

計畫編號：

DOH101-DC-2015

DOH102-DC-2213

MOHW103-CDC-C-315-000101

行政院衛生署疾病管制局 101-103 年度科技研究發展計畫

台灣流感病毒監測：抗原性、抗藥性與基因變化分析

## 總結研究報告

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、黃元品、鄭傑宇、吳馥婷

執行期間：101 年 1 月 1 日至 103 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 7 頁

材料與方法

第 9 頁

結果

第 11 頁

討論

第 18 頁

計畫重要研究成果及具體建議

第 23 頁

參考文獻

第 25 頁

圖、表

第 28 頁

### 三、摘要

**關鍵詞：**流感病毒；抗原性；抗藥性；基因序列

流感病毒每年在很多國家造成流行，以及偶發的全球大流行。流感疫苗與抗病毒藥物是重要的流感防治方法，疫苗株與流行株不符合與抗藥性病毒的產生，將使得防治效果降低。為了監測台灣流感病毒的抗原性、抗藥性與基因變化，我們使用雪貂抗血清，進行病毒性抗原分析，並進行病毒基因定序，監測抗藥性與基因序列變化。台灣 2012 年 1-2 月流行病毒主要以 B 型 Yamagata lineage 病毒為主，3 月起為 A 型流感 H3N2 病毒，A 型(H1N1)pdm09 零星分布。5-10 月，流感 B 型病毒流行程度低，只分離 4 株病毒，但為 Victoria lineage，與 2012-2013 年疫苗株不同 lineage。A 型(H1N1)pdm09 與 H3N2 病毒的抗原性分別與 2012-2013 北半球疫苗株 A/California/7/2009 (H1N1)、A/Victoria/361/2011(H3N2)抗原性相近相似。台灣 2013 年流行病毒主要以 A 型流感 H1N1pdm09 與 H3N2 病毒為主，B 型流感病毒只零星發現。A 型 H1N1pdm09 與 H3N2 病毒的抗原性分別與 2013-2014 北半球疫苗株 A/California/7/2009 (H1N1)、A/Victoria/361/2011 (H3N2)抗原性相近相似。在台灣 2014 年流行病毒為 A 型流感 H1N1pdm09、H3N2 病毒與 B 型流感病毒共同流行。A 型 H1N1pdm09 病毒的抗原性與 2014-2015 北半球疫苗株 A/California/7/2009 (H1N1) 相似；H3N2 與 A/Texas/50/2012 (H3N2)抗原性相近，但有些疫苗低反應株(約占 9.4%)出現；B 型流感 Victoria 與 Yamagata lineages 同時流行，Victoria lineage 約占 64%，兩 lineages 病毒皆出現抗原偏離疫苗株之病毒。至於基因與蛋白質序列的變化，2014 年流行的 A 型 H1N1pdm09 病毒為源自 2010-2011 年 clade 11 繼續演化的 clade 11.2，HA 胺基酸主要位點變化為 K180Q 與 A273T。而 2014 年流行的 A 型 H3N2 病毒源自 2011 年流行 clade

2011-A 病毒，HA 胺基酸主要位點變化為 Y94H 與 N145S。H3N2 疫苗低反應株的 HA 胺基酸主要位點變化 T128A, R142G, A138S, F159S, N225D。B 型流感 Yamagata lineage 明顯分成兩群(TW-01, B/Massachusetts/02/2012 like；TW-02 B/Wisconsin/1/2010 like)，2013-2014 年 Yamagata lineage 分離病毒株約有 57% 抗原性偏離疫苗株 B/Massachusetts/02/2012。2014 年分離病毒無發現抗藥性病毒。2014 年台灣流行之流感病毒，A 型流感 H3N2 與 B 型流感病毒出現抗原變異株，持續監測台灣流感病毒的變化，掌握流感病毒的特性，將有助於調整流感防疫策略施打疫苗與抗病毒藥物等依據。

## **Abstract**

**Keywords:** influenza virus; antigenicity; antiviral resistance; gene sequences

Influenza viruses cause annual epidemics in many countries and occasional worldwide pandemics. Influenza vaccine and antiviral drugs are two useful measures for preventing influenza and reducing the impact of epidemics. Mismatch of vaccines and emergence of resistant viruses will reduce the efficacy of measures. To order to monitor the antigenicity, antiviral resistance and genetic changes, we analyzed the viral antigenicity using ferret antisera and performed the gene sequences for determining antiviral resistance and genetic changes. From January to February of 2012, influenza B Yamagata lineage virus was predominant in Taiwan. After March, influenza A H3N2 virus became predominant. The influenza A(H1N1)pdm09 was only detected sporadically in Taiwan. From May to October 2012, only 4 influenza B viruses were isolated and they all belonged to Victoria lineage, which was unmated with Yamagata lineage B/Wisconsin/1/2010, recommended influenza vaccines for use in the 2012-2013 northern hemisphere. The influenza A(H1N1)pdm09 and H3N2 viruses circulating in 2012 are antigenically similar to recommended influenza

vaccines for use in the 2012-2013 northern hemisphere influenza season, A/California/7/2009 (H1N1), A/Victoria/361/2011, respectively. In 2013, influenza A (H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses co-circulated and influenza B viruses were isolated sporadically. The influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses circulating in 2013 are antigenically similar to influenza vaccines recommended for use in the 2013-2014 northern hemisphere influenza season, A/California/7/2009 (H1N1), A/Texas/50/2012, respectively. Regarding the genetic changes, A(H1N1)pdm09 viruses that reemerged in 2012 to 2013 were classified as three novel variants, clades 11.1, 12.1, and 12.2, which branched from the previously predominant clade 11 and 12 viruses that circulated in 2010 to 2011. Most of the A(H3N2) viruses found in 2012 to 2013 clustered into one large TW2011-13 clade, which first appeared in Taiwan in 2011. In 2014, influenza A (H1N1)pdm09, A(H3N2) and two lineages of influenza B viruses co-circulated. The influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in 2014 were antigenically similar to influenza vaccines recommended for use in the 2014-2015 northern hemisphere influenza season, A/California/7/2009 (H1N1). However, 9.4% of H3N2 viruses analysed showed low reactivity with antisera raised against vaccine strain, A/Texas/50/2012. Two lineages, Victoria and Yamagata, were detected and 64% of them belonged to Victoria lineage. Low reactors against vaccine strains were detected in two lineages. Regarding the genetic changes of these viruses, A(H1N1)pdm09 viruses, belonging clade 11.2, originated from previous clade 11 in 2010-2011 with the substitutions, K180Q and A273T of in HA proteins. Most of the A(H3N2) viruses in 2014 originated from 2011-A clade circulating in Taiwan in 2011. These viruses carried Y94H and N145S substitutions in HA proteins. Some viruses harboring substitutions of T128A, R142G, A138S, F159S and N225D in HA proteins showed poor reactivity with antisera raised against vaccine strain in HI assay. The circulating Yamagata lineage viruses of influenza B have divided into two clades, TW-01

and TW-02, representative strains as B/Massachusetts/02/2012 and B/Wisconsin/1/2010, respectively. Approximately 57% of Yamagata lineage viruses isolated in Taiwan in 2013-2014 showed low reactivity with antisera raised against vaccine strain B/Massachusetts/02/2012. All viruses detected in 2014 retained susceptibility to oseltamivir. Antigenic drift variants of the influenza A (H3N2) and influenza B viruses have emerged in Taiwan in 2014. Continuous monitoring of changes in the influenza viruses and understanding viral characteristics will be a great benefit to optimize influenza control strategies of antiviral and vaccine.

#### 四、本文

##### (1)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*)，病毒基因體為 8 個負單股 RNA，病毒產生 10-11 個蛋白質。流感病毒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) 為主要的病毒抗原，引發中和抗體。HA 與細胞表面的受體唾液酸結合，使病毒進入細胞內，HA 與不同種類受體唾液酸結合，影響病毒感染細胞特異性。NA 則具有切斷醣蛋白及細胞受器上的唾液酸的酵素活性，與病毒自細胞釋出的作用有關[20]。目前為止，A 型流感病毒 HA 的次亞型有 18 種 (H1 至 H17) 與 NA 有 11 種 (N1 至 N11) [23, 24]，禽類可以感染 H1-H16 以及 N1-N9 所組合的亞型，H17-18 與 N10 感染蝙蝠，人則較易受到 H1, H2 及 H3 亞型的感染。H5, H6, H7, H9 及 H10 亞型也有零星人類案例，但仍無法有效人與人之間傳播[1, 21, 26]。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[6, 20, 21]。21 世紀第一個流感大流行是由 A 型流感 H1N1 病毒引起，(現在稱為 A 型 H1N1pdm09 流感病毒，此病毒為一豬源性病毒，2009 年 3 月在墨西哥和美國引起人類感染，導致全球性大流行。至目前為止，該病毒已經過 4 個流感季節 (2009-2013 年)，大多數國家都經歷了多次的流行[2, 9, 17, 32]。2009 年 4 月和 7 月之間的早期階段，病毒已開始演變至少 7 個 clades (clade 1-7) [19]。在台灣，clade 7 境外移入後，於 2009 年 8 月首次成為佔主導地位。後續新的變種 clade 8, 9, 10, 11 繼續出現[32]，顯示的 H1N1pdm09 病毒已經以人類季節性流感病毒類似的方式演變。

流感病毒具有高突變率的特性，可經由突變及基因重配(reassortment)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，稱為抗原漂移 (antigenic drift)，至於抗原轉移 (antigenic 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[6, 20, 21]。流感病毒 H1 亞型的 HA 分子，有 4 個不同的抗原位(antigenic site)：Sa, Sb, Ca, Cb [5, 14]；H3 亞型的 HA 分子，有 5 個不同的抗原位：A, B, C, D, E [11, 18]，位於這些抗原位的胺基酸的改變，會造成抗原飄移(antigenic drift)病毒株的出現，這些變異的病毒株，為造成每年病毒一再流行的原因。

流感疫苗與抗病毒藥物為流感防治最主要的方法，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[4, 7, 8]。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，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 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。再者，抗藥性病毒的產生，使得治療流感的藥物失效。從 2005-2006 流感季後，大部分流行之 A 型流感 H3N2 病毒 M2 蛋白具有 S31N 突變，此突變造成病毒對 adamantane 類藥物具抗藥性 [3, 10]。2007-2008 流感季，丹麥與歐洲其他國家發現 A 型流感 H1N1 病毒 NA 蛋白具有 H275Y 突變，此突變造成病毒對 oseltamivir 藥物具抗藥



