

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-133113

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫

計畫名稱：流感病毒監測與新型流感病毒特性分析

全 程 研 究 報 告

執行單位：疾病管制署

計畫主持人：劉銘燦

研究人員：楊季融、黃騰永

執行期間：104 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

二、目錄：包括目次、圖次、表次、附錄。

頁數

封面

第 1 頁

目錄

第 2 頁

摘要

第 3 頁

本文

前言

第 5 頁

材料與方法

第 7 頁

結果

第 8 頁

討論

第 12 頁

計畫重要研究成果及具體建議

第 14 頁

參考文獻

第 16 頁

圖、表

第 18 頁

三、摘要

關鍵詞：流感病毒；抗原性；抗藥性；基因序列；病毒適應性

流感病毒是一經呼吸道傳染之病原體，每年在全球各地造成區域性的流行，而新型病毒出現則可能引起大流行。抗病毒藥物與流感疫苗，為目前防治流感的主要方法，但流感病毒具高突變性，每年可能產生抗原飄移變異株且也可能產生抗藥性之病毒，故持續監測流感病毒抗原性、抗藥性、基因變化與新型流感的出現，對流感防治是重要且必需的。世界衛生組織(WHO)聯合世界各國流感監測實驗室，形成全球流感監測與應變系統(GISRS, Global Influenza Surveillance and Response System)，GISRS 嚴密監測流感病毒演化與提供實驗室檢驗、疫苗、抗藥性與風險評估等建議。WHO 依照每年病毒監測資料，建議更新流感疫苗的組成。不同亞型的禽流感病毒(如 H5N1, H6N1, H7N9, H9N2, H10N8 等)感染人類的案例出現，讓人憂心這些病毒是否會進一步突變，造成全球大流行。為了監測台灣流感病毒的流行情形與針對發現的新型流感病毒進行特性分析，本計畫擬持續監測每年台灣流感病毒株的變化，應用各種方法分析比較每年分離流感病毒株的特性，包括抗原性，抗藥性與基因序列的變化，並且挑選台灣流行的流感病毒株進行雪貂免疫，免疫後得到的血清，將使用於分析台灣流感病毒抗原的變化，並比較台灣流感病毒流行株與疫苗株之差異。每週產出監測資料，可即時應用於流感防治策略的調整。長期累積的監測資料，有助於建立台灣流感病毒演化的模式。零星感染人類的新型流感病毒，尚無有效地人傳人能力，但當這些病毒進一步突變時，可能有潛能造成大流行。本計畫將進行新型流感病毒特性分析，包括全基因序列分析、重要位點突變、接受器特性與哺乳動物感染，這些病毒的特性對新型流感的風險評估與的防疫非常重要。

Abstract

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

Influenza virus is a highly contagious respiratory virus and cause regional epidemic annually in many countries. A newly emerging novel influenza virus possible causes an influenza pandemic. Both antiviral agents and influenza vaccines are the major measures to control influenza. Due to high mutation rate of influenza virus, antigenic-drifted and antiviral resistant variants may occur in every each. Therefore, it is important and required for influenza control to continue monitoring the changes of genes, antigenicity and antiviral resistance. WHO and influenza Laboratories in various countries comprise Global Influenza Surveillance and Response System, GISRS, which monitors the evolution of influenza viruses and provides recommendations in areas including laboratory diagnostics, vaccines, antiviral susceptibility and risk assessment. WHO updates and recommends the composition of influenza vaccines twice every year based on the data of influenza surveillance. Different subtypes of avian influenza viruses, such as H5N1, H6N1, H7N9, H9N2, H10N8 were detected to infect humans and it is concerned that these viruses mutate further and develop to cause pandemic. In order to monitor the seasonal influenza viruses in Taiwan and characterize the newly detected novel influenza viruses, we intend to investigate the changes of influenza viruses in Taiwan by analysis of antigenicity, antiviral resistance and gene sequences. We will select the predominant and/or low reactor strains of influenza viruses in Taiwan for immunization of ferrets. We also use the obtained ferret sera to test the antigenicity of circulating viruses and to compare the antigenicity between vaccine strains. The weekly surveillance data are applied to adjust the strategies of influenza control and accumulated long-term data will help to establish the evolution pattern of influenza viruses in Taiwan. Novel influenza viruses cause sporadically human infection and have not obtained the ability of human to human transmission yet. Those viruses potentially cause a pandemic if they acquire further mutations. In this study, we will carry out the characteristic analysis of novel influenza viruses, including full-genomic sequencing, important residue signatures, receptor specificity and the infection in mammals. It is very important for risk assessment and influenza control to understand these characteristics of novel influenza viruses.

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 10-14 個蛋白質[16, 25]。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) 為病毒主要的表面抗原，可引發中和抗體。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[16]。流感病毒可分 A, B, C 三亞型，A 型流感病毒可再分次亞型，HA 的次亞型有 18 種 (H1 至 H18) 與 NA 有 11 種 (N1 至 N11) [8, 21, 22, 25]，H1-H16 以及 N1-N9 亞型病毒可感染禽類，H17N10 與 H18N11 為存在蝙蝠的亞型[21, 25]，人類則較易受到 H1, H2 及 H3 亞型的感染[16]。H5, H6, H7, H9 及 H10 亞型也有零星人類案例[6, 9, 18, 24]，但仍無法有效人與人之間傳播。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[3, 16, 17]。1997 年以來 H5N1 病毒感染人類案例持續出現，2013 年在中國大陸爆發 H7N9 感染案例[9]，H5N1 與 H7N9 兩亞型病毒持續改變，具引起大流行之潛能，需密切注意。流感病毒基因具有高突變的特性，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[16, 17]，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，且當新型病毒出現，大部分人類族群對新型病毒皆無免疫力時，易進而造成全球性的大流行。

世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 估計全球每年流感侵襲率在兒童約 20-30%、成年人約 5-10%，流感主要導致嬰兒、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 [2, 4, 5]。而抗藥性病毒產生，將衝擊抗病毒藥物在防治流感上的應用。流感病毒監測主要目的，在於即時瞭解流行病毒的特性、流行時間、感染者族群，病毒的特性包含病毒的亞型(A 型或 B 型)、A 型次亞型(H1、H3 或新型病毒)、基因突變等。流感病毒傳播快速，需全球性監測，才能及早發現新病毒出現。

WHO 為了使疫苗株與流行株符合，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與應變系統(GISRS, Global Influenza Surveillance and Response System)監測資料，而監測資料來源與疫苗施打期約相差 8-10 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[1, 7]。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[11, 12, 14]。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% [27]。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[13]，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。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。2013 年台灣發現第一例 H6N1 感染人類案例，此 H6N1 病毒與流行於台灣家禽間的 H6N1 病毒具高度同源性，推測可能透過禽類不同 clade H6N1 病毒基因重配 (inter-clade reassortment)產生[24]。2013-2017 年大陸經歷 5 波 H7N9 感染人類疫情，台灣也發現 5 名境外移入 H7N9 感染個案，這 H7N9 病毒亦來自不同禽類病毒基因重配產生。這些感染人類的新型流感病毒，若這些病毒繼續演進而具人傳人的能

力，將會引起大流行，故進一步了解這些新型流感病毒的特性，將是流感大流行準備工作不可或缺的一環。

為持續加強流感病毒的全面監測，本計畫進行 (1)持續監測台灣流感病毒基因序列變化；(2) 使用雪貂抗血清，監測台灣流感病毒抗原變化與抗原漂移病毒之產生，並比較流感病毒流行株與分離株之差異。(3) 使用基因定序與酵素檢測分析流感病毒之抗藥性。(4) 挑選主要流行株與/或低反應株(low reactor)，提供合作團隊感染雪貂之抗原病毒。(5) 監測與分離感染人類之新型流感病毒。本計畫的進行，將有助於台灣流感病毒資料之建立與蒐集，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，採取適當防治措施，避免無謂的損失及民眾恐慌。

(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 [20]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 2003-2017 年台灣疾病管制署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%CO₂ 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 μl 的 PBS 溶液，於第一列加入 100 μl 的病毒抗原原液，negative control 行則以 100 μl PBS 取代抗原。
- b. 取第一列的抗原 50 μl 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 50 μl 加入第三列，如此序列稀釋至第八列，抗原呈現 2 倍~128 倍稀釋。
- c. 每孔分別加入 50 μl 的天竺鼠紅血球 (0.75%)，以手輕微搖晃孔盤後，之後以膠膜封住孔盤，置於室溫或 4°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 μl 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 μl 的 PBS 溶液。於第一列加入 50 μl 的各標準病毒株的標準抗血清，negative control 行則以 25 μl PBS 取代抗血清。取第一列的抗體 25 μl 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 25 μl 加入第三列，如此序列稀釋至第八列。抗血清呈現 2 倍~128 倍稀釋。抗血清須經 RDE 處理以去除非專一性凝集。
- b. 分別加入 25 μl (8 HA unit/50 μl) 的待測抗原及標準抗原，以手輕微搖晃孔盤後，置於室溫下反應 10—15 分鐘。
- c. 加入以 PBS 稀釋的 0.75% 的天竺鼠紅血球 50 μl /well，之後以膠膜封住孔盤，至於室溫或 4°C 下靜置 30—60 分鐘，之後記錄抗血清價位結果。

