

計畫編號：DOH100-DC-1015

行政院衛生署疾病管制局 100 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

結案報告

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、黃璫寧、蘇韋如

研究人員：賴美汝

執行期間：100 年 1 月 1 日至 100 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	14
肆、討論	28
伍、結論與建議	35
陸、計畫重要研究成果及具體建議	36
柒、委員審查意見與回覆	37
捌、參考文獻	41

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，可推測當年流行的流感病毒株。本計畫第一部分：從 100 年 8 月至 10 月收集 70 位(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；第二部分，從 99 年 9 月收集不打疫苗共 24 位幼兒，抽血兩次且每月追蹤其健康情形至 100 年 4 月，並分析其抗體變化情形。

第一部分結果數據顯示，對 **B/Taiwan/5806/2011(Yam)** 本土株的血清保護率最低，只有 49%，推測今年可能流行 Flu B 病毒，結果仍有待觀察。

第二部分，不打疫苗的 24 位幼兒，在流感季過後發現其 GMT 值及血清保護率皆有上升情形，以 H1N1 及 H3N2 病毒株較明顯，推測幼兒大部分接觸到的是 H1N1 及 H3N2 病毒株；另一方面，藉由第一次抽血所測得的 MN titer 160 其 protection rate 為 100%，因此 MN titer 大於等於 160 也許可作為具有保護力的 cut off 值。

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 could predict the upcoming epidemic strains, especially using local circulating influenza strain as antigens. In the first part of this project, we have recruited 70 children (2~5 years old) from August 2011 to October 2011 to detect their antibody response against vaccine strains and local strains before vaccination. In the second part, we have recruited 24 non-vaccinated children to track their health status every month, and to analyze their antibody changes, from September 2010 to April 2011.

The results of the first part showed that the lowest seroprotection rate was B/Taiwan/5806/2011 (Yam) which was only 49%. This virus strain might be the dominantly circulating subtype in 2011, but the results are still to be seen.

The results of the second part show that the GMT values and the seroprotection rates of the 24 non-vaccinated children rose after flu season. Antibody titers against H1N1 and H3N2 virus strains were frequently elevated, suggesting that most children might have been exposed to the H1N1 and H3N2 viruses strains in flu season. On the other hand, none with MN titers greater than or equal to 160 got flu-like illness and this might be the cut-off value for protection.

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。

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。

本計畫第一部分：從 100 年 8 月至 10 月收集 70 位(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；第二部分，從 99 年 9 月收集不打疫苗共 24 位幼兒，抽血兩次且每月追蹤其健康情形至 100 年 4 月，並分析其抗體變化情形。

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：本計畫從 100 年 8 月開始徵求二~五歲的兒童 70 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) (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：

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四株本土流感抗原：

A/Taiwan/8492/2011(H1N1) ； A/Taiwan/8214/2011 (H3N2)

B/Taiwan/5806/2011(Yam) ； B/Taiwan/3766/2011(Vic)

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)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

→ $(\text{平均 VC well 數 OD 值}) - (\text{平均 CC well 數 OD 值}) / 2 + (\text{平均 CC well 數 OD 值}) = X$

→ $X = 50\%$ 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。 (14)

參、結果

1、臨床收案部份

研究對象

本計畫從 100 年 8 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 70 名兒童已收畢，受試者基本資料列於 Table 1。

Table 1 Demographic characteristics of the subjects pre-vaccination (2011 年 8 月~10 月收案)

Group	No. of subjects	Age (year)	
		Mean (month)	Range(month)
child			
All subjects	70	29	12~60
Female	31		
Male	39		

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/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 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 70 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 Table 2-1、Table 2-2。

Table 2-1 結果顯示，相較於 H1N1 和 H3N2，Flu B 的 GMT 值偏低，是 33.5，而且可以看到 Table 2-2 中，Flu B 的血清保護率 54%是最低的，表示收案 70 位幼兒平均對於 Flu B 疫苗株其體內抗體最低，但從總體的結果看來，此三株疫苗株的血清保護率皆未低於三成，表示大部分的幼兒皆具有保護力；其中 H1N1 的血清保護率有 81%，H3N2 的血清保護率有 94%，高達八~九成的幼兒體內對 H1N1 及 H3N2 疫苗株有抗體。

Table 2-1 Geometric mean HAI antibody titers (Aventis-標準抗原)

(2011年8月~10月收案)

Child group (N=70)

