

食品微生物之檢驗法—腸炎弧菌之檢驗
Methods of Test for Food Microbiology —
Test of *Vibrio parahaemolyticus* (3)

代碼：NLFDUBV1P82

鍵語：食品、Foods、腸炎弧菌、*Vibrio parahaemolyticus*

1. 適用範圍：本方法適用於食品中腸炎弧菌之檢驗

2. 檢驗方法

2.1. 工作環境：工作平臺須寬敞、潔淨、光線良好(操作平臺光度為 100 呎燭光)，室內通風良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。微生物密度之要求為：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 乾熱滅菌器。

2.2.2 高壓滅菌釜。

2.2.3 冰箱：保持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.4 吸管：已滅菌，1 mL 吸管應有 0.01 mL 之刻度；5 及 10 mL 吸管應有 0.1 mL 刻度。

2.2.5 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。

2.2.6 稀釋用容器：附蓋之 1000 mL 廣口瓶及 100 mL 稀釋瓶或無菌袋。

2.2.7 培養箱：能維持內部溫差在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 以內者。

2.2.8 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以內者。

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

2.2.10 曲玻棒。

2.2.11 離心機：轉速可達 4000 rpm 以上。

2.2.12 離心管：已滅菌，5 mL。

2.2.13 試管：13×100 mm 及 10×100 mm 試管或其他合適者。

2.2.14 低溫冷凍櫃：能保持 $-70 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.15 無菌冷凍試管。

2.2.16 游標尺(Vernier calipers)。

2.2.17 顯微鏡：能放大至 1000 倍之一般光學顯微鏡。

2.2.18 載玻片及蓋玻片：能於染色、鏡檢時，載(蓋)菌用之載(蓋)玻片。

2.2.19 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金，鉑鉍或鉻線，或可拋棄式接種環。

2.2.20 天平：靈敏度為 0.1 g。

2.2.21 精密天平：靈敏度為 0.001 g。

2.2.22 振盪器。

2.2.23 藥勺、剪刀、小刀、鑷子、牙籤：可滅菌。

2.2.24 pH 測定儀。

2.2.25 燈箱：觀察血清試驗用。

2.2.26 酒精燈、濾紙及褐色試藥瓶。

2.2.27 蠟筆：塗寫、劃記載玻片時使用。

2.2.28 研鉢、杵：研磨試藥用。

2.2.29 微量吸管：已滅菌，可吸取體積量為 200 μL 以上者。

2.2.30 無菌濾膜：已滅菌，孔徑 0.2 μm 之親水性醋酸纖維膜。

2.2.31 培養基：

2.2.31.1 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(NaCl)	20.0 g
葡萄糖(glucose)	1.0 g
精胺酸鹽酸鹽(L-arginine hydrochloride)	5.0g
檸檬酸鐵銨(ferric ammonium citrate)	0.5g
硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)	0.3 g
溴甲酚紫(bromcresol purple)	0.02 g
洋菜(agar)	13.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解，分取適量注入試管中，以 121 $^{\circ}\text{C}$ 滅菌 10~12 分鐘，最終 pH 值為 6.9 $\pm$ 0.1。

2.2.31.2 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(NaCl)	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

加熱攪拌溶解，不可高壓滅菌，冷卻至 50 $^{\circ}\text{C}$ 時，注入培養皿。

2.2.31.3 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(NaCl)	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

加熱攪拌溶解後，分取適量注入試管中至 1/3 滿，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2，滅菌後作成斜面培養基。

2.2.31.4 胰化酪蛋白大豆食鹽培養液(Trypticase soy broth, TSB-2 或 3%NaCl)

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(NaCl)	20.0 或 30.0 g
葡萄糖(dextrose)	2.5 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分取適量注入試管或三角瓶中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。

2.2.31.5 胰化酪蛋白大豆食鹽培養基(Trypticase soy agar, TSA-2 或 3%NaCl)

植物蛋白胨(phytone peptone)	5.0 g
胰化酪蛋白胨(trypticase peptone)	15.0 g
氯化鈉(NaCl)	20.0 或 30.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分取適量注入試管或三角瓶中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.3±0.2。

2.2.31.6 運動性試驗培養基(Motility test medium, MTM)

牛肉抽出物(beef extract)	3.0 g
---------------------	-------

蛋白胨(peptone)	10.0 g
氯化鈉(NaCl)	20.0 或 30.0 g
洋菜(agar)	4.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分取適量注入試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。

2.2.31.7 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(NaCl)	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

