

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*

第一部份：病原性大腸桿菌之分離、計數及鑑別

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：檢體經系列稀釋後，以選擇性培養基培養及計數之方法或增菌培養後進行定性分析。
  - 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。
    - 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. 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  $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$  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. 燈箱：觀察血清試驗用。
    - 2.2.10. 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。
    - 2.2.11. 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。
    - 2.2.12. 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。
    - 2.2.13. 增菌用容器：附蓋之 500 mL 或 1000 mL 廣口瓶。
    - 2.2.14. 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑  $9 \times 22$  mm，使用時倒置於  $15 \times 150$  mm 之試管內。
    - 2.2.15. 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。
    - 2.2.16. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
    - 2.2.17. 褐色試藥瓶。
    - 2.2.18. 蠟筆：塗寫、劃記載玻片時使用。
    - 2.2.19. 研鉢、杵：研磨試藥用。

2.2.20. 無菌濾膜：孔徑 0.45  $\mu\text{m}$  或以下之親水性醋酸纖維濾膜。

2.2.21. 試藥：氯化鈉、磷酸二氫鉀( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、磷酸氫二鉀( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )、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( $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )、無水磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、硫酸鎂( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、檸檬酸鈉( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、乳糖(lactose)、蔗糖(sucrose)、葡萄糖(glucose)、葡萄糖(dextrose)、側金盞花糖醇(adonitol)、纖維雙糖(cellobiose)、阿拉伯膠糖(arabinose)、甘露糖醇(mannitol)、山梨酸糖醇(sorbitol)、膽汁鹽(bile salts No.3)、中性紅(neutral red)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、亞甲藍(methylene blue)、溴麝香草藍(bromothymol blue)、酚紅(phenol red)、離胺酸(L-lysine)、硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate)、黏液酸(mucic acid)、無水硫酸鎂( $\text{MgSO}_4$ )、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)、 $\alpha$ -萘酚( $\alpha$ -naphthol)、氫氧化鉀、肌酸(creatine)、95%乙醇、戊醇(amylic alcohol)、異戊醇(isoamyl alcohol)、鹽酸、硝酸鉀( $\text{KNO}_3$ )、醋酸鈉( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )、液態石蠟、氫氧化鈉、硝基苯吡喃半乳糖(O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)、四甲基對位苯二胺鹽酸鹽(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 [ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ]、硫代硫酸鈉( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )、聚己二烯酸 80(polysorbate 80)、硫酸銨 [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ]、丙二酸鈉(sodium malonate)及鋅粉均採用化學試藥級；洋菜(agar)、胰化蛋白胨(tryptose)、胰化酪蛋白(trypticase)、心肌浸出物(heart muscle infusion)、硫蛋白胨(thiotone)、聚蛋白胨(polypeptone)、酵母抽出物(yeast extract)、牛肉抽出物(beef extract)、胨蛋白胨(proteose peptone)、胰化蛋白胨(tryptone)、牛腦浸出物(calf brain infusion)、牛心浸出物(beef heart infusion)、胨蛋白胨(proteose peptone)及蛋白胨(peptone)均採用微生物級。

2.2.22. 試劑：

2.2.22.1. 30%氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉 30 g，以蒸餾水溶解使成 100 mL。

2.2.22.2. 1.0M 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，貯存於 4°C 冰箱中備用。

2.2.22.3. 磷位硝基苯吡喃半乳糖試劑(ONPG reagent)：取鄰位硝基苯吡喃半乳糖 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，貯存於 4°C 冰箱中，使用時須加溫至 37°C。

2.2.22.4. 1N 氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉 4 g，以蒸餾水溶解使成 100 mL。

