

综述

食源性致病菌全基因组测序及全球数据共享平台发展趋势

李晓然¹,张若鸿¹,杨洋¹,崔生辉²,郭云昌³

(1. 河北科技师范学院食品科技学院,河北 秦皇岛 066600; 2. 中国食品药品检定研究院,北京 100050; 3. 国家食品安全风险评估中心,北京 100022)

摘要:随着用于监测食源性致病菌和暴发调查的分子分型技术迅猛发展,全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)正逐渐显露出其重要性。在食品贸易全球化背景下,急需建立食源性致病菌与人类感染间联系的详尽认识,从而精确监测并减少其发生。在该方面,WGS的精确性明显优于之前的分析工具。本文主要以单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)为例,阐述食源性致病菌监测情况和感染暴发调查现状,强调WGS在食源性疾病溯源方面的价值,概述用于数据生成和分析的技术,着重介绍WGS在全球食源性致病菌分型领域的实际应用进展,并对其未来所面临的挑战进行展望。

关键词:食源性致病菌;暴发;全基因组测序;全球数据共享平台

中图分类号:R155 文献标识码:R 文章编号:1004-8456(2020)03-0339-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.03.023

Whole genome sequencing of foodborne pathogens and global data sharing development

LI Xiaoran¹, ZHANG Ruohong¹, YANG Yang¹, CUI Shenghui², GUO Yunchang³

(1. College of Food Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Hebei Qinhuangdao 066600, China; 2. China National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 3. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China)

Abstract: With the rapid development of molecular typing techniques for monitoring foodborne pathogens and outbreak investigations, whole genome sequencing (WGS) is gradually revealing its importance. In the context of the globalization of food trade, it's urgent to establish details of the links between foodborne pathogens and human exposure in order to accurately monitor and reduce their occurrence. The accuracy of WGS is significantly better than prior analysis tools in the aspect. In this paper, we take *Listeria monocytogenes* as example to expound the monitoring of foodborne pathogens and the investigation of infection outbreaks, emphasizing the value of WGS in trace-back of foodborne diseases. The technologies for data generation and analysis are summarized, the practical application progress of WGS in the worldwide foodborne pathogen typing is emphasized, and the challenges in the future are prospected.

Key words: Foodborne pathogens; outbreak; whole genome sequencing; global data sharing platform

食品贸易全球化、消费者消费习惯向高度加工食品方向转变、人口更替及易感人群增加都加重了食源性疾病的患病风险。世界卫生组织(World

Health Organization, WHO)的报告表明,每年全球食源性疾病暴发中的70%是由食源性致病菌污染食品造成的,死亡人数高达180万人,即使在发达国家,每年也会有10%以上的人群患食源性疾病^[1-2],因此,人类和食品中食源性致病菌的国际联合监测对疾病人群鉴别、疾病溯源和疫情控制至关重要。

全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)可对整个致病菌基因组进行测序,获取大量的深度信息,并可进行毒力测定、抗生素耐药性分析、全面洞察菌株的进化。脉冲场凝胶电泳(PFGE)分辨力强、重复性好,普遍被认为是致病菌分型的“金标准”,本文通过分型技术应用实例,介绍了与PFGE

收稿日期:2020-04-21

基金项目:河北省自然科学基金面上项目(H2017407007);河北省高等学校科学技术研究青年基金项目(QN2016256);秦皇岛市科技支撑项目(201701B041);河北科技师范学院博士研究启动基金项目(2015YB010)

作者简介:李晓然 男 硕士生 研究方向为食品科学和食品安全
E-mail:1464130829@qq.com

通信作者:杨洋 男 讲师 研究方向为食品安全及食源性致病菌检测与控制 E-mail:lanxingpijiu@126.com

比较, WGS 在单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 等食源性致病菌领域的优势。考虑到美国、欧盟、中国地区间差异, 对全球数据共享平台的应用展开多方位描述, 并对未来可能面临的挑战进行讨论。

