

出國報告（出國類別：研習）

參加全基因體序列分析研習營與 InFORM 研討會

服務機關：衛生福利部疾病管制署

姓名職稱：邱乾順 聘任研究員

派赴國家：美國

出國期間：106年11月6日至106年11月11日

報告日期：107年1月5日

摘要

近年來次世代定序技術(next generation sequencing, NGS)已被積極應用於公衛實驗室，用於分析病原菌株與微生物感染診斷。NGS 技術之應用關鍵，在於如何分析取得的大量 DNA 序列，擷取所要的資訊。參加此 INFORM 研習與會議之目的，在於了解美國公共衛生機構應用 NGS 技術，在傳染性疾病之監測與流行病學調查之進展，參與此會議可收集分析 NGS 產生之巨量 DNA 序列的工具、分析流程、品質管控、與未來的研究方向。此次 INFORM2017 有超過 600 人參加，由研習與會議簡報知悉，美國各州公衛實驗室已都具有使用 NGS 技術分析菌株的能力，也擁有應用 NGS 分析結果進行疫情研判和流行病學調查之實務經驗。雖然會議簡報的內容都使用 SNP 方式分析 NGS 序列，以建構菌株親緣關樹，但為了能讓菌株的基因資料可跨實驗室比對，美國疾病管制預防中心與歐洲相關人員的共識，將使用 cgMLST (或 wgMLST)的分析策略。我國疾病管制署實驗室因應 NGS 技術的發展與應用趨勢，也已於 2014 年前開始發展與應用 NGS 技術，進行菌株基因分型的研究與提升實驗室 NGS 的分析量能。因應歐美先進國家公衛實驗室的發展趨勢，防疫機關的國家實驗室應招募生物資訊人員，以強化 NGS 技術的應用量能，才能與先進國家技術接軌。

目次

壹、目的.....	4-5
貳、過程.....	6-12
參、心得及建議事項.....	13-14
肆、參考資料	15-16
伍、附錄.....	17

壹、目的

參加本研習與會議之目的，在了解美國公衛實驗室使用次世代定序(next generation sequencing, NGS)技術，應用於食媒性細菌病原株基因分型的發展現況，和在防疫上之應用進展。

NGS技術近年來已有長足進步，在分析成本下降與許多序列分析的電腦程式工具被開發成功的配合下，NGS已被許多先進國家應用，導入病原細菌株的例行性分析，特別是應用於菌株的基因分型：將以NGS技術分析菌株之全基因體序列，以取代食媒疾病分子分型監測網—PulseNet目前所使用的標準分型技術—PFGE(pulsed-field gel electrophoresis)分型方法。全基因體定序(whole genome sequencing, WGS)產生巨量短基因序列資料(每株菌株約200 Mb)，必需依賴電腦軟體工具進行分析。過去已有相當多相關的分析工具被開發使用，雖尚未完善，但在生物資訊專業人員的操作使用下，可產生能夠應用的分析結果，因此將NGS技術導入實際應用的門檻內。針對NGS新科技的應用趨勢，衛生福利部疾病管制署(疾管署)中區實驗室於數年前亦開始投入研究發展，曾應用NGS技術進行菌株抗藥性機制的探討[1-4]。在使用NGS技術進行菌株之全基因體定序基因分型(WGS-based genotyping)的應用，國際在分析技術上尚未完全成熟，在序列分析的方法上仍需投注更多的研究，在防疫監測的應用上，仍有待訂定國際共同使用的分析標準。

WGS-based genotyping的分析方法主要有兩種：wgSNP (whole genome SNP)與wgMLST (whole genome MLST)或 cgMLST (core genome MLST)的方法。wgSNP是目前最常被使用的分析方法，但此方法需使用一參考基因體序列(reference genome)以產生SNP圖譜(SNP profiles)，菌株的SNP profile會受到選用的reference genome與菌株(genomes)數量的影響，產出的結果不易跨實驗室比對。wgMLST (cgMLST)是基因比對(gene-by-gene comparison)的方法，是傳統MLST (multilocus sequence typing)方法的擴增；傳統MLST方法只比較7個基因片段序列，wgMLST比較所有基因序列 (cgMLST比較core genes序列)，因而比對數千個甚至上萬個基因序列，其分型效力(discriminatory power)可超過目前使用的黃金標準—PFGE。Gene-by-gene comparison的方法需先建立一個對偶基因資料庫(allele database)，使用共同的資料庫產生的菌株圖譜，容易跨實驗室進行基因圖譜比對。US CDC著眼於建構全球性的食媒監測網，將選擇wgMLST (或cgMLST)的方法[5]。