(3)結果

2015-2017年台灣社區流感監測資料顯示，2015年1-4月主要流行病毒為H3N2；5-8月B型流感與H3N2病毒同時流行，8月後流感病毒低度流行，主要分離病毒為H3N2(圖一)；2016年1-2月主要流行病毒為H1N1pdm09；3-7月為B型流感，8月後流行病毒為

H3N2(圖一)；從2016年8月起至2017年10月主要流行病毒為H3N2，10月流感流行低，而B型流感比例上升。

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，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。2015年H1N1pdm09病毒為源自clade 11的clade 11.2，2016年 H1N1pdm09 分成clade 11.3與11.4，2017年病毒為clade 11.3 與2016年病毒相似，HA親源樹狀圖如圖二，各變異株流行之消長如圖三。若比較2009年早期之病毒，近期流行 HA基因已有位於抗原相關位點之改變，如K180Q(Sa)、S202T (Sb) 、V169T (近Sb) 、S179N(近Sa) (圖二)。

台灣 2015-2016年爆發H1N1pdm09流行，疫情比2009年與2010-2011 H1N1pdm09流行嚴重，為了瞭解造成此波疫情之病毒clade 11.3與11.4其結合sialic acid 是否有差異，利用glycan-array測試其結合sialic acid的種類，結果發現clade 11.3與11.4 與H1N1pdm09 prototype A/California/7/2009 相似(圖四)。

A型H1N1pdm09自從2009年感染人類引起大流行後，感染人類主要為青少年(7-23歲)，2010-2011年第三波流行時，感染年紀轉至青壯年(24-49歲)，後續2013, 2014年感染族群與第三波類似為青壯年(24-49歲)，2015-2016年感染族群轉至0-6歲幼兒(圖五)。

2015年A型H3N2流感病毒與2014年3C.2a與3C.3a相似，2015年1月出現3C.3b，各clades 病毒HA胺基酸主要位點變化3C.2a為N144S, F159Y, K160T, N225D, 3C.3a為A138S, F159S, N225D, 3C.3b為K83R, N122D, L157S, Q197H, R261Q (圖六)。利用雪貂之抗血清，分析3C.2a與3C.3a的抗原性，其與2014-2015疫苗株A/Texas/50/2012之抗原性已不同(HI titer相差大於8倍)(表一)，2015-2016年A/Switzerland/9715293/2013屬於3C.3a，此病毒台灣2015年3月後已很少流行，主要流行株為3C. 2a (圖七)，相似病毒A/Hong Kong/4801/2014 2015年9月被WHO建議為2016年南半球的疫苗株(圖六)，各變異株之親源樹狀圖與流行消長如圖七。2016年8月起，臺灣以A型流感H3N2為主要流行病毒。流行季初期疫情幅度緩和，經分析病毒HA基因序列，其可分成3C.2a.1、3C.2a.2以及3C.3a.3等三個演化群(圖六)。然而，自2017年5月起，H3N2病毒的流行迅速上升，導致受感染之個案數大幅增加。此外，新基因型病毒株亦同步出現，包括演化群3C.2a.3a以及3C.2a.4(圖六)，且部分病毒帶有可能影響抗原性的胺基酸突變，胺基酸主要位點變化

3C.2a.1 有N171K, N121K, K92R, T135K 3C.2a.2有T131K, R142K, 3C.2a.3有N121K, S144K, 3C.2a.4有 R142G, S144R, I192T, Q197H (圖五)。分析2016-2017年流感季所分離的130株病毒, 85.4% (111/130)的抗原性與當季疫苗株相似; 與疫苗株抗原性偏差的病毒隨機分布於各演化群, 比例介於5.7% (clade 3C.2a.1)~ 30.7% (clade 3C.2a.2)之間(表二)。進一步比較感染各特定演化群H3N2病毒, 是否接種2016-2017流感疫苗, 結果顯示無顯著相關(表三)。這些結果顯示, 臺灣 2016-2017年不同clade的病毒, 並未明顯演化成為新的抗原飄移族群。

B型流感病毒在2011-2012年台灣造成一波流行後, 2012 -2017 B型流感流行之幅度較小 (圖八)。2015年分析152株B型流感病毒中Victoria lineage 13株(8.5%), Yamagata lineage 139株(91.5%), 8月Victoria lineage 所佔比約50%外, 其他月份仍以Yamagata lineage為主 (圖八)。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, 2015-2016 建議之疫苗株; TW-03: B/Florida/4/2006 WHO 2008-2009 建議之北半球疫苗株。2016年分析237 株B型流感病毒中Victoria lineage 134株(60%), Yamagata lineage 94株(40%), 2-7月Victoria lineage 所佔比約比Yamagata lineage多, 10月後B型流感病毒分離數少, Victoria lineage 佔多數(圖八)。2016年B型流感Yamatage lineage 屬於TW-02 clade, 病毒HA增加N131K, L187Q, K313E, E327K變化(圖九)。2017年分析162 株B型流感病毒中19株(12%) 屬於Victoria lineage, 143株(88%) 屬於Yamagata lineage, 2月起Yamagata lineage 所佔比約超過Victoria lineage (圖八), 流行病毒lineage改變可能與疫苗使用有關, 因2016-2017 與2017-2018 使用3價疫苗的B型成分為B/Brisbane/60/2008 屬於Victoria lineage。2016年B型流感Yamatage lineage 屬於 clade 3, 病毒HA增加 L187Q, M266V 變化(圖九)。B型流感Victoria lineage屬於 1A, 病毒HA增加 I132V, N144D 變化(圖十)。

2014-2017年台灣流感病毒抗原分析如表四。2014-2015, 2015-2016, 2016-2017 各分析45, 278, 37 株A型(H1N1)pdm09, 其抗原性與疫苗株A/California/7/2009 (H1N1) 相似, 僅2015-2016 有7株(2.5%) 低反應株(表四)。2014-2015, 2015-2016, 2016-2017各分析157, 31, 353 株A型H3N2, 2014-2015年疫苗株A/Texas/50/2012比較有87株(55%)呈低反

應株，2015-2016年分析31株與2015-2016年疫苗株A/Switzerland/9715293/2013相似，無低反應株。2016-2017年分析353株與2016-2017年疫苗株A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)，有87株(55%)呈低反應株(表四)。2014-2015, 2015-2016, 2016-2017各分析10, 124, 18株B型Vicotria lineage，其抗原性與疫苗株B/Brisbane/60/2008相似，無低反應株。2014-2015, 2015-2016, 2016-2017各分析135, 87, 97株B型Yamagata，2014-2015年與2014-2015疫苗株B/Massachusetts/2/2012 比較有800株(59.3%)呈低反應株，2015-2016, 2016-2017與疫苗株B/Phuket/3073/2013相似，無低反應株。

2014-2017年，發現3株H1N1pdm09具oseltamivir抗藥性與2株B型流感具R150K突變可導致 oseltamivir 抗藥性(表四)。

2015年檢驗通報新型A型流感與其他禽畜業者流感監測個案240例，未發現新型流感病毒。2016年檢驗通報新型A型流感與其他禽畜業者流感監測個案22例，未發現新型流感病毒。2017年檢驗通報新型A型流感與其他禽畜業者流感監測個案173例，發現1例H7N9感染個案。

建立流感特性分析平台—流感病毒適應哺乳動物之重要基因位點突變資料資料庫，目前已收集131個病毒基因突變位點與流感病毒適應哺乳動物相關(圖十一)。

流感病毒HA結合接受器salic acid種類的改變，會造成流感病毒跨物種，2013年台灣發現第一例H6N1感染人類案例，此H6N1病毒已成為在地化廣泛存在台灣家禽中，自2000年後家禽雞分離之H6N1病毒具G228S突變，此位點突變影響HA結合接受器salic acid種類，後續又有P186L突變(圖十二)，為了瞭解這些突變對流感病毒HA結合接受器salic acid的影響，我們構築H6N1 HA突變株5株，改變如下:S228G, T160A, L186P, Q226L, V190D-G225，並利用桿狀病毒表現系統(baculovirus expression system)進行蛋白表達，初步結果如圖十三，以H6N1多株抗體及anti-His tag抗體進行西方墨點分析的結果顯示，帶有H6N1 HA基因的Baculovirus可於Sf9細胞成功組裝，感染High five細胞後可使該細胞表現H6N1流感病毒HA蛋白，型式為未經切割的HA0(約66KD)與切割後的HA1(約39KD)、HA2(約27KD)，該蛋白可利用管柱成功純化。後續將使用glycan array測試突變株結合接受器salic acid的情形。

