



個案報告-我國首例新型流感重症 確定病例之檢驗與病毒序列分析

楊季融、劉健良、羅 哲、林昭樺
陳浚榕、何雨霖、劉銘燦、吳和生

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

摘 要

今年 7 月 17 日，疾病管制局證實我國首例由 H1N1 新型流感病毒所引發之重症確定病例，患者是一名 34 歲男性，無潛在心肺等慢性疾病亦無旅遊史，日前因發生咳嗽、喉嚨痛、呼吸急促等症狀就醫，但症狀並未緩解並陸續引發多重器官衰竭，故送加護病房治療。呼吸道病毒實驗室於接獲通報後將患者咽喉拭子與痰檢體以 real-time RT-PCR 檢測後結果均呈現 H1N1 新型流感陽性反應。經由感染該患者病毒株之 HA、NA 與 M 基因序列分析後顯示該病毒株具有 S31N 變異，對於 amantadine 具抗藥性，而 NA 基因的第 274 個胺基酸仍為 Histidine，此株病毒對於 oseltamivir(克流感)仍為敏感。此外，將其基因序列與本局先前所分離之新型流感病毒株連同其他國家發表的病毒序列相較後顯示，該株帶有 D225G 的改變，演化分析結果亦顯示台灣的新型流感病毒株皆屬同一族群。由於此病毒株可能來自於社區，正確且快速的檢驗方法配合嚴密社區病毒監控與及時的使用抗病毒藥物，將可即時掌握未來 H1N1 新型流感病毒的變化，以期有效防止重

- 西元 2009 年 7 月 28 日受理
- 通訊作者：楊季融
- e-mail : ggyang@cdc.gov.tw
- 西元 2009 年 8 月 21 日接受刊載
- 聯絡地址：台北市南港區昆陽街 161 號

症與死亡案例發生。

關鍵字：新型流感，即時 RT-PCR，抗藥性，演化分析

前言

這波新流感病毒感染疫情最早在 3 到 4 月間於美國與墨西哥被發現。患者具有類流感之症狀包括發熱、頭痛、肌肉痛、咳嗽、流鼻水等，較嚴重者會引起嚴重急性呼吸道疾病如肺炎，有致死的可能性。根據世界衛生組織公佈的資料，至今全球已有 103 個國家共七萬多個病例，患者死亡率約 0.1-0.5%[1]，H1N1 新型流感病毒儼然以一種溫和且快速的型態於全世界蔓延。類似經由多次重組的 H1N1 流感病毒，在 1998 年已被發現，它集合了人、禽與豬病毒的特徵[2]，但人類當時被此種病毒感染的個案並不多，根據美國資料自 2005 到 2009 年間僅檢出 10 例偶發個案。

隨著 H1N1 新型流感確定病例於國際間迅速增加，世界衛生組織於 4 月 29 日將新型流感病毒全球警戒等級調升至第五級，並隨後於 6 月 11 日將全球 H1N1 新型流感疫情等級提升至最高等級(第六級)，該病毒已於全球引發大流行。台灣疾病管制局亦於疫情開始之初立即將之列為第一類法定傳染病，疑似病例須於 24 小時內完成通報，確定病例則應強制或移送指定隔離治療機構實施治療。我國首例新型流感確定病例於 5 月 20 日確認，個案為 52 歲外籍人士，僅出現輕微症狀，自此之後，新型流感確定病例迅速累積，短短一星期已有十例確定病例。隨著世界衛生組織於 6 月 11 日定位 H1N1 新型流感疫情屬溫和大流行，程度與季節性流感相當，同時宣稱已無法採用圍堵策略將其侷限於部分區域，我國衛生署亦迅速配合於 6 月 19 日正式公告，依據傳染病防治法第三條，將 H1N1 新型流感自第一類法定傳染病刪除，罹患流感併發重症屬 H1N1 新型流感病毒感染者，將依第四類法定傳