加熱攪拌溶解後，分裝試管中，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.4±0.2。

2.2.31.8 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(NaCl)	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

加熱攪拌溶解後，取 5 g L-精胺酸(L-arginine)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(L-lysine)，L-鳥胺酸(L-ornithine)之脫羧酶培養液配製方法亦同。對照組之配製，除脫羧酶基礎培養液外，不需添加任何物質。

2.2.31.9 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

加氯化鈉於此培養基內，配成 0%、6%、8% 及 10% 之不同濃度，取適量注入試管內。以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2±0.2。

2.2. 31.10 MR-VP 培養液(MR-VP broth)

緩衝蛋白胨(buffered peptone)	7.0 g
葡萄糖(glucose)	5.0 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	5.0 g
氯化鈉(NaCl)	20.0 或 30.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分取適量注入試管內，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 6.9±0.2。

2.2. 31.11 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(NaCl)	20.0 或 30.0 g
溴甲酚紫(bromcresol purple)	0.04 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解後，分取 2.5 mL 上述之培養液注入含 6 x 50 mm 發酵管之試管內，以 121°C 滅菌 10 分鐘，加入經 0.2 μ m 過濾除菌之 50%(w/v)甘露糖原液(mannose stock solution) 0.278 mL，使醣類之最終濃度為 5%(w/v)，最終 pH 值為 7.0±0.2。含乳糖(lactose)，甘露糖醇(mannitol)，蔗糖(sucrose)及阿拉伯糖(arabinose)之溴甲酚紫培養液配製方法亦同。

2.2. 31.12 Wagatsuma 培養基(Wagatsuma agar)

酵母抽出物(yeast extract)	3.0 g
蛋白胨(peptone)	10.0 g
氯化鈉(NaCl)	70.0 g
磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)	5.0 g
甘露糖醇(mannitol)	10.0 g
結晶紫(crystal violet)	0.001 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解，調整 pH 值為 8.0±0.2，再以蒸氣加熱 30 分鐘(不可高壓滅菌)，冷卻至 50°C 時，加入 5% (v/v) 經生理食鹽水洗滌三次之人或兔之紅血球，培養基注入培養皿前應搖動混合，使絮狀沉澱物分散均勻，並應避免產生氣泡，每一培養皿約倒入 15~20 mL。

2.2. 31.13 動物膠培養基(Gelatin agar, GA)

蛋白胨(peptone)	4.0 g
酵母抽出物(yeast extract)	1.0 g
動物膠(gelatin)	15.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.2 。

2.2.31.14 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(NaCl)	30.0 g
洋菜(agar)	15.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解，以 121°C 滅菌 15 分鐘，最終 pH 值為 7.2 ± 0.2 。

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

蛋白胨(peptone)	10.0 g
氯化鈉(NaCl)	10.0 g
蒸餾水	1000 mL

分注入試管，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 8.5 ± 0.2 。

2.2.31.16 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(NaCl)	30.0 g
蒸餾水	1000 mL

加熱攪拌溶解，分取適量注入試管中，以 121°C 滅菌 10 分鐘，最終 pH 值為 8.5 ± 0.2 。

2.2.31.17 長期保存培養基(Long-term preservation medium)

酵母抽出物(yeast extract)	3.0 g
蛋白胨(peptone)	10.0 g
氯化鈉(NaCl)	30.0 g
洋菜(agar)	3.0 g

蒸餾水

1000 mL

加熱攪拌溶解，取適量注入試管，以 121°C 滅菌 15 分鐘。

2.2.32 試藥：

氯化鈉、葡萄糖、L-精胺酸、檸檬酸鐵銨、硫代硫酸鈉、溴甲酚紫、蔗糖、膽酸鈉、檸檬酸鈉、牛膽汁、檸檬酸鐵、溴麝香草藍、麝香草藍、乳糖、硫酸亞鐵、酚紅、磷酸氫二鉀、L-離胺酸、L-鳥胺酸、甘露糖、甘露糖醇、阿拉伯糖、結晶紫、磷酸二氫鉀、動物膠、草酸銨 (ammonium oxalate)、沙黃 O (safranin O)、 α -萘酚 (α -naphthol)、氫氧化鉀 (potassium hydroxide)、肌酸 (creatine)、鹽酸 (HCl)、碘化鉀、四甲基對位苯二胺鹽酸鹽 (N,N,N',N' -tetramethyl-p-phenylenediamine $\cdot$ 2HCl)、無水磷酸二氫鈉、氫氧化鈉、乙醇、硝基苯派喃半乳糖 (O-nitrophenyl- β -D-galactoside)、礦物油、O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl-pteridine) 及碘 (iodine)、液態氮、液態石臘等均採用化學試藥級。蛋白胨、胨蛋白胨、胰化蛋白胨 (tryptone)、胰化酪蛋白、酵母抽出物、植物蛋白胨、胰化酪蛋白胨、洋菜、牛肉抽出物及緩衝蛋白胨採用微生物級。

