1	814-5	928-6	1030-1	此欄為補體 反滴定用
A											2.0U.
B											1.5U.
C											1.0U.
D											0.5U.
E											全溶
F											全溶
G	此列為 SERUM CONTROL，用以監看血清中是否有破壞補體的成分，若是此處不溶血，品管就不通過。										部分溶解
H	此列為 TISSUE CONTROL，用以監看血清中是否有抗體和抗原以外的背景物質(C-Ag)做非特異性反應。										完全不溶
	在此列標示上面各行所使用的抗原種類。 -----ADV-----*-----FLU-----*										

- 2.2.5 計算每種抗原共需多少 ml，依抗原瓶所示效價取兩倍濃度稀釋。
- 2.2.6 稀釋標本：自 B 到 G 每個 well 加入 VBD 0.25ml。補體反滴定區 C' back titration 每 well 加 VBD 0.05 ml。取已經去活化 1/4 倍的稀釋標本，在 A 中加入 0.5ml，在 G、H 中加入 0.25ml。自 A 取 0.25ml 向下做系列稀釋，到 F 停止，混合完全後，丟棄最後 0.25ml。
- 2.2.7 添加試劑：自 A 到 F 每個 well 加入 0.25ml 的指定 Ag。在 H well 加入 0.25ml 的 c-Ag。在每個 well 中加入 0.25ml 的 2 Units C'。在補體反低定區依照上圖標示分別加入 0.25ml 的補體 (0.5U, 1.0U, 1.5U, 2.0U)
- 2.2.8 孵育：混合均勻後，每盤覆蓋上一層貼紙，放入 4°C 冰箱 隔夜 16-18 小時。
- 2.2.9 製備致敏化綿羊紅血球 (sensitized sheep RBC)
- 2.2.9.1 Hemolysin stock soln = 1/100 (原裝試劑取 1 ml 加入 98 ml VBD 而成)
若 Hemolysin titer = 1/1000 則 Hemolysin working solution = 2 units = 1/500, (stock 1ml + VBD 4 ml) 洗 SRBC 3-4 次，取 packed cells 0.2ml 和 VBD 9.8ml 混合均勻成為 2% cell suspension。取 hemolysin stock solution 2 ml, VBD 8 ml, 2% SRBC 10 ml 混合均勻在 37°C 孵育 15 分鐘即成。合計 20ml, 可供 4 盤使用，每盤要用 5 ml。
- 2.2.10 等 Ag-Ab-C' 孵育完成，所有的 Well 加入致敏化紅血球 0.05ml。
- 2.2.11 放在 37°C 孵育 20-30 分鐘，取出離心 800rpm x 3'。
- 2.2.12 放在 microtiter 反射鏡上觀察溶血情形。
陽性結果：上清液透明清澈，血球聚落在 well 中央成一紅點。
陰性結果：淡褐色液體，無血球沉澱。

流行性感冒病毒紅血球凝集抑制試驗 (HI)，此試驗可用於受試者抗體測定及病毒的分型。

- 1.1 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°C 冰箱備用，但不得超過一週。做試驗時配成 0.75% 懸浮液，即 0.75 mL 10% 紅血球和 19.25 mL PBS PH 7.2 混合。
- 1.2 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 於所有洞(well)中。加 0.05 mL 的 0.75% 天竺鼠紅血球懸浮液至所有洞中。並做三個洞(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°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，也就是 1 個凝集單位(1 HA unit)，做 HI 試驗則取 4 個凝集單位(4 HA unit)。

- 1.3 紅血球凝集抑制試驗：將各型特異性抗血清(Type Specific Antiserum)，從 1/10 開始做 2 倍稀釋，即自第二行至第六行，每個洞(well)，加 0.025 mL PBS。加 0.05 mL 抗血清或病人血清(處理過)於第一行，用 0.025 mL 微量稀釋器混合稀釋之。加 0.025 mL 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 0.05 mL 之 0.5% 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°C 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。
- (A) 抗原效價反測(Ag Back Titration)：從第二行至第六行洞(well)，各加 0.025 mL PBS。第一行加 0.05 mL，4 個血球凝集單位(4 HA unit)的稀釋病毒。用 0.025 mL 微量稀釋器混合稀釋之。每個洞(well)再加 0.025 mL PBS。每個洞(well)加 0.05 mL 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。
- (B) 血清對照：0.025 mL 血清加 0.025 mL PBS 和 0.05 mL 紅血球。
- (C) 各型特異性抗血清(Type-Specific Antiserum)：抗血清 2 倍稀釋。加 0.025 mL 相同之標準病毒於各個洞(well)，混合置室溫作用一小時。加 0.05 mL 之 0.75% 天竺鼠紅血球懸浮液至所有洞(well)。用微混合器混合均勻，加蓋置 4°C 冰箱或室溫，1-2 小時。
- (D) 紅血球對照：0.05 mL PBS 加 0.05 mL 之 0.75% 天竺鼠紅血球懸浮液。
- (E) 結果判讀：病毒分型：與那一型特異性抗血清，有最高抑制紅血球凝集效價作用者即為那一型。
- (F) 病毒株之選用宜包含標準株、疫苗株、及當季流行株。

EUROIMMUM anti-influenza A virus ELISA (IgG)

1 操作步驟

- 1.1 取 0.01 mL 授試者血清加入 1 mL reagent buffer 混合均勻。
- 1.2 取 0.1 mL calibrators, control, diluted sample 加入 antigens-coated well 內。
- 1.3 於室溫(18°C-25°C)作用，30 分鐘。
- 1.4 使用自動洗滌機，設定 0.4 mL 的 wash buffer，進行 3 回洗滌，每回洗滌時間為 30-60 秒。
- 1.5 每一 wells 加入 0.1 mL Enzyme conjugated 之反應劑。
- 1.6 於室溫(18°C-25°C)作用，30 分鐘。
- 1.7 使用自動洗滌機，設定 0.4 mL 的 wash buffer，進行 3 回洗滌，每回洗滌時間為 30-60 秒。
- 1.8 每一 wells 加入 0.1 mL Chromogen/Substrate 之反應劑。

- 1.9 於室溫(18°C-25°C)作用，15 分鐘。
- 1.10每一 wells 加入 0.1 mL Stop solution 之反應劑。
- 1.11使用 ELISA reader 於 O.D 450 nm 下進行定量分析。

2 結果判讀

calibrator 2 為 20RU /ml

<16RU /ml	negative
≥16 to <22 RU/ml	borderline
≥22RU /ml	positive

EUROIMMUM anti-influenza B virus ELISA (IgG)

1 操作步驟

- 1.12取 0.01 mL 授試者血清加入 1 mL reagent buffer 混合均勻。
- 1.13取 0.1 mL calibrators, control, diluted sample 加入 antigens-coated well 內。
- 1.14於室溫(18°C-25°C)作用，30 分鐘。
- 1.15使用自動洗滌機，設定 0.4 mL 的 wash buffer，進行 3 回洗滌，每回洗滌時間為 30-60 秒。
- 1.16每一 wells 加入 0.1 mL Enzyme conjugated 之反應劑。
- 1.17於室溫(18°C-25°C)作用，30 分鐘。
- 1.18使用自動洗滌機，設定 0.4 mL 的 wash buffer，進行 3 回洗滌，每回洗滌時間為 30-60 秒。
- 1.19每一 wells 加入 0.1 mL Chromogen/Substrate 之反應劑。
- 1.20於室溫(18°C-25°C)作用，15 分鐘。
- 1.21每一 wells 加入 0.1 mL Stop solution 之反應劑。
- 1.22使用 ELISA reader 於 O.D 450 nm 下進行定量分析。

2 結果判讀

calibrator 2 為 20RU /ml

<16RU /ml	negative
≥16 to <22 RU/ml	borderline
≥22RU /ml	positive

我國流行性感冒病毒抗體監測分析系統之建立一

民眾流感疫苗接種後抗體反應評估

年度目標及查核點

95 年

年度目標	查核點
完成人員招募、訓練及流感血清免疫反應檢驗平台(HI,CF 等)	95 年 6 月
完成 95 年度流感施打及血清收集 150 例以上	95 年 10 月
完成 95 年度施打者血清免疫反應測試 150 例	95 年 12 月

96 年

年度目標	查核點
完成施打者個案追蹤及檢體血清免疫反應測試 300 例	96 年 4 月
完成 96 年度流感施打及血清收集 150 例以上	96 年 10 月

97 年

年度目標	查核點
完成 96 年度施打者個案追蹤及檢體血清免疫反應測試 300 例	97 年 6 月
完成 97 年度流感施打及血清收集 150 例以上	97 年 10 月
三年檢驗結果評估及資料整合分析	97 年 12 月

