

## 食品微生物之檢驗方法－沙門氏桿菌之檢驗 Methods of Test for Food Microorganisms - Test of *Salmonella*

### 第一部：沙門氏桿菌之分離

1. 適用範圍：本方法適用於食品中沙門氏桿菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經增菌後，續以選擇性培養基培養，配合沙門氏桿菌型別鑑定之方法。
  - 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：保持 $-30\pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
    - 2.2.6. 培養箱：能維持內部溫度溫差在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.7. 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.8. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：能適用於無菌操作者。
    - 2.2.9. 增菌用容器：500 mL 含蓋之可滅菌廣口瓶，或無菌塑膠(鐵胃)袋。
    - 2.2.10. 三角瓶：500 mL。
    - 2.2.11. 燒杯：500 mL。
    - 2.2.12. 加熱板(Hot plate)：具有磁性攪拌功能。
    - 2.2.13. 天平：可稱量到2000 g 者，靈敏度為0.1 g；可稱量到120 g 者，靈敏度為1 mg。
    - 2.2.14. 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。
    - 2.2.15. 吸管輔助器(Pipette aid) 或微量分注器。
    - 2.2.16. 吸管或吸管尖：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。
    - 2.2.17. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線材質，或可拋棄式者。
    - 2.2.18. 試管：16 × 150 mm、20 × 150 mm、10 × 75 mm 及13 × 100 mm 或其它適用者。

- 2.2.19. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
- 2.2.20. 玻璃棒、剪刀、藥勺、小刀及鑷子：可滅菌。
- 2.2.21. 燈箱：一般日光燈源，30瓦。
- 2.2.22. pH 試紙：pH 值適用範圍為6~8。
- 2.2.23. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
- 2.2.24. 振盪器(Shaker)。
- 2.2.25. 無菌濾膜：孔徑0.45  $\mu\text{m}$  或以下之親水性醋酸纖維膜。
- 2.2.26. 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑6 × 50 mm 或其他適用者。
- 2.2.27. 試藥：碘、碘化鉀、煌綠(brilliant green)、氯化鎂( $\text{MgCl}_2$ )、孔雀綠草酸鹽(malachite green oxalate)、氰化鉀(potassium cyanide)、半乳糖醇(dulcitol)、乳糖(lactose)、蔗糖(sucrose)、葡萄糖(glucose)、甲基紅(methyl red)、肌酸(creatine)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、酚紅(phenol red)、氫氧化鈉、氯化鈉、 $\alpha$ -萘酚( $\alpha$ -naphthol)、對-二甲氨基苯甲醛(*p*-dimethyl aminobenzaldehyde)、氫氧化鉀、甲醛溶液(36-38%)、95%乙醇、硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate)、漂白水(約5.25%次氯酸鈉溶液)、無水乙醇、正戊醇(normal amyl alcohol)、亞硫酸鉀(potassium sulfite)、鹽酸、磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、磷酸氫二鉀( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )、磷酸二氫銨( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )、亞硒酸氫鈉( $\text{NaHSeO}_3$ )、硫酸銨[( $\text{NH}_4$ ) $_2\text{SO}_4$ ]、胱胺酸(L-cystine)、膽鹽(bile salts)、膽鹽 No.3 (bile salts No.3)、碳酸鈣( $\text{CaCO}_3$ )、硫代硫酸鈉( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )、無水硫代硫酸鈉( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; anhydrous)、無水磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; anhydrous)、L-離胺酸(L-lysine)、離胺酸鹽酸鹽(L-lysine hydrochloride)、木糖(xylose)、去氧膽酸鈉(sodium deoxycholate)、檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate)、水楊苷(salicin)、溴麝香草藍(bromthymol blue)、酸性復紅(acid fuchsin)、無水硫酸亞鐵( $\text{FeSO}_4$ ; anhydrous)、硫酸亞鐵( $\text{FeSO}_4$ )、檸檬酸鈉( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )、硫酸鎂( $\text{MgSO}_4$ )、尿素(urea)、丙二酸鈉(sodium malonate)、中性紅(neutral red)、結晶紫(crystal violet)、丙酮酸鈉(sodium pyruvate)、亞硫酸銻[ $\text{Bi}_2(\text{SO}_3)_3$ ]、Tergitol anionic 7及 Triton X-100界面活性劑均採用試藥級；牛肉抽出物(beef extract)、酵母抽出物(yeast extract)、蛋白胨(peptone)、胨蛋白胨(proteose peptone)、洋菜(agar)、植物蛋白胨(phytone peptone)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、胰化酪蛋白大豆培養液粉末(trypticase soy broth; dehydrated)、胰化蛋

白培養液粉末(tryptose broth; dehydrated)、聚蛋白胨(polypeptone)、胰化蛋白胨(tryptone)、蛋白胨緩衝液粉末(buffered peptone water powder)、無脂乳粉(nonfat dry milk)、小牛腦浸出物(calf brain infusion)、牛心浸出物(beef heart infusion)、胰蛋白胨 No.3 (proteose peptone No.3)、木瓜酶(papain)及纖維素酶(cellulase)均採用微生物級。

#### 2.2.28. 試劑

- 2.2.28.1. 5%木瓜酶溶液：取木瓜酶5 g，溶於蒸餾水使成100 mL，以9500 rpm 離心10分鐘後，經無菌濾膜過濾，注入已滅菌之三角瓶內。需新鮮配製。
- 2.2.28.2. 1%纖維素酶溶液：取纖維素酶1 g，溶於蒸餾水使成100 mL，溶解後以無菌濾膜過濾後，於2~5°C貯存，並應於2週內使用。
- 2.2.28.3. 0.25%酚紅溶液：取酚紅0.25 g，溶於蒸餾水使成100 mL。
- 2.2.28.4. 1N 氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉40 g，溶於蒸餾水使成1000 mL。
- 2.2.28.5. 1N 鹽酸溶液：取鹽酸89 mL，溶於蒸餾水使成1000 mL。
- 2.2.28.6. 1%煌綠溶液：取煌綠1 g，溶於水使成100 mL，以無菌濾膜過濾。
- 2.2.28.7. 0.1%煌綠溶液：取煌綠0.1 g，溶於蒸餾水使成100 mL。
- 2.2.28.8. 0.002%煌綠溶液：取1%煌綠溶液2 mL，加入蒸餾水使成1000 mL。
- 2.2.28.9. 0.2%溴甲酚紫溶液：取溴甲酚紫0.2 g，溶於蒸餾水使成100 mL。
- 2.2.28.10. 0.85%無菌生理食鹽水(0.85% sterile physiological saline solution)：取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水使成1000 mL分裝於試管，以121°C滅菌15分鐘。
- 2.2.28.11. 福馬林化生理食鹽水(Formalinized physiological saline solution)：取氯化鈉8.5 g，以蒸餾水溶解使成1000 mL，以121°C滅菌15分鐘，冷卻至室溫，再加甲醛溶液6 mL。
- 2.2.28.12. 柯瓦克氏試劑(Kovacs' reagent)：取對-二甲胺基苯甲醛5 g，溶於正戊醇75 mL，再徐徐加入鹽酸25 mL，混合均勻後應呈黃色，保存於4°C冰箱中。
- 2.2.28.13. 歐普氏試劑(Voges-Proskauer reagents, VP reagents)：  
溶液 A：取  $\alpha$ -萘酚5 g，以無水乙醇溶解使成100 mL。  
溶液 B：取氫氧化鉀40 g，以蒸餾水溶解使成100mL。
- 2.2.28.14. 甲基紅指示劑(Methyl red indicator)：取甲基紅0.1 g，溶於

95%乙醇300 mL，再加蒸餾水使成500 mL。

2.2.28.15. 碘-碘化鉀溶液：取碘化鉀5 g，溶於無菌水5 mL，加入碘6 g，攪拌至溶解，再加無菌水稀釋至20 mL，避光儲存。本操作務必在抽氣櫃內進行。

2.2.28.16. 含0.1%硫酸月桂酸鈉氯水溶液：取硫酸月桂酸鈉1 g，溶於蒸餾水992 mL，再加入漂白水8 mL，臨用前配製。

2.2.28.17. 0.5%氰化鉀溶液：取氰化鉀0.5 g，溶於無菌蒸餾水使成100 mL。氰化鉀為劇毒物質，本操作務必在抽氣櫃內進行。

2.2.28.18. 氯化鎂溶液：取氯化鎂400 g，溶於蒸餾水使成1000 mL。

2.2.28.19. 孔雀綠草酸鹽溶液：取孔雀綠草酸鹽0.4 g，溶於蒸餾水使成100 mL。

#### 2.2.29. 血清

2.2.29.1. 沙門氏桿菌多價本體(O)抗血清[*Salmonella* polyvalent somatic (O) antiserum]

2.2.29.2. 沙門氏桿菌多價鞭毛(H)抗血清[*Salmonella* polyvalent flagellar (H) antiserum]