2.2.33 試劑

2.2.33.1 氧化酶試劑 (Oxidase test reagent)

取四甲基對位苯二胺鹽酸鹽 1g 溶於蒸餾水 100 mL 後，貯存於褐色瓶，並置入冰箱中，使用期限以不超過 1 星期為宜。

2.2.33.2 歐普氏試劑 (Voges-Proskauer test reagents, VP reagent)

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，使成 100 mL。

2.2.33.3 硝基苯派喃半乳糖試劑 (ONPG reagent)：取磷酸二氫鈉 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 6.9 g 溶於蒸餾水 45 mL 中，徐徐注入 30% (w/v) 氫氧化鈉溶液約 3 mL，調整 pH 值為 7.0，然後再加入蒸餾水使成 50 mL，即為 1.0 M 磷酸二氫鈉溶液，貯存於 4°C 冰箱中備用。另取硝基苯派喃半乳糖 80 mg 溶於 37°C 蒸餾水 15 mL 中，再加入上述 1.0 M 磷酸二氫鈉溶液 5 mL，即為 0.0133 M 硝基苯派喃半乳糖試劑，貯存於 4°C 冰箱中，使用時須加溫至 37°C。

2.2.33.4 礦物油 (Mineral oil)

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

2.2.33.5 O/129 圓紙片 (O/129 disks)：製備 O/129 濃度 150 μg 小圓片濾紙，係將溶解於無菌水的 O/129 (15 mg/mL) 或 O/129- PO_4 (20.8 mg/mL) 溶液，取 10 μL 加入已滅菌之小圓片濾紙。而 O/129 濃度 10 μg 小圓片濾紙，則將溶解於無菌水的 O/129 (1.0 mg/mL) 或 O/129- PO_4 (1.4 mg/mL) 溶液，取 10 μL 加入滅過菌之小圓片濾紙，自然風乾並避免光照，並貯存於冰箱中備用。

2.2.33.6 5% 甘油溶液：取甘油 5 mL，加蒸餾水至 100 mL 中，充份混勻，裝於試管或廣口瓶內，經 121°C 滅菌 15 分鐘，使成含 5% 之甘油溶液。

2.2.34 革蘭氏染色液 (Gram stain solution)⁽¹²⁾

2.2.34.1 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，取濾液作為初染劑。

2.2.34.2 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。

2.2.34.3 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 加入蒸餾水 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，但自行配製者應檢查其染色效果。

2.2.35 抗血清

2.2.35.1 腸炎弧菌本體(O)抗血清(O antisera)

2.2.35.2 腸炎弧菌莢膜(K)抗血清(K antisera)：包括多價莢膜性抗血清及單價莢膜性抗血清。

2.2.36 稀釋液

2.2.36.1 2%或 3% NaCl 溶液：取氯化鈉 20g 或 30g 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，使成含 2% 或 3% 之食鹽水，最終 pH 值為 7.0±0.1。

2.2.36.2 磷酸緩衝食鹽溶液(Phosphate buffered saline, PBS)：取氯化鈉 7.650 g，無水磷酸氫二鈉 0.724 g，磷酸二氫鉀 0.210 g 溶於蒸餾水 1000 mL 中，以 1N NaOH 調 pH 值為 7.4，以 121°C 滅菌 15 分鐘，作為磷酸緩衝食鹽稀釋液。

2.3 檢液之調製

2.3.1 檢體之處理：檢體為魚類時，取樣應包括魚體表面組織、內臟及鰓。檢體為貝類時，取 10 至 12 個貝類將內部組織均質化，再取均質液 50 g 進行檢驗。檢體為甲殼類時，應包括整個動物體，可能時應包括動物體中間部份如鰓及內臟組織。

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 檢液之處理：分別使用滅菌之吸管，吸取 10 mL 2.3.2 節之 10 倍稀釋檢液加入於 90 mL 稀釋液中，依序作成一系列適當之 100 倍、1000 倍、10000 倍等稀釋檢液。