五、結果報告：

1. 流感疫苗施打：

本計畫第一年度疫苗施打第一例於 95 年 9 月 27 日實施，本次流感疫苗接種所使用為伏流感疫苗（Fluarix, SSW, Dresden, GSK, Germany），所使用之疫苗株依世界衛生組織（WHO）之建議為 2006-2007 年（北半球）流行性感冒季節所建議之病毒株：

A/New Caledonia/20/99（H₁N₁）—like strain

[A/New Caledonia/20/99（IVR-116）之變種]；

A/Wisconsin/67/2005（H₃N₂）—like strain

[A/Wisconsin/67/2005（NYMCX-161）之變種]；

B/Malaysia/2506/2004—like strain；

[B/Malaysia/2506/2004 之變種]。

施打劑量於成人每 0.5 毫升劑量之疫苗（Fluarix）內含各種建議病毒株之凝血素（haemagglutinin）各 15 μ g。本年度預計施打之受測人數為 300 人，至 10 月 31 日止（1-10 月）已施打 281 人（男 146 人、女 135 人）施打率為 93.7%（281/300），依男女性別之年齡層分佈（如圖一），其中以 65 歲為高齡者之分界點分析，高齡人士共有 87 人，而以男性佔大多數（如圖二），主要因本計畫部分針對高齡榮民之安養機構實施測試之結果。

2. 施打者之健康狀態評估與追蹤（問卷）：

有關 281 名受測者之職業別、過去病史統計、生活型態分析、健康狀態分析、對流感疫苗預防效果之認知（見圖三至圖七），一般而言受測者為健康之一般成人，而 65 歲以上則多屬無特殊重病之榮民。

3. 流感疫苗施打之反應與分析：

本計畫原針對接受疫苗施打者實施施打前及施打後之血清抗體免疫反應分析，依原計畫將利用補體結合試驗（CF test）及血球凝集抑制法（HI test）進行比較分析，目前（1-10 月）已施打 281 例，順利取得施打前血清檢體共 281 件，由於施打後須待 3 週之後再行抽第二次血清檢體，因此在此報告前尚有 67 例未取得第二次血清檢體進行比較。又此次國內流感疫苗整體採購時程稍晚（第一位施打者為 95 年 9 月 27 日），加以適逢部分國外流感疫苗廠牌產生施打後嚴重副作用之疑慮（後已排除），民眾施打意願可能受到影響，因此檢驗時程稍有延後，但比較本計畫之查核點：95 年 10 月預計完成流感施打及血清收集 150 例及 95 年 12 月預計完成血清免疫反應測試 150 例，仍屬符合進度。另因 CF test 之實驗程序變異因子較多且缺乏定量數據（以免疫前後效價上升 4 倍視為陽性反應），邇來發現市售流感 ELISA 試劑可定量 A 與 B 亞型之血

清抗體濃度，因此加入流感 A、B 型之 ELISA tests，以便了解可否以 ELISA 取代 CF tests 做為初步評估之依據。茲將部分完成之血清反應結果（CF test 及 ELISA 施打前反應 134 例，施打後反應 89 例，流感 A 型 HI test 施打前反應 30 例，施打後 30 例）敘述如后，最終相關統計分析將待全部檢體收集測試完畢再行呈現。

(1) 補體結合試驗法 (Complement fixation, CF)：

至報告為止，已測試施打前血清共 134 例，同時有施打前後血清可供比較者共 89 例，將 A 與 B 型施打前後依血清稀釋倍數 <4 倍，4 倍，8 倍，16 倍， ≥ 32 倍進行分析，發現無論 A 或 B 型在施打後之稀釋倍數較諸施打前之稀釋倍數均有上升之趨勢（圖八及圖九），可見流感疫苗之施打的確可以提昇宿主對流感病毒之補體結合免疫反應。若以施打前後比較上升 4 倍為確定疫苗反應，則流感 A 型疫苗之反應率為 33.7%，流感 B 型之反應率為 15.7%（表一），然本次計畫只針對施打後一個時間點（3 週後）進行分析，無法確切了解是否陽性反應率會隨時間再上升。又受限於時間因素，部分 2 倍上升之 CF 血清反應需要進一步稀釋作業以取得絕對稀釋倍數（ ≥ 32 倍部分）。若將受測者以 65 歲為分界區分高齡與非高齡者，可見在施打前之 CF 效價，無論為 A 型或 B 型流感，高齡者具較高 CF 效價之比例均較高（圖十及圖十一）。

(2) 酶連結免疫吸附實驗法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) :

由於 ELISA 法操作之變異因子較少且可以大批 (96 孔盤) 快速篩檢，並可獲得定量數據 (2 RU/ML 至 200 RU/ML， ≥ 22 RU/ML 為陽性)，對於受測者初步篩檢可能較優於傳統 CF 法，本次實驗亦測試抗 A 型及 B 型 IgG 之血清反應變化。由已測試 89 例具施打前後血清之結果分析，發現絕大多數受測者施打前均為 A 型及 B 型抗血清陽性 (A 型：88/89；B 型：87/89) 且陽性數值相當高 (表二，A 型平均 98.28，B 型平均 176.08)，不過在施打後之平均值在已測試群體中仍有上升趨勢。至於是否 65 歲以上高齡者之 ELISA 數值與 CF 之結果類似，甚或 ELISA 或 CF 結果是否與 HI 結果吻合，有待進一步實驗之驗證。

(3) 血球凝集抑制法 (Hemagglutinin inhibition, HI) :

為了解 CF 和 ELISA 法與較具特異性反應之 HI 法之關連性，我們選擇前述方法 (CF) 在施打前後 (a) 無血清反應 (b) 有 4 倍以上血清反應 (c) 陽性反應較不明確 (如只上升 2 倍) 之血清檢體共 60 件，進行流感 A 亞型 (H_1N_1) 當季及類疫苗株之先期 HI 測試，此先期 HI 測試結果呈現於 (表三)，可見 30 位受測者中 HI test 有 4 倍上升之比例為 14 位，初算陽性反應率為 46.7%，不

過如同 ELISA 之結果，在未施打疫苗前，若以 $HI \geq 40$ 為設定具保護力之陽性，則只有一位受測前 HI 值 < 40 ($HI = 20$)，且在疫苗施打後所有 HI 值均大於 40。若以 HI 作為標準之參考檢驗法，則 CF 之特異性初估為 75% (12/16) 而敏感度為 43% (6/14)，陽性預估值為 60%，陰性預估值也是 60%。不過此初步結果因樣本數不大，有待 300 例血清完整收集後，將陸續再完成所有檢體之 H_1 及 H_3 亞型，B 型流感 HI 測試再行計算。

4. 對於疫苗施打者在六個月內再度得到類流感症狀之評估方面，由於本計畫為第一年起始計畫且本年度流感疫苗之施打時程較歷年稍緩，最早施打之個案於 9 月底方接受 2006-2007 年流感疫苗之接種，至 10 月中為第二次血清抗體評估，因此須至 2007 年 3 月左右才能獲得施打六個月後之評估結果，然本計畫仍將依以下各種可能狀況逐一探討並陸續收案：

- (A) 因其他非流感病毒之感染而產生類流感症狀。
- (B) 雖施打具保護作用之流感疫苗株，但未產生保護性抗體
- (C) 雖施打流感疫苗株且產生保護性抗體，但仍受其他亞型流感感染（可能為新型流感）。
- (D) 雖施打具保護作用之流感疫苗株且產生保護性抗體，但仍受同型流感株感染（可能為變種病毒且變異處位於其他基

因點)，由全基因序列分析找出可能變異處。

5. 偵測新型流感病毒或變種新病毒：

流感病毒由於本身基因組合與結構之不穩定性，極易發生突變及重組，造成新種流感病毒流行。尤以近來證實具各種流感 A 型亞型之禽鳥可直接感染人類，如何早期偵測新種病毒之浮現為防疫要務之一。本實驗室於 95 年 1-10 月間病毒培養檢體總量為 2659 例，其中共培養呼吸道病毒 23 例而流感 A 型共 20 例(H₁N₁ 15 例，H₃N₂ 5 例)，B 型共 3 例，至今尚未發現人類禽流感或新型流感病毒。但由於 2007 年建議之疫苗株為 A/New Caledonia/20/99 (H₁N₁) - like strain ； A/Wisconsin/67/2005 (H₃N₂) - like strain ； B/Malaysia/2506/2004 - like strain，依本實驗室過去 10 個月間之分離流感病毒株分析可知 H₁N₁ - New Caledonia 及 H₃N₂ - Wisconsin - like 之 A 型流感病毒株已在台灣地區流行，而流感 B 亞型之 Malaysia 病毒株也曾在 6 月間分離出來。所幸本實驗室尚未分離出新型流感病毒株，不過本計畫將持續對於往來高危險地區之榮民實施醫療照顧與監測，以期早日發現新種流感病毒株。

