

宜蘭地區兩起 B 型流感群聚感染之病毒序列分析

邱淑君、林智暉、蘇永瑞、李政壕、吳和生

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

摘要

95 年 11 月初接連有礁溪某國中以及員山鄉某國小的學校流感群聚疫情，由於高陽性率以及密集的群聚疫情發生，為了解兩起 B 型流感群聚的病毒分離株型別及其特性，本研究除將所採集之檢體進行 real-time RT-PCR 臨床鑑定，同時也進行病毒株的細胞培養，檢測病毒的抗原性，並將表面抗原 HA 以及 NA 的基因片段定序，分析造成宜蘭地區兩起群聚事件病毒株之差異與特性研究。結果顯示，群聚疫情中所分離出之病毒株可能具有相當潛力成為今年 (2006-07) 流感年季的主要分離株。而依據病毒的 HA 特性，包括基因序列以及病毒抗原性的表現，均與 2006-07 年 WHO 建議之流感疫苗株 B/Malaysia/2506/2004 相似，今年的疫苗株對其應仍具相當的保護力，施打疫苗仍為預防流感，減輕症狀的最佳選擇之一。

關鍵字：流感病毒、群聚疫情、real-time RT-PCR、序列分析

前言

流感病毒屬於正黏液病毒科 (*Orthomyxoviridae*)，具有特殊的分節性 (segment) 的基因體組成，包含 8 段負股型的單股 RNA，可先經轉譯過程 (transcription) 再轉錄 (translation) 成為具功能性之蛋白質。其中第 1 至 3 片段轉錄出具有複製作用的聚合酶 (Polymerase)，第 4~7 段基因分別轉錄出表面抗原紅血球凝集素 HA (hemagglutinin)、核蛋白 NP (nucleoprotein)、釋放病毒粒子的神經胺酸酶 NA (neuraminidase) 及質體蛋白 (matrix

民國 96 年 4 月 16 日受理；民國 96 年 5 月 3 日接受刊載

通訊作者：邱淑君；聯絡地址：115 台北市南港區昆陽街 161 號

Email：schiu@cdc.gov.tw

protein)，第 8 段基因則轉錄出非結構蛋白質 NS1 以及 NS2 [1]。其中 HA 以及 NA 兩個表面蛋白在病毒免疫特性分析時最被廣泛進行研究，因為表面抗原的改變常影響病毒抗原性的表現，若抗原性發生大幅度改變，使得疫苗注射所產生的抗體對其不具有有效的保護力時，就容易造成局部或大規模的疫情流行。

近年來 B 型流感病毒主要的兩大演化分支 B/Yamagata lineage (B/Yam) 及 B/Victoria lineage (B/Vic)，在日本、美國及其他地區都有抗原改變的趨勢，並已在全球多地造成流行疫情，此抗原的改變與 B 型流感病毒兩大演化分支同時期的流行所造成病毒基因組成的改變有關 [2-5]。B 型流感病毒在台灣每年的流行活躍程度不一，以 1999-2002 年間為例，B 型流感病毒的分離數各為 202, 603 及 435 件，佔期間總流感分離件數的 43.9 % [6]。而 2004-05 流感年季，台灣地區爆發近年來最大一波 B 型流感流行疫情，分離株數及陽性率均為歷年來最高，其中分離株型別 B/Yam 與 B/Vic 比例幾乎為 1:1，2004 年 11 月至 2005 年 1 月，病毒株血清型別以 B/Yam lineage 為主，而在 2005 年 1 月到 6 月底，則以 B/Vic lineage 為主 [7]。

2005-2006 年季台灣地區的流行性感冒病毒主要以 A 型流感為主，其中又以 A/H1N1 次型別為多數，佔總分離數之 64.3%。截至 2006 年 6 月底為止台灣地區的流感病毒分離情況仍以 A 型流感為主。然而自 2006 年 5 月開始，台灣陸續發生數起上呼吸道 B 型流感群聚事件，包括台北縣、基隆市以及宜蘭縣等北台灣地區，尤其宜蘭縣在 11 月初接連有礁溪鄉某國中以及員山鄉某國小的學校群聚事件發生，更顯現出在監測工作上對於病毒的抗原性與其基因分析的重要性。

