

## 食品微生物之檢驗方法－病原性大腸桿菌之檢驗

### Methods of Test for Food Microorganisms-

### Test of Pathogenic *Escherichia coli*

#### 第一部：病原性大腸桿菌之分離及鑑別

1. 適用範圍：本方法適用於食品中病原性大腸桿菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經增菌培養後，以選擇性培養基培養，進行定性分析。
  - 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：能維持內部溫度在 $170 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 者。
    - 2.2.3. 高壓滅菌釜：可達 $121^{\circ}\text{C}$ 以上者。
    - 2.2.4. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
    - 2.2.5. 顯微鏡：能放大至1000倍之一般光學顯微鏡。
    - 2.2.6. 培養箱：能維持內部溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 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. 攪拌均質器或鐵胃：能適用於無菌操作者。
    - 2.2.9. 燈箱：觀察血清試驗用。
    - 2.2.10. 天平：可稱量到2000 g者，靈敏度為0.1 g；可稱量到100 g者，靈敏度為1 mg。
    - 2.2.11. 旋渦混合器。
    - 2.2.12. 酸鹼度測定儀。
    - 2.2.13. 加熱器。
    - 2.2.14. 攪拌器。
    - 2.2.15. 吸管輔助器或微量吸管。
    - 2.2.16. 吸管：已滅菌。1 mL吸管應有0.01 mL刻度；5 mL及10 mL吸管應有0.1 mL刻度。
    - 2.2.17. 吸管尖：10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 及1000  $\mu\text{L}$ 。
    - 2.2.18. 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。

- 2.2.19. 容器：附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵弗龍或其他能耐121°C濕熱滅菌20分鐘以上之三角錐瓶、玻璃瓶或廣口瓶，或無菌袋。
- 2.2.20. 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑9×22 mm或其他適用者。
- 2.2.21. 試管：13×100 mm、16×150 mm或其他適用者。
- 2.2.22. 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。
- 2.2.23. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.2.24. 濾紙及褐色試藥瓶。
- 2.2.25. 蠟筆：塗寫、劃記載玻片時使用。
- 2.2.26. 研鉢、杵：研磨試藥用。
- 2.2.27. 無菌濾膜：孔徑0.45 μm或以下之親水性濾膜。
- 2.2.28. 藥勺、剪刀、小刀、鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.29. 試藥：氯化鈉、磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、磷酸氫二鉀(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、結晶紫(crystal violet)、甲基紅(methyl red)、伊紅Y(eosin Y)、亞甲藍(methylene blue)、磷酸氫銨鈉(NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O)、磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、磷酸二氫鈉(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O)、硫酸鎂(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)、檸檬酸鈉(Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O)、乳糖(lactose)、蔗糖(sucrose)、葡萄糖(glucose)、核糖醇(adonitol)、纖維雙糖(cellobiose)、阿拉伯糖(arabinose)、甘露糖醇(mannitol)、山梨糖醇(sorbitol)、膽鹽(bile salts No.3)、中性紅(neutral red)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、亞甲藍(methylene blue)、溴瑞香草藍(bromothymol blue)、酚紅(phenol red)、離胺酸(L-lysine)、黏液酸(mucic acid)、無水硫酸鎂(MgSO<sub>4</sub>)、尿素(urea)、草酸銨、碘化鉀、氰化鉀、碘、沙黃O(safranin O)、對二甲胺基苯甲醛(*p*-dimethylaminobenzaldehyde)、α-萘酚(α-naphthol)、氫氧化鉀、肌酸(creatine)、95%乙醇、無水乙醇、戊醇(amy alcohol)、異戊醇(isoamyl alcohol)、鹽酸、硝酸鉀(KNO<sub>3</sub>)、醋酸鈉(CH<sub>3</sub>COONa)

、液態石蠟、氫氧化鈉、鄰硝基苯吡喃半乳糖(*o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)、*N,N,N',N'*-四甲基對苯二胺鹽酸鹽(*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride)、對-胺基苯磺酸(sulfanilic acid)、冰醋酸、萘基乙二胺鹽酸鹽〔*N*-(1-naphthyl)ethylene diamine dihydrochloride〕、硫酸銨亞鐵〔Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O〕、硫代硫酸鈉(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、聚山梨醇酯80 (polysorbate 80, Tween 80)、硫酸銨〔(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>〕、丙二酸鈉(sodium malonate)及鋅粉均採用化學試藥級；洋菜(agar)、胰化酪蛋白(trypticase)、心肌浸出物(heart muscle infusion)、硫蛋白朊(thiotone)、聚蛋白朊(polypeptone)、酵母抽出物(yeast extract)、牛肉抽出物(beef extract)、豚蛋白朊(proteose peptone)、胰化蛋白朊(tryptone)、牛腦浸出物(calf brain infusion)、牛心浸出物(beef heart infusion)及蛋白朊(peptone)均採用微生物級。

#### 2.2.30. 試劑：

- 2.2.30.1. 30% 氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉30 g，以蒸餾水溶解使成100 mL。
- 2.2.30.2. 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至pH值為7.0，再加蒸餾水使成50 mL，冷藏備用。
- 2.2.30.3. 鄰硝基苯基吡喃半乳糖試劑(ONPG reagent)：取鄰硝基苯基吡喃半乳糖80 mL，溶於37°C蒸餾水15 mL，加入1.0 M磷酸二氫鈉溶液5 mL，冷藏備用，使用時須加溫至37°C。
- 2.2.30.4. 5 N 氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉20 g，以蒸餾水溶解使成100 mL。
- 2.2.30.5. 5 N 醋酸溶液：取冰醋酸286 ml，加蒸餾水715 ml。
- 2.2.30.6. 50% 葡萄糖溶液：稱取葡萄糖5 g，溶於蒸餾水10 mL，以無菌濾膜過濾。
- 2.2.30.7. 0.5% 氰化鉀溶液：取氰化鉀0.5 g，溶於冷卻至5~8°C之蒸餾水100 mL。(氰化鉀劇毒，調製時均應冷卻至5~8°C，保存期限以不超過2週為宜。)

