

計畫編號：DOH95-DC-1403

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

流感疫苗研究發展計畫--流行病學分支計畫：我國流感病毒抗體監測系統之建立
Research and development of influenza virus vaccine- epidemiological branch project:
establishment of serological surveillance system of influenza virus in Taiwan

研究報告

執行機構：中山醫學大學附設醫院

計畫主持人：陳志豪

協同主持人：曹世明、陳豐霖

研究人員：李原地、紀有財

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目錄

	頁 碼
中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
前言	(5)
材料與方法	(9)
結果	(13)
討論	(15)
結論與建議	(17)
參考文獻	(18)
圖一至圖三	(22)
表一至表六	(25)
附錄一	(31)
附錄二	(34)
附錄三	(37)

中文摘要

本計畫之目的是針對中部地區幼童、成人及老人於每年接種疫苗前後各抽一次血，分離血清後，以當季疫苗株及本土流行株等流感病毒抗原，利用血球凝集抑制試驗(Hemagglutination inhibition test; HAI)來測定不同族群個體 HAI 抗體效價，並利用血清中和試驗 (Serum neutralization test) 計算中和指數(Neutralization index)，以瞭解我國主要流行株在社區人群中之感染狀況以及是否已產生保護力。到目前為止，已經如期收集完成人族群及老人族群各 30 個流感疫苗接種前及接種後三週的血清(共 120 個血清)並完成血球凝集抑制試驗。抗體效價以計算其幾何平均值(GMTs)、seroconversion rates、seroconversion factors 及 seroprotection rates 等數據分析。由 GMTs 結果顯示施打流感疫苗後，兩個族群的 GMTs 均有不同程度的增加。另外，seroconversion factors 亦顯示兩個族群均達到 CPMP 所要求之標準。相反地，老人族群的 seroconversion rates 均大於 30%，但成人族群則祇有針對 A/Taiwan/083/2006 (H3N2)的 seroconversion rate 能大於 40%。當施打完流感疫苗三週後，兩個族群的 seroprotection rates 均可達 70 to 100%。

中文關鍵詞(至少三個)：流感、疫苗接種、抗體力價

英文摘要

The aim of this project is to evaluate the antibody titers against influenza viruses among three populations including children, adults, and geriatric age groups. For each individual, blood is collected before and after they receive influenza virus vaccination. After serum isolation, hemagglutination inhibition (HAI) test and serum neutralization test are applied to assay the HAI titers and neutralization index of each individual against the influenza viruses. The results will reflect the efficacy of the vaccination program of influenza virus in our country. To date, total 120 sera (including pre-vaccination and post-vaccination) were collected from 30 adult and 30 geriatric volunteers. The HAI tests were completed and the antibody titers of both groups were analyzed by geometry mean titers (GMTs), seroconversion rates, seroconversion factors and seroprotection rates. The results indicated that the GMTs of both groups were increased after vaccination. The seroconversion factors indicated that the immune status of both groups fitted the criteria of CPMP. In contrast, the seroconversion rates of elders group were greater than 30% while only the rate of adults group against A/Taiwan/083/2006 (H3N2) were greater than 40%. The seroprotection rates of both groups ranged from 70 to 100% after vaccination of the trivalent influenza virus vaccine.

Keyword: Influenza, vaccination, antibody titer

前言

近 30 多年來，雖然從政府之統計數字顯示，每年因流感致死的實際人數均不超過 400 人，但於 1968-1971 年，流感之死亡率仍是此段時期的一個高峰。Lee 氏等 (1970) 及 Hsia 氏等 (1971) 之報告指出，在台北，從 1969 年 12 月至 1970 年 1 月期間，曾爆發流感，且分離株在抗原特性上與 A/Hong Kong/1/68(H3N2) 流感病毒相當接近。Wang 氏等 (1972) 亦有類似之報告，但流感之爆發則在 1970 年底及 1971 年 6 月。分離株依然與 A/Hong Kong/68(H3N2) 病毒株有關。從以往觀察所得，雖然在溫帶地方之流感大多發生在秋末春初，但在臺灣之流感，其盛行之時期卻沒有明顯之季節界限。而臺灣亦經常於夏季爆發流感，這是與其他溫帶及寒帶地區之國家不同之處。而從 1972 年 1 月至 1973 年 12 月期間，針對流感及其他病毒性疾病的廣泛性監察正在台北積極展開中 (Kao et al., 1978)。在該次研究中，總共有 283 個檢體及 333 個血清樣本被作為流感病毒分離及診斷之用。結果顯示，從 14 個新分離之流感病毒株中，其中 8 個與 A/England/42/72(H3N2) 及 A/Taiwan (NTUH)/7/72(H3N2) 有交叉反應，與 A/Hong Kong/8/68(H3N2) 不同。此結果表示該年之流感病毒在血球凝集素 (Hemagglutinin; HA) 上已經發生抗原性之突變。這些病毒當時被命名為 A/Taiwan (NTUH)/3/72(H3N2)。從 1953-1975 年期間在臺灣所分離到具

