

計畫編號：DOH100-DC-2022

行政院衛生署疾病管制局 100 年度科技研究發展計畫

製備流感病毒之雪貂抗血清

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局

計畫主持人：劉銘燦

研究人員：楊季融、林煜晟

執行期間：100 年 1 月 1 日至 100 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

二、目錄：包括目次、圖次、表次、附錄。

頁數

封面	第 1 頁
目錄	第 2 頁
摘要	第 3 頁
本文	
前言	第 5 頁
材料與方法	第 8 頁
結果	第 12 頁
討論	第 17 頁
計畫重要研究成果及具體建議	第 20 頁
參考文獻	第 21 頁
圖、表	第 22 頁

三、摘要

研究目的: 流感病毒具高傳染性，且每年在很多國家都會造成區域性的流行。流感病毒具高突變性及抗原經常改變，因此，WHO（世界衛生組織）必須依照每年流行的病毒株而更新流感疫苗的組成。流感病毒的抗原性是利用雪貂（ferret）血清進行血球凝集抑制試驗（HI）來分析，雪貂是目前認為對流感病毒反應最佳的動物模式，其感染流感病毒後的症狀與人類非常相似，因此免疫後的雪貂血清被用來分析流感病毒的抗原性。為了監測台灣流感病毒的流行情形，我們使用流感病毒感染雪貂及製備免疫後的血清，來分析流感病毒抗原的變化。

研究方法: 挑選 2011 年台灣主要流行之病毒株與對疫苗株低反應株，進行雪貂免疫，免疫後得到的血清，使用於新分離出的台灣流感病毒的抗原性分析。

結論: 本計劃維護雪貂飼養與流感病毒感染雪貂的動物模式，並且挑選了 7 株流感病毒株進行雪貂免疫，並利用此抗血清分析 2010 至 2011 年間台灣流行的病毒的抗原性特性。在台灣 2011 年 1-2 月主要流行的亞型為流感 A 型(H1N1)pdm09 病毒；3 月起為流感 B 型病毒，以 Victoria lineage 為主，8 月後轉為 Yamagata lineage；2011 年台灣流感 A 型 H3N2 病毒，只零星分離。A 型(H1N1)pdm09 與 H3N2 病毒的抗原性分別與 2011-2012 北半球疫苗株 A/California/7/2009 (H1N1) A/Perth/16/2009 (H3N2) 相似。流感 B 型病毒之 Victoria lineage 與 B/Brisbane/60/2008 相近。

關鍵詞: 流感病毒、雪貂、抗血清

Abstract

Aim: Influenza viruses are highly infectious and cause local outbreaks annually in many countries. The influenza viruses were characterized with high mutation of the genome and frequent change of antigenicity. Therefore, it is necessary that the composition of influenza vaccines are changed and recommended by WHO annually, depending on the circulating viral strains. The antigenic types of influenza viruses were determined by using the haemagglutination-inhibition (HI) tests with postinfection ferret sera. Ferret is considered as the best animal models for influenza virus. The viral infection symptom of ferret is much similar to human. The postinfection ferret sera are required for characterizing the antigenicity of influenza viruses. For surveillance of influenza viruses in Taiwan, we established the ferret model for immunization of influenza viruses and obtained the postinfection ferret sera.

Method: We selected the predominant strains and/or low reactors against vaccine strain circulating in 2011, Taiwan and used them to infect ferrets. The obtained postinfection ferret sera were used to characterize the antigenicity of newly isolated viruses in 2011.

Conclusion: In this study, we selected the 7 predominant strains of influenza viruses in Taiwan for immunization of ferrets and obtained the postinfection ferret sera. We also used the ferret sera to analyze the antigenicity of circulating isolates in Taiwan during 2010-2011. From January to February 2011, influenza A(H1N1)pdm09 virus was predominant in Taiwan. After March, Victoria lineage of influenza B viruses became predominant and the circulating Victoria lineage was replaced by Yamagata lineage on August. During 2011, the influenza A (H3N2) virus was only detected sporadically in Taiwan. The influenza A(H1N1)pdm09, H3N2 viruses and Victoria lineage of influenza B viruses circulating in 2011 are antigenically similar to recommended influenza vaccines for use in the 2011-2012 northern hemisphere influenza season, A/California/7/2009 (H1N1), B/Brisbane/60/2008, A/Perth/16/2009, respectively.

Keywords: influenza virus, ferret, antisera

四、本文

前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等

流感病毒，屬於正黏液病毒科 (*Orthomyxoviridae*)，內含八個基因片段的負股 RNA 病毒，一般以其外套膜上的二種醣蛋白：血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 和神經胺酸酶 (neuraminidase, NA) 做為分型標準，HA 與細胞表面的受體唾液酸結合，促使病毒進入細胞內，同時可使紅血球發生凝集作用，它的另一特徵是中和抗體的抗原。NA 則具有酵素的活性，能切斷醣蛋白及細胞受器上的唾液酸，除了可避免病毒聚集成塊外，也能促進病毒自細胞釋出。到目前為止，一共發現了 16 種 HA (H1 至 H16) 與 9 種 NA (N1 至 N9) (Fouchier *et al.*, 2005)，禽類可以感染 H1-H16 以及 N1-N9 的所有亞型，不過目前世界各地的禽流感主要由高致病性的 H5 和 H7 兩種亞型引起，人則較易受到 H1 及 H3 亞型的感染。人類歷史上曾發生過四次有記載可驗證的流感大流行，分別是 1918 年的西班牙型流感 (H1N1)，1957 年的亞洲型流感 (H2N2) 及 1968 年的香港型流感 (H3N2)，以及 2009 年來自墨西哥與美國 H1N1，其所引起的全球大流行，都讓數以千萬計的人類遭受感染，甚至死亡 (CDC, 2009; Nicholson *et al.*, 2003)。

流感病毒的基因體具有高突變率的特性，可經由突變及基因重組二種方式來產生新型病毒。病毒基因每年所累積的點突變造成抗原小部分的改變，稱為漂移 (drift)，至於大變異 (shift)，則涉及基因段的互換，例如