2.2.29.3. 沙門氏桿菌單價本體族群(O)抗血清[*Salmonella* somatic group (O) antiserum]，包括 A、B、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>、E<sub>4</sub>、F、G、H、I 及 Vi。

#### 2.2.30. 培養基

2.2.30.1. 乳糖培養液(Lactose broth)

牛肉抽出物(beef extract) .....3 g

蛋白胨(peptone).....5 g

乳糖(lactose).....5 g

蒸餾水.....1000 mL

加熱溶解後，以121℃滅菌15分鐘，最終 pH 值為6.9 ± 0.2。

2.2.30.2. 無脂乳粉溶液(Nonfat dry milk, Reconstituted)

無脂乳粉(nonfat dry milk).....100 g

蒸餾水.....1000 mL

加熱溶解後，以121℃滅菌15分鐘。

2.2.30.3. 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water)

蛋白胨(peptone).....10 g

氯化鈉.....5 g

磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).....3.5 g

磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).....1.5 g

蒸餾水.....1000 mL

加熱溶解後，以121℃滅菌15分鐘，最終 pH 值為7.2±0.2。

2.2.30.4. 亞硒酸胱胺酸培養液(Selenite cystine broth, SC)

|                                         |         |
|-----------------------------------------|---------|
| 聚蛋白胨(polypeptone).....                  | 5 g     |
| 或胰化蛋白胨(tryptone)                        |         |
| 乳糖(lactose) .....                       | 4 g     |
| 磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )..... | 10 g    |
| 亞硒酸氫鈉( $\text{NaHSeO}_3$ ).....         | 4 g     |
| 胱胺酸(L-cystine).....                     | 0.01 g  |
| 蒸餾水.....                                | 1000 mL |

加熱溶解後，取10 mL 或225 mL，分別注入試管或三角瓶內後，再於沸騰水浴上蒸氣加熱10分鐘(加熱時應經常搖動，但不可高壓殺菌)，最終 pH 值為 $7.0 \pm 0.2$ 。配製後應當天使用。

2.2.30.5. 四硫代硫酸鹽培養液(Tetrathionate broth, TT)

TT 基礎培養液(TT broth base)

|                                                                           |         |
|---------------------------------------------------------------------------|---------|
| 聚蛋白胨(polypeptone).....                                                    | 5 g     |
| 膽鹽(bile salts).....                                                       | 1 g     |
| 碳酸鈣( $\text{CaCO}_3$ ).....                                               | 10 g    |
| 硫代硫酸鈉( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )..... | 30 g    |
| 蒸餾水.....                                                                  | 1000 mL |

將基礎培養液加熱沸騰，最終 pH 值為 $8.4 \pm 0.2$ 。冷卻至 $45^\circ\text{C}$ 以下，分取10 mL，注入試管中，儲藏於冰箱備用。使用前加入碘-碘化鉀溶液0.2 mL 及0.1%煌綠溶液0.1 mL。

2.2.30.6. Rappaport - Vassiliadis 培養液(RV)

RV 基礎培養液(RV broth base)

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| 胰化蛋白胨(tryptone).....                   | 5 g     |
| 氯化鈉.....                               | 8 g     |
| 磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )..... | 1.6 g   |
| 蒸餾水.....                               | 1000 mL |

量取 RV 基礎培養液1000 mL、氯化鎂溶液100 mL 及孔雀綠草酸鹽溶液10 mL，混合均勻，分取10 mL，注入試管，以 $115^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最終 pH 值為 $5.5 \pm 0.2$ 。RV 基礎培養液必須於配製當天與氯化鎂溶液及孔雀綠草酸鹽溶液混合成為 RV 培養液。氯化鎂溶液儲存於棕色瓶中，於室溫下可保存1年；孔雀綠草酸鹽溶液儲存於棕色瓶中，於室溫下可保存6個月。配製完成之 RV 培養液儲存於冰箱中勿超過1個月。不建議使用市售乾燥培養基配製本培養液。

2.2.30.7. 木糖離胺酸去氧膽酸鹽培養基(Xylose lysine deoxycholate

agar, XLD)

|                                                                           |         |
|---------------------------------------------------------------------------|---------|
| 酵母抽出物(yeast extract).....                                                 | 3 g     |
| L-離胺酸(L-lysine).....                                                      | 5 g     |
| 木糖(xylose).....                                                           | 3.75 g  |
| 乳糖(lactose).....                                                          | 7.5 g   |
| 蔗糖(sucrose).....                                                          | 7.5 g   |
| 去氧膽酸鈉(sodium deoxycholate).....                                           | 2.5 g   |
| 檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate).....                                       | 0.8 g   |
| 硫代硫酸鈉( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )..... | 6.8 g   |
| 氯化鈉.....                                                                  | 5 g     |
| 洋菜(agar).....                                                             | 15 g    |
| 酚紅(phenol red).....                                                       | 0.08 g  |
| 蒸餾水.....                                                                  | 1000 mL |

攪拌加熱至沸騰溶解，注意不可加熱過度。於50℃水浴中冷卻，最終 pH 值為7.4±0.2。每培養皿注入約20 mL，凝固後打開皿蓋約1/2～1/4，使培養基表面乾燥。配製後勿儲存超過一天。

#### 2.2.30.8. 海克頓腸內菌培養基(Hektoen enteric agar, HE)

|                                                                           |         |
|---------------------------------------------------------------------------|---------|
| 蛋白胨(peptone).....                                                         | 12 g    |
| 酵母抽出物(yeast extract).....                                                 | 3 g     |
| 膽鹽 No.3 (bile salts No.3).....                                            | 9 g     |
| 乳糖(lactose).....                                                          | 12 g    |
| 蔗糖(sucrose).....                                                          | 12 g    |
| 水楊苷(salicin).....                                                         | 2 g     |
| 氯化鈉.....                                                                  | 5 g     |
| 硫代硫酸鈉( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )..... | 5 g     |
| 檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate).....                                       | 1.5 g   |
| 溴麝香草藍(bromthymol blue).....                                               | 0.065 g |
| 酸性復紅(acid fuchsin).....                                                   | 0.1 g   |
| 洋菜(agar).....                                                             | 14 g    |
| 蒸餾水.....                                                                  | 1000 mL |

攪拌加熱至沸騰溶解，沸騰勿超過1分鐘。於50℃水浴中冷卻，最終 pH 值為7.5±0.2。每培養皿注入約20 mL，打開皿蓋約1/2～1/4，靜置約2小時，使培養基表面乾燥。配製後勿儲存超過一天。

#### 2.2.30.9. 亞硫酸銨培養基(Bismuth sulfite agar, BS)

|                                     |      |
|-------------------------------------|------|
| 聚蛋白胨(polypeptone)或蛋白胨(peptone)..... | 10 g |
|-------------------------------------|------|

|                                                      |         |
|------------------------------------------------------|---------|
| 牛肉抽出物(beef extract).....                             | 5 g     |
| 葡萄糖(glucose).....                                    | 5 g     |
| 無水磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; anhydrous)..... | 4 g     |
| 無水硫酸亞鐵( $\text{FeSO}_4$ ; anhydrous).....            | 0.3 g   |
| 亞硫酸鉍[ $\text{Bi}_2(\text{SO}_3)_3$ ].....            | 8 g     |
| 煌綠(brilliant green).....                             | 0.025 g |
| 洋菜(agar).....                                        | 20 g    |
| 蒸餾水.....                                             | 1000 mL |

攪拌加熱至沸騰溶解約1分鐘，不須高壓滅菌。冷卻至45～50℃，最終 pH 值為7.7±0.2。每培養皿注入約20 mL，打開皿蓋約1/2～1/4，靜置約2小時，使培養基表面乾燥。培養基注入培養皿前，應搖動混合，使絮狀沈澱物分散均勻，搖動時應避免產生氣泡。培養基以當天使用最佳，最多不得超過48小時，且應貯存於暗處。

#### 2.2.30.10. 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    |
| 胨蛋白胨(proteose peptone).....                                               | 5 g     |
| 葡萄糖(glucose).....                                                         | 1 g     |
| 乳糖(lactose).....                                                          | 10 g    |
| 蔗糖(sucrose).....                                                          | 10 g    |
| 硫酸亞鐵( $\text{FeSO}_4$ ).....                                              | 0.2 g   |
| 氯化鈉.....                                                                  | 5 g     |
| 硫代硫酸鈉( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )..... | 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，分取約5 mL，注入試管，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，斜面長度約4～5 cm，斜面底部之深度約2～3 cm。

#### 2.2.30.11. 胰化蛋白胨培養液(Tryptone broth)

|                      |         |
|----------------------|---------|
| 胰化蛋白胨(tryptone)..... | 10 g    |
| 蒸餾水.....             | 1000 mL |

