

雞肉檢體中沙門氏桿菌快速檢驗方法之探討

陳昭蓉 劉珮如 施養志*

行政院衛生署藥物食品檢驗局

摘 要

本研究主要是探討聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 應用在沙門氏桿菌檢驗之可行性, 首先以沙門氏桿菌純菌菌株, 同時使用兩組 primers: 337-L/338-R 及 TS11/TS4 進行 multiplex PCR 最適條件之探討, 結果 PCR 之最適 thermal program 為 94°C 1 min, 60°C 2 min, 72°C 2 min, 35 cycles; 同時以此條件檢驗沙門氏桿菌標準菌株 53 株、食品檢體分離菌株 32 株及非沙門氏桿菌菌株 14 株, 其準確率為 100%; 以序列稀釋之菌液測試此 PCR 條件之靈敏度, 得知此條件最低可偵測 10^4 CFU。在探討檢驗雞肉檢體之條件: 將沙門氏桿菌菌液添加於未含此菌之雞肉等檢體中, 經離心過濾後進行 PCR, 可偵測出 10^4 CFU, 共需 4 小時。此外, 未添加菌液之市售雞肉等檢體, 經 Lactose broth 增菌 24 小時後, 進行離心過濾及 PCR, 前後共需 28 小時可偵測出雞肉檢體中之沙門氏桿菌, 並經 CNS 檢驗方法確認結果相同, 顯示本研究所建立之 PCR 方法可應用於雞肉檢體中沙門氏桿菌之檢驗。

關鍵字: 雞肉檢體快速檢驗, 沙門氏桿菌, 聚合酶鏈鎖反應

Rapid Detection of *Salmonella* spp. in Chicken Samples

Chao-Jung Chen, Pey-Ru Liu, Daniel Yang-Chih Shih*

National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

The feasibility of detecting *Salmonella* spp. using polymerase chain reaction (PCR) was studied. Two sets of primers: 337-L/338-R and TS11/TS4 were used together with pure strains of *Salmonella* spp. to find the optimum thermal conditions of multiplex PCR. The results showed that the optimum thermal program was 94°C, 1min; 60°C, 2min; 72°C, 2min; 35 cycles. Under the same conditions, 53 standard strains, 32 isolated strains from foods and 14 non *Salmonella* strains were tested; the accuracy obtained was 100%. Series diluted cultures were used to test the sensitivity of PCR. The results showed that both sets of primers could detect 10^4 CFU of *Salmonella* spp. Spiked samples were used to find the optimum conditions

for detecting *Salmonella* spp. directly in chicken samples. After ultrafiltration, 10^4 CFU of *Salmonella* spp. could be detected. It took four hours to complete PCR. Non-spiked samples were incubated in 24 hours with Lactose broth and ultra-filtrated. In this case, 28 hours were totally needed to obtain results. The samples were also checked using the Chinese National Standard (CNS) method. The results showed that the PCR method was applicable to the detection of *Salmonella* spp. directly in chicken samples.

Key words : Rapid detection in chicken samples, *Salmonella* spp., Polymerase chain reaction

前 言

沙門氏桿菌 (*Salmonella* spp.) 是國內法定食品中毒菌之一，為人畜共通之病原菌，其主要感染途徑是藉由食品傳染；根據美國疾病控制及預防中心 (Centers for Disease Control and Prevention) 在 1973 至 1987 年之間的調查結果顯示：有 59% 的沙門氏桿菌是經由食品所傳染。在感染來源方面，動物來源之食品，如家禽肉、蛋類及乳製品等，為最主要與沙門氏桿菌中毒相關之食品，由蔬菜及水果所造成之沙門氏桿菌感染則較少，只佔約 2.2%⁽¹⁾。

雖然目前在國內所發生的食品中毒案中，沙門氏桿菌之檢出率並不高，但是在歐美國家中，此菌之中毒情形均名列前茅，如：美國疾病控制及預防中心 (Centers for Disease Control and Prevention) Bean 等人⁽²⁾在 1990 年的一份報告中指出：1973 至 1987 的 15 年間，共發生 1,869 件細菌性食品中毒案件，其中沙門氏桿菌所引起的中毒事件有 790 件，高居第一位。另外，加拿大的 Todd⁽³⁾亦指出，1975-1984 的十年間，沙門氏桿菌在加拿大亦居細菌性食物中毒病因的第一位。