性，此抗藥性病毒的流行並非在抗藥篩選壓力下產生[12, 13, 16]。在 2008-2009 流感季大部分 A 型流感 H1N1 病毒皆具抗藥性。在台灣，抗藥性病毒株於 2008 年 9 月的 14.3% 迅速擴增至同年 12 月的 100% [33]。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，以辨認病毒之抗原性、抗藥性以及基因序列的變化。目前對於流感病毒分離株之抗原性分析，為進行抑制凝集反應法(HI)檢驗，須利用雪貂之抗病毒血清，雪貂對人類流感病毒的高感受度和臨床病徵與人類類似 [15]，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。目前雪貂抗血清來源皆由日本 NIID 或美國疾病管制局(CDC)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。2009 H1N1 病毒來源為豬流感經重配(reassortment)後跨物種造成，故全基因分析，可監測病毒其他基因的變化，對提早得知新病毒的流行。為加強病毒的全面監測，本計畫擬(1)持續利用雪貂之抗病毒血清分析台灣流感病毒的抗原性；(2)利用基因定序與酵素檢測分析流感病毒之抗藥性；(3)分析台灣流感病毒 HA 基因序列變化，挑選主要流行株與/或低反應株(low reactor)，提供適當病毒株感染雪貂；(4)分析台灣流感病毒 HA 基因序列變化，挑選不同 clades 病毒，進行 8 段基因定序，了解其他基因之變化。本計畫的進行，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。流感病毒研究，具時效性，本計畫也期能及早提供病毒監測資料，調整疫苗施打與抗病毒藥物之防治策略，最佳化防治防治措施，降低流感疾病的衝擊。

## (2)材料與方法

### 1. 流感病毒 HA 基因序列的分析流程：

為了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：a. 將流感病毒氨基酸基因序列，使用 Clustal W 軟體作 alignment. b. 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。c. 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。d. 是用 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。f. 將流感病毒 HA 基因的序列以 MEGA 5 [22] 軟體分析其親緣關係。

2. 新分離病毒株經抗原與 HA 序列分析，挑選主要流行株與抗原偏離株，大量製備抗原並感染雪貂，製備抗血清。再以抗血清分析後續分離之病毒株，比較其抗原差異。因流感病毒變化快速，需持續監測病毒之演化。

### 3. 挑選流感病毒株與培養：

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, TPMGD)，已收集 2003-2014 年台灣疾病管制局與病毒合約實驗室分離的流感病毒株，並已將流感病毒 HA1 基因定序。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，HA 序列相同歸為相同群，各群中數目最多者為主要分離株，挑選主要分離株大量培養，並感染雪貂，獲得抗病毒血清。流感病毒接種於 MDCK 細胞。MDCK 細胞 (Madin-Darby canine kidney cell) 以 DMEM 培養基(內含 10%胎牛血清)於 34°C，5%CO<sub>2</sub> 下繼代培養。

### 4. 病毒與抗血清價位測定

#### 血球凝集試驗

- a. 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 50  $\mu\text{l}$  的 PBS 溶液，於第一列加入 100  $\mu\text{l}$  的病毒抗原原液，negative control 行則以 100  $\mu\text{l}$  PBS 取代抗原。
- b. 取第一列的抗原 50  $\mu\text{l}$  加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 50  $\mu\text{l}$  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。
- c. 每孔分別加入 50  $\mu\text{l}$  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(HI)

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  $\mu\text{l}$  稀釋液中含有 8 HA unit 的抗原。

- a. 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 25  $\mu\text{l}$  的 PBS 溶液。於第一列加入 50  $\mu\text{l}$  的各標準病毒株的標準抗血清，negative control 行則以 25  $\mu\text{l}$  PBS 取代抗血清。取第一列的抗體 25  $\mu\text{l}$  加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 25  $\mu\text{l}$  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。
- b. 分別加入 25  $\mu\text{l}$  (8 HA unit/50  $\mu\text{l}$ ) 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。
- c. 加入以 PBS 稀釋的 0.75% 的天竺鼠紅血球 50  $\mu\text{l}$  /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。

### (3)結果

台灣疾病管制局病毒合約實驗室監測資料顯示，2011年1-2月主要流行型為A (H1N1) pdm09；2011年3月~2012年2月為B型流感病毒；2012年

3月起為A型H3N2流感病毒(圖一)。2013年台灣疾病管制署病毒合約實驗室監測資料顯示，2013年1-2月主要流行型為H3N2；2013年4-7月H1N1pdm09與H3N2同時流行；2013年8-10月流感成低度流行，主要病毒為H3N2(圖一)。2014年1-2月主要流行型為H3N2；2014年3-8月B型流感病毒流行，9月後流感病毒低度流行，主要分離病毒為B型流感病毒與H1N1pdm09(圖一)。經過2011-2012年B型流感病毒高度流行後，2013年B型流感病毒只有零星分離。從2004-2012年台灣經歷5次B型流感流行(圖二)，2004-2005年流感季為Victoria與Yamagata兩個 lineage 同時流行，2006-2007年流感季主要由Victoria lineage 引起，2008年轉換為Yamata lineage 流行，2010年又轉換為Victoria lineage 流行，2011-2012年台灣發生大規模B型流感流行，一般B型流感病毒並不常造成如此巨大且長時間的流行。為了探討本波疫情是否與病毒出現變異有關，首先分析2004-2012年間於我國所收集B型流感病毒之HA基因序列，試圖了解該病毒在這段期間的演化情形。由病毒基因序列之流行趨勢圖的結果來看，B型病毒TW-01於引發2011-2012大流行之前，已分別於2011年3月及7月陸續取代原主流的TW-02以及Victoria lineage，表示此類病毒可能具有較強的競爭優勢(圖三)。2011-2012年流感大流行之B型流感病毒Yamagata lineage，抗原性與先前病毒相比並無明顯變化(表一)。TW-01基因型並非新演化族群，其已在2007-2009年，與其他兩型(TW-02與TW-03)共同流行(圖三、圖四)；這代表TW-01病毒已在台灣存在超過5年之久。為了更深入探討病毒的演化史，本研究詳細分析我國以及全球近10年Yamagata lineage B型流感病毒之全基因體序列，並比較病毒基因體於我國各時期的組成情形。結果顯示，2011-2012年TW-01病毒可追溯到2004-2005年的TW04-II基因型病毒，在演化過程中，病毒並未發生明顯的基因重組，只有各基因片段的胺基酸突變；此外，本研究亦發現某些較為古

老的基因片段存在於TW-02病毒（圖四）。本研究說明，一次大規模的B型流感病毒流行，除了可歸因於病毒本身持續的突變或基因重組外，不同病毒間的相互影響及易感受宿主的數目與疫苗吻合情形亦為重要。此外，持續沉潛低度流行於人群中的病毒，可能成為一個增加病毒變異程度的基因庫，除了提供基因重組的來源外，其本身也可在適當的時機，一舉成為主流病毒，造成不可忽視的疫情。此部份資料以發表於*PLoS One* 2012; 7:e47179。

此外有關2004-2012年台灣B型流感病毒Victoria lineage之流行，2004-2007年兩次Victoria lineage 流行屬於B/Malaysia/2506/2004(2006-2007, 2007-2008 之疫苗株)類似病毒(Mal/2506-like)，2009年後流行之Victoria lineage 轉變為B/Brisbane/60/2008(2009-2010, 2010-2011, 2011-2012之疫苗株)類似病毒(Bri/60-like)（圖五）。分析各時期病毒之全基因體序列，發現2006年有一些Victoria lineage 病毒之NP, M, NS 基因與TW04-II Yamagata lineage 相近，可能經reassortment 產生，此類病毒並沒有成為主流。2009年以後流行的Bri/60-like 病毒之NP基因與TW04-II Yamagata lineage 相近（圖六），後來分離的病毒發現可能經 Bri/60-like 與Mal/2506-like reassortment 產生（圖七）。Bri/60-like病毒雖從2009年起存在台灣，但未引起大規模流行，且有不斷與Yamagata lineage病毒產生reassortment，仍需注意後續變化。B型流感病毒在2011-2012年台灣造成一波流行後，2012年4月至2014年2月皆非主要流行株，分離病毒數目少(圖一、二)。2014年3月後B型流感病毒成為主流病毒。2014年分析200株B型流感病毒中Victoria lineage 113株(56.5%)，Yamagata lineage 87株(43.5%)，4-7月Victoria lineage 所佔比例超過50%，8月後Yamagata lineage比例超過Victoria lineage（圖二）。Yamagata lineage B型流感自2008後可分成3個clade (TW-01, TW-02,

TW-03)，代表的疫苗株分別為TW-01：B/Massachusetts/02/2012, WHO 2013-2014, 2014-2015 建議之北半球疫苗株；TW-02：B/Wisconsin/1/2010, WHO 2012-2013 建議之北半球疫苗株，B/Phuket/3073/2013, WHO, 2015 建議之南半球疫苗株；TW-03: B/Florida/4/2006 WHO 2008-2009 建議之北半球疫苗株。台灣各clade流行交替情形如圖三。台灣2011-2012年大規模B型流感，為TW-01 clade病毒造成。2014年分離的Yamatage lineage TW-02約占80%(65/81) (圖三)。2014年Yamatage lineage TW-02病毒HA增加N131K, L187Q, K313E, E327K變化(圖八)。分析2014年TW-01與TW-02病毒之全基因體序列，發現兩者源自先前之病毒，尚無新的reassortment產生(圖四)。2014年分離的Victoria lineage B型流感與疫苗株B/Brisbane/60/2008相似，屬於同一大clade，無類似Yamatage lineage分成多個clades之情形(圖九)。

台灣2011-2012年流行之A型H3N2流感病毒與2010-2011年A-C三個clades不同，2011-2012年之新分離的病毒仍屬於2011-A clades(圖十)，2010年分離數目以clade 2010-A 最多，2010年11月-2011年3月分離數目則以clade 2010-C 為多，2011年7月後，clade 2011-A成為H3N2主要的分離株(圖九)。clade 2011-A 其HA基因序列已有多處變異(圖十、圖十一)，且2012年N145S變異逐漸出現，胺基酸145位於抗原site A，而先前的變異主要在site B或site C。A型H3N2流感病毒自2011年後，病毒的變化較小，與疫苗株A/Victoria/361/2011 仍同屬一大的clade (2011-A)。HA 基因序列構建的親源樹狀圖與胺基酸差異如圖十一。HA胺基酸的變化，主要在Q33R、T128A、R142A、N145S、N278K(圖十一)，其中位點Q33R與N278先產生後K145S於2013年轉變固定，此N145S與R142A位於抗原位A，T128A位於抗原位B，N278K位於抗原位C，可能導致病毒抗原飄移(drift)。利用雪貂之抗血清，分析這些病毒的抗原性，發現A/Taiwan/80158/2013(具有Q33R、T128A、