2.2.22.5. 5N 氫氧化鈉溶液：取氫氧化鈉 20 g，以蒸餾水溶解使成 100 mL。

- 2.2.22.6. 5N 醋酸溶液：取冰醋酸 286 ml，加水 715 ml。
- 2.2.22.7. 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。
- 2.2.22.8. 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，貯存期限以不超過 2 週為宜。)
- 2.2.22.9. 柯瓦克氏試劑(Kovacs' reagent)：取對一二甲胺基苯甲醛 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，並須保存於 4°C 冰箱中。
- 2.2.22.10. 歐普氏試劑(Voges Proskauer reagent, VP reagent)：  
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。
- 2.2.22.11. 氧化酶試驗試劑(Oxidase test reagent)：取四甲基對位苯二胺鹽酸鹽 1 g，溶於蒸餾水 100 mL，貯存於褐色瓶，置於 4°C 冰箱中，使用期限以不超過一星期為宜。
- 2.2.22.12. 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 5N 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。
- 2.2.22.13. 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。
- 2.2.22.14. 0.5%生理食鹽水：取氯化鈉 5.0 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。
- 2.2.22.15. 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。
- 2.2.22.16. 稀釋液之配製：  
2.2.22.16.1. 磷酸鹽緩衝液(Butterfield's phosphate-buffered dilution water, BPBW)：取磷酸二氫鉀 34 g，溶於蒸餾水 500 mL，以 1N 氫氧化鈉溶液調整 pH 值為 7.2，再加蒸餾水使成 1000 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘，貯存於冰箱中，作為原液。使用時，取原液 1.25 mL，加入蒸餾水 1000 mL，分裝於稀釋用容器中，以 121°C 滅菌 15 分鐘。  
2.2.22.16.2. 磷酸鹽緩衝生理食鹽水(Phosphate buffered saline, PBS)：取氯化鈉 7.65 g、無水磷酸氫二鈉 0.724 g 及磷酸二氫鉀 0.21 g，溶於蒸餾水 500 mL，以 1N 氫氧化鈉溶液調整 pH 值為 7.4，再加蒸餾水使成 1000 mL，以 121°C 滅菌 15 分鐘。
- 2.2.23. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)：  
2.2.23.1. 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。

2.2.23.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)：

取碘化鉀 2 g 及碘 1 g，置於研鉢中，研磨 5~10 秒，加蒸餾水 1 mL 研磨，次加蒸餾水 5 mL 研磨，再加蒸餾水 10 mL，研磨至碘化鉀和碘完全溶於蒸餾水中，將此溶液注入褐色瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，以此洗液併入，使溶液達 300 mL。

2.2.23.3. 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。

2.2.24. 抗血清：

2.2.24.1. 病原性大腸桿菌多價本體莢膜抗血清(Poly-Valent "OK" type antisera)：OK 1、OK 2、OK 3、OK 4、OK 5。

2.2.24.2. 病原性大腸桿菌單價本體莢膜抗血清(Monovalent "OK" type antisera)。

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

2.2.25. 培養基：

2.2.25.1. 磷酸胰化蛋白胰培養液(Tryptone phosphate broth, TP)

	單位濃度	雙倍濃度
胰化蛋白胰(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
聚己二烯酸 80(polysorbate 80)	15 mL	30 mL
蒸餾水	1000 mL	1000 mL

以 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.0±0.2。

2.2.25.2. 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
胰蛋白胰(proteose peptone)	10 g
氯化鈉	5 g
磷酸氫二鈉 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O)	2.5 g
葡萄糖(dextrose)	2 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於三角瓶內或試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最

後 pH 值為  $7.4 \pm 0.2$ 。

2.2.25.3. 伊紅亞甲藍(洋菜)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( $K_2HPO_4$ ) .....	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，分裝於試管或三角瓶內，以  $121^\circ C$  滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為  $7.1 \pm 0.1$ 。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，在冰箱中貯存者，應於使用前檢查有無雜菌之污染。

2.2.25.4. 馬康奇(洋菜)培養基(MacConkey agar)

胨蛋白朊(proteose peptone) .....	3 g
蛋白朊(peptone) .....	17 g
乳糖(lactose) .....	10 g
膽汁鹽(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，分裝於試管或三角瓶內，以  $121^\circ C$  滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為  $7.1 \pm 0.2$ 。以下步驟與 2.2.14.3 節同。

2.2.25.5. 硫酸月桂酸胰化蛋白胨培養液(Lauryl sulfate tryptose broth, LST)

