

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-134512

衛生福利部疾病管制署 108 年署內科技研究計畫

計畫名稱：建立深度分析流感病毒基因序列與病毒特性關連之平台

108 年度研究報告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：劉銘燦

協同主持人：楊季融

研究人員：吳馥婷 吳俊賢

執行期間：108 年 1 月 1 日至 108 年 12 月 31 日

目錄

	頁 碼
目錄	1
計畫中文摘要	2
計畫英文摘要	3
計畫內容	
一、前言	4
二、材料與方法	5
三、結果	8
四、討論	11
五、結論與建議	16
六、計畫重要研究成果及具體建議	17
七、參考文獻	17
八、圖、表	20

共 (31) 頁

計畫中文摘要：

流感病毒嚴重威脅人類健康，流感病毒變化快易產生新變異株，造成病毒抗原飄移、抗藥性與致病力的改變，而抗原飄移導致每年疫苗株組成需調整，抗藥性發生則須改變治療藥物，而致病力的改變造成死亡人數增加。所以瞭解流感病毒在演化和流行病學過程如何造成抗原飄移、抗藥性與致病力等的改變非常重要。病毒繁殖時突變造成病毒歧異度增加，而有夸種(quasispecies)的出現，quasispecies 的動態變化影響病毒抗原飄移、抗藥性與致病力，但低比例 quasispecies 無法以傳統的基因定序法檢測。近年來新的 DNA 定序技術，具高通量(high-throughput)特性，相對於傳統 Sanger 定序法又稱為次世代定序 (next-generation sequencing, NGS) 簡稱 NGS，NGS 可提供大量的 DNA 序列資訊，深度解析基因體，可發現微生物基因體序列低比例的變化，故 NGS 為研究病毒微量 quasispecies 動態變化的強力工具。本計畫擬建立流感病毒 NGS 平台，以 NGS 為工具，研究(1)流感病毒在原始臨床檢體與分離病毒株基因序列差異，(2) 流感病毒 quasispecies 基因序列動態變化，(3) 從個體層次分析流感病毒感染後，不同時期(早、後期)與不同部位(上、下呼吸道)基因序列之變化，瞭解流感病毒在單一宿主內的演變，(4)比較不同流感季之流感病毒 quasispecies 變化，研究當年的主流病毒株基因特徵是否在前季 quasispecies 變異株已存在，瞭解流感病毒變異株出現的機制，(5)分析抗流感藥物使用前後病毒 quasispecies 基因序列的變化，瞭解流感病毒抗藥性出現的機制，(6)比較不同亞型/次亞型流感 quasispecies 變化是否有差異。希望本計畫的結果對流感病毒的演化、適應、抗原飄移、抗藥性與致病力的變化更進一步瞭解，以更有效地防治流感。

關鍵詞：流感病毒、病毒演化、跨種、病毒歧異、次世代定序

計畫英文摘要：

Influenza viruses pose a serious threat to human health. The viruses with high mutations can generate new variants, resulting in the changes of viral antigenic drift, antiviral resistance and virulence. The antigenic drift makes the composition of the vaccine strains to be reformulated each year. When antiviral resistance occurs, the kinds of antivirals shall be changed and the increase of viral virulence causes increased deaths. High mutations in virus propagation make the increase of viral divergence, which contribute to formation of viral quasispecies. The dynamic changes of quasispecies influence the changes of antigen drift, resistance and virulence, however, but the low proportion of quasispecies is unable to be detected with conventional sequencing method. In recent years, new DNA sequencing technology with high throughput, compared to conventional Sanger sequencing method, is termed as next-generation sequencing (NGS). NGS can generate an extraordinary number of sequences to analyze genomics deeply and detect low frequency changes in microbial gene sequences. Therefore, NGS is a powerful tool to study the dynamics of virus quasispecies. In this project, we intend to establish NGS platform for influenza viruses, and address the issues including (1) sequence differences between viruses in the original clinical sample and isolates in cell culture, (2) dynamics of quasispecies, (3) sequence differences between viruses collected in early and late stages and in different location (upper and lower respiratory tract) in the individual to understand evolution of the influenza virus in an individual host, (4) comparison of quasispecies dynamics in different influenza seasons to determine whether predominant strain in this season has existed in the quasispecies of previous seasons, which uncovers the mechanism of variant emergence, (5) sequence differences between viruses collected before and after the treatments of antivirals to understand the development of resistant influenza viruses (6) comparison of quasispecies dynamics in the different types/subtypes of influenza viruses. The results obtained in this project will advance our understanding on influenza virus evolution, adaptation, antigenic drift, antiviral resistance and virulence, which make prevent and control influenza effectively.

keywords : Influenza; virus evolution; quasispecies; viral diversity; next-generation sequencing, NGS

本文

一、前言：

流感病毒嚴重威脅人類健康，每年流感全球侵襲率估計在兒童約20-30%、成年人約5-10%，主要導致嬰兒、老人或慢性病患等高危險群者住院和死亡，估計每年約造成3~5百萬例嚴重病例，約有25-50萬人死亡(WHO, Fact sheet on influenza, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>)。流感病毒，屬於正黏液病毒科(*Orthomyxoviridae*)，病毒基因體為8個負單股RNA，病毒產生10-14個蛋白質[9, 木]。流感病毒突變率高易產生新變異株，造成病毒歧異度變大，形成quasispecies [6]，但流感病毒感染個體時因瓶頸現象造成選擇少數病毒繼續複製並釋出[4, 8, 13]，流感病毒基因的變化為經過多次的感染循環:感染時病毒歧異度窄化而釋出時歧異度增加，使得少數株變為主流株。故quasispecies中各族群的消長決定病毒抗原飄移、抗藥性與致病力的改變[6]。而抗原飄移導致每年疫苗株組成需調整，抗藥性發生則須改變治療藥物，而致病力的改變造成死亡人數增加。過去quasispecies中少數株無法以傳統的基因定序法檢測，但近年來新的DNA定序技術，具高通量(high-throughput)特性，相對於傳統Sanger定序法又稱為次世代定序(next-generation sequencing, NGS)簡稱NGS，NGS可提供大量的DNA序列資訊，深度解析基因體，可發現微生物基因體序列低比例的變化，且不用特定primers的特性，可用於決定未知微生物的基因序列[1]。NGS技術在2005年有Roche 454 FLXpyrosequencing定序平台(<http://www.454.com/>)，後來在2007年，Illumina公司 SOLEXA Genome Analyzer (<http://www.illumina.com>)，Applied Biosystems SOLiD (<http://www.appliedbiosystems.com>)，Life Technologies 的 Ion Torrent PGM (<http://www.iontorrent.com/>)和 Pacific Biosciences公司單分子即時定序(single molecule real-time sequencing, SMRT) (<http://www.pacificbiosciences.com/>)。這些NGS方法具有不同的特性如每次read序列的長短、序列的正確性等差異。在微生物學和病毒學NGS方法典型應用中，除了高通量全基因組定序，發現新微生物和病毒，NGS可以應用到

metagenomic 策略用於檢測未知疾病相關病毒和發現新的病毒等與過去利用微陣列的方法，NGS 提供更高的靈敏度檢測的新病毒[3, 5, 7, 11]。目前 NGS 被應用在研究流感病毒分子流行病學，病毒歧異度變化[12]傳播與致病性，如利用 NGS 研究流感病毒的演變與流感病毒在不同物種間的適應變化例，如原先少數 NA 缺失的變異株因在家禽適應強而成主流病毒[2]，在特定地理區域不同的人類流感病毒的流行和蔓延的模式[4]。

為了瞭解流感病毒演化和流行病學過程中抗原漂移(antigenic drift)、抗藥性、主流病毒株在個體與族群中出現的變化，本計畫擬建立流感病毒次世代(NGS)基因定序平台，並使用 NGS 分析比較流感病毒在原始臨床檢體與分離病毒株基因序列差異，流感病毒 quasispecies 基因序列動態變化，分析從個體層次感染流感病毒後，不同時期(早、後期)與不同部位(上、下呼吸道)基因序列之變化。使用 NGS 比較不同年之流感病毒 quasispecies 變化，研究當年的主流病毒株基因特徵是否在以前 quasispecies 變異株已存在，瞭解流感病毒變異株出現的機制。使用 NGS 分析使用抗流感藥物前後病毒 quasispecies 變異株基因序列的變化。比較不同亞型/次亞型流感 quasispecies 變化。希望本計畫的進行對流感病毒的演化、適應、抗原飄移、抗藥性與致病力的變化更進一步瞭解，以更有效地防治流感。

二、 材料與方法

(一) 檢體與病毒株收集

本計畫檢體來源為通報流感併發重症、上呼吸道群聚、新型 A 型流感及不明原因肺炎等個案檢體。流感核酸檢測 real-time RT-PCR 之步驟與引子、探針序列，以及病毒培養方法，詳見先前文獻[15]。

藉由上述檢驗陽性之臨床檢體，本研究從中挑選作為建置 NGS 分析平台之樣本，挑選的條件如下：

1. 該原始檢體可藉由 Sanger sequencing 完成病毒基因定序，以確保檢體中的病毒

量不至於過低。

2. 該檢體具有經細胞培養後所分離的病毒株，如此可直接比較原始檢體以及病毒分離株的 quasispecies 趨勢。
3. 挑選檢體時將參考原始檢體的 Sanger 定序結果，於各病毒 genetic clade 挑選，以利分析的病毒標的多元化。

(二) 流感病毒基因序列的分析流程

為能即時分析大量流感資料與易於監測流感病毒的變化，發展分析流程如下：

1. 將流感病毒氨基酸基因序列，使用 Clustal W 軟體作 alignment。
2. 使用 Bio-Eidt 將 alignment 之序列，調整 gaps 與切齊各序列的長度，以利後續之分析。
3. 使用 Amino acid variation 軟體，分析各位點變化的情形，選擇變化值大之位點，進行 proteotyping 之分析。
4. 使用 Excel 之巨集功能，將各種氨基酸以不同顏色代表，使各位點氨基酸一目了然，完成 proteotyping 之分析。此分析易於觀察其氨基酸位點變化情形，並依採檢日或發病日觀察這些氨基酸位點變化情形。
5. 將流感病毒基因的序列以 MEGA5 軟體 [10]分析其親緣關係。

