

食品微生物之檢驗方法—大腸桿菌 O157:H7 之檢驗

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

代碼：NLFDUBHEC 80

鍵語：食品、foods、大腸桿菌 O157:H7、*E. coli* O157:H7

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：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。

2.2.2 高壓滅菌釜：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。

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：通常使用者為 10 mL 及 1 mL，可正確量取 10 mL，1 mL 及 0.1 mL。

2.2.5 培養皿：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。

2.2.6 研鉢、杵：用以研磨試藥。

2.2.7 試管：15×150 mm 及 10×100 mm 試管。

2.2.8 培養箱：能維持內部溫差在±1.0°C 以內者。

2.2.9 水浴：能維持水溫溫差在±0.2°C 以內，且可振盪者。

2.2.10 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：能適用於無菌操作者。

2.2.11 接種用白金針或白金耳。

2.2.12 無菌棉花棒。

2.2.13 光源：一般日光燈及長波長 UV 燈。

2.2.14 pH 測定儀。

2.2.15 濾膜：孔徑為 0.45 μm 之濾膜，為親水性纖維素之材質。

2.2.16 藥勺。

2.2.17 曲玻棒：於進行塗抹培養時，使用之 L 型玻璃棒子。

2.2.18 蠟筆：能於塗寫、劃記載玻片時使用之蠟筆。

2.2.19 載玻片：能於染色、鏡檢時，載菌用之載玻片。

2.2.20 顯微鏡：能放大至 1000 倍之一般光學顯微鏡。

2.2.21 0.2 mL 吸管尖頭：0.2 mL 吸管尖頭，剪去尖頭，使該吸管尖頭長約 4 cm。

2.2.22 培養基

2.2.22.1 山梨糖醇—馬康奇洋菜培養基(Sorbitol-MacConkey Agar, SMAC):

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℃，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，在冰箱中貯存者應於使用前先檢查有無雜菌之污染。

2.2.22.2 伊紅亞甲藍洋菜培養基(Levine's Eosin- Methylene Blue Agar, L EMB):

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

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。

2.2.22.3 營養洋菜培養基(Nutrient Agar, NA):

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

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。

2.2.22.4 胰化酪蛋白大豆洋菜培養基(Trypticase Soy Agar, TSA):

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中，以 121℃，滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.3±0.2。

2.2.22.5 胰化酪蛋白大豆培養液 (Trypticase Soy Broth, TSB) :

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
蒸餾水	1000 mL

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。

2.2.22.6 胰化蛋白胨培養液(Tryptone or Tryptophane Broth) :

胰化蛋白胨(tryptone)	10.0 g
蒸餾水	1000 mL

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。

2.2.22.7 甲基紅—歐普氏培養液(MR-VP Broth) :

蛋白胨(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

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。

2.2.22.8 柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液(Koser's Citrate Broth) :

磷酸氫鉍鈉(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

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。

2.2.22.9 腦心浸出培養液 (Brain Heart Infusion Broth, BHI) :

牛腦浸出物(calf brain infusion)	200.0 g
牛心浸出物(beef heart infusion)	250.0 g
胨蛋白胨(proteose peptone)	10.0 g
氯化鈉(NaCl)	5.0 g

磷酸氫二鈉($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.5 g
葡萄糖(dextrose)	2.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分裝於三角瓶內或試管中，以 121°C ，滅菌 15 分鐘，最後 pH 值為 7.4 ± 0.2 ；製成培養基者，則添加 1.5% 洋菜。

2.2.22.10 TC-山梨糖醇—馬康奇洋菜培養基(Tellurite-Cefixime-Sorbitol MacConkey agar, TC SMAC)

亞碲酸鉀(potassium tellurite)	2.5 mg
西士敏(cefixime)	0.05 mg

先將亞碲酸鉀及西士敏溶解於 5 mL 蒸餾水後，經已滅菌之 $0.45 \mu\text{m}$ 孔徑之濾膜行過濾滅菌後，加至 $45 \sim 50^\circ\text{C}$ 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 $1/2 \sim 1/4$ ，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。

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

胰化酪蛋白大豆培養液(trypticase soy broth)	30.0 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	1.5 g
膽鹽(bile salts No.3)	1.12 g
新生黴素溶液(novobiocin solution)	0.2 mL
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°C ，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 $0.45 \mu\text{m}$ 孔徑之濾膜行過濾滅菌後，加至 $45 \sim 50^\circ\text{C}$ 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 $0.45 \mu\text{m}$ 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
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℃，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_2HPO_4)、磷酸氫二鈉($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)、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 -奈酚(α -naphthol)、檸檬酸鈉($Na_3 C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)、硫酸鎂($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)、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(amyI alcohol or isoamyI 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)、豚蛋白胨(proteose peptone)、酵母抽出物(yeast extract)、大豆蛋白胨(phytone peptone)採用微生物級。

2.2.24 革蘭氏染色液(Gram stain solution)

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 -奈酚溶於 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)

吲哚試驗(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 10x100 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，若呈現粉紅色，則

爲正反應(+)；否則爲負反應(-)。可疑 *E. coli* O157:H7 爲負反應。

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，若仍爲紅色，則爲正反應(+)；否則爲負反應(-)。可疑 *E. coli* O157:H7 爲正反應。

2.3.3.4 檸檬酸鹽利用試驗(Citrate utilization test)：自 TSAYE 或 NA 斜面培養基上鈎菌，接種於柯塞爾氏檸檬酸鹽培養液中，並置於 35℃ 培養 96 ± 2 小時後，若呈現混濁狀，則爲正反應(+)；若仍維持原澄清狀，則爲負反應(-)。可疑 *E. coli* O157:H7 爲負反應。

2.4 判定：

2.4.1 可能 *E. coli* O157:H7 者應符合下列之試驗結果：

(1) 革蘭氏染色陰性，無芽胞桿菌。

(2) IMViC 試驗其結果爲

吡咯試驗	甲基紅試驗	歐普氏試驗	檸檬酸鹽利用試驗
+	+	-	-
-	+	-	-

2.4.2 血清型別試驗：經生化試驗及鏡檢確認可疑爲 *E. coli* 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℃ 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(10x100 mm)中，一支試管(10x100 mm)進行 *E. coli* O157 抗血清試驗，另一支試管(10x100 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 (*E. coli* 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 *E. coli* O157 抗血清及數滴 0.5% 食鹽水，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 爲正反應。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℃ 加熱 1 小時或 121℃，加熱 15 分鐘，破壞菌體之莢膜後，再進行一次凝集試驗，有凝集反應者爲正反應。*E. coli* O157:H7 爲正反應。

2.4.2.2 鞭毛抗血清(*E. coli* H7 antisera test)：

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 培養基之位置爲 0.2 mL 吸管尖頭之內側上端，於 35℃ 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℃ 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，而不加抗血清作爲控制組。經

混合均勻後，置於 50~52℃ 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。

註(1)：革蘭氏染色方法：

- a. 製作抹片。
- b. 初染：將已固定之抹片用革蘭氏結晶紫液染 1 分鐘，水洗。
- c. 媒染：加革蘭氏碘液作用 1 分鐘後，水洗。
- d. 脫色：用 95% 乙醇洗至不再有紫色褪出時，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。