R142A、N145S、N278K突變)病毒HI價位降低。2013年主要流行病毒為2013-A(具Y94H突變)。2014年1-5月主要流行H3N2病毒為2013-A，6月主要流行株為2014-A與2014-B，2014-A源自2012-B，HA增加A138S, F159S N225D突變。2014-B為2012-A的分支具HA T144S, F159Y, K160T, N225D改變。利用雪貂之抗血清，分析2014-A與2014-B的抗原性，其2014-A與疫苗株A/Texas/50/2012之抗原性已不同(HI titer相差大於8倍)。各變異株之親源樹狀圖與交替流行如圖十、圖十一。

台灣A型H1N1pdm09自從2009年5月首例後，病毒不斷演變，從2009年第一波clade 7病毒、第二波clade 8病毒、2010-2011年第三波clade 9,10, 11, 12病毒，到2012-2013年第四波時，流行的病毒主要源自clade 11 與clade 12 的clade 11.1, 12.1, 12.2 三個變異株，各變異株交替流行如圖十二，2013年1-3月三種變異株同時流行，四月後clade 11.1成為主要病毒。HA 基因與M基因序列構築的親源樹狀圖與胺基酸差異如圖十三。若比較2009年早期之病毒，HA基因已有5個位於或靠近抗原相關位點之改變，包含H155Q(Ca)、S160G(near Ca)、K180I (Sa)、S202T (Sb)、A214T (near Sb)。利用雪貂之抗血清，分析不同clade間的抗原性，發現其抗原性仍相似。

2011-2014年台灣流感病毒抗原與抗藥性分析如表二。A型(H1N1)pdm09的抗原性與2011-2015年疫苗株A/California/7/2009 (H1N1) 相似，有1株(1/241, 0.4%)呈低反應株。2011-2012年A型H3N2與當年疫苗株A/Perth/16/2009比較有19株(19/109, 17%)呈低反應株，2012-2013年A型H3N2與當年疫苗株A/Victoria/361/2011比較有5株(5/150, 3.3%)呈低反應株，2013-2014年A型H3N2與當年疫苗株A/Victoria/361/2011比較有10株(10/106, 9.4%)呈低反應株。2014年第41 -50週 A型H3N2與當年疫苗株A/Texas/50/2012比較有1株(1/4, 25%)呈低反應株(表二)。2011-2014年B型流

感Victoria lineage流行低，病毒分離株與疫苗株B/Brisbane/60/2008之抗原性必較，2013-2014年A型H3N2與疫苗株B/Brisbane/60/2008比較有17株(17/92, 18.7%)呈低反應株(表二)。2011-2014年B型流感Yamata lineage，2011-2012年Yamata lineage流行幅度大且為主要病毒株，病毒分離株與疫苗株B/Florida/4/2006 (Y) 比較抗原相近，但2011-2012年疫苗株為Victoria lineage B/Brisbane/60/2008。2012-2013年B型Yamata lineage流行低，病毒分離株與2012-2013年疫苗株B/Wisconsin/1/2010(Y) 比較抗原相近。2013-2014年B型Yamata lineage 病毒與2013-2014年疫苗株B/Massachusetts/2/2012 比較有29株(29/51, 57%)呈低反應株(表二)。

2011-2014年共檢測181株A型(H1N1)pdm09、562株A型H3N2、281株B型流感病毒，無發現抗藥性病毒株(表二)。

2009年出現的新型流感H1N1病毒 (H1N1pdm09)快速的引起全球大流行，並取代原有的季節性H1N1病毒而成為主流。早期的H1N1pdm09病毒對克流感呈現感受性(susceptible)，惟其是否會與季節性流感H1N1病毒類似，隨著演化而變成oseltamivir resistant。藉由台灣流感監測網所收集的臨床檢體與病毒株，探討克流感抗藥性H1N1pdm09病毒在我國所佔的比率。自2009年5月至2011年4月間，共檢測1335件H1N1pdm09病毒陽性的樣本(包括臨床檢體及病毒株)，以病毒NA基因是否具有H275Y的胺基酸突變做為其克流感抗藥性的依據。在其中，共發現15株病毒具H275Y突變，比率約為1.12%，而抗藥性病毒的每月陽性率，介於0~2.88%之間。經由更進一步的病毒演化分析顯示，這15株克流感抗藥性病毒屬不同的演化族群，代表其基因體已開始產生變異。此外，病毒NA酵素活性的分析結果顯示，克流感抗藥性病毒的NA/HA活性比率較野生株病毒為低，且2010-2011的抗藥性病毒更較2009-2010為低。這表示H275Y突變對於病毒適應性(fitness)的衝擊仍持續存



在，進而影響此類抗藥性病毒於全世界的傳播能力。儘管如此，H1N1pdm09病毒的持續變異仍可能使其與當年的季節性流感病毒類似，克服適應性的困難而演化出可大規模傳播的機制。此部份之結果發表於*J Med Virol*, 2013; 85:379-387。

A型流感病毒M基因親源樹狀圖分析，發現clade 11.1，12.1和12.2的H1N1pdm09病毒的M基因位於與clade 1-10病毒不同的分支(圖十四A);H3N2病毒的M基因與疫苗株A/Victoria/361/2011的位於同一分支，與2009年之前疫苗株不同(圖十四B)。這些結果顯示2013年H1N1pdm09與2011年H3N2出現了新的M基因突變。2010-2011年H1N1pdm09 clade 11和12病毒的M基因產生G238A突變，而2012-2013年出現clade 11.1病毒及所有clade 12.1病毒出現G225A和T228C突變出現。關於H3N2病毒的M基因，clade TW2011-13 出現C163T突變。這些M基因的核苷酸突變位點與常用的兩個real-time RT-PCR (AW1和AW2)之引子和探針的對應位置如圖十五中所示。C154T，T228C，G225A和G238A突變的H1N1pdm09病毒AW1和AW2測定的正向和反向引子上，可能導致不匹配，H3N2病毒C153T，C163T，G189T突變，可能會與AW1和AW2正向引子與AW1的探針不匹配。故M基因核苷酸突變包括H1N1pdm09病毒之C154T、G225A、T228C、G238A與H3N2病毒之C153T、C163T、G189T，將使其偵測靈敏度大幅下降。為了克服對此類病毒的檢測瓶頸，我們建立了一套新的real-time RT-PCR檢測法(At)，在引子與探針上加入共通性的核苷酸 (degenerate nucleotide bases)，使它們可與病毒模板cDNA完全互補。經由一系列的測試結果顯示，這套改良過後的M基因檢測法對於這些2013年主流H1N1以及H3N2病毒株的檢測能力已大幅提升，靈敏度甚至比WHO所建議之標準方法為高(表三)。此部份之結果發表於*J Clin Microbiol* 2014; 52:76-82。

#### (4) 討論

流感疫苗與抗病毒藥物為流感防治最主要的方法，然而因流感病毒變異快，易導致疫苗株與流行株不符合與抗藥性病毒的產生，使得防治效果降低。為了使疫苗株與流行株相符，需依監測資料每年進行疫苗株調整，故流感病毒抗原性與抗藥性的監測對流感的防治非常重要。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。本計畫利用雪貂抗病毒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，製備雪貂抗病毒血清。雪貂免疫部份，2012年起與預防醫學研究所合作，由本計畫挑選適當的病毒株，預防醫學研究所進行雪貂免疫。台灣2014年A型H1N1pdm09的抗原性與疫苗株A/California/7/2009(H1N1)相似，但A型H1N1pdm09病毒皆已累積數個抗原位之胺基酸的改變，如H1N1pdm09病毒H155Q(Ca)、S160G(near Ca)、K180I(Sa)、S202T(Sb)、A214T(near Sb)，若再增加胺基酸的突變，可能會有抗原變異株的出現。2014年A型H3N2抗原性與2014-2015年疫苗株A/Texas/50/2012抗原性已出現差異。台灣約2-3年會於4-8月出現與疫苗株不吻合的H3N2病毒，造成下個流感季，流行株與疫苗株不吻合，因疫苗製程的時間緊迫，WHO須於每年2月前決定下一季北半球10月使用之疫苗株，WHO依據每年2月以前全球病毒監測資料，建議使用之疫苗株，而台灣抗原變異株常出現於4-8月，導致台灣H3N2流行株與疫苗株經常不吻合，2003-2014年11個流感季有6次不吻合(54%)，2014-2015流行之H3N2也與疫苗株不同，如何克服與改善情況是一大難題。

2011-2012主要流行的Yamagata lineage與與當季使用的疫苗Victoria

lineage B/Brisbane/60/2008 不吻合，2011-2012 年美國、歐洲主要流行的病毒為 H3N2，中國大陸與一些地區雖有 B 型流感病毒流行但為 Victoria lineage(與疫苗相符)[28]，但台灣卻大規模流行的 Yamagata lineage(與疫苗不相符)，探究此次流行病毒的演化與造成獨特區域流行的原因，發現 2011-2012 年流行的病毒與在台灣存在至少 5 年(2007-2011)，基因片段無 reassortment 與抗原性亦無改變，病毒流行的時機和規模與很多因素有關，包括病毒變異株的出現、不同病毒間的交互影響及易感受宿主的數目與疫苗吻合情形等。比較 2011-2012 年與 2008 年 TW-01 B 型流感病毒之病毒基因序列與抗原性，基因片段無 reassortment，在 PB1 (T457A)，PA (S530L)，HA (T196A)，NA (T107I, S296R)，M2(S59N) 和 NS2(V87I)基因有 1-2 個胺基酸改變，兩者抗原性相似，故病毒變異與造成 2011-2012 大規模 B 型流感流行的關連性較少，而其他因素不同病毒間(不同亞型、次亞型與不同 clade)的交互影響、易感受宿主的數目與疫苗吻合情形，可能扮演較重要角色。故一病毒傳一地區後，會造成大規模流行的時機與很多因素有關，包括病毒的基因的改變，不同病毒間的交互影響及易感受宿主的數目與疫苗吻合情形等。2011-2012 年 B 型流感病毒 Yamagata lineage TW-01，就是等待了 5 年才造成大規模流行。另一 B 型流感病毒 Victoria lineage Bri/60-like 病毒，2009 年開始在台灣出現，雖然 2010、2011 年皆出現，但流行幅度不大。2012 年 4 月至 2014 年 2 月 B 型流感流行程度較低，可能原因為經歷 2011-2012 年 B 型流感病毒大規模流行後，大多數人可能已有抗體且尚無新 drift 病毒出現。2014 年 B 型流感在非流行季時，成為主要流行亞型，但幅度相較低，2014-2015 年流感病毒流行，須注意 B 型流感病毒 Yamagata TW-02 與 Victoria lineage 病毒，Bri/60-like 病毒 2009 年開始在台灣出現，雖然 2010、2011 年皆出現，但流行幅度不大，2014-2015 年疫苗株成分