胰化蛋白胨(tryptose) .....	20 g
乳糖(lactose) .....	5 g
磷酸氫二鉀( $K_2HPO_4$ ) .....	2.75 g
磷酸二氫鉀( $KH_2PO_4$ ) .....	2.75 g
氯化鈉.....	5 g
硫酸月桂酸鈉(sodium lauryl sulfate) .....	0.1 g
蒸餾水.....	1000 mL

加熱溶解後，分取 9 mL 注入試管內或 30 mL 注入增菌用廣口瓶內，以  $121^\circ C$  滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為  $6.8 \pm 0.2$ 。

## 2.2.25.6. 血液(洋菜)基礎培養基(blood agar base, BAB)

心肌浸出物(heart muscle infusion) .....	375 g
硫蛋白脛(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，分裝於容器內，以 121°C 滅菌 20 分鐘，最後 pH 值為 7.3±0.2。

## 2.2.25.7. 三糖鐵(洋菜)培養基(Triple sugar iron agar, TSI)

聚蛋白脛(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 [ Fe (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O ] .....	0.2 g
硫代硫酸鈉(Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) .....	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 13 × 120 mm 試管內，以 118°C 滅菌 15 分鐘，最後 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。

## 2.2.25.8. 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(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) .....	9.1 g
磷酸氫二鉀(K <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，經無菌濾膜過濾，分取濾液 1.5~3 mL，注入已滅菌之試管中，最後 pH 值為 6.8±0.2。

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

蛋白脛(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

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  $7.0 \pm 0.2$ 。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  $\mu\text{L}$ ，使培養液中葡萄糖之最終濃度為 5% (w/v)。含側金盞花醇溶液、纖維雙糖溶液、阿拉伯膠糖溶液、甘露糖醇溶液、乳糖溶液及山梨酸糖醇溶液之溴甲酚紫培養液配製方法亦同。

#### 2.2.25.10. 胰化蛋白朊培養液(Tryptone broth)

胰化蛋白朊(tryptone) ..... 10 g  
蒸餾水..... 1000 mL

加熱溶解後，分取 5 mL 注入試管內，以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為  $6.9 \pm 0.2$ 。

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

蛋白朊(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內，以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 10 分鐘，最後 pH 值為  $6.5 \pm 0.2$ 。

#### 2.2.25.12. 氰化鉀培養基(Potassium cyanide broth)

基礎培養液

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

加熱溶解後，取 1000 mL 裝於三角瓶內，以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為  $7.6 \pm 0.2$ 。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 中，混合均勻，分取 1~1.5 ml 注入已滅菌之試管中。

#### 2.2.25.13. MR-VP 培養液(MR-VP broth)

胨蛋白朊(proteose peptone) ..... 7 g  
葡萄糖(glucose) ..... 5 g  
磷酸氫二鉀( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) ..... 5 g  
蒸餾水..... 1000 mL

加熱溶解過濾後，分取 5 mL 注入試管內，以  $121^\circ\text{C}$  滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為  $6.9 \pm 0.2$ 。

#### 2.2.25.14. 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

磷酸氫二鉀( $K_2HPO_4$ ) ..... 1 g  
 硫酸鎂( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ..... 0.2 g  
 檸檬酸鈉( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ) ..... 3 g  
 蒸餾水..... 1000 mL  
 溶解後，分取 10 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.7±0.2。

## 2.2.25.15. 醋酸鹽(洋菜)培養基(Acetate agar)

醋酸鈉( $CH_3COONa$ ) ..... 2 g  
 氯化鈉..... 5 g  
 無水硫酸鎂( $MgSO_4$ ) ..... 0.2 g  
 磷酸二氫銨( $NH_4H_2PO_4$ ) ..... 1 g  
 磷酸氫二鉀( $K_2HPO_4$ ) ..... 1 g  
 溴麝香草藍(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 注入試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.7。滅菌後作成斜面培養基，斜面長度約 5 cm。

## 2.2.25.16. 黏液酸鹽培養液(Mucate broth)

蛋白胨(peptone) ..... 10 g  
 黏液酸(mucic acid) ..... 10 g  
 溴麝香草藍(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內，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最後 pH 值為 7.4±0.1。

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

蛋白胨(peptone) ..... 10 g  
 溴麝香草藍(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內，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最後 pH 值為 7.4±0.1。

