

計畫編號：DOH91-DC-2012

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

台灣地區鼠傷寒桿菌多重抗藥性菌株及其分子
流行病學之研究

研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗組

計畫主持人：李智隆

研究人員：陳光燻

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目 錄

	頁 碼
封面	
(1) 摘要	(1)
(2) 前言	(2)
(3) 材料與方法	(4)
(4) 結果	(6)
(5) 討論	(9)
(6) 結論與建議	(12)
(7) 參考文獻	(13)
	共 () 頁

(1) 摘要

台灣地區食因性及散發性感染事件，以鼠傷寒桿菌最為常見，本實驗收集台灣地區 1990-2001 年間分離 157 株鼠傷寒桿菌菌株，包括二件集體食因性中毒案件(八十九年四月間仁愛之家 19 株中毒案及九十年四月間 11 株原住民食因中毒案件)及各地散發個案之菌株，利用抗藥性試驗(disk diffusion)及質體輪廓(plasmid profile assay, PPA)與脈衝式電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)方法，進行分子流行病學分析探討。另外，利用 PCR 方法檢測其 invasion、integron 與 virulence gene 三種毒力基因。

紙錠藥物結果顯示，單一藥物抗藥性比例以 streptomycin 84.2 % 最高，其次依序為 tetracycline 82.5 %，chloramphenicol 71.9 %，ampicillin 70.2 % 及 nalidixic acid 18.4 %；而對三種(含)以上藥物抗藥性比例占 75.4 %，五種占 25 %，七種以上則為 13.2 %。顯示傳統一線藥物有 70-80 % 以上抗藥高比例；而多重抗藥比例增加且相對於第三代頭孢子素 ceftiraxone 及 Quenolone 類的 ciprofloxacin 藥物也逐漸產生抗藥性。

分析鼠傷寒三種致病相關基因，結果顯示，沙門氏鼠傷寒桿菌侵入深層內皮細胞所必須之 invasion(invA, invasion gene 321bp)基因有 131 株，佔 93.57 % (131/140)比率，帶有經由 site-recombination 機制

的嵌入基因(integron , 265bp)有 88 株佔 62.86 % (88/140) , 與毒力有關之 spvC (virulence gene , 392bp)則有 107 株 76.4 % 陽性率(107/140)。

使用質體輪廓及限制酶脈衝電泳法 , 對特定食因中毒案件及散發菌株進行分子流行病學探討 , 結果均呈一致性圖譜 , 顯示二種方法對分子流行病學事件調查具有其適用性 ; 進一步 , 對各地不同年代散發菌株分析比對 , 菌株分型圖譜顯示 , 二種限制酶 *Xba-1* 與 *Spe-1* 脈衝電泳分型能力相似 , 分別區分成 24 型及 23 型 (X1-X24 與 S1-S23) 且以 89 及 90 年度分離株差異性較大 , 另外 , 對 20 株五種多重抗藥菌株(ampicillin、streptomycin、sulfonamides、chloramphenicol、tetracycline ; ASSuCT, R-types) , 則有較明顯差異出現 , 可能為抗藥性基因變異或基因重組 , 導致限制酶無法辨識。

關鍵詞 : 沙門氏鼠傷寒桿菌、紙錠抗生素敏感試驗、脈衝式電泳法。

(2) 前言

1990 年代 , 鼠傷寒桿菌第 104 確定型(*salmonella typhimurium definitive type104*, DT104)在英國被發現後 , 至 1995 年時 , DT104 已成為英國所有罹患沙門氏桿菌腸道感染致病因的第二位。所有 DT104 型鼠傷寒桿菌中 , 有 90% 對安匹西林、氯黴素、鏈黴素、磺胺藥及四環黴素(R-type , ACSSuT 菌株)等藥物具有抗藥性(1) , 而對較新的抗

菌藥物如 trimethoprin 及 ciprofloxacin 具有藥性的 DT104 也陸續被發現(3)。在過去十幾年來，鼠傷寒桿菌抗藥性在各國均有明顯增加趨勢(1,2)；在美國疾病管制局 1996 年監測抗藥性報告，3903 傷寒株被分離出，1995 年有 976 株(25%)為 *Salmonella typhimurium*，其中大約有 28% 則為鼠傷寒桿菌第 104 確定型，相較於 1990 年的 7% 要高出許多；在 1996 年人體分離的鼠傷寒桿菌有 32% 是具有多重抗藥性的(2,4)；因此在世界各國鼠傷寒桿菌抗藥性問題似乎日愈嚴重。

