

出國報告（出國類別：研習）

困難腸梭菌之國際標準化 ribotyping 方法及其資料庫比對分析

服務機關：疾病管制署

姓名職稱：魏孝倫 副研究員

派赴國家：荷蘭

出國期間：105年6月18日~105年6月29日

報告日期：105年8月02日

摘要

困難腸梭菌感染症(CDI)是使用抗生素引起的腹瀉疾病，常見於歐美的院內感染，在 2000 至 2005 年間並造成致死率高的群聚感染。台灣 CDI 的流行狀況較歐美緩和，但仍有嚴重的個案散發出現，2013 至 2015 年間有 3 例困難腸梭菌 027 型強毒株感染的案例。ribotyping 是困難腸梭菌通用的分型方法，荷蘭參考實驗室已於 2015 年與美國 CDC、英國 NHS 建立標準化的 Capillary PCR-ribotyping 技術。本實驗室自 2011 年也建立了 Capillary PCR-ribotyping 困難腸梭菌資料庫，至目前為止已區分出 100 個以上的型別，惟無法得知其國際通用型別，此次將 100 個型別株與荷蘭參考實驗室資料庫比對，比對出 23 型，較有意義的型別有 012、014、017 及 078，其中 017 德國曾引起大規模群聚感染，而 012、014 及 078 為人畜共通型別。此次研習除了學習到標準化的 Capillary PCR-ribotyping 技術及分析方法，也與荷蘭國家困難腸梭菌參考實驗室建立交流管道，未來可以以檔案傳送方式比對新發現之型別，使目前使用之資料庫與國際接軌，作為院內感染及人畜共通傳染病原的追蹤參考。

目次	
一、目的	4
二、過程	5
三、心得及建議	11

一、目的

學習標準化之 Capillary PCR-ribotyping 技術，並與國際標準化之型別資料庫比對，建立與國際資料庫的聯結管道。

二、過程

1. 研習行程

時間	行程	重點報告
2016/06/18	出發及抵達荷蘭萊登	
2016/06/20~2016/06/23	萊登醫學中心研習	標準化 Capillary PCR-ribotyping 技術操作
2016/06/25~2016/06/27	萊登醫學中心研習	PCR-ribotype 分析及資料庫比對
2016/06/28/2016/06/2	離開荷蘭→抵達台灣	

2. 研習重點

本實驗室在 2009 即建立困難腸梭菌的 Capillary PCR-ribotyping 分型法，但由於缺乏足夠的標準株，大部份菌株的比對僅止於內部資料庫的比對，因此必須得知這些菌株的國際型別。2015 年，美國、英國及荷蘭的困難腸梭菌參考實驗室已合作測試，將 Capillary PCR-ribotyping 方法標準化(1)，其中荷蘭的困難腸梭菌參考實驗室設於萊登大學醫學中心 (Leiden University Medical Centre, LUMC)，同時也是歐盟疾病管制中心 (ECDC) 的困難腸梭菌**核心參考實驗室**，因有機會獲得該實驗室主管 Dr. Kijper 的同意，乃至 LUMC 研習。

Dr. Kijper 所主持的研究團隊，以困難腸梭菌研究為主，包括流行病學及基礎分子生物學兩部份，共分 3 個實驗室及二十幾位研究人員參與。流行病學實驗室，就是「荷蘭困難腸梭菌參考實驗室」，主要任務是負責荷蘭國內的困難腸梭菌之分型，流行病學及抗生素敏感性監測，並協助

歐洲各國進行菌株分型及訓練工作，與英國 Leed 標準參考實驗室合作比對以確認細菌型別或為新型別命名，新的分型方法的研發。分子生物學研究方面，包括了各種困難腸梭菌毒素基因功能，毒素結構及抗藥機制的探討。



荷蘭萊登大學醫學中心(LUMC)



與 Ms. Celine Harmanus 合影

本次在「荷蘭困難腸梭菌參考實驗室」研習，由 Ms. Celine Harmanus 指導我，主要目的:其一是學習 Capillary PCR-ribotyping 標準化方法，確認各個步驟的差異及分析的標準，其二是與國際資料庫比對，確認國內型別的國際命名，其三是了解歐盟參考實驗室運作的模式。

- Capillary PCR-ribotyping 分型法主要分為三個部份:
 - (1). PCR 增幅變異區: 利用螢光標定的引子以 PCR 放大 16s-23s 之間的 intergenic region。
 - (2). 片段分析: 將產物以 ABI3500 定序儀作片段分析。
 - (3). 資料庫分析: 將片段分析資料匯入 Bionumerics 軟體，分析菌株圖譜的異同。

我國實驗室與 LUMC 實驗室操作上較大的差異，其一在於片段分析時 LUMC 使用 LIZ1200，這可較精確的分別片段大小;其二在於分析的資料型式，LUMC 是直接使用片段分析儀的 GeneMapper 軟體所產生的資

料分析，而且在分析會排除距離 1.5bp 以內的訊號，這兩種作法均使背景值降低，使得比對出的型別減少。

台灣與 LUMC 操作方法的相異處如下表:

