

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-122113

衛生福利部疾病管制署 108 年署內科技研究計畫

計畫名稱：流感病毒病原體監測與人類免疫後抗體對流行病毒反應分析

年度研究報告

執行單位：疾病管制署

計畫主持人：劉銘燦

研究人員：楊季融

執行期間：108 年 1 月 1 日至 108 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 9 頁
討論	第 11 頁
計畫重要研究成果及具體建議	第 13 頁
參考文獻	第 14 頁
圖、表	第 16 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。在台灣 2019 年 1-3 月主要流行的病毒為 A 型 H1N1pdm09，4-6 月 B 型 Victoria 成為主要的型別，7 月後主要的型別又轉換為 A 型 H1N1pdm09。抗原性分析顯示 A 型 H1N1pdm09 與 2018-2019 北半球疫苗株 A/Michigan/45/2015 (H1N1) 相似；A 型流感 H3N2 病毒可分為數個 clades，87.6% (113/129) 分離病毒抗原性與疫苗株 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 抗原性相近；B 型流感主要 Victoria lineages，抗原性與疫苗株 B/Colorado/06/2017 差異大，80.9% (89/110) B 型 Victoria lineage 為疫苗低反應株。至於病毒基因序列的變化，2019 年流行的 A 型 H3N2 病毒屬於 3C.2a 群，可再細分成 clade 3C.2a.1, 1a, 1b, 2, 3，clade 3C.2a.1 HA 的變異點為 N171K，後續又增加 N121K, K92R, T135K, R142G, H311Q；3C.2a.2 的變異點為 T131K, R142K；3C.2a.3 的變異點為 S144K, S219Y。台灣 2019 年 2 月起流行病毒主要是 clade 3C.2a.1b。2019 年台灣分離的 H1N1pdm09 屬於 6B1A 183P-5 群，增加 N146D, T202I, N277D 突變。

2019 年 1-10 月抗藥性病毒檢測，H1N1pdm09 305 株、H3N2 167 株，B 型流感 182 株，發現 4 株(1.3%) H1N1pdm09，1 株(0.6%) H3N2 oseltamivir 抗藥性病毒株。

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，將使得疫苗與藥物效果降低，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需要的。

## **Abstract**

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

Influenza virus is a highly contagious respiratory virus and causes regional epidemic annually in the global. A newly emerging novel influenza virus possible causes an influenza pandemic. In 2019, influenza A H1N1pdm09 virus circulated predominantly from January to March. Influenza B Victoria lineage virus became the dominant subtype virus after April. The influenza A H1N1pdm09 virus became predominant virus again after July. The antigenic analysis revealed that the influenza A(H1N1)pdm09 viruses were antigenically similar to A/Michigan/45/2015 (H1N1), the vaccine strain recommended for use in the 2018-2019. The circulating influenza A(H3N2) viruses were divided into several clades and 87.6% (113/129) of isolates were antigenically similar to A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016, vaccine strain of 2018-2019. 89 of 110 (80.9%) tested influenza B Victoria lineage viruses were antigenically distinct from vaccine strains, B/Colorado/06/2017. Regarding the genetic changes, all circulating H3N2 viruses belonged to clade 3C.2a and were divided into several clades (3C.2a.1, 1a, 1b, 2, 3) with the substitutions of HA proteins, N171K in clade 3C.2a.1, with additional N121K, K92R, T135K substitutions, T131K, R142K in clade 3C.2a.2, S144K, S219Y in clade 3C.2a.3. The proportion of clade 3C.2a.1b viruses increased from February, 2019 and circulated predominantly. The isolated H1N1pdm09 viruses belonged to clade 6B-1A 183P-5 with additional N146D, T202I, N277D substitutions

In Taiwan, 4 of 305 A(H1N1)pdm09 viruses, 1 of 167 H3N2 and 0 of 182 influenza B viruses were resistant to oseltamivir from January to October 2019.

The high mutation rate of influenza viruses and occurrence of antigenic drift and antiviral resistant variants impacted the effect of antivirals and vaccines. Therefore, it is important and required for influenza control to continue monitoring the changes of genes, antigenicity and antiviral resistance and 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[1,2]。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[1]。流感病毒可分 A, B, C, D 四亞型，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) [2-5]，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[2,4]，人類則較易受到 H1, H2 及 H3 亞型的感染[1]。H5, H6, H7, H9 及 H10 亞型也有零星人類案例[6-9]，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 [1,10,11]。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[7]，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[1,11]，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 [12-14]。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[15,16]。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 [17-19]。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% [20]。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[21]，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[9]。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變化、抗原變化與抗藥性之產生。(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) 分析人類免疫後抗體對疫苗株與流行病毒株的反應差異，瞭解流行病毒與疫苗株差異對流感疫情高低的影響，並探討以人類血清與雪貂血清對於流感病毒抗原性分析的可能差異。本計畫的進行可即時供流感病毒監測資料，作為調整流感防疫策略依據與參考，強化流感防治。

## (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 2003-2019 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%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。

5. 人類血清檢體之採集及處理：將採集 50-100 位成人血液檢體，於 107 年 10 月後施打流感疫苗前，有意願參與本計畫者，填寫同意書並同時採集血液檢體(第一次)，疫苗施打後 2 週，採集第二次血液檢體，疫苗施打後 6 個月，採集第三次血液檢體，血液檢體採集後，進行血清分離，待測血清置於 -20 度冰箱中保存。血清的前處理，以 1:3 的待測血清與 RDE (receptor destroy enzyme, 日本生研公司) 混合後，37  $^{\circ}\text{C}$  作用 16-20 小時，以 56  $^{\circ}\text{C}$  作用 30 分鐘以去除 RDE 的作用。分別使用疫苗株與流行病毒株，進行血球凝集抑制試驗 (HI)，分析人類免疫後抗體對疫苗株與流行病毒株的反應差異，瞭解流行病毒與疫苗株



