

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

食品微生物之檢驗方法－志賀氏桿菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms- Test of *Shigella*

第一部：志賀氏桿菌之分離

1. 適用範圍：本方法適用於食品中志賀氏桿菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經增菌後，續以選擇性培養基培養，配合志賀氏桿菌型別鑑定之方法。
 - 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. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作者。
 - 2.2.5. 天平：可稱量到 2000 g，靈敏度為 0.1 g；可稱量到 120 g 者，靈敏度為 1 mg。
 - 2.2.6. 冰箱：能維持 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 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. 培養箱：能維持內部溫度溫差在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.9. 顯微鏡：能放大至 1000 倍以上之一般光學顯微鏡。
 - 2.2.10. 吸管輔助器(Pipette aid)或微量分注器。
 - 2.2.11. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.12. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.13. 抽氣櫃。
 - 2.2.14. 燈箱：一般日光燈光源，30 瓦。
 - 2.2.15. 馬克法蘭氏濁度標準組(McFarland nephelometer standard units)。
 - 2.2.16. 吸管或吸管尖：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。
 - 2.2.17. 培養皿：已滅菌，內徑約 9 cm，深度約 15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。
 - 2.2.18. 增菌用容器：附蓋之 500 mL 廣口瓶、500 mL 三角錐瓶、250 mL 燒杯或無菌塑膠(鐵胃)袋。
 - 2.2.19. 杜蘭發酵管(Durham fermentation tube)：外徑 9×22 mm 或其他適用者。

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

- 2.2.20. 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金、鉑銨或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.2.21. 厭氧瓶(Anaerobic jar)：附有催化劑者。
- 2.2.22. 氣體包：適合厭氧菌培養者。使用時，反應 30 分鐘後，厭氧瓶內空氣組成為氧氣含量低於 1%，二氧化碳介於 9~13%。
- 2.2.23. 無菌濾膜：孔徑 0.22 μm 或以下之親水性濾膜。
- 2.2.24. 試管：10 × 100 mm，13 × 100 mm，13 × 120 mm，16 × 150 mm，15 × 150 mm 試管(包括螺旋試管)。
- 2.2.25. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢用。
- 2.2.26. 研鉢、杵。
- 2.2.27. 藥勺、剪刀、小刀、鑷子：可滅菌。
- 2.2.28. 試藥：無水硫酸鎂、黏酸(mucic acid)、氯化鈉、氫氧化鈉、結晶紫(crystal violet)、草酸銨(ammonium oxalate)、碘化鉀、碘、沙黃 O(safranin O)，對-二甲胺基苯甲醛(*p*-dimethyl aminobenzaldehyde)、甲基紅(methyl red)、 α -萘酚(α -naphthol)、氫氧化鉀、肌酸(creatine)、95% 乙醇、無水乙醇、戊醇(amy alcohol)或異戊醇(isoamy alcohol)、乳糖、蔗糖、水楊苷(salicin)、核糖醇(adonitol)、鼠李糖(rhamnose)、葡萄糖、肌醇(inositol)、甘露醇(mannitol)、棉子糖(raffinose)、木糖(xylose)、甘油、半乳糖醇(dulcitol)、氰化鉀、磷酸氫二鈉、磷酸二氫鉀、諾伯黴素(novobiocin)、Tween 80、膽鹽 No.3 (bile salts No.3)、中性紅(neutral red)、去氧膽酸鈉(sodium desoxycholate)、檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate)、硫代硫酸鈉、酚紅(phenol red)、溴麝香草藍(bromthymol blue)、酸性復紅(acid fuchsin)、硫酸亞鐵(FeSO_4)、尿素(urea)、硫酸銨、丙二酸鈉、溴甲酚紫(bromcresol purple)、醋酸鈉(CH_3COONa)、磷酸二氫銨、檸檬酸鈉(sodium citrate)、半胱氨酸鹽酸鹽(cysteine monohydrochloride)、鳥胺酸(ornithine)、L-離胺酸(L-lysine)、礦物油或液態石蠟油及鹽酸等均採用化學試藥級。蛋白胨(peptone)、胰化蛋白胨(tryptone)、胨蛋白胨(proteose peptone)、洋菜(agar)、酵母抽出物(yeast extract)、牛肉抽出物(beef extract)、膠解蛋白胨(gelysate peptone)、小牛肉浸出液(veal infusion)等均採用微生物級。
- 2.2.29. 試劑：
- 2.2.29.1. 生理食鹽水：
取氯化鈉 8.5 g 溶於蒸餾水 1000 mL 中，分裝於試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘。
- 2.2.29.2. 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 中，再徐徐加入鹽酸 25 mL，混合均勻後應呈黃色並須保存於 4°C

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

冰箱中。

2.2.29.3. 甲基紅指示劑(Methyl red indicator)：

取甲基紅 0.1 g 溶於 95%乙醇 300 mL 後，加蒸餾水使成 500 mL。

2.2.29.4. 歐普氏試劑(Voges-Proskauer test reagents, VP reagents)：

溶液 A：取 α -萘酚 5 g 溶於無水乙醇 100 mL 中。

溶液 B：取氫氧化鉀 40 g 溶於蒸餾水中，並使成 100 mL。

2.2.29.5. 0.5%氰化鉀溶液(0.5% potassium cyanide solution)：

取氰化鉀 0.5 g 溶於無菌蒸餾水 100 mL 中(氰化鉀為劇毒物質，本操作務必在抽氣櫃內進行)。

2.2.29.6. 5 N 氫氧化鈉溶液：

取氫氧化鈉 20 g，加蒸餾水使成 100 mL。

2.2.29.7. 礦物油或液態石蠟油：

取礦物油或液態石蠟油 20~50 mL，裝入有蓋容器中約 1/2 滿，以 121°C 滅菌 30 分鐘。

2.2.29.8. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)