新型流感病毒特性分析:分析本年境外移入H7N9流感病毒基因序列，NA有R292K變異位點，病毒對oseltamivir有抗藥性；在HA1-HA2切位新增3個鹼性胺基酸(表五)，可能使H7N9在禽類的病原性提高，推測這一株病毒已經在大陸禽類流傳多代；另外

NS1 蛋白的 C 端增加 20 個胺基酸為細胞 PDZ 結合區，可能會影響病毒的致病性(表五、圖十四)。另影響跨物種感染人類之重要基因位點仍具突變(表五)，對人類感染的潛能需密切監測。

(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，委託預防醫學研究所進行雪貂免疫。經由此合作模式，我們可精確掌握每年台灣流行之流感病毒之基因序列與抗原變化之情形。

2014 年，H3N2 出現抗原漂移的流行株 clade 3C.2a 和 3C.3a 在全球廣泛傳播流行，導致 2014-2015 北半球疫苗不吻合，2015 年南半球季節疫苗株更新為 3C.3a A/Switzerland/9715293/2013。在台灣，3C.2a 和 3C.3a 病毒在 2014 年 5 月超過其他 clade H3N2 病毒，但流行幅度低，2015 - 2016 年 clade 3C.2a 持續流行。在 2016 - 2017 年，病毒繼續分化為多個 clades (3C.2a.1, 3C.2a.2, 3C.2a.3 和 3C.2a.4) (圖五)。Clade 3C.2a.1 病毒於 2015 年 8 月開始出現。在 2016-2017 年流感季節，歐洲和世界其他地區的分支 3C.2a.1 病毒也占主導地位。台灣分別於 2016 年 8 月，2016 年 12 月及 2017 年 2 月於發現 3C.2a.2 (HA 具 T131K-R142K 突變)，3C.2a.3 (HA 具 N121K-S144K 突變) 及 3C.2a.4 (HA 具 R142G-S144R-I192T-Q197H 突變) (圖六)。Clade 3C.2a.2, 3C.2a.3 在 2016-2017 以色列，丹麥和加拿大亦曾報告流行[10, 19, 23]，而 3C.2a.4 以前沒有報告，但根據 GISAID 資料庫在日本，孟加拉國，澳大利亞，泰國和美國有分離病毒株屬於 3C.2a.4。這些資料顯示，2016 - 2017 年流感季節期間 H3N2 病毒的多個 clades 的同時存在流行是一個全球性問題，且 H3N2 病毒持續快速且複雜演化中。

流感病毒 HA 突變的積累是病毒抗原性漂移的主要原因，這通常導致流感每年流行。

除了抗原漂移之外，HA 的突變還可以影響病毒的適性(fitness)並增加病毒傳播和致病性。HA 蛋白的醣化與病毒抗原性，適應性和/或致病性有關。Clade 3C.2a 及其衍生株中的一些 HA 突變導致潛在的糖基化位點的變化。進化枝 3C.2a 病毒的 A128T，N144S 和 K160T 突變與潛在醣化位點的消失 (N144S) 和獲得 (A128T 和 K160T) 相關。Clade 3C.2a H3N2 病毒中醣化位點的變化導致受體結合空間的急劇減少，這對避開預先存在的抗體可能是有利的。在台灣持續的病毒演化過程中，一些具 N171K 的 clade 3C.2a.1 病毒獲得了額外的 N121K，T135K 和/或 K92R 突變 (圖六)。全球其他地區也發現了相同的突變。此外，在 2016-2017 年夏季疫情高峰期間，很大一部分 clade 3C.2a.3a 病毒迅速與 clade 3C.2a.1 病毒共同主導，並攜帶 N121K 和 T135K 突變。曾有報告指出 T135K 和 N121K 突變與疫苗失效有關[15, 23]，T135K 也可能導致醣化位點的消失。在希臘北部，在接種疫苗的患者中，分離病毒屬於 clade 3C.2a.1 的病毒且具 T135K 突變，致使疫苗效果降低。在台灣的資料，T135K 和 N121K 突變都沒有顯著影響 clade 3C.2a.1 和 3C.2a.3a 病毒的抗原性 (表二)。此外，不同 clade 病毒和感染者的接種史之間沒有顯著關係 (表三)，所以，這兩個突變對病毒的影響需進一步研究。Clade 3C.2a 及其衍生病毒不斷出現突變，對接種疫苗保護作用的影響，提高病毒的適性(fitness)，可能導致嚴重的疫情。持續加強監測，以瞭解這些新出現的變異株的抗原性和適性(fitness)的變化。

B 型流感 2016-2017 年從 2015-2016 年 B/Phuket/3073/2013(Yamagata)更新為 Victoria lineage B/Brisbane/60/2008，頻繁更換疫苗株表示全球流感病毒變化快速，易造成疫苗株與流行株不吻合，降低疫苗的效果。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，2003-2017 年 17 個流感季有 7 次不吻合(50%)，如何克服與改善情況是一大難題。

2017 年 B 型流感疫情低，可能原因為經歷 2011-2012 年 B 型流感病毒(主要流行病毒為 Yamagata, TW-01 clade, B/Massachusetts/2/2012-like)大規模流行後，大多數人可能已有抗體。2015 年 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，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[26]。2017

年2月B型流感由原 Victoria lineage 佔多數轉變為 Yamagta lineage，10月B型流感分離比例漸上升(圖八)，雖流行低且分離數目少，但流行B型流感病毒屬於 Yamagta lineage，與2017-2018年使用的三價疫苗中B型流感病毒不吻合，可能會影響疫苗的效果。

2013年3月中國發現第一例A型H7N9人感染病例以來，已出現了五波流行。分析病毒8段基因序列，發現了經由與不同H9N2病毒reassortment 產生的多種H7N9病毒基因型，第二和第三波中的H7N9基因型比第一波中的H7N9基因型更加多樣化，這是由於第二次波中發生的新的reassortment。然而，在第四和第五波H7N9基因型的數目顯著減少。第五波病毒出現HA1/HA2切割位點增加三個鹼性胺基酸(RKR)，造成H7N9病毒在禽類由低病原(LPAI)轉變為高病原(HPAI)，在雪貂動物實驗中，發現其致病力提高。2017年境外移入分離的H7N9病毒，其NA蛋白具R292K的胺基酸突變，導致對克流感具抗藥性，NS1的C端增加20個胺基酸，為PDZ 結合區域，可能也會影響病毒的致病力。目前H7N9病毒經基因突變或與其他病毒基因片段交換(reassortment)，造成病毒持續改變，需密切監測病毒變化，尤其其跨物種造成人與人傳播的潛能變化。

(5)結論與建議

1. 2017年H3N2病毒多個 clades 同時流行，雖然尚無明顯抗原偏移病毒株出現，但2018年南半球疫苗株已更新為clade 3C.2a.1 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016，多個 clades 同時流行的情形，將使疫苗株的挑選難度增加，易造成疫苗株與流行株不吻合，影響疫苗效果。
3. 挑選不同clade H3N2病毒 A/Taiwan/87966/2017 (3C.2a.3), A/Taiwan/77789/2017 (3C.2a.2), A/Taiwan/78583/2017(3C.2a.3a)感染雪貂，國防醫學預醫所已完成製備抗血清。
4. 首先公布高致病 H7N9 病毒序列，引起 WHO 重視 H7N9 病毒改變議題。

(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. 2017年台灣流行之A型流感病毒與2017-2018年使用疫苗株相似，B型流感病毒2

月起 Yamagata lineage 佔多數與 3 價疫苗不吻合。發現 2 株 B 型流感之抗藥性病毒，目前疫苗與抗病毒藥物皆仍為有效之防治策略。

3. 2017 年台灣發現首例人類感染高病原 H7N9 境外移入個案，大陸 2017 年爆發的第 5 波 H7N9 疫情，感染人數與區域皆超過前 4 波，應密切注意後續疫情與病毒的變化。

5. 2017 年台灣禽場仍有 H5N2, H5N3, H5N8, H5N6 流感病毒。故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. 論文：

1. J.R. Yang, M.T. Liu, Human infection caused by an avian influenza A (H7N9) virus with a polybasic cleavage site in Taiwan, 2017, J Formos Med Assoc 116 (2017) 210-212.

