

食品微生物之檢驗方法－腸炎弧菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms- Test of *Vibrio parahaemolyticus*

第一部：腸炎弧菌之分離與計數

1. 適用範圍：本方法適用於食品中腸炎弧菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，以選擇性培養基培養及計數之方法或以三階三支進行培養，配合MPN計數之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好，操作平台光度為100呎燭光以上，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. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 2.2.2. 乾熱滅菌器。
 - 2.2.3. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.4. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.5. 冷凍櫃：能保持 $-30 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.6. 超低溫冷凍櫃：能保持 $-70 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.7. 培養箱：能維持內部溫度溫差 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 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)：能適用於無菌操作者。
 - 2.2.10. 均質機：轉速可達8000 rpm以上。
 - 2.2.11. 離心機：供各式微量離心管離心用。
 - 2.2.12. 顯微鏡：能放大至1000倍之一般光學顯微鏡。
 - 2.2.13. 天平：可稱量到2000 g，靈敏度為0.1 g；可稱量到120 g，靈敏度為5 mg。
 - 2.2.14. 精密天平：靈敏度為0.001 g。
 - 2.2.15. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.16. 酸鹼度測定儀(pH meter)。

- 2.2.17. 加熱器。
- 2.2.18. 振盪器(Shaker)。
- 2.2.19. 吸管輔助器(Pipette aid)。
- 2.2.20. 吸管(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。
- 2.2.21. 微量吸管(Micropipette)：10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.2.22. 吸管尖(Tip)：可滅菌。10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.2.23. 稀釋用容器：無菌袋或有 1000 mL、500 mL、99 mL 及 90 mL 標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶。
- 2.2.24. 培養皿：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。
- 2.2.25. 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金，鉑鈦或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.2.26. 試管：10 \times 100 mm，13 \times 100 mm 試管或其他適用者。
- 2.2.27. 塗抹曲棒：可滅菌者，直徑 3~4 mm，塗抹區域 45~55 mm。
- 2.2.28. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.2.29. 燈箱：觀察血清試驗用。
- 2.2.30. 褐色試藥瓶。
- 2.2.31. 蠟筆：塗寫、劃記載玻片時使用。
- 2.2.32. 研鉢、杵：研磨試藥用。
- 2.2.33. 小圓片濾紙：可滅菌者，直徑約 6 mm。
- 2.2.34. 無菌棉花棒或塗抹棒。
- 2.2.35. 無菌濾膜：孔徑 0.2 μ m 或以下之親水性醋酸纖維濾膜。
- 2.2.36. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.37. 無菌冷凍試管。
- 2.2.38. 試藥：氯化鈉、氫氧化鈉、氫氧化鉀、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸二氫鈉($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)、無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_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)、 α -萘酚 (α -naphthol)、肌酸 (creatine)、碘化鉀、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)、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 (dextrose)、蔗糖 (sucrose)、乳糖 (lactose)、甘露糖 (mannose)、甘露糖醇 (mannitol)、阿拉伯糖 (arabinose)、溴麝香草藍 (bromthymol blue)、麝香草藍 (thymol blue)、酚紅 (phenol red)、溴甲酚紫 (bromcresol purple)、液態氮、液態石臘油、礦物油及甘油均採用化學試藥級；蛋白胨 (peptone)、酵母抽出物 (yeast extract)、胰化蛋白胨 (tryptone)、牛膽汁 (oxgall)、牛肉抽出物 (beef extract)、月示蛋白胨 (proteose peptone)、植物蛋白胨 (phytone peptone)、胰化酪蛋白胨 (trypticase peptone)、胰化酪蛋白 (trypticase)、蛋白胨緩衝液粉末 (buffered peptone-water powder)、動物膠 (gelatin) 及洋菜 (agar) 均採用微生物級。

2.2.39. 試劑

2.2.39.1. 氧化酶試劑 (Oxidase test reagent)

取四甲基對位苯二胺鹽酸鹽 1 g 溶於蒸餾水 100 mL，貯存於褐色試藥瓶，置於冰箱，使用期限以不超過 1 星期為宜。

2.2.39.2. 歐普氏試劑 (Voges-Proskauer test reagents, VP reagent)

溶液 A：取 α -萘酚 5 g 溶於 95% 乙醇 100 mL。

溶液 B：取氫氧化鉀 40 g 溶於蒸餾水使成 100 mL。

2.2.39.3. 30% 氫氧化鈉溶液

稱取氫氧化鈉 30 g 溶於蒸餾水 100 mL。

2.2.39.4. 1.0 M 磷酸二氫鈉溶液

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°C 冰箱中備用。

2.2.39.5. 硝基苯派喃半乳糖試劑(ONPG reagent)

取硝基苯派喃半乳糖 80 mg 溶於 37°C 蒸餾水 15 mL，再加入 1.0 M 磷酸二氫鈉溶液 5 mL，貯存於 4°C 冰箱備用，使用時須加溫至 37°C。

2.2.39.6. 液態石蠟油或礦物油

取液態石蠟油或礦物油 20~50 mL，裝入附蓋容器中約 1/2 滿，以 121°C 滅菌 30 分鐘。

2.2.39.7. 3% 氯化鈉溶液

稱取氯化鈉 3 g 溶於蒸餾水 100 mL，經 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.39.8. 含 3% 氯化鈉之 5% 甘油溶液

稱取氯化鈉 3 g，加甘油 5 mL，再溶於蒸餾水 100 mL，經 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.39.9. 1 N 氫氧化鈉溶液

稱取氫氧化鈉 4 g 溶於蒸餾水 100 mL。

2.2.39.10. 50% 甘露糖溶液

稱取甘露糖 5 g，溶於蒸餾水 10 mL，以無菌濾膜過濾。

2.2.40. O/129 紙錠(O/129 disks)

2.2.40.1. 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 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 14 mL，即為 1.0 mg/mL O/129 溶液。

