

計畫編號：DOH-95-DC-2041

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

產製流感病毒標準化抗血清與抗原

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局

計畫主持人：吳和生

研究人員：吳和生、劉銘燦、曾燦璋、繆伯齡、林昭樺、謝
嚴蔚、楊政剛

執行期間：95年1月1日至95年10月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

二、目錄：包括目次、圖次、表次、附錄。

封面	1 頁
目錄	2 頁
摘要	3 頁
本文	
前言	5 頁
材料與方法	8 頁
結果	11 頁
討論	14 頁
計畫重要研究成果及具體建議	17 頁
參考文獻	18 頁
圖、表	
表一	19 頁
表二	20 頁
表三	20 頁
圖一	21 頁

三、摘要

關鍵詞:流感病毒、雪貂、抗血清

流感病毒具高傳染性，且每年在很多國家都會造成區域性的流行。20 世紀曾發生過 4 至 5 次世界大流行(pandemics)，每次間隔 9 至 39 年；其中以 1918~1919 年期間，H1N1 流感病毒造成 4~5 千萬人的死亡最為嚴重。然而，流感大流行間隔的數年之間，因流感造成的累積死亡人數甚至為世界大流行造成死亡數的數倍之譜。流感病毒其基因具高突變性及抗原經常改變，因此，WHO（世界衛生組織）必須依照每年流行的病毒株而更改流感疫苗的組成。流感病毒的抗原型是利用雪貂（ferret）血清進行血球凝集抑制試驗（HI）鑑定，雪貂是目前認為對流感病毒反應最佳的動物模式，其感染流感病毒後的症狀與人類非常相似，因此免疫後的雪貂血清被用來分辨流感病毒的血清型別。為了監控台灣流感病毒的流行情形，建立雪貂感染流感病毒的動物模式及獲得免疫後的血清是很重要的。在本研究中，我們建立了雪貂飼養與流感病毒感染雪貂的動物模式，並且挑選了四株台灣流行的流感病毒株及一 H5N1 疫苗株進行雪貂免疫，免疫後得到的血清，使用於新分離出的台灣流感病毒的血清分型的鑑定。我們利用此抗血清分析 2004 至 2006 年間台灣流行的 H1N1 病毒的抗原性特性。

Keywords: influenza virus, ferret, antiserum

The Influenza viruses are highly infectious and cause local outbreaks annually in many countries. Four or five pandemics of influenza occurred during the 20th century with intervals of 9–39 years. The H1N1 pandemic of 1918–19 was the most devastating, with 40–50 million deaths. However, the cumulative mortality from influenza during the intervening years is generally many times greater than that associated with pandemic. The influenza viruses were characterized with high mutation of the genome and frequent change of antigenicity. Therefore, it is necessary that the composition of influenza vaccines are changed and recommended by WHO annually, depending on the circulating viral strains. The antigenic types of influenza viruses were determined by using the haemagglutination-inhibition (HI) tests with postinfection ferret sera. Ferret is considered as the best animal models for influenza virus. The viral infection symptom of ferret is much similar to human. The postinfection ferret sera are required for identifying serotypes of influenza viruses. For surveillance of influenza viruses in Taiwan, it is important to establish the immunization of influenza viruses to ferret model and generate the postinfection ferret sera. In this study, we used the ferrets as the animal model for influenza viruses, including the breeding and immunization of ferret. We selected the predominant circulating strains of influenza viruses in Taiwan for immunization of ferrets and generated 4 local strains isolated in Taiwan and 1 H5N1 vaccine strain of the postinfection ferret sera. We also used these sera to identify the serotypes of the new isolates from Taiwan and characterize the antigenicity of major circulating H1N1 isolates in Taiwan during 2004–2006.