1 WGS 的发展

1977 年 SANGER 等开发了第一代测序 (Sanger 测序) 技术, 虽然准确率高, 但成本较高且通量低, 影响了其大规模运用, 因此, 以循环阵列作为特征的第二代测序 (second generation sequencing, SGS) 技术应运而生。其测序高密度阵列, 极大地提高了测序的自动化与平行化, 但需进行的聚合酶链式反应 (PCR) 可能会引入突变, 并且不同模板的扩增效率不同, 会给测序丰度试验带来人为影响。作为替代品, 2011 年太平洋生物科学公司推出了第一款单分子实时测序仪 PacBio RS, 其运用第三代测序 (third-generation sequencing, TGS) 技术无需 PCR, 可直接对单个 DNA 分子测序^[3], 与 SGS 技术比较, 可产生更长读长, 但成本较高、通量低、错误率较高。随着这些基因测序技术的发展, 食源性致病菌的 WGS 与分析越发成熟。

为确定食源性致病菌暴发菌株, 需进行流行病学分析和分离株鉴定。而目前菌株分型鉴定可分为两类: 表型分型和分子分型。前者有经典的血清学分型、噬菌体分型和多位点酶电泳等。血清学分型高效、特异性较强, 但检测时常出现假阳性反应, 制备抗血清耗时较长; 噬菌体分型实用性低, 分辨力较低, 重复性较差; 而多位点酶电泳虽可获取菌株间遗传距离, 但需培养大量菌株进行分析, 耗时较长。分子分型有 PFGE、随机扩增多态性 DNA、DNA 微阵列和 WGS 等^[4]。随机扩增多态性 DNA 虽操作简便, 但反应条件易影响扩增产物, 重复性差; DNA 微阵列虽检测通量高, 但样品前处理耗时、对成本和操作人员要求高。而 PFGE 已被欧盟单核细胞增生李斯特菌参考实验室 (European Union Reference Laboratory for *L. monocytogenes*, EURLm) 和美国 PulseNet 网络实现步骤与数据分析标准化, 已是目前该领域的“金标准”^[5]。但其只能检测限制性核酸内切酶识别位点上的核苷酸变化, 菌株相关性可能被高估或低估, 并且耗时耗力, 与 WGS 比较, 对同一菌株间的比对显现出较多劣势。

2013 年美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA)、美国卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH)、美国农业部 (United States Department of Agriculture, USDA) 与美国疾病控制与

预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 合作启动了一个长期项目, 目的是要将 WGS 逐渐取代用于李斯特菌病暴发调查的 PFGE^[6], 可见 WGS 在该领域的重要地位。一项调查对美国 30 个熟食零售店的 188 株单核细胞增生李斯特菌分离株进行基于 WGS 的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 分型和 PFGE 分型, Simpson 多样性指数分别为 0.95 和 0.91^[7]。可以看出, WGS 可使暴发调查的精确度达到前所未有的高度。

近年来, WGS 在全球各国已有较多应用, 比如 2017 年美国 FDA 和美国 CDC 调查了一起 8 人感染、2 人死亡的李斯特菌病暴发事件, 最终基于 WGS 数据溯源确定为纽约州 Vulto Creamery 公司生产的奶酪; 2019 年, 美国 CDC、USDA 和美国 FDA 调查了一起 4 个州 10 人感染、密歇根州 1 人死亡的李斯特菌病暴发事件, 最终溯源为被污染的肉类和奶酪^[8]; 而在欧盟, 2016—2018 年利用 WGS 分析的奥地利、法国和瑞典 6 例李斯特菌病患者分离株, 最终溯源为冷冻玉米^[9]; 2013 年我国首次利用 WGS 处理可疑肉毒梭菌污染婴儿配方食品的食品安全事件, 目前 WGS 还在冷冻饮品中单核细胞增生李斯特菌跨省追踪等事件调查中取得理想效果^[10]。总体来说, WGS 能够鉴定临床标本、食品样品中食源性致病菌分离株, 与传统技术比较, WGS 可在几天内完成溯源, 为及时控制并召回污染食品、有效诊治患者提供强有力的技术支持。

2 WGS 数据生成和数据分析标准化

2.1 食源性致病菌分型领域 WGS 数据生成的标准化

展开食源性致病菌监测的国际合作, 建立跨国家和部门、基于 WGS 的标准化体系, 会保证分型准确性, 实现可靠数据共享。目前该领域几乎都使用 SGS 技术进行 WGS, 已开发出多种基于该技术分型的方案^[11]。

