

出國報告（出國類別：研究）

抗藥性微生物之相關研究

服務機關：農業部獸醫研究所

姓名職稱：官南綾副研究員

派赴國家：美國

出國期間：113/3/23-113/4/1

報告日期：113/6/5

摘要

在獸醫領域有以治療、預防或控制疾病等目的而使用抗微生物藥物，具抗藥性的微生物，尤其是細菌，其具有抗藥性基因能藉由如質體等傳播到相同或不同屬的其他細菌，助長了抗藥性的傳播。本所長期投注心力於生病動物之病原菌抗藥性監測及研究，抗藥性菌株的演化及所帶有的抗藥機制日益複雜，且在健康一體(One Health)的理念下，各個領域應共同合作，為人類、動物和環境的健康問題找到解決方案，抗微生物藥物耐藥性 (antimicrobial resistance, AMR) 是其中所面臨的重要問題之一。在抗藥性監測方面，全基因序列分析 (Whole genome sequencing, WGS) 是一項重要的技術，能更全面地了解抗藥性細菌的基因體結構、親緣性及傳播機制。本次赴美國研習，參訪家禽研究中心微生物安全及加工研究部門(National Poultry Research Center, Poultry Microbiological Safety and Processing Research Unit, ARS-USDA)，目標是了解 WGS 技術在抗藥性微生物分析之應用，如何建立相關的分析系統和實驗室數據庫，以提高細菌抗藥性研究和監測的能力。本次研習主要包括以下活動：精進次世代定序 (next generation sequencing, NGS) 技術、商用生物資訊軟體及資料庫使用技巧、以及使用 Linux 系統下的開源軟體建立適用於抗藥性細菌之分析程序。應用本次研習的技術，以本所分離臨床病例之多重抗藥大腸桿菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) 共 59 株序列，分析多位點序列分型 (Multilocus sequence typing, MLST)、單核苷酸多型性 (Single-nucleotide polymorphism, SNP)，菌株之間的遺傳差異及親緣性，以及抗藥性基因等實作，提升實驗室研究和監測抗藥性能力，有助於了解抗藥性機制和趨勢，預警可能出現的抗藥性危機。

目錄

第1章 目的.....	4
第2章 研習行程與內容.....	5
第3章 心得與建議.....	7
第1節 心得.....	7
第2節 建議.....	11
第4章 附圖.....	12

第 1 章目的

全基因定序(Whole genome sequencing, WGS)包含次世代定序或是第三世代定序技術等高通量的 DNA 定序技術，可以快速、準確地測定生物或病原體之序列，包括所有的基因、非編碼區域，從而快速識別出特定基因的存在、分布以及可能的變異。目前各國抗藥性監測計畫主要應用 WGS 技術，以了解抗藥性菌株及抗藥性基因之來源。掌握抗藥性菌株的流行演化趨勢，有助於跨領域的資料整合以及與國際資料庫比對。本計畫針對動物臨床病例分離之大腸桿菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*)，並研究其是否具有產廣效性乙內醯胺酶 (Extended-spectrum β -lactarmases; ESBL)能力等備受重視的新興抗藥機制。本次研習請美國專家指導應用生物資訊軟體分析抗藥性微生物全基因體之技術，並分享其經驗，協助本所針對抗藥性菌株建立分析系統及資料庫，提升抗藥性菌株監控及研究能力。

第 2 章研習行程與內容

農業部獸醫研究所於 2024 年 3 月 23 日至 4 月 1 日派遣官南綾副研究員赴美國喬治亞州雅典市 (Athens, Georgia)，參訪家禽研究中心微生物安全及加工研究部門(National Poultry Research Center, Poultry Microbiological Safety and Processing Research Unit, ARS-USDA)，向抗藥性研究及基因體分析專家 Dr. Richard J. Meinersmann 研習。

※詳細行程如下：

日期	行程/活動內容
3 月 23 日(六)	臺北桃園機場(TPE)-美國亞特蘭大機場(ALT)，含轉機，夜宿機上
3 月 24 日(日)	抵達美國亞特蘭大機場(ALT)，前往喬治亞州雅典(Athens, Georgia)
3 月 25 日(一) 至	美國家禽研究中心微生物安全及加工研究部門 研習內容：
3 月 29 日(五)	<ol style="list-style-type: none">1. 次世代定序等全基因定序方法、實驗步驟研習： 著重於影響定序品質的關鍵步驟如核酸製備、樣本庫製備及定序深度等，例如使用 Qubit 及 Bioanalyzer 等儀器確認樣本庫的濃度、質量及片段大小分布等品質控制、上機時樣本庫濃度調整等經驗分享。2. 商用生物資訊軟體經驗交流：<ol style="list-style-type: none">2.1 Geneious Prime 是用於分子生物學和序列分析軟體，廣泛應用於 NGS 分析、分子選殖和引子設計、多重序列比對、基因表現分析、變異位點偵測等多種功能。2.2 食品安全與檢驗局(Food Safety and Inspection Service, FSIS)之專家分享 BioNumerics 應用於細菌全基因分析的經驗。3. 開源軟體教學：<ol style="list-style-type: none">3.1 Linux 系統使用介紹，學習相關基本操作及常用指

