

食品微生物之檢驗方法—大腸桿菌O157:H7之檢驗修正總說明

為加強食品微生物之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰修正「食品微生物之檢驗方法—大腸桿菌O157:H7之檢驗」，其修正要點如下：

- 一、修正英文名稱。
- 二、第一部修正為「大腸桿菌 O157:H7 之分離及鑑別」，另修正「檢驗方法」、「工作環境」、「器具及材料」及「判定」，增列「檢液之調製」及「鑑別試驗」，並刪除「E. coli O157:H7 之分離」。
- 三、增列「第二部：大腸桿菌 O157:H7 之 real-time PCR 檢測」。
- 四、修正「參考文獻」，另增列「檢驗流程圖」。
- 五、增修訂部分文字。

食品微生物之檢驗方法—大腸桿菌 O157:H7 之檢驗修正對照表

修正名稱	現行名稱	說明
食品微生物之檢驗方法—大腸桿菌 O157:H7 之檢驗 Methods of Test for Food <u>Microorganisms</u> - Test of <u>Escherichia coli</u> O157:H7	食品微生物之檢驗方法—大腸桿菌 O157:H7 之檢驗 Methods of Test for Food <u>Microbiology</u> - Test of <u>Escherichia coli</u> O157:H7	修正英文名稱。
修正規定	現行規定	說明
<u>第一部：大腸桿菌 O157:H7 之分離及鑑別</u> 1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中大腸桿菌 O157:H7 之檢驗。 2. 檢驗方法：<u>檢體經增菌培養後，以選擇性培養基進行定性分析。</u> 2.1. <u>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。</u> 2.2. <u>器具及材料</u> 2.2.1. <u>生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。</u> 2.2.2. <u>乾熱滅菌器：能維持內部溫度在 170±10°C 者。</u> 2.2.3. <u>高壓滅菌釜：可達 121°C 以上者。</u> 2.2.4. <u>冰箱：能維持 5±3°C 者。</u> 2.2.5. <u>培養箱：能維持內部溫差在 ±1°C 以內者。</u> 2.2.6. <u>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。</u> 2.2.7. <u>攪拌均質器或鐵胃：能適用於無菌操作者。</u> 2.2.8. <u>電磁加熱攪拌器。</u> 2.2.9. <u>顯微鏡：能放大至 1000 倍之一般光學顯微鏡。</u> 2.2.10. <u>酸鹼度測定儀。</u> 2.2.11. <u>水浴：能維持水溫溫差在 ±0.5°C 以內者。</u> 2.2.12. <u>旋渦混合器。</u>	代碼：NLFDUBHEC 80 <u>鍵語：食品、foods、大腸桿菌 O157:H7、E. coli O157:H7</u> 1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中大腸桿菌 O157:H7 之檢驗。 2. 檢驗方法 2.1 工作環境：工作平台須寬敞、潔淨、光線良好(操作平台光度為 100 呎燭光)，室內通風良好。微生物密度之要求為，每 15 分鐘落菌數不超過 15 菌落/培養皿(85mm)。 2.2 器具及材料 2.2.1 乾熱滅菌器：<u>玻璃用具等之滅菌用，其內部中心溫度能達 170°C 以上，並能維持該溫度 1 小時以上。</u> 2.2.2 高壓滅菌釜：<u>培養基及稀釋液等不能以乾熱滅菌之材料及用具等之滅菌用。滅菌溫度可達 121°C (約 15 lb/in² 或 1 kg/cm²) 並能維持 15 分鐘以上。</u> 2.2.3 冰箱：能維持 5±3°C 者。 2.2.4 吸管或自動吸管/吸管尖：<u>通常使用者為 10 mL 及 1 mL，可正確量取 10 mL，1 mL 及 0.1 mL。</u> 2.2.5 培養皿：<u>內徑約 9 cm，深度 1.5-1.8 cm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮傷或其他缺點。</u> 2.2.6 研鉢、杵：<u>用以研磨試藥。</u> 2.2.7 試管：<u>15×150 mm 及 10×100 mm 試管。</u> 2.2.8 培養箱：<u>能維持內部溫差在 ±1.0°C 以內者。</u> 2.2.9 水浴：<u>能維持水溫溫差在 ±0.2°C 以內，且可振盪者。</u>	一、第一部修正為「大腸桿菌 O157:H7 之分離及鑑別」，另修正「檢驗方法」、「工作環境」、「器具及材料」及「判定」，增列「檢液之調製」及「鑑別試驗」，並刪除「<u>E. coli</u> O157:H7 之分離」。 二、增列「第二部：大腸桿菌 O157:H7 之 real-time PCR 檢測」。 三、修正「參考文獻」，另增列「檢驗流程圖」。 四、增修訂部分文字。

2.2.13. 吸管輔助器或微量吸管。	2.2.10 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：能適用於無菌操作者。
2.2.14. 吸管： <u>已滅菌</u> ，1 mL吸管應有0.01 mL之刻度；5 mL及10 mL吸管應有0.1 mL之刻度。	2.2.11 接種用白金針或白金耳。
2.2.15. 吸管尖： <u>已滅菌</u> ，10 μ L、20 μ L、200 μ L及1000 μ L。	2.2.12 無菌棉花棒。
2.2.16. 容器： <u>附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵氟龍或其他能耐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。</u>	2.2.13 光源： <u>一般日光燈及長波長UV燈。</u>
2.2.17. 試管： <u>附螺旋蓋</u> ，16×125 mm、16×150 mm或其他適用者。	2.2.14 pH測定儀。
2.2.18. 培養皿： <u>已滅菌</u> ，內徑約90 mm，深度約15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮傷或其他缺點。	2.2.15 濾膜： <u>孔徑為0.45 μm之濾膜，為親水性纖維素之材質。</u>
2.2.19. 接種針及接種環(直徑約3 mm)： <u>鎳鉻合金、鉑鈱或鉻線材質，或可拋棄式者。</u>	2.2.16 藥勺。
2.2.20. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子： <u>可滅菌或可拋棄式者。</u>	2.2.17 曲玻棒： <u>於進行塗抹培養時，使用之L型玻璃棒子。</u>
2.2.21. 塗抹曲棒： <u>可滅菌，或可拋棄式者。</u>	2.2.18 蠟筆： <u>能於塗寫、劃記載玻片時使用之蠟筆。</u>
2.2.22. 無菌濾膜： <u>孔徑0.45 μm或以下之親水性濾膜。</u>	2.2.19 載玻片： <u>能於染色、鏡檢時，載菌用之載玻片。</u>
2.2.23. 載玻片及蓋玻片： <u>適用於染色及鏡檢者。</u>	2.2.20 顯微鏡： <u>能放大至1000倍之一般光學顯微鏡。</u>
2.2.24. 濾紙。	2.2.21 0.2 mL吸管尖頭： <u>0.2 mL吸管尖頭，剪去尖頭，使該吸管尖頭長約4 cm。</u>
2.2.25. 褐色試藥瓶。	2.2.22 培養基
2.2.26. 蠟筆或麥克筆： <u>塗寫、劃記載玻片時使用。</u>	2.2.22.1 山梨糖醇—馬康奇洋菜培養基 (Sorbitol-MacConkey Agar, SMAC)：
2.2.27. 研鉢、杵： <u>研磨試藥用。</u>	
2.2.28. 燈箱： <u>觀察血清試驗用。</u>	
2.2.29. 吸管尖頭： <u>將200 μL吸管尖剪去尖頭，使其長約4 cm。</u>	
2.2.30. 試藥	
95%乙醇、 α -萘酚(α -naphthol)、山梨糖醇(sorbitol)、中性紅(neutral red)、丙酮酸鈉(sodium pyruvate)、戊醇(amyl alcohol)、甲基紅(methyl red)、甲醛溶液(36~38%)、吡啶黃素(acriflavine)、肌酸(creatine)、西士敏(cefixime)、西蘇羅錠(cefsulodin)、沙黃O(safranin O)、乳糖(lactose)、亞碲酸鉀(potassium	

