

MOHW103-CDC-C-114-000110

衛生福利部疾病管制署 103 年委託科技研究計畫

**計畫名稱：建立流感 A/H5N1 中和抗體
測試方法及評估疫苗接種後之抗體反應**

期 末 成 果 報 告

執行機構：國立台灣大學

計畫主持人：黃立民

協同主持人：張鑾英

研究人員：賴美汝、劉慧玲

執行期間：103 年 4 月 14 日至 104 年 4 月 30 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	16
肆、討論	33
伍、結論與建議	36
陸、計畫重要研究成果及具體建議	38
柒、期末審查意見回覆	39
捌、參考文獻	40
玖、圖、表	42

摘要

中文摘要

本研究之目的係為了解國人接種 H5N1 疫苗後抗體產生狀況，並評估免疫效果。首先利用疾管署血清庫中過去曾接種 H5N1 疫苗者的血清，共 179 支檢體，建立 H5N1 血清抗體檢驗之標準方式。此外為了解 H5N1 疫苗的效果，由自願參與 2014 年 H5N1 疫苗接種計畫之參與者中，收案共 114 人參與此研究，此 114 人為首次接種 H5N1 流感疫苗者，於疫苗接種前、後 21 日及半年後分別採集血液，利用假病毒中和抗體試驗(pseudo-virus micro neutralization assay)檢測受試者之 H5N1 抗體效價，並計算抗體陽性盛行率，評估其接種後之免疫反應與長期抗體變化。抗體效價建議以 160 為基準來計算血清保護率(Seroprotection rate)，打第一劑後 21 天的血清保護率，相較於打疫苗前有顯著上升，由 16% 上升至 63%，表示疫苗效果良好，體內有抗體產生。另外，藉由問卷統計受試者的職業類別、施打流感疫苗史與慢性病史，同時也評估 H5N1 疫苗接種的免疫反應與不良事件發生率：在接種第一劑後，21 日內，接種部位有反應的共 24 位(21%)，包括紅腫痛癢等症狀，身體有不舒服的共 8 位(7%)，症狀包括疲倦、肌肉痛、眩暈；在接種第二劑後，六個月內，接種部位有反應的共 6 位(5%)，包括紅腫痛癢等症狀，身體有不舒服的共 2 位(1.8%)，症狀包括頭痛、疲倦、肌肉痛、眩暈。

關鍵詞：H5N1 流感疫苗、H5N1 流感抗體、抗體陽性盛行率、不良事件

Abstract

The aim of this study was to understand the antibody responses after H5N1 vaccination, and assess the side effects. First, we established the standard procedure of H5N1 antibody assay using 179 stored serum samples from CDC. Furthermore, we enrolled 114 participants in 2014 to realize the effects of H5N1 vaccine. They were all naïve to H5N1 vaccine and received H5N1 vaccines for the first time. Their blood samples were collected before vaccination, 21 days and 6 months after vaccination. The pseudo-virus micro-neutralization assay was performed to detect the H5N1 antibody titer in serum samples. Results were calculated to assess the sero-surveillance and long-term antibody responses of H5N1 vaccine. The cut-off titer 160 was recommended to derive the sero-protection rate. The data showed that the sero-protection rate at 21 days after one dose of vaccine has increased from 16% to 63%, indicating a satisfactory antibody response of H5N1 vaccines. In addition, we evaluated the adverse effects after H5N1 vaccination by the questionnaire. A total of 24 subjects (21%) had reactions on their injection site, such as red, swollen, pain, and itch, and 8 subjects (7%) had general symptoms, such as tiredness, muscle pain, and dizziness within 21 days after first-vaccination. Six subjects (5%) developed reactions at their injection site following the second dose of H5N1 vaccine. Two subjects (1.8%) had general symptoms after second dose of vaccination.

keywords : H5N1 vaccination, H5N1 antibody, sero-surveillance, adverse effect

壹、前言

流感為流感病毒所造成的呼吸道感染症，其症狀從輕微的發燒、喉嚨痛、咳嗽、頭痛等，到嚴重的肺炎、腦炎等均有可能。流感病毒屬於正黏液病毒科，為單股RNA病毒。根據核蛋白可分為A、B、C三型。其中A型流感由於常導致併發症，並且容易產生變異，對人類的威脅也最大。A型流感病毒不僅感染人類，包括野生水禽、家禽、豬、馬等動物均可能發生感染，但一般來說，不同的病毒亞型感染不同的動物，而水禽則是A型流感的天然宿主，可以分離出所有的亞型。通常感染流感病毒的野生水禽並不發病，而是藉由遷徙將病毒帶往世界各地。藉著病毒的重組與突變，原先並不感染人類的禽流感病毒就有可能轉變為侵襲性強的新流感病毒，除了造成地區性流行之外，甚至造成全球大流行。

人類歷史上有紀錄之流感大流行分別發生於西元1889、1918、1957、1968、1977以及2009年。最著名的流感大流行為1918年由H1N1流感病毒引起的「西班牙流感」，估計造成當時全世界一半人口感染，在美國即造成超過546,000人死亡，全球超過5,000萬人死亡 (Johnson Mueller 2002)。而當時臺灣的感染人數據估計為80萬人，死亡人數約2.5萬人。另外1957年由H2N2病毒引發之的亞洲流感大流行，起源於野生鴨子所感染的禽流感病毒和人類流感病毒混種(Kawaoka 1989)，亦造成約150~450萬人死亡。1968年由H3N2病毒引起的香港流感，是由禽流感病毒中之HA和PB1基因與人類流感病毒重組後，產生H3N2新型流感病毒(Kawaoka 1989)。至於最近一次流感大流行則開始於2009年3月，該新型H1N1流感病毒的5

段基因來自於豬流感病毒、2段基因來自於禽流感病毒，另1段基因來自於人類流感病毒 (WHO 2010)。

香港於1997年首次發現人類感染H5N1禽流感病毒，此起事件證實了禽流感能跨越物種障礙傳染人類，並且引發是否會造成全球大流行的討論。2003年之後，H5N1高病原性禽流感的人類病例陸續在幾個國家發生，且致死率達60% (World Health Organization 2012)；另外，在動物的研究中也發現，高病原性H5N1禽流感 (HPAI)病毒與目前流行的H1N1新流感病毒在實驗室的环境中，同時感染人類肺臟細胞株後，可以發生基因重組的現象，且重組後的病毒在人類肺臟細胞株中生長狀況良好，推論在自然界中，若2種病毒感染同一宿主，即有可能重組出潛力無窮的流感大流行病毒(Octaviani 2010)。故H5N1禽流感病毒確實可能為下一個流感大流行的來源。

流感大流行前疫苗的定義為含有目前最具有潛力成為下一個流感大流行的病毒株，如禽流感病毒 A/H5N1 病毒、H7 病毒等(World Health Organization 2007)。由於H5N1 病毒為具有潛力引起未來流感大流行，因此世界衛生組織(WHO)將 H5N1 病毒列入大流行疫苗之候選病毒株(World Health Organization 2012)，並認為儲備 H5N1 疫苗是可行方案(World Health Organization 2007)。我國依據 WHO 建議，自 95 年起儲備人用流感 A/H5N1 疫苗(簡稱 H5N1 疫苗)，並於 96、97、99、100、101、102 年分別執行 H5N1 疫苗接種計畫，接種對象包括防疫、醫事、禽畜業者與旅客，目前 H5N1 疫苗之累計接種人次約 4 萬人次。我國所儲備的 H5N1 疫苗，包括印尼株

(A/Indonesia/5/2005)以及越南株(A/Vietnam/1194/2004 (H5N1))，96 年的接種者中，2 種疫苗之使用比例各半，97、100-101 年使用越南株，而 99 年則使用印尼株，所使用的疫苗株與當年儲備之疫苗與數量有關。