影响 SGS 测序质量的四个主要因素为覆盖度/测序深度、覆盖均匀度、读长和读取质量^[12]。覆盖度是测序数据占目标基因组的比例, 等于读长与读数除以单倍体基因组长度的乘积。通常需增加测序次数来提高覆盖整个基因组的可能性, 补偿可能的错误从而提升置信度。读取质量由 Q 分数评估, 该分数是指相应碱基判定不正确的概率, 与错误率呈对数相关, 如 Q30 是指测序每测 1 个碱基所得 Q 分数 ≥ 30 的碱基所占百分比 (错误率为 0.1%)^[13]。不同平台、所用硬件软件和化学分析等均会对其产

生影响,因此要想实现全球统一化,对上述四个主要因素的控制尤为关键。该技术获得原始序列数据分为3个主要步骤:DNA分离、测序文库制备和测序。测序文库制备(DNA片段化、连接特定接头序列、扩增模板链)会用到乳胶PCR和桥连PCR(见表1)^[14]。虽然SGS技术精度高、通量大,但读长较短,因此将读长比对到参考基因组,可对不同高度相关的菌株进行比较基因组学分析^[12]。而

表1 最常用于食源性致病菌WGS的测序仪比较

Table 1 Comparison of sequencers most frequently used for foodborne pathogens WGS

| 测序仪 | 型号 | 技术 | 数据采集 | 读取长度 | 运行时间 | 运行成本 (美元/Mb) |
|-----|-----------------------------------|---------|-------|------------|----------|-----------------|
| 第二代 | Illumina MiSeq | 边合成边测序 | 光信号 | 36~300 bp | 4~56 h | 0.1 |
| | Life Technologies Ion Torrent PGM | 半导体测序 | pH值变化 | 200~400 bp | 2~7 h | 0.1 |
| | Illumina HiSeq 2500 | 边合成边测序 | 光信号 | 36~250 bp | 7~11 d | 0.03~0.04 |
| 第三代 | Pacific Biosciences PacBio RS | 单分子实时测序 | 荧光脉冲 | 3 kb | 0.5~10 h | 0.6~1 |
| | Pacific Biosciences PacBio RS II | 单分子实时测序 | 荧光脉冲 | 10~15 kb | 0.5~4 h | 0.4~0.8 |

注:运行时间见制造商说明书;运行时间取决于运行模式、测序仪种类和读取长度

一项对全球微生物识别(global microbial identifier, GMI)成员的调查显示:最常用的三个测序平台是MiSeq(23.7%)、Ion Torrent PGM(15%)和HiSeq(10.5%);MiSeq具有最低错误率(每100个碱基插入/缺失率<0.001)、最高通量(每次运行产生1.6 G数据,60 Mb/h)和最短操作时间;最常检测的病原体是食源性致病菌(75%),主要包括单核细胞增生李斯特菌、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、沙门菌属(*Salmonella*)和弯曲杆菌属(*Campylobacter*)^[16]。尽管多数受访者认为数据质量过滤和标准化很重要,但不同测序仪体现出不同的误差特性,处理样品的实验室方法多种多样(DNA/文库制备),特定数值差别较大,无法统一观点。比如90.9%的受访者提到覆盖度是很重要的测序质量指标,但所提该值的范围包括11~30、31~60、>60等,分别占21.6%、51.3%和18.9%。

GMI国际项目目的是实时收集、共享微生物WGS数据,进行实验室能力测试(proficiency testing, PT),确定对测序结果重要的质量指标和统一化步骤^[17]。其中PT是为了研究DNA/测序文库制备、测序程序和结果输出的质量控制。一般来说通过两种方法实现:第一种是验证不同途径是否可产生相同结果,比如GMI注重不同实验室试验、测序平台和质量标准间的结果比对,从而考量地方标准,但其面临组织与分析方面的挑战。而第二种是建立标准协议。美国PulseNet创建了标准操作程序(standard operating procedure, SOP) PNL32,用于食品和临床中食源性致病菌分离株,是MiSeq测序仪标准化实验室方案^[18]。其规定制备测序文库前,DNA浓度应 ≥ 10 ng/ μ L; Thermo ScientificTM、

TGS测序仪目前还未商业化广泛运用,但其能产生更长读长(较长读长有助于填充较短读长间的间隙),适用于没有参考基因组的从头组装。值得关注的是,目前混合测序可将SGS技术的高精度与TGS技术的长读长优势结合,创建可靠的参考基因组。与单独使用TGS技术比较,混合测序成本和工作量较小,可量化细化到单核苷酸分析水平^[15]。