蛋白胨(peptone)	17.0 g
水解蛋白胨No.3 (proteose peptone No.3)	3.0 g
山梨糖醇(sorbitol)	10.0 g
膽鹽(bile salts)	1.5 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g
洋菜(agar)	13.5 g
中性紅試劑(neutral red)	0.03 g
結晶紫(crystal violet)	0.001 g
蒸餾水	1000 mL

攪拌加熱溶解後，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。培養基注入培養皿前應搖動混合，搖動時應避免產生氣泡，每一培養皿約倒入15~20 mL，凝固後打開皿蓋約1/2~1/4，使培養基之表面微乾，已注入培養皿之培養基以當天使用最佳，

tellurite)、草酸銨(ammonium oxalate)、氫氧化鈉、氫氧化鉀、硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)、硫酸亞鐵銨(ferrous ammonium sulfate)、硫酸鎂(MgSO ₄ ·7H ₂ O)、氯化鈉、無水乙醇、結晶紫(crystal violet)、碘、碘化鉀、萬古黴素(vancomycin)、葡萄糖(glucose)、對-二甲胺基苯甲 醛 (p-dimethylamino-benzaldehyde)、磷酸二氫鉀(KH ₂ PO ₄)、磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄)、磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)、磷酸氫銨鈉(NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O)、膽鹽(bile salts)、檸檬酸鈉(Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)及鹽酸均採用試藥級。大豆蛋白胨(phytone peptone)、牛心浸出物(beef heart infusion)、牛腦浸出物(calf brain infusion)、胨蛋白胨(proteose peptone)、胨蛋白胨No.3(proteose peptone No.3)、洋菜(agar)、胰化蛋白胨(tryptone)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、動物組織胃蛋白酶水解物(peptic digest of animal tissue)、蛋白胨(peptone)、蛋白胨緩衝液粉末(buffered peptone-water powder)、酪蛋白水解氨基酸(casamino acids)、酪蛋白胰蛋白酶水解物(pancreatic digest of casein)、聚蛋白胨(polypeptone)、酵母抽出物(yeast extract)及膠解蛋白胨(gelysate peptone)均採用微生物級。	在冰箱中貯存者應於使用前先檢查有無雜菌之污染。														
2.2.31. 試劑	2.2.22.2 伊紅亞甲藍洋菜培養基(Levine's Eosin- Methylene Blue Agar, LEMB)：														
2.2.31.1. 0.225% 吡啶黃素溶液(0.225% Acriflavin solution)	<table><tr><td>蛋白胨(peptone)</td><td>10.0 g</td></tr><tr><td>乳糖(lactose)</td><td>10.0 g</td></tr><tr><td>磷酸氫二鉀(K₂HPO₄)</td><td>2.0 g</td></tr><tr><td>洋菜(agar)</td><td>15.0 g</td></tr><tr><td>伊紅Y(Eosin Y)</td><td>0.4 g</td></tr><tr><td>亞甲藍(methylene blue)</td><td>0.065 g</td></tr><tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr></table>	蛋白胨(peptone)	10.0 g	乳糖(lactose)	10.0 g	磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	2.0 g	洋菜(agar)	15.0 g	伊紅Y(Eosin Y)	0.4 g	亞甲藍(methylene blue)	0.065 g	蒸餾水	1000 mL
蛋白胨(peptone)	10.0 g														
乳糖(lactose)	10.0 g														
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	2.0 g														
洋菜(agar)	15.0 g														
伊紅Y(Eosin Y)	0.4 g														
亞甲藍(methylene blue)	0.065 g														
蒸餾水	1000 mL														
取吡啶黃素1.125 g，溶於蒸餾水500 mL，過濾除菌，避光冷藏備用。	加熱沸騰溶解後，分裝於試管或三角瓶內，以121℃，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，搖動時應避免產生氣泡，每一培養皿約倒入15~20 mL，凝固後打開培養皿蓋約1/2~1/4，使培養基之表面微乾，已注入培養皿之培養基以當天使用最佳，在冰箱中貯存者應於使用前先檢查有無雜菌之污染。														
2.2.31.2. 0.225% 西蘇羅錠溶液(0.225% Cefsulodin solution)	2.2.22.3 營養洋菜培養基(Nutrient Agar, NA)：														
取西蘇羅錠1.125 g，溶於蒸餾水500 mL，過濾除菌，冷藏備用。	<table><tr><td>牛肉抽出物(beef extract)</td><td>3.0 g</td></tr><tr><td>蛋白胨(peptone)</td><td>5.0 g</td></tr><tr><td>洋菜(agar)</td><td>15.0 g</td></tr><tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr></table>	牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g	蛋白胨(peptone)	5.0 g	洋菜(agar)	15.0 g	蒸餾水	1000 mL						
牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g														
蛋白胨(peptone)	5.0 g														
洋菜(agar)	15.0 g														
蒸餾水	1000 mL														
2.2.31.3. 0.18% 萬古黴素溶液(0.18% Vancomycin solution)	加熱沸騰溶解後，分裝於試管或三角瓶內，以121℃，滅菌15分鐘，最後pH值為6.8±0.2；分裝於試管者，作成斜面培養基。														
取萬古黴素0.9 g，溶於蒸餾水500 mL，過濾除菌，冷藏備用。	2.2.22.4 胰化酪蛋白大豆洋菜培養基(Trypticase Soy Agar, TSA)：														
2.2.31.4. 磷酸鹽緩衝液	<table><tr><td>胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)</td><td>5.0 g</td></tr><tr><td>大豆蛋白胨(phytone peptone)</td><td>5.0 g</td></tr><tr><td>氯化鈉(NaCl)</td><td>5.0 g</td></tr><tr><td>洋菜(agar)</td><td>13.5 g</td></tr><tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr></table>	胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	5.0 g	大豆蛋白胨(phytone peptone)	5.0 g	氯化鈉(NaCl)	5.0 g	洋菜(agar)	13.5 g	蒸餾水	1000 mL				
胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	5.0 g														
大豆蛋白胨(phytone peptone)	5.0 g														
氯化鈉(NaCl)	5.0 g														
洋菜(agar)	13.5 g														
蒸餾水	1000 mL														
	攪拌加熱沸騰溶解後，煮沸一分鐘，分注入合適的試管或三角瓶														

