

計畫編號：DOH91-DC-2011

行政院衛生署疾病管制局九十一年度自行研究計畫

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、廖璿程、李俊青、王姿惠、魏孝倫、
楊國禧、林頂、楊榮泉、歐乃銘、吳炳輝、李鏡梯、
楊世仰、李麗莉、林建州、劉顏

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

一、中英文摘要	2-5
二、本文	
(一)、前言	6-9
(二)、材料與方法	10-14
(三)、結果與討論	15-18
(四)、結論與建議	19-21
(五)、參考文獻	22
(六)、圖表	
圖一、應用標準化腸內菌 PFGE 操作方法分析……	23
圖二、使用標準化腸內菌 PFGE 操作方法分析……	24
圖三：使用標準化腸內菌 PFGE 操作方法分析……	25
圖四：使用標準化 <i>Listeria monocytogenes</i> ……	26
圖五：限制酵素使用量測試，第 1-5 列為……	27
圖六：濁度計(Turbidity meter)，相當容……	28
圖七：使用膠體清洗機(第 1-8 列)協助清……	29
圖八：Lewis Taiwan No. 1 膠體清洗機……	30
圖九：利用 BioNumerics 電腦軟體分析……	31
(七)、附錄	
附錄 A、PulseNet Codes for Foodborne……	32-36
附錄 B、PFGE Codes for Restriction……	37-40

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視網監視網

在本計畫中，我們成功標準化脈衝式電泳技術(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)、發展使用電腦軟體 BioNumerics 分析 PFGE (或稱 DNA)圖譜的能力、與使用電腦資料庫專業技術，做為建立台灣細菌病原實驗室分子分型即時監視網 (PulseNet Taiwan)之技術基礎。依據美國疾病管制局(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)國家食因性疾分子分型監視網(PulseNet)實驗室的 PFGE 標準操作方法，我們已成功建立 *Shigella sonnei*、*Salmonella* spp.、*Klebsiella pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes* 之標準化 PFGE 操作程序，與發展使用 BioNumerics 分析這些病原 PFGE 圖譜之能力。我們也成功組裝膠體清洗機器，在此機器協助下可縮短原 4 小時膠體清洗的時間至 1 小時以內，如此每人每次可輕鬆處理 30-60 個樣本，且可得到更高純度的 DNA，因此，限制酵素(*NotI*、*XbaI*、*SmaI*) 使用量可由原先 PulseNet 標準 PFGE 方法所建議之 40 單位降低至 1 單位以下，大大降低 PFGE 的成本。我們的改進已使 PFGE 成為快速、容易操作、花費不高的分子分型技術。計畫第二年將繼續建立 *Bordetella pertussis*、*Haemophilus influenzae* serotype b、*Legionella* spp.、*Neisseria meningitidis*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、*S. flexneri*、*Vibrio cholerae*

與 *V. parahaemolyticus* 之標準 PFGE 操作程序，同時應用 BioNumerics 可於數秒內快速完成分析、比對、鑑定數千 PFGE 圖譜的能力，建立台灣實驗室分子分型即時監視網，用以監視細菌傳染病。

Abstract

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

In the present research, we standardized the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique, developed the capability to use the computer-aided software (BioNumerics) for analysis of PFGE patterns (or called DNA fingerprints), and used computer database technology, as the technical support for building a Taiwan molecular subtyping network for real time surveillance of bacterial disease, called PulseNet Taiwan. Following the standard PFGE protocols from the PulseNet group, the taskforce of the US national molecular subtyping network for surveillance of foodborne diseases, in US CDC, we standardized the PFGE protocols for *Shigella sonnei*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, and *Streptococcus pyogenes* and developed the capability of using BioNumerics to analyze PFGE patterns. We also assembled an agarose plug washing machine, which helped to shorten the washing time for PFGE plug from 4 h to 1h, to increase the handling capability to 30-60 samples a worker a day, and to obtain better DNA purity in the plugs. Therefore, the amount of restriction enzymes (*NotI*, *XbaI*, *SmaI*) needed for a slice digestion was lessened to less than 1 unit; the amount of the enzymes used for a digestion recommended in the PulseNet PFGE standard protocol was 40 units. The improvement helps to cut down the cost of PFGE. Because of the success made in the present research, to date, PFGE is a rapid, easy, and cost-effective method. It can be used as a routine molecular subtyping technique for bacterial pathogens. In the second year, we will standardize the PFGE protocols for *Bordetella pertussis*, *Haemophilus*

influenzae serotype b, *Legionella* spp., *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. flexneria*, *Vibrio cholerae*, and *V. parahaemolyticus*. To use the standardized PFGE technique and with the aid of BioNumerics which can analyze, compare, and identify thousands of PFGE patterns in seconds, we are ready to set up a national molecular subtyping network for surveillance of bacterial infectious diseases—PulseNet Taiwan.

