

計畫編號：MOHW110-CDC-C-315-113118

衛生福利部疾病管制署 110 年署內科技研究計畫

腹瀉群聚之新式奈米孔檢驗技術導入與應用

110 年度/全程研究報告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：林智暉

研究人員：邱淑君、廖玲敏

執行期間：110 年 01 月 01 日至 110 年 12 月 31 日

目錄

頁 碼

封面

目錄

壹、中文摘要

貳、英文摘要

參、本文

一、前言.....	5
二、材料與方法.....	7
三、結果.....	9
四、討論.....	12
五、結論與建議.....	15
六、重要研究成果及具體建議.....	16
七、參考文獻.....	17
八、圖次.....	20
九、表次.....	22

壹、中文摘要

關鍵詞：快速病原偵測、總體基因體分析、流行病學比對

近年來全球化趨勢及氣候環境變化，使得各種傳染病病原體變異及傳播速度更勝以往，包括新興病原浮現、病毒性病原的變異人畜共通病毒基因重組以及細菌性病原的抗藥性變異等，均有可能造成大規模甚至全球性疫情的發生。現有的檢驗技術對於已知病原均可透過已建立之標準檢驗流程進一步加以確認，但在檢驗時效上仍有待提升。腹瀉傳染病是全球 5 歲以下幼童的第二大死因，儘管衛生狀況和公眾健康意識顯著進步，依據世界衛生組織統計每年大約有 17 億兒童腹瀉病例發生，其中有 52 萬 5 千名年齡小於 5 歲的兒童死於腹瀉疾病。近年來台灣的腹瀉群聚案件通報數逐年攀升，本計畫開發新式奈米孔檢驗技術，提升腹瀉群聚致病原的檢出率，並加強大型腹瀉群聚案件的快速診斷，以解決傳統檢驗技術耗時且檢測病原有限的困境。同時應用奈米孔檢驗技術所具備的可檢出檢體中所有可能微生物病原特性，不但在檢驗同時同步獲得病原的全基因序列，也可進行腹瀉群聚的總體基因體分析，除了累積資訊可提供群聚案件的流行病學比對分析，總體基因體分析也可提供未來臨床治療方向以及改善腸道菌叢組成，強化疫病防治，確保國人健康。

貳、 英文摘要

keywords : rapid pathogen diagnosis, metagenomics , epidemiological analysis

The pathogen mutation and spread rate are increased than past due to the climate change and globalization in recent year. It is possible to appear large scale epidemic or pandemic infections caused by emergent or reemergent pathogens, including recombination of zoonotic virus, bacteria anti-drug genes mutation which were difficult and time consuming to detect these pathogens by using conventional biological and molecular methods. Diarrheal disease is the second leading cause of death in children under five years old. It is both preventable and treatable. Globally, there are nearly 1.7 billion cases of childhood diarrheal disease every year, each year diarrhea kills around 525,000 children under five. To find the solution for quick response epidemic and to improve the diagnostic technology, we propose this study for early identification of infectious agents using portable genomic surveillance. The strategy of this project will proceed diarrhea-related pathogens which easier to cause food-borne outbreak in community, to as research target and to establish the detection procedures and related analysis methods. In the beginning, the newest generation of real-time sequencing technology for genomic epidemiological finding will be established for infectious agent detection and surveillance along with shorter inspection process and to enhance the efficiency of disease control and national health.