依據 H5N1 流感疫苗之臨床試驗資料顯示，在兒童、成人與老人接種 1 或 2 劑雞胚胎蛋裂解型大流行前疫苗後 6-14 個月，再接種 1 劑疫苗，可在接種第三劑疫苗後 7-21 天內快速出現可對抗同型或不同型抗原之抗體反應(Banzhoff 2009; Schwarz 2009; Leroux-Roels 2010; Vesikari 2012)；另接種 1 或 2 劑細胞培養全病毒型越南株大流行前疫苗後 6-24 個月，再接種 1 劑印尼或越南株疫苗，可在接種第三劑疫苗後 21 天快速出現可對抗越南株及印尼株病毒抗原之抗體反應(van der Velden 2012)。

有鑑於我國自 96 年起即陸續執行 H5N1 疫苗之接種計畫，為流感大流行準備工作的其中一項重要策略。本研究之目的為利用過去曾接種 H5N1 疫苗者的血清，建立 H5N1 疫苗接種後之標準抗體檢測方法。之後於 103 年度自願接種 H5N1 流感疫苗者中，利用此方式評估接種者接種後反應狀況以及長期血清保護率(seroprotection rate)，以作為流感大流行整備預防接種策略之實證基礎。

貳、材料與方法。

第一部分：研究族群與招募受試者

- (一) 利用疾管署血清庫中過去曾接種 H5N1 疫苗者的血清，共 179 位，建立血清抗體檢測之標準方式。
- (二) 由自願參與 2014 年 H5N1 疫苗接種計畫之參與者中，施打疫苗是 **Novartis** 的 **AFLUNOV**，收案 100 人參與此研究，此 100 人為首次接種 H5N1 流感疫苗者。於疫苗接種前、後 21 日及半年後分別採集血液，評估其接種後之免疫反應與長期抗體變化。

此計畫於 103 年 4 月通過研究倫理委員會，並配合疾管署於 103 年 4 月 30 日，一同開說明會，講解收案流程。以下是收案流程簡表：

「建立流感 A/H5N1 中和抗體測試方法及評估疫苗接種後之抗體反應」研究計畫收案流程

計畫主持人：國立臺灣大學 黃立民教授

計畫聯絡人：賴美汝 電話：(02)23123456#71729

台大先將所需物資寄給願意幫忙的單位(有離心設備)

1、受試者同意書(一式兩份) 2、問卷 3、收據 4、營養金 5、彩頭管 6、採血針 7、血清小管 8、標籤紙 9、酒精棉片、棉球 10、透氣膠帶 11、血清盒 12、滴管 13、宅急便的單子



口頭詢問前來施打 H5N1 疫苗的民眾(首次施打疫苗者)是否願意參與此計畫(追蹤抗體變化)

願意



第一次抽血(打第一劑疫苗前)

步驟:

- 1、請受試者填寫同意書
(兩份皆要填，一份留存，一份給受試者)
- 2、詢問並填寫問卷第一~三題
(編號從 001 開始)
- 3、打疫苗前抽血(5~10c.c.)
- 4、請受試者填寫收據
(第一聯留存，第二聯給受試者)
- 5、給予受試者營養金 200 元



第二次抽血(21 日後，打第二劑之前)

步驟:

- 1、詢問並填寫問卷第四題
- 2、打第二劑疫苗前抽血(5~10c.c.)
- 3、請受試者填寫收據
(第一聯留存，第二聯給受試者)
- 4、給予受試者營養金 200 元



第一及第二次抽完血的步驟:

- 1、於 6 小時內離心(3000rpm，10 分鐘)
- 2、取血清(約 2~3 c.c.)至血清小管
- 3、寫好標籤紙(註明抽血日期、姓名、編號)貼在血清小管上
- 4、血清小管存於-20°C 冰箱(若只有 4°C 冰箱，必須三天內寄回)



- 1、每兩星期一批，連同受試者同意書及收據一起低溫宅配—收件地址:台北市中山南路 8 號 17 樓小兒感染科實驗室 收件人:賴美汝 0987-331640
- 2、統計人數，回報台大醫院，E-mail 至 lmr21.tw@yahoo.com.tw
- 3、最後一批再連同問卷一同寄回台大

會後詢問並統計全省各縣市醫療院所是否願意參與幫忙收案，願意幫忙收案的醫療院所再回報負責收案的聯絡人姓名及聯絡方式。5月疾管署陸續給我們各地區衛生局回報願意收案之工作人員資訊，而我們這邊聯繫各地方願意幫忙的醫療院所，給予預計收案人數所需的醫療物品，例如針頭、採血管等。計畫內容需收集三次抽血，第一次抽血是打疫苗前，第二次抽血是打疫苗後21天，第三次抽血是打疫苗後半年，每次抽血皆請各地醫療院所幫忙，再將檢體寄回。

第二部份：血清抗體檢測方法

發展以假病毒方式，建立H5N1流感抗體檢驗平台

一、假病毒製備

1. Seeding 4×10^6 cells (10cm dish) of 293T cell lines for O/N
2. Co-transfection : 9 μg pNL-Luc-E-R- (HIV backbond plasmid), 3 μg pCDNA3.1(+)-HA and 3 μg pCDNA3.1(+)-NA were simultaneously added into 1mL OPTI-MEM

HA sequence from **A/Thailand/1(KAN-1)/2004 (H5N1)**

NA sequence from **A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)**

3. Mix with 45 μl transfection reagent(LT1), and stand for 15-20 min at RT
4. Add the mixture into the pre-seeded 293T cells, and incubate for 6hr at 37°C
5. Remove the supernatant and change the fresh DMEM complete medium (10mL/10cm dish) for 48 - 72hr incubation
6. Harvest the cultured media and centrifuge at 1500 rpm for 5min, then collect the

supernatant--pseudotyped virus, and store at 4°C

7. Detect the pseudotyped virus particles titer by luciferase assay

p.s. 1. Transfection condition: DNA: LT1 = 1: 3

Transfection reagent: TransIT-LT1 (Mirus)

2. Don't store pseudotyped virus above 1-1.5 months, it will be degraded.

二、假病毒液之校價測訂(TCID₅₀)

1. Serial Dilute the pseudotyped virus in DMEM medium (5% FBS and 1x P/S), 100 µl/well in 96-well white plate

2. Add the 1.5×10^4 MDCK cells/100µl/well into diluted pseudotyped virus

3. 200µl/well of the pseudotyped virus -MDCK mixture was incubated for 48hr at 37°C

4. Remove the supernatant and wash the cells by 200µl of PBS

5. Add the 50µl of Glo-lysis buffer per well, gently shake and incubate for 5 min at RT

6. Add the 50µl of Neolite for 5 mins incubation, avoid the light

7. Detect the luciferase activity of pseudotyped virus

8. Calculate the TCID₅₀ of Pseudotyped virus.

9. >100倍細胞組(mock)的平均 luciferase activity 表示 positive

Table 2. Virus infectivity determination: Karber method
The method is best explained using a case study. To describe the procedure, the following data will be used:

Virus dilution	CPE present Tube				Proportion of tubes infected
	1	2	3	4	
10 ⁻¹	+	+	+	+	4/4 = 1
10 ⁻²	+	+	+	+	4/4 = 1
10 ⁻³	+	+	+	-	3/4 = 0.75
10 ⁻⁴	+	+	-	-	2/4 = 0.5
10 ⁻⁵	+	+	-	-	2/4 = 0.5
10 ⁻⁶	-	-	-	-	0/4 = 0.0
					sum of proportions = 3.75

Calculate the TCID₅₀ using the following formula:

$$\text{Log TCID}_{50} = L - d (s - 0.5)$$

where L is the log of the lowest dilution (= -1 in this case), d is the difference between dilution steps (= 1 in this case), s is the sum of the proportion of positive tubes (= 3.75 in this case).

For the sample data given above:

$$\text{Log TCID}_{50} = -1 - 1 (3.75 - 0.5)$$

$$= -4.25$$

$$\text{TCID}_{50} = 10^{-4.25}$$

$$100 \text{ TCID}_{50} = 10^{-2.25}$$

Therefore the virus suspension must be diluted between 1 in 100 (10⁻²) and 1 in 1000 (10⁻³). The exact dilution is obtained from the antilog of 0.25 (from 10^{-2.25}).

$$\text{antilog } 0.25 = 1.78$$

Therefore the dilution of virus suspension that gives 100 TCID₅₀ is 1 in 178.