2.2.29.8.1. 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。

2.2.29.8.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)

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

2.2.29.8.3. 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 加入水 90 mL，作為複染液。

註：革蘭氏染色液因放久可能失效，因此若購買成品時，要注意其保存期限，自行配製者應檢查其染色效果。

2.2.30. 培養基

2.2.30.1. 蛋白胨緩衝液(Buffered peptone water, BPW)

蛋白胨(peptone) 10 g

氯化鈉 5 g

磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4) 3.5 g

磷酸二氫鉀(KH_2PO_4) 1.5 g

蒸餾水 1000 mL

攪拌加熱溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2±0.2。

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正

102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正

104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正

MOHWM0003.02

2.2.30.2. 志賀氏桿菌培養液(*Shigella* broth)

基礎培養基(Basal medium)

胰化蛋白胨(tryptone)	20 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	2 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	2 g
氯化鈉	5 g
葡萄糖	1 g
乳化劑 Tween 80	1.5 mL
蒸餾水	1000 mL

溶解後，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.0±0.2。

諾伯黴素溶液(novobiocin solution)：取諾伯黴素 50 mg 溶於蒸餾水 1000 mL，經濾膜作無菌過濾，備用。

使用前，取諾伯黴素溶液 2.5 mL 加至基礎培養基 225 mL 中，供檢測 *S. sonnei* 使用；檢測 *S. sonnei* 外之其他志賀氏桿菌時，則取諾伯黴素溶液 15 mL 加至基礎培養基 225 mL 中。

2.2.30.3. 馬康奇培養基(MacConkey agar)

胨蛋白胨(proteose peptone)	3 g
蛋白胨(peptone)或膠解蛋白胨(gelysate peptone)	17 g
乳糖	10 g
膽鹽 No.3 (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

混搖均勻後，加熱沸騰 1~2 分鐘，以 121℃ 滅菌 15 分鐘，於 50℃ 水浴中冷卻，最終 pH 值為 7.1±0.2。每培養皿注入約 20 mL，蓋上皿蓋，於室溫下放置至培養基表面乾燥備用。

2.2.30.4. 木糖離胺酸去氧膽酸鹽培養基(Xylose lysine desoxycholate agar, XLD)

酵母抽出物(yeast extract)	3 g
L-離胺酸(L-lysine)	5 g
木糖(xylose)	3.75 g
乳糖	7.5 g
蔗糖	7.5 g
去氧膽酸鈉(sodium desoxycholate)	2.5 g
檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate)	0.8 g
硫代硫酸鈉($Na_2S_2O_3$)	6.8 g
氯化鈉	5 g
洋菜(agar)	15 g

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

酚紅(phenol red) 0.08 g
蒸餾水 1000 mL
加熱至沸騰溶解(注意不可加熱過度)。水浴中冷卻至 50℃，
最終 pH 值為 7.4±0.2。每培養皿注入約 20 mL，稍開皿蓋，
靜置約 2 小時，使培養基表面乾燥(配製後勿超過一天使用)。

2.2.30.5. 海克頓腸內菌培養基(Hektoen enteric agar, HE)

蛋白胨(peptone) 12 g
酵母抽出物(yeast extract) 3 g
膽鹽 No.3 (bile salts No.3) 9 g
乳糖 12 g
蔗糖 12 g
水楊苷(salicin) 2 g
氯化鈉 5 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 5 g
檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate) 1.5 g
溴麝香草藍(bromthymol blue) 0.065 g
酸性復紅(acid fuchsin) 0.1 g
洋菜(agar) 14 g
蒸餾水 1000 mL
攪拌加熱至沸騰溶解(沸騰勿超過 1 分鐘)。於水浴中冷卻至
50℃，最終 pH 值為 7.5±0.2。每培養皿注入約 20 mL，稍開
皿蓋，靜置約 2 小時，使培養基表面乾燥(配製後勿超過一天
使用)。

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

牛肉抽出物(beef extract) 3 g
酵母抽出物(yeast extract) 3 g
蛋白胨(peptone) 15 g
胨蛋白胨(proteose peptone) 5 g
葡萄糖 1 g
乳糖 10 g
蔗糖 10 g
硫酸亞鐵(FeSO_4) 0.2 g
氯化鈉 5 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.3 g
酚紅(phenol red) 0.024 g
洋菜(agar) 12 g
蒸餾水 1000 mL
加熱溶解後，分取約 5 mL 注入試管，以 121℃滅菌 15 分鐘，
最終 pH 值為 7.4±0.2。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。

2.2.30.7. 尿素培養液(Urea broth)

