

A/H1N1/2009 新型流感病毒的 流行病學及演化來源

曾凡真¹ 蘇益仁²

國家衛生研究院 感染症研究組¹ 助理研究員² 特聘研究員

帶豬流感病毒基因的 H1N1 新型 流感病毒初步流行病學分析

世界衛生組織 (WHO) 於 4 月 24 日宣布，一種起源於豬的 A 型 H1N1 豬流感病毒 (swine H1N1 influenza) 已在墨西哥、美國的民衆間爆發流行。這個病毒，基因特徵上有“豬流感”病毒的來源 (swine-like)，也就是目前流感病毒株的序列中，以來自豬流感的與它最接近。但是在感染宿主的效率上，卻已能在人與人間有效迅速傳播，與傳統豬流感病毒僅感染直接接觸到豬的人不同，WHO 故正名為 A/H1N1 新型流感病毒 (novel swine-origin influenza A/H1N1; S-OIV)。因為目前市售的流感實驗診斷法，快速抗原檢測或免疫螢光法，對於這株新型 A/H1N1 會有偽陰性與無法分型的問題，WHO 表示確認的實驗診斷需仰賴病毒培養與用 real-time RT-PCR 法偵測病毒基因片斷。

由美國疾病管制局 (Centers for

Diseases Control and Prevention; CDC) 為首的研究團隊已將在 4 月 15 日到 5 月 5 日間，發生在美國的 654 例 H1N1 新型流感病例調查發表在新英格蘭醫學雜誌。臨床症狀上與季節性流感 (seasonal flu) 案例的類似，但新流感案例還有較高比例 (38%) 的嘔吐或腹瀉，暗示人的腸胃道可能也會繁殖排出此病毒，故除了飛沫傳染，經糞口傳染也需注意。八成的美國案例近期並沒有到墨西哥，顯示美國的境內傳播是造成大流行的主因。多所學校爆發了群聚感染，還把病毒帶回去再感染家人，有六成的感染者是 18 歲以下的孩童。如果用感染後需要住院患者來代表嚴重案例，則約有一成的比例，比起季節性流感的 1-2% 高出許多。若以年齡細分美國住院案例，13%-14% 的 30-44 歲和 5 歲以下的感染者嚴重到需住院，其他年齡的約有 0-4%；而死亡或重症案例多有一些宿疾 (如心血管疾病、肺部疾病、糖尿病等) 或特殊生理狀況 (如懷孕等)。

WHO與英國的團隊(包括倫敦帝國、愛丁堡、牛津大學)以及墨西哥衛生部門合作,分析新型流感在墨西哥地區所傳播人數的資料也發表在科學雜誌。墨國當地的流病調查與實驗室確認進行得較晚,所以該國的通報感染人數會被低估,而且會有偵測到的多是嚴重者的傾向,導致墨國人感染後的死亡率會被高估。但這篇研究指出,如果把於流行初期在墨西哥旅行過的外國人當作一對照組,尤其是3月中到4月中隔離進行之前,當時人的接觸頻率與病毒傳播都在未被嚴格控制的狀態下;這些人如有感染回自己國後,會因各國防疫較嚴而被篩檢出,會有較高的通報率。基於這些假設下,估算出4月底前在墨西哥感染的人數約在23,000人(95%信賴區間為6,000到32,000),死亡率約在0.4%(95%信賴區間為0.3%到1.5%)。也估算出這隻病毒在自然狀況下,感染一個人後會傳染給多少人,也就是基礎衍生數(basic reproduction) R_0 ,大約是在1.4到1.6間;同樣地使用病毒HA基因演化的速度,來推算這個傳播能力 R_0 約為1.2;再使用“最近共同起源”(time of most recent common ancestor)的演化分析再推算出這隻新型流感病毒的起源時間,約在2009年1月12日(95%信賴區間為2008年11月3日到2009年3月2日);以墨西哥當地在4月下旬爆發了人之間的大流行來看,也與起源時間的估計值符合,當時這隻病毒應該已經累

