

MOHW105-CDC-C-114-000117

衛生福利部疾病管制署 105 年委託科技研究計畫

計畫名稱：由流感季前兒童血清抗體效價評  
估當季流感流行幅度

期 末 成 果 報 告

執行機構：國立台灣大學

計畫主持人：黃立民

研究人員：賴美汝

執行期間：105 年 8 月 9 日至 105 年 11 月 9 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本局意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本局同意\*

## 目錄

中文摘要	3
英文摘要	4
壹、前言	5
貳、材料與方法	8
參、結果	11
肆、討論	21
伍、結論與建議	27
陸、計畫重要研究成果及具體建議	29
柒、期末審查意見回覆	30
捌、參考文獻	32

## 摘要

### 中文摘要

國內 104-105 流感流行季出現較往年更多的流感重症病例，依據國內監測資料顯示 104 年 7 月 1 日至 105 年 4 月 20 日，累計 1,960 例流感併發重症病例，其中推估 352 例與流感相關死亡，整體疫情較前 3 年嚴重，期望能釐清此波流感疫情原因。本計畫目的為瞭解我國 6 個月至 12 歲孩童之流感抗體相關血清流行病學資料，並與其接種史作關連性分析，以探討 104-105 年流感季疫情的可能原因，並分析疫苗之效益。所得資料作為未來預測流行病毒、疫情狀況及疫苗接種等政策調整之參考依據。

本實驗室已收集抽血時間介於 104 年 8 月至 105 年 4 月，且年紀介於 6 個月至 12 歲的幼童血清檢體，共 89 支(其中 104 年 8 月至 105 年 2 月的有 70 支)，利用血球凝集試驗(HAI assay)，針對 H1N1、H3N2、 B/Vitoria、 B/Yamagata，此四型流感病毒株進行抗體檢測，瞭解研究對象對流感的免疫力情形。結果得知，對於 B 型流感的幾何平均值(Geometric mean titer, GMT)只有 20 左右、血清保護率(Seroprotection rate)只有 40%左右，表示對 B 型流感較無保護力，推測可能是造成 2015 年流感季重症比例增多的原因之一。又加上對 85606/2016(H1N1)的 GMT 值和血清保護率皆偏低，綜合這些現象，有可能是造成 2015 年流感季大流行的原因。流感季前兒童血清抗體效價或許可以推測當季流感流行幅度。另一方面，共有 19 人有施打疫苗的紀錄，統計分析後發現，疫苗對 Flu B 的抗體產生較差，幼童施打疫苗後仍對 B 型流感抵抗力較弱。我們建議每年年底對兒童進行流感血清學監視，有助於流感防治措施的制定。

關鍵詞：流感疫苗、流感抗體、血清保護率

## Abstract

According to Taiwan CDC, there were more severe influenza cases than before in 2015-2016 influenza season in Taiwan. Since the beginning of this influenza season on July 1, 2015, as of April 20, 2016, a total of 1,960 severe influenza cases, including 352 deaths, have been confirmed. The overall epidemic situation is more serious than past 3 years. In order to strengthen the control of influenza in Taiwan, we need to gather evidence to understand what are the reasons behind this unexpected large-scale influenza epidemic and could we predict this in the future? The aim of this project is to investigate the influenza seroepidemiology of children 6 months to 12 years age in Taiwan. We could also understand the antibody titers following vaccination based on the vaccination history.

We have included 89 serums from children aged between 6 months and 12 years of age in this study. They were collected between August, 2015 and April, 2016 (70 serums were collected between August, 2015 and February, 2016). The HAI titers against 4 strains (H1N1, H3N2, B/Vitoria, B/Yamagata) were determined. The results showed that against Flu B, the geometric mean titer (GMT) was about 20 and the seroprotection rate was about 40%. It means there was lacking of protection to Flu B. It might be the reasons why there were more severe cases in 2015 flu season. And also the GMT and the seroprotection rate for 85606/2016(H1N1) were low. Combining these results, large-scale influenza epidemic caused by influenza A (H1N1) and influenza B virus in 2015 could be explained. The results further support that we may predict the scale of influenza epidemic through detecting the antibodies of children in the future. On the other hand, there were 19 children who had been vaccinated before collecting blood. All of them had low antibody titers against influenza B virus. The antibodies responses against influenza B virus vaccine was sub-optimal. We suggest that yearly surveillance of child serology status before influenza season may guide the prevention measures.

keywords : Flu vaccine, Flu antibody, seroprotection 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）。從 20 世紀至今，就有 4 次重要的 pandemic，包括了 1918 的 Spanish flu，1957 的 Asian flu，1968 的 Hong Kong flu，以及 2009 的 swine 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。

本實驗室過去從 95 年至 100 年，連續執行疾管署委託型研究計畫「偵測台灣兒童流感疫苗株與本土流行株的抗體免疫反應」，收案人數約 60 位幼童，整理 95 年度到 100 年度的血清保護率結果。95 年度流行的病毒『B/Malaysia/2506/2004』(Flu B)，96 年度和 97 年度皆流行的病毒是『A/Brisbane/59/2007』(H1N1)，而 98 年度流行的病毒是『A/California/07/2009』(H1N1)，對照下表血清保護率的結果，有很大的相關性；95 年度的結果中，血清保護率最低的是 Flu B，而 96 年度到 98 年度血清保護率最低的是 H1N1，皆與當年所流行的病毒株符合。