前言

交通的便捷，增加人與人接觸機會，也增加疫病傳播機會，而交通工具的攜帶、跨區域或跨國際間之食品銷售、與跨地區間之大集會(如參加朝聖)，使得傳染病極易跨越地理藩籬於國際間散播流行(Aguilera, et al., 2002)；同時因為人民生活型態的改變，也使得傳染病傳播形態隨之改變；而生物恐怖的活動也使致命的傳染病隨時可能爆發流行。為了有效監視疫情，除了建立完善的傳染病通報系統外，實驗室亦應針對病原菌株進行分析比對，以早期偵測並確定傳染病的流行，同時因應國際化後傳染病跨越國界的傳播趨勢，實驗室亦應建立國際間的合作，以進行菌株的分析比對，建立完善的疫病監視網。

為進行細菌菌株的即時比對工作，就要建立地區的實驗室監視網，利用有效的分型方法即時分析病原菌株，將結果送至資料庫中心比對菌株間之關連性。由於近年來利用脈衝式電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)，分析細菌基因體 DNA 圖譜的技術已很成熟，加上有很好的 DNA 圖譜分析軟體例如 BioNumerics 的配合，與電腦貯存資料之成本降低等有利條件，使得地區實驗室利用 PFGE 方法即時分析病原菌株，經由網路傳送至核心實驗室進行指紋圖譜比對，並建立 DNA 指紋圖譜資料庫已非高難度的工作；目前美國疾病管制局已利用此技術建立一個食品中毒細菌病原的

實驗室即時監測網，該監測網目前已含蓋美國 50 個州與 FDA、USDA、加拿大與歐洲等國家，由於成效很好，2004 年前將建立包括亞太地區的監測網(Swaminathan, et al. 2001)。由於病原菌大多具有區域的特異性，台灣應建立自己的病原菌株資料庫，有了本土的資料庫，才有資源談國際合作，也才能在這個快速變動的時代，掌控傳染傳病的流行面貌。

1993 年美國發生一起橫跨數州的 *E. coli* O157 食品中毒案件，美國疾病管制局實驗室應用 PFGE 方法分析由臨床與食品所分離之菌株，確定感染媒介為供應地區速食店的漢堡牛肉餅(hamburger patties)，衛生單位緊急召回(recall)該食品，防止更多人受害。PFGE 分析細菌的結果讓衛生單位得以及早偵測並確定所爆發的疫情，對疫情調查及防疫上有很大貢獻，於是美國疾病管制局接獲越來越多進行 PFGE 分析的要求，基於日增的需求，1995 年美國疾病管制局於是結盟各州立/機關實驗室進行 PFGE 分型工作，初期有 Massachusetts、Minnesota、Texas、Washington、USDA-FSIS 加入，成立 PulseNet 網，到 2000 年 PulseNet 已有 46 州的公衛實驗室、USDA-FSIS、FDA-CFSAN、Center for Veterinary Medicine、與 6 個加拿大省立實驗室加入，目前美國除了美國所有的州已納入這個網絡外，歐洲也成立了 PulseNet-Europe，並邀請亞太國家或地區籌組成立 PulseNet-Pacific Rim，台灣也被邀請參加 2002 年 12 月的籌組會議。這些實驗室進行標準化的 PFGE

分型工作，再將 PFGE 圖譜(或稱 DNA 指紋圖譜)經網路送到資料庫中心進行分析、貯存入資料庫，有些實驗室擁有專線可進入資料庫進行菌株 DNA 指紋圖譜比對。目前資料庫已發揮相當大的成效，有了 PulseNet 系統後，平均每一次爆發流行事件的規模減少三分之二，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；由於有 PulseNet 系統，才能如此早証實病人與污染的食品間的關係，而發出警訊並進行食品的回收，防止更多人受到感染。此一監視網只要一年能救回一個生命，就贏回所花費的成本，想像一個 10 歲的小朋友因感染 O157 大腸桿菌，腎臟功能被破壞，一輩子必需依賴洗腎過活，人生會如何地悲慘？花費醫療資源會有多龐大？

台灣有必要模仿美國的 PulseNet，建立台灣的「實驗室細菌分子分型即時監視網—PulseNet Taiwan」，即時監視本國之重要細菌傳染病。本研究計畫「建立台灣重要細菌病原 DNA 指紋圖譜資料庫」，即為建立台灣的「實驗室分子分型即時監視網」的先期工作，以建立所需之技術基礎；此計畫預定完成之重點目標：(一)建立各種細菌病原的標準化 PFGE 操作方法，(二)建立使用電腦軟體(BioNumerics)分析 PFGE 圖譜的能力，(三)建立可使用網路進行圖譜比對與搜尋之資料庫，(四)有系統保存不同 PFGE 圖譜之菌株，

提供學術研究之用。其中 PFGE 與 BioNumerics 為最重要的核心技術，第一年的工作重心：(一)積極與美國疾病管制局之 PulseNet 工作團隊建立連繫管道，並前往其實驗室學習標準化之 PFGE 技術與要求給與圖譜分析所需之內部參考菌株(reference bacterial strain)與外部參考圖譜(external reference image)，(二)建立台灣快速 PFGE 分析革蘭氏陰性菌與陽性菌之能力，(三)改進 PFGE 方法，提高 DNA 之品質、降低人工成本與材料成本，(四)建立利用 BioNumerics 分析圖譜之能力；第二年重點為：(一)完成 *Shigella sonnei*、*Neisseria meningitidis*、*Salmonella* spp. 之 PFGE 分析，(二)建立前述三種病原菌之指紋圖譜資料庫，(三)完成包括 *Bordetella pertussis*、*Haemophilus influenzae* type b、*Legionella* spp.、*Streptococcus pyogenes*、*Shigella flexneri*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae* 等病原菌之標準 PFGE 操作方法，(四)完成 DNA 指紋圖譜資料庫與本局生物材料中心菌株資料庫網路連結工作，(五)完成透過網路比對分析圖譜之網路系統。

材料與方法

菌株來源與病例相關流病資料：*S. sonnei*、*Salmonella* spp.、*N. meningitidis* 菌株來自本局第三分局、第六分局、或總局檢驗研究組，*Klebsiella pneumoniae* 菌株由中國醫藥盧敏吉副教授提供，腸內細菌 PFGE 分析時使用之內部參考菌株 *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812，由美國疾病管制局 Dr. Bala Swaminathan 提供。同時收集菌株(病例)之流行病學資料，基本上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。