2.2.40.2. O/129 紙錠

吸取 15 mg/mL O/129 溶液 10 μL，加入已滅菌之小圓片濾紙，即為

O/129 150 µg 紙錠；吸取 1.0 mg/mL O/129 溶液 10 µL，加入已滅菌之小圓片濾紙，即為 O/129 10 µg 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。

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

2.2.41.1. 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。

2.2.41.2. 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，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。

2.2.41.3. 哈克氏複染液(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 加入蒸餾水 90 mL，作為複染液。

註：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。

2.2.42. 抗血清

2.2.42.1. 腸炎弧菌本體(O)抗血清(O antisera)

2.2.42.2. 腸炎弧菌莢膜(K)抗血清(K antisera)：包括多價莢膜抗血清及單價莢膜抗血清。

2.2.43. 稀釋液

2.2.43.1. 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 1 N 氫氧化鈉溶液調整 pH 值為 7.4，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.43.2. 0.85%生理食鹽水：取氯化鈉 8.5 g，溶於蒸餾水 1000 mL，分裝於

稀釋用容器中，經 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.44. 培養基

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

蛋白胨(peptone)	5 g
酵母抽出物(yeast extract)	3 g
胰化蛋白胨(tryptone)	10 g
氯化鈉	20 g
葡萄糖(glucose)	1 g
L-精胺酸鹽酸鹽(L-arginine hydrochloride)	5 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

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 。

2.2.44.2. 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 g
蛋白胨(peptone)	10 g
蔗糖(sucrose)	20 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	10 g
膽酸鈉(sodium cholate)	3 g
檸檬酸鈉(sodium citrate·2H ₂ O)	10 g
牛膽汁(oxgall)	5 g
氯化鈉	10 g
檸檬酸鐵(ferric citrate)	1 g
溴麝香草藍(bromthymol blue)	0.04 g

麝香草藍(thymol blue)	0.04 g
洋菜(agar)	15 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 37~45°C 乾燥。

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

牛肉抽出物(beef extract)	3 g
酵母抽出物(yeast extract)	3 g
蛋白胨(peptone)	15 g
月示蛋白胨(proteose peptone)	5 g
氯化鈉	20 或 30 g
乳糖(lactose)	10 g
蔗糖(sucrose)	10 g
葡萄糖(glucose)	1 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 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，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。

2.2.44.4. 胰化酪蛋白大豆鹽類培養液(Trypticase soy broth, TSB-2% 或 3% NaCl)

植物蛋白胨(phytone peptone)	3 g
胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	17 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	2.5 g
氯化鈉	20 或 30 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°C 滅菌 15 分鐘，
最終 pH 值為 7.3 ± 0.2 。

2.2.44.5. 胰化酪蛋白大豆鹽類培養基 (Trypticase soy agar, TSA-2% 或 3% NaCl)

植物蛋白胨(phytone peptone) 5 g

胰化酪蛋白胨(trypticase peptone) 15 g

氯化鈉 20 或 30 g

洋菜(agar) 15 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分裝於試管或三角瓶，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終
pH 值為 7.3 ± 0.2 。

2.2.44.6. 運動性試驗培養基 (Motility test medium, MTM)

牛肉抽出物(beef extract) 3 g

蛋白胨(peptone) 10 g

氯化鈉 20 或 30 g

洋菜(agar) 4 g

蒸餾水 1000 mL

加熱溶解後，分取適量注入試管，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終
pH 值為 7.4 ± 0.2 。

2.2.44.7. Hugh-Leifson 葡萄糖培養液 (Hugh-Leifson glucose broth, HLGB)

蛋白胨(peptone) 2 g

酵母抽出物(yeast extract) 0.5 g

氯化鈉 30 g

葡萄糖(glucose) 10 g

溴甲酚紫(bromocresol purple) 0.015 g

洋菜(agar) 3 g

蒸餾水 1000 mL

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。

2.2.44.8. 脫羧酶基礎培養液(Decarboxylase basal medium)

蛋白胨(peptone)	5 g
酵母抽出物(yeast extract)	3 g
氯化鈉	20 或 30 g
葡萄糖(glucose)	1 g
溴甲酚紫(bromcresol purple)	0.02 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，取 L-精胺酸鹽酸鹽(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(L-lysine)，L-鳥胺酸(L-ornithine)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。

2.2.44.9. 胰化酪蛋白鹽化培養液(Tryptone salt broth, TN)

胰化酪蛋白或胰化蛋白胨(trypticase or tryptone)	10 g
蒸餾水	1000 mL

於此培養液內加入氯化鈉，配製成含 0、6、8 及 10% 不同濃度之胰化酪蛋白鹽化培養液(T₁N₀, T₁N₆, T₁N₈, T₁N₁₀)，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。

2.2.44.10. MR-VP 培養液(MR-VP broth)

蛋白胨緩衝液粉末(buffered peptone-water powder)	7 g
葡萄糖(glucose)	5 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	5 g
氯化鈉	20 或 30 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，分取約 10 mL 注入試管，以 118~121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9 ± 0.2。

2.2.44.11. 溴甲酚紫培養液(Bromcresol purple broth)

蛋白朊(peptone)	10 g
牛肉抽出物(beef extract)	3 g
氯化鈉	20 或 30 g
溴甲酚紫(bromcresol purple)	0.04 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，分取約 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。

2.2.44.12. Wagatsuma 培養基(Wagatsuma agar)

酵母抽出物(yeast extract)	3 g
蛋白朊(peptone)	10 g
氯化鈉	70 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	5 g
甘露糖醇(mannitol)	10 g
結晶紫(crystal violet)	0.001 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，調整 pH 值為 8.0 ± 0.2 ，蒸氣加熱 30 分鐘(不可高壓滅菌)，冷卻至 45~50°C 時，加入 5% (v/v) 經生理食鹽水洗滌三次之人或兔之紅血球，搖動混合使絮狀沉澱物分散均勻(避免產生氣泡)，倒入每一培養皿約 15~20 mL，乾燥後立即使用。