當不同來源的病毒株同時感染同一宿主時，病毒於複製過程就可能產生基因段互換及重新排列組合(reassort)，導致抗原分子的大幅改變，進而形成全新的流感病毒。此高突變率的特性造成其抗原變異較快，人類無法獲得持久的免疫力，因此當感染無抵抗力的族群時，易進而造成全球性的大流行(Nicholson *et al.*, 2003)。

流感疫苗為防治流感最有效的方法，然而因流感病毒變異快，疫苗株與流行株不符合將降低疫苗的效率，並使流感相關死亡率增加，如美國 2003-2004 與 2007-2008 流感季增加(Carrat & Flahault, 2007; CDC, 2004; 2008)。為了盡可能使疫苗株與流行株符合，世界衛生組織(World Health Organization, WHO)每年分別於二月與九月更新並建議北半球與南半球下一流感季使用之疫苗組成，流感疫苗株的選擇(WHO: <http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinerecommendations/en/index.html>)，主要根據全球流感監測資料，而監測資料來源與疫苗施打期約相差 8-12 個月，若新的抗原變異病毒株於此期間出現，將導致疫苗株與流行株不符合降低疫苗的效率。

對於流感的監視除了需掌握病例數及其分布外，還需高效率之實驗室檢驗來判定，以辨認病毒之型別及變異，惟目前對於流感病毒分離株之抗原性分析，處理方法為進行抑制凝集反應法(HI)檢驗，其血清來源皆由美國疾病管制局(CDC)或日本 NIID 提供，但由於血清仰賴他國提供，提

供時間較遲，且無法比較新分離株彼此間抗原性的差異，因此自行製備流感病毒抗血清，實在有其必要。為建立病毒抗原分析鑑定時效性，應強化檢驗及鑑定能力，以期能及早採取適當防治措施，避免無謂的損失及民眾恐慌。故本計畫擬持續維護流感病毒免疫雪貂之動物模式，製備台灣流感病毒之雪貂抗血清。雪貂對人類流感病毒的高感受度和臨床病徵與人類類似 (Maher & DeStefano, 2004)，故為流感病毒研究常用的動物模式，其抗病毒血清，也為國際上判定不同流感病毒抗原差異的依據。因此本實驗的進行，將有助於台灣流感相關基礎資料之建立與蒐集，增加流感病毒演變的了解，並可提供疫苗株選擇的參考。

材料與方法

1. 流感病毒株之選用與培養：國家型基因體計畫台灣病原體微生物基因體資料庫 (Taiwan Pathogenic Microorganism Genome Database)，已收集 2003-2011 年台灣疾病管制局病毒合約實驗室分離的流感病毒株，並將流感病毒 HA 基因部分序列定序。擬分析此基因庫內台灣每年流感病毒株的變化，並從其中挑選主要的流行病毒株與特有的病毒株，作為後續的研究，以及抗病毒血清的製備。流感病毒接種於 MDCK (Madin-Darby canine kidney cell) 細胞。MDCK 細胞以 DMEM 培養基(內含 10% 胎牛血清)於 37°C，5%CO₂ 下繼代培養。

2. 雪貂之引進及飼養管理：

1. 雪貂之進口—由美國 Marshall Farm 引進雪貂，該繁殖畜牧場位於 New York 州西北部 Rochester 與 Syracuse 間的鄉村地區，北濱五大湖區中的安大略湖，為經 USDA 許可與 AAALAC 認證合格的動物供應商。該場僅生產 Beagle 實驗犬及雪貂，品質很穩定。在飼養設施的週邊設備上，Marshall 具合乎 USDA 要求的空調運輸車數輛，並有自己的機械保養設備、完備的血液學及血液生化學檢驗室。雪貂之習性—雪貂對熱很敏感，其最適室溫為 20±3°C，為夜行性動物，夏日照時間 13 小時，冬日照時間 10 小時。
2. 雪貂之飼養管理—每隻成貂每日約食用 60 公克貂飼料。

3. 雪貂免疫：

由美國 Marshall Farm 引進實驗用雪貂，建立飼養管理模式，並於生物安全等級二級（BSL2）實驗室中進行流感病毒免疫，建立免疫流程。人類流感病毒主要有 A 型 H1N1、H3N2 與 B 型，各型其抗原性不同，免疫動物引起的抗體反應亦有差異。目前最佳化流感病毒免疫雪貂的步驟如下：

1. 雪貂麻醉：使用麻醉劑舒泰 50 內含 Zolezepine 與 Tiletamine (Zoletil 50，法國 Virbac 藥廠製造)，雪貂使用量為 0.1 ml/0.4kg。
2. 取 1 ml 流感病毒培養液(HA 價位約 1024~2048/50 μ l)，分別滴入麻醉雪貂之兩個鼻腔，完成免疫。
3. 十四天後，由頸靜脈採血檢測抗體力價，若抗體力價已達 HI 640 以上，則進行心臟全採血。
4. 若抗體力價尚未達到需求時，再次追加免疫，方式為腳掌皮下注射 0.25 ml 病毒，再經十四天後採血檢測抗體力價。

實驗結果發現，經一次或二次免疫後，產生的抗血清，以 HI 方法檢測，其對病毒的專一性高，若經三次免疫後，其抗體易以同亞型其他分離株，有交叉反應，產生的抗體專一性較低。

4. 病毒與抗血清價位測定

血球凝集試驗：

1. 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。
2. 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，抗原呈現 2 倍~128 倍稀釋。
3. 每孔分別加入 50 μl 的天竺鼠紅血球 (0.75%)，以手輕微搖晃孔盤後，之後以膠膜封住孔盤，置於室溫或 4 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置 30—60 分鐘，之後觀察血球凝集，記錄病毒價位。

血球凝集抑制試驗

1. 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。
2. 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。抗血清呈現 2 倍~128 倍稀釋。抗血清須經 RDE 處理以去除非專一性凝集。

3. 分別加入 25 μl (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 10—15 分鐘。
4. 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 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置 30—60 分鐘，之後記錄抗血清價位結果。

結果

分析 2010-2011 年台灣疾病管制局病毒合約實驗室分離的流感病毒株，發現 2010 年冬季(2009 年 12 月-2010 年 2 月)台灣主要流行的病毒株為 A(H1N1)pdm09 ；2009 年 3- 10 月以 B 型流感病毒為主；A 型 H3N2 流感病毒零星分離(圖一)。