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

尿素(urea)	20 g
酵母抽出物(yeast extract)	0.1 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	9.1 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	9.5 g
酚紅(phenol red)	0.01 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，經濾膜過濾後，分取 1.5~3 mL 濾液，注入已滅菌之試管中，最終 pH 值為 6.8 ± 0.2 。

2.2.30.8. 運動性試驗培養基(Motility test medium)

牛肉抽出物(beef extract)	3 g
蛋白胨(peptone)或膠解蛋白胨(gelysate peptone)	10 g
氯化鈉	5 g
洋菜(agar)	4 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取約 8 mL 注入附有螺旋蓋試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4 ± 0.2 。

2.2.30.9. 氰化鉀培養液(Potassium cyanide broth)

牛肉抽出物(beef extract)	3 g
氯化鈉	5 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	0.225 g
磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)	5.64 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.6 ± 0.2 。
冷卻後於抽氣櫃內以吸管輔助器配合無菌操作，加入 0.5% 氰化鉀溶液 15 mL，混合均勻，分取 1~1.5 mL 注入已滅菌之試管中，貯存於冰箱備用，貯存期限不得超過兩週。

2.2.30.10. 丙二酸鹽培養液(Malonate broth)

酵母抽出物(yeast extract)	1 g
硫酸銨 [$(NH_4)_2SO_4$]	2 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	0.6 g
磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)	0.4 g
氯化鈉	2 g
丙二酸鈉(sodium malonate)	3 g
葡萄糖	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 。

2.2.30.11. 胰化蛋白胨培養液(Tryptone broth)

胰化蛋白胨(tryptone)	10 g
蒸餾水	1000 mL

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

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

2.2.30.12. MR-VP 培養液(MR-VP broth)

蛋白胨緩衝液粉末(buffered peptone-water powder)	7 g
葡萄糖	5 g
磷酸氫二鉀(K ₂ HPO ₄)	5 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，分取約 5 mL 注入試管中，以 118°C~121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9±0.2。

2.2.30.13. 溴甲酚紫培養液(Bromcresol 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(bromcresol purple)	0.04 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，分取培養液約 2.5 mL 注入置有杜蘭發酵管之試管內，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 7.0±0.2。冷卻後，每管加入經濾膜過濾除菌之 50% (w/v) 乳糖溶液 0.278±0.002 mL，使培養液中該糖之最終濃度為 5% (w/v)。含蔗糖、水楊苷、核糖醇、鼠李糖、葡萄糖、肌醇、甘露醇、棉仔糖、木糖、甘油、半乳糖醇之溴甲酚紫培養液配製方法亦同。

2.2.30.14. 醋酸鹽培養基(Acetate agar)

醋酸鈉(CH ₃ COONa)	2 g
氯化鈉	5 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(bromthymol blue)	0.08 g
洋菜(agar)	20 g
蒸餾水	1000 mL

加熱至沸騰溶解後，加入無水硫酸鎂 0.2 g，混合均勻。分取約 8 mL 注入試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.7。滅菌後作成斜面培養基，此斜面長度約 5 cm。

2.2.30.15. 黏酸鹽培養液(Mucate broth)

蛋白胨(peptone)	10 g
溴麝香草藍(bromthymol blue)	0.024 g
蒸餾水	1000 mL

溶解後，加入黏酸 10 g，再徐徐注入 5 N 氫氧化鈉溶液，攪拌使完全溶解，分取約 5 mL 注入附有螺旋蓋之試管內，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.1。

2.2.30.16. 黏酸鹽對照培養液(Mucate control broth)

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

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正

102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正

104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正

MOHWM0003.02

溴麝香草藍(bromthymol blue) 0.024 g
蒸餾水 1000 mL
溶解後，分取約 5 mL 注入附有螺旋蓋之試管內，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.1。

2.2.30.17. 脫羧酶基礎培養液(Decarboxylase basal medium)

蛋白胨(peptone)或膠解蛋白胨(gelysate peptone) 5 g
酵母抽出物(yeast extract) 3 g
葡萄糖 1 g
溴甲酚紫(bromcresol purple) 0.02 g
蒸餾水 1000 mL
配製離胺酸脫羧酶培養液時，取 L-離胺酸 5 g 加入上述基礎培養液，加熱溶解後，分取約 5 mL 注入附有螺旋蓋試管，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 6.5±0.2。必要時，於滅菌前調整 pH 值，使滅菌後之 pH 值為 6.5±0.2。滅菌後須旋緊螺蓋儲存。含鳥胺酸之脫羧酶培養液配製方法亦同。

2.2.30.18. 克立斯田森檸檬酸鹽培養基(Christensen citrate agar)

檸檬酸鈉(sodium citrate) 3 g
葡萄糖 0.2 g
酵母抽出物(yeast extract) 0.5 g
半胱氨酸鹽酸鹽(cysteine monohydrochloride) 0.1 g
檸檬酸銨鐵(ferric ammonium citrate) 0.4 g
磷酸二氫鉀(KH₂PO₄) 1 g
氯化鈉 5 g
硫代硫酸鈉(Na₂S₂O₃) 0.08 g
酚紅(phenol red) 0.012 g
洋菜(agar) 15 g
蒸餾水 1000 mL
加熱沸騰約 1 分鐘，俟溶解後，注入試管(16 × 150 mm)中至 1/3 滿處，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9±0.2，滅菌後作成斜面培養基，此斜面長度約 4~5 cm，斜面底部之深度約 2~3 cm。

