

食品微生物之檢驗方法—霍亂弧菌之檢驗修正總說明

為加強食品微生物之管理，並依據食品衛生管理法第二十五條規定：「食品衛生檢驗之方法，由中央主管機關公告指定之。」爰修正「食品微生物之檢驗方法—霍亂弧菌之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、增加第二部：霍亂弧菌之即時 PCR 檢測。
- 二、刪除霍亂毒素基因聚合酵素鏈反應(Polymerase chain reaction, PCR) 霍亂毒素基因(ctx gene)試驗。
- 三、增加即時 PCR 檢測霍亂弧菌之菌種及毒素基因鑑別。
- 四、增加牡蠣檢體增菌培養條件。
- 五、新增檢驗流程圖。
- 六、增修訂部分文字。

食品微生物之檢驗方法—霍亂弧菌之檢驗修正對照表

修正規定	現行規定	說明
<u>第一部：霍亂弧菌之分離</u> 1. 適用範圍：本方法適用於食品中霍亂弧菌之檢驗。 2. 檢驗方法：<u>檢體經系列稀釋後，經增菌，續以選擇性培養基培養，配合霍亂毒素檢測之方法。</u> 2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度為<u>100 呎燭光以上</u>，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。每 15 分鐘落菌數不得超過 15 CFU/培養皿。 2.2. 器具及材料 2.2.1. <u>生物安全操作櫃 (Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。</u> 2.2.2. 乾熱滅菌器。 2.2.3. 高壓滅菌釜。 2.2.4. 冰箱：維持 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。 2.2.5. <u>冷凍櫃：保持 $-30\pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。</u> 2.2.6. <u>超低溫冷凍櫃：保持 $-70\pm 5^{\circ}\text{C}$ 者。</u> 2.2.7. 培養箱：維持內部溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。 2.2.8. 水浴：能維持水溫溫差 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以內者。 2.2.9. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作者。 2.2.10. <u>離心機：供各式微量離心管離心用。</u> 2.2.11. 顯微鏡：放大至 1000 倍之一般光學顯微鏡。 2.2.12. 天平：可稱量到 2000 g，靈敏度為 0.1 g；可稱量到 120 g 者，靈敏度為	1. 適用範圍：本方法適用於食品中霍亂弧菌之檢驗。 2. 檢驗方法 2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度<u>約為 100 呎燭光</u>，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。每 15 分鐘落菌數不得超過 15 CFU/培養皿。 2.2 器具及材料 2.2.1 乾熱滅菌器。 2.2.2 高壓滅菌釜。 2.2.3 冰箱：能維持 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$。 2.2.4 吸管：已滅菌，1 mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度；5 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 刻度。 2.2.5 培養皿：已滅菌，內徑約 <u>90~100 mm</u>，深度約 15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。 2.2.6 稀釋用容器：<u>附蓋之 1000 mL 廣口瓶及 100 mL 稀釋瓶或無菌袋。</u> 2.2.7 培養箱：能維持內部溫差<u>在</u>$\pm 1.0^{\circ}\text{C}$以內者。 2.2.8 水浴：能維持水溫溫差<u>在</u>$\pm 0.2^{\circ}\text{C}$以內者。 2.2.9 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作者。 2.2.10 曲玻棒。 2.2.11 離心機：<u>離心力可達 $8000 \times g$ 以上。</u>	一、增加第二部：霍亂弧菌之即時 PCR 檢測。 二、刪除霍亂毒素基因聚合酶鏈反應(Polymerase chain reaction, PCR)霍亂毒素基因(ctx gene)試驗。 三、增加即時 PCR 檢測霍亂弧菌之菌種及毒素基因鑑別。 四、增加牡蠣檢體增菌培養條件。 五、新增檢驗流程圖。 六、增修訂部分文字。

5 mg。 2.2.13. <u>精密天平</u>：靈敏度為 0.001 g。 2.2.14. <u>旋渦混合器</u>(Vortex mixer)。 2.2.15. <u>酸鹼度測定儀</u>(pH meter)。 2.2.16. <u>加熱器</u>。 2.2.17. <u>振盪器</u>(Shaker)。 2.2.18. <u>吸管輔助器</u>(Pipette aid)。 2.2.19. <u>吸管</u>(Pipette)：已滅菌，1 mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度；5 mL 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 刻度。 2.2.20. <u>微量吸管</u> (Micropipette)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。 2.2.21. <u>吸管尖</u>(Tip)：已滅菌，10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。 2.2.22. <u>稀釋用容器</u>：無菌袋或有 90 mL、99 mL、500 mL 及 1000 mL 標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶。 2.2.23. <u>培養皿</u>：已滅菌，內徑約 90 mm，深度約 15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。 2.2.24. <u>接種針及接種環</u>(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線材質，或可拋棄式者。 2.2.25. <u>試管</u>：10 $\times$ 100 mm、13 $\times$ 100 mm 試管或其他適用者。 2.2.26. <u>塗抹曲棒</u>：可滅菌者，直徑 3~4 mm，塗抹區域 45~55 mm。 2.2.27. <u>載玻片及蓋玻片</u>：適用於染色及鏡檢用。 2.2.28. <u>燈箱</u>：觀察血清試驗用。	2.2.12. <u>離心管</u>：已滅菌，5 mL。 2.2.13. <u>試管</u>：13 $\times$ 100 mm 及 10 $\times$ 100 mm 試管或其他適用者。 2.2.14. <u>低溫冷凍櫃</u>：能保持 $-70\pm 2^{\circ}\text{C}$。 2.2.15. <u>菌種保存試管</u>。 2.2.16. <u>游標尺</u>(Vernier calipers)。 2.2.17. <u>顯微鏡</u>：能放大至 1000 倍以上之一般光學顯微鏡。 2.2.18. <u>載玻片及蓋玻片</u>：適用於染色及鏡檢用。 2.2.19. <u>接種針及接種環</u>(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線，或可拋棄式者。 2.2.20. <u>天平</u>：可稱量到 2000 g，靈敏度為 0.1 g，可稱量到 120 g 者，靈敏度為 1 mg。 2.2.21. <u>振盪器</u>。 2.2.22. <u>藥勺、剪刀、小刀、鑷子及牙籤</u>：可滅菌者。 2.2.23. <u>pH 測定儀</u>。 2.2.24. <u>燈箱</u>：一般日光燈光源，30 瓦。 2.2.25. <u>酒精燈、濾紙及褐色試藥瓶</u>。 2.2.26. <u>研鉢、杵</u>：研磨試藥用。 2.2.27. <u>吸管尖頭</u>(Pipette tips)：已滅菌，10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。 2.2.28. <u>微量吸管</u>。 2.2.29. <u>無菌濾膜</u>：孔徑 0.45 μm 或 0.2 μm 之親水性醋酸纖維膜。 2.2.30. <u>聚合酵素鏈反應器</u>。 2.2.31. <u>電泳槽</u>：供 DNA 電泳用。 2.2.32. <u>照相裝置</u>：供拍攝電泳膠片用。 2.2.33. <u>紫外燈箱</u>：具波長 312	
--	--	--

2.2.29. 褐色試藥瓶。 2.2.30. 蠟筆：塗寫、劃記載玻片時使用。 2.2.31. 研鉢、杵：研磨試藥用。 2.2.32. 無菌濾膜：孔徑 0.2 μm 或以下之親水性醋酸纖維膜。 2.2.33. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。 2.2.34. 無菌冷凍試管。 2.2.35. 試藥： 氯化鈉、氫氧化鈉、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸二氫鈉($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、無水磷酸氫二鈉($\text{Na}_2\text{HPO}_4$, anhydrous)、檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)、硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、膽酸鈉(sodium cholate)、檸檬酸鈉(sodium citrate $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、檸檬酸鐵(ferric citrate)、硫酸亞鐵(FeSO_4)、草酸銨(ammonium oxalate)、沙黃 O(safranin O)、碘化鉀(KI)、碘、結晶紫(crystal violet)、95%乙醇、O/129(2,4-diamino-6,7-diisopropyl-pteridine)、O/129-PO_4(2,4-diamino-6,7-diisopropyl-pteridine phosphate salt)、四甲基對位苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine $\cdot 2\text{HCl}$)、硝基苯派喃半乳糖(o-nitrophenyl-β-D-galactoside, ONPG)、L-精胺酸鹽酸鹽(L-arginine hydrochloride)、L-離胺酸(L-lysine)、L-鳥胺酸(L-ornithine)、葡萄糖(glucose)、葡萄糖	nm 及 365 nm 紫外燈。 2.2.34 試藥： 氯化鈉、氫氧化鈉、葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露糖(mannose)、甘露糖醇(mannitol)、阿拉伯糖(arabinose)、檸檬酸鐵銨、檸檬酸鐵、磷酸二氫鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸氫二鉀、磷酸二氫鉀、硫代硫酸鈉、溴甲酚紫、氯化鎂、硼酸、碳酸氫鈉、碘化鉀、去氧核苷三磷酸(deoxynucleoside triphosphates, dNTPs)、聚合酵素(polymerase)、溴化乙錠(ethidium bromide)、溴酚藍(bromophenol blue)、二甲苯藍(xylene cyanol FF)、DNA 分子量標記物質(DNA molecular weigh marker)： 100-bp DNA Ladder Marker、乙二銨四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na_2-EDTA)、乙醇、甘油、膽酸鈉、檸檬酸鈉、三羥甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris)、牛膽汁(oxgall)、溴瑞酚藍、瑞香草酚藍、硫酸亞鐵、酚紅、L-精胺酸(L-arginine)、L-離胺酸(L-lysine)、L-鳥胺酸(L-ornithine)、結晶紫、動物膠、草酸銨(ammonium oxalate)、沙黃 O(safranin O)、精胺酸鹽酸鹽(L-arginine hydrochloride)、N,N,N',N'-四甲基對位苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine $\cdot 2\text{HCl}$)、硝基苯派喃半乳糖(o-nitrophenyl-β-D-galactoside, ONPG)、礦物油或液態石臘、O/129	
--	--	--

