

111年度食品微生物檢驗業務推廣訓練班

大腸桿菌O157:H7之檢驗

研究檢驗組 食品生物科
葉民煉 111年11月11日



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>

大綱

- 大腸桿菌O157:H7之簡介
- 食品中微生物衛生標準之限量
- 大腸桿菌O157:H7之檢驗方法
 - 配製增菌液、培養基
 - 調製檢液及增菌培養
 - 分離培養
 - 生化試驗及結果判定
 - 抗血清試驗
 - FDA/BAM檢驗方法
 - Real-time PCR檢測方法
- 食品微生物之檢驗常見問答

大腸桿菌O157:H7之簡介

大腸桿菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)

- ❑ 德國兒科醫生Theodor Escherich於1885年發現此菌
- ❑ 菌種特性
 1. 革蘭氏陰性桿菌
 2. 具鞭毛，可運動
 3. 兼性厭氧菌，有氧或無氧狀態下皆可生長
 4. 不會形成芽胞
 5. 最適合生長的pH值為6~7
 6. 最適合生長的溫度為37℃
 7. 耐熱性差，一般烹調溫度即可殺死本菌
- ❑ 帶菌率(健康的人約2~8%，豬、牛約為7~22%)，藉由已受感染的人員或動物糞便而污染食品或水源，飲水、食品的衛生指標菌。
- ❑ 人體腸道共生菌(可提供維生素B₁₂、K及抵抗病原菌入侵)，只有少部分引起下痢、腹痛等症狀，引起腹瀉疾病者稱為腹瀉性大腸桿菌(Diarrheagenic *E. coli*)或病原性大腸桿菌(Pathogenic *E. coli*)。

病原性大腸桿菌(Pathogenic *Escherichia coli*)

Pathogenic *Escherichia coli* Group

□ 六種致病菌群←毒力特性或因子

- 1.腸毒素型大腸桿菌(Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)：旅行者腹瀉、不耐熱(heat-labile, LT)毒素及耐熱(heat-stable, ST)毒素
- 2.腸病原性大腸桿菌(Enteropathogenic *E. coli*, EPEC)：LEE (locus for enterocyte effacement)致病基因群→*eae/tir* gene→附著於腸道上皮細胞
- 3.腸出血性大腸桿菌(Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)：產生志賀毒素、常與全球主要的食源性疾病有關
- 4.腸侵襲性大腸桿菌(Enteroinvasive *E. coli*, EIEC)：產生類似志賀毒素之腸毒素→侵襲結腸上皮細胞
- 5.腸聚集性大腸桿菌(Enteraggregative *E. coli*, EAEC)
- 6.擴黏性大腸桿菌(Diffusely adherent *E. coli*, DAEC)

□ 有些群組可共享相似毒力特徵，如O104:H4原為EAEC，未開發國家引起持續性腹瀉，但很少涉及重大食源性事件，但2011年德國豆芽引起大規模爆發的O104:H4產生EHEC之志賀毒素(至少16國家、3941感染個案、909溶血性尿毒症候群、52死亡個案)

大腸桿菌O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)

- ❑ 1975年首次發現(血便婦人分離菌株，VT毒素(verotoxin))，1982年美國漢堡肉食品中毒事件為首次確認案例
- ❑ 致病菌群：腸出血性大腸桿菌(EHEC)，約佔全球75%感染，其他非O157血清型(O26、O45、O103、O111、O121和O145)正在成為食源性疾病原因，O91、O104:H4、O113等亦可能導致嚴重疾病
- ❑ 志賀毒素(Shiga toxin, *Stx*)：*Stx1*和/或*Stx2*，*Stx1*與第1型痢疾桿菌(*Shigella dysenteriae* Type I)產生的毒素幾乎相同，*Stx2*最常與嚴重的後遺症相關，例如溶血性尿毒症候群(hemolytic uremic syndrome, HUS)，其特徵為急性腎功能衰竭
- ❑ 致病機制：
 - 1.志賀毒素：抑制核糖體60S之蛋白質合成→細胞死亡
 - 2.LEE (locus for enterocyte effacement)致病基因群：
黏附因子→破壞微絨毛(microvilli)，緊密黏附腸道上皮細胞表面
 - 3.pO157質體：腸溶血素(enterohemolysin)等致病蛋白
- ❑ 緩慢發酵或不發酵山梨糖醇(sorbitol)； β -葡萄糖醛酸苷酶(glucuronidase, GUD)酵素活性為陰性

大腸桿菌O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)

❑ 臨床症狀/致病性

- 1.最初水樣腹瀉，接續出血性腹瀉
- 2.低燒
- 3.出血性結腸炎(Hemorrhagic colitis, HC)，伴有痙攣和腹痛的腸道疾病
- 4.症狀持續2~9天，平均約8天
- 5.3~7%出血性結腸炎患者併發溶血性尿毒症候群(hemolytic uremic syndrome, HUS)或栓塞性血小板減少性紫斑症(thrombocytopenic purpura, TTP)，幼兒和老年人更容易感染及發生嚴重併發症的風險更高

❑ 死亡率：3~5%(溶血性尿毒症候群患者)

❑ 潛伏期：1~9天，通常3~4天

❑ 感染劑量：估計非常低(10~100 cells)

❑ 傳染期：排便期間7~9天可傳染(1/3兒童長達3週)

❑ 傳染方式：糞-口傳染，接觸受感染的動物、食入受感染食物或飲水或與患者直接接觸而感染。食用被污染食品為主因，如生牛肉(尤其是絞肉)、生牛奶、乳酪、生菜、果汁等，另人與人之間的傳染或受污染之水源(如未經消毒之飲用水、游泳池水)而引起傳染

大腸桿菌O157之重要感染疫情

爆發 *E. coli* O157 的國家與感染源

時間 (年)	地點	感染源	備註
1982	美國	連鎖速食店漢堡	全球第一例
1987	歐洲 (比利時)	漢堡	歐洲第一例
1990	非洲	因雨季將牛糞便所帶汙染菌沖入水中	非洲第一例
1993	美國	連鎖速食店漢堡	
1993	紐西蘭	未知感染源	紐西蘭第一例
1996	日本	學校午餐提供之汙染的蘿蔔纓	全球規模最大
1996	美國	食品製造公司販售汙染的蘋果汁	
1997	英國	參觀農場，疑似接觸動物造成感染	
1998	愛爾蘭	幼稚園接觸傳染	
1999	美國 (紐約)	露天遊樂場水源受汙染	美國最大
1999	日本	生魚片汙染	
1999	芬蘭	泳池水汙染	
2002	加拿大	未經消毒的羊奶	
2004	加拿大	夏季牧場露營，接觸傳染	
2005	英國	食用學校午餐汙染的肉	英國第二大
2005	加拿大	未消毒的起士	
2006	美國	食用受汙染之菠菜	
2007	冰島	食用受汙染之萵苣	
2009	美國	冷凍未煮熟之曲奇餅乾 (Cookie dough) 受汙染	

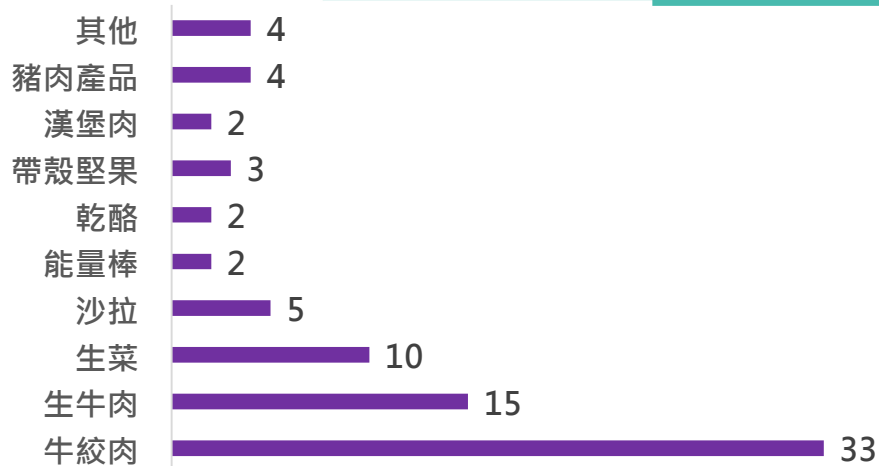
感染控制雜誌(陳星宇等,2011)



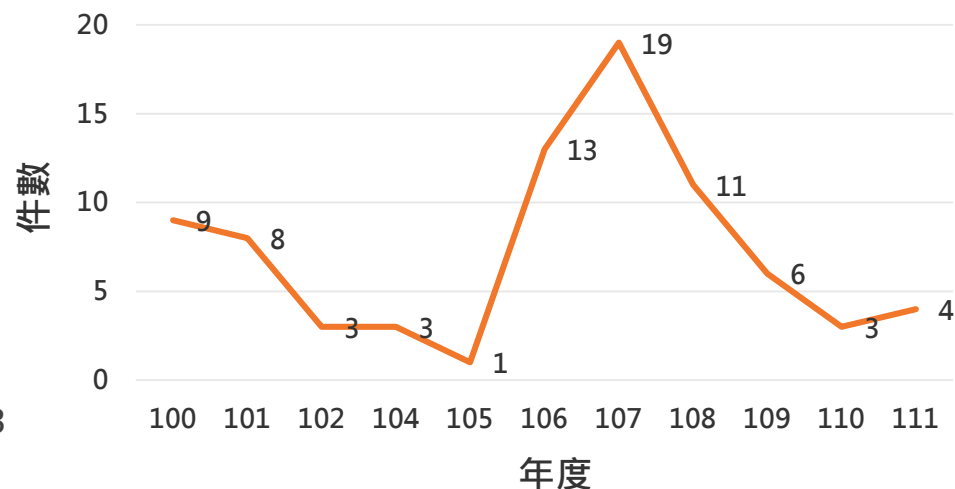
衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

大腸桿菌O157:H7之國際警訊

(100年1月~111年10月)



其他：義式臘腸、羊乳、乳油、預煮牛肉各 1 件



發布國家/單位	牛絞肉	生牛肉	生菜	沙拉	能量棒	乾酪	帶殼堅果	漢堡肉	豬肉產品	其他	總計
美國農業部食品安全檢驗局(FSIS)	18	7		2						1	28
加拿大食品檢驗局(CFIA)	9	6	2	2	1	1		2	4		27
愛爾蘭食品安全局(FSIS)	6	2	2			1	3			2	16
美國食品藥物管理局(FDA)			5	1	1					1	8
日本厚生勞動省			1								1
總計	33	15	10	5	2	2	3	2	4	4	80



食品中微生物衛生標準之限量

「食品中微生物衛生標準」公告

109.10.6 衛授食字第1091302247號

衛生福利部 令

發文日期：中華民國109年10月6日
發文字號：衛授食字第1091302247號
附件：



訂定「食品中微生物衛生標準」。
附「食品中微生物衛生標準」

部長陳時中

衛生福利部(下稱衛福部)今(6)日發布訂定「食品中微生物衛生標準」(下稱本標準)。本標準前經兩次預告，經蒐集各界評論意見並酌予調整後公布，為利各界因應，本標準將提供緩衝期至民國**110年7月1日起實施**。

本標準整併「一般食品類衛生標準」第5條有關微生物之規定，並取代現行「乳品類衛生標準」、「罐頭食品類微生物衛生標準」、「冰類微生物衛生標準」、「嬰兒食品類微生物衛生標準」、「冷凍食品類微生物衛生標準」、「包裝飲用水及盛裝飲用水微生物衛生標準」、「飲料類微生物衛生標準」、「生食用食品類衛生標準」、「生熟食混合即食食品類衛生標準」及「液蛋衛生標準」等10種標準，以上標準均將配合本標準之實施日同步修正或廢止。