為了解宜蘭地區的 B 型流感密集群聚的病毒分離株型別及其特性，除將檢體進行 real-time RT-PCR 鑑定外，也同時進行病毒株的細胞培養，檢測分離株抗原性，並進行表面抗原 HA 以及 NA 的基因片段定序分析，以了解造成宜蘭地區兩起群聚事件病毒株之差異與特性研究。

材料與方法

檢體來源

礁溪鄉某國中共採檢 14 支咽喉拭子 (throat swab)，其中女性 8 件，男性 6 件。發病日從 95 年 10 月 27 日至 10 月 31 日，而所有患者均在 10 月 31 日進行採檢，11 月 1 日送至本局研究檢驗中心流感病毒實驗室；而員山鄉某國小，發病日分別為 95 年 11 月 6 日以及 7 日，分別在 11 月 8 日以及 11 月 9 日進行採檢，共採檢 10 支 咽喉拭子，其中女性 3 件，男性則有 7 件，於 11 月 10 日送至實驗室。

檢體前處理

將咽喉拭子檢體與內含 0.5 ml 運送培養基充分攪拌(vortex)，使病毒自棉棒脫離至培養基中，將培養液取出置於 1.5 ml Nalgene 檢體保存管中，除取出欲接種以及進行 RNA 萃取的檢體量外，其餘檢體均冰至-80°C 保存。

流感病毒核酸萃取

以 QIAamp viral RNA Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 進行核酸萃取。先將 560 μ l 之 carrier RNA+ AVL 混合液與 140 μ l 檢體混合均勻，室溫靜置 10 分鐘後，加入 560 μ l 100%酒精混合均勻後，移至 spin column，離心 8000rpm 1 分鐘。之後丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW1 溶液 500 μ l，再離心 8000rpm 1 分鐘。之後丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW2 溶液 500 μ l，離心 14000rpm 3 分鐘。

最後將 column 置於已標示完整之 1.5ml 微量離心管，加入 50 μ l 之 DEPC 水，於室溫下放置 1 分鐘後，再以 8000rpm 離心 1 分鐘，收集離心液，進行後續分析，剩餘病毒核酸則存至-20°C 備用。

Real-time RT-PCR 鑑定

以 ABI 7000 分析儀進行 multiplex Real-time RT-PCR 反應。利用 AB 廠牌之 one-step RT-PCR kit 進行反應溶液之配置，配方依據製造廠商所建議的比例，包括 2X Buffer 12.5 μ l、Enzyme Mix 0.67 μ l、A 型及 B 型流感的反應核酸引子各 1 μ l (10 μ M) 及探針各 0.5 μ l (5 μ M)，補 DEPC 水至總體積為 20 μ l

之後，加入 5 μ l 前一步驟萃取出之病毒 RNA，進行 Real-time RT-PCR 檢測。反應條件為 48°C 30 分鐘後，95°C 反應 10 分鐘。之後以 95°C 15 秒、60°C 1 分鐘的條件重複進行 40 個循環，最後再以儀器分析軟體進行結果研判。

流感病毒培養

將自咽喉拭子取出之病毒液經過濾後，取 100 μ l 檢體接種至 MDCK 細胞株，每天以倒立式顯微鏡進行細胞病變 (CPE) 的觀察，培養 7-10 天後離心收取上清液，進行後續的鑑定及分析。抗原定性方面以血球凝集抑制法 (HI test) 利用 WHO 流感標準實驗室所提供之流感病毒檢驗標準試劑組 (WHO Influenza Diagnosis Kit) 進行流感病毒血清型別的鑑定。