(dextrose)、蔗糖(sucrose)、乳糖(lactose)、甘露糖(mannose)、甘露糖醇(mannitol)、阿拉伯糖(arabinose)、<u>溴麝香草藍(bromthymol blue)</u>、<u>麝香草藍(thymol blue)</u>、<u>酚紅(phenol red)</u>、<u>溴甲酚紫(bromcresol purple)</u>、<u>液態氮</u>、<u>液態石蠟油</u>、<u>礦物油</u>、<u>甘油</u>及<u>碳酸氫鈉(NaHCO₃)</u>均採用化學試藥級。<u>蛋白胨(peptone)</u>、<u>酵母抽出物(yeast extract)</u>、<u>胰化蛋白胨(tryptone)</u>、<u>牛膽汁(oxgall)</u>、<u>牛肉抽出物(beef extract)</u>、<u>月示蛋白胨(proteose peptone)</u>、<u>植物蛋白胨(phytone peptone)</u>、<u>胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)</u>、<u>胰化酪蛋白(trypticase)</u>、<u>動物膠(gelatin)</u>及<u>洋菜(agar)</u>均採用微生物級。 2.2.36. 試劑 2.2.36.1. 氧化酶試劑 (Oxidase test reagent) 稱取四甲基對位苯二胺鹽酸鹽 1 g，以蒸餾水溶解使成 100 mL，貯存於褐色試藥瓶，置入冰箱，使用期限以不超過 1 週為宜。 2.2.36.2. 30% 氫氧化鈉溶液 稱取氫氧化鈉 30 g，以蒸餾水溶解使成 100 mL。 2.2.36.3. 1.0 M 磷酸二氫鈉溶液 稱取磷酸二氫鈉 6.9 g，溶於蒸餾水 45 mL，徐徐注入 30% 氫氧化鈉溶液約 3 mL，調整 pH 值為 7.0，再加入蒸餾水使成 50 mL，貯存於 4℃ 冰箱中備用。 2.2.36.4. 硝基苯派喃半乳糖試劑(ONPG reagent)	(2,4-diamino-6,7-diisopropyl-pteridine)、<u>瓊膠(agarose)</u>及<u>碘(iodine)</u>等均採用化學級或分子生物分析級試藥。蛋白胨、月示蛋白胨、胰化蛋白胨、胰化酪蛋白胨、酵母抽出物、植物蛋白胨、胰化酪蛋白、洋菜及牛肉抽出物均採用微生物級。 2.2.35. 試劑 2.2.35.1 氧化酶試劑 (Oxidase test reagent) 取 N,N,N',N'-四甲基對位苯二胺鹽酸鹽 1 g 溶於蒸餾水 100 mL 後，貯存於褐色瓶，並置入冰箱中，使用期限以不超過 1 星期為宜。 2.2.35.2 1.0M 磷酸二氫鈉溶液 取磷酸二氫鈉 (NaH₂PO₄ · H₂O) 6.9 g 溶於蒸餾水 45 mL 中，徐徐注入 30%(w/v) 氫氧化鈉溶液約 3 mL，調整 pH 值為 7.0，然後再加入蒸餾水使成 50 mL，即為 1.0M 磷酸二氫鈉溶液，貯存於 4℃ 冰箱中備用。 2.2.35.3 硝基苯派喃半乳糖苷試劑(ONPG reagent) 取硝基苯派喃半乳糖苷 80 mg 溶於 37℃ 蒸餾水 15 mL 中，加入 2.2.33.2 節之 1.0M 磷酸二氫鈉溶液 5 mL，即為 0.0133M 硝基苯派喃半乳糖苷試劑，貯存於 4℃ 冰箱中，使用時須加溫至 37℃。 2.2.35.4 礦物油或液態石蠟 取礦物油或液態石蠟 20~50 mL，裝入有蓋容器中約 1/2 滿，以 121℃ 滅菌 30 分鐘。 2.2.35.5 O/129 紙錠 (O/129 disks) 製備 O/129 濃度 150 µg 紙錠，係將溶解於無菌水的 O/129 (15mg/mL) 或
--	---

稱取硝基苯派喃半乳糖 80 mg，溶於 37℃ 蒸餾水 15 mL，再加入 1.0M 磷酸二氫鈉溶液 5 mL，貯存於 4℃ 冰箱備用，使用時須加溫至 37℃。 2.2.36.5. 液態石臘油或礦物油 取液態石臘油或礦物油 20～50 mL，裝入附蓋玻璃容器中約 1/2 滿，以 121℃ 滅菌 30 分鐘。 2.2.36.6. 1 N 氫氧化鈉溶液 稱取氫氧化鈉 4 g，以蒸餾水溶解使成 100 mL。 2.2.36.7. 50%甘露糖溶液 稱取甘露糖 5 g，以蒸餾水溶解使成 10 mL，以無菌濾膜過濾。 2.2.36.8. 0.85%生理食鹽水 稱取氯化鈉 8.5 g，以蒸餾水溶解使成 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經 121℃ 滅菌 15 分鐘。 2.2.36.9. 10%碳酸氫鈉溶液 稱取碳酸氫鈉 100 g，以蒸餾水溶解使成 1000 mL，以無菌濾膜過濾。 2.2.37. O/129 紙錠 (O/129 disks) 2.2.37.1. O/129 溶液 稱取 O/129 0.15 g (或 O/129-PO₄ 0.208 g)，溶於無菌蒸餾水使成 10 mL，即為 15 mg/mL O/129 溶液。取 15 mg/mL O/129 溶液 1 mL，溶於無菌蒸餾水使成 14 mL，即為 1.0 mg/mL O/129 溶液。 2.2.37.2. O/129 紙錠 吸取 15 mg/mL O/129 溶液 10 μL，加入已滅菌之直徑 5-6 mm 小圓片濾紙，即為 O/129 150 μg 紙錠；吸取 1.0	O/129-PO₄ (20.8 mg/mL) 溶液，取 10 μL 加入已滅菌之紙錠 (直徑約 6 mm)。而 O/129 濃度 10 μg 紙錠，則將溶解於無菌水的 O/129 (1.0 mg/mL) 溶液，取 10 μL 加入已滅菌之紙錠，於無菌陰暗處自然風乾，並貯存於無菌褐色瓶置於冰箱中備用，儲存期限 1 年。 2.2.35.6 革蘭氏染色液 (Gram stain solution) 2.2.35.6.1 哈克氏(Hucker's) 結晶紫液(初染劑) 溶液 A：取結晶紫 2 g 溶於 95%乙醇 20 mL。 溶液 B：取草酸銨 0.8 g 溶於蒸餾水 80 mL。 將溶液 A 與溶液 B 混合，靜置 24 小時後以濾紙過濾，取濾液作為初染劑。 2.2.35.6.2 革蘭氏碘液(媒染劑) 取碘化鉀 2 g 及碘 1 g 置於研鉢中，經研磨 5～10 秒鐘後，加蒸餾水 1 mL 研磨，次加蒸餾水 5 mL 研磨，再加蒸餾水 10 mL，研磨至碘化鉀和碘完全溶於水中，將此溶液注入褐色瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，併入洗液，加蒸餾水至 300 mL，作為媒染劑。 2.2.35.6.3 哈克氏(Hucker's) 複染劑(複染劑) 取沙黃 O 2.5 g 溶於 95%乙醇 100 mL，供作複染原液。使用時，取原液 10 mL 加蒸餾水 90 mL，作為複染劑。 註：革蘭氏染色液因放久可能失效，因此購買成品時，要注意其保存期限，自行配製者應檢查其染色效果。 2.2.35.7. 5 倍	
--	--	--

mg/mL O/129 溶液 10 μ L，加入已滅菌之直徑 5-6 mm 小圓片濾紙，即為 O/129 10 μ g 紙錠。避光、自然風乾，並貯存於無菌褐色瓶置於冰箱中備用，儲存期限 1 年。

2.2.38. 革蘭氏染色液 (Gram stain solution)^(註 1)

2.2.38.1. 哈克氏 (Hucker' s)結晶紫液
 溶液 A：取結晶紫 2 g，溶於 95%乙醇 20 mL。
 溶液 B：取草酸銨 0.8 g，溶於蒸餾水 80 mL。
 將溶液 A 與溶液 B 混合，靜置 24 小時後以濾紙過濾，取濾液供作初染劑。

2.2.38.2. 革蘭氏碘液
 取碘化鉀 2 g 及碘 1 g，置於研鉢中，研磨 5~10 秒，加蒸餾水 1 mL 研磨，次加蒸餾水 5 mL 研磨，再加蒸餾水 10 mL，研磨至碘化鉀和碘完全溶於蒸餾水，將此溶液注入褐色試藥瓶，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵，以此洗液併入，使溶液達 300 mL，供作媒染劑。

2.2.38.3. 哈克氏複染液
 取沙黃 O 2.5 g，溶於 95%乙醇 100 mL，供作複染原液。使用時，取原液 10 mL 加蒸餾水 90 mL，供作複染劑。

註 1：革蘭氏染色液因放久可能失效，購買成品時，需注意其保存期限，自行配製者，應檢查其染色效果。

2.2.39. 抗血清
 霍亂弧菌本體(O)抗血清(O antisera)：O1 及 O139 型抗血清。

2.2.40. 逆相被動乳膠凝集 (Reversed latex

TBE(Tris-borate-EDTA)緩衝溶液

取三羥甲基氨基甲烷 54.0 g、硼酸 27.5 g 及 0.5M pH8.0 EDTA 溶液 20 mL，加水溶解最終體積 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝液。臨用前以水稀釋為 0.5 倍。

