計畫編號：DOH93-DC-2002

行政院衛生署疾病管制局九十三年度自行研究計畫

台灣奈瑟氏腦膜炎球菌臨床分離菌株之血清亞型與 PorA 基因型分析

研 究 報 告

執行機構：衛生署 疾病管制局

研究主持人：李永盛 博士

研究人員：楊秋英、黃蘭香、劉伊倫、郭彥良、曾彥慈

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 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、中文摘要　2

二、英文摘要　3

三、本文

(一)、前言　4

(二)、材料與方法　8

(三)、結果　11

(四)、討論　13

(五)、結論與建議　16

(六)、參考-文獻　17

(六)、圖表

表一：台灣奈瑟氏腦膜炎球菌血清分型結果　22

表二：台灣奈瑟氏腦膜炎球菌 PorA 表現型分析　23

表三：台灣奈瑟氏腦膜炎球菌 porA 序列分析結果　24

圖一、台灣奈瑟氏腦膜炎球菌 porA PCR 結果　25

摘要

關鍵詞：奈瑟氏腦膜炎球菌、血清分型、PorA 基因型

台灣有關流行性腦膜炎之流行病學研究，只有血清群之資料，本計畫針對 1995 年至 2002 年所收集的奈瑟氏腦膜炎雙球菌進行血清型、血清亞型、免疫型與 porA 基因型分析。結果如下：(1)在 127 株菌中有近 80%的菌株為 L3,7,9 免疫型、(2)在分析的五種血清型中，未發現有 2b 的血清型；其他四型中(1, 4, 14 及 21)以 21 型出現頻率最高、(3)在分析的 14 種 PorA 表現型中以 P1.5 及 P1.2 最多，P1.12 居次；VR2 則以 P1.2 為主，其次為 P1.13；其中 P1.5 與 P1.2 多出現在同一菌株、(4) 99%以上的菌株帶有 porA 基因，其中有 96%有蛋白產物。序列分析顯示，127 株菌中有 45 種不同的 VR 序列：VR1 有 22 種，VR2 有 23 種。在 22 種 VR1 序列中 P1.5 (40.9%) 最多、P1.20、P1.17 次之，共佔 29.9.0%，再次為 P1.12 (7.1%)；而 VR2 則以 P1.2 (43.3%)為主，依序為 P1.16-4 (12.6%)、P1.13-1 (11.8%)及 P1.23 (8.7%)。綜合血清型及 LPS 免疫型資料顯示，在台灣的 W135 流腦病例多是由同一品系 W135:NT:P1.5,2:L3,7,9 所造成。

Abstract

Keywords: *Neisseria meningitidis*、serogrouping、porA

The epidemiology of memingococcal disease in Taiwan is only investigated by serogrouping. In this study, we determined the phenotypes and porA genotype of the meningococcal strains collected during 1995 to 2002. Of the 127 strains analyzed, 80% of them express L3,7,9 LPS. Among the five serotypes examined, serotype 21 appeared to be most prevalent and the serotype 2b is not found in all strains tested. DNA-based analyses revealed that > 99% of the strains examined possessed a porA gene. Among these, 96% encode a functional PorA protein. A total of 45 PorA VR sequences were determined, with 22 in VR1 and 23 in VR2. The most prevalent PorA types for VR1 are P1.5 (40.9%) followed by P1.20 and P1.17 (total 29.9%) and P1.12 (7.1%); for VR2 are P1.2 (43.3%), P1.16-4 (12.6%), P1.13-1 (11.8%), and P1.23 (8.7%).

前言

流行性腦脊髓膜炎為世界性的法定傳染病，目前仍是造成第三世界國家高死亡率的重要疾病之一。引起流行性腦脊髓膜炎的病原體是奈瑟氏腦膜炎雙球菌(Neisseria meningitidis)，該菌為具有多醣夾膜之革蘭氏陰性菌。根據夾膜多醣抗原性， 奈瑟氏腦膜炎雙球菌可分為 13 個血清群(serogroup)，其中 A、B、C、W-135 與 Y 五群是主要的流行性腦脊髓膜炎及敗血症的病源菌，其中 A、B、C 易造成流行，A 群主要在非洲撒哈拉沙漠區域及中國地區流行；而歐洲及北美地區則是以 B 群為主因。根據外膜蛋白中的 PorB 與 PorA 蛋白以及脂多醣等表面抗原性的不同，奈瑟氏腦膜炎雙球菌可分為 20 種血清型(serotype)、10 種血清亞型(serosubtype)與 13 種免疫型(immunotype) (van Deuren et al., 2000) 。

