

計畫編號：MOHW112-CDC-C-315-133310

衛生福利部疾病管制署 112 年委託研究計畫

計畫名稱：重要傳染病原次世代定序檢測方法之發展及應用

112 年度研究報告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：慕蓉蓉

研究人員：林鈺棋

研究人員：江仁哲

執行期間：112 年 1 月 1 日至 112 年 12 月 31 日

## 目錄

	頁	碼
目錄		1
計畫中文摘要		2
計畫英文摘要		3
計畫內容		
一、前言		4
二、材料與方法		7
三、結果		10
四、討論		15
五、結論與建議		17
六、參考資料		18
六、圖、表		20

共 (29) 頁

## 計畫中文摘要：

近年由於環境及氣候變遷，加上國際間全球化趨勢，均增加人類與野生動物接觸的機會，造成人畜共通傳染病傳播風險大幅攀升，例如可能來自猩猩和猿猴的 HIV 病毒、源自於鳥類和家禽的禽流感病毒、可能由蝙蝠傳出的 Ebola 病毒及 SARS，以及在 109 年初於中國武漢市爆發由 SARS-CoV-2 造成全球大流行的 COVID-19 等已陸續浮現並造成嚴重流行疫情，顯示在疫情初期精準檢出病原，以及時掌握感染源並落實防疫工作實為當務之急。

次世代定序(Next generation sequencing, NGS) 相較於傳統病原體檢測技術，具有高輸出量及檢測多種標的之優勢，已廣泛運用在檢測及基因定序領域。本計畫運用建立之標的 NGS(targeted-NGS, tNGS)優化新冠病毒全基因定序技術，及時應對 112 年年初開始流行的 BN.1.3 及 XBB.1.5 變異株之基因變異；同步發展可全方位檢測傳染病原之總體基因體學 NGS(metagenomic NGS, mNGS)技術，實際導入並完成於 112 年 7 月底送驗不明原因腦炎病例之福氏內格里原蟲全基因定序，及時釐清感染源，落實防疫措施，降低傳染病造成的衝擊。

關鍵詞：次世代定序、總體基因體學

計畫英文摘要：

keywords : next generation sequencing, metagenomics

Emerging infections have threatened humanity since global warming, dramatic environmental changes resulting in complex interactions between humans and animals. Emergence and evolution of an ever increasing number of human pathogens, originating from animals, such as avian flu, SARS and the SARS-CoV2 resulting in pandemic COVID-19. Rapid detection and identification of emerging infectious pathogens is essential to guide the therapy and predict the outcome.

Next Generation Sequencing (NGS) could resolve the detection limits to the number of targeted pathogens when using traditional techniques. Introducing NGS into a diagnostic setting may revolutionize the investigation of pathogens. This study uses the established targeted-NGS (tNGS) to improve the SARS-CoV-2 whole genome sequencing technology to promptly respond to the mutations of the BN.1.3 and XBB.1.5 variant. We also establish the metagenomic NGS (mNGS) for comprehensive detection of pathogens, and successfully introduced to complete the whole genome sequence of *Naegleria fowleri* in an unexplained encephalitis case at the end of July 2012. Thus, adapting NGS from clinical to public health use benefits monitoring, controlling and preventing infectious diseases.

## 本文

### 一、前言：

近年由於環境及氣候變遷，加上國際間全球化交流頻繁，均使人類與動物接觸機會增加，造成人畜共通及新興傳染病之傳播風險大幅攀升。自1940年起，全球流行的新興傳染病中有60%為人畜共通傳染病，其中高達72%的感染原為野生動物(1)，包括可能來自猩猩和猿猴的HIV病毒(2)、源自於鳥類和家禽的禽流感病毒(3)及可能由蝙蝠傳出的Ebola病毒及SARS(4)。然而，環境及氣候變遷已逐漸改變野生動物的棲息地及生活方式，同時全球都市化的趨勢，也提供野生動物更多的食物及更佳的生活條件，將增加與野生動物接觸的機會，此外，目前仍有部分地區有嗜吃野生動物的習慣，捕獲及食用過程皆可能會接觸野生動物，均造成人畜共通傳染病較以往更容易傳播(5)。

在108年年底於中國武漢市爆發由SARS-CoV-2病毒造成的COVID-19，已快速蔓延造成全球嚴重流行疫情，世界衛生組織已於109年3月宣布，COVID-19的疫情規模已達到全球大流行(6)，目前發現該病毒基因序列與蝙蝠冠狀病毒RaTG13具有高達96%相同度(7)，顯示COVID-19亦可能為源自動物的人畜共通傳染病。因此，因應與日俱增的人畜共通及新興傳染病，建構完善的監測系統，發展重要傳染病原之檢測技術，將扮演防疫上重要的關鍵角色。

次世代定序(Next generation sequencing, 下稱 NGS) 自問世以來, 相較於傳統病原體檢測技術僅能針對單一或數種已知病原體檢測, NGS 兼具高輸出量及定序之優勢, 亦可突破過去傳統病原體檢測技術檢測標的數目之限制, 加上近年 NGS 成本大幅降低, 已廣泛運用在基因檢測等相關領域, 成為全基因定序及臨床診斷上的檢驗利器, 包括未知病原檢測、新興病原體鑑定、微生物全基因體定序、微生物分型、傳染病群聚調查、抗藥性基因分析比對以及微生物菌叢(microbiome)的變化追蹤等(8-15)。

目前各主要 NGS 平台, 包括 illumina、Oxford nanopore、Ion Torrent 及 Pacific BioSciences 等, 在診斷應用上, 依據數據產出量、讀取片段長度及組裝功能差異, 已各自發展多元進階技術, 主要可分成兩大類:

1. 目標次世代定序(targeted NGS, 下稱 tNGS): 已廣泛運用於癌症分子診斷, 獲得更佳的鑑定力(16)。
2. 總體基因體學(metagenomic NGS, 下稱 mNGS), 可檢測臨床檢體中各種微生物及病原體(17)。

tNGS 具備同時偵測多種基因標的之優勢, 因此近年發展以 tNGS 為主之偵測病原體方法, 包括 capture-based 或 amplicon-based, 均可有效提升檢測靈敏度 (18); mNGS 則具有不需使用任何專一性引子之獨特性, 相較於傳統分子檢驗方法, 具有不受限於檢測特定病原體之優勢。

本計畫除運用 tNGS 優化已建立完成之新冠病毒全基因定序技術，以應對持續變異之新冠病毒，並同步建置可全方位檢測重要人畜共通傳染病原體之 mNGS 技術，規劃導入監測網絡系統，以因應未來突發之傳染病及群聚流行疫情，快速釐清感染源，及時落實防疫措施，降低疫病之衝擊。

## 二、材料與方法

### 1、實驗樣本

本計畫為優化新冠病毒全基因定序技術，遴選測試樣本包括 COVID-19 確定病例檢出結果為新冠病毒型別 BN.1.3 及 XBB.1.5 變異株各 2 例，共 4 例；另遴選由法務部法醫研究所於 112 年送驗不明原因死亡個案共 9 例 29 個檢體，作為 mNGS 分析之臨床樣本；此外，北部某醫院於 112 年 7 月底送驗 1 例不明原因腦炎病例之檢體，作為 mNGS 實際檢驗樣本。