- 2.2.30.8. 柯瓦克氏試劑(Kovacs' reagent)：取對-二甲胺基苯甲醛5 g，溶於戊醇或異戊醇75 mL，再徐徐加入鹽酸，混合均勻後應呈黃色，冷藏備用。
- 2.2.30.9. 歐普氏試劑(Voges-Proskauer reagent, VP reagents)：  
溶液A：取 $\alpha$ -萘酚5 g，溶於無水乙醇100 mL。  
溶液B：取氫氧化鉀40 g，溶於蒸餾水使成100 mL。
- 2.2.30.10. 氧化酶試驗試劑(Oxidase test reagent)：取N,N,N',N'-四甲基對苯二胺鹽酸鹽1 g，溶於蒸餾水100 mL，保存於褐色瓶，冷藏備用，使用期限以不超過一星期為宜。
- 2.2.30.11. 亞硝酸鹽試驗試劑(Nitrite test reagents)：  
試劑A：取對-胺基苯磺酸1 g，溶於5 N醋酸溶液125 mL。  
試劑B：取萘基乙二胺鹽酸鹽0.25 g，溶於5 N醋酸溶液200 mL。
- 2.2.30.12. 0.85%生理食鹽水：取氯化鈉8.5 g溶於蒸餾水1000 mL，分裝於容器，經121°C滅菌15分鐘。
- 2.2.30.13. 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。
- 2.2.30.14. 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water, BPW)：取蛋白胨10 g、氯化鈉5 g、磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 3.5 g及磷酸二氫鉀1.5 g，溶於蒸餾水使成1000 mL，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為 $7.2 \pm 0.2$ 。
- 2.2.31. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)：
- 2.2.31.1. 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。
- 2.2.31.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)：  
取碘化鉀2 g及碘1 g，於研鉢研磨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，將此溶液注入褐色瓶，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，以此洗液併入，使溶液達300 mL。

2.2.31.3. 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1：革蘭氏染色液因放久可能失效，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。

2.2.32. 抗血清：

2.2.32.1. 病原性大腸桿菌多價本體抗血清(Polyvalent "O" type antisera)。

2.2.32.2. 病原性大腸桿菌單價本體抗血清(Monovalent "O" type antisera)。

2.2.33. 培養基：

2.2.33.1. 磷酸胰化蛋白朊培養液(Tryptone phosphate broth, TP)

	單位濃度	雙倍濃度
胰化蛋白朊(tryptone).....	20 g	40 g
磷酸氫二鉀(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	2 g	4 g
磷酸二氫鉀(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	2 g	4 g
氯化鈉.....	5 g	10 g
聚山梨醇酯80 (polysorbate 80).....	15 mL	30 mL
蒸餾水.....	1000 mL	1000 mL

加熱溶解後，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.0 ± 0.2。

2.2.33.2. 腦心浸出培養液(Brain heart infusion broth, BHI)

牛腦浸出物(calf brain infusion).....	200 g
牛心浸出物(beef heart infusion).....	250 g
朊蛋白朊(proteose peptone).....	10 g
氯化鈉.....	5 g
磷酸氫二鈉(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	2.5 g
葡萄糖(glucose).....	2 g
蒸餾水.....	1000 mL

加熱溶解後，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.4 ± 0.2。

2.2.33.3. 伊紅亞甲藍培養基(Levine's eosin methylene blue agar, L-EMB)

蛋白朊(peptone).....	10 g
乳糖(lactose) .....	10 g
磷酸氫二鉀(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	2 g
洋菜(agar).....	15 g
伊紅Y (eosin Y).....	0.4 g
亞甲藍(methylene blue).....	0.065 g
蒸餾水 .....	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.1 ± 0.2。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，培養皿約倒入15~20 mL，凝固後打開皿蓋約1/2~1/4，使培養基之表面乾燥。已注入培養皿之培養基宜當天使用，冷藏備用者應於使用前檢查有無雜菌之污染。

#### 2.2.33.4. 馬康奇培養基(MacConkey agar)

胨蛋白朊(proteose peptone).....	3 g
蛋白朊(peptone).....	17 g
乳糖(lactose) .....	10 g
膽鹽(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

加熱沸騰溶解後，分裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.1 ± 0.2。

#### 2.2.33.5. 血液基礎培養基(blood agar base, BAB)

心肌浸出物(heart muscle infusion).....	375 g
硫蛋白朊(thiotone). .....	10 g
氯化鈉 .....	5 g
洋菜(agar).....	15 g
蒸餾水 .....	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分裝於容器，以121°C滅菌20分鐘，最終pH值為7.3 ± 0.2。

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

聚蛋白胨(polypeptone).....	20 g
氯化鈉 .....	5 g
乳糖(lactose) .....	10 g
蔗糖(sucrose) .....	10 g
葡萄糖(glucose) .....	1 g
硫酸銨亞鐵 [ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ] .....	0.2 g
硫代硫酸鈉( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ).....	0.2 g
酚紅(phenol red) .....	0.025 g
洋菜(agar).....	13 g
蒸餾水 .....	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分取5 mL注入試管，以118°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.3 ± 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。

#### 2.2.33.7. 尿素培養液(Urea broth)

尿素(urea).....	20 g
酵母抽出物(yeast extract) .....	0.1 g
磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....	9.1 g
磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) .....	9.5 g
酚紅(phenol red) .....	0.01 g
蒸餾水 .....	1000 mL