代表性的 A 型流感病毒。除 A 型流感病毒外，當時亦分離到 4 株新的 B 型流感病毒，均與 B/Victoria/70 或 B/Hong Kong/5/72 相當接近。雖然流感之死亡率於 1972 年有下降之趨勢，但從 1973-1981 年，流感之死亡率又形成另一高峰。此現象可以推論從 1968-1976 年期間，流感之大流行確實由所謂香港型流感所主導，直到 H1N1 亞型於 1977 年重現並與 H3N2 亞型並存為止 (Shortridge et al., 1979)。

近年來，臺灣也積極針對流感病毒的盛行狀況作廣泛性調查 (Liu et al., 1995; Tseng et al., 1995)。期間所分離到的流感病毒中，以 A/Taiwan/1/86 (H1N1) 最為重要且最有影響力 (CDC, 1986; Robertson, 1987)。而在美國及歐洲諸國，亦不斷有與 A/Taiwan/1/86 (H1N1) 病毒類似之病毒存在。因此，從 1986 年開始，A/Taiwan/1/86 (H1N1) 病毒株被廣泛列為 H1N1 流感病毒疫苗成份之一 (Xu et al., 1993; Tseng et al., 1995)。

在臺灣流感病毒的監測與診斷方面，以往一直依賴傳統的血清學方法為主，近年來則引進極為敏感及專一的方法——反轉錄酶聚合連鎖反應 (Reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) 來鑑定流感病毒 (Liu et al., 1995)。根據 Liu 氏等(1995) 1979 至 1994 年流感病毒的監測結果，除了 1979、1985、1989、1993 及 1994 年以 H3N2 亞型為主外，其他年份則為 H1N1 及 H3N2 亞型共同流行。另外，抗原性相近的同一亞型流感病毒可從同一年間分離到。例如，A/USSR/90/77、

A/Brazil/11/78、A/England/333/80、A/Plzen/26/80 等流感病毒皆可從 1980 年分離到。究其原因，與流感病毒不斷發生抗原突變，以及頻繁的國際旅遊亦可能加速各地流感病毒的交互傳染有關。另外，特定的流感病毒毒株會於某一年出現後會於下一年消失，翌年又再出現 (Reappearance)。例如，A/Taiwan/1/86 於 1986-1988 年流行但卻於 1989 年消失，但又於翌年 (1990-1992) 再出現，病毒株得再分離到，再出現的病毒株與原本的病毒在抗原性上是否有所不同，可以深入探討。除了 A 型流感病毒，B 型流感病毒亦於同一時期流行，並常以兩種或以上的病毒共同流行(Liu et al., 1995)。

一直到 1996 年才開始對流感病毒作演化分析，我們採用電腦軟體 — The Molecular Evolution Genetic Analysis (MEGA) 來比較臺灣 1996 年分離的 A 型流感病毒及其他登錄在基因庫的病毒，並描繪演化樹。在本研究的同時，Oxford 氏等 (1996) 及 Taubenberger 氏等 (1997) 發表對 1918 年“西班牙”流感病毒分子特性分析的報告。因此，我們也採用該病毒的基因，與 1996 年的分離株作比較，結果顯示 1918 年流感病毒屬於人流感及豬流感的中間型病毒，而我們的 1996 年分離株則是從人流感病毒逐年演化而來。

近年來由於衛生署極力推動流感接種疫苗計畫，而大幅降低老人因感染流感併發肺炎死亡的比例。檢驗單位也比較少有從老人分離到流感

病毒的機會。本實驗室則於 2004 年 8 月首次從中部某地區醫院已經接種過流感疫苗老年病人呼吸道檢體中分離到 A 型流感病毒。因此，本計畫的目的藉由血清學的角度探討該病毒的抗原性，並比較該病毒與今年的疫苗株是否有很大差異。

材料與方法

實驗對象

檢體採集：

- a. 小兒血液檢體：由中山醫學大學附設醫院小兒科陳豐霖醫師負責採集。
- b. 成人血液檢體：由中山醫學大學附設醫院感染科李原地醫師負責採集。
- c. 老人血液檢體：由中山醫學大學附設醫院感染科曹世明醫師負責採集。

採集標準：

個體應於接種疫苗前抽一次血及接種疫苗後三星期後再抽一次血。

抽血方式：

以真空棕頭管抽取 1-5 ml 全血，待血液凝固後分離血清並保存於-20°C 冰箱中備用。

病毒抗原及標準抗血清：

標準抗血清及抗原由疾病管制局統一提供，包括

A/Taiwan/0586/2006(H1N1, A/New Caledonia/20/99-like),

A/Taiwan/083/2006 (H3N2, A/Wisconsin/67/2005-like), 及

B/Taiwan/0050/2006 (B/Malaysia/2506/2004-like) 共三株。

血球凝集抑制試驗：

參考世界衛生組織出版的動物流感診斷與監測手冊執行 (Webster et al., 2002) 及疾病管制局之方法，最後由台大高全良教授統一標準。

其實施的方法如下：

紅血球懸浮液製備：

a. 以心臟採血方式抽天竺鼠血液並置於阿氏抗凝劑中，混合均勻。將血球用離心方式，以 pH7.2 磷酸鹽緩衝液洗三次，並製成 10% 儲存儲存懸浮液，置 4℃ 冰箱備用，但不得超過一週。做試驗時配成 0.75% 懸浮液。

b. 抗血清及病人血清之處理-為自血清中除去非特異性抑制因子。將 0.1 ml 血清加入 0.4 ml 接受器摧化酶 (Receptor destroy enzyme[RDE]，100unit/ml)，於 37℃ 水箱作用一夜。加 0.3 ml 之 2.5% 檸檬酸鈉 (Na citrate)，56℃ 水箱，靜置 30 分鐘。再加入 0.2 ml 磷酸鹽緩衝液 (PBS)，則血清最後稀釋度為 1/10。