美國疾病管制與預防中心(US Centers for Disease Control and Prevention, US CDC)因1993年爆發了一個跨洲的*Escherichia coli* O157:H7的大規模食品污染案件，使用PFGE分析菌株的基因指紋圖譜，而確認了漢堡肉是污染來源。在廠商回收污染的食品後，終止了該大規模的群聚感染事件。因此，US CDC在1996年建立了食媒疾病分子分型監測網—PulseNet (the national molecular subtyping network for foodborne disease surveillance) [6]，由各州政府公衛實驗室使用標準化的PFGE方法分析菌株，再將菌株PFGE圖譜傳送到中央資料庫進行比對，如此能在極少病例出現時即偵測到可能的感染流行，追查感染來源。

PulseNet的成效卓越，在全球共同監測食媒疾病的思考下，US CDC協助建立各區域的PulseNet組織，包括PulseNet Asia Pacific, PulseNet Europe, PulseNet Latin America & Caribbean, PulseNet Middle East, PulseNet Africa, 加上PulseNet USA, PulseNet Canada目前已有80個國家參與這個食媒疾病監測網絡。

PulseNet食媒疾病監測網建立在使用標準化的菌株基因分析方法(PFGE)，產生可跨實驗室比對的菌株基因圖譜，建立可供比對的菌株基因圖譜資料庫，因此需要經常性地進行技術訓練與交換應用的經驗。過去，US CDC每年舉辦PulseNet Update Meeting會議，進行公衛實驗室人員教育訓練，交換心得。然而，PulseNet監測網的運作，不只依靠實驗室的菌株基因分析，更需要流行病學調查人員的溯源調查，而源頭調查牽涉聯邦、州、郡的衛生單位，也需上游的食品藥物管理局(FDA)與農業部(USDA)的共同參與。2013年擴大PulseNet Update Meeting，舉辦第一屆的INFORM (The Integrated Foodborne Outbreak Response and Management) 會議(INFORM 2013)，之後每2年舉辦一次，今年的INFORM 2017是第三次舉辦。

US CDC在2013年之前已補助數個州的公衛實驗室，進行NGS應用的先導研究，後來依據2014年的AMD倡議(Advanced Molecular Detection Initiative)，全面性強化公衛實驗室應用NGS技術的量能。在2013年舉辦的第一次INFORM (INFORM 2013)會議，當時已有數個應用NGS技術分析群聚感染事件菌株的研究報告。疾管署中區實驗室負責PulseNet Taiwan的食媒疾病監測，實驗室擁有極大的PFGE分析量能，每年分析數千株菌株之PFGE圖譜。依據PulseNet Taiwan的運作，疾管署中區實驗室和參與PulseNet的國家之實驗室有經常性的交流，相互比對與交換流行菌株之基因圖譜。筆者在2013年參加INFORM 2013的會議後，預知十年內WGS-based genotyping將取代PFGE，成為PulseNet實驗室的標準基因分型工具。因此，中區實驗室過去4年積極開發NGS技術的應用，也已取得很好的成果與進展[7, 8]。這幾年是WGS-based genotyping技術發展的關鍵時期，必需了解此技術的進展與菌株基因分型結果的解讀方式，因此出席INFORM 2017的研習與研討會議。

貳、過程

第一天(2017/11/6)

11月6日抵達美國加州橘郡的開會地點 Hyatt Regency (Orange County, Garden Grove, California)。下午 13:00 開始數個訓練課程。

13:00 - 15:00 的「PulseNet Data Analysis Using BioNumerics and NCBI's Pathogen Detection Pipeline」訓練，教導使用 BioNumerics 與 NCBI 工具，包括 BioNumerics v. 6.6 管理與分析 PFGE 圖譜資料，使用 BioNumerics v. 7.6 分析與管理序列資料，解讀菌株 hqSNP/wgMLST 親緣關係樹，產出 cluster/outbreak 報告給流病人員，和使用 NCBI Pathogen Detection Pipeline。

15:30 - 17:30 的「WGS Wet Lab Troubleshooting」，討論 PulseNet 實驗室全基因體定序方法與問題解決方案。PulseNet 實驗室採用 MiSeq Illumina 的定序平台進行定序。疾管署中區實驗室亦使用 MiSeq Illumina 定序儀。