積了14代到73代“人傳人”的適應能力,所以可以有效傳播。

另一個由法國團隊所作的調查發表在歐盟疾病監測(Euro Surveillance),以墨西哥三月11日到5月2日的發生率資料,使用不同的運算模式去推估 R_0 ,得到2.2-3.1的值,表示這個病毒的傳染力頗高,比WHO與英國估算的高。雖然這些研究因假設、運算等不同所得到的 R_0 數值有出入,可以確定的是這個新型A/H1N1流感病毒的傳染力不容小覷,已在兩個月內傳播遍及全球五大洲;WHO也估算這個病毒新引進到一個社區人群後,約可造成22%-33%的感染率(secondary attack rate),比起季節性流感的5%-15%高的多。美國之前在流感季節監測發現有症狀的人,約3%是同時感染兩隻不同基因的流感病毒,所以新型A/H1N1流感病毒接下來是否會基因突變或進一步重組,而演化出增強的感染力或致病力,必需嚴密監控。總括來看,目前這個新型A/H1N1流感病毒的死亡率、傳播能力 R_0 等的估算值在嚴重程度上,預期可能和1957年的H2N2亞洲大流感規模類似,應該不會到1918年的西班牙全球流感的程度。

美國疾管局研究對此株新型H1N1流感一般民衆的血清交叉反應力(antibody cross reactivity):歷年秋冬季收集美國民衆在注射當季流感疫苗前後的血清,測量對疫苗的各株流感抗體效價上升程度,以評估疫苗的

抗原力，希望能藉此改善下一季流感疫苗的效力。把先前2005-06、2006-07、2007-08與2008-09年於成人與兒童所收集到的血清，使用微中和(microneutralization)或血清凝集素(hemagglutination inhibition)試驗，測量對新型H1N1流感的抗體力價，並與對先前“季節性”H1N1株的反應比較。67%到100%的半歲到九歲的兒童中，在施打過季節性去活性(inactivated)流感疫苗，對當季H1N1呈現至少四倍抗體效價的升高，但對新型A/H1N1都無升高；而全體兒童注射前後抗體效價的幾何平均值，對季節性株約由5-42昇到255-575，但對新型H1N1株前後效價都在12以下，顯示兒童對新型H1N1沒有交叉抗體且季節性疫苗也無法提供保護。然而類似的分析在18到64歲者則有不同結果：54%到78%的成人對季節性疫苗的施打有至少四倍抗體的升高，相對的3%到19%對新型H1N1也有升高；注射前抗體效價的幾何平均值對季節性株在29-48間、對新型H1N1在11-92間，而注射後的各在143-561間、21-97間。而再看注射前成人血清對新型H1N1的抗體，6%-9%的18-64歲有交叉反應，並且高達33%的60歲以上的有抗體。顯示先前的季節性流感疫苗雖然對多數成人無法提供保護，但部分成人體內的抗體對新型H1N1存在中低程度的交叉反應，代表可能之前感染過類似的一株。這種年紀越大越會有交叉抗體的血清學

結果，在多國到目前的感染年齡分佈也能得到佐證。把一個被傳說為新型流感“發源地”，墨西哥Veracruz省的La Gloria的流感症狀資料分析，可以發現當地人的年齡是感染的重要因子：在2月中到4月中之間，15歲以下的有61%有急性呼吸道感染症，但在15歲以上的才29%，代表15歲以下的比起15歲以上的有超過兩倍的相對風險(relative risk=2.13)會有急性呼吸道感染症。但當時因為沒有實驗室確定，可能不全是新型A/H1N1所造成的。如果再把墨國已實驗室確認案例作類似分析，結果是15歲以下比起15歲以上也有1.5倍的相對風險。再以實驗確認感染新型H1N1的案例來看到五月底止在墨西哥每10萬人的感染率，在29歲以下約為5.8-7.26位，在30-59歲3.26位，而在60歲以上只有1.23位。同樣地在日本到五月底止，79.5%的確診案例都是10-19歲；而在英國、美國、澳大利亞也觀察到類似的感染年齡分佈偏低的現象。

六月底在自然雜誌，香港與英、美國團隊發表基因演化分析，考慮地點、時間、物種三因子來採樣，系統性地納入了近千株的(286人株、100豬株、411禽株)流感病毒基因來估算這隻新型A/H1N1病毒的祖先何時出現。有趣的是大部份八段基因可追溯到豬流感病毒株距離現在平均約有10年之久，代表豬流感流行病學一直都被忽略，現今A/H1N1新型豬流感

的爆發，曝露出多年來並沒有採樣足夠豬流感株，以致無法確實找出它在豬身上的近親，但這隻新型 A/H1N1 的基因組合的祖先可能早在豬群中傳播多年。與之前研究類似的發現則是，使用“最近共同起源”演化分析目前所有新型 A/H1N1 案例的各八段基因，發現新型流感病毒約在 2009 年 1 月 21 日 (95% 信賴區間為 2008 年 8 月 3 日到 2009 年 3 月 13 日) 產生，每段基因最早的產生應不早過 2008 年 3 月。

