

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-122415

衛生福利部疾病管制署 109 年科技研究計畫

計畫名稱：

李斯特菌症監測防治-建立實驗室檢驗與菌株分析量能

109 年度研究成果報告

執行機關：疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：邱乾順研究員

研究人員：劉儼毅、洪羽屏、張瑞顯、廖盈淑

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，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意\*

## 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	(5-7)	
二、材料與方法	(8-11)	
三、結果	(12-29)	
四、討論	(30-34)	
五、結論與建議	(35-36)	
六、參考文獻	(37-39)	
七、政府研究計畫(期末報告)摘要資料表(GRB)	(40)	
八、期末審查意見回復	(41-42)	
九、計畫重要研究成果及具體建議	(43)	

計 43 頁

## 摘要

2018年1月李斯特菌症正式列入我國法定傳染病，以強化疾病之監測與防治；2018年全年總計有168例確定病例(25%死亡)，發生率為0.72例/每10萬人；高於美國的發生率(0.26例/每10萬人)與死亡率(15.9%)，急需強化疾病之監測與防治。本研究分兩年1)建立環境檢體採檢、檢驗流程與序列分析方法之標準操作流程，供後續進行檢驗環境檢體與菌株之基因指紋比對；2)建立跨機關李斯特菌病原體資料分析機制，提供不同機關能相互比對菌株基因指紋、評估菌株間親緣關係、追溯菌株來源(strain tracking)；3)建立跨機關共同李斯特菌全基因資料庫：集中跨機關菌株資料，包括基因指紋(cgMLST profiles)、人口學與流行病學資料，讓跨機關有關人員方便取得李斯特菌病原菌株之相關資料，使跨機關資料能共有共享，提升資料應用價值；4)檢驗2019–2020年針對病例追蹤所採檢之檢體。5)進行市售生肉李斯特菌污染率調查，追溯感人國人之李斯特菌來源；本年度完成150件進口牛肉檢驗，菌株cgMLST基因指紋比對，推論進口牛肉應在國內分切銷售過程中被李斯特菌污染。

## 關鍵詞

人畜共通病原、食媒性病原、次世代定序、全基因體定序、院內感染病原

## Abstract

Listeriosis has been announced to be a notifiable disease in Taiwan since January 2018 for strengthening the surveillance and control of the disease. In 2018, a total of 168 confirmed cases of listeriosis was reported to the Taiwan Centers for Disease Control (Taiwan CDC), Ministry of Health and Welfare, with an incidence rate of 0.72 cases/100,000 people and a 25% case-fatality rate. The incidence and case-fatality rate in Taiwan are higher than in the USA, in which the incidence and mortality are 0.26 cases/100,000 people and 15.9%, respectively. The listeriosis surveillance results urge relevant government authorities to discuss the strengthening of surveillance and control measures. In this project, we will aim 1) to establish the standard operating procedures for sampling of environmental specimens, *Listeria*-related testing, whole genome sequence bioinformatic analysis., 2) to build up a cross-laboratory data analysis mechanism for generating and comparing genetic fingerprints of the *Listeria monocytogenes* isolates and further for the global strain tracking; 3) to establish a common *L. monocytogenes* genetic fingerprint database, which contains strain genetic profiles, demographic data, and epidemiological data of domestic isolates, to allow staff of the 3 agencies easily to acquire the information of the pathogenic *L. monocytogenes* strains; 4) to examine the environmental specimens collected from 2019–2020 listeriosis patients' refrigerators; 5) to investigate the *L. monocytogenes* contamination on the retail meat for tracing the likely source of infection in Taiwan listeriosis cases. During this year, we examined 150 imported beef specimens. By comparing the cgMLST profiles of the isolates recovered from the beef specimens with those from listeriosis patients, chicken, and

porks and those from foreign countries, we speculate that the contamination of *L. monocytogenes* on the imported beef products occurred most likely during the processing of meat for retail sales in Taiwan.

keywords

*Listeria monocytogenes*, Listeriosis, Zoonotic pathogen, Foodborne pathogen, Next-generation sequencing (NGS), Whole-genome sequencing (WGS), Web-based service

## 一、前言

李斯特菌症(listeriosis)是人畜共通傳染病，造成動物與人類輕微腸胃炎或嚴重侵襲性感染，引發菌血症、腦炎、腦膜炎、孕婦流產或死胎等，孕婦、高齡者與免疫功能低下的人是李斯特菌症的高危險族群[1]。

*Listeria monocytogenes* 是李斯特菌症的病原菌，廣泛被分離自人、動植物、環境(如土壤、溪流)與食物(如牛奶、乳酪、生肉、海鮮、生菜)，生長溫度範圍為-1°C–45°C [2, 3]，即在冰箱冷藏的低溫環境仍能生長。李斯特菌症主要經由被病原體污染的食物傳播，潛伏期長[4-6]，發病率低[7]，大多以“散發性”病例的面貌出現，回溯追查病例間之流病關聯性與感染來源相當困難，然而國際間仍不時爆發大規模李斯特菌食品中毒案，例如 2011 年美國跨 28 州的哈密瓜李斯特菌中毒案，至 2012 年 8 月 27 日確認 147 病例，33 例死[8]；2017–2018 年(2017-1-1 至 2018-7-17)南非李斯特菌食品中毒案，有 1,060 病例，216 人死亡[9]；2018 年澳洲哈密瓜李斯特菌中毒案，有 19 確定病例，7 人死亡與 1 例流產[10]。

台灣至今尚未有確認的李斯特菌食品中毒案件，2018 年前也未有官方的病例統計，然而學術界研究調查指出，我國李斯特菌症患者有 26%–29%的死亡率[11-14]，衛福部疾病管制署(疾管署)建置之實驗室傳染病自動通報系統所收集之 109 例病例(2014 年 7 月至 2016 年 6 月)，有 21 人(19%)於 30 日內死亡[15]，然而此階段之資料不完整，無法計算李斯特菌症之年發生率。基於李斯特菌之高死亡率與估計國內每年至少有 100 例病例，因此公告將李斯特菌症自 2018 年 1 月 1 日開始列入第四類法定傳染病，以強化此疾病之監測與防治。李斯特菌症因列入法定傳染病，全國各醫療院所有義務通報李斯特菌病例與送交菌株至疾病管制署進行分析。2018 年全國通報實驗室確認的總數有 168 例病例，發生率為 0.72 例/100,000 人，在疾管署預防醫學辦公室完成流病調查之 103 病例中，有 26 例(25%)死亡；對照美國每年約有 800 例實驗室確認病例，發生率為 0.26 例/100,000 人，死亡率為 15.9 % [16]，台灣的李斯特菌症發生率與

死亡率皆高於美國。

台灣李斯特菌症高發生率與高死亡率，需相關機關強化疾病之監測與防治。2019年1月16日疾管署邀請食品藥物管理署(食藥署)與農委會動植物防疫檢疫局(農委會防檢局)，召開跨機關之「李斯特菌監測防治會議」，協商上中下游機關在疾病監測防治之分工與工作重點，其中規劃疾管署研檢中心負責之工作包括：1)採檢人員教育訓練，2)環境追蹤檢體檢驗，3)建立跨機關菌株比對機制。

李斯特菌普遍存在動植物與環境中，生鮮食品普遍受到污染[17]，感染潛伏期長達3-70天[4, 6]，發病率極低[7]，加上病例皆以“散發病例”方式出現，因此不易透過時空群聚資料，比對病例間之流病關聯性，追查到感染來源。國際上的普遍作法即調查病例之冰箱環境與食餘食品，分離菌株並比對人、環境與食品菌株基因型別，藉此追查可能的感染與污染食品來源[18]。

病原體的分離培養檢驗是流病溯源調查最基本的工作，檢體取樣之器材、取樣方法、檢體運送與實驗室檢驗方法，都會影響病原體之分離率；許多研究在病原體分離陽性率顯現很大差異，很可能是採樣與檢驗方法差異的結果[19, 20]。因此，本計畫必需先評估採檢器材、採檢方式、環境檢體病原體分離培養方法，訂定標準操作流程，且進行採檢人員的教育訓練。在菌株的比對上，需訂定機關間共同的基因分型方法與比對的標準操作程序，建立共同基因資料庫，讓參與的機關實驗室能輕易比對菌株遺傳關聯，和能即時取得菌株來源之人口學與流病學資料。

本研究第一年(2019年)將先進行1)環境檢體採檢方法之評估、標準方法之建立。將蒐尋學者發表之論文，比較病原體分離率高的研究所使用的採檢器材、採樣方法，進行實際之操作與評估，建立標準操作流程；2)評估現有之環境檢體檢驗方法之靈敏度，建立標準操作流程，做為2年研究期間與後續李斯特菌監測之標準檢驗方法；3)檢驗2019年度疑似個案相關的環境追蹤檢體。第二年(2020年)進行1)建立可供跨機關李斯特菌病原菌株基

因體序列資料分析機制，藉由產生菌株之基因指紋評估菌株間之親緣關係，並建立菌株追溯來源(strain tracking)的機制；2)建置跨機關李斯特菌基因體共同資料庫，收集包括菌株基因指紋、人口學與流行病學資料，讓跨機關有關人員方便取得病原體菌株之相關資料；3)檢驗 2020 年度疑似個案相關的环境追蹤檢體與 2020 年分離株之基因體定序。

分兩年建立李斯特菌(症)環境檢體採檢、檢驗流程、菌株基因指紋分析流程，並建立跨機關李斯特菌病原資料分析機制與共同病原體全基因體資料庫，提供不同機關團隊互相比對李斯特菌菌株基因指紋、評估菌株親緣關係，進行菌株的國內外溯源追蹤，並檢驗該年度(2018、2019 年)李斯特菌症患者追蹤採檢之環境檢體。

基於執行期程的限制，第一年(2019)將以建立採檢、檢驗標準方法與檢驗病例之環境追蹤檢體為主，第二年(2020)除了檢驗病例之環境追蹤檢體，將進行 2020 年分離菌株之基因體序列分析、建立跨機關比對菌株基因指紋的機制，並進行市售生肉李斯特菌調查與菌株比對。

**2020 年計畫之主要執行內容為：**

- 1. 建立跨機關李斯特菌病原體比對機制**
- 2. 建立跨機關李斯特菌病原基因體資料庫與病例分析：**
- 3. 建置「李斯特菌全球菌株 cgMLST profiles 大數據資料庫」**
- 4. 李斯特菌基因體定序**
- 5. 年度病例環境追蹤檢體之檢驗**
- 6. 環境食品檢體李斯特菌之檢驗與菌株比對**

## 二、材料與方法

### 1. 建立跨機關李斯特菌病原體比對機制

建立跨機關病原體比對機制的第一步就是要建立各方共同使用的菌株基因體比對方法，這個方法理想上能經由網路進行操作(一個讓使用者方便且願意使用的網站平台)。依據近幾年學界與公衛實驗室發表的研究論文，core gene multilocus sequencing typing, cgMLST 的分析方法，將會被標準化以產生可跨實驗室比對菌株全基因體序列基因指紋。本研究將導入本實驗室自行研發的 cgMLST 分型方法，做為跨機關李斯特菌比對機制的共同方法。相關的程式開發基礎則是利用之前所開發之工具「Pan-genome allele database (PGAdb) 建置程式」[21]以及「whole-genome multilocus sequence type (wgMLST) profiling 程式」[22]為基礎，開發 cgMLST profiling 核心運算程式。另外，應用之前所製作的程式與網站為 prototype，本計畫進一步將程式改寫成正式上線版本。

