

計畫編號：DOH98-DC-1016

行政院衛生署疾病管制局 99 年度科技研究發展計畫

偵測台灣兒童對流感疫苗株與本土流行株的
抗體免疫反應後續擴充

期 末 報 告

執行機構：臺大醫院小兒科

計畫主持人：黃立民

研究人員：張鑾英、邵蓓嵐

執行期間：99 年 1 月 1 日至 99 年 3 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

封面	1
目錄	2
中文摘要	3
英文摘要	4
壹、前言	5
貳、材料與方法	7
參、結果	15
肆、討論	25
伍、結論與建議	29
陸、計畫重要研究成果及具體建議	30
柒、委員審查意見與回覆	31
捌、參考文獻	34

中文摘要

流感病毒是每年造成老人、兒童肺炎的主要原因之。由於流感病毒基因變異性大，它在世界各地常造成每年的大流行，使得許多人因此罹病、死亡，對社會造成相當大的衝擊。目前，對抗流感病毒最好的方法，仍是施打流感疫苗。但由於台灣流行的本土株常與世界衛生組織建議的病毒株有吻合度上的差異，這是防疫上需要進一步研究討論的重要部份。

根據衛生署疾病管制局 95-96 年流感病毒抗體監測相關計畫結果顯示，幼兒血清保護率，似與當年流行的流感病毒株有相關性，因此 98 年度 (2009 年 7~9 月) 收案 63 名健康且年紀在 12 至 60 個月兒童打疫苗前之血清，利用標準疫苗株及本土流行株進行 HAI assay 偵測兒童體內抗體。

本擴充計畫新增研究重點：

將 98 年度收案的 63 位幼兒 (12 至 60 個月，打疫苗前)，除了利用新型流感病毒進行 MN assay (Micro-Neutralisation assay) 檢測分析抗體效價。

MN assay 的結果顯示其 GMT 值只有 32；血清保護率以 titer 大於等於 80 為標準，幼兒對新型流感病毒的血清保護率是 16%，和 HAI assay 的結果相似。因此 MN assay 的結果可輔助判讀分析抗體反應，增加可信度。

關鍵詞：流感病毒、流感疫苗、抗體免疫反應、血清保護率

Abstract

Influenza virus is the most common cause of pneumonia in the elder and children each year. Because of its capability for genetic changes, influenza usually results in annual epidemics and the occasional pandemics, leading to substantial morbidity, mortality and expense. Until now, the best way to control influenza outbreaks remains to be influenza vaccine. But surveillance data demonstrated a higher mismatch rate between WHO-recommended vaccine strains and predominately circulating viruses in Taiwan. This is an important issue to evaluate.

According to the data of 3rd-year project from CDC (Taiwan), the seroprotection rates in children before vaccination related to the major circulating strain in Taiwan. In this project, we have recruited 63 children (2~5 years old) to test their antibody response against vaccine strains and local strain before vaccination.

The extension period of this project was to detect the 63 children's (2~5 years old) antibody responses against swine H1N1 by MN assay (micro-neutralisation assay).

The results of MN assay showed the GMT was 32 and the seroprotection rate was 16%, which was similar to the results of HAI assay. The results of MN assay may assist the analysis and increase the reliability of antibody response.

Key word : Influenza virus, Influenza vaccine, Antibody response, seroprotecion rate

壹、前言

流行性感冒病毒是一種 RNA 病毒，由於它的基因是分段式，且病毒本身的 RNA polymerase 缺乏 proofreading 的作用。這個病毒獨特的具有抗原轉型（antigenic shift）與抗原微變（antigenic drift）的特色，使得病毒表面蛋白，hemagglutinin 與 neuraminidase 改變，而持續對人類健康形成威脅 (1)。當病毒經基因重組（genetic reassortment）而改變 hemagglutinin 的亞型時（即所謂 antigenic shift），由於是一種新的病毒產生，大多數的人對它都沒有抵抗力，這時就會造成全世界大流行（pandemic）。在 20 世紀時，就有 3 次重要的 pandemic，包括了 1918 的 spanish flu，1957 的 asian flu 與 1968 的 Hong Kong flu，分別造成了上百萬，甚至上千萬人的死亡。

而當病毒因點突變而造成表面蛋白抗原性微變時（即 antigenic drift），造成的就可能是較小規模的某一區域性的流行。每當流感流行時，總會影響到所有人，兒童與老年人較易有併發症(2-4)。在美國數據顯示，每年流感流行時，侵襲率約為人口總數的百分之十至二十，導致約五千萬人生病，四萬七千多人死亡。在歐洲總計數字也約為如此 (5-9)。

