95年度衛生署疾病管制局自行研究計畫報告書

計畫名稱: 台灣B型流感病毒抗原性變異調查研究

計畫編號: DOH95-DC2017

執行機構: 研究檢驗中心

主 持 人: 林智暉

研究人員: 邱淑君、李政壕

執行期限: 2006/12/31

目　　錄

頁　碼

封面

目錄

壹、 計畫中文摘要 （1）

貳、 計畫英文摘要 （2）

參、計畫內容

一、甲、前言 （3）

二、乙、材料與方法 （5）

三、丙、結果 （7）

四、丁、討論 （9）

五、己、參考文獻 （11）

六、庚、表與圖 （15）

中文摘要

關鍵詞： B 型流行性感冒病毒，抗原變異

為了瞭解 2004-2005 年台灣的 B 型流感病毒的抗原性與基因間的關係，我們取得 348 個分離株進行更深入的分析。雖然 B/Vic lineage 有隨著季節變化增多的現象，但分屬兩個族群不同族群的 B 型流感病毒: B/Yamagata/16/88 (B/Yam) 與 B/Victoris/2/87 (B/Vic)卻同時存在著。與前個流行季的流感病毒序列相比，這一波的 B/Vic-lineage 出現氨基酸替換的變異現象，如此不但可以說明流感病毒不間斷的演化，更從不間斷的強化它傳播全世界的能力。我們的研究成果顯示兩個抗原性與基因特性截然不同的 B/Vic 與 B/Yam lineages 同時在台灣造成流行，也因為如此提高基因重組的發生機率，這些將造成 B 型流感病毒的基因更為多樣性。

Abstract:

Key word: Influenza B virus, hemagglutinin, antigenicity

To characterize the antigenic and genetic relationships of influenza B viruses isolated during the 2004-05 season, a total of 348 isolates collected in different parts of Taiwan were further analyzed. Viruses belonging to both influenza B lineages, B/Yamagata/16/88 (B/Yam) and B/Victoris/2/87 (B/Vic) were detected, although an increasing number of B/Vic lineage isolates was obtained as the season progressed. Recent B/Vic-lineage isolates were found to have additional amino acid substitutions compared to isolates from previous seasons, indicating that viruses of this lineage continue to evolve significantly and may have the capacity to become the dominant influenza B viruses worldwide. Results presented in this report demonstrate that antigenically and genetically distinct viruses within both B/Vic and B/Yam lineages co-circulate and that reassortment among these two lineages occurs frequently contributing to the genetic diversity of the circulating strains.

甲、前言

依據本局監測結果顯示，臺灣地區 2004-2005 年間流行性感冒病毒以 H3 型的 A 型流感病毒株及 B 型流感病毒株為主, 而 B 型病毒流行的型別又與鄰近之日本、大陸、及香港等地不同, 使得台灣的 B 型病毒在國際上較為受到矚目, 具有特殊的防疫意義。由於流感病毒核酸為八段式 RNA 負股基因，容易因為 RNA 複製酶的部不具校正功能產生突變，更容易因基因重組（recombination）或片段重組（reassortment）產生抗原性的改變，進而影響到病毒偵測的敏感性降低與防疫上的困難。

文獻結果顯示，B 型流感病毒原來主要的兩大演化分支 B/Yamagata/16/88 及 B/Victoria/2/87 在日本、義大利及美國都有抗原改變的趨勢，且此抗原的改變與此兩大分支同時間的流行所造成病毒基因的改變有關（26, 27, 28）。基因的改變所造成胺基酸的改變，進而形成了抗原決定位的改變。在日本的研究已證實，由於胺基酸的突變（D164E, N165K），造成抗原決定位的改變，造成日本 2002-2003 年偵測敏感度絳低，同時並預測此新的病毒將可能成為未來流行的主要病毒株（29）。

B 型流感病毒在台灣每年的流行活躍度不一，以 1999-2002 年間為例，B 型流感病毒的分離數各為 202, 603 及 435 件，佔總流感分離件數（1240 件）的 43.96%（30）。此外，2002-2003 年流行的 B 型流感病毒株以 Victoria- like 為主，之後, 2003-2004 年，B 型流感病毒便以 B/Yamagata-like 為主，只有零星的 B/Victoria-like 病毒株出現, 而 2004-2005 年, B/Victoria-like 病毒株又再度活躍, 且因抗原性改變造成一波流行, 佔 B 型病毒總分離株的 50%。