在臺灣地區食因性及散發性感染事件中，多年來以鼠傷寒桿菌檢出率最高；以本局(原預防醫學研究所)歷年來菌株血清型資料顯示，在 1983-1993 十年間食物中毒案件之 1647 菌株中，以沙門氏菌血清型 O4(44%)及 O9(32.5%)最多，其中 O4 血清型以 *Salmonella typhimurium* 最常見，而 O9 則為 *Salmonella typhi*(19)；進一步 1993-1997 年沙門氏菌集體食品中毒案件檢出菌株型別也以 *Salmonella enteritidis* 及 *Salmonella typhimurium* 最多。而鄰近日本自 1989 年至今，*Salmonella enteritidis* 及 *Salmonella typhimurium* 引起食品中毒案件中其分離率亦排名第一、二位。

鼠傷寒桿菌是台灣地區主要食品中毒致病菌，常為食物或肉類受到污染導致而腹痛、腹瀉等症狀，亦因症候輕微或不明顯遭忽略然，多年來一直未被醫界重視。另一方面，歷年來食因性中毒案件或散發

性感染事件所分離出鼠傷寒桿菌菌株，其分子流行病學特性為何？對中毒事件或爆發疫情案件，以防疫角度而言，釐清並迅速處理案情是絕對必須的，而實驗室則需要有提供快速、正確的分子分型結果，這是另一個欲探討的問題。

為明瞭近年來台灣地區臨床分離的鼠傷寒桿菌抗藥性情形，實驗收集來自 1990-2001 十一年間由人體分離的鼠傷寒桿菌約 157 株，依據 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards 標準，以 12 種紙錠抗生素敏感試驗(15)，來篩選鼠傷寒桿菌的多重抗藥性菌株及其他種類抗藥性菌株(如抗 ciprofloxacin)。進一步，由不同引子 *invA* (invasion gene)、*int* (integron)、*spvC* (virulence gene)PCR 實驗，來探討鼠傷寒桿菌菌株帶有侵入、嵌入及毒力基因致病相關性因子。

利用質體輪廓分型(plasmid profile assay, PPA)與脈衝電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分型技術，對特定鼠傷寒感染案件及散發菌株進行比對分析，藉以釐清其分子流行病學特性。

(3) 材料與方法

菌株分離及生化、血清鑑定

實驗收集 11 年(1990-2001)由人體分離的鼠傷寒桿菌 157 株，包括二件集體食因性中毒案件(八十九年四月間仁愛之家 19 株中毒案及

90 年四月間 11 株原住民食因中毒案件)及各地散發個案之菌株 (表一), 培養於 SS-medium (*salmonella shigella* agar)36 , 16-18 小時, 進行基礎生化試驗(triple sugar iron, TSI test)與血清鑑定後, 將菌株於 -20 下保存。

紙錠藥物敏感試驗(disk sensitivity test) :

使用紙錠藥物(BBL)紙錠擴散法(disc diffusion), 包括 ampicillin、sulfonamides、chloramphenical、stroptomycin、tetracycline 及其他種類抗生素如 ciprofloxacin、amikacin、cephalothin(頭孢子素第 1 代)、cefamandole(頭孢子素第 2 代)、ceftirioxone(頭孢子素第 3 代)、gentamicin 與 nalidixic acid 等計 12 種藥物, 菌株培養於 tryptic soy broth(TSB)之隔夜新鮮菌液, 製成 McFarland No.0.5 硫酸鋇標準懸浮液, 平均塗抹於 Mueller-Hinton medium(M-H medium)上, 37 , 18-20 小時培養後觀察抑制圈大小, 依其 BBL 提供抗藥判讀標準。

毒力因子 PCR 實驗

新鮮 2-3 個菌落, 以 100 滅菌水製成懸浮液, 經沸水 10 分鐘後, 離心 13000 轉 15 分鐘, 抽取上清液 2 當作板模。將三組引子 invA(21bp)、int(18bp)、spvC(18bp)進行 PCR 實驗, 條件設定 94 45 秒, 60 45 秒, 72 90 秒, 進行 30 個循環, 產物 7 進行 1.2 % 瓊膠分析。

質體輪廓分型法(plasmid profile analysis, PPA)

