

103年度減毒活病毒疫苗效價評估研究- 冷運冷藏對水痘疫苗效價之影響評估

紀長文 詹蕙嘉 杜慧珍 黃玉卉 謝郁琦
林耀正 蔡幸君 黃莉玲 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

本計畫依風險管理評估原則，針對公費疫苗品質現況及其儲存環境管理情況進行調查研究，103年選定之後市場品質監測調查品項為活性水痘疫苗。本計畫執行期間共赴22縣市並協同各地衛生局稽查人員進行抽樣，查訪基層醫療院所了解其冷運冷藏狀況。而後依據各原廠檢驗方法進行效價試驗，確認該疫苗之品質及有效性；本年度共赴22縣市之26家公費合約醫療院所(2間衛生局、22間衛生所及2家醫療院所)，共完成26件水痘疫苗檢體之抽樣作業及冷運冷藏系統之實地訪查作業，效價試驗之結果均符合食藥署核定之規格。本調查結果提供我國建立疫苗監視的基本數據，作為冷運冷藏對疫苗效價影響之參考，保障民眾接種之有效性。

關鍵詞：水痘疫苗、冷運冷藏

前言

水痘是由水痘帶狀疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV)感染引起高傳染性疾病，屬於帶狀疱疹，盛行於冬天及初春⁽¹⁾，據疾病管制署統計，有60%發病者為三至九歲的孩童，90%以上的人在15歲之前就已感染過水痘，若成年時期才感染，通常症狀會較嚴重且易出現併發症⁽²⁾。水痘主要經由人與人之間皮膚直接接觸、飛沫或空氣傳染，接觸帶狀疱疹的水疱，也藉由接觸被水疱液和黏膜分泌物污染的物品而傳染。潛伏10-23天後，開始出現前驅症狀(prodrome)，包括頭痛、發燒、咳嗽、喉嚨痛、肌肉或關節酸痛、顫抖、全身虛弱、食欲不振等類似感冒症狀，並可能伴隨腹痛，可持續2-5天。前驅症狀後會開始出現皮膚症狀，病灶從頭部往軀幹部與四肢蔓延，水痘的

皮疹可分為四個階段：丘疹、水疱、膿疱、結痂，剛開始皮膚會出現許多紅色丘疹，隨後逐漸變成水疱，並且可能伴隨癢感；之後會逐漸形成膿疱，結痂⁽³⁻⁴⁾。水痘有時會引起併發症，高危險群包括年齡小於5歲、大於20歲或免疫不全者。併發症包括：肺炎、腦炎、繼發性細菌感染、敗血症等。水痘致死率對成人及孩童並不高，但對於新生兒和白血病病童，致死率可能高達5-10%。一般感染過水痘者，可獲得終身免疫力，二次感染的機會並不高，但免疫功能低下的人，仍有機率再度被感染。然而不論免疫功能是否正常，在感染水痘後，都可能變成潛伏性感染，水痘病毒在復原後仍會潛伏在人體的神經節中，待免疫力低下時再次活化，以帶狀疱疹(Herpes Zoster)的形式復發⁽⁵⁾，俗稱皮蛇(shingles)造成神經痛等症狀⁽⁶⁾。懷孕婦女於孕期前六個月內感染水痘對胎

兒最為危險，懷孕末期感染水痘的孕婦發生嚴重肺炎甚至致死的危險性較高，且病毒會因病毒血症(viremia)經胎盤傳染給胎兒。胎兒遭水痘病毒感染的嚴重程度，則依受到感染的時期而定；而孕婦在任一孕期發生嚴重的水痘感染，有3%的機會造成胎兒畸形或導致胎兒子宮內死亡⁽⁷⁾。預防水痘感染的最好方法就是進行大規模的疫苗接種，除了可以對施打族群產生直接效應外，亦可對未施打之族群產生間接效應，進而產生群體免疫反應。水痘疫苗自西元1974年研發成功至今，1歲以上12歲以下的孩童只要接種一劑即可，12歲以上則應接種二劑(間隔4-8週)。一般而言，水痘疫苗的抗體轉陽率及有效性可高達九成。根據目前的觀察，疫苗的保護期達10年以上，保護率在80%到90%以上⁽⁸⁾。即使有少數疫苗接種者仍會感染水痘，但症狀都較輕微。若接觸水痘患者，三天內施打疫苗則保護率可達70-80%。因此建議在幼兒時期即接種水痘疫苗，一方面避免水痘及其症發症，同時也防止成年後出現帶狀皰疹。目前臺灣的預防接種計畫中，提供滿12個月以上的幼兒免費接種水痘疫苗。水痘疫苗是活性減毒疫苗，所以免疫功能低下、HIV及AIDS患者不適合接種。此外，孕婦、有計畫在三個月內懷孕者、尚未治療的開放性肺結核病患及曾經對疫苗成分過敏者，亦不直接種水痘疫苗。