奈瑟氏腦膜炎雙球菌的疫苗研發史已超過 80 年，第一代的疫苗在 1960s 年代即已上市，但只對 A、C、Y 與 W135 型有效，由於其組成為 CPS (capsular polysaccharides)，引發的免疫反應較弱且沒有記憶細胞產生，雖可提供大兒童及成人短期的防疫力，但對高危險群的幼童並沒有足夠的保護能力(Peltola, 1998)。由於 B 群菌的 CPS 為鰥(2→8) N-acetyl neruaminic acid 的聚合物(polysialic acid)，sialic acid 也存在人類某些細胞膜上的醣蛋白(例如：神經細胞上的黏著分子 NCAM) (Pon et al., 1997)，因為免疫耐受性而使

得 B 群菌的 CPS 引發人類免疫反應的能力非常弱，且可能造成自體免疫反應，所以在 B 群疫苗的研發上外膜蛋白(outer membrane protein)成為主要的選擇, 目前古巴及荷蘭兩國研發的疫苗的正在進行人體臨床測試(Claassen et al., 1996; de Kleijn et al., 2000a; de Kleijn et al., 2000b; Sacchi et al., 2001)。

奈瑟氏腦膜炎雙球菌的主要外膜蛋白有五類，其中第一類蛋白又稱 PorA，在大部分的菌株都有表現；所有的奈瑟氏腦膜炎雙球菌都會有 PorB 的表現(第二類或第三類其中之一種)。PorA 與 PorB 都有 porin 的功能，具有八個暴露在表面的環線(loop)構型 (van der Ley et al., 1991)，不同品系的奈瑟氏腦膜炎雙球菌在此 8 個環線之間有些區域的氨基酸變異特別大，稱為變異區：PorA 的兩個變異區 VR1 與 VR2 分別是位於第一與第四個環線(Derrick et al., 1999)； PorB 有四個變異區(VR1 到 VR4)，分別位於第一、五、六及七個環線(Sacchi et al., 1998)。外膜蛋白疫苗的臨床人體測試研究顯示，引起的免疫反應主要是針對 PorA (Rosenqvist et al., 1995; Milagres et al., 1998)，但因品系間的 PorA 具有變異性，只對相同血清亞型(serosubtype)才能產生有效的免疫效果(Fischer et al., 1999)，所以增加 PorA 種類可增加疫苗的廣效性(van der Voort et al., 1996; Cartwright et al., 1999)。目前荷蘭所研發的 PorA-疫苗包含有六種血清亞型的 PorA 蛋白，分別為 P1.7,16、P1.5,2、P1.19,15、P1.7,4、P1.5,10 及 P1.12,13。

為了有效評估這類外膜蛋白疫苗是否能預防不同地區所發生的流行性腦脊髓膜炎，建立並了解各不同地區的奈瑟氏腦膜炎雙球菌血清亞型是必須的資訊。在 WHO 的支持下，共有十一國參與評估奈瑟氏腦膜炎雙球菌血清型與亞型分析之試劑與程序計劃(Poolman et al., 1995)。目前，許多國家已經開始對奈瑟氏腦膜炎雙球菌進行完整的分型分析，尤其是 PorA 的分型，例如英國(Kyaw et al., 2002)，美國(Sacchi et al., 2000; Tondella et al., 2000)、巴西(Sacchi et al., 2001)、加拿大(Arhin et al., 1997a; Arhin et al., 1997b)與澳洲(2002)等。

依疾病管制局流行性腦脊髓膜炎流行病學的最近統計資料顯示，台灣從 1996 到 2004 年至少有 206 位經實驗室細菌鑑定確認的流行性腦脊髓膜炎病例，其病例數及血清型分別為 1996 年 13 例(9 位 B、4 位 W135)、1997 年 19 例(12 位 B、7 位 W135)、1998 年 12 例(6 位 B、4 位 W135、2 位未分型)、1999 年 11 例(10 位 B、1 位 W135)、2000 年 13 例(4 位 B、9 位 W135)、2001 年 46 例(2 位 A、13 位 B、1 位 C、19 位 W135、10 位 Y、1 位未分型)、2002 年 44 例(1 位 A、25 位 B、2 位 C、11 位 W135、5 位 Y)、2003 年 24 例(17 位 B、1 位 W135、2 位 Y、4 位未分型)、2004 年 24 例(1 位 A、15 位 B、3 位 W135、3 位 Y、2 位未分型)。本計畫分別以血清學分析自 1995 至 2002 年疾病管制局所收集的菌株之表現型，以了解台灣分離的奈瑟氏腦

膜炎雙球菌菌株之血清型、血清亞型及免疫型之分佈情形；另以重組 DNA 技術分析各菌株之 porA 基因序列，由分子層次決定各菌株之 PorA 分型。

材料與方法

菌株及培養條件：為了減少因繼代培養造成突變，所有實驗以同一母株於巧克力洋菜膠培養基(chocolate agar plate，購自啟欣生物科技公司)隔夜培養的菌進行。

全菌 ELISA：根據 Abdillahi 與 Poolman (1988)的方法進行：用滅菌過的棉花棒將巧克力平板上的菌沾黏起來，將菌懸浮於磷酸緩衝液(pH 7.4 PBS，OD_{620} = 0.1 – 0.15)，以 56°C 加熱 30 分鐘後保存於 4°C；將 100 μl 熱處理後的菌液放入 96-孔盤置於 37°C，直到蒸乾；於每孔中加入 150 μl 的 blocking solution (5% nonfat milk in PBS)，放置 2 小時；以 PBS 沖洗三次後，於每孔中加入 100 μl 的抗體(購自 NIBSC, National Institute of Biological Standards and Control, UK)，放置 2 小時；以 PBS 沖洗三次後，於每孔中加入 100 μl 的 alkaline phosphatase conjugated anti-mouse antibodies，放置 2 小時；以 PBS 沖洗三次後，於每孔中加入 100 μl 呈色試劑(p-nitrophenyl phosphate substrate)，避光反應一小時後，立即測定其在波長 405 nm 的吸光值。

PCR 增幅 porA 基因：依據 Saunders 等人(Saunders et al., 1993)的方法進行，直接以菌體為模板。首先以牙籤由巧克力平板挑取單一菌落的菌至 5 μl 的

無菌水中，上覆礦物油加熱 95°C 處理 10 分鐘後，於此反應小管中直接加入 45 麴l 反應溶液(20麴M 的正向及反向引子各 1.25 μl、10 mM 的 dNTP 各 1 μl、5 μl 的 10X PCR 緩衝液、1.5 μl 的 50 mM $MgCl_2$、0.5 μl 的 Tag polymerase 及 34.5 μl 的水)，94°C 作用 5 分鐘後，進行 30 輪的增幅反應(每一輪的條件為 94°C 反應 1 分鐘、60°C 反應 1 分鐘，接著 72°C 反應 2 分鐘)，最後再在 72°C 進行 5 分鐘的反應。取 5 μl 的 PCR 產物進行 agarose gel 的電泳分析。本計畫參考 Saunders 等人所使用的引子，以及資料庫中所有的奈瑟氏腦膜炎雙球菌 porA 基因序列，設計能與不同 porA 基因黏合的共同引子進行 PCR。

porA 基因選殖與定序分析：將 PCR 產物與等體積的 phenol/chloroform 劇烈混勻，以離心將水溶液與有機溶液層分開，將水溶液層移至乾淨的微量小管，加入 1/10 體積的 3M NaOAc 溶液及 2 倍體積的 100%酒精把 DNA 沉澱下來，將沉澱下來的 DNA 回溶於 TE 緩衝液(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)。取適量之 DNA 與 pGEM-T-Easy (Promega)在 DNA ligase 作用下進行黏接作用，利用熱休克法把 DNA 送入 *E. coli* 勝任細胞 (competent cell)。抽取轉型菌的質體 DNA，以 *EcoRI* 切割確定質體上帶有 porA 基因片段後，以位於 pGEM-T-Easy 質體上多選殖位(MCS)兩端之 T7 promoter 及 SP6 promoter 之互補序列為引子進行核酸定序。所有之重組 DNA 技術均參考

Sambrook 等人(Sambrook et al., 1989)方法進行。

結果

血清型與 L3,7,9 免疫型分析：本計畫共收集到 1995-2002 年期間的 127 株奈瑟氏腦膜炎雙球菌菌株進行分析。以購自 NIBSC 之五株血清型專一抗體進行全菌 ELISA 分析，其中 P2.2b 專一抗體與所有測試的菌株皆無反應，56%的菌株無法被這五株抗體所辨識，因此無法定出其血清型。表一為其他四種血清型之分佈情形及出現頻率。此外以 L3,7,9 專一抗體分析 127 株菌表現 L3,7,9 LPS 之情形，結果有 78.7%的菌株為 L3,7,9 表現型。

血清亞型分析：以 14 株單源抗體分析 127 菌株之 PorA 表現型，除了單源抗體 MN20F4.17 未與任何菌株反應外，其他 13 種 PorA 變異區在台灣的分離菌株均可發現(表二)。在 127 株菌中有 39 菌株與 14 株抗體皆無反應、20 菌株可與單一抗體反應、68 菌株可與兩株抗體結合。在分析的三種 VR1 表現型，以 P1.5 最多、P1.12 居次而 P1.7 最少。VR2 則以 P1.2 為主，第二為 P1.13，其他依序為 P1.4、P1.15(表二)；其中 P1.5 與 P1.2 多出現在同一菌株。

porA序列分析：根據 *N. meningitidis* MC119 (Z48494.1 GI:683757) 的porA 基因序列設計了PorA-F1 (5'-GTCAGCCTATACGGCGAAATCAAA-3') 及 PorA-R1 (5'-GAATTTGTGGCGCAAACCGAC-3')引子進行colony PCR。以

Agarose電泳分析PCR產物，在127個PCR反應中只有一株菌沒有預期大小(約1.3 kb)的產物出現(圖一)。將各菌株所得到的 PCR 產物選殖於pGEM-T-Easy 載體後進行核酸定序分析並轉譯為氨基酸序列，共得到 22種 VR1序列分屬8個family；VR2共有23種序列分屬13個 family。其中有五株菌之 PorA VR1及VR2 雖然 為 P1.5 及 P1.2，但由於基因序列中帶有終止密碼無法轉譯出完整的蛋白。在VR1與VR2 變異 (variant) 中分別有8及9種是之前未曾發表的序列 (http://neisseria.org/奈瑟氏腦膜炎雙球菌/typing/pora/update.shtml)。在22種 VR1序列中 P1.5 (40.9%)最多，P1.20、P1.17次之，共佔29.9.0%，再次為P1.12 (7.1%)；而 VR2則以 P1.2 (43.3%)為主，依序為 P1.16-4 (12.6%)、P1.13-1 (11.8%)及 P1.23 (8.7%)。

討論

奈瑟氏腦膜炎雙球菌是引發流行性腦膜炎的主要病原，在台灣屬於第二類法定傳染病。雖然奈瑟氏腦膜炎雙球菌的分型可分為血清群、血清型、血清亞型及免疫型，在台灣只有血清群方面的資料，在2000年以前只有B及W135血清群，但在2001年首度發現有A、C 及 Y群菌。由於奈瑟氏腦膜炎雙球菌菌可能經莢膜轉換而改變其血清群(Swartley et al., 1997)，為了加強有關台灣流腦之流行病學研究，本計畫自英國 NIBSC購買單源抗體分析CDC保存之奈瑟氏腦膜炎雙球菌菌株之表現型，發現有近80%的菌株表現L3,7,9 的LPS，此結果顯示若能以去毒化的 L3,7,9 LPS為疫苗成分之一，將可增加疫苗之廣效性。

由於可供使用的單源抗體種類有限，尚有許多菌株之血清型及血清亞型無法確定。本計畫結果顯示台灣並未發現有 2b 血清型及 P1.10 亞型之菌株；在發現的四種血清型中，表現血清型 1、14 及 21 的菌株數目相當。由於單源抗體 6B11F2B5 供應源中斷，並未完成 127 株菌的分析，因此以其百分比來看，台灣的奈瑟氏腦膜炎雙球菌以血清型 21 佔優勢(表一)，主要表現在 B 群菌。表現血清型 4 的兩株菌均為 A 群菌；血清型 14 則主要表現在 Y 群菌；只有 15%的 W135 菌株可分出其血清型。

比較不同血清群菌之血清亞型分佈顯示 B 群菌變異遠較 W135 高，在 67 株 B 群菌中有 30 株菌之 PorA 表現型無法確定，其他 37 株菌共發現有至少 15 種不同的 PorA 表現型，其中以 P1.5,2 與 P1.12,13 為主，各佔 21.6% (8/37)；而在 40 株 W135 菌株中有 8 株菌為無法確定外，共發現 8 種 PorA 表現型，其中 P1.5,2 佔了 62.5%，其他 7 種表現型各佔 2.5%。進一步比較不同時間分離的 W135，發現自 1995-2002 年均有表現 PorA P1.5,2 型的菌株，而 2001 與 2002 年之所有菌株都屬於此血清亞型；綜合血清型及 LPS 免疫型資料顯示在台灣的 W135 流腦病例多是由同一品系 W135:NT:P1.5,2:L3,7,9 所造成。此外 2001 及 2002 的 14 株 Y 群菌之表現型也幾乎完全相同，除了一株之血清型未定，其他均為 Y:14:P1.5,2。雖然這些案例並未有直接接觸的事實，但由菌株的表現型推測，在目前在台灣之 Y 群菌可能也是源自同一品系。

由於 PorA 是一個最具效力的疫苗成分之一，但並非所有菌株均會表現 PorA，為了更清楚瞭解台灣菌株表現 PorA 之情形以及基因變異程度，以 PorA 專一引子對 127 株菌進行 colony-PCR 分析，結果只有一株 C 群菌沒有預期大小之產物(圖一)。序列分析顯示在無法血清型確定的菌株有五株之 porA 基因有終止碼(stop codon)，無法轉譯出完整的 PorA 蛋白，其他的主要是因為沒有專一單源抗體所致；少數則是因單一氨基酸改變而失去與專一抗體之結合力，例如單源抗體 MN5C11G(表一) 除了能與 P1.16 結合外，無法辨識

P1.16 family 的其他變體，例如 P1.16-4 等 (表三)。最後比較菌株之 PorA 表現型與基因型發現大部份均相符，只有兩株有差異。由 ELISA 數值推測可能是因為樣品中含有兩種不同品系所致。另外，P1.13-1 VR2 只有在與 P1.7-2 VR1 共同存在時才會被 P1.13 抗體 MN25H10.75 辨識，顯示 VR2 的構型會受 VR1 影響 (Derrick et al., 1999)。

結論與建議

1. 依血清型及 LPS 免疫型分析顯示，台灣的 W135 流行性腦脊髓膜炎病例多是由同一品系 W135:NT:P1.5,2:L3,7,9 所造成。

2. 2001 及 2002 的 14 株 Y 群菌除了一株之血清型未定，其他均為 Y:14:P1.5,2，顯示目前在台灣之 Y 群菌可能源自同一品系。雖然初步疫調並未發現個案間有直接接觸的事實，但也無法排除之間存有未被發現之無症狀感染者介入傳播之可能性。

3. 建議再進行台灣奈瑟氏腦膜炎雙球 PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) 與 MLST (multilocus sequence typing)分子分型分析後，並與本研究結果進行比較分析，以確認台灣流行性腦脊髓膜炎傳播模式。

參考文獻

Abdillahi, H. and Poolman, J.T. (1988) Neisseria meningitidis group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. Microb Pathog 4, 27-32.

Arhin, F.F., Moreau, F., Coulton, J.W. and Mills, E.L. (1997a) Outer membrane proteins and serosubtyping with outer membrane vesicles from clinical isolates of Neisseria meningitidis. Curr Microbiol 34, 18-22.

Arhin, F.F., Moreau, F., Coulton, J.W. and Mills, E.L. (1997b) Subtyping of Neisseria meningitidis strains isolated in Quebec, Canada: correlation between deduced amino acid sequences and serosubtyping techniques. Can J Microbiol 43, 234-8.

Cartwright, K., Morris, R., Rumke, H., Fox, A., Borrow, R., Begg, N., Richmond, P. and Poolman, J. (1999) Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins. Vaccine 17, 2612-9.

Claassen, I., Meylis, J., van der Ley, P., Peeters, C., Brons, H., Robert, J., Borsboom, D., van der Ark, A., van Straaten, I., Roholl, P., Kuipers, B. and Poolman, J. (1996) Production, characterization and control of a Neisseria meningitidis hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. Vaccine 14, 1001-8.

de Kleijn, E.D., de Groot, R., Labadie, J., Lafeber, A.B., van den Dobbelsteen, G., van Alphen, L., van Dijken, H., Kuipers, B., van Omme, G.W., Wala, M., Juttmann, R. and Rumke, H.C. (2000a) Immunogenicity and safety of a hexavalent meningococcal outer-membrane- vesicle vaccine in children of 2-3 and 7-8 years of age. Vaccine 18, 1456-66.

de Kleijn, E.D., de Groot, R., Lafeber, A.B., Labadie, J., van Limpt, K.C., Visser, J., Berbers, G.A., van Alphen, L. and Rumke, H.C. (2000b) Immunogenicity and safety of monovalent p1.7(h),4 meningococcal outer membrane vesicle vaccine in toddlers: comparison of two vaccination schedules and two vaccine formulations. Vaccine 19, 1141-8.

Derrick, J.P., Urwin, R., Suker, J., Feavers, I.M, and Maiden, M.C. (1999) Structural and evolutionary inference from molecular variation in Neisseria porins. Infect Immun 67, 2406-13.

Fischer, M., Carlone, G.M., Holst, J., Williams, D., Stephens, D.S. and Perkins, B.A. (1999) Neisseria meningitidis serogroup B outer membrane vesicle vaccine in adults with occupational risk for meningococcal disease. Vaccine 17, 2377-83.

Kyaw, M.H., Clarke, S.C., Christie, P., Jones, I.G. and Campbell, H. (2002) Invasive meningococcal disease in Scotland, 1994 to 1999, with emphasis on group B meningococcal disease. J Clin Microbiol 40, 1834-7.

Milagres, L.G., Gorla, M.C., Sacchi, C.T. and Rodrigues, M.M. (1998) Specificity of bactericidal antibody response to serogroup B meningococcal strains in Brazilian children after immunization with an outer membrane vaccine. Infect Immun 66, 4755-61.

Peltola, H. (1998) Meningococcal vaccines. Current status and future possibilities. Drugs 55, 347-66.

Pon, R.A., Lussier, M., Yang, Q.L. and Jennings, H.J. (1997) N-Propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique bactericidal capsular epitope in group B Neisseria meningitidis. J Exp Med 185, 1929-38.

Poolman, J.T., Kriz-Kuzemenska, P., Ashton, F., Bibb, W., Dankert, J., Demina, A., Froholm, L.O., Hassan-King, M., Jones, D.M., Lind, I. and et al. (1995) Serotypes and subtypes of Neisseria meningitidis: results of an international study comparing sensitivities and specificities of monoclonal antibodies. Clin Diagn Lab Immunol 2, 69-72.

Rosenqvist, E., Hoiby, E.A., Wedege, E., Bryn, K., Kolberg, J., Klem, A., Ronnild, E., Bjune, G. and Nokleby, H. (1995) Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. Infect Immun 63, 4642-52.

Sacchi, C.T., Lemos, A.P., Whitney, A.M., Solari, C.A., Brandt, M.E., Melles,

C.E., Frasch, C.E. and Mayer, L.W. (1998) Correlation between serological and sequencing analyses of the PorB outer membrane protein in the Neisseria meningitidis serotyping system. Clin Diagn Lab Immunol 5, 348-54.

Sacchi, C.T., Lemos, A.P., Popovic, T., De Morais, J.C., Whitney, A.M., Melles, C.E., Brondi, L.M., Monteiro, L.M., Paiva, M.V., Solari, C.A. and Mayer, L.W. (2001) Serosubtypes and PorA types of Neisseria meningitidis serogroup B isolated in Brazil during 1997--1998: overview and implications for vaccine development. J Clin Microbiol 39, 2897-903.

Sacchi, C.T., Whitney, A.M., Popovic, T., Beall, D.S., Reeves, M.W., Plikaytis, B.D., Rosenstein, N.E., Perkins, B.A., Tondella, M.L. and Mayer, L.W. (2000) Diversity and prevalence of PorA types in Neisseria meningitidis serogroup B in the United States, 1992-1998. J Infect Dis 182, 1169-76.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saunders, N.B., Zollinger, W.D. and Rao, V.B. (1993) A rapid and sensitive PCR strategy employed for amplification and sequencing of porA from a single colony-forming unit of Neisseria meningitidis. Gene 137, 153-62.

Swartley J.S., Marfin A.A., Edupuganti S., Liu L.J., Cieslak P., Perkins B., Wenger J.D., Stephens DS. 1997. Capsule switching of Neisseria

meningitidis. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(1):271-6.

Tondella, M.L., Popovic, T., Rosenstein, N.E., Lake, D.B., Carlone, G.M., Mayer, L.W. and Perkins, B.A. (2000) Distribution of Neisseria meningitidis serogroup B serosubtypes and serotypes circulating in the United States. The Active Bacterial Core Surveillance Team. J Clin Microbiol 38, 3323-8.

van der Ley, P., Heckels, J.E., Virji, M., Hoogerhout, P. and Poolman, J.T. (1991) Topology of outer membrane porins in pathogenic Neisseria spp. Infect Immun 59, 2963-71.

van der Voort, E.R., van der Ley, P., van der Biezen, J., George, S., Tunnela, O., van Dijken, H., Kuipers, B. and Poolman, J. (1996) Specificity of human bactericidal antibodies against PorA P1.7,16 induced with a hexavalent meningococcal outer membrane vesicle vaccine. Infect Immun 64, 2745-51.

van Deuren, M., Brandtzaeg, P. and van der Meer, J.W. (2000) Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. Clin Microbiol Rev 13, 144-66.

Table 1. Serotypic distribution of *N. meningitidis* isolated in Taiwan during 1995-2002

MAb	type	Number of strains	Frequency
2H102	P2.2b	0	0
MN3C6B	P3.1	18	14%
MN14G21	P3.4	2	2%
MN5C8C	P3.14	19	15%
6B11F2B5	P3.21	19	34% [a]

[a] A total of 56 isolates were analyzed for serotype 21 compared to 127 for others.

Table 2. PorA phenotype of the *N. meningitidis* isolated from patients in Taiwan during 1995-2002

MAb	type	Specificity	Number of strains
MN22A9.19	P1.5	VR1	49
MN14C11.6	P1.7	VR1	8
MN20A7.10	P1.12	VR1	12
MN14C2.3	P1.1	VR2	2
MN16C13F4	P1.2	VR2	51
5G8B2F9	P1.3	VR2	3
MN20B9.34	P1.4	VR2	5
MN5A10.7	P1.9	VR2	2
MN20F4.17	P1.10	VR2	0
MN25H10.75	P1.13	VR2	12
MN21G3.17	P1.14	VR2	1
MN3C5C	P1.15	VR2	4
MN5C11G	P1.16	VR2	2
MN19D6.13	P1.6	VR3?	3

Table 3. Por A types of the meningococcal strains analyzed in this study

VR1		VR2	
Family	Variant (number of strains)	Family	Variant (number of strains)
1.5	5 (52)[a]; 5-1 (2); 5-11 (1)	1.1	1 (2)
1.7	7 (2); 7-1 (1); 7-2 (4)	1.2	2 (55)[a]
1.12	12-1 (9); 12-11 (2); 12-12 (1); 12-13 (1); 12-14 (1)	1.3	3 (4)
1.17	17 (16)	1.4	4 (5)
1.18	18 (1); 18-1 (3)	1.9	9 (2)
1.19	19 (1); 19-4 (1)	1.10	10-8 (2)
1.20	20 (17); 20-1 (1); 20-2 (1)	1.13	13-1 (15); 13-18 (2)
1.22	22-1 (2); 22-8 (1)	1.14	14 (1)
		1.15	15 (2)
		1.16	16 (2); 16-4 (13); 16-44 (1); 16-45 (1); 16-46 (2)
		P1.23	23 (8); 23-1 (1); 23-2 (1); 23-5 (2); 23-6 (1); 23-7 (1)
		P1.25	25-14 (1)
		P1.28	28-1 (1)

[a] Five of them are not expressed. The new variants identified in this study are underlined.

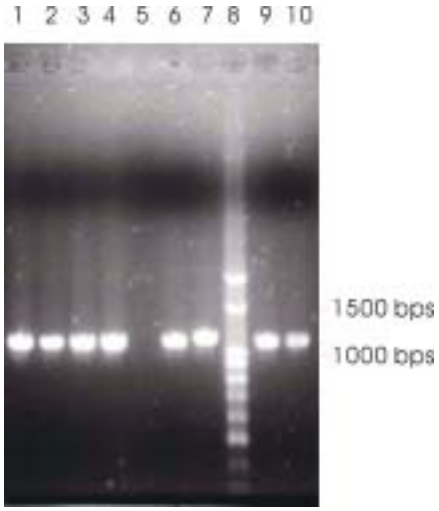

Fig. 1. Electrophoresis of PCR products amplified from different isolates of *N. meningitidis* (lane 1-7, 9 and 10) using porA specific primers. Lane 8, 100-bp DNA markers.