

計畫編號：DOH95-DC-2042

行政院衛生署疾病管制局 95 年度科技研究發展計畫

台灣流感病毒分子演化與其各基因對病毒抗原性表現
影響之研究

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：吳和生

研究人員：林智暉、邱淑君、蘇永瑞、陳彥文

執行期間：95 年 1 月 1 日至 97 年 12 月 31 日

本年度執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

頁 碼

封面	1
目錄	2
一、 中文摘要	3
二、 英文摘要	4
三、 前言	5
四、 材料與方法	8
五、 結果	11
六、 討論	16
七、 參考文獻	19
八、 圖、表	23

共 (26) 頁

摘要

流行性感冒病毒的基因重組現象 (reassortment)，已普遍存在現今流行的 A 型及 B 型流感病毒之許多品系當中。病毒基因發生重組時對病毒之抗原性表現將產生不同程度之影響。基因重組現象對流感病毒是否造成全球性大流行扮演相當重要的關鍵角色，而近期研究已知除了包括血球凝集素(Haemagglutinin)、神經胺酸酶 (Neuramidinase gene) 等表面蛋白變異會導致病毒抗原性產生變化外，其他如聚合酶基因(Polymerase) 等內在基因的改變亦將影響流感病毒抗原性的表現；而持續偵測這些基因及抗原性的變異情形，對於掌握流感病毒的流行動態以及在每年決定施打的流感病毒疫苗株的選取上，著實提供相當重要且關鍵的資訊。為了解台灣流感病毒基因演化及重組情形，評估台灣爆發本土性大流行的可能，並累積資訊提供每年流感病毒疫苗株選取參考依據，本計畫擬對台灣本土之流感病毒分離株進行八個基因片段之全長序列分析，除了解台灣近年來本土流感病毒基因序列重組的情形，並比較基因組成之改變與病毒抗原性表現的關聯性，期望藉由生物資訊的分析，瞭解臺灣地區病毒序列演化與抗原性改變間可能的關係。

關鍵字：流感病毒、基因重組、抗原性、序列分析

Abstract

The segmented genome of influenza virus allows exchange of gene segments between cocirculating strains. Phylogenetic profiles of the genes coding for HA, NA, MP and PA segment proteins of influenza A viruses, isolated from 2005 to 2006 were analyzed in order to understand the evolutionary mechanisms of these viruses. Evolutionary analysis done in the present study provided further evidence for cocirculation of multiple subtypes as well as sequestering and reemergence of phylogenetic lineages of the internal genes. Results presented in this report demonstrate that antigenically and genetically distinct viruses within both A/H1N1 and A/H3N2 subtypes co-circulate and make changes to occur frequently contributing to the genetic diversity of the circulating strains.

**Key words : Influenza Virus 、 Reassortment 、 Antigenicity 、
Phylogenetic analysis**

三、前言

流感病毒屬於正黏液病毒科，具有 8 個負股型的單股基因體，包含組成 polymerase 蛋白的 PB1, PB2 及 PA 基因、構成表面抗原的 HA 及 NA 基因，以及轉譯核蛋白質的 NP 基因、形成質體蛋白的 MP 基因及非結構性蛋白的 NS 等。這樣特殊的基因體，可能因為病毒以 RMA 為模板的 RNA 複製酶的不具校正功能，因而產生突變，更容易因基因發生插入 (insertion) 或刪除 (deletion)，重組 (recombination) 或片段重組 (reassortment) 產生胺基酸的變異，造成病毒抗原性或抗藥性或毒性的改變。

A 型流感病毒，依照其表面抗原 HA 及 NA 的蛋白表現可將其次分型，其中 HA 可分為 H1-H16 等型別，而 NA 則可分為 N1-N9 等 9 種不同的次型別。目前可感染人類的 A 型流感次型別包含 H1-H3、H5、H7 以及 H9 等共 6 種血清型，其中 H2 型別在 1957 年之後便已不再被從人類身上分離出。H5 型流感病毒在 1997 年首先在香港發現人類感染的案例，至 2001 年起陸續於東南亞爆發疫情，且人類染病死亡率高達五成以上，至 2005-06 年起已擴散至全球各地。目前普遍感染人的 A 型流感病毒主要為 H1N1 以及 H3N2 型，而台灣近年的 A 型流感也以此二型為主。

在過去，流感病毒之抗原性判定是依據血球凝集抑制法進行 HA 抗原性偵測，研究流感病毒的演化分類也主要是以 HA 基因為主，然而病毒的重組不僅現在 HA 基因，病毒其他的基因如神經胺酸酶 (NA) 及其他 internal 基因在病毒重組片段交換的機率上與 HA 基因是相似的 (McCullers *et al.*, 1999)。病毒基因的片段重組造成流感病毒的多型性，因此造就了在同時期不同病毒株間流行的優勢，也造成病毒在環境中重複感染人類 (Lindstrom *et al.*, 1999; McCullers *et al.*, 1999)。1918