18:00 PM - 18:45 舉辦開幕儀式，由地主(Orange County Health Care Agency 的官員 Matthew Zhan, MD 主持)，US CDC 的首長 Brenda Fitzgerald, MD (預錄影片)、USDA 的 Carmen Rottenberg, JD 與 FDA 的 Stephen Ostroff, MD 致辭。共有 600 多人參加。開幕後，18:45 PM - 19:30 由 Walmart Stores Inc. 食品安全與健康部門的副總裁 Frank Yiannas, MPH 進行主題演講「Mega Trends in Food Safety」。Frank Yiannas 回顧人民對食品安全觀念的歷史變遷過程，簡報人對食物安全的態度、現今食品販售形態、美國與世界其它地區主要食品污染事件，再討論全球食品安全的趨勢與新興食品系統議題，與如何行動以確保全球消費者，能有安全、充足與永續的食物供應。

19:30 - 20:30 舉行 Welcome Party 與 Posters 展示。本次會議共有 99 個 Posters。筆者之 Poster 題目「Building a pan-genome allele database for whole genome sequence-based genotyping of Salmonella isolates of all serovars」(附錄)。

第二天 (2017/11/7)

7:30 - 8:15 安排 6 個討論會，參加的是「WGS of Non-PulseNet Organisms: Expectations in the Lab, Reporting, etc.」。與會者分享非 PulseNet 監測菌種的全基因定序經驗，包括實驗室操作方法、建立品質標準、分析序列之程式方法等。

8:30 - 10:15 演講「Then and Now: The Changing Landscape of Enteric Disease Surveillance Outbreak Detection and Response」，講者與題目(任職機關)：

- The 1998-99 Outbreak of Listeriosis Linked to Ready-to-eat Meats - Rob Tauxe (CDC)
- The Pre-PulseNet Era and the Challenge of Surveillance for *Listeria monocytogenes* - Brian Saunders (NY)
- Risk Assessments and the Changing Landscape of Foods Linked to Listeriosis Outbreaks - Janell Kause (USDA-FSIS)
- *Listeria monocytogenes* Outbreak Investigations: FDA Perspective - Stic Harris (FDA)
- Where are We Going from Here? - Rob Tauxe (CDC)

四位講者藉著回顧 20 年來發生的李斯特菌感染群突發事件(outbreaks)，說明州政府和聯邦機構(US CDC, USDA, FDA)在食品安全的角色與未來目標。Dr. Tauxe (US CDC)回顧 1998 年一起跨州的大型李斯特菌感染群突發事件，因該事件而建立了流行病學調查模式，實驗室例行性使用 PFGE 分析李斯特菌株，2004 年提出的「*Listeria* initiative」成了美國李斯特菌感染症的處理標準，因該事件，50 個州皆將李斯特菌感染症列入法定傳染病(法國也因此事件將李斯特菌感染症列入法定傳染病)，此事件也突顯風險評估的需求，生產工廠的 HACCP 管理的重要性。此事件也讓 US CDC 直接面對民眾進行風險溝通，並建立如何透過媒體傳達疫情訊息。

Dr. Kause 介紹 USDA 對李斯特菌感染症的風險評估，指出李斯特菌群聚感染事件之風險食物的變遷。Dr. Harris 介紹 FDA 針對食品安全的積極作為，包括 2008 年的 Rapid Response Teams (RRTs)；2011 年的 Food Safety Modernization Act (FSMA)賦與 FDA 在食品安全上能有更多作為；2011 年的 Coordinated Outbreak Response and Evaluation Network (CORE)，強化食品引發的群突發事件的偵測(detection)、應變(response)與防止(prevention)；2013 引入全基因體定序方法分析菌株，提升偵測食品污染所引發的群突發事件的能力等。最後 US CDC 的 Dr. Tauxe 就實驗室的角度切入，認為未來食媒疾病的群突發事件，病例的時空分布會更分散，會依賴基因定序技術監測系統進行偵測，應優先偵測污染的食品。

10:30 - 12:00 進行「Lessons Learned from Shiga Toxin-producing *E. coli* Outbreak Linked to Flour」的演講，講者與題目(任職機關)：

- Multistate Outbreak of Shiga Toxin-Producing *E. coli* Infections Associated with Raw Flour, 2015 - 2016 - Karen Neil (CDC)
- Colorado Investigation - Nerida Corral (CO)
- Multistate Outbreak of *E. coli* O121 and O26 Associated with Raw Flour: FDA Response Perspective - Brooke Whitney (FDA)

- General Mills Gold Medal Flour Recall: Spring/Summer 2016 - Scott Hood (General Mills)
- Risk Communication: STEC Infections Linked to Flour - Laura Whitlock (CDC)
- Multi-provincial Outbreak Investigation of *E. coli* O121 Associated with Flour, November 2016 to May 2017 - Lorelee Tschetter

