

藥試所毒理研究之 SPF 動物及相關設施

之微生物監測系統：I. 細菌監測系統

蔡三福 廖俊旺 王順成

前 言

由於生命科學之研究技術日益精進，實驗動物被廣泛應用於各種學術研究。其中人類及動物疾病的預防及治療，化學品的使用均利用實驗動物研究以獲得相關效應和治療機制的資訊，並以評估其安全性和效果。因此如何獲得健康的動物，以反應實驗的正確性，是實驗成功最主要步驟。針對此，對一般實驗動物均需實施例行監測或針對 SPF（無特定病原；Specific Pathogen Free）動物及其設施進行特殊監測。

實驗動物及其設施健康監測中，以微生物檢測最重要，並以細菌診斷發展最速，1673 年為萌芽期。1880 年 Koch 發展使用固體培養基及 1914 年 Difco 設計粉狀培養基後，細菌的培養與鑑定變得較容易，1970 年代初期細菌診斷發展快速，其中電腦化鑑定及 1990 年後快速細菌鑑定套組的應用及臨床細菌診斷的自動化細菌鑑定系統，使細菌診斷邁向一新紀元，因而確保高品質動物及環境的存在。

國內目前尚未建立完整對實驗動物的微生物監測系統，張照夫等（1993）報告國內 4 所機構，包括兩所動物中心的小鼠口腔、腸道、中耳道及上呼吸道，可分離出 *Pseudomonas aeruginosa* 及 *Yersinia pseudotuberculosis* 等病原細菌，顯示國內實驗動物之檢疫尚存重大缺失。細菌例行的監測項目，需顧及正確性及快速性。本文主要敘述本所 SPF 動物房環境及實驗動物的細菌鑑定，採用的傳統細菌鑑定法及各種快速細菌鑑定套組系統組合，配合本所實驗動物品系（主要為大、小白鼠），建立完整監測病原菌體系，以達到無特定病原實驗動物的標準，以利各種毒理研究之進行。

取樣與鑑定步驟

本所設計之流程乃依下列方法進行環境及實驗動物細菌監測，各系統使用前，先進行該菌純化及形態學的鑑定，包括球菌、桿菌及革蘭氏陰、陽性菌及菌落在培養基上的顏色和大小。鑑定流程主要包括兩種系統：傳統的生化培養鑑定法，及快速鑑定套組。鑑定之初先行純化培養，鑑定流程如圖 1，茲將流程各步驟說明如下。