2009-2011 年台灣間流感 A(H1N1)pdm09 病毒之演化:

A(H1N1)pdm09 病毒自 2009 年 5 月起在我國開始出現，並造成後續長達兩年的流行。疾病管制局流感監測網所分離之病毒監測結果顯示，流感 A(H1N1)pdm09 病毒首先盛行於 2009 年 7 月至 2010 年 1 月間，於 2010 年 12 月又另一波流行。針對該病毒進行 HA 表面蛋白的胺基酸序列分析，結果如圖二顯示，於 2009 年 5 月至 9 月初期，病毒 HA 蛋白之胺基酸變異係為偶發，並無明顯規律；自同年 11 月起，HA 蛋白 E391K 之突變開始產生並成為主流。在 2010 年 2 月至 11 月間，病毒又於 HA 蛋白產生 N142D 突變，這是第二個較為顯著的變異，惟在這之後此突變轉而較少出現。到了同年 12 月，病毒 HA 的多個胺基酸點位開始出現明顯的變化，其中包括 T137A、A151T、S160G、S200P、S202T、A214T、R222K、I233V/G、V266L 及 K300E；E/K391G 的突變亦再次發生，並與 391K 之族群同步流行。利用上述這些病毒胺基酸改變的特徵，進行流感 A(H1N1)pdm09 病毒於台灣流行期間的演化樹分析。結合 proteotyping map 與演化樹之分析結

果，流感 A(H1N1)pdm09 病毒各 HA 演化族群(clade)於本次大流行各時間點的趨勢詳如圖二與圖三所示。於 2009 年 5 月至 9 月之疫情初期間，大多數病毒的 HA 屬先前已被 Nelson 等人報導之 clade 7 (Nelson *et al.*, 2009)，具有 S220T 突變作為特徵。在此之後，本研究亦定義其餘之 HA 演化族群包括 clade 8, 8-1, 9, 10, 11-1 與 11-2 等，各族群之胺基酸特徵與流行趨勢詳述如下。帶有 E391K 的 clade 8 病毒係於 2009 年 11 月取代 clade 7 而成為主要病毒株；自 2010 年 2 月至 11 月間，同時帶有 E391K 及 N142D 的 clade 8-1 病毒再次取代 clade 8 而成為主流，並持續以低度流行方式存在。自 2010 年 12 月起，有意義的三個新興族群同步產生，他們分別為帶有 151T-200P-391G-526M 的 clade 9、14I-222K-233V/G-266L-300E-391K 的 clade 10、114N-202T-391K-468N 的 clade 11-1 以及 202T-214T-391K-468N 的 clade 11-2。這顯示自流感 A(H1N1)pdm09 病毒於台灣開始流行後，共發生三次規模較大的病毒取代，而最後一次的取代因 HA 蛋白的變異程度更大，導致這些新興演化族群的產生。挑選流感 A(H1N1)pdm09 病毒 3 株，A/Taiwan/0559/2011, A/Taiwan/5520/2011, A/Taiwan/5506/2011 分屬於 clade 9, 10, 11，進行雪貂免疫。主要分離病毒與參考血清之 HI titer 如表一，HA 基因序列之親緣樹狀圖如圖四。整體而

言，台灣 2011 年流行之 A(H1N1)pdm09 病毒，已有些變異位點逐漸改變並固定如 N142D 與 E391K，但抗原性仍與 A/California/07/2009 相近(表一)。

挑選 B 型流感病毒 3 株，進行雪貂免疫：2011 年 3 月至 10 月以 B 型流感病毒分離數目居多，其中 3 月至 6 月以 Victoria lineage 為主，7 月後以 Yamagata lineage 為主。分析 Victoria lineage 流行病毒株 HA 基因序列之親緣關係，發現與疫苗株 B/Brisbane/60/2008 位於同一 clade (圖五)，選取 B/Taiwan/3591/2010 免疫雪貂，獲得到其病毒抗血清。分析比較其抗原性的關係如表二，2010 年新分離 B 型流感病毒與 B/Taiwan/3591/2010 (B/Brisbane/60/2008-like) 相近，少數分離株如 B/Taiwan/2112/2011 與 B/Malaysia/2506/2004 較近(圖五)，抗原性與 B/Taiwan/3591/2010 、 B/Brisbane/60/2008 為低反應株，HI 測試相差 16-32 倍(表二)。2008 年台灣流行之 B 型流感 Yamagata lineage 可分成 3 個 clades，以 B/Taiwan/718/2006, B/Taiwan/29/2008, B/Taiwan/80/2008 為代表株，三者分離數目以 B/Taiwan/718/2006 clade 佔多數(圖六)，2010 年-2011 年 1 月流行 Yamagata lineage 病毒株與 B/Taiwan/29/2008 相近，2 月後以 B/Taiwan/718/2006 clade 佔多數(圖六)，挑選主要分離株 B/Taiwan/101/2010 與 B/Taiwan/8506/2011 感染雪貂，得到其病毒抗血清。分析比較其抗原性的關係如表三，2011 年流行的 Yamagata lineage B 型流感病毒，抗原性與