血球凝集試驗

取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 50 µl 的 PBS 溶液。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。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，置於室溫或 4°C 下靜置 30~60 分鐘，之後記錄結果。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)。

血球凝集抑制試驗

取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 25 µl 的 PBS 溶液於第一列加入 50 µl 的各標準病毒株的標準抗血清，negative control 行則以 25 µl PBS 取代抗血清。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分別加入 25 µl 已稀釋至 8 HA unit/50 µl 的待測抗原及標準抗原，以手輕微搖晃孔盤後，置於室溫下反應 60 分鐘。加入以 PBS 稀釋的 0.75% 的天竺鼠紅血球 50 µl/well，之後以膠膜封住孔盤，至於室溫或 4°C 下靜置 30~60 分鐘，之後記錄結果。血球凝集抑制試驗以紅血球無凝集反應孔數最高者為所判定之抗體力價。

數據分析

參考 Belshe et al., 2004 之方法，以 Geometric mean titer、

seroconversion rate、 seroconversion factor 及 seroprotection rate 等作指
標。(即是否合乎 “guidelines of the European Committee for Proprietary
Medicinal Products (CPMP) for the annual relicensure of influenza
vaccines”)

結果

經多次開會後，最後選擇以 GlaxoSmithKline 藥廠的流感疫苗作為本計畫的疫苗。為了解個體對流感疫苗的免疫反應如何，採血時機分為兩次，第一次為疫苗接種前，第二次則為疫苗接種後三週。現在已經完成老年人族群及成年人族群的疫苗接種及抽血等作業，受試者名單如附錄一及附錄二。

本年度計畫所採用的病毒抗原為 A/Taiwan/0586/2006(H1N1)(A/New Caledonia/20/99-like) 、 A/Taiwan/083/2006(H3N2)(A/Wisconsin/67/2005-like) 及 B/Taiwan/0050/2006(B/Malaysia/2506/2004-like)等，各病毒株的 HA 效價如下： A/Taiwan/0586/2006(H1N1) 為 256 倍 /50 μ l 、 A/Taiwan/083/2006(H3N2) 為 512 倍 /50 μ l 、 B/Taiwan/0050/2006 則為 256 倍 /50 μ l (圖一) (表一)。本次實驗所取得的血清檢體，均至少做兩次 HAI 試驗以增加其準確性 (圖二)。

本次實驗共採集成人族群及老人族群各 30 個流感疫苗接種前及接種後三週的血清(共 120 個血清)，成人族群平均年齡為 35.2 歲，老人族群平均年齡則為 67.7 歲 (表二)。

由 GMTs 結果顯示，在施打流感疫苗前，成人族群對 A/Taiwan/0586/2006(H1N1) 已經有 69.6 倍抗體效價，對

A/Taiwan/083/2006(H3N2)及 B/Taiwan/0050/2006 則分別為 20 倍及 29.4 倍。老人族群方面，對 A/Taiwan/0586/2006(H1N1)的抗體效價為 20.6 倍，對 A/Taiwan/083/2006(H3N2)及 B/Taiwan/0050/2006 則分別為 42.6 倍及 13.8 倍。施打流感疫苗後，兩個族群的 GMTs 均有不同程度的增加，其範圍從 30.6 倍至 226.3 倍不等（表三）。另外，老人族群對三種流感病毒的 seroconversion rates 均大於 30%，但成人族群則祇有針對 A/Taiwan/083/2006 (H3N2)的 seroconversion rate 達到 80%（大於 40%）（表四）。相反地，seroconversion factors 則顯示兩個族群均達到 CPMP 所要求之標準（成人必須大於 2.5，老人必須大於 2.0）（表五）。當施打完流感疫苗三週後，兩個族群的 seroprotection rates 均可達 70 to 100%（表六）。

討論

從 GMT 結果顯示，除了老人族群對 B/Taiwan/0050/2006 抗體反應較弱外，成人族群及老人族群對三種流感病毒抗原的 HAI 抗體反應均大於 40 倍。從 Seroconversion rate 結果顯示，則成人族群祇有對 A/Taiwan/083/2006 (H3N2) 有較佳免疫反應，對 A/Taiwan/0586/2006(H1N1)及 B/Taiwan/0050/2006 之免疫反應並未達到標準。老人族群對三種流感病毒抗原的 HAI 抗體反應皆達到標準比率。從 Seroconversion factor 結果顯示兩個族群對三種流感病毒抗原的 HAI 抗體反應皆達到標準值，即成人族群 > 2.5 ，老人族群 > 2.0 。此結果可能與不同個體之抗體反應差異極大有關。從 Seroprotection rate 結果顯示兩個族群對三種流感病毒抗原的 HAI 抗體反應皆達到標準，即成人族群達到 70%，老人族群達到 60%。若接種疫苗前已經有較高之 Seroprotection rate 時，接種疫苗後之 Seroprotection rate 則會更好；反之，則祇有較低之 Seroprotection rate。