2.2.35.8 膠片染液
 取溴化乙錠 0.1 g，加水 10 mL 溶解，供作原液(含溴化乙錠 10 mg/mL)，使用前需以水稀釋成含溴化乙錠 10 μ g/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.2.35.9 6 倍載入膠片緩衝溶液(6 $\times$ gel loading buffer)
 稱取溴酚藍 25.0 g、二甲苯藍 0.25 g 及量取甘油 30 mL，加入無菌水使成 100 mL，置於 4℃ 冰箱儲存備用。

2.2.36 培養基：

2.2.36.1 鹼性蛋白胨水 (Alkaline peptone water, APW)

蛋白胨(peptone)	10.0 g
氯化鈉	10.0 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後分取適量注入試管，以 121℃ 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 8.5 $\pm$ 0.2。

2.2.36.2 鹼性蛋白胨鹽類培養液 (Alkaline peptone salt broth, APS)

蛋白胨(peptone)	10.0 g
氯化鈉	30.0 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，分取適量注入試管中，以 121℃ 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 8.5 $\pm$ 0.2。

2.2.36.3 硫代硫酸鹽-檸檬酸鹽-膽鹽-蔗糖培養基 (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, TCBS)

酵母抽出物(yeast	5.0 g
-------------	-------

agglutination, RPLA)套組
可檢驗霍亂毒素。

2.2.41. 稀釋液

2.2.41.1. 2%或3%氯化鈉溶液：取氯化鈉 20 g 或 30 g，溶於蒸餾水 1000 mL 中，分裝於試管或廣口瓶內，經 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.41.2. 磷酸緩衝食鹽水 (Phosphate buffered saline, PBS)：取氯化鈉 7.7 g、無水磷酸氫二鈉 0.7 g 及磷酸二氫鉀 0.2 g，溶於蒸餾水 1000 mL，以 1N 氫氧化鈉溶液調整 pH 值為 7.4，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.42. 培養基

2.2.42.1. 精胺酸葡萄糖斜面培養基 (Arginine-glucose slant, AGS)

蛋白胨(peptone)	5.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	3.0 g
胰化蛋白胨(tryptone)	10.0 g
氯化鈉	20.0 g
葡萄糖(glucose)	1.0 g
L-精胺酸鹽酸鹽(L-arginine hydrochloride)	5.0 g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	0.5 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.3 g
溴甲酚紫(bromocresol purple)	0.02 g
洋菜(agar)	13.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取適量注入試管，以 121°C 滅菌 10~12 分鐘後作成斜面培養基，最終 pH 值為 6.9±0.1。

extract)	
蛋白胨(peptone)	10.0 g
蔗糖(sucrose)	20.0 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	10.0 g
膽酸鈉(sodium cholate)	3.0 g
檸檬酸鈉(sodium citrate $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	10.0 g
牛膽汁(oxgall)	5.0 g
氯化鈉(NaCl)	10.0 g
檸檬酸鐵(ferric citrate)	1.0 g
溴瑞酚藍(bromthymol blue)	0.04 g
瑞香草酚藍(thymol blue)	0.04 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，再加熱 1~2 分鐘，不可高壓滅菌，冷卻至 50°C 時，注入培養皿。

2.2.36.4 三糖鐵培養基 (Triple sugar iron agar, TSI)

牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	3.0 g
蛋白胨(peptone)	15.0 g
胰蛋白胨(proteose peptone)	5.0 g
氯化鈉(NaCl) 20.0 或 30.0 g	
乳糖(lactose)	10.0 g
蔗糖(sucrose)	10.0 g
葡萄糖(glucose)	1.0 g
硫酸亞鐵(FeSO_4)	0.2 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.3 g
酚紅(phenol red)	0.024 g
洋菜(agar)	12.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分取適量注入試管中至 1/3 滿，以

2.2.42.2. 硫代硫酸鹽 - 檸檬酸鹽 - 膽鹽 - 蔗糖培養基 (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, TCBS)

酵母抽出物(yeast extract)	5.0 g
蛋白胨(peptone)	10.0 g
蔗糖(sucrose)	20.0 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	10.0 g
膽酸鈉(sodium cholate)	3.0 g
檸檬酸鈉(sodium citrate $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	10.0 g
牛膽汁(oxgall)	5.0 g
氯化鈉	10.0 g
檸檬酸鐵(ferric citrate)	1.0 g
溴麝香草藍(bromthymol blue)	0.04 g
麝香草藍(thymol blue)	0.04 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解(不可高壓滅菌)，冷卻至 50°C 時，注入培養皿，放置隔夜或使用前以 $37\sim 45^\circ\text{C}$ 乾燥。

2.2.42.3. 三糖鐵培養基 (Triple sugar iron agar, TSI)

牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	3.0 g
蛋白胨(peptone)	15.0 g
胨蛋白胨(proteose peptone)	5.0 g
氯化鈉	20.0 或 30.0 g
乳糖(lactose)	10.0 g
蔗糖(sucrose)	10.0 g
葡萄糖(glucose)	1.0 g
硫酸亞鐵(FeSO_4)	0.2 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.3 g
酚紅(phenol)	0.024 g

121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4 ± 0.2 ，滅菌後作成斜面培養基。

2.2.36.5 克氏雙糖鐵培養基 (Kligler iron agar, KIA)

胨蛋白胨(proteose peptone)	20.0 g
氯化鈉(NaCl)	20.0 ~ 30.0 g
乳糖(lactose)	20.0 g
葡萄糖(glucose)	1.0 g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	0.5 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.5 g
酚紅(phenol red)	0.025 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分取適量注入試管中至 1/3 滿，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4 ± 0.2 ，滅菌後作成斜面培養基。

2.2.36.6 精胺酸葡萄糖斜面培養基 (Arginine- glucose slant, AGS)

蛋白胨(peptone)	5.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	3.0 g
胰化蛋白胨(tryptone)	10.0 g
氯化鈉(NaCl)	20.0 g
葡萄糖(glucose)	1.0 g
精胺酸鹽酸鹽(L-arginine hydrochloride)	5.0 g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	0.5 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.3 g
溴甲酚紫(bromcresol purple)	0.02 g
洋菜(agar)	13.5 g
蒸餾水	1000 mL

red)		
洋菜(agar)	12.0 g	
蒸餾水	1000 mL	
加熱溶解後，分取適量注入試管至 1/3 滿，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2，滅菌後作成斜面培養基。		
2.2.42.4. 胰化酪蛋白大豆鹽類培養液(Trypticase soy broth, 含 2%或 3%NaCl 之 TSB)		
植物蛋白腴 (phytone peptone)	3.0 g	
胰化酪蛋白腴 (trypticase peptone)	17.0 g	
磷酸氫二鉀 (K ₂ HPO ₄)	2.5 g	
氯化鈉	20.0 或 30.0 g	
葡萄糖(dextrose)	2.5 g	
蒸餾水	1000 mL	
加熱溶解後，分取適量注入試管或三角瓶，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。		
2.2.42.5. 胰化酪蛋白大豆培養基(Trypticase soy agar, 含 2%或 3%NaCl 之 TSA)		
植物蛋白腴 (phytone peptone)	5.0 g	
胰化酪蛋白腴 (trypticase peptone)	15.0 g	
氯化鈉	20.0 或 30.0 g	
洋菜(agar)	15.0 g	
蒸餾水	1000 mL	
加熱溶解後，分取適量注入試管或三角瓶，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。		
2.2.42.6. Hugh-Leifson 葡萄糖培養液(Hugh-Leifson glucose broth, HLGB)		
蛋白腴(peptone)	2.0 g	
酵母抽出物 (yeast extract)	0.5 g	
氯化鈉	30.0 g	
葡萄糖(glucose)	10.0 g	
加熱攪拌溶解，分取適量注入試管中，以 121℃ 滅菌 10～12 分鐘，最終 pH 值為 6.9±0.1，滅菌後作成斜面培養基。		
2.2.36.7 加鹽胰化酪蛋白大豆培養液(Trypticase soy broth, TSB - 2～3%NaCl)		
植物蛋白腴 (phytone peptone)	3.0 g	
胰化酪蛋白腴 (trypticase peptone)	17.0 g	
磷酸氫二鉀 (K ₂ HPO ₄)	2.5 g	
氯化鈉(NaCl)	20.0 或 30.0 g	
葡萄糖(dextrose)	2.5 g	
蒸餾水	1000 mL	
加熱攪拌溶解後，分取適量注入試管或三角瓶中，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。		
2.2.36.8 加鹽胰化酪蛋白大豆培養基(Trypticase soy agar, TSA - 2～3%NaCl)		
植物蛋白腴 (phytone peptone)	5.0 g	
胰化酪蛋白腴 (trypticase peptone)	15.0 g	
氯化鈉(NaCl)	20.0 或 30.0 g	
洋菜(agar)	15.0 g	
蒸餾水	1000 mL	
加熱攪拌溶解後，分取適量注入試管或三角瓶中，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2，做成斜面或平面培養基。		
2.2.36.9. Hugh-Leifson 葡萄糖培養液 (Hugh-Leifson glucose broth, HLGB)		
蛋白腴(peptone)	2.0 g	
酵母抽出物 (yeast extract)	0.5 g	
氯化鈉	30.0 g	
葡萄糖(glucose)	10.0 g	