染病之報告時限、通報及相關防治措施規定辦理，防治策略也更加著重於社區疫情監控。根據本局監測資料顯示，截至今年 7 月 17 日為止，我國 H1N1 新型流感確定病例(含本篇報導之重症病例)總計 93 例，其中包括群聚事件 2 起。社區病毒監測從 6 月 1 日起亦檢出 15 例陽性個案，H1N1 新型流感病毒分率約為 88.2%，除首例重症個案外，所有 H1N1 新型流感確定病例的症狀均屬輕微，且多數已痊癒。

世界衛生組織已定義新型流感確定病例可以下列三種方法確認：(1)具專一性之 RT-PCR 或其衍生方法。(2)直接分離出 H1N1 新型流感病毒。(3)患者之新型流感中和抗體達四倍上升。本篇文章係報導疾管局呼吸道病毒實驗室以 real-time RT-PCR 確認我國首例新型流感重症確定病例之檢驗流程，同時亦將感染該名患者之新型流感病毒株的核酸序列進行後續分析，除釐清它對於抗病毒藥 amantadine 與 oseltamivir 之感受度外，也將該病毒株的核苷酸與胺基酸序列與本局及其他國家目前已分離之 H1N1 新型流感分離株相比較，探討其差異性。

材料與方法

流感重症病例定義

根據疾病管制局定義，患者出現類流感症狀後四週內，發生(1)肺部併發症(Pulmonary complications)且住院者。(2)神經系統併發症(Neurological complications)。(3)心肌炎(myocarditis)或心包膜炎(pericarditis)。(4)侵襲性細菌感染(Invasive bacterial infection)。或(5)非符合上述臨床症狀，但個案需於加護病房治療，或死亡者(詳見疾病管制局網站 www.cdc.gov.tw)。通報後採集患者咽喉拭子(throat swab)，冷藏運送至疾病管制局呼吸道病毒實驗室進行檢驗。

患者基本資料

首例 H1N1 新型流感重症確定病例係 34 歲男性，於 7 月 2 日開始

出現發燒(38°C以上)、咳嗽、呼吸困難及喉嚨痛等症狀，7月9日因發生呼吸急促等症狀自行前往醫院就診，X光片顯示肺炎與未明原因下呼吸道疾病。就醫後症狀並未緩解並陸續引發多重器官衰竭，故送加護病房接受治療。據了解，該名患者並無潛在心肺等慢性疾病亦無旅遊史，顯示病原可能來自於社區。

檢體前處理與病毒核酸萃取

取 0.5mL DMEM(Invitrogen)培養液加入咽喉拭子中，大力攪拌(vortex)並以手指搓揉、擠壓棉棒，使附著在棉棒之病毒與培養液充分混合後，吸取培養液 140 μ L 以 QIAamp viral RNA Kit (QIAGEN)進行病毒 RNA 萃取，剩餘培養液置於-80°C 冷凍保存或經過濾後做後續病毒培養。

H1N1 新型流感分子生物檢驗

H1N1 新型流感病毒之分子生物檢驗係以 Roche LightCycler 480 儀器，進行 One-step real-time RT-PCR。使用之引子(primer)與專一性探針(Taqman probe)序列乃依據世界衛生組織所公布資料[3]，檢測標的包括：(1)A 型流感病毒(Influenza A)之 M(Matrix)基因，所有 A 型流感病毒均可偵測。(2)A 型新型流感病毒(Swine Influenza A)之 NP(Nucleoprotein)基因，可專一偵測 A 型新型流感病毒。(3)新型流感病毒 H1 亞型(Swine Influenza H1)之 HA(Hemagglutinin)基因，可專一偵測 A 型新型流感病毒 H1 亞型。鑑於檢驗之時效性，各新型流感通報病例經前處理之檢體均同時進行上述三個反應，試劑配方乃由實驗室自行研發，使用 LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes 試劑，內容物包括 DEPC Water 3.8 μ L、各專一性引子與探針 0.5 μ L、Activator 1.3 μ L、Enzyme Master Mix 7.4 μ L、Enhancer 1 μ L 以及病毒 RNA 模板 5 μ L，反應條件為 63°C 3 分鐘，95°C 30 秒。再以 95°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 3 秒重複進行 45 個循環，耗時約 1 小時 20 分鐘。