由於本計畫所收集的血清取得不易，除了做 HAI 抗體力價分析外，可加做其他分析項目，例如分析血清中 TH1/TH2 各種細胞素的濃度，可知道各族群注射流感疫苗後的免疫反應有何差異。

本年在注射流感疫苗前收集到的血清，除了與當季的流感病毒作抗體力價分析外，更可以跟一些以前或以後分離到的流感病毒作 HAI 抗

體力價分析，以了解這些病毒是否在各年齡層流行。例如：2001 年分離到的病毒，不見得就是從 2001 年開始流行，可能這些病毒在十年前已經流行（圖三）(Kobasa et al., 2004)。因此，從本計畫所收集到的血清，將來亦可用來回溯以後的流行株，來了解流感病毒真正出現的時機。

除了從血液中取得抗體外，是否有其他方式可用其他非侵入性的方式取得抗體，例如從口水可獲得 IgA。假如可行，對收集小孩自願受試者會比較容易成功。

本實驗室與中興大學獸醫系謝快樂教授實驗室一直保持良好合作關係，因此可以透過中興大學獸醫系的幫忙，與禽畜業者聯絡，徵求自願者，分析禽畜業者的 HAI 抗體力價，是否與一般成年族群一樣。

結論與建議

因為本計畫是配合流感疫苗接種季節，現在祇完成血清收集的階段。以 HAI 試驗檢測抗體力價的部分仍在進行階段，最快會在 11 月底完成。可預期從 HAI 試驗可了解成年人與老年人對接種流感疫苗的免疫效果如何。在小孩族群方面，我們嘗試過很多方法來徵求自願的家長帶小孩來參加本計畫，這些方式包括在醫院張貼海報、在醫院附近幼稚園宣導、在附近社區宣導，都未能徵求到小孩族群，究其原因，第一、每個小孩都在注射疫苗前後各抽一次血，家長普遍都不太願意。第二、小兒科醫師的說服力是很重要。第三、礙於人體試驗委員會之規範，不可以金錢或禮物來吸引受試者，但事實上對受試者需要某種身程度的回饋，可能才回有民眾願意來，這是本人參與本計畫後的一些建議。

參考文獻

- Baldo V, Baldovin T, Floreani A, Minuzzo M, Trivello R: Response to influenza vaccine in people with non-protective HI antibody titers. *Eur J Epidemiol* 2006 (In press).
- Bansal S, Pourbohloul B, Meyers LA: A comparative analysis of influenza vaccination programs. *PLoS Med* 2006;3: e387.
- Belshe RB, Newman FK, Cannon J, Duane C, Treanor J, Van Hoecke C, Howe BJ, Dubin G: Serum antibody responses after intradermal vaccination against influenza. *N Engl J Med* 2004;351:2286-94.
- Chan CH, Chan Y, Shieh HK, Tsai CH, Chen CY, Liu SC, Liu WT: Phylogenetic analysis of influenza B virus in Taiwan during 1997-2001. *J Microbiol Immunol Infect* 2004;37: 135-44.
- Chan CH, Wu MC, Huang CT, Wu KG, Liu WT: Genetic characterization of the hemagglutinin of two strains of influenza B virus co-circulated in Taiwan. *J Med Virol* 1999;59: 208-14.
- Goodwin K, Viboud C, Simonsen L: Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. *Vaccine* 2006;24:1159-69.
- Hsia S, Wang CC, Hsieh WC, Yang SP: Studies on influenza outbreak in Taipei, 1969-1970. *J Form Med Asso* 1971;70: 419-23.
- Hui SL, Chu LW, Peiris JS, Chan KH, Chu D, Tsui W: Immune response to influenza vaccination in community-dwelling Chinese elderly persons. *Vaccine* 2006;24:5371-80.
- Iorio AM, Neri M, Lepri E, Camilloni B, Basileo M, Sigismondi N, Fabiani C, Calzoletti L, Puzelli S, Donatelli I: An influenza A/H3 outbreak during the 2004/2005 winter in elderly vaccinated people living in a nursing home.

Vaccine 2006;10:6615-9.

Jefferson T, Rivetti D, Rivetti A, Rudin M, Di Pietrantonj C, Demicheli V: Efficacy and effectiveness of influenza vaccines in elderly people: a systematic review. *Lancet* 2005;366:1165-74.

Kao CL, Hsieh WC, Liu JL: Studies on the antigens of influenza viruses isolated in Taipei, 1975. I. Antigenic analysis of hemagglutinin. *Chin J Microbiol* 1978;11:110-3.

Kobasa D, Takada A, Shinya K, Hatta M, Halfmann P, Theriault S, Suzuki H, Nishimura H, Mitamura K, Sugaya N, Usui T, Murata T, Maeda Y, Watanabe S, Suresh M, Suzuki T, Suzuki Y, Feldmann H, Kawaoka Y. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* 2004;431:703-7.