Geometric mean titer	
A/California/07/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	49.2
A/Victoria/210/2009(H3N2)	
Pre-vaccination	80.8
B/Brisbane/60/2008	
Pre-vaccination	33.5

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

(2011年8月~10月收案)

Child group (N=70)

Seroprotection rate (%)	
A/California/07/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	81%
A/Victoria/210/2009(H3N2)	
Pre-vaccination	94%
B/Brisbane/60/2008	
Pre-vaccination	54%

3、利用 2011 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四株本土流感抗原：

A/Taiwan/8492/2011(H1N1)；A/Taiwan/8214/2011 (H3N2) ；

B/Taiwan/5806/2011(Yam) ；B/Taiwan/3766/2011(Vic)

今年較特別的地方是疾管局提供兩株 FluB 病毒流行株，皆加以分析。施打疫苗前的抗體效價分析，幼兒組共 70 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)其分析結果分別列於 Table 3-1、3-2。

Table 3-1 結果顯示，幼兒打疫苗前對於本土流行株：

B/Taiwan/5806/2011(Yam)，其 GMT 值最低，只有 29.4，而血清保護率的部分(Table 3-2)，同樣顯示幼兒對 B/Taiwan/5806/2011(Yam)本土株的血清保護率最低，只有 49%；對於 H1N1 本土株及 H3N2 本土株的血清保護率較高分別有 71%及 79%。

除了以上 HAI assay 的結果外，本計劃利用 **A/Taiwan/8492/2011(H1N1)** 及 **A/Taiwan/8214/2011 (H3N2)** 進行 MN assay (Micro-Neutralisation assay) 檢測分析抗體效價，其分析結果分別列於 Table 3-3~3-4。結果顯示兩株病毒的 GMT 值和血清保護率相近，無太大差別。

Table 3-1 Geometric mean HAI antibody titers(本土流行株)

(2011 年 8 月~10 月收案)

Child group (N=70)	
Geometric mean titer	
A/Taiwan/8492/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	37.3
A/Taiwan/8214/2010(H3N2)	
Pre-vaccination	41.2
B/Taiwan/3766/2010(Vic)	
Pre-vaccination	33.5
B/Taiwan/5806/2010(Yam)	
Pre-vaccination	29.4

Table 3-2 Seroprotection rate (本土流行株)

(2011 年 8 月~10 月收案)

Child group (N=70)	
Seroprotection rate (%)	
A/Taiwan/8492/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	71%
A/Taiwan/8214/2010(H3N2)	
Pre-vaccination	79%
B/Taiwan/3766/2010(Vic)	
Pre-vaccination	59%
B/Taiwan/5806/2010(Yam)	
Pre-vaccination	49%

Table 3-3 Geometric mean MN antibody titers(本土流行株)

(2011年8月~10月收案)

MN assay	Child group (N=70)
Geometric mean titer	
A/Taiwan/8492/2009(H1N1)	
Pre-vaccination	63
A/Taiwan/8214/2010(H3N2)	
Pre-vaccination	67.6

Table 3-4 Seroprotection rate (本土流行株)

(2011年8月~10月收案)

MN assay	Child group (N=70)
Seroprotection rate (%)	
A/Taiwan/8492/2009(H1N1)	
Pre-vaccination (MN titer ≥ 80)	39%
Pre-vaccination (MN titer ≥ 160)	26%
A/Taiwan/8214/2010(H3N2)	
Pre-vaccination (MN titer ≥ 80)	47%
Pre-vaccination (MN titer ≥ 160)	27%

4、從 2010 年 9 月至 2011 年 4 月持續追蹤 24 位幼兒健康狀況並分析抗體效價部份

本實驗室從 2010 年 9 月至 2011 年 4 月徵求不打疫苗之受試者，共收案 24 人(健康且年紀在 12 至 60 個月兒童)。2010 年 9 月開始收集此 24 位幼兒的血清(第一次抽血)，過了 4 個月後再收集血清(第二次抽血)，並在這四個月中每月追蹤一次，以電話訪問及記錄此 24 人的健康狀況，若有類流感症狀來門診看病的受試者會留下喉嚨檢體，受試者基本資料列於 Table 4-1，平均年齡為 24 個月。

所收集 24 位的血清利用 2010 年的標準疫苗株(由安萬特疫苗廠提供):

A/California/07/2009 (H1N1) ; A/Victoria/210/2009 (H3N2) ;