葡萄糖(glucose)	10.0 g	溴甲酚紫 (bromcresol purple)	2.0 g
溴甲酚紫 (bromcresol purple)	0.015 g	洋菜(agar)	3.0 g
洋菜(agar)	3.0 g	蒸餾水	1000 mL
蒸餾水	1000 mL	加熱攪拌溶解後分裝試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。	
加熱溶解後，分裝試管，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。		2.2.36.10 脫羧酶基礎培養液 (Decarboxylase basal medium)	
2.2.42.7 脫羧酶基礎培養液 (Decarboxylase basal medium)		蛋白胨(peptone)	5.0 g
蛋白胨(peptone)	5.0 g	酵母抽出物(yeast extract)	3.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	3.0 g	氯化鈉(NaCl)	20.0 或 30.0 g
氯化鈉	20.0 或 30.0 g	葡萄糖(glucose)	1.0 g
葡萄糖(glucose)	1.0 g	溴甲酚紫 (bromcresol purple)	0.02 g
溴甲酚紫 (bromcresol purple)	0.02 g	蒸餾水	1000 mL
蒸餾水	1000 mL	加熱攪拌溶解後，取 L-精胺酸 5g 溶解於上述之培養液中，混合均勻，分取適量注入試管內，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 6.5±0.2，使成精胺酸脫羧酶培養液。含 L-離胺酸及 L-鳥胺酸之脫羧酶培養液配製方法亦同。對照組之配製，除脫羧酶基礎培養液外，不需添加任何物質。	
溶解後，取 L-精胺酸 (L-arginine hydrochloride) 5 g 溶解於上述之培養液中，分取適量注入試管內，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 6.5±0.2，配製成脫羧酶培養液。含 L-離胺酸及 L-鳥胺酸之脫羧酶培養液配製方法亦同。對照組除脫羧酶基礎培養液外，不需添加任何物質。		2.2.36.11 氯化鈉胰化酪蛋白培養液 (Salt trypticase broth, STB)	
2.2.42.8 溴甲酚紫培養液 (Bromcresol purple broth)		胰化酪蛋白或胰化蛋白胨 (trypticase or tryptone)	10.0 g
蛋白胨(peptone)	10.0 g	蒸餾水	1000 mL
牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g	加氯化鈉於此培養液內，配成 0%、3%、6% 及 8% 之不同濃度，分取適量注入試管內。以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2±0.2。	
氯化鈉	20.0 或 30.0 g	2.2.36.12 溴甲酚紫培養液 (Bromcresol purple broth)	
溴甲酚紫 (bromcresol purple)	0.04 g	蛋白胨(peptone)	10.0 g
蒸餾水	1000 mL	牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
溶解後，分取 2.5 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 7.0±0.2。冷卻後，各試管分別加入經無菌濾膜過濾之 50% 甘露糖溶液 278 μL，使培養液中甘露糖之			

最終濃度為 5% (w/v)。含乳糖、甘露糖醇、蔗糖及阿拉伯糖之溴甲酚紫培養液配製方法亦同。

2.2.42.9. 動物膠鹽類培養基(Gelatin salt agar, GS)

蛋白胨(peptone)	4.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	1.0 g
動物膠(gelatin)	15.0 g
氯化鈉	30.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解，以 121℃滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2±0.2。

2.2.42.10. 鹼性蛋白胨水(Alkaline peptone water, APW)

蛋白胨(peptone)	10.0 g
氯化鈉	10.0 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後分注入試管，以 121℃滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 8.5±0.2。

2.2.42.11. 鹼性蛋白胨鹽類培養液(Alkaline peptone salt broth, APS)

蛋白胨(peptone)	10.0 g
氯化鈉	30.0 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，分注入試管，以 121℃滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 8.5±0.2。

2.2.42.12. 克氏雙糖鐵培養基(Kligler iron agar, KIA)

胰蛋白胨(proteose peptone)	20.0 g
氯化鈉	20.0 或 30.0 g
乳糖(lactose)	20.0 g
葡萄糖(glucose)	1.0 g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	0.5 g
硫代硫酸鈉	0.5 g

extract)	
氯化鈉(NaCl)	20.0~30.0 g
溴甲酚紫(bromcresol purple)	0.04 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後分取 2.5mL 注入試管內，以 121℃滅菌 10 分鐘，加入無菌濾膜過濾之 50%(w/v)甘露糖溶液(mannose solution) 0.278mL，使醣類之最終濃度為 5%(w/v)，最終 pH 值為 7.0±0.2。含乳糖、甘露糖醇、蔗糖及阿拉伯糖之溴甲酚紫培養液配製方法亦同。

2.2.36.13 加鹽動物膠培養基(Gelatin salt agar, GS)

蛋白胨(peptone)	4.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	1.0 g
動物膠(gelatin)	15.0 g
氯化鈉(NaCl)	30.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解，以 121℃滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2±0.2。

2.2.36.14 AKI 培養液(AKI medium)

蛋白胨(peptone)	15.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	4.0 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g
蒸餾水	970 mL

加熱攪拌溶解，以 121℃滅菌 15 分鐘，待冷卻後加入經無菌過濾之 10%碳酸氫鈉 30mL，最終 pH 值為 7.4±0.2。

2.2.37 抗血清

2.2.37.1 霍亂弧菌本體(O)抗血清(O antisera): O1 及 O139 型抗血清。

2.2.38 逆相被動乳膠凝集(Reversed latex agglutination, RPLA)套組：可檢驗霍亂弧

(Na ₂ S ₂ O ₃)		菌之腸毒素。
酚紅(phenol red)	0.025 g	2.2.39 稀釋液
洋菜(agar)	15.0 g	2.2.39.1 2%或 3%氯化鈉溶液：取氯化鈉 20 g 或 30 g 溶於蒸餾水 1000 mL 中，分裝於試管或廣口瓶內，經 121℃ 滅菌 15 分鐘， <u>使成含 2%或 3%之氯化鈉溶液。</u>
蒸餾水	1000 mL	2.2.39.2 磷酸鹽緩衝溶液 (Phosphate buffered saline, PBS)：取氯化鈉 7.650 g，無水磷酸氫二鈉 0.724 g，磷酸二氫鉀 0.210 g 溶於蒸餾水 1000 mL 中，以 1N 氫氧化鈉溶液調 pH 值為 7.4，以 121℃ 滅菌 15 分鐘， <u>作為磷酸鹽緩衝稀釋液。</u>
溶解後，分取適量注入試管至 1/3 滿，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。		2.3 檢液之調製
2.2.42.13. AKI 培養液 (AKI medium)		2.3.1 檢體之處理： <u>檢體為魚類時</u> ，取樣包括表面組織、內臟及鰓。 <u>檢體為貝類時</u> ，取 10 至 12 個貝類將內部組織均質化。 <u>檢體為甲殼類時</u> ，包括整個動物體，可能時包括動物體中間部分如鰓及內臟組織。
蛋白胨(peptone)	15.0 g	2.3.2 檢液之調製：稱取檢體 50g 於攪拌均質器內，加入稀釋液 450 mL，高速攪拌 2 分鐘，作成 10 倍稀釋檢液。
酵母抽出物(yeast extract)	4.0 g	2.3.3 檢液之處理： <u>分別使用滅菌之吸管</u> ，吸取 2.3.2 節之 10 倍稀釋檢液 10 mL 加入稀釋液 90 mL 中，依序作成一系列適當之 100 倍、1000 倍、10000 倍等稀釋檢液。
氯化鈉	5.0 g	2.4 鑑別試驗
蒸餾水	970 mL	2.4.1 增菌培養：將 2.3 節之稀釋檢液及(或)原液充分搖勻後，再分別吸取三連續倍數之稀釋檢液各 1 mL 接種於 APW 或 APS 培養液 10 mL 中，每稀釋檢液各接種 2 支，並於 35~37℃，培養 6
加熱溶解，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，待冷卻後加入經無菌過濾之 10%碳酸氫鈉溶液 30 mL，最終 pH 值為 7.4±0.2。		
2.2.42.14. 氯化鈉胰化酪蛋白培養液(Salt trypticase broth, STB)		
胰化酪蛋白或胰化蛋白胨 (trypticase or tryptone)	10.0 g	
蒸餾水	1000 mL	
加氯化鈉於此培養液內，配成含 0、3、6 及 8%之不同濃度，分取適量注入試管內。以 121℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2±0.2。		
2.3. 檢液		
2.3.1. 檢體之處理：魚類檢體之取樣包括表面組織、內臟及鰓。貝類檢體，取 10 至 12 個貝類之內部組織均質之。甲殼類檢體之取樣包括整個動物體，可能時包括動物體中間部分如鰓及內臟組織。		
2.3.2. 檢液之調製：稱取檢體 50 g 於攪拌均質器內，加		

入稀釋液 450 mL，高速攪拌 2 分鐘，作成 10 倍稀釋檢液。 2.3.3. <u>系列稀釋檢液</u>：使用已滅菌之吸管，吸取 2.3.2. 節之 10 倍稀釋檢液 10 mL，加至稀釋液 90 mL 中，依序作成一系列適當之 100、1000、10000 倍等稀釋檢液。 2.3.4. <u>塗抹物檢體</u>：將塗抹棒之頭部置於已滅菌試管內，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄，添加 APW 5 mL 後，將試管蓋旋緊，於 10 秒內來回叩擊手心使其劇烈振盪(振盪幅度需達 15 公分) 50 次，或以旋渦混合器充分震盪至塗抹物頭部之棉絮鬆開，其溶出液供作檢液。 2.4. <u>鑑別試驗</u> 2.4.1. <u>增菌培養</u>^(註 2)：將 2.3. 節之稀釋檢液及(或)原液充分搖勻後，分別吸取三連續倍數之稀釋檢液各 1 mL，接種於 APW 或 APS 培養液 10 mL 中，每稀釋檢液各接種 2 支，於 35±2℃ 培養 6～15 小時。 註 2: <u>牡蠣檢體</u>，需再稱取檢體 25 g，置於攪拌均質器內，加入 APW 培養液 2475 mL，高速攪拌 2 分鐘。於 42±0.2℃ 水浴隔夜培養。 2.4.2. <u>分離培養</u>：由 2.4.1. 節之 APW 或 APS 培養液面起深 1 cm 處，分取一接種環(直徑約 3 mm)量菌液，劃線接種在 TCBS 培養基表	～15 小時。 2.4.2 <u>分離培養</u>：由 2.4.1 節之 APW 或 APS 培養液面起深 1 cm 處，分取一接種環量菌液劃線接種在 TCBS 培養基表面，於 35～37℃ 培養 18～24 小時後，觀察菌落之型態。可疑霍亂弧菌者，其菌落較大(直徑約 2～3 mm)、平滑、呈黃色、略平、中央不透明外緣透明。鈎取至少 3 個可疑菌落，接種於 TSA-2～3% NaCl 培養基，於 35～37℃ 培養 18～24 小時，再另行接種於 TSB-2～3%NaCl 培養液，於 35～37℃ 培養 18～24 小時，以備進行生化試驗。 2.4.3 <u>生化試驗</u> 2.4.3.1 <u>初步試驗</u> 2.4.3.1.1 <u>三糖鐵培養基(TSI)試驗</u> 自 TCBS 或 TSA-2～3%NaCl 培養基上鈎菌，以斜面劃線及穿刺法接種於 TSI 培養基，在 35～37℃ 培養 18～24 小時，觀察培養基變化情形，可疑霍亂弧菌者，其斜面應呈黃色(酸性)少數呈紅色(鹼性)，底部亦呈黃色(酸性)。 2.4.3.1.2 <u>克氏雙糖鐵培養基(KIA)試驗</u> 自 TCBS 或 TSA-2～3%NaCl 培養基上鈎菌，以斜面劃線及穿刺法接種於 KIA 培養基，在 35～37℃ 培養 18～24 小時，觀察培養基變化情形，可疑霍亂弧菌者，其斜面應呈紅色(鹼性)，底部呈黃色(酸性)。 2.4.3.1.3 <u>革蘭氏染色(Gram stain)</u> (1)取 TSA-2～3%NaCl 培養	
---	---	--

