

計畫編號：DOH92-DC-2008

行政院衛生署疾病管制局九十二年度自行研究計畫

**建立重要傳染性病原細菌 DNA 指紋資料庫**

**自行研究成果報告**

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

研究主持人：邱乾順

研究人員：高成炎、林鼎翔、蘇勳璧、廖璿程、李俊青、王佑文、  
林怡璇、魏孝倫、楊世仰、李翠鳳、吳炳輝、李永盛、  
李麗俐、林建州、劉顏

執行期間：91 年 1 月 1 日至 93 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

一、中英文摘要	2-3
二、本文	
(一)、前言	4-5
(二)、材料與方法	6-8
(三)、結果與討論	9-12
(四)、結論與建議	13-14
(五)、參考文獻	15
(六)、圖表	
圖一、 <i>Shigella sonnei</i> 培養於 SS 與 TSA，PFGE 結果顯示……	16
圖二、應用腸內菌標準 PFGE 操作程序分析 <i>Shigella son</i> ……	16
圖三：應用腸內菌標準 PFGE 操作程序分析 <i>Salmonella</i> Ch……	17
圖四：應用腸內菌標準 PFGE 操作程序分析 <i>Klebsiella pn</i> ……	17
圖五：應用腸內菌標準 PFGE 操作程序分析 <i>Bordetella pe</i> ……	18
圖六：應用腸內菌標準 PFGE 操作程序分析 <i>Neisseria men</i> ……	18
圖七：使用 <i>Listeria monocytogenes</i> 標準 PFGE 操作程序……	19
圖八：訓練營學生完成之 PFGE 圖譜，乃經過兩次純水、四……	19
圖九：第一代半自動膠體清洗機(Lewis Taiwan No. 1)，……	20
圖十：使用膠體清洗機(第 1-8 列)協助清洗與使用手工方……	20
圖十一：第二代半自動膠體清洗機，由水浴器、蠕動幫浦……	21
圖十二：第三代全自動膠體清洗機，可由電腦控制清洗液……	21
圖十三：限制酶使用量測試，第 1-5 列為 <i>Salmonella</i> ……	22
圖十四：2003 年國人至印尼峇里島旅遊感染桿菌性痢……	23
圖十五：花蓮縣卓溪鄉山立村 2003 年家族感染事件之……	24
表一：PFGE 標準操作程序，各菌種之培養、包埋清洗、限……	25-26
表二：PFGE 膠體清洗條件 ……	26
三、附錄	
附錄 A、PulseNet Codes for Foodborne Disease Pathogen ……	i - v
附錄 B、PFGE Codes for Restriction Enzymes ……	vi – ix
附錄 C、革蘭氏陰性菌 PFGE 標準操作程序(US CDC pr……	x – xvi
附錄 D、革蘭氏陽性菌 <i>Listeria monocytogenes</i> PFGE 標……	xvii – xxvii
附錄 E、衛生署疾病管制局「細菌實驗室分子分型……	xxviii – xliv

## 摘要

關鍵詞：脈衝式電泳法、分子分型、台灣實驗室分子分型即時監測網

本研究在建立重要細菌病原菌 DNA 指紋圖譜資料庫及其核心技術與電腦操作架構，包括標準化脈衝電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)技術，DNA 指紋圖譜分析與比對技術，圖譜資料庫建置與管理、與電腦網路之建置與應用技術。總計計完成 *Shigella* spp., *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bordetella pertussis*, *Legionella* spp. 等九種菌種之 PFGE 標準化操作程序，並成功組裝了半自動膠體清洗機，藉由機器的協助，可降低操作煩雜度、縮短清洗時間和提昇 DNA 純度，可因而節省大量人力，並降低限制酶使用量，減少 PFGE 分析成本，建立實驗室分析大量菌株之能力。PFGE 分析使用美國疾病管制局之參考量測標識(reference size markers)與跑膠條件，所產生之圖譜能與使用相同操作程序的實驗室所產生的圖譜資料相互比對。PFGE 影像圖譜使用 BioNumerics 電腦軟體分析、建立圖譜資料庫，同時也自行開發 MySQL 與 SQL sever 2000 資料庫，解決 BioNumerics 資料庫功能不足與不易處理大量資料之缺點，並架構電腦網路系統，提供遠端電腦傳送、查尋資料，並下載圖譜資料進行比對之需求。本研究建立之菌株 DNA 圖譜資料庫，計 *Shigella* spp. 522 株、*E. coli* O157 4 株，*N. meningitidis* 有 160 株，*S. pyogenes* 有 597 株，*Salmonella* spp. 有 385 株，*B. pertussis* 有 52 株，*V. parahaemolyticus* 有 25 株，*K. pneumoniae* 有 330 株。此研究建立之架構與技術，已足以提供成立台灣實驗室分子分型即時監測網(PulseNet Taiwan)，在 2003 年之峇里島旅遊團感染桿菌性痢疾事件與花蓮縣卓溪鄉立山村桿菌性痢疾事件之研究調查工作上，展示圖譜資料庫之強大應用價值。

## Abstract

Keywords: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), molecular typing, PulseNet Taiwan

The purpose of research is to build a DNA fingerprint database for clinically important bacteria for epidemiological investigation. To carry out the goal, protocols for pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for various bacterial species have to be standardized and analysis procedures for pattern identification and comparison, a fingerprint database and computer network system need to be set up. During the period of study, we standardized the PFGE protocols for nine bacterial species: *Shigella* spp., *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bordetella pertussis*, *Legionella* spp. We also assemble a gel plug washer. The washer helped to ease the washing procedures, to save washing time, and to improve the DNA purity. The restriction enzyme used for each digestion could be reduced to one fourth of the quantity recommended by US CDC due to good DNA quality. The improvement on the PFGE operation procedures has resulted in reducing PFGE analysis cost and increasing the capability to handle large number of bacterial isolates in the laboratory. Moreover, the reference size markers used in the US CDC's PulseNet were used here that made the PFGE patterns comparable with those produced in the laboratories using the same markers and electrophoretic conditions. BioNumerics software was used to analyze PFGE images and create fingerprint database, but its functions on database management was insufficient. In order to store large amount of data and to search and retrieve data via the Intranet and Internet, a PFGE image file subdatabase, BioNumerics DNA fingerprint subdatabase, and epidemiological information subdatabase were created using MySQL and SQL sever 2000 database softwares. Two servers were set up for the database and to provide an intranet website for data processing and an internet website for data requesting from general laboratories. To date, the fingerprint database has contained DNA fingerprints of 522 *Shigella* spp., 4 *E. coli* O157, 160 *N. meningitidis*, 597 *S. pyogenes*, 385 *Salmonella* spp., 52 *B. pertussis*, 25 *V. parahaemolyticus*, and 330 *K. pneumoniae* isolates. The database, improved PFGE analysis techniques, and computer network will be used to build a laboratory-based molecular subtyping network (PulseNet Taiwan) for real time surveillance of bacterial pathogens. This database has already exhibited its usefulness to the epidemiological investigation on the shigellosis outbreaks occurring on the Bali travel tours and on a family in an aboriginal village in Eastern Taiwan.

## 前言

便捷的交通增加人與人接觸的機會，也同時增加傳染病傳播的機會與速度，當今在世界各地發生的傳染病，皆有可能於一天之內傳播到地球各個角落，最近 SARS 的傳播就是最明顯的例子；跨國、跨地區的食品販售也促使食源性病原有機會散播到世界各地，且其流行常無明顯的地區聚集現象，很難經由傳統的流病監測系統偵測到，當察覺到流行的發生時，往往已造成眾多民眾感染，疫情已難以收拾的地步；加上生物恐怖攻擊的陰影籠罩，人為蓄意散播病原於食品和飲水，或其它媒介，隨時可能引爆大規模感染事件，造成人民傷亡，引發社會恐慌與造成經濟巨大損失。台灣為海洋國家，是世界的一部份，必然與世界各國交流往來，因此勢將不斷受到在世界各地流行的傳染病的侵襲，特別是每年高達百萬國人到對岸的中國經商旅遊，中國又是各類傳染病嚴重流行地區，在台灣已受控制或絕跡多時的傳染病，將源源不斷傳入境內。為解決台灣所面臨的防疫問題，必需利用現代科技，建立快速有效的傳染病監測系統。衛生署疾病管制局為我國各種疫病防治之主管機關，在疫病的監測上，面對傳染病之新流行面貌和生物恐怖攻擊之可能性，必需應用現代之分子生物科技與電腦科技，建立即時監測系統，達早期偵測，及早防治之目標；同時因應國際化後傳染病跨越國界的傳播趨勢，亦應建立國際實驗室間的合作管道，進行菌株的分析比對，方能建立一個完善的疫病監視防疫網。

近年來分子生物學高度的進展與電腦科技的進步，若能應用這些新的科技，將能結合各地區實驗室，即時分析所分離的菌株，透過網路進行比對，而能早期偵測到傳染病的發生。美國疾病管制局(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)所發展的實驗室分子分型即時監測網—PulseNet，即是一個相當成功的典範(5)。PulseNet 結合美國各州郡實驗室與鄰國加拿大各省份之實驗室，應用標準化之脈衝電泳技術(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)，分析各地區分離之食品中毒細菌株，透過電腦網路，將 PFGE 圖像傳送到圖譜資料庫中心進行比對，往往在極少的感染案例出現時，即能偵測到流行的發生，找出感染來源，遏止流行的擴大。此應用分子分型技術與電腦網路科技的嶄新實驗室監測網，展現高超的食品中毒事件偵測能力，在 1996 年建置完成後，已偵破為數眾多的跨州或跨國的食品中毒案件，和為數眾多的小型食品中毒事件(1)，使每次食品中毒之爆發流行事件規模減少三分之二以上，在防疫上及經濟效益上有很大貢獻；例如 2002 年 7 月間美國 Colorado 州 ConAgra 公司的碎牛肉遭 *E. coli* O157 污染的事件，在第 19 個病人出現時，ConAgra 已進行 1 千 9 百萬磅碎牛肉的回收(2)。因為 PulseNet 的效用顯著，美國 CDC 也協助歐洲也成立了 PulseNet Europe，2002 年底也邀請亞太國家與地區籌組成立 PulseNet Asia Pacific，我國也以 Taiwan 名稱成為此組織的成員，並成為執委會委員，跨入國際防疫網行列。

PulseNet 最初目的在進行食品中毒細菌的監測，特別是 *Escherichia coli* O157 是美國肉品業最嚴重的威脅，但其建立之技術平台(包括 PFGE 分子分型技術、圖譜資料庫與

圖譜比對模式、與電腦網路架構)，可應用於各種細菌之分析，目前美國 CDC 主管其它細菌疾病的部門，也開始仿效 PulseNet，成立菌株 DNA 指紋圖譜資料庫，建立監測網。實驗室分子分型監測網即時監測傳染病流行的功能，也可納入國家的生物防禦體系之一環，協助偵測可能的生物恐怖攻擊事件；其累積的菌株 DNA 指紋圖譜資料庫，可用來研究菌株之長期變化，應用於追蹤流行菌株之演化來源；圖譜資料庫的比對，也能應用於區別本土或外來病原，區別流行菌株來源是本土菌株演化出來的強毒性菌株，或由境外移入之新菌株，可用以評估外來菌株對台灣所造成之衝擊程度；更能應用於評估傳染病之防治成效，監測到傳染病的開始、擴大、消失的過程，與評估防治措施介入後之影響；而國內的監測網也是國際防疫網的一環，是加入國際監測網組織的基礎。

基於實驗室分子分型即時監測網強有力的功能，防疫機關有必要建立台灣的「實驗室細菌分子分型即時監測網—PulseNet Taiwan，即時監視本國之重要細菌性傳染病。建構此監測網之核心技術，包括 (一)建立各種病原細菌的 PFGE 標準操作程序，(二)建立使用電腦軟體(BioNumerics)分析 PFGE 圖譜的技術，(三)建立可使用網路進行圖譜比對與搜尋之資料庫；同時，為了建立之圖譜資料庫能跨國際間相互比對，需與其它國家，特別是美國 CDC 之 PulseNet 實驗室，操作 PFGE 所使用之參考量測標織(reference size markers)，所產生 DNA 指紋圖譜方能相互比對。本研究藉由建立國內重要病原細菌 DNA 指紋圖譜資料庫的目標，建立分析菌株圖譜，建置電腦資料庫和進行網路比對圖譜之核心技術，做為 2004 年設立台灣實驗室分子分型即時監測網之基礎。本研究原先優先目標在建立 *Shigella sonnei*、*Neisseria meningitidis*、*Salmonella* spp. 之 PFGE 標準操作技術與 DNA 指紋圖譜資料庫，同時建立應用 BioNumerics 分析與比對圖譜之能力，和建立利用電腦上傳 PFGE 影像圖譜與下載菌株 DNA 指紋圖譜之網路系統，次要目標在建立其它病原細菌(包括 *E. coli* O157、*Bordetella pertussis*、*Legionella* spp.、*Streptococcus pyogenes*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Klebsiella pneumoniae*) 之 PFGE 標準操作方法，並改善 PFGE 操作程序，達到省工、省錢的目標，讓實驗室具有分析大量菌株之能力，為成立台灣實驗室分子分型即時監測網預做準備。

## 材料與方法

**菌株來源與病例相關流病資料：***Shigella* spp.來自三分局與六分局、*N. meningitidis* 菌株來自本局第三分局、第六分局與總局檢驗研究組、*Salmonella* spp.來自三分局與由國立台灣大學獸醫系張照夫教授提供、*V. parahaemolyticus*、*S. pyogenes* 取自三分局菌株庫、*K. pneumoniae* 菌株由中國醫藥盧敏吉副教授收集中部各大醫院分離之菌株、*B. pertussis* 菌株來自三分局菌種庫與李永盛分局長、並由美國密西根州公共衛生實驗室贈送 42 株 *Legionella* spp.標準菌株。PFGE 分析使用之參考菌株 *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812，由美國疾病管制局 Dr. Bala Swaminathan 提供。菌株(病例)之流病資料來自通報醫療院所填寫之「傳染病個案(含疑似病例)報告單」，與當地衛生所人員填寫之「防疫檢驗檢體送驗單」；資料包括病人之姓名、性別、出生年月日、居住地、發病日期、採檢日期、臨床症狀、投藥情形、與旅遊記錄。有些個案需由疾管局或當地衛生局人員個別面談，以找出與其他個案間之流病關係，並將這些資料輸入 Excel 電腦程式中存檔。

**革蘭氏陰性細菌之包埋、酵素處理與清洗(A)：**依據美國疾病管制局腸內菌(*E. coli*、*Salmonella* spp.、*Shigella* spp.)之 PFGE 標準操作方法(3)進行菌體之包埋、酵素處理及清洗，其過程簡述如下：挑取單一菌落接種於指定之培養基與培養條件(表一)；第二天以棉棒刮取菌體，於 Cell Suspension Buffer (100 mM Tris.Cl, 100 mM EDTA, pH 8.0)中做成懸浮液，以濁度計(Turbidity Meter, Dade Microscan™)測量，調整菌液濃度至 0.48 – 0.52 (in Falcon 2054 tubes)，取 400 µl 菌液至 1.5 ml Eppendorf 小管，加 20 µl proteinase K (20 mg/ml)，混合後加入 400 µl 融化後回溫至 56°C 的 1% SeaKem® Gold agarose/1% SDS，快速以 micropipette 混均勻後注入模具中，放置於室溫 15 min 或 4°C 5 min 使充份凝固，再將膠片自模具中推入 5 ml Cell Lysis Buffer (50 mM Tris.Cl; 50 mM EDTA, pH 8.0; 1% Sarcosine; 0.1 mg/ml proteinase K)，置於 56°C 水浴器振盪 2 h；膠體經酵素處理後，加 15 ml 預熱至 56°C 的 ddH<sub>2</sub>O，置水浴器振盪 15 min，重覆 ddH<sub>2</sub>O 清洗一次，再以 15 ml 預熱至 56°C 的 TE buffer (10 mM Tris.Cl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)清洗四次，膠體最後保存於 5 ml 的 TE 中，置於 4°C 冷藏，以供 PFGE 電泳分析使用。膠體清洗步驟或使用膠體清洗機，清洗步驟與條件如表二。

**革蘭氏陽性菌(*S. pyogenes*)之包埋、酵素處理與清洗(B)：**依據美國疾病管制局之 *Listeria monocytogenes* 之 PFGE 標準操作方法(4)，進行革蘭氏陽性菌之包埋、酵素處理與清洗。其過程簡述如下：挑取單一菌落接種於指定之培養基與培養條件(表一)；第二天以棉棒刮取菌體，於 TE buffer (10 mM Tris.Cl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)中做成懸浮液，以濁度計(Turbidity Meter, Dade Microscan™)測量，調整菌液濃度至 0.68 – 0.72 (in Falcon 2054 tubes)，取 240 µl 菌液至 1.5 ml Eppendorf 管，加 60 µl lysozyme (10 mg/ml)，以 micropipette 混合後放置於 37°C 水浴器中 10 min，再加入 300 µl 融化後回溫至 56°C 的 1.2% SeaKem® Gold agarose/1% SDS，快速以 micropipette 混均勻注入模具中，放置於室

溫 15 min 或 4°C 5 min 使充份凝固，再將膠片自模具中推入 5 ml Cell Lysis Buffer (50 mM Tris.Cl; 50 mM EDTA, pH 8.0; 1% Sarcosine; 0.15 mg/ml proteinase K)，置於 56°C 水浴器振盪 2 h；膠體經酵素處理後，加入 15 ml 預熱至 56°C 的 ddH<sub>2</sub>O，置水浴器振盪 15 min，重覆 ddH<sub>2</sub>O 清洗一次，再以 15 ml 預熱至 56°C 的 TE buffer (10 mM Tris.Cl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)清洗四次，膠體最後保存於 5 ml 的 TE 中，置於 4°C 冷藏，以供 PFGE 電泳分析使用。膠體清洗步驟或使用膠體清洗機，清洗步驟與條件如表二。

**PFGE 電泳分析：**以刀片切取約 2-mm 寬含 chromosome DNA 的膠薄片(slice)，膠薄片先置入 200 µl 的指定之限制酶緩衝液，室溫下放置 5 min，以 micropipette 吸出緩衝液，再注入 200 µl 含指定 units 量之限制酶之緩衝液(表一)，置於指定溫度下放置 2 h，以 micropipette 吸出緩衝液再注入 200 µl 的 0.5X TBE buffer (89 mM Tris borate, 2 mM EDTA)，放置 5 min 後，將膠薄片取出，用吸水紙儘量吸乾附著於膠薄片之緩衝液，再將膠薄片依序平貼於孔梳(comb)上，15 孔之膠片於第 1、5、10、15 孔位置，10 孔之膠片於第 1、5、10 孔位置放置以 *XbaI* 切割之 *S. enterica* serovar *Braendrap* H9812 基因體 DNA 片斷做為標準量測標織(reference size markers)，之後將孔梳放置於鑄膠台上，倒入融化回溫至 56°C 的 1% SeaKem® Gold agarose，放置室溫 20-30 min，待瓊膠凝固後，即可進行電泳。PFGE 電泳使用 Bio-Rad CHEF Mapper 脈衝式電泳儀(Bio-Rad Laboratories Inc.)，使用指定之跑膠條件(表一)，完成跑膠後，膠片以 0.5 µg/ml 的 ethidium bromide 染色 15 min，再以 ddH<sub>2</sub>O 退染 2 h (過程更換水 3-4 次)，DNA 圖譜影像再以數位影像處理系統 AlphaEase™ (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA)拍照貯存成數位檔案，以供後續比對分析。

**脈衝式電泳法圖譜解讀：**依照美國疾病管制局 PulseNet 實驗室的經驗，菌株間任何一 DNA 片斷的差異皆可能具有流行病學上的意義，本實驗依據美國疾病管制局的經驗，菌株 PFGE 圖譜只要與既有之圖譜擁有一 DNA 片斷的差異，即視為不同的 PFGE 圖譜，給與 PFGE 圖譜編號。PFGE 圖譜編號將依據美國疾病管制局 PulseNet 實驗室的命名原則編號，在編號前加入台灣之代號 TW-，例如 TW-EXHX01.0025，代表 *E. coli* O157 (EXH)，使用 *XbaI* (X01)限制酶切割處理之第 25 (.0025)號 PFGE 圖譜；美國 PulseNet 使用之菌株代號表見附錄 A，限制酶編號表見附錄 B。

**組裝半自動膠體清洗機：**仿照美國疾病管制局所設計的半自動膠體清洗機，在台灣購買蠕動幫浦與零件，請廠商進行組裝，完成第一代膠體清洗機，再與廠商合作，改良第一代膠體清洗機流速控制、空氣打氣控制、水浴器空間、與排水不易之問題，組裝為改良式第二代膠體清洗機，之後再與廠商合作，開發全自動第三代清洗機，此清洗機可控制流速、空氣打氣量、清洗液種量、排水等自動功能。

**測試最低限制酶使用量：**PFGE 標準操作方法建議之限制酶量 *XbaI*、*SmaI*、*NotI* 為 40 units。測試減少酵素用量，確定三種酵素最低使用量，以減少酵素使用量，降低

PFGE 分析成本。

**資料庫之建置：**資料庫包括 PFGE 圖像檔資料庫、DNA 指紋圖譜資料庫、流病資料資料庫<sup>註1</sup>等三種。DNA 指紋圖譜資料來自應用商業電腦分析軟體 BioNumerics 之影像處理功能，參照參考量測標織進行圖譜處理，並對應到個別菌株，指定為該菌株之 DNA 指紋圖譜，再輸入該菌株之編號、分離地點、分離時間、與簽定(assign)圖譜型別等資料，成立圖譜資料庫。此 BioNumerics 分析所得之數值化圖譜資料，再彙集至 SQL Server 2000 所管理之資料庫，使資料庫資料，得以提供多人利用網路同時讀取之目的。同時利用 My SQL 建立菌株、寄主、疫情等流病之資料庫，與 SQL Server 2000 資料庫之菌株圖譜資料結合，形成菌株 DNA 指紋圖譜與流病資料庫。此圖譜與流病資料庫，可提供本局地區實驗室，經由本局 intranet 網路讀取資料，並可下載圖譜資料至地區實驗室以 BioNumerics 分析，進行圖譜比對與親緣性分析等工作。

**網路架構與建置：**建置內部與外部網站，進行資料之上傳、下載、查尋與列印等功能，並提昇資料庫之安全性。安全性之設定包括網路 IP 認證控管、局內防火牆防護、使用者登入控管(使用者 ID、Password)、使用者權限區分。內部網站利用本局之 intranet 連結，獲得授權之本局實驗室可經由 intranet 進行蒐尋列印資料庫資料，和下載 DNA 指紋圖譜資料至個人電腦；外部網站設置於另一電腦伺服器主機，經由本局網站 (<http://www.cdc.gov.tw>)，提供局外實驗室與監測網地區實驗室上傳 PFGE 圖像檔與菌株流病資料。核心實驗室擁有權限下載 PFGE 圖像進行處理，將菌株 DNA 指紋圖譜與流病資料匯入資料庫；外部網站並提供 PFGE 標準操作方法，意見表達信箱，公布監測網動態新聞。

---

<sup>註1</sup> PFGE 圖像(PFGE image)：應用脈衝電泳分析菌株基因體，所得之 DNA 片斷大小分佈圖譜圖像，即整片膠之數位影像。PFGE 圖像資料庫儲存原始 PFGE 圖像檔。

DNA 指紋圖譜(DNA fingerprint)：個別菌株之 DNA 片斷分佈圖譜，乃 PFGE 圖像經 BioNumerics 軟體處理常態化後，對應至個別菌株之 PFGE 圖譜。DNA 指紋圖譜指利用各種基因分型(genotyping)分析菌株所得之 DNA 片斷大小分佈圖譜，本研究皆指應用 PFGE 方法所得之菌株 DNA 指紋圖譜。