## 2.2.25.18. 吲哚亞硝酸鹽培養基(Indole nitrite medium)

胰化酪蛋白(trypticase) ..... 20 g  
 無水磷酸氫二鈉( $Na_2HPO_4$ ) ..... 2 g  
 葡萄糖(Dextrose) ..... 1 g  
 硝酸鉀( $KNO_3$ ) ..... 1 g  
 洋菜(agar) ..... 1 g



蒸餾水..... 1000 mL  
 加熱並煮沸 1~2 分鐘，俟完全溶解後，分取 5 mL 注入試管內，以 118°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.2±0.2。

#### 2.2.25.19. 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°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. 檢體之處理：

2.3.1.1. 固態檢體：將檢體適當切碎，混合均勻後，取 25 g，加入已滅菌之 PBS 或 BPBW 稀釋液 225 mL，用攪拌均質器攪拌。先以低速攪拌數秒鐘，再高速攪拌，攪拌之總時間不能超過 2 分鐘，作為 10 倍稀釋檢液。

2.3.1.2. 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方便使用之用具，將檢體粉碎，並混合均勻，取 25 g，加入已滅菌之 PBS 或 BPBW 稀釋液 225 mL，作為 10 倍稀釋檢液。

2.3.1.3. 液態檢體：用振盪方式，將檢體混合均勻，取 25 mL，加入已滅菌之 PBS 或 BPBW 稀釋液 225 mL，作為 10 倍稀釋檢液。

2.3.1.4. 冷凍檢體：須解凍之檢體，如冷凍魚、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(置於 45°C 以下之水浴中，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，再予以切碎並混合均勻。取 25 g，加入已滅菌 PBS 或 BPBW 稀釋液 225 mL，用攪拌均質器攪拌(攪拌方法同 2.3.1.1. 節)，作為 10 倍稀釋檢液。

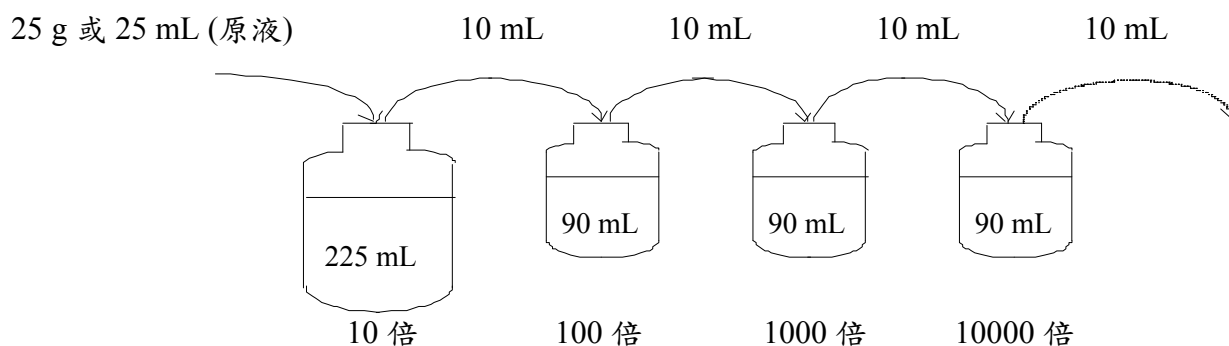
不須解凍者，如食用冰塊、冰棒、冰淇淋等冰類製品，應速先行使成適當小塊。取 25 g，加入已滅菌之 PBS 或 BPBW 稀釋液 225 mL，用攪拌均質器攪拌(攪拌方法同 2.3.1.1. 節)，作為 10 倍稀釋檢液。

2.3.1.5. 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 加入已滅菌之 PBS 或 BPBW 稀釋液 225 mL，用攪拌均質

器攪拌(攪拌方法同 2.3.1.1 節)，作為 10 倍稀釋檢液。

註 2：處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量之滅菌乳化劑(如 Triten X-100、Tergitol Anionic 7 或 1% Tween 80，使其於檢液中濃度為 1%)，充分振搖，使之乳化。

2.3.2. 檢液之處理：分別使用滅菌之吸管，吸取 2.3.1 節之 10 倍稀釋檢液 10 mL，加入 BHI 培養液 90 mL，依序作成一系列適當之 100 倍、1000 倍及 10000 倍等稀釋檢液，其稀釋方法如下圖所示。



