

出國報告(出國類別:研究)

食品病原性生物分子分型技術研習
出國報告

服務機關:衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱:机文財副研究員

出國地區:瑞士日內瓦

出國期間:中華民國 106 年 10 月 13 日至 10 月 22 日

報告日期:中華民國 106 年 12 月 11 日

摘要

近年來國內外食安問題頻傳，然因目前的檢驗技術多屬針對性，對不同病原採取不同檢驗流程與培養篩檢材料，受限於人力物力，目前針對食品衛生安全之相關研究通常僅就生菌數、大腸桿菌群、大腸桿菌等衛生指標，及金黃色葡萄球菌、沙門氏菌、仙人掌桿菌、單核球增多李斯特菌等常見病原進行檢測分析，然而對未檢出目標病原之檢體，卻缺乏其他潛在病原及可能污染原因的系統性探討；此外，由於交通發達，國際間人員、貨物交流頻仍，提高了病原傳播及變異的機會，傳統的檢測方式不易發現新型高風險病原之興起。為進一步提升食品衛生安全，完備食因性病原之監測及防範，國際逐漸採用次世代定序分析，以發掘潛在的食因性病原及型別等細節資料，結果將有助提高食品中毒原因判明率，提早發現新興病原，預防大規模案件爆發。然而次世代定序技術中，軟硬體差異及操作流程等諸多因素均可能影響分析結果，本計畫透過參訪國際知名微生物元基因體學(Metagenomics)實驗室與國際臨床元基因體學研討會，研習檢測流程、品質管控及標準化等重點，以利日後結果判讀及行政審定。

	頁數
摘要.....	1
壹、前言與目的.....	3
貳、行程及工作紀要.....	4
參、研習內容.....	5
肆、新增國際實驗室研究人員資料.....	18
伍、心得與建議.....	18
陸、謝誌.....	19
柒、參考資料.....	19

壹、前言與目的

我國每年的食品中毒案件中，可有效鏈結原因食品與臨床檢體病原者，相較於日本、美國等已開發國家的中毒原因判明率，仍有努力空間。細究其原因，除了缺乏適當嫌疑食餘檢體，主要因素之一乃檢驗方法之限制。傳統的食因性病原監控常需針對不同病原採取特定材料及流程，透過培養的方式，觀察菌落特徵及生化代謝特性進行食因性病原鑑定，然而流程上常需不同階段的篩選培養，受限現有檢驗方法數及人力物力，故通常僅針對常見食品中毒病原進行檢測，容易遺漏其他較少見之病原，亦不利緊急疫情的調查與控制。考量每個國家氣候、食材來源、風土民情均不相同，食品污染風險及病原種類也各有差異，即使是先進國家，如德國，也曾於2011年發生因食用芽菜，導致超過3,000人感染病原性大腸桿菌，殃及歐美洲數國之情事，最終造成50餘人死亡，隨著食品業全球化，本國自然無法置身度外，面對外食人口增加、國人飲食習慣改變、病原變異及國際物流等未來風險，須持續加強行政面管理外，亦應透過增加可檢驗品項、改善檢驗效能及提升檢驗技術，以發掘新興病原，擴增食品風險及病原之背景資料，達到提早預防大規模食品中毒案件之目標。近年來一些新興技術如次世代定序，已經廣泛應用於各種微生物之研究，透過全基因體定序、16S RNA 基因解讀等，搭配元基因體學(Metagenomics)分析，可有效分析檢體中微生物的組成菌群、菌種變異、毒力因子與抗藥性、親緣關係等，相關研究應用在食因性病原的檢測及案情調查已成為食品安全領域上極重要的課題。然而欲將次世代定序技術列為食品安全常規檢驗方法仍有極大的挑戰，不同的儀器、前處理套組、分析軟體及參數設定、操作人員手法等均可能顯著影響分析結果，因此需要反覆驗證軟硬體及檢驗流程的品質管控，以達到流程標準化，方可進行有效之結果判定。考量臨床醫療亦面臨類似問題，且相關研究較為成熟，本計畫希冀藉由參訪國際知名微生物元基因體學實驗室與研討會，研習檢測步驟及品管重點，對本署日後相關業務之推展將有相當助益；亦可擴展國際人脈，提高本署能見度。

貳、行程及工作紀要

日期	行程及工作紀要
10/13 (星期五)	啟程(桃園機場至荷蘭阿姆斯特丹至瑞士日內瓦)
10/14~10/18 (星期六~星期三)	一、地點:日內瓦大學醫學院微生物基因體實驗室 二、了解實驗室研究方向、技術平台 三、病原微生物分子分型技術研習，如: <ol style="list-style-type: none"> 1. 元基因體學分析流程 2. 相關軟硬體使用經驗 3. 檢體前處理及資訊分析之品質管控
10/19~10/20 (星期四、星期五)	一、地點:日內瓦會議中心(Campus Biotech) 二、聽取研討會主題，如: <ol style="list-style-type: none"> 1. 元基因體學分析流程 2. 元基因體學檢驗判別流程標準化 3. 次世代技術於病因物質檢驗之應用案例 4. 元基因體學分析之展望與挑戰 三、參研壁報論文
10/21~10/22 (星期六、星期日)	返程(瑞士日內瓦至荷蘭阿姆斯特丹至桃園機場)