令。

3.2 Conda 基本操作及常用指令教學。其為跨平臺軟體套件管理系統和環境管理系統，可在 Linux 系統下運作，方便使用者管理多種軟體進行數據分析。

4. 細菌基因體分析系統研習：

細菌全基因序列組裝、親緣性及抗藥性研究等會用到的軟體如 FastQC、SPAdes、QUAST、MLST 及 AMRFinder 等組成分析系統之教學。

5. 抗藥性菌株序列分析實作：

應用本所自生病動物分離之多重抗藥 *E.coli* 菌株序列實測。

6. 資料庫建立及數據管理研習：

Geneious Prime 建立實驗內資料庫以及使用 Excel 等軟體管理大量數據之經驗分享。

3 月 30 日(六)

至

4 月 1 日(一)

美國亞特蘭大機場(ALT)-臺北桃園機場(TPE) ，含轉機，夜宿機上

第 3 章心得與建議

第 1 節心得

此次研習以本所自生病動物分離之59株多重抗藥*E.coli*菌株序列進行分析，研習期間重要心得如下：

一、次世代定序技術精進及經驗分享：

臺美雙方皆是使用次世代定序技術(next generation sequencing, NGS)

Illumina MiSeq系統進行細菌全基因定序，美方專家特別就NGS中重要步驟—樣本庫製備(library preparation)以及定序深度(coverage)分享其寶貴經驗：

- (1) 不同的核酸製備套組對於後續產出的序列品質影響顯著。
- (2) 以本次目標細菌*E.coli*為例，20至40倍的定序深度是可接受的範圍，本次59株序列皆為30倍以上的定序深度，足夠後續進行抗藥性、親緣性等分析。
- (3) 定序深度並非越高越好，若超過100倍以上的序列反而不建議採用，因為非特異性序列占比偏高反而影響後續分析。可藉由調整樣本上機濃度，使每株細菌的定序深度落在特定的範圍。

二、商用生物資訊(Bioinformatics)軟體操作及開放資料庫 (Open data base) 使用技巧：

- (1) Geneious Prime提供序列比對及分析、演化分析、蛋白質結構預測等多種功能。

1.1本次研習美方專家特別介紹其中「分類」(classify)的功能，與國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 資料庫結合的技巧，以*E.coli*序列實測，篩選出特定目標如ESBL相關抗藥基因，將序

列與NCBI資料庫比對後，擷取其中對應到的抗藥性基因建立自己的資料庫，並可應用於偵測特定抗藥基因型別變異。

1.2 實測Geneious Prime中的MAUVE功能，MAUVE的特點是多序列比對，它可以處理大量的基因體數據，用於比較不同物種或相同物種中不同個體的基因體之保守序列（conserved sequence），能夠了解基因是否有重排、插入及缺失等結構變化，有助了解演化的順序。

(2) BioNumerics軟體使用經驗分享：軟體最大的功能是能整合指紋圖譜資料模組(fingerprint data module)、序列資料模組(sequence data module)及數值資料模組（character data module）。以細菌抗藥性研究為例，可將指紋圖譜資料如脈衝式電泳圖譜、序列資料類型如NGS序列，數值資料類型如藥物感受性試驗結果、親緣性分析方法如多位點序列分型（Multilocus sequence typing, MLST）的結果，以及流行病學背景等多元資料整合。此軟體具有強大的數據管理及可視化能力。但由於該軟體開發商認為BioNumerics的功能已完備，不再投注後續功能維護、升級，雲端分析系統亦將於2024年12月31日後走入歷史。此行Dr. Meinersmann另引薦食品安全與檢驗局(Food Safety and Inspection Service, FSIS)之專家分享細菌全基因分析的經驗。由於該單位長期使用BioNumerics，因此目前面臨需要投注大量人力、時間，將原有的巨量資料另外轉化的問題。