面，於 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養，觀察菌落之型態。可疑霍亂弧菌者，其菌落較大(直徑約 2~3 mm)、平滑、呈黃色、略平、中央不透明外緣透明。鈎取至少 3 個可疑菌落，接種於含 2%或 3%NaCl 之 TSA 培養基，於 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養，再另行接種於含 2%或 3%NaCl 之 TSB 培養液，於 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養，以備進行生化特性試驗。

2.4.3. 生化試驗

2.4.3.1. 初步試驗

2.4.3.1.1. 精胺酸葡萄糖斜面培養基(AGS)試驗

由含 2%或 3%NaCl 之 TSA 培養基上鈎菌，以斜面劃線及穿刺法接種於 AGS 斜面培養基，於 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養，霍亂弧菌典型反應呈現鹼性(紫色)斜面和微酸性(淡黃色)底部。

2.4.3.1.2. 三糖鐵培養基(TSI)試驗

自 TCBS 培養基或含 2%或 3%NaCl 之 TSA 培養基上鈎菌，以斜面劃線及穿刺法接種於 TSI 培養基，於 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養，觀察培養基變化情形，若為可疑霍亂弧菌者，其斜面應呈黃色(酸性)少數呈紅色(鹼性)，底部亦呈黃色(酸性)。

2.4.3.1.3. 革蘭氏染色(Gram stain)

(1)加適量無菌 0.85%生理食鹽水於載玻片上，以接種

基 16~24 小時培養之菌株，於載玻片上製成薄抹片，風乾或微熱固定。

(2)初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染 1 分鐘，水洗，水洗應不超過 5 秒鐘。

(3)媒染：加革蘭氏碘液作用 1 分鐘，水洗。

(4)脫色：用 95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再以自來水沖洗，此步驟需時甚短，僅數秒即可，惟視抹片之厚薄而定。

(5)複染：用哈克氏複染液複染 30 秒鐘，水洗。

(6)自然風乾。

(7)鏡檢：呈現深紫色者為革蘭氏陽性菌，呈現淡紅色者為革蘭氏陰性菌。霍亂弧菌為革蘭氏陰性，菌體呈彎曲或直短棒狀，不產芽胞。

2.4.3.1.4 加鹽動物膠培養基(GS)試驗

自 TCBS 或 TSA-2~3%NaCl 培養基上鈎菌接種於 GS 培養基，於 $35\sim 37^{\circ}\text{C}$ 培養 12~24 小時，霍亂弧菌可在 GS 上生長，菌落周圍會出現不透明環。

2.4.3.1.5 細胞色素氧化酶試驗(Cytochrome oxidase test)

自 GS 培養基或 TSA-2~3%NaCl 培養基 24 小時培養之新鮮菌落進行氧化酶試驗。滴加氧化酶試劑於菌落上，氧化酶陽性之菌落呈現粉紅色，並逐漸成深紫色；或以接種環或無菌牙籤，刮取少量細菌(避免使用鎳鉻製品)，置於含有氧化酶試劑濕潤濾紙上，正反應會慢慢有深紫色出現(10 秒鐘內)，否則為負反應，霍亂弧菌應

針(或環)自 <u>2.4.2.節之含 2% 或 3%NaCl 之 TSA 培養基上</u> 鈎取適當菌株，<u>均勻塗抹成薄抹片</u>，<u>風乾後迅速通過火焰 3~4 次微熱固定</u>，<u>勿直接火烤</u>。 (2)初染：將已固定之抹片，用<u>哈克氏結晶紫液</u>染 1 分鐘，水洗。 (3)媒染：加<u>革蘭氏碘液</u>作用 1 分鐘，水洗。 (4)脫色：用 95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再以水沖洗，此步驟僅<u>約 30 秒</u>，惟視抹片之厚薄而定。 (5)複染：用<u>哈克氏複染液</u>複染 30 秒鐘，水洗。 (6)風乾。 (7)鏡檢：呈現深紫色者為革蘭氏陽性菌，呈現淡紅色者為革蘭氏陰性菌。霍亂弧菌為革蘭氏陰性，菌體呈彎曲或直短棒狀，不產芽胞。 2.4.3.1.4. <u>動物膠培養基(GS)試驗</u> 自 <u>TCBS 培養基或含 2%或 3%NaCl 之 TSA 培養基</u>上鈎菌接種於 GS 培養基，於 <u>35±2℃</u> 培養 12~24 小時，霍亂弧菌可在 GS 上生長，菌落周圍會出現不透明環。 2.4.3.1.5. <u>細胞色素氧化酶試驗(Cytochrome oxidase test)</u> 自 <u>含 2%或 3%NaCl 之 TSA 培養基</u>上刮取少量細菌(避免使用鎳鉻製品)，置於含有氧化酶試劑濕潤濾紙上，正反應會慢慢有深紫色出現	為正反應。 2.4.3.1.6 <u>O/129 敏感性試驗(O/129 sensitivity test)</u> <u>可使用含 O/129 10 µg 和 150 µg 之紙錠</u>置於已接種菌之 <u>TSA-2~3%NaCl 培養基</u>上，或將菌接種在已含有 O/129 10 µg/mL 和 150 µg/mL 之 <u>TSA-2~3%NaCl 培養基</u>上。經 <u>35~37℃</u> 培養 <u>18~24 小時</u>後，霍亂弧菌應對含 O/129 10 µg 及 150 µg 者均具抑制作用之敏感性。 2.4.3.1.7 <u>精胺酸葡萄糖斜面培養基(AGS)試驗</u> 由 <u>TSA-2~3%NaCl 培養基</u>上鈎菌接種 AGS 斜面培養基，於 <u>35~37℃</u> 培養 <u>18~24 小時</u>，霍亂弧菌典型反應呈現鹼性(紫色)斜面和微酸性(淡黃色)底部。 2.4.3.2. <u>確認試驗</u> 2.4.3.2.1 <u>葡萄糖氧化與發酵試驗(Glucose oxidation-fermentation test)</u> 自 <u>TSA-2~3%NaCl 斜面培養基</u>上鈎菌接種於二支 HLGB 培養液，其中一支注入已滅菌之液態石蠟或礦物油至高約 1~2cm，在 35±2℃ 培養二天後，觀察其反應情形，HLGB 培養液顏色呈黃色者為正反應，紫色為負反應，霍亂弧菌應為正反應。 2.4.3.2.2 <u>精胺酸二水解酶試驗(Arginine dihydrolase test)</u> 自 <u>TSA-2~3%NaCl 斜面培養基</u>上鈎菌分別接種於精胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養液中，接種後分別注入已滅菌之液態石蠟或礦物油覆蓋表面高約 1~2cm，需鬆蓋，於 <u>35~37℃</u> 培養，每 24 小時觀察一次<u>最多觀察 4 天</u>。精胺酸脫羧酶培養液呈	
--	--	--

(10 秒鐘內)，否則為負反應，霍亂弧菌為正反應。

2.4.3.1.6. O/129 敏感性試驗 (O/129 sensitivity test)

將含 O/129 10 µg 和 150 µg 之濾紙圓片置於已接種菌之含 2%或 3%NaCl 之 TSA培養基，或將菌接種在已含有 O/129 10 µg/mL 和 150 µg/mL 之含 2%或 3%NaCl 之 TSA培養基。經 35±2℃ 隔夜培養，霍亂弧菌應對含 O/129 10 µg 及 150 µg 者均具抑制作用之敏感性。

2.4.3.1.7. 克氏雙糖鐵培養基(KIA)試驗

自 TCBS 培養基或含 2%或 3%NaCl 之 TSA培養基上鈎菌，以斜面劃線及穿刺法接種於 KIA 培養基，於 35±2℃ 隔夜培養，觀察培養基變化情形，若為可疑霍亂弧菌者，其斜面應呈紅色(鹼性)，底部呈黃色(酸性)。

2.4.3.2. 確認試驗

2.4.3.2.1. 葡萄糖氧化與發酵試驗(Glucose oxidation-fermentation test)

自含 2%或 3%NaCl 之 TSA斜面培養基上鈎菌，接種於二支 HLGB 培養液，其中一支注入已滅菌之液態石蠟或礦物油至高約 1~2 cm，於 35±2℃ 培養二天後，觀察其反應情形，HLGB 培養液顏色呈黃色者為正反應，紫色為負反應，霍亂弧菌為正反應。

紫色，且脫羧酶基礎培養液呈黃色者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌應為負反應。

2.4.3.2.3 離胺酸脫羧酶試驗 (Lysine decarboxylase test)