六、討論：

本計畫第一年之實施重點在針對一般民眾（包括流感高危險群如高齡老人）實施疫苗施打及血清反應監測。在疫苗施打部分，由於每年流感疫苗之施打常於 9、10 月間開始，對於希望在年度計畫內收集足夠實驗人數，若發生施打時程延後或媒體報導負面疫苗施打訊息，即可能影響民眾施打意願，不易在年度時限內完成目標施打數。本組至 95 年 10 月底已完成預估人數 93.7%之施打率，比較自政府開放醫護人員免費施打或 65 歲以上之施打完成率，在年度內完成之施打完成率應高於一般施打完成率。

計畫內受測者之年齡性別分析與一般研究之分佈有所不同，主要因本計畫之部分實施重點在針對流感高危險族險（如高齡人士）及新型流感之潛在感染者（如第一線醫護人員及經常往來新型流感流行區之榮民）實施監測，因此小於 65 歲女性中有較多女性護理人員而大於 65 歲以上多為榮民之家之男性榮民。雖於這種年齡性別異常分佈可能影響後續之血清免疫分析，但因本計畫部分為建構新型流感高危險族群監測網，以便提供防疫單位更早察查可能新疫情之發生，分離新型流感病毒。且即使年齡性別分佈不盡理想，由後續之血清免疫反應分析，仍可發現潛在有意義之結果。

有關血清反應監測部分，我們發現疫苗施打前受測者普遍之流感 A

及 B 型之非特異性 ELISA 抗體陽性比率相當高 (>95%)。且此現象在 CF 法之結果在年齡高者 (>65 歲) 有較高之趨勢，受測者不論 A 型或 B 型流感平均 CF 之稀釋值多高於 <65 歲之受測者。此現象是否因為台灣地區歷年均均有不同規模之流感流行，而反覆暴露於流感病原體之高齡者其抗體消失較慢，亦或因近年來政府對於高齡者固定施以免費之流感疫苗注射，雖然依照文獻流感疫苗施打後之抗體在 6 個月至 1 年內將逐漸消失，然若連續數年施以疫苗追加接種，是否可使抗體保持高的效價，且這些抗體是否為某一疫苗株之特異性抗體，則有待後續追蹤檢查及 HI 效價之証實。

有關流感疫苗施打後之反應，初期結果觀察以 CF 法產生 4 倍效價增加之定義下，流感 A 型及 B 型之反應率在 3 週後抽血之比率並不高，部分原因可能是一般民眾未施打前之陽性率已偏高，因此非特異性之 CF 法無法觀察出疫苗血清反應，而部分增加之抗體效價已達首次實驗之最高稀釋濃度 (32X)，因此將會進行更高倍之稀釋，以決定疫苗施打後之真正效價。另一可能原因為血清施打前後間隔三週可能不足以讓所有個案疫苗效價上升，是否須進行不同時間點之監測，需要進一步之研究。

初步分析結果部分 CF 反應與 ELISA 之反應變化一致，雖然 ELISA 有大量篩檢且具定量反應及操作較簡便之優點，但所測 IgG 抗體在一

般群眾之陽性率及反應值均偏高，不利觀察疫苗注射後之反應，可能因為 IgG 之血清存在時間較久，與疫苗血清反應之特異性抗體產生吻合度較差，未來也將測試 IgM ELISA，以觀察是否與 HI 有較佳之一致性。有關 HI 之測試結果，發現以 H₁ 之抗原先期測試 30 位受試者，絕大部分已屬陽性（HI \geq 40）並可能具保護力，不過在疫苗施打後仍可見 46.7% 具疫苗免疫反應。雖然文件指出若 HI \geq 40 可視為具疫苗保護力，且與微量中和反應有一致性，但此設定並非絕對，是否因疫苗施打而造成 HI 效價上升更有利於防止流感之發生，有賴後續之追蹤研究。

七、結論與建議：

1. 有關感疫苗施打部分至今年 10 月底止，已完成預定施打人數之 93.7%，預定於今年 12 月底止，應可完成 300 例之施打數。由於流感疫苗之施打均集中於 9、10 月間，易導致結案報告匆促及準備不及，建議結案報告於翌年 2、3 月間呈現，較能得到完整的結果。
2. 本計畫已建立部分常態追蹤流感疫苗施打後之監測系統資料（主要為醫護高危險群及榮民安養機構），對於高齡安養機構之疫苗施打成效追蹤，研擬未來與本院高齡醫學中心合作，長期追蹤部分（100 至 150 名）高齡疫苗施打者之血清免疫反應，以了解高齡危險群之疫苗施打成效。同時建議對不同族群（如小孩、一般成人、高齡者），建構出監測系統，以了解目前疫苗政策是否有修正之空間，又此系統將有助於未來新型流感（如禽流感）疫苗之評估。
3. 就施打後血清免疫反應結果之分析，由於需 3 週以上之二次採血間隔，目前資料尚不足以完全呈現受測者之疫苗反應，而疫苗之保護成效亦有待長期追蹤。然就初期資料分析所得，以 3 週為抽血間隔所得之流感疫苗陽性反應率（CF 法）並不高，對 A 型有 39.3%，B 型有 40.5%不見效價上

升，可能部分原因為抽血間隔太短，免疫反應尚未充分作用，部分可能原因為施打前已有血清陽性反應（ELISA 結果），因此血清陽轉之反應不明顯，尤以高齡者施打前平均血清效價有高於一般成人之趨勢，其原因究竟是反應近年老年免費疫苗施打之成效，或者高齡者非特異性流感抗體效價普遍較高，仍有待釐清。進一步研究高齡者之疫苗反應，應是未來目標之一。

4. 初步觀察針對特異流感抗原之 HI test 與 CF 法之血清免疫反應吻合度並不高。血球凝集抑制反應可呈現對疫苗株或當季流行株較專一性之抗體反應，此反應與 CF 法或 ELISA 法之相關程度，待完成 300 例後再行分析。
5. 至目前為止尚未培養出新型流感病毒株，2006-2007 年建議之疫苗病毒株已在施打前有陽性培養報告，往後之流感監測應考慮比較一般人對當季病毒株與疫苗株血清效價之異同，以了解疫苗施打之時程是否合乎防疫需要。

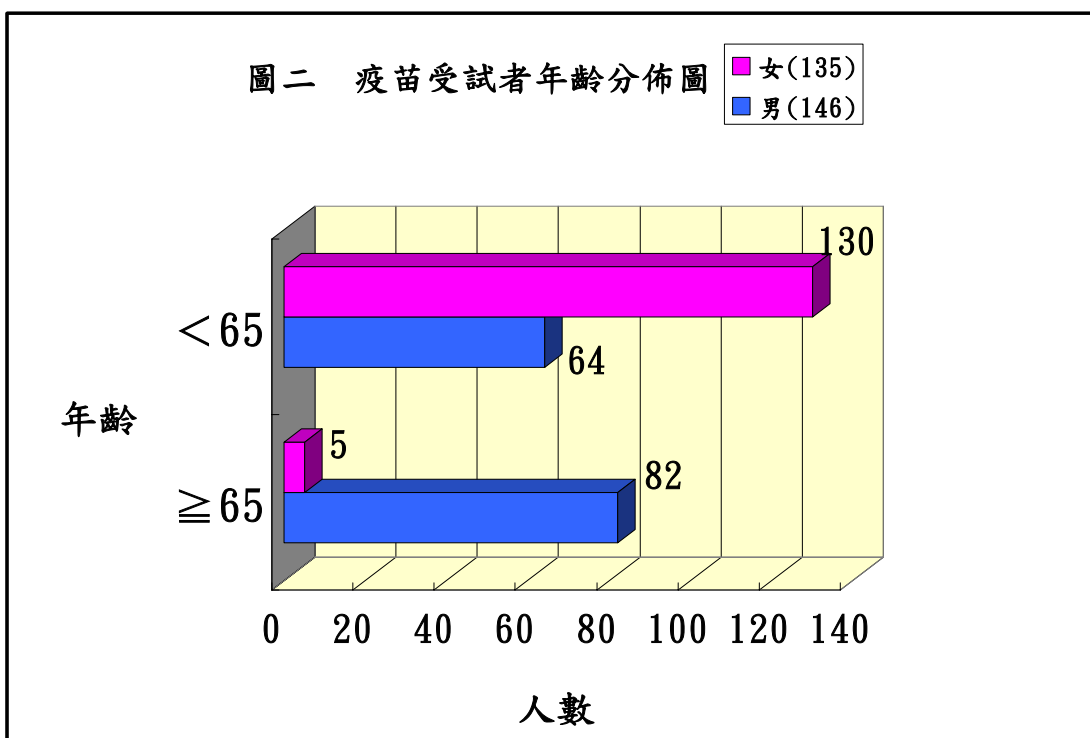
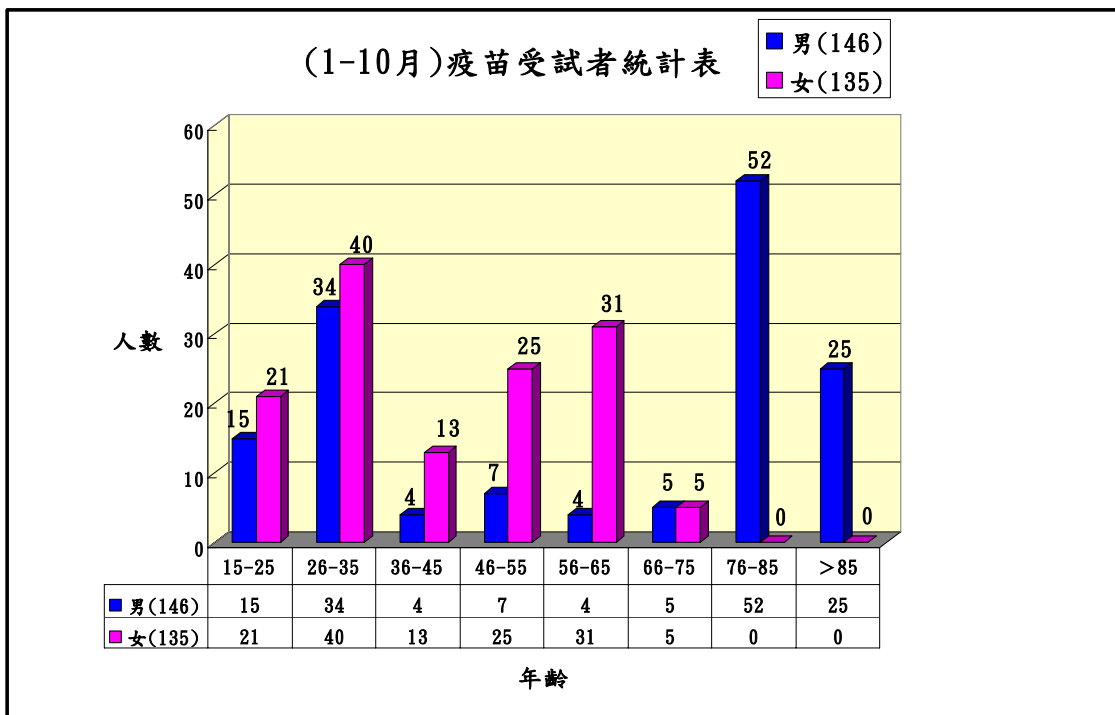
八、參考文獻：