NanoDropTM分光光度计测量260和280 nm处光密度比值应为1.75~2.05;使用基因测序试剂盒(500个循环)时,>75%的碱基须达到Q30,而使用基因测序试剂盒(300个循环)时,>85%的碱基须达到Q30;上传到PulseNet之前,覆盖度需 ≥ 20 。

总体来说,目前食源性致病菌分型鉴定存在差异,其测序数据质量过滤和标准化的特定数值差别较大,从事相关领域人员无法统一观点。并且SGS技术的不同测序平台误差特性不同,要想具有全球可比性,仍需对其进行细致广泛的评估与分析。若想选择最合适的测序仪,应在合理价格前提下,着重考虑测序仪的高通量、用户便利性和主观偏好性。虽然标准化程序对新建的、可进行WGS的实验室可行,但对于早已能进行WGS的实验室而言,由于程序标准化的过渡需考虑投资与工作流程的变化,其实施可能会受低遵从性影响。此外,新优化的技术在纳入SOP前必须充分验证,将其流程细节分享给各个实验室,以解决质量参数和一般阈值较难确定的问题。

2.2 食源性致病菌分型领域WGS数据分析的标准化

SGS技术虽能在短时间内生成大量序列信息,但分析、解释其数据的生物信息学工具却较落后。目前该技术的全基因组分析已逐渐转化为生物计算分析与数据储存,其高覆盖度、高精度对于SNP等变体分析来说,比TGS技术更可靠^[19]。而针对读长短的问题,有两种解决方法:从头组装序列重建基因组和基于参考基因组比对进行组装(见表2)。

从头组装的算法主要分为三类:OLC(overlap-layout-consensus)算法(适用于TGS技术)、贪婪算

表2 最常用于WGS数据的组装算法概述

Table 2 Overview of assembly algorithms most frequently used for WGS data

| 组装方法 | 组装工具 | 算法 | 是否收费 |
|-----------|-------------|----------|------|
| 从头组装 | Velvet | DBG | 否 |
| | Newbler | OLC | 是 |
| | CLC Genomic | DBG | 是 |
| | SOAPdenovo | DBG | 否 |
| 基于参考基因组比对 | BWA | FM-index | 否 |
| | Bowtie 2 | FM-index | 否 |

注:OLC为重叠-排列-生成共有序列(overlap-layout-consensus);DBG为De Bruijn Graph

法(目前已淘汰)和DBG(De Bruijn Graph)算法^[20]。DBG是由节点(固定k个核苷酸长度的子序列)与边(测序读长重叠部分)连接成的抽象结构,用于展示k-mer和重叠区域的相互关系^[20]。在选择组装工具时,需依据数据特性,比如用DBG组装工具时,须在灵敏度较高情况下,寻求更长特异性的k-mer,并将其长度调整为读长。一项对GMI成员的调查表明,较多使用的组装工具为Velvet(75%)、Newbler(46.9%)、CLC Genomics(46.9%)、SOAPdenovo(25%)^[17]。而用质量评估工具(quality assessment tool,QUAST)对7种组装工具进行比较后发现,SPAdes具有最高N50值(重叠群组装到目标基因组一半时的数值)、最多数量的映射基因和完整基因;IDBA具有最长重叠群和最低样品浓度需求^[21]。

基于参考基因组比对适用于计算量较小的变体检测。每一读长需与其密切相关的参考基因组进行比对,算法主要有三类:哈希表算法、前缀/后缀树算法、归并排序算法(较少使用)^[17]。一项对GMI成员的调查显示,多数人使用的基于参考基因组比对组装工具为BWA(66.7%)和Bowtie 2(53.3%),所节省内存较多,而Novoalign、SMALT和SHRiMP等仅有10%的使用者^[17]。该组装方法必须用SNP分析变体,其分析流程包括基因组组装、基因注释和与参考基因组比对,通常涉及合适程序与自定义脚本的结合,而建立标准化分析途径会有助于生成准确结果。一项对单核细胞增生李斯特菌分离株进行不同组装工具和SNP callers的组合测试发现,SNP识别真假阳性的数量和准确度存在较大差异,不同组合表现不同,有时结果甚至彼此相反^[7]。而不同软件组合的数据质量筛选、修整会对WGS数据分析产生积极或消极的影响,因此还不能对不同参数作出一般性描述。一项WGS PT表明,>93%样本虽正确使用各种分析方法,但变体数量和分支长度差异较大,所得聚类阈值不同,可见要想标准化不同方法的阈值仍面临诸多困难^[22]。但实现其标准化最简单的方法应是将分析方法分为