### 2. 建立跨機關李斯特菌病原基因體資料庫與病例分析:

#### 1) 跨部會協作

透過「食媒性疾病跨機關專案經理人平台」進行，以年度菌株分讓的方式進行合作，後續菌株的基因分型工作由本署辦理。

#### 2) 李斯特菌症病例菌株來源

為本署傳染病檢驗認可實驗室分離回送與本署檢驗及疫苗研製中心檢驗之李斯特菌確定病例菌株，以【確定病例發病日】為計算基準，自 2018 年 1 月 1 日至 2020 年 9 月 29 日止，總計收集有 442 株菌株。其中 2018 年有 168 株(佔確定病例數 100%)、2019 年有 163 株(佔確定病例數 99.4%)、2020 年目前【收集至發病日 9/29 的確定病例】計有 111 株(佔確定病例數 100%)。

### 3) 病例資料來源

李斯特菌症個案人口學資料來自本署【法定傳染病監視通報系統】，2018年確定病例有168例(167例為本土病例，境外移入病例為1例)，2019年確定病例有164例(163例為本土病例，境外移入病例為1例)，2020年至9月29日發病個案之確定病例統計有111例(皆為本土病例)，病例的【旅遊史登載定義】為自發病日往前推算一個月內是否具有國外旅遊史。本研究以實驗室收集之菌株為基礎，對應法定傳染病監視通報系統進行病例人口學及相關登錄資料的勾稽，進行實驗分析與流病資料比對。

### 4) PFGE 圖譜分析與資料庫比對

菌株依照疾病管制署之標準化 PFGE 操作流程(該方法參據美國疾病管制中心 PulseNet 實驗室之標準化 PFGE 操作方法所訂定)[23]，進行菌株之包埋、菌體溶解與膠體清洗。染色體 DNA 分別以 *Apal* 與 *Ascl* 酵素進行切割後進行膠體電泳分析，經 ethidium bromide 染色後拍照儲存為 TIFF 影像檔，以 BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Belgium) 圖譜分析軟體進行分析，並將菌株相關之人口學與疫情調查資料輸入本署之李斯特菌 DNA 指紋圖譜資料庫，以進行圖譜分析、遺傳關聯性比對。以 UPGMA 演算法搭配 Dice 相似性係數(Dice similarity coefficient) 以 1.5% optimization、0.75% tolerance 條件，建立菌株親緣關係樹狀圖。

### 5) 疑似菌株通報與監測

依據本署「加強李斯特菌監測防治行動方針」內容，依規劃之「疑似菌株操作型定義」進行圖譜分析結果通報，該定義為「4個月內出現2名(含)以上確定病例，且其菌株兩種 PFGE 圖譜型別皆相同者」。

### 3. 建置「李斯特菌全球菌株 cgMLST profiles 大數據資料庫」

我們從 NCBI SRA 資料庫下載 *L. monocytogenes* 全基因體(Illumina) raw reads 資料，20,000 餘筆(accessed: up to 2020.6)，經過汰選 (species identification by *fastANI* [24]、reads quality check by *seqkit* [25])。我們同時下載每筆資料的 metadata。進一步根據 metadata 完整度淘選，最後剩下約 14,000 筆資料。這些資料，利用本實驗室開發的 cgMLST profiling 程式，將全基因體 DNA 序列資料逐筆轉換成 cgMLST profile (基因指紋)，同時將整理後的 metadata 與依據基因體序列分析得到之資料，包括 NCBI accession number, Location\_country, Date\_year, Sequence type (ST), Resistance gene 等，寫入 NoSQL (MongoDB) 資料庫。因為考量跨機關李斯特菌病原基因體資料庫及全球菌株大數據資料庫的資料量可能會越來越大，有分散式搜尋的需求，所以採用 NoSQL 的資料庫進行儲存。

### 4. 李斯特菌基因體定序

使用 Illumina MiSeq 定序儀進行菌株之全基因體定序，每株菌株輸出量設定為>50 倍菌種基因體長度(coverage >50X)；使用軟體 FastQC 檢查原始短序列(raw reads)的整體定序品質，再使用軟體 Trimmomatic 清除品質不佳的原始短序列，最後使用組裝軟體 SPAdes [26]組裝成長片段序列(contigs)。

後續使用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 工具與已被定義的 MLST alleles 比對，若比對成功，可獲得該項菌株的 ST 型別(sequence types)與 CC 型別(clonal complexes)，若比對沒有結果，可能為新的 allele 或非李斯特菌，再將基因序列上傳給負責管理李斯特菌 MLST 的實驗室(<https://bigsd.b.pasteur.fr/listeria/listeria.html>)以獲得新的 ST 與 CC 型別。

cgMLST 型別(CT)的命名：使用 single linkage 演算法進行群組分析 (clustering analysis)，菌株落在差異小於或等於 5 個 loci (基因)一群組 (cluster)內，將被認定為相同 CT 型別，其它的各予一個 CT 型別編號。進行菌株 cgMLST profiles 比對時，若該指紋與資料庫之菌株差異小於或等於 5 個 loci 時，給予該菌株相同 CT 型別編號，若差異大於 5 個 loci 或以上，給予該菌株新的 CT 編號。

## 5. 年度病例環境追蹤檢體之檢驗

在基層衛生單位徵得疑似菌株來源個案的採檢同意下進行後續的冰箱環境檢體採檢，並依據 2019 年完成的實驗室標準操作手冊-「李斯特菌環境檢體檢驗操作程序 RDC-SOP-R3-E13」進行檢驗。

## 6. 環境食品檢體李斯特菌之檢驗與菌株比對

從市面上 3 家大型生鮮超市通路商分別採購 150 件進口牛肉檢體，進口國包括美國與澳洲。其中有 50 件牛肉檢體是真空包裝的大塊完整之牛排肉，其餘 100 件牛肉檢體是經國內廠商切片的一般保鮮膜包裝之火鍋牛肉片。分離之 *L. monocytogenes* 菌株進行全基因體定序，與之前國內由病人、雞、豬 *L. monocytogenes* 分離之菌株進行基因指紋比對，並與存放在 NCBI 資料庫的菌株進行比對，以探討菌株可能來源。

### 三、結果

#### 1. 建立跨機關李斯特菌病原體比對機制

為建立跨機關(跨實驗室)間菌株相互比對機制，使用本實驗室研發之 cgMLST scheme 產生菌株基因指紋(cgMLST profiles)。本實驗室開發之 cgMLST 分析方法，擁有 2,172 core genes，這些 core genes 係比對 181 株李斯特菌完整基因體序列上之基因，將出現在 92% (167/181) 或以上的基因體之基因定義為 core genes (可參考網頁 <http://rdvd.cdc.gov.tw/cgMLST/>)。在 cgMLST 型別(cgMLST type, CT) 的命名，係利用 single linkage 演算法與資料庫現有之 cgMLST profiles 進行群組分析(clustering analysis)，差距在 5 個 loci (genes) 以內，被認定為同一 CT 型別，差距超過 5 個 loci 者為新 CT 型別，在此標準下，同一 CT 型別菌株視為具相同全基因體序列基因型。

由於之前實驗室開發的程式與網站為 prototype，正式上線後須考量網站後續的維護與擴充，因此我們將原本的程式統一以 Python 程式語言改寫，並且以 Django 建立 MVC 網站架構，拆開前端服務與後端運算方便之後的維護。另外，我們也改進了原本 profiling 步驟中的 alleles 搜尋方式，由原本的文本搜尋改為資料庫搜尋(將 alleles 由存成文字檔改寫入資料庫 PostgreSQL)，大幅提升 profiling 的速度。而考量到未來使用網站的流量可能增大，我們運用 Celery 分散式排程系統來進行運算資源的妥善分配，避免因使用者同時上線而塞車。在“視覺為王”的時代，UI/UX 是目前的顯學，為了讓此跨機關的比對平台有更好的視覺化呈現效果及使用者體驗，我們採用 React JavaScript 函式庫來製作網站前端。綜合以上，我們開發了名為 **BENGA cgMLST@Taiwan** 的網站平台(<http://rdvd.cdc.gov.tw/cgMLST/>) (包含 *cgMLST profiling*, *Strain tracking*, *Clustering* 功能)，提供各實驗室上傳李斯特菌全基因體序列，以產生 cgMLST profiles，並與 NCBI 的李斯特菌株相互比對 cgMLST profiles 並進行親緣分析。相關人員只要將李斯特菌組裝好的

全基因體序列上傳至平台，即可進行即時比對。網站平台的介面如圖 1.1:

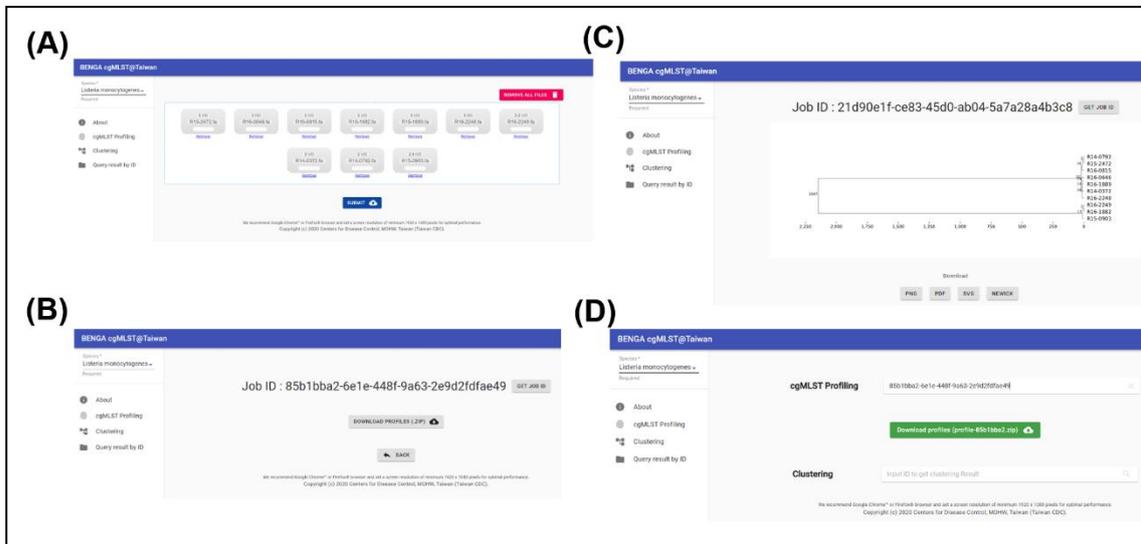


圖 1.1 : BENG A cgMLST@Taiwan 網站。A. 展示的是網站的 cgMLST profiling 上傳頁面。B. 呈現的是 cgMLST profiling 的結果頁。C. 展示利用 cgMLST profiles 進行 Clustering 功能的結果頁(以 dendrogram 方式呈現)。D. 呈現的是利用 JobID 查詢之前跑過的 profiling 以下載 profiles。