流感分離株 HA 以及 NA 基因序列定序及分析

將培養陽性之病毒液同樣以 QIAamp Viral RNA Kit 進行病毒核酸純化，之後分別進行病毒 HA 以及 NA 基因片段之核酸增幅反應。其中 HA 片段複製長度為 1115 bp，包含 HA1 基因全長；而 NA 片段複製長度為 1157 bp，包含 NA 基因全長。PCR 反應完成後，將產物以 QIAquick PCR purification 試劑 (QIAGEN, Hilden, Germany) 純化後，以 sequencing primer 利用 BigDye v3.1 Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) 進行增幅反應，再以 Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer 進行核酸定序。為防止交互污染影響實驗結果之正確性，所有反應在不同時間，以不同批試劑重複進行定序。

定序反應所得之各病毒基因序列以 Lasergene 序列分析軟體進行整合 (assemble)，並以序列分析軟體 MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, version 3.1) 進行序列及演化分析。

結果

礁溪鄉某國中所採檢的 14 支咽喉拭子中，共有 9 支為 B 型流感病毒 real-time RT-PCR 檢測陽性 (圖一)，陽性率為 64.3%；而員山鄉某國小所採 10 支檢體中，共有 5 支為 B 型流感病毒 real-time RT-PCR 檢測陽性 (圖二)，

陽性率亦高達 50%。

將檢測 Ct 值較高的陽性檢體挑出進行病毒分離，其中礁溪群聚及員山鄉群聚疫情分別培養出 2 株流感病毒。經過間接螢光免疫法 (IFA) 進行檢測確認爲培養陽性後，以血球凝集抑制法進行抗原性檢測，結果 4 株病毒均屬於 B/Vic lineage，在抗原性的表現上均與 2006-07 年世界衛生組織所建議之疫苗株 B/Malaysia/2506/2004 相近，分離株對 B/Malaysia/2506/2004 抗血清中和效價爲 640，而 B/Malaysia/2506/2004 標準抗原對標準抗血清的中和效價則爲 1280，顯示在 HA 抗原表現上，與 B/Malaysia/2506/2004 疫苗株表現相當接近。

群聚分離株的 HA 及 NA 基因經定序分析後，發現分離病毒的 HA 序列與疫苗株 B/Malaysia/2506/2004 基因演化樹爲同一群 (圖三)。而在胺基酸序列的比對上差異亦甚小，此結果與血球凝集抑制法檢測結果相符，就 HI 檢驗結果顯示分離株對 B/Malaysia/2506/2004 抗血清 HI 效價與 B/Malaysia/2506/2004 標準抗原之 HI 效價僅有 2 倍差異，表示抗原性表現與 B/Malaysia/2506/2004 差異不大。而 NA 序列演化樹分析結果如圖四所示，發現 2006 年 B/Vic 流感分離株明顯被區分爲 2 群，分別爲 clade I 以及 clade II，而 4 株分離株經由基因比對及計算結果，均屬於 clade I。

討論

B 型流感病毒株的基因重組(reassortment)現象，自 2000 年起在全球各地陸續被發現。由於兩個 lineage 的 B 型流感病毒在同時間同地區一起流行，而發生了病毒基因重組的現象，其中 B/Vic 病毒的 HA 基因雖仍屬 B/Vic，但在 NA 基因上，卻帶有 B/Yam 病毒的基因片段 [8, 9]。而經由病毒序列分析顯示，此次宜蘭縣兩批群聚所分離出之病毒株，亦爲此類重組病毒 (圖三及圖四)。事實上今年台灣地區所分離出的 B 型 Victoria lineage 分離株，均帶有 B/Yam lineage 的 NA 片段，換言之，台灣 2006 年的 B/Vic-like 病毒株，均爲此類重組病毒。分析神經胺酸酶基因序列時，發現 2006 年台灣地區的 B/Vic

病毒株除了 NA 屬於 B/Yam-like，又再次分為兩群。而近期北台灣地區所分離到的 B 型流感分離株，跟此次宜蘭所發生的兩件群聚事件分離株，均被歸類為 clade I 病毒群（圖四）。