該演講由 US CDC, Colorado, FDA, 廠商(General Mills), 加拿大 Public Health Agency of Canada 代表就發生在美國與加拿大的一起麵粉污染 *Escherichia coli* O121 與 O26 事件進行簡報與討論。簡報說明事件發生經過與調查, FDA 進行的風險溝通, 實驗室之菌株分析結果等。小麥加工過程與麵粉產品非無菌狀態, 發生病原性大腸桿菌污染的群聚感染事件也是頭一遭, 而污染的菌是 non-*E. coli* O157:H7, 實驗室偵測鑑定也不純熟。因此, 今年安排此事件的報告, 讓大家了解整理事件的偵測、應變與預防的經過。

13:30 - 15:00 進行「Navigating Whole Genome Sequencing and Its Utility in Foodborne Surveillance, Outbreak Detection and Response」的演講, 講者與題目(任職機關):

- The Interagency Collaboration on Genomics for Food and Feed Safety - Chris Braden (CDC)
- The Madness Behind the Method: Whole Genome Sequencing for Cluster Detection - Minnesota, 2017- Carlota Medius (MN)
- Whole Genome Sequencing for Routine Surveillance, Outbreak Detection & Response in NSW, Australia - Kiera Glasgow (Health Protection NSW)
- Making of a Whole Genome Sequencing Core - Vishnu Chaturvedi (CA)

這個時段講者簡報菌株全基因體定序分析技術, 在食媒疾病監測、群突發事件的偵測與應變。除了美國講者, 也邀請澳洲 New South Wales 公衛部門的 Kiera Glasgow 分享澳洲應用全基因體定序於食媒疾病監測與群聚感染事件調查的現況與經驗。

15:30 - 17:30 進行「Culture-Independent Diagnostic Tests (CIDTs): Changing the Landscape of Surveillance」的演講, 講者與題目(任職機關):

- CDC Update on Culture Independent Diagnostic Test (CIDT) Issues
- Peter Gerner-Smidt (CDC)

- Meeting the Challenge of Changing Diagnostic Testing Practices and the Impact on Public Health Surveillance - Ellyn Marder (CDC)
- The Implications and Impact of CIDTs at Public Health Laboratories - Dave Boxrud (MN)
- Impact of Culture Independent Diagnostic Tests on Enteric Disease Outbreak Detection and Response: Nebraska, 2015 - 2017 - Anna Carlson (NE)
- CIDT' s and Exclusion - David Young (SC)
- Impact of CIDTs on STEC Exclusions for Childcare in Minnesota - Dana Eikmeier (MN)

此演講討論一個新的診斷趨勢，即越來越多醫院實驗室使用非培養的診斷技術(culture independent diagnostic testing, CIDT)，此種診斷方法的改變，將不再有菌株被培養出來，並被送到公衛實驗室進行基因分型，因而影響到目前食媒疾病的監測與流行病學調查。面對此問題，一些州政府要求臨床實驗室將 CIDT 陽性檢體，送到州公衛實驗室進行培養，而如此將大大增加公衛實驗室的經費成本。另一個解決方案冀望於 metagenomics 技術的開發；期待利用 metagenomics 的技術，進行檢體所有 DNA 的定序，再進行致病原菌株序列的擷取與分型。目前 metagenomics 的成本太高，至今只有少數的評估報告。目前國內臨床診斷使用 CIDT 的情況尚未普遍，但美國遭遇到的問題，台灣也將在多年後即會面臨到。Metagenomics 技術若成本下降，未來將可能成為例行性的診斷技術，即檢體一次性定序，即可能鑑定出所有可能的致病原。

17:30 - 18:00 進行頒獎儀式，共有 4 個獎項：

- OutbreakNet Bill Keene Award for Excellence in Epidemiology
- PulseStar Award for Outstanding
- Achievement in PulseNet Kati Kelley Award for Exceptional Service to PulseNet
- John J. Guzewich Environmental Health Public Health Team Award

其中 Bill Keene Award 是紀念 Oregon 州的流行病學家 Bill Keene。Dr. Keene 是一傑出與具有熱誠的食媒疾病流行病學調查專家，曾偵破無數食媒疾病群聚感染流行案件。2013 年被邀請到台灣疾病管制署授課，對台灣相當友善，也曾熱心地訓練疾管署防疫醫師在食媒疾病流行病學的調查專業能力。Bill Keene 在 2013 年底不幸因突發急病過世。