衛生福利部核准國內上市之水痘疫苗共有兩種產品，分別為荷商葛蘭素史克藥廠生產之美瑞克疫苗(Varilrix)及美商默沙東藥廠生產之伏痘敏活性水痘疫苗(Varivax)，即目前台灣市面上可提供幼童施打的水痘疫苗有美瑞克及伏痘敏活性水痘疫苗。根據文獻統計，疫苗接種每年可防止約3億嬰幼兒的死亡，但因活性減毒疫苗對溫度極為敏感，且疫苗接種之合約醫院幅員遼闊，因此如何管控從製造廠至施打者之間運送過程，確保維持疫苗效價不受運送條件或過程影響便成為一個重要課題⁽⁹⁾。其中溫度是影響疫苗品質的關鍵點，溫度過高或過低都會對疫苗造成影響⁽¹⁰⁻¹¹⁾，適當的

疫苗冷運冷藏系統包括了冷藏設備(2-8°C)、冷凍設備(-15°C以下)、緊急供電設備、溫度監控裝置及良好的運送配備如冷藏車、冰桶等。疫苗之存放應標示排列整齊，放置於適當位置，盡量避免放置於門邊，並有專人管理。國人使用之疫苗，部分為衛生福利部公費補助施打，該類疫苗由疾病管制署協同各地衛生局共同輔導監督轄區中衛生所及合約醫療院所之儲存管理措施，藉以確保疫苗之品質；而水痘疫苗屬對高溫敏感疫苗，疫苗效價易受儲存環境溫度影響，為了解該類疫苗自源頭供應端至使用端儲存管理情況及品質現況，本計畫將針對目前市售之活性水痘病毒疫苗進行效能評估調查研究，期望藉此調查結果作為後續產品品質控管之參考，並保障民眾健康與疫苗接種之有效性。本計畫依原廠查驗登記所載方法進行效價試驗及結果判定，檢驗方法係原廠自行開發並經確效之Plaque forming assay，為細胞感染後計數其病毒斑數量，計算病毒感染價(PFU/mL)。近年來研究指出利用定量即時聚合酶鏈鎖反應(qPCR)等技術進行水痘疫苗效價試驗，所得效價結果和Plaque forming assay法並無差異性，卻更省時及節省人力等優點⁽¹²⁾，因此本次計畫亦同時利用此法來進行水痘效價試驗。

材料與方法

一、材料

(一)檢體

由食藥署協同台北市政府、新北市政府、台中市政府、台南市政府、高雄市政府衛生局及各縣市衛生局就轄區內衛生局、衛生所及醫療院所，共完成22個縣市中各2間衛生局、22間衛生所及2家醫療院所之抽樣及實地訪查，共計26件檢體(表一)。

(二)標準品與試藥

1. 標準品：原廠提供In-house standard、水痘疫苗標準品(購自歐洲藥典)
2. 一般試藥：phosphate-gelatin-sucrose (PGS) stabilizer原廠提供、MRC-5

表一、水痘疫苗檢體依檢體來源及縣市分布統計表

疫苗品名	A廠水痘疫苗(件數)			總計
	抽樣縣市	衛生局	衛生所 醫療院所	
台北市	0	0	1	1
新北市	0	1	0	1
基隆市	1	1	0	2
宜蘭縣	0	1	0	1
桃園縣	0	1	0	1
新竹縣	0	1	0	1
新竹市	0	1	0	1
苗栗縣	0	1	0	1
台中市	0	1	0	1
彰化縣	0	1	0	1
南投縣	0	1	0	1
雲林縣	0	1	0	1
嘉義縣	0	1	0	1
嘉義市	0	1	0	1
台南市	0	2	0	2
高雄市	0	1	1	2
屏東縣	0	1	0	1
台東縣	0	1	0	1
花蓮縣	0	1	0	1
金門縣	0	1	0	1
連江縣	0	1	0	1
澎湖縣	1	1	0	2
合計	2	22	2	26

cell line 購自ATCC (USA)、核心試劑組Taqman PCR core reagent kit購自Applied Biosystems (USA)、引子PF (CGGCCAGGCTCGTTGA)、PR (CCCGACGACTGTGCAATACA)、探針(ACATCAACCGTGTTTTT)購自TIB mobiol (Germany)