B/Massachusetts/2/2012 為 TW-01 clades Yamagata lineage，此 Bri/60-like 病毒後續可能會如同 2011-2012 般模式演變，造成另一次疫苗不吻合的大規模 [31]。

2013-2014 年在台灣雖無監測到對 oseltamivir 具抗藥性病毒，但從 2009-2012 年共發現 15 株病毒具 H275Y 突變，比率約為 1.12%(15/1335)，而抗藥性病毒的每月陽性率，介於 0~2.88% 之間。經由病毒全基因分析，發現，這 15 株克流感抗藥性病毒分布在不同的 clades，顯示這些抗藥性病毒乃經不同 clades 敏感病毒株經藥物篩選後，分別產生。H1N1pdm09 病毒的持續變異仍可能使其與當年的季節性流感病毒類似，克服適應性的困難而演化出可大規模傳播的機制[30]。

分子檢測(如 real-time RT-PCR)方法具有高靈敏度和特異性，適合需快速與準確地分亞型之流感病毒檢驗的要求，故已被推薦使用檢測 A 型 H1N1pdm09 流感和高致病性禽流感 (H5N1)，俾利病毒流感之監測，疫情管理，診斷和治療 [27, 29]。然而流感病毒變化快，引子與探針的標的的基因若發生突變，可能影響 real-time RT-PCR 檢測流感病毒的準確性，故必須不斷監測與優化引子與探針序列，以保持 real-time RT-PCR 的敏感度。流感病毒的 M 基因相較於 HA 與 NA，具較高的保守度，故成為分子檢驗 real-time RT-PCR 引子與探針的標的，分析 A 型流感病毒 M 基因的變異度，發現核苷酸 137-251 的保守性較高，常用與 WHO 建議使用的 real-time RT-PCR 即以此區域為標的[25, 27, 29]。當分析以前分離流感病毒的 M 基因序列，2003 年之前流行人類季節性 A 型 H1N1 和 H3N2 流感病毒，與 real-time RT-PCR AW1 的引子和探針序列完全相同，但標的基因序列開始改變，2009-2012 年 NCBI 資料庫中，人類 H1N1pdm09 之流感病毒 M 基因 5353 條序列，G238A 突變自 2012 年 8 月開始增加，G225A 與 T228C 在 2012 年前並未發現，此

兩位點為 2013 年後新出現。1968-2012 年 NCBI 資料庫中，分離自人類 H3N2 之流感病毒 M 基因 4543 條序列，C153T 自 2001 年增加，2005 年達到 100%；G189T 自 2011 年開始增加並固定，C163T 在 2011 年開始發現。故 A 型流感病毒 M 基因核苷酸累積的突變包括 H1N1pdm09 病毒之 C154T、G225A、T228C、G238A 與 H3N2 病毒之 C153T、C163T、G189T，將影響原有 real-time RT-PCR 檢測靈敏度。當發現這些基因突變，我們建立了一套新的 real-time RT-PCR 檢測法(At)，在引子與探針上加入共通性的核苷酸 (degenerate nucleotide bases)，使檢測敏感度大幅提升。

#### (5)結論與建議

1. 2012-2014年流行的A型H1N1pdm09病毒，主要源自2010-2011年clade 11，持續演變成clade 11.2,變異株。比較2009年早期之病毒，HA基因已有多個位於或靠近抗原相關位點之改變，包含K180I (Sa)、S202T (Sb)、A214T (near Sb)。利用雪貂之抗血清，分析clade 11.2 的抗原性與2014-2015年疫苗株A/California/7/2009 (H1N1)相似。但若再累積新的胺基酸改變，可能會出現抗原變異株，須持續密切監測病毒變化。
2. 2012-2014年台灣流感A型H3N2病毒，與疫苗株A/Victoria/361/2011相似。2014年5月起A型H3N2流感病毒出現2群變異株，第一群2014-A病毒HA具T128A(site B)、R142A(site A)、A138S(site A), N145S(site A)、F159S(site B)、N278K (site C)、N225D(R)突變，造成抗原改變。第二群2014-B 病毒HA具T144S(site A), N145S(site A) F159Y(site B), K160T (site B), N225D (site R)突變，也影響抗原性，須因應疫苗不吻合之衝擊。
3. 2012-2014年台灣B型流感病毒，2012年Yamagata lineage 大規模流行，2013年B型流感病毒流行低，2014年Victoria 與 2個clade Yamagata 同時出現。B型流感病毒Victoria lineage Bri/60-like病毒，2009年開始在台灣

出現，雖然2010、2011年皆出現，但流行幅度低，2013、2014年5-6月間Victoria lineage Bri/60-like分離比例上超越Yamagata lineage，2014-2015年疫苗株成分B/Massachusetts/2/2012為Yamagata lineage，此Bri/60-like病毒不吻合，後續可能會如同Yamagata lineage般模式演變，造成另一次疫苗不吻合的大規模。

- 4.分析2014年B型流感病毒全基因序列，結果顯示2014年TW-01與TW-02兩者分別源自先前之病毒，尚無新的reassortment產生，兩者的PB1與PA基因片段來源不同。B型流感病毒，常有一些變異株低度流行於人群中，為一個增加病毒變異程度的基因庫，提供基因重組的來源外，其本身也可在適當的時機，一舉成為主流病毒，造成嚴重的疫情。
5. 2012-2013年在台灣陸續發現新的H1N1以及H3N2流感病毒變異株，當它們在實驗室以目前被WHO所建議之即時反轉錄聚合酶鏈鎖反應(real-time RT-PCR)檢測時，常出現M基因檢測陰性但HA基因檢測陽性的現象，使檢驗結果無法順利研判；對於某些僅利用M基因檢測法作為常規檢驗的實驗室，則容易造成偽陰性的結果產生。為找尋導致此現象的原因，本研究分析這些H1N1以及H3N2新興變異株的M基因片段，發現某些核苷酸突變恰好存在於上述real-time RT-PCR之引子或探針的模板結合位點。這些核苷酸突變包括H1N1病毒之G225A、T228C與G238A；以及H3N2病毒之C163T等。這些新出現的核苷酸突變加上原本已經存在於H1N1病毒之C154T和存在於H3N2病毒之C153T以及G189T，使其偵測靈敏度大幅下降。為了克服對此類病毒的檢測瓶頸，本研究建立了一套新的real-time RT-PCR檢測法，在引子與探針上加入共通性的核苷酸(degenerate nucleotide bases)，使它們可與病毒模板cDNA完全互補。經由一系列的測試結果顯示，這套改良過後的M基因檢測法對於這些2013

年主流H1N1以及H3N2病毒株的檢測能力已大幅提升，靈敏度甚至比WHO所建議之標準方法為高。本研究除提供臨床實驗室一個有效的流感病毒檢測法外，亦突顯同時檢測多個基因區域之real-time RT-PCR方法對臨床上檢驗流感病毒的重要。

#### (6) 計畫重要研究成果及具體建議

1. 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，即時病毒資料有助於調整防疫策略疫苗施打與抗病毒藥物之應用。
2. 2012年分析25株B型流感病毒全基因序列，發現引起2011-2012年台灣大規模B型流感流行之病毒，已存在台灣5年，基因片段並無發生reassortment且抗原一無改變，造成此大規模流行，可能與不同亞型與次亞型病毒間的交互影響、易感受宿主的數目與使用疫苗吻合情形有關。此外，也發現低度流行於人群中的病毒，可能成為一個增加病毒變異程度的基因庫，除了提供基因重組的來源外，其本身也可在適當的時機，一舉成為主流病毒，造成不可忽視的疫情。
3. 分析15株抗藥性A型流感H1N1pdm09全基因序列，發現這些抗藥性A型流感H1N1pdm09分別屬於不同的clade，H1N1pdm09病毒於台灣開始流行後，共發生三次規模較大的病毒變化，2009-2010年主要為clade 7與clade 8，2010-2011年為clade 9, 10, 11共同流行，代表H1N1pdm09已如同季節性流感，在人群中開始產生變異，H1N1pdm09病毒的持續變異仍可能使其與2008-2009的H1N1季節性流感病毒類似，克服適應性的困難而演化出可大規模傳播的機制。
4. 本研究建立了新的real-time RT-PCR檢測法，在引子與探針上加入共通性的核苷酸 (degenerate nucleotide bases)，使它們可與病毒模板cDNA完全互補。提高對2013年主流H1N1以及H3N2病毒株的檢測靈敏度。
5. 2013年台灣出現且分離首例人類H6N1與H7N9禽流感病毒，全基因定序完成，H6N1病毒與台灣禽場之H6N1相似度最高，8片段基因來自

不同 clade H6N1 病毒。自大陸移入之 H7N9 病毒，與大陸爆發分離之病毒相似，基因可能來自三種禽流感 reassort 而成(H9N2, H7N3, H7N9)，基因皆來自禽類。除了人類季節性流感病毒例行監測外，對人類與禽類之禽流感亦應加強監測。

6. 2014 年台灣 A 型流感 H3N2 與 B 型流感 Yamagata lineage 病毒出現新變異株與 2014-2015 使用之疫苗，抗原差異，若 2014-2015 年此類病毒變成主流流行株，恐造成疫苗效果降低。2014 年流行之病毒未發現抗藥性病毒，故若 2014-2015 流感季，流感疫情擴大，應提早應用抗病毒藥物之防治策略。

7. 2014 年 9 月 WHO 建議 2015 年南半球疫苗株 A 型流感 H3N2 更新為 A/Switzerland/9715293/2013，B 型流感 Yamagata 更新為 B/Phuket/3073/2013，此兩病毒與台灣目前流行病毒相近。

#### 8. 論文：

1. Yang J-R, Kuo C-Y, Huang H-Y, Wu F-T, Huang Y-L, Cheng C-Y, Su Y-T, Wu H-S, and Liu M-T: Characterization of Influenza A(H7N9) Viruses isolated from Human Cases Imported into Taiwan. *PloS ONE (resived)* 2014.
2. Marjuki H, Mishin VP, Chesnokov AP, Jones J, De La Cruz JA, Sleeman K, Tamura D, Nguyen HT, Wu HS, Chang FY, Liu MT, Fry AM, Cox NJ, Villanueva JM, Davis CT, and Gubareva LV: Characterization of Drug-Resistant Influenza A(H7N9) Variant Viruses Isolated from an Oseltamivir-Treated Patient in Taiwan. *J Infect Dis* 2014.(in press)
3. Wei SH, Yang JR, Wu HS, Chang MC, Lin JS, Lin CY, Liu YL, Lo YC, Yang CH, Chuang JH, Lin MC, Chung WC, Liao CH, Lee MS, Huang WT, Chen PJ, Liu MT, and Chang FY: Human infection with avian influenza A H6N1 virus: an epidemiological analysis. *Lancet Respir Med* 2013; 1:771-778.
4. Yang JR, Huang YP, Chang FY, Hsu LC, Huang HY, Pan YT, Lin YC, Wu HS, and Liu MT: Characterization of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses in Taiwan in 2009-2011. *J Med Virol* 2013; 85:379-387.
5. Yang JR, Huang YP, Chang FY, Hsu LC, Lin YC, Huang HY, Wu FT, Wu HS, and Liu MT: Phylogenetic and Evolutionary History of Influenza B Viruses, which Caused a Large Epidemic in 2011-2012, Taiwan. *PLoS One* 2012; 7:e47179.
6. 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.