一、細菌鑑定之取樣

(一)動物之採樣

1. 新購動物取樣：新購實驗動物經由無菌盒送達時，需以隨機取樣方法取 5% 的動物或至少雌雄各 4 隻，進行解剖。

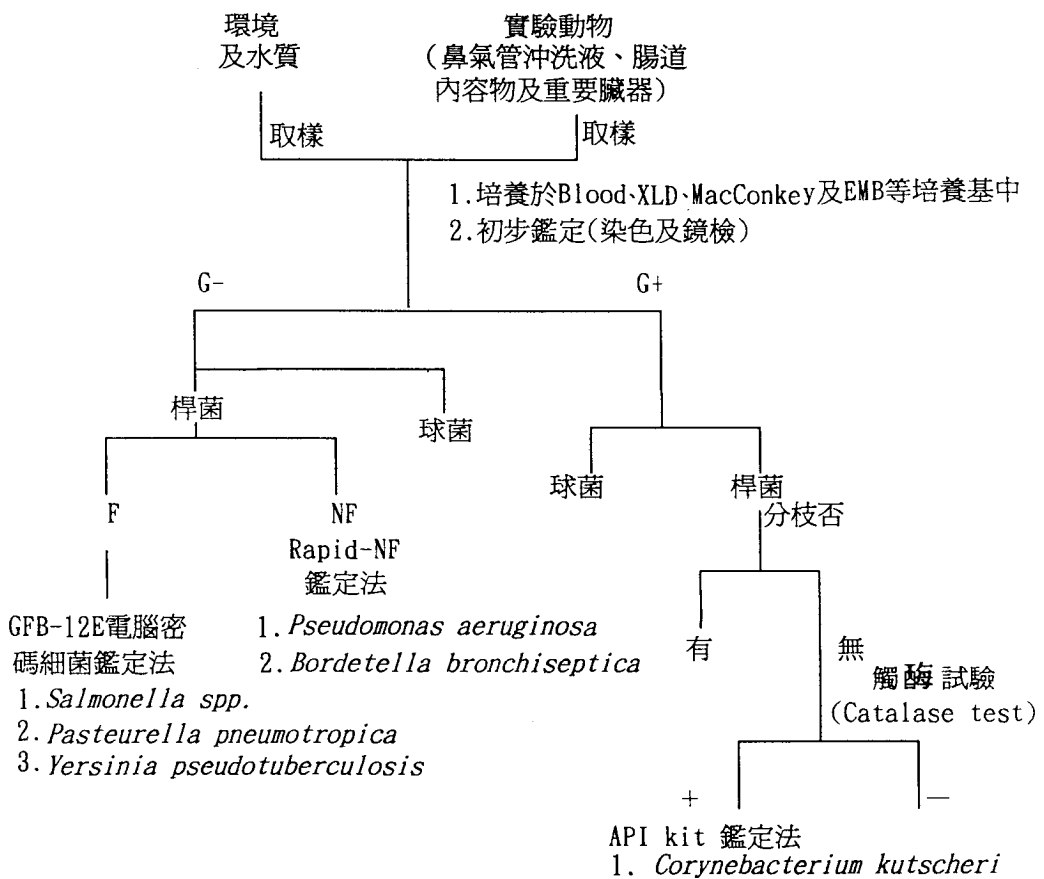


圖1. 臺灣省農業藥物毒物試驗所 SPF 動物房細菌監測流程圖

(+表示陽性反應，G-表革蘭氏陰性菌，G+表革蘭氏陽性菌，
F表能發酵葡萄糖，NF表不發酵)。

2. 試驗期間動物取樣：

- (1)每週從各飼育室取5%的動物，收集每籠內糞材及飲水樣品，進行細菌培養。
- (2)每13週，各飼育室依試驗組別隨機取機，至少雌雄各4隻，進行解剖。

3. 解剖過程：實驗動物以乙醚麻醉後，於無菌操作臺上，以仰臥方式固定於軟木板上，先剪開皮膚至下顎，再剪開腹腔，以採血針插入腹部動脈後放血，並剪開胸腔，取鼻氣管之沖洗液及腸道內容物，進行細菌培養。

(二)環境及水質之採樣

1. 環境取樣：利用無菌棉花棒沾取試管中之TSB (Tryptic soy broth)，分別擦拭動物房的籠架、操作臺、牆壁、門把手、地板及飼育盒，再將棉花分別置入各試管中，進行細菌培養。

2. 水質取樣：各動物房水龍頭的水及逆滲透 (RO) 之一次蒸餾水，分別取0.5ml，置入內含TSB各試管中，進行細菌培養。

二、初步鑑定與培養

(一)培養基

1. 血液培養基 (Blood agar) : 含 5 % 綿羊血之平板培養基。

2. EMB 培養基 (Eosin methylene blue) : Difco 公司出品, 依商品標示, 稱好精確克數, 加入適量蒸餾水中, pH調至7.2。然後經加熱攪拌至完全溶解後, 於121°C 滅菌15分鐘後, 冷卻至50°C 倒平板。

3. XLD 培養基 (Xylose-Lysine-Deoxycholate) : Difco 公司出品, 依商品標示, 稱適量 XLD 溶於適量的蒸餾水中, 然後加熱至近沸騰 (不經高壓滅菌), 唯須完全溶解。經冷卻至50°C 倒平板。

4. MacConkey 培養基: Difco 公司出品, 依商品標示, 稱好精確克數, 加入適量蒸餾水中, 經加熱攪拌溶解後, 於121°C 滅菌15分鐘, 冷卻至50°C 倒平板。

(二)細菌培養

1. 利用4ml 之 TSB 吸管沖洗鼻道, 將沖洗液置於試管中培養18~24小時 (37°C), 再以接種環劃至血液培養基上。

2. 取部份腸道的內容物, 於內含 TSB 之試管中培養18~24小時, 另取腸道內容物接種於 Tetrathionate broth、Selenite broth (量為1:10) 中增菌10~16小時, 再以接種環劃至 XLD、EMB、MacConkey 及血液培養基中培養18~24小時。