依據疾病管制局與全國合約實驗室的研究結果顯示，2004-2005 年間台灣地區 B 型流感病毒發生流行，為分析台灣境內流行之流感病毒株的免疫特性，並與國際間流行病毒株做比較，以瞭解抗原與核酸變異情形及其演化來源，進而了解本次流行的原因，並瞭解未來流行的趨勢，本計畫擬以流感病毒標準紅血球凝集抑制試驗，進行病毒株檢測，並對兩

年來流感病毒株進行資料整理與分析病毒免疫特性及特別病毒株序列特性分析，進行流行病學的研究，檢討新的檢驗抗原標的，以協助實驗室診斷方式的改進，作為臺灣地區監測與防疫的重要資訊。

乙、材料與方法

1. 病毒核酸萃取

為了提高病毒核酸的萃取產率，擬以商業化的試劑進行萃取，即 QIAGEN 所生產的 QIAamp viral RNA mini Kit 與 ROCH 生產的 MagNa Pure LC Total Nucleic acid Kit。

A. QIAamp viral RNA mini Kit :

操作步驟：

（1）Kit 在開封之後，依照說明書說明加入適量的 96~100% Ethanol 到 AW1 及 AW2 中。加入 1 mL Buffer AVL 到 1 管 Lyophilized carrier RNA 中，以 Vortex 的方式 Mix 使粉末完全溶解後，再吸取回 Buffer AVL 中，保存於 4℃冰箱。

（2）取 570 μL 已製備好的 Buffer AVL（已加入 carrier RNA）到 eppendrof 中再加入 140μL 的檢體，以 Vortex 的方式 Mix。

（3）室溫放置 10 分鐘，過程中以 Vortex 的方式混合檢體，最後稍微離心將管壁上及蓋子上的液體離下，以防蓋子打開液體濺出。

（4）加入 560 μL 96~100% Ethanol 到 eppendrof 中，以 vortex 方法將檢體混合均勻，之後稍微離心將管壁上及蓋子上的液體離下，以防蓋子打開液體濺出。

（5）Total RNA Column 置於 collection tube 中，小心地吸取（4）的混合物一半量到入 column 中。離心 8,000 rpm（6,000 × g）1 分鐘，之後倒掉過濾液。

（6）再將(5)的混合物另一半量倒入 column 中。離心 8,000 rpm（6,000 × g）1 分鐘，之後倒掉過濾液。

（7）加入 500μL 的 Buffer AW1，離心 8000 rpm（6,000 × g）1 分鐘，之後倒掉過濾液。再加入 500μL 的 Buffer AW2，離心 14000 rpm（20000 × g）3 分鐘。

（8）倒掉過濾液後以離心 13,000 rpm（10,000 × g）1 分鐘去除殘留的 ethanol。

（9）將 column 置於新的 collection tube 中，加入 RNase-free 的二次水 50 μL。

（10）靜置 5 分鐘，離心 8,000 rpm（6,000 × g）1~2 分鐘將 RNA 溶出。萃取後的 RNA 可保存於 4℃或-20℃，等待操作 RT-PCR。

2. 病毒培養

將 2004-2005 年流行期儲存之 B 型流感病毒以細胞培養方式重新活化繁殖，以作為實驗的材料。細胞採用對 B 型流感病毒易感之狗腎細胞, MDCK 細胞，以 DMEM 培養基在適當條件下（31），並依據以本局標準作業程序進行培養。

3. 紅血球凝集抑制試驗

由 WHO 流感病毒參考實驗室取得標準抗血清，依據以本局標準作業程序，進行紅血球凝集抑制試驗（32），偵測台灣境內 B 型流感病毒分離株抗原性，依反應結果分析病毒免疫特性。

