

計畫編號：(DOH95-DC-2021)； GRB 編號：PG9502-0049

行政院衛生署疾病管制局九十四年度計畫

發展與評估下世代之細菌分子分型技術(一)：研發 *Neisseria meningitidis* 之 MLVA 分子分型方法

自行研究成果報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

研究主持人：邱乾順

研究人員：李俊青、李孟訓、王佑文

執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目 錄

一、摘要	3-4
二、本文	
(一)、前言	5-6
(二)、材料與方法	7-9
(三)、結果	10-12
(四)、討論	13-17
(五)、結論	18
(六)、參考文獻	19-21
(七)、圖表	

Figure 1. Minimum Spanning Tree diagram, consisting of 93 MLVA types are identified. Differences in loci between two MLVA types are numbered. Circle size is proportional to the number of isolates belonging to an MLVA type. Two or more MLVA types differing in four or less loci are regarded as a group. MLVA types in groups (T1 – T8) are marked in dark gray shadow and ST groups or ST complexes marked in light dashed lines. 22-23

Table 1: VNTR locus characteristics at genomes of *N. meningitidis* strains Z2491, MC58 and FAM18. 24-25

Table 2. ST, PFGE and MLVA genotypes for 100 *N. meningitidis* isolates. 26-28

Table 3. Features of selected VNTR loci observed in 100 *N. meningitidis* isolates. 29

Table 4. MLVA profiles of *Neisseria meningitidis* isolates from four patient/contact episodes. 30

Table 5. VNTR locus-specific primers and the predicted sizes of amplicons from *N. meningitidis* strains Z2491, MC58 and FAM18.

31

(八)、附錄(研究成果論文)

摘要

關鍵詞：奈瑟氏腦膜炎雙球菌、多位址變異重覆序列分析、變異重覆序列、脈衝電泳、多位址基因序列分型、DNA 指紋圖譜資料庫、分子流行病學

多位址變異重覆序列分析(multilocus variable-number tandem repeat [VNTR] analysis, MLVA)技術已被發展應用在數個細菌之分型工作上，具有高分型效力(discriminatory power)。MLVA 技術之研發，有賴細菌之基因體序列之解序資料，由於奈瑟氏腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitidis*)已有 3 株菌株(strains Z2491, MC58 與 FAM18)之基因體序列已被解序完成，因此可利用電腦軟體尋找比對此 3 條基因體序列，尋找具有潛力的變異重覆序列位址(VNTR loci)。在本研究，我們發展 *N. meningitidis* 之 MLVA 方法，並評估此技術在分析 *N. meningitidis* 之分型效力(discriminatory power)與探討此病原種源關係(phylogenetic relationship)之效力。

本研究鑑定出 12 個具有高度變異的 VNTR loci，並測試 100 株 *N. meningitidis* 分離株在此 12 個 VNTR loci 之基因圖譜，這些分離株於 1996-2002 年分離自台灣各地之流行性腦脊髓膜炎(簡稱流腦)散發病例，並在先前研究中，曾使用脈衝電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)與多位址基因序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分析其基因圖譜，可供比較。測試結果顯示，在所測試的 100 株 *N. meningitidis* 分離株，發現 12 個 VNTR loci 之對偶基因(alleles)數介於 3-40 個；理論上，在 100 株分離株所發現之 12 個 VNTR loci 對偶基因數，即可產生 5×10^{11} 種 MLVA 圖譜組合(MLVA types)。分型結果，在 100 株分離株鑑定出 93 種 MLVA types，分型效力指數為 0.998，高於 PFGE 的 0.95 與 MLST 的 0.87，指出此 *N. meningitidis* 之 MLVA 技術，具有很高的分型效力。而利用 minimal spanning tree (MST)演算法，建立之種源關係，與利用 MLST 方法得到之 ST 序列型別所建立之種源關係，具有高度一致性。

我們的研究指出，所發展之 MLVA 技術在 *N. meningitidis* 的分型效力上高於 PFGE，可做為 *N. meningitidis* 流行病學與法醫學調查之細分型技術；MLVA 也和 MLST 方法一樣，也是分析 *N. meningitidis* 種源關係有用的工具。

Abstract

Keywords: *Neisseria meningitidis*, multilocus VNTR analysis (MLVA), variable-number tandem repeat (VNTR), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), DNA fingerprint database, molecular epidemiology

The multilocus variable-number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) technique has been developed for fine typing of many bacterial species. The genomic sequences of *Neisseria meningitidis* strains Z2491, MC58 and FAM18 have been available for searching potential VNTR loci by computer software. In this study, we developed and evaluated a MLVA method for molecular subtyping and phylogenetic analysis of *N. meningitidis* strains.

A total of 12 VNTR loci were identified for subtyping and phylogenetic analysis of 100 *N. meningitidis* isolates, which had previously been characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing. The number of alleles ranges from 3 to 40 for the 12 VNTR loci; theoretically, the numbers of alleles can generate more than 5×10^{11} MLVA types. In total, 93 MLVA types were identified in the 100 isolates, indicating that MLVA is powerful in discriminating *N. meningitidis* strains. The discriminatory index for MLVA is 0.998, which is higher than PFGE (0.95) and MLST (0.87). In phylogenetic analysis with the minimal spanning tree method, clonal relationships, established with MLVA types, agreed well with those built with ST types.

Our study indicates that the MLVA method has a higher degree of resolution than PFGE in discriminating *N. meningitidis* isolates. It is powerful tool for fine typing of *N. meningitidis* isolates for epidemiological and forensic investigation. MLVA may also be a useful tool for phylogenetic studies of strains evolving over different time scales.

前言

Neisseria meningitidis 是引發兒童與青少年細菌性腦膜炎與敗血症主要病原之一[1]。此病原在非洲，特別是薩哈拉沙漠南部著名的流行性腦膜炎(簡稱流腦)帶與亞洲，引發週期性的流腦流行[1]。然而，在許多工業化國家，*N. meningitidis*也常引發嚴重的感染問題[2, 3]。人潮擁擠的大型活動，例如麥加朝聖節，偶而會出現跨洲的流腦爆發流行事件[4, 5]。

應用各種不同分型方法分析 *N. meningitidis* 菌株，能用於確定疾病的流行，調查病原菌之傳播。隨著分子生物學的來臨，已有許多種分子分型技術被發展出來，做為 *N. meningitidis* 流行病學研究之工具。在這些方法中，脈衝電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)和多位址基因序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是最經常被使用於分析 *N. meningitidis* 菌株的技術[6, 7]。PFGE 對大部份細菌具有高分型效力(discriminatory power)，但因產生的結果為影像圖譜型式之資料，跨實驗室間之比對困難。相對的，MLST 是使用 7 個常駐基因(housekeeping genes)之序列資料，任一序列中只要有一個鹼基不同，即視為不同的對偶基因(allele)，根據 7 個 housekeeping genes 產生的基因型別稱為 ST 型別(sequence type)，7 個基因序列因此可產生天文數字的組合，產生無數的 ST types。在 ST 資料處理上，目前已有一個國際性的 *Neisseria* MLST 資料庫，各實驗室可經由網際網路到資料庫去比對 ST types、存放新的 ST 資料。在全球各研究 *N. meningitidis* 的實驗室貢獻下，目前已有數千個 ST types 存放在資料庫中，這些被鑑定出來的 ST 基因型，經 BURST 與 split decomposition 演算法分析，與實際的流病資料和各實驗室的迴饋，可被分成許多不同的種源組(clonal complex) [8]。由於這些 housekeeping genes 鹼基序列的變異相當慢，ST 基因型相對上相當穩定，因此 MLST 是研究 *N. meningitidis* 種源關係，探討流腦病原全球流行面貌的有利工具[6]，但是 MLST 在一些 *N. meningitidis* 菌株之細緻分型的效力上，比 PFGE 低[9]，不利於偵測菌株在短期間之演化。

近年來，已有多種細菌菌種的多位址變異重覆序列分析技術(multilocus variable-number tandem repeat [VNTR] analysis, MLVA)被陸續發展出來[10-19]，這些研究結

果皆指出MLVA技術具有高度的分型效力；同時，Yazdankhah等人[20]最近也發展一套擁有4個VNTR loci的MLVA技術，能有效區分自散發病例與群突發(outbreak)病例分離之*N. meningitidis* serogroup W135菌株。在本研究，我們成功發展之MLVA方法，擁有12個VNTR loci，用於分析先前已經PFGE與MLST分析過之100株*N. meningitidis*分離株，研究結果指出此一MLVA方法，具有比PFGE高的分型效力，且其建立之菌株種源關係與用MLST方法所建立之種源關係有相當高的一致性。