差異對流感疫情高低的影響，並探討以人類血清與雪貂血清對於流感病毒抗原性分析的可能差異。

### (3)結果

2019年台灣社區流感監測資料顯示，2018-2019年流感季台灣主要流行的流感病毒為A/H1N1pdm09，2018年12月至2019年3月A/H1N1pdm09為主要流行株，2019年4月後B型Victoria lineage 增加，比例超過A/H1N1pdm09，7月後A/H1N1pdm09比例超過B型Victoria lineage (圖一)，A/H1N1pdm09 自2009年爆發流行後，接續在台灣2009-2010, 2010-2011, 2015-2016, 2018-2019 4個流感季造成疫情。

台灣2009-2019年10個流感季，其中4次主要流行病毒為H1N1pdm09，4次主要流行病H3N2，2次為B型Yamagata lineage (圖一、圖二)，分析主要流行病毒替換取代模式，發現3次H1N1pdm09 (2010-2011, 2015-2016, 2018-2019)主要流行病毒變化皆發生在12月(圖二)，接續流行的病毒為B型Victoria lineage；H3N2與B型則較不固定。

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 clade 11 H1N1pdm09 衍生 clade 11.3 (6B.1)與11.4(6B.2)，2017-2018年病毒為 clade 11.3 (6B.1)，變化較少，2018-2019年病毒為 6B.1衍生的6B.1A，6B.1A 可再細分183P-1~183P-7。HA親源樹狀圖如圖三，2019年兩波H1N1pdm09流行的病毒屬於6B.1A 183P-5，2017-2019年各變異株流行之消長如圖四。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, T202I (Sb) 、V169T (近Sb) 、S179N(近Sa) 、S91R(Cb)、S181T( Sa) 、S200P (near Sb) (圖三)。2017-2019 HA胺基酸時序動態變化如圖五，近期變化在N146D, T202I與N277D。分析502株A/H1N1pdm09病毒抗原性、其中12株(2.4%)為疫苗低反應株，其餘抗原性與2018-2019疫苗株A/Michigan/45/2015 (H1N1)相似。

台灣流行的A/H3N2 病毒在2017年分成clade 3C.2a.1, 2, 3, 3a, 4，2017年6-7月台灣H3N2流行病毒主要是clade 3C.2a.1, 3C.2a.3a，2018年3-4月H3N2流行病毒主要是clade 3C.2a.2，2019年2月後又轉變成3C.2a.1b，HA親源樹狀圖如圖六，各變異株流行之消長

如圖七。分析129株A/H3N2病毒抗原性、其中18株(14%)為疫苗低反應株，其餘抗原性與2018-2019疫苗株A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)相似。2019-2020 WHO建議北半球疫苗株為A/Kansas/14/2017，屬於3C.3a，台灣2019年，只分離1株此clade 病毒。2017-2019 H3N2 HA胺基酸時序動態變化如圖八，近期改變為S219F。

台灣 2019 年 3 月起 B 型流感比例增加，主要為 Victoria lineage (圖九)， B/Victoria 病毒在 HA 有兩種變異株一種為疫苗株 B/Colorado/06/2017 具 2 個胺基酸 deletion(a.a. 162-163)，另一種為具 3 個胺基酸 deletion(a.a. 162-164)，HA 親源樹狀圖如圖十一，這 2 種病毒與無 deletion 病毒 HI 價位相差 8 倍以上，顯示抗原性有明顯差異，分析 110 株 B/Victoria 病毒抗原性、其中 89 株(80.9%)為疫苗 B/Colorado/06/2017 低反應株。2019 年 B 型 Yamagata lineage 屬於 clade 3，HA 親源樹狀圖如圖十，分析 7 株 B/Yamagata 病毒，皆與疫苗株 B/Phuket/3073/2013 相似。

2019年1-10月檢測H1N1pdm09 305株、H3N2 167株，B型流感182株，其中H1N1pdm09 4株、H3N2 1株具oseltamivir抗藥性。

分析人類免疫後與雪貂感染後之抗血清對疫苗株與流行病毒株的反應差異：  
108 年 31 位施打 2018-2019 年 3 價流感疫苗，疫苗施打後 14 天，測試疫苗免疫活性結果如下：對 A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B/Victoria, B/Yamagata GMT 分別增加 1.6, 1.3, 1.1, 1.1 倍；Seroconversion rate 分別為 12.9%, 0.0%, 3.2%, 0.0%；12.9；疫苗施打前 seroprotection rate 分別為 93.5%, 22.6%, 35.5%, 41.9%，疫苗施打後 seroprotection rate 分別為 96.8%, 51.6%, 45.2%, 45.2%。

A/H1N1pdm09:選取 10 位施打 2018-2019 年 3 價流感疫苗後，對 A/H1N1pdm09 抗體 4 倍上升者之抗血清，抗原病毒選擇為疫苗株 GP1908 與流行株 TW85606 (A/Michigan/45/2015-like)，流行株 subclade 183P-2, 183P-5, 183P-6 (圖三、表二)進行 HI 測試，結果顯示人類免疫後與雪貂感染後之抗血清對疫苗株與流行病毒株反應相似(表二)，使用人類與雪貂抗血清測試，對目前不同 clade A/H1N1pdm09 流行株其抗原性與疫苗株 A/Michigan/45/2015 相近。

B/Victoria:選取 6 位施打 2018-2019 年 3 價流感疫苗後，對 B/Victoria 抗體上升者之抗血清與 4 株病毒感染後之雪貂抗血清，抗原病毒選擇為 2017-2018 疫苗株 B/Brisbane/60/2008、流行株 TW80158(B/Brisbane/60/2008-like)、2018-2019, 2019-2020 季疫苗株 B/Colorado/06/2017 (2 個胺基酸 deletion)、流行株 TW70072 (3 個胺基酸

deletion)，(圖十一、表三)進行 HI 測試，結果顯示 6 個人類免疫後抗血清，有 2 個對 B/Brisbane/60/2008 與 TW80158 反應較差，而有 4 個對 TW70072 反應較差(表二)。相較於雪貂感染後之抗血清，感染 B/Brisbane/60/2008、TW80158、B/Colorado/06/2017 之抗血清對 3 個胺基酸 deletion TW70072 病毒反應差(HI 下降 8 倍以上)，而感染 TW70072 之抗血清對 B/Brisbane/60/2008、TW80158、B/Colorado/06/2017 HI 下降 8 倍，結果顯示此三類病毒抗原性已有差異，發生抗原飄移。