<b>Local Strain</b>	<b>95年度</b>	<b>96年度</b>		<b>97年度</b>		<b>98年度</b>	<b>99年度</b>	<b>100年度</b>
<b>Seroprotection rate (%)</b>	<b>(2005~2006)</b>	<b>(2006~2007)</b>		<b>(2008~2009)</b>		<b>(2009)</b>	<b>(2010)</b>	<b>(2011)</b>
	<b>Child group (N=30)</b>	<b>Child group (N=60)</b>	<b>&lt;2year group (N=24)</b>	<b>Child group (N=60)</b>	<b>&lt;2 year group (N=28)</b>	<b>Child group (N=63)</b>	<b>Child group (N=60)</b>	<b>Child group (N=70)</b>
<b>H1N1</b>								
Pre-vaccination	57%	25%	17%	15%	17%	21%	17%	71%
<b>H3N2</b>								
Pre-vaccination	73%	55%	42%	92%	83%	84%	32%	79%
<b>B</b>								
Pre-vaccination	22.7%	90%	79%	78%	76%	65%	32%	49%

而其中 95 年度~99 年度之「建立我國年度社區民眾血清庫及偵測台灣兒童、成年人、與老年人接受流感疫苗前後的抗體免疫反應」計畫，連續三年收集各種不同年齡層的台灣民眾，採取接種季節流感疫苗前後血液，檢測其抗體。分析結果發現台灣成人及老人對於疫苗株多數在接種前已有抗體。另一個重要的發現是五歲以下兒童則會對當時台灣本土存在的三種亞型之一不具足夠的保護抗體，而下個季節所流行的病毒株正好都是兒童缺乏抗體的流感病毒型別。因此兒童在每年九到十月所做的血清抗體結果可以準確預測下一季節流行病毒株，結果已發表在期刊(12)。

綜合以上，文獻指出幼兒的血清保護率，與當年流行的流感病毒株有相關性，兒童血清抗體陽性率與該行病毒流行幅度成反比，未來可利用偵測幼兒打疫苗前的血清保護率來預測當年流行的病毒株(12)，又以本土病毒株的免疫結果來推測當年流行的病毒株更為貼近台灣流行趨勢。

國內 104-105 流感流行季出現較往年更多的流感重症病例，依據國內監測資料顯示 104 年 7 月 1 日至 105 年 4 月 20 日，累計 1,960 例流感併發重症病例，其中推估 352 例與流感相關死亡。整體疫情較前 3 年嚴重，為釐清此波流感疫情原因，以及各項因應作為之妥適性，以利強化未來流感防治政策調整之實證依據。本計畫研究內容主要欲得知抗體陽性率與流感流行幅度的相關性。我們過去研究發現，兒童血清抗體陽性率與該行病毒流行幅度成反比。因此本實驗欲驗證此觀察是否仍然適用，做為將來決策參考。

貳、材料與方法。

### 第一部份：血清的收集並且申請人體試驗委員會通過

收集的條件：抽血時間於 104 年 8 月至 105 年 2 月，且年紀介於 6 個月至 12 歲的血清(約 200  $\mu$ l)，共 70 支；於 104 年 8 月至 105 年 4 月的血清，總計共 89 支。

來源：其中有 67 支檢體來自於研究計畫：『台灣兒科病人細菌性肺炎之前瞻性、全國性研究』；有 22 支檢體來自於先前參與『第三期、開放標記、隨機分配、對照、多機構合作試驗評估諾華 B 型腦膜炎雙球菌重組疫苗，與常規疫苗合併施打於台灣健康嬰兒之安全性與免疫原性』試驗的剩餘檢體。

### 第二部份：血清抗體檢測方法

利用 HAI assay 進行抗體測試：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) (13)

詳細步驟如下：

一、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

## 二、血球凝集試驗步驟：

### (A)試劑製備: 0.75%天竺鼠血球懸浮液

本法利用天竺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  $\mu$ l 的 PBS 溶液
2. 於第一列加入 100  $\mu$ l 的病毒抗原原液，negative control 行則以 100  $\mu$ l PBS 取代抗原
3. 取第一列的抗原 50  $\mu$ l 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ 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  $\mu$ l 稀釋液中含有 8 HA unit 的抗原。(1 HA unit 約為 10<sup>7</sup> 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  $\mu$ l 的 PBS 溶液
2. 於第一列加入 50  $\mu$ l RDE treated serum
3. 取第一列的抗體 25  $\mu$ l 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 25  $\mu$ l 加入第三列，如此序列稀釋至第八列
4. 分別加入 25  $\mu$ l 已稀釋至 8 HA unit/50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l +25  $\mu$ l PBS + 50  $\mu$ 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 $\mu$ 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、結果資料建檔與分析並預測流行之病毒株：

以下二個參數將被使用在評估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 及血清保護率 seroprotection rate, 血清保護率定義內容如下：HAI 抗體效價大於 40 的百分率(the percentage of vaccine recipients with a serum HAI titer at least 1:40 after vaccination) (13)。

## 參、結果

### 第一部份：血清檢體的收集

#### (一)共收集 89 支血清檢體：

其中有 67 支檢體來自於研究計畫：『台灣兒科病人細菌性肺炎之前瞻性、全國性研究』；有 22 支檢體來自於先前參與『第三期、開放標記、隨機分配、對照、多機構合作試驗評估諾華 B 型腦膜炎雙球菌重組疫苗，與常規疫苗合併施打於台灣健康嬰兒之安全性與免疫原性』試驗的剩餘檢體。