## 2. 建立跨機關李斯特菌病原基因體資料庫與病例分析

李斯特菌確定病例以發病日為計算基準，今(2020)年截至 9 月 29 日止新增有 111 株李斯特菌菌株，皆進行 PFGE 圖譜分析與資料庫比對，自李斯特菌症成為第四類法定傳染病開始的 3 年期間(2018~2020 年)總計收集有 442 株菌株，佔通報系統確定病例數的 99.77% (442/443)。這些菌株使用先前計畫與本計畫經費進行全基因體定序 (whole genome sequencing)，與法定傳染病系統之人口學資料結合，使用 BioNumerics 電腦套裝軟體(Applied Maths, Belgium)，建立可供永續進行菌株比對的李斯特菌基因指紋資料庫。

本實驗室依據本署「加強李斯特菌監測防治行動方針」內容，依規劃之「疑似群聚菌株操作型定義」進行圖譜分析結果通報，該定義為「4個月內出現2名(含)以上確定病例，且其菌株2種 PFGE 圖譜型別相同者」，無「地域」的界定。延續 2019 年已通報列管的 10 個疑似群聚菌株圖譜，本(2020)年度新增通報 7 個疑似群聚菌株圖譜，全計畫累計共通報 17 個疑似群聚菌株圖譜(表 2.1)，分析圖譜的年度與縣市分布如圖 2.1 所示，多數疑似群聚圖譜菌株於每年重覆出現。(註：由於 PFGE 圖譜之分型效力不如全基因體序列的分型方法，加上大多數歐美國家已全部使用全基因體定序的分型法分析菌株，因此 2021 年開始將放棄 PFGE，只做全基因體定序，再依所建立解讀標準，進行李斯特菌症的監測，且能與國際接軌，比對/交換國際李斯特菌流行菌株之基因指紋)。

表 2.1:李斯特菌疑似群聚感染(PFGE 圖譜相同)案件通報情形

疑似流水號	圖譜型別	通報年份
1	Lmp.030_Lmc.049	2019 年
2	Lmp.030_Lmc.006	
3	Lmp.009_Lmc.005	
4	Lmp.009_Lmc.006	
5	Lmp.009_Lmc.049	
6	Lmp.023_Lmc.011	
7	Lmp.002_Lmc.004	
8	Lmp.047_Lmc.003	
9	Lmp.118_Lmc.106	
10	Lmp.002_Lmc.003	
11	Lmp.047_Lmc.004	2020 年
12	Lmp.137_Lmc.025	
13	Lmp.004_Lmc.021	

14	Lmp.029_Lmc.110
15	Lmp.003_Lmc.083
16	Lmp.081_Lmc.008
17	Lmp.017_Lmc.013

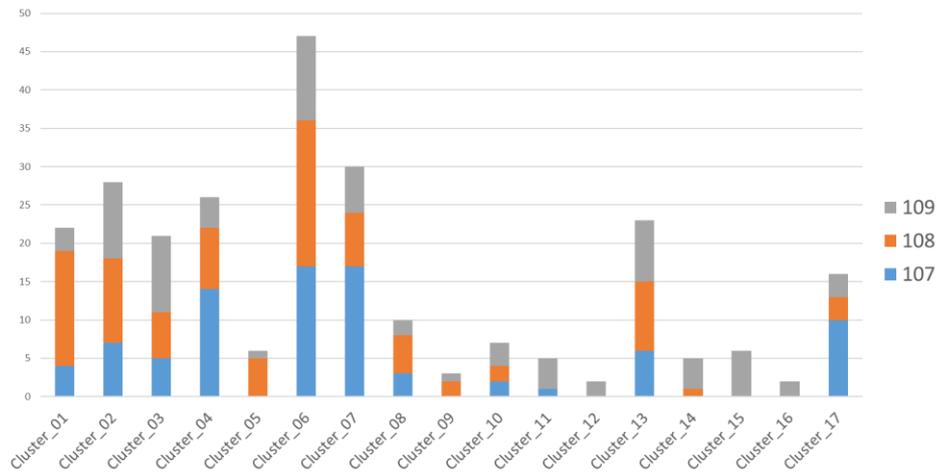


圖 2.1：疑似群聚圖譜年度分布圖

選取 2018~2020 年已收集的 442 株菌株病例資料進行分析，個案男女性別占比分別是男性 49.55 (N=219)與女性 50.45 (N=223)；個案年齡組距與性別比分布如圖 2.2 所示，流行趨勢以 55 歲以上的中高齡人口為主要流行族群。以病例發病月份進行分析，結果如圖 2.3 所示，其中於 2018 年前 2 個月，因在當年度始將李斯特菌症列為法定傳染病而開始有通報作業，故在通報執行初始可能有病例低報的情形發生，導致病例數明顯較低；2020 年則是因病例資料統計至 9 月底，故無後續第四季發生的趨勢資料，另 2020 年度遇有嚴重特殊傳染性肺炎的特殊因素影響，可能影響病例的發生。綜觀全年發病月份分布，雖有春夏季稍高的趨勢，但無明顯的季節差異變化。有關病例的症狀

表現仍以菌血症(50.68%)和敗血症(35.29%)為主，其次的表現是發燒(22.85%)，出現腸胃道症狀的比例只有 10.40%，而出現較嚴重的神經學症狀的比例為 3.17~4.98 % (表 2.2)。

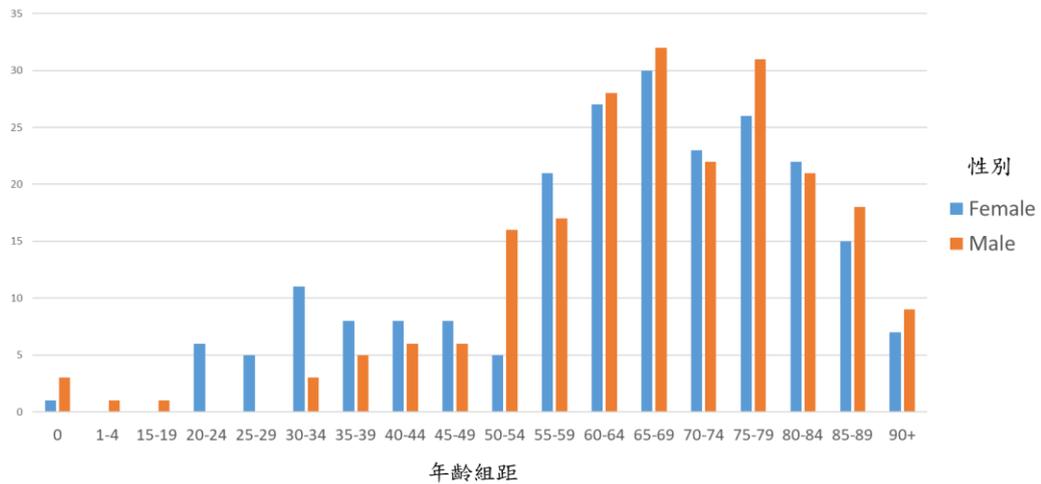


圖 2.2：個案年齡組距與性別比分布圖(N=442)

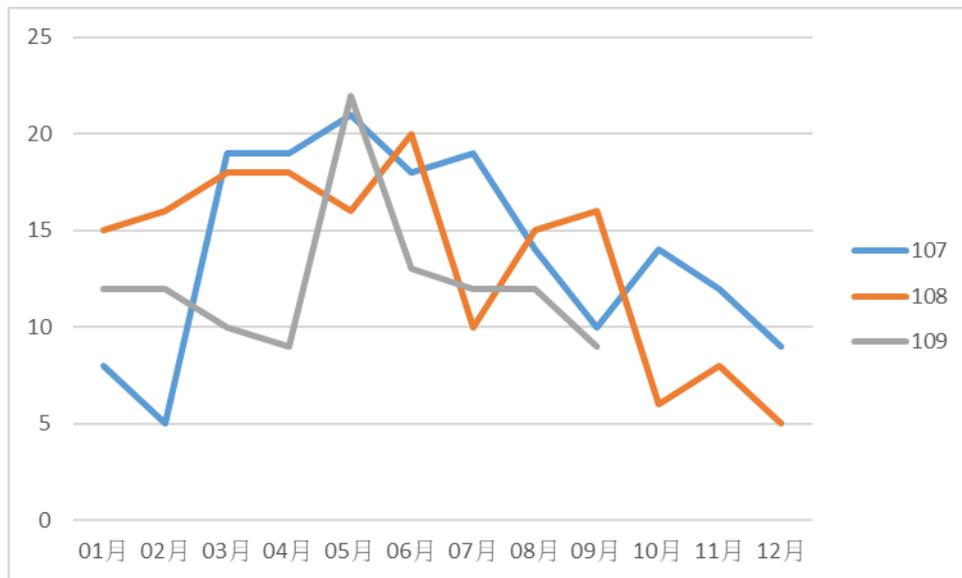


圖 2.3：2018~2020(截至 0929)年李斯特菌症病例發病月份趨勢圖(N=442)

表 2.2：2018~2020 年(截至 9 月 29 日)李斯特菌症病例症狀分析表  
(N=442)

症狀	病例數	症狀出現比例,%
Bacteremia (菌血症)	224	50.68
Sepsis (敗血症)	156	35.29
Fever (發燒)	101	22.85
Gastrointestinal symptoms (腸胃道症狀)	46	10.40
Meningitis (腦膜炎)	22	4.98
Meningoencephalitis (腦膜腦炎)	14	3.17

### 3. 建置「李斯特菌全球菌株 cgMLST profiles 大數據資料庫」

從 NCBI SRA 資料庫收集了約 14,000 筆序列品質符合挑選標準的 *Listeria monocytogens* 全基因體菌株序列資料(raw reads)及相應的菌株背景資料。我們由菌株背景資料中，整理菌株資料欄位，包括基因體序列來源(包含 SRA accession、BioSample ID、Country、Year、Serovar、Host、SampleSource)與利用全基因體序列分析產生的資料(cgMLST、ST、ResistGene)等。由於資料量較大以及為了日後的持續擴充，我們將每一筆菌株資料以 Jason 格式存於 NoSQL (MongoDB)大數據資料庫中。菌株儲存的資料結構如圖 3.1 所示。此資料庫提供使用者透過比對使用者上傳菌株的 cgMLST profile 與預存於資料庫中的全球菌株的 cgMLST profiles 進行一對一快速比對(strain tracking)，按照差異的 locus 數量進行排序，由少至多顯示前 100 筆搜尋結果供使用者下載。結果頁面顯示如圖 3.2 所示。此資料庫目前擁有 14,937 筆菌株的 cgMLST profiles，這些菌株包含了 652 個 ST 型別與 7,687 個 cgMLST (CT)型別，涵蓋了 49 個國家的來源，分離時間含蓋 1905–2018 年間，有標記寄主(host)的資料中(約 2,400