(三)儀器設備

本實驗使用生物安全操作櫃(VCM-620，造鑫，Taiwan)、高速型高通同步定量聚合酶連鎖反應器系統(ABI 7500, Applied Biosystems, USA)。

二、抽樣

(一)抽樣保存箱確效試驗

於抽樣保存箱內放置適量的冰寶或乾冰，並於上、中及下層各放置一個溫度記錄器，中層即為放置抽樣樣本之處，將保存箱放於24°C或37°C的恆溫箱中至少兩天，並模擬抽樣時開啟冰箱門。

(二)水痘疫苗抽樣

抽樣時間自103年2月起至8月止，地點為台灣本島及離島各縣市衛生局、衛生所及合約疫苗接種醫療院所。抽樣前期委託疾管署調查各縣市衛生局之水痘疫苗貯存數量後進行實地抽樣，各抽樣點之抽樣量為同批號單劑量包裝之A廠疫苗，共抽6瓶；疫苗抽樣時當場記錄有：1.疫苗貯存設備、2.貯存溫度的紀錄形式、3.當天冰箱內的高低溫度計紀錄、4.冷藏設備內疫苗擺放是否符合規範、5.抽樣前後的溫度變化、6.保存期間的曾經最高及最低溫度、7.抽樣疫苗的來源及入庫時間、8.記錄溫度監視卡(cold chain monitor)保存期限及變色程度、9.是否有自動發電機或不斷電系統、10.是否有溫度異常警報系統、11.貯存期間是否發生停電的情形。疫苗運送：抽取之樣品放入經確效並置有足量冰寶之保存箱，以電子式連續溫度記錄器進行疫苗運送期間的溫度記錄，在結束回署後，將疫苗貯存於冷藏室中，並讀取保存箱中溫度記錄器的抽樣過程溫度紀錄，建立各縣市相關疫苗貯存設備、運送及溫度紀錄資料等水痘及MMR疫苗冷運冷藏訪查資料庫，以作為效價評估之參考資料。依原廠查驗登記所載方法進行試驗及結果判定，檢驗方法係原廠自行開發並經確效，細胞感染後計數其plaque數量，計算病毒感染價(PFU/mL)。

三、效價試驗方法

(一)Plaque forming assay

1. MRC-5細胞於T-75細胞培養瓶中以MEM培養基培養至足夠試驗所需之細胞數目，調整細胞濃度至 8×10^4 個/mL，加入60-mm細胞培養皿中(4×10^5 個細胞/dish)培養48-72小時，留待水痘病毒接種用。
2. 疫苗接種：取疫苗檢體及參考疫苗分別進行獨立試驗，每個抽樣點檢體進行六重複，均參考原廠出廠效價以稀釋液溶解。將病毒稀釋液0.1 mL直接種於已移除培養基之細胞培養皿中央，適度搖動細胞培養皿使均勻散佈。將培養皿置於室溫下避光感作均勻搖動一小時後加入細胞維持培養溶液再置於培養箱中培養7天。
3. 細胞染色：細胞培養7天後，移除培養基後以2.5% coomassie blue細胞染劑染色30分鐘，洗去染劑以倒立式位相差顯微鏡判讀並記錄各組培養皿底部產生PFU數量並計算其效價。

(二)qPCR法

將MRC-5細胞培養於DMEM，並將細胞稀釋至適當濃度後分至96孔盤，每well含8000個細胞/200 μ L。病毒感作：疫苗標準品回溶置冰上待用。使用PGS stabilizer

solution 將標準疫苗及檢品稀釋20倍(3 \log_{10})加至A、E排，依序向下各稀釋1.78倍3次(0.25 \log_{10})，分別加至B-D，F-H排，共四個稀釋階(表二)。使用Suction 移除培養液，加入稀釋疫苗100 μ L，400 \times g室溫下離心一小時後吸除上液，加入DMEM medium培養24-72小時。每well加入4.5% Triton-X solution 10 μ L後即可進行qPCR或先置於-80 $^{\circ}$ C冰箱中保存作用至少一小時。