依此結果為例：

		dilute -1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	mock
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
第一批 4 repeats	A	30538	4611.9	525.41	50.039	8.340	14.595	6.255	4.170	2.085
	B	31416	3117.0	329.43	45.869	8.340	2.085	2.085	0.000	2.085
	C	60633	5568.9	567.11	54.209	2.085	4.170	2.085	0.000	2.085
	D	61857	4676.6	690.12	58.379	20.850	10.425	0.000	0.000	2.085
第二批 4 repeats	E	113339	16077	1457.4	185.56	16.680	12.510	0.000	2.085	4.170
	F	110564	10062	1161.3	218.92	41.699	12.510	4.170	0.000	4.170
	G	112857	17549	2114.2	598.39	91.738	18.765	0.000	0.000	0.000
	H	118589	19017	2014.1	366.95	54.209	16.680	2.085	2.085	0.000

Wavelength Combination: lLm1
Mean Temperature: 22.0

計算出來的TCID₅₀

第一批：TCID₅₀ = 10^{-3.5} / 100ul

第二批：TCID₅₀ = 10^{-4.5} / 100ul

三、假病毒與血清之中和試驗

1. In a 96-well plate, 2-fold serially diluted serum samples (pretreat the serum: 56°C , 30min) beginning at 1:10
2. Incubated with 200 median (50%) tissue culture infective doses(TCID₅₀)of pseudotyped virus at the final volume of 100 µL at 37°C for 1 hour
3. Add 1.5 X 10⁴ MDCK cells/100µl/well into the mixture for 48hr at 37°C
4. Remove the supernatant and wash the cells by 200µl of PBS
5. Add the 50µl of Glo-lysis buffer per well, gently shake and incubate for 5 min at RT
6. Add the 50µl of Neolite for 5 mins incubation, avoid the light
7. Detect the luciferase activity of pseudotyped virus
8. Caculate the the 50% inhibitory concentration(IC₅₀):
RLA was measured by Neolite luciferase substrate.
Inhibition percentage was calculated as the following: (RLA in virus challenge controls – RLA in test well for each serum at specific dilution)/RLA in virus challenge controls.
The 50% inhibitory concentration(IC₅₀) titer was determined by the reciprocal of the last dilution that resulted in >50% reduction of luciferase activity.

第三部份：問卷

以下為問卷內容。

問 卷 調 查

受訪者編號：_____

接種第一劑日期：____年____月____日

接種第二劑日期：____年____月____日

負責人：_____

計畫名稱：建立流感 A/H5N1 中和抗體測試方法及評估疫苗接種後之抗體反應

一、基本資料

性別：男 女；居住縣市：_____

職業類別：金融管理；行銷業務；餐飲服務；教育傳播；資訊工程
學生； 自由業； 其他_____

或是以下身份：操作 H5N1 病毒實驗室人員；醫事人員；防疫人員；
海、岸巡人員、機場、港口安檢、證照查驗及關務人員；
禽畜養殖業或屠宰、販賣、化製廠等作業人員、動物防疫人員；
預定出國旅遊的旅客。

教育程度：小學 國中 高中 大學 碩士 博士

二、流感疫苗接種史

過去 10 年間曾施打季節性流感疫苗年度(請打勾，可複選)

2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011
2012 2013

三、慢性病史

無 有_____

四、接種第一劑後，21 日內所發生之不良事件

1. 在接種疫苗後，接種部位有無反應：

無任何反應 (跳答第 2 題)

有，出現了下列狀況 (續答 1-1 至 1-5)：

1-1 紅：無 $\leq 2\text{cm}$ 2-5cm $> 5\text{cm}$

1-2 腫：無 $\leq 2\text{cm}$ 2-5cm $> 5\text{cm}$

1-3 痛：無 輕微疼痛 觸摸有疼痛感 手臂酸痛

1-4 癢：無 有

1-5 這些反應持續了多久？1 天以內 1-2 天 3 天 超過 3 天

2. 在接種後，身體有無出現反應：

無任何反應（跳答第 3 題）

有出現反應（續答 2-1 至 2-2）

2-1 在接種疫苗後，身體出現下列反應（可複選）：

(1)發燒，37.5-38°C 38.1-39.0 >39°C

(2)頭痛 (3)疲倦 (4)出汗 (5)發抖 (6)肌肉痛 (7)關節痛 (8)眩暈

(9)耳鳴 (10)噁心 (11)嘔吐 (12)感冒症狀 (13)蕁麻疹 (14)眼睛腫脹

(15) 臉部麻痺

2-2 這些反應持續多久？1 天以內 1-2 天 3 天 4-7 天以上

五、 接種第二劑後，六個月內所發生之不良事件

1. 在接種疫苗後，接種部位有無反應：

無任何反應（跳答第 2 題）

有，出現了下列狀況（續答 1-1 至 1-5）：

1-1 紅：無 ≤2cm 2-5cm >5cm

1-2 腫：無 ≤2cm 2-5cm >5cm

1-3 痛：無 輕微疼痛 觸摸有疼痛感 手臂酸痛

1-4 癢：無 有

1-5 這些反應持續了多久？1 天以內 1-2 天 3 天 超過 3 天

2. 接種後，身體有無出現反應：

無任何反應

有出現反應（續答 2-1 至 2-2）

2-1 接種疫苗後，身體出現下列反應（可複選）：

(1)發燒，37.5-38°C 38.1-39.0 >39°C

(2)頭痛 (3)疲倦 (4)出汗 (5)發抖 (6)肌肉痛 (7)關節痛 (8)眩暈

(9)耳鳴 (10)噁心 (11)嘔吐 (12)感冒症狀 (13)蕁麻疹 (14)眼睛腫脹

(15) 臉部麻痺

2-2 這些反應持續多久？1 天以內 1-2 天 3 天 4-7 天以上

參、結果

第一部份：研究族群與招募受試者

(一)原訂計畫中，欲利用疾管署血清庫中過去曾接種 H5N1 疫苗者的血清，共 179 隻檢體，至 Novartis serological laboratories in Marburg/Germany and Siena/Italy 實驗室建立血清抗體檢測之標準方式，研究期間持續與 Novartis 公司接洽，且已收到 Novartis 的合約書，本實驗室申請血清出口一事也通過了，但由於 Novartis 公司處於整合階段，內部忙碌，無暇接應，因此在計畫期間未能到 Novartis 實驗室觀摩學習。然而，本實驗室透過清華大學吳夙欽教授的幫助，提供我們材料與教導實驗方法，並參考文獻，建立 H5N1 血清抗體檢測方法，完成剩餘檢體共 179 支的抗體檢測。

(二)預計由自願參與 2014 年 H5N1 疫苗接種計畫之參與者中，收案 100 人參與此研究，此 100 人為首次接種 H5N1 流感疫苗者，於疫苗接種前、後 21 日及半年後分別採集血液，評估其接種後之免疫反應與長期抗體變化。4 月底與疾病管制署一同開說明會，然後 6 月與各地方醫療院所聯繫，並寄發醫療物品。總共有 25 間醫療院所參與收案，一開始收案人數共 127 人，大於原訂 100 人是因為考慮到半年後回來第三次抽血，可能回收率不高，結果完成三次抽血人數共 114 人，參與此計畫的縣市醫療院所及收案人數統計如下表 Table 1。