新型流感病毒培養

將檢體前處理後之 DMEM 培養液以 0.45 μ m 濾膜過濾，取 100~200 μ L 接種至 MDCK 細胞株，持續觀察細胞病變(CPE)，待 CPE 出現後(約培養 7-10 天)將培養管離心取上清液，以免疫螢光染色進行病毒鑑定。

新型流感病毒株 HA、NA 與 M 基因序列分析

將病毒液以 QIAamp Viral RNA 套組(Qiagen)萃取其 RNA，以傳統 RT-PCR 的方式，依照世界衛生組織所建議之引子序列[4]，分別將 HA、NA 以及 M 基因片段進行增幅，再以序列分析儀分析增幅片段之序列，每個基因片段均至少以 3 組定序引子進行定序，確保序列的正確性。抗病毒藥 amantadine 抗藥性的決定位點位於 M 基因片段的第 31 個胺基酸位點，若該位點為絲胺酸(Serine)，則為 amantadine sensitive，若該位點為天冬醯胺(Asparagine)，則為 amantadine resistant。Oseltamivir 抗藥性的決定位點則位於 NA 基因片段的第 274 個胺基酸，若該位點為組胺酸(histidine)，則為 oseltamivir sensitive，若為酪胺酸(Tyrosine)，則屬 oseltamivir resistant。得到各定序引子決定的序列後先以 Sequencher 4.5 軟體將序列片段組裝，再以 MEGA 4.0 與 Bioedit 軟體進行序列比對及演化等分析。

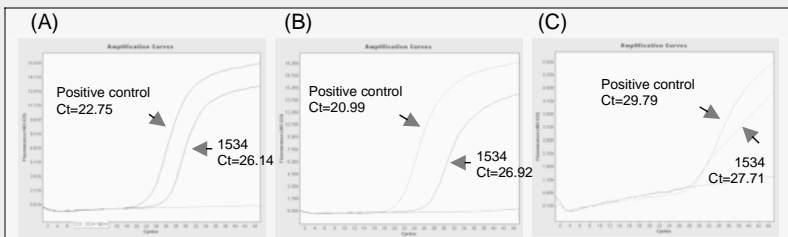
結果

Real-time RT-PCR 檢驗結果

病患咽喉拭子檢體在 7 月 11 日於三軍總醫院合約實驗室進行第一次檢驗，由於結果呈現 H1N1 新型流感弱陽性，故馬上通報疾管局呼吸道病毒實驗室協助進行複驗。實驗室於收到該名患者之原始檢體後，立即針對 A 型流感、A 型新型流感以及新型流感 H1 亞型進行 one-step real-time RT-PCR 檢驗。結果顯示 A 型流感與 A 型新型流感均

呈現微弱之陽性訊號，與三總合約實驗室之結果吻合。

由於該檢體之檢驗結果屬弱陽性，為求謹慎，實驗室主動取得該名患者於同一日送驗退伍軍人菌所採集之痰檢體，以相同之檢驗流程重複進行 H1N1 新型流感 real-time RT-PCR 檢驗。結果顯示痰檢體在 A 型流感、A 型新型流感及新型流感 H1 亞型等三個試驗，皆呈現明顯之陽性訊號(圖一)，Ct 值分別為 26.2、26.9 與 27.7。該名患者隨即於 7 月 17 日證實為我國首例由新型流感病毒引發之重症個案，實驗室亦立即進行檢體之病毒培養，以利後續相關分析。