3. 取部份重要器官, 包括肺、肝、腎及腦, 進行組織臟器培養, 其它器官則於肉眼病變時, 需一併進行培養。

(三)革蘭氏染色 (Gram's stain) 鑑定法

1. 於乾淨的玻璃片滴上一滴水, 用白金耳挑取微量細菌, 混合後做成直徑約 1 公分的圓形區域, 再用火迅速烤幾秒鐘加以固定。

2. 加適當的結晶紫染劑 (Crystal violet) 染 1 分鐘後, 水洗。

3. 覆蓋碘溶液 (Gram's iodine solution) 染 2 分鐘後, 水洗。

4. 以脫色劑脫色, 至藍色液體不再流出為止, 約10~15秒後, 水洗。

5. 最後加複染液, 染30 秒~ 1 分鐘, 水洗。

6. 以濾紙壓乾 (或烤乾), 鏡檢記錄之 (附錄一)。

7. 革蘭氏陽性菌呈藍紫色反應 (圖2.), 陰性菌呈紅色反應 (圖3.)。

三、GFB-12E 電腦密碼細菌鑑定系統法

(一)鑑定對象: 包括腸內桿菌 (enterobacteriaceae)、產氣單胞菌 (aeromonas)、類產氣單胞菌 (plesiomonas)、弧菌屬 (vibrio)、巴氏桿菌屬 (pasteurella)、放射桿菌屬 (actinobacillus), 及其它葡萄糖發酵性革蘭氏陰性桿菌。此法可監測的致病性病原體包括: 沙門氏桿菌屬 (*Salmonella spp.*)、致病性大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、巴斯德桿菌 (*Pasteurella pneumotropica*) 及 *Yersinia pseudotuberculosis*。

(二)鑑定用培養基及試驗: 密碼鑑定法係依據 TSIA、CIT、URE、SIM、VP、ORN 等 6 種培養基共11種生化試驗, 外加氧化酶 (Oxidase) 試驗。此12種生化試驗結果, 每 3 項編成 1 組, 計分成 4 組, 每一組的各項各有一個分數, 依序為 4、2、1, 該項呈陽

性反應則得該分數，陰性則為零，因此每一個被鑑定的細菌具有4個位數的密碼（附錄二）。

1. Triple Sugar Iron Agar (TSIA)：依指定的配方，稱好精確重量，加入蒸餾水，經水浴後，分裝於15×103 mm 試管中，再經高壓滅菌後，排成斜面（注意斜面為基底長的一半），將純化菌劃於斜面上並穿刺入基底的1/2，再置於一般35~37°C 培養箱，培養18~24小時。

2. Simmon's Citrate Agar (CIT)：配製程序同 TSIA，唯需調整 pH 值（根據配方）後再經水浴，菌種僅塗劃於斜面上。

3. Christensen's Urea Agar (URE)：程序同 CIT，唯 Urea Agar Base 不經高壓滅菌，調整 pH 值後，過濾除菌，依一定比例將 Agar 滅菌後，冷卻至50~55°C，再將 Urea Agar Base 加入，做成斜面。

4. Sulfide-Indole-Motility Medium (SIM)：配製程序同 TSIA，唯僅做成垂直面，並將菌種穿刺入垂直面1/2。

5. Voges-Proskauer Medium (VP)：配製程序同 TSIA，唯 VP 為液體，需接種較大量的菌種。

6. Moller's Ornithine Decarboxylase Medium (ORN)：配製程序同 TSIA，唯 ORN 為液體，且其配方上除了 Basal Medium 外，尚需加入一定比例 L(+)-ornithine，使其佔總溶液的1%，此外調整 pH 值至6.0，接種後，再添加5滴的礦物油 (Mineral oil，需滅菌)。