三、 建立Linux系統之分析程序：

(1) 美方專家主要使用的分析程序皆建立在Linux系統下。Linux是一種開放資源的操作系統，受到所有開發者的共同監督，安全性與穩定性都很高。在生物資訊領域，有非常多元、自由度高、開發成熟且免費的程序可在該系統下運作。缺點是此系統操作較複雜，需要投入較高的學習時間熟悉指令，不是所有的程序都有圖形使用者介面（Graphical User Interface,

GUI)，具有較高的門檻。

- (2) 美方專家針對*E.coli*序列分析需要使用之程序進行教學，包含python、conda等基本指令，程序安裝、使用、除錯、資料庫應用等，並以59株*E.coli*原始序列實測，以下簡單說明測試結果。

2.1 **FastQC**：應用於NGS原始序列品質確認，若該次定序結果不佳，則不宜用於後續分析。

2.2 **SPAdes, Shovill**：是一種de novo組裝程序，在沒有參考基因體(reference)的情況下，將NGS得到的小片段原始序列組裝成完整的基因體序列(contig)。

2.3 **QUAST**：de novo組裝後的序列品質確認。

2.4 **Parsnp**：進行單核苷酸多型性 (Single-nucleotide polymorphism, SNP) 分析，可檢測基因體中單個鹼基發生變異的情況，可呈現個體間的遺傳差異及親緣性。以Parsnp分析59株*E.coli*的結果顯示在部分地域的不同牧場間可能存在同源的抗藥性菌株。

2.5 **MLST, AQUAMIS**：菌株親緣性分析，可比對基因型別(sequence type, ST)。

本次59株*E.coli*中扣除不明的ST型，單一檢測ST的發生率為 53.5% (23/43)，顯示畜禽中ST多樣性較高。值得注意的是，其中五種 ST(ST10、ST38、ST69、ST617和ST648)，屬於重要人類腸道外致病性大腸桿菌 (extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC) 品系，可引起人類腸道外感染。然而，從食品安全的角度來看，從生病食用動物中分離出的 ExPEC不太可能導致人類感染，因為這些動物最終不會進入市場。然而，產食動物是抗藥性菌株重要的儲存庫，當動物生病治療使用抗生素的情況下，抗藥性菌株透過選擇壓力而存留，亦可能經由動物飼養、屠宰場活動、環境、水、土壤甚至人體接觸等機會而傳播。因此，合理使用抗生素、配合飼養管理及加強抗藥性監測和研究實屬必要，最終目的是減少抗藥性菌株的產生和傳播，以保障公共健康和食品安全。

2.6 ResFinder, AMRFinder：ResFinder為丹麥技術大學(Technical University of Denmark, DTU)之基因體流行病學中心(Center for Genomic Epidemiology, CGE)所開發，AMRFinder則為NCBI所開發，兩者皆為抗藥性基因比對、分析程式。59株*E.coli*序列使用兩種程式測試的結果皆顯示，除了都帶有ESBL相關之抗藥基因CTX-M外，各別帶有不同類型的抗藥性基因，分屬四環素類(tetracycline)、胺基糖苷類(aminoglycoside)及氟奎諾酮類(fluoroquinolone)等類別，與其藥物感受性試驗的結果相符，並顯示部分菌株序列可能帶有特定質體。電腦模擬(in silico)與細菌活體外(in vitro)的結果可互相印證，且藉由WGS分析得到更多抗藥性機制的資訊。

第 2 節建議

- 一、樣本庫製備的品質，對於後續定序資料的優劣有決定性的影響。良好的樣本庫製備可以減少雜質，提高定序覆蓋度和深度，提升後續分析的準確性及可信度。因此前置準備相關重要，本次研習美方專家特別提點過程中的注意事項，後續將精進實驗室相關操作步驟，確保序列品質。
- 二、商用生資軟體確有其優點，包含使用介面具親和力、操作容易，數據可視化能力強，且後續有廠商提供技術支援及更新，建議能編列固定預算於相關軟體使用。然而，部分軟體非買斷，而是每年續約，其使用費可能由數萬到數十萬不等，特定分析模組需要另外購買，所費不貲。商用軟體的維護和更新依賴於開發廠商，亦可能成為缺點，若廠商停止支援，用戶可能面臨風險和困擾。因此，有需要學習使用開源軟體及資料庫，以確保對於細菌WGS分析能力有更高的自由度。
- 三、本次研習在美方專家的協助下，對於Linux系統有初步的認識，實際在Linux系統下建立適用於細菌抗藥性分析程序，確實加強WGS分析的能力，尤其是抗藥性分析的部分。以NCBI的AMRFinder為例，本次研習後，AMRFinder能成功實用於細菌抗藥性基因比對，有助於抗藥性研究及相關監測。另外，應用MLST及SNP的菌株親緣性追溯分析，可完成跨領域抗藥性菌株比對。此外，進行大量WGS分析之效率仰賴電腦硬體，Linux系統下的程序可使用國家高速網路與計算中心(National Center for High-Performance Computing, NCHC)的資源運算，是執行大型監測計畫的優勢。
- 四、未來將使用合適的商用生資軟體、開源程序、開放分析平臺及資料庫等多元組合，持續提升WGS分析能力應用於細菌抗藥性之研究及監測。

第 4 章附圖

圖 1.



