

計畫編號：DOH99-DC-2017

行政院衛生署疾病管制局 99 年度科技研究發展計畫

Salmonella DNA-based 血清分型技術之研發

研究報告

執行機構：衛生署疾病管制局

計畫主持人：邱乾順

研究人員：高俊偉

執行期間：2010 年 1 月 1 日至 2010 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

一、摘要	2-4
二、本文	
(一)、前言	5-11
(二)、材料與方法	12-13
(三)、結果	14-16
(四)、討論	17-18
(五)、結論與建議	19
(六)、計畫主要研究成果及具體建議	20-21
(七)、參考文獻	22-23
(八)、圖表	
表一、傳統血清學與 DNA-based serotyping 鑑定 35 株 WHO EQAS 菌株	24-26

摘要

沙門氏菌(*Salmonella*)擁有 2,500 種以上血清型，血清型有不同宿主範圍，是防治 *Salmonella* 方向的依據，也是國際上稱呼沙門氏菌之共同語言。血清分型是 *Salmonella* 流病學與相關研究之基礎。然而利用抗原-抗血清反應的傳統血清學分型法，具有相當高誤判率。相對於不同血清型菌株，相同血清型之菌株具有較高遺傳關聯，菌株間因此可能享有較高的 PFGE 圖譜相似度，PFGE 圖譜因此可能用於預測沙門氏菌之血清型，唯其前提是用於比對之 PFGE 圖譜菌株庫，對應的菌株血清型必需要正確無誤。

本計畫將建立沙門氏菌 DNA 血清分型技術，以彌補高錯誤率之傳統血清學分型法，重新檢測疾病管制局 *Salmonella* DNA 指紋圖譜資料庫內菌株之血清型，讓此 DNA 指紋圖譜資料庫成為快速決定 *Salmonella* 菌株血清型之工具，嘉惠 PulseNet Taiwan 分子分型監測網之運作，且每年可節省數百萬元之血清試劑與人力成本。

本研究第一年已確立能用於達成目標之 DNA -based *Salmonella* serotyping scheme，即利用 Luminex 方法鑑定 A, B, C, D, E 與 O13 抗原種類，使用傳統血清集法鑑定其它 O 群抗原，以核酸定序方法鑑定 H1 與 H2 抗原(基因)種類，應用生化試測區別具有相同抗原組成之血清型。此一 typing scheme 已用於正確鑑定 35 株 WHO EQAS 測試標準菌株。第二年將使用此一 typing scheme 檢測 *Salmonella* 圖譜資料庫內約 340 株疑似血清型鑑定錯誤之菌株，使該資料庫成為預測台灣 *Salmonella* 分離株血清型之工具。

關鍵字：沙門氏菌、血清分型、DNA-based 血清分型

Abstract

To date, more than 2,500 serotypes (serovars) have been identified for the *Salmonella* genus. Serovars are the internationally recognized terms for delineating *Salmonella* and each serovar possesses unique host range. The traditional serotyping, based on agglutination of somatic and flagella antigens with antisera, is a labor-intensive and costly method and has a high level of misidentification rate. Theoretically, isolates of the same serovar share higher PFGE pattern similarity than isolates with different serovars. Therefore, serovars can be predicted by comparing PFGE patterns with those with known serotypes in a PFGE fingerprint database. In this study, we aimed to develop and evaluate DNA-based *Salmonella* serotyping methods to replace or complement the conventional serotyping method. A new DNA-based *Salmonella* serotyping scheme was proposed and used to re-identify the serovars of the isolates, which bore rare PFGE patterns or different PFGE patterns with others in a major clade, in Taiwan CDC's *Salmonella* Fingerprint Database. Up to date, the database contains more than 16,000 entries that can be a useful resource for rapid prediction of *Salmonella* serovars and is beneficial to the operation of PulseNet Taiwan, a molecular subtyping network for surveillance of bacterial infectious diseases in Taiwan. Determination of *Salmonella* serovars by PFGE patterns can save expenses of conventional serotyping by several millions of NT dollars per year.

In the first year, we have established a DNA-based serotyping scheme. The procedures are: 1) to determine O group antigens: A, B, C, D, E and O13 using luminex-based probe hybridization method, 2) to determine other O group antigens using conventional antiserum

agglutination method, 3) to determine H1 and H2 antigens using PCR to amplify the genes, sequencing and blasting the sequences against those in GenBank for identification of alleles of H1 and H2, 4) to determine those with common antigenic formula but belonging to different subspecies (biovars) using biochemical testing. The new typing scheme has been successfully applied to identify 35 WHO EQAS reference strains. In the second year, we will use the new typing scheme to re-check 340 isolates in the *Salmonella* Fingerprint Database for which their PFGE patterns are rare or their serotypes could have been misidentified as they have discordant PFGE relationship with other serotypes.