流病資料：指菌株、分離來源之寄主基本資料、與疫情相關之流行病學資料。

## 研究成果與討論

**重要病原細菌 PFGE 標準操作程序：**PFGE 分子分型法是建立重要病原細菌 DNA 指紋圖譜基因庫所使用的方法，因此首先必需將 PFGE 操作程序標準化，產生之 PFGE 圖譜方能相互比對。計畫期間計完成 *Shigella* spp., *E. coli* O157, *Salmonella* spp., *V. parahaemolyticus*, *K. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *S. pyogenes*, *B. pertussis*, *Legionella* spp. 等九種重要細菌種屬之脈衝電泳操作程序標準化工作。影響 PFGE 結果之因素很多，必須測試包括菌株培養基種類、菌體包埋與清洗作業、限制酶種類、脈衝電泳儀廠牌、agarose 廠牌與等級、孔梳長度、參考量測標識(reference size markers)、跑膠條件(如 pulse time, voltage, temperature, buffer, running time)、與 PFGE 圖像數位影像擷取條件等。例如 *Shigella sonnei* 培養於 SS (*Salmonella-Shigella* Agar) 與 TSA (Trypticase Soy Agar) 之 PFGE 分析結果即有差異(圖一)，來自 SS 培養基的菌株，本研究使用美國疾病管制局腸內菌之 PFGE 標準操作方法(3)與 *L. monocytogenes* PFGE 標準操作方法(4)，經過改良測試，發展定型各種菌種之 PFGE 標準操作程序。其中腸內菌標準操作方法，在經修正適合於各菌種之培養基、限制酶種類後，適用於所有選定之革蘭氏陰性菌之 PFGE 操作，而 *L. monocytogenes* PFGE 標準操作方法，也在改變培養基與限制酶之後，也很成功應用於革蘭氏陽性菌 *S. pyogenes* 之 PFGE 操作。以上九種菌種之 PFGE 操作，除了 *N. meningitidis* 使用 *N. meningitidis* M413 菌株之 *Nhe* I 切割染色體 DNA 片斷為參考量測標識外，其它皆使用 *S. enterica* ser. Braenderup H9812 菌株之 *Xba*I 切割染色體 DNA 為參考量測標識。各菌種 PFGE 操作條件，列於表一；用於革蘭氏陰性菌(*E. coli* O157 為代表)與陽性菌(*L. monocytogenes* 為代表)之標準操作程序，列於附錄 C 與附錄 D。此操作程序，配合表一所列之條件，即可適用於上列九種菌種之 PFGE 操作。圖二至圖七是應用各菌種之 PFGE 標準操作程序分析菌株，所得之 PFGE 圖像代表，應用 PFGE 標準操作程序分析，在不同膠片與不同時間產生之圖譜，經 BioNumerics 分析之後，產生之菌株 DNA 指紋圖譜皆可相互比對。

**改進 PFGE 操作流程：**美國疾病管制局的 PFGE 標準操作方法，可得到良好的 DNA 指紋圖譜，然而其操作過程乃相當煩瑣且耗費人力，且使用大量限制酶，PFGE 是一種昂貴的基因分型法，對進行例行性分析大量菌株而言，在人力、時間與成本考量上，仍屬高度困難的工作。因此有必要改進 PFGE 操作流程，以節省操作時間、人力、降低限制酶使用量，以降低分析負荷，提升實驗室勝任分析大量菌株之能力。改進方向包括：

(一) **菌體包埋與清洗技術的改進。**能否得到高品質的菌體基因體 DNA 是 PFGE 圖譜影像品質好壞之關鍵，要得到最高純度的菌體基因體 DNA，包埋之菌量(DNA 量)與清洗膠體的方法是關鍵。利用濁度計(Turbidity Meter, Dade Microscan™)可精確定量菌量，並由實驗測試不同濁度(菌量)之 PFGE 圖譜結果，得到不同菌種之最適菌量(表一)。菌體在使用 proteinase K 與清潔劑(detergent)溶解後，其清洗次數是最重要的步驟，往往增加兩次的換洗過程，就得到絕然不同的清晰 PFGE 圖譜(圖八)，但清洗膠體的步驟很煩瑣，耗費大量人力與時間，一個熟練技術人員，利用手工方式更換清洗液(水與 TE

buffer)，很難一天處理超過三十個樣本。在美國疾病管制局 PulseNet 實驗室有人組裝蠕動幫浦，協助清洗膠體，可得到不錯的效果，因此在台灣也自行購買蠕動幫浦等物件，自行組裝一台半自動膠體清洗機(圖九)，應用此機器可將清洗膠體時間由原先 4 小時縮短至 1 小時，大大節省人力與時間，在省掉令人精疲力盡更換清洗液的過程後，一個技術人員一天可輕鬆處理 30-60 個樣本，大大增加實驗室處理檢體的容量，且應用膠體清洗機清洗之膠體樣本，DNA 品質甚至比用手工更換清洗液的好(圖十)；但此膠體清洗機在更換清洗液時，需人力反轉篩管，倒出屯積在篩管內的清洗液，甚為麻煩，且整套設備由水浴器、蠕動幫浦、管線與試管架組成，相當佔空間，在某地區廠商的協助下，再次設計組裝第二代膠體清洗機(圖十一)，此二代機將水浴器、蠕動幫浦、管線組裝在一起，且增加快速接頭，可經此洩掉屯積於篩管內之清洗液，同時設計上也更容易控制流速與打氣量，和控制循環時間。但此二代機乃需人為操作的方式，於各清洗階段時更換清洗液，仍屬半自動的機器；在廠商的協助下，發展全自動的第三代膠體清洗機(圖十二)，此機器可在面板上設定各清洗階段使用之清洗液種類(水或 TE buffer)、循環時間，也可自動排水，操作上只要放置樣本，機器即自動完成各階段的清洗程序，因而更加節省人力，因此可設定更多清洗次數，第三代機所得之 DNA 品質與與第一、第二代機清洗相當，但可節省大量人力的耗費。

**(二)限制酶最低使用量：**例行性進行菌株 PFGE 分析，除了操作 PFGE 的技術過去難以突破外，花費的成本高也是個大問題，成本除了高價儀器設備費與技術人員薪資之外，酵素與試劑的花費也很龐大，特別是限制酶的價格昂貴，如 *NotI* 每一 unit 價格是新台幣 5.5 元，美國疾病管制局標準操作手冊上建議每一樣本使用 40 units，故每跑一片 11 個樣本的膠片，agarose 與限制酶成本至少 3000 元。鑑於以前之經驗，酵素的使用量與 DNA 的品質有關，DNA 品質越好就越能節省酵素的使用，由於使用自行組裝之 PFGE 膠體清洗機協助清洗膠體，得到的 DNA 品質相當良好，經測試發現良好 DNA 品質之樣本，1 unit 的限制酶即足夠完全切割樣本 DNA，在 DNA 品質夠佳的情況下，*XbaI*、*SmaI* 在 0.3125 units 時也都足以完成酵素切割作用(見圖十三)。經此測試，而將標準操作流程中之限制酶使用量定在 10 units(*SgrAI* 使用 20 units)(表一)，如此限制酶使用量即可節省四分之三，每年可節省可觀的經費。

**參考量測標識之選擇：**本研究共使用兩種參考量測標識(reference size markers)，一為美國疾病管制局 PulseNet 實驗室用於腸內菌 PFGE 分析使用之 *XbaI* 處理之 *S. enterica* serovar Braenderup H9812 基因體 DNA 片斷，一為美國疾病管制局的 Dr. Tanja Popovic (Chief, Epidemiologic Investigations Laboratory, Meningitis and Special Pathogens Branch, DBMD/NCID/CDC) 提供之 *N. meningitidis* M413 菌株 *NheI* 處理之基因體 DNA 片斷。每一片膠使用相同之參考量測標識和使用相同跑膠條件，不同膠片產生之 PFGE 指紋圖譜，方能相互比對。目前美洲、歐洲、亞洲許多國家皆使用美國疾病管制局的 PFGE 標準操作方法與共同參考量測標識，未來才能與這些國家之圖譜相互比對，建立合作平台。

**PFGE 圖像分析：**如何比對菌株之 DNA 指紋圖譜，是建立可運用網路進行比對之

資料庫成功與否的關鍵之一。由 Applied Maths 公司所發展圖譜分析軟體—BioNumerics，是一個可接受影像圖譜(Fingerprint type)、核酸與胺基酸序列(Sequences type)、Characters type、Matrix type 等多種不同形式資料，建構整合各種資料之資料庫，且具比對鑑定(Identification)、親緣分析(Clustering)、空間分析(Dimensioning)、統計分析(Statistical tools)之功能，也提供資料庫分享功能(Database sharing)，使資料庫之資料可在安全許可下經由網路下載，也可貯存成 bundle 格式資料檔，傳送給非同一網路內之實驗室，分享資料。目前核心實驗室已購得兩套 BioNumerics 軟體，能處理菌株之 DNA 指紋圖譜資料、核酸序列資料、藥物敏感性試驗等資料。雖然 BioNumerics 具有很多強大功能，但其產生之資料必需擁有 BioNumerics 軟體才能讀取使用。因為 BioNumerics 之價格非常昂貴，非一般研究者所能負擔，且其產生之資料庫，在資料輸入、查尋、存取、和管理上仍不如 MySQL、SQL server 2000 等專業資料庫軟體所管理之資料庫，因此本研究仍將 BioNumerics 產生之 DNA 指紋圖譜資料庫，傳輸到電腦伺服器(server)，由 MySQL、SQL server 2000 等專業資料庫軟體管理，如此可經由網路進行圖譜資料與流病資料上傳、上載、查尋、列印，且提升資料庫安全性，強化管理。

**DNA 指紋圖譜資料庫：**計畫期間分析並儲存之菌株 DNA 指紋圖譜，計 *Shigella* spp. 有 522 株，*N. meningitidis* 有 160 株，*S. pyogenes* 有 597 株，*Salmonella* spp. 有 385 株，*B. pertussis* 有 52 株，*V. parahaemolyticus* 有 25 株，*K. pneumonia* 有 330 株。

**應用 DNA 指紋圖譜資料庫進行流病分析之實例：**經由比對菌株 DNA 指紋圖譜，比較菌株種源關係，據此可推測病例之流病關係，當有時、空流病背景資料的參者時，可做相當準確的菌株(病例)間關連性之判斷，提供準確流病分析供防疫單位有效處理疫情。應用細菌 DNA 指紋圖譜資料庫於防疫工作，是本研究計畫最主要目的。在資料庫建構過程，已應用 PFGE 分析技術與資料庫資料，調查多起細菌性傳染病流行事件，例如 2001-2002 年台灣中部與東部桿菌性痢疾流行事件，菌株源於印度；2001 桃芝颱風過境後信義鄉潭南村桿菌性痢疾爆發流行事件，菌株與之前在阿里山引爆流行之菌株相同；2001 年桃園縣中壢市公所旅遊感染事件，感染地點應為南投縣仁愛鄉；2003 中部醫檢協會年度聚餐食品中毒事件；中部某醫學中心病房疑似百日咳院內感染事件。有關 2003 年 11 月間國人到印尼峇里島旅遊感染桿菌性痢疾事件與花蓮縣卓溪鄉立山村桿菌性痢疾事件，展示 DNA 指紋圖譜資料庫之功能。

**(一)印尼峇里島旅遊團感染桿菌性痢疾事件：**2003 年 11 月間 (11 月 7~25 日入境)之台灣旅遊團至印尼峇里島旅遊，計 114 人確定感染桿菌性痢疾，感染病例分佈台灣各地，中部地區也自通報病例中分離出 10 株菌株，其中一人未出國，但其室友曾到峇里島旅遊而出現症狀，應屬境外移入病例境內傳染的例子，在同時期，三分局檢驗室也檢出兩起國人在中國被感染桿菌性痢疾的病例。菌株經 PFGE 分析，DNA 指紋圖譜進入資料庫比對，描繪菌株親緣關係。菌株親緣關係圖(圖十四)顯示峇里島相關的菌株分成兩個群組(clusters A, B)，兩個群組相同度(similarity coefficient)只有 75%，在短時間內，此差異度表示兩群菌株不相屬，可見國人在峇里島感染的菌株

至少有兩個來源，或被兩種不同菌株同時所感染，但以感染時間持續近 1 個月，且有眾多旅行團被波及來看，前者的可能性相當大。A 群組的菌株和 1998 年桃園武漢國小桿菌性痢疾事件分離的菌株有相同圖譜，和中國移入的兩個菌株只差一 DNA 片斷，這些菌株間應有很大關連性。由於 *S. sonnei* 之基因體變化快且容易獲得或失去大型質體(此研究本實驗室已有初步成果)，此點由 2003 年峇里島旅遊團分離的一株菌株(sh33781)也多出一條 DNA 片斷而得到支持。因此推測，2003 年峇里島這個菌株應該是一個分佈相當廣的流行菌株，可能在中國與東南亞各國皆已在流行，甚至早在 1998 年之前即已經傳入台灣，並經過一段時間後造成武漢國小的桿菌性痢疾爆發流行事件，此菌株和 2000 進入台灣的菌株 sh18933 有較接近的親緣關係，sh18933 此型別菌株曾在 2000-2002 造成台灣桿菌性痢疾大流行，菌株應來自印度。雖然 1998 年武漢國小菌株與 2003 峇里島菌株在 *NotI* 與 *XbaI*-PFGE 的圖譜皆相同，但在測試的 18 種藥物敏感性測驗，有 nalidixic acid 出現差異(武漢國小菌株為抗藥性，峇里島菌株為敏感性)，應用本實驗室自行研發的分型方法—IS1-PCR 分析，其圖譜上也出現一片斷的差異，可見菌株在不同地區與經歷至少 5 年的演化，雖然在 PFGE 圖譜上沒有改變，但的確也已不是完全相同了。此例也說明流病資訊的重要，單單依賴圖譜比對，而無時空與疫情的資料配合，不容易做出精確的判斷。

(二)花蓮縣卓溪鄉立山村桿菌性痢疾群聚事件：花蓮縣卓溪鄉立山村 2003 年底出現 *S. flexneri* 2a 桿菌性痢疾感染的家庭聚集事件，菌株之 PFGE 圖譜與資料庫之圖譜比對，發現與 2000-2002 年分離之四株菌株有相同圖譜(圖十五)，查尋流病資料結果顯示，此四株菌株分離地點皆在卓溪鄉立山村，與此感染家族住同一村落。此結果指出此一家族聚集感染之菌株來源，是一直在該社區循環感染的菌株。此比對結果讓疾管局地方防疫單位能進一步探討該地村民的生活習慣與衛生環境，了解為何痢疾會年復一年在該地循環感染的原因，以擬訂新的防治措施。此事件也說明 DNA 指紋圖譜資料庫不但有追蹤疾病流行的功能，也能做為評估防治成效的基礎。

**實驗室分子分型即時監測網架構：**在建立病原細菌 DNA 指紋資料庫的同時，也規劃建立監測網的架構，以便 2004 年能開始推動台灣的實驗室分子分型即時監測網 (PulseNet Taiwan)。監測網包括核心實驗室、資料庫中心、監測網地區實驗室、菌種保存中心、與網路系統。監測網運作方式為：實驗室即時執行菌株 PFGE 分析，將 PFGE 圖像檔與菌株流病資料經網路傳送至核心實驗室，核心實驗室以 BioNumerics 分析 PFGE 圖像，將產生之菌株 DNA 指紋圖譜與流病資料，分別存入各資料庫並比對菌株 DNA 指紋圖譜，再將結果傳送回原送實驗室，有傳染病聚集之可能時，再將訊息傳送到防疫單位進行流病調查，確定有傳染病的流行時，再將訊息交防治權責組進行防治工作；具獨特 DNA 指紋圖譜，或與流行事件相關，或相隔一段時間再出現之相同圖譜菌株，或其它原因而值得保存時，由核心實驗室通知原分離菌株之實驗室，將菌株寄送菌種保存中心，進行菌種永久保存。監測網之完整架構與說明，詳見附錄 E。

## 結論與建議

研究期間計完成 *Shigella* spp., *E. coli* O157, *Salmonella* spp., *V. parahaemolyticus*, *K. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *S. pyogenes*, *B. pertussis*, *Legionella* spp. 等九種菌之 PFGE 操作程序的標準化工作，並建立菌株 DNA 指紋圖譜資料庫，與架設經由網路存取資料之系統，可供流病研究與疾病監測之用，據此在 2004 開始設立台灣的實驗室分子分型即時監測網。所建立之 PFGE、資料庫、網路技術平台，也可應用於所有能夠以 PFGE 或其它分子分型方法分析之病原細菌。

研究期間所分析並儲存之菌株 DNA 指紋圖譜，計 *Shigella* spp. 有 522 株，*N. meningitidis* 有 160 株，*S. pyogenes* 有 597 株，*Salmonella* spp. 有 385 株，*B. pertussis* 有 52 株，*V. parahaemolyticus* 有 25 株，*K. pneumoniae* 有 330 株、*E. coli* O157 有 4 株。這些圖譜資料，將可應用於未來分離之菌株的比對鑑定，流病追蹤之用。

本研究建立之 PFGE 標準操作程序，皆力求與美國疾病管制局接軌，即在參考量測標識的使用與跑膠條件，力求與美國一致，美國疾病管制局 PulseNet 實驗室沒有建立的分析項目，才自行發展。目前九種菌種使用 *S. enterica* serovar Braenderup H9812 與 *N. meningitidis* M413 兩種菌株做為參考量測標識，美國 PulseNet 實驗室用 *S. enterica* serovar Braenderup H9812 於腸內菌的 PFGE 分析，我們發現此標識可用於 *B. pertussis*、*V. parahaemolyticus*、*K. pneumoniae* 等菌種，甚至可用於 *S. pyogenes*；*N. meningitidis* M413 則用於 *N. meningitidis* 的分析。應用相同的參考量測標識與相同跑膠條件，所得到的圖譜將可和使用相同條件的實驗室所產生的圖譜進行比對，容易進行資訊交流，也能合作建置地區或全球的實驗室分子分型即時監測網。

本研究也同時建立分子分型監測網的架構，並已申請到 2004-5 年的研究計畫，結合疾病管制局北、中、南、東四個實驗室成立 PulseNet Taiwan 的即時監測網，先行監測 *Shigella* spp., *N. meningitidis*, 與 *Salmonella enterica* ser. Typhi & Paratyphi, 將視第一年的成效，加入其它傳染病項目。經過七年的考驗，美國疾病管制局所建立的分子分型監測網(PulseNet)，在食因性疾病的監測上展現優越的成效，此一監視網因能提早偵測到食因性疾病的流行，讓防疫單位能提早介入，大大降低感染人數，維護人民生命健康，節省龐大醫療資源。區域性或全球性的監視網，則具有跨國界合作監測傳染病流行與追蹤病原來源的能力，例如台灣 2001 年的第一例 *E. coli* O157 感染病例，菌株在進入美國疾病管制局的 DNA 圖譜資料庫比對後，可相當確定此病例的病原，來自美國，又如台灣在 2001 年時發生 *S. sonnei* 引發之桿菌性痢疾大流行，創下全年度 1303 例最高病例記錄，在利用 PFGE 技術分析所收集之菌株後，發現流行菌株來自印度，此一範例，說明「一個外來菌株入侵後，常引發當地傳染病大流行」(6)。PulseNet Taiwan 監測網的成立，將使我國在細菌性傳染病的監測防治上，進入嶄新的階段。

PFGE 經十數年來的應用，證明是研究細菌性疾病流行病學很有用的工具，然而 PFGE 的操作費時、費人力、且成本花費高，許多實驗室在操作 PFGE 時，經常遭受挫

折。經由許多研究者的努力，PFGE 技術已相當成熟，操作也可以在一天之內完成，第二天即可得到結果，加上膠體清洗機的應用，可減輕許多人力負擔，單位時間內處理檢體的容量大大地增加，在技術上改善而得到高純化的 DNA，使限制酶用量可降低為原先的 1/4，因而降低分析成本。今日 PFGE 不再是困難且昂貴的分型方法，已可做為細菌的例行性分析工具，處理大量菌株的分型工作。

防疫資訊化是防疫工作的目標，本研究開發資料庫與電腦網路系統，以儲存大量資料的需要，解決 BioNumerics 軟體資料庫功能不足的問題，讓監測網實驗室與生物材料中心能透過網路，即能傳輸、查尋資料，能下載圖譜資料進行比對，坐在電腦前面即能取得所需要的資訊，做想做的分析，使防疫工作更加便捷。

有了本土菌株之 DNA 圖譜資料庫，即能用以區別本土或外來病原，掌控外來病原對台灣防疫的衝擊狀況。台灣四面環海，本有利於阻隔傳染病的入侵，但近年來，國人到國外疫區(特別是中國)經商旅遊頻繁，復又引進大量東南亞外勞，傳染病將源源不斷侵入台灣，如動物的口蹄疫和 2003 年的 SARS，因此傳統的流病監測方式勢必無法應付今日快速傳播的傳染病的流行，特別是有些疾病如流行性腦脊髓膜炎的流行，常常以散發性的型態出現(因為感染者只有很少比率會發病)，很難偵測到此傳染病的流行。例如 2001 年中部地區出現前所未有的 Y 血清群菌株感染的流行性腦脊髓膜炎病例，全年有 5 例分佈在 19-21 歲的病例，其中 3 人死亡，這些病例沒有明顯時空聚集情形，病例間也找不到有接觸的流病關連性，但菌株的 PFGE 圖譜證明這些病例的菌株應該有共同來源，應該是外來侵入的菌株。有了病原細菌 DNA 指紋圖譜資料庫與實驗室分子分型監測網，細菌性傳染病的監控將可更加完善。

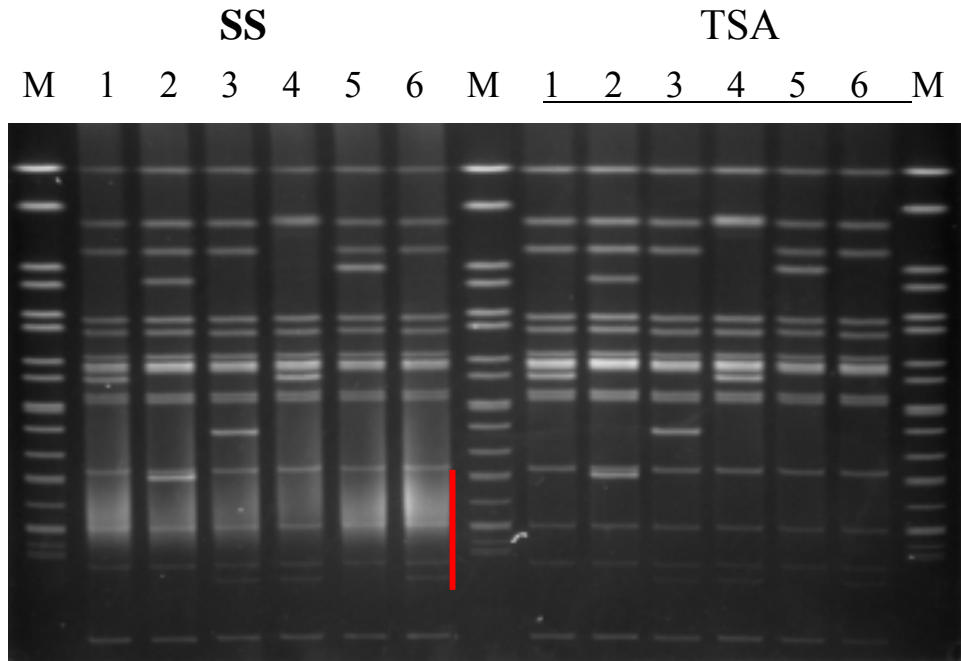
生物恐怖攻擊是當今很受重視的議題，未來發生大規模生物戰的機率雖然不高，但以**造成社會人心恐慌**和**讓受攻擊者蒙受巨大經濟損失**為目的的生物恐怖攻擊，將會源源不斷。未來敵人很可能在暗處發動攻擊，製造傳染病的流行，激化人心不安，並造成醫療資源巨大損失；面對無法預知的生物恐怖攻擊，除要建立完善的傳染病通報體系外，能**即時**分析病原體的分子分型監測網將能扮演重要角色。美國也已將 PulseNet 系統放入生物防衛系統中，用於偵測利用食品與飲水為媒介的恐怖攻擊，同時也積極發展用於監測重要生物戰劑項目，包括兔熱病(Tularemia，病原為 *Francisella tularensis*)與鼠疫(plague，病原為 *Yersinia pestis*)。