若干步骤,将每个步骤间的结果进行单一水平的结果输入/输出。目前利用分析步骤相关的各个软件可进行总体分析,但要想确保其互操作性,需注意输入/输出程序的兼容数据格式。此外,分析方法还应满足非专业、非生物信息学用户的需求,可进行自动化分析。

美国食品安全与营养应用中心(American Center for Food Safety and Applied Nutrition,CFSAN)已研究出一种针对食品和临床食源性致病菌分离株,基于WGS数据构建SNP模型的分析方法^[23]。步骤包括:用Bowtie 2进行读长与参考基因组比对、SAMtools处理比对文件、VarScan识别变体位点、通过自定义Python脚本建立SNP模型。其可自动化运行,将FASTQ格式的测序数据转换为FASTA格式的SNP模型。但因分析步骤数量较多且复杂,并且测序平台间存在较大差异,仍存在缺乏质量筛选等问题。值得关注的是,我国已构建首个WGS数据计算云引擎,可将WGS数据分析流程传输到云端;研发出以阿里云对象存储服务(object storage service,OSS)为框架的WGS三级模式结构的原始测序数据交付中心,可将原始数据实时、快速输送;还建立了基于WGS的特征基因图谱识别算法,可使数据计算云引擎和原始测序数据交付中心相互比对,提高全基因组分析的精确性。

3 WGS数据的全球共享与讨论

在食源性致病菌WGS数据全球共享的发展进程中,除了要研究数据生成与分析的标准化以外,还需建立数据共享的国际化标准。国际核酸序列数据库协作组织(International Sequence Database Collaboration,INSDC)存储WGS数据的数据库主要有3个:美国生物技术信息中心(National Center for Biotechnology,NCBI)、欧洲核苷酸档案(European Nucleotide Archive,ENA)和日本DNA数据库(DNA Data Bank of Japan,DDBJ)。在美国,GMI和美国FDA的GenomeTrakr数据库使用INSDC的公开数据访问层,通过建立生物项目数据库(BioProject)号,填充元数据(描述存储数据而保存的信息)集字段(包括提交数据的实验室、样品日期地点、分离株来源和测序参数等),从而将WGS数据提交到NCBI^[12]。在欧洲,欧洲食品安全局(European Food Safety Authority,EFSA)和欧洲疾病预防控制中心(European Centre for Disease Prevention and Control,ECDC)针对食源性致病菌,为将PFGE数据过渡到WGS数据,建立了一个联合数据库。该数据库依从数据保护法律,采取更严格的数据上传方法,数据

来源(国家)等相关信息被视为敏感信息,不允许实验室研究^[24]。值得关注的是,目前欧盟数据保护条例的数据保护指令 95/46/EG 已修改(2018年5月生效),但只有一些方面被修改或添加,关键原则依然不变^[25]。

上述元数据十分重要,与测序数据结合,极大地增强了数据库的实用性。但国家法律和数据处理行为限制了其共享与交流,不同国家的元数据相关概念也各不相同,因此目前还未达成元数据公开方面的共识^[26]。此外,WGS数据和元数据由于存在用途不明、未经授权的应用情况,并且其公开可能会出现专利和知识产权归属问题,因此在数据公布前,研究人员通常不愿将数据分享到公共数据库。而食源性致病菌数据的存在以及检测到食品污染甚至相关暴发都会对贸易业、旅游业产生深远影响,因此在建立数据法律框架时,必须要考虑这些问题。