Keywords : *Salmonella*, serotyping, DNA-based serotyping

前言

沙門氏菌(*Salmonella*)是全球主要人畜共通病原細菌，除了引發各種動物疾病，亦造成人類之腸胃炎、全身性感染與菌血症。*Salmonella* 分成兩個種(species)：*S. enterica* 與 *S. bongori*。*S. enterica* 依據生化代謝特性與血清學特性，分成 6 個亞種(subspecies)與超過 2,500 種血清型(serovars) [1]。

Salmonella 的血清型是(1)國際討論溝通 *Salmonella* 的共同語言，(2)不同血清型具有不同之宿主範圍(host range)，在公共衛生學上，可藉此推論該地區流行的 *Salmonella* 病原之可能污染來源。故 *Salmonella* 之血清分型，仍是公衛流病監測 *Salmonella* 與學術研究之基礎工作。

Salmonella 之血清型，是由體抗原(O antigens)與鞭毛抗原(H antigens)所決定，大多數 *Salmonella* 血清型具有兩種不同鞭毛，只有少數不具鞭毛、一種鞭毛或三種鞭毛。不同鞭毛不會同時在菌體上被表現。在血清分型時，不同鞭毛之鑑定最困難，需要進行“相誘導”(phase induction) [2]，取得轉換鞭毛相的菌體，才能鑑定第二種或第三種鞭毛之型別。傳統血清型鑑定，是簡單的抗原-抗血清凝集的原理，原理雖然簡單，但因為許多抗原組成相近，抗血清會有交叉反應(cross reaction)，常造成偽凝集，或有些菌株之抗原性不強，凝集性很弱，而發生誤判。因此傳統血清分型結果，會有相當高比率鑑定錯誤。

傳統血清分型由於操作煩瑣、相當耗時、耗人力、血清試劑不易購齊且

價格高昂，使得血清分型只能在血清試劑較齊全的參考實驗室進行等缺點，加上分型結果有相當高比率錯誤的情形，使得傳統血清學分型工作，成為進行 *Salmonella* 感染監測、流行病學調查與研究工作，最令人頭痛的基本工作。

近年來，由於基因分子生物學的快速進展，多種 O、H 抗原相對應的基因陸續被鑑定出來，許多不同血清型 *Salmonella* 基因體序列被定序公佈，和各種基因分型方法的應用，累積相當多不同血清型菌株之基因圖譜資料，這些資料，皆可應用於直接鑑定或間接預測 *Salmonella* 血清型。目前可能用於進行 *Salmonella* 血清型鑑定的方法有：

1. O-antigen 與 H-antigen 的 PCR 基因檢測：此方法與傳統血清分型一樣，屬直接 *Salmonella* 血清分型技術，目前已有許多特定的 O-antigen 與 H-antigen 基因與 PCR-based 的偵測方法被研究發表[3-9]。PCR-based 的偵測方法，所能鑑定的 O-antigen 與 H-antigen 基因型相當有限。由於許多 O-antigen 與 H-antigen 之基因序列有很高相似度，這種利用 PCR 增幅 O-antigen 與 H-antigens 基因 DNA 片斷，再以 DNA 片斷推論對應之 O-antigen 與 H-antigen 的種類，將會有很高的誤判機率。因此，在技術平台上，美國疾病管制中心(US Centers for Disease Control and Prevention)，發展之 Luminex 平台，設計轉一性的 probes，可改善這個技術。

2. Luminex-based *Salmonella* serotyping：美國疾病管制中心由兩個博

士與工作團隊，花費數年時間進行許多 O-antigen 與 H-antigen 基因的定序工作，進行 DNA 序列比對，設計 probes，建立 Luminex 操作平台的血清分型法。Luminex 技術平台為液態雜合(liquid hybridization)技術，理論上可同時偵測 100 個標的，操作容易，所需時間由 PCR 增幅 DNA 到完成 DNA 種類鑑定，可在一個工作天內完成。這個方法之重點在 probes 的設計與測試評估，由於不同 O-antigen 與 H-antigen 基因序列相近，要設計一套高專一性的 probes，相當不容易。2006 年計畫主持人曾到美國疾病管制中心該實驗室研習 2 個月，參與 probes 之測試工作，體會美國疾病管制中心發展此技術平台的艱辛過程。為了發展此技術，該中心投入龐大經費與人力，耗費多年時間，不斷重覆設計新的 probes，以大量不同血清型菌株進行測試評估，不斷地重覆循環。目前該技術已可鑑定約 100 種美國主要的血清型，已可鑑定 95%以上分離株的血清型，具高度實用性。

