

食品微生物之檢驗方法－霍亂弧菌之檢驗

Methods of Test for Food Microorganisms- Test of *Vibrio cholerae*

第一部：霍亂弧菌之分離

1. 適用範圍：本方法適用於食品中霍亂弧菌之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經系列稀釋後，經增菌，續以選擇性培養基培養，配合霍亂毒素檢測之方法。
 - 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. 冰箱：維持 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.5. 冷凍櫃：保持 $-30\pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.6. 超低溫冷凍櫃：保持 $-70\pm 5^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 2.2.7. 培養箱：維持內部溫差在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.8. 水浴：能維持水溫溫差 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 2.2.9. 攪拌均質器(Blender)或鐵胃(Stomacher)：適用於無菌操作者。
 - 2.2.10. 離心機：供各式微量離心管離心用。
 - 2.2.11. 顯微鏡：放大至1000倍之一般光學顯微鏡。
 - 2.2.12. 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5 mg。
 - 2.2.13. 精密天平：靈敏度為0.001 g。
 - 2.2.14. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.15. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.16. 加熱器。
 - 2.2.17. 振盪器(Shaker)。
 - 2.2.18. 吸管輔助器(Pipette aid)。
 - 2.2.19. 吸管(Pipette)：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刻度。

- 2.2.20. 微量吸管(Micropipette)：10 μ L、20 μ L、200 μ L及1000 μ L。
- 2.2.21. 吸管尖(Tip)：已滅菌，10 μ L、20 μ L、200 μ L及1000 μ L。
- 2.2.22. 稀釋用容器：無菌袋或有90 mL、99 mL、500 mL及1000 mL標記附蓋(栓)之可滅菌廣口瓶。
- 2.2.23. 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、刮痕或其他缺點。
- 2.2.24. 接種針及接種環(直徑約3 mm)：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 2.2.25. 試管：10 $\times$ 100 mm、13 $\times$ 100 mm試管或其他適用者。
- 2.2.26. 塗抹曲棒：可滅菌者，直徑3~4 mm，塗抹區域45~55 mm。
- 2.2.27. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢用。
- 2.2.28. 燈箱：觀察血清試驗用。
- 2.2.29. 褐色試藥瓶。
- 2.2.30. 蠟筆：塗寫、劃記載玻片時使用。
- 2.2.31. 研鉢、杵：研磨試藥用。
- 2.2.32. 無菌濾膜：孔徑0.2 μ m或以下之親水性醋酸纖維膜。
- 2.2.33. 藥勺、剪刀、小刀、壓舌板及鑷子：可滅菌或可拋棄式者。
- 2.2.34. 無菌冷凍試管。
- 2.2.35. 試藥：
氯化鈉、氫氧化鈉、磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)、磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)、磷酸二氫鈉($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)、無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4 , anhydrous)、檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)、硫代硫酸鈉($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)、硫代硫酸鈉($Na_2S_2O_3$)、膽酸鈉(sodium cholate)、檸檬酸鈉(sodium citrate $\cdot 2H_2O$)、檸檬酸鐵(ferric citrate)、硫酸亞鐵($FeSO_4$)、草酸銨(ammonium oxalate)、沙黃O (safranin O)、碘化鉀(KI)、碘、結晶紫(crystal violet)、95%乙醇、O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl-pteridine)、O/129- PO_4 (2,4-diamino- 6,7-diisopropyl-pteridine phosphate salt)、四甲基對位苯二胺鹽酸鹽(N,N,N',N' -tetramethyl- p -phenylenediamine $\cdot 2HCl$)、硝基苯派喃半乳糖(o-nitrophenyl- β -D-galactoside, ONPG)、L-精胺酸鹽酸鹽(L-arginine hydrochloride)、L-離胺酸(L-lysine)、L-鳥胺酸(L-ornithine)、葡萄糖(glucose)、葡萄糖(dextrose)、蔗糖

(sucrose)、乳糖(lactose)、甘露糖(mannose)、甘露糖醇(mannitol)、阿拉伯糖(arabinose)、溴麝香草藍(bromthymol blue)、麝香草藍(thymol blue)、酚紅(phenol red)、溴甲酚紫(bromcresol purple)、液態氮、液態石臘油、礦物油、甘油及碳酸氫鈉(NaHCO_3)均採用化學試藥級。蛋白胨(peptone)、酵母抽出物(yeast extract)、胰化蛋白胨(tryptone)、牛膽汁(oxgall)、牛肉抽出物(beef extract)、月示蛋白胨(proteose peptone)、植物蛋白胨(phytone peptone)、胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)、胰化酪蛋白(trypticase)、動物膠(gelatin)及洋菜(agar)均採用微生物級。