7. 氧化酶 (Oxidase) 試驗：此結果可在5~10秒內判讀，因此可待 TSIA 培養後，吊取其斜面的細菌，塗抹在濾紙上，再滴試劑 Kovacs 進行之。

(三)判讀及試劑配方

判讀方法如表1，需加試劑為 SIM、VP 及 Oxidase 三部份。

1. SIM：檢測是否產生 IPA (Indole pyruvic acid)，後再觀察細菌有無運動性 (Motility)，最後滴入 Kovacs indol 試驗，測定是否產生 Indole，根據上述三項結果加以判讀。

Kovacs indol 試劑之配方如下：

- (1) Pure amyl or isoamyl alcohol150ml
- (2) *p*-dimethylaminobenzaldehyde10g
- (3) 濃 HCl50ml

將10g 之(2)溶於150ml 之(1)中，後緩緩加入 50ml 之(3)，配製完成後於暗處放置，隔夜後使用，平時貯存於4°C 冰箱中。

2. VP：先加入12滴（約0.6 ml）的 VP1，再加入4滴（約0.2ml）VP2 後，輕搖管壁均勻混合，靜置2~5分鐘後判讀結果。

(1)VP1 (5% α -Naphthol)：5g α -Naphthol 加入 100 ml 純酒精 (absolute alcohol)。

(2)VP2 (40% KOH) : 40g KOH 加入100ml 蒸餾水 (D. W.) 。

3. Oxidase : 加入 2 ~ 3 滴 Kovacs oxidase 試劑於濾紙上，5 ~ 10秒內觀察反應結果。

Kovacs oxidase 試劑配方：取 1 克 tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 加入100ml 蒸餾水中。

此試劑需以 *Pseudomonas spp.* 或 *P. aeruginosa* 做為陽性對照株。

4. 判讀結果詳見表1.

表1. GFB-12E 電腦密碼鑑定系統判讀依據

培養基	生化試驗	陽 性 反 應 現 象	陰 性 反 應 現 象
TSIA	AS	黃色 (斜面酸化)	紅色或不變色
	AB	黃色 (基底酸化)	紅色或不變色
	GAS	任何氣泡之產生或撕裂培養基	無氣泡生成
	H ₂ S	產生黑色沈澱	無黑色沈澱
CIT	CIT	深藍色	青綠色
URE	URE	粉紅色	黃色
SIM	IND	加 Kovacs indole 試劑 5 滴後，在培養基上層呈紅色	不呈現紅色 (呈銅色)
	MOT	細菌生長擴散遠離接種線	生長固定於接種線
	IPA	黑色，混濁，培養基上棕褐色環	不呈棕褐色環
Semi-VP	VP	加入 VP1 及 VP2 試劑後，呈現紅色	不呈現紅色 (呈銅色)
ORN	ORN	呈混濁及深紫色	呈清澈及淺黃綠色
OXI	OXI	加入 Kovacs oxidase 試劑後，菌落呈現藍色	無色或不變色

AS : Acid of slant (斜面酸化) , AB : Acid of butt (基底酸化; AS,AB 均指利用醣類之能力)。GAS : 指產生 CO₂ 及 H₂ 之能力。H₂S : 指產生 H₂S 之能力。CIT : 指細菌是否利用 Citrate 為唯一碳原。URE : 指產生 Urease 之能力。IND : 指 Indole 產生之能力。MOT : 指具運動性之能力。IPA : 指產生 Indole pyruvic acid 之能力。VP : 指產生 Acetoin 之能力。ORN : 指細菌是否具有 Decarboxylase。OXI : 指細菌是否具有 Oxidase。

(四)細菌判讀例證：如某一純化的細菌，其試管培養生化反應，TSIA為基底酸化，有氣泡及產生黑色沉澱，SIM呈運動性，ORN呈混濁，其餘均為陰性反應（圖4.、圖5.），則計算其生化試驗結果，電腦密碼數為3422，經查電腦密碼表，可知此菌為沙門氏桿菌（*Salmonella choleraesuis*）。