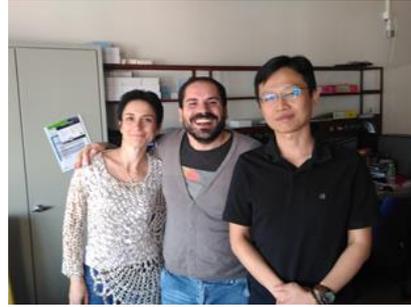
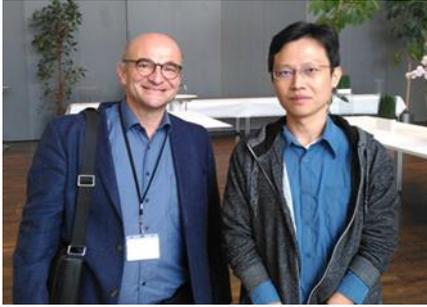
參、研習內容

(一) 日內瓦大學醫學院微生物基因體實驗室及國際臨床元基因體學研討會

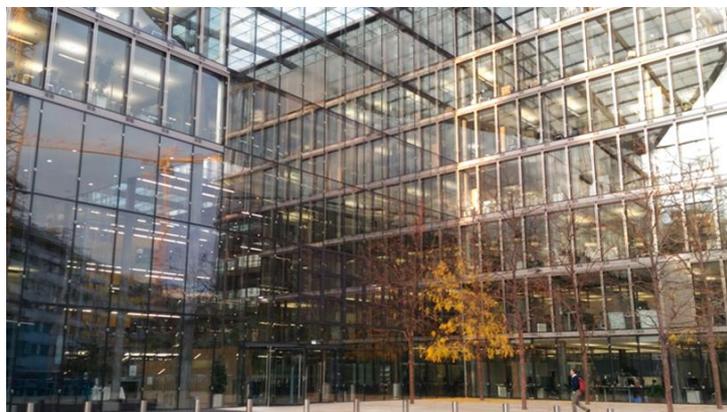
瑞士日內瓦大學醫學院微生物基因體實驗室位於日內瓦大學附屬醫院旁(圖一)，由 Jacques Schrenzel 醫師/教授主持，成員有博士後研究員、助理等約十數人(圖二)，研究方向包含臨床感染、細菌學及生物資訊分析，且與諸多研究機構有實質上的合作關係，每年除了均能發表數量可觀的優質論文，且致力於元基因體學的應用推展，於國際間享有盛名；2017 年國際臨床元基因體學研討會(ICCMg、nternational Conference of Clinical Metagenomics)則是第二度舉行，Schrenzel 教授即為會議的共同發起人之一。議程在當地頗具建築特色的會議中心展開(圖三)，與會者來自世界多國，內容聚焦次世代定序及元基因體學於臨床感染症中病原微生物鑑別的實際應用，不僅有成功實例分享，也有各種檢測流程設計與軟硬體資訊。



圖一、日內瓦大學附設醫院(上)及醫學院實驗室(下)。



圖二、實驗室人員合照照片(左: Jacques Schrenzel 教授；右:實驗室資訊分析人員。)



圖三、國際臨床元基因體學研討會場地(Campus Biotech)。

(二) 次世代定序於感染案例中病原判別之應用潛力

次世代定序藉由大規模平行式的定序，可在一次實驗中獲得至少數百萬鹼基序列的大量訊息，常用以建立各種生物的全基因序列圖譜或微生物菌相(Microbiota)圖譜，因此越來越多的研究試圖將次世代定序應用於病原菌檢測，除了可減少傳統階段性選擇培養及生化分析的時間，搭配資料庫比對與元基因體學(Metagenomics)分析技術，可同時檢測多種病原，相關衍生應用還可獲得許多有用之資訊，如病原菌的毒力決定因子、抗藥性、血清型別、親緣關係或基因突變點位。現今由於人員物流全球化發達，提高了病原流通突變的機率，增加新興病原出現的可能性，然而目前對病原微生物的檢測多仰賴已知的訊息，如生長喜好、菌落型態、生化特性、

臨床病徵及特定基因序列等，若以傳統方法檢測，容易忽略新興病原。次世代定序因則透過全基因體定序，有助發掘不明風險的非典型目標，透過單核苷酸多形性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 或基因組序列差異分析，亦有利病因溯源及歷史案例連結，日後如果透過國際間資料庫的整合比對，更可預測食因性病原的傳播及變化，以提早擬定防治策略。

雖然次世代定序仍有部分有待克服的缺點，例如需要高規格的樣本前處理以獲取大量高純度核酸、儀器與試劑費用昂貴、從樣本前處理至數據產出的一次流程耗時數日、龐大的實驗數據分析不易等，然而隨著次世代定序技術平台日漸成熟，單次定序成本已逐漸降低，越來越多的套裝試劑與軟體亦有助減少費用及操作難度，因此將次世代定序應用於臨床病因微生物檢測的案例越見增加。比起傳統選擇性培養搭配生化鑑別法，次世代定序更適合檢測像結核分枝桿菌、真菌或部分病毒等生長緩慢、不易培養或具有高感染危險性的病原微生物；考量臨床感染中，如腦膜炎、肺炎、敗血症等，仍有 15 至 60% 案例肇因不明(圖四)，藉由次世代定序掃描檢體微生物組成，將有助解析病因物質。