程序	步驟	Taiwan	LUMC
PCR 增幅變異區	引子序列	FAM-GTGCGGCTGGATCACCTC CT CCCTGCACCCTTAATAACTTG ACC	TET-GTGCGGCTGGATCACCTC CT CCCTGCACCCTTAATAACTTGA CC
	溫度循環	95°C 15 min→ 30cycles [95°C 1 min →57°C 1 min→72°C 1 min] →72°C 3min.	95°C 15 min→ 24cycles [95°C 1 min →57°C 1 min→72°C 1 min] →72°C 30 min.
片段分析	標準液	LIZ 600	LIZ 1200
	片段分析儀	ABI3730	ABI3500XL
	產物稀釋倍數	150 X	10 X
資料庫分析	分析軟體	Bionumerics version 6.0	Bionumerics version 7.1
	分析檔案形式	圖譜型式	fsa file (fsa 為 ABI GeneMapper 分析後匯出資料)
	閾值	15%	無(GeneMapper 分析時已去除 10%背景值)
	訊號排除	所有訊號均比對	大小差異在 1.5 bp 以內的訊號，只保留較強的訊號
	比對模式	與所資料庫中所有菌型比對，以 Jaccard 模式比對是否有相同的圖譜	建立包含各種型別的 reference library，分別以 Jaccard，Dice，Pearson correlation 模式比對是否有相同的圖譜,只要一種模式比對相同，就視為相同

- 資料庫比對結果

本次共準備了 100 個國內型別與國際資料庫比對，有 45 個國內型別比對到 23 個國際型別，另有 53 個國內型別在國際資料庫比對不到。在 45 個比對到的菌株中，有 5、2、4、3、3、3、6、2、3 分別屬於 9 個型別，顯示標準法的分型較不敏感，這個差異推測可能與其在片段分析時設定較高的閾值(cutoff range)，忽略掉細微的訊號有關;在未比對到的 53 個國內型別，有 34 個是非產毒株，推測與國際資料庫主要是收集來自 CDI 個案的產毒株有關;另有 3 個型別被排除為困難腸梭菌。其它未出現在國際資料庫中的型別，Ms. Celine Harmanus 將協助我將這些菌株的 fsa. 檔案送至英國 Leeds 的參考實驗室作比對或為新型別命名。

目前國內的 ribotype 型別前 5 位為 R4、R10、R14、R106 及 R45，分別佔 32%、25%、21%、19%及 15%，其國際型別: R4、R10、R14 及 R45 為新型別，R106 為 106 型，另外，比對出的型別中，以 012、014、017 及 078 型較為重要: 017 曾在德國及英國引發高致死率的群聚感染(2)，而 012、014 及 078 是常見的人畜共通型別(3)，荷蘭的研究發現豬隻中分離出的以 078 型為主，且與人類分離株有高親源性。

LUMC 目前使用的除了標準化的 Capillary PCR-ribotyping 方法，並輔助以 MLVA 技術以監測群聚感染，同時也在發展 NGS 技術，NGS 技術為同時探討演化及追蹤群聚的最佳方法，但目前成本仍高，無法常規使用。

- 歐盟參考實驗室運作的模式

2005 年，侵襲歐洲各國的 O27 型困難腸梭菌被確認後，在歐洲臨床微生物及感染症學會的困難腸梭菌研究小組(ESGCD)主導下，第一個汎歐洲的困難腸梭菌監測計畫(ECDIS)成形，並發表了 CDI 的指引。自 2010 年起，在 ECDC 經費支援下，ESGCD 進行第二階段的 ECDIS-NET 監測計畫(4)，其目的及作法如下：

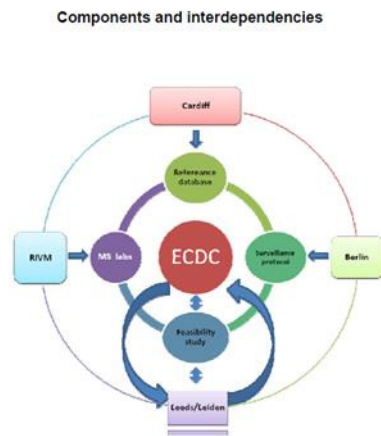
(1).幫助歐洲各國建立監測能力：

- a. 調查各會員國參考實驗室及地區醫院診斷，實驗室檢驗，分型能力及訓練需求，並為各個參考實驗室提供訓練。
- b. 討論並確認檢驗，分型及分析的**困難腸梭菌實驗室標準操作流程**，並將之提供會員。
- c. 為會員國的參考實驗室提供分型及抗生素敏感試驗的外部品管測試。
- d. 審閱並討論出一個包含流行病學及微生物學資料且適用於各國的**監測標準操作流程**，在 6 個會員國的醫院試辦此監測流程，確認可行性。

(2).建立歐洲的困難腸梭菌資料庫，此系統將以個案流行病學資料、微生物的 ribotyping 分型及抗生素敏感性資料為基礎，最終目標是**發展網絡資料庫**，作法有：

