

食品微生物之檢驗方法－大腸桿菌O157:H7之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms - Test of *Escherichia coli* O157:H7

第一部：大腸桿菌O157:H7之分離及鑑別

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：檢體經增菌培養後，以選擇性培養基進行定性分析。
  - 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. 培養箱：能維持內部溫差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.6. 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。
    - 2.2.7. 攪拌均質器或鐵胃：能適用於無菌操作者。
    - 2.2.8. 電磁加熱攪拌器。
    - 2.2.9. 顯微鏡：能放大至1000倍之一般光學顯微鏡。
    - 2.2.10. 酸鹼度測定儀。
    - 2.2.11. 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以內者。
    - 2.2.12. 旋渦混合器。
    - 2.2.13. 吸管輔助器或微量吸管。
    - 2.2.14. 吸管：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之刻度。
    - 2.2.15. 吸管尖：已滅菌，10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 及1000  $\mu\text{L}$ 。
    - 2.2.16. 容器：附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵氟龍或其他能耐 $121^{\circ}\text{C}$ 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。
    - 2.2.17. 試管：附螺旋蓋， $16 \times 125$  mm、 $16 \times 150$  mm或其他適用者。

- 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、刮傷或其他缺點。
- 2.2.19. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金、鉑鈱或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.2.20. 藥勺、剪刀、小刀及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.21. 塗抹曲棒：可滅菌，或可拋棄式者。
- 2.2.22. 無菌濾膜：孔徑0.45  $\mu\text{m}$ 或以下之親水性濾膜。
- 2.2.23. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢者。
- 2.2.24. 濾紙。
- 2.2.25. 褐色試藥瓶。
- 2.2.26. 蠟筆或麥克筆：塗寫、劃記載玻片時使用。
- 2.2.27. 研鉢、杵：研磨試藥用。
- 2.2.28. 燈箱：觀察血清試驗用。
- 2.2.29. 吸管尖頭：將200  $\mu\text{L}$ 吸管尖剪去尖頭，使其長約4 cm。
- 2.2.30. 試藥

95% 乙醇、 $\alpha$ -萘酚( $\alpha$ -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 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( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、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( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、磷酸氫二鉀( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )、磷酸氫銨鈉( $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )、膽鹽(bile salts)、檸檬酸鈉( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )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)、聚蛋白朊(polypeptone)、酵母抽出物(yeast extract)及膠解蛋白朊(gelysate peptone)均採用微生物級。

#### 2.2.31. 試劑

##### 2.2.31.1. 0.225% 吡啶黃素溶液(0.225% Acriflavin solution)

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。

##### 2.2.31.2. 0.225% 西蘇羅錠溶液(0.225% Cefsulodin solution)

取西蘇羅錠1.125 g，溶於蒸餾水500 mL，過濾除菌，冷藏備用。

##### 2.2.31.3. 0.18% 萬古黴素溶液(0.18% Vancomycin solution)

取萬古黴素0.9 g，溶於蒸餾水500 mL，過濾除菌，冷藏備用。

##### 2.2.31.4. 磷酸鹽緩衝液(Butterfield's phosphate-buffered dilution water)

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°C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°C滅菌15分鐘。

##### 2.2.31.5. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)<sup>(註1)</sup>

###### (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，取濾液供作初染劑。

###### (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。

###### (3) 哈克氏複染液(複染劑)

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。

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。

#### 2.2.31.6. 柯瓦克氏試劑(Kovacs' reagent)

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。

#### 2.2.31.7. 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。

#### 2.2.31.8. 歐普氏試劑(Voges-Proskauer test reagents, VP test reagents)

試劑A：取 $\alpha$ -萘酚5 g，溶於無水乙醇100 mL。

試劑B：取氫氧化鉀40 g，以蒸餾水溶解，使成100 mL。

#### 2.2.31.9. 0.85%生理食鹽水(Physiological saline solution)

取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水1000 mL，以121°C滅菌15分鐘。

#### 2.2.31.10. 含1%甲醛之生理食鹽水(Physiological saline solution with 1% formalin)

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。

#### 2.2.31.11. 蛋白胍緩衝液(Buffered peptone water, BPW)

取蛋白胍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。

#### 2.2.32. 抗血清

2.2.32.1. 大腸桿菌O157抗血清(*Escherichia coli* O157 antiserum)。

2.2.32.2. 大腸桿菌H7抗血清(*Escherichia coli* H7 antiserum)。

#### 2.2.33. 培養基

2.2.33.1. 含丙酮酸鹽之修飾蛋白胍緩衝液(Modified buffered peptone water with pyruvate, mBPWp)