美国病原体系统资源整合中心(Pathosystems Resource Integration Center, PATRIC)是一个经认真研讨、面向用户的数据库系统,其中有用的基因组几乎呈指数增长^[27]。该分析资源中心、数据库整合了各种病原体的研究数据和元数据,能满足临床应用需求。其基因组数据与元数据的相关信息(分离物、宿主、序列、表型和项目)都是公开可用的,并且个人序列可与其条目进行比对,不公开信息,保护数据隐私^[27]。这种单向数据交流可与现有数据进行协调,若所有新序列信息都要保密,则会影响数据库的发展和实时性,因此,即使技术基础有保障,也仍需寻求用户方面的折衷与共识,才能实现高效全球数据共享。2019年我国以食源性疾病分子溯源网络(TraNet)为框架,建立了首个能在国家、省、市范围内实际应用的,基于WGS的分子溯源网络。通过分析整合NCBI、抗性基因数据库(Comprehensive Antibiotic Research Database, CARD)、ResFinder等公共数据库中特征基因数据,创建了常见食源性致病菌血清学分型、毒力基因和耐药基因等自动化分析模块,促进了我国食源性致病菌遗传与变异特征、耐药机制及进化等重点方向的研究发展。

迄今为止,已有专家发起了一些基于WGS、对单核细胞增生李斯特菌等食源性致病菌分型的倡议,但其国际标准化仍有待讨论。“One Health”战略使公共卫生、食品安全间的信息交流变得越加密切,因此,与元数据集相关的食源性致病菌全球开放式序列数据库将做出重大贡献。为达到数据保护标准,需限制性访问实验室数据和流行病学数

据/临床数据。同时,为有效维护公众健康,应根据需求允许获取更多信息。若原始测序数据的格式与质量参数一致,可将其直接上传到中央数据库相关的集中分析管道进行比对,这样会有助于测序标准化发展。全球数据共享有助于全面了解世界各地出现的公共卫生事件和导致经济损失的食源性致病菌传播情况,能避免不必要的重复,减少财政负担和工作量,为世界提供了一个可提高科研质量、有效增强风险管理的契机。

参考文献

- [1] RICHARDSON L C, BAZACO M, PARKER C C, et al. An updated scheme for categorizing foods implicated in foodborne disease outbreaks: a triagency collaboration [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2018, 14(12): 701-710.
- [2] World Health Organization. *Listeria infections* [R]. Geneva, Switzerland: WHO, 2017.
- [3] KARLSSON A, STAAF J. Clinical application of fusion gene detection using next-generation sequencing and the NanoString technology [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1908: 139-152.
- [4] FRAZAO M R, DE-SOUZA R A, MEDEIROS M I C, et al. Molecular typing of *Campylobacter jejuni* strains: comparison among four different techniques [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2019, 51(2): 519-525.
- [5] FLETCHER J, ALAPS H, HENRY C M, et al. Vulnerabilities, threats and gaps in food biosecurity [J]. *Health Secur*, 2018, 8: 61-75.
- [6] JACKSON B R, TARR C, STRAIN E, et al. Implementation of nationwide real-time whole-genome sequencing to enhance listeriosis outbreak detection and investigation [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2016, 63(3): 380-386.
- [7] ALEXANDER J T, MATTHEW J S. CRISPR-based subtyping using whole genome sequence data does not improve differentiation of persistent and sporadic *Listeria monocytogenes* strains: CRISPR subtyping of *L. monocytogenes* [J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(13): 319-326.
- [8] Centre for Disease Prevention and Control (CDC). Outbreak of *Listeria* infections linked to deli-sliced meats and cheeses [R]. CDC, 2019.
- [9] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* PCR serogroup IVb MLST ST6-6 December 2017 [R]. Stockholm: ECDC, 2018.
- [10] 李颖,董银苹,张迪,等.一起丁酸梭菌致新生儿坏死性小肠结肠炎暴发事件的实验室诊断与溯源[J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52(2): 129-133.
- [11] SCHÜRCH A C, SCHAİK W. Challenges and opportunities for whole-genome sequencing-based surveillance of antibiotic resistance [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2018, 1388(1): 108-120.
- [12] HEBERT P D N, BRAUKMANN T W A, PROSSER S W J, et al. A sequel to sanger: amplicon sequencing that scales [J]. *BMC*