圖 2.

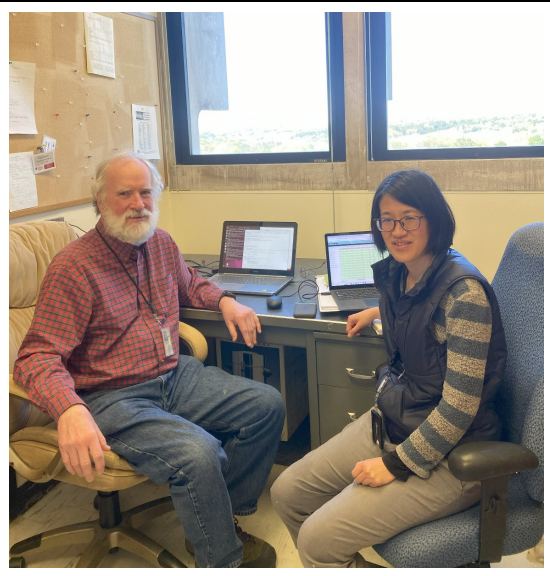


圖 3.

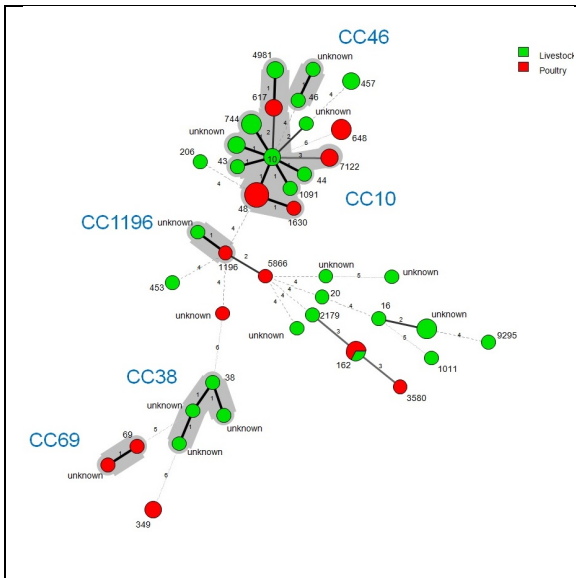


圖 4.

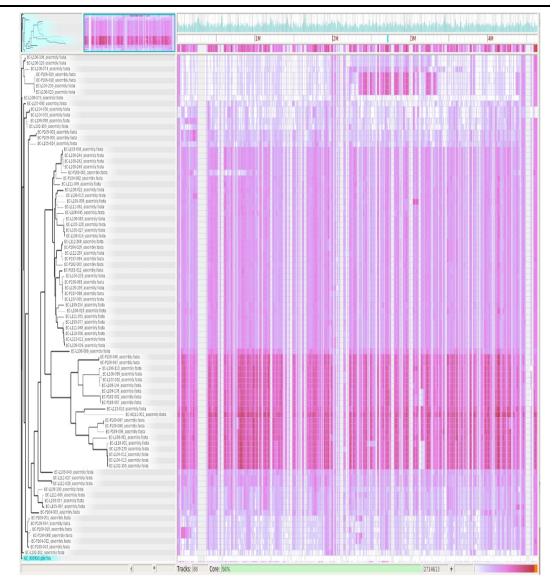


圖 1: 本次參訪位於美國喬治亞州雅典市-家禽研究中心微生物安全及加工研究部門。

圖 2: 抗藥性研究及基因體分析專家 Dr. Richard J. Meinersmann(左), 於研習期間指導本所官南綾副研究員(右) 應用相關軟體及分析系統, 獲益良多。

圖 3: 59 株 *E.coli* 之 MLST 分析結果, 以最小生成樹(Minimum spanning tree, MST) 呈現菌株之間的親緣性。

圖 4: 59 株 *E.coli* 之 SNP 結果顯示在部分地域的不同牧場間可能存在同源的抗藥性菌株。