菌株編號原則：具獨特 PFGE 圖譜之菌株，將送至本局生物材料中心永久貯存，菌株將依據美國疾病管制局細菌編號，加上台灣之英文代號 TW-；美國 PulseNet 使用之菌株編號表見附錄 A；其它非腸道疾病病原菌株編號，則自行依據屬名第一個英文字母加種名前兩個字母命名，例如 *Streptococcus pyogenes* 為 TW-SPY；*Streptococcus pneumoniae* 為 TW-SPN。

腸內細菌之包埋、酵素處理與清洗：依據美國疾病管制局 *E. coli*、

Salmonella spp.、*Shigella* spp.之 PFGE 標準操作方法[Gautom, 1997]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 Tryptic Soy Agar with 5% sheep red blood (Blood Agar Plate)，置 37°C 恆溫箱中培養 16 小時；第二天以棉棒刮取菌體，於 Cell Suspension Buffer (100 mM Tris: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 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; 50 mM EDTA, pH 8.0; 1% Sarcosine; 0.1 mg/ml proteinase K)，置 54°C 水浴器振盪 2 h；膠體經酵素處理後，加 15 ml 預熱至 54°C 的 ddH₂O，置水浴器振盪 15 min，重覆 ddH₂O 清洗一次，再以 15 ml 預熱至 54°C 的 TE buffer (10 mM TrisCl 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。

革蘭氏陽性菌之包埋、酵素處理與清洗：依據美國疾病管制局之 *Listeria monocytogenes* 之 PFGE 標準操作方法[Graves, et al., 2001]，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 Tryptic

Soy Agar with 5% sheep red blood (Blood Agar Plate)，置 37°C 之二氧化碳恒溫箱(5% CO₂)中培養 16 小時；第二天以棉棒刮取菌體，於 TE buffer (10 mM TrisCl 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 0.78 – 0.82 (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; 50 mM EDTA, pH 8.0; 1% Sarcosine; 0.15 mg/ml proteinase K)，置於 54°C 水浴器振盪 2 h；膠體經酵素處理後，加入 15 ml 預熱至 54°C 的 ddH₂O，置水浴器振盪 15 min，重覆 ddH₂O 清洗一次，再以 15 ml 預熱至 54°C 的 TE buffer (10 mM TrisCl 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。

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 *NotI* 或 *XbaI* 限制酵素緩衝液，室溫下放置 5 min，以 micropipette 吸出緩衝液，再注入 200 µl 含 2 units 的 *NotI* 或 5 units 的 *XbaI* 限制酵素之緩衝液，置於 37°C 下放置 2 h，以 micropipette 吸出緩衝

液再注入 200 μ l 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 *Xba*I 切割之內部參考 *S. enterica* serovar *Braendrap* H9812，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 Auto Algorithm 30-600 kb (pulse time 2.16 s \rightarrow 54.17 s, angle 120° ; voltage 190 V)跑膠條件跑 19 小時，完成跑膠後，膠片以 0.5 μ g/ml 的 ethidium bromide 染色 15 min，再以 ddH₂O 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

*Xba*I (X01)限制酵素切割處理之第 25 (.0025)個 PFGE 圖譜；美國 PulseNet 使用之限制酵素編號表見附錄 B。

複製組裝半自動膠體清洗機：依照美國疾病管制局所設計的半自動膠體清洗機，在台灣複製組裝，由於該清洗機未有專利權保護，複製無違反專利權之虞。

測試最低限制酵素使用量：PFGE 標準操作方法建議之限制酵素量 *Xba*I、*Sma*I、*Not*I 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 之成本。

研究成果與討論

腸內菌之脈衝式電泳：美國疾病管制局腸內菌之 PFGE 標準操作方法，經過多次測試，已很成功應用於 *S. sonnei*、*Salmonella* spp.、*K. pneumoniae* (見圖一、二、三)，在縮小膠體(agarose plug)厚度後，此技術已能很穩定、重覆操作，使用 BioNumerics 分析不同時間跑膠之 PFGE 圖譜，證明其再現性非常高，足以據此 PFGE 標準操作方法與跑膠條件，建立 PFGE 圖譜資料庫。

革蘭氏陽性菌之脈衝式電泳：美國疾病管制局之 *L. monocytogenes* PFGE 標準操作方法，經過多次測試後，已成功應用於 PFGE 分析 A 型鏈球菌 *S. pyogenes* (見圖四)，得到之圖譜相當清晰，每次得到之 PFGE 圖譜穩定度與再現性非常高。此項測試成功，對過去操作革蘭氏陽性菌的挫折感具有鼓舞作用，將可據此應用於其它革蘭氏陽性菌之 PFGE 分析。

限制酵素最低使用量：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，成本除了高昂的儀器設備費與技術人員薪資，酵素與試劑的花費也很龐大，特別是限制酵素的價格昂貴，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 15 個樣本的膠片，要花費 3500 元(agarose 200 元，限制酵素 3300 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

用複製成功之清洗機器協助清洗膠體，得到的 DNA 品質非常好，經測試發現 1 units 的限制酵素即足夠(見圖五)，使跑一片膠片的成本可節省近 3000 元，每年可節省百萬元以上的經費。測試結果顯示，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。