1. Cifu A, Levinson W. Influenza. JAMA. 2000; 284: 2847-9.
2. Cox NJ; Subbarao K. Influenza. Lancet. 1999;354:1277-82.
3. Palache AM. Influenza vaccines. A reappraisal of their use. Drugs. 1997;54:841-56.
4. Zimmerman RK, Ruben FL, Ahwesh ER. Influenza, influenza vaccine, and amantadine/rimantadine. J Fam Pract. 1997;45:107-22.
5. Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Bridges CB; Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2004;53(RR-6):1-40.
6. Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Bridges CB; Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2005;54(RR-8):1-40.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: influenza vaccine supply and recommendations for prioritization during the 2005-06 influenza season. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2005 Sep 2;54:850.
8. Couch RB. Prevention and treatment of influenza. N Engl J Med. 2000;343:1778-87.
9. Strassburg MA, Greenland S, Sorvillo FJ, Lieb LE, Habel LA. Influenza in the elderly: report of an outbreak and a review of vaccine effectiveness reports. Vaccine. 1986;4:38-44.
10. Govaert TM, Thijs CT, Masurel N, Sprenger MJ, Dinant GJ, Knottnerus JA. The efficacy of influenza vaccination in elderly individuals. A randomized double-blind placebo-controlled trial. JAMA. 1994;272:1661-5.
11. Gross PA, Hermogenes AW, Sacks HS, Lau J, Levandowski RA. The efficacy of influenza vaccine in elderly persons. A meta-analysis and review of the literature. Ann Intern Med. 1995;123:518-27.
12. Nichol KL, Margolis KL, Wuorenma J, Von Sternberg T. The efficacy and cost

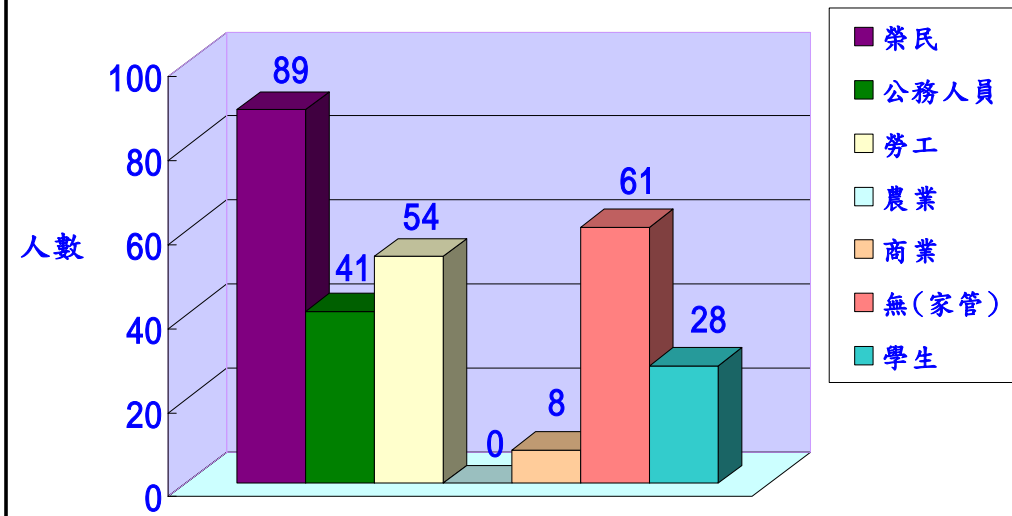
effectiveness of vaccination against influenza among elderly persons living in the community. *N Engl J Med.* 1994;331:778-84.

13. Claas EJ, Osterhaus AE, Van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet.* 1998;351:472-7.
14. Subbarao EK, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science.* 1998;279:393-6.
15. Peiris JSM, Yu WC, Leung CW, Cheung CY, Ng WF, Nicholls JM et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet.* 2004;363:617-9.
16. The Writing Committee of World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. *N Engl Med.* 2005;353:1347-85.