加熱溶解後，分取約5 mL，注入試管內，以121℃滅菌15分鐘，最終 pH 值為6.9±0.2。

#### 2.2.30.12. 胰化酪蛋白大豆培養液(Trypticase soy broth)

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.....5 g  
葡萄糖(glucose).....2.5 g  
蒸餾水.....1000 mL  
加熱溶解後，取225 mL，倒入500 mL 三角錐瓶，以121℃  
滅菌15分鐘。最終 pH 值為7.3±0.2。

2.2.30.13. 胰化酪蛋白大豆胰化蛋白培養液(Trypticase soy- tryptose broth)

胰化酪蛋白大豆培養液粉末  
(trypticase soy broth; dehydrated).....15 g  
胰化蛋白培養液粉末  
(tryptose broth; dehydrated).....13.5 g  
酵母抽出物(yeast extract).....3 g  
蒸餾水.....1000 mL  
加熱溶解後，分取約5 mL，注入試管內，以121℃滅菌15  
分鐘，最終 pH 值為7.2±0.2。

2.2.30.14. 含亞硫酸鉀胰化酪蛋白大豆培養液(Trypticase soy broth containing potassium sulfite)

亞硫酸鉀(potassium sulfite).....5 g  
胰化酪蛋白大豆培養液.....1000 mL  
加熱溶解後，以121℃滅菌15分鐘，備用。

2.2.30.15. MR-VP 培養液(MR-VP broth)

蛋白胨緩衝液粉末.....7 g  
(buffered peptone-water powder)  
葡萄糖(glucose).....5 g  
磷酸氫二鉀( $K_2HPO_4$ ).....5 g  
蒸餾水.....1000 mL  
溶解後，分取約5 mL，注入試管中，以121℃滅菌12~15  
分鐘，最終 pH 值為6.9±0.2。

2.2.30.16. 辛蒙斯檸檬酸鹽培養基(Simmons citrate agar)

氯化鈉.....5 g  
檸檬酸鈉( $Na_3C_6H_5O_7$ ).....2 g  
磷酸氫二鉀( $K_2HPO_4$ ).....1 g  
磷酸二氫銨( $NH_4H_2PO_4$ ).....1 g  
硫酸鎂( $MgSO_4$ ).....0.2 g

溴麝香草藍(bromthymol blue).....0.08 g  
洋菜(agar).....15 g  
蒸餾水.....1000 mL  
加熱溶解後，分取約5 mL，注入試管中，以121℃滅菌15分鐘，最終 pH 值為6.8±0.2。滅菌後作成斜面培養基，此斜面長度約4~5 cm，斜面底部深度約2~3 cm。

2.2.30.17. 尿素培養液(Urea broth)

尿素(urea).....20 g  
酵母抽出物(yeast extract).....0.1 g  
磷酸氫二鉀(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).....9.1 g  
磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).....9.5 g  
酚紅(phenol red).....0.01 g  
蒸餾水.....1000 mL  
溶解後，以無菌濾膜過濾，分取1.5~3.0 mL 濾液，注入已滅菌之試管中，最終 pH 值為6.8±0.2。

2.2.30.18. 尿素培養液(Urea broth) (rapid)

尿素(urea).....20 g  
酵母抽出物(yeast extract).....0.1 g  
磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).....0.095 g  
磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).....0.091 g  
酚紅(phenol red).....0.01 g  
蒸餾水.....1000 mL  
溶解後，以無菌濾膜過濾，分取1.5~3.0 mL 濾液，注入已滅菌之試管中，最終 pH 值為6.8±0.2。

2.2.30.19. 丙二酸鹽培養液(Malonate broth)

酵母抽出物(yeast extract).....1 g  
硫酸銨[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>].....2 g  
磷酸氫二鉀(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).....0.6 g  
磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).....0.4 g  
氯化鈉.....2 g  
丙二酸鈉(sodium malonate).....3 g  
葡萄糖(glucose).....0.25 g  
溴麝香草藍(bromthymol blue).....0.025 g  
蒸餾水.....1000 mL  
加熱溶解後，分取約3 mL，注入試管中，以121℃滅菌15分鐘，最終 pH 值為6.7±0.2。

2.2.30.20. 離胺酸鐵培養基(Lysine iron agar, LIA)

|                                                              |         |
|--------------------------------------------------------------|---------|
| 蛋白胨(peptone).....                                            | 5 g     |
| 酵母抽出物(yeast extract).....                                    | 3 g     |
| 葡萄糖(glucose).....                                            | 1 g     |
| 離胺酸鹽酸鹽(L-lysine hydrochloride).....                          | 10 g    |
| 檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate).....                          | 0.5 g   |
| 無水硫代硫酸鈉( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; anhydrous)..... | 0.04 g  |
| 溴甲酚紫(bromcresol purple).....                                 | 0.02 g  |
| 洋菜(agar).....                                                | 15 g    |
| 蒸餾水.....                                                     | 1000 mL |

加熱溶解後，分取約4 mL，注入試管中，以121℃滅菌12分鐘，最終 pH 值為 $6.7\pm 0.2$ 。滅菌後作成斜面培養基，此斜面長度約2.5 cm，斜面底部之深度約4 cm。

2.2.30.21. 離胺酸脫羧酶培養液(Lysine decarboxylase broth)

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| 蛋白胨(peptone).....            | 5 g     |
| 酵母抽出物(yeast extract).....    | 3 g     |
| 葡萄糖(glucose).....            | 1 g     |
| 離胺酸(L-lysine).....           | 5 g     |
| 溴甲酚紫(bromcresol purple)..... | 0.02 g  |
| 蒸餾水.....                     | 1000 mL |

加熱溶解後，分取約5 mL，注入附有螺旋蓋試管中，以121℃滅菌15分鐘，最終 pH 值為6.5~6.8。

2.2.30.22. 氰化鉀培養液[Potassium cyanide (KCN) broth]

|                                         |         |
|-----------------------------------------|---------|
| 聚蛋白胨(polypeptone).....                  | 3 g     |
| 氯化鈉.....                                | 5 g     |
| 磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....  | 0.225 g |
| 磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )..... | 5.64 g  |
| 蒸餾水.....                                | 1000 mL |

加熱溶解後，以121℃滅菌15分鐘，最終 pH 值為 $7.6\pm 0.2$ 。冷卻後於抽氣櫃內以吸管輔助器配合無菌操作，加入0.5%氰化鉀溶液15 mL，混合均勻，分取1~1.5 mL，注入已滅菌之試管，貯存於冰箱備用，貯存期限不超過兩週。

2.2.30.23. 酚紅碳水化合物培養液(Phenol red carbohydrate broth)

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| 胨蛋白胨 No.3 (proteose peptone No.3)..... | 10 g    |
| 氯化鈉.....                               | 5 g     |
| 牛肉抽出物(beef extract).....               | 1 g     |
| 酚紅(phenol red).....                    | 0.018 g |
| (或0.25%酚紅溶液7.2 mL)                     |         |

蒸餾水.....1000 mL

取半乳糖醇5 g，溶解於上述之培養液後，分取約2.5 mL，注入裝有發酵管之試管內，以118℃滅菌10分鐘，最終pH 值為7.4±0.2。含乳糖或蔗糖10 g 之酚紅碳水化合物培養液配製方法亦同。

2.2.30.24. 紫色碳水化合物培養液(Purple carbohydrate broth)

胨蛋白胨 No.3 (proteose peptone No.3).....10 g

牛肉抽出物(beef extract).....1 g

氯化鈉.....5 g

溴甲酚紫(bromcresol purple).....0.02 g

蒸餾水.....1000 mL

操作步驟與2.2.28.23相同，最終 pH 值為6.8±0.2。

2.2.30.25. 麥康奇培養基(MacConkey agar)

胨蛋白胨(proteose peptone).....3 g

蛋白胨(peptone).....17 g

乳糖(lactose).....10 g

膽鹽 No.3 (bile salts No.3).....1.5 g

氯化鈉.....5 g

中性紅(neutral red).....0.03 g

結晶紫(crystal violet).....0.001 g

洋菜(agar).....13.5 g

蒸餾水.....1000 mL

加熱溶解後，分裝於試管或三角瓶內，以121℃滅菌15分鐘，最終 pH 值為7.1±0.2。

2.2.30.26. 營養培養液(Nutrient broth)

牛肉抽出物(beef extract).....3 g

蛋白胨(peptone).....5 g

蒸餾水.....1000 mL

加熱溶解後，分取約10 mL，注入試管，以121℃滅菌15分鐘，最終 pH 值為6.8±0.2。

2.2.30.27. 腦心浸出物培養液(Brain heart infusion broth, BHI)

小牛腦浸出物(calf brain infusion).....200 g

牛心浸出物(beef heart infusion).....250 g

胨蛋白胨(proteose peptone).....10 g

氯化鈉.....5 g

磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).....2.5 g

葡萄糖(glucose).....2 g

蒸餾水.....1000 mL

加熱溶解後，分裝於試管中，以121℃滅菌15分鐘，最終 pH 值為7.4±0.2。

2.2.30.28. 含硫酸亞鐵胰化酪蛋白大豆培養液(Trypticase soy broth containing ferrous sulfate)