菌體包埋與清洗技術的改進：能否得到高品質的 DNA 是操作 PFGE 成功與否的關鍵，要得到最高品質的 DNA，膠體中之菌量(DNA 量)與清洗膠體的方法是關鍵。本實驗室已在美國購得兩台濁度計(如圖六)，此種濁度計操作非常容易，可節省定量菌體所需時間，利用此濁度計，實驗室能很快測定不同細菌之最適濃度。在清洗包埋後之膠體，傳統上是利用手工方式更換清洗液(水與 TE buffer)，如此重覆更換清洗液之手續，非常耗費時間，一個技術人員異常勞累下一天只能處理 20 幾個檢體，計畫主持人 2002 年夏天到美國疾病管制局 PulseNet 主持人 Dr. Bala Swaminathan 實驗室進修時，曾使用該實驗室設計用來清洗膠體的半自動化機器，清洗之效果很好，特將此機器拍照，回國後自行複製組裝，經測試發現該機器清洗膠體的效果比用傳統手工清洗的效果好(見圖七)，有了這個機器的協助，可將清洗膠體時間由原需 4 小時縮短至 1 小時，因而大為節省人力，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，節省人力成本。為了感謝在美國疾病管制局研習時 Lewis Graves 好意地展示這種機器，

特將此第一台機器命名為 Lewis Taiwan No. 1 (見圖八)。

BioNumerics 分析脈衝式電泳圖譜：由 Applied Maths 所發展的 BioNumerics 是一個 PFGE 圖譜分析軟體，可接受圖譜、核酸序列等多種不同形式資料，建構菌株資料庫，並且有蒐尋、比對、整合不同形式資料建構菌株關係樹圖的功能，目前已購得一套 BioNumerics 軟體。電腦分析 PFGE 圖譜是建構指紋圖譜資料庫的必要條件，是故每一片 PFGE 膠片上必須放置內部參考(菌株)圖譜(稱為 internal reference，見圖九)，做為常態化(normalize)圖譜之用，同時也要製作一外部參考圖譜(稱為 external reference，見圖九)，做為常態化不同片膠片圖譜之用，外部參考圖譜很重要，若不同實驗室使用不同的外部參考圖譜，就算使用相同內部參考菌株，完成之圖譜也無法相互比對，所以實驗室間必使用相同的內部參考圖譜，同時也應使用同一外部圖譜，如此不同實驗室建立的 PFGE 圖譜即能相互比對。目前已自美國疾病管制局取得跑 PFGE 膠的內部參考菌株 *S. enterica* serovar Braenderup H9812，並已經用於 *Salmonella* spp., *S. sonnei*, *K. pneumoniae*, *S. pyogenes* 的 PFGE 分析，美國疾病管制局的 Dr. Swaminathan 也已答應給我們 H9812 的外部參考圖譜，由於使用的系統皆與美國疾病管制局一致，未來所得到的 PFGE 圖譜將可與使用這套系統的國家/實驗室進行比對，與國際接軌。經由 Dr. Swaminathan 的介紹，目前也和美國疾病管

制局的 Dr. Tanja Popovic (Chief, Epidemiologic Investigations Laboratory, Meningitis and Special Pathogens Branch, DBMD/NCID/CDC)和 Dr. Fred Tenover (Associate Director for Laboratory Science, DHQP/CDC)等連絡，他們也答應給與 *N. meningitidis* 和 *Staphylococcus aureus* 的 PFGE 標準操作手冊、內部參考菌株與外部參考圖譜。原則上，因美國疾病管制局是傳染病研究的龍頭，若他們已建立了標準，台灣最好能採用他們的標準，圖譜資料才能與大多數國家相互比對，在美國疾病管制局沒有建立標準的部份，才自行建立，例如 *S. pyogenes* 目前美國疾病管制局沒有建立這方面的標準，台灣才自行建立，用以監視侵襲性 A 型鏈球菌的流行動態。

結論與建議

標準化 PFGE 操作方法與使用 PFGE 圖譜分析軟體(BioNumerics)的能力是建立 DNA 指紋圖譜資料庫的核心技術，本計畫的第一年，實驗室已建立標準化 PFGE 的操作能力，用以分析重要病原細菌如革蘭氏陰性菌 *S. sonnei*、*Salmonella* spp.、*K. pneumoniae*，與革蘭氏陽性菌如 *S. pyogenes*，計畫第二年將陸續利用既有的基礎，建立其它病原細菌之 PFGE 標準操作方法，做為建立台灣的實驗室即時分子分型監視網(PulseNet Taiwan)的基礎，第二年的目標菌有 *B. pertussis*、*H. influenzae* serotype b、*Legionella* spp.、*N. meningitidis*、*S. aureus*、*S. pneumoniae*、*S. flexneri*、*Vibrio cholerae* 與 *V. parahaemolyticus*。在圖譜的分析上，也已經購得 BioNumerics 軟體，並獲得美國疾病管制局的同意，轉移 *S. enterica* serovar Braenderup H9812 之外部參考圖譜(external reference image)，所建立之圖譜資料將能與國際上大多數國家相互比對，與國際重要實驗室接軌。

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。然而今日，經研究者的努力，發展快速操作方法，並研發清洗膠體的半自動化機器，加快操作時間，減輕人力負擔，增加單位時間處理大量樣品的能力；而本實驗室對限制酵素使用量的測試，發現

在 DNA 品質很好的情況下使用量可為原先用量的 1/40 即可，如此可降低數倍的成本。目前 PFGE 可以是快速、容易操作、成本不高、且具高分型效力的細菌分子分型方法。

台灣要儘快建立實驗室分子分型監視網(PulseNet Taiwan)，即時監控重要細菌病原。經過七年的考驗，証實美國疾病管制局所建立的分子分型監視網(PulseNet)，能很有效地監視食因性疾病，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，則具有跨國合作監視傳染病流行與追蹤病原來源的能力，例如台灣去年第一例 *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」（邱乾順等人，2002）。

