

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 9×22 mm，使用時倒置於 15×150 mm 之試管內。
 - 2.2.15. 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金，鉑鈹或鉻線材質，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 μm 或以下之親水性濾膜。
- 2.2.21. 試藥：氯化鈉、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸氫二鉀(K_2HPO_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(Na_2HPO_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(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)、 α -萘酚(α -naphthol)、氫氧化鉀、肌酸(creatine)、95%乙醇、無水乙醇、戊醇(amylic alcohol)、異戊醇(isoamyl alcohol)、鹽酸、硝酸鉀(KNO_3)、醋酸鈉(CH_3COONa)、液態石蠟、氫氧化鈉、硝基苯吡喃半乳糖(O-nitrophenyl- β -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)、胰化蛋白胍(tryptose)、胰化酪蛋白(trypticase)、心肌浸出物(heart muscle infusion)、硫蛋白胍(thiotone)、聚蛋白胍(polypeptone)、酵母抽出物(yeast extract)、牛肉抽出物(beef extract)、胍蛋白胍(proteose peptone)、胰化蛋白胍(tryptone)、牛腦浸出物(calf brain infusion)、牛心浸出物(beef heart infusion)及蛋白胍(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. 1.0 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，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. 1 N 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. 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。
- 2.2.22.6. 5 N 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-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 α -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 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。
- 2.2.22.13. 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 1 N 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 1 N 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. 磷酸胰化蛋白胨培養液(Tryptone phosphate broth, TP)

	單位濃度	雙倍濃度
胰化蛋白胨(tryptone).....	20 g.....	40 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	2 g	4 g
磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄).....	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
胨蛋白胨(proteose peptone)	10 g
氯化鈉.....	5 g
磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ 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±0.2。

2.2.25.3. 伊紅亞甲藍(洋菜)培養基(Levine’s eosin methylene blue agar, L-EMB)

蛋白胨(peptone)	10 g
乳糖(lactose)	10 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO 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°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.1±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°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.1±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 ₂ HPO ₄)	2.75 g
磷酸二氫鉀(KH ₂ PO 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°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.8±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)

聚蛋白朊(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 ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O]	0.2 g
硫代硫酸鈉(Na ₂ S ₂ 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 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 ₂ PO ₄)	9.1 g
磷酸氫二鉀(K ₂ 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

溶解後，分取約 2.5 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 7.0 ± 0.2。冷卻後，各試管分別加入經無菌濾膜過濾之 50% 葡萄糖溶液 278 μL，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 注入試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.9±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°C 滅菌 10 分鐘，最後 pH 值為 6.5±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.....	5 g
磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄)	0.225 g
無水磷酸氫二鈉(Na ₂ 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°C 滅菌 15 分鐘，最後 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 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(K ₂ 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°C 滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 6.9±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(NaNH ₄ HPO ₄ · 4H ₂ O)	1.5 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	1 g
硫酸鎂(MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.2 g
檸檬酸鈉(Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O)	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 ₃ COONa)	2 g
氯化鈉	5 g
無水硫酸鎂(MgSO ₄)	0.2 g
磷酸二氫銨(NH ₄ H ₂ PO ₄)	1 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO 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 ₂ HPO 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 ₄) ₂ SO ₄ 〕	2 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	0.6 g
磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄)	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：

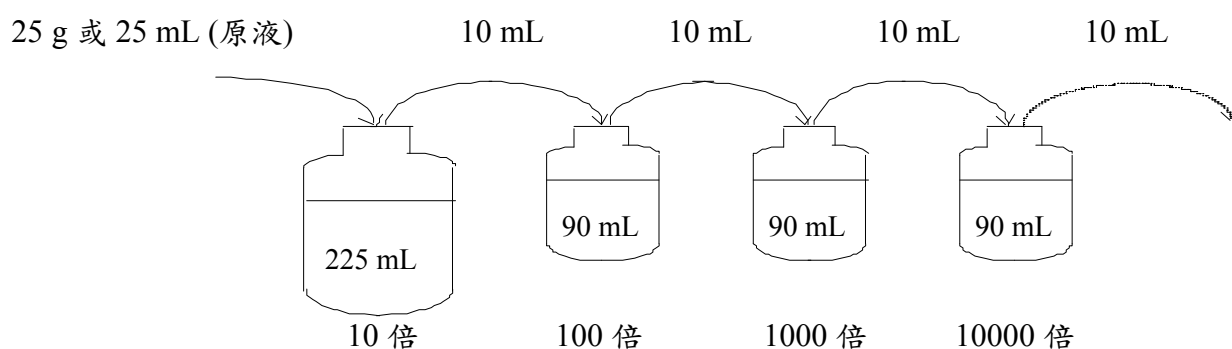
2.3.1. 檢體之處理：

- 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)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。