B/Brisbane/60/2008

及 2010 年的本土流行株病毒(由疾管局提供):

A/Taiwan/5347/2010 (H1N1) ; A/Taiwan/3869/2010 (H3N2) ;

B/Tiwan/3591/2010

進行 HAI assay，並利用 **A/Taiwan/5347/2010 (H1N1)** 進行 MN assay (Micro-Neutralisation assay) 檢測分析抗體效價。其分析結果分別列於 Table 4-2~4-9。

實驗數據以幾何平均抗體效價 Geometric mean titer (GMT)、血清保護率(seroprotection rate) 及血清轉換率(seroconversion rate)來分析第一次抽血

和第二次抽血的抗體效價。首先看到 Table 4-2 中，對於標準疫苗株的幾何平均抗體效價(GMT)，第二次抽血的 GMT 值皆有上升的情形；Table 4-3 中顯示第一次抽血的血清保護率皆滿高的，表示大部分的幼兒已具抗體，尤其對於 H3N2 在第二次抽血檢測的抗體更是高達 100%，而 FluB 的血清保護率相較於另外兩株是最低的；Table 4-4 顯示血清轉換率的結果，以 H1N1 的血清轉換率最高，有 17%的幼兒其抗體效價有四倍上升的情形。

對於本土流行株的 GMT 值結果在 Table 4-5，相較於另外兩株，以 FluB 的 GMT 值最低；Table 4-6 中，第一次抽血的血清保護率以 H1N1 最低，只有 4%，然而第二次抽血的血清保護率以 Flu B 最低，只有 17%；Table 4-7 中看到血清轉換率的結果，以 H1N1 最高，有 21%，H3N2 有 17%，而 FluB 最低，只有 4%。暗示有可能在這四個月中，此 24 位幼兒大部分接觸到的是 H1N1 及 H3N2 病毒株，所以第二次抽血血清抗體上升的情形較明顯。

另一方面，對於本土流行株 H1N1 的 MN assay 結果也顯示第二次抽血的 GMT 值有上升(Table 4-7)，且血清保護率不管是 MN titer 大於等於 80 或 160，同樣皆有上升的情形(Table 4-8)，而血清轉換率有 25%(Table 4-9)，和 HAI assay 的結果相似。

Table 4-1 Demographic characteristics of the subjects

99年9月~100年4月收案追蹤 24 位幼兒

Group	No. of subjects	Age (year)	
		Mean (month)	Range(month)
child			
All subjects	24	24	12~60
Female	13		
Male	11		

Table 4-2 Geometric mean HAI antibody titers(標準疫苗株)

99年9月~100年4月收案追蹤 24 位幼兒

Child group (N=24)		
Geometric mean titer (HAI assay)	第一次抽血	第二次抽血
標準抗原(Aventis提供):		
A/California/07/2009(H1N1)	31.7	67.3
A/Victoria/210/2009(H3N2)	65.4	97.9
B/Brisbane/60/2008	35.6	51.9

Table 4-3 Seroprotection rate (標準疫苗株)

99年9月~100年4月收案追蹤 24 位幼兒

Child group (N=24)		
Seroprotection rate (%) (HAI assay)	第一次抽血	第二次抽血
標準抗原(Aventis提供):		
A/California/07/2009(H1N1)	71%	92%
A/Victoria/210/2009(H3N2)	96%	100%
B/Brisbane/60/2008	67%	88%

Table 4-3 Seroconversion rate (標準疫苗株)

99年9月~100年4月收案追蹤 24 位幼兒

Child group (N=24)	
Seroconversion rate (%) (HAI assay)	
標準抗原(Aventis提供):	
A/California/07/2009(H1N1)	17%
A/Victoria/210/2009(H3N2)	8%
B/Brisbane/60/2008	8%

Table 4-4 Geometric mean HAI antibody titers(本土流行株)

99年9月~100年4月收案追蹤 24 位幼兒

Child group (N=24)		
Geometric mean titer (HAI assay)	第一次抽血	第二次抽血
本土流行株(CDC提供):		
A/Taiwan/5347/2010(H1N1)	16.8	35.6
A/Taiwan/3869/2010(H3N2)	25.9	43.6
B/Taiwan/3591/2010	14.1	21.8

Table 4-5 Seroprotection rate (本土流行株)

