

國立臺灣大學獸醫專業學院獸醫學院研究所

碩士論文

Graduate Institute of Veterinary Medicine

School of Veterinary Medicine

National Taiwan University

Master Thesis



Schwarzengrund 血清型沙門氏菌之分子分型法之比較

Comparison of Molecular Subtyping Methods for

Salmonella enterica serovar Schwarzengrund

研究生 胡崇玟 撰

Chung-Wen Hu

指導教授：周崇熙 博士

林辰栖 博士

Advisor: Chung-Hsi JiuJiu Chou, Ph.D.

Chen- Si Lin, Ph.D.

中華民國 103 年 1 月

January, 2014


致謝



進了實驗室兩年半，不論在研究或是平常生活中，都受到了大家許多的幫忙，在寫致謝的時候，千言萬語湧上心頭，感謝的話怎麼樣說都不夠。

首先要感謝連一洋老師、周崇熙老師以及林辰栖老師對我的栽培與指導。屏科大的連一洋老師在大學時期的指導，並且在我選擇研究所指導老師惶惶然時，把我引薦給了周崇熙老師。進實驗室的第一天，周老師準時九點從美國打視訊回台灣，親切的問候並安排我日後的研究，從這一天起，開始了我研究生的生涯。老師總是傾全力給予學生支持，在我有困惑不解時，老師會用生動活潑的方式說明教導，在有學習新知的機會時，老師也總是願意讓我們去學習。老師說的一句話讓我印象深刻：「進研究所不是只是學習怎麼做實驗，而是學習做事的方法。」謝謝老師給我機會，讓我待在這個像家一般溫暖的實驗室，與眾人一起處事，並精進自己；因為周老師的帶領，在這裡的這段時間，我大大的擴展了自己的眼界；也因為有活力十足的周老師，讓在實驗室的每天都充滿了歡笑，讓我們有機會到外島進行科普活動，帶領我們走出學術的象牙塔，把所學奉獻給偏鄉的孩子。同時也要感謝林老師總是二話不說的支持，因為有林老師，我才有辦法在這裡學

習。



接下來要感謝的是實驗室的大家，尤其是揚棋學長以及嘉蘭學姊。打從進實驗室就跟著揚棋學長做實驗，溫和的學長即使我出包也不會氣急敗壞的責怪，總是協助我去矯正、給我指導，盡力的給我支援。雖然我跟著嘉蘭學姊學實驗的機會較少，但是在跟著她時，我了解了實驗的每個小細節都應該精確、小心，養成良好習慣；而且在平日，大大小小的事情都可以諮詢學姊，讓初上台北的我，漸漸的穩定下來。添富學長、子昇學長、健聰、金玉、UP、MOMO、阿大、品文，也都在實驗或者行政工作上給予我很多的幫助；還有我的同學宗承、麗瓊，以及學弟妹庭維、正一、筱芙、睿穎，大家也經常在我需要時給予協助，感謝實驗室的大家庭，在這些日子以來，沒有大家的體諒、包容以及教導，我也沒辦法走到這一步。另外還要感謝淡水家衛所的春申學長以及長庚的茂成學長，因為有他們的協助，論文中的實驗以及分析才得以完成。


最後，當然要感謝我的家人，不論是遠在南部的爸爸、媽媽、阿嬤，還是同在台北的叔叔，因為有你們的全力支援，讓我可以安心的待在台北，完成學業也擴展自己的視野。

真的，非常的感謝大家。(鞠躬)

摘要



Salmonella enterica serovar Schwarzengrund 是一具有人畜共通傳染風險之血清型，相較於歐美國家，臺灣於家禽、豬隻、人類都曾經分離出高比例的 *S. Schwarzengrund*，但是在歐美國家 *S. Schwarzengrund* 卻鮮少被分離，非主要造成動物或人類疾病的血清型。本研究利用 30 株於 2000-2012 年來自鴨、寵物食品、雞、野鳥、豬、火雞等不同來源之 *S. Schwarzengrund* 菌株，因具有流行病學相關性的菌株會有相同的抗藥性表現，因此本研究中分析 30 株 *S. Schwarzengrund* 對於 Ampicillin、Cephalothin、Chloramphenicol、Gentamicin、Streptomycin、Kanamycin、Tetracycline、Oxytetracycline、Ciprofloxacin、Enrofloxacin、Nalidixic acid 以及 Sulfamethoxazole/Trimethoprim 等 12 種抗菌劑的抗藥性差異，利用抗藥性表現以及流行病學背景篩選出不具流行病學相關性的菌株，用來計算分子分型法鑑別力時。進行脈衝式電泳分析時，發現常用的 *Xba*I 限制酶分型法無法有效辨別出無流行病學相關性之菌株，進而使用 *Avr*II、*Spe*I、*Not*I、*Sfi*I、*Pac*I 等五種限制酶，觀察其對於 *S. Schwarzengrund* 的分型能力。並且進一步利用 Multi Locus Sequence Typing (MLST) 及介質輔助雷射脫附飛行時間質譜法 (MALDI-TOF MS)，評估這些方法的



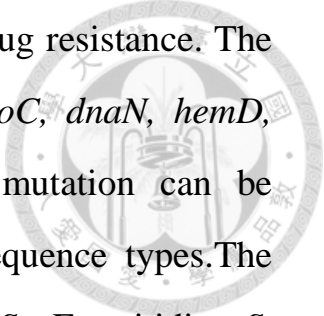
分型鑑別能力。脈衝式電泳的結果，對於不具流行病學相關之 *S. Schwarzengrund* 菌株 *XbaI* 限制酶 D 值為 0.65，*AvrII*、*SpeI*、*NotI*、*SfiI*、*PacI* 等限制酶之 D 值分別為 0.96、0.89、0.95、0.93、0.91。使用 *AvrII* 以及 *SfiI* 對於 *S. Schwarzengrund* 菌株之分型力較佳，若結合此兩個限制酶，可以使得不具流行病學相關性的菌株被成功的鑑別，推薦可使用在 *S. Schwarzengrund* 的分型。本試驗中 MLST 使用 *aroC*、*dnaN*、*hemD*、*hisD*、*purE*、*sucA*、*thrA* 等七個管家基因作為定序的目標，若有單一點突變即可予以辨別，由序列比對得知各菌株之 sequence type。MLST 結果 *S. Albany*、*S. Enteritidis*、*S. Typhimurium*、*S. Schwarzengrund* 以及 *S. Pullorum* 之 sequence type 分別為 ST292、ST11、ST19、ST96、ST92，可見 MLST 能夠成功的鑑別不同血清型，但 30 株 *S. Schwarzengrund* 皆為 ST96，因此 MLST 對於 *S. Schwarzengrund* 不具分型能力。利用 MALDI-TOF MS 雖可以將 30 株 *S. Schwarzengrund* 菌株分為 A1、A2、B、C 等 4 個群集，但同一來源之 *S. Schwarzengrund* 卻被鑑定為不同之群集，且 MALDI-TOF MS 也無法將不同血清型做區別，因此 MALDI-TOF 並不適合作為 *S. Schwarzengrund* 的親緣性鑑定。

關鍵字：Schwarzengrund 血清型沙門氏菌、脈衝式電泳、多重基因座序列分型法、介質輔助雷射脫附飛行時間質譜法

Abstract



According to previous studies confirmed that *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund can cause the risk of transmission between human and animal. It has been isolated from poultry, pigs and humans in Taiwan. *S. Schwarzengrund* had highly prevalent in Taiwan that is different from Europe and USA. This study includes 30 isolates of *S. Schwarzengrund*, from duck, pet food, broiler, wild bird, pig and turkey. These *S. Schwarzengrund* were isolated between 2000 and 2012. 30 isolates of *S. Schwarzengrund* stains were examined for resistance to ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, gentamicin, streptomycin, kanamycin, tetracycline, oxytetracycline, ciprofloxacin, enrofloxacin, nalidixic acid, sulfamethoxazole/trimethoprimand. Resistance to chloramphenicol and nalidixic acid are 100%. 7 isolates are resisting to cephalothin. Using *Xba*I restriction enzymes cannot distinguish unrelated *S. Schwarzengrund* stains so we used other restriction enzymes include *Avr*II, *Spe*I, *Not*I, *Sfi*I, *Pac*I trying to find a suitable discriminatory method for the epidemiological analysis of *S. Schwarzengrund*. The discrimination index of *Xba*I is 0.65. *Avr*II, *Spe*I, *Not*I, *Sfi*I, *Pac*I have an index of 0.96, 0.89, 0.95, 0.93, 0.91. *Avr*II and *Sfi*I have been proven to be the better restriction enzymes for the discrimination of *S. Schwarzengrund*. Combined these two enzymes can be better able to differentiate unrelated strain. We also used Multi locus sequence typing (MLST) and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). The isolates of *S.*



Schwarzengrund we used in this study are also multidrug resistance. The *Salmonella* loci selected for MLST analysis were *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *pure*, *sucA* and *thrA*. If there is a single mutation can be distinguished by the sequence and show different sequence types. The results shows that sequence type of *S. Albany*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Schwarzengrund* and *S. Pullorum* are as follows: ST292, ST11, ST19, ST96, ST92. MLST can discriminate different serotypes but the same serotype will have same sequence type so we cannot use MLST to typing *S. Schwarzengrund*. *S. Schwarzengrund* isolates could be clustered into A1, A2, B and C group. According the isolates of same outbreak would be separated in the different clusters. MALDI-TOF has been considerate to be usefulness for the epidemiological discrimination of *S. Schwarzengrund*. After compare these molecular typing methods, using multiple enzyme combination of PFGE such as *AvrII-SfiI* is the recommended method for the epidemiological analysis of *S. Schwarzengrund*.

Key Words: *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund, Pulsed field gel electrophoresis, Multi locus sequence typing, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

目錄



致謝.....	I
摘要.....	III
Abstract.....	V
目錄.....	VII
表次.....	IX
圖次.....	X
第一章 緒言.....	1
第二章 文獻探討.....	3
第一節 沙門氏菌簡介.....	3
2.1.1. 沙門氏菌特性.....	3
2.1.3. 沙門氏菌之流行病學.....	5
2.1.4. 沙門氏菌之抗藥性.....	7
第二節 <i>Schwarzengrund</i> 血清型沙門氏菌.....	12
2.2.1. <i>S. Schwarzengrund</i> 簡介.....	12
2.2.2. <i>S. Schwarzengrund</i> 流行病學.....	13
第三節 分子生物學分型方法.....	16
2.3.1. 脈衝式電泳.....	16
2.3.2. 多重基因座序列分型法 (MLST).....	19
2.3.3. 介質輔助雷射脫附-飛行時間質譜法 (MALDI-TOF).....	21
2.3.4. 分子分型法之鑑別力.....	26
第三章 材料與方法.....	27
第一節 沙門氏菌來源及鑑定.....	27
3.1.1. <i>Schwarzengrund</i> 血清型沙門氏菌來源.....	27
3.1.2. 沙門氏菌血清型之鑑定.....	27
第二節 沙門氏菌之抗菌劑感受性試驗.....	30
3.2.1 培養基配置.....	30
3.2.2 菌液濃度調整.....	30
3.2.3 瓊脂藥片擴散法.....	30
第三節 脈衝式電泳.....	32
3.3.1 試劑製備.....	32
3.3.2 菌塊製備.....	32
3.3.3 限制酶切割.....	33
3.3.4 PFGE 結果.....	34
第四節 多重基因座序列分型法.....	35
3.4.1. 萃取 Genomic DNA.....	35
3.4.2. 基因片段增幅及定序.....	35

第五節	介質輔助雷射脫附飛行時間質譜法.....	37
第四章	結果.....	38
第一節	抗菌劑感受性試驗.....	38
第二節	脈衝式電泳.....	39
第三節	多重基因座序列分型法.....	45
第四節	介質輔助雷射脫附飛行時間質譜法(MALDI-TOF).....	47
第五章	討論.....	48
第一節	抗菌劑感受性試驗.....	48
第二節	脈衝式電泳.....	52
第三節	多重基因座序列分型法.....	56
第四節	介質輔助雷射脫附飛行時間質譜法.....	59
第六章	結論與建議.....	62
第七章	參考文獻.....	64
表格.....		72
圖片.....		80

表次



Table 1. Isolates of <i>Salmonella</i> Schwarzengrund	72
Table 2. Inhibition zone for antimicrobial resistance test	73
Table 3. Conditions were used for PFGE.....	74
Table 4. Primers used for the PCR amplification	75
Table 5. Primers used for the Sequencing.....	75
Table 6. Resistant pattern of 30 <i>S. Schwarzengrund</i>	76
Table 7. Number of resistant isolates and prevalence of resistance (%) to 12 antimicrobial agents in <i>S. Schwarzengrund</i>	77
Table 8. Serotype and STs of strains used in this study	78
Table 9. The cluster of <i>S. Schwarzengrund</i> using MALDI-TOF	79

圖次



Fig 1. <i>Salmonella</i> ser. Braenderup H9812 restricted with <i>Xba</i> I	80
Fig 2. PFGE patterns of 30 stains <i>S. Schwarzengrund</i> using restriction enzyme <i>Xba</i> I	81
Fig 3. Dendrogram of <i>Xba</i> I-digested patterns of all isolates	82
Fig 4. Dendrogram of unrelated <i>S. Schwarzengrund</i> strains digested by <i>Xba</i> I	83
Fig 5. PFGE patterns of 30 stains <i>S. Schwarzengrund</i> using restriction enzyme <i>Avr</i> II	84
Fig 6. Dendrogram of <i>Avr</i> II-digested patterns of all isolates	85
Fig 7. Dendrogram of unrelated <i>S. Schwarzengrund</i> strains digested by <i>Avr</i> II	86
Fig 8. PFGE patterns of 30 stains <i>S. Schwarzengrund</i> using restriction enzyme <i>Spe</i> I	87
Fig 9. Dendrogram of <i>Spe</i> I-digested patterns of all isolates	88
Fig 10. Dendrogram of unrelated <i>S. Schwarzengrund</i> strains digested by <i>Spe</i> I	89
Fig 11. PFGE patterns of 30 stains <i>S. Schwarzengrund</i> using restriction enzyme <i>Sfi</i> I	90
Fig 12. Dendrogram of <i>Sfi</i> I-digested patterns of all isolates	91
Fig 13. Dendrogram of unrelated <i>S. Schwarzengrund</i> strains digested by <i>Sfi</i> I	92
Fig 14. PFGE patterns of 30 stains <i>S. Schwarzengrund</i> using restriction enzyme <i>Not</i> I	93
Fig 15. Dendrogram of <i>Not</i> I-digested patterns of all isolates	94
Fig 16. Dendrogram of unrelated <i>S. Schwarzengrund</i> strains digested by <i>Not</i> I	95
Fig 17. PFGE patterns of 30 stains <i>S. Schwarzengrund</i> using restriction enzyme <i>Pac</i> I	96
Fig 18. Dendrogram of <i>Pac</i> I-digested patterns of all isolates	97
Fig 19. Dendrogram of unrelated <i>S. Schwarzengrund</i> strains digested by <i>Pac</i> I	98
Fig 20. Dendrogram of unrelated <i>S. Schwarzengrund</i> strains digested by <i>Avr</i> II and <i>Sfi</i> I	99
Fig 21. Mass spectrometric profiles and dendrogram of <i>S. Schwarzengrund</i> analysis by MALDI-TOF	100
Fig 22. Dendrogram of all <i>Salmonella</i> isolates analysis by MALDI-TOF	101

第一章 緒言



沙門氏菌是一人畜共通傳染病原，不論是在醫療衛生或食品安全上都相當重要，傳染途徑主要藉由糞口路徑，人類感染沙門氏菌經常是藉由食入受汙染的食品，尤其是禽肉、雞蛋、及海鮮等(Gast, 2007)。

Salmonella enterica serovar Schwarzengrund 根據前人的研究發現它是一個會造成人畜共通傳染危險的病原，並且研究也發現到 *S. Schwarzengrund* 是少數幾種會造成侵入性沙門氏菌症 (invasive salmonellosis) 的血清型之一 (Vugia et al., 2004)，其危險性較其他血清型之沙門氏菌來得高。雖然在國外 *S. Schwarzengrund* 並不是主要造成動物或人類臨床疾病的血清型，但是臺灣對於沙門氏菌的調查中卻可以看到 *S. Schwarzengrund* 分離率相當的高，在林等人的研究中更可發現 *S. Schwarzengrund* 在市售白肉雞所分離到的沙門氏菌佔將近 50% 的分離率，並且其中多為具多重抗藥性之菌株(林等人，2008)。

有鑑於 *S. Schwarzengrund* 在臺灣不論是人類病例或者是家禽場、寵物食品等都有分離的病例，了解其流行病學的相關性就極其重要。利用分子分型法來鑑定沙門氏菌的親緣關係時，脈衝式電泳(PFGE) 被視為黃金標準，已知可以運用在沙門氏菌的不同血清型上。但是，本研究卻發現最常使用來對沙門氏菌進行切割之限制酶 *XbaI*，無法分辨不具流行病學相關性之菌株，因此本研究開始致力於尋找適合

S. Schwarzengrund 的分子分型方法。

首先因脈衝式電泳依然是目前眾所週知的黃金標準法則，因此我們仍然使用脈衝式電泳，但選擇其他已知可用來對沙門氏菌進行親緣性鑑定的限制酶，包括 *AvrII*、*SpeI*、*NotI*、*SfiI*、*PacI* 等五種限制酶，以期找出對 *S. Schwarzengrund* 能提供高鑑別力之方法。

除了脈衝式電泳之外，本研究也嘗試利用 Multi Locus Sequence Typing (MLST)，希望可以提高不同分離株之間的鑑別度。MLST 穩定、容易操作，其結果可於國際間交換比對(Torpdahl et al., 2005)，在長期的流行病學研究中被視為黃金標準法，MLST 利用保守片段的基因序列，來得到細菌的 sequence type (ST)，即使只是單一的鹼基改變也可能被判斷為不同 ST。另外再加上介質輔助雷射脫附飛行時間質譜法(MALDI-TOF MS)，MALDI-TOF MS 是一種直譜分析的方法，在臨床上已經被廣泛的使用於微生物鑑定上(Seng et al., 2010)，可以快速的鑑定細菌，使臨床醫生更快決定治療方針。在沙門氏菌研究上的運用尚不多，但 MALDI-TOF MS 因為可以找到蛋白質分子上改變的單一胺基酸(Griffin et al., 2012)，因此也可以用來作為一個親緣關係調查的工具。本研究希望可以找尋適合用於 *S. Schwarzengrund* 之分子分型方法，以提供未來對於 *S. Schwarzengrund* 之流行病學研究上的輔助。

第二章 文獻探討

第一節 沙門氏菌簡介



2.1.1. 沙門氏菌特性

沙門氏菌為一腸內細菌科沙門氏菌屬(*Enterobacteriaceae*, Genus *Salmonella*)的革蘭氏陰性短桿菌，大部分的沙門氏菌皆有周鞭毛因而具運動性，其中只有兩個血清型例外，就是會造成雞白痢的 *S. Pullorum* 以及造成家禽傷寒的 *S. Gallinum*，這兩個血清型不具有周鞭毛因此沒有運動性，而且跟其他血清型沙門氏菌不同的是，它們也不會產生硫化氫。沙門氏菌的菌體大小約為 $0.7-1.5 \times 2.0-5.0 \mu\text{m}$ ，是不會產生芽孢的兼性厭氧菌，在有氧及無氧環境下皆可行呼吸作用。沙門氏菌廣泛的存在自然界，除了會感染溫血動物、冷血動物、在環境中也可以找到沙門氏菌，因沙門氏菌可適應的溫度於 $5-45^\circ\text{C}$ 。


沙門氏菌可以發酵葡萄糖及碳水化合物，大多數的沙門氏菌都不能發酵乳糖，因可利用的糖類的不同，使用 triple sugar iron agar (TSIA) 來檢測時，在 TSIA 上會有斜紅底黃的表現，並且會有產氣的情形；沙門氏菌會產生硫化氫的特性也會在 TSIA 及 Sulfide-Indole-Motility (SIM) 上經由有無黑色的變化來觀察，另外在 SIM 上還可看出沙門氏菌之移動性。在 indole、oxidase test 的試驗中皆會呈現陰性，而 catalase test 及 lysine decarboxylase (lysine decarboxylase broth 會呈現紫色) 結

果則為陽性。

沙門氏菌屬可分為*S. enterica* 以及*S. bongori*，目前已知有2600多種的血清型(Guibourdenche et al., 2010)。*S. enterica* 又可分為六個亞種分別為：*S. enterica* subsp. *enterica* (Subspecies I)、*S. enterica* subsp. *salamae* (Subspecies II)、*S. enterica* subsp. *arizonae* (Subspecies IIIa)、*S. enterica* subsp. *diarizonae* (Subspecies IIIb)、*S. enterica* subsp. *houtenae* (Subspecies IV)、*S. enterica* subsp. *indica* (Subspecies VI)，這些亞型可利用不同的生化性狀做區分。*S. bongori*對人類無病原性，*S. enterica* subsp. *enterica*以及*S. enterica* subsp. *salamae*主要感染對象為溫血動物，其他四個亞種則為冷血動物或者存在環境中。

2.1.2. 沙門氏菌血清型鑑定

進行沙門氏菌血清型的鑑定多以 Kauffmann - White scheme 作為標準的分型方法，主要是利用沙門氏菌的體表抗原(Somatic antigen; O antigen)以及鞭毛抗原(Flagella antigen; H antigen)做分類的依據。體表抗原的成份為 Lipopolysaccharide (LPS)，存在於菌體表面，會與血清中的抗體產生凝集反應。而鞭毛抗原則可以添加福馬林來固定，使其與血清抗體進行凝集反應。一開始的體表抗原是利用字母來分群，但是因為後來陸陸續續增加 O 抗的數目，英文字母不夠用，導致 O 抗群(group)有字母跟數字夾雜併用的問題，在 2007 年 WHO 出版的



Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars 第九版中提到，將舊有的英文字母全數改成數字，也將分型方法修正為 White-Kauffmann-Le Minor scheme。H 抗原可分為第一相 (Phase I) 及第二相 (Phase II)，Phase I 會以英文字母表示，Phase II 則以數字來代表。在 White-Kauffmann-Le Minor scheme 中則提到鞭毛抗原還有 R phase，R phase 在沙門氏菌中相當少見，目前只在 WHO 的 Reference Centre 中進行此類的鑑定。

2.1.3. 沙門氏菌之流行病學


沙門氏菌每年平均在全世界造成 13 億的病例數，每年全世界平均有 3 百萬人因非傷寒沙門氏菌而死亡，在發展中國家更是造成相當多的腸胃道疾病(Coburn et al., 2007)。傷寒以及副傷寒沙門氏菌以人類為主要宿主，其他非傷寒沙門氏菌則可在種不同動物以及環境當中分離到。在美國的食媒疾病當中，統計 2000-2008 年的案例，由非傷寒沙門氏菌所造成的病例佔 11%(1 百萬人)，若提及因為食媒病而死亡的案例，非傷寒沙門氏菌更是排名第一(28%)，在英國、澳洲、美國非傷寒沙門氏菌皆為造成食媒疾病之前三病原之一(Scallan et al., 2011)。

在國外人類沙門氏菌症分離出的血清型以 *S. Enteritidis*、*S. Typhimurium* 及 *S. Newport* 血清型較常見(Bangtrakulnonth et al., 2004)



在雞隻則以 *S. Enteritidis* 為常見的血清型；許多水產品也可分離出沙門氏菌，而主要盛行的血清型為 *S. Weltevreden*、*S. Newport* 及 *S. Saintpaul*(Kumar et al., 2009)。大部分的血清型只會造成腸胃炎，但有些血清型可能會造成腸熱(enteric fever)，如 *S. Typhi*、*S. Paratyphi A* 及 *C*、*S. Sendai*，而少數非傷寒沙門氏菌如 *S. Choleraesuis* and *S. Dublin* 可能較不會使感染的動物下痢而是造成菌血症的情形。有幾個血清型則是有相當高的宿主特異性，如 *S. Choleraesuis*、*S. Abortusovis*、以及 *S. Dublin*，這些血清型大多分別感染豬、羊以及牛，*S. Arizonae* 主要之宿主則為爬蟲類動物；*S. Pullorum* 以及 *S. Gallinum* 只會在雞隻身上感染 (Fierer et al., 2001)。非傷寒沙門氏菌大多造成自限性的腸胃道感染，但是其中約莫有 5% 可能會發展成為菌血症，非傷寒沙門氏菌造成之菌血症有 12-47% 的致死率，致死率差異大與感染的菌株毒力和各國菌株抗藥性的差異有關。血清群為 D 者(如 *S. Enteritidis*) 最有可能侵入血液系統，若發展成為菌血症，在有免疫抑制疾病(如 HIV 病人)或者是老年人，會相當容易造成死亡(Dhanoa et al., 2009)。


造成沙門氏菌感染之來源相當的多，除了常見的家禽相關產品、牛奶、起司若未經適當滅菌處理，也有可能造成沙門氏菌之流行病爆發(Van Duynhoven et al., 2009)。因沙門氏菌可在環境中存活一段時間，經環境污染之蔬菜水果也可以造成沙門氏菌的感染，2006 年時美國



就發生過跨州之沙門氏菌感染事件爆發，最終發現傳染源為遭細菌污染的番茄，在這個事件當中，感染沙門氏菌的病人，主要為 30 幾歲的女性，因此雖沙門氏菌較容易侵害免疫力較弱的族群，但是根據受污染的食物不同，食用族群也會有所變化，根據流行病學事件中病人的類型，也可以協助研究人員去找到真正的感染源(Behravesh et al., 2012)。另外，因為現代社會養寵物的人變多，受污染的寵物食品也逐漸成為一個可能的感染源，寵物飼料、寵物食用的肉乾零食等都可能造成沙門氏菌感染。1999 年在加拿大曾有 *S. Infantis* 經乾燥豬耳零食造成人類的沙門氏菌感染爆發流行病學事件，2002 年於美國德州也有寵物的牛肉乾造成 *S. Newport* 感染的事件，最近一次在美國爆發的跨州沙門氏菌感染則是 *S. Schwarzengrund* 所造成，在 1 年內同一公司所生產之寵物乾飼料販賣至各處，造成了 70 幾個人類病例(Li et al., 2012)。


Jackson 等人進一步的研究了血清型與其傳播媒介之間的關係，發現如 *S. Enteritidis* 通常是造成由蛋為媒介之流行病學事件，*S. Infantis* 則多由豬肉產品所媒介。*Heidelberg*、*Enteritidis*、*Hadar* 這三個血清型的沙門氏菌則經常由蛋品、家禽分離得到，可能是因為對於家禽有良好的宿主適應性(Jackson et al., 2013)。

2.1.4. 沙門氏菌之抗藥性




最先被發現的抗生素是由黴菌所分泌，在 1928 年英國科學家 Alexander Fleming 所發現，經黴菌污染的培養皿在黴菌周圍無細菌的生長，因此推測是否此黴菌可以分泌物質使細菌無法生長，這個就是盤尼西林被發現的由來，接續的有越來越多的抗生素被找到，進一步提煉出來作為疾病治療用，在生技越來越發達的這個時代，也有許多抗生素是經由人工合成的。