#### (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) (圖六、圖七)。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、圖七)。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[23-25]，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。Clade 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[25,26]，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。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。2019-2020 年 WHO 建議的 2019-2020 北半球 H3N2 疫苗株為 A/Kansas/14/2017，屬於 3C.3a，與目前台灣流行 3C.2a1b 抗原差異大，降低疫苗的效果。2019-2020 年 B/Victoria 疫苗株 B/Colorado/06/2017 疫苗株與台灣 2019 年流行 B/Victoria 病毒其 HA 具 3 個胺基酸 deletions(162-164)且 G133R and K136E 突變，造成與疫苗株 B/Colorado/06/2017 抗血清反應差，抗原飄移，影響降低疫苗的效果。

2019-2020 年使用的四價流感疫苗中，H3N2 與 B/Victoria 疫苗株與目前流行病毒不吻合，若主要流行病毒為 H3N2 或 B/Victoria 應調整防疫策略，加重抗病毒藥物使用，避免疫情擴大。台灣 2019 年目前流行流感病毒與 WHO 建議 2020 年南半球的疫苗 A/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09-like virus; A/South Australia/34/2019 (H3N2)-like virus; B/Washington/02/2019-like (B/Victoria lineage) virus; and B/Phuket/3073/2013-like (B/Yamagata lineage) virus 相似。

### (5) 結論與建議

1. 即時監測瞭解台灣流感病毒基因改變、抗藥性、抗原變化與抗原漂移病毒之產生，每週提供流感病毒抗原性與抗藥性資料，作為調整流感防疫策略依據。
2. 2019-2020 年使用的四價流感疫苗中，H3N2 與 B/Victoria 疫苗株與目前流行病毒不吻合，若主要流行病毒為 H3N2 或 B/Victoria 應調整防疫策略，加重抗病毒藥物使用，避免疫情擴大。
3. 分析人類免疫後抗體對疫苗株與流行病毒株的反應差異，瞭解流行病毒與疫苗株差異對流感疫情高低的影響，並探討以人類血清與雪貂血清對於流感病毒抗原性分析的可能差異。
4. 長期監測台灣流感病毒資料，建立台灣流感病毒流行與演化模式。
5. 論文：

Yang JR, Kuo CY, Huang HY, Hsu SZ, Wu FT, Wu FT, Li CH, Liu MT. 2019. Seasonal dynamics of influenza viruses and age distribution of infected individuals across nine seasons covering 2009-2018 in Taiwan. *J Formos Med Assoc* doi:10.1016/j.jfma.2019.08.030.

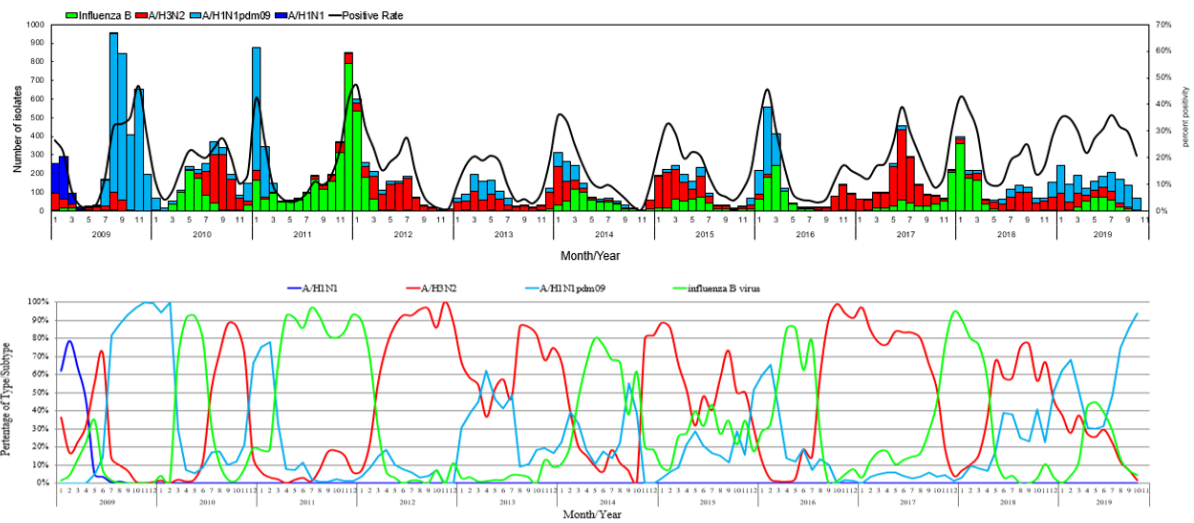
Chen HJ, Su CP, Liu MT, Tsou TP. 2019. Comparative Epidemiology of Influenza B by Lineage in Intensive Care Unit-Admitted Patients with Complications: A Nationwide Study in Taiwan, 2013-2017. *Int J Infect Dis* doi:10.1016/j.ijid.2019.07.017.