2.2.30.19. 小牛肉浸出液培養基(Veal infusion agar)

小牛肉浸出液(veal infusion) 500 g
胨蛋白胨(proteose peptone No.3) 10 g
氯化鈉 5 g
洋菜(agar) 15 g
蒸餾水 1000 mL
加熱溶解後，分取約 7 mL 注入試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。滅菌後作成斜面培養基，使斜面長度約 6 cm。

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

2.2.31. 抗血清

2.2.31.1. 志賀氏桿菌多價本體族群抗血清(*Shigella* somatic polyvalent antisera)：A, A₁, B, C, C₁, C₂, D 及 A-D (Alkalescens- Dispar biotypes)等 8 種。

2.2.31.2. 志賀氏桿菌單價本體族群抗血清(*Shigella* somatic monovalent antisera)：S. *dysenteriae* (type-sera 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 及 12)、S. *flexneri* (type-sera I, II, III, IV, V, VI 與 group sera (3) 4, 6 及 7 (8))、S. *boydii* (type-sera 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 及 18)、S. *sonnei* (phase I 及 phase II)共 41 種。

2.3. 檢液之調製

2.3.1. 固態檢體：先適當切碎，混合均勻後，取 25 g 加至含諾伯黴素之志賀氏桿菌培養液 225 mL 中，充分混合均勻，振搖約 10 分鐘後，即為 10 倍稀釋檢液。

2.3.2. 粉狀、粒狀或其他易於粉碎之檢體：可用已滅菌之藥勺或其他方便使用之用具加以粉碎後，混合均勻，取檢體 25 g，以下步驟同 2.3.1. 節之操作。

2.3.3. 液態檢體：可用振搖方式，使充分均勻混合後，取檢體 25 mL，以下步驟同 2.3.1. 節之操作。

2.3.4. 冷凍檢體：須解凍者，如冷凍魚、禽畜肉、蔬果、水餃等，應在冷藏之溫度下解凍(如 2~5℃，18 小時內即可解凍完全)；亦可使用較高溫度快速解凍(即放在 45℃ 以下之水浴中，可於 15 分鐘內解凍之檢體適用之)。解凍時應經常搖動檢體，以幫助檢體之解凍。俟檢體解凍後，再予以適當切碎並混合均勻。不須解凍者，如食用冰塊、冰棒等冰類製品，應速先行使成適當小塊；再依照 2.3.1. 節方法，製成 10 倍稀釋檢液。如測試檢體工作無法於一小時內開始進行，檢體應勿先添加稀釋液，並貯存在≤ -10℃ 環境中。

2.3.5. 凝態及濃稠液態檢體：如布丁、煉乳、海苔醬等，經適當攪拌均勻後，取檢體 25 g，以下步驟同 2.3.1. 節之操作。

2.3.6. 環境檢體或塗抹物檢體：

2.3.6.1. 環境檢體：取 1 g 置於含志賀氏桿菌培養液 10 mL 之試管內，供作檢液。

2.3.6.2. 塗抹物檢體：將塗抹棒之頭部置於已滅菌試管內，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄，添加蛋白胰緩衝液 5 mL 後，將試管蓋旋緊，於 10 秒內來回叩擊手心使其劇烈振盪(振盪幅度需達 15 公分) 50 次，或以旋渦混合器充分振盪至塗抹物頭部之棉絮鬆開。取溶出液 1 mL 置於含志賀氏桿菌培養液 10 mL 之試管內，供作檢液。

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

或將塗抹棒之頭部置於含志賀氏桿菌培養液 10 mL 之試管內，以無菌操作折(剪)斷塗抹物木柄，供作檢液。

- 註：1. 處理含油脂量多，不易勻散及易起泡沫之檢體時，應加入適量之已滅菌乳化劑(如 1% Tween 80 等)，並充分振搖，使之乳化。
- 2 檢體總量不足 25 g (mL)，應依檢體量，添加適量之志賀氏桿菌培養液，作成 10 倍稀釋檢液。

2.4. 鑑別試驗

- 2.4.1. 增菌培養：將 2.3.節調製之檢液充分振搖，混合均勻後置入厭氧瓶中，再放入新鮮的催化劑及氣體包，於 42°C(欲檢測 *S. sonnei* 時，培養溫度為 44°C)培養 20 小時。

2.4.2. 分離培養

- 2.4.2.1. 自 2.4.1.節之增菌培養液中取一接種環量，在馬康奇培養基、XLD 及 HE 培養基表面劃線後(二重複)，於 35°C 培養 20 小時，觀察所形成菌落之形態。志賀氏桿菌在馬康奇培養基上的典型菌落為外緣呈粗糙不規則或平整，無色透明或淡粉紅色；在 XLD 培養基上的典型菌落為外緣呈粗糙不規則或平整，紅色、無色透明或與培養基同色。在 HE 培養基上的典型菌落為外觀潮濕扁平，菌落外緣粗糙不規則或平整，呈綠色、藍綠色、無色透明或與培養基同色。