共 70 支檢體符合條件：於 104 年 8 月至 105 年 2 月間抽血，另外 19 支檢體於 104 年 3 月至 4 月間抽血，其年紀皆符合年紀介於 6 個月至 12 歲之條件。

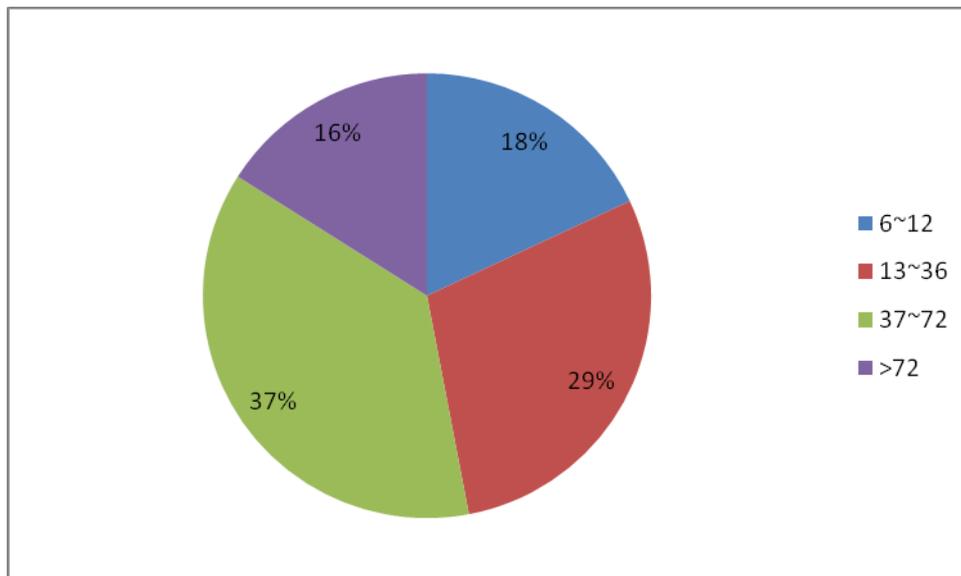
89 位幼童之人口特徵如下表 **Table1**，平均年齡 42.8 個月，年紀介於 11 個月~131 個月，年齡分佈比率如下圖 **Fig1**，其年紀介於 6 個月~12 個月，占 18%，年紀介於 13 個月~36 個月，占 29%，而 37 個月~72 個月間，占 37%。大於 72 個月的只占 16%。

Table1.受試者的人口特徵

Demographic characteristics of the subjects (2015 年 8 月~2016 年 4 月)

		group (N=89)
Age(month)	Mean	42.8
	Range	11~131
Gender	Male	51
	Female	38

Fig.1 年齡分布比率圖(The ratio of age distribution)



## 第二部份：培養病毒並檢測病毒效價

感謝疾管署提供病毒株，本實驗室將這 5 株本土流感病毒株進行培養並測定效價，大約介於 16HA~128HA：

1. A/Taiwan/85102/2015(H1N1)
2. A/Taiwan/85606/2016(H1N1)
3. A/Taiwan/84913/2015(H3N2)
4. B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)
5. B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)

這五株本土流感病毒株，經過基因序列的分析與比對後，與 2015 年~2016 年 WHO 疫苗株之序列相近的，挑選出來。再將這些病毒株當做抗原，進行 HAI assay，偵測血清中的抗體。

## 第三部份：抗體檢測結果統計

(一)收集 2015 年 8 月~2016 年 4 月間共 89 位幼童之血清檢體，經過 HAI assay 檢測

血清中的抗體，結果顯示幾何平均值(Geometric mean titers, GMT)如下 **Table2**。

發現其中 85102/2015(H1N1) 和 85606/2016(H1N1)的 GMT 值，兩者就有很明顯的不同，85606/2016(H1N1)的 GMT 值只有 33.2，表示幼童體內對此株

85606/2016(H1N1)的抗體效價較低。另外也可發現兩株 B 型流感：

85823/2016(B/Vic) 和 85540/2016(B/Yam)，兩者的 GMT 值更低，只有 22.1 跟 17，表示幼童體內對 B 型流感的抗體效價非常低。

利用 SAS 統計方法分析，比較對不同株病毒的差異，sample size 89 時，得到的 power>0.80，檢定力是足夠的。

**Table2. Geometric mean HAI antibody titers**  
**(2015 年 8 月~2016 年 4 月之幼童血清)**

<b>Geometric mean titer</b>	<b>Child group (N=89)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	<b>72.3</b>
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	<b>33.2</b>
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	<b>66.9</b>
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	<b>22.1</b>
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	<b>17</b>

(二)血清保護率(Seroprotection rate) ，表示 HAI 抗體效價大於 40 的百分率，結果如下 **Table3** 。結果顯示，對於兩株 Flu B：85823/2016(B/Vic) 和 85540/2016(B/Yam)的血清保護率皆偏低，分別是 40.4%及 37%，表示 89 位幼童平均對於 B 型流感，其體內抗體偏低，不具有保護力。另外對於 85606/2016(H1N1) 的血清保護率也只有 56%，稍微偏低。而對於 85102/2015(H1N1)及 4913/2015(H3N2)這兩株，血清保護率較高，有 80~87%，表示高達八成的幼兒體內對 85102/2015(H1N1) 及 4913/2015(H3N2)有保護力。