(三) 流感病毒株培養

將臨床檢體接種於 MDCK (Madin-Darby canine kidney cell) 細胞，分離流感病毒。

MDCK 細胞以 EMEM 培養基(內含 10%胎牛血清)於 34°C，5%CO₂ 下繼代培養。

(四) 病毒與抗血清價位測定

本研究利用紅血球凝集試驗測定病毒量；以紅血球凝集抑制試驗測定抗血清力價，評估病毒抗原性。

1. 紅血球凝集試驗

- (1) 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 50 uL 的 PBS 溶液，於第一列加入 100 ul 的病毒抗原原液，negative control 行則以 100 uL PBS 取代抗

原。

- (2) 取第一列的抗原 50 uL 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 50 uL 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 ul 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 °C 下靜置 30—60 分鐘，之後觀察血球凝集，記錄病毒價位。

2. 紅血球凝集抑制試驗

- (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 uL 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 uL 的 PBS 溶液。於第一列加入 50 uL 的各標準病毒株的標準抗血清，negative control 行則以 25uL PBS 取代抗血清。取第一列的抗體 25 uL 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 25 uL 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 uL (8 HA unit/50 uL) 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 uL /well，之後以膠膜封住孔盤，至於室溫或 4°C 下靜置 30—60 分鐘，之後記錄抗血清價位結果。

(五) 病毒 RNA 萃取及反轉錄

病毒 RNA 萃取利用自動核酸萃取系統 MagNA Pure Compact Instrument (Roche Applied Science) 進行樣品核酸萃取，取 5 µL 萃取之核酸，利用隨機核苷酸(random octamer) 進行反轉錄反應，合成第一股 cDNA (first strand cDNA)：核酸與引子於 65°C 作用 5 分鐘後，置於冰上，再利用 PrimeScript RTase reverse transcriptase 進行反轉錄反應，反應條件為先 30°C 作用 10 分鐘後，再次 50°C 作用 60 分鐘，最後 95°C 作用 5 分鐘。

(六) NGS 平台

本研究使用 Illumina MiSeq sequencer 或 Pacific Biosciences 公司 SMRT 平台進行流感病毒序列分析，並比較與傳統方法序列差異。不同平台詳細步驟依廠商提供步驟進行。

(七) NGS 資料分析

本研究使用 CLC Genomics Workbench version 7.0.3 (CLC Bio, Qiagen) 軟體進行資料分析比對，本年除規劃將待測病毒的全基因體完成組裝外，亦後續進行病毒 quasispecies 的分析，比較流感病毒在原始臨床檢體與分離病毒株基因序列差異，分析流感病毒 quasispecies 基因序列動態變化。

三、 結果

本年度為四年計畫執行的第三年，截至 108 年 11 月止，研究成果敘述如下：

(一) 檢體收集挑選及病毒全基因片段放大

本計畫於 108 年的主要分析目標有二：(1) 持續比較同一流感病毒感染個案，其不同受感染呼吸道部位之病毒 quasispecies 突變的分布差異；以及 (2) 以 NGS 比較不同流感季之流感病毒 quasispecies 變化，研究當年成為主流病毒株之基因特徵是否在以前 quasispecies 變異株已存在。因此，108 年 1 月至 11 月間，本計畫以回溯方式挑選 104 年 1 月至 12 月間，通報新型 A 型流感及不明原因肺炎，且其送驗之檢體同時包含上呼吸道(咽喉拭子)及下呼吸道(痰液)，並經 real-time RT-PCR 檢出為 A(H3N2) 病毒感染陽性之 6 名個案，將其檢體(共 6 對，12 支)以 RT-PCR 完成流感病毒全基因片段放大，並利用電泳分析確認取得病毒全基因產物。此外，亦挑選採集自 104~107 年間 A(H3N2) 病毒陽性之上呼吸道咽喉拭子檢體，包含 104 年 11 支、106 年 9 支以及 107 年 1 支，同步以 NGS 進行檢體中病毒全基因體 quasispecies 分析。

挑選個案的條件如下：

(1) 該個案所採集之臨床檢體可藉由 Sanger sequencing 完成病毒基因定序，以確保檢體中的病毒量不至於過低。

(2) 分析對象挑選自通報新型 A 型流感及不明原因肺炎個案，係因依通報原則，該等個案須同時採集上呼吸道(例如咽喉拭子)及下呼吸道(例如痰液或其他呼吸道分泌物)之檢體，符合本年計畫分析目標之需求。

(二) 以 NGS 分析流感病毒感染個體後於不同部位(上、下呼吸道) quasispecies 基因序列動態變化

利用 106-107 年間已建立完成之流感病毒次世代(NGS)基因定序分析流程，108 年持續利用相同流程，針對病毒量相對強，且為成對檢體 (屬同一個案之上呼吸道及下呼吸道檢體)之核酸進行流感病毒全基因體分析，以比較病毒在呼吸道不同部位之基因序列差異，瞭解各 quasispecies 於基因層次之動態變化。前述 12 支檢體核酸經由 RT-PCR 進行病毒全因基片段放大後，皆可於洋菜膠電泳圖上看到病毒基因片段產物，後續將該 12 支病毒產物所製備之全基因體序列庫(library)以 Illumina Miseq 進行定序，再以 CLC Genomics Workbench version 7.0.3 (CLC Bio, Qiagen)軟體進行個基因片段 contig 組裝後，針對各成對樣本病毒 quasispecies 之全基因序列比較(咽喉拭子檢體病毒 vs.痰液檢體病毒)結果綜整如表 1~8。

將該 6 對檢體之病毒全基因序列進一步分析結果顯示，感染同一個案上呼吸道及下呼吸道之 A(H3N2)病毒，在其 8 個基因體片段中，除了 NP 基因外，其餘 7 個片段都會出現具特定核苷酸位點突變的 quasispecies。這些帶有突變的 quasispecies 所占比例大多小於 10%，比例約介於 2.21%~12.20%之間 (以 2%為最低 cut-off point)，於單一樣本並非主流族群，亦即這些微量病毒群體的序列資訊並無法以傳統的 Sanger 定序偵測。在 6 對樣本所觀察到的病毒 quasispecies 中，胺基酸因核苷酸同步改變(non-synonymous mutation)且出現次數最多的基因體為 PA，出現 6 次，其次依序為 PB1(3 次)、HA(2 次)、PB2、NA、M2、NS1 及 NS2(各 1 次)；NP 並未觀察到具非同義突變的病毒 quasispecies；各基因片段出現突變位點的出現次數均為 1 次。此外，部分病毒 quasispecies 所帶有的核苷酸突變並不會改變其蛋白質的胺基酸序列(synonymous mutation)，此類同義突變出現次數最多的基因體為 PB2 及 NP(各 3 次)，其次依序為

PB1、PA(各 2 次)及 HA(1 次)；NA、MP 及 NS1 片段未觀察到具同義突變的病毒 quasispecies。

此外，分析感染人類上、下呼吸道各 A(H3N2)病毒 quasispecies 基因體蛋白非同義突變種類的位點分布，由於皆未重複，因此在這 6 對樣本中並無觀察到突變熱點(hot spot)，但在 1 對樣本中觀察到 NS1 與 NS2 蛋白連動突變的現象(NS1 P3S 與 NS2 P3S)。在同義突變的位點方面，各核苷酸突變仍屬散發，並未發現有重複趨勢。綜觀病毒 quasispecies 全基因體的突變趨勢(表 9、表 10)，在所有觀察到的胺基酸位點中，非同義突變皆出現 1 次，其對於病毒演化或病原特徵所扮演的角色需進一步評估。

(三) 以 NGS 比較不同流感季之流感病毒 quasispecies 變化，研究當年成為主流病毒株之基因特徵是否在以前 quasispecies 變異株已存在

為瞭解流感病毒演化過程中，某一期間主流病毒株 (或稱變異株)所具有的基因特徵，是否在該流行期以前即先以少數 quasispecies 的形式存在於病毒群體，進而探討分析流感病毒 quasispecies 變異情形可否應用於預測未來主流病毒之演化趨勢。本年度以 A(H3N2)病毒為對象，首先針對 105~108 年該亞型流感病毒 HA 蛋白於全球的長期變化趨勢進行分析，結果顯示，此期間病毒 HA 蛋白主要改變為 E78G, K108R, N137K, T144A, T147K, T51K/N, R158G, S160K, N187K 以及 H327Q 等 10 種變異 (圖 1 A-J)，資料來源取自 Nextstrain 網站：<https://nextstrain.org/flu/seasonal/h3n2/ha/2y>；部分突變隨著時間演進於族群中逐漸成為主流，其餘則以非主流形式穩定存在。進一步將回溯選取之 21 支 A(H3N2)病毒陽性檢體進行全基因體 NGS 分析，檢視各檢體病毒 quasispecies 出現情形之結果顯示，在所有出現於 21 支臨床檢體之病毒 quasispecies 中，其所佔比例之中位數介於 0.26%~0.15%之間。上述 10 種突變中，於 quasispecies 可觀察到 6 種突變 (表 11)，其出現次數最多者依序為 K108R (出現 15 次；比例為 0.32%~0.11%)、T144A (13 次；0.37%~0.14%)、R158G (12 次；0.39%~0.12%)、E78G (11 次；0.40%~0.13%)、N187K 與 H327Q (各為 1 次；比例分別為 0.11%與 0.14%)；N137K、T147K、T151K/N 與 S160K 等 4 種突變並未於各 quasispecies 中發現。