自 TSA-2~3%NaCl 斜面培養基上鈎菌分別接種於離胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養液中，接種後分別注入已滅菌之液態石蠟或礦物油覆蓋表面高約 1~2 cm，需鬆蓋，於 35~37℃ 培養，每 24 小時觀察一次最多觀察 4 天。離胺酸脫羧酶培養液呈紫色且脫羧酶基礎培養液呈黃色者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌應為正反應。

2.4.3.2.4 鳥胺酸脫羧酶試驗 (Ornithine decarboxylase test)

自 TSA-2~3%NaCl 斜面培養基上鈎菌分別接種於鳥胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養液中，接種後分別注入已滅菌之液態石蠟或礦物油覆蓋表面高約 1~2 cm，需鬆蓋，於 35~37℃ 培養，每 24 小時觀察一次最多觀察 4 天。鳥胺酸脫羧酶培養液呈紫色，且脫羧酶基礎培養液呈黃色者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌應為正反應。

2.4.3.2.5 嗜鹽性試驗 (Halophilism test)

自 TSB-2~3%NaCl 培養液上鈎菌分別接種於含 0、3、6 及 8%氯化鈉之 STB 培養液中，於 35~37℃ 培養 18~24 小時後，觀察之。霍亂弧菌可在 0%及 3%氯化鈉生長良好，但在 6 及 8%NaCl 生長極緩慢或不能生長。

2.4.3.2.6.42℃ 生長試驗

2.4.3.2.2. 精胺酸二水解酶試驗(Arginine dihydrolase test) <u>自含 2%或 3%NaCl 之 TSA 斜面培養基上鈎菌</u>，分別接種於精胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養液中，接種後分別注入已滅菌之液態石蠟或礦物油，覆蓋表面高約 1~2 cm，需鬆蓋，於 35±2℃培養 4 天，每 24 小時觀察一次。精胺酸脫羧酶培養液呈紫色，且脫羧酶基礎培養液呈黃色者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌為負反應。 2.4.3.2.3. 離胺酸脫羧酶試驗(Lysine decarboxylase test) <u>自含 2%或 3%NaCl 之 TSA 斜面培養基上鈎菌</u>，分別接種於離胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養液中，接種後注入已滅菌之液態石蠟或礦物油，覆蓋表面高約 1~2 cm，需鬆蓋，於 35±2℃培養 4 天，每 24 小時觀察一次。離胺酸脫羧酶培養液呈紫色且脫羧酶基礎培養液呈黃色者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌為正反應。 2.4.3.2.4. 鳥胺酸脫羧酶試驗(Ornithine decarboxylase test) <u>自含 2%或 3%NaCl 之 TSA 斜面培養基上鈎菌</u>，分別接種於鳥胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養液中，接種後注入已滅菌之液態石蠟或礦物油，覆蓋表面高約	(Growth test, 42℃) 由培養 24 小時之 <u>TSB-2~3%NaCl</u> 中鈎菌接種於 <u>TSB-2%NaCl</u> 培養液後，於 42℃水浴中培養 24 小時。培養液呈混濁狀者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌應為正反應。 2.4.3.2.7 發酵試驗 (Fermentation test)： 自 <u>TSA-2~3%NaCl</u> 斜面培養基上鈎菌，接種於含各種糖類之溴甲酚紫培養液中，注入已滅菌之液態石蠟或礦物油覆蓋表面高約 1~2 cm，於 35~37℃培養，每 24 小時觀察一次<u>最多觀察 5 天</u>。顏色由紫色轉變為黃色，為正反應，否則為負反應。霍亂弧菌對甘露糖醇、甘露糖及蔗糖應為正反應，對阿拉伯糖及乳糖應為負反應。 2.4.3.2.8 硝基苯派喃半乳糖苷試驗(ONPG test)： 自 2.4.3.1.1 節之可疑霍亂弧菌之 TSI 斜面培養基(或其他含乳糖的培養基)上鈎菌，置於含有已滅菌之 0.85%生理食鹽水 0.2 mL 之試管中，作成濃懸浮液後，再加入一片浸過硝基苯派喃半乳糖苷試劑之紙錠，並輕輕搖動後，於 35~37℃培養 6~24 小時，紙錠變成黃色者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌應為正反應。 2.4.4 血清學試驗 (Serological test) 2.4.4.1 細菌本體抗原抗血清凝集試驗 [Agglutination test of antigen with somatic (O) antisera test]： <u>將菌接種在 TSA-2 ~ 3%NaCl 培養基</u>，於 35~	
---	---	--

1~2 cm，需鬆蓋，於 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培養 4 天，每 24 小時觀察一次。鳥胺酸脫羧酶培養液呈紫色，且脫羧酶基礎培養液呈黃色者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌為正反應。

2.4.3.2.5. 嗜鹽性試驗 (Halophilism test)

自含 2%或 3%NaCl 之 TSB 培養液上鈎菌，分別接種於含 0、3、6 及 8%氯化鈉之 STB 培養液中，於 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養觀察。霍亂弧菌可在 0%及 3%氯化鈉生長良好，但在 6 及 8%氯化鈉生長極緩慢或不能生長。

2.4.3.2.6. 42°C 生長試驗 (Growth test, 42°C)

由培養 24 小時之含 2%或 3%NaCl 之 TSB 中鈎菌接種於含 2%NaCl 之 TSB 培養液後，於 42°C 水浴中培養 24 小時。培養液呈混濁狀者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌為正反應。

2.4.3.2.7. 發酵試驗 (Fermentation test)：

自含 2%或 3%NaCl 之 TSA 斜面培養基上鈎菌，接種於含各種糖類之溴甲酚紫培養液中，注入已滅菌之液態石蠟或礦物油，覆蓋表面高約 1~2 cm，於 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培養 4~5 天，每 24 小時觀察一次，顏色由紫色轉變為黃色為正反應，否則為負反應。霍亂弧菌對甘露糖醇、甘露

37°C 培養 18~24 小時。用蠟筆在載玻片上劃成數個適當格位，於格位上方滴入各種體抗原抗血清 1 滴，鈎取一接種環菌量，於有抗血清之格位上來回塗抹 1 分鐘。於另一格位滴入一滴 2~3%氯化鈉溶液作對照組，反覆傾斜混合 1 分鐘。正反應者應呈凝集現象，對照組則無；負反應者，則兩組均無凝集現象。

2.4.5 腸毒性測試

(Determination of enterotoxigenicity)

2.4.5.1 霍亂毒素 (Cholera toxin, CT) 試驗

可採用市售之逆相被動乳膠凝集 (reversed latex agglutination, RPLA) 套組進行霍亂毒素檢驗。自 TSA-2~3%NaCl 培養基上鈎菌，接種於 AKI 培養液 10 mL 中，於 $35\sim 37^{\circ}\text{C}$ 培養 16~20 小時，取培養液 5~7 mL 以 $8000\times g$ 離心 10 分鐘。取上清液通過 $0.2\ \mu\text{m}$ 之無菌濾膜，收集濾液備用。以逆相被動乳膠凝集套組檢驗濾液是否含有霍亂弧菌腸毒素，操作方法依照各商品說明書。

2.4.5.2 霍亂毒素基因 (ctx gene) 試驗

2.4.5.2.1 霍亂毒素基因聚合酶鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 引子，序列如下：

Forward 5'-TGA AAT AAA GCA GTC AGG TG-3'

Reverse 5'-GGT ATT CTG CAC ACA AAT CAG-3'

PCR 增幅產物大小 777 bp

2.4.5.2.2. DNA 模板處理

自 TSA-2~3%NaCl 培養基

糖及蔗糖應為正反應，對阿拉伯糖及乳糖為負反應。 2.4.3.2.8. 硝基苯派喃半乳糖苷試驗(ONPG test)： 自 2.4.3.1.2.節之可疑霍亂弧菌之 TSI 斜面培養基(或其他含乳糖的培養基)上鉤菌至含有已滅菌之 0.85%生理食鹽水 0.2 mL 之試管中，作成濃懸浮液後，再加入一片浸過硝基苯派喃半乳糖苷試劑之小圓片濾紙，輕輕搖動後，於 35±2℃ 培養 6~24 小時，小圓片濾紙變成黃色者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌為正反應。 2.4.4. 血清學試驗 (Serological test) 細菌本體抗原抗血清凝集試驗 [Agglutination test of antigen with somatic (O) antisera test]： 取約 3~5 倍火柴棒頭之菌量，以 3%氯化鈉溶液 0.5 mL 懸浮菌體，取菌液備用。用蠟筆在載玻片上劃成數個適當格位，置入少量菌液到每一個格位的下方位置，再於格位之上方各滴入 1 滴各種體抗原抗血清，於另一格位滴入一滴 2%或 3%氯化鈉溶液作對照組，反覆傾斜 1 分鐘，使充分混合均勻。正反應者應呈凝集現象，對照組則無；負反應者，則兩組均無凝集現象。 2.4.5. 霍亂毒素(Cholera	上鉤取一接種環的菌量置入含無菌水 150 µL 之 1.5 mL 無菌試管中，混合均勻。置入水浴槽煮沸 15 分鐘，以 8000 × g 離心 10 分鐘，吸取上清液至另一新的 1.5 mL 無菌試管，於 -20℃ 保存備用。 2.4.5.2.3 聚合酵素鏈反應 取 DNA 模板 10 µL，加入 10 倍 PCR 緩衝溶液(含 1.5mM MgCl₂) 2.5 µL、聚合酵素(2 U/µL) 1.0 µL、dNTP (2.5 mM) 4.0 µL、Forward 引子 (10 µM) 1.0 µL、Reverse 引子 (10 µM) 1.0 µL、無菌純水 30.5 µL，最終體積為 50 µL。聚合酵素鏈反應使用聚合酵素鏈反應器，溫度循環條件為 94℃，5 分鐘；94℃/1 分鐘，55℃/1 分鐘，72℃/1 分鐘共計 35 個循環；72℃，7 分鐘。 2.4.5.2.4 膠片電泳分析 取 PCR 增幅產物 10 µL 與 6 倍載入膠片緩衝溶液 1 µL 混合均勻注入 2%膠片孔中，以 50 或 100 伏特電壓進行電泳。同時必須取 DNA 分子量標記物質進行電泳，作為 PCR 增幅產物大小之判別與計算依據。經電泳後之膠片置入溴化乙錠染液中進行染色約 15 分鐘，續置入水中漂洗及退染，再置於紫外燈箱上，以波長 365 nm 之紫外光照射觀察是否有明顯之 DNA 螢光帶，進行照相並判讀結果。 2.5 以上試驗可參考使用國際間認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，惟檢驗結果有爭議時，應以傳統方法為準。 2.6 判定：霍亂弧菌陽性
---	---

toxin, CT)試驗^(註3)

可採用市售之逆相被動乳膠凝集 (reversed latex agglutination, RPLA)套組進行霍亂毒素檢驗。自含 2% 或 3%NaCl 之 TSA 培養基上鈎菌，接種於 AKI 培養液 10 mL 中，於 35~37℃ 培養 16~20 小時，取培養液 5~7 mL 以 8000 × g 離心 10 分鐘。取上清液通過 0.2 μm 之無菌濾膜，收集濾液備用。以逆相被動乳膠凝集套組檢驗濾液是否含有霍亂毒素，操作方法依照各商品說明書。

註 3: 霍亂毒素基因即時聚合酶鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)霍亂毒素基因(ctx gene)試驗依照本檢驗方法第二部：霍亂弧菌之即時 PCR 檢測。

2.5. 菌種保存

將菌株以穿刺法接種於長期保存培養基或 MTM 培養基，於 35±2℃ 培養 24 小時，旋緊蓋子或注入已滅菌之液態石蠟或礦物油，以避免水分散失，在初次生長後，置於室溫，不必冷藏。若要長期保存，則取經含 2%或 3%NaCl 之 TSB 培養液培養 6~12 小時之菌液 1 mL，加入無菌甘油 0.1 mL 至無菌冷凍試管，以液態氮冷凍或立刻置入-70℃ 冷凍櫃保存。

者，應符合下表所列之結果

試驗或基質		正反應	負反應	霍亂弧菌的反應 ^a
三糖鐵培養基試驗	斜面	黃色	紅色	+
	底部	黃色	紅色	+
克氏雙糖鐵瓊脂培養基試驗	斜面	黃色	紅色	-
	底部	黃色	紅色	+
革蘭氏染色		陽性(深紫色)	陰性(淡紅色)	-
42℃ 培養生長試驗		混濁	澄清	+
硝基苯派喃半乳糖苷試驗		黃色	原色	+
葡萄糖氧化與發酵試驗		黃色	紫色	+
細胞色素氧化酶試驗		深紫色	非深紫色	+
精胺酸二水解酶試驗		紫色	黃色	-
離胺酸脫羧酶試驗		紫色	黃色	+
鳥胺酸脫羧酶試驗		紫色	黃色	+
嗜鹽性試驗	0%及 3%氯化鈉	可生長	不生長或生長極緩慢	+
	6%及 8%氯化鈉	可生長	不生長或生長極緩慢	-
加鹽動物膠培養基試驗		生長	不生長	+
精胺酸葡萄糖斜面試驗	斜面	黃色	紫色	-
	底部	黃色	紫色	+
發酵試驗	蔗糖	黃色	紫色	+
	乳糖	黃色	紫色	-
	甘露糖	黃色	紫色	+
	阿拉伯糖	黃色	紫色	-
	甘露糖醇	黃色	紫色	+
O/129 敏感性試驗	10 μg	生長	不生長	S ^b
	150 μg	生長	不生長	S ^b
細菌本體抗原抗血清凝集試驗		凝集	無凝集	A/nA ^c

a: 「+」表示 80%以上菌株為正反應，「-」表示 80%以上菌株為負反應。

b: 「S」表示具抑制作用，不生長之敏感性。

c: 「A」表示與細菌本體抗原抗血清(O1 型或 O139 型)凝集，「nA」表示無法與細菌本體抗原抗血清(O1 型及 O139 型)凝集。

2.6_ 判定：霍亂弧菌陽性者，應符合下表所列之結果

試驗或基質		正反應	負反應	霍亂弧菌的反應 ^a
三糖鐵培養基試驗	斜面	黃色	紅色	+
	底部	黃色	紅色	+
克氏雙糖	斜面	黃色	紅色	-
鐵瓊脂培養基試驗	斜面	黃色	紅色	+
	底部	黃色	紅色	+
革蘭氏染色		陽性(深紫色)	陰性(淡紅色)	-
42℃ 培養生長試驗		混濁	澄清	+
硝基苯派喃半乳糖苷試驗		黃色	原色	+
葡萄糖氧化與發酵試驗		黃色	紫色	+
細胞色素氧化酶試驗		深紫色	非深紫色	+
精胺酸二水解酶試驗		紫色	黃色	-
離胺酸脫羧酶試驗		紫色	黃色	+
鳥胺酸脫羧酶試驗		紫色	黃色	+
嗜鹽性試驗	0%及 3%氯化鈉	可生長	不生長或生長極緩慢	+
	6%及 8%氯化鈉	可生長	不生長或生長極緩慢	-
加鹽動物膠培養基試驗		生長	不生長	+
精胺酸葡萄糖斜面培養基試驗	斜面	黃色	紫色	-
	底部	黃色	紫色	+
發酵試驗	蔗糖	黃色	紫色	+
	乳糖	黃色	紫色	-
	甘露糖	黃色	紫色	+
	阿拉伯糖	黃色	紫色	-
	甘露糖醇	黃色	紫色	+
O/129 敏感性試驗	10 μ g	生長	不生長	S ^b
	150 μ g	生長	不生長	S ^b
細菌本體抗原抗血清凝集試驗		凝集	無凝集	A/nA ^c

a: 「+」表示 80%以上菌株為正反應，「-」表示 80%以上菌株為負反應。

b: 「S」表示具抑制作用，不生長之敏感性。

c: 「A」表示與細菌本體抗原抗血清(O1 型或 O139 型)凝集，「nA」表示無法與細菌本體抗原抗血清(O1 型及 O139

型)凝集。 2.7. 以上試驗可參考使用國際間認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，惟檢驗結果有爭議時，應以<u>本檢驗方法</u>為準。 <u>第二部：霍亂弧菌之 real-time PCR 檢測</u> 1. <u>適用範圍</u>：本方法適用於霍亂弧菌之菌種及毒素基因鑑別。 2. <u>檢驗方法</u>：檢體之增菌液或經分離純化後之菌株，經 DNA 萃取 3 後，以即時聚合酶鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 鑑別菌種及毒素基因之方法。 2.1. <u>工作環境</u>：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體 DNA 抽取、real-time PCR 試劑配製及 real-time PCR 等檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。Real-time PCR 試劑之配製應於生物安全操作櫃內進行。 2.2. <u>裝置</u>^(註 1) 2.2.1. <u>即時聚合酶鏈反應器</u>：Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System，或同級品。 2.2.2. <u>高壓滅菌釜</u>。 2.2.3. <u>生物安全操作櫃</u> (Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II) (含)以上者。 2.2.4. <u>加熱振盪器</u>：具溫控		
--	--	--

及振盪功能。

2.2.5. 微量冷凍離心機

(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4°C 溫控功能。

2.2.6. 離心機：供各式微量離心管離心用。

2.2.7. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。

2.2.8. 冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。

2.2.9. 旋渦混合器 (Vortex mixer)。

2.2.10. 酸鹼度測定儀 (pH meter)。

2.2.11. 水浴裝置：溫差±1°C 以內者。

2.2.12. 天平：最大稱重量為 2000 g，靈敏度為 0.1 g；最大稱重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。

註 1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或未提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。

2.3. 試藥

2.3.1. DNA 抽取用：適用於革蘭氏陰性細菌 DNA 抽取之市售套組。

2.3.2. Real-time PCR 鑑別試驗用引子及探針^(註 2)

2.3.2.1. 霍亂弧菌菌種鑑別基因(標的基因：*ompW*)

引子 F：5'-

CACCAAGAAGGTGACTT

TATTGTG -3'

引子 R：5'- <u>GAACTTATAACCCACCCG</u> <u>CG-3'</u> 探針 P： 5'-(FAM)-TACTGACAACA <u>TCAGTTTTGAAGTCCTC</u> <u>GCTCGT-(BHQ1)-3'</u> PCR 增幅產物大小 588 bp 2.3.2.2. 霍亂弧菌毒素基因 (標的基因：<i>ctx</i>) 引子 F：5'- <u>CGTAATAGGGGCTACAG</u> <u>AGATA-3'</u> 引子 R：5'- <u>GGTATTCTGCACACAAA</u> <u>TCAG-3'</u> 探針 P： 5'-(FAM)-CAGCAGCAGAT <u>GGTTATGGATTGGCAGG</u> <u>T-(BHQ1)-3'</u> PCR 增幅產物大小 399 bp 註 2：合成之引子及探針， 拆封後，以無菌去離子水稀 釋成適當濃度，分裝後置於 -20℃貯存備用，另探針需避 光保存，探針 5'端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM) 標記，3'端採用 Black Hole Quencher-1 (BHQ1)標記。 2.3.2.3. TaqMan® Fast Reagents Starter Kit (適用於 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System) 本試劑內含 real-time PCR 所需去氧核糖核苷三磷 酸、聚合酶等，使用時添加 引子、探針及待測檢體 DNA。		
--	--	--

<u>2.3.3. 對照用物質：Vibrio cholerae 標準菌株或其 DNA。</u> <u>2.4. 器具及材料^(註 3)</u> <u>2.4.1. 微量吸管</u> (Micropipette)：10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。 <u>2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tip)：可滅菌。10 μL、20 μL、200 μL 及 1000 μL。</u> <u>2.4.3. 離心管：200 μL、600 μL、1.5 mL 及 2 mL。</u> <u>2.4.4. Real-time PCR 反應管：100 μL。</u> <u>2.4.5. Real-time PCR 反應盤：具 96 個反應孔，適用於 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System。</u> <u>2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。</u> <u>註 3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。</u> <u>2.5 Real-time PCR 溶液^(註 4)</u> <u>Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 鑑別試驗用</u> <u>5 μM 引子 F.....2.0 μL</u> <u>5 μM 引子 R.....2.0 μL</u> <u>5 μM 探針.....1.0 μL</u> <u>TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....12.5 μL</u> <u>檢體 DNA 溶液.....5.0 μL</u> <u>無菌去離子水.....2.5 μL</u> <u>總體積.....25.0 μL</u> <u>註 4：Real-time PCR 溶液應置於冰浴中配製。</u> <u>2.6 檢體 DNA 溶液之製備</u>		
---	--	--

2.6.1. 檢體增菌液之 DNA 溶液製備

自第一部 2.4.1.節增菌液中吸取菌液 1 mL，置入已滅菌之 1.5 mL 離心管中，以 15000 × g 離心 3 分鐘，去除上清液。

2.6.1.1. 直接煮沸法

將沉澱物加入無菌去離子水 1 mL，震盪混合均勻，以 15000 × g 離心 3 分鐘，去除上清液，重複操作一次。續將沉澱物加入無菌去離子水 1 mL，震盪混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸 10 分鐘，取出離心管，作為檢體 DNA 原液，置於-20℃ 冷凍保存。

2.6.1.2. 抽取 DNA 法

採用適用於革蘭氏陰性細菌 DNA 抽取之市售套組，依套組操作說明步驟抽取 DNA。抽取之 DNA 溶液收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，作為檢體 DNA 原液，置於-20℃ 冷凍保存。

2.6.2. 分離菌株之 DNA 溶液製備

取一接種環之分離菌株，置入含有無菌去離子水 1 mL 之已滅菌 1.5 mL 離心管中，震盪混合均勻，煮沸 10 分鐘，取出離心管，待冷卻後以 15000 × g 離心 3 分鐘，吸取上清液至另一已滅菌 1.5 mL 離心管，作為檢體 DNA 原液，置於-20℃ 冷凍保存。亦可依 2.6.1.2.節進

行檢體 DNA 原液之製備。

2.6.3. DNA 濃度測定及純度判斷

取適量之檢體 DNA 原液，以無菌去離子水做適當倍數之稀釋，分別測定 260 nm 及 280 nm 之吸光值 (O.D.)。以波長 260 nm 吸光值乘 50 ng/μL 及稀釋倍數，即為檢體 DNA 原液濃度。DNA 溶液純度則以 $O.D._{260}/O.D._{280}$ 比值作判斷，其比值應介於 1.7~2.0。

2.7. 鑑別試驗^(註 5)

2.7.1. Real-time PCR 操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取已滅菌之 1.5 mL 離心管，依照 2.5. 節配製 real-time PCR 溶液，依序加入 TaqMan® Fast Reagents Starter Kit、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 20 μL 入 real-time PCR 反應盤的反應孔中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μL，再將 real-time PCR 反應盤置於離心機中，以 200 × g 瞬間離心，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應。同時另製作正反應及負反應對照組。

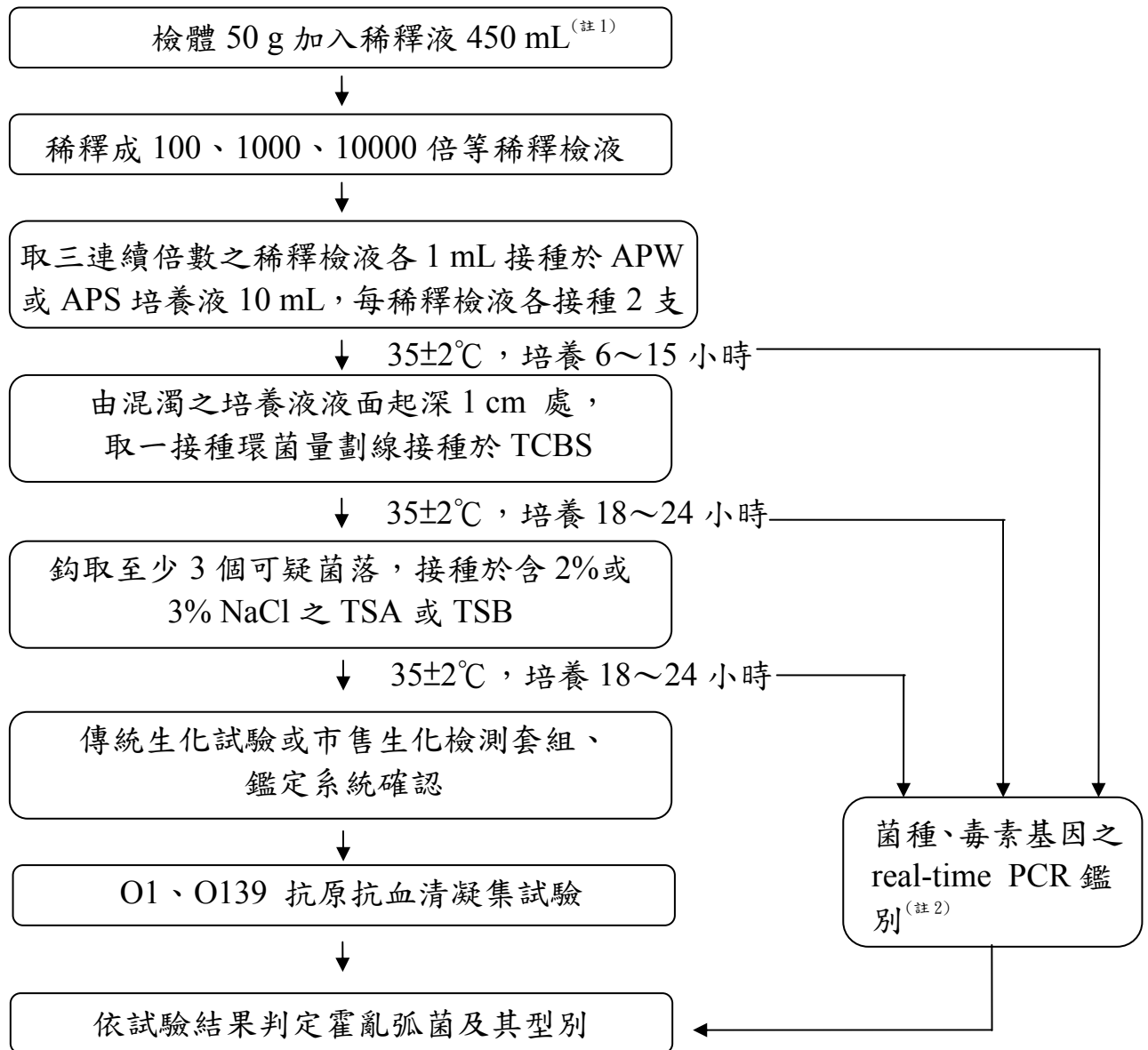
2.7.1.1. 霍亂弧菌菌種鑑別基因

<u>步驟</u>	<u>溫度</u>	<u>時間</u>
<u>1.熱活化</u>	<u>95°C</u>	<u>20 sec</u>
<u>2.最初變性</u>	<u>95°C</u>	<u>5 sec</u>

<u>3.黏接、延展 65°C 45 sec</u> <u>步驟 2 至步驟 3，共進行 45 個循環反應。</u> <u>2.7.1.2. 霍亂弧菌毒素基因</u> <table border="1"> <thead> <tr> <th>步驟</th><th>溫度</th><th>時間</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td><u>1.熱活化</u></td><td><u>95°C</u></td><td><u>20 sec</u></td></tr> <tr> <td><u>2.最初變性</u></td><td><u>95°C</u></td><td><u>5 sec</u></td></tr> <tr> <td><u>3.黏接、延展</u></td><td><u>60°C</u></td><td><u>30 sec</u></td></tr> </tbody> </table> <u>步驟 2 至步驟 3，共進行 45 個循環反應。</u> <u>2.7.2. Real-time PCR 螢光分析</u> <u>析</u> <u>檢體 DNA 經 real-time PCR 反應後，直接從 real-time PCR 反應器上之螢幕觀察探針所產生之螢光增幅曲線，即可判讀反應結果。同時另測試正反應及負反應對照組。</u> <u>2.7.3. 確認</u> <u>檢體 DNA 之 real-time PCR 增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 real-time PCR 螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 real-time PCR 增幅產物為霍亂弧菌毒素基因之基因片段，可確認該檢體中含有霍亂弧菌毒素基因。</u> <u>註 5：本 PCR 反應條件係採 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。</u> <u>附註：第二部霍亂弧菌之</u>	步驟	溫度	時間	<u>1.熱活化</u>	<u>95°C</u>	<u>20 sec</u>	<u>2.最初變性</u>	<u>95°C</u>	<u>5 sec</u>	<u>3.黏接、延展</u>	<u>60°C</u>	<u>30 sec</u>		
步驟	溫度	時間												
<u>1.熱活化</u>	<u>95°C</u>	<u>20 sec</u>												
<u>2.最初變性</u>	<u>95°C</u>	<u>5 sec</u>												
<u>3.黏接、延展</u>	<u>60°C</u>	<u>30 sec</u>												

<u>real-time PCR 檢測可視需要執行。</u>		
--------------------------------	--	--

檢驗流程圖



註 1：牡蠣檢體，需再稱取檢體 25 g，置於攪拌均質器內，加入 APW 培養液 2475 mL，於 42±0.2°C 水浴隔夜培養。

註 2：可依檢體含菌量情況自行探討接續 real-time PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。