### 2、檢體核酸萃取

利用自動核酸萃取系統 EZ2 Connect(Qiagen)或 Maelstrom 4810(圓點奈米)進行樣品核酸萃取，萃取完成的核酸置於-20°C 冷凍櫃保存。

### 3、新冠病毒全基因定序之 tNGS 建庫及定序分析

- (1) 萃取臨床檢體樣本 RNA，使用 COVIDSeq Assay (Illumina)之反轉錄酶合成 cDNA 後，進行 Multiplex PCR，使用 Arctic hCoV-2019 V3 primer 作為 tNGS 引子，PCR 混合物以 Biometra 系統 (Biometra, Analytik Jena)進行反應，反應條件為 98°C作用 3 分鐘，再進行 35 次循環反應 (98°C作用 15 秒鐘，63°C作用 5 分鐘)，最後維持在 4°C保存。

- (2) 將上述 PCR 產物進行片段化反應後，以磁珠純化，純化產物再依不同樣本加入不同編號之 Index 進行 Index-PCR，反應條件為 72°C 作用 3 分鐘，98°C 作用 3 分鐘，再進行 7 次循環反應 (98°C 作用 20 秒鐘，60°C 作用 30 秒鐘，72°C 作用 1 分鐘)，72°C 作用 3 分鐘，最後維持在 10°C 保存。
- (3) Index-PCR 產物經磁珠純化後，利用 Qubit 1X dsDNA High Sensitivity Assay Kits (Invitrogen) 測量濃度後，將最後的建庫產物置入 iSeq 100 i1 Reagent v2 (300-cycle)，於 iSeq 100 System 上機。
- (4) tNGS 定序資料經由 DRAGEN COVID Lineage V3.5.13 進行組裝分析。分析完成之新冠病毒全基因序列上傳至 Nextclade (<https://clades.nextstrain.org/>) 進行病毒型別分析。

#### 4、總體基因體學 (mNGS) 之建庫、定序及生物資訊分析

mNGS 無需使用專一性引子或探針，具有可直接檢測未知病原體定序分析之優勢，mNGS 實驗流程說明如下：

- (1) 合成雙股 DNA：取 10  $\mu$ L 萃取之樣本核酸，以隨機核苷酸 (random primer) 進行反轉錄反應，核酸與引子於 65°C 作用 5 分鐘後，保存於 4°C，再利用 reverse transcriptase 進行反轉錄反應，反應條件為 25°C 作用 5 分鐘，50°C 作用 10 分鐘，85°C 作用 5 分鐘，最後

維持於 4°C 保存，以合成第一股 cDNA (first strand cDNA)；將 cDNA 接續加入 RNase H 去除樣本 RNA，再以 DNA polymerase 及 DNA ligase 於 16°C 作用 2 小時，完成第二股 cDNA(second strand cDNA)的合成。

(2) 基因建庫及上機：將雙股 cDNA 及樣本 DNA 混合，以 DNA Prep kit(Illumina)進行基因建庫，最後以磁珠純化建庫產物，並利用 Qubit 1X dsDNA High Sensitivity Assay Kits(Invitrogen)測量濃度後，置入 iSeq 100 i1 Reagent v2 (300-cycle)，於 iSeq 100 System 上機。

(3) 病原體生物資訊分析：將 iSeq 100 System 分析完成之 fastq 檔分別利用微生物識別軟體(Kraken2)及視覺化軟體(Krona)進行分析，先過濾人類基因相符序列，再與微生物資料庫進行比對，以比對出對應之病原體，最後利用病原體引子進行 PCR 並定序確認。

(4) 病原體序列組裝及分析：fastq 檔以 SPAdes 進行 de novo assembly 組裝，組裝完成之片段上傳至 NCBI 進行比對；接續以 Pokka(19) 軟體完成基因註解，並上傳至 NCBI 基因資料庫進行登錄。

### 三、 結果

#### 1、 優化「新冠病毒全基因定序技術」，即時應對病毒變異

因應COVID-19疫情期間監測新冠病毒之防疫需求，本計畫執行單位於疫情初期完成建立「新冠病毒全基因定序技術」，可直接從COVID-19確診病例檢體中檢測並組裝出完整新冠病毒全基因序列，以利我國中央流行疫情指揮中心長期監測國內外各種新冠病毒變異株之流行趨勢及變異，統計至112年9月底止，已完成5,400餘件新冠病毒全基因序列，並將全基因序列定期上傳至全球共享流感數據倡議組織(GISAID)，以利國際資訊分享交流。

自112年年初全球開始陸續流行病毒株BN.1.3(BA.2.75變種)及XBB.1.5變異株，本計畫透過新冠病毒全基因定序過程發現，該兩種變異株之Spike基因(序列位置：21,563-25,384 bp)變異已影響定序工作，因此將本計畫111年建立之「新冠病毒Spike基因tNGS(Spike-tNGS)分型技術」導入原有新冠病毒全基因定序技術進行調整，優化成果如下：

##### 1.1、 優化BN.1.3變異株定序

將BN.1.3變異株之Spike基因序列進行解析，依GISAID網站資料，比對台灣(本計畫樣本F77496)、美國、日本、德國及泰國等檢驗單位上傳之BN.1.3全基因序列，發現位於Spike基因上的21,690-21,940 bp區間均存在約250bp的N base(missing data)(如圖一)，顯示新冠病毒BN.1.3的

Spike基因變異點位，已影響國際多國新冠病毒全基因定序工作

因應BN.1.3之Spike基因變異點位影響新冠病毒全基因定序技術，為利病毒監測工作順利進行，本計畫即時優化定序技術，優化前後之BN.1.3全基因定序比對結果如圖二。結果顯示，優化前BN.1.3樣本F77496位於21,690-21,940 bp區間之覆蓋率(Coverage)明顯偏低處，僅約0-20倍深度；經技術優化後，對同為BN.1.3樣本F78628之覆蓋率達到100倍深度以上。

## 1.2、優化XBB.1.5變異株定序

外，在BN.1.3之後出現同步流行的XBB.1.5變異株，經初步分析亦發現有Spike基因定序結果不理想之問題，因此將美國、日本、德國及義大利等檢驗單位上傳至GISAID網站之XBB.1.5全基因序列，與本計畫XBB.1.5樣本F78499進行比對，發現位於Spike基因上的22,600-22,800 bp區間均存在約200 bp的N base(如圖三)，顯示XBB.1.5之Spike基因變異亦已影響各國新冠病毒全基因定序工作。

針對XBB.1.5之Spike基因變異點位，本計畫接續導入Spike-tNGS優化新冠病毒全基因定序技術，優化前後之XBB.1.5全基因定序比對結果如圖四。優化前XBB.1.5樣本F77496位於22,600-22,800 bp區之覆蓋率(Coverage)明顯偏低，僅約0-20倍深度；技術經優化後，對同為XBB.1.5