年的西班牙流感最新的研究顯示，1918 年流行病毒株之聚合酶基因（Polymerase gene）組成與禽鳥的病毒具高度的相似性，而與人類病毒基因演化的距離較遠，顯示此病毒的 Polymerase 基因片段來自禽鳥病毒，間接證實當年的內在基因間發生的重組亦是造成此波致命流行的可能原因之一（Taubenberger *et al.*, 2005; Tumpey *et al.*, 2005）。因此，偵測單一 HA 基因序列的改變，並不足以解釋所有病毒特性上的改變。

近年 A 型流感病毒基因重組最顯著的例子，為 2003 年 A/H1N1 流感病毒與 A/H3N2 病毒因同時流行感染人類，而導致病毒基因發生重組，產生 A/H1N2 新型流感病毒，並且根據基因序列分析顯示，此 A/H1N2 型病毒帶有的 HA 基因片段，序列與當時流行之 A/H1N1 型 A/New Caledonia/20/99 病毒序列相似，但其帶有的 NA 基因片段，序列卻與當時流行的 H3N2 型病毒 A/Fujian/411/2002 相似，顯示病毒在當時因為同時流行（co-circulating），而造成了病毒序列的交換，至於病毒發生此基因交換的機制，目前仍不清楚。所幸此新型病毒之抗原性表現與 A/H1N1 病毒之 A/New Caledonia/20/99 之抗原性低於 4 倍差異，顯示現行人體所具有之抗體對此新型病毒具保護力，而未造成全球性的流行。

基於上述研究顯示，以血球凝集抑制法（HI test）進行 HA 抗原性偵測，為初步判斷病毒抗原性的重要依據。但抗原上的變異若光只研究 HA 基因上的組成變異，似乎不足以鑑別病毒在其他基因上因突變、重組及基因片段重組所造成的病毒特性的改變。因此本研究將以三年的時間建立病毒 8 段基因全長序列分析機制，深入探討台灣本土流感病毒分離株包含神經胺酸酶及其他 internal 基因發生基因重組的比例情形，並將這些序列進行演化上的分析，與病毒抗原性進行交互探討，本年度以 HA、NA、PA 以及 MP 等四段基因作為標的研究，分析其序列與抗原

性之間的相關性。

四、材料與方法

1. 細胞及病毒之培養

研究使用的細胞為 MDCK 細胞株，所使用之培養基為 DMEM medium，細胞培養環境為 36°C，5 % CO₂。

進行分析之病毒在 MDCK 細胞長滿並更換維持培養基後，分別接種待測病毒，培養環境為 34°C，5 % CO₂，每日觀察細胞病變(cytopathic effect；CPE)，待 80%以上 CPE 時，將其冷凍解凍三次，以 3000RPM 離心 15 分鐘收取上清液置於-80°C 備用。

2. 病毒株之鑑定

利用免疫螢光染色 (Immunofluorescence antibody test，IFA)法進行流感型別的初步鑑定。將離心下來之病毒離心沈澱之細胞以加入 1 毫升磷酸緩衝液(PBS)後，混合成細胞懸浮液，取出 10 µl 的細胞懸浮液作成抹片，乾燥後以冰的丙酮(Acetone)固定 10 分鐘，取出在室溫中乾燥，以個別之單株抗體(CHEMICON International, Inc)進行間接染色，染色後，以螢光顯微鏡進行鏡檢，細胞呈現蘋果綠螢光則判定為流感病毒培養陽性。

3. 病毒株抗原性鑑定

利用每年世界衛生組織所提供之流感病毒鑑定試劑組 (WHO Influenza Diagnostic Reagent Kit) 進行流感病毒抗原性的次分型，所有操作程序依照試劑組裡所建議的操作方式進行。

4. 病毒核酸萃取：

病毒核酸萃以商業化試劑萃取：

以 QIAGEN 的 QIAamp viral RNA Kit 進行核酸萃取步驟：

(1) QIAamp viral RNA Kit：

A. 560µl 之 carrier RNA+ AVL 混合液與 140µl 檢體混合均勻，室溫靜

置 10 分鐘

B. 10 分鐘後，加入 560 μ l 絕對酒精，通入 spin column，離心 8000rpm 1 分鐘。

C. 丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW1 500 μ l，離心 8000rpm 1 分鐘。

D. 丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW2 500 μ l，離心 14000rpm 3 分鐘。

將 column 置於以標示完整之 1.5ml 離心管，加入 60 μ l 之 DEPC 水，於室溫下放置 3 分鐘，以 8000rpm 1 分鐘離心，收集離心液，置於-20 備用。