2. J.R. Yang, S.Z. Hsu, C.Y. Kuo, H.Y. Huang, T.-Y. Huang, H.-C. Wang and M-T. Liu, an epidemic surge of influenza A(H3N2) virus at the end of the 2016-2017 season in Taiwan with an increased viral genetic heterogeneity, J Clin Virol (2017) submitted.

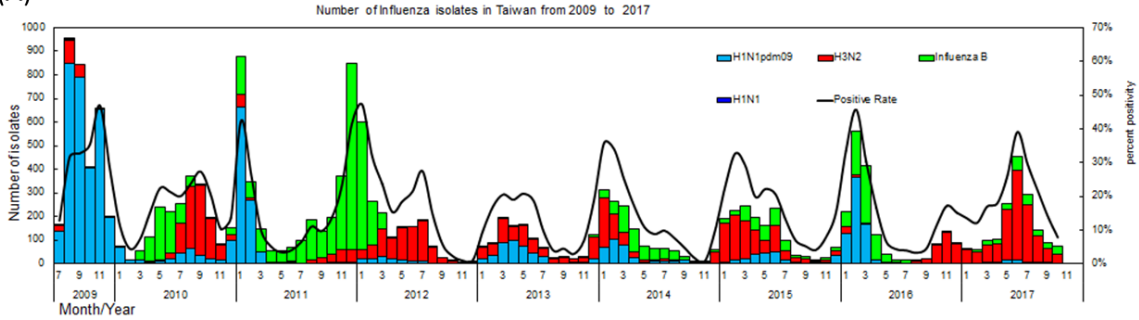
(7) 參考文獻：請依台灣醫誌編排方式

1. 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.
2. Carrat F, and Flahault A: Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* 2007; 25:6852-6862.
3. CDC: Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58:467-470.
4. CDC: Update: influenza activity--United States, 2003-04 season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004; 53:284-287.
5. 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.
6. Chen H, Yuan H, Gao R, Zhang J, Wang D, Xiong Y, Fan G, Yang F, Li X, Zhou J, Zou S, Yang L, Chen T, Dong L, Bo H, Zhao X, Zhang Y, Lan Y, Bai T, Dong J, Li Q, Wang S, Zhang Y, Li H, Gong T, Shi Y, Ni X, Li J, Zhou J, Fan J, Wu J, Zhou X, Hu M, Wan J, Yang W, Li D, Wu G, Feng Z, Gao GF, Wang Y, Jin Q, Liu M, and Shu Y: Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet* 2014; 383:714-721.
7. 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.
8. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, and Osterhaus AD: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005; 79:2814-2822.
9. Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, Chen J, Jie Z, Qiu H, Xu K, Xu X, Lu H, Zhu W, Gao Z, Xiang N, Shen Y, He Z, Gu Y, Zhang Z, Yang Y, Zhao X, Zhou L, Li X, Zou S, Zhang Y, Li X, Yang L, Guo J, Dong J, Li Q, Dong L, Zhu Y, Bai T, Wang S, Hao P, Yang W, Zhang Y, Han J, Yu H, Li D, Gao GF, Wu G, Wang Y, Yuan Z, and Shu Y: Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med* 2013; 368:1888-1897.
10. Glatman-Freedman A, Drori Y, Beni SA, Friedman N, Pando R, Sefty H, Tal I, McCauley J, Rahav G, Keller N, Shohat T, Mendelson E, Hindiyeh M, and Mandelboim M: Genetic divergence of Influenza A(H3N2) amino acid substitutions mark the beginning of the 2016-2017 winter season in Israel. *J Clin Virol* 2017; 93:71-75.
11. 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.
12. 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.
13. Maher JA, and DeStefano J: The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab Anim (NY)* 2004; 33:50-53.

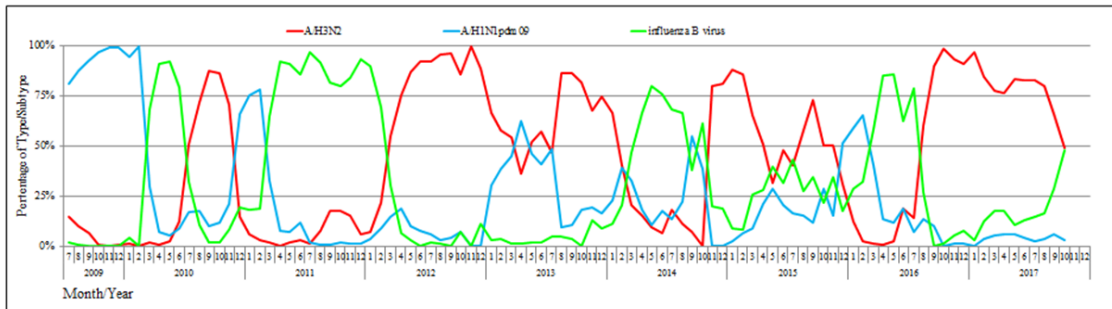
14. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van-der-Werf S, Schweiger B, Opp M, Paget J, van-de-Kasstele J, Hay A, and Zambon M: Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:552-560.
15. Melidou A, Gioula G, Exindari M, Ioannou E, Gkolfinopoulou K, Georgakopoulou T, Tsiodras S, and Papa A: Influenza A(H3N2) genetic variants in vaccinated patients in northern Greece. *J Clin Virol* 2017; 94:29-32.
16. Nelson MI, and Holmes EC: The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 2007; 8:196-205.
17. Nicholson KG, Wood JM, and Zambon M: Influenza. *Lancet* 2003; 362:1733-1745.
18. Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW, Orr WK, and Shortridge KF: Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 1999; 354:916-917.
19. Skowronski DM, Chambers C, Sabaiduc S, Dickinson JA, Winter AL, De Serres G, Drews SJ, Jassem A, Gubbay JB, Charest H, Balshaw R, Bastien N, Li Y, and Kraiden M: Interim estimates of 2016/17 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2), Canada, January 2017. *Euro Surveill* 2017; 22.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Trebbien R, Fischer TK, Krause TG, Nielsen L, Nielsen XC, Weinreich LS, Lis-Tonder J, Skov MN, Christiansen CB, and Emborg HD: Changes in genetically drifted H3N2 influenza A viruses and vaccine effectiveness in adults 65 years and older during the 2016/17 season in Denmark. *J Clin Virol* 2017; 94:1-7.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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)



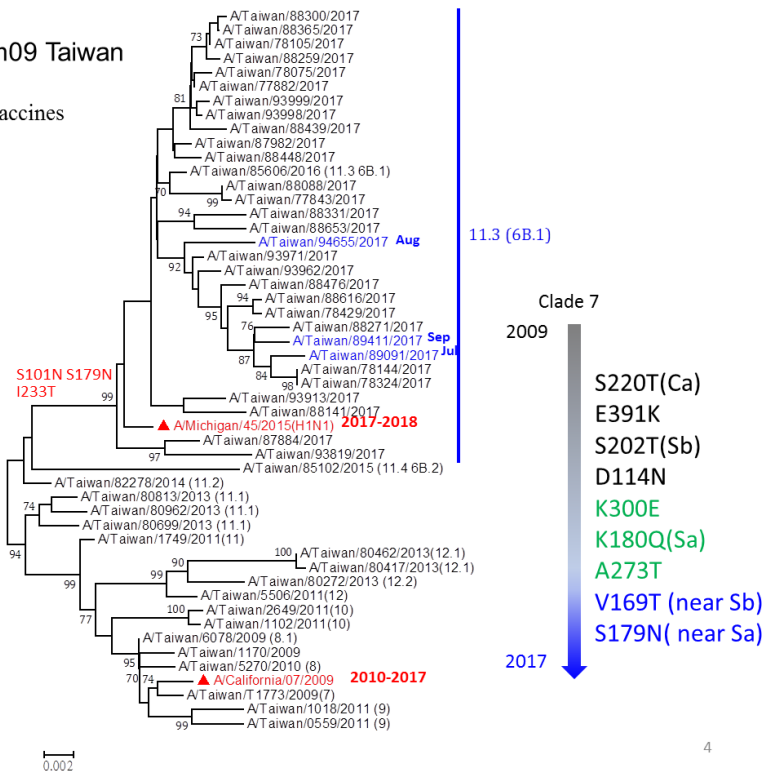
(B)