目前，公衛政策上要能有效控制流感病毒的蔓延，主要還是要靠流感疫苗。已有許多研究發現施行流感疫苗可以降低流感疾病嚴重度，上呼吸道症狀，並縮短因病未能工作的時間，有經濟上實質的效益 (10)。在 2004 年更配合美國疾病管制局建議，免費為 6 個月到 2 歲以下的幼兒施打流感

疫苗。

雖然如此，台灣仍有一些不同於國外的地方需加以考慮使得疫苗政策更為完善。根據我們自己流感病毒監測資料顯示，世界衛生組織建議的疫苗株會有與台灣當時流行的病毒株不吻合的情形發生。有時流行於全世界的病毒株會早一步在台灣出現 (11)。這個現象顯示世界衛生組織的疫苗並不全然適合台灣，台灣必須加強流感監測，自己決定疫苗株。

根據衛生署疾病管制局 95-96 年流感病毒抗體監測相關計畫結果顯示，幼兒血清保護率，似與當年流行的流感病毒株有相關性，以幼童針對本土抗原的免疫結果來推測當年流行的病毒株較成人為接近，因此本計畫收案 63 名健康且年紀在 12 至 60 個月兒童打疫苗前之血清，利用疫苗株及本土流行株進行 HAI assay 監測兒童體內抗體，希望上述研究成果能有效藉由判斷幼童血清保護率之結果來推測當年可能流行的病毒株，對於國人在流行性感冒的防疫上更有幫助。

本擴充計畫新增研究重點：

將 98 年度收案的 63 位幼兒(12 至 60 個月，打疫苗前)，除了利用新型流感病毒以 HAI 檢驗方法分析測定抗體效價外，另外再進行 MN assay (Micro-Neutralisation assay) 檢測分析抗體效價。

貳、材料與方法

一、徵求研究對象：

從 98 年 7 月開始徵求二~五歲的兒童 63 人至台大醫院進行本研究，徵求對象從健兒門診以及其親朋好友中收集，範圍擴大至社區。另外我們將設計說明書及同意書，並讓參加人員或其家屬需簽署受試者同意書。

二、收集血液檢體(打疫苗前)：將收集的血液檢體進行離心，取血清，將血清儲存在 -80°C ，取 $50\mu\text{l}$ 之血清處理 RDE (Receptor Destroy Enzyme) 之後方可進行 HAI (hemagglutinin-inhibition) assay。

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

1. 將 1 volume 血清檢體吸至 1.5ml 離心管中
2. 取 4 volume RDE(100 units/ml)與血清混合，vortex
3. 37°C 作用，O/N
4. 加入 3 volume sodium citrate(2.5%)，vortex
5. 56°C 作用 30 分鐘
6. 加入 2volume 的 PBS (Final serum dilution 為 1:10)
7. -20°C 保存

3、利用 HAI assay 進行抗體測試：由安萬特疫苗廠提供今年疫苗株及由疾管局提供本土流行株之抗原進行 HAI assay。HAI assay 參考世界衛生組織出版的動物流感診斷與監測手冊執行進行方法(WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance) (12)

標準疫苗株由安萬特疫苗廠提供所使用的三種流感病毒標準抗原：

A/Brisbane/59/2007 (H1N1) ； A/Uruguay/716/2007 (H3N2) ；

B/Brisbane/60/2008。

本土流行株由疾管局劉銘燦博士所製備的三株本土流感抗原：

A/Taiwan/1899/2009 (H1N1-like) ； A/Taiwan/3982/2009

(H3N2-like) ； B/Tiwan/5908/2009

由疾管局劉銘燦博士提供新型流感病毒(swine H1N1)：

A/California/07/2009

詳細步驟如下：

(A)試劑製備: 0.75%天筑鼠血球懸浮液

本法利用天筑鼠血球上的多醣體成份，吸附流感病毒的特性，以測試病毒濃度，所以混濁不沉澱為陽性，沉澱成一小圓點為陰性

1. 取天竺鼠血液約 5 ml，加入 0.5ml 的抗凝劑保存液，充份混合，可儲存約一星期
2. 清洗血球：取 2ml 含抗凝劑血液，加入 PBS 至 14ml 以 1500 RPM 離心 5 分鐘(各別離心機數據不同，需再測試)
3. 倒掉上清液，再加入 PBS，輕輕混合，再次離心重覆清洗 3 次，最後一次以 2000 RPM 離心 15 分鐘
4. 倒掉上清液，取離心後中段 RBC，泡成 0.75% 的 RBC 懸浮液