(7) 參考文獻：請依台灣醫誌編排方式

1. Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet.* 2007;8(3):196-205.
2. Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol.* 2014;22(4):183-191.
3. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol.* 2005;79(5):2814-2822.
4. Tong S, Li Y, Rivaller P, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(11):4269-4274.
5. Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003657.
6. Chen H, Yuan H, Gao R, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet.* 2014;383(9918):714-721.
7. Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med.* 2013;368(20):1888-1897.
8. Peiris M, Yuen KY, Leung CW, et al. Human infection with influenza H9N2. *Lancet.* 1999;354(9182):916-917.
9. Wei SH, Yang JR, Wu HS, et al. Human infection with avian influenza A H6N1 virus: an epidemiological analysis. *Lancet Respir Med.* 2013;1(10):771-778.
10. CDC. Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009;58(17):467-470.
11. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet.* 2003;362(9397):1733-1745.
12. Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine.* 2007;25(39-40):6852-6862.
13. CDC. Update: influenza activity--United States, 2003-04 season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004;53(13):284-287.
14. 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(14):423-430.
15. Bright RA, Medina MJ, Xu X, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet.* 2005;366(9492):1175-1181.
16. Deyde VM, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis.* 2007;196(2):249-257.
17. Hauge SH, Dudman S, Borgen K, Lackenby A, Hungnes O. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(2):155-162.
18. Hurt AC, Ernest J, Deng YM, et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Res.* 2009;83(1):90-93.
19. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, et al. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):552-560.
20. Yang JR, Lin YC, Huang YP, et al. Reassortment and mutations associated with emergence and spread of oseltamivir-resistant seasonal influenza A/H1N1 viruses in 2005-2009. *PLoS One.* 2011;6(3):e18177.
21. Maher JA, DeStefano J. The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab*

- animal*. 2004;33(9):50-53.
22. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28(10):2731-2739.
  23. Glatman-Freedman A, Drori Y, Beni SA, et al. 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.
  24. Skowronski DM, Chambers C, Sabaiduc S, et al. Interim estimates of 2016/17 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2), Canada, January 2017. *Euro Surveill*. 2017;22(6).
  25. Trebbien R, Fischer TK, Krause TG, et al. 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.
  26. Melidou A, Gioula G, Exindari M, et al. Influenza A(H3N2) genetic variants in vaccinated patients in northern Greece. *J Clin Virol*. 2017;94:29-32.

(8)圖、表



圖一、2009-2019 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)。2018 年 12 月至 2019 年 3 月主要流行為 A 型 H1N1pdm09，4-6 月為 B 型 Victoria，7 月後 A 型 H1N1pdm09 又成為主要流行株。

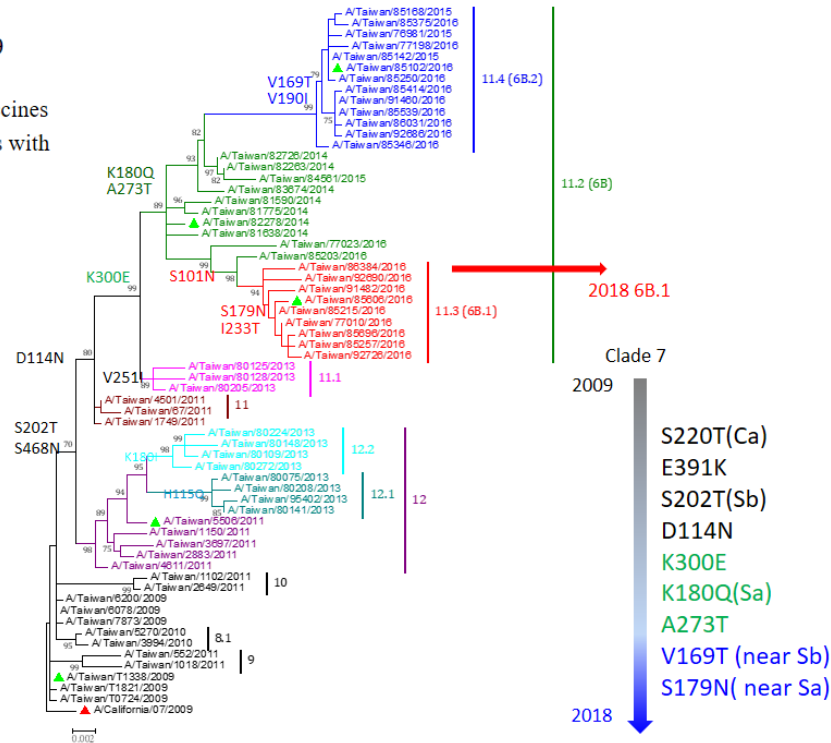


圖二、台灣 2009-2019 年 10 個流感季，主要流行病毒替換取代模式，發現 3 次 H1N1pdm09 (2010-2011, 2015-2016, 2018-2019) 主要流行病毒變化皆發生在 12 月，且後續皆為 B 型 Victoria 流行；H3N2 與 B 型則較不固定。



HA/H1N1pdm09

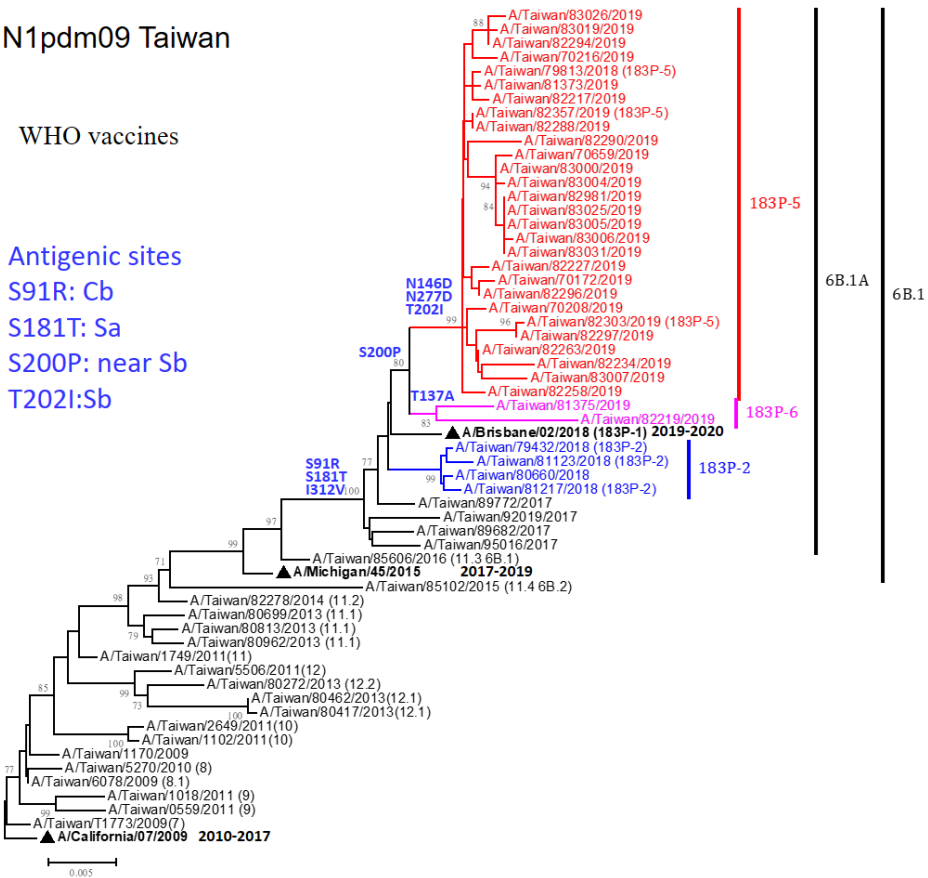
- ▲ WHO vaccines
- ▲ TW strains with ferret sera