豬流感病毒背景介紹

流感病毒顆粒是靠它的 HA 糖蛋白與宿主細胞所表現的接受器 (receptors) 結合進入宿主細胞進行感染，而不同物種的細胞接受器所表現的唾液酸 (sialic acid) 和半乳糖 (galactose) 分子有不同的鍵結方式 (linkage)。禽流感病毒是與 α -2,3 linkage 結合感染細胞，這種鍵結方式的受器會表現在鴨子的小腸表皮細胞，但不會表現在人類上呼吸道。而人類流感病毒最佳的是透過與 α -2,6 linkage 結合，這會表現在人類呼吸道表皮細胞，禽類腸道細胞則缺乏。這些病毒受體不同的糖類鍵結方式結果造成，人類流感病毒在一般情形下無法有效率的在鳥禽類中感染及複製，禽流感病毒也無法在人類有效率的複製。相較之下，豬的呼吸道上皮細胞同時擁有禽流感與人類流感病毒感染所需的 α -2,3 linkage 和 α -2,6 linkage 接受器，所以豬同時

被此兩物種的流感病毒感染的機會就大幅提升了。因此，豬被認為製造人類流感、禽流感與豬流感 (swine flu) 三種病毒基因重組混合株 (triple reassortant) 的中間宿主。

A/H1N1 新型流感病毒的基因來源分析

多篇美、英、荷、香港的研究以基因分析來探討此一 A/H1N1 新型流感病毒的基因來源與重組的發生時間等，所有都證明它應是由豬跳到人的一新興株。分析多個感染新型 A/H1N1 人案例的病毒 8 段基因序列，與全球各物種的流感病毒序列比對顯示，新 A/H1N1 的 HA (hemagglutinin, HA; 紅血球凝集素)、NP 和 NS 共 3 個基因片段，接近目前北美的典型豬流感 (classical swine flu) 病毒株群；PB2 和 PA 共 2 個基因與自 1998 年開始在北美豬隻流行的一隻典型的 H3N2 “三重組株” (classical swine triple reassortant) 有高親源性；PB1 基因也是包含在上述的典型 H3N2 “三重組株”中，但其更早祖先則是 1968 年時的香港“人流感”。NA (neuraminidase, NA; 神經胺酸酶) 與 M (matrix) 基因則不與北美系 (North American lineage) 的豬流感相近，反而比較接近於源自“歐亞大陸系” (Eurasian lineage) 的豬流感病毒株。至於基因上是否能透露出新型 A/H1N1 的傳染力或致病性的特性，幾個由 1918 的 H1N1 或高致病性 H5N1

研究所知可提高“傳染人能力”的基因改變，在新型 A/H1N1 中尚未被偵測到；例如在 PB2 的 627 由 K 變 E，PB1 的 F2、NS1 的 PDZ 結合基鍵區域 (ligand domain) 等，在新型 A/H1N1 中都是缺乏的；所以這次新型 A/H1N1 的高傳染力的基因特徵與之前株的機轉是不同，仍需更多的分析研究來釐清。

在主要表面抗原糖蛋白 HA 與 NA 的源系分析，新型 A/H1N1 的 HA 基因與美國 1999-2000 年的 A/swine/Indiana/ P12439/00、亞洲廣西 2005-2006 年的兩株 A 型 H1N2 豬流感病毒較接近，但是與季節性人流感 H1N1 的 HA 基因差異極大。這兩株 A 型 H1N2 本身是一種新的重組株，加上在北美近十年流行並感染過人類的另外一隻 A 型 H1N1 “三重組株”，與新型 A/H1N1 在 HA 的基因上都同屬於“北美系”豬流感病毒。把新型 A/H1N1 的 HA 與北美曾盛行的 H1N1 豬流感三重組株作比較，在 HA1 基因仍約相差了 20-30 個胺基酸，但基因分析顯示新型 A/H1N1 的 HA 上的結合體位點 (receptor binding sites) 是和上述的北美系豬流感病毒的一樣。至於新型 A/H1N1 的 NA 基因，則與歐亞大陸系的較為接近，但與北美三重組株的 NA 基因有極大的差異，約有超過 77 個胺基酸不同，明顯顯示 A/H1N1/2009 在兩個主要抗原基因 HA 與 NA，已經有源自於不同演化系種豬流感病毒的證據。

