

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-144407

衛生福利部疾病管制署 109 年署內科技研究計畫

計畫名稱：建立深度分析流感病毒基因序列與病毒特性關連之平台

109 年度 研究報告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：劉銘燦

協同主持人：楊季融

研究人員：吳馥婷

執行期間：109 年 1 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

目錄

	頁 碼
目錄	1
計畫中文摘要	2
計畫英文摘要	3
計畫內容	
一、前言	4
二、材料與方法	5
三、結果	8
四、討論	9
五、結論與建議	14
六、計畫重要研究成果及具體建議	15
七、參考文獻	15
八、圖、表	17

共 (23) 頁

計畫中文摘要：

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

關鍵詞：流感病毒、病毒演化、跨種、病毒歧異、次世代定序

計畫英文摘要：

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

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

本文

一、前言：

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

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

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

二、 材料與方法

(一) 檢體與病毒株收集

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

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

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

量不至於過低。

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

(二) 流感病毒基因序列的分析流程

為能即時分析大量流感資料與易於監測流感病毒的變化，發展分析流程如下：

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

(三) 流感病毒株培養

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

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

(四) 病毒與抗血清價位測定

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

1. 紅血球凝集試驗

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

原。

- (2) 取第一列的抗原 50 uL 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 50 uL 加入第三列，如此序列稀釋至第八列，抗原呈現 2 倍~128 倍稀釋。
- (3) 每孔分別加入 50 ul 的天竺鼠紅血球 (0.75%)，以手輕微搖晃孔盤後，之後以膠膜封住孔盤，置於室溫或 4 °C 下靜置 30—60 分鐘，之後觀察血球凝集，記錄病毒價位。

2. 紅血球凝集抑制試驗

- (1) 進行血球凝集抑制試驗前，須先以 PBS 溶液稀釋抗原原液至每 50 uL 稀釋液中含有 8 HA unit 的抗原。
- (2) 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 25 uL 的 PBS 溶液。於第一列加入 50 uL 的各標準病毒株的標準抗血清，negative control 行則以 25uL PBS 取代抗血清。取第一列的抗體 25 uL 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 25 uL 加入第三列，如此序列稀釋至第八列。抗血清呈現 2 倍~128 倍稀釋。抗血清須經 RDE 處理以去除非專一性凝集。
- (3) 分別加入 25 uL (8 HA unit/50 uL) 的待測抗原及標準抗原，以手輕微搖晃孔盤後，置於室溫下反應 10—15 分鐘。
- (4) 加入以 PBS 稀釋的 0.75% 的天竺鼠紅血球 50 uL /well，之後以膠膜封住孔盤，至於室溫或 4°C 下靜置 30—60 分鐘，之後記錄抗血清價位結果。

(五) 病毒 RNA 萃取及反轉錄

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

(六) NGS 平台

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

(七) NGS 資料分析

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

三、 結果

(一)、檢體收集挑選及病毒全基因片段放大

挑選 104 年 1 月至 107 年 6 月間，通報新型 A 型流感及不明原因肺炎，且其送驗之檢體同時包含上呼吸道(咽喉拭子)及下呼吸道(痰液)，並經 real-time RT-PCR 檢出為 A(H3N2) 病毒感染陽性且 Ct 值 小於 25 個案，將其檢體以 RT-PCR 完成流感病毒全基因片段放大，並利用電泳分析確認取得病毒全基因產物。

(二) 以 NGS 分析流感病毒神經胺酸酶抗藥性 quasispecies 變異株趨勢

利用 108 年已建立完成之流感病毒次世代(NGS)基因定序分析流程，109 年持續利用相同流程，針對病毒量相對強(Ct 大於 25)之核酸進行流感病毒全基因體分析，以比較病毒流感病毒神經胺酸酶抗藥性 quasispecies 變異株趨勢。檢體核酸經由 RT-PCR 進行病毒全基因片段放大後，皆可於洋菜膠電泳圖上看到病毒基因片段產物，後續將該 PCR 產物所製備之全基因體序列庫(library)以 Illumina Miseq 進行定序，再以 CLC Genomics Workbench version 7.0.3 (CLC Bio, Qiagen)軟體進行個基因片段 contig 組裝後，針對各成對樣本病毒 quasispecies 之全基因序列比較結果綜整如表一。為瞭解流感病毒 NA 基因 quasispecies 變異趨勢，探討其影響病毒針對神經胺酸酶抗病毒藥物之感受度，