3. PFGE 圖譜比對預測：由於相同血清型菌株的遺傳相關性應高於不同血清型菌株，因此相同血清型菌株之 PFGE 圖譜，在群組分析(clustering analysis)時，應該會聚集在同一個群組內。若有一個包含眾多 PFGE 圖譜的資料庫，即可應用此原理，進行 PFGE 圖譜的比對，而預測血清型[10]。這個應用的前提，要資料庫中同一血清型菌株(圖譜)數量夠多，且所有菌株的血清型是正確的。目前本局 *Salmonella* DNA Fingerprint database 已含有近 80 種

血清型超過 16,000 筆 PFGE 圖譜資料，其中前 20 血清型菌株佔了總數之 95% 以上，且每一血清型有 70 株以上菌株，足以做為 PFGE 圖譜比對之基礎。因此，若本局之 PFGE 圖譜資料庫之血清型皆正確，未來只有少於 5% 的菌株需要做直接的血清型別鑑定，如此每年可省下數百萬元以上之試劑經費，與至少兩名人力。血清型別雖在推測動物宿主來源上有應用價值，唯其分型資料過於粗糙，對公衛上進行疾病監測與群突發調查(outbreak investigation)貢獻度有限，而在公衛之疾病監測與群突發調查應用上，目前以 PFGE 之基因分型資料最有價值，因此 PFGE 圖譜分析已成為本局與國際食因性疾病分子分型監測網(PulseNet International)之常規分型工具。PFGE 分析所需時間僅為 2-3 天，比傳統血清分型需要 1-2 個星期工作天，速度明顯有利於疾病的監測工作。若能利用常規分析所得到的 PFGE 圖譜資料，來進行血清型之預測，是一舉兩得，且可更快速又節省龐大經費成本。衛生署正在研擬將 *Salmonella* 感染症列為法定傳染病，*Salmonella* 基因分型(PFGE 與 MLVA)將可為疾病管制局進行 *Salmonella* 流病追蹤調查提供很用之資訊。然而，cluster analysis 結果顯示，本局資料庫有相當數量菌株之血清型鑑定可能有誤，重新做傳統血清分型結果，亦無法肯定確定這些菌株之血清型，故有需要借助於 DNA-based 的鑑定方法，重新檢驗這些可疑菌株，建立正確血清型之資料庫。

4. *Salmonella* 血清型間基因體差異增幅法：經由比較不同 *Salmonella*

血清型基因體序列，得到不同血清型間之基因差異區域，設計 primers，增幅出大小不同 DNA 片斷，再以毛細管電泳方法區別片段大小，由於各血清型有特異之片段分佈(圖譜)，據此推測菌株之血清型[11]。這個方法屬於接間的鑑定原理，重點在需有足夠大的已知血清型菌株資料庫，才能提高預測之準確度與應用性。對本實驗室而言，不是一個好的研究方向。

5. 生物晶片技術平台：此技術平台應用至少兩種原理，一種原理與 luminex 的原理相似都是 probes-hybridization 的方法，以偵測各種 O-antigen 與 H-antigen 基因種類[12]，第二種方法是晶片設計 *Salmonella* 各種基因，可同時用於偵測 *Salmonella* 毒性基因，進行分型(typing)與間接的血清鑑定[13]。第二種方法需要有足夠代表性的資料庫進行比對。由於晶片技術之操作不易，且需要相當昂貴儀器配合，不易在普通實驗室進行。

6. MLST 比對：菌株 multilocus sequence typing 結果顯示，同一血清型菌株具有相近之 MLST 基因序列，而不同血清型菌株則有較遠之關係[14]，此一結果，可應用於比對 MLST 資料，推測菌株之血清型。當然，該技術為間接的血清型預測，其準確度與 MLST 資料庫大小有依存關係。目前學者 Dr. Achtman 正在進行大量 *Salmonella* 菌株之 MLST 分析，由其提供之初步結果可看出，不同血清型菌株有明顯不同之 MLST 基因型，此方法應是可行。目前 Dr. Achtman 已建立 *Salmonella* 之 MLST 資料庫，可經由網路至其網站

(<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>)進行比對工作。唯每一株菌株至少要進行 14 (7 個基因)個定序，成本高昂，資料庫之資料庫豐富性程度，亦是決定此方法可行性之關鍵。