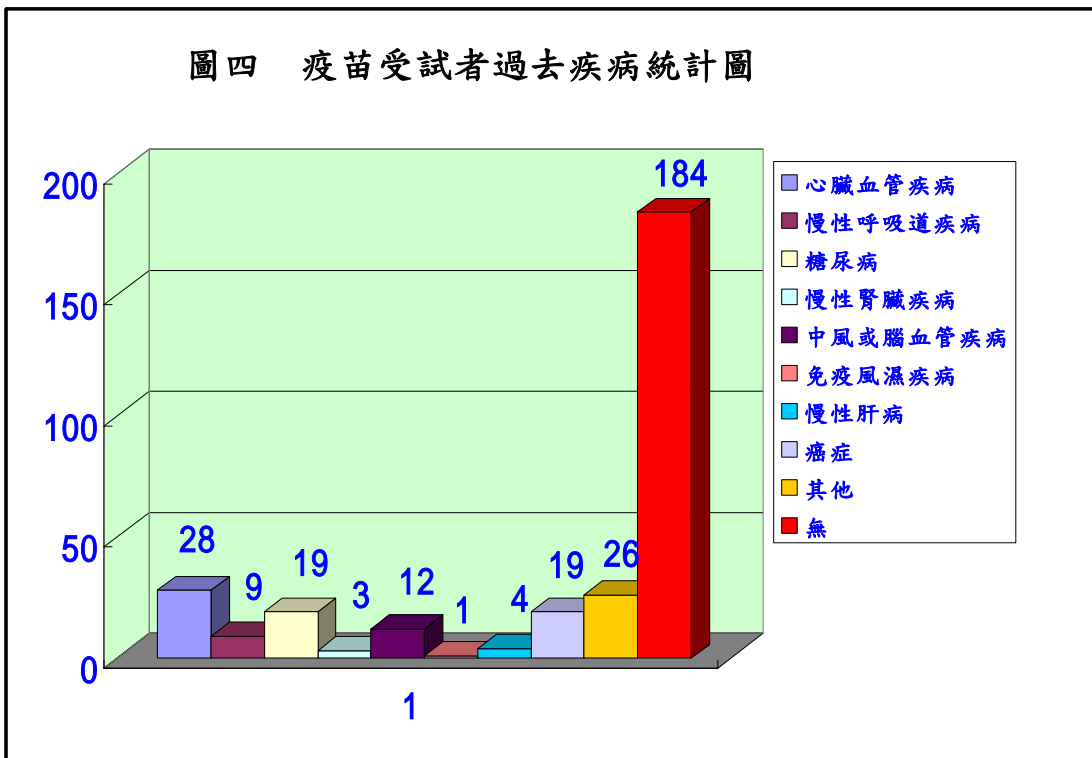
九、圖表：



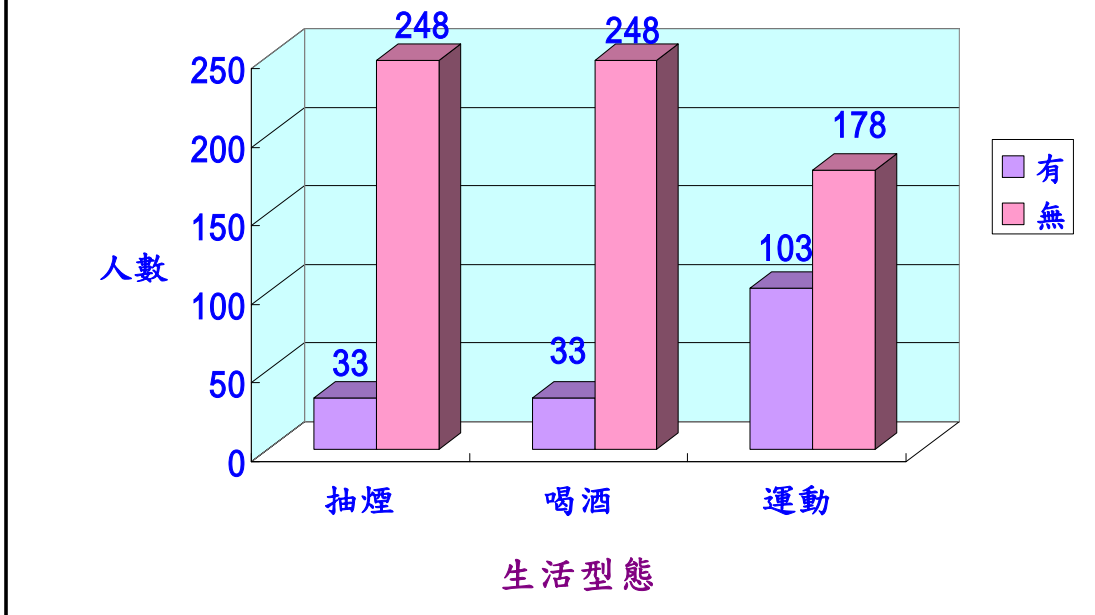
圖三 受試者職業統計圖



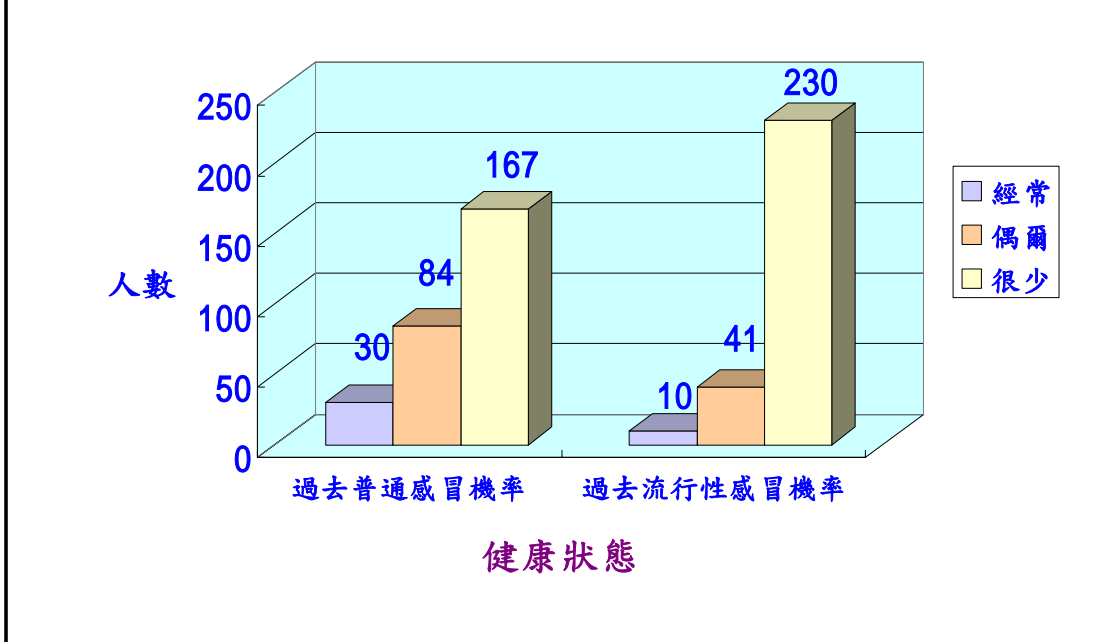
圖四 疫苗受試者過去疾病統計圖



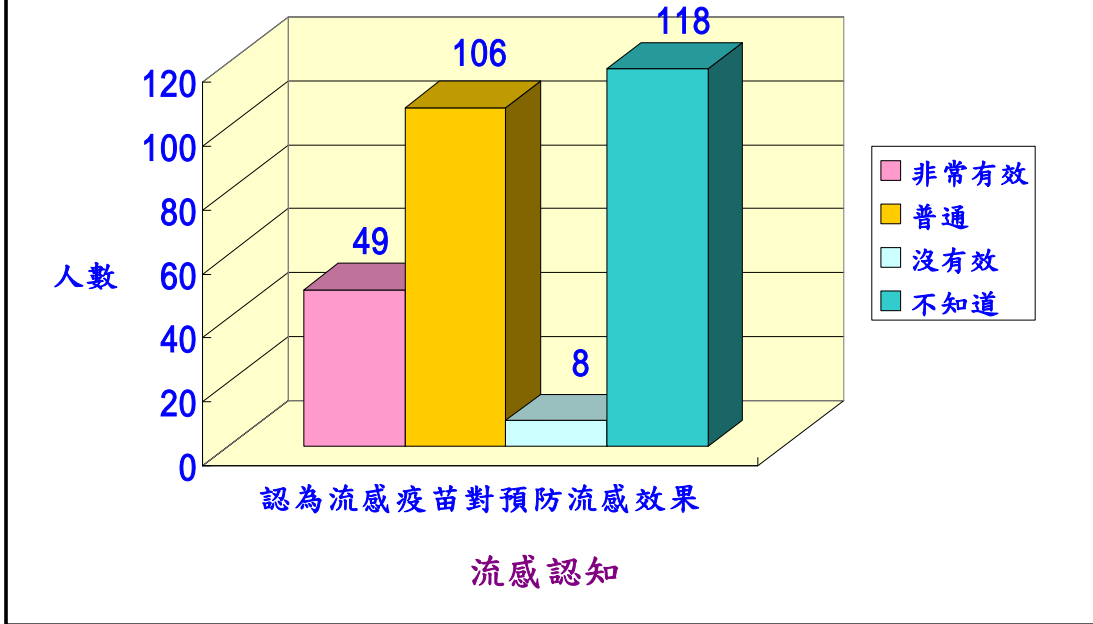
圖五 生活型態統計圖



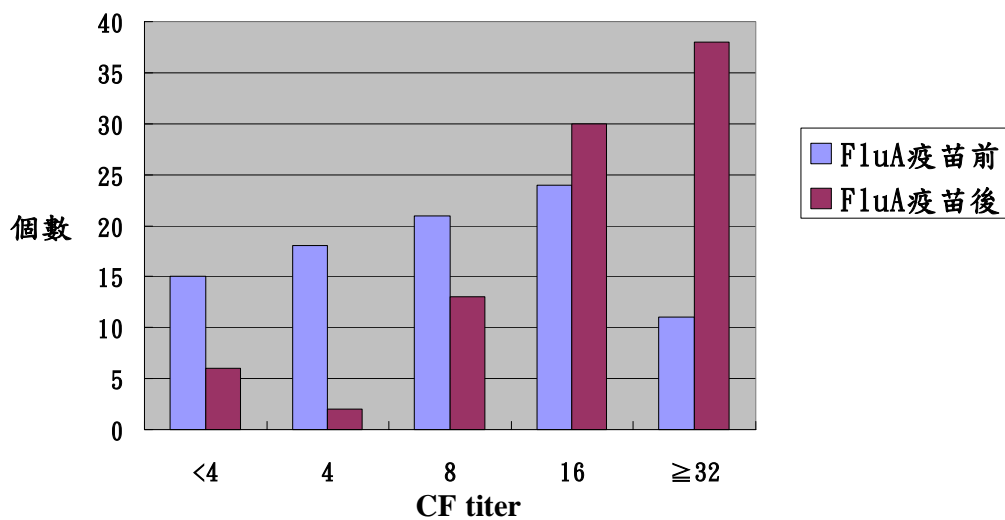
圖六 健康狀態統計圖



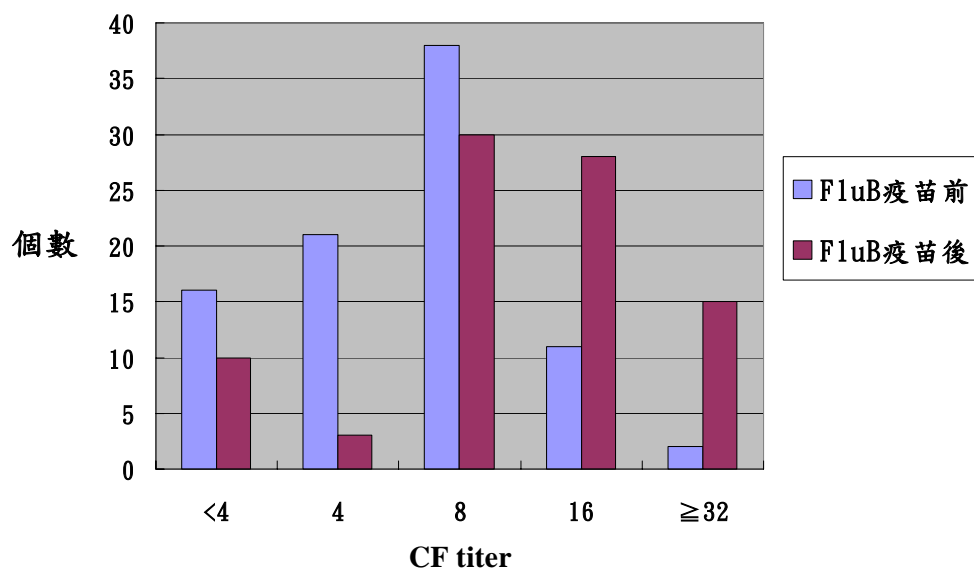
圖七 流感認知統計圖



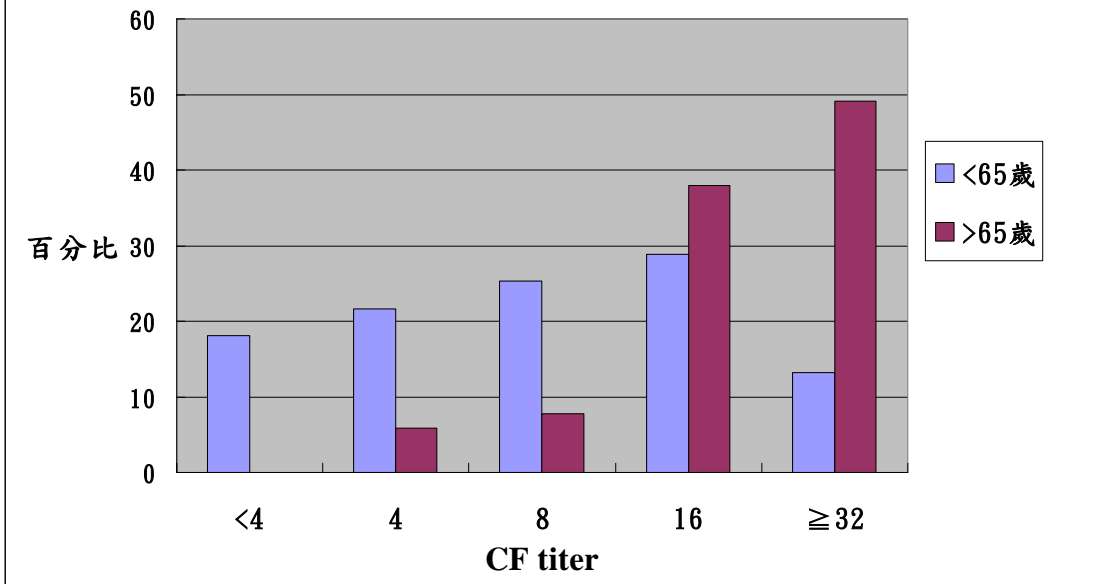
圖八 FluA施打疫苗前後CF titer比較



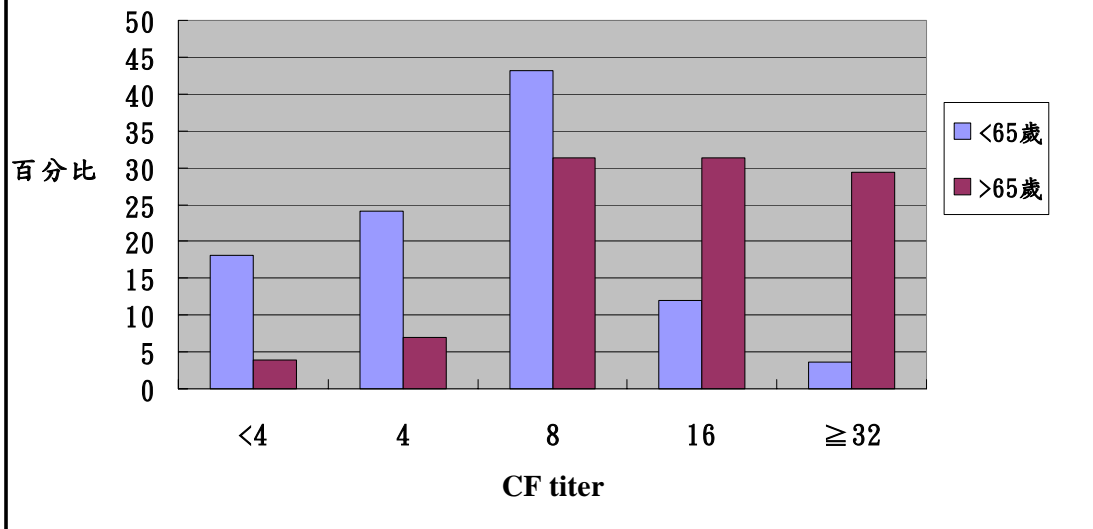
圖九 FluB施打疫苗前後CF titer比較



圖十 FluA施打疫苗前CF titer比較圖



圖十一 FluB施打疫苗前CF titer比較圖



表一 施打疫苗前後 CF titer 比較表

上升倍數	FluA (%) (N:89)	FluB (%) (N:89)
無	35(39.3)	36(40.5)
至少 2 倍上升	24(27.0)	39(43.8)
至少 4 倍上升	30(33.7)	15(15.7)

表二 施打疫苗前後 ELISA 比較表

(89 人，RU/ml \pm 1 S.D.)

	流感 A 型抗體值	流感 B 型抗體值
施打前	98.28 \pm 45.63	176.08 \pm 57.50
施打後	134.10 \pm 53.75	213.07 \pm 40.29

表三 HI 法及 CF 法之相關性比較

血清免反應		HI 法		合計
		未達 4 倍	4 倍以上	
CF 法	未達 4 倍	12	8	20
	4 倍以上	4	6	10
合計		16	14	30

十、附錄

台北榮民總醫院 DOH95-DC-1404 臨床試驗計畫受試者人數統計表							
編號	姓名	抽血(前)	抽血(後)	性別	年齡	聯絡電話	備註