(7) 參考文獻：請依台灣醫誌編排方式

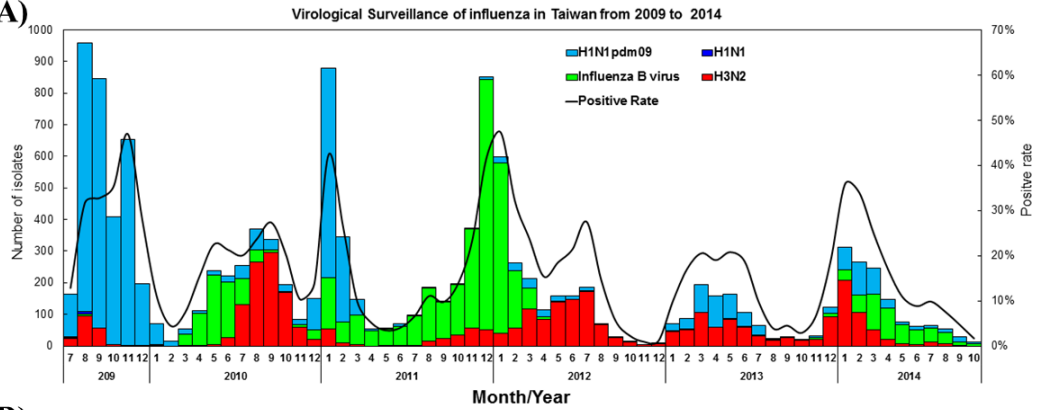
1. Arzey GG, Kirkland PD, Arzey KE, Frost M, Maywood P, Conaty S, Hurt AC, Deng YM, Iannello P, Barr I, Dwyer DE, Ratnamohan M, McPhie K, and Selleck P: Influenza virus A (H10N7) in chickens and poultry abattoir workers, Australia. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:814-816.
2. Bandaranayake D, Jacobs M, Baker M, Hunt D, Wood T, Bissielo A, Macfarlane M, Lopez L, Mackereth G, and Huang Q: The second wave of 2009 pandemic influenza A(H1N1) in New Zealand, January-October 2010. *Euro Surveill* 2011; 16:pii: 19788.
3. Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Oronoz G, Wallis TR, Davis XM, Povinelli L, Cox NJ, and Klimov AI: Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 2005; 366:1175-1181.
4. Carrat F, and Flahault A: Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* 2007; 25:6852-6862.
5. Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, and Gerhard W: The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 1982; 31:417-427.
6. CDC: Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58:467-470.
7. CDC: Update: influenza activity--United States, 2003-04 season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004; 53:284-287.
8. 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.
9. CDC: Update: influenza activity - United States, August 30, 2009-March 27, 2010, and composition of the 2010-11 influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010; 59:423-430.
10. Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, Shu Y, Gubareva LV, Cox NJ, and Klimov AI: Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis* 2007; 196:249-257.
11. Fitch WM, Leiter JM, Li XQ, and Palese P: Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:4270-4274.
12. Hauge SH, Dudman S, Borgen K, Lackenby A, and Hungnes O: Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:155-162.
13. Hurt AC, Ernest J, Deng YM, Iannello P, Besselaar TG, Birch C, Buchy P, Chittaganpitch M, Chiu SC, Dwyer D, Guigon A, Harrower B, Kei IP, Kok T, Lin C, McPhie K, Mohd A, Olveda R, Panayotou T, Rawlinson W, Scott L, Smith D, D'Souza H, Komadina N, Shaw R, Kelso A, and Barr IG: Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Res* 2009; 83:90-93.
14. Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H, and Takada A: Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One* 2010; 5:e8553.
15. Maher JA, and DeStefano J: The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab animal* 2004; 33:50-53.
16. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van-der-Werf S, Schweiger B, Opp M, Paget J, van-de-Kasstele J, Hay A, and Zambon M: Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:552-560.
17. Mytton OT, Rutter PD, Mak M, Stanton EA, Sachedina N, and Donaldson LJ:

- Mortality due to pandemic (H1N1) 2009 influenza in England: a comparison of the first and second waves. *Epidemiol Infect* 2012; 140:1533-1541.
18. Nakajima K, Nobusawa E, Nagy A, and Nakajima S: Accumulation of amino acid substitutions promotes irreversible structural changes in the hemagglutinin of human influenza AH3 virus during evolution. *J Virol* 2005; 79:6472-6477.
  19. Nelson M, Spiro D, Wentworth D, Beck E, Fan J, Ghedin E, Halpin R, Bera J, Hine E, Proudfoot K, Stockwell T, Lin X, Griesemer S, Kumar S, Bose M, Viboud C, Holmes E, and Henrickson K: The early diversification of influenza A/H1N1pdm. *PLoS Curr* 2009; 1:RRN1126.
  20. Nelson MI, and Holmes EC: The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 2007; 8:196-205.
  21. Nicholson KG, Wood JM, and Zambon M: Influenza. *Lancet* 2003; 362:1733-1745.
  22. 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.
  23. Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, and Donis RO: A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:4269-4274.
  24. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, and Donis RO: New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2013; 9:e1003657.
  25. Ward CL, Dempsey MH, Ring CJ, Kempson RE, Zhang L, Gor D, Snowden BW, and Tisdale M: Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *J Clin Virol* 2004; 29:179-188.
  26. Wei S-H, Yang J-R, Wu H-S, Chang M-C, Lin J-S, Lin C-Y, Liu Y-L, Lo Y-C, Yang C-H, Chuang J-H, Lin M-C, Chung W-C, Liao C-H, Lee M-S, Huang W-T, Chen P-J, Liu M-T, and Chang F-Y: Human infection with avian influenza A H6N1 virus: an epidemiological analysis. *Lancet Respir Med* 2013.
  27. WHO: Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases. Available from <http://www.who.int/influenza/resources/documents/RecAllabtestsAug07.pdf>. Accessed 6 March 2013. . 2007.
  28. WHO: Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2012–2013 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec* 2012; 87:83-95.
  29. WHO: WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans. Available from [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO\\_Diagnostic\\_RecommendationsH1N1\\_20090521.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf) Accessed 6 March 2013. . 2009.
  30. Yang JR, Huang YP, Chang FY, Hsu LC, Huang HY, Pan YT, Lin YC, Wu HS, and Liu MT: Characterization of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses in Taiwan in 2009-2011. *J Med Virol* 2013; 85:379-387.
  31. Yang JR, Huang YP, Chang FY, Hsu LC, Lin YC, Huang HY, Wu FT, Wu HS, and Liu MT: Phylogenetic and Evolutionary History of Influenza B Viruses, which Caused a

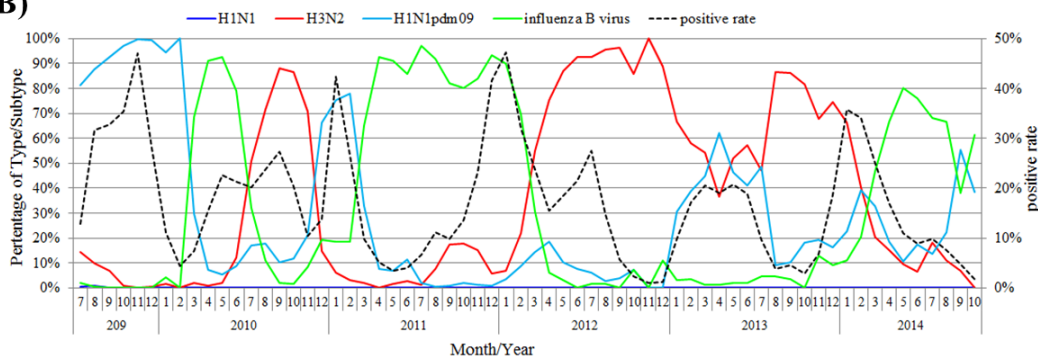
- Large Epidemic in 2011-2012, Taiwan. *PLoS One* 2012; 7:e47179.
32. Yang JR, Huang YP, Chang FY, Hsu LC, Lin YC, Su CH, Chen PJ, Wu HS, and Liu MT: New variants and age shift to high fatality groups contribute to severe successive waves in the 2009 influenza pandemic in Taiwan. *PLoS One* 2011; 6:e28288.
  33. 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.