台灣是 *Salmonella* 嚴重流行的國家，*Salmonella* 是 2006 年宣布成立的 PulseNet Taiwan 監測網主要監測病原對象，PulseNet 監測網利用標準化 PFGE 為分子分型工具，因此所有 *Salmonella* 分離株送到本實驗室皆會進行 PFGE 分析，因為同一種血清型菌株具有比其它不同血清型菌株親近的 PFGE 圖譜(遺傳關係)，所以可利用 PFGE 圖譜和資料庫內已知血清型菌株之 PFGE 圖譜進行比對，從而間接鑑定菌株之血清型。PFGE 分析時間在本實驗室為 2-3 天，而傳統血清分型則需要 1-2 星期，且傳統血清型錯誤率高、成本也高，加上血清分型結果相當粗糙，對流行病學調查之貢獻度有限，所以在防疫的疾病監測上，血清型資料不是立即必要的流病資料。只是，血清型為國際上討論溝通沙門氏菌的共同語言，且可據而推測可能之動物(宿主)來源，也有助於流病學之研究與疾病防治方向。應用 PFGE 圖譜比對推論菌株血清型之基本前提，是資料庫菌株之血清型必需是正確的。建立 DNA-based 的血清型鑑定技術，可檢驗目前資料庫菌株之正確性，特別是檢驗罕見血清型菌株的鑑定正確度，具有高度價值。

本計畫主要目的在確立一套適合本實驗室目標的 DNA-based

Salmonella serotyping scheme，可用於正確鑑定 *Salmonella* 圖譜資料庫內疑似血清型鑑定錯誤的菌株，讓此一擁有 16,000 株菌株的 PFGE 圖譜資料庫，可以應用來推定新菌株之血清型，節省大量時間與經費之消耗。計畫第一年已針對各種方法進行評估，對達成目標最可行的 serotyping scheme，是利用(1) Luminex-based 技術決定 A, B, C, D, E, O13 等 O 血清群抗原。*Salmonella* 有 46 個 O 群抗原(serogroups)，95%以上分離株屬上述 6 種 O 群抗原；(2) 傳統抗原-抗血清凝集方法，鑑定其它 O 群抗原；(3)PCR 增幅 H1 & H2 基因，定序，與 GenBank 資料庫之基因序列比對，決定 H1 & H2 基因型別；(4)生化試驗決定 O:H1:H2 抗原組成相同但屬於不同 biovars (subspecies)之血清型(此類菌株非常罕見)。此一 serotyping scheme 已用於分析 35 株 WHO EQAS 測試的標準菌株，第二年將利用此確立的 DNA-based serotyping scheme，進行菌株庫可疑血清型菌株(約 340 株)之再鑑定，讓該 PFGE 圖譜資料庫成為推定新菌株血清型之有力工具。

材料與方法

- 1. Luminex-based O serogrouping:** 依據Dr. Fitzgerald at US CDC所發表的論文[4]，建立luminex-based的技術，鑑定A, B, C1, C2, D, E, O13等O群抗原。大部地區，95%以上的分離株屬於這些O群抗原，非屬於這些抗原的菌株，將以傳統血清凝集方法鑑定。
- 2. 發展 H1 與 H2 專一性 primers:** H1 與 H2 基因位於兩個基因座(loci)，但有極少數 H1 與 H2 基因位置有對調情形[15]。H1 與 H2 都是兩端序列變化小 (conserved region)、中間差異大(variable region)情形，因此可於兩端設計 H1-specific 與 H2-specific 之 primer sets，利用 PCR 增幅該基因。利用 multiple alignment 的電腦程式，找出兩端的 consensus sequences，利用 Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>)設計 primers，再以 10 株不同血清型菌株測試，決定各 primer set 之增幅專一性與效力。
- 3. PCR 增幅 H1 與 H2 與定序：**PCR 增幅 H1 (primers, H1_F: ATGGCACAAGTCATTAATACA; H1_R: TTAACGCAGTAAAGAGAGGAC) 與 H2 (primers, H2_F: ATGGCACAAGTAATCAACACT, H2_R: TAACGTAACAGAGACAGCAC)基因片段(約 1,600 bp)。所增幅的 H1 與 H2 DNA 片段，委請民間公司(明欣生技公司，台北)進行定序。定序之

primers 與 PCR 所用之 primers 相同。由於 H1 與 H2 基因序列兩端為 conserved region，中間部份為 variable region，因此兩端定序之長度需達 900-1000 bp 方能得到全長基因序列。目前已有民間公司，可穩定定序 1000 bp 序列之能力。