	單位濃度	雙倍濃度
蛋白胍(peptone).....	10 g.....	20 g
氯化鈉.....	5 g.....	10 g
磷酸二氫鉀(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	1.5 g.....	3 g

磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ..... 3.6 g ..... 7.2 g  
酪蛋白水解氨基酸(casamino acids) ·· 5 g ..... 10 g  
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°C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  
胰蛋白胨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°C滅菌15分鐘，冷卻至47~50°C，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。

### 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)

胰化酪蛋白朊(trypticase peptone)..... 15 g  
大豆蛋白朊(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. 胰化蛋白朊培養液(Tryptone or Tryptophane broth)

胰化蛋白朊(tryptone)或胰化酪蛋白朊(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)

蛋白朊緩衝液粉末(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<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O)..... 1.5 g  
磷酸二氫鉀(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ..... 1 g  
硫酸鎂(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)..... 0.2 g  
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) ..... 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  
胨蛋白朊(proteose peptone)或聚蛋白朊(polypeptone)....  
..... 10 g

氯化鈉 ..... 5 g  
磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ..... 2.5 g  
葡萄糖(glucose) ..... 2 g  
蒸餾水 ..... 1000 mL

加熱溶解後，以 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最終pH值為 $7.4 \pm 0.2$ 。

#### 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 $121^\circ\text{C}$ 滅菌15分鐘，最終pH值為 $7.3 \pm 0.2$ 。

### 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 $10000 \times g$ 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，添加蛋白胰緩衝液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  $\mu$ L (通常稀釋至 $10^{-2}$ ~ $10^{-4}$ ，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® *Escherichia coli* 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菌。大腸桿菌O157:H7為革蘭氏陰性、無莢膜、無芽孢之桿狀菌。

#### 2.4.4. 生化試驗

##### 2.4.4.1. 吲哚試驗(Indole test)

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。

##### 2.4.4.2. 歐普氏試驗(VP test)

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。

##### 2.4.4.3. 甲基紅試驗(MR test)

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。

##### 2.4.4.4. 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。

#### 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。

##### 2.4.5.1. O157抗血清試驗(O157 antiserum test)

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
革蘭氏染色	深紫色	淡紅色	—
吡啶試驗	紅色	原色	+
甲基紅試驗	紅色	黃色	+
歐普氏試驗	粉紅色	原色	—
檸檬酸鹽利用試驗	混濁 (生長)	澄清 (未生長)	—

O157抗血清試驗	凝集	無凝集	+
H7抗血清試驗	凝集	無凝集	+

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(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者，靈敏度為0.1 g；最大稱重量為100 g者，靈敏度為1 mg。

### 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1)</sup>

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子及探針

2.3.2.1.1. *Escherichia coli* O157 (標的基因：wzy<sub>O157</sub> gene)

引子F：wzyF1831, 5'-CTCGATAAATTGCGCATTCTA  
TTC-3'

引子R：wzyR1936, 5'-CAATACGGAGAGAAAAGGAC  
CAA-3'

探針P：wzyP1881，5'-(FAM)-ACTTAGTGGCTGGGA  
ATGCATCGGC-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小：106 bp

2.3.2.1.2. *Escherichia coli* H7 (標的基因：*flic<sub>H7</sub>* gene)

引子F：FLICH71068-F，5'-TACCATCGCAAAAGCAA  
CTCC-3'

引子R：FLICH71314-R，5'-GTCGGCAACGTTAGTGAT  
ACC-3'

探針P：FLICH7-P，5'-(FAM)-CGGCTGCCGCGACAT  
CTTCAAT-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小：247 bp

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'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<sup>(註2)</sup>

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<sup>(註3)</sup>

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 $\mu$ M探針P.....	1.5 $\mu$ L
TaqMan <sup>®</sup> Fast Reagents Starter Kit.....	12.5 $\mu$ L
檢體DNA溶液.....	5.0 $\mu$ L
無菌去離子水.....	2.0 $\mu$ L
總體積.....	25.0 $\mu$ L

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，旋渦混合均勻，以15000  $\times$ 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 $^{\circ}$ 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