流感病毒基因片段的交換，是產生新型流感病毒的主要機制之一。自 2002 年 2 月起，全球在埃及、以色列、英國及美國等地陸續發現 A (H1N2) 型流感病毒，經專家學者比對基因序列發現此病毒株應由當時的 A (H1N1) 及 A (H3N2) 型病毒基因序列重組而形成的新型病毒。本局當時曾對台灣地區所有已分離出為 A 型 H1 病毒株進行神經胺酸酶基因序列分析，但並未發現台灣有 A (H1N2) 型流感病毒。A (H1N2) 型流感病毒曾在 1988 年 12 月至 1989 年 3 月在中國大陸 6 個城市被分離出，但在當時並未擴散造成流行。而 2001 年開始出現的 A (H1N2) 型病毒由於其 HA 基因片段型別與當時流行病毒株 A/New Caledonia/20/99(H1N1) 的 HA 相似，而 NA 基因片段序列與流行病毒株 A/Fujian/411/2002(H3N2) 型的 NA 相似，而且在抗原性的測定上，與當時的 H1N1 型疫苗株 A/New Caledonia/20/99 並無顯著性的改變，故世界衛生組織評估疫苗應可對此 A (H1N2) 新型病毒具有保護力〔10〕，而經過五年的持續監測，也證實 A (H1N2) 病毒確為零星出現，並未造成大規模疫情〔11〕。

病毒基因的片段重組造成流感病毒的多型性，因此造就了在同時期不同病毒株間流行的優勢，也造成病毒在環境中重複感染人類〔12〕。病毒的抗原性表現不僅呈現在 HA 基因的序列改變，其他的基因片段如 NA 及其他各內在基因(internal genes)的組成變化亦會影響病毒抗原性的表現〔1,12〕。由於幾次群聚病毒分離株均屬於 clade I 病毒群，顯示 clade I 病毒相較於 clade II 更容易在人群間快速散佈，而此特性是否與 NA 的胺基酸變異有關，仍需要進一步的進行研究探討。

本研究透過流感群聚病毒的基因序列分析顯示，B/Vic-like 的病毒目前仍持續在演化當中，尤其 Clade I 群病毒，除了在群聚疫情中被分離出外，也在一般監測檢體中出現，顯示此群病毒的活動力強，具有相當潛力成為今年

(2006-07)冬季的主要分離株(dominant strain)；而事實上經由 2006-2007 年流感病毒監測資料結果亦顯示，宜蘭流感群聚中所分離得到的病毒，確實也在本季造成一波 B 型流感疫情，成為本季的主要流感分離株。依據病毒的 HA 特性，包括基因序列以及病毒抗原性的表現，均與 2006-07 年流感疫苗株 B/Malaysia/2506/2004 相似，故雖然此病毒株目前仍非常活躍，但今年的疫苗株對其應仍具保護力，施打疫苗仍為預防流感，減輕症狀的選擇之一。

結論

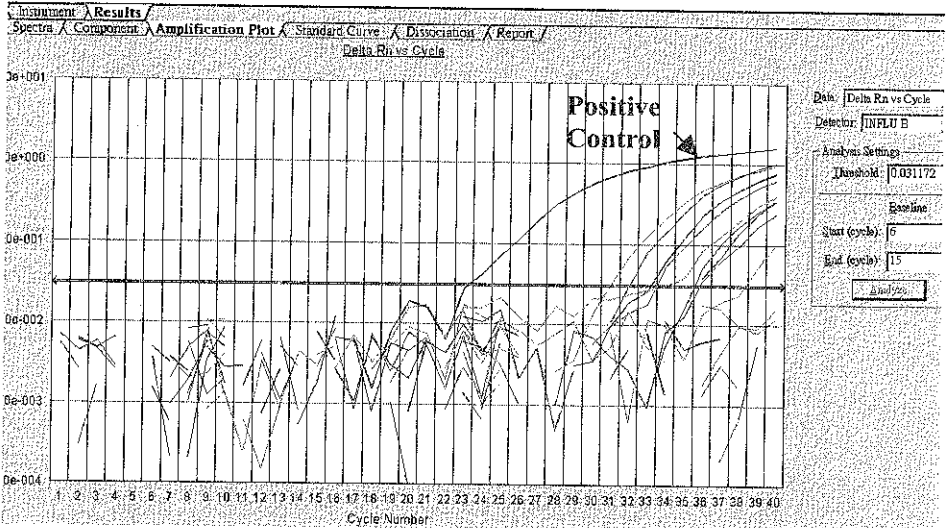
基於上述分析研究顯示，以血球凝集抑制法進行 HA 抗原性偵測，為初步判斷病毒抗原性的重要依據。但抗原上的變異若僅研究 HA 基因上的組成變異，似乎不足以鑑別病毒在其他基因上發生突變、重組所造成的病毒特性的改變，必須經由其他基因的深入探討病毒在基因上的轉變與抗原表現特性間的關聯性。