第三天(2017/11/8)

7:30 - 8:15 時段安排 5 個討論會，參加的是「Analytical Tools for WGS: Bioinformatic Pipelines, Cloud Computing and the Dark Arts as

Practiced by Your State Public Health Bioinformaticians (STAPH-B)」。
與會者分享 NGS 資料的分析工具(電腦軟體)、分析流程、菌株巨量序列資料之
貯存、如何取得貯存與運算資源等。

8:30 - 12:00 分三個議場進行會議，參加的是實驗室的會議時段，聚焦
在全基因體定序、序列分析與流行病學調查之應用實例。講者與題目(任職機
關)：

- Laboratory and Epi Data Integration in SEDRIC - Rashida Hassan (CDC)
- Implementation to Integration: DCLS' s Phased Approach to Sharing Molecular Subtyping Data with Epidemiologists - Luran Turner (VA)
- Salmonella Anatum Infections Associated with Imported Papaya - Colin Schwensohn & Molly Leeper (CDC)
- Salmonella Heidelberg Linked to Contact with Cattle - Lauren Stevenson and Morgan Schroeder (CDC)
- Salmonella Saintpaul Investigation - Beth Tolar (CDC)
- Finding a Needle in the Haystack - Using WGS to Identify Clusters with Common PFGE Patterns - Lisha Constantine-Renna (TN), Hope Dishman (GA), Katherine Marshall (CDC)
- Whole Genome MLST Databases - Heather Carleton (CDC), Rebecca Lindsey (CDC), Hannes Pouseele (Applied-Maths)

13:30 - 17:30 有「PulseNet」與「OutbreakNet and Environmental Health Track」兩個議場，參加的是 PulseNet 的會議。內容聚焦在導入全基因體定序之新技術時，食媒疾病分子分型監測網(PulseNet)需做那些準備，包括如何符合 Clinical Laboratory Improvements Amendments (CLIA)法案的要求進行定序實驗室(wet-lab)與序列分析工具的確效，如何建立使用全基因體序列進行沙門氏菌的血清型別鑑定，如何使用 Bioinformatics 工具檢查 DNA 序列品質，如何檢查 DNA 序列樣本的污染等。講者與題目(任職機關)：

- CDC' s Experience with CLIA Validation of WGS Wet-Lab and Analytical Tools - Rebecca Lindsey (CDC)
- Single-Molecule Real-Time Sequencing Technology (SMRT): Validation and Implementation of Long-Read - Sequencing at the Microbial Laboratory of the California Department of Public Health - Rituparna Mukhopadhyay (CA)
- Lessons Learned: Integrating Automated Workflows for PulseNet - Roxy Meek (WA)

- Lessons Learned: Validation of SeqSero and Establishing a WGS Workflow for Salmonella Serotyping - Jisun Haan (MN)
- Tracking and Data Management of WGS and CIDTs: Sharing Best Practices Panelists - Angela Taylor (MN), Ryan Jepson (IA), Bill Wolfgang (NY)
- Using Bioinformatics Tools to Examine Sequence Quality - Heather Carleton (CDC), Joel Sevinsky (CO)
- Laboratory Mitigation of Sequence Contamination - Lauren Turner (VA)
- WGS CLIA Validation - Karim Morey (OR)

第四天(2017/11/9)

8:00 - 12:30 有「PulseNet」、「Environmental Health」、

「OutbreakNet」三個議場，參加的是 PulseNet 的會議。

一、PulseNet USA and International Roadmap: Transitioning to WGS Surveillance and Outbreak Detection。簡報者報告 PulseNet International 與 USA Steering Committee 的發展現況，同時 FDA、USDA-FSIS 與 Florida 公衛實驗室，報告他們運用菌株分型(主要是全基因體定序)建構偵測食品污染事件的能力與實例。講者與題目(任職機關)：

- PulseNet International & USA Steering Committee Updates - Peter Gerner-Smidt (CDC)
- Integration of Regulatory and Clinical Data: An FDA Perspective - Eric Stevens (FDA)
- Integration of Regulatory and Clinical Data: An USDA-FSIS Perspective - Cesar Morales (USDA-FSIS)
- Perspectives from a Food Regulatory Laboratory: FL Ag' s Experience with WGS Implementation - Serena Giovinazzi (FL Ag)

