

計畫編號：MOHW110-CDC-C-315-114410

衛生福利部疾病管制署 110 年署內科技研究計畫

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

110 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

協同主持人：

研究人員：林鈺棋

研究人員：陳筱蓉

執行期間：110 年 1 月 1 日至 110 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	6	
三、結果	8	
四、討論	11	
五、結論與建議	13	
六、參考資料	14	
六、圖、表	16	

共 (20) 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，以下簡稱 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。因此，本計畫將應用 NGS 平台之 amplicon based target enrichment，發展全方位人畜共通傳染病原之檢測技術，並運用於新興傳染病檢測及群聚事件調查，及時釐清感染源，以落實防疫措施，降低傳染病造成的衝擊。

關鍵詞：新興傳染病、次世代定序

計畫英文摘要：

keywords : emerging disease, next generation sequencing

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. Combining amplicon based amplification with NGS will result in target pathogen enrichment and even pathogen typing. Thus, adapting NGS from clinical to public health use benefits monitoring, controlling and preventing infectious diseases.

本文

一、前言：

由於環境及氣候變遷，加上國際交流頻繁的全球化趨勢，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生存條件，將增加人類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 109 年年初於中國武漢市爆發 COVID-19，由 SARS-CoV-2 病毒造成，迄今已快速蔓延全球造成嚴重疫情，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]，目前發現該病毒的基因序列與蝙蝠冠狀病毒 RaTG13 具有高達 96% 的相同度[7]，顯示 COVID-19 亦可能為源自動物的人畜共通傳染病。因此，因應與日俱增的新興傳染病，建構完善的監測系統及發展重要傳染病原之檢測技術，將扮演防治的關鍵角色。

從 2004 年次世代定序(Next generation sequencing，以下簡稱 NGS)問世以來，已成為全基因定序及臨床診斷上的利器，由於近年來 NGS 成本大幅

降低，已廣泛應用在傳染病原檢測及追蹤，包括不明原因傳染病原檢測、新興微生物(病原)之鑑定分析、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 NGS 平台在診斷的應用上，依據數據產出量、讀取片段長度及組裝功能差異，已各自發展多元技術，主要分成三種方法：

1. Metagenomic NGS，可檢測臨床檢體中各種微生物[16]。
2. Target NGS：已廣泛運用於癌症分子診斷，獲得最佳的鑑定力[17]。
3. Target universal multiplex PCR for NGS：常運用於 16s rRNA metagenomics，進行菌種鑑定或微生物族群分析[18]。

相較於傳統病原體檢測技術僅能針對一種或數種已知病原體檢測，NGS 兼具有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，並可藉由定序方式獲得病原體基因序列甚至進行病原體型別等更多資訊。Target NGS 具備針對個別基因進行偵測的能力，近年發展以 target NGS 為主之 target enrichment 策略偵測病原體，無論是 capture based 或是 amplicon based，均可提高檢測靈敏度 [19]。因此，本計畫將應用 Target NGS 平台，以 amplicon based target enrichment 策略建置發展全方位人畜共通傳染病原檢測技術，並運用於未來新興傳染病及群聚事件調查等，快速釐清感染源，及時落實防疫措施，以降低疫病之衝擊。

二、材料與方法

1、實驗樣本

本計畫陽性對照組樣本使用基因合成並載入載體 pUC57，其序列包含 MERS-CoV、SARS-CoV、SARS-CoV-2、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-HKU1 及 HCoV-OC43 等 7 種冠狀病毒部分片段；臨床樣本使用包括 4 例通報不明原因腦炎病例及 1 例通報嚴重特殊傳染性肺炎病例之鼻咽拭子檢體。

2、檢體核酸萃取

利用自動核酸萃取系統 MagNA Pure Compact Instrument (Roche Applied Science) 進行檢體核酸萃取，萃取完成的核酸置於 -80°C 冷凍櫃保存。

3、Target NGS 之基因庫建置及 NGS 定序

本計畫 Target NGS 使用之 Multiplex PCR 引子序列及合成片段長度如表一。Target NGS 基因建庫步驟如下：

樣本 RNA 以反轉錄酶合成 cDNA 後，進行 Multiplex PCR，反應試劑使用 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche)，取 1 μ L 樣本 cDNA 與 1X KAPA HiFi HotStart ReadyMix、200nM forward primer 及 200nM reverse primer 混合，混合物以 Biometra 系統 (Biometra, Analytik Jena) 進行反應，反應條件為 95°C 作用 3 分鐘，再進行 35