1	林 x x	√	√	女	38	093xxxxxx9	
2	林 x x	√	√	男	63	093xxxxxx9	
3	林 x x x	√	√	女	58	093xxxxxx9	
4	吳 x x	√	√	女	27	091xxxxxx6	
5	李 x x	√	√	男	29	091xxxxxx2	
6	王 x x	√	√	女	43	093xxxxxx8	
7	王 x x x	√		女	64	093xxxxxx8	
8	余 x x	√	√	女	46	095xxxxxx1	
9	張 x x	√	√	女	45	093xxxxxx8	
10	萬 x x	√	√	男	40	28xxxxx4	
11	黃 x x	√	√	女	35	092xxxxxx7	
12	黃 x x	√	√	女	25	28xxxxx1	
13	樊 x x	√	√	女	37	28xxxxx1	
14	黃 x x	√		女	24	28xxxxx1	
15	徐 x x	√		女	49	28xxxxx1	
16	梁 x x	√	√	女	24	28xxxxx1	
17	王 x x	√		女	26	28xxxxx1	
18	吳 x x	√	√	女	27	093xxxxxx7	
19	彭 x x	√	√	女	29	093xxxxxx5	
20	李 x x	√	√	女	26	092xxxxxx6	
21	張 x x	√		女	31	28xxxxx3	
22	林 x x	√	√	女	28	28xxxxx3	
23	賴 x x	√	√	女	41	28xxxxx3	
24	劉 x x	√		女	26	28xxxxx3	
25	鍾 x x	√	√	女	24	28xxxxx3	
26	萬 x	√	√	女	35	095xxxxxx6	
27	郭 x x	√	√	女	62	28xxxxx4	
28	陳 x x	√	√	女	35	28xxxxx4	
29	周 x x x	√	√	女	62	093xxxxxx1	
30	陸 x x	√	√	女	57	093xxxxxx9	
31	李 x x	√	√	女	73	092xxxxxx8	
32	邱 x x x	√	√	女	66	091xxxxxx8	
33	陳 x x	√	√	女	48	093xxxxxx4	

