

出國報告（出國類別：研究）

流感病毒檢驗與監視技術之研習

服務機關：行政院衛生署疾病管制局

姓名職稱：楊季融 助理研究員

派赴國家：日本

出國期間：民國 99 年 10 月 11 日至 10 月 24 日

報告日期：民國 99 年 12 月 24 日

摘要

流感病毒自 1918 年開始侵襲人類至今，已陸續引發多次大規模的疫情，這幾次的大流行皆造成人類無數之傷亡。1997 年在香港首度引發的禽流感病毒感染人類疫情，亦使我們了解 A 型流感病毒除了大家熟知的 H1N1 及 H3N2 亞型之外，包括 H5N1、H7N7 與 H9N2 亞型等皆有染感人類的機會。由於流感病毒本身具備持續突變的能力，其表面抗原 HA 蛋白經突變後，可改變病毒體之抗原性，使其可躲避人體免疫系統的攻擊，進而引發新一波大規模感染。對抗流感病毒感染可以仰賴抗病毒藥物，而疫苗的施打也是一個重要的防疫措施。隨著病毒演化的結果，不同亞型之流感病毒已對不同種類之抗病毒藥物產生抗藥性，疫苗也因病毒抗原性的突變失去其預期的保護效力，上述種種因素皆增加流感疫情防治上的困難。有鑒於此，對於流感病毒之抗原性、抗藥性以及演化趨勢等資訊的即時監視是必需且重要的。台灣疾病管制局近年來已陸續建置我國流感病毒之監視系統，為使相關技術及智能更趨完備，擬計畫派員赴日本國立感染症研究所 (National Institute of Infectious Diseases, NIID) 流感病毒研究中心研習新興流感病毒之監測與檢驗方法等，此外，由於該中心屬 WHO 全球六大參考實驗室 (Collaborating Center) 之一，此次取經亦可學習 WHO 內部對於流感病毒監視之運作流程，並將其優點納入我國監視系統，以精進其運作成效。

目 次

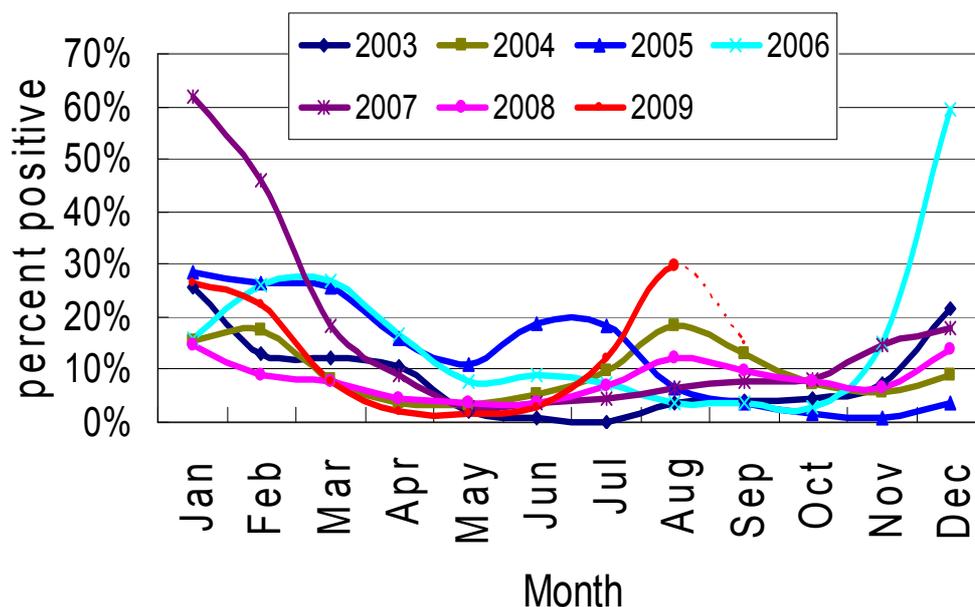
目 的	4
過 程	8
心得及建議	20
附 錄	23

目的

流感病毒自 1918 年開始侵襲人類至今，已陸續引發多次大規模的疫情，包括 1918 年由 H1N1 亞型引發之西班牙流感 (Spanish flu)、1957 年 H2N2 亞型之亞洲流感 (Asia flu)、1968 年 H3N2 亞型之香港流感 (Hong Kong flu) 以及 2009 年由 H1N1 亞型引發之新型流感 (pandemic flu) 等。此外，1997 年於香港亦爆發禽流感病毒感染人類疫情，顯示 A 型流感病毒除了常見之 H1N1 及 H3N2 亞型可感染人類之外，H5N1、H7N7 與 H9N2 等亞型亦有感染人類宿主的機會。這些突如其來的大規模疫情，皆造成全球無數患者的傷亡。探究其原因，皆因流感病毒本身具持續突變與演化的能力，一旦其基因體產生突變(小變異如 antigenic drift 或大變異如 antigenic shift)，特別是發生在主要的表面糖蛋白 HA 或 NA 時，會導致流感病毒的抗原性產生大轉變，其對於宿主的特異性也可能因而受到影響。

若從世界各國流感病毒的流行趨勢來看，此病毒好發於氣溫較低的冬季。以台灣的資料為例，流感病毒的主要流行高峰為每年的 11 月至隔年 2 月左右 (圖一)，其它同樣位居北半球的國家亦有類似的趨勢。因此在這段期間對於流感病毒的相關疫情防治便相形重要。疫苗是預防流感病毒感染的有效方法之一。然而

圖一、 Seasonality of influenza in Taiwan



因流感病毒的基因體具有高突變率的特性，疫苗常因此而失去其應有的保護效力，有鑑於此，世界衛生組織 (WHO) 每年皆需依照北半球與南半球各國當年所流行之流感病毒株，分別決定下年度流感疫苗株的組成，其中北半球公佈時間為每年二月，南半球則為每年 9 月。表一係將近十年 WHO 所公佈流感疫苗之病毒株做一整理比較，從結果來看，近十年的流感疫苗株包括 A 型流感病毒 H1N1、H3N2 以及 B 型流感病毒均經過多次改變，顯示流感病毒本身的變異確實相當迅速。

表一、近十年流感疫苗之病毒株

northern hemisphere influenza season												
Year	2010-2011	2009-2010	2008-2009	2007-2008	2006-2007	2005-2006	2004-2005	2003-2004	2002-2003	2001-2002	2000-2001	1999-2000
Vaccine strain (H1N1)	A/Perth/16-2009	A/Brisbane/59/2007	A/Solomon Islands/3/2006	A/New Caledonia/20/99			A/Beijing/262/95					
southern hemisphere influenza season												
Year	2010	2009	2008	2007	2006	2005	2004	2003	2002	2001	2000	1999
Vaccine strain (H1N1)	A/California/07/2009	A/Brisbane/59/2007	A/Solomon Islands/3/2006	A/New Caledonia/20/99			A/Beijing/262/95					
northern hemisphere influenza season												
Year	2010-2011	2009-2010	2008-2009	2007-2008	2006-2007	2005-2006	2004-2005	2003-2004	2002-2003	2001-2002	2000-2001	1999-2000
Vaccine strain (H3N2)	A/Perth/16-2009	A/Brisbane/10/2007	A/Wisconsin/67/2005	A/California/7/2004	A/Fujian/411/2002	A/Moscow/10/99		A/Sydney/5/97				
southern hemisphere influenza season												
Year	2010	2009	2008	2007	2006	2005	2004	2003	2002	2001	2000	1999
Vaccine strain (H3N2)	A/Perth/16-2009	A/Brisbane/10/2007	A/Wisconsin/67/2005	A/California/7/2004	A/Wellington/1/2004	A/Fujian/411/2002	A/Moscow/10/99		A/Sydney/5/97			
northern hemisphere influenza season (H1N1)												
Year	2010-2011	2009-2010	2008-2009	2007-2008	2006-2007	2005-2006	2004-2005	2003-2004	2002-2003	2001-2002	2000-2001	1999-2000
Vaccine strain (FLUB)	A/Perth/16-2009	B/Brisbane/60/2008	B/Florida/4/2006	B/Malaysia/2506/2004	B/Shanghai/361/2002	B/Hong Kong/330/2001	B/Sichuan/379/99	B/Beijing/184/93				
southern hemisphere influenza season (H1N1)												
Year	2010	2009	2008	2007	2006	2005	2004	2003	2002	2001	2000	1999
Vaccine strain (FLUB)	B/Brisbane/60/2008	B/Florida/4/2006	B/Malaysia/2506/2004	B/Shanghai/361/2002	B/Hong Kong/330/2001	B/Sichuan/379/99	B/Beijing/184/93					

另一項對抗流感病毒的利器便是抗病毒藥物。目前用來治療流感病毒的藥物，主要可分成兩類：即 M2 離子通道阻隔劑(adamantanes; amantadine and rimantadine)以及神經胺酸酶抑制劑(oseltamivir and zanamivir)。不同流感病毒依其型別對於這些抗病毒藥物具不同感受性。根據本局本(99)年截至 9 月 3 日針對各類流感病毒抗藥性之監測結果顯示 (表二)，A 型流感病毒中，新型流感 H1N1 病毒對 amantadine 具 100%抗藥性，但對 oseltamivir 仍呈現 100%感受性，自去(98)年累計至今僅 8 株 oseltamivir 抗藥株被證實。季節性 H3N2 病毒的情況與新型流感病毒類似，皆呈現 amantadine 抗藥性以及 oseltamivir 感受性。季節性 H1N1

病毒由於本年並無分離株，若依據去年之監測結果，其對 amantadine 皆具感受性但呈現 100% oseltamivir 抗藥性。至於 B 型流感病毒，本年並無發現對 amantadine 與 oseltamivir 具抗藥性之病毒株。這些流感病毒對於抗病毒藥物產生抗藥性的原因，也是由於基因突變 (M 基因或是 NA 基因)所導致。

表二、台灣流感病毒抗原性與抗藥性分析結果 (updated 11/26/2010)

Antigenicity and Drug resistance of Influenza viruses in Taiwan, 2010

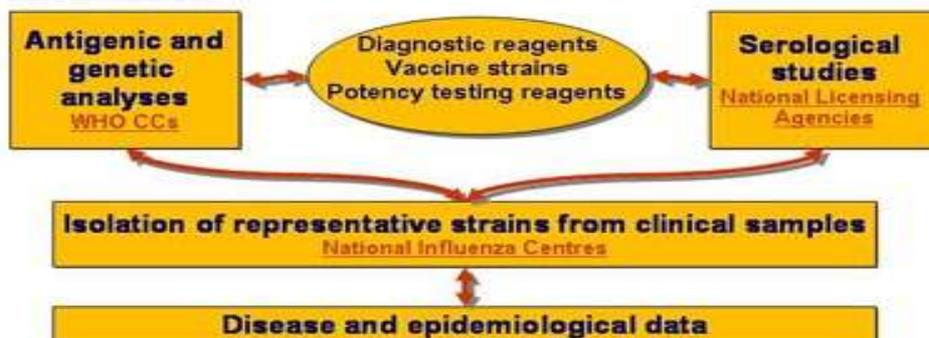
Time (Week)	Antigenicity								Oseltamivir susceptibility					
	pandemic H1N1		H3N2		Flu B (Vic)		Flu B (Yam)		pandemic H1N1		H3N2		Flu B	
	Tested No.	LR*	Tested No.	LR	Tested No.	LR	Tested No.	LR	Tested No.	Resistant	Tested No.	Resistant	Tested No.	Resistant
W1-W25	24	1	10	0	127	1	12	3	47	0	0	0	80	0
W26-W46	32	2	98	1	25	0	4	0	48	0	213	0	6	0
W47	3	0	7	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0
W1-W47	59	3	115	1	152	1	16	3	95	0	219	0	86	0

因此，好的流感疫情防治策略，必須與流感病毒的監測緊密結合。目前在流感病毒體的監測上，大致需要涵蓋以下幾個層面：(一)病毒抗原性分析。(二)病毒序列演化分析。(三)病毒抗藥性分析。綜觀以上三者之結果，可幫助我們了解流感病毒的流行情形、評估流感疫苗效益及抗病毒藥物的成效等。WHO 於 1952 年開始建構全球流感監測網 (Global Influenza Surveillance Network, 圖二)，持續對於流感病毒的變異進行監視。此系統的主要目的即是藉由監測的結果選定最適病毒株作為下年度疫苗株的篩選依據，而一個有效的疫苗可保護自己與身邊的人免於流感病毒的威脅。另一個重要的目的，則是藉由此監測系統彙整全球流感病毒株的演化及流行趨勢，進而即時監測與發現可能產生的新興流感病毒變異株。並針對可能造成大流行的變異株提早對全球發佈警訊。

圖二、WHO 全球流感監測網

WHO Global Influenza Surveillance Network

Make recommendations on the influenza vaccine formulation



從圖二來看，此全球流感監測系統包含了實驗室以及流病中心，其中前者係 WHO CCs 與被 WHO 認可之流感病毒實驗室(NIC)，他們需進行病毒抗原性與疫苗相關血清學等分析，而 WHO CCs 同時負責開發相關診斷試劑以協助其他國家提升監測的技術層面。

世界衛生組織在全球有六大流感參考實驗室 (collaborating centers)，其中五個負責全球人類流感疫情監視統籌之工作，分別位於美國 (Centers for Disease Control and Prevention, Influenza Branch)、日本 (National Institute of Infectious Diseases, Department of Virology III)、英國 (National Institute for Medical Research)、澳洲與中國大陸 (China CDC)。此次赴日研習之地點，即為五大流感中心之一---NIID 流感中心之第一室、第二室以及流病中心。研習為期兩星期，研習內容包括日本 NIID 對於流感病毒的完整監視系統包括體制面與技術面，技術面尚包括流感病毒體監測技術、新興流感病毒檢驗方法、流感病毒雞胚蛋培養技術等。除了可比較我國與日本在技術層面的差異，進而學習其優點以更加精進台灣 CDC 現有系統之外，更可實地了解 WHO 內部對於流感病毒監測所採行之策略等。另，我們亦期望可藉此機會建立與日本 NIID 更為暢通之聯繫管道，俾利日後雙方對於流感相關資訊之分享與交流。

過程

(一)、行程

此次赴日研習地點為國立感染症研究所流感中心第一室與第二室，位於東京都武藏村山市。研習期間自民國99年10月11日起至10月24日止，含路程共計14天。相關時間、地點及行程內容詳述如下：

日期	工作 日誌	地 點	行 程 內 容
99/10/11	啓程	台北→東京	路程
99/10/12~23	研習	東京	研習
99/10/24	回程	東京→台北	路程

(二)、研習內容

本次研習內容主要由日本 NIID 流感中心第一室室長 Dr. Takato Odagiri 與第二室室長 Dr. Tsutomu Kageyama 共同安排及指導。研習內容為日本 NIID 流感病毒監測系統之整體運作模式 (相關學習內容與每日研習課表詳如附表一)，其主題主要可分為幾大項目：流感病毒(包含新興流感病毒)培養技術、流感病毒抗原性分析、流感病毒演化樹分析、流感病毒抗藥性分析、流感病毒快速分子生物檢測法以及流感病毒疫情監測系統簡介等。此外，依照日本 NIID 之規定，各短期研習人員必須接受兩小時實驗室生物安全 (Laboratory Biosafety)課程，並於通過考試後始能獲得進入實驗室操作之授權，因此生物安全相關課程亦為本次研習內容之一。以下將針對各主題詳細介紹。

(1) 流感病毒培養技術

此部份之技術研習由流感中心第一室 Dr. Hong Xu 指導，包括流感病毒傳統細胞培養與雞胚蛋培養。

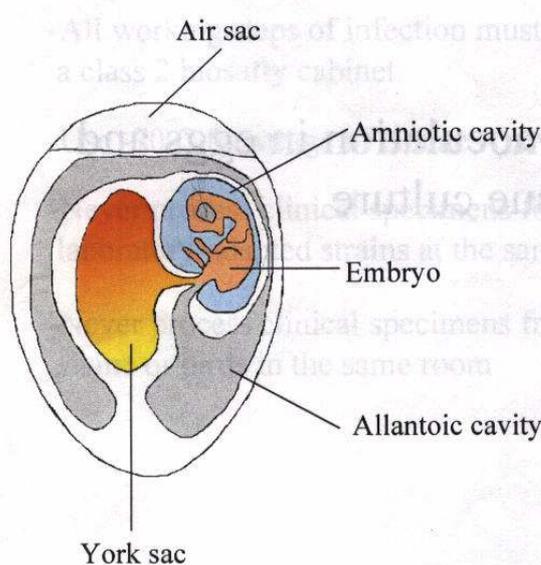
細胞培養為大多數實驗室用來培養流感病毒的方法，常被選用的細胞株為 Madin-Darby canine kidney (MDCK)細胞。首先將細胞培養於含有 10%胎牛血清 (fetal bovine serum)之 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培養基，並置於 37°C 含有 5% CO₂ 的培養箱，待細胞生長量約達培養皿之 85~90% 時，接種臨床檢體或病毒液。接種時，首先將約 200 µl 檢體與清洗後之細胞於 37°C 黏著 1 小時，再加入含有 5µg/ml trypsin-acetylated 之 DMEM 培養基，重置於 37°C、5% CO₂ 的培養箱。細胞於接種檢體或病毒後約 3 至 4 天可產生細胞病變 (Cytopathic effect, CPE)，接著收取病毒上清液後可利用血球凝集試驗 (Hemagglutination test, HA test)測定病毒量。

流感病毒雞胚蛋 (embryonic egg)培養是一種相當重要的流感病毒培養技術，其目的除可作為病毒放大的工具外，更可將病毒株由細胞適應系統 (cell-adapted)轉變為雞胚蛋適應系統 (egg-adapted)。由於目前的流感疫苗大多

數都是藉由雞胚蛋系統培養製造，因此在製備疫苗之前，必須先將選定的病毒株成功於雞胚蛋培養數代後，再以基因轉殖的方法製備疫苗。使流感病毒由細胞適應株轉變為雞胚蛋適應株的過程往往需要經過多次的繼代培養，除了熟練的技術外，仍需依賴病毒本身的特性決定該病毒是否可成功轉變為雞胚蛋適應株。

雞胚蛋培養流感病毒的接種模式可分為尿囊膜腔 (Allantoic cavity)培養以及羊膜腔 (Amniotic cavity)培養，其中前者主要是大量放大病毒，接種對象建議為已經過雞胚蛋增殖過的病毒液，而後者則為直接從臨床檢體或由細胞培養之病毒增殖時使用。在以臨床檢體做為培養標的時，日本 NIID 建議以雙腔接種的方式，分別將臨床檢體接種於上述兩個腔室，以提高培養成功率。

圖三、流感病毒雞胚蛋培養



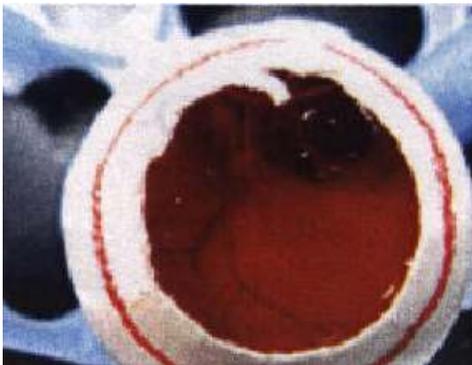
雞胚蛋接種所選用的雞胚年齡為 8 天，日本 NIID 之雞胚蛋接種流程概述如下：

- 1.) 以強光照射雞胚蛋找出其氣室之位置，並於氣室頂端打一個小洞 (圖四 a)。
- 2.) 以剪刀以該洞為中心將蛋殼剪開約直徑兩公分之區域 (圖四 a)。

- 3.) 以鑷子將殼膜撥開，找出雞胚以及羊膜腔之位置 (圖四 a)。
- 4.) 將臨床檢體或病毒液以 27 號針先接種 100 μl 於羊膜腔後，將針抽離羊膜腔至尿囊膜腔，同樣接種 100 μl 檢體於尿囊膜腔。(圖四 b)
- 5.) 以膠帶將帶殼剪開處密封 (圖四 c)，於 34°C 培養 2~3 天後，收取病毒 (圖四 d)。
- 6.) 收取病毒時，將膠帶撕開，先以空針將尿囊膜液全數吸取 (平均可收取約 10~15 ml)，在將羊膜腔倒出，以空針刺入腔中吸取病毒液 (平均可收取約 1~1.3 ml)，最後以離心 (3000 rpm, 10 min) 方式將雜質沉澱，該上清液經由 HA 試驗測定病毒效價後，即可用作後續分析 (圖四 d)。

圖四、流感病毒雞胚蛋培養流程

(a) 剪開蛋殼, 找出胚胎



(b) 接種病毒 (以藍色染劑代替病毒)



(c) 封膜、培養



(d) 收病毒

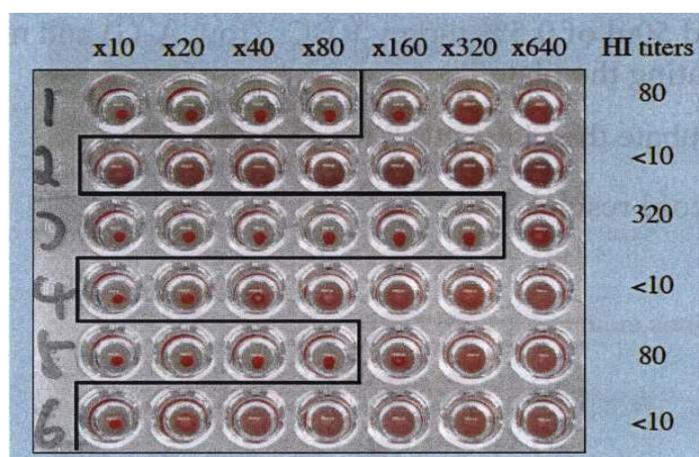


(2) 流感病毒抗原性分析

此部份之技術研習由流感中心第一室 Dr. Hong Xu、Dr. Seiichiro Fujisaki 以及 Dr. Noriko Kishida 等三位共同指導，包括流感病毒紅血球凝集試驗 (HA test, Dr. Hong Xu 與 Dr. Noriko Kishida)、紅血球凝集抑制試驗 (HI test, Dr. Hong Xu 與 Dr. Noriko Kishida)以及流感病毒全基因序列分析 (Whole-genome sequencing, Dr. Seiichiro Fujisaki)等。

紅血球凝集抑制試驗是用來測試流感病毒抗原性最常用的方法之一。利用流感病毒具有凝集天竺鼠或是火雞等動物紅血球的能力，先將已知抗原性病毒的標準抗血清進行數次 2 倍稀釋後與待測病毒反應，再將血清反應過後的病毒液與紅血球混合，觀察各稀釋倍數的凝集結果，結果判讀時，以完全將凝集反應抑制之倍數點為其 HI 效價 (圖五)。若待測病毒與標準抗血清病毒的抗原性相似，則該標準抗血清可抑制待測病毒凝集紅血球的能力，甚至經過數百倍稀釋過後，凝集抑制的效果仍在。反之，若待測病毒的抗原性與標準血清之病毒不同，則紅血球凝集抑制的效果將會於數倍稀釋之內提前消失。經過此種試驗之後，可藉由比較待測病毒以及標準病毒與各標準抗血清反應過後之紅血球凝集抑制效價 (HI titer)，判定待測病毒與標準病毒兩者抗原性之異同，一般來說，若效價差異在 8 倍以上，則判定該待測病毒之抗原性與標準病毒不同。

圖五、紅血球凝集抑制試驗



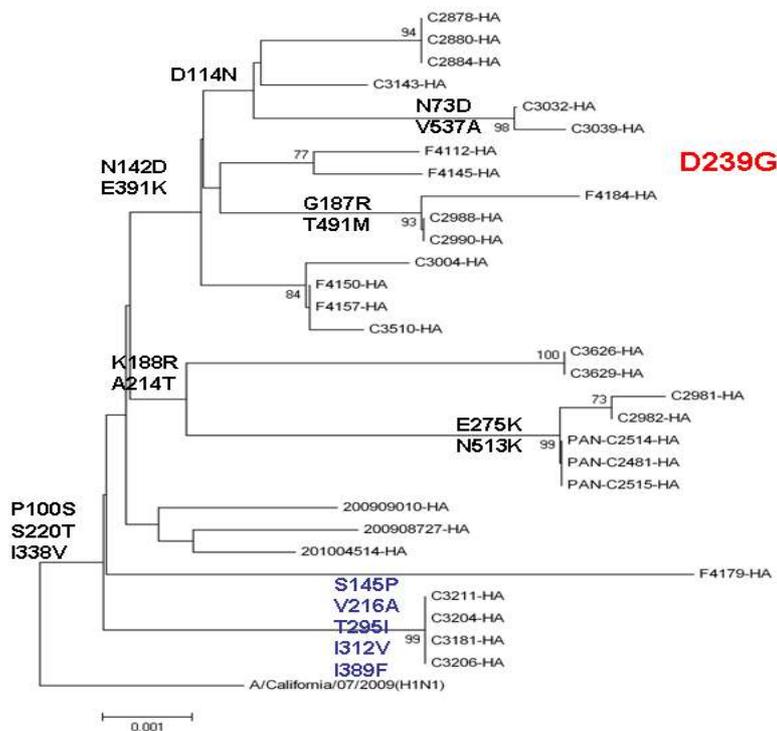
在進行流感病毒之抗原性分析時，以紅血球凝集抑制試驗測定病毒體表面蛋白之抗原性變異情形屬於表現型的分析方式 (phenotypic analysis)，除此之外，也需要進行該表面抗原之序列分析，從核苷酸或胺基酸等分子層面，探討何種變異可導致病毒表面蛋白抗原性之改變，亦即為基因型分析 (genotypic analysis)。聚合酶鏈鎖反應 (PCR)配合增殖產物之核苷酸序列分析是進行此種分析最常用的方法，而 HA 基因為最重要且最常分析的標的之一，該基因可分為 HA1 以及 HA2 區域，日本 NIID 的常規分析標的為 HA1 區域，分析長度為該區域之全長序列 (約 1kb)。首先利用增幅引子先將 HA1 序列以傳統 PCR 進行增殖放大，之後再以 6 對定序引子將放大後的產物進行序列分析。分析後的序列需再以人工方式藉由軟體 (Sequencher)確認各序列的正確性，若該 6 對定序引子之序列結果無法正確配對結合，則該次序列分析反應需重新進行。

(3) 流感病毒演化樹分析

此部份之技術研習由流感中心第一室 Dr. Seiichiro Fujisaki 指導，係延續流感病毒基因序列分析的步驟，將分析過後之流感病毒基因 (核苷酸或胺基酸) 序列，以軟體 (MEGA 4.0 或 MEGA 5.0)利用特定演算法比較分析各序列之異同情形，再將結果以演化樹的方式呈現。日本 NIID 採用 MEGA 4.0 以及 5.0 軟體進行分析，首先將各序列以 Clustal W 的方式進行排列 (alignment)，之後以 Neighbor-Joining (MEGA 4.0)或 Maximum-likelihood (MEGA 5.0)演算法進行演化樹建構，重複運算次數則設定為 1000 次。建置完成後的演化樹可藉由 Bootstrap 值評估演化樹各分支的可信度，Bootstrap 值愈大，表示該分支可明顯與其他分支區隔，屬有意義的群體。以台灣 2010 年新型流感病毒 (pandemic H1N1 viruses)分離株的 HA 基因演化樹分析結果為例 (圖六)，圖中顯示該病毒亦已持續藉由小變異 (antigenic drift)的累積在演化樹上形成不同分支，位於各分支的病毒皆帶有特定位置的胺基酸突變，例如 N142D、E391K

等，特別的是，帶有 D239G 的病毒是由重症死亡個案及其接觸者中分離。利用此方式，實驗室可持續監測流感病毒之基因變異情形，以早期發現可能出現的新興病毒以及各重要的胺基酸突變位點。

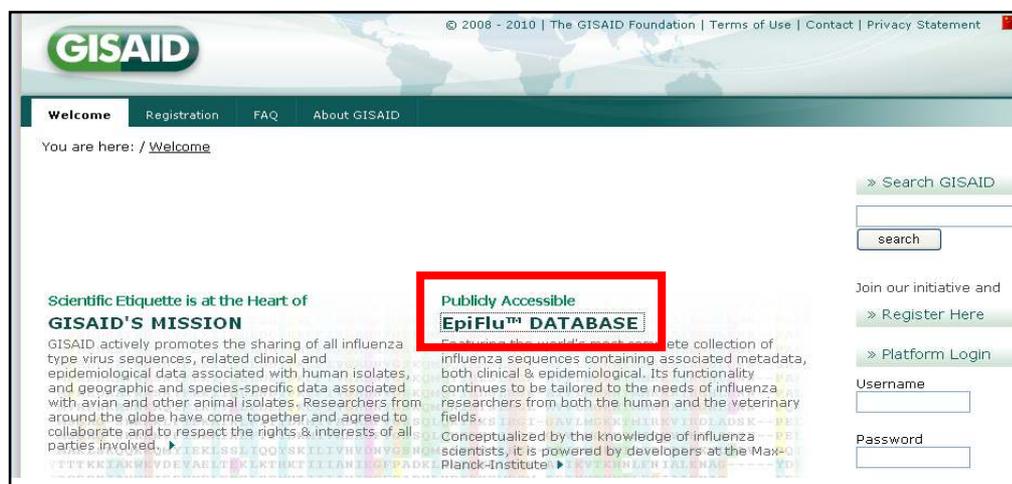
圖六、台灣 2010 年新型流感病毒 HA 基因演化樹分析



爲了要與世界各國所流行之流感病毒株互相比較，WHO 各參考實驗室會將其分析過後之基因序列發佈於一個流感病毒基因資料庫名爲 GISAID (圖七)，因此，透過此基因資料庫可了解各參考實驗室對於各階段流感病毒之序列監測結果。由於 WHO 各參考實驗室幾乎僅限於將他們所分析之序列資訊，於第一時間發佈於此基因資料庫，因此這也是其相較另一個資料庫 (NCBI Influenza virus resources database) 的優勢。進行演化分析時，可於資料庫中選取某些適當之病毒株基因序列進行比較，對於非 WHO 參考實驗室來說，利用此基因資料庫可使分析過後的演化樹，更能與其他各國互相比較，使 WHO 可協助將各地對於流感病毒的監測資料結果串聯起來。

圖七、GISAID 資料庫 (EpiFLU DATABASE)

(<http://platform.gisaid.org/dante-cms/struktur.jdante?aid=1131>)



(4) 流感病毒抗藥性分析

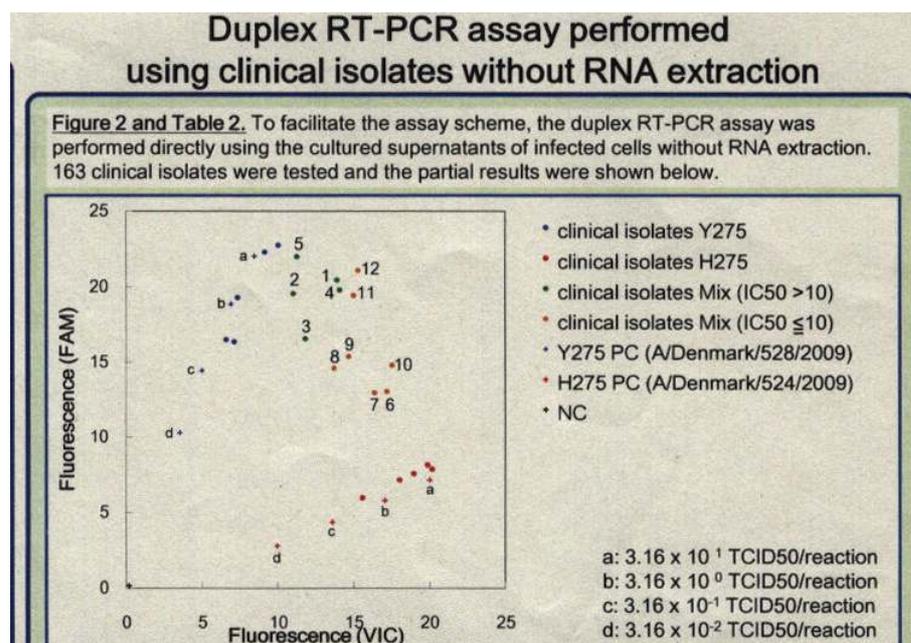
此部份之技術研習由流感中心第一室 Dr. Emi Takashita 與第二室 Dr. Mina Nakauchi 指導。研習內容包括 NA 抑制劑 (NAI)類抗病毒藥物 Tamiflu (oseltamivir)對於新型流感病毒之 IC_{50} 測定以及利用即時 PCR(Real-time RT-PCR)鑑定 Tamiflu-resistant pandemic H1N1 viruses。

測定 NAI 類抗病毒藥物之 IC_{50} 值是決定病毒是否對該藥物具有抗藥性的標準方法，而 IC_{50} 即是藥物可以抑制 50%病毒活性的最低濃度。當病毒對該類藥物產生抗藥性時，藥物對於病毒的 IC_{50} 會升高。因此比較待測病毒與已知藥物敏感性及抗藥性的陽性對照病毒的 IC_{50} 值，可判定該病毒對於 NAI 類藥物的抗藥趨勢。目前用來測定 Tamiflu 對於新型流感病毒之 IC_{50} 的方法，主要可利用冷光法及螢光法，日本 NIID 採用前者作為常規測定的工具。此方法之原理乃是利用流感病毒 NA 蛋白對於唾液酸 (sialic acid)之切割活性，當 NAI 類藥物與病毒反應時，若病毒具有藥物抗藥性，則該 NA 蛋白之活性於高濃度藥物時亦不會被抑制 (高 IC_{50})，因此加入標定有冷光之類唾液酸分子後，該分子可被 NA 蛋白切割，進而釋放冷光。反之，若病毒不具藥物抗藥性，則加入藥物之後 NA 蛋白之活性在極低藥物濃度時便被抑制 (低 IC_{50})，

冷光訊號因而相對減弱。

以 real-time RT-PCR 鑑定 Tamiflu 抗藥性新型流感病毒係以具專一性之引子與探針 (probe)，針對 Tamiflu 抗藥性與敏感性病毒株於特定序列之差異進行偵測。由於 Tamiflu 抗藥性決定點位在 NA 基因第 275 個胺基酸，因此該基因即為此方式之檢測標的。以 Tamiflu 抗藥株來說，第 275 個胺基酸為酪氨酸 (Tyrosine, Y)，相對應的核苷酸序列則為 TAC，而 Tamiflu 敏感株的第 275 個胺基酸為組氨酸 (Histidine, H)，核苷酸序列則為 CAC。此方法所用之專一性探針可辨認此單一核苷酸 (T 與 C)之差異，進而產生相對應之螢光訊號，利用螢光訊號之有無，並與對照病毒株進行比較，可做為判定待測病毒為 Tamiflu 敏感株或是抗藥株。以圖八為例 (由日本 NIID 提供)，具 Y275 之 Tamiflu 抗藥病毒株 (藍色螢光點)位在圖表的左上角，而具 H275 之 Tamiflu 感受性病毒株 (紅色螢光點)位在圖表的右下角。此外，此方法亦可用來檢測當 Tamiflu 敏感株與抗藥株混合感染之情形。將兩種病毒混合後，螢光訊號 (綠色與橘色螢光點)會位在圖表左上與右下之間的區域，配合標準曲線 (standard curve)的比較，可作為兩種病毒混合比例之半定量依據。

圖八、以即時 RT-PCR 檢測具 Tamiflu 抗藥性之流感病毒



(5) 流感病毒分子生物檢測法

此部份之技術研習由流感中心第二室室長 Dr. Tsutomu Kageyama 安排及指導。研習內容包括以即時 PCR 以及傳統 PCR 進行流感病毒之鑑定與分型，尤其著重於流感病毒 H5N1 亞型之偵測。

日本 NIID 採用之即時 PCR 係以 Taqman probe 系統進行，其基因檢測標的，以 A 型與 B 型流感病毒之 Matrix (M) 基因進行病毒鑑定，再以 HA 基因進行病毒亞型判定。一般來說，較常感染人類之流感病毒包括 A 型流感 H1N1 (含新型流感 H1N1 病毒)、A 型流感 H3N2 與 B 型流感病毒。因此當 A 型流感病毒 M 基因呈現陽性後，隨即以各型別相對應之引子與探針進行上述三亞型之鑑定。在極少數的情況下，待分型之流感病毒無法以 seasonal H1、pandemic H1 以及 seasonal H3 之因子與探針完成分型，此時則需考慮該病毒為其他型別之流感病毒。一般來說，這些其他型別之流感病毒只能感染禽類或豬等動物，但由於香港曾於 1997 年爆發高病原性禽流感病毒 H5N1 亞型感染人類之嚴重疫情，因此待測病毒可能為此種病毒即成為需要考慮的狀況之一。除此之外，低病原性之禽流感病毒 H7N7 及 H9N2 感染人類之偶發案例以往也曾有相關報導，因此對於這些 H1 與 H3 亞型以外的流感病毒，亦不可掉以輕心。

日本 NIID 所採用流感病毒 H5N1 即時 PCR 之檢測引子與探針如表二，其中 H5 基因可檢測過去亞洲地區曾流行過之流感 H5N1 病毒株，而 N1 基因反應除了可與 H5N1 之 NA 反應之外，仍可偵測 pandemic H1N1 病毒之 NA 基因。故加入此 N1 檢測法並配合 H1、H3 及 H5 等型別之檢測結果，可綜合判定是否為流感病毒 H5N1 之感染。

表二、禽流感病毒 H5N1 之即時 PCR 檢測引子與探針 (NIID)

Gene	H5
Clade	1, 2, 3
Primers sequences	H5HA-205-227v2-For CGATCTAGAYGGGGTGAARCCTC (10 μM)
	H5HA-326-302v2-Rev CCTTCTCCACTATGTANGACCATTC (10 μM)
Probe sequences	H5-Probe-239-RVa FAM-AGCCAYCCAGCTACRCTACA-MGB (5pmol/μl)
	H5-Probe-239-RVb FAM-AGCCATCCCGCAACACTACA-MGB (5pmol/μl)

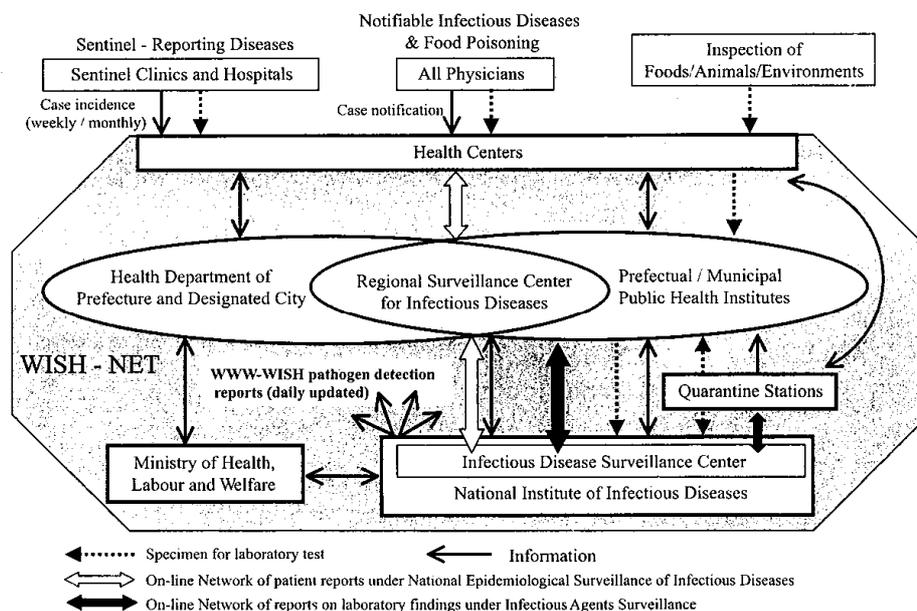
Gene	N1
Clade	1, 2, 3
Primers sequences	N1-For-474-502-v2 TAYA AACTCAAGGTTTGAGTCTGTYGCTTG (10 μM)
	N1-Rev-603-631-v2 ATGTRTTCCTCCA AACTCTTGATRGTGTC (10 μM)
Probe sequences	N1-Probe-501-525-v3 FAM-TCAGCRAGTGCYTGCCATGATGGCA- MGB (5pmol/μl)

(6) 日本 NIID 流感病毒疫情監測系統簡介

此部份之技術研習由日本 NIID 傳染病監測中心 (Infectious Disease Surveillance Center)資深研究員 Dr. Kazuyo Yamashita 安排及指導。研習內容包括簡介日本 NIID 對於傳染病原體 (著重於括流感病毒)之監測網，並提供日本最新流感病毒疫情調查結果。

日本 NIID 所主導之傳染病監測網 (Network of National Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases, NESID)如表三。此系統主要由地區醫院、定點醫療診所、健康中心 (health center)、檢疫站 (quarantine stations)、縣(市)立公共衛生機構 (prefectural and municipal public health institutes, PHIs)以及日本 NIID 等共同組成，並由 NIID 負責統整及發佈每日疫情資訊，其監測內容包括病人以及病原體相關資訊等兩部份。

表三、日本傳染病監測網



本次所研習之部份著重於病原體監測系統，以流感病毒為例，各地區醫院與定點醫療診所的臨床醫師針對具類流感症狀之患者進行採檢，並將檢體送到各 PHIs 進行流感病毒檢驗，各 PHIs 檢驗所需試劑皆由日本 NIID 流感中心提供。目前全日本共有 76 個 PHIs，它們對於臨床檢體的檢驗包括以即時 PCR 檢測流感病毒、流感病毒分離、以及流感病毒紅血球凝集 (HA) 以及紅血球凝集抑制 (HI) 試驗等。當檢驗結果分析完成後，各 PHIs 會將結果包括患者年齡、性別、臨床症狀、檢體採集日、檢驗方法等發佈於監測系統中，若流感病毒可從臨床檢體中被分離，則該病毒之 HI 結果亦同時發佈。日本 NIID 會定期根據系統之資料向各 PHIs 要求寄送較特別之流感病毒株，進行後續更為詳細之抗原性、抗藥性及演化等分析。NIID 也會定期將監測結果更新於官網，作為相關訊息交流的網路平台。

心得及建議

流行性感冒屬於一種具有季節性的國際傳染病，其致病原---流感病毒也因本身具有快速且持續突變的能力，導致世界各國皆需建立一套專屬的系統，進行相關流行病學與病原體監測等工作。台灣 CDC 在流感病毒的防治上，藉由各組室有制度的分工合作，已建立相當完備之機制。從去 (2009)年 H1N1 新型流感病毒的防治成果來看，顯示本局的流感防治網包括行政單位與實驗室等均禁得起考驗。此外，職於研習期間，日本 NIID 流感中心主任 Dr. Tashiro 亦多次在公開場合稱讚台灣 CDC 近年來對流感相關業務的運作績效，並積極鼓勵建立雙方永續的合作機制，我想，這些都是肯定台灣 CDC 的最好證明。

WHO 流感監測網的運作從 1952 年開始已行之有年，其最主要的目的，即是定期篩選出適當的疫苗株，進而產製流感疫苗供大眾施打。以台灣的角度來看，由於我國並非 WHO 會員國，在與其他國家討論相關傳染病議題時，往往面臨到溝通管道不盡暢通的窘境，也較難直接取得 WHO 的第一手傳染病資訊。日本 NIID Influenza Virus Research Center 為 WHO 在亞洲兩個流感參考實驗室之一，對於全球流感病毒之相關檢驗、演化分析與監視等，已具備成熟且穩定之技術與運作模式。其功能除協助亞洲其他國家進行流感病毒監測外，更進一步將各國之監測結果相互整合，使流感病毒在亞洲各國的流行趨勢可以完整呈現出來。此次赴日本 NIID 研習，除了研習某些特定技術例如流感病毒機胚蛋培養及新興分子生物檢驗監測技術外，亦已藉由這次機會實地了解日本 NIID 對於流感病毒監測的運作情形以及其流感中心實驗室對於病原體相關業務的作業方式。此外，短短兩週的研習期間內，我也透過與各研究員相互討論的機會，使日本 NIID 更加了解台灣 CDC 的運作成果，且目前已順利的與他們建立溝通管道，自研習回國以來，皆持續與日本方面以 email 方式保持聯絡，相信日後有任何疑難雜症，可透過雙方互相討論共同解決問題。

從流感病毒近六個月的流行的趨勢來看，日本以新型流感 H1N1 病毒為主要

流行型別，季節性 H3N2 與 B 型流感病毒居相對少數，這個趨勢與台灣不盡相同，我國目前以季節性 H3N2 最多，新型流感 H1N1 次之，B 型流感最少。由於台灣與日本的交流密切，因此這個趨勢令我有些意外。此外，台灣的病毒包括新型流感 H1N1 以及季節性流感 H3N2 亞型的變異情形，經與日本相互比較之後似乎有領先的趨勢。因此，台灣對於流感病毒體的監測結果，對日本 NIID 站在 WHO 亞洲區參考實驗室的角度來說，是一項非常重要的資訊。日方亦期許我們對於台灣流行的病毒株持續嚴密監測，使他們更能掌握整個亞洲的流行趨勢。

在研習的第二週，有個小插曲令我印象深刻。即 WHO 位於澳洲的流感參考實驗室於 *Eurosurveillance* 期刊發表了關於新型流感病毒 H1N1 新變異株的文章。文章內容指出具 HA 蛋白 E391K 以及 N142D 變異的新型流感病毒 H1N1 已在澳洲與紐西蘭等國大規模流行，雖然其抗原性與目前的疫苗株 A/California/07/2009 並無明顯差異，但此報導仍是一項病毒持續進行變異的警訊。特別的是，日本 NIID 對於流感病毒 HA 蛋白的常規變異監測僅限於 HA1 區域，由於該區域並不包含第 391 個胺基酸位點，因此 NIID 第一時間並無法了解此類變異株於該國的流行情形。由於台灣 CDC 流感中心對於群聚個案的病毒 HA 蛋白皆進行全序列監測，因此在與第一室室長討論此訊息的過程中，職亦立即將台灣對於此兩個位點的監測結果與之相互交流，日本方面亦開始考慮將其先前錯失的 HA2 區域納入日後常規監測，避免錯失任何可能的變異點。這個機會也適時的讓日本了解台灣 CDC 在這方面的努力。

總結本次心得感想，從病毒體監測的整體技術層面來看，台灣 CDC 與日本 NIID 雙方的流感中心並無太大差異。惟在相關國際訊息接收度上，台灣 CDC 確實較無法獲得 WHO 內部的第一手資訊。日本與台灣距離相近，對我們來說，算是 WHO 流感參考實驗室中關係較為密切的夥伴。期許日後可與日本建立更為多元的合作管道，透過此種國際合作讓 WHO 看到台灣更多的防疫成果。

以下為本次赴日研習之兩點建議：

1. 本次赴日研習期間，日本 NIID 流感中心主任 Dr. Tashiro 提及，請職於回國後，將其請求轉達予本局長官知悉，即希望流感病毒相關議題可正式納入本局與日本 NIID 所簽訂之合作計畫項目中，如此台日雙方之相關單位於未來將會有更為正式的交流，另有關人員也可藉由每年定期互訪拉近彼此的關係，俾促進雙方永續之合作。
2. 若以專業角度來看，台灣 CDC 對於流感病毒監測之整體運作能力，不比 WHO Collaborating Center 之一的日本 NIID 差。撇開政治因素不談，台灣 CDC 在未來可持續爭取成為 WHO 所認可之 National Influenza Center (NIC)，若真有機會，本局將可藉由與世界其他各國更為密切的往來，獲得更多寶貴的防疫資訊與研究資源。

附錄

附表一、日本 NIID 研習課表

Training agenda for Mr Ji-Rong Yang

Date		
Oct 13 Wed	AM	Culture of MDCK cells from LN ₂ (Dr Hong)
	PM	Sequencing and phylogenetic analysis (1) (Dr Fujisaki)
14 Thu	AM	Lectures by Yang and Odagiri (Influenza Center and virus surveillance)
	PM	phylogenetic analysis (2) (Dr Fujisaki)
15 Fri	AM	Passage of MDCK cells, Inoculation of viruses into eggs (Dr Hong)
	PM	Detection of NAI-resistant by real-time PCR (Dr Kageyama)
	19:00	Welcome party with Indonesian trainees and staff of NIID
18 Mon	AM	Inoculation of viruses to MDCK cells, harvest viruses from eggs and HA titration (Dr Hong)
	PM	14-16:00 move to Shinjuku Campus under escort by Odagiri 16:00-18:00 Lecture and training of surveillance network system of NIID by Dr Yamashita (Infectious Diseases Surveillance Center)
	19 Tue	AM
20 Wed	AM	NAI susceptibility assay (2) (Dr Takashita)
	PM	HA titration (1) for HI test on Thu (Dr Kishida)
21 Thu	AM	HA (2)
	PM	HI tests (Dr Hong)
22 Fri	AM	Harvest viruses from MDCK cells and HA (Dr Hong)
	PM	Lecture of PCR diagnosis, pandemic responses (Dr Kageyama)
		Final discussion (All participants)