次循環反應 (95°C作用 30 秒鐘, 50°C作用 30 秒鐘, 72°C作用 30 秒鐘), 最後 72°C作用 3 分鐘後, 維持在 4°C保存。

將上述 PCR 產物經 AMPure XP beads(Beckman Coulter)純化後, 進行 Index PCR, 反應試劑使用 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix(Roche), 取 5 μ L 磁珠純化之 PCR 產物與 1X KAPA HiFi HotStart ReadyMix 及 10 μ L Nextera DNA UD Indexes 混合, 混合物以 Biometra 系統 (Biometra, Analytik Jena)進行反應, 反應條件為 95°C作用 3 分鐘, 再進行 8 次循環反應 (95°C作用 30 秒鐘, 55°C作用 30 秒鐘, 72°C作用 30 秒鐘), 最後 72°C作用 5 分鐘後, 維持在 4°C保存, 上述 Index PCR 產物經 AMPure XP beads(Beckman Coulter)純化後, 以 Illumina iSeq 定序。

4、Bioinformatics 分析

NGS 定序資料以 Local Run Manager(illumina)之 PCR Amplicon Module 進行分析。

三、 結果

1、 建立 Target NGS 實驗流程

為發展NGS運用於重要傳染病之檢測方法，本計畫應用NGS平台之amplicon based target enrichment策略，規劃之Target NGS實驗流程如圖一，流程說明如下：

- (1) 萃取樣本RNA，以reverse transcriptase反轉錄成cDNA。
- (2) 取樣本cDNA進行Multiplex PCR。
- (3) Multiplex PCR產物經磁珠純化後，進行Index PCR。
- (4) Index PCR產物經磁珠純化，最後以Qubit定量後上機。

2、 Multiplex PCR 之正確性評估

本年度挑選包括MERS-CoV、SARS-CoV、SARS-CoV-2、HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-HKU1及HCoV-OC43等共7種冠狀病毒作為檢測標的，並設計片段長度介於100-300bp共9段序列（其中SARS-CoV-2共3段序列），並合成該9段序列之陽性對照組，以測試Multiplex PCR之正確性，結果如圖二所示。以陽性對照組DNA為模板，各專一性引子確實可合成對應之PCR片段，且經Sanger定序結果皆與陽性對照組序列一致，顯示Multiplex PCR之正確性。

3、 Target NGS 之可行性評估及靈敏度分析

為評估 Target NGS 之可行性，同步分析其靈敏度，本計畫以陽性對照組 DNA 為樣本，分別稀釋至 10^2 、 10^3 、 10^4 及 10^5 copy numbers 共 4 種濃度，連同陰性對照組 (NC 組) 共 5 組進行 Target NGS 分析，並以讀取各標的之 reads 數，作為 Target NGS 之定量指標，結果如圖 3 所示，5 組中各標的讀取 reads 數值如下：

(1) NC 組：0-54。

(2) 10^2 組：62-1,520。

(3) 10^3 組：658-8,710。

(4) 10^4 組：4,750-134,493。

(5) 10^5 組：30,364-292,464。

結果顯示，Target NGS 確實可讀取冠狀病毒陽性對照組之 9 段序列，並可區分各序列之差異，且陽性對照組 DNA 濃度越高，則讀取越多 reads 數，兩者呈現正相關；此外，依靈敏度分析結果， 10^2 組雖可讀取全部 9 段序列，由於該組 reads 數接近於 NC 組，為降低背景值影響判讀結果，故研訂 1,000 reads 數作為初步陽性判定標準。

4、 Target NGS 之專一性分析

進一步挑選過去通報不明原因腦炎病例共 4 例 (CS1-4) 及 1 例通報嚴重特殊傳染性肺炎病例 (CS5) 之鼻咽拭子檢體，經萃取核酸後進行 Target NGS 分析，以評估專一性，結果如圖 4 所示。結果顯示，以 Target NGS 分析不明原因腦炎病例，CS1 至 CS4 可分別讀取 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63 及 HCoV-HKU1 達 1,000 以上 reads 數；此外，嚴重特殊傳染性肺炎病例 CS5 可讀取包括 SARS-CoV-2-N、SARS-CoV-2-E 及 SARS-CoV-2-R 等共 3 段序列，且 reads 數均達到 1,000 以上。由於上述臨床檢體之 Target NGS 分析結果均與 real-time RT-PCR 檢測結果一致，且非專一性 reads 數均未達 1,000，顯示 Target NGS 具高鑑別力。