34	石 x x	√		女	44	091xxxxxx0	
35	賈 x x	√	√	女	66	28xxxxx1	
36	鄭 x x	√	√	女	56	092xxxxxx7	
37	許 x x	√	√	女	57	29xxxxx7	
38	陸 x x	√	√	女	46	095xxxxxx3	
39	蔡 x x	√	√	女	61	28xxxxx5	
40	張 x x	√	√	女	52	26xxxxx0	
41	任 x x	√	√	女	58	28xxxxx5	
42	梁 x x	√	√	女	57	092xxxxxx6	
43	白 x x	√	√	女	56	28xxxxx0	
44	董 x x	√	√	女	63	28xxxxx2	
45	劉 x x	√		女	35	89xxxxx6	
46	戴 x x	√		男	30	29xxxxx7	
47	胡 x x	√		男	27	095xxxxxx6	
48	孫 x x	√		女	42	093xxxxxx8	
49	林 x x	√		女	49	093xxxxxx4	
50	鍾 x x	√		男	32	091xxxxxx8	
51	鍾 x x	√		男	58	091xxxxxx8	
52	楊 x x	√		女	58	091xxxxxx8	
53	陳 x x	√	√	女	64	092xxxxxx5	
54	施 x x	√	√	男	68	092xxxxxx5	
55	林 x x	√	√	女	51	28xxxxx3	
56	張 x x	√	√	女	69	092xxxxxx1	
57	陳 x x	√	√	女	52	28xxxxx6	
58	羅 x x	√	√	男	34	03-3xxxxx1	
59	林 x x	√		男	32	28xxxxx7	
60	林 x x	√	√	女	33	28xxxxx0	
61	林 x x	√	√	男	35	23xxxxx6	
62	賴 x x	√	√	女	30	096xxxxxx6	
63	陳 x x	√	√	女	29	28xxxxx8	
64	鐘 x x	√	√	男	49	28xxxxx5	
65	廖 x x	√	√	女	44	28xxxxx5	
66	廖 x x	√	√	女	50	28xxxxx3	
67	劉 x x	√	√	男	25	092xxxxxx9	
68	朱 x x	√	√	女	28	28xxxxx1	
69	葉 x x	√	√	男	30	28xxxxx0	
70	陳 x x	√		男	32	28xxxxx0	

71	連 x x	√		男	30	092xxxxxx0	
72	李 x x	√		女	28	28xxxxx0	
73	莊 x x	√	√	女	28	091xxxxxx6	
74	邱 x x	√		男	28	28xxxxx0	
75	莊 x x	√		女	27	28xxxxx0	
76	陳 x x	√	√	男	28	092xxxxxx9	
77	賴 x x	√		男	29	28xxxxx0	
78	陳 x x	√	√	男	27	28xxxxx0	
79	陳 x x	√	√	女	57	093xxxxxx1	
80	陳 x x	√	√	男	34	28xxxxx0	
81	鄭 x x	√	√	女	61	28xxxxx0	
82	賴 x x	√	√	女	52	28xxxxx9	
83	楊 x x	√	√	女	59	28xxxxx0	
84	林 x x	√	√	女	24	28xxxxx0	
85	陳 x x	√	√	女	27	28xxxxx0	
86	劉 x x	√		女	30	28xxxxx0	
87	潘 x x	√		女	34	091xxxxxx1	
88	戴 x x	√		女	24	091xxxxxx2	
89	葉 x x	√	√	女	23	098xxxxxx6	
90	陳 x x	√	√	女	58	093xxxxxx6	
91	廖 x x	√	√	女	27	28xxxxx0	
92	李 x x	√		女	71	22xxxxx0	
93	蔡 x x	√	√	女	62	092xxxxxx7	
94	陳 x x	√	√	男	29	093xxxxxx3	
95	周 x x	√	√	男	31	096xxxxxx0	
96	黃 x x	√	√	女	56	28xxxxx8	
97	潘 x x	√	√	女	54	092xxxxxx7	
98	鄭 x x	√	√	女	54	28xxxxx7	
99	褚 x x	√	√	女	54	093xxxxxx1	
100	洪 x x	√	√	女	65	29xxxxx5	
101	黃 x x	√	√	男	50	28xxxxx0	
102	葉 x x	√	√	女	28	28xxxxx0	
103	梁 x x	√	√	女	46	28xxxxx8	
104	丁 x	√	√	女	32	86xxxxx9	
105	董 x x	√	√	女	33	28xxxxx1	
106	張 x x	√	√	女	31	28xxxxx0	
107	褚 x x	√	√	女	27	28xxxxx6	

108	王 x x	√		女	55	28xxxxx7	
109	張 x x	√		男	27	24xxxxx8	
110	張 x x	√	√	女	26	28xxxxx0	
111	林 x x	√	√	女	24	28xxxxx0	
112	王 x x	√	√	男	27	095xxxxxx6	
113	吳 x x x	√	√	女	52	28xxxxx0	
114	廖 x x	√	√	女	18	28xxxxx0	
115	林 x x	√	√	男	22	28xxxxx0	
116	林 x x	√	√	男	20	28xxxxx0	
117	徐 x x	√		男	27	29xxxxx2	
118	林 x x	√		女	30	28xxxxx0	
119	何 x x	√		男	35	28xxxxx0	
120	宋 x x	√		女	25	095xxxxxx7	
121	陳 x x	√		男	34	096xxxxxx5	
122	周 x x	√		女	30	096xxxxxx2	
123	林 x x	√		男	24	093xxxxxx3	
124	林 x x	√		男	31	28xxxxx0	
125	詹 x x	√	√	男	46	28xxxxx7	
126	蔡 x x	√	√	男	46	28xxxxx1	
127	李 x x	√	√	男	47	28xxxxx1	
128	翁 x x	√	√	男	45	28xxxxx1	
129	韓 x	√	√	女	54	28xxxxx1	
130	李 x x	√	√	女	25	28xxxxx1	
131	邱 x x	√	√	女	45	28xxxxx1	
132	劉 x x	√	√	女	50	28xxxxx1	
133	王 x x	√	√	男	32	092xxxxxx0	
134	郭 x x	√	√	女	25	091xxxxxx7	
135	林 x x	√	√	女	45	28xxxxx1	
136	李 x x	√	√	女	50	28xxxxx1	
137	陳 x x	√	√	女	42	28xxxxx0	
138	林 x x	√	√	女	27	28xxxxx1	
139	蕭 x x	√	√	女	21	092xxxxxx4	
140	曾 x x	√	√	女	40	28xxxxx2	
141	蔡 x x	√	√	男	20	093xxxxxx1	
142	黃 x x	√	√	男	37	28xxxxx8	
143	王 x x	√	√	男	30	096xxxxxx9	
144	陳 x x	√	√	女	32	095xxxxxx6	

145	蔡 x x	√	√	男	49	28xxxxx3	
146	林 x x	√	√	男	19	096xxxxxx6	
147	郭 x x	√	√	女	25	28xxxxx1	
148	阮 x x	√	√	女	53	096xxxxxx8	
149	戴 x x x	√		女	54	28xxxxx1	
150	葉 x x	√	√	女	24	27xxxxx5	
151	李 x x	√	√	男	23	095xxxxxx0	
152	黃 x x	√	√	男	23	22xxxxx4	
153	楊 x x	√	√	女	28	091xxxxxx0	
154	張 x x	√	√	女	29	28xxxxx1	
155	陳 x x	√	√	男	29	092xxxxxx2	
156	林 x x	√	√	女	27	093xxxxxx6	
157	王 x x	√	√	男	37	096xxxxxx0	
158	蘇 x x	√	√	女	24	093xxxxxx2	
159	林 x x	√	√	男	27	093xxxxxx6	
160	吳 x x	√	√	女	41	27xxxxx1	
161	林 x x x	√	√	女	62	25xxxxx1	
162	莊 x x	√	√	男	20	093xxxxxx3	
163	鄭 x x	√	√	女	21	095xxxxxx2	
164	張 x x	√	√	男	21	096xxxxxx8	
165	王 x x	√	√	女	20	091xxxxxx8	
166	鄭 x x	√	√	男	21	096xxxxxx9	
167	曾 x x	√	√	女	22	093xxxxxx6	
168	施 x x	√	√	男	25	28xxxxx7	
169	古 x x	√	√	男	29	093xxxxxx7	
170	張 x x	√		女	32	28xxxxx6	
171	李 x x	√	√	男	25	093xxxxxx8	
172	吳 x x	√		男	30	092xxxxxx1	
173	鍾 x x	√	√	男	25	095xxxxxx2	
174	黃 x x	√	√	女	25	096xxxxxx6	
175	陳 x x	√		女	53	22xxxxx7	
176	陳 x	√	√	女	56	28xxxxx1	
177	張 x x	√	√	女	55	28xxxxx2	
178	潘 x x	√		男	28	091xxxxxx8	
179	黃 x x	√	√	女	61	092xxxxxx1	
180	張 x x	√		女	57	28xxxxx7	
181	傅 x x	√	√	女	63	25xxxxx7	