(Butterfield's phosphate-buffered dilution water)	中，以121℃，滅菌15分鐘，最後pH值為7.3±0.2。										
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值至7.2，再加蒸餾水使成1000 mL，以121℃滅菌15分鐘，作為原液，冷藏備用。使用時，取原液1.25 mL，加入蒸餾水使成1000 mL，分裝於容器，以121℃滅菌15分鐘。	2.2.22.5 胰化酪蛋白大豆培養液 (Trypticase Soy Broth, TSB)：										
2.2.31.5. 革蘭氏染色液(Gram stain solution) ^(註1)	<table><tr><td>胰化酪蛋白胰 (trypticase peptone)</td><td>5.0 g</td></tr><tr><td>大豆蛋白胰(phytone peptone)</td><td>5.0 g</td></tr><tr><td>氯化鈉(NaCl)</td><td>5.0 g</td></tr><tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr></table>	胰化酪蛋白胰 (trypticase peptone)	5.0 g	大豆蛋白胰(phytone peptone)	5.0 g	氯化鈉(NaCl)	5.0 g	蒸餾水	1000 mL		
胰化酪蛋白胰 (trypticase peptone)	5.0 g										
大豆蛋白胰(phytone peptone)	5.0 g										
氯化鈉(NaCl)	5.0 g										
蒸餾水	1000 mL										
(1)哈克氏(Hucker's)結晶紫液(初染劑)	攪拌溶解後，分注入合適的試管或三角瓶中，以121℃，滅菌15分鐘，最後pH值為7.3±0.2。										
溶液A：取結晶紫2 g，溶於95%乙醇20 mL。	2.2.22.6 胰化蛋白胰培養液 (Tryptone or Tryptophane Broth)：										
溶液B：取草酸銨0.8 g，溶於蒸餾水80 mL。	<table><tr><td>胰化蛋白胰(tryptone)</td><td>10.0 g</td></tr><tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr></table>	胰化蛋白胰(tryptone)	10.0 g	蒸餾水	1000 mL						
胰化蛋白胰(tryptone)	10.0 g										
蒸餾水	1000 mL										
將溶液A與溶液B混合，靜置24小時後以濾紙過濾，取濾液供作初染劑。	溶解後，分取5 mL注入試管內，以121℃，滅菌15分鐘，最後pH值為6.9±0.2。										
(2)革蘭氏碘液(媒染劑)	2.2.22.7 甲基紅－歐普氏培養液 (MR-VP Broth)：										
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，研磨至碘化鉀與碘完全溶解，移入褐色瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，洗液併入瓶中，加蒸餾水使成300 mL。	<table><tr><td>蛋白胰(peptone)</td><td>7.0 g</td></tr><tr><td>葡萄糖(dextrose)</td><td>5.0 g</td></tr><tr><td>磷酸氫二鉀(K₂HPO₄)</td><td>5.0 g</td></tr><tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr></table>	蛋白胰(peptone)	7.0 g	葡萄糖(dextrose)	5.0 g	磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	5.0 g	蒸餾水	1000 mL		
蛋白胰(peptone)	7.0 g										
葡萄糖(dextrose)	5.0 g										
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	5.0 g										
蒸餾水	1000 mL										
(3)哈克氏複染液(複染劑)	溶解後，分取5 mL注入試管內，以121℃，滅菌15分鐘，最後pH值為6.9±0.2。										
取沙黃O 2.5 g，溶於95%乙醇100 mL，作為複染原液。使用時，取複染原液10 mL，加蒸餾水90 mL，供作複染液。	2.2.22.8 柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液(Koser's Citrate Broth)：										
註1：革蘭氏染色液因放久可能失效，購買成品時，應注意其保存期限；自行配製者，應檢查其染色效果。	<table><tr><td>磷酸氫銨鈉 (NaNH₄HPO₄·4H₂O)</td><td>1.5 g</td></tr><tr><td>磷酸氫二鉀(K₂HPO₄)</td><td>1.0 g</td></tr><tr><td>硫酸鎂(MgSO₄·7H₂O)</td><td>0.2 g</td></tr><tr><td>檸檬酸鈉 (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O)</td><td>3.0 g</td></tr><tr><td>蒸餾水</td><td>1000 mL</td></tr></table>	磷酸氫銨鈉 (NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O)	1.5 g	磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	1.0 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)	3.0 g	蒸餾水	1000 mL
磷酸氫銨鈉 (NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O)	1.5 g										
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	1.0 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)	3.0 g										
蒸餾水	1000 mL										
2.2.31.6. 柯瓦克氏試劑(Kovacs' reagent)	溶解後，分取10 mL注入試管內，以121℃，滅菌15分鐘，最後pH值為6.7±0.2。										
取對-二甲胺基苯甲醛5 g，溶於戊醇75 mL，再徐徐加入鹽酸25 mL，混合均勻後應呈黃色，冷藏備用。	2.2.23.9 腦心浸出培養液 (Brain Heart Infusion Broth, BHI)：										
2.2.31.7. 甲基紅指示劑(Methyl red indicator)	<table><tr><td>牛腦浸出物(calf brain)</td><td>200.0 g</td></tr></table>	牛腦浸出物(calf brain)	200.0 g								
牛腦浸出物(calf brain)	200.0 g										
取甲基紅0.1 g，溶於95%乙醇300											