2.2.36. 試劑

2.2.36.1. 氧化酶試劑(Oxidase test reagent)

稱取四甲基對位苯二胺鹽酸鹽1 g，以蒸餾水溶解使成100 mL，貯存於褐色試藥瓶，置入冰箱，使用期限以不超過1週為宜。

2.2.36.2. 30%氫氧化鈉溶液

稱取氫氧化鈉30 g，以蒸餾水溶解使成100 mL。

2.2.36.3. 1.0 M磷酸二氫鈉溶液

稱取磷酸二氫鈉6.9 g，溶於蒸餾水45 mL，徐徐注入30%氫氧化鈉溶液約3 mL，調整pH值為7.0，再加入蒸餾水使成50 mL，貯存於4°C冰箱中備用。

2.2.36.4. 硝基苯派喃半乳糖試劑(ONPG reagent)

稱取硝基苯派喃半乳糖80 mg，溶於37°C蒸餾水15 mL，再加入1.0M磷酸二氫鈉溶液5 mL，貯存於4°C冰箱備用，使用時須加溫至37°C。

2.2.36.5. 液態石臘油或礦物油

取液態石臘油或礦物油20~50 mL，裝入附蓋玻璃容器中約1/2滿，以121°C滅菌30分鐘。

2.2.36.6. 1 N氫氧化鈉溶液

稱取氫氧化鈉4 g，以蒸餾水溶解使成100 mL。

2.2.36.7. 50%甘露糖溶液

稱取甘露糖5 g，以蒸餾水溶解使成10 mL，以無菌濾膜過濾。

2.2.36.8. 0.85%生理食鹽水

稱取氯化鈉8.5 g，以蒸餾水溶解使成1000 mL，分裝於稀釋用容器中，經121°C滅菌15分鐘。

2.2.36.9. 10%碳酸氫鈉溶液

稱取碳酸氫鈉100 g，以蒸餾水溶解使成1000 mL，以無菌濾膜過濾。

2.2.37. O/129紙錠(O/129 disks)

2.2.37.1. O/129 溶液

稱取O/129 0.15 g (或O/129-PO₄ 0.208 g)，溶於無菌蒸餾水使成10 mL，即為15 mg/mL O/129溶液。取15 mg/mL O/129溶液1 mL，溶於無菌蒸餾水使成14 mL，即為1.0 mg/mL O/129溶液。

2.2.37.2. O/129 紙錠

吸取15 mg/mL O/129溶液10 µL，加入已滅菌之直徑5-6 mm小圓片濾紙，即為O/129 150 µg紙錠；吸取1.0 mg/mL O/129溶液10 µL，加入已滅菌之直徑5-6 mm小圓片濾紙，即為O/129 10 µg紙錠。避光、自然風乾，並貯存於無菌褐色瓶置於冰箱中備用，儲存期限1年。

2.2.38. 革蘭氏染色液(Gram stain solution) ^(註1)

2.2.38.1. 哈克氏(Hucker's)結晶紫液

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。

2.2.38.2. 革蘭氏碘液

取碘化鉀2 g及碘1 g，置於研鉢中，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，研磨至碘化鉀和碘完全溶於蒸餾水，將此溶液注入褐色試藥瓶，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵，以此洗液併入，使溶液達300 mL，供作媒染劑。

2.2.38.3. 哈克氏複染液

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加蒸餾水90 mL，供作複染劑。

註1：革蘭氏染色液因放久可能失效，購買成品時，需注意其保存期限，自行配製者，應檢查其染色效果。

2.2.39. 抗血清

霍亂弧菌本體(O)抗血清(O antisera)：O1及O139型抗血清。

2.2.40. 逆相被動乳膠凝集(Reversed latex agglutination, RPLA)套組
可檢驗霍亂毒素。

2.2.41. 稀釋液

2.2.41.1. 2%或3%氯化鈉溶液：取氯化鈉20 g或30 g，溶於蒸餾水
1000 mL中，分裝於試管或廣口瓶內，經121°C滅菌15分
鐘。

2.2.41.2. 磷酸緩衝食鹽水(Phosphate buffered saline, PBS)：取氯化
鈉7.7 g、無水磷酸氫二鈉0.7 g及磷酸二氫鉀0.2 g，溶於
蒸餾水1000 mL，以1N氫氧化鈉溶液調整pH值為7.4，以
121°C滅菌15分鐘。

2.2.42. 培養基

2.2.42.1. 精胺酸葡萄糖斜面培養基(Arginine-glucose slant, AGS)