(8)圖、表

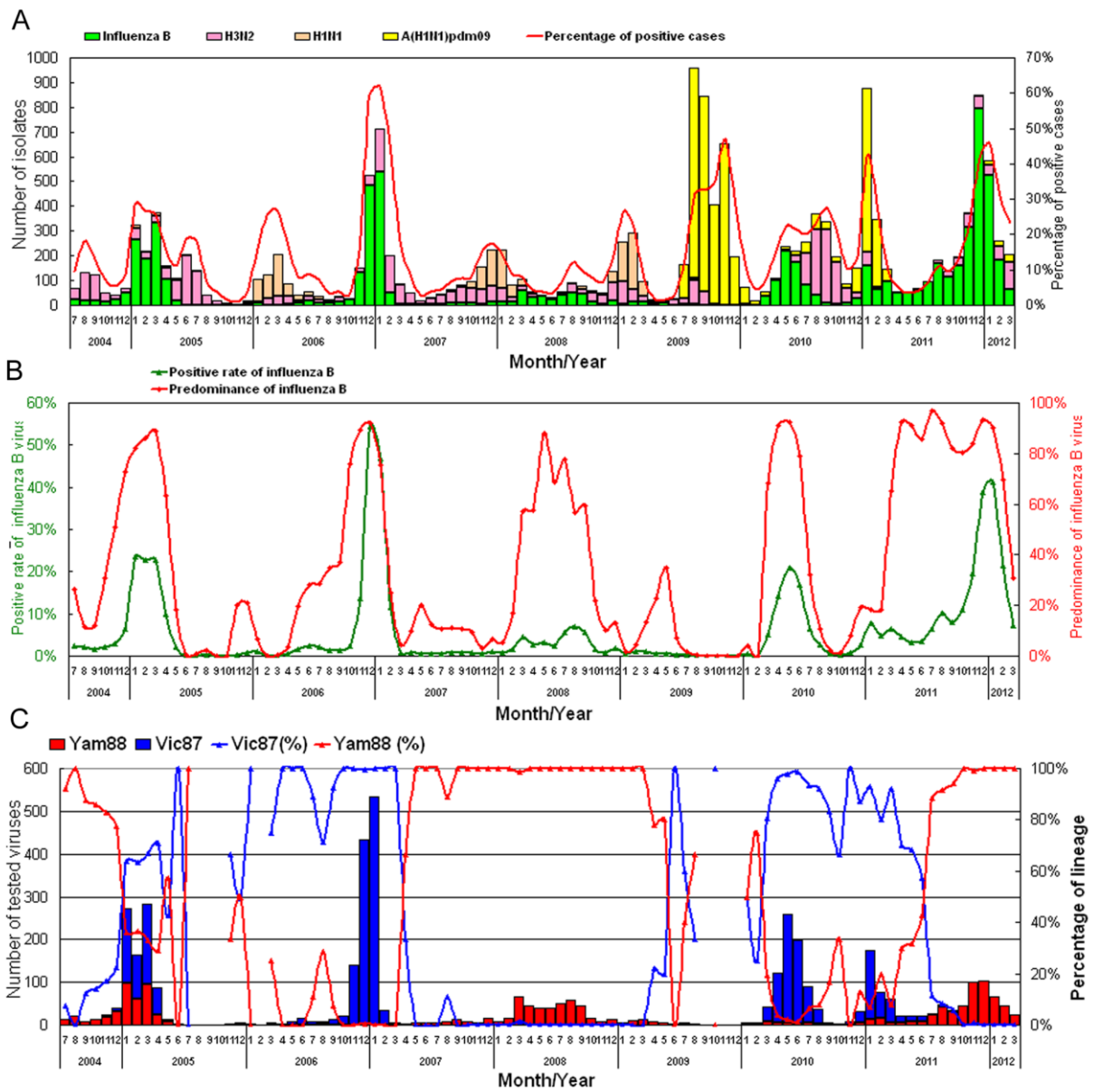
(A)



(B)

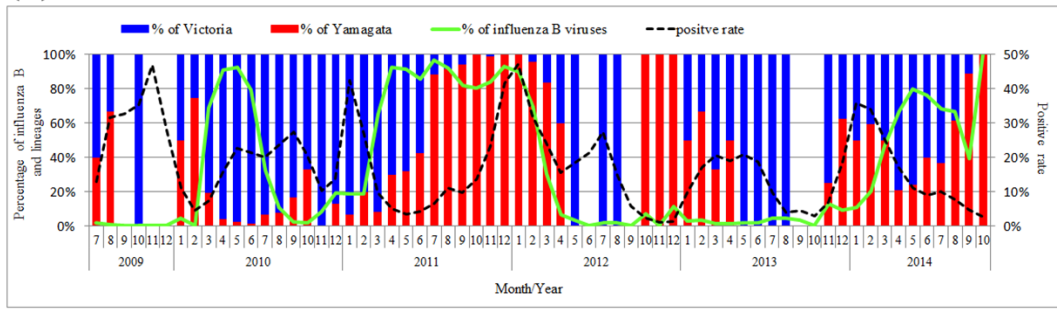


圖一、2009-2014 年台灣流感病毒各亞型與次亞型流行情形，分離病毒樹目(A)與各亞型與次亞型百分比(B)。

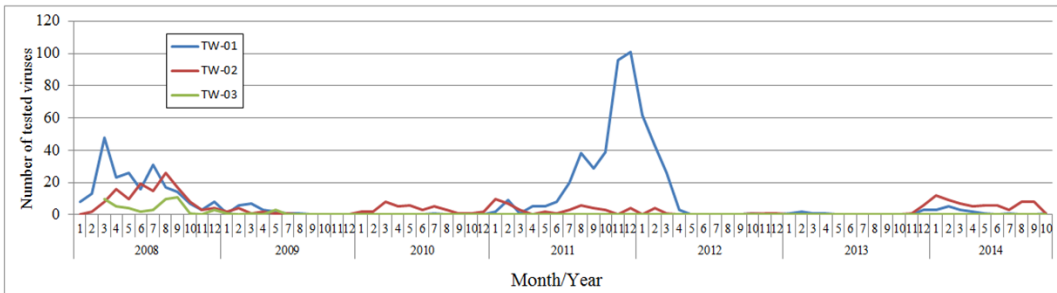


圖二、 A. 台灣 2004-2012 年台灣流感病毒流行之亞型與次亞型。B. B 型流感病毒陽性率與佔總流感總數之分率。C. Victoria lineage (Vic87) 與 Yamagata lineage (Yam88) 病毒株之比例與分析之病毒數目

(A)

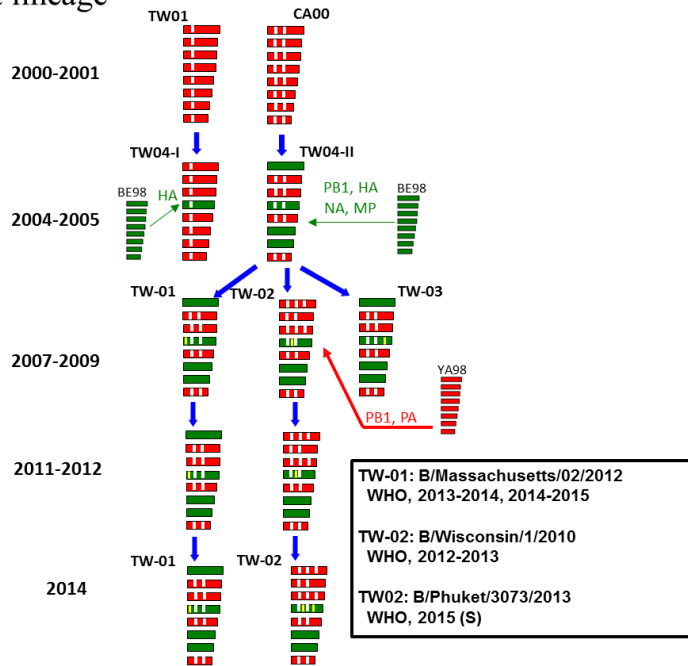


(B)

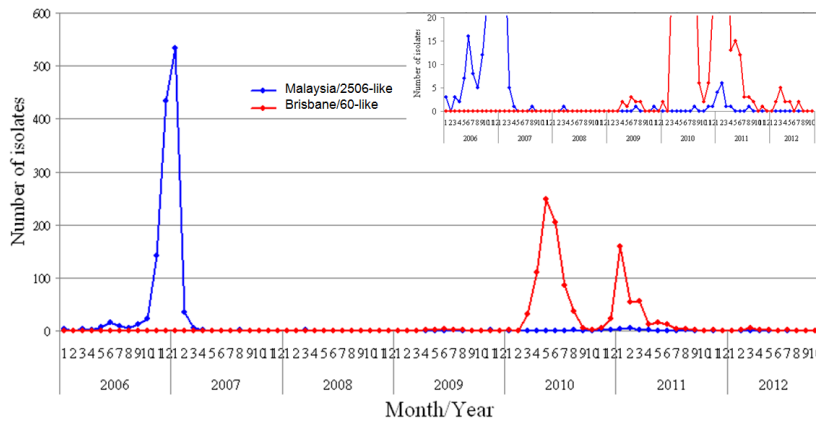


圖三、台灣 2009-2014 年台灣 B 型流感病毒 Victoria 與 Yamagata lineage 分布情形(A)。Yamagata lineage 不同 clades (TW-01, TW-02, TW-03)流行情形。

Yamagata lineage

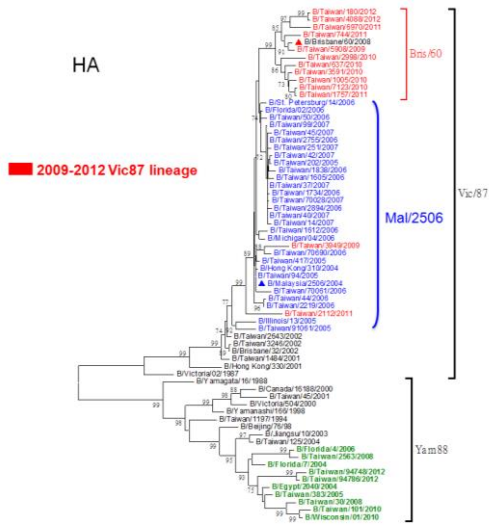


圖四、圖示依據 B 型流感全基因序列分析，台灣流行之 Yamagata lineage 病毒之可能之演化來源。

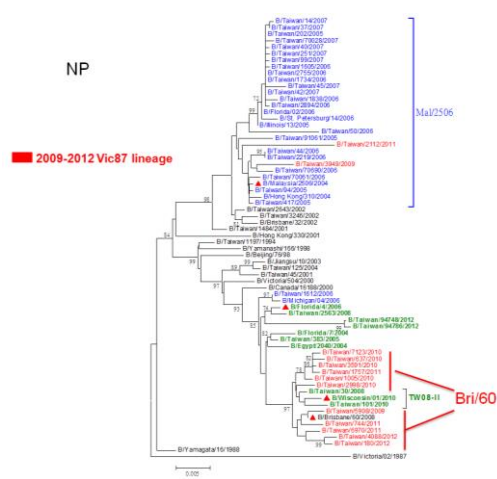


圖五、台灣 B 型流感病毒 Victoria lineage 從 B/Malaysia/2506/2004(2006-2007, 2007-2008 之疫苗株)類似病毒轉變為 B/Brisbane/60/2008(2009-2010, 2010-2011, 2011-2012 之疫苗株)類似病毒。插入圖顯示 B/Malaysia/2506/2004 類似病毒 2009-2012 年仍可發現。

(A)