(B)病毒HA titler測試

1. 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 50 μ l 的 PBS 溶液
2. 於第一列加入 100 μ l 的病毒抗原原液，negative control 行則以 100 μ l PBS 取代抗原
3. 取第一列的抗原 50 μ l 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 50 μ l 加入第三列，如此序列稀釋至第八列
4. 分別加入以 PBS 稀釋的 0.75% 的天竺鼠紅血球 50 μ l /well，以手輕微搖晃孔盤後，之後以膠膜封住孔盤，置於室溫置 30 分鐘，之後記錄結果。

取最高稀釋倍數會產生完全凝集為 end point。例如 1:256 為 end

point，即原液為 256HA/50 μ l。

5. 進行血球凝集抑制試驗前，須先以 PBS 溶液稀釋抗原原液至每 50 μ l 稀釋液中含有 8 HA unit 的抗原。(1 HA unit 約為 10^7 個病毒量)

(C)血球凝集抑制試驗(HAI assay)

1. 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 25 μ l 的 PBS 溶液
2. 於第一列加入 50 μ l RDE treated serum
3. 取第一列的抗體 25 μ l 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 25 μ l 加入第三列，如此序列稀釋至第八列
4. 分別加入 25 μ l 已稀釋至 8 HA unit/50 μ l 的標準抗原，以手輕微搖晃 96 孔盤後，置於室溫下反應 30 分鐘
5. 加入以 PBS 稀釋的 0.75% 的天竺鼠紅血球 50 μ l/well，至於室溫下靜置 30 分鐘，之後記錄結果
6. 血球凝集抑制試驗以紅血球無凝集反應孔數最高者為 end point titer

(D) Quality control

1. 每次進行 HI 測試時對同一抗原應 duplicate，同時做 serum control (即 treated serum (1:10~640) 25 μ l + 25 μ l PBS + 50 μ l 0.75% GP RBC)。
需 serum control 無血球凝集反應才可讀取結果。

2. 每次 HI 時應同時執行 病毒抗原之 back titration ，以確保所使用之 抗力價足夠。一般 back titration 時會做 4HA, 2HA, 1HA, 0.5HA/25 μ l，正常時應該 4HA, 2HA 完全凝集，1HA 完全或接近完全凝集。0.5HA 為部份凝集。如果 抗原 back titration 結果偏低時，HI titer 會比實際值偏高，反之則 HI titer 會比實際值偏低。

三、中和試驗：MN assay (Micro-Neutralisation assay)

(A) Virustitration and TCID50

1. 培養單層 MDCK 於 96 well，seeding 1.5×10^4 cell/well (七成滿)
2. 病毒解凍後以稀釋液稀釋 100 倍
3. 除了 column 1 之外，每個 well 加入 100 ul 稀釋液
4. 在 column 1 加入 146 ul 稀釋病毒液，mix 後由 column 1 取 46 ul 移至 column 2、3~11 進行連續稀釋
5. 移去 medium，以 250 ul 1x PBS wash
6. 加入 100 ul 冰的 fixative，室溫靜置 10 min
7. 移去 fixative，風乾 plate
8. 利用 ELISA 測量吸光值，當 OD > 2 倍 Cell control 的 OD 值則視為 positive

(B) Virus neutralisation assay

1. 培養單層 MDCK 於 96 well，約 1.5×10^4 cell/well (七成滿)
2. 56°C 加熱血清 30 min 去活性
3. 每個 well 加入 50 ul 稀釋液
4. 第一列(RowA; A1-A11)再加入 40 ul 稀釋液
5. 於 RowA 加入 10 ul 處理過的血清，mix 後取 50 ul 移至下個 well，
連續對倍稀釋(A、B、C、H)
6. 將病毒稀釋為 100 TCID₅₀/ 50 ul，每個 well 加入 50 ul 稀釋病毒液
(CC 加入 50 ul 稀釋液)
7. 以 100 TCID₅₀ 為起始進行 back-titration
8. NA 跟 back-titration 一起放入 37°C 培養(NA O/N; back 2 hr)
9. 移去 medium，250 ul 1x PBS wash
10. 加入 100 ul 冰的 fixative，室溫靜置 10 min
11. 移去 fixative，風乾 plate

(C) ELISA

1. 風乾的 plate 用 wash buffer 洗三次
2. 稀釋 1:2000 一抗於 blocking buffer，每個 well 加入 100 ul 稀釋一抗，
室溫 1 hr
3. 用 wash buffer 洗四次
4. 稀釋 1:4000 二抗於 blocking buffer，每個 well 加入 100 ul 稀釋二抗，