抗生素之作用機制主要有以下幾類：(1)抑制細菌細胞壁的合成，細菌的細胞質濃度經常是大於細胞所在環境的濃度，若無細胞壁存在則因滲透壓差會讓水份跑進細胞內，導致細菌破裂。Penicillin 會使得組成細胞壁所需的肽聚糖無法合成，藉此破壞細胞壁使細菌死亡。 β -lactam 類的藥物多屬於此類的作用機制。(2)抑制蛋白質的合成，此類藥物會對原核細胞上的核糖體有專一性，因此可以抑制細菌蛋白質的合成，如胺基配醣體類(aminoglycosides)、巨環內酯類(macrolides)以及四環黴素類(tetracycline)皆屬於此種作用機制。(3)破壞細菌之細胞膜，例如 polymyxin B 會使得細胞膜的通透性增加，導致細菌可能因離子通道打開無法平衡細胞內外之離子濃度而死亡。(4)抑制細菌核酸合成，此類藥物作用機制為抑制細菌之 DNA 的複製或轉錄，使細菌無法增生，喹諾酮(quinolones)類藥物如 fluoroquinolones 即為抑制細菌 DNA gyrase 或 topoisomerase IV 的酵素活性，以此抑制細菌複



製。Rifampin 也是屬實此作用機制之藥物。(5)抑制細菌的新陳代謝，如 sulfanilamide 為 para-aminobenzoic (PABA)之結構類似物，因此會跟 PABA 競爭，使得原本跟 PABA 結合的酵素轉而跟藥物結合，造成無法進一步的合成葉酸，使得細菌之新陳代謝產生問題。

人類開始廣泛的使用抗菌劑治療各種疾病，但是隨著使用量的增加，以及使用範圍的增廣，抗藥性的問題漸漸浮出檯面。除了用來治療疾病，抗菌劑也被少量的添加於飼料當中作為生長促進用途，這些用於促進生長的抗菌劑稱之為 antibiotic growth promoters (AGPs)，AGPs 被使用於畜牧已經有 50 多年的歷史，雖然使用 AGPs 是可以有效的降低腸胃道感染並促進生長，使得飼養成本降低，但是長期使用 AGPs 卻使得抗藥性菌株增加，並且可能藉由一些食物媒介疾病傳播給人類(Lin et al., 2013)。歐盟於 2006 年全面禁止了 AGPs 的添加，美國也在市場機制的壓力下，逐漸減少 AGPs 的使用(Ghosh et al., 2012)。臺灣在 2005 年開始逐漸刪減可使用於飼料添加之抗菌劑，農委會於 2011 年宣布之動物用藥準則中，目前尚有 14 種藥物可添加於飼料中。抗藥性的發生主要與突變的發生以及基因水平的轉移 (horizontal gene transfer, HGT)有關，最常發生的突變多跟改變與抗菌劑接合之目標或者是增加藥物排出的速率，另外也可能經由增加製造可以將藥物修飾降解之酵素來抵抗抗菌劑。而擁有這些突變基因的細菌，因為得



以逃過抗菌劑的作用，存活後有可能將此基因利用 conjugation、transformation、transduction 等方法，將抗藥基因遺傳下去(Andersson et al., 2010)。Anderson 等人在 1960 年首度發表有關沙門氏菌多重抗藥性的問題，在美國對 ampicillin、chloramphenicol、streptomycin、sulfonamides 以及 tetracycline 的 *S. Typhimurium* 被發現於 1979 年到 1996 年已經由 0.6% 上升至 34% (Glynn et al., 1998)。Fluoroquinolone 類的藥物是治療 invasive salmonellosis 的藥物之一，但是在世界各國已經有相當多的文獻指出沙門氏菌對它產生抗藥性，這也將會造成治療的困難以及住院率的增加(Lo et al., 2012)。在今日治療 invasive *S. enterica* 感染所使用的 ceftriaxone 及 ciprofloxacin，表現 AmpC β -lactamase 的 *bla*CMY-2 基因，會造成對於廣效性 cephalosporins (如 ceftriazone) 的抗藥性增加，前人的研究發現 invasive salmonellosis、抗藥性和住院率彼此之間是有很強的關聯，也就是說抗藥性的沙門氏菌，不只會增加致病率及致死率，也會增加醫療照護的負擔(Hamilton et al., 2012)。

當人類研發更多的藥物對抗細菌，細菌也會衍生出更多的抗藥性來對抗，這是生物為了存活做出來的適應，產生突變或者是抗藥性基因的傳播都有可能使得細菌越能夠抵抗各種抗菌劑，研究指出在醫療照護場所中的細菌多具有多重抗藥性，這種情況也會越來越普遍

(Tenover, 2006)。而且一旦產生抗藥性，其可逆性相當的低，因此在使用藥物的時候，應當要謹慎以對，不濫用抗菌劑，使用對的抗菌劑並且遵照用藥時間使用。



第二節 Schwarzengrund 血清型沙門氏菌



2.2.1. *S. Schwarzengrund* 簡介

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar *Schwarzengrund* 其生化性狀與大多沙門氏菌相同，可以發酵葡萄糖但無法發酵乳糖以及蔗糖，會產氣以及酸，可以產生硫化氫在 Triple Sugar agar (TSIA) 或者 Xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar) 上看到黑色的硫化鐵。

其體表抗原為若 Poly B 的 Group O: 4(B) 其 factor 為 1, 4, 12, 27，*S. Schwarzengrund* 之鞭毛抗原 Phase I 為 factor d，Phase II 為 Factor 1,7。

S. Schwarzengrund 是最早被發現具有 fluoroquinolone 抗藥性的沙門氏菌 (Herikstad et al., 1997)，並且在泰國也有多重抗藥性的 *S. Schwarzengrund* 被發現，在泰國是經由被污染的雞肉傳染給人，而丹麥跟美國也因為進口這些家禽產品，而把這些 *S. Schwarzengrund* 給引進他們國內，造成這些有多重抗藥性的菌株在國際間散佈。

除了有多重抗藥性之外，*S. Schwarzengrund* 被發現是少數會引起 invasive Salmonellosis 的血清型之一，不同於一般的沙門氏菌感染可能只是造成自限性的腸胃疾病，若是得到 invasive Salmonellosis 是會造成生命危險，感染的病人並且通常都會需要住院，因為經常會包含菌血症等全身性的感染症狀，因此治療通常需要多種藥物併用，才有


辦法治癒，對於免疫力差的兒童、老人或者是免疫缺陷的病人更是危險，甚至是死亡的案例也是時有所聞(Vugia et al., 2004)，若是感染了多重抗藥性之 *S. Schwarzengrund*，更是加倍危險。



2.2.2. *S. Schwarzengrund* 流行病學


雖然 *S. Schwarzengrund* 在國外研究報告中並不是一個常見的血清型，但是近年來它的分離率卻逐漸提高，WHO 也提到在亞洲國家 *S. Schwarzengrund* 分離率越來越高是一個新興的需注意的血清型。在日本它的分離率就從 2000~2003 年間的 0% 提升到 28.1% (Asai et al., 2009)，泰國的研究針對人類以及其他來源做的沙門氏菌血清型調查中都發現到，*S. Schwarzengrund* 分離率有顯著的提升。1993 到 1997 年之間，這個血清型在人類病例中所佔低於 0.2%，在 2001 至 2002 年間提升為 1%。同樣的時期在雞隻的分離更是從 7.2% 攀升至 26%。不論是從雞肉食品來源、其他食品，以及人類的感染中都發現到分離率升高的情況。

造成 *S. Schwarzengrund* 的傳染主要還是經由家禽產品污染到細菌所造成，但是美國在 2006-2007 年間陸續發生了跨州的 *S. Schwarzengrund* 感染，經過調查之後發現這是因為污染的乾狗糧所造成的，這些飼料雖然是不同廠牌，但是都是經由同一個加工場所加工，然後賣到美國各地，其中大部分感染的都是小孩子。美國 CDC 因此



建議最後在接觸到這些乾狗糧之後，最好要洗手以確保安全，並且也建議不要讓五歲以下的小孩子去碰觸甚至是吃到這些飼料。在人類病例中雖較少見到 *S. Schwarzengrund*，但是美國曾經發生過一次院內感染的流行病爆發，病人所感染到的菌株也是對 fluoroquinolone 具抗藥性之 *S. Schwarzengrund*，因為在醫療照護中心普遍使用 fluoroquinolone 作為治療，因此當遇到此疫情時，反而無法將細菌有效撲滅，而這疫情也蔓延了長達 4 年之久才沒有再追蹤到新的病例。相當特殊的是，當研究者去比對當初美國疾管局所收集之近 8000 株於 1994-1998 年的沙門氏菌株，發現大多數菌株對 fluoroquinolone 皆無抗藥性，只有 1 株菌例外，而這株菌的血清型也是 *Schwarzengrund* (Olsen et al., 2001)。

在 2006~2007 年間，林等人分別從上市白肉雞與仿土雞分離沙門氏菌，針對其分離率及抗藥性進行比較。在仿土雞共分離得 345 株，其中 *S. Albany* 163 株最多，而其次為 *S. Schwarzengrund* 分離到 90 株。白肉雞的部份共得 225 株，其中 *S. Albany* 45 株，*S. Schwarzengrund* 50 株與 *S. Enteritidis* 43 株，三者分離數相近，*S. Schwarzengrund* 為白肉雞分離株中數量最多之血清型。二雞品種之分離株多有抗藥性且為多重抗藥性，而仿土雞較白肉雞嚴重(林等人, 2008)。另外，在 2008~2009 年對白肉種雞場的調查，可以看到 *S. Schwarzengrund* 的陽性率為



11.1%，也相當的高(蔣等人，2010)。周等人曾於 1998-1999 年間對臺灣不同年齡肉雞進行研究，其中於白肉雞分離的沙門氏菌以 *S. Schwarzengrund* 最多，佔 57.5% (23/40) (周等人，2001)。臺灣人類感染沙門氏菌血清型的調查，在 1998~2002 間的病例中，*S. Schwarzengrund* 也是排名前五名的血清型，可見在臺灣的人類沙門氏菌病例中也常見 *S. Schwarzengrund* 的出現(Lauderdale et al., 2006)。臺灣不論是在家禽場或者是人類感染的病例中，都發現到 *S. Schwarzengrund* 是一個常見的血清型，與其他國家相比是很特殊的情況。

第三節 分子生物學分型方法




細菌可以利用其表現型(phenotype)跟基因型(genotype)做分型，表現型包含菌落外觀、生化性狀、抗藥性、血清型等等，但是有時細菌的基因有了改變，不一定會反應在表現型上，就如同有抗藥性基因存在也不一定會有抗藥性的表現，因此當我們在流行病學調查時，仍然需要利用細菌的基因型作為參考，來判斷菌株間的親緣關係。現今分子生物學的進步，提供更多的知識以及更便利的鑑定技術，讓我們可以利用分子生物學的方法，去鑑定細菌基因型態的差異。

分子分型法可以被用來辨別疾病爆發之間的相關性、偵測院內感染的病原、偵測感染源、監測疫苗的計畫等等。一個好的分子分型方法應該要可以被廣泛的使用，並且具有高的鑑別力，以及也應需要具備高再現性(Olive et al., 1999)。目前常見的分子分型方法包括：脈衝式電泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)、核糖體分型(Ribotyping)、隨機增幅多型性 DNA (Randomly amplified polymorphic DNA analysis, RAPD)、重複序列 PCR (Repetitive sequence-based PCR, REP-PCR)、多重基因座序列分型法 (Multi Locus Sequence Typing, MLST) 等等。


2.3.1. 脈衝式電泳

美國疾管局在 1996 年建立了食因性疾病實驗室分子分型監測網，



簡稱 PulseNet，訂定標準化的脈衝式電泳方法，讓各地的實驗室進行 PFGE 後將結果傳送至資料庫，根據圖譜的分析，美國疾管局有機會可以更加迅速的找到食因性疾病爆發流行的事件。因成效顯著，各國紛紛開始推動，在網路的協助下，最後促成了國際性的合作，催生了 PulseNet International。在這些國際性的食因性疾病調查中，皆推崇脈衝式電泳為目前分子分型的黃金標準法，脈衝式電泳可以利用來做跨國的研究調查，除了它鑑別能力佳以外，也因為跟一般以 PCR 作為基礎的分子分型法不同，脈衝式電泳不會輕易的被 PCR 機型、試劑、技術純熟度等差異所影響，其結果相當穩定，可以在不同實驗室甚或國際間進行比較。臺灣疾管局在 2002 年即開始派員前往美國進行技術的學習，在 2006 年建立細菌傳染病分子分型監測網，簡稱台灣剝絲網(PulseNet Taiwan)，此網站主要目的有以下幾點：首先要進行食因性疾病監測，尤其沙門氏菌感染經常為散發的情形，若無一個集中分析的機制，很難發現是否為一個流行病學事件；再者是希望建置臺灣自己本地的細菌性傳染病病原 DNA 指紋圖譜資料庫，除了做病原監測，若未來有外來菌株引入，也可以藉此做比較及研究；第三則是臺灣有此平台以後可以與國際接軌，在防疫上互相交流與協助。(邱等人，2007)

脈衝式電泳的原理為利用電場方向改變，使 DNA 在膠體間泳動，



此方法一開始由哥倫比亞大學 Schwartz 與 Cantor 所建立，後續再經由不同科學家的努力，發展至今有了穩定的技術與儀器，而此方法也可以運用在不同的微生物之上。一般電泳只有單一方向的電場，而且分子大於 30kb 則其泳動速度相差不大，難在電泳膠中分離出可供分辨的條帶，但是脈衝式電泳藉由電場方向的變換與脈衝時間的改變，即可以讓不同大小分子的泳動速度有所差異，再加上長時間的電泳，最後可以得到能夠作為研究分析的圖譜。因為電泳時間長，會造成緩衝液溫度上升，因此進行脈衝式電泳時通常會將溫度控制在 14°C，並且緩衝液溫度較低時，電泳速度慢，會使得結果的條帶較細。

脈衝式電泳利用限制酶來將完整的細菌 genomic DNA 切割成較小的片段，不同的限制酶會辨認不同的序列做切割，依據菌種的不同，適用的限制酶也會有所改變，在沙門氏菌最常使用的限制酶為 *XbaI*，目前已知可以被廣泛的運用在不同沙門氏菌血清型。但是，在 Zheng 等人的研究中也指出，發現利用原本的限制酶對 *Salmonella Enteritidis* 鑑別力不足 (Zheng et al., 2011)，因此可以看出雖然 *XbaI* 為沙門氏菌的脈衝式電泳的首選限制酶，但沙門氏菌血清型數量太多，還是可能沒辦法適用於每種血清型的分型上。Tenover 在 1995 年提出，利用條帶數差異去鑑定其流行病學關係，若是條帶數目及分子量大小皆相同者，分離株則具有相同的基因型，菌株可能是來自於同一個流行病學

事件。若條帶差異在四到六條之間，則之間的基因型可能是相關的 (Tenover et al., 1995)。脈衝式電泳被認定在有疾病爆發時，是一個相當重要的分型工具，可以協助調查菌株之間的親緣性關係，但是這只是一個工具，PFGE 圖譜相同不能同等於具流行病學相關性，還需要配合流行病學背景的調查，才能斷定是否為同一個流行病學事件。

2.3.2. 多重基因座序列分型法 (MLST)

多重基因座序列分型法由Maiden在1998年被發展出來，MLST是從多位點酵素分析法(Multilocus enzyme electrophoresis, MLEE) 發展過來，MLEE是分析澱粉膠體電泳 (starch gels electrophoresis)上 housekeeping enzymes的差異，來對細菌做分型。但是當時代進步，定序的技術有了長足的進步，可以穩定又快速的進行定序，而且MLEE的結果難以在實驗室之間進行比較，於是MLST便取代了MLEE，以定序結果在不同實驗室間比較，較為可行且穩定，可以取代其他及使用同樣條件進行還是會有不同結果的分子分型方法(Maiden et al., 1998)。MLST的原理是去找細菌的七個管家基因(housekeeping gene)做定序然後分析，因為管家基因是保守片段，不會輕易的在演化過程中丟失或有巨大的改變，因此可以偵測的到。因為整段基因都進行了定序，在基因序列中有一個鹼基的差異，也會被視為是不同的 sequence type (ST)。每個基因都會有自己的對偶基因型(allele type)，

將七個基因的結果組合以後就能夠獲得這個細菌的 allelic profile。

MLST是分析管家基因，這些基因片段的變化較少，如果是短期可能看不出差異，因此它較適合做長期的流行病學調查或細菌演化的研究 (Harbottle et al., 2006)。

Neisseria meningitidis、*Staphylococcus aureus*、*Yersinia pestis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Vibrio cholerae*、*Campylobacter jejuni* 等細菌都被證實可以使用MLST進行流行病學分型。已知報告中學者使用了16sRNA、*pduF*、*glnA*、*manB* 基因作為沙門氏菌MLST的目標基因，定序此四個基因來分型，並與脈衝式電泳做比較。因為MLST能夠分析單一鹼基的差異，在造成食物媒介性的流行病病菌調查中，可以比PFGE具有更佳的鑑別力，因為PFGE是利用各個片段大小去判斷，但是同樣大小的片段，卻有可能包含了不同的基因序列在其中，這是使用PFGE無法鑑別的，但若是利用MLST的話就可以一窺其中改變的序列，因此前人的研究顯示了MLST有其作為取代PFGE成為主要的流行病學分子分型法。(Kotetishvili et al., 2002; Nemoy et al., 2005)。此方法也具有高的再現性，並且操作較PFGE更為簡易快速，所得結果亦可在實驗室間進行比較，是一個很好的流行病學調查的工具。

MLST優勢為具有相當高的再現性，但是若菌株之間的來源過於相近，可能會導致其鑑別力反而低於脈衝式電泳(Torpdahl et al., 2005)。後續研究者嘗試去增加更多個基因的分析，來提高整體的鑑別力。

目前全球適用之沙門氏菌MLST所選用的七個管家基因如下，是由*S. Typhi* CT18之全基因中所篩選得來(Kidgell et al., 2002)，括弧內為此基因所調控之生理功能：

aroC (chorismate synthase)

dnaN (DNA polymerase III beta subunit)

hemD (uroporphyrinogen III cosynthase)

hisD (histidinol dehydrogenase)


purE (phosphoribosylaminoimidazole carboxylase)

sucA (alpha ketoglutarate dehydrogenase)

thrA (aspartokinase+homoserine dehydrogenase)


另外，除了作為流行病學研究之外，MLST也有望可取代目前使用的抗血清分型方法，Achtman等人收集4257株沙門氏菌，包含554個不同的血清型，進行MLST的試驗。用抗血清來鑒定沙門氏菌血清型仍是目前各國所通用的方法，也是目前被承認的標準法，但抗血清價格昂貴又需小心保存，若是一個實驗室要常備多種抗血清，實在不容易，而使用MLST除了可以作為血清分型，同時也能夠進行流行病學之分析，但這需要大量的資料庫作為後盾，才能在未來使用MLST的方式進行比對血清型(Achtman et al., 2012)。

2.3.3. 介質輔助雷射脫附-飛行時間質譜法 (MALDI-TOF)




介質輔助雷射脫附-飛行時間質譜法 (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF) 是一種質譜分析法，質譜儀的作用原理就是將待測物轉成氣態離子型態，由質譜儀利用電場或是磁場來測量這些帶電離子荷質比 (mass/charge, m/z)，將所得的結果由電腦進行分析。質譜儀的主要組成有進樣區、能量源、質量分析器、帶電離子偵測器以及後端進行訊號處理的系統，為了防止分析樣本的離子與氣體碰撞，導致分析結果不穩定或受到影響，質譜儀內需維持真空狀態。MALDI-TOF 一開始是由 Tanka 在 1987 年以鈷金屬粉末(300A)混合甘油作為基質，然後脫附游離出分子量上萬 Da 的蛋白質分子。之後由 Hillenkamp 發展出利用有機酸做基質，可成功的偵測到高達十萬 Da 的蛋白質分子。後人因使用有機酸較為便利而且靈敏度高，因此便沿用此方法，而不再利用鈷金屬粉末做基質。

MALDI-TOF 與平常的質譜儀的差異在於，要分析的蛋白質分子或是細菌樣本只取少量，與許多的介質做結合，介質溶液如 sinapinic acid 或 α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid，不同的介質可吸收的能量波長不一樣，因此依照不同的待測物來選擇介質。將此待測物與介質的混合溶液置於樣本盤上風乾，成為固態分子之後放入真空狀態的儀器內部，以雷射光作為能量，激發固態分子成為帶電荷的氣態離子。以往的質譜儀技術只能分析小的蛋白質分子，因為要將分子變成氣態離



子需要給予能量，但是若是分子量較大的蛋白質，給予低能量無法成為氣態離子，給予足夠的能量之後分子則容易斷裂分解，也沒辦法得到整個完整的分子，會造成過多雜訊干擾。利用小分子介質作為輔助有幾個用途，可以讓蛋白質分子在介質中均勻的分散開來，並且吸收雷射光的能量。蛋白質分子若是直接受到能量衝擊會容易被打成碎片，但是在介質的保護之下，是由介質吸收能量在轉給蛋白質分子，少了直接的衝擊。介質另外一個用途是協助將氣態蛋白質變成質子化的蛋白質，也就是帶有正電荷的離子，這樣才能夠被儀器給偵測到這些離子的荷質比，以此結果推算蛋白質分子的質量。介質與樣本的比例差異大，在介質中只需要混入少量的樣本即可，若是樣本比例過大，反而容易做不出結果。

MALDI-TOF 近年來在臨床醫療上被廣泛的運用，因可以利用它作為快速鑑定細菌的工具。不同樣本需要使用的波長與介質也不同，分析細菌時可用的介質有以下幾種：3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid、sinapic acid、2,5-dihydroxybenzoic acid (Hsieh et al., 2008)。依據 MALDI-TOF 的結果，比照資料庫，能夠迅速鑑定細菌種別，一次可操作的菌株量大，在臨床上可以作為一個治療的參考。Neville 等人的研究，發現若是以現今臨床微生物實驗室鑑定的方法計算成本，因不同細菌所需之套組、培養基不同，成本約為 1.55~31.76 澳元不等



(約台幣 42~860 元)，若使用自動化鑑定系統成本約台幣 270 元，但是利用 MALDI-TOF 成本則約為台幣 13 元。除了省下大量成本，鑑定時間可以縮短到 30 分~1 小時，若是以原本的方法培養到鑑定出來可能需時一到兩天(Neville et al., 2011)。因為 MALDI-TOF 的簡便與時效性佳，學者們進一步的研究是否可以利用這個技術來偵測具抗藥性菌株或者特殊的血清型來協助臨床疾病診治。在非洲 Multidrug-resistant typhoid fever (MDRTF) 疫情嚴重，因多重抗藥性菌引起的傷寒在非洲爆發疫情，尤其對於五歲以下的小孩更是造成嚴重傷亡。在肯亞，MDRTF rate 於 20 年間從 5% 攀升到 77.2%。雖然大部分的菌種可以與之鑑別，但是有一兩種菌也會產生硫化氫，很容易與之混淆，再加上血清型判定需要較長的時間，因此研究利用 MALDI-TOF 的方法，可以分別出 Typhi 以及其他的血清型，使診斷以及治療的流程加快(Kuhns et al., 2012)。經由不同軟體以及蛋白質之比較，不同血清型會有特定的 peak 出現，而所有的沙門氏菌都出現 m/z 10381，推斷為 ribosomal protein L17 的表現，其中只有 *S. Gallinarum*、*S. Pullorum*、*S. Schleissheim* 三個血清型不會在此荷質比出現 peak；在 Typhimurium、Enteritidis、Virchow、Infantis 及 Hadar 五個於德國最常見之血清型，可以 100% 的經由 MALDI-TOF 分辨，使用的辨別方法如在 m/z 7097 會有 signal 的情形，大多為 Typhimurium，

其他血清型在此蛋白質顯示出的荷質比為 7111，但是 Typhimurium 因為此蛋白質有單點的突變，從 Lysine 變成了 Asparagine，也就造成荷質比的差異(Dieckmann et al., 2011)。



一般大腸桿菌與 O157 在一般培養時分不出來，若要進行血清型的判斷出來要花很多時間，但是利用 MALDI-TOF 就可以從其質譜結果上看出差異(Mazzeo et al., 2006)。研究也發現可利用 MALDI-TOF 去找出 Vancomycin-Resistant *Enterococci* (Griffin et al., 2012) 或者 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 等具有抗藥性的菌株，在一開始就能夠判定是具有抗藥性的情形下，用藥即可避開這些藥物，讓治療不會延遲。利用 MALDI-TOF 可以使得負責擬定治療流程的醫療人員更快速並且正確的進行給藥。因為早期正確用藥，使得病患的住院時間減少，利用抗菌劑的時間跟著減少，所以也讓長期使用抗生素的一些缺點減少，如長期用藥、越用越多種藥物，就越會有藥物的交互作用，還有藥物本身的副作用也會比較輕微；一些二次感染的情形也連帶的減少；還有也較不容易發生抗藥性的問題(Tamma et al., 2013)。此技術因為也可以偵測到點突變，胺基酸改變，會導致荷質比的變化，因此在沙門氏菌血清型的判定以及流行病學的監測上，都可以有所用處(Barbuddhe et al., 2008)，MALDI-TOF 的操作時間短，只要將樣本做適當的處理，可以快速鑑別同一流行病爆發事件之葡萄

球菌，並且加速疾病調查的流程，也有潛力作為進一步流行病學調查的工具(Bernardo et al., 2002)。



2.3.4. 分子分型法之鑑別力

進行一個分子分型法的優劣判定，會去評估其鑑別力。鑑別力可使用以下公式計算：

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

D值為鑑別力，N代表的是所有的菌株數， n_j 代表的是呈現出j型態的菌株數。D值最大為1，代表的就是此分型方法可以將所有的不具流行病學相關的菌株鑑別出來，如有一百株就分出一百種型別。一般而言若是一個有好的鑑別力的方法其D值應大於0.9，但前提是使用作為分析的菌株應為不具流行病學相關的，才能正確的算出D值(Hunter et al., 1988)。

第三章 材料與方法

第一節 沙門氏菌來源及鑑定



3.1.1. Schwarzengrund 血清型沙門氏菌來源


本研究當中使用的沙門氏菌包含了30株於2000-2012年來自鴨、寵物食品、雞、野鳥、豬等不具流行病學相關的 *S. Schwarzengrund*，詳細菌株資訊如 Table 1。其中 15 株 *S. Schwarzengrund* 是由國立嘉義大學郭鴻志教授分讓，6 株是由國立中興大學陳德勛教授實驗室分讓。另外還有用來跟 *S. Schwarzengrund* 比較的四個不同血清型的沙門氏菌各兩株：兩株來自不同種雞場的 *S. Albany* 臨床分離株；*S. Enteritidis* 包含一株標準菌株(ATCC13076)，一株為分離自孵蛋機的臨床分離株；*S. Typhimurium* 標準菌株 ATCC23566 以及分離自中止蛋的菌株；還有 *S. Pullorum* 標準菌株 BCRC15464 以及採自烏骨雞場的臨床分離株各兩株。

