

計畫編號：DOH95-DC-2016

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

流感病毒神經胺酸酶及其他internal gene對病毒抗原
性表現影響力之探討

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：劉銘燦

研究人員：林智暉、邱淑君、李政壕

執行期間：95年1月1日至95年12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

目 錄

頁 碼

封面	1
目錄	2
一、 中文摘要	3
二、 英文摘要	4
三、 前言	5
四、 材料與方法	7
五、 結果	10
六、 討論	13
七、 參考文獻	15
八、 圖、表	18

共 (19) 頁

摘要

流行性感冒病毒具有由 8 段基因體組成，當有不同病毒株同時於地區流行時，易造成基因體片段間的交換，這樣的過程稱之為基因片段重組 (reassortment)。基因片段重組的結果可能十分分歧。2003-2004 年，台灣地區 B 型流感病毒以 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 病毒株台灣卻造成流行，分離株佔 B 型流感分離數的 50%，且呈現非典型季節性的變化，顯示可能已有不同病毒株在臺灣地區同時流行並造成基因多型性的現象。本研究以全長序列分析各病毒片段基因體方式，探討 2003-2005 年病毒基因序列對病毒抗原性表現的影響，並藉由生物資訊的分析，瞭解臺灣地區病毒序列演化與抗原性改變間可能的關係。

關鍵字：流感病毒、基因重組、抗原性、序列分析

Abstract

• The segmented genome of influenza B virus allows exchange of gene segments between cocirculating strains. Phylogenetic profiles of the genes coding for 8 segment proteins of influenza B viruses, both B/Yamagata/16/88 lineage (B/Yam) and B/Victoria/2/87 lineage (B/Vic) isolated from 2003 to 2005 were analyzed in order to understand the evolutionary mechanisms of these viruses. Evolutionary analysis done in the present study provided further evidence for cocirculation of multiple lineages as well as sequestering and reemergence of phylogenetic lineages of the internal genes. 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.

Key words : Influenza Virus 、 Reassortment 、 Antigenicity 、 Phylogenetic analysis

三、前言

流感病毒 (influenza virus) 為台灣重要病原，每年均造成多人上呼吸道感染。流感病毒分為 A、B、C 三型，而以 A 型及 B 型病毒最常感染人類，並持續交替流行。B 型流感病毒與 A 型流感病毒相較，沒有明顯的高峰期，症狀也較不顯著，抗原變異性也較為穩定 (Hall, et al., 1973; McCullers *et al.* 1999)；就整體罹患率而言，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，佔總流感分離件數的 43.96% (Lin *et al.*, 2004)。B 型流行性感冒病毒的分離株主要以 B/Yamagata/16/88 及 B/Victoria/2/87 兩個演化支流為主 (Kanegae *et al.*, 1999, Chan *et al.*, 2004)。然而，基因的改變所造成胺基酸的改變，可形成抗原決定位的改變。

B 型流感病毒屬於 *Orthomyxoviridae*，具有 8 個負股型的單股基因體，包含組成 polymerase 蛋白的 PB1, PB2 及 PA 基因、構成表面抗原的 HA 及 NA 基因，以及轉譯核蛋白質的 NP 基因、形成質體蛋白的 MP 基因及非結構性蛋白的 NS 等。這樣特殊的基因體，可能因為病毒以 RMA 為模板的 RNA 複製酶的不具校正功能，因而產生突變，更容易因基因發生插入 (insertion) 或刪除 (deletion)，重組 (recombination) 或片段重組 (reassortment) 產生胺基酸的變異，造成病毒抗原性或抗藥性或毒性的改變。

在過去，B 型流感病毒的演化分類主要是以 HA 基因為主，然而病毒的重組不僅現在 HA 基因，病毒其他的基因如神經胺酸酶及其他 internal 基因在病毒重組片段交換的機率上與 HA 基因是相似的 (McCullers *et al.*, 1999)。依據研究顯示，傳統上僅以血球凝集抑制法進行 HA 抗原性偵測，並不足以鑑別由病毒在其他基因上因突變、重組及基因片段重組所

造成的病毒特性的改變。

因此，為了更進一步瞭解台灣地區 B 型流感病毒的流行及演化全貌，本研究擬進行 2003-2005 年特別病毒株的全序列分析，包含神經胺酸酶及其他 internal 基因，將這些序列進行演化上的分析，並與其病毒抗原性進行交互探討。

四、材料與方法

1. 細胞及病毒之培養：

研究使用的細胞為 MDCK 細胞株，所使用之培養基為 DMEM medium，細胞培養環境為 36°C，5 % CO₂。

進行分析之病毒在 MDCK 細胞長滿並更換維持培養基後，分別接種待測病毒，培養環境為 34°C，5 % CO₂，每日觀察細胞病變(cytopathic effect；CPE)，待 80%以上 CPE 時，將其冷凍解凍三次，以 3000RPM 離心 15 分鐘收取上清液置於-80°C 備用。

2. 病毒株之鑑定：

免疫螢光染色 (Immunofluorescence antibody test，IFA)：

將離心下來之病毒離心沈澱之細胞以加入 1 毫升磷酸緩衝液(PBS)後，混合成細胞懸浮液，取出 10 µl 的細胞懸浮液作成抹片，乾燥後以冰的丙酮(Acetone)固定 10 分鐘，取出在室溫中乾燥，以個別之單株抗體 (CHEMICON International, Inc)進行間接染色，染色後，以螢光顯微鏡進行鏡檢，細胞呈現蘋果綠螢光則判定為 B 型流感病毒培養陽性。

3. 病毒核酸萃取：

病毒核酸萃以商業化試劑萃取：

以 QIAGEN 的 QIAamp viral RNA Kit 進行核酸萃取步驟：

(1) QIAamp viral RNA Kit：

- A. 560µl 之 carrier RNA+ AVL 混合液與 140µl 檢體混合均勻，室溫靜置 10 分鐘
- B. 10 分鐘後，加入 560µl 絕對酒精，通入 spin column，離心 8000rpm 1 分鐘。
- C. 丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW1 500µl，離心 8000rpm 1 分鐘。

D. 丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW2 500 μ l，離心 14000rpm 3 分鐘。

將 column 置於以標示完整之 1.5ml 離心管，加入 60 μ l 之 DEPC 水，於室溫下放置 3 分鐘，以 8000rpm 1 分鐘離心，收集離心液，置於-20 備用。

4. 流感病毒片段基因之核酸增幅反應：

(1) PCR Amplification

核酸增幅片段如下表所列：

Segment	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	MP	NS
Amplicon	2358	2336	2272	1116	1541	1557	1150	921

以 Qiagen one-step RT-PCR 試劑組進行核酸複製反應，操作程序依照試劑組建議進行。每一反應均加入 10 μ l 之 5X buffer 以及 Q-solution，dNTP 以及 Enzyme mix 均加入 2 μ l，各片段之專一性核酸引子均加入 3 μ l，以純化之病毒 RNA 5 μ l 作為複製模板 (template)，反應最終體極為 50 μ l。反應條件為 50 $^{\circ}$ C 30 分鐘，95 $^{\circ}$ C 15 分鐘，之後以 95 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 60 秒條件進行 35 個循環，最後以 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘進行最終延長 (final elongation)。反應完成後以 1.5% Agarose 進行核酸膠體電泳確認複製片段。進行下一步驟前，產物均存放於 4 $^{\circ}$ C。

5. PCR Product Purification

以 Qiagen 廠牌之 QIAquick Purification Kit 進行複製片段之純化，操作程序依照試劑組建議進行。將產物加入 5X 體積之 PB 溶液，之後加入試劑組所附之 column 中，以 13000 rpm 離心 1 分鐘後，丟棄離出液，再加入 750 μ l 之 PE 溶液，以 13000 rpm 離心 1 分鐘後，丟棄離出液，之後以 DEPC 水將產物溶出，進行序列分析用。

6. 序列分析

利用 ABI 3130 sequence analyzer 進行核酸序列的分析。以 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 試劑組進行定序。操作程序依照試劑組建議進行，將 BigDye Terminator v3.1 與 5X buffer 依照分析片段比例混合後，加入 1ul 反應核酸引子，再加入 2 ul 純化之 cDNA 模板之後，以 95°C 5 秒、60°C 4 分鐘進行 25 個循環的反應。之後以 100% 酒精沉澱後風乾，再將反應產物溶於 HiDi-Formamide 後，加入 96 孔反應盤，上機進行分析。