4. 核酸序列及演化來源分析

以 QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen, Santa Clara, CA) 或利用 automated MagNAPure LC 機器以 MagNAPure LC Total Nucleic Acid Isolation kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) 進行病毒 RNA 萃取後，利用本局現有之流感病毒 HA、NA 基因之核酸引子對，以 one step RT-PCR 試劑 (Qiagen) 進行 Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 反應，並將 cDNA 產物以 QIAquick PCR purification 試劑(Qiagen)純化後，以 BigDye Terminator cycle sequencing kit 搭配 ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) 進行核酸定序反應. 為防止交互污染，所有反應將在不同時間，以不同批試劑重複進行，已確定續列的正確性。分析好的序列將以序列分析軟體(sequence analysis software of the Unversity of Wisconsin Gentic Group, Version 10.3)及 Phylogeny Inference Package (PHYLIP, Version 3.573c) 進行演化樹分析。並與 WHO 流感病毒參考實驗室進行資料交流，以獲得全球流感病毒流行與變異資料，並與台灣本土資料進行比較分析。

丙、結果

Antigenic characteristics of epidemic influenza B viruses

2004年九月至2005年四月，總共有348株B型流感病毒被我們分離出來。其中173 (49.7%)歸屬於B/Yam- lineages，而175 (50.3%)分類於B/Vic-lineages。B/Yam-lineage在HI試驗中幾乎可以完全被抗B/SH (B/Shanghai/361/2002)標準株的雪貂抗血清中和，而B/Vic-lineage分離株則可被抗B/HK (B/Hong Kong/330/2001)或B/Brisbane/32/2002標準株的雪貂抗血清和。但在某一些B/Vic-lineage分離株，如B/Taiwan/39/2004 and B/Taiwan/56/2004，其HI試驗結果比標準品相比卻減少4-8倍(表一)。雖然第一株B/Vic–like的病毒株在2004年九月被分離出來，但呈現新的感染性抗原的病毒株只出現在當年的11月。

Phylogenetic analyses

流感病毒的HA分子主要呈現出抗原性變化的地方在其HA1 domain (positions 25-1140)，因此我們針對HA1基因的做了序列分析。而另一個負責流感病毒脫離細胞的NA基因，我們亦將台灣2004-2005年流行季的B型流感病毒之NA基因定序完成，以便研究2004-2005年間，台灣B型流感病毒的基因序列與其他標準病毒株序列之相關性。這些序HA1及NA序列的演化比對結果(phylogenetic analyses)，呈現在圖一中。2004-2005年的B型流感病毒其序列演化分析樹可以清楚地分為兩大類別，分別是B/Vic-lineage與B/Yam-lineag。B/Vic-lineage又可再細分為B/HK和B/Shandong/7/97，而Yam-lineage亦可歸類於B/Sichuan/379/99及B/Jiangsu/10/2003。

所有分離到屬於B/Yam-lineage的病毒株均擁有H40Y與L131P的氨基酸替換，並呈現出B/SH疫苗株的HA1基因94.1%-97.8%的相似性。B/Jiangsu/10/2003 亞群與B/SH的HA1基因序列相較下，在E128K,、K129N、I180V、 D33A、及 G256R有氨基酸替換的情形(表二A)。所有分離到屬於B/Vic-lineage亞群，B/Shangdong/7/9類別的病毒株，其HA基因序列呈現相對B/SH標準病毒株有95.3%-98.9%的相似性。這些病毒與B/HK亞群的HA1序列差異在於R116 H,、N121T與E164D三個氨基酸的替換。另外我們也發現在某一些病毒株的基因序列在K48E、E115K、A217S分別有變異(表二B)。相較於B/Shandong/7/97，另一個由9個分

離株組成的亞群擁有K80R及K129N兩個變異點，其變異可造成另一個糖化位點(glycosylation site)。在2004-2005年的台灣B型流感病毒株中，我們亦同時在Yamagata-及Victoria-lineage發現129這個位點皆存在變異的現象。

在NA基因的序列分析中，最值得注意的是演化分析的結果呈現出最近病毒分離株中，幾乎同時擁有Victoria-like HA與Yamagata lineage NA (圖一)。並且沒有任何一個病毒株的HA與NA之兩段基因皆來自Victoria lineage，因此這證明了在這分屬兩個不同類別的B型流感病毒正進行著基因重組的現象。