依現有文獻選定可能影響 N2 病毒對於 oseltamivir 抗病毒藥物感受度之重要胺基酸變異位點，進行各位點 quasispecies 的趨勢分析。這些位點及可能與 oseltamivir 抗藥性相關之變異包括位點 119 (E119D、E119I、E119V)、222 (I222L)、224 (R224K)、249 (K249E)、274 (H274Y)、276 (E276D)、292 (R292K)、371 (R371K) 以及 391 (Q391K) (圖一)。經由分析自 2015 年 1 月至 2018 年 6 月間，採集自患者咽喉拭子且 A(H3N2) 流感病毒檢驗陽性之 21 支檢體的 NA 蛋白顯示，各檢體病毒 quasispecies 出現情形詳如表 1-1~1-21，在所有出現於 21 支臨床檢體之病毒 NA 蛋白 quasispecies 中，其所佔比例之中位數介於 0.15%~0.60% 之間，常見突變點 E119G (20/21), I222V (10/21), I222T (12/21), R224K (8/21), R224K (11/21), K249E (10/21), K249R (14/21), H274R (14/21), H274R (16/21), R292G (15/21), Q391R (16/21)，而突變會造成抗藥性 9 個位點及 22 種突變中，於 quasispecies 可觀察到 6 種突變 (表 2)，其出現次數最多者依序為 K249E (出現 10 次；比例為 0.12%~0.35%)、R224K (8 次；0.1%~0.3%)、Q391K (2 次；0.11%~0.28%)、H274Y (2 次；0.12%, 0.14%)、E276D (1 次；0.19%) 以及 R292K (1 次；0.15%)，其餘位點及相關突變並未於各 quasispecies 中發現。

四、 討論

流感病毒對於公共衛生防治所帶來的威脅，在於其高度變異性，導致具特殊突變的變異株無預警的出現，進而影響疫苗的保護效力 (例如季節性流感病毒每年都持續累積改變)；或是藉由基因重組，形成前所未有的新型病毒，進一步造成全球大流行疫情。以 Sanger 定序為原理之序列分析技術已長期沿用數十年，成為微生物鑑定及演化分析等的重要利器。然而，以流感病毒來說，當利用 Sanger 定序儀分析病毒變異情形時，礙於技術本身偵測靈敏度的限制，僅能得到病毒 quasispecies 中的主流病毒序列，對於佔比較為微量之病毒族群，無法有效檢測其核苷酸，因此該等變異容易被忽略，致使研究人員無法藉由此類傳統技術一窺病毒於演變過程中的細微變化，此限制亦使 Sanger 定序技

術逐漸無法滿足現今對於病毒演化精準分析之期待。隨著全球科技的進展，利用次世代定序的新技術已可克服此一限制，藉由其針對病毒基因體核酸序列於單一位點的高涵蓋率分析，現階段研究者已可獲得解析度更佳，且定序量能更大之分析結果，對於流感病毒的演變亦可進行更為全面的監控，以本計畫本年所分析之結果為例，流感病毒於感染人類呼吸道不同部位，並完成增殖複製後，這些位於不同部位之病毒已開始產生細微變化，且變化的分布擴及整個基因體。檢視其發生比例，這些可觀察到的變異，其佔比大多小於 10%，因此，應用次世代定序技術探討流感病毒之演化，已可針對比率較為微量之病毒中間產物進行定性與定量分析，掌握其消長趨勢，此優勢亦將有助於我國傳染病防治相關單位，藉由此種敏感性較高之定序技術，及早研判新流感變異株出現的時機，對病原體未來可能造成的公共衛生風險提早因應。

本年為四年期計畫的第四年，第一年度以 NGS 技術同步分析 18 對未經培養且存在於原始臨床檢體中的 A(H3N2)病毒，以及同一檢體經由哺乳動物細胞 (MDCK) 培養後所分離的病毒株 quasispecies 之差異比較顯示，這些 quasispecies 在各基因體片段皆有核苷酸的突變，這些變異會伴隨蛋白質胺基酸產生非同義或同義突變。然而，進一步分析的結果顯示，存在於原始檢體中的病毒，與經細胞培養後的同一病毒，其差異主要位於病毒的表面蛋白(HA 與 NA)，即該兩蛋白為此比較下非同義突變的熱點 (例如 HA 蛋白的 174 與 176 兩位點，以及 NA 蛋白的 151 位點等)。第二年度針對病毒 quasispecies 的分析，進一步轉為比較感染宿主 (人類) 呼吸道不同部位之同一病毒，其 quasispecies 之變異趨勢，從另一層面探討病毒於不同環境感染及複製增殖後，可能出現的改變。結果顯示，A(H3N2)亞型病毒於不同呼吸道部位感染後，同樣會因為環境的不同，彼此逐漸產生差異。值得注意的是，雖然病毒 quasispecies 在各基因體片段亦皆有核苷酸的突變，且這些變異會伴隨蛋白質胺基酸產生非同義或同義突變，但其差異主要位於病毒的聚合酶蛋白 (PB2 及 PA)；這兩個蛋白亦出現非同義突變的熱點 (例如 PB2 蛋白位點 673，以及 PA 蛋白位點 640)。這個趨勢與第一年比較病毒培養前後差異之結果不同。在 109 觀察的 6 對 A(H3N2)病毒之結果中，感染不同呼吸道部位且流行年代更早 (104 年 1~12