材料與方法

鑑定 VNTR loci : 使用台灣大學資訊研究所高成炎教授實驗室所發展之 VNTRDB 電腦程式, 蒐尋 *N. meningitidis* 菌系 Z2491 (GenBank accession no. AL157959), MC58 (GenBank accession no. AE002098) 與 FAM18 (來自 The Wellcome Trust Sanger Institute [21]) 具有 VNTR 潛力之重覆序列位址 (tandem repeat loci)。VNTRDB 程式仍依據 Tandem Repeat Sequence Finder 之演算法 [22] 所發展而成, 其能先蒐尋 1 條基因體序列上之重覆序列位址, 再定位這些位址在其它條基因體序列之位址與計算位址之重覆單元 (repeat unit) 數目, 然後再蒐尋第 2 條基因體上之重覆序列位址, 再定位這批位址在另外兩條基因體上之位置與計算重覆單元數目, 如此重覆蒐尋, 可避免漏掉在某一基因體上只有 1 個重覆單元的 VNTR locus。本電腦蒐尋工作找到超過 300 個在 3 條基因體上有變異重覆序列之 VNTR loci, 其中 23 個 loci 具有短的重覆單元 (≤ 30 bp), 重覆單元序列相同度超過 85% 與不具 indels, 被選擇用來測試 10 株遺傳變異大的菌株, 最後有 12 個 loci (Table 1), 皆存在 10 株測試的菌株中, 且只存在單一增幅物 (amplicon), 因此被選用做為本 MLVA 方法之分析標的, 進行後續之 *N. meningitidis* 基因分型。

備製細菌基因體 DNA : *N. meningitidis* 菌株貯存於 -70°C 超低溫冷凍環境下。分析前, 先培養於加有 5% 綿羊血之 tryptic soy agar, 在 5% CO_2 , 37°C 環境下培養 18 小時。第二天, 取一接種環 (10 μl) 之菌體, 於 100 μl TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 下製成細菌懸浮液, 100°C 加熱 10 分鐘, 經由離心 (3700 g) 10 分鐘後, 將上層液移到新的 eppendorf 管備用。

PCR 增幅與 DNA 片段分析: 用於增幅 12 個 VNTR loci 之 primers, 列於 Table 5, primers 係使用位於 Primer3 website [23] 之免費軟體所設計。每組 primer 對之一, 由台灣之 ABI 代理商合成與 ABI 系統相容之染料 (6-FAM, NED, VIC 或 PET) (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA)。PCR 增幅反應中, 每一反應物含有 10- μl PCR 混合液, 混合液含有 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 0.4 μM primers, 200 μM each deoxyribonucleotide, 1.0 unit 的 recombinant SuperNew Taq DNA polymerase (Jier Sheng Company, Taipei, Taiwan) 與 1 μl 的

DNA template。PCR 反應液置於溫度循環器 GeneAmp PCR System 9600 (Applied BioSystems), 以 94 °C 處理 5 分鐘後, 再進行 30 次循環反應(94 °C 30 秒、54 °C 45 秒與 72 °C 45 秒), 再經 72 °C 反應 10 分鐘。取 3 µl PCR 反應物跑膠(2% SeaKem LE agarose, Cambrex Bio Science, Rockland, ME, USA), 測試增幅 amplicon 之 DNA 片段大小與增幅反應之品質。

具螢光之 PCR amplicons, 用水稀釋 100 或 200 倍, 再以 ABI Prism 3130 Genetic Analyzer 分析其片段大小(以 GeneScan 500 LIZ Size Standard [cat # 4322682; Applied BioSystems] 為參考標誌)。各樣本資料與 amplicons 長度資料, 以 GeneScan Data Analysis Software ver 3.7 (Applied BioSystems)貯存分析, 所有不同長度之 amplicons, 皆經定序決定其重覆單元數目, DNA 定序以 ABI Prism Big Dye Terminator cycle sequencing ready reaction kit 反應, 使用 ABI Prism 3130 Genetic Analyzer 分析。12 個 VNTR loci (Table 1)重覆單元之推算, 係以 *N. meningitidis* strain Z2491, MC58 與 FAM18 之重覆單元數目與根據基因體序列推估之 amplicons 長度為依據(Table 5)。

資料分析：經由 amplicons 長度推估之重覆單元數目, 以阿拉伯數字記錄, 以 BioNumerics software (version 3.5; Applied Maths, Kortrijk, Belgium)之 “Character Type” 資料形式, 輸入疾病管制局 *Neisseria* Fingerprint Database 資料庫。應用 Minimum Spanning Tree 演算法(由 BioNumerics 軟體所提供)建構菌株之 MLVA 種源關係樹, 各 VNTR loci 之對偶基因變數值, 以 Nei 's diversity index (DI)為衡量標準, 其計算方程為： $1 - \sum(\text{allele frequency})^2$ 。MLVA、PFGE 與 MLST 分型效力指數(discriminatory power)之計算, 係根據分析本研究 100 株菌株之分型結果, 以 Hunter 等人之公式計算 [24]。

菌株來源：本次研究, 總計分析 105 株收集自流腦病例與健康接觸者之 *N. meningitidis* 菌株。收集自病例之 100 株菌株, 包括 2 株 serogroup A 菌株 52 株 serogroup B 菌株、3 株 serogroup C 菌株、31 株 serogroup W135 菌株、11 株 serogroup Y 菌株與 1 株 non-groupable 菌株(Table 2)。這些菌株大多分離自 1996-2002 年間之散發病例, 只有 2 株菌株(NM255 與 NM256)分離自同一家庭感染者, 另兩株(NM377 and NM378)分離 2 名具

有時 空聚集的病例。所有分離自病例的 100 株菌株，皆擁有 PFGE 與 MLST 之分析資料[9]。
5 株自健康接觸者菌株，係收集自 4 個感染案例(Table 4)。

結果

鑑定具潛力之VNTR loci：經由電腦VNTRDB程式蒐尋*N. meningitidis* strains Z2491, MC58與FAM18基因體序列，挑選23個具有潛力之VNTR loci，這些loci具短的重覆單元(30 bp)，同時在測試10株遺傳差異大的*N. meningitidis*菌株後，其中12個VNTR loci被選擇為MLVA方法的標的，用於分析後續的*N. meningitidis*分離株。11個被放棄的VNTR loci，有的是在測試的10株菌株中，產生2條或以上之DNA片段，或在10株菌株中，有的沒有PCR產物出現。11個loci中，有4個是*opa*基因、此基因在其它*Neisseria* spp.也存有多套loci與變異的重覆單元[25]，如此loci太過於複雜，無法做為MLVA基因分型的標的。在12個被選定的VNTR loci中，有3個(NMTR1, NMTR9, NMTR12)先前已被Yazdankhah等人[20]所鑑定出。Yazdankhah等人所鑑定之VNTR06與VNTR08 loci實際上為同一個locus，與本研究之NMTR9為同一locus，在*N. meningitidis* strain MC58，用增幅VNTR06 locus之primers VNTR06-F與VNTR06-R係位於nt286076-286057與nt285626-285649，增幅VNTR08 locus之primers VNTR08-F與VNTR08-R位於nt285707-285726與nt286018-285999，兩組primers實際上增幅同一VNTR locus。12組VNTR loci之重覆單元長度，介於4-30 bp之間，其中有7 loci重覆單元為3的倍數。NMTR12為含有12與13 bp重覆單元之複合locus，12與13重覆單元之排列順序與數目在各菌株中會有變異。NMTR12之重覆單元數目，皆經由DNA定序決定。12個VNTR loci中，至少有9個位於基因上(Table 1)。由於VNTRDB program輪流使用3條基因體序列為本，尋找出重覆序列loci，再定位這些loci在其它基因體序列上的位置，如此可避免漏掉重覆單元為1的locus；例如NMTR9a在strain MC58基因體上只有1個重覆單元，但在strain Z2491有2個單元，在strain FAM18有3個單元(Table 1)。

MLVA基因分型：分析100株收集自1996-2002年期間的*N. meningitidis*菌株，這些菌株在先前研究中已經PFGE與MLST分型方法分析，具有PFGE圖譜與ST型別資料[9]。MLVA分析結果顯示，大部菌株只存有一套所測試的loci，只有5株菌株含有2套NMTR1, NMTR7, NMTR9或NMTR18 locus，有2株菌株沒有NMTR1 locus，3株菌株沒有NMTR12 locus (Table 2)。分析100株菌株，所鑑定12個loci之對偶基因數介於3-40個之間(Table 3)，有6個loci