四、本文

前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等

流感病毒是一呼吸道病原體，屬於正黏液病毒科 (Orthomyxoviruses)，是一種內含八個基因段的負股 RNA 病毒，一般以其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) 做為分型標準，HA 是一種病毒結合蛋白，可促使病毒進入細胞大量複製，同時可使紅血球發生凝集作用，它的另一特徵是中和抗體的抗原。NA 則具有酵素的活性，能切斷醣蛋白及細胞受器上的唾液酸，除了可避免病毒聚集成塊外，也能促進病毒自細胞釋出。到目前為止，一共發現了 16 種 HA (H1 至 H16) 與 9 種 NA (N1 至 N9) (Fouchier *et al.*, 2005)，禽類可以感染 H1-H16 以及 N1-N9 的所有亞型，不過目前世界各地的禽流感主要由高致病性的 H5 和 H7 兩種亞型引起，人則較易受到 H1 及 H3 亞型的感染。人類歷史上曾發生過三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)，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 (Nicholson *et al.*, 2003)。

流感病毒的基因體具有高突變率的特性，可經由突變及基因重組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，稱為小變異 (drift)，至於大變異 (shift)，則涉及基因段的互換，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，因此當感染無抵抗力的族群時，易進而造成全球性的大流行(Nicholson *et al.*, 2003)。

歐美等醫藥及公共衛生發達的國家，每年仍有 2-3 萬人死於流感，美國疾病管制局更預估在世界大流行時，美國幾乎會有 2 億人口感染，四千萬到一億人會發病，30-80 萬人需住院。而台灣地區粗估將有 480 萬-1,200 萬人會因感染而發病，其中 3 萬-8 萬人會需要住院。加上我國每天將近萬人出國洽商或旅遊，同時居住中國大陸與台灣之人數更高達 50 萬餘人，一旦發生流感流行，國內外與國際間之防治措施，將面臨極為嚴格之考驗。有鑑於流感病毒對人群的威脅，全球五大洲各國自 1997 年起，針對因應國內特性制訂預防全球大流行防治計畫，其中包括歐洲-英國等十一國、美洲-美國等兩國、亞洲-日本等國、大洋洲-澳洲等國、非洲-南非等國。本國亦積極籌劃因應流感大流行之準備計畫，以有效地掌握流感之流行途徑及趨勢，確實保障國民健康。

依傳染病防治法，「流行性感冒併發重症」為法定傳染病第三類，中央主管機關依法應針對法定傳染病訂定傳染病防治政策及計畫。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，以辨認病毒之型別及變異性，惟目前對於流感病毒分離株之血清分型，處理方法為進行抑制凝集反應法(HI)檢驗，其血清來源皆由美國疾病管制局(CDC)提供，但由於血清仰賴美國 CDC 提供，當全球性流感大流行，鑑定血清國際需求量增加時，可能出現血清短缺之困境。因此製備流感病毒鑑定血清，實在有其必要。為建立病毒型別鑑定時效性，應強化檢驗及鑑定能力，以期能及早採取適當防治措施，避免無謂的損失及民眾恐慌。故本計畫擬建立流感病毒免疫雪貂之動物模式，製備本土流感病毒株型別鑑定試劑。雪貂對人類流感病毒的高感受度和臨床病徵與人類類似，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血清型的依據。因此本實驗的進行，將有助於本土流感相關基礎資料之建立與蒐集，並建立流感動物實驗模式。

材料與方法

流感病毒株之選用與培養：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)，已收集 2003-2006 年台灣疾病管制局 12 個病毒合約實驗室分離的流感病毒株，並將流感病毒 HA 基因部分序列定序。擬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與特有的病毒株，作為後續的研究，以及抗病毒血清的製備。流感病毒可接種於 MDCK 細胞或雞胚蛋。MDCK 細胞 (Madin-Darby canine kidney cell) 以 DMEM 培養基(內含 10% 胎牛血清)於 37℃，5%CO₂ 下繼代培養，大量製備純化流感病毒的抗原，則採用雞胚蛋的方式。

建立以雞胚蛋培養流感病毒

雞胚蛋為流感病毒高敏感宿主，可選用 9~11 日齡 SPF 雞胚蛋進行尿囊腔 (Allantoic Cavity) 及羊膜腔 (Amniotic Cavity) 接種。