DNA 指紋資料庫也可用於評估疾病防治的成效與疾病的擴散。花蓮縣卓溪鄉立山村，相同的菌株在經歷數年，仍是當地的感染病原，即可證明防治成效不彰，防疫人員就應改弦易轍，想其它防治策略。印尼峇里島和中國的菌株很接近，可推測此菌株可能已廣泛的散佈。這些實例皆證明 DNA 指紋圖譜資料庫之應用在傳染病研究與追蹤上的功用，若能即時分析比對菌株，即能即時地監測傳染病的流行，此研究最大價值即在於所建立的核心技術，能用於建立 2004 開始的「台灣實驗室分子分型即時監測網」系統，能實際應用於細菌性傳染病的監測與防治上。

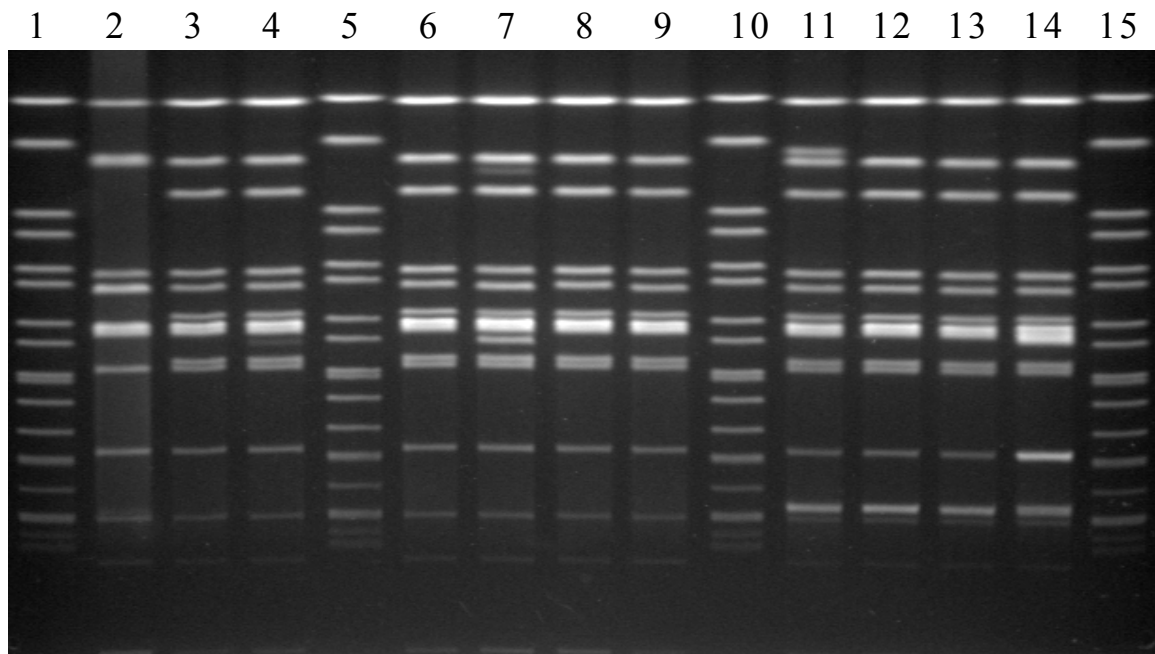
## 參考文獻

1. 2000. Multistate outbreak of listeriosis--United States, 2000. MMWR Morb.Mortal.Wkly.Rep. **49**:1129-1130.
2. 2002. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating ground beef--United States, June-July 2002. MMWR Morb.Mortal.Wkly.Rep. **51**:637-639.
3. **Gautom, R. K.** 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. J.Clin.Microbiol. **35**:2977-2980.
4. **Graves, L. M. and B. Swaminathan.** 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. Int.J.Food Microbiol. **65**:55-62.
5. **Swaminathan, B., T. J. Barrett, S. B. Hunter, and R. V. Tauxe.** 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerg.Infect.Dis. **7**:382-389.
6. 邱乾順、楊榮泉、趙長勝、劉顏、江亭誼、魏孝倫、廖采苓. 台灣東部與中部地區 *Shigella sonnei* 所引發之桿菌性痢疾分子流行病學研究報告(DOH90-DC-2018). 2002.

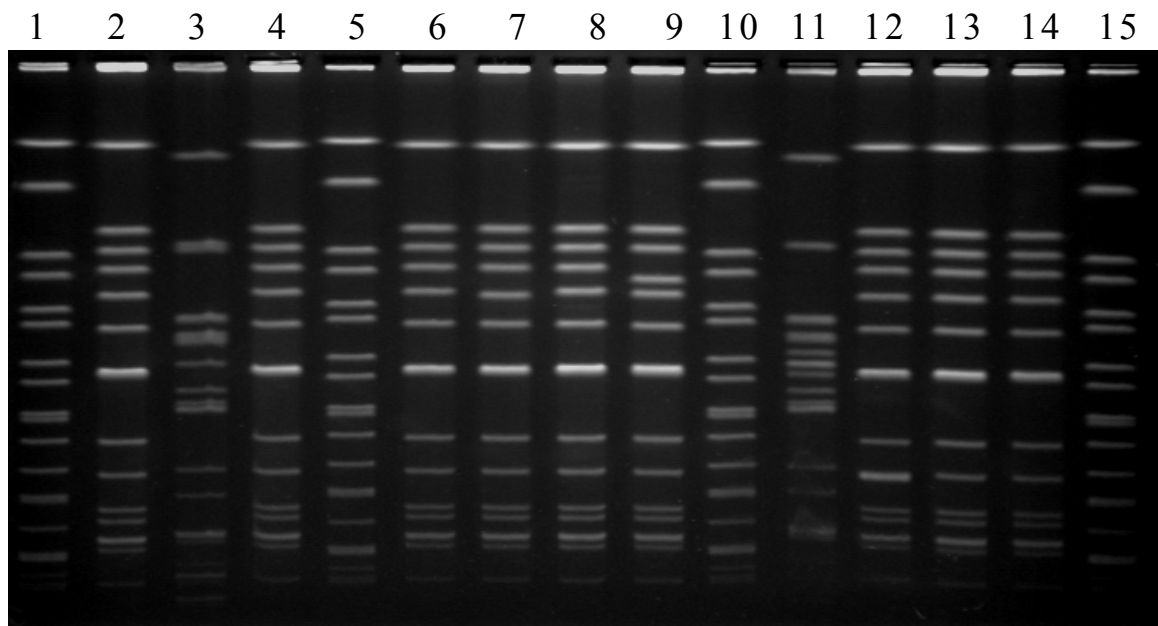
圖表



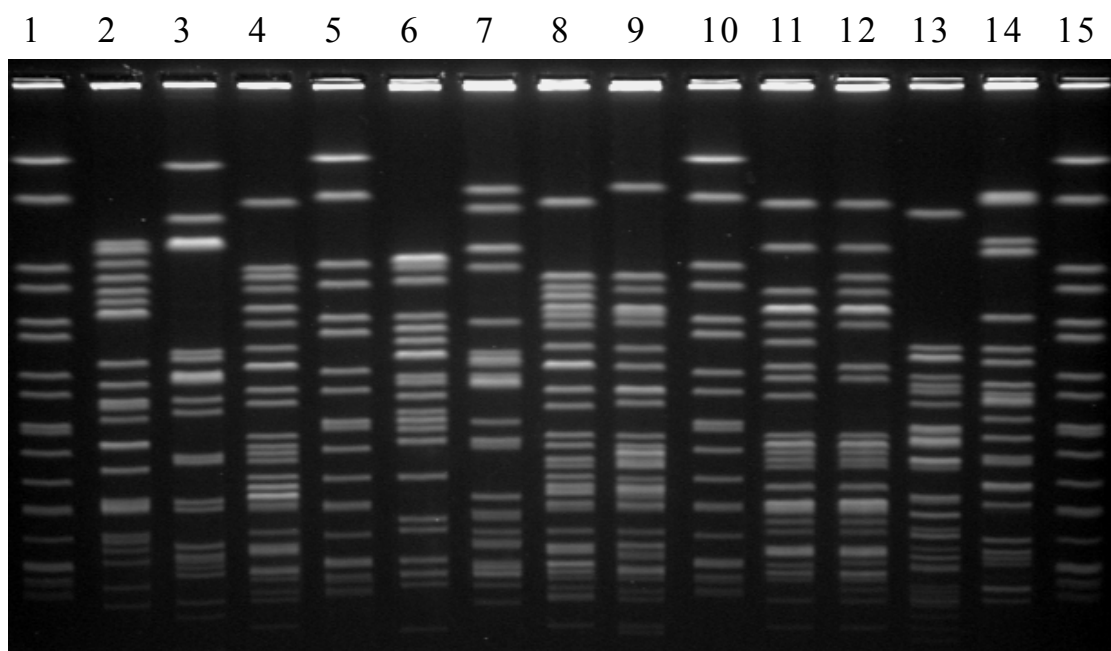
圖一、*Shigella sonnei* 培養於 SS 與 TSA，PFGE 結果顯示培養於 SS 培養基之菌株，PFGE 圖譜可見可能為菌體多醣成分之雜質(紅色直線區域)，顯示培養基會影響 PFGE 結果。



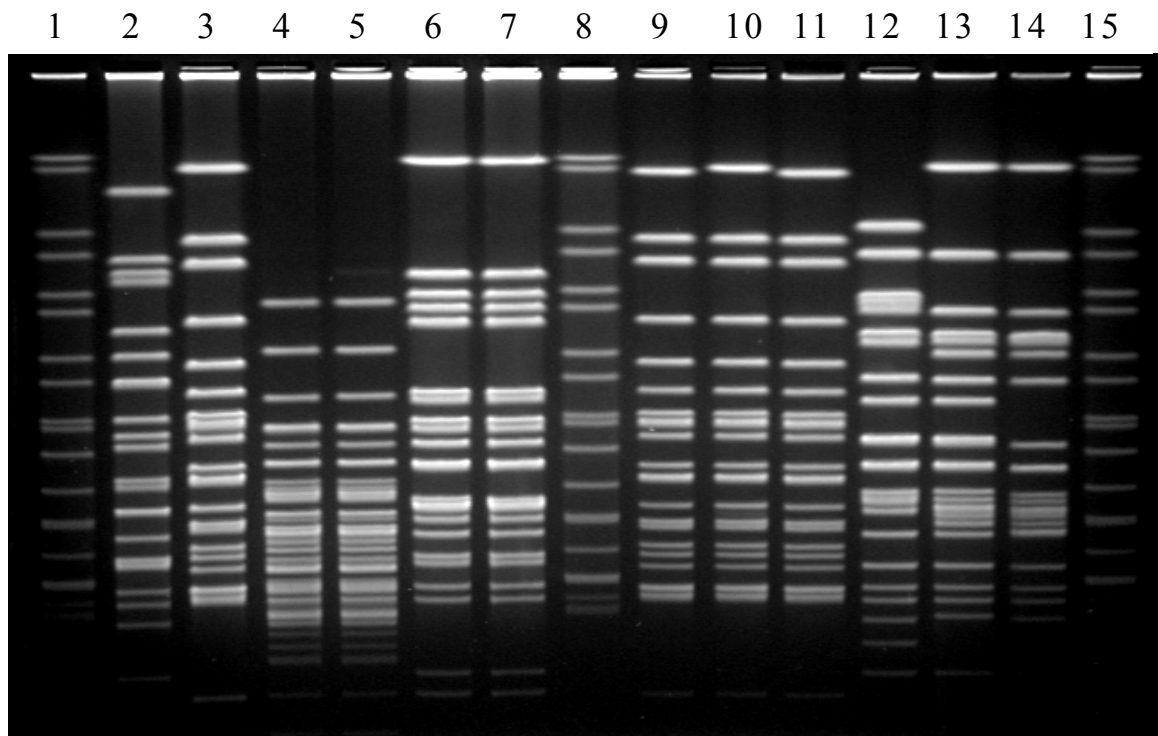
圖二：應用腸內菌標準 PFGE 操作程序分析 *Shigella sonnei* 之 PFGE 圖譜，第 1、5、10、15 為標準菌株 *Salmonella* Braenderup H9812 以 *Xba*I 切割之圖譜，其餘為分離自中部地區之 *S. sonnei* 菌株。



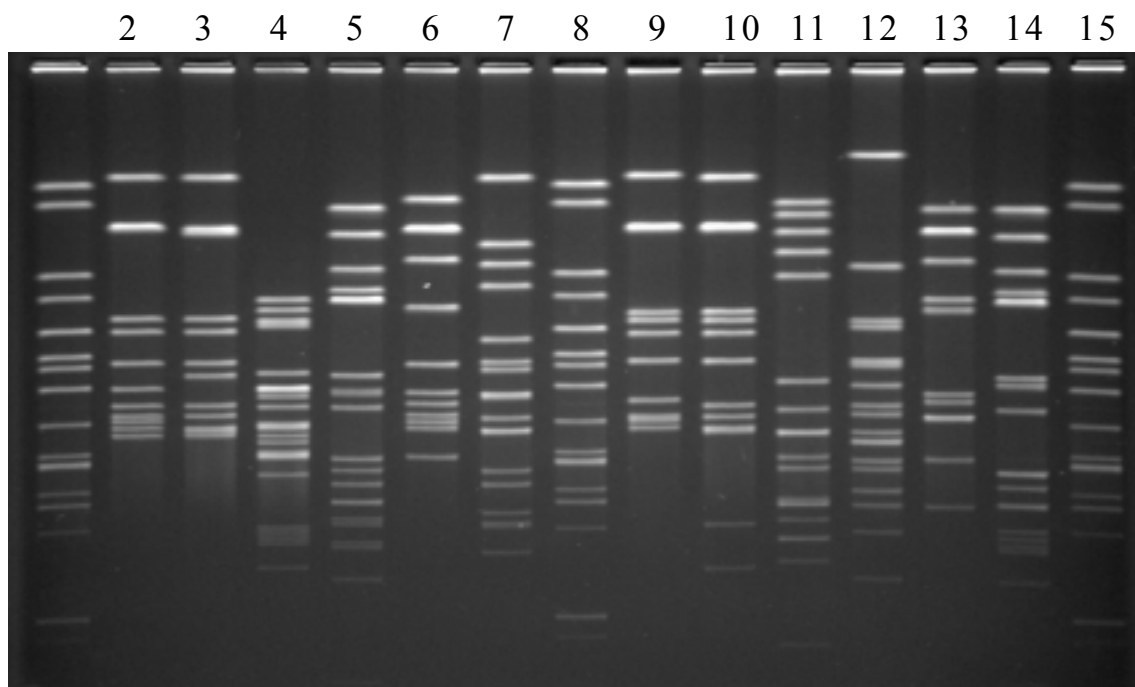
圖三：應用腸內菌標準 PFGE 操作程序分析 *Salmonella Choleraesuis* 之 PFGE 圖譜，第 1、5、10、15 為標準菌株 *Salmonella Braenderup* H9812 以 *Xba*I 切割之圖譜，其餘為分離自台灣南部養豬場之 *S. Choleraesuis* 菌株。



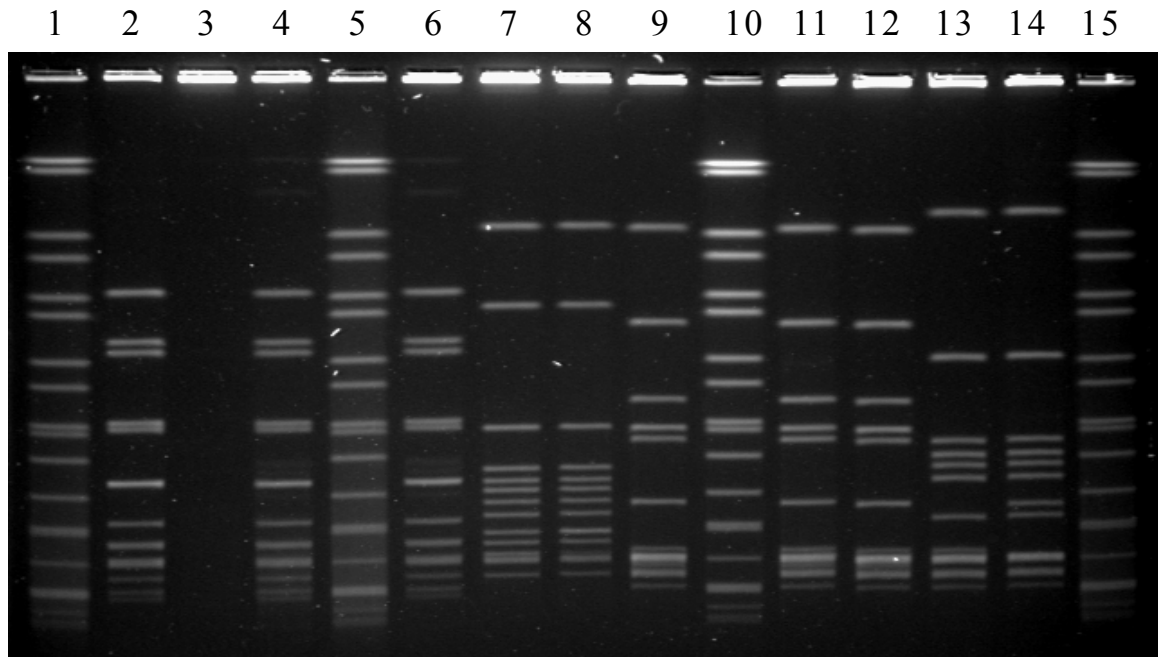
圖四：應用腸內菌標準 PFGE 操作程序分析 *Klebsiella pneumoniae* 之 PFGE 圖譜，第 1、5、10、15 為標準菌株 *Salmonella Braenderup* H9812 以 *Xba*I 切割之圖譜，其餘為分離自台灣中部醫學中心之 *K. pneumoniae* 菌株。



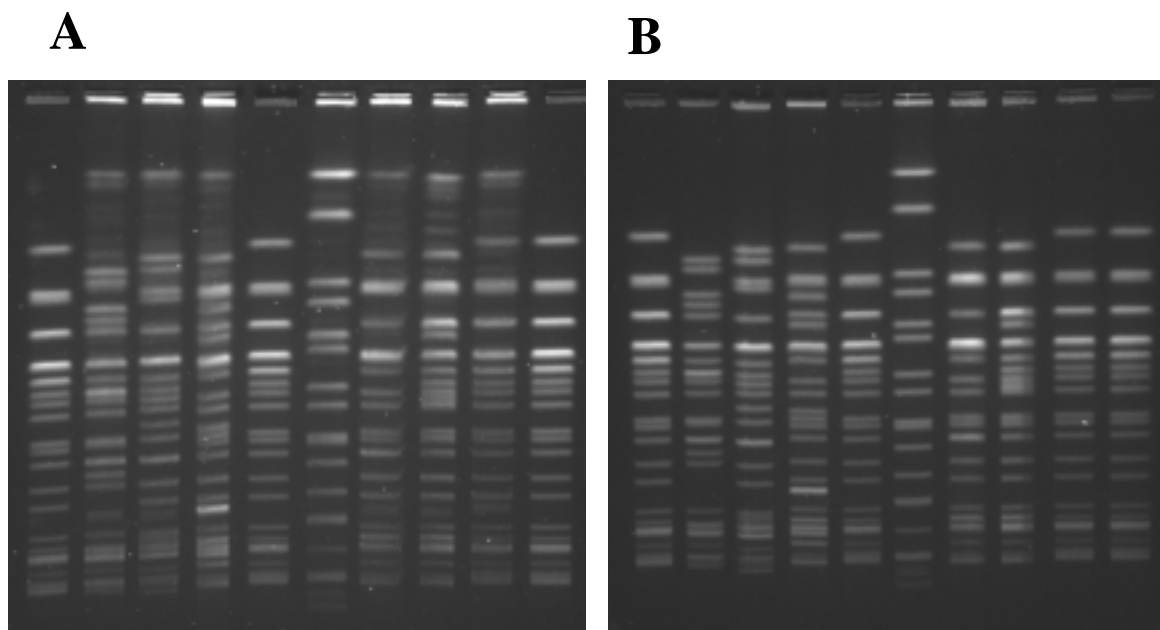
圖五：應用腸內菌標準 PFGE 操作程序分析 *Bordetella pertussis* 之 PFGE 圖譜，第 1、8、15 為標準菌株 *Salmonella* Braenderup H9812 以 *Xba*I 切割之圖譜，其餘為 *B. pertussis* 菌株。



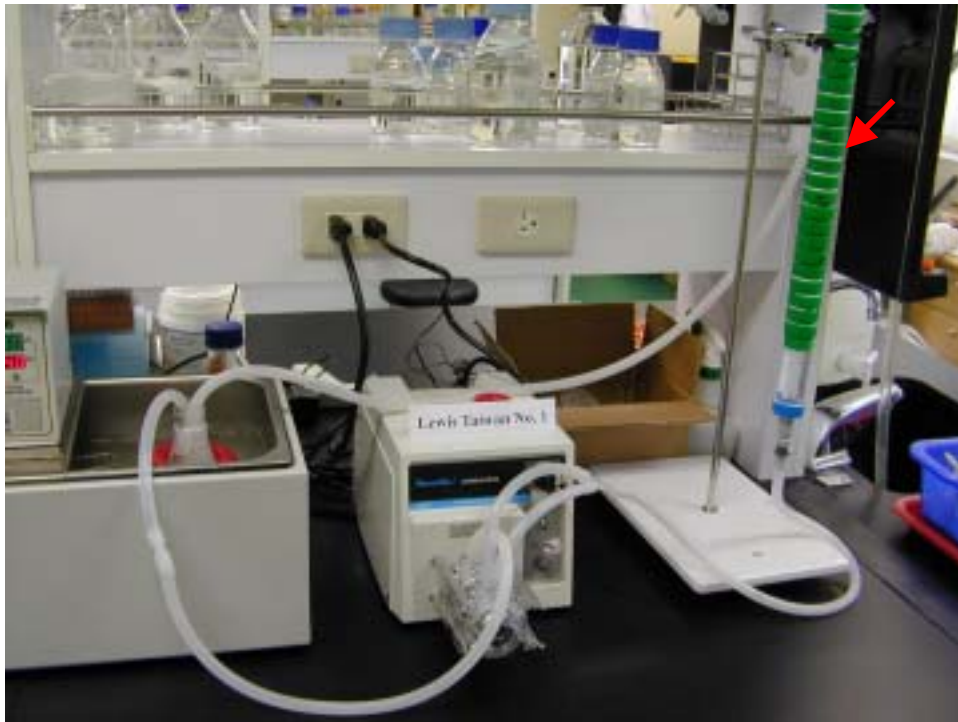
圖六：應用腸內菌標準 PFGE 操作程序分析 *Neisseria meningitidis* 之 PFGE 圖譜，第 1、8、15 為標準菌株 *N. meningitidis* M413 以 *Nhe*I 切割之圖譜，其餘為 *N. meningitidis* 菌株。