(NMTR1, NMTR2, NMTR7, NMTR9, NMTR10與NMTR12)超過10個對偶基因數，4個loci (NMTR1, NMTR2, NMTR7與NMTR9)之allelic polymorphism index高於0.9 (Table 3)。基於在100株菌株所發現之12個loci之對偶基因數目，可產生至少 5×10^{11} MLVA types的組合。

100株菌株，共發現93個MLVA types (Table 2)，大多數的MLVA types只出現在1株菌株，TW4, TW5, TW51, TW52與TW62 則出現在2株菌株，TW3出現於3株菌株。TW62出現在2株serogroup B菌株(NM255與NM256)，此2株菌株分離自同一家庭的2名感染病例；TW52出現在2株serogroup C菌株(NM377 and NM378)，此2株菌株分離自兩名具有高度流行病學相關性的病例。TW3, TW4與TW5 出現在serogroup Y菌株，這些菌株分離自散發病例，可能皆源於新進侵入台灣的菌種[9]。2株為TW51的serogroup W135菌株分離時間相距2年。

就如先前研究所示[9]，PFGE擁有比MLST高的分型效力，然而，本研究結果顯示，MLVA擁有比PFGE更高的分型效力。MLVA方法將測試的100株菌株分成93個MLVA基因型，其分型效力指數(discriminatory index)為0.998，相對的PFGE與MLST的分型效力指數分別為0.95與0.87 [9]。MLVA方法能區別所有serogroup B菌株，區別31株serogroup W135菌株中的29株(Table 2)，相對地，這些菌株只有2個ST與4個PFGE types (Table 2)。在11株serogroup Y菌株中，只有1種ST與2種PFGE types，但MLVA將這些菌株分成7個基因型別(Table 2)。

種源關係分析(phylogenetic analysis)：應用minimal spanning tree演算法，建構100株菌株間之MLVA種源關係樹。在12個loci中，菌株擁有擁有8個或更多相同loci，被視為同一種源群(clonal group)，因此，有8個明顯的MLVA groups被建立，這些種源關係與使用ST types所建立的種源關係具有很高的一致性(Figure 1)。2株serogroup A菌株為不同MLVA types (TW48與TW59)，具有3個loci的差異，此2株菌株為ST-7 type，屬於ST-5 complex (Table 2)。類似於之前使用MLST分析的結果，發現52株serogroup B菌株中，擁有複雜的種源關係；大多數serogroup B菌株的MLVA types，分佈在3個大的MLVA groups中，T2, T3與T4 groups和其它13個MLVA types被視為不同clonal lineages。T2 group由10個MLVA types所組成：在此群組之菌株與TW10菌株(與T2 group內最接近的TW16差距5個loci)皆屬於ST-3439

group。類似T2 group，T3 group由11個MLVA types所組成，所有在此群組之菌株皆屬於ST-3200 group。除了TW39，T4 group之菌株皆屬於ST-41/44 complex。使用ST types所建構的MST種源關係中，一些在ST-41/44 complex群組中之菌株，使用MLVA types所建構的種源關係圖中，他們(TW1, TW2, TW27, TW55與TW63)未被歸類在T4 group中，但這些菌株與T4 group有較親近的遺傳距離。

除了TW65與TW88，其它serogroup W135菌株皆屬於T7 group。3株serogroup C菌株，分屬2種MLVA types (TW25與TW52)，皆與serogroup W135菌株有較親密的種源關係，雖然這些菌株與T7 group最親近的菌株有5個loci的差異。31株serogroup W135與3株 serogroup C 菌株，共分成32個MLVA types，對照上，這些菌株只分成2個ST types (ST-11與其single locus variant, ST-3016) (Table 2)。TW25與TW52 types的serogroup C菌株分別出現在2001與2002年，由於TW25與TW52有7個loci的差異，據此推論此兩個基因型菌種，應非同源，應在不同時期被分別被引進台灣。

在serogroup Y分離株所鑑定的7個MLVA types，形成緊密的群組，彼此差異只在1-2個loci，顯示這些不同MLVA types菌株，應源於最近才侵入台灣的種源(clone)；TW3為這些相近MLVA types的建始者(founder)，此TW3菌株也是最早出現在台灣的serogroup Y菌株，在2001年開始出現在台灣，特別在台灣中部引發一小型流行事件。

病例與接觸者分離株之MLVA圖譜：5株收集自4個病例與健康接觸者案例之菌株，以MLVA分析比較其MLVA圖譜。在3個案例中，分離自病例與接觸者的菌株具有相同MLVA types，第四個案例中，分離自病例與接觸者之菌株在NMTR-7有差異(Table 4)。

討論

本研究結果顯示，MLVA 方法是 *N. meningitidis* 分子分型相當有用的工具，用於流行病學調查與探討菌株間之種源關係。MLVA 展示比 PFGE 高的分型效力，其分型結果更符合流行病學觀察。所研究的 100 株分離自病例之 *N. meningitidis* 菌株，有 96 株分離自散發病例，這些病例無明顯的流行病學上的交集。此一具有 12 個 VNTR loci 的 MLVA 方法，不僅能區別所有具高遺傳歧異度的 serogroup B 菌株，對具高度同源性的 serogroup W135 菌株，亦展現高度的分型效力；雖然 serogroup W135 菌株早在 1996 年之前已侵入台灣，但到 2002 年底，在測試的 31 株菌株中，只演化出 2 種 ST types 與 4 種 PFGE types [9]，但 MLVA 將 31 株菌株分成 30 個 MLVA types。MLVA 分型結果亦支持 serogroup Y 是最近才在台灣出現的菌系。在台灣 serogroup Y 菌株，首度出現於 2001 年，分離自 2001-2002 年的 11 株 serogroup Y 菌株，有相當接近的 MLVA 圖譜，在 7 個 MLVA types 中，之間的差異只有 1-2 個 loci，這個群組分析結果支持 serogroup Y 菌種是最近才引入這個國家的說法。MLVA 基因分型的研究亦顯示，在 1996-2002 年間，沒有一個大的 *N. meningitidis* 主要流行菌株在台灣這個國家流竄，台灣是流腦低度流行的國家。

本研究結果顯示，使用 MLVA types 所建立之菌株種源關係與使用 ST types 所建立之種源關係有相當高的一致性。就如 Figure 1 所顯示，在同一 ST complex 或 ST group 之菌株，分享較多的 VNTR loci。在 12 個 loci 中，4 個(NMTR1, NMTR2, NMTR7 與 NMTR 12) 有高度的變異度，他們應具有較高的變異速率；其餘之 VNTR loci 可能具有中度或低度之變異速率，因此 VNTR loci 可以是很有用的工具，以研究菌株經由不同時間刻度演化後之種源關係。調查 *N. meningitidis* 菌株經歷長時間演化後之種源關係，可使用較低或中度變異速率的 loci；法醫學或群突發事件之調查，則包括具有高度變異速率的 loci。在此研究中，使用 10 或 11 個 loci (去掉 1-2 個具高度變異速率的 VNTR loci，如 NMTR1 或 NMTR2) 所產生的種源關係結構，沒有明顯變化，只是其結構更加緊密(data not shown)；因此，使用更多具有較低變異的 VNTR loci，將可增加研究經由長時期演化之 *N. meningitidis* 菌株種源關係。

11 株 serogroup Y 菌株的 MLVA 圖譜，說明 12 VNTR loci 的穩定度。比較此 11 株菌之 MLVA 圖譜，可見 VNTR2 具有最高變異速率；經過 2 年時間，在 11 株 serogroup Y 菌株中，總共出現 6 種 VNTR2 對偶基因型，但只有 2 種 NMTR1, NMTR7 與 NMTR9 對偶基因型。VNTR loci 的穩定度也可經由比較自病例-接觸者個案菌株之 MLVA 圖譜來表示，雖然有一病例-接觸者案例之菌株出現一個單一 locus 變異(Table 4)，但此 MLVA 方法應足夠穩定，用於法醫與群突發事件的調查。由於變異出現之機率甚低，正常情形同一群突發事件只見很小部份的菌株出現單一 locus 的變異[15]，VNTR loci 的變異不致於影響 MLVA 資料的解釋，特別是在解釋短時間內爆發之群突發事件或法醫學的比對上。