Kojimahara N, Maeda A, Kase T, Yamaguchi N: Cross-reactivity of influenza A (H3N2) hemagglutination-inhibition antibodies induced by an inactivated influenza vaccine. *Vaccine* 2006;14:5966-9.

Lee SH, Hsieh WC, Chen ST, Liu WT, Yang SP: Influenza on Taiwan 1968—An antigenic study of virus isolated. *Chin J Microbiol* 1970;3:1-5.

Liu WT, Wei HY, Hu ST, Tsai CH, Chern SR, Wang HC: Isolation and identification of influenza viruses from clinical materials in 1977-1993 at Veterans General Hospital-Taipei. *Chin J Microbiol Immunol* 1995;28:117-27.

Oxford JS, Lo KC, Earle R, Geddes J: Investigation of brain samples from cases of encephalitis lethargica (1918-1922) for influenza genes by PCR. *Options for the control of influenza III. Conference program and abstracts*, 1996;p. 78.

Piedra PA, Gaglani MJ, Kozinetz CA, Herschler G, Riggs M, Griffith M, Fewlass C, Watts M, Hessel C, Cordova J, Glezen WP: Herd immunity in adults against influenza-related illnesses with use of the trivalent-live attenuated influenza vaccine (CAIV-T) in children. *Vaccine* 2005;23:1540-48.

Robertson JS: Sequence analysis of the haemagglutinin of A/Taiwan/1/86, a new variant of human influenza A (H1N1) virus. *J Gen Virol* 1987;68:1205-8.

Sakamoto S, Kino Y, Oka T, Herlocher ML, Maassab HF: Gene analysis of reassortant influenza virus by RT-PCR followed by restriction enzyme digestion. *J Virol Methods* 1996;56:161-71.

Shaw MW, Arden NH, Maassab HF.: New aspects of influenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:74-92.

Shih SR, Chen GW, Yang CC, Yang WZ, Liu DP, Lin JH, Chiu SC, Chen HY, Tsao KC, Huang CG, Huang YL, Mok CK, Chen CJ, Lin TY, Wang JR, Kao CL, Lin KH, Chen LK, Eng HL, Liu YC, Chen PY, Lin JS, Wang JH, Lin CW, Chan YJ, Lu JJ, Hsiung CA, Chen PJ, Su IJ.: Laboratory-based surveillance and molecular epidemiology of influenza virus in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005;43:1651-61.

Shortridge KF, Webster RG, Kam SL, Gardner JM: Reappearance of H1N1 influenza virus in man: evidence for the persistence of the virus in domestic chickens. *Bull WHO* 1979;57:475-7.

Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG: Initial genetic characterization of the 1918 “ Spanish” influenza virus. *Science* 1997;275:1793-6.

Tsai CH, Wei HY, Wang HC, Liu WT: A new influenza virus A/H3N2

variant of Taiwan origin. *Chin J Microbiol Immunol* 1993;26:160-5.

Tseng RK, Chen HY, Horng CB: Influenza virus infections in Taiwan from 1979 to 1995. *Jap J Med Sci Biol* 1996;49:77-93.

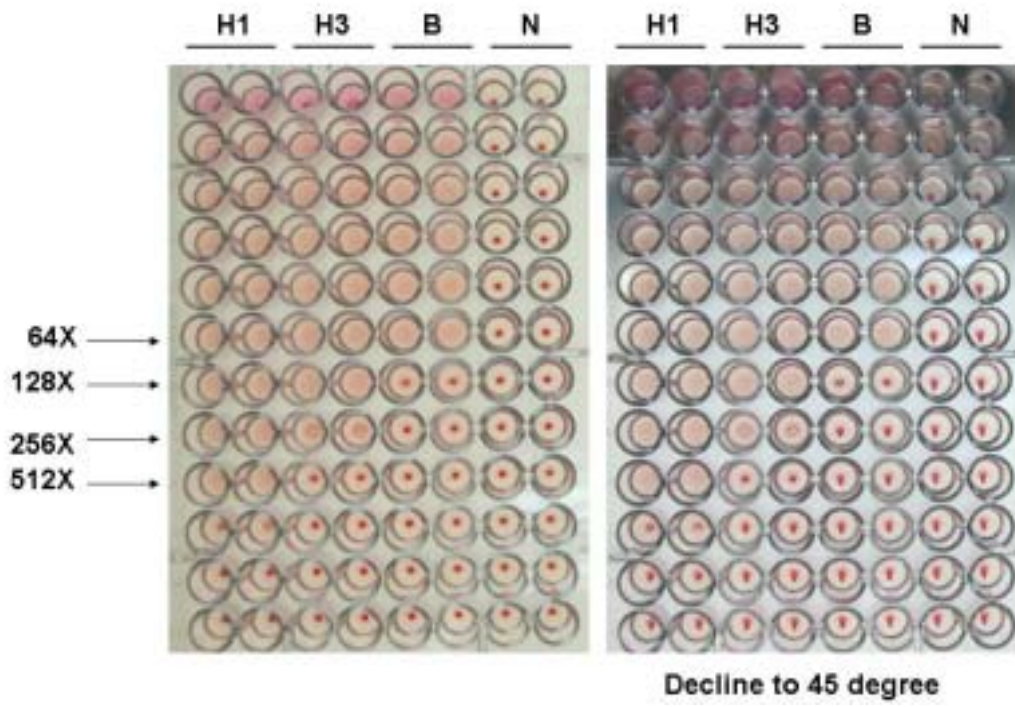
Tseng RK, Chen HY, Horng CB: Influenza virus infections in Taiwan from 1979 to 1994. *J Form Med Asso* 1995;94:S126-36.