月)之流感病毒，病毒 quasispecies 突變比例差異主要仍位於其聚合酶蛋白 (PA 及 PB1)，此現象與第二年所得結果之趨勢吻合。探討造成這些差異的可能原因，計畫第一年度所觀察到的 HA 蛋白 174 與 176 位點突變與病毒於該區間 (胺基酸 174-176) 是否具糖基化 (glycosylation) 有關，在所觀察到的突變當中，無論是位點 174 或 176 產生任一形式的改變，皆會移除胺基酸 174-176 區間之糖基，而經移除糖基後的病毒，其抗原性、受體結合專一性與致病能力皆有可能改變。因此，造成此種改變之原因，是否有病毒於感染時需適應人類與其他哺乳類 (例如 MDCK 是狗腎臟細胞) 細胞不同受體特性有關，值得未來進一步探討。反觀第二年及第三年所觀察到的病毒 quasispecies 突變主要位於聚合酶蛋白 PB2、PB1 與 PA，可能因人類之不同呼吸道部位之環境溫度具有差異，上呼吸道之溫度相對較低 (例如 33~34 度)，下呼吸道之溫度略升至 36~37 度。以此推論，雖本年所觀察到之突變目前在文獻上並未有明確之報導，但病毒 quasispecies 是否因需適應人類呼吸道不同部位之溫度而於聚合酶產生該等突變，將是未來深入探討病毒演化值得關注的層面。綜合以上，本計畫藉由應用次世代定序技術，針對流感病毒於不同環境複製後的變化，已持續累積科學實證，未來藉由此等於基因層次之發現搭配其他病毒功能性實驗結果 (例如利用重組病毒製作技術產製具單一突變病毒，釐清各突變對於病毒的影響)，將可累積更多證據，共同推估造成流感病毒變異株出現的可能原因及潛在風險，進而針對已出現的變異株進行最有效的早期偵測及預警。

流感病毒的基因體具有高變異性，時常藉由核苷酸的點突變改變各種病毒蛋白的特性，而此種特性轉變最常在病毒的兩種表面糖蛋白-紅血球凝集素(HA)及神經胺酸酶(NA)發現。以 HA 蛋白而言，特定胺基酸的變異可能造成其抗原性特徵的改變，進而影響宿主抗體的辨認能力，降低對抗病毒的中和效力，這也是流感疫苗株每年皆須藉由世界衛生組織於全球嚴密的監測結果，定期更新其組成的主要原因；國人也因如此每年皆須重複接種可能帶有新成分的流感疫苗，以期維持可抵抗病毒感染的最適當免疫力。由於疫苗至今仍為防治流感最重要的策略之一，因此如何提升疫苗的保護力一直是傳染病疫情防治相關單位以及產、學、研界亟需思考的重要議題；而提高流感疫苗株與流行株抗原

特徵的吻合程度，是達成該目的之重要方式。有鑑於此，即時掌握流感病毒變異趨勢，進而預測各病毒未來的可能樣貌及特徵，是當前世界衛生組織偕同各國的國家流感中心以及相關學術研究單位，持續進行的工作。然而，如何以現有資訊準確預測病毒後序的演化走勢，往往是實現提升疫苗株與流行株吻合度的最大瓶頸。隨著本計畫於前兩年已針對流感病毒的全基因體建立穩定的次世代分析流程，本年度首度嘗試藉由分析病毒 quasispecies 突變特徵的方式，探討流感病毒群體中 quasispecies 樣態是否可以作為預測病毒未來演化特徵的指標。此分析的假設前提為流感病毒於群體中的演化係採循序漸進且持續累積，亦即一個新的主流病毒變異株係由某一母群體病毒先藉由少數的基因突變開始產生，其後再隨時間演進慢慢累積其群體佔比，最終取代原有主流病毒。根據 108 年分析 21 支採集自 104~107 年臨床檢體中 A(H3N2) 病毒 quasispecies 的組成，並與一年後(105~108 年)全球主流病毒變異株的 HA 蛋白特徵比較之結果顯示，在該期間主流病毒 HA 蛋白的主要 10 個胺基酸突變中 (E78G, K108R, N137K, T144A, T147K, T51K/N, R158G, S160K, N187K 以及 H327Q 等)，共有 6 個突變 (E78G、K108R、T144A、R158G、N187K 以及 H327Q) 可於至少一年前採集的臨床檢體中病毒 quasispecies 發現，其中 4 個突變 (E78G、K108R、T144A 以及 R158G) 在 50% 以上的臨床樣本皆可觀察，故 105~108 年主流病毒株基因特徵確實已存在於部分 104~107 年病毒 quasispecies 群體中。然雖如此，這些出現次數多的 quasispecies 於各檢體中病毒群體的佔比並非持續維持在高排名，分析時不容易直接以檢體中各 quasispecies 比例高低排序觀察 (每個樣本所具有的病毒 HA 基因 quasispecies 數目範圍約介於 600~800 種之間)，因此如何由檢體 quasispecies 突變分布趨勢及其比例高低，評估未來主流病毒 HA 基因的可能特徵，將是本計畫下一年度之研究重點。