MLVA 技術是鑑定群突發菌株(outbreak strain)有用的工具。在我們的記錄中，1996-2000 年沒有 serogroup C 菌株被分離到。第一株 serogroup C 菌株(具有 TW25 genotype)首先在 2001 年被確定，2 株(具 TW52 genotype)在 2002 年被鑑定，雖然 3 株菌株具有不同 PFGE 圖譜，但有相同 ST 基因型(ST-11 type) [9]，最初，2002 年分離之菌株被認為是源於 2001 年的菌株，但 TW25 與 TW52 有 7 個 VNTR loci 的差異，包括 4 個高變異 loci (NMTR1, NMTR2, NMTR7 與 NMTR9)與 3 個中度變異 loci (NMTR12, NMTR18 與 NMTR19)。根據 MLVA 圖譜推測，該兩個 MLVA 菌株應該不是源於同一個境外移入的菌株；相對的，MLVA 分型結果顯示 serogroup Y 菌株應該源於同一個新移入台灣的種源；源於此菌種之菌株，已在台灣這個國家生根，在 2003-2005 年每年皆引發 2-3 個病例。

本研究鑑定出 12 個 VNTR loci，但應仍然有許多 VNTR loci 存在 *N. meningitidis* 基因體中。例如 Jordan 等人[26]曾找出 22 個 coding tandem repeat loci，這些 loci 存有不同數目的重覆單元，在已公佈的 3 條 *N. meningitidis* 基因序列中，其中只有 5 個 loci 被包括在本研究的 12 個 loci 中。在本研究結果發表之同時[27]，荷蘭的 Schouls 等人也發表其所發展之 *N. meningitidis* MLVA 方法[28]，該實驗室亦鑑定出 12 個 VNTR loci，但其中有 5 個與本實驗室所鑑定的不同，原因可能有二：1)使用電腦程式蒐尋時，所設定的 score value 門檻值不同，若門檻值設得太高，將有一些重覆序列長度短且重覆次數少(score value 低)的 VNTR loci 會被忽略掉，門檻值設得太低，電腦蒐尋將增加 2-3 天的時間，找出一堆無意義的 repeat sequence loci；2)測試菌株的差異：電腦蒐尋時，找出 40 個以上的 VNTR

candidates, 在初步的評估中, 所選用的 10 株測試菌株, 其代表性不足, 結果有些 loci 在這些菌株中存有兩個或兩個以上的 copies 而被排除, 有的 loci 不存在所有測試的菌株中而被排除, 事實上, 不同區域來源之菌株可能有相當大的差異, 因此兩個實驗室排除了不同的 loci。此結果對本實驗室發展其它細菌菌種之 MLVA 方法有很大幫助, 特別在 *Shigella sonnei* 的 MLVA 方法研發上, 特將 score value 門檻值設低, 因此更多 VNTR candidates, 最後鑑定出 26 個 VNTR loci。MLVA 具有高分型效力且其結果可供探討菌種種源關係之用, 且有 PFGE 與 MLST 之優點, 當足夠多的 VNTR loci 被找到時, 可選擇具中、高變異度的 loci, 做為細分型(fine typing)菌株之方法, 做為流行病學與法醫學調查之用; 具中、低變異度的 loci, 則適合於探討 *N. meningitidis* 的種源關係, 且其 loci 之數目愈多, 其功能愈強。

VNTR loci 的變異速率的評估是一件困難的工作, 一般可借由不同區域的實驗室, 分析大量當地菌株, 計算各個 loci 之變異度(allelic diversity), 另外可由 loci 的突變率(mutation rate)來決定。目前, 已有實驗室發展出測量 VNTR loci 突變率的方法; Vogler 等人[29]首度發展測量 VNTR loci 突變率之方法, 決定出 28 個 *Escherichia coli* O157:H7 VNTR loci 之突變率, 此研究結果, 可讓 MLVA 在種源關係的研究上, 添加數值計算的理論基礎。

在 12 個 *N. meningitidis* VNTR loci 中, 有 5 個 loci 之重覆單元長度不是 3 bp 的倍數, 然而不一定需要是 3 bp 的倍數, 才會具有生物功能。例如 NMTR1 具有 7-bp 的重覆單元, 該 locus 位於 glycosyltransferase (PglE)基因的結構區, 重覆單元的變異與 pilin glycosylation 與 phase variation 有關[30], tandem repeat 序列與 repeat sequence tracts 通常扮演不同的生物功能;目前, 在 *Neisseria* spp.已有超過 100 個重覆序列 loci 與 phase-variable 基因有關[25, 26, 31], repeat loci 可能位於一個基因序列內部或位於非密碼區(non-coding region), 這種 repeat loci 一般與基因調控有關[31]。NMTR2, NMTR12 與 NMTR19 之生物功能尚未被解析, NMTR12 是一個具有 12 與 13 重覆單元的 VNTR locus, 兩種重覆單元以不同數目或順序排列, 此種複合 VNTR locus 是扮演何種生物功能, 仍有待進一步的探討。

本研究測試 100 株 *N. meningitidis* 菌株所得之 MLVA 分型效力指數為 0.998, 相對上 PFGE 與 MLST 分別為 0.95 與 0.87 [9], MLVA 顯然比 PFGE 與 MLST 更具高分型效力。

例如在分析 31 株分離自散發病例的 serogroup W135 菌株,三種方法分別得到 30 種 MLVA types、4 種 PFGE types 與 2 種 ST types。MLVA 為 PCR-based 的方法,利用 PCR 增幅 DNA 片段,以 DNA sequencer 決定 DNA 片段長度,由長度計算其重覆序列單元數目,其大部份操作步驟,由自動化機器執行,可在短時間內分析大量菌株。MLST 為目前研究 *N. meningitidis* 學者普遍使用之方法,用於探討菌株之演化與全球 *N. meningitidis* 傳播的問題,更因 *N. meningitidis* MLST database 的建立,可經由網路進入 database,進行資料比對與存取,使得 MLST 成為目前探討 *N. meningitidis* 流行病學之黃金標準。然而 MLST 分析需要定序 7 個基因,因需要精確序列,每一基因片段需雙向定序,其耗費之費用數倍於 MLVA。在發展 MLVA 中,需要定序確認各 amplicons 之重覆序列單元數目,加上 NMTR12 之重覆序列單元有 12-與 13-bp,研究過程每一菌株之 NMTR12 皆經定序,以了解該 locus 之重覆序列規則性。由於 *N. meningitidis* MLVA 方法正在發展中,未來在能取得更多的 *N. meningitidis* 基因體序列時,更多的 VNTR loci 可被鑑定出來,屆時固定 multiplex PCR 的組合與操作方法,MLVA 將比 PFGE 與 MLST 方法更加省時、省力、低成本,且可自動化,在短時間分析大量 *N. meningitidis* 菌株。

本實驗室發展 MLVA 方法最初動機,不僅為了發展一個可取代 PFGE 具高分型效力、又具 MLST 可探討演化與種源關係的方法,更是為了解決防疫機關所可能面臨的一項問題。在 2001 年,中部地區突然發生數起感染 *N. meningitidis* serogroup Y 死亡案例,更有軍中士兵因流腦猝死案例,有的案例曾引發醫療糾紛,更引發人民挑戰公權力的問題。其中一例發生在彰化縣一名女學生猝死案例,因其它原因糾葛,死者家長不肯依傳染病防治法於 24 小時內火化或深埋遺體,選擇挑戰公權力,加上數日後,鄰近某軍營一名士兵也因流腦猝死,引發軍民醫療糾紛,抗爭持續達兩年之久。事件發生當時,執法人員不滿衛生機關執法魄力,未能要求喪家依法處理遺體,讓病原散播,而導致鄰近軍營士兵遭受感染猝死。最後,兩案例之感染菌株分別為 serogroup Y 與 serogroup B 而排除其關連性,但假設兩個案例感染菌株是相同 serogroup,若無進一步的分型分析,多名公衛部門的當事者恐難逃興訟或牢獄之災;又假設兩個案例感染菌株同是 serogroup Y 或 serogroup W135,此兩種血清型菌種是近期內傳入台灣,遺傳特性相近,雖然有 PFGE 和 MLST 方法,恐也難以