樣本F80600之覆蓋率大幅改善，原本覆蓋率明顯偏低的22,600-22,800 bp處提升達100倍以上。

本計畫應對BN.1.3及XBB.1.5之Spike基因變異點位均已完成優化，優化後的新冠病毒全基因定序技術，已即時實際導入於指揮中心及本署定時公布之新冠病毒型別監測資料。

## **2、建立「總體基因體學(mNGS)檢驗技術」，以因應未來新型傳染病挑戰**

因應後新冠疫情時代的整備，本計畫於112年建立可全方位檢測傳染病原體之總體基因體學(mNGS)技術，實驗流程如圖五，說明如下：

- (1) 萃取樣本RNA，反轉錄成cDNA。
- (2) cDNA進行第二股cDNA合成為dcDNA。
- (3) 進行片段化及Index PCR，Index PCR產物經磁珠純化定量後上機。
- (4) 取得fastq檔後進行生物資訊軟體分析。

## **3、mNGS 技術之可行性評估**

為評估mNGS之可行性，遴選COVID-19陽性臨床檢體(F78686，BN.1.2，Ct=15.3)為測試樣本，分別進行新冠病毒全基因定序及mNGS技術分析，並比對兩者之序列及覆蓋情形(如圖六)。結果顯示，兩者對於測試樣本的覆蓋率均全面達100倍深度以上，組裝序列相同度達99.89%。

此外，依兩技術獲得之讀長數目，等比例調整覆蓋率上限，以比較新冠病毒全基因定序技術(約55萬條讀長，2250倍覆蓋率上限)與mNGS技術(約121萬條讀長，5000倍覆蓋率上限)之序列分布情形，結果顯示全基因定序技術在10,500bp、20,000bp及28,000bp附近的覆蓋率偏低，mNGS之覆蓋率則分布較平均。綜合上述結果，證實本計畫建立之mNGS技術，可運用於傳染病病原體檢驗。

確認mNGS檢驗之可行性後，將上述兩技術獲得之讀長另以微生物識別軟體Kraken2及視覺化軟體Krona進行分析(如圖七)，結果指出由新冠病毒全基因定序技術(約55萬條)及mNGS技術(約121萬條)取得之讀長，進行病原體識別分析後，大部分讀長均比對為新冠病毒，顯示本計畫運用mNGS及病原體識別軟體與分析方式，可自NGS原始資料(fastq檔)，正確鑑別出對應之病原體。

#### 4、mNGS 導入檢驗臨床檢體之綜合分析結果

為評估mNGS實際導入檢驗臨床檢體之可行性，本計畫以法務部法醫研究所送驗之不明原因死亡個案共8例28件檢體為測試樣本，經萃取檢體核酸後進行mNGS，相同檢體核酸另以對應病原體之qPCR引子及探針進行複驗確認，以分析mNGS導入臨床檢體檢驗之正確性，並評估其檢測極限，結果如表一所示。

結果顯示，自28件檢體中導入mNGS檢驗，其中共7件檢體檢出病原體(4件Rhinovirus，3件Cytomegalovirus)，經qPCR複驗，確認該7件由mNGS檢出陽性之病原體，均可利用qPCR檢出相同對應病原體之檢驗結果，證實mNGS檢驗結果之正確性；此外，依據mNGS及qPCR檢驗結果，發現樣本若以qPCR檢出Ct值約30以上之病原體時，則該樣本難以利用mNGS檢出相同對應之病原體，顯示mNGS之檢測極限約qPCR之Ct值30。

#### **5、導入 mNGS 完成福氏內格里原蟲全基因序列，成為全國關注焦點**

因應112年7月底由北部某醫院送驗1例不明原因腦炎病例中以qPCR檢出福氏內格里原蟲(*Naegleria fowleri*)，由於該原蟲屬於罕見病原體，應使用高準確檢驗方法進行複驗，以驗證qPCR檢驗結果之正確性，同時考量該病原之致死率極高，為縮短檢驗時效以利盡早落實防治措施，故本計畫直接取該病例之腦脊髓液檢體核酸，即刻進行mNGS定序分析。

利用mNGS定序取得之fastq原始數據，經生物資訊軟體組裝及校正分析後，可獲得總長度達49,558 bp之組裝片段，將該片段上傳至NCBI基因資料庫比對，發現與來自美國(KX580902、KX580903)、日本(AP025248)及巴基斯坦(MZ461463)的福氏內格里原蟲粒線體全基因序

列均高達99%相同度(如圖八)，故確認該組裝序列為福氏內格里原蟲粒線體全基因序列，佐證該病例之腦脊髓液檢體中，確實存在福氏內格里原蟲。

接續將該組裝序列經基因註解軟體分析，並上傳至NCBI基因資料庫進行登錄，經審核已取得Accession number OR459835並公布。

#### 四、 討論

- 1、本計畫 110 年重點研究成果為建立檢測傳染病原體之 tNGS 技術，111 年延續擴展 tNGS 應用範圍，建立重要傳染病原體之組裝分型技術，當時以 SARS-CoV-2 Omicron(BA.2.3)變異株之 spike 基因序列為模板設計引子建立 Spike-tNGS 技術，測試結果對於包括 Omicron 及 Delta 等多種變異株均有良好的讀長覆蓋率及型別鑑定力，可應對未來新冠病毒變異。
- 2、應對 112 年年初陸續出現 BN.1.3 及 XBB.1.5 主要流行變異株之高度序列變異，憑藉本計畫 111 年建立之 Spike-tNGS 技術及經驗，及時發現病毒變異，並於短期內調整實驗流程，成功優化新冠病毒全基因定序技術，以正確定序資訊，提供指揮中心及本署定時公布新冠病毒型別監測資料。因此，本計畫自 110-112 年有關 SARS-CoV-2 之 tNGS 研究成果，於 COVID-19 疫情期間已實際導入應用於新冠病毒全基因定序及型別

監測等相關防疫監測工作，以具備科學實證之病毒全基因序列，提供本署防疫決策層級研訂防治政策使用。

- 3、此外，因應 112 年 7 月底由北部出現 1 例不明原因腦炎病例檢出福氏內格里原蟲(*Naegleria fowleri*)之特殊緊急事件，同樣憑藉本計畫 112 年上半年建立的 mNGS 技術，在最短時間之內直接檢測病例之腦脊髓液檢體核酸，成功組裝出福氏內格里原蟲粒線體全基因序列，經分析註解後上傳 NCBI 並已完成登錄。本事件為國內首次導入 NGS 技術直接從臨床檢體中檢出福氏內格里原蟲之成功範例，也成為全國新聞關注的焦點，本署藉由本新聞事件進行衛教宣導，讓國人進一步瞭解從事水域活動時衛生安全之重要性。有關運用 mNGS 技術檢出福氏內格里原蟲全基因一案已撰寫文章並投稿至本署疫情報導期刊，目前文稿審查中。
- 4、綜上，本計畫以具體實績彰顯於突發事件發生前已建立 tNGS 及 mNGS 等先進技術之正面價值及實際效益，因此應對未來各種傳染病之挑戰，結合 tNGS 及 mNGS 技術之優勢，部署全方位監測網絡，及時找出可能致病原，同步提供決策層級運用，盡早研訂及落實防治措施，遏止疫病擴散，為後新冠疫情時代重要的防疫整備工作。