筆)，2,200 筆有標記為人類檢體來源，大部分菌株(約 9,000 筆)含有同時抗 fosfomycin (fosX)及抗 lincomycin (lin)的抗藥基因。

```
{'_id': ObjectId('5f9796796870361c0c3a4e71'),
'NCBIAccession': 'SRR1553882',
'BioSample': 'SAMN02991377',
'Identifier': 'MOD1_LS985',
'Country': 'USA',
'Year': '2014',
'Serovar': '4',
'cgMLST': '133',
'ST': '382',
'ResistGene': 'fosX, lin',
'profile': {'group_455': '003371ebb5d068856746aabc130224dc1f0f11074d6fe960e6dedf189ed57c96',
'acpA': '00b9be07180ec34dfad93a530f894e6f18815a5210e57f71d6dc56dc04189e90',
'group_1643': '00cc7c71cfba21010befe19db0a8ad445c1a8e8e4ca754d69d9796c25c92875',
'mepA_2': '00d5cfaea8f8ebcc710220c974ecf2553000a4620544ae09aa6176d3cf0bcb4b',
'pphA': '00d644ee678824c19e700bdc0fe59ca2f3b67f2340a368d141813ce3838e29e3',
'group_1468': '00f3c107c2c7f180ff8475a1225e961e1a49cddabb4bdf618d18e57daa8f3cba',
'adk': '00fa994b404127933a2ccb05becc1196f00d8ee1d0d41bda9e329dd992db6f1',
'group_6999': '01153a5b7f6f1cb31d8a79fa4a6e411faa2983561ece5bb33644560d611a1436',
'yceM': '011d7b7b31ef64cb403bdf8a4aaf30f926d6ae0e691e0560869dbe14a88b5df2',
'group_1814': '01406c9c9bbbe1e2bb5c5931dfe606de4353289b73aeb0787a8de264fe604ecc',
'group_2096': '015dc689681c2eb84e8eca2b717bbf361fdf82acdb288c47683e6aa7b2d99c85',
'group_6748': '0161ea84bda261b81b5eca5eb4dff3fce8f280730d4baa12d21c4e882ba8d749',
'manZ_4': '0163731e17f14cf312598718a439b3fb94728f5d19f5926191628b12df759e33',
```

圖 3.1：李斯特菌全球菌株 cgMLST profiles 大數據資料庫資料結構圖

Display rows (Default:100) DOWNLOAD 

Difference (loci)	NCBIAccession	BioSample	Identifier	Serovar	cgMLST	Year	Country	ST	Host	Resistance Gene	Void loci
0	SRR7912065	<a href="#">SAMN10141039</a>	R14.0372	1/2b	1482	2014	Taiwan	87	Homo sapiens	fosX, lin	4
9	SRR7912164	<a href="#">SAMN10141254</a>	R18.1428		688	2013	Taiwan	87	Homo sapiens	fosX, lin	4
9	SRR7912239	<a href="#">SAMN10141165</a>	R18.0083		688	2018	Taiwan	87	Homo sapiens	fosX, lin	5
11	SRR7912100	<a href="#">SAMN10141151</a>	R18.0059		1475	2018	Taiwan	87	Homo sapiens	fosX, lin	5
12	SRR9264871	<a href="#">SAMN12011594</a>	R19.0113		176	2019	Taiwan	87	Homo sapiens	fosX, lin	4
12	SRR8640831	<a href="#">SAMN11026878</a>	R18.2507		1540	2018	Taiwan	87	Homo sapiens	fosX, lin	4
12	SRR8640764	<a href="#">SAMN11026865</a>	R18.2472		176	2018	Taiwan	87	Homo sapiens	fosX, lin	4

3.2：李斯特菌全球菌株 cgMLST profiles 大數據資料庫資料比對結果頁

#### 4. 李斯特菌基因體定序

李斯特菌症於 2018 年列入我國第四類法定傳染病，醫療院所分離之菌株皆送到本實驗室進行基因分型。3 年期間(2018~2020 年)總計收集有 442 株菌株，同時於 2016 年與 2019 年進行雞、豬肉李斯特菌污染調查。這些分離菌株，使用先前計畫與本計畫經費完成全基因體定序，以進行疾病主動監測與調查人類感染來源比對之基礎。菌株使用 Illumina MiSeq 定序平台分析，輸出序列量設定在 50 倍李斯特菌基因體量(~150 Mb)，序列經由品質檢核後，進行組裝並轉成 cgMLST 基因指紋，可與資料庫之菌株進行基因指紋比對。

此系統已實際應用於國際李斯特菌流行菌株之比對。今年(2020) 3 月 20 日接到香港 Dr. Kam (the coordinator of PulseNet Asia Pacific) 來信通知美國 CDC 在調查一起韓國輸往美國的金針菇李斯特菌污染案(圖 4.1)，並提供該流行菌株之全基因體序列。本實驗室利用比對 cgMLST profiles 方法，排除台灣有該流行菌株引發之病例(圖 4.2)。

##### Fwd: Request for information: Listeria and Enoki mushrooms

11 封郵件

Kai Man Kam <kmkam1@gmail.com>

2020年3月20日 下午2:04

收件者: Kai Man Kam <kmkam1@gmail.com>

副本: Kai Man Kam <kmkam@cuhk.edu.hk>

密件副本: nipmcs@cdc.gov.tw

Dear all,

How are you? Hope this message finds you well.

Some of you might have already received the self-explanatory message below from Morgan Schroeder requesting for information on Listeria strains linked to mushrooms.

Please kindly check with your respective databases if possible. In case of matches or further queries, please contact Morgan directly,

Thank you for your assistance, and wish you all a nice weekend,  
From Kai Man KAM.

----- Forwarded message -----

From: **Schroeder, Morgan (CDC/DDID/NCEZID/DFWED)** <vgl0@cdc.gov>

Subject: Request for information: Listeria and Enoki mushrooms

Hello all,

The US is investigating an ongoing cluster of Listeria monocytogenes that has been linked to Enoki mushrooms imported from South Korea. Information has been posted on EPIS, and CDC and FDA have both posted web notices (please see details below). In addition, France confirmed they have 5 food isolates collected in 2017 from Enoki mushrooms from South Korea via the Netherlands that share the same cgMLST type. We are concerned about the global reach of this outbreak and would also like to ask each of you whether you have any matches or additional information related to this product in your countries.

For more information about this ongoing investigation please visit:

\* CDC web posting <<https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/sun-hong-foods-inc-recalls-enoki-mushroom-because-possible-health-risk>>

\* FDA recall <<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/enoki-mushrooms-03-20/index.html>>

圖 4.1：香港 Dr. Kam 來函通知美國 CDC 調查韓國金針菇李斯特菌污染事件，邀請協助調查。

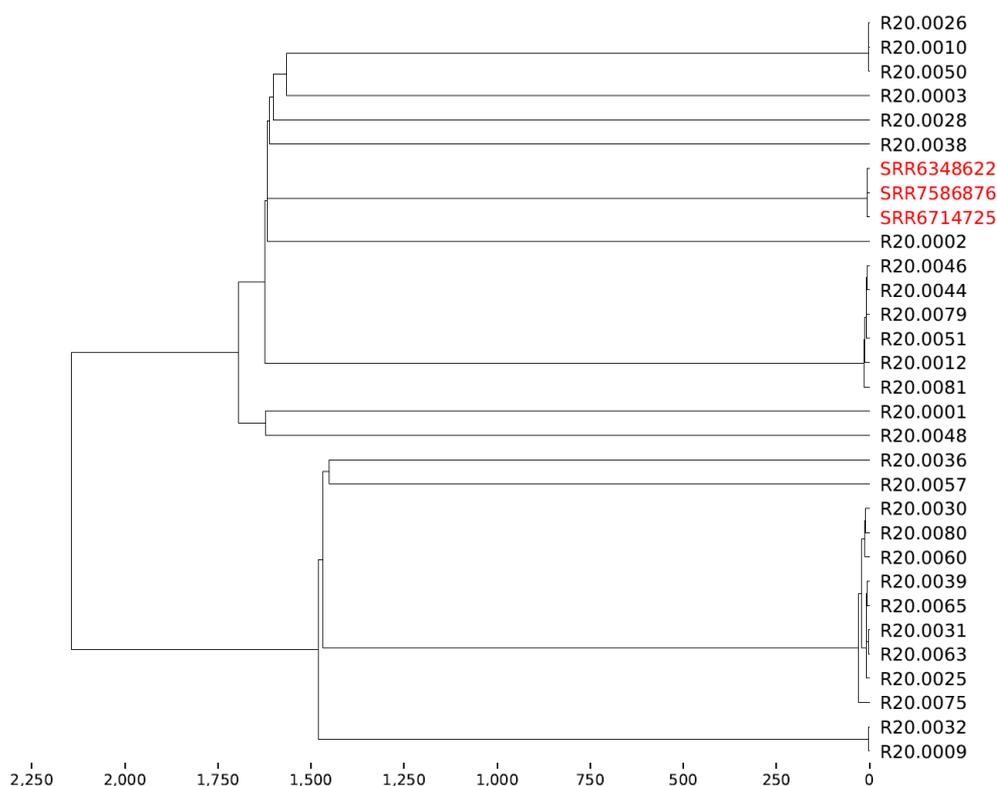


圖 4.2：美國金針菇李斯特菌分離株(紅色字體標示)與我國資料庫菌株遺傳距離最小之一群菌株親緣關係樹狀圖。顯示此 3 株污染金針菇之李斯特菌流行菌株(紅字標示)與本國菌株有相當大遺傳距離。

## 5. 年度病例环境追踪检体之检验

李斯特菌個案疑似感染通報與環境(冰箱)樣本採樣係依據本署「加強李斯特菌監測防治行動方針」內容，依規劃之「疑似菌株操作型定義」進行圖譜分析結果通報，該定義為「4 個月內出現 2 名(含)以上確定病例，且其菌株 2 種 PFGE 圖譜型別相同者」，無「地域」的界定。由於李斯特菌症感染多數無症狀，通報的個案多為侵襲性感染的重症與

高危險族群，加之本國地域的侷限性與食品食材的交流性，故在疑似的篩檢上對於地區分布無特定限縮，但可透過監測資料的分析了解地區縣市間是否有特殊流行株的出現。延續 2019 年已通報列管的 10 個疑似菌株圖譜，本(2020)年度新增通報 7 個疑似菌株圖譜，全計畫累計共通報 17 個疑似菌株圖譜。

在徵得疑似圖譜個案同意下進行環境檢體採檢與檢驗，本(2020)年度截至 10 月 30 日止，共計完成 6 例個案居家冰箱環境檢體檢驗，檢驗結果皆呈李斯特菌陰性。

## 6. 環境食品檢體李斯特菌之檢驗與菌株比對

為了追蹤感染國人之菌株來源，逐年進行市售生肉李斯特菌分離，再分析比對人與肉品分離株之遺傳關聯性。在 2016 年與 2019 年曾進行豬、雞肉李斯特菌調查，本年度利用此計畫進行進口牛肉之調查。今年總計進行二項牛肉調查：(一) 50 件真空包裝的大塊完整之進口牛排肉，這些牛肉在原產地分切真空包裝後進口(在台灣未再進行分切)販售；(二) 100 件國內廠商分切進口牛肉片。這些牛肉進口後，由廠商分切後包裝，冷藏或冷凍販售。