2.4.5. 生化試驗：自 2.4.3.節之血液(洋菜)基礎培養基斜面上鉤菌；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(H₂S production test)：鉤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°C 培養箱中，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。
- 2.4.5.1.2. 尿素酶試驗(Urease test)：鉤菌接種於尿素培養液中，置於 35°C 培養箱中培養 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。
- 2.4.5.1.3. 阿拉伯膠糖發酵試驗(Arabinose fermentation test)：鉤菌接種於阿拉伯糖溴甲酚紫培養液中，置於 35°C 培養箱中培養 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。
- 2.4.5.1.4. 吲哚試驗(Indole test)：鉤菌接種於胰化蛋白胨培養液中，置於 35°C 培養箱中培養 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。

- 2.4.5.1.5. 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°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°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 × 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°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.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°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°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. 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^(註1)：
 - 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。
 - 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 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. 冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。
 - 2.2.10. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 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(pH meter)。
 - 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^(註2)：

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 TC - 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' - 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)、去氧鳥糞嘌呤三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。

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

註 2：合成之引子及探針，拆封後，以無菌去離子水稀釋成適當濃度，分裝後置於-20 $^{\circ}$ C 貯存備用。

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

2.3.4. 對照用物質：病原性大腸桿菌標準菌株或其 DNA。

2.4. 器具及材料^(註 3)：

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

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

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

2.4.4. PCR 反應管：200 μ 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. 0.5M 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 × 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^(註4)：

10 倍含 15 mM 氯化鎂之 PCR 緩衝溶液...	5.0 μL
<i>Taq</i> DNA polymerase (2 U/μL)	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 $15000 \times g$ 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生理食鹽水 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，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 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 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^(註5)：

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 ^(註6)	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。

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^(註 1)

- 2.2.1. 即時聚合酶鏈反應器：Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System，或同級品。
- 2.2.2. 高壓滅菌釜。
- 2.2.3. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC): 第二等級(class II) (含)以上者。
- 2.2.4. 加熱振盪器：具溫控及振盪功能。
- 2.2.5. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge): 可達 20000 × g，並具 4°C 溫控功能。
- 2.2.6. 離心機：供各式微量離心管離心用。
- 2.2.7. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。
- 2.2.8. 冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。
- 2.2.9. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
- 2.2.10. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
- 2.2.11. 天平：最大稱重量為 2000 g，靈敏度為 0.1 g；最大稱重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。

註 1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或未提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。

2.3. 試藥

- 2.3.1. DNA 抽取用：適用於革蘭氏陰性細菌 DNA 抽取之市售

套組。

2.3.2. Real-time PCR 用^(註2)

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

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

2.3.2.1.1.1. 標的基因：*stx1*

引子 F：Stx1F934

5'- GTG GCA TTA ATA CTG AAT TGT CA TCA -3'

引子 R：Stx1R1042

5'- GCG TAA TCC CAC GGA CTC TTC -3'

探針 P：Stx1P990

5'- (6FAM) – TGA TGA GTT TCC TTC TAT

GTG TCC GGC AGA T - (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'- GAT GTT TAT GGC GGT TTT ATT TGC -3'

引子 R：Stx2R1300

5'- TGG AAA ACT CAA TTT TAC CTT TAG CA -3'

探針 P (Stx2P1249)：

5'- (6FAM) - TCT GTT AAT GCA ATG GCG

GCG GAT T - (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'- AGC AGG TTT CCC ACC GGA TCA CCA -3'

引子 R：LT2R

5'- GTC CTC AGA TTC TGG GTC TC -3'

探針 P：LTP2

5'- (6FAM) - AAG AAC CCT GGA TTC ATC

ATG CAC CAC AAG - (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'- GCT AAT GTT GGC AAT TTT TAT TTC TGT A -3'

引子 R：STaR

5'- AGG ATT ACA ACA AAG TTC ACA GCA GTA A -3'

探針 P：STaP3

5'- (6FAM) - CTT TCC CCT CTT TTA GTC

AGT CAA CTG AAT CAC TT - (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*^(註3)

引子 F：EaeF2

5'- CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA -3'

引子 R：EaeR

5'- CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA -3'

探針 P：EaeP3

5'- (6FAM) - AGG TAT TGG TGG CGA ATA CTG

GCG AGA CTA - (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：I1F

5'- ATA TCT CTA TTT CCA ATC GCG T -3'

引子 R：I5R

5'- GAT GGC GAG AAA TTC TAT CCC G -3'

探針 P：invEP5

5'- (6FAM) - AAA GAC CTT GAT ACA AAT TTG

CCC CCG GAC A - (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。

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標準菌株或其 DNA。

2.4. 器具及材料^(註 4)

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

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

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

2.4.4. Real-time PCR 反應管：100 μ 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^(註 5)

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

5 μ M 引子 F 2.0 μ L

5 μ M 引子 R..... 2.0 μ L

5 μ M 探針..... 1.0 μ L

TaqMan® Fast Reagents Starter Kit 12.5 μ L

檢體 DNA 溶液..... 2.0 μ L

無菌去離子水 5.5 μ L

總體積 25.0 μ 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.節增菌液中吸取菌液 1 mL，置入已滅菌之 1.5 mL 離心管中，以 15000 \times g 離心 3 分鐘，去除上清液。

2.6.1.1. 直接煮沸法

將沉澱物加入無菌去離子水 1 mL，震盪混合均勻，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，震盪混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸 10 分鐘，取出離心管，作為檢體 DNA 原液，置於 -20°C 冷凍保存。

2.6.1.2. 抽取 DNA 法

採用適用於革蘭氏陰性細菌 DNA 抽取之市售套組，依套組操作說明步驟抽取 DNA。抽取之 DNA 溶液收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，作為檢體 DNA 原液，置於 -20°C 冷凍保存。

2.6.2. 分離菌株之 DNA 溶液製備

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，震盪混合均勻，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°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 $\text{O.D.}_{260}/\text{O.D.}_{280}$ 比值作判斷，其比值應介於 1.7~2.0。

2.7. 鑑別試驗^(註5)

2.7.1. Real-time PCR 操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取已滅菌之 1.5 mL 離心管，依照 2.5. 節配製 real-time PCR 溶液，依序加入 TaqMan® Fast Reagents Starter Kit、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 23 μL 入 real-time PCR 反應盤的反應孔中，各別加入檢體 DNA 溶液 2 μL ，再將 real-time PCR 反應盤置於離心機中，以 $200 \times g$ 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。

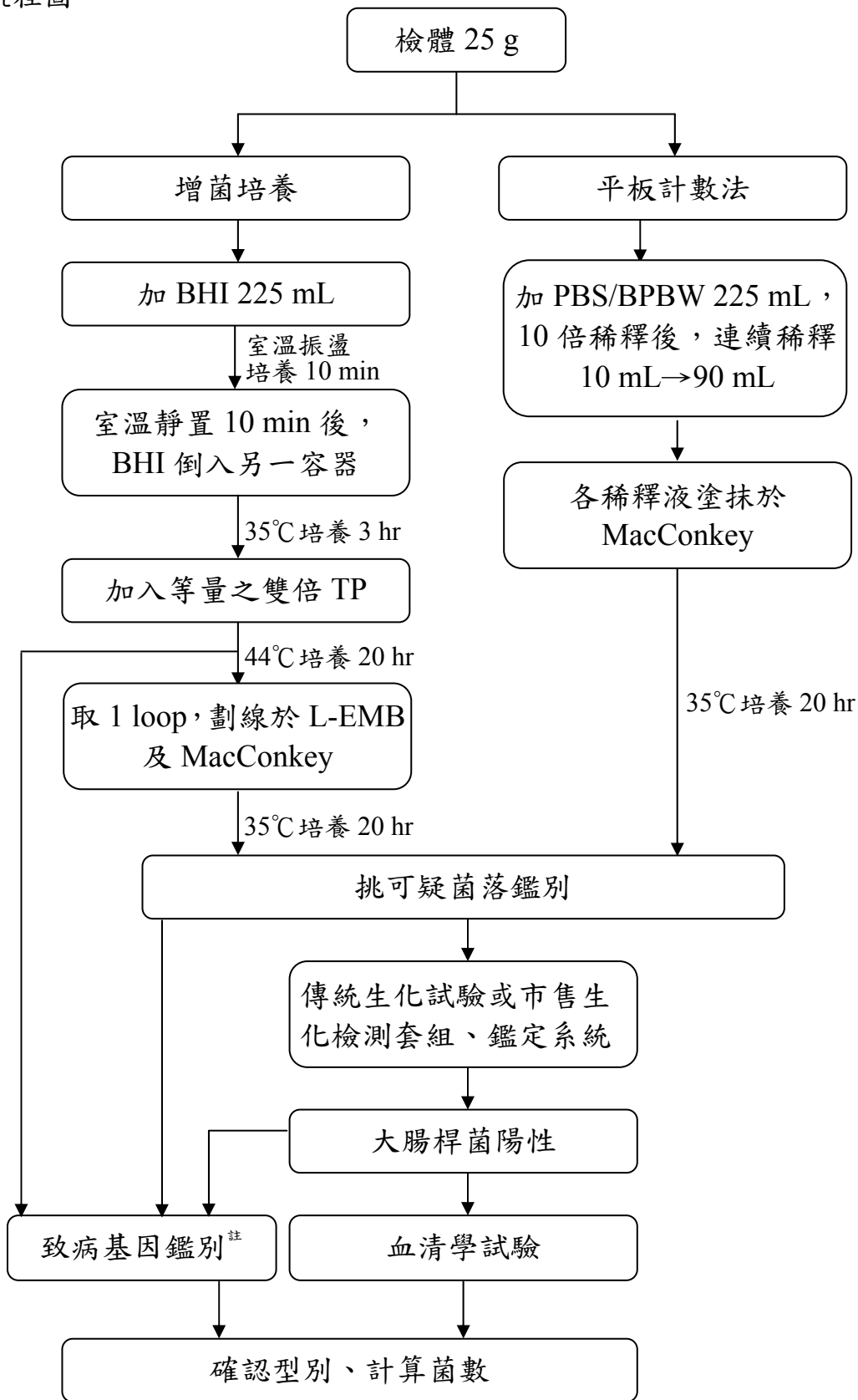
2.7.3. 確認

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 5：本 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。

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。