- a. 建立會員網絡。
- b. 提供會員參考菌株及新菌株的比對的服務。

運作模式如下圖(4):



RIVM: Centre for Infectious Diseases Control (CIb), RIVM, Bilthoven
Berlin: Charité - Universitätsmedizin Berlin
Cardiff: Anaerobe Reference Laboratory, University Hospital of Wales
Leiden: Leiden University Medical Center, Leiden
Leeds: Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, Univ. of Leeds & Health Protection Agency

- a. 以荷蘭的 LUMC 及英國的 Leeds 教學醫院的困難腸梭菌參考實驗室為核心實驗室，負責建置及維護資料庫，各國將 CDI 個案的分離株的分型檔案送至核心實驗室比對並入庫。
- b. 核心實驗室定期將監測資料回饋給 ECDC。
- c. 核心實驗室與英國厭氧參考實驗室密切合作，隨時比對新發現的菌型。
- d. 德國柏林的參考實驗室則負責建立監測標準流程及測試。

三、心得及建議

歐洲在 2002~2004 年發生 027 型困難腸梭菌強毒株引起的群聚感染後，個案有逐漸下降的趨勢，但 ECDC 的政策仍是持續監測。ECDIS 的調查發現(5)，CDI 的風險因子仍以 65 歲以上，合併潛在性疾病及近期抗生素使用為主。依 2011-2013 年的研究(6)，歐洲各國的型別分佈不同，且主流型別也會隨著時間及區域而改變，推測與各國各時期採行的抗生素管制策略不同而不同，因此歐盟認為須持續監測才能因應隨時變動的流行狀況。

台灣的流行狀況不如歐美嚴重，重症的個案以散發型的為主，並無大規模群聚。台灣在 2009 年對呼吸照護病房病人做了點盛行率研究(7)，發現有 19.5%的無症狀帶原，有 4%符合 CDI 的病例定義，但這些 CDI 的個案並未被醫師確診，推測這些個案的症狀較為緩和或不典型。較嚴重的個案有，2012 台南的醫院報告了 3 例的 126 riobtype 型感染的小型群聚(8)，其中一例是發展成偽膜性結腸炎，在 2013~2015 年，中部、南部及北部的醫院也各有一例 027 型別感染造成的 CDI(9-11)，其中有一例產生嚴重的偽膜性結腸炎。

由台灣的流行狀況來看，對於 CDI 的監測，較經濟且有效的作法，應是收集疑似個案的菌株，建立包含個案資料及菌株型別的資料庫，並以 MLVA 輔助監測可能發生的群聚。另一方面，由於資料庫中有人畜共通的菌型出現，因此可同時收集不同動物來源的菌種，進行分型,以了解動物傳染人類的風險。

此行最大的收穫,除了確認我國資料庫的型別,建立標準方法外,就是建立與國際社會交流的管道，未來國內有任何新興突發的困難腸梭菌菌型，就可以透過檔案交換比對的方式,取得最新的資訊。

Reference:

1. Fawley WN, Knetsch CW, MacCannell DR, Harmanus C, Du T, et al. Development and Validation of an Internationally-Standardized, High-Resolution Capillary Gel-Based Electrophoresis PCR-Ribotyping Protocol for *Clostridium difficile*. *Plos One*, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0118150.
2. Arvand M, Hauri AM, Zaiss NH, Witte W, Bettge-Weller G. *Clostridium difficile* ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal *C. difficile* infection in Hesse, Germany. *Euro Surveill*. 2009;12;14(45).
3. Koene MG, Mevius D, Wagenaar JA, Harmanus C, Hensgens MP, et al. *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(8):778-84.
4. Supporting capacity building for surveillance of *Clostridium difficile* infections at European level. <http://www.ecdisnet.eu/index.php/home/protocol>
5. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, ECDIS Study Group. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet*. 2011;1;377(9759):63-73.
6. Davies KA, Ashwin H, Longshaw CM, Burns DA, Davis GL, EUCLID study group. Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. *Euro Surveill*. 2016;21;21(29)
7. Wei HL, Wei SH, Huang CW, Shih CH, Huang YW, et al. Molecular typing and epidemiology of *Clostridium difficile* in respiratory care wards of central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2015;48(1):65-71.
8. Hung YP, Lin HJ, Tsai BY, Liu HC, Liu HC, et al. *Clostridium difficile* ribotype 126 in southern Taiwan: a cluster of three symptomatic cases. *Anaerobe*. 2014;30:188-92.
9. Liao TL, Lin CF, Chiou CS, Shen GH, Wang J. *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027 Emerges in Taiwan. *Jpn J Infect Dis*. 2015;68(4):338-40.
10. Hung YP, Cia CT, Tsai BY, Chen PC, Lin HJ, et al. The first case of severe *Clostridium difficile* ribotype 027 infection in Taiwan. *J Infect*. 2015;70(1):98-101.
11. Lai MJ, Chiueh TS, Huang ZY, Lin JC. The first *Clostridium difficile* ribotype 027 strain isolated in Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 2016;115(3):210-2.