

第三章 材料與方法

第一節 菌株來源

總體而言，本研究之菌株來源為自1997至2002年，由苗栗、台中、南投、彰化、雲林、屏東、高雄等地取得人和動物(豬)檢體，分離株 (isolates) 經由培養、選擇性培養基上生化性狀，和血清鑑定後為 *S. Choleraesuis* 共212株，詳細之人類與動物之株數依年代分布請見表三。

在人類菌株方面，總計本研究中由人類分離之菌株共 54 株。包括以下數個來源：

- 1) 由疾病管制局提供 1998-2002 年由苗栗、台中、彰化、南投、雲林等地區分離之 *Salmonella* C1 group (O antigen O7) 菌株。1998年共 36株，1999年 52株，2000年 26株，2001年 50株，2002年 46株。而在 C1 group 中，依進一步之血清型鑑定結果，每年分離出之 *Salmonella Choleraesuis* 菌株數由 1997-2002，分別是 0, 3, 4, 1, 2，總共 10 分離株 (表四)。
- 2) 由長庚醫院邱醫師提供臨床個案 *S. Choleraesuis* 分離株共 31 株。
- 3) 另有其他來源之 *S. Choleraesuis*。分別來自於台大醫院 (5 株)，台北榮總 (2 株)，台中榮總 (1 株)，中國醫藥學院 (1 株)，高雄榮總 (2 株)，奇美醫院 (2 株)。

而在動物菌株方面，由台大獸醫系張照夫教授提供。1997年共 8 株，1998年共 25 株，1999年共 25 株，2000年共 34 株，2001年共 28 株，2002年共 38 株。共計 158 件。

第二節 實驗方法

1. 血清鑑定

- 1) 經生化鑑定為 *Salmonella* sp. 之菌株，挑單一菌落培養於 TSA 平板培養基，37 隔夜培養。
- 2) 將載玻片用棉布擦乾淨，用奇異筆劃上格線，分成四等份。
- 3) 以無菌操作法先取約 1 個鈎菌環 (直徑 4-5 mm) 量之 0.5% 生理食鹽水於平放之載玻片上。用以鈎菌環取培養後之單一菌落，與生理食鹽水混合均勻。
- 2) 加入 10 μ g O- antisera (6, 7)，用鈎菌環混合均勻，在一分鐘內判讀有發生凝集者為陽性。陽性者再作 H-antisera (c; 1,5) 凝集。
- 3) 以無菌接種環鈎 1-2 個單一菌落，接種於 3ml 之 TSB，37 隔夜培養。
- 4) 加等量之 0.6% Formaline saline，37 2 小時殺死細菌，使細菌之鞭毛抗原相停留於此階段。
- 5) 將加了生理食鹽水的菌液 (已不具感染力)，分裝 0.5 cc 到試管，加入待測血清 (c; 1,5)。
- 6) 置於 50 水浴槽，在 15, 30, 60 分鐘記錄觀察凝集狀況。超過一小時可丟棄不用。若有出現棉絮狀凝集，則記錄為陽性。須注意當棉絮狀出現後，不可搖晃試管。
- 9) 當其中一種血清型作不出來時，進行相誘導 (phase induction)。相誘導為根據已知的 H 抗原，使用試管法誘導另一相 H 抗原之出現 (王等, 1994)。
- 10) 準備 SIM 培養基，並於 SIM 未凝固前 (若已凝固則用微波爐加溫成液態，在降溫到不燙手) 加入 H 抗原第一相血清 1 滴，無菌操作，

用鑷子將管徑略大於無菌接種環的管子 (內管)放入培養基內，微搖均勻之，放入 4℃，成半固態時取出。

- 11) 用小頭無菌接種環取菌後種入管子內 (內管)表層 1-2 mm 培養基，37℃ 培養。約八小時後，每兩小時觀察一次。如細菌游出內管外 (混濁或變黑)，快達培養基表面時，用無菌接種環釣菌 (釣接近表面的菌)。
- 12) 將所得菌接入 TSB 培養基，隔夜培養。
- 13) 重複步驟 6-9。登記為 H 抗原第二相。
- 14) 若仍未誘導出另一相，可加兩滴血清，促進反應之進行。