自第一部2.4.2.節TSA YE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  $\times$ 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 $^{\circ}$ 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/ $\mu$ 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，其比值宜介於1.7~2.0。

## 2.7. 鑑別試驗

### 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<sup>(註4)</sup>。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：第二部分大腸桿菌O157:H7之real-time PCR檢驗可視需要執行。

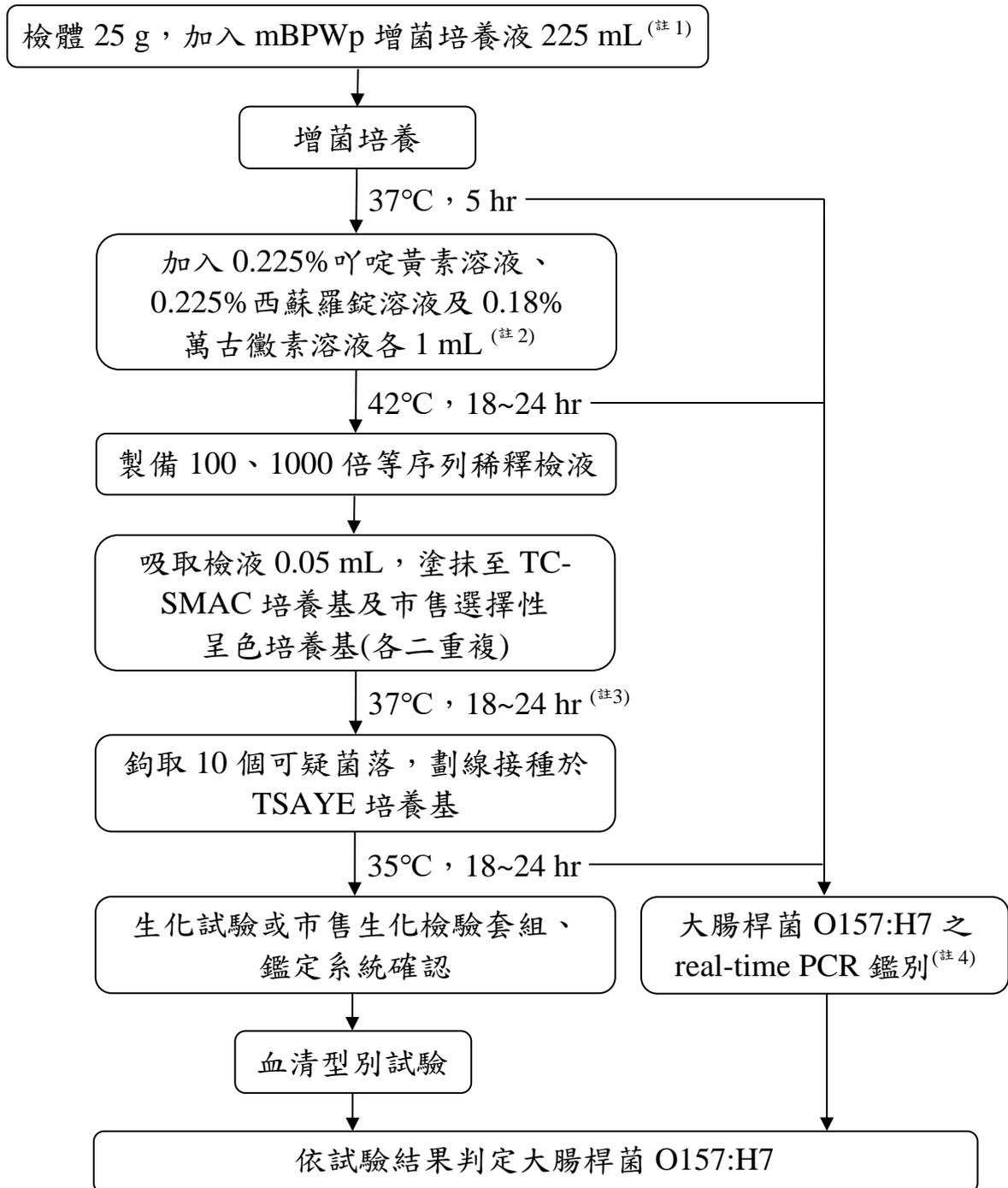
### 參考文獻

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*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *wzy*<sub>O157</sub>, and the *fliC*<sub>h7</sub> 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。