釐清兩者流病關連性。MLVA 方法的發展，不只在公衛流行病學上有其應用價值，也可應用於法醫學上以釐清法律責任。

結論

MLVA 展現比 PFGE 高的分型效力，是 *N. meningitidis* 有用的分型技術；其產生的資料簡單，能夠在不同實驗室間經由網際網路傳輸，進行資料之比對。MLVA 資料能被用於探討 *N. meningitidis* 菌株間之種源關係，因此 MLVA 技術除了可做為法醫與群突發事件的流行病學調查工具，也可以應用於探討菌株經由不同時間演化後之種源關係。然而，每一 VNTR locus 突變率仍未被探討，若欲拓展 MLVA 的價值，仍應鑑定出更多的 VNTR loci，同時需分析更多已知流病歷史的 *N. meningitidis* 菌株，以取得充份的參考資料。

參考文獻

1. World Health Organization: **Control of epidemic meningococcal disease. WHO Practical Guidelines**, 2 edn. Geneva: World Health Organization; 1998.
2. Pollard AJ, Scheifele D: **Meningococcal disease and vaccination in North America**. *J Paediatr Child Health* 2001, **37**(S5):20-27.
3. Devoy AF, Dyet KH, Martin DR: **Stability of PorA during a meningococcal disease epidemic**. *J Clin Microbiol* 2005, **43**(2):832-837.
4. Lingappa JR, Al Rabeah AM, Hajjeh R, Mustafa T, Fatani A, Al Bassam T, Badukhan A, Turkistani A, Makki S, Al Hamdan N *et al*: **Serogroup W-135 meningococcal disease during the Hajj, 2000**. *Emerg Infect Dis* 2003, **9**(6):665-671.
5. Moore PS, Harrison LH, Telzak EE, Ajello GW, Broome CV: **Group A meningococcal carriage in travelers returning from Saudi Arabia**. *Jama* 1988, **260**(18):2686-2689.
6. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA *et al*: **Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**(6):3140-3145.
7. Popovic T, Schmink S, Rosenstein NA, Ajello GW, Reeves MW, Plikaytis B, Hunter SB, Ribot EM, Boxrud D, Tondella ML *et al*: **Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological investigations of meningococcal disease outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C**. *J Clin Microbiol* 2001, **39**(1):75-85.
8. ***Neisseria* MLST Home Page** [<http://pubmlst.org/neisseria>]. (accessed January 4, 2007).
9. Chiou CS, Liao JC, Liao TL, Li CC, Chou CY, Chang HL, Yao SM, Lee YS: **Molecular epidemiology and emergence of worldwide epidemic clones of *Neisseria meningitidis* in Taiwan**. *BMC Infect Dis* 2006, **6**(1):25.
10. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson PJ, Hugh-Jones ME: **Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis***. *J Bacteriol* 2000, **182**(10):2928-2936.
11. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, Roring SM, Scott AN, Brittain D, Hughes SL, Hewinson RG, Neill SD: **Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets**. *Microbiology* 2002, **148**(Pt 2):519-528.
12. Coletta-Filho HD, Takita MA, de Souza AA, Aguiar-Vildoso CI, Machado MA:

- Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**(9):4091-4095.
13. Farlow J, Smith KL, Wong J, Abrams M, Lytle M, Keim P: **Francisella tularensis** strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol* 2001, **39**(9):3186-3192.
 14. Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, Worsham PL, Wong J, Keim P: **Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the Yersinia pestis genome.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**(9):3179-3185.
 15. Noller AC, McEllistrem MC, Pacheco AG, Boxrud DJ, Harrison LH: **Multilocus variable-number tandem repeat analysis distinguishes outbreak and sporadic Escherichia coli O157:H7 isolates.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(12):5389-5397.
 16. Ramisse V, Houssu P, Hernandez E, Denoeud F, Hilaire V, Lisanti O, Ramisse F, Cavallo JD, Vergnaud G: **Variable number of tandem repeats in Salmonella enterica subsp. enterica for typing purposes.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(12):5722.
 17. Schouls LM, van der Heide HG, Vauterin L, Vauterin P, Mooi FR: **Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Dutch Bordetella pertussis strains reveals rapid genetic changes with clonal expansion during the late 1990s.** *J Bacteriol* 2004, **186**(16):5496-5505.
 18. Slack AT, Dohnt MF, Symonds ML, Smythe LD: **Development of a Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) for Leptospira interrogans and its application to Leptospira interrogans serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia.** *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005, **4**(1):10.
 19. Top J, Schouls LM, Bonten MJ, Willems RJ: **Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of Enterococcus faecium isolates.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(10):4503-4511.
 20. Yazdankhah SP, Lindstedt BA, Caugant DA: **Use of variable-number tandem repeats to examine genetic diversity of Neisseria meningitidis.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(4):1699-1705.
 21. **The Wellcome Trust Sanger Institute** [<http://www.sanger.ac.uk>]. (accessed January 5, 2007).
 22. Benson G: **Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**(2):573-580.
 23. **Primer3** [<http://frodo.wi.mit.edu>]. (accessed January 5, 2007).
 24. Hunter PR: **Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods.** *J Clin Microbiol* 1990, **28**(9):1903-1905.

25. Snyder LA, Butcher SA, Saunders NJ: **Comparative whole-genome analyses reveal over 100 putative phase-variable genes in the pathogenic *Neisseria* spp.** *Microbiology* 2001, **147**(Pt 8):2321-2332.
26. Jordan P, Snyder LA, Saunders NJ: **Diversity in coding tandem repeats in related *Neisseria* spp.** *BMC Microbiol* 2003, **3**:23.
27. Liao JC, Li CC, Chiou CS: **Use of a multilocus variable-number tandem repeat analysis method for molecular subtyping and phylogenetic analysis of *Neisseria meningitidis* isolates.** *BMC Microbiol* 2006, **6**(1):44.
28. Schouls LM, van der Ende A, Damen M, van de Pol I: **Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Neisseria meningitidis* yields groupings similar to those obtained by multilocus sequence typing.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**(4):1509-1518.
29. Vogler AJ, Keys C, Nemoto Y, Colman RE, Jay Z, Keim P: **Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7.** *J Bacteriol* 2006, **188**(12):4253-4263.
30. Power PM, Roddam LF, Rutter K, Fitzpatrick SZ, Srikhanta YN, Jennings MP: **Genetic characterization of pilin glycosylation and phase variation in *Neisseria meningitidis*.** *Mol Microbiol* 2003, **49**(3):833-847.
31. Martin P, van de Ven T, Mouchel N, Jeffries AC, Hood DW, Moxon ER: **Experimentally revised repertoire of putative contingency loci in *Neisseria meningitidis* strain MC58: evidence for a novel mechanism of phase variation.** *Mol Microbiol* 2003, **50**(1):245-257.