四、Rapid-NF 套組鑑定法

(一)鑑定對象：可鑑定葡萄糖非發酵性革蘭氏陰性桿菌，包括 *Pseudomonas spp.*, *Moraxella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Bordetella spp.* 等，應用於監測本所動物房之病原菌，如 *Pseudomonas aeruginosa*（假單胞菌）及 *Bordetella bronchiseptica*。

(二)鑑定步驟及原理：Rapid-NF 系利用細菌預先存在細胞壁內的酵素作為鑑定依據。

1. 將分離之純菌落經葡萄糖發酵試驗鑑定為非發酵葡萄糖之革蘭氏陰性菌，培養於 TSA (Tryptic soy agar) 或 Blood agar 中，經18~24小時，以接種環挑取，移至快速接種液 (Rapid inoculation fluid)，調成相當於Mcfarland #1~#3之濃度。

2. 將接種液以巴氏德吸管全部吸取注入 Panel 中（注意沿著盒壁注入，以避免氣泡產生），重新將已撕開的護膜貼回右上角處。將盤組左右搖擺（但需水平）後置於水平桌上，將盤組往前傾斜，使接種液等量流入各試劑中。

3. 將盤組置於35~37°C培養箱，經4小時±30分鐘後研讀結果。

4. 結果判讀如表2.及表2—1.，並將結果登錄於記錄紙上（附錄三），盤組共10個反應孔號，4~10可作2個不同試驗，再加上氧化酶試驗，共有18個試驗組（圖6.）。