99年9月~100年4月收案追蹤 24 位幼兒

Child group (N=24)		
Seroprotection rate (%) (HAI assay)	第一次抽血	第二次抽血
本土流行株(CDC提供):		
A/Taiwan/5347/2010(H1N1)	4%	29%
A/Taiwan/3869/2010(H3N2)	38%	79%
B/Taiwan/3591/2010	13%	17%

Table 4-6 Seroconversion rate (本土流行株)

99年9月~100年4月收案追蹤 24 位幼兒

Child group (N=24)	
Seroconversion rate (%) (HAI assay)	
本土流行株(CDC提供):	
A/Taiwan/5347/2010(H1N1)	21%
A/Taiwan/3869/2010(H3N2)	17%
B/Taiwan/3591/2010	13%

Table 4-7 Geometric mean MN antibody titers(本土流行株)

99年9月~100年4月收案追蹤 24 位幼兒

Child group (N=24)		
Geometric mean titer (MN assay)	第一次抽血	第二次抽血
本土流行株:		
A/Taiwan/5347/2010(H1N1)	29.1	67.3

Table 4-8 Seroprotection rate (本土流行株)

99年9月~100年4月收案追蹤 24 位幼兒

Child group (N=24)

Seroprotection rate (%)	第一次抽血	第二次抽血
A/Taiwan/5347/2010(H1N1)		
Pre-vaccination (MN titer ≥ 80)	29%	50%
Pre-vaccination (MN titer ≥ 160)	8%	38%

Table 4-6 Seroconversion rate (本土流行株)

99年9月~100年4月收案追蹤 24 位幼兒

Child group (N=24)

Seroconversion rate (%) (MN assay)	
本土流行株(CDC提供):	
A/Taiwan/5347/2010(H1N1)	25%

肆、討論

一、比較 70 位幼兒對本土流行株及標準疫苗株之 GMT 值和血清保護率

(Table 5-1, Table 5-2)

由 Table 5-1 可以看到 2011 年 8~10 月收集的 70 位幼兒對本土流行株及標準疫苗株之 GMT 值結果的比較，除了 H3N2 差異較大之外，兩者並無太大差異，Flu B 的 GMT 值皆偏低，H3N2 的 GMT 值皆較高。

在血清保護率方面，Table 5-2 可以看到，對 B/Taiwan/5806/2011(Yam) 本土株的血清保護率是最低的，只有 49%，推測在 2010~2011 年的流感季可能流行 FluB 病毒株，結果仍有待觀察。

Table 5-1 Geometric mean HAI antibody titers

(2011年8月~10月----比較本土流行株及標準疫苗株)

Child group (N=70)		
Geometric mean titer	本土流行株	標準疫苗株
A/Taiwan/8492/2009(H1N1)		A/California/07/2009(H1N1)
Pre-vaccination	37.3	49.2
A/Taiwan/8214/2010(H3N2)		A/Victoria/210/2009(H3N2)
Pre-vaccination	41.2	80.8
B/Taiwan/3766/2010(Vic)		B/Brisbane/60/2008
Pre-vaccination	33.5	33.5
B/Taiwan/5806/2010(Yam)		
Pre-vaccination	29.4	

Table 5-2 Seroprotection rate

(2011年8月~10月----比較本土流行株及標準疫苗株)

Child group (N=70)		
Seroprotection rate (%)	本土流行株	標準疫苗株
A/Taiwan/8492/2009(H1N1)		A/California/07/2009(H1N1)
Pre-vaccination	71%	81%
A/Taiwan/8214/2010(H3N2)		A/Victoria/210/2009(H3N2)
Pre-vaccination	79%	94%
B/Taiwan/3766/2010(Vic)		B/Brisbane/60/2008
Pre-vaccination	59%	54%
B/Taiwan/5806/2010(Yam)		
Pre-vaccination	49%	

二、整理從 95 年度到 100 年度幼兒打疫苗前血清對本土流行株之血清保護率 (Table 6)

Table 6 是整理 95 年度到 100 年度的血清保護率結果。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 Table 6 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)。

而今年(2011 年)以 FluB 的血清保護率較其他病毒株低，是否今年會流行 FluB 仍有待觀察，但推測有可能會流行 FluB 病毒株。

Table 6 95~100年度幼兒對本土流行株之血清保護率

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

三、比較 24 名幼兒，針對 H1N1 本土流行株所做 HAI assay 及 MN assay 的 GMT 值、血清保護率及血清轉換率

比較 HAI assay 和 MN assay 所分析的結果(Table 7)，兩種分析方法所得 GMT 值、血清保護率及血清轉換率無太大差異，可以看出第二次抽血的抗體有上升的情形。其中注意到，血清保護率 MN titer 以大於等於 160 更為接近 HAI assay 的結果。