流感病毒由於其基因組成的特性，每年病毒流行的型別均不相同，往往即使次型別相同，血清型別也有差異，因此流感病毒的持續監測對於流感疫情的防治相當重要。由本次研究結果顯示，結合實驗室抗原性以及基因序列資料，在疫情剛發生初期，應能提供足夠資訊，以利在疫情防治之政策擬定上，做最正確的判斷及處置。

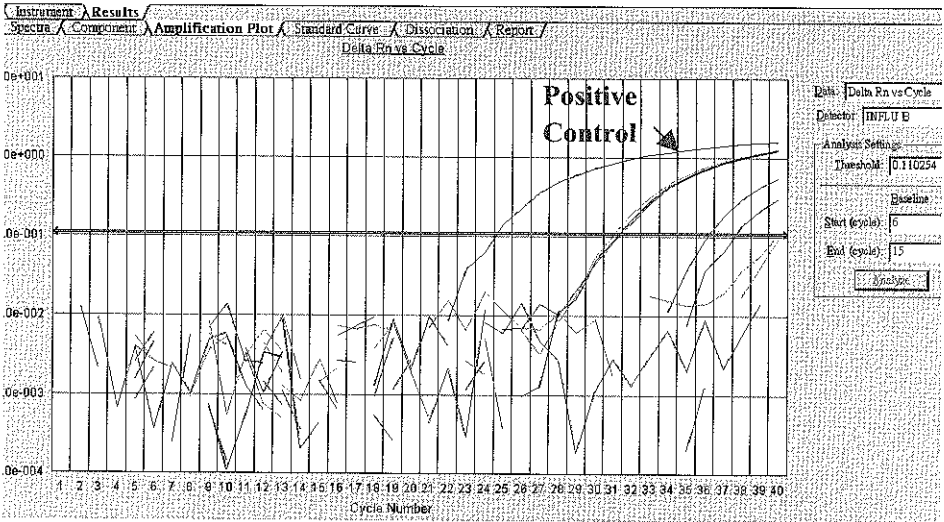
參考文獻

1. McCullers JA, Saito T, Iverson AR. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003. *J Virol.* 2004; 78: 12817-28.
2. Barr IG, Komadina N, Durrant C, et al. Circulation and antigenic drift in human influenza B viruses in SE Asia and Oceania since 2000. *Commun Dis Intell.* 2006; 30: 350-57.
3. Daum LT, Canas LC, Klimov AI, et al. Molecular analysis of isolates from influenza B outbreaks in the U.S. and Nepal, 2005. *Arch Virol.* 2006; 151: 1863-74.