(三)結果判讀：分加試劑前及加試劑後之結果，見表2.及表2—1.，然後計算所得的鑑定密碼，輸入預存的軟體 (IDS) 電腦中，按照指示則可知此陰性非發酵菌種類。

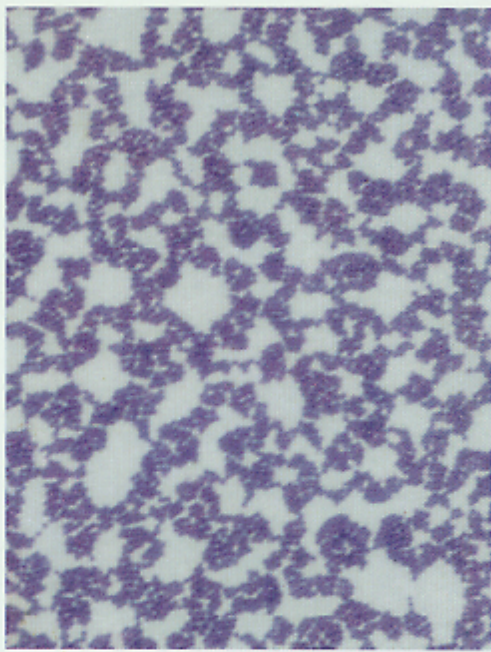


圖2. 革蘭氏染色法陽性菌成藍紫色，1,000X。

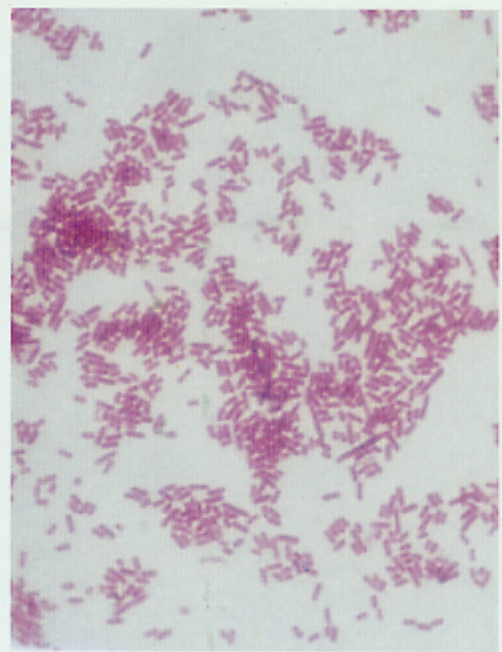


圖3. 革蘭氏染色法陰性菌成紅色，1,000X。

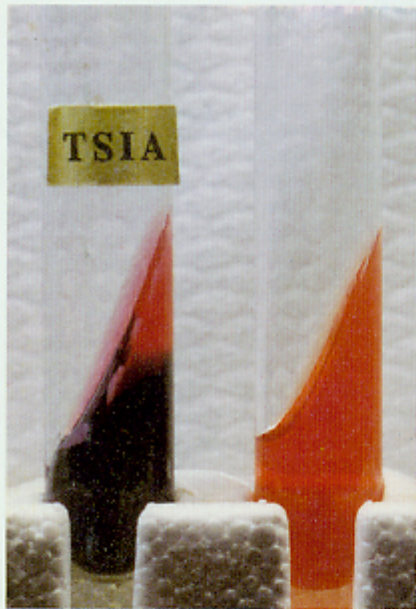


圖4. TSIA 細菌試管培養生化反應，陽性反應之基底酸化呈黃色，並有氣泡及產生黑色沈澱。



圖5. GFB-12E電腦密碼鑑定系統，沙門氏桿菌試管培養生化反應，TSIA 呈陽性反應外，SIM 呈運動性及 ORN 呈混濁性，餘均為陰性反應。

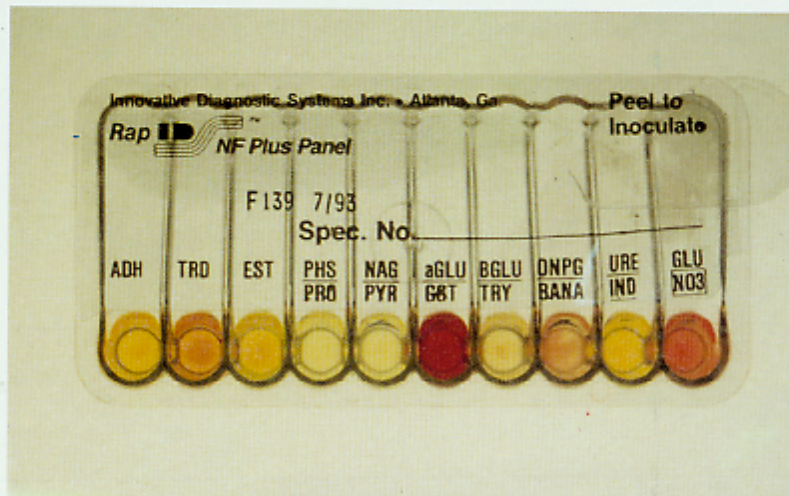


圖6. Rapid-NF 鑑定套組之10個反應孔。

表2. Rapid-NF 套組加試劑前之判讀

編號	測試項目	測 試 反 應	
		+	-
1.	ADH	紅	黃或淡橘色
2.	TRD	黃或黃橘色	紅或橘色
3.	EST	黃或淡橘色	紅或深橘
4.	PHS	黃色	清澈或淡褐色
5.	NAG		
6.	AGLU		
7.	BGLU		
8.	ONPG		
9.	URE	紅色	黃、黃橘或橘色
10.	GLU	黃色	藍或綠色

表2-1. Rapid-NF 套組加試劑後之判讀

編號	測試項目	試 劑	測 試 反 應*	
			+	-
4.	PRO	加 Rapid NF Plus Reagent (2滴)	明顯的 紫、藍紫 紅、橘 深粉紅色	顏色清澈、 褐色、淡橘 或粉紅
5.	PYR			
6.	GGT			
7.	TRY			
8.	BANA			
9.	IND	加 spot Indole (2滴)	棕或黑色	橘或紅色
10.	NO ₃	加 Innova Nitrate (2滴)	紅或橘色	清澈或黃色

*加入試劑後30秒至3分鐘內觀察顏色變化，逾時易產生偽陽性反應。

五、API Coryne 系統鑑定法

(一)鑑定對象：可鑑定革蘭氏陽性短桿菌 *Corynebacterium spp.* 菌屬，應用於本所動物房病原菌 *Corynebacterium kutscheri* 之監測。