使用市售之 Roche Molecular Biochemicals 之 high pure plasmid isolation kit , 依據試劑組所附之標準操作 , 抽取菌株質體 DNA , 使用 1.2 % SK LE agarose 及 0.5×TBE 電泳液 , 電泳條件為 100V, 3.5 小時 , 進行 DNA 片段分析 , EtBr 染色及照相存檔。

脈衝式電泳法(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

將特定抗藥性菌株及食因性中毒案件與各地散發個案之菌株 , 依據美國 CDC 最近 2001 年發表快速脈衝電泳分型法 , 以 *Xba-1* 與 *Sfi-1* 二種限制酶進行染色體 DNA 切割作用 , 以不同變換時間方式(*Xba-1* 採 5-20 秒與 *Sfi-1* 採 5-20 秒及 20-45 秒) , 電泳時間分別為 18 及 16 小時 , 使用 1.2 % PFGE agarose 及 0.5×TBE 電泳液 , 進行 DNA 片段分析 , EtBr 染色及照相 , 依片段產生不同的分子圖譜進行分析。

(4) 結果

紙錠抗生素敏感試驗

以紙錠藥物敏感試驗分析 114 株散發菌株 , 初步抗藥結果顯示 , 以 streptomycin 有 84.2 % 最高抗藥比率 (96/114) , 其次為 tetracycline 抗藥比率 82.45 (94/114) , chloramphenicol 比率為 71.93 (82/114) , 而 ampicillin 比率為 70.18 % (80/114) , 其他藥物依序如 nalidixic acid 有 18.42 % 比率 (21/114) , gentamicin 為 8.77 % (10/114) 等等。有

3.8 % 抗 ciprofloxacin 藥物(3/114)及部分抗 ceftiraxone 的中間值菌株被分離出 (如表二)。

在多重抗藥性方面，三種 (含) 藥物以上抗藥性比率有 75.44 % (86/114)，而五種抗藥性有 25 % (含 20 株 ampicillin、streptomycin、sulfonamides、chloramphenicol、tetracycline；ASSuCT 菌株 17.54 %) 菌株則有的被分離出；高達七種以上藥物抗藥性則有 13.16 % (15/114) (如表三)。

毒力因子 PCR 實驗：

三組不同引子 invA(invasion gene , 321bp)、int(integron , 265bp)、spvC(virulence gene , 392bp)進行 PCR 實驗 (如圖一)，結果顯示鼠傷寒桿菌侵入深層內皮細胞所必須之 invasion 基因有 131 株，佔 93.57 % (131/140)比率，帶有經由 site-recombination 機制的嵌入基因有 88 株佔 62.86 % (88/140)，而與毒力有關之 spvC 則有 107 株 76.4 % 陽性率(107/140)；另外，20 株 ASSuCT 多重抗藥菌株及七種抗藥性菌株，則完全帶有 invA、int 與 spvC 三種基因。

質體輪廓分型法(plasmid profile assay, PPA)：

分析二件食因性中毒案件(台中仁愛之家中毒案及原住民中毒案) 菌株，其質體型態呈現明顯差異。八十九年仁愛之家中毒案，三條質體分佈在於 10、20 與 25Kb 大小，而九十年原住民食因性中毒案

則有 4.5、6、8.5、10 與 20 Kb 大小之五條質體出現 (如圖二), 進一步, 比對相近分離時間、地點的菌株, 其質體型態亦明顯差異 (如圖三、四)。另外, 以 1-20 Kb 質體大小做為分型區分依據時, 分析由 89 年分離之散發菌株共 52 株, 可區分成 9 型 (P1-P9); 相較於分離於 90 年株菌株的 8 型 (P1-P8) (如圖三、四)。

脈衝電泳法(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

使用 *Xba*1 及 *Spe*-1 兩種限制酶脈衝電泳方法, 區分食因性中毒案件時, *Xba*1 分型圖譜顯示, 主要差異處位於 480Kb、240Kb 及 96Kb; 而另一種 *Spe*-1 限制酶則位於 144-48Kb 之間且兩案件間均有明顯差異存在 (如圖五、六)。