我國目前正積極參與 APEC、WTO 等國際組織，在國際間傾向自由貿易之前提下，預期不久將來進口食品將大量增加，由於沙門氏桿菌中毒在國外之高發生率，對進口食品檢驗沙門氏桿菌實為重要。目前沙門氏桿菌之傳統檢驗方法包括增菌培養 (pre-enrichment)、選擇性培養 (selective enrichment)、純化、血清學試驗及生化型試驗等步驟，檢驗時間約需 5-7 天，相當費時費力，因此開發沙門氏桿菌快速檢驗方法是目前從事臨床檢驗或食品檢驗研究者十分重要之課題。

聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, 簡稱 PCR) 是由美國 Cetus 公司的 Mullis 等人⁽⁴⁾於 1984 年間所發明的，其應用相當廣泛：在研究方面，可應用於選殖 (cloning) 及 DNA 序列 (sequencing) 分析兩方面；在例行分析方面 (routine analysis)，PCR 可使用在如血液、糞便等各種臨床檢體之檢驗，以瞭解可能之病原體，而 PCR 使用於遺傳檢驗時，可用來篩選不良的基因藉以瞭解遺傳疾病之發生原因。在食品病原菌檢驗方面，Lampel 等人⁽⁵⁾利用 PCR 檢測 *Shigella flexneri*；Besessn 等人⁽⁶⁾應用此技術檢測 *Listeria monocytogenes*，Bej 等人⁽⁷⁾則利用 PCR 複製 Coliform bacteria 中之 lac Z 及 lam B gene 來檢測水中 Coliform bacteria。

在沙門氏桿菌菌株之鑑定上，由於傳統檢驗方法相當耗時，而市面上商業培養基、套組、DNA probe、antibody-dependent assay、ELISA 等快速方法必須配合增菌培養等步驟，無法有效節省時間；因此本研究擬建立一套 PCR 快速檢驗方法，期可實際應用在食品檢體之檢驗。

材 料 與 方 法

一、菌株

本研究聚合酶鏈鎖反應所使用之沙門氏桿菌及非沙門氏桿菌標準菌株如表一及表二所示，分別來自美國菌種收集中心 (ATCC , American type culture collection , Maryland , USA) , 美國農業部 (USDA , United State Department of Agriculture , USA) , 食品工業發展研究所菌種保存中心 (CCRC , Culture Collection and Research Center) 及行政院衛生署預防醫學研究所等。

另外於市售雞肉、雞心、雞肝及雞肫等檢體中所篩出之沙門氏桿菌菌株如表二所示，篩檢之步驟乃依據中國國家標準⁽⁸⁾方法行之。

二、試劑及藥品

本研究使用之藥品包括：DNA GeneReleaser kit 購自 BioVentures 公司 (USA)、Agarose I、Ethidium bromide 均購自 Amresco 公司 (Ohio , USA)、Mineral oil 購自 Sigma 公司 (St. Louis , USA)、Dynazyme DNA polymerase kit 則購自 Finnzyme 公司 (Riihitontuntie , Finland)。

三、PCR 引子

本研究所使用之多套組寡核苷酸引子有二組，其中 TS11/TS4 是由 Tsen⁽⁹⁾等學者在 1994 年發表，可針對沙門氏桿菌進行檢測之引子，其經 PCR 增殖後之 DNA 片段大小為 1179-bp。而另一組引子 337-L/338-R 則為 Miller⁽¹⁰⁾等學者發展出來，可檢測出 Coliform pathogenic bacteria，如 *Shigella*、*Salmonella* 及 *Escherichia coli* 等細菌，其經 PCR 增殖後之 DNA 片段大小為 299-bp。其序列分別如下：

TS11 : 5'-GTCACGGAAGAAGAGAAATCCGTACG-3'

TS4 : 5'-GGGAGTCCAGGTTGACGAAAAATTT-3'

337-L : 5'-ATGCAAAGCCCGACCATGACG-3'

338-R : 5'-GTATCGACCACCGATGGTT-3'