#### 2.4. 鑑別試驗：

2.4.1. 平板計數法：將 2.3 節之 10 倍稀釋檢液塗抹於馬康奇(洋菜)培養基表面，置於 35°C 培養箱中培養 20 小時。

2.4.2. 增菌培養：將 2.3.1 節檢體處理之 PBS 或 BPBW 稀釋液以 BHI 培養液取代，充分混合，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，置於 35°C 培養箱中培養 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。

2.4.3. 分離培養：自 4.1 節之馬康奇(洋菜)培養基直接取鈎取可疑菌落，增菌培養之 2.4.2 節 TP 培養液各取一白金耳量，分別在 L-EMB 及馬康奇(洋菜)培養基表面劃面後，於 35°C 培養箱培養 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，在 L-EMB 之菌落為直徑 2-4 mm，頂部凸狀，中央暗紫色具金屬光澤，在馬康奇(洋菜)培養基上之菌落為紅色、無色、或淡粉紅色，挑取可疑菌落接種於血液(洋菜)基礎培養基斜面上，置於 35°C 培養箱中，培養 24±2 小時後，供作生化試驗及血清型別試驗用。

#### 2.4.4. 革蘭氏染色(Gram stain)

(1) 加適量無菌生理食鹽水於載玻片上，以接種針(或環)鈎取適量菌株，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。

2.4.5. 生化試驗：自 2.4.3.節之血液(洋菜)基礎培養基斜面上鈎菌；作以下試驗。

2.4.5.1. 初步試驗：

2.4.5.1.1. 硫化氫產生試驗( $H_2S$  production test)：鈎菌利用斜面劃線及穿刺法接種方法：TSI 斜面(洋菜)培養基，置於  $35^\circ C$  培養箱中，培養  $20 \pm 2$  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。

2.4.5.1.2. 尿素酶試驗(Urease test)：鈎菌接種於尿素培養液中，置於  $35^\circ C$  培養箱中培養  $20 \pm 2$  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。

2.4.5.1.3. 阿拉伯膠糖發酵試驗(Arabinose fermentation test)：鈎菌接種於阿拉伯糖溴甲酚紫培養液中，置於  $35^\circ C$  培養箱中培養  $20 \pm 2$  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。

2.4.5.1.4. 吲哚試驗(Indole test)：鈎菌接種於胰化蛋白胨培養液中，置於  $35^\circ C$  培養箱中培養  $24 \pm 2$  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。

2.4.5.1.5. 鄰位硝基苯吡喃半乳糖試驗(ONPG test)：自 2.4.5.1.1.節之可疑病原性大腸桿菌反應之 TSI Agar 斜面上鈎菌，置於含有 0.85%生理食鹽水 0.2 mL 之試管中，作成懸浮液後，再加入一片浸過鄰位硝基苯吡喃半乳糖試劑之濾紙小圓片，輕輕搖動後，置於  $35^\circ C$  培養箱中培養 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。

經鄰位硝基苯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。

2.4.5.2. 第二步試驗：

2.4.5.2.1. 側金盞花醇發酵試驗(Adonitol fermentation test)：鈎菌接種於側金盞花醇溴甲酚紫培養液中，置於  $35^\circ C$  培養箱中，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。