mL，再加蒸餾水使成500 mL。			infusion)		
2.2.31.8. 歐普氏試劑 (Voges-Proskauer test reagents, VP test reagents)			牛心浸出物(beef heart infusion)		250.0 g
試劑A：取α-萘酚5 g，溶於無水乙醇100 mL。			胨蛋白胨(proteose peptone)		10.0 g
試劑B：取氫氧化鉀40 g，以蒸餾水溶解，使成100 mL。			氯化鈉(NaCl)		5.0 g
2.2.31.9. 0.85% 生理食鹽水 (Physiological saline solution)			磷酸氫二鈉 (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)		2.5 g
取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水1000 mL，以121°C滅菌15分鐘。			葡萄糖(dextrose)		2.0 g
2.2.31.10. 含1%甲醛之生理食鹽水 (Physiological saline solution with 1% formalin)			蒸餾水		1000 mL
取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水1000 mL，以121°C滅菌15分鐘，冷卻至室溫，加入甲醛溶液28 mL，混合均勻。			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；製成培養基者，則添加1.5%洋菜。		
2.2.31.11. 蛋白胨緩衝液 (Buffered peptone water, BPW)			亞碲酸鉀 (potassium tellurite)		2.5 mg
取蛋白胨10 g、氯化鈉5 g、磷酸氫二鈉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 ± 0.2。			西士敏(cefixime)		0.05 mg
2.2.32. 抗血清			先將亞碲酸鉀及西士敏溶解於5 mL蒸餾水後，經已滅菌之0.45 μm孔徑之濾膜行過濾滅菌後，加至45 ~ 50°C已滅菌之1000 mL SMAC培養基中，並混合均勻，最後pH值為7.1±0.2，即為TC SMAC培養基。培養基注入培養皿前，應搖動混合使加入之亞碲酸鉀與西士敏分散均勻。搖動時應避免產生氣泡，每一培養皿約倒入15~20 mL，凝固後打開皿蓋約1/2~1/4，使培養基之表面微乾。已注入培養皿之培養基以當天使用最佳，在冰箱中貯存者應於使用前，先檢查有無雜菌之污染。		
2.2.32.1. 大腸桿菌 O157 抗血清 (<i>Escherichia coli</i> O157 antiserum)。			2.2.22.11 修飾後胰化酪蛋白大豆培養液 (Trypticase Soy Broth Modified, mTSB)：		
2.2.32.2. 大腸桿菌 H7 抗血清 (<i>Escherichia coli</i> H7 antiserum)。			胰化酪蛋白大豆培養液 (trypticase soy broth)		30.0 g
2.2.33. 培養基			磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)		1.5 g
2.2.33.1. 含丙酮酸鹽之修飾蛋白胨緩衝液 (Modified buffered peptone water with pyruvate, mBPWP)			膽鹽(bile salts No.3)		1.12 g
	單位 濃度	雙倍 濃度	新生黴素溶液 (novobiocin solution)		0.2 mL
蛋白胨(peptone)	10 g	20 g			
氯化鈉	5 g	10 g			
磷酸二氫鉀 (KH ₂ PO ₄)	1.5 g	3 g			
磷酸氫二鈉 (Na ₂ HPO ₄)	3.6 g	7.2 g			
酪蛋白水解氨基	5 g	10 g			

酸(casamino acids)		
酵母抽出物(yeast extract)	6 g	12 g
乳糖(lactose)	10 g	20 g
丙酮酸鈉(sodium pyruvate)	1 g	2 g
蒸餾水	1000 mL	1000 mL

加熱溶解後，以121℃滅菌15分鐘，最終pH值為7.2 ± 0.2。

2.2.33.2. TC-山梨糖醇-馬康奇培養基 (Tellurite-cefixime-sorbitol MacConkey agar, TC-SMAC)

(a) 山梨糖醇-馬康奇培養基 (Sorbitol-MacConkey agar, SMAC)

蛋白胨(peptone)或膠解蛋白胨(gelysate peptone)	17 g
胨蛋白胨No.3 (proteose peptone No.3)或聚蛋白胨(polypeptone)	3 g
山梨糖醇(sorbitol)	10 g
膽鹽(bile salts)	1.5 g
氯化鈉	5 g
洋菜(agar)	13.5 g
中性紅(neutral red)	0.03 g
結晶紫(crystal violet)	0.001 g
蒸餾水	1000 mL

(b) 1%亞碲酸鉀溶液(1% Potassium tellurite solution)

取亞碲酸鉀1 g，溶於蒸餾水100 mL，過濾除菌，冷藏備用，於一個月內使用完畢。

(c) 0.005% 西士敏溶液 (0.005% Cefixime solution)

取西士敏50 mg，溶於95%乙醇1000 mL，過濾除菌，冷凍備用，於一年內使用完畢。

將山梨糖醇-馬康奇培養基加熱沸騰溶解後，以121℃滅菌15分鐘，冷卻至47~50℃，加入經無菌濾膜之1%亞碲酸鉀溶液250 μL及0.005%西士敏溶液1 mL，混合均勻，分取約20 mL倒入培養皿，凝固後確定其表面乾燥後使用，最終pH值為7.1 ± 0.2。

蒸餾水	1000 mL
-----	---------

不含新生黴素溶液之mTSB基礎培養液，攪拌溶解後，分注入合適三角瓶中，經121℃，滅菌15分鐘，最後pH值為7.3±0.2。將新生黴素溶解於5 mL蒸餾水後，經已滅菌之0.45 μm孔徑之濾膜行過濾滅菌後，加至45~50℃已滅菌之mTSB基礎培養液1000 mL中，混合均勻，即為mTSB培養液。

2.2.22.12 出血性大腸桿菌增菌培養液 (EHEC Enrichment Broth, EEB)

西士敏(cefixime)	0.05 mg/L
西蘇羅錠(cefsulodin)	10.0 mg/L
萬古黴素(vancomycin)	8.0 mg/L

將西士敏、西蘇羅錠、萬古黴素先溶解於5 mL之去離子水中，經已滅菌之0.45 μm孔徑之濾膜行過濾滅菌後，加至已滅好菌之mTSB培養液，混合均勻後，即可使用，最後pH為7.3±0.2。

2.2.22.13 酵母抽出物胰化酪蛋白大豆培養基 (Trypticase Soy Agar with 0.6% Yeast Extract, TSAYE)

胰化酪蛋白大豆培養基 (trypticase soy agar, TSA)	40.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	6.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分裝於試管內，以121℃，15分鐘滅菌後，迅速將試管斜放，待冷凝之後即為斜面之培養基。

2.2.22.14 運動性試驗培養基 (SIM Medium)：

蛋白胨(peptone)	30.0 g
牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
蛋白胨化鐵(peptonized iron)	0.2 g
硫代硫酸鈉 (sodium thiosulfate)	0.025 g
洋菜(agar)	3.0 g