**Table3. Seroprotection rate**  
(2015 年 8 月~2016 年 4 月之幼童血清)

<b>Seroprotection rate</b>	<b>Child group (N=89)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	<b>87.6%</b>
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	<b>56%</b>
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	<b>79.7%</b>
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	<b>40.4%</b>
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	<b>37%</b>

(三)共 70 支檢體是於 104 年 8 月至 105 年 2 月間抽血的。GMT 值(Geometric mean titers)和血清保護率(Seroprotection rate)的結果如下 **Table4**、**Table5**。整體看來，統計結果和 89 支的結果類似，對於兩株 Flu B：85823/2016(B/Vic) 和 85540/2016(B/Yam)的血清保護率皆偏低，分別只有 40%和 37%。對於 85606/2016(H1N1)的血清保護率也只有 52.3%，稍微偏低。

**Table4. Geometric mean HAI antibody titers**  
(2015 年 8 月~2016 年 2 月之幼童血清)

<b>Geometric mean titer</b>	<b>Child group (N=70)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	<b>68.3</b>
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	<b>31.5</b>
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	<b>61.2</b>
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	<b>20.8</b>
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	<b>16.6</b>

**Table5. Seroprotection rate**  
(2015 年 8 月~2016 年 2 月之幼童血清)

<b>Seroprotection rate</b>	<b>Child group (N=70)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	<b>90%</b>
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	<b>52.3%</b>
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	<b>78.6%</b>
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	<b>40%</b>
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	<b>37%</b>

(四)若將抽血時間再往前統計，共 33 支檢體是於 104 年 8 月至 104 年 12 月間抽血的。GMT 值(**Geometric mean titers**)和血清保護率(**Seroprotection rate**)的結

果如下 **Table6**、**Table7**。整體來說，相較於 89 支和 70 支的 GMT 值結果，有下降的趨勢，抗體效價較低。而血清保護率的結果顯示，對於兩株 Flu B：85823/2016(B/Vic) 和 85540/2016(B/Yam) 的血清保護率皆偏低，對於 85606/2016(H1N1) 的血清保護率也只有 51.5%，稍微偏低。

**Table6. Geometric mean HAI antibody titers**  
(2015 年 8 月~2015 年 12 月之幼童血清)

<b>Geometric mean titer</b>	<b>Child group (N=33)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	62.2
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	29.8
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	50.4
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	20.9
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	17.6

**Table7. Seroprotection rate**  
(2015 年 8 月~2015 年 12 月之幼童血清)

<b>Seroprotection rate</b>	<b>Child group (N=33)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	87.9%
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	51.5%
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	72.7%
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	36.4%
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	42.4%

(五)若將年齡層分為六歲(72 個月)以下跟六歲以上，89 人中，六歲以下(Age<72 month)共有 75 人，六歲以上(Age>72 month)共有 14 人，GMT 值(**Geometric mean titers**)和血清保護率(**Seroprotection rate**)的結果如下 **Table8**、**Table9**。從結果得知，六歲以上的幼童，其 GMT 值和血清保護率的數值皆較高，普遍較具有保護力。

**Table8. Geometric mean HAI antibody titers**

(將年齡層區分為六歲以下與六歲以上)

<b>Geometric mean titer Child group</b>	2015年8月 ~2016年4月 Age<72 month (N=75)	2015年8月 ~2016年4月 Age>72 month (N=14)	2015年8月 ~2016年4月 (N=89)
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	67.1	107.7	72.3
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	30	56.6	33.2
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	60.6	113.1	66.9
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	19.8	40	22.1
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	15.4	28.3	17

**Table9. Seroprotection rate**

(將年齡層區分為六歲以下與六歲以上)

<b>Seroprotection rate Child group</b>	2015年8月 ~2016年4月 Age<72 month (N=75)	2015年8月 ~2016年4月 Age>72 month (N=14)	2015年8月 ~2016年4月 (N=89)
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	86.7%	92.9%	87.6%
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	52%	56.6%	56%
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	77.3%	92.9%	79.7%
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	37.3%	78.6%	40.4%
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	33.3%	57.1%	37%

(六)共有 19 支檢體，在抽血前有施打 104 年疫苗的記錄，統計分析後，GMT 值和血清保護率的結果如下 **Table10**、**Table11**。結果顯示，對於兩株 Flu B：85823/2016(B/Vic) 和 85540/2016(B/Yam)的 GMT 值和血清保護率皆偏低，就算有打過流感疫苗，仍無法達到保護的效果。另外，對於 85606/2016(H1N1)的血清保護率有 58%，稍微偏低。但是對於 85102/2015(H1N1)及 4913/2015(H3N2)這兩株，血清保護率較高，有 89~95%，表示高達九成的幼兒體內對 85102/2015(H1N1) 及 4913/2015(H3N2)有保護力。整體來說，疫苗對 Flu B 的抗體產生較差，幼童施打疫苗後仍對 B 型流感抵抗力較弱。

**Table10. Geometric mean HAI antibody titers**  
(抽血前有打 104 年流感疫苗)

<b>Geometric mean titer</b>	<b>Child group (N=19)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	<b>71.7</b>
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	<b>28.8</b>
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	<b>92.6</b>
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	<b>24</b>
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	<b>18.6</b>

**Table11. Seroprotection rate**  
(抽血前有打 104 年流感疫苗)

<b>Seroprotection rate</b>	<b>Child group (N=19)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	95%
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	58%
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	89%
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	42%
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	42%