溶解後，經無菌濾膜過濾，分取濾液1.5~3 mL，注入已滅菌之試管，最終pH值為6.8 ± 0.2。

#### 2.2.33.8. 溴甲酚紫培養液(Bromocresol purple broth)

蛋白胨(peptone).....	10 g
牛肉抽出物(beef extract).....	3 g
氯化鈉 .....	5 g
溴甲酚紫(bromocresol purple) .....	0.04 g
蒸餾水 .....	1000 mL

加熱溶解後，分取約2.5 mL注入裝有發酵管(觀察氣體產生者，如葡萄糖、甘露糖醇、乳糖)之試管，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%葡萄糖溶液278 μL，使培養液中葡

葡萄糖之最終濃度為5% (w/v)。含核糖醇溶液、纖維雙糖溶液、阿拉伯糖溶液、甘露糖醇溶液、乳糖溶液及山梨糖醇溶液之溴甲酚紫培養液配製方法亦同。

#### 2.2.33.9. 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5 mL注入試管，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.9 ± 0.2。

#### 2.2.33.10. 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(bromocresol purple)..... 0.02 g  
蒸餾水..... 1000 mL  
加熱溶解後，分取5 ml注入附有螺旋蓋之試管，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.8 ± 0.2。

#### 2.2.33.11. 氰化鉀培養液(Potassium cyanide broth)

基礎培養液

聚蛋白胨(polypeptone)..... 3 g  
氯化鈉..... 5 g  
磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)..... 0.225 g  
磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)..... 5.64 g  
蒸餾水..... 1000 mL  
加熱溶解後，取1000 mL裝於容器，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.6 ± 0.2。以安全吸球吸取0.5%氰化鉀溶液15 ml，加入基礎培養液1000 mL，混合均勻，分取1~1.5 ml注入已滅菌之試管。

#### 2.2.33.12. 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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)..... 5 g  
蒸餾水..... 1000 mL

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

2.2.33.13. 柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液(Koser's citrate broth)

磷酸氫銨鈉( $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ).....	1.5 g
磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....	1 g
硫酸鎂( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) .....	0.2 g
檸檬酸鈉( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) .....	3 g
蒸餾水 .....	1000 mL

溶解後，分取10 mL注入附有螺旋蓋之試管，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.7 ± 0.2。

2.2.33.14. 醋酸鹽培養基(Acetate agar)

醋酸鈉( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ).....	2 g
氯化鈉 .....	5 g
無水硫酸鎂( $\text{MgSO}_4$ ) .....	0.2 g
磷酸二氫銨( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ).....	1 g
磷酸氫二鉀( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).....	1 g
溴瑞香草藍(bromothymol blue).....	0.08 g
洋菜(agar).....	20 g
蒸餾水 .....	1000 mL

加熱沸騰溶解後，始加入無水硫酸鎂並混搖均勻。分取8 mL注入試管，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.7。滅菌後作成斜面培養基，斜面長度約5 cm。

2.2.33.15. 黏液酸鹽培養液(Mucate broth)

蛋白胨(peptone).....	10 g
黏液酸(mucic acid).....	10 g
溴瑞香草藍(bromothymol blue).....	0.024 g
蒸餾水 .....	1000 mL

蛋白胨加熱溶解後，始加入黏液酸，再徐徐注入5 N氫氧化鈉溶液，攪拌使完全溶解，分取5 mL注入附有螺旋蓋之試管，以121°C滅菌10分鐘，最終pH值為7.4 ± 0.1。

2.2.33.16. 黏液酸鹽對照培養液(Mucate control broth)

蛋白胨(peptone).....	10 g
-------------------	------

溴瑞香草藍(bromothymol blue)..... 0.024 g  
蒸餾水 ..... 1000 mL  
加熱溶解後，分取5 mL注入附有螺旋蓋之試管，以  
121°C滅菌10分鐘，最終pH值為7.4 ± 0.1。

2.2.33.17. 吡啶亞硝酸鹽培養基(Indole nitrite medium)

胰化酪蛋白(trypticase)..... 20 g  
磷酸氫二鈉(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ..... 2 g  
葡萄糖(glucose) ..... 1 g  
硝酸鉀(KNO<sub>3</sub>) ..... 1 g  
洋菜(agar)..... 1 g  
蒸餾水 ..... 1000 mL  
加熱沸騰溶解後，分取11 mL注入試管，以118°C滅菌  
15分鐘，最終pH值為7.2 ± 0.2。

2.2.33.18. 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  
溴瑞香草藍(bromothymol blue)..... 0.025 g  
蒸餾水 ..... 1000 mL  
加熱溶解後，分取3 mL注入試管，以121°C滅菌15分鐘  
，最終pH值為6.7 ± 0.2。

2.3. 檢液之調製：

- 2.3.1. 固態檢體：將檢體適當切碎，混合均勻後，取25 g，加入BHI培養液225 mL，混合均勻，作成10倍稀釋檢液。
- 2.3.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎之檢體：使用已滅菌之藥勺或其他用具將檢體粉碎，並混合均勻。取25 g，加入BHI培養液225 mL，混合均勻，作成10倍稀釋檢液。
- 2.3.3. 液態檢體：將檢體振盪混合均勻，取25 mL，加入BHI培養液225 mL，混合均勻，作成10倍稀釋檢液。