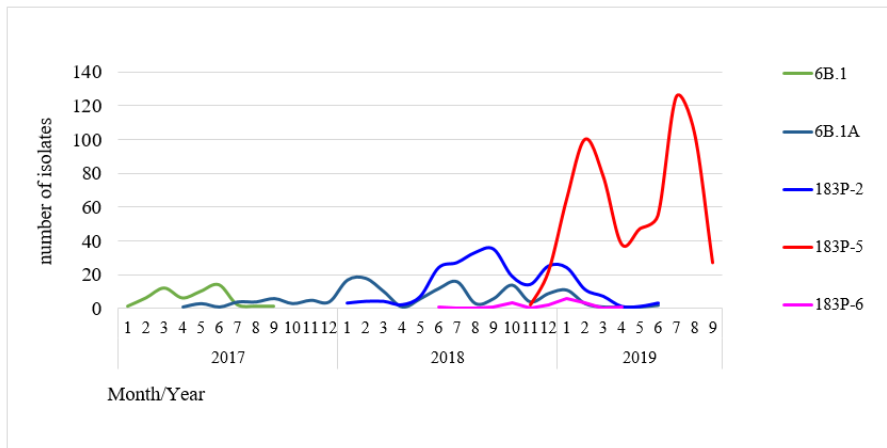
HA/H1N1pdm09 Taiwan

- ▲ WHO vaccines

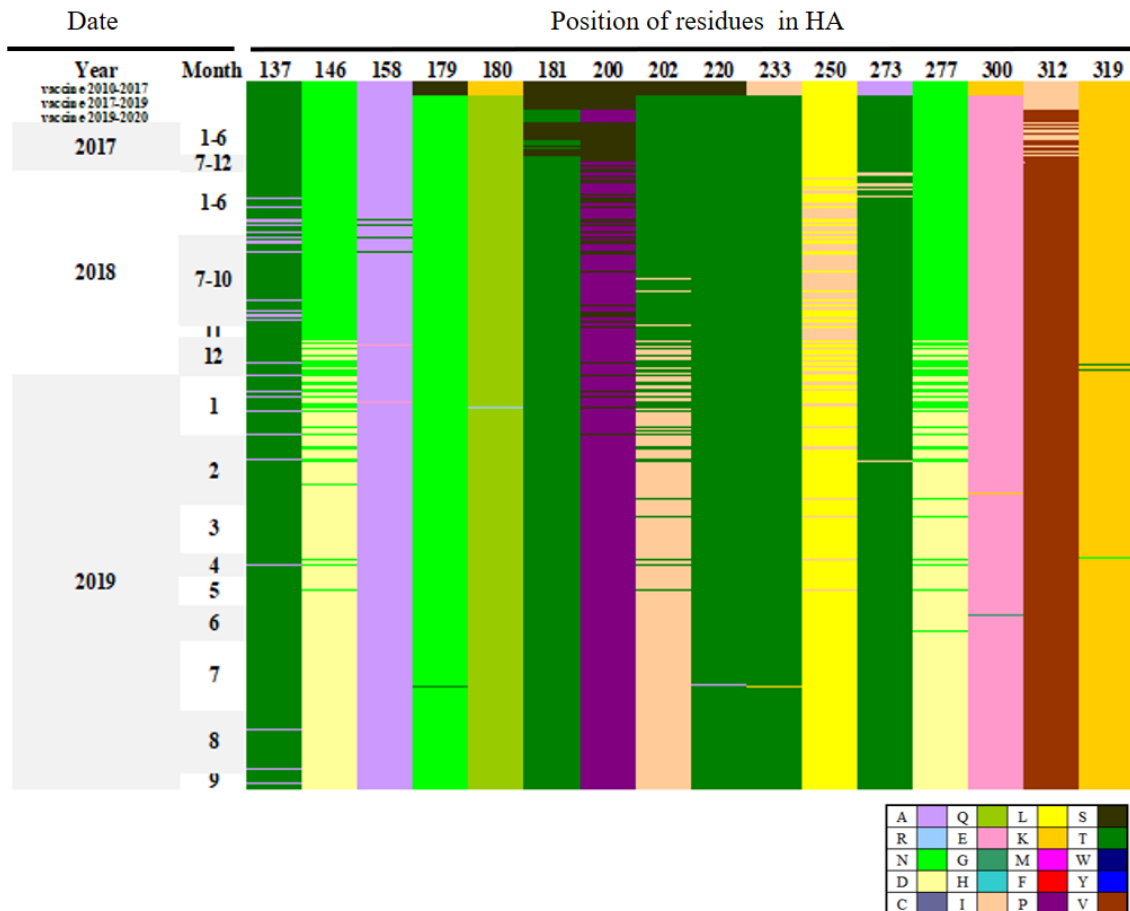
- Antigenic sites
- S91R: Cb
- S181T: Sa
- S200P: near Sb
- T202I:Sb