2.4 鑑別試驗

2.4.1 最確數(Most probable number, MPN)之測定：將 2.3 節之稀釋檢液及(或)原液充分搖勻後，再分別吸取三連續倍數之稀釋檢液各 1 mL 接種於 10 mL APW 或 APS 培養液中，每稀釋檢液各接種 3 支(稱三階三支)，並於 35~37°C，培養 16~18 小時，

觀察是否混濁。未呈現混濁者，即可視為腸炎弧菌陰性；呈現混濁者，則繼續進行以下試驗。最後鑑定結果確定為腸炎弧菌者，依附表計算其 MPN 數。

2.4.2. 分離培養：由 2.4.1 節之呈現混濁 APW 或 APS 培養液面起深 1cm 處，分取一接種環量菌液劃線接種在 TCBS 培養基表面，於 35~37°C 培養 18~24 小時後，觀察菌落之型態。若為可疑腸炎弧菌者，其菌落為圓弧形，呈綠色或藍綠色，直徑約 2~3 mm。鉤取至少 3 個可疑菌落，接種於 TSA-2 或 3% NaCl 培養基，於 35~37°C 培養 12~24 小時，再另行接種於培養 TSB-2 或 3% NaCl 培養液，於 35~37°C 培養 12~24 小時，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 三糖鐵培養基(TSI)試驗

自 TCBS 或 TSA-2 或 3% NaCl 培養基上鉤菌，以斜面劃線及穿刺法接種於 TSI 培養基，在 35~37°C 培養 18~24 小時，觀察培養基變化情形，若為可疑腸炎弧菌者，其斜面應呈紅色（鹼性），底部呈黃色（酸性），無裂痕及黑色產生。

2.4.3.1.2 革蘭氏染色(Gram stain)

- (1) 取 16~24 小時培養之菌株，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，水洗，水洗應不超過 5 秒鐘。
- (3) 媒染：加革蘭氏碘液作用 1 分鐘，水洗。
- (4) 脫色：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。腸炎弧菌為革蘭氏陰性，菌體呈彎曲或直短棒狀，不產芽孢，且具單極鞭毛。

2.4.3.1.3 運動性試驗(Motility test)

自 TCBS 或 TSA-2 或 3% NaCl 培養基上鉤菌穿刺接種於 MTM 培養基，深度約 2/3 培養基深，於 35~37°C 培養 18~24 小時，沿穿刺線有放射狀線或培養基呈混濁者，為正反應，否則為負反應，腸炎弧菌應為正反應。

2.4.3.1.4 動物膠培養基(GA)及動物膠鹽類培養基(GS)試驗

自 TCBS 或 TSA-2 或 3% NaCl 培養基上鉤菌接種於 GA 和 GS 培養基，於 35~37°C 培養 12~24 小時，腸炎弧菌不能生長在 GA 上，可在 GS 上生長，菌落周圍會出現不透明環。

2.4.3.1.5 精胺酸葡萄糖斜面培養基(AGS)試驗

由 TSA-2 或 3% NaCl 培養基上鉤菌接種 AGS 斜面培養基，於 35~37°C 培養 18~24 小時，腸炎弧菌應不會產生硫化氫或氣體，典型反應呈現鹼性(紫色)斜面和酸性(黃色)底部。

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

自 GS 培養基或其他非發酵培養基 24 小時培養之新鮮菌落進行氧化酶試驗。滴加氧化酶試劑於菌落上，氧化酶陽性之菌落呈現粉紅色，並逐漸成深紫色。以接種環或無菌牙籤，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，腸炎弧菌應為正反應。

2.4.3.1.7 O/129 敏感性試驗(O/129 sensitivity test)

可使用含 O/129 10 µg 和 150 µg 之濾紙圓片置於已接種菌之 TSA-2 或 3% NaCl 培養基上，或將菌接種在已含有 O/129 10 µg/mL 和 150 µg/mL 之 TSA-2 或 3% NaCl 培養基上。經 35~37°C 培養 18~24 小時後，腸炎弧菌應對含 O/129 10 µg 者具耐受性，對 150 µg 者具敏感性。

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 TSA-2 或 3% NaCl 斜面培養基上鉤菌接種於二支 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，在 35±2°C 培養二天後，觀察其反應情形，腸炎弧菌應對葡萄糖發酵及氧化，但不產氣。典型反應之顏色如下表：