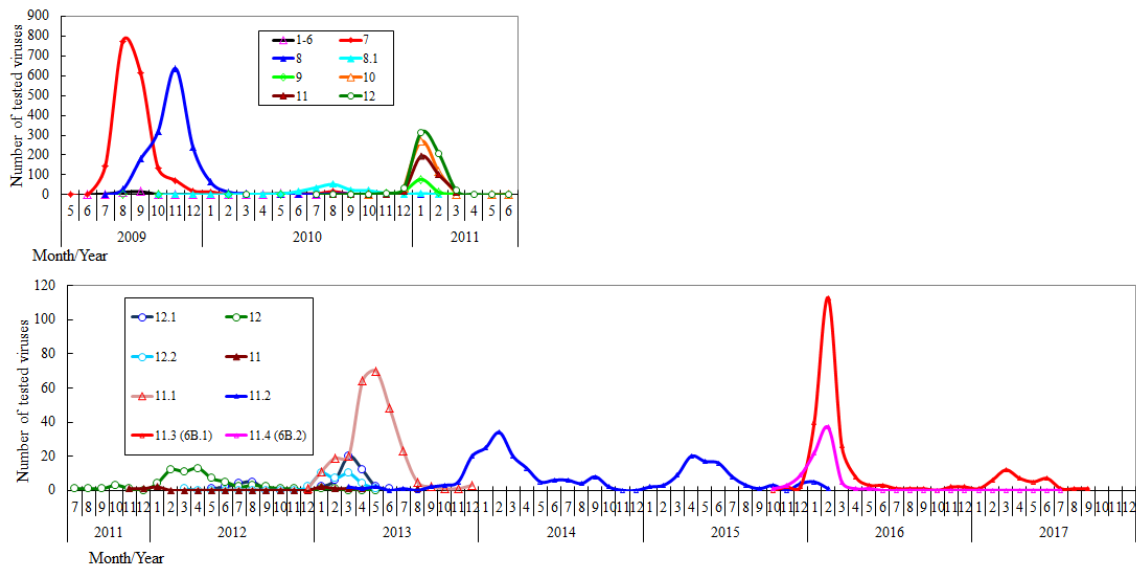
圖一、2009-2017 年台灣流感病毒各亞型與次亞型流行情形，每月病毒分離數(A)與各亞型與次亞型百分比(B)。2014-2015, 2015-2016, 2016-2017 年主要流行型為 H3N2, H1N1pdm09, H3N2 流感。

HA/H1N1pdm09 Taiwan

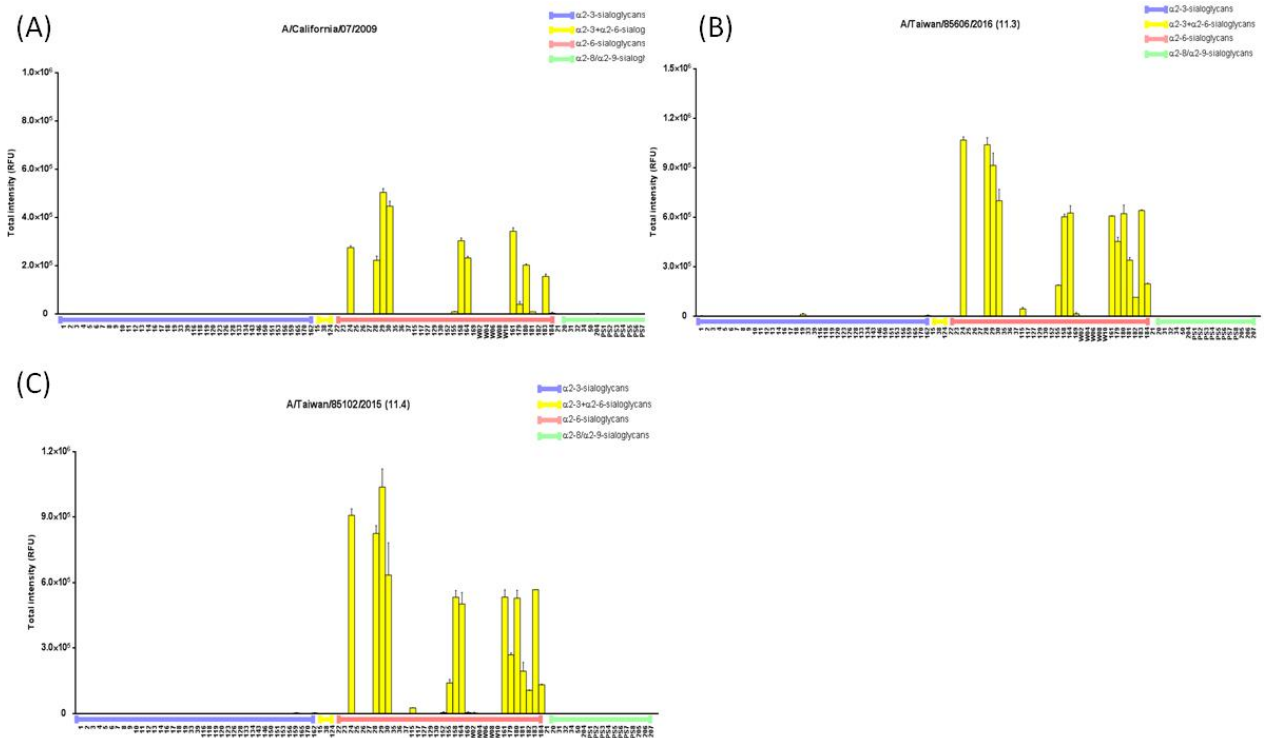
▲ WHO vaccines



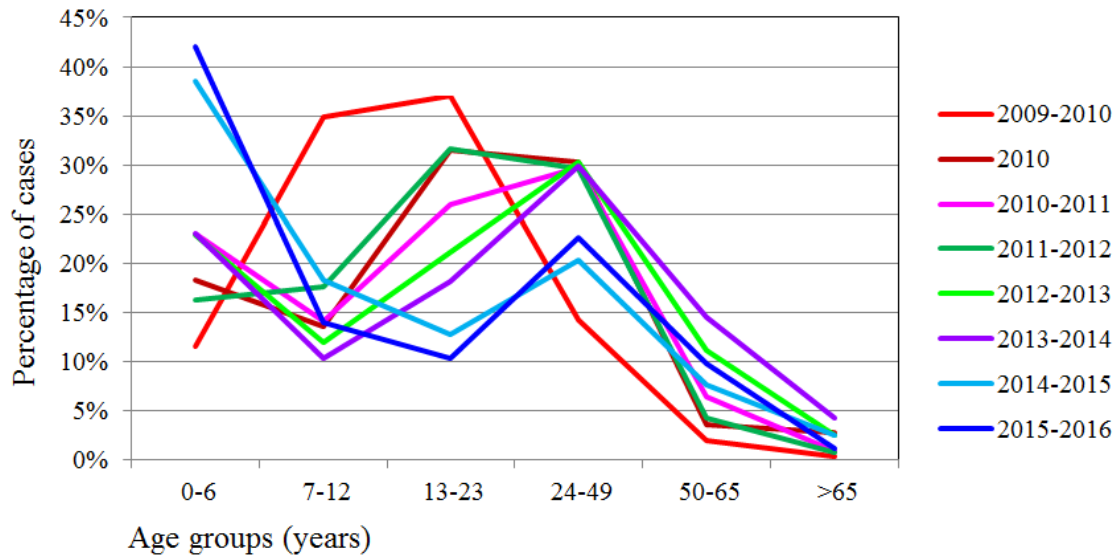
圖二、A 型 H1N1pdm09 流感病毒 HA 基因之親源樹狀圖。



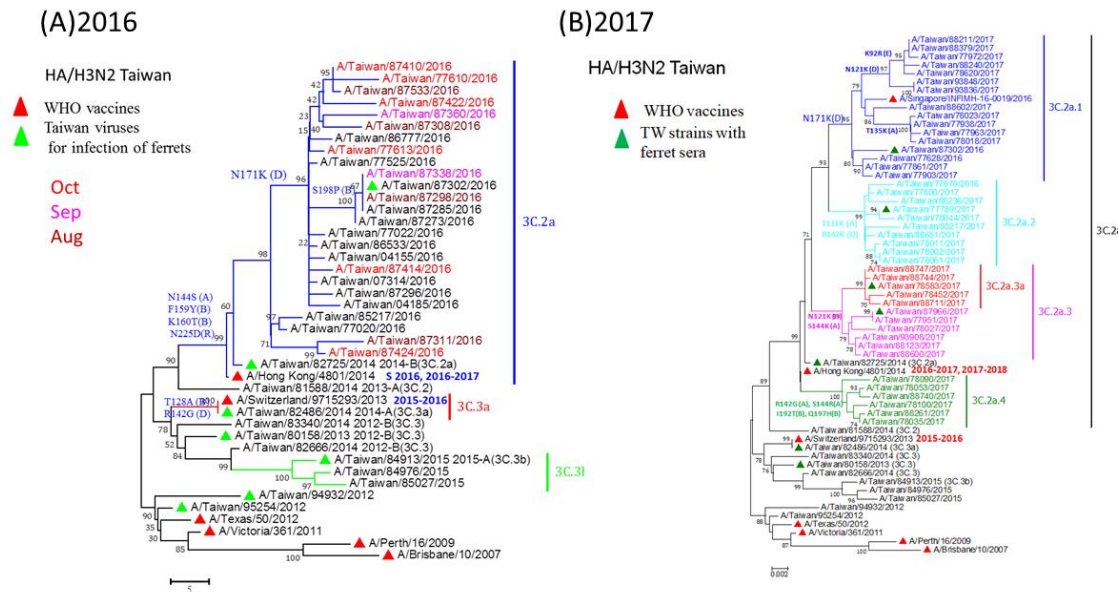
圖三、台灣 2009-2016 年台灣 A 型 H1N1pdm09 流感病毒不同 clade 之變化。2017 年主要之病毒為 Clade 11.3 (6B.1)



