

出國報告（出國類別：實習）

## 禽流感分子流行病學軟體分析及高 生物安全動物試驗設施研究

服務機關： 行政院農業委員會家畜  
衛生試驗所  
姓名職稱： 陳麗璇助理研究員  
林育如副研究員  
派赴國家： 美國  
出國期間： 106年11月26日至  
106年12月10日  
報告日期： 107年3月2日

## 目次

一、	摘要.....	3	
二、	目的.....	3	
三、	過程.....	3	
(一)	計畫行程.....	3	
(二)	內容重點.....	5	
1.	線上生物安全課程以及詳閱資訊安全手冊	5	
2.	分子生物軟體分析相關操作與應用	6	
3.	研習及參訪動物生物安全第三等級實驗室	9	
四、	心得及建議.....	14	

## 一、摘要

本次實習由林育如副研究員及陳麗璇助理研究員赴美國農業部農業研究局東南家禽實驗室 (Southeast Poultry Research Laboratory, SEPRL; Agricultural Research Service, ARS; U.S. Department of Agriculture, USDA) 研習有關禽流感分子流行病學軟體分析及高生物安全禽流感動物試驗設施研究與操作實務訓練，進行雙方合作研究，以提升實驗室診斷及研究能力，進而協助防疫需求，並持續建立雙方交流合作關係。

## 二、目的

2014 年~2015 年 H5Nx 高病原性禽流感爆發於韓、日、歐洲、北美及我國，在美國及我國皆造成家禽產業重創。在 2015 年家畜衛生試驗所(畜衛所)的國際研討會期間，與參與國家日、韓、美有熱烈的討論，因此本所於 106 年「家禽流行性感冒與牛呼吸道疾病診斷與控制技術之研究」科技計畫(106 農科-4.1.2-衛-H1)中編列赴美國農業部農業研究局東南家禽實驗室的預算，並於 106 年秋派員前往，期以建立未來雙方實驗室互惠交流的共識。

## 三、過程

### (一)計畫行程

本次研習行程獲東南家禽實驗室主任 Dr. David Swayne 及博士後研究 Dr. Dong-Hun Lee 協助安排 (如圖 1.)，主要與 Dr. Dong-Hun Lee 研習禽流感分子演化分析。

東南家禽實驗室成立於 1962 年，早年主要任務為解決肉雞之呼吸道疾病，後續加入其他重要禽病例如新城病、高病原性禽流感及沙門氏菌等，至 2005 年起專注於禽類病毒性疾病，其組織架構詳見附錄第 3 頁。該實驗室除了動物試驗設施及實驗室等設備，另闢有一區培育 SPF 禽類，使試驗所需之乾淨禽類可自給自足。本次研習期間，該實驗室在 2 年多的規劃預備之後，正著手動工建設新實驗室，

預計工程期間為 2017 至 2022 年，屆時該區域除了面積較原建物大，同時將整合所有實驗室及辦公室。

日期	行程內容
106 年 11 月 26 日	起程，抵達美國喬治亞州雅典
106 年 11 月 27 日~ 106 年 12 月 1 日	於東南家禽實驗室研習 生物安全教育訓練 資訊安全訓練 禽流感分子演化及流行病學軟體分析
106 年 12 月 2 日 106 年 12 月 3 日	假日
106 年 12 月 4 日~ 106 年 12 月 8 日	於東南家禽實驗室進行高生物安全禽流感動物試驗設施研究與操作實務訓練。
106 年 12 月 9 日 106 年 12 月 10 日	搭機返回臺灣



圖 1. 於東南家禽實驗室入口大廳處合影，由左至右依序為 Dr. David Swayne、林育如副研究員、陳麗璇助理研究員及 Dr. Dong-Hun Lee，後方牆面上掛圖為未來東南家禽實驗室新建築完工示意圖。

## (二)內容重點

隸屬於美國農業部農業研究局之東南家禽實驗室係國際級家禽疾病研究重地，主要進行重要家禽第三危險群病原之相關試驗研究，本所已於 105 年 5 月與該單位簽定材料轉移及研究協議書。

1. 線上生物安全課程以及詳閱資訊安全手冊：東南家禽實驗室如前述，除了進行重要家禽第三危險群病原之相關試驗研究，同時為公務部門，若有任何進入生物安全第二等級以上之實驗室以及電腦設備之使用，必須熟知兩者之安全手冊並通過測驗後始得取得通行及操作許可。東南家禽實驗室之生物安全第二等級以上之實驗室規範訓練係為線上教學，採用 CITI program ( Collaborative Institutional Training Initiative ) 訓練平台 (如圖2.)。本次雖是短期研習，但仍必須完成七項課程訓練，包括有：Risk Management: Personal Protective Equipment；Risk Management: Engineering Controls；Risk Management: Emergency and Spill Response；Work Safely with Sharp Instruments；Disinfection and Sterilization；Centrifuge Precautions；Biosecurity。另外也必須接受資訊安全教育訓練，資訊安全手冊詳如下列網址：<https://s3.amazonaws.com/nasda2/media/FY2018-USDA-ISA-Training.pdf?mtime=20171030102648> (如圖3.)。



圖 2. 生物安全第二等級以上之實驗室課程線上教學 (CITI program) 登入後及通過測驗之畫面。

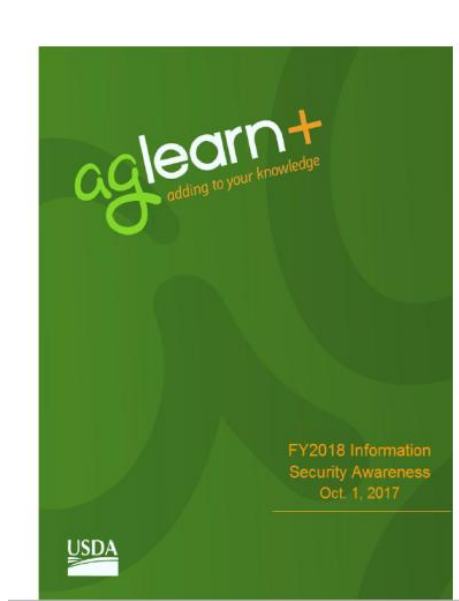


圖 3. 2017 年版本之資訊安全手冊。

## 2. 分子生物軟體分析相關操作與應用：

### i. 次世代定序 (Next generation sequencing, NGS)之介紹：

- a. 檢體的製備、應用 NGS 之實驗室流程及分析軟體介紹：東南家禽實驗室裡建置之 NGS 儀器為 Illumina 公司之 Miseq 機型 (如圖 4.)，簡介其維護及進行讀取時需穩定的底台等相關注意事項，維運一台儀器不會太難。目前應用 NGS 進行大量禽流感病毒之定序，為了使流感基因順利進行定序，其策略需先進行 RT-PCR 以達禽流感全基因增幅之目的，其後相關步驟及流程以 Nextera XT DNA Library Prep Kit 為主，操作說明詳見下列網址：

[https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/samplepreps\\_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-03.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-03.pdf)。

NGS 儀器定序後之資料，則是採用商品化生物資訊軟體 Geneious (如圖 5.)進行序列組合與分析。

- b. 實地展示部份操作流程：進出生物安全第二等級實驗室，需先通過線上課程訓練及測驗。本次實習由實驗室資深技術人員 Diane Smith 帶領進出之流程，進入需使用管制卡感應後，始得進入，並於緩衝區更換衣物鞋子，再穿上實驗長袍及防護眼鏡。生物安全第二等級實驗室具共用區域，並區隔數間實驗室，分屬不同研究人員及試驗目的。本次實習得以進入該管制區，實際見識 NGS 相關流程裡之前處理，例如禽流感全基因增幅、利用 AMPure XP 磁珠套組 (Beckman) 進行核酸純化及螢光核酸定量 (Qubit® dsDNA HS Assay) 等步驟，並由實驗室資深人員詳細解釋各流程裡可能面臨的問題。
- ii. 禽流感序列分析及投稿：
- a. 分子生物資訊軟體分析及操作：以 106 年 2 月份臺灣爆發之 H5N6 亞型家禽流行性感冒病毒 (隸屬 2.3.4.4 分支 H5 亞型之 C 群) 之序列做為材料，進行分子生物軟體分析及操作，包括 NCBI 基因庫序列擷取並運用常見編輯軟體，例如 Excel、Notepad 及免費之序列編輯軟體 Bioedit，進行序列名稱編輯。運用線上免費超級電腦協助運算序列之排列及演化樹之建立，例如 CIPRES Science Gateway (如圖 6.)，該系統僅需線上申請，每年即可使用 30000 CPU 核心小時的額度。
- b. 投稿相關國際期刊：前述研析結果經過反覆討論，並檢視該內容，選擇適合之國際期刊投稿。本次實習期間，適逢臺灣黑面琵鷺檢出隸屬 2.3.4.4 分支 H5 亞型 B 群之 H5N6 亞型病毒，Dr. Dong-Hun Lee 為瞭解該鳥種之飛行途徑，查詢韓國建置之候鳥飛行路徑追蹤系統 <http://mbird.or.kr/>，發現 106 年韓國恰有追蹤 3 隻琵鷺 (如圖 7. 螢光綠色點，另以紅圈標示之)，往返於韓國漢江出海口、長江出海口及臺灣臺南七股與嘉義，該候鳥追蹤系統亦描述於同 (106) 年 10 月本所李婉甄助理研究員赴南韓動植物檢疫局 (APQA) 出國報告。返回臺灣後，仍持續與 Dr. Lee 及 Dr. Swayne 密切聯繫並應用前述分子生物分析操作方式，準備投稿之前置作業。

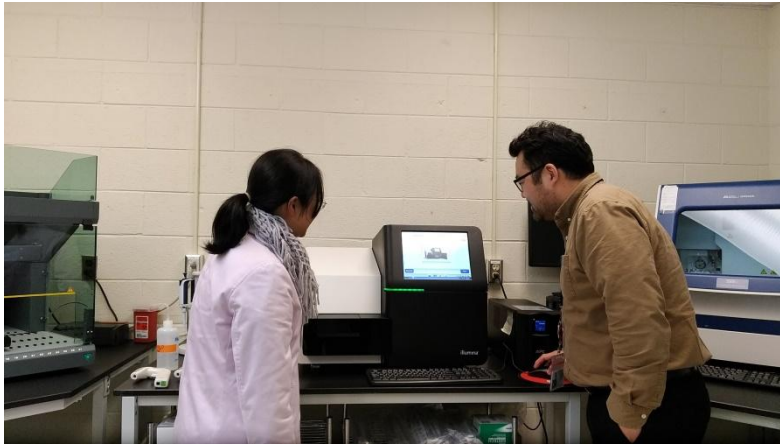


圖 4. Dr. Dong-hun Lee 解說 Illumina 之 Miseq 次世代定序儀。

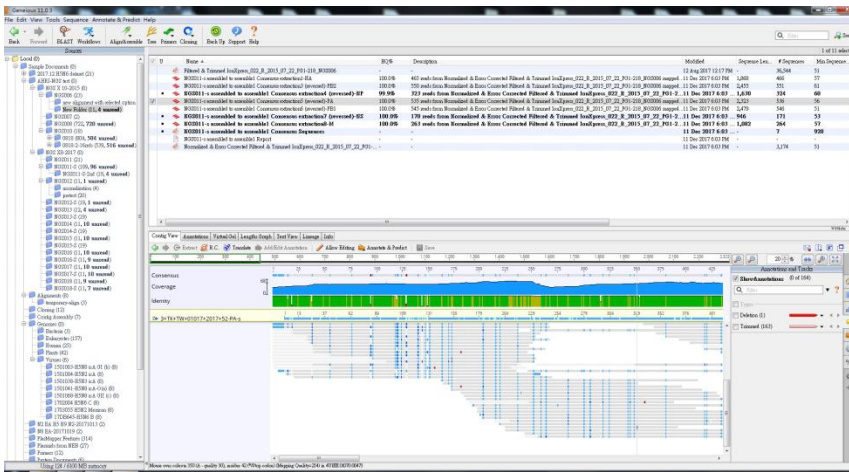


圖 5. Geneious 軟體操作畫面。

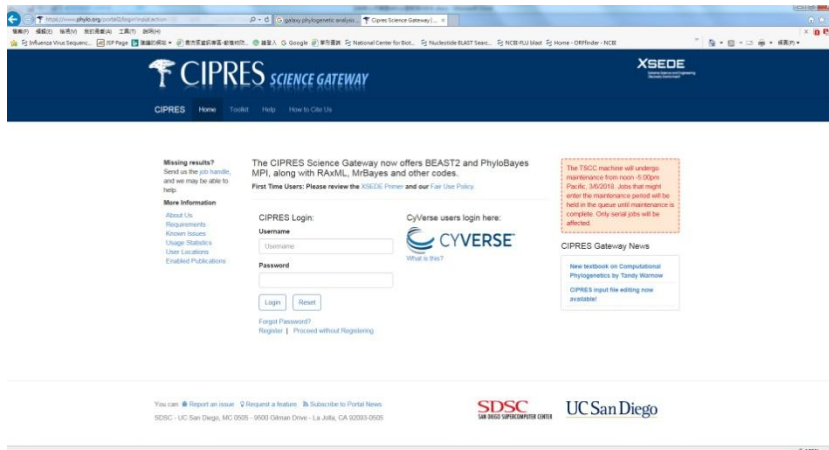


圖 6. 線上免費超級電腦 CIPRES Science Gateway 登入畫面



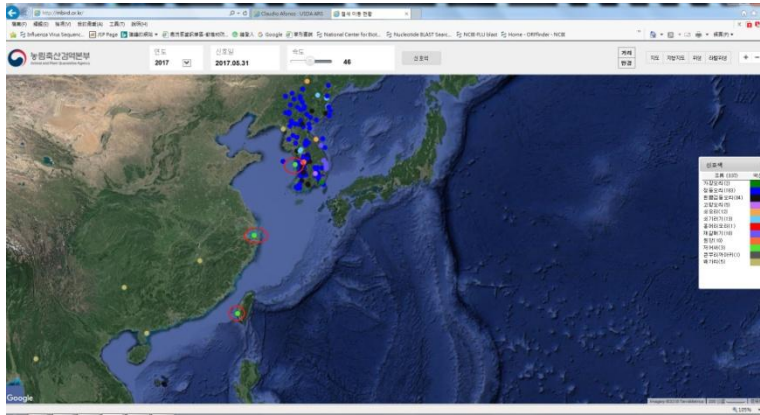


圖 7. 韓國候鳥飛行路徑追蹤系統 <http://mbird.or.kr/>，圖示 2017 年 3 隻瑤鷺為螢光綠色點，另以紅圈標示之。

### 3. 研習及參訪動物生物安全第三等級實驗室：

- i. 實際參訪進行禽流感動物試驗的家禽及水禽設施：由生安官 Nick Chaplinski 介紹現有之動物試驗設備，研習期間適逢部份三級動物實驗室結束試驗並完成清消，得以進入參訪動物試驗設備（如圖 8.於門板上貼綠色磁性標示，以表示清消完成）。雖然現行的設備仍然堪用，但為了更加方便研究人員進行試驗，改善動物飼養之動線及負荷，實際操作之生物安全人員、維護人員及實驗室人員仍會共同參與新隔離設備之引進及改良。以陸禽及水禽的試驗設施為例，以往的試驗研究以陸禽為主，陸禽試驗設施多以托盤收集排泄物，近期隨著水禽扮演禽流感散布的角色愈重，水禽動物實驗次數增加，而水禽飼養過程中展現之戲水習性及體重生長迅速，往往容易造成托盤中水份過多，再加上三級動物實驗室規定的穿著更為嚴謹，飼養/試驗人員體力消耗愈發吃重（如圖 9.）。故當新引進之水禽飼養隔離籠送至東南家禽實驗室，各參與人員會抽空檢視該設備，該設備改良處為可由外接水管引進水流至底盤沖洗排泄物至下方的儲水槽，附輪子利於移動。上方可加 HEPA 等進排氣管線，到我們離開實驗室前，該設備仍在討論改善中。

另動物生物安全第三等級實驗室裡，美方研究人員向我們簡介如何應用簡易生物安全操作區 (Biobubble, Class Biologically clean, Cbc)於空間有限的動物設施中（如圖 10. 自網路截取之示意圖），該簡易操作區係因操

作之試驗動物體積較大，例如火雞或鴨等體積較大的禽類，常宥於生物安全操作櫃可操作之空間較小，而 **Biobubble** 則可容試驗人員提著動物傳輸容器，全身進入該操作區域中，進行採樣或抽血等較細緻動作。

試驗動物舍及人員淋浴之廢水則是利用該地區丘陵之地形，將大型儲水槽集中設置於地勢較低處，廢水需經 121°C 30 分鐘之處理才可排出，但由於儲水槽之體積龐大，每儲水槽往往需耗時 1 天才能處理完全。生安官另解釋各儲水槽之間如何相互備援、廢水處理之確效以及定期檢查儲水槽壁之厚度等細節。



圖 8. 可選擇不同磁性標示貼於門上以代表該動物舍之狀態。



圖 9. 三級動物實驗室試驗人員配戴之正壓呼吸器。



圖 10. 網路截取之 Biobubble 示意圖，取代生物安全操作櫃之功能。

- ii. 新試驗研究建築之規劃簡介：生安官 Nick Chaplinski 表示蓋新建築，比起利用舊設備改善仍是較為容易的。由於實驗室建築已超過 50 年，設備老舊，已爭取經費擴大重建。為確保研究工作銜接無虞，採輪替建立及拆除方式，待新設施建好並功能建全後，再拆除舊有設備。預估約需耗時 4~5 年，漸進式完成所有辦公室、二級實驗室及三級實驗室。本次研習期間僅介紹最先建設之動物生物安全第三等級實驗室之設計，包括在地下室的污水處理系統，一樓為實驗室及動物舍，二樓為空調及壓差系統，介紹各區之間如何進行區隔及如何進行消毒等作業程序。

首先改建之動物生物安全第三等級及生物安全第三等級實驗室除了需求空間之外，人員、空氣、廢棄物及動物的動線需儘早規劃，另壓差的基準點亦需定位，其後才能依據此基準點設定風險愈高空間的壓差愈大。其他特點或設計細節如下：

- a. 每間實驗室可獨立關閉，每區域亦可獨立關閉，獨立清消。
- b. 動物生物安全第三等級實驗室無設置對外之透明窗，均由人工控制光線，然而無透明窗可觀察之處，則需設置攝影機，以維護試驗人員安全。

- c. 動物生物安全第三等級實驗室中，設置一間無小隔離籠之特殊規格實驗室，動物直接平飼於地板，故為全間房舍為隔離籠之概念，為防止該間外洩病原，為該棟最困難之設計。
- d. 生物安全第三等級實驗室區域中，亦另闢一間 **Hot suite** 專門留待新興/未知傳染病使用，該間實驗室位於三級實驗室區域中，可經由三級實驗室區域進入，亦另有單獨出入口。
- e. 第三等級實驗室區域中，設有休息區，人員經由換裝等進出步驟，即可進入休息區。規劃休息區的原因在於試驗人員往往於動物生物安全第三等級實驗室完成檢體採集後，直接進入生物安全第三等級實驗室進行後續處理，長時間處於負壓環境，極易出現疲勞狀態並造成出錯，這樣的狀況應儘量避免。
- f. 三級實驗室的維護設備空間需求很大，往往需有 2.5 倍於三級實驗室的空間去安置空調及廢水處理系統。廢水經由 1 樓地板排水管收集至地下室，為放置大型儲水槽，地下室挑高約在 20-24 呎，則地下室天花板引入之排水管難以檢視，故另設置空中走道方便巡查排水管。
- g. 清消方式未來將採外接式引噴霧清消氣體進入實驗室，人員可於實驗室外控制清消的啟動與關閉，並選擇對冰箱/電腦等儀器最小影響之清消藥劑。

iii. 其他資訊：

- a. **Dr. Mary Pantin-Jackwood** 為東南家禽實驗室 **Veterinary Medical Officer**，動物試驗經驗豐富，亦累積大量禽流感相關試驗結果，她熱心地分享動物試驗中訣竅，例如試驗名稱及試驗檢體之編碼應循一定規則編寫，否則經年累月的試驗及其檢體，只會愈加龐大繁雜。以及鴨隻進行攻毒試驗過程中，與雞隻攻毒後的反應可能不同之處。另近年 **Dr. Pantin-Jackwood** 動物試驗相關結果投稿均以 **GraphPad** 統

計軟體編輯，簡潔易懂，本次實習分享該軟體之使用經驗，鼓勵我們嘗試該統計軟體，並不吝分享及示範該軟體之操作。

- b. Dr. Claudio Afonso 於 12 月 4 日下午於 Poultry Diagnostic and Research Center 進行研討會，演講題目為 Fourth-generation DNA sequencing technology for diagnostic of avian diseases，內容簡述為新技術 Oxford Nanopore 之應用，該技術目前逐漸趕上次世代定序，優點為時間縮短，可利用 USB 之電力進行，價格較便宜。然而缺點為準確率仍需改善，但準確率一項仍為目前人們選用定序設備的第一考量，故該技術仍需等待條件成熟，包含其配套之分析軟體的便利性。目前該技術惟一優勢為可檢視特殊檢體內概況，特別是內含無法再增殖之病原。

#### 四、心得及建議

- (一) 本次前往美國東南家禽實驗室，除了研習分子生物軟體分析操作，以及如何應用次世代定序進行禽流感序列分析，包括檢體的製備、NGS 之實驗室流程及分析軟體介紹，並以 106 年 2 月份臺灣爆發之 H5N6 亞型家禽流行性感冒病毒之序列做為材料，進行分子生物軟體分析及操作，並整理相關研究數據完成科學論文撰寫，建立雙方合作發表模式。
- (二) 有關美國東南家禽實驗室之研習，雖然該單位為研究單位，但人員編制卻很精簡，主要都是高階研究人力(博士後研究人員)，且各個實驗室之間合作密切，創造更大的價值，對於試驗的討論亦充分的尊重第一線的研究人員及操作技術人員。另外，由於該試驗單位的建物需要可以使用 50 年，因此在規劃初期就必須盡可能邀集實際操作之生物安全人員、維護人員及實驗室人員的共同參與並考量加入未來發展的可行性等規劃。
- (三) 建議事項：
1. 應持續建立雙方交流合作關係，東南家禽實驗室之家禽疾病研究經驗豐富且研究範圍廣泛，是我國與美國農業部進行技術合作的重要夥伴之一，該實驗室負責人 Dr. Swaney 更是 FAO 及 OIE 的禽流感諮詢顧問。除了本次研習的分子演化及次世代定序的分析外，對於禽流感的動物試驗、檢驗方法的開發及改良亦有諸多討論，是未來雙方可以繼續合作的方向。
  2. 由於該研究單位座落於全美肉用禽類養殖最多的喬治亞州，即使目前設備老舊，但最初規劃之生物安全概念均得以維護與落實，直到今日仍能持續進行家禽第三危險群病原之相關動物試驗。新規劃之試驗研究建築以確保該研究單位所有家禽疾病之試驗均無病原外漏之虞為其試驗設備設計第一考量，另有其他設計細節以便於清消、維護、區隔及管理之改良，可做為未來我方相關試驗設備建置之參考。

# Southeast Poultry Research Laboratory

---



US DEPARTMENT OF AGRICULTURE  
Agricultural Research Service  
South Atlantic Area  
934 College Station Road  
Athens, Georgia

---

*Southeast Poultry Research Laboratory*

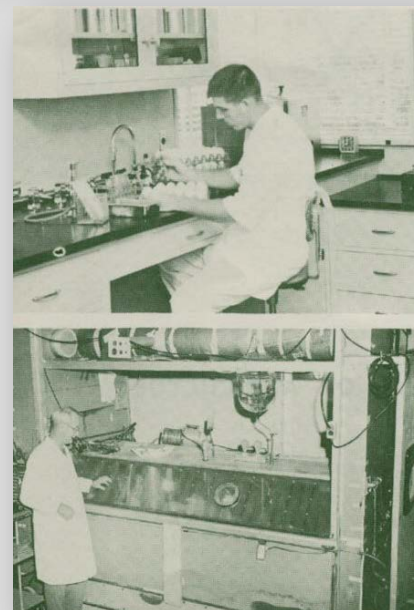


# Southeast Poultry Research Laboratory

## USDA-ARS

---

- Established: 1962
  - Established to solve respiratory disease complex of broilers
  - 1970's/80's: refocused to Newcastle disease, HPAI and salmonella
  - 1990's/2000's: addition of PEMS, avian metapneumovirus, and other emerging viral diseases
  - 2005: salmonella program became a separate unit in RRC
- OIE Collaborating Center for Research on Emerging Avian Diseases, and FAO Reference Laboratory for AI





# Structure

Agricultural Research Service  
Chavonda Jacobs-Young: Administrator

National Program Staff  
Jeff Silverstein - Deputy Administrator  
Cyril Gay - National Program Leader

Southeast Area  
Deborah Brennan- Area Director

**USNPRC**  
Eileen Thacker – Center Director

## Russell Research Center

## Southeast Poultry Research Laboratory

David Swayne-Lab Director

- **Toxicology & Mycotoxin:** Charles Bacon
- **Egg Quality & Safety:** Richard Gast
- **Quality & Safety Assessment:** Kurt Lawrence
- **Bacteriology Epidemiology & Antimicrobial Resistance:** Kim Cook
- **Poultry Microbiological Safety:** Authur Hinton

- **Exotic & Emerging Avian Viral Diseases:** David Suarez
- **Endemic Poultry Viral Diseases:** Vacant
- **Avian Disease and Oncology Laboratory:** Vacant

# Research Mission

---

*“Our mission is to provide scientific solutions to national and international **exotic, endemic and emerging** poultry viral diseases through a comprehensive research program emphasizing basic and applied research in diagnostics, prevention, and control strategies, prediction of disease outbreaks, molecular epidemiology, and understanding disease pathogenesis”*



# Facilities

---

## *Integrated, Self-contained Research Facility*

- SPF poultry production
- Laboratories for non-infectious work: pathology, immunology and gene sequencing
- BSL-2 enhanced laboratories and animal facilities
- BSL-3 enhanced laboratories and animal facilities
- Maintenance and administrative support

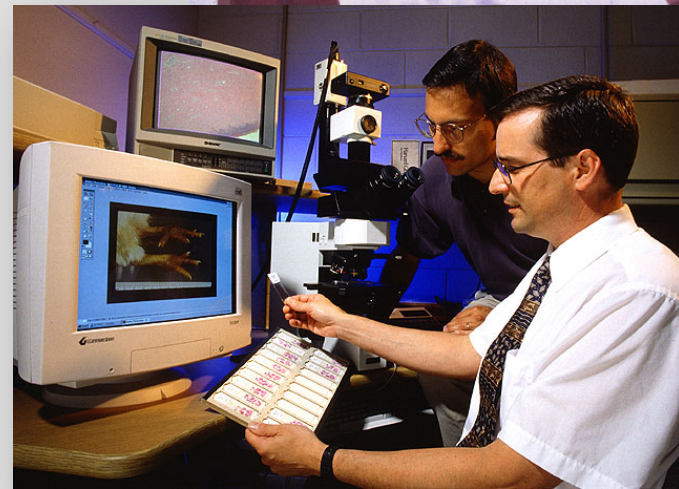
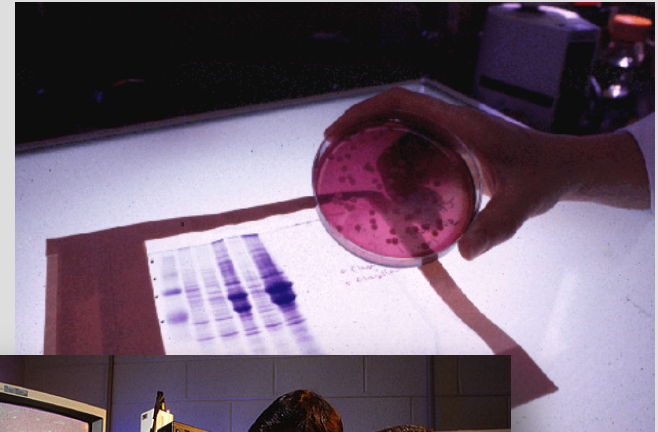


# Research Expertise

---

## *Integrated Approach*

- Food Safety
- Molecular Biology
- Pathobiology
- Immunology
- Vaccinology
- Veterinary Medicine
- Virology



# Allied Issues: Biosecurity

---

**Containment** - safe methods for managing infectious agents in the laboratory with minimal to no risk of exposure to outside environment and employees.

- *Laboratory Practices and Technique (people)*
- *Safety Equipment (primary barriers)*
- *Facilities (secondary barriers) (BSL-2E & BSL-3E)*

**Exclusion** - methods for preventing the introduction of infectious agents into the laboratory or animal housing units

# Allied Issues: Biosafety

---

- Personal safety equipment
- Occupational Health Maintenance Program



# Facility Security to Support Biosecurity

---

- Restricted entry
- Security fence
- Electronic keycard access
- Locked buildings
- Escort system for visitors
- 24/7 electronic monitoring



# SEPRL General Facilities

---

- 32 Acres
  - Two zones:
    - Production – SPF production and maintenance
    - Compound – buildings with infectious agents
- 35 Buildings, with a total square footage of 76,248.





# Specific Facilities & Support at SEPRL

---

## *Production Area (Non-infectious)*

- FAPP Housing for Disease-Free Poultry
  - Concrete or wood construction
  - Shower in
  - Positive pressure
- Egg-type Chickens: White Leghorn
- Meat-type Chickens: White Plymouth Rock
- Turkeys: Beltsville White

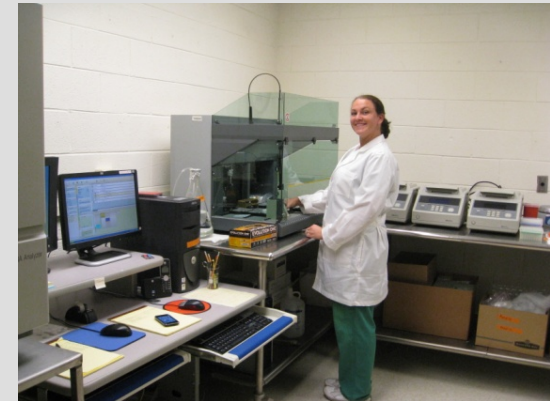


# Specific Facilities & Support at SEPRL

---

## *Production Area (Non-infectious)*

- Egg storage, incubation and brooding facility
- Hatching and grow-out facility
- DNA sequencing laboratory - ABI 3730
- Immunology support laboratory
- Histopathology/immunohistochemistry



# Specific Facilities & Support at SEPRL

---

## *Compound Area (Infectious)*

- Medium (BSL-2) level containment facilities



# Specific Facilities & Support at SEPRL

---

## *Compound Area (Infectious)*

- High Containment Facilities (BSL-3 enhanced) laboratories:
  - Concrete construction
  - Restricted entry
  - Easy accessed roof ventilation systems
  - “Shower-out” concept
  - 8 laboratories
  - Pass-through autoclave
  - Heat-treated sewage



# Specific Facilities & Support at SEPRL

---

## *Compound Area (Infectious)*

- High Containment Facilities (BSL-3 enhanced):  
Animal Facility
  - “Shower-out” concept
  - Dirty-clean corridor
  - 2 Laboratories
  - 7 Animal Rooms
  - Attached incinerator
  - Pass-through autoclave
  - Heat-treated sewage



# Specific Facilities & Support at SEPRL

---

## *Compound Area (Infectious)*

- Effluent Decontamination System
  - Heat sterilize sewage (ABSL-2E, BSL-3E & ABSL-3E)
  - Electronic monitoring
- Two 500 kw Generators
- Virus archive: AIV (1330), NDV (820) and enteric viruses



# Specific Facilities & Support at SEPRL

---

- Electronic Monitoring of Critical Equipment and Buildings
  - Glass breakage
  - Fire alarm
  - Static pressures
  - Incubator temperatures
  - Freezer temperatures
  - Sewage decontamination
  - Control of gates and doors



# New Facilities

---

- \$158 million for new facilities
- Timeline: 2017-2022



---

*Southeast Poultry Research Laboratory*





# Thank You!