丁、討論

在這篇報導中，我們的分析結果表現原屬不同族群的兩類B型流感卻在同一個流行季共同傳播著。B/Yam-lineage病毒相對來說表現較強，但B/Vic-lineage在2005年的一月到三月有明顯升高的趨勢。在所有歸屬於B/Yam-lineage的173個病毒分離株，其抗原性的表現與均與WHO所建議的當季疫苗株，B/Shanghai/361/2002相當類似。

B/Yam-lineage HA基因在序列演化分析樹的結果出現兩個截然不同抗原性的分支，而B/Vic-lineage的分離株也形成兩類族群，其對B/HK標準株的雪貂抗血清反應不明顯，因此推測B/Vic-lineage的病毒株已發生antigenic drift的現象。

B/Vic-lineage與B/Yam-lineage產生基因重組的現象已經在很多文獻被報導過(1, 2, 6, 7, 10, 16, 17)，這樣的大片段的重組在人類造成大流行(1)。我們的研究資料顯示B/Vic 病毒株的基因序列正呈現類似B/Vic的HA片段與B/Yam NA基因序列，這樣的基因重組現象早在先前便已出現(2, 7)，相對的基因重組現象亦發生在B/Yam-like HA基因及 B/Vic-like NA基因片段 (2, 18)。這樣基因重組的特性，正好可以為B型流感病毒爲什麼能擁有這麼多的基因多樣性與感染性做解釋(1, 2)。

我們在兩類的B型流感品系中均觀察到HA基因存在128 (E to K)及129 (K to N)的變異現象。我們還不清楚這樣的氨基酸更替會產生怎麼樣的功用，或許只會改變某個抗原點，也或許這樣的現象正是不同品系共同躲避人類免疫系統的方法之一(19, 20)。目前為止這樣B型流感病毒的抗原位點更換到底是否會爆發流行仍是未知數(21-23)。

值得一提的是幾乎所有來自兩大品系的B型流感病毒，在197-199的氨基酸序列分別是N、E及T，研究發現這樣的序列會產生一個糖化的位點，寡糖鏈將會對抗原點產生遮蔽效應，如此躲過人類抗體的偵查(24)。

本篇報導中屬於B/Vic-lineage的新變異病毒株，未來或許有能力進一步產生全球性的大流行。此外值得注意的是不段增加的B/Vic-lineag分離株，在我們的研究當中發現其:K80R、K129N及K48E的替換現象，與WHO進來所建議的2006-2007北半球疫苗株(B/Malaysia/2506/2004)有類似的特性(25)。

我們的研究成果顯示2004-2005年的台灣，兩群抗原性與基因特性截然不同的B型流感病毒同時傳播著，勢必造成基因片段的重組現象。這樣的現象也必定會產生新的基因性與

抗原性病毒株，進而造成新一波的大流行。因此唯有不斷的監視流感病毒的基因與抗原性變化始能控制其未來可能產生的大流行。

己、參考文獻

1. Lindstrom SE, Hiromoto Y, Nishimura H, Saito T, Nerome R, Nerome K. 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. 1999; 73:4413-26.
2. McCullers JA, Wang GC, He S, Webster RG. Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. J Virol. 1999;73:7343-8.
3. Kanegae Y, Sugita S, Endo A, Ishida M, Senya S, Osako K, et al. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. J Virol. 1990;64:2860-5.
4. Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota JS, Kendal AP, Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. Virology. 1990;175:59-68.
5. Nakagawa N, Kubota R, Maeda A, Nakagawa T, Okuno Y. Heterogeneity of influenza B virus strains in one epidemic season differentiated by monoclonal antibodies and nucleotide sequences. J Clin. Microbiol. 2000;38:3467-9.
6. Nerome R, Hiromoto Y, Sugita S, Tanabe N, Ishida M, Matsumoto M, et al. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism. Arch Virol. 1998;143:1569-83.
7. Shaw MW, Xu X, Li Y, Normand S, Ueki RT, Kunimoto GY, et al. Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000-2001 and 2001-2002 seasons. Virology. 2002;303:1-8.
8. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2002-2003 season. Wkly Epidemiol Rec. 2002;77:62-66
9. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2003-2004 influenza season. Wkly Epidemiol Rec. 2003;78:58-62.

