計畫編號：DOH98-DC-1012

行政院衛生署疾病管制局 98~99 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

總 結 報 告

執行機構：臺大醫院小兒科

計畫主持人：黃立民

協同主持人：張鑾英、邵蓓嵐

研究人員 ： 賴美汝

執行期間：98 年 5 月 12 日至 99 年 12 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	38
伍、結論與建議	44
陸、計畫重要研究成果及具體建議	45
柒、委員審查意見與回覆	46
捌、參考文獻	48

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。

已有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，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。本計畫第一年(2009 年)收集 63 名，第二年(2010 年)收集 60 位健康且年紀在 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 與 MN assay 監測兒童體內抗體。第一年幼兒的血清保護率以 H1N1 最低，只有 15%，與 2009~2010 年所流行的病毒株 H1N1(A/California/07/2009)吻合。而 2010 年的結果顯示，幼兒對 H1N1 本土病毒株的血清保護率最低，只有 17%，很有可能會流行 H1N1，但 H3N2 及 Flu B 的血清保護率也不高，只有 32%，因此今年流行的病毒株仍有待觀察。

另一方面，結果顯示 MN assay 較 HAI assay 對偵測體內抗體變化似乎更為敏感，將來可當作參考的依據。

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 paper, the seroprotection rate in children before vaccination related to the major circulating strain in Taiwan, especially against to the local circulating influenza strain. In this project, we have recruited 60~63 children (2~5 years old) to detect their antibody response against vaccine strains and local strain before vaccination. In the first year, the lowest seroprotection rate is H1N1, only 15%, which matched with the dominant subtype of influenza virus in 2009~2010. Our data showed the seroprotection rate against H1N1 in 2010 was 17%, might be the dominantly circulating subtype in 2010. But the seroprotection rate against H3N2 and Flu B were 32%. Therefore, it remains to see what influenza virus will be the dominantly circulating subtype.

On the other hand, the data of MN assay seemed more sensitive to detect the antibody response. It will be a stander in the future.

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）。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。根據我們自已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，自已決定疫苗株。

已有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 (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，因此本計畫利用標準疫苗株及本土流行株進行 HAI assay 與 MN assay 監測兒童體內抗體。

另一方面，結果顯示 MN assay 較 HAI assay 對偵測體內抗體變化似乎更為敏感，將來也可當作參考的依據。

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。

貳、材料與方法

一、徵求研究對象：本計畫第一年從 2009 年 7 月開始徵求二~五歲的兒童共 63 人至台大醫院進行本研究，第二年從 2010 年 7 月開始徵求二~五歲的兒童共 60 人，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℃，取 50μl 之血清處理 RDE (Receptor Destroy Enzyme) 之後方可進行 HAI (hemagglutinin-inhibition) assay。

<u>血清 RDE 酵素(receptor destroy enzyme)前處理步驟：</u>

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℃作用，O/N
4. 加入 3 volume sodium citrate(2.5%)， vortex
5. 56℃作用 30 分鐘
6. 加入 2volume 的 PBS (Final serum dilution 為 1:10)
7. -20℃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) (13)

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：

第一年(2009 年)

A/Brisbane/59/2007 (H1N1) ；A/Uruguay/716/2007 (H3N2) ；B/Florida/60/2008。

第二年(2010 年)

A/California/07/2009 (H1N1) ；A/Victoria/210/2009 (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：

第一年(2009 年)

A/Taiwan/1899/2009 (swine H1N1-like) ；A/Taiwan/3982/2009 (H3N2-like)；B/Tiwan/5908/2009

第二年(2010 年)

A/Taiwan/5347/2010 (H1N1-like) ；A/Taiwan/3869/2010 (H3N2-like)；B/Tiwan/3591/2010

詳細步驟如下：

(A)<u>試劑製備: 0.75%天筑鼠血球懸浮液</u>

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. 取天筑鼠血液約 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)<u>病毒 HA titler 測試</u>

1. 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 50 µl 的 PBS 溶液
2. 於第一列加入 100 µl 的病毒抗原原液，negative control 行則以 100 µl PBS 取代抗原

3. 取第一列的抗原 50 μl 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 50 μl 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 μl /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/50μl。

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 μl 稀釋液中含有 8 HA unit 的抗原。（1 HA unit 約為 10^7 個病毒量）

(C)<u>血球凝集抑制試驗(HAI assay)</u>

1. 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 25 μl 的 PBS 溶液

2. 於第一列加入 50 μl RDE treated serum

3. 取第一列的抗體 25 μl 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 25 μl 加入第三列，如此序列稀釋至第八列

4. 分別加入 25 μl 已稀釋至 8 HA unit/50 μl 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 μl/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) <u>Quality control</u>

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 µl +25 µl PBS + 50 µl 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, IHA, 0.5HA/25µl，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 x 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 x 10^4 cell/well (七成滿)

2. 56℃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℃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 + H_2O_2)，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； S**eroconversion 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。(14)

參、結果

1、臨床收案部份

第一年(2009 年 7~9 月)

第一年計畫從 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，受試者基本資料列於 Fig.1。

Fig.1 Demographic characteristics of the subjects (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**		

第二年(2010 年 7~9 月)

第二年從 99 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 60 名兒童，受試者基本資料列於 Fig.2。

Fig.2 Demographic characteristics of the subjects

(2010 年 7 月~9 月)

Group	No. of subjects	Age (year)	
child		**Mean (month)**	**Range(month)**
All subjects	**60**	**17**	**12~60**
Female	**29**		
Male	**31**		

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：

第一年(2009 年)

A/Brisbane/59/2007 (H1N1) ； A/Uruguay/716/2007 (H3N2) ； B/Florida/60/2008。

第二年(2010 年)

A/California/07/2009 (H1N1) ； A/Victoria/210/2009 (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 **C**ommittee for **P**roprietary **M**edicinal **P**roducts)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.) 。

安萬特(Aventis)疫苗廠皆已完成標準抗原之免疫抗體反應分析，由於第一年(2009 年 7~9 月)收案的 63 位及第二年(2010 年 7~9 月)收案的 60 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.3-1、3-2、4-1、4-2。

第一年(2009 年 7~9 月)

Fig.3-1 結果顯示，Flu B 的 GMT 值最低，只有 17.1，相對的可以看到 Fig.3-2 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 Flu B 疫苗株其體內抗體較低。另一方面，對於 H1N1 及 H3N2 的血清保護率則分別有 51%及 70%。

Fig.3-1 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**

Fig.3-2 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%**

第二年(2010 年 7~9 月)

Fig.4-1 結果顯示，H1N1 及 Flu B 的 GMT 值皆偏低，分別是 19.1 和 18，但可以看到 Fig.4-2 中，H1N1 的血清保護率是最低的，只有 15%，表示收案 60 位幼兒平均對於 H1N1 疫苗株其體內抗體最低；對於 Flu B 疫苗株的血清保護率也偏低，只有 25%；然而 H3N2 的血清保護率有 85%，大部分的幼兒體內對 H3N2 疫苗株有抗體。

Fig.4-1 Geometric mean HAI antibody titers (Aventis-標準抗原)

(2010 年 7 月~9 月)

	Child group (N=60)
Geometric mean titer	
A/California/07/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	**19.1**
A/Victoria/210/2009(H3N2)	
Pre-vaccination	**45.4**
B/Brisbane/60/2008	
Pre-vaccination	**18**

Fig.4-2 Seroprotection rate (Aventis-標準抗原)

(2010 年 7 月~9 月)

	Child group (N=60)
Seroprotection rate (%)	
A/California/07/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	**15%**
A/Victoria/210/2009(H3N2)	
Pre-vaccination	**85%**
B/Brisbane/60/2008	
Pre-vaccination	**25%**

3、利用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：

<u>第一年(2009 年 7~9 月)</u>

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 人完成分析。

<u>第二年(2010 年 7~9 月)</u>

A/Taiwan/5347/2010 (H1N1-like) ；A/Taiwan/3869/2010 (H3N2-like)；B/Tiwan/3591/2010

進行施打疫苗前的抗體效價分析，幼兒組共 60 人(2~5 歲)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.5-1、5-2、6-1、6-2。

第一年(2009 年 7~9 月)

Fig.5-1 結果顯示，幼兒打疫苗前對於本土流行株：A/Taiwan/1899/2009 (swine H1N1-like)，其 GMT 值最低，只有 15.4，而血清保護率的部分 (Fig.5-2)，同樣顯示幼兒對 H1N1 本土株的血清保護率最低，只有 21%。另一方面，對於 H3N2 本土株及 Flu B 本土株的血清保護率分別是 84%及 65%。

Fig.5-1 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**

Fig.5-2 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%**

第二年(2010 年 7~9 月)

Fig.6-1 結果顯示，幼兒打疫苗前對於本土流行株：A/Taiwan/5347/2010 (H1N1)，其 GMT 值最低，只有 16.1，而血清保護率的部分(Fig.6-2)，同樣顯示幼兒對 H1N1 本土株的血清保護率最低，只有 17%；然而，對於 H3N2 本土株及 Flu B 本土株的血清保護率也不高，皆只有 32%。

Fig.6-1 Geometric mean HAI antibody titers(本土流行株)

(2010 年 7 月~9 月)

	Child group (N=60)
Geometric mean titer	**本土流行株**
A/Taiwan/5347/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	**16.1**
A/Taiwan/3869/2010(H3N2)	
Pre-vaccination	**24.9**
B/Taiwan/3591/2010	
Pre-vaccination	**23**

Fig.6-2 Seroprotection rate (本土流行株)

(2010 年 7 月~9 月)

	Child group (N=60)
Seroprotection rate (%)	**本土流行株**
A/Taiwan/5347/2010(H1N1)	
Pre-vaccination	**17%**
A/Taiwan/3869/2010(H3N2)	
Pre-vaccination	**32%**
B/Taiwan/3591/2010	
Pre-vaccination	**32%**

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 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(受試者基本資料列於 Fig.1)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.7-1、7-2。

Fig.7-1 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.7-2)，幼兒對新型流感病毒的血清保護率是 **9.5%**，表示大部分幼兒對新型流感病毒株其體內無抗體，不具有保護力。

Fig.7-1 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**

Fig.7-2 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

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(受試者基本資料列於 Fig.1)完成分析，分析結分別列於 Fig.8-1、8-2。Fig.8-1 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.8-2 血清保護率的結果，若以 titer 大於等於 80 來計算，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。

Fig.8-1 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**

Fig8-2　Seroprotection rate (sw H1N1)

(2009 年 7 月~9 月)

	Child group (N=63)
Seroprotection rate (%) (MN titer ≥80)	
A/California/07/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	**16%**

6、利用新型流感病毒 (sw H1N1) 進行 HAI 和 MN 分析測定成人組，壯年組，及老人組打疫苗前血清的抗體效價

本實驗室從 96 年度(2007 年)到 97 年度(2008 年)所收集打疫苗前的血清中，取老人組(大於 75 歲)共 50 人，壯年組(50 歲~74 歲) 共 50 人，成人組(20~49 歲)共 50 人，利用**新型流感病毒: A/California/07/2009 (swine H1N1)**進行 HAI assay 及 MN assay (Micro-Neutralisation assay) 檢測分析抗體效價。

受試者基本資料列於 Fig.9-1，成人組(Adult group)平均年齡 34 歲，壯年組(Elder group)平均年齡 65 歲，老人組(very old group)平均年齡 79 歲。

Fig.9-1 Demographic characteristics of the subjects

(2007~2008 年所收集的打疫苗前血清)

Group	No. of	Age (year)	
		Mean±SD	Range
Adult			
subjects	**50**	**34 ±7**	**20~48**
Female	**37**		
Male	**13**		
Elder			
subjects	**50**	**65 ±6**	**50~74**
Female	**40**		
Male	**10**		
Very old			
subjects	**50**	**79 ±3.3**	**75~88**
Female	**19**		
Male	**31**		

Fig.9-2 中分別顯示 HAI assay 以及 MN assay 結果計算出的 GMT 值，我們可以看到 MN assay 的 GMT 值皆高於 HAI assay，可能原因是 MN assay 偵測血清中的抗體較 HAI assay 敏感，因此測得的抗體效價較高。GMT 值結果中，老人組(very old group)打疫苗前對於新型流感病毒株：A/California/07/2009，不管是 HAI assay (GMT 值：22.7)還是 MN assay(GMT 值：85.7)，其 GMT 值相較於壯年組及成人組都要來的高一些，顯示老人組(very old group)有較高的抗體效價。

Fig.9-2 Geometric mean MN and HAI antibody titers (sw H1N1)

(2007~2008 年所收集的打疫苗前血清)

	Adult group Range 20—49 year (N=50)		Elder group Range 50—74 year (N=50)		**Very old group >75 year (N=50)**	
A/California/07/2009						
Geometric mean titer	**MN**	**HAI**	**MN**	**HAI**	**MN**	**HAI**
Pre-vaccination	**22.3**	**12.6**	**59**	**16.7**	**85.7**	**22.7**

Fig.9-3 顯示 3 組的 MN assay 之血清保護率(Seroprotection rate)，若用抗體效價大於等於 160 來當做有保護力的標準：成人組(Adult group)的血清保護率是 0%，壯年組(Elder group)的血清保護率是 20%，老人組(very old group)的血清保護率是 32%，較接近 HAI assay 之血清保護率的結果(Fig.9-4)，HAI assay 結果之血清保護率(Fig.9-4)中以抗體效價大於等於 40 來當做有保護力的標準，成人組(Adult group)的血清保護率是 4%，壯年組(Elder group)的血清保護率是 16%，老人組(very old group)的血清保護率是 36%。因此對於 MN assay 的結果，未來對於成人可以考慮使用抗體效價大於等於 160 當做有保護力的標準，依此計算血清保護率。

整體而言，不管是 MN assay 或 HAI assay，其老人組的血清保護率皆高於成人組及壯年組。

Fig.9-3 Seroprotection rate (sw H1N1)

(microneutralization (MN) antibody response)

	Adult group Range 20—49 year (N=50)	Elder group Range 50—74 year (N=50)	Very old group >75 year (N=50)
A/California/07/2009			
MN titer ≥160			
Pre-vaccination	**0%**	**20%**	**32%**
MN titer ≥80			
Pre-vaccination	**8%**	**42%**	**74%**
MN titer ≥40			
Pre-vaccinat	**30%**	**84%**	**96%**

Fig.9-4 Seroprotection rate (sw H1N1)

(HAI antibody response)

	Adult group Range 20—49 year (N=50)	**Elder group Range 50—74 year (N=50)**	**Very old group >75 year (N=50)**
A/California/07/2009			
HAI titer ≥40	**HAI**	**HAI**	**HAI**
Pre-vaccination	**4%**	**16%**	**36%**

Fig.9-5 中，我們比較了三組的 HAI assay 以及 MN assay 測得抗體效價(antibody titer)的倍數差異。整體而言，MN assay 測得的抗體效價平均高於 HAI assay 測得的抗體效價約 2~4 倍，而且結果有年紀越大其倍數差越大的趨勢。成人組(**Adult group**) 的 HAI assay 及 MN assay 抗體效價相同的占 40%，抗體效價差 2 倍的占 30%，抗體效價差 4 倍的占 26%；而壯年組(**Elder group**) 的 HAI assay 及 MN assay 抗體效價差 2 倍的占 34%，抗體效價差 4 倍的占 46%；而老人組(**very old group**) 的 HAI assay 及 MN assay，其抗體效價差 2 倍的占 24%，抗體效價差 4 倍的占 62%。

Fig.9-5　比較 HAI and MN antibody titers 倍數差異

	Adult group Range 20—49 year (N=50)	Elder group Range 50—74 year (N=50)	Very old group >75 year (N=50)
HAI and MN titer			
1X	40%	4%	
2X	30%	34%	24%
4X	26%	46%	62%
8X	4%	12%	12%
16X		4%	2%

7、利用 2009 年本土流感病毒株:A/Taiwan/5347/2010 (H1N1-like) 進行 MN 分析測定打疫苗前之血清(2010 年 7~9 月收集)的抗體效價

擴增研究計畫增加利用 2009 年的本土流感病毒株**:A/Taiwan/5347/2010 (H1N1-like)**進行 MN assay，偵測 60 位(受試者基本資料列於 Fig.2)打疫苗前之幼兒其體內的抗體，分析結分別列於 Fig.10-1、10-2。

Fig.10-1 結果顯示，幼兒打疫苗前對於本土流感病毒株：**A/Taiwan/5347/2010 (H1N1-like)**，其 GMT 值是 41.4；Fig.10-2 血清保護率的結果，若以 titer 大於等於 160 來計算，幼兒對本土流感病毒株(H1N1)的血清保護率是 **20%**。

Fig.10-1 Geometric mean MN antibody titers

(2010 年 7 月~9 月)

	Child group (N=60)
Geometric mean titer (MN assay)	
A/Taiwan/5347/2010(H1N1-like)	
Pre-vaccination	**41.4**

Fig.10-2　Seroprotection rate

(2010 年 7 月~9 月)

	Child group (N=60)
Seroprotection rate (%) (MN titer ≥160)	
A/Taiwan/5347/2010(H1N1-like)	
Pre-vaccination	**20%**

肆、討論

一、比較 2009 年 7~9 月收集的 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 (Fig.11-1，Fig.11-2)

由 Fig.11-1 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 Fig.11-2，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，只有 16%。

造成此差異最大的原因在於使用的病毒株抗原不同，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。

然而 2009~2010 年所流行的病毒株是 H1N1(A/California/07/2009)，因此可以發現對於本土株的血清保護率更貼近台灣所流行的趨勢。

Fig.11-1 Geometric mean HAI antibody titers

(2009 年 7 月~9 月----比較本土流行株及標準疫苗株)

	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**

Fig11-2 Seroprotection rate

(2009 年 7 月~9 月----比較本土流行株及標準疫苗株)

	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 2010 年 7~9 月收集的 60 位幼兒，對本土流行株及標準疫苗株之 GMT 值和血清保護率 (Fig.12-1，Fig.12-2)

由 Fig.12-1 可以看到 2010 年 7~9 月收集的 60 位幼兒對本土流行株及標準疫苗株之 GMT 值結果的比較，兩者比較並無太大差異，H1N1 及 Flu B 的 GMT 值皆偏低；H3N2 的 GMT 值皆較高。

在血清保護率方面，Fig.12-2 可以看到，不管是本土株還是疫苗株，對 H1N1 的血清保護率皆是最低的，只有 15%、17%，因此在 2010~2011 年的流感季可能流行 H1N1 病毒株。

然而，對於 H3N2 的血清保護率，本土株及疫苗株則有明顯不同，本土株只有 32%，但疫苗株高達 85%，可能原因在於病毒株的不同。

另外，Flu B 的血清保護率也偏低，本土株只有 32%，疫苗株只有 25%，因此仍須注意 Flu B 的流行。

Fig.12-1 Geometric mean HAI antibody titers

(2010 年 7 月~9 月----比較本土流行株及標準疫苗株)

	Child group (N=60)	
Geometric mean titer	**本土流行株**	**標準疫苗株**
H1N1		
Pre-vaccination	**16.1**	**19.1**
H3N2		
Pre-vaccination	**24.9**	**45.4**
Flu B		
Pre-vaccination	**23**	**18**

Fig.12-2 Seroprotection rate

(2010 年 7 月~9 月----比較本土流行株及標準疫苗株)

	Child group (N=60)	
Seroprotection rate (%)	**本土流行株**	**標準疫苗株**
H1N1		
Pre-vaccination	**17%**	**15%**
H3N2		
Pre-vaccination	**32%**	**85%**
Flu B		
Pre-vaccination	**32%**	**25%**

三、比較從 95 年度(2006 年)到 99 年度(2010 年)的幼兒，其打疫苗前的血清對本土流行株之血清保護率 (Fig.13)

95 年度 (2006 年) 流行的病毒是 Flu B：『B/Malaysia/2506/2004』，96 年度 (2007 年) 和 97 年度 (2008 年) 皆流行的病毒是 H1N1：『A/Brisbane/59/2007』，而 98 年度(2009 年) 流行的病毒是 H1N1：『A/California/07/2009』，對照 Fig.13 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。已有文獻指出，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)。

今年(2010 年)的結果顯示，幼兒對 H1N1 本土病毒株的血清保護率最低，只有 17%，很有可能會流行 H1N1，但 H3N2 及 Flu B 的保護率也不高，只有 32%，因此今年流行的病毒株仍有待觀察。

Fig.13　95~99年度幼兒對本土流行株之血清保護率

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

伍、結論與建議

一、第一年(2009 年)幼兒的血清保護率以 H1N1 最低，只有 15%，與 2009~2010 年所流行的病毒株 H1N1(A/California/07/2009)吻合。而 2010 年的結果顯示，幼兒對 H1N1 本土病毒株的血清保護率最低，只有 17%，很有可能會流行 H1N1，但 H3N2 及 Flu B 的血清保護率也不高，只有 32%，因此今年流行的病毒株仍有待觀察。

二、對於 MN assay 的結果，未來可以考慮使用抗體效價大於等於 160 來當做有保護力的標準，來計算血清保護率。

陸、重要研究成果及具體建議

1.計畫之新發現或新發明

(1) 已有文獻指出幼兒的血清保護率，與當年流行的流感病毒株有高度相關(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。

(2) MN assay 測得的抗體效價平均高於 HAI assay 測得的抗體效價約 2~4 倍。

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

(1) 建議利用本土流行株進行 HAI assay 監測兒童打疫苗前的體內抗體，分析之後判斷幼童血清保護率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。

(2) 對於 MN assay 的結果，未來可以考慮使用抗體效價大於等於 160 來當做有保護力的標準，來計算血清保護率。

柒、委員審查意見與回覆

99 年度期中報告之委員審查意見

1.前瞻性追蹤疫苗接受者，以確定 MN 及 HAI 的 titer。

2.需考量與國民免疫力計畫之銜接。

3.MN 之應用值得探討推廣應用之可行性,且兒童之接種抗體評估亦值得常年監測。

4.此計畫最大癥結點仍是檢驗方法，因此建議若是在人力時間許可範圍下，最好仍應完成檢驗分析方法確效，以昭公信。

5. 有關流感疫苗的有效性可持續追蹤兒童接種疫苗後的血清抗體濃度與是否有類流感症狀產生（每週追蹤一次，且持續追蹤整個流感季)，進而加以統計分析評估而建立， CDC 宜規劃辦理相關計畫。

99 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) 現在以 12 月- 60 月齡兒童（預定 60 位)，對於流感疫苗株與本土流行株的抗體效價，比較 HAI 及 MN 的 seroprotection rate（HAI≧1:40)。發現今年對於 H1N1、H3N2 與 fluB 的 seroprotection rate 均不高，預測今年都會流行，尤其是 H1N1（pandemic)。

(2) 為新的預測 model，很值得參考。

(3) 可以持續進行，擴大收樣數目，或許更有代表性（建議以 120 位兒童為群體）。

(4) 已達預期效益，其推展可貼切本土流行趨勢，值得持續偵測，以供防疫政策採參。

(5) 可協助預測流感季之主要流行病毒亞型。

(6) 可提供 CDC 預測流行病毒株可能性。

2. 需修正之部分：請定期（每年）持續評估，結果與 CDC 病毒監測的病毒株比較，可以更正確的預測流行株。

3. 特殊績效

(1) 預測值可以提供 CDC 參考，提早預防。

(2) MN assay 開發與 HAI 比較，其發展有正面效益。

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, Kioumehr 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
14. 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