## 五、 結論與建議

1、 本計畫為第三年計畫，歷年重要研究成果如下：

(1) 第一年完成建置 tNGS 技術，可同時檢測多種病毒，其中包含 SARS-CoV-2。

(2) 第二年完成建立新冠病毒之 Spike-tNGS 分型技術。

(3) 本年(第三年)接續運用第二年 Spike-tNGS 研究成果，完成因應 BN.1.3 及 XBB.1.5 變異株 Spike 基因高度變異之定序技術優化；同時建立 mNGS 技術，並即刻應用於檢出福氏內格里原蟲之突發事件。

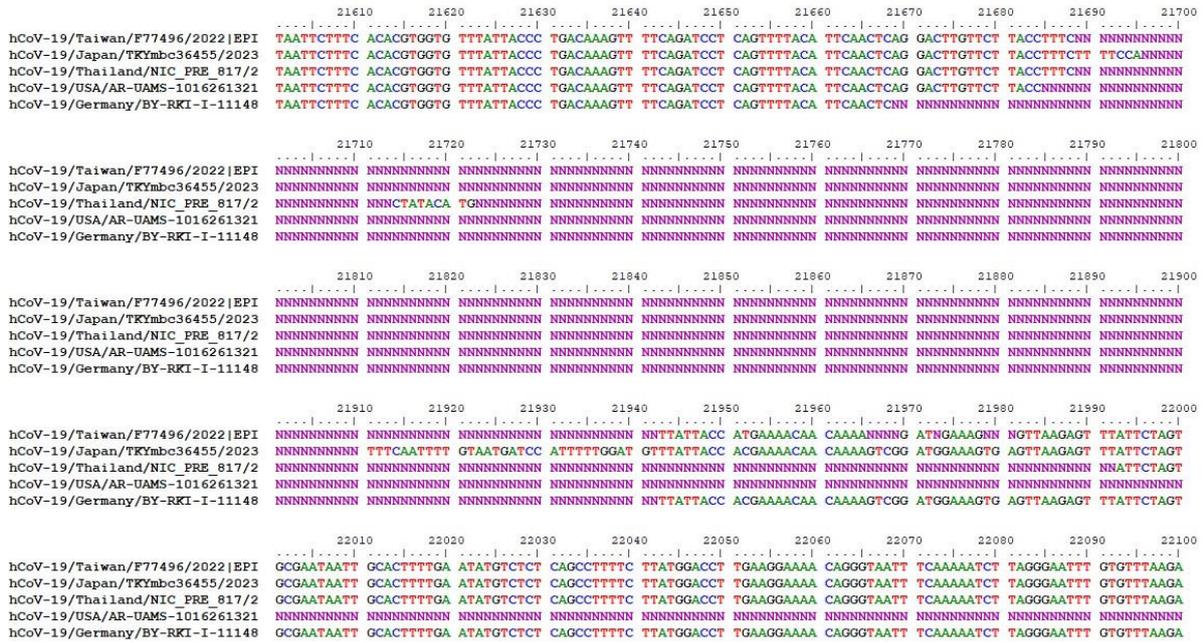
2、 本計畫 112 年建立之 mNGS 技術，成為國內首例從臨床檢體中檢出福氏內格里原蟲之 NGS 技術，以實證基礎確認由罕見致病原造成的社會關注事件，亦寫下運用 NGS 取得科學實證以提升傳染病監測品質之成功範例。後續擬評估將 mNGS 導入傳染病監測網絡，以全方位傳染病原檢測優勢，應變未來新型傳染病的挑戰。

## 六、參考資料

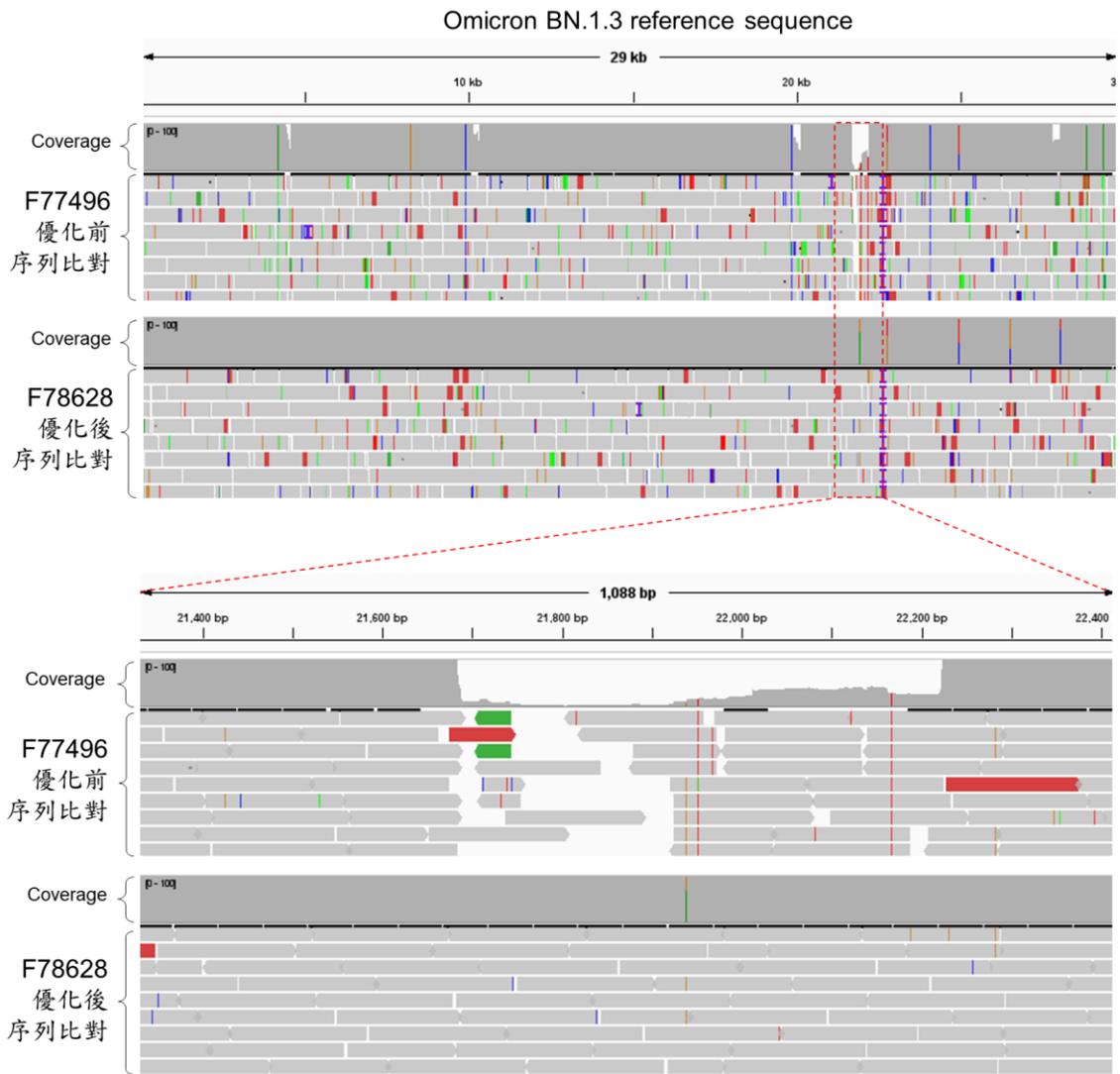
1. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451:990-3.
2. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397:436-41.
3. Reperant LA, Kuiken T, Osterhaus AD. 2012. Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: from exposure to establishment in humans. *Vaccine* 30:4419-34.
4. Reperant LA, Osterhaus A. 2017. AIDS, Avian flu, SARS, MERS, Ebola, Zika... what next? *Vaccine* 35:4470-4474.
5. Anonymous. Coronavirus: Why are we catching more diseases from animals? Available at: <https://www.bbc.com/news/health-51237225>.
6. Anonymous. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. Available at: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
7. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579:270-273.
8. Monira S, Nakamura S, Gotoh K, Izutsu K, Watanabe H, Alam NH, Nakaya T, Horii T, Ali SI, Iida T, Alam M. 2013. Metagenomic profile of gut microbiota in children during cholera and recovery. *Gut Pathog* 5:1.
9. Koser CU, Ellington MJ, Cartwright EJ, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, Holden MT, Dougan G, Bentley SD, Parkhill J, Peacock SJ. 2012. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathog* 8:e1002824.
10. Deng X, den Bakker HC, Hendriksen RS. 2016. Genomic Epidemiology: Whole-Genome-Sequencing-Powered Surveillance and Outbreak Investigation of Foodborne Bacterial Pathogens. *Annu Rev Food Sci Technol* 7:353-74.
11. Brzuszkiewicz E, Thurmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, Boelter J, Petersen H, Gottschalk G, Daniel R. 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol* 193:883-91.
12. Nakamura S, Yang CS, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, Goto N, Takahashi

- K, Yasunaga T, Ikuta K, Mizutani T, Okamoto Y, Tagami M, Morita R, Maeda N, Kawai J, Hayashizaki Y, Nagai Y, Horii T, Iida T, Nakaya T. 2009. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. *PLoS One* 4:e4219.
13. Palacios G, Druce J, Du L, Tran T, Birch C, Briese T, Conlan S, Quan PL, Hui J, Marshall J, Simons JF, Egholm M, Paddock CD, Shieh WJ, Goldsmith CS, Zaki SR, Catton M, Lipkin WI. 2008. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N Engl J Med* 358:991-8.
  14. Clausen PT, Zankari E, Aarestrup FM, Lund O. 2016. Benchmarking of methods for identification of antimicrobial resistance genes in bacterial whole genome data. *J Antimicrob Chemother* doi:10.1093/jac/dkw184.
  15. Cannas A, Mazzarelli A, Di Caro A, Delogu G, Girardi E. 2016. Molecular Typing of Mycobacterium Tuberculosis Strains: A Fundamental Tool for Tuberculosis Control and Elimination. *Infect Dis Rep* 8:6567.
  16. Mohammad HA, Madi NM, Al-Nakib W. 2020. Analysis of viral diversity in stool samples from infants and children with acute gastroenteritis in Kuwait using Metagenomics approach. *Virol J* 17:10.
  17. Garziera M, Roncato R, Montico M, De Mattia E, Gagno S, Poletto E, Scalone S, Canzonieri V, Giorda G, Sorio R, Cecchin E, Toffoli G. 2019. New Challenges in Tumor Mutation Heterogeneity in Advanced Ovarian Cancer by a Targeted Next-Generation Sequencing (NGS) Approach. *Cells* 8.
  18. No JS, Kim WK, Cho S, Lee SH, Kim JA, Lee D, Song DH, Gu SH, Jeong ST, Wiley MR, Palacios G, Song JW. 2019. Comparison of targeted next-generation sequencing for whole-genome sequencing of Hantaan orthohantavirus in *Apodemus agrarius* lung tissues. *Sci Rep* 9:16631.
  19. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068-9.

## 七、圖、表



圖一、本計畫與多國新冠病毒 BN.1.3 變異株序列比對。



圖二、新冠病毒全基因定序技術優化前後對 BN.1.3 變異株分析比較。

```

22410      22420      22430      22440      22450      22460      22470      22480      22490      22500
Taiwan-F78499      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
hCoV-19/Italy/LOM-01019279/202 TCTCAGAAAC AAGGTGTACG TTGAAATCCT TCACCTGTAGA AAAAGGAATC TATCAAACCT CTAACCTTAG AGTCCAACCA ACAGAATCTA TTGTAGATT
hCoV-19/USA/TX-KV1300820/2023| TCTCAGAAAC AAGGTGTACG TTGAAATCCT TCACCTGTAGA AAAAGGAATC TATCAAACCT CTAACCTTAG AGTCCAACCA ACAGAATCTA TTGTAGATT
hCoV-19/Japan/PG-391350/2022|E TCTCAGAAAC AAGGTGTACG TTGAAATCCT TCACCTGTAGA AAAAGGAATC TATCAAACCT CTAACCTTAG AGTCCAACCA ACAGAATCTA TTGTAGATT
hCoV-19/Germany/SH-RKI-1-11177 TCTCAGAAAC AAGGTGTACG TTGAAATCCT TCACCTGTAGA AAAAGGAATC TATCAAACCT CTAACCTTAG AGTCCAACCA ACAGAATCTA TTGTAGATT

22510      22520      22530      22540      22550      22560      22570      22580      22590      22600
Taiwan-F78499      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
hCoV-19/Italy/LOM-01019279/202 TCCTAATATT ACAAACTTGT GCCCTTTTCA TGAAGTTTTT AAGGCCACCA CATTTCGATC TGTTTATGCT TGGAACAGGA AGAGAATCAG CAACTGTGTT
hCoV-19/USA/TX-KV1300820/2023| TCCTAATATT ACAAACTTGT GCCCTTTTCA TGAAGTTTTT AAGGCCACCA CATTTCGATC TGTTTATGCT TGGAACAGGA AGAGAATCAG CAACTGTGTT
hCoV-19/Japan/PG-391350/2022|E TCCTAATATT ACAAACTTGT GCCCTTTTCA TGAAGTTTTT AAGGCCACCA CATTTCGATC TGTTTATGCT TGGAACAGGN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
hCoV-19/Germany/SH-RKI-1-11177 TCCTAATATT ACAAACTTGT GCCCTTTTCA TGAAGTTTTT AAGGCCACCA CATTTCGATC TGTTTATGCT TGGAACAGGA AGAGAATCAG CAACTGTGTT

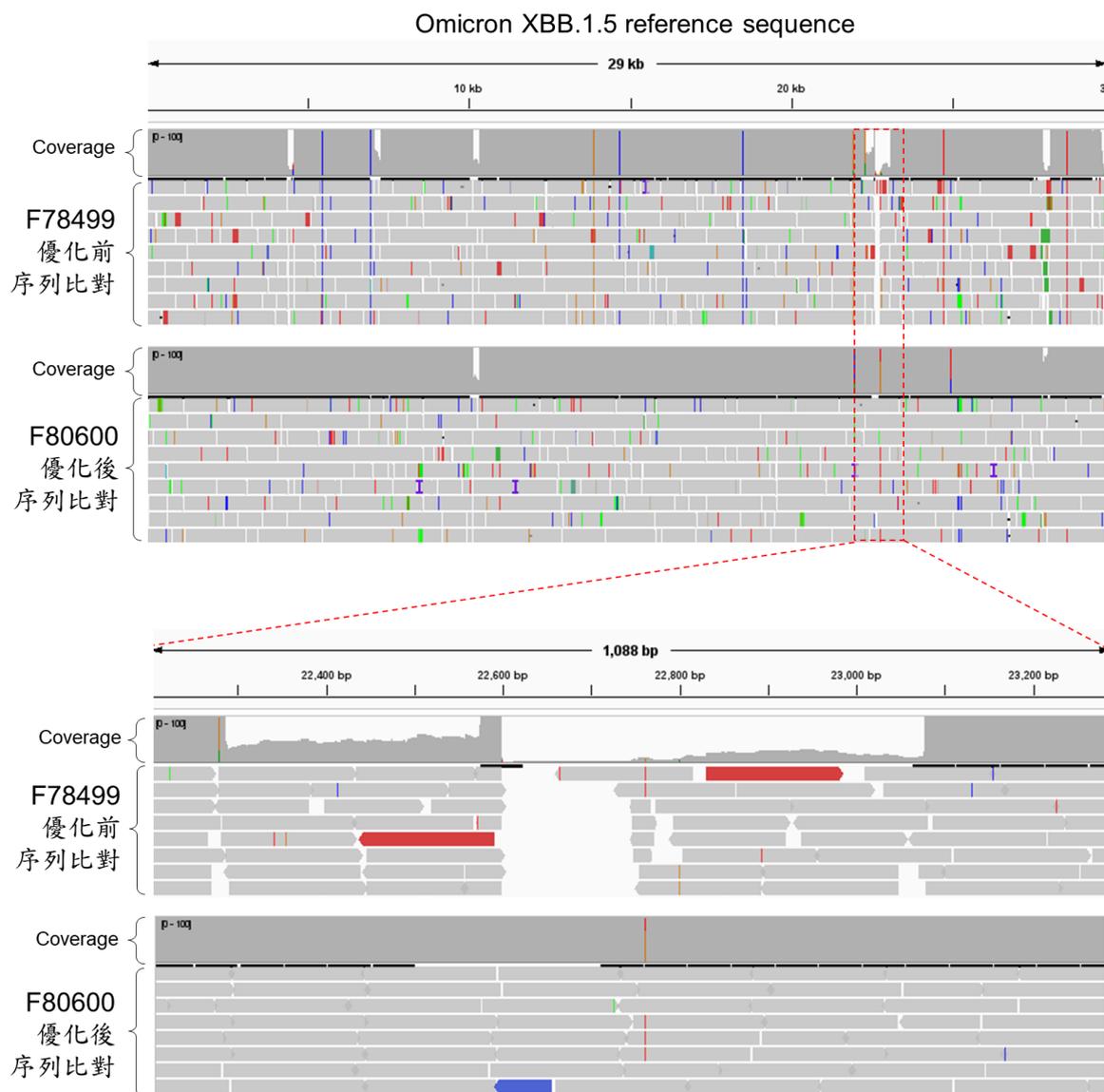
22610      22620      22630      22640      22650      22660      22670      22680      22690      22700
Taiwan-F78499      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
hCoV-19/Italy/LOM-01019279/202 GCNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
hCoV-19/USA/TX-KV1300820/2023| GCNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
hCoV-19/Japan/PG-391350/2022|E GCNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
hCoV-19/Germany/SH-RKI-1-11177 GGTGATTATT CTGTCNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN

22710      22720      22730      22740      22750      22760      22770      22780      22790      22800
Taiwan-F78499      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
hCoV-19/Italy/LOM-01019279/202 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
hCoV-19/USA/TX-KV1300820/2023| NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
hCoV-19/Japan/PG-391350/2022|E NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
hCoV-19/Germany/SH-RKI-1-11177 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN

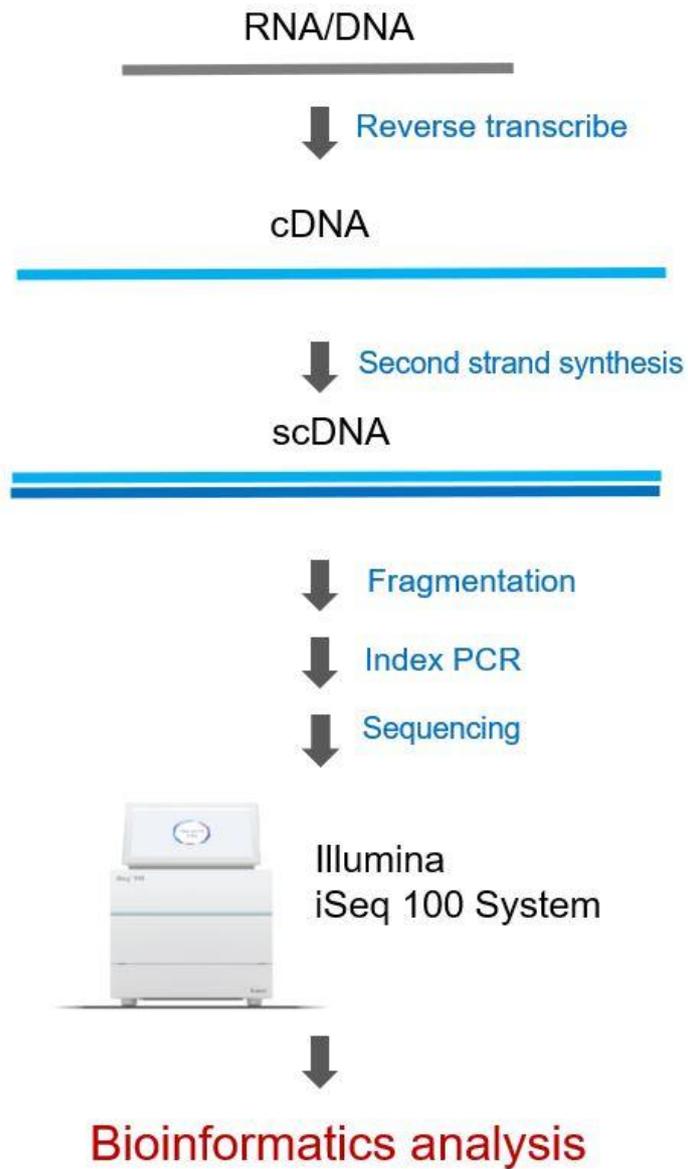
22810      22820      22830      22840      22850      22860      22870      22880      22890      22900
Taiwan-F78499      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
hCoV-19/Italy/LOM-01019279/202 NNNNNNNNGC GTTATAGCTT GGAATTCTAA CAAGCTTGAT TCTAAGCCTA GTGGTAATTA TAAATACCTG TATAGATTGT TTAGGAAGTC TAAGCTCAAA
hCoV-19/USA/TX-KV1300820/2023| NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NAACTCTGAT TCTAAGGTTG GTGGTAATTA NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
hCoV-19/Japan/PG-391350/2022|E TACAGGCTGC GTTATAGCTT GGAATTCTAA CAAGCTTGAT TCTAAGCCTA GTGGTAATTA TAAATACCTG TATAGATTGT TTAGGAAGTC TAAGCTCAAA
hCoV-19/Germany/SH-RKI-1-11177 TACAGGCTGC GTTATAGCTT GGAATTCTAA CAAGCTTGAT TCTAAGCCTA GTGGTAATTA TAAATACCTG TATAGATTGT TTAGGAAGTC TAAGCTCAAA

```

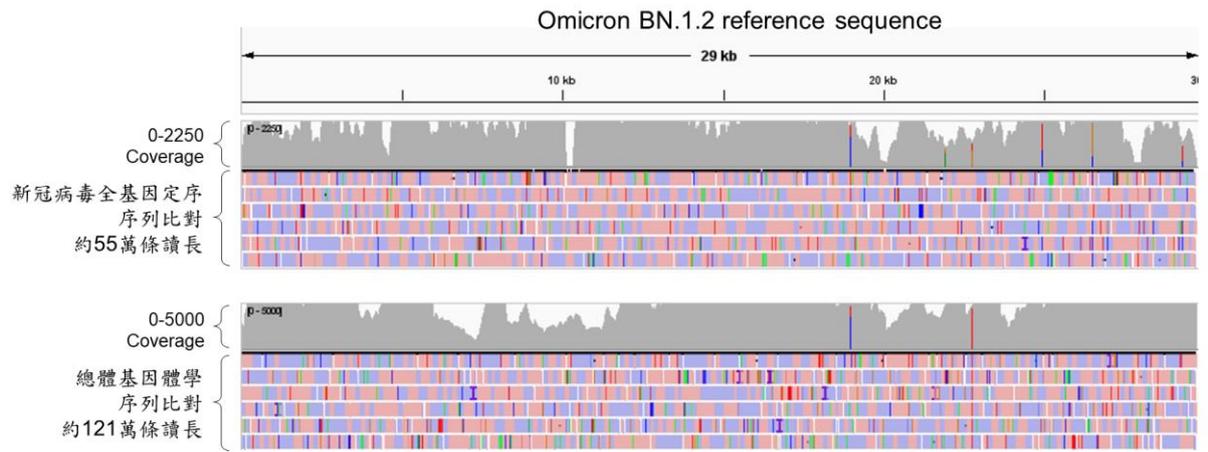
圖三、本計畫與多國新冠病毒 XBB.1.5 變異株序列比對。



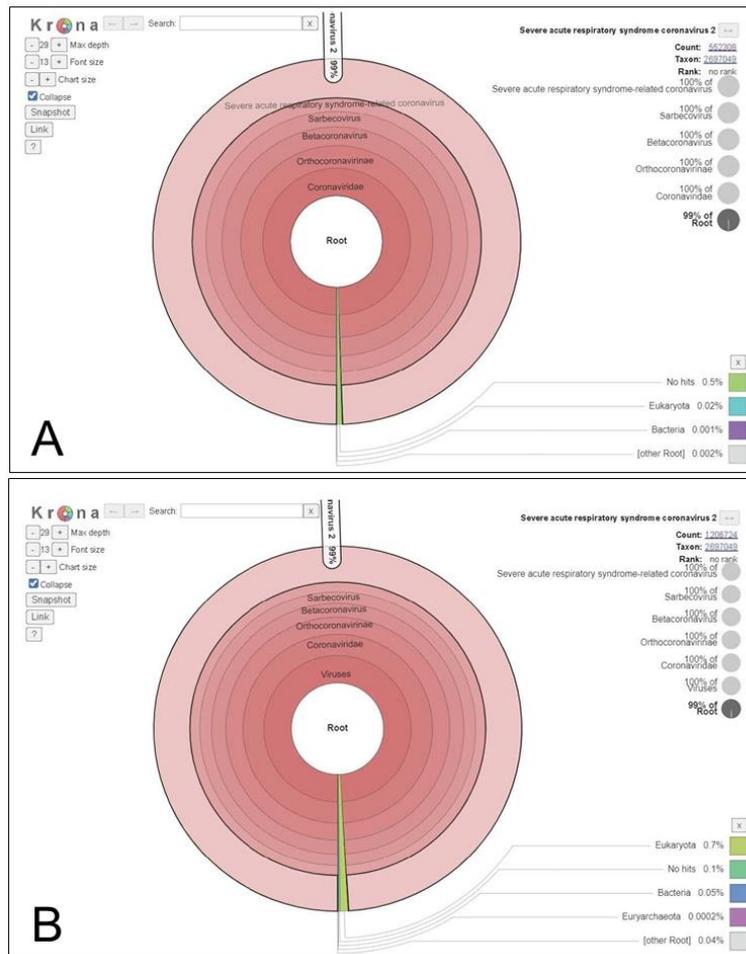
圖四、新冠病毒全基因定序技術優化前後對 XBB.1.5 變異株分析比較。



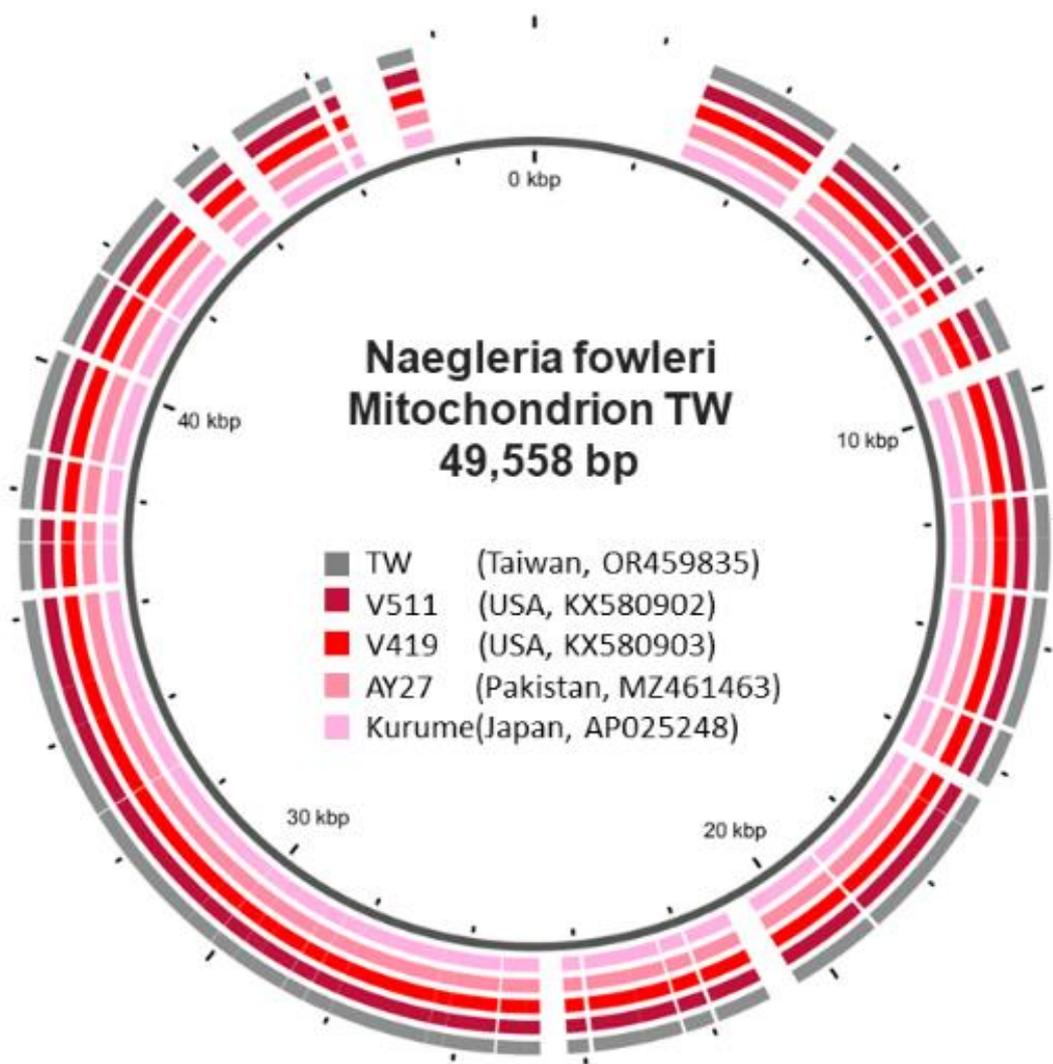
圖五、本計畫建立mNGS之實驗流程。



圖六、新冠病毒全基因定序技術及 mNGS 技術組裝序列及覆蓋率比較。



圖七、新冠病毒全基因定序技術(A)及mNGS技術(B)之病原體識別結果



圖八、本計畫檢出福氏內格里原蟲粒線體全基因序列與國際序列比較。

表一、112年不明原因死亡個案以mNGS及對應qPCR之檢驗結果

樣本	檢體種類	檢驗結果	
		mNGS (RPM)*	qPCR (Ct值)
D1	病毒拭子(左肺)	ND	—
	病毒拭子(右肺)	ND	—
D2	病毒拭子(氣管)	Rhinovirus (<10)	Rhinovirus (28.8)
	病毒拭子(左肺)	ND	Rhinovirus (28.7)
	病毒拭子(右肺)	ND	ND
D3	病毒拭子(氣管)	ND	—
	病毒拭子(左肺)	ND	—
	病毒拭子(右肺)	ND	—
D4	病毒拭子(氣管)	Rhinovirus (<10)	Rhinovirus (28.4)
	病毒拭子(左肺)	Rhinovirus (<10)	Rhinovirus (32.1)
	病毒拭子(右肺)	ND	Rhinovirus (31.7)

表一(續)、112年不明原因死亡個案以mNGS及qPCR之檢驗結果

樣本	檢體種類	檢驗結果	
		mNGS(RPM)*	qPCR(Ct值)
D5	氣管拭子-病毒	ND	—
	左肺拭子-病毒	ND	—
	右肺拭子-病毒	ND	—
	鼻咽拭子-病毒	ND	—
D6	鼻咽拭子-病毒	Rhinovirus (<10)	Rhinovirus (27.2)
	肛門拭子-病毒	ND	ND
	氣管拭子-病毒	ND	ND
	左肺拭子-病毒	ND	Rhinovirus (33.5)
	右肺拭子-病毒	ND	ND
	鼻咽拭子-病毒	ND	Rhinovirus (36.3)
D7	右肺拭子-病毒	ND	—
	左肺拭子-病毒	ND	—
	氣管拭子-病毒	ND	—
D8	氣管拭子-病毒	Cytomegalovirus (<10)	Cytomegalovirus (28.7)
	左肺拭子-病毒	Cytomegalovirus (<10)	Cytomegalovirus (29.3)
	右肺拭子-病毒	Cytomegalovirus (<10)	Cytomegalovirus (29.4)

\*RPM : Reads per million reads.

## 112 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：重要傳染病原次世代定序檢測方法之發展及應用

計畫主持人：慕蓉蓉

填報日期：112 年 12 月 20 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	mNGS 沒有全面之計畫研究，應和臨床重症醫師合作，取得適當檢體。	本計畫已完成建立 mNGS 技術，同步完成可行性及正確性之功，後續將規劃與臨床端之合作方式。	-
2	不明死亡原因的 28 件檢體，以 mNGS 驗出 CMV 和 Rhinovirus，代表 mNGS 之功效不足。	本計畫以 mNGS 檢驗不明原因死亡檢體除檢出兩種病毒外，亦檢出多種細菌，例如 <i>Staphylococcus aureus</i> 、 <i>Streptococcus pneumoniae</i> 及 <i>Enterobacter cloacae</i> 等，考量該類常見細菌均可能透過採檢或實驗污染影響檢驗結果，本計畫為評估 mNGS 之檢驗結果正確性，故選擇以病毒作為合適測試標的。	-
3	研究方法正確適當，結論及建議具實用價值，具創新及可行性，對施政有明顯助益。	謝謝委員意見。	-
4	表一建議補上樣本取得之年份；若有臨床送驗之相關訊息者，亦請補上。	1、已於表一標題加註樣本取得年份(112 年)。 2、不明原因死亡檢體樣本均由法務部法醫研究所送驗(P7)，該所未提供個案症狀或死因等相關臨床訊息。	P28-29

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
5	建議補充以 NGS 組裝出福氏阿米巴之全基因體對於公衛之防治或臨床之治療具體效益，或提出何種情境下之全基因體是較佳之檢驗項目。	已將本事件對於公衛防治之具體效益補充於討論段第 3 點。	P16
6	未見於報告中呈現投稿情形。	已將投稿情形補充於討論段第 3 點。	P16

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 112 年 12 月 22 日  
前至 GRB 系統完成資料抽換。