(三)qPCR及結果分析

細胞盤解凍20分鐘後vortex並離心，並稀釋已感作之細胞(40X)，配製qPCR Master Mix (表三)，以八爪pipette加入至每個反應槽Master Mix 40 μ L及細胞核酸10 μ L後離心(1000 rpm 2 min)進行qPCR，反應條件如表四。結果分析：各檢品與標準品qPCR數據經內建分析軟體設定試驗之Ct value及Melting curve值建立標準曲線，電腦計算得到各檢品數據(圖一至圖三中▼)。

結果與討論

本計畫執行水痘疫苗後市場品質監測計畫，預先由衛生福利部西藥、醫療器材及化粧品

表二、qPCR配置圖

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
稀釋階1: 20(1.3 \log_{10})	A	STD	STD	STD	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	NC
稀釋階2: 1.78	B	STD	STD	STD	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	NC
稀釋階3: 1.78	C	STD	STD	STD	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	NC
稀釋階4: 1.78	D	STD	STD	STD	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	NC
稀釋階1: 20(1.3 \log_{10})	E	S5	S5	S6	S6	S7	S7	S8	S8	S9	S9	In	In
稀釋階2: 1.78	F	S5	S5	S6	S6	S7	S7	S8	S8	S9	S9	In	In
稀釋階3: 1.78	G	S5	S5	S6	S6	S7	S7	S8	S8	S9	S9	In	In
稀釋階4: 1.78	H	S5	S5	S6	S6	S7	S7	S8	S8	S9	S9	In	In

表三、qPCR反應所需試劑量表

Reagents	Final Conc.	Volume (μL)
Deionized water		21.5
10x Buffer A	1x	5
25 mM MgCl ₂	3 mM	6
dCTP	0.2 mM	1
dGTP	0.2 mM	1
dATP	0.2 mM	1
dUTP	0.4 mM	2
AmpErase (1 U/μL)	0.01 U/μL	0.5
Primer PF (20 μM)	200 nM	0.5
Primer PR (20 μM)	200 nM	0.5
Probe V (10 μM)	100 nM	0.5
AmpliTaq Gold DNA polymerase (5 U/μL)	0.05 U/μL	0.5
Template (diluted lysate)	10 μL	10
Total		50

表四、qPCR反應條件

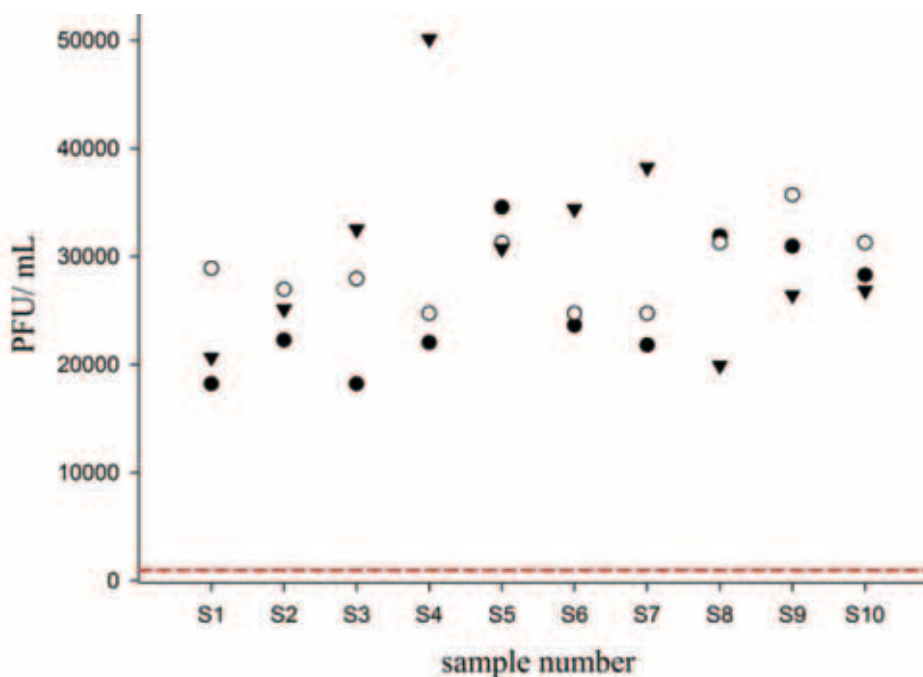
Cycle	Temperature	Time
1 cycle	50°C	2 minutes
1 cycle	95°C	10 minutes
40 cycle	95°C	15 seconds
	60°C	1 minute