另一方面，若將 104~107 年間 21 支 A(H3N2) 陽性臨床檢體中，所有病毒 quasispecies 具有之 HA 基因突變佔比進行排序，觀察各樣本前十名 quasispecies 突變種類，結果顯示，這些比例前 10 名之 quasispecies 突變確實有重複出現情形。進一步將這些突變與國際病毒演化資料庫 (Nextstrain) 之分析趨勢相比，無論各突變重複出現之次數多寡，在總

計 210 個 quasispecies 中 (每支檢體取前 10 名, 21 支檢體共有 210 個), 共有 25 個 (11.9%, 25/210) 突變於在該臨床樣本採集日期之後於國際間出現。這些突變依重複出現的次數由高至低排列包含 (1) 出現 10 次之 S281G; (2) 出現 5 次之 F95L 與 R224G; (3) 出現 4 次之 I298T; (3) 出現 3 次之 N61S、E135G 與 S278N; (4) 出現 2 次之 K98R、T151A、V182M、V198I 與 K280E/R; (5) 出現 1 次之 T44A、D69G、S107N、R158G、T176A、E188G、K205R、S214P、P243H、I252T、I276V、N314D 與 A320P 等 (圖 2A-Y)。值得注意的是, 這些突變雖確實於 quasispecies 被觀察後的一段期間之後出現於國際間, 但具有這些突變的變異株於族群中存在的比例低, 且無取代原有病毒成為主流; 反之, 這些變異株皆僅短暫出現後隨即消失。因此, 這些具有這些 quasispecies 突變的病毒環境適應力或傳播競爭力, 可能不如群體中的其他病毒。由於根據本年的觀察結果, 某一年度臨床檢體中佔比較高的病毒 quasispecies, 確實有機會可於後續形成病毒變異株。故以流感病毒 quasispecies 作為預測未來病毒演化特徵指標的可行性, 值得繼續評估與探討。

在以次世代定序進行病毒序列分析的技術層次方面, 本計畫於第一年度單次上機可分析全基因體的病毒樣本數為 36 件; 第二~三年度則再進一步提升至 48 件。平均每一樣本病毒全基因體之分析單價, 由 3,033 元降低至 2,274 元, 節省約 25% 之費用; 此單價更較以傳統 Sanger 定序法, 平均每進行一株病毒全基因體序列分析所需花費 13,000 元為低(節省約 82.5% 經費)。然雖如此, 若考量兩種分析方法的即時性, 以 NGS 進行病毒全基因體序列分析, 由 RT-PCR 起算, 經過序列庫製備以及 Miseq 上機, 約需 5~10 天可進行序列組裝分析; 反之, 傳統 Sanger 定序耗時較短, 約 2~3 天即可得到定序結果進行組裝。因此, 以分析時效來看, NGS 現階段仍無法完全取代 Sanger 定序, 未來兩者方法的選用時機, 可依照不同時效或經費需求等因素進行評估。

五、結論與建議

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

六、計畫重要研究成果及具體建議

- (一) 本年度持續驗證本計畫所建立及優化之流感病毒次世代全基因定序平台的穩定性。依現階段分析流程，單一批次所能分析之樣本數為48件，自最初RT-PCR起算，經次世代定序庫製備至完成上機得到最終序列，約需5~7個工作天；相較於傳統Sanger

定序法分析相同樣本數之所需經費，可節省約82.5%。因此，次世代定序應用於流感病毒之深度演化分析具經濟效益。

- (二) 分析結果顯示，同一亞型流感病毒於不同呼吸道部位感染後彼此之差異，與其存在於臨床檢體且經由哺乳類動物細胞培養後產生之差異不同。因此，流感病毒之演化趨勢與其所處環境有關，惟其相互關聯性須進一步探討；該研究成果未來將有助於我國於流感大流行之整備及應變工作。
- (三) 已完成以NGS比較不同流感季之流感病毒quasispecies變化，研究當年成為主流病毒株之基因特徵是否在以前quasispecies變異株已存在的初步分析流程，依現階段所觀察結果，某年度佔比排名較高的病毒quasispecies突變種類，有可能成為未來預測流感病毒變異株出現的一項重要指標。
- (四) 次世代定序分析對於流感病毒基因體監測具實際應用價值。雖其現階段對於傳染病的例行檢驗尚無應用之必要性，惟其良好的檢測靈敏度，將有助於國家實驗室評估病毒惟亮的演變趨勢，以及其潛在風險；目前許多先進國家(例如美國疾病控制及預防中心及日本國立感染症研究所)之國家級實驗室業皆完成此類技術之建置，作為傳染病原體深度分析之有效利器。因此，本次世代定序分析技術藉由本計畫完成建立後，將可協助實驗室及政策權單位進行新病毒風險評估等相關研究，藉以訂定具實用價值之防疫政策。

七、 參考文獻：

1. Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, and Palu G: Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *Int J Mol Sci* 2011; 12:7861-7884.
2. Croville G, Soubies SM, Barbieri J, Klopp C, Mariette J, Bouchez O, Camus-Bouclainville C, and Guerin JL: Field monitoring of avian influenza viruses: whole-genome sequencing and tracking of neuraminidase evolution using 454 pyrosequencing. *J Clin Microbiol* 2012; 50:2881-2887.
3. Dunne WM, Jr., Westblade LF, and Ford B: Next-generation and whole-genome sequencing in the diagnostic clinical microbiology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:1719-1726.