圖四、2016 年 H1N1pdm09 clade 11.3 與 11.4 結合 sialic acid 接受器的種類

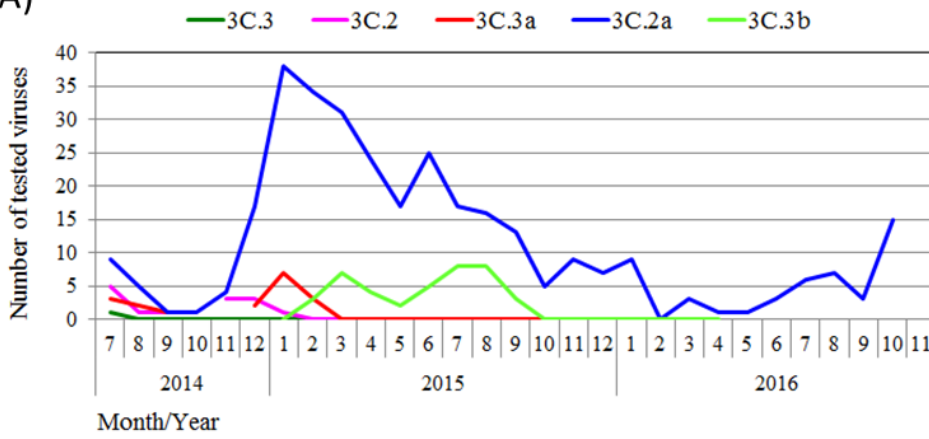


圖五、A 型 H1N1pdm09 流感病毒感染族群年紀之分布。

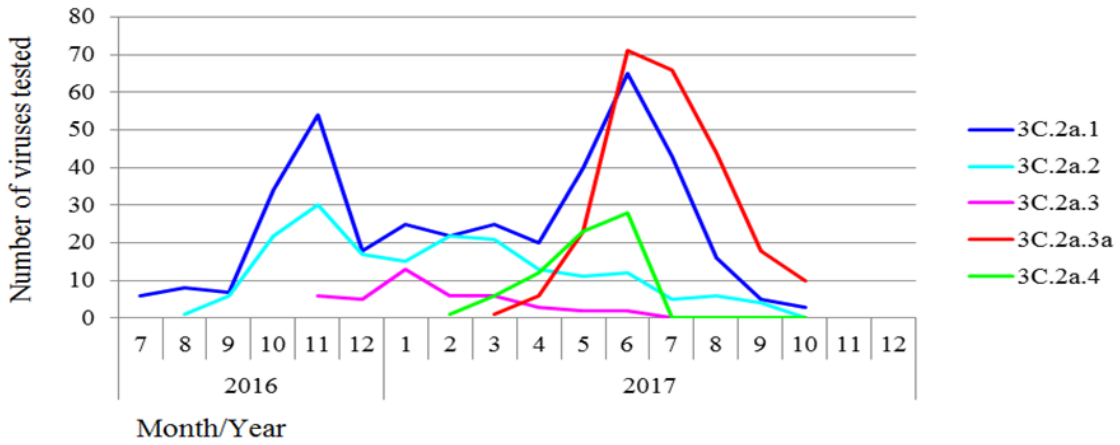


圖六、2016, 2017 年 A 型 H3N2 流感病毒 HA 基因之親源樹狀圖。

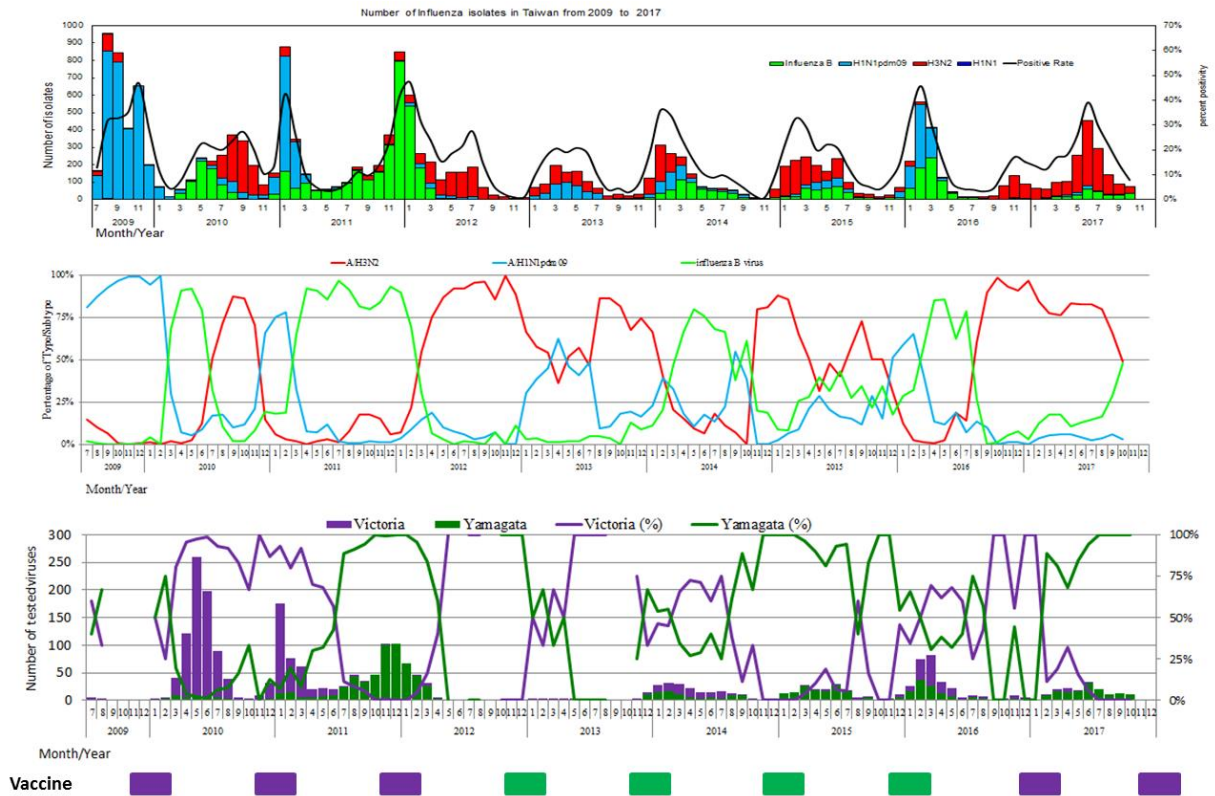
(A)



(B)