3.1.2. 沙門氏菌血清型之鑑定

所使用之 *S. Schwarzengrund* 菌株實驗前會再進行完整的血清型鑑定，以確保是 *Schwarzengrund* 血清型。鑑定方法遵照 White-Kauffmann-Le Minor scheme 完成血清型鑑定。

1. 體表抗原（O 抗原）檢測

待測菌株繼代至 Tryptic Soy Agar (TSA; Difco, USA)，37 °C




培養 18 小時。取配置好的 O Antiserum Poly A-I & Vi (Difco, USA)，取 2-3 μ l 滴於乾淨玻片上，用滅菌牙籤取一單一菌落與抗血清混合，1 分鐘內若出現細沙狀之沈澱及判定為陽性，若超過 1 分鐘則為偽陽性。若 Poly A-I & Vi 顯示為陽性繼續檢測是否為 Poly B、Group O: 4(B)其 factor 為 1, 4, 12, 27，此為 *S. Schwarzengrund* 之體表抗原。

2. 鞭毛抗原 Phase I 檢測

將菌株繼代於 TSA 之後，取單一菌落至 3.5 ml 之 Tryptic Soy Broth (TSB; Difco, USA) 培養於 37 °C 培養 18 小時。取氯化鈉 8.5 g 溶於 1000 ml 二次水中，以 121 °C 滅菌 15 分鐘製成 0.85% NaCl，冷卻至室溫，添加 37% 福馬林溶液 6 mL，即為固定鞭毛抗原所需的 0.6% Formalin Saline，保存於室溫下。待 TSB 培養 18 小時候在養菌管中加入 3.5 ml 0.6% Formalin Saline，放置於 50 °C 水浴槽中一小時。將 *Salmonella* H Antiserum Poly A-PolyE (Difco, USA) 各取 0.5 ml 於試管內，加入等量已固定鞭毛之菌液，置於 50 °C 水浴槽中，每 10 分鐘觀察一次，操作需小心不要劇烈搖晃以免產生偽陽性，若在試管中見到棉絮狀之凝集，則可判定為陽性。觀察需在 1 小時內完成，超過後出現之凝集判定為偽陽性。

S. Schwarzengrund 之 Phase I 為 factor d。

3. 鞭毛抗原 Phase II 檢測



配置含 0.3% Agar 之 TSB，取 3 ml 置於試管中與 *Salmonella* H Antiserum Single Factor d 抗血清 0.5 ml 混合，並用滅菌剪刀取適當長度之塑膠無菌滴管放置於試管內，待其凝固後以接種針挑取單一菌落於滴管內之培養基表面，放置於 37 °C 培養箱內培養，每兩小時觀察一次。待細菌由滴管生長至外面，約於培養基表面下 2-3 mm，將菌用接種針取出培養於 3.5 ml TSB 中，於 37 °C 培養 6-8 小時。後續步驟同 Phase I，檢測出 *Salmonella* H Antiserum Single Factor 1,7 陽性即可確定為 Schwarzengrund 血清型。

第二節 沙門氏菌之抗菌劑感受性試驗



3.2.1 培養基配置


進行抗菌劑感受性試驗之培養基需使用 Muller-Hinton agar (Difco, USA)，經過 121°C、15 分鐘、1.5 大氣壓之高溫高壓滅菌後，待其冷卻利用 pipet-aid 加入直徑 15 公分之培養皿中，加入 80 ml 之 Muller-Hinton agar，使其培養基厚度均為 5 mm。進行感受性試驗之培養基應於當天新鮮配置。

3.2.2 菌液濃度調整

前一晚先行培養所需使用之菌株於 TSB 中，菌液需調整成 0.5 McFarland 之濃度。因使用目測之差異大，因此利用分光光度計作為測量濃度之工具，0.5 McFarland 濃度的菌液在波長 600 nm 時之 OD 值約為 0.08-0.1。測量原菌液濃度後，利用 TSB 作為稀釋將菌液濃度調整到 0.5 McFarland standard。

3.2.3 瓊脂藥片擴散法

取已調整好濃度之菌液 300 μ l 均勻散佈至 Muller-Hinton agar 上，並以無菌棉棒將菌液均勻塗抹於 agar 上。實驗所用之抗菌劑藥片 (Oxoid, USA)，包括 Beta-lactam 類的 Ampicillin (10 μ g, AMP10) Cephalothin (30 μ g, KF30)，Phenicols 類的 Chloramphenicol (30 μ g,



C30) , Aminoglycosides 類的 Gentamicin (10 μ g, CN10) 、 Streptomycin (10 μ g, S10) 、 Kanamycin (30 μ g, K30) , Tetracycline 類的 Tetracycline (30 μ g, TE30) 、 Oxytetracycline (30 μ g, OT30) , Quinolone 類的 Ciprofloxacin (5 μ g, CIP5) 、 Enrofloxacin (ENR) 、 Nalidixic acid (30 μ g, NA30)以及 Sulfamethoxazole/Trimethoprim (1.25/23.75 μ g, SXT25) 。 共計 12 種藥片 。 將藥片放入 Disk Dispenser (Oxoid, USA) , 使用 Disk Dispenser 將藥片貼於塗好菌液之 Muller-Hinton agar 上 , 於 37 °C 培養 18 小時 。 測量抑菌圈直徑 , 判讀菌株是否具抗藥性或者為敏感性(如 Table 2.) 。

第三節 脈衝式電泳



實驗主要根據 PulseNet USA 的沙門氏菌脈衝式電泳標準流程，並依照實驗需求進行些許調整(CDC, 2010)。使用 *XbaI*、*AvrII*、*SpeI*、*SfiI*、*PacI*、*NotI* 等六種限制酶(Zheng et al., 2007)。


3.3.1 試劑製備

泡製所需量之 Tris-EDTA (TE buffer)、Cell suspension buffer (CSB)、cell lysis buffer (CLB)以及 0.5X TBE buffer。

取 10 ml pH 8.0 的 1M Tris 和 2 ml 0.5M EDTA (pH 8.0)加入 DDW，配製成 1L 的 TE buffer；100 ml 的 CSB 配製方法為在 DDW 中 10 ml 1M Tris (pH 8.0)及 20 ml 0.5M EDTA (pH 8.0)。25 ml pH 8.0 的 1M Tris、50 ml 0.5M EDTA (pH 8.0)以及 50 ml 10% Sarcosyl 稀釋於 DDW 中，配製成 500 ml CLB。取 5X TBE buffer (Protech, Taiwan)用 DDW 稀釋 10 倍，泡製成 0.5X TBE buffer，即為電泳緩衝液。

3.3.2 菌塊製備


將欲進行試驗之菌株接種於 TSA 上，於 37 °C 培養箱培養 18±2 小時。Pulsed Field Certified Agarose (BIO-RAD, USA) 0.15g 加入 15 ml TE buffer 中，微波煮沸後放入 56 °C 水浴槽降溫備用。使用 10 µl 鈎菌環取足夠之菌量到 500 µl CSB 內，混合均勻後抽取 100 µl 至 900 µl CSB 內，測量菌液於波長 600 nm 時之吸光值。400 µl OD₆₀₀ 值為



1.2 之菌液加入 20 μ l proteinase K (QIAGEN, Germany)輕彈離心管使混合均勻，取 400 μ l 1% Pulsed Field Certified Agarose 與菌液混合均勻後注入膠模，待其凝固。在 15 ml 離心管中加入 25 μ l proteinase K 及 5 ml CLB，將已凝固之菌塊推入。確定菌塊皆在液面下，放入 56 °C 水浴槽水浴 2 小時，約半小時手動震盪一次。同時進行二次水以及 TE buffer 的預熱。將菌塊撈出依照不同菌株放在 Screened Caps (BIO-RAD, USA)上，放入雜交管後以 56 °C 轉速 60 rpm 清洗菌塊 15 分鐘，先用二次水清洗兩次，再以 TE buffer 用同樣條件清洗四次。清洗好之菌塊放入裝 1 ml TE buffer 的微量離心管中，保存於 4 °C 冰箱。

3.3.3 限制酶切割

以滅菌過二次水 180 μ l、NEBuffer 20 μ l (New England Biolabs, UK) 之比例先調配好預切割液，不同限制酶有相對應適合之 NEBuffer，*Xba*I、*Avr*II、*Spe*I、*Sfi*I 皆為使用 NEBuffer 4，*Pac*I 使用 NEBuffer 1、*Not*I 使用 NEBuffer 3。每個菌塊放入 200 μ l 預切割液，37 °C 水浴 20 分鐘。將菌塊撈起並擦乾後放入含限制酶、BSA 2 μ l (New England Biolabs, UK)、 NEBuffer 20 μ l 以及滅菌二次水之 200 μ l 溶液，確認菌塊沒入溶液當中，37 °C 水浴 3~4 小時。取 1 g Pulsed Field Certified Agarose 加入 100 ml 0.5X TBE buffer，加熱沸騰使粉末均勻溶解，放



入 56°C 水浴槽降溫。降溫後之 Pulsed Field Certified Agarose 倒入鑄膠模，靜置待其凝固。取 2300 ml 0.5X TBE buffer 灌入電泳槽中，打開幫浦固定在流速 70，確認管線中無氣泡後打開預冷機，讓 TBE buffer 降溫至 14 °C。消化好之菌塊取出放至 200 µl 0.5 X TBE buffer 內靜置 5 分鐘。將菌塊取出吸乾殘留液體之後放入尺梳移走的孔洞中，確定無氣泡殘留。Marker 使用 *Salmonella enterica* serovar Braenderup (ATCC® BAA664™)，並用 *Xba*I 限制酶切割。

使用機器為 CHEF Mapper® XA System (Bio-Rad, USA)，條件設定參考 Zheng 等人的研究 (如 Table 3.)，其中 *Avr*II 與 *Bln*I 為不同廠商所出之限制酶，是相同切位的異構酶。進行脈衝式電泳的時間經過測試，發現 19 小時皆已足夠，不需跑到 20.5 小時，因此稍作調整。

3.3.4 PFGE 結果

GelStar™ Nucleic Acid Stain (Lonza, USA) 40 µl 加 400 ml 0.5X TBE buffer 混勻，電泳膠取出放入，染色 20 分鐘後以 ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad, USA) 紫外光顯像，照相並存檔。使用 Bionumerics 軟體 (Bio-Rad, USA; 第 7.1 版)，樹狀圖建立是以 Dice coefficient of similarity 以及 unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) 來進行運算，分析條件設定為 band tolerance 1.5 及 optimization 為 1% (Ngoi et al., 2013)。

第四節 多重基因座序列分型法



3.4.1. 萃取 Genomic DNA

使用 DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Germany)，將菌液以 5283 xg (本試驗使用 Eppendorf 5424R 離心機，該離心機轉速顯示為 7500 rpm) 離心 10 分鐘後棄上清液，加入 180 μ l ATL 溶液，將 pellet 與溶液混合均勻。再加入 20 μ l proteinase K，混合均勻，靜置於室溫下 3 分鐘。加入 200 μ l AL 溶液混合均勻。加 200 μ l 100 % 酒精(Merck, Germany)混合均勻。將管內溶液吸取置於 column 中，以 6010 xg (8000 rpm) 離心 1 分鐘，棄 Collection tube 中溶液。加 500 μ l AW1 溶液，以 6010 xg (8000 rpm) 離心 1 分鐘。換一個新的 Collection tube 後，加 500 μ l AW2 溶液以 18407 xg (14000 rpm)離心 3 分鐘，換一個新的微量離心管。加 50 μ l AE 溶液，以 6010 xg (8000 rpm) 離心 1 分鐘，微量離心管內為 DNA。抽取之 DNA 放置於 -20 °C 中保存。

3.4.2. 基因片段增幅及定序

選用以下 7 個管家基因作為 *thrA*、*purE*、*sucA*、*hisD*、*aroC*、*hemD*、*dnaN*，引子對如 Table 4。七個基因之 PCR 條件皆為 94 °C 10 分鐘(initial denaturation)，94 °C 50 秒 (denatruation)、57 °C 50 秒 (annealing)、72 °C 50 秒 (extension)進行 25 個增幅循環，72 °C 五分鐘 (final extension)，最後維持於 4 °C 保存。配置 1.5 % 電泳膠，並加

入 10000 倍稀釋之 Cyber green (Genomics, Taiwan)，以 100V 進行 60 分鐘電泳，電泳結束後直接以紫外光顯像，照相並存檔。確認產物大小無誤之後將產物進行定序(委託基龍米克斯生物科技有限公司進行)。利用 MLST Databases at the ERI, University College Cork 網頁 (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>) 進行序列之比對。序列比對後得到個別菌株的基因對偶基因型別，再利用對偶基因型別去對照得到 Sequence type。



第五節 介質輔助雷射脫附飛行時間質譜法

本部分試驗工作委託林口長庚醫院檢驗醫學科協助進行。實驗前需先進行菌株培養，挑選共26株*S. Schwarzengrund*以及四個血清型各兩株進行試驗。其中4株*S. Schwarzengrund*菌株並無運用於其他分型方法當中，因此之後不列入比較，將結果以菌株A、B、D、E表示。編號20-23、25、26、28、29等8株菌因有其他相同來源的*S. Schwarzengrund*菌株已送分析，便無委由長庚醫院另進行試驗。

本實驗使用之機器為Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)，取單一菌落放置於樣本盤上，加上1 μ l 介質溶液，此介質溶液為50% acetonitrile中包含1.5 mg α -cyano-4-hydroxycinnamic acid及2.5% Trifluoroacetic acid (TFA)。介質溶液與菌落混合後待其乾燥，將樣本盤放入質譜儀內，等待質譜儀內部進行抽真空。質譜儀內環境形成真空後，使用波長337nm之氮氣雷射，讓樣本離子化，質譜儀內部有正電荷離子之接受器，接收結果之後可利用ClinProTools software (Bruker Daltonics)進行每個 peak 之定位與分析。

第四章 結果

第一節 抗菌劑感受性試驗



對於 30 株 *S. Schwarzengrund* 進行 12 種抗菌劑感受性試驗之個別結果如 Table 6。可以見到這些菌株皆具有多重抗藥性，最嚴重的甚至對於其中 10 種藥物都產生抗藥性。種雞場 B 場、K 場、Q 場之菌株有不同的抗藥性型態，寵物食品、鴨場、野鳥來源、火雞、豬隻等菌株之抗藥性型態也有所不同，但若是於同一來源所分離之菌株就會呈現出相同的抗藥表現，藉由抗藥性表現差異，排除具流行病學相關性之菌株，選擇出 15 株流行病學不相關的菌株，用來計算脈衝式電泳鑑別效果。

其中所有的 *S. Schwarzengrund* 都對 nalidixic acid 以及 chloramphenicol 產生抗藥性，菌株對 streptomycin 之抗藥性也相當嚴重，有 29 株菌皆對 streptomycin 產生抗藥性，而對 cephalothin 和 kanamycin 產生抗藥性之菌株較少，只有 23% (7 株菌)。其餘抗生素之抗藥性比例如下：ampicillin 為 60%、ciprofloxacin 及 enrofloxacin 為 30%、gentamicin 為 77%、tetracycline 以及 oxytetracycline 皆為 70%、sulfamethoxazole/ trimethoprim 為 83%，整理抗藥性比例如 Table 7。

第二節 脈衝式電泳



以 *Salmonella* ser. Braenderup H9812 作為 marker，此為國際之標準對照，使用 *Xba*I 限制酶切割，使用 1% Pulsed Field Certified Agarose 並使用 0.5X TBE buffer，電泳時間為 18 到 19 小時，維持在 14 °C，Included Angle 為 120°，6V/cm，所得結果如 Fig1。

以 *Xba*I 限制酶所切割之 *S. Schwarzengrund* 電泳圖譜如 Fig 2a 及 2b，利用肉眼判斷可以見到即使是不具流行病學相關之菌株，仍然會有相同的圖譜。若以 Tenover 所述之脈衝式電泳結果標準分析來看，這些菌株之基因型皆為關係密切甚至是相同，*S. Schwarzengrund* 菌株條帶差異最多在 2-3 個條帶。經由軟體分析之親緣關係樹狀圖如 Fig 3。可以看到有許多菌株其分型相同，包含來自寵物食品、白肉雞、豬場、流浪狗、火雞共 12 株菌全部為同一分型。放入作為 marker 之標準菌株 H9812 一起比較，作為對照，確認其分型相同實驗無誤。在 Fig 3 中所顯示的為所有菌株之脈衝式電泳結果，包含 *S. Schwarzengrund*、*S. Albany*、*S. Enteritidis*、*S. Typhimurium* 以及 *S. Pullorum*，可以見到同一血清型之間的基因型較相似，因此所呈現之圖譜也會有相近之親緣關係。在計算 discrimination index (D)時須使用不具流行病學相關之菌株，因此根據抗藥性結果以及菌株來源背景，將具有流行病學相關性之菌株刪除，留下 15 株 *S. Schwarzengrund* 菌進行 D 值計算。15

株菌之親緣樹狀圖如 Fig 4。從這張圖可以更清楚的看到，15 株菌共分出六型，包含寵物食品、鴨(2000 年分離)、B 場、Q 場、K 場白肉種雞場、火雞、流浪狗、B 場豬隻、白肉雞等來源之 9 株菌株，分型皆為 X1 型。鳳頭蒼鷹及紅冠水雞來源之菌株所得圖譜為 X2 型，X1 與 X2 型差異只有一個條帶。根據 Hunter 等人研究中的計算方法，計算 D 值為 0.65。

以 *AvrII* 限制酶切割之 *S. Schwarzengrund* 電泳圖譜如 Fig 5a 及 5b，可以看到利用 *AvrII* 所切割之條帶變化較明顯。但其中有一菌株無法成功使用 *AvrII* 進行切割，只會有一個條帶出現，無法進行比對辨識。因 *AvrII* 限制酶切割後之條帶較少，皆在 10 個條帶以內，因此不適用 Tenover 之準則分析條帶數差異所代表之意義。利用軟體分析所有菌株之親緣性結果如 Fig 6。*S. Albany*、*S. Enteritidis*、*S. Typhimurium* 以及 *S. Pullorum* 之間因為基因型類似，因此仍可見顯示出相近之親緣關係。利用不具流行病學相關之 *S. Schwarzengrund* 計算 D 值，軟體分析之親緣樹狀圖如 Fig 7。15 株菌共切出 11 種不同的圖譜(A1 到 A11 型)，鳳頭蒼鷹及紅冠水雞之菌株同為 A1 型，白肉種雞 Q 場及 K 場分離之菌株為 A2 型，寵物食品及白肉種雞 B 場分離菌株為 A3 型，A2 及 A3 型之間差異只有一個條帶。豬場 A 及 B 場之菌株皆為 A6。白肉雞分離所得菌株利用 *AvrII* 切割後無法有多個條帶，因此所得之

親緣性與其他菌株便顯示為相差許多。*AvrII* 酵素切割之結果 D 值為 0.96。

以 *SpeI* 限制酶所切割之 *S. Schwarzengrund* 電泳圖譜如 Fig 8a 及 8b，肉眼辨識其條帶分布密集，可以粗略看出有 7 種不同的圖譜，條帶位置差異小。利用軟體分析之所有菌株的親緣樹狀圖如 Fig 9。具有相同流行病學背景之 *S. Schwarzengrund* 如 C 場火雞、野鳥、白肉種雞場之菌株皆呈現相同之圖譜。利用不具流行病學相關之 *S. Schwarzengrund* 分析之親緣關係樹狀圖如 Fig 10。*SpeI* 限制酶無法將寵物食品、鴨場、流浪狗、白肉種雞場來源之菌株辨別，15 株菌分出了 9 種圖譜(S1 到 S9)，流浪狗、寵物食品、B 場白肉種雞場、Q 場白肉種雞場、2000 年由鴨隻的菌株為 S1 型，紅冠水雞、鳳頭蒼鷹的菌株為 S4 型，來自於 A 場豬隻及 B 場豬隻的菌株為 S5 型，計算得到 D 值為 0.89。

以 *SfiI* 限制酶切割之 *S. Schwarzengrund* 電泳圖譜如 Fig 11a 及 11b，利用軟體分析之所有菌株親緣樹狀圖如 Fig 12。不具流行性學相關之 *S. Schwarzengrund* 菌株以軟體分析其親緣關係圖如 Fig 13。利用 *SfiI* 限制酶切割可分出 11 種不同圖譜(F1 到 F11)，其中流浪狗、D 場火雞、B 場白肉種雞場之圖譜皆為 F1 型，而寵物食品及 K 場白肉種雞來源之菌株圖譜為 F4，2012 年分離自火雞之菌株以及 A 場豬隻之菌

株圖譜同為 F9。計算出之 D 值為 0.95。

以 *NotI* 限制酶切割之 *S. Schwarzengrund* 電泳圖譜如 Fig 14a 及 14b，將電泳圖利用軟體分析。所有菌株包含不同血清型之分析結果如 Fig 15，流行病學相關之菌株皆呈現相同圖譜，同一血清型所得之結果親緣性接近。流行病學不相關之 15 個 *S. Schwarzengrund* 菌株所分析圖譜如 Fig 16，共有 9 個不同之分型(N1-N9)。N1 型包括流浪狗、白肉種雞場 Q 及 K 的三個菌株，白肉雞、紅冠水雞及鳳頭蒼鷹皆為 N4 型，A 場豬隻及 B 場豬隻分離之菌株則皆為 N5 型。D 值為 0.93。

以 *PacI* 限制酶切割之 *S. Schwarzengrund* 電泳圖譜如 Fig 17a 及 17b，將電泳圖利用軟體分析，可得分析結果如 Fig 18。流行病學不相關之 *S. Schwarzengrund* 菌株經軟體分析後的親緣關係如 Fig 19，其中 2000 年所分離之鴨隻菌株、寵物食品、白肉種雞場 Q 及 K 分型為 P1，A、B 場豬場以及自火雞所分離之菌株為 P2 型，15 株菌共分 10 種不同圖譜(P1-P10)。 *PacI* 限制酶切割之 D 值為 0.91。 *SfiI* 和 *AvrII* 兩個限制酶對於 *S. Schwarzengrund* 的鑑別效果較好，所以結合此兩種限制酶後，可以將無流行病學相關之菌株成功分型。(Fig 20)


Pullorum 血清型所挑選的兩株菌株，一為標準菌株 BCRC15464，此標準菌株之分離來源為人類之下痢病例，可說是相當特殊的一個案例，*XbaI* 以及 *AvrII* 切割後結果可以看到兩株 *S. Pullorum* 差異很明顯

(如 Fig 3 及 Fig 6)，條帶數量及位置都有很大的變化。*NotI* 及 *PacI* 的結果則是跑出相同的條帶看不出變化(如 Fig 15 及 Fig 18)。*SpeI* 和 *SfiI* 切割後的結果條帶有些微差異，可以鑑別出兩株(如 Fig 9 及 Fig 12)。

Typhimirum 血清型兩株菌株一為標準菌株 ATCC23566，一為臨床分離株(分離自中止蛋)，利用 *XbaI* 切割後條帶位置數目相同，判定為同一型態，而 *AvrII* 限制酶的結果可以分出兩株菌株之差異，有數個條帶位置有所差異(如 Fig 3 及 Fig 6)。*SpeI*、*SfiI* 切割結果兩菌株有三個條帶的差異(如 Fig 9 及 Fig 12)。*NotI* 限制酶切割出條帶約只有一個差異，*PacI* 的結果顯示兩株菌株親緣關係相差遠，標準菌株被分析為與野鳥之 *S. Schwarzengrund* 菌株親緣關係較近(如 Fig 15 及 Fig 18)。

Enteritidis 血清型兩株菌株一為標準菌株 ATCC13076，一為分離自種雞場孵蛋機之臨床分離株，*XbaI* 之型態有兩個條帶之差異。*AvrII* 切割結果約莫有 4 個條帶差異(如 Fig 3 及 Fig 6)，可以很清楚辨別出兩個菌株的不同。*SpeI*、*SfiI* 無法辨別兩株菌株的差異(如 Fig 9 及 Fig 12)。*NotI*、*PacI* 切割結果可以鑑別出為不同之型態，但條帶差異不大，相關性相當的近(如 Fig 15 及 Fig 18)。

Albany 血清型兩株菌株皆為臨床分離株，但分屬不同雞場，*XbaI*



切割後分別有不同之型態，有數條條帶的差異。*AvrII* 也可將兩株菌株鑑別，但判定之親緣關係與 *S. Schwarzengrund* 相當近(如 Fig 3 及 Fig 6)。*SpeI* 切割結果雖可鑑別兩株菌之型態不同，但其中一株菌卻被分為跟 *S. Schwarzengrund* 有較近之親緣性(如 Fig 9)。*SfiI* 切割後分析結果，被分至兩個不同的群集，分別與 *S. Enteritidis*、*S. Typhimirum* 擁有較相近之徒譜型態(Fig 12)。*NotI* 切割後的條帶結果相似，但仍可鑑別出兩者有不同型態，*PacI* 則無法鑑別出兩者差異(如 Fig 15 及 Fig 18)。

在其他血清型的部份所使用的樣本數量不夠多，但就目前的結果來做個推估，*S. Pullorum* 用 *XbaI* 和 *AvrII* 切割效果都不錯，而所挑選之 *S. Typhimirum* 用 *XbaI* 無法鑑別，但利用其他限制酶時卻都可以將兩株菌株鑑別出來；以 *S. Enteritidis* 來看則是較適合使用 *XbaI* 及 *AvrII*，其他的限制酶雖可以將兩菌株鑑別，但差異小，在判讀上較難；*S. Albany* 除了 *PacI* 無法鑑別其差異，其他限制酶都可將兩株 *S. Albany* 成功鑑別，而且條帶差異都很大，但是 *S. Albany* 於 *AvrII*、*SpeI*、*NotI*、*SfiI* 的結果發現容易與其他 *S. Schwarzengrund* 菌株有較近之親緣性，這兩個血清型使用這四個限制酶時可能鑑別效果會較差。

第三節 多重基因座序列分型法



aroC 基因增幅所得之產物大小為 826 bp，*dnaN* 基因增幅所得之產物大小為 833 bp，*hemD* 基因增幅所得之產物大小為 666 bp，*purE* 基因增幅所得之產物大小為 510 bp，*sucA* 基因增幅所得之產物大小為 643 bp，*thrA* 基因增幅所得之產物大小為 852 bp，*hisD* 基因增幅所得之產物大小為 894 bp。因這些基因為沙門氏菌之管家基因，因此皆可增幅出這些大小的片段。

利用電泳確認增幅成功之後，將 PCR 產物送定序，使用定序之引子對如 Table 5。所得之定序結果至 MLST 網站上進行比對，將各個基因之序列依序輸入，即可得一對偶基因型之號碼。目前基因庫中共有 6167 個資料，包含 1817 個 Sequence type。

30 株 *S. Schwarzengrund* 菌株 *aroC* 基因定序結果，皆屬於對偶基因型 *aroC* 43，比對序列長為 501 bp；*dnaN* 基因之定序結果，所有 *S. Schwarzengrund* 菌株皆屬於對偶基因型 *dnaN* 47，比對序列長為 501 bp；*hemD* 基因之定序結果，也皆屬於對偶基因型 *hemD* 49，比對序列長為 501 bp；30 株 *S. Schwarzengrund* 菌株的 *hisD* 基因之定序結果，皆屬於對偶基因型 *hisD* 49，比對序列長為 501 bp；30 株 *S. Schwarzengrund* 菌株的 *purE* 基因之定序結果，皆屬於對偶基因型 *purE* 41，比對序列長為 399 bp；*sucA* 基因之定序結果，所有 *S.*