4. Fordyce SL, Bragstad K, Pedersen SS, Jensen TG, Gahrn-Hansen B, Daniels R, Hay A, Kampmann ML, Bruhn CA, Moreno-Mayar JV, Avila-Arcos MC, Gilbert MT, and Nielsen LP: Genetic diversity among pandemic 2009 influenza viruses isolated from a transmission chain. *Virology* 2013; 10:116.
5. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Aina A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, and Sata T: Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One* 2010; 5:e10256.
6. Luring AS, and Andino R: Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1001005.
7. Lin Z, Farooqui A, Li G, Wong GK, Mason AL, Banner D, Kelvin AA, Kelvin DJ, and Leon AJ: Next-generation sequencing and bioinformatic approaches to detect and analyze influenza virus in ferrets. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8:498-509.
8. Moncla LH, Zhong G, Nelson CW, Dinis JM, Mutschler J, Hughes AL, Watanabe T, Kawaoka Y, and Friedrich TC: Selective Bottlenecks Shape Evolutionary Pathways Taken during Mammalian Adaptation of a 1918-like Avian Influenza Virus. *Cell Host Microbe* 2016; 19:169-180.
9. Nelson MI, and Holmes EC: The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 2007; 8:196-205.
10. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28:2731-2739.
11. Tang P, and Chiu C: Metagenomics for the discovery of novel human viruses. *Future Microbiol* 2010; 5:177-189.
12. Van den Hoecke S, Verhelst J, Vuylsteke M, and Saelens X: Analysis of the genetic diversity of influenza A viruses using next-generation DNA sequencing. *BMC Genomics* 2015; 16:79.
13. Varble A, Albrecht RA, Backes S, Crumiller M, Bouvier NM, Sachs D, Garcia-Sastre A, and tenOever BR: Influenza A virus transmission bottlenecks are defined by infection route and recipient host. *Cell Host Microbe* 2014; 16:691-700.
14. Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, and Gao GF: Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol* 2014; 22:183-191.
15. Yang JR, Kuo CY, Huang HY, Wu FT, Huang YL, Cheng CY, Su YT, Chang FY, Wu HS, and Liu MT: Newly emerging mutations in the matrix genes of the human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses reduce the detection sensitivity of the real-time RT-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2014; 52:76-82.

八、圖、表

圖一、流感病毒神經胺酸酶抗藥性位點

Summary of neuraminidase amino acid substitutions associated with reduced inhibition by neuraminidase inhibitors.

Type/subtype Comments	Amino acid substitution ^a	N2 numbering ^a	Susceptibility assessed by NA inhibition assays (IC ₅₀ fold change vs wild type [NAI susceptible virus]) ^b				Source of viruses/ selection with ^c	
			Oseltamivir	Zanamivir	Peramivir	Laninamivir		
A(H3N2)	E119D	119	NI (2)	RI (32)	NI (2)	?	RG	
	E119I	119	HRI (208)	RI (17)	NI (3)	?	Clin/Ose; in vitro	
	E119V	119	RI/HRI (18-2057)	NI (1-7)	NI (1-3)	NI (3-4)	Sur; Clin/Ose; in vitro; RG	
<i>Host cell selected, not found in clinical specimens</i>	Q136K	136	NI (1-7)	RI/HRI (11-132)	NI(3-9)	NI(2)	Sur	
	D151A	151	NI (2-3)	RI (29-43)	RI (10)	NI (7)	Sur	
	D151E	151	RI (11)	NI (2)	?	?	RG	
	D151G	151	NI (1)	HRI (>1500)	?	?	RG	
	D151V/D	151	NI (8)	HRI (164)	?	?	Sur	
	I222L	222	NI (9)	NI (2)	?	?	RG	
	R224K	224	HRI (>4000)	RI (>50)	?	?	RG	
	Del 245-248 ^e	245-248	HRI (157-222)	NI/RI (3-21)	NI (1)	NI (1)	Clin/Ose	
	Del 247-250 ^e	247-250	HRI (235)	RI (17)	NI (5)	NI (1)	Sur/recNA	
	K249E	249	RI (10-15)	NI (4-6)	NI (1-3)	NI (1-3)	Sur	
	E276D	276	RI (15)	HRI (160)	?	?	RG	
	R292K	292	HRI (>10 000)	NI/RI/HRI (3-134)	RI/HRI (14-719)	NI(2)	Clin/Ose; in vitro/Zan; RG	
	N294S	294	HRI (300-1879)	NI (8)	NI (1)	?	Clin/Ose; RG	
	N329K (-cho)	329	RI (10-14)	NI/RI (7-11)	?	?	Sur	
	S331R (-cho)	331	RI (17-77)	RI (13-25)	?	?	Sur	
	R371K	371	RI (45)	RI (15)	?	?	RG	
	Q391K	391	RI (87)	RI (32)	RI (16)	NI (9)	Sur	
	<i>T148I was host cell selected</i>	E119V+T148I	119+148	HRI (>6000)	HRI (>800)	HRI (>110)	HRI (>250)	Sur; in vitro; RG
		E119V+I222L	119+222	HRI (1571)	RI (5)	?	?	RG
		E119V+I222V	119+222	HRI (293-2286)	NI (2)	NI (7)	?	Clin/Ose
I222T+S331R		222+331	RI (12-31)	NI (3-7)	NI (2)	NI (3-4)	Sur/Clin	