5. 流感病毒片段基因之核酸增幅反應：

核酸增幅片段如下表所列：

Segment	PA	HA		NA		MP
		H1	H3	N1	N2	
Amplicon	2195	1193	1078	1408	1466	1027

以 Qiagen one-step RT-PCR 試劑組進行核酸複製反應，操作程序依照試劑組建議進行。每一反應均加入 10 μ l 之 5X buffer 以及 Q-solution，dNTP 以及 Enzyme mix 均加入 2 μ l，各片段之專一性核酸引子均加入 3 μ l，以純化之病毒 RNA 5 μ l 作為複製模板 (template)，反應最終體極為 50 μ l。反應條件為 50 $^{\circ}$ C 30 分鐘，95 $^{\circ}$ C 15 分鐘，之後以 95 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 60 秒條件進行 35 個循環，最後以 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘進行最終延長 (final elongation)。反應完成後以 1.5% Agarose 進行核酸膠體電泳確認複製片段。進行下一步驟前，產物均存放於 4 $^{\circ}$ C。

6. PCR 產物純化

以 Qiagen 廠牌之 QIAquick Purification Kit 進行複製片段之純化，操作程序依照試劑組建議進行。將產物加入 5X 體積之 PB 溶液，之後加入試劑組所附之 column 中，以 13000 rpm 離心 1 分鐘後，丟棄離出液，再加入 750 μ l 之 PE 溶液，以 13000 rpm 離心 1 分鐘後，丟棄離出液，之後以 DEPC 水將產物溶出，進行序列分析用。

7. 核酸定序

利用 ABI 3130 sequence analyzer 進行核酸序列的分析。以 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 試劑組進行定序。操作程序依照試劑組建議進行，將 BigDye Terminator v3.1 與 5X buffer 依照分析片段比例混合後，加入 1 μ l 反應核酸引子，再加入 2 μ l 純化之 cDNA 模板之後，以 95°C 5 秒、60°C 4 分鐘進行 25 個循環的反應。之後以 100% 酒精沉澱後風乾，再將反應產物溶於 HiDi-Formamide 後，加入 96 孔反應盤，上機進行分析。

8. 序列 grouping 及 演化分析

利用中央研究院何美鄉研究員研究室以及中央研究院資料所施純潔老師研究室所研發出之『Phylo-mlogo』軟體中之 **grouping** 程式，將病毒各段基因序列進行軟體程式分析加以分群 grouping 之後，同時利用『Phylo-mlogo』軟體中之 **gLR** 程式，計算每 group 中病毒 HI 效價呈現 LR 的比例。最後以 MEGA3 序列分析軟體進行各 group 間基因序列之演化分析，以及 Phylogenetic Tree 的繪製。

五、結果

A 型流感病毒分離概況

本年度共分析包括 2005-06 年 A 型流感病毒共 150 株病毒的抗原性表現，以及其 HA 基因及 NA 基因的序列分析。2005-06 流感季節主要分離株以 A/H1N1 型為主。占 A 型流感病毒的總分離數之 70.9%。A/H3N2 病毒在 2005 年 9 月仍為台灣地區主要的流行株型別，在 12 月 A/H1N1 病毒株分離率快速上升之後，分離株數才下降，共占總分離數之 29.1%。

1. A/H1N1 病毒的抗原性

在本年度所進行 A/H1N1 病毒共 79 株分離株中，其利用 HI test 進行血清型別鑑定的結果均為 A/New Caledonia/20/99-like，與 2005-06 年 WHO 建議的流感病毒疫苗株型別相符。

2. A/H1N1 之 HA 基因片段分析

將 79 株 A/H1N1 分離株 HA 基因片段進行序列分析，分析片段長度為 1193 bp，分析的胺基酸位置由位置 1~位置 326，包含 HA1 基因片段全長。將 79 條基因序列以 Phylo-mlogo 之 grouping function 進行病毒株的分組，選出每群有 3 株病毒以上的病毒群，並以病毒採檢日最早的分離株作為代表序列，進行後續的基因序列變異分析，並在代表株位置標示出各株所代表的分離株數。所得結果如圖一(a)所示，所有 05-06 年的病毒株與參考病毒株 A/New Caledonia/20/99 均有 V169A 以及 W255R 兩個胺基酸位點的變異，但仍區分為兩個 subgroup，其中一個 subgroup 共 2 群 7 支分離株在 256 位置由 Y 變為 F。而另一 subgroup 與前一 subgroup 共有四個胺基酸位點的變異，包括 T90K、R149K、R212K 以及 T269N。

3. A/H1N1 之 NA 基因片段分析

共 68 株 A/H1N1 分離株 NA 基因片段進行序列分析，分析片段長度

為 1408 bp，分析的胺基酸位置由位置 17~位置 450。將 68 條基因序列以 Phylo-mlogo 之 grouping function 進行病毒株的分組，選出每群有 3 株病毒以上的病毒群，並以病毒採檢日最早的分離株作為代表序列，進行後續的基因序列變異分析，並在代表株位置標示出各株所代表的分離株數。所得結果如圖二(a)所示，所有 05-06 年的病毒株與參考病毒株 A/New Caledonia/20/99 均有 V581I 的胺基酸位點變異，但 2006 年的分離株與 2005 年的分離株相較，多了 2 個胺基酸位點變異，包括 V244M 以及 D392N。而 2006 年的 N1 基因又分為兩個 subgroup，其中一群具有 R140K 胺基酸變異，而另一 subgroup 則有 H74N、G87E、K183R 以及 S276T 等胺基酸位點的變異。