(二)原理

1. API Coryne 套組為利用20個含有脫水物質來測試細菌的酵素活性或糖類的醱酵。當菌量的濃度足夠時，則可促使及利用還水酵素之活性，於培養期間代謝產物可使微孔顯現出自然的呈色反應，或另藉試劑之加入以進行呈色反應。

2. 醱酵試驗是藉由含多種糖類物質的培養基（含pH指示劑）所組成的，其原理為利用碳水化合物的醱酵，以pH指示劑測試顏色改變。

3. 於35~37°C 培養箱培養24小時後，反應的判讀乃根據樣本的比對，及來自 APILAB 或 ATB plus 等電腦密碼鑑定。

(三)步驟及方法

1. 菌株的選取：

(1)確認所分離到的菌株為無孢子形成的G+（革蘭氏陽性）兼性厭氧性短桿菌。

(2)菌株具溶血性（haemolysis）。

(3)挑取純化一菌株混合於0.3ml滅菌的蒸餾水中，再以滅菌的棉花棒均勻沾取後，塗滿整個 Columbia sheep blood agar 培養皿中。

(4)於35~37°C 培養箱中再培養24小時。

2. 套組之準備：

(1)準備培養盒。

(2)標示菌株於培養盒邊緣。

(3)加 5 ml 蒸餾水於培養盒之蜂巢狀小孔中。

3. 接種液之備製：

(1)打開懸浮液培養瓶。

(2)使用滅菌棉花棒，刮取先前製備的培養皿，調成混濁濃度大於 Mcfarland #6 的狀況。

4. 套組之培養：

(1)盤組上的11個試驗組包括 NIT 至 GEL：均勻置入懸浮液，並避免氣泡產生。

• NIT 至ESC 試驗孔分別加入150ul 懸浮液（巴氏德吸管 3 滴或 PSI pette 6 滴）。

• URE 試驗，懸浮液僅需充滿試管狀部份。

• GEL 試驗，懸浮液需充滿整個試管狀及盃狀凹。

(2)0 至 GLYG 之最後 9 個試驗：

• 將約0.5ml 菌液注入 GP Medium 中，混合均勻。

• 將此懸浮液注入各試管管狀部份。

(3)將礦物油覆蓋於 URE 及 0 至 GLYG 的盃狀凹中，並形成微凸圓狀。

(4)將培養盒封密。

(5)於35~37°C 培養箱培養24小時。

5. 套組之判讀 (如表3.) :

(1)加試劑:

· NIT 試驗加入 1 滴 NIT 1 及 NIT 2。

· PYZ 試驗加入 1 滴 PYZ。

· PyrA, PAL, β GUR, β GAL, α GLU, β NAG 試驗分別加入 1 滴 ZYMA 及 ZYMB。

(2)靜置10分鐘後，對照圖譜判讀顏色反應，必要時於 PyrA 至 β NAG試驗孔可置於1000w強光下10秒，以去掉多餘的試劑顏色。

(3)進行觸酶試驗 (進行第21個試驗) :加 1 滴過氧化氫到 ESC 或 GEL 試驗孔中，待 1 分鐘後，若有氣泡產生為陽性反應。

(4)將結果登錄在記錄紙上 (附錄四)。

(5)結果判讀依據表3.，部份試驗孔須加試劑使其呈色再行判讀，最後計算所得的鑑定密碼，輸入電腦，則可知此菌屬何種棒狀桿菌。

表3. API Coryne 套組之判讀原理及結果

編號	測試項目	反應	結果	
			+	-
1.	NIT	nitrate減少	加 NIT1 及 NIT2(10mn)	
			深紅色	淡紅色或無色
2.	PYZ	pyrazinamidase	PYZ(10mn)	
			黃藍色	淡棕、橘色
3.	PyrA	Pyrrolidonyl Arylamidase	EYMA + ZYMB PyrA→BNAG(10mn)	
			橘色	淡橘或無色
4.	PAL	Alkaline Phosphatase	紫色	淡紫色或無色
5.	β GUR	β -glucuronidase	藍色	淡紫色或無色
6.	β GAL	β -galactosidase	紫色	淡紫色或無色
7.	α GLU	α -glucosidase	紫色	淡紫色或無色
8.	β NAG	N-Acetyl-B glucosaminidase	棕褐色	淡紫色或無色
9.	ESC	Esculin	黑色	灰色
10.	URE	Urease	桃紅色	黃橘色
11.	GEL	gelatine	擴散的黑色	無擴散
12.	O	對照組 (醱酵試驗)	黃色	紅色
13.	GLU	glucose		
14.	RIB	ribose		
15.	XYL	xylose		
16.	MAN	mannitol		
17.	LAC	lactose		
18.	SAC	sucrose		
19.	GLYG	glycogen		
20.	CAT	catalase	H ₂ O ₂ 3% (1 min)	
			氣泡	無氣泡

六、觸酶試驗 (Catalase test)

(一)用穿刺針取菌落中心的細菌至載玻片上塗抹。

(二)加入 1 ~ 2 滴 3 % 之 H_2O_2 。

討 論

張照夫等 (1993) 調查國內實驗動物設施中的小鼠，所分離的細菌種類相當複雜，鑑定的工作十分繁瑣。因此設計完整的流程，以符合不同工作項目及針對動物所關注的病原菌做有效的監控系統，是本所急欲建立的目標。本文中所設計的檢驗流程，乃針對本所動物房中之大、小白鼠所做的健康監控。

Kitch 等 (1992) 報告指出，Rapid NF 為目前唯一商品化鑑定非醱酵菌套組，於 4 小時內完成操作及判讀，實驗中利用 Rapid NF plus system 鑑定已知 345 株非醱酵桿菌，結果 311 (90.1%) 菌株均可準確判讀，效果相當良好，唯本試驗中最值得注意是最初的 24 ~ 72 小時內需具備有純化培養的技術，以避免人為的誤導。

本流程中 Rapid NF 對 *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Acinetobacter* species, *A. xylooxidans* subspecies, *Flavobacterium indologenes*, *F. gleum*, *P. alcaligenes*, 及 *Methylobacterium* spp. 等菌種尚無法鑑定，唯上述均非動物房重要病原菌偵測對象，而且 *Acinetobacter* genus 在分類上亦尚未完全建立及命名。至於進行電腦密碼鑑定系統時，需注意所使用的培養基組材料，品質不良易造成偽陽性或偽陰性反應，因此實驗室需建立標準菌種如 *E. coli* 等，自行進行品管控制，以為比對標準，而具時效性或新配成的生化培養管，均須做標準菌種的品管，以達到鑑定的準確性。

目前全套自動化細菌鑑定系統，已逐漸被國內研究機構接受使用，但由於價格昂貴，並不合乎成本效益，且無論自動化如何方便，以從事微生物學診斷的觀點來看，自動化及傳統式的鑑定法各有其優缺點，然而若不先熟悉傳統式的鑑定操作，冒然的全盤以自動化做為診斷依據，將導致判讀上嚴重的誤差，因此 SPF 動物房的細菌學檢驗，應先建立傳統式的人工鑑定系統及鑑定基本背景知識，再朝向全自動化的鑑定為目標，方能確保檢驗的準確性。

誌謝：本文完成，復蒙中興大學獸醫學系臨床微生物學科徐慶霖老師賜予卓見和指導斧正，謹此致謝。

附錄：農藥毒理 SPF 動物細菌檢驗記錄表格

一、初步培養表格

Record 1 : Primary culture			
Case No :	Data :	Speciman :	
Medium : <input type="checkbox"/> BAP <input type="checkbox"/> EMB <input type="checkbox"/> MacConkey <input type="checkbox"/> XLD <input type="checkbox"/> other			
Test organism	Gram	Growth	Colony Count
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			

二、GFB-12E 生化試驗結果計算電腦密碼數字用表格

Record 2 : GFB-12E Biochemical test												
Date :				Speciman :								
Test organism	TSIA				CIT	URE	SIM			VP	ORN	OXI
	AS	AB	Gas	H ₂ S	CIT	URE	IND	MOT	IPA	VP	ORN	OXI
	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
REMARK :												