以上之寡核苷酸引子皆由德國 TIB MOLBIOL Syntheselabor 所合成。

四、沙門氏桿菌之培養及鑑定

依據中國國家標準⁽⁸⁾方法進行菌株之培養及鑑定，並以微生物全自動鑑定儀 (AMS VITEK system) 進行生化試驗以鑑定菌株種類。

五、沙門氏桿菌 PCR 檢驗方法最適條件之探討

以 loop 從 *Salmonella* spp. 之純菌菌落中鉤取 single colony (約 10^8 CFU) 的菌量至 0.5 ml 之 Eppendorf tube 中，加入 GeneReleaser 試劑 20 μ l 後，覆以 1-2 滴礦物油以防止水份蒸散，隨後於 Programmable thermal controller (MJ. research Inc. PTC- 100-60) 進行下列步驟：65°C, 30 sec→ 8°C, 30 sec→ 65°C, 90 sec→ 97°C, 180 sec→ 8°C, 60 sec→ 65°C, 180 sec→ 97°C, 60 sec→ 65°C, 60sec→ 80°C, 10 min，使 DNA 由細胞內釋出。

待反應結束後，依序加入無菌蒸餾水 56.4 μ l、10倍 optimized Dynazyme buffer 10 μ l、2.5mM dNTP 8 μ l、1.0 μ M TS11/TS4 primers 1 μ l、1.0 μ M 337-L/338-R primers 0.8 μ l、2U/ μ l 之 Dynazyme polymerase 2 μ l，之後再加入 1 滴礦物油，不必混合，直接再於 Programmable thermal controller (MJ.

research Inc. PTC-100-60) 進行 PCR。其程序如下：先在 94°C 維持 4 分鐘，使 DNA 釋放完全；再於 94°C 維持 1 分鐘，使 DNA 分開成雙股 (denaturation)，再降溫至 60°C，維持 2 分鐘，進行黏合作用 (annealing)，接著進行延長作用 (extension)，於 72°C 進行 2 分鐘，如此共 35 個循環。取 10 μ l 反應物於內含 0.5 μ g/ml Ethidium bromide 之 1.5% Agarose I，於 0.5 $\times$ TBE buffer 中進行電泳後，在 UV box 觀察、拍照及記錄。

六、靈敏度試驗

取 *Salmonella typhimurium* ATCC14028 為試驗菌株，DNA 之取得仍使用前述之 GeneReleaser kit。將標準菌株進行序列稀釋，並加以培養計算其稀釋菌數。取不同濃度之菌液 10 μ l 進行 PCR 測試，PCR 反應所須試劑及條件如上所述。

七、添加試驗

選擇市售最常見之雞肉、雞心及雞肫等檢體，經 CNS 傳統方法確認不含沙門氏桿菌後，添加本 PCR 法所能測得之最低菌數進行 PCR 測試，並探討這些檢體中存在之可能抑制因子對 PCR 直接檢測之影響，嘗試使用過濾膜離心過濾，以去除抑制因子對 PCR 方法之干擾⁽¹¹⁾。

八、增菌液之選擇

以一般 *Salmonella* spp. 常見之 Saline、Peptone water 及 Lactose broth 調製最低濃度菌液進行 PCR 試驗，探討這些增菌液對於 PCR 之進行是否會產生抑制作用。

九、雞肉等檢體之檢驗

將雞肉、雞心、雞肝、雞肫直接以 PCR 法檢驗，其 PCR 之檢驗方法如下所述：取剪碎之檢體 10g，與 Lactose broth 90 ml 混合均勻之後，分別在此時及 37°C、24 小時增菌之後，取含菌液 200 μ l，以離心過濾膜 (Millipore Inc. ULTRA FREE-MC300K, 孔徑分子量 30 萬)，在 12,000rpm 下離心過濾 10 分鐘，去除可能造成 PCR 抑制作用之因子⁽¹²⁾，之後以 GeneReleaser 試劑 30 μ l 洗下濾膜上之 *Salmonella* spp.，進行 PCR 檢測。