2.2.44.13. 動物膠培養基(Gelatin agar, GA)

蛋白朊(peptone)	4 g
酵母抽出物(yeast extract)	1 g
動物膠(gelatin)	15 g

洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.2。

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

蛋白胨(peptone)	4 g
酵母抽出物(yeast extract)	1 g
動物膠(gelatin)	15 g
氯化鈉	30 g
洋菜(agar)	15 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.2。

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

蛋白胨(peptone)	10 g
氯化鈉	10 g
蒸餾水	1000 mL

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

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

蛋白胨(peptone)	10 g
氯化鈉	30 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 分鐘，最終 pH 值為 8.5 ± 0.2。

2.2.44.17. 長期保存培養基(Long-term preservation medium)

酵母抽出物(yeast extract)	3 g
蛋白胨(peptone)	10 g
氯化鈉	30 g
洋菜(agar)	3 g

蒸餾水

1000 mL

加熱溶解後，取 4 mL 注入試管，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.3. 檢液之調製

2.3.1. 海鮮檢體：

2.3.1.1. 魚類、貝類及蝦、蟹等甲殼類檢體：魚類檢體之取樣應包括魚體表面組織、鰓及內臟。貝類檢體之取樣應包括肉及液體。蝦、蟹等甲殼類檢體之取樣儘可能包括整個動物體，檢體太大時，取中心部份，包括鰓及內臟。將檢體以高速攪拌均質 90 秒，再取均質液 50 g，加入 PBS 稀釋液 450 mL，以 8000 rpm 轉速攪拌 1 分鐘，作為 10 倍稀釋檢液。

2.3.1.2. 軟體貝類：取適量檢體混合，加入同等體積之 PBS 稀釋液，以高速攪拌均質 90 秒，即為 1/2 倍稀釋檢液。取 1/2 倍稀釋檢液 20 g (避免氣泡造成體積誤差，以稱重量取)，加入 PBS 稀釋液 80 mL，作為 10 倍稀釋檢液。

2.3.2. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如 2~5°C，18 小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(即放在 45°C 以下之水浴中，可於 15 分鐘內解凍之檢體適用之)。解凍時應經常搖動檢體，以幫助檢體之解凍。俟檢體解凍後，再予以適當切碎並混合均勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒等冰類製品，應速先行使成適當小塊；取檢體 50 g，加入 PBS 稀釋液 450 mL，充分混合均勻，製成 10 倍稀釋檢液。如檢驗工作無法立即進行，應將檢體貯存於 -20°C。

2.3.3. 固態檢體：適當切碎混合均勻後，取檢體 50 g，以下步驟同 2.3.2. 節之操作。

2.3.4. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎之檢體：用已滅菌之藥勺或其他方便使用之用具加以粉碎後，混合均勻，取檢體 50 g，以下步驟同 2.3.2. 節之操作。

2.3.5. 液態檢體：用振搖方式，使充分均勻混合，取檢體 50 mL，作為原液，

以下步驟同 2.3.2.節之操作。

- 2.3.6. 凝態及濃稠液態檢體：經適當攪拌均勻後，取檢體 50 g，以下步驟同 2.3.2.節之操作。
- 2.3.7. 系列稀釋檢液：使用已滅菌之吸管，吸取上述之 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 及 10000 倍等稀釋檢液。
- 2.3.8. 塗抹物檢體：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振盪至塗抹物頭部之棉絮鬆開，其溶出液供作檢液。

2.4. 鑑別試驗

2.4.1. 增菌培養：最確數(Most probable number, MPN)計數法

- 2.4.1.1. 將 2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分搖勻，分別吸取三連續倍數之稀釋檢液各 1 mL，接種於 APW 10 mL 中，每稀釋檢液各接種 3 支(稱三階三支)，原液、10 倍及 100 倍稀釋檢液時，每階試管含檢體量 1、0.1 及 0.01 (g 或 mL)；10、100 及 1000 倍稀釋檢液時，每階試管含檢體量 0.1、0.01 及 0.001 (g 或 mL)，於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 隔夜培養，最後確定為腸炎弧菌者，依附表計算其 MPN 數。加熱、乾燥、冷凍等處理之檢體，為提高檢出率，取 2.3.節之 10 倍稀釋檢液 10 mL，加入同體積之 2 倍濃度 APW，使 APW 內含檢體量 1 g。

2.4.2. 分離純化：

- 2.4.2.1. 由 2.4.1.節之呈現混濁 APW 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 培養基表面，於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 隔夜培養後，觀察菌落之型態。若為可疑腸炎弧菌者，其菌落為圓弧形，呈綠色或藍綠，直徑約 2~3 mm。
- 2.4.2.2. 鉤取至少 3 個可疑菌落，接種於 TSA-2%或 3% NaCl 培養基，於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 隔夜培養，再另行接種於 TSB-2%或 3% NaCl 培養液，於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 隔夜培養，以備進行生化試驗。

2.4.2.3. 塗抹物檢體無需定量時，則吸取 2.3.8.節檢液 0.1 mL，劃線於 TCBS 培養基，二重覆，於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 隔夜培養，再依 2.4.2.1.及 2.4.2.2.節進行鑑別。

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 TSA-2%或 3% NaCl 培養基上鉤菌，以斜面劃線及穿刺法接種於 AGS 培養基，鬆蓋，於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 隔夜培養，腸炎弧菌不產生硫化氫或氣體，典型反應呈現鹼性(紫色)斜面和酸性(黃色)底部。

2.4.3.1.2. 三糖鐵培養基(TSI)試驗

自 TCBS 培養基或 TSA-2%或 3% NaCl 培養基上鉤菌，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，若為可疑腸炎弧菌者，其斜面應呈紅色(鹼性)，底部呈黃色(酸性)，無裂痕及黑色產生。