分析仁愛之家、原住民案件與散發菌株時, 顯示彼此有明顯差異圖形 (如圖七、八), 僅部分菌株相似; 而以差異 4 條帶(含)以上為分型依據時, 對 128 株散發菌株進行分子分型時, *Xba*1 可區分 24 型 (X1-X24) (如圖九), 而 *Spe*-1 則出現 23 型圖譜。進一步將特定五種抗藥性菌株(ACSSuT 菌株與, ACSSu (I) T 菌株), 進行脈衝電泳分析比較, 圖譜顯示兩者菌株差異性不大但與一般敏感菌株也有明顯不同 (如圖十)。

(5)討論

沙門氏鼠傷寒桿菌是台灣地區主要食品中毒致病菌, 常為食物或

肉類受到污染導致而腹痛、腹瀉等症狀，亦因症候輕微或不明顯遭忽略，另外，在國內食因性中毒相關案件調查上，常僅限於人體致病菌分離，無法究其根源（肉製品、蛋類等）所在進行追尋，因此，相對於探討抗藥性及分子流行病學文獻並不多。本局為瞭解近十年來台灣地區臨床分離的鼠傷寒桿菌抗藥性情形並分析其相關分子流行病學特性。

實驗分析 1990-2001 年間 114 株鼠傷寒桿菌菌株，藥物敏感結果顯示，單一藥物抗藥性比例以 streptomycin 84.2 % 最高，其次依序為 tetracycline 82.5 % ， chloramphenicol 71.9 % ， ampicillin 70.2 % 及 nalidixic acid 18.4 % ，顯示傳統一線藥物有 70-80 % 以上抗藥高比例出現；在多重藥物抗藥比例方面，三種（含）以上藥物抗藥性比例占 75.4 % ，五種占 17.5 % ，七種以上則有 13.2 % 。另外，值得注意的是，第三代頭孢子素 Ceftriaxone 及 Quenolone 類的 Ciprofloxacin 藥物也逐漸產生抗藥性，且特定分離的抗 Ceftriaxone 及抗 Ciprofloxacin 藥物菌株，幾乎對 10 種以上藥物均產生抗藥性，在醫界及防疫單位對此類特定抗藥菌株，治療與監控上須特別考量。

有些菌株分離係屬於原發性的抗藥性(primary resistance), 亦即並非病人接受過治療後，才產生抗藥性，因此，推想這些致病株可能在動物體內（家禽類）即為抗藥性菌株，而此類動物常係養殖過程中抗

生素添加導致，未來若能進一步比對家畜類及其產品(蛋類或生雞肉)所分離之鼠傷寒桿菌與人體分離鼠傷寒桿菌菌株之間差異性，或可釐清菌株抗藥性增加是否與農業養殖生態有因果關係。

利用三組 *invA*、*int* 與 *spvC* 不同引子，對臨床分離鼠傷寒桿菌攜帶毒素因子，進行 PCR 實驗檢測。結果顯示其中侵入深層內皮細胞所必須之 *invasion* 基因，有 131 株佔 93.57 % (131/140) 比率；帶有經由 *site-recombination* 機制的嵌入基因有 88 株佔 62.86 % (88/140)，而與毒力有關之 *spvC* 則有 107 株 76.4 % 陽性率(107/140)；而 20 株 ASSuCT 多重抗藥菌株及七種抗藥性菌株，則完全帶有 *invA*、*int* 與 *spvC* 三種基因。另外，兩中毒案件也顯示帶有三種基因，顯示是否其菌株本身有較強致病性，須進一步分析菌株特性。

利用市售質體抽取試劑組，抽取菌株 *plasmid-DNA* 後，以電泳分析其質體大小，取其特性為快速、方法簡便。本實驗分析 89 年及 90 年二件特定食因中毒案件菌株，結果呈現一致性之質體型別 P1(10、20 與 25 Kb)型及 P2(4.5、6、8.5、10 與 20 Kb)型，顯示質體輪廓分型法，是可應用於分子流行病學事件調查。另外，進一步分析 89 年分離之散發菌株共 52 株，可將其區分成 9 型 (P1 - P9)；而相較於 90 年菌株則出現 8 型 (P1-P8)。因此，在對散發病例亦有某程度分型效果呈現；然而細菌質體穩定性不夠，其再現性會因時間

或多次培養導致質體遺失而不足，因此採用質體分型時，建議以較穩定 2Kb-25Kb 質體大小為分型依據為宜。

脈衝電泳分型法，廣泛使用於細菌分子分型與流行病學上調查上，是目前流行病學上較被採認一種分型方法，其優點是再現性高、穩定，而缺點是時間長、步驟繁瑣等。本實驗採用美國 CDC 最近 2001 年發表快速脈衝電泳分型法，其與本局以往使用方法（Gautom,1997 略加修改），最大差異在於，蛋白酶使用及作用溫度改變，使相對 lysis 與 wash 時間大為縮短，使其實驗僅須二天且分型效果良好。