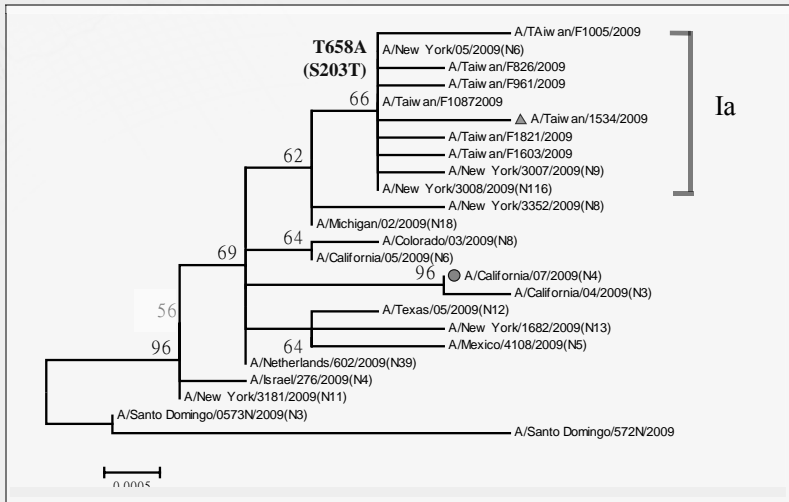


圖一、我國首例 H1N1 新型流感重症患者檢體 real-time RT-PCR 檢驗結果
圖(A) A 型流感試驗。(B)A 型新型流感試驗。(C)新型流感 H1 亞型試驗。陽性對照(positive control)與首例患者檢體(1534)之 RNA 螢光訊號均以箭頭標示。綜合以上結果，檢體 1534 判定為 H1N1 新型流感陽性。

新型流感病毒株 HA、NA 與 M 基因序列分析

為比較此患者體內之病毒株與本局及其他國家已分離之 H1N1 新型流感分離株是否有特定序列之差異，同時探討該病毒株對於抗病毒藥物 amantadine 與 oseltamivir 之敏感性，實驗室以傳統 RT-PCR 將其 HA、NA 與 M 基因片段增幅後，將產物進行核苷酸與胺基酸的序列分析並以 HA 基因序列進行演化分析。從 M 基因序列片段來看，第 31 個胺基酸位點為 Asparagine，顯示該病毒株對於 amantadine 具抗藥性。從 NA 片段的序列來看，第 274 個胺基酸位點為 Histidine，顯示對於

oseltamivir 仍為敏感。從 HA 基因演化分析圖顯示，本株新型流感病毒 (A/Taiwan/1534/2009)與本局及其他國家包括美國、墨西哥、荷蘭與以色列等先前的分離株位於同一族群(clade Ia；圖二)，此族群與被選作 H1N1 新型流感疫苗株 A/California/07/2009 的序列相比，具有核苷酸 T658A(胺基酸 S203T)的改變。此外，A/Taiwan/1534/2009 的 HA 基因第 225 個胺基酸為甘胺酸(Glycine)，與同族群包含本局現有之其他新型流感分離株的天冬胺酸(Aspartic acid)不同。



圖二、分離株 A/Taiwan/1534/2009 之 HA 基因演化分析圖

將病毒株 A/Taiwan/1534/2009(紅色三角形)連同本局與其他國家的 H1N1 新型流感病毒 HA 基因序列，以 MEGA 4.0 軟體進行序列比對後，再以 Neighbor-Joining Method 建構演化樹，其中各分枝 bootstrap 值為重複 1000 次計算而來。圖中顯示目前本局的分離株包括 A/Taiwan/1534/2009，皆位於族群 Ia，此族群與被選作 H1N1 新型流感疫苗株的 A/California/07/2009 (藍色圓圈)相比，具有 T658A(S203T)的改變。