Wang TS, Chen SH, Lo CH, Hsia S: Surveillance of viral infections at the National Taiwan University Hospital. *J Form Med Asso* 1972;71:615-20.

Webster RG, Cox NJ, Stohr K: II. Laboratory procedures F. Serologic diagnosis of influenza virus infections by hemagglutination inhibition. In: WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2002;37-39.

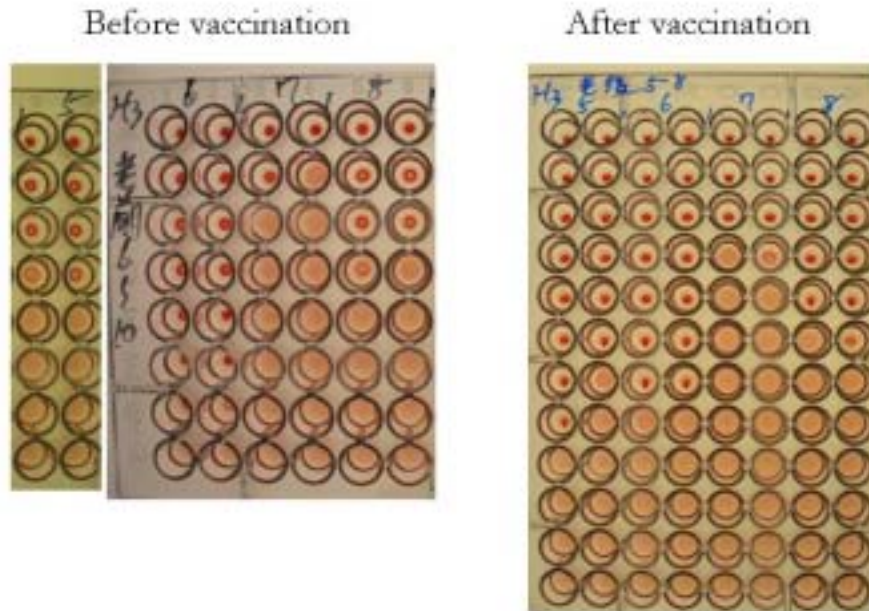
Xu X, Rocha EP, Regenry HL, Kendal AP, Cox NJ: Genetic and antigenic analyses of influenza A (H1N1), 1986-1991. *Virus Res* 1993;28:37-55.

Result of HA test

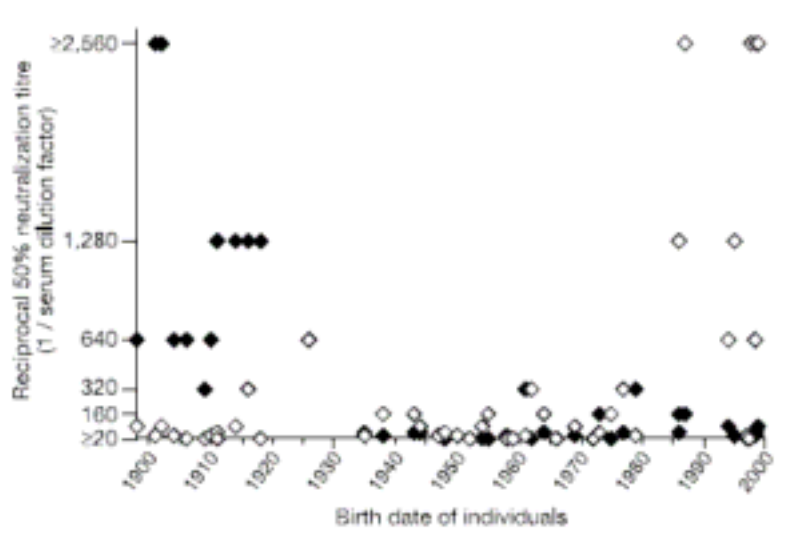


圖一、流感病毒抗原的 HA 效價。

Examples of HAI tests



圖二、血球凝集抑制試驗範例。



圖三、不同年代人類血清對 1918 年西班牙流感病毒及當代流感病毒的中和抗體反應。Filled diamond: 含有西班牙流感病毒 HA 及 NA 的重組病毒。Open diamond: A/Kawasaki/233/2001(H1N1)。(Kobasa et al., 2004)

表一、本實驗使用的流感病毒 HA 力價及抗原性

病毒命名	HA 力價	抗原性
A/Taiwan/0586/2006(H1N1)	256/50 μ l	A/New Caledonia/20/99-like
A/Taiwan/083/2006(H3N2)	512/50 μ l	A/Wisconsin/67/2005-like
B/Taiwan/0050/2006	256/50 μ l	B/Malaysia/2506/2004-like