- 2.3.4. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚肉、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)；亦可使用更高的溫度快速解凍(45°C以下之水浴，可於15分鐘內解凍者)。解凍時應經常搖動檢體，以加速解凍。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、冰淇淋等冰類製品，應速先行使成適當小塊。取25 g，加入BHI培養液225 mL，混合均勻，作成10倍稀釋檢液。
- 2.3.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳等檢體，經適當攪拌均勻後，取25 g加入BHI培養液225 mL，混合均勻，作成10倍稀釋檢液。
- 2.3.6. 塗抹物(Swab)檢體：將塗抹棒之頭部置於已滅菌試管，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄，添加BPW緩衝液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，取溶出液供作檢液。
- 註2：處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量已滅菌之乳化劑(如Tween 80，使其於檢液中濃度為1%)，並充分振搖，使之乳化。
- 註3：檢體總量不足25 g (mL)時，應依檢體量，添加適量之BHI培養液，混合均勻，作成10倍稀釋檢液。
- 2.4. 鑑別試驗：
- 2.4.1. 增菌培養：將2.3.節之檢液於室溫振盪培養10分鐘，再靜置10分鐘使檢體自然沉澱，取上層BHI培養液於另外已滅菌之容器，於35°C培養3小時，使細胞復甦(resuscitation)。移入等量之雙倍濃度之TP培養液，於44 ± 0.2°C培養20小時。
- 2.4.2. 分離培養：增菌培養之2.4.1.節TP培養液鈎取一種環菌量，分別在L-EMB及馬康奇培養基表面劃線後，於35°C培養20小時，觀察所形成菌落之生長狀態，若為可疑病原性大腸桿菌者，菌落中央呈暗紫色，扁平，帶有或不帶金屬光澤，在馬康奇培養基上之菌落為紅色、無色、或淡粉紅色，挑取至少5個可疑菌落接種於血液基礎培養基，於35°C培養24 ± 2小時，供作革蘭氏染色、生化試驗及血清型別試驗用。

### 2.4.3. 革蘭氏染色(Gram stain)：

- (1) 加適量0.85%生理食鹽水於載玻片上，以接種針(或環)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。結果為革蘭氏染色陰性，無芽胞桿菌者，則為可疑病原性大腸桿菌。

### 2.4.4. 生化試驗：自2.4.2.節之血液基礎培養基鉤菌，作以下試驗。

#### 2.4.4.1. 初步試驗：

- 2.4.4.1.1. 硫化氫產生試驗( $H_2S$  production test)：鉤菌利用斜面劃線及穿刺法接種方法，TSI斜面培養基，於35°C培養20±2小時，培養基呈黑色者為正反應，否則為負反應，病原性大腸桿菌為負反應。
- 2.4.4.1.2. 尿素酶試驗(Urease test)：鉤菌接種於尿素培養液，於35°C培養20±2小時，培養液由橘紅色變為紫紅色者為正反應，仍維持橘紅色者為負反應，病原性大腸桿菌為負反應。
- 2.4.4.1.3. 阿拉伯糖發酵試驗(Arabinose fermentation test)：鉤菌接種於阿拉伯糖溴甲酚紫培養液，於35°C培養20±2小時，培養液由紫色變為黃色者為正反應，否則為負反應，病原性大腸桿菌為正反應。
- 2.4.4.1.4. 吲哚試驗(Indole test)：鉤菌接種於胰化蛋白胨培養液，於35°C培養24±2小時，加入柯瓦克氏試劑0.2 mL，輕輕搖動後靜置10分鐘，上層呈現紅色，則為正反應；否則為負反應，病原性大腸桿菌通常為正反應，經上述試驗確認為可疑病原性大腸桿菌時，始繼續進行以

下試驗。

- 2.4.4.1.5. 鄰硝苯基吡喃半乳糖試驗(ONPG test)：自2.4.4.1.1.節之可疑病原性大腸桿菌反應之TSI培養基斜面上鉤菌，置於含有0.85%生理食鹽水0.2 mL之試管，作成懸浮液後，再加入一片浸過鄰硝苯基吡喃半乳糖試劑之濾紙小圓片，輕輕搖動後，於35°C培養6小時，濾紙小圓片變成黃色者為正反應，否則為負反應，病原性大腸桿菌為正反應。

經鄰硝苯基吡喃半乳糖試驗確認為可疑病原性大腸桿菌時，始繼續進行以下試驗。

2.4.4.2. 第二步試驗：

- 2.4.4.2.1. 核糖醇發酵試驗(Adonitol fermentation test)：鉤菌接種於核糖醇溴甲酚紫培養液，於35°C培養48小時，培養液由紫色變為黃色者為正反應，否則為負反應，大部分病原性大腸桿菌為負反應。
- 2.4.4.2.2. 氰化鉀試驗(KCN test)：鉤菌接種於氰化鉀培養液後以橡皮塞封緊試驗管口，於35°C培養48±2小時，每隔24小時觀察一次，培養液由清澈狀變為混濁狀者為正反應，仍維持清澈狀者為負反應，病原性大腸桿菌為負反應。
- 2.4.4.2.3. 離胺酸脫羧酶試驗(Lysine decarboxylase test)：鉤菌接種於離胺酸脫羧酶培養液，徐徐注入液態石蠟至高約2.5 cm，於35°C培養96±2小時，每隔24小時觀察一次。培養液維持原紫色者為正反應，由紫色變為黃色者為負反應，大部分病原性大腸桿菌為正反應。
- 2.4.4.2.4. 歐普氏試驗(VP test)：鉤菌接種於MR-VP培養液，於35°C培養48±2小時，取培養液1 mL至另一已滅菌之試管，加入歐普氏試劑之溶液A 0.6 mL及溶液B 0.2 mL後，再加入少許肌酸，振搖均勻，經2~4小時後觀察結果，呈現粉紅色則為正反應，否則為負反應，病原性大腸桿菌為負反應。
- 2.4.4.2.5. 纖維雙糖發酵試驗(Cellobiose fermentation test)：鉤菌接種於纖維雙糖溴甲酚紫培養液，於35°C培養48±2小