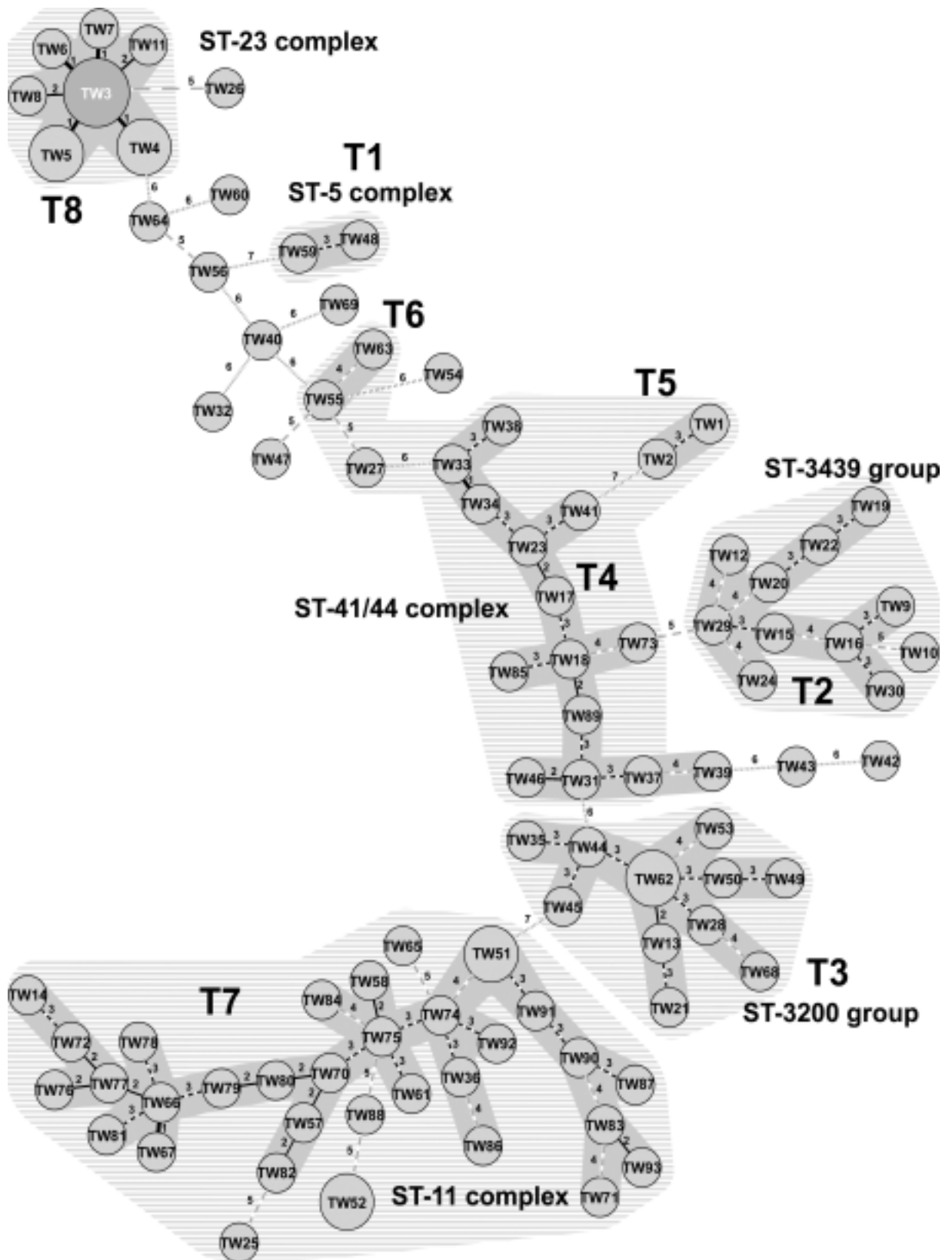


Figure 1. Minimum Spanning Tree diagram, consisting of 93 MLVA types are identified.

Differences in loci between two MLVA types are numbered. Circle size is proportional to the number of isolates belonging to an MLVA type. Two or more MLVA types differing in four or less loci are regarded as a group. MLVA

types in groups (T1 – T8) are marked in dark gray shadow and ST groups or ST complexes marked in light dashed lines.

Table 1: VNTR locus characteristics at genomes of *N. meningitidis* strains Z2491, MC58 and FAM18.

VNTR locus ^a	Consensus sequence(s) of repeat unit ^b	Length of repeat unit (bp)	Locus in Z2491		Locus in MC58		Locus in FAM18		Function (Reference or locus_tag ^c)
			Location	Number of repeat unit	Location	Number of repeat unit	Location	Number of repeat unit	
NMTR1 (VNTR01)	CAAACAA	7	814844–815018	25	657240–657484	35	601072–601274	29	glycosyl transferase [[30]
NMTR2	CATTCT	7	920757–920875	17	773274–773301	4	716022–716154	19	Unknown
NMTR6	GCTTCAGTT ACAGCTTCT TTG	21	1603619–1603660	2	1518318–1518359	2	1407985–1408068	4	membrane protein (NMA1680)
NMTR7	CAAG	4	1638925–1638972	12	1556771–1556814	11	1444059–1444090	8	hypothetical protein (NMB1507)
NMTR9 (VNTR06 & VNTR08)	GCCAAAGTT	9	2158594–2158514	9	285906–285968	7	277433–277666	26	rotamase (NMA2206)
NMTR9a	CCGCTGCTA CTGCCGCTG CTGAAGCAC CTG	30	1100635–1100694	2	970825–970854	1	932818–932907	3	dihydroliipoamide succinyltransferase E2 component (NMA1150)
NMTR9b	TACGGCTGC CGCGTCAA	18	1385171–1385206	2	1293181–1293216	2	1191565–1191582	1	murein hydrolase (NMA1488)
NMTR9c	CGGATACGC TCTTGG	15	1446130–1446174	3	1353481–1353510	2	1250095–1250139	3	hypothetical protein (NMA1547)
NMTR10	CAGATT	6	2058538–2058515	4	386427–386480	9	1824619–1824596	4	DNA-directed RNA polymerase-chain (NMA0141)
NMTR12 (VNTR02)	a: GGGCTGTAG AGAT b: GGCTGTAGA GAT	13 12	1234098–1234135	3 = 2a1b	1131164–1311531	29 = 20a9b	1043723–1044023	24 = 13a11b	Unknown
NMTR18	GGGTAGCG G	9	2052950–2052967	2	392028–392045	2	1819003–1819047	5	aldose 1-epimerase (NMA2099)
NMTR19	CGTATTTTC CCAT	13	2075417–2075442	2	369378–369403	2	1844470–1844534	5	Unknown

^a Loci in parentheses have previously been characterized by Yazdankhah et al. [20].

^b NMTR12 is a compound tandem repeat locus with 12- and 13-bp repeat units, arranged in variable

numbers and sequences.

^c Locus tag in parentheses are based on gene annotation of *N. meningitidis* strain Z2491 (GenBank accession no. AL157959), except the NMTR7 locus, which is based on gene annotation of strain MC58 (GenBank accession no. AE002098).

Table 2. ST, PFGE and MLVA genotypes for 100 *N. meningitidis* isolates.

Strain code	Year of Isolation	Serogroup	ST code ^a	PFGE code ^a	MLVA code	MLVA allelic profile ^b (NMTR1, 2, 6, 7, 9, 9a, 9b, 9c, 10, 12, 18, 19)
ST-5 complex/Subgroup III						
NM77	2001	A	ST-7	NMEN06.0065	TW59	27, 14, 2, 3, 6, 1, 2, 4, 4, 22, 2, 2
NM320	2002	A	ST-7	NMEN06.0066	TW48	21, 17, 2, 3, 6, 1, 2, 4, 4, 23, 2, 2
ST-11 complex/ET-37 complex						
MS4527	1996	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW87	47, 8, 4, 11, 33, 2, 1, 3, 4, 6, 6, 5
NM6	1996	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW76	37, 8, 4, 12, 37, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM7	1996	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW90	58, 8, 4, 17, 34, 2, 1, 3, 4, 6, 6, 5
NM19	1997	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW92	33(34), 7, 4, 11, 33, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM24	1998	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW74	36, 7, 4, 15, 32, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
2002-060	2001	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW36	16, 7, 4, 10, 23, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM163	2001	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW93	41(42), 8, 4, 9, 34, 3, 1, 3, 4, 25, 6, 5
NM21125	2001	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW77	37, 9, 4, 12, 32, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM64	2001	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW79	38, 6, 4, 12, 35, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM66	2001	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW58	27, 6, 4, 15, 39, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM76	2001	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW83	39, 8, 4, 18, 34, 3, 1, 3, 4, 25, 6, 5
NM79	2001	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW72	35, 10, 4, 12, 32, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM80	2001	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW57	27, 5, 4, 10, 37, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
2002-059	2002	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW78	38, 5, 4, 12, 36, 3, 1, 3, 4, 16, 6, 5
NM181	2002	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW81	38, 9, 4, 11, 29, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM25845	2002	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW84	42, 6, 4, 21, 34, 3, 1, 3, 4, 23, 6, 5
NM293	2002	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW66	32, 9, 4, 12, 36, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM321	2002	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW67	34, 9, 4, 12, 36, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM5	1996	W135	ST-11	NMEN06.0056	TW70	35, 6, 4, 10, 37, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM12	1997	W135	ST-11	NMEN06.0057	TW80	38, 6, 4, 14, 37, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM14	1997	W135	ST-11	NMEN06.0057	TW91	59, 7, 4, 15, 34, 2, 1, 3, 4, 6, 6, 5
NM4967	1997	W135	ST-11	NMEN06.0057	TW75	37, 6, 4, 15, 38, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM19172	2000	W135	ST-11	NMEN06.0057	TW61	28, 5, 4, 13, 38, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM102	2001	W135	ST-11	NMEN06.0057	TW14	10, 10, 4, 9, 19(27), 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM152	2001	W135	ST-11	NMEN06.0057	TW82	39, 5, 4, 16, 37, 3, 1, 3, 4, 24, 6, 5
NM357	2002	W135	ST-11	NMEN06.0057	TW65	30, 7, 5, 25, 35, 3, 1, 3, 4, 24, 7, 5
NM60	2001	W135	ST-11	NMEN06.0059	TW71	35, 8, 4, 27, 35, 3, 1, 3, 4, 25, 6, 6
NM68	2001	W135	ST-11	NMEN06.0059	TW86	43, 7, 4, 10(11), 25, 3, 1, 3, 4, 24, 3, 6
NM257	2002	W135	ST-11	NMEN06.0059	TW88	49, 6, 4, 13, 24, 3, 1, 3, 4, 24, 3(6), 7
NM81	2001	C	ST-11	NMEN06.0067	TW25	11, 5, 4, 16, 27, 3, 1, 2, 4, 21, 6, 4
NM377	2002	C	ST-11	NMEN06.0068	TW52	24, 6, 4, 13, 24, 3, 1, 2, 4, 18, 4, 5
NM378	2002	C	ST-11	NMEN06.0068	TW52	24, 6, 4, 13, 24, 3, 1, 2, 4, 18, 4, 5
NM25	1998	W135	ST-3016	NMEN06.0058	TW51	23, 7, 4, 9, 32, 2, 1, 3, 4, 6, 6, 5
NM18972	2000	W135	ST-3016	NMEN06.0058	TW51	23, 7, 4, 9, 32, 2, 1, 3, 4, 6, 6, 5
ST-23 complex/Cluster A3						
NM21468	2001	Y	ST-23	NMEN06.0060	TW3	4, 18, 5, 7, 9, 1, 2, 2, 11, 24, 2, 2
NM22034	2001	Y	ST-23	NMEN06.0060	TW3	4, 18, 5, 7, 9, 1, 2, 2, 11, 24, 2, 2
NM82	2001	Y	ST-23	NMEN06.0060	TW3	4, 18, 5, 7, 9, 1, 2, 2, 11, 24, 2, 2
NM25569	2002	Y	ST-23	NMEN06.0060	TW7	4, 18, 5, 6, 9, 1, 2, 2, 11, 24, 2, 2
NM267	2002	Y	ST-23	NMEN06.0060	TW5	4, 19, 5, 7, 9, 1, 2, 2, 11, 24, 2, 2
NM28225	2002	Y	ST-23	NMEN06.0060	TW5	4, 19, 5, 7, 9, 1, 2, 2, 11, 24, 2, 2
NM100	2001	Y	ST-23	NMEN06.0061	TW6	4, 20, 5, 7, 9, 1, 2, 2, 11, 24, 2, 2
NM153	2001	Y	ST-23	NMEN06.0061	TW8	4, 15, 5, 7, 10, 1, 2, 2, 11, 24, 2, 2
NM21519	2001	Y	ST-23	NMEN06.0061	TW4	4, 21, 5, 7, 9, 1, 2, 2, 11, 24, 2, 2
NM21675	2001	Y	ST-23	NMEN06.0061	TW4	4, 21, 5, 7, 9, 1, 2, 2, 11, 24, 2, 2
NM25238	2001	Y	ST-23	NMEN06.0061	TW11	5, 23, 5, 7, 9, 1, 2, 2, 11, 24, 2, 2
ST-32 complex/ET-5 complex						
NM159	2001	B	ST-3465	NMEN06.0042	TW39	17, 8, 2, 12, 12, 1, 2, 3, 9, 26, 2, 3