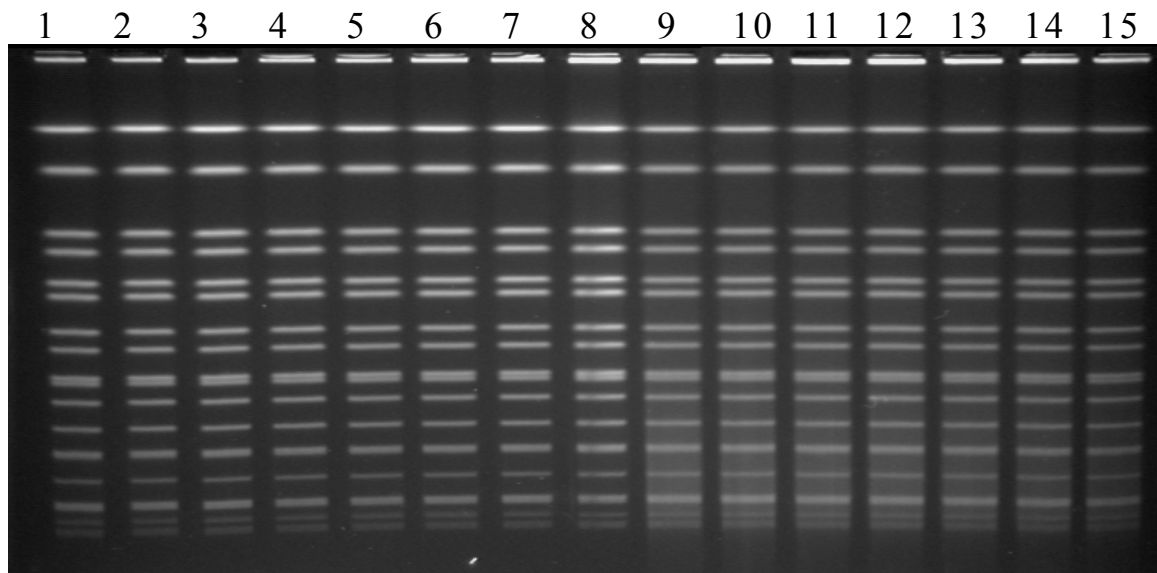
圖七：使用 *Listeria monocytogenes* 標準 PFGE 操作程序分析 *Streptococcus pyogenes* 之 PFGE 圖譜，第 1、5、10、15 為標準菌株 *Salmonella* Braenderup H9812 以 *Xba*I 切割之圖譜，其餘為分離自台灣中部地區猩紅熱病人之 *S. pyogenes* 菌株。



圖八、(A) 訓練營學生完成之 PFGE 圖譜，乃經過兩次純水、四次 TE 清洗處理，具有許多不完全切割(incomplete cut)片斷；(B)相同的 PFGE 膠體，再經兩次 TE 溶液清洗，所得到的清晰 PFGE 圖譜，限制酶切割完全。(此兩 PFGE 圖像由美國 CDC PulseNet 實驗室 Mary Ann Lambert-Fair 女士所提供)。



圖九：第一代半自動膠體清洗機(Lewis Taiwan No. 1)，由水浴器、蠕動幫浦與試管架組成，一次可清洗 30 個以上樣本(每一篩蓋可放一樣本，可串連 30 個以上)，縮短清洗時間由原需 4 小時至 1 小時左右，得到高純度 DNA，品質優於手工方法清洗。



圖十：使用膠體清洗機(第 1-8 列)協助清洗與使用手工方法(第 9-15 列)清洗之標準菌株 *Salmonella* Braenderup H9812 以 *Xba*I 切割之 PFGE 圖譜，使用膠體清洗機方法製備之 DNA 品質，優於應用手工方法製備之 DNA。

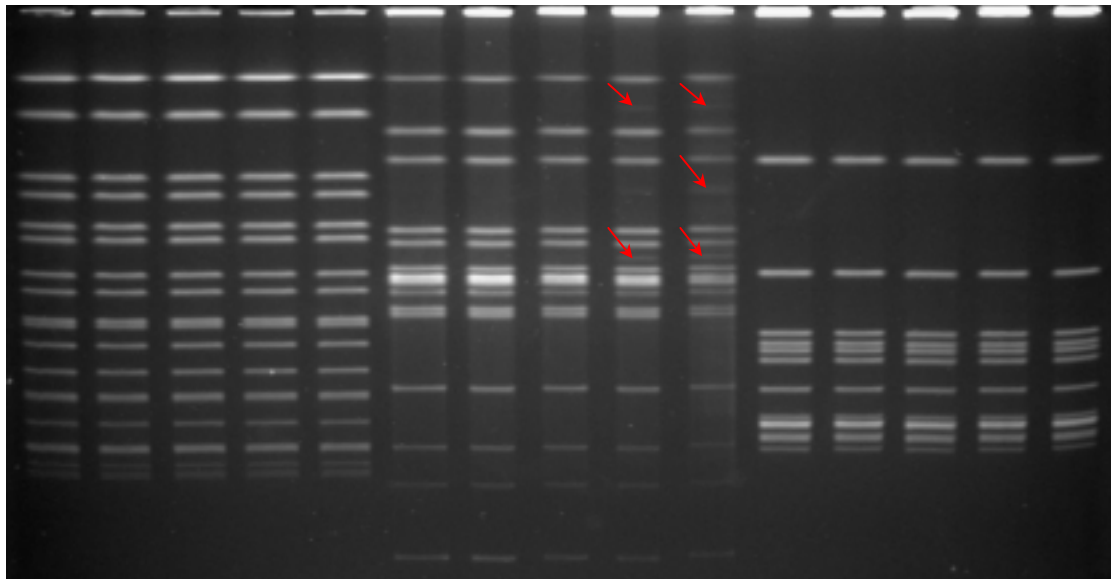


圖十一、第二代半自動膠體清洗機，由水浴器、蠕動幫浦、與試管架組成。立體組合以減少佔據桌面，蠕動幫浦可控制清洗液、空氣流速與循環時間，篩管下方裝快速接頭(紅色箭頭指示處)，方便除去屯積在篩管內之清洗液。

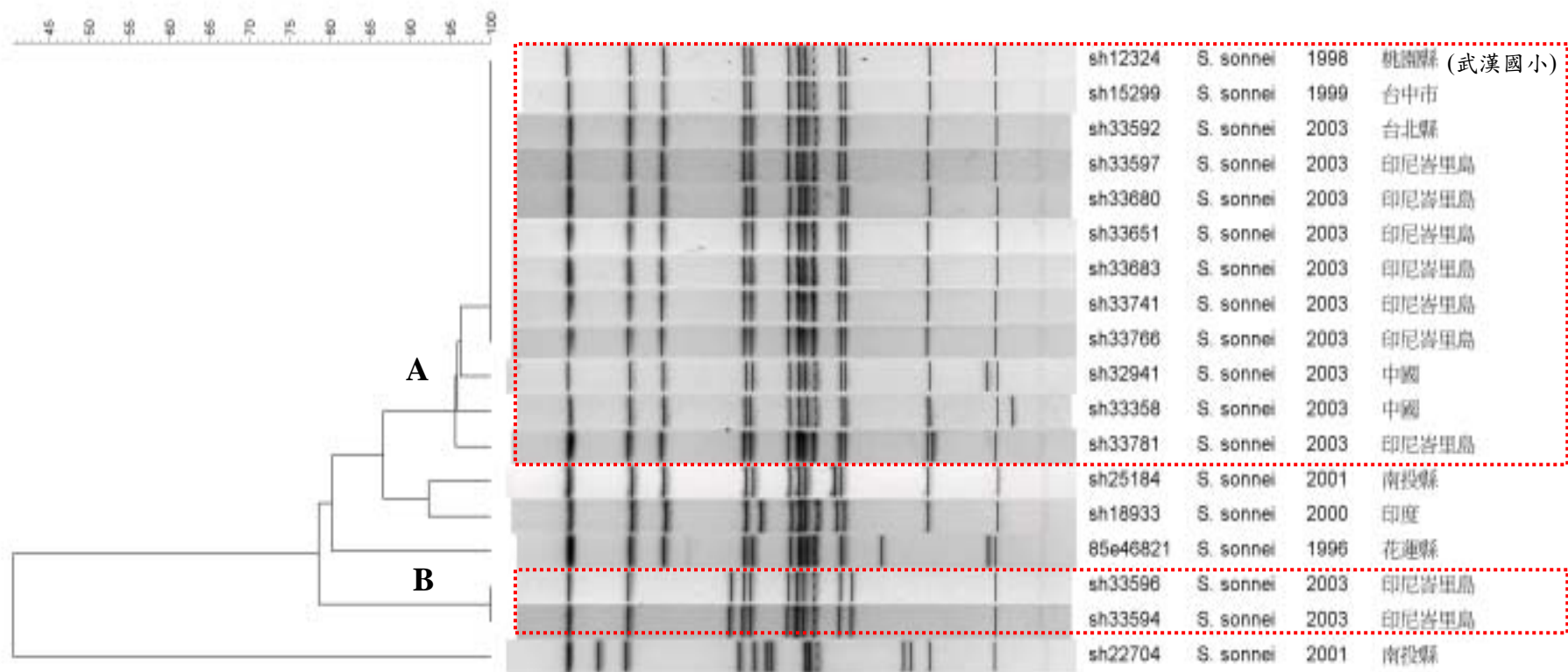


圖十二、第三代全自動膠體清洗機，可由電腦控制清洗液種類(兩種選擇)、清洗液量、流速、循環時間、循環次數與排水等功能。

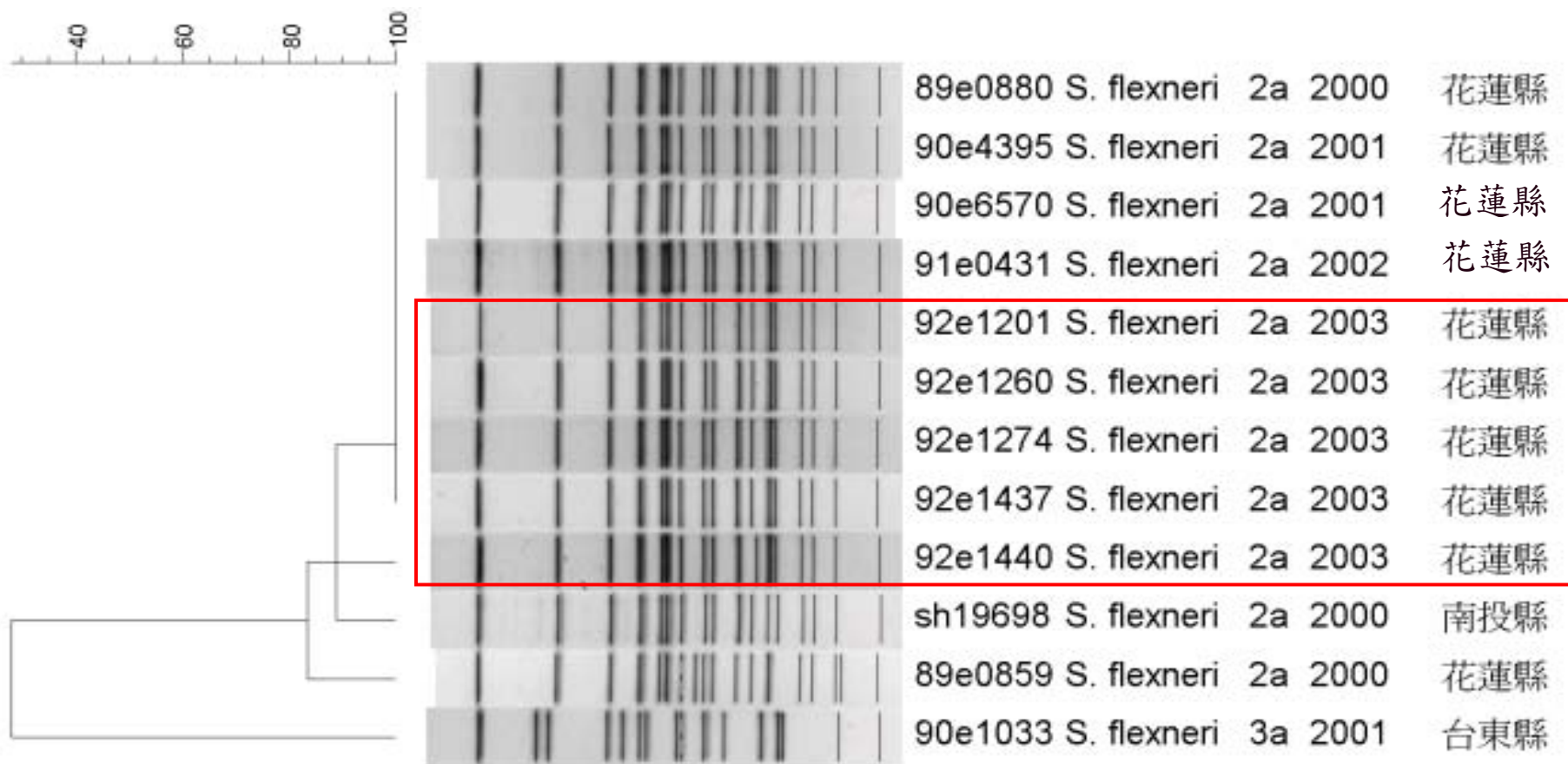
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



圖十三：限制酶使用量測試，第 1-5 列為 *Salmonella* Braenderup H9812 分別以 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 units 的 *XbaI* 切割之 PFGE 圖譜，第 6-10 為 *Shigella sonnei* SH30670 分別以 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 units 的 *NotI* 切割之 PFGE 圖譜，第 11-15 為 *Streptococcus pyogenes* SP10282 分別以 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 units 的 *SmaI* 切割之 PFGE 圖譜，此測試證明若 DNA 品質好，低至 0.31 units 的酵素即足夠，而在此試驗中之 *S. sonnei* SH30670 的 DNA 品質較差，在 0.625 units 的 *NotI* 時開始出現不完全切割的情況(如箭頭所示)。



圖十四、2003 年國人至印尼峇里島旅遊感染桿菌性痢疾，自三分局檢驗室所分離之菌株，與 *Shigella* spp. 指紋圖譜資料庫圖譜資料比對所製之菌株親緣關係圖。印尼分離之菌株分成 A 與 B 群(紅色虛線框標示)，A 群菌株包括 1998 年年底桃園縣武漢國小桿菌性痢疾爆發事件之菌株，1999 年台中市分離之菌株 (與武漢國小有關連)，2003 年台北縣菌株(病例未出國但其室友為峇里島旅遊病例)。A 群中有兩個在中國感染之病例與另一峇里島病例，菌株與主要的菌株圖譜只有一 DNA 片斷之差異。



圖十五、花蓮縣卓溪鄉山立村 2003 年家族感染事件之 *Shigella flexneri* 2a 菌株 (紅色虛線框所標示)與 DNA 指紋圖譜資料庫內親緣性相近菌株之親緣關係圖, *S. flexneri* 3a 為親緣性低菌株, 做為參考菌株。與 2003 年菌株具相同圖譜之菌株(89e0880、90e4395、90e6570、91e0431)也皆分離自卓溪鄉山立村之前之病例。

表一：PFGE 標準操作程序，各菌種之培養、包埋清洗、限制酶、與跑膠條件

菌種	培養基	培養條件 <sup>a</sup>	濁度 (OD) <sup>b</sup>	包埋、清洗方式 <sup>c</sup>	第一限制酶 (units); 反應溫度	第二限制酶 (units); 反應溫度	參考分子標誌	跑膠條件
<i>Shigella</i> spp.	TSA	37°C, 16 h	0.5	A	<i>NotI</i> (10); 37°C	<i>XbaI</i> (10); 37°C	<i>XbaI</i> 切割之 <i>S. enterica</i> ser. Braenderup H9812 基因體 DNA 片斷	Auto Algorithm 30-600 kb (pulse time 2.16 s → 54.17 s), angle 120°; voltage 6 V/cm; 19 h
<i>Escherichia coli</i> 0157	BAP	37°C, 16 h	0.5	A	<i>XbaI</i> (10); 37°C	<i>NotI</i> (10); 37°C	同上	同上
<i>Salmonella</i> spp.	TSA	37°C, 16 h	0.5	A	<i>XbaI</i> (10); 37°C	<i>SpeI</i> (10); 37°C	同上	同上
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	TSA	37°C, 16 h	0.5	A	<i>SfiI</i> (10); 50°C	<i>NotI</i> (10); 37°C	同上	同上
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LBA	37°C, 16 h	0.5	A	<i>XbaI</i> (10); 37°C		同上	同上
<i>Legionella</i> spp.	BCYE	37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 16 h	0.7	A	<i>SfiI</i> (10); 50°C		同上	同上
<i>Bordetella pertussis</i>	BGA	37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 16 h	0.5	A	<i>XbaI</i> (10); 37°C	<i>DraI</i> (10); 37°C	同上	pulse time 4 s → 40 s, angle 120°; voltage 6 V/cm; 19 h
<i>Neisseria meningitidis</i>	BAP	37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 16 h	0.7	A	<i>NheI</i> (10); 37°C	<i>SpeI</i> (10); 37°C	<i>NheI</i> 切割之 <i>N. meningitidis</i> M415 基因體 DNA 片斷	pulse time 2 s → 35 s, angle 120°; voltage 6 V/cm; 19 h
<i>Streptococcus pyogenes</i>	BAP	37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 16 h	0.7	B	<i>SmaI</i> (10); 25°C	<i>SgrAI</i> (20); 37°C		pulse time 4 s → 40 s, angle 120°; voltage 6 V/cm; 19 h

<sup>a</sup> BAP: Blood Agar Plate (TSA + 5% sheep blood); BCYE: Buffered Charcoal Yeast Extract Agar; BGA: Bordet-Gengou Agar; LBA: Luria Bertani Agar; TSA: Trypticase Soy Agar

<sup>b</sup> 使用管徑 13 mm 管徑之玻璃管在濁度計(Dade Microscan™)所測得之 OD 值

<sup>c</sup> A: 革蘭氏陰性菌包埋、清洗方法; B: 革蘭氏陽性菌包埋、清洗方法

表二、PFGE 膠體清洗條件

步驟	溶液 <sup>a</sup>	溶液量 <sup>b</sup>	水浴溫度	流度	方式	所需時間
1	RO	500 ml	56°C	250 ml/min	沖洗	2 min
2	RO	500 ml	56°C	200 ml/min	循環 6 min 後沖洗	8.5 min
3	TE	500 ml	56°C	200 ml/min	沖洗	2 min
4	TE	500 ml	56°C	200 ml/min	循環 6 min 後沖洗	8.5 min
5	TE	500 ml	56°C	200 ml/min	循環 6 min 後沖洗	8.5 min
6	TE	500 ml	56°C	200 ml/min	循環 6 min 後沖洗	8.5 min

<sup>a</sup> RO: reversed osmosis water; TE (TE buffer (10 mM Tris.Cl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)

<sup>b</sup> 溶液量以 20 個檢體(screen caps)計算，超過 20 個檢體，需增加溶液量。

附錄 A. PulseNet Codes for Foodborne Disease Pathogens (Non-*Salmonella*)

Code	Organism	Code	Organism
B66	<i>Bacillus cereus</i>	EXF	<i>Escherichia coli</i> O169:H41
		EKK	<i>Escherichia coli</i> O169:NM
DBB	<i>Campylobacter coli</i>	EH2	<i>Escherichia coli</i> O45:H2
DBD	<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	ENM	<i>Escherichia coli</i> O145:NM
DBR	<i>Campylobacter jejuni</i>	EXI	<i>Escherichia coli</i> invasive
		EXS	<i>Escherichia coli</i> Stx-producing
DRP	<i>Clostridium botulinum</i> A	EXT	<i>Escherichia coli</i> toxigenic
DRK	<i>Clostridium botulinum</i> B		
DR6	<i>Clostridium botulinum</i> C	GX6	<i>Listeria monocytogenes</i>
DSG	<i>Clostridium botulinum</i> D		
DSP	<i>Clostridium botulinum</i> E	JZG	<i>Shigella boydii</i>
DSK	<i>Clostridium botulinum</i> F	JZP	<i>Shigella dysenteriae</i>
DS1	<i>Clostridium botulinum</i> G	JZX	<i>Shigella flexneri</i>
DZP	<i>Clostridium perfringens</i>	J16	<i>Shigella sonnei</i>
EXA	<i>Escherichia coli</i>	KZG	<i>Vibrio cholerae</i>
EXD	<i>Escherichia coli</i> O111	K16	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
EXK	<i>Escherichia coli</i> O111:NM	K1R	<i>Vibrio vulnificus</i>
EXH	<i>Escherichia coli</i> O157:H7		
EZH	<i>Escherichia coli</i> O157:H19	K6G	<i>Yersinia enterocolitica</i>
EXN	<i>Escherichia coli</i> O157:NM		
EZK	<i>Escherichia coli</i> ONT:H16		
EVC	<i>Escherichia coli</i> O26:H11		

PulseNet Codes for *Salmonella* serotypes (A)

Code	Organism	Code	Organism
JRE	<i>Salmonella</i> Abaetetuba	JBP	<i>Salmonella</i> Braenderup
TDA	<i>Salmonella</i> Adelaide	TDG	<i>Salmonella</i> Brandenburg
RIA	<i>Salmonella</i> Aequatoria	JBX	<i>Salmonella</i> Bredeney
JRF	<i>Salmonella</i> Agbeni	RIC	<i>Salmonella</i> Brunei
JAB	<i>Salmonella</i> Agona	JC6	<i>Salmonella</i> California
LXM	<i>Salmonella</i> Ajiobo	JRG	<i>Salmonella</i> Carrau
TDB	<i>Salmonella</i> Alachua	JCG	<i>Salmonella</i> Cerro
TDC	<i>Salmonella</i> Albany	TKK	<i>Salmonella</i> Chameleon
LXN	<i>Salmonella</i> Altona	JCP	<i>Salmonella</i> Chester
TDD	<i>Salmonella</i> Amager	RIE	<i>Salmonella</i> Chicago
LXO	<i>Salmonella</i> Amsterdam	JD6	<i>Salmonella</i> Choleraesuis
JAG	<i>Salmonella</i> Anatum	JD6	<i>Salmonella</i> Choleraesuis var. Kunzendorf
APA	<i>Salmonella</i> Apapa	TEJ	<i>Salmonella</i> Cremieu
ARE	<i>Salmonella</i> Arechavaleta	JDG	<i>Salmonella</i> Cubana
XLD	<i>Salmonella</i> Babelsberg	EPB	<i>Salmonella</i> Denver
TDE	<i>Salmonella</i> Baildon	JDP	<i>Salmonella</i> Derby
TEG	<i>Salmonella</i> Bardo	JDX	<i>Salmonella</i> Dublin
JAP	<i>Salmonella</i> Bareilly	DUI	<i>Salmonella</i> Duivenhoks
RIB	<i>Salmonella</i> Barranquilla	RIH	<i>Salmonella</i> Eastbourne
JAX	<i>Salmonella</i> Berta	EPA	<i>Salmonella</i> Ekpoui
JB6	<i>Salmonella</i> Binza	JRH	<i>Salmonella</i> Emek
JBG	<i>Salmonella</i> Blockley	JEG	<i>Salmonella</i> Enteritidis
THE	<i>Salmonella</i> Bongor	TDH	<i>Salmonella</i> Flint
TDF	<i>Salmonella</i> Bovismorbificans	JEP	<i>Salmonella</i> Florida

