

電泳分析

取 1 μ L loading dye 與 4 μ L 之 PCR 產物均勻混合後，加入 2 % agarose gel (內含 0.004 % ethidium bromide) 之孔洞內，以 100 V 電壓行電泳分析 30 分鐘，將膠片置於紫外燈下觀察並拍照。

PCR 產物之純化、定序與比對

以 Qiagen (QIAquick® PCR Purification Kit) 套組純化增幅之 PCR 產物，首先取 5 倍量 Buffer PB 與 1 倍量 PCR 產物均勻混合，將 QIAquick spin column 置入 2 mL collection tube 中，再將混合液加入 QIAquick spin column 中，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，棄 2 mL collection tube 中之過濾液，再將 QIAquick spin column 置入同一管 2 mL collection tube 中。於 QIAquick spin column 中加入 0.75 mL Buffer PE，再以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，棄 2 mL collection tube 中之過濾液，再將 QIAquick spin column 置入同一管 2 mL collection tube 中，再以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，再將 QIAquick column 置入自備已滅菌之微量離心管中，於 QIAquick membrane 上加入 50 μ L 滅菌去離子水，於室溫下靜置 1 分鐘，再以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，取其濾過液送定序。將定序後所得之基因序列送入 GeneBank 比對，並以 DNASTAR 軟體進行分析。

抗菌劑最小抑制濃度測試

本試驗選用的抗菌劑分別為 doxy-cycline、oxytetracycline、florfenicol、flumequine、ofloxacin、oxolinic acid、norfloxacin、sulfadimethoxine、sulfamonomethoxine 等 9 種。以瓊脂平板稀釋法來進行，各抗菌劑之貯備溶液為 10,000 g/mL，然後再以滅菌蒸餾水 10 倍序列稀釋的方式，配成 1,000、100 及 10 μ g/mL 的稀釋液；再加到 MHA (Mueller - Hinton agar, Becton Dickson, USA) 中再行分裝。將弧菌分離株分別培養在 BHIB 於 28 °C 18 小時，調整菌液濃度約為 10^7 CFU/mL，並利用多點接種器沾取菌液，接種在已分裝之 MHA 平板表面，於 28 °C 培養 24 小時後觀察細菌是否生長，完全抑制細菌發育之最低抗菌劑濃度，為該菌之最小抑制濃度。將判讀結果，以 Microsoft Excel 2007 軟體建檔及分析抗菌劑之 MIC₅₀ 及 MIC₉₀。此外，則依據美國臨床微生物檢驗室標準委員會之判讀標準，判讀菌株之抗藥性。

結果

1. 樣品及病例收集

本實驗自 2008 年 3 月至 12 月，從 433 件樣品中進行 PCR 反應，其中共有 120 株能增幅出預期產物。再以 vm-F、vc-Rmm、vp-MmR、vv-Rmm、v.al2-MmR 等 specific primer

進行菌種別之鑑定。結果以 *V. parahaemolyticus* 為最多共計51株，*V. vulnificus*次之有16株，*V. alginolyticus* 12株，*V. cholerae* 8株。各不同來源之菌株分離件數詳如表2、3。

2.外觀及肉眼病變檢查

在送檢病例中，分離出4株標的菌株，其中*V. parahaemolyticus*有2株，*V. vulnificus*及*V. alginolyticus*各1株，*V. cholerae*則是未分離到。罹病石斑魚從外觀上可見眼睛角膜混濁變白、出血、凸眼與潰瘍，並伴隨有單側或雙側性凸眼。肉眼可見軀幹、口吻部及腹部體表，有嚴重程度不等之潰瘍、糜爛及充出血，在體表病灶上可見一層白色薄膜般物質，覆蓋在病灶部位。剖檢後可見肝臟腫大潮紅，有時亦可見腹水。有些病例剖檢後臟器並不見明顯肉眼病變（圖2）。

3.微生物分離及初步鑑定

收集之池水、底泥及魚體表等樣品培養至TCBS培養基上，選取中等大小直徑約 2-4 mm 之獨立菌落，中心不透明周圍透明平滑的黃色及綠色菌落，行革蘭氏染色亦可見革蘭氏陰性短桿菌，呈 S 狀或逗點狀排列，其 oxidase 及 catalase 反應為陽性（圖3）。

4.聚合酶鏈鎖反應及核酸定序

檢測本實驗採用弧菌屬共通PCR引子之特異性，利用標準菌株 *V. parahaemolyticus*

(ATCC 17802)、*V. vulnificus* (ATCC 27562)、*V. cholerae* (BCRC 17642)、*V. alginolyticus* (ATCC 17749) 檢測弧菌屬共通 PCR引子之特異性，均有大小約 663 bp 的產物，其餘非 *Vibrio* spp.之菌株則均無任何增幅產物（圖4）。故本試驗所採用的 PCR 引子對進行檢測 *Vibrio* spp.之核酸具有敏感性。另參照 Nhung 等人所發表之PCR鑑定方法對於4株標準菌株均可增幅出預期產物（圖5）。PCR 產物經純化過程後，送至明欣生物科技公司定序，將定序後所得之基因序列輸入GeneBank 進行比對，結果均有99 % 以上的相似度。

5.單管多引子聚合酶鏈鎖反應

針對弧菌野外分離株及3株標準菌株進行多套式單管 PCR反應，皆可得到特異性增幅產物，*V. parahaemolyticus* (297bp)，*V. vulnificus* (435bp)，及 *V. cholerae* (640bp)，如圖6所示。

6.抗菌劑最小抑制濃度測試

在藥物敏感性試驗方面，以平板稀釋法檢測其最小抑菌濃度 (MICs)，結果如表4所示，在MICs結果顯示87株弧菌野外分離株對sulfamonomethoxine有87株 (100 %) 具抗藥性，其次為sulfadimethoxine有85株 (97.7 %)，而oxolinic acid及flumequine再次之分別有24株 (27.6 %)、21株 (24.1 %)，