實驗限制酶選擇，為已發表文獻上常用二種限制酶 *Xba-1* 及 *Spe-1*，脈衝電場方向以固定 120 度，電場轉換時間設定為 *Xba-1*, 5-35 秒與 *Spe-1*, 5-20 秒，電泳時間為 24 小時。由 *Xba1* 限制酶分型圖譜顯示，二件食因性中毒案件，經限制酶切割染色體 DNA 大小位於 48 Kb-500 Kb 左右，主要差異處位於 480、240 及 96 Kb 有四條帶差異；而另一種 *Spe-1* 限制酶則分佈於 48-288 Kb 大小，差異處則位於 50、130 及 160 Kb 有三條帶差異；兩案件菌株圖譜顯示，應為不同菌株來源，所區分成單一脈衝型別(X1 與 S1)。

進一步，分析案件與散發菌株間關聯性，比對八十九四月年仁愛之家中毒案菌株與相近時間分離（八十九年五至九月）菌株進行分析，僅部分少數菌株相似，而九十年四月原住民中毒案件中，比較九

十年五至六月菌株，有較相近菌株型態出現，然而這些分子相關性卻無法確切釐清，相對地，在質體輪廓試驗分析上，案件與散發菌株間關聯性亦無法明確區分。

分析 128 株散發菌株時，以差異 4 條帶(含)以上為分型依據時，*Xba*I 可區分 24 型別 (X1-X24)(圖九)，而 *Spe*-I 則出現 23 型別。顯示兩種限制酶均有明顯分型效果；相對於，本實驗亦選擇 *Sfi*-I 限制酶進行分析，因其分型之條帶狀過多 (圖形未顯示) 而不利比對。比較不同分離年份圖譜差異上，以 89、90 年分子差異性最大；可能係收集菌株數較多之緣故；另外，特定 20 株五種抗藥性菌株(R-type, ACSSuT 菌株)進行分析時，本身菌株圖譜差異性不大，但與一般敏感菌株 (S-type) 則有明顯不同，可能為抗藥性基因變異或重組，導致限制酶無法辨識，而這些差異是否在菌株上有特定意義性，須進一步探討。

(6) 結論與建議

結論

近十年來國內沙門氏鼠傷寒桿菌有抗藥性日趨嚴重情形，傳統一線藥物有 70-80 % 有抗藥性，多重抗藥性菌株也逐漸增加，而頭孢子素二代、三代抗生素及 *quenolone* 類藥物均有抗藥性菌株處生，值得醫界在治療及防疫衛生單位疫情管制上加以重視。

探討源自人體沙門氏鼠傷寒桿菌致病株致病因子如侵入、嵌入及毒力基因，分別為 93.57 %、62.86 % 與 76.4 % 陽性率，尤其是 20 株多重抗藥性及二件聚集案件菌株均完全攜帶有三種毒力基因，值得進一步分析其菌株特性。

以質體輪廓分型法及限制脢脈衝式電泳法，對特定食因中毒案件分析的一致性結果，顯示二種方法均可使用於分子流行病學案件調查。因此對特定流行案件使用質體輪廓分型法有快速、省時之效，但對散發性菌株無法區分時，則採用分型效果較佳且再現性的脈衝式電泳法為宜。

建議

食物或肉類受鼠傷寒桿菌污染導致中毒案件甚多，但卻一直無法釐清整個事件來龍去脈，導因於畜禽類及其產品檢測之鼠傷寒桿菌分離，分屬不同單位農委會及藥物食品檢驗局職責，人體鼠傷寒桿菌是本局業務範圍，若能整合不同單位，以整合型計劃或合作計劃，進一步比對家畜類及其產品所分離之鼠傷寒桿菌與人體分離鼠傷寒桿菌菌株之間差異性，或可釐清菌株抗藥性增加是否與農業養殖生態(如畜禽類養殖過程之飼料添加抗生素等)有因果關係。