尿囊腔 (Allantoic Cavity) 之接種方法如後，1.雞胚蛋先在照光器燈光透視下畫出氣室及雞胚頭部，於氣室邊緣上方 5 mm 處，避開血管及頭部以鉛筆做一記號，碘酒擦拭蛋殼消毒後，打孔器依記號打洞；2.以 1 mL 針筒抽取病毒液，由打好之孔洞，採與雞蛋縱軸平行方向插入，注入 0.2 mL 病毒液；3.接種完成後以膠帶或指甲油封住洞口，置於 34℃ 恆溫箱中培養 48~72 小時。4.經觀察沒有死亡之雞胚蛋放置於 4℃ 下至

少 4 小時以上，待血管收縮後再抽取尿囊液。收取的方法為，先將蛋殼表面以碘酒進行擦拭消毒，以無菌剪刀剪破氣室端之蛋殼，再以無菌鑷子避開血管，小心刺破尿囊腔，以 dropper 吸取尿囊液並分裝冷凍保存於-80°C 中。

羊膜腔（Amniotic Cavity）接種方法為 1. 雞胚蛋先在照光器燈光透視下畫出氣室及雞胚頭部，2. 氣室及雞胚位置以打洞器各打出一個小孔，3. 吸取一滴 PBS buffer 滴在雞胚位置之小孔，用橡皮吸頭由氣室小孔製造出負壓，使雞胚位置造出第二個氣室，3. 在新氣室上切開蛋殼，以無菌鑷子小心除去薄膜，即可看到清楚的雞胚胎，4. 以 1mL 針筒吸取病毒液，注射 0.2mL 在羊膜腔內，5. 以膠帶密封後，置於 34°C 恆溫箱中培養 48~72 小時。6. 經觀察沒有死亡之雞胚蛋放置於 4°C 下至少 4 小時以上，待血管收縮後再抽取羊膜腔液，收取的方式為，將蛋殼表面以碘酒消毒後，以無菌剪刀剪開第二氣室處蛋殼，以 5mL 針筒插入羊膜腔內吸取羊膜腔液並分裝冷凍保存於-80°C 中。收取的尿囊腔液或羊膜腔液以 3000rpm 離心 10 分鐘去除沉澱物後，即可測定細胞感染價與 HA 價。

雪貂之引進及飼養管理： 1. 雪貂之進口—由美國 Marshall Farm 引進雪貂，該繁殖畜牧場位於 New York 州西北部 Rochester 與 Syracuse 間的鄉村地區，北濱五大湖區中的安大略湖，為經 USDA 許可與 AAALAC

認證合格的動物供應商。該場僅生產 Beagle 實驗犬及雪貂，品質很穩定。在飼養設施的週邊設備上，Marshall 具合乎 USDA 要求的空調運輸車數輛，並有自己的機械保養設備、完備的血液學及血液生化學實驗室及主要用以作雪貂去勢手術的大型手術設備。雪貂之習性—雪貂對熱很敏感，其最適室溫為 $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ ，為夜行性動物，夏日照時間 13 小時，冬日照時間 10 小時。2. 雪貂之飼養管理—每隻成貂每日約食用 60 公克貂飼料。

結果

建立雪貂的飼養與病毒的感染模式：由美國 Marshall Farm 引進實驗用雪貂，建立飼養管理模式，並於生物安全等級二級（BSL2）實驗室中進行流感病毒免疫，建立免疫流程。人類流感病毒主要有 A 型 H1N1、H3N2 與 B 型，各型其抗原性不同，免疫動物引起的抗體反應亦有差異。

目前最佳化流感病毒免疫雪貂的步驟如下：

1. 將雪貂麻醉(以 Zoletil 50，0.1ml/0.4kg，皮下注射)。
2. 準備流感病毒（病毒價位 10^6 TCID₅₀/ml 以上）當抗原，取病毒培養液 1ml 分 20 滴分別滴入雪貂鼻腔(每邊鼻腔 10 滴)，完成免疫。
3. 十四天後，由頸靜脈採血檢測抗體力價，若抗體力價已達 HI 640 以上，則進行心臟全採血。
4. 若抗體力價尚未達到需求時，再次追加免疫，方式為腳掌皮下注射 0.25 ml 病毒，再經十四天後採血檢測抗體力價。