新型 A/H1N1 流感病毒的 M 基因，如同 NA 基因的源系，與歐亞大陸系 A 型流感的病毒株有極高相似性。最早幾株 A/H1N1/2009 流感病毒的初步藥物試驗顯示，使用神經胺酸？抑制類 (neuraminidase inhibitor) 的抗病毒藥物，如 oseltamivir 和 zanamivir，仍是有效的；然而其他藥物，如 M2 蛋白抑制類抗病毒則有感受性降低的現象。分析患者病毒 M2 蛋白基因，若是第 31 個胺基酸由 Ser 突變成 Asn，則會造成 M2 蛋白抑制類抗病毒藥物 (M2 blockers) 如 amantadine 和 rimantadine 失效，此次加州案例的病毒已有這個突變。因為歐亞大陸系 A 型流感病毒對 M2 蛋白抑制類藥物本來就有較高比例的抗藥性，然而這樣的表現型在美國豬流感病毒還未曾出現過，也支持新型 A/H1N1 的 M 基因與歐亞大陸系株的親源性較高、而與北美系較遠的說法。不幸的是在此次新型 A/H1N1 爆發流行三個月後，也就是在 2009 年的六月底左右，對 oseltamivir 有抗藥性的新型 A/H1N1 株，就是在 NA 基因上帶有 274 點由 H 變 Y 突變的株已經被發現了，分別在丹麥、日本與香港的三個獨立感染的病人。前二者是在使用 oseltamivir 治療時，發展出抗藥性；但第三例則還未曾用過 oseltamivir，她是在六月中由舊金山飛來香港時發燒被篩檢到，培養病毒後發現有抗藥性，表示是被別人傳染到一株已具有抗藥突變的新型 A/H1N1。這也暗示說抗

oseltamivir 的新型 A/H1N1 可能已在美國或其它地區傳播中，這對防疫與治療來說，無疑是雪上加霜。所幸 zanamivir 對這些株還有效，而且抗 zanamivir 的株目前也還沒看到。

至於新型 A/H1N1 的其它基因，PB2、PB1、PA、NP 和 NS，這 5 個基因都與北美豬隻近期流行的一隻典型的 H3N2 “三重組株” (classical swine triple reassortant) 有高親源性。而這五段內部基因同時出現的組合，在許多北美的豬流感株中常被偵測到，研究豬流感的團隊稱它為“三重組內部基因組合莢” (triple reassortant internal gene cassette)。這個組合中的三個“聚合酶” (polymerases)，PB2、PB1、PA 基因組合被懷疑具有高度的繁殖與適應能力，可以和各物種流感株的 HA 與 NA 外部抗原基因搭配，組合出新型的豬流感，研究團隊假設這“組合莢”也是近年豬流感一直有效由人、禽引入新的 HA 與 NA，成功演化的動力之一。由“三重組株”衍生出的豬流感病毒曾有人感染的案例，例如 2005 年在美國威斯康辛州與加拿大，2006 年在加拿大；其中甚至有感染者並沒有接近到豬，故此 H3N2 三重組豬流感病毒株被懷疑有人傳染人的可能，所幸當時並沒有在人群散播開來的記錄。而在 2007 年夏美國俄亥俄州發生的人感染 H1N1 “三重組株”，這個豬流感病毒也帶有上述的組合莢，可能是近年來較大的一次豬傳人事件；26 人在農

牧產展上接觸或接近到豬後，發生中程度以上的流感症狀，當時案例都有豬接觸史，所以無法釐清有人傳人的可能。

豬流感病毒的流行病學與演化

由上述可知，北美大陸同時應該有很多隻豬流感病毒株盛行，才有機會製造出這隻歷經多次重組的 A/H1N1 新型流感病毒。首先了解北美大陸豬流感病毒的演化史，也用例子來說明新興重組株的潛在危險。從 1930 年到 1990 年在北美洲豬的流行性感冒，大部份是由典型的 H1N1 豬流感病毒 (classic H1N1 swine flu) 所造成。在美國 1976-1977 年、1988-1989 年和 1997-1998 年在豬隻所進行的血清學研究顯示，典型 H1N1 的血清陽性率 (28-51%) 比例較高，但 H3 型的陽性率大約只有 1%。然而在 1997 開始有了改變，H3 型血清陽性率增加到了 8%，同時也在美國和加拿大的豬隻分離到較多的 H3N2 病毒，至少有三種不同基因型或重組型。根據經驗知道，人類流感病毒也會傳染給豬，所造成的“人”株或“人豬”重組株能引發豬隻重要的臨床症狀。例如 1997 年 1 月加拿大的安特略省，一隻一週大的小豬死於肺炎，從中分離出一株未經基因重組的純種 H3N2 人類流感病毒 (Sw/ONT/97)。1998 年 8 月美國的北卡羅來那州豬隻中，分離出第一株包含人類 H3N2 流感病毒的 HA、NA、PB1 基因，

與典型豬流感病毒的M、NP、NS、PB2、PA基因的H3N2“人豬二重組”病毒株(Sw/NC/98)，造成豬隻呼吸道疾病、高燒，並且流產與死亡。1998年之後在美國多個農業州發生的豬流感流行，則含有更進一步的重組，包含來自人類流感病毒的HA、NA、PB1基因，典型豬流感M、NP、NS基因與禽流感病毒PA、PB2基因，就是H3N2“人禽豬三重組”病毒。隨後約在1999年底，這個第一代的三重組型H3N2，再與典型H1N1豬流感進行基因重組，產生第二代H1N2和H1N1豬流感重組病毒株。其中H1N2豬流感重組株，有感染到野生禽類與農場火雞的記錄。如此類似推演下去也可能重組出別的HA、NA組成型，例如2004年被偵測到的H3N1。而目前北美流行的豬流感病毒形成三大系列並行的局面：各種H1N1株、重組株H3N2、與重組株H1N2。

類似的演化與重組也發生在歐洲和亞洲大陸的豬流感病毒，只是基因庫的來源是該地區物種的流感病毒。相對於這次A/H1N1新型流感病毒的歷史是，在1979年後歐亞大陸豬隻流行兩株流感病毒：一是類似於1968年香港“人流感”大流行(human-like swine influenza virus)的一株H3N2，二是“源於禽流感”(avian-like)的一株H1N1。兩者間的重組株在1983年左右被首次偵測到，是隻外表帶著香港H3N2人流感的HA3、NA2，內在

帶著H1N1禽流感那株的其它6段基因。這隻H3N2重組株與其衍生後代，從此在歐亞大陸的豬群中流行，並且也曾經感染過人，發生在1992-1993年於荷蘭、1999年於香港，分別是3個小孩的獨立事件。接著歐亞系的H3N2重組株又與源於禽流感的那株H1N1再重組，得到第二代的H1N1與H1N2重組株，1990年後也在歐洲流行。

結語：對人類的影響

流感病毒這樣不斷地重組產生新的重組株，再加上每段基因原本就有的持續突變演化(antigenic drift)，使得監控疫情與疫苗的選用複雜化，也讓診斷分辨任一株H1N1流感是否為新興株變得困難；因為不管是典型的株、或混到其它物種流感基因的株，雖然表面抗原理論上應該呈現H1，但其實病毒的抗原性已不同到無法以舊有抗H1抗體中和了。而且能暴發流行的新興重組株具有有效感染新物種宿主的能力，也似乎有高致病能力，例如這次造成美墨流行的新型H1N1也是經過多次重組，還含有歐亞大陸的NA與M，這兩個基因對當地的人或豬應是新的抗原。流感病毒這些不同物種間的重組，變造成了人類每一百年間有3至4次新流感大流行的疫情，使全球人類健康及經濟受到重創。此次新型A/H1N1流感將如何演變或再重組，或到2009年秋冬時在北半球將如何流行，對現有的抗病

毒藥物抗藥性的程度，都是未來幾個月必須嚴密監測的重點。

參考文獻

1. Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *MMWR* 2009;58:521-4.
2. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al: Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009;325:197-201.
3. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, et al: Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 2009;459:1122-5.
4. Dawood FS, et al: Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in human. *N Engl J Med* 2009 Jun 18;360(25):2605-15.
5. Boelle P, Bernillon P, Desenclos J: A preliminary estimation of the reproduction ratio for new influenza A (H1N1) from the outbreak in Mexico, March-April 2009. *Euro Surveill* 2009; 14.
6. Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, et al: Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): Early findings. *Science Express* 2009 Jun 19;324(5934):1557-61.
7. Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, et al: Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med* 2009 Jun 18;360(25):2616-25.
8. Olsen CW: The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res* 2002;85:199-210.
9. Kothalawala H, Toussaint MJ, Gruys E: An overview of swine influenza. *Vet Q* 2006;28: 46-53.
10. Ducatez MF, Webster RG, Webby RJ: Animal influenza epidemiology. *Vaccine* 2008;26 (Suppl 4):D67-9.
11. Vincent AL, Ma W, Lager KM, et al: Swine influenza viruses a North American perspective. *Adv Virus Res* 2008;72:127-54.
12. Ito T, Suzuki Y, Suzuki T, et al: Recognition of N-glycolylneuraminic acid linked to galactose by the alpha 2,3 linkage is associated with intestinal replication of influenza A virus in ducks. *J Virol* 2000;74:9300-5.
13. Update: novel influenza A (H1N1) virus infections-worldwide, May 6, 2009. *MMWR* 2009; 58:453-8.
14. Mayers KP, Olsen CW, Gray GC: Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin Infect Dis* 2007;44:1084-8.