五、結果

1. 流感病毒抗原性

2003-05 年期間流感病毒在抗原表現上，可以 B/Yamagata lineage 與 B/Victoria lineage 加以區分，且彼此間幾乎沒有相互交叉反應的情形。其中 B/Yam lineage 病毒分離株由 B/Sichuan/379/99-like (Sichuan/379)，轉變為 B/Shanghai/361/2002-like (SH/361)，而對 Sichuan/379 抗血清呈現 Low Reactor (LR) 的情形。而 B/Vic lineage 病毒分離株則以 B/Hong Kong/330/2001-like (HK/330) 為主要抗原型別。絕大多數的 B/Vic 病毒株對於 HK/330 抗血清呈現很好的效價反應，少數 2005 年 B/Vic 病毒分離株對 HK/330 抗血清，HI 效價呈現 LR 的情形。

2. HA 基因片段分析

分析 2003-05 年表現表面抗原 HA 基因片段，如圖一(a)所示，可見台灣 B 型流感病毒可明顯分為兩群，其中一群與 HK/330，即 B/Victoria lineage 代表疫苗株親緣關係相近，另一群則與 SH/361，B/Yamagata lineage 代表疫苗株親緣關係相近。

3. NA 基因片段分析

分析 2003-05 年表現神經胺酸酶 NA 基因，如圖一(b)所示，可以發現分析的 B 型流感病毒 NA 基因並沒有明顯的 grouping，所有的 NA 基因均與 SH/361 疫苗株相近，而與 HK/330 親緣關係相距較遠。

4. PB2 基因片段分析

分析 2003-05 年表現聚合酶蛋白組成基因之一的 PB2 基因片段，如圖二(a)所示，可見 2003-05 年台灣 B 型流感病毒亦可明顯分為兩群，其中一群與 B/Vic 疫苗株 HK/330 親緣關係相近，另一群則與 B/Yam 疫苗株 SH/361 親緣關係相近。

5. NP 基因片段分析

分析 2003-05 年期間核蛋白 NP 基因片段，如圖二(b)所示，台灣 B 型流感病毒仍明顯分為兩群，其中一群與 B/Hong Kong/330/2001，即 B/Victoria lineage 代表疫苗株親緣關係相近，另一群則與 B/Shanghai/361/2002，B/Yamagata lineage 代表疫苗株親緣關係相近。

6. PA 基因片段分析

分析 2003-05 年 B 型流感病毒表現聚合酵素之一的 PA 基因，如圖三(a)所示，可以發現分析的 B 型流感病毒 PA 基因與 NA 基因相似，並沒有明顯的演化上的分群，所有的 NA 基因均與 Sichuan/379 疫苗株相近，而與 HK/330 親緣關係相距較遠。

7. PB1 基因片段分析

分析 2003-05 年期間參與表現聚合酵素之 PB1 基因片段，如圖三(b)所示，台灣 B 型流感病毒也明顯分為兩群，其中一群與 B/Vic lineage 疫苗株 HK/330 親緣關係相近，而另一群則與 B/Shanghai/361/2002，即 B/Yamagata lineage 代表疫苗株親緣關係相近。

8. NS 基因片段分析

2003-05 年間 B 型流感病毒表現非結構蛋白之 NS 基因，如圖四(a)所示，顯示台灣 2003-05 年的 B 型流感病毒 NS 基因，並沒有明顯的演化上的分群，除 2003-T46 分離株與 SH/361 相近外，其餘分離株均與 HK/330 疫苗株相近，且持續演化當中。

9. MP 基因片段分析

分析 2003-05 年間 B 型流感病毒質體蛋白之 MP 基因，亦無明顯的演化上的分群，所有分離株在演化樹分析上均與 B/Yam lineage 的疫苗株

SH/361 相近，而與 B/Vic lineage 之參考疫苗株 HK/330 在親緣關係上相距較遠。

六、討論

台灣地區B型流感病毒的分離情形，自2003年至2004年中均為偶發案例，或為定醫依照就診病患出現疑似類流感症狀而進行採檢分離出。自2004年歲末，B型流感病毒分離率快速增加，並至2005年4月形成一流行高峰，其中還包括數件群聚感染事件的發生。而分析這三年的病毒株抗原性，發現Yamagata lineage與Victoria lineage的病毒株，自2003年起便在台灣地區同時存在（co-circulating），兩種病毒同時存在，便有機會因為被感染人的相互接觸，導致病毒在環境中發生基因重組（reassortment）（McCullers *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2004），影響病毒的抗原性表現。

將台灣地區2003-05年B型流感病毒的8段基因片段進行基因序列分析，發現病毒的基因變化各片段不盡相同。其中在表面抗原血球凝集素HA gene部份，序列可明顯分為兩群（圖一(a)），與外在表現出的抗原性相符。然而在另一表面蛋白神經胺酸酶部份，雖然抗原表現分為兩群，但內部基因組成卻無明顯區分（圖二(b)），同樣的情形亦發生在PA、NS與MP等基因片段，而PB1、PB2及NP基因，則與HA 基因相同，在演化分析上明顯分為兩群（圖二至圖四）。台灣的B型流感病毒內部基因（internal gene）的多樣性表現，究竟是發生過基因交換的結果，還是因為環境的壓力導致病毒基因在演化上，趨向於同一subgroup；亦或是趨向於2個subgroups，仍有待進一步的探討與研究。

為進一步分析群聚事件、爆發流行病毒株以及LR strain 與sporadic case 分離株間的基因片段組成是否具有特殊的變異，我們亦將病毒株流行病學特徵與8段基因序列加以比對分析。其中與當季疫苗株抗血清進行HI效價鑑定結果為反應效價低者（LR cases），以藍色字體表示；而為群聚事件（Cluster cases）之病毒分離株，以紅色字體表示；爆發流行時所得到之分離株（Outbreak cases），以綠色字體表示；而為一般偶發案例

者 (Sporadic cases) ，則以黑色字體表示。結果顯示，群聚檢體、爆發流行病毒株、以及抗原表現上與當年疫苗株呈現LR之病毒株進行8段序列分析比較，並無法將其明確加以區別，與sporadic case 間並無差異性的存在。比較值得注意的是，群聚分離株中，2005-R26與2005-R82, 2005-R86 為來自兩件群聚事件的病毒株，基因組成上卻很相似，顯示該株病毒在流行病學特性上，容易造成群聚感染。

2004年兩株與Sichuan/379疫苗株抗血清反應為LR的病毒株，與2005年爆發流行的分離株，在演化樹上位於同一個分支，推論造成2005年流行的病毒株，在2004年便已被分離出 (2004-T190, 2004-T239) 。當時與Sichuan/379 antiserum反應為LR，但2005年的outbreak strains與SH/361反應呈現well inhibited。此現象與先前對台灣地區A型流感的研究報告相符，顯示台灣地區的病毒在抗原型別表現上，要比WHO 建議的疫苗株約提早一至二個流行季 (Lin *et al.*, 2004; Shih *et al.*, 2005) ，在全球監視系統的角度上來看，台灣地區病毒分離情形及抗原性監測，對全球的流感監測系統，能夠提供相當早且有意義的病毒活動資訊 (activity information) 。

七、參考文獻

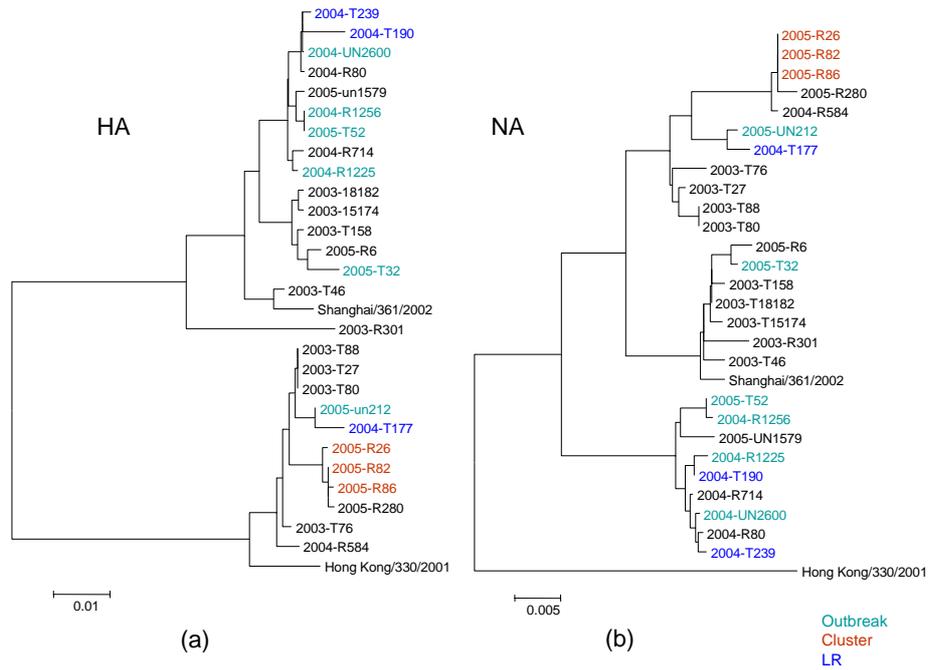
1. **Chan CH, Chan Y, Shieh HK, Tsai CH, Chen CY, Liu SC, Liu WT.** 2004. Phylogenetic analysis of influenza B virus in Taiwan, 1997 to 2001. *J Microbiol Immunol Infect.* **37**:135-144.
2. **Chi XS, Hu A, Bolar TV, Al-Rimawi W, Zhao P, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM.** 2005. Detection and characterization of new influenza B virus variants in 2002. *J Clin Microbiol.* **43**:2345-239
3. **Hall, C. E., M. K. Cooney, and J. P. Fox.** 1973. The Seattle virus watch. IV. Comparative epidemiologic observations of infections with influenza A and B viruses, 1965–1969, in families with young children. *Am. J. Epidemiol.* **98**:365–380.
4. **Hoffmann E, Mahmood K, Chen Z, Yang CF, Spaete J, Greenberg HB, Herlocher ML, Jin H, Kemble G.** 2005. Multiple gene segments control the temperature sensitivity and attenuation phenotypes of ca B/Ann Arbor/1/66. *J Virol.* **79**:11014-11021.
5. **Jackson D, Zurcher T, Barclay W.** 2004. Reduced incorporation of the influenza B virus BM2 protein in virus particles decreases infectivity. *Virology.* **322**:276-285.
6. **Jackson D, Barclay W, Zurcher T.** 2005. Characterization of recombinant influenza B viruses with key neuraminidase inhibitor resistance mutations. *J Antimicrob Chemother.* **55**:162-169.
7. **Kanegae, Y., S. Sugita, A. Endo, M. Ishida, S. Senya, K. Osako, K. Nerome, and A. Oya.** 1990. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the

same epidemic season. *J. Virol.* **64**:2860–2865

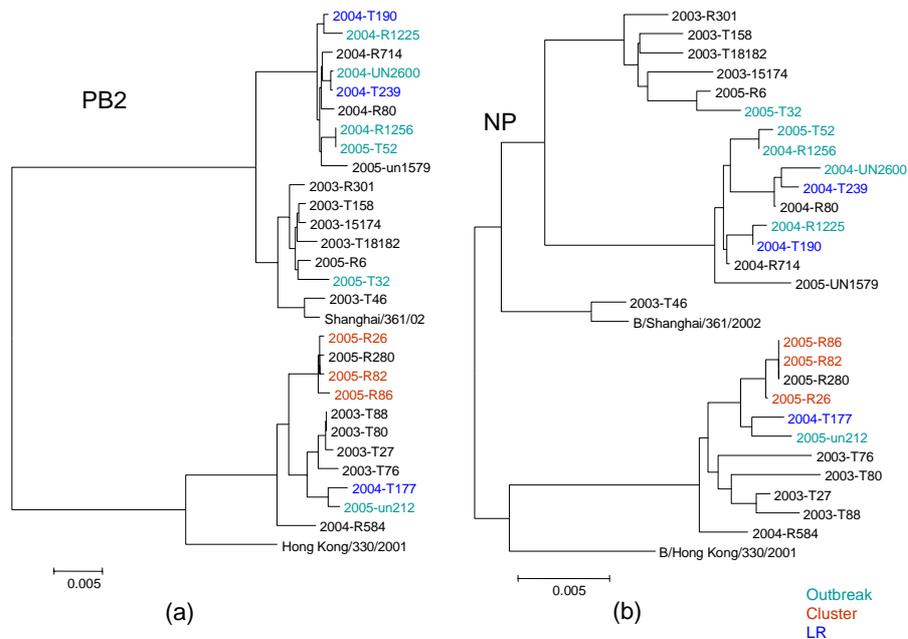
8. **Kendal AP, Joseph JM, Kobayashi G, Nelson D, Reyes CR, Ross MR, Sarandria JL, White R, Woodall DF, Noble GR, Dowdle WR.**1979. Laboratory-based surveillance of influenza virus in the United States during the winter of 1977-1978. I. Periods of prevalence of H1N1 and H3N2 influenza A strains, their relative rates of isolation in different age groups, and detection of antigenic variants. *Am J Epidemiol.* **110**:449-461.
9. **Lin JH, Chiu SC, Su YJ, Chen HY.** 2004. Isolation of influenza viruses and influenza epidemics in Taiwan area, 1999-2002. Options for the Control of Influenza V, 2003:430-434 pp.
10. **Lin TY, Huang YC, Ning HC, Tsao KC.** 2004. Surveillance of respiratory viral infections among pediatric outpatients in northern Taiwan. *J Clin Virol.* **30**:81-85.
11. **Lindstrom, S. E., Y. Hiromoto, H. Nishimura, T. Saito, R. Nerome, and K. Nerome.** 1999. 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.* **73**:4413–4426.
12. **Luo, C., T. Morishita, K. Satou, Y. Tateno, K. Nakajima, and E. Nobusawa.**1999. Evolutionary pattern of influenza B viruses based on the HA and NS genes during 1940 to 1999: origin of the NS genes after 1997. *Arch. Virol.***144**:1881–1891.
13. **McCullers, J. A., G. C. Wang, S. He, and R. G. Webster.** 1999. Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. *J. Virol.* **73**:7343–7348.

14. **McCullers JA, Saito T, Iverson AR.** 2004. Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003. 2004. *J Virol.* **78**:12817-12828.
15. **Nakagawa N, Nukuzuma S, Haratome S, Go S, Nakagawa T, Hayashi K.** 2002. Emergence of an influenza B virus with antigenic change. *J Clin Microbiol.* **40**:3068-3070.
16. **Numazaki Y, Oshima T, Ohmi A, Tanaka A, Oizumi Y, Komatsu S, Takagi T, Karahashi M, Ishida N.** 1987. A microplate method for isolation of viruses from infants and children with acute respiratory infections. *Microbiol Immunol.* **31** : 1085-1095.
17. **Shih SR, Chen GW, Yang CC, Yang WZ, Liu DP, Lin JH, Chiu SC, Chen HY, Tsao KC, Huang CG, Huang YL, Mok CK, Chen CJ, Lin TY, Wang JR, Kao CL, Lin KH, Chen LK, Eng HL, Liu YC, Chen PY, Lin JS, Wang JH, Lin CW, Chan YJ, Lu JJ, Hsiung CA, Chen PJ, Su IJ.** 2005. Laboratory-based surveillance and molecular epidemiology of influenza virus in Taiwan. *J Clin Microbiol.* **43**:1651-1661.
18. **Xu X, Lindstrom SE, Shaw MW, Smith CB, Hall HE, Mungall BA, Subbarao K, Cox NJ, Klimov A.** 2004. Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses. *Virus Res.* **103**:55-60.

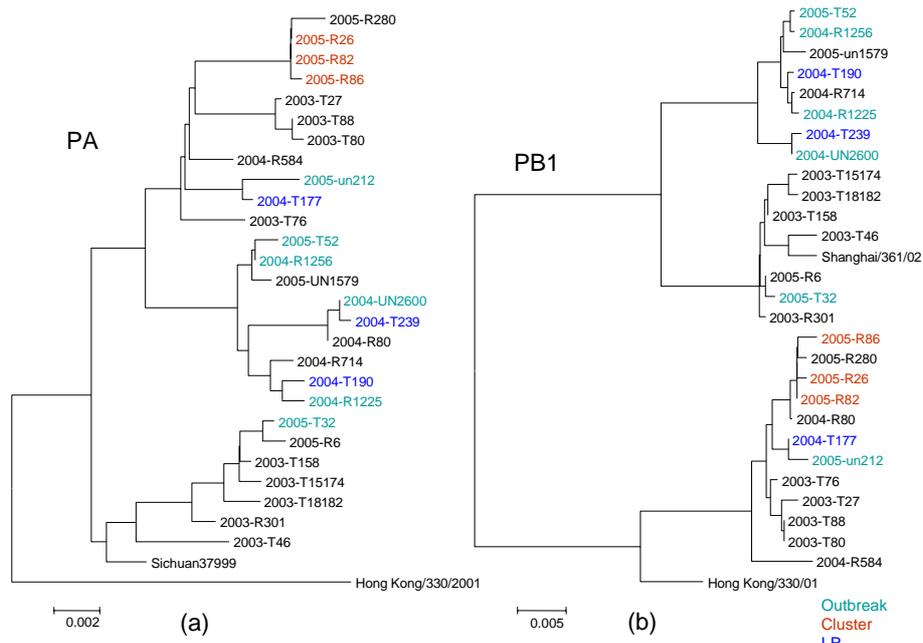
八、圖表



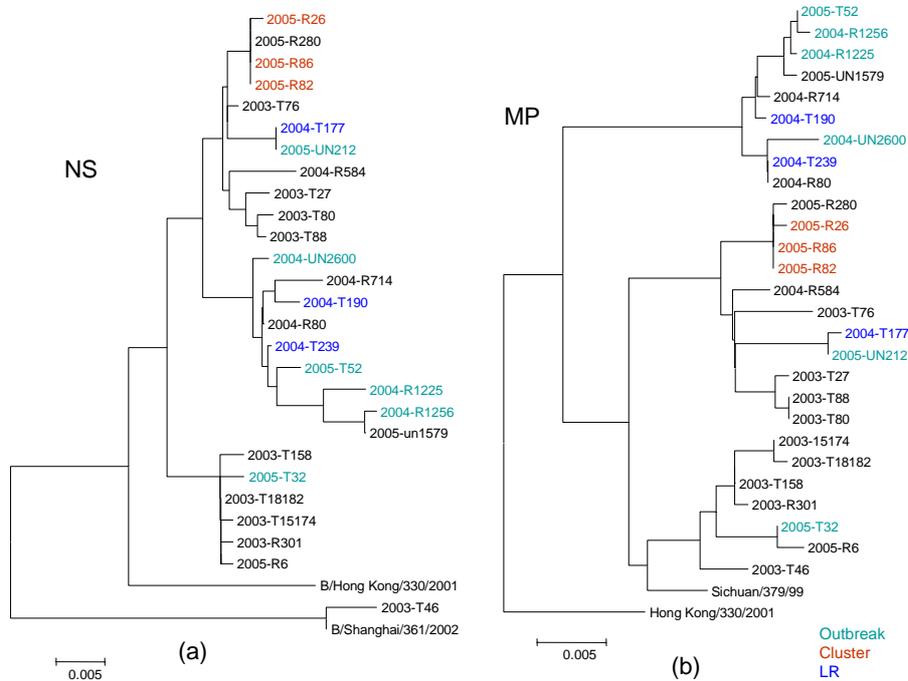
圖一、B 型流感病毒基因序列演化分析。圖(a)為血球凝集素 HA gene 演化分析圖，圖(b)為神經胺酸酶 NA gene 演化分析圖。



圖二、B 型流感病毒基因序列演化分析。圖(a)為 PB2 gene 演化分析圖，圖(b)為核蛋白 NP gene 演化分析圖。



圖三、B 型流感病毒基因序列演化分析。圖(a)為 PA gene 演化分析圖，圖(b)為 PB1 gene 演化分析圖。



圖四、B 型流感病毒基因序列演化分析。圖(a)為非結構蛋白 NS gene 演化分析圖，圖(b)為質體蛋白 MP gene 演化分析圖