實驗結果發現，經一次或二次免疫後，產生的抗血清，以 HI 方法檢測，其對病毒的專一性高，若經三次免疫後，其抗體易以同亞型其他分離株，有交叉反應，產生的抗體專一性較低。

建立以雞胚蛋培養流感病毒：已建立以雞胚蛋培養流感病毒：流感病毒 A 型 H1N1 與 B 型已可進行以雞胚胎蛋培養，A 型 H3N2 則不易雞胚蛋培養，改以 MDCK 細胞培養。

流感病毒株的挑選與培養：分析 2003-2006 年台灣疾病管制局病毒合約

實驗室分離的流感病毒株，發現台灣主要流行的病毒株有流感病毒 A 型 H1N1 (2005 年 12 月~2006 年 4 月)，流感病毒 A 型 H3N2 (2003 年 1 月~3 月；2003 年 12 月~2004 年 3 月；2004 年 6 月~9 月；2005 年 4 月~9 月；計四波較大流行)，流感病毒 B 型(2004 年 12 月~2005 年 4 月)。分析流感病毒 HA 基因序列與其抗原性，並從其中挑選主要的流行病毒株，作為後續的研究，目前篩選當作免疫抗原的病毒株有 A/Taiwan/7702/2004 (H3N2), B/Taiwan/8578/2004, A/Taiwan/0071/2006(H1N1), NIBRG-14 (H5N1xPR8), A/Taiwan/083/2006 (H3N2)。與 WHO 公布的疫苗株比較 A/Taiwan/7702/2004 為 A/California/ 7/2004 -like, B/Taiwan/8578/2004 為 B/Hong Kong/330/2001-like, A/Taiwan/0071/2006 為 A/New Caledonia/20/99-like, A/Taiwan/083/2006 為 A/Wisconsin/67/2005-like。A/Taiwan/7702/2004, A/Taiwan/083/2006 無法以雞胚蛋培養，改使用 MDCK 細胞來培養病毒，其餘病毒株可使用雞胚蛋培養病毒。

雪貂抗血清的製備與分析：已建立雪貂的飼養與病毒的感染模式後，已完成五株病毒 A/Taiwan/7702/2004 (H3N2), B/Taiwan/8578/2004, A/Taiwan/ 0071/2006 (H1N1), NIBRG-14 (H5N1xPR8), A/Taiwan/083/2006 (H3N2) 的雪貂免疫，並獲得抗病毒血清，除了 B 型流感病毒 (B/Taiwan/8578/2004)，其他抗血清效價可達 640 以上，且有專一性 (表一)。其中，A/Taiwan/07702/2004 (H3N2) 的抗血清已作

為新分離的流感病毒抗原檢驗的抗血清之一。

2005/2006 台灣主要流行的流感病毒為 A 型 H1N1，為了瞭解這些 H1N1 的特性，將其 HA 基因 497 nt 片段(序列 100~596 nt)為群組的基準，該片段序列完全一樣之分離株視為相同之病毒，總計相同之病毒分離株個數大於等於 5 (n) 的病毒代表株有 16 株，其中二株其 n 為 54 與 51 (表二)。分析這 16 株代表株流行的時間、流行的區域與分子演化(表二與圖一)，可知 2005~2006 流感病毒株 H1N1，明顯分成 2 clades，Clade 1 為與台灣 2004、2005 分離的流感病毒類似，Clade 2 主要在 2005 年 12 月從高雄開始流行(圖一)；此二個 clades 主要的氨基酸位點差異在 T90K, R149K, R212K, T269N(表三)；序列相同的病毒可於短時間內(1~2 個月)散佈至全台，但亦有侷限於某一縣市(表二)；雖然流感突變率高，但仍可見序列(HA 100~596 nt)完全一樣的病毒，在世界持續流行數年，以 A/Taiwan/05515/2005 為例，序列一樣的病毒延續一年以上，若比較世界其他分離株，序列一樣的病毒可延續三年以上；將這些病毒株與 A/Taiwan/ 0071/2006 (H1N1)的抗血清進行 HI 測試，發現 A/Taiwan/2900/2006 為 low reactor，分析其氨基酸序列與其他病毒株的差異主要為氨基酸 144 的改變(K to E，表三)。可見 2005~2006 H1N1 流感病毒株的抗原性已有差異。

討論

雪貂對人類流感病毒的高感受度和臨床病徵與人類類似，故為研究流感病毒常使用的實驗動物，其抗病毒血清，也為國際上判定不同流感病毒血清型的依據。本計畫已初步建立雪貂的飼養與病毒的感染模式，並已製備五株抗病毒血清，後續將使用此抗流感病毒的血清，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，再製備雪貂抗病毒血清。目前對於流感病毒分離株之血清型別的鑑定，使用抑制凝集反應法(HI)，以往血清來源皆仰賴美國疾病管制局提供，其提供的量有限，無法完整分析台灣每年分離的病毒株，易造成有些病毒抗原性已改變而無法即時偵測。2006年美國疾病管制局已不再提供雪貂抗病毒血清，改提供羊抗病毒血清，羊血清只能分H1或H3亞型，無法鑑定病毒的血清型別，所以，為了能即時偵測台灣流感病毒抗原性的變化，製備雪貂抗流感病毒血清，有其迫切性。

流感病毒從鼻腔滴入的方式免疫雪貂，類似自然狀況感染，觀察免疫後的雪貂，發現體溫約升高1~2度，也有打噴嚏與流鼻水之情形，與人類感染流感病毒之病徵類似。而雪貂對不同型別的流感病毒產生的抗體反應有差異，本計畫使用流感病毒A型H1N1、H3N2與B型，目前的免疫流程下，流感病毒A型H1N1與H3N2可在一次免疫後，HI效價達到640以上，但B型流感病毒免疫後產生的抗體反應偏低，需第

二次免疫，我們曾嘗試第三次免疫，結果雖可提高抗體效價，但其抗體與其他同亞型分離株，有交叉反應，產生的抗體專一性較低，故整個雪貂免疫流程，免疫次數不可超過二次，若經兩次免疫後抗體效價即使不高，仍須進行全採血。

本計畫抗原製備方面，採用流感病毒接種於 MDCK 細胞或雞胚蛋，但後續抗原的製備，會以接種 MDCK 細胞為主，原因如下：疾病管制局病毒合約實驗室從檢體分離病毒使用 MDCK 細胞為主，MDCK 細胞分離的病毒，改接種至雞胚蛋，需繼代數次，才能提高病毒的效價，多次繼代易造成病毒突變，所以直接接種至 MDCK 細胞，可避免多次繼代的問題。而且現今流行的人類流感病毒 A 型 H3N2，不易以雞胚蛋培養。所以，為了病毒來源一致性，後續研究將以接種至 MDCK 細胞為主。本計畫製備之抗原已提供其他有關台灣流感病毒抗體監測之三個計畫使用（DOH-95-DC-1402, 1403, 1404）。

2005/2006 年台灣分離的流感病毒有 A 型 H1N1, H3N2 與 B 型，而 H1N1 為主要流行病毒，H1N1 自 2004 年基因型變異大，但抗原性仍屬於 A/New Caledonia/20/99 (2000~2006 WHO 建議的疫苗株)(WHO, 2006)，台灣 2005/2006 年台灣分離的 H1N1 的基因型差異大，可分成 2 clades(圖一)，但血清型與 A/New Caledonia/20/99 類似，2006 年日本流行之 H1N1 亦分成 2 clades，且 Clade 2 的血清型已偏離 A/New

Caledonia/20/99 (Hata *et al.*, 2006)，比對其氨基酸序列發現，氨基酸 144 K to E 的改變，類似台灣 A/Taiwan/2900/2006 的變化，所以，H1N1 之 HA 基因，氨基酸 144 的改變(K to E)，可能是抗原性偏離 A/New Caledonia/20/99 的重要氨基酸位點。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 建立雪貂的飼養與病毒的感染模式
2. 建立以雞胚蛋培養流感病毒
3. 流感病毒株的挑選與培養
4. 製備流感病毒株抗原
5. 製備 5 株流感病毒株雪貂抗血清
6. 利用抗血清分析 2005/2006 H1N1 流感病毒株的抗原特性

參考文獻：

請依台灣醫誌編排方式（例：Travell JG, Rinzler S, Herman M: Pain and disability of shoulder and arm.

J Am Med Asso 1942;120:417-22.）

- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005;79: 2814-2822.
- Hata M, Tsuzuki M, Sakae K, Minagawa H, Kimura T, Miyazaki Y: Sequence characteristics of HA gene in influenza type A (H1N1) virus isolated during the 2005-2006 season in Aichi Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 2006;59: 209-211.
- Nicholson Kg, Wood JM, Zambon M: Influenza. *Lancet* 2003;362: 1733-1745.
- WHO: Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2007 influenza season. *Wkly Epidemiol Rec* 2006;81: 390-395.

(8)圖、表

HAEMAGGLUTINATION INHIBITION REACTIONS		
A	ANTIGENS	FERRET ANTISERA A/Taiwan/7702/2004
	A/Taiwan/7702/2004 (H3N2)	1280
	A/Wellington1/2004 (H3N2)	2560
	A/California/7/2004 (H3N2)	1280
	A/Fujian/411/2002 (H3N2)	640
	A/Panama/2007/99 (H3N2)	320
	A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	<20
	B/Hong Kong/330/2001	<20
B	ANTIGENS	FERRET ANTISERA B/Taiwan/8578/2005
	B/Taiwan/8578/2005	160
	B/Hong Kong/330/01	40
	B/Shanghai/361/102	<20
	B/Johannesburg/5/99	<20
C	ANTIGENS	FERRET ANTISERA A/Taiwan/0071/2006
	A/Taiwan/0071/2006 (H1N1)	2560
	A/Taiwan/7809/2004 (H3N2)	10
	B/Taiwan/8595/2004	<10
D	ANTIGENS	FERRET ANTISERA NIBRG-14
	NIBRG-14 (H5N1xPR8)	640
	A/Taiwan/0071/2006 (H1N1)	160
	A/Taiwan/7809/2004 (H3N2)	20
	B/Taiwan/8595/2004	<10
E	ANTIGENS	FERRET ANTISERA A/Taiwan/083/2006
	A/Taiwan/083/2006 (H3N2)	640
	A/Taiwan/7702/2004 (H3N2)	160
	A/Taiwan/0586/2006 (H1N1)	10

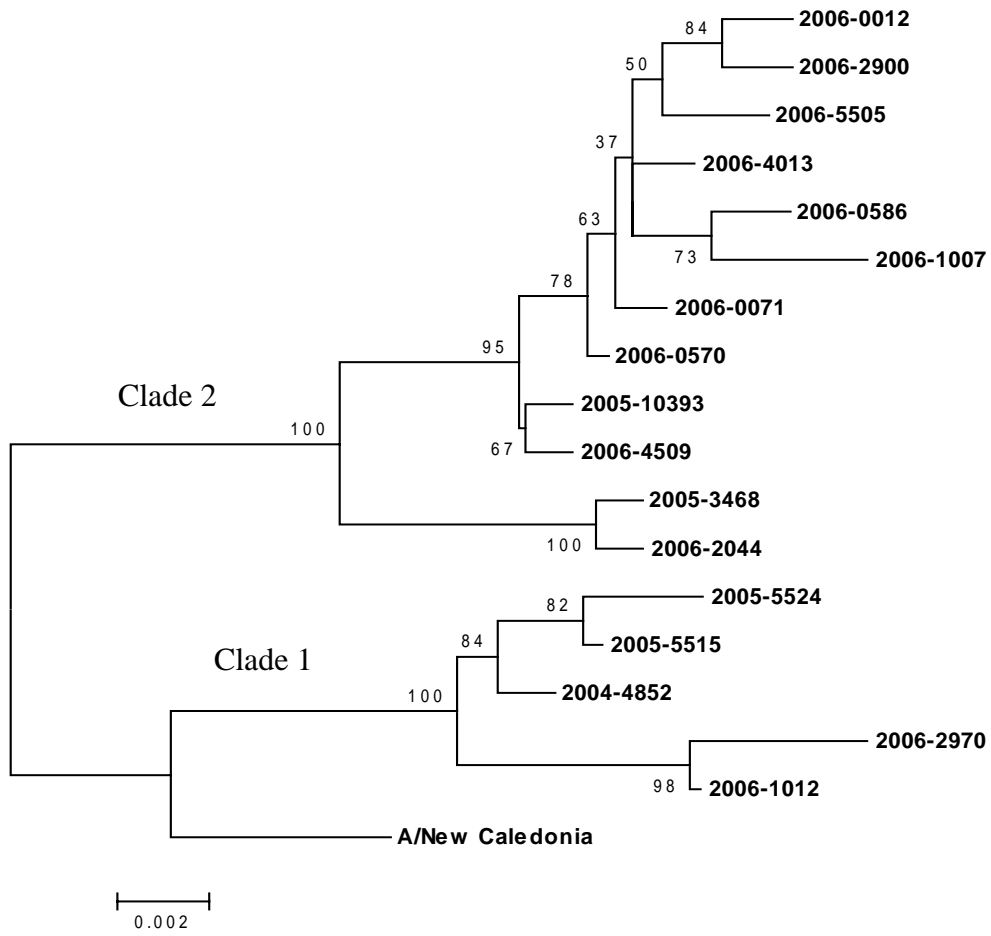
表一、流感病毒抗血清與其他抗原的反應，(A) /Taiwan/7702/2004, (B)B/Taiwan/8578/2004, (C) A/Taiwan/ 0071/2006 (H1N1), (D) NIBRG-14 (H5N1xPR8), (E) A/Taiwan/083/2006 (H3N2)。

	Lab ID	n	HI titer	first case	last case	duration(yy/m/d)	first case	Result of BLAST
Clade 1	2004-04852	12	320	2004/1/5	2005/5/6	0/6/1	花蓮縣	A/England/2005, 0nt A/New York/293/2003,
Clade 1	2005-05515	31	320	2005/1/10	2006/4/2	1/2/22	宜蘭縣	A/Aichi/67/2006, 0nt,
Clade 1	2005-05524	10	320	2005/1/16	2005/11/7	0/9/21	台北市	A/New York/293/2003, 1 nt
Clade 1	2006-01012	8	320	2006/1/11	2006/3/19	0/2/8	苗栗縣	A/New York/293/2003, 3nt
Clade 1	2006-02970	7	640	2006/2/22	2006/4/27	0/2/5	彰化縣	A/New York/293/2003, 5nt
Clade 2	2005-03468	54	320	2005/12/10	2006/4/9	0/4/30	高雄縣	A/Canterbury/106/2004, 4nt
Clade 2	2005-10393	23	320	2005/12/27	2006/4/8	0/4/12	高雄市	A/Aichi/150/2006, 5nt
Clade 2	2006-05505	18	320	2006/1/4	2006/4/6	0/3/2	台中市	A/Aichi/150/2006, 2 nt
Clade 2	2006-04509	20	640	2006/1/8	2006/3/30	0/2/22	台南縣	A/Canterbury/8/2000, 7nt
Clade 2	2006-01007	7	320	2006/1/9	2006/3/19	0/2/10	竹南鎮	A/Aichi/150/2006, 6nt
Clade 2	2006-02900	14	320	2006/1/12	2006/3/16	0/2/4	彰化縣	A/Aichi/150/2006, 1 nt
Clade 2	2006-04013	5	320	2006/1/23	2006/3/24	0/2/1	台北市	A/Aichi/150/2006, 4nt
Clade 2	2006-00586	51	320	2006/2/5	2006/4/26	0/2/21	台北縣	A/Aichi/150/2006, 6nt
Clade 2	2006-00570	19	320	2006/2/29	2006/5/13	0/3/4	台北縣	A/Aichi/150/2006, 3 nt
Clade 2	2006-02044	7	320	2006/3/1	2006/5/1	0/2/0	花蓮縣	A/Canterbury/106/2004, 5nt
Clade 2	2006-00012	5	640	2006/1/3	2006/5/21	0/4/18	台北縣	A/Canterbury/106/2004, 3 nt
Clade 2	2006-0071	19	1280	2006/2/9	2006/5/13	0/3/4	台北縣	A/Aichi/150/2006, 6nt

表二、分析 2005/2006 H1N1 流感病毒 HA 基因序列相同(100~596 nt)個數大於等於 5 (n) 之病毒株特性。

Hem. Caledonia No.	95	96	99	101	102	111	146	157	162	176	182	186	209	224	225	234	249	249	282	287	292	329	331	339	
A/Hem. Caledonia/29/99	E	L	K	T	N	E	T	V	K	R	D	V	E	N	D	R	V	U	T	T	F	A	C	V	S
2004-04852	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	D	-	-	-	R	F	-	-	-	-	A	-	
2006-02970	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	K	-	-	R	F	-	-	-	-	-	-	
2005-05515	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	D	-	-	-	R	F	-	-	-	-	A	-	
2006-01012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	K	D	-	-	-	R	F	-	-	-	V	D	-	
2006-01012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	D	-	-	-	R	F	-	-	-	-	-	-	
2006-02044	-	-	-	K	-	-	-	-	K	S	A	-	D	-	K	-	R	-	H	-	-	-	-	-	
2005-10393	-	-	-	K	-	-	N	A	-	K	-	A	-	D	-	K	-	R	-	H	-	-	-	-	
2005-03468	-	-	-	K	-	-	-	-	-	K	-	A	-	D	-	K	-	R	-	H	-	-	-	-	
2006-04013	-	-	R	K	-	-	N	A	-	K	-	A	-	-	-	K	-	R	-	H	-	-	-	-	
2006-00012	G	-	R	K	-	-	N	T	-	K	-	A	-	-	-	K	-	R	-	H	-	S	-	-	
2006-2900	-	-	R	K	-	-	N	T	E	K	-	A	-	-	-	K	-	R	-	H	-	T	-	-	
2006-05505	-	-	R	K	-	-	N	T	-	K	-	A	-	D	-	K	-	R	-	H	Q	-	-	-	
2006-4509	-	-	-	K	-	-	N	A	-	K	-	A	-	D	-	K	I	R	-	H	-	-	-	-	
2006-00586	-	S	R	K	S	G	N	A	-	K	-	A	-	-	-	K	-	R	-	H	-	-	-	-	
2006-01007	-	S	R	K	S	-	N	A	-	K	-	A	-	D	-	K	-	R	-	H	-	-	-	T	
2006-00570	-	-	R	K	-	-	N	A	-	K	-	A	-	D	-	K	-	R	-	H	-	-	-	-	
2006-0071	-	-	R	K	-	-	N	A	-	K	-	A	-	G	-	K	-	R	-	H	-	-	-	-	
HO number	77	77a	81	92P	92	96	101	132	144	149P	162	169	173	190	211	212P	249	255	260P	263	274	305	317	325	

表三、台灣 2005/2006 年 H1N1 流感病毒 HA 基因序列相同(100~596 nt)個數大於等於 5 之病毒的 HA 基因氨基酸序列的變化。



圖一、2004~2006 H1N1 流感病毒 HA 基因序列相同(100~596 nt)個數大於等於 5 之病毒的親源樹狀圖。