

出國報告（出國類別：研究）

利用 DNA 分子技術測定細菌及披  
衣菌屬血清型與抗藥基因之技術：  
利用 DNA 分子技術鑑定沙門氏菌  
血清型別及應用研習心得報告

服務機關：行政院衛生署疾病管制局

姓名職稱：邱乾順 聘任研究員

派赴國家：美國

出國期間：2007/8/21-10/6

報告日期：2007/11/2

## 摘要

新興 luminex 技術平台，具有可偵測多重蛋白質與 DNA 目標功能，在醫學診斷與基因分型上很有發展潛力。本次為期六週(2007.8.21-10.6)研習，到美國疾病管制中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)研習，在相關實驗室了解利用 luminex 技術平台發展沙門氏菌之 DNA-based serotyping 與 A 型鏈球菌 *emm* typing 之技術研發過程，並利用此機會和美國 CDC 之 PulseNet 團隊商談國際合作計畫。Luminex 技術在上述兩種細菌之分型應用，關鍵在於設計與測試具有專一性之 probes，如何決定 probe 之專一性，則需測試大量具代表性之菌種，經歷重覆試驗，才能發展一個能被廣泛採用的技術標準。學術研究發表論文雖然不易，但從學術發展成果到應用這個階段，常需更大量經費與人力的投入。在國際合作方面，和美國 PulseNet 實驗室達成之共識：1)由美國 CDC 接手本實驗室所研發之 *Shigella sonnei* 的 MLVA 分型法之跨國/跨實驗室的確效工作；2)美國 CDC 願意參與利用 MLVA 技術分析國際 *Shigella sonnei* 菌株親緣性的研究，以探討該重要旅遊傳染病的全球傳播面貌；3)美國 CDC 願參與 *Shigella flexneri* 之 MLVA 技術研發工作。本次研習，除了學習 luminex 技術之研發關鍵，更強化與美國 CDC 之合作交流管道。

# 目次

頁次

摘要

目次

本文

目的

3

過程

4-6

心得

7-9

建議事項

10

# 本文

## 目的

沙門氏菌(*Salmonella*)擁有超過 2,500 餘種血清型別，鑑定血清型別是一項勞心勞力的工作，且常有鑑定錯誤之情形，美國疾病管制中心(美國 CDC)在 8 年前開始進行研發以 DNA 為標的血清分型法，最近採用 luminex 技術平台，發展 DNA-based 的血清分型技術，目前已達到應用階段；A 型鏈球菌之 M 蛋白是主要的毒力因子，是發展疫苗的標的，然而 M 蛋白型別多達 150 種以上，傳統之 M 蛋白血清分型法，在血清取得上相當困難，只有在美國、英國等國之少數參考實驗室有能力進行分析，但分析過程繁瑣；最近學者發展之 *emm* 基因分型法，需經過 DNA 的定序過程，除了成本偏高外，分析之速度與分析量能皆不如 luminex 方法；2002 年本人首度到美國 CDC 研習脈衝電泳技術，與利用該分子分型技術建構之食源性細菌傳染病的監測網之運作，期間受到美國 CDC 邀請，參加 2002 年底在美國夏威夷舉辦的「亞太地區細菌傳染病監測網組織—PulseNet Asia Pacific (PNAP)」籌備會議，才得以加入 PNAP 成爲會員與成爲執委會的一員，2006 年 10 月 3 日本局正式宣佈成立 PulseNet Taiwan (台灣剝絲網)，過去數年來始終與美國 CDC 維持良好關係。今年有機會再到美國研習，除了了解美國 CDC 應用 luminex 技術發展沙門氏菌 DNA-based 血清分型與 A 型鏈球菌 *emm* 基因分型的過程與未來發展方向，也藉機認識美國 PulseNet 團隊新成員，並商談 *Shigella sonnei* 新型 MLVA 分型技術的後續確效與 *Shigella flexneri* 新型 MLVA 分型技術的共同研發工作；藉由執行研究計畫，強化雙方的互動關係。

## 過程

**沙門氏菌 DNA-based 血清分型:** *Salmonella* 之血清型是由體抗原(O-antigen)與鞭毛抗原(H antigens)的組合所決定。美國 CDC 於 9 年前開始發展此 DNA-based serotyping 方法，此方法由 Dr. Patricia I (Patti) Fields 手下的 Dr. Collette Fitzgerald 負責 O antigens 基因分型與 Dr. John R Mcquiston 負責 H antigen 基因分型的研發工作，目前已進入第 9 年，所找出的專一性 probes，已可鑑定美國前 100 名血清型菌株，雖然 *Salmonella* 目前已有 2,500 種以上的血清型，但前 100 名血清型已佔每年臨床分離株的 90% 以上。Luminex 技術原理和生物晶片一樣，可利用抗原-抗體的結合原理，一次偵測多達 100 個蛋白目標，或利用 DNA 之雙股雜交特性，一次偵測多達 100 個 DNA 目標。雖然原理簡單，*Salmonella* 之 H antigen 基因序列，有些非常相近，甚至只差一個鹼基，probes 常有交叉雜交的情形，一個真正專一性的 probe 的確效工作，往往要測試數百株相近血清型之菌株，且 probe 常要經過多次的修改；所以發展此一技術，必需投入龐大人力、資金與時間。

本次在 John R Mcquiston 的實驗室，一起測試一些新設計的 probes，同時測試直接使用 cell lysate 作為 template 的效果，以取代抽取 genomic DNA 之成本/時間的消耗。這次最大的收穫是透過實際操作了解 luminex 技術的特性，包括一些影響因素與解讀數據的心得，這些經驗若自己由零開始，必需花費巨資與時間，遭遇許多失敗的痛苦，才有機會取得；經驗中最特別的是碰到 PCR 反應使用的 primer 濃度太高，會嚴重影響 luminex 的偵測靈敏度，這個經驗對未來發展與應用 luminex 技術，可避免重蹈覆轍，特別是許多實驗室在經過多年的操作，仍不知此一特性，所得到的實驗結論，將會有很大的偏差。

**A 型鏈球菌之 emm 分型:** 此一研習工作原本未在規劃之中，然而在美國 CDC 偶然碰到 Dr. Maria Da Gloria Carvalho，她於 2002 年來 CDC 擔任博士後研究，因同住在 Villa International 旅館而認識，目前她已是 CDC 的正式職員，是 Dr. Bernald Beall 的主要幫手。透過她熱心的幫忙，引介到 Dr. Beall 的實驗室與

他見面，Dr. Carvalho 也特地安排 Alma A Trujillo 示範 A 型鏈球菌 luminex 之 *emm* 分型方法，對方也同意將部份已完成測試的 probes 給本實驗室使用。與 Dr. Beall 的談話中，他非常關心 G 型鏈球菌正在引發的嚴重感染與流行議題。

**合作計畫案：**9 月 21 日與 Dr. Peter Gerner-Smidt 部門之 12 位同仁討論有關 *Shigella sonnei* MLVA 技術的發展成果與 *Escherichia coli* O157:H7 的新發現，商談合作事宜。*Shigella sonnei* 是 PulseNet 監測網監測的主要病原菌，MLVA 是未來 PulseNet 可能採用取代 PFGE 的標準分型技術。美國 CDC 兩年前知道本實驗室開始發展這個技術之後，即建議分工合作，US CDC 不發展這個技術，但在此技術發展成熟後，可接手進行跨實驗室/跨國的確效工作。10 月 3 日負責 PulseNet 分型技術開發的 Dr. Efrain Ribot 與 Dr. Kara Cooper 與我討論雙方合作的共識：1) 由美國 CDC 接手本實驗室所研發之 *Shigella sonnei* 的 MLVA 分型法之跨國/跨實驗室的確效工作；2) 美國 CDC 願意參與利用 MLVA 技術分析國際 *Shigella sonnei* 菌株親緣性的研究，以探討該重要旅遊傳染病的全球傳播面貌；3) 美國 CDC 將參與 *Shigella flexneri* 之 MLVA 技術研發工作。跨實驗室/跨國的確效工作是決定是否採用一個新的分型方法，做為 PulseNet 與 PulseNet International 內 50 幾個國家，百餘個公共衛生實驗室共同採用的重要評估程序，由 PulseNet 的領導者接手評估工作，才可能完成此一確效工作。

**台灣過去接受美國 CDC 的協助，無條件傳授 PFGE 的標準操作方法，並持續幫忙解決所碰到的技術問題，協助加入 PulseNet Asia Pacific 地區性組織，並分享重要食品爆發流行事件的菌株 PFGE 指紋圖譜與流病訊息，台灣能在 PulseNet 這個監測網上有所貢獻，是件值得自我期許的事。**

**研究成果交流：**今年越南學者 Dr. Phung Dac Cam 曾要求提供 *Vibrio parahaemolyticus* 之 PFGE 技術，由於美國 CDC 尚未公佈該菌的 PFGE 標準操作方法，特趁此機會進行該菌的 PFGE 操作方法之評估，並將結果寫成論文發表。這次到美國 CDC 才知道他們已完成該方法與跨實驗室之評估工作，並於最近發表論文，然而該方法相當複雜，且使用 SfiI 為第一優先使用酵素(primary

enzyme)；本實驗室使用之方法較單純，建議使用 NotI 為第一優先酵素。此研究結果的差異，已和 Dr. Efrain Ribot 討論，希望在公佈正式的 *V. parahaemolyticus* 標準 PFGE protocol 時，能考慮這項研究結果。本次研習亦參觀美國 CDC 的 *Salmonella* 傳統血清分型工作，Matthew L Mikoleit 展示他們新的 phase induction 的做法，深入了解，才知道他所謂的新方法，是跟據本實驗室之前發表的論文而來，Mikoleit 亦告知加拿大也開始使用本實驗室發表的方法。這項訊息深具鼓舞效果，本實驗室的研究成果，已成為國際主要 *Salmonella* 參考實驗室使用的方法。

**PulseNet International：** Ahmed M Elsedawy 是美國 CDC 內負責 PulseNet International 聯繫工作的人，趁著在 CDC 碰面機會，他與我討論台灣 PulseNet 的發展現況。Elsedawy 要求本局提供 1) PulseNet Taiwan 的簡短現況介紹，2) PulseNet Taiwan 的徽章(logo)，放在 PulseNet International 的網站上。

## 心得

美國 CDC 自從 2001 年 9 月 11 日遭到恐怖攻擊與隨後的炭疽孢子信件攻擊事件之後，安全管制相當嚴格，往往要花費兩個禮拜才能完成各種手續，進入實驗室工作，短期研習若不是有熟人熱心協助，幾乎無法做什麼工作，2-3 個月的短期研習，對接待的對方而言是項嚴重負擔，除了繁瑣的行政作業外，訪問者對實驗室一切生疏，樣樣需要麻煩人。因為和接待實驗室許多人早已經熟識，6 週的研習，才有機會了解研習的 luminex 技術，建立新的人脈關係，談好合作計畫；只是一項技術若不經一段時間的實際操作，往往只了解皮毛，一些經由嚐試錯誤累積的經驗結晶，往往無法體驗獲得，往後仍要付出嚐試錯誤的成本代價去獲得。美國 CDC 比較歡迎 6-12 個月的研習，如此能參與一些小計畫，做出一些研究成果。本局主要是短期的國外研習，只能派有經驗的人前往，才能在短短數週內得一些成果。

台灣因中國的打壓，被排除在國際性的防疫組織之外，在有重大疫情出現時，無法取得世界衛生組織的協助，往往有賴美國 CDC 的支援，本局要多建立美國 CDC 的人脈網絡，平時經常聯絡互動，若能執行合作研究計畫，自然能增進互動關係。2002 年筆者到美國 CDC 的 PulseNet 實驗室研習後，即和該部門之主要成員建立良好關係，回國後所建立的 PFGE 分析技術與能量，讓美國 CDC 寡目相看，也分擔下世代分子分型技術的研發工作，如今研發成果已可進行確效的評估階段；同時也儘量支持美國 CDC 所提出的國際合作計畫，例如參與 *Global Salmonella Typhi Fingerprint Database* 計畫。在我們自身的努力下，美國 CDC 也友善的回報我們的需求，例如讓台灣加入 PulseNet Webboard 的名單中，分享偵察中的疫情情報，取得 outbreak 菌株之 PFGE (DNA)指紋圖譜資料，以供比對，同意我們使用他們所發展的軟體等，也邀請台灣加入 PulseNet Asia Pacific 組織，更在中國打壓台灣時，暗助台灣。在國際現實中，除要人助亦要自助，要努力建立自己的實力，平時也要多交朋友，經常互動，並對雙方做出貢獻。所發展的



*Shigella sonnei* MLVA 技術，是 PulseNet 監測網所需的，這個研發工作除了能發表學術論文，提昇本局學術地位，亦能對 PulseNet 團隊做出貢獻，未來 PulseNet 所使用的標準分型方法中，有台灣疾管局發展出來的技術，可讓本局與有榮焉。

台灣除了和美國 CDC 建立關係，也應和亞洲各國公衛實驗室建立人脈關係，共提合作計畫是建立相互往來最好的方式。在 PulseNet Asia Pacific 組織內，日本 NIID 向日本政府申請一個國際合作的三年研究計畫，資助組織內 13 個成員國每年 200 萬日元的經費，進行與 PulseNet 技術與流行病學相關之研究，此項為期三年耗資 2000 餘萬台幣的國際研究計畫，日本之主要重點應在建立國際人脈關係。我國也應有類似規劃，爭取國際合作經費，提供與我友好之外國政府公衛單位研究經費，建立國際人脈網絡。

*Salmonella* 的血清型達 2,500 種以上，雖然血清分型太過於粗糙，不是敏感的疾病監測分型法，但各血清型之寄主範圍不同，血清分型資料有益於了解 *Salmonella* 之主要感染來源，有利防疫措施的訂定；加上血清型別是目前全世界溝通 *Salmonella* 的共同語言，故血清分型雖然非常繁瑣，耗時費力，成本高，但仍是 *Salmonella* 流行病學監控的基本工作。*Salmonella* 傳統血清分型工作，H 抗原轉換(phase reversal)，是最關鍵步驟，美國 CDC 過去使用的 H 抗原轉換做法，非常繁瑣，本實驗室曾發展的 paper-bridged phase reversal 方法，具有快速、容易操作、低成本(節省血清量與培養基等耗材)、高成功率的優點。這次到美國 CDC 發現他們也開始使用這個方法，同時也被告知，加拿大實驗室也採用這個方法。本實驗室在 2004 年開始建構 *Salmonella* 參考實驗室，至今已累計超過 70 種血清型，包括 10,000 餘筆 PFGE 圖譜資料，本實驗室首先發現可利用 PFGE 圖譜資料庫，預測 *Salmonella* 之血清型。雖然 *Salmonella* 血清型高達 2,500 餘種，但在台灣流行之主要血清型相當有限，2004 年至今累計萬餘株菌株，共只有 76 種血清型。今年(2007 年)本實驗室開始利用 PFGE 圖譜去預測菌株血清型，可預測之菌株達 97% 以上，如此只有少數菌株需要進行傳統血清分型，在 *Salmonella* 的感染監測工作上，可節省大筆經費。但 PFGE 圖譜血清型別鑑定，仍有其缺點，例如

*Salmonella* Typhimurium 的變異 *S.* I O4:i-血清型是近年來全世界日愈增多的血清型，其 PFGE 圖譜皆落在 *S.* Typhimurium 圖譜群中，無法區別。另外，*Salmonella* Bardo 與 *Salmonella* Newport 也常無法區別，可能此兩種血清型事實上是同一種。PFGE 圖譜預測血清型，將無法偵測到與 *S.* I O4:i-變異種的出現。

## 建議事項

1. A 型鏈球菌除了引發猩紅熱，也是許多嚴重侵襲性疾病的病原，過去許多例子說明當一般流行的菌株被某些特殊 DNA (例如 bacteriophage or conjugative transposon) 感染之後，往往變成高毒力菌株，引發嚴重的爆發流行。本局應將該嚴重侵襲性病原列為通報項目，取得菌株，分析其 *emm* 型別與 superantigens 等致病因子基因，建立資料庫，做為監測該菌嚴重侵襲性傳染病之基礎。
2. 向美國 CDC 爭取 *Salmonella* DNA-based serotyping 與 A 型鏈球菌 *emm* typing 之 luminex 技術，提昇台灣科技水平與強化與美國 CDC 之交流互動。
3. 爭取國際合作經費，支持跨國之合作研究計畫，建立國際人脈，強化國際交流。
4. 提供 PulseNet International 有關 PulseNet Taiwan 之現況簡介與 logo，行銷台灣與台灣疾病管制局。