### (一) 真空包裝的大塊完整之進口牛排肉

50 件檢體採自台中市 3 家賣場，分別來自美國(27 件)與澳洲(23 件)，分 6 批 (2020 年 6 月 29 日至 7 月 30 日)採購檢驗。50 件檢體皆未檢出 *L. monocytogenes*，但有 8 件檢出李斯特菌屬 *L. welshimeri*。

### (二) 國內廠商分切進口牛肉片

100 件牛肉片檢體於 2020 年 8 月 13 日至 10 月 15 日，分 9 批次購自台中市三家賣場，肉品來自美國(49 件)與澳洲(51 件)(表 6.1)，有 13 件採樣時為冷凍狀態，87 件為冷藏狀態。檢驗結果有 25 件檢體分離出 *L. monocytogenes* (美國 3 件，澳洲 22 件)，23

件檢出非 *L. monocytogenes* 的李斯特菌(*L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri*)；25 件檢出 *L. monocytogenes* 的檢體，有 9 件也檢出其它種的李斯特菌。25 件 *L. monocytogenes* 陽性檢體皆為冷藏檢體，13 件冷凍檢體未檢出任何 *Listeria* 屬的菌。

表 6.1：分切後販售之進口牛肉片來源與李斯特菌檢驗結果統計。

		<i>L. monocytogenes</i>		
Market	Country	陽性	陰性	總計
A	美國	3	14	17
	澳洲	8	11	19
B	美國		24	24
	澳洲	8	8	16
C	美國		8	8
	澳洲	6	10	16
總計		25	75	100

### (三) 牛肉檢體分離菌株之基因型別分析

25 件檢出 *L. monocytogenes* 之檢體，各挑選 2 株分離株進行全基因體定序，產出 cgMLST profiles，並和之前自病人與豬/雞生肉分離之菌株進行指紋比對。50 株菌株中有 48 株菌株成功完成全基因體定序，有 38 株來自 19 件檢體的菌株，具有相同的 ST、CT 型別與抗藥基因，有 8 株來自 4 個檢體的菌株具有不同 ST、CT 基因型別與抗藥基因，顯示有些檢體會同時有不同基因型別之李斯特菌污染(混合感染)(表 6.2)。48 株菌株分屬 6 個 ST 型別，其中 ST3, ST9, ST155, ST378 菌株進一步分成不同 CT 型別，而 12 株 ST204 菌株皆為相同的 CT (7944) 型別，4 株 ST330 菌株同屬 CT7943。

表 6.2：48 株進口牛肉 *L. monocytogenes* 分離株之基因型別與抗藥基因。

Sample_ID	IsolatID	ST	cgMLST type	AMR genes
L20C059	R20.0226	9	1529	abc-f, fosX, lin, tet(M)
	R20.0227	9	1529	abc-f, fosX, lin, tet(M)
L20C060	R20.0228	378	125	abc-f, fosX, lin
	R20.0229	9	7950	abc-f, fosX, lin, tet(M)
L20C061	R20.0230	378	125	abc-f, fosX, lin
	R20.0231	378	125	abc-f, fosX, lin
L20C062	R20.0232	9	7950	abc-f, fosX, lin, tet(M)
	R20.0233	9	7950	abc-f, fosX, lin, tet(M)
L20C063	R20.0234	3	7945	fosX, lin
	R20.0235	3	7945	fosX, lin
L20C064	R20.0236	330	7943	fosX, lin
	R20.0237	330	7943	fosX, lin
L20C067	R20.0238	378	125	abc-f, fosX, lin
	R20.0239	378	125	abc-f, fosX, lin
L20C068	R20.0240	330	7943	fosX, lin
	R20.0241	330	7943	fosX, lin
L20C091	R20.0258	3	7952	fosX, lin
	R20.0259	3	7952	fosX, lin
L20C094	R20.0262	204	7944	abc-f, fosX, lin
	R20.0263	204	7944	abc-f, fosX, lin
L20C096	R20.0264	204	7944	abc-f, fosX, lin
	R20.0265	204	7944	abc-f, fosX, lin

L20C104	R20.0284	378	125	abc-f, fosX, lin
	R20.0285	378	125	abc-f, fosX, lin
L20C107	R20.0286	204	7944	abc-f, fosX, lin
	R20.0287	204	7944	abc-f, fosX, lin
L20C110	R20.0288	9	7956	abc-f, fosX, lin
	R20.0289	155	1448	fosX, lin
L20C111	R20.0290	378	125	abc-f, fosX, lin
	R20.0291	378	125	abc-f, fosX, lin
L20C115	R20.0292	155	1536	fosX, lin
	R20.0293	378	125	abc-f, fosX, lin
L20C116	R20.0294	378	125	abc-f, fosX, lin
	R20.0295	378	125	abc-f, fosX, lin
L20C119	R20.0296	204	7944	abc-f, fosX, lin
	R20.0297	204	7944	abc-f, fosX, lin
L20C132	R20.0309	378	1586	abc-f, fosX, lin
	R20.0310	378	1586	abc-f, fosX, lin
L20C135	R20.0311	204	7944	abc-f, fosX, lin
	R20.0312	204	7944	abc-f, fosX, lin
L20C136	R20.0313	204	7944	abc-f, fosX, lin
	R20.0314	204	7944	abc-f, fosX, lin
L20C137	R20.0316	378	125	abc-f, fosX, lin
L20C138	R20.0317	9	7948	abc-f, fosX, lin
	R20.0318	9	7948	abc-f, fosX, lin
L20C140	R20.0319	378	125	abc-f, fosX, lin
L20C150	R20.0321	155	1448	fosX, lin
	R20.0322	378	125	abc-f, fosX, lin

#### (四) 牛肉檢體分離菌株親緣關係

應用 cgMLST profiles 建立 48 株牛肉分離株親緣關係樹(圖 6.1)。該 cgMLST 關係樹顯示，不同 ST 型別菌株有極大遺傳距離，相同 ST 型別菌株，ST9, ST155, ST3 菌株內亦有出現明顯遺傳距離差異之情形，而來自相同檢體具有相同 ST 型別分離株，具有相同 cgMLST 型別或只有 1 個 locus (gene) 的差異。

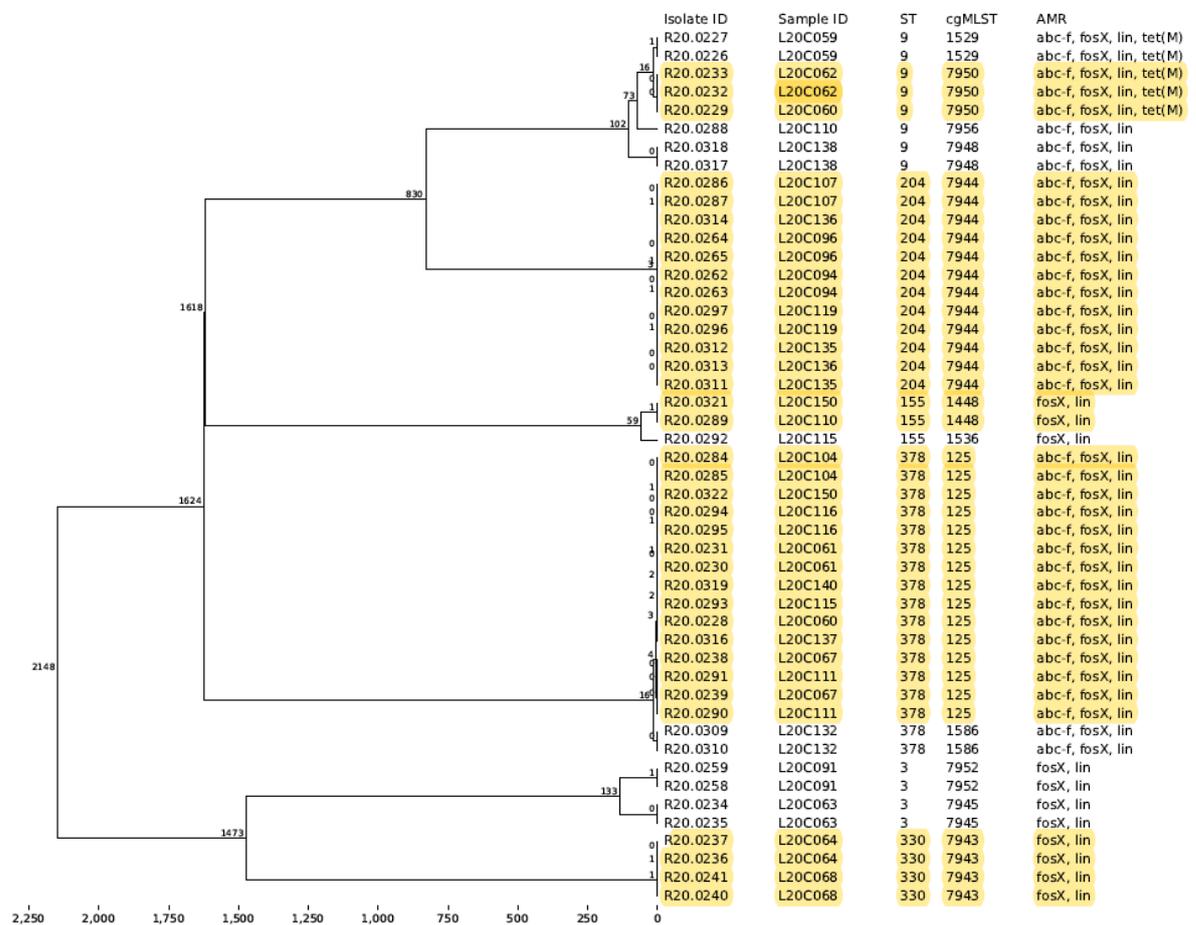


圖 6.1：48 株菌株之 cgMLST 遺傳關係樹。擁有來自不同檢體但有相同 CT 型別菌株群組，以土黃色標示。

#### (五) cgMLST 型別群聚菌株來源之探討

總計有 5 個具相同 CT 型別但分離自不同檢體之群聚(cluster) (Table 6.3)。其中 4 個群聚(CT7950, CT7944, CT1488, CT7943) 其檢體雖然批號(Due Date)或有不同，但都來自相同來源(公司、供應商、來源國)，然而 CT125 分離株檢體則來自 2 家公司與供應商，與兩個來源國(美國、澳洲)。

Table 6.3 : CT 群聚之菌株來源

ST type	CT type	Sample ID	Source country	DueDate
9	CT7950	L20C062	澳洲	2020/8/14
9	CT7950	L20C060	澳洲	2020/8/14
204	CT7944	L20C094	澳洲	2020/9/7
204	CT7944	L20C096	澳洲	2020/9/8
204	CT7944	L20C107	澳洲	2020/9/22
204	CT7944	L20C119	澳洲	2020/9/24
204	CT7944	L20C135	澳洲	2020/10/11
204	CT7944	L20C136	澳洲	2020/10/11
155	CT1448	L20C110	美國	2020/9/21
155	CT1448	L20C150	美國	2020/10/15
378	CT125	L20C067	澳洲	2020/8/19
378	CT125	L20C111	澳洲	2020/9/21
378	CT125	L20C137	澳洲	2020/10/13
378	CT125	L20C140	澳洲	2020/10/12
378	CT125	L20C150	美國	2020/10/15
378	CT125	L20C060	澳洲	2020/8/14
378	CT125	L20C061	澳洲	2020/8/14
378	CT125	L20C104	澳洲	2020/9/21
378	CT125	L20C115	澳洲	2020/9/25
378	CT125	L20C116	澳洲	2020/9/24
330	CT7943	L20C064	澳洲	2020/8/19
330	CT7943	L20C068	澳洲	2020/8/19

