

四、肉眼病變

氣管及支氣管內充滿著紅色泡沫樣粘液或滲出液。肺臟病變為雙側性，主要為橫膈葉之前背側，可見嚴重小葉間隔水腫及出血。病變區呈暗紅堅硬且與正常肺組織界線分明(圖1)，部分肺肋膜與胸壁粘連在一起，胸腔內可看到淡紅色血樣滲出液。

五、初步診斷

依據病史、臨床症狀及肉眼病變，初步懷疑為放線桿菌胸膜肺炎感染症。

六、實驗室檢查

1.微生物學檢查

由肺臟之病變區鈎菌培養於添加100 µg/mL NAD (菸鹼醯胺腺嘌呤二核酶酸)的BHI (brain heart infusion) 之培養基，置於37 °C、5 % CO₂之培養箱中，經18至24小時後，取10個直徑約為0.5-2 mm，圓形、透明及邊緣平整疑似APP之菌落，分別繼代於Blood agar/MacConkey agar (血液/馬康其培養基)及巧克力培養基增菌純化。經18至24小時37 °C，5 % CO₂培養後，APP在Blood agar幾乎沒有可見菌落產生，但可產生β溶血現象；在MacConkey agar上則無法生長(圖2)。另外，以*Staphylococcus aureus*在Blood agar上與APP成垂直方向劃菌，經18至24小時培養後，可見在*Staphylococcus aureus*周圍有明顯的溶血區域(圖3)；尿素酶斜管試驗鑑定呈紅紫色(圖4)，符合上述特性之菌株再進行DNA萃取工作，進行後續之血清型分型鑑定。

2.PCR進行菌株鑑定

自巧克力培養基上以loop挑選4-5個菌落混於200 µL之0.85 %生理食鹽水中，以商品化基因體DNA純化試劑組(Genomic DNA Purification Kit, Hopegen Biotechnology Development Enterprise)進行模板DNA之製備，將所得DNA保存於-20 °C。參照Gram等人(1998)利用APP特有之omlA基因序列設計之species-specific引子(表1)對來鑑定所分離之菌株是否為APP，所有血清型的APP均可增幅一950 bp大小之產物(圖7)。設定PCR反應條件：94 °C加熱3分鐘以解開雙股DNA，變性(denaturation)之溫度為94 °C，反應時間為1分鐘；黏合(annealing)之溫度為60 °C，反應時間為1分鐘；增幅(extension)之溫度為72 °C，反應時間為1分鐘，反應33個循環，最後再以72 °C，10分鐘，將未延長完全的反應做完，反應即告完成。將PCR產物以2 %之agarose，電壓70伏特進行電泳分析。將agarose以EtBr(溴化乙錠)染色約10分鐘後，置於紫外燈觀察箱(gel analysis system)中，以數位影像分析系統觀察片段大小並進行拍攝記錄。經序列分析並至NCBI基因庫進行比對結果與*Actinobacillus pleuropneumoniae omlA* gene相似度達98 %。

3.APP血清型鑑定(Serological typing)

模板DNA之製備及PCR操作流程參照前述。先將初步鑑定為血清型1、2、5的菌株，參照Schuchert等人(2004)根據APP的capsular polysaccharide biosynthesis region(CPS)設計之引子對，分別以PCR法進行血清型1、2、5之鑑定，所使用之引子對及PCR條件(表1)。

4.APP抗菌劑感受性試驗

在本次藥物感受性試驗中，所選用的抗生素紙錠是以畜牧場常會取得及使用的藥物，總共20種(表2)，使用抗生素紙錠主要為Oxoid(Oxoid, UK)產品。參照臨床及實驗室標準機構CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)測定之標準操作方法，來了解菌株對抗生素的感受性(susceptibility)。採用chocolate Mueller-Hinton 當作感受性試驗的培養基。以0.9 %之無菌生理食鹽水懸浮成0.5 McFarland硫酸鋇標準液的混濁度(相當於1-4x10⁸ CFU/mL之菌落濃度)，以無菌棉棒沾取菌液，均勻塗佈於chocolate Mueller-Hinton培養基上，待數分鐘菌液乾掉後，接著用滅菌過的鑷子夾取抗生素藥片(disc)貼附於培養基表面，並輕壓使抗生素藥片與培養基表面完全接觸，置於37 °C、5 % CO₂培養箱中，經20至24小時後，測量抑制圈直徑(包含紙錠之直徑)(圖5)，依照CLSI的標準並參考廠商之說明書，以具抗藥性(Resistance, R)、中間型(Intermediate, I)