蛋白胨(peptone)	5.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	3.0 g
胰化蛋白胨(tryptone)	10.0 g
氯化鈉	20.0 g
葡萄糖(glucose)	1.0 g
L-精胺酸鹽酸鹽(L-arginine hydrochloride)	5.0 g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	0.5 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.3 g
溴甲酚紫(bromocresol purple)	0.02 g
洋菜(agar)	13.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱溶解後，分取適量注入試管，以121°C滅菌10~12
分鐘後作成斜面培養基，最終pH值為6.9±0.1。

2.2.42.2. 硫代硫酸鹽-檸檬酸鹽-膽鹽-蔗糖培養基

(Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, TCBS)

酵母抽出物(yeast extract)	5.0 g
蛋白胨(peptone)	10.0 g
蔗糖(sucrose)	20.0 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	10.0 g
膽酸鈉(sodium cholate)	3.0 g
檸檬酸鈉(sodium citrate $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	10.0 g

牛膽汁(oxgall).....5.0 g
氯化鈉.....10.0 g
檸檬酸鐵(ferric citrate).....1.0 g
溴麝香草藍(bromthymol blue).....0.04 g
麝香草藍(thymol blue).....0.04 g
洋菜(agar).....15.0 g
蒸餾水.....1000 mL
加熱溶解(不可高壓滅菌)，冷卻至50℃時，注入培養皿，
放置隔夜或使用前以37~45℃乾燥。

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

牛肉抽出物(beef extract).....3.0 g
酵母抽出物(yeast extract).....3.0 g
蛋白胨(peptone).....15.0 g
胨蛋白胨(proteose peptone).....5.0 g
氯化鈉.....20.0或30.0 g
乳糖(lactose).....10.0 g
蔗糖(sucrose).....10.0 g
葡萄糖(glucose).....1.0 g
硫酸亞鐵(FeSO_4).....0.2 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).....12.0 g
蒸餾水.....1000 mL
加熱溶解後，分取適量注入試管至1/3滿，以121℃滅菌
15分鐘，最終pH值為7.4±0.2，滅菌後作成斜面培養基。

2.2.42.4. 胰化酪蛋白大豆鹽類培養液(Trypticase soy broth, 含2% 或3%NaCl之TSB)

植物蛋白胨(phytone peptone).....3.0 g
胰化酪蛋白胨(trypticase peptone).....17.0 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4).....2.5 g
氯化鈉.....20.0或30.0 g
葡萄糖(dextrose).....2.5 g
蒸餾.....1000 mL
加熱溶解後，分取適量注入試管或三角瓶，以121℃滅

菌15分鐘，最終pH值為 7.3 ± 0.2 。

2.2.42.5. 胰化酪蛋白大豆培養基(Trypticase soy agar, 含2%或3%NaCl之TSA)

植物蛋白胨(phytone peptone).....5.0 g
胰化酪蛋白胨(trypticase peptone).....15.0 g
氯化鈉.....20.0或30.0 g
洋菜(agar).....15.0g
蒸餾水.....1000 mL
加熱溶解後，分取適量注入試管或三角瓶，以 121°C 滅菌15分鐘，最終pH值為 7.3 ± 0.2 。

2.2.42.6. Hugh-Leifson葡萄糖培養液(Hugh-Leifson glucose broth, HLGB)

蛋白胨(peptone).....2.0 g
酵母抽出物(yeast extract).....0.5 g
氯化鈉.....30.0 g
葡萄糖(glucose).....10.0 g
溴甲酚紫(bromcresol purple).....0.015 g
洋菜(agar)3.0 g
蒸餾水.....1000 mL
加熱溶解後，分裝試管，以 121°C 滅菌15分鐘，最終pH值為 7.4 ± 0.2 。

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

蛋白胨(peptone)5.0 g
酵母抽出物(yeast extract).....3.0 g
氯化鈉.....20.0或30.0 g
葡萄糖(glucose)1.0 g
溴甲酚紫(bromcresol purple).....0.02 g
蒸餾水.....1000 mL
溶解後，取L-精胺酸(L-arginine hydrochloride) 5 g溶解於上述之培養液中，分取適量注入試管內，以 121°C 滅菌10分鐘，最終pH值為 6.5 ± 0.2 ，配製成脫羧酶培養液。含L-離胺酸及L-鳥胺酸之脫羧酶培養液配製方法亦同。對照組除脫羧酶基礎培養液外，不需添加任何物質。

2.2.42.8. 溴甲酚紫培養液(Bromcresol purple broth)

蛋白胨(peptone)10.0 g
牛肉抽出物(beef extract)3.0 g
氯化鈉.....20.0或30.0 g
溴甲酚紫(bromcresol purple)0.04 g
蒸餾水.....1000 mL
溶解後，分取2.5 mL注入試管內，以121℃滅菌10分鐘，
最終pH值為7.0±0.2。冷卻後，各試管分別加入經無菌
濾膜過濾之50%甘露糖溶液278 µL，使培養液中甘露糖
之最終濃度為5% (w/v)。含乳糖、甘露糖醇、蔗糖及阿
拉伯糖之溴甲酚紫培養液配製方法亦同。

2.2.42.9. 動物膠鹽類培養基(Gelatin salt agar, GS)

蛋白胨(peptone)4.0 g
酵母抽出物(yeast extract).....1.0 g
動物膠(gelatin).....15.0 g
氯化鈉.....30.0 g
洋菜(agar)15.0 g
蒸餾水.....1000 mL
加熱溶解，以121℃滅菌15分鐘，最終pH值為7.2±0.2。

2.2.42.10. 鹼性蛋白胨水(Alkaline peptone water, APW)

蛋白胨(peptone).....10.0 g
氯化鈉.....10.0 g
蒸餾水.....1000 mL
溶解後分注入試管，以121℃滅菌10分鐘，最終pH值為
8.5±0.2。

2.2.42.11. 鹼性蛋白胨鹽類培養液(Alkaline peptone salt broth, APS)

蛋白胨(peptone)10.0 g
氯化鈉.....30.0 g
蒸餾水.....1000 mL
溶解後，分注入試管，以121℃滅菌10分鐘，最終pH
值為8.5±0.2。

2.2.42.12. 克氏雙糖鐵培養基(Kligler iron agar, KIA)

胰蛋白胨(proteose peptone).....20.0 g

氯化鈉.....20.0或30.0 g
乳糖(lactose).....20.0 g
葡萄糖(glucose).....1.0 g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate).....0.5 g
硫代硫酸鈉($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).....0.5 g
酚紅(phenol red).....0.025 g
洋菜(agar).....15.0 g
蒸餾水.....1000 mL
溶解後，分取適量注入試管至1/3滿，以121℃滅菌15分鐘，最終pH值為7.4±0.2。

2.2.42.13. AKI培養液(AKI medium)

蛋白胨(peptone).....15.0 g
酵母抽出物(yeast extract).....4.0 g
氯化鈉.....5.0 g
蒸餾水.....970 mL
加熱溶解，以121℃滅菌15分鐘，待冷卻後加入經無菌過濾之10%碳酸氫鈉溶液30 mL，最終pH值為7.4±0.2。

2.2.42.14. 氯化鈉胰化酪蛋白培養液(Salt trypticase broth, STB)

胰化酪蛋白或胰化蛋白胨(trypticase or tryptone) 10.0 g
蒸餾水.....1000 mL
加氯化鈉於此培養液內，配成含0、3、6及8%之不同濃度，分取適量注入試管內。以121℃滅菌15分鐘，最終pH值為7.2±0.2。

2.3. 檢液

2.3.1. 檢體之處理：魚類檢體之取樣包括表面組織、內臟及鰓。貝類檢體，取10至12個貝類之內部組織均質之。甲殼類檢體之取樣包括整個動物體，可能時包括動物體中間部分如鰓及內臟組織。

2.3.2. 檢液之調製：稱取檢體50 g於攪拌均質器內，加入稀釋液450 mL，高速攪拌2分鐘，作成10倍稀釋檢液。

2.3.3. 系列稀釋檢液：使用已滅菌之吸管，吸取2.3.2.節之10倍稀釋檢液10 mL，加至稀釋液90 mL中，依序作成一系列適當之100、1000、10000倍等稀釋檢液。

2.3.4. 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 APW 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震盪至塗抹物頭部之棉絮鬆開，其溶出液供作檢液。

2.4. 鑑別試驗

2.4.1. 增菌培養^(註2)：將2.3.節之稀釋檢液及(或)原液充分搖勻後，分別吸取三連續倍數之稀釋檢液各1 mL，接種於APW或APS培養液10 mL中，每稀釋檢液各接種2支，於35±2℃培養6～15小時。

註2: 牡蠣檢體，需再稱取檢體25 g，置於攪拌均質器內，加入APW培養液2475 mL，高速攪拌2分鐘。於42±0.2℃水浴隔夜培養。

2.4.2. 分離培養：由2.4.1.節之APW或APS培養液面起深1 cm處，分取一接種環(直徑約3 mm)量菌液，劃線接種在TCBS培養基表面，於35±2℃隔夜培養，觀察菌落之型態。可疑霍亂弧菌者，其菌落較大(直徑約2～3 mm)、平滑、呈黃色、略平、中央不透明外緣透明。鈎取至少3個可疑菌落，接種於含2%或3%NaCl之TSA培養基，於35±2℃隔夜培養，再另行接種於含2%或3%NaCl之TSB培養液，於35±2℃隔夜培養，以備進行生化特性試驗。

2.4.3. 生化試驗

2.4.3.1. 初步試驗

2.4.3.1.1. 精胺酸葡萄糖斜面培養基(AGS)試驗

由含2%或3%NaCl之TSA培養基上鈎菌，以斜面劃線及穿刺法接種於AGS斜面培養基，於35±2℃隔夜培養，霍亂弧菌典型反應呈現鹼性(紫色)斜面和微酸性(淡黃色)底部。

2.4.3.1.2. 三糖鐵培養基(TSI)試驗

自TCBS培養基或含2%或3%NaCl之TSA培養基上鈎菌，以斜面劃線及穿刺法接種於TSI培養基，於35±2℃隔夜培養，觀察培養基變化情形，若為可疑霍亂弧菌者，其斜面應呈黃色(酸性)少數呈紅色(鹼性)，底部亦呈黃色(酸性)。

2.4.3.1.3. 革蘭氏染色(Gram stain)

(1)加適量無菌0.85%生理食鹽水於載玻片上，以接種針(或

環)自2.4.2.節之含2%或3%NaCl之TSA培養基上鈎取適當菌株，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：用95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再以水沖洗，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。霍亂弧菌為革蘭氏陰性，菌體呈彎曲或直短棒狀，不產芽胞。

2.4.3.1.4. 動物膠培養基(GS)試驗

自TCBS培養基或含2%或3%NaCl之TSA培養基上鈎菌接種於GS培養基，於 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培養12~24小時，霍亂弧菌可在GS上生長，菌落周圍會出現不透明環。

2.4.3.1.5. 細胞色素氧化酶試驗(Cytochrome oxidase test)

自含2%或3%NaCl之TSA培養基上刮取少量細菌(避免使用鎳鉻製品)，置於含有氧化酶試劑濕潤濾紙上，正反應會慢慢有深紫色出現(10秒鐘內)，否則為負反應，霍亂弧菌為正反應。

2.4.3.1.6. O/129敏感性試驗(O/129 sensitivity test)

將含O/129 10 μg 和150 μg 之濾紙圓片置於已接種菌之含2%或3%NaCl之TSA培養基，或將菌接種在已含有O/129 10 $\mu\text{g/mL}$ 和150 $\mu\text{g/mL}$ 之含2%或3%NaCl之TSA培養基。經 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養，霍亂弧菌應對含O/129 10 μg 及150 μg 者均具抑制作用之敏感性。

2.4.3.1.7. 克氏雙糖鐵培養基(KIA)試驗

自TCBS培養基或含2%或3%NaCl之TSA培養基上鈎菌，以斜面劃線及穿刺法接種於KIA培養基，於 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 隔夜培養，觀察培養基變化情形，若為可疑霍亂弧菌者，其斜面應呈紅色(鹼性)，底部呈黃色(酸性)。

2.4.3.2. 確認試驗

2.4.3.2.1. 葡萄糖氧化與發酵試驗(Glucose oxidation-fermentation test)

自含2%或3%NaCl之TSA斜面培養基上鈎菌，接種於二支HLGB培養液，其中一支注入已滅菌之液態石蠟或礦物油至高約1~2 cm，於35±2℃培養二天後，觀察其反應情形，HLGB培養液顏色呈黃色者為正反應，紫色為負反應，霍亂弧菌為正反應。

2.4.3.2.2. 精胺酸二水解酶試驗(Arginine dihydrolase test)

自含2%或3%NaCl之TSA斜面培養基上鈎菌，分別接種於精胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養液中，接種後分別注入已滅菌之液態石蠟或礦物油，覆蓋表面高約1~2 cm，需鬆蓋，於35±2℃培養4天，每24小時觀察一次。精胺酸脫羧酶培養液呈紫色，且脫羧酶基礎培養液呈黃色者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌為負反應。

2.4.3.2.3. 離胺酸脫羧酶試驗(Lysine decarboxylase test)

自含2%或3%NaCl之TSA斜面培養基上鈎菌，分別接種於離胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養液中，接種後注入已滅菌之液態石蠟或礦物油，覆蓋表面高約1~2 cm，需鬆蓋，於35±2℃培養4天，每24小時觀察一次。離胺酸脫羧酶培養液呈紫色且脫羧酶基礎培養液呈黃色者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌為正反應。