2.4.5.2.2. 氰化鉀試驗(KCN test)：鈎菌接種於氯化鉀培養液後以橡皮塞封緊

試驗管口，置於 35°C 培養箱中培養 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。

- 2.4.5.2.3. 離胺酸脫羧酶試驗(Lysine decarboxylase test)：鈎菌接種於離胺酸脫羧酶培養液後，徐徐注入液態石蠟至高約 2.5 cm，置於 35°C 培養箱中培養 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。
- 2.4.5.2.4. 普氏試驗(VP test)：鈎菌接種於 MR-VP 培養液中，並置於 35°C 培養箱中培養 48±2 小時後，取培養液 1 mL 至另一已滅菌之試管中，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。
- 2.4.5.2.5. 纖維雙糖發酵試驗(Cellobiose fermentation test)：鈎菌接種於纖維雙糖溴甲酚紫培養液中，置於 35°C 培養箱中培養 48±2 小時後，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。
- 2.4.5.2.6. 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中，置於 35°C 培養箱中培養 72~96 小時後，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。
- 2.4.5.2.7. 乳糖產氣試驗：鈎菌接種於乳糖溴甲酚紫培養液中，置於 35°C 培養箱中培養 48±2 小時後，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。
- 2.4.5.2.8. 丙二酸鹽試驗(Malonate test)：鈎菌接種於丙二酸鹽培養液中，置於 35°C 培養箱中培養 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。
- 2.4.5.2.9. 甘露醇利用試驗(Mannitol utilization test)：鈎菌接種於甘露醇溴甲酚紫培養液中，置於 35°C 培養箱中培養 48±2 小時後，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。
- 2.4.5.2.10. 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中，置於 35°C 培養箱中培養 48±2 小時後，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。
- 2.4.5.2.11. 甲基紅試驗(MR test)：將 2.4.5.2.4. 節剩餘之 MR-VP 培養液再培養 48±2 小時後，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。
- 2.4.5.2.12. 醋酸鹽氧化試驗(Acetate oxidation test)：鈎菌接種於醋酸鹽(洋菜)培養基斜面上，置於 35°C 培養箱中培養 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。
- 2.4.5.2.13. 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中，置於 35°C 培養箱中培養 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。
- 註 3：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。
- 2.4.5.2.14. 細胞色素氧化酶試驗(Cytochrome oxidase test)：鈎菌接種於 BAB 斜面上，置於 35°C 培養箱中培養 24±2 小時後，滴加 2~3 滴氧化酶試驗試劑於斜面之菌落上，於 2 分鐘內菌落上粉紅色後逐漸轉變為暗紫色者為正反應(+); 否則為負反應(-)，病原性大腸桿菌為負反應。
- 2.4.5.2.15. 硝酸鹽還原試驗(Nitrate reduction test)：鈎菌接種於亞硝酸鹽培養基中，置於 35°C 培養箱中培養 18~24 小時，取培養液 3 mL 至另一已滅菌之試管中，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。
- 2.4.5.2.16. 山梨醇發酵試驗(Sorbitol fermentation test)：鈎菌接種於山梨醇溴甲酚紫培養液中，置於 35°C 培養箱中培養 48±2 小時後，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。
- 2.4.6. 鏡檢：自 2.4.5 節及或 2.4.5.1.1 節培養基斜面上鈎菌，接種於 BAB 斜面上，置於 35°C 培養箱中培養 24±2 小時後，鈎菌作革蘭氏染色鏡檢，結果為革蘭氏染色陰性，無芽胞桿菌者，為可疑病原性大腸桿菌。
- 2.4.7. 血清型別試驗：經生化試驗及鏡檢確認為可疑病原性大腸桿菌陽性時，將 2.4.5 節之 BAB 置於 22°C 培養箱中，再繼續培養至少 24 小時後，加入 0.5% 生理食鹽水 5 mL，充分振盪後，將懸浮液等量移入兩支已滅菌之試管中，一支試管進行多價與單價本體莢膜抗血清試驗，另一支試管進行單價本體抗血清試驗，其步驟如下：
- 2.4.7.1. 多價本體莢膜抗血清試驗(Polyvalent "OK" type antisera test)：利用蠟

筆在載玻片上畫成兩部份大小約  $1 \times 2$  cm，一邊滴入一滴多價本體莢膜抗血清及數滴 0.5% 生理食鹽水，混合均勻後，另一邊滴入數滴 0.5% 生理食鹽水，作為對照組，再各取一白金耳量懸浮液，分別塗抹於載玻片上之兩部份內，反覆傾斜 3 分鐘，使混合均勻後觀察結果。正反應者則有凝集現象，對照組則無，負反應者則為無凝集現象，病原性大腸桿菌為正反應。凝集反應可能很緩慢或很微弱，血清學試驗呈負反應時，可將細菌懸浮液以  $100^{\circ}\text{C}$  加熱 15 分鐘破壞菌體之莢膜組織後，再作一次凝集試驗。