PulseNet 使用的技術平台，可應用於分析絕大部份細菌，監視大多數細菌性傳染病。在「建立台灣重要細菌病原 DNA 指紋圖譜資料庫計畫」第二年計畫完成後，即有能力組織疾病管制局北、中、南、東實驗室成立分子分型網，即時監視細菌性傳染病的流行。

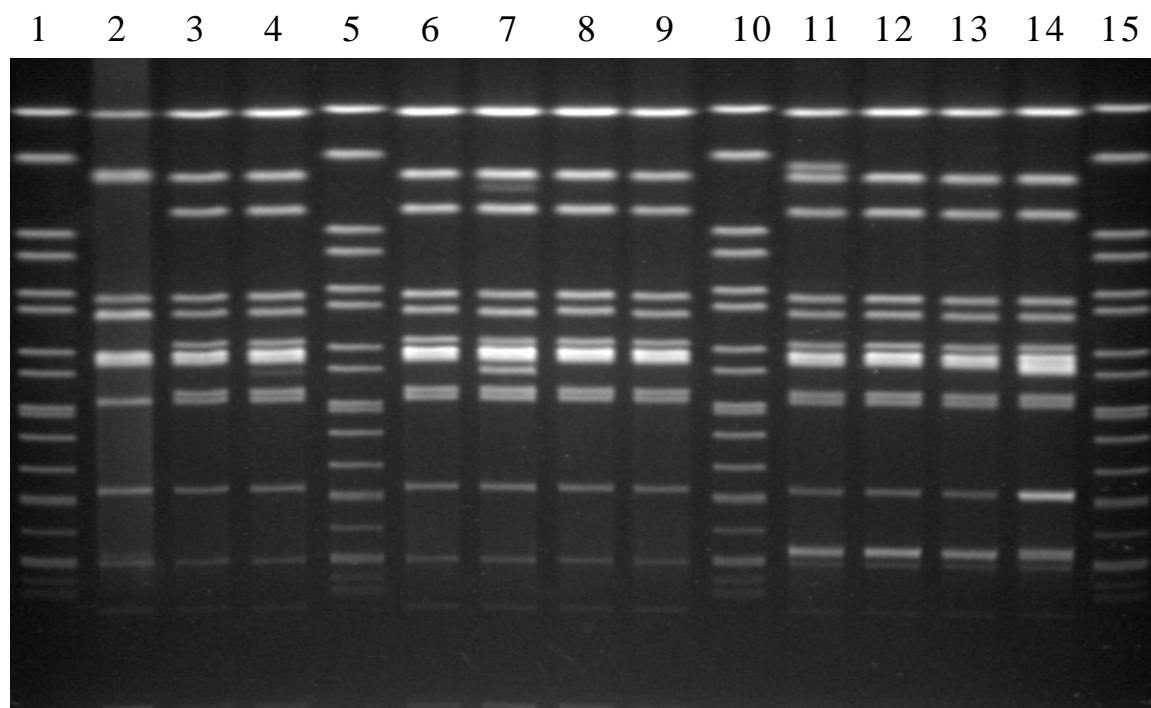
推動分子分型監視網，可同時累積本土菌株之 DNA 圖譜資料庫，有此資料庫即能用以區別本土或外來病原，掌控外來病原對台灣防疫的衝擊狀況。台灣四面環海，本有利於阻隔傳染病的入侵，但近年來，國人到國外疫區(特別是中國)經商旅遊頻繁，復又引進大量東南亞外勞，傳染病將源源不斷侵入台灣，傳統的流病監視方式勢必無法應付，有了細菌病原 DNA 指紋圖譜資料庫與實驗室分子分型監視網，即能完善細菌性傳染病的監控。

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。數年前，來自中國的口蹄疫病毒摧毀台灣的養豬產業，造成數千億元的損失與大量失業農民，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視網將能扮演重要角色。

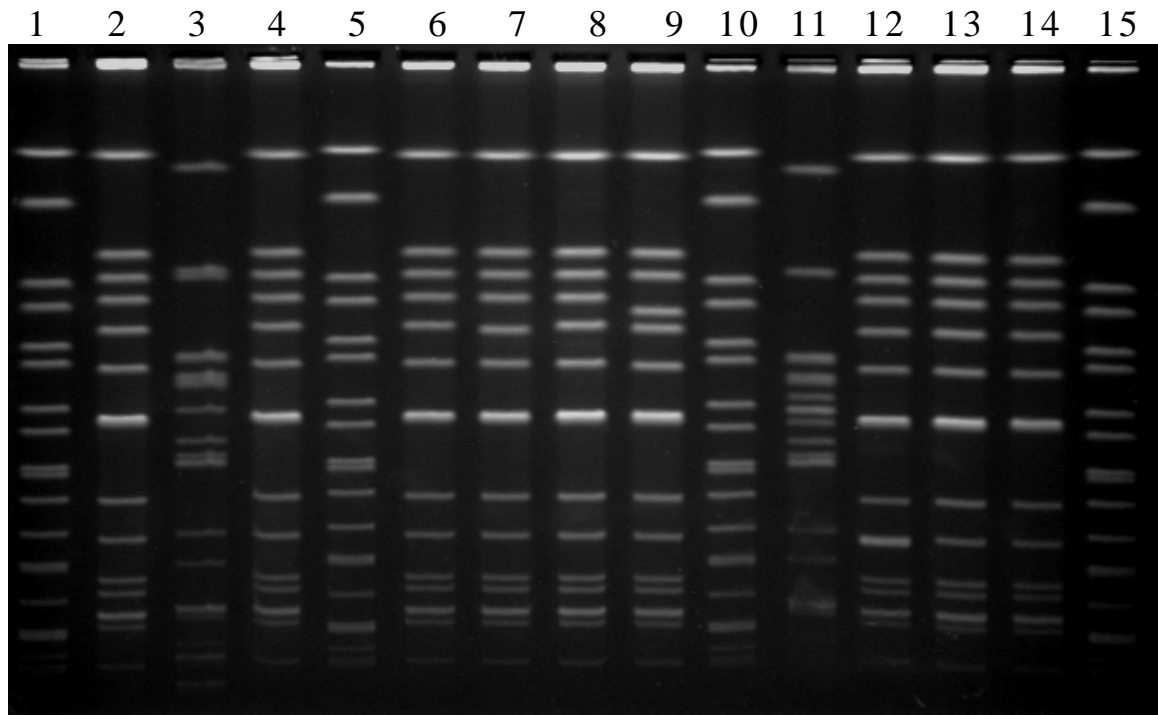
參考文獻

1. Aguilera JF, Perrocheau A, Meffre C: Outbreak of serogroup W135 meningococcal disease after the hajj pilgrimage, Europe, 2000. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:761-7.
2. Gautam RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol* 1997 Nov;35(11):2977-80.
3. Graves LM, Swaminathan B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 2001 Apr 11;65(1-2):55-62.
4. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB: PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis*. 2001 May-Jun;7(3):382-9.
5. 邱乾順、楊榮泉、趙長勝: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。

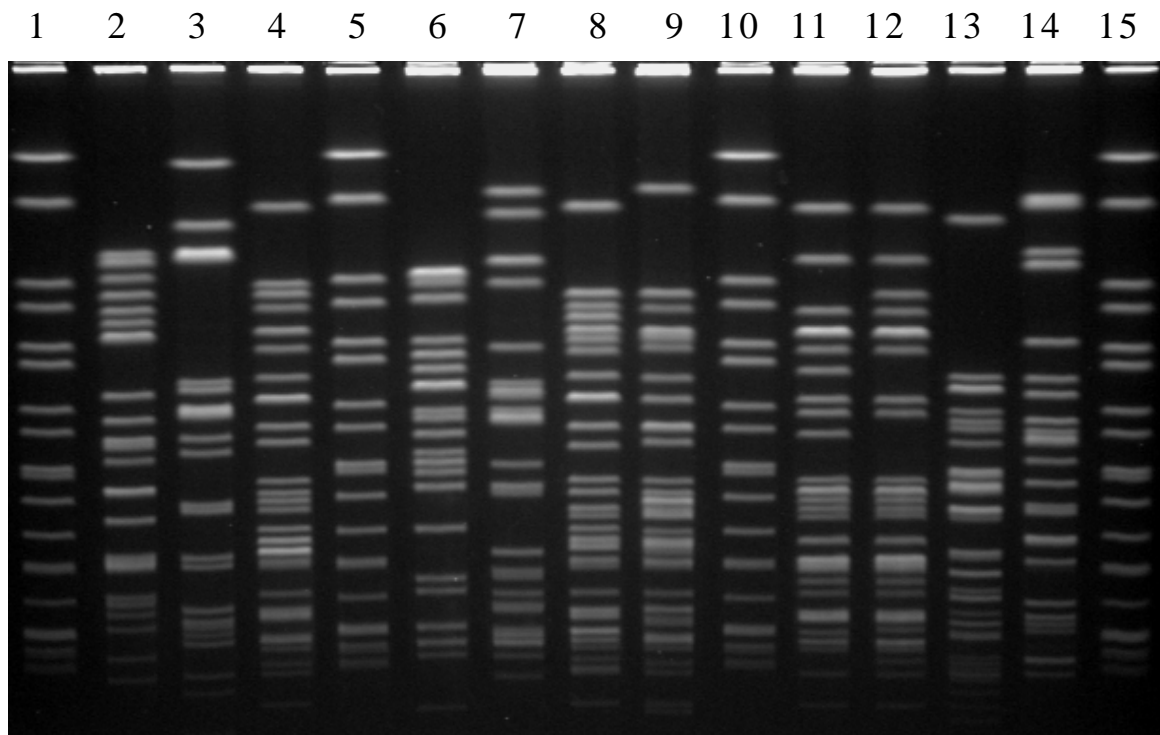
圖表



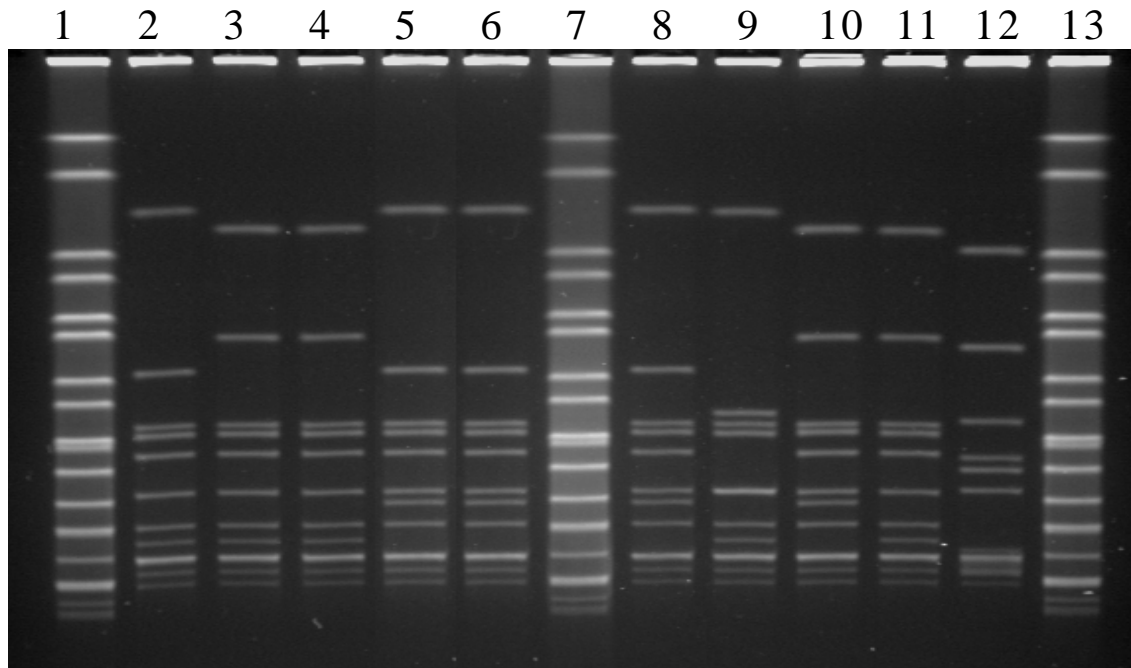
圖一：應用標準化腸內菌 PFGE 操作方法分析 *Shigella sonnei* 之 PFGE 圖譜，第 1、5、10、15 為標準菌株 *Salmonella* Braenderup H9812 以 *Xba*I 切割 DNA 之圖譜，其餘為分離自中部地區之 *S. sonnei* 菌株。



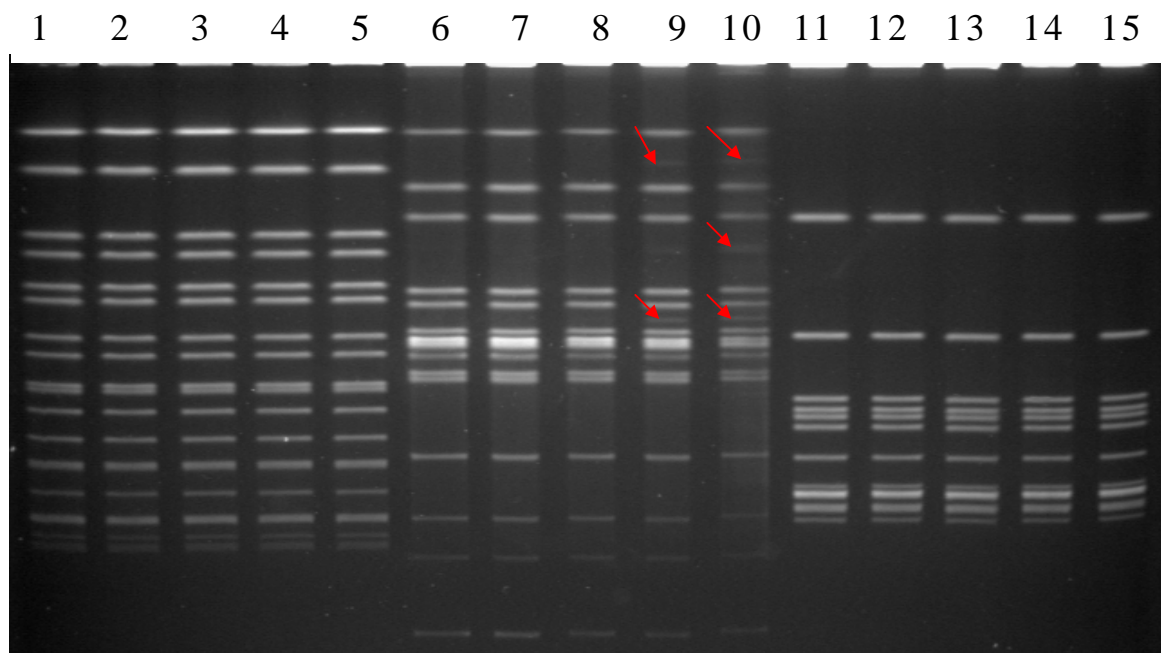
圖二：使用標準化腸內菌 PFGE 操作方法分析 *Salmonella Choleraesuis* 之 PFGE 圖譜，第 1、5、10、15 為標準菌株 *Salmonella Braenderup* H9812 以 *Xba*I 切割 DNA 之圖譜，其餘為分離自台灣南部養豬場之 *S. Choleraesuis* 菌株。