室溫 1 hr

5. 用 wash buffer 洗六次

6. 每個 well 加入 100 ul 新鮮配置的 substrate (10 mg OPD + 20 ml citrate buffer + H₂O₂), 室溫 5~10 min 至顏色改變(VC 較 CC 顏色深)

7. 加入 100 ul stop solution

8. 紀錄 490 nm OD 值

(D) Data analysis

1. 記錄每 well 結果，利用 ELISA 測量吸光值，

當 OD > 2 倍 Cell control 的 OD 值則視為 positive

2. 決定 virus neutralization antibody end point titer

→ (平均 VC well 數 OD 值) - (平均 CC well 數 OD 值) / 2 + (平均 CC well 數 OD 值) = X

→ X = 50% specific signal

3. negative control OD 值 < 0.2

四、結果資料建檔與分析並預測流行之病毒株：

以下四個參數將被使用在評估各家疫苗廠施打疫苗前後抗體效價變化的指標：幾何平均抗體效價 **GMT**, Geometric mean titer、血清轉換率 **seroconversion rate**、血清轉換係數 **seroconversion factor** 及血清保護率

seroprotection rate. 這些參數定義內容如下：(1).血清轉換係數:打疫苗後平均抗體除以打疫苗前平均抗體的倍數；**Seroconversion factor**： the fold increase in serum HAI titers after vaccination (the post-vaccination Ab titer divided by the pre-vaccination Ab titer) ；(2).血清保護率：HAI 抗體效價大於 40 的百分率；**Seroprotection rate**: the percentage of vaccine recipients with a serum HAI titer at least 1:40 after vaccination；(3).血清轉換率:打疫苗後血 HAI 抗體效價呈四倍以上增加的比率；**Seroconversion rate**: the percentage of vaccine recipients who have an increase in serum HAI titers by at least a factor of 4 after vaccination, as compared with titers before vaccination。 (13)

參、結果

1、臨床收案部份

研究對象

本計畫從 98 年 7 月開始徵求研究對象(健康且年紀在 12 至 60 個月兒童)至台大醫院進行本研究，徵求對象從健兒門診以及其親朋好友中收集，範圍擴大至社區。另外設計說明書及同意書，讓參加人員或其家屬需簽署受試者同意書。統計收案 63 名兒童已收畢，受試者基本資料列於 Fig.1。

Fig.1 Demographic characteristics of the subjects

pre-vaccination (2009 年 7 月~9 月)			
Group	No. of subjects	Age (year)	
child		Mean (month)	Range(month)
All subjects	63	29.4	12~60
Female	25		
Male	38		

2、利用標準抗原進行 HI 分析測定疫苗前的抗體效價部份

安萬特(Aventis)疫苗廠提供的[疫苗標準抗原]已入關進口，本實驗室採用安萬特(Aventis)疫苗廠提供的自家備製的流感疫苗標準抗原，進行血清抗體分析。

安萬特疫苗廠所使用的三種流感病毒標準抗原：

A/Brisbane/59/2007 (H1N1) ； A/Uruguay/716/2007 (H3N2) ；

B/Brisbane /60/2008 。

以下四個參數將被使用在評估各家疫苗廠施打疫苗前後抗體效價變化的指標：幾何平均抗體效價Geometric mean titer (GMT)、血清轉換率 seroconversion rate、血清轉換係數seroconversion factor及血清保護率 seroprotection rate。這些參數定義內容如下：(1)血清轉換係數：打疫苗後平均抗體除以打疫苗前平均抗體的倍數；Seroconversion factor：the fold increase in serum HAI titers after vaccination (the postvaccination Ab titer divided by the prevaccination Ab titer) ；(2)血清保護率：HAI抗體效價大於40的百分率；Seroprotection rate: the percentage of vaccine recipients with a serum HAI titer at least 1:40 after vaccination ；(3)血清轉陽率：打疫苗後血清HAI抗體效價呈四倍以上增加的比率；Seroconversion rate：the percentage of vaccine recipients who have an increase in serum HAI titers by at least a factor of 4 after vaccination, as compared with titers before vaccination 。

根據CPMP guidelines (European Committee for Proprietary Medicinal

Products)定義：對18-60歲的成年人，血清轉陽率(seroconversion rate)必須大於**40%**；血清轉換係數(seroconversion factor)必須大於**2.5**；血清保護率(seroprotection rate)必須大於**70%**；對大於60歲的老年人，血清轉陽率(seroconversion rate)必須大於**30%**；血清轉換係數(seroconversion factor)必須大於**2.0**；血清保護率(seroprotection rate)必須大於**60%** (CPMP/BWP/214/96. September 1996; Circulaire No 96-0661 : 1 – 22.)。由於沒有針對幼兒的標準，因此對於幼兒的部份本實驗採用大於60歲的老年人之標準。

安萬特(Aventis)疫苗廠皆已完成標準抗原之免疫抗體反應分析，由於今年收案的 63 位幼兒皆是打疫苗前的血清，因此只分析打疫苗前的幾何平均抗體效價 Geometric mean titer (GMT)及血清保護率(seroprotection rate)其分析結分別列於 Fig.2-1、2-2。

Fig.2-1 結果顯示，Flu B 的 GMT 值最低，只有 17.1，相對的可以看到 Fig.2-2 中，Flu B 的血清保護率也是最低，只有 16%，表示收案 63 位幼兒平均對於疫苗株的 Flu B 其體內抗體較低。另一方面，對於 H1N1 及 H3N2 的血清保護率則分別有 51%及 70%。

Fig2-1 Geometric mean HAI antibody titers (Aventis-標準抗原)

(2009年7月~9月)

Child group (N=63)

Geometric mean titer

A/Brisbane/59/2007(H1N1)

Pre-vaccination	31.4
-----------------	------

A/Uruguay/716/2007(H3N2)

Pre-vaccination	37.9
-----------------	------

B/Brisbane/60/2008

Pre-vaccination	17.1
-----------------	------

Fig2-2 Seroprotection rate (Aventis-標準抗原)

(2009年7月~9月)

Child group (N=63)

Seroprotection rate (%)

A/Brisbane/59/2007(H1N1)

Pre-vaccination	51%
-----------------	-----

A/Uruguay/716/2007(H3N2)

Pre-vaccination	70%
-----------------	-----

B/Brisbane/60/2008

Pre-vaccination	16%
-----------------	-----

3、利用 2009 年本土株病毒抗原分析抗體效價部份

由疾管局劉銘燦博士所製備的三株本土流感抗原：A/Taiwan/1899/2009 (H1N1-like) ； A/Taiwan/3982/2009 (H3N2-like) ； B/Tiwan/5908/2009 進行施打疫苗前的抗體效價分析，幼兒組共 63 人(5 歲以下)完成分析，由於皆是打疫苗前的血清，因此只分析打疫苗前的幾何平均抗體效價 Geometric mean titer (GMT)及血清保護率(seroprotection rate)其分析結分別列於 Fig.3-1、3-2。

Fig.3-1 結果顯示，幼兒打疫苗前對於本土流行株：A/Taiwan/1899/2009 (H1N1-like)，其 GMT 值最低，只有 15.4，而血清保護率的部分(Fig.3-2)，同樣顯示幼兒對 H1N1 (A/Taiwan/1899/2009 -- H1N1-like)的血清保護率最低，只有 21%。另一方面，Fig.3-2 的結果顯示幼兒打疫苗前對於 H3N2 及 Flu B 皆有抗體，其血清保護率分別是 84%及 65%。

Fig3-1 Geometric mean HAI antibody titers(本土流行株)

(2009年7月~9月)

Child group (N=63)

Geometric mean titer	本土流行株
A/Taiwan/1899/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	15.4
A/Taiwan/3982/2009(H3N2)	
Pre-vaccination	42.3
B/Taiwan/5908/2009	
Pre-vaccination	30.4

Fig3-2 Seroprotection rate (本土流行株)

(2009年7月~9月)

Child group (N=63)

Seroprotection rate (%)	本土流行株
A/Taiwan/1899/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	21%
A/Taiwan/3982/2009(H3N2)	
Pre-vaccination	84%
B/Taiwan/5908/2009	
Pre-vaccination	65%

4、利用新型流感病毒(sw H1N1)進行 HI 分析測定打疫苗前之血清的抗體效價

由於今年(2009 年)爆發新型流感病毒(swine H1N1)大流行，於是我們透過疾管局劉銘燦博士拿到新型流感病毒株：**A/California/07/2009**，試圖利用這新型流感病毒株進行 HAI assay，偵測 63 位打疫苗前之幼兒其體內的抗體。

幼兒組共 63 人(5 歲以下)完成分析，由於皆是打疫苗前的血清，因此只分析打疫苗前的幾何平均抗體效價 Geometric mean titer (GMT)及血清保護率(seroprotection rate)其分析結分別列於 Fig.4-1、4-2。

Fig.4-1 結果顯示，幼兒打疫苗前對於新型流感病毒株：**A/California/07/2009** (swine H1N1)，其 GMT 值只有 **12.7**，相當低；而血清保護率的結果(Fig.4-2)，幼兒對新型流感病毒的血清保護率是 **9.5%**，表示大部分幼兒體內無抗體，不具有保護力。

Fig4-1 Geometric mean HAI antibody titers (sw H1N1)
(2009 年 7 月~9 月)

Child group (N=63)	
Geometric mean titer(HAI assay)	
A/California/07/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	12.7

Fig4-2 Seroprotection rate (sw H1N1)

(2009 年 7 月~9 月) Child group (N=63)	
Seroprotection rate (%)	
A/California/07/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	9.5%

5、利用新型流感病毒 (sw H1N1) 進行 MN 分析測定打疫苗前之血清的抗體效價

本擴充計畫重點，除了利用新型流感病毒以 HI 檢驗方法分析測定抗體效價外，增加利用新型流感病毒株進行 MN assay，偵測 63 位打疫苗前之幼兒其體內的抗體。

幼兒組共 63 人(5 歲以下)完成分析，由於皆是打疫苗前的血清，因此只分析打疫苗前的幾何平均抗體效價 Geometric mean titer (GMT)及血清保護率(seroprotection rate) ，其血清保護率以 titer 大於等於 80 為標準，分析結果分別列於 Fig.5-1、5-2。Fig.5-1 結果顯示，幼兒打疫苗前對於新型流感病毒株：**A/California/07/2009** (swine H1N1)，其 GMT 值只有 **32**；Fig.5-2 血清保護率的結果，以 titer 大於等於 80 為標準，幼兒對新型流感病毒的血清保護率是 **16%**，表示大部分幼兒體內無抗體，不具有保護力。**Fig5-1**

Geometric mean MN antibody titers (sw H1N1)

(2009 年 7 月~9 月)

Child group (N=63)	
Geometric mean titer (MN assay)	
A/California/07/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	32

Fig5-2 Seroprotection rate (sw H1N1)

(2009年7月~9月) Child group
(N=63)

Seroprotection rate (%)

A/California/07/2009(H1N1)

Pre-vaccination **16%**

肆、討論

一、比較 63 位幼兒對本土流行株及標準疫苗株之 GMT 值和血清保護率

(Fig6-1, Fig6-2)

由 Fig6-1 可以看到 63 位幼兒對本土流行株及標準疫苗株之 GMT 值結果的比較，差異最大的是對於 H1N1 病毒，本土流行株的 GMT 值 15.4 但標準疫苗株的 GMT 值是 31.4，且對於標準疫苗株的 Flu B 其 GMT 值較低，只有 17.1。

另一方面，在血清保護率的部分，比較的結果顯示在 Fig6-2，同樣對於本土流行株的 H1N1，63 位幼兒的血清保護率最低，只有 21%，但是對於標準疫苗株卻是 Flu B 最低。

造成此差異最大的原因在於使用的病毒株抗原不同，本土流行株病毒是 A/Taiwan/1899/2009 (H1N1-like)，而標準疫苗株病毒是 A/Brisbane/59/2007 (H1N1)，而本土流行株病毒較相似於新型流感病毒 (swine H1N1)，因此測得的血清保護率較低。

Fig6-1 Geometric mean HAI antibody titers

(本土流行株及標準疫苗株:2009年7月~9月)
Child group (N=63)

Geometric mean titer	本土流行株	標準疫苗株
H1N1		
Pre-vaccination	15.4	31.4
H3N2		
Pre-vaccination	42.3	37.9
Flu B		
Pre-vaccination	30.4	17.1

Fig6-2 Seroprotection rate

(本土流行株及標準疫苗株:2009年7月~9月)
Child group (N=63)

Seroprotection rate (%)	本土流行株	標準疫苗株
H1N1		
Pre-vaccination	21%	51%
H3N2		
Pre-vaccination	84%	70%
Flu B		
Pre-vaccination	65%	16%

二、比較從 96 年度到 98 年度幼兒其打疫苗前的血清對本土流行株之血清保護率 (Fig7)

96 年度(2007 年)流行的病毒是 H1N1(seasonal flu)，其 96 年度(2007 年)的結果中，對於本土流行株(Local strain)的血清保護率，我們可以發現，相較於 H3N2 及 Flu B，H1N1 的血清保護率最低，打疫苗前(pre-vaccination)的血清保護率只有 25%，小於兩歲幼兒也只有 17%，皆偏低。

而 97 年度(2008 年)流行的病毒是 H1N1(seasonal flu)，由 97 年度(2008 年)本土流行株的血清保護率結果也可發現，在幼兒組及小於兩歲幼兒組，打疫苗前的血清保護率各只有 15%及 17%，也是相當低。

由 98 年度(2009 年)本土流行株的結果中，幼兒打疫苗前對於本土流行株：H1N1 (A/Taiwan/1899/2009 – H1N1-like)的血清保護率最低，只有 21%；另一方面，結果顯示幼兒打疫苗前對於 H3N2 及 Flu B 皆有抗體，其血清保護率分別是 84%及 65%。

由於今年(2009 年)新型流感(S-OIV)出現，所以造成新型流感(S-OIV)大流行。因此今年較特別，是否會流行 pandemic flu 以外的 seasonal flu，有待觀察。

Fig7 96~98年度幼兒對本土流行株之血清保護率

Local Strain Seroprotection rate (%)	96年度(2006)		97年度(2008)		98年度(2009)
	Child group (N=60)	<2 year group (N=24)	Child group (N=60)	<2 year group (N=28)	Child group (N=63)
H1N1					
Pre-vaccination	25%	17%	15%	17%	21%
H3N2					
Pre-vaccination	55%	42%	92%	83%	84%
B					
Pre-vaccination	90%	79%	78%	76%	65%

伍、結論與建議

由於今年(2009年)新型流感(S-OIV)出現，所以造成新型流感(S-OIV)大流行。因此今年較特別，是否會流行 pandemic flu 以外的 seasonal flu，有待觀察。

陸、重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

(1) 幼兒(共 63 位)打疫苗前對於新型流感病毒株：

A/California/07/2009，HAI assay 的結果顯示其 GMT 值只有 12.7，相當低(Fig.4-1)；而血清保護率的結果(Fig.4-2)，幼兒對新型流感病毒的血清保護率是 9.5%，表示幼兒體內無抗體，不具有保護力。

(2) MN assay 的結果其 GMT 值只有 **32**；血清保護率的結果，以 titer 大於等於 80 為標準，幼兒對新型流感病毒的血清保護率是 **16%**，和 HAI assay 的結果相似，皆偏低。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

此計畫幫助並鼓勵民眾施打季節性流感疫苗及新型流感疫苗。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

由於今年(2009 年)新型流感(S-OIV)出現，所以造成新型流感(S-OIV)大流行。因此今年較特別，是否會流行 pandemic flu 以外的 seasonal flu，有待觀察。

柒、委員審查意見與回覆

一、98 年度期中報告之委員審查意見

1.以 HA 偵測臺灣人群對 H1N1 新型流感的血清流行病學發現目前小孩的 titer 無人大於 1：40。

回覆：本實驗偵測幼兒 40 位，收案日期在 2009 年 7~8 月，對 H1N1 新型流感確實無任何一位幼兒的抗體效價大於等於 1：40，原因也許是收案的時間點，或是樣本數太少。

2.建議分析方法應予標準化，並用 positive control serum 來確認（由 CDC 提供），並建立標準化操作流程。

回覆：HAI assay 是參照 WHO 所公佈並提供的分析方法，故已建立標準化的操作流程，且實驗皆有進行 Quality control。

3.樣本收集及測試資料尚待累積，惟抗體測試方法宜有共識，建議邀請研究單位討論，研議其可行性。

回覆：樣本已收案完成，正在建立資料庫與分析結果。

4.目前仍在徵求研究對象，所以無突破性成果，至於兒童對象是採隨機或是各個年齡層平均分配？

回覆：收案對象是採隨機的。

二、98 年度期末報告之委員審查意見

1. 可供本局採行或參考之部分：

(1) 假說：兒童的流感免疫力調查，可預期當年的流感盛行株。今年則以 Pandemic H1N1 的抗體為對象，在 2009 年 7-9 月收集兒童血清，結果：

A. Seasonal H1N1 最低，Flu B 只有 30% ，H3N2 為 50% 。

B. Pandemic H1N1 幼兒 sero protection rate 為 0% 。

C. 成人的調查，年齡越大的 sero protection rate 越高，而 MN titer > HAI 。

D. MN titer 以 1：160 為宜。

(2) 由於今年流行 H1N1 新型流感，所以小孩子體內血清保護率一定低，實驗結果也證實比其他 H3N2 和 B 兩株低。

(3) 保有多數小孩血清，萬一有任何新病毒株流行，將有助於進行回溯實驗分析瞭解相關流病訊息。

(4) 相關數據可作為本局季節性流感接種政策及成效評估，亦可做為疫苗採購之參考。

(5) 協助本局預測流感病毒之演化。。

2. 需修正之部分：無

3. 特殊績效

- (1) 為流感疫苗決策的重要參考。
- (2) 宜持續 surveillance，並與病毒株資料合併。
- (3) 資料顯現結果，可提供 CDC 在推廣預防接種作業之宣導依據。

三、99 年度期末報告之委員審查意見

1. Page 8、19: A/Taiwan/1899/2009(H1N1) 為 seasonal H1N1 非 swine H1N1

回覆：Page 8、19 已修改。

2. Page 16、18：使用之 Flu B strain 表與文字不符，B/Florida/60/2008 或 B/Brisbane/60/2008?

回覆：Page 8、16 文字部分已修改成 B/Brisbane/60/2008。

3. MN 方法的穩定性，以及 Reproducibility 需較大規模，及系列血清來驗證。

回覆：98 年度期末報告中已進行老人組(大於 75 歲)50 人，壯年組(50 歲~74 歲)50 人，成人組(20~49 歲)36 人，共 136 人利用新型流感病毒(swine H1N1)進行 MN assay，檢測分析打疫苗前後之抗體效價；此擴充計畫增加幼兒組(12 至 60 個月，打疫苗前) 63 位進行 MN assay。未來仍可擴大規模增加 MN assay 的穩定性，及其 Reproducibility。

4. 將來可持續監控幼兒的抗流感之抗體免疫力，以作為下一年疫苗株選擇之參考。

回覆：未來可持續監控。

5. 血清保護率之 cut off value 數據宜有說明界定較佳。

回覆：血清保護率之 cut off value 數據依據此篇文獻界定：

Robert B. Belshe, M.D., Frances K. Newman, M.S., Joan Cannon, R.N., Carol Duane, R.N., Ph.D., John Treanor, M.D., Christian Van Hoecke, M.D., Barbara J. Howe, M.D., and Gary Dubin, M.D. Serum Antibody Responses after Intradermal Vaccination against Influenza. N Engl J Med 2004;351:2286-94。

捌、參考文獻

1. Murphy BR, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, eds. *Virology*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1990:1091-152.
2. Monto AS, Kioumeh F. Tecumseh study of respiratory illness. IX. Occurrence of influenza in the community, 1966-1971. *Am J Epidemiol* 1975;102:553-63.
3. Baker WH. Excess pneumonia and influenza associated hospitalization during influenza epidemics in the United States, 1970-78. *Am J Public Health* 1986;76:761-5.
4. Barker WH, Mullooly JP. Impact of epidemic type A influenza in a defined adult population. *Am J Epidemiol* 1980;112:798-811.
5. Strikas RA, Wallace GS, Myers MG. Influenza pandemic preparedness action plan for the United States: 2002 update. *Clin Infect Dis* 2002; 35:590-6.
6. Monto AS. Individual and community impact of influenza. *Pharmacoeconomics* 1999;16:1-6.
7. Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet* 1999;354:1277-82.
8. Carrat F, Valleron AJ. Influenza mortality among the elderly in France, 1980-90: how many deaths may have been avoided through vaccination? *J Epidemiol Community Health* 1995;49:419-25.
9. Fleming DM, Zambon M, Bartelds AI, de Jong JC. The duration and magnitude of influenza epidemics: a study of surveillance data from sentinel general practices in England, Wales and Netherlands. *Eur J Epidemiol* 1999;15:467-73.
10. Nichol KL, Lind A, Margolis KL, Murdoch M, McFadden R, Hauge M, et al. The effectiveness of vaccination against influenza in healthy, working adults. *N Engl J Med* 1995;333:889-93.
11. Hsieh YC, Chen HY, Yen JJ, Liu DP, Chang LY, Lu CY, Shao PL, Lee CY, Huang LM. Influenza in Taiwan: seasonality and vaccine strain match. *J Microbiol Immunol Infect.* 2005;38:238-43.
12. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev. 1 WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance
13. Robert B. Belshe, M.D., Frances K. Newman, M.S., Joan Cannon, R.N., Carol Duane, R.N., Ph.D., John Treanor, M.D., Christian Van Hoecke, M.D., Barbara J. Howe, M.D., and Gary Dubin, M.D. Serum Antibody Responses after Intradermal Vaccination against Influenza. *N Engl J Med* 2004;351:2286-94