10. Lin JH, Chiu SC, Su YJ, Chen HY. Isolation of influenza viruses and influenza epidemics in Taiwan area, 1999-2002. 2004. Options for the Control of Influenza V, 2003:430-434.
11. Xu X, Lindstrom SE, Shaw MW, Smith CB, Hall HE, Mungall BA, et al. Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses. Virus Res. 2004;103:55-60.
12. Kendal AP, Joseph JM, Kobayashi G, Nelson D, Reyes CR, Ross MR, et al. 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. 1979;110:449-61.
13. Kendal AP, Lee DT, Parish HS, Raines D, Noble GR, Dowdle WR. Laboratory-based surveillance of influenza virus in the United States during the winter of 1977--1978. II. Isolation of a mixture of A/Victoria- and A/USSR-like viruses from a single person during an epidemic in Wyoming, USA, January 1978. Am J Epidemiol. 1979;110:462-8.
14. Devereaux MD, Parr GR, Lachmann SM, Page-Thomas P, Hazleman BL. The diagnosis of stress fractures in athletes. JAMA.1984;252:531-3.
15. Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. Ann. Rev Biochem. 1987;56:365-94.
16. Barr IG, Komadina N, Hurt A, Shaw R, Durrant C, Iannello P, et al. Reassortants in recent human influenza A and B isolates from South East Asia and Oceania. Virus Res. 2003;98:35-44.
17. Hiromoto Y, Saito T, Lindstrom SE, Li Y, Nerome R, Sugita S, et al. Phylogenetic analysis of the three polymerase genes (PB1, PB2 and PA) of influenza B virus. J Gen Virol. 2000;81:929-37.
18. Hay AJ, Gregory V, Douglas AR, Lin YP. The evolution of human influenza viruses. Philos. Trans R Soc Lond. B Biol. Sci. 2001;356:1861-70.
19. Nakagawa N, Kubota R, Nakagawa T, Okuno Y. Neutralizing epitopes specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the 'loop'. J Gen Virol. 2003;84:769-73.

20. Nakagawa N, Nukuzuma S, Haratome S, Go S, Nakagawa T, Hayashi K. Emergence of an influenza B virus with antigenic change. J Clin. Microbiol. 2002;40:3068-70.
21. Air GM, Laver WG, Luo M, Stray SJ, Legrone G, Webster RG. Antigenic, sequence, and crystal variation in influenza B neuraminidase. Virology. 1990; 177:578-87.
22. Yamashita M, Krystal M, Fitch WM, Palese P. Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. Virology. 1988;163:112-22.
23. Zou S, Prud'homme I, Weber JM. Evolution of the hemagglutinin gene of influenza B virus was driven by both positive and negative selection pressures. Virus Genes. 1997;14:181-5.
24. Nakagawa N, Kubota R, Maeda A, Okuno Y. Influenza B virus Victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002-2003 season. J Clin. Microbiol. 2004;42:3295-7.
25. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2006-2007 season. Wkly Epidemiol Rec.
26. Chi XS, Hu A, Bolar TV, Al-Rimawi W, Zhao P, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM. Detection and characterization of new influenza B virus variants in 2002. J Clin Microbiol. 2005;43:2345-239.
27. McCullers JA, Saito T, Iverson AR.2004. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003. J Virol. 2004;78:12817-12828.
28. Nakagawa N, Nukuzuma S, Haratome S, Go S, Nakagawa T, Hayashi K. Emergence of an influenza B virus with antigenic change. J Clin Microbiol. 2002;40:3068-3070.
29. Nakagawa N, Kubota R, Okuno Y. Variation of the conserved neutralizing epitope in influenza B virus victoria group isolates in Japan.J Clin Microbiol. 2005;43:4212-4214.
30. Lin TY, Huang YC, Ning HC, Tsao KC. Surveillance of respiratory viral infections among pediatric outpatients in northern Taiwan. J Clin Virol. 2004;30:81-85.

31. Numazaki Y, Oshima T, Ohmi A, Tanaka A, Oizumi Y, Komatsu S, Takagi T, Karahashi M, Ishida N. A microplate method for isolation of viruses from infants and children with acute respiratory infections. Microbiol Immunol. 1987;31:1085-1095.

