

Pleisiomonas spp.、*Shewanella* spp. 及 *Vibrio* spp. 5 屬。根據目前的研究報告指出，已被分離鑑定的弧菌有 *V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. cholerae*、*V. fischeri*、*V. furnissii*、*V. harveyi*、*V. ichthyenteri*、*V. logei*、*V. ordalii*、*V. pelagius*、*V. salmonicida*、*V. splendidus*、*V. trachuri*、*V. viscosus*、*V. vulnificus* 等。弧菌症在海水魚養殖產業中，已被認為是最重要的危險因子之一。弧菌科菌種之致病性強弱不一，在造成感染人類方面以霍亂弧菌 (*V. cholerae*)、海洋弧菌 (*V. vulnificus*, 又稱創傷弧菌)、腸炎弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 較為常見。

本試驗針對石斑魚及其養殖環境，進行人畜共通傳染性弧菌 (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*) 之流行病學調查，並進行菌種別分析鑑定及藥物敏感性試驗，利用卡方測定 (Chi-square test) 將不同來源分離菌株加以比較，探討其是否具有統計學上之明顯差異。提供藥物敏感性結果予臨床獸醫師，在石斑魚弧菌病治療及公共衛生學上對該類病原防治之參考。

樣品及病例收集

本研究自 2008 年 3-12 月，採樣地區為嘉義縣，樣材為石斑魚養殖魚池之池水、底泥及健康石斑魚體體表。收集罹病之石斑魚隻並送至嘉義縣家

畜疾病防治所，進行病例檢驗及病原菌分離培養。採樣流程如圖 1。標準菌株分別為 *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802)、*V. vulnificus* (ATCC 2756)、*V. cholerae* (BCRC 17642)、*V. alginolyticus* (ATCC 17749)。此外，*Escherichia coli* (BCRC 11509)、*Staphylococcus aureus* (BCRC 10781)、*Aeromonas salmonicida* (BCRC 14163)、*Streptococcus iniae* (BCRC 14744) 則用於抗菌劑感受性試驗及作為 16S rDNA 序列親緣關係對照比較。

外觀及肉眼解剖病變檢查

先以肉眼進行外觀檢視，檢查是否有體表潮紅、出血、潰瘍及眼睛病變。以蓋玻片刮取魚體表黏液，並剪下鰓絲作成濕壓片，以光學顯微鏡觀察，有無細菌、寄生蟲和黴菌感染。解剖過程採無菌操作，並將肝臟、脾臟及腎臟等臟器作塗抹片，以劉氏 (Liu's stain) 及革蘭氏染色 (Gram's stain) 後鏡檢。

微生物分離及初步鑑定

收集之池水、底泥及用玻片刮取之魚體表等樣品置於 50 mL 離心管中，先經 3,000 rpm 離心後將樣品拭子放至蛋白胨水 (alkaline peptone water) 中，於 25 °C 培養 6-7 小時後，以滅菌之接種環沾取菌液至 TCBS 培養基上，在 28 °C 低溫培養箱中經 18-24 小時培養，選取獨立菌落。再接種至 TSA media 培養

18-24 小時進行增菌純化。再進行革蘭氏染色、oxidase 與 catalase 試驗，若 oxidase 與 catalase 試驗為陽性且革蘭氏染色呈陰性，則將菌株以甘油及冷凍乾燥保存於 -80°C 中備用。

DNA之萃取

將革蘭氏陽性弧菌培養於 TSA 上，於 28°C 培養 24 小時後，以 Qiagen (New England Biolabs, Inc. USA) 商業化 DNA 萃取套組 (DNeasy[®] Tissue Kit) 進行萃取，取過濾液檢測 OD_{260} 及 OD_{280} 值。

引子對之選擇

本實驗使用的引子對資料整理如表1。

聚合酶連鎖反應

分為2組，第1組採用Tarr等 (2007) 報告中所發表之引子對，V.16S-700F及 V.16S-1325R，總反應容積為 $25\ \mu\text{L}$ ，其中包含 sterile water $13\ \mu\text{L}$ 、DNA solution $5\ \mu\text{L}$ 、 $10\times$ PCR buffer $2.5\ \mu\text{L}$ 、dNTPs mixture ($2.5\ \text{mM}$) $2\ \mu\text{L}$ 、primer F ($5\ \mu\text{M}$) $1\ \mu\text{L}$ 、primer R ($5\ \mu\text{M}$) $1\ \mu\text{L}$ 及 Taq DNA polymerase ($2.5\ \text{units}$) $0.5\ \mu\text{L}$ 。其 PCR 反應程序如下：predenature 93°C 15分鐘1個循環；denaturation 94°C 30秒；annealing 58°C 30秒；extention 72°C 1分鐘，共 35 個循環，於 72°C 7分鐘終結，最後降溫至 4°C 。第2組則採用Nhung 等人 (

2007) 報告中所發表之引子對 vm-F、vc-Rmm、vp-MmR、vv-Rmm、v.al2-MmR，總反應容積為 $30\ \mu\text{L}$ ，其中包含 sterile water $18\ \mu\text{L}$ 、DNA solution $5\ \mu\text{L}$ 、 $10\times$ PCR buffer $2.5\ \mu\text{L}$ 、dNTPs mixture ($2.5\ \text{mM}$) $2\ \mu\text{L}$ 、primer F ($5\ \mu\text{M}$) $1\ \mu\text{L}$ 、primer R ($5\ \mu\text{M}$) $1\ \mu\text{L}$ 及 Taq DNA polymerase ($2.5\ \text{units}$) $0.5\ \mu\text{L}$ 。其PCR反應程序如下：predenature 94°C 3分鐘1個循環；denaturation 94°C 3分鐘；annealing 58°C 30秒；extention 72°C 1分鐘，共35個循環，於 72°C 7分鐘終結，最後降溫至 4°C 。

單管多引子聚合酶連鎖反應 (multiplex PCR)

參考 Bauer and Rørvik 的方法並略加以修改，其引子對分別為UtoxF、vptoxR、vctoxR 及 vvtoxr，總反應容積為 $50\ \mu\text{L}$ 其中包含 sterile water $24\ \mu\text{L}$ 、DNA solution $5\ \mu\text{L}$ 、 $10\times$ PCR buffer $5\ \mu\text{L}$ 、dNTPs mixture ($2.5\ \text{mM}$) $5\ \mu\text{L}$ 、primer F ($5\ \mu\text{M}$) $3\ \mu\text{L}$ 、primer R ($5\ \mu\text{M}$) 各 $1\ \mu\text{L}$ 及 Taq DNA polymerase ($2.5\ \text{units}$) $2\ \mu\text{L}$ 。其PCR 反應程序如下：predenature 95°C 4分鐘1個循環；denaturation 95°C 30秒；annealing 58°C 30秒；extention 72°C 30秒，共25個循環，於 72°C 7分鐘終結，最後降溫至 4°C 。