2. 脈衝式電場電泳實驗步驟

根據美國 CDC 處理步驟作部分修飾。

Day 0-菌株準備工作

- 1) 將欲處理之菌株，接種在適合 *Salmonella* 的培養基上 (Blood agar plate or TSA)，37℃，隔夜培養。
- 2) 同時準備標準菌株 H9812 (*S. Braenderup*)，由 -80℃ 冷凍冰箱取出培養。使用此標準菌株的目的是當做電泳時的 marker，以確定實驗過程之正確進行與未來利用此菌株之限制酶切割片段結果，進行所有菌株限制酶切割片段位置之正常化 (normalization)。

Day 1-製作及清洗 PFGE 小膠片 (plug)

- 1) 打開震盪水浴器，調整為 54℃。
- 2) 微波煮沸 1% Seckem Gold agarose，使完全溶解 (以 TE buffer 當溶

- 劑)。將 agarose 置於 56 水浴槽備用。
- 3) 在 Kimble©管內，加入 2~3 ml 細胞分散緩衝液 (Cell suspension buffer ,CSB)。
 - 4) 用無菌接種環挑菌，與 CSB 混合均勻，調整為濁度 0.68-0.72 的懸浮菌液 (使用的濁度計為 Dade Microscan™ Turbidity Meter)。
 - 5) 取 400µl 菌液於 1.5ml 微離心管。
 - 6) 加入 20µl Proteinase K (20mg/ml stock)，輕輕地混合均勻，不要翻轉。
 - 7) 加入 400µl 已降溫的 agarose，和菌液混合均勻，分裝入製作小膠片 (plug)之填充模型 (plug mold, Bio-Rad Laboratories)。
 - 8) 準備 Proteinase K/Cell Lysis Buffer (CLB), 在 50ml 離心管中,加入 5ml CLB 和 25µl Proteinase K。
 - 9) 小膠片凝固後，將之推入 50ml 離心管，確保每個小膠片都浸入 CLB 中，54 水浴震盪 1.5-2 小時。
 - 10) 預熱二次去離子水和 TE 緩衝液至 50 。
 - 11) 將小膠片取出，放在 green-screened caps (具有孔洞，Bio-Rad 產品)。
 - 12) 將全部有小膠片的綠蓋子串在一起，用自動清洗器，清洗小膠片，流速 100-130 rpm。清洗過程為先用 500ml 二次去離子水先洗一次，之後將二次去離子水流掉。再用 500 ml 二次去離子水循環清洗 8 分鐘。之後流掉。重複此清洗過程一次。之後再以 500ml TE 緩衝液先洗一次，流掉後以 500 ml TE 緩衝液清洗 8 分鐘，流掉。重複此過程二次。最後將清洗完成的小膠片放入已加入 3ml TE 緩衝液的管子中，保存於 4 。

Day 1 or 2- 限制？之切割

- 1) 進行限制？切割。使用酵素為 *Xba* I (Promega, Medison, WI, USA)。

- 2) 打開乾浴器預熱至 37 。
- 3) 預切割 (predigest)：以廠商提供之 BSA 2 μ l, Buffer D 20 μ l 混入 178 μ l 之二次去離子水中，將此 200 μ l 預切割液放入 1.5 ml 微離心管中。
- 4) 每個小膠片切下寬約 2mm 與長約 10mm，放到含預切割液之微離心管內，將小膠片完全泡在溶液中，於室溫下作用 5 分鐘。
- 5) 將微離心管中液體吸出，此時管內只剩小膠片。
- 6) 預備每管含 200 μ l 之限制？切割液, 內含 *Xba* I (10unit/ μ l) 1 μ l, BSA 2 μ l, Buffer D 20 μ l, 二次去離子水 177 μ l。
- 7) 將此溶液加到步驟 5 含小膠片之微離心管中，並確定每個小 plug 都泡在溶液中。
- 8) 37 下反應 1.5 至 2 個小時。
- 9) 此時配製 2400 ml 0.5x TBE 緩衝液。
- 10) 以 0.5x TBE 緩衝液製備 150 ml 1% Seckem© Gold agarose 液。
- 11) 將消化完成後之小膠片微離心管內的液體吸出，加入 200 μ l 0.5x TBE 緩衝液停止反應。將適量 0.5x TBE 緩衝液倒入電泳槽，打開幫浦，調整流速在 70rpm，將 TBE 緩衝液降溫並維持於 14 。
- 12) 組裝鑄膠容器，將管內小膠片取出，用試鏡紙微吸乾，貼在電泳梳上。
- 13) 將貼好的電泳梳立起放在製膠台上，移到冷藏室 (4)的水平桌上，放置 10 分鐘。
- 14) 利用這時間將 1 % agarose 微波煮沸，放到 56 水浴槽降溫。
- 15) 等 agarose 降溫後，將其倒入製膠台，靜置 10 分鐘凝固。
- 16) 將製好之電泳膠放入電泳槽，以設定好的條件進行電泳分析。