Targeting Acute Infectious Diseases in Hospitalized Patients

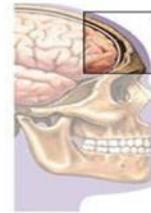
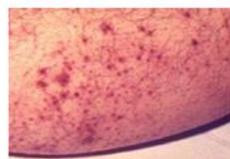


Pneumonia
15 – 25% unknown cause

- Van Gageldonk-Lafeber, (2005) *CID* 41:490-497
- Louie, et al., (2005) *CID* 41:822-828
- Ewig, et al. (2002) *Eur Respir J* 20:1254-1262

Meningitis / Encephalitis
40 – 60% unknown cause

- Glaser, et al., (2006) *CID* 43:1565-1577
- Vora, et al., (2010) *Neurology* 82:443-451



Fever / Sepsis
~20% unknown cause

- Eber, et al. (2010) *Arch Intern Med* 170:347-353

**Failure to obtain a timely diagnosis leads to delayed / inappropriate therapy,
increased mortality, and excess healthcare costs**

圖四、次世代定序於臨床應用之潛力(<http://clinicalmetagenomics.org/>)。

目前已有不少運用次世代定序，成功判明臨床感染症中罕見肇因病原的實例，尤其針對情況危急的菌血症、腦炎及肺炎。Schrenzel 教授實驗室即曾於肝膿瘍膿液中，檢出人畜共通傳染，較多見於獸醫、畜牧業者等從業人員的布魯氏菌。會議講者中，亦有述及於反覆感染、久治不癒的人工關節患處裡，檢出主要與肺炎有關的黴漿菌。此外，美國科學家則在一位不明原因感染而病危的青少年身上，成功發現聖地羅西鉤端螺旋體(*Leptospira santarosai*)，後續更成功治癒出院(圖五)，其他較常應用的案例有尿路感染、院內感染、鮑氏不動桿菌與金黃色葡萄球菌這類的抗藥性微生物等。諸多案例皆證實次世代定序於病原判別的應用潛力，因此美國 FDA 及國家標準技術研究所(National Institute of Standards and Technology、NIST)等組織也開始著重次世代定序臨床應用的管理規範。迄 2017 年為止，美國 FDA 已核准 Illumina 公司的 MiSeqDx platform 及 Life Technologies Corporation 公司的 Ion PGM Dx system，以及儀器所需使用的材料套組，諸如樣本前處理、核酸庫製備、定序晶片及品質管控與資料分析的軟體等，作為臨床診斷的輔助工具，目前可用於纖維性囊腫的檢測。

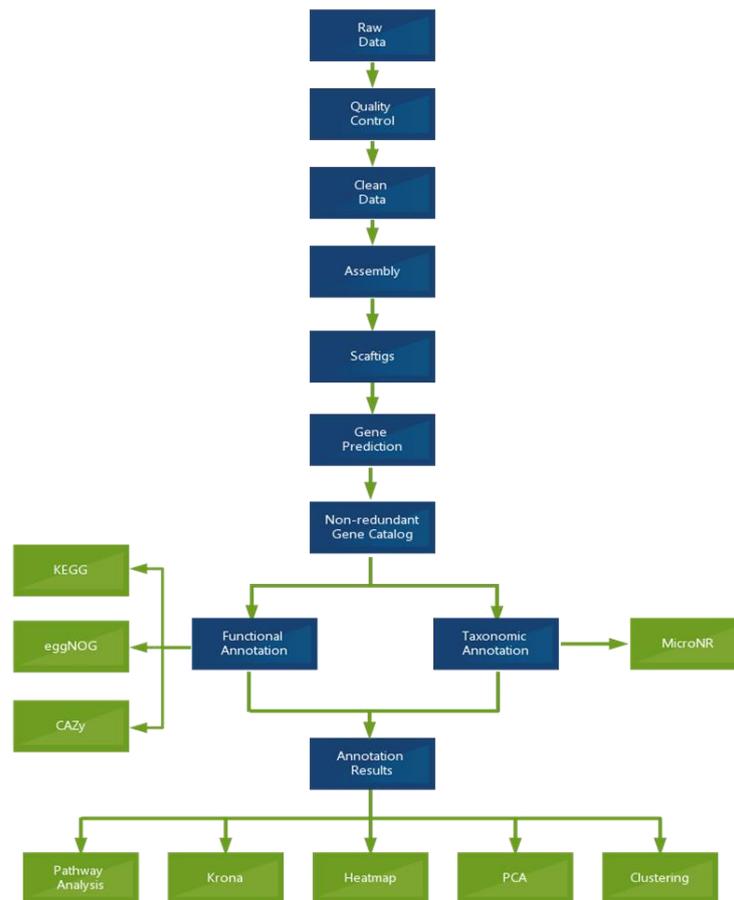
(<http://www.cde.org.tw/Content/Files/Knowledge/45189bb7-1908-4797-a371-b0dee4d9fb53.pdf>)