32. Kendal AP, Joseph JM, Kobayashi G, Nelson D, Reyes CR, Ross MR, Sarandria JL, White R, Woodall DF, Noble GR, Dowdle WR. 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. 1979;110:449-461.

庚、

表一 Antigenic characterization of influenza B viruses by HI with antisera against reference strains

antigens/isolates	HI titers with ferret antisera			
	SIC/379	SH/361	HK/330	BRIS/32
B/Sichuan/379/99	**320**	320	<20	<20
B/Shanghai/361/2002	160	**160**	<20	20
B/Hong Kong/330/2001	<20	<20	**160**	160
B/Brisbane/32/2002	<20	<20	160	**320**
B/Taiwan/14/2004	<20	<20	20	<20
B/Taiwan/39/2004	<20	<20	20	<20
B/Taiwan/56/2004	<20	<20	20	20
B/Taiwan/74/2004	<20	<20	20	20
B/Taiwan/61/2004	<20	<20	20	20
B/Taiwan/52/2005	<20	<20	160	80
B/Taiwan/68/2005	<20	<20	80	80
B/Taiwan/70/2005	<20	<20	80	160
B/Taiwan/77/2005	<20	<20	80	40
B/Taiwan/98/2005	<20	<20	80	320
B/Taiwan/103/2005	<20	<20	160	160
B/Taiwan/110/2005	<20	<20	320	80
B/Taiwan/117/2005	<20	<20	160	80
B/Taiwan/121/2005	<20	<20	160	320
B/Taiwan/122/2005	<20	<20	160	320
B/Taiwan/473/2005	<20	<20	160	80
B/Taiwan/13/2004	80	40	<20	<20
B/Taiwan/16/2004	80	160	<20	<20
B/Taiwan/34/2004	80	80	<20	<20
B/Taiwan/43/2004	160	320	<20	<20
B/Taiwan/48/2004	80	80	<20	<20
B/Taiwan/52/2004	80	80	<20	<20
B/Taiwan/54/2004	80	160	<20	<20
B/Taiwan/57/2004	160	320	<20	<20
B/Taiwan/68/2004	80	80	<20	<20
B/Taiwan/43/2005	320	80	<20	<20
B/Taiwan/81/2005	320	160	<20	<20
B/Taiwan/102/2005	640	320	<20	<20
B/Taiwan/165/2005	320	40	<20	<20
B/Taiwan/635/2005	320	160	<20	<20
B/Taiwan/637/2005	320	160	<20	<20

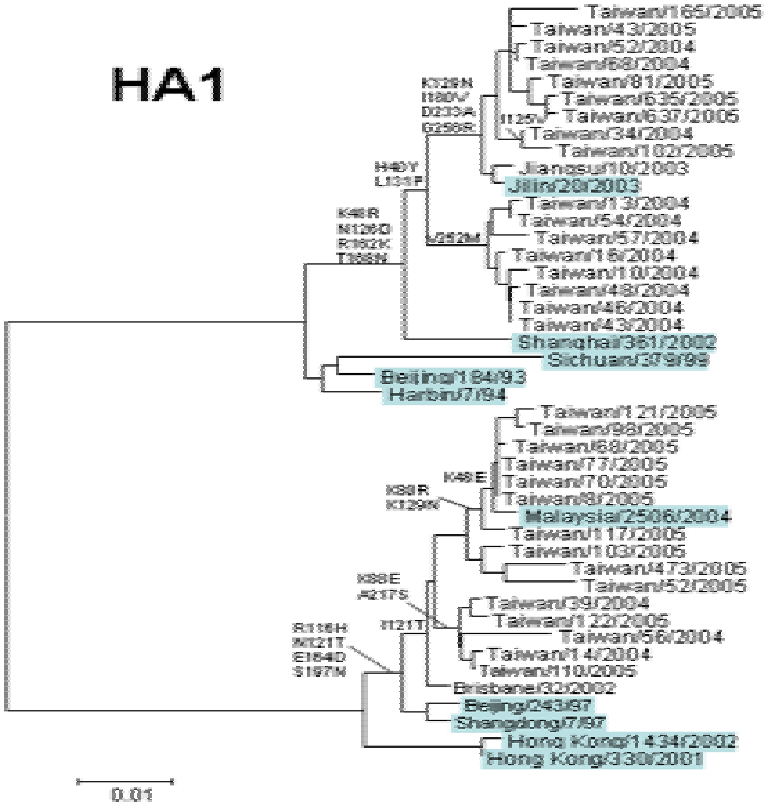
表二 A　Yamagata lineage amino acid analysis