2.2.33.3. 含0.6%酵母抽出物之胰化酪蛋白大豆培養基(Trypticase soy agar with 0.6% yeast extract, TSAYE)		蒸餾水	1000 mL
加熱沸騰溶解後，分注入試管，每管培養基含量約2 cm高，並放入已剪去尖頭之0.2 mL吸管尖頭，吸管尖頭之尖端朝下，以121°C滅菌15分鐘，最後pH值為7.3±0.2。		2.2.23 試藥：氯化鈉(NaCl)、中性紅試劑(neutral red)、結晶紫(crystal violet)、磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)、磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)、氫氧化鈉(NaOH)、草酸銨(ammonium oxalate)、碘化鉀(KI)、碘(I ₂)、沙黃(safranin)、對-二甲基胺苯甲醛(P-Dimethylamino-benzaldehyde)、甲基紅(methyl red)、α-萘酚(α-naphthol)、檸檬酸鈉(Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)、硫酸鎂(MgSO ₄ ·7H ₂ O)、氫氧化鉀(KOH)、肌酸(creatine)、乙醇(alcohol)、無水乙醇(anhydrous alcohol)、硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)、戊醇或異戊醇(amy alcohol or isoamy alcohol)、西士敏(cefixime)、西蘇羅錠(cefsulodin)、膽汁鹽(bile salt No.3)、膽鹽(bile salts)、福馬林(formaldehyde)、萬古黴素(vancomycin)、新生黴素(novobiocin)、亞碲酸鉀(potassium tellurite)、溴甲酚紫(bromocresol purple)、及鹽酸(HCl)均採試藥級。蛋白胨(peptone)、胰化蛋白胨(tryptone)、洋菜(agar)、山梨糖醇(sorbitol)、水解蛋白胨 No.3 (proteose peptone No.3)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、牛腦浸出物(calf brain infusion)、牛肉抽出物(beef extract)、牛心浸出物(beef heart infusion)、蛋白胨化鐵(peptonized iron)、月示蛋白胨(proteose peptone)、酵母抽出物(yeast extract)、大豆蛋白胨(phytone peptone)採用微生物級。	
胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	15 g	2.2.24 革蘭氏染色液(Gram stain solution)	
大豆蛋白胨(phytone peptone)	5 g		
氯化鈉	5 g		
洋菜(agar)	15 g		
酵母抽出物(yeast extract)	6 g		
蒸餾水	1000 mL		
加熱沸騰溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.3±0.2。			
2.2.33.4. 胰化蛋白胨培養液(Tryptone or Tryptophane broth)			
胰化蛋白胨(tryptone)或胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	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。			
2.2.33.5. 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 ₂ HPO ₄)	5 g		
蒸餾水	1000 mL		
加熱溶解後，分取10 mL注入試管，以118~121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.9±0.2。			
2.2.33.6. 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		
磷酸二氫鉀(KH ₂ PO 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		
加熱溶解後，分取10 mL注入試管			

，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為6.7±0.2。

2.2.33.7. 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)或聚蛋白胨(polypeptone)	10 g
氯化鈉	5 g
磷酸氫二鈉(Na ₂ HPO ₄)	2.5 g
葡萄糖(glucose)	2 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.4±0.2。

2.2.33.8. SIM培養基(Sulfide indole motility, SIM medium)

酪蛋白胰蛋白酶水解物(pancreatic digest of casein)	20 g
動物組織胃蛋白酶水解物(peptic digest of animal tissue)	6.1 g
硫酸亞鐵銨(ferrous ammonium sulfate)	0.2 g
硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)	0.2 g
洋菜(agar)	3.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱沸騰溶解後，分注入試管，每管培養基含量約2 cm高，並放入吸管尖頭，使吸管尖頭之尖端朝下，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.3±0.2。

2.3. 檢液之調製

2.3.1. 香菜(cilantro)及香芹(parsley)：將檢體切碎後，取25 g，加入mBPWp增菌培養液225 mL，混合均勻(無需攪拌均質)，作為檢液。

2.3.2. 葉菜類(香菜及香芹除外)：將檢體切碎後，取200 g，加入mBPWp增菌培養液450 mL，混合

2.2.24.1 革蘭氏結晶紫液(初染劑)：溶液A：取2 g結晶紫溶於20 mL之95%乙醇中。

溶液B：取0.8 g草酸銨溶於80 mL蒸餾水80 mL中。

將溶液A與溶液B混合，靜置24小時後過濾，取濾液，作為初染劑。

2.2.24.2 革蘭氏碘液(媒染劑)：取2 g碘化鉀及1 g碘置於研鉢中，經研磨5~10秒鐘後，加1 mL蒸餾水研磨，次加5 mL蒸餾水研磨，再加10 mL蒸餾水，研磨至碘化鉀和碘完全溶於水中，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。

2.2.24.3 革蘭氏複染液(複染劑)：取2.5 g沙黃溶於100 mL之95%乙醇中，供作複染原液。使用時，取10 mL原液加90 mL蒸餾水，作為複染液。

2.2.25 試劑

2.2.25.1 柯瓦克氏試劑(Kovac's reagent)：取5 g對-二甲基胺苯甲醛溶於75 mL戊醇或異戊醇中，再徐徐加入25 mL濃鹽酸，混合均勻後應呈黃色，並須保存於4°C冰箱中。

2.2.25.2 甲基紅指示劑：取0.1 g甲基紅溶於300 mL之95%乙醇中，然後加蒸餾水至全量為500 mL。

2.2.25.3 歐普氏試劑(Voges-Proskauer reagent, VP reagent)：

溶液A：取5 g α-萘酚溶於100 mL無水乙醇中。

溶液B：取40 g氫氧化鉀溶於蒸餾水中，使成100 mL。

2.2.25.4 抗血清

2.2.25.4.1 大腸桿菌O157單價本體抗血清(E. coli O157 Type antisera)

2.2.25.4.2 大腸桿菌單價鞭毛抗血清(E. coli H7 Type antisera)

2.3 E. coli O157：H7之分離：

2.3.1 增菌培養：秤取檢體25 g，加

均勻(無需攪拌均質)，作為檢液。 2.3.3. 果汁、牛乳及其他混濁類飲料：將檢體混勻後，取200 mL，以10000 ×g離心10分鐘，去除上清液，沉澱物加入mBPWp增菌培養液225 mL，混合均勻，作為檢液。 2.3.4. 瓶裝水、其他非混濁液體：將檢體混勻後，取125 mL，加入雙倍濃度之mBPWp增菌培養液125 mL，混合均勻，作為檢液。 2.3.5. 其他檢體：將檢體切碎後，取25 g，加入mBPWp增菌培養液225 mL，混合均勻(必要時攪拌均質)，作為檢液。 2.3.6. 塗抹物(Swab)檢體：將塗抹棒之頭部置於已滅菌試管中，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄，添加蛋白胨緩衝液5 mL，將試管蓋旋緊，於10秒內來回叩擊手心使其劇烈振盪(振盪幅度需達15公分) 50次，或以旋渦混合器充分振盪至塗抹物頭部之棉絮鬆開。取溶出液1 mL，置於mBPWp增菌培養液10 mL之試管，供作檢液。或將塗抹棒之頭部置於mBPWp增菌培養液10 mL之試管中，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄，供作檢液。 註2：檢體總量不足時，應依檢體量，添加適量之mBPWp增菌培養液，作成檢液。 2.4. 鑑別試驗 2.4.1. 增菌培養 將2.3.節之檢液於37°C培養5小時，加入經過濾除菌之0.225%吡啶黃素溶液、0.225%西蘇羅錠溶液及0.18%萬古黴素溶液各1 mL (2.3.2.節葉菜類之檢液則各加入2 mL)，混合均勻，於42°C培養18~24小時。 2.4.2. 分離培養 將2.4.1.節增菌培養液混合均勻後，吸取增菌培養液10 mL，加至磷酸鹽緩衝液90 mL中，依序作成一系列適當之100倍、1000倍、10000倍等稀釋檢液，吸取各稀釋檢液50	入已滅菌之EEB 225 mL，用攪拌均質器攪拌或鐵胃搓揉均勻，於37°C振盪培養6小時後取樣，並於取完樣後繼續振盪培養至24小時。 2.3.2 分離培養：取2.3.1節培養6小時之增菌培養液0.1 mL至TC SMAC培養基上，以曲玻棒塗抹均勻，另取增菌培養液1白金耳量，至另一TC SMAC培養基上，劃線接種。將此含TC SMAC之培養皿置於37°C培養17~18小時後，觀察菌落型態。典型E. coli O157:H7菌落，為淺灰色，菌落中心呈燻黑，直徑1~2 mm。如無可疑菌落則取增菌24小時之增菌液重覆以上分離培養之步驟。 2.3.3 確定試驗：由TC SMAC上之可疑菌落，以白金針接種在EMB培養基表面，作劃線培養，其典型形態為直徑2~4 mm，頂部凸狀，中央黑紫色，具有金屬光澤。鈎取典型菌落接種於TSAYE或NA斜面培養基上，於35°C培養18~22小時後，作革蘭氏染色(註1)並鏡檢，其結果若呈革蘭氏陰性，無芽胞桿菌者，則繼續進行(IMViC)試驗。 2.3.3.1 IMViC試驗(註2) 吡啶試驗(Indole test)：自TSAYE或NA斜面培養基上鈎菌，接種於胰化蛋白胨培養液中，並置於35°C培養24±2小時後，加入0.2 mL柯瓦克氏試劑，輕輕搖動後靜置10分鐘，若上層呈現紅色，則為正反應(+)；否則為負反應(—)。可疑E. coli O157:H7通常為正反應，有時亦呈負反應。 2.3.3.2 歐普氏試驗(VP test)：自TSAYE或NA斜面培養基上鈎菌接種於MR-VP培養液中，並置於35°C培養48±2小時後，取1 mL培養液至另一已滅菌之10×100 mm試管中，加入0.6 mL VP試劑A及0.2 mL VP試劑B後，再加入少許肌酸，輕輕搖勻，經2~4小時後觀察結果，若	
---	---	--