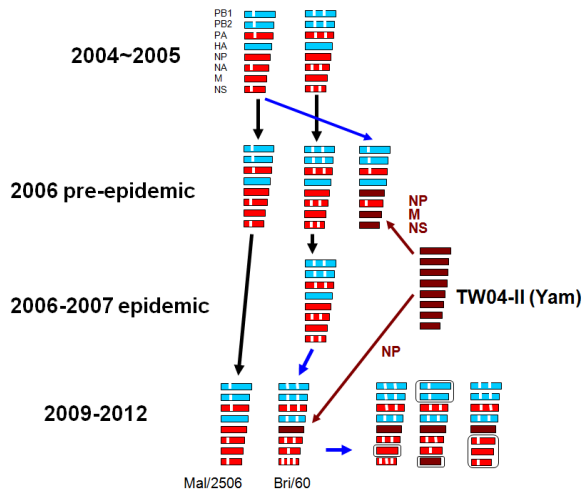


(B)

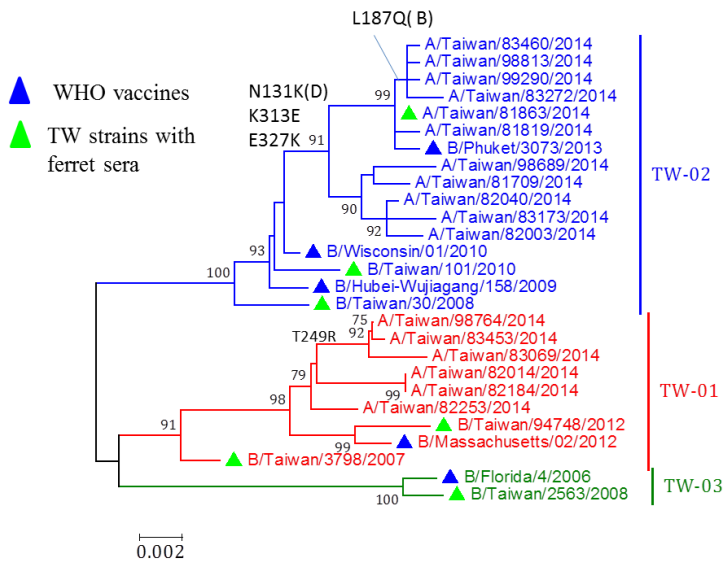


圖六、台灣 B 型流感病毒, HA(A)與 NP(B)基因序列之親源樹狀圖。

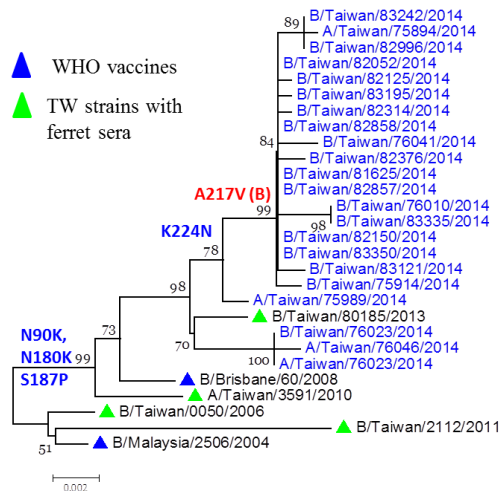




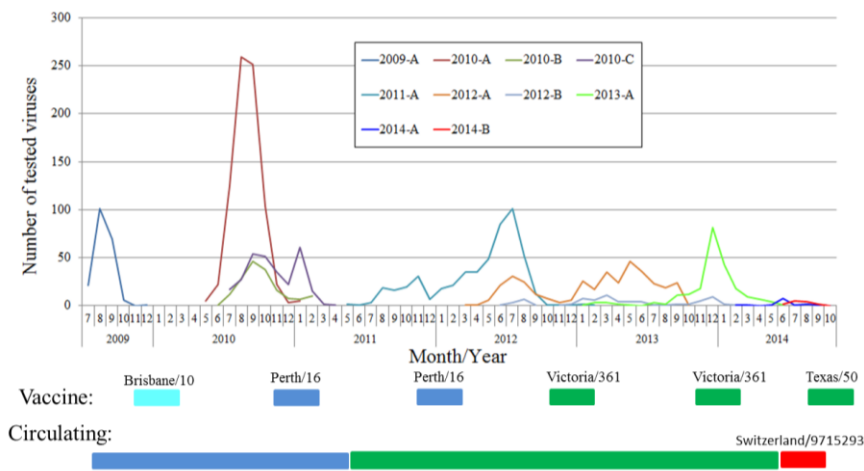
圖七、根據 B 型流感全基因序列分析，2009-2012 年台灣流行之 Victoria lineage 病毒之可能之演化來源。



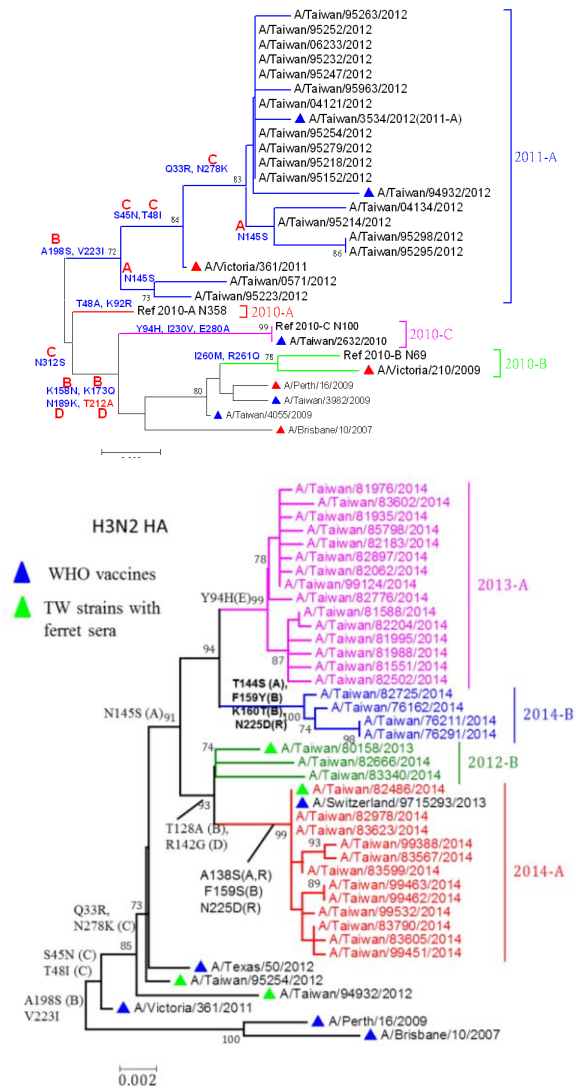
圖八、B 型 Yamagata 流感病毒 HA 基因之親源樹狀圖。2014 年流行 TW-02 病毒，增加多個突變，造成抗原性改變。



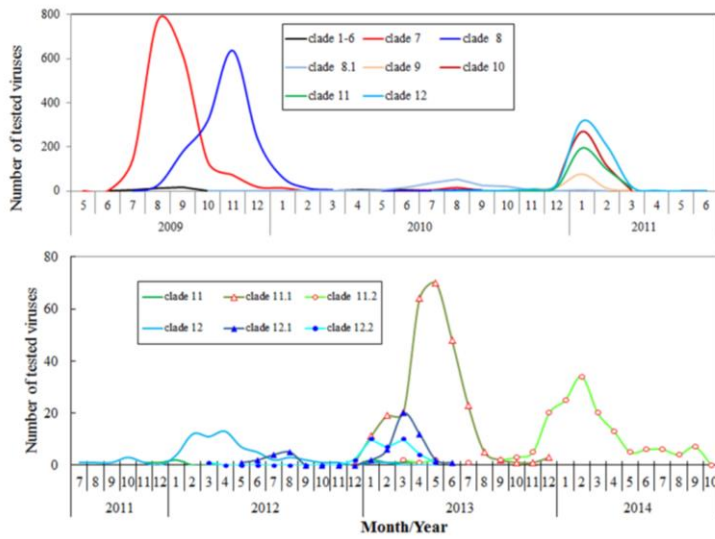
圖九、B 型 Victoria 流感病毒 HA 基因之親源樹狀圖。



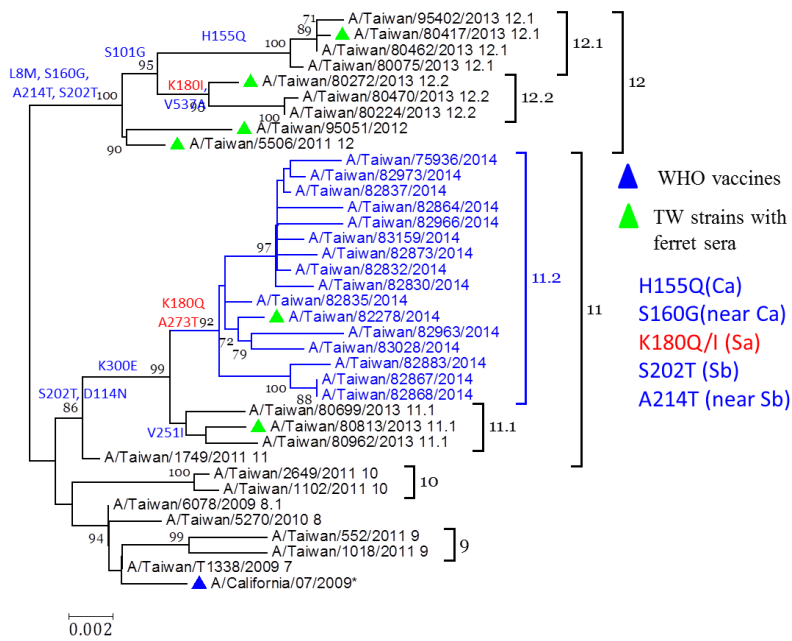
圖十、台灣 2009-2014 年台灣 A 型 H3N2 流感病毒不同 clade 之變化。2014 年出現新的變異株 2014-A 與 2014-B，2014-A 抗原改變。