在脈衝式電泳設定方面為：Auto Algorithm、molecular weight：30kb-600kb、calibration factor：1.00, 0.5x TBE, 14 、forward voltage gradient：6v/cm run time：19 hrs、included angle：120°、initial switch

time : 2.16s、 final switch time : 54.17s、 ramping factor : linear、 流速 : 70 rpm。

Day 2 or 3-PFGE 結果分析

- 1) 將電泳完畢之 gel 從電泳槽中移出，並用 ethidium bromide (etbr, 1 升二次去離子水中加 100 μ l) 染色 20 分鐘，再用二次去離子水退染 20 分鐘。
- 2) 將退染完成的 gel 以紫外光顯像，所顯示圖譜經由照相軟體連結至電腦儲存，未來進一步利用 BioNumerics 軟體 (Applied Maths, Belgium) 進行親源樹狀圖分析。BioNumerics 分析的條件，圖形的容忍值 (position tolerances) 設定為 1.0%，相似度之比較 (comparison setting) 選擇 Dice coefficient，以不加權計分 (UPGMA) 進行叢集分析。即將所得菌株圖譜，以 $N_{ab} / N_a + N_b$ 數學式，用不加權計分的方式計算菌株間的相似度。
 N_{ab} : a 菌株與 b 菌株在相同位置 (片段大小相同) 出現的片段數； N_a : a 菌株所有片段數目； N_b : b 菌株所有片段數目。

3. 抗生素紙錠測試

利用紙錠擴散法 (agar disc diffusion test)，又稱 Kirby-Bauer 試驗，進行細菌的抗藥性試驗。抗生素敏感性測試依照 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 之紙錠擴散試驗稍作修飾進行。其步驟如下：

- 1) 以無菌接種環從 TSA 上挑選 2-4 個單一菌落，接種到 2 ml 生理食鹽水試管中，調整菌量到與 McFarland 0.5 硫酸鋇標準液的濁度相同 (以生理食鹽水調整濁度)。

- 2) 以無菌棉花棒沾取懸浮菌液，在管壁上輕壓去除多餘菌液，以每 60 度轉動一次的角度塗抹在 Mueller-Hinton agar 上，共塗三次。靜置 5 分鐘，以自動貼片機將藥片貼至 agar 上，35- 37 培養 16-18 小時。抗生素藥片距離培養皿邊緣至少 1.4 公分，兩種藥片之間至少 2.2 公分。經過 16-18 小時培養，測量藥片旁邊之抑制圈直徑，比對 NCCLS 標準值，結果以具抗藥性 (resistance, R)，中間型 (intermediate, I)，敏感性 (susceptibility, S)表示，可判讀細菌對不同藥物之感受性。
- 3) 每次實驗，以 *E. coli* ATCC 25922 當作內在效度比較之菌株，確保每次實驗過程正確進行。以 *E. coli* ATCC 25922 菌株實驗結果必須每次都符合 NCCLS 要求的範圍之內 (表五)。
- 4) 將所得藥物感受性結果，使用 BioNumerics 軟體，以 Pearson correlation coefficient 比較菌株之間差異性，進行叢集分析。