意 義	未加液態石蠟試管	添加液態石蠟試管
氧 化	黃 色	紫 色
發 酵	黃 色	黃 色
HLGB 培養液液色	紫 色	紫 色

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

自 TSA-2 或 3% NaCl 斜面培養基上鉤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 35~37°C 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，腸炎弧菌應為負反應。

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

自 TSA-2 或 3% NaCl 斜面培養基上鉤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 35~37°C 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基呈黃色者為正反應，否則為負反應，腸炎弧菌應為正反應。

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

自 TSA-2 或 3% NaCl 斜面培養基上鉤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 35~37°C 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，腸炎弧菌應為正反應。

2.4.3.2.5 嗜鹽性試驗(Halophilism test)

自 TSB-2 或 3% NaCl 培養液上鉤菌分別接種於含 0、6、8 及 10% NaCl 之 STB 培養液中，於 35~37°C 培養 18~24 小時後，觀察生長情形。腸炎弧菌可在 6% 及 8% NaCl 生長良好，但在 0% NaCl 無法生長，10% NaCl 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 TSB-2 或 3% NaCl 中鉤菌接種於 TSB-2% NaCl 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，腸炎弧菌應為正反應。

2.4.3.2.7 歐普氏試驗(VP test)：

自 TSA-2 或 3% NaCl 斜面培養基上鉤菌接種於 MR-VP 培養液中，並於 35~37°C 培養 48 小時。取培養液 1 mL 至另一已滅菌試管中，加入溶液 A 0.6 mL 及溶液 B 0.2 mL 後，再加入少許肌酸，輕輕搖勻，經 4 小時後觀察結果。呈現粉紅色者，為正反應，否則為負反應。腸炎弧菌應為負反應。

2.4.3.2.8 發酵試驗(Fermentation test)：

自 TSA-2 或 3% NaCl 斜面培養基上鉤菌，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 35~37°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。腸炎弧菌對甘露糖醇、甘露糖及阿拉伯糖應為正反應，對蔗糖及乳糖應為負反應。

2.4.3.2.9 硝基苯派喃半乳糖試驗(ONPG test)：

自 2.4.3.1.1 節之可疑腸炎弧菌之 TSI 斜面培養基(或其他含乳糖的培養基)上鉤菌，置於含有已滅菌之 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試劑之小圓片濾紙，並輕輕搖動後，於 35~37°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，腸炎弧菌應為負反應。

2.4.3.2.10 Kanagawa 現象(Kanagawa phenomenon)：

滴數滴已培養 18 小時之可疑腸炎弧菌 TSB-2 或 3% NaCl 培養液至完全乾燥的 Wagatsuma 培養基，進行雙重複試驗，並於另一相同培養基上滴上幾滴已確定為正反應或負反應的培養液作對照，在 35~37°C 培養，於 24 小時內(不

得超過 24 小時)觀察結果。正反應是由 β -溶血作用造成，菌落周圍的紅血球變成透明乾淨，沒有同心環或綠變。由菌落邊緣向外量至透明環外側邊緣為 3 mm 或大於 3 mm 以上為透明區即屬 Kanagawa 正反應。分離自食品之腸炎弧菌，通常為負反應；分離自糞便之腸炎弧菌，則通常為正反應。

2.4.4 血清學試驗(Serological test)

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

將菌接種在 TSA-2 或 3% NaCl 培養基，於 35~37°C 培養 18~24 小時後，使用含有 2% NaCl 及 5% 甘油溶液沖洗，取其懸浮液，以 121°C 滅菌 1 小時，於 4000 rpm 轉速離心 15 分鐘，再使用 2% NaCl 溶液沖洗菌體，取濃菌液備用。用蠟筆在載玻片上劃成數個適當格位，置入少量該濃菌液到每一個格位的下方位置，然後於格位之上方各滴入 1 滴各種體抗原抗血清，而於另一格位滴入一滴 2% NaCl 溶液(作對照組之用)，反覆傾斜 1 分鐘，使充分混合均勻。正反應者應呈凝集現象，但對照組則無；負反應者，則兩組均無凝集現象。若所有體抗原抗血清無任何凝集現象，再將菌液以 121°C 滅菌 1 小時，再測試，若仍呈負反應，則該菌之體抗原型別非屬所測試者。

2.4.4.2 細菌莢膜抗原抗血清凝集試驗 [Agglutination test of antigen with capsular (K) antisera test]