圖十一、A 型 H3N2 流感病毒 HA 基因之親源樹狀圖。

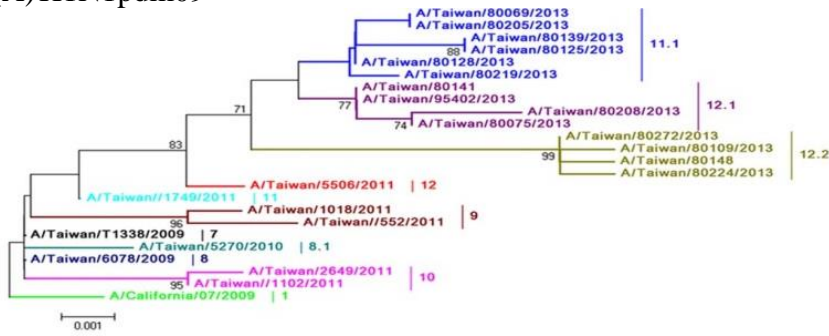


圖十二、台灣 2009-2014 年台灣 A 型 H1N1pdm09 流感病毒不同 clade 之變化。2014 年主要之病毒為 Clade 11.2

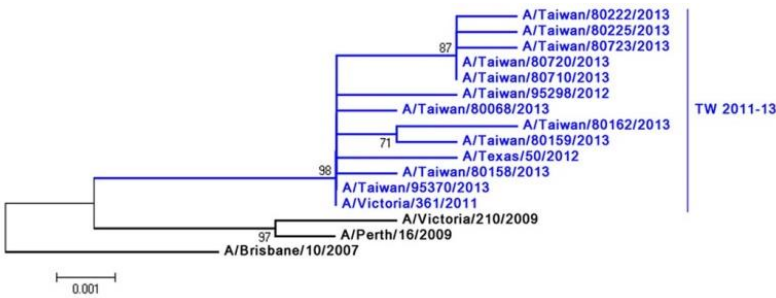


圖十三、A 型 H1N1pdm09 流感病毒 HA 基因之親源樹狀圖。

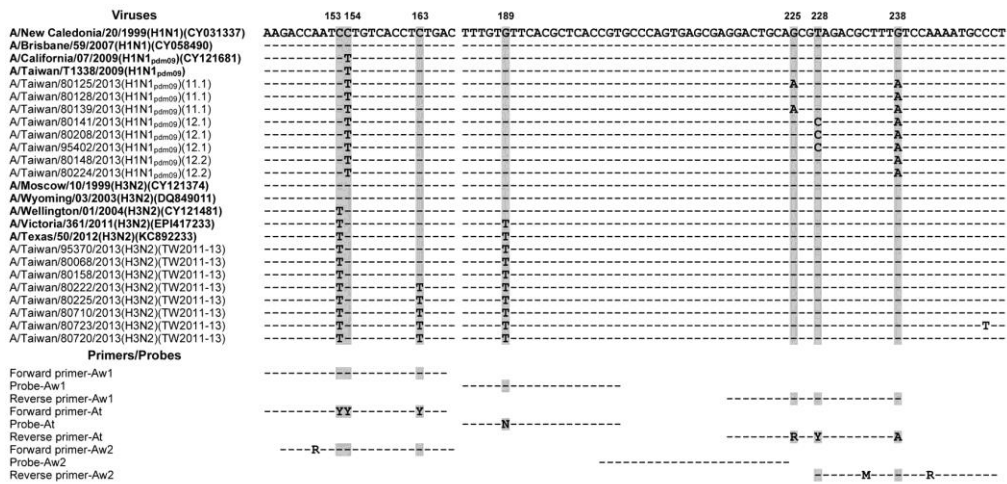
(A) H1N1pdm09



(B) H3N2



圖十四、A 型 H1N1pdm09 流感病毒 M 基因(A)與 H3N2 流感病毒 M 基因(B)之親源樹狀圖。



圖十五、台灣 A 型 H1N1pdm09 與 H3N2 流感病毒，M 基因位點的改變，造成與 real-time RT-PCR 引子與探針序列不同。

表一 B 型流感病毒的血球凝集抑制測試反應。

| viruses             | Post-infection ferret sera |            |             |            |             | Genotype | Collection Date<br>(yy/mm/dd) | Passage<br>History* |
|---------------------|----------------------------|------------|-------------|------------|-------------|----------|-------------------------------|---------------------|
|                     | TW/3798                    | TW/30      | TW/2563     | TW/101     | TW/94748    |          |                               |                     |
| Reference viruses   |                            |            |             |            |             |          |                               |                     |
| B/Taiwan/3798/2007  | <b>640</b>                 | 640        | 1280        | 160        | 1280        | TW-01    | 2007/5/28                     | C3                  |
| B/Taiwan/30/2008    | 80                         | <b>320</b> | 320         | 320        | 320         | TW-02    | 2008/02/22                    | C3                  |
| B/Taiwan/2563/2008  | 640                        | 640        | <b>1280</b> | 160        | 640         | TW-03    | 2008/04/07                    | C3                  |
| B/Taiwan/101/2010   | 80                         | 320        | 320         | <b>320</b> | 160         | TW-02    | 2010/04/10                    | C3                  |
| B/Taiwan/94748/2012 | 640                        | 1280       | 1280        | 160        | <b>1280</b> | TW-01    | 2012/01/14                    | C3                  |
| Test viruses        |                            |            |             |            |             |          |                               |                     |
| B/Taiwan/2140/2009  | 640                        | 640        | 1280        | 160        | 640         | TW-01    | 2009/3/19                     | C3                  |
| B/Taiwan/2180/2009  | 640                        | 640        | 1280        | 160        | 640         | TW-01    | 2009/3/30                     | C3                  |
| B/Taiwan/94564/2011 | 640                        | 320        | 1280        | 80         | 640         | TW-01    | 2011/12/17                    | C3                  |
| B/Taiwan/94786/2012 | 640                        | 1280       | 1280        | 160        | 640         | TW-01    | 2012/02/14                    | C2                  |
| B/Taiwan/94543/2011 | 640                        | 640        | 1280        | 160        | 640         | TW-01    | 2011/12/09                    | C3                  |
| B/Taiwan/94685/2012 | 640                        | 640        | 1280        | 80         | 640         | TW-01    | 2012/01/03                    | C3                  |
| B/Taiwan/94691/2012 | 640                        | 640        | 1280        | 160        | 640         | TW-01    | 2012/01/03                    | C4                  |
| B/Taiwan/94619/2011 | 640                        | 640        | 1280        | 160        | 1280        | TW-01    | 2011/12/28                    | C4                  |
| B/Taiwan/94712/2012 | 320                        | 640        | 1280        | 80         | 640         | TW-01    | 2012/01/05                    | C3                  |
| B/Taiwan/94714/2012 | 640                        | 640        | 1280        | 160        | 640         | TW-01    | 2012/01/06                    | C4                  |
| B/Taiwan/94818/2012 | 640                        | 640        | 1280        | 80         | 640         | TW-01    | 2012/03/05                    | C3                  |
| B/Taiwan/94609/2011 | 640                        | 640        | 1280        | 160        | 640         | TW-01    | 2011/12/24                    | C3                  |
| B/Taiwan/94679/2011 | 640                        | 640        | 1280        | 80         | 640         | TW-01    | 2011/12/31                    | C2                  |
| B/Taiwan/94631/2011 | 320                        | 320        | 1280        | 80         | 640         | TW-01    | 2011/12/28                    | C3                  |
| B/Taiwan/94698/2012 | 640                        | 640        | 1280        | 80         | 640         | TW-01    | 2012/01/04                    | C3                  |
| B/Taiwan/94611/2011 | 320                        | 640        | 1280        | 80         | 320         | TW-01    | 2011/12/26                    | C3                  |
| B/Taiwan/94633/2011 | 640                        | 640        | 1280        | 80         | 320         | TW-01    | 2011/12/28                    | C2                  |
| B/Taiwan/94656/2011 | 640                        | 640        | 1280        | 160        | 320         | TW-01    | 2011/12/29                    | C3                  |
| B/Taiwan/94638/2012 | 640                        | 640        | 1280        | 80         | 320         | TW-01    | 2011/12/28                    | C3                  |

\*: Passage history of virus was indicated by the number; e.g. viruses of second generation propagated in MDCK cells from clinical specimens were indicated as C2.

表二、2011-2014 年台灣流感病毒抗原與抗藥分析

| <b>Antigenicity and Drug resistance of Influenza viruses in Taiwan, 2011-2014</b> |              |         |            |           |            |            |            |           |
|---|--------------|---------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
| Seasons (Week 41-<br>Week 40 following year)                                      | Antigenicity |         |            |           |            |            |            |           |
|   | H1N1pdm09    |         | H3N2       |           | FluB (Vic) |            | FluB (Yam) |           |
|   | Tested No.   | LR (%)  | Tested No. | LR (%)    | Tested No. | LR (%)     | Tested No. | LR (%)    |
| 2011-2012   | 11           | 0 (0%)  | 109        | 19 (17%)  | 19         | 0 (0%)     | 224        | 0 (0%)    |
| 2012-2013   | 116          | 1(0.8%) | 150        | 5(3.3%)   | 10         | 3 (30%)    | 11         | 0 (0%)    |
| 2013-2014   | 113          | 0 (0%)  | 106        | 10 (9.4%) | 92         | 17 (18.5%) | 51         | 29 (57%)  |
| 2014-2015*  | 1            | 0 (0%)  | 4          | 1(25%)    | 1          | 0 (0%)     | 8          | 3 (37.5%) |

| Seasons (Week 41-<br>Week 40 following year) | Oseltamivir susceptibility |           |            |           |            |           |
|--|----------------------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
|  | pandemic H1N1              |           | H3N2       |           | FluB       |           |
|  | Tested No.                 | Resistant | Tested No. | Resistant | Tested No. | Resistant |
| 2011-2012                                    | 65                         | 0         | 434        | 0         | 262        | 0         |
| 2012-2013                                    | 51                         | 0         | 83         | 0         | 3          | 0         |
| 2013-2014                                    | 62                         | 0         | 45         | 0         | 16         | 0         |
| 2014-2015*                                   | 3                          | 0         | 0          | 0         | 0          | 0         |

表三、三種 real-time RT-PCR assays 檢測不同的 A 型 H1N1pdm09 與 H3N2 變異株之敏感度比較

| Viruses         | Detection limits<br>(M gene copies per<br>reaction) |                  |      | Variations at nucleotide position of the M<br>gene* |     |     |     |     |     |     | HA clade  |
|-----------------|---|------------------|------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|
|                 | Aw1   | Aw2 <sup>§</sup> | At   | 153   | 154 | 163 | 189 | 225 | 228 | 238 |           |
| A/TW/80125/2013 | 300   | 300              | 30   | - <sup>#</sup>                                      | T   | -   | -   | A   | -   | A   | 11.1      |
| A/TW/80128/2013 | 750   | 75               | 37.5 | -   | T   | -   | -   | -   | -   | A   | 11.1      |
| A/TW/80208/2013 | 315   | 315              | 15.8 | -   | T   | -   | -   | -   | C   | A   | 12.1      |
| A/TW/80720/2013 | 3500  | 350              | 17.5 | T   | -   | T   | T   | -   | -   | -   | TW2011-13 |

<sup>§</sup> Assay recommended by the WHO for the detection of A(H1N1)pdm09 viruses

\*The variations at the indicated positions were compared to the sequences of the primers and probe used in the Aw1 assay.

-<sup>#</sup> indicates nucleotides that were identical to the sequences of the primers and probe used in the Aw1 assay.