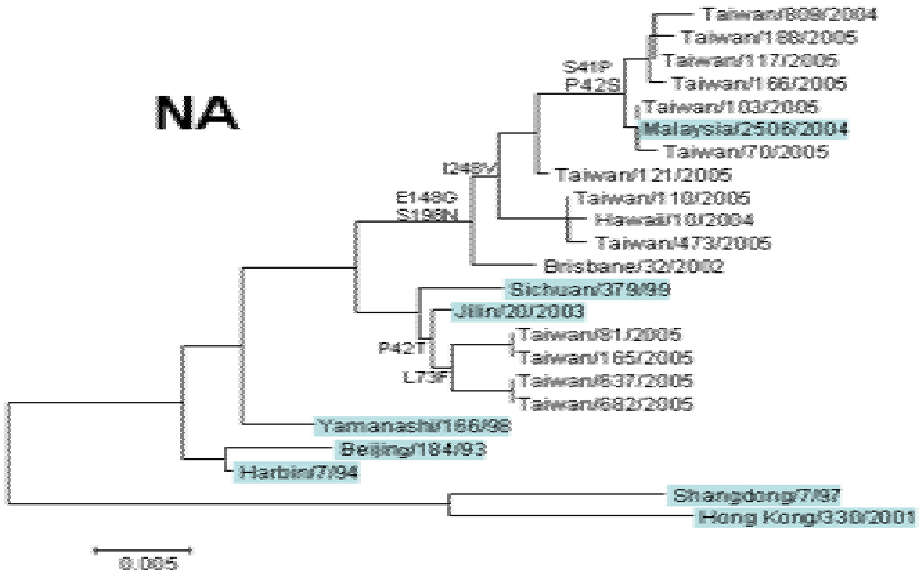
	Amino acid position																																				
strains	37	40	48	56	65	69	75	87	88	101	105	108	112	118	125	126	128	129	131	136	141	149	162	165	168	179	180	183	184	197	199	230	233	252	256	267	294
B/Shanghai/361/2002	I	H	R	D	V	R	T	V	R	R	R	P	R	R	I	D	E	K	L	R	G	K	K	N	N	Y	I	E	G	D	T	G	D	V	G	V	D
B/Beijing/184/93	T		K	N												N			P			R	R		T			K		N	I						
B/Sichuan/379/99	T		K	T			I	I	K							N			P				R		T	H		K	E	N						I	
B/Harbin/7/94	T		K	N												N			P			R	R	D	T		V			N	A						
B/Jiangsu/10/2003	T	Y																N	P		R						V			N			A		R		
B/Jilin/20/2003	T	Y																N	P								V			N			A		R		
B/Taiwan/13/2004	T	Y											K				K		P											N				M			
B/Taiwan/16/2004	T	Y																	P											N				M			
B/Taiwan/34/2004	T	Y												K	V		K	N	P								V			N			A		R		
B/Taiwan/43/2004	T	Y															K		P											N				M			
B/Taiwan/48/2004	T	Y											K				K		P											N				M			
B/Taiwan/52/2004	T	Y				K								K			K	N	P								V			N			A		R		
B/Taiwan/54/2004	T	Y											K				K		P											N				M			
B/Taiwan/57/2004	T	Y	K						K			A	K				K		P											N				M			
B/Taiwan/68/2004	T	Y											K				K	N	P								V			N			A		R		
B/Taiwan/43/2005	T	Y									K			K			K	N	P								V			N			A		R		
B/Taiwan/81/2005	T	Y												K			K	N	P								V			N			A		R		N
B/Taiwan/102/2005	T	Y									K			K	V		K	N	P								V			N		D	A		R		
B/Taiwan/165/2005	T	Y		N	G	K			K		K		K	K			K	N	P	K							V			N		D	A		R		
B/Taiwan/637/2005	T	Y				K					K			K			K	N	P								V			N			A		R		
B/Taiwan/635/2005	T	Y				K				K	K						K	N	P								V			N			A		R		