史克藥廠生產之美瑞克(Varilrix)及美商默沙東藥廠生產之伏痘敏活性水痘疫苗(Varivax)，由於本年度疾管署公費之水痘預防接種均使用伏痘敏活性水痘疫苗(Varivax)，本次計畫僅針對伏痘敏活性水痘疫苗(Varivax)進行抽樣檢驗。

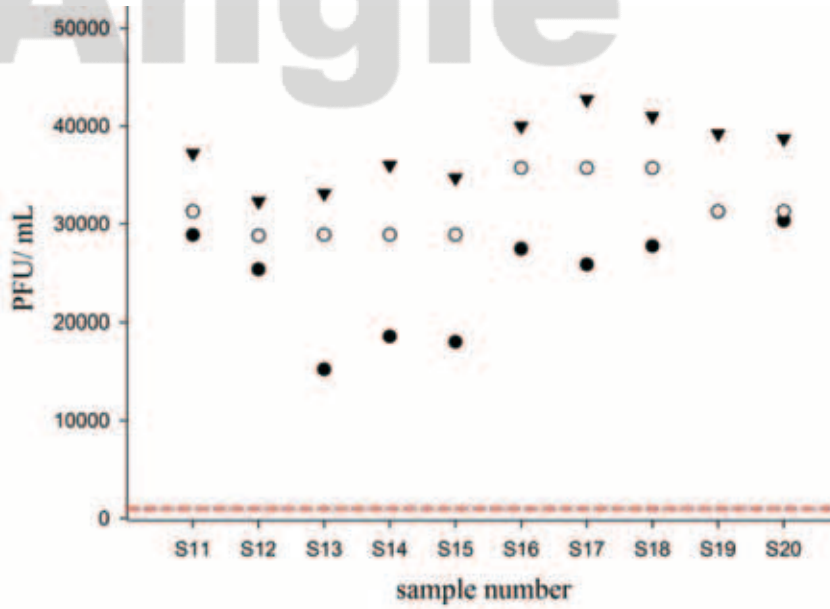
一、現場訪查分析

本計畫於103年2月至8月間，配合疾管署調查各縣市水痘疫苗之留存批號及數量後，總計抽回A廠之7個批號(V1668、V2261、V2262、V2263、V2301、V2321、V2339)共計26件水痘疫苗樣品。抽樣範圍涵蓋台、澎、金、馬等22個縣市等共26間單位，包含2縣市