時，培養液由紫色變為黃色者為正反應，否則為負反應，病原性大腸桿菌為負反應。

- 2.4.4.2.6. 檸檬酸鹽利用試驗(Citrate utilization test)：鈎菌接種於柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液，於35°C培養72~96小時，呈現混濁狀，則為正反應；仍維持原澄清狀則為負反應，病原性大腸桿菌為負反應。
- 2.4.4.2.7. 乳糖發酵試驗(Lactose fermentation test)：鈎菌接種於乳糖溴甲酚紫培養液，於35°C培養48±2小時，產生氣體者，則為正反應；未產生氣體者，則為負反應，病原性大腸桿菌為正反應。
- 2.4.4.2.8. 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48±2小時，每隔24小時觀察一次。培養液由綠色變為藍色者為正反應；仍維持綠色者為負反應，大部分病原性大腸桿菌為負反應。
- 2.4.4.2.9. 甘露糖醇發酵試驗(Mannitol fermentation test)：鈎菌接種於甘露糖醇溴甲酚紫培養液，於35°C培養48±2小時，顏色由紫色變為黃色，且有氣體產生者為正反應；否則為負反應，大部分病原性大腸桿菌為正反應。
- 2.4.4.2.10. 葡萄糖發酵試驗(Glucose fermentation test)：鈎菌接種於葡萄糖溴甲酚紫培養液，於35°C培養48±2小時，顏色由紫色變為黃色，且有氣體產生者為正反應；否則為負反應，大部分病原性大腸桿菌為正反應。
- 2.4.4.2.11. 甲基紅試驗(MR test)：將2.4.4.2.4.節剩餘之MR-VP培養液再培養48±2小時，加入甲基紅指示劑0.3 ml，輕輕搖勻，仍為紅色，則為正反應；否則為負反應，病原性大腸桿菌為正反應。
- 2.4.4.2.12. 醋酸鹽氧化試驗(Acetate oxidation test)：鈎菌接種於醋酸鹽培養基斜面上，於35°C培養48±2小時，每隔24小時觀察一次；斜面上有菌體生長且培養基由綠色變為藍色者為正反應；否則為負反應，大部分病原性大腸桿菌為正反應。
- 2.4.4.2.13. 黏液酸鹽利用試驗(Mucate utilization test)：鈎菌分別接種於黏液酸鹽培養液及黏液酸鹽對照培養液，於

35°C培養48 ± 2小時，每隔24小時觀察一次。黏液酸鹽培養液由藍色變為黃色，而黏液酸鹽對照培養液仍維持藍色者為正反應；否則為負反應，大部分病原性大腸桿菌為正反應。

2.4.4.2.14. 氧化酶試驗(Oxidase test)：鉤菌接種(避免使用鎳鉻製品)於血液基礎培養基，於35°C培養24 ± 2小時，鉤取菌落後塗抹於滴有氧化酶試劑濾紙上，10~15秒後變為深藍紫色者為正反應；否則為負反應，病原性大腸桿菌為負反應。

2.4.4.2.15. 硝酸鹽還原試驗(Nitrate reduction test)：鉤菌接種於吡啶亞硝酸鹽培養基，於35°C培養18~24小時，取培養液3 mL至另一已滅菌之試管，加入亞硝酸鹽試驗試劑A及試劑B各2滴，輕輕搖勻後觀察結果，呈現紅紫色則為正反應，若顏色無變化時加入少許鋅粉而有紅紫色呈現時則為負反應，否則亦為正反應。病原性大腸桿菌為正反應。

2.4.4.2.16. 山梨糖醇發酵試驗(Sorbitol fermentation test)：鉤菌接種於山梨糖醇溴甲酚紫培養液，於35°C培養48 ± 2小時，培養液由紫色變為黃色者為正反應；否則為負反應，大部分病原性大腸桿菌為正反應。

註4：對於部分病原性大腸桿菌類似*Shigella*不產氣、無運動性、乳糖發酵較慢者，在離胺酸脫羧酶試驗、醋酸鹽氧化試驗、粘液酸鹽利用試驗中，其中一次或一次以上為正反應。

2.4.5. 血清型別試驗：經革蘭氏染色及生化試驗確認為可疑病原性大腸桿菌陽性時，自2.4.4.節鉤菌接種於血液基礎培養基，於35°C培養24小時，鉤取約3~5倍火柴棒頭之菌量，懸浮於0.85%生理食鹽水3 mL，於100°C加熱1小時或121°C加熱15分鐘，以900 ×g離心20分鐘，去除上清液，再以0.85%生理食鹽水0.5 mL懸浮菌體，取菌液備用。利用蠟筆在載玻片上畫成兩部分，大小約1 × 2 cm，於一部分滴入多價本體抗血清1滴，混合均勻，再於另一部分加入0.85%生理食鹽水30 μL，作為對照組。各吸取懸浮菌液5~10 μL，分別滴入載玻片上之兩部分內，混合均勻，反覆前後傾斜搖動1分鐘後觀察結

果。正反應者有凝集現象，負反應者及對照組則為無凝集現象，病原性大腸桿菌為正反應。病原性大腸桿菌多價本體抗血清試驗呈正反應時，續以單價本體抗血清重複上述步驟進行確認。

註5：血清型別試驗可參考使用經確效認可之市售套組，並依其產品說明進行檢測。

2.5. 判定：病原性大腸桿菌陽性者應符合下表所列之結果。

試 驗	正 反 應 (+)	負 反 應 (-)	病原性大腸 桿菌之反應
革蘭氏染色	陽性 (深紫色)	陰性 (粉紅色)	—
硫化氫產生試驗	黑色	非黑色	—
尿素酶試驗	紫紅色	橘紅色	—
阿拉伯糖發酵試驗	黃色	紫色	+
吡哌試驗	紅色	原色	+
鄰硝苯基吡喃半乳糖 試驗	黃色	原色	+
核糖醇發酵試驗	黃色	紫色	—
氰化鉀試驗	混濁 (生長)	清澈 (未生長)	—
離胺酸脫羧酶試驗	紫色	黃色	+
歐普氏試驗	粉紅色	原色	—
纖維雙糖發酵試驗	黃色	紫色	—
檸檬酸鹽利用試驗	混濁 (生長)	清澈 (未生長)	—
乳糖發酵試驗	產氣	未產氣	+
丙二酸鹽試驗	藍色	綠色	—
甘露糖醇發酵試驗	黃色，且產氣	紫色或未產氣	+
葡萄糖發酵試驗	黃色，且產氣	紫色或未產氣	+
甲基紅試驗	紅色	黃色	+
醋酸鹽氧化試驗	藍色	綠色	+