Table 7 比較HAI assay 和MN assay

Child group (N=24)				
本土流行株: A/Taiwan/5347/2010(H1N1)	HAI		MN	
	第一次 抽血	第二次 抽血	第一次 抽血	第二次 抽血
Geometric mean titer	17.3	35.6	29.1	67.3
Seroprotection rate(%)				
(MN with titer ≥ 80 HAI with titer ≥ 40)	4%	29%	29%	50%
(MN with titer ≥ 160 HAI with titer ≥ 40)	4%	29%	8%	38%
Seroconversion rate(%)	21%		25%	

四、探討 24 名幼兒在追蹤期間有感冒症狀者的血清轉換率

統計分析此 24 名幼兒，在追蹤期間共有 13 名幼兒有感冒症狀，例如咳嗽、發燒、流鼻水等，又 13 名幼兒的 HAI assay 結果中，第二次抽血血清抗體大於四倍效價上升的有 5 人，佔 38%；而 MN assay 結果中，第二次抽血血清抗體大於四倍效價上升的有 6 人，佔 46%，推測當年 H1N1 流行性感冒盛行率佔呼吸道感染約 38%-46%之間(Table 8)。另一點值得注意的是，有四倍效價上升的受試者在追蹤期間都有感冒症狀。

Table 8 探討24名幼兒在追蹤期間有感冒症狀者的血清轉換率

	Child group (N=24)		有感冒症狀者 (N=13)	
Seroconversion rate (%)				
本土流行株(CDC提供):	HAI	MN	HAI	MN
A/Taiwan/5347/2010(H1N1)	21%	25%	38%	46%

五、針對 H1N1 病毒株，探討 24 名幼兒其第一次抽血的 HAI assay 及 MN assay 結果，血清抗體效價是否具有保護效力

1. 利用標準抗原(Aventis 提供)所做的 HAI assay 結果(第一次抽血)中:

HAI titer 40 的 protection rate 為 **83%** (15/18)，只有三個人生病

HAI titer 80 的 protection rate 為 **100%**(2/2)

2. 利用本土流行株病毒(CDC 提供)所做的 HAI assay 結果(第一次抽血)中:

HAI titer 40 的 protection rate 為 **100%** (1/1)

對標準疫苗株的 HAI titer 大於等於 40 有 18 人，對本土流行株 HAI titer 大於等於 40 卻只有 1 人。造成兩者之間的差異可能是幼兒對於疫苗株的保護力不一定等於本土流行株，即便兩個病毒是如此相似，很值得進一步探究原因。

另一方面，利用本土流行株病毒(CDC 提供)所做的 MN assay 結果(第一次抽血)中： MN titer 40 的 protection rate 為 88% (8/9) ； MN titer 80 的 protection rate 為 85% (6/7) ； MN titer 160 的 protection rate 為 100% (2/2)，由 MN assay 結果看來，MN titer 大於等於 160 也許可作為具有保護力的 cut off 值。

伍、結論與建議

1. 今年(2011年)以 FluB 的血清保護率較其他病毒株低，是否今年會流行 FluB 仍有待觀察，但推測有可能會流行 FluB 病毒株。
2. 從 99 年 9 月收案不打疫苗的 24 位幼兒，每月追蹤其健康情形至隔年 4 月，發現在流感季過後其 GMT 值及血清保護率皆有上升情形，以 H1N1 及 H3N2 病毒株較明顯，推測幼兒大部分接觸到的是 H1N1 及 H3N2 病毒株。
3. 藉由第一次抽血所測得的 MN titer 160 其 protection rate 為 100%，因此 MN titer 大於等於 160 也許可作為具有保護力的 cut off 值。

陸、重要研究成果及具體建議

1.計畫之新發現或新發明

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.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