圖五、次世代定序於臨床應用之潛力(<http://clinicalmetagenomics.org/>)。

(三) 次世代定序及資訊分析流程

臨床微生物檢體的次世代定序操作步驟，主要分為樣本前處理、核酸抽取、基因庫製備、定序及資料分析。其中，為得到最理想的效果，資料分析通常需經過連續性，依序使用多種不同軟體的資訊處理流程(Pipeline)(圖六)，又可細分成定序資料品質管控與篩選、定序資料比對組裝、序列組裝成果品質管控、片段序列分析與資料庫比對、基因功能註解(annotation)及親緣分析等多個步驟，視研究目的，不同研究主題往往需要專屬的資訊處理流程及對應軟硬體。由於各種次世代定序儀器及分析軟體皆有優缺點，例如某些儀器平均定序片段較長，適合搭配擅長組裝大片段的軟體，此外，軟硬體的選擇尚有不少因素需要考慮，包含資料數量、重複序列多寡、軟體計算速度、介面操作難易度及耗費電腦資源程度等。



圖六、次世代定序資訊分析流程(<http://clinicalmetagenomics.org/>)。

1. 資料修裁(Data Trimming):

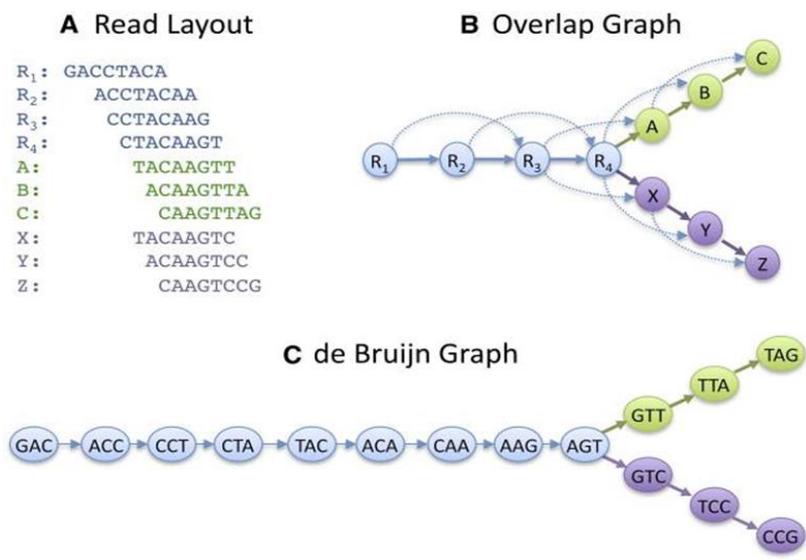
原始定序資料通過基本的品質控管後，為提高後續分析的正確性，須對資料進行初步的篩選，剔除多餘或選擇與研究目的相關資訊。

- 適子及其他標籤序列(Adaptor、Tag)
- 原核及真核核糖核酸(Prokaryotic、Eukaryotic):例如部分研究鎖定人體檢體中的病原微生物，即可透過移除真核 RNA 序列，以針對病原菌轉錄體序列進行分析。
- RNA 種類(mRNA、tRNA、microRNA)
- 高度重複序列(Highly repetitive sequence):高度重複之短序列不易正確組裝，若非研究關鍵，可考慮於序列組裝前，先行移除。
- 讀長(Reads length): 例如移除讀長小於 50 bp 的瑣碎序列，提高組裝正確性。

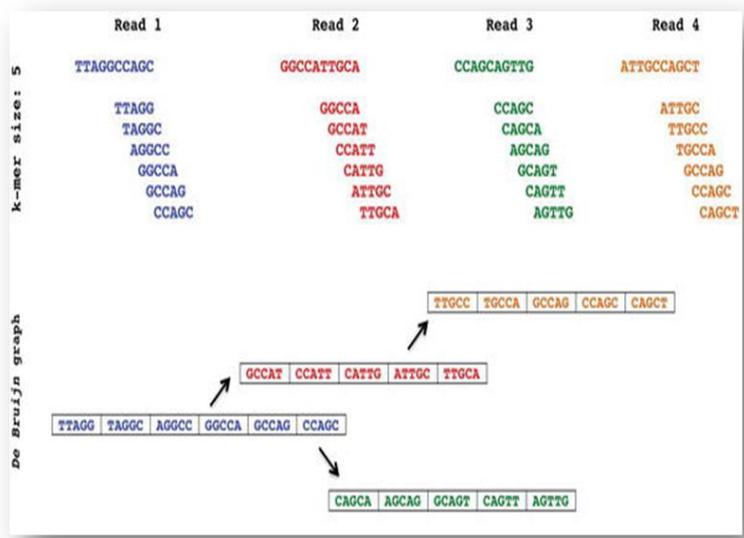
2. 序列組裝(Assembly)

序列組裝方式主要分為有參考資料庫/序列的前提下，進行測序片段比對組裝(Alignment)，以及不仰賴現有資料，單純使用原始序列資訊進行拼接組裝的 *De Novo*法(圖七)。透過參考資料庫進行基因序列組裝，不僅可提高組裝正確性，也有助發現單核苷酸多型性點位 (Single Nucleotide Polymorphism、SNP)、拷貝數變異 (Copy Number Variation、CNV)、插入變異或缺失等突變，可快速掃描新興病原的遺傳差異，然而針對像環境菌群等含有大量未知物種，或變異程度超過預期、全新基因等，仍需要其他輔助，方能提高發掘率；而 *de novo* 法係完全依靠邏輯運算完成序列組裝，又可分成 Overlap-layout-consensus (OLC)及 de Bruijn graph (DBG)兩種常見的運算方式。OLC 法乃將定序序列(reads)做兩兩比對 (Pair-wise alignment)，找出重疊區域後，以古典數學之漢米爾頓路徑問題，計算出這些片段可能的排列順序，因相當耗費電腦演算資源，故適合序列數目較少而測序長度較長的原始資料。DBG 法則是將所有測序片段拆解為 k-mer (k 為自

行選定的序列核苷酸字母數)，由 k-mer 重疊的區段，以尤拉路徑(Eulerian Path) 原理，運算出組裝結果 (圖八)。因電腦演算需求較低，適合資料量大但片段短的資料快速分析上。



圖七、OLC 及 DBG 運算法比較(Genome Res. 2010. 20: 1165 - 1173.)。



圖八、DBG 法分析流程，圖中所選擇 k-mer 為 5 (Applications of RNA-Seq and Omics Strategies - From Microorganisms to Human Health, DOI: 10.5772/intechopen.68983)。

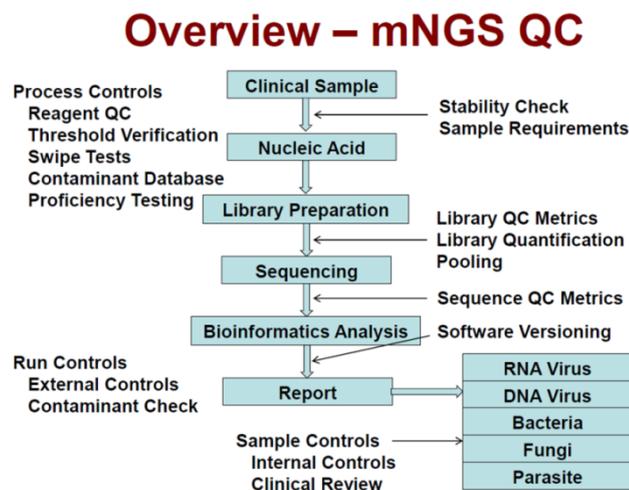
3. 基因功能註解 (annotation)

定序序列組裝完成後，可得到長度較長，訊息較完整的序列群集，如果是個體的綜合資訊，可經由與現行資料庫分析比對，找出結果中是否有特定功能之基因，來推斷生物特性，或藉由比較關係接近但彼此間有特殊生理功能差異之菌種所帶的不同基因，以發掘基因之角色。若研究對象為不同微生物組成的群體，亦可將組裝後的長片段先行併倉(Binning)，例如按菌種先將序列分成小群集的資訊，以利後續基因分析。

(四) 次世代定序實際應用的品質管理

1. 品質管理綜觀

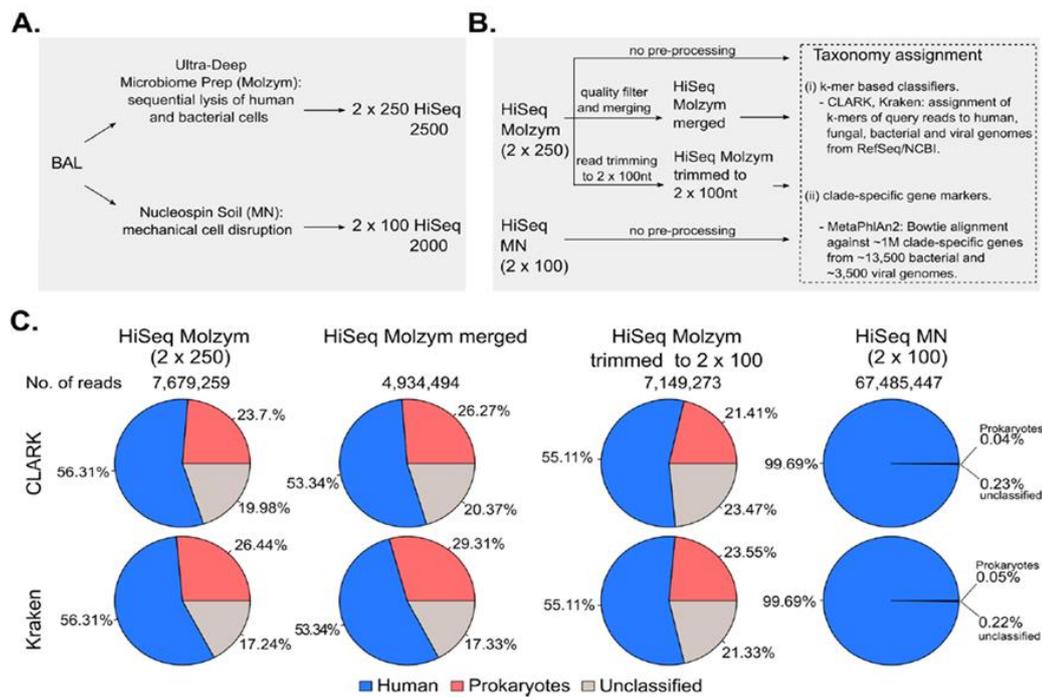
當次世代定序技術逐漸由學術研究進入到實際應用，由於涉及到結果判定、標準設立、行政措施等法規科學層面，縱然操作成本逐年下降，在現今如此多樣的軟硬體前提下，如何達到檢測品質管控及流程標準化，將是未來應用次世代定序無法避免的一道難題，如此，方能促進技術推廣與實驗室間的資訊比對。事實上，次世代定序的實際應用，從樣本前處理、核酸抽取與擴增、基因庫製備、定序及資料分析到實驗室環境皆可能需要一定的品質管理，涉及層面廣含試劑及儀器效能確認、外添加的反應控制組、軟體設定、污染排除等(圖九)。