Table 1、縣市醫療院所及收案人數統計狀況

區域	縣市	醫療機構名稱	已收案人數	完成三次抽血人數	統計
北部	台北市	台大醫院	4	4	31
	桃園縣	八德市衛生所	6	5	
	新竹市	新竹市東區衛生所	1	1	
		新竹市北區衛生所	10	10	
	苗栗縣	苗栗市衛生所	1	1	
		竹南鎮衛生所	2	2	
		後龍鎮衛生所	1	1	
		公館鄉衛生所	1	1	
		南庄鄉衛生所	2	2	
		頭屋鄉衛生所	1	1	
頭份鄉衛生所		2	2		
造橋鄉衛生所	1	1			
中部	台中市	潭子衛生所	9	9	67
		清水衛生所	5	4	
		沙鹿衛生所	7	7	
	彰化縣	二林鎮衛生所	12	11	
		福興鄉衛生所	6	2	
		花壇鄉衛生所	4	3	
		永靖鄉衛生所	12	10	
		衛生福利部彰化醫院	12	11	
南投縣	南投市衛生所	10	10		
南部	雲林縣	二崙鄉衛生所	5	5	16
	嘉義縣	大埔鄉衛生所	4	4	
	嘉義市	衛生福利部嘉義醫院	5	3	
	台南市	東區衛生所	4	4	
總共		25 間	127	114	114

第二部份：抗體檢測結果統計

(一)利用疾管署血清庫中過去曾接種 H5N1 疫苗者的血清，共 179 位，建立血清抗體檢測之標準方式：H5N1-pseudotyped micro-neutralization assay。

由於此 179 支血清是疾管署的剩餘檢體，因此本單位沒有受試者的背景資料，也不清楚受試者的疫苗接種紀錄，結果僅能以統計抗體效價結果呈現。

結果顯示幾何平均值(Geometric mean MN antibody titers)是 114.2，如下 Table 2。

Table 2 抗體效價幾何平均值(179 支剩餘檢體)

Geometric mean MN antibody titers (179)

Geometric mean titer (MN assay)	group (N=179)
H5N1 pseudovirus	114.2

血清保護率(Seroprotection rate)的結果，若抗體效價以 80 為基準(大於或等於 80 表示體內具有抗體)，計算出來的血清保護率是 85.5%；若抗體效價以 160 為基準(大於或等於 160 表示體內具有抗體)，計算出來的血清保護率是 54.2%。如下 Table 3。

Table 3 血清保護率 Seroprotection rate (179 支剩餘檢體)

Seroprotection rate (%)	group (N=179)
H5N1 pseudovirus (MN assay)	
MN titer ≥ 80	85.5%
MN titer ≥ 160	54.2%

(二)由自願參與 2014 年 H5N1 疫苗接種計畫之參與者中，收案共 114 人參與此研究，此 114 人為首次接種 H5N1 流感疫苗者。於疫苗接種前、後 21 日及半年後分別採集血液，評估其接種後之免疫反應與長期抗體變化。

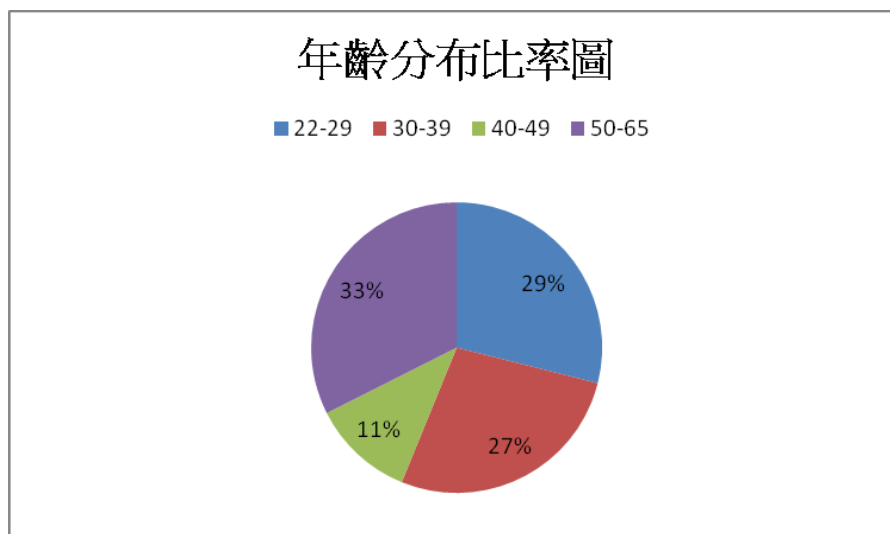
共 114 人檢測抗體，檢測方法：H5N1-pseudotyped micro-neutralization assay。首先統計參與此研究的受試者，共 114 人，平均年齡是 40.9 歲，年齡分布從 22 歲到 65 歲，男性共有 53 人，女性 61 人。如下 **Table 4**。年齡分布比率圖如下 **Fig. 4-1**。

Table 4 受試者的人口特徵

Demographic characteristics of the subjects (2014 年 6 月~2015 年 2 月)

characteristics		group (N=114)
Age	Mean	40.9±13.46
	Range	22-65
Gender	Male	53
	Female	61

Fig. 4-1 年齡分布比率圖(The ratio of age distribution)



幾何平均值(**Geometric mean MN antibody titers**)的結果顯示，在未打疫苗前的幾和平均值是 56.2，打完第一劑疫苗後 21 天的幾和平均值是 136.6，打完第二劑疫苗後 6 個月的幾和平均值是 135。發現打第一劑後 21 天的抗體效價，相較於打完第二劑較高，暗示打第二劑疫苗並沒有加強抗體的表現，或是打第二劑後的抗體於六個月後在體內減少。如下 **Table 5**。

Table 5 抗體效價幾何平均值

Geometric mean MN antibody titers (2014 年 6 月~2015 年 2 月)

group (N=114)	
Geometric mean titer	
(MN assay)	
H5N1 pseudovirus	
Pre-vaccination	56.2
Post-vaccination (21Days)	136.6
Post-vaccination(6 months)	135

關於血清保護率(Seroprotection rate)的結果，若抗體效價以 80 為基準(大於或等於 80 表示體內具有抗體)，計算出來的血清保護率，打疫苗前是 62%，打完第一劑疫苗後 21 天的血清保護率是 91%，打完第二劑疫苗後 6 個月的血清保護率是 98%；若抗體效價以 160 為基準(大於或等於 160 表示體內具有抗體)，計算出來的血清保護率，打疫苗前是 16%，打完第一劑疫苗後 21 天的血清保護率是 63%，打完第二劑疫苗後 6 個月的血清保護率是 61%。因為受試者皆為第一次施打 H5N1 疫苗，若以 80 為基準計算，其打疫苗前的血清保護率已達 62%，如此高的原因有可能(1) 有些受試者年紀較大(大於 50 歲的有 37 人，占 33%)，體內抗體對 H5N1 有 cross-protective 的效果；(2) 受試者的職業很多是醫事防疫人員(有 39 人，占 34.2%)，或禽畜養殖業或屠宰、販賣、化製廠等作業人員、動物防疫人員(有 34 人，占 29.8%)，才會造成未打 H5N1 疫苗，體內已有保護力的狀況。而若以 160 為基準計算，打疫苗前的血清保護率為 16%，較為合理，因此抗體效價建議以 160 為基準。另外，打第一劑後 21 天的血清保護率，相較於打疫苗前有顯著上升，由 16% 上升至 63%，表示疫苗效果良好，體內有產生抗體。然而血清保護率在打完第二劑後六個月，反而是 61%，降低一點點，有可能打第二劑疫苗並沒有加強抗體的表現，或是打第二劑後的抗體於六個月後在體內減少。如下 **Table 6**。

Table 6 血清保護率 Seroprotection rate (2014 年 6 月~2015 年 2 月)

Seroprotection rate (%)	group (N=114)			
	H5N1 pseudovirus (MN assay)	Pre-vaccination	Post-vaccination (21Days)	Post-vaccination (6 months)
MN titer ≥ 80		62%	91%	98%
MN titer ≥ 160		16%	63%	61%

血清轉換率(**Seroconversion rate**)，表示打疫苗後的抗體效價相較於未打疫苗前的抗體效價，有呈現四倍效價上升的比率。結果顯示，打完第一劑疫苗後 21 天的血清轉換率是 36%，打完第二劑疫苗後 6 個月的血清轉換率是 34%。可見疫苗效果良好，有 34~36% 的受試者打完疫苗後有四倍效價上升。如下 **Table 7**。

Table 7 血清轉換率 Seroconversion rate (2014 年 6 月~2015 年 2 月)