ST-41/44 complex/Lineage 3						
NM21700	2001	B	ST-41	NMEN06.0002	TW85	40, 4, 2, 18, 10, 1, 1, 3, 4, 3, 2, 3
NM25135	2001	B	ST-41	NMEN06.0002	TW89	58, 4, 2, 11, 10, 1, 1, 3, 4, 4, 2, 3
2002-075	2002	B	ST-41	NMEN06.0002	TW18	10, 4, 2, 8, 10, 1, 1, 3, 4, 4, 2, 3
NM30607	2002	B	ST-41	NMEN06.0002	TW73	36, 4, 2, 10, 13, 1, 1, 3, 4, 4, 3, 3
NM20	1997	B	ST-41	NMEN06.0003	TW23	11, 5, 2, 7, 12, 1, 1, 3, 4, 4, 2, 3
NM39	1999	B	ST-41	NMEN06.0004	TW37	16, 8, 2, 12, 12, 1, 1, 3, 4, 3, 2, 3
NM25614	2002	B	ST-41	NMEN06.0046	TW34	15, 6, 2, 7, 12, 1, 1, 3, 4, 4, 2, 4
NM295	2002	B	ST-41	NMEN06.0046	TW33	15, 6, 2, 8, 12, 1, 1, 3, 4, 4, 2, 4
NM9	1996	B	ST-41	NMEN06.0047	TW17	10, 5, 2, 7, 14, 1, 1, 3, 4, 4, 2, 3
NM84	2001	B	ST-41	NMEN06.0047	TW38	17, 7, 2, 10, 12, 1, 1, 3, 4, 4, 2, 4
NM40	1999	B	ST-41	NMEN06.0090	TW41	18, 5, 2, 15, 16, 1, 1, 3, 4, 4, 2, 3
NM21261	2001	B	ST-154	NMEN06.0001	TW31	14, 8, 2, 11, 10, 1, 1, 3, 4, 3, 2, 3
NM24481	2001	B	ST-154	NMEN06.0001	TW46	20, 9, 2, 11, 10, 1, 1, 3, 4, 3, 2, 3
NM8	1996	B	ST-437	NMEN06.0025	TW63	28, 15, 2, 11, 9, 1, 1, 3, 8, 4, 3, 2
NM18	1997	B	ST-437	NMEN06.0044	TW55	26, 13, 2, 9, 8, 1, 1, 3, 8, 4, 3, 2
NM32	1998	B	ST-3466	NMEN06.0031	TW27	12, 6, 5, 8, 3, 1, 1, 3, 8, 4, 3, 2
Hua443	2002	B	ST-3468	NMEN06.0048	TW2	0, 16, 3, 15, 16, 1, 3, 3, 10, 3, 3, 3
2002-061	2002	B	ST-3468	NMEN06.0049	TW1	0, 14, 3, 14, 16, 1, 3, 3, 9, 3, 3, 3
ST-162 complex						
NM420	2002	B	ST-162	NMEN06.0037	TW42	18, 7, 2, 8, 13, 1, 2, 3, 25, 10, 3, 2
ST-865 complex						
NM15	1997	B	ST-865	NMEN06.0029	TW64	29, 21, 2, 7, 22, 1, 1, 2, 10, 0, 2, 2
NM272	2002	B	ST-865	NMEN06.0030	TW56	26, 14, 2, 10, 21, 1, 1, 2, 11, 0, 2, 2
ST-3129 group						
NM2	1996	B	ST-3129	NMEN06.0020	TW40	17, 13, 2, 8, 34, 1, 1, 2, 11, 8, 3, 2
NM13	1997	B	ST-3129	NMEN06.0027	TW69	34, 12, 4, 8, 16, 1, 1, 2, 10, 7, 3, 2
ST-3200 group						
NM21435	2001	B	ST-3200	NMEN06.0005	TW53	25, 11, 3, 8, 16, 1, 1, 3, 8, 3, 2, 2
NM71	2001	B	ST-3200	NMEN06.0007	TW28	13, 11, 3, 10, 15, 2, 1, 3, 8, 3, 2, 2
NM30	1998	B	ST-3200	NMEN06.0010	TW50	22, 8, 3, 17, 15, 2, 1, 3, 8, 3, 2, 2
NM88	2001	B	ST-3200	NMEN06.0010	TW35	15, 13, 3, 13, 13, 2, 1, 3, 8, 3, 2, 2
NM397	2002	B	ST-3200	NMEN06.0010	TW49	22, 6, 3, 5, 12, 2, 1, 3, 8, 3, 2, 2
NM10	1996	B	ST-3200	NMEN06.0012	TW44	19, 8, 3, 13, 10, 2, 1, 3, 8, 3, 2, 2
NM255	2002	B	ST-3441	NMEN06.0010	TW62	28, 8, 3, 10, 16, 2, 1, 3, 8, 3, 2, 2
NM256	2002	B	ST-3441	NMEN06.0010	TW62	28, 8, 3, 10, 16, 2, 1, 3, 8, 3, 2, 2
NM21992	2001	B	ST-3469	NMEN06.0006	TW45	19, 7, 3, 9, 12, 2, 1, 3, 8, 3, 2, 2
NM30088	2002	B	ST-3470	NMEN06.0013	TW13	8, 8, 3, 10, 9, 2, 1, 3, 8, 3, 2, 2
NM390	2002	B	ST-3503	NMEN06.0014	TW21	10, 9, 3, 8, 9, 2, 1, 3, 8, 3, 2, 2
NM26447	2002	B	ST-4836	NMEN06.0010	TW68	34, 11, 3, 15, 13, 2, 1, 3, 8, 4, 2, 2
ST-3439 group						
NM62	2001	B	ST-1393	NMEN06.0093	TW10	5, 34, 3, 13, 17, 1, 1, 3, 14, 5, 3, 2
NM16	1997	B	ST-3192	NMEN06.0023	TW16	10, 22, 3, 13, 14, 1, 1, 3, 15, 4, 3, 2
NM30397	2002	B	ST-3192	NMEN06.0024	TW22	10, 24, 3, 7, 16, 1, 1, 3, 14, 4, 3, 2
NM383	2002	B	ST-3192	NMEN06.0024	TW19	10, 20, 3, 13, 16, 1, 1, 2, 14, 4, 3, 2
NM21	1997	B	ST-3192	NMEN06.0091	TW20	10, 16, 3, 14, 15, 1, 1, 3, 14, 4, 3, 2
NM22	1997	B	ST-3192	NMEN06.0092	TW24	11, 21, 3, 10, 14, 1, 1, 3, 14, 4, 3, 2
Nm15656	1999	B	ST-3439	NMEN06.0016	TW9	5, 20, 3, 7, 14, 1, 1, 3, 15, 4, 3, 2
NM38	1999	B	ST-3439	NMEN06.0017	TW30	14, 20, 3, 13, 15, 1, 1, 3, 15, 4, 3, 2
NM37	1999	B	ST-3439	NMEN06.0089	TW15	10, 17, 3, 10, 13, 1, 1, 3, 18, 4, 3, 2
NM4	1996	B	ST-3440	NMEN06.0022	TW29	13, 16, 3, 10, 13, 1, 1, 3, 16, 4, 3, 2
NM22208	2001	B	ST-3442	NMEN06.0015	TW12	5, 30, 3, 10, 19, 1, 1, 3, 19, 4, 3, 2
Single clonal lineage						
NM3	1996	B	ST-3175	NMEN06.0021	TW26	11, 15, 4, 7, 9, 1, 2, 3, 11, 31, 2, 2
NM28	1998	B	ST-3196	NMEN06.0036	TW54	26, 9, 5, 21, 24, 1, 1, 3, 33, 9, 3, 2
NM90	2001	NT	ST-3366	NMEN06.0069	TW32	14, 4, 2, 7, 6, 1, 1, 3, 16, 8, 3, 2