圖九、次世代定序實際應用之品質管控 (<http://clinicalmetagenomics.org/>)。

2. 樣本前處理品質管理

將次世代定序運用臨床病原微生物之檢測，由於臨床檢體基質富含大量人體上皮及免疫細胞，亦容易有非致病的常在菌(Normal flora)汙染，因此需要在前處理步驟盡量減少此類可能產生大量背景資訊的基質，避免干擾後續目標分析。以人體肺炎肺部沖提液為例，Schrenzel 教授實驗室研究使用細菌分離萃取商業套組對資訊輸出之影響，若直接以檢體萃取核酸進行分析，不論使用不同儀器機型或組裝軟體，最後所得到的序列幾乎皆為來自人體的背景資訊(>99%)；檢體若先經套組處理，則原核微生物的序列占比可大幅提升至 20 到 30%，方有利病原判別(圖十)。食品基質由於富含大量食品本身與環境背景菌，未來次世代定序的運用也將面臨類似問題。



圖十、臨床檢體不同樣本前處理方式對輸出資料的影響 (Int. J. Mol. Sci.2017.

18:doi:10.3390/ijms18092011)。

3. 試劑套組品質管制

雖然次世代定序過程所使用，包含檢體與 DNA 製備擴增、定序及儀器設備維護清洗等不同試劑套組，多由相關廠商直接生產輸出，然而不同批次的產品效果可能因生產原料、製造條件、貨物運送而存在些微差異，即使是實驗室使用的無菌水，亦可能因機器濾心、盛裝容器這類的問題，有不同的污染程度。考量法規科學所需的嚴謹性，研討會議中即有研究者提出應透過預先測試，就酵素、控制組微生物標準株等重點試劑進行質量上一定程度的品管措施，以維持實驗的穩定性(圖十一)。

Critical Reagent Log (Very partial list)	
Baseline DNase	Epicentre - Illumina
C.neoformans	American Type Culture Collection
DNA Clean & Concentrator Kit -5 Capped Columns	Zymo Research
dNTPs	Thermo Fisher - Invitrogen
EZ1 Virus Mini Kit v.2.0	QIAGEN
HiSeq Rapid SR Cluster Kit v2 Flowcell	Illumina
HiSeq Rapid SR Cluster Kit v2 Rapid SR Cluster Kit	Illumina
HiSeq Rapid SR Cluster Kit v2 Flowcell	Illumina
K.pneumoniae	American Type Culture Collection
Linear acrylamide	Thermo Fisher - Life Technologies
Lysing Matrix B Tube (2mL)	MP Biomedicals
MS2 Phage	American Type Culture Collection
NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit	NEBNext (New England Biolabs)
Nextera Index Kit v2 Set A (96 indexes, 384 samples)	Illumina
Phusion High-Fidelity PCR Kit	Thermo Fisher - Life Technologies
SEQUENASE VERSION 2.0 DNA POLYMERASE - UNDILUTED	Affymetrix
Superscript III enzyme	Thermo Fisher - Invitrogen
Synthetic CSF Matrix 100 mL	Golden West Biologicals
T1 Phage	American Type Culture Collection
Turbo Dnase Kit	Thermo Fisher - Ambion
Water, (DNASE, RNASE free), Fisher BioReagents	Fisher Scientific
Buffer EB	Qiagen
Water, (DNASE, RNASE free), Fisher BioReagents	Fisher Scientific

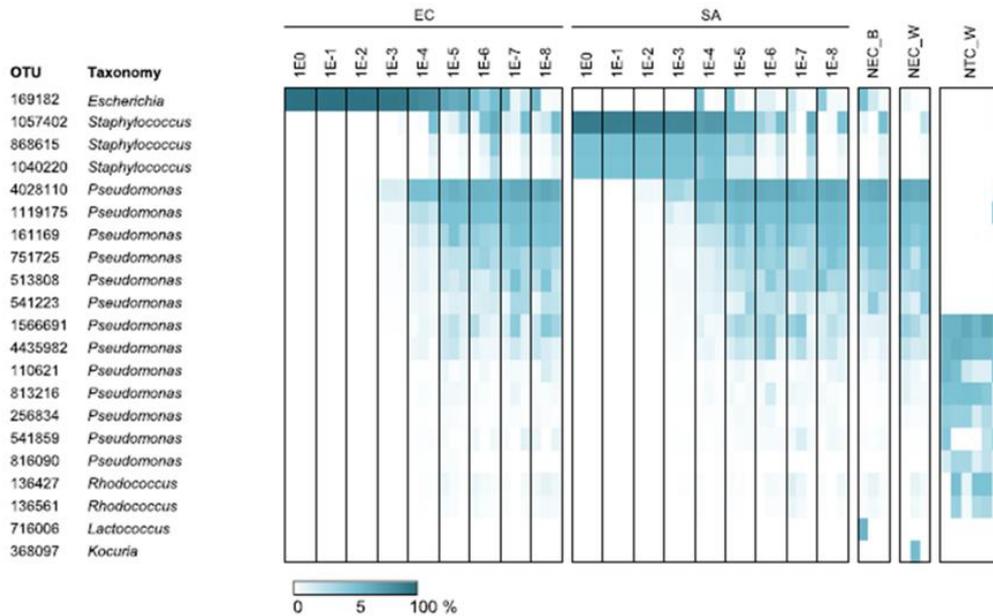
Include:
Enzyme kits
Control organisms
Sterile materials