討論

我國這波 H1N1 新型流感病毒疫情，從 4 月 26 日開始監測至 7 月 17 日，已有 93 名陽性確定病例，其中包括本篇文章報導之首例重症個案，目前並無因新型流感而死亡的病例，新型流感病毒亦已取代一般季節性流感病毒，病毒分率迅速攀升至目前的 88.2%，成為最主要流行的流感病毒型別。鄰近國家香港亦報導新型流感的比率約達 70%[5]，而美國則為 63.4%[6]，由此可見此病毒驚人的傳播力。在新型流感的防治策略上，疾管局與世界各國同步，從阻絕境外移入開始，擴大至防堵社區大爆發，並嚴密監測重症病患。目前新型流感感染症雖只有重症被列為第四類法定傳染病，對於確定病例亦不再進行強制隔離，但疾管局對於此種流感病毒的監測卻更加全面化。此外，從先前的文獻可知，雖然感染本波新型流感病毒之症狀嚴重性並不會超過一般季節性流感[7]，但病毒的變異卻也不斷地持續進行，防堵下一波新型流感疫情不僅在我國，於全世界均是一個重要的課題。

從患者不同檢體的檢驗結果來看，較深部的痰檢體同樣可測得病毒，且含量甚至比上呼吸道的咽喉拭子檢體高，顯示本株 H1N1 新型流感病毒似乎可同時感染人類的上、下呼吸道系統，這個現象與先前文獻報導的結果相同[8]，亦可從我們所觀察其 HA 基因序列第 225 個胺基酸已由 Aspartic acid 變成 Glycine 得到解釋。根據該報導指出，這種改變較常出現在禽類的流感病毒包括 H5N1，具有這種改變的病毒株可與 α 2,3 形式的唾液酸(sialic acid)結合，由於此種形式的唾液酸多位於人類下呼吸道系統，使病毒可從較深部的痰檢體中被偵測出來。日後對於新型流感重症通報病例之檢體採集，此類深部檢體應可作為適當的採集部位之一。

目前世界各國均陸續發現對克流感(成分為 oseltamivir)具抗藥性之 H1N1 新型流感分離株。經由實驗室分析 NA 基因片段序列的結果



來看，第 274 個胺基酸仍為 Histidine，顯示對於克流感仍具敏感性，克流感仍可做為臨床上治療新型流感病毒感染症之首選藥物。此外，感染此重症患者之 H1N1 新型流感病毒株與本局先前的分離株在 HA 的演化分析上皆屬同一族群，但具有胺基酸 D225G 的改變，此株病毒是否因此變異導致毒力改變進而引發重症，或毒力改變係與其他變異相關，需再進行另 5 個基因片段之序列分析後以探討可能原因。

目前本局已積極準備 H1N1 新型流感疫苗以及治療藥物克流感，為第二波秋冬可能面臨的疫情備戰。未來對於具有類流感症狀的患者，也會將 H1N1 新型流感納入優先病因考量，及早以克流感治療，避免重症及死亡病例發生。由於本次首例患者並無旅遊史，顯示病原可能來自於社區，社區病毒監測的重要性不言而喻。不只如此，快速而且正確的檢驗方法將在未來扮演不可或缺的重要角色，配合其它防疫作為，可使本局有效監控此病毒的活動情形。

參考文獻

1. WHO. Pandemic (H1N1) 2009 - update 58. 6 July 2009. Available at: http://www.who.int/csr/don/2009_07_06/en/index.html
2. Olsen, CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res* 2002; 85:199-210.
3. WHO. CDC protocol of realtime RT-PCR for swine influenza A(H1N1) revision 1. 30 April 2009. Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptcr/en/index.html>
4. WHO. Sequencing primers and protocol. 12 May 2009. Available at: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/sequencing_primers/en/index.html
5. Centre for Health Protection, HK. Flu express for the 2008/09 flu season (Volume 5, Number 23-28).
6. CDC. 2008-2009 Influenza Season Week 27 ending July 11, 2009. Available at: <http://www.cdc.gov/flu/weekly/>

7. Novel swine-origin influenza A (H1N1) virus investigation team. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009; 360: 2605-15.
8. Munster VJ, de Wit E, Fouchier RA, et al. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza virus in ferrets. *Science* 2009; 325: 481-3.