- Genomics,2018,19(1):219.
- [13] JIYOUN Y, DIEGO A M, TIAN C, et al. RNAseq analysis of bronchial epithelial cells to identify COPD-associated genes and SNPs[J]. *Bmc Pulmonary Medicine*,2018,18(1):42.
- [14] SUPERNAT A, VIDARSSON V O, STEEN V M, et al. Comparison of three variant callers for human whole genome sequencing[J]. *Scientific Reports*,2018,8(1):17851.
- [15] CHAO B, YU H, JIA L, et al. Divergence, evolution and adaptation in ray-finned fish genomes[J]. *Science China Life Sciences*,2019,62(8):1003-1018.
- [16] MORANGILAD J. Whole genome sequencing (WGS) for foodborne pathogen surveillance and control-taking the pulse[J]. *Euro Surveillance*,2018,22(23):30547.
- [17] RINDOM S. About GMI-vision and objectives[R]. 2013.
- [18] FEYE K M, RICKE S C. Establishment of a standardized 16S rDNA library preparation to enable analysis of microbiome in poultry processing using Illumina MiSeq Platform[J]. *Methods in Molecular Biology*,2019,1918:213-227.
- [19] ZOLEDOWSKA S, MOTYKA-POMAGRUK A, SLEDZ W, et al. High genomic variability in the plant pathogenic bacterium *Pectobacterium parmentieri* deciphered from de novo assembled complete genomes[J]. *BMC Genom*,2018,19(1):751.
- [20] PAUL D N, THOMAS W A, SEAN W J, et al. A sequel to sanger: amplicon sequencing that scales[J]. *BMC Genomics*,2018,19(1):219.
- [21] LEHMANN R, LIGHTFOOT D J, SCHUNTER C, et al. Finding nemo's genes: a chromosome-scale reference assembly of the genome of the orange clownfish *Amphiprion percula* [J]. *Molecular Ecology Resources*,2019,19(3):570-585.
- [22] PETTENGILL J, UNDERWOOD A, LUKJANCENKO O, et al. 2015 GMI PT dry-lab analyses and report[R]. 2015.
- [23] SALTYSKOVA A, WUYTS V, MATTHEUS W, et al. Comparison of SNP-based subtyping workflows for bacterial isolates using WGS data, applied to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and serotype 1, 4, [5], 12: i: - [J]. *PLoS One*,2018,13(2):e0192504.
- [24] RIZZI V, FELICIO T D S, FELIX B, et al. The ECDC-EFSA molecular typing database for European Union public health protection (Euroreference) [R]. 2017.
- [25] 何波. 欧盟《通用数据保护条例》简史[J]. *中国通信业*,2018(6):60-63.
- [26] USONGO V, BERRY C, YOUSFI K, et al. Impact of the choice of reference genome on the ability of the core genome SNV methodology to distinguish strains of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg [J]. *PLoS One*,2018,13(2):e0192233.
- [27] WATTAM A R, DAVIS J J, ASSAF R, et al. Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center [J]. *Nucleic Acids Research*,2017,45(D1):D535-D542.

· 新冠肺炎疫情防控 ·

解读《新冠肺炎疫情期间重点人群营养健康指导建议》

新冠肺炎疫情期间,广大居民居家静态生活时间较长,运动量大幅减少,屏幕时间显著增多,部分疫情较重地区蔬菜、水产品等新鲜食物供应受限,对居民身心健康产生影响。特别是老年人免疫功能较弱、儿童青少年正处在生长发育和行为形成的关键期,长时间居家生活对他们的身心健康影响较大。

当前,我国疫情防控工作已从应急状态转为常态化,为加强对老年人、儿童青少年等重点人群的营养健康指导,减少疫情期间长时间居家生活对其身心健康的影响和后续可能出现的肥胖、慢性病等不良健康后果,切实维护重点人群身体健康,巩固当前疫情防控成果,我委组织编制了新冠肺炎疫情期间老年人、儿童青少年营养健康指导建议。

《新冠肺炎疫情期间老年人群营养健康指导建议》和《新冠肺炎疫情期间儿童青少年营养指导建议》根据老年人、儿童青少年不同的人群特点和营养需求,针对摄入食物的种类、数量、频次、烹饪方式等提出了具体的建议,同时对足量饮水、积极身体活动、保持健康体重、加强慢病管理等也提出了建议,以指导广大老年人群和儿童青少年均衡膳食,保持健康生活方式,有效维护身心健康。

(相关链接:<http://www.nhc.gov.cn/xcs/fkdt/202005/aa359e8f8e2648e7a474e7b38aacb4b0.shtml>)