4. H1 與 H2 基因之比對：H1 與 H2 基因兩端定序之序列，以電腦軟體接合，再截取相同起點與終點之序列，並確定為 in-frame 之序列。將 in-frame 之 H1 與 H2 序列進行 Blast 分析，與 GenBank 內所有的 H1 與 H2 序列（目前有超過 800 條序列，85 種 H 抗原種類）進行比對，決定所 H1 與 H2 之抗原種類。有些沒有 H2 產物之菌株，可能是真的沒有該基因存在，或有存在，但 PCR 反應效率差而沒被增幅出來。這些菌株以本實驗室發展出來的 paper-bridged phase induction 方法[2]，進行測試。真正沒有 H2 鞭毛之菌株將無法游到添加 H1 抗血清之濾紙的對面，有 H2 沒有被 PCR 所增幅之菌株，帶有 H2 鞭毛的菌則會游到濾紙的對邊。
5. 測試 WHO EQAS 標準菌株：利用 WHO 每年進行外部品質試測(EQAS)血清型別之菌株，做為測試 DNA-based serotyping scheme 之標準菌株，以評估該方案之可行性。

結果

一、增幅 H1 與 H2 之 primer sets

利用 multiple sequence alignment 電腦軟體排列存在 GenBank 內之 H1 基因序列與 H2 基因序列，找到其 common consensus sequence region (位於基因序列的兩端)。以 Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) 網路軟體設計之 primer sets，測試結果，H1 之 primer set 為 H1_F:

ATGGCACAAGTCATTAATACA; H1_R:

TTAACGCAGTAAAGAGAGGAC ; H2 之 primer set 為 H2_F:

ATGGCACAAGTAATCAACACT, H2_R:

TAACGTAACAGAGACAGCAC。該 primer sets 位於 H1 與 H2 之最兩端，增幅之 H1 與 H2 基因片段約 1,600 bp 大小。

二、分析 35 株 WHO EQAS 測試菌株

應用 DNA-based serotyping scheme 測試 35 株 WHO EQAS 菌株，其結果和傳統血清鑑定結果(表一)比較，可驗證此一 serotyping scheme 鑑定菌株血清型之程序。

1. Luminex-based hybridization 方法偵測 O 群抗原基因：O 群抗原目前共有 46 群，使用的 luminex-based method 可偵測 A, B, C1/C2, D, E 與 O13。D 群包括有 3 個 O 群抗原：D1 (O:9)、D2 (O:9,46)、D3 (O:9,46,27)；E 群包括 2 個 O 群抗原：E1 (O:3,10) 與 E4 (O:1,3,19)，luminex-based method 無法加以區別，有些血清型具有相同 H1:H2 抗原組成，但屬於不同 D 與 E 群內之 O 群抗原，因此 luminex 偵測到 D 與 E 群

抗原基因，還需以傳統血清學方法加以區別。例如在WHO標準菌株中，Panama (表一之菌株編號：WHO4.4)與India (屬D2群)有相同H1:H2鞭毛抗原組成，需再以O46加以區別。Enteritidis (WHO5.8, WHO7.2, WHO8.3, WHO9.1)與Hillingdon (屬D2群)具有相同H1:H2抗原組成，需以O46加以區別。Give (WHO5.1)與Parkroyal (屬於E4群)，Meleagridis (WHO8.5)與Calabar (屬於E4群)，Muenster (WHO9.3)與Vilvoorde (屬於E4群)，有相同H1:H2抗原，需以O19加以區分。

2. 生化代謝試驗：有些血清型具有相同的O:H1:H2抗原組成，但屬於不同biovars (subspecies)，必需以生化代謝試驗加以區別。例如Vinohrady (WHO4.7)抗原組成為O28:m,t:[enz15]，因為PCR無法增幅出[e,n,z15]基因，其實際組成為28:m,t:-，此結果和II 28:m,t:[e,n,x]相同(因為[e,n,x]之基因亦不存在)，需使用生化代謝試驗，區別屬於biovar I的Vinohrady與biovar II的II 28:m,t:[e,n,x]。Oranienburg (WHO8.1)與biovar II的II 6,7:m,t:-，Javiana (WHO8.4)與biovar II的II 9,12:l,z28:1,5，Indiana (WHO8.7)與biovar II的II 4,12:z:1,7等具有相同的抗原組成，需加做生化代謝試驗加以區別。
3. DNA-based method決定H1與H2抗原種類：使用H1與H2序列，和GenBank基因庫之H1與H2序列比對，決定H1與H2抗原種類，由測試的35株菌株結果觀察，是成功可行的。GenBank內之H1與H2基因序列已超過800條，擁有至少有85種H1與H2基因序列，已包括大部份常見(雖未包括所有可能的)H1與H2基因序列。然而，該基因庫內之序列也有可能注記(annotation)錯誤的情形。例如有一條注記為z48的序列，實際上是k抗原基因序列，另有5條屬於1,5的序列注記為1,2抗原。另外傳統血清分型注記在中括弧[]內的抗原，表示為可能存在也可能不存在

者，在目前所測試的菌株中，PCR反應皆未能增幅該基因。例如表一的WHO4.7 (Vinohrady)的抗原組成注記為28:m,t:[e,n,z15]，PCR反應未能增幅此一H2基因。使用paper-bridged phase induction方法[2]測試，證明此菌株無phase II鞭毛存在。

討論

本計畫主要目標在利用 DNA-based serotyping 的方法，鑑定資料庫內血清型疑似錯誤的菌株，建立一個擁有完全正確血清型的 PFGE 圖譜資料庫，做為預測新菌株血清型之工具。本局 2004-2009 年已收集超過 16,000 株 *Salmonella* 菌株，這些菌株皆有 PFGE 圖譜。使用 2004-2007 年菌株之 PFGE 圖譜資料庫預測 2008 年與 2009 年之菌株血清型，其可預測比率達到 95% 以上。如此，每年需要血清型鑑定的菌株只有 100 株左右，可節省血清型鑑定所需數百萬人力與試劑的經費花費。

傳統血清學型別鑑定相當繁雜，耗時費力，且有相當高的錯誤率。DNA-based serotyping 得到的是精準的資料，可正確無誤確定血清型，雖然該技術無法完全取代傳統血清學的方法，且有些需要加做生化代謝試驗才能確定血清型。唯 biovar I (subspecies: enterica) 之外的分離株數量相對小，需要加做生化代謝試驗的機會不多，DNA-based serotyping 的方法有其實用性。

H1 與 H2 基因長度在 1,600 bp 左右，序列兩端是 conserved region，中間為變異區域(variable region)，所以只能在兩端設計可專一增幅 H1 與 H2 基因的 primer sets。1,600 bp 的長度，在定序上是個挑戰。過去定序一般只能達到 600 bp 左右的正確長度，所以 1,600 bp 勢必要從中間再設計 primer 方能決定全長序列，但因為中間的區域是高變異區域，需要設計數個 primers 才有可能決定全長序列。目前台灣有生技公司可穩定定序長度達 1,000 bp，如此只要從兩端定序，即可得到 H1 與 H2 全長序列。民間生技公司此一定序能力，也是本研究實驗設計成功的關鍵。

美國 CDC 花費數年研發一套包括可同時偵測數種主 O 群抗原與 H1 和

H2 抗原基因的 luminex-based *Salmonella* serotyping 技術，該技術可鑑定近 100 種高盛行率的血清型別。雖然 100 多種血清型對照 *Salmonella* 擁有的超過 2,500 種血清型，似乎用途有限，其實這個方法有其高度實用性，因為流行的血清型別種類相當有限，每年有 98% 以上分離株屬於這 100 種血清型。未來若證明 PFGE 圖譜的確可正確推定菌株血清型，則引入美國 CDC 此一技術的需求性降低，因為大部份分離株可用 PFGE 圖譜鑑定，少數的菌株可用本研究所建立的 DNA-based serotyping 程序鑑定，且這些少數的菌株，也很有可能是美國 CDC 的 luminex-based serotyping 技術所無法鑑定的血清型。美國 CDC 這個技術，可在一天之內鑑定菌株血清型，對鑑定大量菌株有相當大的實用價值，而研發此技術的關鍵在設計專一性的 probes，目前美國 CDC 未釋出這些 probes 序列，要引此方法勢必要透過美國 CDC 的技術轉移。日前，美國 CDC 該實驗室主管已同意代為訓練本局同仁，是一引入該技術的良好機會。

結論與建議

1. 第一年的研究確立了 DNA-based *Salmonella* serotyping scheme，也依據此一程序，測試了 35 株 WHO EQAS 標準菌株，証實該鑑定程序的可行性。
2. 美國 CDC 發展具有實用性的 luminex-based *Salmonella* serotyping 技術，並答應幫忙訓練本局同仁。明年本局應使用日本國家傳染病研究所的研究經費，派同仁前往訓練，引入該技術，提昇本局 *Salmonella* 參考實驗室的技術水準。

99 年度計畫重要研究成果及具體建議

計畫名稱：*Salmonella* DNA-based 血清分型技術之研發

主持人：邱乾順 計畫編號：DOH99-DC-2017

1. 計畫之新發現或新發明

本計畫建立 DNA-based *Salmonella* serotyping 技術程序，可鑑定罕見且不易使用傳統血清學正確鑑定的菌株，可提昇本局 *Salmonella* 參考實驗室的技術水準。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

Salmonella 感染症是台灣重要人畜共通的腹瀉疾病，主要經由污染的食品為媒介，每年的感染案例眾多。*Salmonella* 血清型別有助於推論動物宿主來源，有助釐清正確的防治對象。由於感染人類的 *Salmonella* 菌大多源於食用動物，在監測 *Salmonella* 的工作上，必需納入農政機關。本局的 *Salmonella* 參考實驗室是目前國內唯一能大量鑑定菌株血清型的單位，所建立的 DNA-based *Salmonella* serotyping 技術，可做為跨機關合作之技術平台。衛生署正在評估將 *Salmonella* 感染症列為法定傳染病，以加強對該疾病的監測，提昇食品安全。在 *Salmonella* 感染症列入法定傳染病後，

Salmonella 菌株的血清型鑑定與(PFGE)基因分型分析之工作勢必大量增加，本研究可望建立一個可供血清型鑑定的 PFGE 圖譜資料庫，對未來防疫工作相當有所益助。

參考文獻

1. Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL: **Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme.** *Res Microbiol* 2004, **155**(7):568-570.
2. Chiou CS, Huang JF, Tsai LH, Hsu KM, Liao CS, Chang HL: **A simple and low-cost paper-bridged method for *Salmonella* phase reversal.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006, **54**(4):315-317.
3. Echeita MA, Herrera S, Garaizar J, Usera MA: **Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens.** *Res Microbiol* 2002, **153**(2):107-113.
4. Fitzgerald C, Collins M, van Duyne S, Mikoleit M, Brown T, Fields P: **Multiplex, bead-based suspension array for molecular determination of common *Salmonella* serogroups.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**(10):3323-3334.
5. Fitzgerald C, Gheesling L, Collins M, Fields PI: **Sequence analysis of the rfb loci, encoding proteins involved in the biosynthesis of the *Salmonella* enterica O17 and O18 antigens: serogroup-specific identification by PCR.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**(12):7949-7953.
6. Fitzgerald C, Sherwood R, Gheesling LL, Brenner FW, Fields PI: **Molecular analysis of the rfb O antigen gene cluster of *Salmonella* enterica serogroup O:6,14 and development of a serogroup-specific PCR assay.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**(10):6099-6105.
7. Herrera-Leon S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar J, Echeita MA: **Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(6):2581-2586.
8. Herrera-Leon S, Ramiro R, Arroyo M, Diez R, Usera MA, Echeita MA: **Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes.** *Res Microbiol* 2007, **158**(2):122-127.
9. Hong Y, Liu T, Lee MD, Hofacre CL, Maier M, White DG, Ayers S, Wang L, Berghaus R, Maurer JJ: **Rapid screening of *Salmonella* enterica serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles.** *BMC Microbiol* 2008, **8**:178.
10. Kerouanton A, Marault M, Lailier R, Weill FX, Feurer C, Espie E, Brisabois A: **Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella* enterica serotype discrimination.** *Foodborne Pathog Dis* 2007, **4**(3):293-303.
11. Leader BT, Frye JG, Hu J, Fedorka-Cray PJ, Boyle DS: **High-throughput**

- molecular determination of *Salmonella enterica* serovars by use of multiplex PCR and capillary electrophoresis analysis.** *J Clin Microbiol* 2009, **47**(5):1290-1299.
12. Yoshida C, Franklin K, Konczy P, McQuiston JR, Fields PI, Nash JH, Taboada EN, Rahn K: **Methodologies towards the development of an oligonucleotide microarray for determination of *Salmonella* serotypes.** *J Microbiol Methods* 2007, **70**(2):261-271.
 13. Scaria J, Palaniappan RU, Chiu D, Phan JA, Ponnala L, McDonough P, Grohn YT, Porwollik S, McClelland M, Chiou CS, Chu C, Chang YF: **Microarray for molecular typing of *Salmonella enterica* serovars.** *Mol Cell Probes* 2008, **22**(4):238-243.
 14. Sukhnanand S, Alcaine S, Warnick LD, Su WL, Hof J, Craver MP, McDonough P, Boor KJ, Wiedmann M: **DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(8):3688-3698.
 15. McQuiston JR, Parrenas R, Ortiz-Rivera M, Gheesling L, Brenner F, Fields PI: **Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *flpA* from *Salmonella*.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(5):1923-1932.