硫酸亞鐵( $\text{FeSO}_4$ ).....35 mg

胰化酪蛋白大豆培養液.....1000 mL

加熱溶解後以121℃滅菌15分鐘，最終 pH 值為7.3±0.2。

2.2.30.29. 預增菌培養液(Universal preenrichment broth)

胰化蛋白胨(tryptone).....5 g

胨蛋白胨(proteose peptone).....5 g

磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....15 g

磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).....7 g

氯化鈉.....5 g

葡萄糖(glucose).....0.5 g

硫酸鎂( $\text{MgSO}_4$ ).....0.25 g

檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate).....0.1 g

丙酮酸鈉(sodium pyruvate).....0.2 g

蒸餾水.....1000 mL

加熱溶解後，分裝於試管中，以121℃滅菌15分鐘，最終 pH 值為6.3±0.2。

2.3. 檢液之調製與增菌培養

2.3.1. 脫水蛋黃、蛋白及全蛋，液狀乳(脫脂乳、含2%脂肪乳，全脂乳及白脫乳)，粉末配方混合物(蛋糕、餅乾、甜甜圈及麵包)，嬰兒配方食品(infant formula)及其他含蛋之口服或管灌食品：冷凍檢體分析前不須解凍。如冷凍檢體須回溫方可切割取樣時，儘速解凍以免傷及沙門氏桿菌或造成競爭性微生物之增殖。樣品可置於45℃以下水浴中，持續搖動，解凍時間不超過15分鐘，或在2~5℃，解凍時間不超過18小時。在無菌操作下稱取檢體25 g，置於已滅菌含蓋廣口瓶內。檢體為非粉末類，則加乳糖培養液225 mL。檢體為粉末狀，則先加乳糖培養液15 mL，以已滅菌玻璃棒攪拌均勻，再依續加入乳糖培養液10、10及190 mL，使總添加量為225 mL。攪拌均勻後，將瓶蓋旋緊並在室溫放置60±5分鐘。必要時，以1N 氫氧化鈉溶液或1N 鹽酸溶液將 pH 值調至6.8±0.2。將瓶蓋略旋鬆，於35℃培養24±2小時後供作檢液。

2.3.2. 蛋品

- 2.3.2.1. 帶殼蛋：先以刷子清洗蛋表面並瀝乾。浸於含0.1%硫酸月桂酸鈉之氯水溶液約30分鐘。以無菌操作取出蛋黃及蛋白，混合均勻後稱取25 g，置於已滅菌廣口瓶內。加含硫酸亞鐵胰化酪蛋白大豆培養液225 mL，混合均勻，在室溫靜置60±5分鐘。先以 pH 試紙測其 pH 值，必要時，以無菌之1N 氫氧化鈉溶液或1N 鹽酸溶液將 pH 值調至6.8±0.2。於35°C 培養24±2小時後，供作檢液。
- 2.3.2.2. 全蛋液(均質化者)：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌廣口瓶內。加含硫酸亞鐵胰化酪蛋白大豆培養液225 mL，混合均勻後，續依2.3.2.1.節步驟進行檢液之調製。
- 2.3.2.3. 水煮蛋(雞蛋、鴨蛋及其他)：蛋殼完整者，依2.3.2.1.節步驟處理，再以無菌操作取出蛋黃及蛋白，混合均勻後稱取25 g，置於已滅菌廣口瓶內，加胰化酪蛋白大豆培養液225 mL，振盪均勻後，續依2.3.2.1.節步驟進行檢液之調製。
- 2.3.3. 脫脂乳粉
- 2.3.3.1. 即溶脫脂乳粉：以無菌操作稱取檢體25 g，徐徐加至盛有0.002%煌綠溶液225 mL 之廣口瓶中，使其佈滿於表面。必要時，檢體量可倍增，並依上述步驟加至盛有等比例0.002%煌綠溶液之廣口瓶中。勿混合或調整 pH 值，靜置60±5分鐘後，將瓶蓋旋鬆，於35°C 培養24±2小時，供作檢液。
- 2.3.3.2. 非即溶脫脂乳粉：依2.3.3.1.節步驟進行檢液之調製，但不建議倍增檢體量。
- 2.3.4. 全脂乳粉：依2.3.3.1.步驟進行檢液之調製，但不建議倍增檢體量。
- 2.3.5. 酪蛋白
- 2.3.5.1. 乳酸酪蛋白(Lactic casein)：以無菌操作稱取檢體25 g，徐徐加至盛有預增菌培養液225 mL 之廣口瓶中，使其佈滿於表面。必要時，檢體量可倍增，並依上述步驟加至盛有等比例預增菌培養液之廣口瓶中。勿混合或調整 pH 值，靜置60±5分鐘後，將瓶蓋旋鬆，於35°C 培養24±2小時，供作檢液。
- 2.3.5.2. 酶凝酪蛋白(Rennet casein)：以無菌操作稱取檢體25 g，徐徐加至盛有乳糖培養液225 mL 之廣口瓶中，使其佈滿於表面。必要時，檢體量可倍增，並依上述步驟加至盛有等比例乳糖培養液之廣口瓶中。勿混合或調整 pH 值，靜置60±5分鐘後，將瓶蓋旋鬆，於35°C 培養24±2小時，供作檢液。
- 2.3.5.3. 酪蛋白鈉(Sodium caseinate)：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌均質杯內，加乳糖培養液225 mL，混合均勻。必要時，檢體量可倍增，並依上述步驟加至盛有等比例乳糖培養液之

廣口瓶中，混合均勻。將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 $60\pm 5$ 分鐘後，混勻並測 pH 值。必要時，調整 pH 值至 $6.8\pm 0.2$ 。將瓶蓋略旋鬆，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm 2$ 小時後，供作檢液。

- 2.3.6. 黃豆粉：依2.3.5.2.步驟進行檢液之調製，但不建議倍增檢體量。
- 2.3.7. 含蛋製品(麵條、蛋捲、通心麵、義大利麵條)、乾酪、生麵糰、沙拉(含火腿、蛋、雞肉、鮭魚、火雞肉)、生鮮、冷凍、或乾燥水果及蔬菜、堅果核仁、甲殼類(蝦、螃蟹、小龍蝦、龍蝦)及魚類：檢驗分析前，冷凍檢體最好不要解凍。需回溫再切取檢體時，可在 $45^{\circ}\text{C}$ 以下之水浴，持續搖動，解凍不超過15分鐘，或在 $2\sim 5^{\circ}\text{C}$ ，解凍時間不超過18小時。以無菌操作稱取檢體25 g，置入已滅菌之均質杯內。加乳糖培養液225 mL，均質2分鐘。將已均質化之檢體與培養液混合物倒入已滅菌廣口瓶內，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 $60\pm 5$ 分鐘後，混勻並調整 pH 值至 $6.8\pm 0.2$ 。將瓶蓋略旋鬆，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm 2$ 小時後，供作檢液。
- 2.3.8. 乾酵母：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌含蓋廣口瓶內。加胰化酪蛋白大豆培養液225 mL。混合均勻，將瓶蓋旋緊，在室溫靜置 $60\pm 5$ 分鐘後，混勻並調整 pH 值至 $6.8\pm 0.2$ 。將瓶蓋略旋鬆，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm 2$ 小時後，供作檢液。
- 2.3.9. 糖霜及甜點加覆料(Frosting and topping mixes)：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌含蓋之廣口瓶內。加營養培養液225 mL，混合均勻。將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 $60\pm 5$ 分鐘後，混勻並調整 pH 值至 $6.8\pm 0.2$ 。將瓶蓋略旋鬆，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm 2$ 小時後供作檢液。
- 2.3.10. 香辛料
- 2.3.10.1. 黑胡椒、白胡椒、芹菜片及種子、辣椒粉、小茴香、紅椒、香芹碎片、迷迭香、芝麻、麝香草及蔬菜片等：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌含蓋之廣口瓶內，加胰化酪蛋白大豆培養液225 mL，混合均勻。將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 $60\pm 5$ 分鐘。調整 pH 值至 $6.8\pm 0.2$ 。將瓶蓋略旋鬆，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm 2$ 小時後，供作檢液。
- 2.3.10.2. 洋蔥片、洋蔥粉、大蒜片：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌含蓋之廣口瓶內。加含亞硫酸鉀胰化酪蛋白大豆培養液225 mL 後，依2.3.10.1.節步驟調製檢液。
- 2.3.10.3. 眾香子、肉桂、丁香及牛至草香辛料：眾香子、肉桂及牛至草香辛料以檢體與胰化酪蛋白大豆培養液為1：100的比例、丁香以1：1000，其它葉狀調味料則至少以1：10的比例予以混合，續依2.3.10.1.節步驟製備檢液。

- 2.3.11. 糖果及糖衣(包括巧克力)：以無菌操作稱取檢體25 g，置入已滅菌均質杯內，加無脂乳粉培養液225 mL，均質2分鐘。將此溶液倒入已滅菌含蓋廣口瓶內，將瓶蓋旋緊後於室溫靜置60±5分鐘。必要時，調整 pH 值至6.8±0.2後，加1%煌綠溶液0.45 mL，混合均勻，並將瓶蓋旋鬆後，於35℃培養24±2小時後，供作檢液。
- 2.3.12. 椰子：以無菌操作稱取檢體25 g，置入已滅菌之含蓋廣口瓶內。加乳糖培養液225 mL，將瓶蓋旋緊並混合均勻，於室溫靜置60±5分鐘後，混勻並測 pH 值。必要時，將 pH 值調至6.8±0.2。加業經蒸氣加熱15分鐘之 Tergitol anionic 7 2.25 mL，混合均勻。或加經蒸氣加熱15分鐘之 Triton X-100 2至3滴。將瓶蓋旋鬆，於35℃培養24±2小時後，供作檢液。
- 2.3.13. 食品染料及食品著色劑：當染料之 pH 值≥6.0時，使用2.3.1.節之方法製備檢液。染料之 pH 值<6.0時，以無菌操作稱取檢體25 g，置入已滅菌含蓋廣口瓶，加不含煌綠之 TT 培養液225 mL。將瓶蓋旋緊，混合均勻，於室溫靜置60±5分鐘，調整 pH 值至6.8±0.2。加0.1%煌綠溶液2.25 mL，混合均勻。將瓶蓋旋鬆，於35℃培養24±2小時後，依2.4.3.直接劃線於選擇性培養基。
- 2.3.14. 明膠：以無菌操作稱取檢體25 g，置入無菌含蓋廣口瓶內。加乳糖培養液225 mL 及5%木瓜酶溶液5 mL，混合均勻。將瓶蓋旋緊，於室溫靜置60±5分鐘。混合均勻，以試紙測 pH 值。必要時，將 pH 值調至6.8±0.2。將瓶蓋旋鬆，於35℃培養24±2小時後，供作檢液。
- 2.3.15. 肉、肉類代用品(如素雞等)、肉類副產品、動物成分(如膠原蛋白等)、魚粉、肉粉及骨粉：以無菌操作稱取檢體25 g，置入已滅菌之均質杯內。加乳糖培養液225 mL，均質2分鐘。將已均質化之檢體與培養液混合物倒入已滅菌廣口瓶內，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置60±5分鐘。檢體為粉狀或磨碎狀不需均質時，加乳糖培養液並充分混合均勻後，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置60±5分鐘。以試紙測 pH 值，必要時，將 pH 值調至6.8±0.2。加以蒸氣加熱15分鐘之 Tergitol Anionic 7或 Triton X-100，儘量減少用量，加至會產生泡沫即可，最多加至2.25 mL，實際用量視檢體成分而定。粉狀肝臟及腎臟類製品等，不需加界面活性劑。將瓶蓋旋鬆，於35℃培養24±2小時後，供作檢液。
- 2.3.16. 蛙腿：將15對蛙腿或分別來自15對之蛙腿15隻(平均每支重量在25 g 以上時) 置於無菌塑膠袋內，上覆乳糖培養液，檢體與培養液之比例為1：9 (g/mL)。混合均勻，於室溫靜置60±5分鐘後

，以試紙測試 pH 值，必要時，將 pH 值調至 $6.8\pm0.2$ 。於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm2$ 小時後，供作檢液。

- 2.3.17. 兔檢體：將兔檢體置入無菌塑膠袋內，上覆乳糖培養液，檢體與培養液之比例為1：9。混合均勻，於室溫靜置 $60\pm5$ 分鐘後，以試紙測試 pH 值，必要時，將 pH 值調至 $6.8\pm0.2$ 。於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm2$ 小時後，供作檢液。
- 2.3.18. 關華豆膠(Guar gum)：取乳糖培養液225 mL 及已除菌之1% 纖維素酶溶液2.25 mL 至已滅菌含蓋之廣口瓶中。在以磁鐵攪拌混合之過程中，迅速加入檢體25 g，充分攪拌後，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 $60\pm5$ 分鐘後(無需調整 pH 值)，將瓶蓋旋鬆，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm2$ 小時後，供作檢液。
- 2.3.19. 柳橙汁(已滅菌及未滅菌)、未過濾之蘋果汁(已滅菌及未滅菌)、已過濾之蘋果汁(已滅菌)：以無菌操作量取檢體25 mL，置於已滅菌且盛有預增菌培養液225 mL 之含蓋廣口瓶中，混合均勻。將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 $60\pm5$ 分鐘 (無需調整 pH 值)，續將廣口瓶之蓋子旋鬆，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm2$ 小時後，供作檢液。
- 2.3.20. 網紋甜瓜(Cantaloupe)：檢驗分析前，冷凍檢體最好不要解凍。需回溫再切取檢體時，可在 $45^{\circ}\text{C}$ 以下之水浴，持續搖動，解凍不超過15分鐘，或在 $2\sim5^{\circ}\text{C}$ ，解凍時間不超過18小時。檢體為塊狀或丁狀時，以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌之均質杯內。加預增菌培養液225 mL，均質2分鐘。將已均質化之檢體與培養液混合物倒入已滅菌廣口瓶內，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 $60\pm5$ 分鐘(無需調整 pH 值)，續將廣口瓶之蓋子略旋鬆，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm2$ 小時後，供作檢液。檢體為完整網紋甜瓜時，將檢體置於無菌塑膠袋內，加足夠之預增菌培養液，使檢體浮起。添加培養液之體積可能為檢體重量之1.5倍，例如檢體1500 g 可能需要培養液約2250 mL。必要時，再加更多培養液。將盛有檢體及培養液之塑膠袋置於適當之容器內，將袋口摺下以防止污染，但不密封。於室溫靜置 $60\pm5$ 分鐘後(無需調整 pH 值)，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm2$ 小時，供作檢液。
- 2.3.21. 芒果(Mango)：檢驗分析前，冷凍檢體最好不要解凍。需回溫再切取檢體時，可在 $45^{\circ}\text{C}$ 以下之水浴，持續搖動，解凍不超過15 分鐘，或在 $2\sim5^{\circ}\text{C}$ ，解凍時間不超過18小時。檢體為塊狀或丁狀時，以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌之均質杯內。加蛋白胰緩衝液225 mL，均質2分鐘。將已均質化之檢體與培養液混合物倒入已滅菌廣口瓶內，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 $60\pm5$ 分鐘

後，混勻並調整 pH 值至 $6.8\pm 0.2$ 。將瓶蓋略旋鬆，並於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm 2$ 小時後，供作檢液。檢體為完整芒果時，將檢體置於無菌塑膠袋內，加足夠之蛋白胨緩衝液，使檢體浮起。添加培養液之體積可能為檢體重量之1.5倍，例如檢體500 g 可能需要培養液約750 mL。必要時，再加更多培養液。將盛有檢體及培養液之塑膠袋置於適當之容器內，將袋口摺下以防止污染，但不密封，於室溫靜置 $60\pm 5$ 分鐘。必要時，調整 pH 值至 $6.8\pm 0.2$ 。於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm 2$ 小時後，供作檢液。

2.3.22. 蕃茄(Tomato)：檢體為塊狀或丁狀時，以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌之均質杯內。加蛋白胨緩衝液225 mL，均質2分鐘。將已均質化之檢體與培養液混合物倒入已滅菌廣口瓶內，將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 $60\pm 5$ 分鐘後，混勻並調整 pH 值至 $6.8\pm 0.2$ 。將瓶蓋略旋鬆，並於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm 2$ 小時後，供作檢液。檢體為完整蕃茄時，將檢體置於無菌塑膠袋內，加足夠之預增菌培養液，使檢體浮起。加培養液之體積可能為檢體重量之1.5倍，例如檢體300 g 可能需要培養液約450 mL。必要時，再加更多培養液。將盛有檢體及培養液之塑膠袋置於適當之容器內，將袋口摺下以防止污染，但不密封。於室溫靜置 $60\pm 5$ 分鐘後(無需調整 pH 值)，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm 2$ 小時，供作檢液。

2.3.23. 塗抹物(Swab)檢體：以無菌操作折斷塗抹物木柄或以無菌剪刀或其他無菌器具將塗抹棒之頭部置於無菌含蓋試管內，加蛋白胨緩衝液5 mL，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。取溶出液1 mL，置於已盛裝蛋白胨緩衝液9 mL 之已滅菌含蓋之試管內，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm 2$ 小時後，供作檢液。或以無菌操作折斷塗抹物木柄、或以無菌剪刀或其他無菌器具將塗抹物之頭部置於已盛裝蛋白胨緩衝液10 mL 之已滅菌含蓋試管內，於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm 2$ 小時後，供作檢液。

2.3.24. 其他檢體：以無菌操作稱取檢體25 g，置於已滅菌均質杯內，加蛋白胨緩衝液225 mL，均質攪拌2分鐘。將已均質化之檢體與培養液混合物倒入已滅菌含蓋之廣口瓶內。將瓶蓋旋緊，於室溫靜置 $60\pm 5$ 分鐘後混合均勻。當檢體中細菌因長期冰凍或其他原因受損，則可使用乳糖培養液代替蛋白胨緩衝液。必要時，調整 pH 值至 $6.8\pm 0.2$ 。將瓶蓋旋鬆於 $35^{\circ}\text{C}$ 培養 $24\pm 2$ 小時後，供作檢液。

## 2.4. 選擇性增菌培養與分離

2.4.1. 檢液接種至選擇性增菌培養液：將2.3.節檢液混合均勻，依下列

操作：

- 2.4.1.1. 檢體為關華豆膠：各吸取檢液1 mL 至 SC 及 TT 培養液各10 mL 中，混合均勻。
- 2.4.1.2. 檢體為其他食品：吸取檢液0.1 mL 至 RV 培養液10 mL 中，另吸取檢液1 mL 至 TT 培養液10 mL 中，混合均勻。
- 2.4.2. 選擇性增菌培養：
  - 2.4.2.1. 檢體為高度污染食品：將 RV 培養液置於42℃水浴培養24±2 小時。另將 TT 培養液置於43℃水浴培養24±2小時。
  - 2.4.2.2. 檢體為低度污染食品(關華豆膠除外)：將 RV 培養液置於42℃水浴培養24±2小時。另將 TT 培養液置於35℃培養24±2小時。
  - 2.4.2.3. 檢體為關華豆膠：將 SC 及 TT 培養液置於35℃培養24±2小時。
- 2.4.3. 分離培養：分別自2.4.2.節之 RV、SC 及 TT 增菌培養液中取一接種環量，在 HE、XLD 及 BS 培養基表面作劃線後，於35℃培養24±2小時，觀察所形成菌落型態。
- 2.4.4. 在各培養基中，典型沙門氏桿菌菌落之性狀如下：
  - 2.4.4.1. HE 培養基：呈藍綠或藍色菌落，有(或無)黑色中心。很多典型菌落有大而具光澤之黑色中心或黑色菌落。部分非典型菌落會形成黃色菌落，有(或無)黑色中心。
  - 2.4.4.2. XLD 培養基：呈粉紅色菌落，有(或無)黑色中心。很多典型菌落有大而具光澤黑色中心或呈黑色菌落。部分非典型菌落會形成黃色菌落，有(或無)黑色中心。
  - 2.4.4.3. BS 培養基：典型菌落為褐色、灰色或黑色，有時會產生金屬光澤。菌落周圍之培養基顏色，起初為褐色，隨著培養時間加長而轉為黑色並產生光環效應。部份非典型菌落會形成綠色菌落，周圍培養基色澤稍微變深或不變色。於 BS 培養基上未發現典型菌落，須再於35℃培養24±2小時。
- 2.4.5. 自 HE、BS 及 XLD 培養基中各挑2個或2個以上之典型菌落，無典型菌落時，挑取2個或2個以上之非典型菌落，每一菌落同時接種於 TSI 及 LIA 斜面培養基，並同時進行斜面劃線及穿刺接種。以無菌接種針輕觸菌落的中心並接種於 TSI 斜面及底部，穿刺於 LIA 底部兩次並於斜面劃線〔離胺酸脫羧反應為專性厭氧性(strictly anaerobic)，故 LIA 培養基斜面底部之深度約4 cm〕。
- 2.4.6. 將已接種菌之 TSI 及 LIA 斜面培養基於35℃培養24±2小時，培養時，將試管蓋旋鬆。典型沙門氏桿菌在 TSI 培養基斜面呈紅色反應(鹼性)，底部呈黃色(或無色)反應(酸性)，有培養基顏色變黑或無硫化氫產生；在 LIA 培養基之底部呈紫色反應(鹼性)，大多

數沙門氏桿菌在 LIA 培養基會產生硫化氫而呈黑色。凡是在 LIA 斜面培養基底部產生鹼性的菌株須保留作生化及血清學試驗；在 LIA 培養基底部產生酸性且在 TSI 斜面培養基產生鹼性斜面及酸性底部者亦須保留菌株作生化及血清學試驗。在 LIA 斜面培養基底部產生酸性且在 TSI 斜面培養基產生酸性斜面及酸性底部之菌株則可以丟棄。如 TSI 斜面培養基上菌株呈非沙門氏桿菌典型反應，則重複2.4.5.節之步驟，鉤取更多可疑菌落接種於 TSI 及 LIA 培養基。

2.4.7. 針對以下疑似沙門氏桿菌菌株，進行生化及血清學試驗。

2.4.7.1. SC 或 RV 增菌培養液經由劃線培養及穿刺培養步驟，於 TSI 斜面培養基中呈現疑似沙門氏桿菌反應之菌株，至少取3株；以及 TT 增菌培養液經由劃線培養及穿刺培養步驟，於 TSI 斜面培養基中呈現疑似沙門氏桿菌反應之菌株，至少取3株。

2.4.7.2. 當 TSI 斜面培養基中呈現疑似沙門氏桿菌反應之3株菌株，並非來自同一組分離培養基時，則必須再檢測其它於 TSI 斜面培養基中呈現疑似沙門氏桿菌反應之菌株。每25 g 檢體至少須檢測於 TSI 斜面培養基呈現疑似沙門氏桿菌反應之菌株6株。

## 2.5. 鑑定試驗

2.5.1. 混合菌株(Mixed culture)之純化：將 TSI 斜面培養基上未純化菌株劃線培養於麥康奇、HE 或 XLD 培養基，於35°C 培養24±2小時。觀察是否有疑似沙門氏桿菌菌落：

2.5.1.1. 麥康奇培養基：典型菌落為透明無色，有時會有黑色中心。

2.5.1.2. HE 培養基：如2.4.4.1.節。

2.5.1.3. XLD 培養基：如2.4.4.2.節。

至少接種2株疑似沙門氏桿菌菌落於 TSI 及 LIA 斜面培養基，步驟如2.4.5.節及2.4.6.節。

## 2.5.2. 純菌株(Pure culture)

2.5.2.1. 尿素酶試驗(傳統方法)：以無菌接種針挑取 TSI 斜面培養基上可疑菌株，接種於尿素培養液內，於35°C 培養24±2小時。由於未接種之尿素培養液偶爾會轉變為紫紅色，故試驗時應包括未接種之培養液作為對照用。培養液由橘紅色轉變為紫紅色者為正反應，顏色不變者為負反應，沙門氏桿菌為負反應。

2.5.2.2. 尿素酶試驗(快速法)：自含可疑菌株之 TSI 斜面培養基上鉤取二接種環量菌種至供快速測試用之尿素培養液內，於37±0.5°C 水浴培養2小時。培養液由橘紅色轉變為紫紅色者

為正反應，顏色不變者為負反應，沙門氏桿菌為負反應。  
尿素酶試驗為負反應者，應自其 TSI 培養基中鉤菌，作以下之血清及生化試驗。

### 2.5.3. 本體抗血清試驗(Serological somatic test)

#### 2.5.3.1. 多價本體(O)抗血清試驗[Polyvalent somatic (O) test]

將玻片或塑膠培養皿劃出約  $1 \times 2$  cm 之二區。自經培養 24~48 小時之 TSI 培養基斜面鉤取一接種環菌量至 0.85% 生理食鹽水 2 mL，混合均勻。分別取菌株懸浮液各 1 滴，滴入玻片上二區部位。滴 1 滴生理食鹽水在玻片之一區，滴 1 滴多價本體抗血清在玻片另一區。以無菌接種環或接種針將玻片上菌液與 0.85% 生理食鹽水(或本體抗血清)混合均勻。將玻片前後搖動約 1 分鐘後在光源上觀察結果：

正反應：菌液與本體抗血清產生凝集，且菌液與 0.85% 生理食鹽水無凝集者。

負反應：菌液與本體抗血清，以及菌液與 0.85% 生理食鹽水均無凝集者。

非特異型反應：兩者均產生凝集。

#### 2.5.3.2. 單價本體族群(O)抗血清試驗[Monovalent somatic(O)group test]

如 2.5.3.1. 節，取菌株懸浮液，利用單價本體族群(O)抗血清(包括 Vi 抗血清)進行試驗。正反應者應產生凝集現象，負反應者則無。將與 Vi 抗血清凝集之菌株，配製成濃稠菌株懸浮液，於沸水中加熱 20~30 分鐘後，冷卻。將經加熱、冷卻處理之濃稠菌株懸浮液再與本體族群抗血清 C<sub>1</sub>、D、Vi 作用。菌株懸浮液於加熱處理前與 Vi 抗血清呈凝集反應，且加熱後不與 Vi 抗血清呈凝集但與族群抗血清 D 凝集者可能為 *Salmonella typhi*；加熱前與 Vi 抗血清呈凝集，且加熱後不與 Vi 抗血清呈凝集但與族群抗血清 C<sub>1</sub>凝集者可能為 *Salmonella paratyphi* C；經加熱處理之菌株懸浮液仍與 Vi 抗血清呈凝集反應，而不與其它單價本體族群抗血清凝集之菌株可能不是沙門氏桿菌。能與任何單價本體族群抗血清凝集之菌株為單價本體族群(O)抗血清正反應；不能與任何單價本體族群(O)抗血清凝集者為單價本體族群(O)抗血清負反應。

#### 2.5.4. 多價鞭毛(H)血清試驗[Serological polyvalent flagellar (H) test]

將尿素酶負反應之可疑沙門氏桿菌菌株自 TSI 斜面培養基中接種至 BHI 培養液中，於 35°C 培養 4~6 小時，或於胰化酪蛋白大豆胰化蛋白胨培養液中培養 24±2 小時。取上述培養液 5 mL，加

入福馬林化生理食鹽水2.5 mL，混合均勻。將多價鞭毛抗血清0.5 mL 置於試管(13 × 100 mm 或10 × 75 mm)內，添加上述福馬林化菌株培養液0.5 mL。以福馬林化生理食鹽水0.5 mL 與福馬林化菌株培養液0.5 mL 混合，作為對照組。將上述混合液放入水浴(48 ~ 50°C)培養，每隔15分鐘觀察一次至1小時後，判讀最後結果。正反應為測試組呈凝集而對照組無凝集；負反應為測試組及對照組均無凝集；非特異型反應為測試組及對照組均有凝集。

2.5.5. 生化試驗：自尿素酶負反應之 TSI 培養基鈎菌，作以下試驗。

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

於 LIA 培養基之試驗結果符合典型沙門氏桿菌之反應者，不需重複此試驗。鈎菌接種於離胺酸脫羧酶培養液，旋緊試管蓋後，於35°C培養48±2小時，每隔24小時觀察一次。培養液維持紫色者為正反應，由紫色變為黃色者為負反應，沙門氏桿菌應為正反應。培養液變為非紫非黃色時，則加數滴0.2%溴甲酚紫溶液後再行觀察。

2.5.5.2. 半乳糖醇利用試驗(Dulcitol utilization test)

鈎菌接種於酚紅半乳糖醇培養液或紫色半乳糖醇培養液並將試管旋鬆，於35°C培養24小時後開始觀察，直至48±2小時。培養液變為黃色並(或)產生氣體者為正反應，否則為負反應，大部分沙門氏桿菌為正反應。

2.5.5.3. 胰化蛋白胨培養液(Tryptone broth): 鈎菌接種於胰化蛋白胨培養液，於35°C培養24±2小時後，進行下列試驗：

2.5.5.3.1. 氰化鉀試驗(KCN test): 鈎菌接種於氰化鉀培養液中，以橡皮塞封緊試管口，於35°C培養24小時後開始觀察直至48±2小時。培養液由清澈變為混濁者為正反應，否則為負反應。大部分沙門氏桿菌為負反應。氰化鉀為劇毒物質，操作時須小心。

2.5.5.3.2. 丙二酸鹽試驗(Malonate test): 鈎菌接種於丙二酸鹽培養液，於35°C培養24小時後開始觀察直至48±2小時。培養液由綠色變為藍色者為正反應，維持綠色者為負反應，大部分沙門氏桿菌為負反應。

2.5.5.3.3. 吲哚試驗(Indole test): 取胰化蛋白胨培養液5 mL 置入空試管，加柯瓦克氏試劑0.2~0.3 mL，上層呈深紅色或紫色者為正反應。大部分沙門氏桿菌為負反應。將中間色如橘色或粉紅色者記錄為±。

2.5.5.3.4. 沙門氏桿菌之鞭毛抗血清試驗：如尚未進行鞭毛抗血清試驗者可在補作。

- 2.5.5.3.5. 將吡哌試驗為正反應，鞭毛抗血清試驗為負反應，或氰化鉀試驗為正反應，離胺酸脫羧酶試驗為負反應之菌株判定為非沙門氏桿菌。
- 2.5.6. 其它生化反應：菌株與表一中試驗1至10反應結果相符者為“沙門氏桿菌”；菌株具鞭毛抗血清凝集反應，但與沙門氏桿菌生化反應不符者，需依2.5.1.節先行純化，再自2.5.2.節重新測試。菌株與表一所列試驗1至10之沙門氏桿菌典型反應結果不符者，繼續進行下列生化反應：
- 2.5.6.1. 乳糖發酵試驗 (Lactose fermentation test)：將菌株接種於酚紅乳糖培養液或紫色乳糖培養液，於35℃培養24小時後開始觀察直至48±2小時，產酸(顏色變黃)並有氣體產生者為正反應；只有產酸者亦視為正反應。大部份的沙門氏桿菌為負反應。將乳糖試驗為正反應之非沙門氏桿菌菌株丟棄，惟在 TSI 培養基上呈酸性反應，並在 LIA 培養基上呈正反應，或丙二酸鹽培養基上呈正反應之菌株保留，進行下列試驗，以判定是否為 *S. arizonae*。
- 2.5.6.2. 蔗糖發酵試驗(Sucrose fermentation test)：將菌株接種於酚紅蔗糖培養液或紫色蔗糖培養液，再依2.5.6.1.節之步驟培養及觀察。將正反應之菌株丟棄；惟在 TSI 培養基上呈酸性反應，且在 LIA 培養基上呈正反應之菌株則保留。
- 2.5.6.3. MR-VP 試驗：鈎菌接種於 MR-VP 培養液，於35℃培養48±2小時。
- 2.5.6.3.1. 歐普氏試驗(VP test)：取培養48小時菌液1 mL 至另一試管中(剩餘之 MR-VP 培養液於35℃再培養48±2小時)，加入歐普氏試劑之溶液 A 約0.6 mL 振搖均勻。再加歐普氏試劑之溶液 B 約0.2 mL，振搖均勻，加入少許肌酸以加速反應。4小時後觀察結果，呈現粉紅至鮮紅色者為正反應，大部份沙門氏桿菌為負反應。
- 2.5.6.3.2. 甲基紅試驗(MR test)：取已培養96小時菌液5 mL 至試管中，加入甲基紅指示劑5至6滴，立即觀察反應結果，培養液呈紅色者為正反應，呈黃色者為負反應。大部份沙門氏桿菌為正反應。  
將氰化鉀試驗呈正反應，歐普氏試驗呈正反應，甲基紅試驗呈負反應之非沙門氏桿菌丟棄。
- 2.5.6.4. 檸檬酸鹽利用試驗(Citrate utilization test)：鈎菌接種於辛蒙斯檸檬酸鹽培養基，須在斜面上作劃線及穿刺培養，於35℃培養96±2小時。斜面上有菌體生長且培養基顏色由綠色變為藍

色者為正反應，大部份沙門氏桿菌為正反應。

- 2.6. 判定：沙門氏桿菌陽性者，應符合表一所列之結果。與表二之結果相同者，則被歸類為非沙門氏桿菌。菌株不是以上二類者，則須進行其他試驗<sup>(註)</sup>。

註：可依參考文獻(Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier, New York.) 進行其他試驗。

表一、沙門氏桿菌之生化及血清反應

| 試驗或基質               | 正反應(+)        | 負反應(-)      | 沙門氏桿菌之反應 <sup>a</sup> |
|---------------------|---------------|-------------|-----------------------|
| 1. 葡萄糖(TSI)         | 黃色底部          | 紅色底部        | +                     |
| 2. 離胺酸脫羧酶試驗(LIA)    | 紫色底部          | 黃色底部        | +                     |
| 3. 硫化氫(TSI 和 LIA)   | 變黑            | 無變黑         | +                     |
| 4. 尿素酶試驗            | 紫紅色           | 顏色不變        | -                     |
| 5. 離胺酸脫羧酶培養液        | 紫色            | 黃色          | +                     |
| 6. 酚紅(或紫色)半乳糖醇培養液   | 黃色，產氣         | 顏色不變<br>不產氣 | + <sup>b</sup>        |
| 7. 氰化鉀培養液           | 混濁<br>(生長)    | 澄清<br>(不生長) | -                     |
| 8. 丙二酸鹽培養液          | 藍色            | 顏色不變        | - <sup>c</sup>        |
| 9. 吲哚試驗             | 表面呈深紅色<br>或紫色 | 表面呈黃色       | -                     |
| 10. 多價本體及鞭毛血清試驗     | 凝集            | 無凝集         | +                     |
| 11. 酚紅(或紫色)乳糖及蔗糖培養液 | 黃色，產氣         | 不產氣<br>顏色不變 | - <sup>c</sup>        |
| 12. 酚紅(或紫色)蔗糖培養液    | 黃色，產氣         | 不產氣<br>顏色不變 | -                     |
| 13. 歐普氏試驗           | 粉紅或紅色         | 顏色不變        | -                     |
| 14. 甲基紅試驗           | 紅色            | 黃色          | +                     |
| 15. 辛蒙斯檸檬酸鹽培養基      | 生長，藍色         | 不生長<br>顏色不變 | V                     |

a. “+”表示90%以上在1~2天內均為正反應，“-”表示90%以上在1~2天內均為負反應；“V”表示不一定。

b. 大部分的 *S. arizonae* 為負反應。

c. 大部分的 *S. arizonae* 為正反應。

表二、非沙門氏桿菌菌株之判定標準

| 試驗或基質                 | 結果                         |
|-----------------------|----------------------------|
| 1. 尿素酶                | 正反應(紫紅色~紅色)                |
| 2. 吲哚試驗及<br>多價鞭毛抗血清試驗 | 正反應(表面呈深紅色或紫色)<br>負反應(無凝集) |
| 3. 離胺酸脫羧酶及<br>氰化鉀培養液  | 負反應(黃色)<br>正反應(混濁)         |
| 4. 酚紅(或紫色)乳糖培養液       | 正反應(黃色，產氣) <sup>a,b</sup>  |
| 5. 酚紅(或紫色)蔗糖培養液       | 正反應(黃色，產氣) <sup>b</sup>    |
| 6. 氰化鉀培養液             | 正反應(混濁)                    |
| 歐普試驗及<br>甲基紅試驗        | 正反應(粉紅至紅色)<br>負反應(黃色)      |

- a. 測試丙二酸鹽試驗為陽性之菌株需再試驗是否為 *S. arizonae*  
b. 如 LIA 為正反應之菌株不應丟棄，應繼續測試看是否為沙門氏桿菌。

2.7. 如使用經確效認可之市售培養基、生化檢測套組或生化試驗鑑定系統，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。菌株經商業生化套組鑑定為疑似沙門氏桿菌，仍須進行本體族群(O)抗血清試驗及鞭毛血清試驗，如二者均為正反應，則判定為沙門氏桿菌陽性。

## 第二部：沙門氏桿菌之 real-time PCR 檢測

1. 適用範圍：本方法適用於沙門氏桿菌之鑑別。
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<sup>(註 1)</sup>
    - 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℃ 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℃)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<sup>(註 2)</sup>
      - 2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

2.3.2.1.1. 沙門氏桿菌鑑別基因(標的基因：*invA*)

引子 F：5'- CAA CGT TTC CTG CGG TAC TGT -3'

引子 R：5'- CCC GAA CGT GGC GAT AAT T - 3'

探針 P：

5'-(FAM)- CTC TTT CGT CTG GCA TTA TCG ATC  
AGT ACC A -(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 116 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。

2.3.2.2. 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：沙門氏桿菌標準菌株或其 DNA。

2.4. 器具及材料<sup>(註 3)</sup>

2.4.1. 微量吸管(Micropipette)：2μL、10 μL、20 μL、100μL、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<sup>(註 4)</sup>

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

10 μM 探針..... 0.5 μL

TaqMan® Fast Reagents Starter Kit..... 13.0 μL

|                |              |
|----------------|--------------|
| 檢體 DNA 溶液..... | 2.0 $\mu$ L  |
| 無菌去離子水 .....   | 5.5 $\mu$ L  |
| 總體積 .....      | 25.0 $\mu$ L |

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、2.4.2.節增菌液中吸取菌液 1 mL 或分離菌株，取一接種環量，加入無菌去離子水 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，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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  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，振盪混合均勻，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  $-20^{\circ}\text{C}$  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/ $\mu$ L 及稀釋倍數，即為檢體 DNA 原液濃度。DNA 溶液純度則以  $\text{O.D.}_{260}/\text{O.D.}_{280}$  比值作判斷，其比值應介於 1.7 ~2.0。

## 2.7. 鑑別試驗<sup>(註 5)</sup>

### 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. 沙門氏桿菌菌屬鑑別基因反應條件

| 步驟                       | 溫度   | 時間     |
|--------------------------|------|--------|
| 1. 熱活化                   | 95°C | 20 sec |
| 2. 最初變性                  | 95°C | 15 sec |
| 3. 黏接、延展                 | 60°C | 30 sec |
| 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

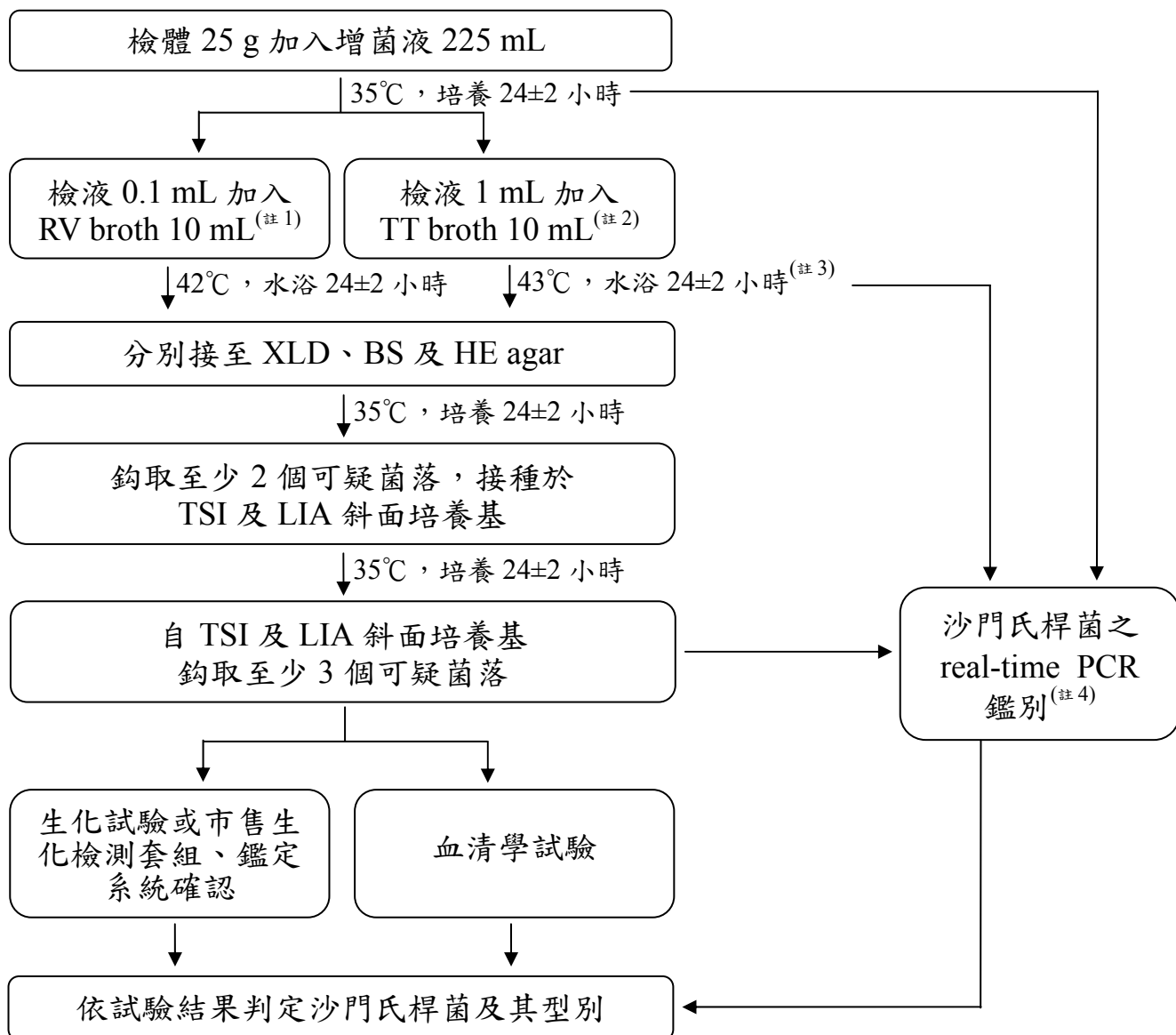
檢體 DNA 之 real-time PCR 增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 real-time PCR 螢光分析圖均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即確認該 real-time PCR 增幅產物為沙門氏桿菌之 DNA 片段，可確認該檢體中含有沙門氏桿菌之基因。

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：第二部沙門氏桿菌之 real-time PCR 檢測可視需要執行。

### 檢驗流程圖



註 1：檢體為關華豆膠，使用 SC 培養液。

註 2：TT broth 在使用前需先加入碘-碘化鉀溶液 0.2 mL 及 0.1%煌綠溶液 0.1 mL。

註 3：檢體為低度污染食品(關華豆膠除外)，將 TT 培養液置於 35°C 培養 24±2 小時；檢體為關華豆膠，將 SC 及 TT 培養液置於 35°C 培養 24±2 小時。

註 4：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。