四、 討論

本計畫運用 amplicon based target enrichment 策略，完成測試並成功建立 Target NGS 技術及實驗流程。本年度優先遴選包括 SARS-CoV-2 在內的 7 種冠狀病毒作為標的以評估分析，測試結果靈敏度可達 10^3 copy number，且可有效鑑別 7 種冠狀病毒，顯示 Target NGS 確實兼具高靈敏度及多標的偵測之優勢。

五、 結論與建議

- 1、 本計畫為第一年計畫，已完成建立以 amplicon based target enrichment 方式之 Target NGS 平台，可供檢測 7 種冠狀病毒。
- 2、 後續將持續精進 Target NGS 之應用層面，並測試該技術運用於重要傳染病原之型別鑑定。

六、參考資料

- [1] Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451:990-3.
- [2] Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*. 1999;397:436-41.
- [3] Reperant LA, Kuiken T, Osterhaus AD. Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: from exposure to establishment in humans. *Vaccine*. 2012;30:4419-34.
- [4] Reperant LA, Osterhaus A. AIDS, Avian flu, SARS, MERS, Ebola, Zika... what next? *Vaccine*. 2017;35:4470-4.
- [5] Coronavirus: Why are we catching more diseases from animals? Available at: <https://www.bbc.com/news/health-51237225>.
- [6] 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, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579:270-3.
- [8] Monira S, Nakamura S, Gotoh K, Izutsu K, Watanabe H, Alam NH, et al. Metagenomic profile of gut microbiota in children during cholera and recovery. *Gut pathogens*. 2013;5:1.
- [9] Koser CU, Ellington MJ, Cartwright EJ, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS pathogens*. 2012;8:e1002824.
- [10] Deng X, den Bakker HC, Hendriksen RS. Genomic Epidemiology: Whole-Genome-Sequencing-Powered Surveillance and Outbreak Investigation of Foodborne Bacterial Pathogens. *Annual review of food science and technology*. 2016;7:353-74.
- [11] Brzuszkiewicz E, Thurmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, et al. 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). *Archives of microbiology*. 2011;193:883-91.
- [12] Nakamura S, Yang CS, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, et al. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. *PloS one*. 2009;4:e4219.
- [13] Palacios G, Druce J, Du L, Tran T, Birch C, Briese T, et al. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *The New England journal of medicine*. 2008;358:991-8.
- [14] Clausen PT, Zankari E, Aarestrup FM, Lund O. Benchmarking of methods for identification of antimicrobial resistance genes in bacterial whole genome data. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016.

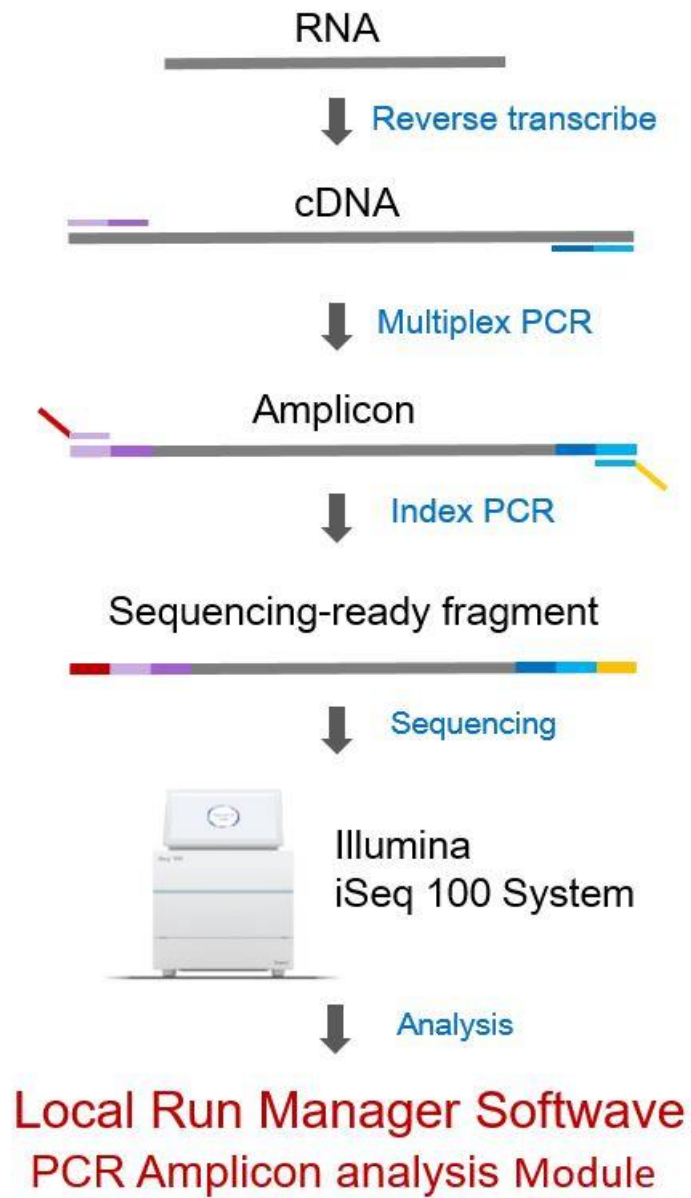
- [15] Cannas A, Mazzarelli A, Di Caro A, Delogu G, Girardi E. Molecular Typing of Mycobacterium Tuberculosis Strains: A Fundamental Tool for Tuberculosis Control and Elimination. *Infectious disease reports*. 2016;8:6567.
- [16] Mohammad HA, Madi NM, Al-Nakib W. Analysis of viral diversity in stool samples from infants and children with acute gastroenteritis in Kuwait using Metagenomics approach. *Virology journal*. 2020;17:10.
- [17] Garziera M, Roncato R, Montico M, De Mattia E, Gagno S, Poletto E, et al. New Challenges in Tumor Mutation Heterogeneity in Advanced Ovarian Cancer by a Targeted Next-Generation Sequencing (NGS) Approach. *Cells*. 2019;8.
- [18] Meenatchi R, Thinesh T, Brindanganam P, Hassan S, Kiran GS, Selvin J. Revealing the impact of global mass bleaching on coral microbiome through 16S rRNA gene-based metagenomic analysis. *Microbiological research*. 2020;233:126408.
- [19] No JS, Kim WK, Cho S, Lee SH, Kim JA, Lee D, et al. Comparison of targeted next-generation sequencing for whole-genome sequencing of Hantaan orthohantavirus in *Apodemus agrarius* lung tissues. *Scientific reports*. 2019;9:16631.