#### (六) 牛肉分離株與人、雞、豬分離株關聯性探討

48 株牛肉分離株分屬 6 個 ST 型別，與之前病人、雞/豬分離株比對，其中有 5 個 ST 型別(ST3, ST9, ST155, ST330, ST378)出現於人或雞/豬分離株，ST204 目前尚未出現於病人分離株 (6.4)。

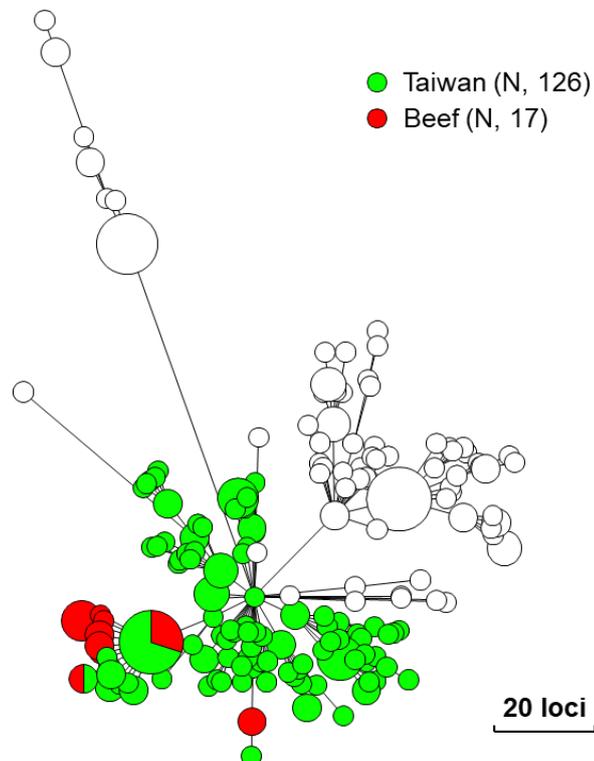
表 6.4：人、雞、豬、牛肉分離株之 ST 型別分布。

Clonal complex	ST type	Human	Chicken	Pig	Cattle	Total
CC87	87, 1459	125	20	14		159
CC19	378	47	13	27	17	104
<b>CC5</b>	<b>5, 1523</b>	<b>54</b>				<b>54</b>
CC155	155, 1524	34		13	3	50
CC9	9, 1113	2	14	20	8	44
CC3	3	11	1	2	4	18
<b>CC1</b>	<b>1, 1533</b>	<b>18</b>				<b>18</b>
<b>CC101</b>	<b>101</b>	<b>17</b>				<b>17</b>
CC288	330, 288	7	1	3	4	15
CC8	551, 1532, 8, 16	5	5	2		12
<b>CC204</b>	<b>204</b>				<b>12</b>	<b>12</b>
CC177	177	8				8
CC2	2	6				6
ST1081	1081	4				4
CC6	6	3				3
Other 6 CCs	26, 392, 451, 455, 845, 1457	6				6
<b>Total</b>		<b>347</b>	<b>54</b>	<b>81</b>	<b>48</b>	<b>482</b>

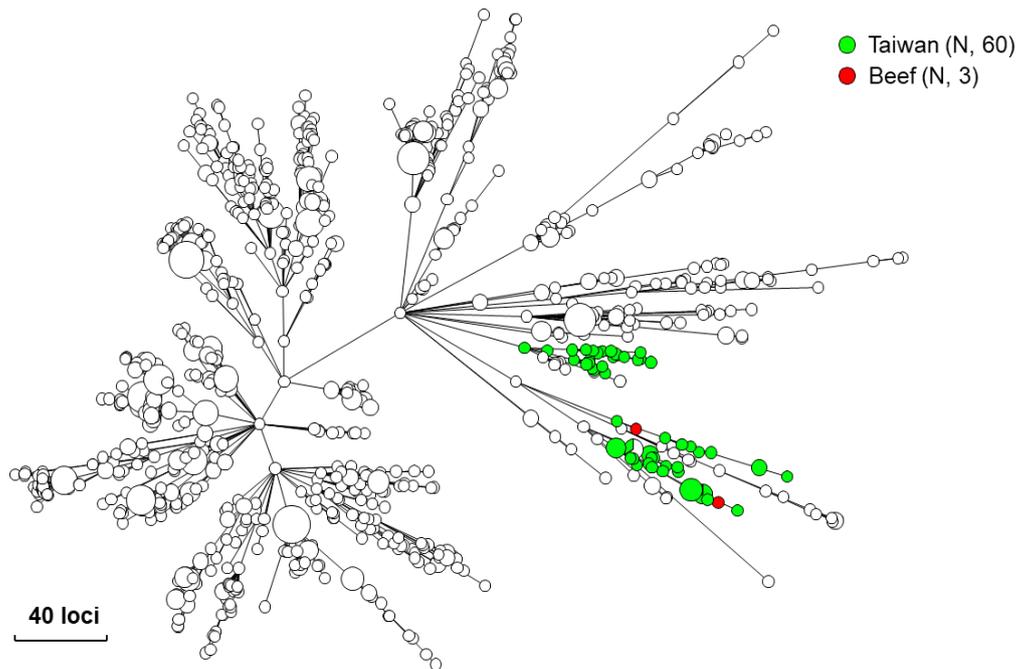
為了探討進口牛肉分離株是源於原產地或在國內，進一步和國內與國外菌株進行親緣關係分析。ST204 目前尚未出現於病人分離株，也未在之前的雞/豬分離株中出現。這次在牛肉分離的 ST204 菌株(為 CT7944)和存在 BENGA cgMLST@Taiwan 網站 (<http://rdvd.cdc.gov.tw/cgMLST/>)的菌株(目前資料庫有 196 株來自 NCBI 的 ST204 菌株)進行 cgMLST 指紋比對，這些牛肉分離

株與遺傳距離最親近的 100 株菌株只有 18–41 loci 差異，這 100 株菌株分別來自 17 個國家(Australia, Austria, Belgium, Canada, China, Denmark, France, Ireland, Italy, Japan, Netherlands, New Zealand, Poland, Spain, Switzerland, United Kingdom, USA)。因此牛肉分離的 ST204 菌株應屬國際盛行的李斯特菌基因型。

其它 5 種 ST 型別菌株都與之前台灣病人、雞、豬分離株有較近的遺傳距離，例如台灣非常盛行的 ST378 菌株，人、豬、雞、牛肉分離株的距離都在 20 個 loci 之內，和其它國家 ST378 分離株有較遠距離(圖 6.2)，圖 6.2 其它 ST378 菌株大多源於美國；ST155 則是國外相當盛行的菌系(clone)，台灣的 ST155 菌株之前只出現在病人與豬肉檢體(表 6.4)，國內的 ST155 菌株分屬兩個群組，和絕對多數的國外 ST155 分離株能明顯區別(圖 6.3)，而 3 株牛 ST155 分離株則落在其中一個以台灣分離株為主的群組中。



**圖 6.3：**台灣 ST378 菌株與與 NCBI 資料庫 ST378 菌株之 cgMLST 親緣關係樹。該關係樹使用 minimum spanning tree 演算法所建構。國外菌株以白色標示。每一圓圈代表一 cgMLST 型別，圓圈面積與該型別菌株數成正比。



**圖 6.4：**台灣與 NCBI 資料庫 ST155 菌株 cgMLST 親緣關係樹。該關係樹使用 minimum spanning tree 演算法所建構。國外菌株以白色標示。每一圓圈代表一 cgMLST 型別，圓圈面積與該型別菌株數成正比。

#### 四、討論

##### 1. 建立跨機關李斯特菌病原體比對機制

雖然本實驗室早已進行李斯特菌全基因體定序，然而在全基因體序列基因分型的應用上，仍面臨一些困難。首先是全基因體序列的分析方法：過去大多數研究使用 wgSNP 的方法，但這個方法難以標準化以產生可跨實驗室比對的菌株基因指紋；現在公衛實驗室已普遍採用 cgMLST 的方法，這個方法容易標準化以產生可跨實驗室比對的菌株基因指紋，然而目前尚無國際認可採用的共同平台以產生可相互比對的 cgMLST 指紋。本實驗室過去 8 年積極開發 cgMLST 分析技術，所建立的軟體程式工具與網路平台架構，可讓不同實驗室(機關)產生可相互比對菌株基因指紋。

如何命名 cgMLST 型別，也是應用 cgMLST 方法另一項問題。曾有法國學者應用數十個 outbreaks 菌株去訂定 *L. monocytogenes* cgMLST 型別，但是 outbreak 有各種型態，有些 outbreaks 由親緣差距極大菌株所引發，有些則歷經長時間的演化，菌株已有相當大的遺傳距離。本實驗室利用 wgSNP 較不受產生 DNA 序列時人為操作誤差的影響，藉由統計大量具相同 wgSNP 菌株間其 cgMLST 差異的分布，決定使用 single linkage 演算法進行菌株群組分析時，差異在 5 個或以下 loci 的 cgMLST profiles，視為相同的 CT 型別。在這個研究，我們分析自 25 件牛肉檢體分離的 48 株菌株，發現分離自同一件檢體具相同 ST 型別的 2 株菌株(視為 isogenic strains)，都有相同的 CT 型別(相同 cgMLST profile 或只有 1 個 locus 的差距)。應用這個標準，我們能更容易解讀全基因體序列分析結果，有利於實驗室與跨機關/部門(例如流病調查單位與疾病管制業務組)間的溝通。

本實驗室歷經三年完成 BENGA cgMLST@Taiwan 跨機關病原體基因體比對平台的樣板，目前測試結果顯示能讓不同實驗室間透過網路分

析菌株全基因體序列，產生可跨實驗室相互比對的 cgMLST 基因指紋。此平台應用了許多目前常用的 web 前後端開發技術以確保網站後續的維護與擴充。此平台已雖具備應用的基礎功能，但還是有許多需要進一步改進的地方，以求完善。目前規劃未來可進一步改善的地方如下：

- (1) **選擇不同物種 cgMLST 資料庫**-可利用文字輸入搜尋 cgMLST 資料庫，並列出資料庫中可執行之功能(e.g. cgMLST profiling、Strain tracking、Clustering、病原體全基因體資料庫搜尋等)。
- (2) **cgMLST profiling 功能改良與擴充**-上傳介面優化、Email 執行結果。
- (3) **Clustering 功能改良與擴充**-上傳介面優化、Email 執行結果、新增 emf、wmf 下載格式、新增 MST 及 NJ tree 的結果
- (4) **Strain tracking 功能改良與擴充**-上傳介面優化、Email 執行結果、供使用者下載前 100 筆比對到的 isolates 資料(含 cgMLST profile 及 metadata)。
- (5) **病原體全基因體資料庫功能改良與擴充**-提供可利用邏輯運算符進行及文字輸入方式進行搜尋。
- (6) **資料庫後台管理介面**-設計易於操作的管理介面並提供權限控管機制，使機關內非資訊人員也可以進行資料庫的更新與管理。
- (7) **增加新分析功能**-在同一網路介面下，新增/聯結開放的分析功能，例如 bacterial species identification、ST 型別 (clonal complex)、resistance genes 等。