## 肆、討論

一、探討流感季前兒童血清抗體效價是否可評估當季流感流行幅度或有無關聯性？

首先比較不同抽血時間，其 GMT 值(Geometric mean titers)和血清保護率 (Seroprotection rate)的差異，如下 Table12、Table13。三種不同抽血時間，統計分析後，整體的結果趨勢相似，無太大差異，而時間越往前，GMT 值和血清保護率越低。

由結果得知，對於 B 型流感的 GMT 值只有 20 左右、血清保護率只有 40%左右，表示對 B 型流感較無保護力，又加上對 85606/2016(H1N1)的 GMT 值和血清保護率皆偏低，對照疾管署傳染病(流感)統計資料查詢，2016 年初感染流感人數大幅增加，多數感染 H1N1 及 B 型流感。綜合以上，流行季前幼童血清抗體效價較低的，可推測為當季將流行之病毒株，若同時有兩型流感的血清保護率低於 50%，可推測當季流感將大幅上升，疫情將比以往嚴重。

**Table12. Geometric mean HAI antibody titers**

(比較不同抽血時間)

<b>Geometric mean titer Child group</b>	<b>2015年8月 ~2015年12月 (N=33)</b>	<b>2015年8月 ~2016年2月 (N=70)</b>	<b>2015年8月 ~2016年4月 (N=89)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	<b>62.2</b>	<b>68.3</b>	<b>72.3</b>
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	<b>29.8</b>	<b>31.5</b>	<b>33.2</b>
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	<b>50.4</b>	<b>61.2</b>	<b>66.9</b>
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	<b>20.9</b>	<b>20.8</b>	<b>22.1</b>
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	<b>17.6</b>	<b>16.6</b>	<b>17</b>
P value	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>

\* P value was measured by Kruskal-Wallis Test.

**Table13. Seroprotection rate**

(比較不同抽血時間)

<b>Seroprotection rate Child group</b>	<b>2015年8月 ~2015年12月 (N=33)</b>	<b>2015年8月 ~2016年2月 (N=70)</b>	<b>2015年8月 ~2016年4月 (N=89)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	<b>87.9%</b>	<b>90%</b>	<b>87.6%</b>
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	<b>51.5%</b>	<b>52.3%</b>	<b>56%</b>
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	<b>72.7%</b>	<b>78.6%</b>	<b>79.7%</b>
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	<b>36.4%</b>	<b>40%</b>	<b>40.4%</b>
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	<b>42.4%</b>	<b>37%</b>	<b>37%</b>

二、探討施打流感疫苗是否能提供足夠的保護力

104 年施打的流感疫苗株分別是：

- (1)A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus；
- (2)A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)-like virus；
- (3)B/Phuket/3073/2013-like virus

而本計畫當做抗原的是以下本土流型株：

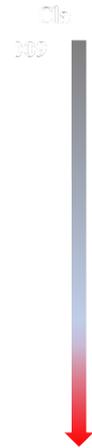
- 1. A/Taiwan/85102/2015(H1N1)
- 2. A/Taiwan/85606/2016(H1N1)
- 3. A/Taiwan/84913/2015(H3N2)
- 4. B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)
- 5. B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)