結果與討論

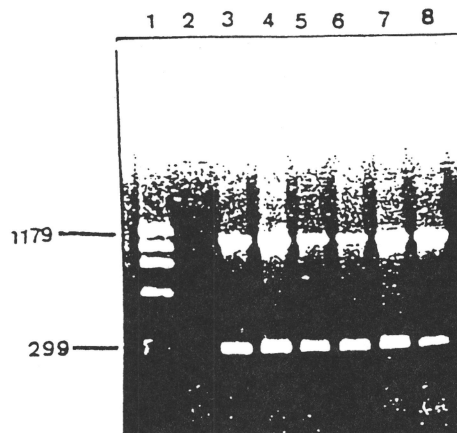
一、PCR 最適條件之探討

由於本研究旨在建立一套快速且具實用性之 PCR 方法，因此，我們採用多套組 PCR (multiplex PCR)，將二組不同的 primers，同時加入 PCR tube 內進行反應，期能使 PCR 有更廣範圍之應用性。本研究選用之二組 primers 分別為 337-L/338-R 及 TS11/TS4，其中 337-L/338-R 針對腸內菌科細菌之 *phoP/phoQ* 基因進行 PCR 增殖作用，此段基因可能與 virulence 有關，一般的 Coliform pathogenic bacteria 皆有此段基因存在，故可應用來檢測環境中之腸內菌科致病菌⁽¹⁰⁾；而 TS11/TS4 則是由一段沙門氏桿菌所特有之 1.8 Kb 片段所發展出來，可針對 *Salmonella* spp. 進行 PCR 檢測⁽⁹⁾。本研究以 *S. enteritidis* ATCC13076、*S. typhimurium* CCRC10312 等菌株為標準菌株，在萃取 DNA 之方法上，為求簡便快速，採用 DNA GeneReleaser kit 取代傳統耗時之萃取方法；在考慮 PCR 條件時，雖然此兩組 primers 之各自的最適反應條件已被發表，但同時進行 PCR 時，其加熱條件及試

劑成份必須有適當的調整，並考慮此二組 primers 之 T_m 值，探討出此多套組 PCR 之最適 thermal program，其結果如下：94℃→ 1 min，60℃→ 2 min，72℃→ 2 min，共進行 35 cycles，在此條件之下，兩組 PCR primers TS11/TS4 及 337-L/338-R 在電泳膠片上呈現明顯兩條 bands，且無任何 extra band (圖一)，故本研究以下之 PCR 檢測，皆使用此一 thermal program。

二、PCR 引子特異性 (specificity) 之探討

將美國菌種收集中心、美國農業部、行政院衛生署預防醫學研究所等單位所分離鑑定確認為 *Salmonella* spp. 之標準菌株，以及本單位分離自雞心、雞肉、雞肫、雞肝等檢體，經 VITEK 系統確認為 *Salmonella* spp. 之菌株，利用上述確立之 PCR 檢測法進行檢測，共檢測 85 株沙門氏桿菌及 14 株非沙門氏桿菌，其結果分別如表一與表二所示：85 株 *Salmonella* spp. 菌株皆為 337-L/338-R 299-bp 及 TS11/TS4 1179-bp 正反應，而表三所示非沙門氏桿菌之菌株則都為 TS11/TS4 1179-bp 負反應，顯示本研究選用之寡核苷酸引子對於檢測 *Salmonella* spp. 之特異性相當良好；由於 337-L/338-R 299-bp 主要是針對 *phoP/phoQ* 基因，而此段基因與 virulence 相當有關⁽¹⁰⁾，在表三中本研究測試的 *E.coli* 及 *Citrobacter freundii* 有些菌株對 337-L/338-R 出現“-”反應，其原因可能是這些菌株發生 *phoP* mutation，或只是一般不具 virulence 之腸內菌⁽¹³⁾。



圖一 Multiplex PCR 檢測沙門氏桿菌標準菌株特異性之結果

Fig. 1. Detection specificity for *Salmonella* spp. using multiplex PCR primer pairs 337-L/338-R and TS11/TS4. Lane 1: ϕ χ 174/HaeIII digested DNA marker; lane 2: negative control; lane 3: *S. typhimurium* CCRC10312; lane 4: *S. typhimurium* ATCC14028; lane 5: *S. paratyphi* A ATCC9150; lane 6: *S. enteritidis* ATCC 13076; lane 7: *S. dublin* ATCC 15480; lane 8: *S. derby* TUF7597.