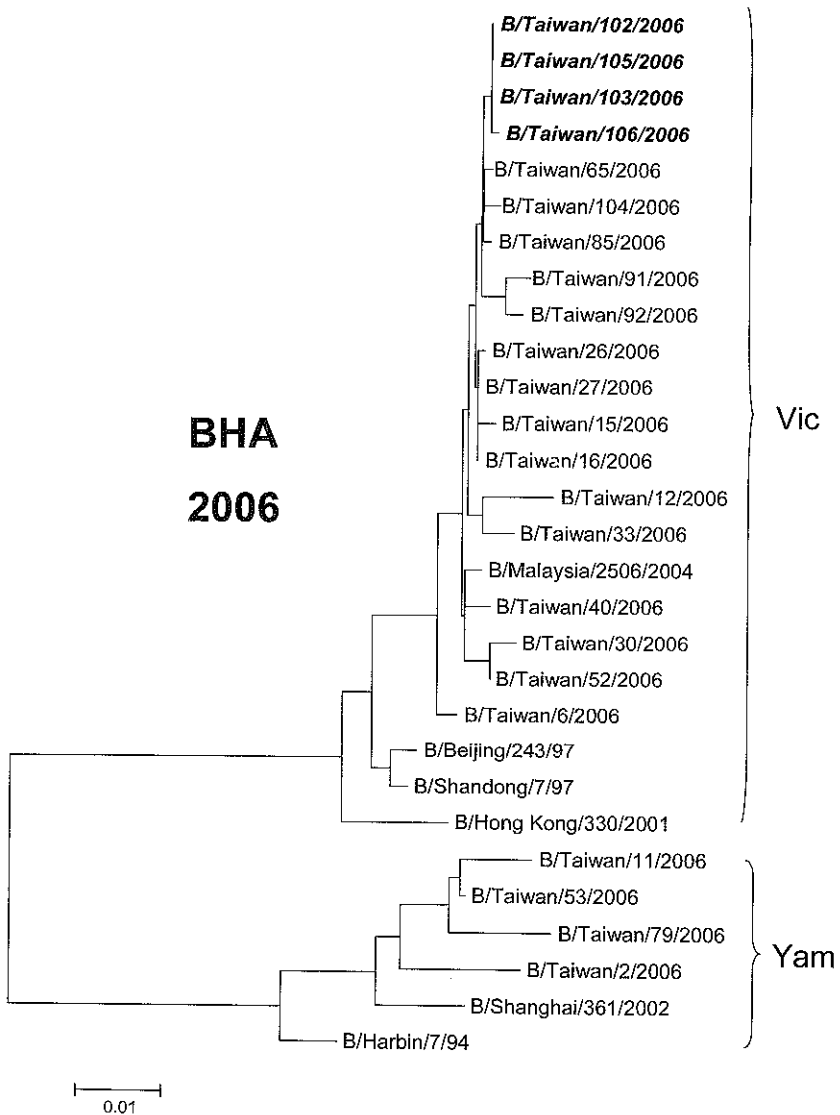
4. Motta FC, Siqueira MM, Lugon AK, et al. The reappearance of Victoria lineage influenza B virus in Brazil, antigenic and molecular analysis. *J Clin Virol.* 2006; 36: 208-14.
5. Nakagawa N, Nukuzuma S, Haratome S, et al. Emergence of an influenza B virus with antigenic change. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3068-70.
6. Lin JH, Chiu SC, Su YJ, et al. Isolation of influenza viruses and influenza epidemics in Taiwan area, 1999-2002. *Options for the Control of Influenza V, 2003.* 2004; 430-34 pp.
7. Lin JH, Chiu SC, Shaw MW, et al. Characterization of the epidemic influenza B viruses isolated during 2004-2005 season in Taiwan. *Virus Res.* 2007; 124: 204-211.
8. Xu X, Lindstrom SE, Shaw MW, et al. Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses. *Virus Res.* 2004; 103: 55-60.
9. Shaw MW, Xu X, Li Y, et al. Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000-2001 and 2001-2002 seasons. *Virology.* 2002; 303: 1-8.
10. <http://www.who.int/entity/wer/2003/en/wer7845.pdf>
11. Chen MJ, La T, Zhao P, et al. Genetic and phylogenetic analysis of multi-continent human influenza A(H1N2) reassortant viruses isolated in 2001 through 2003. *Virus Res.* 2006; 122: 200-5.
12. Lindstrom SE, Hiromoto Y, Nishimura H, et al. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J. Virol.* 1999;73: 4413-26.



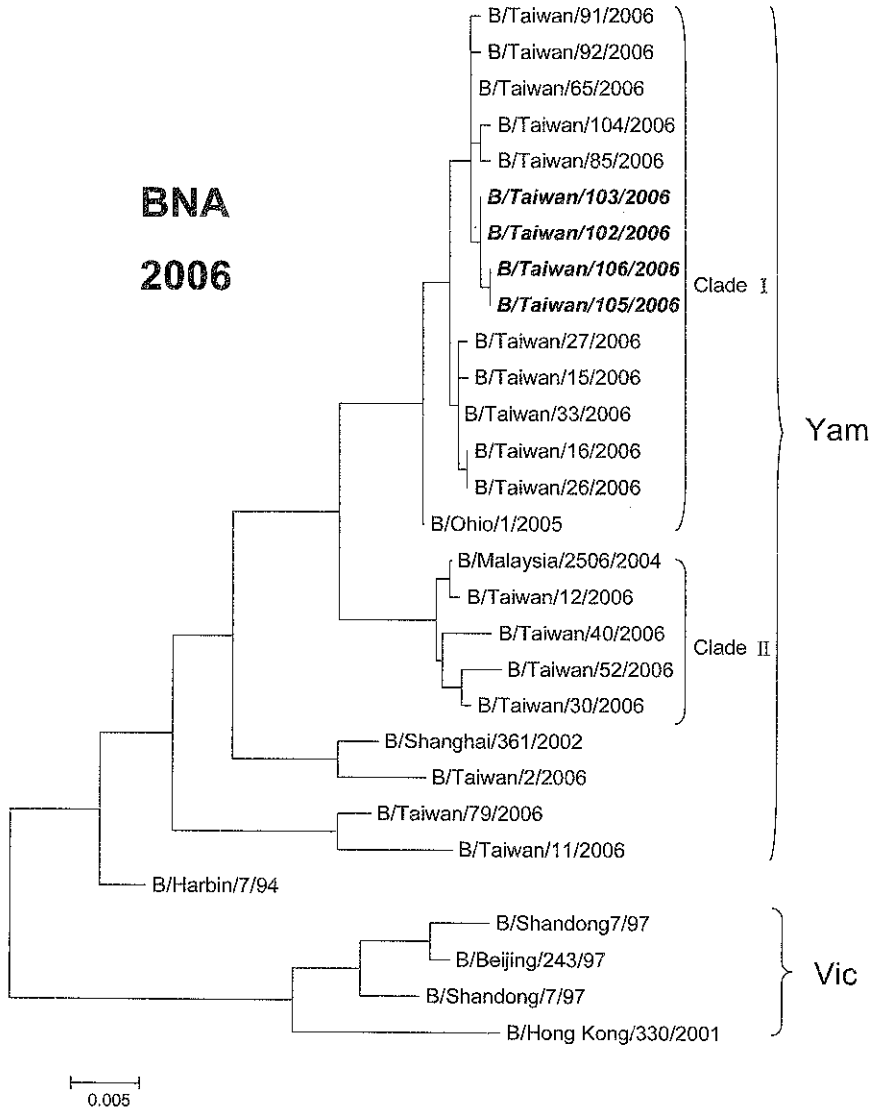
圖一、宜蘭縣礁溪鄉某國中流感群聚事件 real-time RT-PCR 檢測結果。14 支檢體中共有 9 支檢驗出 Influenza B positive，檢測結果 Ct 值介於 30-38 之間。Positive Control 為實驗 real-time RT-PCR 反應中之陽性實驗對照組。



圖二、宜蘭縣員山鄉某國中流感群聚事件 real-time RT-PCR 檢測結果。9 支檢體中共有 5 支檢驗出 Influenza B positive，檢測結果 Ct 值介於 30-37 之間。Positive Control 為實驗 real-time RT-PCR 反應中之陽性實驗對照組。



圖三、2006 年 B 型流感 HA 基因演化圖。其中宜蘭縣礁溪鄉及員山鄉群聚分離株，以粗斜體字表現。



圖四、2006 年 B 型流感 NA 基因演化圖。其中宜蘭縣礁溪鄉及員山鄉群聚分離株，以粗斜體字表現。