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。

柒、委員審查意見與回覆

100 年度期中報告之委員審查意見

1. 對推斷幼兒血清保護率以預測當年或下季可能流行株有正面助益，且有利民眾衛教推廣。
2. 經過多年計畫執行成果，累積的數據愈來愈可證實幼兒血清保護率之結果，可用來精確推測當年可能流行病毒株的趨勢。
3. 今年追加追蹤疫苗接種前後抗體變化情形與是否有類流感症狀產生，希望能有所成果供政策參考。
4. 計畫中原定收集 60 位幼兒，進行 Flu A, B 盛行株抗體分析，現已收集 90 位，超過進度。分析結果顯示，90 位幼兒對 pandemic H1N1、seasonal H3N2 或 Flu B 的中和保護抗體仍然相當低。
5. 今年（2011 年）施打疫苗或流行季後的抗體，很值得參考。
6. HAI 與 MN 比較能依研究進行，提供研擬檢測標準參考。
7. 請補充關於去年 7-9 月收的 60 個與後面 9-11 月收的 30 個案例之分析比較(以看出流感季前後流行株之差異)。

回覆: 補充 Table 9-1 和 Table9-2，結果顯示從 99 年 7-9 月收案 60 名及從 99 年 9-11 月收案 30 名的分析比較，可以看出對 H3N2 本土株的 GMT 值和血清保護率有相對上升的情形，而相反的，對 FluB 的 GMT 值和血清保

護率有相對降低的趨勢，流感季前後有差異，但不明顯。

Table 9-1 Geometric mean HAI antibody titers

(比較流感季前後流行株之差異)

	Child group (N=60) (2010年7~9月)	Child group 增加30位 (2010年9~11月)
Geometric mean titer	本土流行株	
A/Taiwan/5347/2010(H1N1)		
Pre-vaccination	16.1	20.9
A/Taiwan/3869/2010(H3N2)		
Pre-vaccination	24.9	38.2
B/Taiwan/3591/2010		
Pre-vaccination	23	20.9

Table 9-2 Seroprotection rate

(比較流感季前後流行株之差異)

	Child group (N=60) (2010年7~9月)	Child group 增加30位 (2010年9~11月)
Seroprotection rate (%)	本土流行株	
A/Taiwan/5347/2010(H1N1)		
Pre-vaccination	17%	23%
A/Taiwan/3869/2010(H3N2)		
Pre-vaccination	32%	47%
B/Taiwan/3591/2010		
Pre-vaccination	32%	23%

100 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) 就幼兒、兒童對流感病毒中和抗體的追蹤調查，可支持抗體陽性率之消長，對預測來年流行，有良好的正確率。
- (2) 對建立常態流感疫苗效益監測之貢獻狀況，宜由 CDC 分析其效益。並針對建立 CDC 與研究單位合作機制，可列入參考評估。
- (3) 此項計畫已延續多年，相關的分析技術與技巧已非常成熟，建議應該回歸到常規疫情分析的部分。此計畫應該功成身退，順勢退場。
- (4) 幼兒的血清保護率與流行的流感病毒型別高度相關。
- (5) 根據實驗結果，明年流感是淡季，最可能流行 B Yamagata.

2. 需修正之部分：

- (1) 已達需求例數（兒童），請持續。
- (2) 方法學上 MN 及 HI 的比較，可以加強說明。
- (3) 建議連結監測體系及群聚感染之疫調系統，回歸疾管局，並將此階段的累積資料與經驗轉植成 CDC 之偵測作為，拓展功能。
- (4) 將 70 名幼兒打疫苗前 MN 數據補齊。

3. 特殊績效：

- (1) 參考 herd immunity。
- (2) 推斷幼兒血清保護率以預測可能流行趨勢有策略運用之參考價值。

4. 對本計畫 101 年繼續執行相關意見：

- (1) 為持續性研究，偵測兒童抗流感病毒效價，擬予同意。
- (2) 連續計畫之執行，累積資料與經驗，對防疫作為處置上有正面效益。

(3) 此項計畫性質偏向藥廠 postmarket surveillance，在此執行尚有很多問題必須事先釐清。理論上這類上市產品的效價應由藥廠提供資料。但評估幼兒使用疫苗以後的有效性問題也有其需求，建議其重提計畫與合作對象。

回覆:

1、已完成打疫苗前共 70 位幼兒的 MN assay，結果列在 Table 3-3、3-4。

2、方法學上 MN 及 HI 的比較:

MN assay 和 HI assay 在方法上最大的不同有兩點，第一點是 MN assay 有充足時間的 virus-antibody reaction，讓抗體可以和病毒起中和作用，第二點就是 MN assay 有一個 inoculation step，virus-antibody mixture 在適當的環境中(MDCK cell)作用。

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, Kioumehri 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