2.4.7.2. 單價本體莢膜抗血清試驗(Monovalent "OK" type antisera test)：取 2.4.6.1. 節細菌懸浮液，利用各單價本體莢膜抗血清代替多價本體莢膜抗血清，依 2.4.6.1. 節進行試驗及觀察，正反應者應呈凝集現象，對照組則無；負反應者則無凝集現象，且對照組亦無，病原性大腸桿菌為正反應。凝集反應可能很緩慢或很微弱，血清學試驗呈負反應時，可將細菌懸浮液以  $100^{\circ}\text{C}$  加熱 15 分鐘破壞菌體之莢膜組織後，再作一次凝集試驗。

2.4.7.3. 單價本體抗血清試驗(Monovalent "O" type antisera test)：取 2.4.6. 節另一支試管中之細菌懸浮液，利用各單價本體抗血清代替多價本體莢膜抗血清，依 2.4.6.1. 節進行試驗及觀察。正反應者呈凝集現象，但對照組則無；負反應者則兩組均無凝集現象，病原性大腸桿菌為正反應。大部分凝集反應很緩慢且很微弱，血清學試驗呈負反應時，可將細菌懸浮液以  $100^{\circ}\text{C}$  加熱 1 小時，再作一次凝集試驗。

## 2.5. 判定：

2.5.1. 病原性大腸桿菌陽性者應符合第 2.4.5. 節、2.4.6. 節及 2.4.7. 節之反應結果。

2.5.2. 平板計數：計數 2.4.1. 節馬康奇(洋菜)培養基之可疑菌落，乘以判定病原性大腸桿菌陽性之比率。

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

## 第二部份：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：檢體經分離純化後，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。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<sup>(註 1)</sup>：
    - 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 抽取用試藥：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' cag tta atg tgg tgg cga agg 3'

引子 R：LP31, 5' cac cag aca atg taa ccg ctg 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' atc cta ttc ccg gga gtt tac g 3'

引子 R：LP44, 5' gcg tca tcg tat aca cag gag c 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' ccc tca gga tgc taa acc ag 3'

引子 R：STIb 2, 5' tta ata gca ccc ggt aca agc 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' tct gta tta tct ttc ccc tc 3'

引子 R：STIa 2, 5' ata aca tcc agc aca ggc 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' agc agg ttt ccc acc gga tca cca 3'

引子 R：LT-2, 5' gtg ctc aga ttc tgg gtc tc3'

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' aat ggt gct tgc gct tgc tgc 3'

引子 R：EP2, 5' gcc gct tta tcc aac ctg gta 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' ata tct cta ttt cca atc gcg t 3'

引子 R：I-5, 5' gat ggc gag aaa tta tat ccc g 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/ $\mu$ 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, 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：病原性大腸桿菌標準菌株或其 DNA。

2.4. 器具及材料<sup>(註 3)</sup>：

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  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L 及 1000  $\mu$ L。

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

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

2.4.6. PCR 反應管：200  $\mu$ L 及 500  $\mu$ 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. 0.5M 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  $\times$  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. PCR 溶液<sup>(註4)</sup>：

10 倍含 15 mM 氯化鎂之 PCR 緩衝溶液...	5.0 µL
Taq DNA polymerase (2 U/µL).....	2.0 µL
2.5 mM dNTP .....	8.0 µL
10 µM 引子 F .....	2.0 µL
10 µM 引子 R.....	2.0 µL
檢體 DNA 溶液.....	1.0 µL
無菌去離子水 .....	30.0 µL
總體積 .....	50.0 µL

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 2.4.節檢體增菌液或分離菌株取 1 mL 菌液，置入已滅菌之 1.5 mL 離心管中，以 15000 × g 離心 3 分鐘，去除上清液。

##### 2.6.1.1. 直接煮沸法：

將沉澱物懸浮於無菌生理食鹽水 1 mL，再以 15000 × g 離心 3 分鐘，去除上清液。重複一次。續將沉澱物懸浮於無菌去離子水中，置入加熱振盪器煮沸 10 分鐘，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. 病原性大腸桿菌分離菌株之 DNA 溶液製備：

自培養基上鈎取一接種環的菌量，置入含有 1 mL 無菌去離子水之已滅菌 1.5 mL 離心管中，震盪混合均勻，以 15000 × 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/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. 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5：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。

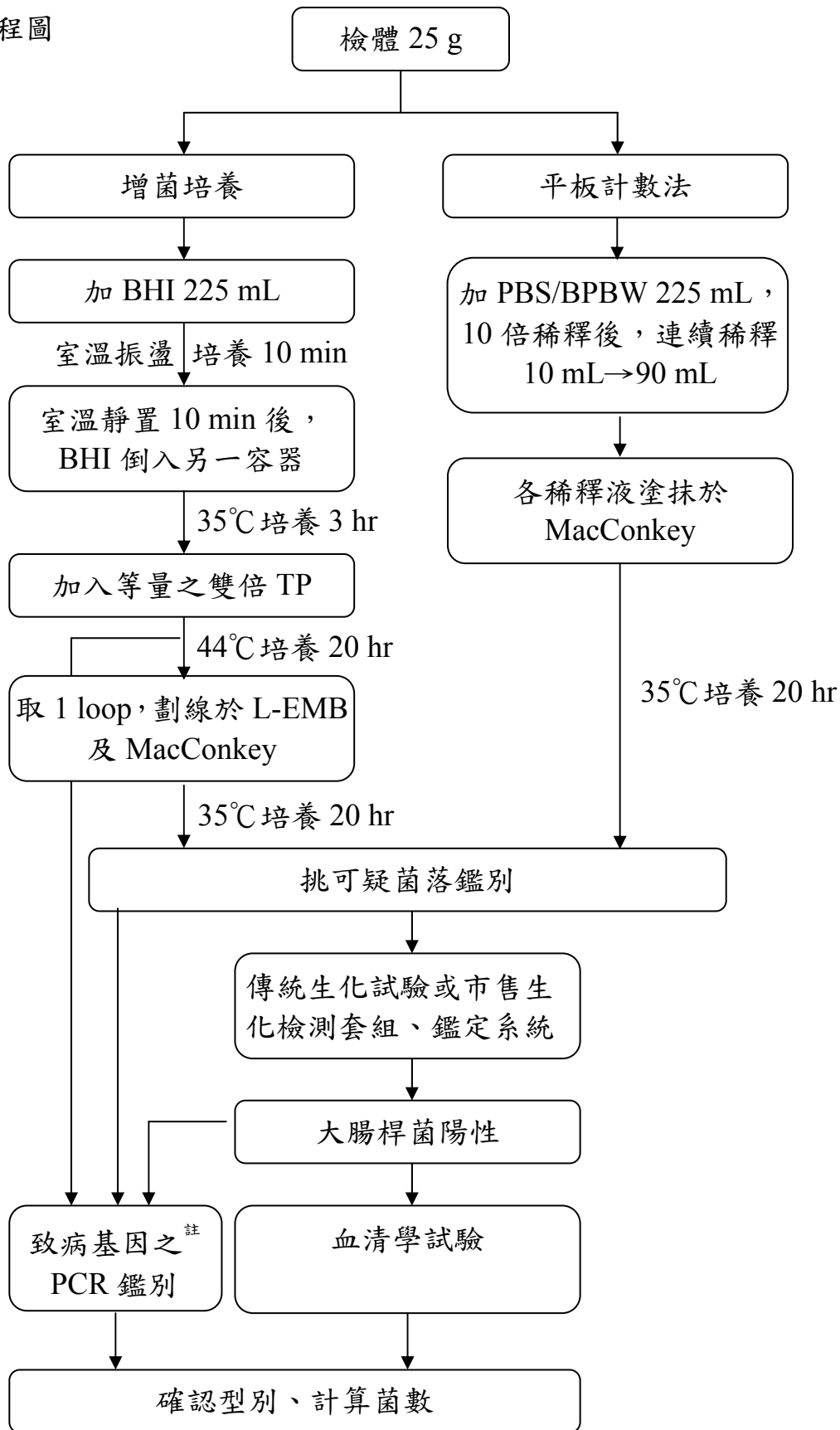
## 2.7.4. 鑑別：

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 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 6：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。

檢驗流程圖



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