二、State Solutions for Analysis and Reporting: Perspectives the State Public Health Bioinformaticians (Staph-B) Workgroup。由 Kelly Oakeson 簡報 Utah 公衛實驗室的全基因體序列生物資訊分析現況；Joel Sevinsky 報告 Colorado 公衛實驗室如何使用雲端資源運算 NGS 資料與貯存 NGS 巨量資料；Angela J. Taylor 分享 Minnesota 州實驗室與流病人員溝通 NGS 資料的模式。講者與題目(任職機關)：

- Bioinformatic Analyses of Whole Genome Sequence Data in Public Health Laboratory - Kelly Oakeson (UT)
- Cloud Solutions for State NGS Bioinformatics and Storage - Joel Sevinsky (CO)

- NGS Communication between Laboratories and Epidemiologists -
Angela J. Taylor (MN)

三、Current Laboratory-based Strategies in Addressing CIDTs。面對臨床實驗室使用CIDT (culture independent diagnostic testing)的趨勢，未來公衛實驗室將難以收到菌株進行基因分型，無法如目前的情況偵測可能的群聚感染流行。Colorado 與 Tennessee 簡報其面對CIDT因應做法。US CDC也簡報其因應的努力方向，即冀望於使用 metagenomics 的方法，定序檢體中的DNA，再利用生物資訊分析方式，偵測檢體中之病原菌種與DNA序列，分析其基因型別。講者與題目(任職機關)：

- CIDT Challenges and Changes in Colorado - Emily Travanty (CO)
- CIDT: An Overachieving GI Panel - Jeannette Dill (TN)
- PanGIA: Culture Independent Identification and Characterization of Infectious Agents Directly from Clinical and Environmental Sources - Jonathan Jacobs (MRI Global)
- Development of Sequencing Methods for Direct-from-Specimen Surveillance and Subtyping - Heather Carleton (CDC)

第五、六天(2017/11/10-11)：回程。2017年11月11日回到台灣。

參、心得及建議事項

美國疾病管制預防中心(US CDC)於1996年建立PulseNet監測網後，即每年舉辦相關技術的練訓，邀請講者分享應用菌株分型技術偵測食媒疾病群聚感染事件的經驗。因為PulseNet監測網非實驗室的菌株分型即可盡其功，必需有流行病學人員的溯源調查，以找出感染源；而溯源調查必需有上游的食品(FDA)、食物生產端(USDA)與環境部門的配合。因此在2013年將原本每年舉辦的PulseNet Update Meeting，改為每2年舉辦的INFORM (The Integrated Foodborne Outbreak Response and Management)會議，參加人員包括來自US CDC, FDA, USDA, 州郡的實驗室、流行病學與環境健康人員。過去的會議會邀請國際人員參加，但近年來因經費刪減，國際會議的成份已大為降低。今年有600多人參加，但只邀請一名澳洲講者，另有台灣、日本與韓國食品部門人員自費與會。

標準化PFGE技術與圖譜資料庫軟體(BioNumerics)是PulseNet監測網得以運作的技術核心。2002筆者曾到US CDC研習，將標準化的PFGE技術引入國內；2002年參加在夏威夷舉辦的PulseNet Asia Pacific籌備會議，讓台灣成為該區域監測網的執委會成員；2006年疾管局宣布成立PulseNet Taiwan。疾管署目前擁有世界級的PFGE分析量能，除了進行食媒病原菌株的基因分型，該技術亦應用於其它致病原的基因分型，協助流病調查與疫情研判。累積的菌株PFGE基因圖譜資料庫也是重要的資產(例如疾管署目前累積的沙門氏菌PFGE圖譜資料已達四萬餘筆)，資料庫資料除了提供平時流病調查的菌株基因圖譜比對外，亦能提供上、中、下游食媒致病原(例如沙門氏菌)菌株的比對，和研判流行趨勢。之前曾使用沙門氏菌資料庫探討台灣之人、豬沙門氏菌的流病關聯性[9]，也有學者應用此資料庫，探討朴子溪與高屏溪沙門氏菌分離株與人分離株之流病關聯性[10]。近2年發現台灣沙門氏菌*S. enterica* serovar Anatum與*S. Brancaster*急速上升的流行趨勢，透過與農方分離菌株之PFGE圖譜的比對，確定與豬、雞分離株有相同的主要基因型別。

