

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-114110

衛生福利部疾病管制署 109 年度科技研究發展計畫

新型檢驗技術平台之開發與導入應用

年度研究報告

執行機構：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：林智暉

協同主持人：李以彬、邱淑君

研究人員：胡絲絜

執行期間：109 年 1 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果
應事先徵求本署同意*

目錄

一、前言	5
二、材料與方法	8
三、結果	10
四、討論	15
五、結論與建議	18
六、計畫重要研究成果及具體建議	19
七、參考文獻	20
八、圖表	23

中文摘要

關鍵詞：快速病原偵測、即時全基因定序、腸道菌叢分析

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。本計畫為因應上述困境，以109年腹瀉群聚檢體開發能夠簡化現行檢驗流程且之新型檢驗技術平台並導入我國現行傳染病原檢測應用，除可支援疫情發生之在地即時檢測以有效提升檢驗效能，同時應用新型檢驗平台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，也可了解腹瀉患者的腸道菌叢分布，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。

英文摘要

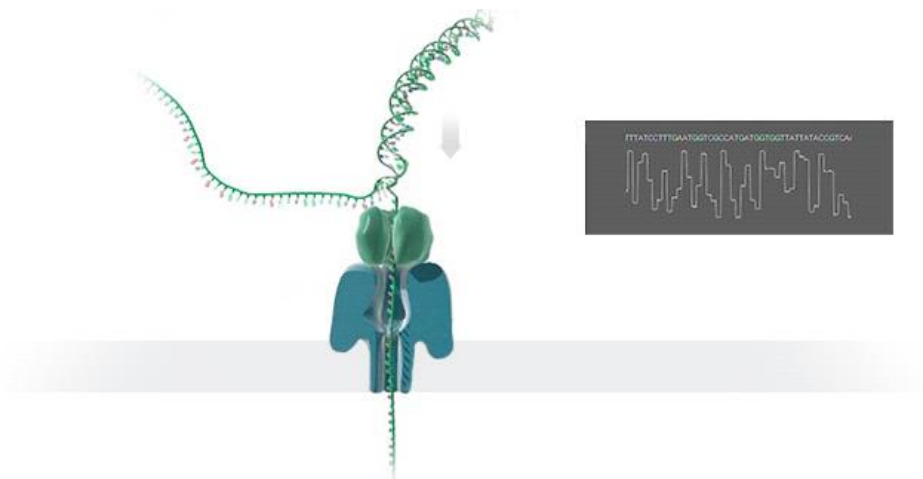
keywords : rapid pathogen diagnosis, real-time sequencing, gut microbiota analysis

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. 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.

一、前言

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，如病毒性病原的變異如人畜共通病毒基因的重組以及細菌性病原變異產生的抗藥性均可能難以利用常規性分子生物方式檢驗測出，造成防疫漏洞。目前針對傳染病的即時偵測有許多新型檢驗技術方法開發，考量的角度除了病原檢出的靈敏度、成本必須下降同時又能兼顧檢測速度等因素(1)。

在傳染病核酸變異偵測的考量上，全基因定序可有效掃描傳染病原全基因組成，針對抗原變異區段進行分析以評估流行風險，是新型檢驗技術開發的方向之一。Nanopore核酸偵測系統又被定義為第三代定序系統，具有系統儀器體積小、可於實驗室獨立操作及定序快速等特點，可深入疫情發生地區進行即時偵測以快速確認病原，國際間已多應用於包括伊波拉病毒、茲卡病毒、登革熱及流行性感冒等疫情偵測(2-5)。Nanopore的運作主要將待檢測的雙股核酸結合一含有解旋功能之攜帶蛋白質，將目標核酸牽引至通道蛋白並與之結合，雙股核酸經解旋後以單股形式通過通道蛋白質，藉由核酸通過通道蛋白造成的電流擾動進行解碼與序列分析(Base calling)，此動作可於定序過程中進行同步後端分析校正，同時研發新型技術可將另一股單股核酸送入通道蛋白，進行雙重定序達到序列校正之目的(6)。



次世代定序技術在定序前，須將核酸進行片段化至 150 bp，進行短片
段定序後再行組裝，然而片段化後的序列組裝常因為重複序列的存在或是
過於破碎的片段導致組裝出現錯誤。Nanopore的長片段且完整的核酸不須
經過片段化即可通過通道蛋白進行快速(400 bp/秒)與長片段(平均約 20 kb)
的定序。雖其定序錯誤率因高速定序，較傳統次世代定序為高，但可進行
多次的定序，利用高覆蓋率校正錯誤區域，同時定序晶片及解碼技術持續
更新，可將更高解析度之電流擾動準確解碼，將定序正確率由 90%提升至
99%以上 (7)。

近年各種新型檢驗技術廣受檢驗與研究單位採用，本計畫以新型即時
檢驗及定序技術平台自臨床檢體中直接進行致病原偵測，初步以 109 年通
報腹瀉群聚的臨床檢體(糞便)進行細菌病原檢測，檢體經由核酸萃取後直接
銜接接合體(Adaptor)與攜帶蛋白質，將待偵測檢體核酸帶入偵測芯片奈米
孔洞，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。

16S rRNA 定序是一種偵測微生物 16S rRNA 高度變異區序列進行微生物菌群組成、菌種豐富度分析及菌種鑑定的技術。目前應用糞便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 (8, 9)，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。

二、材料與方法

檢體收集

收集 109 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×g 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 糞便 DNA 萃取套組 (QiaAmp stool DNA extraction protocol, Qiagen, Valencia, CA) 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 條碼標記後混合成 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(10)。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(11)。腸道菌叢的偵測以 EPI2ME 軟體中的 FASTQ 16S 軟體進行菌叢 16S rRNA 序列資料分析。

三、結果

本年度以 109 年通報腹瀉群聚的臨床檢體(糞便)進行新型檢驗技術平台建置，並進行細菌性病原檢測。檢體經由核酸萃取後直接銜接接合體(Adaptor)與攜帶蛋白質，將待偵測檢體核酸帶入偵測芯片奈米孔洞，經由通過孔洞時所產生的電流擾動進行解碼與序列分析並同時偵測檢體中所有的微生物核酸片段，再檢出其中的腹瀉細菌致病原進行比對分析(圖一)。結果如表一所示，在受測的腹瀉群聚檢體中，有 2 個例行性檢驗為陰性的群聚檢體，可藉由新型檢驗技術平台檢出可能致病原(群聚編號#3 以及#9)。而有 1 個驗出雙重病原的群聚檢體，可藉由新型檢驗技術平台加以確認主要的致病原(群聚編號#10)。另外有 7 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，檢驗技術平台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。