- 2.4.2.2. 純菌株(Pure culture)：自 2.4.2.1.節之培養基上鉤取典型菌落，利用斜面劃線及穿刺法接種於 TSI 斜面培養基中，於 35°C 培養 24 小時後開始觀察直至 48±2 小時。志賀氏桿菌在 TSI 斜面培養基之斜面呈紅色(鹼性)，底部呈黃色(酸性)，但無氣體或硫化氫產生。惟少數 *S. flexneri* 菌株可能會產生微量氣體。

- 2.4.2.3. 混合菌株(Mixed culture)之純化：將 TSI 斜面培養基上未純化菌株，劃線接種於馬康奇培養基或 XLD 或 HE 培養基。於 35°C 培養 20 小時後，鉤取典型菌落，以下步驟同 2.4.2.2. 節操作。

2.5. 鑑定試驗：

2.5.1. 初步試驗：

- 2.5.1.1. 尿素酶試驗(Urease test)：自 TSI 斜面培養基上鉤取可疑菌株，接種於尿素培養液中，於 35°C 培養 24±2 小時。培養液由橘紅色轉變為紫紅色者為正反應，顏色不變者為負反應，志賀氏桿菌為負反應。

- 2.5.1.2. 運動性試驗(Motility test)：自 TSI 斜面培養基上鉤取可疑菌株，穿刺接種於運動性試驗培養基之表面中央點至深度 0.5 吋處。於 35°C 培養 24 小時後開始觀察直至 48±2 小時。當測試菌沿穿刺線呈放射線狀生長者為正反應，否則為負反應，

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

志賀氏桿菌為負反應。

2.5.1.3. 革蘭氏染色(Gram stain)：自 TSI 斜面培養基鉤取可疑菌株接種於小牛肉浸出液培養基斜面上，於 35℃ 培養 24±2 小時，依下列步驟進行革蘭氏染色後鏡檢。

- (1) 鉤取菌體，於載玻片上製成薄抹片，風乾或微熱固定。
- (2) 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染 1 分鐘後水洗，水洗時間應不超過 5 秒鐘。
- (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，再以水洗，此步驟需時甚短，僅數秒即可，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) 自然風乾。
- (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。志賀氏桿菌為革蘭氏陰性、無莢膜、無芽孢之桿菌。

經上述試驗，確認為可疑志賀氏桿菌者，自小牛肉浸出液培養基鉤菌進行下列生化試驗及血清學試驗。

2.5.2. 生化試驗：

2.5.2.1. 氰化鉀試驗(KCN test)：鉤菌接種於氰化鉀培養液，以橡皮塞塞緊試管口，於 35℃ 培養 24 小時後開始觀察直至 48±2 小時。培養液由清澈變為混濁者為正反應，否則為負反應，志賀氏桿菌為負反應。

2.5.2.2. 丙二酸鹽試驗(Malonate test)：鉤菌接種於丙二酸鹽培養液，於 35℃ 培養 24 小時後開始觀察直至 48±2 小時。培養液由綠色變為藍色者為正反應，維持綠色者為負反應，志賀氏桿菌為負反應。

2.5.2.3. 吲哚試驗(Indole test)：鉤菌接種於胰化蛋白胨培養液中，於 35℃ 培養 48±2 小時後，加入柯瓦克氏試劑 0.2~0.3 mL，輕輕搖動後靜置約 10 分鐘，上層呈紅色者為正反應，否則為負反應，志賀氏桿菌為正反應或負反應。

2.5.2.4. 歐普氏試驗(VP test)：鉤菌接種於 MR-VP 培養液中，於 35℃ 培養 48±2 小時後，取培養液 1 mL 至另一已滅菌之試管中，加入歐普氏試劑溶液 A 約 0.6 mL 及歐普氏試劑溶液 B 約 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，呈現粉紅色至鮮紅者為正反應，否則為負反應，志賀氏桿菌為負反應。

2.5.2.5. 甲基紅試驗(Methyl red test)：將 2.5.2.4. 節驗餘之 MR-VP 培養液於 35℃ 再培養 48±2 小時後，取培養液 5 mL 至另一已滅菌試管中，加入甲基紅指示劑 5~6 滴，輕輕搖勻，呈紅色者為正反應，否則為負反應，志賀氏桿菌為正反應。

2.5.2.6. 檸檬酸鹽利用試驗(Citrate utilization test)：鉤菌接種於克立

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

斯田森檸檬酸鹽培養基斜面，於 35℃ 培養 24~48 小時。培養基斜面呈現粉紅色者為正反應，仍維持原培養基顏色，為負反應，志賀氏桿菌為負反應。

- 2.5.2.7. 脫羧酶試驗(Decarboxylase test)：鉤菌接種於含離胺酸之脫羧酶培養液，徐徐注入已滅菌之液態石蠟油或礦物油至高約 2.5 cm，旋緊螺蓋，置於 35℃ 培養 24 小時後開始觀察直至 48±2 小時。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，志賀氏桿菌為離胺酸脫羧酶負反應。鳥胺酸脫羧酶試驗之操作步驟亦同，志賀氏桿菌可能為鳥胺酸脫羧酶正或負反應。

- 2.5.2.8. 醋酸鹽氧化試驗(Acetate oxidation test)：鉤菌接種於醋酸鹽培養基斜面上，於 35℃ 培養 24 小時後開始觀察直至 48±2 小時。培養基斜面上菌體生長且由綠色變為藍色者為正反應，否則為負反應。除少數 *S. flexneri* 血清型 4a 醋酸鹽為正反應外，其餘志賀氏桿菌為負反應。