PulseNet Codes for *Salmonella* serotypes (B)

Code	Organism	Code	Organism
RIG	<i>Salmonella</i> Fresno	JG6	<i>Salmonella</i> Java
JRA	<i>Salmonella</i> Gallinarum	JGG	<i>Salmonella</i> Javiana
TDJ	<i>Salmonella</i> Gaminara	TEL	<i>Salmonella</i> Johannesburg
JEX	<i>Salmonella</i> Give	TEM	<i>Salmonella</i> Kedougou
JRI	<i>Salmonella</i> Gostrup	JGP	<i>Salmonella</i> Kentucky
RID	<i>Salmonella</i> Godesberg	TEN	<i>Salmonella</i> Kiambu
TEB	<i>Salmonella</i> Goettingen	JRN	<i>Salmonella</i> Kintambo
TEK	<i>Salmonella</i> Guildford	KOT	<i>Salmonella</i> Kottbus
TDK	<i>Salmonella</i> Hadar	JRO	<i>Salmonella</i> Kralendyk
EPC	<i>Salmonella</i> Haifa	TEP	<i>Salmonella</i> Lagos
JHA	<i>Salmonella</i> Hartford	RIF	<i>Salmonella</i> Lansing
TDL	<i>Salmonella</i> Havana	LEX	<i>Salmonella</i> Lexington
JF6	<i>Salmonella</i> Heidelberg	TDN	<i>Salmonella</i> Lindenburg
LXP	<i>Salmonella</i> Hindmarsh	JGX	<i>Salmonella</i> Litchfield
JRJ	<i>Salmonella</i> Houten	TDP	<i>Salmonella</i> Liverpool
JRK	<i>Salmonella</i> Hvittingfoss	JH6	<i>Salmonella</i> Livingstone
TDM	<i>Salmonella</i> Ibadan	JRP	<i>Salmonella</i> Lomalinda
JFG	<i>Salmonella</i> Illinois	LOM	<i>Salmonella</i> Lomita
JFP	<i>Salmonella</i> Indiana	TEC	<i>Salmonella</i> London
JFX	<i>Salmonella</i> Infantis	JHG	<i>Salmonella</i> Madelia
JRL	<i>Salmonella</i> Inverness	SKK	<i>Salmonella</i> Manchester
VKK	<i>Salmonella</i> Isangi	JHP	<i>Salmonella</i> Manhattan
JRM	<i>Salmonella</i> Istanbul	TDQ	<i>Salmonella</i> Marina
LXQ	<i>Salmonella</i> Ituri	MDI	<i>Salmonella</i> Matadi

PulseNet Codes for *Salmonella* serotypes (C)

Code	Organism	Code	Organism
TDR	<i>Salmonella</i> Mbandaka	JKP	<i>Salmonella</i> Paratyphi A
JHX	<i>Salmonella</i> Meleagridis	JKX	<i>Salmonella</i> Paratyphi B
MEN	<i>Salmonella</i> Mendoza	JRS	<i>Salmonella</i> Pensacola
TEA	<i>Salmonella</i> Miami	POM	<i>Salmonella</i> Pomona
TEQ	<i>Salmonella</i> Mikawasima	JL6	<i>Salmonella</i> Poona
JIG	<i>Salmonella</i> Minnesota	JRT	<i>Salmonella</i> Potsdam
JIP	<i>Salmonella</i> Mississippi	JRB	<i>Salmonella</i> Pullorum
JIX	<i>Salmonella</i> Montevideo	XLB	<i>Salmonella</i> Putten
JJ6	<i>Salmonella</i> Muenchen	JLG	<i>Salmonella</i> Reading
TDS	<i>Salmonella</i> Muenster	TEE	<i>Salmonella</i> Rissen
JRQ	<i>Salmonella</i> Nchanga	JLP	<i>Salmonella</i> Rubislaw
JRR	<i>Salmonella</i> Newbrunswick	JN6	<i>Salmonella</i> Saintpaul
JJG	<i>Salmonella</i> Newington	JLX	<i>Salmonella</i> Sandiego
JJP	<i>Salmonella</i> Newport	JRU	<i>Salmonella</i> Saphra
LXR	<i>Salmonella</i> Nima	JM6	<i>Salmonella</i> Schwarzengrund
TDT	<i>Salmonella</i> Norwich	XLC	<i>Salmonella</i> Seegefeld
TDU	<i>Salmonella</i> Ohio	JRC	<i>Salmonella</i> Sendai
TED	<i>Salmonella</i> Onderstepoort	JMP	<i>Salmonella</i> Senftenberg
JJX	<i>Salmonella</i> Orangienburg	JRV	<i>Salmonella</i> Soesterberg
XLA	<i>Salmonella</i> Orion	JNG	<i>Salmonella</i> Stanley
OSL	<i>Salmonella</i> Oslo	JRW	<i>Salmonella</i> Stanleyville
OTH	<i>Salmonella</i> Othmarschen	STO	<i>Salmonella</i> Stockholm
LXS	<i>Salmonella</i> Pakistan	JNP	<i>Salmonella</i> Tallahassee
JKG	<i>Salmonella</i> Panama	TEF	<i>Salmonella</i> Telelkebir

PulseNet Codes for *Salmonella* serotypes (D)

Code	Organism	Code	Organism
JNX	<i>Salmonella</i> Tennessee	JQX	<i>Salmonella</i> Wichita
JP6	<i>Salmonella</i> Thompson	JQO	<i>Salmonella</i> Wien
EPF	<i>Salmonella</i> Tsevie	TDY	<i>Salmonella</i> Worthington
JPP	<i>Salmonella</i> Typhi	JAA	<i>Salmonella</i> enterica spp.
JPX	<i>Salmonella</i> Typhimurium	TER	<i>Salmonella</i> Group B Monophasic
JPX	<i>Salmonella</i> Typhimurium var. Copenhagen		
JRD	<i>Salmonella</i> Typhisuis	JR1	Subspecies I
TDW	<i>Salmonella</i> Uganda	JR2	Subspecies II
JQG	<i>Salmonella</i> Urbana	JR3	Subspecies III a
TDX	<i>Salmonella</i> Virchow	JR9	Subspecies III b
JRX	<i>Salmonella</i> Virginia	JR4	Subspecies IV
UKK	<i>Salmonella</i> Wandsbek	JR5	Subspecies V
WWS	<i>Salmonella</i> Wandsworth	JR6	Subspecies VI
RIJ	<i>Salmonella</i> Warragul		
JRY	<i>Salmonella</i> Wassenaar	JMG	<i>Salmonella</i> Siegburg *
JQP	<i>Salmonella</i> Weltevreden	JMX	<i>Salmonella</i> Simsbury **
WES	<i>Salmonella</i> Weslaco		

\* *Salmonella* Siegburg was combined with Cerro and is now called *Salmonella* Cerro Var. O14+. The name Siegburg has been dropped; the code JMG has been dropped.

\*\* *Salmonella* Simsbury was combined with Senftenberg. The name Simsbury has been dropped; the code JMX has been dropped.

附錄 B. PFGE Codes for Restriction Enzymes (A). **Bolded Entries** designate restriction enzymes currently used for PFGE subtyping of Foodborne bacterial pathogens. (Enzyme) indicates the isoschizomer (restriction enzyme that recognizes the same sequence).

<i>Aat</i> I ( <i>Stu</i> I)	
<i>Aat</i> II	A01
<i>Acc</i> I	A02
<i>Acc</i> II ( <i>Mvn</i> I)	
<i>Acc</i> III ( <i>Mro</i> I)	
<i>Acc</i> 65 I ( <i>Asp</i> 718)	
<i>Aci</i> I	A03
<i>Acs</i> I ( <i>Apo</i> I)	
<i>Acy</i> I	A04
<i>Afl</i> I ( <i>Ava</i> II)	
<i>Afl</i> II ( <i>Bfr</i> I)	
<i>Afl</i> III	A05
<i>Age</i> I	A06
<i>Aha</i> II ( <i>Acy</i> I)	
<i>Aha</i> III ( <i>Dra</i> I)	
<i>Ahd</i> I	A07
<i>Alu</i> I	A08
<i>Alw</i> I	A09
<i>Alw</i> 26 I	A10
<i>Alw</i> 44 I ( <i>Apa</i> L I)	
<i>Alw</i> N I	A11
<i>Aoc</i> I ( <i>Sau</i> I)	
<i>Aos</i> I ( <i>Avi</i> II)	
<i>Apa</i> I	A12
<i>Apa</i> L I	A13

<i>Apo</i> I	A14
<i>Apy</i> I	A15
<b><i>Asc</i> I</b>	A16
<i>Ase</i> I ( <i>Asn</i> I)	
<i>Asn</i> I	A17
<i>Asp</i> I	A18
<i>Asp</i> 700	A19
<i>Asp</i> 718	A20
<i>Asp</i> E I	A21
<i>Asp</i> H I	A22
<i>Asu</i> II ( <i>Sfu</i> I)	
<i>Ava</i> I	A23
<i>Ava</i> II	A24
<i>Avi</i> II	A25
<i>Avr</i> II ( <i>Bln</i> I)	A26
<i>Axy</i> I ( <i>Sau</i> I)	
<i>Bal</i> I	B01
<i>Bam</i> H I	B02
<i>Ban</i> I	B03
<i>Ban</i> II	B04
<i>Ban</i> III ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bbe</i> I ( <i>Nar</i> I)	
<i>Bbr</i> P I ( <i>Pml</i> I)	
<i>Bbs</i> I ( <i>Bpu</i> A I)	
<i>Bbu</i> I ( <i>Sph</i> I)	

<i>Bbv</i> I	B05
<i>Bcg</i> I	B06
<i>Bcl</i> I	B07
<i>Bcn</i> I ( <i>Nci</i> I)	
<i>Bco</i> I ( <i>Ava</i> I)	
<i>Bfa</i> I	B08
<i>Bfr</i> I	B09
<i>Bgl</i> I	B10
<i>Bgl</i> II	B11
<b><i>Bln</i> I</b> ( <i>Avr</i> II)	A26
<i>Blp</i> I ( <i>Cel</i> II)	
<i>Bme</i> 18 I ( <i>Ava</i> II)	
<i>Bmy</i> I	B12
<i>Bpm</i> I	B13
<i>Bpu</i> 1102 I ( <i>Cel</i> II)	
<i>Bpu</i> A I	B14
<i>Bsa</i> I	B15
<i>Bsa</i> A I	B16
<i>Bsa</i> B I	B17
<i>Bsa</i> H I	B18
<i>Bsa</i> J I	B19
<i>Bsa</i> M I ( <i>Bsm</i> I)	
<i>Bsa</i> W I	B20
<i>Bsc</i> I ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bse</i> A I ( <i>Mro</i> I)	

PFGE Codes for Restriction Enzymes (B)

<i>Bse</i> P I ( <i>Bss</i> H II)	
<i>Bse</i> R I	B21
<i>Bsg</i> I	B22
<i>Bsh</i> I ( <i>Hae</i> III)	
<i>Bsh</i> 1236 I ( <i>Mvn</i> I)	
<i>Bsi</i> C I ( <i>Sfu</i> I)	
<i>Bsi</i> E I	B23
<i>Bsi</i> HKAI	B24
<i>Bsi</i> L I ( <i>Apy</i> I)	
<i>Bsi</i> M I ( <i>Mro</i> I)	
<i>Bsi</i> W I	B25
<i>Bsi</i> X I ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bsi</i> Y I	B26
<i>Bsl</i> I	B27
<i>Bsm</i> I	B28
<i>Bsm</i> B I	B29
<i>Bsm</i> F I	B30
<i>Bso</i> B I	B31
<i>Bsp</i> 13 I ( <i>Mro</i> I)	
<i>Bsp</i> 50 I ( <i>Mvn</i> I)	
<i>Bsp</i> 106 I ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bsp</i> 120 I ( <i>Apa</i> I)	
<i>Bsp</i> 143 I ( <i>Hae</i> II)	
<i>Bsp</i> 1286 I ( <i>Bmy</i> I)	
<i>Bsp</i> 1407 I ( <i>Ssp</i> B I)	
<i>Bsp</i> 1720 I ( <i>Cel</i> II)	
<i>Bsp</i> C I ( <i>Pvu</i> I)	
<i>Bsp</i> D I ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bsp</i> E I ( <i>Mro</i> I)	

<i>Bsp</i> H I	B32
<i>Bsp</i> LU 11 I	B33
<i>Bsp</i> M I	B34
<i>Bsp</i> M II ( <i>Mro</i> I)	
<i>Bsp</i> X I ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bsr</i> I	B35
<i>Bsr</i> B I	B36
<i>Bsr</i> D I	B37
<i>Bsr</i> F I	B38
<i>Bsr</i> G I	B39
<i>Bss</i> G I ( <i>Bst</i> X I)	
<i>Bss</i> H II	B40
<i>Bss</i> K I	B41
<i>Bss</i> S I	B42
<i>Bst</i> I ( <i>Bam</i> H I)	
<i>Bst</i> 1107 I	B43
<i>Bst</i> B I ( <i>Sfu</i> I)	
<i>Bst</i> E II	B44
<i>Bst</i> N I ( <i>Apy</i> I)	
<i>Bst</i> O I ( <i>Apy</i> I)	
<i>Bst</i> P I ( <i>Bst</i> E II)	
<i>Bst</i> U I ( <i>Mvn</i> I)	
<i>Bst</i> X I	B45
<i>Bst</i> Y I ( <i>Xho</i> II)	
<i>Bsu</i> 15 I ( <i>Cla</i> I)	
<i>Bsu</i> 23 I ( <i>Mro</i> I)	
<i>Bsu</i> 36 I ( <i>Sau</i> I)	
<i>Bsu</i> R I ( <i>Hae</i> III)	
<i>Cac</i> 8 I	C01

<i>Cel</i> II	C02
<i>Cfo</i> I ( <i>Hha</i> I)	
<i>Cfr</i> I ( <i>Eae</i> I)	
<i>Cfr</i> 9 I ( <i>Sma</i> I)	
<i>Cfr</i> 10 I	C03
<i>Cla</i> I	C04
<i>Cpo</i> I ( <i>Rsr</i> II)	
<i>Csp</i> I ( <i>Rsr</i> II)	
<i>Csp</i> 6 I ( <i>Rsa</i> I)	
<i>Csp</i> 45 I ( <i>Sfu</i> I)	
<i>Cvn</i> I ( <i>Sau</i> I)	
<i>Dde</i> I	D01
<i>Dpn</i> I	D02
<i>Dpn</i> II ( <i>Sau</i> 3A I)	
<i>Dra</i> I	D03
<i>Dra</i> II	D04
<i>Dra</i> III	D05
<i>Drd</i> I	D06
<i>Dsa</i> I	D07
<i>Dsa</i> V ( <i>Scr</i> F I)	
<i>Eae</i> I	E01
<i>Eag</i> I	E02
<i>Eam</i> 1105 I ( <i>Asp</i> E I)	
<i>Ear</i> I	E03
<i>Ecl</i> 136 II ( <i>Sac</i> I)	
<i>Ecl</i> X I ( <i>Eag</i> I)	
<i>Eco</i> 47 I ( <i>Ava</i> II)	
<i>Eco</i> 47 III	E04
<i>Eco</i> 57 I	E05

PFGE Codes for Restriction Enzymes (C)

<i>Eco</i> 81 I ( <i>Sau</i> I)	
<i>Eco</i> 88 I ( <i>Ava</i> I)	
<i>Eco</i> 91 I ( <i>Bst</i> E II)	
<i>Eco</i> 130 I ( <i>Sty</i> I)	
<i>Eco</i> ICR I ( <i>Sac</i> I)	
<i>Eco</i> N I	E06
<i>Eco</i> O65 I ( <i>Bst</i> E II)	
<i>Eco</i> O109 I ( <i>Dra</i> II)	
<i>Eco</i> R I	E07
<i>Eco</i> R II ( <i>Apy</i> I)	
<i>Eco</i> R V	E08
<i>Eco</i> T14 I ( <i>Sty</i> I)	
<i>Eco</i> T22 I ( <i>Nsi</i> I)	
<i>Ehe</i> I ( <i>Nar</i> I)	
<i>Esp</i> I ( <i>Cel</i> II)	
<i>Fdi</i> II ( <i>Avi</i> II)	
<i>Fnu</i> 4H I	F01
<i>Fnu</i> D II ( <i>Mvn</i> I)	
<i>Fok</i> I	F02
<i>Fse</i> I	F03
<i>Fsp</i> I ( <i>Avi</i> II)	
<i>Fsp</i> II ( <i>Sfu</i> I)	
<i>Hae</i> II	H01
<i>Hae</i> III	H02
<i>Hap</i> II ( <i>Hpa</i> II)	
<i>Hga</i> I	H03
<i>Hgi</i> A II ( <i>Asp</i> H I)	
<i>Hha</i> I	H04
<i>Hin</i> 6 I ( <i>Hha</i> I)	

<i>Hinc</i> II	H05
<i>Hind</i> II ( <i>Hinc</i> II)	
<i>Hind</i> III	H06
<i>Hinf</i> I	H07
<i>Hin</i> P1 I ( <i>Hha</i> I)	
<i>Hpa</i> I	H08
<i>Hpa</i> II	H09
<i>Hph</i> I	H10
<i>Ita</i> I ( <i>Fnu</i> 4H I)	
<i>Kas</i> I ( <i>Nar</i> I)	
<i>Kpn</i> I ( <i>Acc</i> 65 I)	K02
<i>Kpn</i> 2 I ( <i>Mro</i> I)	
<i>Ksp</i> I ( <i>Sac</i> II)	
<i>Ksp</i> 632 I	K01
<i>Mae</i> I	M01
<i>Mae</i> II	M02
<i>Mae</i> III	M03
<i>Mam</i> I	M04
<i>Mbo</i> I ( <i>Sau</i> 3A I)	
<i>Mbo</i> II	M05
<i>Mfe</i> I ( <i>Mun</i> I)	
<i>Mfl</i> I ( <i>Xho</i> II)	
<i>Mlu</i> I	M06
<i>Mlu</i> N I ( <i>Bal</i> I)	
<i>Mnl</i> I	M07
<i>Mro</i> I	M08
<i>Msc</i> I ( <i>Bal</i> I)	
<i>Mse</i> I	M09
<i>Msl</i> I	M10

<i>Msp</i> I ( <i>Hpa</i> II)	
<i>Msp</i> A1 I	M11
<i>Mst</i> I ( <i>Avi</i> II)	
<i>Mst</i> II ( <i>Sau</i> I)	
<i>Mun</i> I	M12
<i>Mva</i> I ( <i>Apy</i> I)	
<i>Mvn</i> I	M13
<i>Mwo</i> I	M14
<i>Nae</i> I	N01
<i>Nar</i> I	N02
<i>Nci</i> I	N03
<i>Nco</i> I	N04
<i>Nde</i> I	N05
<i>Nde</i> II ( <i>Sau</i> 3A I)	
<i>Ngo</i> A IV ( <i>Nae</i> I)	
<i>Ngo</i> M I ( <i>Nae</i> I)	
<i>Nhe</i> I	N06
<i>Nla</i> III	N07
<i>Nla</i> IV	N08
<i>Not</i> I	N09
<i>Nru</i> I	N10
<i>Nsi</i> I	N11
<i>Nsp</i> I	N12
<i>Nsp</i> II ( <i>Bmy</i> I)	
<i>Nsp</i> III ( <i>Ava</i> I)	
<i>Nsp</i> V ( <i>Sfu</i> I)	
<i>Nsp</i> H I ( <i>Nsp</i> I)	
<i>Num</i> II ( <i>Nar</i> I)	
<i>Oxa</i> N I ( <i>Sau</i> I)	

PFGE Codes for Restriction Enzymes (D)

<i>Pac</i> I	P01
<i>Pae</i> R7 I	P02
<i>Pal</i> I ( <i>Hae</i> III)	
<i>Pfl</i> M I	P03
<i>Pin</i> A I ( <i>Age</i> I)	
<i>Ple</i> I	P04
<i>Pma</i> C I ( <i>Pml</i> I)	
<i>Pme</i> I	P05
<i>Pml</i> I	P06
<i>Ppu</i> 10 I ( <i>Nsi</i> I)	
<i>Ppu</i> M I	P07
<i>Psh</i> A I	P08
<i>Psp</i> 1406 I	P09
<i>Psp</i> A I ( <i>Sma</i> I)	
<i>Psp</i> E I ( <i>Bst</i> E II)	
<i>Pss</i> I ( <i>Dra</i> II)	
<i>Pst</i> I	P10
<i>Pvu</i> I	P11
<i>Pvu</i> II	P12
<i>Rca</i> I ( <i>Bsp</i> H I)	
<i>Rsa</i> I	R01
<i>Rsp</i> X I ( <i>Bsp</i> H I)	
<i>Rsr</i> II	R02
<i>Sac</i> I	S01
<i>Sac</i> II	S02
<i>Sal</i> I	S03
<i>Sap</i> I	S04
<i>Sau</i> I	S05
<i>Sau</i> 3A I	S06

<i>Sau</i> 96 I	S07
<i>Sca</i> I	S08
<i>Scr</i> F I	S09
<i>Sex</i> A I	S10
<i>Sfa</i> N I	S11
<i>Sfc</i> I	S12
<i>Sfi</i> I	S13
<i>Sfu</i> I	S14
<i>Sgr</i> A I	S15
<i>Sin</i> I ( <i>Ava</i> II)	
<i>Sma</i> I	S16
<i>Sna</i> B I	S17
<i>Sno</i> I ( <i>Apa</i> L I)	
<i>Spe</i> I	S18
<i>Sph</i> I	S19
<i>Spl</i> I ( <i>Bsi</i> W I)	
<i>Spo</i> I ( <i>Nru</i> I)	
<i>Ssp</i> I	S20
<i>Ssp</i> B I	S21
<i>Sst</i> I ( <i>Sac</i> I)	
<i>Sst</i> II ( <i>Sac</i> II)	
<i>Stu</i> I	S22
<i>Sty</i> I	S23
<i>Sun</i> I ( <i>Bsi</i> W I)	
<i>Swa</i> I	S24
<i>Tai</i> I	T01
<i>Taq</i> I	T02
<i>Tfi</i> I	T03
<i>Tha</i> I ( <i>Mvn</i> I)	

<i>Tru</i> 91 I ( <i>Mse</i> I)	
<i>Tse</i> I	T04
<i>Tsp</i> 45 I	T05
<i>Tsp</i> 509 I	T06
<i>Tsp</i> R I	T07
<i>Tth</i> 111 I ( <i>Asp</i> I)	
<i>Tth</i> HB8 I ( <i>Taq</i> I)	
<i>Van</i> 91 I ( <i>Pfl</i> M I)	
<i>Vsp</i> I ( <i>Asn</i> I)	
<b><i>Xba</i> I</b>	X01
<i>Xcm</i> I	X02
<i>Xho</i> I	X03
<i>Xho</i> II	X04
<i>Xma</i> I ( <i>Sma</i> I)	
<i>Xma</i> III ( <i>Eag</i> I)	
<i>Xmn</i> I ( <i>Asp</i> 700)	
<i>Xor</i> II ( <i>Pvu</i> I)	

**附錄 C. 革蘭氏陰性菌 PFGE 標準操作程序(US CDC protocol:Summary of One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory PFGE Protocol for *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella* species**

**Day 0**

1. Inoculate test cultures to appropriate media and incubate at appropriate temperature.

**Day 1 – Make and Wash PFGE Plugs**

1. Turn on and/or confirm temperature of shaker (54°C) and stationary (37°C, 50°C, 56°C) water baths.
2. Make (or melt) 1% SeaKem® Gold: 1% SDS agarose<sup>1</sup> in **TE Buffer**; keep agarose in 56 °C water bath.
3. Suspend growth in ~2 ml of **Cell Suspension Buffer** (CSB) in Falcon 2054 tubes.
4. Adjust concentration of cell suspensions to the following value on the Dade Microscan™ Turbidity Meter:  
    **0.48 – 0.52** (measured in Falcon 2054 tubes)  
    **0.68 – 0.72** (measured in Falcon 2057 tubes)
5. Transfer 400 μl of each cell suspension to 1.5-ml microcentrifuge tubes; incubate in a 37 °C water bath for five minutes.
6. Add 20 μl of Proteinase K (20 mg/ml stock) to each tube and mix gently.
7. Add and gently mix 400 μl melted 1% SeaKem® Gold: 1% SDS agarose to the cell suspensions; maintain temperature (55 - 60°C) of melted agarose while making plugs by keeping flask of agarose in beaker of warm water.
8. Immediately, dispense mixture into well(s) of disposable (2 plugs) or reusable (3-4 plugs) plug molds. Allow plugs to solidify 10-15 minutes at room temperature.
9. Prepare Proteinase K/Cell Lysis Buffer so that the final concentration of Proteinase K in the lysis buffer is 0.1 mg/ml; add 5 ml to labeled 50 ml tubes.
  - a. 5 ml **Cell Lysis Buffer** x the number of tubes (5 ml x 10 tubes = 50 ml).
  - b. 25 μl Proteinase K stock solution x the number of tubes (25 μl x 10 tubes = 250 μl).
10. Transfer plugs to 50 ml tubes, place tubes in rack and incubate in a 54°C shaker water bath for **1.5-2 h** with constant and vigorous agitation. Two large or 3-4 small plugs of the same strain can be restricted in the same tube.
  - 10a. Preheat sterile reagent grade water to 50°C (~120 ml for 4 tubes; ~300 ml for 10 tubes).
11. Replace orange caps with green-screened caps. Pour off lysis buffer and add 15 ml sterile reagent grade water (50°C) to each tube. Put original cap on top of green cap. Shake tubes

vigorously at 50°C for 10-15 min. Repeat wash step with water one more time.

11a. Pre-heat sterile **TE Buffer (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0)** to 50°C (~260 ml for 4 tubes; ~650 for 10 tubes)

12. Wash plugs with 15 ml pre-heated (50°C) sterile TE Buffer **four times** in 50°C water bath for 10-15 min.
13. Decant last wash and add 5 ml sterile TE (room temperature). Continue with restriction or store plugs in sterile TE buffer at 4°C. Transfer plugs to smaller tubes, if desired.

### **Day 1 or 2 – Restriction Digestion (see pages 4 and 5)**

1. Cut 2-mm plug slices and incubate in 200  $\mu$ l diluted buffer that is recommended for the restriction enzyme used (i. e., H Buffer if using Roche *Xba*I) for 5-10 min in a 37°C water bath or at room temperature for 10-15 min. Use 3 standards for 10-well gel and 4 for 15-well gel.
2. Remove buffer from plug slices and add 200  $\mu$ l restriction enzyme mixture to each tube; incubate in 37°C water bath for 1.5-2 h.
3. If plug slices will be loaded into the wells, cast the electrophoresis gel approximately 30 min. before restriction digestion reactions and finished.

#### **A. Loading restricted plugs on the comb:**

1. Make 2.2 liters of 0.5X Tris-Borate EDTA Buffer (TBE); use 100 ml to make the 1% SeaKem® Gold (SKG) Agarose in 0.5X TBE. Place agarose in 55-60°C water bath and equilibrate agarose to 50-60°C for at least 15 minutes before pouring into gel form. Confirm that the gel form is level and that the comb teeth touch the gel platform.
2. Remove test and control samples from 37°C water bath; replace enzyme/buffer mixture with 200  $\mu$ l 0.5X TBE. Incubate at room temperature for 5 min.
3. Load plug slices on the bottom of the comb teeth in the appropriate order (standards are in lanes 1, 5, 10 for 10-well gel; lanes 1, 5, 10, 15 for 15-well gel). Remove excess buffer with edge of tissue paper. Allow plug slices to air dry for ~ 5 minutes.
4. Position comb in gel form, confirm that the plugs slices are correctly aligned on the bottom of the comb teeth, and carefully pour the agarose (cooled to 56°C) into the gel form.
5. Add 2.2 L 0.5X TBE to the electrophoresis chamber (100 ml will have to be added to original volume to replace that used for gel; turn on equipment).
6. Remove comb after gel solidifies (~30 minutes). Fill in wells of gel with 1% SKG Agarose; place gel in electrophoresis chamber.

## **B. Loading restricted plugs into the wells:**

1. Make 2-2.2 liters of 0.5X Tris-Borate EDTA Buffer (TBE) and 1% SeaKem® Gold (SKG) Agarose. Equilibrate agarose to 50-60°C for at least 15 minutes before pouring into gel form.
2. Add 2-2.2 liters of 0.5X TBE to the electrophoresis chamber; turn on equipment.
3. After gel has solidified for at least 30 minutes, remove comb, and load restricted plug slices into appropriate wells. (Standards are in lanes 1, 5, 10 for 10-well gel; lanes 1, 5, 10, 15 for 15-well gel).
4. Fill in wells of gel with 1% SKG Agarose (optional); place gel in electrophoresis chamber.

## **Electrophoresis Conditions**

- A. Select following conditions on CHEF Mapper for *Escherichia coli* O157:H7 or for *Shigella sonnei*.

Auto Algorithm

30- kb – low MW

600 kb – high MW

Select default values except where noted by pressing “enter”.

**Change run time to 18-19 h.<sup>2</sup>**

(Default values: Initial switch time = 2.16 s; Final switch time = 54.17 s)

- B. Select the same conditions on CHEF Mapper for *Salmonella* serotypes, except change high MW value to 700 kb (Final switch time = 63.8 s)

## **Day 2 or 3 – Stain and Image PFGE Gel**

1. Remove gel from electrophoresis chamber and stain gel with ethidium bromide for 30 minutes; destain gel for 60-90 minutes with Type I water (change water every 20-30 minutes)
2. Drain buffer from electrophoresis chamber; rinse chamber with reagent grade water or flush buffer from lines.
3. After gel has been destained, capture and save image on Gel Doc system.
4. Convert **.lsc file** (.img file on Gel Doc 1000) to \*.tif file for analysis; save \*.tif file on diskette or equivalent.

Use of trade names and commercial sources is for identification purposes only and does not imply endorsement by CDC or the U.S. Department of Health and Human Services.

---

<sup>1</sup> Run times are based on equipment and reagents used at CDC. The lowest band in the standard should migrate 1.0-1.5 cm from the bottom of gel.

## Reagents used in Standardized PFGE Laboratory Protocol

### TE Buffer (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0) or GibcoBRL #0126A (0.01M, pH 8.0)

10 ml of 1 M Tris, pH 8.0

2 ml of 0.5 M EDTA, pH 8.0

Dilute to 1000 ml with sterile Type 1 water

### 1% SeaKem® Gold: 1% SDS agarose in TE Buffer

- a. Mix 0.5 g (or 0.25 g) SeaKem® Gold (SKG) agarose and 47 ml (or 23.5 ml) TE Buffer in a 250 ml screw-cap flask.
- b. **Dissolve agarose completely** and place flask in 55-60°C water bath for at least 5 minutes.
- c. Add 2.5 ml (or 1.25 ml) of 20% SDS and mix well; return agarose to 55-60°C water.

### Cell Suspension Buffer (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0)

50 ml (100 ml) of 1 M Tris, pH 8.0

100 ml (200 ml) of 0.5 M EDTA, pH 8.0

Dilute to 500 ml (1000 ml) with sterile Type 1 water

### Proteinase K

Proteinase K solutions (20 mg/ml) are available commercially, or a stock solution can be prepared from the powder in sterile Type 1 water, aliquoted in 300-500  $\mu$ l amounts, and kept frozen. Just before use, thaw the amount needed, and keep on ice. **Discard any thawed Proteinase K stock solution that was prepared from powder and sterile water at end of workday.** Store commercially prepared Proteinase K solutions according to directions provide by the supplier.

### Cell Lyssis Buffer (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosine):

25 ml (50 ml) of 1 M Tris, pH 8.0

50 ml (100 ml) of 0.5 M EDTA, pH8.0

50 ml (100 ml) 10% Sarcosyl (N-Lauroyl-Sarcosine, Sodium salt)

OR

5 g (10 g) of Sarcosyl (N-Lauroyl-Sarcosine, Sodium salt)<sup>2</sup>

Dilute to 500 ml (1000 ml) with sterile Type 1 water

Dilute **10 X H buffer** (Roche<sup>3</sup> or equivalent) 1:10 (in Falcon 2054 or 2057 tubes) with sterile reagent grade water:

<b>Reagent</b>	<b>1 /plug slice</b>	<b>1 /10 plug slices</b>	<b>1 /15 plug slices</b>
<b><i>Sterile Reagent Grade Water</i></b>	180 1	1800 1	2700 1
<b>H Buffer</b>	20 1	200 1	300 1
<b>Total Volume</b>	200 1	2000 1	3000 1

<sup>2</sup> If Sarcosyl powder is added directly, it may take 60-90 minutes to dissolve at room temperature.

<sup>3</sup> **Enzymes from some suppliers require addition of BSA.**

**Dilute 10X H buffer** (Roche) 1:10 with sterile reagent grade water and add *XbaI* restriction enzyme (~50 U/sample) as follows:

<b>Reagent</b>	<b>1 /plug slice</b>	<b>1 /10 plug slices</b>	<b>1 /15 plug slices</b>
<b>Sterile Reagent Grade Water</b>	175 1	1750 1	2625 1
<b>H Buffer</b>	20 1	200 1	300 1
<b>Enzyme (10 U/ul)</b>	5 1	50 1	75 1
<b>Total Volume</b>	200 1	2000 1	3000 1

For *BlnI* (*AvrII*) or *SpeI*, use the following calculations (30 Units/plug slice):

<b>Reagent</b>	<b>1 /plug slice</b>	<b>1 /10 plug slices</b>	<b>1 /15 plug slices</b>
<b>Sterile Reagent Grade Water</b>	177 1	1770 1	2655 1
<b>H Buffer</b>	20 1	200 1	300 1
<b>Enzyme (10 U/ul)</b>	3 1	30 1	45 1
<b>Total Volume</b>	200 1	2000 1	3000 1

Note: Keep vial of restriction enzyme on ice or in insulated storage box (-20°C) at all time.

#### **10X TBE:**

<b>Reagent</b>	<b>Volume in milliliters (ml)</b>					
<b>10X TBE</b>	100	105	110	115	120	125
<b>Reagent Grade Water</b>	1900	1995	2090	2185	2280	2375
<b>Total Volume of 0.5X TBE</b>	2000	2100	2200	2300	2400	2500

**Prepare 1% SeaKem® Gold (SKG) Agarose in 0.5X TBE** (for electrophoresis gel) as follows:

- a. Weigh SKG into 500 ml screw-cap flask.
- b. Add 0.5X TBE; swirl gently to disperse agarose.
- c. Remove cap, cover loosely with clear film, and microwave for 60-sec; mix gently and repeat for 15-sec intervals until agarose is completely dissolved.
- d. Recap flask and place in 50-60°C water bath.

Mix 1.0 g agarose with 100 ml 0.5X TBE for 14-cm-wide gel form (10 or 15 wells)

Mix 1.5 g agarose with 150 ml 0.5X TBE for 21-cm-wide gel form ( $\geq$  15 wells)

Note: A small volume (2-5 ml) of melted and cooled (50-60°C) 1% SKG agarose may be needed to seal wells when plugs are loaded into the wells.

Use of trade names and commercial sources is for identification purposes only and does not imply endorsement by CDC or the U.S. Department of Health and Human Services.

附錄 D. 革蘭氏陽性菌 *Listeria monocytogenes* PFGE 標準操作程序(US CDC protocol: Standardized Protocol For Molecular Subtyping of *Listeria monocytogenes* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

**BIOSAFETY WARNING:** The infectious dose for listeriosis has not been determined and it may depend, in part, on the susceptibility of the host. Groups at highest risk of acquiring infection are pregnant women, neonates, immunocompromised patients, and the elderly, although up to 30% of adults with listeriosis may be immunocompetent. Therefore, laboratorians working with *Listeria monocytogenes*, particularly those who may be at increased risk of acquiring listeriosis, should be made aware of this potential and advised to be particularly cautious when working with this organism.

**Please read laboratory instructions before continuing.** Treat all plasticware, glassware, pipettes, spatulas, etc. that come in contact with the cell suspensions or plugs as contaminated materials and dispose of, or disinfect, according to instructions. **Prepare all reagents and stock solutions prior to starting protocol (see Section 5a).**

### 5.30 Cultures/Cell Suspension

Grow bacteria on Brain Heart Infusion Agar (BHIA) plates in a 37°C incubator overnight. Using a cotton swab remove bacteria from the plates to tubes (Falcon 2057, 14 ml -17 x 100 mm) containing 3 milliliters (ml) of TE.

**Note:** Thaw lysozyme stock (10 mg/ml) solution and proteinase K stock (20 mg/ml) solution, keep on ice. **Discard any leftover** (thawed) lysozyme or proteinase K stock solutions after step 5.34.

Using the MicroScan Turbidity Meter (Dade International, Inc.), adjust the optical density of bacterial cell suspensions to 0.79 - 0.82 (for cell suspensions in Falcon 2057 tubes). The graduated marking on the falcon 2057 tube should face the front of the tube to avoid deflecting the light path. If using a spectrophotometer, adjust the optical density of bacterial cell suspensions to 1.3 (range of 1.25 to 1.35) at 610 nm with TE.

Transfer 240  $\mu$ l of each bacterial suspension to a 1.5 microcentrifuge tube.

Add 60  $\mu$ l of **Lysozyme solution** (10 mg/ml) and mix by pipetting up and down. **Do not vortex.** Incubate in a water bath at 37°C for **10 minutes**.

**5.31 Preparation of SSP (1.2% SeaKem® Gold:1% Sodium Dodecyl Sulfate: 0.2 mg/ml proteinase K).**

Prepare 10 ml of 1.2% SeaKem® Gold agarose in sterile Type 1 water by dissolving 0.12 g of SeaKem® Gold agarose in 10 ml of Type 1 water in a 125 ml screw cap Wheaton bottle or flask. Microwave the agarose until it completely melts; keep in a 53 to 56 °C water bath

Prepare the volume of SSP solution needed according to Table 5.31a in the following order:

Add 10% SDS to a 50 ml polypropylene screw-cap tube, then place the tube in a beaker containing water at 53 to 56 °C.

Add 1.2% SeaKem® Gold Agarose (from step 1) to the tube containing 10% SDS, mix by swirling while keeping the tube in warm water (53 to 56 °C).

3. Add proteinase K **just before ready to use**; mix well by swirling while keeping the tube in warm water (53 to 56 °C).

**Table 5.31a**

Number of strains	SDS (10%)	SeaKem® Gold Agarose (1.2%)	Proteinase K (20 mg/ml)
1	30 $\mu$ l	267 $\mu$ l	3 $\mu$ l
11	330 $\mu$ l	2.9 ml	33 $\mu$ l
13	390 $\mu$ l	3.5 ml	39 $\mu$ l
16	480 $\mu$ l	4.3 ml	48 $\mu$ l
25	750 $\mu$ l	6.7 ml	75 $\mu$ l

### 5.32 Plug preparation.

Remove cell/lysozyme suspensions in 1.5 ml tubes from 37 °C water bath (5.3, step 5).

Add 300 µl of the warm (53 to 56 °C) SSP solution to 300 µl cell suspensions; mix by gently pipetting the mixture up and down a few times.

Immediately, dispense mixture into wells in plug molds. Do not allow bubbles to form. Allow plugs to solidify for 10-15 minutes at room temperature. Alternately, plugs may be solidified in a refrigerator for 5 minutes.

**Note:** When reusable plug molds (2-cm x 1-cm x 1.5-mm) are used, up to 2 plugs can be made from these amounts of cell suspension and agarose; when disposable plug molds (1.5 mm x 10-mm x 5-mm) are used three to four plugs can be made.

### 5.33 Lysis

Prepare cell lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA, pH 8.0, 1% Sarkosyl, 0.15 mg/ml proteinase K) according to Table 5.33a.

Table 5.33a

Number of samples	50 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA, pH 8.0, 1% Sarkosyl	Proteinase K (20 mg/ml)
1	4 ml	30 µl
10	40 ml	300 µl
13	52 ml	390 µl
15	60 ml	450 µl
20	80 ml	600 µl

Add 4 ml of cell lysis buffer to each labeled 50 ml polypropylene screw-cap tube.

Add plug(s) to tubes containing cell lysis buffer.

Incubate plugs in a 54°C (+/-1°C) shaker water bath (Lab-Line Instruments, Inc.) for 2 hours with constant agitation. When making duplicate plugs (two plugs of same isolate), both plugs may be lysed in the same tube.

**Note: All steps up to this point in the protocol should be done in sequence as outlined without delay.**

### **5.34 Washes**

1. Wash plugs 2X with 15 ml of sterile Type 1 water (preheated to) for 10 minutes at 50 to 54 °C in a water bath with constant shaking. Wash 4X with 15 ml of TE, pH 8.0 (preheated to 50 to 54°C) at 50 to 54°C for 15 minutes in a water bath with constant shaking.
2. After the last wash is completed, decant TE buffer and add 5 ml of fresh TE, pH 8.0, (room temperature) to each tube. Plugs slices (2-mm) may be restricted immediately with the appropriate enzyme or stored in TE at 4 - 6°C.

**Note: *Salmonella* ser. Braenderup strain (H9812) is used as a reference standard. DNA of the H9812 strain must be digested with *Xba*I to give the appropriate band pattern. Follow instructions in the *E. coli* O157:H7 Standardized Laboratory protocol (Section 5.11) for making plugs and preparing restriction digests.**

### **5.35 Restriction Digestion of *L. monocytogenes* DNA in Agarose Plugs using *Asc*I**

Dilute 10X “4” Buffer (New England BioLabs) 1:10 in sterile Type 1 water in a labeled Falcon 2057 tube according to Table 5.35a for the desired number of samples.

**Note:** Wear gloves when handling 10X buffer. Keep buffer on ice.

Table 5.35a

Reagent	1/1 plug slice	1/13 plug slices
Sterile Type 1 Water	135 1	1755 1
“4” Buffer	15 1	195 1
<b>Total Volume</b>	150 1	1950 1

Add 150 1 diluted “4” Buffer to each labeled 1.5-ml microcentrifuge tube.

Carefully remove plug(s) from tube containing TE with wide end of the spatula. Cut off a 2.0 mm slice and add it to an appropriate labeled 1.5-ml microcentrifuge tube containing diluted “4” buffer. Be sure plug slice is submerged completely in the buffer.

**Notes:** The shape and size of the plug slice that is cut will depend on the size of the teeth on the comb used for casting the gel. Gels wells that are cast with combs that have 10-mm-wide teeth will require a different size plug slice than those cast with combs with smaller teeth (5.5-mm). The number of slices that can be cut from the plugs will also depend on the skill and experience of the operator, integrity of the plug (i. e., whether it tore while doing the lysis and washing steps), and whether the slices are cut vertically or horizontally (5-mm x 10-mm plug). A small piece or the entire plug (10-mm x 5-mm) can be digested with restriction enzymes. Using only a small piece of the plug has some advantages: less restriction enzyme is used; the remainder of the plug is available to digest with enzymes such as *Apa*1, *Sma*1, etc.

**Note:** Keep vial of restriction enzyme on ice or in insulated storage box (-20°C) at all times. Wear gloves.

Replace rest of plug in original tube that contains TE Buffer.

Place tubes containing plug slices in “4” buffer in a float and incubate in a 37°C water bath for 10-15 minutes.

While plug slices are incubating in the “4” buffer, prepare the *AscI* enzyme mixture according to table 5.35b. The same Falcon 2057 tube that was used for “4” Buffer may be used.

Table 5.35b

Reagent	1/1 plug pllice	1/13 plug slices
Sterile Type 1 Water	132.5 l	1722 l
“4” Buffer	15 l	195 l
Enzyme (10 U/ l)	2.5 l	32.5 l
Total Volume	150 l	1950 l

At the end of the “4” buffer incubation, remove “4” buffer by inserting pipette fitted with 200-250 l tip all the way to bottom of tube and aspirating the buffer. Be careful not to damage the plug slice with pipette tip and that plug slice is not discarded with the tip.

Add 150 l of the *AscI* restriction enzyme mix to each tube. Close tube and mix by tapping gently on bench top; confirm that plug slice is submerged in the enzyme mix.

Place sample tubes in float and incubate in 37°C water bath for at least 4 h.

### 5.36 Restriction Digestion of *L. monocytogenes* DNA in Agarose Plugs using *ApaI*

Dilute 10X “A” Buffer ([Roche Molecular Biochemicals](#)) 1:10 in sterile Type 1 water in a labeled Falcon 2057 tube according to Table 5.36a for the number of samples desired.

**Note:** Wear gloves when handling 10X buffer. Keep buffer on ice.

Table 5.36a

<b>Reagent</b>	<b>1/1 plug slice</b>	<b>1/13 plug slices</b>
<b>Sterile Type 1 Water</b>	135 1	1755 1
<b>“A” Buffer</b>	15 1	195 1
<b>Total Volume</b>	150 1	1950 1

Add 150 1 diluted “A” Buffer to each labeled 1.5-ml microcentrifuge tube.

Carefully remove plug(s) from tube containing TE with wide end of the spatula. Cut off a 2.0-mm slice and add it to an appropriate labeled 1.5-ml microcentrifuge tube containing diluted “A” Buffer. Be sure plug slice is submerged completely in the buffer.

**Note:** Keep vial of restriction enzyme on ice or in insulated storage box (-20 °C) at all times. Wear gloves.

Replace rest of plug in original tube that contains TE Buffer.

Place tubes containing plug slices in “A” buffer in a float and incubate in a 37°C water bath for 10 minutes.

While plug slices are incubating in the “A” buffer, prepare the *Apa1* enzyme mixture according to table 5.36b for the number of samples desired. The same Falcon 2057 tube that was used for “A” buffer may be used.

Table 5.36b

Reagent	1/1 plug slice	1/13 plug slices
Sterile Type 1 Water	130 $\mu$ l	1690 $\mu$ l
“A” Buffer	15 $\mu$ l	195 $\mu$ l
Enzyme (40 U/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l	65 $\mu$ l
<b>Total Volume</b>	150 $\mu$ l	1950 $\mu$ l

At the end of the “A” buffer incubation, remove “A” buffer by inserting pipette fitted with 200-250  $\mu$ l tip all the way to bottom of tube and aspirating the buffer. Be careful not to damage the plug slice with pipette tip and that plug slice is not discarded with the tip.

Add 150  $\mu$ l of the *Apa*I restriction enzyme mix to each tube. Close tube and mix by tapping gently on bench top; confirm that plug slice is submerged in the enzyme mix.

Place sample tubes in float and incubate in 30  $^{\circ}$ C water bath for at least 5 hours. Longer incubations may be required for some lots of *Apa*I. Sample tubes may be incubated overnight.

### 5.37 Casting PFGE Gel and Loading Restricted plugs

Place a 15-well comb in 21 cm (8.5") wide x 14 cm (5.5") long gel form (for 12 samples); use leveling platform to confirm that the gel is level. **Confirm that front of comb holder and teeth face the top of gel to allow maximum distance for DNA fragments to migrate.** The same procedure may be used for 10-well comb in 14 cm (5.5") wide x 13 cm (5") long gel form (for 7 samples).