PFGE仍存有一些缺點，例如不易操作，需熟練的技術人員操作，因此只能在參考實驗室進行分析；產出含糊的(ambiguous)圖譜資料型態，難以精確比對；對一些單系(monophyletic)菌種(如*Shigella sonnei*, *S. enterica* serovar Enteritidis, *E. coli* O157:H7)等微生物之分型效力(discriminatory power)不佳。近年來因NGS技術進步、分析成本下降、分析序列之電腦工具的開發應用等，使得NGS成為能實際應用於進行例行性菌株全基因體定序的工具，歐美國家也在積極發展NGS技術以應用於防疫目的。2014年US CDC提出AMD倡議(Advanced Molecular Detection Initiative)，此5年計畫第一年即獲得3000萬美元經費來提升公衛部門應用分子技術診斷已知和新興病原感染、偵測群聚感染事件、了解與控制抗藥問題、發展保護人民健康的方法。目前美國50個州都已擁有NGS分析設備與能力，取得NGS操作的認證(certification)。

此次會議，所有簡報有關群突發事件的調查，都已使用NGS的技術，進行全基因體定序基因分型(WGS-based genotyping)。應用WGS序列進行基因分型的序列分析方法，主要有wgSNP approach與extended MLST (cgMLST/wgMLST) approach。雖

然PulseNet International在去年的聚會討論決定使用cgMLST/wgMLST的分析方式[5]，然而這次會議簡報者都還是使用SNP的分析方式，原因是extended MLST的分析方式需要建置一個可供產生菌株cgMLST/wgMLST基因圖譜的基因資料庫(allele database)，使用共同的allele database，產生菌株基因圖譜才能跨實驗室相互比對，也才能讓PulseNet International得以運作。法國已擁有自己的*Listeria* allele database，自2017年開始，國內所有*Listeria monocytogenes*菌株皆進行全基因體定序，使用cgMLST方式決定基因型別[11]。US CDC預計今年再和歐洲相關人員討論WGS-based genotyping的標準，因此需密切注意其決定。

筆者2013年參加INFORM 2013年會議，體認NGS應用的發展趨勢，回國後即積極建置實驗室NGS定序量能，招募具電腦分析能力的研發替代役與研究助理，投入開發巨量序列分析工具的工作。過去在NGS的應用上已有一些成果[1-4]，也開發出可供cgMLST/wgMLST應用的工具[7, 8]，在技術上可與美國、歐洲等先進國家接軌。

建議事項：

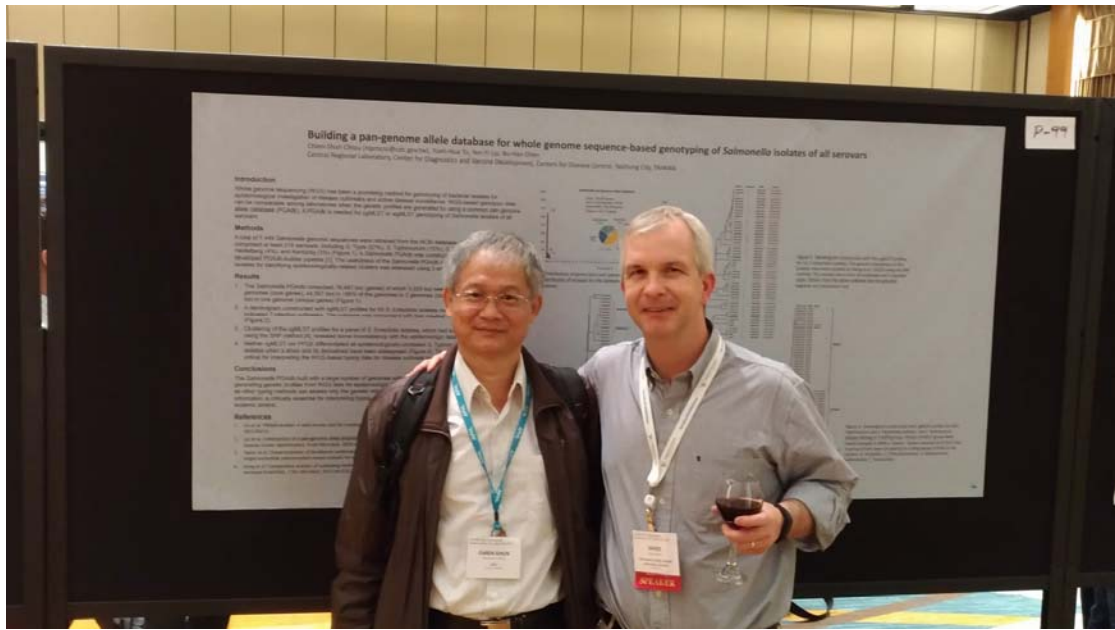
- 一、**應經常性派員參加INFORM會議：**每2年舉辦的INFORM會議，有和PulseNet相關的技術訓練與經驗交流，有分子分型技術在食媒疾病監測與流病調查的實例分享，也有跨機關與跨專業的簡報分享，是值得台灣公衛機關實驗室、流病人員與業務單位關注的會議。應至少每隔一屆(4年)即派員參加，以收集最新的發展訊息與經驗。
- 二、**防疫關機應加速提升NGS的應用能力：**NGS進行的全基因體定序產生的DNA序列資料，不但能產生菌株基因型別，供流病調查與研究之用，也能自DNA序列中擷取抗藥基因與致病因子基因資料，可鑑定菌株血清型(沙門氏菌、李斯特菌、大腸桿菌等)，所得到的DNA序列資料，也能隨時回溯分析應用(例如2016年底中國發現plasmid-borne colistin-resistance gene, *mcr-1*，丹麥與英國分析其WGS資料庫，很快偵測到先前菌株攜帶*mcr-1*基因的結果)。菌株全基因體序列也可取代菌株的貯存方式，當有需要的時候可立即進行基因比對分析；在生物安全上，國際交換DNA序列也比交換活體菌株容易。歐美先進國家已積極應用NGS技術，法國自2017年即完全採用NGS進行*Listeria monocytogenes*菌株的基因分型，美國也規劃在2019年全面使用NGS進行所監測的食媒菌種的基因分型；今年法國奶粉污染菌株，法方提供給疾管署的是菌株的全基因體序列，已不再提供PFGE圖譜。面對先進國家防疫機關採用新技術的趨勢，台灣防疫機關應重視，方能與國際防疫技術接軌。
- 三、**招募生物資訊人才：**NGS的應用，重點在分析巨量DNA序列資料的能力。目前中區實驗室雖有初階的NGS資料分析量能，但這些人員皆屬非正職人員的研發替代役或研究助理。中區實驗室三年內將因退伍與助理轉業而離職，會面臨生資分析團隊瓦解的危機。日本國家傳染病研究所很早即有生物資訊組的編制，疾管署有必要儘快招募生物資訊人才，提升NGS此項新技術在防疫的應用。