Schwarzengrund 菌株皆屬於對偶基因型 *sucA* 15，比對序列長為 501 bp；*thrA* 基因之定序結果，皆屬於對偶基因型 *thrA* 3，比對序列長為 501 bp。



得到七個基因之對偶基因型態號碼後，與資料庫比對，所有菌株皆屬於 sequence type 96。查找 MLST 之資料庫，可見 ST96 皆為不同年代、不同地點所分離之 *S. Schwarzengrund*。30 株 *S. Schwarzengrund* 菌株七個基因之對偶基因型與 ST 號碼表列如 Table 6。

另外四個血清型的菌株也同樣進行了 MLST，其個別基因之對偶基因型及 sequence type 結果如 Table 6 所示。*S. Typhimurium* 不論是標準菌株或是臨床分離株，皆為 ST19；*S. Enteritidis* 的標準菌株以及由孵蛋機所分離的菌株，MLST 結果也是一致，同為 ST11；兩株由不同雞場分離得到的 *S. Albany* 都是 ST292；*S. Pullorum* 的標準菌株與臨床分離株也皆為 ST92。

第四節 介質輔助雷射脫附飛行時間質譜法(MALDI-TOF)


MALDI-TOF 由長庚醫院協助進行實驗及分析，所得結果如 Table 6。分析菌株共 26 株，總共可以大略的分出 4 群，分別為 A1、A2、B、C。A1 群包含流浪狗、K 場白肉種雞場、B 場白肉種雞場(編號 4 之菌株)、Q 場白肉種雞場之菌株。A2 群有寵物食品、B 場白肉種雞場(編號 1、2 之菌株)、紅冠水雞(編號 12)。B 群包含 2000 年由鴨隻分離之菌株以及來自白肉雞、A 豬場、D 場火雞的菌株。其餘菌株皆為 C 分群。Fig 21 和 Fig 22 分別為單純 *S. Schwarzengrund* 比較之結果以及加入其他血清型比較的結果。Fig 21 為 *S. Schwarzengrund* 經過 MALDI-TOF 後荷質比的表現，根據結果化為條帶後再予以分析其差異。可以看到每株菌株都有不同的蛋白質表現，因此沒有百分之百相同的。Fig 22 顯現五種血清型一比較後的樹狀圖，可以看到無法使用 MALDI-TOF 的結果來區分不同的血清型，*S. Schwarzengrund* 和其他的血清型出現在同一個群集中。

第五章 討論

第一節 抗菌劑感受性試驗



本研究中加入抗菌劑感受性試驗之調查，除了想要了解臺灣不同來源之*S. Schwarzengrund*對抗菌劑的感受性，也藉此去了解各菌株之抗藥性表現的差異，來自於同一來源的菌株會呈現有相同的抗藥性型態，而不同來源的菌株，因抗菌劑使用習慣的不同，可能會有不同的抗藥性型態，雖抗藥性型態不能完全代表其親緣性關係，但仍可作為一個參考，在本研究中也就可以看到，相同來源之菌株呈現出相同之抗藥性型態的情況。實驗結果發現*S. Schwarzengrund*菌株對於nalidixic acid有相當嚴重的抗藥性(100%)，文獻指出香港對nalidixic acid、ampicillin及chloramphenicol有抗藥性之菌株在十年間有顯著性增加的趨勢，nalidixic acid抗藥性多是因為在DNA gyrase基因上的單點突變所造成，而這很有可能會進一步的演變至菌株對ciprofloxacin或是其他fluoroquinolones類藥物的抗藥性，對fluoroquinolones類藥物產生抗藥性之機制為gyrase基因上兩個或更多的突變，這些對nalidixic acid具抗藥性之菌株可能會同時增加對ciprofloxacin的抗藥性或者是使得對fluoroquinolone藥物的敏感性降低。Lauderdale等人在臺灣的研究，對ciprofloxacin有抗藥性的菌株共有2%，比歐洲或者美國都高出許多，原因為在臺灣主要流行的血清型中，*S. Schwarzengrund*和*S.*



Choleraesuis對ciprofloxacin抗藥性特別高，而在歐美國家這兩個血清型不常見。本研究中ciprofloxacin、enrofloxacin的抗藥性皆為30% (9/30)，菌株來源為豬場及鴨場，其他來源之菌株都對ciprofloxacin有敏感性，可能與不同物種飼養中習慣用藥不同有關係，在林等人的研究中也提到在臺灣健康豬隻腸道分離到對enrofloxacin具有抗藥性的沙門氏菌菌株 (林等人，2008)。未來在對於沙門氏菌治療上若併用fluoroquinolone和 β -lactam類藥物，因為針對之目標不同，可以更迅速的達到殺滅細菌效果，並減少抗藥性的產生(Kim et al., 2010; Neupane et al., 2010; Ryan et al., 2011)。

本實驗中cephalothin之抗藥性不高，只有7株菌株對此藥物產生抗藥性，主要也都是豬場來源的菌株，但對於ampicillin就有60%菌株 (18/30)已經產生抗藥性，在從臺灣病人所分離出的沙門氏菌中也有85%的*S. Schwarzengrund*對ampicillin是有抗藥性的。ampicillin以及cephalothin屬於 β -lactam類的抗菌劑，有文獻指出在治療沙門氏菌造成的疾病時， β -lactam類藥物可以有效的阻止整個疾病演變為腦炎的情況。Hamiton等人研究發現，若有*bla*CMY-2基因的表現會導致對 β -lactamx類藥物的抗藥性，但是這個基因需要有ceftriaxone持續存在才會表現，沒有藥物的刺激則很快就不表現了，但若是持續的有藥物刺激甚至可能會降低其他藥物的敏感性(如 chloramphenicol、

tetracycline)，而且對 β -lactam類藥物具有抗藥性的菌株平時有可能躲藏於健康家禽的腸道，因此在使用抗菌劑治療時務必小心使用時機及用藥時間，可能不只使用的單一抗菌劑會產生抗藥性，而是連帶的影響其他抗菌劑之效用(Shahada et al., 2010; Xiong et al., 2012)。

本實驗室中使用的aminoglycosides類藥物分別有gentamicin、kanamycin、streptomycin，抗藥性分別為77%、23%、97%，差異很大。在臺灣沙門氏菌人類分離的*S. Schwarzengrund*中對streptomycin的抗藥性也是很高，高達98.3%，對gentamicin則是有68.3%的菌株有抗藥性。此類抗菌劑抗藥性產生機制包含通透性改變、對抗菌劑結構做修飾以及在核糖體上產生突變等，因此雖屬同類藥物但因機制不同，可能會產生不同的抗藥性結果。其他藥物如chloramphenicol、tetracycline與SXT是畜牧業的第一線用藥，都呈現了非常高的抗藥性，與林等人於豬隻以及上市雞隻的沙門氏菌抗藥性調查結果相符(林等人，2008)。

目前對於*S. Schwarzengrund*的研究中，發現到*S. Schwarzengrund*普遍對nalidixic acid具有抗藥性(Chen et al., 2010)，這與本研究中的結果相符，前述若細菌對nalidixic acid具有抗藥性就有更大的機會演變成對於ciprofloxacin的抗藥性，是否這是造成臺灣沙門氏菌對於ciprofloxacin的抗藥性較其他各國嚴重的原因之一，是一個值得進一

步探究的問題。30 個 *S. Schwarzengrund* 菌株中，分離自野鳥的菌株抗藥性最為嚴重，分離自種雞場的菌株則對許多藥物有敏感性，可能因為種雞場的生物安全措施做的較好，因此有良好的疾病控制，不需要使用多種藥物合併治療，因此也比較不會產生抗藥性。




第二節 脈衝式電泳




脈衝式電泳為一個在分子流行病學研究上被認為是黃金標準的分型方法，在現今的流行病學研究，判斷沙門氏菌之親緣關係時，必定會使用脈衝式電泳作為一個鑑定的重要依據。雖然脈衝式電泳所需時間長並且所費不貲，但因為其結果只要僅遵相同步驟，做出來的結果再現性相當高，不只能夠作為地區的流行病學調查，利用網路設立平台，也可以讓整個國家或者國際間進行菌株之比較(Kilic et al., 2010)。XbaI 是 PulseNet 脈衝式電泳實驗中首選作為沙門氏菌分析之限制酶，因 XbaI 在沙門氏菌所切割出的條帶數目約 9-12 條，這個數目在脈衝式電泳圖上可以方便判定其位置，並且有足夠的比較性。另外 AvrII 以及 SpeI 也在許多沙門氏菌疫情研究上使用(Guerin et al., 2004)。沙門氏菌的血清型眾多，雖這幾個限制酶是在沙門氏菌研究上常使用的，但以單一血清型分析時，研究學者也發現同樣的限制酶在不同的血清型中分型力不一。如 Guerin 等人發現 *S. Livinstone* 分析時，XbaI 及 SpeI 之分析效果較 AvrII 好，但是 *S. Enteritidis* 則是以 NotI 效果最佳。

本研究發現 XbaI 對於 *S. Schwarzengrund* 的鑑別效果不彰，目前針對 *S. Schwarzengrund* 的脈衝式電泳研究大多是利用 XbaI，甚至是就只用這單一的限制酶圖譜來做親緣性關係之鑑定，不禁令人產生是

否有判斷力不足之疑慮。




本研究在脈衝式電泳分析時，放進另外四個血清型之菌株各兩株，欲做一個對照，除了分析不同限制酶對沙門氏菌 Schwarzengrund 血清型之分型能力，也要了解這些限制酶是否能夠把 Schwarzengrund 與其他血清型之菌株做一個鑑別。*XbaI* 限制酶雖無法將 *S. Schwarzengrund* 有效鑑別，但是其他四個血清型可以與之區別，親緣性關係較遠。*AvrII* 是六個酵素中最能夠將無流行病學相關性的 *S. Schwarzengrund* 菌株鑑定出來的，其他的血清型也能夠與 *S. Schwarzengrund* 區別開來；*AvrII* 在沙門氏菌的圖譜上條帶數量較少，只要有一條條帶位置差異，親緣性判定就會相差很多，而且在本試驗中白肉雞來源的 *S. Schwarzengrund* 菌株，無法順利切出多個條帶，同一批來源之菌株都有相同的圖譜。2004 年臺灣疾管局與美國疾管局就 *E. coli* O157 是否可以用 *NotI* 切割的問題產生疑問，*NotI* 可將臺灣本土株的 *E. coli* O157 做很好的鑑別，但是美國株卻無法使用。而後研究者發現當 *E. coli* O157 有 *z2389* 這個基因時，此基因會轉譯出 DNA modification methyltransferase，可以將 DNA 甲基化，甲基化後會使得 *NotI* 切位喪失，因此具有此種基因之 *E. coli* O157 便無法用 *NotI* 切割(Chiou et al., 2010)。此基因是位於 CP-933R 的噬菌體 DNA 上，因此有可能因為嗜菌體感染細菌而造成細菌帶有特殊基因。對於



AvrII 無法切割出多個條帶的菌株，推測可能也有類似的基因變化造成，導致切位被改變，以至於在其他菌株可以成功的進行限制酶切割並且鑑別出不同型態之圖譜，在這一株 *S. Schwarzengrund* 上卻沒辦法。在沙門氏菌尚未有太多相關的研究文獻，這個發現值得後人繼續深究探討。*SpeI* 對 *S. Schwarzengrund* 之鑑定力稍差，但是尚可將其他血清型跟 *S. Schwarzengrund* 做一個鑑別。*NotI* 沒有辦法把幾個血清型之間做鑑別，只有作為 Marker 的 H9812 可以跟其他菌株分出不同的群別，結果顯示若是利用 *NotI* 在單一血清型之親緣性關係判斷上，對 *S. Schwarzengrund* 之鑑別力還足夠，只是有若干菌株依然會被歸類為同一型，而且其結果條帶位置差異不大，若非利用軟體分析，在肉眼觀察上可能容易出錯。

PacI 結果中只有 *S. Enteritidis* 可以跟 *S. Schwarzengrund* 鑑別出不同的分群，其他 *S. Pullorum*、*S. Albany*、*S. Typhimurium* 與 *S. Schwarzengrund* 的圖譜表現相近，分析之相關性高，無法有效的從圖譜上分辨血清型。可能是因為 *PacI* 所切割之條帶很密集，其條帶數目跟位置的差異不大，軟體分析時就無法將不同血清型的菌株分辨。且有許多落在 marker 之外的條帶，若是無法有清楚的背景與條帶，容易會有誤判的情況，也因此國際間沙門氏菌流行病學之研究，也較少使用 *PacI*。要解決 marker 無法對照的問題，可以在作為 marker 的



H9812 菌株中另外塞入更小的質體，讓它能夠於電泳膠上顯現，但若要這麼做將會使難度增加，操作不易難以標準化，不利於通用的流行病學調查。*Sfi*I 不僅可以辨別出不同來源之 *S. Schwarzengrund* 菌株，在不同血清型之間的鑑別也不錯，在 Zhang 等人的研究中 *Sfi*I 對 *S. Enteritidis* 的分型力是六個限制酶中最低的，但是以 *S. Schwarzengrund* 菌株來看，*Sfi*I 是可以適用作為一個鑑定其親緣關係之限制酶。


目前脈衝式電泳或是以條帶作為結果判定的分子分型方法，多使用不加權平均重法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) 的方法來進行運算，其運算方式是用條帶之間的距離來做分析，Hall 等人建議 UPGMA 雖被廣泛使用，但在判讀的時候應將其流行病學背景一同考慮，不能只單純就 UPGMA 結果所示之親緣性就決定之間的親緣關係，利用序列分析的方法會比判斷條帶位置的方法好(Hall et al., 2006)。在脈衝式電泳的部份尚未有新的演算方法，因此 Ferris 等人認為在軟體分析時，應使用 curve based 來分群集，而不用條帶位置作為判定標準(Ferris et al., 2004)，但若以 curve 做分群集的基礎，會因為不同的染色方式、跑膠條件、照相品質等等因素，造成不同實驗室間的結果難以放在一起比較。

第三節 多重基因座序列分型法



多重基因座序列分型法的概念很簡單，就是使用多個基因定序後，根據定序結果進行分型，因此研究者在發展 MLST 的方法時，也試圖去針對不同的基因做定序來分析沙門氏菌。但本實驗主要還是選用目前全球適用之七個基因做為測試，因為目前只有這七個基因有建立線上比對的系統以及資料庫。Noda 等人選取自 1973 年至 2004 年間之 *S. Enteritidis*，研究為希望可以看到長時間以來的變化，挑選了不同年代以及確認其來源不相關的 30 株菌株，但分析後結果皆為相同 sequence type (Noda et al., 2011)。但是 Harbottle 等人對於 *S. Newport* 進行 MLST 卻可以成功的分型，可見得雖都是選用這七個基因，但是在沙門氏菌不同血清型卻是具有不相同的分型能力。

目前在基因庫中的 *S. Pullorum* 皆為 ST 92，只有一株來源不明的 *S. Pullorum* 為 ST 747，兩者只有在 *hemD* 的 allelic profile 有所不同在另外也發現 *S. Pullorum* 與 *S. Enteritidis* 其中五個基因的對偶基因型皆相同，因此其 eBurstGroup (eBG) 分群也同屬一個分群。目前於資料庫中有 138 個 eBGs，若是某一個 ST 包含了超過十株的菌株，或者是有至少兩個 ST，這些 ST 之間只有單一個 allele 的差異 (Single Locus Variants)，就可成為一個 eBG；另外有些 ST 雖然有兩個基因座差異，但若是同一血清型還是歸為同一個 eBG。資料庫中目前已有 310 株



S. Enteritidis 的資料，而本研究中挑選的兩株 *Enteritidis* 與大部分資料庫中的 *S. Enteritidis* 屬同一個 ST。*S. Albany* 目前於資料庫中的資料不多，在 10 株現有資料中，4 株資料分離來源為臺灣，根據該學者參與發表之研究結果可看到同屬 ST292 之 *S. Albany*，具有 *integrons dfrA1/orfC* 以及 *blaPSE1* (Krauland et al., 2009)，但具有相同之 integron profile 不代表基因型會相同，同樣的 integron profile 也可能是不同的血清型。*S. Schwarzengrund* 在目前資料庫中共有 18 筆資料，分別屬於 4 個不同的 ST，包含 ST96、ST241、ST322、ST848，大多數的 *S. Schwarzengrund* 與本研究中所做出的結果相同為 ST96，其中屬於 ST96、ST241 的 *S. Schwarzengrund* 多為人類來源之菌株，在歐洲不同國家所分離；而屬於 ST848 的菌株則是在非洲地區家禽所分離得到的，目前只有一個菌株資料；其中 ST241 除了 *S. Schwarzengrund* 還有 Bredeney 血清型之菌株，兩個血清型在抗血清的差異只有 H 抗的 phase I，其他 O 抗和 H 抗 phase II 都相同，也許因此他們之間的基因型很相近，導致歸屬為同一 ST。*S. Typhimurium* 於資料庫中共有 929 個菌株資料，分屬不同的 ST 甚至是 eBGs。本研究所做出的 ST19，為 *S. Typhimurium* 中最大宗之 sequence type，ST19 結果皆為 *S. Typhimurium* 血清型。Ikumapayi 等人的研究中發現，*S. Typhimurium* 顯示為 ST19 及 ST34 的菌株，其實只是在 *dnaN* 這個基因序列上差了

一個鹼基對 (G→A)，導致一個為 *dnaN7* 一個為 *dnaN19*，被分為不同之 Sequence type，可見得若是有單點之突變，在 MLST 的方法中是會被辨認出來的(Ikumapayi et al., 2007)。




使用 MLST 無法將不同來源之 *S. Schwarzengrund* 做鑑定，甚至於其他血清型也沒辦法辨別不同來源的菌株，但是不同血清型會被分為不一樣的 ST，是可以確定的，因此以 MLST 的方法做為血清型的鑑定還是相當的被推薦。

第四節 介質輔助雷射脫附飛行時間質譜法


MALDI-TOF 是一個便利的工具，可以快速的處理多個菌株，因為其操作流程所需時間較少，有許多文獻都在探討使用 MALDI-TOF 作為一個抗藥性菌株篩選的工具，在流行病學的部分著墨較少。在 Fujinami 等人的研究中發現對於 *Legionella* 菌株，MALDI-TOF 有跟 PFGE 相似的鑑別力，可以精確的鑑別其親緣性關係。鑑別 *Vibrio parahaemolyticus* 的流行病學關係時，用單一限制酶的脈衝式電泳也很難去鑑別，需要佐以 MLSA 或者是加入其他限制酶一起分析，耗時耗力，但是若是使用 MALDI-TOF 即可鑑別這些菌株(Fujinami et al., 2011; Hazen et al., 2009)。在前人的研究中提到它有潛力成為鑑別 closely related *Enterobacteriaceae* 的方法，而且可以分析到種別及血清型(Schaumann et al., 2013)。雖然此方法它處理樣本的操作過程較為簡便，可以使得鑑別的時間縮短，但是儀器本身相當昂貴，每年也需要維修校正的費用。

沙門氏菌於 MALDI-TOF 這部份的研究，目前多著眼於血清型之分型，少有利用這個技術來做流行病學鑑定之相關討論，因此本研究在尋找適合 *S. Schwarzengrund* 之分型方法時，尋思若此技術能夠成功的將 *S. Schwarzengrund* 分型，未來在流行病學研究上，將可以節省相當多的時間。但是，要能夠成就這個方法，需要依靠資料庫的



建立，目前 Biotyper 資料庫中缺乏對遺傳性上高度相關的菌株的特異性 reference spectra，就本研究來看也是一樣，此機型與分析軟體最多只能分析到 *Salmonella* spp.，無法進一步的分析出是盒種血清型，從樹狀圖中也可以看出，不同血清型並無特定的分出群集，沒辦法依照 MALDI-TOF 的結果進行血清型分型。而且放入分析的 30 株 Schwarzengrund 中，包含流行病學相關的菌株，在脈衝式電泳可以看出這些菌株會被分出同樣的圖譜或是相近的群集，但在 MALDI-TOF 卻沒辦法看出同樣的趨勢。而且 MALDI-TOF 儀器型別與設定值會有所差異，因所能撞擊分離的蛋白質大小不一，有些儀器可以接受 1000-25000 Da 這個範圍的蛋白質，但是有些只能接收到 2000-20000 Da 這個範圍內的蛋白質，根據接收器分析的範圍不同，也會得到不一樣的分析結果，接收範圍較廣之儀器，可以更靈敏，即使是把多種細菌混雜在一起，也可以一次就由 MALDI-TOF 辨認出不同種之細菌，但是接受範圍較窄之儀器則難以有效的分辨這種混雜多樣細菌之樣本，還是需要有單一純化之菌株 (Hsieh et al., 2008; Sparbier et al., 2012)。本研究使用的 MALDI-TOF 機型為 Microflex LT，屬於較基礎應用的儀器，未來可以嘗試更高階的儀器，以期能夠將此方法運用在流行病學分型鑑定上。

前述的兩個分子分型方法，皆為再現性高並且能夠於不同實驗



室間進行比較，但 MALDI-TOF 即使是培養環境的不同，也有可能使得細菌產生不一樣的醣蛋白，造成結果不相同，而且較新鮮的菌株可以把蛋白表現的較好，不同的介質和雷射光強度也都會影響到蛋白的表現。MALDI-TOF 的再現性，與操作人員也很有關係，同樣條件下有將近 80% 的差異是因為不同人操作所造成。而每台機器也皆有其建議判讀的蛋白質大小，若是判讀超出範圍的部份(如 < 500 Da)，就會有非常大的差異度(de Noo et al., 2005; Usbeck et al., 2013)。

MALDI-TOF 所表現出之 peak intensity 也有大的差異，變異係數可高達 26%。若欲加強 MALDI-TOF 之再現性，可以做的是例如自動化的樣品處理、事先分組(prefractionation)、將目標表面進行預處理、標準化使用的介質、樣本品質要一致、重複測量、做好機器的校正 (Albrethsen, 2007)。

沙門氏菌因血清型眾多，而且在長庚醫院平時利用此機型做細菌鑑定，使用同樣的介質與條件，可能對於沙門氏菌並不是最適當的條件，再加上資料庫數據不足，本研究無法利用 MALDI-TOF 來對 *S. Schwarzengrund* 做更佳的流行病學上親緣關係的鑑定。


第六章 結論與建議



S. Schwarzengrund 在美國不是常見會造成沙門氏菌感染症的血清型，排名尚不到前 20，但是 *Schwarzengrund* 血清型菌株曾經發生過跨州之流行病爆發事件以及院內感染的疫情，而且雖於美國不常見，在南亞地區卻經常分離到此血清型之菌株(Akiyama et al., 2012)。臺灣在不同的家畜禽沙門氏菌調查中，也都發現到具多重抗藥性的 *S. Schwarzengrund* 分離率漸增，發展適合用於 *S. Schwarzengrund* 之流行病學分子分型法是勢在必行的。

本研究的結果顯示六種限制酶對於 *S. Schwarzengrund* 之鑑別力由高至低依序為 *AvrII*、*SfiI*、*NotI*、*PacI*、*SpeI*、*XbaI*，其中尤以 *AvrII* 以及 *SfiI* 效果最佳，未來進行 *S. Schwarzengrund* 之流行病學分子分型調查上，使用此兩限制酶最為適合，同時結合兩個限制酶分析則可以更有效的鑑別菌株基因型之親緣關係。另外，在 Zheng 等人的研究中建議 *AvrII* 使用量需達 30U/菌塊，由於相較於其他限制酶，*AvrII* 的價格昂貴，在本研究中嘗試降低使用量，測試結果發現降到 10U/菌塊依舊可以有同樣的切割效果，因此未來在使用 *AvrII* 時可以減少使用量降低成本。

目前沙門氏菌的 MLST 選用的七個管家基因，對於用來鑑定沙門氏菌不同菌株間的親緣關係似乎無法有良好的效果，同一血清型時



難以鑑別。在沙門氏菌鑑別力不足，因此未來也許可以尋求加入其他的管家基因或是毒力基因，來增加鑑別力，但若是要選擇其他的基因對 *S. Schwarzengrund* 做 MLST 的分析，有研究發現 *panB* (Ketopantoate hydroxymethyltransferase) 及 *icdA* (Isocitrate dehydrogenase) 兩管家基因在 *S. Schwarzengrund* 無法被偵測到，而 *fimA*、*aceK*、*mdh*、*manB* 以及 *spaN* 曾被成功的運用在研究中，利用此幾個基因時，MLST 之鑑別力是高於脈衝式電泳的，因此未來可以考慮挑選這些基因做為接續的 MLST 親緣性關係研究之用。而 MALDI-TOF 對於沙門氏菌的分型能力不佳，而且所得結果無法於實驗室間進行比較，不適合作為 *S. Schwarzengrund* 的分型方法。

所以以本研究所探討的方法，最適合使用於 *S. Schwarzengrund* 之流行病學分子分型方法仍是脈衝式電泳，建議可使用 *AvrII*、*SfiI* 兩個酵素併用，可使分型效果最佳。

第七章 參考文獻

- 林正忠、劉哲宏、張照勤、李維誠、劉正義、陳德勛。(2008)。不同來源之豬隻沙氏桿菌流行病學調查：探討台灣居民感染人畜共通沙氏桿菌症風險。台灣衛誌，27(3)，243-249。
- 林正忠、郭俊緯、張照勤、王裕智、沈瑞鴻、葉光勝、陳德勛。(2008)。上市白肉雞與仿土雞之沙氏桿菌分離率與抗藥性比較。台灣獸醫誌，34(4)，217-225。
- 邱乾順、吳和生。(2007)。食因性細菌傳染病分子分型監測網(PulseNet)簡介。疫情報導，23(4)，204-221。
- 周崇熙、蔡向榮。(2001)。台灣肉雞沙氏桿菌、彎曲桿菌之盛行率及抗菌劑感受性調查。中華獸醫誌，27(1)，27-38。
- 蔣世峯、周崇熙。(2010)。臺灣地區白肉種雞場之沙門氏菌污染模式研究。碩士論文。國立台灣大學獸醫專業學院獸醫學研究所。
- Achtman, M., Wain, J., Weill, F. X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M. G., Hale, J. L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L. H., Brisse, S., & the *S. enterica* MLST study group. (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog*, 8(6), 1-19. e1002776.
- Akiyama, T., & Khan, A. A. (2012). Molecular characterization of strains of fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund carrying multidrug resistance isolated from imported foods. *J Antimicrob Chemother*, 67(1), 101-110.
- Albrethsen, J. (2007). Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem*, 53(5), 852-858. doi: 10.1373/clinchem.2006.082644
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*, 8(4), 260-271.
- Asai, T., Murakami, K., Ozawa, M., Koike, R., & Ishikawa, H. (2009). Relationships between multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund and both broiler chickens and retail chicken meats in Japan. *Jpn J Infect Dis*, 62(3), 198-200.
- Bangtrakulnonth, A., Pornreongwong, S., Pulsrikarn, C., Sawanpanyalert, P., Hendriksen, R. S., Lo Fo Wong, D. M., & Aarestrup, F. M. (2004). *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002. *Emerg Infect Dis*, 10(1), 131-136.
- Barbuddhe, S. B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T., & Hain, T. (2008). Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass

- spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 74(17), 5402-5407.
- Behravesh, C. B., Blaney, D., Medus, C., Bidol, S. A., Phan, Q., Soliva, S., Daly, E. R., Smith, K., Miller, B., Taylor, T., Jr., Nguyen, T., Perry, C., Hill, T. A., Fogg, N., Kleiza, A., Moorhead, D., Al-Khaldi, S., Braden, C., & Lynch, M. F. (2012). Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Typhimurium infections associated with consumption of restaurant tomatoes, USA, 2006: hypothesis generation through case exposures in multiple restaurant clusters. *Epidemiol Infect*, 140(11), 2053-2061.
- Bernardo, K., Pakulat, N., Macht, M., Krut, O., Seifert, H., Fleer, S., Hüniger, F., & Krönke, M. (2002). Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *PROTEOMICS*, 2(6), 747-753.
- Chiou, C. S., Li, H. Y., Tung, S. K., Chen, C. Y., Teng, C. H., Shu, J. C., Tseng, J. T., Hsu, C. Y., & Chen, C. C. (2010). Identification of prophage gene *z2389* in *Escherichia coli* EDL933 encoding a DNA cytosine methyltransferase for full protection of *NotI* sites. *Int J Med Microbiol*, 300(5), 296-303.
- Chen, M. H., Wang, S. W., Hwang, W. Z., Tsai, S. J., Hsieh, Y. C., Chiou, C. S., & Tsen, H. Y. (2010). Contamination of *Salmonella* Schwarzengrund cells in chicken meat from traditional marketplaces in Taiwan and comparison of their antibiograms with those of the human isolates. *Poult Sci*, 89(2), 359-365.
- Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol*, 85(2), 112-118.
- de Noo, M. E., Tollenaar, R. A. E. M., Özalp, A., Kuppen, P. J. K., Bladergroen, M. R., Eilers, P. H. C., & Deelder, A. M. (2005). Reliability of human serum protein profiles generated with C8 magnetic beads assisted MALDI-TOF mass spectrometry. *Ana Chem*, 77(22), 7232-7241.
- Dhanao, A., & Fatt, Q. K. (2009). Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia: epidemiology, clinical characteristics and its' association with severe immunosuppression. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 8(15), 1-7.
- Dieckmann, R., & Malorny, B. (2011). Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 77(12), 4136-4146.
- Ferris, M. M., Yan, X., Habbersett, R. C., Shou, Y., Lemanski, C. L., Jett, J. H., Yoshida, T. M., & Marrone, B. L. (2004). Performance assessment of DNA fragment sizing by high-sensitivity flow cytometry and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 42(5), 1965-1976.
- Fierer, J., & Guiney, D. G. (2001). Diverse virulence traits underlying different

- clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest.*, 107, 775- 780.
- Fujinami, Y., Kikkawa, H. S., Kurosaki, Y., Sakurada, K., Yoshino, M., & Yasuda, J. (2011). Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol Res*, 166(2), 77-86. d
- Gast, R. K. (2007). Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. *Avian Dis.*, 51(4), 817-828.
- Ghosh, T. K., Haldar, S., Bedford, M. R., Muthusami, N., & Samanta, I. (2012). Assessment of yeast cell wall as replacements for antibiotic growth promoters in broiler diets: effects on performance, intestinal histo-morphology and humoral immune responses. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 96(2), 275-284.
- Glynn, M. K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M., & Angulo, F. J. (1998). Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *N Engl J Med.*, 338, 1333-1338.
- Griffin, P. M., Price, G. R., Schooneveldt, J. M., Schlebusch, S., Tilse, M. H., Urbanski, T., Hamilton, B., & Venter, D. (2012). Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant *Enterococci* and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol*, 50(9), 2918-2931.
- Guerin, P. J., De Jong, B., Heir, E., Hasseltvedt, V., Kapperud, G., Styrmø, K., Gondrosen, B., Lassen, J., Andersson, Y., & Aavitsland, P. (2004). Outbreak of *Salmonella* Livingstone infection in Norway and Sweden due to contaminated processed fish products. *Epidemiology Infect.*, 132(5), 889-895.
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P. I., Bockemuhl, J., Grimont, P. A., & Weill, F. X. (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol*, 161(1), 26-29.
- Hall, B. G., & Barlow, M. (2006). Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology of infectious diseases. *Ann Epidemiol*, 16(3), 157-169.
- Hamilton, R. D., Hulsebus, H. J., Akbar, S., & Gray, J. T. (2012). Increased resistance to multiple antimicrobials and altered resistance gene expression in CMY-2-positive *Salmonella enterica* following a simulated patient treatment with ceftriaxone. *Appl Environ Microbiol*, 78(22), 8062-8066.
- Harbottle, H., White, D. G., McDermott, P. F., Walker, R. D., & Zhao, S. (2006). Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. *J Clin Microbiol*, 44(7), 2449-2457.
- Hazen, T. H., Martinez, R. J., Chen, Y., Lafon, P. C., Garrett, N. M., Parsons, M. B., Bopp, C. A., Sullards, M. C., & Sobecky, P. A. (2009). Rapid identification of

- Vibrio parahaemolyticus* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 75(21), 6745-6756.
- Herikstad, H., Hayes, P., Mokhtar, M., Fracaro, M. L., Threlfall, E. J., & Angulo, F. J. (1997). Emerging quinolone-resistant *Salmonella* in the United States. *Emerg Infect Dis*, 3(3), 371-372.
- Hsieh, S. Y., Tseng, C. L., Lee, Y. S., Kuo, A. J., Sun, C. F., Lin, Y. H., & Chen, J. K. (2008). Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol Cell Proteomics*, 7(2), 448-456.
- Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*, 26, 2465-2466.
- Ikumapayi, U. N., Antonio, M., Sonne-Hansen, J., Biney, E., Enwere, G., Okoko, B., Oluwalana, C., Vaughan, A., Zaman, S. M., Greenwood, B. M., Cutts, F. T., & Adegbola, R. A. (2007). Molecular epidemiology of community-acquired invasive non-typhoidal *Salmonella* among children aged 2-29 months in rural Gambia and discovery of a new serovar, *Salmonella enterica* Dingiri. *J Med Microbiol*, 56, 1479-1484.
- Jackson, B. R., Griffin, P. M., Cole, D., Walsh, K. A., & Chai, S. J. (2013). Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food Commodities, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis*, 19(8), 1239-1244.
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G., & Achtman, M. (2002). *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect Genet Evol*, 2(1), 39-45.
- Kilic, A., Bedir, O., Kocak, N., Levent, B., Eyigun, C., Tekbas, O. F., Gorenek, L., Baylan, O., & Basustaoglu, A. C. (2010). Analysis of an outbreak of *Salmonella* Enteritidis by repetitive-sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Intern Med*, 49(1), 31-36.
- Kim, D. M., Neupane, G. P., Jang, S. J., Kim, S. H., & Lee, B. K. (2010). In vitro efficacy of the combination of ciprofloxacin and cefotaxime against nalidixic acid-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Int J Antimicrob Agents*, 36(2), 155-158.
- Kotetishvili, M., Stine, O. C., Kreger, A., Morris, J. G., & Sulakvelidze, A. (2002). Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* Strains. *J Clin Microbiol*, 40(5), 1626-1635.
- Krauland, M. G., Marsh, J. W., Paterson, D. L., & Harrison, L. H. (2009). Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates. *Emerg Infect Dis*, 15(3), 388-396.

- Kuhns, M., Zautner, A. E., Rabsch, W., Zimmermann, O., Weig, M., Bader, O., & Groß, U. (2012). Rapid discrimination of *Salmonella enterica* serovar Typhi from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS ONE*, 7(6), e40004.
- Kumar, R., Surendran, P. K., & Thampuran, N. (2009). Distribution and genotypic characterization of *Salmonella* serovars isolated from tropical seafood of Cochin, India. *J Appl Microbiol*, 106(2), 515-524.
- Lauderdale, T. L., Aarestrup, F. M., Chen, P. C., Lai, J. F., Wang, H. Y., Shiau, Y. R., Huang, I. W., Hung, C. L., & hospitals, Tsar. (2006). Multidrug resistance among different serotypes of clinical *Salmonella* isolates in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 55(2), 149-155.
- Li, X., Bethune, L. A., Jia, Y., Lovell, R. A., Proescholdt, T. A., Benz, S. A., Schell, T. C., Kaplan, G., & McChesney, D. G. (2012). Surveillance of *Salmonella* prevalence in animal feeds and characterization of the *Salmonella* isolates by serotyping and antimicrobial susceptibility. *Foodborne Pathog Dis*, 9(8), 692-698.
- Lin, J., Hunkapiller, A. A., Layton, A. C., Chang, Y. J., & Robbins, K. R. (2013). Response of intestinal microbiota to antibiotic growth promoters in chickens. *Foodborne Pathog Dis*, 10(4), 331-337.
- Lo, N. W., Chu, M. T., & Ling, J. M. (2012). Increasing quinolone resistance and multidrug resistant isolates among *Salmonella enterica* in Hong Kong. *J Infect*, 65(6), 528-540.
- Maiden, M. C. J., Bygraves, Jane A., Feil, E., Morelli, G., Joanne E. R., Urwin, R. Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. & Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad*, 95(6), 3140-3145.
- Mazzeo, M. F., Sorrentino, A., Gaita, M., Cacace, G., Di Stasio, M., Facchiano, A., Comi, G., Malorni, A., & Siciliano, R. A. (2006). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 72(2), 1180-1189.
- Nemoy, L. L., Kotetishvili, M., Tigno, J., Keefer-Norris, A., Harris, A. D., Perencevich, E. N., Johnson, J. A., Torpey, D., Sulakvelidze, A., Morris, J. G., Jr., & Stine, O. C. (2005). Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol*, 43(4), 1776-1781.
- Neupane, G. P., Kim, D. M., Kim, S. H., & Lee, B. K. (2010). In vitro synergism of ciprofloxacin and cefotaxime against nalidixic acid-resistant *Salmonella*

- enterica* serotypes Paratyphi A and Paratyphi B. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(9), 3696-3701.
- Neville, S. A., Lecordier, A., Ziochos, H., Chater, M. J., Gosbell, I. B., Maley, M. W., & van Hal, S. J. (2011). Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. *J Clin Microbiol*, 49(8), 2980-2984.
- Ngoi, S. T., & Thong, K. L. (2013). Molecular characterization showed limited genetic diversity among *Salmonella* Enteritidis isolated from humans and animals in Malaysia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 77(4), 304-311.
- Noda, T., Murakami, K., Asai, T., Etoh, Y., Ishihara, T., Kuroki, T., Horikawa, K., & Fujimoto, S. (2011). Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strains in Japan between 1973 and 2004. *Acta Vet Scand*, 53, 38.
- Olive, D. Michael., & Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-Based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*, 37, 1661.
- Olsen, S. J., DeBess, E. E., McGivern, T. E., Marano, N., Eby, T., Mauvais, S., Balan, V. K., Zirnstein, G., Cieslak, P. R., & Angulo, F. J. (2001). A Nosocomial Outbreak of Fluoroquinolone-Resistant *Salmonella* Infection. *N Engl J Med*, 344(21), 1572-1579.
- Ryan, M. P., Dillon, C., & Adley, C. C. (2011). Nalidixic acid-resistant strains of *Salmonella* showing decreased susceptibility to fluoroquinolones in the midwestern region of the Republic of Ireland due to mutations in the *gyrA* gene. *J Clin Microbiol*, 49(5), 2077-2079.
- Scallan, Elaine, Hoekstra, Robert M., Angulo, Frederick J., Tauxe, Robert V., Widdowson, Marc-Alain, Roy, Sharon L., Jones, Jeffery L., & Griffin, Patricia M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. *Emerg Infect Dis*, 17(1), 7-15.
- Schaumann, R., Knoop, N., Genzel, G. H., Losensky, K., Rosenkranz, C., Stîngu, C. S., Schellenberger, W., Rodloff, A. C., & Eschrich, K. (2013). Discrimination of *Enterobacteriaceae* and Non-fermenting Gram Negative Bacilli by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Open Microbiol J*, 7, 118-122.
- Seng, P., Rolain, J., Fournier, P. E., Scola, B. L., Drancourt, M., & Raoult, D. (2010). MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol*, 1733-1754.
- Shahada, F., Sugiyama, H., Chuma, T., Sueyoshi, M., & Okamoto, K. (2010). Genetic analysis of multi-drug resistance and the clonal dissemination of beta-lactam resistance in *Salmonella* Infantis isolated from broilers. *Vet Microbiol*, 140(1-2), 136-141.

- Sparbier, K., Weller, U., Boogen, C., & Kostrzewa, M. (2012). Rapid detection of *Salmonella* sp. by means of a combination of selective enrichment broth and MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *31*(5), 767-773.
- Tamma, Pranita D., Tan, Kennard, Nussenblatt, Veronique R., Turnbull, Alison E., Carroll, Karen C., & Cosgrove, Sara E. (2013). Can matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) enhance antimicrobial stewardship efforts in the acute care setting? *Infection control and hospital epidemiology*, *34*(9), 990-995.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control*, *34*(5), 3-10.
- Tenover, F. C., Arbeit, Robert D., Goering, R. V. , Mickelsen, P. A. , Murray, B. E. , Persin, G. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal dna restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol*, *33*(9), 2233–2239.
- Torpdahl, M., Skov, M. N., Sandvang, D., & Baggesen, D. L. (2005). Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *J Microbiol Methods*, *63*(2), 173-184.
- Usbeck, J. C., Kern, C. C., Vogel, R. F., & Behr, J. (2013). Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in response to varying growth conditions. *Food Microbiol*, *36*(2), 379-387.
- Van Duynhoven, Y. T., Isken, L. D., Borgen, K., Besselse, M., Soethoudt, K., Haitisma, O., Mulder, B., Notermans, D. W., De Jonge, R., Kock, P., Van Pelt, W., Stenvers, O., Van Steenberg, J., & Outbreak Investigation, Team. (2009). A prolonged outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection related to an uncommon vehicle: hard cheese made from raw milk. *Epidemiol Infect*, *137*(11), 1548-1557.
- Vugia, D. J., Samuel, M., Farley, M. M., Marcus, R., Shiferaw, B., Shallow, S., Smith, K., & Angulo, F. J. (2004). Invasive *Salmonella* infections in the United States, FoodNet, 1996-1999: incidence, serotype distribution, and outcome. *Clin Infect Dis*, *38*(3), 149-156.
- Xiong, N., Brewer, M. T., Anderson, K. L., Watrous, G. K., Weeks, K. E., Barnhill, A. E., Day, T. A., Kimber, M. J., & Carlson, S. A. (2012). Beta-lactam antibiotics prevent *Salmonella*-mediated bovine encephalopathy regardless of the beta-lactam resistance status of the bacteria. *Vet J*, *192*(3), 535-537.
- Zheng, J., Keys, C. E., Zhao, S., Meng, J., & Brown, E. W. (2007). Enhanced

Subtyping Scheme for *Salmonella* Enteritidis. *Emerg Infect Dis*, 13(12), 1932-1935.

Zheng, J., Keys, C. E., Zhao, S., Ahmed, R., Meng, J., & Brown, E. W. (2011). Simultaneous analysis of multiple enzymes increases accuracy of pulsed-field gel electrophoresis in assigning genetic relationships among homogeneous *Salmonella* strains. *J Clin Microbiol*, 49(1), 85-94.

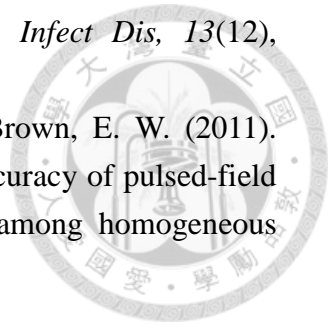


Table 1. Isolates of *Salmonella* Schwarzengrund

NO.	Source	Year
1	broiler breeder farm B	2008
2	broiler breeder farm B	2008
3	broiler breeder farm K	2008
4	broiler breeder farm B	2009
5	broiler breeder farm Q	2009
6	Pet food	2008
7	Duck	2000
8	Pet food	2008
9	Stray dog	2003
10	Wild bird (Crested Goshawk)	2011
11	Wild bird (Crested Goshawk)	2011
12	Wild bird (Moorhen)	2011
13	Wild bird (Moorhen)	2011
14	Wild bird (Moorhen)	2011
15	Broiler	2010
16	Turkey	2012
17	Pig (Farm A)	2012
18	Pig (Farm B)	2012
19	Pig (Farm B)	2012
20	Pig (Farm B)	2012
21	Pig (Farm B)	2012
22	Pig (Farm B)	2012
23	Pig (Farm B)	2012
24	Turkey (Farm C)	2012
25	Turkey (Farm C)	2012
26	Turkey (Farm C)	2012
27	Turkey (Farm D)	2012
28	Turkey (Farm D)	2012
29	Turkey (Farm D)	2012
30	Duck	2012

Table 2. Inhibition zone for antimicrobial resistance test

Antimicrobials	Inhibition zone (mm)	
	Resistant	Sensitive
Ampicillin	≤13	≥17
Cephalothin	≤14	≥18
Gentamicin	≤12	≥15
Kanamycin	≤13	≥18
Streptomycin	≤11	≥15
Chloramphenicol	≤12	≥18
Ciprofloxacin	≤15	≥21
Enrofloxacin	≤14	≥23
Nalidixic acid	≤13	≥19
Tetracycline	≤14	≥19
Oxytetracycline	≤14	≥19
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	≤10	≥16

From CLSI 2012



Table 3. Conditions were used for PFGE

Enzyme	Digestion temperature (°C)	Enzyme units/plug	Run time (hour)	Initial switch time (second)	Final switch time (second)
<i>XbaI</i>	37	50	19	2.16	63.8
<i>AvrII/ BlnI</i>	37	30	19	2.16	63.8
<i>SpeI</i>	37	30	20.5	5	25
<i>SfiI</i>	5	30	20.5	5	25
<i>PacI</i>	37	30	20.5	0.1	15
<i>NotI</i>	37	30	20.5	0.1	15

(Zheng et al., 2007)

Table 4. Primers used for the PCR amplification



Gene		Sequences (5' to 3')
<i>aroC</i>	F	CCT GGC ACC TCG CGC TAT AC
	R	CCA CAC ACG GAT CGT GGC G
<i>dnaN</i>	F	ATG AAA TTT ACC GTT GAA CGT GA
	R	AAT TTC TCA TTC GAG AGG ATT GC
<i>hemD</i>	F	GAA GCG TTA GTG AGC CGT CTG CG
	R	ATC AGC GAC CTT AAT ATC TTG CCA
<i>hisD</i>	F	GAA ACG TTC CAT TCC GCG CAG AC
	R	CTG AAC GGT CAT CCG TTT CTG
<i>purE</i>	F	ATG TCT TCC CGC AAT AAT CC
	R	TCA TAG CGT CCC CCG CGG ATC
<i>thrA</i>	F	GTC ACG GTG ATC GAT CCG GT
	R	CAC GAT ATT GAT ATT AGC CCG
<i>sucA</i>	F	AGC ACC GAA GAG AAA CGC TG
	R	GGT TGT TGA TAA CGA TAC GTA C

(Torpdahl et al., 2005)

Table 5. Primers used for the Sequencing

Gene		Sequences (5' to 3')
<i>aroC</i>	sF	GGC ACC AGT ATT GGC CTG CT
	sR	CAT ATG CGC CAC AAT GTG TTG
<i>dnaN</i>	sF	CCG ATT CTC GGT AAC CTG CT
	sR	CCA TCC ACC AGC TTC GAG GT
<i>hemD</i>	sF	GTG GCC TGG AGT TTT CCA CT
	sR	GAC CAA TAG CCG ACA GCG TAG
<i>hisD</i>	sF	GTC GGT CTG TAT ATT CCC GG
	sR	GGT AAT CGC ATC CAC CAA ATC
<i>purE</i>	sF	CGC ATT ATT CCG GCG CGT GT
	sR	CGC GGA TCG GGA TTT TCC AG
<i>sucA</i>	sF	AGC ACC GAA GAG AAA CGC TG
	sR	GGT TGT TGA TAA CGA TAC GTA C
<i>thrA</i>	sF	ATC CCG GCC GAT CAC ATG AT
	sR	CTC CAG CAG CCC CTC TTT CAG

(Torpdahl et al., 2005)

Table 6. Resistant pattern of 30 *S. Schwarzengrund*



NO.	Resistance pattern
1	C-NA-S
2	C-NA-S
3	AMP-C-CN-NA
4	AMP-C-CN-NA-OT-TE-S-SXT
5	AMP-C-CN-NA-OT-TE-S-SXT
6	C-KF-NA-S
7	AMP-C-CN-K-NA-OT-TE-S-SXT
8	C-KF-NA-S
9	AMP-C-CN-K-NA-OT-TE-S-SXT
10	AMP-C-CN-K-KF-NA-OT-TE-S-SXT
11	AMP-C-CN-K-KF-NA-OT-TE-S-SXT
12	AMP-C-CN-K-KF-NA-OT-TE-S-SXT
13	AMP-C-CN-K-KF-NA-OT-TE-S-SXT
14	AMP-C-CN-K-KF-NA-OT-TE-S-SXT
15	AMP-C-CN-NA-OT-TE-S-SXT
16	C-CIP-CN-E-KF-NA-OT-TE-S-SXT
17	AMP-C-CIP-CN-E-KF-NA-S-SXT
18	AMP-C-CIP-CN-E-KF-NA-S-SXT
19	AMP-C-CIP-CN-E-KF-NA-S-SXT
20	C-CIP-CN-E-NA-OT-TE-S-SXT
21	C-CIP-CN-E-NA-OT-TE-S-SXT
22	C-CIP-CN-E-NA-OT-TE-S-SXT
23	AMP-C-CIP-CN-E-KF-NA-S-SXT
24	C-NA-OT-TE-S-SXT
25	C-NA-OT-TE-S-SXT
26	C-NA-OT-TE-S-SXT
27	AMP-C-CN-NA-OT-TE-S-SXT
28	AMP-C-CN-NA-OT-TE-S-SXT
29	AMP-C-CN-NA-OT-TE-S-SXT
30	C-CIP-CN-E-NA-OT-TE-S-SXT

AMP, Ampicillin; C, Chloramphenicol; CIP, Ciprofloxacin; CN, Gentamicin; E, Enrofloxacin; K, Kanamycin; KF, Cephalothin; NA, Nalidixic acid; OT, Oxytetracycline; TE, Tetracycline; S, Streptomycin; SXT, Sulfamethoxazole/Trimethoprim

Table 7. Number of resistant isolates and prevalence of resistance (%) to 12 antimicrobial agents in *S. Schwarzengrund*

Antimicrobial Drugs		Number of resistant isolate (Prevalence of resistance, %)
Beta-lactam	Ampicillin (AMP)	18 (60%)
	Cephalothin (KF)	7 (23%)
Aminoglycosides	Gentamicin (CN)	11 (73%)
	Kanamycin (K)	7 (47%)
	Streptomycin (S)	29 (97%)
Phenicol	Chloramphenicol (C)	30 (100%)
Quinolones	Ciprofloxacin (CIP)	9 (30%)
	Enrofloxacin (E)	9 (30%)
	Nalidixic acid (NA)	30 (100%)
Tetracycline	Tetracycline (TE)	21 (70%)
	Oxytetracycline (OT)	21 (70%)
Sulfonamides	Sulfamethoxazole/Trimethoprim (SXT)	25 (83%)

Table 8. Serotype and STs of strains used in this study

Strain/serotype	Allelic profile							ST
	<i>aroC</i>	<i>dnaN</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>	
<i>S. Schwarzengrund</i>	43	47	49	49	41	15	3	96
ATCC 23566 (ST)	10	7	12	9	5	9	2	19
<i>S. Typhimurium</i>¹	10	7	12	9	5	9	2	19
ATCC 13076 (SE)	5	2	3	7	6	6	11	11
<i>S. Enteritidis</i>²	5	2	3	7	6	6	11	11
<i>S. Albany</i> (Farm E)	104	100	54	78	104	9	48	292
<i>S. Albany</i> (Farm F)	104	100	54	78	104	9	48	292
BCRC 15464 (SP)	5	2	3	7	31	41	11	92
<i>S. Pullorum</i>³	5	2	3	7	31	41	11	92

¹ Isolate from suspended eggs

² Isolate from hatching machine

³ Isolate from chicken

Table 9. The cluster of *S. Schwarzengrund* using MALDI-TOF

NO.	Source	Year	Cluster
3	Broiler breeder farm K	2008	A1
4	Broiler breeder farm B	2008	
5	Broiler breeder farm Q	2008	
9	Stray Dog	2003	
1	Broiler breeder farm B	2008	A2
2	Broiler breeder farm B	2008	
6	Pet Food	2008	
12	Wild bird (Moorhen)	2011	
7	Duck	2000	B
15	Broiler	2010	
17	Pig (Farm A)	2012	
27	Turkey (Farm D)	2012	
8	Pet Food	2008	C
10	Wild bird (Crested Goshawk)	2011	
11	Wild bird (Crested Goshawk)	2011	
13	Wild bird (Moorhen)	2011	
14	Wild bird (Moorhen)	2011	
16	Turkey	2012	
18	Pig (Farm B)	2012	
19	Pig (Farm B)	2012	
24	Duck	2012	
30	Turkey (Farm C)	2012	



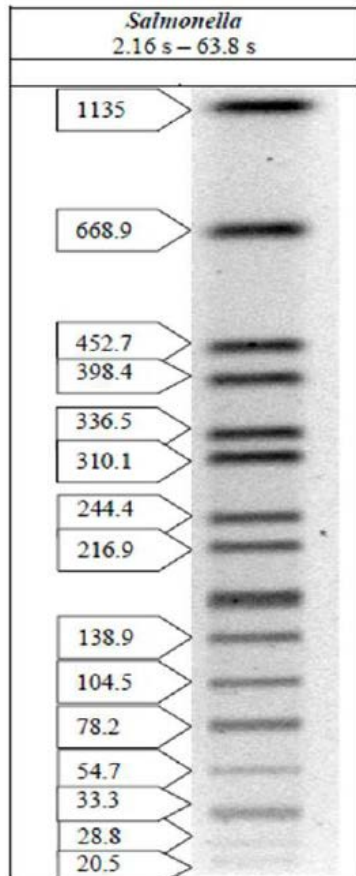


Fig 1. *Salmonella* ser. Braenderup H9812 restricted with *Xba*I and Run with 1% Pulsed Field Certified Agarose Gel and 0.5X TBE buffer for 18-19 hours at 14°C, 120°, Linear Ramping Factor, 6V/cm