將菌接種在 TSA-2 或 3% NaCl 培養基，於 35~37°C 培養 18~24 小時後，使用 2% NaCl 溶液沖洗，取其濃菌液備用。先進行多價莢膜抗血清試驗後，再進行單價莢膜抗血清試驗。用蠟筆在載玻片上劃成數個適當格位，置入少量該濃菌液到每一個格位的下方位置，然後於格位之上方各滴入 1 滴各種多價莢膜抗血清(另同法試驗各種單價莢膜抗血清)，而於另一格位滴入一滴 2% NaCl 溶液(作對照組之用)，反覆傾斜 1 分鐘，使充分混合均勻。正反應呈現凝集現象，但對照組及負反應者，應無凝集現象。

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，在 35~37°C 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 1 mL 已培養 6~12 小時之 TSB-2 或 3% NaCl 菌液，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°C 冷凍櫃保存。

2.6 判定

2.6.1 腸炎弧菌陽性者，應符合下表所列之結果

試驗或基質		正反應	負反應	腸炎弧菌的反應 ^a
三糖 鐵培 養基 試驗	斜面	黃色	紅色	—
	底部	黃色	紅色	+
	產氣	培養基斷裂或裂縫	培養基完整	—
	硫化氫	黑色	非黑色	—
運動性試驗		沿穿刺線有放射狀線 或培養基呈混濁狀	沿穿刺線無放射狀線 或培養基透明	+
葡萄糖氧化與發酵試驗		黃色	紫色	+
硝基苯派喃半乳糖試驗		黃色	原色	—
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 性試 驗	0%及 10%氯化鈉	可生長	不生長或生長極緩慢	—
	6%及 8%氯化鈉	可生長	不生長或生長極緩慢	+
42°C 培養生長試驗		混濁	澄清	+
革蘭氏染色		陽性(深紫色)	陰性(淡紅色)	—
動物膠培養基試驗		生長	不生長	—
動物膠鹽類培養基試驗		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	+
	產氣	培養基斷裂或裂縫	培養基完整	—
	硫化氫	黑色	非黑色	—
歐普氏試驗		紅色	原色	—
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	+
	150 µg	生長	不生長	—
Kanagawa 現象		透明環	無透明環	+ 或 — ^b
細菌本體抗原抗血清凝集試驗		凝集	無凝集	+
多價英膜及單價英膜抗血清凝集試驗		凝集	無凝集	+

a 「+」表示 80% 以上菌株為正反應，「—」表示 80% 以上菌株為負反應。

b 分離自食品之腸炎弧菌通常為負反應；分離自糞便之腸炎弧菌，則通常為正反應。

2.6.2 最確數：由 2.6.1 節判定為腸炎弧菌陽性者之各階 APW 或 APS 培養液呈現混濁狀之試管數，利用最確數表（如附表），推算出腸炎弧菌之最確數(MPN/g 或 MPN/mL)。

附表：最確數表

正反應試管數			MPN/mL(g)	95%信賴界限		正反應試管數			MPN/mL(g)	95%信賴界限	
0.10mL	0.01mL	0.001mL		下限	上限	0.10mL	0.01mL	0.001mL		下限	上限
0	0	0	<3.6	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

說明：

- (1)若稀釋倍數為 10、100、1000 倍，且 APW 或 APS 培養液呈現混濁時，經劃線至 TCBS 培養基並進行生化試驗及血清學試驗，確認含有腸炎弧菌之試管數為 3-1-0，對照 MPN 數應為 43，即該檢體腸炎弧菌數為 43 MPN/mL(g)。
- (2)若稀釋倍數為原液、10、100 倍，而結果同上時，則該檢體腸炎弧菌數為 $43 \div 10 = 4.3$ MPN/mL(g)。
- (3)若稀釋倍數為 100、1000、10000 倍，而結果同上時，則該檢體腸炎弧菌數為 $43 \times 10 = 4.3 \times 10^2$ MPN/mL(g)，其餘類推。

參考文獻：

1. Elliot, E. L., Kaysner, C. A., Jackson, L. and Tamplin, M. L. 1998. Chapter 9. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp.. In FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. (Revision A) pp.9.01-9.27. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
2. Garthright, W. E. 1998. Appendix 2. Most Probable Number from Serial Dilution. In FDA Bacteriological Analytical Manual. 8th ed.(Revision A). pp.2.01~2.12. AOAC International,

Gaithersburg, MD, USA.

3. Maturin, L. J. and Peer, J. T. 1998. Chapter 3. Aerobic Plate Count. In FDA Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. (Revision A). pp 3.01~3.10. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