表 1、流感病毒神經胺酸酶抗藥性 quasispecies 變異株趨勢

1-1 A/Taiwan/90170/2015(H3N2)

F10170 104/01/27	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)													
	119			222			224	249	274	276	292	371		391
胺基酸突變	E119G	I222V	I222T	R224G	R224K	K249R	H274R	E276K	R292G	R371C	R371H	Q391*	Q391R	
quasispecies百分比	0.16	0.11	0.23	0.17	0.12	0.35	0.33	0.11	0.33	0.17	0.11	0.18	0.29	
quasispecies百分比中位數	0.18													
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	868													

1-2 A/Taiwan/90264/2015(H3N2)

F10264 104/02/13	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)									
	119		222		224	249	274	276	292	
胺基酸突變	E119K	E119G	I222V	I222T	R224K	K249E	H274R	E276K	R292G	R292K
quasispecies百分比	0.10	0.24	0.12	0.32	0.12	0.28	0.19	0.15	0.26	0.15
quasispecies百分比中位數	0.16									
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	698									

1-3 A/Taiwan/90276/2015(H3N2)

F10276 104/02/16	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)					
	119	222	249	274	276	292
胺基酸突變	E119G	I222V	K249R	H274R	E276G	R292G
quasispecies百分比	0.16	0.13	0.18	0.17	0.18	0.22
quasispecies百分比中位數	0.17					
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	576					

1-4 A/Taiwan/90296/2015(H3N2)

F10296 104/02/20	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)									
	119	222			249	274	276	292	391	
胺基酸突變	E119G	I222V	I222T	K249R	H274R	E276G	R292G	Q391*	Q391R	
quasispecies百分比	0.10	0.11	0.11	0.19	0.15	0.12	0.15	0.12	0.12	
quasispecies百分比中位數	0.16									
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	675									

1-5 A/Taiwan/90308/2015(H3N2)

F10308 104/02/25	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)									
	119	222	224		249		274	292	391	
胺基酸突變	E119G	I222T	R224G	R224K	K249E	K249R	H274R	R292G	Q391R	
quasispecies百分比	0.23	0.20	0.13	0.10	0.20	0.26	0.10	0.14	0.11	
quasispecies百分比中位數	0.16									
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	696									

1-6 A/Taiwan/90460/2015(H3N2)

F10460 104/03/31	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)							
	119	222	224	274	292	371	391	
胺基酸突變	E119G	I222V	R224G	H274R	R292G	R371H	Q391R	Q391L
quasispecies百分比	0.26	0.20	0.14	0.17	0.21	0.11	0.39	0.11
quasispecies百分比中位數	0.17							
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	780							

1-7 A/Taiwan/90565/2015(H3N2)

F10565 104/05/04	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)							
	119	222	224	249	292	371	391	
胺基酸突變	E119G	I222T	R224G	K249E	R292G	R371C	Q391R	Q391L
quasispecies百分比	0.51	0.14	0.23	0.14	0.22	0.17	0.35	0.13
quasispecies百分比中位數	0.19							
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	644							

1-8 A/Taiwan/90729/2015(H3N2)

F10729 104/06/03	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)							
	119	222	249		274		391	
胺基酸突變	E119G	I222V	K249E	K249R	H274Y	H274R	Q391R	Q391L
quasispecies百分比	0.28	0.18	0.29	0.24	0.14	0.14	0.14	0.14
quasispecies百分比中位數	0.17							
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	664							

1-9 A/Taiwan/90928/2015(H3N2)

F10928 104/06/17	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)									
	119	222		224	249		274	292	371	391
胺基酸突變	E119G	I222V	I222T	R224G	K249E	K249R	H274R	R292G	R371H	Q391R
quasispecies百分比	0.14	0.17	0.21	0.14	0.14	0.18	0.24	0.24	0.10	0.28
quasispecies百分比中位數	0.17									
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	709									

1-10 A/Taiwan/90996/2015(H3N2)