**SAFETY WARNING:** Use insulated gloves when handling flasks after microwaving because they will be hot.

Weigh out the amount of SeaKem® Gold (SKG) to make a 1% gel in 0.5X Tris-Borate EDTA Buffer

Melt 1% SeaKem® Gold (SKG) Agarose that was prepared with 0.5X Tris-Borate EDTA Buffer (TBE) as follows:

- a. Remove cap, cover top of flask loosely with clear plastic film, and microwave on medium power for 30 sec; mix gently and repeat for 10-20 sec intervals until completely melted.
- b. Recap flask and place melted agarose in 53 to 56 °C water bath for 5-6 minutes.

Remove enzyme/buffer mixture from plug slices with pipette and tip. Insert pipette fitted with 200-250 µl tip all the way to bottom of tube and aspirate buffer. Be careful not to damage the plug slice with pipette tip and that plug slice is not discarded with the tip.

Add 200 µl 0.5X TBE to each tube.

Load the restricted standards and sample plug slices on the bottom of the comb teeth in the appropriate order (standards are in lanes 1, 5, and 10 for 10-well gel; lanes 1, 8, and 15 for 15-well gel). Remove excess buffer with edge of tissue.

Position comb in gel form, confirm that the plug slices are correctly aligned on the bottom of the comb teeth, and carefully pour the agarose (cooled to 56 °C) into the gel form.

Allow gel to harden for at least 5 minutes.

Unscrew and remove end gates from gel casting unit; remove agarose residue from sides and bottom of casting platform with a tissue. Keep gel on black casting platform and carefully place gel inside casting frame in electrophoresis chamber. Close cover.

**Note: Loading the plug slices can be tedious; each person has to develop his/her own technique for consistently placing the plugs onto the teeth (or in the wells) so the lanes will be straight and the bands sharp. For *Listeria*, the gel slices are loaded on the comb teeth inside the black support bar. Loading gel slices on the inside of the black support bar allows maximum distance for DNA fragments to migrate.**

### 5.39 Preparation of Pulsed Field Electrophoresis System

1. Confirm that electrophoresis chamber is level; if necessary, adjust the leveling screws on bottom of unit. Put black gel frame in electrophoresis chamber; avoid touching the electrodes.

Add 2.2 L of 0.5X TBE; close the cover of electrophoresis chamber.

Turn on cooling module and confirm that temperature setting is 14 .

Turn on power supply and pump; confirm that pump setting is 70 (the buffer flow at this setting is approximately 1 liter/min) and that buffer is circulating through the tubing.

### 5.310 Electrophoresis Conditions

Use the following electrophoresis conditions for *AscI* or *ApaI* digested *L. monocytogenes* DNA plugs slices when using the Chef Mapper:

Running buffer 0.5X TBE; temperature = 14

Gel 1.0% SeaKem® Gold Agarose prepared in 0.5X TBE

Select Auto Algorithm on the Chef Mapper key pad

Enter 30 kb for the Low MW; Enter 450 kb for the High MW

Select default values by pressing "**Enter**"

**For 14 cm (5.5") wide x 13 cm (5") long Gel change Run Time to 20 hours; press "Enter"**

**For 21 cm (8.5") wide x 14 cm (5.5") long Gel change Run Time to 22 hours; press "Enter"**

*Change Initial switch time to = 4 seconds*

**Final switch time will be = 40 seconds**

**Press "Start Run"**

When run is over, **TURN OFF 3 POWER SWITCHES**, open lid and remove gel.

### **5.311 Ethidium bromide Gel Staining**

1. Add 40  $\mu$ l of 10 mg/ml ethidium bromide to 400 ml of reagent grade water in a container large enough to hold the gel to be stained. Place the gel in the solution.
2. Stain the gel for 20 to 30 minutes. Mild agitation will improve the diffusion of ethidium bromide into the gel.
3. Pour off the staining solution, and rinse once with water. Destain in water for 60 to 90 minutes. Changing the rinse water every 20-30 minutes will speed destaining.

## 附錄 E: 衛生署疾病管制局「細菌實驗室分子分型即時監測網—PulseNet Taiwan」架構

### 一、主架構

本研究規劃完成的疾病管制局細菌病原實驗室分子分型即時監測網(PulseNet Taiwan)架構(圖一),是由核心實驗室(位於疾病管制局中區分局實驗室)、資料庫中心(架設於中區分局實驗室)、地區實驗室(台北總局細菌實驗室、南區分局、東區分局)、生物材料中心(資服組生物材料科)與外部實驗室等五個主要單元構成,監測網也規劃防疫部門(各分局防疫科與總局疾病監測調查組)參與,在監測網偵測有群聚病例出現可能時,即通知防疫部門進行流行病學調查,以證明是否有傳染病的流行。監測網之核心實驗室負責指揮與協調監測網之運作,制定各菌種 PFGE 標準操作程序,分析各區實驗室產生之菌株 PFGE 圖像<sup>註</sup>,並建立與維護菌株 DNA 指紋圖譜資料庫(包括流病資料庫),公佈監測網動態訊息,並負責傳達防疫部門監測訊息,協助生物材料中心收集菌株。各分區實驗室或外部實驗室利用 PFGE 標準操作程序產生之菌株 PFGE 圖像,只有核心實驗室有權限進行處理,將產生之 DNA 指紋圖譜資料與流病資料存入資料庫。

資料庫中心是監測網內所有病原菌 DNA 指紋圖譜資料與流病資料的保存位置,中心包括資料庫主機與暫存伺服器,由核心實驗室負責維護。由於 DNA 圖譜之認定常因人而異,會因個人主觀判斷,影響圖譜 DNA 片斷數目之認定,故所有監測網參與實驗室傳送之菌株 PFGE 圖像與流病資料,需經由核心實驗室專人分析後,方存入資料庫主機,而不接受各實驗室各自貯存資料入資料庫,以確保圖譜處理方式與資料格式之一致性。

疾病管制局地區實驗室(包含台北總局細菌實驗室、南部分局、東部分局)稱為監測網地區實驗室。地區實驗室負責轄區收集之監測疾病菌株與菌株流病資料,再以 PFGE 標準操作方法分析,並將 PFGE 圖像與流病資料經網路傳送到核心實驗室,進行圖譜處理與菌株流病資料輸入工作。地區實驗室具有透過疾管局 intranet 下載資料庫 DNA 指紋圖譜之權限,因此地區實驗室在擁有 BioNumerics 軟體條件下,能下載資料庫 DNA 指

---

<sup>註</sup>解釋名詞:

PFGE (pulsed-field gel electrophoresis): 利用脈衝電泳儀,將菌株基因體 DNA 片斷依大小在 agarose 膠中分離之技術。

PFGE 圖像(PFGE image): 應用脈衝電泳分析菌株基因體,所得之 DNA 片斷大小分佈圖譜圖像,即整片膠之數位影像。PFGE 圖像資料庫儲存原始 PFGE 圖像檔。

DNA 指紋圖譜(DNA fingerprint): 個別菌株之 DNA 片斷大小分佈圖譜,乃 PFGE 圖像經 BioNumerics 軟體處理常態化後,對應至個別菌株之 PFGE 圖譜。DNA 指紋圖譜指利用各種基因分型法(genotyping)分析菌株所得之 DNA 片斷分佈圖譜,本研究皆指應用 PFGE 方法所得到之菌株 DNA 指紋圖譜。

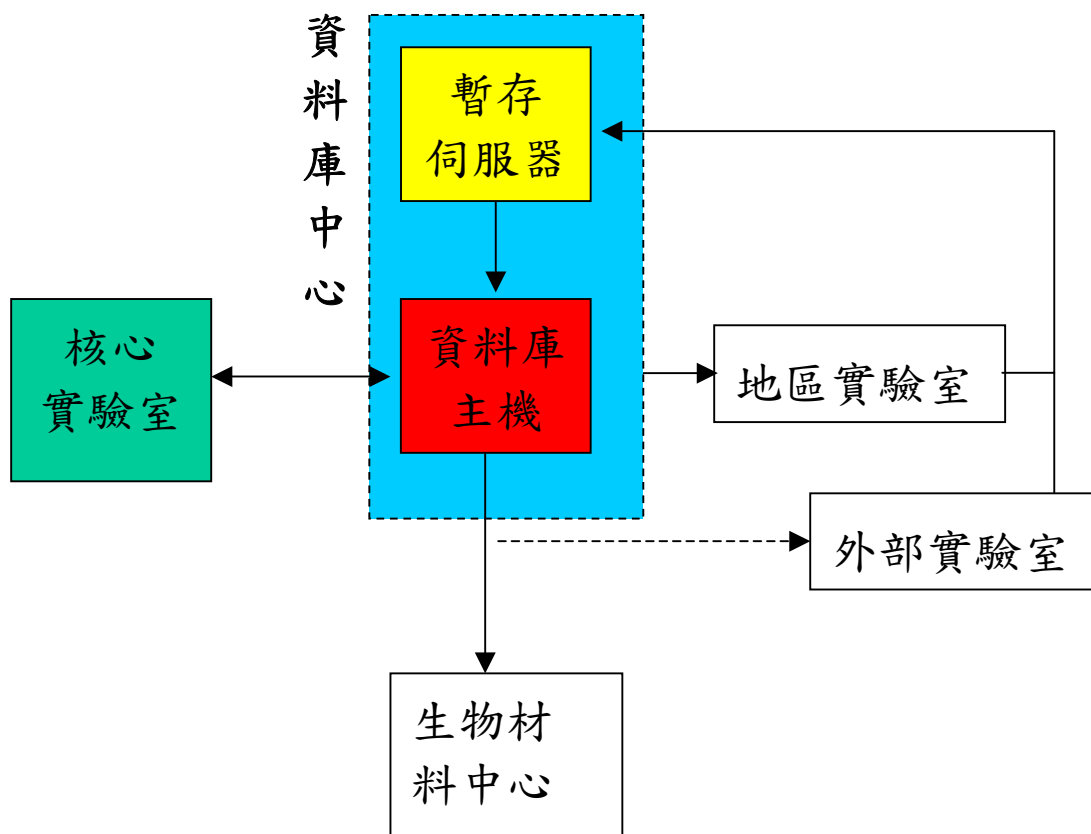
流病資料: 指菌株,分離來源之寄主基本資料,與疫情相關之流行病學資料之總和。

紋圖譜於地區個人電腦上進行比對鑑定、親緣性分析，但地區實驗室無法保留下載之 DNA 指紋圖譜資料，以確保資料之安全性。地區實驗室之菌株具有保存價值時，核心實驗室會發出電子郵件通知，地區實驗室需將菌株寄送至生物材料中心，進行永久保存。地區實驗室具有使用 intranet 上網查詢資料庫之菌株 DNA 指紋圖譜與流病資料，並下載列印資料之權限。

生物材料中心負責保管所有監測網所蒐集到的重要病原菌株，目前的生物材料中心即為疾病管制局生物材料科。生物材料中心具有能自 intranet 上網查詢資料庫之菌株 DNA 指紋圖譜與流病資料，並下載列印資料之權限。

外部實驗室指監測網以外之實驗室，可利用外部網站公佈之 PFGE 標準操作方法分析所擁有之菌株，再將 PFGE 圖像與菌株流病資料經外部網頁傳送到核心實驗室，由核心實驗室人員協助分析，輸入菌株 DNA 指紋圖譜資料庫，再將鑑定比對結果傳送給原送驗之外部實驗室。外部實驗室無法下載與查詢資料庫資料之權利。

## 監測網架構圖



圖一、監測網主架構圖，包括核心實驗室、資料庫中心、監測網地區實驗室、外部實驗室與生物材料中心組成之監測網系統。



- PFGE 圖像檔資料庫：貯存 PFGE 圖像檔，以保存所有菌株的原始 PFGE 圖像。
- DNA 指紋圖譜資料庫：監測網使用 BioNumerics 軟體進行 DNA 指紋圖譜分析、建立圖譜與對應相關資料，故所有 PFGE 圖像檔均需透過 BioNumerics 軟體轉換為數位形式的 DNA 指紋圖譜。由於 BioNumerics 是以自設的型態儲存資料，因此想要從中取出 DNA 指紋圖譜的相關資訊時，必須透過 BioNumerics 內建的轉換程式將所有資料全部匯出。為了能夠自由的存取 BioNumerics 軟體所產生的任一筆資料，本計畫以 SQL Server 2000 資料庫軟體建立一個 DNA 指紋圖譜資料庫，並與 BioNumerics 進行連結，將所有 BioNumerics 所產生的資料全部保存在 DNA 指紋圖譜資料庫中，如此即能在缺乏 BioNumerics 軟體情況下，經由網路蒐尋、讀取、列印資料庫中特定菌株的圖譜與流病資訊。此外，具有使用權限的實驗室研究人員，亦能經由 intranet 從 DNA 指紋圖譜資料庫中下載資料，在地區實驗室即能使用 BioNumerics 軟體，進行菌株 DNA 指紋圖譜比對鑑定，和分析菌株親緣性的比對工作。
- 流病資料庫：除了 DNA 指紋圖譜資料，本計劃另外使用 MySQL 資料庫軟體建構流病資料庫，保存菌株相關之流病資料，包括寄主之基本資料(性別、年齡、居住地點、旅遊史)與菌株分離來源，及流行事件之記載等資料。雖然 BioNumerics 也提供
- 建立資料庫格式，具有建立流病資料庫之功能，但 BioNumerics 內建之資料庫功能簡陋，有資料輸入困難、查尋不易、操作煩複等多種缺陷，特別是其資料必需有 BioNumerics 軟體才能讀取，BioNumerics 價格昂貴(每套依功能選項不同，約 NT\$50-120 萬元)，不是一般實驗室能夠負擔。而自行建構之流病資料庫，除其資料可來自 BioNumerics 軟體本身、Excel 格式檔案資料、與網路格式資料之外，更能廣泛提供網路查尋、列印之功能。
- 內部網站：核心實驗室與資料庫主機之間除了 DNA 指紋圖譜資料是透過 BioNumerics 直接存取外，還需要一個整合式介面作為資料流通的窗口，因此資料庫主機架設有一內部網站，提供管理、上傳資料與查尋菌株資料功能。內部網頁在安全管理上設定有三種等級的身分：
  - 最高管理者：為資料庫維護人員。具有新增使用者、修改使用者資料、刪除使用者以及所有的資料處理功能，其資料上傳功能可以直接存取主資料庫。
  - 資料管理者：對象為核心實驗室人員。具有最高管理者系統維護之外的所有權限，包含：管理外部上傳資料、新增流病資料、管理既有流

病資料、查詢菌株流病與圖譜的整合性資料<sup>1</sup>等功能，其資料上傳功能可以直接存取主資料庫。

- 一般使用者：此身分等級的對象為監測網實驗室與生物材料中心人員。此等級使用者只具有上傳 PFGE 圖像檔、上傳流病資料、查詢既有菌株 DNA 指紋圖譜與流病資料等權限，此外，一般使用者上傳的資料會放置在暫存伺服器，等待資料管理者進行處理。
- 暫存伺服器：為監測網對外的窗口，接受上傳資料之暫存地點，設置此暫存伺服器目的在保護資料庫主機免於遭受直接攻擊。暫存伺服器專責處理對外的資料流通，內建有外部網站與暫存資料庫，分別負責資料傳輸與保存的工作。
- 外部網站：外部網站設置在暫存伺服器上，為監測網與外部實驗室溝通的窗口，其功能有：公佈 PFGE 標準操作方法、公佈監測網動態消息、以及提供監測網地區實驗室與外部實驗室上傳菌株資料<sup>2</sup>。
- 暫存資料庫：暫存伺服器設置在暫存伺服器上，其目的在保存所有尚未經過核心實驗室審核的外部資料，包括監測地區實驗室與外部實驗室所上傳的 PFGE 圖像檔與菌株流病資料。

核心實驗室除了制定 PFGE 標準操作程序外，核心實驗室是唯一產生 DNA 指紋圖譜資料、維護資料庫的單位。所有資料庫主機內的資料都經由核心實驗室核定之後才能儲存，以確保資料的專業與統一。

乙、通路原則：為了確認菌株資料的機密安全，資料庫主機限制只能經由疾病管制局的內部網路 IP 存取資料，核心實驗室對資料庫中心的存取原則如下：

- 核心實驗室人員可以直接連上內部網頁，並給予資料管理者之權限。
- 核心實驗室人員擁有 DNA 指紋圖譜資料庫的完整權限，除了能夠藉由 BioNumerics 軟體下載所有 DNA 指紋圖譜資料外，還能夠更新 DNA 指紋圖譜資料庫內的資料。
- 內部網頁設有搜尋功能，核心實驗室人員可以透過網頁送出想要的搜尋條件，然後網頁會自動表列所有符合條件的菌株。當需要檢視某筆菌株的詳細資料時，內部網頁會自動尋找 PFGE 圖像檔資料庫、DNA 指紋圖譜資料庫、與流病資料庫的資料，並將結果綜合呈現。
- 核心實驗室具有修改流病資料的權限。當流病資料輸入有誤或是需要加入新資料時，核心實驗室人員可以利用搜尋功能顯示該筆流病資料，並予以

<sup>1</sup> 內部網站會將菌株的 DNA 指紋圖譜資料與流病資料整合在同一頁面上呈現，此一型態的整合性資料稱為「DNA 圖譜與流病綜合資料」。

<sup>2</sup> 內部外部網站均可上傳資料，但資料所需的審核程序不同。為了區分兩者的不同，經由內部網站上傳的 PFGE 圖像檔稱為內部 PFGE 圖像，經由外部網站上傳的 PFGE 圖像檔則稱為外部 PFGE 圖像。

補充或修改。

- 核心實驗室人員可以透過內部網頁檢視所有保存在暫存伺服器上的外部資料，所有要上傳的資料皆必須先經過核心實驗室審核通過，才可上傳至資料庫中。

丙、優點：使用目前架構有以下優點：

- (1) 將監測網功能以局內局外作為區分，讓資料庫主機得以單純處理局內資訊；限制資料庫主機只能由疾病管制局局內 IP 存取，能夠有效隔絕外來駭客的入侵途徑，確保菌株資料的機密安全。
- (2) 使用暫存伺服器作為對外溝通的中間點，讓監測網得以在保障菌株資料庫的安全的前提下，延伸至疾病管制局外的實驗室。
- (3) 將 DNA 指紋圖譜資料與流病資料分開處理，讓圖譜研究分析工作與流病登記工作能夠獨立運作，避免研究人員負擔過多行政工作。
- (4) 以網頁搜尋功能型式整合所有資料庫中的資料，除了讓使用者能夠快速找出特定資料之外，當使用者需要調整搜尋功能時，也能夠在不影響資料庫內容的前提下完成修改工作。
- (5) 將圖譜分析以外的功能整合於內部網頁上，使核心實驗室人員得以在單一介面完成大部分工作，精簡操作流程。

### 三、 監測網地區實驗室架構

甲、單元架構：監測地區實驗室是指疾病管制局內不屬於核心實驗室的地區實驗室，其成員可能是各分局之實驗室。設置的目的在於分攤核心實驗室的菌株收集與 PFGE 分析工作，同時加強對於各區域的疾病監控(圖三)。

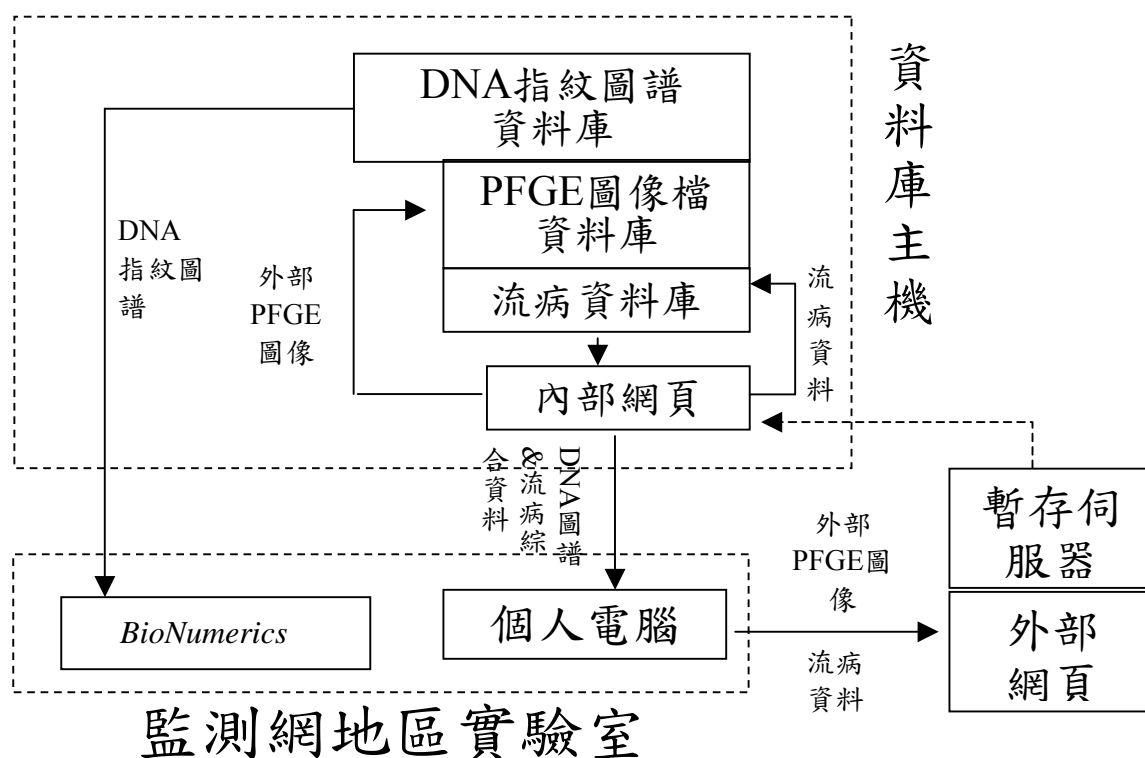
乙、. 通路原則： 監測地區實驗室裝設有 BioNumerics 分析軟體，並擁有從 DNA 指紋圖譜資料庫下載 DNA 指紋圖譜資料進行鑑定比對的權限，但 DNA 指紋圖譜在比對過後會自動刪除，避免菌株的 DNA 指紋圖譜資料外流。此外，監測網地區實驗室會被限制無法上傳任何資料到 DNA 指紋圖譜資料庫，以便維持資料庫之 DNA 指紋圖譜資料之一致性。

另外，監測網地區實驗室必須透過外部網頁將菌株的 PFGE 圖像檔與流病資料上傳至資料庫中心，再由核心實驗室人員統一處理後納入資料庫中。

監測網地區實驗室還擁有從內部網頁查詢完整菌株資料的權限，以便快速掌握疾病的相關資訊，即時進行管控。監測網地區實驗室人員可以利用內部網頁的搜尋功能，依據特定條件顯示資料庫內的相關資料，權限與核心實驗室人員相同。