NM15252	1999	B	ST-3437	NMEN06.0019	TW47	20, 13, 2, 14, 7, 1, 1, 3, 8, 17, 2, 2
NM25660	2002	B	ST-3438	NMEN06.0018	TW43	18, 19, 2, 18, 12, 1, 2, 3, 16, 7, 2, 2
NM412	2002	B	ST-3504	NMEN06.0050	TW60	27, 20, 2, 15, 15, 4, 2, 2, 10, 0, 2, 2

^a Characterized previously [9].

^b Number in parentheses indicates the second copy of the locus. The second allele indicated in the parentheses was ignored in the MST analysis.

Table 3. Features of selected VNTR loci observed in 100 *N. meningitidis* isolates.

Locus	Length of repeat unit (bp)	Size range of amplicon (bp)	Range of repeat unit ^a	Number of alleles ^a	Polymorphism index ^b
NMTR1	7	197-589	3-59	40	0.96
NMTR2	7	236-446	4-34	23	0.92
NMTR6	21	165-228	2-5	4	0.73
NMTR7	4	195-291	3-27	18	0.9
NMTR9	9	189-513	3-39	28	0.94
NMTR9a	30	188-278	1-4	4	0.6
NMTR9b	18	182-218	1-3	3	0.33
NMTR9c	15	187-217	2-4	3	0.35
NMTR10	6	221-395	4-33	12	0.71
NMTR12	13, 12	218-572	3-31	19	0.81
NMTR18	9	182-227	2-7	6	0.67
NMTR19	13	186-251	2-7	6	0.64

^a Not including the unamplifiable allele at NMTR1 and NMTR12.

^b Nei's diversity index (DI) = $1 - \sum(\text{allele frequency})^2$.

Table 4. MLVA profiles of *Neisseria meningitidis* isolates from four patient/contact episodes.

Patient / Contact	Sex	Age	Strain code	Year	Serogr oup	MLV A code	MLVA profile (NMTR1, 2, 6, 7, 9, 9a, 9b, 9c, 10, 12, 18, 19)											
							1	2	3	4	5	6	7	8	9	9a	9b	9c
Patient P1	M	0.3	NM153	2001	Y	TW8	4	15	5	7	10	1	2	2	11	24	2	2
Contact of P1	F	29.3	NM156	2001	Y	TW8	4	15	5	7	10	1	2	2	11	24	2	2
Patient P2	M	0.4	Hua443	2002	B	TW2	0	16	3	15	16	1	3	3	10	3	3	3
Contact of P2	F	38.3	Hua452	2002	B	TW2	0	16	3	15	16	1	3	3	10	3	3	3
Patient P3	M	5.3	NM30397	2002	B	TW22	10	24	3	7	16	1	1	3	14	4	3	2
Contact of P3	NA	6.5	NM30464	2002	B	TW22	10	24	3	7	16	1	1	3	14	4	3	2
Contact of P3	NA	34.3	NM30465	2002	B	TW22	10	24	3	7	16	1	1	3	14	4	3	2
Patient P4	F	2.7	NM25614	2002	B	TW34	15	6	2	7	12	1	1	3	4	4	2	4
Contact of P4	F	24.3	NM25618	2002	B	TW33	15	6	2	8	12	1	1	3	4	4	2	4

NA: Not available

Table 5. VNTR locus-specific primers and the predicted sizes of amplicons from *N. meningitidis* strains Z2491, MC58 and FAM18.

Locus	Primer designation	Primer sequence (5' 3') ^a	T _m (°C)	Predicted size of amplicon (bp)		
				Z2491	MC58	FAM18
NMTR1	NMTR-1 F	6-FAM-GGGTCAAAGACGGAAGTGA	54.9	351	421	379
	NMTR-1 R	AAAATCATCCGAATCAATAAAGAC	49.8			
NMTR2	NMTR-2 F	PET-GTGCGCCAGTAAGAAAATACAAT	53.9	327	236	341
	NMTR-2 R	TCAGAAAAGTTTTGCATTTTGAA	50.1			
NMTR6	NMTR-6 F	6-FAM-GCGGCATCTTTCATTTTGTC	52.8	165	165	207
	NMTR-6 R	CGAAGAAGCGAAAGACCAAG	53.9			
NMTR7	NMTR-7 F	CCATCCTTATCCGAATCTGAA	55	231	227	215
	NMTR-7 R	VIC-CTGAAACCCTGCCTGAAGAA	53.4			
NMTR9	NMTR-9 F	PET-GGAAAGAATGATGAAAATCAAAGC	51.3	243	225	396
	NMTR-9 R	CCGTCTGAAAAGCGGATACC	55.8			
NMTR9a	NMTR-9a F	GTTGTTGCCGACCAAGTTTT	54.4	218	188	248
	NMTR-9a R	6-FAM-GAACCTTGCAATGCGTTCAC	55.2			
NMTR9b	NMTR-9b F	CGACTTCATCGTCCACAAA	53	200	200	182
	NMTR-9b R	VIC-GGCTTTGTCTGCCTGTACG	56.3			
NMTR9c	NMTR-9c F	GGAAATCTGCGCTTTCGTAG	54	202	187	202
	NMTR-9c R	NED-TCATGTCAGCAATTCCTCA	54			
NMTR10	NMTR-10 F	NED-GGCATCGATGATGTGAAACA	53.3	221	251	221
	NMTR-10 R	GTGCTGAAGCACCAAGTGAA	55.9			
NMTR12	NMTR-12 F	CAAAGAGAGAGTGGAAGAACATCA	54.5	218	548	481
	NMTR-12 R	PET-AATGACGAAGAGTGGCAGGATT	56.6			
NMTR18	NMTR-18 F	AACGGAAAATTCCTGCACAA	53.1	182	182	209
	NMTR-18 R	VIC-CGTTTTCCGTGTTTCCTGATT	53.4			
NMTR19	NMTR-19 F	NED-GACATATTGTGCGATGTCGAG	53.3	186	186	225
	NMTR-19 R	CGCCAACAGAAAAGAATACGA	53.6			

^a 6-FAM, VIC, NED and PET are ABI compatible dyes (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA)