

計畫編號：DOH96-DC-2023

行政院衛生署疾病管制局九十六年度科技研究發展計畫

霍亂弧菌分子基因型別鑑定監測系統之建立

## 研 究 報 告

執行機構：衛生署疾病管制局

計畫主持人：慕蓉蓉

研究人員：曾士展、林穎君

執行期間：96 年 1 月 1 日至 96 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

目錄	頁次
中文摘要	3
英文摘要	4
前言	6
材料與方法	9
結果	12
結論與建議	14
計畫重要研究成果及具體建議	15
參考文獻	17
圖	20
表	22

## 摘要

關鍵詞：霍亂弧菌，分型，資料庫

「霍亂」是我國傳染病防治法規範的第二類傳染病，感染未治療嚴重患者可在數小時內死亡。全世界每年霍亂病例數皆有下降趨勢，整體而言其死亡率亦逐漸下降，但在非洲、亞洲等部分衛生條件不良的國家，仍是一大威脅。由於霍亂屬於國際疫病，個案需通報到世界衛生組織（WHO）；如果造成流行或擴散，將對我農產畜牧及水產品出口，影響至極。因此本計劃將 54 株霍亂弧菌利用 DNA based 的方法建立 PFGE (pulse-field gel electrophoresis) 及 MLVA (multiple-locus VNTR analysis) 分子分型技術，並對菌株進行親緣性樹狀圖演化分析 (phylogenetic analysis)。研究結果顯示，MLVA 分型效力高於 PFGE，寄望基因資料庫的建構，能強化食因性傳染病與其它細菌性傳染病的監測工作，有效提供分子流行病學的分析，有效降低食因性傳染病之威脅。

## Abstract

Keywords: *Vibrio cholerae*, typing, database

Genome-based bacterial typing is essential for determining phylogenetic relationship and epidemiological and forensic investigation. In this study, we employed two methods for molecular typing of *Vibrio cholerae*: PFGE (pulse field gel electrophoresis) and MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis).

A total of 54 *Vibrio cholerae* clinical isolates (23 of O1 serogroup, 27 of O139 serogroup, and 4 of non O1/non O139) were analyzed by PFGE and partitioned into 4 clades with 85% similarity, O139 could not be separated from O1 within this similarity, clustered in the same clade.

A total of 9 VNTR loci were used for fine typing of 54 *Vibrio cholerae* clinical isolates. This MLVA enables the partitioning to 5 clades with  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ . MLVA could discriminate not only O139 from O1 but also all ctxA (+) isolates from ctxA (-). Our data indicated that MLVA has higher degree of resolution than PFGE in discriminating of *Vibrio cholerae* isolates.

## 前言

霍亂是由霍亂弧菌引起的一種急性腸道傳染病，依其膜外的多醣體抗原可區分 200 種以上的不同血清型，其中主要致病株為產生毒素之 O1 及 O139 血清型霍亂弧菌，而其餘統稱不產毒的非 O1 非 O139 群<sup>1,2</sup>。O1 群依其溶血特性，有二種生物型別 (Biotypes)：O1 典型 (cholera classical) 及 O1 埃爾托型 (El Tor)。十九世紀世界性大流行主要是 O1 典型，1961 年以後流行多為 El Tor 型為主，如 1991 年中南美洲大流行亦為 El Tor 型<sup>3</sup>。另一種能產生毒素之霍亂弧菌 O139 血清型，在 1992-1993 年印度及孟加拉曾爆發流行<sup>2</sup>。民國八十六年高雄美濃爆發甲魚池遭霍亂弧菌汙染，即為 O139 血清型。國內隨著生活條件改善、自來水供給普及，醫療水準提升，近年來僅有零星散發霍亂發生，多為個案或境外旅遊受到感染而移入的案件。近兩次為民國九十四年 6 月台南市北區爆發二例小川型霍亂弧菌 (Vibrio Cholera O1 El Tor Ogawa) 感染個案；以及民國九十五年 5 月亦為台南市爆發之 O139 型霍亂弧菌感染。

本疾病管制局於 95 年 10 月 3 日成立 Taiwan PulseNet，以期建立細菌傳染病實驗室監測網，並建構病原 PFGE 及 MLVA 基因資料庫，以強化食因性傳染病與其它細菌性傳染病的監測工作<sup>4-6</sup>。因

此，本計畫建立霍亂分子圖譜及基因體資料庫，以利日後發生案例時比對，藉以釐清感染源彼此相關性，以及提供分子流行病學的分析，提升防疫通報作業<sup>7-9</sup>。

## 材料與方法

### 霍亂弧菌菌株

本實驗使用來自本局生物材料科取得之 54 株霍亂弧菌菌株。以生化特性確定菌株並以抗血清作 serotyping 之後，進行進一步研究。

### PFGE 電泳分析：

使用 *NotI* 限制酶進行菌株分型實驗，以脈衝電泳儀 CHEF-MAPPER (BIO-RAD, USA)，變換時間：2-10 秒 13 小時與 20-25 秒 6 小時，電場值為  $6\text{V}/\text{cm}^2$ ，200V 電壓值，使用 1 % SeaKem Gold agarose ( BMA, Rockland, ME, USA )及 0.5×TBE 電泳液，以 H9812 菌株 (*XbaI* 限制酶切割) 當作片段大小指標。

使用限制酶之脈衝圖譜，利用電腦將圖片掃描儲存成圖片檔，接著以套裝軟體 Phoretix 1D gel analysis advanced version 5.01 (Nonlinear Dynamics, UK)對菌株進行親緣性樹狀圖分析，其原理是利用不同 DNA 片段電泳圖譜進行分析，以 UPGMA( unweighted pair group method using arithmetic averages ) 的方式畫出樹狀圖 (dendrogram)，由樹狀圖對應出相似指數，分析菌株間分子關聯性。

## 核酸處理

採用 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, USA) 抽取霍亂弧菌之 chromosome DNA。以溶解酶 (lysozyme) 及蛋白酶 (proteinase K) 脫去細菌外層，通過特有之管柱吸附 DNA，清洗之後即可析出 DNA。純化後的 DNA 則冰存於-20℃待用。

## 核酸增幅偵測法

抽取之霍亂弧菌 DNA 針對不同 loci 來進行基因型別鑑定，PCR 增幅所使用之引子對 (primer pair) 及 repeated core motif 如下：

基因名稱	引子對 (5' - 3')	Core motif
VC0147	F: GGATACTCAAACGCAGGATGA R: CTTTCGGTCGGTTTCTCTTGT	AACAGA
VC0437	F: CGAGGTTAAAGGTCCTAACAA R: ATCAGGCTACATTCAGGTCTA	GACCCTA
VC0500	F: TTGCTCTGGTGTTCATAGGTG R: CAGTGCGGAATTTAGACTCG	TTGTCGA
VC1418	F: CAGTATGGATGAACACAGATG R: TTTGGGTGTCAGTAAGACTTG	TGA
VC1457	F: TCAGGAGGTCTAGAATCTGCC R: CTGTGGGTAGAAGTGAAACGG	AAATCAA
VC1650	F: GTCAAATTACTGGGTGAACGC R: TTCTGGGTTAGGCTGTTCTG	GATAATCCA
VCA0171	F: TGCTGATGAGTCTTCTTGCG R: TTAGACGTGGTCAAAGCTGC	TGCTGT
VCA0283	F: AAATATCTGTAGCCTCCTCAG R: TTTCTTCCGATGAACTCTCTG	ACCAGA



VCA1082	F: GGATGATTGCGGTGTTTATTC R: TCTTTCTTCTCCAGATAAGGC	AAC
---------	--	-----

PCR反應試劑內含1X PCR緩衝溶液，0.25 mM dNTP，0.2  $\mu$ M引子各一，1 U Taq 與核酸檢體，總反應體積為50  $\mu$ L。反應條件依primer不同而有異：

**VC0147、VCA0171：**

Activation→95°C for 5min  
Denature→94°C for 1min  
Anneal→62°C for 1min  
Extend→72°C for 1min

**VC0437、VC0500、VC1418、VC1650、VCA0283、VCA1082：**

Activation→95°C for 5min  
Denature→94°C for 1min  
Anneal→60°C for 1min  
Extend→72°C for 1min

**VC1457：**

Activation→95°C for 5min  
Denature→94°C for 1min  
Anneal→65°C for 1min  
Extend→72°C for 1min

進行35個循環，最後以72°C做聚合延長反應10分鐘，最後降溫至4°C。

## 結果

### 1. 以 PFGE 技術建立 DNA 指紋圖譜資料庫：

本研究參考美國疾病管制局1996年用來建置PulseNet National Datadase之PFGE技術<sup>4, 6</sup>，將台灣霍亂弧菌作基礎的初步分型；配合套裝軟體BioNumeric (Applied Maths, USA) 對菌株進行親緣性樹狀圖之分析，以UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) 的方式畫出樹狀圖，由樹狀圖對應出相似指數，分析菌株間分子關聯性。23株O1型及27株O139型霍亂弧菌以及4株非O1非O139型霍亂弧菌以 NotI 酵素切割後作PFGE基因分型(圖一，編號最後有P者為O139型，編號最後有N者為非O1非O139型)。以85% 相似度(similarity)劃分54株霍亂弧菌親緣性，可分為四個單系群(clade)：單系群A包含兩株非O1非O139型(2002-002N及2003-389N)。單系群B包含兩株無毒素基因的O1型霍亂弧菌(2003-499(-)及2003-520(-))。單系群C包含27株O139型霍亂弧菌中之24株(2003-94P至2003-105P，相似度高達90%)以及一部份O1型霍亂弧菌。單系群D為另一群O1型霍亂弧菌型別。

3株型別差異性大的O139型菌株(2003-30P、2002-008P及2007-001P)並不隸屬任一clade，而經PCR分析得知2002-008P及

2007-001P無毒素基因，並非會造成大規模流行之霍亂弧菌，其基因型別與產毒素之O139型菌株差異很大。

27株O139型以PFGE可分為11種不同型別，24株O1型則包含19種型別。

## 2. 以 VNTR 建立 MLVA 基因資料庫：

PFGE 被美國疾病管制局運用為食因性致病細菌次分型(subtype) 與流行病學關聯性判斷之準則，但其敏感度與型別之區分會依限制酶的選擇而產生變異，基因上細微的變化亦不易探測<sup>9</sup>。為解決 PFGE 技術層面的問題，利用多位址變異重覆序列(VNTR，variable number of tandem repeats)分析基因高變異 VNTR loci，以 PCR 與基因定序的方式，結合生物資訊平台，建立重複性高且無實驗室間差異之 MLVA 基因資料庫，此技術已被發展應用在數個細菌之分型<sup>10-12</sup>。

經過 PFGE 分型之 54 株霍亂弧菌(23 株 O1 型、27 株 O139 型及 4 株非 O1 非 O139 型霍亂弧菌)，再以 MLVA 基因分型技術分析比較<sup>10</sup>。以 Danin-Poleg *et al.*選用之 9 個 VNTR loci，經 PCR 及基因定序後，應用 Maximum Likelihood 演算法，建構 54 株霍亂弧菌間之 MLVA 種源關係樹(圖二及表一)。從樹狀圖中將具有統計意義

( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$ ) 群組定為單系群，可將 54 株霍亂弧菌分為 5 個單系群。其中 24 個 O139 型與 PFGE 分型一致，同屬單系群 I，顯示 MLVA 分析，可將 O139 型霍亂弧菌與 O1 型霍亂弧菌成功區分。

霍亂弧菌單系群 II 中包含 7 株不產毒之霍亂弧菌(虛線方框部分)，其中 2007-001P(-)及 2002-008P(-)為 O139 型，2003-112(-)為 O1 型，而 2002-009N(-) 2002-002N(-)、2002-004N(-)及 2003-389N(-)4 株非 O1 非 O139 型，可推論霍亂弧菌之產毒與否較血清型別有更緊密之種緣關係。

27 株 O139 型以 MLVA 可分為 23 種不同基因型別，23 株 O1 型則包含 22 種型別。顯示 MLVA 不僅在同種源之單系群區分比 PFGE 具有較高的區分效力，更在基因型別的分型上展現更高的分型效力。

## 討論與建議

本研究利用 PFGE 及 MLVA 不同方法分型霍亂弧菌。在 PFGE 分型中，單系群 C 無法將 O1、O139 型做明顯的區分，而 MLVA 可將霍亂弧菌分成較多的單系群，且可將 O139 型與 O1 型成功區分。O139 型霍亂弧菌在 1992 年被分離發現，也許因年代接近，尚無顯著的演化上的變異，因此屬同一種源。而 O1 型霍亂弧菌，因長時間的演化，則有不同種源的區分。

霍亂弧菌毒素基因 *ctxAB* 位於嗜菌體 CTX $\phi$  上，當 CTX $\phi$  DNA 鑲嵌在霍亂弧菌染色體中，配合其他致毒基因 (virulence gene，例如：TCP，toxin coregulated pilus pathogenicity island，VPI cluster 等)，造成宿主致病的主要因素<sup>1, 2, 9, 13</sup>。因此毒素基因的鑲嵌亦成為演化的一部份。這個推論可從 MLVA 單系群 II 及單系群 V 中霍亂弧菌(虛線方框部分)產毒與否較血清型別有更緊密之種緣關係得到應證。另外，本次實驗中 2002-004N(-)在 PFGE 的分型中因 smearing 而無法分型(圖一最左邊之 lane)，這情形在其他文獻亦曾報導過<sup>10</sup>，雖仍無法得知原因為何，至少以 MLVA 分型時，是成功的。

以 PFGE 分析 54 株全部霍亂菌株，其分型能力為 0.958 (分為

34 種型別，表二)，而 MLVA 分型能力為 0.996 (可分為 44 種型別，表二)。兩種分型法雖均可分析菌株間之關聯性，但本研究結果顯示，MLVA 之分型能力優於 PFGE，在 O139 型霍亂菌株的分型上，MLVA 0.986 之分型能力更勝於 PFGE 的 0.820。

以 2006 年發生在台南的兩起霍亂案件(2006-001，2006-002)為例，由於地緣相近，發生時間只相隔兩星期，且以 PFGE 分型時，型別一致(圖一)，當時無法釐清是否為同一感染源。由於 MLVA 的高分型力，成功顯示此兩菌株為不同型別(表一)。反之，雖然 MLVA 在同種源之單系群區分比 PFGE 具有較高的區分效力，更在基因型別的分型上展現更高的分型效力，但也有 MLVA 無法區分，而 PFGE 可區分出不同型別的情形，2003-026P 與 2003-033P 就是一個例子。

因此，PFGE 為目前國際認可之共同比對工具，而 MLVA 的高分型能力亦為日後國際發展主力。在此雙重優勢下，期望霍亂弧菌 PFGE 指紋圖譜及 MLVA 基因資料庫的建構，能強化食因性傳染病與其它細菌性傳染病的監測工作，有效提供分子流行病學的分析，有效降低食因性傳染病之威脅。

## 計畫重要研究成果及具體建議

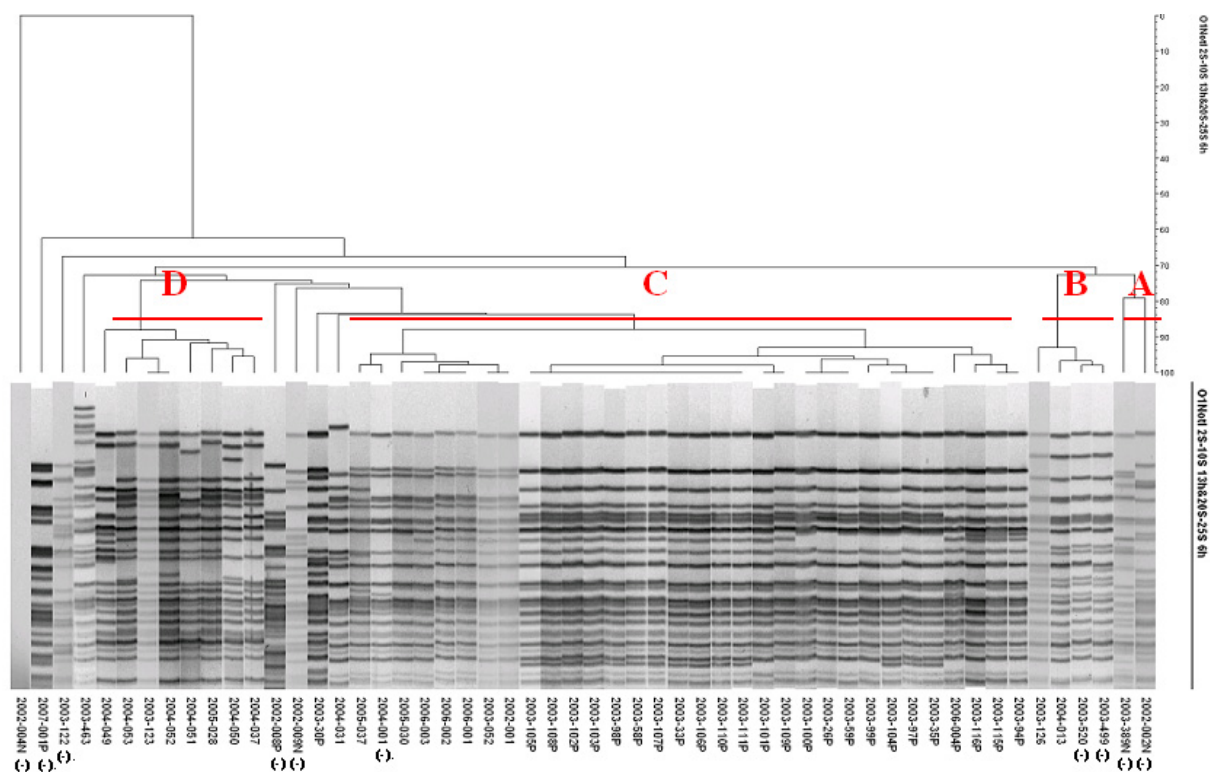
本疾病管制局於 95 年 10 月 3 日成立 Taiwan PulseNet，期望霍亂弧菌 PFGE 指紋圖譜及 MLVA 基因資料庫的建構，能強化食因性傳染病與其它細菌性傳染病的監測工作。本計畫建構完成霍亂弧菌 PFGE 及 MLVA 基因資料庫，研究結果顯示 MLVA 比 PFGE 在基因型的分型上展現較高的分型效力，能有效提供分子流行病學的分析，有效降低食因性傳染病之威脅。

## 參考文獻

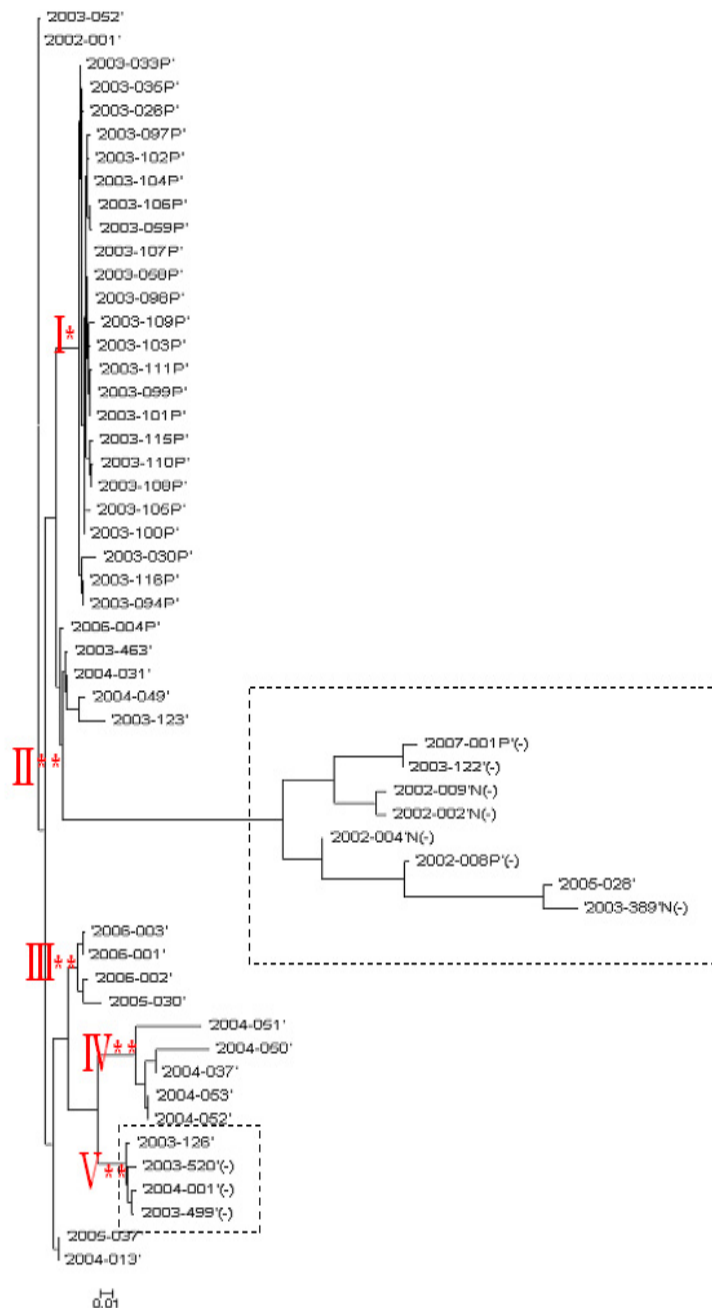
1. Kaper JB, Morris JG, Jr., Levine MM. Cholera. *Clin Microbiol Rev.* Jan 1995;8(1):48-86.
2. Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev.* Sep 2004;68(3):403-431, table of contents.
3. Guerrant RL. Cholera--still teaching hard lessons. *N Engl J Med.* Jun 8 2006;354(23):2500-2502.
4. Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol.* Mar 2005;43(3):1045-1050.
5. Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* Oct 2003;11(10):479-487.
6. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis.* May-Jun 2001;7(3):382-389.
7. Byun R, Elbourne LD, Lan R, Reeves PR. Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes. *Infect Immun.* Mar 1999;67(3):1116-1124.
8. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* Dec 1998;62(4):1301-1314.
9. Kotetishvili M, Stine OC, Chen Y, et al. Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness. *J Clin Microbiol.* May 2003;41(5):2191-2196.
10. Danin-Poleg Y, Cohen LA, Gancz H, et al. *Vibrio cholerae* strain typing and phylogeny study based on simple sequence repeats. *J Clin Microbiol.* Mar 2007;45(3):736-746.
11. Danin-Poleg Y, Somer L, Cohen LA, Diamant E, Palti Y, Kashi Y. Towards the definition of pathogenic microbe. *Int J Food Microbiol.* Dec 1 2006;112(3):236-243.
12. Ravi Kumar A, Sathish V, Balakrish Nair G, Nagaraju J. Genetic characterization of *Vibrio cholerae* strains by inter simple sequence repeat-PCR. *FEMS Microbiol Lett.* Jul 2007;272(2):251-258.



13. Faruque SM, Nair GB, Mekalanos JJ. Genetics of stress adaptation and virulence in toxigenic *Vibrio cholerae*. *DNA Cell Biol.* Nov 2004;23(11):723-741.



圖一、54 株霍亂弧菌株之 PFGE 圖譜(23 株 O1 型、27 株 O139 型及 4 株非 O1 非 O139 型霍亂弧菌)，菌株來自疾管局生材科菌株庫。編號後有 P 者為 O139 型，編號後有 N 者為非 O1 非 O139 型，不產毒素者以(-)標示。單系群(clade)：A、B、C、D 以 85% similarity 劃分。



圖二、54 株霍亂弧菌株之 MLVA 分析圖(23 株 O1 型、27 株 O139 型及 4 株非 O1 非 O139 型霍亂弧菌，編號標示如圖一)。應用 Maximum Likelihood 演算法繪製 MLVA 種源關係樹， $p < 0.01$ (\*)及  $p < 0.05$ (\*\*)具統計意義之系群劃分為同源種單系群(clade)：I、II、