除了上述出現於全球 105-108 年 A(H3N2)病毒流行株之 10 種主要突變之外，根據該 21 支臨床檢體所有出現的病毒 quasispecies 突變種類，本年亦進一步分析各檢體中佔比最高的前 10 種 quasispecies 突變，結果綜整如表 12。結果顯示，在該 21 支檢體中總計 210 種 quasispecies 突變中，出現比例前 10 名者確實有重複趨勢，出現次數最多之突變位點為胺基酸 281，出現次數為 10 次 (4.76%, 10/210)，突變種類為 S281G，比例介於 0.74%~0.31%之間。其後依序為 (僅文字說明次數最多之前 5 名，共 7 種，其餘詳如表 12)位點 181 (出現 9 次, 4.29%, 9/210)，突變種類為 N181D (0.40%~0.37%)與 N181S (0.47%~0.32%)；位點 102 (出現 7 次, 3.33%, 7/210)，突變種類為 L102P (0.44%~0.32%)，位點 130 (出現 6 次, 2.86%, 6/210)，突變種類為 S130P (0.39%~0.36%)與 T130S (0.47%)；位點 95、224 及 257 各出現 5 次 (各佔 2.38%, 5/210)，突變種類為 F95L (0.58%~0.31%)、R224G (0.63%~0.26%)與 D257G (0.41%~0.27%)。進一步分析具有出現次數前 5 名突變之 7 個位點病毒 quasispecies 存在的檢體採集時間，結果顯示，在 11 支採集自 104 年的檢體中，各有 7 支 (63.6%, 7/11)具有位點 281 及 181 突變之 quasispecies；具有位點 102 突變之檢體數為 4 支 (36.4%, 4/11)；具有位點 224 與 257 突變之檢體數各為 3 支 (27.3%, 3/11)；具有位點 95 與 130 突變之檢體數則各為 1 支 (9.1%, 1/11)。在 9 支採集自 106 年的檢體部分，有 4 支 (44.4%, 4/9)具有位點 130 之 quasispecies；具有位點 95 與 281 quasispecies 突變之檢體數各為 3 支 (33.3%, 3/9)；具有位點 102、181、224 與 257 突變之檢體數各為 2 支 (22.2%, 2/9)。在唯一 1 支採集自 107 年的檢體中，具有位於位點 95、102 及 130 之病毒 quasispecies。各位點 quasispecies 於各年代檢體出現之比例並不相同，其是否有明顯之時序關聯，有待分析更為足量之樣本探討結論。

四、 討論

流感病毒對於公共衛生防治所帶來的威脅，在於其高度變異性，導致具特殊突變的

變異株無預警的出現，進而影響疫苗的保護效力（例如季節性流感病毒每年都持續累積改變）；或是藉由基因重組，形成前所未有的新型病毒，進一步造成全球大流行疫情。以 Sanger 定序為原理之序列分析技術已長期沿用數十年，成為微生物鑑定及演化分析等的重要利器。然而，以流感病毒來說，當利用 Sanger 定序儀分析病毒變異情形時，礙於技術本身偵測靈敏度的限制，僅能得到病毒 quasispecies 中的主流病毒序列，對於佔比較為微量之病毒族群，無法有效檢測其核苷酸，因此該等變異容易被忽略，致使研究人員無法藉由此類傳統技術一窺病毒於演變過程中的細微變化，此限制亦使 Sanger 定序技術逐漸無法滿足現今對於病毒演化精準分析之期待。隨著全球科技的進展，利用次世代定序的新技術已可克服此一限制，藉由其針對病毒基因體核酸序列於單一位點的高涵蓋率分析，現階段研究者已可獲得解析度更佳，且定序量能更大之分析結果，對於流感病毒的演變亦可進行更為全面的監控，以本計畫本年所分析之結果為例，流感病毒於感染人類呼吸道不同部位，並完成增殖複製後，這些位於不同部位之病毒已開始產生細微變化，且變化的分布擴及整個基因體。檢視其發生比例，這些可觀察到的變異，其佔比大多小於 10%，因此，應用次世代定序技術探討流感病毒之演化，已可針對比率較為微量之病毒中間產物進行定性與定量分析，掌握其消長趨勢，此優勢亦將有助於我國傳染病防治相關單位，藉由此種敏感性較高之定序技術，及早研判新流感變異株出現的時機，對病原體未來可能造成的公共衛生風險提早因應。

本年為四年期計畫的第三年，第一年度以 NGS 技術同步分析 18 對未經培養且存在於原始臨床檢體中的 A(H3N2)病毒，以及同一檢體經由哺乳動物細胞 (MDCK) 培養後所分離的病毒株 quasispecies 之差異比較顯示，這些 quasispecies 在各基因體片段皆有核苷酸的突變，這些變異會伴隨蛋白質胺基酸產生非同義或同義突變。然而，進一步分析的結果顯示，存在於原始檢體中的病毒，與經細胞培養後的同一病毒，其差異主要位於病毒的表面蛋白(HA 與 NA)，即該兩蛋白為此比較下非同義突變的熱點（例如 HA 蛋白的 174 與 176 兩位點，以及 NA 蛋白的 151 位點等）。第二年度針對病毒 quasispecies 的分析，進一步轉為比較感染宿主（人類）呼吸道不同部位之同一病毒，其 quasispecies 之變

異趨勢，從另一層面探討病毒於不同環境感染及複製增殖後，可能出現的改變。結果顯示，A(H3N2)亞型病毒於不同呼吸道部位感染後，同樣會因為環境的不同，彼此逐漸產生差異。值得注意的是，雖然病毒 quasispecies 在各基因體片段亦皆有核苷酸的突變，且這些變異會伴隨蛋白質胺基酸產生非同義或同義突變，但其差異主要位於病毒的聚合酶蛋白 (PB2 及 PA)；這兩個蛋白亦出現非同義突變的熱點 (例如 PB2 蛋白位點 673，以及 PA 蛋白位點 640)。這個趨勢與第一年比較病毒培養前後差異之結果不同。在本年 (計畫第三年)所觀察的 6 對 A(H3N2)病毒之結果中，感染不同呼吸道部位且流行年代更早 (104 年 1~12 月)之流感病毒，病毒 quasispecies 突變比例差異主要仍位於其聚合酶蛋白 (PA 及 PB1)，此現象與第二年所得結果之趨勢吻合。探討造成這些差異的可能原因，計畫第一年度所觀察到的 HA 蛋白 174 與 176 位點突變與病毒於該區間 (胺基酸 174-176)是否具糖基化 (glycosylation)有關，在所觀察到的突變當中，無論是位點 174 或 176 產生任一形式的改變，皆會移除胺基酸 174-176 區間之糖基，而經移除糖基後的病毒，其抗原性、受體結合專一性與致病能力皆有可能改變。因此，造成此種改變之原因，是否有病毒於感染時需適應人類與其他哺乳類 (例如 MDCK 是狗腎臟細胞)細胞不同受體特性有關，值得未來進一步探討。反觀第二年及第三年所觀察到的病毒 quasispecies 突變主要位於聚合酶蛋白 PB2、PB1 與 PA，可能因人類之不同呼吸道部位之環境溫度具有差異，上呼吸道之溫度相對較低 (例如 33~34 度)，下呼吸道之溫度略升至 36~37 度。以此推論，雖本年所觀察到之突變目前在文獻上並未有明確之報導，但病毒 quasispecies 是否因需適應人類呼吸道不同部位之溫度而於聚合酶產生該等突變，將是未來深入探討病毒演化值得關注的層面。綜合以上，本計畫藉由應用次世代定序技術，針對流感病毒於不同環境複製後的變化，已持續累積科學實證，未來藉由此等於基因層次之發現搭配其他病毒功能性實驗結果 (例如利用重組病毒製作技術產製具單一突變病毒，釐清各突變對於病毒的影響)，將可累積更多證據，共同推估造成流感病毒變異株出現的可能原因及潛在風險，進而針對已出現的變異株進行最有效的早期偵測及預警。

流感病毒的基因體具有高變異性，時常藉由核苷酸的點突變改變各種病毒蛋白的特

性，而此種特性轉變最常在病毒的兩種表面糖蛋白-紅血球凝集素(HA)及神經胺酸酶(NA)發現。以 HA 蛋白而言，特定胺基酸的變異可能造成其抗原性特徵的改變，進而影響宿主抗體的辨認能力，降低對抗病毒的中和效力，這也是流感疫苗株每年皆須藉由世界衛生組織於全球嚴密的監測結果，定期更新其組成的主要原因；國人也因如此每年皆須重複接種可能帶有新成分的流感疫苗，以期維持可抵抗病毒感染的最適當免疫力。由於疫苗至今仍為防治流感最重要的策略之一，因此如何提升疫苗的保護力一直是傳染病疫情防治相關單位以及產、學、研界亟需思考的重要議題；而提高流感疫苗株與流行株抗原特徵的吻合程度，是達成該目的之重要方式。有鑑於此，即時掌握流感病毒變異趨勢，進而預測各病毒未來的可能樣貌及特徵，是當前世界衛生組織偕同各國的國家流感中心以及相關學術研究單位，持續進行的工作。然而，如何以現有資訊準確預測病毒後序的演化走勢，往往是實現提升疫苗株與流行株吻合度的最大瓶頸。隨著本計畫於前兩年已針對流感病毒的全基因體建立穩定的次世代分析流程，本年度首度嘗試藉由分析病毒 quasispecies 突變特徵的方式，探討流感病毒群體中 quasispecies 樣態是否可以作為預測病毒未來演化特徵的指標。此分析的假設前提為流感病毒於群體中的演化係採循序漸進且持續累積，亦即一個新的主流病毒變異株係由某一母群體病毒先藉由少數的基因突變開始產生，其後再隨時間演進慢慢累積其群體佔比，最終取代原有主流病毒。根據本年分析 21 支採集自 104~107 年臨床檢體中 A(H3N2)病毒 quasispecies 的組成，並與一年後(105~108 年)全球主流病毒變異株的 HA 蛋白特徵比較之結果顯示，在該期間主流病毒 HA 蛋白的主要 10 個胺基酸突變中 (E78G, K108R, N137K, T144A, T147K, T51K/N, R158G, S160K, N187K 以及 H327Q 等)，共有 6 個突變 (E78G、K108R、T144A、R158G、N187K 以及 H327Q)可於至少一年前採集的臨床檢體中病毒 quasispecies 發現，其中 4 個突變 (E78G、K108R、T144A 以及 R158G)在 50% 以上的臨床樣本皆可觀察，故 105~108 年主流病毒株基因特徵確實已存在於部分 104~107 年病毒 quasispecies 群體中。然雖如此，這些出現次數多的 quasispecies 於各檢體中病毒群體的佔比並非持續維持在高排名，分析時不容易直接以檢體中各 quasispecies 比例高低排序觀察 (每個樣本所具有的病毒

HA 基因 quasispecies 數目範圍約介於 600~800 種之間)，因此如何由檢體 quasispecies 突變分布趨勢及其比例高低，評估未來主流病毒 HA 基因的可能特徵，將是本計畫下一年度之研究重點。

另一方面，若將 104~107 年間 21 支 A(H3N2)陽性臨床檢體中，所有病毒 quasispecies 具有之 HA 基因突變佔比進行排序，觀察各樣本前十名 quasispecies 突變種類，結果顯示，這些比例前 10 名之 quasispecies 突變確實有重複出現情形。進一步將這些突變與國際病毒演化資料庫 (Nextstrain)之分析趨勢相比，無論各突變重複出現之次數多寡，在總計 210 個 quasispecies 中 (每支檢體取前 10 名，21 支檢體共有 210 個)，共有 25 個 (11.9%, 25/210)突變於在該臨床樣本採集日期之後於國際間出現。這些突變依重複出現的次數由高至低排列包含 (1)出現 10 次之 S281G；(2)出現 5 次之 F95L 與 R224G；(3)出現 4 次之 I298T；(3)出現 3 次之 N61S、E135G 與 S278N；(4)出現 2 次之 K98R、T151A、V182M、V198I 與 K280E/R；(5)出現 1 次之 T44A、D69G、S107N、R158G、T176A、E188G、K205R、S214P、P243H、I252T、I276V、N314D 與 A320P 等 (圖 2A-Y)。值得注意的是，這些突變雖確實於 quasispecies 被觀察後的一段期間之後出現於國際間，但具有這些突變的變異株於族群中存在的比例低，且無取代原有病毒成為主流；反之，這些變異株皆僅短暫出現後隨即消失。因此，這些具有這些 quasispecies 突變的病毒環境適應力或傳播競爭力，可能不如群體中的其他病毒。由於根據本年的觀察結果，某一年度臨床檢體中佔比較高的病毒 quasispecies，確實有機會可於後續形成病毒變異株。故以流感病毒 quasispecies 作為預測未來病毒演化特徵指標的可行性，值得繼續評估與探討。

在以次世代定序進行病毒序列分析的技術層次方面，本計畫於第一年度單次上機可分析全基因體的病毒樣本數為 36 件；第二~三年度則再進一步提升至 48 件。平均每一樣本病毒全基因體之分析單價，由 3,033 元降低至 2,274 元，節省約 25%之費用；此單價更較以傳統 Sanger 定序法，平均每進行一株病毒全基因體序列分析所需花費 13,000 元為低(節省約 82.5%經費)。然雖如此，若考量兩種分析方法的即時性，以 NGS 進行病毒全基因體序列分析，由 RT-PCR 起算，經過序列庫製備以及 Miseq 上機，約需 5~10 天

可進行序列組裝分析；反之，傳統 Sanger 定序耗時較短，約 2~3 天即可得到定序結果進行組裝。因此，以分析時效來看，NGS 現階段仍無法完全取代 Sanger 定序，未來兩者方法的選用時機，可依照不同時效或經費需求等因素進行評估。

五、結論與建議

- (一) 本計畫藉由前兩年所建立之次世代定序分析技術與初步結果，已於第三年延續完成比較流感病毒於人類不同呼吸道部位增殖複製後所產生的差異。結果顯示，同一亞型流感病毒於不同呼吸道部位感染後彼此之差異，與其存在於臨床檢體且經由哺乳類動物細胞培養後產生之差異不同。因此，不同宿主環境對於流感病毒演化產生之影響，可能並不相同。本計畫針對病毒 quasispecies 演化於基因層次之分析結果，未來可搭配其他病毒功能性實驗測試（例如利用重組病毒製作技術產製具單一突變之病毒，釐清各突變對於病毒的影響），累積更多科學實證，共同推估造成流感病毒變異株出現的可能原因及潛在風險，進而針對已出現的變異株進行最有效的早期偵測及預警。
- (二) 在以 NGS 比較不同流感季之流感病毒 quasispecies 變化，研究當年成為主流病毒株之基因特徵是否在以前 quasispecies 變異株已存在的分析方面，某一年度主流病毒的 HA 蛋白突變中，有部分可於至少一年前採集的臨床檢體中病毒 quasispecies 發現，另外，若分析某一年度臨床檢體之病毒 quasispecies 突變趨勢，在其比例較高的突變中類當中，亦有部分可於被觀察到的一段期間之後出現於國際間。因此，以流感病毒 quasispecies 作為預測未來病毒演化特徵指標的作法似乎具可行性，惟進行此類預測時作為依據的關鍵資料仍須藉由下年度持續累積分析樣本數之後較易釐清。

六、計畫重要研究成果及具體建議

- (一) 本年度持續驗證本計畫所建立及優化之流感病毒次世代全基因定序平台的穩定性。依現階段分析流程，單一批次所能分析之樣本數為48件，自最初RT-PCR起算，經次世代定序庫製備至完成上機得到最終序列，約需5~7個工作天；相較於傳統Sanger定序法分析同樣本數之所需經費，可節省約82.5%。因此，次世代定序應用於流感病毒之深度演化分析具經濟效益。
- (二) 綜合比較本計畫106、107與108年所得之分析結果顯示，同一亞型流感病毒於不同呼吸道部位感染後彼此之差異，與其存在於臨床檢體且經由哺乳類動物細胞培養後產生之差異不同。因此，流感病毒之演化趨勢與其所處環境有關，惟其相互關聯性須進一步探討；該研究成果未來將有助於我國於流感大流行之整備及應變工作。
- (三) 本年度已完成以NGS比較不同流感季之流感病毒quasispecies變化，研究當年成為主流病毒株之基因特徵是否在以前quasispecies變異株已存在的初步分析流程，依現階段所觀察結果，某年度佔比排名較高的病毒quasispecies突變種類，有可能成為未來預測流感病毒變異株出現的一項重要指標。
- (四) 次世代定序分析對於流感病毒基因體監測具實際應用價值。雖其現階段對於傳染病的例行檢驗尚無應用之必要性，惟其良好的檢測靈敏度，將有助於國家實驗室評估病毒演變的演變趨勢，以及其潛在風險；目前許多先進國家(例如美國疾病控制及預防中心及日本國立感染症研究所)之國家級實驗室業皆完成此類技術之建置，作為傳染病原體深度分析之有效利器。因此，本次世代定序分析技術藉由本計畫完成建立後，將可協助實驗室及政策權單位進行新病毒風險評估等相關研究，藉以訂定具實用價值之防疫政策。

七、參考文獻：

1. Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, and Palu G: Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *Int J Mol Sci* 2011; 12:7861-7884.
2. Croville G, Soubies SM, Barbieri J, Klopp C, Mariette J, Bouchez O, Camus-Bouclainville C, and Guerin JL: Field monitoring of avian influenza viruses: whole-genome

- sequencing and tracking of neuraminidase evolution using 454 pyrosequencing. *J Clin Microbiol* 2012; 50:2881-2887.
3. Dunne WM, Jr., Westblade LF, and Ford B: Next-generation and whole-genome sequencing in the diagnostic clinical microbiology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:1719-1726.
 4. Fordyce SL, Bragstad K, Pedersen SS, Jensen TG, Gahrn-Hansen B, Daniels R, Hay A, Kampmann ML, Bruhn CA, Moreno-Mayar JV, Avila-Arcos MC, Gilbert MT, and Nielsen LP: Genetic diversity among pandemic 2009 influenza viruses isolated from a transmission chain. *Viol J* 2013; 10:116.
 5. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, and Sata T: Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One* 2010; 5:e10256.
 6. Lauring AS, and Andino R: Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1001005.
 7. Lin Z, Farooqui A, Li G, Wong GK, Mason AL, Banner D, Kelvin AA, Kelvin DJ, and Leon AJ: Next-generation sequencing and bioinformatic approaches to detect and analyze influenza virus in ferrets. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8:498-509.
 8. Moncla LH, Zhong G, Nelson CW, Dinis JM, Mutschler J, Hughes AL, Watanabe T, Kawaoka Y, and Friedrich TC: Selective Bottlenecks Shape Evolutionary Pathways Taken during Mammalian Adaptation of a 1918-like Avian Influenza Virus. *Cell Host Microbe* 2016; 19:169-180.
 9. Nelson MI, and Holmes EC: The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 2007; 8:196-205.
 10. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28:2731-2739.
 11. Tang P, and Chiu C: Metagenomics for the discovery of novel human viruses. *Future Microbiol* 2010; 5:177-189.
 12. Van den Hoecke S, Verhelst J, Vuylsteke M, and Saelens X: Analysis of the genetic diversity of influenza A viruses using next-generation DNA sequencing. *BMC Genomics* 2015; 16:79.
 13. Varble A, Albrecht RA, Backes S, Crumiller M, Bouvier NM, Sachs D, Garcia-Sastre A, and tenOever BR: Influenza A virus transmission bottlenecks are defined by infection route and recipient host. *Cell Host Microbe* 2014; 16:691-700.
 14. Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, and Gao GF: Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol* 2014; 22:183-191.

15. Yang JR, Kuo CY, Huang HY, Wu FT, Huang YL, Cheng CY, Su YT, Chang FY, Wu HS, and Liu MT: Newly emerging mutations in the matrix genes of the human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses reduce the detection sensitivity of the real-time RT-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2014; 52:76-82.

八、圖、表

表 1、上呼吸道與下呼吸道 A(H3N2) 流感病毒 quasispecies 於 PB2 蛋白產生之突變分析

(A) 非同義突變

	PB2
a.a position	386
swab	V
sputum	L
percentage (%)	9.63

(B) 同義突變

	PB2		
a.a position (nt)	686(2058)	719(2157)	729(2187)
swab	T	A	G
sputum	G	G	A
percentage (%)	2.88	8.05	3.15

表 2、上呼吸道與下呼吸道 A(H3N2) 流感病毒 quasispecies 於 PB1 蛋白產生之突變分析

(A) 非同義突變

	PB1		
a.a position	61	480	535
swab	S	R	I
sputum	T	K	T
percentage (%)	3.15	8.04	2.45

(B) 同義突變

	PB1	
a.a position (nt)	176(528)	445(1335)
swab	A	C
sputum	G	T
percentage (%)	9.21	6.60

表 3、上呼吸道與下呼吸道 A(H3N2) 流感病毒 quasispecies 於 PA 蛋白產生之突變分析

(A) 非同義突變

	PA					
a.a position	11	118	231	618	621	627
swab	L	I	T	V	I	*
sputum	P	L	A	A	T	G
percentage (%)	2.21	2.47	12.20	2.40	2.24	2.38

(B) 同義突變

	PA	
a.a position (nt)	104(312)	496(1486)
swab	A	A
sputum	G	C
percentage (%)	2.34	3.94

表 4、上呼吸道與下呼吸道 A(H3N2)流感病毒 quasispecies 於 HA 蛋白產生之突變分析

(A) 非同義突變

	HA	
a.a position	522	524
swab	K	N
sputum	E	K
percentage (%)	3.86	3.52

(B) 同義突變

	HA
a.a position (nt)	269(807)
swab	C
sputum	T
percentage (%)	6.45

表 5、上呼吸道與下呼吸道 A(H3N2)流感病毒 quasispecies 於 NP 蛋白產生之突變分析

(A) 非同義突變

	NP
a.a position	-
swab	-
sputum	-
percentage (%)	-

(B) 同義突變

	NP		
a.a position (nt)	175(525)	228(684)	494(1482)
swab	G	G	A
sputum	A	A	G
percentage (%)	43.83	2.45	2.83

表 6、上呼吸道與下呼吸道 A(H3N2)流感病毒 quasispecies 於 NA 蛋白產生之突變分析

(A) 非同義突變

	NA
a.a position	263
swab	I
sputum	V
percentage (%)	5.49

(B) 同義突變

	NA
a.a position (nt)	-
swab	-
sputum	-
percentage (%)	-

表 7、上呼吸道與下呼吸道 A(H3N2)流感病毒 quasispecies 於 MP 蛋白產生之突變分析

(A) 非同義突變

	M2
a.a position	43
swab	F
sputum	L
percentage (%)	4.41

(B) 同義突變

	MP
a.a position (nt)	-
swab	-
sputum	-
percentage (%)	-

表 8、上呼吸道與下呼吸道 A(H3N2)流感病毒 quasispecies 於 NS 蛋白產生之突變分析

(A) 非同義突變

	NS1	NS2
a.a position	3	3
specimen	S	S
cultured virus	P	P
percentage (%)	4.02	4.02

(B) 同義突變

	NS
a.a position	-
swab	-
sputum	-
percentage (%)	-

表 9、A(H3N2)流感病毒於上、下呼吸道 quasispecies 全基因體非同義突變次數分析

No. of mutation	Viral proteins							
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M1/M2	NS1/NS2
1	1	3	6	2	0	1	0/1	1/1
Total	16							

表 10、A(H3N2)流感病毒於上、下呼吸道 quasispecies 全基因體同義突變次數分析

Viral genome segment	Number of synonymous mutation (%)
PB2	3 (27.3)
PB1	2 (18.2)
PA	2 (18.2)
HA	1 (9.0)
NP	3 (27.3)
NA	0
MP	0
NS	0
Total	11 (100)

表 11、2015~2018 年人類上呼吸道檢體 A(H3N2)流感病毒 quasispecies 具特定突變(後續出現於 2017~2019)之統計結果

Mutation of quasispecies	No. of specimens with designated mutation (% of quasispecies)
E78G	11 (0.13~0.40)
K108R	15 (0.11~0.32)
N137K	0
T144A	13 (0.14~0.37)
T147K	0
T151K/N	0
R158G	12 (0.12~0.39)
S160K	0
N187K	1 (0.11)
H327Q	1 (0.14)

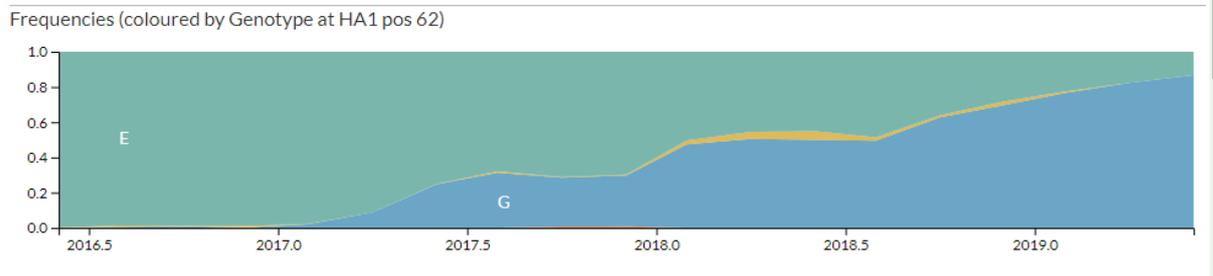
表 12、2015~2018 年人類上呼吸道檢體 A(H3N2)流感病毒 quasispecies 突變位點出現次數前 10 名之統計結果

No. of presence	AA. Position	Mutations (% of quasispecies)
10	281	S281G (0.74~0.31)
9	181	N181D (0.40~0.37), N181S (0.47~0.32)
8	-	-
7	102	L102P (0.44~0.32)
6	130	S130P (0.39~0.36), T130S (0.47)
5	95, 224, 257	F95L (0.58~0.31), R224G (0.63~0.26), D257G (0.41~0.27)
4	43, 101, 123, 217, 298	K43R (1.09~0.37), K43E (0.73~0.30), D101G (1.73~0.28), S123P (2.80~0.27), R217G (0.49~0.31), I298T (0.43~0.32)
3	45, 48, 60, 61, 133, 135, 140, 150, 163, 171, 186, 199, 209, 251, 274, 278, 310	I45T (0.37~0.34), I45L (1.16), D48G (0.44~0.33), Q60R (0.44~0.32), N61S (1.11~0.40), N61D (0.36), T133A (0.38~0.36), T133I (0.97), E135G (0.58~0.35), E135K (0.87), S140G (0.52~0.33), G150R (0.39~0.34), F163S (0.41~0.31), F163L (0.31), T171A (0.45~0.31), N186S (0.55~0.35), N186K (0.86), H199R (0.38~0.34), H199Y (0.55), F209L (0.59~0.37), T251A (0.44~0.36), F274L (0.40~0.36), F274S (0.37), S278G (0.43~0.36), S278N (1.36), F310L (0.34~0.33), F310S (0.48)
2	51, 73, 74, 77, 81, 98, 126, 141, 146, 147, 151, 182, 198, 222, 240, 241, 259, 280, 303, 307, 325	E51G (0.41~0.34), Q73L (0.39~0.31), I74T (0.73~0.29), G77R (0.49~0.38), T81A (0.53~0.33), K98R (0.79~0.33), S126P (0.37~0.34), F141S (0.40), F141L (0.40), V146A (0.78~0.35), T147N (1.37), T147S (0.31), T151A (0.44~0.39), V182A (0.33), V182M (0.76), V198A (0.38), V198I (0.88), T222I (1.30), T222N (1.05), R240K (0.61), R240G (0.35), D241G (0.40), D241N (1.64), L259P (0.41~0.39), K280R (0.42), K280E (0.42), S303G (0.56~0.31), D307G (0.44~0.32), V325A (0.35~0.31)
1	38, 40, 42, 44, 59, 66, 67, 69, 70, 76, 84, 86, 89, 92, 93, 105, 107, 144, 149, 158, 159, 176, 179, 183, 188, 193, 205, 206, 208, 214, 216, 220, 221, 242, 243, 252, 255, 261, 264, 276, 292, 293, 297, 300, 312, 314, 315, 316, 320, 321	N38S (0.27), T40A (0.61), V42A (0.30), T44A (0.37), V59A (0.35), E66G (0.31), I67V (0.37), D69G (0.36), S70G (0.53), D76G (0.35), D84G (1.25), L86I (0.95), D89G (0.44), C92R (0.34), D93G (0.35), E105G (0.28), S107N (0.77), N144S (0.99), N149S (0.34), R158G (0.39), S159P (0.47), T176A (0.32), A179V (0.89), T183A (0.43), E188G (0.35), L193S (0.62), K205R (0.27), D206G (0.43), K208E (0.32), S214P (0.37), G216E (0.99), V220I (1.72), S221P (0.37), I242T (0.30), P243H (0.28), I252T (0.74), P255T (2.28), V261I (41.96), T264A (0.33), I276V (0.30), K292E (0.34), C293R (0.42), C297R (0.37), P300S (2.23), N312S (0.98), N314D (0.32), R315K (2.78), I316T (0.30), A320P (0.41), C321R (0.27)

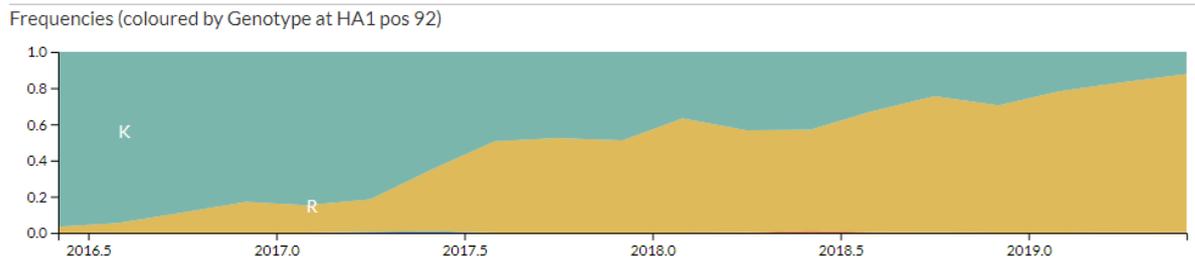
*ND: not determined

圖 1、2017~2019 年 A(H3N2) 流感病毒 HA 蛋白主要胺基酸突變位點及趨勢分析

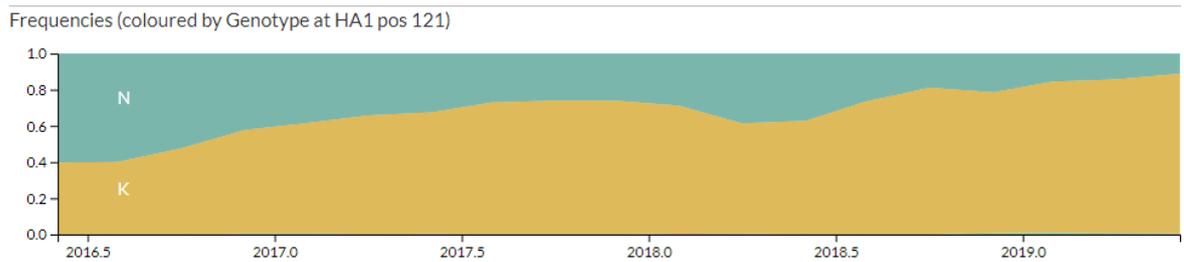
(A) E78G



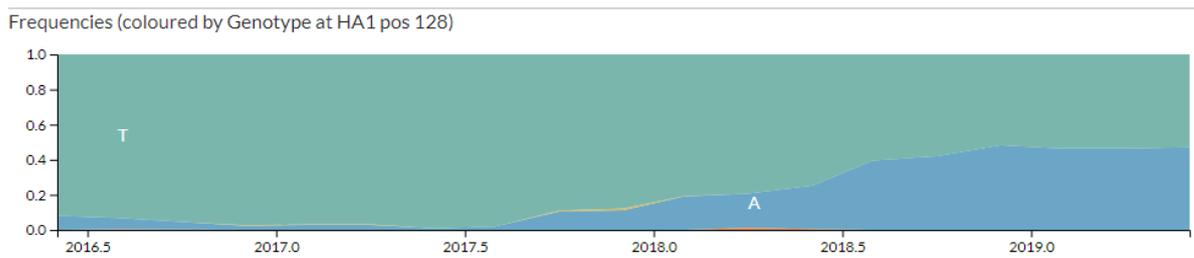
(B) K108R



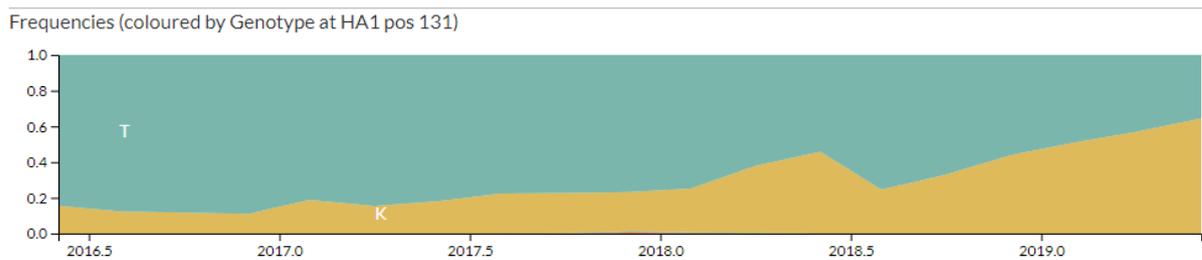
(C) N137K



(D) T144A

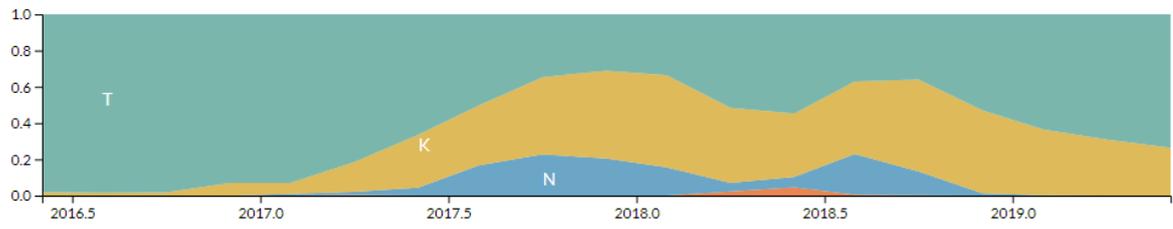


(E) T147K



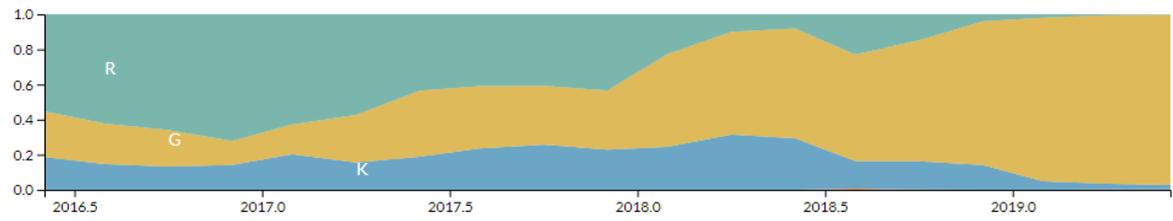
(F) T151K/N

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 135)



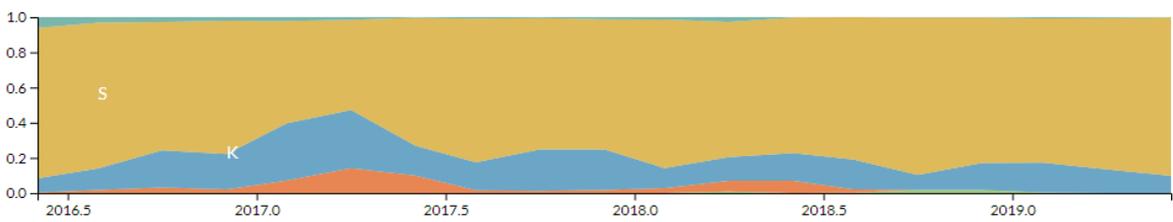
(G) R158G

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 142)



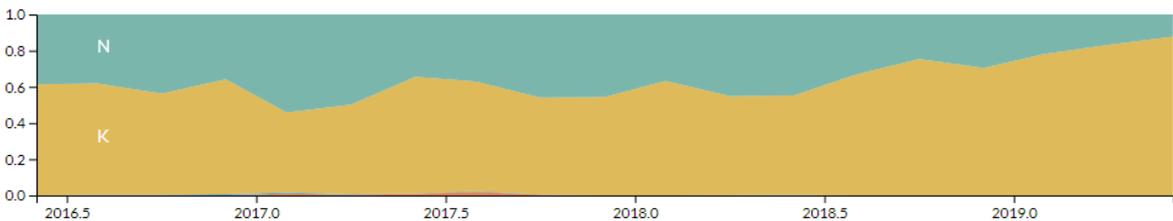
(H) S160K

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 144)



(I) N187K

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 171)



(J) H327Q

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 311)

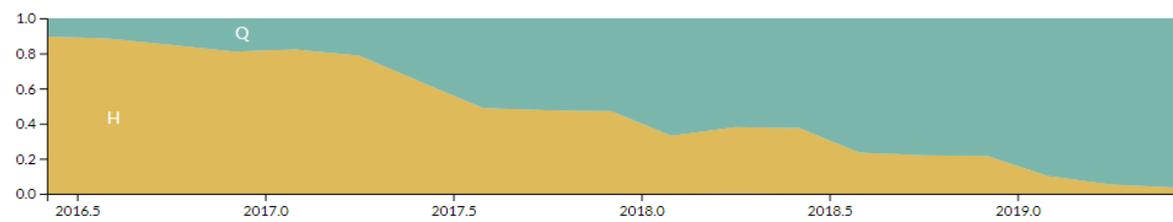
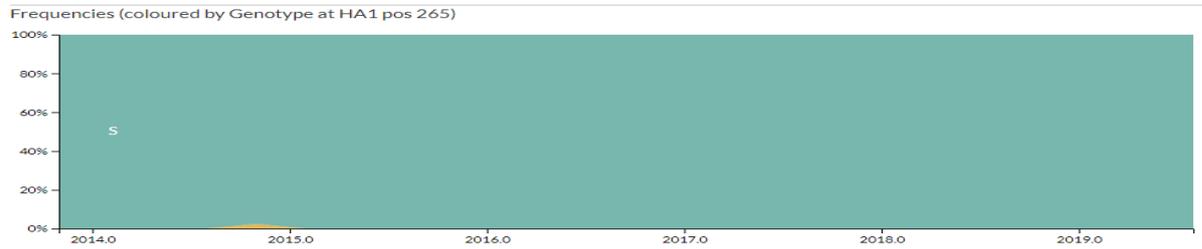
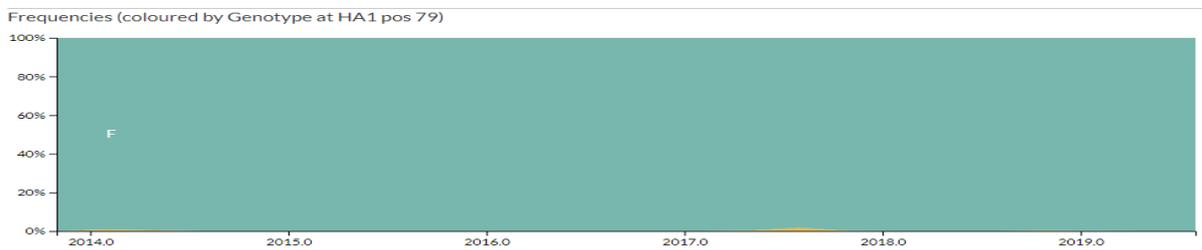


圖 2、2015-2018 年臨床檢體中 A(H3N2) 流感病毒 HA 蛋白 quasispecies 曾於 2016~2019 年國際間出現之趨勢分析

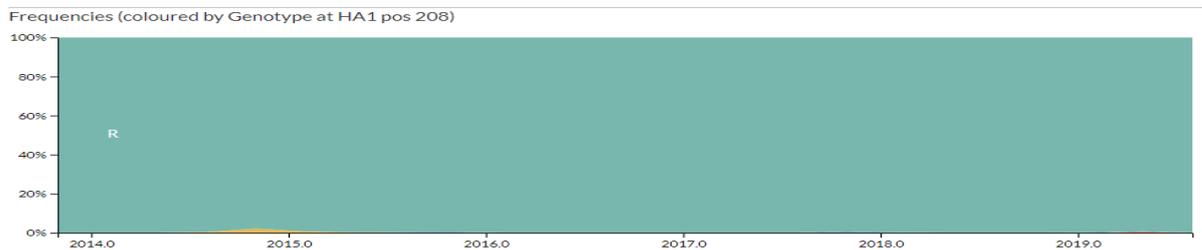
(A) S281G



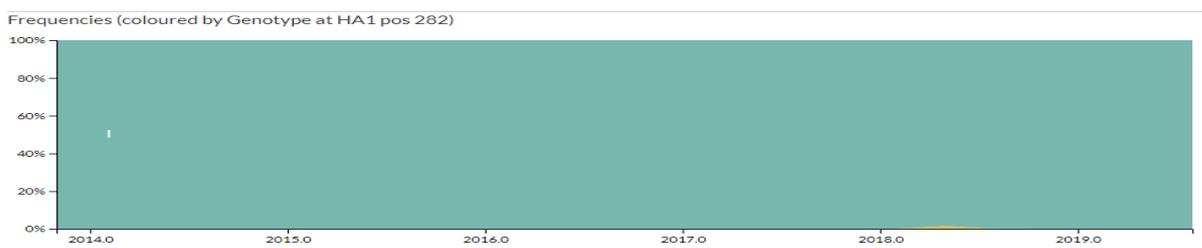
(B) F95L



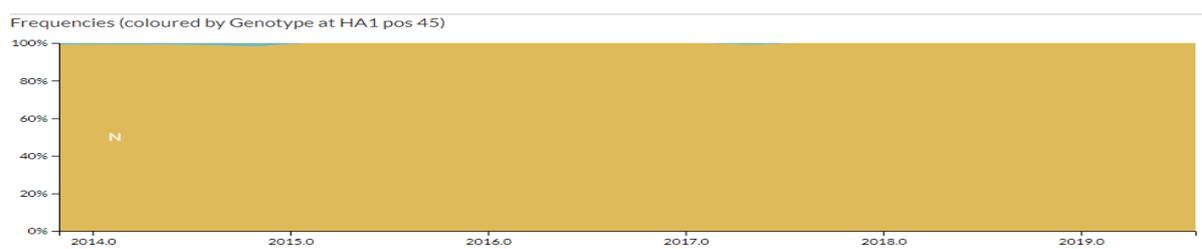
(C) R224G



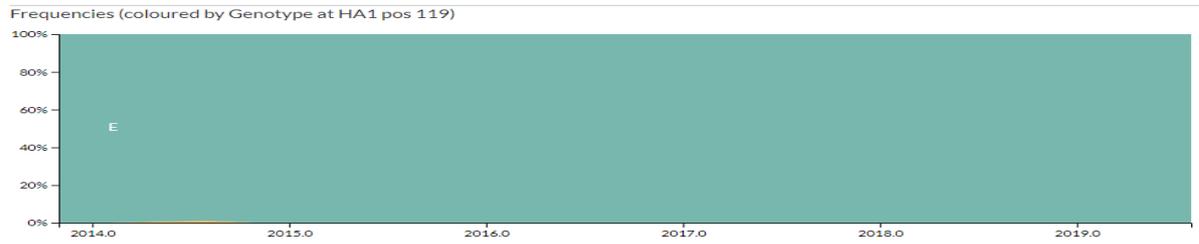
(D) I298T



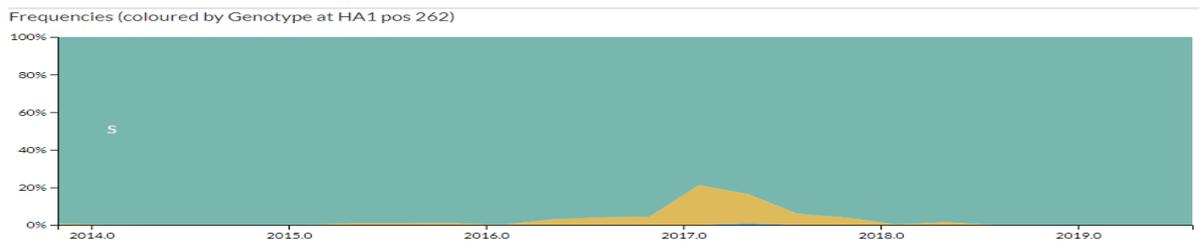
(E) N61S



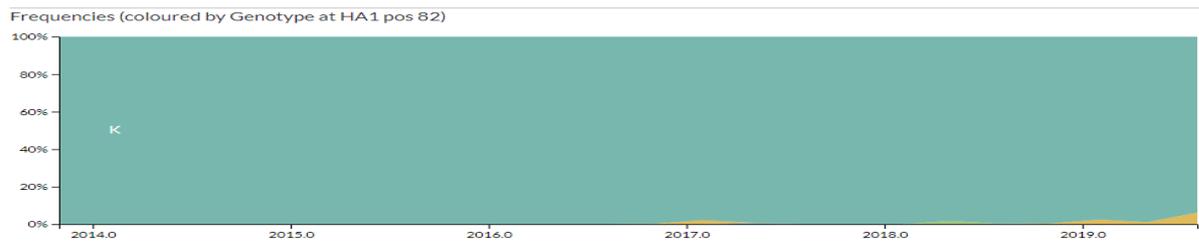
(F) E135G



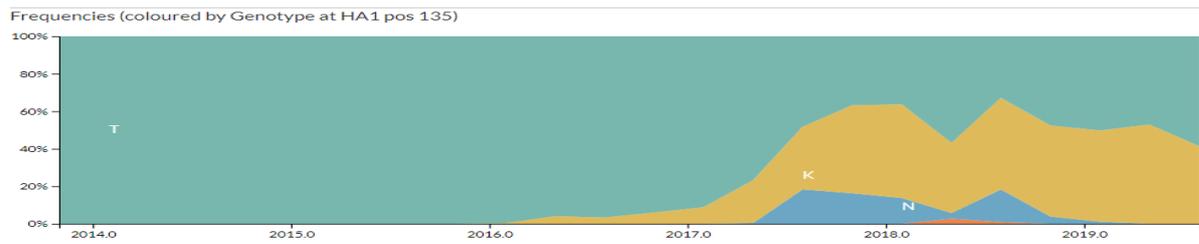
(G) S278N



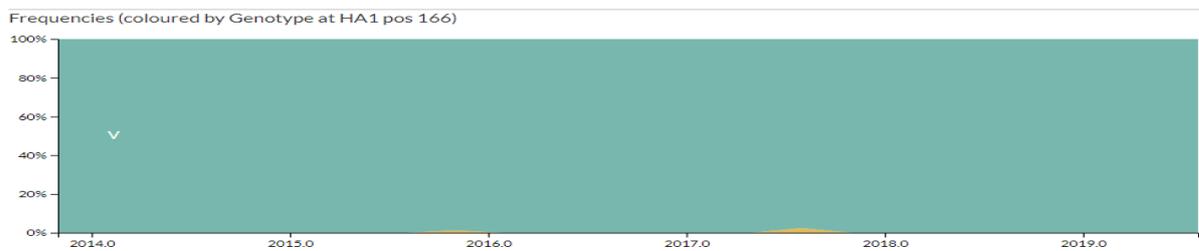
(H) K98R



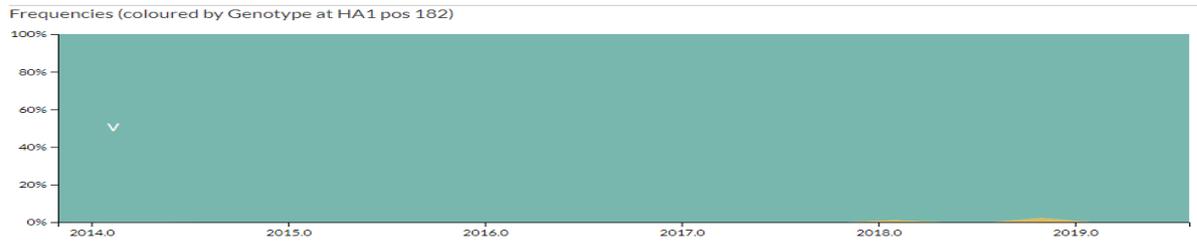
(I) T151A



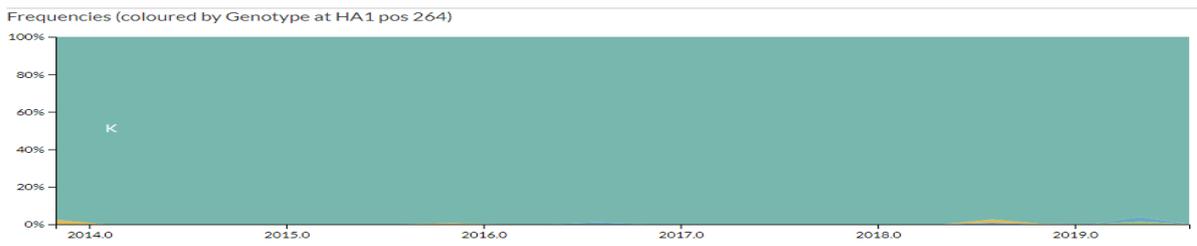
(J) V182M



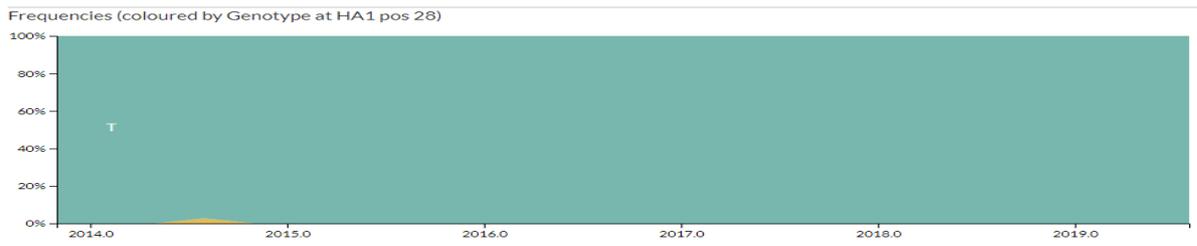
(K) V198I



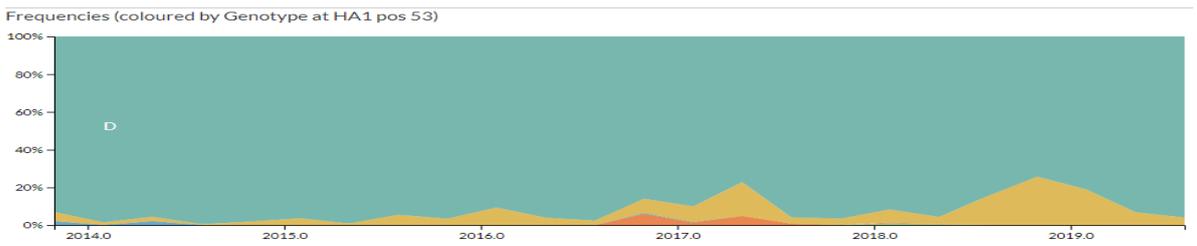
(L) K280E/R



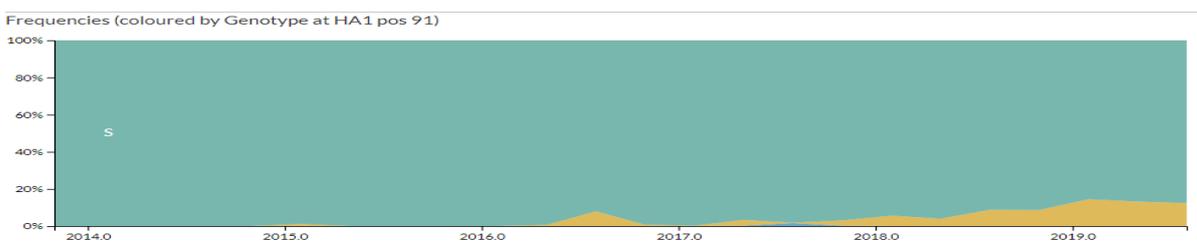
(M) T44A



(N) D69G

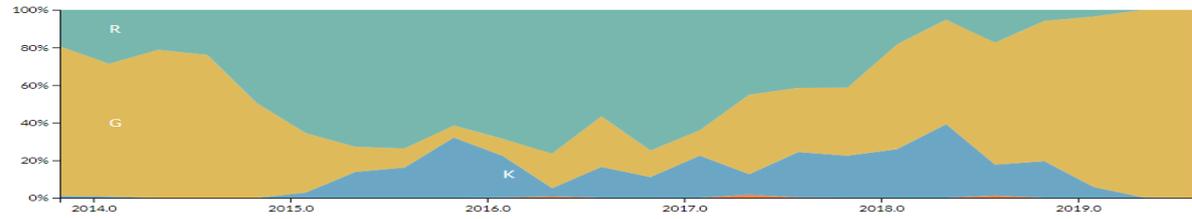


(O) S107N



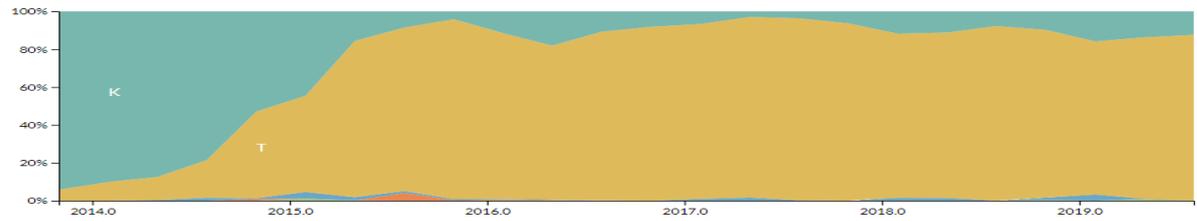
(P) R158G

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 142)



(Q) T176A

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 160)



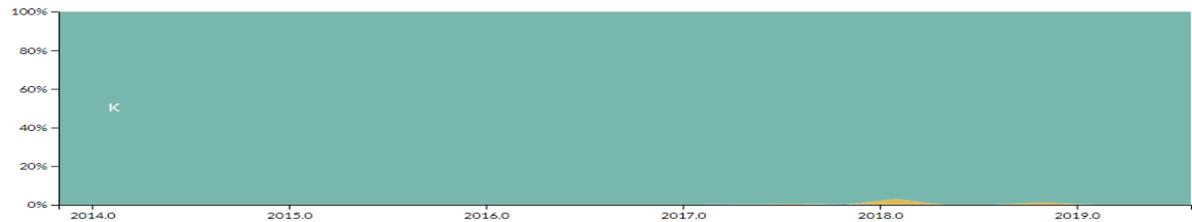
(R) E188G

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 172)



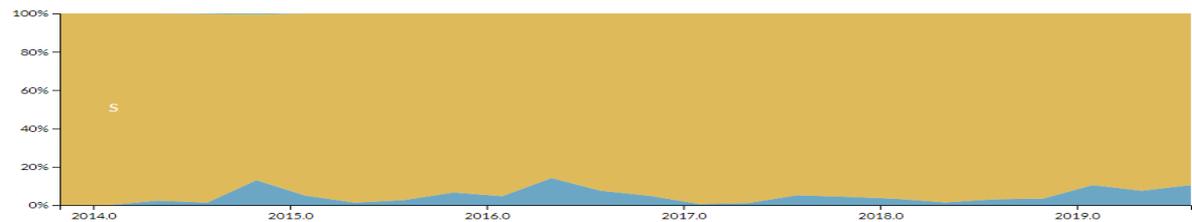
(S) K205R

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 189)



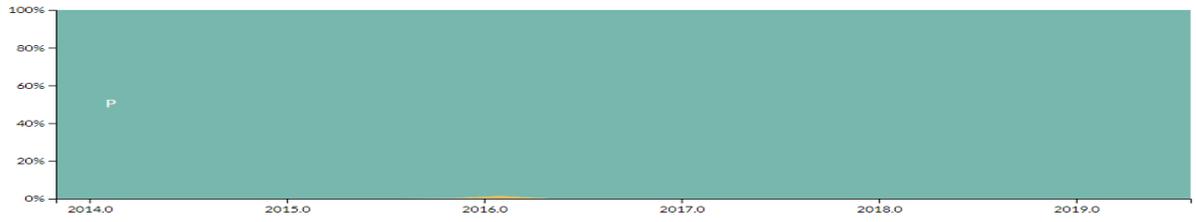
(T) S214P

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 198)



(U) P243H

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 227)



(V) I252T

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 236)



(W) I276V

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 260)



(X) N314D

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 298)



(Y) A320P

Frequencies (coloured by Genotype at HA1 pos 304)



衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫

108 年度計畫重要研究成果及具體建議

(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：建立深度分析流感病毒基因序列與病毒特性關連之平台

主持人：劉銘燦

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-134512

1.計畫之新發現或新發明

同一亞型流感病毒於不同呼吸道部位感染後彼此之差異集中於聚合酶蛋白，與其存在於臨床檢體且經由哺乳類動物細胞培養後產生之差異(集中於 HA 與 NA 表面蛋白)不同。因此，不同宿主環境對於流感病毒演化產生之影響，可能並不相同。

某一年度主流病毒的 HA 蛋白突變中，有部分可於至少 1 年前採集的臨床檢體中病毒 quasispecies 發現。若分析某年度臨床檢體之病毒 quasispecies 突變趨勢，在其比例較高的突變中類當中，亦有部分可於被觀察到的一段期間(0.5~2 年)之後出現於國際間。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

本計畫研究成果可使民眾了解流感病毒的變化速度快，且每年持續感染人類，引發疾病。因疫苗對於流感病毒之預防亟具效果，民眾應每年定期施打疫苗，藉由提升免疫力確保健康。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

次世代定序技術對於流感病毒基因體監測分析具應用價值，可協助實驗室及早掌握病毒演變全貌，進行新病毒風險評估等相關防治作為。

衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫

期末審查意見回復

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-134512

計畫名稱：建立深度分析流感病毒基因序列與病毒特性關連之平台

計畫主持人：劉銘燦

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	自臨床檢體直接做 NGS 找到流感序列以及 quasispecies，變異在 RNA polymerase 及 HA，對於疫苗株的 quasispecies 的變異為何？	本計畫透過自臨床檢體以 NGS 方法直接找出傳統 Sanger 定序法無發現之流感病毒 quasispecies，已可提供更多有關病毒變異及演化特徵之相關訊息。藉由長期監測及統計分析結果，若這些流感病毒 quasispecies 確實有機會於少量出現後大幅成長，進而成為新的流感病毒主流，則本計畫之 NGS quasispecies 分析流程及所得結果將可有效作為未來疫苗選株評估的重要參考依據。本計畫並未直接分析流感疫苗株的 quasispecies。	無修正
2	PA、PB 是 polymerase 理論上較少變化，為何 NGS 看到反而變化多？而 HA、NA 較少？是否與 Baloxavir	(1) 本研究利用 NGS 發現病毒 quasispecies 主要位於其 PA 及 PB 等聚合酶，而非 HA 或 NA 表面蛋白，是透過比較存在於人類不同呼吸道部位檢體之流感病毒而得。推測此觀察結果的原因之一可能為人類上下呼吸道溫度環境不同，致使病毒需藉由聚合酶之突變，使其可適應不同的	無修正

	<p>抗藥性有關?</p>	<p>環境溫度，完成病毒增殖複製。反觀若比較存在於人類臨床檢體病毒及其經哺乳動物細胞培養後之分離株，則可發現病毒 quasispecies 主要位於 HA 表面蛋白，而非 PA 或 PB 等聚合酶。推測此觀察結果的原因為人類呼吸道細胞與用於病毒培養之哺乳動物細胞(MDCK 細胞，為狗腎臟上皮細胞)之病毒受體不同，致使病毒需藉由表面蛋白之突變，使其可結合至不同種類之受體，完成感染。</p> <p>(2) 根據文獻報導，新的抗病毒藥物 Baloxavir 抗藥性係由病毒 PA 蛋白之 I38T 突變造成，因本年以各種不同層面所觀察之流感病毒 quasispecies 中，並未帶有此 PA 蛋白之 I38T 突變，故本年以 NGS 分析所得各類病毒 quasispecies，與 Baloxavir 抗藥性無關。</p>	
--	---------------	---	--

備註:請將此表單附在期末報告後方，如有修正期末報告內容請註明頁碼，並務必至 GRB 系統完成資料抽換。