μL(通常稀釋至$10^{-2} \sim 10^{-4}$，經培養後生長約100~300個菌落數)至TC-SMAC培養基及市售大腸桿菌O157選擇性呈色培養基(如CHROMagar™ O157、R & F® <i>Escherichia coli</i> O157:H7 chromogenic plating medium、Rainbow® O157等)，並以塗抹曲棒塗抹均勻(各二重複)。同時亦可再鉤取一接種環量之稀釋檢液，於選擇性培養基表面劃線。TC-SMAC培養基於37°C培養18~24小時，觀察所形成之菌落型態，大腸桿菌O157:H7在TC-SMAC培養基上的典型菌落為無色或淺灰色，菌落中心呈燻黑，直徑1~2 mm；市售大腸桿菌O157選擇性呈色培養基則依產品說明培養條件進行培養及觀察典型菌落之型態。自TC-SMAC培養基及市售大腸桿菌O157選擇性呈色培養基上鉤取10個可疑菌落(若可疑菌落少於10個時，則鉤取所有的可疑菌落)，劃線於TSAYE培養基，於35°C培養18~24小時，進行後續革蘭氏染色及生化試驗。 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，以無菌接種針(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：以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秒鐘，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	呈現粉紅色，則為正反應(+); 否則為負反應(-)。可疑 <i>E. coli</i> O157:H7為負反應。 2.3.3.3 甲基紅試驗(MR test)：將2.3.3.2節剩餘之MR-VP培養液再培養48 ± 2小時後，加入0.3 mL甲基紅指示劑，輕輕搖勻，若仍為紅色，則為正反應(+); 否則為負反應(-)。可疑 <i>E. coli</i> O157:H7為正反應。 2.3.3.4 檸檬酸鹽利用試驗(Citrate utilization test)：自TSAYE或NA斜面培養基上鉤菌，接種於柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液中，並置於35°C培養96 ± 2小時後，若呈現混濁狀，則為正反應(+); 若仍維持原澄清狀，則為負反應(-)。可疑 <i>E. coli</i> O157:H7為負反應。 2.4 判定： 2.4.1 可能 <i>E. coli</i> O157:H7者應符合下列之試驗結果： <table><tr><td>(1)革蘭氏染色陰性，無芽胞桿菌。</td><td>(2)IMViC試驗其結果為</td></tr><tr><td>吲哚</td><td>甲基紅</td></tr><tr><td>歐普氏</td><td>檸檬酸鹽</td></tr><tr><td>試驗</td><td>試驗</td></tr><tr><td>試驗</td><td>利用試驗</td></tr><tr><td>+</td><td>+</td></tr><tr><td>+</td><td>+</td></tr><tr><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>-</td><td>-</td></tr></table> 2.4.2 血清型別試驗：經生化試驗及鏡檢確認為可疑 <i>E. coli</i> O157:H7時，將2.3.3節TSAYE或NA斜面培養基上之菌株，接種於BHI培養液，於35°C培養24小時後，加入0.5%氯化鈉溶液5 mL，充分振盪後，將懸浮液等量移入兩支已滅菌之試管(10×100 mm)中，一支試管(10×100 mm)進行<i>E. coli</i> O157抗血清試驗，另一支試管(10×100 mm)進行加熱後抗血清試驗，其步驟如下： 2.4.2.1 大腸桿菌O157單價本體抗血清試驗 (<i>E. coli</i> O157, antisera test)： 利用蠟筆在載玻片上劃成兩部分大小約1×2 cm，一邊滴入一滴<i>E. coli</i> O157抗血清及數滴0.5%食鹽	(1)革蘭氏染色陰性，無芽胞桿菌。	(2)IMViC試驗其結果為	吲哚	甲基紅	歐普氏	檸檬酸鹽	試驗	試驗	試驗	利用試驗	+	+	+	+	-	-	-	-	
(1)革蘭氏染色陰性，無芽胞桿菌。	(2)IMViC試驗其結果為																			
吲哚	甲基紅																			
歐普氏	檸檬酸鹽																			
試驗	試驗																			
試驗	利用試驗																			
+	+																			
+	+																			
-	-																			
-	-																			

菌。<u>大腸桿菌O157:H7為革蘭氏陰性、無莢膜、無芽孢之桿狀菌。</u> <u>2.4.4. 生化試驗</u> <u>2.4.4.1. 吲哚試驗(Indole test)</u> <u>鈎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0.2~0.3 mL，輕輕搖動後靜置10分鐘。上層呈紅色者為正反應，否則為負反應。大腸桿菌O157:H7通常為正反應，有時亦呈負反應。</u> <u>2.4.4.2. 歐普氏試驗(VP test)</u> <u>鈎菌接種於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A 0.6 mL及歐普氏試劑B 0.2 mL後，再加入少許肌酸，輕輕搖勻，經2小時後觀察結果。呈粉紅色者為正反應，否則為負反應。大腸桿菌O157:H7為負反應。</u> <u>2.4.4.3. 甲基紅試驗(MR test)</u> <u>將2.4.4.2.節剩餘之MR-VP培養液，於35°C再培養48±2小時，加入甲基紅指示劑5滴，輕輕搖勻。呈紅色者為正反應，否則為負反應。大腸桿菌O157:H7為正反應。</u> <u>2.4.4.4. 檸檬酸鹽利用試驗(Citrate utilization test)</u> <u>鈎菌接種於柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液，於35°C培養96±2小時，呈混濁者為正反應；維持原澄清者，則為負反應。大腸桿菌O157:H7為負反應。</u> <u>2.4.5. 血清型別試驗</u> <u>經革蘭氏染色及生化試驗確認為可疑大腸桿菌O157:H7，將2.4.2.節TSAYE培養基上之可疑菌株，再接種於TSAYE培養基，於35°C培養18~24小時，進行抗血清試驗。</u> <u>2.4.5.1. O157抗血清試驗(O157 antiserum test)</u> <u>自TSAYE培養基鈎取約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</u>	<u>水，混合均勻；另一邊只滴入數滴0.5%食鹽水(對照用)，再各取一白金耳量懸浮菌液分別塗於載玻片之兩部分內，反覆搖晃玻片後，靜置3分鐘，使混合均勻後觀察結果。若正反應者則有凝集現象，但對照組則無；負反應者均無凝集現象，E. coli O157:H7為正反應。凝集反應可能很緩慢或很微弱，可將另一試管之細菌懸浮液，以100°C加熱1小時或121°C，加熱15分鐘，破壞菌體之莢膜後，再進行一次凝集試驗，有凝集反應者為正反應。E. coli O157:H7為正反應。</u> <u>2.4.2.2 鞭毛抗血清(E. coli H7 antisera test)：</u> <u>將2.3.3節TSAYE或NA斜面培養基上之可疑菌株，接種於置有0.2 mL吸管尖頭之SIM培養基。菌體接入SIM培養基之位置為0.2 mL吸管尖頭之內側上端，於35°C培養，當菌株游走至吸管尖頭外側之SIM培養基表面，即可將外側表面之該菌株繼續接種至另一含吸管尖頭之SIM培養基，重複此步驟三至五次後，續將菌株接種於BHI培養液，於35°C培養6~8小時，取等量之菌液及含1%(v/v)福馬林之0.5%食鹽水於試管中，混合均勻之後，取0.5 mL置一小試管中，並加入二滴H7抗血清，另一試管則僅有菌液，而不加抗血清作為控制組。經混合均勻後，置於50~52°C之水浴中，加熱1小時，觀察凝集反應。加抗血清之試驗組有凝集反應；而控制組無凝集反應者為正反應。E. coli O157:H7為正反應。</u> <u>註(1)：革蘭氏染色方法：</u> <u>a.製作抹片。</u> <u>b.初染：將已固定之抹片用革蘭氏結晶紫液染1分鐘，水洗。</u> <u>c.媒染：加革蘭氏碘液作用1分鐘後，水洗。</u> <u>d.脫色：用95%乙醇洗至不再有紫</u>	
---	--	--

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劃成兩部分，大小約1×2 cm，於一部分滴入O157單價本體抗血清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均無凝集現象。大腸桿菌O157:H7為正反應。

2.4.5.2. H7 抗血清試驗 (H7 antiserum test)

自TSAYE培養基鉤取菌株，接種於內含吸管尖頭之SIM培養基。菌體接入SIM培養基之位置為吸管尖頭之內側上端，於35°C培養18~24小時，當菌株游走至吸管尖頭外側之SIM培養基表面，即可將外側表面之該菌株繼續接種至另一內含吸管尖頭之SIM培養基，重複此步驟3~5次後，續將菌株接種於BHI培養液，於35°C培養6~8小時，吸取等量之菌液及含1%甲醛之生理食鹽水於試管中，混合均勻，取0.5 mL置於一小試管中，並加入H7抗血清3滴，另一試管加入0.85%生理食鹽水100 μL，作為對照組。經混合均勻後，於50°C之水浴加熱1小時後觀察結果。正反應者有凝集現象，負反應者及對照組則均無凝集現象。大腸桿菌O157:H7為正反應。

註3：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：大腸桿菌O157:H7陽性者，應符合下表所列之結果。

試驗或 基質	正反應 (+)	負反應 (-)	大腸桿菌 O157:H7 之反應
革蘭氏	深紫色	淡紅色	二

色褪出時，再以自來水沖洗。此步驟需時甚短，僅數秒鐘即可，惟視抹片之厚薄而定。

e.複染：用革蘭氏複染液複染30秒鐘，水洗。

f.自然乾燥。

g.鏡檢：呈現深紫色者為革蘭氏陽性菌，呈現紅色者為革蘭氏陰性菌。

註(2)：IMViC試驗：為鑑別大腸桿菌之一連串試驗，I表示吲哚試驗；M表示甲基紅試驗；V表示歐普氏試驗；i為諧音字；C表示檸檬酸鹽利用試驗。

參考文獻：

1. American Public Health Association. (1992) Coliform *Escherichia coli* and its toxins. In "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods", 3rd ed. pp.325 ~ 350. APHA, Washington, DC.
2. Hitchins, A. D., P. Feng, W. D. Wathkins, S. R. Rippey, and L. A. Chandler (1995) *Escherichia coli* and coliform bacteria. In "FDA Bacteriological Analytical Manual". 8th ed. pp.4.01~4.29. AOAC International, Arlington, VA. USA.
3. Denka Seiken Co., (1990) *Escherichia coli* Antisera "SEIKEN". Denka Seiken Co. Ltd. Tokyo, Japan.
4. 經濟部中央標準局. (1991) 食品微生物之檢驗法-生菌數之檢驗. 總號10890, 類號N6186。
5. 經濟部中央標準局. (1988) 食品微生物之檢驗法-大腸桿菌之檢驗. 總號10951, 類號N6192。

<u>染色</u>			
<u>吲哚試驗</u>	<u>紅色</u>	<u>原色</u>	<u>+</u>
<u>甲基紅試驗</u>	<u>紅色</u>	<u>黃色</u>	<u>+</u>
<u>歐普氏試驗</u>	<u>粉紅色</u>	<u>原色</u>	<u>—</u>
<u>檸檬酸鹽利用試驗</u>	<u>混濁</u> <u>(生長)</u>	<u>澄清</u> <u>(未生長)</u>	<u>—</u>
<u>O157抗血清試驗</u>	<u>凝集</u>	<u>無凝集</u>	<u>+</u>
<u>H7抗血清試驗</u>	<u>凝集</u>	<u>無凝集</u>	<u>+</u>

附註：如使用經確效認可之市售培養基、生化檢驗套組或生化試驗鑑定系統，其檢驗結果有爭議時，以本檢驗方法為準。

第二部：大腸桿菌O157:H7之real-time PCR檢測

1. 適用範圍：本方法適用於大腸桿菌O157:H7之鑑別。

2. 檢驗方法：檢體之增菌液或經分離純化後之菌株，經DNA萃取後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)進行鑑別之方法。

2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體DNA抽取、real-time PCR試劑配製及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

