

出國報告（出國類別：研究）

流感病毒之新世代檢測技術及資料 分析研習

服務機關：衛生福利部疾病管制署

姓名職稱：林智暉 副研究員

派赴國家：日本

出國期間：民國 103 年 10 月 5 至 14 日

報告日期：民國 103 年 12 月 12 日

摘要

日本國立感染症研究所為因應全球日益嚴重的人類新型流感/禽流感疫情，由原本的第三部病毒室獨立成爲一個完整的流感中心，成爲日本國立感染症研究所負責流感病毒的專責機構。本次研習除了瞭解流感研究中心的實際運作外，也進一步觀摩 WHO 參考實驗室針對全球新型流感/禽流感病毒之監測及最新檢驗技術之發展情形，並研習建置相關系統資訊技術以應用於流感病毒之動態流行趨勢分析，同時經由經驗交流分享，促進日後建立相關合作議題與方向。

目錄

壹、 目的	4
貳、 過程	5
參、 心得	22
肆、 建議事項.....	24
伍、 附錄	25

壹、目的

爲因應國際間不斷傳出人類感染新型流感病毒 (例如 H7N9、H6N1、H3N2v 等)，本次奉派赴日本國立感染症研究所 (National Institute of Infectious Diseases, NIID) 流感中心 (Influenza Center) 進行檢驗技術研習與資訊分享交流，研習內容包括：(1) 流感中心之基礎架構、規劃管理、與未來之研究發展方針；(2) 研習流感新型檢測技術與資料分析系統的研究開發；(3) WHO 參考實驗室之實際運作以及作業流程，包含疫苗種株製備及資料分享。經由研習的過程亦加強與日方的研究合作關係，對將來的國際交流與合作延續有實質的幫助。

貳、過程

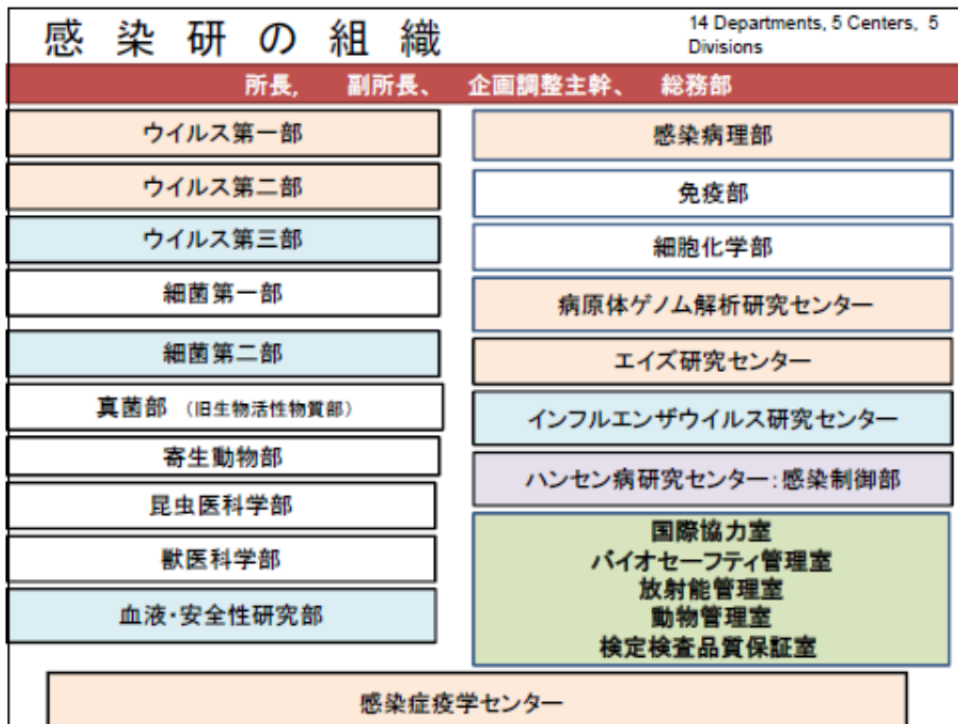
一、行程

日期	地點	工作紀要
10月5日	台北→日本東京	啓程
10月6~13日	國立感染症研究所流感研究中心	研習
10月14日	日本東京→台北	回程

二、內容

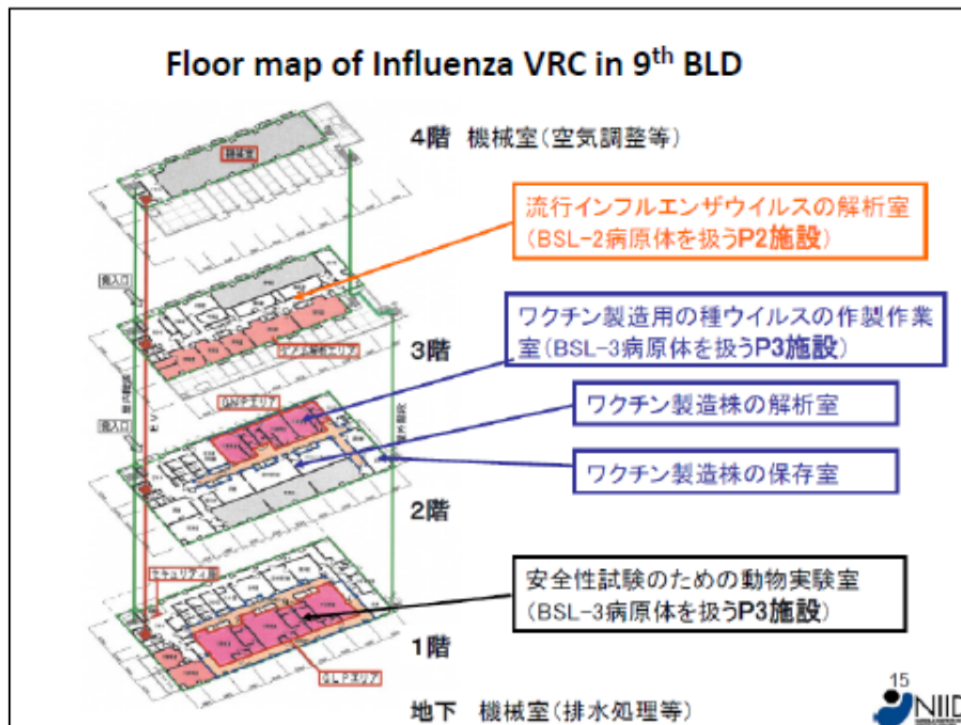
(1) 流感研究中心 (インフルエンザウイルス研究センター)

本次研習地點為位於村山廳舍的流感研究中心。日本國立感染症研究所鑒於 2009 年全球爆發 H1N1pdm(09) 新型流感大流行，以及因應近年來越來越多的新型流感/禽流感病毒包括 A 型 H5N1、H10N8、H7N9、H5N8 等感染人類疫情，於 2009 年 4 月將流感病毒由原本的病毒部門獨立出來，成立直隸於研究所部門架構下的流感病毒研究中心 (インフルエンザウイルス研究センター)，中心橫跨 6 號棟的 5 樓及新建獨棟大樓(感染研 9 號棟) 專責進行流感病毒的相關研究。流感病毒研究中心又細分為 6 室，總人員數計 27 人，其業務範圍囊括流感病原、病因、預防、診斷及治療等相關之研究、WHO 參考實驗室相關業務、細胞培養以及鼻腔接種疫苗之研發以及疫苗製劑品質管理及其他國際合作相關業務等。



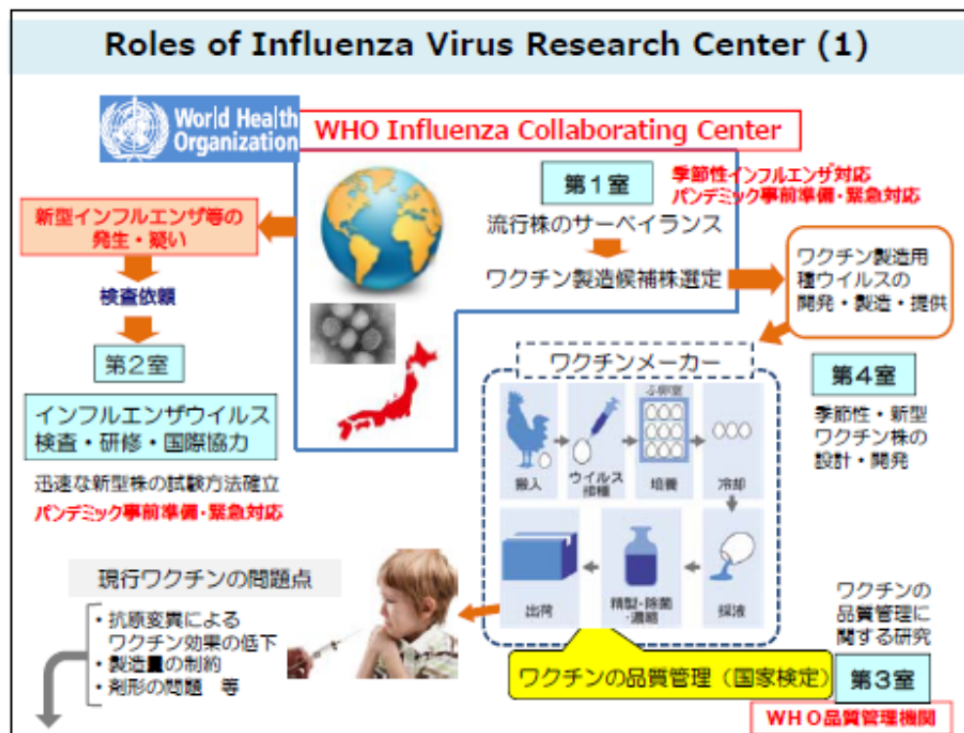
流感研究中心主要位於新建之 9 號樓，包含地上 4 樓以及地下 1 樓，在空

間的規劃上地下一樓及 4 樓為機械室，1 樓為 P3 等級之動物室，2 樓進行流感疫苗株的製造與分析與保存，3 樓則規劃為操作 P2 等級流感病毒檢驗研究空間。依照操作流感病毒之病原體屬性不同規劃操作區域空間，降低實驗間交互污染風險。



(2) WHO 參考實驗室(WHO Influenza Reference Laboratory)運作

WHO 參考實驗室以及日本的國家流感中心 (WHO CC and NIC Japan)設置於流感研究中心的第一室(1st Lab)，主要進行流感病毒的監測，第 1 室負責季節性流行株的監測，在監測的過程中不但同時挑選疫苗製造株及候補株，也與其他 WHO 參考實驗室討論並評估流行株導致流感大流行的可能性，並進一步進行因應策略的擬訂。此外若在監測作業中發現新型流感病毒，則立即將病毒株送至第 2 室，透過實驗室端的研究以及國際合作，快速建立新型病毒株鑑定方法，並針對此新型病毒進行導致大流行的可能性進行事前規劃以及建立緊急對應策略。



日本國家流感中心實驗室同時為 WHO 認可全球四個可提供疫苗株種株的實驗室之一，疫苗種株的篩選與製造以 H7N9 新型 A 型流感為例，在疫苗株選取會議決定以 A/Anhui/1/2013 (H7N9)做為建議疫苗株後，病毒種株就會送入實驗室進行後續疫苗株的製備。以 PR8 病毒株作為骨架，將 Anhui 株的

表面蛋白 HA 以及 NA 接入 PR8 病毒以組成表現 Anhui 株抗原性的重組病毒作為疫苗種株。而在重組出的病毒株中後續還要進行挑選以找到增殖速度快且 HA titer 表現高，且抗原性未變掉的重組疫苗替代株 (如下圖 NIIDRG-10.1)，之後再將此病毒株送交 WHO 各實驗室進行病原性、基因組成的確認以及抗原性的再次確認之後，始可提供給全球各大藥廠進行流感疫苗的製備。

H7N9 ウイルスワクチン製造種株の作出

2013.4.10. A/Anhui/1/2013 株の輸入
2013.4.11~ ワクチン株開発の開始

リバーシジェネティクス法による
ワクチン株ウイルスの作製

A/Anhui/1/2013(H7N9)

PR8株

LLCMK2細胞

抗原性、塩基配列の確認

増殖性が高く、抗原性が維持されている株を選択

↓

•有力候補株: A/Anhui/1/2013 (NIIDRG-10.1)

↓

病原性、遺伝的安定性、抗原的安定性を確認し、WHOへ報告

World Health Organization

Summary of status of development and availability of avian influenza A(H7N9) candidate vaccine viruses

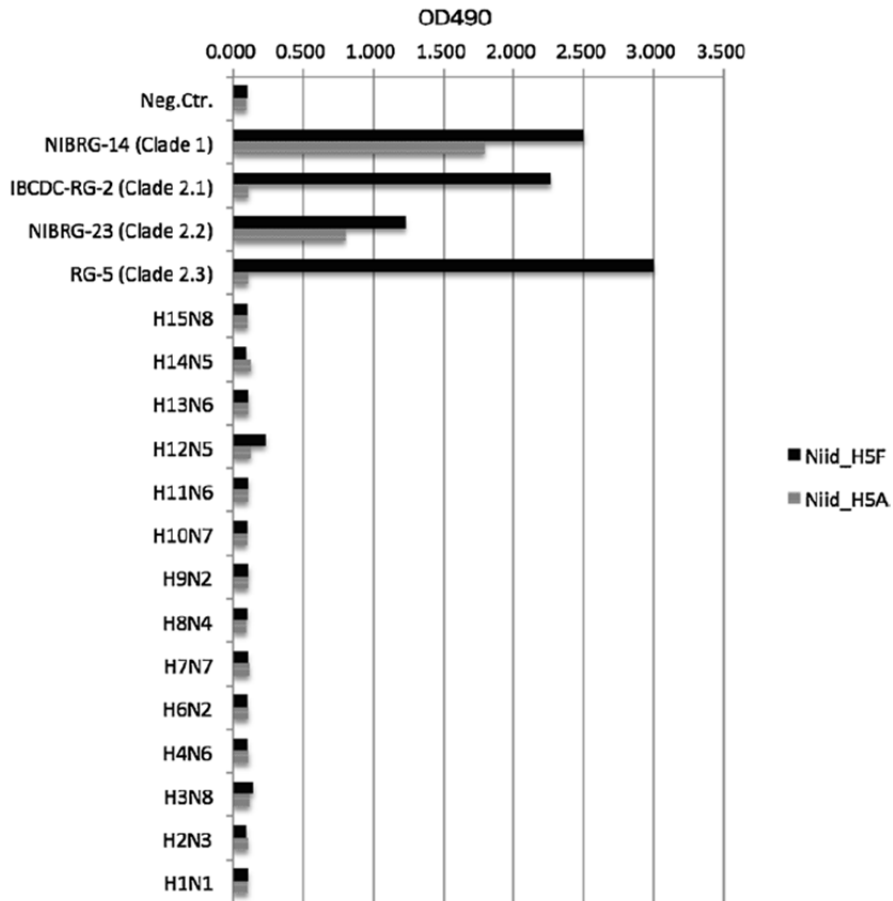
30 July 2013

Parent virus	Candidate vaccine virus	Type of virus or reassortant	Developing institute	Available from
A/Shanghai/2/2013	IBDC-8922A ¹	Reverse genetics	CDC, USA	CDC, USA
Synthetic H7N9	IBDC-252 ²	Reverse genetics	IBDC, UK	IBDC, UK
	CBEL-95-6A ³	Reverse genetics	CBEL, USA	CBEL, USA
A/Anhui/1/2013	IBDC-702 ⁴	Wild type virus	IBDC, UK	WHO CGS
	IBDC-702 ⁴	Reverse genetics	IBDC, UK	IBDC, UK

©国内外のワクチンメーカーへ分与予定

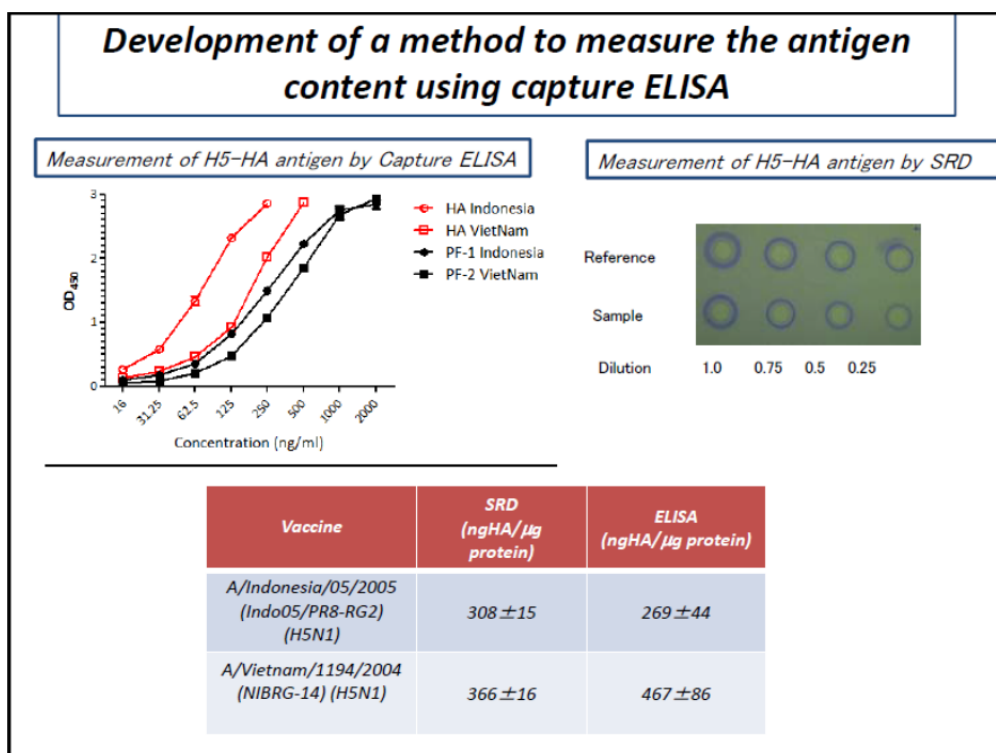
(3) 新型檢測技術與資料分析

目前的各項流感病毒檢測技術雖然快速且多元，但仍各有各的缺點，例如 rRT-PCR 增幅技術雖快速且可精確鑑定型別，但儀器設備及試劑試料價格昂貴；快速檢測試劑可立即初判感染流感型別，但卻有靈敏度的限制。NIID 遂積極開發新型病原體檢測技術以改善這些問題。有鑒於單一檢驗方法有時並無法呈現正確的結果，例如 RNA 偵測系統有其不穩定的因素(包括 RNA 容易 degrade、萃取過程漏失等)，建置另一套抗原偵測系統進行輔助勢在必行。ELISA 自 1971 年研發至今，不論是測抗原或抗體都可達到很高的專一性及靈敏度，且所需精密儀器設備相較之下較分子生物學檢驗方法少。自 1997 年 H5N1 流感病毒開始感染人類至今，由於患者血液中的 H5N1 抗原常因量少而偵測不易，NIID 流感研究中心針對 H5N1 抗原檢測於近兩年成功研發了新型 ELISA 檢測系統，稱為 antigen-capture ELISA，又稱為是 sandwich ELISA。原理主要是將專一性的抗體結合在檢測平盤底部，這些專一性抗體對欲偵測抗原具有極高的親和性，因此能夠在抗原濃度很低的原始檢體中，將欲偵測抗原集中於平盤表面，之後再加入另一組能辨認異於固定相的抗體辨認表位(epitope)的標記抗體來偵測所結合的抗原。NIID 研究團隊利用經過純化的 A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) 的病毒顆粒經 UV-irradiation 或 formaldehyde 去活化後，注入小鼠體內以產生 B-cell hybridoma，之後篩選超過 4000 個 hybridomas，找到 8 個對 H5N1 病毒具專一性的抗體，其中 6 個不但對 H5 的 HA 蛋白具有高度專一性，同時也具有體外中和病毒能力 (in vitro neutralization activity)。而其中又有 4 個抗體可以偵測到所有現今已知所有 clade 的 H5 strain (包括越南株以及印尼株等)且不對其他型別的 A 型流感病毒具感受性。



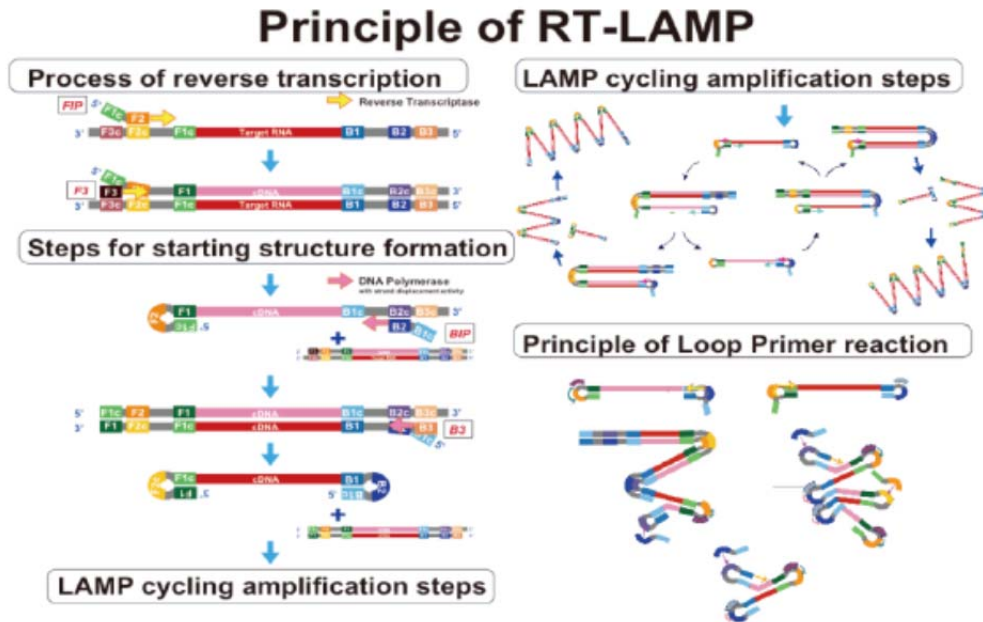
(資料來源：Jpn J. Infect. Dis., 65: 19-27, 2012)

這些抗體其中有 2 個用於 H5N1 病毒細胞培養後的免疫螢光染色鑑定，而其中對 H5N1 病毒 clade 1, 2.1, 2.2, 2.3 均具有高度親合性的單株抗體 Niid-H5F 則用來進行 capture ELISA 抗原檢測，經測試 capture ELISA 的偵測靈敏度已達 50 ng/mL HA，可實際用來輔助 RNA 核酸偵測，檢測抗原濃度較低的疑似病患血清檢體，降低檢體檢驗結果偽陰性的風險。

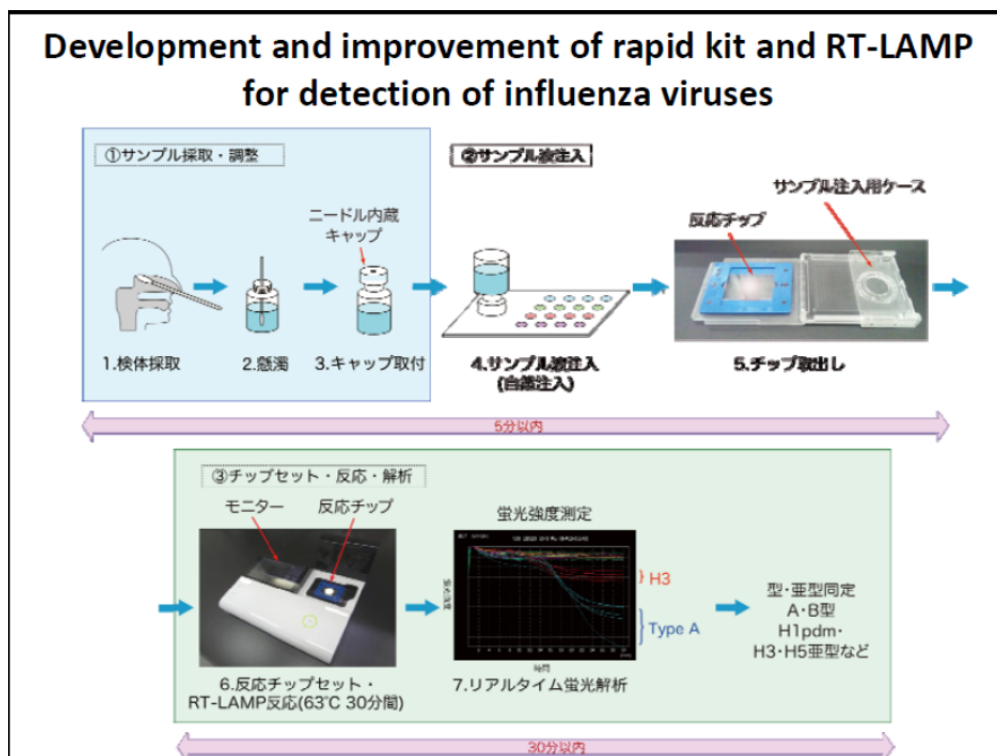


另為克服對於病毒基因檢測技術中因為病毒的RNA量少且不穩定的因素，NIID流感研究中心在今年開始研發另一個流感新型檢測技術，稱為direct RT-LAMP檢測技術 (direct reverse transcription loop-mediated isothermal amplification)，在2000年日本研發出LAMP核酸增幅技術，由於操作簡單，使用儀器僅需溫度可達60-65°C恆溫的水浴槽或加熱板，作用也僅需30-40分鐘，適用於機場檢疫或者是小規模臨床實驗室、偏遠物資缺乏地區或者田野分子流行病學調查研究用。direct RT-LAMP的反應原理，簡單來講，即在進行LAMP反應前加入反轉錄酶，將反應檢體的RNA先轉錄為DNA。後續原理如同LAMP技術，LAMP的denature的步驟由一特定的DNA polymerase取代，所設計的反應核酸引子的 T_m 值也全部控制在特定溫度，省去annealing的步驟。因其primer設計會使被擴增的DNA產物呈現stem-loop的結構，促使self-prime 發生而讓DNA片段長度持續以對數倍數延伸，過程中也不斷釋出啓始或中間反應的DNA片段，使得最終DNA複製片段快速放大，終止反應後，可以magnesium pyrophosphate產生沈澱的方式以肉眼直視結果，也可以利用SYBR Green I螢光顯色來判斷檢

體檢驗結果。目前應用此方法的研究發表均證實LAMP可偵測達10 copies/ μ L左右，具有極高的靈敏度。



Direct RT-LAMP 檢測方法目前 NIID 已被步完成，預計二年後達到商品化的檢測試劑，操作步驟中完全不需要額外核酸萃取的過程。當採集疑似染病患者咽喉部位檢體後，檢體直接加入 15 μ L extraction buffer 裡，直接加入試劑組中的 RNA Amplification Reagent 跟核酸引子混合液 10 μ L，簡單翻轉混合後即可放入恆溫反應槽進行反應，35 分鐘之後便可以透過反應過程螢光之變化情形來判定檢測結果。



NIID 流感研究中心利用 RT-LAMP 檢測技術進行了 H7N9 新型流感病毒的檢驗開發，以 A/Shanghai/1/2013、A/Shanghai/2/2013 以及 A/Anhui/1/2013 的 HA 基因為模版設計了 RT-LAMP 的核酸引子對：

Table 1
Primer set.

Primer name	Sequence (5'-3')	Position ^c	Length (bp)
AH7N9-F3	TTCTGAGATTCAAA	995-1010	16
AH7N9-B3	GGTTGGTTTTCTATAAGCCG	1177-1198	22
AH7N9-FIP ^a (F1c+F2)	ACCAACCATCAATAGGCCTT- CTATTGGTGCTATAGCGG	1061-1081 (F1c) 1021-1039 (F2)	40
AH7N9-BIP ^b (B1c+B2)	GGTTTCAGACACCAGAATGCACA- CCTGTATTGATCAATGCGG	1084-1106 (B1c) 1145-1166 (B2)	45
AH7N9-LF	CCCATCCATTTCAATGAAC	1040-1060	21
AH7N9-LB	ACTGCTGCAGATTACAAAAG	1117-1136	20

^a AH7N9-FIP primer consisted of F1c and F2.

^b AH7N9-BIP primer consisted of B1c and B2.

^c The nucleotide positions of the HA gene of A/Anhui/1/2013 are based on the cRNA sequence obtained from the GISAID database (isolate ID number: EPLISL138739).

實驗結果顯示所設計的引子對 H7N9 新型流感的不但專一性高，對其他禽鳥的 H7N9 病毒以及其他季節性流感均不會產生非特異性增幅反應，同時檢測系統的靈敏度可以達到 15copeis/ μ L。透過 RT-LAMP 檢測方法的建立，不但可以快速區分 H7N9 新型流感與其他季節性流感，在 RT-LAMP 的架構下，未來若有其他型別新型流感出現，均可透過此一系統快速建立出實用的檢測

方法，以縮短病原體偵測時間，提升防疫時效。

Table 2
The specificity of the RT-LAMP assay was tested using serial dilutions of viral RNA from H7 subtype avian influenza A viruses.

Virus	Viral RNA concentrations (copies/ μ L) ^a	Number of positive replicates/number of tests for each assay				
		Dilution rate of viral RNA				
		10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
A/Anhui/1/2013 (H7N9)	1.5 × 10 ⁵	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
A/duck/Fukui/1/2004 (H7N7)	1.5 × 10 ⁵	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2
A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3)	2.9 × 10 ⁷	NT	NT	0/2	0/2	0/2
A/duck/Gunma/466/2011 (H7N9)	7.7 × 10 ⁷	NT	NT	0/2	0/2	0/2
A/duck/Hong Kong/293/1978 (H7N2)	1.4 × 10 ⁸	NT	NT	0/2	0/2	0/2
A/quail/Aichi/1/2009 (H7N6)	8.2 × 10 ⁷	NT	NT	0/2	0/2	0/2
A/Netherlands/33/2003 (H7N7)	4.5 × 10 ⁷	NT	NT	0/2	0/2	0/2

NT indicates "not tested."

^a Viral RNA copy number was calculated based on the M gene of each virus as described in the text.

(4) 流感資料分析系統之建立

現今流感資料分析主要來自於三大部分，包括抗原性的分析、抗藥性的分析、以及基因組成變異分析等。透過這三部分的資料彙整，可以對季節性流感以及新型流感所造成的流行幅度與流行趨勢進行預測與預防。其中抗原性的資料來自於利用標準抗原及抗血清的反應作為依據，進一步判定待測病毒株對標準抗血清的反應是否發生改變(產生 4 倍或以上的差異)，原始檢測資料常以下表方式呈現。

Hemagglutination inhibition tests of influenza A/H1pdm09 viruses

Strains	Passage History	Sample date	Rabbit serum					HI test date: 2014/8/28	
			Wisconsin/10/98 Cell&Egg No.9930-2	California/ 07/09 pdm Egg NIID No.2	California/ 07/09 pdm X-179A Egg NIID No.7	Narita/1709 pdm Cell NIID No.5	Wakayama/ 153/13 pdm Cell No.1	Sapporo/ 163/11 pdm Cell NIID No.1	
REF. Ag.									
A/Wisconsin/10/1998	C3/C3E2 +2		1280	1280	640	1280	640	80	
A/California/07/2009pdm	E2 +2	2009/04/09	160	1280	640	1280	640	160	
A/California/07/2009pdm X-179A	Ex/E1 +2		320	2560	1280	2560	1280	320	
A/Narita/1/2009pdm	MDCK 1 +2	2009/05/08	160	1280	640	640	640	160	
A/WAKAYAMA/153/2013	MDCK 1 +1	2013/11/05	160	2560	1280	2560	1280	160	
A/SAPPORO/163/2011pdm	MDCK 2 +2	2011/03/04	40	80	20	40	20	320	
TEST Ag.									
A/NARA/32/2014	MDCK 2 +1	2014/03/04	320	2560	2560	2560	2560	320	
A/Nepal/0463/2014	MDCK 1 +1	2014/03/28	320	2560	1280	2560	2560	320	
A/MIYAZAKI/51/2014	MDCK 1 +1	2014/04/10	320	2560	1280	2560	1280	320	
A/NIIGATA-C/55/2014	MDCK 2 +1	2014/05/07	320	2560	1280	2560	1280	320	
A/Nepal/0504/2014	MDCK 1 +1	2014/04/03	320	2560	1280	2560	1280	320	
A/Taiwan/448/2014	MDCK 3 +1	2014/04/02	160	2560	1280	2560	1280	320	
A/YAMAGATA/218/2014	MDCK 1 +1	2014/04/25	160	2560	1280	2560	1280	320	
A/Nepal/0506/2014	MDCK 1 +1	2014/04/03	160	2560	1280	2560	1280	320	
A/SAITAMA-C/31/2014	MDCK 3 +1	2014/04/16	320	2560	1280	2560	1280	160	
A/Nepal/0524/2014	MDCK 1 +1	2014/04/01	160	2560	1280	2560	1280	160	
A/Nepal/0511/2014	MDCK 2 +1	2014/03/30	160	2560	1280	1280	1280	320	
A/Nepal/0618/2014	MDCK 1 +1	2014/04/09	160	2560	1280	1280	1280	320	
A/Nepal/0626/2014	MDCK 1 +1	2014/04/10	160	2560	1280	1280	1280	320	
A/NARA/30/2014	MDCK 1 +1	2014/03/03	160	1280	1280	2560	1280	320	
A/OKAYAMA/63/2014	MDCK 2 +1	2014/02/04	160	1280	1280	1280	1280	320	
A/NAGANO/2319/2014	MDCK 1 +1	2014/05/16	160	1280	1280	1280	1280	160	
A/Taiwan/362/2014	MDCK 2 +1	2014/03/18	160	1280	1280	1280	1280	160	
A/Taiwan/459/2014	MDCK 3 +1	2014/04/06	160	1280	1280	1280	1280	160	
A/Nepal/0604/2014	MDCK 1 +1	2014/04/07	160	1280	640	1280	1280	320	
A/Nepal/0651/2014	MDCK 1 +1	2014/04/11	160	1280	640	1280	1280	320	
A/Nepal/0642/2014	MDCK 1 +1	2014/04/06	160	1280	640	1280	1280	160	
A/Taiwan/446/2014	MDCK 3 +1	2014/04/04	80	1280	640	1280	1280	160	
A/SHIKAWA/68/2014	MDCK 1 +1	2014/03/08	160	1280	640	1280	640	160	
A/FUKUSHIMA/95/2014	MDCK 2 +1	2014/05/13	160	1280	640	1280	640	160	
A/Nepal/0444/2014	MDCK 1 +1	2014/03/27	160	1280	640	1280	640	160	
A/Nepal/0446/2014	MDCK 1 +1	2014/03/27	160	1280	640	1280	640	160	
A/Nepal/0448/2014	MDCK 1 +1	2014/03/27	160	1280	640	1280	640	160	
A/Nepal/0460/2014	MDCK 1 +1	2014/03/26	160	1280	640	1280	640	160	
A/Nepal/0515/2014	MDCK 1 +1	2014/03/30	160	1280	640	1280	640	160	
A/Nepal/0530/2014	MDCK 1 +1	2014/04/03	160	1280	640	1280	640	160	
A/Nepal/0638/2014	MDCK 1 +1	2014/04/04	160	1280	640	1280	640	160	
A/SAPPORO/136/2014	MDCK 1 +1	2014/04/30	160	640	640	640	640	160	

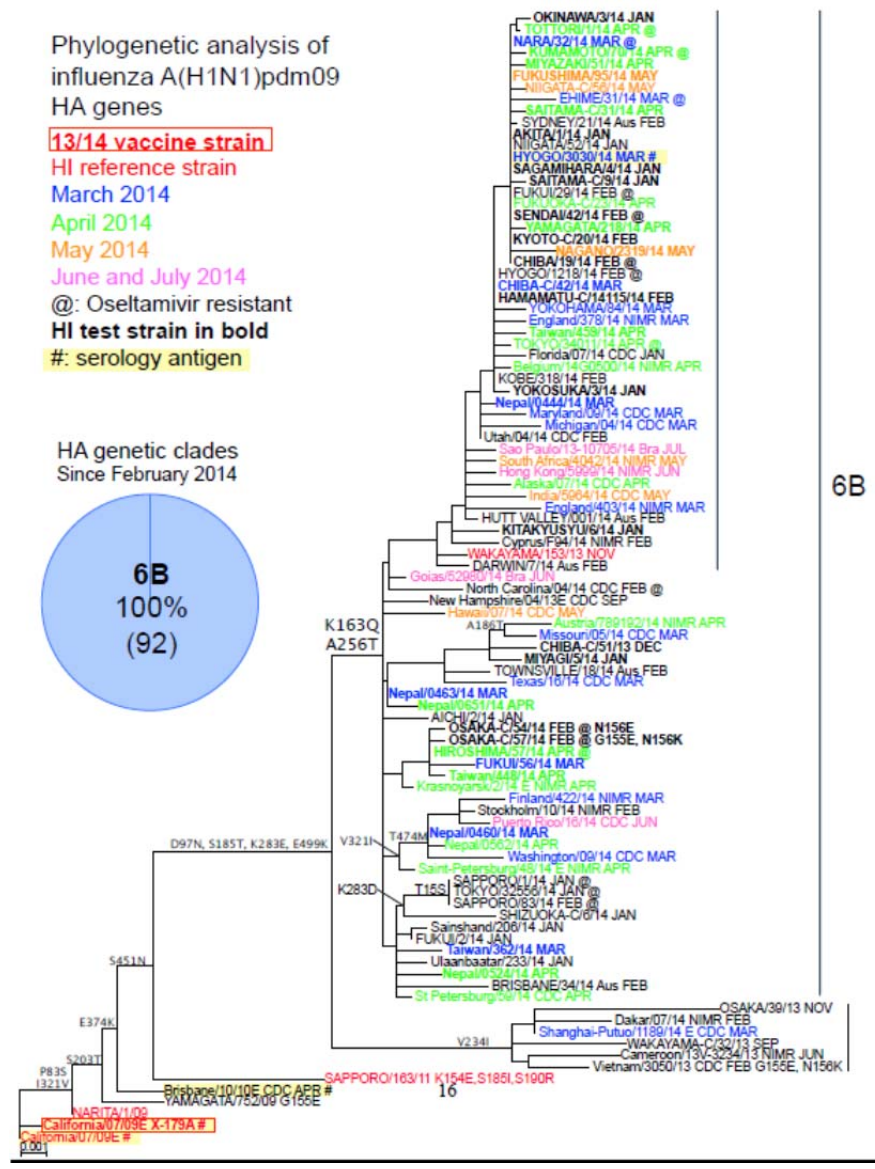
*Antigenic sites
 ND: not determined
 @: oseltamivir resistant
 sequences in phylogenetic tree

而在抗藥性分析方面則針對病毒株所表現的抗藥性以及病毒表面蛋白 NA 基因的組成來加以判定。病毒株抗藥性的表現以 Neuraminidase inhibitors susceptibility assay (NI test) 來針對現在常用的抗病毒藥劑包括 Oseltamivir、Peramivir、Zanamivir 以及 Laninamivir 進行 IC50 測定 (如下表)。而基因組成

則透過定序尋找已知的抗藥性基因變異 Marker (例如 H275Y 等)，以判定病毒是否帶有抗藥性基因。

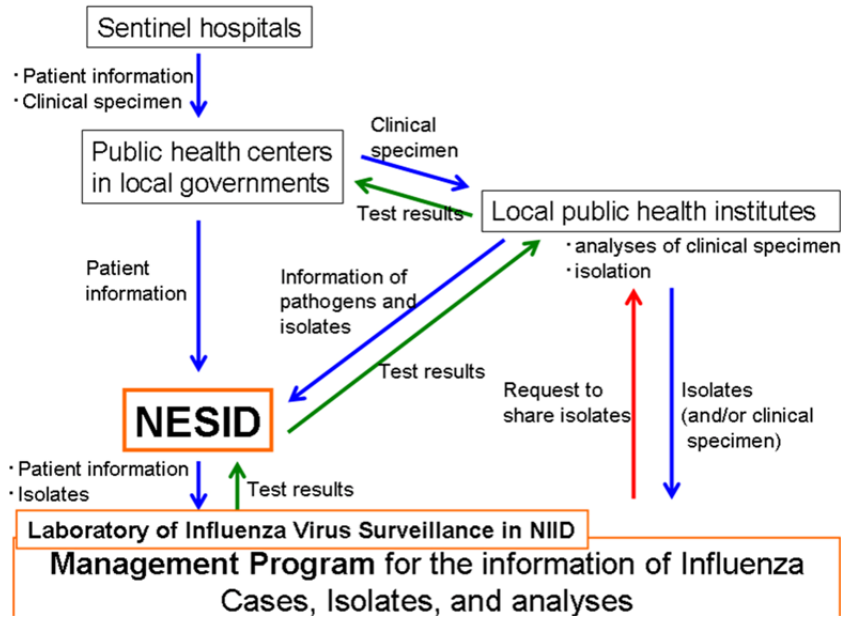
Neuraminidase Inhibitors Susceptibility Assay							
NIID-ID	Strains	Subtype	Sample date	IC50(nM)*			
				Oseltamivir	Peramivir	Zanamivir	Laninamivir
13/14-893	B/Taiwan/156/2014	B/yam	2014/05/01	15.60	0.39	1.44	0.55
13/14-894	B/Taiwan/185/2014	B/yam	2014/05/09	8.44	0.35	0.92	0.48
13/14-895	B/Taiwan/190/2014	B/vic	2014/05/16	22.65	0.56	0.85	3.09
13/14-896	A/Taiwan/362/2014	AH1pdm09	2014/03/18	0.60	0.08	0.60	0.18
13/14-897	A/Taiwan/364/2014	AH3	2014/03/29	0.06	0.06	0.48	0.24
13/14-898	A/Taiwan/442/2014	AH3	2014/03/25	0.15	0.09	0.74	0.54
12/13 - 772	B/Memphis/20/96(CDC reference strain)	B Victoria		2813.81	1104.59	1781.99	3663.78
12/13 - 771	B/Memphis/20/96(CDC reference strain)	B Victoria		6.13	0.84	13.21	5.20
	Average IC50 (Oseltamivir-sensitive B viruses)	B		15.58±8.24	0.75±0.32	1.71±0.78	1.70±0.53
12/13 - 768	A/Texas/12/2007 (CDC reference strain)	AH3	2007/06/09	183.96	0.10	0.73	0.28
03/04 - 372	A/FUKUII/20/2004 (ISIRV reference strain)	AH3	2004/02/02	0.11	0.12	0.87	0.84
	Average IC50 (Oseltamivir-sensitive A/H3N2 viruses)	AH3		0.11±0.07	0.08±0.05	0.35±0.17	0.46±0.18
10/11 - 663	A/Perth/261/2009 (ISIRV reference strain)	AH1pdm09		231.34	30.33	0.15	0.12
10/11 - 662	A/Perth/265/2009 (ISIRV reference strain)	AH1pdm09		1.25	0.06	0.43	0.04
	Average IC50 (Oseltamivir-sensitive A/H1N1pdm viruses)	AH1pdm09		0.21±0.09	0.07±0.03	0.25±0.11	0.34±0.17

最後則是基因組成變異分析，透過基因定序的方法 (通常是表面蛋白 HA 以及 NA 基因) 進行演化分析，除了瞭解病毒基因變異的圖譜，同時也依據病毒株採集的時序來判斷未來可能會造成流行的病毒分支及其演化趨勢。初步總結所有資料的分析可以以下圖表示，包括歷年來疫苗株在演化樹的位置、待分析時期分離株的基因組成以及基因演化分佈、是否為抗藥性分離株以及其抗原表現等。



然而隨著分離株的增加以及新型流感病毒的出現，需要分析彙整的資料愈來愈龐大，所需耗費的人力也愈來愈多。爲了加速資料分析速度與提高精確性，NIID 流感研究中心建置了一套管理系統 (National Eipdemiological Surveillance of Infectious Disease, NESID)。

Surveillance system of infectious diseases



NESID 的概念來自於透過一套資訊管理系統，讓各地的醫院及衛生單位在收到病毒之後可以將病患的資料、各地衛生單位對病毒的檢驗結果輸入資訊管理系統。之後 NIID 流感研究中心可以透過資訊系統得知全國的病毒資料，並可透過系統跟各地實驗室調待分析可疑病毒株來進行後續抗原性、抗藥性以及基因組成分析，掌握全國的流感流病資訊。

Management of isolates

The screenshot shows the 'Management of isolates' software interface. It includes a search and filter section with various dropdown menus and buttons. Below is a table of isolates with columns for accession number, date, virus name, and other details. A red box highlights a specific row in the table.

Accession No.	Year	Month	Day	Virus Name	Strain	Origin	Specimen Type	Collection Date	Collection Location	Collection Method	Other Content	
13/14 891	2014/05/13	B/Taiwan/126/2014	B Victoria	MO	MDOCK 3	3	810	Tai	培養細胞1	2014/04/07	1 海外	外国株
13/14 892	2014/05/13	B/Taiwan/132/2014	B Victoria	MO	MDOCK 3	3	810	Tai	培養細胞1	2014/04/01	1 海外	外国株
13/14 893	2014/05/13	B/Taiwan/155/2014	B Yamagata	MO	MDOCK 2	2	810	Tai	培養細胞1	2014/05/01	1 海外	外国株
13/14 894	2014/05/13	B/Taiwan/185/2014	B Yamagata	MO	MDOCK 1	1	810	Tai	培養細胞1	2014/05/05	1 海外	外国株
13/14 895	2014/05/13	B/Taiwan/190/2014	B Victoria	MO	MDOCK 1	1	810	Tai	培養細胞1	2014/05/16	1 海外	外国株
13/14 896	2014/05/13	A/Taiwan/263/2014	A/Alaska	MO	MDOCK 3	3	810	Tai	培養細胞1	2014/03/28	1 海外	外国株
13/14 897	2014/05/13	A/Taiwan/264/2014	A/HK	MO	MDOCK 2	2	810	Tai	培養細胞1	2014/03/29	2 海外	外国株

當流感分離株進來系統後，會加上 NIID ID，記錄繼代歷程，同時後續進行的抗原資料、甚至基因定序資料均會登錄至管理系統，由於 NIID 流感研究中心亦為 WHO 參考實驗室之一，是以管理系統會進一步將序列資料輸出成 GISAID 可上傳格式，以利後續基因定序資料上傳資源共享。

sequences

The screenshot shows a web application for managing virus sequences. It features a search and filter interface at the top, followed by a main data table. A red box highlights a row in the 'Succession History' section, with a red arrow pointing to it from the word 'sequence'. Below the main table is a 'GISAID deposit sheet' section with a table containing columns like 'Accession', 'Sequence', 'Lineage', 'Passage', 'History', 'Location', 'Province', 'Sub-province', 'Location', 'Host'.

ID	Year	Month	Day	Virus Name	Strain	Host	Location	Province	Sub-province	Location	Host	
13/14	884	2014/06/13	B/Taiwan/185/2014	B Yamao	MDCK	MDCK 1	Taiwan			2014/05/19	1	外型株
13/14	895	2014/06/13	B/Taiwan/186/2014	B Yamao	MDCK	MDCK 1	Taiwan			2014/05/19	1	外型株
13/14	886	2014/06/13	A/Taiwan/182/2014	Akiyoda	MDCK	MDCK 2	Taiwan			2014/03/19	1	外型株
13/14	887	2014/06/13	A/Taiwan/183/2014	Akiyoda	MDCK	MDCK 2	Taiwan			2014/03/19	2	外型株
13/14	888	2014/06/13	A/Taiwan/442/2014	Akiyoda	MDCK	MDCK 2	Taiwan			2014/03/19	1	外型株
13/14	889	2014/06/13	A/Taiwan/443/2014	Akiyoda	MDCK	MDCK 3	Taiwan			2014/04/04	1	外型株
13/14	900	2014/06/13	A/Taiwan/443/2014	Akiyoda	MDCK	MDCK 3	Taiwan			2014/04/02	1	外型株

Accession	Sequence	Lineage	Passage	History	Location	Province	Sub-province	Location	Host
164304	HA: EPI53K/ANKANGAWA/148/2014	H3N2	MDCK 2 +1		Japan				human
164305	HA: EPI53K A/Taiwan/364/2014	H3N2	MDCK 2 +1		Taiwan				human
164306	HA: EPI53K A/Taiwan/442/2014	H3N2	MDCK 2 +1		Taiwan				human
164307	HA: EPI53K A/Taiwan/446/2014	H3N2	MDCK 3 +1		Taiwan				human
164308	HA: EPI53K A/Taiwan/469/2014	H3N2	MDCK 3 +1		Taiwan				human
164309	HA: EPI53K ANNIGATA/502/2014	H3N2	CaCo-2/2		Japan				human

同時管理系統也建置有病毒株的抗藥性資料輸入欄位，包括測定日期、藥劑記錄、測量出來的結果 (IC50 值)。將所有資訊藉由此一系統整合，實驗室工作人員不會因為需手動整理資料造成筆誤，管理者也不需要一天到晚追逐正在操作實驗的成員要結果。透過完善的資料管理系統，能更有精確的匯整所有的實驗數據，以利進行後續的討論分析。

Drug resistances

The screenshot shows a software application window titled 'ウイルス体管理' (Virus Management). It features a search and filter interface at the top with various dropdown menus and date pickers. Below this is a table of virus records. The table has columns for '印刷対象' (Print target), '解所中' (Disinfection status), '受付年度' (Reception year), '受付年月日' (Reception date), 'ウイルス株名' (Virus strain name), '毒型名' (Toxin name), '細胞名' (Cell name), '継代番号' (Passage number), '報告機関名' (Reporting institution name), '検体採取年月日' (Specimen collection date), '継代回数' (Passage count), '行政登録名' (Administrative registration name), '遺伝子型' (Genotype), and '発生状況' (Occurrence status).

Below the table, there is a detailed view of a specific virus entry. This view includes a 'Date of NA inhibition assay' field and a row of 'IC50 values' (0.05, 0.06, 0.48, 0.24). Red boxes and arrows highlight these specific fields.

透過有效率的資訊管理系統建立，不但可以降低人為紀錄資料漏失的風險，當資料庫愈來愈龐大時，便更能展現效率，達到事半功倍的效果。

參、心得

本次研習在日本國立感染症研究所流感研究中心主任 Dr. Takato Odagiri 及其研究團隊包括掌管 Surveillance System 的 Dr. Shinji Watanabe 及各室室長們 (Dr. Kageyama, Dr. Itamura, Dr. Nobusawa, Dr. Asanuma) 傾力相授下，雖然行程緊湊，但是研習內容充實且獲益良多。本次研習包括對流感研究中心的內部整體規劃、WHO 參考實驗室的實際運作；流感新型檢測技術的研究開發以及資訊管理系統的建置與資料分享都有更進一步的學習。

經由本次的研習也發現無論是日本國立感染症研究所或是美國 CDC 的組織架構，在經歷 2009 年 H1N1pdm(09) 流感病毒的全球性大流行後，為因應持續爆發疫情的新型 A 型流感包括目前仍在發生的 H7N9、H5N8、H5N1 以及 H10N8 等，世界各國對於流感病毒的研究資源與投入人力規模都有急速的擴大與進展。相較之下近年來台灣的流感研究資源卻未見增加反而不斷限縮，且在各公衛及農政單位多頭馬車的運作之下，無法建置有效的資訊共享系統，面對著台灣高頻繁的旅遊人口往來以及季節性候鳥遷徙，台灣對於全球性流感的防疫陣線著實令人擔憂。

在本次研習中，感受最深的是日本國立感染症研究所實驗室在開發新型檢測技術時，不是以高點數文獻發表為主要追求目標，而是如何能將先研發的新型檢測技術實際落實於一線檢驗作為優先考量。最明顯的例子便是 capture ELISA 檢測系統的改進以及 RT-LAMP 方法的再進化，前者得從作業量龐大的 4000 個得到的 hybridomas 中經過不斷的測試，最後挑選出最穩定具專一性的單株抗體才進行檢測，而 RT-LAMP 檢測系統可以非常的 user friendly，既不需要精密的設備儀器，也不需要昂貴的試劑材料，更不需要高超的實驗技術，在大家不斷的追求 NGS 等高單價的研究檢測系統的同時，用最實質的方式將快速且準確的檢測系統提供給大眾，建置穩定且有效且令人安心的檢驗方法。研究成果也同步發表，或許雖未刊登在高點數的國際期刊，但一樣對全球防疫做

出貢獻。

本次研習過程亦與國立感染症研究所所長 Dr. Haruo Watanabe 晤談，瞭解 NIID 在國內疾病管制與國際合作之情形，在會談中雙方對於未來的實質合作其實具有相當大的共識與期許，除了生物材料與疫病資訊的交流之外，更進一步的研究合作是雙方所期盼的。總結此次研習除了檢驗技術與研究的切磋學習，在做人處事上也深深感受到日本學者的熱情、謙卑與積極努力的態度。令我深感其實我們同樣處在檢驗、研究與應用發展的工作環境下，如何在自己工作崗位上對防疫做出實質貢獻，將所回饋機關與社會並持續精進之，確實值得深省。

肆、建議事項

1. 在一味追求文獻發表的同時，應思考疾管署的研究與檢驗未來發展。聘任研究人員依照現行規範，二年中就需有研究成果發表於國際期刊的壓力下，往往追求向高深度高點數的研究邁進，以求能順利被期刊接受並發表。建議如果聘任研究人員的聘期未來能改變比照大學或中研院的續聘體制，讓聘任研究人員回歸思考疾管署的任務需求，發展有效且穩定的檢測技術，才是對國內及國際的防疫發揮實質性的貢獻。
2. 流感的防治工作是屬於全球性的防疫戰線，透過持續的國際合作及研究交流，不但能提升我國在公共衛生領域實力都能的能見度，也能強化我國自己的防疫能力。建議應鼓勵同仁積極參與國際合作事務，也給基層檢驗及研究人員有實際出國見習的機會（包括技術與經驗交流），才能增廣國際視野，瞭解國際進展趨勢，也能提升基層人員的榮譽感與責任心。

伍、附錄



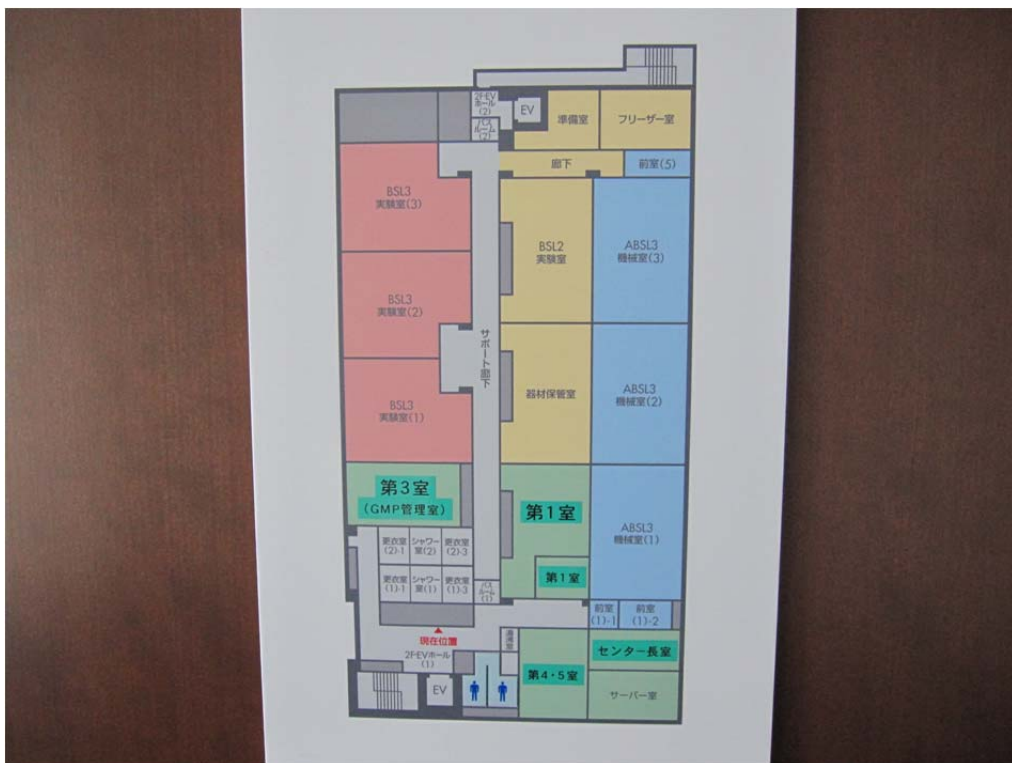
與國立感染症研究所長 Dr. Haruo Watanabe 及流感研究中心 Dr. Takato Odagiri
會談後合照



與流感研究中心研究團隊會議，分享研究成果



流感研究中心所在之村山聽舍園區感染研9號棟



流感研究中心建築之內部空間規劃