品許可證查詢系統，進行該品項領有許可證之產品查詢，截至103年12月，國內領有許可證者共有2家廠商之2項產品，分別為荷商葛蘭素

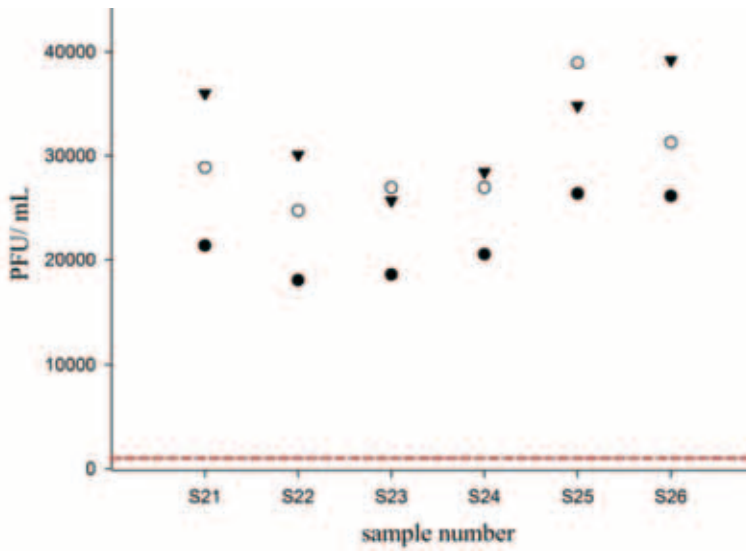


圖一、A廠活性水痘病毒疫苗抽樣檢體S1-S10之效價試驗結果



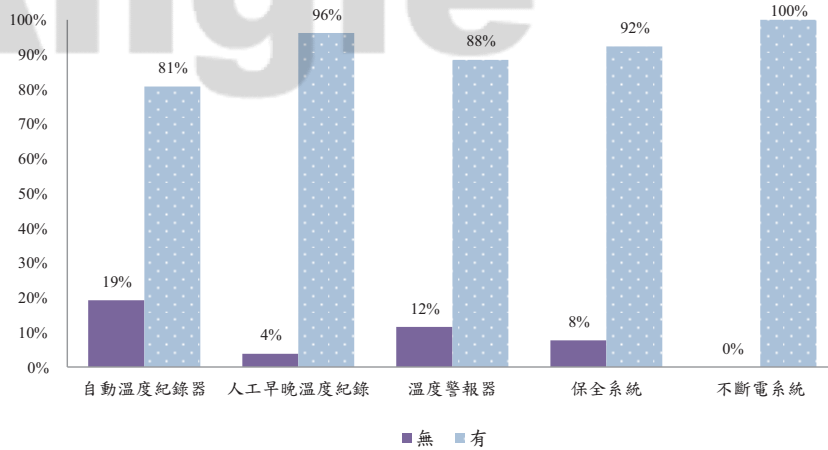
- 品監抽樣
- ▼ 品監抽樣 (qPCR 法)
- 原廠檢驗
- 表規格下限 (1×10^3 PFU/mL)

圖二、A廠活性水痘病毒疫苗抽樣檢體S11-S20之效價試驗結果



- 品監抽樣
- ▼ 品監抽樣 (qPCR 法)
- 原廠檢驗
- 表規格下限 (1×10^3 PFU/mL)

圖三、A廠活性水痘病毒疫苗S21-S26效價試驗結果



圖四、26個水痘疫苗抽樣點之現場訪查所見紀錄

衛生局、22間所屬衛生所及2家疫苗接種合約醫療院所。各縣市抽查疫苗檢體及各衛生單位之貯存設備、環境及溫度紀錄等所有資料庫已建檔，以作為效價結果之評估參酌資料。為評估及釐清可能造成疫苗效價結果變異因子之影響，食藥署依據各縣市實地訪查所建立之相關疫苗管理程序、冷運冷藏系統、貯存環境、設備及溫度紀錄等相關資料庫進行比對分析後，針對現行各縣市衛生單位與疫苗貯存管理相關之缺失，在疫苗管理及硬體設施配置方面，有5個地點沒有使用自動溫度記錄器(19.2%)，包含4間衛生所及1間醫療院所；在冰箱每日早晚溫度紀錄部分有一間醫療院所無人工紀錄(3.8%)；並發現有三個抽樣地點(2間衛生所及1間醫療院所)沒有在儲存設備上裝置溫度警報器(11.5%)，意即冰箱發生異常無法得知。保全系統則有2間衛生所沒有設置(7.7%)(圖四)。就儲存設備進行分析，多數的衛生局、所及醫療院(18間)所使用的是冷藏櫃(69%)；而有6間衛生所使用家用雙門冰箱(23%)；另使用冷藏室的2間皆為地方衛生局(8%)。

二、水痘疫苗效價試驗分析

本計畫共進行A廠的七個批號計26件水痘疫苗檢品S1-S26，結果顯示26件抽樣檢體均符合衛福部核准水痘效價之標示含量規定($\geq 10^3$

PFU/mL)，合格率为100%，效價試驗結果請見圖一至圖三。qPCR法初步檢驗結果顯示與Plaque forming assay差異並不大，但水痘案件檢驗卻更加節省二分之一時間及人力，並縮短檢驗流程，惟此次試驗檢體僅為A廠產品，能否應用在B廠的產品，仍待進一步分析確認，因此建議未來需進行更多檢體的試驗，以開發此方法作為兩家水痘疫苗廠產品效價試驗之新方法，使分析結果可應用於不同產品一致性的分析。