4. A/H3N2 病毒的抗原性

在本年度所進行 A/H3N2 病毒共 57 株分離株中，其利用 HI test 進行血清型別鑑定的結果，多為 A/California/7/2004-like，與 2005-06 年 WHO 建議的流感病毒疫苗株型別相符。然而有些病毒在經 HI 檢測發現對 A/California/7/2004 抗血清的效價呈現反應較低的情況 (Low Reactor, LR)，測得的效價有 4 倍下降 (4-fold difference) 的差異。所檢測的 57 株分離株中，有 7 株為 Cali-LR，比例約為 12.3%。

5. A/H3N2 HA 基因片段分析

將 57 株 A/H3N2 分離株 HA 基因片段進行序列分析，分析片段長度為 1466 bp，分析的胺基酸位置由位置 15~位置 406。將 57 條基因序列以 Phylo-mlogo 之 grouping function 進行病毒株的分組，選出每群有 3 株病毒以上的病毒群，並以病毒採檢日最早的分離株作為代表序列，進行後續的基因序列變異分析，並在代表株位置標示出各株所代表的分離株數，標示 LR 者表示此群病毒中具有對 California/7/04 抗血清呈現 4 倍下降的病毒株，並標示此群病毒裡 LR 分離株數的比例。所得結果如圖二(b)

所示，所有 05-06 年的病毒株與參考病毒株 A/California/7/04 均有 N188D、S193F 以及 D225N 等三個胺基酸位點的變異，其中包括 2005-T311 等共三群分離株具有 G50E 胺基酸位點變異，其中共包含有 4 株 LR 分離株。

6. A/H3N2 NA 基因片段分析

共 80 株 A/H3N2 分離株 NA 基因片段進行序列分析，分析片段長度為 1408 bp，分析的胺基酸位置由位置 17~位置 450。將 80 條基因序列以 Phylo-mlogo 之 grouping function 進行病毒株的分組，選出每群有 3 株病毒以上的病毒群，並以病毒採檢日最早的分離株作為代表序列，進行後續的基因序列變異分析，並在代表株位置標示出各株所代表的分離株數。所得結果如圖二(b)所示，所有 05-06 年的病毒株與參考病毒株 A/California/7/04 除了 2005-R35、2005-R22 兩群病毒以外，均有 D93N 的胺基酸位點變異；有 15 株分離株具有 E221D 胺基酸位點變異，其中包含 3 株 LR 分離株。而 2006 年有一病毒群 2006-T172，具有 T16I、R210K、L370S 以及、P386S 等胺基酸位點變異，與其他 N2 基因序列差異較大。

7. A 型流感 MP 基因片段分析

由於 A/H1N1 與 A/H3N2 病毒的 MP 基因序列的相似度很高（相似度達 92.1%），故在基因序列分析上將 A/H1N1 以及 A/H3N2 基因 MP 片段一起進行分析。共 50 株 A 型流感分離株 MP 基因片段進行序列分析，分析片段長度為 1027 bp，然而 MP 基因轉譯出兩段蛋白質，分別為 M1 以及 M2 蛋白，故在胺基酸的分析上將分別進行分析。M1 分析的胺基酸位置由位置 17~位置 252。將 50 條基因序列以 Phylo-mlogo 之 grouping function 進行病毒株的分組，選出每群有 3 株病毒以上的病毒群，並以病毒採檢日最早的分離株作為代表序列，進行後續的基因序列變異分析，並在代表株位置標示出各株所代表的分離株數。所得結果如圖三(a)所示，所有 A/H3N2 分離株所帶有的 M1 基因與 A/Fujian/411/2002 均有

T218A 胺基酸位點的變異。值得注意的是，A/Wyoming/03/03 為 A/H3N2 的 reference strain 之一，但其胺基酸的位點包括 167、205、230、231、239 等、胺基酸組成均與 A/H1N1 病毒的組成相同，而與其他 A/H3N2 病毒有相當大的差異，而 MEGA 分析軟體以 Neighbor-Joining method 進行 Phylogenetic analysis，也將 A/Wyoming/3/03 與 A/H1N1 歸於基因序列組成較相近的一群（圖三(a)）。

M2 分析的胺基酸位置由位置 9 到位置 88。將 50 條基因序列以 Phylo-mlogo 之 grouping function 進行病毒株的分組，選出每群有 3 株病毒以上的病毒群，並以病毒採檢日最早的分離株作為代表序列，進行後續的基因序列變異分析，並在代表株位置標示出各株所代表的分離株數。所得結果如圖三(b)所示，50 株 A 型流感病毒株中，A/H3N2 有 28 株病毒具有 S31N 胺基酸位點變異（2005-un2410 病毒群），在 A/H1N1 病毒中則未發現。

8. A 型流感 PA 基因片段分析

共 41 株 A 型流感分離株 PA 基因片段進行序列分析，分析片段長度為 2195 bp，分析的胺基酸位置由位置 10~位置 710。A 型流感病毒無論是 A/H1N1 或是 A/H3N2 在基因序列上具有相當程度的相似性（相似性高達 90%）故在序列分析上與 MP 基因相同，將 A/H1N1 與 A/H3N2 序列同時進行分析。將 41 條基因序列以 Phylo-mlogo 之 grouping function 進行病毒株的分組，選出每群有 3 株病毒以上的病毒群，並以病毒採檢日最早的分離株作為代表序列，進行後續的基因序列變異分析，並在代表株位置標示出各株所代表的分離株數。所得結果如圖四所示，2005 年 A/H1N1 分離株 PA 基因可分為兩群，其中一群與 A/New Caledonia/20/99 reference strain 具有 V505I 胺基酸位點的變異，而另一群與 reference strain 則具有 K158R 以及 L549I 等胺基酸位點的變異。A/H3N2 的 PA 基因與 A/H1N1 相似，同樣也分成兩群病毒，其中一群與 A/Panama/2007/99 具有

E101G、S208T 胺基酸位點變異，另一群則在位置 62 處由 I 變為 M，在位置 327 處胺基酸由 G 變為 K。

六、討論

台灣地區2006年主要的流行分離株以A/H1N1為主。雖然病毒在抗原性的表現上與建議疫苗株A/New Caledonia/20/99並無差異，顯示疫苗對於現今流行之 A/H1N1型分離株，仍具有良好的保護效果。然而仔細分析病毒的HA以及NA的基因組成，發現病毒的基因序列，已發生多處胺基酸位點的改變，與A/New Caledonia/20/99已產生極大的差異（圖一(a)、圖二(a)）。其中具有Y256F胺基酸位點變異的分離株，在2006年二月之後，便沒有再被分離出。而所有的A/H1病毒，經針對其NA序列進行分析，結果均帶有N1的NA序列，顯示2003年發生於英國等地的A/H1N2重組病毒，並未進入到台灣地區，台灣本土的A/H1病毒，也並未與A/H3的NA發生基因交換的現象。

台灣地區的A/H3N2病毒，多年來一直活躍於各個季節，幾乎一年四季均可被分離出，已經監測流感病毒活動的最主要標的。近年來流感病毒的抗原性持續的在改變，不但影響其血球凝集的特性，同時也影響其在雞胚胎蛋的生長，嚴重影響疫苗株的產製。2005-06年台灣的A/H3N2分離株有將近1/3具有G50E胺基酸位點變異，其中包含部分對A/California/7/04抗血清HI表現為LR的分離株。2006年中有一群病毒具有N126D、R142G以及N144S的病毒被分離出，由於這些位點部分位於病毒的Antigenic site上，有的影響到Glycosylation site的改變，雖然並未造成病毒抗原性的改變，然而是否會增加病毒基因的不穩定性，此群病毒的後續演化情形，值得加以持續監測。前人研究顯示，A/H3N2病毒的HA序列有許多的胺基酸位點具有高度的不穩定性，每幾年便會發生一次胺基酸變異，包括位置189、144、172等（Nakajima *et al.*, 2003），而這些位點，自1968年至2006年，仍在持續發生變異，在病毒胺基酸變異與抗原性改變的相關性研究上，這些位置必須列入監測項目。

NA基因近年來一直被研究流感病毒的學者所注意，NA基因同樣位於流感病毒的表面，神經胺酸酶為一酵素，促成病毒粒子的釋放。近年研發出一種抑制神經胺酸酶的藥物Tamiflu，就是以A型及B型流感病毒的NA為主要的作用對象，且具有相當好的效果，尤其在H5N1疫情爆發時，更被世界衛生組織列為建議用藥。然而近年研究顯示，N1胺基酸序列274位置（N2 numbering）當由H轉變為Y，而N2的胺基酸序列若發生下列位點變異：R292K、E119G/A/D/V，則病毒則會對Tamiflu產生抗藥性（Yen *et al.*, 2003）。由於流感病毒特殊的遺傳物質組成，造成其基因不穩定性，流感抗藥物的研發常常趕不上病毒突變的速度，分節的RNA基因組成應是原因之一。分析台灣地區2005-06年約150株A型流感病毒的NA序列顯示，台灣的A型流感，包括A/H1N1以及A/H3N2病毒，至今仍無對Tamiflu產生抗藥性的品系出現。然而在鄰近台灣的東南亞地區，包括越南、泰國等地均有A/H5N1病毒對Tamiflu出現抗藥性的分離株，造成治療上的困難。病毒若藉由民眾旅遊提供病毒序列交換重組機會，抗藥性的情形將日趨嚴重。

MP基因轉譯成2個蛋白質，分別為 M1以及M2，其中M2蛋白形成一離子通道（ion channel），為病毒釋出作用的重要步驟。故有許多的抗流感病毒的藥物，包括Amantadine以及Remantadine，是針對A型流感病毒的M2蛋白進行作用。而近年研究發現，流感病毒對上述藥物產生抗性，而且抗藥性分離株逐年增加快速。經研究基因序列發現，當A型流感病毒的M2 胺基酸組成若發生下列變異，包括：V27A、A30T、S31N等，病毒即對Amantadine以及Remantadine產生抗藥性（Bright, *et al.*, 2005）。本研究分析台灣2005年50株A型流感病毒的M2片段發現，2005年的A/H1N1病毒仍為Amantadine Sensitive。然而A/H3N2的病毒有相當高的比例（>50%）具有S31N的胺基酸變異，顯示台灣地區的A型流感病毒抗藥性在A/H3N2相當嚴重。相信明年度進行2006年的MP基因定序分析之後，會有更顯著

性的發現與結論。但無論結果如何，都應該發布警訊，提醒臨床醫師在疑似感染流感病患用藥的選擇上，應考慮到這方面的風險。

病毒的PA基因為組成Polymerase的三個基因片段之一。A型病毒的PA基因雖然具有高達90%以上的相似性，由於A/California/7/04疫苗株的PA基因序列無人發表，故無法以其作為參考病毒株，然而利用2001-02年A/H3N2疫苗株作為reference strain進行分析，仍有一些胺基酸位點的組成，使其區分為A/H1N1以及A/H3N2兩大分支。而其下又各自分為兩群分別具有各自胺基酸位點變異（圖四）。仔細比對A型流感病毒的PA以及MP序列，發現具有E101G與S208T胺基酸位點變化的病毒群，均為在M2胺基酸序列具有S31N變異的分離株。A/H3N2流感病毒的抗藥性表現與PA基因的胺基酸位點改變，是否具有直接性或間接性的關聯，仍需要進行實驗加以驗證。

目前本計畫已完成95年度的基因序列分析，明年度除了繼續分析其他流感病毒的HA、NA、PA、MP等段基因外，將陸續加入PB1、PB2、NS、NP等其他四段的基因序列分析，期望將A型流感病毒的8段分析完成後，能對台灣地區病毒的基因重組情況，以及序列演化的情形，能有更完整的了解，以提供國內的流感監測相關資訊，並作為疫苗株選擇的參考依據。

七、參考文獻

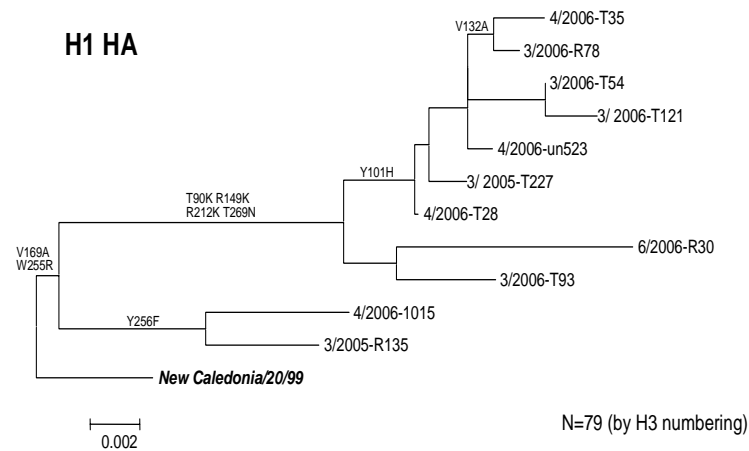
1. **Bright RA, Medina MJ, Xu X, Oronoz-Perez G, Wallis TR, Davis XM, Povinelli L, Cox NJ, Klimov AI.** 2005. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* **366**:83-95.
2. **Chan CH, Chan Y, Shieh HK, Tsai CH, Chen CY, Liu SC, Liu WT.** 2004. Phylogenetic analysis of influenza B virus in Taiwan, 1997 to 2001. *J Microbiol Immunol Infect.* **37**:135-144.
3. **Chi XS, Hu A, Bolar TV, Al-Rimawi W, Zhao P, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM.** 2005. Detection and characterization of new influenza B virus variants in 2002. *J Clin Microbiol.* **43**:2345-239
4. **Hall, C. E., M. K. Cooney, and J. P. Fox.** 1973. The Seattle virus watch. IV. Comparative epidemiologic observations of infections with influenza A and B viruses, 1965–1969, in families with young children. *Am. J. Epidemiol.* **98**:365–380.
5. **Hoffmann E, Mahmood K, Chen Z, Yang CF, Spaete J, Greenberg HB, Herlocher ML, Jin H, Kemble G.** 2005. Multiple gene segments control the temperature sensitivity and attenuation phenotypes of ca B/Ann Arbor/1/66. *J Virol.* **79**:11014-11021.
6. **Jackson D, Zurcher T, Barclay W.** 2004. Reduced incorporation of the influenza B virus BM2 protein in virus particles decreases infectivity. *Virology.* **322**:276-285.
7. **Jackson D, Barclay W, Zurcher T.** 2005. Characterization of recombinant influenza B viruses with key neuraminidase inhibitor resistance mutations. *J Antimicrob Chemother.* **55**:162-169.
8. **Kanegae, Y., S. Sugita, A. Endo, M. Ishida, S. Senya, K. Osako, K. Nerome, and A. Oya.** 1990. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J. Virol.* **64**:2860–2865
9. **Kendal AP, Joseph JM, Kobayashi G, Nelson D, Reyes CR, Ross MR,**

- Sarandria JL, White R, Woodall DF, Noble GR, Dowdle WR.**1979. Laboratory-based surveillance of influenza virus in the United States during the winter of 1977-1978. I. Periods of prevalence of H1N1 and H3N2 influenza A strains, their relative rates of isolation in different age groups, and detection of antigenic variants. *Am J Epidemiol.* **110**:449-461.
10. **Lin TY, Huang YC, Ning HC, Tsao KC.** 2004. Surveillance of respiratory viral infections among pediatric outpatients in northern Taiwan. *J Clin Virol.* **30**:81-85.
11. **Lindstrom, S. E., Y. Hiromoto, H. Nishimura, T. Saito, R. Nerome, and K. Nerome.** 1999. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J. Virol.* **73**:4413–4426.
12. **Luo, C., T. Morishita, K. Satou, Y. Tateno, K. Nakajima, and E. Nobusawa.**1999. Evolutionary pattern of influenza B viruses based on the HA and NS genes during 1940 to 1999: origin of the NS genes after 1997. *Arch. Virol.***144**:1881–1891.
13. **McCullers, J. A., G. C. Wang, S. He, and R. G. Webster.** 1999. Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. *J. Virol.* **73**:7343–7348.
14. **McCullers JA, Saito T, Iverson AR.**2004. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003. *J Virol.* **78**:12817-12828.
15. **Nakajima K, Nobusawa E, Tonegawa K, Nakajima S.** 2003. Restriction of Amino Acid Change in Influenza A Virus H3HA: Comparison of Amino Acid Changes Observed in Nature and In Vitro. *J. Virol.* **77**:10088-10098.
16. **Nakagawa N, Nukuzuma S, Haratome S, Go S, Nakagawa T, Hayashi K.** 2002. Emergence of an influenza B virus with antigenic change. *J Clin Microbiol.* **40**:3068-3070.
17. **Numazaki Y, Oshima T, Ohmi A, Tanaka A, Oizumi Y, Komatsu S, Takagi T, Karahashi M, Ishida N.** 1987. A microplate method for isolation of viruses from infants and children with acute respiratory infections.

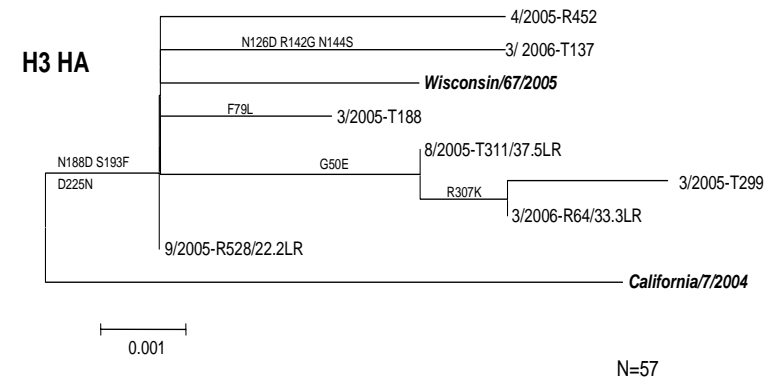
Microbiol Immunol. **31** : 1085-1095.

18. **Shih SR, Chen GW, Yang CC, Yang WZ, Liu DP, Lin JH, Chiu SC, Chen HY, Tsao KC, Huang CG, Huang YL, Mok CK, Chen CJ, Lin TY, Wang JR, Kao CL, Lin KH, Chen LK, Eng HL, Liu YC, Chen PY, Lin JS, Wang JH, Lin CW, Chan YJ, Lu JJ, Hsiung CA, Chen PJ, Su IJ.** 2005. Laboratory-based surveillance and molecular epidemiology of influenza virus in Taiwan. J Clin Microbiol. **43**:1651-1661.
19. **Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG.** 2005. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. Nature. **437**:889-93.
20. **Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solorzano A, Swayne DE, Cox NJ, Katz JM, Taubenberger JK, Palese P, Garcia-Sastre A.** 2005. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. Science. **310**:77-80.
21. **Xu X, Lindstrom SE, Shaw MW, Smith CB, Hall HE, Mungall BA, Subbarao K, Cox NJ, Klimov A.** 2004. Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses. Virus Res. **103**:55-60.
22. **Yen HL, Hoffmann E, Taylor G, Scholtissek C, Monto AS, Webster RG, Govorkova EA.** 2006. Importance of Neuraminidase Active-Site Residues to the Neuraminidase Inhibitor Resistance of Influenza Viruses. J. Virol. **80**:8787-8795.

八、圖表

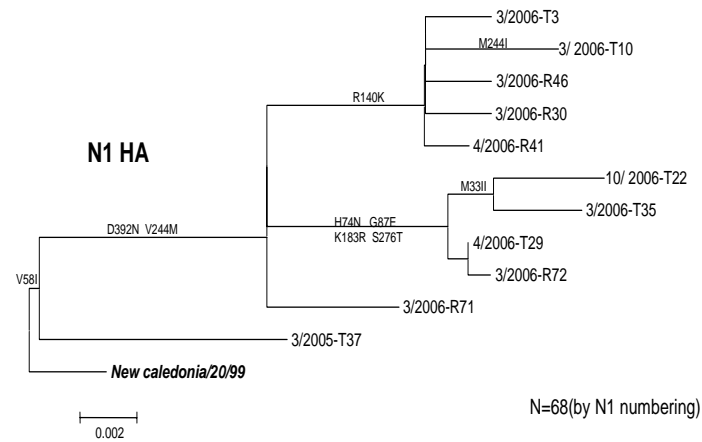


(a)

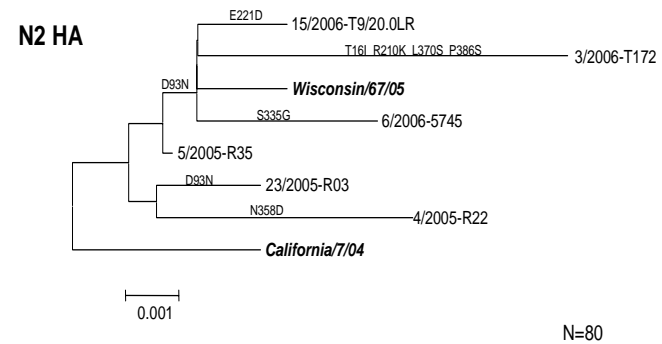


(b)

圖一、A 型流感病毒基因序列演化分析。圖(a)為 H1 HA gene 演化分析圖，圖(b)為 H3 HA gene 演化分析圖。所有的序列均以 Phylo-mlogo 軟體進行 grouping 之後，選出代表分離株以 Neighbor-Joining method 進行分析，Bootstrap 值=500。

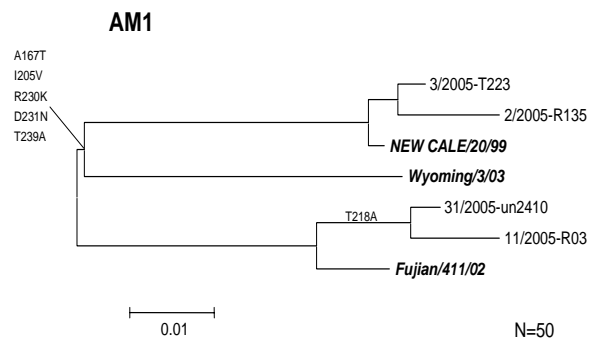


(a)

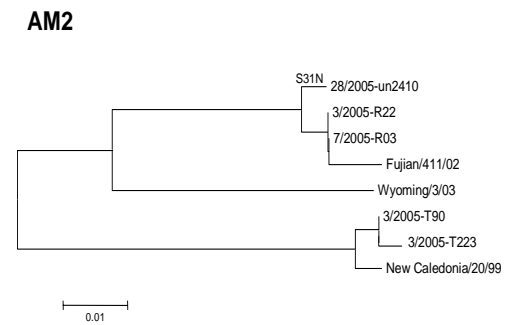


(b)

圖二、A 型流感病毒基因序列演化分析。圖(a)為 N1 gene 演化分析圖，圖(b)為 N2 gene 演化分析圖。所有的序列均以 Phylo-mlogo 軟體進行 grouping 之後，選出代表分離株以 Neighbor-Joining method 進行分析，Bootstrap 值 =500。

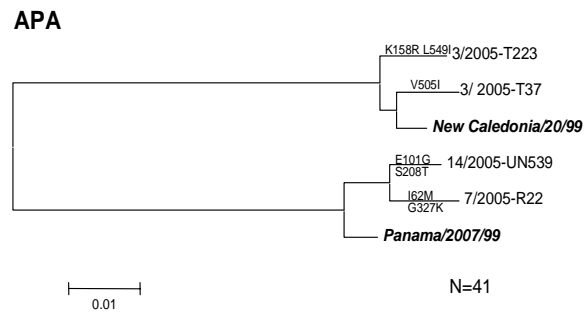


(a)



(b)

圖三、A 型流感病毒基因序列演化分析。圖(a)為 M1 gene 演化分析圖，圖(b)為 M2 gene 演化分析圖。所有的序列均以 Phylo-mlogo 軟體進行 grouping 之後，選出代表分離株以 Neighbor-Joining method 進行分析，Bootstrap 值 =500。



圖四、A 型流感病毒 PA 基因序列演化分析。所有的序列均以 Phylo-mlogo 軟體進行 grouping 之後，選出代表分離株以 Neighbor-Joining method 進行分析，Bootstrap 值=500。