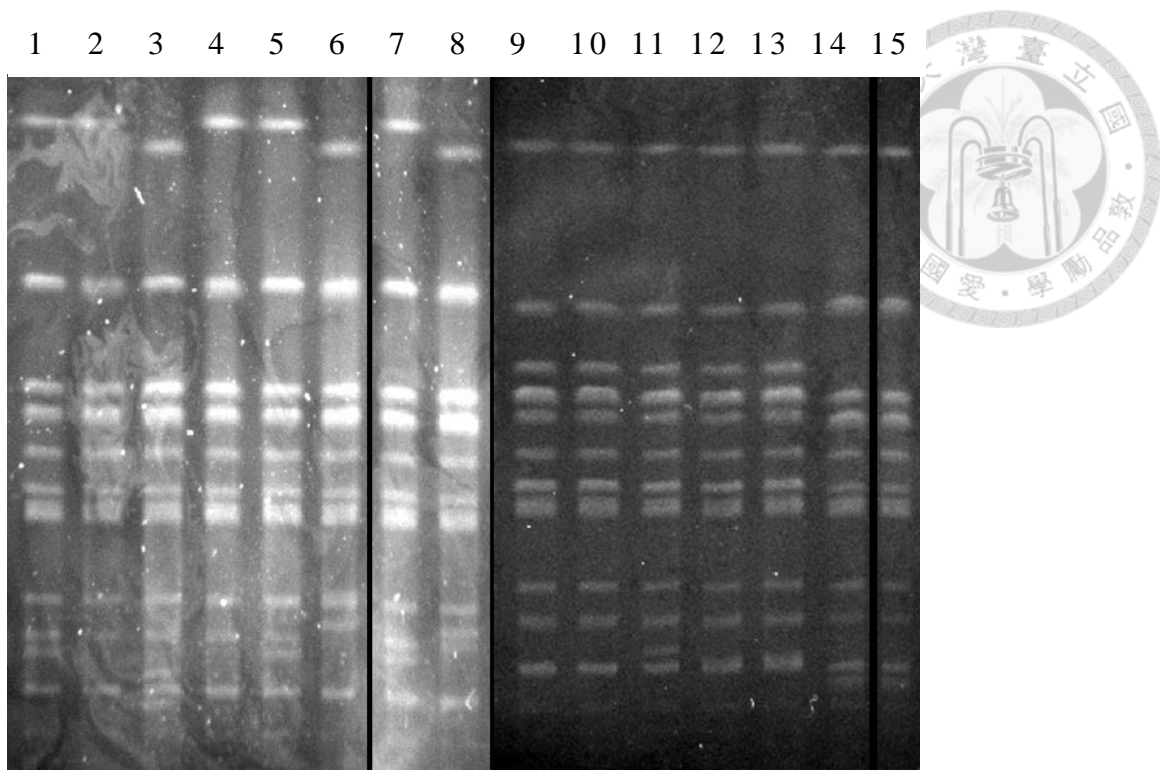


Fig 2a. PFGE patterns of 30 stains *S. Schwarzengrund* using restriction enzyme *XbaI*

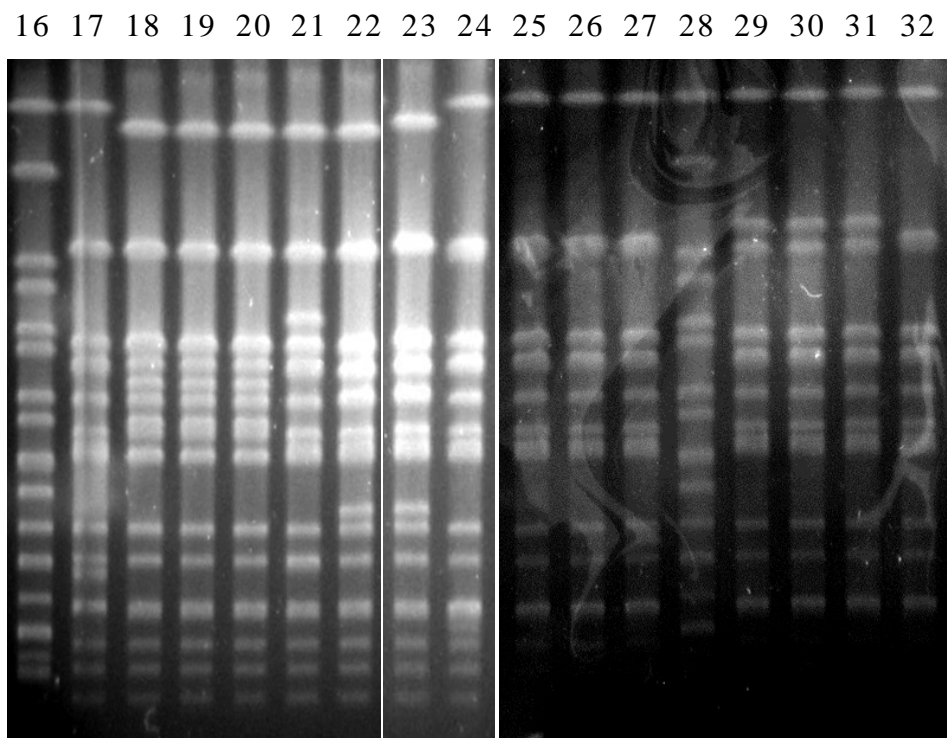


Fig 2b. PFGE patterns of 30 stains *S. Schwarzengrund* using restriction enzyme *XbaI*

Lane 16, 28: *S. Braenderup* H9812. Lane 1-15, 17-27, 29-32: *S. Schwarzengrund*

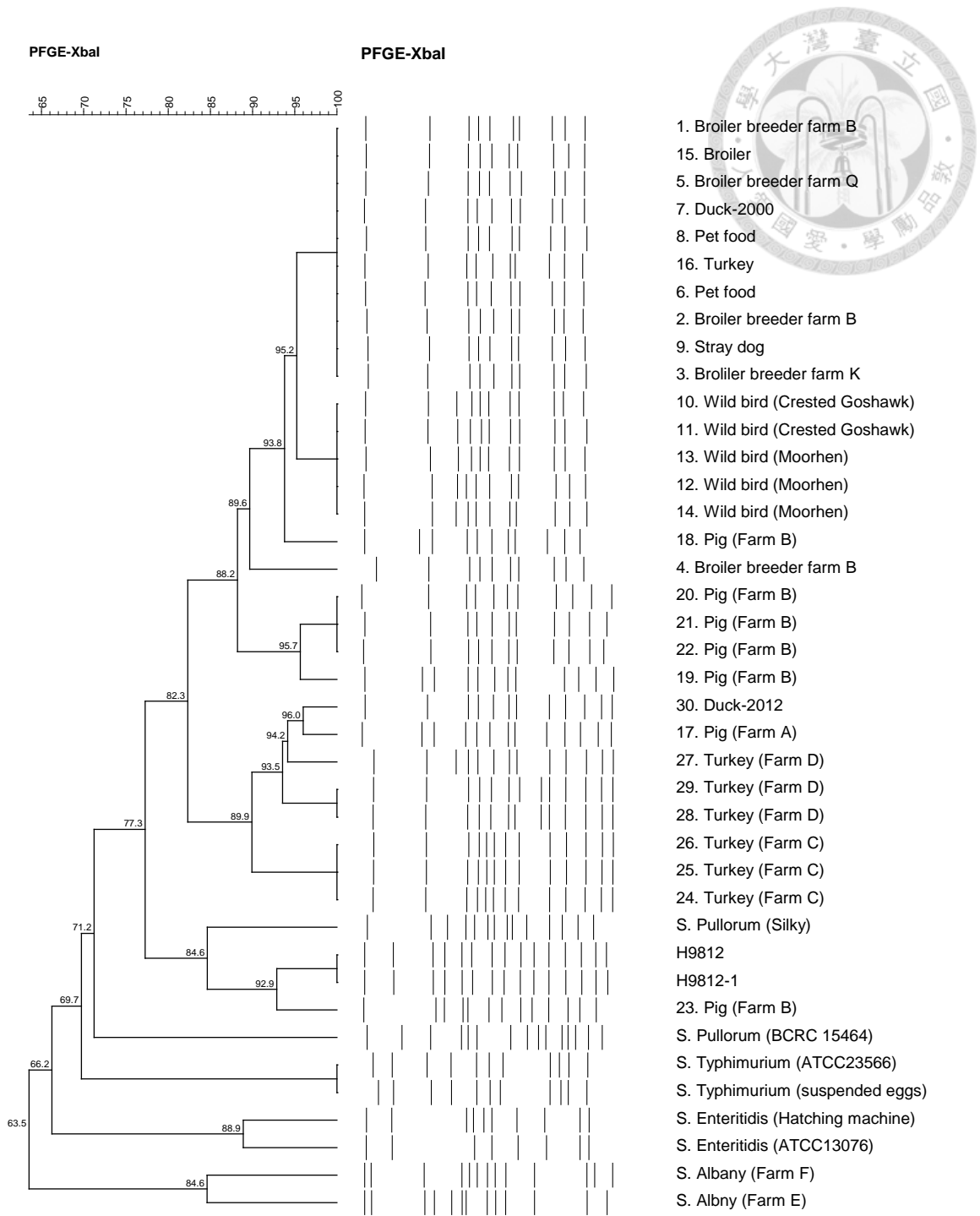


Fig 3. Dendrogram of *XbaI*-digested patterns of all isolates

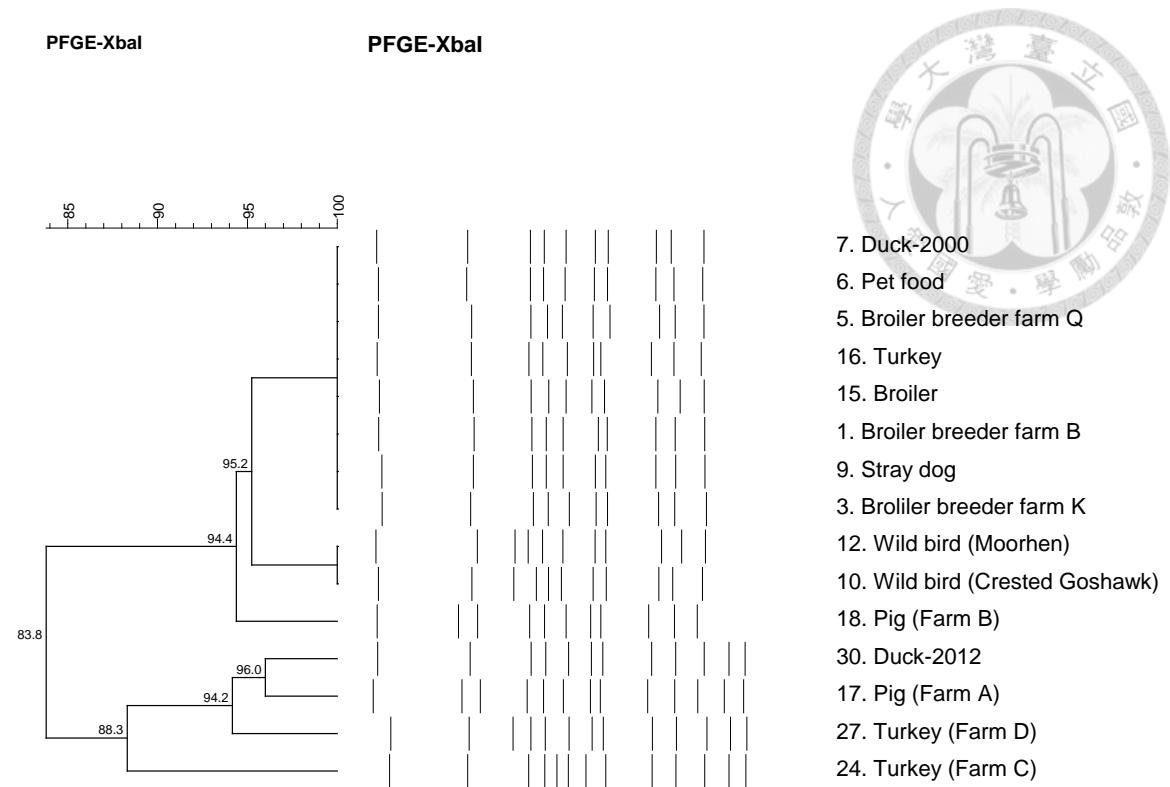


Fig 4. Dendrogram of unrelated *S. Schwarzengrund* strains digested by *Xba*I

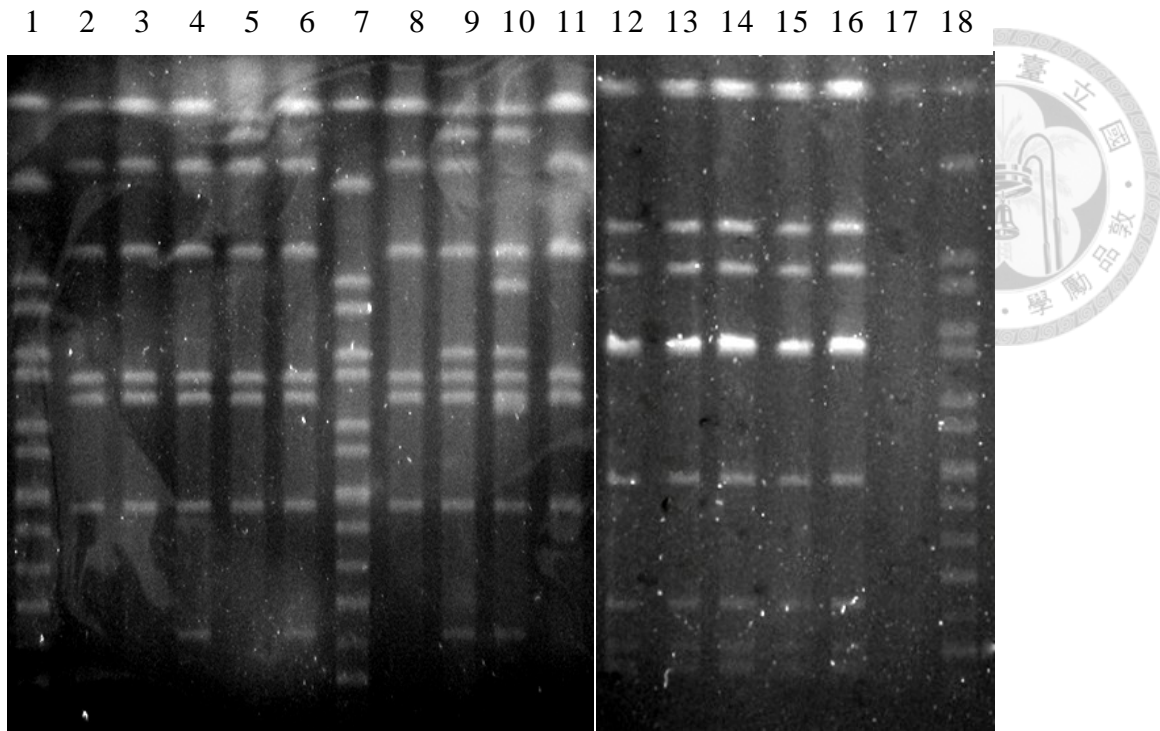


Fig 5a. PFGE patterns of 30 stains *S. Schwarzengrund* using restriction enzyme *AvrII*

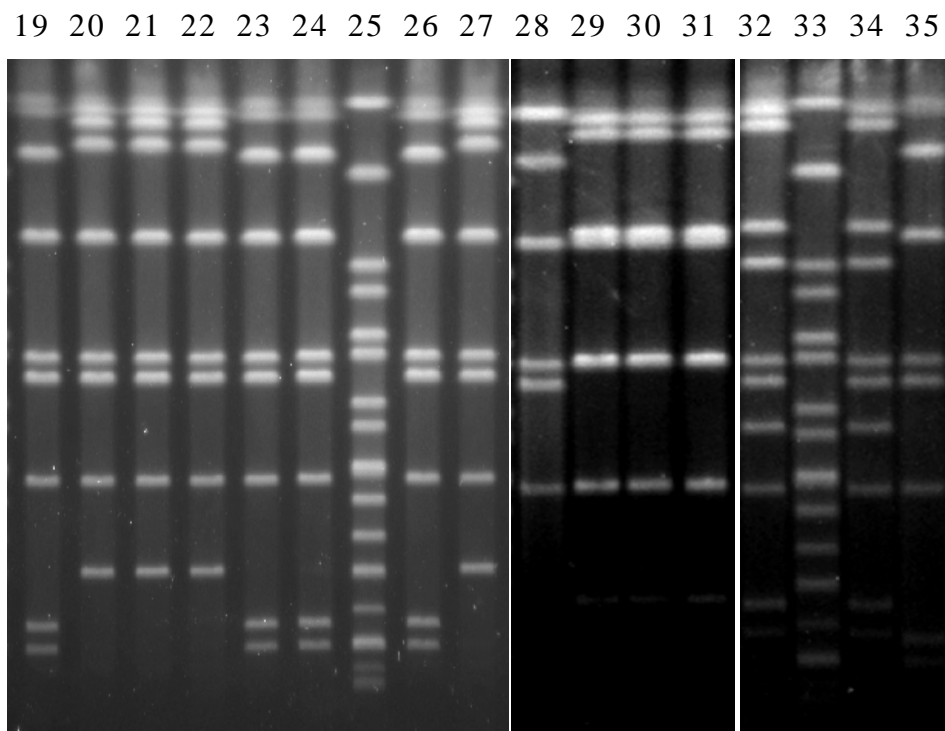


Fig 5b. PFGE patterns of 30 stains *S. Schwarzengrund* using restriction enzyme *AvrII*

Lane 1, 7, 18, 25, 33: *S. Braenderup* H9812. Lane 2-6, 8-17, 19-24, 26-32, 34, 35: *S. Schwarzengrund*

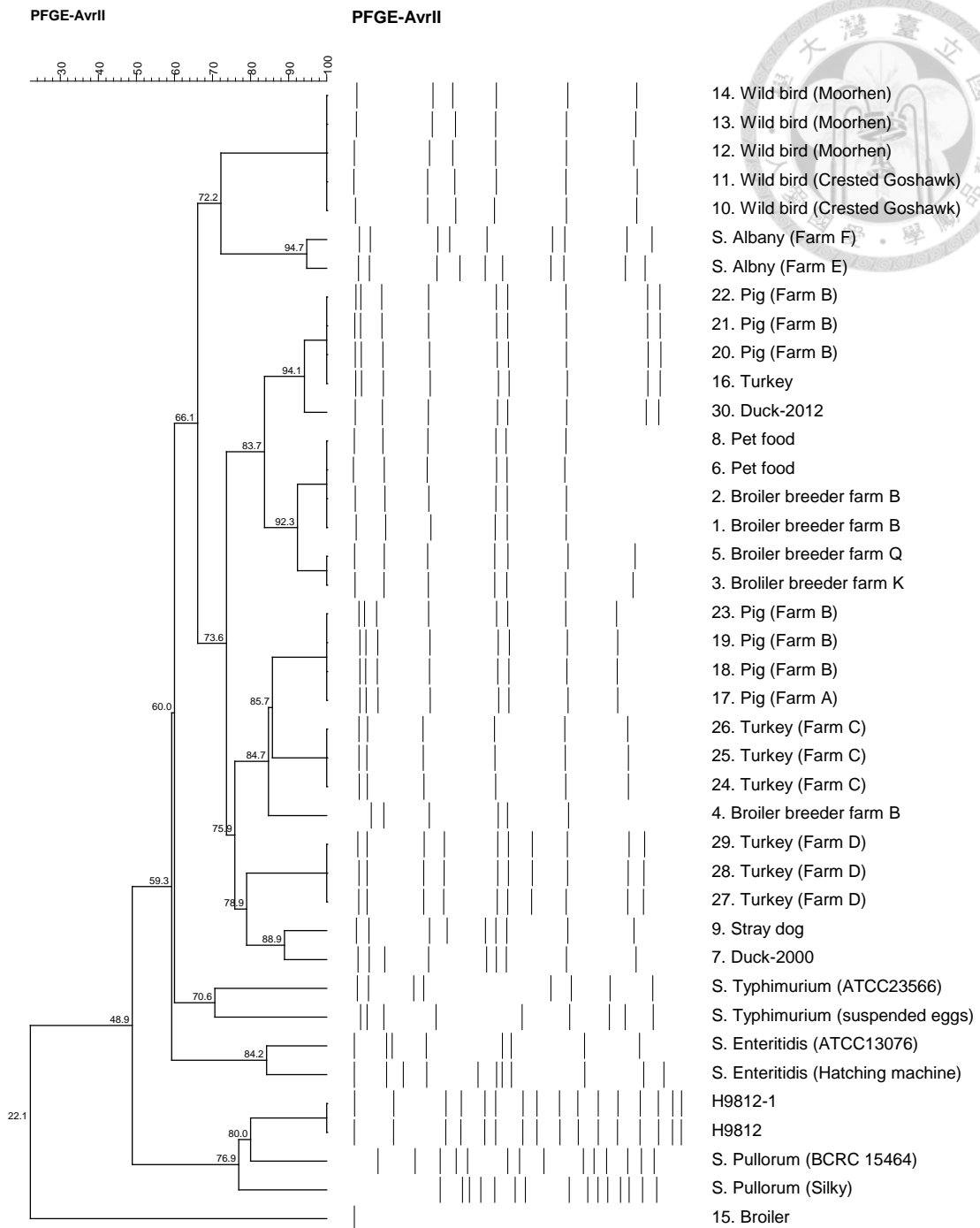


Fig 6. Dendrogram of *AvrII*-digested patterns of all isolates

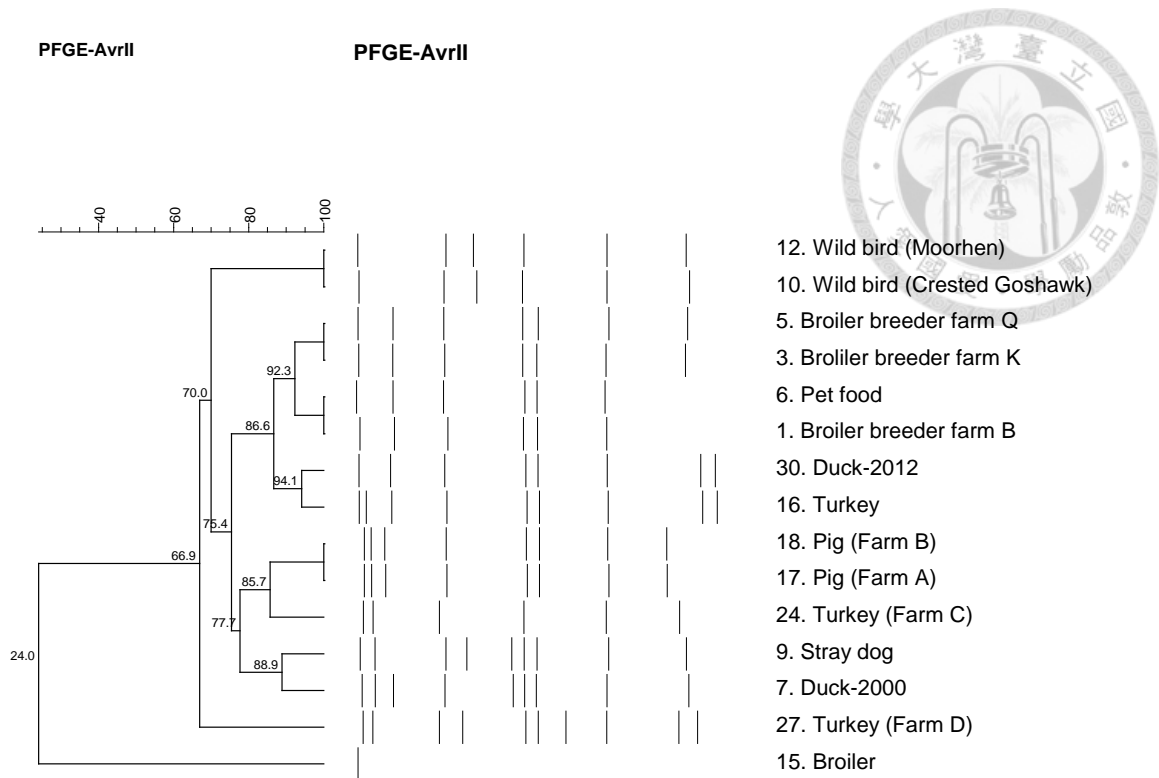


Fig 7. Dendrogram of unrelated *S. Schwarzengrund* strains digested by *AvrII*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

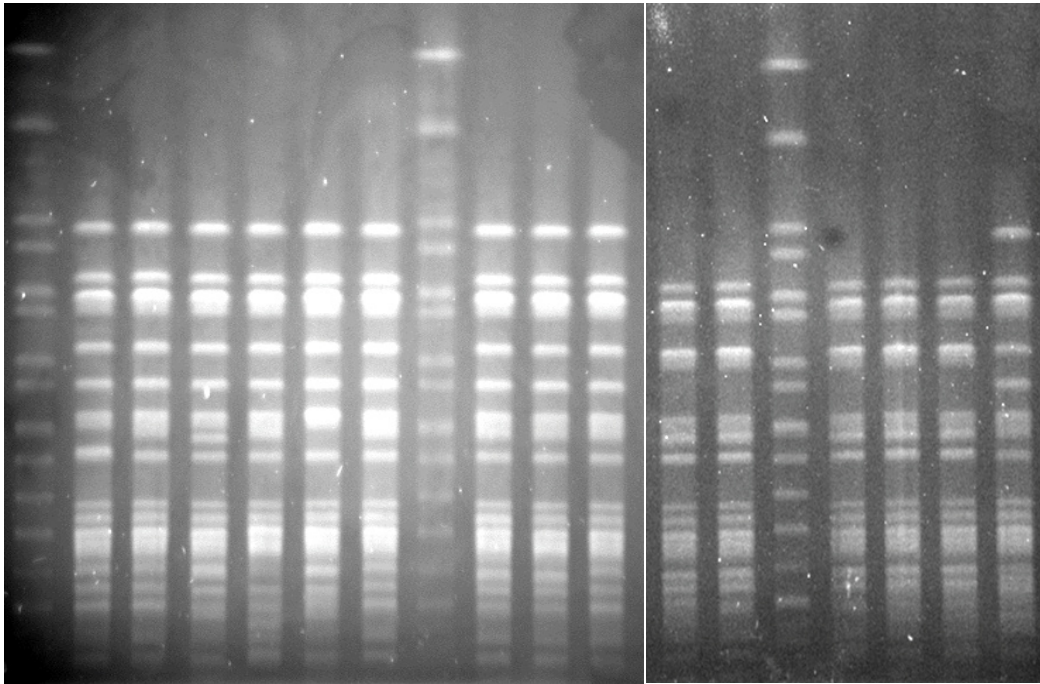


Fig 8a. PFGE patterns of 30 stains *S. Schwarzengrund* using restriction enzyme *SpeI*