由於所開發之新型檢驗技術平台具有長片段核酸序列解讀功能，因此透過檢測可獲得長片段的基因序列，透過分析軟體進行基因組裝，可得到各個疑似病原菌的全長序列(圖二)，不須額外再進行短片段核酸增幅以及基因定序等操作，即可在偵測細菌病原的同時同步獲得病原體的全基因序列。本研究以 108 年檢出之 EHEC(O104:H4)出血性大腸桿菌株進行全基

因序列偵測及組裝，結果獲得 chromosome 全長序列約 5253kbp。進一步分析菌株基因組成，發現菌株 GC 比約為 50.7%，共有 5174 個可編譯蛋白質的基因編碼區(Coding DNA Sequence, CDS)，其 ribosomal RNA operons 數目為 7 個，與其他已知的 EHEC 血清型別基因體比對結果相近，而其 tRNA loci 數目為 92 個，與其他血清型菌株相近但略少(表二)。研究結果顯示，由檢體透過新型檢驗平台的長片段核酸讀取功能，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。

本年度也與結核桿菌實驗室合作，利用新型檢驗技術平台進行結核菌株的全基因定序。將結核菌的核酸進行萃取定量後，直接加入檢測芯片進行序列解讀，不須設計特殊引子進行增殖，即可在半天的時間內獲得待測菌株的全長序列約 4411kbp (圖三)，且所有核酸位點的覆蓋率為 100%，可提供結核菌株完整的遺傳資訊。結果顯示所開發的新型檢驗技術平台，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，而且在菌株的定序作業上不需要設計特定引子，即可在短時間內獲得全基因序列。可大幅簡化檢驗流程及縮短後續分析所需時間。

由於開發之檢驗技術平台具有可檢出臨床檢體中所有的病原微生物特性，因此本研究也隨機選取 50 名急性腹瀉患者檢體進行腸道菌叢的組成

分析，檢測流程如圖四所示。急性腹瀉患者定義在腹瀉的時間在四週以內稱為急性腹瀉。若腹瀉時間大於四週，因需要考慮可能是其他身體疾病例如胰臟功能不良、吸收不良症、小腸或大腸的慢性疾病等，故不列入本次研究對象。50 個糞便檢體來源有 24 名為女性，26 名為男性，男女比約為 1:1。患者的年齡分布分為 3 個群組，分別是以小於 18 歲的學生及嬰幼兒族群、18 到 65 歲的社會人士、以及 65 歲以上的長者族群，其中小於 18 歲的患者共 11 位，約占所有患者的 22.0%。18 到 65 歲的患者共 31 位，占所有患者比例的 62.0%，而 65 歲以上的長者共計 8 位，佔 16.0% (表三)。

16S rRNA 為原核生物核糖體小亞基的重要組成之一，序列包含數個保守區域和 9 個高變異區域，其中高變異區具有屬或種的特異性，被認為是最適合當做細菌系統發育和分類鑑定的指標。在 16S metagenomics 中，操作分類單元 Operational taxonomic unit (OTU) 是根據序列的相似性做分類。其方法為叢集相似的 16S rRNA 基因序列的定序的片段，在每一個叢集中根據設定的序列相似性程度呈現一個 OTU，形成的 OTU 可能為細菌的屬或種層級。一般而言，在 16S metagenomics 分析中最多以 97% 序列相似性為典型的 OTU 叢集分析的門檻，因此分類出的 OTU 中會包含多個物種，大致上可以準確到屬 (Genus)，因此本研究將資料選擇分類以 Genus 來呈現。將新型檢驗平台解讀完的 16s rRNA 序列經由 EPI2ME 分析，檢測片段

平均長度為 1359 bp，辨識率達 100%，產出序列的平均品質檢測分數(Quality score)為 9.16。軟體將序列雲端即時連上美國國家生物技術資訊中心 NCBI 網站進行比對及分類，得到的各菌屬以及 reads 數由多至少依序呈現。

人體內的細菌主要可分為四個類門，包括厚壁菌門 (Firmicutes)、擬桿菌門(Bacteroidetes)、放線菌門 (Actinobacteria)以及變形菌門 (Proteobacteria)，其中厚壁菌門及擬桿菌門佔腸道微生物相的 9 成以上(12)。本次研究檢測結果發現在腹瀉群聚患者體內主要以擬桿菌門為最大宗，佔總測得菌叢的 65.8%，其次為厚壁菌門 (30.4%)，其他還包括放線菌門、變形菌門、疣微菌門 (Verrucomicrobia)以及梭桿菌門 (Fusobacteria)等(圖五)。將急性腹瀉患者依不同年齡群進行腸道菌叢分析，結果發現各年齡層的菌門相對豐富度(relative abundance)比例也有不同。厚壁菌門數量隨著年齡增加而比例變高，小於 18 歲的族群放線菌門比例比其他年齡層高。就此次急性腹瀉患者的年齡分布個案數進行比較，結果顯示小於 18 歲的族群患者數量也比其他年齡層少。而 18-65 歲族群的腸道菌門種類相較其他年齡層族群也較為多樣化(圖六)。

將各菌門內的菌屬(OTU)進一步加以分析(圖七到圖十)，結果發現在急性腹瀉患者腸道菌叢四大菌門中以厚壁菌門種類最多，但單一菌屬的數量則以擬桿菌門的 *Bacteroides* 以及 *Prevotella* 兩個菌屬為最大宗，目前已知

這兩種菌屬均屬於人體常見的中間菌。現今一些醫學上常被拿來作為益生菌的菌屬包括放線菌門的 *Bifidobacterium*、*Streptomyces*，以及厚壁菌門的 *Lactobacillus* 以及 *Enterococcus* 等，在急性腹瀉患者菌叢中相對的比例非常少。*Bifidobacterium* 以及 *Enterococcus* 因會合成包括硫胺素(thiamine, B1)，葉酸(folate, B9)，生物素(biotin, B7)，核黃素 (riboflavin, B2)和泛酸(panthothenic acid, B5)等人體所需水溶性維生素，所以歸類為好菌(13)。而常見的腹瀉致病原包括 *Staphylococcus*、*Bacillus*、*Clostridium*、*Samonella*、*Shigella*、*Campylobacter* 等分屬於厚壁菌門、擬桿菌門以及變形菌門，因其會對人體造成疾病，被歸類為壞菌。經比較急性腹瀉患者的好壞菌比例，結果發現急性腹瀉患者的中間菌與壞菌比例與一般健康人體相近，但好菌數比一般人少很多，壞菌數相對豐富度高於好菌的 8 倍以上(圖十一)。

四、討論

本研究開發之新型檢驗技術目的在於希望簡化現行檢驗流程，建立直接由臨床檢體中檢出可能致病原之檢測平台。經以腹瀉群聚糞便檢體進行測試結果顯示新型檢驗技術平台可直接自糞便檢體中檢出所有可疑細菌病原，傳統培養檢驗法受限於檢體採集後送達實驗室的時程影響運送品質，致病菌不一定仍具活性可被培養出來，因此在常規檢測中常導致檢驗結果陰性，或者是僅有 1、2 個檢體可培養出致病原。利用新型檢驗平台經檢測結果顯示可提高疑似病原菌的檢出率，也可以由常規檢測陰性的群聚中檢出主要致病菌，可解決大型群聚案件因未檢出病原而無法研判的困境。而藉由平台技術本身的核酸長片段解析模式，可在病原偵測同時同步獲得病原菌的全基因序列。不但可縮短傳統培養方法及型別鑑定所需時程，也可透過單一檢測操作檢出臨床檢體中所有可疑致病原，提升檢驗效能。

本次開發之新型檢驗平台具有不需要針對特殊標的病原設計不同的引子或探針，因此可以在檢體經由核酸萃取後直接加入檢測芯片進行序列解讀。這樣的特性不但可以檢測檢體中所有的致病原，也可降低已知病原的分生檢測成本，並避免因偵測位點變異導致檢測失效的風險。而這樣的特性也可以用來偵測未知以及新興病原，同時不需要經由培養等鑑定程序，可快速獲得病原的長片段基因序列，縮短未知病原檢測時程。

近期許多研究報告顯示，腸道微生物相能夠與「精準化醫療（precision medicine）」接軌，從微生物角度思考，我們可精準投予或是消滅某特定菌種，而不只是對患者進行糞菌移植，而從患者角度著手，也可精準地瞭解患者微生物相對於疾病和治療的反應，以了解後續治療的方向(14, 15)。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。一般健康民眾腸道菌叢中的好菌：壞菌：中間菌的比例約為 20：10：70。本次研究結果發現急性腹瀉患者腸道中的壞菌以及中間菌的比例與健康民眾接近，但好菌比健康民眾比較起來少很多，壞菌的數量比好菌高 8 倍以上(圖十一)。近期有期刊探討日本健康民眾與其他包括丹麥、西班牙、美國、中國大陸、瑞士、俄羅斯、委內瑞拉、馬拉威、澳洲、法國及祕魯的腸道菌叢研究，結果發現在人體腸道菌叢四大菌門中，日本人的放線菌門(Actinobacteria)菌數比其他國家的民眾高，而變形菌門 (Proteobacteria) 與擬桿菌門 (Bacteroidetes) 的比例則相對其他國低。進一步去探究日本健康民眾腸道菌叢內放線菌門裡的菌屬組成，結果發現原來是其中的 *Bifidobacterium* 數量比其他 11 個國家人民高出許多，研究結論表示由於日本的飲食習慣，日本的傳統食物中有許多含有大量的 *Bifidobacterium*，可見提升腸道菌叢中好菌的比例有助於保障民眾的健康(16)。

此次急性腹瀉患者的各年齡族群罹病個案數分析結果顯示小於 18 歲的族群患者數量也比其他年齡層少，而小於 18 歲的族群放線菌門比例比其他年齡群高。推測原因可能是小於 18 歲的族群多為學生，學校的營養午餐由營養師分析調配，中央廚房統一烹調，不但注重衛生，營養也較為均衡，故能維持腸道菌相的穩定。18- 65 歲族群的腸道菌門種類相較其他年齡層族群也較為多樣化，可能與出社會的上班族外食機率較高的飲食習慣有關，而由於外食的關係，食物的衛生條件取決於店家，比較無法掌控，可能是在這次調查中 18-65 歲的腹瀉患者比其他年齡族群多的可能原因之一。人體內的微生物群可提供的功能包括產生能量、生成人體所需維生素以及抗發炎反應等，維持腸道菌叢的穩定有助於提升人體對於疾病的免疫力。腸道微生物群的乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*) 和雙歧桿菌屬 (*Bifidobacterium*) 中的部分菌種有抑制發炎的作用(17)，另有腸道微生物可使促進抗病原菌感染反應的 Th17 細胞增加，因此維持腸道微生物的多樣性，可讓腸道免疫系統達到穩定的動態平衡，提升對抗疫病的防禦力。

五、結論與建議

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，包括新興病原再浮現、病毒性病原的變異、人畜共通病毒基因重組以及未知病原等，均有可能造成大規模甚至全球性疫情的發生。本研究開發之新型檢驗技術平台，經以腹瀉群聚檢體進行系統建置及檢測成效評估結果顯示，不但可直接由臨床檢體檢出所有可能致病原，同時可縮短現行檢驗方法及型別檢定所需時程，且不需要設計特定標的病原體的引子探針，利用單一檢測即可偵測檢體內所有致病原，可降低已知病原分生檢驗成本，並避免因偵測位點變異導致檢測失效的風險。未來可應用於未知病原偵測，將有助於我國疾病疫情掌握；也可應用於其他病原監測分析，健全傳染病監測網絡，保障民眾健康。

本研究同時探討了我國急性腹瀉患者的腸道菌叢組成，結果顯示這些病人體內的壞菌不但多於好菌，而且腸道菌叢中的好菌比例比一般健康的人少非常多。建議急性腹瀉患者的治療除了現行的補充水分或電解質等消極的支持性療法以外，國人可透過提升腸道內好菌的比例來改變腸道壞菌的生長環境，強化對疾病的抵抗力。

六、計畫重要研究成果及具體建議

本研究開發之新型檢驗技術平台，不但可直接由臨床檢體檢出所有可能之腹瀉致病原，同時可縮短現行檢驗方法及型別檢定所需時程，且不需要設計特定標的病原體的引子探針即可偵測檢體內所有病原微生物，並獲得病原體所有遺傳變異資訊。未來可應用於未知病原偵測，有助於我國疾病疫情掌握。

此外，本研究亦分析我國急性腹瀉患者的腸道菌叢組成，結果顯示患者體內的壞菌不但多於好菌，而且腸道菌叢中的好菌比例比一般健康的人少非常多。建議急性腹瀉患者的治療除了現行的補充水分或電解質等支持性療法外，建議相關單位可利用本研究完成之調查報告結果，透過提升腸道內好菌的比例來改善腸道菌相，推動健康國民政策，提昇對疫病的抵抗力，達成全民健康的目標。

七、參考文獻：

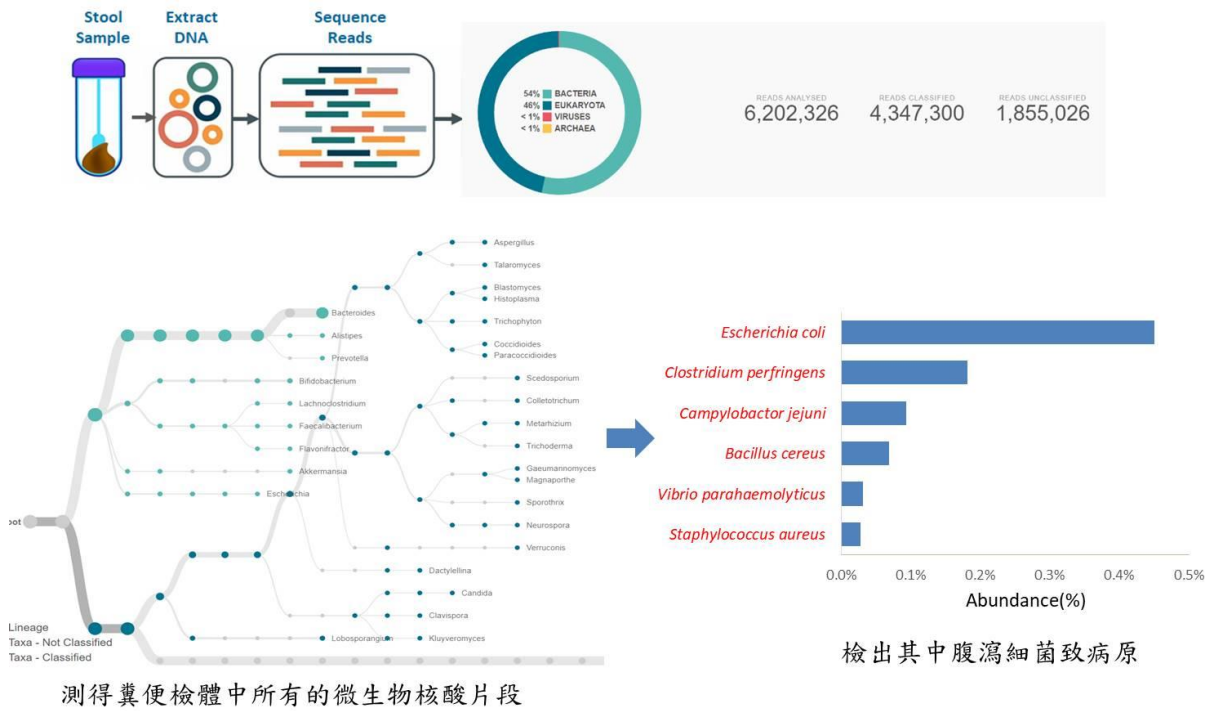
1. Gardy JL, Loman NJ. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. *Nature reviews Genetics*. 2018;19(1):9-20.
2. Quick J, Loman NJ, Duraffour S, Simpson JT, Severi E, Cowley L, et al. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*. 2016;530(7589):228-32.
3. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nature protocols*. 2017;12(6):1261-76.
4. Kafetzopoulou LE, Efthymiadis K, Lewandowski K, Crook A, Carter D, Osborne J, et al. Assessment of metagenomic Nanopore and Illumina sequencing for recovering whole genome sequences of chikungunya and dengue viruses directly from clinical samples. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2018;23(50).
5. Lewandowski K, Xu Y, Pullan ST, Lumley SF, Foster D, Sanderson N, et al. Metagenomic Nanopore Sequencing of Influenza Virus Direct from Clinical Respiratory Samples. *Journal of clinical microbiology*. 2019;58(1).
6. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Archives of disease in childhood Education and practice edition*. 2013;98(6):236-8.
7. Deamer D, Akeson M, Branton D. Three decades of nanopore sequencing. *Nature biotechnology*. 2016;34(5):518-24.
8. 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.
9. Zheng P, Li Z, Zhou Z. Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2018;34(7):e3043.
 10. Payne A, Holmes N, Rakyan V, Loose M. BulkVis: a graphical viewer for Oxford nanopore bulk FAST5 files. *Bioinformatics*. 2019;35(13):2193-8.
 11. 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. *Briefings in bioinformatics*. 2019;20(4):1542-59.
 12. Durack J, Lynch SV. The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *The Journal of experimental medicine*. 2019;216(1):20-40.
 13. Guarino A, Lo Vecchio A, Canani RB. Probiotics as prevention and treatment for diarrhea. *Current opinion in gastroenterology*. 2009;25(1):18-23.
 14. Jobin C. Precision medicine using microbiota. *Science*. 2018;359(6371):32-4.
 15. Zhu W, Winter MG, Byndloss MX, Spiga L, Duerkop BA, Hughes ER, et al. Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis. *Nature*. 2018;553(7687):208-11.
 16. Nishijima S, Suda W, Oshima K, Kim SW, Hirose Y, Morita H, et al. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA research : an international journal for rapid publication*

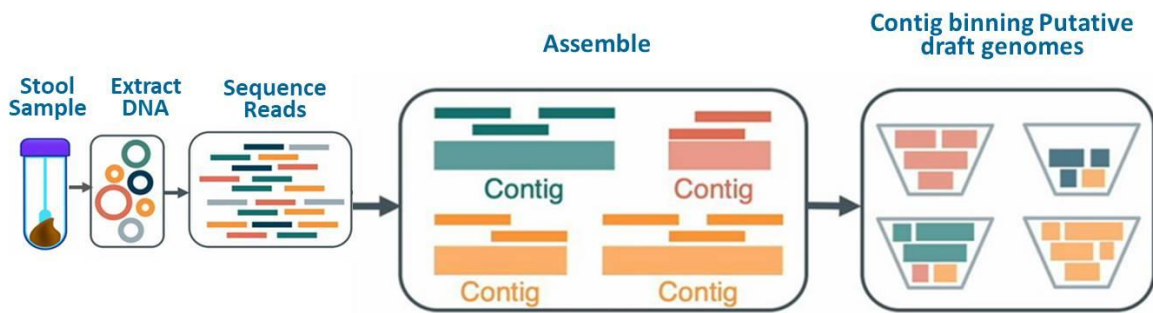
of reports on genes and genomes. 2016;23(2):125-33.

17. Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J, Shetty AK. Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics*. 2005;115(1):178-81.

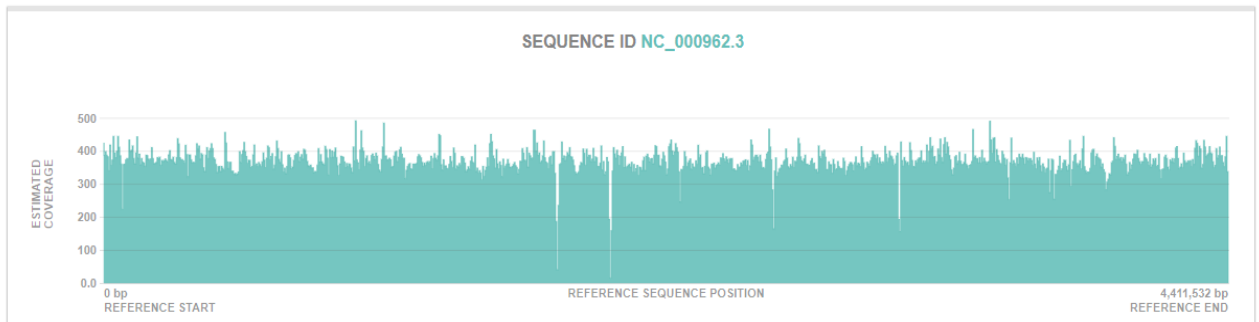
八、圖表



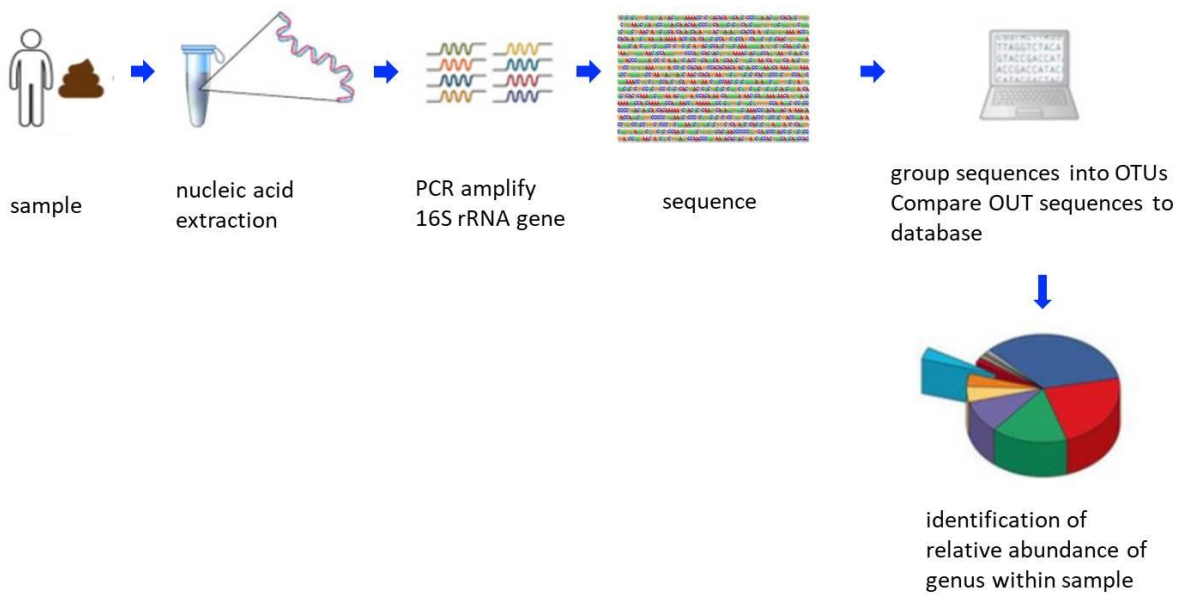
圖一、腹瀉群聚細菌病原偵測流程圖



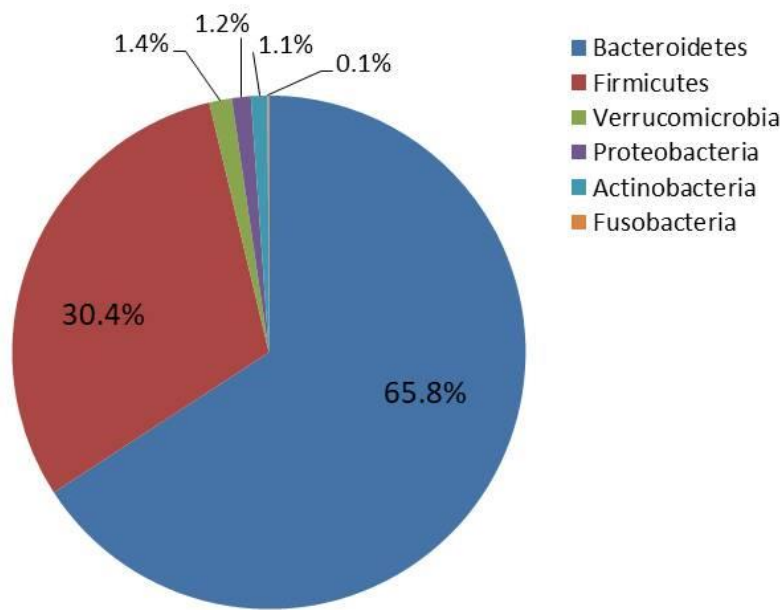
圖二、病原菌全基因序列偵測流程圖



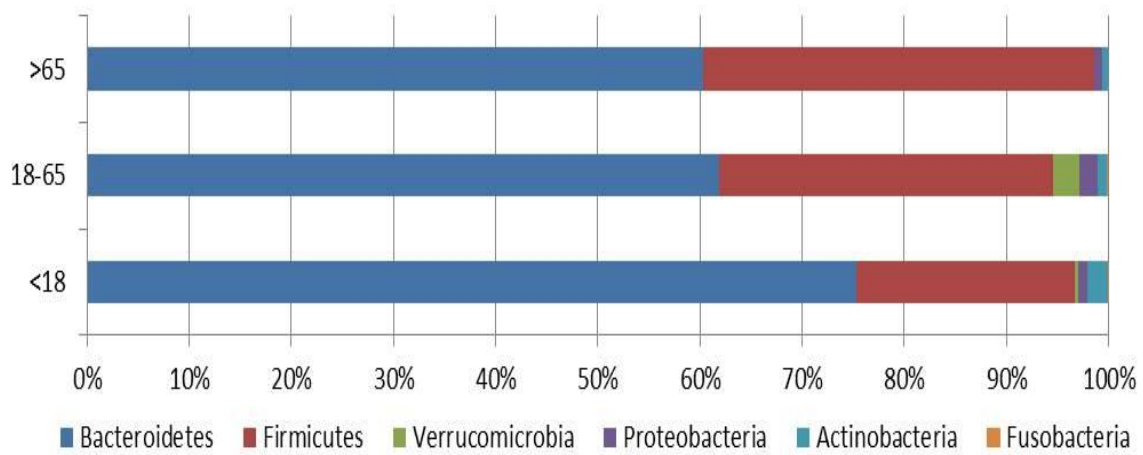
圖三、Mycobacterium tuberculosis全基因序列圖譜



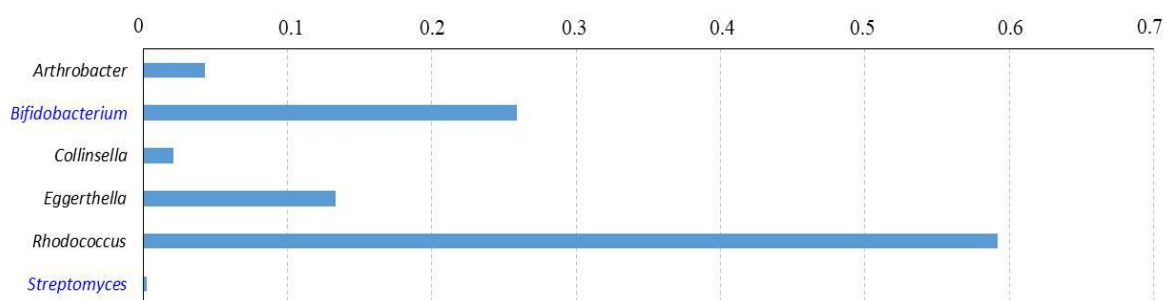
圖四、腹瀉患者腸道菌叢偵測流程圖



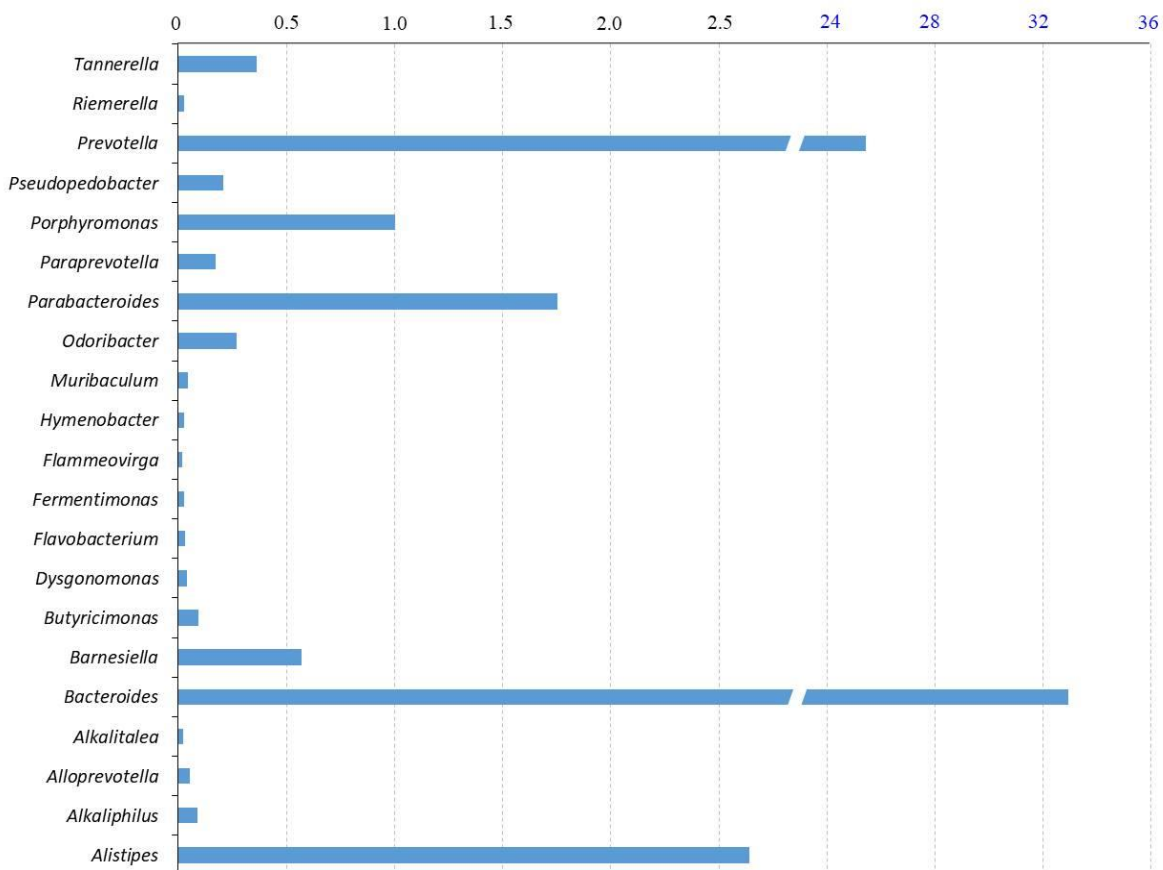
圖五、腹瀉患者腸道菌門相對豐富度分析圖



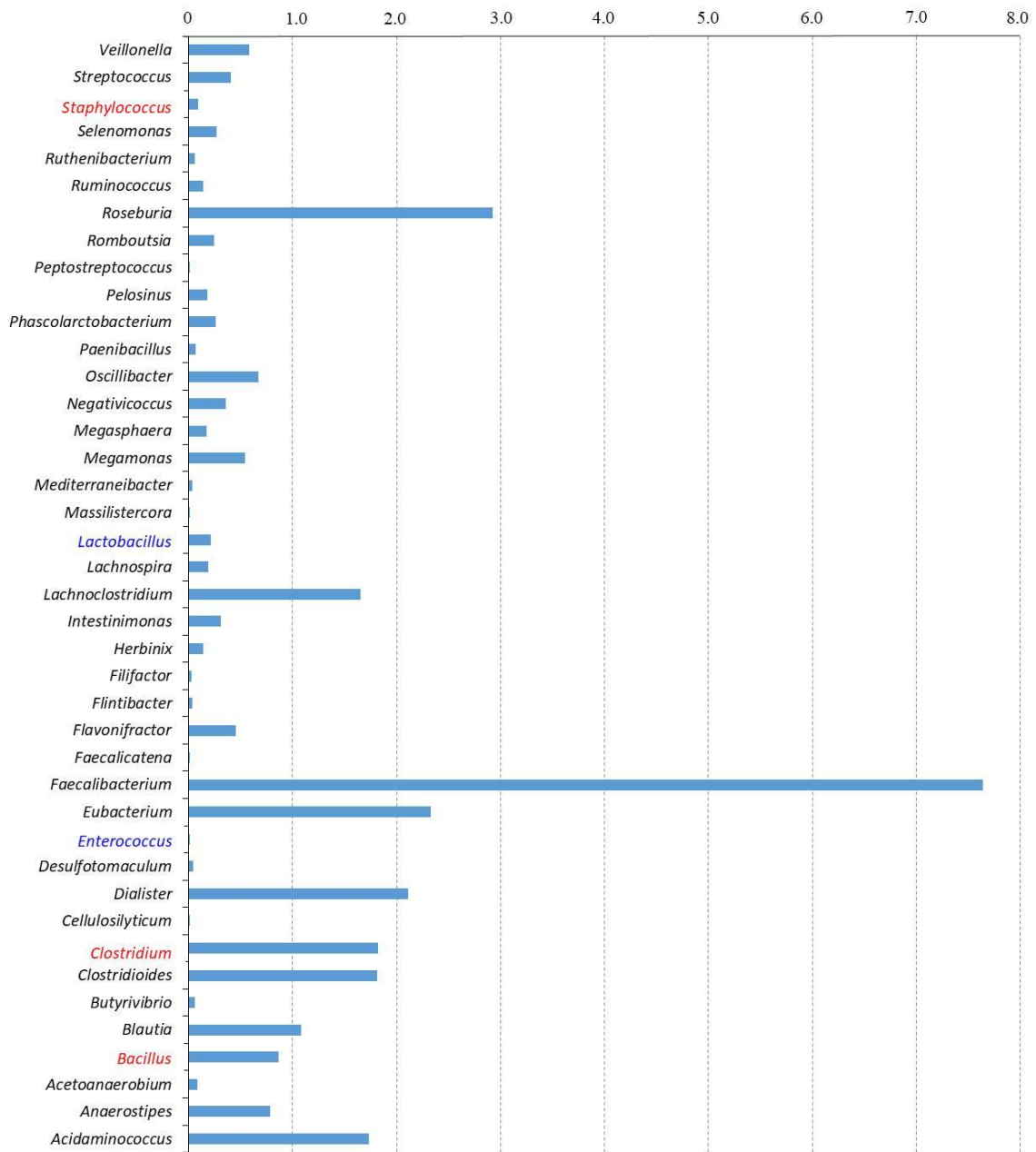
圖六、不同年齡族群之腹瀉患者腸道菌門相對豐富度分析圖



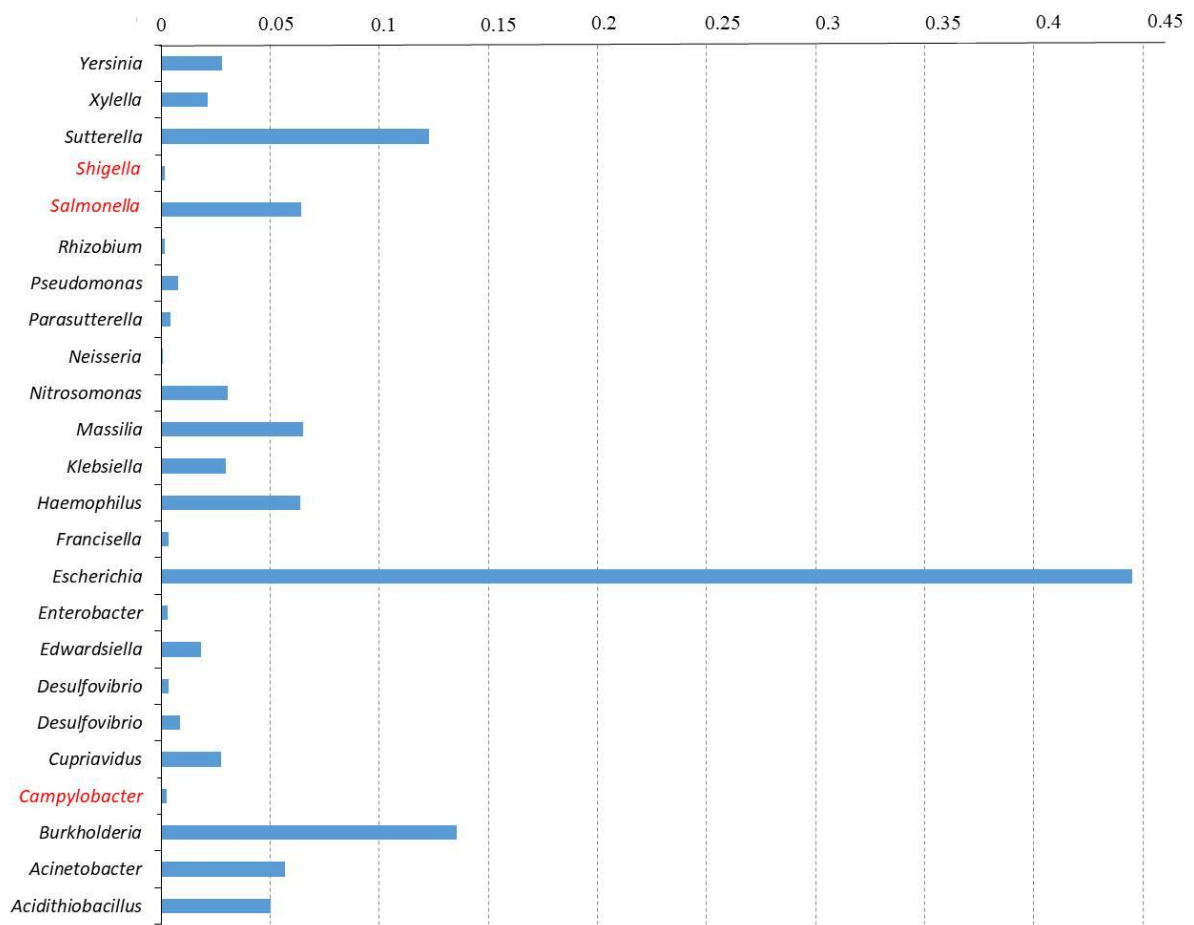
圖七、腹瀉患者腸道菌叢之放線菌門菌屬相對豐富度(relative abundance, %)分析圖



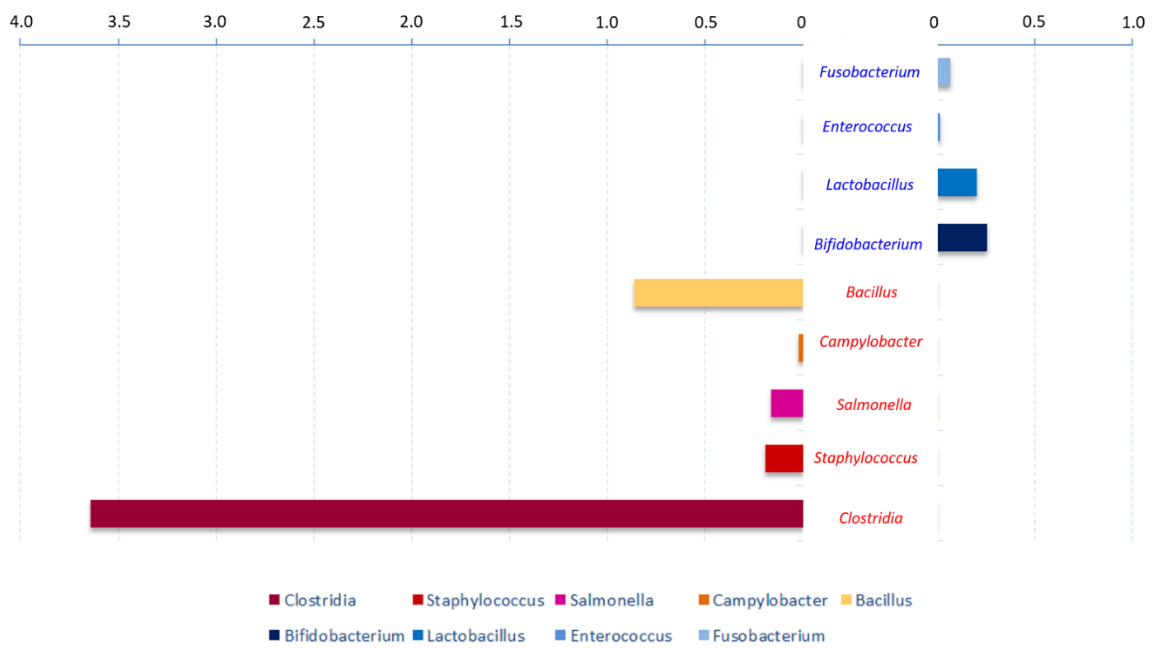
圖八、腹瀉患者腸道菌叢之擬桿菌門菌屬相對豐富度(relative abundance, %)分析圖



圖九、腹瀉患者腸道菌叢之厚壁菌門菌屬相對豐富度(relative abundance, %)分析圖



圖十、腹瀉患者腸道菌叢之變形菌門菌屬相對豐富度(relative abundance, %)分析圖



圖十一、腹瀉患者腸道菌叢之好壞菌屬相對豐富度(relative abundance, %)

分析圖

表一、傳統檢驗方法與新型檢驗平台檢驗效能比較表

細菌病原培養結果*			新型檢驗平台檢測結果(Taxon)		
群聚	病原體	檢出數(%)	主要病原體	檢出數(%)	其他病原體
#1	<i>Salmonella spp.</i>	1/7 (14.3)	<i>Salmonella</i>	5/7 (71.4)	<i>Escherichia</i> 、 <i>Staphylococcus</i>
#2	<i>Salmonella spp.</i>	2/8 (25.0)	<i>Salmonella</i>	5/8 (75.0)	<i>Escherichia</i> 、 <i>Clostridium</i> 、 <i>Campylobacter</i>
#3	Negative	0/9 (0.0)	<i>Escherichia</i>	4/9 (44.4)	<i>Bacillus</i> 、 <i>Clostridium</i>
#4	<i>V. parahaemolyticus</i>	2/8 (25.0)	<i>Vibrio</i>	4/8 (50.0)	<i>Escherichia</i> 、 <i>Clostridium</i> 、 <i>Bacillus</i>
#5	<i>Staphylococcus</i>	1/8 (12.5)	<i>Staphylococcus</i>	5/8 (62.5)	<i>Escherichia</i> 、 <i>Bacillus</i>
#6	<i>Salmonella spp.</i>	2/9 (22.2)	<i>Salmonella</i>	6/9 (66.7)	<i>Escherichia</i> 、 <i>Staphylococcus</i> 、 <i>Bacillus</i>
#7	<i>V. parahaemolyticus</i>	2/12 (16.7)	<i>Vibrio</i>	8/12(66.7)	<i>Escherichia</i> 、 <i>Staphylococcus</i>
#8	<i>Bacillus cereus</i>	1/8 (12.5)	<i>Bacillus</i>	3/8 (37.5)	<i>Campylobacter</i> 、 <i>Clostridium</i>
#9	Negative	0/7 (0.0)	<i>Salmonella</i>	4/8 (50.0)	<i>Escherichia</i> 、 <i>Staphylococcus</i>
#10	<i>Staphylococcus/EPEC</i>	2/9 (22.2)/3/9(33.3)	<i>Escherichia</i>	6/9 (66.7)	<i>Staphylococcus</i> 、 <i>Bacillus</i>

*腹瀉群聚細菌病原檢測項目為霍亂、沙門氏菌、桿菌性痢疾、腸炎弧菌以及出血性大腸桿菌，必要時得應食品中毒案件調查需求加驗金黃色葡萄球菌以及仙人掌桿菌。

表二、2019 年台灣出血性大腸桿菌(O104:H7)全基因序列與其他出血性大腸桿菌株比對分析表

Strains	O145:H25	O145:H28	O26:H11	O103:H2	O111:HNM	O157:H7	O165:H25	O104:H4
	CFSAN004176	RM13514	11365	12009	11128	Sakai	2012C-4227	2019TW
Chromosome								
Size(kbp)	5194	5586	5697	5449	5371	5498	5203	5253
GC(%)	50.5	50.7	50.7	50.7	50.6	50.5	50.7	50.7
CDSs	5179	5613	5780	5457	5409	5204	5032	5174
rRNA operons	7	7	7	7	7	7	7	7
tRNA loci	99	104	101	98	106	105	106	92

表三、腹瀉患者性別、年齡及腹瀉病原檢測結果統計表

個案數 (N=50)	
項目	人數 (%)
性別	
Female	24 (48.0)
Male	26 (52.0)
年齡	
<18	11(22.0)
18-65	31 (62.0)
>65	8 (16.0)

衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫
109 年度計畫重要研究成果及具體建議

(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：新型檢驗技術平台之開發與導入應用

主持人：林智暉

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-114110

1.計畫之新發現或新發明

本研究所建置之新型檢驗技術平台可自臨床檢體直接檢測所有可疑致病原，且不需設計特定標的病原體引子探針，利用單一操作流程即可鑑定各種病原，降低已知病原分生檢測成本，並避免因偵測位點變異導致檢測失效的風險。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

本研究分析腹瀉患者腸道菌相組成，有助於提供未來臨床治療方向，並提供國人腸道菌相改進方向，提升對疾病的免疫力，強化疫病防治。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

新型檢驗技術平台可快速確認致病原，應用於新興或未知病原偵測可提供防疫應變政策擬定參考，達到及早預警。

109 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：新型檢驗技術平台之開發與導入應用

計畫主持人：林智暉

填報日期：109 年 12 月 23 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	因應新興、再浮現傳染病檢驗技術所需。	謝謝委員肯定。	
2	開發簡化現行檢驗流程之新型檢驗技術平台並導入檢測使用。	謝謝委員肯定。	
3	新平台可檢出檢體所有可能微生物病原，同時可得病原全基因序列。	謝謝委員肯定。	
4	對我國腹瀉患者腸道菌叢分布提供將來防治之參考。	謝謝委員肯定，將提供資料作為將來防治參考，促進國人健康。	
5	偵測病原體，但是疾病往往是毒素造成，如何判讀相當重要。	謝謝委員指導，本檢驗平台可偵測毒素基因協助致病原判定。	
6	需要再擴張檢驗的範圍。	謝謝委員建議，明年度將增加病毒性腹瀉病原檢測。	
7	可以增加病原體的偵測率。	謝謝委員肯定。	

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
8	群聚案件之流病資料若能與檢驗結果資料結合探究，此技術平台之應用價值可能有所提升。	謝謝委員建議。	
9	是否有傳統檢驗結果有驗出而此計畫之檢驗技術平台未檢出或檢驗結果兩邊不一致時，如何判定？	目前尚無傳統檢驗方法有驗出而此平台未檢出的情形發生。 若檢驗結果兩邊不一致時，將以其他檢驗方法(本實驗室所開發之多種腹瀉病原 multiplex PCR 平台) 協助判定。	

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 109 年 12 月 23 日
前至 GRB 系統完成資料抽換。