監測網地區實驗室人員雖然可以完整查詢菌株資料，卻不具有修改資料的權限，即使發現輸入資料有誤，監測網地區實驗室人員仍需通知核心實驗室人員，由相關業務承辦人員修改。

## 監測網地區實驗室架構圖



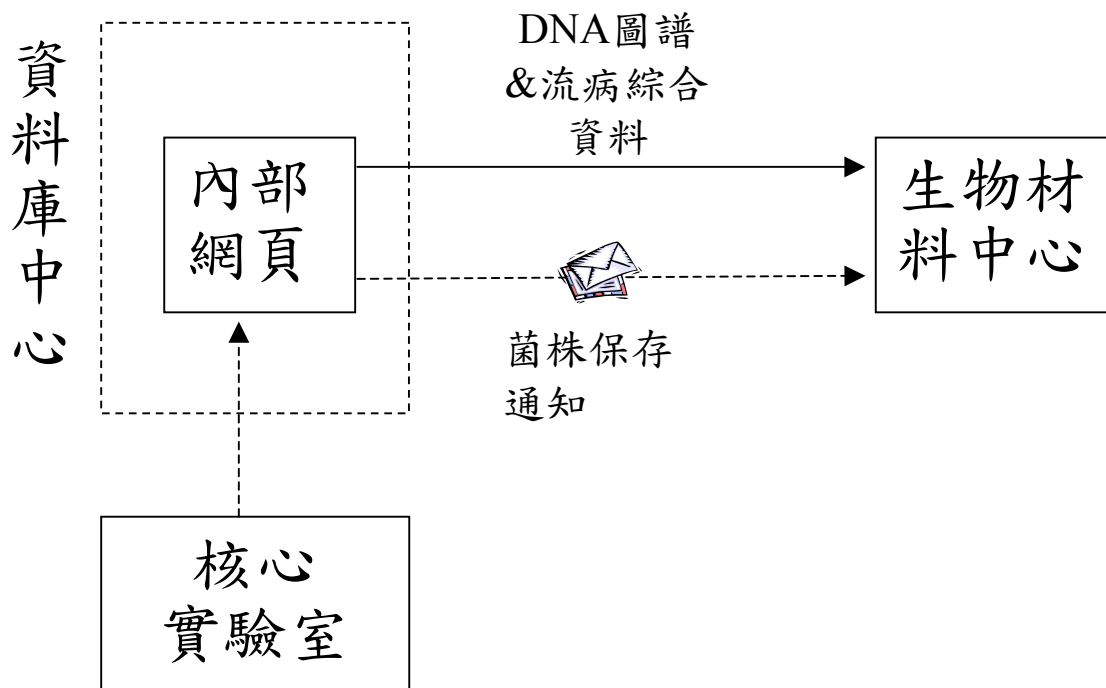
圖三、監測網地區實驗室與資料庫中心架構圖

丙、優點：設置監測網地區實驗室的優點如下：

- (1) 地區實驗室能使用資料庫之完整資料，鑑定比對地區菌株，以即時監測地區傳染病之流行，核心實驗室能得到全國菌株之 DNA 指紋圖譜與流病資料，充實資料庫，同時能即時偵測全國傳染病之流行。
- (2) 地區實驗室能承擔地區所收集菌株之 PFGE 分析工作，提升分析速度，且地區實驗室對菌株流病資料掌握較清楚，具有較強的流病判斷能力。
- (3) 提供監測地區實驗室直接比對的權限，讓地區實驗室人員得以即時進行研究分析，加強監測網的敏銳度。

#### 四、 生物材料中心架構

甲、單元結構：生物材料中心為獨立單位，其目的在保存所有監測網的實體菌株，以便未來繼續提供研究使用。目前設定的生物材料中心為疾病管制局生物材料科(圖四)。



圖四、監測網生物材料中心資料存取流向架構圖

乙、通路原則：由於生物材料中心的功能在於菌株保存，因此不預設任何菌株比對機制，如果真的有比對菌株的需求時，上傳規定與原則比照地區實驗室辦理。

另外，由於生物材料中心有提供菌株與菌株相關資料的需求，因此具有至內部網頁查詢菌株資料的權限，其權限範圍與地區監測實驗室相同。

丙、優點：建立保存菌株的機制且確保未來研究使用，所保存之菌株能連結其流病資料與 DNA 指紋圖譜，菌株因而更具研究價值。

#### 五、 外部實驗室架構

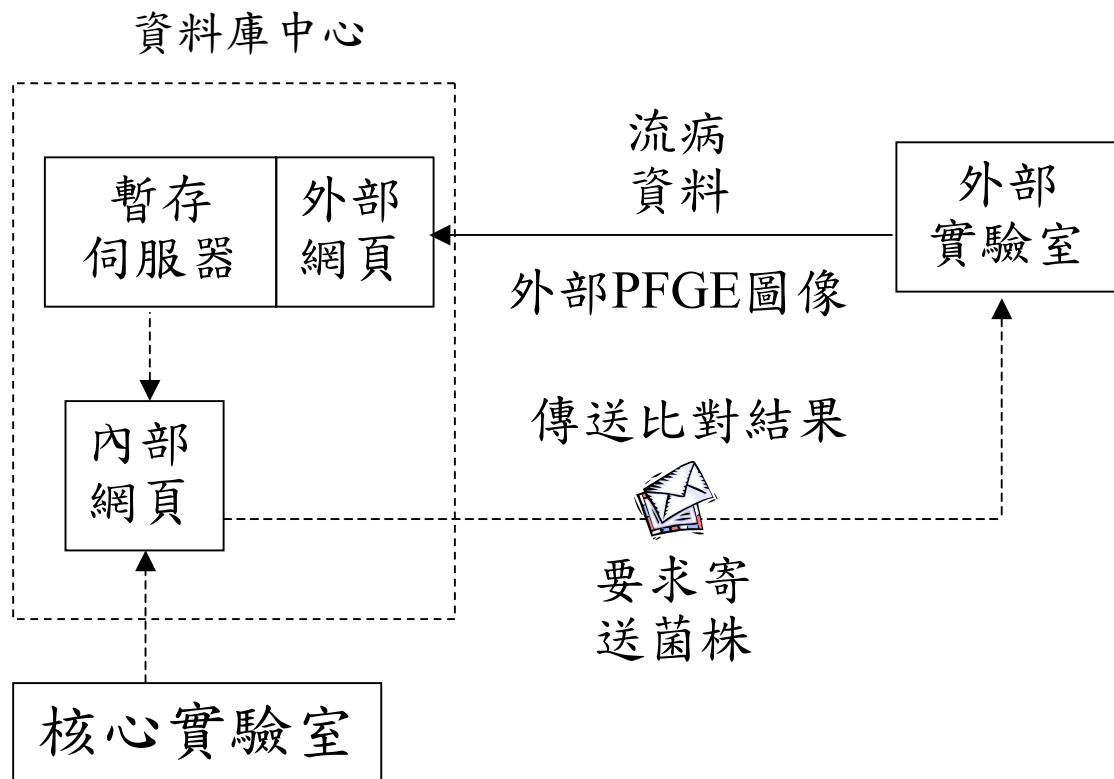
甲、單元結構：外部實驗室泛指疾病管制局以外的所有實驗室，設置此級實驗室的目的是有二：一是提供監測網與其他研究單位的溝通管道，例如美國 CDC；其次是藉此增加監測網所能取得的菌株資訊，加大監測網的監測範圍(圖五)。

乙、通路原則：外部實驗室不能使用任何內部網頁功能，僅能透過核心實驗室進行菌株比對工作，比對結果亦必須由核心實驗室人員以電子郵件形式寄回。

丙、優點：採用此一架構的優點如下：

- (1) 設定外部實驗室可以提供疾病管制局與局外單位一個溝通的管道，使監測網不侷限於疾病管制局內部；
- (2) 藉由外部實驗室的設定，提供監測網與國外機構交流的窗口；

- (3) 限制外部實驗室必須透過核心實驗室才能得到比對結果，可以有效防止局外人士惡意的駭客行為。



圖五、外部實驗室資料存取流向架構圖

## 六、 操作流程

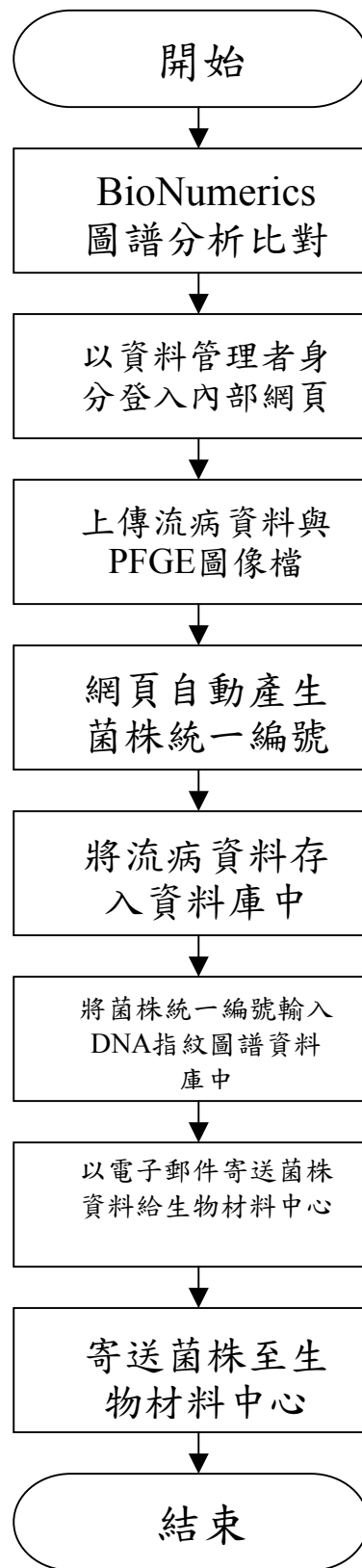
介紹所有監測網的單位之後，接下來描述各單位處理資料的流程。

### 甲、核心實驗室內部資料上傳流程

由於核心實驗室必然是疾病管制局內部單位，因此也會有例行性的檢驗業務，而由核心實驗室例行業務所收集到的菌株資料，自然會由業務負責人自行輸入資料庫，核心實驗室人員新增菌株資料的流程如下(圖六)：

- (1) 核心實驗室人員先將 PFGE 圖像檔以 BioNumerics 分析，產生 DNA 指紋圖譜，然後將圖譜上傳至 DNA 指紋圖譜資料庫。
- (2) 圖譜上傳完成之後，核心實驗室人員需要進入內部網頁，以網頁輸入或是檔案上傳(.txt)的方式填寫該菌株的流病資料，同時上傳菌株的 PFGE 圖檔。
- (3) 內部網頁接受到上傳的資料後，資料庫主機會產生一組菌株統一編號，並自動填入流病資料中。
- (4) 接著，內部網頁會將流病資料存入流病資料庫，同時將 PFGE 圖檔重新命名後存入 PFGE 圖檔資料庫。

- (5) 資料上傳後，核心實驗室人員需要回到 BioNumerics 上，將資料庫主機產生的菌株統一編號填入 DNA 圖譜資料庫中。
  - (6) 完成輸入工作後，核心實驗室人員可以利用上傳網頁的回覆資料功能，將菌株的完整分析資料以電子郵件方式寄送給生物材料中心。
  - (7) 最後，核心實驗室人員必須將菌株寄送至生物材料中心保存。
- 詳細流程如圖所示(圖六)：



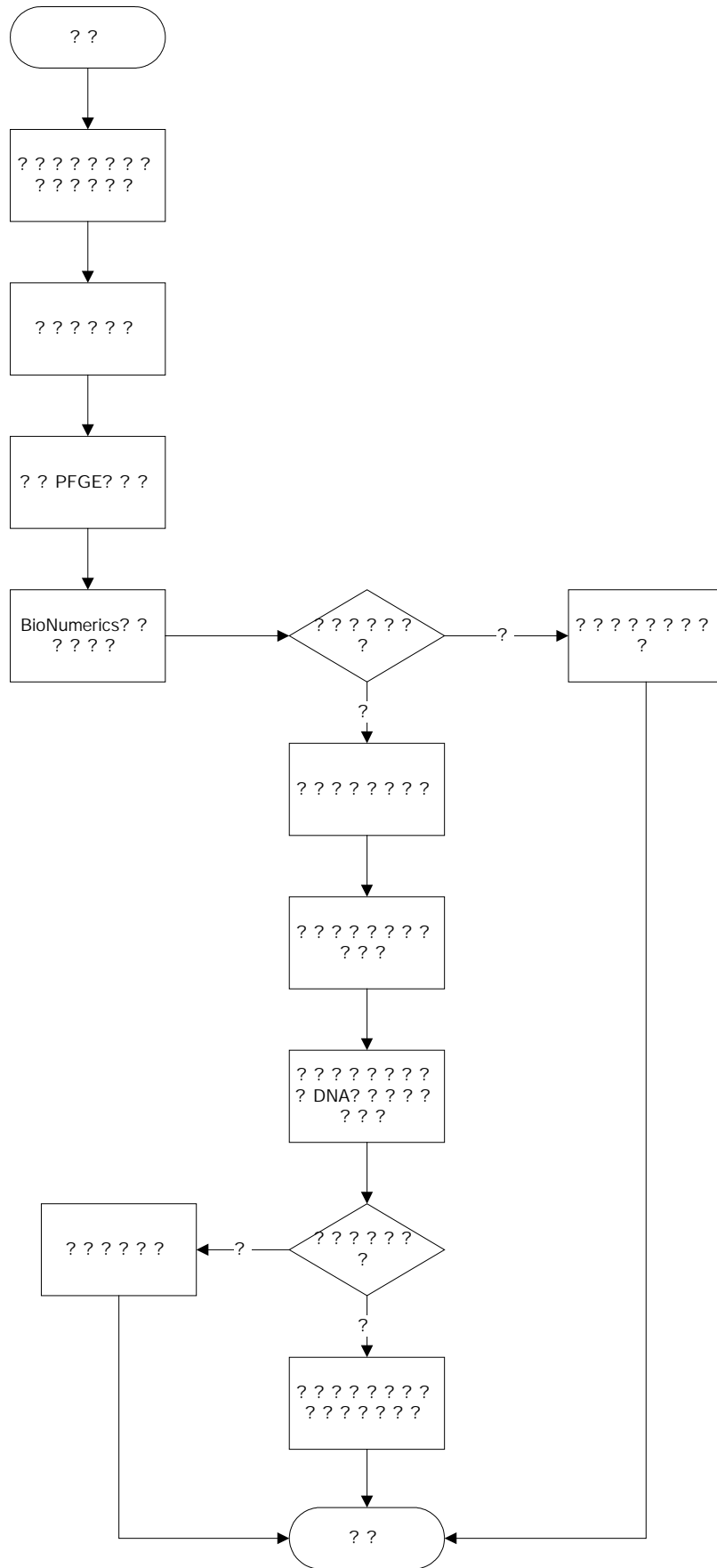
圖六、核心實驗室內部資料上傳流程圖

## 乙、核心實驗室處理外部資料流程

核心實驗室除了自己本身產生的資料外，還必須負責處理其他單位的菌株資料，核心實驗室人員檢視外部上傳資料的流程如下(圖七)：

- (1) 核心實驗室人員先以資料管理者身分登入網頁。
- (2) 利用內部網頁顯示所有暫存伺服器中現存的上傳資料，並選擇待處理的資料。
- (3) 為了進行分析，核心實驗室人員需要先下載 PFGE 圖像檔。此時，內部網頁會在暫存伺服器與核心實驗室人員的電腦之間建立傳輸協定，然後讓核心實驗室人員的電腦直接由暫存伺服器中下載 PFGE 圖像檔。
- (4) 下載圖像檔後，核心實驗室人員將圖像檔以 BioNumerics 軟體進行分析，同時決定圖像檔中的 DNA 指紋圖譜是否有效。
- (5) 若 DNA 指紋圖譜無效，則以電子郵件形式回覆原上傳者，告知 DNA 指紋圖譜無效之原因，並請原上傳者重新上傳。
- (6) 若核心實驗室人員認定該筆菌株資料有保存之必要，則直接將該菌株的 DNA 指紋圖譜資料保存至 DNA 指紋圖譜資料庫。
- (7) 再次進入內部網頁，並且核定該筆資料進入資料庫主機。
- (8) 資料庫主機會給予該枝菌株一個菌株統一編號。
- (9) 經過核心實驗室人員核定之後，內部網頁會自動由暫存伺服器中找出該筆菌株的流病資料與 PFGE 圖像檔，將菌株統一編號加入流病資料中，並將 PFGE 圖像檔重新命名，然後分別存入流病資料庫與 PFGE 圖像檔資料庫。
- (10) 核心實驗室人員再次到 BioNumerics，並將資料庫主機產生的菌株統一編號填入。
- (11) 核心實驗室人員需要決定此菌株是否為重要菌株。
- (12) 如果不屬於重要菌株，則直接將比對結果以電子郵件形式回覆原上傳單位。
- (13) 如果屬於重要菌株，則除了回覆比對結果外，同時必須另外發出通知給原上傳單位與生物材料科，告知該菌株必須保存。

詳細流程如圖所示(圖七)：



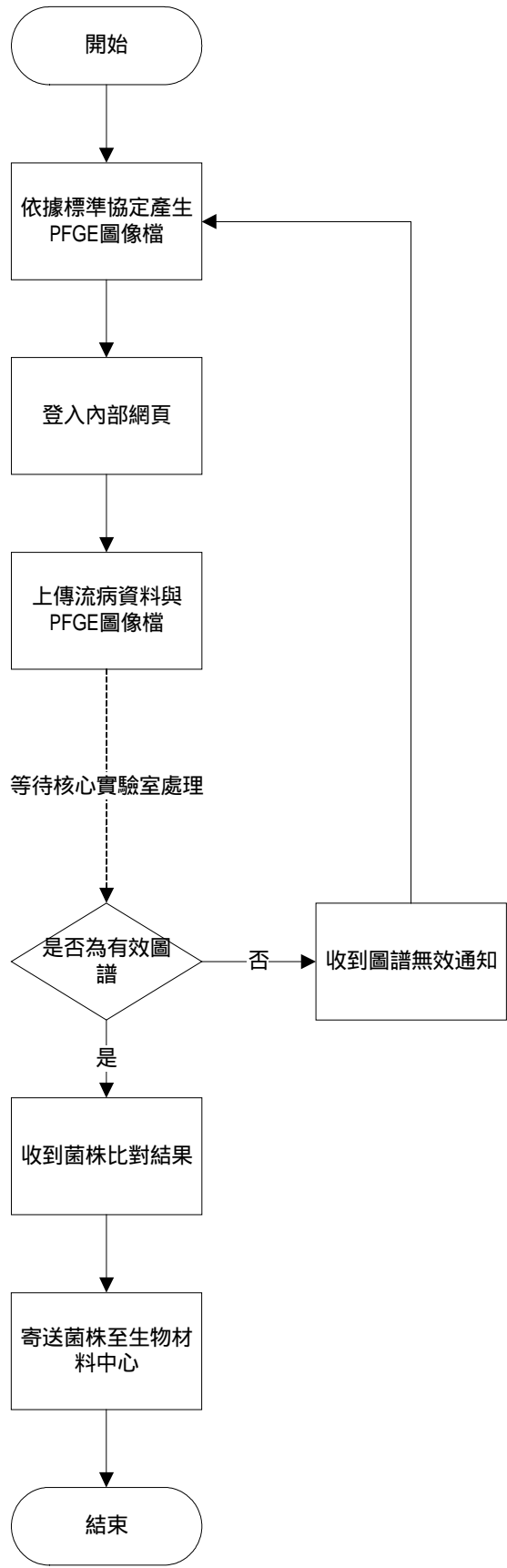
圖七、核心實驗室處理外部資料流程圖

### 丙、監測地區實驗室資料上傳流程

由於監測地區實驗室平時就會收集到大量地區內的重要病原菌株，因此監測地區實驗室必須透過外部網頁將所有菌株的 PFGE 圖像檔與流病資料上傳至資料庫中心，再由核心實驗室人員統一處理後納入資料庫中。其上傳流程如下(圖八)：

- (1) 監測地區實驗室人員依據各菌株之 PFGE 操作協定，製作菌株的標準 PFGE 圖像檔。
- (2) 監測地區實驗室人員可以以一般使用者身份登入內部網頁，然後透過網頁的上傳功能，將 PFGE 圖像檔與菌株的流病資料上傳至暫存伺服器。
- (3) 核心實驗室人員則每日會由暫存伺服器中，將 PFGE 圖像檔與流病資料依據前面章節所描述的流程進行分析處理。
- (4) 由於 PFGE 操作有技術上的要求，因此不一定每次都能產生良好的影像，此一鑑定工作則是由核心實驗室的各菌株業務負責人主持。
- (5) 若圖檔分析後發現該圖譜無效，則監測地區實驗室人員會收到圖檔無效通知，此時必需重複 1~3 步驟，直到圖譜成功進入資料庫為止。
- (6) 若圖譜有效，則監測地區實驗室人員會收到比對結果。
- (7) 收到比對結果後，監測地區實驗室人員則依據正常保存菌株程序，將菌株送至生物材料中心保存。

詳細流程如圖所示(圖八)：



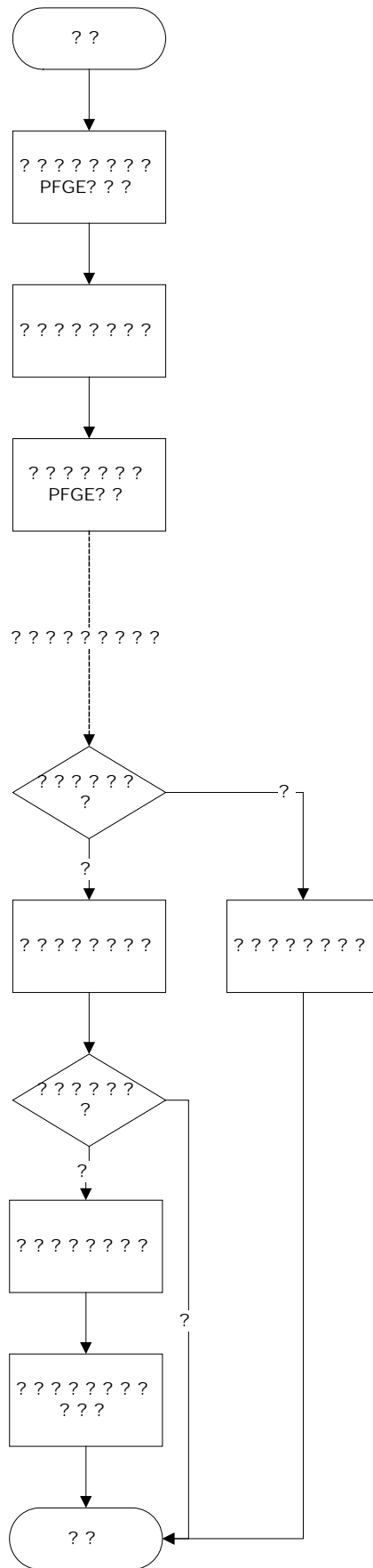
圖八、監測地區實驗室資料上傳流程圖

#### 丁、外部實驗室資料上傳流程

當外部實驗室有需要要求監測網進行菌株比對工作時，分析工作流程如下(圖九)：

- (1) 外部實驗室需要依據核心實驗室公佈在外部網頁上的 PFGE 標準操作協定，製作標準 PFGE 圖像檔。
- (2) 製作完成的圖像檔必須連同菌株的流病資料，透過外部網頁上傳至暫存伺服器，等待核心實驗室人員處理。
- (3) 如果圖像檔內的 DNA 指紋圖譜屬於無效影像，或是上傳之流病資料有問題，上傳人員會收到資料無效的通知，告知上傳資料那裡有問題。
- (4) 如果上傳資料是有效的，上傳人員會收到電子郵件形式寄發的比對結果。
- (5) 另外，如果核心實驗室人員比對後發現該菌株為：
  - A. 從未出現的新菌株；
  - B. 曾經出現過，但已經許久沒有收集到過的再浮現菌株；則核心實驗室人員會透過內部網頁另外寄送兩封電子郵件，一封用來告知原上傳單位將菌株寄送至生物材料中心保存，另外一封則是通知生物材料中心該菌株需要保存，並告知原上傳單位的聯絡資訊。
- (6) 外部實驗室收到菌株保存通知後，應該立即與生物材料中心聯絡，並將該菌株寄送至生物材料中心保存。

詳細流程如圖(圖九)所示：



圖九、外部實驗室資料上傳流程圖