19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36

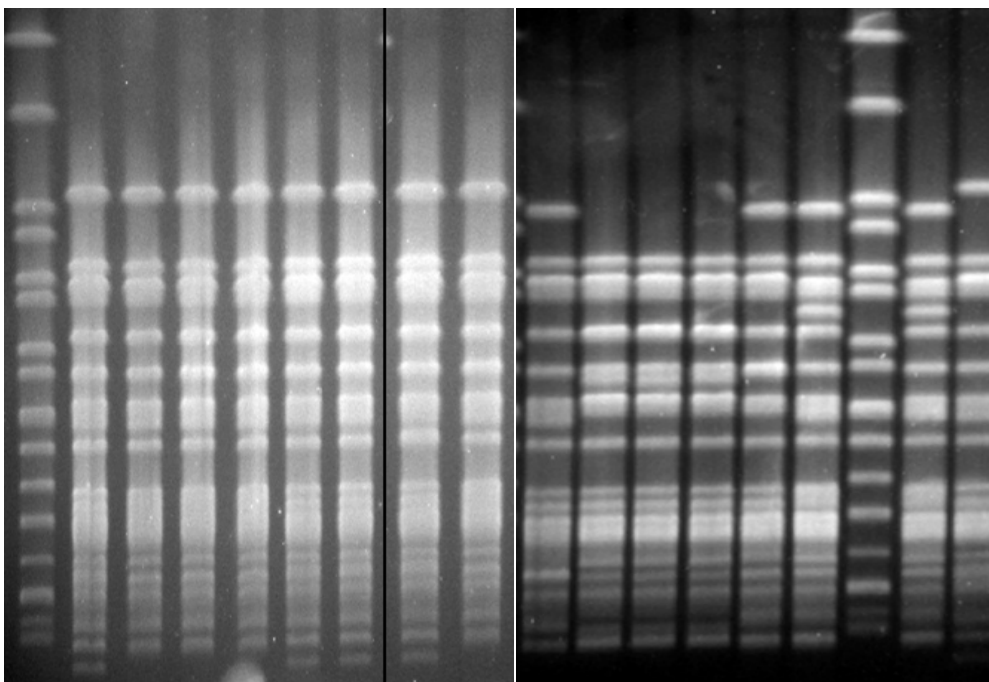


Fig 8b. PFGE patterns of 30 stains *S. Schwarzengrund* using restriction enzyme *SpeI*

Lane 1, 8, 14, 19, 34: *S. Braenderup* H9812. Lane 2-7, 9-13, 15-18, 20-33, 35, 36: *S. Schwarzengrund*

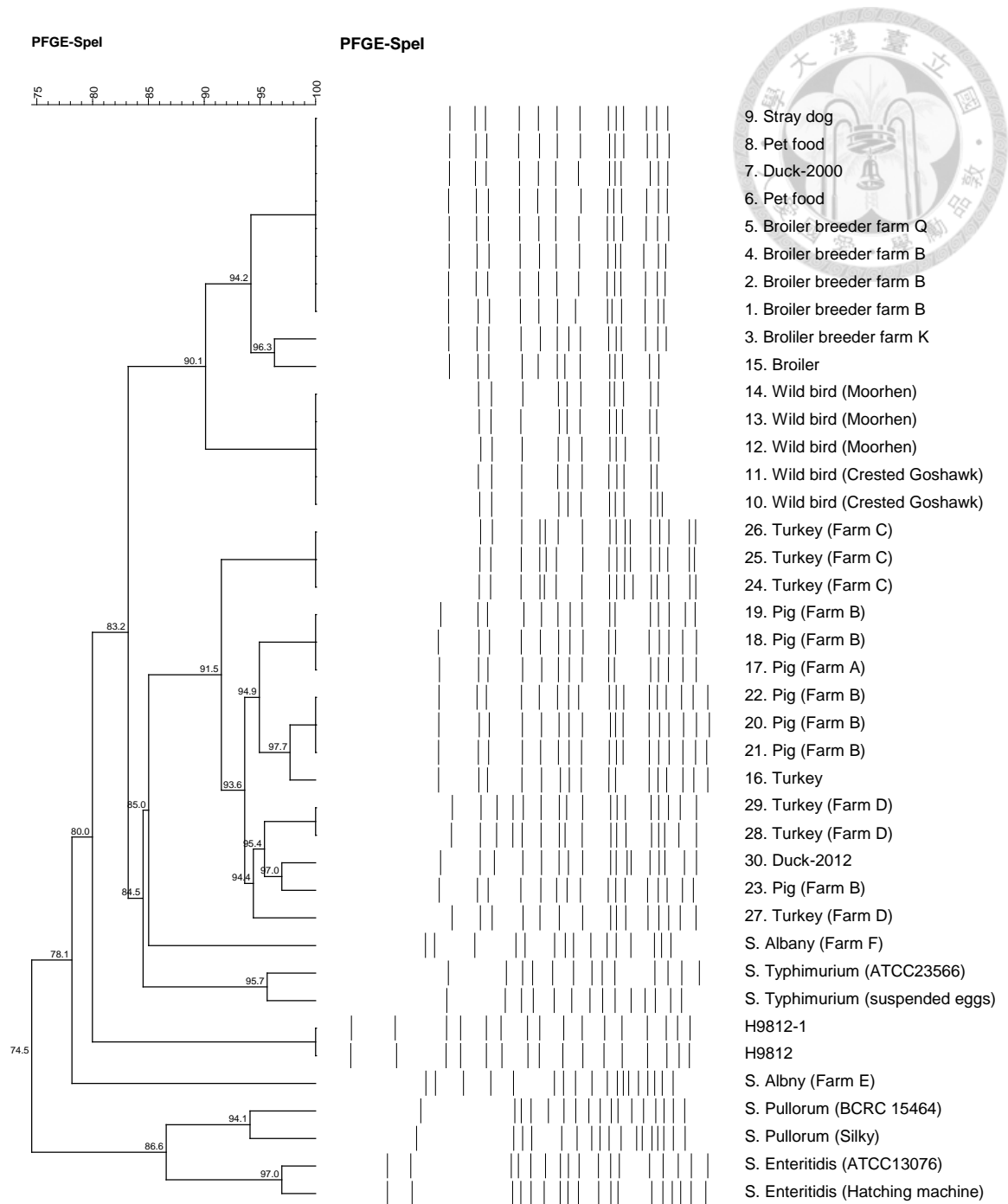


Fig 9. Dendrogram of *SpeI*-digested patterns of all isolates

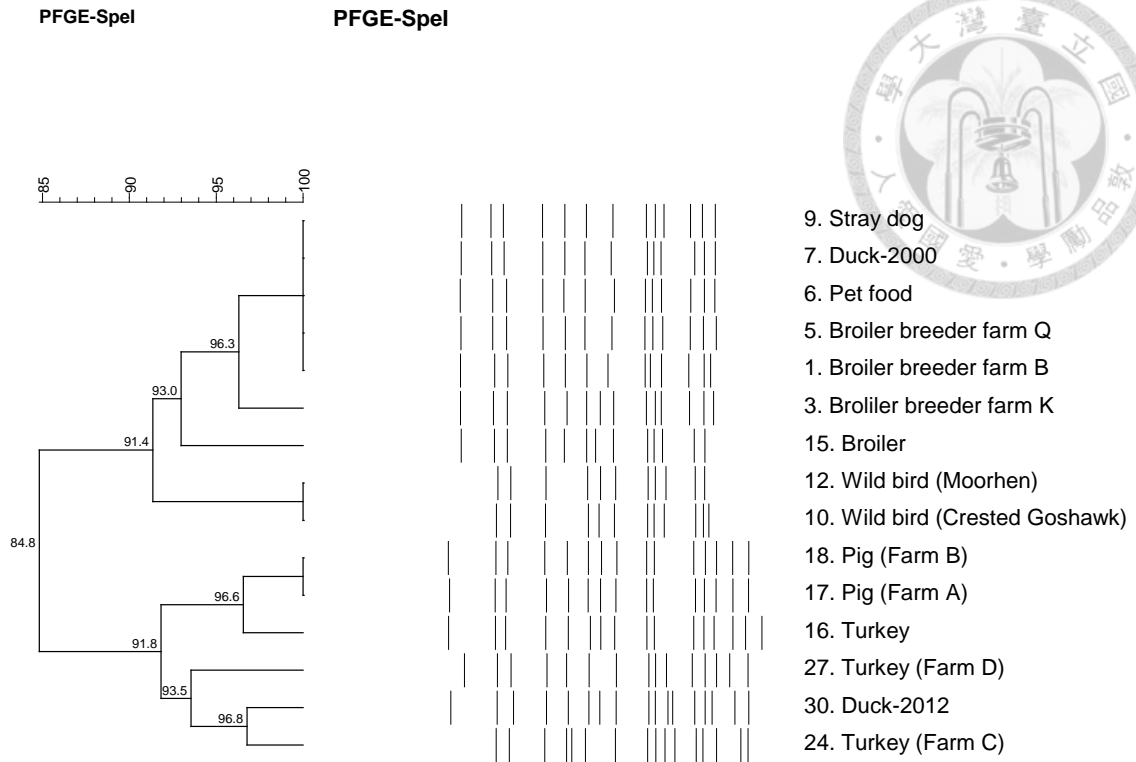


Fig 10. Dendrogram of unrelated *S. Schwarzengrund* strains digested by *SpeI*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

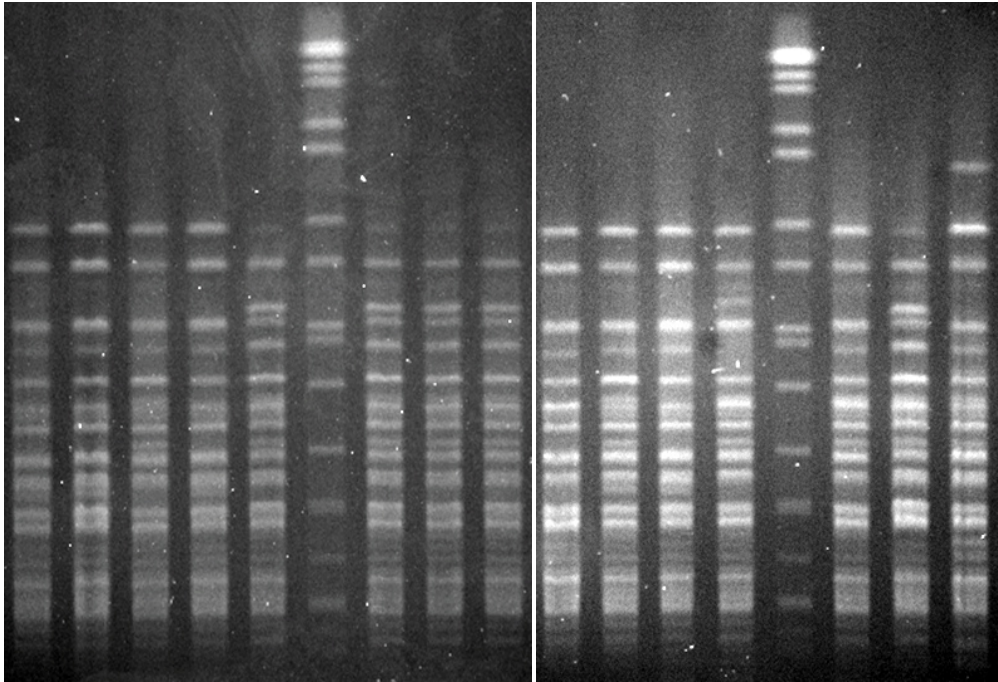


Fig 11a. PFGE patterns of 30 stains *S. Schwarzengrund* using restriction enzyme *Sfi*I

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

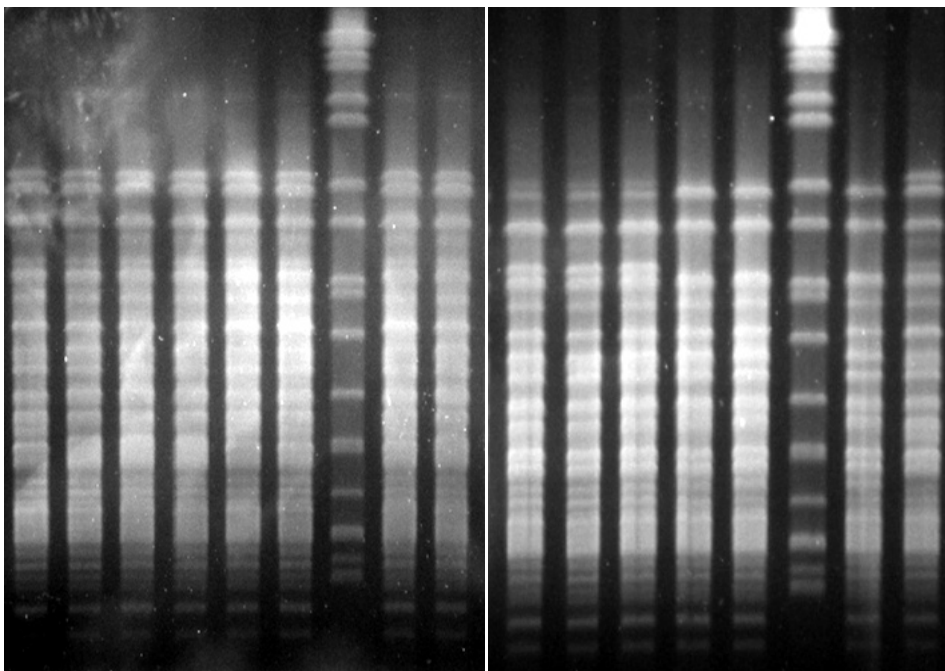


Fig 11b. PFGE patterns of 30 stains *S. Schwarzengrund* using restriction enzyme *Sfi*I

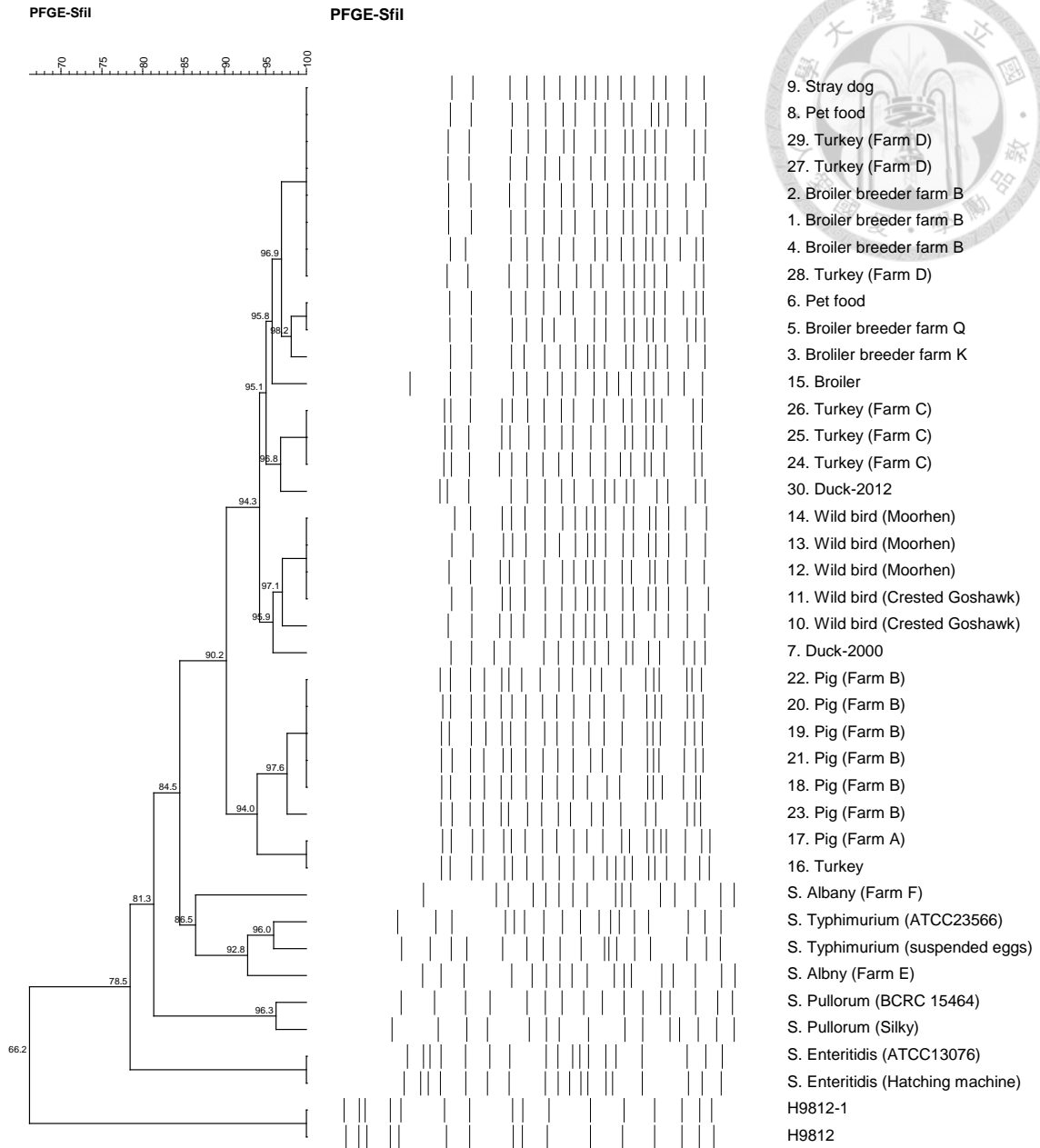


Fig 12. Dendrogram of *Sfi*I-digested patterns of all isolates

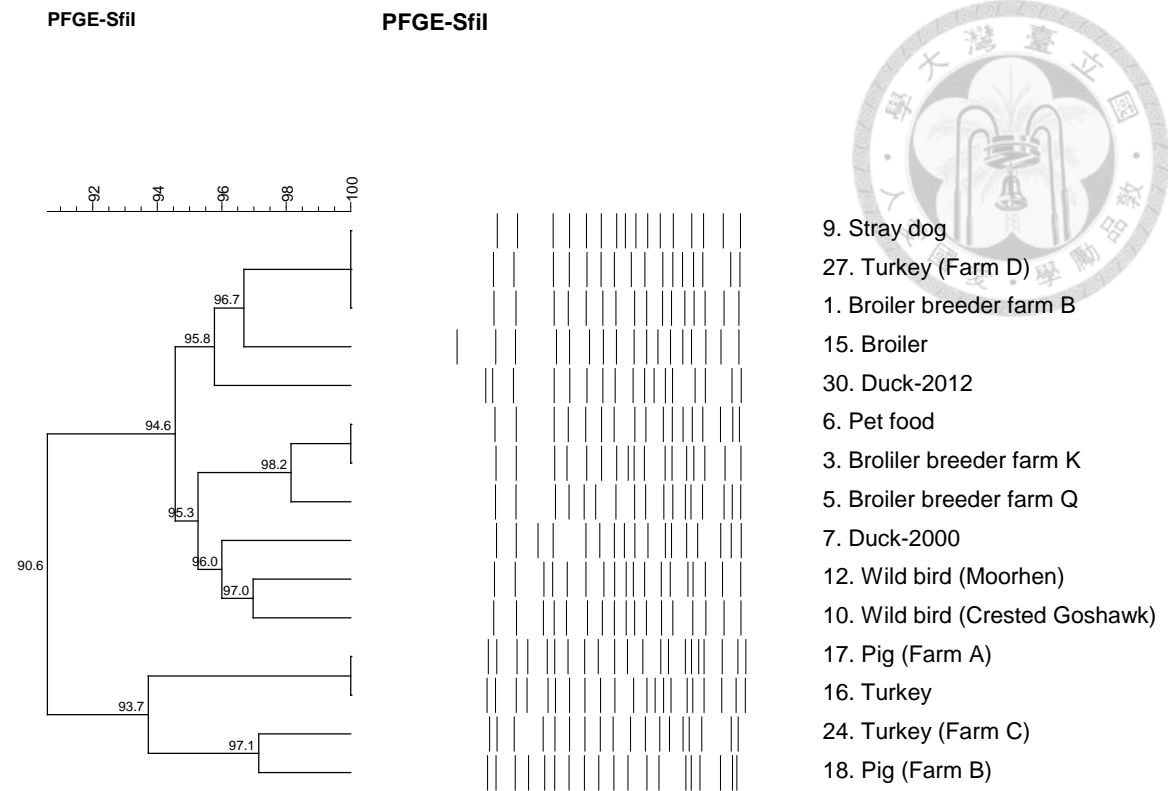


Fig 13. Dendrogram of unrelated *S. Schwarzengrund* strains digested by *Sfi*I

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

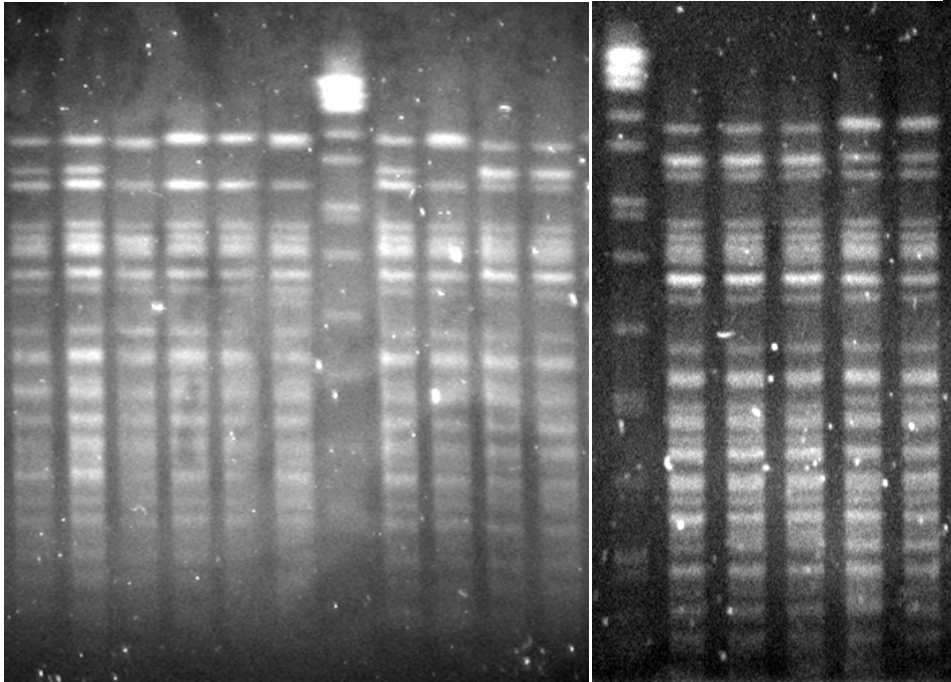


Fig 14a. PFGE patterns of 30 stains *S. Schwarzengrund* using restriction enzyme *NotI*

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35

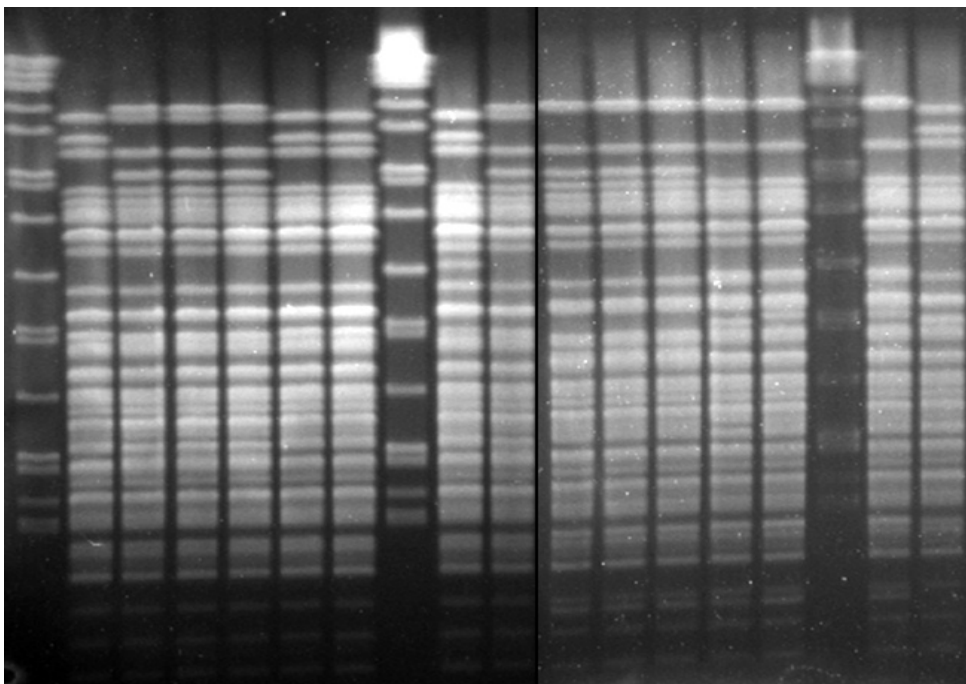


Fig 14b. PFGE patterns of 30 stains *S. Schwarzengrund* using restriction enzyme *NotI*

Lane 7, 12, 18, 25, 33: *S. Braenderup* H9812. Lane 2-6, 8-11, 13-17, 19-24, 26-32, 34, 35: *S. Schwarzengrund*