QC metric:
Prior to use
Activity
Contamination

圖十一、重點試劑例子(<http://clinicalmetagenomics.org/>)。

Schrenzel 教授實驗室亦有研究，指出次世代定序所受污染極難避免。以檢測大腸桿菌及金黃色葡萄球菌為例，發現當取連續稀釋標準菌進行前處理及定序分析，原始菌數較多時，檢出序列皆如同預期，占比幾乎皆為該標準菌株；一旦稀釋倍數增加，菌數減少，假單胞菌屬(Pseudomonas)這類容易污染容器、管道的菌種序列資訊將逐漸浮現，並可能影響結果判別，比方不易確認綠膿桿

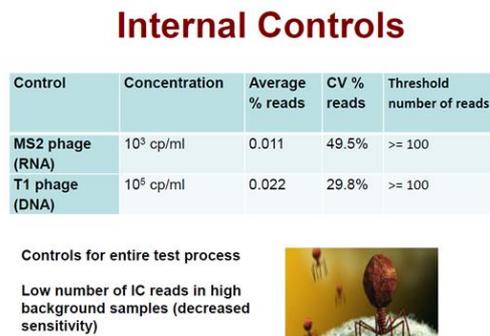
菌究竟來自感染或實驗過程的水污染(圖十二)。



圖十二、試劑污染對資訊結果的影響 (BMC Microbiol. 2016. 16:73)。

4. 內部及外部控制組

在次世代定序過程中，試劑套組與儀器狀態均可能影響輸出結果。為確實維持每次實驗的穩定性及可信度，必須透過作為控制組的標準參考微生物，以利評估分析結果。內部控制組中，因為直接添加入待檢測的檢體，臨床上常用的為經過定量且少見於人體檢體的噬菌體(圖十三)，方不致影響結果判讀。經由參考微生物的輸出資訊品管並比較整體相對數據量，可得知檢體之定序品質；外部控制組則採不同標準菌(圖十四)，單獨完成整個實驗流程後，藉分析結果得知讀長、基因體涵蓋率等品質參數。



圖十三、內部控制組參考微生物 (<http://clinicalmetagenomics.org/>)。

External Controls

- Positive Control

Representative Organism	Pathogen Category	Genus	Family	LoD	Units
CMV	DNA Virus	<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>Herpesviridae</i>	9.41	copies/mL
HIV	RNA Virus	<i>Lentivirus</i>	<i>Retroviridae</i>	100.75	copies/mL
<i>K.pneumoniae</i>	Gram(-) Bacteria	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	8.71	CFU/mL
<i>S.galactiae</i>	Gram(+) Bacteria	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcaceae</i>	8.92	CFU/mL
<i>A.niger</i>	Mold	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillaceae</i>	130.06	CFU/mL
<i>C.neoformans</i>	Yeast	<i>Filobastidiella</i>	<i>Tremellaceae</i>	0.01	CFU/mL
<i>T.gondii</i>	Parasite	<i>Toxoplasma</i>	<i>Sarcocystidae</i>	55.06	organisms/mL

- Negative Control

- Elution buffer (negative extract)
- Also used as background normalizer

圖十四、外部控制組參考微生物 (<http://clinicalmetagenomics.org/>)。

5. 資訊處理品質管制

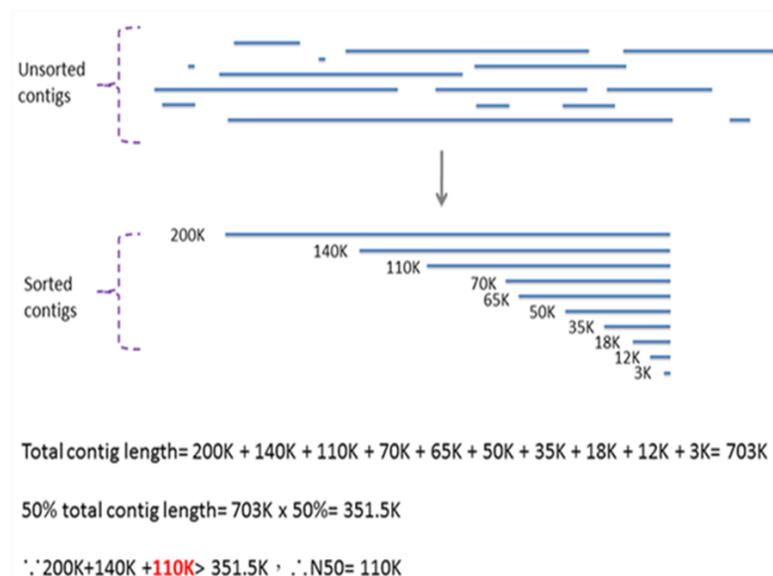
完整的次世代定序應用流程中，資訊取得與處理的品質至為關鍵，也因此，衍生出多種不同的品質參數與相關專門用以管控資訊品質的軟體，例如定序完成後，針對原始的定序序列品質參數，即有定序平均讀長(Reads)、讀長分布情形等參數，若儀器理想狀態下可獲取平均數百鹼基的長度，一旦某次實驗讀出的多為數十鹼基的瑣碎片段，將不利後續序列的組裝分析，因此可視為品質問題。此外，組裝分析後亦有相當的品質策略，常用的參數有：