Seroconversion rate (%)	group (N=114)
H5N1 pseudovirus (MN assay)	
Post-vaccination (21 Days)	36%
Post-vaccination (6 Months)	34%

第三部份：問卷統計

統計共 114 位受試者的問卷。

一、基本資料

Table 8. 基本資料(Basic information)

問題		人數統計	%
性別	男	53	53.51
	女	61	46.49
職業類別	金融管理	0	0
	行銷業務	1	0.88
	餐飲服務	0	0
	教育傳播	2	1.75
	資訊工程	0	0
	學生	0	0
	自由業	11	9.65
	其他	100	87.72
或是以下身份 (missing=9)	操作 H5N1 病毒實驗室人員	12	11.43
	醫事人員	23	21.9
	防疫人員	16	15.24
	海、岸巡人員、機場、港口安檢、證照查驗及 關務人員	12	11.43
	禽畜養殖業或屠宰、販賣、化製廠等作業人 員、動物防疫人員	34	32.38
	預定出國旅遊的旅客	8	7.62
教育程度	小學	9	7.89

	國中	11	9.65
	高中	20	17.54
	大學	61	53.51
	碩士	8	7.02
	博士	5	4.39

二、 流感疫苗接種史，過去 10 年間曾施打季節性流感疫苗年度

Table 9 流感疫苗接種史(History of influenza vaccination)

施打季節性流感疫苗年度	施打人數統計
2003	8
2004	10
2005	11
2006	12
2007	17
2008	19
2009	19
2010	25
2011	28
2012	33
2013	39
空白(無施打流感疫苗)	12

三、慢性病史

Table 10 慢性病史(History of chronic disease)

慢性病史	人數統計	%	備註
無	91	79.82	
有	23	20.18	糖尿病、高血壓、高血脂、慢性腎臟疾病

四、接種第一劑後，21 日內所發生之不良事件

**Table 11-1 接種第一劑後，接種部位 21 日內所發生之不良事件
(Adverse effects on the vaccination site after boosted the first vaccine for 21Days)**

1.在接種疫苗後，接種部位有無反應 (接種第一劑後，21 日內)	人數統計	
無	90	
有	24	
	1-1 接種第一劑後 21 日內接種部位-紅	人數統計
	≤2cm	2
	2-5cm	1
	>5cm	0
	1-2 接種第一劑後 21 日內接種部位-腫	人數統計
	≤2cm	5
	2-5cm	1
	>5cm	1
	1-3 接種第一劑後 21 日內接種部位-痛	人數統計

	輕微疼痛	3
	觸摸有疼痛感	6
	手臂酸痛	13
	1-4 接種第一劑後 21 日內接種部位-癢	人數統計
	有	3
	1-5 接種第一劑後 21 日內接種部位- 紅腫痛癢這些反應持續了多久？	人數統計
	1 天以內	3
	1-2 天	9
	3 天	5
	超過 3 天	3

**Table 11-2 接種第一劑後，身體 21 日內所發生之不良事件
(Adverse effects on body after boosted the first vaccine for 21Days)**

2.在接種後，身體有無出現反應 (接種第一劑後，21 日內)	人數統計	
無	106	
有	8	
	2-1 在接種疫苗後，身體出現下列反應	人數統計
	疲倦	3
	肌肉痛	6
	眩暈	1
	2-2 這些反應持續多久？	人數統計
	1 天以內	1
	1-2 天	5

	3 天	1
	4-7 天以上	0

五、接種第二劑後，六個月內所發生之不良事件

Table 12-1 接種第一劑後，接種部位六個月內所發生之不良事件
(Adverse effects on the vaccination site after boosted the first vaccine for 6 months)

1.在接種疫苗後，接種部位 有無反應 (接種第二劑後，六個月內)	人數統計	
無	108	
有	6	
	1-1 接種第二劑後，六個月內接種部位-紅	人數統計
	≤2cm	2
	2-5cm	0
	>5cm	0
	1-2 接種第二劑後，六個月內接種部位-腫	人數統計
	≤2cm	2
	2-5cm	0
	>5cm	0
	1-3 接種第二劑後，六個月內接種部位-痛	人數統計
	輕微疼痛	2
	觸摸有疼痛感	1
	手臂酸痛	2
	1-4 接種第二劑後，六個月內接種部位-癢	人數統計

	有	0
	1-5 接種第二劑後，六個月內接種部位- 紅腫痛癢這些反應持續了多久？	人數統計
	1 天以內	2
	1-2 天	0
	3 天	2
	超過 3 天	2

**Table 12-2 接種第一劑後，身體六個月內所發生之不良事件
(Adverse effects on body after boosted the first vaccine for 6 months)**

2.在接種後，身體有無出現反應 (接種第二劑後，六個月內)	人數統計	
無	112	
有	2	
	2-1 在接種疫苗後，身體出現下列反應	人數統計
	頭痛	1
	疲倦	1
	肌肉痛	1
	眩暈	1
	2-2 這些反應持續多久？	人數統計
	1 天以內	0
	1-2 天	0
	3 天	2
	4-7 天以上	0

六、迴歸分析

1、有哪些因子會影響疫苗施打前之 titer? (linear regression)

Outcome: Log(Pre-vaccination titer)

Table 13

Variable	單變項分析		多變項分析(年齡、身分別，疫苗接種史)	
	Coefficient estimation	p-value	Coefficient estimation	p-value
Age	0.00299	0.2624	0.00129	0.6809
Gender (F:2 ; M:1)	-0.1058	0.1394		
居住區域				
北部	-	-		
中部	-0.1761	0.0323		
南部	-0.00789	0.9455		
身分別				
1 操作 H5N1 病毒實驗室人員	-	-	-	-
2 醫事人員+3 防疫人員	0.24507	0.05	0.23375	0.0834
4 海、岸巡人員、機場、港口安檢、證照查驗及關務人員	0.27594	0.0739	0.26958	0.0858
5 禽畜養殖業或屠宰、販賣、化製廠等作業人員、動物防疫人員	0.30546	0.0168	0.28299	0.0426
6 預定出國旅遊的旅客	-0.03763	0.8261	-0.05299	0.7645
教育程度				
大學以上 vs.高中以下(高中以下:0; 大學以上:1)	-0.1316	0.0779		
疫苗接種史(有:1; 無:0)	0.02147	0.7842	0.00126	0.9891
近五年疫苗接種史(有:1; 無:0)	0.12503	0.0891		
慢性病史(有:2; 無:1)	0.14268	0.1084		

進行 linear 迴歸分析，探討有哪些因子(X)會影響施打疫苗前的 titer(Y)。

黃底粗體標示的為顯著之變項

以身分別：” 5 禽畜養殖業或屠宰、販賣、化製廠等作業人員、動物防疫人員” 為例，因其 Coefficient estimation>0，故可知此身分的人相較於” 1 操作 H5N1 病毒實驗室人員” ，在施打疫苗前有顯著較高的 titer。多變項分析中，僅將年齡、身分別，疫苗接種史放進迴歸中分析，發現身分別：” 5 禽畜養殖業或屠宰、販賣、化製廠等作業人員、動物防疫人員” 有顯著，代表是當控制了年齡、疫苗接種史後，此身分的人相較於” 1 操作 H5N1 病毒實驗室人員” ，在施打疫苗前有顯著較高的 titer。因此結果顯示，居住區域在中部，以及禽畜養殖業或屠宰、販賣、化製廠等作業人員、動物防疫人員在打疫苗前，其抗體效價顯著較高。

2、打了第一劑 H5N1 疫苗，21 天後，哪些人有顯著產生四倍效價上升? (logistic regression)

$$\text{Outcome: } \frac{\text{Post-vaccination (21Days)titer}}{\text{Pre-vaccination titer}} \geq 4$$