- 2.5.2.9. 黏酸鹽利用試驗(Mucate utilization test)：分別鉤菌接種於黏酸鹽培養液及黏酸鹽對照培養液中，於 35℃ 培養 24 小時後開始觀察直至 48±2 小時。當黏酸鹽培養液由藍色變為黃色，黏酸鹽對照培養液仍維持藍色者為正反應，否則為負反應，志賀氏桿菌為負反應。

- 2.5.2.10. 溴甲酚紫糖類發酵試驗：鉤菌接種於含糖類之溴甲酚紫培養液中，於 35℃ 培養 2~5 天，每隔 24 小時觀察其產酸、產氣情形。培養液顏色由紫色轉變為黃色產酸者為產酸正反應，否則為產酸負反應。產氣者為產氣正反應，否則為產氣負反應。

- 2.5.3. 血清學試驗(Serological test)：鉤菌至生理食鹽水 3 mL 中，混合均勻，調整菌液濃度至馬克法蘭濁度標準 5 (McFarland Turbidity Standard No. 5)，供作菌體懸浮液。利用蠟筆在玻片或培養皿上畫九格大小約 1×3 cm 的矩形，第一格至第八格矩形之上方分別滴入一滴志賀氏桿菌多價本體族群抗血清(A、A₁、B、C、C₁、C₂、D、A-D 共八組)，另下方滴入一滴菌體懸浮液；第九格矩形的下方滴入菌體懸浮液，另上方滴一滴生理食鹽水(對照組)。以無菌接種環或接種針將菌體懸浮液與抗血清(或生理食鹽水)均勻混合，反覆前後傾斜搖動 3~4 分鐘後，在燈箱光源上方觀察。正反應者，菌體懸浮液與抗血清產生凝集現象(此處正反應係指混合後有明顯之凝集現象，並且背景有 50%以上呈透明)，但對照組則無；負反應者菌體懸浮液與抗血清，以及菌體懸浮液與生理食鹽水均無凝集現象，志賀氏桿菌為正反應。志賀氏桿菌多價本體族群抗血清試驗呈正反應時，續以單價本體族群抗血清重覆上述步驟，確認菌株血清型別。血清學試驗呈負反應時，須將菌體懸浮液，蒸氣加熱 30 分鐘，冷卻後，重複上述凝集試驗。

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正

102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正

104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正

MOHWM0003.02

2.6. 判定：志賀氏桿菌陽性者，應符合表一及表二所列之結果。

表一、志賀氏桿菌之生化反應

試驗		正反應 (+)	負反應 (-)	志賀氏桿菌之反應 ⁽¹⁾
三糖鐵培養基試驗	斜面	黃色	紅色	—
	底部	黃色	紅色	+
	產氣	培養基裂縫或斷裂	培養基完整	— ⁽²⁾
	硫化氫	黑色	非黑色	—
尿素酶試驗		紫紅色	原色	—
吲哚試驗		表面產生紅色	表面產生黃色	d ⁽³⁾
甲基紅試驗		紅色	黃色	+
歐普氏試驗		紅色	原色	—
檸檬酸鹽試驗		粉紅色	黃褐色(原色)	—
氰化鉀試驗		混濁	澄清	—
運動性試驗		沿穿刺線有放射狀線產生	沿穿刺線無放射狀線產生	—
離胺酸脫羧酶試驗		紫色	黃色	—
鳥胺酸脫羧酶試驗		紫色	黃色	d ⁽⁴⁾
溴甲酚紫糖類發酵試驗 ⁽⁵⁾	葡萄糖	產酸	不產酸	+
		產氣	不產氣	— ⁽⁶⁾
	核糖醇	產酸	不產酸	—
	半乳糖醇	產酸	不產酸	d ⁽⁷⁾
	甘油	產酸	不產酸	d ⁽⁸⁾
	肌醇	產酸	不產酸	—
	乳糖	產氣	不產酸	d ⁽⁹⁾
	甘露醇	產酸	不產酸	d ⁽¹⁰⁾
	棉子糖	產酸	不產酸	d ⁽¹¹⁾
	鼠李糖	產酸	不產酸	d ⁽¹²⁾
	水楊苷	產酸	不產酸	—
	蔗糖	產酸	不產酸	d ⁽¹³⁾
	木糖	產酸	不產酸	d ⁽¹⁴⁾
丙二酸鹽試驗		藍色	綠色	—
黏酸鹽利用試驗		黃色	藍色	— ⁽¹⁵⁾
醋酸鹽氧化試驗		藍色	綠色	— ⁽¹⁶⁾
多價本體族群抗血清血清學試驗		凝集	無凝集	+

(1) +：90%以上菌株為正反應；d：11~89%菌株為正反應；—：90%以上菌株為負反應。

(2) 部分 *S. flexneri* 菌株在 TSI 培養基中會產生微量氣體。

(3) *S. sonnei*、*S. dysenteriae* 血清型 1 及 *S. flexneri* 血清型 6 為吲哚負反應；*S. dysenteriae* 血清型 2、血清型 7、血清型 8 及 *S. boydii* 血清型 5、血清型 7、

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
 102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
 104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
 MOHWM0003.02

血清型 9、血清型 11、血清型 13、血清型 15 為正反應；其餘的志賀氏桿菌為正或負反應。

- (4) *S. boydii* 血清型 13 及 *S. sonnei* 為鳥胺酸脫羧酶正反應。
- (5) 除少數外，志賀氏桿菌發酵糖類不產氣。
- (6) 部分 *S. flexneri* 血清型 6 能發酵葡萄糖產氣，為正反應；*S. boydii* 血清型 13 及血清型 14 亦可為正反應。
- (7) *S. sonnei* 不能發酵半乳糖醇，為負反應；*S. dysenteriae* 血清型 5 及 *S. flexneri* 血清型 6 能發酵半乳糖醇，為正反應；*S. boydii* 血清型 2、血清型 3、血清型 4、血清型 6 及血清型 10 亦可發酵半乳糖醇，但可能有延遲反應；其餘大部份志賀氏桿菌為負反應。
- (8) 大部分 *S. dysenteriae* 及 *S. boydii* 能發酵甘油，為正反應，其餘志賀氏桿菌可為正或負反應。
- (9) 志賀氏桿菌通常在 2 天內不會發酵乳糖，為負反應。*S. sonnei* 於培養 3 天以上，有 75% 為正反應；*S. flexneri* 血清型 2a、*S. boydii* 血清型 9 及血清型 15 可為正反應。有些 *S. dysenteriae* 血清型 1 發酵乳糖緩慢。
- (10) *S. dysenteriae* 不能發酵甘露醇，為負反應；有些 *S. flexneri* 血清型 4a、血清型 6 為負反應；少數 *S. sonnei* 為負反應。
- (11) *S. dysenteriae* 及 *S. boydii* 不能發酵棉子糖，為負反應；其餘志賀氏桿菌為正或負反應。
- (12) *S. sonnei* 能發酵鼠李糖，為正反應；其餘大部份志賀氏桿菌菌株為負反應。
- (13) *S. sonnei* 發酵蔗糖須培養超過數天後才會出現正反應。
- (14) *S. sonnei* 不能發酵木糖；大部分 *S. dysenteriae* 及 *S. flexneri* 亦不能發酵木糖；*S. boydii* 可為正或負反應。
- (15) *S. dysenteriae*、*S. flexneri* 及 *S. boydii* 黏酸鹽利用試驗為負反應，而 *S. sonnei* 可為正或負反應。
- (16) 除少數 *S. flexneri* 血清型 4a 菌株於醋酸鹽氧化試驗為正反應外，其餘志賀氏桿菌均為負反應。

表二、*S. dysenteriae*、*S. flexneri*、*S. boydii* 及 *S. sonnei* 之生化反應⁽¹⁾

試驗	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>
吲哚試驗 ⁽²⁾	d	d	d	—
鳥胺酸脫羧酶	—	— ⁽³⁾	—	+
乳糖產酸	—	—	—	(+) ⁽⁴⁾
蔗糖產酸	—	—	—	(+)
甘露醇產酸	—	+	+	+
半乳糖醇產酸 ⁽⁵⁾	d	d	—	—
棉仔糖產酸	—	—	d	(+)
木糖產酸	—	d	—	—

(1)~(5)：詳見表一之相關試驗說明。

2.7. 如使用經確效認可之市售培養基、生化檢測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。

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

第二部：志賀氏桿菌之 real-time PCR 檢測

1. 適用範圍：本方法適用於志賀氏桿菌之鑑別。
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 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 $20000 \times g$ ，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. 侵入質體抗原基因(標的基因：*ipaH*)
引子 F：5'-ACCATGCTCGCAGAGAAACT-3'

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

引子 R：5'-TACGCTTCAGTACAGCATGC-3'

探針 P：

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

PCR 增幅產物大小 181 bp

2.3.2.1.2. 乳糖通透酶基因(標的基因：*lacY*)

引子 F：5'-CTGGCACTATTATGTCTGTA-3'

引子 R：5'-GGAACGGTACTTCAAACA-3'

探針 P：

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

PCR 增幅產物大小 102 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。

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：志賀氏桿菌及 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)參考菌株或其 DNA。

2.4. 器具及材料^(註 3)

2.4.1. 微量吸管(Micropipette)：2 µL、10 µL、20 µL、100µL、200 µL 及 1000 µL。

2.4.2. 吸管尖頭(Pipette tip)：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 3：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。

2.5. Real-time PCR 溶液^(註 4)

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

10 µM 引子 F 0.5 µL

10 µM 引子 R 0.5 µL

10 µM 探針 0.5µL

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

TaqMan® Fast Reagents Starter Kit.....12.5 μ L
檢體 DNA 溶液..... 5.0 μ L
無菌去離子水..... 6.0 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 2.3.1.節於 35°C 培養 18~24 小時之檢液中吸取菌液 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，振盪混合均勻，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，振盪混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸 10 分鐘，取出離心管，作為檢體 DNA 原液，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

自培養基上鉤取一接種環的菌量，置入含有無菌去離子水 1 mL 之已滅菌 1.5 mL 離心管中，振盪混合均勻，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/ μ L 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 20 μ L 入 real-time PCR 反應盤的反應孔中

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，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，於侵入質體抗原基因反應以志賀氏桿菌或 EIEC 為正反應對照組，乳糖通透酶反應以 EIEC 為正反應對照組。

2.7.1.1. 侵入質體抗原基因及乳糖通透酶基因反應條件

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。		

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 與標的基因之正反應對照組之 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。志賀氏桿菌侵入質體抗原基因為正反應，乳糖通透酶基因為負反應。EIEC 之前述兩者基因皆為正反應。

註5：本Real-time PCR反應條件係採Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

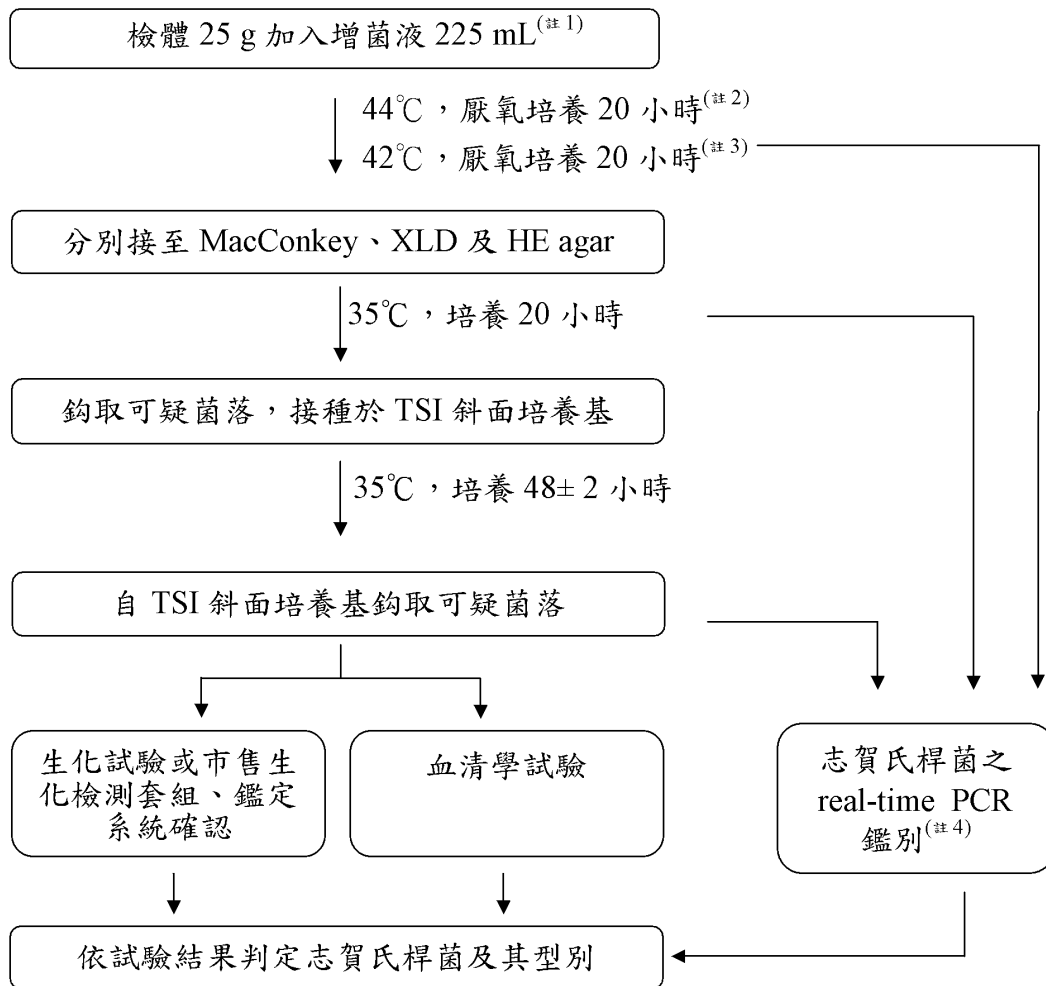
附註：第二部志賀氏桿菌之 real-time PCR 檢驗可視需要執行。

參考文獻

1. Andrews, W. H. and Jacobson, A. 2001. Bacteriological Analytical Manual Chapter 6 *Shigella*. US FDA.
2. Lin, W. S., Cheng, C. M. and Van, K. T. 2010. A quantitative PCR assay for rapid detection of *Shigella* species in fresh produce. *J. Food Pro.* 73(2): 221-233.
3. Pavlovic, M., Luze, A., Konrad, R., Berger, A., Sing, A., Busch, U. and Huber, I. 2011. Development of a duplex real-time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella* spp. *J. Appl. Microbio.* 110(5): 1245-1251.

97 年 5 月 8 日署授食字第 0971800158 號公告修正
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正
104 年 4 月 29 日部授食字第 1041900638 號公告修正
MOHWM0003.02

檢驗流程圖



註 1：欲檢測 *S. sonnei* 需於志賀氏桿菌培養液加入 50 mg/L 諾伯黴素 2.5 mL，檢測 *S. sonnei* 外之其他志賀氏桿菌需於志賀氏桿菌培養液加入 50 mg/L 諾伯黴素 15 mL。

註 2：檢測 *S. sonnei* 時，44°C 厭氧培養 20 小時。

註 3：檢測 *S. sonnei* 外之其他志賀氏桿菌時，42°C 厭氧培養 20 小時。

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