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，以接種針(或環)自 2.4.2.2.節之 TSA-2%或 3% NaCl 培養基上鉤取適量菌株，均勻塗抹成薄抹片，風乾後迅速通過火焰 3~4 次微熱固定，勿直接火烤。
- (2) 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染 1 分鐘，水洗。
- (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，再水洗，此步驟僅約 30 秒，惟視抹片之厚薄而定。
- (5) 複染：用哈克氏複染液複染 30 秒，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。腸炎弧菌為革蘭氏陰性，菌體呈彎曲或直短棒狀、不產芽孢，且具單極鞭毛。

2.4.3.1.4. 運動性試驗(Motility test)

自 TCBS 培養基或 TSA-2%或 3% NaCl 培養基上鉤菌，穿刺接種於 MTM 培養基，深度約 2/3 培養基深，於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 隔夜培養，沿穿刺線有放射狀線或培養基呈混濁者為正反應，否則為負反應，腸炎弧菌為正反應。

2.4.3.1.5. 動物膠培養基(GA)及動物膠鹽類培養基(GS)試驗

自 TCBS 培養基或 TSA-2%或 3% NaCl 培養基上鉤菌，接種於 GA 培養基和 GS 培養基，於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 培養 12~24 小時，腸炎弧菌不能生長在 GA 培養基上，可在 GS 培養基上生長，菌落周圍會出現不透明環。

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

自 TSA-2%或 3% NaCl 培養基上刮取少量新鮮菌落(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，腸炎弧菌為正反應。

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

將含 O/129 10 μg 紙錠和 150 μg 紙錠置於已接種菌之 TSA-2%或 3% NaCl 培養基，或將菌接種在已含有 O/129 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 TSA-2%或 3% NaCl 培養基。經 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 隔夜培養後，腸炎弧菌應對含 O/129 10 μg 者具耐受性，對 150 μg 者具敏感性。

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 TSA-2%或 3% NaCl 培養基上鉤菌，接種於二支 HLGB 培養液，其中一支注入已滅菌之液態石蠟油或礦物油至高約 1~2 cm，於 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 培養 2 天後，觀察其反應情形，腸炎弧菌應對葡萄糖發酵及氧化，但不產氣，其顏色變化如下表：

反應	未加液態石蠟試管	添加液態石蠟試管
氧化	黃色	紫色

發酵	黃色	黃色
HLGB 培養	紫色	紫色

2.4.3.2.2. 精胺酸二水解酶試驗(Arginine dihydrolase test)

自 TSA-2%或 3% NaCl 培養基上鈎菌，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油或礦物油，覆蓋表面高約 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。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，腸炎弧菌為負反應。

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

自 TSA-2%或 3% NaCl 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，接種後注入已滅菌之液態石蠟油或礦物油，覆蓋表面高約 1~2 cm，鬆蓋，於 $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 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基呈黃色者為正反應，否則為負反應，腸炎弧菌為正反應。

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

自 TSA-2%或 3% NaCl 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，接種後注入已滅菌之液態石蠟油或礦物油，覆蓋表面高約 1~2 cm，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，腸炎弧菌為正反應。

2.4.3.2.5. 嗜鹽性試驗(Halophilism test)

自 TSB-2% 或 3% NaCl 培養液上鈎菌，分別接種於 T_1N_0 、 T_1N_6 、 T_1N_8 及 T_1N_{10} 培養液，於 $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養後觀察。腸炎弧菌可在 T_1N_6 及 T_1N_8 生長良好，但在 T_1N_0 無法生長， T_1N_{10} 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 TSB-2% 或 3% NaCl 培養液中鈎菌，接種於 TSB-2% NaCl 培養液，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，腸炎弧菌為正反應。

2.4.3.2.7. 歐普氏試驗(VP test)：

自 TSA-2% 或 3% NaCl 培養基上鈎菌，接種於 MR-VP 培養液中，於 35 ± 2°C 培養 48 小時。取培養液 1 mL 至另一已滅菌試管中，加入歐普氏試劑溶液 A 0.6 mL 及溶液 B 0.2 mL，再加入少許肌酸，輕輕搖勻，經 4 小時後觀察結果。呈現粉紅色者，為正反應，否則為負反應。腸炎弧菌為負反應。

2.4.3.2.8. 發酵試驗(Fermentation test)：

自 TSA-2% 或 3% NaCl 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油或礦物油，覆蓋表面高約 1~2 cm，於 35 ± 2°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。腸炎弧菌對甘露糖醇、甘露糖及阿拉伯糖為正反應，對蔗糖及乳糖為負反應。

2.4.3.2.9. 硝基苯派喃半乳糖試驗(ONPG test)：

自 2.4.3.1.2. 節之可疑腸炎弧菌之 TSI 培養基(或其他含乳糖的培養基)上鈎菌至含有已滅菌之 0.85% 生理食鹽水 0.2 mL 之試管中，作成濃懸浮液，再加入一片浸過硝基苯派喃半乳糖試劑之小圓片濾紙，輕輕搖動後，於 35 ± 2°C 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，腸炎弧菌為負反應。

2.4.3.2.10. Kanagawa 現象(Kanagawa phenomenon)：

滴數滴已培養 18 小時之可疑腸炎弧菌 TSB-2 或 3% NaCl 培養液至完全乾燥的 Wagatsuma 培養基，進行雙重複試驗，並於另一相同培養基上滴上幾滴已確定為正反應或負反應的培養液作對照，於 35 ± 2°C 培養，24 小時內(不得超過 24 小時)觀察結果。正反應係由 β-溶血作用造成，菌落周圍的紅血球變成透明乾

淨，無同心環或綠變。透明環直徑為3 mm 或大於3 mm 以上為 Kanagawa 正反應，通常分離自食品之腸炎弧菌為負反應。

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〕：

取約3~5倍火柴棒頭之菌量，懸浮於含3%氯化鈉之5%甘油溶液，以121°C滅菌1小時，於900×g轉速離心20分鐘，去除上清液，再以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滴各本體抗原抗血清，於另一格位滴入一滴3%氯化鈉溶液作為對照組，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。若所有本體抗原抗血清均無任何凝集現象，則將菌液以121°C滅菌1小時後再測試，若仍呈負反應，則該菌之體抗原型別非為所測試者。

2.4.4.2. 細菌莢膜抗原抗血清凝集試驗〔Agglutination test of antigen with capsular (K) antisera test〕

取約3~5倍火柴棒頭之菌量，懸浮於3%氯化鈉溶液，於900×g轉速離心20分鐘，去除上清液，再以3%氯化鈉溶液0.5 mL懸浮菌體，取菌液備用。先進行多價莢膜抗血清試驗後，再進行單價莢膜抗血清試驗。用蠟筆在載玻片上劃成數個適當格位，置入少量該菌液到每一個格位的下方位置，再於格位之上方各滴入1滴多價莢膜抗血清(另同法進行試驗各單價莢膜抗血清試驗)，於另一格位滴入一滴3%氯化鈉溶液作為對照組，反覆傾斜1分鐘，使充分混合均勻。正反應呈現凝集現象，對照組及負反應者，應無凝集現象。

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 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 TSB-2%或3% NaCl 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°C 冷凍櫃保存。

2.6. 判定

2.6.1. 腸炎弧菌陽性者，應符合下表所列之結果

試驗或基質		正反應	負反應	腸炎弧菌反應 ^a
革蘭氏染色		陽性(深紫色)	陰性(淡紅色)	—
三糖鐵培養基試驗	斜面	黃色	紅色	—
	底部	黃色	紅色	+
	產氣	培養基斷裂或裂縫	培養基完整	—
	硫化氫	黑色	非黑色	—
運動性試驗		沿穿刺線有放射狀線或培養基呈混濁狀	沿穿刺線無放射狀線或培養基呈透明	+
葡萄糖氧化與發酵試驗		黃色	紫色	+
硝基苯派喃半乳糖試驗		黃色	原色	—
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	T ₁ N ₀ , T ₁ N ₁₀	可生長	不生長或生長極緩慢	—
	T ₁ N ₆ , T ₁ N ₈	可生長	不生長或生長極緩慢	+
42°C生長試驗		混濁	澄清	+
動物膠培養基試驗		生長	不生長	—
動物膠鹽類培養基試驗		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	+
	產氣	培養基斷裂或裂縫	培養基完整	—
	硫化氫	黑色	非黑色	—
歐普氏試驗		紅色	原色	—
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	+
	150 µg	生長	不生長	-
Kanagawa 現象		透明環	無透明環	+ 或 - ^b
細菌本體抗原抗血清凝集 試驗		凝集	無凝集	+ 或 -
細菌莢膜抗原抗血清凝集 試驗		凝集	無凝集	+ 或 -

a: 「+」表示80%以上菌株為正反應，「-」表示80%以上菌株為負反應。

b: 分離自食品之腸炎弧菌通常為負反應；分離自糞便之腸炎弧菌，則通常為正反應。

2.6.2. 由2.6.1.節判定為腸炎弧菌陽性者，依2.7.節計數其菌數。

2.7. 最確數計算：由2.6.節判定為腸炎弧菌之各階試管數，利用接種量為每試0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)之三階三支最確數表(如附表)，推算出腸炎弧菌之最確數(MPN/g 或 MPN/mL)。

附表：最確數表

正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 信賴界限		正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 信賴界限	
0.1*	0.01	0.001		下限	上限	0.1	0.01	0.001		下限	上限
0	0	0	< 3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000

正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 信賴界限		正反應試管數			最確數 (MPN/g 或 MPN/mL)	95% 信賴界限	
0.1*	0.01	0.001		下限	上限	0.1	0.01	0.001		下限	上限
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

*：各階試管中所含檢體量(g 或 mL)

說明：最確數表適用的接種量為各階試管含檢體 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)，當接種量不同時應乘或除倍率，換算公式為：

$$\text{最確數 MPN/g (MPN/mL)} = \frac{\text{最確數表之最確數}}{\text{第一階試管含檢體量} \times 10}$$

例如：經判定含有測試菌之正反應試管數為 3-1-0 時，對照最確數表之最確數為 43，

(1) 當接種量為各階試管含檢體 1, 0.1, 0.01 (g 或 mL)，推算出測試菌之最確數=

$$\frac{43}{1 \times 10} = 4.3 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

(2) 當接種量為各階試管含檢體 0.1, 0.01, 0.001 (g 或 mL)，推算出測試菌之最

$$\text{確數} = \frac{43}{0.1 \times 10} = 43 \text{ MN/g (MPN/mL)}。$$

(3) 當接種量為各階試管含檢體 0.01, 0.001, 0.0001 (g 或 mL)，推算出測試菌之

$$\text{最確數} = \frac{43}{0.01 \times 10} = 4.3 \times 10^2 \text{ MPN/g (MPN/mL)}。$$

2.8. 如使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。

第二部：腸炎弧菌之Multiplex PCR檢測

1. 適用範圍：本方法適用於腸炎弧菌之菌種及致病基因鑑別。
2. 檢驗方法：檢體之增菌液或經分離純化後之菌株，以多套式聚合酶鏈反應(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)鑑別菌種及致病基因之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。DNA模板處理、PCR試劑配製及PCR等檢驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。PCR試劑之配製應於生物安全操作櫃內進行。
 - 2.2. 裝置^(註1)
 - 2.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II) (含)以上者。
 - 2.2.2. 聚合酶鏈反應器：GeneAmp® PCR System 9700，或同級品。
 - 2.2.3. 真空乾燥裝置：供DNA乾燥用。
 - 2.2.4. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.5. 加熱振盪器：具55°C溫控及振盪功能。
 - 2.2.6. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達20000 ×g，並具4°C溫控功能。
 - 2.2.7. 離心機：供各式微量離心管離心用。
 - 2.2.8. 分光光度計：具波長260 nm、280 nm。
 - 2.2.9. 冰箱：能維持5 ± 3°C者。
 - 2.2.10. 冷凍櫃：能保持-30 ± 3°C者。
 - 2.2.11. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.12. 電泳槽：供DNA電泳用。
 - 2.2.13. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。
 - 2.2.14. 紫外燈箱：具波長302 nm、365 nm紫外燈。
 - 2.2.15. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.16. 水浴裝置：溫差±1°C以內者。
 - 2.2.17. 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。

2.2.18. 精密天平：靈敏度為0.001 g。

2.2.19. 培養箱：能維持內部溫度溫差± 1.0°C以內者。

2.2.20. 振盪器(Shaker)。

2.2.21. 微波爐或加熱板(Hot plate)。

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. Multiplex PCR用^(註2)

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子

2.3.2.1.1. 腸炎弧菌菌種鑑別基因(標的基因：thermolabile hemolysin, *tlh*)

引子F：L-TL, 5'-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3'

引子R：R-TL, 5'-GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC-3'

PCR增幅產物大小450 bp

2.3.2.1.2. 腸炎弧菌致病基因

2.3.2.1.2.1. 標的基因：thermostable direct hemolysin (*tdh*)

引子F：VPTDH-L, 5'-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3'

引子R：VPTDH-R, 5'-TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3'

PCR增幅產物大小270 bp

2.3.2.1.2.2. 標的基因：thermostable related hemolysin (*trh*)

引子F：VPTRH-L, 5'-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3'

引子R：VPTRH-R, 5'-CATAACAAACATATGCCCATTTCCG-3'

PCR增幅產物大小500 bp

2.3.2.2. 去氧核糖核苷三磷酸(Deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)溶液

含去氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate, dATP)、去氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate, dCTP)、去氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸

(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各2.5 mM之溶液。

2.3.2.3. 聚合酶

Taq DNA polymerase (2 U/ μ L)，內附10倍含15 mM氯化鎂之PCR緩衝溶液，或同級品。

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°C貯存備用。

2.3.3. 電泳用：溴化乙錠(ethidium bromide)、溴酚藍(bromophenol blue)、二甲苯藍(xylene cyanol FF)、乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na₂-EDTA)、三羥甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris)、氫氧化鈉及硼酸採試藥級。瓊膠(agarose)及甘油採分子生物分析級試藥。DNA分子量標記物質(DNA molecular weight marker)：100 bp DNA ladder marker。

2.3.4. 對照用物質：腸炎弧菌參考菌株或其DNA。

2.4. 器具及材料^(註3)

2.4.1. 吸管輔助器(Pipette aid)。

2.4.2. 吸管(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。

2.4.3. 微量吸管(Micropipette)：10 μ L、20 μ L、200 μ L及1000 μ L。

2.4.4. 吸管尖頭(Micropipette tip)：可滅菌。10 μ L、20 μ L、200 μ L及1000 μ L。

2.4.5. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL及2 mL。

2.4.6. PCR反應管：200 μ L及500 μ L。

2.4.7. 電泳膠片製作盤。

2.4.8. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL及2000 mL。

註3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

2.5. 試劑之配製

2.5.1. 0.5 M乙二胺四乙酸(EDTA)溶液

稱取乙二胺四乙酸二鈉186.1 g，加去離子水800 mL溶解，再加入氫氧化鈉20 g以調整pH值至8.0，並加去離子水使成1000 mL。

2.5.2. 0.5倍TBE (Tris-borate-EDTA)緩衝溶液

稱取三羥甲基氨基甲烷54 g及硼酸27.5 g，加入0.5 M EDTA溶液20 mL，再加水溶解使成1000 mL，供作5倍TBE緩衝溶液，或使用市售5倍TBE緩衝溶液。臨用時以去離子水將5倍TBE緩衝溶液稀釋為0.5倍，作為0.5倍TBE緩衝溶液。

2.5.3. 2%膠片

稱取瓊膠2 g，加入0.5倍TBE緩衝溶液100 mL，加熱攪拌至瓊膠完全溶解，適當冷卻後，倒入電泳膠片製作盤，並置入適當之尺梳，待膠片凝固後，即可使用。

2.5.4. 6倍載入膠片緩衝溶液(6 × gel loading buffer)

稱取溴酚藍25 g及二甲苯藍0.25 g，加入甘油30 mL，再加入無菌去離子水使成100 mL，置於4°C冰箱貯存備用。

2.5.5. 膠片染液

稱取溴化乙錠0.1 g，加水10 mL溶解，供作原液(10 mg/mL)，使用前以水稀釋成1 µg/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.5.6. Multiplex PCR溶液^(註4)

10倍含15 mM氯化鎂之PCR緩衝溶液.....	5.0 µL
<i>Taq</i> DNA polymerase (2 U/µL).....	1.0 µL
2.5 mM dNTP.....	8.0 µL
10 µM 引子 L-TL.....	1.25 µL
10 µM 引子 R-TL.....	1.25 µL
10 µM 引子 VPTDH-L.....	1.25 µL
10 µM 引子 VPTDH-R.....	1.25 µL
10 µM 引子 VPTRH-L.....	1.25 µL
10 µM 引子 VPTRH-R.....	1.25 µL
檢體 DNA 溶液.....	1.0 µL

無菌去離子水..... 27.5 μ L

總體積..... 50.0 μ L

註4：PCR 溶液應置於冰浴中配製。

2.6. 檢體 DNA 溶液之製備

2.6.1. 檢體增菌液之 DNA 溶液製備

自第一部份 2.4.2.1. 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 \times g 離心 3 分鐘，去除上清液。

2.6.1.1. 直接煮沸法

將沉澱物加入無菌生理食鹽水 1 mL，振盪混合均勻，以 15000 \times 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，振盪混合均勻，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°C 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°C 冷凍保存。

2.6.2. 腸炎弧菌分離菌株之 DNA 溶液製備

自第一部份 2.4.2.2. 節培養基上鈎取一接種環的菌量，置入含有無菌去離子水 1 mL 之已滅菌 1.5 mL 離心管中，振盪混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸 10 分鐘，取出離心管，待冷卻後以 15000 \times 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°C 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/ μ L 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. Multiplex PCR操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋檢體DNA原液及引子備用。取PCR反應管，依照2.5.6.節配製multiplex PCR溶液，依序加入無菌去離子水、10倍PCR緩衝溶液、dNTP、引子、DNA polymerase及檢體DNA溶液，混合均勻後，將反應管置於離心機瞬間離心，使混合液聚積於反應管之底部。移入PCR反應器，依2.7.2.節設定反應條件，進行反應，結束後，取出PCR增幅產物，進行電泳分析。

2.7.2. Multiplex PCR條件

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	94°C	35 min
2. 變性	94°C	1 min
3. 黏接	60°C	1 min
4. 延展	72°C	2 min
步驟2至步驟4，共進行35個循環反應。		
5. 最終延展	72°C	3 min

2.7.3. 膠片電泳分析

取適量之6倍載入膠片緩衝溶液，分別與無菌去離子水(空白組)及PCR增幅產物混合均勻，注入2%膠片孔中，以50或100伏特電壓進行電泳。同時另取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。電泳後之膠片置入膠片染液中進行染色約15分鐘，置入水中漂洗及褪染，再以紫外光照射觀察是否有明顯之DNA螢光帶，並判讀結果。同時另測試正反應及負反應對照組。

2.7.4. 鑑別

檢體DNA溶液之PCR增幅產物電泳結果，與正反應對照組及DNA分子量標記物質之電泳結果進行相互比對，當檢體DNA溶液與正反應對照組DNA均出現PCR增幅產物，經由DNA分子量標記物質估算PCR增幅產物大小為450 bp者，即判定該檢體含有腸炎弧菌；PCR增幅產物大小為270 bp者，即判定該檢體含有腸炎弧菌*tdh*致病基因；PCR增幅產物

101年5月16日署授食字第1011901876號公告
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正
106年4月27日衛授食字第1061900803號公告修正
MOHWM0011.02

大小為500 bp者，即判定該檢體含有腸炎弧菌*trh*致病基因。

註5：本PCR反應條件係採GeneAmp® PCR System 9700設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

附註：第二部腸炎弧菌之Multiplex PCR檢測可視需要執行。

第三部：腸炎弧菌之real-time PCR檢測

1. 適用範圍：本方法適用於腸炎弧菌之菌種及致病基因鑑別。
2. 檢驗方法：檢體之增菌液或經分離純化後之菌株，經DNA萃取後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)進行鑑別之方法。
 - 2.1. 工作環境：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. 裝置^(註1)
 - 2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System，或同級品。
 - 2.2.2. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.3. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 2.2.4. 加熱振盪器：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. 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用^(註2)

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

2.3.2.1.1. 腸炎弧菌菌種鑑別基因(標的基因：*tlh*)

引子F：5'-ACTCAACACAAGAAGAGATCGACAA-3'

引子R：5'-GATGAGCGGTTGATGTCCAA-3'

探針P：5'-(FAM)-CGCTCGCGTTCACGAAACCGT-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小207 bp

2.3.2.1.2. 腸炎弧菌致病基因(標的基因：*tdh*)

引子F：5'-AAACATCTGCTTTTGAGCTTCCA-3'

引子R：5'-CTCGAACAACAACAATATCTCATCAG-3'

探針P：5'-(FAM)-TGTCCCTTTTCCTGCCCCCGG-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小74 bp

2.3.2.1.3. 腸炎弧菌致病基因(標的基因：*trh*)

引子F：5'-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3'

引子R：5'-ACGATTGCGTAACTGGTGAT-3'

探針P：5'-(FAM)-CATTCGCGATTGACCTACCATCCA-(TAMRA)-3'

PCR增幅產物大小139 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°C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 tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA)標記。

2.3.2.2. 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。

2.3.3. 對照用物質：腸炎弧菌參考菌株或其DNA。

2.4. 器具及材料^(註3)

- 2.4.1. 微量吸管(Micropipette)：2 μL 、10 μL 、20 μL 、100 μL 、200 μL 及1000 μL 。
- 2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tip)：可滅菌。10 μL 、20 μL 、200 μL 及1000 μL 。
- 2.4.3. 離心管：200 μL 、600 μL 、1.5 mL及2 mL。
- 2.4.4. Real-time PCR反應管：100 μL 。
- 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。
- 2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL及2000 mL。

註3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

2.5. Real-time PCR溶液^(註4)

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System鑑別試驗用

5 μM 引子F.....	2.0 μL
5 μM 引子R.....	2.0 μL
5 μM 探針.....	1.5 μL
TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....	12.5 μL
檢體DNA溶液.....	5.0 μL
無菌去離子水.....	2.0 μL
總體積.....	25.0 μL

註4：Real-time PCR溶液應置於冰浴中配製。

2.6. 檢體DNA溶液之製備

2.6.1. 檢體增菌液之DNA溶液製備

自第一部2.4.1.節於35°C培養18~24小時之檢液中吸取菌液1 mL，置入已滅菌之1.5 mL離心管中，以15000 $\times g$ 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，振盪混合均勻，以15000 $\times g$ 離心3分鐘，去除上清液，續將沉澱物加入無菌去離子水1 mL，振盪混合均勻，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°C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°C冷凍保存。

2.6.2. 分離菌株之DNA溶液製備

自培養基上鉤取一接種環的菌量，置入含有1 mL無菌去離子水之已滅菌1.5 mL離心管中，振盪混合均勻，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°C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. 腸炎弧菌菌種鑑別基因(*tlh*)反應條件

步驟	溫度(°C)	時間(sec)
1. 熱活化	95	20

2. 最初變性	95	5
3. 黏接、延展	59	45

步驟2至步驟3，共進行40個循環反應。

2.7.1.2. 腸炎弧菌致病基因(*tdh*)反應條件

步驟	溫度(°C)	時間(sec)
1. 熱活化	95	20
2. 最初變性	95	5
3. 黏接、延展	60	25

步驟2至步驟3，共進行40個循環反應。

2.7.1.3. 腸炎弧菌致病基因(*trh*)反應條件

步驟	溫度(°C)	時間(sec)
1. 熱活化	95	20
2. 最初變性	95	5
3. 黏接、延展	54	30

步驟2至步驟3，共進行40個循環反應。

2.7.2. Real-time PCR 螢光分析

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。

2.7.3. 確認

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與腸炎弧菌之正反應對照組之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增幅產物為標的基因片段，可確認該檢體中含有腸炎弧菌或其致病基因。

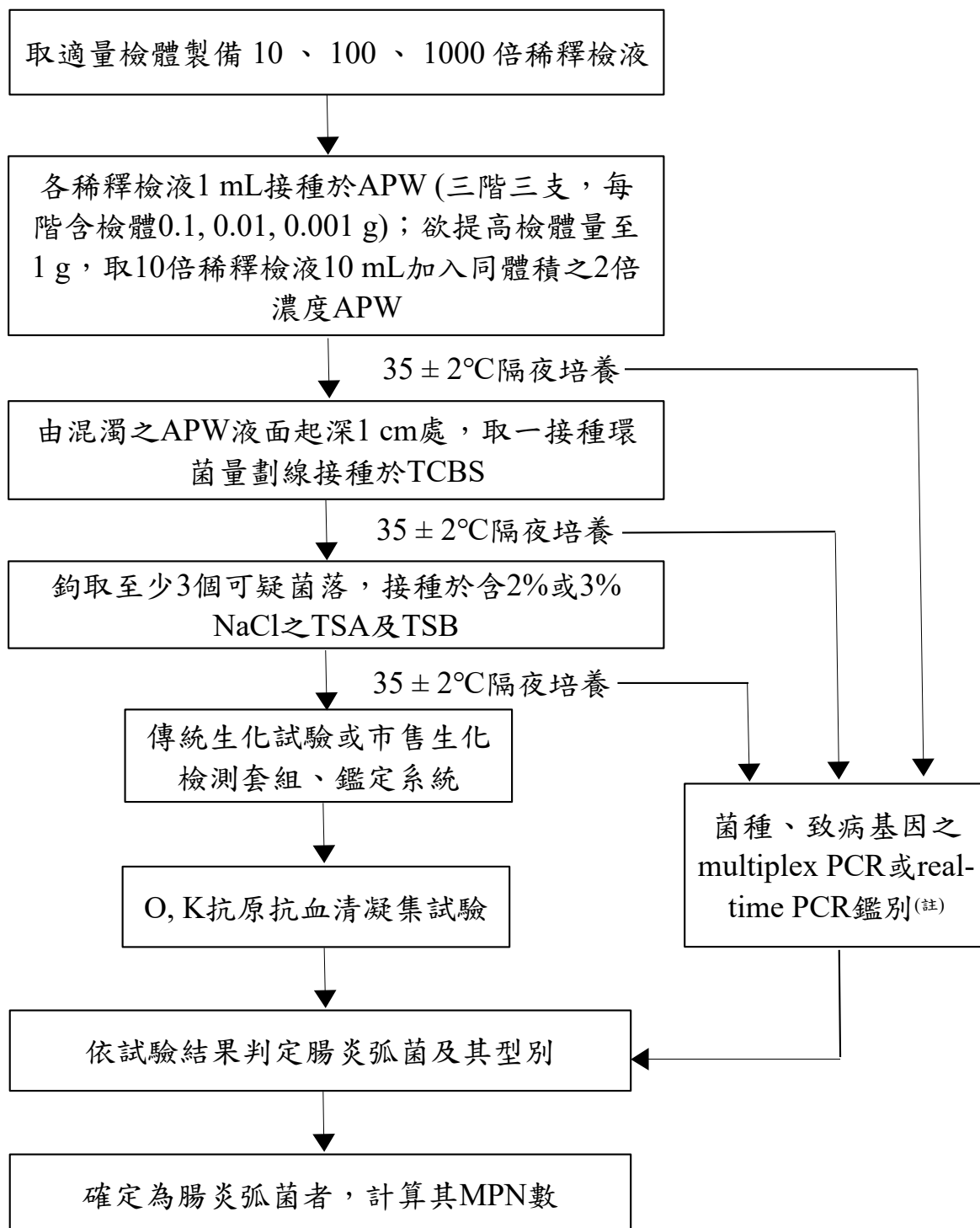
註5：本real-time PCR反應條件係採Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

附註：第三部腸炎弧菌之real-time PCR檢驗可視需要執行。

參考文獻：

1. Kaysner, C. A. and DePaola, Jr., A. 2004. Bacteriological Analytical Manual Chapter 9 *Vibrio*. US FDA.
2. Nordstrom, J. L., Vickery, M. C. L., Blackstone, G. M., Murray, S. L., and DePaola, A. 2007. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5840-5847.
3. Blackstone, G. M., Nordstrom, J. L., Vickery, M. C. L., Bowen, M. D., Meyer, R. F., and DePaola, A. 2003. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *J. Microbiol. Methods* 53: 149-155.
4. Garrido, A., Chapela, M. J., Ferreira, M., Atanassova, M., Fajardo, P., Lago, J., Vieites, J. M., and Cabado, A. G. 2012. Development of a multiplex real-time PCR method for pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* detection (tdh+ and trh+). *Food Control* 24: 128-135.

檢驗流程圖



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