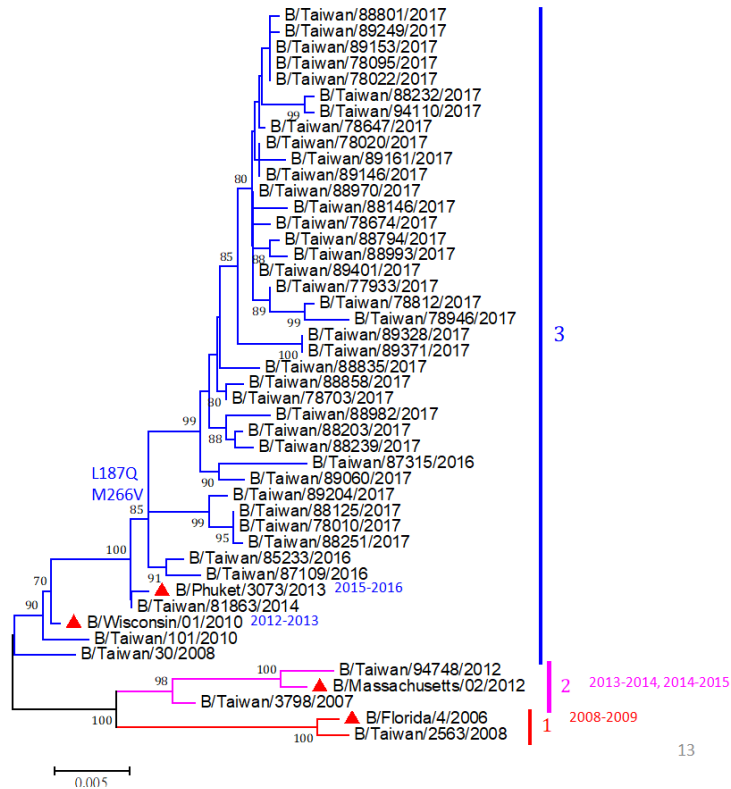
圖七、 台灣 2014-2017 年台灣 A 型 H3N2 流感病毒不同 clade 之變化。2016 年主要流行的病毒為 3C.2a.1，2017 年有多個 clades (3C.2a.1~4) 同時流行與。



圖八、台灣 2009-2017 年台灣 B 型流感病毒 Victoria 與 Yamagata lineage 分布情形，2015 年 B 型流感流行低，以 Yamagata lineage 佔多數，2016 年兩個 lineages 同時流行，2017 年 2 月 Yamagata lineage 分離比例超過 Victoria lineage，2016-2017 與 2017-2018 使用的疫苗株為 Victoria lineage B/Brisbane/60/2008。

HA/B Yamagata, Taiwan

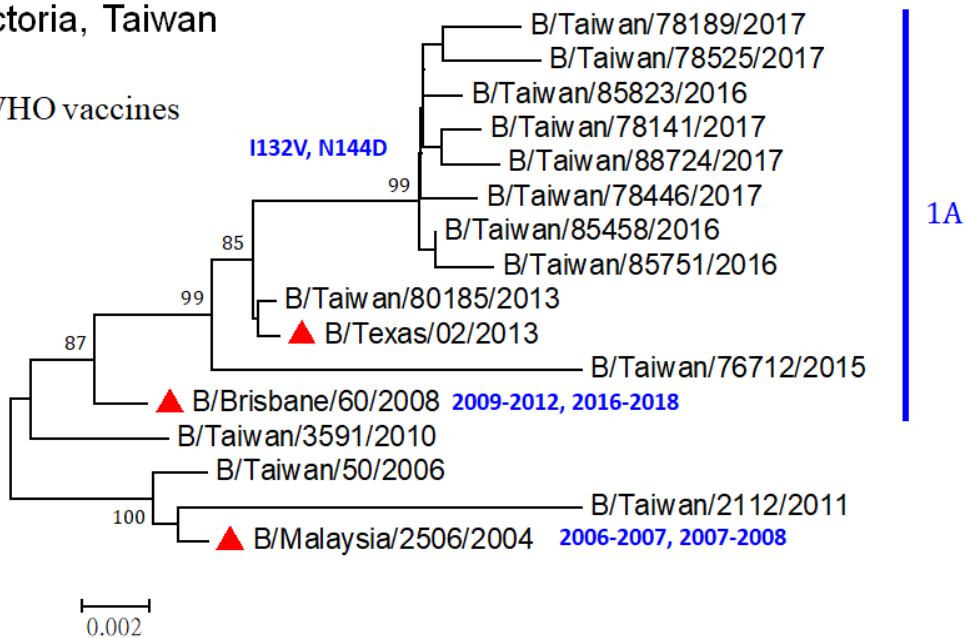
▲ WHO vaccines



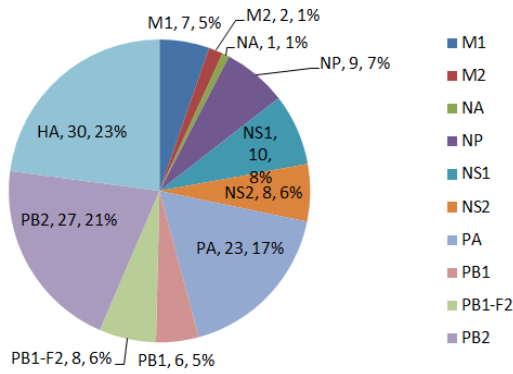
圖九、B 型 Yamagata 流感病毒 HA 基因之親源樹狀圖。

HA/B Victoria, Taiwan

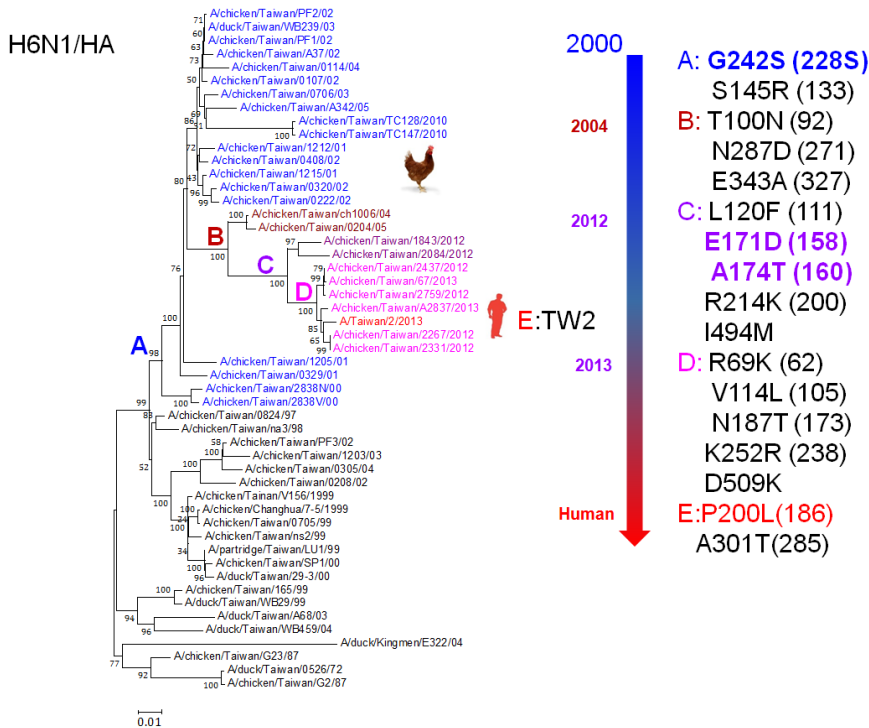
▲ WHO vaccines



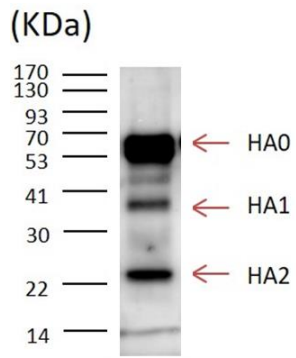
圖十、B 型 Victoria 流感病毒 HA 基因之親源樹狀圖。



圖十一、流感病毒適應哺乳動物之各基因位點突變資料庫。



圖十二、台灣流感病毒 H6N1 HA 基因之親源樹狀圖與重要位點改變情形。括號中號碼為對應 H3 之號碼。



1st: mouse anti-H6 polyclone 1:2000

2nd: anti mouse 1:5000

圖十三，桿狀病毒表現系統表現之 H6N1 HA 蛋白，以 H6N1 多株抗體抗體進行西方墨點分析的結果，未經切割的 HA0(約 66 KD)與與切割後的 HA1(約 39KD)、HA2(約 27KD)。