圖三、A 型 H1N1pdm09 流感病毒 HA 基因之親源樹狀圖。上圖 2009-2016 下圖為 2019 分離株。

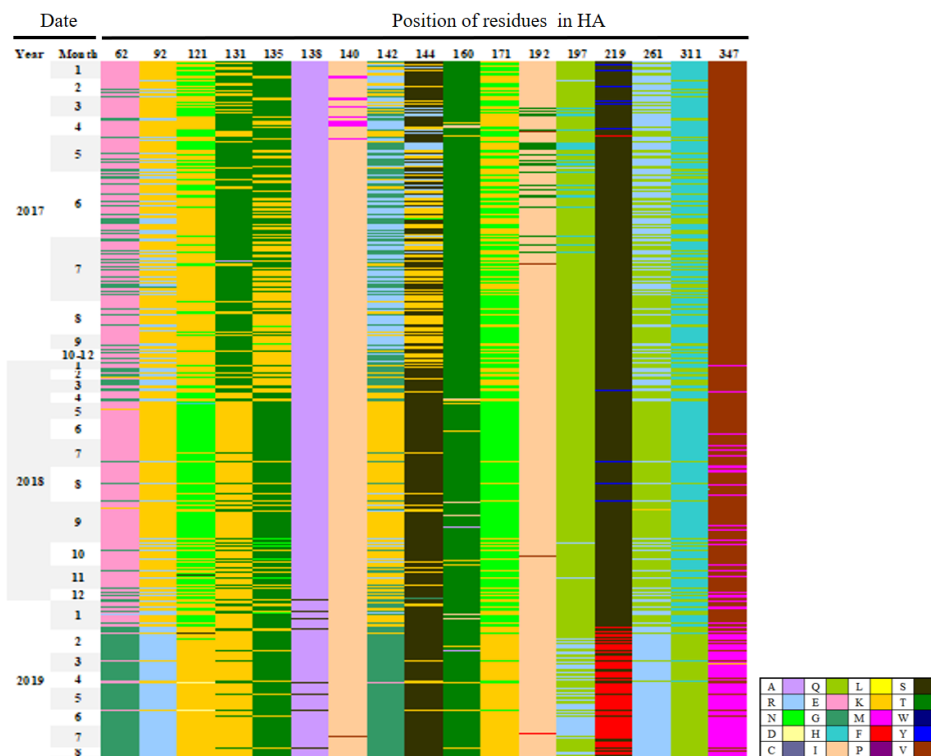


圖四、台灣 2017-2019 年台灣 A 型 H1N1pdm09 流感病毒不同 clade 之變化。2019 年主要之病毒為 6B.1A 183P-5 群。

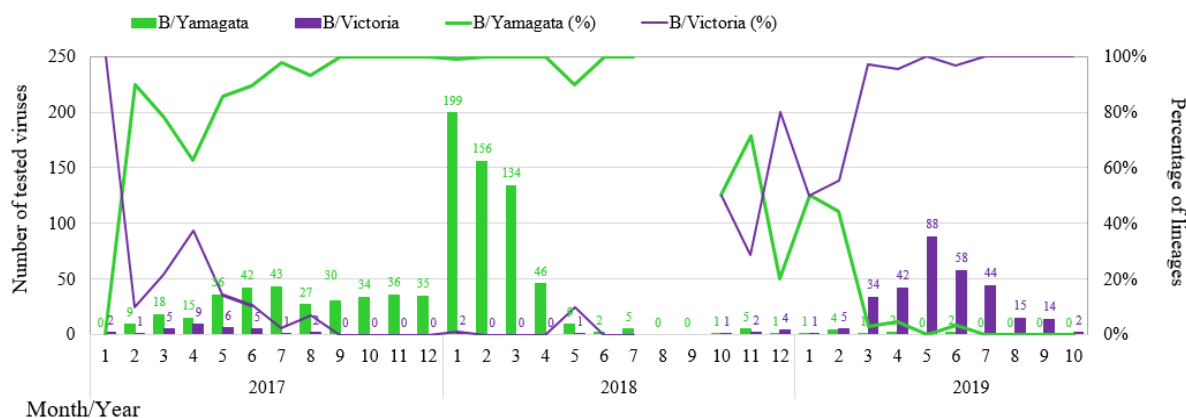