表二、Demographic characteristics of the subjects

Demographic characteristics of the subjects

Group	No. of subjects	Age (yr)	
		Mean±SD	Range
Adult			
All subjects	30	35.2±6.6	26-47
Women	19	36.4±7.0	27-47
Men	11	33.3±6.1	26-45
Elder			
All subjects	30	67.7±4.2	60-77
Women	11	67±3.5	60-72
Men	19	68.1±4.6	60-77

表三、老人族群及成人族群接種流感疫苗前後幾何平均值

Geometric mean HAI antibody titers before and after vaccination of adult and elders		
	Adult group (N=30)	Elders group (N=30)
Geometric mean titer		
A/Taiwan/0586/2006(H1N1), (A/New Caledonia/20/99-like)		
Before vaccination	69.6	20.6
After vaccination	163.7	56.2
A/Taiwan/083/2006 (H3N2), (A/Wisconsin/67/2005-like)		
Before vaccination	20	42.6
After vaccination	83.8	226.3
B/Taiwan/0050/2006 (B/Malaysia/2506/2004-like)		
Before vaccination	29.4	13.8
After vaccination	81.9	30.6

表四、老人族群及成人族群接種流感疫苗前後之 seroconversion rates

Seroconversion rate before and after vaccination of adult and elders

	Adult group (N=30)	Elders group (N=30)
Seroconversion rate (%)		
A/Taiwan/0586/2006(H1N1), (A/New Caledonia/20/99-like)	33.3%	43%
A/Taiwan/083/2006 (H3N2), (A/Wisconsin/67/2005-like)	80%	77%
B/Taiwan/0050/2006 (B/Malaysia/2506/2004-like)	33.3%	37%

For adult, the seroconversion rate must exceed 40%. For elders, the seroconversion rate must exceed 30%.

表五、老人族群及成人族群接種流感疫苗前後之 seroconversion factors

Seroconversion factor before and after vaccination of adult and elders		
	Adult group (N=30)	Elders group (N=30)
Seroconversion factor		
A/Taiwan/0586/2006(H1N1), (A/New Caledonia/20/99-like)	5.1 (0.5-40)	4.2 (0.25-32)
A/Taiwan/083/2006 (H3N2), (A/Wisconsin/67/2005-like)	4.67 (2-8)	8.8 (1-80)
B/Taiwan/0050/2006 (B/Malaysia/2506/2004-like)	6.5 (1-64)	3.8 (0.5-40)

For adult, the seroconversion factor must exceed 2.5. For elders, the seroconversion factor must exceed 2.0.

表六、老人族群及成人族群接種流感疫苗前後之 seroprotection rates

	Adult group (N=30)	Elders group (N=30)
Seroprotection rate (%)		
A/Taiwan/0586/2006(H1N1), (A/New Caledonia/20/99-like)		
Before vaccination	77%	43%
After vaccination	100%	90%
A/Taiwan/083/2006 (H3N2), (A/Wisconsin/67/2005-like)		
Before vaccination	26.7%	80%
After vaccination	96.7%	100%
B/Taiwan/0050/2006 (B/Malaysia/2506/2004-like)		
Before vaccination	53.3%	16.7%
After vaccination	96.7%	70%

For adult, the seroprotection rate must exceed 70%. For elders, the The seroprotection rate must exceed 60%.

附錄一、參與本計畫老人族群名單及相關基本資料

序號	姓名	性別	年齡	第一次抽血日期	疫苗注射日期	第二次抽血日期
1	王 X 洋	男	69	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
2	梁 XX 娥	女	65	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
3	劉 X 桂	女	65	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
4	阮 X 聲	男	67	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
5	羅 X 坤	男	67	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
6	林 X 波	男	65	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
7	王 X 川	男	69	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
8	郭 X 六	男	67	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
9	林 X 涼	男	69	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
10	李 X 登	男	71	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25

附錄一、參與本計畫老人族群名單及相關基本資料（續）

序號	姓名	性別	年齡	第一次抽血日期	疫苗注射日期	第二次抽血日期
11	何 X 華	男	77	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
12	陳 X 二	男	69	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
13	劉 X	男	72	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
14	吳 X 洲	男	69	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
15	陳 X 華	男	69	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
16	林 X 茂	男	76	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
17	陳 X 旗	男	71	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
18	洪 X 澤	男	67	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
19	陳 X 灩	女	71	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
20	蕭 X 雪	女	67	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25

附錄一、參與本計畫老人族群名單及相關基本資料（續）

序號	姓名	性別	年齡	第一次抽血日期	疫苗注射日期	第二次抽血日期
21	司徒 XX 妹	女	68	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
22	徐 X 菊	女	65	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
23	巫 X 丹	女	72	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
24	李 XX 月	女	71	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
25	王 X 蘭	女	67	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
26	汪 X 沙	女	66	2006/9/22	2006/9/29	2006/10/25
27	陳 X 勝	男	61	2006/10/2	2006/10/2	2006/10/25
28	陳 X 榮	男	60	2006/10/2	2006/10/2	2006/10/25
29	張 X 敦	男	60	2006/10/4	2006/10/4	2006/10/25
30	張 XX 英	女	60	2006/10/4	2006/10/4	2006/10/25