表二 B　Victoria lineage amino acid analysis

strains	Amino acid position																													
	25	48	62	69	75	80	88	101	105	109	112	115	116	121	128	129	154	156	164	171	180	197	198	199	217	225	265	268	279	293	294
B/Shangdong/7/97	Y	K	D	R	N	K	R	R	R	N	R	E	H	I	E	K	A	M	D	N	I	N	E	N	A	V	R	L	R	A	D
B/Beijing/243/97	N													I			V					T		T							
B/Brisbane/32/2002	N													T										A							
B/Hong Kong/330/2001	N												R	N								S		T							
B/Hong Kong/1434/2002	N												R	N		E			E			S		T							
B/Taiwan/14/2004	N					E			K			K		T	K									T	S						
B/Taiwan/39/2004	N					E								T										T	S						
B/Taiwan/56/2004	N					E						K		T	K						F		K	T	S	F	K	F	G	E	
B/Taiwan/61/2004	N				K	E			K					T										T	S						
B/Taiwan/74/2004	N	E				R								T	K	N								T							
B/Taiwan/52/2005	N		N	K		R		K	K	T	K	K		T	K	N								T							
B/Taiwan/68/2005	N	E				R								T	K	N								T							
B/Taiwan/70/2005	N	E				R								T	K	N								T							
B/Taiwan/77/2005	N	E				R								T	K	N								T							
B/Taiwan/98/2005	N	E				R						K		T	K	N								T							N
B/Taiwan/103/2005	N					R		K			K	K		T	K	N								T							
B/Taiwan/110/2005	N					E						K		T	K									T	S						
B/Taiwan/117/2005	N	E				R								T		N								T							
B/Taiwan/121/2005	N	E				R						K		T	K	N				S				T							
B/Taiwan/122/2005	N					E								T										A	S						
B/Taiwan/473/2005	N		N	K			K	K	K	T	K	K		T	K			V						T	S						

圖一.


HA1
Taiwan/165/2005
Taiwan/43/2005
Taiwan/52/2004
Taiwan/68/2004
Taiwan/81/2005
Taiwan/635/2005
Taiwan/637/2005
Taiwan/34/2004
Taiwan/102/2005
Jiangsu/10/2003
Jilin/28/2003
Taiwan/13/2004
Taiwan/54/2004
Taiwan/57/2004
Taiwan/16/2004
Taiwan/10/2004
Taiwan/48/2004
Taiwan/46/2004
Taiwan/43/2004
Shanghai/361/2002
Sichuan/379/99
Beijing/184/93
Harbin/7/94
Taiwan/121/2005
Taiwan/98/2005
Taiwan/68/2005
Taiwan/77/2005
Taiwan/70/2005
Taiwan/8/2005
Malaysia/2506/2004
Taiwan/117/2005
Taiwan/103/2005
Taiwan/473/2005
Taiwan/52/2005
Taiwan/39/2004
Taiwan/122/2005
Taiwan/56/2004
Taiwan/14/2004
Taiwan/110/2005
Brisbane/32/2002
Beijing/243/97
Shangdong/7/97
Hong Kong/1434/2002
Hong Kong/330/2001
0.01


NA
Taiwan/809/2004
Taiwan/188/2005
Taiwan/117/2005
Taiwan/166/2005
Taiwan/103/2005
Malaysia/2506/2004
Taiwan/70/2005
Taiwan/121/2005
Taiwan/110/2005
Hawaii/10/2004
Taiwan/473/2005
Brisbane/32/2002
Sichuan/379/99
Jilin/20/2003
Taiwan/81/2005
Taiwan/165/2005
Taiwan/637/2005
Taiwan/682/2005
Yamanashi/166/98
Beijing/184/93
Harbin/7/94
Shangdong/7/97
Hong Kong/330/2001
0.005