圖表

表一、傳統血清學與 DNA-based serotyping 鑑定 35 株 WHO EQAS 菌株

ID	Serotype	Conventional serotyping			DNA-based serotyping			Note
		O-group	H1	H2	O-group	H1	H2	
WHO4.1	Montevideo	C1	g,m,[p],s	-	C1	g,m,[p],s	-	
WHO4.2	Schwarzengrund	B	d	1,7	B	d	1,7	
WHO4.3	Paratyphi B var. Java	B	b	1,2	B	b	1,2	Tartrate metabolism
WHO4.4	Panama	D1	l,v	1,5	D	l,v	1,5	O46 to distinguish from India
WHO4.7	Vinohrady	O28	m,t	[e,n,z15]	-	m,t	-	biochemical metabolism to distinguish from II 28:m,t:[e,n,x]
WHO4.8	Singapore	C1	k	e,n,x	C1	k	e,n,x	
WHO5.1	Give	E1	[d],l,v	1,7	E	l,v	1,7	O15, O34, O19 to distinguish from Give var. O15+, Give var. O15+, O34+, Parkroyal
WHO5.2	Braenderup	C1	e,h	e,n,z15	C1	e,h	e,n,z15	
WHO5.4	Heidelberg	B	r	1,2	B	r	1,2	
WHO5.5	Chester	B	e,h	e,n,x	B	e,h	e,n,x	
WHO5.7	Mbandaka	C1	z10	e,n,z15	C1	z10	e,n,z15	
WHO5.8	Enteritidis	D1	g,m	-	D	g,m	-	O46 to distinguish from Hillingdon

WHO7.1	Concord	C1	l,v	1,2	C1	l,v	1,2	
WHO7.2	Enteritidis	D1	g,m	-	D	g,m	-	O46 to distinguish from Hillingdon
WHO7.3	Livingstone	C1	d	l,w	C1	d	l,w	O14 to distinguish from Livingstone var. 14+
WHO7.4	Montevideo	C1	g,m,[p],s	-	C1	g,m,[p],s	-	
WHO7.5	Mbandaka	C1	z10	e,n,z15	C1	z10	e,n,z15	
WHO7.6	Elisabethville	E1	r	1,7	E	r	1,7	
WHO7.7	Poona	O13	z	1,6	O13	z	1,6	O22 to distinguish from Farmsen
WHO7.8	Isangi	C1	d	1,5	C1	d	1,5	
WHO8.1	Oranienburg	C1	m,t	-	C1	m,t	-	O14 and biochemical metabolism to distinguish from Oranienburg var. 14+ and II 6,7:m,t:-
WHO8.2	Thompson	C1	k	1,5	C1	k	1,5	
WHO8.3	Enteritidis	D1	g,m	-	D	g,m	-	O46 to Enteritidis from Hillingdon
WHO8.4	Javiana	D1	l,z28	1,5	D	l,z28	1,5	Biochemical metabolism to distinguish from II 9,12:l,z28:1,5
WHO8.5	Meleagridis	E1	e,h	l,w	E	e,h	l,w	O15, O34, O19 to distinguish from Meleagridis var. 15, Meleagridis var. 15+, 34+, and Calabar
WHO8.6	Blockley	C2	k	1,5	C2	k	1,5	O6 to distinguish from Haardt
WHO8.7	Indiana	B	z	1,7	B	z	1,7	Biochemical metabolism to distinguish from II 4,12:z:1,7
WHO8.8	Hiduddify	C2	l,z13,z28	1,5	C2	l,z13,z28	1,5	
WHO9.1	Enteritidis	D1	g,m	-	D	g,m	-	O46 to distinguish from Hillingdon
WHO9.2	Brandenburg	B	l,v	e,n,z15	B	l,v	e,n,z15	

WHO9.3	Muenster	E1	e,h	1,5	E	e,h	1,5	O15, O34, O19 to distinguish from Muenster var. 15, Muenster var. 15+, 34+, and Vilvoorde
WHO9.4	Bredeney	B	l,v	1,7	B	l,v	1,7	
WHO9.5	Sandiego	B	e,h	e,n,z15	B	e,h	e,n,z15	
WHO9.6	Worthington	O13	z	l,w	O13	z	l,w	
WHO9.8	Stanley	B	d	1,2	B	d	1,2	