Table 14

Variable	單變項分析		多變項分析(年齡、身分別，疫苗接種史)	
	OR(95%CI)	p-value	OR(95%CI)	p-value
Age	0.99(0.96,1.02)	0.4587	1(0.96,1.03)	0.7716
Gender (F:2 vs. M:1)	1.26(0.59,2.71)	0.5527		
居住區域				
北部	1	-		
中部	1.23(0.51,2.97)	0.6494		
南部	0.61(0.16,2.34)	0.4671		
身分別				
1 操作 H5N1 病毒實驗室人員	1	-	1	-
2 醫事人員+3 防疫人員	0.69(0.17,2.79)	0.6027	1.29(0.27,6.13)	0.7455
4 海、岸巡人員、機場、港口安檢、證照查驗及關務人員	2(0.38,10.41)	0.4102	1.96(0.36,10.86)	0.4399

5 禽畜養殖業或屠宰、販賣、化製廠等作業人員、動物防疫人員	1.24(0.31,4.95)	0.7625	1.85(0.39,8.75)	0.4402
6 預定出國旅遊的旅客	6(0.81,44.35)	0.0792	9.1(1.08,76.57)	0.0422
教育程度				
大學以上 vs.高中以下(高中以下:0; 大學以上:1)	1.59(0.7,3.61)	0.2672		
疫苗接種史(有:1; 無:0)	0.38(0.17,0.87)	0.022	0.34(0.12,0.94)	0.0381
近五年疫苗接種史(有:1; 無:0)	0.27(0.12,0.6)	0.0014		
慢性病史(有:2; 無:1)	0.54(0.19,1.5)	0.2361		

進行 logistic 迴歸分析，黃底粗體標示的為顯著之變項

探討施打疫苗後對那些人有效(有效的定義：Seroconversion)。

其結果解釋以”疫苗接種史”為例：因 $OR < 1$ ，代表有疫苗接種史的人比沒有疫苗接種史的人，打了第一劑 H5N1 疫苗 21 天後，較不會有疫苗施打後 titer 上升四倍的狀況，且此狀況有顯著差異。多變項分析中，也是僅將年齡、身分別，疫苗接種史放進迴歸中分析。

3、打了第二劑 H5N1 疫苗，6 個月後，哪些人有顯著產生四倍效價上升？

$$\text{Outcome: } \frac{\text{Post-vaccination (6 months)titer}}{\text{Pre-vaccination titer}} \geq 4$$

Table 15

Variable	單變項分析		多變項分析(年齡、身分別，疫苗接種史)	
	OR(95%CI)	p-value	OR(95%CI)	p-value
Age	0.98(0.95,1.01)	0.1228	0.99(0.96,1.03)	0.6014
Gender (F:2 vs. M:1)	1.4(0.64,3.06)	0.3996		
居住區域				

北部	1	-		
中部	1.33(0.54,3.27)	0.5324		
南部	0.49(0.11,2.1)	0.3321		
身分別				
1 操作 H5N1 病毒實驗室人員	1	-	1	-
2 醫事人員+3 防疫人員	0.35(0.09,1.32)	0.1196	0.62(0.14,2.73)	0.5301
4 海、岸巡人員、機場、港口 安檢、證照查驗及關務人員	0.5(0.1,2.6)	0.4102	0.46(0.08,2.58)	0.3807
5 禽畜養殖業或屠宰、 販賣、化製廠等作業 人員、動物防疫人員	0.48(0.13,1.83)	0.2808	0.71(0.16,3.17)	0.6514
6 預定出國旅遊的旅客	3(0.42,21.3)	0.2719	4.52(0.56,36.19)	0.1556
教育程度				
大學以上 vs.高中以下(高中以 下:0;大學以上:1)	2.35(0.98,5.64)	0.0559		
疫苗接種史(有:1;無:0)	0.38(0.17,0.87)	0.0225	0.35(0.13,1)	0.0496
近五年疫苗接種史(有:1;無:0)	0.3(0.13,0.68)	0.0036		
慢性病史(有:2;無:1)	0.34(0.11,1.07)	0.0655		

進行 logistic 迴歸分析，黃底粗體標示的為顯著之變項

探討施打疫苗後對那些人有效(有效的定義：Seroconversion)。

其結果解釋以” 疫苗接種史” 為例：因 $OR < 1$ ，代表有疫苗接種史的人比沒有疫苗接種史的人，打了第二劑 H5N1 疫苗 6 個月後，較不會有疫苗施打後 titer 上升四倍的狀況，且此狀況有顯著差異。

肆、討論

一、評估首次接種者接種後免疫反應狀況，及長期抗體追蹤。

血清保護率(Seroprotection rate)的結果中，若以 80 為基準計算，其打疫苗前的血清保護率已達 62%，如此高的原因有可能(1) 有些受試者年紀較大(大於 50 歲的有 37 人，占 33%)，體內抗體對 H5N1 有 cross-protective 的效果；(2) 受試者的職業很多是醫事防疫人員(有 39 人，占 34.2%)，或禽畜養殖業或屠宰、販賣、化製廠等作業人員、動物防疫人員(有 34 人，占 29.8%)，才會造成未打 H5N1 疫苗，體內已有保護力的狀況。而若以 160 為基準計算，打疫苗前的血清保護率為 16%，較為合理，因此抗體效價建議以 160 為基準。另外，打第一劑後 21 天的血清保護率，相較於打疫苗前有顯著上升，由 16% 上升至 63%，表示疫苗效果良好，體內有產生抗體。然而血清保護率在打完第二劑後六個月，反而是 61%，降低一點點，有可能打第二劑疫苗並沒有加強抗體的表現，或是打第二劑後的抗體於六個月後在體內減少。

而血清轉換率(Seroconversion rate)的結果可見疫苗效果良好，有 34~36% 的受試者打完疫苗後有四倍效價上升。

二、統計不良事件

1、在接種第一劑後，21 日內，接種部位有反應的共 24 位(21%)，包括紅腫痛癢等症狀；身體有不舒服的共 8 位(7%)，症狀包括疲倦、肌肉痛、眩暈。

2、在接種第二劑後，六個月內，接種部位有反應的共 6 位(5%)，包括紅腫痛癢等症狀；身體有不舒服的共 2 位(1.8%)，症狀包括頭痛、疲倦、肌肉痛、眩暈。

三、計畫執行期間遭遇的困難

1、關於計畫中提到使用疾管署剩餘檢體的數量，原來預計會有 260 位，但疾管

署回覆符合分讓條件者只有 183 位，加上我方有檢驗容量每位 0.5mL 之需求，實際分讓數量有所出入，未避免造成我們單位績效未達成的誤會，疾管署已同意我們提出計畫變更，更改剩餘檢體共 179 支。

2、計畫內容中有三次抽血，分別是打疫苗前，打疫苗後 21 天及半年後，由於第三次抽血時間會到 104 年 2 月，後續還需時間檢測檢體抗體，因此需延長計畫時間及經費使用時間，疾管署已同意我們提出計畫變更，更改計畫結束時間及經費使用時間為 104 年 4 月 30 日。

3、總共有 25 間醫療院所參與收案，一開始收案人數共 127 人，大於原訂 100 人是因為考慮到半年後回來第三次抽血，可能回收率不高，結果完成三次抽血人數共 114 人。造成人數落差原因，有些是抽血了才發現受試者已超過 65 歲，故無法納入研究，而大部分是半年後不願意回來抽血，或是不在台灣，無法回國抽血。

4、原訂計畫中，欲利用疾管署血清庫中過去曾接種 H5N1 疫苗者的血清，共 179 隻檢體，至 Novartis 實驗室建立血清抗體檢測之標準方式，研究期間持續與 Novartis 公司接洽，且已收到 Novartis 的合約書，本實驗室申請血清出口一事也通過了，但由於 Novartis 公司處於整合階段，內部忙碌，無暇接應，因此在計畫期間未能到 Novartis 實驗室觀摩學習，而未來仍會密切聯繫。

四、探討以假病毒檢測抗體的方法之可行性與準確性

傳統大部分用來檢測血清抗體的方法有兩種：hemagglutination inhibition

assay (HI) 或 microneutralization (MN) assay，但由於這兩種方法限制於使用材料需要活病毒，例如 H5N1 或 H7N9 病毒需要在生物安全等級 3 的實驗室(BSL-3)進行，增加實驗危險與困難。此研究建立假病毒中和試驗(pseudovirus-based neutralization assay)只需在生物安全等級 2 實驗室(BSL-2)進行，安全性與便利性都提高許多，但準確性與敏感度仍需要進一步實驗證實。有文獻比較 HI assay 與 pseudovirus-based neutralization assay 的結果，指出 pseudovirus-based neutralization assay 敏滿度較 HI assay 低。(Chao Qiu 2013)

伍、結論與建議

1. 發展以假病毒(pseudo-virus)方式，建立 H5N1 血清抗體檢測方法：

原訂計畫中，欲利用疾管署血清庫共 179 支剩餘檢體，至 Novartis 實驗室建立血清抗體檢測之標準方式，雖然研究期間持續與 Novartis 公司接洽，但由於 Novartis 公司處於整合階段，內部忙碌，無暇接應，因此在計畫期間未能到 Novartis 實驗室觀摩學習。然而，本實驗室透過清華大學吳夙欽教授的幫助，提供我們材料與教導實驗方法，並參考文獻，建立 H5N1 血清抗體檢測方法，完成剩餘檢體共 179 支的抗體檢測，以及 2014 年自願參加 H5N1 疫苗接種計畫的受試者共 114 人，包括其疫苗接種前、後 21 日及半年後的血清檢體，皆已完成抗體檢測。

2. 了解 H5N1 疫苗之血清保護率(Seroprotection rate)及血清轉換率(Seroconversion rate)並評估首次接種者接種後免疫反應狀況，及長期抗體追蹤：

抗體效價建議以 160 為基準，打疫苗前的血清保護率(**Seroprotection rate**)為 16%，較為合理。另外，打第一劑後 21 天的血清保護率，相較於打疫苗前有顯著上升，由 16% 上升至 63%，表示疫苗效果良好，體內有產生抗體。然而血清保護率在打完第二劑後六個月，反而降低為 61%。

血清轉換率(**Seroconversion rate**)的結果可見疫苗效果良好，有 34~36% 的受試者打完疫苗後有四倍效價上升。

3. 評估 H5N1 疫苗接種後不良事件發生情形。

在接種第一劑後，21 日內，接種部位有反應的共 24 位(21%)，包括紅腫痛癢等症狀；身體有不舒服的共 8 位(7%)，症狀包括疲倦、肌肉痛、眩暈。在接種第二劑後，六個月內，接種部位有反應的共 6 位(5%)，包括紅腫痛癢等症狀；身體有不舒服的共 2 位(1.8%)，症狀包括 頭痛、疲倦、肌肉痛、眩暈。

陸、重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

- (1) 建立 H5N1-假病毒(pseudo-virus)之血清抗體檢測方法。
- (2) 了解 H5N1 疫苗之血清保護率(Seroprotection rate)及血清轉換率(Seroconversion rate)並評估首次接種者接種後免疫反應狀況，及長期抗體追蹤。
- (3) 評估 H5N1 疫苗接種後不良事件發生情形。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

H5N1 疫苗效果良好，可鼓勵民眾施打 H5N1 疫苗。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

可以利用假病毒(pseudo-virus)之血清抗體檢測方法： pseudotyped micro-neutralization assay，進行抗體檢測，相較於利用活病毒的方法，更為安全，因為活的 H5N1 或 H7N9 病毒，必須在生物安全等級 3 的實驗室(BSL-3)操作，將來也可應用在 H7N9 或其他流感病毒株，檢測血清抗體，得知疫苗效果如何。

柒、期末審查意見回覆

1. 本研究所建立之假病毒中和抗體試驗(pseudotyped micro-neutralization assay)較利用活病毒之方法安全，建議於研究報告中詳述假病毒中和抗體試驗方法之完整實驗操作流程(如：luciferase activity 及 TCID50 之分析方法等)，提供疾管署或其他研究單位未來用於 H5N1 抗體檢測技術開發之參考及應用。

回覆：於第11~13頁已增加TCID50方法測訂及計算方式，另外也註明製備假病毒所使用的plasmid，HA sequence from **A/Thailand/1(KAN-1)/2004 (H5N1)**；NA sequence from **A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)**。

2. 建議將假病毒中和抗體試驗與以反向基因(reverse genetic)製造出之重組疫苗病毒株(reassortant vaccine virus)建立之中和試驗(Micro Neutralization assay)或血球凝集抑制試驗(HI assay)等方法的檢測結果進行評估比對。

回覆：利用其他方法進行評估比對是重要且必須要做的，但由於中和試驗或血球凝集抑制試驗方法皆需要活病毒才能進行，活病毒取得不易，且檢體數量不少，需時間及經費，可考慮未來與疾管署合作新的計畫來達成。

3. 建議修訂表格及圖表之呈現方式。

回覆：表格及圖表之呈現方式已修改。

4. 建議除以幾何平均數呈現抗體效價外，亦應將原始數據一併提供呈現，有助瞭解接種個案之抗體變化。

回覆：原始數據於附錄已新增，在第 42~46 頁。

5. 建議可根據問卷收集的資料作次分群的抗體效價分析，例如：性別、年齡、流感疫苗接種劑次等，並了解其接種 H5N1 疫苗前後之抗體效價變化情形。

回覆：已請公衛所杜裕康老師進行統計及迴歸分析，結果加入報告中第 29~32 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. Banzhoff, A., R. Gasparini, F. Laghi-Pasini, T. Staniscia, P. Durando, E. Montomoli, P. L. Capecchi, P. di Giovanni, L. Sticchi, C. Gentile, A. Hilbert, V. Brauer, S. Tilman and A. Podda (2009). "MF59-adjuvanted H5N1 vaccine induces immunologic memory and heterotypic antibody responses in non-elderly and elderly adults." *PLoS One* **4**(2): e4384.
2. Johnson, N. P. and J. Mueller (2002). "Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic." *Bull Hist Med* **76**(1): 105-115.
3. Kawaoka, Y., S. Krauss and R. G. Webster (1989). "Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics." *J Virol* **63**(11): 4603-4608.
4. Leroux-Roels, I., F. Roman, S. Forgue, C. Maes, F. De Boever, M. Drame, P. Gillard, R. van der Most, M. Van Mechelen, E. Hanon and G. Leroux-Roels (2010). "Priming with AS03 A-adjuvanted H5N1 influenza vaccine improves the kinetics, magnitude and durability of the immune response after a heterologous booster vaccination: an open non-randomised extension of a double-blind randomised primary study." *Vaccine* **28**(3): 849-857.
5. Octaviani, C. P., M. Ozawa, S. Yamada, H. Goto and Y. Kawaoka (2010). "High level of genetic compatibility between swine-origin H1N1 and highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses." *J Virol* **84**(20): 10918-10922.
6. Schwarz, T. F., T. Horacek, M. Knuf, H. G. Damman, F. Roman, M. Drame, P. Gillard and W. Jilg (2009). "Single dose vaccination with AS03-adjuvanted H5N1 vaccines in a randomized trial induces strong and broad immune responsiveness to booster vaccination in adults." *Vaccine* **27**(45): 6284-6290.
7. van der Velden, M. V., G. Aichinger, E. M. Pollabauer, A. Low-Baselli, S. Fritsch, K. Benamara,