182	王 x x	√	√	女	57	27xxxxx8	
183	林 x	√	√	女	63	28xxxxx8	
184	萬 x x	√	√	女	60	25xxxxx8	
185	洪 x x	√		女	57	093xxxxxx9	
186	連 x x	√	√	女	51	28xxxxx2	
187	尤 x x	√		女	28	28xxxxx1	
188	梁 x x	√		男	33	096xxxxxx1	
189	廖 x x	√		男	23	091xxxxxx6	
190	陳 x x	√		女	23	091xxxxxx3	
191	曾 x x	√		男	34	28xxxxx0	
192	郎 x x	√		女	63	24xxxxx7	
193	王 x x	√		女	27	28xxxxx0	
194	楊 x x	√		男	27	28xxxxx0	
195	何 x	√		女	27	28xxxxx0	
196	張 x x	√		女	27	28xxxxx0	
197	董 x x	√		女	55	091xxxxxx3	
198	林 x x	√	√	男	57	22xxxxx7#xx4	
199	嵇 x x	√	√	男	83	22xxxxx7#xx4	
200	劉 x x	√	√	男	83	22xxxxx7#xx4	
201	羅 x x	√	√	男	98	22xxxxx7#xx4	
202	賈 x x	√	√	男	85	22xxxxx7#xx4	
203	牛 x x	√		男	80	22xxxxx7#xx4	
204	李 x x	√		男	85	22xxxxx7#xx4	
205	朱 x x	√	√	男	96	22xxxxx7#xx4	
206	林 x x	√		男	86	22xxxxx7#xx4	
207	崔 x x	√	√	男	76	22xxxxx7#xx4	
208	柏 x x	√		男	84	22xxxxx7#xx4	
209	藍 x x	√		男	82	22xxxxx7#xx4	
210	張 x x	√	√	男	80	22xxxxx7#xx4	
211	趙 x	√	√	男	74	22xxxxx7#xx4	
212	王 x x	√	√	男	81	22xxxxx7#xx4	
213	金 x x	√	√	男	77	22xxxxx7#xx4	
214	王 x	√	√	男	90	22xxxxx7#xx4	
215	馮 x x	√	√	男	86	22xxxxx7#xx4	
216	鐘 x x	√		男	86	22xxxxx7#xx4	
217	關 x x	√	√	男	86	22xxxxx7#xx4	
218	黃 x	√	√	男	80	22xxxxx7#xx4	

219	胡 x x	√	√	男	91	22xxxxx7#xx4	
220	林 x x	√	√	男	80	22xxxxx7#xx4	
221	馮 x x	√	√	男	78	22xxxxx7#xx4	
222	周 x x	√	√	男	79	22xxxxx7#xx4	
223	李 x x	√	√	男	85	22xxxxx7#xx4	
224	陳 x x	√	√	男	83	22xxxxx7#xx4	
225	周 x	√	√	男	65	22xxxxx7#xx4	
226	陳 x x	√	√	男	81	22xxxxx7#xx4	
227	楊 x	√	√	男	83	22xxxxx7#xx4	
228	唐 x	√	√	男	85	22xxxxx7#xx4	
229	陳 x x	√	√	男	92	22xxxxx7#xx4	
230	楊 x x	√	√	男	78	22xxxxx7#xx4	
231	朱 x x	√		男	55	22xxxxx7#xx4	
232	李 x x	√		男	82	22xxxxx7#xx4	
233	馮 x x	√	√	男	76	22xxxxx7#xx4	
234	廖 x x	√	√	男	82	22xxxxx7#xx4	
235	賴 x x	√	√	男	82	22xxxxx7#xx4	
236	張 x x	√	√	男	83	22xxxxx7#xx4	
237	王 x x	√	√	男	70	22xxxxx7#xx4	
238	錢 x x	√	√	男	79	22xxxxx7#xx4	
239	唐 x x	√	√	男	92	22xxxxx7#xx4	
240	唐 x x	√	√	男	93	22xxxxx7#xx4	
241	翁 x x	√		男	94	22xxxxx7#xx4	
242	邵 x x	√	√	男	88	22xxxxx7#xx4	
243	葉 x x	√	√	男	79	22xxxxx7#xx4	
244	孫 x x	√	√	男	88	22xxxxx7#xx4	
245	劉 x x	√		男	78	22xxxxx7#xx4	
246	翁 x x	√	√	男	80	22xxxxx7#xx4	
247	金 x x	√	√	男	75	22xxxxx7#xx4	
248	王 x x	√	√	男	81	22xxxxx7#xx4	
249	劉 x	√	√	男	75	22xxxxx7#xx4	
250	段 x x	√	√	男	84	22xxxxx7#xx4	
251	黃 x x	√	√	男	84	22xxxxx7#xx4	
252	楊 x x	√	√	男	88	22xxxxx7#xx4	
253	劉 x x	√	√	男	83	22xxxxx7#xx4	
254	寧 x x	√	√	男	85	22xxxxx7#xx4	
255	羅 x x	√	√	男	86	22xxxxx7#xx4	

256	黃 x x	√	√	男	78	22xxxxx7#xx4	
257	鄭 x	√	√	男	76	22xxxxx7#xx4	
258	黃 x	√	√	男	86	22xxxxx7#xx4	
259	吳 x x	√	√	男	89	22xxxxx7#xx4	
260	翁 x x	√		男	92	22xxxxx7#xx4	
261	盧 x x	√	√	男	86	22xxxxx7#xx4	
262	戴 x x	√	√	男	82	22xxxxx7#xx4	
263	廖 x x	√	√	男	80	22xxxxx7#xx4	
264	薛 x x	√	√	男	80	22xxxxx7#xx4	
265	陳 x x	√	√	男	82	22xxxxx7#xx4	
266	程 x x	√	√	男	81	22xxxxx7#xx4	
267	邱 x x	√	√	男	79	22xxxxx7#xx4	
268	張 x x	√	√	男	86	22xxxxx7#xx4	
269	楊 x x	√	√	男	93	22xxxxx7#xx4	
270	梁 x x	√		男	80	22xxxxx7#xx4	
271	李 x x	√	√	男	80	22xxxxx7#xx4	
272	孔 x x	√	√	男	86	22xxxxx7#xx4	
273	郭 x x	√	√	男	80	22xxxxx7#xx4	
274	許 x x	√	√	男	82	22xxxxx7#xx4	
275	朱 x x	√		男	77	22xxxxx7#xx4	
276	朱 x x	√	√	男	93	22xxxxx7#xx4	
277	蔣 x x	√	√	男	82	22xxxxx7#xx4	
278	王 x x	√	√	男	77	22xxxxx7#xx4	
279	耿 x x	√	√	男	77	22xxxxx7#xx4	
280	陳 x x	√	√	男	86	22xxxxx7#xx4	
281	林 x x	√	√	男	81	22xxxxx7#xx4	

十一、回覆意見書

致審查委員書面回覆意見：

1. 考慮增加小孩族群為受試者對象：由於原合約書中依計畫為成人及高齡者共 300 名（因榮民系統以老年人為多），且另有其他疫苗團隊涵蓋小孩族群，因此未於本年度將小孩納入，擬與其他團隊協調後納入小孩族群之疫苗施打。
2. 對個別疫苗株之反應效價及納入當季疫苗株及當季本地分離病毒株之分析：由於本年度之疫苗株為
A/New Caledonia/20/99 (H₁N₁) –like strain
A/Wisconsin/67/2005 (H₃N₂) –like strain
B/Malaysia/2506/2004 –like strain；
且與目前流行株在序列分析上近似（疫苗廠商未提供疫苗株供比較），因此以當季流行株同時代表疫苗株之反應效價，依委員意見對歷年之代表株將協調後選擇納入測試。
3. 本年計畫未納入 NT test，將與其他團隊協調 NT test 之作業平台。
4. 「不良反應狀態分析部分」原已於計畫修改中刪除，宥於原送出名稱與成果報告名稱須一致，故尚未修改，擬於下年度計畫提報中一併修改。