圖五、2017-2019 H1N1pdm09 HA 胺基酸時序動態變化，近期變化在 N146D, T202I 與 N277D。

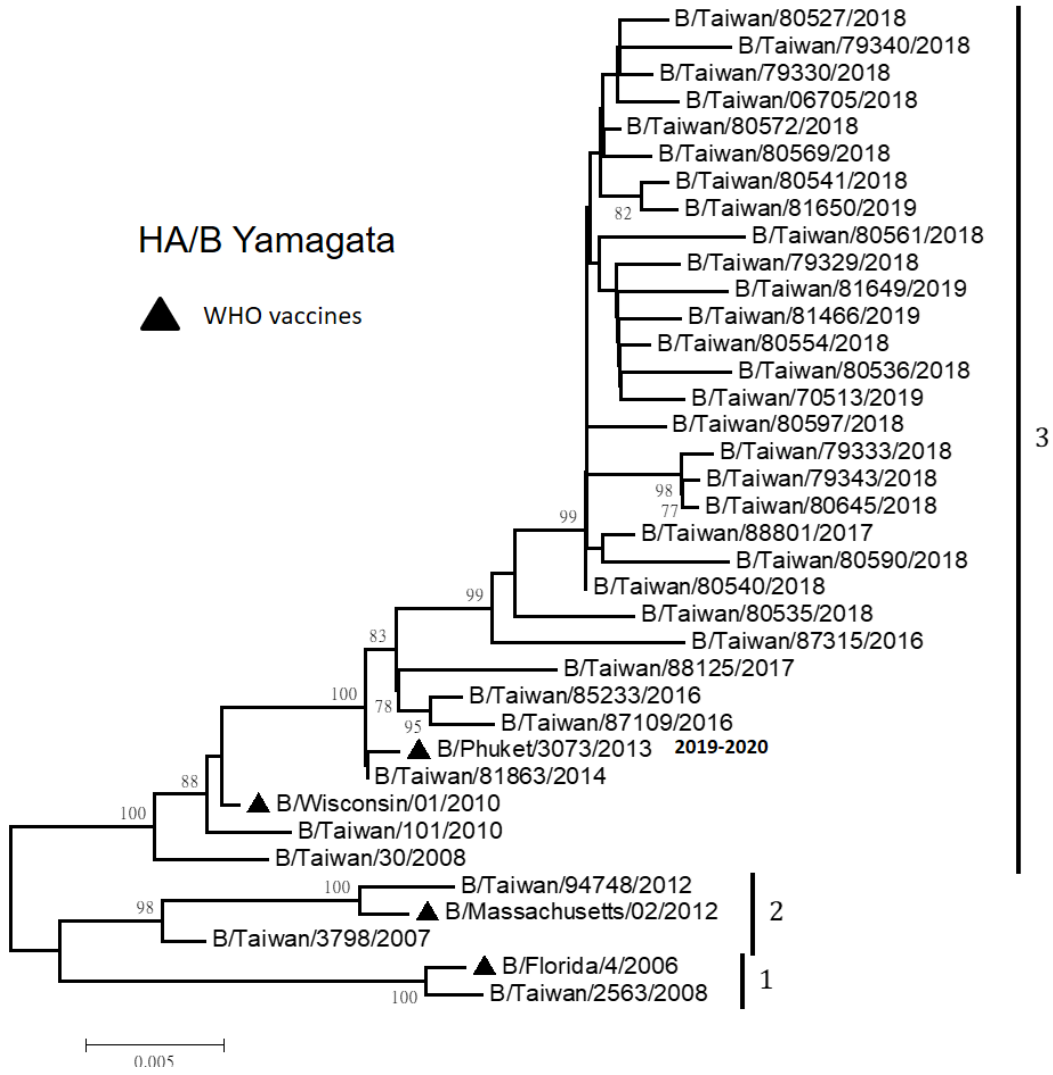




圖八、2017-2019 台灣 H3N2 胺基酸時序動態變化。



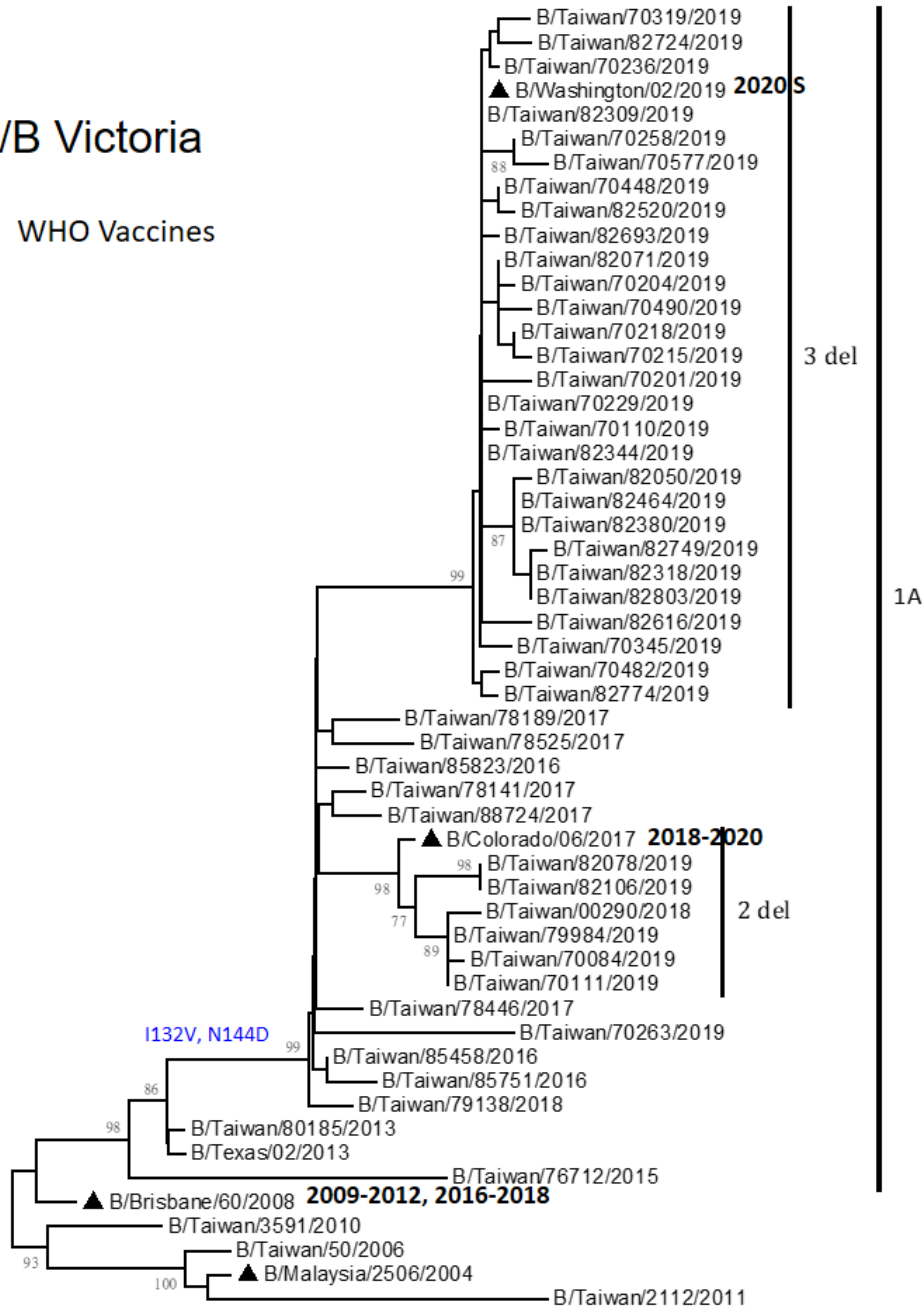
圖九、台灣 2017-2019 年台灣 B 型流感病毒 Victoria 與 Yamagata lineage 分布情形，2019 年主要為 Victoria lineage。