F10996 104/06/30	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)							
	119	222	224	274	276		292	391
胺基酸突變	E119G	I222T	R224G	H274R	E276K	E276G	R292G	Q391R
quasispecies百分比	0.21	0.14	0.37	0.17	0.28	0.14	0.28	0.15
quasispecies百分比中位數	0.18							
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	797							

1-11 A/Taiwan/91058/2015(H3N2)

F11058 104/07/25	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)									
	119	222	224	249	274	276	292	371	391	
胺基酸突變	E119G	I222T	R224G	K249R	H274R	E276K	R292G	R371H	Q391R	
quasispecies百分比	0.25	0.39	0.22	0.18	0.26	0.21	0.17	0.13	0.29	
quasispecies百分比中位數	0.18									
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	767									

1-12 A/Taiwan/93600/2017(H3N2)

F13600 106/01/31	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)									
	119	222	224	249		274	276	292	371	391
胺基酸突變	E119G	-	R224G	K249E	K249R	H274R	-	R292G	-	Q391R
quasispecies百分比	0.44	-	0.15	0.18	0.14	0.27	-	0.27	-	0.19
quasispecies百分比中位數	0.19									
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	679									

1-13 A/Taiwan/93742/2017(H3N2)

F13742 106/02/17	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)												
	119	222		224		249	274	276	292	371	391		
胺基酸突變	E119G	I222V	I222T	R224G	R224K	K249R	H274R	E276G	-	-	Q391K	Q391*	Q391R
quasispecies百分比	0.14	0.24	0.14	0.14	0.14	0.17	0.17	0.14	-	-	0.11	0.11	0.15
quasispecies百分比中位數	0.15												
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	712												

1-14 A/Taiwan/93805/2017(H3N2)

F13805 106/02/28	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)											
	119		222	224	249		274	276	292	371	391	
胺基酸突變	E119K	E119G	-	R224G	K249E	K249R	-	-	R292G	-	Q391R	
quasispecies百分比	0.12	0.18	-	0.17	0.12	0.18	-	-	0.31	-	0.13	
quasispecies百分比中位數	0.17											
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	643											

1-15 A/Taiwan/94452/2017(H3N2)

F14452 106/07/13	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)											
	119	222	224		249	274	276	292	371	391		
胺基酸突變	E119G	I222V	R224G	R224K	K249R	H274R	E276G	R292G	R371C	Q391*	Q391R	
quasispecies百分比	0.13	0.21	0.21	0.14	0.28	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.35	
quasispecies百分比中位數	0.20											
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	696											

1-16 A/Taiwan/94459/2017(H3N2)

F14459 106/07/15	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)											
	119	222	224	249	274	276	292	371	391			
胺基酸突變	E119G	I222T	-	K249E	-	-	R292G	-	Q391K			
quasispecies百分比	0.37	0.17	-	0.17	-	-	0.34	-	0.28			
quasispecies百分比中位數	0.20											
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	506											

1-17 A/Taiwan/94613/2017(H3N2)

F14613 106/08/18	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)													
	119	222	224		249		274		276	292		371	391	
胺基酸突變	E119G	-	R224G	R224K	K249E	K249R	H274Y	H274R	H274L	-	R292G	R292*	-	Q391R
quasispecies百分比	0.13	-	0.33	0.26	0.19	0.31	0.12	0.12	0.12	-	0.26	0.13	-	0.26
quasispecies百分比中位數	0.19													
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	621													

1-18 A/Taiwan/94675/2017(H3N2)

F14675 106/08/31	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)										
	119	222	224		249	274	276	292	371		391
胺基酸突變	E119G	I222T	R224G	R224W	K249R	-	-	-	R371C	R371H	Q391R
quasispecies百分比	0.20	0.19	0.30	0.15	0.18	-	-	-	0.15	0.15	0.21
quasispecies百分比中位數	0.17										
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	640										

1-19 A/Taiwan/94966/2017(H3N2)

F14966 106/12/06	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)										
	119	222	224	249		274	276		292	391	
胺基酸突變	E119G	I222T	R224W	K249E	K249R	H274R	E276G	E276D	R292G	Q391*	Q391R
quasispecies百分比	0.35	0.18	0.19	0.35	0.26	0.29	0.19	0.19	0.40	0.17	0.17
quasispecies百分比中位數	0.26										
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	638										

1-20 A/Taiwan/95049/2017(H3N2)

F15049 106/12/27	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)		
	222	274	391
胺基酸突變	I222V	H274R	Q391R
quasispecies百分比	0.53	0.80	0.72
quasispecies百分比中位數	0.60		
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	191		

1-21 A/Taiwan/95714/2018(H3N2)

F15714 107/06/22	NA蛋白抗藥性突變位點(residue)									
	119	222	224	249	274	276	292	371	391	
胺基酸突變	E119G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
quasispecies百分比	0.36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
quasispecies百分比中位數	0.38									
總突變位點數 (cutoff: 0.1%)	190									