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(classII)(含)以上者。

2.2.4. <u>加熱振盪器：具溫控及振盪功能。</u> 2.2.5. <u>微量冷凍離心機：可達20000 ×g，並具4°C溫控功能。</u> 2.2.6. <u>離心機：供各式微量離心管離心用。</u> 2.2.7. <u>分光光度計：具波長260 nm、280 nm。</u> 2.2.8. <u>冷藏冷凍設備：具冷藏及凍結(-20°C)功能。</u> 2.2.9. <u>旋渦混合器。</u> 2.2.10. <u>酸鹼度測定儀。</u> 2.2.11. <u>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。</u> 2.3. <u>試藥</u> 2.3.1. <u>DNA抽取用：適用於革蘭氏陰性細菌DNA抽取之市售套組。</u> 2.3.2. <u>Real-time PCR用^(註1)</u> 2.3.2.1. <u>鑑別試驗用引子及探針</u> 2.3.2.1.1. <u><i>Escherichia coli</i> O157 (標的基因：wzyO157 gene)</u> <u>引子F：wzyF1831，5'-CTCGATAAATTGCGCATTCTATTC-3'</u> <u>引子R：wzyR1936，5'-CAATACGGAGAGAAAAGGACCAA-3'</u> <u>探針P：wzyP1881，5'-(FAM)-ACTTAGTGGCTGGGAATGCATCGGC-(BHQ1)-3'</u> <u>PCR增幅產物大小：106 bp</u> 2.3.2.1.2. <u><i>Escherichia coli</i> H7 (標的基因：flic_{H7} gene)</u> <u>引子F：FLICH71068-F，5'-TACCATCGCAAAAGCAACTCC-3'</u> <u>引子R：FLICH71314-R，5'-GTCGGCAACGTTAGTGATACC-3'</u> <u>探針P：FLICH7-P，5'-(FAM)-CGGCTGCCGCGACATCTTCAAT-(BHQ1)-3'</u> <u>PCR增幅產物大小：247 bp</u> <u>註1：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'</u>		
---	--	--

端採用 Black Hole Quencher-1 (BHQ1)標記。

2.3.2.2. TaqMan® Fast Reagents Starter Kit (適用於 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System)

本試劑內含real-time PCR所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時添加引子、探針及待測檢體DNA。

2.3.3. 對照用物質：大腸桿菌 O157:H7參考菌株或其DNA。

2.4. 器具及材料^(註2)

2.4.1. 微量吸管：10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.2. 吸管尖：可滅菌，10 µL、20 µL、200 µL及1000 µL。

2.4.3. 離心管：200 µL、600 µL、1.5 mL及2 mL。

2.4.4. Real-time PCR反應管：100 µL。

2.4.5. Real-time PCR反應盤：具96個反應孔，適用於 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System。

2.4.6. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL及2000 mL。

註2：使用之塑膠或玻璃器皿均為無DNase污染。

2.5. Real-time PCR溶液^(註3)

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

5 µM引子F	2.0 µL
5 µM引子R	2.0 µL
5 µM探針P	1.5 µL
TaqMan® Fast Reagents Starter Kit	12.5 µL
檢體DNA溶液	5.0 µL
無菌去離子水	2.0 µL
總體積	25.0 µL

註3：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

<u>備</u> <u>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 ×g離心3分鐘，去除上清液。</u> <u>2.6.1.1. 直接煮沸法</u> <u>將沉澱物加入無菌去離子水1 mL，旋渦混合均勻，以15000 ×g離心3分鐘，去除上清液，續將沉澱物加入無菌去離子水1 mL，旋渦混合均勻，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℃冷凍保存。</u> <u>2.6.1.2. 抽取DNA法</u> <u>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℃冷凍保存。</u> <u>2.6.2. 分離菌株之DNA溶液製備</u> <u>自第一部2.4.2.節TSAYE培養基上鉤取一接種環之分離菌株，置入內含無菌去離子水1 mL之已滅菌1.5 mL離心管，旋渦混合均勻，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之1.5 mL離心管，作為檢體DNA原液，於-20℃冷凍保存。亦可依2.6.1.2.節進行檢體DNA原液之製備。</u> <u>2.6.3. DNA濃度測定及純度判斷</u> <u>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.₂₆₀/O.D.₂₈₀比值作判斷，其比值宜介於1.7~2.0。</u> <u>2.7. 鑑別試驗</u> <u>2.7.1. Real-time PCR操作步驟</u> <u>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</u>		
--	--	--

滅菌之離心管，依照2.5.節配製 real-time PCR 溶液，並注入 real-time PCR 反應盤的反應孔中，再將 real-time PCR 反應盤置於離心機中，以200 ×g瞬間離心後，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應^(註4)。同時另製作正反應及負反應對照組。

步驟	溫度	時間
1.熱活化	95°C	20 sec
2.最初變性	95°C	3 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。

註4：上述反應條件不適時，可依所使用之儀器，設定適合之反應條件。

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增幅產物為標的基因片段，可確認該檢體中含有大腸桿菌O157:H7。

附註：第二部大腸桿菌O157:H7之real-time PCR檢驗可視需要執行。

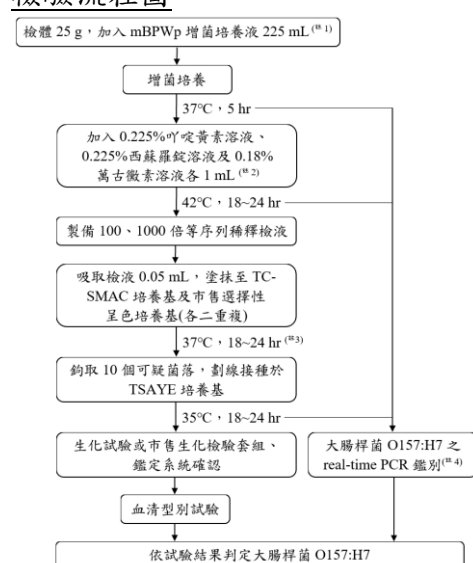
參考文獻

1. Feng, P., Weagant, S. D. and Jinneman, K. 2020. Chapter 4A: Diarrheagenic *Escherichia coli*. Bacteriological Analytical Manual. [<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4a-diarrheagenic-escherichia-coli>].
2. Fratamico, P. M. and DebRoy, C. 2010. Detection of *Escherichia coli*

O157:H7 in food using real-time multiplex PCR assays targeting the *stx*₁, *stx*₂, *wzy*_{O157}, and the *fliC*_{H7} or *eae* genes. Food Anal. Methods 3: 330-337.

3. Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A. and Burkhardt, W. 2020. Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Bacteriological Analytical Manual. [https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria].

檢驗流程圖



註1：食品檢體依第一部2.3.節檢液之調製加入適量增菌培養液。

註2：葉菜類(香菜及香芹除外)之檢液則各加入2 mL。

註3：市售大腸桿菌O157:H7選擇性呈色培養基則依產品說明之培養條件進行培養及觀察典型菌落之形態。

註4：可依檢體含菌量情況自行探討接續之real-time PCR之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。