101年11月19日署授食字第1011902814號公告  
102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正  
103年12月10日部授食字第1031901801號公告修正  
110年1月20日衛授食字第1091902961號公告修正  
MOHWM0017.03

黏液酸鹽利用試驗	黃色	藍色	+
氧化酶試驗	深藍紫色	原色	—
硝酸鹽還原試驗	紅紫色	原色 <sup>a</sup>	+
山梨糖醇發酵試驗	黃色	紫色	+
血清型別試驗	凝集	無凝集	+

<sup>a</sup>：若無紅紫色時加入少許鋅粉，而有紅紫色呈現時則為負反應，否則亦為正反應。

- 2.6. 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：病原性大腸桿菌之PCR檢測

1. 適用範圍：本方法適用於病原性大腸桿菌致病基因鑑別。
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，以聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)鑑別致病基因之方法。
  - 2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體DNA抽取、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<sup>(註1)</sup>：
    - 2.2.1. 聚合酶鏈反應器：GeneAmp® PCR System 9700，或同級品。
    - 2.2.2. 高壓滅菌釜：可達121°C以上者。
    - 2.2.3. 真空乾燥裝置：供DNA乾燥用。
    - 2.2.4. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
    - 2.2.5. 加熱振盪器：具溫控及振盪功能。
    - 2.2.6. 微量冷凍離心機：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. 冷藏冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。
    - 2.2.10. 旋渦混合器。
    - 2.2.11. 電泳槽：供DNA電泳用。
    - 2.2.12. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。
    - 2.2.13. 紫外燈箱：具波長302 nm、365 nm紫外燈。
    - 2.2.14. 酸鹼度測定儀。
    - 2.2.15. 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. PCR用<sup>(註2)</sup>：

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子：

2.3.2.1.1. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)致病基因

2.3.2.1.1.1. 標的基因：*stx1*

引子F：LP30

5'-CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG-3'

引子R：LP31

5'-CACCAGACAATGTAACCGCTG-3'

PCR增幅產物大小348 bp

2.3.2.1.1.2. 標的基因：*stx2*

引子F：LP43

5'-ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG-3'

引子R：LP44

5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3'

PCR增幅產物大小584 bp

2.3.2.1.2. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)致病基因

2.3.2.1.2.1. 標的基因：*sth*

引子F：STIb 1

5'-CCCTCAGGATGCTAAACCAG-3'

引子R：STIb 2

5'-TTAATAGCACCCGGTACAAGC-3'

PCR增幅產物大小166 bp

2.3.2.1.2.2. 標的基因：*stp*

引子F：STIa 1

5'-TCTGTATTATCTTTCCCCTC-3'

引子R：STIa 2

5'-ATAACATCCAGCACAGGC-3'

PCR增幅產物大小186 bp

2.3.2.1.2.3. 標的基因：*lth, ltp*

引子F：LT-1

5'-AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA-3'

引子R：LT-2

5'-GTGCTCAGATTCTGGGTCTC-3'

PCR增幅產物大小132 bp

### 2.3.2.1.3. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)致病基因

標的基因：*bfpA*

引子F：EP1

5'-AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC-3'

引子R：EP2

5'-GCCGCTTTATCCAACCTGGTA-3'

PCR增幅產物大小326 bp

### 2.3.2.1.4. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)致病基因

標的基因：*invE*

引子F：I-1

5'-ATATCTCTATTTCCAATCGCGT-3'

引子R：I-5

5'-GATGGCGAGAAATTATATCCCG-3'

PCR增幅產物大小382 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/ $\mu$ 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，分裝後於-20°C冷凍保存。

### 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, Na<sub>2</sub>-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：病原性大腸桿菌參考菌株或其DNA。

#### 2.4. 器具及材料<sup>(註3)</sup>：

- 2.4.1. 微量吸管：2  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 及1000  $\mu\text{L}$ 。
- 2.4.2. 吸管尖：可滅菌。10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 及1000  $\mu\text{L}$ 。
- 2.4.3. 離心管：200  $\mu\text{L}$ 、600  $\mu\text{L}$ 、1.5 mL及2 mL。
- 2.4.4. PCR反應管：200  $\mu\text{L}$ 。
- 2.4.5. PCR反應盤：具96個反應孔，適用於GeneAmp® PCR System 9700。
- 2.4.6. 電泳膠片製作盤。
- 2.4.7. 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0.5M EDTA溶液20 mL，再加去離子水溶解使成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，冷藏備用。

##### 2.5.5. 膠片染液：

稱取溴化乙錠0.1 g，加去離子水10 mL溶解，供作原液(10 mg/mL)，使用前以去離子水稀釋成1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

#### 2.5.6. PCR 溶液<sup>(註4)</sup>：

10 倍含 15 mM 氯化鎂之 PCR 緩衝溶液.....	5.0 $\mu$ L
<i>Taq</i> DNA polymerase (2 U/ $\mu$ L) .....	2.0 $\mu$ L
2.5 mM dNTP .....	8.0 $\mu$ L
10 $\mu$ M 引子 F .....	2.0 $\mu$ L
10 $\mu$ M 引子 R.....	2.0 $\mu$ L
檢體 DNA 溶液.....	1.0 $\mu$ L
無菌去離子水 .....	30.0 $\mu$ L
總體積 .....	50.0 $\mu$ L

註4：PCR 溶液應於冰浴中配製。

#### 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. 節增菌液中吸取菌液 1 mL，置入已滅菌之 1.5 mL 離心管，以 15000  $\times$ g 離心 3 分鐘，去除上清液。

##### 2.6.1.1. 直接煮沸法：

將沉澱物懸浮於無菌去離子水 1 mL，再以 15000  $\times$ g 離心 3 分鐘，去除上清液。重複一次。續將沉澱物續懸浮於無菌去離子水，置入加熱振盪器煮沸 10 分鐘，作為檢體 DNA 原液，於 -20 $^{\circ}$ 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，於 -20 $^{\circ}$ 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，振盪混合均勻，以 15000  $\times$ g 離心 3 分鐘，去除上清液。依 2.6.1.1. 節或 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 O.D.<sub>260</sub>/O.D.<sub>280</sub> 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. 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，將反應管以200 ×g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. PCR條件：

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95°C	3 min
2. 變性	94°C	1 min
3. 黏接 <sup>(註6)</sup>	55°C	1 min
4. 延展	72°C	1 min
步驟2至步驟4，共進行35個循環反應。		
5. 最終延展	72°C	5 min

註6：EHEC及EPEC致病基因鑑別溫度為56°C。

### 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，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DNA模版與正反應對照組DNA均出現PCR增幅產物，經由DNA分子量標記物質估算PCR增幅產物大小於EHEC為348

bp者，即判定該檢體含有*stx1*致病基因；PCR增幅產物大小於EHEC為584 bp者，即判定該檢體含有*stx2*致病基因；PCR增幅產物大小於ETEC為166 bp者，即判定該檢體含有*sth*致病基因；PCR增幅產物大小於ETEC為186 bp者，即判定該檢體含有*stp*致病基因；PCR增幅產物大小於ETEC為132 bp者，即判定該檢體含有*lth*, *ltp*致病基因；PCR增幅產物大小於EPEC為326 bp者，即判定該檢體含有*bfpA*致病基因；PCR增幅產物大小於EIEC為382 bp者，即判定該檢體含有*invE*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：第二部病原性大腸桿菌之PCR檢測可視需要執行。

### 第三部：病原性大腸桿菌之real-time PCR檢測

1. 適用範圍：本方法適用於病原性大腸桿菌致病基因鑑別。
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)鑑別致病基因之方法。
  - 2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。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：可達121°C以上者。
    - 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：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. 冷藏冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。
    - 2.2.9. 旋渦混合器。
    - 2.2.10. 酸鹼度測定儀。
    - 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. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)致病基因
          - 2.3.2.1.1.1. 標的基因：*stx1*

引子F：Stx1F934

5'-GTGGCATTAAATACTGAATTGTCATCA-3'

引子R：Stx1R1042

5'-GCGTAATCCCACGGACTCTTC-3'

探針P：Stx1P990

5'-(FAM)-TGATGAGTTTCCTTCTATGTGTCCGG  
CAGAT-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小109 bp

2.3.2.1.1.2. 標的基因：*stx2*

引子F：Stx2F1218

5'-GATGTTTATGGCGGTTTTATTTGC-3'

引子R：Stx2R1300

5'-TGGAAACTCAATTTTACCTTTAGCA-3'

探針P：Stx2P1249

5'-(FAM)-TCTGTTAATGCAATGGCGGCGGATT-(  
BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小83 bp

2.3.2.1.2. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) 致病基因

2.3.2.1.2.1. 標的基因：*lt*

引子F：LT1F

5'-AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA-3'

引子R：LT2R

5'-GTGCTCAGATTCTGGGTCTC-3'

探針P：LTP2

5'-(FAM)-AAGAACCCTGGATTCATCATGCACCA  
CAAG-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小132 bp

2.3.2.1.2.2. 標的基因：*st*

引子F：StaF

5'-GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA-3'

引子R：StaR

5'-AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA-3'

探針P：STaP3

5'-(FAM)-CTTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG  
AATCACTT-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小190 bp

#### 2.3.2.1.3. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)致病基因

標的基因：*eaeA*<sup>(註3)</sup>

引子F：EaeF2

5'-CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA-3'

引子R：EaeR

5'-CTCATGCGGAAATAGCCGTTA-3'

探針P：EaeP3

5'-(FAM)-AGGTATTGGTGGCGAATACTGGCGAGAC  
TA-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小106 bp

#### 2.3.2.1.4. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)致病基因

標的基因：*invE*

引子F：IIF

5'-ATATCTCTATTTCCAATCGCGT-3'

引子R：I5R

5'-GATGGCGAGAAATTATATCCCG-3'

探針P：invEP5

5'-(FAM)-AAAGACCTTGATACAAATTTGCCCCCGG  
ACA-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小382 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，分裝後於-20°C冷凍保存，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。

註3：EHEC及EPEC皆帶有*eaeA*基因，故鑑別時再以*stx1*及*stx2*基因區分EHEC及EPEC。

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：各類別病原性大腸桿菌參考菌株或其DNA。

#### 2.4. 器具及材料<sup>(註4)</sup>

2.4.1. 微量吸管：2  $\mu$ L、10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L及1000  $\mu$ L。

2.4.2. 吸管尖：可滅菌。10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L及1000  $\mu$ L。

2.4.3. 離心管：200  $\mu$ L、600  $\mu$ L、1.5 mL及2 mL。

2.4.4. Real-time PCR反應管：100  $\mu$ L。

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4：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5)</sup>