## 2. 建立跨機關李斯特菌病原基因體資料庫與病例分析

今年李斯特菌仍維持使用兩個酵素(ApaI, AscI)的 PFGE 方法分析，偵測群聚感染事件與跨實驗室間之比對。但由於 PFGE 圖譜之分型效力

不如全基因體序列的分型方法，加上大多數歐美國家已全部使用全基因體定序的分型法分析菌株，因此 2021 年開始將放棄 PFGE，只執行全基因體定序，再依所建立的 cgMLST 解讀標準，進行李斯特菌症的監測。全基因體定序與 cgMLST 分析方法的建立，不但建立跨機關間菌株之比對功能，且能與國際技術接軌，可與國際公衛實驗室進行比對與交換李斯特菌流行菌株之基因指紋。未來將利用農委會主政的 GHSA 二期計畫，提升現有 BENGAL cgMLST@Taiwan (<http://rdvd.cdc.gov.tw/cgMLST/>) 的功能，並持續與農委會、食藥署合作，協商建立共同的李斯特菌基因體資料庫。

### 3. 建置「李斯特菌全球菌株 cgMLST profiles 大數據資料庫」

建置全球大數據資料庫的目的，是為了能快速比對本土菌株與國外菌株親緣關係，以即時偵測國內疾病與國外疾病的流行關係，尤其可監控進口食品與國內臨床案例甚至是環境的關聯性，疾管署是疫病的監控防治機關，必需持續擴充與維護建立的資料庫。另外，也建議可在定期的跨機關專案經理人會議中討論保留的菌株資訊，以提供建置資料庫欄位的依據。由於要維護與擴充李斯特菌全球菌株大數據資料庫需要持續不斷的由 public database 下載李斯特菌全基因體 raw reads，這挑戰了網路速度、穩定性以及儲存空間，因此，建議能有一較長遠的規劃與經費支持能維持資料庫的更新與運作。

### 4. 李斯特菌基因體定序

基於全基因體序列基因分型需使用高精準度的定序平台，目前 Illumina 平台仍是無法取代的標準定序系統。本實驗室也曾評估定序的倍數需大於 30 倍基因體序列量，因此本實驗室上機設定 50X，以確保可得到超過 30X 的序列量。在基因體序列分析上，國際公衛實驗室與本實驗室都使用 cgMLST 方法，讓實驗室間能相互比對菌株基因指

紋，且在 cgMLST 型別的命名上要統一(至少國內要統一)，以利跨實驗室/機關間的溝通。

## 5. 年度病例環境追蹤檢體之檢驗

環境檢體的採檢需要跨團隊的合作，現階段在食品端的法規與查驗仍在發展中，該病於本機關的防治工作上目前亦尚未納入環境採檢工作，故該項計畫為試辦方式進行須由衛生局志願協調支應，計畫成果將評估該項工作的成效與是否納入後續防治工作執行之必要。另透過跨機關合作，將盡力補足李斯特菌在本國動物與食品環境的菌株型別背景值。

從檢驗結果中顯示國人喜歡食用的未全熟之牛肉仍有李斯特菌汙染的風險，其中經過國內廠商切片的一般保鮮膜包裝火鍋牛肉片的李斯特菌陽性率較高且都分布在市面上 3 家大型生鮮超市通路商。從原始數據分析李斯特菌陽性檢體並沒有發生於特定批號，顯示李斯特菌是持續存在於肉品當中。因此，在食用牛排或火鍋片時仍以全熟的方式較為安全。

## 6. 環境食品檢體李斯特菌之檢驗與菌株比對

本年度調查(美、澳)進口牛肉李斯特菌汙染情形，並比對分離菌株與人、雞、豬分離株間之遺傳關聯性。其中 50 件在原產地國分切真空包裝後進口的牛肉片皆未檢出 *L. monocytogenes*。另 100 件檢體，應是在國內分切後再包裝販售，其中 13 件以冷凍形態販售，皆未檢出 *L. monocytogenes*，其餘 87 件以冷藏形態販售，當中有 25 件檢出 *L. monocytogenes* (陽性率 27.8%)。因 *L. monocytogenes* 可在低溫繁殖，冷藏況狀下仍會讓 *L. monocytogenes* 增殖，因此建議肉品保存在冷凍狀態下販售，或可降低李斯特菌感染的風險。

本調查主要目的在評估進口牛肉是否也是國人感染李斯特菌的風險來源。由菌株基因型別的比對，發現牛肉分離株有 6 種 ST 基因型別，

其中 ST204 是世界其它國家(例如澳洲[27])盛行的基因型別，但目前台灣尚未發現 ST204 感染病人，因這些分離來源牛肉都來自澳洲，有可能菌株是源於澳洲。其它 5 個 ST 型別(ST3, ST9, ST330, ST155, ST378)皆出現在病人或之前自雞、豬肉分離的菌株。我們將國內屬於此 5 種 ST 型別菌株和國外(NCBI 資料庫)菌株比對親緣關係，發現這 5 種 ST 型別菌株都和本國之前由人、雞、豬分離的菌株株有相當近的遺傳距離。由於這些進口牛肉應在國內分切重新包裝後販售，很可是在這個過程中某個環節受到污染。這個進口牛肉李斯特菌的調查結果，提供很重要訊息，將透過預計今年 12 月中召開的跨機關「食媒疾病專案經理人會議」的年終檢討會議，分享食藥署與農委會(防檢局)此項研究結果。

本計畫對進口牛肉李斯特菌株的分析比對，得利於過去幾年開發的 cgMLST 分析技術與持續性的進行國內病人與食品調查分離株的全基因體定序，並有系統的建立國內外菌株可供快速比對的 cgMLST profiles 資料庫。

## 五、結論與建議

### 結論部分

#### 1. 建立跨機關李斯特菌病原體比對機制

本計畫已建立李斯特菌全基因體序列比對機制，也完成 BENGA cgMLST@Taiwan 跨機關病原體基因體比對網頁平台，未來能透過持續性的改善此平台與增加新的分析功能，讓機關間能相互比對菌株，甚至建立共同的菌株 cgMLST 資料庫。

#### 2. 建置「李斯特菌全球菌株 cgMLST profiles 大數據資料庫」

已將 NCBI 資料庫貯存的 14,937 筆菌株基因體序列轉成可供快速比對的 cgMLST profiles，這些 cgMLST profiles 貯存在雲端，可透過網路在 BENGA cgMLST@Taiwan 網頁(<http://rdvd.cdc.gov.tw/cgMLST/>)進行菌株間的比對。

#### 3. 環境食品檢體李斯特菌之檢驗與菌株比對

美澳進口的牛肉有 50 件在原產地分切包裝進口，都未檢出 *L. monocytogenes*，100 件進口後在國內分切包裝販售的檢體，當中 13 件以冷凍狀態販售的檢體皆未檢出李斯特菌，87 件以冷藏狀態販售的檢體有 25 件(28.7%)檢出 *L. monocytogenes*。

由進口牛肉檢出菌株之基因型別分析，除了 ST204 菌株尚未在國內檢出外，ST3, ST9, ST155, ST330, ST378 菌株都與之前在國內病人、雞、豬分離之菌株有高度親緣關係，與國外同 ST 型別菌株有遠的遺傳距離。這些進口牛肉極可能在國內分切處理過程受到李斯特菌污染。

## 建議部分

### 1. 建立跨機關李斯特菌病原體比對機制

全基因體定序將是分析比對細菌株的有效工具，本實驗室發展的 cgMLST 網路平台，有必要持續更新發展，做為國內外比對細菌株的工具平台。該平台也很容易擴充具分析盛行的院內感染菌種的功能，有利院內感染調查與控制，與學術研究。然而此一 cgMLST 比對分析平台仍有許多需後續研發更新之處，例如：上傳介面 UI/UX 優化、文字及邏輯搜尋資料庫功能、Email 運算結果功能、下載格式擴充，操作簡易的後台管理介面等，都需要新的計畫案的支持。

### 2. 建置「李斯特菌全球菌株 cgMLST profiles 大數據資料庫」

由於要維護與擴充李斯特菌全球菌株大數據資料庫需要持續不斷的由 public database 下載李斯特菌全基因體 raw reads，這挑戰了網路速度、穩定性以及儲存空間，因此，建議疾管署能有一較長遠的規劃能維持資料庫的更新與運作，**招募正職生物資訊專業人才，建立生物資訊實驗室。**

### 3. 環境食品檢體李斯特菌之檢驗與菌株比對

李斯特菌在低溫(冷藏)狀況下仍能繁殖生長，本研究在 13 件冷凍檢體未檢出李斯特菌(樣本數少，仍有待調查更多樣本數)，因此生肉保存在冷凍狀態下，或可能降低李斯特菌感染風險。

進口牛肉李斯特菌污染，極可能污染發生在國內分切包裝後販售的過程，此結果可提供主管機關做為研擬管理政策的參考依據，以降低國人感染李斯特菌的風險。

## 六、參考文獻

1. Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Shabbir MZ, Barbuddhe S, Malik SV, Singh RK: **Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review.** *Vet Q* 2015, **35**(4):211-235.
2. Walker SJ, Archer P, Banks JG: **Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures.** *J Appl Bacteriol* 1990, **68**(2):157-162.
3. Membre JM, Kubaczka M, Dubois J, Chene C: **Temperature effect on *Listeria monocytogenes* growth in the event of contamination of cooked pork products.** *J Food Prot* 2004, **67**(3):463-469.
4. Angelo KM, Jackson KA, Wong KK, Hoekstra RM, Jackson BR: **Assessment of the incubation period for invasive listeriosis.** *Clin Infect Dis* 2016, **63**(11):1487-1489.
5. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H: **What is the incubation period for listeriosis?** *BMC Infect Dis* 2013, **13**:11.
6. Linnan MJ, Mascola L, Lou XD, Goulet V, May S, Salminen C, Hird DW, Yonekura ML, Hayes P, Weaver R *et al*: **Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese.** *N Engl J Med* 1988, **319**(13):823-828.
7. Imanishi M, Routh JA, Klaber M, Gu W, Vanselow MS, Jackson KA, Sullivan-Chang L, Heinrichs G, Jain N, Albanese B *et al*: **Estimating the attack rate of pregnancy-associated listeriosis during a large outbreak.** *Infect Dis Obstet Gynecol* 2015, **2015**:201479.
8. **2011 United States listeriosis outbreak**  
[[https://en.wikipedia.org/wiki/2011\\_United\\_States\\_listeriosis\\_outbreak](https://en.wikipedia.org/wiki/2011_United_States_listeriosis_outbreak)]
9. **South Africa declares end to largest ever *Listeria* outbreak**  
[<https://www.foodsafetynews.com/2018/09/south-africa-declares-end-to-largest-ever-listeria-outbreak/>]
10. **Listeriosis – Australia** [<https://www.who.int/csr/don/09-april-2018-listeriosis-australia/en/>]
11. Hong MK, Yang CK: **Congenital listeriosis: a review of cases in Taiwan since 1990 until 2011.** *Taiwan J Obstet Gynecol* 2012, **51**(2):289-291.
12. Huang YT, Liao CH, Yang CJ, Teng LJ, Wang JT, Hsueh PR: **Listeriosis, Taiwan, 1996-2008.** *Emerg Infect Dis* 2011, **17**(9):1731-1733.
13. Hsieh WS, Tsai LY, Jeng SF, Hsu CH, Lin HC, Hsueh PR, Chen CY, Chou HC, Tsao PN, Yang PH: **Neonatal listeriosis in Taiwan, 1990-2007.** *Int J Infect Dis* 2009, **13**(2):193-195.

14. Huang SL, Chou YT, Hsieh YC, Huang YC, Lin TY, Chiu CH: **Epidemiology and clinical characteristics of *Listeria monocytogenes* bacteremia in a Taiwanese medical center.** *J Microbiol Immunol Infect* 2010, **43**(6):485-490.
15. 林民浩, 葉芝廷, 鄭皓元, 劉宇倫, 郭宏偉, 李佳琳, 劉定萍: **應用實驗室傳染病自動通報系統於李斯特菌感染監測：現況與自動研析機制之建置.** *疫情報導* 2017, **33**(11):189-197.
16. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM: **Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens.** *Emerg Infect Dis* 2011, **17**(1):7-15.
17. Wong HC, Chao WL, Lee SJ: **Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan.** *Appl Environ Microbiol* 1990, **56**(10):3101-3104.
18. Moura A, Tourdjman M, Leclercq A, Estelle H, Laurent E, Fredriksen N, Cauteren DV, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G *et al*: **Real-Time whole-genome sequencing for surveillance of *Listeria monocytogenes*, France.** *Emerg Infect Dis* 2017, **23**(9):1462.
19. Jackson TC, Acuff GR, Lucia LM, Prasai RK, Benner RA, Terry CT: **Survey of residential refrigerators for the presence of *Listeria monocytogenes*.** *J Food Prot* 1993, **56**(10):874-875.
20. Beumer RR, te Giffel MC, Spoorenberg E, Rombouts FM: ***Listeria* species in domestic environments.** *Epidemiol Infect* 1996, **117**(3):437-442.
21. Liu YY, Chiou CS, Chen CC: **PGAdb-builder: A web service tool for creating pan-genome allele database for molecular fine typing.** *Sci Rep* 2016, **6**:36213.
22. Liu YY, Chen CC, Chiou CS: **Construction of a pan-genome allele database of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for molecular subtyping and disease cluster identification.** *Front Microbiol* 2016, **7**(2010):2010.
23. Graves LM, Swaminathan B: **PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis.** *Int J Food Microbiol* 2001, **65**(1-2):55-62.
24. Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S: **High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries.** *Nature Communications* 2018, **9**(1):5114.
25. Shen W, Le S, Li Y, Hu F: **SeqKit: A cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation.** *PLoS One* 2016, **11**(10):e0163962.
26. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD *et al*: **SPAdes: a new genome**

**assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing.** *J Comput Biol* 2012, **19**(5):455-477.

27. Fox EM, Allnutt T, Bradbury MI, Fanning S, Chandry PS: **Comparative Genomics of the *Listeria monocytogenes* ST204 Subgroup.** *Front Microbiol* 2016, **7**(2057).

政府研究計畫（期末報告）摘要資料表（GRB）

系統編號	PG10902-0174				
計畫中文名稱	李斯特菌症監測防治-建立實驗室檢驗與菌株分析量能				
主管機關	衛生福利部疾病管制署				
主管機關計畫編號	MOHW109-CDC-C-315-122415				
執行單位	衛生福利部疾病管制署				
年度	109	本期期間	10901 - 10912		
本期經費（單位：千元）	2047				
本期經費來源					
執行進度		預定進度%	實際進度%	超前%	落後%
	當年	90	91	1	0
	全程	95	95	0	0
經費支用		預定支用經費 （單位：千元）	實際支用經費 （單位：千元）	支用比率%	
	當年	2047	1873	91	
	全程	3237	3063	95	
研究人員	中文姓名		英文姓名		
	邱乾順		Chien-Shun Chiou		
	張瑞顯		Jui-Hsien Chang		
	洪羽屏		Yu-Ping Hong		
	劉儼毅		Yen-Yi Liu		
	廖盈淑		Ying-Shu Liao		
報告頁數	39	使用語言	中文		
全文處理方式	可立即對外提供參考				
中文關鍵詞	人畜共通病原；食源性病原；次世代定序；全基因體定序；院內感染病原				
英文關鍵詞	Listeria monocytogenes; Listeriosis; Zoonotic pathogen; Foodborne pathogen; Next-generation sequencing (NGS); Whole-genome sequencing (WGS); Web-based service				
<b>計畫中文摘要</b>					
<p>2018年1月李斯特菌症正式列入我國法定傳染病，以強化疾病之監測與防治；2018年全年總計有168例確定病例（25%死亡），發生率為0.72例/每10萬人；高於美國的發生率（0.26例/每10萬人）與死亡率（15.9%），急需強化疾病之監測與防治。本研究分兩年1)建立環境檢體採檢、檢驗流程與序列分析方法之標準操作流程，供後續進行檢驗環境檢體與菌株之基因指紋比對；2)建立跨機關李斯特菌病原體資料分析機制，提供不同機關能相互比對菌株基因指紋、評估菌株間親緣關係、追溯菌株來源(strain tracking)；3)建立跨機關共同李斯特菌全基因資料庫；集中跨機關菌株資料，包括基因指紋(cgMLST profiles)、人口學與流行病學資料，讓跨機關有關人員方便取得李斯特菌病原菌株之相關資料，使跨機關資料能共有共享，提升資料應用價值；4)檢驗2019/2020年針對病例追蹤所採檢之檢體。5)進行市售生肉李斯特菌污染率調查，追溯感國人國人之李斯特菌來源；本年度完成150件進口牛肉檢驗，菌株cgMLST基因指紋比對，推論進口牛肉應在國內分切銷售過程中被李斯特菌污染。</p>					
<b>計畫英文摘要</b>					
<p>Listeriosis has been announced to be a notifiable disease in Taiwan since January 2018 for strengthening the surveillance and control of the disease. In 2018, a total of 168 confirmed cases of listeriosis was reported to the Taiwan Centers for Disease Control (Taiwan CDC), Ministry of Health and Welfare, with an incidence rate of 0.72 cases/100,000 people and a 25% case-fatality rate. The incidence and case-fatality rate in Taiwan are higher than in the USA, in which the incidence and mortality are 0.26 cases/100,000 people and 15.9%, respectively. The listeriosis surveillance results urge relevant government authorities to discuss the strengthening of surveillance and control measures. In this project, we will aim 1) to establish the standard operating procedures for sampling of environmental specimens, Listeria-related testing, whole genome sequence bioinformatic analysis., 2) to build up a cross-laboratory data analysis mechanism for generating and comparing genetic fingerprints of the Listeria monocytogenes isolates and further for the global strain tracking; 3) to establish a common L. monocytogenes genetic fingerprint database, which contains strain genetic profiles, demographic data, and epidemiological data of domestic isolates, to allow staff of the 3 agencies easily to acquire the</p>					

## 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：李斯特菌症監測防治-建立實驗室檢驗與菌株分析量能

計畫主持人：邱乾順

填報日期：109/12/16

\*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	李斯特菌已列入法定傳染病，研究目的具任務需要性質。	謝謝委員的肯定。	無
2	建立跨機關李斯特菌病原體比對機制，建置 cgMLST profiles 全球大數據資料庫，與環境食品檢體菌株之比對，在病菌溯源若能善用檢驗及田野調查，則有助於釐清問題及防治。	謝謝委員的建議!	無
3	實驗室檢驗量能之建立，需整合田野調查之專業人才，才能釐清問題根源，找出防治方法。	謝謝委員的評論。 食媒性疾病的溯源絕非單靠實驗室的檢驗與菌株分析能力，必需有熱誠的流病專業人才參與進行田野調查。美國 CDC 建立的 PulseNet—食媒性疾病分子分型監測網，即強調”Connection”，聯結實驗室、流病與衛生防疫單位，聯結地方、州與聯邦衛生單位，聯結食品主管部門 (FDA)、農業主管部門 (USDA)、環境業務部門 (EPA)、消費者團體等等。	無

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
4	建立李斯特菌 cgMLST 檢測的標準流程。	中區實驗室已在撰寫「李斯特菌 cgMLST 標準操作流程手冊」，也預計明年開始全面執行李斯特菌株的 cgMLST 基因分型，取代現行的 PFGE 分型方法。	無
5	進口牛肉李斯特菌檢驗中，屬於進口分切後販售檢驗陽性之結果，下一步會如何處理？	將於今年 12 月舉行的「跨機關食媒性疾病監測計畫專案經理人」年終檢討會議，報告本計畫的研究成果，討論共同提出跨機關溯源調查計畫之可行性，以確認真正的污染點。	無
6	食物與人的感染溯源至食物，非常難得。	謝謝委員肯定。	無
7	建議分切廠的問題與主管機關共商對策。	將於今年度的「跨機關食媒性疾病監測計畫專案經理人」年終檢討會議，提案討論與食藥署、農委會防檢局共同提出跨機關溯源調查計畫之可行性。	無

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。

**衛生福利部疾病管制署委託/署內科技研究計畫**  
**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：李斯特菌症監測防治-建立實驗室檢驗與菌株分析量能

主持人：\_\_\_邱乾順\_\_\_

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-122415

1. 計畫之新發現或新發明

實驗室歷經三年完成 BENGA cgMLST@Taiwan 跨機關病原體基因體比對平台(<http://rdvd.cdc.gov.tw/cgMLST/>)的樣板，目前測試結果顯示能讓不同實驗室間透過網路分析菌株全基因體序列，產生可跨實驗室相互比對的 cgMLST 基因指紋。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

從檢驗結果中顯示國人喜歡食用的未全熟之牛肉仍有李斯特菌污染的風險，其中經過國內廠商切片的一般保鮮膜包裝火鍋牛肉片的李斯特菌陽性率較高。從原始數據分析李斯特菌陽性檢體並沒有發生於特定批號，顯示李斯特菌是持續存在於肉品當中。因此，在食用牛排或火鍋片時仍以全熟的方式較為安全。

李斯特菌在低溫(冷藏)狀況下仍能繁殖生長，本研究在 13 件冷凍檢體未檢出李斯特菌(樣本數少，仍有待調查更多樣本數)，因此生肉保存在冷凍狀態下，或可能降低李斯特菌感染風險。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

要維護與擴充李斯特菌全球菌株大數據資料庫需要持續不斷的由 public database 下載李斯特菌全基因體 raw reads，這挑戰了網路速度、穩定性以及儲存空間，因此，建議疾管署能有一較長遠的規劃能維持資料庫的更新與運作，招募正職生物資訊專業人才，建立生物資訊實驗室。

進口牛肉李斯特菌污染，極可能污染發生在國內分切包裝後販售的過程，此結果可提供主管機關做為研擬管理政策的參考依據，以降低國人感染李斯特菌的風險。