表一 沙門氏桿菌標準菌株之 PCR 檢測結果

Table 1. PCR results for standard *Salmonella* spp.

Strain No.	No. of strain tested	PCR result	
		337-L/338-R	TS11/TS4
<i>S. typhimurium</i> (ATCC14028)	1	+	+
<i>S. typhimurium</i> (ATCC13311)	1	+	+
<i>S. typhimurium</i> (CCRC10312)	1	+	+
<i>S. typhimurium</i> (USDA1351E)	1	+	+
<i>S. typhimurium</i> (100000)	1	+	+
<i>S. typhimurium</i> (100001)	1	+	+
<i>S. typhimurium</i> (STM1)	1	+	+
<i>S. typhimurium</i> (STM2)	1	+	+
<i>S. typhimurium</i> (STM3)	1	+	+
<i>S. typhimurium</i> (STM4)	1	+	+
<i>S. typhimurium</i> (STM5)	1	+	+
<i>S. typhimurium</i> (STM6)	1	+	+
<i>S. typhi</i> (ATCC6539)	1	+	+
<i>S. typhi</i> (ATCC19430)	1	+	+
<i>S. typhi</i> (ATCC8427)	1	+	+
<i>S. paratyphi</i> A(ATCC9150)	1	+	+
<i>S. paratyphi</i> B(ATCC10719)	1	+	+
<i>S. enteritidis</i> (ATCC13076)	1	+	+
<i>S. dublin</i> (ATCC15480)	1	+	+
<i>S. dublin</i> (USDA1146B1)	1	+	+
<i>S. choleraesuis</i> (ATCC13312)	1	+	+
<i>S. choleraesuis</i> (ATCC10708)	1	+	+
<i>S. derby</i> (CCRC12435)	1	+	+
<i>S. derby</i> (TUF7957)	1	+	+
<i>S. derby</i> (CDCRF622)	1	+	+
<i>S. infantis</i> (USDA117B)	1	+	+
<i>S. agona</i> (TUF9143)	1	+	+
<i>S. kentucky</i> (USDA1073A)	1	+	+
<i>S. muenchen</i> (PT625)	1	+	+
<i>Salmonella</i> spp.	23	+	+

表二 雞肉等檢體所篩出之沙門氏桿菌之 PCR 檢測結果

Table 2. PCR results for *Salmonella* isolates from chicken samples

<i>Salmonella</i> strain No.	No. of strain tested	PCR result	
		337-L/338-R	TS11/TS4
2SXLD	1	+	+
5SHE	1	+	+
5SXLD	1	+	+
6SBS	1	+	+
8THE-5	1	+	+
9SBS-1	1	+	+
9XLD-2	1	+	+
11SHE-1	1	+	+
12THE	1	+	+
14THE	1	+	+
21SXLD	1	+	+
23SXLD-2	1	+	+
23SXLD-3	1	+	+
26THE	1	+	+
41SBS	1	+	+
42THE	1	+	+
43TBS	1	+	+
44SHE	1	+	+
46TR	1	+	+
47TR	1	+	+
50SR	1	+	+
51TXLT-4	1	+	+
52SXLT-4	1	+	+
59SHE	1	+	+
64SBS	1	+	+
65SXLD	1	+	+
67SBS	1	+	+
78SBS	1	+	+
79SHE	1	+	+
80SHE	1	+	+
81SHE	1	+	+
82SHE	1	+	+

表三 非沙門氏桿菌之 PCR 檢測結果
Table 3. PCR results for non-Salmonella bacteria

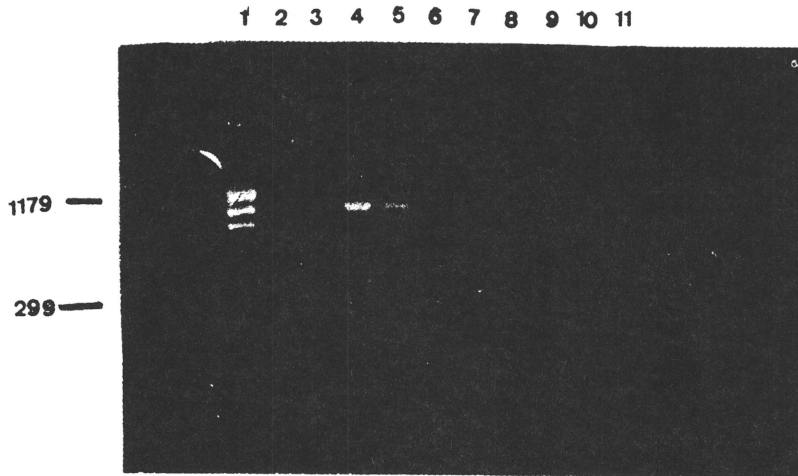
strain No.	No. of strain tested	PCR result	
		337-L/338-R	TS11/TS4
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC10370)	1	—	—
<i>Escheichia coli</i> (ATCC11509)	1	—	—
<i>Citrobacter freundii</i> (ATCC12291)	1	+	—
<i>Shigella dysenterie</i> (ATCC13983)	1	+	—
<i>E. coli</i> (25SHE)	1	—	—
<i>E. coli</i> (40SHE)	1	+	—
<i>Cit. freundii</i> (20SXLD)	1	+	—
<i>Cit. freundii</i> (55SHE-1)	1	+	—
<i>Cit. freundii</i> (57SHE-1)	1	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (64SBS)	1	—	—
<i>Providencia stuartii</i> (35TBS)	1	—	—
<i>Morganella morganii</i> (3THE-1)	1	—	—
<i>Hafnia alvei</i> (49SHE)	1	—	—
<i>Proteus mirabilis</i> (97SXLD)	1	—	—

三、靈敏度試驗

各取 10^9 至 10^2 稀釋濃度的 *S. enteritidis* ATCC13076 之菌液 10 μ l 加入 GeneReleaser kit 之後，直接進行一次PCR反應之後，則其檢測所需最低菌數可達到 10^4 CFU (圖二)，為求靈敏度之提高，本研究另採用二次 PCR (Double PCR)，以第一次 PCR 所產生之 DNA 片段為模板 (template)，再加入 primers、dNTP 及 DNA polymerase 進行 PCR。然而，在電泳膠片上仍未觀察到 DNA 產物之存在。因此，本研究所選用之多套組 PCR 之靈敏度為 10^4 CFU。在理論上，PCR 方法乃針對目標基因做增殖反應，只要有一個目標基因的存在，利用 PCR 方法即可將其增殖放大，故靈敏度應甚高，然本研究所確立之 PCR 方法其偵測極限較一般單一 primer 之 PCR 稍高，其原因可能是同時使用兩組 primers (Multiplex PCR)，調整溫度及試劑濃度的同時可能在靈敏度方面會略低於各 primer 單獨使用的情形。

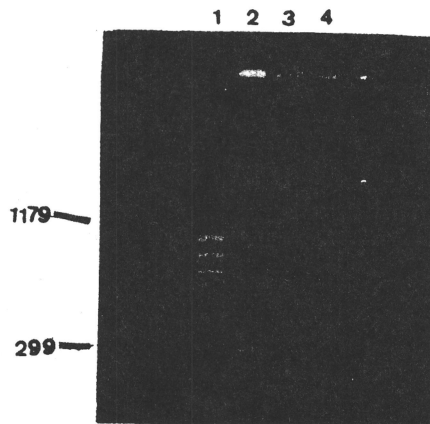
四、添加試驗

將靈敏度試驗中所述之最低濃度菌液 10^4 CFU添加至雞肉及雞肫等檢體中，以所建立之 PCR 方法進行測試，由於每一種食品所含的抑制因子均不同，故本研究考慮一般性降低抑制因子影響之方法，採用離心過濾，利用適當孔径大小之過濾膜，將菌體及抑制因子分開，測試數種過濾膜之後，選擇 Millipore, ULTRA FREE-MC300K (孔径分子量30萬) 之濾膜，離心過濾之後，則可將雞肉等檢體中之抑制因子與菌體分開，再進行 PCR 檢測，其結果如圖三所示。



圖二 Multiplex PCR檢測沙門氏桿菌靈敏度之結果

Fig. 2. Sensitivity for PCR assay for *S. typhimurium* ATCC14028 using Multiplex PCR primers 337-L/338-R and TS11/TS4. Lane 1: ϕ χ 174/*Hae*III digested DNA marker; lane 2 & 3: negative control; lane 4: 10^7 CFU; lane 5: 10^6 CFU; lane 6: 10^5 CFU; lane 7: 10^4 CFU; lane 8: 10^3 CFU; lane 9: 10^2 CFU; lane 10: 10^1 CFU; lane 11: 10^0 CFU.

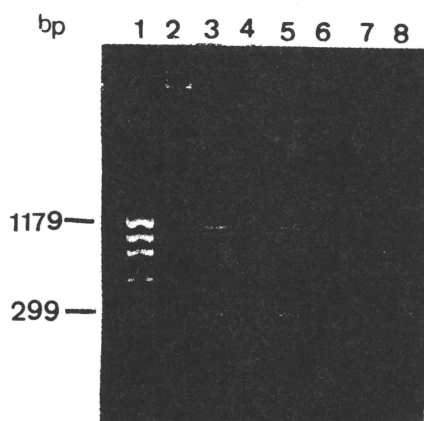


圖三 取雞肉、雞肫及豬肉等檢體添加 10^4 CFU *Salmonella* cells 之 Multiplex PCR檢測結果

Fig. 3. Detection of Multiplex PCR assay using primer pairs 337-L/338-R and TS11/TS4 for the addition of 10^4 CFU cells of *S. typhimurium* ATCC14028 to pork and chicken meat. Lane 1: ϕ χ 174/*Hae*III digested DNA marker; lane 2: chicken meat; lane 3: gizzard; lane 4: pork.

五、增菌液之選擇

選用一般增菌常用之 Peptone water、Saline 及 Lactose broth 三種液體培養基，添加靈敏度所能偵測之最低菌量 10^4 CFU，進行 PCR，以探討其對 PCR 是否會有抑制作用，並作為檢體檢驗時增菌液選擇之參考，其結果如圖四所示，此三種增菌液對 PCR 方法均無干擾，因此，本研究選用一般沙門氏桿菌增菌時最常用之 Lactose broth (Stone *et al.* 1994) 進行下面之增菌步驟⁽¹⁴⁾。

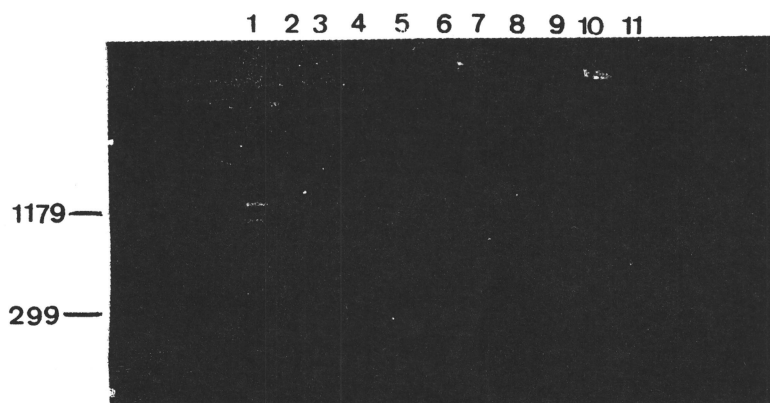


圖四 以不同之增菌液 (LB, Saline, Peptone water) 進行 Multiplex PCR 檢測之結果

Fig. 4. Detection of Multiplex PCR assay using primer pairs 337-L/338-R and TS11/TS4 for the addition of 10^4 CFU and 10^5 CFU cells of *S. typhimurium* ATCC14028 to different broth. Lane 1: ϕ χ 174/*Hae*III digested DNA marker; lane 2: negative control; lane 3: 10^4 CFU cells in Lactose broth; lane 4: 10^5 CFU cells in Lactose broth; lane 5: 10^4 CFU cells in Saline; lane 6: 10^5 CFU cells in Saline; lane 7: 10^4 CFU cells in Peptone water; lane 8: 10^5 CFU cells in Peptone water.

六、雞肉等檢體之檢驗

將未添加菌液之雞肉、雞心、雞肫等檢體進行 PCR 檢測。但在進行 PCR 檢測時，若直接加入 Lactose broth，混合均勻之後，即進行 PCR 檢測，卻無法偵測出 *Salmonella* spp. 之存在，推測可能是檢體中菌數未達到本 PCR 法之最低靈敏度菌數，故再採取增菌 24h 之後之培養液，並經離心過濾後進行 PCR 檢測，其結果如圖五所示，並以傳統 CNS 檢驗方法、選擇性培養、生化反應鑑定做確認，其結果顯示 PCR 為正反應者確實含有沙門氏桿菌。由上述結果得知：PCR 方法確可取代傳統耗時的檢驗方法，雖然 PCR 方法仍須再增菌 24 小時，使得菌數達到最低可偵測之靈敏度，然整個實驗過程加上增菌時間，耗時約 28 小時，仍較傳統方法費時 5-7 天快速，且其準確度高。故本研究建立之 PCR 方法確實可應用在雞肉等檢體上，快速檢測沙門氏桿菌。



圖五 以 Multiplex PCR檢測市售之雞肉檢體之結果

Fig 5. Detection of Multiplex PCR assay using primer pairs 337-L/338-R and TS11/TS4 for chicken samples. Lane 1: ϕ χ 174/*Hae*III digested DNA marker; lane 2: Sample No. 83; lane 3: Sample No. 84; lane 4: Sample No. 85; lane 5: Sample No. 86; lane 6: Sample No. 87; lane 7: Sample No. 88; lane 8: Sample No. 89; lane 9: Sample No. 90; lane 10: Sample No. 91; lane 11: Sample No. 92.

謝 誌

本研究經費承蒙行政院農委會補助 [計畫編號: 85科技-1·9-糧45(2-2)], 使得本計畫順利完成, 在此致上最深的謝意。

參 考 文 獻

1. Tauxe, R. V. (1991) *Salmonella*, a postmodern pathogen. J. Food Prot. 54:563.
2. Bean, N. H. and Griffin, P. M. (1990) Food borne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogens, vehicles and trends. J. Food Prot. 53:804.
3. Todd, E. C. D. (1992) Food Borne disease in Canada, A 10-year summary from 1975 to 1984. J. Food Prot. 55:123.
4. Mullis, K. and Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. 155:335.
5. Lampel, K. A., Jagon, J. A., Trucksess, M. and Hill, W. E. (1990) Polymerase chain reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food. Appl. Environ. Microbiol. 56:1536.
6. Besessn, M. T., Luo, Q., Roberta, H. A., Blaster, M. T. and Ellison, R. T. (1990) Detection of *Listeria monocytogenes* by Using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 56:2930.

6. Besessn, M. T., Luo, Q., Roberta, H. A., Blaster, M. T. and Ellison, R. T. (1990) Detection of *Listeria monocytogenes* by Using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 56:2930.
7. Bej, A. K., Dicesare, J. L., Haffand, L., and Atlas, R. M. (1990) Detection of *Escherichia coli* based upon polymerase chain reaction and amplification of uid. 90th ASM meeting 13-17 May poster abstra. p289.
8. 經濟部中央標準局. (1988) 食品微生物之檢驗法－沙門氏桿菌之檢驗，中國國家標準 10952, N6193.
9. Tsen, H. Y., Liou, J. and Lin, C. K. (1994) Possible use of a polymerase chain reaction method of *Salmonella* in beef. J. Ferment. Bioengin. 77:137.
10. Miller, S. I., Kukral, A. M. and Mekalanos, J. J. (1989) A two -component regulatory system (*phoP/phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5054.
11. Bej, A. K., Mahbubani, M. H., Boyce, M. J. and Atlas, R. M. (1994) Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60:368.
12. Lees, D. N., Henshilwood, K. and Dore, W. J. (1994) Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. Appl. Environ. Microbiol. 60:2999.
13. Way, J. S., Josephson, K. L., Pillai, S. D., Abbaszadegan, M., Gerba, C. P. and Pepper, I. L. (1993) Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 59:1473.
14. Stone, G.G., Oberst, R. D., Hays, M. P., McVey, S. and Chengappa, M. M. (1994) Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR proccedure. J. Clin. Microbiol. 32:1742.

(Received 08/08/97'; Revised 11/15/97'; Accepted 02/17/98')