2.4.3.2.4. 鳥胺酸脫羧酶試驗(Ornithine decarboxylase test)

自含2%或3%NaCl之TSA斜面培養基上鈎菌，分別接種於鳥胺酸脫羧酶培養液及脫羧酶基礎培養液中，接種後注入已滅菌之液態石蠟或礦物油，覆蓋表面高約1~2 cm，需鬆蓋，於35±2℃培養4天，每24小時觀察一次。鳥胺酸脫羧酶培養液呈紫色，且脫羧酶基礎培養液呈黃色者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌為正反應。

2.4.3.2.5. 嗜鹽性試驗(Halophilism test)

自含2%或3%NaCl之TSB培養液上鈎菌，分別接種於含0、3、6及8%氯化鈉之STB培養液中，於35±2℃隔夜培

養觀察。霍亂弧菌可在0%及3%氯化鈉生長良好，但在6及8%氯化鈉生長極緩慢或不能生長。

2.4.3.2.6. 42°C 生長試驗(Growth test, 42°C)

由培養24小時之含2%或3%NaCl之TSB中鈎菌接種於含2%NaCl之TSB培養液後，於42°C水浴中培養24小時。培養液呈混濁狀者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌為正反應。

2.4.3.2.7. 發酵試驗(Fermentation test)：

自含2%或3%NaCl之TSA斜面培養基上鈎菌，接種於含各種糖類之溴甲酚紫培養液中，注入已滅菌之液態石蠟或礦物油，覆蓋表面高約1~2 cm，於35±2°C培養4~5天，每24小時觀察一次，顏色由紫色轉變為黃色為正反應，否則為負反應。霍亂弧菌對甘露糖醇、甘露糖及蔗糖應為正反應，對阿拉伯糖及乳糖為負反應。

2.4.3.2.8. 硝基苯派喃半乳糖苷試驗(ONPG test)：

自2.4.3.1.2.節之可疑霍亂弧菌之TSI斜面培養基(或其他含乳糖的培養基)上鈎菌至含有已滅菌之0.85%生理食鹽水0.2 mL之試管中，作成濃懸浮液後，再加入一片浸過硝基苯派喃半乳糖苷試劑之小圓片濾紙，輕輕搖動後，於35±2°C培養6~24小時，小圓片濾紙變成黃色者為正反應，否則為負反應，霍亂弧菌為正反應。

2.4.4. 血清學試驗(Serological test)

細菌本體抗原抗血清凝集試驗[Agglutination test of antigen with somatic (O) antisera test]：

取約3~5 倍火柴棒頭之菌量，以3%氯化鈉溶液0.5 mL懸浮菌體，取菌液備用。用蠟筆在載玻片上劃成數個適當格位，置入少量菌液到每一個格位的下方位置，再於格位之上方各滴入1 滴各種體抗原抗血清，於另一格位滴入一滴2%或3%氯化鈉溶液作對照組，反覆傾斜1分鐘，使充分混合均勻。正反應者應呈凝集現象，對照組則無；負反應者，則兩組均無凝集現象。

2.4.5. 霍亂毒素(Cholera toxin, CT)試驗^(註3)

可採用市售之逆相被動乳膠凝集(reversed latex agglutination, RPLA)套組進行霍亂毒素檢驗。自含2%或3%NaCl之TSA培養基上鈎菌，接種於AKI培養液10 mL中，於35~37°C培養

16~20小時，取培養液5~7 mL以8000 × g離心10分鐘。取上清液通過0.2 μm之無菌濾膜，收集濾液備用。以逆相被動乳膠凝集套組檢驗濾液是否含有霍亂毒素，操作方法依照各商品說明書。

註3: 霍亂毒素基因即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)霍亂毒素基因(ctx gene)試驗依照本檢驗方法第二部：霍亂弧菌之即時PCR檢測。

2.5. 菌種保存

將菌株以穿刺法接種於長期保存培養基或MTM培養基，於35±2℃培養24小時，旋緊蓋子或注入已滅菌之液態石蠟或礦物油，以避免水分散失，在初次生長後，置於室溫，不必冷藏。若要長期保存，則取經含2%或3%NaCl之TSB培養液培養6~12小時之菌液1 mL，加入無菌甘油0.1 mL至無菌冷凍試管，以液態氮冷凍或立刻置入-70℃冷凍櫃保存。

2.6. 判定：霍亂弧菌陽性者，應符合下表所列之結果

試驗或基質		正反應	負反應	霍亂弧菌反應 ^a
三糖鐵培養基試驗	斜面	黃色	紅色	+
	底部	黃色	紅色	+
克氏雙糖鐵瓊脂培養基試驗	斜面	黃色	紅色	—
	底部	黃色	紅色	+
革蘭氏染色		陽性 (深紫色)	陰性 (淡紅色)	—
42℃培養生長試驗		混濁	澄清	+
硝基苯派喃半乳糖苷試驗		黃色	原色	+
葡萄糖氧化與發酵試驗		黃色	紫色	+
細胞色素氧化酶試驗		深紫色	非深紫色	+
精胺酸二水解酶試驗		紫色	黃色	—
離胺酸脫羧酶試驗		紫色	黃色	+
鳥胺酸脫羧酶試驗		紫色	黃色	+
嗜鹽性	0%及 3%氯化鈉	可生長	不生長或生長極緩慢	+
	6%及 8%氯化鈉	可生長	不生長或	—

試驗			生長極緩慢	
加鹽動物膠培養基試驗		生長	不生長	+
精胺酸葡萄糖斜面培養基試驗	斜面	黃色	紫色	—
	底部	黃色	紫色	+
發酵試驗	蔗糖	黃色	紫色	+
	乳糖	黃色	紫色	—
	甘露糖	黃色	紫色	+
	阿拉伯糖	黃色	紫色	—
	甘露糖醇	黃色	紫色	+
O/129 敏感性試驗	10 µg	生長	不生長	S ^b
	150 µg	生長	不生長	S ^b
細菌本體抗原抗血清凝集試驗		凝集	無凝集	A/nA ^c

a: 「+」表示80%以上菌株為正反應，「—」表示80%以上菌株為負反應。

b: 「S」表示具抑制作用，不生長之敏感性。

c: 「A」表示與細菌本體抗原抗血清(O1型或O139型)凝集，「nA」表示無法與細菌本體抗原抗血清(O1型及O139型)凝集。

2.7. 以上試驗可參考使用國際間認可之市售培養基、生化檢測套組或鑑定系統，惟檢驗結果有爭議時，應以本檢驗方法為準。

第二部：霍亂弧菌之real-time PCR檢測

1. 適用範圍：本方法適用於霍亂弧菌之菌種及毒素基因鑑別。
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 3 後，以即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)鑑別菌種及毒素基因之方法。
 - 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 × g，並具 4℃ 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℃)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. 水浴裝置：溫差±1℃以內者。
 - 2.2.12. 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 鑑別試驗用引子及探針^(註2)

2.3.2.1. 霍亂弧菌菌種鑑別基因(標的基因：*ompW*)

引子F：5'-CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG-3'

引子R：5'-GAAGTTATAACCACCCGCG-3'

探針P：

5'-(FAM)-TACTGACAACATCAGTTTTGAAGTCCT
CGCTCGT-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小588 bp

2.3.2.2. 霍亂弧菌毒素基因(標的基因：*ctx*)

引子F：5'-CGTAATAGGGGCTACAGAGATA-3'

引子R：5'-GGTATTCTGCACACAAATCAG-3'

探針P：

5'-(FAM)-CAGCAGCAGATGGTTATGGATTGGCAG
GT-(BHQ1)-3'

PCR增幅產物大小399 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。

2.3.2.3. 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：*Vibrio cholerae* 標準菌株或其 DNA。

2.4. 器具及材料^(註3)

2.4.1. 微量吸管(Micropipette)：10 µL、20 µL、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

5 μ M引子F	2.0 μ L
5 μ M引子R.....	2.0 μ L
5 μ M探針.....	1.0 μ L
TaqMan® Fast Reagents Starter Kit	12.5 μ L
檢體DNA溶液.....	5.0 μ L
無菌去離子水	2.5 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2.4.1.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，震盪混合均勻，以15000 $\times$ g離心3分鐘，去除上清液，重複操作一次。續將沉澱物加入無菌去離子水1 mL，震盪混合均勻，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

取一接種環之分離菌株，置入含有無菌去離子水1 mL之已滅菌1.5 mL離心管中，震盪混合均勻，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/ μL 及稀釋倍數，即為檢體DNA原液濃度。DNA溶液純度則以 $\text{O.D.}_{260}/\text{O.D.}_{280}$ 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 μL 入real-time PCR反應盤的反應孔中，各別加入檢體DNA溶液5 μL ，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。

2.7.1.1. 霍亂弧菌菌種鑑別基因

步驟	溫度	時間
1. 熱活化	95°C	20 sec
2. 最初變性	95°C	5 sec
3. 黏接、延展	65°C	45 sec
步驟2至步驟3，共進行45個循環反應。		

2.7.1.2. 霍亂弧菌毒素基因

步驟	溫度	時間
1. 熱活化	95°C	20 sec
2. 最初變性	95°C	5 sec
3. 黏接、延展	60°C	30 sec
步驟2至步驟3，共進行45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。

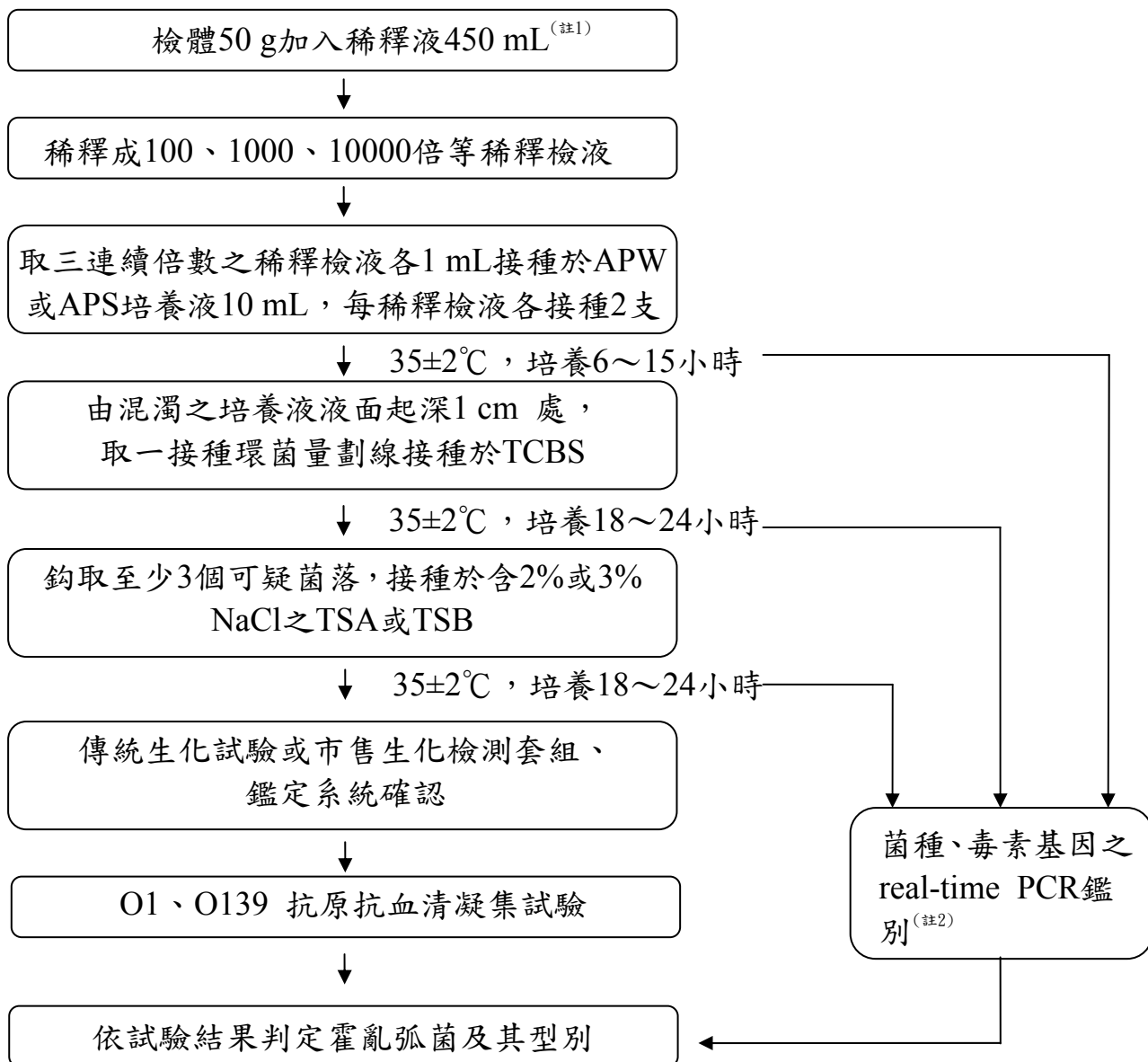
2.7.3. 確認

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增幅產物為霍亂弧菌毒素基因之基因片段，可確認該檢體中含有霍亂弧菌毒素基因。

註5：本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：第二部霍亂弧菌之real-time PCR檢測可視需要執行。

檢驗流程圖



註1：牡蠣檢體，需再稱取檢體25 g，置於攪拌均質器內，加入APW培養液2475 mL，於42±0.2°C水浴隔夜培養。

註2：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。