本標準之訂定，重新將食品區分為七大類，並參採國際管理趨勢，將部分食品類別之規定納入**採樣計畫**、增訂部分**指標性病原菌**，以取代傳統之衛生指標菌，將使有關監測之結果更具風險代表性。

衛福部強調，由於微生物之動態消長與製造及販賣場所衛生狀況有直接關係，故食品業者仍應以強化食品良好衛生規範準則(GHP)及危害分析與重要管制點(HACCP)制度等之自主管理為優先，自源頭排除可能造成微生物污染之風險，提高管理效能；衛生標準則是驗證管理成效及提供衛生機關查核之依據。為使標準更符合國際管理趨勢，衛福部仍將持續參考國內外相關科學研究資訊及最新管理規範，滾動修正有關規定，以維護食品衛生安全。



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

「食品中微生物衛生標準」之管制項目

110.07.01施行

食品品項	總生菌數	腸桿菌科	大腸桿菌群	大腸桿菌	大腸桿菌 O157:H7	金黃色葡萄球菌	金黃色葡萄球菌腸毒素	沙門氏菌	單核球增多性李斯特菌	腸炎弧菌	阪崎腸桿菌(屬)	糞便性鏈球菌	綠膿桿菌
1. 乳及乳製品類		CFU (1.1~1.4)		MPN (1.5)			定性 (1.1~1.5)	定性 (1.1~1.5)	定性 (1.1~1.5)				
2. 嬰兒食品類		CFU (2.1~2.3)	MPN (2.4)					定性 (2.1~2.4)	定性 (2.1~2.4)		MPN (2.1~2.3)		
3. 生鮮即食食品及生熟食混和即食食品類				MPN (3.3, 3.4)	定性 (3.3, 3.4)			定性 (3.1~3.5)	定性 (3.1~3.4)	MPN (3.1, 3.2)			
4. 包裝/盛裝飲用水及飲料類		CFU (4.2~4.4, 4.6, 4.7)	CFU (4.1)	MPN (4.5)	定性 (4.5)			定性 (4.5, 4.7)				CFU (4.1)	CFU (4.1)
5. 冷凍食品及冰類		CFU (5.1~5.3)		MPN (5.4)				定性 (5.1~5.3, 5.5, 5.6)		MPN (5.5, 5.6)			
6. 其他即食食品類						CFU (6.1~6.3)		定性 (6.1~6.3)	CFU (6.1~6.3)				
7. 液蛋類	CFU (7.2)							定性 (7.1)					

◎罐頭食品：經保溫試驗(37°C，10天)檢查合格，沒有因微生物繁殖而導致產品膨罐、變形或pH值異常改變等情形。

◎屬「不易導致李斯特菌生長之即食食品」者，無須檢測李斯特菌。所稱「不易導致李斯特菌生長之即食食品」需符合以下條件之一：

(1)pH值低於4.4；(2)水活性低於0.92；(3)同時符合pH值低於5.0和水活性低於0.94的產品；(4)添加可抑制李斯特菌生長之抑制劑(inhibitors)，且可提出相關科學證據。糖、蜂蜜、糖果類(含可可及巧克力)及食鹽等產品，且符合上開條件之一者，無須檢測李斯特菌。



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

大腸桿菌O157:H7之限量標準

食品類別	食品品項	微生物及其毒素、代謝產物	限量標準
3. 生鮮即食食品 ^a 及生熟食混和即食食品類 ^b	3.3 生鮮即食蔬果 3.4 混和生鮮即食蔬果之生熟食混和即食食品	大腸桿菌	10 MPN/g
		大腸桿菌O157:H7 ^c	陰性
		沙門氏菌	陰性
		單核球增多性李斯特菌	陰性
4. 包裝/盛裝飲用水及飲料類	4.5 未經商業殺菌之鮮榨果蔬汁、添加少於50%乳品且未經商業殺菌之含乳鮮榨果蔬汁	大腸桿菌	10 MPN/g
		大腸桿菌O157:H7 ^c	陰性
		沙門氏菌	陰性

^a生鮮即食食品：指直接提供消費者食用之食品，不再經加熱或其他可有效消除或降低微生物含量之處理。

^b同時含有「生鮮即食水產品」、「生鮮即食蔬果」、「未全熟蛋」兩種以上之生熟食混和即食食品，從嚴合併適用混和生食種類規範之微生物項目。

^c大腸桿菌如「陰性」，得不用加驗大腸桿菌O157:H7。



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

大腸桿菌O157:H7之檢驗方法

大腸桿菌O157:H7之檢驗方法

微生物檢驗之主要儀器設備



高壓
滅菌釜



培養箱
水浴槽



生物安全
操作櫃



生化試
驗鑑定

增菌液、培養基(液)、試劑及抗血清

名稱	用途/試驗
出血性大腸桿菌增菌培養液(EHEC Enrichment Broth, EEB) : mTSB + CCV Supplement	增菌培養
TC-山梨糖醇—馬康奇培養基(Tellurite-Cefixime-Sorbitol MacConkey agar, TC-SMAC)	分離培養
伊紅亞甲藍培養基(Levine's Eosin-Methylene Blue Agar, L-EMB)	確定試驗
非選擇培養基：酵母抽出物胰化酪蛋白大豆培養基(Trypticase Soy Agar with 0.6% Yeast Extract, TSAYE)或營養培養基(Nutrient Agar, NA)	純化菌株/ 繼代接種
革蘭氏染色液(Gram's stain solution)：結晶紫液、碘液、複染液	革蘭氏染色
胰化蛋白胨培養液(Tryptone or Tryptophane Broth)、柯瓦克氏試劑(Kovac's reagent)	吲哚試驗
甲基紅—歐普氏培養液(MR-VP Broth)、甲基紅指示劑(Methyl red indicator)、歐普氏試劑(Voges-Proskauer reagent, VP reagent)	甲基紅試驗 歐普氏試驗
柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液(Koser's Citrate Broth)	檸檬酸鹽 利用試驗
腦心浸出培養液(Brain Heart Infusion Broth, BHI)	抗血清試驗
運動性試驗培養基(SIM Medium)	抗血清試驗
抗血清套組：大腸桿菌O157單價本體抗血清(<i>E. coli</i> O157 type antisera)、大腸桿菌單價鞭毛抗血清(<i>E. coli</i> H7 type antisera)	抗血清試驗

IMViC試驗：吲哚試驗、甲基紅試驗、歐普氏試驗、檸檬酸鹽利用試驗



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

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

	組成分	克數	功能
mTSB	胰化酪蛋白大豆培養液 (Trypticase Soy Broth, TSB)	30 g	基礎培養液
	磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	1.5 g	緩衝pH值
	膽鹽(bile salts No.3)	1.12 g	抑制革蘭氏陽性菌
	新生黴素溶液 (novobiocin solution) (100 mg/mL)	0.2 mL	抑制革蘭氏陽性菌
	蒸餾水	1000 mL	
Supplement	西士敏(cefixime)	0.05 mg	抑制革蘭氏陽性菌及部分抑制革蘭氏陰性菌
	西蘇羅錠(cefsulodin)	10 mg	抑制革蘭氏陽性菌及部分抑制革蘭氏陰性菌
	萬古黴素(vancomycin)	8 mg	抑制革蘭氏陽性菌

※修飾後胰化酪蛋白大豆培養液 (Trypticase Soy Broth Modified, mTSB)之配製

- 1.mTSB基礎培養液(TSB+ K_2HPO_4 +bile salts)攪拌溶解後，以121°C滅菌15分鐘。
- 2.新生黴素100 mg溶於蒸餾水1 mL，經無菌濾膜過濾。
- 3.取新生黴素溶液0.2 mL加至45~50°C之mTSB基礎培養液1000 mL，搖動混合均勻。

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

- 1.西士敏、西蘇羅錠、萬古黴素分別溶於去離子水5 mL，經無菌濾膜過濾。
- 2.Supplement溶液加至mTSB培養液1000 mL，搖動混合均勻，最終pH為7.3±0.2。

TC-山梨糖醇—馬康奇培養基

(Tellurite-Cefixime-Sorbitol MacConkey agar, TC-SMAC)

組成分		克數	功能
Sorbitol MacConkey (TC-SMAC)	蛋白胨(peptone)	17 g	提供微生物生長所需之氮、礦物質和氨基酸
	水解蛋白胨No.3(protease peptone No.3)	3 g	提供微生物生長所需之氮、礦物質和氨基酸
	山梨糖醇(sorbitol)	10 g	碳源(MacConkey agar→乳糖)
	膽鹽(bile salts)	1.5 g	抑制革蘭氏陽性菌生長
	氯化鈉(NaCl)	5 g	維持滲透壓
	中性紅(neutral red)	0.03 g	pH指示劑(sorbitol-positive→red; Sorbitol-negative→colourless)
	結晶紫(crystal violet)	0.001 g	抑制革蘭氏陽性菌生長，尤其腸球菌及葡萄球菌
Supplement	洋菜(agar)	13.5 g	凝固劑
	蒸餾水	1000 mL	
	亞碲酸鉀(potassium tellurite)	2.5 mg	抑制變形桿菌屬(<i>Proteus</i> spp)
	西士敏(cefixime)	0.05 mg	抑制non-O157 <i>E. coli</i> 及其他微生物

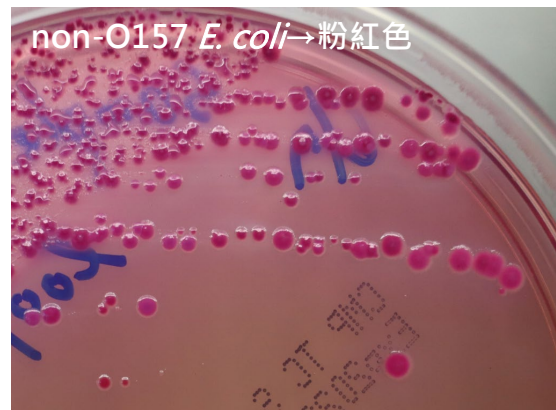
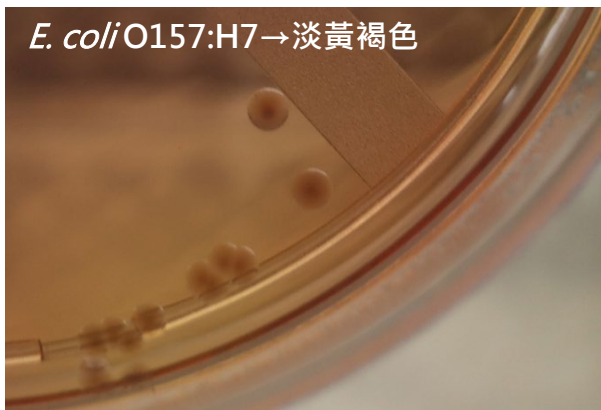
- 1.TC-SMAC (Sorbitol MacConkey agar)培養基加熱溶解後，以121℃滅菌15分鐘。
 - 2.亞碲酸鉀及西士敏溶於蒸餾水5 mL，經無菌濾膜過濾。
 - 3.Supplement溶液加至45～50℃之SMAC培養基1000 mL，搖動混合均勻，最終pH值為7.1±0.2。
- ☆搖動混合時避免產生氣泡，每片培養皿約倒入15～20 mL，凝固後打開皿蓋約1/2～1/4，使培養基表面略為乾燥。另培養基以當天使用最佳，如冷藏備用者於使用前，先檢查有無雜菌污染。