	name	Year	211-217-219	230	237
H3N2	A/Port Chalmers/1/1973(H3N2)	1973	GPPLTPKQKRKMARTARSKVRRDKMAD		
	A/Philippines/2/1982(H3N2)	1982	GPPLTPKQKRKMARTARSKVRRDKMAD		
	A/Bangkok/1/1979(H3N2)	1979	GPPLTPKQKRKMARTARSKVRRDKMAD		
	A/Leningrad/360/1986(H3N2)	1986	GPPLTPKQKRKMAGTARSKVRRDKMAD		
	A/Sichuan/2/1987(H3N2)	1987	GPPLTPKQKRKMARTARSKVRRDKMAD		
	A/Beijing/353/1989(H3N2)	1989	GPPLTPKQKRKMARTARSKV		
	A/Beijing/32/1992(H3N2)	1992	GPPLTPKQKRKMARTARSKV		
	A/Shandong/9/1993(H3N2)	1993	GPPLTPKQKRKMARTARSKV		
	A/Moscow/10/1999(H3N2)	1999	GPPLTPKQKRKMARTARSKV		
	A/Fujian/411/2002(H3N2)	2002	GPPLTPKQKRKMARTARSKV		
	A/Wellington/01/2004(H3N2)	2004	GPPLTPKQKRKMARTARSKV		
	A/Wisconsin/67/2005(H3N2)	2005	GPPLTPKQKRKMARTARSKV		
	A/Brisbane/10/2007(H3N2)	2007	GPPLTPKQKREMARTARSKV		
	A/Texas/50/2012(H3N2)	2013	GPPLTPKQKREMARTARSEV		
H1N1	A/USSR/90/1977(H1N1)	1977	RPPLTPKQKRKMARTIRSEVRRNKMAD		
	A/Brazil/11/1978(H1N1)	1978	RPPLTPKQKRKMARTIRSEVRRNKMAD		
	A/Chile/1/1983(H1N1)	1983	RPPLTPKQKRKMARAIRSEVRRNKMAD		
	A/Singapore/6/1986(H1N1)	1986	RPPLTPKQKRKMAGTIRSEVRRNKMAD		
	A/Beijing/262/1995(H1N1)	1995	GPFFTPTQKRKMAGTIRSEV		
	A/New Caledonia/20/1999(H1N1)	1999	GPFFTPTQKRKMAGTIRSEV		
	A/Brisbane/59/2007(H1N1)	2007	GPFFTPTQKRKMAGTTRSEV		
	A/California/07/2009(H1N1)	2009	RPSLPPEQK		
H7N9	A/Shanghai/1/2013	2013	RSPLSTK		
	A/Anhui/1/2013	2013	RSPLSTK		
	A/Taiwan/1/2013	2013	RSPLSTK		
	A/Taiwan/3/2013	2013	RSSLSTK		
	A/Taiwan/1/2014	2014	RSPLSTK		
	A/Taiwan/2/2014	2014	RSPLSTK		
	A/Taiwan/1/21017	2017	RPPLSPKKEWEMERTIKPEVRRNKMVD		
	A/Guangdong/17SF003/2016	2016	GSPLSTK		
	A/Guangdong/17SF006/2017	2017	RSPLSTK		
	A/Qingyuan/GIRD1/2017	2017	RSPLSTK		

圖十四、A 型流感 H3N2, H1N1, H7N9 病毒 NS1 蛋白 C 端長短的變化

表一、A 型 H3N2 流感病毒的血球凝集抑制測試反應。

Antigens referenced	Date	clade	Ferret sera				
			TW/94932	TW/95254	TW/80158	TW/82486	TW/82725
A/Tawian/94932/2012	2012/5/3	3C	2560	2560	2560	2560	2560
A/Taiwan/95254/2012	2012/8/30	3C	2560	2560	2560	1280	2560
A/Taiwan/80158/2013	2013/2/18	3C.3	1280	2560	1280	320	320
A/Taiwan/82486/2014	2014/2/21	3C.3a	160	320	160	320	160
A/Taiwan/82725/2014	2014/3/3	3C.2a	320	640	640	320	640
Antigens tested							
A/Taiwan/84432/2015	2015/4/18	3C.2a	640	640	640	160	640
A/Taiwan/76377/2015	2015/5/14	3C.3a	80	160	160	320	80
A/Taiwan/84434/2015	2015/4/18	3C.3b	320	640	640	160	160
A/Taiwan/90296/2015	2015/2/20	3C.3b	2560	1280	1280	320	640
A/Taiwan/84857/2015	2015/7/3	3C.2a	-	320	320	40	320
A/Taiwan/84913/2015	2015/7/17	3C.3b	-	640	1280	320	640
A/Taiwan/84956/2015	2015/8/8	3C.3b	-	640	320	160	640
A/Taiwan/84970/2015	2015/8/15	3C.2a	-	320	160	80	320
A/Taiwan/84976/2015	2015/8/22	3C.3b	-	320	320	160	640
A/Taiwan/85003/2015	2015/9/8	3C.2a	-	160	320	80	320

表二.不同 clades H3N2 流感病毒之抗原性

Fold reduction	Virus evolutionary clades (%)						Statistical significance
	3C.2a1	3C.2a2	3C.2a3	3C.2a.3a	3C.2a4	Total	
≥8	3 (5.7)	8 (30.7)	1 (11.1)	3 (16.7)	4 (16.7)	19 (14.6)	
2~4	35 (66.0)	12 (46.2)	2 (22.2)	10 (55.5)	15 (62.5)	74 (56.9)	<i>p</i> =0.036
≤1	15 (28.3)	6 (23.1)	6 (66.7)	5 (27.8)	5 (20.8)	37 (28.5)	
Total	53	26	9	18	24	130	

*The fold reduction was calculated based on that against the A/Taiwan/82725/2013 as the homologous titer.

表三.不同 clades H3N2 流感病毒感染個案是否施打疫苗之關聯性

Virus clade	Vaccination of 2016-2017 seasonal TIV (%)			Statistical significance
	Yes	No/Unknown	total	
3C.2a1	37 (42.5)	35 (40.3)	72 (41.4)	<i>p</i> =0.38
3C.2a2	17 (19.5)	15 (17.2)	32 (18.4)	
3C.3a3	5 (5.8)	2 (2.3)	7 (4.0)	
3C.2a.3a	15 (17.3)	15 (17.2)	30 (17.2)	
3C.2a4	13 (14.9)	20 (23.0)	33 (19.0)	
Total	87	87	174	

表四、2014-2017 年台灣流感病毒抗原性與抗藥性分析，流行株之抗原性與疫苗株 A/California/7/2009 (H1N1) (2014-2017), A/Texas/50/2012 (H3N2)(2014-2015), A/Switzerland/971593/2013 (2015-2016), A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) (2016-2017), B/Brisbane/60/2008 (cell cultured- propagated) (2014-2017), B/Massachusetts/2/2012 (2014-2015), B/Phuket/3073/2013(2015-2016, 2016-2017) 比較，HI tier 相差 8 倍以上為低反應株(low reactor, LR)。

Antigenicity and Drug resistance of Influenza viruses in Taiwan, 2014-2018

Time (Week)	Antigenicity								Oseltamivir susceptibility					
	pandemic H1N1		H3N2		FluB (Vic)		FluB (Yam)		pandemic H1N1		H3N2		FluB	
	Tested No.	Low reactor (%)	Tested No.	Low reactor (%)	Tested No.	Low reactor (%)	Tested No.	Low reactor (%)	Tested No.	Resistant	Tested No.	Resistant	Tested No.	Resistant
W40/2014-39/2015	45	0	157	87 (55%)	10	0	135	80 (59.3%)	67	1	172	0	50	0
W40/2015-39/2016	278	7 (2.5%)	31	0	124	0	87	0	101	2	48	0	108	0
W40/2016-39/2017	37	0	353	31 (8.8%)	18	0	97	0	38	0	292	0	126	2
W40/2017-W51/2017	11	0	26	2	0	0	54	8 (14.8%)	12	0	41	0	55	0

表五、H7N9 (A/Taiwan/1/2017) 流感病毒胺基酸位點突變特性分析

Protein	Position	Mutations		A/Taiwan/1/2017	Functions
PB2	627	E	K	K	Replication ability
	701	D	N	D	Nuclear Import
	702	K	R	K	Species-associated signature positions
PB1	368	I	V	V	Increased transmission in ferret
PB1-F2	66	N	S	N	Induction of apoptosis
	87-90 a.a in length			90 a.a	Increased pathogenicity in mice
PA	100	V	A	A	Species-associated signature positions
	336	L	M	L	Increased polymerase activity in mice
	356	K	R	R	Species-associated signature positions
	409	S	N	N	Species-associated signature positions
HA (H3 numbering)	Cleavage site	Single basic aa	Multiple basic aa	PEVP <u>KRKR</u> TARGL	high pathogenesis in poultry
	138	S	A	A	Increased binding to human-type influenza receptor
	160	T	A	A	
	186	G	V	V	
	226	Q	L	Q	
	228	G	S	G	
NA (N2 numbering)	119	E	V	E	Oseltamivir resistance
	222	I	L	I	Oseltamivir resistance
	292	R	K	K	Resistance to oseltamivir and zanamivir
NS1	42	P	S	S	Increased pathogenesis in mice
	92	D	E	D	Altered virulence in mice
	205	N	S	S	Altered antiviral response in host
	210	G	R	G	
	C-terminal in length		217 a.a		237 a.a.