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

5  $\mu$ M引子F ..... 2.0  $\mu$ L

5  $\mu$ M引子R..... 2.0  $\mu$ L

5  $\mu$ M探針..... 1.0  $\mu$ L

TaqMan® Fast Reagents Starter Kit ..... 12.5  $\mu$ L

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5：Real-time PCR溶液應於冰浴中配製。

#### 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.節增菌液中吸取菌液1 mL，置入已滅菌之1.5 mL離心管，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，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，於-20°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，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，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.<sub>260</sub>/O.D.<sub>280</sub>比值作判斷，其比值應介於1.7~2.0。

### 2.7. 鑑別試驗<sup>(註6)</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23 μL入real-time PCR反應盤的反應孔，各別加入檢體DNA溶液2 μL，再將real-time PCR反應盤以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。

病原性大腸桿菌致病基因反應條件

步驟	溫度	時間
1. 熱活化	95°C	2 min
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增幅產物為病原性大腸桿菌致病基因之基因片段，可確認該檢體中含有病原性大腸桿菌致病基因。

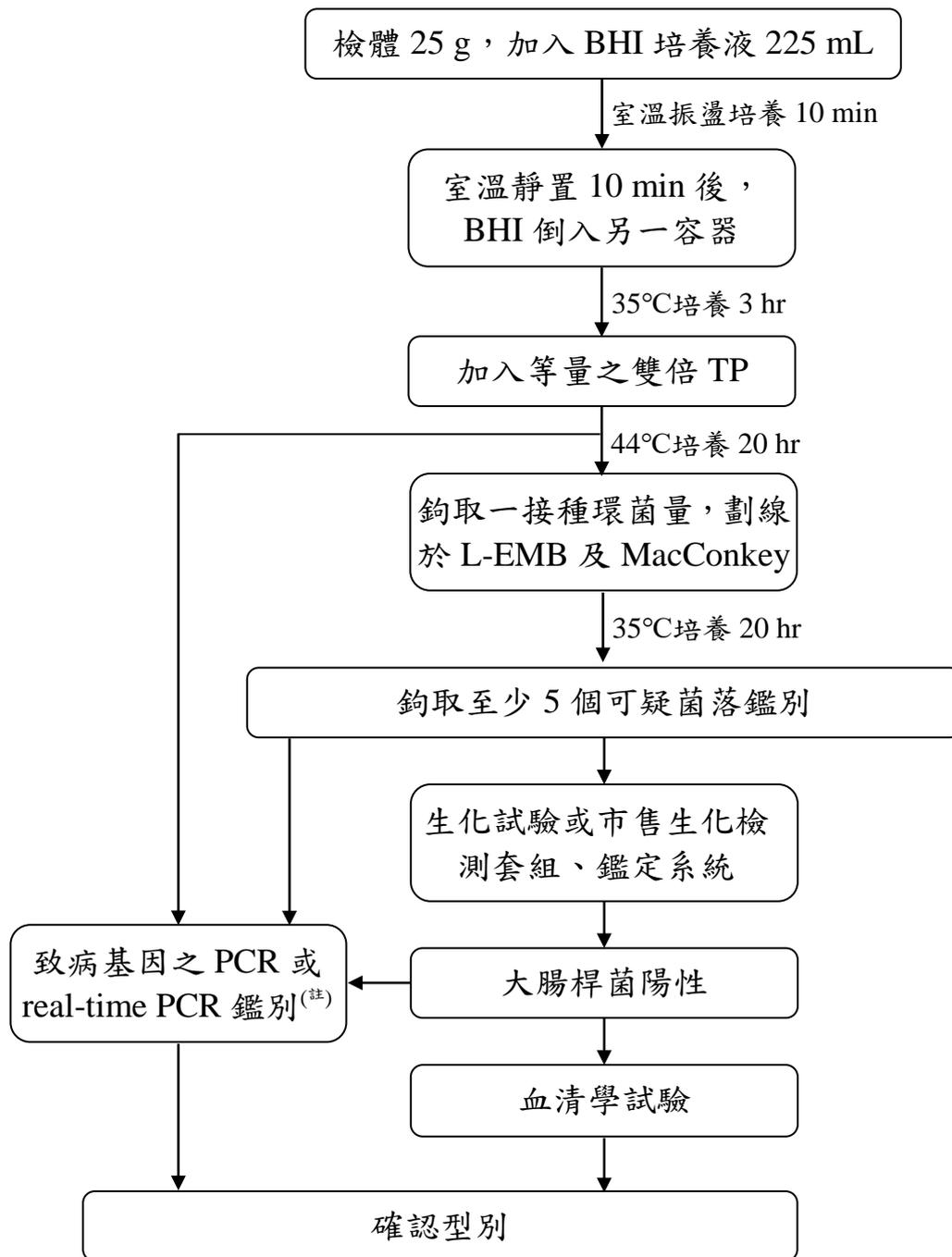
註6：本real-time PCR反應條件係採Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

附註：第三部病原性大腸桿菌之real-time PCR檢測可視需要執行。

### 參考文獻：

1. Feng, P., Weagant, S. D. and Jinneman, K. 2018. Chapter 4A Diarrheagenic *Escherichia coli*. Bacteriological Analytical Manual. [<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-diarrheagenic-escherichia-coli>]
2. 小西典子、尾畑浩魅、下島優香子、門間千枝、甲斐明美、辻孝雄。2009。6種類の毒素原性大腸菌が検出された仕出し弁当を原因とする集団食中毒事例とColony-sweep PCR法を応用した検査法について。感染症学雑誌，83: 490-495。
3. Fukushima, H., Katsube, K., Tsunomori, Y., Kishi, R., Atsuta, J. and Akiba, Y. 2009. Comprehensive and rapid real-time PCR analysis of 21 foodborne outbreaks. Int. J. Microbiol. 2009: 917623.

## 檢驗流程圖



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