表 2、流感病毒神經胺酸酶抗藥性 quasispecies 變異株趨勢分析總表

Viruses	119		222		224		249		274			276		292		371		391				
	E119G	E119K	I222V	I222T	R224K	R224G	R224W	K249E	K249R	H274Y	H274R	H274L	E276G	E276K	E276D	R292G	R292K	R371C	R371H	Q391K	Q391R	Q391L
A/Taiwan/90170/2015	0.16		0.11	0.23	0.12	0.17			0.35		0.33			0.11		0.33		0.17	0.11			0.29
A/Taiwan/90264/2015	0.24	0.11	0.12	0.32	0.12			0.28			0.19			0.15		0.26	0.15					
A/Taiwan/90276/2015	0.16		0.13						0.18		0.17				0.18		0.22					
A/Taiwan/90296/2015	0.1		0.11	0.11					0.19		0.15											0.12
A/Taiwan/90308/2015	0.23			0.2	0.1	0.13		0.2	0.26		0.1					0.14						0.11
A/Taiwan/90460/2015	0.26		0.2			0.14					0.17					0.21			0.11			0.39
A/Taiwan/90565/2015	0.51			0.14		0.23		0.14								0.22		0.17				0.35
A/Taiwan/90729/2015	0.28		0.18					0.29	0.24	0.14	0.14											0.14
A/Taiwan/90928/2015	0.14		0.17	0.21		0.14		0.14	0.18		0.24					0.24			0.1			0.28
A/Taiwan/90996/2015	0.21			0.14		0.37					0.17		0.14	0.28		0.28						0.15
A/Taiwan/91058/2015	0.25			0.39		0.22			0.18		0.26			0.21		0.17			0.13			0.29
A/Taiwan/93600/2017	0.44					0.15		0.18	0.14		0.27					0.27						0.19
A/Taiwan/93742/2017	0.14		0.24	0.14	0.14	0.14			0.17		0.17			0.14						0.11		0.15
A/Taiwan/93805/2017	0.18	0.12				0.17		0.12	0.18		0.18					0.31						0.13
A/Taiwan/94452/2017	0.13		0.21		0.21				0.28		0.13		0.13			0.13		0.13				0.35
A/Taiwan/94459/2017	0.37			0.17	0.17			0.17								0.34					0.28	
A/Taiwan/94613/2017	0.13				0.26	0.33		0.19	0.31	0.12	0.12	0.12				0.26						0.26
A/Taiwan/94675/2017	0.2			0.19	0.3		0.15		0.18									0.15	0.15			
A/Taiwan/94966/2017	0.35			0.18			0.19	0.35	0.26		0.29		0.19		0.19	0.4						0.17
A/Taiwan/95049/2017			0.53								0.8											0.72
A/Taiwan/95714/2018	0.36																					
Number	20	2	10	12	8	11	2	10	14	2	16	1	5	4	1	15	1	4	5	2	16	3

衛生福利部疾病管制署委託/署內科技研究計畫 109 年度計畫重要研究成果及具體建議

(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：建立深度分析流感病毒基因序列與病毒特性關連之平台

主持人：劉銘燦

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-144407

1. 計畫之新發現或新發明

完成影響流感病毒對於 oseltamivir 抗病毒藥物感受度之重要胺基酸變異位點分析 包含 NA 蛋白 9 個位點及 22 種突變，在 quasispecies 的趨勢分析突變中，可發現其中有 6 個位點 6 種突變以抗藥性有關，其出現次數最多者依序為 K249E (出現 10 次；比例為 0.12%~0.35%)、R224K (8 次；0.1%~0.3%)、Q391K (2 次；0.11%~0.28%)、H274Y (2 次；0.12%, 0.14%) 與 R292K (1 次；0.15%)。抗藥性 NA 蛋白的突變比例非均勻分布，病毒抗藥性的易產生於演化熱點突變區。以流感病毒 quasispecies 作為預測未來病毒演化特徵指標的作法似乎具可行性，惟進行此類預測時作為依據的關鍵資料仍須藉由持續累積分析樣本數之後較易釐清。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

本計畫研究成果可使民眾了解流感病毒的變化速度快，易產生抗藥性與疫苗低反應病毒，而流感病毒每年持續感染人類，引發疾病。疫苗與抗病毒藥物為防治流感最有效的兩種策略對於流感病毒之預防亟具效果，民眾應每年定期施打疫苗，藉由提升免疫力確保健康。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

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

109 年度科技研究計畫期末執行進度審查意見回復表

計畫名稱：建立深度分析流感病毒基因序列與病毒特性關連之平台

計畫主持人：劉銘燦

填報日期：109/12/22

*修正處請在報告中以紅字標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處頁碼
1	進行流感病毒基因演化即時監測，主要分析對象為病人，應與禽流感之 NGS 資料進行比較。	謝謝委員意見。	無修正
2	建議病毒基因序列與抗藥性分析可加上流感重症者之流病資訊。	謝謝委員建議，未來相關研究會將流感重症者之流病資訊加入分析。	無修正
3			
4			
5			

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 109 年 12 月 23 日

前至 GRB 系統完成資料抽換。