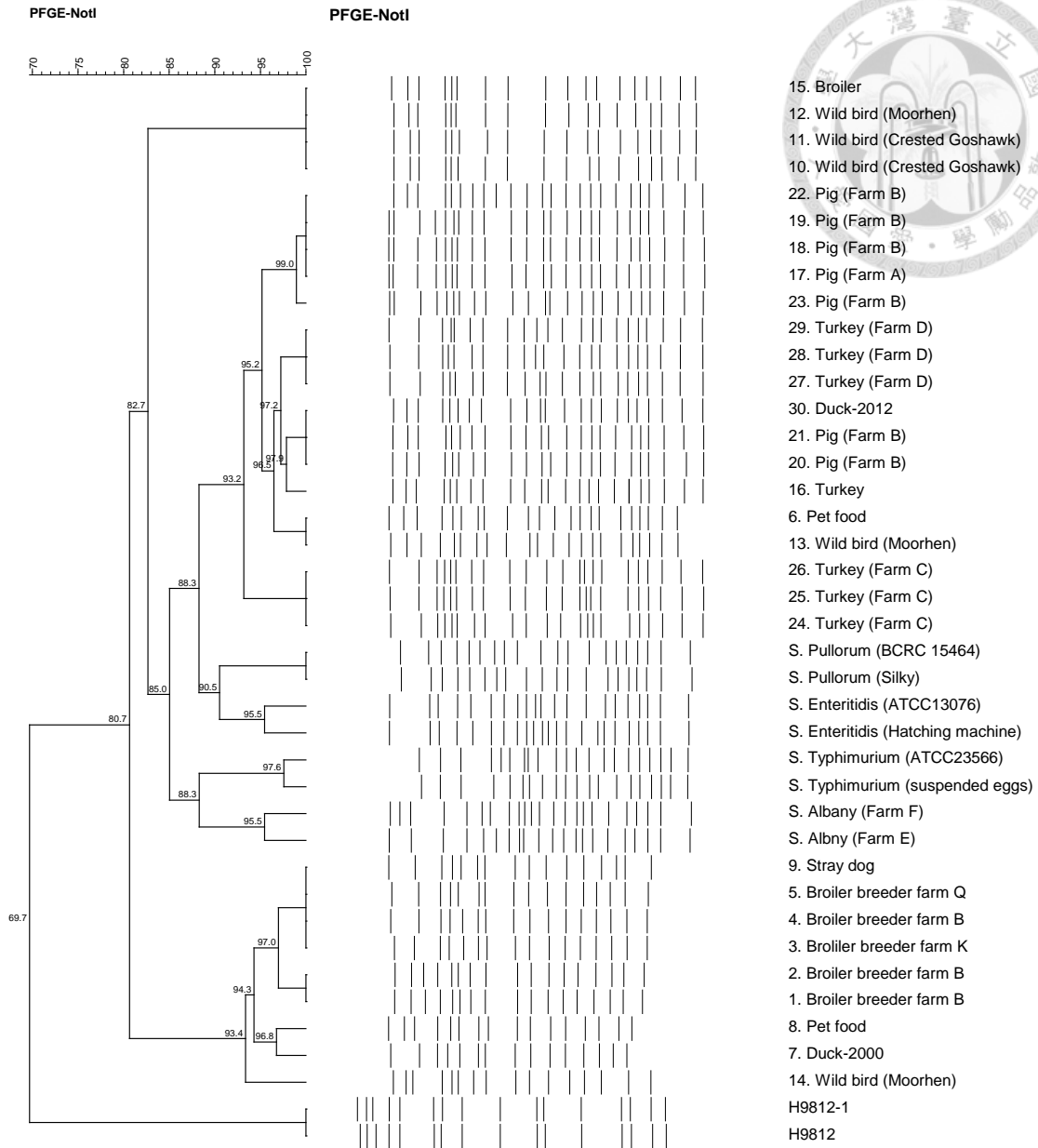


Fig 15. Dendrogram of *NotI*-digested patterns of all isolates

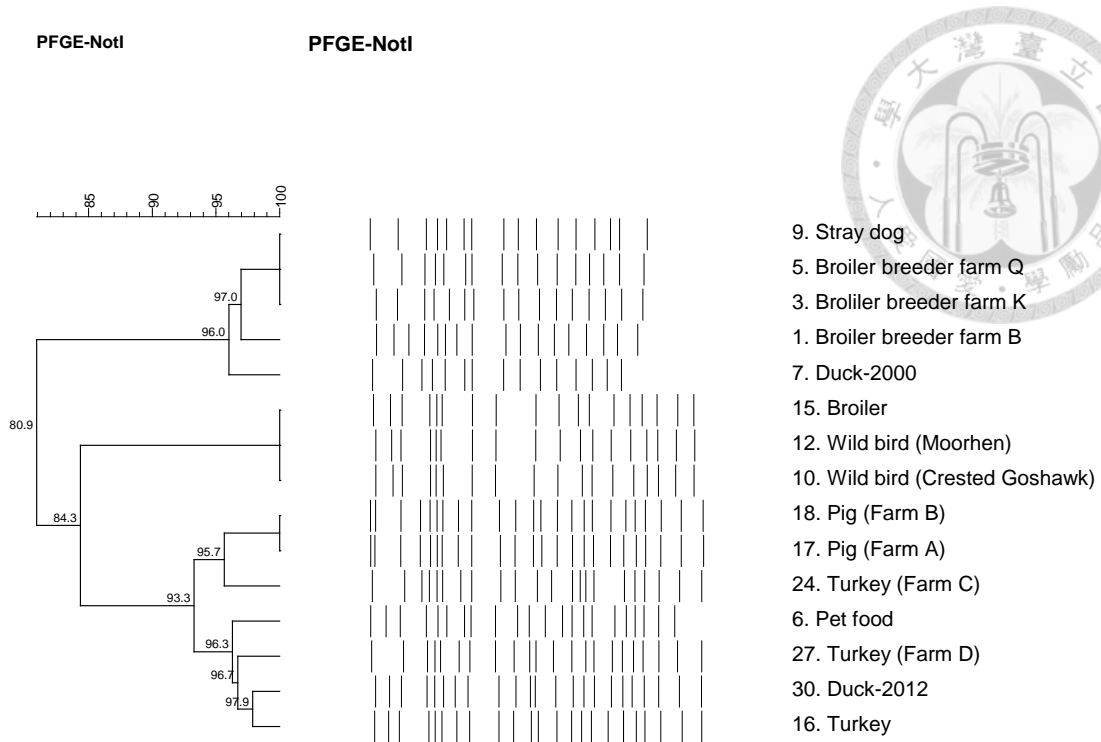


Fig 16. Dendrogram of unrelated *S. Schwarzengrund* strains digested by *NotI*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

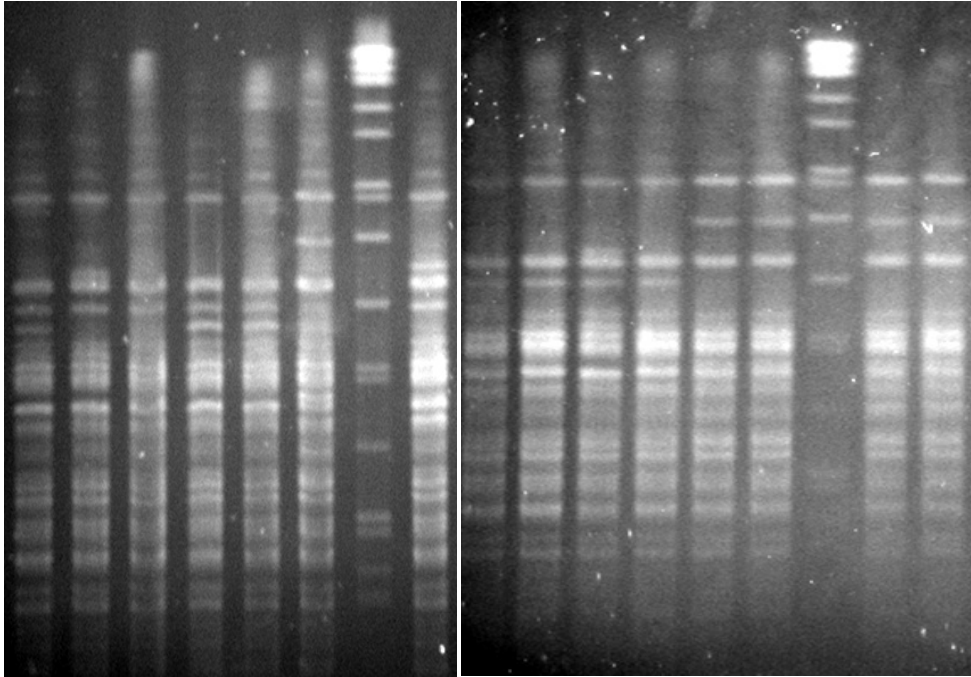


Fig 17a. PFGE patterns of 30 stains *S. Schwarzengrund* using restriction enzyme *PacI*

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34

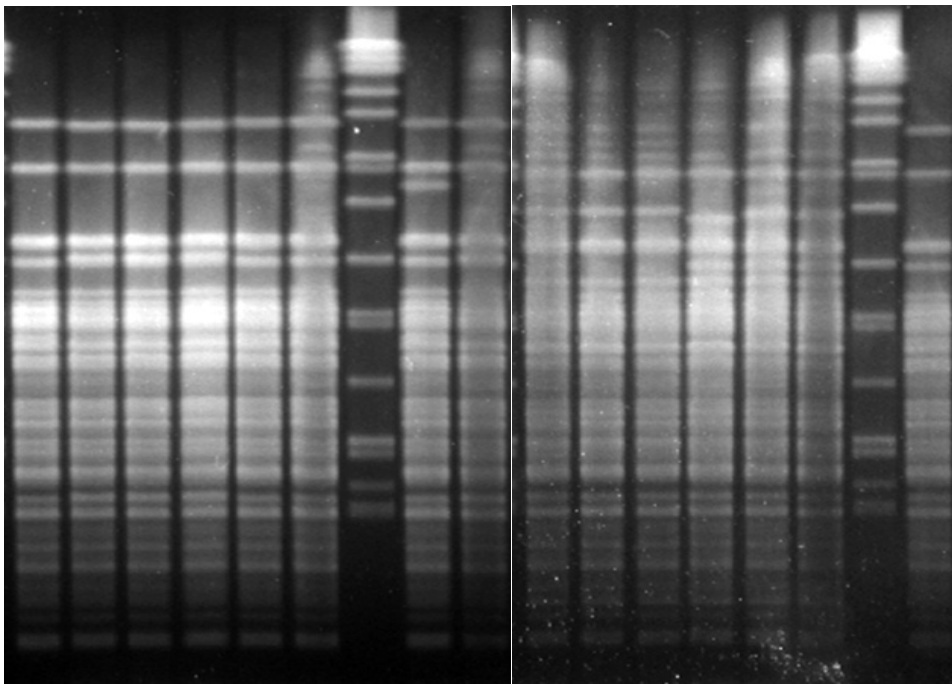


Fig 17b. PFGE patterns of 30 stains *S. Schwarzengrund* using restriction enzyme *PacI*

Lane 7, 15, 24, 33: *S. Braenderup* H9812. Lane 1-6, 8-14, 16-23, 25-32, 34: *S. Schwarzengrund*

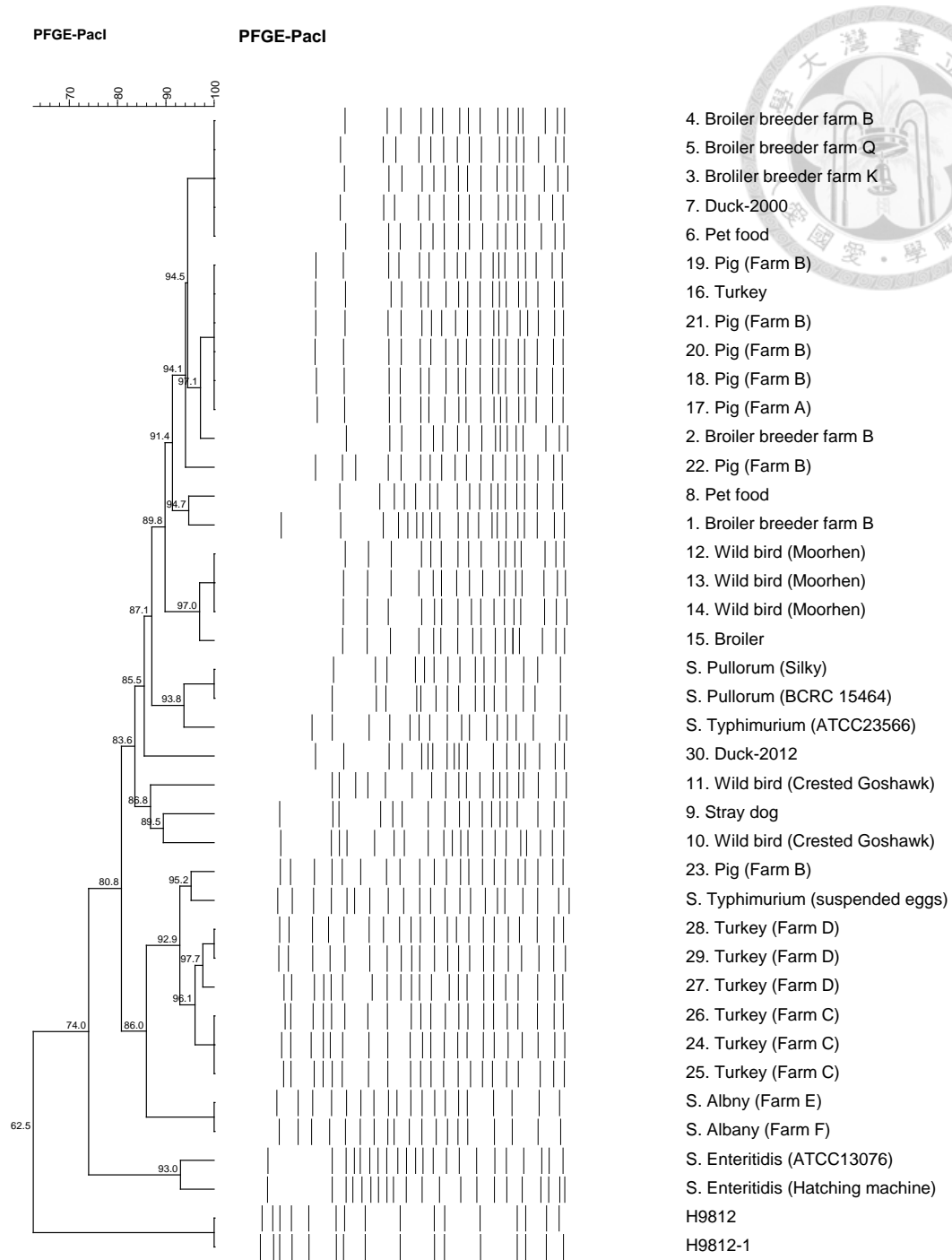


Fig 18. Dendrogram of *PacI*-digested patterns of all isolates

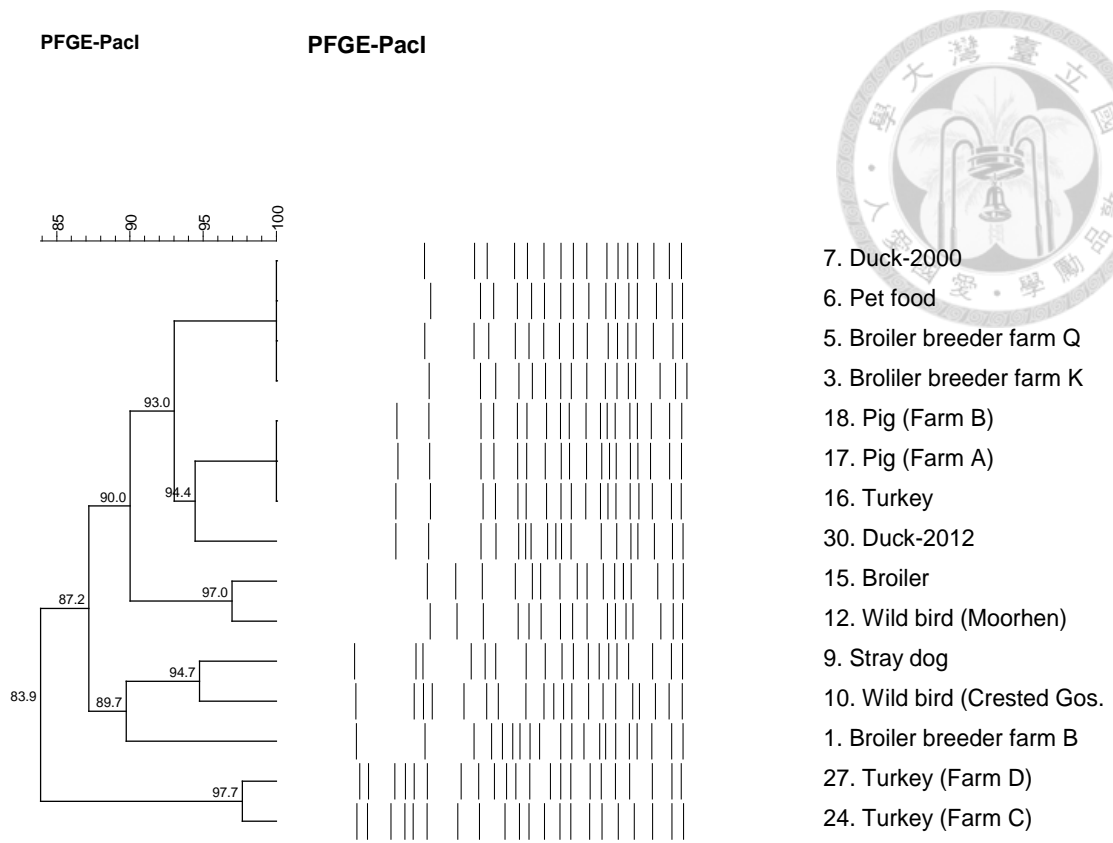


Fig 19. Dendrogram of unrelated *S. Schwarzengrund* strains digested by *PacI*

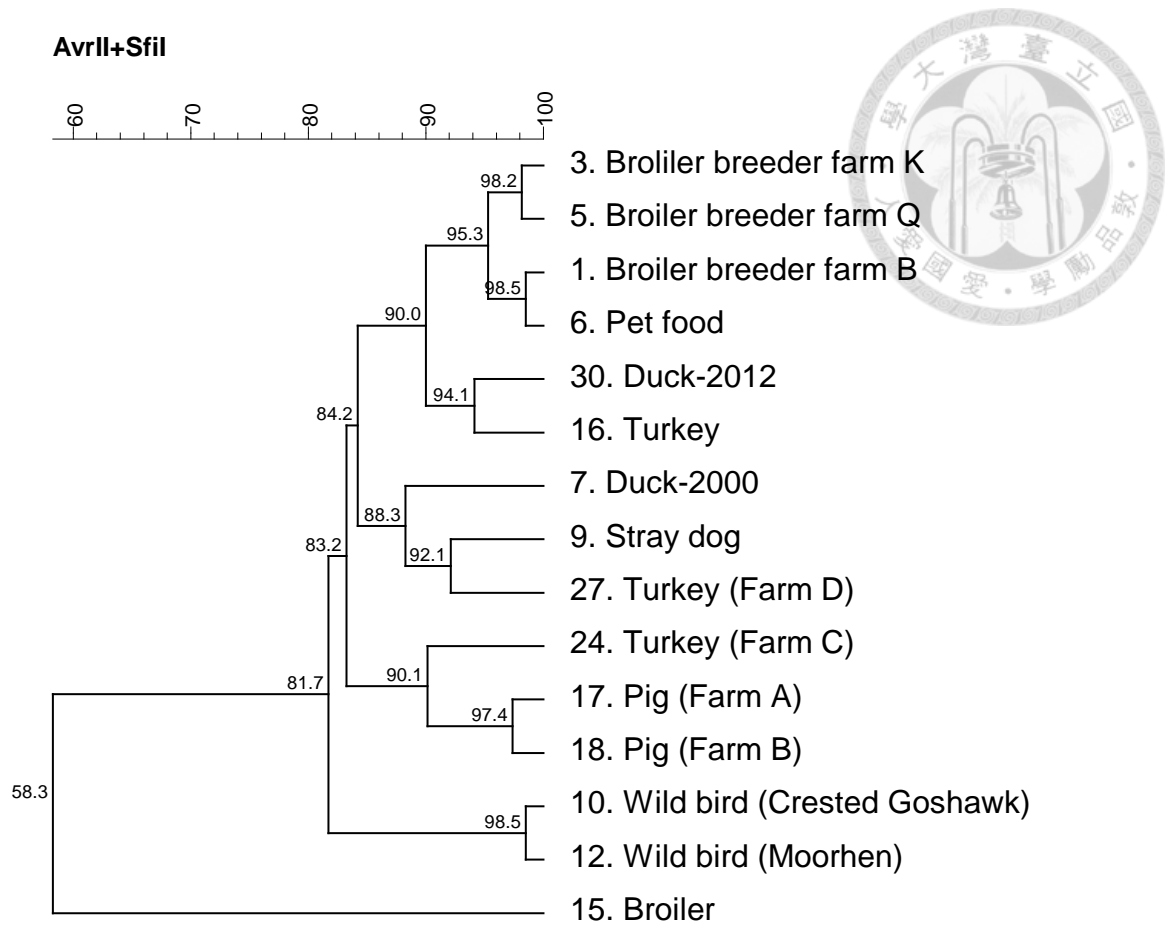


Fig 20. Dendrogram of unrelated *S. Schwarzengrund* strains digested by *AvrII* and *SfiI*

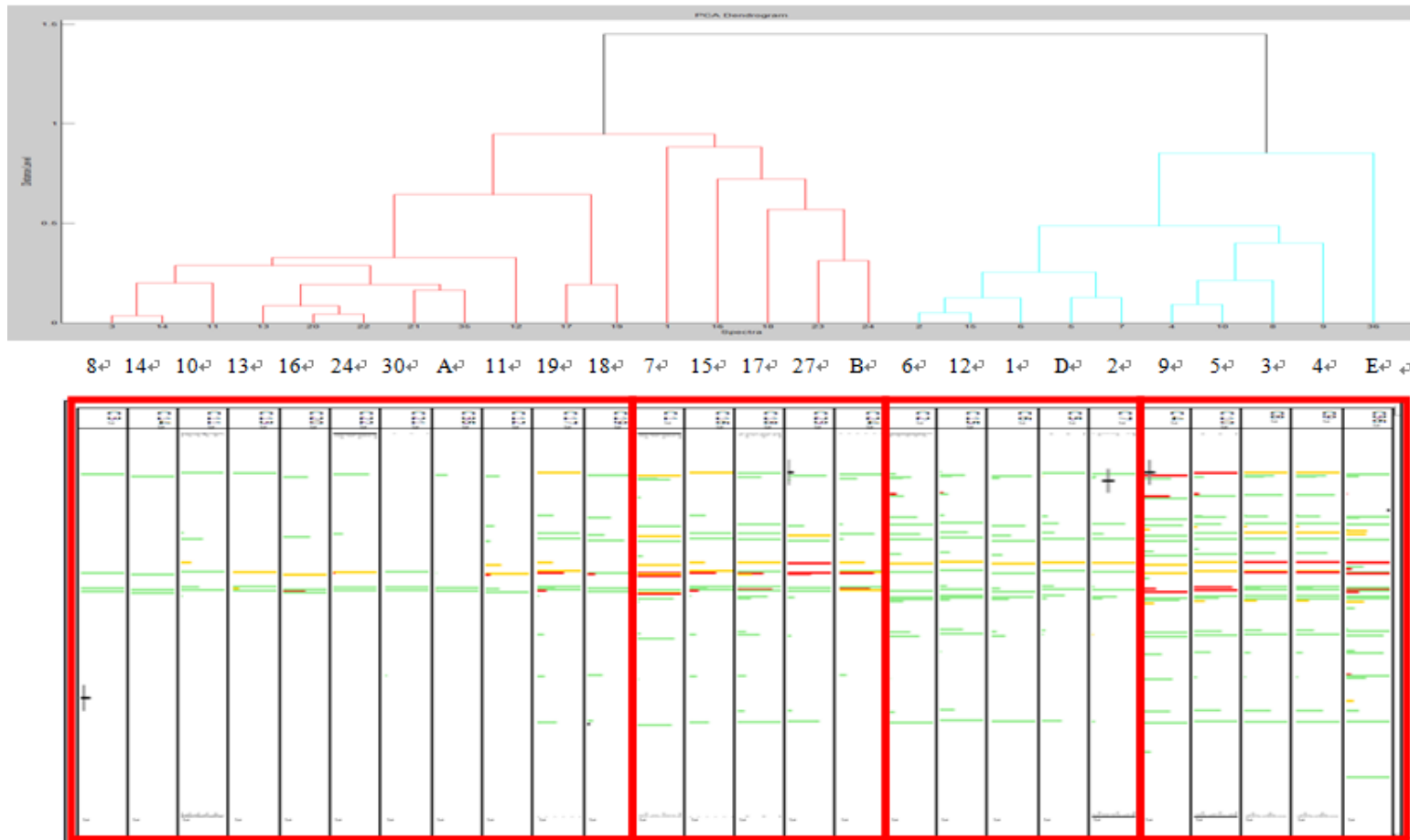


Fig 21. Mass spectrometric profiles and dendrogram of *S. Schwarzengrund* analysis by MALDI-TOF. Stain A, B, D and E are *S. Schwarzengrund* but not used in this study.

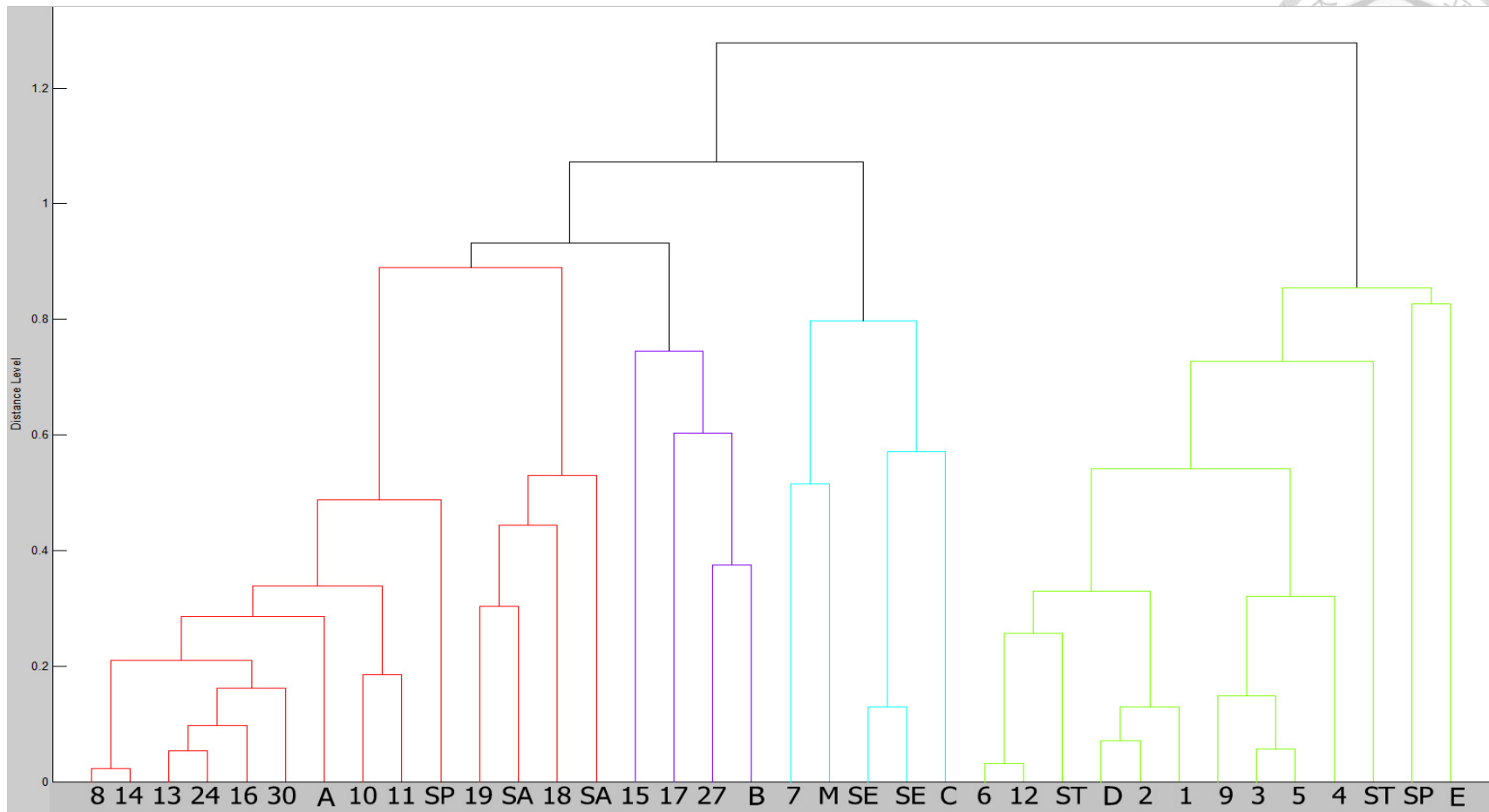


Fig 22. Dendrogram of all *Salmonella* isolates analysis by MALDI-TOF

Stain A, B, D and E are *S. Schwarzengrund* and stain C is *S. Typhimurium*. These stains have not been used in this study.