- GC 占比：GC 含量占成功組裝完成基因組中 ATCG 四種鹼基之比例，除非特例，理論上多樣性充足的檢體裡，CG 含量應接近 50%。
- 定序深度：定序得到的總鹼基數與目標基因組鹼基數的比值。例如一已知菌種的基因體約含 5 百萬個鹼基，測序則獲得 5 千萬鹼基的資料量，定序深度即為 10x。
- 序列覆蓋率(%)：檢出序列占已知目標基因組的比例。基因組如果含有高比例

的 GC 或重複序列，均可能影響序列組裝的完整性。

- Contig N50：在 *de novo* 組裝法中，將原始讀取序列拼接成多條得較長片段，即為 Contig，而先後順序已知的 Contigs 則進一步成為 Scaffold。由於 Contigs 長度不一，將所有的片段長度相加，便可獲得一個總長度，若將所有的 Contigs 依照長度，由長到短進行排列，一旦相加的長度達到總長度的一半時，最後一個加上的片段長度即為 Contig N50 參數。如果平均讀長太短或序列組裝拼接非常不完整，Contig N50 亦較小，因此可作為序列組裝品管的判斷依據(圖十五)。

除了上述的多種不同品管參數外，亦可採用標準物質分析，經由檢視比較定序成果與已知參考微生物的基因序列，判定定序正確性與組裝效果，了解是否有漏失、組裝偏誤等問題。



圖十五、Contig N50 (<http://yourgene.pixnet.net/blog/post/75655965-n50>)

6. 環境品質管制

為避免結果誤判，會議中，學者更提出可定期針對實驗室環境及儀器、容器進行採檢，以收集背景資料，了解日後可能污染微生物種類與趨勢變化。

肆、新增國際實驗室研究人員資料

(一) Jacques Schrenzel 教授

Jacques Schrenzel 教授為日內瓦大學醫學院微生物基因體實驗室主持人，研究方向為臨床感染及微生物資訊分析，同時也是國際臨床元基因體學研討會的共同發起人。

(二) Vladimir Lazarevic 博士

Vladimir Lazarevic 博士為日內瓦大學醫學院微生物基因體實驗室博士後研究學者，負責綜整研究規劃，擁有豐富的次世代定序檢測品管與污染研究經驗。

(三) Stefano Leo

Stefano Leo 博士同為日內瓦大學醫學院微生物基因體實驗室博士後研究學者，負責生物資訊分析，熟捻多種元基因體學分析軟體及 LINUX 系統。

伍、心得與建議

(一)研習心得

為進一步提升食品衛生安全，完備食因性病原之監測及防範，本計畫透過參訪，研習次世代定序及元基因體學分析技術，相關成果將應用於發掘食品中潛在食因性病原，未來有助提升食品中毒原因判明率。因定序技術可深入分析檢出病原，獲得病原的型別、毒力變化、抗藥性及親緣關係等資料，除了可與國內外病原相互比較，提早發現新興病原，更可預防大規模案件爆發，增加民眾對食品安全的信心。總而言之，本次研習藉由與實際操作人員的經驗交流，了解檢測流程及品質管控的諸多細節與重點，然而實際應用上，仍有困難點有待克服，例如連鎖聚合酶反應 (Polymerase Chain Reaction、PCR) 衍生的錯誤及放大偏好差異、外部污染、檢出之病原菌即為原因物質等問題，因為食品基質相對複雜，相關方法在食品上的實用性仍

有待研究改進。

(二)建議

因目前的檢驗技術多屬針對性，對不同病原須採取不同檢驗流程與培養篩檢材料，受限人力物力，故針對食品衛生安全通常僅監測生菌數、大腸桿菌群、大腸桿菌等衛生指標，及金黃色葡萄球菌、沙門氏菌、仙人掌桿菌、單核球增多李斯特菌等常見病原，也因此容易遺漏其他病原。未來可利用次世代定序等新技術，提高非典型或新興病原檢出率。考量次世代序列資料相當龐大，建議開設生物資訊課程或引進生物資訊人員，以強化資訊分析能力。

陸、謝誌

再次感謝長官的愛護與栽培，也因此後學才有機會踏上瑞士國土，見識到次世代定序及元基因體學的最新發展與應用，也更加了解相關檢測流程及品質管控的重點。

柒、參考資料網站

International Conference on Clinical Metagenomics (ICCMg)官網

[http:// clinicalmetagenomics.org/](http://clinicalmetagenomics.org/)