參、本文

一、前言

近年來國與國之間距離消失，使得各種傳染病病原體傳播快速且擴散範圍更廣，加上生物科技及醫療發展發達與普及，各種藥物及治療氾濫導致致病菌變異更勝以往，因此防疫難度日益增長甚至發生大規模疫情。目前針對即時偵測傳染病有許多新型檢驗技術方法開發，考量除了病原檢出的靈敏度、結果呈現的豐富度及成本必須下降同時又能兼顧檢測速度等因素[1]。

在傳染病原體傳播快速且擴散範圍更廣的考量上，即時偵測傳染病與全基因定序是有效應用於流行疫情偵測，而透過新式奈米孔檢驗技術檢測將可提高疑似病原菌的檢出率並運用總體基因體學(metagenomics) 研究糞便中細菌種類的多樣性及豐富度，並以此作為研究方向[2]。新式奈米孔檢驗技術又被稱為第三代定序系統，具有解讀較長序列、提高連續序列片段長度、定序速度快，且能直接對原始 DNA 樣本進行定序，避免了 PCR 擴增出現的錯誤率及偏好性，可得到各個疑似病原菌的全長序列，不須額外再進行短片段核酸增幅以及基因定序等操作，並運用總體基因體學研究糞便中細菌種類的多樣性及豐富度，來探討腹瀉群聚與細菌之間的交互關係。總體基因體學的定序策略分成兩大類：全基因體霰彈槍法與 16S 目標

區間定序，可研究微生物之代謝特性與路徑與其種與物種的分布及多樣性。

由於許多的病原微生物無法培養增殖，透過直接萃取遺傳物質（包含 DNA 與 RNA）進行檢測可解決這些病原菌分析上的困境。近年來由於新式奈米孔檢驗技術不斷攀升，應用總體基因體學의各種研究在數量及領域廣度都呈現爆炸性成長，總體基因體分析除了可偵測疾病感染源，也可應用於群聚疫調、感控監測、病原變異分析以及新興病原偵測等。目前應用糞移植重建腸道菌相已是包括癌症在內的重症醫療方向之一[3-4]，現階段腹瀉病人的治療多以支持性療法為主，在檢測致病原的同時同步偵測腹瀉患者的腸道微生物相分析有助於理解腹瀉患者與健康人體腸道菌叢的差異，可提供未來治療方向。本計畫以新式奈米孔檢驗技術自臨床檢體中直接進行致病原偵測，初步以 110 年通報系統腹瀉群聚的臨床檢體(糞便)進行細菌病原檢測，經由通過孔洞時所產生的電流擾動進行解碼與序列分析，偵測各種可能的致病原並針對特定高變區的序列進行定序，執行上相對較容易、快速，具有更大的基因組覆蓋範圍和數據輸出。目前應用環境中存在的微生物種類進行全面性分析，可鑑別物種與研究多樣性，並可準確至屬、種或菌株層級，可完善台灣腹瀉病原基因資料庫，提升我國醫療品質並優化國內防疫網，以增進全民福祉。

二、材料與方法

糞檢體收集

110 年通報腹瀉群聚之患者送驗糞便檢體，以 1:10 之比例加入 PBS 強力震盪成懸浮液，之後以 4°C，3000 rpm 離心 15 分鐘，收集上清液分裝至冷凍小管中，保存於-80°C或進行後續核酸萃取。

核酸萃取及檢測

檢體核酸的萃取依照 QIAGEN 廠牌之 QiaAmp DNA 萃取套組 (QiaAmp DNA Mini and Blood Mini Handbook) 試劑組建議之操作步驟進行。檢體 DNA 經以 Qubit 核酸測定儀定量後以試劑 NEBNext FFPE Repair Mix 以及 NEBNext Ultra II End repair/dA tailing Module 進行尾端整平及 polyA 尾端修飾。將處理後的核酸經純化及 barcode 條碼標記後合成 DNA 序列庫 (DNA library)。將 library DNA 連接 adapter 之後加入檢測芯片進行核酸偵測。

序列資料收集及分析

病原序列資料以 MINKNOW 軟體進行收集[5]。資料分析則以雲端軟體 EPI2ME 進行序列解讀 (<https://epi2me.nanoporetech.com/>)，後續利用 nanopolish 比對 FAST5 與 FASTQ 檔案結果進行定序校正，修正錯

誤解碼。利用 canu 軟體進行進行序列拼裝，並以 minimap2 進行比對標的物基因後組裝[6]。

三、結果

本年度以 110 年通報腹瀉群聚的臨床檢體(糞便)進行新式奈米孔檢驗技術建置，並進行細菌性病原檢測，檢體利用高通量技術大量的核酸定序，檢出其中的腹瀉細菌致病原進行比對分析(圖一)，同時以傳統細菌培養及市售腸道腹瀉病原偵測試劑(The BioFire[®] FilmArray[®] Gastrointestinal Panel, BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, USA)同步進行兩種檢驗方式進行比對分析，結果如表一所示，其中傳統細菌培養有 2 個例行性送驗為陰性檢體(編號#4 及編號#8)，透過新式奈米孔檢驗技術檢測檢體(編號#4)檢出有仙人掌桿菌、大腸桿菌及曲狀桿菌屬，由 FilmArray 技術驗證檢體(編號#4)內確實帶有致病菌的大腸桿菌，而另一個以傳統培養法及 FilmArray 均檢出陰性的新北市兩所高中大型腹瀉群聚(共送驗 47 個檢體)，以新式奈米孔檢驗則檢出可能致病原 *Clostridium perfringens*、*Staphylococcus* 以及 *Bacillus* (群聚編號#8)。而有 3 個傳統培養法檢測出仙人掌桿菌(*B. cereus*)以及金黃色葡萄球菌(*S. aureus*)的群聚，因 FilmArray 原廠之檢測標的並無含概仙人掌桿菌及金黃色葡萄球菌，所以無檢出該病原，但 FilmArray 測得檢體中有困難梭菌(*C. difficile* toxinA/B)以及致病性大腸桿菌(EAEC、EPEC、ETEC、EIEC)；以新式奈米孔技術檢測則是上述之病原菌均有檢出 (群聚編號#5、#7 以及#10)(表一)。另外有 5 個群聚

檢體，不但可以進一步確認致病原，並可將檢出率提升 2~5 倍。而所有的群聚除了主要致病原，新式奈米孔也可以檢出檢體中其他的病原菌。輔以流行病學疫調資料，將可更了解整起腹瀉群聚案件全貌，有助於疫情的判定。

由於導入之新式奈米孔檢驗技術具有高敏感度偵測功能，因此透過檢測可獲得長片段的基因序列，為增加細菌辨種之正確率，僅取長度在 2000 bp 以上之序列，經由 Epi2me 軟體分析，各檢體成功辨識之有效序列數量為 19,846 - 43,306，共成功辨識 839,147 條有效序列，這些序列中可辨識至屬(genus) 層級，結果列於圖二，依序分別為大腸桿菌佔多數，其次為沙門氏桿菌、金黃色葡萄球菌、弧菌屬、桿菌屬、梭菌屬及志賀氏桿菌屬等。這樣的細菌學檢驗結果若以一般傳統培養至鑑定需花費 4-6 天的時間，而我們以新式奈米孔分析細菌僅花費 48 小時即可獲得，大幅縮短檢驗時間(圖三及圖四)，此外，本研究運用總體基因體學是藉由新式奈米孔檢驗技術研究糞便中細菌種類的多樣性及豐富度，來探討腹瀉群聚與細菌之間的交互關係，並分析全基因序列偵測及組裝。本研究執行 110 年腹瀉群聚細菌性病原檢驗研究結果顯示，由檢體透過奈米孔檢驗的長片段核酸讀取功能，在檢測同時也同步獲得包括 *Salmonella enterica*、*Escherichia coli* 以及 *Clostridium perfringens* 的全基因序列(圖五到圖七)，其中沙門氏菌

經由 O 抗原、H 抗原的基因比對，與傳統血清學方法確定的 O 與 H 抗原結果相符，而產氣莢膜梭狀桿菌也檢出基因序列中帶有 *cpa* 以及 *cpe* 的毒素基因，顯示新式奈米孔檢驗不但可快速確認病原菌，且不需要以特定標的引子進行 PCR 複製及後續定序作業，即可獲得菌株基因全貌。結果顯示所開發的新式奈米孔檢驗技術，可在由臨床檢體檢測病原的同時同步獲得病原全基因序列，並進一步確認抗原基因序列以及偵測是否帶有毒素基因，可大幅簡化檢驗流程及縮短後續分析所需時間不須針對特定病原設計探針引子，即可檢出臨床檢體中所有可疑致病原。研究結果顯示，由檢體透過新式奈米孔檢驗技術的長序列讀取優勢，能更接近完整基因組圖譜，易直接判斷基因位置是位在質體或染色體上，資訊分析工具多元化可增加資料完善分析。

四、討論

傳統研究微生物的方法多是以分離培養得到單一物種的方式來探究其特性，但是未知微生物往往因生長條件不明而無法培養。在我國腹瀉群聚傳統細菌培養可檢測 7 種病原(包括霍亂、沙門氏菌、桿菌性痢疾、金黃色葡萄球菌、腸炎弧菌、出血性大腸桿菌以及仙人掌桿菌)，而 FilmArray 技 GI Panel 可檢測 22 種腹瀉病原，但因其為針對特定病原設計探針引子來進行偵測，因此仍有檢驗上的限制，例如我國常見的金黃色葡萄球菌、仙人掌桿菌以及產氣莢膜梭狀桿菌等便無法檢測。新式奈米孔檢驗技術可檢測檢體中所有的核酸序列，不但可擴大病原檢測範圍，也可強化未知及新興病原的偵測，且不需要高階儀器，亦無需培養時菌種型態以及生化學血清學的人為判讀，可大幅降低設備成本以及人為操作誤判的風險。FilmArray 受限於每次操作僅能進行單支檢體檢驗，檢驗成本較高。Nanopore 最多可同步進行 12 支檢體檢測，檢驗成本較低，惟在臨床處置上若許有宿主菌叢干擾，所得結果須再分析，並由臨床醫師依病情做判定。

開發之新式奈米孔檢驗技術具有解讀較長序列、提高連續序列片段長度、定序速度快，且能直接對原始 DNA 樣本進行定序，避免了 PCR 擴增出現的錯誤率及偏好性，同時不需要透過培養及純化等繁瑣的步驟，即可得到各個疑似病原菌的全長序列，也可分析病原菌的親緣關係，新式奈米

孔檢驗技術可直接檢測臨床檢體中所有可疑的致病原。本次結果如圖二顯示大腸桿菌讀取數較多，依此結果一般可能認為大腸桿菌是造成嚴重腹瀉原因之一，但經資料判讀結果顯示，除了出血性大腸桿菌(EHEC)以及少數的致病性大腸桿菌(包括 EAEC、EPEC、ETEC、EIEC)以外，在腸道菌叢發現大腸桿菌是人體的一種正常菌落，正常情況下，對人體並無害處，體內還會達成一種平衡狀態，不僅不會致病，甚至對人類還有正面助益，除了能幫助體內維他命的合成以及免疫系統發育外，還可阻擋病菌的侵襲[7-8]，因此在應用新式奈米孔檢驗技術檢測總體基因體組成的研究分析上，未來須持續檢驗，收集並建立群聚檢驗資料庫，進行群聚調查之判定閾值分析，透過資訊軟體的分析及判讀，提高疑似病原菌的檢出率，並以此作為研究方向，以精準檢出致病原，達到有效防疫及治療並避免藥物濫用。

如今，越來越需要將標準的短片段核酸增幅以及基因定序等分析轉移到新式奈米孔檢驗技術。除了定序平台外，定序後的生物資訊分析也是重要的一環，新式奈米孔檢驗技術的資料處理包含很多層面，有多種工具可選擇，例如 basecalling 有 Albacore、Scrappie、Guppy 等工具； Reads Cleaning 可考慮 Porechop、NanoFilt 等；Alignment 有 NGMLR、GraphMap、marginAlign 可選擇；De novo assembly 則有 Canu、Miniasm、MECAT 等；Consensus & polish 則可考慮 Pilon、Racon 或

Nanopolish，研究者可視情況選擇不同的處理工具。若需進行即時分析 (real-time analysis)，也有數種工具可選擇：比如 MinKNOW + EPI2ME，其優點是有圖像介面，並可透過網路上傳到 EPI2ME。目前，新式奈米孔檢驗數據分析本身就是一個研究的熱點，幾乎每個月甚至每周都有新的工具發表，測序處理流程日趨簡化，單次檢測量能也趨於高通量[9]。因此，新式奈米孔檢驗技術未來將可望帶來更多臨床應用。近年來由於新式奈米孔檢驗技術不斷攀升，應用總體基因體學各種研究在數量及領域廣度都呈現爆炸性成長，相關生物資訊演算法與工具也連帶蓬勃發展。總體基因學在臨床微生物實驗室的應用日趨廣泛，除了鑑定傳染病原、流行群聚疫調、醫院感染控制與監測外，也應用於病原微生物的變異分析以及新興病原偵測[10-11]，除了探討病原微生物間的流行動態外，透過全基因偵測可對具有潛力導致流行的分離菌株進行即時檢測，針對其特性擬定適當的防疫策略[12]。

五、結論與建議

隨著科技拉近了人與人之間的距離，傳染病已無國界之分，使得各種傳染病病原體傳播快速且擴散範圍更廣，加上生物科技及醫療發展發達與普及，各種藥物及治療氾濫導致致病菌變異，可能產生更強的潛在傳染病危機，造成防疫難度面臨前所未有的嚴峻挑戰，因此導入新興檢測工具進行應對已是刻不容緩。而透過新式奈米孔檢驗技術的開發可同步獲得病原體的全基因及遺傳變異資訊，強化未知病原偵測與新知探索，以因應病原體的快速變異並有效建立預警機制。累積病原資訊可建立台灣腹瀉病原基因資料庫，提供後續相關腹瀉群聚流行病學的比對分析，除了使數據資料從一次性檢驗分析拓展為重複使用外，也能發展精準醫療之應用，維護民眾健康。

六、重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

總體基因學在臨床微生物實驗室的應用日趨廣泛，相關生物資訊演算法與工具也連帶蓬勃發展，新式奈米孔檢驗技術除了鑑定傳染病原、流行群聚疫調、醫院感染控制與監測外，也應用於病原微生物的變異分析以及新興病原偵測，針對其特性擬定適當的防疫策略。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

腹瀉傳染病是我國傳染病防治的重點項目之一，大型腹瀉事件發生時常造成防疫困擾以及社會大眾擔憂，對台灣的觀光資源及國際形象造成極大影響。因此快速釐清感染源有效防止病原傳播，有助於警示民眾注意飲食安全衛生，降低腹瀉傳染病發生的頻率是政府對民眾進行最有效的防疫作為，保障民眾健康。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

為能精進目前衛生醫療政策及相關計畫之審議作業，並使審議原則更符合健康促進、健康照護、疾病管制等領域特性，本計畫以新式奈米孔檢驗技術自臨床檢體中直接進行致病原偵測各種可能的致病原並針對特定高變區的序列進行定序，可完善台灣腹瀉病原基因資料庫，提升我國醫療品質並優化國內防疫網之參考。

七、參考文獻

1. Gardy JL, Loman NJ. Towards a genomics informed, real time, global pathogen surveillance system. *Nature reviews Genetics*. 2018;19(1):9-20.
2. Jain M, Olsen HE, Paten B, Akeson M. The oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol* 2016;17(1):239.
3. Qian Y, Yang X, Xu S, Wu C, Song Y, Qin N, et al. Alteration of the fecal microbiota in Chinese patients with Parkinson's disease. *Brain, behavior, and immunity*. 2018;70:194-202.
4. Zheng P, Li Z, Zhou Z. Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2018;34(7):e3043.
5. Payne A, Holmes N, Rakyan V, Loose M. BulkVis: a graphical viewer for Oxford nanopore bulk FAST5 files. *Bioinformatics*. 2019;35(13):2193-8.
6. Senol Cali D, Kim JS, Ghose S, Alkan C, Mutlu O. Nanopore sequencing technology and tools for genome assembly: computational analysis of the current state, bottlenecks and future directions. *Brief Bioinform* 2019;20(4):1542-59.
7. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(1):142-201.
8. Delmas J, Dalmasso G, Bonnet R. *Escherichia coli*: The Good, the Bad and the Ugly. *Clin Microbiol* 2015;4:195.
9. Nanopore News. Available at: <https://nanoporetech.com/about-us/news>
10. Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic Next-Generation Sequencing for pathogen detection. *Annu Rev Pathol* 2019;14:319-38.
11. Sun X, Song L, Yang W, Zhang L, Liu M, Li X, Tian G, et al. Nanopore sequencing and its clinical applications. *Methods Mol Biol* 2020;2204:13-32.
12. Cameron A, Bohrhunter JL, Taffner S, Malek A, Pecora ND. Clinical

pathogen genomics. Clin Lab Med 2020;40(4):447-458.

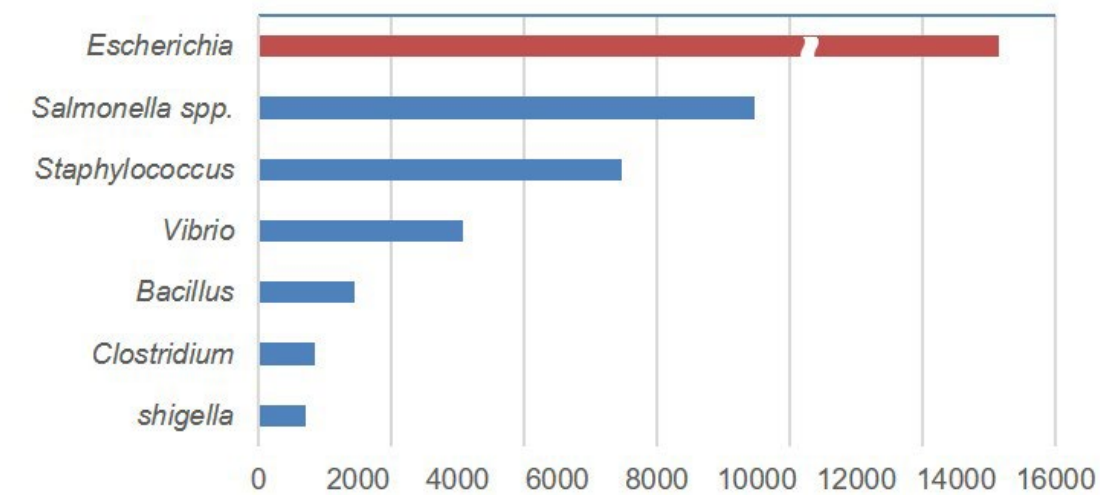
八、圖次



測得糞便檢體中所有的微生物核酸片段

檢出其中腹瀉細菌致病原

圖一、腹瀉群聚細菌病原偵測流程圖



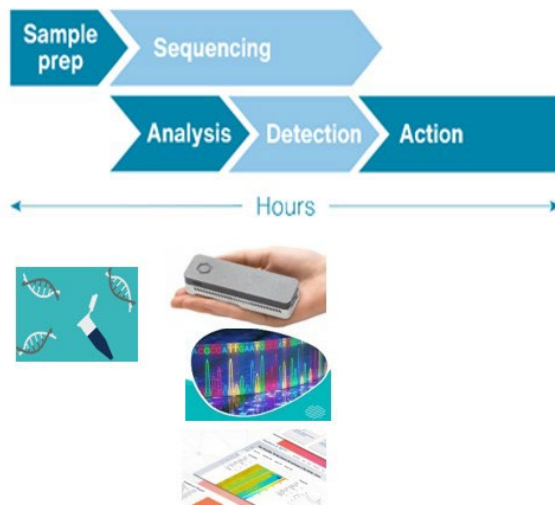
圖二、腹瀉群聚檢體之檢測分析圖

Traditional sequencing-based pathogen detection workflow:

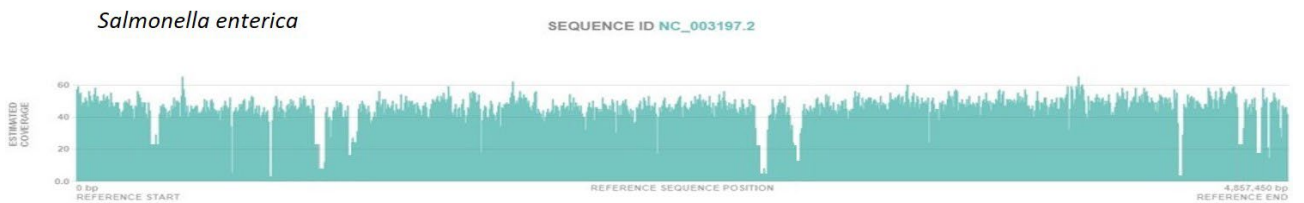


圖三、傳統細菌培養流程圖

Nanopore sequencing pathogen detection workflow:

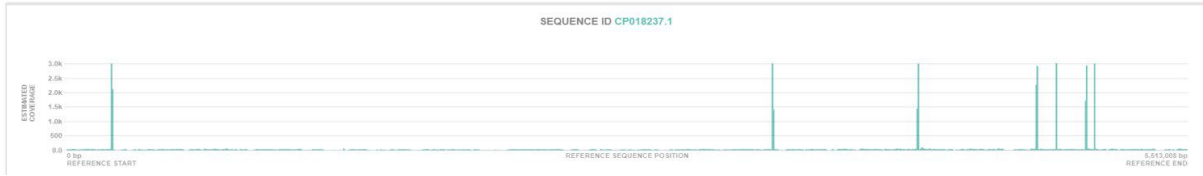


圖四、新式奈米孔檢驗技術流程圖



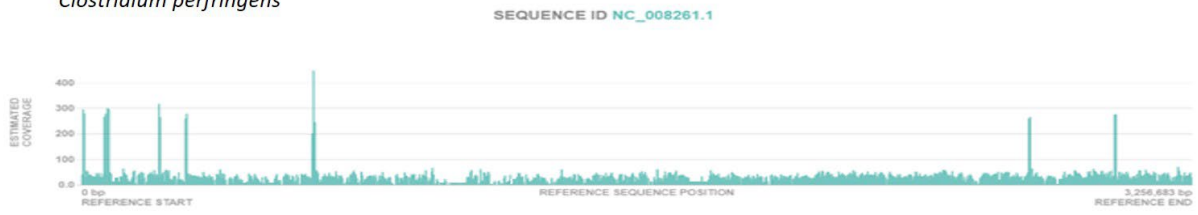
圖五、*Salmonella enterica* 全基因序列圖譜

Escherichia coli



圖六、*Escherichia coli* 全基因序列圖譜

Clostridium perfringens



圖七、*Clostridium perfringens* 全基因序列圖譜

九、表次

表一、傳統培養、FilmArray 與新式奈米孔檢驗技術比較腹瀉病原檢測結果

細菌培養		Filmarray GI panel 檢測	奈米孔檢驗技術檢測(Taxon)
可檢測病原數	7*	22	檢體中所有微生物病原
群聚	病原體	病原體	病原體
#1	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio</i> 、EPEC、 <i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Vibrio (V. parahaemolyticus)</i> 、 <i>Escherichia</i> 、 <i>Clostridium</i> 、 <i>Bacillus</i> 、 <i>Plesiomonas</i>
#2	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> 、EPEC	<i>Salmonella (S. enterica)</i> 、 <i>Escherichia</i> 、 <i>Staphylococcus</i> 、 <i>Clostridium</i>
#3	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio</i> 、EPEC、ETEC	<i>Vibrio (V. parahaemolyticus)</i> 、 <i>Escherichia</i> 、 <i>Staphylococcus</i> 、 <i>Shigella</i>
#4	Negative	EPEC	<i>Bacillus</i> 、 <i>Escherichia</i> 、 <i>Campylobacter</i>
#5	<i>Bacillus cereus</i>	EPEC、ETEC、EIEC	<i>Bacillus (B. cereus)</i> 、 <i>Escherichia</i> 、 <i>Campylobacter</i> 、 <i>Clostridium</i> 、 <i>Shigella</i>
#6	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> 、 <i>Vibrio</i> 、EAEC	<i>Salmonella (S. enterica)</i> 、 <i>Escherichia</i> 、 <i>Vibrio</i> 、 <i>Clostridium</i> 、 <i>Shigella</i>
#7	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Clostridium difficile</i> toxinA/B	<i>Staphylococcus (S. aureus)</i> 、 <i>Escherichia</i> 、 <i>Clostridium</i> 、 <i>Campylobacter</i>
#8	Negative	Negative	<i>Clostridium</i> 、 <i>Staphylococcus</i> 、 <i>Bacillus</i>
#9	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella (S. enterica)</i> 、 <i>Escherichia</i> 、 <i>Staphylococcus</i> 、 <i>Bacillus</i>
#10	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Clostridium difficile</i> toxinA/B、EAEC	<i>Staphylococcus (S. aureus)</i> 、 <i>Escherichia</i> 、 <i>Clostridium</i> 、 <i>Bacillus</i>

110 年度科技研究計畫期末執行進度審查意見回復表

計畫名稱：腹瀉群聚之新式奈米孔檢驗技術導入與應用

計畫主持人：林智暉

填報日期：110 年 12 月 6 日

*修正處請在報告中以紅字標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處頁碼
1	符合進度，方向正確，對整體防疫有助益。	謝謝委員肯定。	
2	主要用於公衛領域，可做為公共衛生防治介入措施之重要參考，對整體防疫有助益。	謝謝委員肯定。	
3	精準快速偵測病原，對腹瀉群聚調查可產生快速、精確之結果，惟能夠「快速」因應是需要被列入評估的。	謝謝委員建議。目前病原偵測結果已能提供預醫辦進行即時因應處理疫情，未來會與其他檢驗方法列入評估比較。	
4	方法可行，惟此計畫使用之技術於幾個計畫中重複。	謝謝委員指正。近年 Nanopore 技術趨於成熟，本署其他相關檢驗亦開始導入應用，未來將應依委員建議規劃整合執行。	
5	FilmArray 與 Nanopore 之檢驗成本和效益以及其使用的策略，再請計畫主持人說明，因為在臨床處置上若有太多宿主菌叢干擾，其使用性待商榷。	謝謝委員指正。FilmArray 受限於每次操作僅能進行單支檢體檢驗，檢驗成本較高。Nanopore 最多可同時進行 12 支檢體檢測，檢驗成本較低，後續將依委員建議進行檢測結果再分析，由臨床醫師依病情做判定。	12

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
6	使用 Nanopore 用於群聚調查判定之閾值是否會進一步分析？	謝謝委員建議。未來會持續檢驗，收集並建立群聚檢驗資料庫，並依委員建議進行群聚調查之判定閾值分析。	13

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 110 年 12 月 23 日
前至 GRB 系統完成資料抽換。