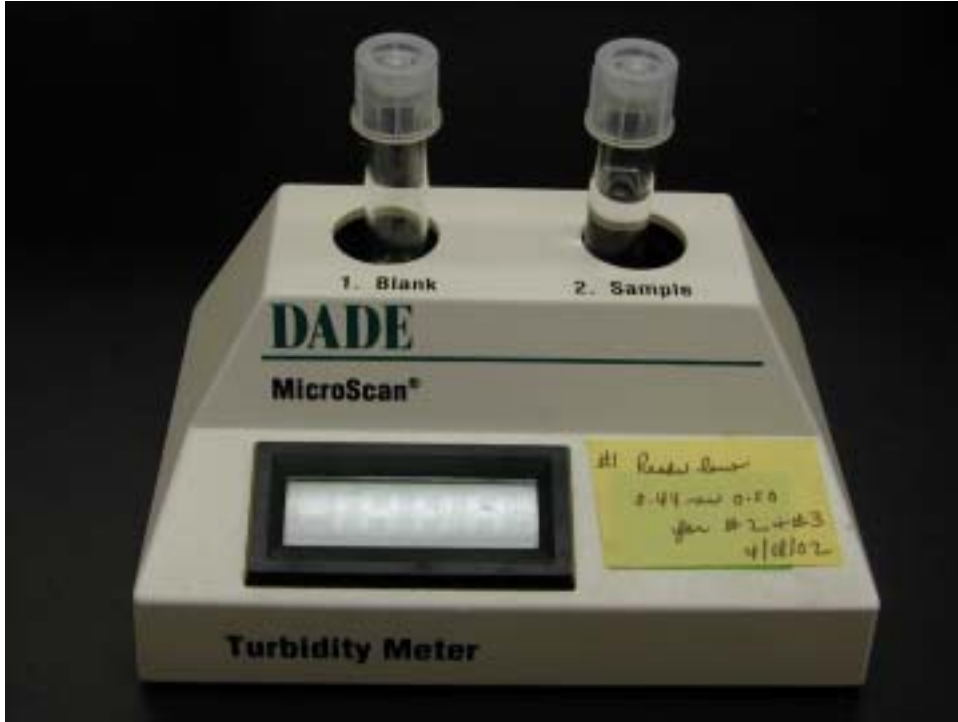
圖三:使用標準化腸內菌 PFGE 操作方法分析 *Klebsiella pneumoniae* 之 PFGE 圖譜，第 1、5、10、15 為標準菌株 *Salmonella* Braenderup H9812 以 *Xba*I 切割 DNA 之圖譜，其餘為分離自台灣中部醫學中心之 *K. pneumoniae* 菌株。



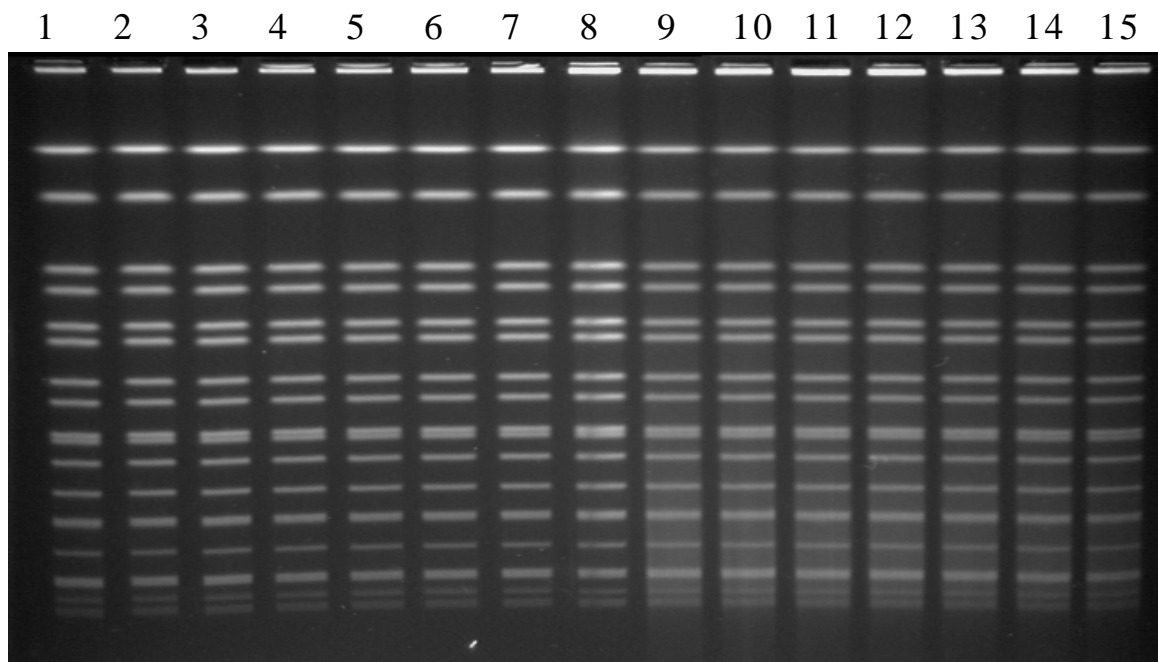
圖四：使用標準化 *Listeria monocytogenes* PFGE 操作方法分析 *Streptococcus pyogenes* 之 PFGE 圖譜，第 1、7、13 為標準菌株 *Salmonella* Braenderup H9812 以 *Xba*I 切割 DNA 之圖譜，其餘為分離自台灣中部地區猩紅熱病人之 *S. pyogenes* 菌株。



圖五：限制酵素使用量測試，第 1-5 列為 *Salmonella* Braenderup H9812 分別以 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 units 的 *Xba*I 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 *Not*I 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 *Sma*I 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 *Not*I 時開始出現不完全切割的情況(如箭頭所示)。



圖六：濁度計(Turbidity meter)，相當容易操作，能快速定量菌體濃度。



圖七：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 DNA 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。



圖八：Lewis Taiwan No. 1 膠體清洗機，一次可清洗 30 以上樣本，縮短清洗時間由原需 4 小時至 1 小時，得到之 DNA 品質優於手工方法清洗者。



圖九：利用 BioNumerics 電腦軟體分析 PFGE 圖譜。紅色箭頭所指為內部參考圖譜(*Salmonella* Braenderup H9812)，做為每一 PFGE 膠片圖譜常態化之用，綠色箭頭所指為外部參考圖譜，做為常態化不同片 PFGE 膠片圖譜之用，使用相同內部參考與外部參考，常態化後之 PFGE 圖譜，即可相互比對。

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
<i>Asc</i> I	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
<i>Bln</i> I (<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)	
<i>Xba</i> I	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)	