B/Taiwan/29/2008 、B/Taiwan/0101/2010 與 2008-2009 年疫苗株

B/Florida/4/2006 相似。

挑選 A 型 H3N2 流感病毒 1 株，進行雪貂免疫: 2009 年台灣分離 A 型 H3N2 流感病毒，分析 HA 基因序列，發現一新的變異株

A/Taiwan/4055/2009，主要突變位置為 E62K, N144K, K158N, K173Q,

N189K (Yang *et al.*, 2010)。台灣 2010 年流行之 A 型 H3N2 流感病毒與

A/Taiwan/4055/2009, A/Taiwan/3982/2009 疫苗株 A/Brisbane/10/2007,

A/Perth/16/2009 位於不同 clades，且 2010 年新分離的病毒可分成 A-C 三

個 clades (圖九)，分離數目以 clade 2010-A 最多，2010 年 11 月-2011 年 3

月分離數目則以 clade 2010-C 為多(圖十)。2011 年 7 月後，clade 2011-A

成為 H3N2 主要的分離株。選擇 A/Taiwan/8214/2011 病毒完成感染雪貂，

得到其病毒抗血清。分析比較其抗原性的關係如表四，2011 年分離株，與

A/Taiwan/4055/2009 (A/Perth/16/2009-like)之抗原性相近(表四)。整體而

言，2010-2011 年主要新分離的病毒其抗原 仍與 A/Taiwan/4055/2009 相

近(表四)，雖然其 HA 基因序列已有多處變異(圖八)。

2011 年已完成 7 株病毒 A/Taiwan/0559/2011(H1N1),

A/Taiwan/5520/2011(H1N1), A/Taiwan/5506/2011 (H1N1) 、

A/Taiwan/8214/2011 (H3N2) 、B/Taiwan/0101/2010 、B/Taiwan/3591/2010 、

B/Taiwan/5806/2011 的雪貂免疫，並獲得抗病毒血清，並將之使用於新分離病毒抗原之分析。

討論

流感病毒基因持續突變，造成抗原漂移(antigenic drift)，使得人類免疫系統無法辨認，造成流感病毒之每年流行。雪貂對人類流感病毒的高感受度和臨床病徵與人類類似，為研究流感病毒常使用的實驗動物，且其對流感病毒抗原漂移之免疫反應與人類類似，故雪貂抗病毒血清，為國際上分析流感病毒抗原差異的試劑。本計畫已建立並持續維護雪貂的飼養與病毒感染的動物模式，並可成功製備雪貂抗病毒血清，後續將使用此抗流感病毒的血清，分析比較台灣每年流行的病毒株間免疫反應的關係，並挑選適合的病毒株，再製備雪貂抗病毒血清。目前對於流感病毒分離株之流感病毒抗原，使用抑制凝集反應法(HI)，以往血清來源皆仰賴日本 NIID 提供，其提供的量有限，且無法及時，故無法完整分析台灣每年分離的病毒株，易造成有些病毒抗原性已改變而無法即時偵測。以 2009 年爆發新型流感病毒 H1N1 為例，可自行製備雪貂抗病毒血清，台灣可即時瞭解新型流感病毒 H1N1 抗原的變化。所以，為了能即時偵測台灣流感病毒抗原性的變化，製備雪貂抗流感病毒血清，有其必要性。2009 年 1 月台灣分離到 H3N2 低反應之變異株，此變異株以 A/Taiwan/4055/2009 為代表，此變異株於台灣 2009 年 4 月分離數目超越舊的 A/Brisbane/10/2007-like 流行株，這新的變異株抗原性與疫苗株 A/Brisbane/10/2007 已有明顯差異(HI

titer 相差 8-16 倍)，這結果已整理發表於 *Virus Research* 期刊(Yang *et al.*, 2010)。WHO 於 2009 年 9 月更新 2010 年南半球使用之流感病毒疫苗與 2010 年 2 月更新 2010-2011 年北半球使用之流感病毒疫苗，將 A/Brisbane/10/2007 更換為 A/Perth/60/2009 (WHO, 2010)。2011 年台灣流行的 H3N2 病毒與疫苗株 A/Perth/60/2009 或 A/Taiwan/4055/2009 HA 基因有多個位點變化，但利用雪貂抗血清之 HI 試驗分析，其抗原性仍相似。WHO 於 2011 年 9 月建議 2012 年南半球使用之流感病毒疫苗組成，H3N2 仍維持 A/Perth/60/2009。

台灣 2010-2011 流感病毒的流行特性分析：(1) A(H1N1)pdm09 病毒於台灣開始流行後，共發生三次規模較大的病毒變化，而 2011-2011 年變異程度更大，導致新的變異株(clade 9, 10, 11)產生，雖然 HA 基因序列之親緣樹狀圖明顯分支，抗原性仍與 A/California/07/2009 相近。(2) 3-10 月以 B 型流感病毒居多，且 3-6 月 Victoria lineage 佔多數，7 月起已仍 Yamagata lineage 較多。Victoria lineage 病毒 HA 基因序列之親緣樹狀圖無明顯分支，且與疫苗株 B/Brisbane/60/2008 位於同一 clade，抗原性仍與 B/Brisbane/60/2008 相近； Yamagata lineage 病毒 HA 基因序列之親緣分析，發現鄰近 2008 年台灣流行之 B 型流感 Yamagata lineage 其中一 clades, 以 B/Taiwan/29/2008 為代表株，抗原性與 B/Taiwan/29/2008 、

B/Taiwan/0101/2010 與 2008-2009 年疫苗株 B/Florida/4/2006 相似。(3) A 型 H3N2 流感病毒流行特徵：台灣 2011 年流行之 A 型 H3N2 流感病毒與 A/Taiwan/4055/2009, A/Taiwan/3982/2009 疫苗株 A/Brisbane/10/2007, A/Perth/16/2009 位於不同 clades，且 2011 年 7 月後新分離的病毒與 2011 年流行株 HA 基因序列之親緣分析，明顯不同，但其抗原仍與 A/Taiwan/4055/2009 相近。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 建立與維護雪貂的飼養管理與流感病毒的感染模式，有助於流感病毒所引起之免疫反應與致病性等特性的研究。
2. 長期持續進行台灣流感病毒的分析，將有助於掌握流感病毒的流行特性，對疫苗株的挑選與疫苗施打策略提供參考。
3. 製備流感病毒株抗原與製備 7 株流感病毒株雪貂抗血清。
4. 利用抗血清分析 2010-2011 流感病毒株的抗原特性: 2011 年 1-2 月主要流行的亞型為流感 A 型(H1N1)pdm09 病毒。3 月起為流感 B 型病毒，以 Victoria lineage 為主，8 月後轉為 Yamagata lineage。2011 年台灣流感 A 型 H3N2 病毒，只零星分離。A 型(H1N1)pdm09 與 H3N2 病毒的抗原性分別與 2011-2012 北半球疫苗株 A/California/7/2009 (H1N1) A/Perth/16/2009 (H3N2) 相似。流感 B 型病毒之 Victoria lineage 與 B/Brisbane/60/2008 相近。

5. 論文：

- Yang JR, Lo J, Ho YL, Wu HS and Liu MT: Pandemic H1N1 and seasonal H3N2 influenza infection in the human population show different distributions of viral loads; which substantially affect the performance of rapid influenza tests. *Virus Res* 2011; 155:163-167.
- Yang JR, Lin YC, Huang YP, Su CH, Lo J, Ho YL, Yao CY, Hsu LC, Wu HS and Liu MT: Reassortment and mutations associated with emergence and spread of oseltamivir-resistant seasonal Influenza A/H1N1 viruses in 2005-2009. *PLoS ONE* 2011; 6:e18177.
- Yang JR, Huang YP, Chang FY, Hsu LC, Lin YC, Su CH, Chen PJ, Wu HS and Liu MT: New variants and age shift to high fatality groups contribute to severe successive waves in the 2009 influenza pandemic in Taiwan. *PLoS One* 2011; (in press).

參考文獻：

請依台灣醫誌編排方式(例：Travell JG, Rinzler S, Herman M: Pain and disability of shoulder and arm. *J Am Med Asso* 1942;120:417-22.)

Carrat F and Flahault A: Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* 2007; 25:6852-6862.

CDC: Update: influenza activity--United States, 2003-04 season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004; 53:284-287.

CDC: Update: influenza activity--United States, September 30, 2007-April 5, 2008, and composition of the 2008-09 influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57:404-409.

CDC: Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58:467-470.

Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B and Osterhaus AD: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of virology* 2005; 79:2814-2822.

Maher JA and DeStefano J: The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab Anim (NY)* 2004; 33:50-53.

Nelson M, Spiro D, Wentworth D, Beck E, Fan J, et al.: The early diversification of influenza A/H1N1pdm. *PLoS Curr Influenza* 2009; RRN1126

Nicholson KG, Wood JM and Zambon M: Influenza. *Lancet* 2003; 362:1733-1745.

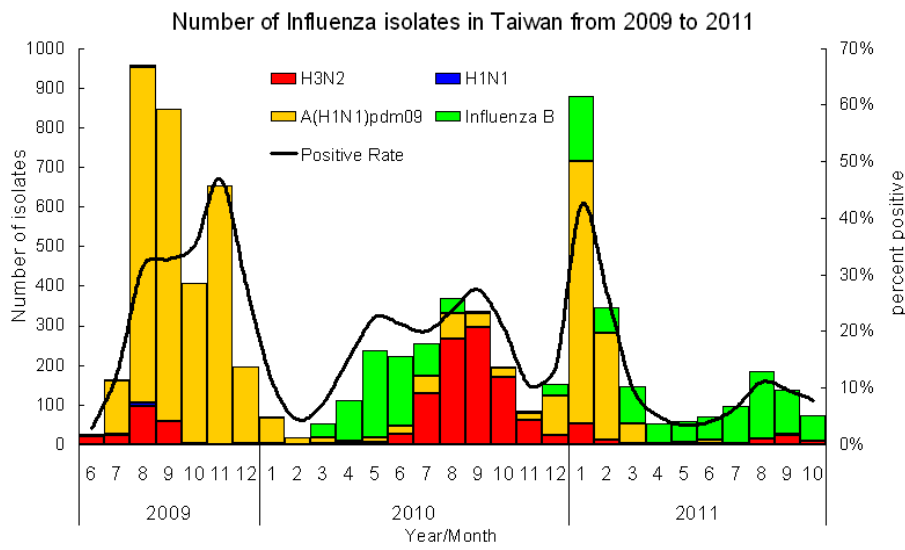
WHO: Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2010-2011 northern hemisphere influenza season. *Weekly epidemiological record* 2010; 85:81-92.

WHO: Recommendations for influenza vaccines,

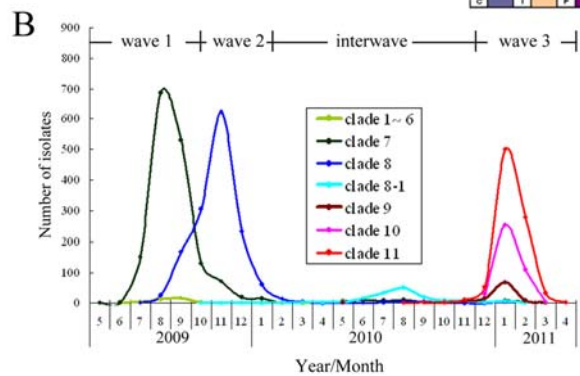
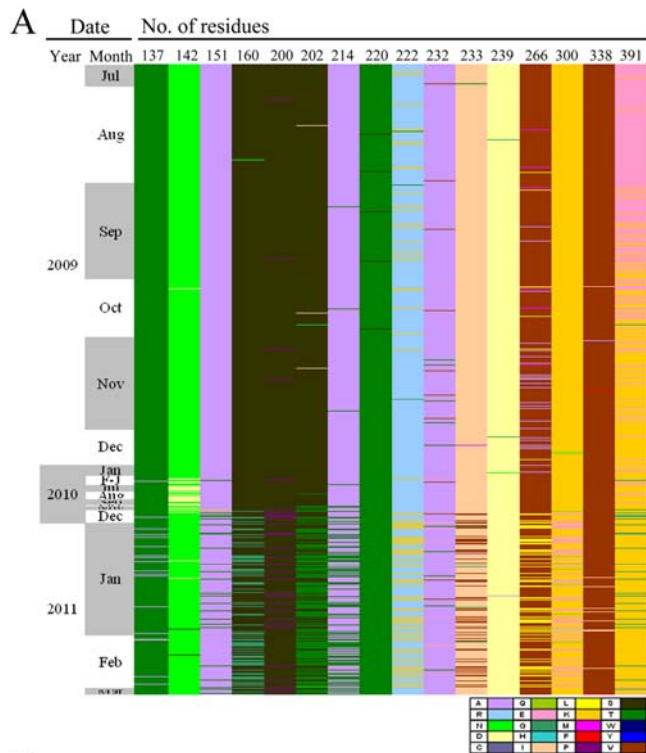
<http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinerecommendations/en/index.html>

Yang JR, Lin CH, Chen CJ, Liu JL, Huang YP, Kuo CY, Yao CY, Hsu LC, Lo J, Ho YL, Wu HS and Liu MT: A new antigenic variant of human influenza A (H3N2) virus isolated from airport and community surveillance in Taiwan in early 2009. *Virus Res* 2010; 151:33-38.

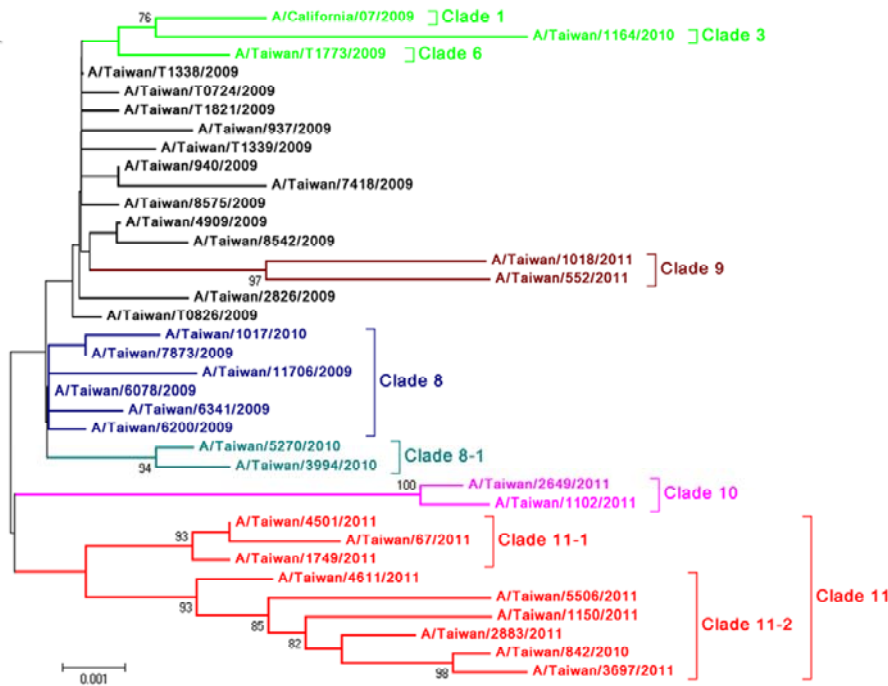
(8)圖、表



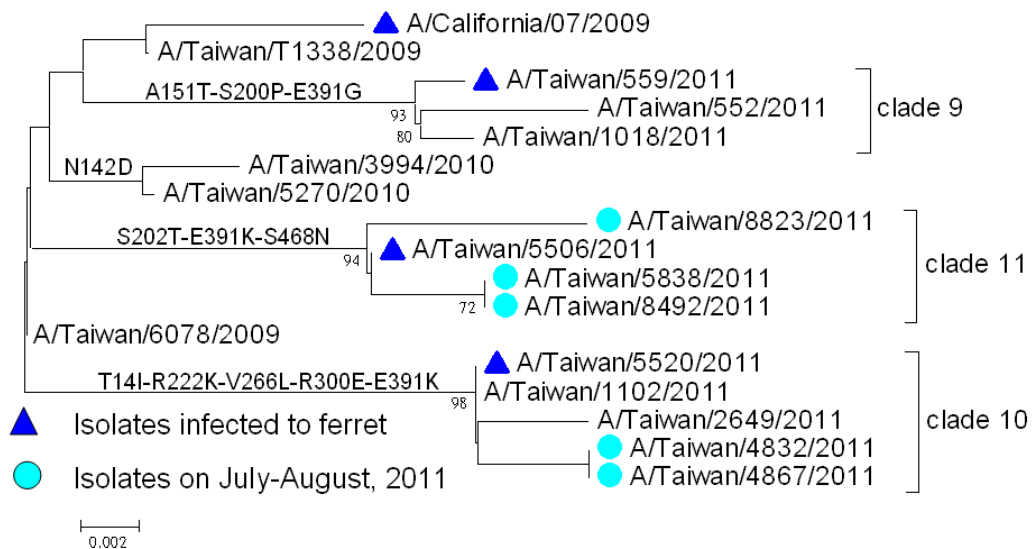
圖一、2009~2011 年台灣流感病毒分離情形。2011 年 1-2 月主要流行型為 A (H1N1) pdm09；2010 年 3-10 月為 B 型流感病毒；A 型 H3N2 流感病毒零星分離。



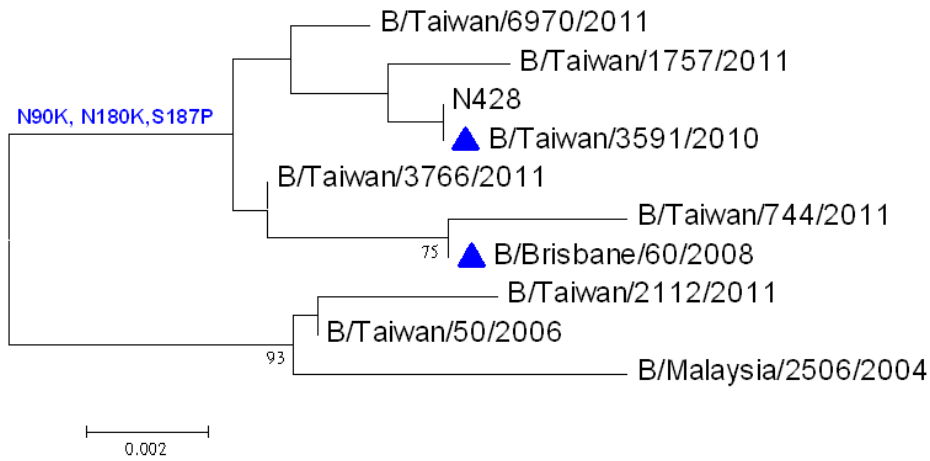
圖二、(A)台灣 2009-2011 年 A(H1N1)pdm09 流感病毒 HA 基因氨基酸序列的變化。y 軸代表不同的分離病毒株依分離時間的先後排列，x 軸為不同氨基酸位置。以不同顏色代表不同氨基酸。(B) 變異株演化情形。



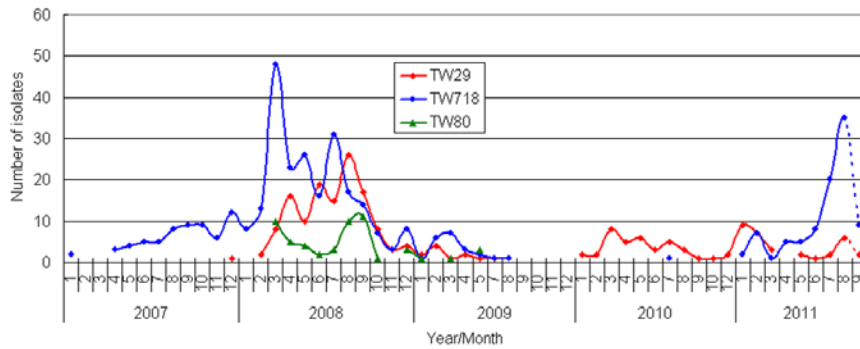
圖三、2009-2011 年台灣 A(H1N1)pdm09 流感病毒, HA 基因序列之親源樹狀圖。



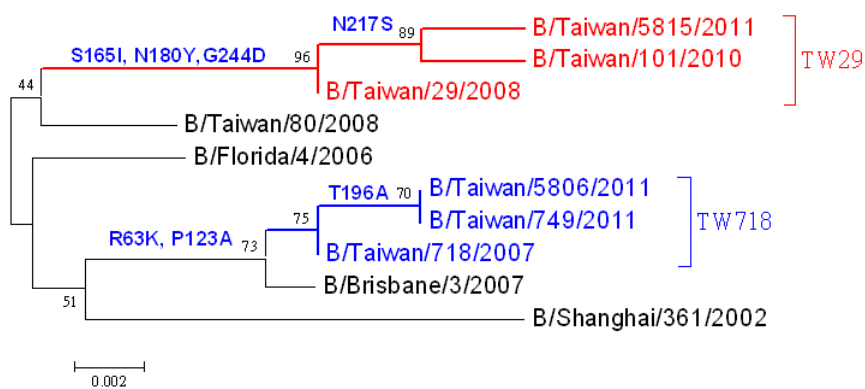
圖四、2011 年 6-8 月台灣 A(H1N1)pdm09 流感病毒, HA 基因序列之親源樹狀圖。



圖五、2011 年台灣 B 型 Victoria lineage 流感病毒, HA 基因序列之親源樹狀圖。



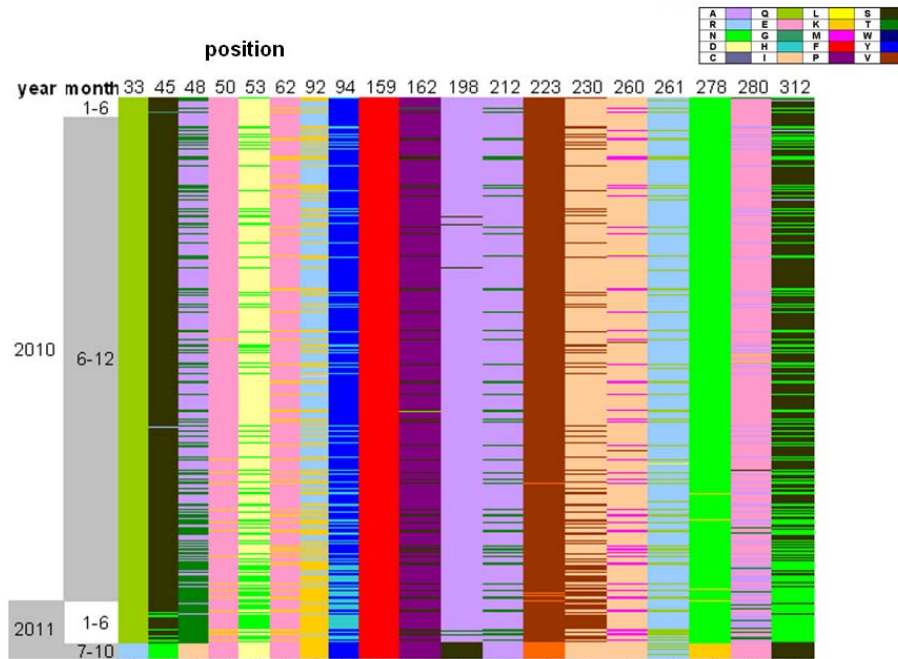
圖六、2007-2011 年台灣 B 型流感病毒 Yamagata lineage, 變異株演變情形。各變異親緣關係如圖七所示。



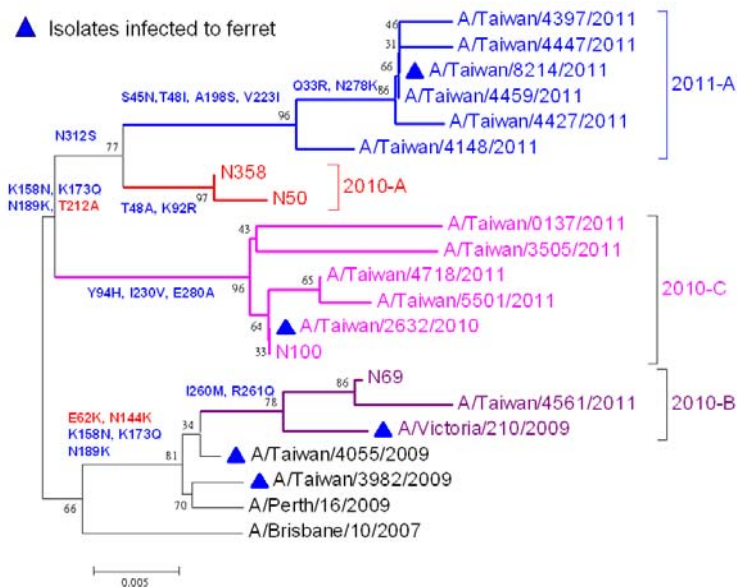
圖七、2011 年台灣 B 型 Yamagata lineage 流感病毒, HA 基因序列之親源樹狀圖。

Evolution of influenza viruses A H3N2

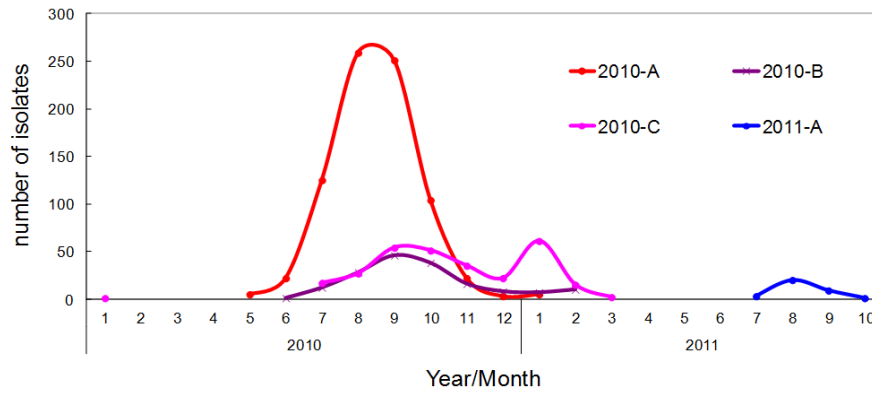
2010-2011 H3N2
1342 isolates



圖八、台灣 2010-2011 年 A 型 H3N2 流感病毒 HA 基因氨基酸序列的變化。y 軸代表不同的分離病毒株依分離時間的先後排列，x 軸為不同氨基酸位置。以不同顏色代表不同氨基酸。



圖九、2011 年台灣 A 型 H3N2 流感病毒, HA 基因序列之親源樹狀圖。主要分離病毒以 N 數目代表相同序列分離株之個數。



圖十、2010-2011 年台灣 A 型流感病毒 H3N2，變異株演變情形。Clade 親緣關係如圖九所示。

表一、A(H1N1)pdm09 流感病毒雪貂抗血清與 2011 年分離病毒的血球凝集抑制測試反應。

POSTINFECTION FERRET SERA						
REFERENCE ANTIGENS	Date collected	Cal/07	TW/559	TW/5506	TW/5520	clades
A/California/07/2009	2009/4/9	640	160	640	640	1
A/Taiwan/0559/2011	2011/01/24	160	640	80	160	9
A/Taiwan/5506/2011	2011/01/17	1280	320	1280	640	11
A/Taiwan/5520/2011	2011/01/25	640	640	1280	1280	10
Tested viruses						
A/Taiwan/4832/2011	2011/6/14	320	80	320	320	10
A/Taiwan/8823/2011	2011/6/29	640	320	1280	640	11
A/Taiwan/4867/2011	2011/7/20	640	640	640	640	10
A/Taiwan/5838/2011	2011/7/25	320	160	320	320	11
A/Taiwan/8492/2011	2011/8/2	640	320	640	1280	11

表二、B 型流感病毒 Victoria lineage 雪貂抗血清與 2011 年分離病毒的血球凝集抑制測試反應。

POSTINFECTION FERRET SERA			
REFERENCE ANTIGENS	Date collected	Bri/60	TW/3591
B/Brisbane/60/2008	2008/8/4	<u>1280</u>	320
B/Taiwan/3591/2010	2010/04/09	320	<u>640</u>
Tested viruses			
B/Taiwan/1757/2011	2011/1/27	1280	320
B/Taiwan/2112/2011	2011/2/17	40	40
B/Taiwan/3766/2011	2011/4/7	320	640
B/Taiwan/744/2011	2011/4/11	320	320
B/Taiwan/6970/2011	2011/6/23	640	160

表三、B 型流感病毒 Yamagata lineage 雪貂抗血清與 2011 年分離病毒的血球凝集抑制測試反應。

POSTINFECTION FERRET SERA						
REFERENCE ANTIGEN	Date collected	TW/718	TW/29	TW/80	TW/101	Clade
B/Taiwan/718/2007	2007/5/28	<u>320</u>	640	640	320	TW718
B/Taiwan/29/2008	2008/2/22	80	<u>320</u>	320	320	TW29
B/Taiwan/80/2008	2008/04/07	160	320	<u>640</u>	160	TW80
B/Taiwan/101/2010	2010/04/10	80	640	320	<u>320</u>	TW29
Tested viruses						
B/Taiwan/5806/2011	2011/7/6	320	640	640	160	TW718
B/Taiwan/749/2011	2011/4/15	320	640	640	320	TW718
B/Taiwan/5815/2011	2011/7/12	160	80	160	160	TW29

表四、A 型流感病毒 H3N2 雪貂抗血清與 2011 年分離病毒的血球凝集抑制測試反應。

POSTINFECTION FERRET SERA							
REFERENCE ANTIGEN	collected	TW/4055	TW/3982	Vic/210	TW/2632	TW/8214	clade
A/Taiwan/4055/2009	2009/1/19	<u>640</u>	1280	640	320	160	
A/Taiwan/3982/2009	2009/07/30	640	<u>640</u>	320	160	160	
A/Victoria/210/2009	2009/6/2	640	1280	<u>1280</u>	1280	160	2010-B
A/Taiwan/2623/2010	2010/5/14	1280	1280	320	<u>640</u>	160	2010-C
A/Taiwan/8214/2011	2011/8/7	320	640	80	320	<u>80</u>	2011-A
Tested viruses							
A/Taiwan/3505/2011	2011/1/1	640	640	160	160	160	2010-C
A/Taiwan/5501/2011	2011/1/6	640	640	80	320	80	2010-C
A/Taiwan/4781/2011	2011/3/10	1280	640	320	1280	80	2010-C
A/Taiwan/0137/2011	2011/3/4	1280	1280	640	1280	160	2010-C
A/Taiwan/4148/2011	2011/5/6	1280	1280	1280	1280	160	2011-A
A/Taiwan/4397/2011	2011/9/15	1280	640	320	640	160	2011-A
A/Taiwan/4426/2011	2011/10/3	1280	640	160	640	160	2011-A
A/Taiwan/4447/2011	2011/10/18	1280	640	320	1280	80	2011-A
A/Taiwan/4459/2011	2011/10/19	640	320	640	640	320	2011-A