鼠傷寒桿菌抗藥性增加，建議醫界對抗生素過份使用應有警覺，而農政單位對抗生素添加畜禽類飼料及其產品檢測，須進一步加強管

制及檢驗。

(7) 參考文獻

1. Glynn, M. K., C. Bopp, W. Dewitt : Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 infections in the United States. *N. Engl. J. Med* 1998 ; 338:1333-1338.
2. Gross, U., H. Tschape, I. Bednarek, and M. Frosch : Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype *typhimurium*. *Eur. J. Clin. Micro. Infect. Dis* 1998 ; 17:385-387.
3. Threlfall EJ, Frost JA, Ward LR. Increasing spectrum of resistance in multiresistance *Salmonella typhimurium*. *Lancet* 1996 ; 347:1052-1053.
4. Multidrug-Resistant *Salmonella* Serotype *Typhimurium*--United States. 1996 April 11, 1997/ 46(14);308-31
5. Hall, R.M., C. Vockler : The region of the IncN plasmid coding for resistance for β -lactam antibiotic, streptomycin/spectinomycin and sulfonamide is closely related to antibiotic resistance segments found in IncW plasmid and Tn21-like transposons. *Nucleic acid Res* 1987 ; 15:7491-7501.
6. Stokes, H.W. and Hall, R.M. : A novel family of potentially mobile DNA element encoding site-specific gene-integration function: integron. *Mol. Microbiol* 1989 ; 3:1669-1683.
7. Collis, C.M., and R.M Hall. : Gene cassette from the insert region of

- integrans are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* 1992 ; 6:2785-2885.
8. Martinez, E., and F. dela Cruz. : Genetic element involved in T21 site-specific integration, a new mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *EMBO J* 1990 ; 9:1275-1281.
9. Hall, R.M. and Stokes, H.W. : integron: novel DNA element which capture genes by site-specific recombination. *Genetica* 1993 ; 90: 115-132.
10. Ridley, A. and Threlfall, E.J : Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella typhimurium* DT104. *Microb. Drug resist* 1998 ; 4:113-118.
11. Sandvang, D., Aarestrup, F.M. and Jensen, L.B : Characteristics of integron and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica typhimurium* DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 1998 ; 160: 37-41.
12. Axel, C. and Karim, S.B : Occurrence of a *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104-like antibiotic resistance gene cluster including the floR gene in *Salmonella enterica* serovar Agona. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy.* 2000 ; May. Vol.44 : No5, 1359-1361.
13. Tenover, C.F., Arbeit, R. D., Goering, R. V. : Interpreting chromosomeal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis:

- criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol 1995 ;
32:2233-2239.
- 14.Lance F. Bolton, Lynda C. Kelley. : Decton of multidrug-resistant
Salmonella enterica serotype *typhimurium* DT104 bases on a gene
which confers cross-Resistance to florfenicol and chloramphenicol. J.
Clin. Microbiol. 1999 ; 37:1348-1351.
- 15Antonis M G., Panayotis T. Tassios., Maria Lambiri. : Multiple clones
within multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium*
DT104. J. Clin. Microbiol 2000 ; 38:1269-1271.
- 16 Ashraf A. Khan., Mohammed S. Nawaz., Saeed A. Khan. : Decton of
multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104.by multiplex
polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett 2000 ; 182:355-360.
- 17.Dorthe Sandvang., Frank Moller Aarestrup. : Characterisation of
integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant
Salmonella enterica typhimurium DT104. FEMS Microbiol Lett
1997 ; 162:177-181
- 18.K.L. Thong., Y.F.Ngeow., Martin Altwegg. ; Molecular analysis of
Salmonella enteritidis by pulsed-field gel electrophoresis and
ribotyping. J.Clin. Microbiol. 1995 ; 33:1070-1074.
- 19.王添貴,蔡金來,林建生等 : 近年食品中毒沙門氏菌血清型之新趨勢.
疫情報導 1999 ; 15:1-6.

20. Cheng-Hsun Chiu., T. Y Lin., and J, T. Ou. : Prevalence of the virulence plasmid of nontyphoid *Salmonella* in the serovars isolated from human and their association with bacteremia .Mol. Microbiol. 1999 ; 43:899-903.
21. Gulig, P.A., Danbara, H., Guiney, D.G. ; Molecular analysis of spv virulence genes of the salmonella virulence plasmids. Mol Microbiol. 1993 ; 7:825-830.
22. Altschul, S. F., Madden, A.A. Schaffer, J. 1997. Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acid Res. 25:3389-3402.