- O. Kistner, M. Muller, M. Zeitlinger, H. Kollaritsch, T. Vesikari, H. J. Ehrlich and P. N. Barrett (2012). "Cell culture (Vero cell) derived whole-virus non-adjuvanted H5N1 influenza vaccine induces long-lasting cross-reactive memory immune response: Homologous or heterologous booster response following two dose or single dose priming." Vaccine.
8. Van Kerkhove, M. D., E. Mumford, A. W. Mounts, J. Bresee, S. Ly, C. B. Bridges and J. Otte (2011). "Highly pathogenic avian influenza (H5N1): pathways of exposure at the animal-human interface, a systematic review." PLoS One **6**(1): e14582.
 9. Vesikari, T., A. Forsten, A. Borkowski, N. Gaitatzis, A. Banzhoff and R. Clemens (2012). "Homologous and heterologous antibody responses to a one-year booster dose of an MF59 ((R)) : Adjuvanted A/H5N1 pre-pandemic influenza vaccine in pediatric subjects." Hum Vaccin Immunother **8**(7).
 10. WHO (2010). "WHO recommendations for the post-pandemic period."
 11. World Health Organization. (2007). "Global stockpile of H5N1 vaccine 'feasible'." from <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr21/en/>.
 12. World Health Organization. (2007). "Questions and answers on pandemic influenza vaccine." from http://www.who.int/immunization/newsroom/PI_QAs/en/index.html.
 13. World Health Organization. (2012). "Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine virus for pandemic preparedness." from http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/characteristics_virus_vaccines/en/.
 14. World Health Organization. (2012). "Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2012." from http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20120706CumulativeNumberH5N1cases.pdf
 15. Chao Qiu, Yang Huang, Anli Zhang, Di Tian, Yanmin Wan, Xiaoling Zhang, Wanju Zhang, Zhiyong Zhang, Zhenghong Yuan, Yunwen Hu, Xiaoyan Zhang, and Jianqing Xu :Safe Pseudovirus-based Assay for Neutralization Antibodies against Influenza A(H7N9) Virus. *Emerg Infect Dis*. 2013 Oct; 19(10): 1685 – 1687.

玖、圖、表。

附錄：研究調查問卷、法規及其他重要資料均應列為研究報告附錄。

一、利用 H5N1-pseudotyped micro-neutralization assay 檢測抗體之原始數據

(1)疾管署血清庫之剩餘檢體，共 179 支檢體。

編號	titer	編號	titer	編號	titer	編號	titer	編號	titer
AI0004	160	AI0200	320	AI0424	80	AI0875	320	AI1021	640
AI0015	160	AI0207	160	AI0452	80	AI0878	160	AI1035	160
AI0021	320	AI0215	80	AI0453	160	AI0882	80	AI1036	160
AI0024	80	AI0246	80	AI0485	80	AI0888	80	AI1040	320
AI0025	160	AI0249	160	AI0502	80	AI0889	80	AI1052	40
AI0035	160	AI0260	320	AI0507	640	AI0890	80	AI1056	160
AI0105	320	AI0267	20	AI0510	160	AI0895	160	AI1067	80
AI0106	320	AI0274	10	AI0528	80	AI0899	160	AI1070	160
AI0111	320	AI0280	80	AI0622	80	AI0902	80	AI1215	320
AI0115	80	AI0281	160	AI0665	160	AI0904	80	AI1218	320
AI0154	10	AI0283	160	AI0678	80	AI0921	80	AI1219	80
AI0155	160	AI0284	160	AI0693	160	AI0944	320	AI1220	320
AI0158	160	AI0285	160	AI0695	40	AI0948	160	AI1221	320
AI0159	160	AI0286	160	AI0703	160	AI0949	160	AI1222	160
AI0163	160	AI0288	80	AI0705	40	AI0952	160	AI1223	80
AI0165	160	AI0289	80	AI0706	80	AI0958	160	AI1239	80
AI0166	160	AI0290	320	AI0707	160	AI0974	160	AI1244	40
AI0167	640	AI0291	80	AI0712	160	AI0976	40	AI1245	80
AI0168	80	AI0311	320	AI0815	160	AI0978	640	AI1246	40
AI0169	160	AI0341	320	AI0819	160	AI1005	80	AI1248	80
AI0170	80	AI0343	160	AI0823	80	AI1007	160	AI1250	160
AI0180	160	AI0345	320	AI0828	40	AI1008	160	AI1351	40
AI0193	160	AI0348	160	AI0870	160	AI1014	160	AI1352	40
AI0196	320	AI0349	320	AI0873	320	AI1020	320	AI1354	80

編號	titer	編號	titer	編號	titer
AI1355	40	AI1466	40	AI1630	160
AI1356	40	AI1470	160	AI1631	80
AI1359	80	AI1471	160	AI1632	80
AI1360	80	AI1492	80	AI1654	160
AI1366	160	AI1500	80	AI1668	160
AI1370	80	AI1524	40	AI1673	160
AI1371	80	AI1530	80	AI1676	160
AI1373	40	AI1535	160	AI1683	160
AI1375	40	AI1554	80	AI1686	320
AI1379	40	AI1555	160	AI1689	80
AI1385	5	AI1565	160	AI1697	160
AI1393	40	AI1566	160		
AI1394	80	AI1574	320		
AI1401	80	AI1576	160		
AI1405	40	AI1577	80		
AI1408	80	AI1579	160		
AI1409	40	AI1599	5		
AI1443	160	AI1611	80		
AI1453	40	AI1614	40		
AI1454	80	AI1615	160		
AI1455	80	AI1622	160		
AI1456	80	AI1623	160		
AI1457	80	AI1625	320		
AI1462	80	AI1626	80		

(2)由自願參與 2014 年 H5N1 疫苗接種計畫之參與者中，收案共 114 人參與此研究，此 114 人為首次接種 H5N1 流感疫苗者。於疫苗接種前、後 21 日及半年後分別採集血液，共 342 支檢體。

受試者編號	第一次抽血 titer	第二次抽血 titer	第三次抽血 titer
AA001	40	320	320
AA002	160	160	160
AA004	80	320	160
AA005	40	160	160

AA006	80	160	160
BA001	20	160	320
BB001	80	160	160
BB002	80	160	80
BB003	40	40	80
BB004	80	160	80
BB005	80	160	160
BB006	80	80	80
BB007	40	80	160
BB008	80	160	80
BB009	160	160	160
BB010	20	80	160
CA001	160	160	160
CB001	40	160	160
CB002	160	320	160
CC001	40	80	320
CD001	80	320	320
CE001	80	320	160
CE002	80	320	160
CF001	40	80	160
CG001	160	160	320
CG002	80	320	320
CH001	160	160	160
DA001	10	80	80
DA002	80	160	320
DA003	5	40	80
DA004	80	80	80
DA005	80	80	80
DA006	5	40	80
DA007	160	160	160
DA008	5	80	80
DA009	40	80	80
DA011	80	320	160
DA012	320	640	320
DB002	80	160	80
DB006	80	320	320
DC001	80	80	160

DC002	80	160	160
DC003	20	80	160
DD001	80	160	160
DD002	80	80	80
DD004	80	160	80
DD006	5	40	40
DD007	80	80	80
DD008	80	320	320
DD009	80	160	80
DD010	80	160	160
DD011	160	160	160
DD012	80	80	80
DF002	40	80	80
DF003	40	40	80
DF004	20	80	80
DF005	80	160	160
DF006	80	320	160
DF007	80	80	80
DF008	80	160	320
DF009	80	160	160
DF010	40	160	80
DF011	40	40	80
DF012	40	160	80
EA001	10	80	160
EA002	160	320	160
EA003	40	160	160
EA004	80	640	640
EA005	80	80	160
EA006	80	80	80
EA007	10	160	160
EA008	80	320	640
EA009	160	320	160
EA010	10	80	80
FA001	160	160	160
FA002	40	80	160
FA003	10	40	80
FA004	40	160	80

FA005	80	80	80
GA001	160	320	160
GA002	80	160	80
GA003	80	160	160
GA004	80	160	160
GB001	80	160	80
GB002	80	160	160
GB004	160	160	160
HA001	160	160	160
HA002	80	80	80
HA003	80	320	160
HA004	80	80	80
JA001	80	160	160
JA002	40	40	40
JA003	80	160	160
JA004	40	160	160
JA005	20	40	80
JA006	5	80	80
JA007	10	40	80
JA008	40	80	80
JA009	40	80	160
JB001	40	80	80
JB002	80	640	320
JB004	160	320	320
JB005	40	80	80
JC001	40	160	160
JC002	40	160	160
JC003	80	320	160
JC004	40	160	160
JC005	160	160	160
JC006	80	160	160
JC007	80	320	160
KA001	40	80	80
KA002	80	160	160
KA003	160	320	320
KA004	10	160	80