肆、參考資料

1. Chiou CS, Chen YT, Wang YW, Liu YY, Kuo HC, Tu YH, Lin AC, Liao YS, Hong YP: **Dissemination of mcr-1-Carrying Plasmids among Colistin-Resistant Salmonella Strains from Humans and Food-Producing Animals in Taiwan.** *Antimicrob Agents Chemother* 2017, 61(7).
2. Liao Y-S, Liu Y-Y, Lo Y-C, Chiou C-S: **Azithromycin-nonsusceptible *Shigella flexneri* 3a in men who have sex with men, Taiwan, 2015 – 2016.** *Emerg Infect Dis* 2017, 23(2):345.
3. Chiou CS, Izumiya H, Kawamura M, Liao YS, Su YS, Wu HH, Chen WC, Lo YC: **The worldwide spread of ciprofloxacin-resistant *Shigella sonnei* among HIV-infected men who have sex with men, Taiwan.** *Clin Microbiol Infect* 2016, 22(4):383 e311-386.
4. Chiou CS, Alam M, Kuo JC, Liu YY, Wang PJ: **Chromosome-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi.** *Antimicrob Agents Chemother* 2015, 59(1):721-723.
5. Nadon C, Van Walle I, Gerner-Smidt P, Campos J, Chinen I, Concepcion-Acevedo J, Gilpin B, Smith AM, Man Kam K, Perez E *et al*: **PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance.** *Euro Surveill* 2017, 22(23).
6. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV: **PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States.** *Emerg Infect Dis* 2001, 7(3):382-389.
7. 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.
8. 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.
9. Kuo HC, Lauderdale TL, Lo DY, Chen CL, Chen PC, Liang SY, Kuo JC, Liao YS, Liao CH, Tsao CS *et al*: **An association of genotypes and antimicrobial resistance patterns among *Salmonella* isolates from pigs and humans in Taiwan.** *PLoS One* 2014, 9(4):e95772.
10. Ho YN, Tsai HC, Hsu BM, Chiou CS: **The association of *Salmonella***

- enterica* from aquatic environmental and clinical samples in Taiwan. *Sci Total Environ* 2017, **624**:106-113.
11. Alexandra M, Mathieu T, Alexandre L, Estelle H, Edith L, Nathalie F, Dieter Van C, H el ene B-D, Pierre T, Guillaume V *et al*: Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. *Emerg Infect Dis* 2017, **23**(9):1462.

伍、附錄



照片一：與 David Boxrud (Minnesota Department of Health)在Poster 前合影。