III、IV、V。

	VC0147	VC0437	VC0500	VC1418	VC1457	VC1650	VCA0171	VCA0283	VCA1082
2002-001	10	7	4	9	4	7	17	28	8
2002-002N(-)	11	7	np	np	np	4	13	np	8
2002-004N(-)	9	6	np	np	np	3	np	np	7
2002-009N(-)	14	7	np	np	np	1	12	28	9
2003-052	10	7	4	9	4	6	17	28	7
2003-112(-)	9	8	np	np	np	np	13	np	9
2003-123	8	7	np	9	4	np	7	17	8
2003-126(-)	9	7	np	9	np	7	21	24	8
2003-389N(-)	17	7	np	np	np	8	19	np	9
2003-463	8	7	4	9	4	7	11	15	9
2003-499	10	7	np	9	np	3	22	21	9
2003-520(-)	10	8	np	9	np	7	21	24	8
2004-001(-)	9	8	np	9	np	7	22	20	9
2004-013	9	7	4	9	4	8	17	21	9
2004-031	8	7	4	9	4	7	11	15	10
2004-037	7	7	np	9	6	7	np	21	8
2004-049	9	7	np	9	4	np	10	20	8
2004-050	7	7	np	9	6	7	np	2	8
2004-051	9	9	np	9	4	7	23	14	7
2004-052	8	7	np	9	4	7	np	21	8
2004-053	8	9	np	9	4	7	np	20	7
2005-028	8	7	np	9	5	8	12	np	7
2005-030	10	7	4	9	4	8	18	19	7
2005-037	8	7	4	9	4	6	12	17	8
2006-001	10	7	4	9	4	8	17	27	9
2006-002	10	7	4	9	4	8	18	22	10
2006-003	10	7	4	9	4	8	17	27	9
2002-008P(-)	9	8	np	np	np	5	10	np	7
2003-026P	10	7	4	10	3	8	11	18	7
2003-030P	10	6	4	10	3	8	17	11	7
2003-033P	10	7	4	10	3	8	11	18	7
2003-035P	10	7	4	10	3	8	11	16	8
2003-058P	10	7	4	10	3	9	11	19	8
2003-059P	10	7	4	9	3	8	11	17	7
2003-094P	10	7	4	10	3	9	11	17	7
2003-097P	10	7	4	10	3	9	11	15	8
2003-098P	10	7	4	10	3	9	10	15	8
2003-099P	10	7	4	10	3	9	11	18	8
2003-100P	10	7	4	10	3	9	11	19	7
2003-101P	10	7	4	10	3	9	11	18	8
2003-102P	10	7	4	9	3	9	11	16	9
2003-103P	10	7	4	9	3	9	11	16	8
2003-104P	10	7	4	11	3	9	11	17	8
2003-105P	10	7	4	10	3	9	11	14	8
2003-106P	10	7	4	9	3	9	11	18	7
2003-107P	10	6	4	10	3	8	11	18	7
2003-108P	10	7	4	10	3	9	11	17	7
2003-109P	10	7	4	10	3	8	11	18	7
2003-110P	10	5	4	10	3	8	11	16	8
2003-111P	10	7	4	11	3	9	11	17	7
2003-115P	10	7	4	9	3	10	11	15	7
2003-116P	10	7	4	10	3	7	11	18	7
2006-004P	10	8	4	10	np	6	np	21	7
2007-001P(-)	8	11	np	np	np	np	14	np	8

表一、54 株霍亂弧菌中分佈於 9 個 VNTR loci 之重覆序列數

(number of repeats) 。 np = no amplification product

	Total VC	O1	O139
	D (Type)	D (Type)	D (Type)
<b>PFGE</b>	<b>0.952(34/54)</b>	<b>0.980(19/23)</b>	<b>0.820(11/27)</b>
<b>MLVA</b>	<b>0.996(44/54)</b>	<b>0.996(22/23)</b>	<b>0.986(23/27)</b>

**D: discriminatory power**

表二、PFGE 與 MLVA 的分型能力。(Total VC 指全部 54 株霍亂弧菌之分型)