各個本土流行病毒株與疫苗株的基因序列比對關係，如下圖 **Fig(A)(B)(C)(D)**

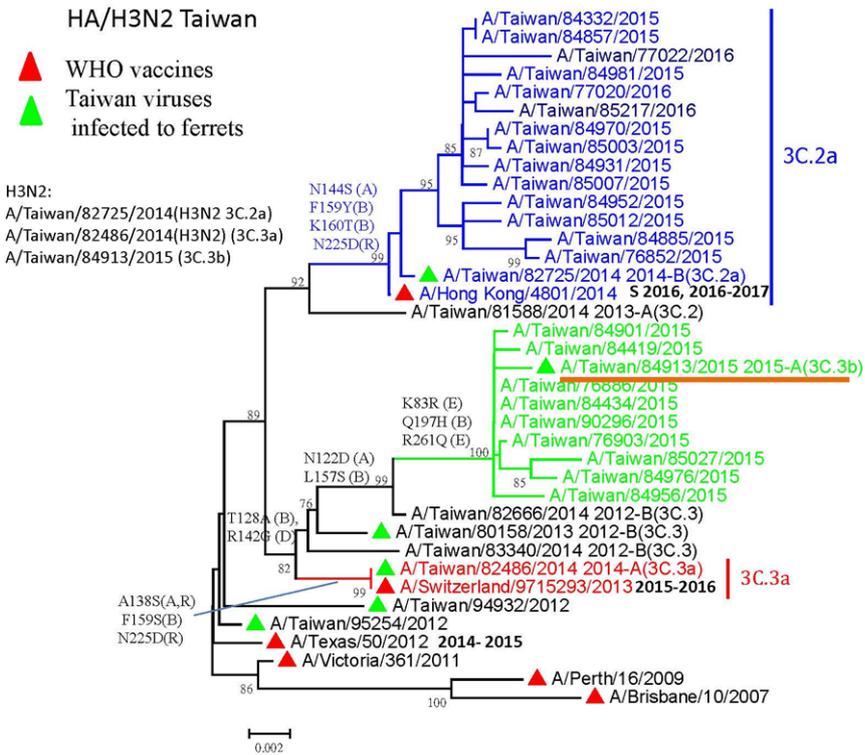
**Fig 2(A)**



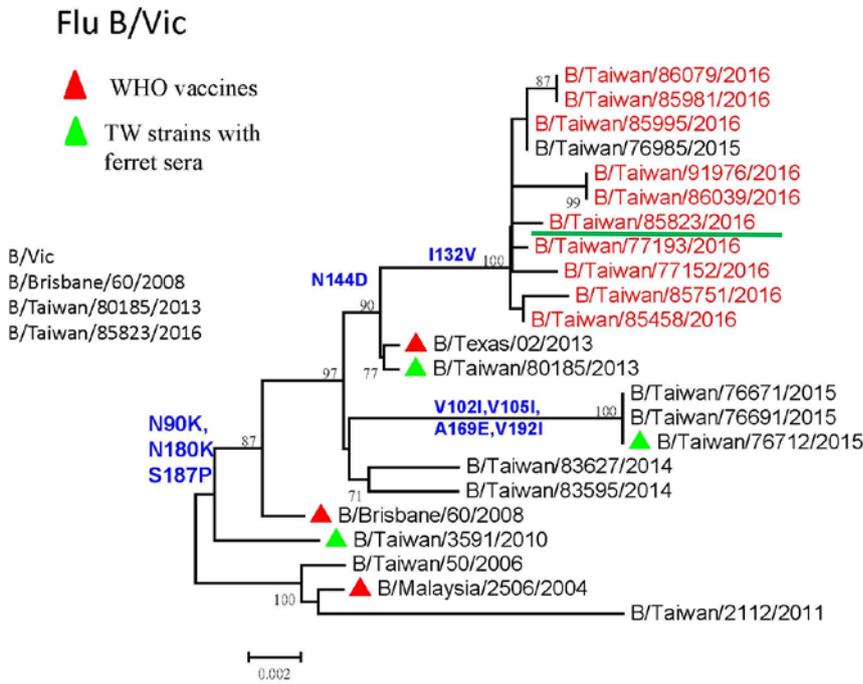
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)  
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)



**(B)**

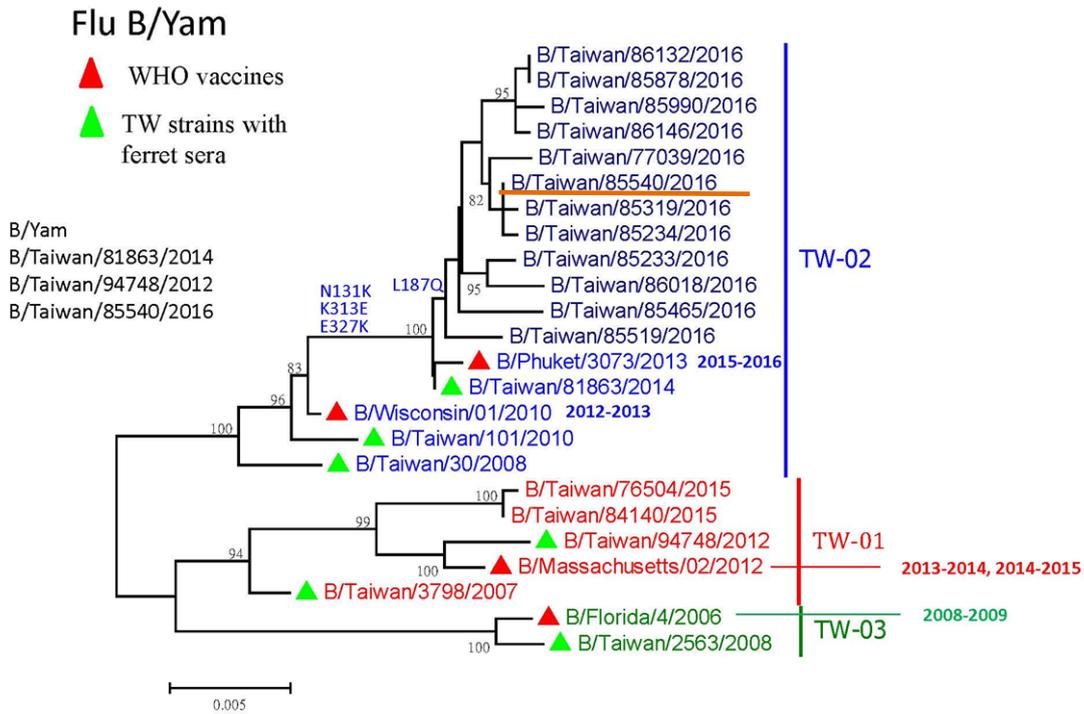


(C)



4

(D)



由圖 Fig2(A)(B)(C)(D)可了解，挑選出來的本土流行病毒株，與疫苗株的基因序列做比對分析，藉由血清抗體統計分析結果，得知疫苗是否能提供足夠的保護力。

共有 19 支檢體，在抽血前有施打 104 年疫苗的記錄，Table11 結果顯示，對於兩株 Flu B：85823/2016(B/Vic) 和 85540/2016(B/Yam)的 GMT 值和血清保護率皆偏低，就算有打過流感疫苗，仍無法達到保護的效果。另外，對於 85606/2016(H1N1)的血清保護率有 58%，稍微偏低。整體來說，疫苗對 Flu B 的抗體產生較差，幼童施打疫苗後仍對 B 型流感抵抗力較弱，但是檢體數目太少，尚未能對此下結論。

先前有研究提到東方人對於 B 型流感疫苗的免疫反應較差，疾管署也曾有過類似結果，施打 B 型流感疫苗後，抗體效價仍較低，關於這方面的研究可能依靠將來擴大規模且嚴謹的調查，未來也應針對 B 型流感深入研究或研發更有效產生抗體的疫苗，現階段或許可以考慮增加 B 型流感疫苗的施打劑量。

### 三、討論並比較 85102/2015(H1N1) 和 85606/2016(H1N1)這兩株基因的差異

由結果發現，不管是 GMT 值或血清保護率，幼童對 85102/2015(H1N1) 和 85606/2016(H1N1) 這兩株的反應有很明顯的不同 (Table2，Table3)，85102/2015(H1N1)的 GMT 值有 72.3，而 85606/2016(H1N1)的 GMT 值只有 33.2，請見下表 **Table 14**，經過「Wilcoxon Signed Rank」統計分法檢定，P value<0.001，具有統計上的差異。

這兩株病毒經過基因比對分析，從圖 Fig2(A)了解他們基因的相似度，基本上與疫苗株 A/California/7/2009 (H1N1)已有一些距離，表示 HA 序列已有所演變，最大差異是在 HA 序列上的抗原位點(Antigenic site)有所不同，85102/2015(H1N1)此株在 169 胺基酸位點由 V(Val)變成 T(Thr)，而 85606/2016(H1N1)在 179 位點上由 S(Ser)變 N(Asn)。

2016(H1N1)病毒株的突變，導致抗體效價降低，驗證了病毒的 HA 序列上抗原位點的改變，使國人抗體反應差，降低對流感的保護力，造成疫情升溫。

**Table14. Geometric mean HAI antibody titers**  
(比較 2015-H1N1 與 2016-H1N1 的 GMT 值)

<b>Geometric mean titer</b>	<b>Child group (N=89)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	<b>72.3</b>
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	<b>33.2</b>
P value	<b>&lt;0.001</b>

\* P value was measured by Wilcoxon Signed Rank Test.

#### 四、計畫執行期間遭遇的困難

1、計畫原本預計收集 100 支檢體，但實際只收集到 89 支，而且於 104 年 8 月至 105 年 2 月收集的是 70 支。但先前執行的計畫經驗，有 60 支檢體就足夠提供資訊，因此尚可完成此計畫原本的目的。

2、計畫期程太短，只有 3 個月，執行狀況非常緊急。例如一開始要申請人體試驗委員會通過，這樣的過程通常就需耗費 1~1.5 個月，再來做 HAI assay 檢測抗體只剩下一點點時間。中間還要期中報告審查，工作事項繁瑣。建議未來若有短時間的委託型研究計畫，可將流程簡化，例如去除期中報告或期中審查會議，經費方面也去除分三期款等規定。

## 伍、結論與建議

本計畫目的為瞭解我國 6 個月至 12 歲孩童之流感抗體相關血清流行病學資料，主要欲釐清以下問題：

- 一、 流感季前兒童血清抗體效價是否可評估當季流感流行幅度或有無關聯性？
- 二、 若有施打疫苗的紀錄，其流感疫苗是否提供足夠的保護力？

藉由分析幼童的抗體免疫反應，得到實證資料並提出各項具體政策建議。

關於第一點，由 Table13.血清保護率的結果，我們發現幼童對 2015(H1N1)原本保護率高達九成左右，但對 2016(H1N1)卻下降為五成，基因比對結果得知 H1N1 發生新的突變，因此造成保護率下降，可以解釋為何 2016 年年初流感出現大量 H1N1 感染；結果也顯示出幼童對 B 型流感抵抗力較低，約四成左右具有保護力，對照疾管署傳染病(流感)統計資料查詢，2016 年初感染流感人數大幅增加，多數感染 H1N1 及 B 型流感。綜合以上，流行季前幼童血清抗體效價較低的，可推測為當季將流行之病毒株，若同時有兩型流感的血清保護率低於 50%，可推測當季流感將大幅上升，疫情將比以往嚴重。

Table13. Seroprotection rate

<b>Seroprotection rate Child group</b>	<b>2015年8月 ~2015年12月 (N=33)</b>	<b>2015年8月 ~2016年2月 (N=70)</b>	<b>2015年8月 ~2016年4月 (N=89)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	87.9%	90%	87.6%
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	51.5%	52.3%	56%
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	72.7%	78.6%	79.7%
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	36.4%	40%	40.4%
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	42.4%	37%	37%

第二點，共有 19 人有施打疫苗的紀錄，統計分析後，幼童施打疫苗後仍對 B 型流感抵抗力較弱，Table.11 顯示血清保護率約 4 成。

**Table11. Seroprotection rate (抽血前有打 104 年流感疫苗)**

<b>Seroprotection rate</b>	<b>Child group (N=19)</b>
1.A/Taiwan/85102/2015(H1N1)	95%
2.A/Taiwan/85606/2016(H1N1)	58%
3.A/Taiwan/84913/2015(H3N2)	89%
4.B/Taiwan/85823/2016(B/Vic)	42%
5.B/Taiwan/85540/2016(B/Yam)	42%

建議未來可以針對 B 型流感深入研究或研發更有效產生抗體的疫苗，現階段或許可以考慮增加 B 型流感疫苗的施打劑量。並且於流感季前，若能採集約 60 支 2-6 歲幼童血清，分析其血清中的抗體，能迅速了解當季對流感的抵抗力情形，也許能藉此推測流行的病毒株或是流行幅度，故建議每年年底對兒童進行流感血清學監視，有助於流感防治措施的制定。

## 陸、重要研究成果及具體建議

### 1. 計畫之新發現或新發明

- (1) 於 104 年 8 月至 105 年 2 月所收集的幼童血清，其抗體檢測結果，對於 B 型流感的 GMT 值只有 20 左右、血清保護率只有 40% 左右，表示對 B 型流感較無保護力。
- (2) 兒童血清對 2015 的 A 型流感 H1N1 病毒有相當高血清保護力，但對 2016 A 型流感 H1N1 病毒則下降許多，表示 A 型流感 H1N1 病毒出現顯著變異，可以解釋為何 2016 年年初流感出現大量 H1N1 感染。
- (3) 共有 19 人有施打疫苗的紀錄，統計分析後，幼童施打疫苗後仍對 B 型流感抵抗力較弱。

### 2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

鼓勵民眾施打流感疫苗。

### 3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

建議未來可以於每年流感季前，採集約 60 支 2-6 歲幼童血清，分析其血清中的抗體，能迅速了解當季對流感的抵抗力情形，藉此推測流行的病毒株或是流行幅度，同時新病毒株在流行時陸續出現，可以用此批兒童血清再次檢驗，判斷是否有明顯變異，產生與流行季前不同的流行株。此外針對 B 型流感的疫苗深入研究或研發更有效產生抗體的疫苗，現階段或許可以考慮增加 B 型流感疫苗的施打劑量。

## 柒、期末審查意見回覆

(一) 因研究計畫比對之流感病毒株非 104-105 年流感季季初分離，未來若要進行當季評估，建議就季中可能變異之流感病毒株再追加分析。

回覆：謝謝委員建議。

(二) 請加入如何解釋 H1N1 病毒株變異以及 A 型/B 型流感疫苗株保護率差異之討論。

回覆：第 25、26 頁的第三點有詳細討論，其中一段：2016(H1N1) 病毒株的突變，導致抗體效價降低，驗證了病毒的 HA 序列上抗原位點的新改變具有臨床意義，使國人抗體反應變差，降低對流感的保護力，造成疫情升溫。

第 25 頁的討論已加入：先前有研究提到東方人對於 B 型流感疫苗的免疫反應較差，疾管署也曾有過類似結果，施打 B 型流感疫苗後，抗體效價仍較低，關於這方面的研究可能依靠將來擴大規模且嚴謹的調查，未來也應針對 B 型流感深入研究或研發更有效產生抗體的疫苗，現階段或許可以考慮增加 B 型流感疫苗的施打劑量。

(三) 請針對 104 年及 105 年 H1N1 流感病毒株變異及血清保護率下降等數字，進行統計顯著檢定。

回覆：已於第 26 頁加入 Table14，經過「Wilcoxon Signed Rank」統計分法檢定， $P\text{ value}<0.001$ ，具有統計上的差異。

(四) 本研究計畫之結論寫法應求謹慎，以免遭錯誤解讀為流感疫苗無效，並請再檢視結論內容是否可對應各項研究目的。

回覆：已修改結論的部分(第 27、28 頁)。

(五) 期中報告審查意見應納入期末報告修正。

回覆：期中報告審查意見如下：

(1) 年齡別血清抗體效價之異質性及疫苗可能對於流感提供保護力具有相當有價值參考，惟應說明本研究計畫之樣本數是否具充分檢定力。

回覆：利用 SAS 統計方法分析，比較對不同株病毒的差異，sample size 89 時，得到的 power>0.80，檢定力是足夠的。(已加入報告第 13 頁)

(2) 建議期末報告應加強文獻回顧，以及對政策及未來研究提供具體建議。

回覆：已於期末報告中多加說明。

(3) 世界衛生組織於本 (105) 年 9 月 29 日公布南半球 2017 年流感疫苗株建議，發現孩童施打疫苗後血清抗體對今年 2-8 月流行病毒株中和效價低，建議可確認我國是否有此狀況。

回覆：可參考報告第 19、20 頁的結果，共有 19 支檢體，在抽血前有施打 104 年疫苗的記錄，統計分析後，GMT 值和血清保護率的結果如 Table10、Table11。對於 85823/2016(B/Vic) 和 85540/2016(B/Yam)的 GMT 值和血清保護率(42%)皆偏低。另外，對於 85606/2016(H1N1)的血清保護率有 58%，稍微偏低。但是對於 85102/2015(H1N1)及 4913/2015(H3N2)這兩株，血清保護率較高，有 89~95%。

(六) 請具體描述如何從兒童血清抗體效價結果評估流感流行幅度；另請就 B 型流感抗體效價結果提出具體政策建議。

回覆：已將具體描述與建議加入結論(第 27、28 頁)。

捌、參考文獻：請依台灣醫誌編排方式。

(例：Cheng HF, Su YM, Yeh JR, and Chang KJ: Alternative transcript of the nonselective type endothelin receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 533-538.)

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. Su WJ, Shao PL, Liu MT, Liu DP, Huang KC, Chang LY, Lu CY, Wang JR, Shih HR, Huang DTN, Chi H, **Huang LM\***. Low seroprotection against pre-seasonal influenza local strains in children might predict the upcoming epidemic influenza strains. *Clin Infect Dis*; 51: 171-176, 2010 (Jul)
13. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev. 1 WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance