

計畫編號：MOHW110-CDC-C-315-114408

衛生福利部疾病管制署 110 年度科技研究發展計畫

食源性人畜共通腹瀉傳染病之精準監測與病原比對網路平台

研究報告

執行機構：衛生福利部疾病管制署-檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：林智暉

協同主持人：邱乾順

研究人員：廖慧雯、邱淑君、曾雅鈴、胡絲絮、廖玲敏、陳宥樺、
張瑞顯、陳柏翰

執行期間：110 年 1 月 1 日至 110 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.....	7
二、 方法.....	16
三、 結果.....	21
四、 討論.....	25
五、 結論與建議	27
六、 計畫重要研究成果及具體建議.....	28
七、 參考文獻.....	29
八、 圖表.....	31

中文摘要

關鍵詞：食源性人畜共通傳染病、次世代定序、全基因體、核心基因組多
基因座序列分型 (cgMLST)、李斯特菌、曲狀桿菌、沙門氏菌、網
路服務平台、腹瀉病毒

對全球公共衛生造成重大威脅的腹瀉傳染病大多為人畜共通傳染病，病原可以於自然情況下在人類與動物之間交互傳播，且主要傳播途徑為經由食媒傳染，故將之歸類為食源性人畜共通傳染病。食源性人畜共通傳染病除了對國人健康造成極大風險，對畜產業與國際貿易亦都有程度上的影響，根據估算，腹瀉為 2016 年全球第八大死因，且為 5 歲以下兒童的第五大死因。這些腹瀉病原與人畜間的感染因果關係仍待釐清，農衛雙方目前亦欠缺可供精準比對人畜共通病原全基因體的網路平台，而新興腹瀉病原難以用傳統培養方式進行偵測與鑑定。為解決上述問題，本計畫將進行人畜共通腹瀉病原細菌之感染現況與流行趨勢調查，並建立人畜共通細菌病原菌株比對之網路平台，使相關機關可經由網路快速比對菌株親緣關係，上傳下載菌株資料。預定優先開發李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、曲狀桿菌 (*Campylobacter coli/C. jejuni*) 與沙門氏菌 (*Salmonella spp.*) 之 cgMLST allele databases 與 cgMLST profiling 工具並安裝於網頁上，以提供使用經由網路即可產生其菌株之 cgMLST 基因指紋，同時將本土菌株與 National

Center for Biotechnology Information (以下簡稱 NCBI) 菌株轉成 cgMLST profiles，將這些 cgMLST profiles 安裝於網路上，以提供使用者上網快速比對其菌株與 cgMLST profile database 上菌株 (本土與 NCBI 資料庫內來自各國的菌株)，找出最近親緣關係的菌株，以進行溯源 (strain tracking) 調查。

此外，為了瞭解腹瀉病毒在人畜之間如何相互傳染流行的模式，本計畫將進行動物及人類腹瀉病毒之基因型別動態流行分析，以及新興/再浮現腹瀉病原之調查。

英文摘要

keywords : Foodborne zoonoses, Next-generation sequencing, Whole genome, core-genome multilocus sequence typing (cgMLST), *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Salmonella*, Web service platform, Viral diarrheal pathogens.

Worldwide, foodborne diseases, and more especially diarrheal diseases incidence by introducing new zoonotic pathogens that cause diarrheal illness or by increasing transmission of pathogens common to both animals and humans. Foodborne zoonoses is mainly a public health and agriculture responsibility, of which diarrheal diseases are the 8th leading cause of death and account for 1 in 9 child deaths worldwide, making diarrhea the 5th leading cause of death among children under the age of 5. Although knowing the causative organism might not affect clinical management, it is vital for public health protection, and primary care is in the front line as regards outbreak detection. Epidemiological, microbiological, and environmental studies require the combined effort of doctors and vets, alongside laboratory investigation and agriculture health and safety. This project is aim to establish a framework to investigate the dynamic epidemiology of foodborne zoonoses in Taiwan, to characterized the phylogeographic relationships among these zoonotic pathogens that cause diarrhea in humans and animals. In addition, this project will build a web-service platform for zoonotic bacterial pathogens. All institutes responsible for zoonotic foodborne disease control will be able to rapidly compare the genetic relatedness among isolates, upload or download relevant metadata via the internet. The first priority is to build cgMLST allele databases and the cgMLST profiling tool for *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter coli/C. jejuni*, and *Salmonella*, which will allow users to generate cgMLST profiles for their own isolates. Genomic sequences

of Taiwan isolates and the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database will be converted into cgMLST profiles and be installed on this web-service platform for rapidly searching the best-matched profiles, as called strain tracking. Thus, this project shall provide a feasible method for estimating the diffusion coefficient of a spatial outbreak and for measuring the variability among hosts in spatial spread and available sequences in global databases, and to make it possible for early detection and warning system.

一、前言

1.腹瀉傳染病與食源性人畜共通傳染病 (foodborne diseases)

1.1 腹瀉疾病之全球性疾病負擔現況

急性腸胃炎(腹瀉)的成因眾多，包括病原感染、藥物和化學物質、其他非傳染性疾病等，但主要由種類眾多之病原感染所引起(Scallan *et al.*, 2011)。根據全球疾病負擔 (Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors, 簡稱 GBD) 健康數據中心之估算，腹瀉為 2016 年全球第八大死因，且為 5 歲以下兒童的第五大死因，估計造成 1,655,944 人死亡，其中 446,000 人為 5 歲以下兒童(Troeger *et al.*, 2018)。另外根據世界衛生組織食源性疾病負擔流行病學參考小組 (Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group) 所發表的估算報告指出，2010 年有多達 6 億人因食用受到污染的食品而生病，其中 5.5 億為傳染性病原體引起的腹瀉疾病，尤其諾羅病毒及曲狀桿菌感染最常發生。若以失能調整損失人年 (Disability-adjusted Life Years; DALYs) 來估算此疾病負擔的估算值，全球人口在 2010 年因為食媒性疾病所導致之失能調整損失人年高達了 3300 萬，其中 1800 萬與腹瀉病原體相關，尤其是非傷寒沙門氏菌 (non- typhoidal Salmonella, NTS) 和腸病原型大腸桿菌 (enteropathogenic *E. coli*, EPEC) 所占比例最高(WHO, 2015)。

至於我國腹瀉傳染病之疾病負擔，疾管署曾委託國家衛生研究院進行我國腸道病原體感染傳播模式分析及盛行率調查，結果顯示自2001~2015年間，我國每年急性腸胃炎不分年齡之發生率平均約為15,269~20,529/100,000，其中以<5歲之年齡層發生率最高，每年平均約45,340~57,425/100,000。如以就醫成本花費問卷分析住院孩童之社會成本，估計每位<5歲急性腸胃炎孩童平均住院4.4天期間，造成之社會成本約25,666.3元，依健保資料庫分析之每年<5歲急性腸胃炎住院孩童住院人次估算，我國<5歲急性腸胃炎孩童住院期間之社會成本總額，以2015年為例約9億元(熊昭，2017)。

1.2 食源性人畜共通傳染病簡介及其監測現況

這些對全球公共衛生造成重大威脅的腹瀉傳染病大多為人畜共通傳染病，病原可以於自然情況下在人類與脊椎動物之間傳播，除了對人類健康造成風險，對經濟動物的生產與國際性貿易都有程度上的影響。傳播途徑主要為食媒傳染，也就是經由攝食被病原體汙染之食物或飲水而引起，故被歸類為食源性人畜共通傳染病 (Foodborne zoonotic diseases)。常見的食源性人畜共通傳染病病原體包含曲狀桿菌、沙門氏菌、耶氏菌 (Yersinia)、大腸桿菌及李斯特菌等(EFSA & ECDC, 2019)，此類病原細菌常出現於產食動物 (food-producing animals) 的腸道中，

雖然對產食動物的健康影響並不顯著，但是可由腸道持續排出，因此在「農場到餐桌」的各個環節都存在污染食物的風險，如造成大規模腹瀉群聚事件往往伴隨著重大的經濟損失。歐盟每年即有超過 35 萬例食源性人畜共通傳染病之通報個案，其對民眾健康及經濟動物生產之威脅不容小覷。為了保障民眾健康，先進國家大多採取整合性的措施以確保食品供應每一環節之安全，這些措施即包含食源性病原體的監測。在國內，衛福部疾病管制署（疾管署）與食品藥物管制署（食藥署）和農委會動植物防疫檢疫局（防檢局）曾共同執行一個跨機關的四年期研究計畫—「整合與提升我國食媒性疾病及其病原監測防護網計畫(2014-2017)」，2018 年疾管署亦將李斯特菌症列入我國法定傳染病，強化對此高致死率疾病的監控；2018 年全國共發生 168 例李斯特菌症病例、2019 年亦有 164 例。然而感染數量龐大的沙門氏菌症與曲狀桿菌症尚未列入法定傳染病，無法經由全國性的通報掌握流行趨勢與病例數量。

至於常見之腹瀉病毒，如諾羅病毒及輪狀病毒，雖然並無明顯的人畜間直接傳播現象，但是研究顯示腹瀉病毒為潛在性人畜共通疾病 (Wilhelm *et al.*, 2015)。以輪狀病毒為例，近年來各國文獻報告中持續出現跨物種傳播及基因重組的證據 (Martella *et al.*, 2010)，如在 2009 年匈牙利的研究中，感染輪狀病毒小孩糞便中分別分離出與牛、豬、貓、馬

和兔之輪狀病毒株有高度相似性的病毒株(Bányai *et al.*, 2009)；台灣的孩童監測中也檢測到類似人-豬重組輪狀病毒株感染的病例(Hwang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2017)。綜合上述的結果，腹瀉病毒在動物上可能同時發生人類與動物病毒株的交互感染，並產生新型具致病力的新病毒株，再透過肉、乳製品等作為食媒性病毒人畜共通的間接傳播來源。動物病毒若轉移至人體，可能會引致嚴重的疾病，例如之前的 H5N1 禽流感病毒及 SARS 冠狀病毒 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) 都造成人類疫情，近來之新型冠狀病毒 (SARS-CoV-2) 更已在全球造成超過 50 萬人死亡，且疫情仍在持續。為了瞭解腹瀉病毒於各種宿主間病毒型別的分布狀況，掌握病毒之變異狀況與分析新重組病毒株的型別變化可能的來源，有必要持續監測腹瀉病毒於人類與非人類動物宿主中之型別與基因資料。

有關人畜共通疾病之監測，在歐盟已依據 2003/99/EC 指令對人畜共通傳染病及其病原持續進行監測，會員國需將下列 8 種人畜共通傳染病在動物、飼料、食品及人類之發生資料及抗藥性資料通報至歐洲食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA)：布氏桿菌病 (brucellosis)、曲狀桿菌症 (campylobacteriosis)、胞蟲症 (echinococcosis)、李斯特菌症 (listeriosis)、沙門氏菌感染症 (salmonellosis)、旋毛蟲感染症

(trichinellosis)、結核病(tuberculosis)以及產志賀毒素大腸桿菌(shigatoxin-producing *E. coli*, STEC)感染症，以判定人畜共通傳染病之來源及趨勢。歐盟之間測結果每年均由歐洲食品安全局(EFSA)和歐洲疾病預防控制中心(ECDC)聯合發佈調查報告，報告顯示由肉類和其他受污染動物性食品傳播的病原體導致食品安全領域持續面臨挑戰(EFSA & ECDC, 2019)。根據2018年之監測結果，人類通報病例數最高的人畜共通傳染病為曲狀桿菌症(246,571例)，而排名第二的是沙門氏菌感染症(91,857例)。在農產品之檢測結果顯示，曲狀桿菌在雞肉的陽性率高達37.5%、在豬肉中的陽性率也有5.8%，而沙門氏菌在雞肉的陽性率為7.15%、豬肉的陽性率為1.58%。動物之監測結果，曲狀桿菌在肉雞的陽性率為26.0%、豬的陽性率為2.0%，而沙門氏菌在產蛋雞場的陽性率為4.0%、豬的陽性率為41.26%。

目前在台灣對於食源性人畜共通傳染病之監測，並無長期系統性之監測資料。人類病例部分，目前僅針對腹瀉群聚之通報個案，進行沙門氏菌及腸道出血性大腸桿菌之檢測，但對於曲狀桿菌並未常態性進行檢測。而相關病原在食品及動物之感染現況與流行趨勢亦有待釐清，故本計畫擬完成人畜共通腹瀉病原之感染現況與流行趨勢調查，此外並進行動物及人類腹瀉病毒病原之基因型別親緣分析及進行新興/再浮現腹瀉

病原調查，以評估腹瀉病毒病原在國內造成人畜傳染流行的可能性。

2. 食源性人畜共通傳染病之菌株比對與溯源調查

人畜共通食媒性疾病的防治，需上、中、下游的農畜、食品與人之管理與防疫機關共同合作，結合上、中、下游機關共同監測，以即時掌握疾病流行的走向，更重要是如此可提升釐清追查感染來源的機會。要釐清追溯感染來源，必需進行病原菌株之分型比對。在細菌病原菌株比對上，過去美國與歐盟等先進國家共同使用脈衝電泳法（pulsed-field gel electrophoresis, PFGE），產生菌株 PFGE 圖譜，再使用 BioNumerics 軟體分析圖譜，可進行跨實驗室的菌株 PFGE 圖譜比對，因此得以成立跨國的食媒性病原分子分型監測組織—PulseNet International (Nadon et al., 2017)，共同監測分享食媒性疾病群聚感染事件之菌株資訊。隨著次世代定序技術（next generation sequencing, NGS）的發展，細菌全基因組序列基因分型（whole-genome sequence based genotyping）已逐漸取代 PFGE，成為國際公衛實驗室分析比對細菌株的標準基因分型工具。

應用全基因體定序方法比對細菌株，在序列分析方面，經過十多年來的研發與實際應用的驗證，在跨實驗室比對的需求下，core genome multilocus sequencing typing（cgMLST）已被認為優於 whole-genome single nucleotide polymorphism（wgSNP）；然而，cgMLST 的應用，目前

仍存在三角習題(Uelze *et al.*, 2020)，即 1) 必需使用共同的 allele database 來產生 cgMLST 基因指紋，方能跨實驗室間相互比對；2) 新的 alleles 無法即時入庫更新，因此無法即時反應在該菌株之 cgMLST 基因指紋上；3) 批次更新 allele database 後，相同菌株使用前後 allele database 版本產生的 cgMLST profiles 可能會有所差異。本實驗室已投入 6 年時間發展 cgMLST 技術(Liu, Chen, *et al.*, 2016; Liu, Chiou, *et al.*, 2016)，近年又使用一套定義 alleles 的方法，可解決目前 cgMLST 應用上的三角習題。

本實驗室執行 2014-2017 年跨機關「整合與提升我國食媒性疾病及其病原監測防護網計畫」時，透過三方組成的「計畫專案經理人」制度，共同協商建立了跨機關的「沙門氏菌 PFGE 圖譜資料庫」，存放三個機關分離株的 PFGE 圖譜與其相關的資料 (metadata)，並簽訂三方使用資料庫的規範合約。然而，該資料庫仍需透過 BioNumerics 軟體讀取與分析圖譜，三方需有熟悉 BioNumerics 軟體的技術人員方能使用，因此成效不彰。2014-2017 年的跨機關計畫執行完畢後，三方機關認同並保留「專案經理人」工作小組的運作，加上 GHSA 第二期計畫被核准執行，因此規劃利用 GHSA 二期的機會，建立網路平台。該網路平台底層的核心工具(prodigal, prokka, roary, BLAST)皆是開源軟體，然而仍需自行開發程式軟體、串聯開源軟體，方能符合我們的需求。提供 cgMLST allele database 與 cgMLST

profiling 工具，讓農衛雙方實驗室可透過網路產生菌株之 cgMLST profiles、比對蒐尋菌株 cgMLST profiles 資料庫內遺傳關係最相近之菌株，與安裝工具讓使用者可上傳 cgMLST profiles 產生菌株親緣關係圖等。如此，農衛雙方能共同維護菌株之 cgMLST profiles 資料庫，也能便捷使用網路平台工具與資料庫，提升跨機關間之溝通與合作。

建立此網路平台，除了提供國內參與機關間的運用，在農衛雙方同意下，也可規劃開放供國內學術界與利益相關人士使用；而此計畫建立之成果，將是和歐美等國跨域合作的基礎。目前歐、美、加拿大等國家都正積極建立使用全基因組序列進行菌株分型的量能，和標準化跨實驗室間比對菌株圖譜（cgMLST）的工作；國內若能儘快建立跨實驗室比對菌株基因型別的能力與團隊，將能提供有利條件，與這些國家合組食媒性疾病的監測防疫團隊（就如之前的 PulseNet International），與提升台灣的防疫能力與國際形象。

本計畫預定建立一個網路資料庫平台，供機關上傳菌株基因組序列以產生 cgMLST 基因指紋，上傳菌株相關 metadata 資料，以產生一個包括 cgMLST 基因指紋的共同資料庫，且自 NCBI 資料庫下載各方存放之菌株基因組序列，轉成 cgMLST 基因指紋，如此透過網路就可以和國內跨機關的菌株與 NCBI 的菌株比對 cgMLST 基因指紋，追查親緣性最接近的菌

株，進行菌株溯源 (strain tracking) 的調查。預計分年優先完成沙門氏菌、曲狀桿菌及李斯特菌的菌株 cgMLST 指紋圖譜資料庫與網路平台。(目前雖無跨機關共同執行之計畫，然而為推動本研究計畫，過去衛福部疾病管制署(疾管署)與食品藥物管制署(食藥署)和農委會動植物防疫檢疫局(防檢局)曾共同執行一個跨機關的四年期研究計畫—「整合與提升我國食媒性疾病及其病原監測防護網計畫(2014-2017)」並持續每四個月召開一次「食媒計畫專案經理人」工作小組之運作，該「食媒計畫專案經理人工作小組」在計畫結束後仍維持運作，定期召開會議，協調、分享三個機關在食媒疾病的最新作為與資料。在2020年6月30日，會議中做成決議：食藥署與防檢局將提供疾管署最近分離之李斯特菌菌株，以供進行全基因組定序分析，比對人、畜、食品分離株間之遺傳親緣關係，為三方機關在食媒病原菌株分析、比對與建立共同基因資料庫之合作，進行先導研究。

二、方法

本計畫為四年期計畫，第一年度計畫重點在於進行人類腹瀉群聚檢體及比對農方監測之動物人畜共通腹瀉病原相關資料，以釐清人畜共通腹瀉病原之感染現況與流行趨勢，並訂定農衛雙方菌株基因圖譜比對之網路平台架構及進行李斯特菌菌株之全基因組定序。

1 人畜共通腹瀉病原之監測調查

1.1 檢體收集及來源

人類腹瀉群聚檢體之來源為腹瀉群聚通報案件之糞便檢體或糞便細菌拭子。動物檢體則請農方單位協助收集。

1.2 糞便檢體及糞便細菌拭子處理

糞便細菌拭子依下述方法進行細菌病原體分離鑑定。糞便檢體則以約 1:10 之比例加入 PBS 強力震盪成懸浮液後，進行核酸萃取，以便進行後續之腹瀉病原核酸檢測。

1.3 核酸萃取

取糞便懸浮液，使用 Qiagen 核酸萃取套組純化細菌及病毒核酸，置於-80°C 待用。

1.4 腹瀉病原核酸檢測

1.4.1 反轉錄 cDNA 合成

病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板，加入 1 μ L 10 μ M 隨機引子及 2 μ L 20mM dNTP 於 70 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘後，馬上將反應管置於冰上 1 分鐘後；再加入單管 RT 混合液，內含 200U 反轉錄酵素 (Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase Cat. No. 18080-085)、20U RNase 抑制劑及含 50 mM Tris-HCl、75mM KCl、3 mM MgCl₂、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液，反應總體積為 20 μ L。於 25 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘，50 $^{\circ}$ C 50 分鐘反轉錄作用，之後 85 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘。反應結束後 cDNA 可以保存於-80 $^{\circ}$ C 當中。

1.4.2 定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time PCR)

配置總體積 20 μ L 的 PCR 的混合物包含 1 倍的 premix，0.5 μ M of primers，0.5 μ M 的探針及 1ng DNA 模板。在即時定量循環偵測系統 (Bio-Rad multicolor real-time PCR detection system /ABI 7500 FAST) 進行 35 個熱循環:包括 denaturation 95 $^{\circ}$ C 45 秒、annealing 57 $^{\circ}$ C 45 秒、extension 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，最後 extension 72 $^{\circ}$ C 7 分鐘。各病原及其對應之 primers 序列如下表：

病原	基因	序列
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	For : 5'- TCGGGCAATTCGTTATTGG -3'
		Rev : 5'- GATAAACTGGACCACGGTGACA -3'
<i>Campylobacter</i> <i>jejuni</i>	<i>cadF</i>	For : 5'- CTGCTAAACCATAGAAATAAAAATTTCTCAC -3'
		Rev : 5'- CTTTGAAGGTAATTTAGATATGGATAATCG -3'
STEC	<i>stx1</i>	For : 5'- ACTTCTCGACTGCAAAGACGTATG -3'
		Rev : 5'- ACAAATTATCCCCTGWGCCACTATC -3'
	<i>stx2</i>	For : 5'- CCACATCGGTGTCTGTTATTAACC -3'
		Rev : 5'- GGTCAAAACGCGCCTGATAG -3'
		Rev : 5'- TCGACGCCATCTTCATTCACA -3'
		Rev : 5'- TCGACGCCATCTTCATTCACA -3'
Rotavirus	<i>NSP3</i>	For : 5'- ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG -3'
		Rev : 5'- GGTCACATAACGCCCTATAGC -3'

1.4.3 病毒基因庫分析比對

將定序後之核酸序列與 NCBI 基因資料庫已知之基因序列進行比對分析，以確定病毒型別及序列宿主來源相關性。

1.5 細菌病原體分離鑑定

1.5.1 沙門氏菌

將糞便懸浮液或糞便細菌拭子接種於 SS 或 HE 培養基，37°C

培養 18~24 小時後，挑選無色半透明或具有黑色中心可疑菌落，使用接種針以穿刺劃線法接種於 TSIA、LIA 和 SIM 培養基上，37°C 培養 18~24 小時，觀察其生化反應特性。生化反應符合沙門氏菌或傷寒副傷寒桿菌者，先以 poly O 群抗血清進行凝集試驗，如果反應陽性再以個別單一價型 O 型抗血清分別試驗。傷寒疑似菌株(O9 陽性)另需進行 Vi 抗血清的測試。

1.5.2 出血性大腸桿菌

將糞便懸浮液或糞便細菌拭子接種於 SMAC 或 CHROM-STECC 培養基培養基上，置於 37°C 培養 18~20 小時後，挑選可疑菌落次接種於 TSIA、LIA、SIM 培養基上，37°C 培養 18~20 小時，觀察其生化反應特性。生化反應符合出血性大腸桿菌之菌落，進行毒素基因鑑定，以及 O 抗原及 H 抗原血清型別鑑定。

1.5.3 曲狀桿菌

檢體塗於 Campy agar，在微需養環境 (O₂ 含量 6~12%，CO₂ 含量 5~8%) 42°C 培養箱培養 48 小時，選取灰色有光澤，看起來像水滴之菌落以 PCR 鑑定 23 rRNA 基因，若被增幅出一段 650 bp 大小的片斷，則為 *Campylobacter* spp.。

2 菌株比對網路平台建立

(1) 建立菌株比對網路平台

- i. 建構 web-service 平台：委由嘉因資訊公司承包，以現有之 cgMLST@Taiwan (<http://rdvd.cdc.gov.tw/cgMLST/>)平台為基礎，提升與優化網路架構。
- ii. 開發軟體程式：透過與台大林詩舜教授團隊協助共同開發軟體程，建立自動化分析流程，以便可以自動從 NCBI 下載並分析基因組。

(2) *L. monocytogenes* 菌株之全基因組定序

利用 NGS 完成防檢局 33 株與食藥署 6 株 *L. monocytogenes* 菌株之全基因組定序分析。

(3) 訂定農衛雙方菌株 metadata 資料架構

於 6 月份以視訊的方式召開農衛雙方之「專案經理人」會議，會中討論了防檢局、食藥署與疾管署三方菌株附帶資料(metadata)的資料格式架構，以制定日後上傳菌株附帶資料之格式與資料庫 metadata 資料欄位之架構待建立菌株全基因組序列比對網路平台之後，利用食藥署與防檢局提供之李斯特菌菌株進行李斯特菌之比對網路平台之測試，並將全基因組定序將 NCBI 資料庫約 2 萬筆菌株基因組序列，轉成 cgMLST 基因指紋。

三、 結果

(一) 人畜共通腹瀉病原之感染現況與流行趨勢監測

1. 收集並分析我國2018至2021年諾羅病毒變異趨勢，並挑選各年度諾羅病毒檢體進行基因型別流行分析。整理歷年檢驗結果，根據諾羅病毒趨勢流行監測情形(如圖一)，由圖一可知，自2020年6月7日起，因國內疫情趨緩，社會回歸正常運作後出現報復性旅遊及國人防疫警覺降低，導致諾羅病毒檢出率大幅提升，其中諾羅病毒陽性率主要聚集出現在2020年底至2021年初為主，另自2021年5月19日至7月26日提升全國疫情警戒升至第3級緣故，檢出陽性比例則呈現下降趨緩情形，而2021年9月後的陽性率又再出現明顯增幅。
2. 進一步分析比對歷年流行趨勢，由圖二可知，2018~2021年諾羅病毒GI型、GII型檢出比例情形可發現近期GI.6感染群聚數出現上升趨勢。根據2021年諾羅病毒GI型別及GII分析流行株趨勢(GI：圖三A，GII：圖三B)。由圖三A可知，諾羅病毒GI型別，主要流行株為GI.6，佔比約42%，其次為GI.5(23%)及GI.4(21%)，GII主要流行株以GII.4為主，佔比約31%，其次為GII.2(26%)、GII.17(22%)及GII.3(13%)。因此，為瞭解腹瀉病毒於各種宿主

間病毒型別的傳播情況，以掌握病毒之變異狀況與分析新重組病毒株的型別可能的變異來源，仍須持續監測腹瀉病毒於人類與非人類動物宿主中之流行型別與基因序列資料。

3. 由於病毒的高變異性，並且，諾羅病毒、輪狀病毒與沙波病毒已知可在人類與其他動物體內存活，有可能成為人畜共通病毒（zoonotic virus）。以諾羅病毒為例，先前的文獻報告指出，在自然感染的豬隻檢測到GII基因群的諾羅病毒(GII.11、GII.18與GII.19)，但是豬隻與人類感染的病毒是屬於GII 基因群中的不同基因分群，發現感染人之GII-2、4，其中GII-4是全球群聚感染事件中，仍是主要引起流行的病毒基因型別之一。

(二) 建立菌株比對網路平台

以現有之 cgMLST@Taiwan (<http://rdvd.cdc.gov.tw/cgMLST/>)平台為基礎，提升與優化網路架構，建立菌株全基因組序列比對網路平台。本實驗室之菌株全基因組序列比對網路平台(cgMLST@Taiwan)合併於本署其他科室的”基因資料庫管理應用系統”網路平台項下，已接近開發完成階段，預計於12月可以進行測試機驗證。

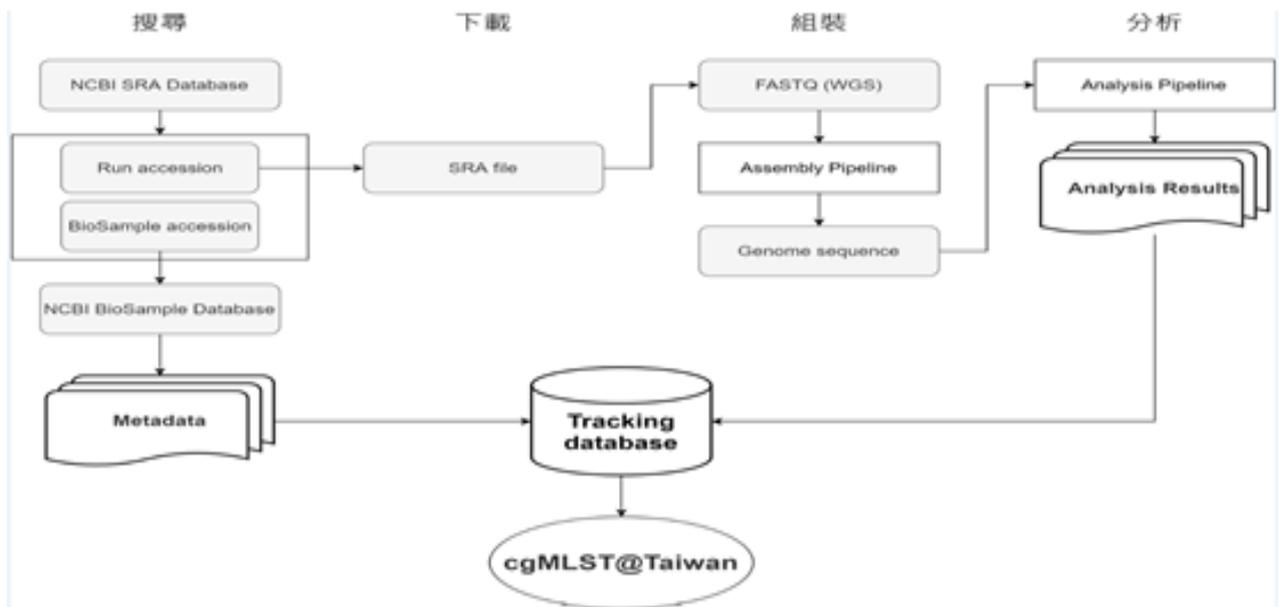


今年度菌株全基因組序列比對網路平台提升與優化功能，分別為：

1. About、物種學名選單：描述該物種資料庫的概要與相關資料下載
2. cgMLST profiling：將病原菌基因組序列轉換為 cgMLST 基因指紋
3. Strain tracking：
 - 1)開發軟體以自動從 NCBI 下載資料庫內之菌株基因體序列，並擷取菌株相關資料(菌株編號、分離時間、地點、寄主來源、等)，產生菌株之 cgMLST 圖譜、抗藥基因、傳統 ST 基因型別、質體型別、…等之資料，建立該菌種之 cgMLST 基因指紋；2)建立網頁功能，提供可網路查尋、下載 cgMLST 資料庫之功能；3)優化可上傳 cgMLST 基因指紋檔案，以便快速進行與資料庫中 cgMLST 基因指紋比對之軟體工具，進行菌株之全球溯源追蹤。
4. Clustering：將 cgMLST 基因指紋之比較結果繪製成樹狀圖。

(三) 開發軟體程式(台大林詩舜教授團隊協助開發)：

上述 3.1 之軟體程式開發工具，是與台大生物科技研究所林詩舜教授團隊合作。林教授團隊協助開發軟體程式，建立自動化分析流程(如下圖)，以供自動從 NCBI 下載並分析基因組，取得菌株相關資料(ID, year-isolation, country-location, host, etc.)、序列組裝、序列分析(ST、ID-species, plasmid_Inc、ARM genes, etc.)、cgMLST profiling，目前進度已完成下載、組裝與分析的部分，預計可達成目標。



(四) *L. monocytogenes* 菌株之全基因組定序

已經完成防檢局 33 株與食藥署 6 株 *L. monocytogenes* 菌株之全基因組定序分析，提升與優化網路架構之菌株比對網路平台即將於 11 月底完成，接續立即將防檢局與食藥署提供之 *L. monocytogenes* 菌株進行全基因組定序比對，做為三方使用網路平台之測試資料。

(五) 訂定農衛雙方菌株 metadata 資料架構

於 6 月份以視訊的方式召開農衛雙方之「專案經理人」會議，會議中討論並確認了防檢局、食藥署與疾管署三方菌株附帶資料(metadata)的資料格式架構(附件)。

附件：Metadata 資料架構

欄位名稱	欄位說明
DNA_Accession	唯一識別編號(Key)
Bioproject_accession	bioproject
BioSample	樣本相關資料
*Attribute_package	臨床或環境檢體
*Organism	生物分類之物種
Isolate	採集到的樣本
Strain	isolate 分析後之結果具有同一個屬性者為同一個 strain
*Collected_by	收集樣本的單位或組織
*Collection_date	年
*Geo_loc_name	國家
*Isolation_source	檢體種類
Host	性別, 年齡
特殊毒力因子	食藥署建議新增
備註	食藥署建議新增

四、討論

(一) 因 2021 年上半年度國內新冠疫情趨緩，國人防疫警戒心降低加上報復性出遊，導致腹瀉群聚通報增加，諾羅病毒檢出率大幅提升；而下半年度因疫情警戒再度提升至三級，腹瀉群聚通報量下降，諾羅病毒檢出率亦大幅降低，且流行型別相較過往有些許差

異，其中以 GI 型別來看，近幾年主流型別為 GI.3，然而今年(2021 年)則改以 GI.6 及 GI.5 流行為主；GII 型別為本國好發病原，其中尤以 GII.2 為主要流行株，今年則主要以 GII.4 為主。

- (二) 2019 年至 2021 年諾羅 GI 型別檢出比例，由圖二可知，進一步分析比對歷年流行趨勢，可觀察到近期 GI.6 感染群聚數開始出現上升趨勢有逐年升高之趨勢。
- (三) 分析本國流行諾羅病毒主型別(GI/GII)，顯示每年流行各子型別有不同之差異(2021 年 GI 主要以 GI.6 為主，其次為 GI.5 及 GI.4；GII 則主要以 GII.4 為主，其次為 GII.2、GII.17 及 GII.3)。
- (四) 由於新一代的 NGS 定序的成本經過這幾年來的發展已經大幅降低了，因此對於菌株可以進行大數據的研究分析，其技術已迅速成為進行菌株和疫情分析溯源的重要工具。cgMLST 的目的是為了將 MLST 的差異性與 WGS 的廣泛遺傳數據相結合，利用整個菌株基因組的數千個基因進行多項研究和監測分析，以便提供最大辨識度是本研究計劃的最大優勢。

五、 結論與建議

- (一) 近期因新冠疫情趨緩，國內旅遊趨盛，腹瀉事件有提升趨勢，除宣導國人注意個人衛生外，提升檢驗實驗室檢驗量能亦為改進重點。台灣尚無長期系統性之監測資料，透過本計畫建立之監測模式，釐清腹瀉病原之感染現況與傳播方式，可發揮疫情防治作用，提供快速準確的病源資訊供疫調單位參考。
- (二) 在疫情爆發的情況下，對病原體進行快速、準確和標準化的分類與辨識至關重要。自 MLST 技術開發出來之後，MLST 已成為基因序列的標準程序，因為具有獨特的的辨識能力。藉由這幾年的經驗為基礎，利用 NGS 分析數千個基因，大大增加了其辨識能力，進而協助疫情調查。另建立 cgMLST 資料庫需要廣泛之基因多樣性，避免部分類別之病原菌無法精確分析導致分析結果出現誤差或誤判。

六、計畫重要研究成果及具體建議

- (一) 諾羅病毒近年持續在我國引發群聚事件，流行的基因型別各年不同，顯示各型別諾羅病毒在我國已本土化，且病毒隨時間不斷演變造成差異。諾羅病毒的易傳播性與高度變異性，在國際間常造成大型群聚感染，在有效疫苗上市且具規模施打之前，仍需持續監控並分析其變異，即時偵測及透過監測防疫網之建立，以避免因食源性人畜共通腹瀉病毒可能造成的經濟與健康危害，確保本國國民之健康安全。
- (二) 透過網路即可產生菌株的 cgMLST 基因指紋，同時將本土菌株與 NCBI 菌株轉成 cgMLST profiles，將這些 cgMLST profiles 安裝於網路上，可以提供使用者上網快速比對其菌株與 cgMLST profile database 上菌株（本土與 NCBI 資料庫內來自各國的菌株），找出最近親緣關係的菌株，以進行相關研究之調查。

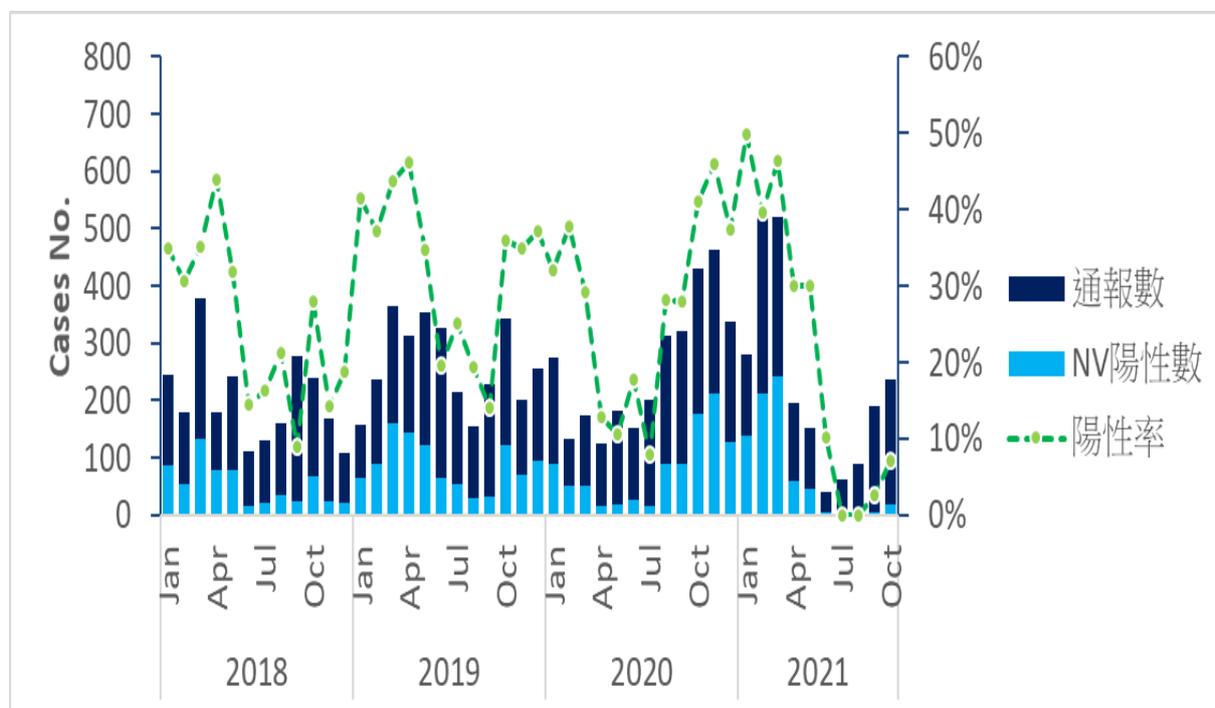
七、 參考文獻

- Bányai, K., Bogdán, Á., Domonkos, G., Kisfali, P., Molnár, P., Tóth, A., Melegh, B., Martella, V., Gentsch, J. R., & Szúcs, G. (2009). Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003–2006, Hungary. *Journal of Medical Virology*, 81(2), 362–370. <https://doi.org/10.1002/jmv.21375>
- EFSA, & ECDC. (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. European Food Safety Authority, 17(12), e05926. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- Hwang, K.-P., Wu, F.-T., Bányai, K., Wu, H.-S., Yang, D. C.-F., Huang, Y.-C., Lin, J.-S., Hsiung, C. A., Huang, J. C., Jiang, B., & Gentsch, J. R. (2012). Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt 7), 990–997. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.042499-0>
- Liu, Y.-Y., Chen, C.-C., & Chiou, C.-S. (2016). Construction of a Pan-Genome Allele Database of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis for Molecular Subtyping and Disease Cluster Identification. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02010>
- Liu, Y.-Y., Chiou, C.-S., & Chen, C.-C. (2016). PGADB-builder: A web service tool for creating pan-genome allele database for molecular fine typing. *Scientific Reports*, 6(1), 36213. <https://doi.org/10.1038/srep36213>
- Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., & Ciarlet, M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.028>
- Nadon, C., Van Walle, I., Gerner-Smidt, P., Campos, J., Chinen, I., Concepcion-Acevedo, J., Gilpin, B., Smith, A. M., Man Kam, K., Perez, E., Trees, E., Kubota, K., Takkinen, J., Nielsen, E. M., Carleton, H., & FWD-NEXT Expert Panel. (2017). PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. *Euro Surveill: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 22(23). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.23.30544>
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.p11101>
- Troeger, C., Blacker, B. F., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, S., Zimsen, S. R., Albertson, S. B., Stanaway, J. D., Deshpande, A., Abebe, Z., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Asgedom, S. W., Anteneh, Z. A., Antonio, C. A. T., Aremu, O., Asfaw, E. T., Atey, T. M., Atique, S., ... Reiner, R. C. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity,

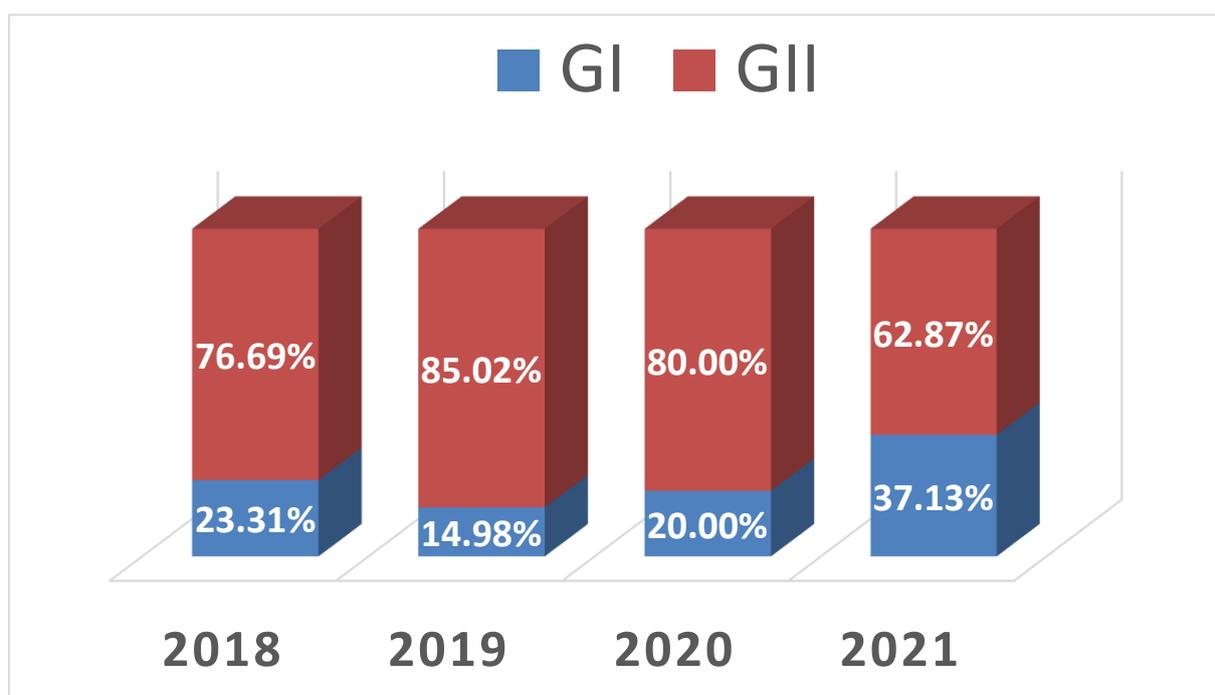
- mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11), 1211–1228. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1)
- Uelze, L., Grützkke, J., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Juraschek, K., Deneke, C., Tausch, S. H., & Malorny, B. (2020). Typing methods based on whole genome sequencing data. *One Health Outlook*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s42522-020-0010-1>
- Wilhelm, B., Waddell, L., Greig, J., Rajić, A., Houde, A., & McEwen, S. A. (2015). A scoping review of the evidence for public health risks of three emerging potentially zoonotic viruses: Hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus. *Preventive Veterinary Medicine*, 119(1–2), 61–79. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.015>
- World Health Organization. (n.d.). WHO | WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. World Health Organization. Retrieved July 27, 2020, from http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/
- Wu, F.-T., Bányai, K., Jiang, B., Liu, L. T.-C., Marton, S., Huang, Y.-C., Huang, L.-M., Liao, M.-H., & Hsiung, C. A. (2017). Novel G9 rotavirus strains co-circulate in children and pigs, Taiwan. *Scientific Reports*, 7, 40731. <https://doi.org/10.1038/srep40731>
- 熊昭 (2017)。腹瀉病原監測與食媒相關性分析。衛生福利部疾病管制署委託之專題研究成果報告 (報告編號：MOHW106-CDC-C-114-133302)。

八、圖表

圖一、諾羅病毒監測(2018~2021)



圖二、2018至2021年本國諾羅病毒GI型別、GII型別檢出比例。

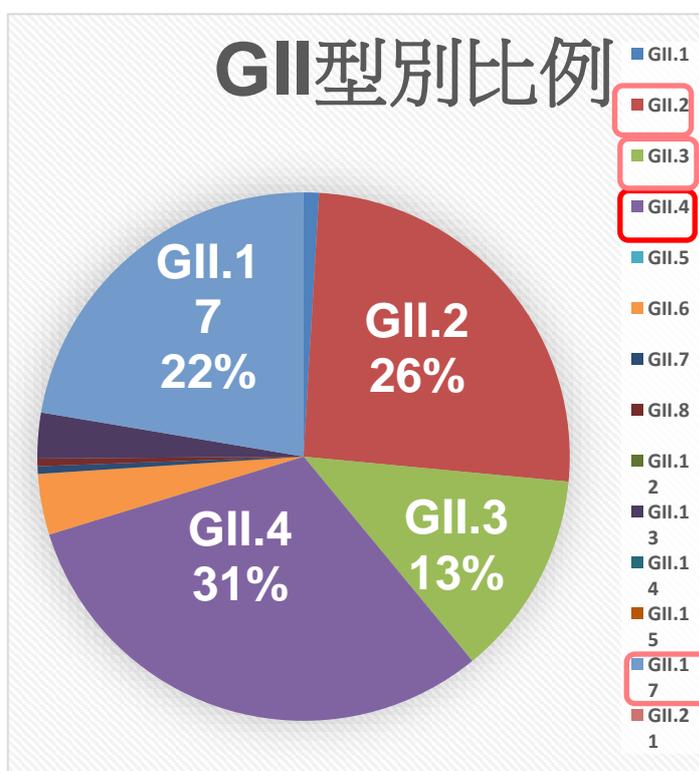


圖三、2021年本國諾羅病毒GI型別(A)、GII型別(B)檢出型別比例。

(A)



(B)



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：食源性人畜共通腹瀉傳染病之精準監測與病原比對網路平台

計畫主持人：林智暉

填報日期：110.12.23

*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，方法可行。	感謝委員肯定。	
2	可做為公共衛生預防及介入之參考。	感謝委員建議。本計畫建立之監測模式，釐清腹瀉病原之感染現況與傳播方式，可發揮疫情防治作用，並提供快速準確的病源資訊供疫調單位參考。	
3	檢驗方法更新及符合世界趨勢，與國際接軌。	感謝委員肯定。	
4	需跨部門合作，利用監測結果以促進國內食源病毒防治。	感謝委員意見。將持續進行農衛雙方的跨部門合作，並互享監測成果以促進國內食源病毒防治。	

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。