七、圖、表

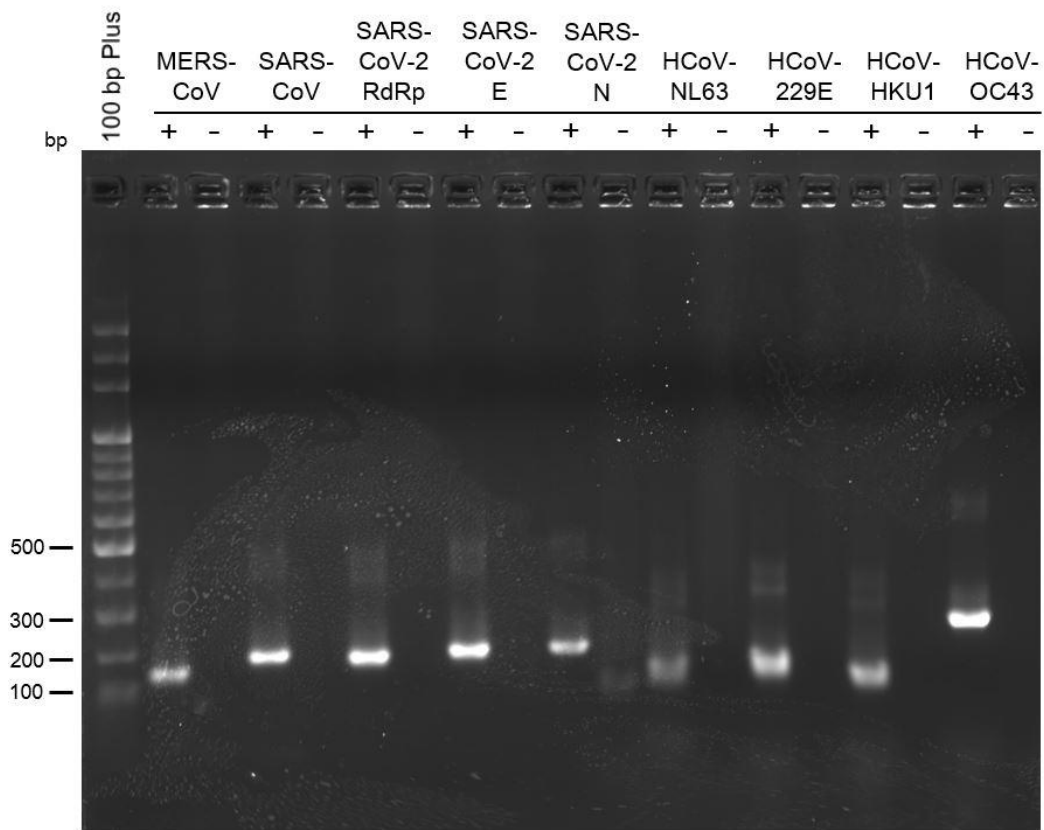
表一：Multiplex PCR 引子序列及合成片段長度

Target	Primer	Sequences(5'-3')*	Product sizes(bp)
MERS-CoV	MERS-F2	CAGACAACCATTCAGAARGTTA	108
	MERS-R2	TTTAGAACAAAACCTGGCCATA	
SARS-CoV	SARS-F	TCTGCAACCTGAGCTTGACT	175
	SARS-R	ACAGAAGCRTTAATGCCTGA	
SARS-CoV-2	SARS2-F1	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	167
	SARS2-R1	CAAATGTAAAAACACTATTAGCATA	
	SARS2-F2	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	180
	SARS2-R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	
	SARS2-F3	CACATTGGCACCCGCAATC	195
	SARS2-R3	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	
HCoV-NL63	NL63-F2	TTCAAGCCGTGAGTTCTAACA	89
	NL63-R2	GACGTCGTTGTAGATCCCTAAC	
HCoV-229E	229E-F2	CATACTATCAACCCATTCAACAAG	136
	229E-R2	CACGGCAACTGTCATGTATT	
HCoV-HKU1	HKU-F2	TCCTACTAYTCAAGAAGCTATCC	146
	HKU-R2	AATGAACGATTATTGGGTCCAC	
HCoV-OC43	OC43-F2	CATACYCTGACGGTCACAATAATA	109
	OC43-R2	ACCTTAGCAACAGTCATATAAGC	

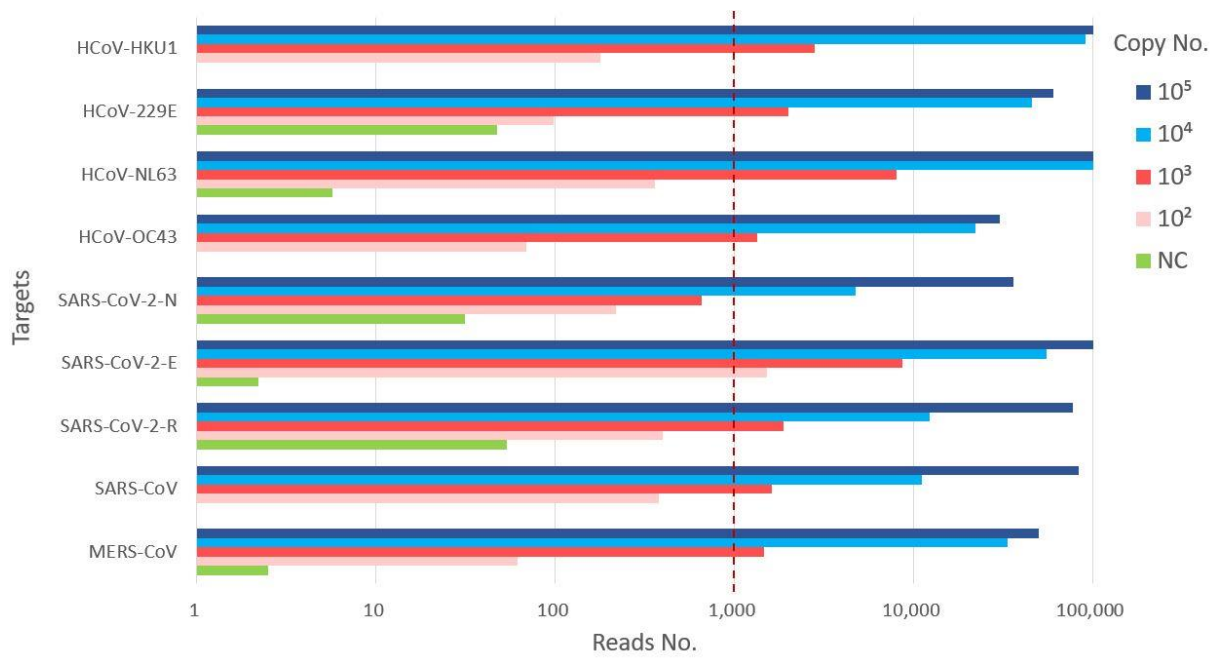
*The Illumina forward and reverse overhang adapter sequences to be added to specific primer.



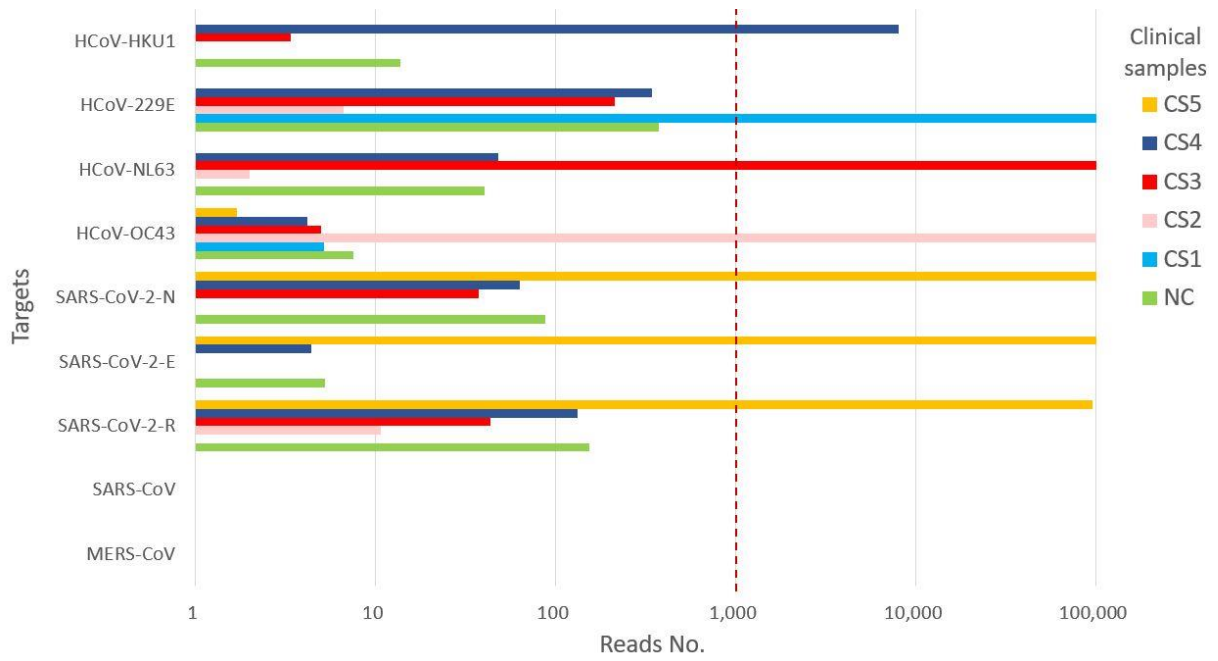
圖一、本計畫規畫之 Target NGS 實驗流程。



圖二、冠狀病毒陽性對照組 PCR 片段之電泳分析圖。



圖三、冠狀病毒陽性對照組之Target NGS靈敏度分析。



圖四、臨床樣本之 Target NGS 分析結果。

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：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：110.12.08

*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，目標符合需要。	謝謝委員。	
2	可協助了解不明原因感染源致死/重症或特殊因素個案之病因。	謝謝委員。	
3	Target amplification 如果長度不大，不必用 NGS。	明年度將加入 S gene 偵測進行組裝分型。	
4	Target NGS 應用於於新冠病毒檢測上，建議含括 S gene。	謝謝委員建議，111 年將加入 S gene 偵測。	

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。