附錄二、參與本計畫成人族群名單及相關基本資料

序號	姓名	性別	年齡	第一次抽血日期	疫苗注射日期	第二次抽血日期
1	王 X 利	女	33	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/19
2	蔡 X 陞	男	34	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/19
3	葉 X 芬	女	31	2006/9/22	2006/10/3	2006/10/27
4	李 X 紋	女	30	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/23
5	陳 X 壬	男	32	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/20
6	朱 X 純	女	33	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/23
7	賴 X 義	男	45	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/20
8	湯 X 媛	女	43	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/20
9	白 X 秀	女	47	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/24
10	吳 X 文	男	34	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/20

附錄二、參與本計畫成人族群名單及相關基本資料（續）

序號	姓名	性別	年齡	第一次抽血日期	疫苗注射日期	第二次抽血日期
12	吳 X 華	女	46	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/23
13	黃 X 玲	女	38	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/24
14	王 X 聖	男	28	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/25
15	謝 X 欽	男	34	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/23
16	王 X 屏	女	46	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/24
17	張 X 煒	男	27	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/26
18	劉 X 岑	女	27	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/24
19	廖 X 貞	女	44	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/20
20	王 X 彩	女	28	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/20

附錄二、參與本計畫成人族群名單及相關基本資料（續）

序號	姓名	性別	年齡	第一次抽血日期	疫苗注射日期	第二次抽血日期
21	盧 X 君	女	27	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/20
22	蔡 X 杰	男	38	2006/9/22	否	否
23	蔡 X 容	男	43	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/24
24	江 X 成	男	26	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/24
25	戴 X 華	女	35	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/26
26	楊 X 耀	男	30	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/26
27	吳 X 芹	女	31	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/19
28	林 X 賢	男	33	2006/9/22	2006/9/26	2006/10/17
29	柯 X 貞	女	46	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/24
30	陳 X 如	女	35	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/26
31	余 X 芳	女	37	2006/9/22	2006/9/28	2006/10/24

註：第 22 號自願者退出計畫。

附錄三、針對審查委員意見之回應

1. 請再說明徵求研究對象之年齡層。由研究結果表一及表二可看出老人族群似乎是以 60 歲以上為研究對象，成人族群則介於 25 歲至 50 歲之間，是否就是本研究之研究對象年齡層？小孩族群之年齡層為何？

回覆：老人族群：>65 歲

成人族群：20 歲至 50 歲

小孩族群：<5 歲

2. 本研究於第一年未能徵求到任何一名小孩族群之受試者，是否有因應措施（如文中提到的改以其他非侵入性方式取得抗體以增加家長同意的意願等）？或是調整年度計畫目標（如文中提到的增加禽畜業者為研究對象）？

回覆：方案一、繼續嘗試與台中地區小兒科診所合作，徵求受試者。
方案二、嘗試發展其他非侵入性方式取得抗體以增加家長同意的意願，例如從唾液。

方案三、調整年度計畫目標，放棄做小孩族群，增加禽畜業者為研究對象。

方案四、可對已經參加本計畫的受試者作接種疫苗 6 個月後之追蹤，比較抗體效價。

1. 本計劃的結果完全未列出過去一年中究竟血清抽了多少人，初步結果為何。執行成果不良。主持人非感染科醫師，無法規劃整體計劃。

回覆：

1. 本計劃已經完成各老人族群及成人族群施打流感疫苗前後各 30 個檢體(共 120 個檢體)。

2. 雖然本人非感染科醫師，但本院感染科全體，包括感染科曹世

明主任、各感染科醫師、感染科醫檢師及護理人員皆全力配合，才能順利完成老人族群及成人族群之檢體採集，唯本院缺少感染小兒科醫師，導致徵求小孩族群受試者產生困難，則始料未及。

2. 從所附之期末報告，第一項研究目標完成 2/3 (缺少幼童之血清)，第二項研究目標僅提 HI 試驗書面方式及病毒抗原之 HA 效價，故從年度計畫目標而言，本研究執行仍有大幅改善空間？

回覆：現在已經完成老人族群及成人族群施打流感疫苗前後各 30 個檢體對三種 2006 年流行株的 HAI 效價測定與分析。

3. 加速完成實驗室內血清抗體 (HI 及 serum neutralization test) 之標準技術？

回覆：中山、北榮及台大的 HI test 流程已經統一， serum neutralization test 則需要等疾病管制局提供適當的病毒抗原才能進行。

4. 取得本年度流感疫苗標準抗原，以做為分析抗體反應標準參考？

回覆：本計畫的流感病毒抗原，屬當年流行株，疾病管制局暫時無提供流感疫苗標準抗原，以做為分析抗體反應標準參考。

5. 由於本計畫目標是評估疫苗接種前後血清反應，故每一年齡層樣本數目很重要，目前每年齡層僅 30 人，是否足夠評估？建議應加入生物統計專家評估。

回覆：本計畫是依據『行政院衛生署疾病管制局委託流感防治科技研究計畫研究重點』第三項撰寫，其研究內容為『每年對於幼童/成人/老人/禽畜業者於接種疫苗前後各抽一次血，每一族群樣本數約 30 個.....』。另外，本人會請校內公衛系生物統計專家作數據分析。

6. 持續追蹤上述 3 點