圖十、B 型 Yamagata 流感病毒 HA 基因之親源樹狀圖。

# HA/B Victoria

▲ WHO Vaccines



圖十一、B 型 Victoria 流感病毒 HA 基因之親源樹狀圖。

表一、疫苗免疫效力分析

	A(H1N1)pdm09	A(H3N2)	B/Vic	B/Yam
GMT increase	1.6	1.3	1.1	1.1
Seroconversion	12.9%	0.0%	3.2%	0.0%
Seroprotection/pre-vaccination	93.5%	22.6%	35.5%	41.9%
Seroprotection/post-vaccination	96.8%	51.6%	45.2%	45.2%

表二、人類免疫後與雪貂感染後之抗血清對 A/H1N1pdm09 疫苗株與流行病毒株的反應

Antisera		Tested antigens				
Human case	vaccination	GP1908 (6B.1)	TW/85606 (6B.1)	TW80660 (183P-2)	TW81373 (183P-5)	TW81375 (183P-6)
1	pre	10	20	20	20	20
	post	<b>640</b>	640	320	640	640
2	pre	10	20	10	20	20
	post	<b>80</b>	80	40	80	80
3	pre	10	20	20	20	20
	post	<b>40</b>	40	20	40	40
4	pre	<10	20	20	20	20
	post	<b>40</b>	40	20	40	40
5	pre	10	20	10	20	20
	post	<b>80</b>	80	40	80	80
6	pre	20	40	20	20	20
	post	<b>160</b>	160	160	160	160
7	pre	20	40	20	20	20
	post	<b>80</b>	80	40	80	80
8	pre	20	40	20	40	40
	post	<b>40</b>	80	40	80	80
9	pre	10	40	20	20	20
	post	<b>40</b>	80	40	40	80
10	pre	<10	20	20	20	20
	post	<b>80</b>	80	40	80	80
Ferret		1280	<b>640</b>	320	640	640

表三、人類免疫後與雪貂感染後之抗血清對 B/Vicoria 疫苗株與流行病毒株的反應

Antisera		Tested antigens			
Human case	vaccination	Bris60	TW80185	Colo06 Δ2 (162-163)	TW70072 Δ3(162-164)
11	pre	10	10	10	40
	post	10	10	<b>80</b>	80
12	pre	10	20	10	20
	post	10	20	<b>160</b>	1280
13	pre	320	320	160	20
	post	160	320	<b>160</b>	20
14	pre	20	40	10	10
	post	40	40	<b>40</b>	10
15	pre	80	80	80	40
	post	80	80	<b>80</b>	40
16	pre	80	40	80	10
	post	160	40	<b>160</b>	<10
Ferret	Bris60	<b>640</b>	80	80	<10
	TW80185	160	<b>320</b>	80	10
	Colo06	80	40	<b>640</b>	20
	TW70072	<10	<10	<10	<b>160</b>



## 108 年度計畫重要研究成果及具體建議

(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：流感病毒病原體監測與人類免疫後抗體對流行病毒反應分析

主持人：劉銘燦

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-122113

### 1. 計畫之新發現或新發明

台灣 2019 流感季病毒株分析

- A/H1N1pdm09: 屬於 6B.1A clade，在 HA 具 183P 改變，抗原性與 2018-2019 北半球疫苗株(A/Michigan/45/2015)相近。
- A/H3N2: 可分為 3C.2a1, 3C.2a2, 3C.2a3 以及 3C.2a4，台灣 2018 年 2-12 月 3C.2a2 佔多數，2019 年 1 月 3C.2a1 比例增加。2019-2020 北半球疫苗株為 A/Kansas/14/2017，屬於 3C.3a。
- B/Victoria & B/Yamagata: B/Victoria: 台灣 2019 年 3 月後 B/Vic 病毒其 HA 具 3 個胺基酸 deletions(162-164)且 G133R and K136E 突變，造成與疫苗株 B/Colorado/06/2017 抗血清反應差，抗原飄移。B/Yamagata 病毒流行株主要為 clade 3，2019 年流行病毒其抗原性分別與疫苗株 B/Phuket/3073/2013 相近。
- 2019 檢出 H1N1pdm09 4 株、H3N2 1 株具 oseltamivir 抗藥。  
人類免疫後與雪貂感染後之抗血清對疫苗株與流行病毒株反應，使用人類與雪貂抗血清測試，對目前不同 clade A/H1N1pdm09 流行株其抗原性與疫苗株 A/Michigan/45/2015 相近。

### 2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

2018 年台灣禽場仍爆發禽流感疫情。故除了人類季節性流感病毒外，對禽流感亦應注意防範。

### 3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

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，將使得疫苗與藥物效果降低，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。

## 衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫 期末審查意見回復

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-122113

計畫名稱：流感病毒病原體監測與人類免疫後抗體對流行病毒反應分析

計畫主持人：劉銘燦

\*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	今年暑假及年底有兩波 H1 的流行，但仍與疫苗株相符。	謝謝委員意見。	無
2	接受疫苗的抗體上升程度，差異很大(成年人)，但兒童的也是差異很大(60 位)，成年人的資料請補齊。	謝謝委員意見，成年人的資料增列於期末報告。	10
3	FluB(Victoria)80%是疫苗株 low reactor，今年要注意。	謝謝委員意見。	無
4	2019 年初及年底 H1N1 病毒應用兒童血清測試抗原性差異。	已由黃立民教授進行兒童血清測試抗原性差異。	無
5	H3N2 與 B/Victoria 疫苗株與目前流行病毒不吻合，應主動提出，並加強監測國內流感病毒變化。	已於衛服部流感防治小組委員會中報告，相關資料每周提供給疾管署相關組室。	無
6	建議若人類免疫後抗體比雪貂血清更具流行株抗原變異之鑑別性，應系統性建立並設定條件來收集人類免疫後抗體對不同流行株與疫苗株之長期監測與疫情解讀之應用。	謝謝委員意見，未來將納入相關計畫。	無
7	建議未來可系統性蒐集人類血清進行分析。	謝謝委員意見，未來將納入相關計畫。	無

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