討論

1. 本計畫訪查22縣市之衛生局及其所屬轄區衛生所、醫療院所之疫苗冷藏儲情況，結果顯示縣市間衛生所的儲存硬體、管理制度皆有差異，且資源、經費較為充足的五都與其他縣市並無不同。
2. 檢視今年抽樣所得26件水痘疫苗之效價試驗，結果顯示儲存場所管理需改善之水痘病毒疫苗，其效價試驗數據雖符合原廠查驗登記所核定之規格，但由於抽樣點的限制，抽樣件數因此受限，現有樣品數可能無法真實反應實際情況，且溫度影響疫苗效價的參數頗多，例如：超過允許溫度的幅度、時間的長短、疫苗距離效期之長短及各種疫苗對溫度變化之敏感度等，唯

有建置完備的冷藏設備及提供完整教育訓練，建立醫療人員之正確管理觀念，才能確保冷鏈系統之完善。

參考文獻

1. Wood, M.J. 2000. History of varicella zoster virus. *Herpes* 7(3): 60-65.
2. 李秉穎等。2013。感染與疫苗。行政院衛生署疾病管制局。[<http://www.cdc.gov.tw/professional/info.aspx?treeid=916d2c7524972019&nowtreeid=066086d103a097be&tid=381697DCFACE0123>]。
3. Atkinson W, Wolfe S, Hamborsky J. 2012. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases* (12th ed.). pp. 301-323. Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Foundation. Washington DC.
4. Elston, Dirk M., Papadopoulos, Anthony J., 2012. Chickenpox Clinical Presentation. Medscape Reference retrieved.
5. Kanbayashi Y., Onishi K., Fukazawa K. and *et al.* 2012. Predictive Factors for Postherpetic Neuralgia Using Ordered Logistic Regression Analysis. *The Clinical Journal of Pain.* 28(8): 712-714.
6. Nagel, M.A., Cohrs, R.J., Mahalingam, R., and *et al.* 2008. The varicella zoster virus vasculopathies: Clinical, CSF, imaging, and virologic features. *Neurology.* 70(11): 853-860.
7. Daniel B. Hrdy. 1987. Epidemiology of rotaviral infection in adults. *Rev. Infect. Dis.* 9(3): 461-469.
8. Sandra S. Chaves, Paul Gargiullo, John X. Zhang and *et al.* 2007. Loss of Vaccine-Induced Immunity to Varicella over Time. *N. Engl. J.* 356(11): 1121-1129.
9. WHO. Temperature sensitivity of vaccines. Geneva. WHO/2006/ IVB/06.10.
10. Boros C. A., Hanlon M, Gold M. S. and *et al.* 2001. Storage at -3°C for 24 hours alters the immunogenicity of pertussis vaccines. *Vaccine* 19(25-26): 3537-3542.
11. Ho M. M., Mawas F, Bolgiano B and *et al.* 2002. Physico-chemical and immunological examination of the thermal stability of tetanus toxoid conjugate vaccines. *Vaccine* 20(29-30): 3509-3522.
12. Russell M.S., Li C., Larocque L. and *et al.* 2011. Rapid and accurate determination of the potency of varicella vaccine by quantitative polymerase chain reaction. *Vaccine* 29: 8490-8495.

Assessing and Monitoring the Varicella Vaccine Cold Chain System Taiwan, 2014

CHANG-WEN CHI, HUI-CHIA CHAN, HUEY-JEN DUH,
YU-HUI HUANG, YAO-CHENG LIN, HSING-CHUN TSAI,
LI-LING HUANG AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

The varicella vaccine has been used to protect children, from 12 months of age and older, from a varicella virus infection through active immunization. The vaccine is composed of live-attenuated viruses which require specific conditions during storage and handling, in order to not compromise its potency. The varicella vaccine should be stored under the recommended temperature range (from 2°C to 8°C), particularly in location with a subtropical climate. In 2014, we conducted a study to evaluate and monitor the cold chain system used in Taiwan for storing the varicella vaccine. A total of 26 varicella vaccine samples were collected from 22 cities and counties of Taiwan designated by the CDC. Among the samples taken, 24 samples came from health stations, while the other 2 came from local hospitals. The samples collected were then assayed for its potency. Our results showed that all of the varicella vaccine samples had met the requirements under the potency test. In addition to assessing the storage of the vaccines, each location was inspected and analyzed. The results of this investigation will serve to be a reference for future concurrent risk assessment. Proper storage and handling management, and persistent monitoring of the cold chain system will ensure the quality and potency of vaccines administered in Taiwan and worldwide.

Key words: varicella vaccine, post-market surveillance