Performance testing of TC-SMAC

ISO 11133

Function	Incubation	Control strains	WDCM numbers	Method of control	Criteria	Charcteristic reactions
Productivity	37±1°C, 21±3 h	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	00014 (non-toxigenic strain)	Qualitative	Good growth	Transparent colonies with a pale yellowish-brown appearance and a diameter~1 mm
Selectivity		<i>Staphylococcus aureus</i>	00032 or 00034	Qualitative	Total inhibition	—
		<i>Escherichia coli</i>	00012 or 00013	Qualitative	Partial inhibition	Growth of some pink colonies

☆WDCM 00014=ATCC™ 700728=NCTC 12900, 另ATCC 43888 (*stx1*-,*stx2*-,*uidA*+) = **BCRC 15374**



伊紅亞甲藍培養基

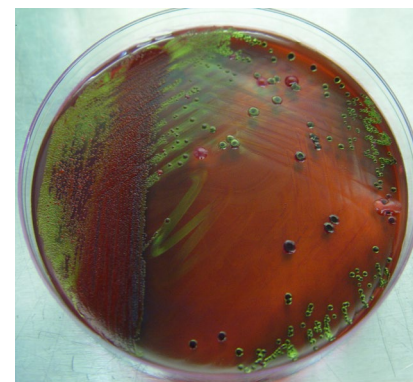
(Levine's Eosin-Methylene Blue Agar, L-EMB)

組成分	克數	功能
蛋白胨(peptone)	10 g	提供微生物生長所需之氮、礦物質和氨基酸
乳糖(lactose)	10 g	碳源(鑑別乳糖發酵/非乳糖發酵微生物)
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	2 g	緩衝pH值
伊紅Y (eosin Y)	0.4 g	鑑別指示劑、抑制革蘭氏陽性菌
亞甲藍(methylene blue)	0.065 g	鑑別指示劑、抑制革蘭氏陽性菌
洋菜(agar)	15 g	凝固劑
蒸餾水	1000 mL	

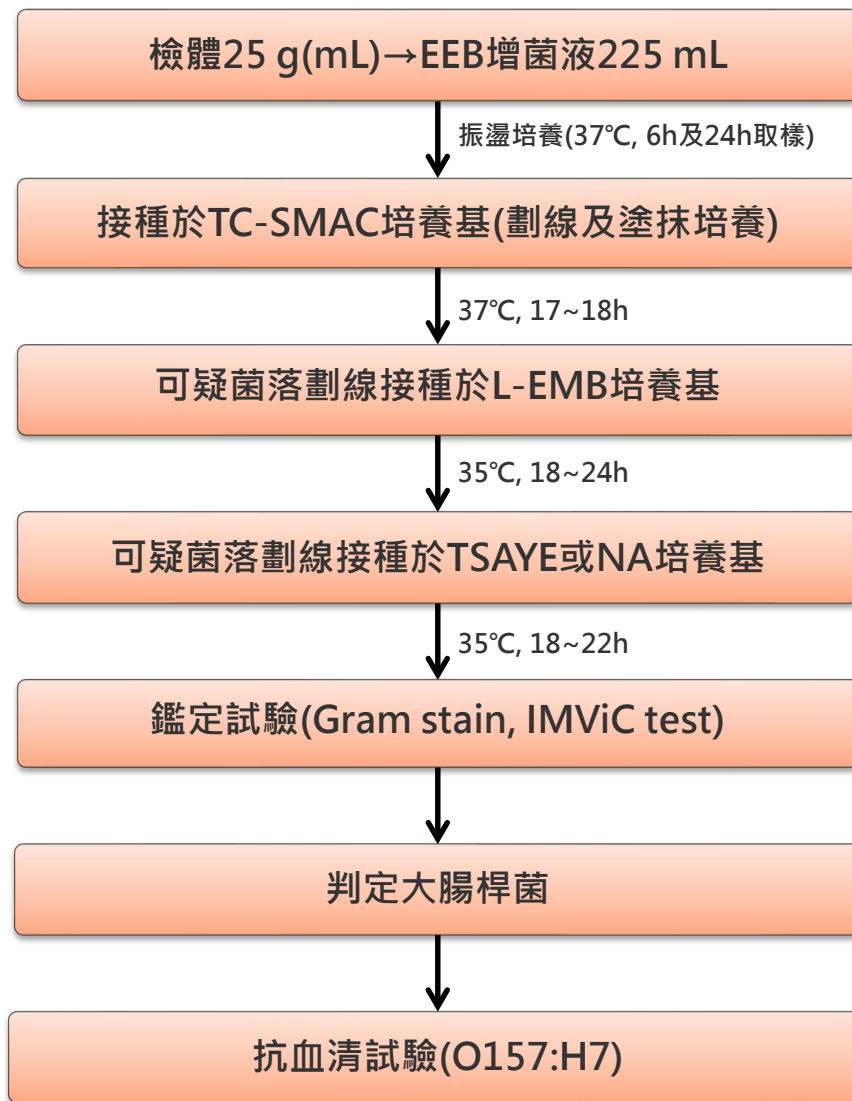
☆加熱沸騰溶解後，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.1±0.2。

☆培養基倒入培養皿前，搖動混合使絮狀沈澱物分散均勻，及避免氣泡產生。另培養皿倒入15~20 mL，凝固後打開皿蓋約1/2~1/4，使培養基表面略為乾燥。

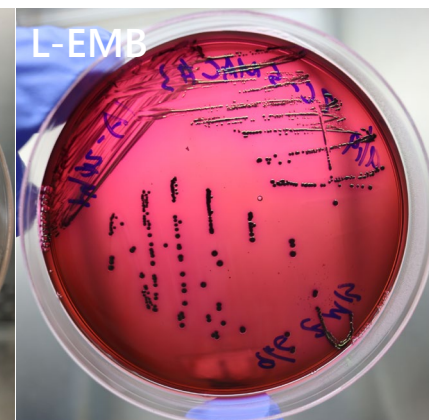
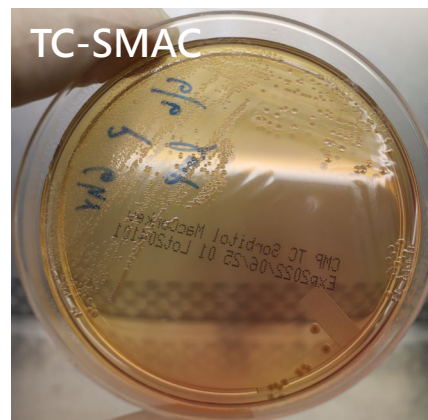
1. **Low selective** and differential medium containing **lactose** and two indicator dyes, **Eosin Y** and **Methylene Blue**
2. Lactose-fermenting organisms (e.g. Coliform)→**blue-black** colonies
Lactose nonfermenters (e.g. *Salmonella*, *Shigella*)→colorless, transparent or amber
3. Blue-black colonies←**eosin-methylene blue dye complex** when the pH drops down
4. *E. coli* may show a characteristic **green metallic luster** (metallic sheen)←high acid production from lactose



大腸桿菌O157:H7之檢驗流程

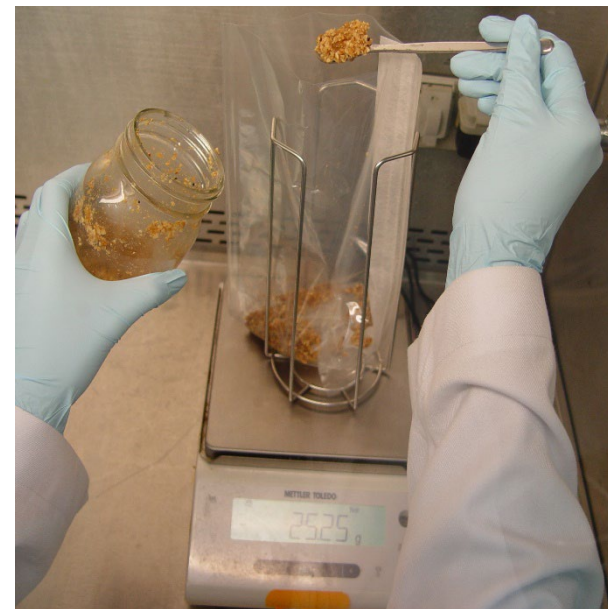
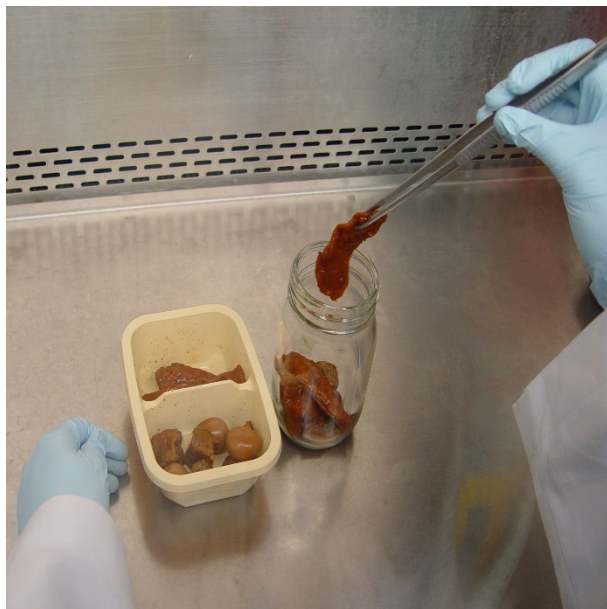


培養基	可疑菌落型態
TC-SMAC	淺灰色，菌落中心呈燻黑，直徑1~2 mm
L-EMB	中央呈暗紫色，扁平，帶或不帶金屬光澤



調製檢液

檢體混合均勻



採樣檢體置於無菌
均質瓶

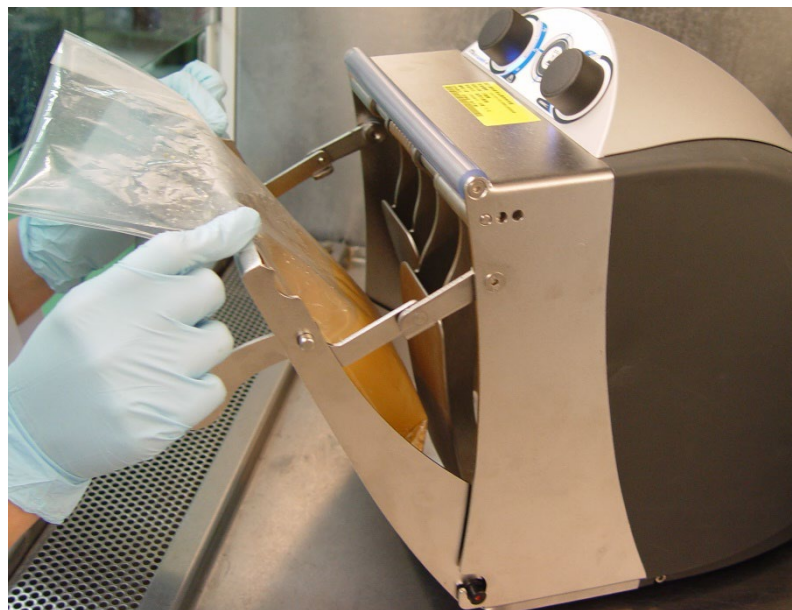


攪拌均質機
混合檢體



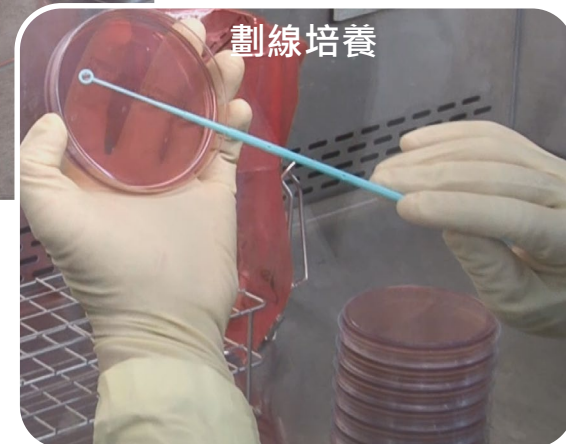
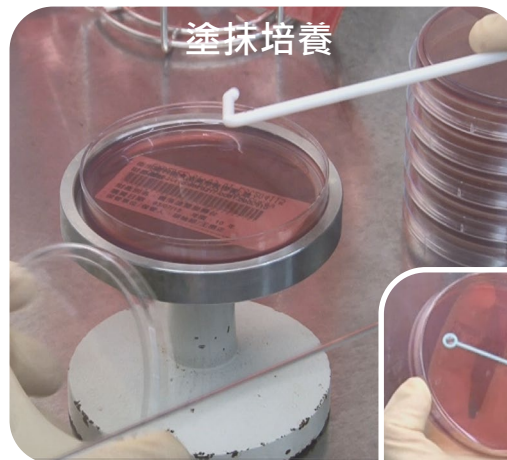
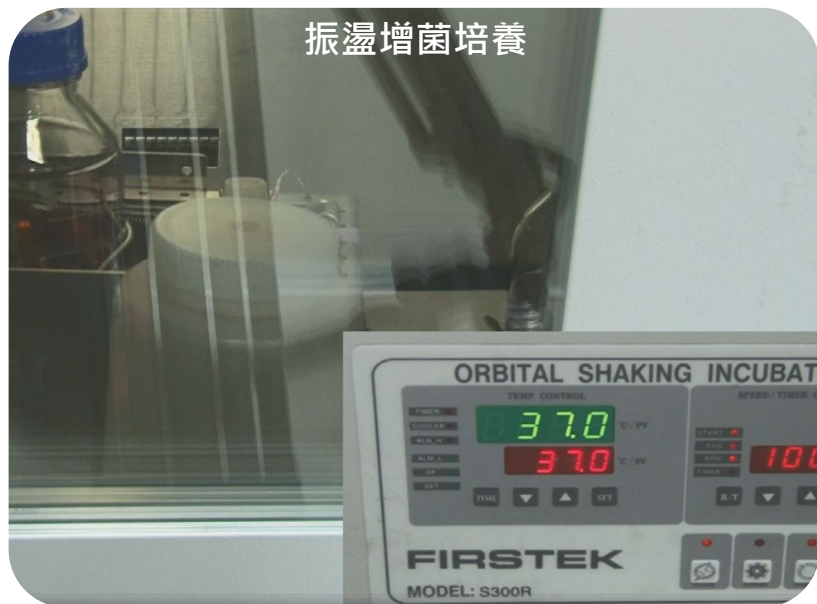
取檢體25 g (mL)

製備EEB增菌培養液



加入EEB增菌液250 mL → 鐵胃(或攪拌均質機)混合均勻

增菌培養→分離培養



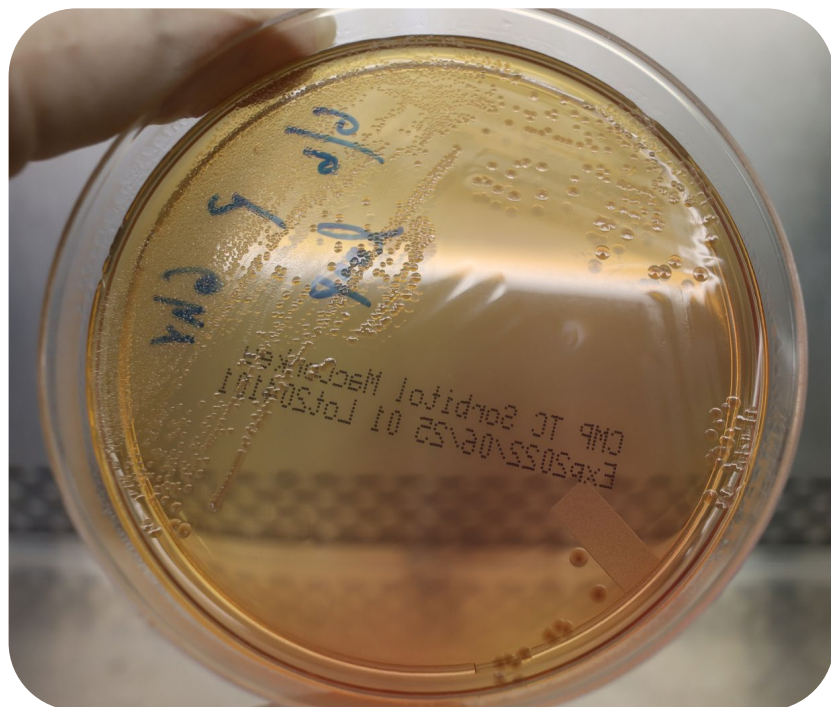
增菌培養：

EEB增菌培養液於37℃振盪培養6小時及24小時後進行取樣(如6小時之增菌培養液無可疑菌落，則取24小時之增菌培養液進行分離培養)

分離培養：

各取EEB增菌培養液0.1 mL及1 loop至TC-SMAC培養基分別進行塗抹及劃線培養，於37℃培養17~18小時。

分離培養→確定試驗



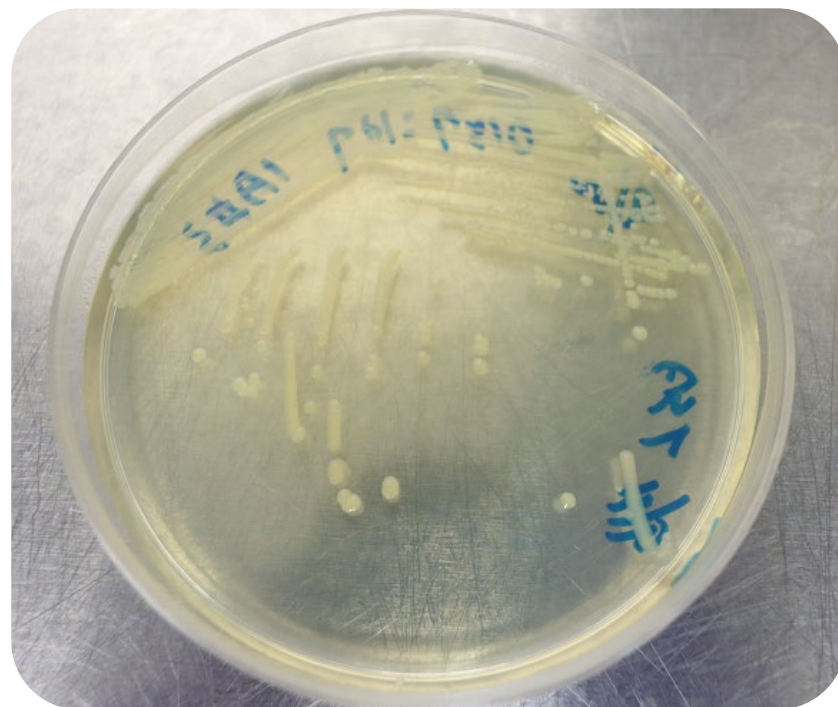
觀察菌落型態(TC-SMAC)：
可疑菌落為淺灰色，菌落中心呈燻
黑，直徑1~2 mm。

確定試驗：
挑取可疑菌株劃線於L-EMB培養基，
於35℃培養18~24小時。

分離培養→確定試驗



觀察菌落型態(L-EMB)：
可疑菌落為中央呈暗紫色，扁平，
帶或不帶金屬光澤。



接種菌株：
可疑菌落接種於TSAYE或NA培養
基，於35°C培養18~22小時。

鑑定試驗

□ 傳統鑑定方法

革蘭氏染色(Gram stain) + IMViC試驗

□ Vitek自動微生物鑑定系統

□ API 20E生化測試套組

※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。



革蘭氏染色(Gram stain)

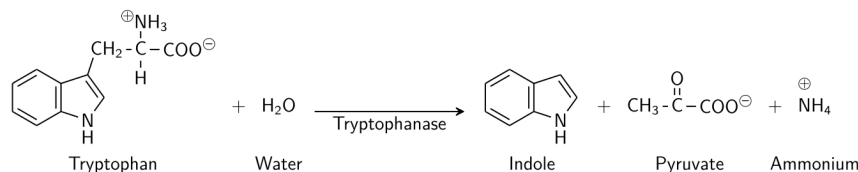
- (1) 鉤取菌體：載玻片→生理食鹽水→鉤取菌株→塗抹成薄抹片→風乾→微熱固定(迅速過火3~4次)
- (2) 初染：結晶紫液染1分鐘→水洗
- (3) 媒染：碘液作用1分鐘→水洗
- (4) 脫色：95%乙醇沖洗至不再有紫色褪出→水洗數秒
- (5) 複染：複染液複染30秒→水洗
- (6) 風乾
- (7) 鏡檢：深紫色→革蘭氏陽性菌；淡紅色→革蘭氏陰性菌
- (8) 判定：大腸桿菌為革蘭氏陰性，無芽胞，桿狀或短桿狀。

IMViC試驗

1. 吲哚試驗(Indole test)
2. 歐普氏試驗(VP test)
3. 甲基紅試驗(MR test)
4. 檸檬酸鹽利用試驗(Citrate utilization test)

吲哚試驗(Indole test)

- 原理：色胺酸(tryptophan)+色胺酸酶(tryptophanase)→吲哚+氨+丙酮酸
吲哚+柯瓦克氏試劑(Kovac's reagent)→**紅色**



- 流程：鉤菌接種於胰化蛋白胨培養液→增菌培養(35°C , $24\pm 2\text{hr}$)→柯瓦克氏試劑
0.2 mL→輕輕搖動後靜置10 min→上層呈現紅色者，為正反應
- 結果：大腸桿菌O157:H7通常為**正反應**，有時亦呈負反應

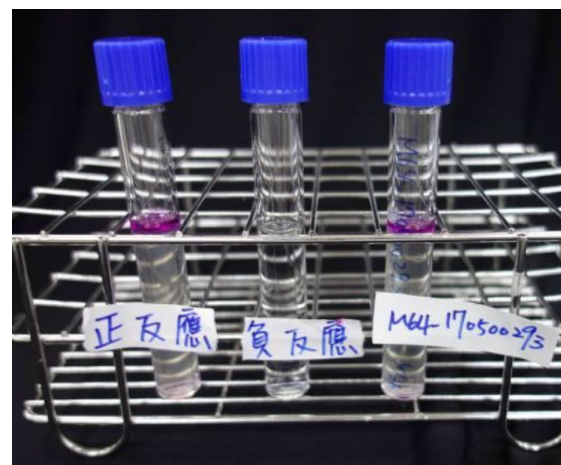
胰化蛋白胨培養液

胰化蛋白胨(tryptone)	10 g
蒸餾水	1000 mL

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

柯瓦克氏試劑(Kovac's reagent)

對-二甲基胺苯甲醛5 g溶於戊醇或異戊醇75 mL，再徐徐加入濃鹽酸25 mL，混合均勻後呈黃色，冷藏保存。



歐普氏試驗(VP test)

- 原理：葡萄糖→有機酸→丁二醇發酵路徑→中性產物(乙醯甲基甲醇, acetyl methyl carbinol)→**粉紅色**
- 流程：鉤菌接種於MR-VP培養液→增菌培養(35°C, 48±2hr)
培養液1 mL+VP試劑(A：0.6 mL+ B：0.2 mL)+少許肌酸→輕輕搖勻
→2~4hr後觀察結果→呈現粉紅色，為正反應
- 結果：大腸桿菌O157:H7為**負反應**

甲基紅-歐普氏培養液(MR-VP Broth)

蛋白胨(peptone)	7 g
葡萄糖(glucose)	5 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	5 g
蒸餾水	1000 mL

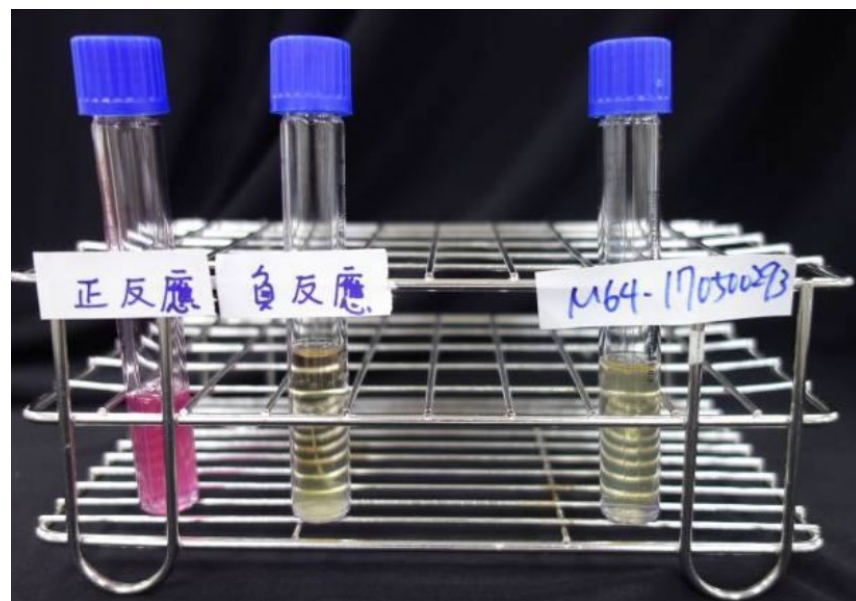
溶解後，分取5 mL注入試管中，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為 6.9 ± 0.2 。

歐普氏試劑

(Voges-Proskauer reagent, VP reagent)

溶液A： α -奈酚5 g溶於無水乙醇100 mL。

溶液B：氫氧化鉀40 g溶於蒸餾水，使成100 mL。



甲基紅試驗(MR test)

- 原理：葡萄糖→丙酮酸→混合酸路徑(mixed acid fermentation)
→大量酸性代謝產物→**紅色**
- 流程：MR-VP培養液再培養 48 ± 2 hr→加入甲基紅指示劑0.3 mL→輕輕搖勻
→紅色為正反應，黃色為負反應
- 結果：大腸桿菌O157:H7為正反應

甲基紅 (pH指示劑)

低於pH 4.4時

高於pH 6.2時

4.4 ⇒ 6.2

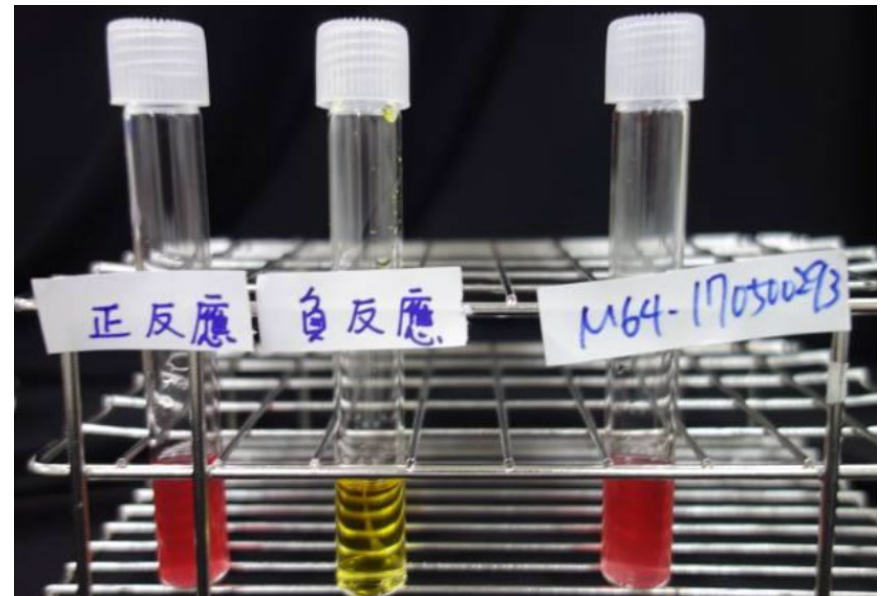
甲基紅-歐普氏培養液(MR-VP Broth)

蛋白胨(peptone)	7 g
葡萄糖(glucose)	5 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	5 g
蒸餾水	1000 mL

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

甲基紅指示劑

甲基紅0.1 g溶於95%乙醇300 mL，加蒸餾水至500 mL。



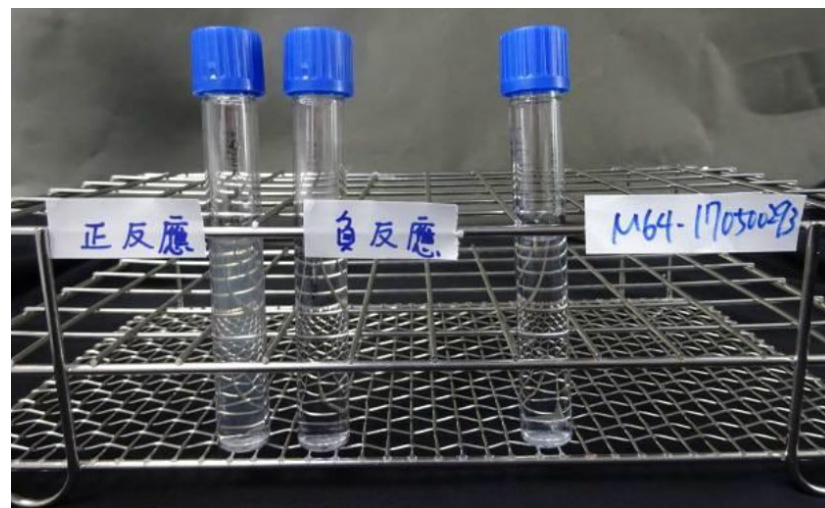
檸檬酸鹽利用試驗(Citrate utilization test)

- 原理：利用檸檬酸鈉作為唯一碳源→生長者呈現混濁狀
- 流程：鉤菌接種於柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液→增菌培養(35°C, 96±2hr)
→呈現混濁狀為正反應，澄清者為負反應
- 結果：大腸桿菌O157:H7為負反應

柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液(Koser's Citrate Broth)

磷酸氫銨鈉($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1.5 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	1 g
硫酸鎂($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
檸檬酸鈉($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3 g
蒸餾水	1000 mL

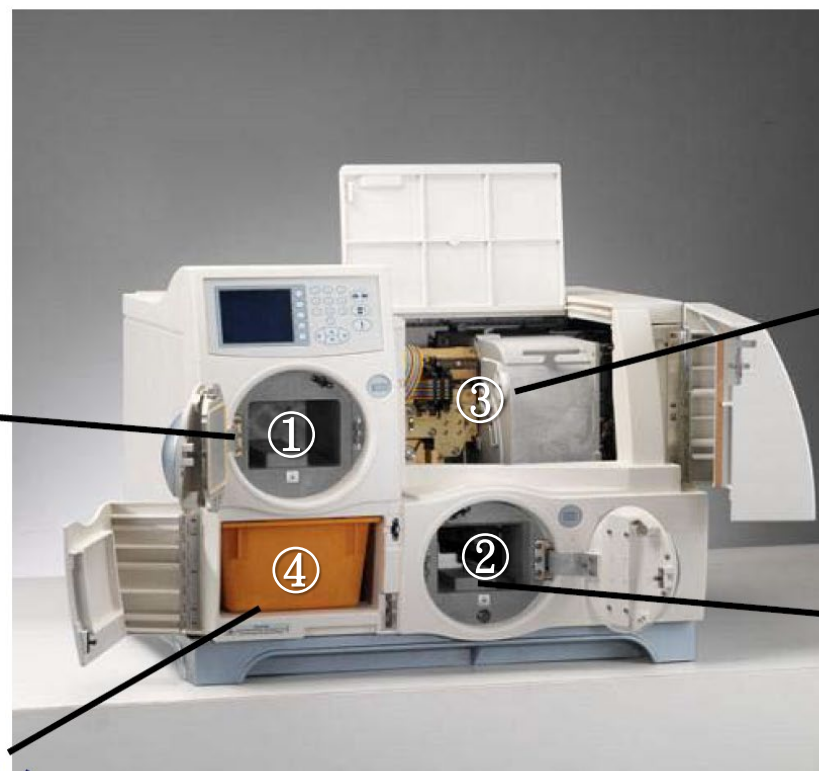
溶解後，分取10 mL注入試管中，以121°C滅菌15分鐘，最終pH值為 6.7 ± 0.2 。



大腸桿菌O157:H7之結果判定

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	陽性 (深紫色)	陰性 (淡紅色)	-
吡哌試驗	紅色	原色	+ / -
甲基紅試驗	紅色	黃色	+
歐普氏試驗	紅色	原色	-
檸檬酸鹽利用 試驗	混濁狀	澄清	-

Vitek自動微生物鑑定系統



真空添充倉

培養判讀倉

裝載倉

廢物倉



電子比濁計

Vitek自動微生物鑑定系統

革蘭氏陰性菌鑑定卡片(GN ID card)→47 test



VITEK® 2 GN ID card size
10 cm x 6 cm x 0.5 cm, 16 grams

VITEK® 2 GN ID card

Identification of Gram-negative bacilli

Rapid, accurate species-level identification of clinically important Gram-negative bacilli

- Identify more than 150 fermentative & non-fermentative Gram-negative bacilli
- **Convenient & safe:** closed, ready-to-use disposable system

Biochemical Details																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	+	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	(+)
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Vitek自動微生物鑑定系統

No.	Well Test	No.	Well Test
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE (APPA)	33	SACCHAROSE/SUCROSE (SAC)
3	ADONITOL (ADO)	34	D-TAGATOSE (dTAG)
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE (PyrA)	35	D-TREHALOSE (dTRE)
5	L-ARABITOL (IARL)	36	CITRATE (SODIUM) (CIT)
7	D-CELLOBIOSE (dCEL)	37	MALONATE (MNT)
9	BETA-GALACTOSIDASE (BGAL)	39	5-KETO-D-GLUCONATE (5KG)
10	H ₂ S PRODUCTION (H ₂ S)	40	L-LACTATE alkalization (ILATk)
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE (BNAG)	41	ALPHA-GLUCOSIDASE (AGLU)
12	Glutamyl Arylamidase pNA (AGLTp)	42	SUCCINATE alkalization (SUCT)
13	D-GLUCOSE (dGLU)	43	Beta-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE (NAGA)
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE (GGT)	44	ALPHA-GALACTOSIDASE (AGAL)
15	FERMENTATION/GLUCOSE (OFF)	45	PHOSPHATASE (PHOS)
17	BETA-GLUCOSIDASE (BGLU)	46	Glycine ARYLAMIDASE (GlyA)
18	D-MALTOSE (dMAL)	47	ORNITHINE DECARBOXYLASE (ODC)
19	D-MANNITOL (dMAN)	48	LYSINE DECARBOXYLASE (LDC)
20	D-MANNOSE (dMNE)	52	DECARBOXYLASE BASE (0DEC) ← Negative control
21	BETA-XYLOSIDASE (BXYL)	53	L-HISTIDINE assimilation (IHISa)
22	BETA-Alanine arylamidase pNA (BAIap)	56	COUMARATE (CMT)
23	L-Proline ARYLAMIDASE (ProA)	57	BETA-GLUCURONIDASE (BGUR)
26	LIPASE (LIP)	58	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.) (O129R)
27	PALATINOSE (PLE)	59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE (GGAA)
29	Tyrosine ARYLAMIDASE (TyrA)	61	L-MALATE assimilation (ImLTa)
31	UREASE (URE)	62	ELLMAN (ELLM)
32	D-SORBITOL (dSOR)	64	L-LACTATE assimilation (ILATa)

© Based on established **biochemical methods** and newly developed substrates measuring **carbon source utilization, enzymatic activities, and resistance**. There are 47 biochemical tests and one negative control well.



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

Vitek自動微生物鑑定系統

活化菌株

分離純化菌株劃線於TSAYE或NA培養基
(35°C, 18~22小時)

製備菌液

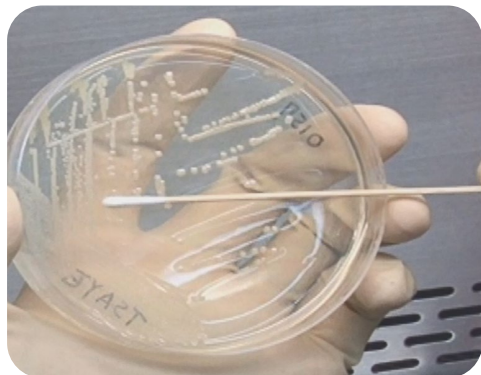
- 0.45%無菌食鹽水3 mL加入專用小管
- 無菌棉花棒沾取菌落，製備懸浮菌液
- 調整懸浮菌液濃度至0.50~0.63 McF(McFarland←比濁計測定)

Vitek

- GN(革蘭氏陰性菌)鑑定卡片
- 充填卡片(真空充填倉)
- 裝載卡片(裝載倉→讀取條碼→封口→載入卡片→移除卡片)
- 鑑定結果

Vitek自動微生物鑑定系統

棉花棒沾取菌落



調整菌液濃度



Vitek GN card



設定工作表



裝載GN卡片



充填GN卡片



Vitek鑑定報告

bioMérieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Sep 21, 2022 18:50 CST
Printed by: LabSuper

McFarland: (0.50 - 0.63)

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 2411933403	Expires: Mar 13, 2023 12:00 CST
	Completed: Sep 21, 2022 03:01 CST	Status: Final	Analysis Time: 9.97 hours
Organism Origin	VITEK 2		
Selected Organism	97% Probability	Escherichia coli O157	Confidence: Excellent identification
	Bionumber: 0405611140567241		
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:		% Probability	Confidence Level
Analysis Messages:		96~99%	Excellent
Confirm by serological tests		93~95%	Very Good
Highly pathogenic organism		89~92%	Good
Contraindicating Typical Biopattern(s)		85~88%	Acceptable
Escherichia coli O157		SAC(80),O129R(80)	

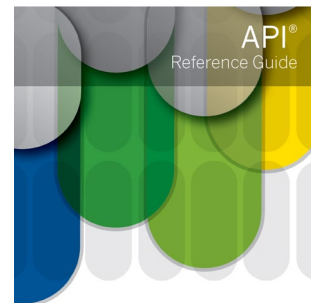
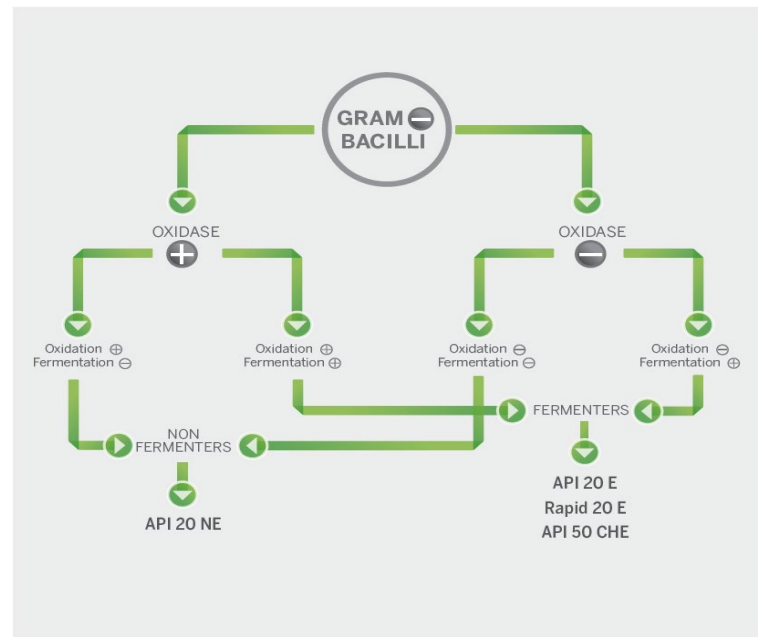
Biochemical Details																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	+	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	+	62	ELLM	+	64	ILATa	-			



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

API生化測試套組

	API® 20 E	API® 10 S	Rapid 20 E™	API® 20 NE			API® Staph	API® 20 Strep	API® Candida	API® 20 CAUX	API® 20 A	API® Coryne	API® Campy	API® Listeria	API® NH	API® 50 CHE	API® 50 CHL	API® 50 CHB		ID 32 E	Rapid ID 32 E	ID 32 GN	ID 32 Staph	Rapid ID 32 Strep	ID 32 C	Rapid ID 32 A
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>																										
<i>Enterobacter spp</i>		●																								
<i>Erwinia spp</i>	●																●									
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>												●												●		
<i>Escherichia coli</i>	●	●	●														●				●					



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

API 20E生化測試套組

劃線培養
(18~24 h)



製備菌液
(0.85% NaCl)



Suspension Medium 5ml

充填菌液

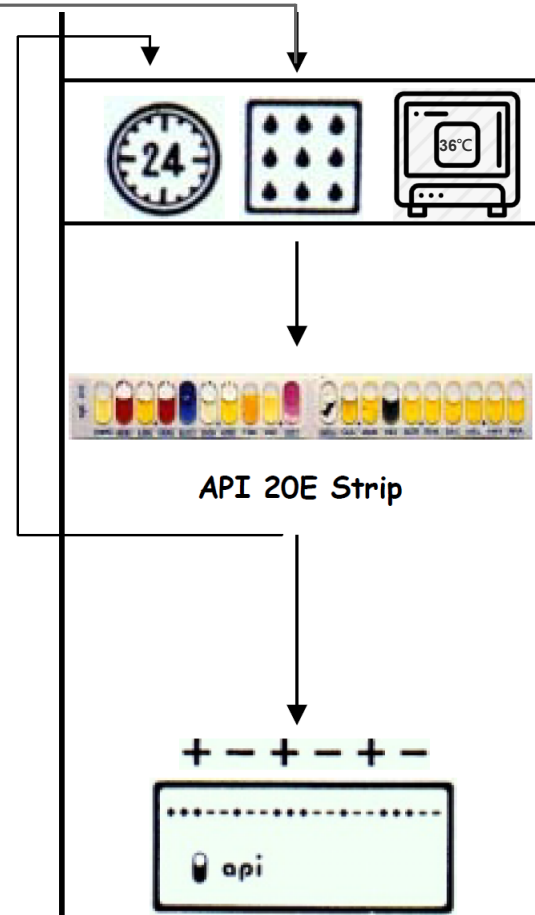


API 20E Strip

培養
($36\pm 2^{\circ}\text{C}$, 18~24 h)

加入試劑

結果判讀



API 20E生化測試套組

POS



NEG



影音教學

- (1) <https://www.youtube.com/watch?v=PXlis18qN9k>
- (2) https://www.youtube.com/watch?v=ew3amo02_b0



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

API 20E生化測試套組



Choose your language : English ▼

APIWEB™

Welcome to
APIWEB™

If you are registered
enter your login and password :

Login / E-mail

ywang

Password

.....

Go

[I have forgotten my password](#)

Welcome to APIWEB™

API

ID32

- ▶ API 10S
- ▶ API 20 A
- ▶ API 20 C AUX
- ▶ **API 20 E**
- ▶ API 20 NE
- ▶ API 20 STREP
- ▶ API 50 CHB
- ▶ API 50 CHE

- ▶ API 50 CHL
- ▶ API CAMPY
- ▶ API CANDIDA
- ▶ API CORYNE
- ▶ API LISTERIA
- ▶ API NH
- ▶ API STAPH
- ▶ RAPID 20 E

- ▶ ID 32 C
- ▶ ID 32 E
- ▶ ID 32 STAPH
- ▶ rapid ID 32 A
- ▶ rapid ID 32 E
- ▶ rapid ID 32 STREP

軟體判定鑑別結果

<https://apiweb.biomerieux.com/login>



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

API 20E生化測試套組

API 20 E V5.0
[Instructions](#)
[Color check](#)
Reset

+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
7			1			4			4			5			5			2		

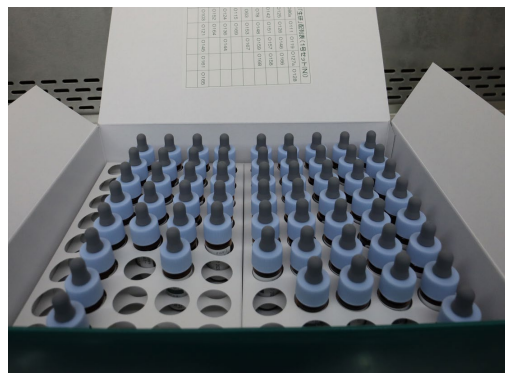
Confirm

GOOD IDENTIFICATION							
Strip	API 20 E V5.0						
Profile	7 1 4 4 5 5 2						
Note							

Significant taxa	% ID	T	Tests against				
Escherichia coli 1	97.9	0.67	ADH	1%			

Next taxon	% ID	T	Tests against				
Salmonella enterica ssp arizonae	1.9	0.31	CIT	75%	H2S	99%	IND 1%

大腸桿菌O157本體抗血清凝集試驗



鉤取適量菌落(約 3~5倍火柴棒頭)

懸浮於生理食鹽水3 mL

加熱處理(121°C, 15 min或100 °C, 1 hr)

離心(900 ×g, 20 min)→去除上清液

沉澱物加入生理食鹽水0.5 mL懸浮菌體

玻片滴入O157抗血清1滴

(測試組)

玻片滴入生理食鹽水30 µL

(控制組)

各吸取懸浮菌液5~10 µL，滴入二區部位

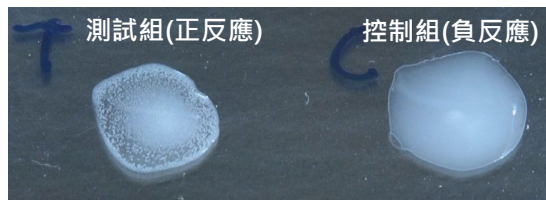
混合均勻，前後搖動約1分鐘

有無凝集現象？

no → 負反應(-)

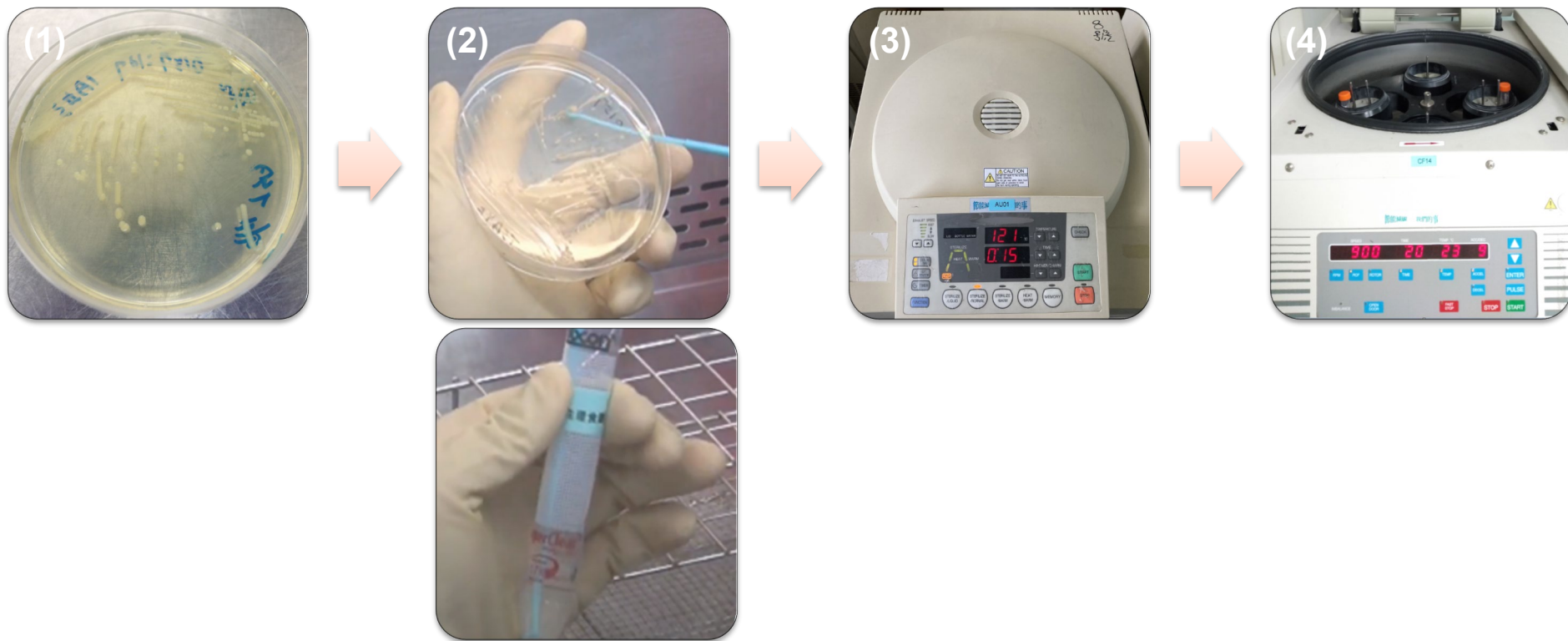
yes
正反應(+)

※血清型別試驗依產品
說明進行檢測



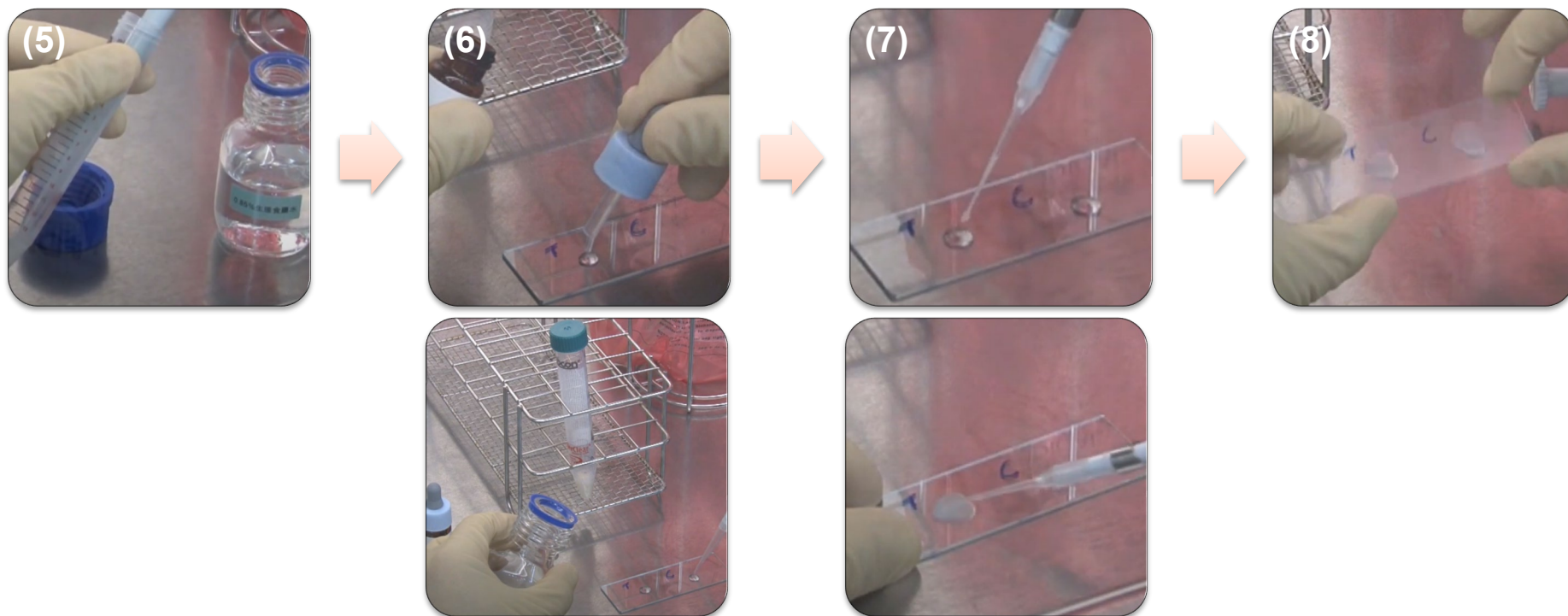
衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

大腸桿菌O157本體抗血清凝集試驗



1. 分離純化菌株劃線接種於TSAYE或NA培養基，於35°C培養24小時。
2. 鉤取適量菌落(約 3~5倍火柴棒頭)，懸浮於生理食鹽水3 mL。
3. 懸浮菌體以121°C加熱15分鐘(或100 °C, 1小時)。
4. 離心(900 ×g，20分鐘)，去除上清液。

大腸桿菌O157本體抗血清凝集試驗



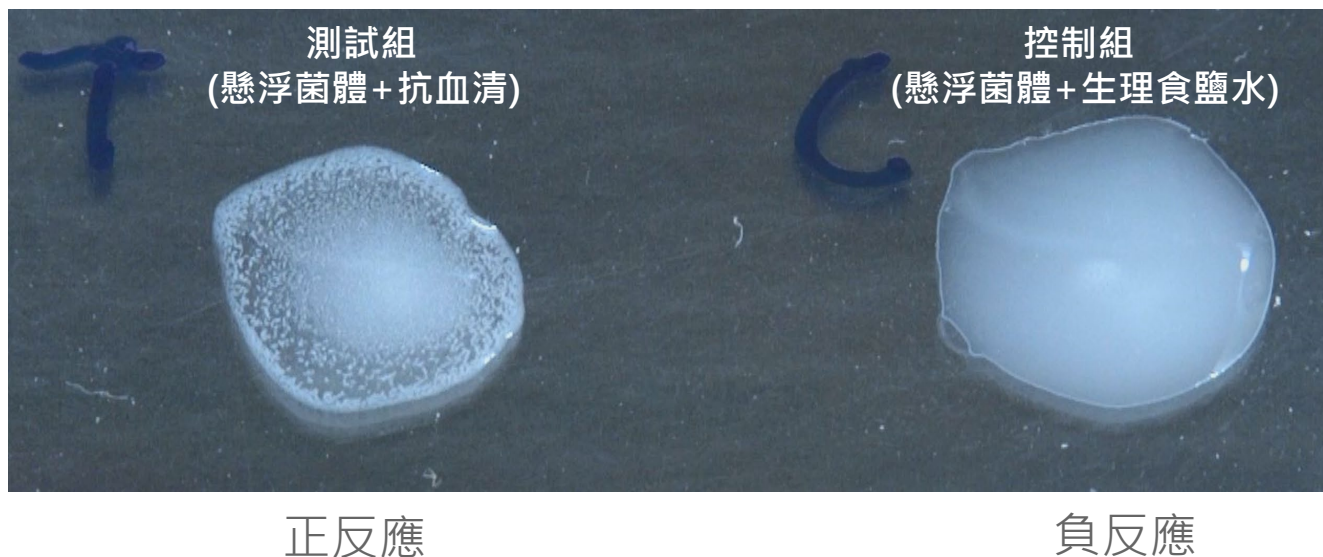
5.製備檢液：沈澱物以生理食鹽水0.5 mL懸浮菌體。

6.玻片滴入O157抗血清1滴(Test)，另以生理食鹽水30 μ L作為控制組(Control)。

7.各吸取菌株懸浮液5~10 μ L，滴入二區部位(Test/Control)，混合均勻。

8.前後搖動約1分鐘，觀察凝集反應結果。

大腸桿菌O157本體抗血清凝集試驗



結果判定

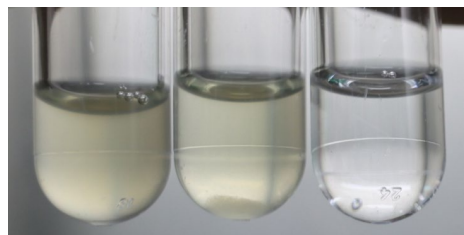
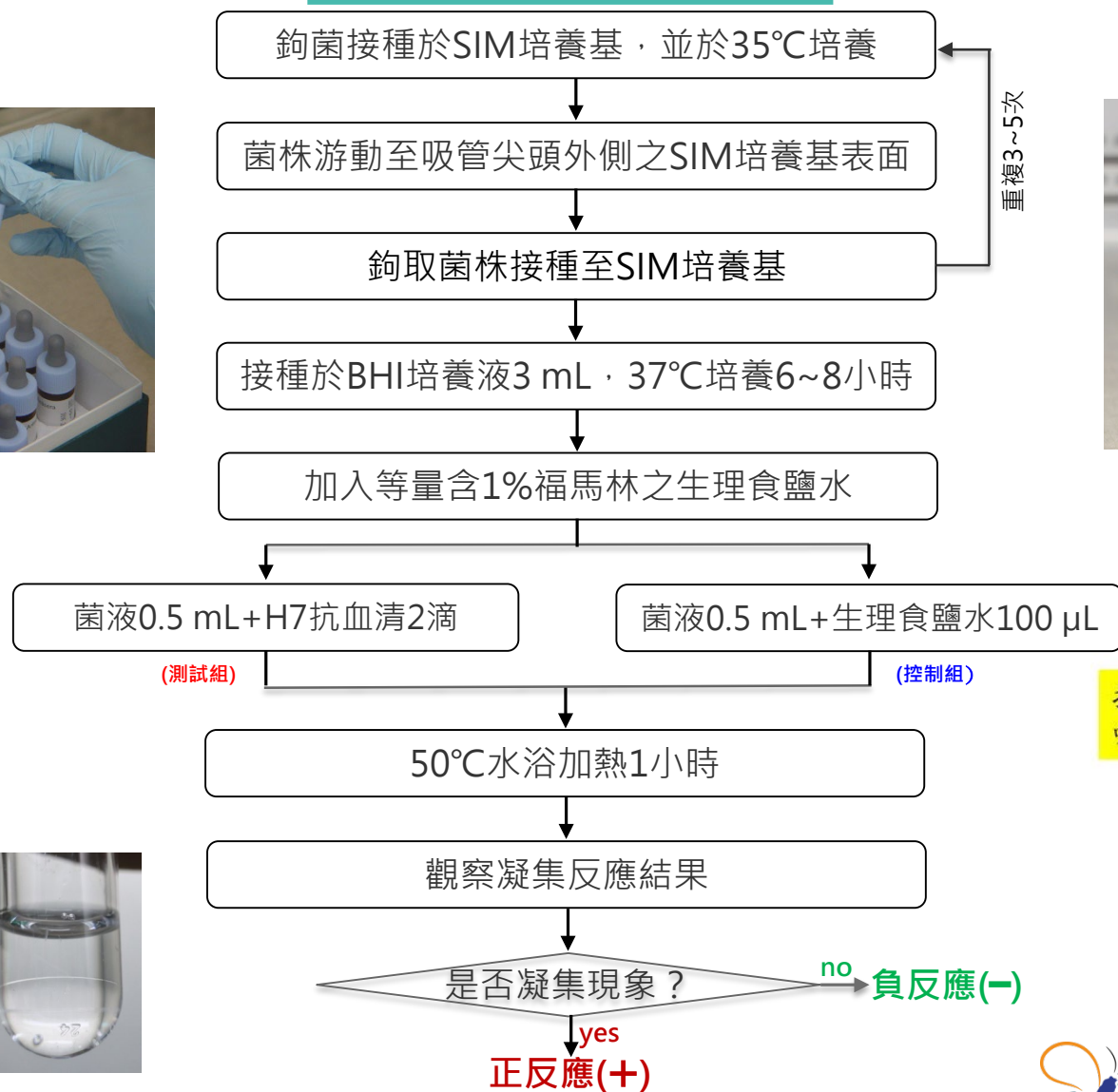
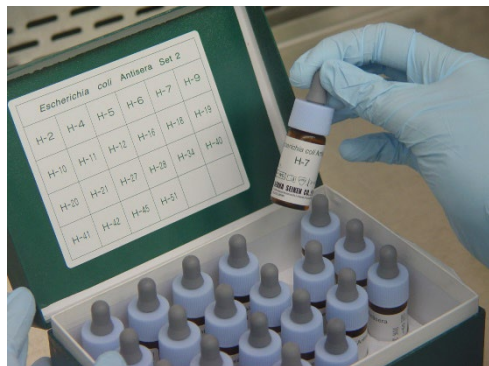
正反應：有凝集反應

負反應：無凝集反應

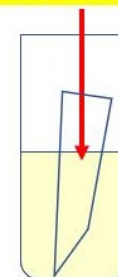
結果判定	測試組	控制組
正反應	+	-
負反應	-	-

※控制組須為負反應，若為正反應→重新挑菌後再行測試

大腸桿菌H7鞭毛抗血清試驗



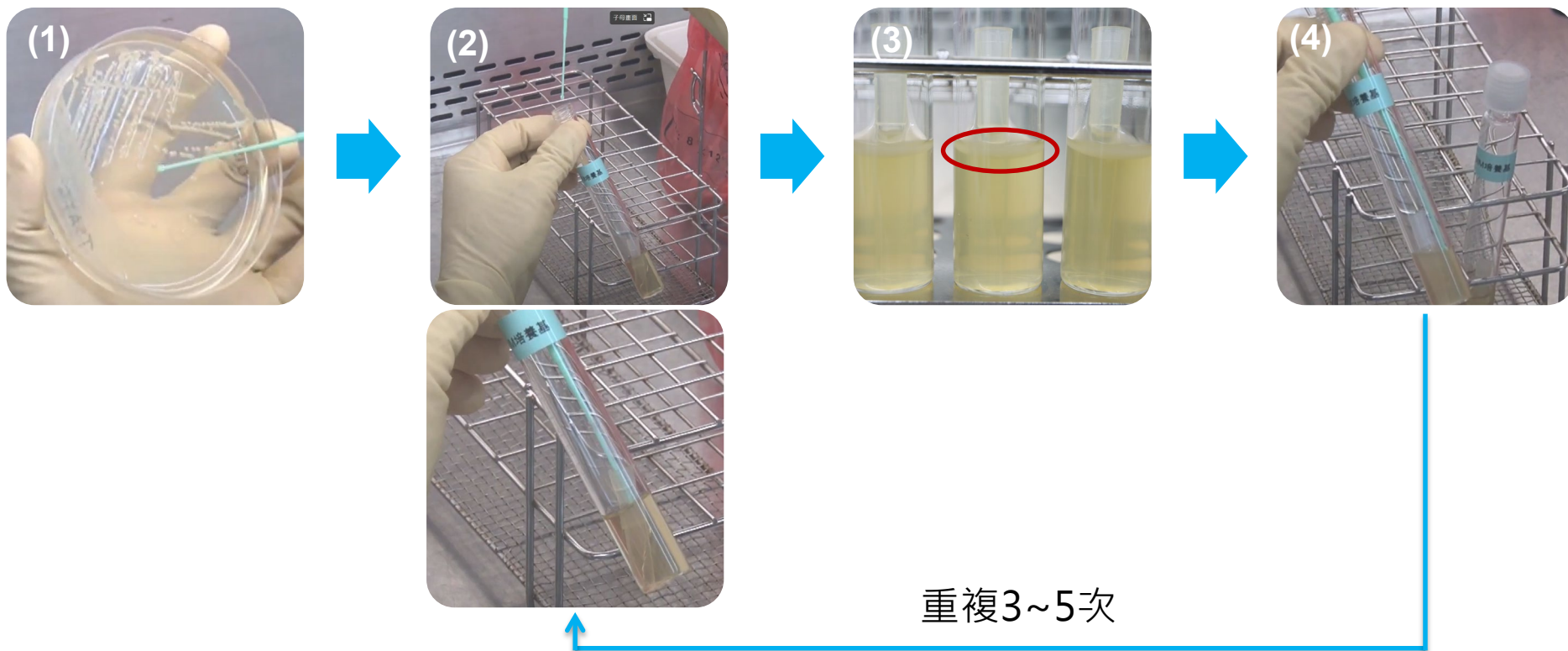
接種位置：
吸管尖頭之內側上端



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

大腸桿菌H7鞭毛抗血清試驗

Tube agglutination test for H antigen serotyping



1. 分離純化菌株劃線接種於TSAYE或NA培養基，於35°C培養24小時。
2. 鉤菌接種於0.2 mL吸管尖(tip)內側上端之SIM培養基(0.3% agar)，於35°C進行培養。
3. 培養至菌株游動至吸管尖外側之SIM培養基表面。
4. 鉤取外側表面之菌株再接種至另一含吸管尖之SIM培養基(此步驟重複3~5次)。

大腸桿菌H7鞭毛抗血清試驗

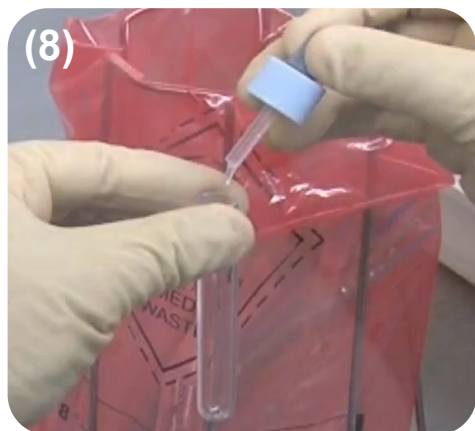
Tube agglutination test for H antigen serotyping



5. 鉤取游動至SIM培養基吸管尖外側表面之菌株。
6. 接種於BHI培養液3 mL，於37°C培養6~8小時。
7. 加入等量含1%福馬林之生理食鹽水，混合均勻。

大腸桿菌H7鞭毛抗血清試驗

Tube agglutination test for H antigen serotyping



8. 試管中滴入2滴H7鞭毛抗血清，另以生理食鹽水100 μ L作為控制組。
9. 各試管加入菌液0.5 mL，混合均勻。
10. 於50°C水浴加熱1小時，觀察凝集反應結果。

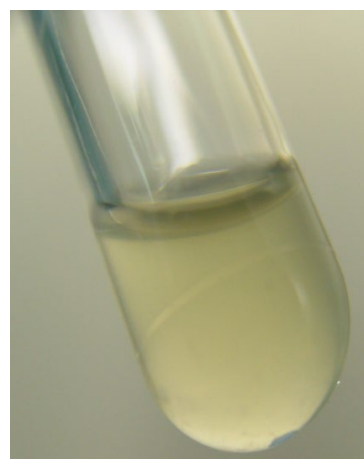
大腸桿菌H7鞭毛抗血清試驗

Tube agglutination test for H antigen serotyping



正反應

(Cotton-wool-like agglutination)



負反應

結果判定

正反應：有凝集反應

負反應：無凝集反應

結果判定	測試組	控制組
正反應	+	—
負反應	—	—

※控制組須為負反應

※若凝集反應不明顯時，再以50°C水浴加熱1小時後觀察結果

食品微生物之檢驗常見問答

食品檢驗技術及常見問答-食品微生物

Q

「食品微生物之檢驗方法－生菌數之檢驗」(MOHWM0014.01) 附中樣品編號4之生菌數計算舉例說明，10000倍稀釋檢液之菌落數分為523及487，為何生菌數計算結果為5100000 CFU/g？

A

生菌數為平板菌落數平均值乘其稀釋倍數，經計算其值為5050000 CFU/g，而生菌數結果表示時應將該數字第三位數字四捨六入(當第三位數字為五時，遇第二位數字為奇數時進位，偶數時捨去)，使其有效數為兩位。當第二位數字“0”為偶數時將第三位數“5”捨去，生菌數結果以5000000 CFU/g表示，本署已研議修正。

食品檢驗技術及常見問答-食品微生物

Q

有關「食品微生物之檢驗方法 - 腸桿菌科之檢驗」，若各稀釋倍數之所有平板中可疑菌落數均小於15個時，該選取那一稀釋倍數進行計數？另，可疑菌落少於5個時，該如何進行生化試驗？

A

1. 檢體進行腸桿菌科之檢驗，若各稀釋倍數之可疑菌落數均小於15個時，則以最低稀釋倍數或原液之所有平板菌落數進行計數及計算菌數，並據以出具檢驗報告。
2. 另，每片鉤取可疑菌落至少5個進行試驗，依生化試驗結果判定並計算出可疑菌落中含有腸桿菌科之比率(R值)，再計算出檢體中腸桿菌科之菌數。若可疑菌落少於5個時，則鉤取所有平板之可疑菌落進行生化試驗。

食品檢驗技術及常見問答-食品微生物

Q

依公告之食品微生物檢驗方法，是否可使用Vitek進行微生物鑑別試驗？

A

衛生福利部公告之食品微生物檢驗方法係以傳統生化試驗進行菌種鑑別，亦得使用經確效認可之生化檢測套組或生化鑑定系統(例如：Vitek)為之，惟檢驗結果有爭議時，以公告檢驗方法為準。爰此，建議將檢體檢出之陽性菌株冷凍保存，以利後續生化試驗之鑑定。

Thanks for Your Attention



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>